

ISSN 0029-0629 CODEN: NFGZAD

Japanese Journal of Fertility and Sterility
日本不妊学会雑誌

Vol. 41 No. 1 January 1996
第41卷第1号 平成8年1月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. / 日不妊会誌

第41回日本不妊学会総会および学術講演会 (第2回予告)

第41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。会員の皆様の多数のご参加をお願い申し上げます。

記

期 日：平成8年11月6日(水) 役員会(理事会・幹事会)

7日(木) 学術講演会, 評議員会, 総会, 総懇親会

8日(金) 学術講演会

会 場：徳島県郷土文化会館

〒770 徳島市藍場町2-14, TEL: 0886-22-8121, FAX: 0886-22-8123

ホテルクレメント徳島

〒770 徳島市寺島本町1-61, TEL: 0086-56-3111, FAX: 0886-56-3132

学術講演会

本講演会では、招請講演、特別講演、会長講演、教育講演、シンポジウム、ワークショップ、一般講演を行う予定です。

- I 招請講演 Wylie Vale, PhD. (調整中)
(The Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, The Salk Institute)
「生殖に関するアクチビンとインヒビンの役割(仮題)」
- II 特別講演 森 崇英 教授(京都大学医学部婦人科学産科学教室)
「着床障害の治療に関する基礎的検討」
- III 会長講演 青野 敏博 教授(徳島大学医学部産科婦人科学教室)
「本邦婦人における多嚢胞卵巣症候群」
- IV 教育講演
 1. 鎌田 正晴 助教授(徳島大学医学部産科婦人科学教室)
「免疫性不妊症の基礎と臨床」
 2. 中堀 豊 助教授(東京大学大学院医学系研究科・国際保健学専攻人類遺伝学)
「性の分化と性染色体」
 3. 仲野 良介 教授(和歌山県立医大学産科婦人科学教室)
「アポトーシス：ヒト生殖における意義」
 4. 西宗 義武 教授(大阪大学微生物病研究所附属感染動物実験施設)
「精子形成に対する分子生物学的アプローチ」
 5. 矢内原 巧 教授(昭和大学医学部産科婦人科学教室)
「排卵および着床期におけるステロイドホルモンの役割」
 6. 内海 恭三 教授(京都大学農学部畜産学科家畜繁殖学研究室)
「胚の性判別の基礎と応用」
- V シンポジウム
 1. 精子と卵のインターアクション
座長：豊田 裕 教授(帯広畜産大学原虫病分子免疫研究センター)

2. 卵および卵胞発育の基礎

座長：武谷 雄二 教授(東京大学医学部産科学婦人科学教室)

VI ワークショップ 1. 機能性不妊症の取扱い

座長：水口 弘司 教授(横浜市立大学医学部産科学婦人科学教室)

2. 男性不妊の新治療

座長：白井 將文 教授(東邦大学医学部泌尿器科学第一講座)

VII 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、1996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。

〒770 徳島市蔵本町3-18-15

徳島大学医学部産科婦人科学教室内 第41回日本不妊学会総会事務局

TEL: 0886-33-7177

FAX: 0886-31-2630

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1演者1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部とともにお送りください。
6. 申込み締切日：1996年(平成8年)5月31日(金)(必着)

演題発表方法

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。

学会参加費 8,000円

懇親会費 8,000円

総懇親会は学術講演会初日の11月7日(木)にホテルクレメント徳島(徳島駅に隣接している)で行います。是非ご出席下さい。

1996年1月

第41回日本不妊学会

会長 青野敏博

倫理委員会報告

社団法人日本不妊学会倫理委員会は、かねてより数回にわたって、「ヒト円形精子細胞を用いた授精法」について検討を重ね、その内容を下記の如くまとめましたので、報告致します。

「ヒト円形精子細胞を用いた授精法について」

最近、マウスを用いた動物実験によって、精巣から得た円形精子細胞(round spermatid)を卵子に融合させることによって正常産子が得られることが報告された。円形精子細胞は減数分裂を終了し、核型はn (haploid)、細胞内に中心体(centriole)を含み、遺伝子の刷り込み(genomic imprinting)も終わっていることから、補助生殖技術を用いて成熟卵細胞と融合させることによって産仔の生産が可能であり、円形精子細胞は受精生理学的には成熟精子と同格と考えられる。しかしながら、現時点での臨床応用には次の諸問題を指摘できる。すなわち動物実験における研究ではマウス円形精子細胞を用いた少数の出産例があるのみであり、安全性についての詳細な検討(受精率、発生率、吸収胎子数、染色体検査、次世代への影響など)が行われていない。またヒトにおいては円形精子細胞選択時に精祖細胞、第一精母細胞あるいは第二精母細胞などのより未熟な精細胞を選択する可能性があり、それらを卵子へ注入した場合の結果が予測できない。特に、適応となる無精子症患者では染色体異常が高率に観察されることから、対象となる患者の染色体異常がどの程度、精子(精子細胞)に受け継がれるのかについての研究はなされていないので、少なくとも該当する円形精子細胞に関してその染色体検査を行い、染色体異常の発現頻度を検討すべきである。円形精子細胞内には卵子を活性化する因子が存在していないため、注入前に卵子を人為的に活性化する必要があるが、ヒト卵子の活性化法はまだ適切な方法が見い出されていない。また、ヒト円形精子細胞を用いた受精後の胚発生能についても十分に解明されていない。なお、精子細胞核を用いる方法についても同様の問題点が指摘される。

以上のように、円形精子細胞の補助生殖技術への臨床応用には動物実験を含む基礎的な研究が不足していることから、これらの問題の解明を待って実施されるべきであり、日本不妊学会倫理委員会としては我が国における本法の臨床応用に慎重であることを希望する。

1995年10月26日

社団法人日本不妊学会倫理委員会
委員長 広井 正彦

「新しい生殖医療技術のガイドライン」発刊のお知らせ

社団法人日本不妊学会倫理委員会は、「新しい生殖医療技術のガイドライン」を刊行すべく、次の項目について検討を重ね、現在編集作業を進めております。平成8年4月頃に発刊を予定しておりますが、詳細は日本不妊学会事務局 (tel. 03-3288-7266) へお問合せ下さい。

1. 序文
2. 総論
3. 配偶者間人工授精 AIH
4. 非配偶者間人工授精 AID
5. 体外受精・胚移植 (IVF-ET)
6. 配偶子卵管内移植 (GIFT)
7. 受精卵卵管内移植 (PROST, ZIFT) など
8. 精子凍結保存
9. 胚凍結保存
10. 顕微授精
11. 男女生み分け
12. 精子・卵・胚の研究 (限界)
13. 精子採取法
14. 胚生検
15. 卵および胚の donation
16. 代理母
17. 減数手術
18. 結語

日本不妊学会雑誌

第41巻 第1号

平成8年1月1日

—目 次—

原 著

ラット精巣および精巣上体間質におけるアルブミンと³H-アンドロゲンの結合が

- ³H-アンドロゲンの管内移行に及ぼす影響(英文) ……………山本雅憲・他…… 1
- 多嚢胞性卵巣症候群を合併した症例に対する体外受精・胚移植の成績 ……………長谷川功・他…… 8
- マウス胚盤胞の収縮運動に及ぼすインドメサシンとプロスタグランジンの影響 ……新村末雄・他……13
- 男性不妊症におけるhCG-hMG併用療法の評価(英文) ……………大枝忠史・他……18
- 排卵誘発後の子宮内外同時妊娠4症例の臨床的検討 ……………水野薫子・他……25
- 体外受精治療周期における加齢の着床期性ステロイド値および子宮内膜の
超音波断層像に及ぼす影響 ……………熊谷 仁・他……30
- 先天性精管欠損症に対する精巣上体開窓術の試み—精巣鞘膜腔内精子貯留法— ……平井 景・他……36
- ブタ卵母細胞の体外成熟に及ぼすPhorbol 12-Myristate, 13-Acetateの影響 ……………辻井弘忠・他……41
- 精路通過障害に対する精巣鞘膜腔内精子貯留法(Moni's window operation)の経験 ……天野俊康・他……49
- 特発性男性不妊症に対するTranilastの有用性に関する検討 ……………秋山博伸・他……54
- 2種類のGnRH agonist製剤, leuprorelin acetate depotとbuserelin acetateを併用した
IVF-ETのための卵巣刺激法の試み……………詠田由美・他……59
- 抗プロゲステロン製剤, RU-486を用いたマウスの分娩誘起(英文) ……………金山喜一・他……66
- PCNA法を用いた閉塞性無精子症の精細胞DNA合成能の定量的解析 ……………井本勝彦・他……70
- ヒト顆粒膜細胞におけるインターロイキン-6分泌に対する漢方薬の影響 ……………太田博孝・他……76
- Triple stain法による男性不妊症の検討 ……………中村 剛・他……82
- 射精障害の臨床的検討 ……………永井 敦・他……89
- 腹腔鏡施行症例における抗クラミジア抗体と卵管障害についての検討 ……………矢野義明・他……95
- 単一精子受精機構異常における顕微操作：
余剰雄性前核除去法と卵細胞質内精子注入法……………千田 智……100
- 男性不妊, 原因不明不妊に対する腹腔内人工授精の有用性についての検討 ……………石田徳人・他……106
- 地方部会講演抄録……………111

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 41, No. 1, 1996)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Binding of ^3H -Androgen to Albumin in the Peritubular Space Alters Proluminal
 ^3H -Androgen Movement in the Rat Testis and Epididymis ······ *M. Yamamoto, S. Katsuno,*
H. Hibi & K. Miyake ··· 1
- Results of In vitro Fertilization-Embryo Transfer in Women with Polycystic
Ovarian Syndrome ······ *I. Hasegawa, Y. Yamamoto, R. Kato,*
K. Oda, M. Tamura, T. Yahata,
A. Honda, T. Kurabayashi & K. Tanaka ··· 8
- The In Vitro Influence of Indomethacin and Prostaglandins on the Contraction
of Mouse Blastocysts ······ *S. Niimura & E. Takahashi* ··· 13
- Clinical Evaluation of hCG-hMG Combined Therapy in Patients
with Male Infertility ······ *T. Oeda, A. Nagai, T. Ichikawa,*
H. Akiyama, H. Ozawa & H. Ohmori ··· 18
- Four Cases of Heterotopic Pregnancy Following Ovulation Induction
······· *K. Mizuno, T. Okuno, T. Kasai,*
T. Kinoshita & J. Kato ··· 25
- Influence of Aging on the Levels of Sex Steroids and Ultrasonographic Image of Endometrium
during the Mid-Luteal Phase in the Treatment of In Vitro Fertilization
······· *J. Kumagai, H. Kodama, J. Fukuda,*
H. Karube, Y. Shimizu & T. Tanaka ··· 30
- Epididymal Window Operation with Congenital Absence of the Vas Deferens
— Tunica Vaginalis Sperm Reservoir — ······ *K. Hirai, N. Takasaki, Y. Iwamoto,*
H. Ueda, A. Shimizu, H. Tonami ··· 36
- The Effect of Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate on the Maturation of Pig Oocytes Cultured
in Vitro ······ *H. Tsujii & T. Kasai* ··· 41
- Experience of Moni's Window Operation for Obstructive Azoospermia
······· *T. Amano, S. Tokunaga, H. Ito, Y. Nakamura,*
D. Ikeda, M. Ohkawa & Y. Shirao ··· 49
- Clinical Evaluation of Tranilast on Idiopathic Male Infertility ··· *H. Akiyama, T. Oeda, T. Ichikawa,*
H. Ozawa, A. Nagai & H. Ohmori ··· 54
- An Alternate Approach to Controlled Ovarian Hyperstimulation with Leuprorelin Acetate Depot
and Buserelin Acetate for In vitro Fertilization and Embryo Transfer
······· *Y. Nagata, K. Honjo, M. Kubota,*
K. Ikeda, M. Kurashima & K. Shirakawa ··· 59

Induction of Parturition using RU-486, an Anti-Progesterone Compound in Mice	<i>K. Kanayama, H. Koie, K. Nariai, T. Endo, K. Yabe & H. Kada</i> ...66
Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in Obstructive Azoospermia using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen	<i>K. Imoto, H. Takihara, S. Shirataki, Y. Baba, K. Kamada, T. Shimabukuro & K. Naito</i> ...70
Effect of the Kampo Prescriptions on the Secretion of Interleukin-6 in Human Granulosa Cells	<i>H. Ota, H. Tanaka, H. Kodama, J. Fukuda, H. Karube & T. Tanaka</i> ...76
A Comparison between Semen Parameters and the Acrosome Reaction Evaluated by Triple Stain Technique	<i>T. Nakamura, T. Ichikawa, Y. Shiseki & J. Shimazaki</i> ...82
A Clinical Study of Ejaculatory Dysfunction	<i>A. Nagai, H. Ohmori, K. Nagao, M. Takanami, N. Ishii, K. Miura, M. Shirai & Y. Sawamura</i> ...89
Correlation of Antibodies to Chlamydia Trachomatis and Laparoscopically Diagnosed Tubal Damages.....	<i>Y. Yano, M. Morita, H. Kubo & S. Hirakawa</i> ...95
Micromanipulation on Oocytes for the Defect of Monospermic Fertilization: Intracytoplasmic Sperm Injection and Extra Male Pronuclear Extraction	<i>S. Chida</i> ...100
Direct Intra Peritoneal Insemination for Male Factor Infertility and Unexplained Infertility	<i>N. Ishida, Y. Kuribayashi, T. Kondo, K. Hirai, T. Shiota, M. Oshida, J. Watanabe, Y. Ohno, K. Matsumoto, B. Ishizuka & A. Amemiya</i> ...106

BINDING OF ^3H -ANDROGEN TO ALBUMIN IN THE PERITUBULAR SPACE ALTERS PROLUMINAL ^3H -ANDROGEN MOVEMENT IN THE RAT TESTIS AND EPIDIDYMISS

Masanori YAMAMOTO, Satoshi KATSUNO, Hatsuki HIBI, Koji MIYAKE

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

Abstract: In vivo microperfusion and subsequent micropuncture of rat seminiferous and caput epididymidal tubules were used to examine the effects of interstitial albumin-androgen binding on ^3H -androgen compartmentalization in the rat testis and epididymis. Tubules were perfused with four different fluids: 1) minimum essential medium (MEM) containing ^3H -testosterone and ^{14}C -polyethyleneglycol (PEG); 2) MEM containing the same radiolabelled compounds plus 8 mg/ml bovine serum albumin (BSA); 3) MEM containing the same radiolabelled compounds plus 80 mg/ml BSA; 4) serum from castrate rats containing the same radiolabelled compounds. Bound ^3H -androgen in the interstitial fluid of the testis and epididymis after 1 hr. perfusion were measured by a charcoal extraction assay.

In the testis and epididymis, bound ^3H -androgens in the interstitial fluid were significantly increased after perfusion with increasing albumin concentrations. ^3H -androgen movement into tubule lumina were significantly decreased in the testis, but binding to interstitial albumin could not explain the restriction of movement of ^3H -androgens from interstitium to lumen. In the caput epididymis, apparent antigrade ^3H -androgen movement into the tubule lumen was eliminated by increasing interstitial albumin concentration and interstitial albumin ^3H -androgen binding.

These findings suggest that transepithelial movement of ^3H -androgen into the reproductive tract tubules is influenced by the presence of androgen binding components in the testicular and epididymal interstitial extravascular space.

Key words: androgen binding, androgen movement, testis, epididymis, micropuncture,

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 1 - 7, 1996)

Introduction

The seminiferous and epididymal tubules are androgen target tissues which provide an important microenvironment for spermatogenesis, for seminiferous and epididymal epithelial secretion, and for subsequent sperm maturation^{1, 2)}. Nevertheless, very little is known about local mechanisms regulating androgen availability from the interstitial compartment to the microenvironment inside the seminiferous or epididymal tubules.

A method of in vivo microperfusion and micropuncture has been developed to examine the movement of ^3H -androgens from blood-to-lumen and from inter-

stitium-to-lumen in the rat testis and epididymis^{3, 4)}. Movement of ^3H -androgens into the seminiferous tubule lumen is limited, i.e. intraluminal ^3H -androgen concentrations plateau at approximately 10 ~ 15 % of peritubular ^3H -androgen concentrations^{3, 4)}. This occurs whether the androgen originated in the vascular or interstitial space³⁾ and is not subject to competitive inhibition⁵⁾.

In the caput epididymis, intraluminal ^3H -androgens plateau at approximately 350 % of interstitial ^3H -androgen concentrations when ^3H -androgens are perfused around the tubules; thus, the movement of ^3H -androgens occur against an apparent concentration gradient^{3, 4)}. This movement is subject to competitive inhibition⁵⁾.

These studies have demonstrated that there is a fundamental difference in androgen movement across the seminiferous and epididymal epithelia. The mechanism underlying this difference involves the presence of androgen binding protein (ABP) in the tubule lumina⁵⁻⁷) but, may also be affected by androgen binding to proteins, especially albumin or testosterone-estrogen binding globulin (TeBG), in the interstitial space. This aspect of androgen compartmentalization in the testis and epididymis has not been examined.

Serum albumin is the principle carrier protein for testosterone in the plasma and interstitial fluid of rats⁸), and since rat testicular interstitial fluid has been reported to contain essentially the same concentration of albumin as rat serum⁹), the macromolecule presumably influences androgen movement from the interstitial to the intraluminal compartment. The present study was undertaken to determine whether or not androgen binding to albumin in the peritubular spaces of the rat testis and epididymis affects net movement of androgen into the tubules of those organs.

Materials and Methods

In vivo microperfusion and micropuncture in the testis and caput epididymidis

Adult, male, Sprague-Dawley rats (550 ~ 650 g) were maintained in a constant temperature (25 °C) vivarium under a 12 hr. light/12 hr. dark cycle with free access to food and water. Animals were anesthetized and prepared for *in vivo* perfusion and micropuncture of reproductive tract tubules as previously described^{3,4}). Briefly, a testis and epididymis of each animal were exteriorized in a special testicle holder and stabilized in 33 °C, 2% agar. A small window in the agar to the superior surface of the testis or epididymis was left open and covered with mineral oil. The tubules were perfused *in vivo* with a sharpened, 100 μ tip pipette inserted through the tunica albuginea. The tip of the pipette was always kept in sight to insure that the seminiferous or epididymal tubule was not cut or punctured. The perfusion pump was set for a 15 min. priming infusion at a rate of 36 μ l/min in the testis and of 6 μ l/min in the caput epididymidis. Subsequently, a sustaining perfusion rate was set a 6 μ l/min in the testis and 2 μ l/min in the

caput epididymidis for the remainder of the experiment.

Four different perfusion fluids were used: 1) the control fluid, lissamine green-dyed minimum essential medium (MEM) contained 26.7 μ Ci ³H-testosterone (New England Nuclear, Boston, MA; specific activity 55.2 Ci/mmol)/ml (480 nM testosterone) and 1.3 μ Ci ¹⁴C-polyethyleneglycol (¹⁴C-PEG; New England Nuclear, specific activity: 15 mCi/g)/ml; 2) MEM containing the same radiolabelled compounds plus 8 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); 3) MEM containing the same radiolabelled compounds plus 80 mg/ml BSA; and 4) testosterone-depleted rat serum obtained from 7-day castrate rats containing the same radiolabelled compounds (CRS). These fluids were perfused around seminiferous and epididymal tubules in separate experiments. Intraluminal fluid from a tubule and fluid from the adjacent interstitial space were collected by micropuncture beginning 1 hr. after initiation of the sustaining perfusion. Cell-free fluids (150 ~ 500 nl) were obtained after centrifugation and were aliquoted in triplicate. Radioactivity of ³H-androgen and ¹⁴C-PEG in these interstitial and intraluminal fluid were determined in all samples by scintillation spectrophotometry. Intraluminal ³H-androgen and ¹⁴C-PEG concentrations were calculated as a percentage of those concentrations surrounding the tubules⁵). ¹⁴C-PEG is essentially excluded by the blood-testis and blood-epididymal barriers; thus, it was included in the perfusion fluid as a marker for contamination of intraluminal fluid by fluid from the extratubular compartments and a means by which the intraluminal ³H-androgen data could be corrected for inadvertent contamination by the perfused interstitial fluid³).

Measurement of bound vs. free ³H-androgen in rat serum and in the interstitial fluids in the testis and caput epididymidis

One μ l samples of castrate rat serum containing the previously stated ³H-androgen concentrations and the perfused interstitial fluids from testicular and epididymal peritubular space after 1 hr. of sustaining perfusion were obtained in glass micropipettes. The ³H-androgen concentration in each of the fluid samples was determined by scintillation spectrophotometry.

Table 1 The percentage of ^{14}C -PEG and ^3H -androgen retained around seminiferous tubules after 1 hr. in vivo perfusion relative to ^{14}C -PEG and ^3H -testosterone concentrations in original perfusion fluid

Perfusion fluid	^{14}C -PEG retained (%)	^3H -Androgen retained (%)
MEM (control)	82.6 \pm 2.7 ¹	14.3 \pm 1.9 ¹
MEM + 8 mg/ml BSA	96.5 \pm 1.7 ¹	41.3 \pm 4.4 ²
MEM + 80 mg/ml BSA	90.2 \pm 6.6 ¹	68.6 \pm 2.2 ³
Castrate serum	94.0 \pm 3.3	68.5 \pm 3.7 ³

^{1, 2, 3} Within columns Means \pm S.E. sharing the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

try of triplicate 50 nl aliquots. Activated charcoal powder (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was added to the remainder of the fluid sample (approximately 850 nl) by packing the charcoal into one end of the glass micropipette to a constant fill of 0.3 mm³ pipette volume (approx. 110 ng charcoal). The charcoal was dispersed in the fluid by mechanical agitation and the mixture was allowed to stand at 4°C for 15 min. The micropipette containing the sample plus charcoal was then centrifuged at 5,000 r.p.m. for 10 min. at 0°C in an IEC model B-20 refrigerated centrifuge. Preliminary qualifying experiments demonstrated this procedure was effective for separating bound vs. free ^3H -androgen in microsamples. In short, extractions were performed with increasing volumes of charcoal, then in multiple pipettes containing a constant amount of bound: free ^3H -testosterone. The procedure used in the present experiments used the amount of charcoal-to-sample in which the free testosterone in control samples was completely partitioned into the charcoal phase (data not shown).

Triplicate aliquots of each supernatant were assayed by scintillation spectrophotometry to determine the concentration of protein-bound ^3H -androgens in the remaining fluid. Protein-bound ^3H -androgens were expressed as a percentage of the total ^3H -androgens in the original sample collected.

Data analysis

Chauvenet's criterion¹⁰) was applied to all data. Group data are presented as Mean \pm SEM. All multiple comparisons were made by the Kruskal-Wallis test for non-parametric data followed by the Wilcoxon rank sum test ($p < 0.05$).

Results

Testis

^{14}C -PEG concentrations remaining in testicular

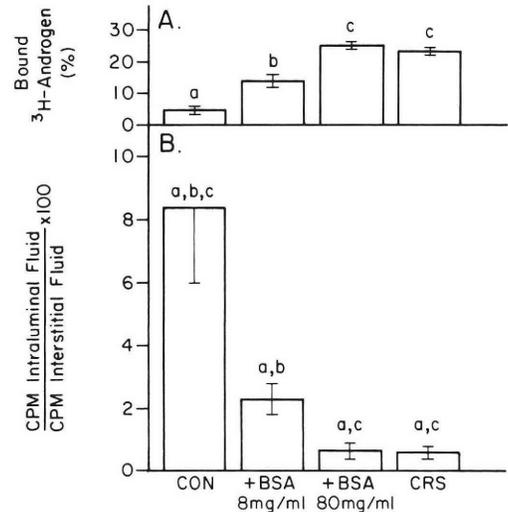


Fig. 1 The effect of perfused, interstitial, albumin-containing media and castrate rat serum (CRS) on bound vs. free ^3H -androgen in the rat testicular interstitium and the net appearance of ^3H -androgen in the seminiferous tubule

Control perfusion fluid (CON) was MEM containing ^3H -testosterone and ^{14}C -PEG. Other fluids perfused, MEM + 8 mg/ml BSA (+ BSA 8 mg/ml), MEM + 80 mg/ml BSA (+ BSA 80 mg/ml) and CRS, all contained the same radio-labelled compounds. All fluids were perfused in vivo for 1 hr. prior to intraluminal and interstitial fluid collection by micropuncture. A) The percentage of total ^3H -androgen concentration in testicular interstitial fluid bound to macromolecules after 1 hr. perfusion. B) The percentage of testicular interstitial fluid ^3H -androgen concentrations appearing in seminiferous tubule fluid after 1 hr. perfusion. ^{a,b,c} Histogram bars (Mean \pm S.E.) sharing the same superscript are not significantly different ($p < .045$).

peritubular fluids after 1 hr. perfusion were consistent in all groups and ranged between 83 ~ 96 % of those in the original perfusion fluid (Table 1). ^3H -

androgen concentrations remaining in testicular peritubular fluids in the control group were approximately 14.3 % of those in the original perfusion fluid, and this value increased in a step-wise fashion in fluid containing 8 mg/ml BSA and 80 mg/ml BSA (Table 1). The mean value for the latter group was not significantly different from the data obtained when castrate rat serum was used as the perfusion fluid (68.5 ± 3.7 %; Table 1).

The percent of total ^3H -androgen bound to protein in the control testicular peritubular fluid after 1 hr. of perfusion was 5.2 ± 0.7 % (Fig. 1A). This value was significantly increased in interstitial fluids containing 8 mg/ml BSA (13.7 ± 1.5 %) and 80 mg/ml BSA (25.0 ± 0.9 %; Fig. 1A). This latter value was not different from that obtained when seminiferous tubules were perfused with castrate rat serum containing the same amount of ^3H -testosterone (23.2 ± 0.9 %). The

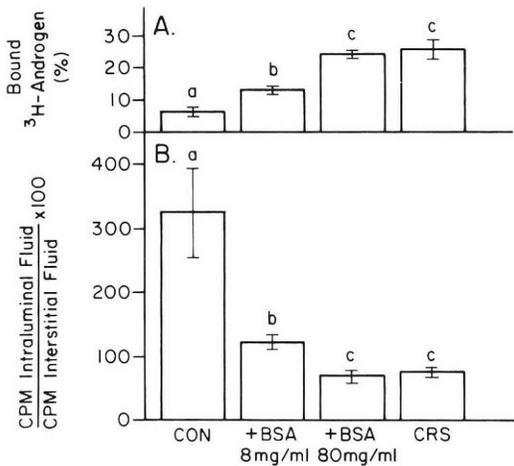


Fig. 2 The effect of perfused, interstitial, albumin-containing media and castrate rat serum (CRS) on bound vs. free ^3H -androgen in the rat caput epididymidal interstitium and the net appearance of ^3H -androgen in the caput epididymidal tubule (Further description is as in Fig. 1.)

percent bound ^3H -androgens in castrate rat serum not perfused into testicular interstitial fluid was 95.0 %.

Intraluminal ^3H -androgen concentrations in seminiferous tubules perfused with the control fluid were 8.4 ± 2.4 % of ^3H -androgen concentrations in the peritubular fluid outside those same tubules (Fig. 1B). This value reflected net androgen movement into the tubule lumen and was not significantly different from values obtained from tubules perfused with 8 mg/ml BSA, 80 mg/ml BSA or castrate rat serum (2.3 ± 0.5 %, 0.6 ± 0.3 %, and 0.6 ± 0.2 %, respectively, Fig. 1B). Net ^3H -androgen movement into tubules perfused with 8 mg/ml BSA was significantly higher than that detected in tubules perfused with 80 mg/ml BSA or castrate serum (Fig. 1B).

Caput epididymidis

^{14}C -PEG concentrations remaining in epididymal interstitial fluids after 1 hr. perfusion were approximately 75 ~ 80 % of those in the original perfusion fluid (Table 2), and there were no significant differences in the data obtained from any group. ^3H -androgen concentrations remaining around the caput tubules in the control group were 22.5 ± 3.7 % of those in the original perfusion fluid, these values were significantly increased when perfusion fluid contained 8 mg/ml BSA and 80 mg/ml BSA (Table 2). This latter value was not significantly different from that obtained when castrate serum was used as the perfusion fluid (49.6 ± 6.0 %).

The percent ^3H -androgen bound to protein in the epididymal interstitial fluid in the control group after 1 hr. perfusion was 6.4 ± 1.0 % (Fig. 2A), a value not different from the control group values obtained in the seminiferous tubule perfusion experiments. The percent bound ^3H -androgen was significantly increased in the 8 mg/ml BSA group (12.9 ± 0.2 %) and the 80 mg/ml BSA group (24.0 ± 0.9 %). As before, the latter value was not different from the

Table 2 The percentage of ^{14}C -PEG and ^3H -androgen retained around caput epididymidal tubules after 1 hr. in vivo perfusion relative to ^{14}C -PEG and ^3H -testosterone concentrations in original perfusion fluid

Perfusion fluid	^{14}C -PEG retained (%)	^3H -Androgen retained (%)
MEM (control)	74.6 ± 5.9 ¹	22.5 ± 3.7 ¹
MEM + 8 mg/ml BSA	78.6 ± 3.5 ¹	32.0 ± 4.4 ²
MEM + 80 mg/ml BSA	83.7 ± 2.2 ¹	58.6 ± 4.1 ³
Castrate serum	79.5 ± 5.7 ¹	49.6 ± 6.0 ³

1, 2, 3) Within columns Means \pm S.E. sharing the same superscript are not significantly different ($p < 0.05$).

results obtained when castrate serum was perfused around the caput tubules ($25.4 \pm 3.5\%$; Fig. 2A).

Intraluminal ^3H -androgen concentrations in epididymal fluid in the control group were $322.4 \pm 90.4\%$ of those in peritubular fluid (Fig. 2B). These values were significantly decreased in 8 mg/ml and 80 mg/ml BSA and the castrate serum groups ($144.3 \pm 20.7\%$, $70.0 \pm 6.4\%$, and $75.8 \pm 3.8\%$, respectively).

Discussion

The effects of intravascular steroid binding on steroid availability to tissues has previously been a topic of vigorous study and debate^{11,12}), but it has been generally accepted that the activity of a steroid is largely influenced by the extent of that steroid's binding to steroid binding proteins in plasma¹³). Androgens in plasma are bound primarily to albumin or TeBG¹⁴), and this binding clearly affects androgen availability to parenchymal cells; however, there has been little investigation of the effects of androgen binding in the extravascular space. Androgen binding to macromolecules outside the basal surface of the seminiferous epithelium could be of special importance in the testis where Leydig cells secrete testosterone directly into the interstitium. This causes intratesticular testosterone concentrations to be much higher than those in serum¹⁵), and the bound: free ratio of testicular interstitial androgen is unknown. Also, local factors appear to play a role in testosterone concentrations in the seminiferous epithelium¹⁵), and this may be through affecting free androgen availability. In the epididymis previous attention has focused on the role of intraluminal androgen binding protein (ABP) in androgen compartmentalization^{5, 7, 16}), but interstitial binding of steroids may well limit availability of peritubular androgens to the epididymal lumen.

Androgen binding and compartmentalization in the testis

Previous reports from this laboratory have demonstrated that ^3H -androgens experience restricted net entry into the seminiferous tubule lumen relative to their concentrations in either the vasculature or testicular interstitial space^{3, 5, 17}). The reasons for this are unknown, but it has been hypothesized that a large

portion of the androgen passing into the rat testicular interstitium becomes bound to macromolecules, either albumin or basally secreted ABP, leaving little steroid remaining for movement on into the seminiferous tubule lumen. The present experiments in the rat testis were performed to determine the effects of varying concentrations of interstitial albumin, and subsequent varying ^3H -androgen bound: free ratios, on the net movement of ^3H -androgen into the seminiferous tubule lumen.

Retention of ^3H -androgen perfused around seminiferous tubules is low relative to ^{14}C -PEG, but is increased with increased androgen binding in the perfusion medium (Table 1). The low values for retained ^3H -androgen in the control and 8 mg/ml BSA perfusions are not due to simple dilution since ^{14}C -PEG concentrations remained at approximately 85 ~ 95 % of those in the original perfusion fluid in all experiments (Fig. 1A). Increasing the bound androgen in the testicular interstitium both increased the retention of ^3H -androgen outside seminiferous tubules (Table 1), and decreased net movement of ^3H -androgens into the tubule lumen (Fig. 1B); nevertheless, interstitial binding of ^3H -androgens to albumin cannot account for the lack of net proluminal, transepithelial ^3H -androgen movement into seminiferous tubules. Approximately 75 % of the interstitial ^3H -androgens were not protein-bound, even at 80 mg/ml BSA in the perfusion fluid, yet in the same experiments, only approximately 1 % of interstitial ^3H -androgens appeared in the tubule lumen (Fig. 1B). In control experiments which have consistently shown intraluminal ^3H -androgen concentrations to reach only 10 ~ 20 % peritubular concentrations, only 5 % of ^3H -androgen was protein bound; thus again, peritubular ^3H -androgen binding cannot account for restricted proluminal ^3H -androgen movement. This is perhaps not surprising since it is well accepted that the primary route of testosterone egress from the testis is via the vasculature¹⁶) even though the mechanism by which this occurs may be disputed¹⁸). Testosterone concentration in seminiferous and epididymal interstitial fluid after sustained perfusion containing MEM only was significantly lower than ^3H -testosterone concentration in the original perfusion fluid¹⁹). Therefore, testosterone secreted into the peritubular

space does not seem to have a competitive effect on the proluminal androgen movement. Same mechanism seems to be involved in the concentration of protein-bound androgen in the interstitium.

Interestingly, ^3H -androgens in CRS were 95% bound prior to perfusion, yet when collected from interstitial space 1 hr. after perfusion, the ^3H -androgen was only 25% bound to protein (Fig. 1A). The cause for this is unknown, but other intratesticular factors, possibly secreted by Sertoli or peritubular myoid cells, might affect the albumin- ^3H -androgen binding in the interstitial compartment. The presence of such factors, locally secreted, would be consistent with the hypothesis of Parvinen and Huhtaniemi¹⁵⁾ of local regulation of androgen availability at the seminiferous tubule.

Interstitial androgen binding and compartmentalization in the epididymis

The results obtained in the caput epididymidis were similar in many ways to those obtained from the testis. Increasing the percent protein-bound ^3H -androgen in the caput interstitium was associated with an increased retention of ^3H -androgen around the caput tubules, similar to that seen in seminiferous tubules (Table 2). Increasing the percent bound ^3H -androgen also caused a significant decrease in the net proluminal movement of the perfused ^3H -androgen; but this effect was much more profound in the epididymis than in the testis. In control perfusions, where only 6% of ^3H -androgens were protein-bound, intraluminal ^3H -androgen concentrations were 322% of those in interstitial fluid (Fig. 2B), a result similar to those previously reported³⁻⁵⁾. When the bound ^3H -androgens in interstitial fluid were increased in a step-wise fashion, however, intraluminal ^3H -androgens fell to values less than those that expected from diffusion of free ^3H -androgen alone. Even at the highest albumin concentrations, 75% of the peritubular ^3H -androgen were still free for diffusion, and it is unclear why movement of ^3H -androgen into the intraluminal space was reduced so dramatically by albumin. As in the testis, it is unclear why ^3H -androgens were 95% bound in castrate rat serum before perfusion but only 25% bound afterward.

Despite these new questions, it is clear that interstitial albumin prevents large movements of vascular

androgen into the epididymal lumen. This explains the large difference seen in proluminal ^3H -androgen movement between experiments wherein ^3H -androgens are infused via the vasculature and intraluminal ^3H -androgen concentrations reach only 35% of vascular ^3H -androgen concentrations³⁾, and perfusion experiments wherein ^3H -androgens in MEM have been presented directly to the basal surface of the tubules and intraluminal ^3H -androgen concentrations reach 300~350% of peritubular androgen concentrations³⁻⁵⁾. In nature, then, we speculate that the presence of albumin or other steroid binding molecules in the interstitium eliminate the apparent anti-grade movement of androgens as seen in ^3H -androgen perfusion experiments wherein there are no binding molecules in the control perfusion fluid.

In conclusion, increases in interstitial BSA concentrations and subsequent increases in percent bound interstitial ^3H -androgens significantly decrease net proluminal ^3H -androgen movement into the seminiferous and caput epididymal tubules; however, perfusion solutions, including castrate rat sera in which ^3H -androgens were 95% protein-bound prior to in vivo perfusion, once perfused around either seminiferous or caput tubules never bound more than 25% of available ^3H -androgens. Unknown factors in the interstitia of the testis and epididymis apparently decrease albumin ^3H -androgen binding, possibly by competing for the steroid binding site of albumin. This opens the interesting possibility that tissues can regulate extravascular free androgens by releasing molecules which compete for steroid binding sites on albumin or other molecules.

References

- 1) Brooks DE (1981) Metabolic activity in the epididymis and its regulation by androgens. *Physiol Rev* 61: 515-521
- 2) Robaire B, Hermo L (1988) Efferent ducts, epididymis, and vas deferens: structure, functions, and their regulation. In: Knobil E, Neil JD (eds), *The Physiology of Reproduction* vol 1, Raven Press, New York, pp999-1080
- 3) Turner TT (1988) Transepithelial movement of ^3H -androgen in seminiferous and epididymal tubules: A study using in vivo micropuncture and in vivo microperfusion. *Biol Reprod* 39: 399-408

- 4) Yamamoto M, Turner TT (1990) Transepithelial movement of non-polar and polar compounds in male rat reproductive tubule examined by in vivo microperfusion and in vivo micropuncture. *J Urol* 143: 853-856
- 5) Turner TT, Jones CE, Roddy MS (1989) On the proluminal movement of ^3H -androgens across the rat epididymal epithelium. *Biol Reprod* 40: 143-152
- 6) Yamamoto M, Turner TT (1989) Proluminal movement of ^3H -androgen across the epididymal epithelium in the rat after hypophysectomy and gonadotropin supplementation. *Biol Reprod* 41: 474-479
- 7) Turner TT, Roddy MS (1990) Intraluminal androgen binding protein alters ^3H -androgen uptake by rat epididymal tubules in vitro. *Biol Reprod* 43: 414-419
- 8) Corvol P, Bardin CW (1973) Species distribution of testosterone binding globulin. *Biol Reprod* 3: 277-282
- 9) Sharpe RM, (1979) Gonadotrophin-induced accumulation of interstitial fluid in the rat testis. *J Reprod Fertil* 55: 365
- 10) Worthing AG, Geffner J (1943) In: *Treatment of Experimental Data*. John Wiley & Sons, Inc. New York, pp76-86
- 11) Pardridge WA (1967) Selective delivery of sex steroid hormones to tissues in vivo by albumin and sex hormone binding globulin. *Ann NY Acad Sci* 538: 173-181
- 12) Ekins RP, Edwards PR (1976) Plasma protein-mediated transport of steroid and thyroid hormones: A critique. *Ann NY Acad Sci* 538: 193-198
- 13) Coffey DS (1988) Androgen action and the sex accessory tissues. In: Knobil E, Neil JD (eds), *The Physiology of Reproduction Vol 1*, Raven Press, New York, pp1081-1095
- 14) Bridges CDB, Peters T, Smith JE, et al. (1986) Biosynthesis and secretion of transport proteins. *Fed Proc* 45: 2291-2299
- 15) Parvinen M, Huhtaniemi I (1990) Testosterone micromilieu in staged rat seminiferous tubules. *J Steroid Biochem* 36: 377-385
- 16) Turner TT, Jones CE, Howards SS, et al. (1984) On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinol* 115: 1925-1932
- 17) Yamamoto M, Turner TT (1991) Different mechanisms are responsible for ^3H -androgen movement across the rat seminiferous and epididymal epithelia in vivo. *Biol Reprod* 45: 358-364
- 18) Maddox S, Setchell BP (1988) The physiology of the endocrine testis. *Ox Rev Reprod* 10: 53-67
- 19) Yamamoto M, Nagai T, Miyake K (1991) Different mechanisms are involved in ^3H -androgen uptake by the rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Nagoya J Med Sci* 53: 33-41

(受付: 1994年9月21日)

(受理: 1994年12月15日)

ラット精巣および精巣上体間質におけるアルブミンと ^3H -アンドロゲンの結合が ^3H -アンドロゲンの管内移行に及ぼす影響

名古屋大学医学部泌尿器科教室

山本雅憲, 勝野 暁, 日比初紀, 三宅弘治

ラット精巣および精巣上体間質におけるアルブミンとアンドロゲンの結合が ^3H -アンドロゲンの管内移行に及ぼす影響を微小灌流法および微小穿刺法を用いて検討した。

精細管および精巣上体管は以下の4種類の液体を用いて灌流した。1) ^3H -テストステロンと ^{14}C -ポリエチレングリコールを含む minimum essential medium (MEM), 2) 1) 液に 8 mg/ml の牛血清を混ぜたもの, 3) 1) 液に 80 mg/ml の牛血清を混ぜたもの, 4) 1) 液に精巣を除去したラットの血清を混ぜたものの4種類である。灌流1時間後の精巣および精巣上体間質中の結合型アンドロゲンはチャーコール抽出法により測定した。

精巣および精巣上体における間質中の結合型アンドロゲンは間質中のアルブミンの濃度が増大するにつれて、有意に増加した。精細管内へのアンドロゲン移行は有意に減少したものの、アルブミンとアンドロゲンの結合によりこの現象が生ずることを説明することはできなかった。精巣上体頭部においては明らかな濃度勾配に抗したアンドロゲンの管内移行は、間質中のアルブミンの濃度が増大するにつれて消失した。

これらの結果より、精巣および精巣上体における、生殖管内への経上皮性のアンドロゲン移行は間質中のアンドロゲン結合物質により影響を受けることが示された。

キーワード: ラット, 精巣, 精巣上体, ^3H -アンドロゲン, アルブミン

多嚢胞性卵巣症候群を合併した症例に対する 体外受精・胚移植の成績

Results of In vitro Fertilization-Embryo Transfer in Women with Polycystic Ovarian Syndrome

新潟大学医学部産婦人科学教室

長谷川 功

Isao HASEGAWA

織田 和哉

Kazuya ODA

本多 晃

Akira HONDA

山本 泰明

Yasuaki YAMAMOTO

田村 正毅

Masaki TAMURA

倉林 工

Takumi KURABAYASHI

加藤 龍太

Ryuta KATO

八幡 哲郎

Tetsuro YAHATA

田中 憲一

Kenichi TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology

Niigata University School of Medicine, Niigata 951, Japan

多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) を合併する症例に対する体外受精・胚移植 (IVF-ET) の問題点を明らかにする目的で、当科において施行されたIVF-ETのうち、PCOSを合併する11例17周期を対象とし、PCOSを有しない80例117周期を対照群として両群間のIVF-ETの成績を比較検討した。

臨床的妊娠率はPCOS群、対照群それぞれ17.6%、24.8%とPCOS群で不良な傾向はあったが有意差は認めなかった。しかしその内容は大きく異なり、PCOS群では周期あたりの採卵数が有意に多いが受精数・卵割数はほぼ同数であり、その結果受精率はそれぞれ32.5%、63.8%とPCOS群で有意に不良であった。PCOS群ではhCG投与日のprogesterone値の上昇が認められ、これに関連した卵の質的低下があったものと推定された。

今後PCOS合併例に対するIVF-ETでは、synchronizeした卵胞発育、至適なホルモン値が得られるようなGnRH agonistやFSH製剤の投与量・投与方法の検討が必要であると考えられた。

キーワード：IVF-ET, PCOS

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 8 - 12, 1996)

緒 言

卵管因子・子宮内膜症・男性因子などの適応で体外受精・胚移植 (IVF-ET) を実施する症例に、排卵障害が合併していることは比較的よく経験される。これらのうち、視床下部一下垂体性排卵障害、高ゴナドトロピン性排卵障害などと並んで、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) があるが頻度は圧倒的にPCOSが高い。また前二者では卵巣が低反応性を示し、human menopausal gonadotropin (hMG) 製剤の増量・製剤中の

luteinizing hormone (LH) 含有量が問題とされることが多いが、PCOSでは逆に不用意なhMG製剤の投与により卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) を招くといった危険性もある²⁾。さらにPCOSの内分泌の病態の中心をなす高LH状態、とくに卵胞期の高LH状態は卵胞発育に悪影響を与え、卵のqualityを低下させると報告されている³⁾。今回当科で行われたIVF-ETにおけるPCOS合併例の成績を分析、PCOS非合併例と比較することにより、こうした影響の有無、PCOS合併例のIVF-ETにおける問題点について検討した。

対象および方法

平成5年4月から平成6年4月の期間に、新潟大学医学部附属病院産婦人科において施行されたIVF-ETのうち、明らかに受精率が不良と思われる男性因子、40歳以上の症例を除外し、卵管因子・子宮内膜症・原因不明不妊の適応で採卵が行われた91症例・134周期を対象とした。解析はIVF-ET chartより retrospective に行った。このうちPCOSを合併する11例・17周期を対象群とし、PCOSを有しない80例・117周期を対照群(排卵障害例は含まず)とした。

PCOSの基準は日本産科婦人科学会内分泌委員会⁴⁾の基準に従い、月経周期異常があり、卵胞期初期においてLH>FSH、LH>7mIU/ml、かつ超音波上 polycystic ovary を呈するものとした。IVF-ETのプロトコルはすでに報告した方法⁵⁾によった。すなわち全例でgonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) として busarelin acetate (スプレキュア®, ヘキストジャパン, 東京) 900 μ g/日を前周期黄体期中期より使用し、月経周期3日目より follicular stimulating hormone (FSH) 製剤(フェルチノームP®, セロノジャパン, 東京)を300単位/日 \times 2日間、以後150単位連日投与した。2つ以上の卵胞径が18mm(2方向平均径)に達した時点でhCG 10000単位を投与し、その34時間後に経陰

的に採卵した。採卵4時間後に媒精し、48時間後に胚移植を行った。排卵誘発開始日およびhCG投与日のLH、FSHをIRMAで、estradiol (E₂)、progesterone (P₄)をRIAで測定するとともに、PCOS合併群・対照群両群間の採卵数・卵成熟度・受精数(率)・卵割数(率)・妊娠率などを比較した。卵の成熟度の判定は田中らの分類⁶⁾に基づき成熟度の高い順にG1、G2、G3と分類し、各採卵周期において最も優位なものをその周期のgradeとした。

統計処理にあたっては、平均値の差の検定には Student t-テストを、分布の差の検定には χ^2 検定を用いた。

成績

PCOS群とコントロール群の背景を表1に示す。両群間において年齢・不妊期間・BMIに有意差なく、またIVF時に採取された精液の所見にも有意差は認めなかった。ホルモン測定値をみると、非誘発周期の卵胞期初期においてはPCOS群でLHが有意に高値であった(表1)が、表2に示すように、この差はGnRHa使用中の排卵誘発開始時(D3)にはほぼ消失していた。しかしhCG投与日のE₂、P₄値はPCOS群が有意に高値であった。また表3に示すように、周期あたりの卵胞数・採卵数はPCOS群が有意に多数であ

表1 PCOS群・対照群の背景

	PCOS群	対照群	p-value
症例数	11	80	—
周期数	17	117	—
年齢	32.3 \pm 3.9	33.2 \pm 3.4	N.S.
不妊期間(年)	5.6 \pm 2.2	6.4 \pm 3.2	N.S.
Body mass index	20.0 \pm 2.4	20.9 \pm 2.1	N.S.
LH (mIU/ml)	14.0 \pm 9.1	4.0 \pm 1.5	p<0.01
FSH (mIU/ml)	6.1 \pm 1.8	8.2 \pm 2.4	p<0.01
精子数($\times 10^6$ /ml)	73.0 \pm 30.4	82.4 \pm 48.1	N.S.
精子運動率(%)	56.9 \pm 19.0	58.9 \pm 17.3	N.S.

各数値はMean \pm S.D.を表わす

表2 FSH開始日およびhCG投与日における内分泌的所見

		PCOS群	対照群	p-value
FSH開始日	LH (mIU/ml)	2.0 \pm 1.0	1.7 \pm 0.8	N.S.
	FSH (mIU/ml)	5.1 \pm 1.2	6.3 \pm 2.7	N.S.
hCG投与日	LH (mIU/ml)	2.3 \pm 1.7	2.2 \pm 1.9	N.S.
	FSH (mIU/ml)	9.5 \pm 2.1	12.9 \pm 4.7	p<0.01
	E ₂ (pg/ml)	2679 \pm 531	1677 \pm 911	p<0.01
	P ₄ (ng/ml)	1.2 \pm 1.5	0.6 \pm 0.7	p<0.02

各数値はMean \pm S.D.を表わす

表3 採卵周期あたりの体外受精・胚移植成績

パラメーター	PCO群	対照群	p-value
卵胞数	20.6 ± 5.1	10.2 ± 5.0	p < 0.001
採卵数	15.0 ± 4.9	6.6 ± 4.1	p < 0.001
卵成熟度*	41.2 %	65.0 %	N.S.
受精数	4.9 ± 3.9	4.2 ± 3.3	N.S.
受精率	32.8 ± 25.2 %	66.7 ± 28.3 %	p < 0.001
卵割数	3.8 ± 3.7	3.6 ± 3.2	N.S.
移植胚数	2.2 ± 1.4	2.6 ± 1.2	N.S.
妊娠率	17.6 % (3 / 17)	24.8 % (29 / 117)	N.S.
(on going)	11.8 %	18.8 %	N.S.

*成熟卵(田中らの grade I)が優位であった周期の頻度

表4 トータルの卵・胚における成績

パラメーター	PCO群	対照群	p-value
受精率 (受精数/総採卵数)	32.5 % (83/255)	63.8 % (496/778)	p < 0.001
卵割率 (卵割数/受精数)	74.7 % (62/83)	87.1 % (432/496)	p < 0.01
着床率 (着床数/移植胚数)	10.5 % (4/33)	12.3 % (37/301)	N.S.

った。しかし卵胞全体に占める径15 mm以上の卵胞の比率(各周期の平均)は、PCOS群45.5 ± 14.1%、対照群64.5 ± 14.9%と有意にPCOS群で低く、小卵胞の比率が多いことが明らかとなった。採取された卵の成熟度はPCOS群で不良であったが有意差はなかった。受精数・卵割数には両群で差はなく、結果として受精率はPCOS群が有意に低値であった。トータルの卵を対象とした受精・着床成績(表4)でも、PCOS群で有意に受精率・卵割率が低値であった。着床率には有意差は認めなかった。臨床的妊娠(超音波断層法で胎嚢を確認)率(表3)はPCOS群・対照群それぞれ17.6%、24.8%と、PCOS群で低率であり(有意差なし)、とくにon going妊娠率では差がより大きかった。OHSS(moderate-severe)の発生はPCOS群が4周期(23.5%)、対照群が6周期(5.1%)でPCOS群に有意に高率(p=0.02)であった。

考 察

今回の検討により、PCOSを合併した症例に対するIVF-ETにおいては、結果としての妊娠率は対照と比較して有意差はないが、その内容には際立った違いがあることが明らかになった。すなわちPCOS症例では、対照と比較して採取された卵の受精率は有意に低い、卵胞数・採卵数が有意に多いために、

結果的に移植可能で良好な受精卵数ひいては妊娠率に差がなくなったと考えられた。Urmanら⁷⁾Homburgら⁸⁾も、hMG-hCG療法に抵抗性を示すかもしくは妊娠に至らない難治性PCOS例にIVF-ETを行ったところ、対照とした卵管因子群のIVF-ETに比し、peak E₂値が高く採卵数も多いが受精率は低く、結果的に同程度の妊娠率であったと報告している。PCOSでは、卵胞期の高LH血症によって、卵母細胞の第1減数分裂の再開が早期に開始され、受精(精子侵入)までの期間が長くなること、また高LH血症によってもたらされる卵胞内のandrogen優位の微小環境により、卵のqualityの低下を招くとされている⁹⁾。今回の成績ではLH値はhCG投与時よりもより、D3の時点で既にGnRH agonistにより抑制されていたが、progesterone値はhCG投与時に平均1.0 ng/mlを越える高値であったことから、肉眼的成熟度には差はなかったものの、premature luteinizationにともなう卵の質的低下があったものと推察される。受精率が低かったもうひとつの理由として、通常採卵時に穿刺される径10 mm以上の卵胞の中で径15 mm以上の卵胞の占める割合がPCOS例では低く、小卵胞由来の未熟卵が比較的多くなった可能性があり、こうした多数の小卵胞の存在はOHSSの発生増加とも関連があると考えられる。

今後は、発育卵胞の中で比較的径の大きな成熟卵胞の割合を大きくするすなわち、synchronizeした卵胞発育を得ることが必要と考えられる。その対策としてまずGnRH agonistの有効利用が考えられるが、Gersak et al.¹⁰⁾はPCOS合併例に対するIVF-ETで、buserelin 500 μ g皮下注による平均15.2日間のdesensitizationで、LH/FSH比を2.84から0.60に正常化できたが、その後のhMG製剤に対する卵巣の反応性はGnRH agonist非使用例と同じで、multiple follicular developmentを変えられなかったとしている。今後GnRH agonistの投与量・投与方法も検討すべきと思われる。また、hMG製剤の投与方法にも工夫が必要である。FSHの純度の高い製剤を用いることはもちろん、PCOSに対する通常のhMG-hCG療法で行われるFSHのlow dose administration¹¹⁾や、FSH開始日を遅らせることにより、発育卵胞数を制限するなどの対策が考えられる。

以上総括すると、PCOS合併例に対するIVF-ETを一般の症例と同一のプロトコールで行った場合、受精率の低い卵が多数採取され、その数によって妊娠率には有意差はないものの、OHSSの発生頻度が高く採卵時の患者の負担も大きいなどの問題点があることが明らかとなった。今後、大きさのsynchronizeした至適な卵胞数、E₂、P₄値が得られるような卵巣誘発法の工夫が必要と考えられた。

文 献

- 1) Adams J, Polson D, Franks S (1986) Prevalence of polycystic ovaries in women with anovulation and idiopathic hirsutism. *Br Med J* 293: 470-473
- 2) Hamilton-Fairly D, Franks S (1990) Common problem in induction of ovulation. *Clin Obstet Gynecol* 4: 609-613
- 3) Regan L, Owen E, Jacobs HS (1990) Hypersecretion

tion of luteinizing hormone, infertility, and miscarriage. *Lancet* 336: 1141-1144

- 4) 杉本 修, 青野敏博 他 (1993) 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検討結果報告. *日産婦誌* 45: 1359-1367
- 5) Hasegawa I, Tani H, Takakuwa K, et al. (1992) Immunotherapy with paternal lymphocytes preceding in vitro fertilization-embryo transfer for patients with repeated failure of embryo transfer. *Fertil Steril* 57: 445-447
- 6) 田中 温, 戸枝通保, 金子隆弘 他 (1989) GIFT法の実際と成績. *臨産婦* 43: 133-141
- 7) Ulman B, Fluker MR, Yuen BH, et al. (1992) The outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with polycystin ovary syndrome failing to conceive after ovulation induction with exogenous gonadotropins. *Fertil Steril* 57: 1269-1273
- 8) Homburg R, Feldberg D, Berkowitz D, et al. (1993) In vitro fertilization and embryo transfer for the treatment of infertility associated with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 60: 858-863
- 9) Abdulwahid NA, Adams J, Van der Spuy ZM (1985) Gonadotropin control of follicular development. *Clin Endocrinol* 23: 613-618
- 10) Gersak K, Meden-Vrtovec H, Tomazevic T (1994) The effects of gonadotropin-releasing hormone agonist on follicular development in patients with polycystic ovary syndrome in an in vitro fertilization and embryo transfer. *Human Reprod* 9: 1596-1599
- 11) Shoham Z, Patel A, Jacobs HS (1991) Polycystic ovarian syndrome: safety and effectiveness of stepwise and lowdose administration of purified follicle-stimulating hormone. *Fertil Steril* 55: 1051-1056

(受付: 1995年3月16日)

(受理: 1995年7月25日)

Results of in vitro fertilization-embryo transfer in women with polycystic ovarian syndrome

Isao Hasegawa, Yasuaki Yamamoto, Ryuta Kato, Kazuya Oda, Masaki Tamura, Tetsurou Yahata, Akira Honda, Takumi Kurabayashi and Kenichi Tanaka

Department of Obstetrics and Gynecology
Niigata University School of Medicine, Niigata 951, Japan

To clarify the problems involved in the in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET) for women with polycystic ovarian syndrome (PCOS), the outcome of IVF-ET was compared in 11 women (17 cycles) with PCOS and 80 control women (117 cycles) without PCOS. The data demonstrated that the fertilization rate of PCOS women was significantly lower than that of control women (32.5% vs 63.8%, respectively) and that the serum progesterone level on the hCG injection day was inversely higher, suggesting the poor oocyte quality in PCOS women. By a significantly more number of retrieved oocytes, there was no statistical difference in overall clini-

cal pregnancy rate (17.6 % vs 24.8 %, respectively) but the development of ovarian hyperstimulation syndrome was significantly frequent in PCOS. A well-planned regimen of GnRH agonist/FSH administration ensuring synchronized follicular development and adequate hormone levels may be required in IVF-ET program for women with PCOS.

Key words: polycystic ovarian syndrome, in vitro fertilization

マウス胚盤胞の収縮運動に及ぼすインドメサシンと プロスタグランジンの影響

The In Vitro Influence of Indomethacin and Prostaglandins on the Contraction of Mouse Blastocysts

新潟大学農学部家畜生産学教室

新村 末雄

高橋 英太

Sueo NIIMURA

Eita TAKAHASHI

Department of Animal Science

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

培養マウス胚盤胞の自律的な収縮運動に及ぼすインドメサシン (IM) とプロスタグランジン (PG) の影響をタイムラプスビデオを用いて調べた。

10^{-4} MのIMを含む培養液で発生した胚盤胞のハッチング率は17.9%であり、対照の胚の46.4%に比べ有意に低かった。このような胚盤胞において、弱度(20%未満の体積の減少)の収縮回数は対照の胚のものと差はなかったが、強度(20%以上の体積の減少)の収縮回数は有意に多かった。また、 10^{-4} MのIMとともに 10^{-6} MのPGF₂ α あるいは 10^{-8} MのPGE₂を含む培養液で発生した胚盤胞では、IMのみを含む培養液で発生した胚に比べ、弱度の収縮回数は有意に多く、強度のものは有意に少ないとともに、ハッチング率は有意に高かった。

これらの結果から、胚盤胞の収縮運動はハッチングに関係しているとともに、この運動にはPGが関与していることが推察された。

キーワード: マウス胚盤胞, 収縮運動, インドメサシン, プロスタグランジン, タイムラプスビデオマイクログラフイー

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 13 - 17, 1996)

緒 言

胚盤胞の自律的な収縮運動は、1929年に初めてウサギ¹⁾で観察されて以来、ウシ^{2,3)}、ブタ⁴⁾、モルモット⁵⁾、ラット⁶⁾、ハムスター⁷⁾およびマウス⁸⁻¹⁴⁾でもみられることがタイムラプスシネマあるいはタイムラプスビデオを用いて確かめられている。また、この運動は胚盤胞の透明帯からの脱出 (blastocyst hatching; 胚盤胞ハッチング) に関係していると一般に考えられている^{6,9,10,14)}。しかしこれまでに、この運動の生理的役割を検討した報告はみられないこと、また、マウス¹²⁾とウシ^{2,3)}では収縮を行わずにハッチングする胚盤胞があるといわれていることから、胚盤胞の収縮運動がハッチングに関係しているのか否かは不明である。

本研究は、胚盤胞のハッチングを抑制することが知られているインドメサシン (indomethacin; IM)^{15,16)}を含む培養液およびIMとともにプロスタグランジン (prostaglandin; PG) F₂ α あるいはPGE₂を含む培養液で発生したマウス胚盤胞について、収縮運動をタイムラプスビデオを用いて記録・観察し、胚盤胞の収縮運動に及ぼすIMとPGの影響を明らかにするとともに、収縮運動とハッチングとの関係について検討を試みたものである。

材料および方法

供試動物として、ICR系成熟雌マウスを用いた。飼育は、温度24℃、湿度55±15%の室内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。これらのマウスに、PMSG(セロトロピン®, 帝國臓

器, 東京) と hCG (ゴナトロピン®, 帝国臓器) それぞれ 5 単位ずつを 48 時間間隔で腹腔内投与して過排卵を誘発した後, ただちに同系統の成熟雄と交配させた。

胚盤胞の収縮運動に及ぼす IM の影響を調べる目的で, hCG 投与後 48 時間に採取した 2 細胞期胚を, 胚盤胞における PG 合成およびハッチングを有意に抑制することが確かめられている 10^{-4} M の IM¹⁵⁻¹⁷⁾ (Sigma Chemical Company, MO, USA) を含む M16 培養液¹⁸⁾ 中で, 倒立位相差顕微鏡 (ニコン, 東京) に装着した炭酸ガス培養チャンバー (SK-1, 三啓, 東京) を用い, 炭酸ガス 5%, 空気 95% の気相下で 37°C で培養した。なお, IM および以下の $\text{PGF}_2\alpha$ と PGE_2 はエタノールに溶解したものを原液として使用し, すべての実験において培養液中のエタノールの最終濃度が 0.2% になるように調整した。対照には, エタノールを 0.2% 含む培養液で発生した胚盤胞を使用した。つぎに, IM のハッチング抑制効果が認められなくなる濃度の $\text{PGF}_2\alpha$ あるいは PGE_2 を添加した培養液で発生した胚盤胞の収縮運動を調べる目的で, 採取した 2 細胞期胚を, 10^{-4} M の IM とともに 10^{-5} M ないし 10^{-8} M の $\text{PGF}_2\alpha$ (フナコシ, 東京) あるいは 10^{-6} M ないし 10^{-9} M の PGE_2 (フナコシ) を含む M16 培養液でそれぞれ培養した。

観察は, 倒立位相差顕微鏡に取り付けた CCD カラーカメラ (日立電子, 東京) とタイムラプスビデオカセットレコーダー (日本ビクター, 横浜) で 4 秒間隔に撮影した映像を用いて行った。なお観察に用いた胚盤胞において, ハッチングは最も早いもので, 形成後 32 時間に完了することが確かめられたので, 収縮についての観察は胚盤胞形成後 32 時間まで行った。また, ハッチングの有無は胚盤胞形成後 140 時間に判定した。一方, 収縮の程度については Hurst と MacFarlane の方法¹⁹⁾ に従ってマイクロメーターを用いて画面上の胚の直径を計測して体積を算出し, 収縮時の体積が収縮前の体積から何%減少したかによって, 20%未滿を弱度, 20%以上を強度と判定した。なお, 胚は完全な球形ではないので, 長径と短径を計測し, その平均値を胚の直径として用いた。

数値の統計処理は分散分析法で行った。

結 果

1. ハッチング率

ハッチング率は, エタノールのみを含む培養液で発生した胚盤胞では 46.4% (13/28) であったが, IM を含む培養液で発生した胚盤胞では有意に低く, 17.9% (5/28) であった。一方, IM とともに 10^{-5} M ないし

10^{-8} M の $\text{PGF}_2\alpha$ を含む培養液で発生した胚盤胞のハッチング率は, それぞれ 36.0, 43.3, 27.4 および 25.8%, また, IM とともに 10^{-6} M ないし 10^{-9} M の PGE_2 を含む培養液で発生した胚盤胞のハッチング率は, それぞれ 26.5, 34.4, 46.7 および 33.0% であり, IM とともに 10^{-6} M の $\text{PGF}_2\alpha$ あるいは 10^{-8} M の PGE_2 を含む培養液で発生した胚の値が, IM のみを含む培養液で発生した胚の値 (17.9%) に比較して有意に最も高かった。

2. 収縮の程度と回数

本実験において, すべての胚盤胞は形成後約 10 時間経過した拡張期以降に収縮と拡張を繰り返す行いが確かめられた。収縮の程度は同一胚でも収縮ごとに異なっていたので, 本実験では収縮の程度を弱度と強度の 2 種類に分類して解析を行った。すなわち, 弱度の収縮 (20%未滿の体積の減少, 図 1a~c) では, 胚の体積は減少するが, 囲卵腔の明瞭な拡張をともしない程度のもので, 強度の収縮 (20%以上の体積の減少, 図 2a~c) は, 胚の体積の減少にともしない, 囲卵腔の拡張が明瞭なものである。なお, 強度の収縮を起こした胚の中には, 囲卵腔が著しく拡張し, 胚盤胞腔がわずかしか認められないものもあ

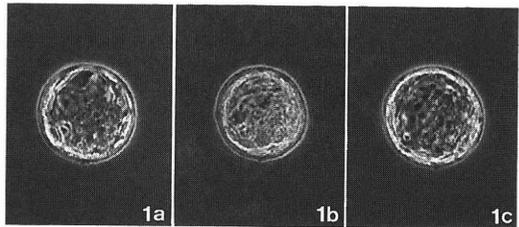


Fig. 1 The weak contraction

All videomicrographs are of mouse blastocysts cultured in the IM-free medium, and taken at a magnification of $\times 120$. a: before contraction; b: at the time of contraction; c: at the time of re-expansion.

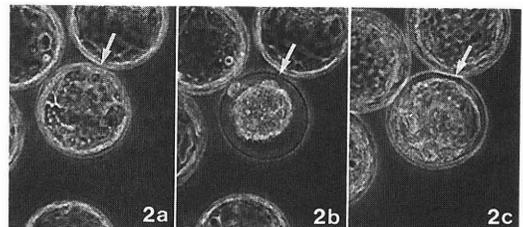


Fig. 2 The strong contraction (arrows)

All videomicrographs are of mouse blastocysts cultured in the IM-free medium, and taken at a magnification of $\times 120$. a: before contraction; b: at the time of contraction; c: at the time of re-expansion.

Table 1 The number of times of contraction of mouse blastocysts cultured in media of different kinds

Kinds of media	No. of blastocysts observed	Degrees of contraction	
		Weak	Strong
M16 medium containing 0.2 % ethanol (control)	28	4.71 ± 2.62 ^{ab}	0.86 ± 0.97 ^{ab}
M16 medium containing 10 ⁻⁴ M IM	28	3.64 ± 2.68 ^a	2.00 ± 1.09 ^c
M16 medium containing 10 ⁻⁴ M IM and 10 ⁻⁶ M PGF ₂ α	30	6.03 ± 3.34 ^b	1.10 ± 1.18 ^b
M16 medium containing 10 ⁻⁴ M IM and 10 ⁻⁸ M PGE ₂	30	5.37 ± 2.88 ^b	0.43 ± 0.73 ^a

The number of times of contraction was counted over the span of 32 hrs after blastocyst formation.

Values represent Means ± S.D.

Values with different superscripts in the same column are significantly different.

った。また、収縮の間隔は、いずれの培養液で発生した胚盤胞においても、弱度のものでは10分ないし15時間、強度のものでは20分ないし18時間であった。さらに、胚盤胞形成後32時間までの期間における収縮回数は、胚ごとに異なっており、少ないものでは2回、多いものでは14回であった。

各種培養液で発生した胚盤胞の収縮回数について得られた成績は、表1に示した通りである。すなわち、IMを含む培養液で発生した胚盤胞の弱度と強度の収縮回数は、3.64回および2.00回であり、対照の胚盤胞に比べ、弱度の収縮回数に差はみられなかったが、強度の収縮回数は有意に多かった。また上述のように、IMのハッチング抑制効果が認められなくなる10⁻⁶MのPGF₂ α あるいは10⁻⁸MのPGE₂を含む培養液で発生した胚盤胞の弱度と強度の収縮回数は、それぞれ6.03回と1.10回および5.37回と0.43回であり、対照の胚のものとは差はなかった。

考 察

本実験において、IMを含む培養液で発生したマウス胚盤胞の収縮運動を、収縮の頻度と程度をパラメーターとして解析した結果、このような胚盤胞では、対照の胚盤胞に比べ、全体の頻度には有意差はみられなかったものの弱度の収縮回数が減少し、強度の収縮回数が有意に増加することが確かめられた。これらのことから、胚盤胞の収縮運動はハッチングに関係していることがうかがわれた。なお収縮運動の有無について、前述のマウス¹²⁾およびウシ^{2,3)}の胚盤胞での結果とマウスを用いた本実験の結果との間に相違がみられるが、この相違の原因として、これらの報告^{2,3,12)}では、本実験のように収縮の程度別回数は調べておらず、主として体積が20%以上減少す

る収縮(本実験の強度の収縮に相当)のみを観察していることから、弱度の収縮を見落としたためと思われる。

一方本実験において、IMとともにPGF₂ α あるいはPGE₂を含む培養液で発生し、ハッチング率が対照の胚盤胞のものと同程度に回復した胚盤胞では、IMのみを含む培養液で発生した胚盤胞に比べ、弱度の収縮回数は有意に多く、強度のものは有意に少ないことが確認された。これらのことから、弱度の収縮はハッチングに役割を果たしているが、強度の収縮はハッチングを抑制する働きのあること、および、これらの運動にはPGが関与していることが推察された。強度の収縮がハッチングを抑制することの理由については明らかではないが、前報¹⁴⁾で示したように、収縮を起こした胚が再拡張するのに要する時間が原因していることが考えられた。すなわち、収縮を起こした胚が収縮前の体積にまで回復するのに要する時間は、弱度の収縮に比べて強度のものでは著しく長いことから、このような強度の収縮を多数行った胚ではハッチング時期を逸してしまうためと思われる。なお、PGは栄養膜細胞の透過性を変化させる作用のあることが知られているとともに²⁰⁾、胚盤胞の収縮の原因のひとつに栄養膜細胞の透過性の変化による胚盤胞腔液の流出が考えられていることから^{10,21)}、胚盤胞の収縮運動は、PGが栄養膜細胞の透過性を変化させることによって起こることも想像された。

ハッチング率に関して、本実験のIMのみを含む培養液およびIMとともに10⁻⁶MのPGF₂ α を含む培養液で発生した胚盤胞の値は、千田の報告¹⁶⁾の値と同程度であった。一方、10⁻⁴Mないし10⁻⁶MのPGE₂を培養液に添加した場合には、IMのハッチング抑制効果

は消失しなかったといわれているが¹⁶⁾、本実験でさらに低濃度のPGE₂の添加の影響について検討したところ、10⁻⁸MのPGE₂を添加した場合にIMのハッチング抑制効果が有意に消失することが確かめられた。

文 献

- 1) Lewis WH, Gregory PW (1929) Cinematographs of living developing rabbit eggs. *Science* 69: 226-229
- 2) Massip A, Mulnard J (1980) Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fert* 58: 475-478
- 3) Massip A, Mulnard J, Vanderzwalmen P, et al. (1982) The behaviour of cow blastocyst in vitro: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 134: 399-405
- 4) Lindner GM, Wright RW Jr (1978) Morphological and quantitative aspects of the development of swine embryos in vitro. *J Anim Sci* 46:711-718
- 5) Blandau R (1971) Culture of guinea pig blastocyst. In: Blandau RJ (ed), *The Biology of the Blastocyst*. Univ of Chicago Press, Chicago and London, pp59-70
- 6) Bitton-Casimiri V, Brun JL, Psychoyos A (1970) Comportement in vitro des blastocystes du 5e jour de la gestation chez la Ratte; étude microcinématographique. *C R Acad Sc Paris* 270: 2979-2982
- 7) Bavister BD (1987) Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. In: Bavister BD (ed), *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation in Vitro*. Plenum Press, New York and London, pp219-249
- 8) Checiu M, Schlecta B, Checiu I, et al. (1990) In vitro studies on preimplantation development. I. Event of normal and pathological development as revealed by microcinematography. *Morphol-Embryol* 36:101-111
- 9) Cole RJ, Paul J (1965) Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. In: Wolstenholm GEW, O'Connor M (eds), *Preimplantation Stages of Pregnancy*. J & A Churchill LTD, London, pp82-112
- 10) Cole RJ (1967) Cinemicrographic observations of the mouse blastocyst. *J Embryol exp Morphol* 17: 481-490
- 11) Mulnard JG (1967) Analyse microcinématographique du développement de L'œuf de souris du stade II au blastocyste. *Arch Biol (Liège)* 78: 107-138
- 12) Bin L, Mulnard J (1980) Analyse cinématographique et morphométrique du comportement in vitro du blastocyste de la souris. *Arch Biol (Bruxelles)* 91: 37-48
- 13) Borghese E, Cassini A (1963) Cleavage of mouse egg. In: Rose GG (ed), *Cinemicrography in Cell Biology*. Academic Press, New York and London, pp263-277
- 14) 新村末雄, 高橋英太 (1995) 培養マウス胚盤胞における収縮運動のタイムラプスビデオによる観察. *日畜会報* 66: 713-719
- 15) Biggers JD, Leonov BV, Baskar JF, et al. (1978) Inhibition of hatching of mouse blastocyst in vitro by prostaglandin antagonists. *Biol Reprod* 19: 519-533
- 16) 千田 智 (1985) IndomethacinおよびProstaglandin E₂, Prostaglandin F₂ α がマウス胎胚のHatchingに与える影響. *日産婦誌* 37: 2067-2072
- 17) Niimura S, Ishida K (1987) Immunohistochemical demonstration of prostaglandin E-2 in preimplantation mouse embryos. *J Reprod Fert* 80:505-508
- 18) Whittingham DG (1971) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl* 14:7-21
- 19) Hurst PR, MacFarlane DW (1981) Further effects of nonsteroidal anti-inflammatory compounds on blastocyst hatching in vitro and implantation rates in the mouse. *Biol Reprod* 25: 777-784
- 20) Lewis GS (1989) Prostaglandin secretion by the blastocyst. *J Reprod Fert Suppl* 37: 261-267
- 21) Soltynska MS (1985) Ultrastructure of mouse blastocysts during blastocoele expansion. *Roux's Arch Dev Biol* 194: 425-428

(受付: 1995年5月31日)

(受理: 1995年8月18日)

The in vitro influence of indomethacin and prostaglandins on the contraction of mouse blastocysts

Sueo Niimura and Eita Takahashi

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

The influence of indomethacin (IM) and prostaglandins (PGs) on the contraction of cultured mouse blastocysts

was examined by time-lapse videomicrography.

The hatching rate of blastocysts cultured in a medium containing IM at 10^{-4} M was 17.9 %, which was significantly lower than 46.4 % seen in control blastocysts. In the IM-treated blastocysts, the weak contraction (volume reduction by less than 20 %) and the strong contraction (volume reduction by 20 % or more) were seen 3.64 and 2.0 times, respectively. The number of weak contraction did not differ from that in the control blastocysts, but the number of strong contraction was significantly higher. On the other hand, blastocysts cultured in a medium containing IM and $\text{PGF}_2\alpha$ at 10^{-6} M or PGE_2 at 10^{-8} M had a significantly more number of weak contraction and a significantly less number of strong contraction, as compared with the blastocysts cultured in the medium containing IM alone. The hatching rate of blastocysts treated with both IM and $\text{PGF}_2\alpha$ or PGE_2 was significantly higher than those treated with IM alone.

From these results, it was inferred that the contraction of blastocysts affects the hatching and the PG participates in the contraction.

Key words: mouse blastocyst, contraction, indomethacin, PG, time-lapse videomicrography

CLINICAL EVALUATION OF hCG-hMG COMBINED THERAPY IN PATIENTS WITH MALE INFERTILITY

Tadashi OEDA, Atsushi NAGAI, Takaharu ICHIKAWA
Hironobu AKIYAMA, Hideo OZAWA and Hiroyuki OHMORI

Department of Urology, Okayama University Medical School
Okayama 700, Japan

Abstract: To assess the usefulness of hormonal therapy in idiopathic male infertility, human chorionic gonadotropin (hCG) and human menopausal gonadotropin (hMG) combined therapy was performed.

hCG (5,000IU) and hMG (150IU) were administered weekly by intramuscular injection to 33 idiopathic infertile men for 12 to 24 weeks. Serum LH and FSH levels of the subjects were less than 15 IU/l.

Except for azoospermia, sperm density and motility at 0, 12 and 24 weeks were 8.5 ± 9.9 ($n=29$), 6.1 ± 7.6 ($n=28$) and 5.6 ± 7.2 ($n=26$) (Mean \pm S.D., $\times 10^6/ml$), and 28.6 ± 23.1 , 22.3 ± 20.8 and 20.2 ± 20.5 (%), respectively. No significant change was seen in sperm motility, but sperm density decreased significantly. General improvement was observed in 2 of 28 (7.1 %) and 1 of 26 (3.8 %) patients at 12 and 24 weeks, respectively. Pregnancies were achieved in 2 cases (7.1 %) during the treatment period. In azoospermic patients, no sperm was seen after treatment. No severe adverse effects were seen in any of the patients.

In conclusion, in this study, no usefulness was observed in combined hCG and hMG therapy for idiopathic male infertility. We should be careful in selecting patients for this treatment and another schedule of administration should be evaluated.

Key words: idiopathic male infertility, hCG, hMG

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 18 - 24, 1996)

Introduction

Although many papers concerning the treatment for idiopathic male infertility have been published^{1,2)}, we often encounter difficulties in dealing with male infertile patients. Nowadays due to vast improvement made in gynecological techniques, pregnancies can be achieved in couples of severe oligozoospermia, who have been thought to be hopeless. In fact, such gynecological techniques might be a great benefit for infertile couples. However, many people still think that natural pregnancy is an ideal. Therefore it is important to improve the quality of semen in oligozoospermic or asthenozoospermic patients. Thus we evaluated the usefulness of human chorionic gonadotropin and human menopausal gonadotropin (hCG-hMG) combined therapy, which has been reported as one of the effective hormonal treatments for idiopathic male infertility^{3,4,5)}.

Materials and Methods

Thirty three idiopathic infertile men whose serum gonadotropins were not so elevated (less than 15 mIU/ml) were selected as candidates for hCG-hMG therapy. Their age ranged from 22 to 38 years (mean; 31.6 years). The duration of suffering from sterility was 6 to 144 months (mean; 36.1 months). No varicocele was found by palpation. Except for 4 azoospermic patients, sperm count and motility before treatment were $8.5 \pm 9.9 \times 10^6/ml$ and 28.6 ± 23.1 % (Mean \pm S.D.), respectively. Sperm density was less than $10 \times 10^6/ml$ in 20 and $10 \times 10^6/ml$ or more in 9 (Table 1).

Semen samples were obtained at the outpatient clinic through masturbation. After homogenizing for 30 minutes at 37 °C, the samples were examined by the same urologist using Makler chamber at 200 fold magnification under a light microscope. Semen examination was done once or more at each evaluation

Table 1 Patient characteristics

age	22 ~ 38	Mean 31.6
duration of sterility	6 ~ 144	Mean 36.1 (mos)
serum hormones		
LH (normal range 1.4 ~ 7.4)	0.6 ~ 10.6	Mean 4.9 (IU/l)
FSH (3.0 ~ 10.2)	2.6 ~ 14.9	Mean 8.5(IU/l)
testosterone (2.9 ~ 10.7)	2.7 ~ 17.3	Mean 5.1(ng/ml)
Johnsen's score count (JSC)	3.7 ~ 9.0	Mean 6.9 (n = 31)
sperm count		
azoospermia		4
severe oligozoospermia ($10 \times 10^6/ml$)		20
mild oligozoospermia ($20 \times 10^6/ml$)		6
asthenozoospermia		3

Table 2 Criteria of judgement on efficacy in semen quality

1. improvement in sperm density
(1) markedly improved: increased $20 \times 10^6/ml$ or more
(2) improved: increased $10 \times 10^6/ml$ or more
(3) no change: changed within $\pm 10 \times 10^6/ml$
(4) deteriorated: decreased $10 \times 10^6/ml$ or more
2. improvement in sperm motility
(1) markedly improved: increased 20 % or more
(2) improved: increased 10 % or more
(3) no change: changed within ± 10 %
(4) deteriorated: decreased 10 % or more
3. general improvement (judged in 5 classes according to improvement in both sperm density and motility)
(1) markedly improved
(2) improved
(3) improved a little
(4) no change
(5) deteriorated

(Kumamoto Y et al., 1988⁷⁾)

period and the best value was adopted.

Testicular biopsy was performed before treatment in 31 patients including 4 azoospermia. Specimens were fixed in Bouin's solution and stained with hematoxylin and eosin, and histological examination was done according to the germinal cell score count reported by Johnsen (JSC)⁶⁾.

5,000 IU of hCG (Gonotropin[®], Teikoku Hormone MGF. Co., Ltd) and 150 IU of hMG (Pergonal[®], Teikoku Hormone MGF. Co., Ltd) were administered to the subjects once a week by intramuscular injection for 12 to 24 weeks. Sperm density and motility were determined and compared before and after 12 or 24 weeks of treatment. In addition, the

efficacy was estimated from three parameters; sperm density, sperm motility and general efficacy including both of these two parameters. The efficacy was assessed according to the criteria used in Methyl B₁₂ multicentric trial (Table 2)⁷⁾.

Serum hormone levels (LH, FSH, testosterone) were also assayed simultaneously by radioimmunoassay.

The subjects were grouped by pre-treatment value of JSC, semen findings and serum hormone levels and an analysis was made in each group on the difference of responsibility.

Statistical analysis was made with Wilcoxon's method.

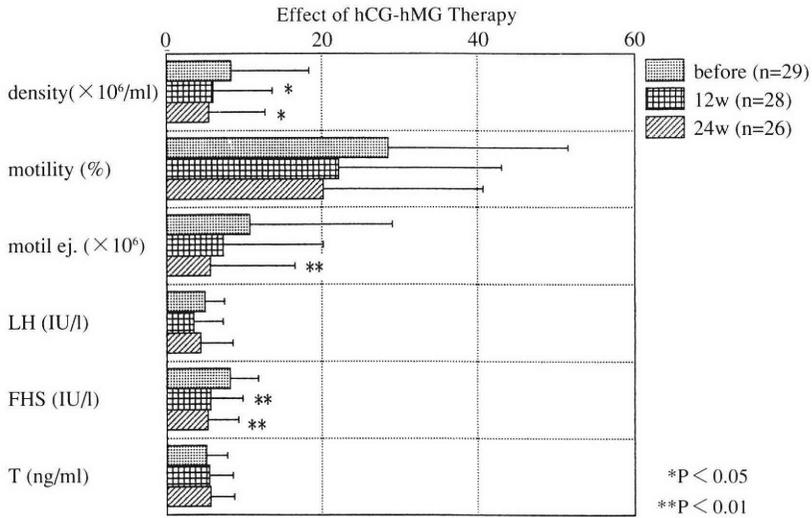


Fig.1 The effect of hCG-hMG therapy on sperm density, sperm motility, total motile sperm count (motile ej.), and serum LH, FSH and testosterone (T) leveles (excluded azoospermia).

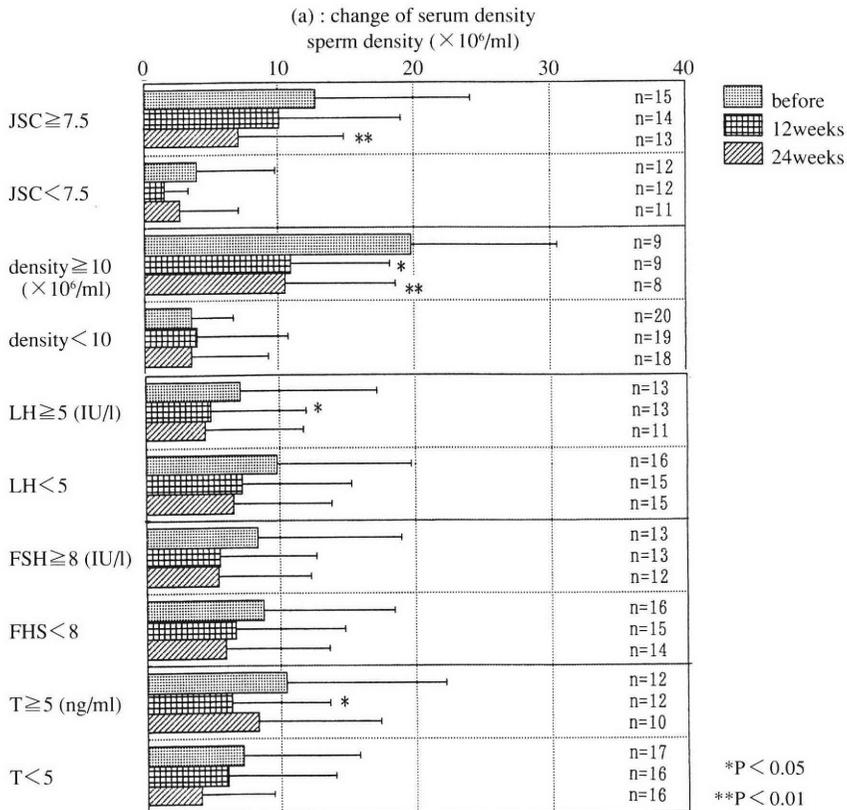


Fig.2 (a)-(c) : Difference of the responsibility of semen quality and serum FSH levels according to the difference of pretreatment value of various parameters (excluded azoospermia).

JSC : Johnsen's score count, T: testosterone

- (a) : change of sperm density
- (b) : change of sperm motility
- (c) : change of serum FSH level

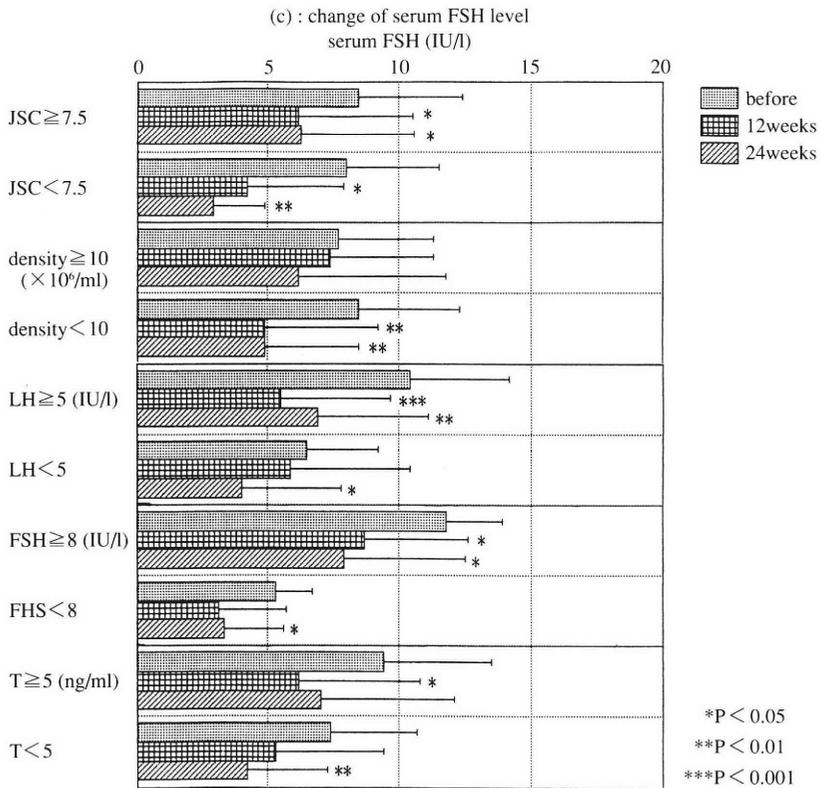
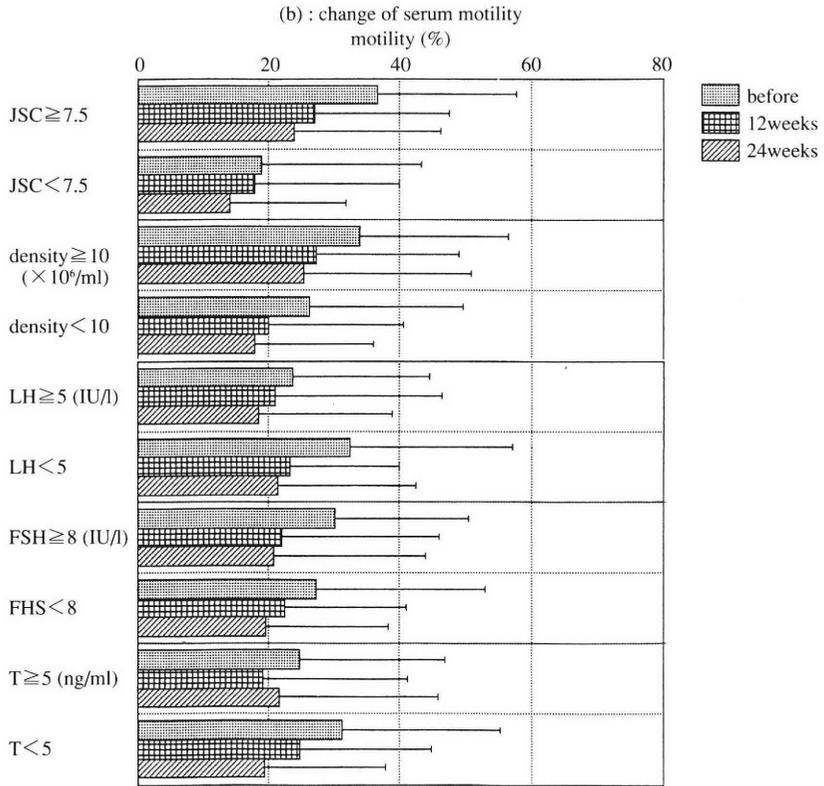


Table 3 Effectiveness after 12 and 24 weeks of treatment

	12W (n=28)	24W (n=26)
1. sperm density		
markedly improved	0	0
improved	2	1
no change	20	23
deteriorated	6	2
efficacy rate	7.1 %	3.8 %
2. sperm motility		
markedly improved	3	3
improved	2	2
no change	15	12
deteriorated	8	9
efficacy rate	17.9 %	19.2 %
3. general improvement		
markedly improved	0	0
improved	2	1
improved a little	4	3
no change	18	19
deteriorated	4	3
efficacy rate	7.1 %	3.8 %

Results

In the 29 patients excluding azoospermia, the number of patients evaluated after 12 and 24 weeks of treatment were 28 and 26. Sperm density, motility and total motile sperm count of these patients at 0, 12 and 24 weeks were 8.5 ± 9.9 (n=29), 6.1 ± 7.6 (n=28) and 5.6 ± 7.2 (n=26) (Mean \pm S.D., $\times 10^6$ /ml), 28.6 ± 23.1 , 22.3 ± 20.8 and 20.2 ± 20.5 (%) and 10.8 ± 18.4 , 7.3 ± 12.9 and 5.8 ± 10.7 ($\times 10^6$), respectively. No significant change was seen in sperm motility, but significant decrease was shown in sperm density at 12 and 24 weeks and in total motile sperm count at 24 weeks. Concerning the serum hormone levels, only FSH showed a significant decrease after the treatment (Fig. 1).

The difference of responsibility in semen quality and serum FSH level according to the difference of pre-treatment findings are shown in Fig. 2 a ~ 2 c. In relatively high JSC and high sperm density group, sperm density decreased significantly after the treatment. In sperm motility, no significant change was seen in each group. Serum FSH decreased significantly at 24 weeks of treatment even in the relatively

low FSH group. In serum LH and testosterone levels, no marked change was observed in each group (data is not shown in figure).

The efficacy at 12 and 24 weeks for each parameter are shown in Table 3. The efficacy rates (sum of marked improvement and improvement) were low in both sperm count and motility. Similarly, general efficacy rates were also low (7.1 % at 12 weeks and 3.8 % at 24 weeks).

Pregnancies were achieved in 2 cases (7.1 %) by AIH during the treatment period. Data of these two patients are shown in Table 4. In the patient No.11, sperm density showed a small increase at 12 weeks and serum FSH decreased at 24 weeks. But there was no marked change in any parameters in case No.20.

As an adverse effect, gynecomastia was seen at 20 weeks of injection in only one patient.

Discussion

Although many papers have documented the usefulness of many kinds of treatments in male infertility^{1,2)}, at present there is no drug that is widely accepted as truly effective. We evaluated in this study the effectiveness of the combined therapy of hCG and

Table 4 Data of patients who obtained pregnancy during treatment

case No.	11	20				
age	31	35				
method for pregnancy	AIH	AIH				
duration of treatment at preg.(w)	23	14				
	0W	12W	24W	0W	12W	24W
semen findings						
sperm density($\times 10^6/ml$)	3.5	11.1	4.0	4.5	4.3	3.8
sperm motility(%)	35	33	13	5	6	14
total motile sperm count($\times 10^6$)	10.0	37.7	3.9	5.2	0.7	2.7
serum hormone levels						
LH(IU/l)	1.6	2.3	1.2	8.3	9.5	6.8
FSH(IU/l)	9.6	14.1	2.7	11.9	14.5	14.0
testosterone(ng/ml)	4.4	4.2	6.5	6.9	8.2	2.9

hMG, which has been also reported before as to be useful in some papers^{3,4,5}.

We have reported previously the results of hCG-hMG therapy in idiopathic male infertility in which we used weekly 2,000IU of hCG and 150IU of hMG, but the result was not satisfactory⁸. Thus this time the dose of hCG was raised to 5,000IU per week to expect a stronger effect of Leydig cell stimulation. However, as shown above, the result of this therapy was unsatisfactory as the treatment of idiopathic male infertility.

One of the reasons for our poor result may be the poor semen quality before treatment. Severe oligozoospermia (less than $10 \times 10^6/ml$) was seen in majority of the subjects of this study (20 in 29). Knuth⁹ revealed by prospective randomized double blind trial that hCG-hMG treatment showed no effect in severe oligozoospermia (less than $10 \times 10^6/ml$). However, in this study, semen quality showed no improvement after the treatment even in the group with sperm density of $10 \times 10^6/ml$ or more. Therefore the result would have been similar if patients with better semen quality had been selected.

Another possible reason for the poor response may be the levels of gonadotropins, especially FSH. Serum FSH level of the subjects before treatment in this study was less than 15mIU/ml, although the normal range is 2.9 to 8.2. Thus the subjects comprised 16 patients with abnormally elevated FSH level. It is easily supposed that the response of the patients with elevated FSH level is not good to this type of treat-

ment. However, in this study, the group in which FSH level was normal did not show good response either. Therefore it is not likely that the response would have been better if patients with low FSH level had been selected.

The third possibility is the schedule of treatment. Though we administrated hCG and hMG weekly, two times or more administrations per week may be adequate to make it more physiological. And, of course, the dose of the drugs should be considered. We can say, at least, dose-up of hCG was not likely to bring a better result.

Mizutani¹⁰ reported that the response to hCG-hMG therapy was determined by the response to LH-RH test before treatment. He said if serum gonadotropin was normal, the result of treatment was better in the relatively low response group than that of high response group. On the other hand, Schill³ said no difference was seen in the effectiveness between responders and non-responders to GnRH. We cannot comment on the relationship between the response to LH-RH test and the result of treatment, because we did not perform this test on all patients. The results would have been better if we had selected patients based on their response to LH-RH test. In another report, Namiki¹¹ said that the effectiveness of this treatment depended on the incidence of high-affinity FSH receptors in the testis, and not on the serum FSH level. Although this method might be useful in predicting the efficacy of hCG-hMG therapy, it is not common in ordinary institutions.

Recently the usefulness of pulsatile LH-RH injection in oligozoospermia is reported. This new type of treatment is documented to show some effect even in the patients with elevated serum FSH level¹²⁾. We must also evaluate in the future the efficacy of this new, more physiological hormonal therapy for idiopathic male infertility.

In conclusion, in this study, though the number of patients was small, we could find no usefulness in the combined therapy of hCG and hMG for idiopathic male infertility. We should be careful in selecting patients and another schedule of administration should be evaluated.

References

- 1) Yamamoto M (1993) Modern trends of treatment in male infertility. *Jpn J Urol* 84: 229-243
- 2) Sorbie PJ and Perez-Marrero R (1984) The use of Clomiphene citrate in male infertility. *J Urol* 131: 425-429
- 3) Schill WB, Jünger D, Unterburger P, et al. (1982) Combined hMG/hCG treatment in subfertile men with idiopathic normogonadotrophic oligozoospermia. *Int J Androl* 5: 467-477
- 4) Hazama M, Kamidono S, Ishigami J, et al. (1984) Clinical evaluation of hMG-hCG combined treatment in idiopathic male infertility. *Jpn J Fertil Steril* 29: 315-323
- 5) Mehan D J and Chehval M J (1982) Human chorionic gonadotropin in the treatment of the infertile man. *J Urol* 128: 60-63
- 6) Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count — a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25
- 7) Kumamoto Y, Maruta H, Ishigami J, et al. (1988) Clinical efficacy of mecbalamin in treatment of oligozoospermia; results of double-blind comparative clinical study. *Acta Urol Jpn* 34: 1109-1132
- 8) Yamashita Y, Nagai A, Oeda T, et al. (1990) Clinical evaluation of hCG-hMG combined therapy in patients with male infertility. *Jpn J Fertil Steril* 35: 601-606
- 9) Knuth UA, Hönlgl W, Bals-Pratsch M, et al. (1987) Treatment of severe oligospermia with human chorionic gonadotropin/human menopausal gonadotropin: a placebo-controlled, double blind trial. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 1081-1087
- 10) Mizutani M, Moriyama H, Sanda N, et al. (1987) Combined administration of human chorionic gonadotropin and human menopausal gonadotropin to idiopathic male infertility. *Acta Urol Jpn* 33: 51-54
- 11) Namiki M, Nakamura M, Okuyama A, et al. (1988) Testicular follicle-stimulating hormone receptors and effectiveness of human menopausal gonadotropin-human chorionic gonadotropin treatment in idiopathic male infertility. *Acta Urol Jpn* 34: 957-961
- 12) Aulitzky W, Frick J and Hadziselimovic F (1989) Pulsatile LHRH therapy in patients with oligozoospermia and disturbed LH pulsatility. *Int J Androl* 12: 265-272

(受付: 1995年4月26日)

(受理: 1995年9月1日)

男性不妊症におけるhCG-hMG併用療法の評価

大枝忠史, 永井 敦, 市川孝治, 秋山博伸, 小澤秀夫, 大森弘之

岡山大学医学部泌尿器科学教室

血中ゴナドトロピンが15 IU/ml未満の特発性男性不妊症33例(無精子症4例, 10×10⁶/ml未満の高度乏精子症20例, 10×10⁶/ml以上の軽度乏精子症6例, 精子無力症3例)に対し, hCG-hMG療法(hCG 5,000 IU, hMG 150 IUを週1回筋注)を施行した。

その結果, 無精子症を除く29例において12週後および24週後の精液所見(精子濃度, 精子運動率および総運動精子数)に有意の改善を認めなかった。治療前の精子濃度別, 血中ホルモン濃度別, 精巣組織所見(JSC)別の精液所見にも改善を認めず, ゴナドトロピン正常例においても同様であった。また, Methyl-B₁₂の全国試験で使用された判定基準による改善率(改善以上)は, 12週(n=28)および24週(n=26)においてそれぞれ精子濃度で7.1および3.8%, 精子運動率で17.9および19.2%, 全般改善度で7.1および3.8%と低かった。

以上より, hCG-hMG療法の患者の選択や投与法は慎重に検討する必要があると考えられた。

キーワード: 特発性男性不妊症, hCG-hMG療法

排卵誘発後の子宮内外同時妊娠4症例の臨床的検討

Four Cases of Heterotopic Pregnancy Following Ovulation Induction

山梨医科大学医学部産科婦人科学教室

水野 薫 子 奥 野 隆 笠 井 剛
Kaoruko MIZUNO Takashi OKUNO Tsuyoshi KASAI

木 下 俊 彦 加 藤 順 三
Toshihiko KINOSHITA Junzo KATO

Department of Obstetrics and Gynecology
Yamanashi Medical University, Yamanashi 409-38, Japan

排卵誘発治療後、子宮内外同時妊娠に至った症例を4例経験した。うち1例は子宮内双胎であった。全例卵巣過剰刺激症候群をともなった下腹痛を初期症状とし、血性腹水を認めた。開腹手術により子宮外妊娠部分を切除し、子宮内妊娠は継続、生児を得ることができた。

子宮内外同時妊娠は近年、卵管のダメージにともなう子宮外妊娠の増加と、排卵誘発剤の使用や補助生殖技術にともなう多胎妊娠の増加のため、増加傾向にある。子宮内に妊娠を認めるとき、同時に子宮外妊娠の有無を発見することは困難であるが、複数卵胞発育時には妊娠初期より注意深く観察を行い、下腹痛や血性腹水貯溜などの初期症状を見落とさないことが肝要である。不妊治療にあたる際には、ゴナドトロピン製剤の使用による過排卵や胚操作に十分な注意を払い予防につとめるとともに、つねに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。

キーワード：子宮内外同時妊娠、排卵誘発、子宮外妊娠

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 25 - 29, 1996)

緒 言

子宮内外同時妊娠はきわめてまれな病態とされてきた。しかし近年、卵管のダメージにともなう子宮外妊娠の増加、排卵誘発剤の使用やIVF-ETなどの補助生殖技術(ART)にともなう多胎妊娠の増加のため、その発生頻度は増加しつつある²⁻⁷⁾。我々もIVF-ETを含め、ゴナドトロピン製剤を用いた排卵誘発治療後に4例の子宮内外同時妊娠症例を経験し、生児を得たので報告する。

症 例

症例1：[] 25歳 OG0P

既往歴：1歳時、腸重積にて開腹手術、同時に虫垂切除術も施行。

現病歴：12か月間の不妊にて近医受診、クロミフェンに反応せずhMGを使用したところ1周期目で卵

巣過剰刺激症候群(OHSS)が出現、[] 3月2日当科を紹介され初診となる。

臨床経過：3月4日(妊娠3週6日)重症OHSSにて入院。腹水穿刺にて1700mlの血性腹水を吸引したが、3月10日(妊娠4週5日)子宮内にGSを1個確認し、症状軽快したため退院。4月5日(妊娠8週3日)、左下腹痛にて再入院となったが安静にて症状軽減し退院。しかしその後下腹痛が続き、径9cm大の右卵巣嚢腫の縮小がみられないため、6月3日(妊娠16週6日)開腹手術となった。右卵巣ルテイン嚢胞および左卵管膨大部妊娠を認め、左卵管妊娠部は未破裂で凝血塊貯溜により腫大していた。両側卵管に癒着はなかったが、大網が腹膜に癒着していた。以上より右卵巣嚢腫核出術と左卵管切除術を施行した。

術後、妊娠経過に異常なく、11月11日(妊娠39週6日)2460gの女児を正常経腔分娩した。

症例2: 34歳 OG0P

既往歴: 特記すべき事項なし。

現病歴: 13か月間の不妊にて当科初診。無排卵周期のためクロミフェンを投与したが、皮疹などのアレルギー反応が出現したためhMG-hCG療法を施行したところ、2周期目で妊娠成立した。

臨床経過: 10月8日(妊娠5週2日)尿中妊娠反応陽性、子宮内にGSを1個確認、両側卵巣腫大と腹水を認めた(中等度OHSS)。10月15日(妊娠6週2日)子宮内にGSを2個確認。11月10日(妊娠10週0日)下腹痛にて来院。腹水はなかったが、子宮外に胎児を確認し、開腹手術となった。開腹時、腹腔内出血し始めており、左卵巣は鷲卵大に腫大していた。右卵巣と両側卵管は正常、腹腔内癒着はなく、直腸前壁の腹膜妊娠であった。

その後妊娠27週より切迫早産にて入院、1994年5月8日(妊娠35週3日)前期破水、陣発し、胎児仮死のため2子ともに鉗子分娩にて生児を得た。第1子は1822gの男児、第2子は2624gの女児で、現在両児とも順調に発育している。

症例3: 39歳 1G1P

既往歴: 特記すべき事項なし。

現病歴: 12年間の不妊を主訴に11月当科初診。子宮卵管造影にて通過性はあるものの癒着を疑わせる所見があり、不妊期間が長期間にわたるためIVF-ETを施行、1周期目(移植胚数4個)に妊娠成立した。

臨床経過: 10月6日(妊娠4週0日)尿中妊娠反応陽性。10月15日(妊娠5週2日)子宮内にGSを1個確認、ダグラス窩に腹水を認め吸引したところ暗血性であった。10月19日(妊娠5週6日)性器出血と下腹痛が出現し入院、10月25日(妊娠6週5日)血性腹水を認め、子宮内外同時妊娠を疑い開腹手術となる。腹腔内は両側卵管とも強度に癒着しており、左卵管采に凝血塊を認め、左卵管膨大部妊娠流産の所見であった。また子宮後壁と直腸、S状結腸と骨盤壁も癒着し、ダグラス窩は閉鎖しており、強い炎症があったことを疑わせた。

術後、妊娠経過に異常なく、6月27日(妊娠41週4日)3980gの女児を正常経陰分娩した。

症例4: 27歳 OG0P

既往歴: 特記すべき事項なし。

現病歴: 8か月間の不妊、無排卵周期を主訴に当科初診。無排卵および乏精子症のためpFSH、hMG-hCG療法と洗浄濃縮精子によるAIHを行い、8周期目に妊娠成立した。

臨床経過: AIH施行3日後、下腹痛のため来院。中等度OHSSを認めたが、11月15日(妊娠4週6日)受診時には軽快しており、子宮内GSを確認した。11月28日(妊娠6週5日)下腹痛と肛門痛を訴え来院、ダグラス貯溜を認め吸引したところ、ほぼ血液であったため、子宮内外同時妊娠を疑い開腹手術を施行した。両側卵巣、卵管は癒着もなく正常で、ダグラス窩腹膜妊娠であった。

表1 子宮内GS確認時期、OHSSの程度、子宮外妊娠診断時期と診断根拠

症例	子宮内GS	OHSS	外妊診断時期	診断根拠
1	4W5D	grade 5	16W6D	手術時診断
2	5W2D (1個) 6W2D (2個)	grade 3	10W0D	子宮外GS (FHB+, CRL2cm)
3	5W2D	grade 3	6 W5D	血性腹水
4	4W6D	grade 3	6 W5D	血性腹水

OHSS重症度分類はGolanら(1989)による

表2 子宮内外同時妊娠におけるhCG値

症例	妊娠週数	尿中hCG (mIU/ml)	血中hCG (mIU/ml)
1	4W0D	89	229
	4W3D	—	613
2	5W2D	—	3700
	5W6D	2930	9800
3	6W5D	45100	28300
	6W5D	50500	48400

表3 子宮内外同時妊娠の頻度

De Voe and Pratt (1948) ¹⁾	1/30000 (0.003 %)	自然
Richards (1982) ⁵⁾	1/15600 (0.0064 %)	自然
Reece (1983) ⁶⁾	1/7963 (0.013 %)	自然
Yovich (1985) ⁷⁾	1/300 (0.33 %)	ゴナドトロピン使用
Bello (1986) ²⁾	1/3889 (0.026 %)	自然
Molloy (1990) ⁴⁾	10/1001 (1.0 %)	IVF-ET, GIFT
Dor (1991) ³⁾	1/107 (0.93 %)	IVF-ET

術後、妊娠経過に異常なく、7月31日(妊娠41週4日)3404gの男児を正常経陰分娩した。

以上、4症例のOHSSの程度と診断時期、診断根拠を表1にまとめた。またhCGの値を表2にあげた。

考 察

子宮内外同時妊娠の頻度は、1948年 De Voe and Pratt¹⁾が自然周期において30,000例の妊娠に1例と推測してから、近年では3889例に1例²⁾と増加している。またIVF-ETなどのARTによる妊娠例ではその頻度はさらに高く、0.9%³⁾から1.0%⁴⁾と報告されている(表3)。我々の施設では、1993年から1994年の2年間に排卵誘発により88例の妊娠例を得たが、そのうち他院から紹介された1例を除く3例が子宮内外同時妊娠であり、その発生率は3.4%と諸家の報告に比して高率であった。さらにIVF-ET例においても3.2%(31例中1例)と同様に高率であった。

子宮内外同時妊娠の主な原因は、卵管のダメージにともなう子宮外妊娠の増加と、排卵誘発剤の使用による過排卵やIVF-ETなどのARTにともなう多胎妊娠の増加が考えられる。具体的には、クラミジア感染などによる性行為感染症(STD)や骨盤内炎症性疾患(PID)後⁸⁾、卵管手術後⁹⁾、などに子宮外妊娠はおこりやすい。また、子宮外妊娠の既往も外妊をくりかえすリスクファクターである¹⁰⁾。とくに自然の子宮内外同時妊娠は、PIDにより解剖学的、機能的に損傷をうけた卵管をもつ患者におこりやすい¹¹⁾。今回の経験でも症例3は卵管に強度の癒着があり、卵管の性状が子宮内外同時妊娠の発生に関与することが示唆された。一方、過排卵は多胎妊娠を増加させる因子であるとともに、子宮外妊娠の増加にも関与している¹⁰⁾。症例2と症例4は腹腔内の癒着はなく、卵管の性状にも問題がなく、卵管の障害よりも過排卵にその原因があったのではないかと思われる。それはこの2例が卵管妊娠ではなく、腹膜妊娠であったことから推測される。そして過排卵を予防するためには排卵誘発の適応を見直すことも必要であ

る、さらにIVF-ETにおけるテクニックの問題点もつぎのように指摘されている¹²⁾。1)子宮内にETチューブを深く入れると胚が卵管口にとどまったり卵管腔内に直接入ってしまうことがある。また、head downしているので重力によって胚の卵管内への遊走が促される。2)ETでの血清の使用が卵管への遊走に関与している可能性がある。3)ETの際、併発する流体静力学的な力による卵管口への胚の押し出しや¹¹⁾、子宮収縮のため胚が卵管へ移動する、などである。したがって、超音波検査を併用し、ETチューブを子宮腔の中心に入れ、移植胚と移植培養液の適切な量と注入圧を厳守すべきである。

子宮内外同時妊娠の問題点は、いかに早期に子宮外の妊娠を発見できるかという点にかかわってくる。Goldman¹²⁾はつぎのような臨床基準をあげている。1)子宮外妊娠が疑われるのに子宮が妊娠週数相当の大きさである。2)子宮外妊娠摘出後も妊娠徴候が存在する。3)子宮内容除去後、腹腔内出血の臨床症状がある。4)血中hCG値が妊娠週数相当値よりも高く、多胎の存在を示す。以上のような場合、子宮内にGSが1個であれば子宮内外同時妊娠を疑うべきであるとしている。一方で、血中hCG値は子宮内外同時妊娠の診断としてはあてにならない、判断の誤りになるので疑わしいときは超音波検査を用いるべき¹³⁾という意見や、子宮内外同時妊娠では単胎、双胎にかかわらず正常妊娠に比べ、血中hCG値は有意に低いという報告もある¹⁴⁾。実際、我々が経験した4症例でもhCG値だけでは診断の決め手にはならなかった(表2)。また超音波検査は非常に有用であるが、妊娠初期の場合、付属器の腫大をOHSSによる卵巣腫大とまちがえることがある¹³⁾ので注意が必要である。また今回の経験でも4症例中2例は腹膜妊娠であったように、超音波検査での子宮外妊娠部位の早期検出が困難なこともある。そこで臨床上、症状が出現してから子宮内外同時妊娠の診断がつくことが実際のところ多い。症状として最も多いのは腹痛で、性器出血がそれに次ぐ。幸いにも急性腹痛や

ショックはまれである¹²⁾。我々の経験した4症例でも下腹痛を主訴に来院している。さらに腹水貯溜の所見がある場合、腹腔内出血はOHSSにマスクされ見落としがちなので、ダグラス窩穿刺を施行し、血性腹水の有無を判定することは子宮内外同時妊娠の診断として非常に有用であると考えられた。さらに子宮内外同時妊娠とOHSSの関連を示唆する報告があるように¹³⁾、我々の4症例にも全例OHSSが認められ、その関連性を強く疑わせた。中等度以上のOHSSを認める場合、それは過排卵の存在を疑わせる症状であり、つねに多胎妊娠と子宮外妊娠の可能性を考慮し、なおかつ子宮内外同時妊娠をも念頭におくべきである。妊娠初期の診察には、とくに排卵誘発を行った場合、子宮内にGSを認めても(たとえ2個あっても)つねに子宮外妊娠の可能性を忘れずに、初期症状を見逃さぬようこれらの所見を総合的に判断しなければならない。

子宮内妊娠の生育が超音波所見上、週数相当であれば開腹手術が子宮内の妊娠継続を妨げることはない⁴⁾ので、生児を得るためにも早期の対応が必要である。最近では腹腔鏡下での手術が広く行われるようになり、患者の負担も軽減されつつある。また、子宮外妊娠の場所が卵管角部の場合、経腔超音波ガイド下にGSを穿刺、KClを注入し減数するという方法も報告されており¹⁵⁾、今後非観血的方法として注目すべき治療法である。

子宮内外同時妊娠は早期発見、早期治療であれば子宮内の妊娠は充分継続できるので、その予防とともに、妊娠初期にはつねに子宮内外同時妊娠の可能性を念頭におきながら診察にあたることが重要と考えられた。

文 献

- 1) DeVoe RW, Pratt JH (1948) Simultaneous intrauterine and extrauterine pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 56: 1119-1126
- 2) Bello GV, Schonholz D, Moshirpur J, et al. (1986) Combined pregnancy: The Mount Sinai experience. *Obstet Gynecol Surv* 41: 603-613
- 3) Dor J, Seidman DS, Levrant D, et al. (1991) The incidence of combined intrauterine and extrauterine pregnancy after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 55: 833-834
- 4) Molloy D, Deambrosio W, Keeping D, et al. (1990) Multiple-sited (heterotopic) pregnancy after in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Fertil Steril* 53: 1068-1071
- 5) Richards SR, Stempel LE, Carlton BD (1982) Heterotopic pregnancy: Reappraisal of incidence. *Am J Obstet Gynecol* 142: 928-930
- 6) Reece EA, Petrie RH, Sirmans MF, et al. (1983) Combined intrauterine and extrauterine gestations: A review. *Am J Obstet Gynecol* 146: 323-330
- 7) Yovich JL, McColm SC, Turner SR, et al. (1985) Heterotopic pregnancy from in vitro fertilization. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 2: 146-150
- 8) Cates W, Wasserheit JN (1991) Genital chlamydial infections: Epidemiology and reproductive sequelae. *Am J Obstet Gynecol* 164: 1771-1781
- 9) Winston RML (1980) Microsurgery of the fallopian tube: from fantasy to reality. *Fertil Steril* 34: 521-530
- 10) Grant A (1962) The effect of ectopic pregnancy on fertility. *Clin Obstet Gynecol* 5: 861-874
- 11) Bearman DM, Vieta PA, Snipes RD, et al. (1986) Heterotopic pregnancy after in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 45: 719-721
- 12) Goldman GA, Fisch B, Ovadia J, et al. (1992) Heterotopic pregnancy after assisted reproductive technologies. *Obstet Gynecol Surv* 47: 217-221
- 13) Walker DJ, Clarke TC, Kennedy CR (1993) Heterotopic ectopic and intrauterine pregnancy after embryo replacement. *Br J Obstet Gynecol* 100: 1048-1049
- 14) Johnson MR, Bolton VN, Riddle AF, et al. (1993) Interactions between the embryo and corpus luteum. *Human Reprod* 8: 1496-1501
- 15) Fernandez H, Lelaidier C, Doumerc S, et al. (1993) Nonsurgical treatment of heterotopic pregnancy: A report of six cases. *Fertil Steril* 60: 428-432
- 16) Fernandez H, Coste J, Job-Spira N (1991) Controlled ovarian hyperstimulation as a risk factor for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 78: 656-659
- 17) Mascarenhas L, Eliot B (1993) Severe ovarian hyperstimulation syndrome, selective embryo reduction and heterotopic pregnancy. *Human Reprod* 8: 1329-1331

(受付：1995年6月28日)

(受理：1995年9月11日)

Four cases of heterotopic pregnancy following ovulation induction

Kaoruko Mizuno, Takashi Okuno, Tsuyoshi Kasai, Toshihiko Kinoshita and Junzo Kato

Department of Obstetrics and Gynecology
Yamanashi Medical University, Yamanashi 409-38, Japan

Clinical features of four cases of heterotopic pregnancies following ovulation induction with hMG-hCG treatment were presented and discussed. The first symptom was lower abdominal pain with OHSS, hemoperitoneum was present in all cases. The removal of ectopic pregnancies was performed at laparotomy, therefore the patients had ongoing intrauterine pregnancies and then living infants were delivered.

Recently, the incidence of heterotopic pregnancies has increased, because of the increase in number of ectopic pregnancies due to tubal damage, and multiple pregnancies due to assisted reproductive technology. When we perceive an intrauterine gestational sac, it is difficult to discover an extrauterine sac at the same time in the early pregnant period. After multiple follicles are produced by ovulation induction, we should not miss incipient symptoms: lower abdominal pain, hemoperitoneum, etc. It is important that a possibility of heterotopic pregnancies should always be considered.

Key words: heterotopic pregnancy, ovulation induction, ectopic pregnancy

体外受精治療周期における加齢の着床期性ステロイド値 および子宮内膜の超音波断層像に及ぼす影響

Influence of Aging on the Levels of Sex Steroids and Ultrasonographic Image of Endometrium during the Mid-Luteal Phase in the Treatment of In Vitro Fertilization

秋田大学医学部産科婦人科学教室

熊谷 仁

Jin KUMAGAI

軽部 裕子

Hiroko KARUBE

児玉 英也

Hideya KODAMA

清水 靖

Yasushi SHIMIZU

福田 淳

Jun FUKUDA

田中 俊誠

Toshihiko TANAKA

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

子宮内膜の胚の受容能力が加齢とともに変動するか否かを明らかにする目的で、以下の検討を行った。

まず、できるだけ受精卵側の因子の影響を取り除くために形態学的に良好な胚を2ないし3個移植し得た患者54例の体外受精54周期を選択し、患者の年齢に基づいて31歳以下(A群, n=19), 32~35歳(B群, n=15), 36歳以上(C群, n=20)の3群に分類した。各群の臨床的妊娠率はA群58%, B群60%, C群25%で、前2群とC群との間に危険率5%以下で有意差を認めた。しかし、着床期の血中性ステロイド値(血中E₂, P₄, およびP₄/E₂比)と子宮内膜超音波断層所見(子宮内膜の厚さおよびleaf patternの出現頻度)は、各群間に有意差は認められなかった。

以上の結果より、今回用いた子宮内膜の受容能力のパラメーターに加齢にともなう変化が認められないことから、加齢にともなう妊娠率の低下は移植胚の形態に評価されないqualityの低下に起因する可能性が高いと考えられる。

キーワード: 着床, 子宮内膜, 体外受精, 性ステロイド, 超音波断層法

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 30-35, 1996)

緒言

体外受精の治療において、妊娠率が加齢とともに減少することはよく知られた現象である¹⁻³⁾。したがって、高齢患者の妊娠率低下の原因を明らかにすることは、体外受精の成績を改善する上での重要な鍵であるが、どのような要因がその妊娠率低下の原因となっているかに関しては、いまだ明確な解答が得られていない。この問題の最も重要で基本的な論点は、その妊娠率の低下が移植する胚のqualityの低下によるものなのか、母体側の子宮内膜の受容性の低下に起因するののかという問題である。近年、donor

の胚を高齢女性の子宮内膜に移植した場合に良好な妊娠率が得られたことが報告されたことから、高齢者の子宮内膜環境は必ずしも不良ではなく、妊娠率の低下は移植する胚のqualityの低下に起因するとの考えが支配的となっている^{4,5)}。しかし、一方で、oocyte donationの成績がdonorの年齢よりもrecipientの年齢に依存するとの報告⁶⁾もあり、加齢により子宮内膜の受容能力が低下する可能性も否定されていない。

今回は、子宮内膜の胚の受容能力が加齢とともに低下するか否かを明らかにする目的で、できるだけ胚側の因子の影響を取り除くために実際に良好な胚

を移植し得た症例に限って体外受精の治療成績を分析することにした。そして、その条件下での妊娠率や着床期の子宮内膜環境に関与すると考えられる臨床的パラメーターについての加齢の影響を検討し、高齢者の妊娠率低下の要因を考察したのでここに報告する。

研究方法

1) 対象患者

1993年10月から1994年3月まで当科で体外受精の治療を行った治療周期の中から、以下に示す形態学的判定基準により良好胚と判定された胚を2個ないし3個移植可能であった患者54例、54周期を対象とした。患者の平均年齢は33.6歳、平均不妊期間は6.1年、不妊原因は卵管因子20周期(37%)、男性因子11周期(20%)、子宮内膜症5周期(9%)、原因不明18周期(33%)であった。54治療周期を患者年齢により31歳以下(A群, n=19)、32~35歳(B群, n=15)、36歳以上(C群, n=20)の3群に分類した。各群の平均不妊期間は、 4.2 ± 1.3 年、 6.6 ± 2.1 年、および 7.4 ± 4.1 年で、加齢にともない不妊期間が長期化する傾向が認められた。不妊原因の構成、卵巣刺激の方法については、各群間には差を認めなかった。今回の検討周期で臨床的妊娠に至った症例は計25例(うち流産7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^{7,8)}が、以下に簡単に述べる。卵巣の刺激法は、human menopausal gonadotropin (hMG, パーゴナル®, 帝国臓器またはhMG日研, 日研化学)とgonadotropin-releasing hormone agonist-(GnRHa, buserelin acetate, スプレキュア®, ヘキストジャパン)の併用周期を主体とし、基本的にはlong protocol、一

部hMGに対する反応の不良な患者に対してはshort protocolを用いた⁹⁾。hMGは、月経周期の2ないし3日目より患者の反応にあわせて一日150~300 IUを連日投与し、最大卵胞径が17~18 mm以上に達した段階でhuman chorionic gonadotropin (hCG, ゴナトロピン®, 帝国臓器)10,000 IUに切り替え、採卵はその36時間後に経腔超音波断層法を用いて行った。採取された卵子は10%非働化患者血清を加えたhuman tubal fluid medium¹⁰⁾を用い、3種混合ガス(90% N₂, 5% CO₂, 5% O₂)の気相で培養し、媒精した。受精が確認された胚は媒精後約48時間後に形態を実体顕微鏡下で評価し子宮内に移植した。同時に移植する胚の数は最高3個までとし、余剰胚については、患者の希望に応じて凍結保存を行った。移植当日(0日)、3日目、6日目に卵巣過剰刺激症候群の危険がなければhCG 2,000 IUによる黄体刺激を行い、移植後16日目に尿中のhCGを定性し妊娠の有無を診断した。超音波画像上で胎嚢が確認された場合を臨床的妊娠とした。

過去の報告に基づき¹¹⁾、1) 媒精後48時間で少なくとも4分割に達している、2) fragmentationの割合が胚の全細胞質の10%以下である、3) 各割球が均等大きさである、4) 細胞質が明るく変性がない、の形態学的基準を満たす胚を良好胚に分類した。

3) 測定項目

移植後6日目に経腔超音波断層装置を用いて子宮の縦断面を描出し内膜の厚さを測定した。また、過去の報告^{12,15)}に基づいてその内膜のエコーパターンを、leaf patternまたはdiffuse patternに分類した。また同時に、肘静脈より採血して得られた血清を-20℃にて保存した。保存した血清は、後日estradiol (E₂), progesterone (P₄)、およびP₄/E₂比を測定した。E₂およびP₄の測定には酵素免疫測定法に基づくE₂測

表1 各群の体外受精治療成績^{a)}

	A群 25~31歳 (n=19)	B群 32~35歳 (n=15)	C群 36~39歳 (n=20)
平均採卵数(個) ^{b)}	7.4 ± 4.4	8.1 ± 4.4	5.4 ± 3.3
平均移植数(個) ^{b)}	2.3 ± 0.7	2.8 ± 0.6	2.8 ± 0.6
妊娠数	11	9	5
単胎	6	4	3
多胎	2	3	0
流産	3	2	2
妊娠率(%)	58	60	25 ^{c)}
流産率 ^{b)} (%)	27	22	40

^{a)}値はMean ± S.D., ^{b)}各群間に有意差を認めず, ^{c)}p < 0.05 versus AおよびB群

表2 各群の着床期血中ステロイド値と子宮内膜超音波所見^a

	A群 25～31歳 (n=19)	B群 32～35歳 (n=15)	C群 36～39歳 (n=20)
Estradiol (pg/ml)	1860 ± 1759	2022 ± 2585	1849 ± 1810
Progesterone (ng/ml)	47 ± 50	79 ± 152	58 ± 77
P ₄ /E ₂ (× 10 ³)	32 ± 22	55 ± 55	53 ± 59
子宮内膜の厚さ (mm)	13 ± 3	14 ± 2	13 ± 3
leaf patternの頻度 (%)	36	29	36

^a値はMean ± S.D.表3 体外受精の予後と着床期血中ステロイド値, および子宮内膜超音波所見^{1a}

	妊娠例 (n=18)	流産例 (n=7)	非妊娠例 (n=29)
Estradiol (pg/ml)	2151 ± 2475	2084 ± 1888	1554 ± 1591
Progesterone (ng/ml)	108 ± 143	104 ± 112	60 ± 72
P ₄ /E ₂ (× 10 ³)	63 ± 50	78 ± 116	54 ± 60
子宮内膜の厚さ (mm)	14 ± 3	11 ± 3	11 ± 3
leaf patternの頻度 (%)	35	0	34

^a値はMean ± S.D.

定キット, Vidas Estradiol (日本ビオメリューバイテック) および Elmotest-Progesterone (持田製薬) を使用した。キットの同時再現性については, 5回連続して測定した場合の測定値のCV値は20%以下であった。

4) 統計

各群間の平均値の検定は Student t-test, 頻度の検定は χ^2 test を用い, 危険率5%以下で有意差ありとした。

研究結果

各群の体外受精治療成績を表1に示す。平均採卵個数は有意差を認めなかったが, C群で少ない傾向を認めた。平均移植数は, 各群間に差は認められなかった。3群間の臨床的妊娠率はA群で58%, B群で60%とそれぞれ高い値を示したが, C群では25%であり, 前2群とC群との間に危険率5%以下で有意差を認めた。流産率は各群間で有意差を認めなかったが, C群では40%と高率であった。

各群の着床期血中ステロイド値と子宮内膜超音波断層所見を表2に示す。内分泌環境のパラメーターとして測定した血中E₂, P₄, P₄/E₂比の値について, 各群間に差は認められなかった。また, 超音波断層法における内膜の厚さ, leaf patternの出現頻度についても, 各群間で差を認めなかった。以上, 今回検討した子宮内膜の臨床的パラメーターに関して, 加齢にともない有意に変動するものは認められなかった。

今回の成績を妊娠の有無およびその予後に従って比較した成績を, 表3に示す。妊娠群(流産を除く), 流産群, 非妊娠群の間で血中E₂, P₄, P₄/E₂比の値, および超音波断層法における内膜の厚さ, leaf patternの出現頻度について, 各群間に有意な差は認められなかった。

考 察

子宮内膜の着床環境が加齢とともに低下するのかわかるといふ問題を検討するためには, できるだけ受精卵側の要素を取り除く必要がある。胚の移植前の形態は, 胚のqualityの良好な指標と考えられており, 形態学的に良好な胚を複数移植可能だった周期は, 高い妊娠率が期待できることが知られている¹⁶⁻¹⁸⁾。そこで今回は, 形態学的に良好なqualityの胚を2~3個移植し得た症例のみを, 体外受精の治療患者の中から選択することとした。このような選択をすることによって, 年齢にしたがって分類された各群間で, 胚の個数および形態学的なqualityに差がなくなり, 移植される胚側の要素の均一化がなされたと考えた。そして, そのような条件下で実際に各群間の妊娠率を比較してみると, やはり36~39歳の群では妊娠率が有意に低下しているという結果が得られた。このように胚側の要素をできるだけ均一化してもなお高齢者では妊娠率の低下が認められることから, 高齢者の着床率の低下に子宮内膜の受容能力の低下が関与する可能性があると推定した。以

上の前提のもとで、子宮内膜の着床環境に影響を与える、または子宮内膜の環境を反映すると考えられる臨床的なパラメーターについて、高齢者と若年者間での比較を行った。

血中の性ステロイド値は子宮内膜の環境を反映する重要な指標と考えられ、黄体機能不全の診断においても血中 P_4 の値はその診断において重要な位置を占めている。体外受精における内分泌環境は過排卵誘発を行うことから、今回測定したように血中 E_2 、 P_4 の濃度は自然周期ではありえない高いレベルに達する症例が大部分である。過去の報告では、過排卵誘発にともなう E_2 の過剰分泌、それにともなうアンバランスな P_4/E_2 比の低下が体外受精の着床率低下の原因となる可能性が報告¹⁹⁻²¹⁾されている。 E_2 の過剰分泌はそれ自体が黄体に対して *luteolytic* に作用する可能性があるとともに、子宮内膜の受容能力に直接影響する可能性が考えられている。今回の、妊娠の予後に基づいて比較した結果では、非妊娠群では妊娠群に比較して血中 E_2 および P_4 の値は低く P_4/E_2 比も低下する傾向は認められたが、統計学的に有意差が認められる水準には達しなかった。これは、症例数が少ないことに加えて測定値そのものに症例間のばらつきがきわめて大きいことと起因すると考えられた。年齢により分類された3群の間で性ステロイド値を比較してみると、高齢者(36~39歳)の性ステロイドの値は若年の群のそれと比較して、とくに有意差は認められず、 P_4/E_2 比が低下する傾向も認めなかった。

超音波断層法による子宮内膜の厚さと体外受精の妊娠率の関連に関する検討は以前から数多く報告されており、一般にhCG投与の時期に子宮内膜の厚さの測定を行っている報告が多い。その結果、一部その関連を否定する報告²²⁾も存在するが、多くは薄い子宮内膜が妊娠に不利であると報告している²³⁻²⁸⁾。今回の検討では、黄体期中期に測定を行ったが、我々の検討ではhCG投与の時期の子宮内膜の厚さと黄体期中期の子宮内膜の厚さは良好な相関を示す($r=0.78$)ことから、過去の検討と同様な成績が得られると予測していた。その結果統計学的な有意差は認めなかったものの、流産群、非妊娠群が妊娠群より子宮内膜が薄い傾向が認められた。しかし、今回検討した高齢者群の子宮内膜の厚さは若年者のそれと比較して、まったく差を認めなかった。また、近年超音波画像上で黄体期の子宮内膜日付診が試みられ¹²⁻¹⁵⁾、各stageでの子宮内膜のエコーパターンと体外受精の妊娠率との相関が検討されている²⁵⁻²⁷⁾。

正常な子宮内膜では黄体期初期においては子宮内膜の輝度が低下した *leaf pattern* を示し、中期にかけて輝度が増加した *diffuse pattern* の画像を示すと報告され、hCG投与の時期においては妊娠群では有意に *leaf pattern* の出現頻度が高いとの報告²⁷⁾も認められる。しかし黄体期中期の *leaf pattern* の出現は、発育遅延内膜である可能性があり、今回ひとつのパラメーターとして検討を行った。しかし、*leaf pattern* の出現頻度は妊娠群と非妊娠群でまったく差を認めず、加齢による変動もまったく認めなかった。ただ、流産群のすべてが *diffuse pattern* を示しており、今後これが有意な現象なのかを検討する余地があるものと考えられた。

以上、今回の検討は、できるだけ胚側の要因を移植胚の数および形態学的な *quality* で均一化して高齢者と若年者との妊娠率を検討しても、高齢者の妊娠率は低率であることから加齢にともない子宮内膜の受容能力が低下する可能性があると考え、血中性ステロイド値および子宮内膜の超音波断層像の臨床的パラメーターの比較を行った。その結果、今回用いたパラメーターそのものが体外受精の予後を予測するうえで鋭敏なものではないという問題点はあるものの、ある程度妊娠率と相関すると予測される子宮内膜の肥厚度も含めて、加齢にともない変化はまったく認められなかった。以上の検討結果は、子宮内膜の受容能力が加齢にともない変化しない可能性を示唆するものであり、加齢にともない妊娠率の低下は形態に評価され得ない移植胚の *quality* の低下に起因する可能性が高いと考えられた。今後の原因のさらなる追及が着床困難な高齢症例の治療成績の向上につながるものと考えられる。

文 献

- 1) Hughes EG, King C, Wood EC (1989) A prospective study of prognostic factors in in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 51: 838-844
- 2) Padilla S, Garcia JE (1989) Effect of maternal age and number of in vitro fertilization procedures on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 52: 270-273
- 3) Piette C, de Mouzon J, Bachelot A, et al. (1990) In vitro fertilization: influence of women's age on pregnancy rates. *Hum Reprod* 5: 56-59
- 4) Navot D, Drews MR, Bergh PA, et al. (1994) Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril* 61: 97-101
- 5) Yuval Y, Abraham K, Amnon B, et al. (1993)

- Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effect of ovarian function. *Fertil Steril* 60: 314-318
- 6) Levran D, Ben-Shlomo I, Dor J, et al. (1991) Aging of endometrium and oocytes: observations on conception and abortion rates in an egg donation model. *Fertil Steril* 56: 1091-1094
- 7) Kodama H, Kato M, Matsui T, et al. (1991) Efficacy of a gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for in vitro fertilization. *Jpn J Fertil Steril* 36: 389-395
- 8) 児玉英也, 福田 淳, 松井俊彦 他 (1994) 秋田大学における体外受精, 1991~1993年の成績, 秋田医学 18: 391-395
- 9) Frydman R, Forman R, Belaisch-Allart J, et al. (1988) Comparison between flare up and down regulation effects of luteinizing hormone-releasing hormone agonists in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 50:471-475
- 10) Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985) Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44:493-498
- 11) Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, et al. (1993) Should we transfer bad quality embryo together with good ones to increase the number of embryos transferred and pregnancy rate in turn. *Jpn J Fertil Steril* 38: 377-380
- 12) Fleischer AC, Kalemeris GC, Machin JE, et al. (1986) Sonographic depiction of normal and abnormal endometrium with histologic correlation. *J Ultrasound Med* 5: 445-452
- 13) 吉満陽孝, 中村元一, 井村睦規 他 (1987) 超音波子宮内膜像の変化と卵巣ホルモン動態との関連性に関する研究. 日産婦誌 39: 1769-1775
- 14) 白河一郎 (1992) 自然排卵周期およびhMG-hCG排卵誘発周期における超音波子宮内膜像の変化と卵巣ホルモンの関係. 日産婦誌 44: 412-418
- 15) 廣田 穰, 吉村俊和, 白木 誠 他 (1992) 経膈超音波断層法による子宮内膜評価の正確性に関する検討. 日不妊誌 37: 35-40
- 16) Erenus M, Zouves C, Rajamahendran P, et al. (1991) The effect of embryo quality on subsequent pregnancy rates after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 56: 707-710
- 17) Shulman A, Ben NI, Ghetler Y, et al. (1993) Relationship between embryo morphology and implantation rate in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 60: 123-126
- 18) Stassen C, Camus M, Bollen N, et al. (1992) The relationship between embryo quality and the occurrence of multiple pregnancies. *Fertil Steril* 57: 626-630
- 19) Gidley-Baired AA, O'Neill C, Sinosich MJ, et al. (1986) Failure of implantation in human in vitro fertilization and embryo transfer patients: the effects of altered progesterone/estrogen ratio in human and mice. *Fertil Steril* 45: 69-74
- 20) Forman R, Belaisch-Allart J, Fries N, et al. (1988) Evidence for an adverse effect of elevated serum estradiol concentrations on embryo implantation. *Fertil Steril* 49: 118-122
- 21) 小田高久, 吉村慎一, 河野八郎 他 (1984) 体外受精胚移植において卵巣過剰刺激は着床障害の原因となるか. 日本受精着床学会雑誌 6: 94-98
- 22) Ueno J, Oehninger S, Grzyski RG, et al. (1991) Ultrasonographic appearance of the endometrium in natural and stimulated in-vitro fertilization cycles and its correlation with outcome. *Hum Reprod* 7: 901-904
- 23) Abdalla HI, Brooks AA, Johnson MR, et al. (1994) Endometrial thickness: a predictor of implantation in ovum recipients? *Hum Reprod* 9: 363-365
- 24) Glissant A, de Mouzon J, Frydman R, (1985) Ultrasound study of the endometrium during in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril* 44: 786-790
- 25) Gonen Y, Caspere RF, (1990) Prediction of implantation by the sonographic appearance of the endometrium during controlled ovarian stimulation in in vitro fertilization (IVF). *J Vitro Fertil Embryo Transfer* 7: 146-152
- 26) Check JH, Nowroozi K, Choe J, et al. (1991) Influence of endometrial thickness and echogenic patterns on pregnancy rates during in vitro fertilization. *Fertil Steril* 56: 1173-1175
- 27) Coulam CB, Bustillo M, Soenksen DM, et al. (1994) Ultrasonographic predictors of implantation after assisted reproduction. *Fertil Steril* 62: 1004-1010
- 28) Gonen Y, Casper RF, Jacobson W, et al. (1989) Endometrial thickness and growth during ovarian stimulation: a possible predictor of implantation in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 52: 446-450

(受付: 1995年5月22日)

(受理: 1995年9月25日)

Influence of aging on the levels of sex steroids and ultrasonographic image of endometrium during the mid-luteal phase in the treatment of In vitro fertilization

Jin Kumagai, Hideya Kodama, Jun Fukuda, Hiroko Karube,
Yasushi Shimizu and Toshihiko Tanaka

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

This study was aimed at investigating the influence of aging on endometrial receptivity for embryos in human in vitro fertilization (IVF) treatment.

The IVF patients, who were transferred two or three embryos with good morphological grade, were classified according to their age; A group, < 32 years old, n = 19; B group, 32 ~ 35 years old, n = 15; C group, > 35 years old, n = 20. The pregnancy rates of these groups were 58 %, 60 % and 25 % in A, B and C group, respectively, and there was a significant reduction ($p < 0.05$) in the rate in the C group than in the A or B group. However, there were no significant differences in parameters, which reflected endometrial environment during the mid-luteal phase, including serum estradiol (E_2) and progesterone (P_4) levels P_4/E_2 ratio, and endometrial thickness and echo pattern among the three groups. These results indicated that no endometrial parameters studies did not explain the reduction of pregnancy rate in the high-age (C) group.

The low pregnancy rate in the high-age group may be associated with reduction of embryonal quality, which was not evaluated by morphological grading.

Key words: implantation, endometrium, IVF-ET, sex steroids, ultrasonography

先天性精管欠損症に対する精巣上体開窓術の試み — 精巣鞘膜腔内精子貯留法 —

Epididymal Window Operation with Congenital Absence of the Vas Deferens — Tunica Vaginalis Sperm Reservoir —

大阪医科大学泌尿器科学教室

平井 景
Kei HIRAI

高崎 登
Noboru TAKASAKI

岩本 勇作
Yusaku IWAMOTO

上田 陽彦
Haruhiko UEDA

Department of Urology Osaka Medical College, Osaka 569, Japan

清水クリニック

清水 篤
Atsusi SHIMIZU

Shimizu Clinic, Osaka 569, Japan

となみクリニック

砺波 博一
Hirokazu TONAMI

Tonami Clinic, Osaka 581, Japan

先天性精管欠損症の患者から精子を得るために、精巣鞘膜腔内に精子を貯留する方法を試みた。

対象は先天性精管欠損症の患者5例である。方法は顕微鏡下に精巣上体頭部の鞘膜を約3mm切開し、精巣上体管を露出する。精巣上体管の壁を一部切開し、精巣上体管壁と精巣上体の鞘膜を8-0または9-0ナイロン糸で4点縫合した開窓部を作製し、同部を精巣鞘膜腔内に露出させる。術後、注射針にて内容を吸引し、人工授精などに供した。全例から運動精子が回収された。1回の穿刺による吸引量は0.1ml～0.9ml、精子濃度は13～300×10⁶/ml、運動率は0～61%であった。顕微授精により2例が受精したが妊娠は成立しなかった。術中、術後および穿刺による合併症はとくにみられなかった。

この術式の手技は簡単であり、頻回に運動精子を得ることが可能であると思われる。

キーワード：精管欠損症、精子貯留法、精巣上体開窓術

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 36 - 40, 1996)

緒 言

精管の閉塞を含め精子輸送路通過障害により無精子症をきたす閉塞性無精子症は、男性不妊症の約6～8%にみられ、通過障害を解除することにより治療効果が期待できる。その原因は後天的なものとし

て避妊目的で精管切断術を受けたものや、外鼠径ヘルニア、停留精巣などの鼠径部における手術後の合併症として精管の閉塞をきたすものがある。先天的なものとしては精管欠損症があり、これは閉塞性無精子症の約11～50%を占めている²⁾。多くは両側性の欠損で、精巣上体の体部、尾部の欠損をとまなう

ことが多い。

先天性精管欠損症の造精機能は一般に正常と考えられており³⁾、精子を得るために精巢上部に人工精液瘤を造設する方法や精巢上部管を直接穿刺する方法 (microepididymal sperm aspiration: MESA) がとられている。しかしながら、前者は運動性の良好な精子を得ることが困難で⁴⁾、後者は頻回に精子を回収することが困難である²⁾。このため1992年Moniら⁵⁾は先天性精管欠損症に対して、精巢鞘膜腔内に精子を貯留する方法すなわち人工素材を使用しない一種の精液瘤造設術を考案し、運動精子を頻回に得ることが可能であったと報告した。最近我々も運動性の良好な精子採取を目的として精巢上部開窓術と名付けた、Moniらに類似した方法を試みたのでその成績を報告する。

対象と方法

対象は1992年3月から1994年8月の間に当科男性不妊外来を受診した者のうち、初診時あるいは2回目の受診時に経皮的に精巢上部を26G×1/2の注射針で直接穿刺吸引し運動精子の存在が確認された5例の先天性精管欠損症の患者で、年齢は29歳から34歳で平均31歳、初診までの不妊期間は2年から5年で平均4年であった。全例、精管は両側とも触知しなかった。精巢の大きさは14 mlから20 mlで平均

17.6 ml、血中FSH値は2.3 mIU/mlから6.4 mIU/mlで平均4.1mIU/ml、精液量は全例0.5 ml以下であった。手術方法は硬膜外麻酔下に陰囊皮膚を縦に約4 cm切開し総鞘膜を開き、精巢および精巢上部を創外に脱臼する。この際、精索に精管のないことを確認した。顕微鏡下に、精巢上部の頭部の鞘膜を約3 mm切開し、精巢上部管を露出する。精巢上部管壁の一部を縦に切開し小孔(精巢上部開窓部)をつくる(図1)、この小孔と切開された精巢上部の鞘膜とを8-0または9-0ナイロン糸で4点縫合する。これを精巢上部の頭部に2か所造設する(図2)。精巢生検は術後の癒着防止のため行わない。総鞘膜、陰囊皮膚を4-0吸収糸で2層に縫合し閉創する。手術1か月後から陰囊の状態を観察し、鞘膜腔内の内容液を注射針にて吸引する。内容液の吸引については多少手技的なコツがある。内容液量はわずか1 mlほどしかないので、26G×1/2の注射針を用いて精巢上部の表面にまで達する穿刺を行い、軽度の陰圧をかけながら注射針を引くと鞘膜腔内の内容液が吸引される。運動性の良好な精子浮遊液が得られれば、精液検査後人工授精などに供する。

結 果

5例全例に、運動精子の回収が可能であった。症例1および2は本法を行った初期の症例で、貯留液

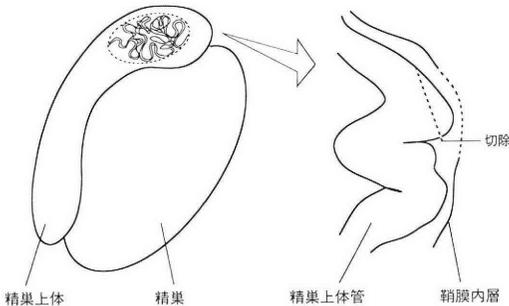


図1 精巢上部管と精巢上部管壁の切除 (文献⁵⁾より改変)

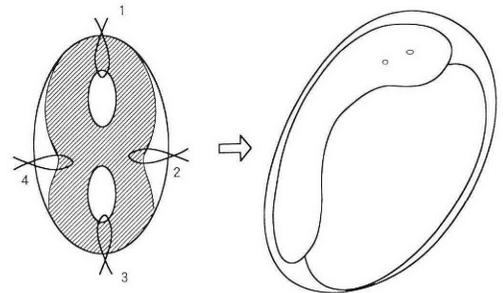


図2 精巢上部管の壁と精巢上部の鞘膜を4点縫合 (文献⁵⁾より改変)

表1 精巢上部開窓術の結果

症例	術後観察 期間(月)	初回精子 回収時期(月)	吸引回数 (回)	吸引量 (ml)	採取精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	運動率 (%)	抗精子抗体
1	26	7	10	0.3 ± 0.1	135.2 ± 88.5	24.8 ± 9.3	陰性
2	26	10	7	0.5 ± 0.3	87.5 ± 97.2	12.8 ± 6.6	陰性
3	18	5	7	0.1 ± 0.03	51.0 ± 44.8	10.0 ± 10	陰性
4	14	3	2	0.1 ± 0	20.5 ± 14.8	35.5 ± 36	陰性
5	6	3	2	0.6 ± 0.4	32.5 ± 24.7	10.0 ± 14.1	陰性

表2 回収精子による治療成績

症例	AIH		体外受精		顕微授精	
	施行回数	妊娠	施行回数	受精	施行回数	受精
1 H.H.	6	0	3	0	4	2
2 Y.N.	1	0	2	0	2	1
3 T.H.	1	0	0	0	0	0
4 Y.S.	1	0	0	0	0	0
5 H.H.	1	0	0	0	0	0

の穿刺吸引を試みたが穿刺吸引技術が未熟であったため、6か月間は吸引ができなかった。7か月目に方法の項で示した手技により吸引可能となり、精子が認められるようになったのは、症例1は7か月目で、症例2は10か月目であった。他の3例は術後1か月目より貯留液の吸引は可能であったが、精子が認められたのは術後3か月目からであった。1回の穿刺により吸引した内容量は0.1~0.9 ml、精子濃度は13~300×10⁶/ml、運動率は0~61%であった(表1)。穿刺による赤血球の混入はほとんどみられなかった。症例1に行ったハムスターテストでは侵入率20%であった。回収した精子を本学産婦人科において人工授精、体外受精、顕微授精に供したところ卵細胞質内精子注入法(ICSI)による顕微授精にて2例に受精が成功したが妊娠は成立しなかった(表2)。術後1か月ごとに血液生化学検査、抗精子抗体を検査したがとくに異常は認められなかった。また術後二次感染や陰嚢部痛、陰嚢腫大もなく、陰嚢の触診および超音波エコー検査でも特徴的な所見はなく異常は認められなかった。穿刺時に麻酔は不要で穿刺による合併症もとくにみられなかった。

考 察

先天性精管欠損症に対して、人工精液瘤と呼ばれる精液のリザーバーを精巣上体に装着し、そこに貯留した精子を回収して体外受精を試みる方法が行われたが、運動性の良好な精子浮遊液を得ることが困難で、その妊娠成功率も低い⁴⁾。当科においても6例の患者に対して独自にデザインした人工精液瘤を装着したが、人工授精可能な運動性の良好な精子が得られず、感染などによりその使用期間も短期であった⁶⁾。一方、Silberら⁷⁾は先天性精管欠損症に対して精巣上体を直接穿刺して得られた精子を体外受精に供する方法で妊娠に成功したと報告した。本邦では見玉ら⁷⁾が初めての妊娠例を報告して以来、多くの施設でこの方法が取り入れられている。しかし、この方法は出血や精巣上体の線維化が起りやすい

ため繰り返して行うことができない場合が多い。

簡単かつ頻回に精子を得るために、Moniら⁵⁾は4例の先天性精管欠損症に対して精巣鞘膜腔内に精子を貯留させる方法を考案した。この方法により、4例全例から運動精子を得ることができたとし、そのうち1例が人工授精で妊娠に成功したと報告している。我々もMoniらの方法に類似した方法を行い、施行した5例全例から運動精子の回収が可能であった。はじめて精子が回収されるようになる時期は、Moniらは術後4週から6週の間精子の回収が可能と報告しているが、我々の経験では貯留液の回収は術後1か月目から可能であったが、貯留液に精子が認められるようになったのは術後3か月目からであった。また、Moniらは単に吸引するとしか記載していないが、精子の回収には我々の行ったような工夫があるものと思われる。術後2年を経過した症例でも運動精子の回収が可能で、運動率については複数回穿刺してもほとんど差はなく約20%であった。本法は人工精液瘤造設や精巣上体管穿刺法に比べて容易であり、長期間にわたって運動精子の回収が可能であると考えられる。また術後行った血液生化学検査や抗精子抗体に異常が認められなかったことより安全な術式と思われた。しかしながら鞘膜腔内に貯留した精子がどのような影響を受けているのかは今後の検討課題と思われる。Moniらは4例中1例が人工授精により妊娠したと報告しているが、我々の場合人工授精により妊娠した症例はなかったが、顕微授精により受精の成立がみられた。精巣上体から得られた精子では、人工授精よりも最初から体外受精や顕微授精を試みるのがよいと思われる。

最近、Craftら⁸⁾が経皮的精巣上体穿刺(percutaneous epididymal sperm aspiration: PESA)によって得られた精子を用いて体外受精や顕微授精を行い良好な成績であったと報告しているが、我々の場合経皮的精巣上体穿刺は運動精子の有無を調べるために用いただけであり、得られた精子は利用していなかった。経皮的精巣上体穿刺は本法に比べて手術の必要がなく副

作用もほとんどないので今後症例を重ねて検討したいと考えている。しかし、経皮的精巣上体穿刺は穿刺部位における出血や瘢痕のため複数回行うと精子の回収が困難になると予想される。また、経皮的精巣上体穿刺はある程度精巣上体管が拡張している場合にしか適応性がないのではないかとと思われる。脊髄損傷後および後腹膜リンパ節郭清術後の射精障害などに対しては硫酸ネオスチグミンのクモ膜下注入や電気射精が行われているが、前者は高血圧や頭痛などの副作用が多く後者は射精の誘発率が悪い⁹⁾。このような症例や閉塞性無精子症に対する精路再建術の不成功例に対しても本法は試みられる価値があると思われる。

最近では顕微授精の技術の向上により、運動性のない精子でも受精可能となってきた。閉塞性無精子症や射精障害などに対して本法を試みれば、たとえ運動精子が得られなくても受精の可能性があると考えられる。

この意味においても精子を回収する方法のひとつとして本法は有用と思われる。

結 語

先天性精管欠損症の5例に対して、精巣上体開窓術と名付けた手術を行った。本法は他の術式に比べて簡単であり、術後全例から頻回かつ長期間にわたって運動精子の回収が可能であったことより有用な術式と考えられた。

本論文の要旨は、第38回日本不妊学会学術講演会(1993年、京都)および第82回日本泌尿器科学会総会(1994年、福岡)において発表した。

文 献

- 1) Greenberg SH, Lipshultz LI and Wein AJ (1978)

Experience with 425 subfertile male patients. *J Urol* 119: 507-510

- 2) Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C, et al. (1988) Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: A new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 50: 525-528
- 3) Jequier AM, Ansell ID and Bullimore NJ (1985) Congenital absence of the vasa deferentia presenting with infertility. *J Androl* 6: 15-19
- 4) Belker AM, Jimenez-Cruz DJF, Kelami A, et al. (1986) Alloplastic spermatocele: poor sperm motility in intraoperative epididymal fluid contraindicates prosthesis implantation. *J Urol* 136: 408-409
- 5) Moni VN and Lalitha PA (1992) Moni's window operation: a new surgical technique to create a sperm reservoir in congenital vasal agenesis. *J Urol* 148: 843-844
- 6) 高崎 登, 平井 景, 砺波博一 他(1990)男性不妊症の臨床的検討. *大阪医大誌* 49: 113-122
- 7) Kodama H, Kigure T, Harada T, et al. (1991) In vitro fertilization using epididymal spermatozoa for the patients with obstructive azoospermia. *Acta Obst Gynecol Jpn* 43: 1267-1269
- 8) Craft I, Khalifa Y, Tsirigotis M, et al. (1995) Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 63: 1038-1042
- 9) 小谷俊一, 成島雅博, 伊藤裕一 他(1989)人工射精法: 硫酸ネオスチグミン注入法の再評価と電気射精, パイプレーター法の検討. *日パラプレジア学会誌* 2: 262-263

(受付: 1995年7月17日)

(受理: 1995年9月25日)

Epididymal window operation with congenital absence of the vas deferens — Tunica vaginalis sperm reservoir —

Kei Hirai, Noboru Takasaki, Yusaku Iwamoto and Haruhiko Ueda

Department of Urology Osaka Medical College, Osaka 569, Japan

Atsusi Shimizu

Shimizu Clinic, Osaka 569, Japan

Hirokazu Tonami

Tonami Clinic, Osaka 581, Japan

Therapy for the patients with congenital absence of the vas deferens was limited to alloplastic spermatocele or

epididymal sperm aspiration in conjunction with IVF. However, new surgical technique, "sperm reservoir", has been recently described. We tried this procedure on 5 patients using microsurgical technique. They have undergone epididymal tubule muralization to the tunica vaginalis. Aspiration was successful in all patients. Yields were ranged from 0.1 ml to 0.9 ml with the sperm count of 13 to $300 \times 10^6/\text{ml}$ and up to 61 % motility. We could get insemination in two patients.

This procedure is easy and may become a useful alternative to epididymal aspiration.

Key words: sperm reservoir, absence of the vas deferens, epididymal window operation

ブタ卵母細胞の体外成熟に及ぼす Phorbol 12-Myristate, 13-Acetateの影響

The Effect of Phorbol 12-Myristate, 13-Acetate on the Maturation of Pig Oocytes Cultured in Vitro

信州大学農学部資源開発学教室

辻 井 弘 忠 笠 井 徹

Hirota TSUJII Tooru KASAI

Department of Agriculture Biotechnology

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

ブタ卵母細胞の体外成熟において、phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA) を成熟培地に添加して、実験 1) 卵母細胞の成熟に及ぼす影響、実験 2) 卵母細胞内 PKC 活性に及ぼす影響について検討した。成熟培地は TCM199 にペニシリン G 75 mg/l, 硫酸ストレプトマイシン 50 mg/l, 乳酸ナトリウム 3.4 ml/l, ビルビン酸ナトリウム 100 mg/l, 重炭酸ナトリウム 2.2 g/l, PVA 1 mg/ml, PMSG 10 IU/ml, hCG 10 IU/ml, E₂ 1 μg/ml, 10% pFF を添加して用いた。実験 1 a) では成熟培養開始から、それぞれ 0, 50, 100, 200, 400nM PMA を添加し成熟培養 50 時間目に卵母細胞の成熟を判定したところ、Control に比べ、100nM 添加区以外で GVBD が有意に高まり (P < 0.05), 400nM 添加区で有意に高い成熟率が得られた (P < 0.05)。また極体の放出は 100, 200, 400nM 添加区で有意に高まった (P < 0.05)。実験 1 b) では、200nM PMA を成熟培養開始 0, 10, 20, 30, 40 時間目から添加したところ、培養開始 20 時間目から添加した区で最も成熟に好影響を与えた。実験 1 c) では、成熟培養 20 時間目に卵丘細胞を剥離後、PMA 添加の影響を調べた結果、卵丘細胞を剥離した卵母細胞では、PMA の有無にかかわらず、高率な成熟が起こった (P < 0.05)。実験 2 a) では成熟培養開始から PMA 存在下で卵母細胞を培養し、経時的に卵母細胞内の PKC 活性の測定を行った。実験 2 a) では Control と比べ PMA 添加区の卵母細胞内 PKC 活性に差は見られなかった。実験 2 b) では、成熟培養開始 20 時間目から PMA を添加し継続して 50 時間まで培養し、添加時から培養終了まで経時的に卵母細胞内 PKC 活性を測定したところ、培養開始 40 時間における PKC 活性が Control に比べ PMA 添加区で有意に低い結果を得た (P < 0.05)。

これらのことから、ブタ卵母細胞の体外成熟では、PMA により卵母細胞をとりまく卵丘細胞内を活性化することにより減数分裂再開が高率に起こり、成熟途中における卵丘細胞と卵母細胞の結合解離および、それにもなう卵母細胞内の直接的な PKC 活性の変動が卵母細胞の成熟に有効であることが示された。また、これまで不明であった体外成熟培養における卵母細胞内 PKC 活性についても、成熟培養中に一定の傾向で変化することが判明した。

キーワード：PMA, ブタ卵母細胞, 体外成熟, PKC 活性

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 41 - 48, 1996)

緒 言

ブタ卵母細胞の体外成熟について多くの報告があり¹⁻⁴⁾、これらの報告では、排卵前卵母細胞の成熟過程から得た知見をもとに、ブタ卵母細胞の体外成

熟培地にはホルモン⁵⁾、血清⁶⁾などを添加して用いられているが、得られた成熟卵子を体外受精に供した場合、異常受精が多発する¹⁻⁴⁾。この異常受精の原因のひとつとして細胞内蛋白のリン酸化が不完全であることが示唆されている^{7,8)}。ブタ卵母細胞の体

外成熟における細胞内のリン酸化についてはいまだ不明な点が多い。

Xenopusなどの卵成熟を中心的に制御する因子としてMPF (Maturation/M-phase-promoting-factor) が同定されており⁹⁾, その卵成熟制御の本質は, 細胞内の蛋白質リン酸化である。卵母細胞において減数分裂が再開および進行する時に細胞内で起こる蛋白質リン酸化はセリン/スレオニンもしくはチロシンキナーゼによって引き起こされることが知られている^{10,11,12)}。また, これらのキナーゼはMPFを中心としたキナーゼカスケードを形成している¹³⁾。ブタ卵母細胞の体外成熟においても減数分裂再開および第2分裂中期までの減数分裂の進行には, 他の真核生物および脊椎動物の細胞増殖, 卵成熟と同様にMPFに代表される細胞内キナーゼの活性化/不活性化に依存するところが大きいと考えられるが, MPFを介した一連の減数分裂ステージ (GV, GVBD, M I, A I, T I, M II) の転移に介在する多数のキナーゼに関して, その経路の完全な同定はない。

古くから知られるCキナーゼ (PKC) は, セリン/スレオニンキナーゼのひとつであり, 細胞内の多くの蛋白質をその基質とすることが報告されている¹⁴⁾。これまでMPFキナーゼカスケードの下流に存在するMAPキナーゼをPKCがリン酸化すると報告もあり¹⁵⁾, 卵母細胞の成熟に関与するPKCの動態についての検討が必要であると思われる。

そこで本研究では, ブタ卵母細胞の減数分裂再開および減数分裂の進行におけるPKCに着目し, この酵素を特異的に活性化する外部因子として, ホルボルエステル (PMA: phorbol 12-myristate, 13-acetate)^{14,16)}を成熟培地に添加した場合のブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響を調べた。また, 体外成熟中のブタ卵母細胞内PKC活性についても測定した。

材料および方法

卵母細胞の採取

食肉センターにて, ハンプシャー, 大ヨークおよびランドレースを主体とした交雑種約100頭から黄体および白体を有さない卵巣のみを採取し, 27~30℃に保温した0.9%生理食塩水に浸した状態で研究室に持ち帰った。あらかじめ研究室で38℃に温めておいた生理食塩水で持ち帰った卵巣を3回洗浄した。卵巣表面に存在する直径2~5 mmの卵胞の内容物を22 Gの針をつけた5 ml ディスポーザブルシリンジで吸引し, これを10 ml 試験管に集めた。このとき卵胞内容物の損傷を防ぐために操作は緩やかに行った。

吸引終了後, 試験管を38℃のウォーターバス中に5分間静置し, 卵胞内容物が沈殿した後に上清を捨て, 5 mlの洗浄液を加え再び懸濁した。この操作を3回繰り返し卵胞内容物を洗浄した。洗浄終了後, 卵胞内容物をシャーレ上に広げ実体顕微鏡下で卵子を卵子操作液中へ移した。緊密な数層の卵丘細胞に包まれ, 黒く均一な細胞質をもつ卵母細胞のみを集め, 成熟培養液で2回洗浄し実験1および2の成熟培養に供した。

培養液および試薬

卵胞内容物の洗浄および卵子操作液はTCM199 (SIGMA) にペニシリンG 75 mg/l, 硫酸ストレプトマイシン 50 mg/l, 乳酸ナトリウム (60%シロップ) 3.4 ml/l, ピルビン酸ナトリウム 100 mg/l, 重炭酸ナトリウム 2.2 g/l およびPVA 1 mg/mlを添加したものを用い, これをPVA-199とした。卵母細胞の成熟培養液 (mM-199) は, PVA-199にPMSG 10 IU/ml (ビーメックス, 三共ゾーキ), hCG 10 IU/ml (プペローゲン, 三共ゾーキ), E₂ (エストラジオール 17β) 1 μg/ml, 10% (V/V) (ブタ卵胞液) pFFを添加して用いた。

実験で用いたPKC activatorはPMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate; SIGMA) を90%エタノールに溶解し, これをmM-199に添加して用いた。

卵母細胞の成熟培養

成熟培養は, ミネラルオイル下のmM199 100 μlドロップに15個の卵母細胞を導入し, 37℃, 5% CO₂, 95%空気の条件下で50時間行った。実験1-b, dおよび実験2-bにおいてPMAの添加は, それぞれの実験区で設定した時間に卵母細胞を取り出し, あらかじめインキュベーター内に用意した添加培地に移し替えることにより行った。

卵母細胞成熟の判定

成熟培養50時間後に, 卵子をアセトアルコール (エタノール: 酢酸=3:1) で48時間以上固定し, 成熟率の判定のための観察に供した。脱脂・固定終了後, 卵子を1%アセトアルセインで染色し, 位相差光学顕微鏡を用いて400から600倍で観察を行った。それぞれの実験で得られた成熟培養後の卵子は, それぞれの核相により卵核胞 (GV) の崩壊をGVBD, 判定した卵子中の第1極体を放出 (polar body emission) した卵子をM IIとし, 第一減数分裂後期 (A I) からM II期であるものを成熟とみなした。

実験 1) ブタ卵母細胞の体外成熟に及ぼす Protein Kinase C activatorの影響

a) 異なるPMA濃度がブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

成熟培養開始時の卵母細胞をそれぞれ0nM (Control), 50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nMの5区のPMA添加培地下で50時間培養した。

b) PMA添加時間の違いがブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

培養開始から培養終了までPMA無添加区をControlとし、培養開始(0~50 hr), 培養開始10時間(10~50 hr), 20時間(20~50 hr), 30時間(30~50 hr), 40時間(40~50 hr)から培養終了までの5区で200 nM PMAを添加した。

c) 成熟培養20時間目に体外成熟培地へ添加したPMAが卵丘細胞裸化ブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

成熟培養20時間目に0.2%ヒアルロニダーゼ添加mM-199処理およびピペッティングにより卵母細胞より卵丘細胞を除去した。卵丘細胞裸化卵母細胞(De-nuded)を無添加もしくはPMA添加培地に導入し、継続して50時間まで培養した。

実験2) ブタ卵母細胞の体外成熟中のProtein Kinase C活性測定

試薬

AssayにはProtein kinase C enzyme assay system (code RPN77a; Amersham)を用いた。また、Assayに供する卵母細胞の前処理にはTris-buffer (50 mM Tris/5 mM EDTA/10 mM EGTA/10 mM Benzamidine/50 μ g/ml PMSF/0.3% (w/v) 2-mercaptoethanol)を用い、これをSample bufferとした。

卵子の前処理

卵母細胞-卵丘細胞複合体を成熟培養液から取り出し、ヒアルロニダーゼおよびピペッティングにより卵丘細胞を取り除いた。卵母細胞を200 cells/mlの濃度でSample buffer (4°C)に導入し、30秒間ソニケーション(4°C)した後、15,000 rpm, 4°C, 60分遠心分離し、これをPKC sampleとした。

PKC assay

AssayはProtein kinase C enzyme assay system (code RPN77a; Amersham)のプロトコールに従い、反応時間は、それぞれのマイクロチューブに32P-ATPを導入した時点より15分とした。反応の終了後、反応液をbinding paper (10×10 mm)にそれぞれ60 μ lずつのせ、完全に乾燥させた後、10 ml/binding paperの5% acetic acidで非結合32P-ATPを洗い、シンチレーションバイアルに静かに導入した。3 ml トルエンシンチラントを加え、活性測定まで冷暗所で保存した。

PKC活性の評価

PKC活性は、液体シンチレーションカウンターに

より測定した結果より、合成基質ペプチドの単位時間内でのリン酸化程度を算出し、Mean \pm S.D. pmols/minで示した。

PKC活性測定はPKC activator添加開始時間の異なる以下の2通りで行った。a) 成熟培養開始時から培養終了まで、無添加(Control), PMA添加で卵母細胞-卵丘細胞複合体を培養し、培養開始0, 5, 10, 20, 30, 40, 50時間における卵母細胞内のPKC活性を調べた。b) 成熟培養20時間目にa)と同様の区を設け、培養開始20, 25, 30, 40, 50時間における卵母細胞内のPKC活性を調べた。

統計処理

実験1における各実験区のデータは χ^2 検定法を用いて分析した。また実験2におけるPKC活性はt検定を用い $p < 0.05$ を有意差と認めた。

結 果

実験1) 体外成熟に及ぼすProtein Kinase C activatorの影響

a) 異なるPMA濃度がブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

Table 1に示すように、Controlに比べ100 nM添加区以外のすべての区で有意に高いGVBDがみられた($p < 0.05$)。また、成熟率については、Control 50.0% (25/50)に比べ400 nM添加区70.9% (39/55)で有意に高い成熟率が得られた($P < 0.05$)。供試卵のうち、極体を放出した卵子(M II)の割合をFig. 1に示す。Control (20.0%)と比較し、100 nM 42.9%, 200 nM (46.0%)および400 nM (52.7%)添加区において有意に高いM IIが得られた($p < 0.05$)。

Table 1 The effect of various concentration of PMA added to maturation medium on the nuclear maturation rate of pig oocytes cultured in vitro

PMA	n	No. of oocytes (%)	
		GVBD*	Matured**
Control	50	32 (64.0) ^a	25 (50.0) ^a
50 nM	52	44 (84.6) ^b	25 (48.1) ^a
100 nM	56	46 (82.1) ^{ab}	34 (60.7) ^{ab}
200 nM	50	42 (84.0) ^b	31 (62.0) ^{ab}
400 nM	55	51 (92.7) ^b	39 (70.9) ^b

*: The number of oocytes developed beyond GVBD stage after 50hr maturation in culture.

** : The number of oocytes reached A I ~ M II stage of their nuclear status after 50hr culture

Different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

b) PMA添加時間の違いがブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

a)においてブタ卵母細胞の体外成熟には200 nMおよび400 nM PMAが有効であると考え、次に成熟培養中の異なる時間区でのPMAの影響を検討した。Table 2に示すように、40~50 hr区を除くすべての区でControlに比べて有意に高いGVBDがみられた ($p < 0.05$)。成熟率はControl (49.2%) に比べて10~50 hr (76.8%), 20~50 hr (75.6%), 30~50 hr (69.8%) 区に

おけるPMA添加により有意に高い結果が得られた ($p < 0.05$)。またM II 率をFig. 2に示す。Control (28.3%) と比べ0~50hr (42.1%) および20~50hr (61.0%) 区で有意に高い結果が得られた ($p < 0.05$)。

c) 成熟培養20時間目に体外成熟培地へ添加したPMAが卵丘細胞裸化ブタ卵母細胞の成熟に及ぼす影響

実験a, b)では、成熟培養20時間目からの200 nMおよび400 nM PMA添加が有効であることがわかったが、これらの実験では卵丘細胞-卵母細胞複合体を用いたため、PMAが、卵丘細胞層に対して作用したのか、卵母細胞へ直接的に作用したかについて不明であったため、卵丘細胞を裸化して200 nM PMA添加の影響について検討した。成熟培養20時間目に

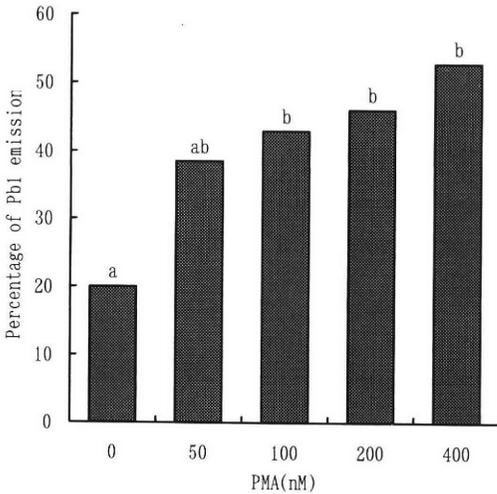


Fig. 1 The effect of various concentration of PMA added to maturation medium on the emission of the first polar body (Pb1) of pig oocytes cultured in vitro

Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

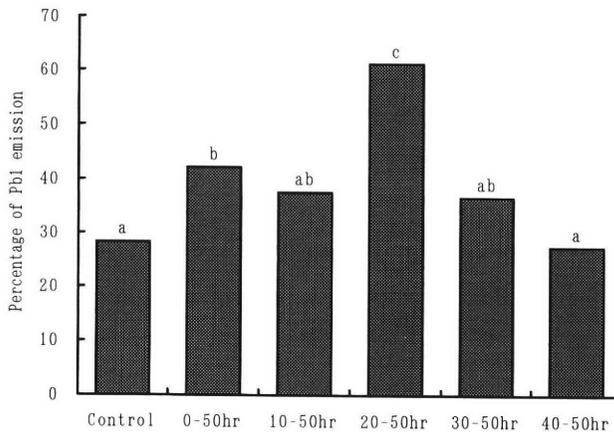


Fig. 2 The first polar body (Pb1) emission of pig oocytes cultured for different additional period of time with PMA (200nM)

Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Table 2 The effect of 200 nM PMA added at various times on the nuclear maturation rate of pig oocytes cultured in vitro

Time	n	No. of oocytes (%)	
		GVBD*	Matured**
Control	120	83 (69.2) a	59 (49.2) ad
0~50 hr	107	90 (84.1) b	64 (59.8) ab
10~50 hr	112	105 (93.7) c	86 (76.8) c
20~50 hr	123	117 (95.1) c	93 (75.6) c
30~50 hr	126	120 (95.2) c	88 (69.8) bc
40~50 hr	110	80 (72.7) ab	45 (40.9) d

*: The number of oocytes developed beyond GVBD stage after 50hr maturation in culture.

** : The number of oocytes reached A I ~ M II stage of their nuclear status after 50hr culture

Different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

卵丘細胞を裸化し、その後PMA無添加、PMA添加のそれぞれの条件で培養した場合の成熟結果をTable 3に示す。卵丘細胞裸化卵母細胞におけるGVBDは、それぞれControl (97.2%), PMA添加 (97.6%)と実験区間に差はなかった。成熟率についてもControl (97.2%), PMA添加 (97.6%)区と差は見られなかった。

実験2) ブタ卵母細胞の体外成熟中のProtein Kinase C活性測定

a) 成熟培養開始時に添加したPMAが卵母細胞内PKC活性に及ぼす影響

成熟培養から50時間までの卵母細胞内PKC活性をFig. 3に示す。PKC活性は培養開始0時間から5時間もしくは10時間にかけて減少し、20時間で上昇する傾向がみられた。測定を行った全区におけるPKC活性化程度にはControlと比べ有意差はなかった。

b) 成熟培養20時間目に添加したPMAが卵母細胞内PKC活性に及ぼす影響

実験1において成熟培養20時間目からのPKC acti-

vator添加が卵母細胞の成熟に有効であったことから、この条件での卵母細胞内PKC活性について調べた。成熟培養20時間目にPKC activatorを添加した場合の添加時から50時間までの卵母細胞内PKC活性をFig. 4に示す。20時間以降におけるControlの卵母細胞内PKC活性には緩やかな上昇がみられたが、40hr以降減少した。また40時間におけるPKC活性はControl (0.563 ± 0.011 pmols/min)に比べ、PMA添加区 (0.399 ± 0.018 pmols/min)と有意に低いPKC活性が得られた ($p < 0.05$)。

考 察

本研究の実験1a)において成熟培養開始からPMA添加培地で培養した場合、減数分裂の再開および進行に好影響を及ぼし、濃度依存の傾向で第一極体の放出が高まった。しかし、この時卵母細胞内のPKC活性にControlとの差は見られなかった(実験2a)。これらの結果から、PMAを添加することにより卵母細胞をとりまく卵丘細胞が活性化された後、何らかの因子が卵母細胞内に影響を与え減数分裂再開および進行が誘導されたと推察された。卵母細胞の減数分裂再開および進行を中心的になう細胞内因子は卵成熟促進因子(MPF)であるが、MPFの制御には、c-mos遺伝子産物(Mos)が非常に重要であり、この蛋白の生理的意義がMPF活性化経路の上流に位置することが報告されている¹⁰⁾。c-mos mRNAは、雌性生殖組織・細胞でとくに高く発現し、卵成熟期にはMosが合成される。この合成は、卵母細胞の減数分裂再開を促進する細胞外因子の刺激により引き起こされ、GVBDの誘起、つまり減数分裂の再開には

Table 3 The effect of PMA added to maturation medium at 20 ~ 50hr on the maturation of pig oocytes freed from cumulus cells

Group	PMA	n	No. of oocytes (%)	
			GVBD*	Matured**
Denuded	-	36	35 (97.2) ^b	35 (97.2) ^b
	+	42	41 (97.6) ^b	41 (97.6) ^b

*: The number of oocytes developed beyond GVBD stage after 50hr maturation in culture.

** : The number of oocytes reached A I ~ M II stage of their nuclear status after 50hr culture.

Different superscripts in the same column are significantly different ($p < 0.05$).

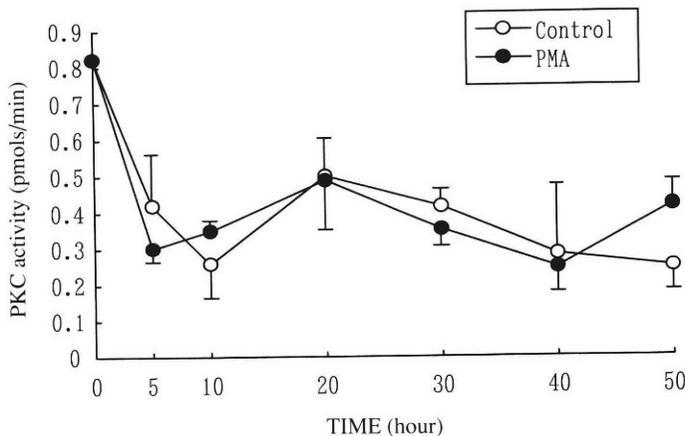


Fig. 3 The effect of PMA on the PKC activity within oocytes cultured in vitro for 50hr
Each point represents the mean, and the vertical line indicates the S.D. from two independent experiments.

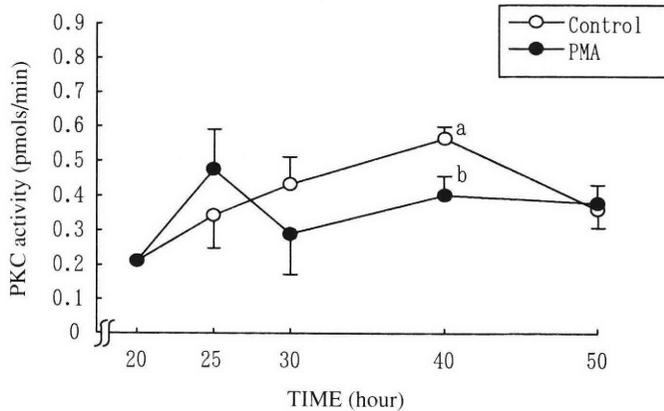


Fig. 4 The effect of PMA added between 20hr and 50hr of culture on the PMA within oocytes cultured in vitro for 50hr. Each point represents the mean, and the vertical line indicates the S.D. from two independent experiments. Different letters indicate a significant difference ($P < 0.05$).

Mosが必須であることが知られている¹⁰⁾。またPMAはブタ顆粒膜細胞の蛋白合成を活性化することが報告されており¹⁷⁾、本実験で用いた卵丘細胞層でも同様に蛋白合成が刺激を受けたと思われる。これらのことからPMA添加による高率なGVBDおよび成熟の向上は、卵丘細胞から伝達された、何らかの刺激による卵母細胞内のMosなどの蛋白合成による可能性が推察された。

実験1b)において、成熟培養時間を10時間で区切った場合、GVBDは成熟培養開始から40時間までのPMA添加により向上し、A1～MⅡにみる核成熟は、成熟培養開始10時間から40時間のPMA添加によりControlと比べ有意に高まった。また、成熟培養開始20時間から30時間におけるPMA添加は、顕著に第1極体の放出を誘導した。成熟培養20時間で卵母細胞の核成熟を確認したところすべてが卵核期であった。これらの結果から、PMAは減数分裂休止の状態にある卵母細胞を刺激し、GVBDを誘導し、MⅡへの転移に有効であることが示された。実験2b)において培養開始20時間からのPMA添加は卵母細胞内のPKC活性に影響した。Control区の卵母細胞内PKC活性は成熟培養20時間から40時間までに上昇し、その後下降した。このことからPKC activatorの添加が卵母細胞内PKC活性に影響することが判明した。このPKC活性の上昇は、PMA添加区では、40時間以前に見られ、Control区でPKC活性上昇のピークとなる40時間においては有意に低いPKC活性を示した。これらのことから、成熟培養20時間に添加したPMAは卵母細胞内に直接的に働き、成熟培養20時間以降

の細胞内PKC活性の上昇をControlよりも早い時期に引き起こした結果、第1極体放出までの減数分裂の完了を高率に誘導したと推察された。このようなPKC activatorの直接的な作用は卵母細胞内のPKC標的蛋白へ伝播される。このPKC標的蛋白のひとつにMAPキナーゼがあげられるが¹³⁾、このMAPキナーゼはMPFの下流に位置し、分裂期の紡錘体形成に重要な役割を持つことが報告されている^{11, 12, 15)}。本実験の成熟培養20時間におけるPMA添加は、卵母細胞内PKC活性を亢進し、MAPキナーゼ活性化によるM期以降への進行を効率よく引き起こした可能性が推察された。

卵丘細胞裸化 (Denuded) 卵母細胞におけるGVBDに関して、ControlとPMA添加区に有意な差はみられなかった。しかし無処理の卵母細胞と比べ高いGVBDが得られた。分裂前期前半におこる減数分裂の休止が何に起因するかという問題について、この時期の卵母細胞をとりまく環境に着目すると、卵胞の発育とともに顆粒膜細胞は有糸分裂増殖により多層の顆粒膜 (membrana granulosa) を形成する。この時期の卵母細胞は顆粒膜細胞に接着し、卵胞外の何らかの因子は、顆粒膜細胞を経由して卵母細胞にいたると考えられる。体内においてホルモンの影響を受けた卵胞内の顆粒膜細胞および卵子周辺の卵丘細胞は形態的变化をとげると同時に顆粒膜細胞層と卵丘細胞層の間の接着細胞数が減少する¹⁸⁾。顆粒膜細胞に卵丘細胞-卵母細胞複合体を接着させて体外成熟させた場合に顕著な減数分裂再開始の抑制が報告されており¹⁹⁾、顆粒膜細胞は細胞表面に減数分裂再開始抑制

因子を産生し、接着した細胞を通して卵母細胞に作用すること、また減数分裂再開にあたっては、この抑制因子の作用を抑制する二重の機構があり、減数分裂の進行には卵丘細胞および顆粒膜細胞の膨潤による減数分裂再開抑制因子の伝達阻止が起こることが示唆されている¹⁹⁾。実験1e)において成熟培養20時間に卵丘細胞を剥離し、卵母細胞のみで培養したところ、減数分裂を完了した卵子が高率に見られた。これは、減数分裂再開(進行)抑制因子の影響から卵母細胞を解放したことに起因すると思われた。またPMA添加数時間後から卵丘細胞-卵母細胞の結合に形態的な変化が見られ、添加10時間以降では卵丘細胞の解離は卵母細胞に接している放射冠にまで達していたことから、PMAの卵母細胞-卵丘細胞への影響は、卵丘細胞の形態的变化を促進することによる卵丘細胞と卵母細胞間の物質移動の遮断に起因した可能性も推察された。

本実験で得られた結果より、ブタ卵母細胞の体外成熟においてPKCが減数分裂を誘導すること、成熟培養中の卵母細胞内でPKC活性が変動することが判明した。またPMAの刺激により卵丘細胞から減数分裂再開を誘起する何らかの物質が産生されることが推察されたが、今後この物質の同定およびMosなどの減数分裂進行に関与する卵母細胞内の物質との関連についての検討が必要であると思われた。さらにFBS添加時のPKC活性化以外の細胞内キナーゼの動態についても同時に検討する必要があると考えられた。

文 献

- Edwards RG (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. *Nature* 208: 349-351
- Foote WD and Thibault C (1969) Recherches experimentales sur la maturation in vitro des oocytes de truie et de veau. *Ann Biol Anim Bioch Biophys* 9: 329-349
- Mcgaughey RW and Polge C (1971) Cytogenetic analysis of pig oocytes matured in vitro. *J Exp Zool* 170: 383-396
- Motlik J, Crozet N, Fulka J (1984) Meiotic competence in vitro of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J Reprd Fertil* 72: 323-328
- Funahashi H and Day BN (1993) Effect of the duration of exposure to hormone supplements on cytoplasmic maturation of pig oocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 98: 179-185
- Funahashi H and Day BN (1993) Effect of different serum supplements in maturation medium on meiotic and cytoplasmic maturation of pig oocytes. *Theriogenology* 39: 965-973
- Osborn JC and Moor RM (1983) The role of steroid signals in the maturation of mammalian oocytes. *Journal of Steroid Biochemistry* 19: 133-137
- Hylka VW and diZerega GS (1990) Granulosa cells from pig follicles of different sizes demonstrate maturational differences in their steroidogenic responses to FSH, calcium ionophore A23187 and phorbol diester. *J Reprod Fertil* 89: 181-191
- 山下正兼, 長濱嘉孝 (1992) 卵成熟におけるMPFの形成, 活性化, 作用, 消失機構. *実験医学* 10(9): 51-57
- 佐方功幸 (1992) c-mos産物の発現制御と機能. *実験医学*, 10(9): 137-145
- Gotoh Y, Moriyama K, Matsuda S, et al. (1991) Xenopus M phase MAP kinase: isolation of its cDNA and activation by MPF. *EMBO J* 10: 2661-2668
- Gotoh Y, Nishida E, Matsuda S, et al. (1991) In vitro effects on microtubule dynamics of purified Xenopus M phase-activated MAP kinase. *Nature* 349: 251-254
- 後藤由季子, 西田栄介 (1992) MAPキナーゼの活性化と機能. *実験医学* 10(9): 70-77
- 黒木登志夫, 笠原浩二 (1991) CキナーゼとCキナーゼ標的蛋白. *実験医学* 9(13): 137-144
- 後藤由季子, 西田栄介 (1991) MAPキナーゼと細胞周期制御. *実験医学* 9(13): 159-164
- 福本康夫, 星島正彦, 高井義美 (1989) 細胞工学別冊・細胞増殖と細胞内情報伝達機構. 新井賢一編, 秀潤社, 東京, pp53-62
- Lindsell CE, Misra V and Murphy BD (1993) Regulation of follistatin messenger ribonucleic acid in porcine granulosa cells by epidermal growth factor and the protein kinase-C pathway. *Endocrinology*, 132: 1630-1636
- 鈴木秋悦 (1981) 哺乳動物の初期発生. 卵子. 妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明 他編, 理工学社, 東京, pp23-32
- Sato E, Ishibashi T and Iritani A (1982) Meiotic arresting substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis. In: Channing CP and Segal SJ (eds), *Intraovarian Control Mechanism*. Plenum Press, New York, pp161-173

(受付: 1995年5月18日)

(受理: 1995年9月27日)

The effect of phorbol 12-myristate, 13-acetate on the maturation of pig oocytes cultured in vitro

Hirotada Tsujii and Tooru Kasai

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

This experiment was conducted to study the effect of phorbol 12-myristate, 13-acetate (PMA) on the nuclear maturation (Experiment 1) and protein kinase C (PKC) activity within the oocytes (Experiment 2) of pig during in vitro culture. The medium used for this experiment was modified TCM199. In experiment 1, firstly pig oocytes were cultured with PMA (0, 50, 100, 200 and 400nM) for 50hr. In case of 50, 200, and 400nM PMA added to culture medium, the rate of GVBD had improved ($p < 0.05$) and addition of 400nM PMA had improved the rate of maturation ($p < 0.05$). The emission of the first polar body was stimulated by the addition of PMA at the concentration of 100, 200, 400nM ($p < 0.05$). In the second part of experiment 1, 200nM PMA was added to culture at various times and we found that the addition of PMA between 20 to 50hr was the most effective for pig oocyte maturation in vitro. In the third part of experiment 1, the effect of 200nM PMA added were tested on pig oocytes that were freed from cumulus cells at 20hr in vitro culture. The rate of GVBD and maturation was higher regardless of PMA in the case of oocytes culture without cumulus cells. In experiment 2, firstly the effect of PMA added to culture medium between 0 to 50hr and secondly between 20 to 50hr were examined. PMA added between 20 to 50hr tended to hasten the time of maximum PKC activity within oocyte. On the other hand, PKC activity at 40hr of culture significantly lower in PMA added compared to control group ($p < 0.05$).

These results indicate that PMA added to maturation medium stimulated the activity of cumulus oophorus around the oocyte and then the meiotic arrest of pig oocyte had decreased. On the other hand, disconnection of cumulus cells from oocyte and increasing of PKC activity by addition of PMA were effective for meiotic resumption of pig oocyte cultured in vitro. Besides it is found that PKC activity within pig oocyte would change with a certain tendency during maturation culture in vitro.

Key words: pig oocyte, IVM, PKC activity

精路通過障害に対する 精巣鞘膜腔内精子貯留法 (Moni's window operation) の経験

Experience of Moni's Window Operation for Obstructive Azoospermia

金沢大学医学部泌尿器科学教室

天 野 俊 康

Toshiyasu AMANO

中 村 靖 夫

Yasuo NAKAMURA

徳 永 周 二

Shuji TOKUNAGA

池 田 大 助

Daisuke IKEDA

伊 藤 秀 明

Hideaki ITO

大 川 光 央

Mitsuo OHKAWA

Department of Urology

School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

金沢大学医学部眼科学教室

白 尾 裕

Yutaka SHIRAO

Department Ophthalmology

School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan

広範な精路通過障害に対し精巣鞘膜腔内精子貯留法 (Moni's window operation) を試み、その結果および今後の展望につき報告する。

症例1は、32歳男性。先天性精管欠損症による無精子症に対し精巣鞘膜腔内精子貯留法を施行したが、精子回収はできなかった。症例2は、30歳男性。2歳時に両側ヘルニア根治術を受けた。両側精管の完全閉塞を認め、本術式を行った。4 ml, 4×10^5 ml, 運動率0%の精子が回収されたが、AIHには至らなかった。本術式は異物を使うことなく比較的容易に施行でき、成功した場合何度も精子回収が可能とされており、妊娠例も報告されている。

今後、精巣上体管の切開方向、切開箇所を増加などの術式の工夫や、術前精巣生検をしないまたは針生検にする、さらにIVF-ETの応用などにて、成績向上が期待され、今後の改良によって、広範な精路通過障害の1治療法になりうるものと考えられた。

キーワード：精巣鞘膜腔内精子貯留法、男性不妊症、閉塞性無精子症

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 49 - 53, 1996)

緒 言

男性不妊症の原因として精路閉塞および欠損は1.4～2.0%程度¹⁾とされる。最近の我々の統計でも男子不妊症の2.1%が精路通過障害で、その60%が先天性精管欠損症であった²⁾。先天性精管欠損症など広範な精路通過障害に対する治療法は、人工精液瘤造設術などが行われてきたが、妊娠の成立は容易ではな

い³⁻⁶⁾。1992年Moniら⁷⁾は、精巣上体管を精巣鞘膜腔内に開放し、そこから精子を回収する方法を報告した。今回我々は、2症例に対し精巣鞘膜腔内精子貯留法 (Moni's window operation) を行ったので報告する。

対象および方法

症例1) 患者：32歳、男性

主訴：無精子症の精査、加療

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：結婚後1年経ても挙子なく、近医(産婦人科)受診したところ無精子症を指摘され、1994年3月29日精査、加療のため当科を受診した。

現症：右精巣容量は12 ml、左精巣は9 mlで弾性硬に触れたが、両側精管は触知できなかった。前立腺は正常であった。

精液所見：精液量0.3 ml、精子濃度0/mlと無精子症であった。

内分泌学的検査：LH3.1mIU/ml(正常値0.6～16.8)、FSH 10.3 mIU/ml(正常値2.7～22.9)、PRL11.2 ng/ml(正常値2.3～14.6)、Testosterone 671.8 ng/dl(正常値270～1070)。末梢血リンパ球培養による染色体検査は46,XYと正常男子型であった。

経過：1994年4月18日精巣生検の所見は、両側とも基底膜の肥厚や精細管上皮の一部脱落はあるものの、Leydig細胞の増殖はなく、精細管に精子が認められ、Johnsen score 9と考えられた(図1)。精管は両側とも欠損していた。以上より両側精管欠損症による無精子症と診断された。1994年10月5日右側に精巣鞘膜腔内精子貯留法を施行した。腰椎麻酔下に右陰囊皮膚を切開し、総鞘膜、精巣鞘膜外層を開くと、拡張した精巣上体管が精巣鞘膜内層を通じて透視できた。顕微鏡下に精巣鞘膜内層を切開し、精巣上体頭部にて精巣上体管を剝離し穿刺したところ運動性はないが精子が確認された。そこで精巣上体管に約5 mmの縦切開を加え、精巣鞘膜内層に8-0ナイロン糸にて4点固定し、さらに余剰の精巣鞘膜内層も縫合した(図2)。精巣鞘膜外層、総鞘膜、皮下および皮膚を閉じ手術を終了した。

術後約1か月頃より陰囊部超音波検査にて約0.5 mlのecho free space認められたが(図3)、その後容積の増大がなく、術後4か月の時点で穿刺を試みたが精子の回収はできなかった。

症例2) 患者：30歳、男性

主訴：男子不妊症の精査、加療

既往歴：2歳時、両側ヘルニア根治術。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：結婚後1年経ても挙子なく、妻は近医(産婦人科)にて異常なしとされ、夫側の精査、加療のため1994年10月7日当科を受診した。

現症：右精巣容量は26 ml、左精巣は22 mlで弾性硬に触れ、grade IIの左精索静脈瘤を認めた。前立腺は正常であった。

精液所見：精液量3.1 ml、精子濃度0/mlと無精子

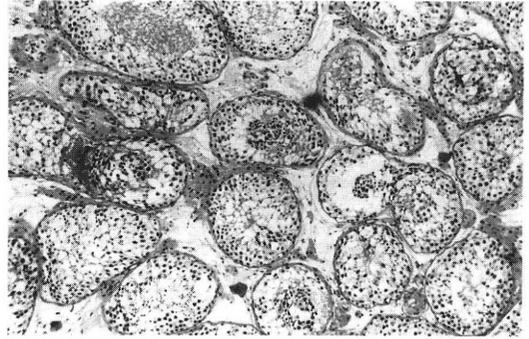


図1 症例1 精巣生検所見(×40)

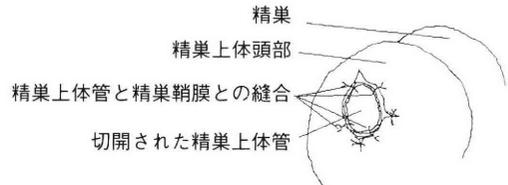


図2 症例1 顕微鏡下手術の所見のシェーマ



図3 症例1 術後陰囊部超音波検査所見
右精巣頭部に接しecho free spaceが認められた。

症であった。

内分泌学的検査：LH 2.1 mIU/ml, FSH 6.6 mIU/ml, PRL 13.6ng/ml, Testosterone 295.0 ng/dl. 末梢血リンパ球培養による染色体検査は46,XYと正常男子型であった。

経過：1994年11月16日精巢生検の所見は、数はやや少ないものの各精細管に精子を認めJohnsen score 8と考えられた(図4)。両側精管精嚢造影にて右側は鼠径管内で、左側は外鼠径輪付近にて完全閉塞していた。以上よりヘルニア根治術後の閉塞性無精子症と診断された。閉塞部位が長く(とくに左側)vasov-

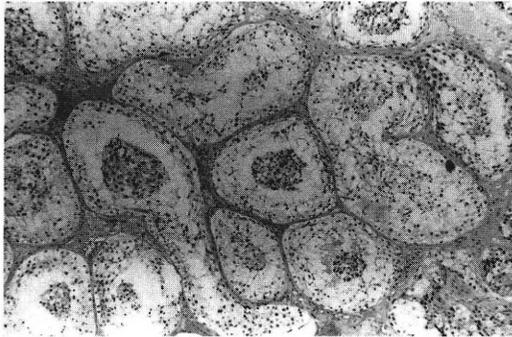


図4 症例2 精巢生検所見(×40)

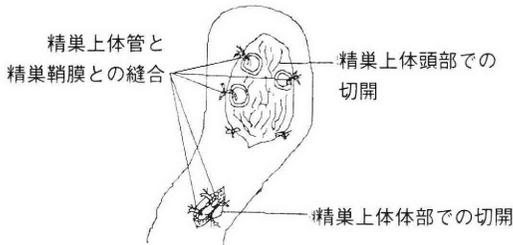


図5 症例2 顕微鏡下手術所見のシエマ

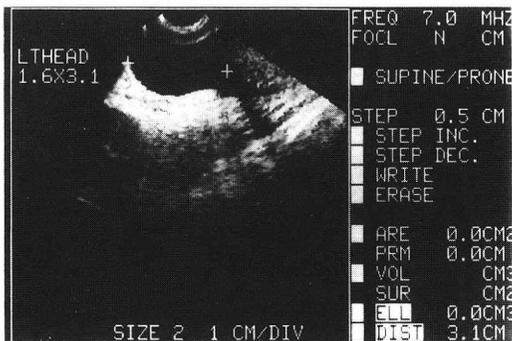


図6 症例2 術後陰嚢部超音波検査所見 左精巣頭部に接しecho free spaceが認められた。

sostomyが困難ではないかと考えられ、1994年12月12日、硬膜外持続麻酔下に左精巣血管高位結紮術および左側精巣鞘膜腔内精子貯留法を施行した。精巣鞘膜腔内精子貯留法は、症例1と同様の到達法にて行ったが、精巣上体管の拡張がなく精巣上体頭部にて精巣鞘膜内層を開き、顕微鏡的に精巣上体管を数本横切開し、そのうちの3本を8-0ナイロン糸にて精巣鞘膜内層および精巣白膜に固定した。さらに精巣上体体部でも同様に切開し精巣上体管を縦切開し、4点で固定した(図5)。

術後約1か月頃より陰嚢部超音波検査にて約4.2mlのecho free spaceめられ(図6)、術後5週の時点で穿刺を試みたところ4mlの簿血性液が採取された。しかしながら精子濃度は 4×10^5 /mlのみで運動率も0%であったためAIHは施行しなかった。

なお今後については、症例1では再度穿刺または精巣上体からの微小穿刺法(MESA)にて精子が得られれば、体外受精・胚移植(in vivo fertilization-embryo transfer, IVF-ET)などによるassisted reproductive technologyによる受精、症例2では上記に加え右側のvasov-

考 察

先天性精管欠損症や小児期鼠径ヘルニア手術時の両側精管結紮など、広範囲におよぶ精路通過障害に対して人工精液造設術が行われてきたが、人工精液造から回収した精子での人工授精の成績は満足のいくものではない³⁻⁶⁾。Belkerらの91例(両側39例片側52例)の造設術の報告では³⁾、妊娠したものの7例(8%)、さらに出産にまで至ったものはわずか4例(4.4%)のみであった。少数ではあるが我々の経験でも人工精液造からは十分な精子が回収できなかった。人工精液造の成績が良くない理由として、異物である人工精液造の内腔への繊維化による閉塞など種々の点があげられる⁸⁾。また、MESAおよびIVF-ETによる受精⁹⁾も徐々に普及しつつあるが、出血や繊維化のためMESAは繰り返し行いにくいとされている。

1992年Moniらは精巣上体管を精巣鞘膜腔内に開放し、精液をその腔内に貯留させる方法を発表した⁷⁾。この精巣鞘膜腔内精子貯留法は、顕微鏡下の手術であるが、その手技は比較的容易であり、人工異物を体内に置く必要もない。Moniらの4例の成績では、1回につき0.4~0.8ml、精子濃度 $12 \sim 56 \times 10^6$ /mlの内容液が回収され、しかも各例において3~8回の吸引が可能であり、1例ではAIHにて妊娠が成立し

ている。本邦では平井の報告によると2例中1例では、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率40%の内容液が0.3~0.5 ml吸引可能であったが、妊娠には至らなかった¹⁰⁾。今回の症例2において4 mlの内溶液の吸引が可能であったが、陰嚢水腫の合併もあり量的に多かったものと思われた。精子総数に関しては 1.6×10^6 であり、これまでの報告とほぼ同等と考えられた。

我々の経験を踏まえ本術式において良好な精子浮遊液を得るための工夫および条件につき検討を加えた。まず顕微鏡下の手術手技に慣れることは言うまでもないが、精巣上体を露出し切開する際に原法では横切開後鞘膜に固定されていたが、症例1では縦切開を用いた。我々は当初、固定操作が容易な縦切開でも十分に精子が貯留されると考えた。しかし、症例1では内溶液の貯留が不十分で穿刺できなかつた。症例2では輸出小管が数本流入する精巣上体頭部では精巣上体を数本横に開いた。さらに頭部で切開された精巣上体管から少量の精子が末梢へも通過する可能性も考え、体部でも縦切開を一箇所加え固定した。そうすることで不十分ながらも精子回収は可能であった。結果的にはやはり横切開の方が固定による緊張は少なく、かつ精巣上体も頭部のみでなく体部などでも開き、少しでも精子の鞘膜腔内への流出の機会を増やした方がよいかもしれない。

また開窓部位も原法では精巣上体頭部で施行されたが、精子の受精能という点からまず精巣上体尾部から切開を開始し、良好な精子を得られた部位にて本法を施行するなど今後の検討が必要であろう。

つぎに精巣生検に関してであるが、本法施行に際しては鞘膜腔の癒着を防ぐため施行されていなかった^{7,10)}。精巣容積、血中ホルモンレベル(LH, FSH, テストステロン, プロラクチンなど)、精管の触診、鼠径ヘルニアなどの既往歴によってかなり確実に診断は可能である。今回の2例に関しても必ずしも精巣生検は必須ではなかったのではないかとの反省もある。ただ正常精巣容量で、FSHが正常あるいはわずかに上昇という症例が精巣生検の最も一般的な適応であり、今後このような症例に対しては、安全で侵襲の少ない針生検、とくにbiopty gun^{11,12)}による検査が適当と考え現在実行中である。

また吸引の時期については、原法では術後4~6週で行っている⁷⁾が、最も良好な精子濃度や運動率などを得る時期については今後の検討課題であろう。さらに超音波検査による内容液貯留状態の観察も容易であり、妻の排卵日にあわててAIH用に採取するにも好都合である。さらにIVF-ETなども応用す

ることにより妊娠率を向上させることも可能であろう。

本術式は、未だ施行症例数も少なく今後の展開に関しても明確ではない。MESAおよびIVF-ETが可能で施設では初めからMESAにて精子を回収し、IVF-ETとした方が現実性が高いかもしれない。しかしながら本法は手術手技が比較的容易であり、繰り返し精子が回収できることを最大の利点としており、コスト面でも精神面でも負担の軽いAIHでの妊娠も可能である。MESAが可能で施設では、MESAに引き続き本術式を施行するのの一法かと考える。以上より本法は今後各施設の状況に照らし、広範な精路通過障害に対する治療法として考慮される術式のひとつであると考えられた。

結 語

広範囲に及ぶ閉塞性無精子症2例に対し精巣鞘膜腔内精子貯留法(Moni's window operation)を施行した。精子の回収など満足のいく成績ではなかったが、今後の改良点や治療の選択に関して考察を加えた。

なお本論文の要旨は1995年日本不妊学会北陸支部学術総会にて報告した。

文 献

- 1) 片山 喬(1990)男性不妊, 日泌尿会誌 81: 1287-1301
- 2) 今尾哲也, 伊藤秀明, 中村靖夫 他(1994)男性不妊症の臨床的検討, 日不妊会誌 39: 586-586
- 3) Belker AM, Jimenez-Cruz DJF, Kelami A, et al. (1986) Alloplastic spermatocele: Poor sperm motility in intraoperative epididymal fluid contraindicates prosthesis implantation. J Urol 136: 408-409
- 4) 三浦一陽, 田中貞雅, 松橋 求 他(1987)人工精液瘤による妊娠成功例, 日不妊会誌 32: 359-363
- 5) 吉田英機, 渡辺 政, 柴崎 裕(1991)閉塞性無精子症に対する外科療法, 泌尿器外科 4: 793-797
- 6) 山根 亨, 大枝忠史, 吉田光宏 他(1991)精管欠損および閉塞性無精子症に対する手術療法の検討, 西日泌尿 53: 1427-1430
- 7) Moni VN, Lalitha PA (1992) Moni's window operation: A new surgical technique to create a sperm reservoir in congenital vasal agenesis. J Urol 148: 843-844
- 8) Belker AM (1994) Alloplastic spermatocele for treatment of obstructive azoospermia. In: Whitehead ED, Nagler HM (eds), Management of impotence and infertility. JB Lippincott Company,

- Philadelphia, pp265-273
- 9) Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, et al. (1988) Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: A new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 50: 525-528
- 10) 平井 景 (1993) 閉塞性無精子症に対する新しい精子回収法—精巣総鞘膜腔内精子貯留法—, 日不妊会誌 38: 507-507
- 11) Rajfer J, Binder S (1989) Use of biopty gun for transcutaneous testicular biopsies. *J Urol* 142: 1021-1022
- 12) Morey AF, Deshon GE, Rozanski TA, et al. (1993) Technique of biopty gun testis needle biopsy. *Urology* 42: 325-326
- (受付: 1995年6月16日)
(受理: 1995年9月27日)

Experience of Moni's window operation for obstructive azoospermia

Toshiyasu Amano, Shuji Tokunaga, Hideaki Ito,
Yasuo Nakamura, Daisuke Ikeda and Mitsuo Ohkawa

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

Yutaka Shirao

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

Two patients with obstructive azoospermia, who were performed Moni's window operation, are reported. Case 1 was 32-year-old male with azoospermia due to absent vas deferens. Moni's window operation was performed, but no fluid with sperm could be collected. Case 2 was 30-year-old male, who complained male infertility for 1 year. He received bilateral inguinal hernioplasty at the age of 2. The diagnosis of obstructive azoospermia was made, then Moni's window operation was performed. Five weeks after operation, 4ml of fluid with 4×10^5 /ml concentration of sperm were collected. However, the motility of sperm was 0%, and pregnancy has not occurred.

Several technical points to collect good quality and quantity sperm fluid were discussed. The operative techniques, including transverse incision of epididymal ducts and increase of fistula of epididymal duct to tunica vaginalis sac are considered to be important. No testicular biopsies, or minimal invasive biopsies, such as needle biopsy, may be recommended. In addition, another assisted reproductive technology, such as IVF-ET, can contribute to the higher possibility of pregnancy with Moni's window operation for obstructive azoospermia patients.

Key words: Moni's window operation, male infertility, obstructive azoospermia

特発性男性不妊症に対する Tranilast の有用性に関する検討

Clinical Evaluation of Tranilast on Idiopathic Male Infertility

岡山大学医学部泌尿器科学教室

秋山 博 伸
Hironobu AKIYAMA

大枝 忠 史
Tadashi OEDA

市川 孝 治
Takaharu ICHIKAWA

小澤 秀 夫
Hideo OZAWA

永井 敦
Atsushi NAGAI

大森 弘 之
Hiroyuki OHMORI

Department of Urology

Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

特発性男性不妊症患者41例に対し肥満細胞阻害剤である tranilast (リザベン®) を投与した。投与中止例を除く40例について検討した結果、精子濃度において投与前 $7.69 \pm 6.42 (\times 10^6/\text{ml})$ (Mean \pm S.D.) が、投与後12週で $18.0 \pm 17.7 (\times 10^6/\text{ml})$ と有意に改善した。また、24週で評価可能であった26例でも、投与前 $9.02 \pm 6.56 (\times 10^6/\text{ml})$ が、投与後24週で $19.4 \pm 13.0 (\times 10^6/\text{ml})$ と有意に改善した。精子運動率においては有意な変動は認めなかった。精液所見の全般改善率は12週で52.5%、24週で53.8%であった。妊娠は3例に認めた。副作用は5例に眠気などの軽微なものを認めたほか、1例に出血性膀胱炎を認め、出血性膀胱炎の1例では投与を中止した。精漿中ケミカルメディエーターのうち、6-keto-PGF_{1 α} は、精液所見改善群において有意な減少を示した。

tranilast は特発性男性不妊症の治療薬のひとつとして有用であると考えられた。

キーワード：男性不妊症、トラニラスト、肥満細胞阻害剤、プロスタグランジン、ヒスタミン

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 54 - 58, 1996)

緒 言

近年、特発性男性不妊症と精巣中の肥満細胞の増生との関連性が報告されており^{1,2)}、肥満細胞から分泌される種々のケミカルメディエーターにより精子形成障害が惹起される可能性が検討されている。今回我々は、肥満細胞阻害剤である tranilast を特発性男性不妊症患者に投与し、その有用性について検討したので報告する。

対象および方法

対象は平成2年12月から平成6年6月までの間に当科不妊外来を受診した特発性男性不妊症患者41例である。患者の年齢は25～43歳(平均33.5歳)で、妻の年齢は22～36歳(平均29.8歳)である。治療前の精液所見の内訳は、精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高度乏精子症30例、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の軽度乏精子症6例、

また、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上で精子運動率50%未満の精子無力症5例であった。前治療は、23例にメチルビタミンB₁₂、カリクレイン、漢方薬、hCG-hMG療法などが施行されており、いずれも無効であった。

投与方法は、tranilast (商品名リザベン®) 100 mg を1日3回、原則として12週以上経口投与した。投与開始後12週および24週で、精子濃度、精子運動率、総運動精子数について検討した。また、精子濃度、精子運動率に対する効果、および改善度については、メチルビタミンB₁₂用量比較試験の際使用した治療効果判定基準³⁾を用いて評価を行った。精液は3～5日の禁欲期間の後、外来で用手法にて採取し、37℃にて30分静置の後、マクラー算定盤を用い、光学顕微鏡(200倍)で肉眼的に精子濃度および運動率を算定した。また、肥満細胞から分泌されるケミカルメディエーターのうち、PGD₂、6-keto-PGF_{1 α} 、ヒスタ

ミンについて精漿内濃度を測定し、精液検査所見の変動と比較した。これらケミカルメディエーターの測定は、それぞれDCC法、PEG法、チューブ固相法を用い、RIA法で行った。各検討は41症例のうち、副作用により投与中止となった1例を除く40症例について行った。なお、統計処理については、2群の分散が等しい場合にはpaired t-testを、等しくない場合にはWelch検定を用いた。

結 果

投与12週目で評価できたものは40例、24週目で評価できたものは26例であった。tranilast投与による精子濃度、精子運動率、総運動精子数の変化を検討すると、精子濃度において、投与前に比し12週および24週で、また、総運動精子数においても、12週で有意な改善を認めた(表1)。

つぎに、治療効果について検討すると、著明改善、改善をあわせた改善率は、精子濃度では12週で40.0%、24週で46.2%、精子運動率では12週で40.0%、24週で50.0%であった。また、これらをあわせた全般改善度では、12週で52.5%、24週で53.8%の改善率であった(表2)。なお、妊娠の成立は3例に認め

た。また、前治療無効例については、全般改善度において23例中12例(52.2%)で改善もしくは著明な改善を示した。

副作用は眠気4例、胃部不快感1例と軽微なものほか、1例に出血性膀胱炎を認めた。出血性膀胱炎の1例は、投与開始約3週で肉眼的血尿と排尿痛で発症したが、投与中止により速やかに症状は消失した。

つぎに、精漿中ケミカルメディエーターに関し評価可能であった症例について、その変動を表3に示す。PGD₂、6-keto-PGF_{1α}、ヒスタミンはいずれもtranilast投与により減少傾向を示したが、6-keto-PGF_{1α}は24週投与群(n=18)において有意に減少していた。さらに、精液所見全般改善度により、改善群(改善以上)と非改善群(やや改善以下)に分け、それらの投与前後の変動を検討すると、6-keto-PGF_{1α}は改善群の12週投与群(n=18)、PGD₂は逆に非改善群の24週投与群(n=7)において有意な減少を認めた。ヒスタミンについては有意な変動は認めなかったが、改善群では投与後に減少傾向を認めたのに対し、非改善群では逆に上昇傾向を認めた(表4、5)。また、ヒスタミンは、投与前は改善群が非改善群よりも高

表1 tranilast投与による精子濃度、精子運動率の変化

		投与前	12週	24週
精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	A群	7.69 ± 6.42	18.0 ± 17.7 P < 0.005	
	B群	9.02 ± 6.56	19.0 ± 17.4 P < 0.05	19.4 ± 13.0 P < 0.001
精子運動率 (%)	A群	22.9 ± 17.0	28.7 ± 21.5 N.S.	
	B群	21.0 ± 15.4	25.8 ± 22.1 N.S.	27.2 ± 19.0 N.S.
総運動精子数 (×10 ⁶)	A群	6.23 ± 7.61	13.7 ± 19.8 P < 0.05	
	B群	7.09 ± 8.13	12.3 ± 17.9 N.S.	15.4 ± 22.4 N.S.

A群：12週投与例(n=40)

B群：24週投与例(n=26)

表2 治療効果一覧

層別	週	総計	著明改善	改善	やや改善	不変	悪化	改善率
精子濃度改善度	12	40	8	8	—	24	0	40.0%
	24	26	6	6	—	14	0	46.2%
運動率改善度	12	40	11	5	—	20	4	40.0%
	24	26	8	5	—	12	1	50.0%
全般改善度	12	40	11	10	4	14	1	52.5%
	24	26	5	9	3	8	1	53.8%

値であったのに対し、投与後は逆に改善群の方が低値を示していた(表4, 5).

考 察

Tranilast は、肥満細胞、各種炎症細胞からのヒスタ

ミンをはじめとする多くのケミカルメディエーターの遊離を抑制することにより、主としてIgE抗体の関与するI型アレルギー反応を抑制する経口抗アレルギー剤である⁴⁾。従来の抗ヒスタミン薬が、主にH₁受容体と拮抗することによってヒスタミンの作用

表3 tranilast投与による精漿中ケミカルメディエーターの変化

		投与前	12週	24週
PGD ₂ (× 10 ³ pg/ml)	n = 31	14.3 ± 22.6	9.59 ± 9.59 N.S.	
	n = 18	14.3 ± 26.7	9.43 ± 9.10 N.S.	5.03 ± 3.99 N.S.
6-keto-PGF _{1α} (× 10 ⁶ pg/ml)	n = 35	1.20 ± 1.82	0.73 ± 0.56 N.S.	
	n = 18	1.52 ± 1.54	0.62 ± 0.42 p < 0.05	0.66 ± 0.51 p < 0.05
histamine (nmol/l)	n = 22	1.90 ± 1.85	1.46 ± 0.85 N.S.	
	n = 11	2.62 ± 2.38	1.61 ± 1.08 N.S.	2.02 ± 1.88 N.S.

表4 tranilast投与による精漿中ケミカルメディエーターの変化(精液所見改善群)

		投与前	12週	24週
PGD ₂ (× 10 ³ pg/ml)	n = 17	14.9 ± 27.4	9.27 ± 11.7 N.S.	
	n = 11	17.9 ± 33.4	7.76 ± 10.4 N.S.	5.46 ± 4.74 N.S.
6-keto-PGF _{1α} (× 10 ⁶ pg/ml)	n = 18	1.49 ± 1.46	0.73 ± 0.49 P < 0.05	
	n = 11	1.65 ± 1.71	0.65 ± 0.47 N.S.	0.64 ± 0.62 N.S.
histamine (nmol/l)	n = 9	2.79 ± 2.60	1.11 ± 0.44 N.S.	
	n = 6	3.57 ± 2.87	1.10 ± 0.41 N.S.	1.40 ± 0.67 N.S.

表5 tranilast投与による精漿中ケミカルメディエーターの変化(精液所見非改善群)

		投与前	12週	24週
PGD ₂ (× 10 ³ pg/ml)	n = 14	13.7 ± 14.7	9.98 ± 6.07 N.S.	
	n = 7	8.74 ± 4.63	12.1 ± 5.70 N.S.	4.34 ± 2.18 P < 0.05
6-keto-PGF _{1α} (× 10 ⁶ pg/ml)	n = 17	0.90 ± 0.96	0.73 ± 0.63 N.S.	
	n = 7	1.32 ± 1.21	0.58 ± 0.31 N.S.	0.69 ± 0.27 N.S.
histamine (nmol/l)	n = 13	1.29 ± 0.44	1.70 ± 0.97 N.S.	
	n = 5	1.48 ± 0.41	2.22 ± 1.29 N.S.	2.76 ± 2.49 N.S.

を阻止するいわゆる対症療法であるのとは異なり、アレルギー疾患の原因療法により近づいた薬剤として用いられている⁴⁾。

特発性男性不妊症に対する肥満細胞阻害剤の有用性の検討については、ketotifenを用いたSchillら⁵⁾や山根ら⁶⁾の報告がある。tranilastは、ketotifenよりも強いケミカルメディエーター遊離抑制作用を有する薬剤であり、今回の検討においても、ketotifenに比し良好な成績、すなわち、精液所見全般改善度において、12週、24週でそれぞれ57.5%、53.8%と、山根らのketotifenにおける20.6%、18.8%を大きく上回る結果であった。また、これまでに当教室において特発性男性不妊症に対する有用性を検討したメチルコバラミン³⁾、 α -ブロッカー・ β -ステイミュラント併用療法⁷⁾、hCG-hMG療法⁸⁾、人参養榮湯⁹⁾と比較しても良好な成績であった。さらに、精子濃度において有意な改善を認めたことは、精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の高度乏精子症が大半を占めていたことを考慮すると、きわめて良好な成績であると思われる。

特発性男性不妊症と精巣中の肥満細胞の増生との関連性について、三宅ら²⁾は、不妊精巣では間質に肥満細胞が増加しており、とくに壁が肥厚し狭小化した精細管周囲に多数出現するとともに、精細管壁内においても増加していると報告している。また、ケミカルメディエーターについては、動物実験において $\text{PGF}_{1\alpha}$ 、 $\text{F}_{2\alpha}$ が精子形成障害を惹起することが報告されており¹⁰⁾、男性不妊症とケミカルメディエーターとの関連性が示唆される。今回は、ケミカルメディエーターのうち、主要なPGである PGD_2 ¹¹⁾、精子形成障害があるとされる6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ ¹⁰⁾、tranilastにより遊離が強力に抑制されるヒスタミン⁴⁾について精漿内濃度を測定し、精液所見との関連性について検討した。前述したように、精液所見改善群と非改善群で比較すると、精漿中ケミカルメディエーターは精液所見改善群でより顕著な減少傾向を示した。精漿中のPGの主な産生部位は精囊であると考えられており¹²⁾、tranilast投与によるPG抑制による効果は当初、精子濃度よりも運動率により強く表れるのではないかと予想された。しかし、結果は逆であり、精子濃度の有意な改善を認めたものの、精子運動率には変動がなかった。この事実、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ が、精液所見改善群において有意に低下していたこととあわせて、精巣内の肥満細胞が造精機能障害に関与しているという推測を支持するものと考えられた。

副作用としては、出血性膀胱炎の報告が散見されており¹³⁾、自験例においても1例に認められ、投与

中止となった。他の副作用はいずれも軽微なものであり、出血性膀胱炎に注意を怠らなければ安全性に問題は無いものと思われた。

以上より、特発性男性不妊症に対する治療薬のひとつとしてtranilastは有用であり、その作用機序より、他の薬剤無効症例に対しても使用すべき薬剤であると考えられた。

結 語

1) 特発性男性不妊症患者41例に対し、tranilastを使用した。投与中止例を除く40例について検討し、12週、24週で精子濃度の有意な改善を認めた。精子運動率においては有意な変動は認めなかった。また、精液所見全般改善率は、12週で52.5%、24週で53.8%であり、妊娠は3例に認めた。

2) 副作用は5例に眠気などの軽微なものを認めたほか、出血性膀胱炎を1例に認めた。

3) 精漿中ケミカルメディエーターのうち、6-keto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ は、精液所見改善群において、投与後に有意に減少していた。

4) Tranilastは特発性男性不妊症の治療薬のひとつとして有用であり、他の薬剤無効症例に対しても有用な薬剤であると思われた。

本論文の要旨は、第39回日本不妊学会および第15回世界不妊学会で発表した。

文 献

- 1) 長井辰哉 (1991) 男子不妊症精巣肥満細胞の組織化学的検討. 泌尿紀要 37: 349-355
- 2) 三宅弘治 (1983) 精巣生検よりみた特発性男子不妊症. 泌尿紀要 29: 991-1004
- 3) 大橋輝久, 永井 敦, 入江 伸 他 (1987) 特発性男子不妊症に対するMethylcobalaminの検討—精漿内Vitamin B₁₂濃度を中心として—. 日不妊会誌 32: 200-205
- 4) 医薬品インタビューフォーム (1993) リザベン®, キッセイ薬品工業株式会社, 松本, pp1-2
- 5) Schill WB, Schneider J, Ring J (1986) The use of Ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo- and asthenozoospermia. Andrologia 18: 570-573
- 6) 山根 亨, 大枝忠史, 吉田光宏 他 (1992) 特発性乏精子症に対するKetotifen療法の臨床的検討. 日不妊会誌 37: 172-176
- 7) 山下良孝, 永井 敦, 大枝忠史 他 (1990) 男子不妊症に対する α -Blocker, β -Stimulant併用療法の臨床的検討. 日不妊会誌 35: 165-169
- 8) 山下良孝, 永井 敦, 大枝忠史 他 (1990) 男子

- 不妊症に対する hCG-hMG 療法の臨床的検討. 日本不妊会誌 35: 601-606
- 9) 大枝忠史, 市川孝治, 小澤秀夫 他 (1994) 特発性男性不妊症患者に対する人参養榮湯の使用経験. 新薬と臨床 43: 2197-2203
- 10) Abbatiello ER, Kaminsky M, Weisbroth S (1976) The effect of prostaglandins $F_{1\alpha}$, $F_{2\alpha}$ on spermatogenesis. Int J Fertil 21: 82-88
- 11) 井階幸一, 氏原真弓, 藤井公男 他 (1987) 肥満細胞における Prostaglandin D_2 合成に対する Tranilast の抑制効果. 皮膚科紀要 82: 603-605
- 12) 伊藤晴夫 (1975) プロスタグランディンと男性性機能. 代謝 12: 1733-1740
- 13) 土岐清秀, 井上 均, 吉村一宏 他 (1994) Tranilast が原因と考えられる難治性膀胱炎の 1 例. 西日泌尿 56: 699-703
- (受付: 1995 年 6 月 16 日)
(受理: 1995 年 9 月 29 日)

Clinical evaluation of tranilast on idiopathic male infertility

Hironobu Akiyama, Tadashi Oeda, Takaharu Ichikawa
Hideo Ozawa, Atsushi Nagai and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology
Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

A total of 41 idiopathic infertile men were treated with oral administration of tranilast (Rizaben®, 300 mg/day). Sperm count, sperm motility and the levels of chemical mediators in seminal plasma were analyzed. Sperm count showed a significant increase after administration, however, no significant change was seen in sperm motility. Efficacy rate including both sperm count and sperm motility was noted in 52.5 % of the patients after 12 weeks and in 53.8 % after 24 weeks of administration. Pregnancies were achieved in 3 cases. Adverse effects were found in 6 cases. 5 of them were mild, but 1 of them was hemorrhagic cystitis. Chemical mediators, especially 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ and histamine, in seminal plasma showed tendency to decrease in group of semen improvement. Therefore, it was suggested that tranilast might be useful in the treatment of male infertility.

This medicine is thought to act by suppressing chemical mediators in the testis and seminal plasma.

Key words: male infertility, tranilast, mast cell blocker, prostaglandins, histamine

2種類のGnRH agonist製剤, leuprorelin acetate depotとbuserelin acetateを併用したIVF-ETのための卵巣刺激法の試み

An Alternate Approach to Controlled Ovarian Hyperstimulation with Leuprorelin Acetate Depot and Buserelin Acetate for In vitro Fertilization and Embryo Transfer

福岡大学医学部産婦人科学教室

詠田由美
Yumi NAGATA

本庄考
Kou HONJO

窪田真知
Machi KUBOTA

池田景子
Keiko IKEDA

倉島雅子
Motoko KURASHIMA

白川光一
Koichi SHIRAKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-08, Japan

2種類のGnRH agonist製剤, すなわち酢酸leuprorelin徐放性製剤(LA depot)と酢酸buserelin(BA)を併用した卵巣刺激法(LB ultralong protocol)後, IVF-ETを施行して妊娠に至り挙児に成功した症例を経験した。

症例は40歳G1P0(妊娠8週で流産), 他院でのIVF-ETでも妊娠に至らず, 挙児希望にて当科を初診。診断は, 続発不妊, 子宮筋腫, 子宮内膜症, 両側卵管閉塞。LA depot皮下注を4週間隔で2回施行後, 最終LA depot投与後28日よりBA600 μ g/日に変更し, LA depot最終投与後35日よりhMG連日注射を開始。hMGの総投与量は2925 IU, 投与日数は16日であった。hCG投与後35時間で5個採卵, 媒精, 翌日3個の2前核期胚を確認した。同日胚移植(最終LA depot投与より53日)し, 妊娠に至り, 妊娠37週1日帝王切開術で3,222gの女児を得た。LB ultralongは, IVF-ETにおける排卵誘発法の変法となり得ると考えられた。

キーワード: 卵巣刺激法, 体外受精-胚移植, 酢酸リュープロレリン徐放性製剤, 子宮筋腫, 子宮内膜症
(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 59 - 65, 1996)

緒言

高活性LHRH agonistを動物に継続的に投与すると下垂体が脱感作を起こし, LH分泌が強く抑制され性腺機能が低下する(paradoxical effect)^{1,2)}。このparadoxical effectを利用して, 子宮内膜症や子宮筋腫などの性ホルモン依存性の疾患の治療が広く行われている^{3,4)}。さらに, この作用をIVF-ETの卵巣刺激法に応用し, IVF-ETの治療成績は飛躍的に向上した^{5,6)}。現在のIVF-ETでは本邦では酢酸buserelin(以下BA)(Suprecur®, ヘキスト・ジャパン, 東京)の点鼻投与を, 欧米では酢酸leuprorelin(以下LA)の水溶液注射製剤の連日皮下注射を併用した卵巣刺激法が一般的に施行されている。

LA水溶液注射製剤は, 血中濃度を持続的に高く保つためには, 注射による連日投与が必要であった。この煩雑さを除くため, 乳酸・グリコール酸共重合体を基剤とするマイクロカプセル内にLAを含有した酢酸leuprorelin徐放性製剤(以下LA depot)(Leuplin® for injection 3.75, 武田薬品工業, 大阪)が開発された⁷⁾。ラットではLA連日投与群よりもLA depot単回投与群のほうが, より強力なparadoxical effectが得られ⁸⁾、本邦では子宮内膜症の治療薬として使用されている^{9,10,11)}。LA depotは, 子宮内膜症や子宮筋腫が着床障害の原因をなしている不妊患者のIVF-ET前処置薬として有用な治療薬と考えられる。しかしながら, 徐放性製剤であるため血中から薬剤が消失する時期が最終投与後7~8週以後¹²⁾になるため, LA

depot投与後にIVF-ET治療周期に移行するタイミングや胚移植時期の設定は慎重に検討しなければならない。

我々は、LA depot投与にて子宮内膜症と子宮筋腫治療後、すみやかにIVF-ET治療周期に移行するLA depot and BA ultralong protocol (LB ultralong protocol)をIVF-ETの卵巣刺激に併用し、妊娠成立に至り、挙児に成功した1例を経験したので報告する。

症 例

症例：40歳，経妊1回経産0回

主訴：挙児希望

既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：父が胃癌で死亡，その他特記すべきことなし。

月経歴：初経11歳，月経周期は整順，月経痛軽度。

結婚歴：昭和55年(27歳)

妊娠分娩歴：平成3年10月(38歳)妊娠8週にて流産。

現病歴：結婚後避妊は施行していなかったが妊娠に至らないため，A病院にて挙児希望にて受診し，卵管通過障害の診断を受けた。7月よりB医院でのIVF-ETを希望し転院した。

8月同医院にて初回IVF-ETを受け妊娠成立に至り，胎児心拍を確認できたが妊娠8週で流産となった。その後もB医院にて4回のIVF-ETを受けたが妊娠に至らず，12月挙児希望にて当科を初診した。

現症：身長151cm，体重47kg，血圧116/70，全身所見には特記すべきことなし。内診所見では子宮は前傾前屈，超鶏卵大，可動性は不良で可動痛を認めた。両側付属器，Douglas窩には腫瘍や硬結を触知せず。

血液検査所見：血清Hb値11.9 g/dl，肝機能・腎機能異常なし。血清CA 125は16.8 U/ml，CA19-9は47 U/mlと軽度上昇。血清クラミジア抗体は，IgG抗体，IgA抗体ともに陰性であった。

内分泌学的検査所見：月経期の血清LH値は3.8 mIU/ml，血清FSH値は7.5 mIU/mlであった。黄体期中期の血清エストラジオール値は108 pg/ml，血清プロゲステロン値は17.9 ng/mlと正常であったが，血清プロラクチン値は19 ng/mlと上昇を認めた。

不妊検査所見：基礎体温は2相性で，精液検査では異常なし，排卵期の頸管粘液は正常で，性交後試験は陽性であった。

画像診断：経陰超音波検査では，子宮底部筋層内に22×20 mm，体部筋層内に18×15 mmの正常筋層

よりやや低輝度の充実性円形エコーを認めた。子宮卵管造影検査(以下HSG)では，子宮底部に円形の脈管像を認め，子宮内腔は底部から圧迫され弓状を呈していた。両側卵管は間質部からまったく描出されず，24時間後の残像撮影では腹腔内に造影剤の拡散は認められず，残存した脈管像のみが認められた(図1)。MRIのT2強調画像では，子宮底部，体部および頸部に4個の境界明瞭なlow intensity massを認めた(図2)。

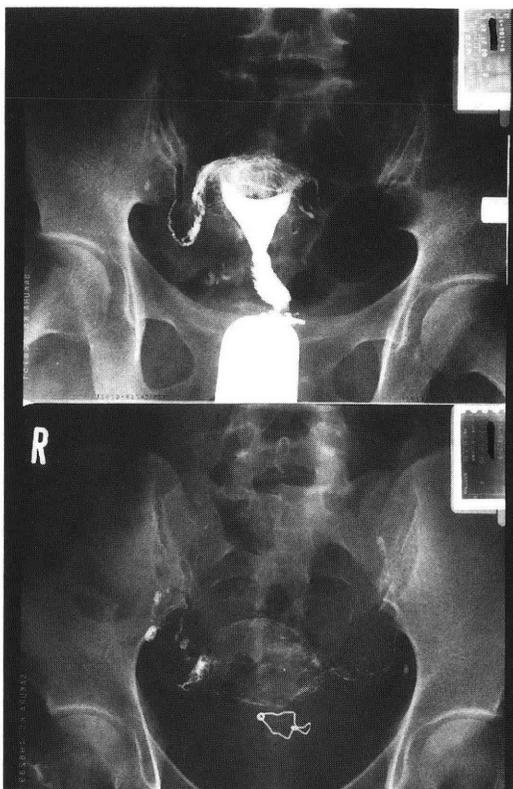


図1 症例の子宮卵管造影所見
上段；momental film，下段；24時間後のfollow up film

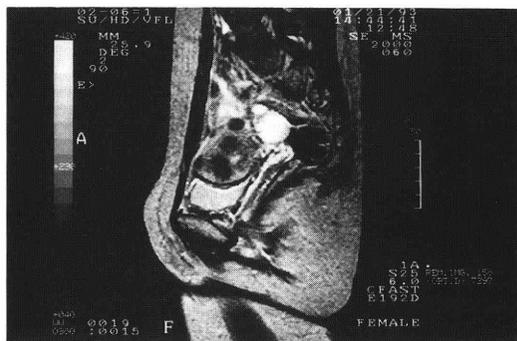


図2 MRI，T2強調画像

初診時診断：続発不妊，両側卵管閉塞，子宮筋腫，子宮内膜症，高プロラクチン血症と診断された。

臨床経過：以上の臨床所見より，卵管閉塞の原因精査ならびに子宮内膜症の臨床進行期診断目的で腹腔鏡検査を勧めたが，同意が得られず，当科においても不妊治療としてIVF-ETを選択した。

平成5年1月よりBAの点鼻投与を5か月施行し，続けて6月にBA ultralong protocol，その後，平成5年10月と平成6年4月にBA short protocol併用にてIVF-ETを施行したが妊娠には至らなかった。平成6年6月の超音波所見では子宮底部に20×18mm，体部に18×15mmの筋腫像を認め，HSG所見では子宮底部の筋腫核周囲の脈管像は消失したが，子宮内腔は底部から圧迫され依然として弓状を呈し，両側卵管は間質部からまったく描出されなかった。平成6年7月，子宮内膜症治療，筋腫縮小効果ならびに十分な下垂体脱感作を期待し，患者の同意のもとLA depotの投与を開始し，引き続きIVF-ETを行った。

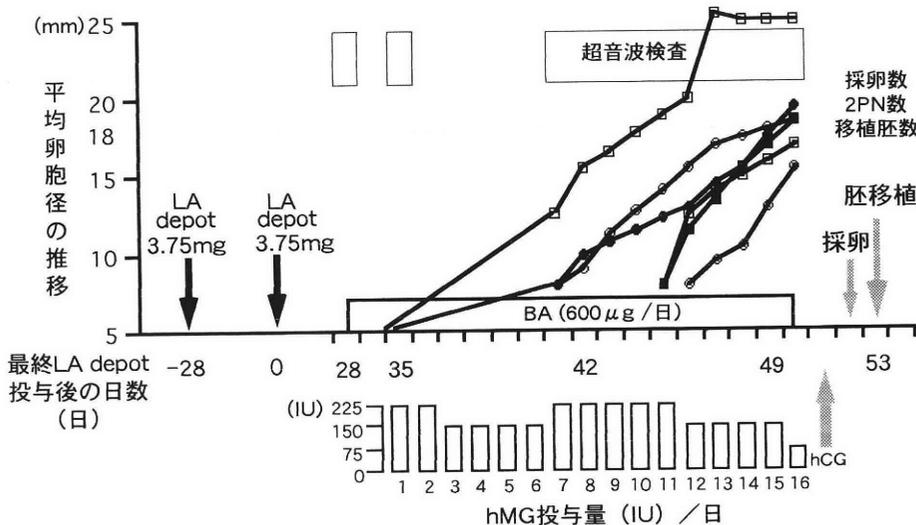
LB ultralong protocol の方法ならびにIVF-ETの経過 (図3)

LB ultralong protocolは以下の方法で施行した。LA depotの3.75mg皮下注射を4週間隔で2回施行後，2回目の投与後28日よりBA 600μg/日の点鼻に変更し，LA depotの最終投与後35日よりhMG連日注射を開始した。

図3に症例の治療経過を示す。最終月経第2日目にあたる平成6年7月29日に初回LA depot 3.75mgの皮下注射を施行し，平成6年8月26日に2回目のLA depot 3.75mgの皮下注射を施行した。最終LA depot投与後28日目にあたる9月24日，内診所見では子宮は鶏卵大で，経膈超音波検査では子宮底部および体部の筋腫核は1cm径以下に縮小し，また両側卵巣には卵胞発育を認めなかった。同日よりBA 600μg/日の点鼻を開始し，最終LA depot投与後35日より排卵誘発を開始した。

卵巣刺激には，conventional hMG (Humegon® 75IUあるいは150IU，日本オルガノン社，東京)を使用した。hMG注射開始6日目の経膈超音波検査では，平均径15mmの主席卵胞1個のみの発育であったため，さらにhMG投与量を増加した。hMG注射開始12日目には，1個の主席卵胞が平均径は18mmを越えたが，当科の採卵決定基準は平均径18mm卵胞が2個以上と設定しているため，さらにhMGの投与を行なった。最終LA depot投与後50日に，平均卵胞径25mmが1個，19.5mmが1個，18.5mmが2個，17.0mmが1個および15.5mmが1個の6個の卵胞で採卵を決定し，同日BA点鼻投与を中止した。この間のhMG総投与量は2,925IU，投与日数は16日であった。

下垂体・卵巣系ホルモンの推移は，BA投与直前，すなわち，LA depot 2回投与後28日での，血清LH値，血清FSH値は抑制され，血清エストラジオール値は



LA depot: leuprorelin acetate depot,
BA: busserelin acetate

図3 Leuprorelin acetate depotとBusserelin acetateを併用した卵巣刺激法ならびにIVF-ETの治療経過

表1 LB* ultralong protocolにおける下垂体・卵巣系ホルモンの推移

	基礎値	LA depot** 2回投与前	BA*** 投与前	hMG投与 10日目	hCG 投与前
最終LA depot 投与後の日数	/	0	28	46	51
LH (mIU/ml)	3.6	/	< 1.0	0.8	1.3
FSH (mIU/ml)	7.5	/	3.7	13.8	13.5
PRL (ng/ml)	19	/	14.0	20.3	24.6
E ₂ (pg/ml)	/	13	< 10	712	1938
P ₄ (ng/ml)	/	/	/	0.2	0.5

* leuprorelin acetate depot and buserelin acetate

** leuprorelin acetate depot

*** buserelin acetate

閉経レベルまで低下した。血清LH値はhCG投与直前まで低値を維持し、hCG投与直前の血清プロゲステロン値の上昇は見られていない。なお、血清プロラクチン値は、LA depot 2回投与後28日では正常範囲内となった。(表1)。

平成6年10月16日にhCG 10,000 IUの投与を行い、hCG投与35.5時間後に経膈超音波下に採卵した。なお、採卵決定日に25 mm径であった主席卵胞からは卵は採取されず、採取卵は5個であった。280分の前培養後、Percoll Cushion 変法¹³⁾にて調整した運動精子 $84.5 \times 10^4/\text{ml}$ で媒精した。媒精19時間後に実体顕微鏡下に2前核期胚を3個、多精子受精胚を2個を確認した。同日すなわち最終LA depot投与後53日目に3個の2前核期胚を子宮に胚移植した。黄体補充には採卵日と胚移植日にprogesterone 50 mgの筋注を行い、その後progesterone 25 mgの筋注とdydrogesterone 15 mgの内服を12日間を施行した。胚移植後14日目に低感度尿妊娠反応の陽性を確認し、2週間後に子宮内胎嚢と胎児心拍を確認し、単胎の妊娠と判明した。

妊娠成立時、超音波検査では子宮底部ならびに体部の筋腫核は1.0 cm以下に縮小し、他の筋腫核は経膈超音波検査では検出不能であった。妊娠初期から中期にはとくに切迫流産兆候もなく、また筋腫の増大も認められず、外来にて4週間ごとに通常の妊婦健診を施行した。妊娠24週頃より軽度の腹部緊満感を自覚したため、妊娠25週3日、切迫早産の診断で入院となった。入院時、子宮口は未開大で、切迫早産の治療には塩酸リトドリンの内服あるいは点滴静注を行ったが、治療前ならびに経過中、とくに筋腫の増大傾向や変性による症状は認められなかった。

妊娠37週1日の平成7年6月20日自然陣痛が発来したが、高年初産婦ならびに軟産道強靱の適応にて

帝王切開術となった。児は3,222 gの女児でApgar scoreは1分後8点、5分後10点であった。開腹時に子宮底部より1.5 cm径の筋腫を核出し、組織学的にleiomyomaを確認した。また、開腹時の子宮内膜症臨床進行期分類ではR-AFS IV期であった。

考 察

LA depotは、その強力なparadoxical effectにより⁸⁾、血清LH、FSHの基礎値や血清エストロゲン値の低下をもたらし、子宮内膜症の自覚所見の消失、R-AFSスコアの改善など、子宮内膜症に対する臨床的効果は高い^{9,10)}。子宮内膜症の存在は、着床環境や流産との関与が考えられ^{14,15)}、子宮内膜症を有する婦人に対するIVF-ETの前処置にGnRH agonist療法が有用であったという報告もあり^{16,17)}、IVF-ETの妊娠成績の向上や流産回避の上でもLA depotの効果は期待し得ると考えられた。

子宮筋腫に対するGnRH agonist療法は、手術前投与や閉経前投与としてその有用性が報告されている^{4,18)}。とくにLA depotは、4週間隔投与3回目(投与開始後12週)で筋腫縮小効果が得られるとの報告があり¹⁹⁾、子宮内膜症のみならず子宮筋腫にも有効であると考えられる。しかしながら、筋腫縮小効果は一過性であり、投与終了後30から60日で投与前の大きさに復活するrebound効果も報告されている^{20~22)}。

本症例は、前医でのIVF-ETで妊娠成立の既往があるものの、妊娠8週で流産となっており、HSGやMRIの所見から判断して、子宮筋腫の存在が流産の一因と考えられた。また、流産後に施行した数回のIVF-ETでは妊娠に至らず、子宮内膜症の存在はIVF-ETの成績不振の要因のひとつと考えられた。しかし

ながら、子宮筋腫特有の過多月経や貧血の症状もなく、また子宮の大きさからも筋腫核出術の適応とは考えられず、その治療法について苦慮した。そのため、本症例においてはGnRH agonist療法による筋腫縮小効果と子宮内膜症の改善を期待し、さらにrebound効果発現前の妊娠成立を期待しLB ultralong protocolを選択した。

GnRH agonist製剤長期間使用後に消退出血を待たずして、IVF-ETの排卵誘発を行うultralong protocolの試みがある²³⁾。本邦ではBAの点鼻投与を、欧米ではLAの水溶液注射製剤の連日皮下注射に続いてIVF-ETに移行する方法が一般的で、LA depotの皮下投与に続くIVF-ETの報告はない。LA depotの強力なparadoxical effectは子宮内膜症や子宮筋腫には有用であると考えられるが、徐放性製剤であるため血中より完全に薬剤が消失する時期が妊娠成立の上で問題となる。妊娠ラットへの高濃度LA投与の毒性試験では流産率の上昇が確認されている²⁴⁾。そのため、LA depotを投与後にIVF-ET治療周期に移行するタイミングや胚移植時期の設定は慎重に考慮しなければならないと考えられた。

子宮内膜症患者に対するLA depot投与後の内分泌動態では、LA depot最終投与後7～8週で血中よりLA depotは消失し検出不可能となるとされている¹²⁾。したがって、胚移植の時期をLA depot最終投与後49日以降とし、着床時期を血中より完全に薬剤が消失する最終投与後56日以降に設定することが望ましいと考えられた。胚移植時期を設定したうえでhMG投与開始時期をLA depot最終投与後5～6週としたが、LA depot単独投与では内因性LHサージの発生の可能性が考えられ、その抑制のためにBAを併用した。

子宮内膜症患者にLA depot 1回の皮下注射を4週間隔で繰り返した場合、初回投与後3週で内因性ゴナドトロピンは低値となり、LA depot 2回目投与から4週でLHRHテストの反応性は消失する²⁵⁾。oocytogenesisあるいはfolliculogenesisではLHとFSHの基礎分泌が必要で²⁶⁾、長期間の下垂体脱感作後は卵胞発育が抑制されると考えられる。LA depotの投与は子宮内膜症と子宮筋腫の縮小を第1目的としたが、6か月間の投与を行った場合、卵胞発育に要するhMGの投与量が増加し、投与日数も延長することが予測された。本症例ではLA depot 2回目の投与から28日で超音波所見上の子宮筋腫の縮小が認められ、また血清ゴナドトロピンとエストラジオール値は閉経レベルに達したため、LA depot投与は2回で終了した。

以上より、LA depot最終投与後の28日よりBA600

μg/日の点鼻に変更し、LA depot最終投与後の5週0日よりhMG連日注射を開始するLB ultralong protocolの設定となった。胚移植も最終LA depot投与後53日に行い得た。

本症例は子宮内膜症、子宮筋腫を合併した両側卵管閉塞症例で、既往妊娠ではIVF-ET後の流産歴を有し、その後はIVF-ETを繰り返しても妊娠に至らないという、高度の難治症例であった。LB ultralong protocolの併用によるIVF-ETでは妊娠成立後の妊娠早期から中期の経過は良好で、妊娠全期間を通して筋腫による悪影響は認められなかった。

以上より、IVF-ETの難治症例に対する排卵誘発法としてLB ultralong protocolの併用は一変法となり得ることができ、有用な方法と考えられた。なお、hMG投与6日目より超音波検査にて確認した主席卵胞は、採卵決定日には25 mm径にまで達していたが、卵は採取されなかった。follicular cystと考えられるが、その発生機序に関しては今後検討を行いたい。

結 語

我々はLA depotの強力なparadoxical effectによる子宮内膜症と子宮筋腫治療後、すみやかにIVF-ET治療周期に移行し、かつLA depotの血中消失時期に胚移植時期の設定が可能であったLB ultralong protocolをIVF-ETの卵巣刺激に併用し、妊娠成立に至り、挙児に成功した1例を経験したので報告した。

稿を終えるにあたり、LA depotについて御教示いただいた、近畿大学医学部産婦人科教授 星合 昊先生に深謝いたします。なお、本論文の要旨は、第13回日本受精着床学会(東京)において発表した。

文 献

- 1) Fraser HM, Lincoln GA (1980) Effect of chronic treatment with an LHRH agonist on the secretion of LH, FSH and testosterone in the ram. *Biol Reprod* 2: 269-276
- 2) Johnson ES, Gendrich RL, White WF (1976) Delay of puberty and inhibition of reproductive processes in the rat by a gonadotropin-releasing hormone agonist analog. *Fertil Steril* 27: 853-860
- 3) Pring DW, Maresh M, Fraser AC (1983) Luteinizing hormone-releasing hormone agonist in woman with endometriosis. *Br Med J* 287: 1718-1719
- 4) Filcoli M, Hall DA, Loughlin JS, et al. (1983) A conservative approach to the management of uterine leiomyoma: Pituitary desensitization by a luteinizing hormone-releasing hormone analogue. *Am J Obstet Gynecol* 147: 726-727

- 5) Porter RN, Smith W, Craft IL, et al. (1984) Induction of ovulation for in-vitro fertilization using buserelin and gonadotropins. *Lancet* 2: 1284-1285
- 6) Serafini P, Batzofin J, Stone B, et al. (1988) An alternate approach to controlled ovarian hyperstimulation in "poor responders": pretreatment with a gonadotropin-releasing hormone analog. *Fertil Steril* 49:90-95
- 7) Ogawa Y, Okada H, Heya T, et al. (1989) Controlled release of LHRH agonist, leuprolide acetate, from microcapsules: Serum drug level profiles and pharmacological effects in animals. *J Pharm Pharmacol* 41: 439-444
- 8) 前多敬一郎, 藤野明子, 東村博子 他 (1990) TAP-144の徐放性製剤 (TAP-144-SR) の性腺機能抑制効果に関する検討. *薬理治療* 18: 2615-2629
- 9) 水野正彦, 矢嶋 聡, 水口弘司 他 (1992) 子宮内膜症に対する酢酸リユープロレリン徐放性製剤 (TAP-144-SR) の臨床的有用性の検討-酢酸ブセレリンを対照薬とした二重盲検比較試験-. *産婦世界* 44: 923-955
- 10) 星合 昊, 矢嶋 聡, 杉本 修 他 (1993) 酢酸リユープロレリン徐放性製剤 (TAP-144-SR) の子宮内膜症に対する臨床効果. *産婦世界* 45: 61-82
- 11) Dlugi AM, Miller JD, Knittle J, et al. (1990) Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Fertil Steril* 54: 419-427
- 12) 中村元一, 中野仁雄, 望月真人 他 (1992) 酢酸リユープロレリン注射用徐放性製剤 (TAP-144-SR) の子宮内膜症患者における薬物動態の検討. *薬理治療* 20: 3329-3341
- 13) 詠田由美, 本庄 考, 池田景子 他 (1995) HTF stock液にて作製した蛋白無添加80%Percoll液およびPercoll Cushion変法の有用性に関する検討. *日本受精着床会誌* 12: 97-101
- 14) Pittaway DE, Wentz AC (1984) Endometriosis and corpus luteum function. Is there a relationship? *J Reprod Med* 29: 712-716
- 15) Pittaway DE, Ellington CP, Klimek M (1988) Pre-clinical abortions and endometriosis. *Fertil Steril* 49: 221-223
- 16) Dikker D, Goldman GA, Ashkenazi J, et al. (1990) The value of pretreatment with gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue in IVF-ET therapy of severe endometriosis. *Human Reprod* 5: 418-420
- 17) Dikker D, Feldburg D, Goldman JA, et al. (1992) The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 57: 597-600
- 18) 森田 豊, 小島俊行, 竹田 省 他 (1991) 子宮筋腫および子宮腺筋症に対する術前buserelin投与の子宮漿膜下血管への影響と術中出血量におよぼす効果. *日産婦誌* 43: 197-204
- 19) Friedman AJ, Benacerraf B, Harrison-Atlas D, et al. (1989) A randomized, placebo-controlled, double-blind study evaluating the efficiency of leuprolide acetate depot in the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 51: 251-256
- 20) Friedman AJ, Barbieri RL, Benacerraf B, et al. (1987) Treatment of leiomyomata with intranasal or subcutaneous leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 48: 560-564
- 21) Maheux R, Lemay A, Meratt P (1987) Use of intranasal luteinizing hormone agonist in uterine leiomyomas. *Fertil Steril* 47: 229-233
- 22) 植村次雄, 木村昭裕, 白須和裕 他 (1989) LHRH agonistの鼻腔内投与による子宮筋腫の縮小効果について. *日産婦誌* 41: 365-368
- 23) Nakamura K, Oosawa M, Kondou I, et al. (1992) Menotropin stimulation after prolonged gonadotropin releasing hormone agonist pretreatment for in vitro fertilization in patients with severe endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 9: 113-117
- 24) 大島洋次郎, 根岸良吉, 吉田隆男 他 (1990) TAP-144-SRのラットにおける器官形成期投与試験(要旨). *薬理治療* 18 (Suppl. 3): 609
- 25) 植村次雄, 白須和裕, 堀 裕雅 他 (1992) 酢酸リユープロレリン徐放性製剤 (TAP-144-SR) の子宮内膜症における内分泌動態に及ぼす影響. *日不妊会誌* 37: 572-579
- 26) Gougeon A (1986) Dynamics of follicular growth in the human: A model from preliminary results. *Human Reprod* 1: 81-87

(受付: 1995年9月18日特掲)

(受理: 1995年9月30日特掲)

**An alternate to controlled ovarian hyperstimulation
with leuporelin acetate depot and buserelin acetate for in vitro fertilization and embryo transfer**

Yumi Nagata, Kou Honjo, Machi Kubota,
Keiko Ikeda, Motoko Kurashima and Koichi Shirakawa

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-08, Japan

Conception was successful in a patient where ovulation for IVF-ET was induced after administration of leuporelin acetate depot (LA depot) and buserelin acetate (BA).

The patient was a 40-year-old woman, who previously aborted in 8 weeks of pregnancy after IVF-ET treatment. She visited our clinic to desire for a baby. She was diagnosed as secondary infertility, uterine myoma, endometriosis and bilateral tubal obstruction. LA depot, 3.75 mg, was injected subcutaneously twice at 4-week intervals. BA 600 microgram per day was administered by rhinenchysis, starting from just 28 days after final LA depot administration. Then, hMG injection was started daily at just 35 days after the final LA depot administration. The basal level of LH and FSH in serum were < 1.0 and 3.7 mIU/ml before BA rhinenchysis, and 1.3 and 13.5 before hCG injection. These results indicated sufficient suppression of the serum LH level. Total hMG dose was 2925 IU and was administered for 16 days. We decided ova pick up with withdrawal day of BA rhinenchysis when at least two largest follicles reached over 18 mm. Subsequently, 5 oocytes in 6 follicles were collected and inseminated. On the following day, two pronuclei were confirmed in 5 oocytes. Three embryos of pronucleus stage were transferred into the uterus (53 days after LA depot administration). Consequently, a pregnancy with a single fetus became successful. She showed no complication with myoma during her pregnancy period. She delivered after 37 weeks of gestation.

Key words: ovarian hyperstimulation, IVF-ET, leuporelin acetate depot, uterine myoma, endometriosis

INDUCTION OF PARTURITION USING RU-486, AN ANTI-PROGESTERONE COMPOUND IN MICE

Kiichi KANAYAMA, Hiroshi KOIE*, Koichi NARIAI
and Tuyoshi ENDO

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

Katsuhiro YABE

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

Hidemi KADA

Laboratory of Animal Science, Department of Bioproduction Technology Junior College
Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156, Japan

Abstract: An attempt was made for inducing parturition by RU-486 at the late pregnancy in mice. The female mice were mated, and the day on which the vaginal plug was confirmed was regarded as Day 1.

RU-486 was injected on Day 17 or Day 18. Injection of RU 486, whether on Day 17 or Day 18, induced parturition within an average of 24 hours. In the Day 17 administration group, however, 5 out of 7 mother mice delivered stillborn young. On the other hand, in Day 18 administration group, most of the young were alive at birth. This study shows that injection of RU-486 on Day 18 is effective in inducing parturition for controlling birth timing in mice.

Key words: parturition, induction, mouse

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 66 - 69, 1996)

Introduction

It is well known that progesterone is essential for the continuation of pregnancy. A decrease in the blood progesterone concentration is considered to be involved in the onset of parturition. The blood progesterone concentration has been shown to decrease before parturition in rats¹⁾, rabbits²⁾, sheep³⁾, goats⁴⁾, pigs⁵⁾ and cattle⁶⁾. On the other hand, it has been also known that administration of progesterone at the late pregnancy prolongs the pregnant period⁷⁾. Therefore, a decrease in the blood progesterone concentration is considered to be one of the important factors to

induce parturition. Recently, there have been attempts to control the timing of parturition using RU-486, an antagonist of progesterone at its receptor level^{8 ~ 11)}.

In this study, to control the birth timing in mice, RU-486 was administered in the late pregnancy, and the time required for the induction of parturition and survival rate of the young were examined.

Materials and Methods

Mature female ddY mice (8 ~ 10 weeks old) were used in this study. The mice were mated with proven fertile mature male ddY mice (3 ~ 4 months old) and the next day on which formation of a vaginal plug

*Present address: The Second Department of Veterinary Internal Medicine, College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Kanagawa 252, Japan

was confirmed was regarded as Day 1. Between 19:00 and 21:00 on Day 17 or 18, RU-486 was administered. 30 mg/kg of RU-486 dissolved in 1 ml sesame oil (solvent) was subcutaneously injected into the cervical region of the mice. The dose of RU-486 was determined by our preliminary experiment in the rabbit. In the control group, mice were injected with 1 ml sesame oil without RU-486 in the same manner.

After injection of RU-486, each mouse was moved into a separate cage, and observed for induction of parturition, and the number and survival rate of the young every 1 ~ 2 hours.

For the convenience of this experiment, body weight of each newborn young was not measured. Therefore, total body weight of each litter was divided by the number of young of the litter to obtain the estimated body weight of individual newborn young.

The interval between RU-486 injection and the onset of parturition, and the body weight of a litter including stillborn young were analyzed by analysis of variance followed by Duncan's multiple-range test, and differences were considered significant when p -values were less than 0.05.

Results and Discussion

As shown in Table 1, in Day 17 administration group parturition in control mice was induced 40 ~ 71 hours (mean: 57.2 hours) after the injection of sesame oil, while it was induced 17 ~ 33 hours (mean: 22.6 hours) after administration in the RU-486-injected mice. Out of the 6 mice in the control group, no stillborn young have been delivered as

shown in Table 2. Average of the litter size in this group was 10.4, and average of the total body weight of a litter was 17.8 g. Therefore, the body weight of individual newborn young was estimated to be 1.71 g. On the other hand, young of 5 out of the 7 mother mice were stillborn in the RU-486-injected mice. The body weight of individual newborn young including the stillborn young was estimated to be 1.07 g (Table 2).

In Day 18 administration group, parturition was induced 24 ~ 38 hours (mean: 32.1 hours) after the injection of sesame oil in the control mice, while in the RU-486-injected mice, induction of parturition was observed 13 ~ 27 hours (mean: 21.2 hours) after RU-486 injection (Table 1). In the RU-486-injected mice, only 1 out of the 8 mother mice delivered stillborn young. The body weight of individual newborn young including stillborn young was estimated to be 1.48 g, as shown in Table 2.

In RU-486-injected groups in both Day 17 and Day 18, parturition was induced within 24 hours on average, showing no difference. When parturition was induced by RU-486 on Day 17, the mother mice delivered young of about 1.1 g in weight. Most of them were stillborn. On the other hand, a large majority were live newborn young if parturition was induced by RU-486 on Day 18. Although the estimated body weight of individual young of Day 18 group was about 0.15 g lighter than that of the control group, their growth was satisfactory. Therefore, we can realize that induction of parturition by RU-486 was shown to give satisfactory results if injection was carried out on Day 18, but live young were hardly

Table 1 Relationship between the day of RU-486 injection and interval to the onset of the parturition

Day of RU-486 injection	Group	No. of mice examined	Range of interval from RU-486 injection to the onset of the parturition (hrs.)	Average interval between RU-486 injection and the onset of the parturition \pm S.D. (hrs.)
Day 17*	Control (Oil-injected)	6	40 ~ 71	57.2 \pm 11.6 ^a
	RU-486-injected**	7	17 ~ 33	22.6 \pm 5.2 ^b
Day 18	Control (Oil-injected)	5	24 ~ 38	32.1 \pm 5.6 ^c
	RU-486-injected***	8	13 ~ 27	21.2 \pm 4.6 ^b

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

* The day on which the vaginal plug was confirmed was regarded as Day 1.

** RU-486 was injected at 20:00 \pm 1 hr on Day 17.

*** RU-486 was injected at 20:00 \pm 1 hr on Day 18.

Table 2 Effects of RU-486 administration on the frequency of stillbirth and body weight of a litter

Day of RU-486 injection	Group	No. of mice examined	No. of delivery cases of stillbirth	Litter size (including still-born young) ($\bar{x} \pm S.D.$)	Total body weight of a litter including stillborn young (g) ($\bar{x} \pm S.D.$)	Estimated body weight of individual young including stillborn young**** (g)
Day 17*	Control (Oil-injected)	6	0	10.4 \pm 3.6	17.8 \pm 1.4 ^a	1.71
	RU-486-injected**	7	5	10.7 \pm 0.8	11.4 \pm 3.3 ^b	1.07
Day 18	Control (Oil-injected)	5	0	10.8 \pm 3.8	17.6 \pm 4.2 ^a	1.63
	RU-486-injected***	8	1	9.4 \pm 4.2	13.9 \pm 5.2 ^{a, b}	1.48

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

* The day on which the vaginal plug was confirmed was regarded as Day 1.

** RU-486 was injected at 20:00 \pm 1 hr on Day 17.

*** RU-486 was injected at 20:00 \pm 1 hr on Day 18.

**** As body weight of each young was not measured, total body weight of a litter was divided by the number of young of the litter to obtain estimated body weight of individual young.

obtained if RU-486 injection was carried out on Day 17. On the other words, the critical point in which the parturition can be induced by RU-486 in mice existed between Day 17 and Day 18.

Although the mechanism of induction of parturition by RU-486 is not fully understood¹⁰, binding of RU-486 to the progesterone receptor in the uterus may have the same effect as a decrease in the blood progesterone concentration. This action of RU-486 on the uterus may be one of the factors to induce parturition. On the other hand, gap junctions (gjs), which is present between uterine muscle cells and forms immediately before the onset of parturition, is involved in the occurrence of cooperative contraction of the uterus at the parturition¹². It has been shown that the gjs formation is enhanced by the injection of RU-486¹³, and this is considered to be a direct mechanism to induce parturition by RU-486.

Based on these results, it is concluded that injection of RU-486 to mice on the Day 18 of the pregnancy is effective in inducing parturition. The newborn mice with estimated body weight of about 1.5 g were considered to grow without hindrance.

Acknowledgment

The authors thank Roussel Uclaf, Paris for supplying RU-486 for research use.

References

- 1) Hashimoto I, Henricks DM, Anderson LL, et al. (1968) Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333-341
- 2) Challis JRG, Davies I, Ryan KJ (1973) The relationship between progesterone and prostaglandin F concentrations in the plasma of pregnant rabbits. *Prostaglandins* 4: 509-516
- 3) Fylling P (1970) The effect of pregnancy, ovariectomy and parturition of plasma progesterone level in sheep. *Acta Endocrinologica* 65: 273-283
- 4) Thorburn GD, Nicol DH, Bassett JM, et al. (1972) Parturition in the goat and sheep: changes in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin F. *J Reprod Fertil Suppl* 16: 61-84
- 5) Ash RW, Heap RB (1975) Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning. *J Endocr* 64: 141-154
- 6) Donaldson LE, Bassett JM, Thorburn GD (1970) Peripheral plasma progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation, and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J Endocr* 48: 599-614
- 7) Edgren RA, Peterson DL (1966) Delay of parturition in rats by various progestational steroids. *Proc Soc Exp Biol Med* 123: 867-869
- 8) Bosc MJ, Germain G, Nicolle A, et al. (1987) Control of birth in rats by RU 486, an antiprogesterone compound. *J Reprod Fertil* 79: 1-8
- 9) Tsujii T (1989) Effects of the antigestagenic agent RU 486 in pregnant rats. *Jpn J Fertil Steril* 34: 37-46
- 10) Li Y, Perezgrovas R, Gazal OS, et al. (1991) Antiprogesterone, RU 486, facilitates parturition in

- cattle. *Endocrinology* 129: 765-770
- 11) Kanayama K, Nariyai K, Koie H, et al. (1994) Effects of antiprogesterone compound RU 486 on parturition induction in pigs. *Jpn J Fertil Steril* 39: 305-307
- 12) Saito Y (1983) The correlation between gap junction formation and changes of steroid hormone receptor concentration in the myometrial tissues of pregnant and postpartum rats. *Akita J Med* 9: 233
- 13) Garfield RE, Grasc JM, Baulieu EE (1987) Effects of the antiprogesterone RU 486 on preterm birth in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 157: 1281-1285
- (受付: 1995年6月22日)
(受理: 1995年10月2日)

抗プロゲステロン製剤, RU-486 を用いたマウスの分娩誘起

日本大学農獣医学部獣医学科生理学教室
金山喜一, 鯉江 洋*, 成相孝一, 遠藤 克

埼玉医科大学法医学教室
矢部 勝弘

東京農業大学短期大学部生物生産技術学科畜産学教室
加田日出美

*現所属: 日本大学農獣医学部獣医学科第二内科学教室

RU-486を妊娠末期のマウスに投与して分娩の誘起を試みた。妊娠17日または18日のマウスに30 mg/kgのRU-486を投与すると、いずれの場合も平均で24時間以内に分娩が誘起された。妊娠17日にRU-486を投与すると大部分は死産であったが、妊娠18日投与区では大多数の産子が生存産子として分娩された。

以上の結果より、妊娠18日のマウスではRU-486を用いて分娩の誘起が可能であることが示された。

キーワード: 分娩, 誘起, マウス

*現所属: 日本大学農獣医学部獣医学科第二内科学教室

PCNA法を用いた閉塞性無精子症の精細胞DNA合成能の定量的解析

Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in Obstructive Azoospermia using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen

山口大学医学部泌尿器科学教室

井本 勝彦
Katsuhiko IMOTO

瀧原 博史
Hiroshi TAKIHARA

島袋 智之
Tomoyuki SHIMABUKURO

内藤 克輔
Katsusuke NAITO

Department of Urology

Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan

小野田市立病院泌尿器科

白瀧 敬
Satoshi SHIRATAKI

Onoda city Hospital, Onoda 756, Japan

周東総合病院泌尿器科

馬場 良和
Yoshikazu BABA

Shuto General Hospital, Yanai 742, Japan

社会保険徳山中央病院泌尿器科

鎌田 清治
Kiyoharu KAMADA

Tokuyama Central Hospital, Tokuyama 745, Japan

今回我々はproliferating cell nuclear antigen (PCNA)法を用いて精細胞DNA合成能の視点より閉塞性無精子症患者の造精機能を定量的に解析した。

対象は、左精索静脈瘤患者14例、閉塞性無精子症患者8例であった。精巣生検組織固定後のパラフィン切片に抗PCNAモノクローナル抗体(PC-10)を用い免疫組織化学染色を行い、各切片の個々の精細管において基底膜に接する全精細胞数と全PCNA陽性精細胞数との比率をLabeling Index (%) (以下L.I.)として算出した。L.I.は左精索静脈瘤患者右精巣で $39.5 \pm 6.27\%$ 、同左精巣で $29.5 \pm 6.13\%$ 、閉塞性無精子症患者精巣で $20.8 \pm 5.75\%$ であった。

以上PCNA法を用いた精細胞のDNA合成能は、閉塞性無精子症患者精巣においては低下していることが示された。

キーワード：PCNA、閉塞性無精子症、精細胞DNA合成能

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 70 - 75, 1996)

緒 言

従来より、組織学的には閉塞性無精子症患者の造精機能は正常人のそれと大差ないと一般的に報告されている。しかし近年、精管結紮後の患者では正常人よりも造精機能が低下していたとの報告もなされてきた²⁾。さらに、我々の精管結紮後再吻合までの期間別の検討³⁾、また松田ら⁴⁾の報告においても精路閉塞期間が長期間におよんだ症例では術後成績が低下していたと報告されており、精路通過障害が長期間におよんだ場合に造精機能が低下している可能性も否定できない。そこで今回我々は、著者らが報告したproliferating cell nuclear antigen (以下PCNA) 法⁵⁾を用いて、精細胞DNA合成能の視点から閉塞性無精子症の造精機能を客観的に評価した。

対象および方法

対象は、1992年9月から1994年8月までに山口大学医学部附属病院泌尿器科において精巣生検を行った左精索静脈瘤患者14例、閉塞性無精子症患者8例であった。左精索静脈瘤患者の年齢分布は23歳～44歳で平均年齢は33.1歳、閉塞性無精子症患者の年齢分布は26歳～49歳で平均年齢は34.5歳であった。閉塞性無精子症の原因としては、原因不明2例、精巣上体炎1例、先天性精管欠損症3例、精管結紮後2例(結紮後9年、結紮後22年)であった。染色体異常症例および精巣容量は8ml未満の症例は本研究の対象より除外した。閉塞性無精子症においては閉塞期間5年未満の症例は除外し、また左右の精巣を独立して取り扱った。

精巣生検組織はブアン氏液にて1時間固定し、厚さ5 μ mのパラフィン切片を作製した。免疫組織化学染色はavidin-biotin peroxidase complex法を用いた。キシレン、アルコール列にて型通り脱パラフィンし、水洗後内因性ペルオキシダーゼを阻害した(0.3% H₂O₂水溶液, 30分間)。抗PCNAモノクローナル抗体

(PC-10, Dakopatts, Copenhagen, Denmark)は、100倍に希釈して免疫染色用の一次抗体として用いた。希釈液は0.02% TritonX-100と1%正常馬血清を含むリン酸緩衝液(PBS; phosphate buffered saline)を用いた。組織切片に一次抗体を加え、暗室にて2時間インキュベートした後、冷PBSで洗浄した(0℃, 5分間×3回)。以下のインキュベーションの後にも同様に冷PBSで洗浄した。次にビオチン化抗マウス抗体(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)で1時間インキュベートした後、ペルオキシダーゼ発色には3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (和光純薬, 大阪)を用い、増感のためイミダゾール(和光純薬)を添加した。核染色にはマイヤーのヘマトキシリンを使用した。すべてのインキュベーションは室温にて行った。

各切片において水平断され、ほぼ円形に保たれた精細管を選び、個々の精細管において基底膜に接する全精細胞数と基底膜に接する全PCNA陽性精細胞数との比率をLabeling Index (%) (以下L.I.) とし、同時にJohnsen's mean score count (以下JSC)⁶⁾も算出した。統計学的検定法はMann-Whitney's U-testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1) PCNA法を用いた精巣組織所見

各精細管において核が茶色にびまん性に染色されたPCNA陽性精細胞が散見れた(Fig. 1～3)。

2) Johnsen's mean score count

左精索静脈瘤患者右精巣で 7.50 ± 1.09 (Mean \pm S.D.), 同左精巣で 7.59 ± 1.16 、閉塞性無精子症患者精巣で 8.40 ± 0.47 であり、閉塞性無精子症患者精巣は左精索静脈瘤患者右精巣より有意に高値を示した(Table 1, $p < 0.05$)。

3) Labeling Index

左精索静脈瘤患者右精巣で $39.5 \pm 6.27\%$ 、同左精巣で $29.5 \pm 6.13\%$ 、閉塞性無精子症患者精巣で

Table 1 Johnsen's mean score count and Labeling index

	No. Pts.	Age (yrs.)	Johnsen's Mean Score Count	PCNA Labeling index
Lt. Varicocele	(Rt.)	14	7.50 ± 1.09	39.5 ± 6.27
	(Lt.)	14	7.59 ± 1.16	29.5 ± 6.13 b
Obstructive Azoospermia	8	34.5 ± 7.27	8.40 ± 0.47 a	20.8 ± 5.75 c,d

Values are means \pm standard deviation.

a: $p < 0.05$ v.s. Lt. Varicocele (Rt.) group

b: $p < 0.001$ v.s. Lt. Varicocele (Rt.) group

c: $p < 0.0001$ v.s. Lt. Varicocele (Rt.) group

d: $p < 0.0005$ v.s. Lt. Varicocele (Lt.) group

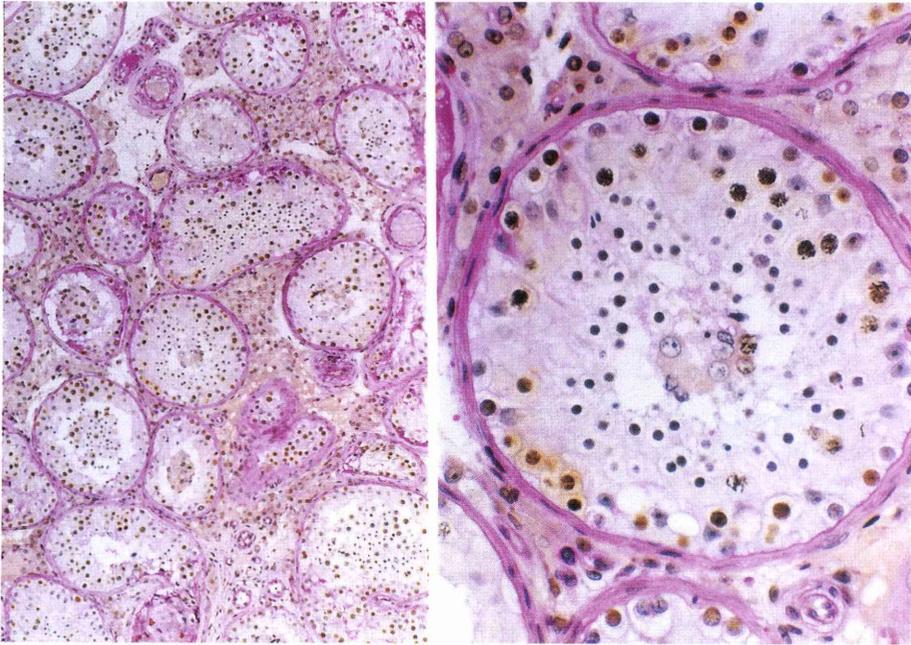


Fig. 1 Immunohistochemical staining of right testis from a 35-year-old man with left varicocele, with an anti-PCNA monoclonal antibody (PC-10).

Left: $\times 100$, Right: $\times 400$. Nuclei of cells which incorporated PCNA were brown in color while unincorporated nuclei were blue. PCNA-labeled cells were found on the periphery of the seminiferous tubule. L.I. is 45.7 and JSC is 8.0.

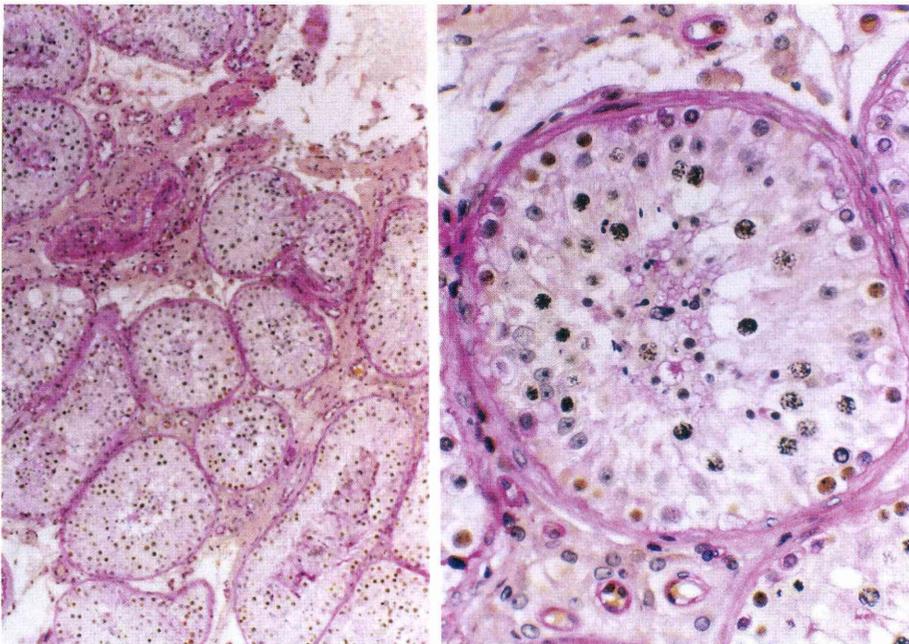


Fig. 2 Immunohistochemical staining of left testis (same patient of Fig. 1) with an anti-PCNA monoclonal antibody (PC-10). Left: $\times 100$, Right: $\times 400$. L.I. is 27.1 and JSC is 8.0.

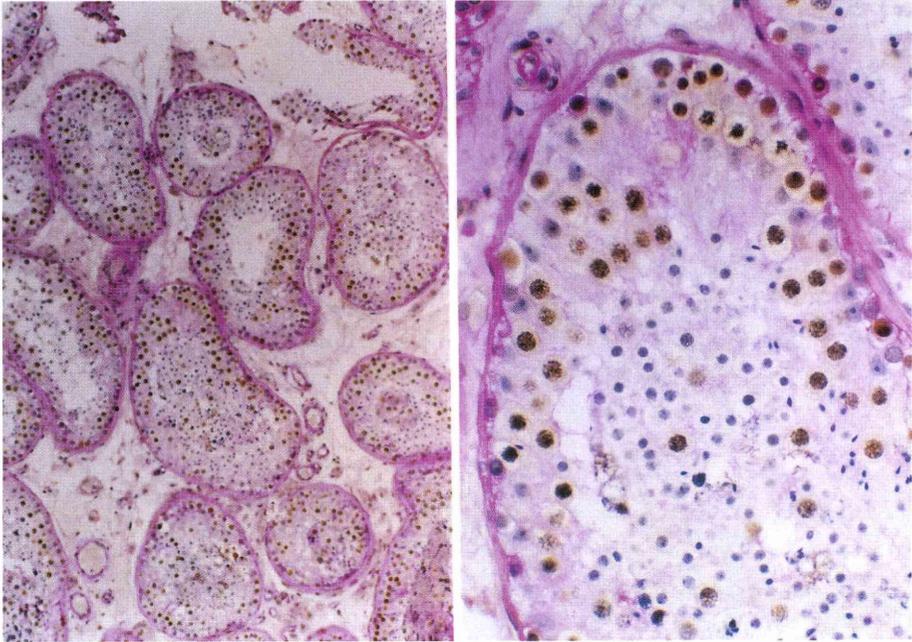


Fig. 3 Immunohistochemical staining of right testis from a 49-year-old man with obstructive azoospermia due to vasectomy performed 22 years before, with an anti-PCNA monoclonal antibody (PC-10).

Left: $\times 100$, Right: $\times 400$. L.I. is 24.8 and JSC is 8.6.

20.8 \pm 5.75%であり、左精索静脈瘤患者左精巣と閉塞性無精子症患者精巣は左精索静脈瘤患者右精巣より有意に低値を示した (Table 1, 各々 $p < 0.001$, $P < 0.0001$).

考 察

閉塞性無精子症患者の造精機能は Makler によれば 1) 精細管直径, 2) 精細管基底膜の厚さ, 3) 精細管内精細胞数, 4) 精細胞成熟度の 4 点から正常人のそれとほぼ同様である。しかし, Jonathan らは精管結紮患者 31 例と正常人 21 例の精巣生検を対象として, 一精細管あたりの精子細胞数を算出し, 精管結紮患者は正常人より精子細胞数が低下していたと報告している²⁾。さらに精路再建術後の成績^{3,4)}からも精路通過障害が長期間におよんだ場合に造精機能が低下している可能性も否定できない。そこで今回我々は, 閉塞性無精子症の造精機能を評価するために精細胞 DNA 合成能の定量的解析の視点から PCNA 法⁵⁾を試み, 同時に JSC も算出し両者を比較した。なお, 今回の検討においては臨床研究における倫理上の制限から正常対照群は設定できなかったため, 左精索静脈瘤患者左右精巣と閉塞性無精子症患者精巣との間で造精機能の比較検討を行った。

精細胞の DNA 合成能の評価には従来より flow cytometry による DNA 量解析^{7,8,9)} やトリチウム-thymidine autoradiography 法¹⁰⁾, bromodeoxyuridine (以下 BrdU) 法¹¹⁾ などの細胞増殖のマーカーによる免疫組織染色法が応用されてきた。我々は BrdU 法を用いてラット精細胞の DNA 合成能に基づいた造精機能の定量的解析を行いその有用性を報告した¹¹⁾。しかし, BrdU 法は手技が煩雑で発癌性薬剤の前投与などを要するため, 臨床応用には限界がある。このため我々は PCNA 法を用いてラット精細胞の DNA 合成能の定量的解析を行い BrdU 法と比較検討した⁵⁾。PCNA は 36-kDa の DNA 合成酵素である DNA ポリメラーゼ δ の補助酵素であり¹²⁾, 細胞周期の G1 後期から S 期の核に蓄積し¹³⁾, 細胞増殖の重要な役割を果たしている¹⁴⁾。PCNA は細胞増殖期の細胞核に存在するため腫瘍細胞の DNA 合成能解析に応用されてきた。近年パラフィン切片に使用可能な抗体が得られ, グアン氏液で固定したパラフィン切片でも PCNA 法が使用可能となった。精祖細胞から精子までの精子形成過程において DNA 合成は leptotene spermatocytes までに行われていると報告されている¹⁵⁾。著者らの検討では形態学的に容易に識別可能な leptotene spermatocytes 以降の PCNA 陽性精細胞を除外し補正することによ

り、PCNA法はBrdU法に近似し、PCNA法は精細胞DNA合成能の客観的評価の指標として有用であることが示された⁵⁾。これらの結果からPCNA法を閉塞性無精子症と左精索静脈瘤の造精機能の評価に試みた。

今回の解析においては閉塞性無精子症患者精巣におけるL.I.は左精索静脈瘤患者右精巣におけるそれより有意に低値を示し、左精索静脈瘤患者左精巣におけるそれよりもさらに有意に低値を示した。すなわち、精細胞のDNA合成能は閉塞性無精子症患者精巣においては低下していることが示された。一方、JSCは閉塞性無精子症患者精巣では左精索静脈瘤患者右精巣より有意に高値を示しており、PCNA法による精細胞DNA合成能の結果と一致しなかった。JSCと他の造精機能評価法との解離については、伊藤らは精巣生検を施行した男子不妊症患者52例を対象としてJSCとGerminal cell index (以下GCI)を比較したところJSCとGCIとは正相関するがJSCが9点台であっても43%の症例でGCIは低下しており、JSCは造精機能の客観的評価の指標として問題があると報告している¹⁶⁾。閉塞性無精子症におけるJSCとL.I.の結果の解離については必ずしも明らかではないが、ひとつの推論としては、JSCは精細胞の層の配列、精子形成能を形態学的に解析しているのに対して、L.I.は精細管基底膜に接する精祖細胞のDNA合成能を定量的に解析している。すなわち、精子形成過程において前者は精子成熟を、後者は精祖細胞のDNA合成能を解析しているために両者の結果に解離が生じたと考えられている。

今回の我々の結果は、精子形成能が閉塞性無精子症において低下している点ではJonathanらの結果²⁾と一致した。彼らが一精細管あたりの精子細胞数を直接算出したのに対して、我々は細胞周期のG1後期からS期にある精細胞を算出して精細胞DNA合成を定量的に解析し、細胞動態の観点から造精機能の評価した。一方左精索静脈瘤患者においては、造精機能の低下は患側精巣に高度で対側精巣は軽度であると報告されている^{9,17,18,19)}。田中らも精索静脈瘤患者10例と正常コントロールの精巣生検にPCNA法を応用してImage cytometryを用いて精細胞DNA合成能を比較検討し、精索静脈瘤患者精巣は正常コントロール精巣より精細胞DNA合成能が低下していたと報告している²⁰⁾。

今回の検討においては臨床研究における倫理上の制限から正常対照群は設定できなかったが、閉塞性無精子症患者精巣のPCNA法による精細胞DNA合成

能が左精索静脈瘤患者の左右いずれの精巣におけるそれより低下していたことより、閉塞性無精子症患者の精細胞DNA合成能は正常人よりも低下していることが推察された。

なお、本論文の要旨は第39回日本不妊学会学術講演会にて発表した。(本研究は1994年度文部省科学研究費一般研究C課題番号06671591(H.T.)の補助を受けた。)

文 献

- 1) Makler A and Abramovici H (1978) The Correlation between sperm count and testicular biopsy using a new scoring system. *Int J Fertil* 23: 300-304
- 2) Jonathan PJ, Robert EB, Martin D, et al. (1985) Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy—A controlled study—. *New Engl J Med* 313: 1252-1256
- 3) 瀧原博史, 井本勝彦, 白瀧 敬 他 (1995) 精路通過障害に対する精路再建手術の臨床的研究. *西日泌尿* 57: 421-427
- 4) 松田公志, 六車光英, 小松洋輔 他 (1993) 精路閉塞症に対する精管精管吻合術および精巣上体精管吻合術, 閉塞原因と手術成績の検討. *日泌尿会誌* 84: 1665-1674
- 5) 井本勝彦, 瀧原博史, 白瀧 敬 他 (1994) 抗PCNAモノクローナル抗体を用いた造精機能評価の基礎的検討—抗BrdUモノクローナル抗体との比較—. *日本アンドロロジー学会第13回学術大会講演抄録集*: 123-124
- 6) Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testis: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25
- 7) 川井修一 (1984) Flow Cytometryによる睾丸内精子形成能の評価判定, 第1報: ヒト睾丸組織内DNA量分布測定の基礎的検討. *泌尿紀要* 30: 1021-1027
- 8) 川井修一 (1985) Flow Cytometryによる睾丸内精子形成能の評価判定, 第2報: 男子不妊症患者の精子形成能の評価. *泌尿紀要* 31: 87-95
- 9) Takihara H, Sakatoku J, Cockett ATK (1991) The Pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril* 55: 861-868
- 10) Monesi V (1962) Autoradiographic study of DNA synthesis and the cell cycle in spermatogonia and spermatocytes of mouse testis using tritiated thymidine. *J Cell Biol* 14: 1-18
- 11) Shirataki S, Takihara T, Imoto K, et al. (1994) Quantitative analysis of spermatogenic DNA syn-

- thesis in the rat using a monoclonal anti-5-bromo-deoxyuridine. *Andrologia* 26: 343-349
- 12) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al. (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 326: 515-517
- 13) Jaskulski D (1988) Inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxy-nucleotides to PCNA/cyclin. *Science* 240: 1544-1546
- 14) 田中一成 (1991) 抗PCNA抗体による増殖細胞核の染色—パラフィン切片への応用—, *病理と臨床* 9: 791-798
- 15) 西宗義武 (1979) 精細胞のDNA合成. 性I, 代謝 vol 16 臨時増刊号, 中山書店, 東京, pp433-438
- 16) 伊藤直樹, 熊本悦明, 丸田 浩 他 (1995) spermatogenesisの定量的評価法に関する検討—Johnsen's score count (JSC) と Germinal cell index (GCI) の比較—. *日泌尿会誌* 86: 88
- 17) 石津和彦 (1990) 片側性精索静脈瘤による両側精巣の造精機能障害—実験的研究—. *日不妊会誌* 35: 1, 142-149
- 18) Guarch R, Pesce C, Pusas A, et al. (1992) A quantitative approach to the classification of hypospermatogenesis in testicular biopsies for infertility. *Hum Pathol* 23: 1032-1037
- 19) Abdallah AI, Hosni AA, Shawki EH, et al. (1977) Bilateral testicular biopsy in men with varicocele. *Fertil Steril* 28: 663-667
- 20) 田中宏和, 藤澤正人, 瀧見 昇 他 (1995) Image cytometryによるヒト精細胞DNA合成能の解析. *日泌尿会誌* 86:88

(受付: 1995年7月13日)

(受理: 1995年10月2日)

Quantitative analysis of spermatogenic DNA synthesis in obstructive azoospermia using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen

Katsuhiko Imoto, Hiroshi Takihara, Satoshi Shirataki,
Yoshikazu Baba, Kiyoharu Kamada, Tomoyuki Shimabukuro
and Katsusuke Naito

Department of Urology
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755, Japan

Many authors reported that the spermatogenesis in patients with obstructive azoospermia is almost equivalent to histopathologically normal control group. In recent years, some authors reported that the spermatogenesis in patients with obstructive azoospermia is lower than that in normal control group histopathologically. In view of spermatogenic DNA synthesis, we quantitatively analyzed spermatogenesis in obstructive azoospermia using a monoclonal antibody (PC-10) against proliferating cell nuclear antigen.

The material consisted of 14 men with left varicocele and 8 men with obstructive azoospermia whose testicular biopsies were performed in our department between September, 1992 and August, 1994. A piece of testicular tissue was taken from each testicle and immediately fixed in Bouin's fluid for 1 hour at room temperature. The tissue was dehydrated, embedded in paraffin, and cut into $5\mu\text{m}$ sections. The tissue sections were immunostained with the avidin-biotin complex immunoperoxidase technique using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen. We selected round tubules on each tissue section and counted labeling index (%) (Number of proliferating cell nuclear antigen-labeled germinal cells per that of germinal cells on the periphery of the seminiferous epithelium). The labeling index was $39.5 \pm 6.27\%$ in the right testicles of left varicocele group, $29.5 \pm 6.13\%$ in the left testicles of left varicocele group and $20.8 \pm 5.75\%$ in the testicles of obstructive azoospermia group. The testicles of obstructive azoospermia group showed significant lower labeling index than the right testicles of left varicocele group ($p < 0.0001$) and still lower than the left testicles of left varicocele group ($p < 0.0005$).

In conclusion, it was shown that using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen, spermatogenic DNA synthesis in obstructive azoospermia was significantly decreased.

Key words: PCNA, obstructive azoospermia, spermatogenesis

ヒト顆粒膜細胞における インターロイキン-6分泌に対する漢方薬の影響

Effect of the Kampo Prescriptions on the Secretion of Interleukin-6 in Human Granulosa Cells

秋田大学医学部産科婦人科学教室

太田博孝

Hiroataka OTA

福田淳

Jun FUKUDA

田中秀則

Hidenori TANAKA

軽部裕子

Hiroko KARUBE

児玉英也

Hideya KODAMA

田中俊誠

Toshinobu TANAKA

Department of Obstetrics and Gynecology

Akita University School of Medicine, Akita 010, Japan

卵巣機能の調節にサイトカインが重要な役割を果たしていることが知られてきた。今回、漢方薬のサイトカイン、とくにインターロイキン-6(IL-6)分泌に及ぼす影響を検討した。

体外受精治療周期から得られた顆粒膜細胞を2日間培養し、同時に当帰芍薬散、温経湯、芍薬甘草湯、あるいは各種生薬、アロマターゼ拮抗剤(4-OHA; 10⁻⁷M)を添加し、培養液中のIL-6分泌量の変動を測定した。4-OHA添加の有無にかかわらず、各漢方薬は10~1000 μgの濃度でIL-6分泌量を有意に増加させた。各漢方薬を構成する主な生薬の添加(100 μg/ml)では当帰、芍薬、甘草がIL-6を生薬非添加群より有意に増加させた。桂皮、蒼朮、茯苓ではIL-6分泌量の減少傾向をみた。

以上より、漢方薬には中枢への内分泌作用とともに、ヒト顆粒膜細胞でIL-6分泌促進作用を有することを、さらに構成生薬ではその分泌を促進、抑制、影響しない生薬など、相互に調節しあって卵巣機能を統合していることを明らかにした。

キーワード: ヒト、顆粒膜細胞、漢方薬、インターロイキン-6、サイトカイン

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 76-81, 1996)

緒言

性成熟期女性に使われる漢方薬に当帰芍薬散、温経湯、芍薬甘草湯、桂枝茯苓丸などがある。これら漢方薬は不妊症、不育症などの性腺機能低下症にも幅広く使われている。漢方薬は複数の生薬から構成され、その有効成分も多岐にわたる。一般的な西洋薬のように単一の成分のみの薬剤では、中枢や卵巣などの標的器官のみに作用し、他の器官に作用することは少ない。

近年、視床下部-下垂体-卵巣の内分泌系の調節に液性免疫因子であるサイトカインが内分泌ホルモンとともに重要な調節因子であることが明らかになってきた¹⁻³⁾。サイトカインとは免疫細胞やマクロフ

ージなどから分泌され、他の細胞の受容体と結合することにより作用する液性因子をいう。サイトカインは上記細胞のみならず、繊維芽細胞、血管内皮細胞⁴⁾、さらに卵巣の顆粒膜細胞⁵⁾、子宮内膜間質細胞⁶⁾でも分泌される。卵巣顆粒膜細胞から分泌されるサイトカインにはインターロイキン(IL)-1、IL-6、腫瘍壊死因子(TNF)-α、インターフェロン(INF)-γなどがある¹⁻³⁾。これらサイトカインは相互に作用しあい、卵巣機能調節の複雑なネットワークを形成している。

このうちIL-6は基本的にT細胞から分泌され、B細胞を抗体産生細胞に分化するように働く。さらにIL-6は卵巣で性ステロイドホルモン分泌に関与していることが知られてきた^{2,3,6)}。また、IL-6は骨形成

や⁷⁾、副腎皮質ホルモン分泌の促進にも関与する⁸⁾という多彩な生理作用をもつことが指摘されている。

しかし、漢方薬と卵巣でのIL-6分泌との関連について検討した報告は今のところ見られていない。そこで、本研究では卵巣顆粒膜細胞からの漢方薬のIL-6分泌に及ぼす影響について検討したので報告する。

材料と方法

1) 細胞採取法

研究に用いた顆粒膜細胞は同意の得られた27歳より36歳までの不妊婦人で、体外受精・胚移植を受けた症例から得られた。各症例は月経開始7日前よりLHRHアナログ(スプレキュア®; 日本ヘキスト株式会社, 東京)300 μ gを1日3回投与した。各症例は月経開始3日目よりhuman menopausal gonadotropin (hMG; 帝国臓器株式会社, 東京)225単位を連日注射された。超音波断層法で経腔的に連日卵胞径を計測し、最大卵胞径が18mmに達した時、human chorionic gonadotropin (hCG; 帝国臓器)10,000 IUに切り換え、36~37時間後超音波断層法下に経腔的に卵胞を穿刺した。各症例で穿刺した卵胞は最大卵胞径が少なくとも15mm以上あるものとした。卵子を分離後、顆粒膜細胞を含む卵胞液に0.1% hyaluronidaseを含むHam's F-12を20対1の割合で加え、単層Percoll液(5ml)上に層積し顆粒膜細胞を分離した。分離後 20×10^4 /mlの濃度になるようにHam's F-12を加え細胞浮遊液を作製した。用いた症例のhCG切り換え日の血中プロゲステロン値はいずれも1ng/ml未満の例で、卵胞内に成熟卵子を認めた例とした。なお、各卵胞からは平均22万個の顆粒膜細胞が得られた。また、各実験は2~3の症例から集めた顆粒膜細胞をまとめて行い、同一の実験を最低2回繰り返した。

2) 細胞培養法

浮遊細胞の一部は0.5% trypan blueにて染色し、その細胞数、細胞生存率を算定した。細胞生存率は45~65%であった。Ham's F-12には5% fetal bovine serum (A-1115-L: HyClone Lab., Inc.; Logan, Utah, USA)とpenicillin-streptomycin溶液(GIBCO; 100 U/ml, 100 μ g/ml)を添加した。細胞浮遊液は各ウェルあたり 2×10^4 個とし、全量で1mlとなるようにmulti-well tissue culture plate (Falcon; 3047)上に分配した。各plateは5% CO₂, 95% air, 37℃の条件下で24時間前培養後培養液を交換し、各種薬剤を加え再び全量で1mlとした後、48時間静置培養した。培養終了後培養液はIL-6測定時まで-20℃で保存した。

表1 本研究で用いた漢方薬とその構成生薬

	当帰芍薬散	温経湯	芍薬甘草湯
芍薬	○	○	○
当帰	○	○	
甘草		○	○
川芎	○	○	
茯苓	○		
桂皮		○	
蒼朮	○		
牡丹皮		○	

3) 添加薬物

実験に供した漢方薬は当帰芍薬散、温経湯、芍薬甘草湯である。生薬は表1に示すように各漢方薬を構成する主なもので、芍薬、当帰、甘草、川芎、茯苓、桂皮、蒼朮、牡丹皮である。これら漢方薬と生薬はすべてツムラ株式会社(東京)より提供された。培養液で1mg/mlの濃度で溶解後0.22 μ mのフィルターで滅菌濾過し、1 μ g/mlの濃度まで希釈した。各漢方薬は各ウェルあたり1~1000ng/mlの濃度で、また各生薬は各ウェルあたり100ng/mlの濃度で検討した。またすべてのウェルに基質としてandrostenedione (Sigma; 10^{-7} M)を添加した。同剤はそれ自体、アロマターゼ活性を刺激し、かつエストロゲンに転換される。さらにアロマターゼ活性抑制剤として4-hydroxy-androstenedione (4-OHA)を使用した。4-OHAはBrodieら⁹⁾により見いだされた合成ステロイドであり、アロマターゼに結合しその活性を失活させる自殺基質である。

4-OHAは顆粒膜細胞を用いた予備実験で 10^{-7} Mの濃度でエストラジオール分泌をほぼ測定感度以下と十分抑制したため、以後同濃度で使用した。両ホルモンは100%エタノール液で溶解し 10^{-2} Mの溶液を作成後培養液で希釈し、 10^{-7} Mの濃度で使用した。

4) IL-6測定法

ヒトIL-6の測定はELISAによるキット(Human IL-6 ELISA Kit Fujirebio; 富士レビオ株式会社, 東京)を用いて測定した。本キットの測定感度は0.2pg/mlであり、ヒトIL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、TNF- α との交叉反応性はない¹⁰⁾。

5) 統計分析法

各群は平均5~9個のウェルから構成した。測定値の平均はMean \pm SEMで示した。各群間の検定は一元配置分散分析法(ANOVA)を用い、P<0.05以下の時を有意差ありとした。

結 果

1) 漢方薬添加によるIL-6分泌量の変動

当帰芍薬散 $1 \mu\text{g}$ から $1000 \mu\text{g}$ を培養液中に添加し、IL-6分泌量の変動をみた(図1)。4-OHA非添加, 添加の両群では全体でそれぞれ有意($P < 0.05$, 0.001)の差をみた。漢方薬, 4-OHA非添加の対照群でIL-6量は 18.8 pg/ml で, 当帰芍薬散によりIL-6は用量依存性に増加し, $1000 \mu\text{g}$ 添加群で漢方非添加群より有意の増加を, また4-OHA同時添加群では非添加の対照群より減少はなく, 100 , $1000 \mu\text{g}$ の当帰芍薬散添加でIL-6分泌量の有意($P < 0.01$)の増加をみた。

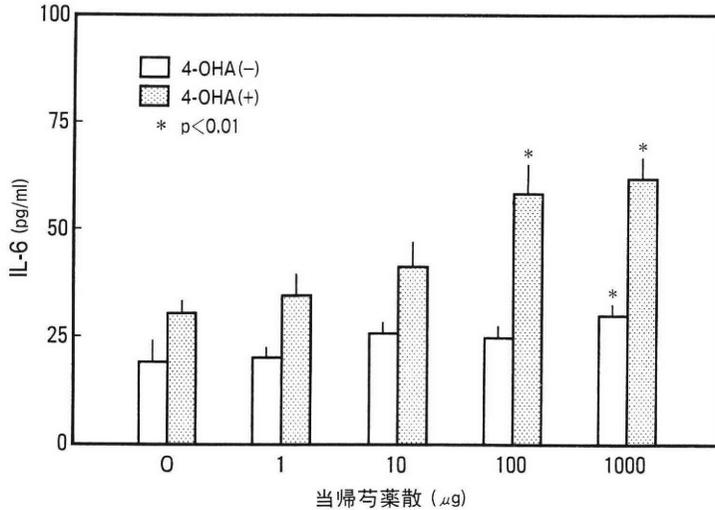


図1 当帰芍薬散添加によるIL-6分泌量の変動
* $P < 0.01$ (漢方非添加群と比較し)

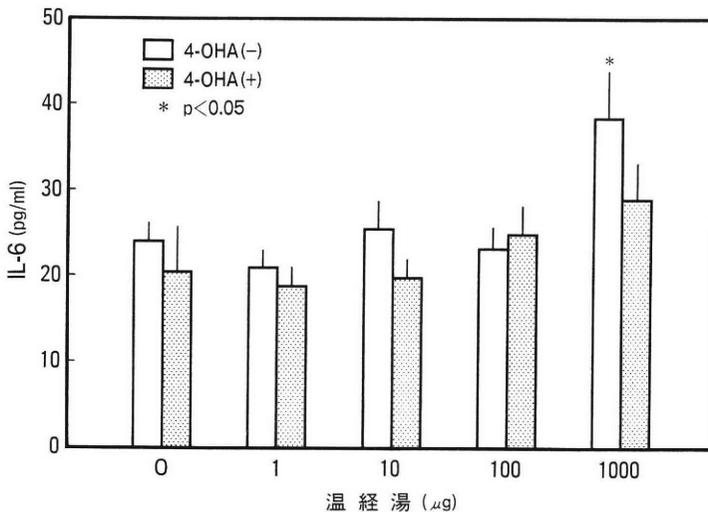


図2 温経湯添加によるIL-6分泌量の変動
* $P < 0.05$ (漢方非添加群と比較し)

温経湯投与群のうち4-OHA非投与群では各群間に有意($P < 0.05$)の差があり, $1000 \mu\text{g}$ 群で漢方非添加群より有意の増加をみた(図2)。しかし, 4-OHA同時添加群では増加傾向をみたものの, 各群間に有意の差はなかった。

芍薬甘草湯投与群では4-OHA非添加, 添加の両群で各群間に有意の差はなかった。しかし, 4-OHA同時添加群のうち, $100 \mu\text{g}$ 群と漢方非添加群の2群間の比較では有意($P < 0.05$)の増加を認めた(図3)。

2) 生薬添加によるIL-6分泌量の変動

8種の生薬各 $100 \mu\text{g}$ をそれぞれ添加し, IL-6分泌量の変動をみた(図4)。全体では有意($P < 0.01$)の差

を認めた。生薬非添加群より有意の増加をみたのは、当帰、芍薬、甘草の3種の生薬であった ($P < 0.05, 0.05, 0.01$)。桂皮、蒼朮、茯苓ではIL-6量はむしろ減少傾向を示した。

考 察

卵巢から分泌されるサイトカインにはIL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ などがある¹⁻³⁾。IL-6が卵巢内で産生されることは、mRNAレベルでも証明されている¹¹⁾。しかし、IL-6がヒト卵巢内でどのような働きをしているのかは不明な点が多い。In vitroの研究では、IL-6はラット顆粒膜細胞から分泌され、FSHや

INF- γ にはさらにその効果を高める作用がある^{12,13)}。一方、IL-6の作用は卵巢周期の各時期や動物種で異なるようである。すなわち、IL-6は未熟ラット顆粒膜細胞ではプロゲステロン分泌を用量依存性に抑制する¹³⁾。また、牛小卵胞由来の顆粒膜細胞でIL-6はFSHによる顆粒膜細胞の分化増殖を抑制し、エストラジオール分泌を抑制する¹⁴⁾。排卵期でIL-6は卵胞壁を脆弱化し、血管透過性を亢進させるという^{15,16)}。しかし、IL-6は黄体細胞でhCG添加によるエストラジオール分泌に影響しない¹⁷⁾。本研究で各漢方薬にはIL-6分泌促進作用を認め、とくに当帰芍薬散では著明であった。構成生薬では、当帰、芍薬、甘草

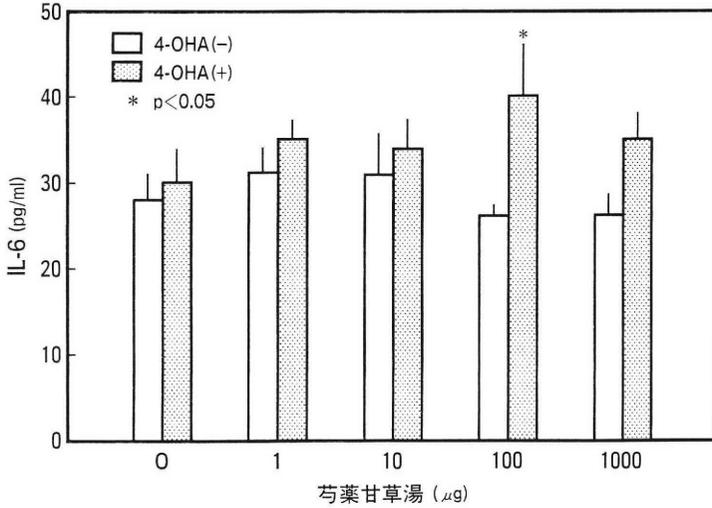


図3 芍薬甘草湯添加によるIL-6分泌量の変動
* $P < 0.05$ (漢方非添加群と比較し)

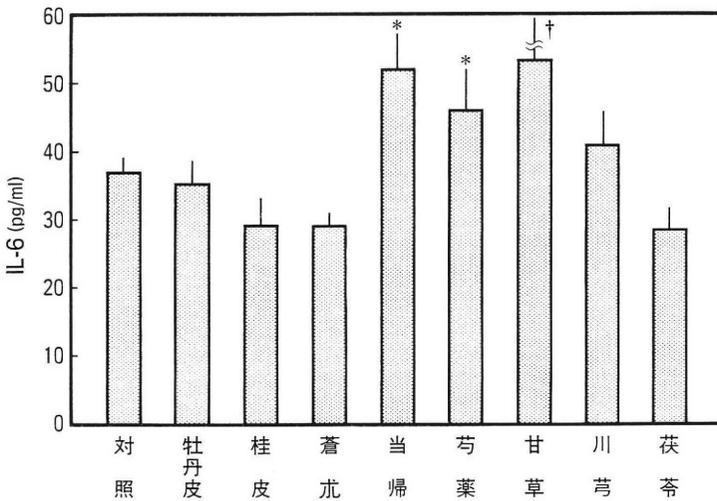


図4 生薬添加によるIL-6分泌量の変動
* $P < 0.05$ (漢方非添加群と比較し), † $P < 0.01$ (漢方非添加群と比較し)

にIL-6分泌促進作用がみられ、桂皮、茯苓などにはむしろ抑制傾向を認めた。当帰、芍薬は当帰芍薬散を構成する主な生薬であることは興味ある事実である。

漢方薬にはインターフェロンやサイトカイン誘発能、抗腫瘍活性などの生体の免疫調節作用を有することが報告されている。例えば、小柴胡湯、十全大補湯には末梢単球でIL-1, IL-6やTNF- α 、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)などを誘導する¹⁸⁻²⁰⁾、また、当帰芍薬散には血中に存在する免疫複合体の除去作用が報告されている²¹⁾。漢方薬の構成生薬レベルでは、桂枝、柴胡、川芎、当帰にはTNF産生能があり¹⁹⁾、当帰には免疫複合体除去作用が²²⁾、甘草の主成分であるグリチルリチンにはインターフェロン誘発能がある^{23,24)}。したがって、今回得られた当帰、芍薬、甘草のIL-6分泌促進作用とあわせ、漢方薬の免疫系を介する作用がきわめて多様であることが示唆された。

今回の成績は漢方薬の作用機序の特徴を示すものとしてきわめて興味深い。すでに我々は漢方薬が卵巣顆粒膜細胞のアロマターゼ活性に直接影響することを報告した^{25,26)}。さらに顆粒膜細胞アロマターゼ活性に影響する生薬として、抑制のみするもの、正常以下に抑制された時正常状態に戻そうと促進する生薬群、さらに同活性にまったく影響しない生薬があることを報告してきた^{27,28)}。漢方薬は主な作用をもつ君薬、君薬の薬効をさらに増強する臣薬、君・臣2薬による薬効を助ける佐薬や、逆にそれらの働きを調節する使薬の4種の生薬群から構成される。したがって、本成績のように各生薬間の機能に大きな差異が発現していることはよく理解された。

以上、本研究から漢方薬には中枢、あるいは卵巣への内分泌作用とともに、ヒト顆粒膜細胞でサイトカイン分泌促進作用を有することが明らかになった。今後、さらにIL-1, INF- γ など他のサイトカインをめぐる卵巣機能へのかかわりについて検討することが必要と考えられた。

本論文の要旨の一部は、第39回日本不妊学会公開シンポジウム(富山, 1994年)において発表した。

謝 辞

IL-6測定に多大なご協力をいただいた秋田大学医学部産科婦人科学研究所の阿部直臣、高橋真紀両氏に感謝いたします。

文 献

1) Ben-Rafael Z, Orvieto R (1992) Cytokines-

involvement in reproduction. *Fertil Steril* 58: 1093-1099

- 2) Brännström M, Norman RJ (1993) Involvement of leukocytes and cytokines in the ovulatory process and corpus luteum function. *Hum Reprod* 8: 1762-1775
- 3) Tabibzadeh S (1994) Cytokines and the hypothalamic-pituitary-ovarian-endometrial axis. *Hum Reprod Update* 9: 947-967
- 4) Van-Snick J (1990) Interleukin-6: an overview. *Ann Rev Immunol* 8: 253-278
- 5) Ziltener HJ, Maines-Bandiera S, Schrader JW, et al. (1993) Secretion of bioactive interleukin-1, interleukin-6, and colony-stimulating factors by human ovarian surface epithelium. *Biol Reprod* 49:635-641
- 6) Tabibzadeh SS, Santhanam U, Sehgal PB, et al. (1989) Cytokine-induced production of IFN- β 2/IL-6 by freshly explanted human endometrial stromal cells-Modulation by estradiol-17 β . *J Immunol* 142: 3134-3139
- 7) Feyen JHM, Elfrod P, Di Padova FE, et al. (1989) Interleukin-6 is produced by bone and modulated by parathyroid hormone. *J Bone Min Res* 4: 633-638
- 8) Salas MA, Evans SW, Levell MJ, et al. (1990) Interleukin-6 and ACTH act synergistically to stimulate the release of corticosterone from adrenal gland cells. *Clin Exp Immunol* 79: 470-473
- 9) Brodie AMH, Schwarzel WC, Brodie HJ (1976) Studies of the mechanism of estrogen biosynthesis in the rat ovary 1. *J Steroid Biochem* 7: 783-793
- 10) Shimamura T, Taki S, Honda H, et al. (1991) Analysis of interleukin 6 (IL-6)/IL-6 receptor system using monoclonal anti-IL-6 antibodies. *Mol Immunol* 28: 1155-1161
- 11) Motro B, Itin A, Sachs L, et al. (1990) Pattern of interleukin 6 gene expression in vivo suggests a role for this cytokine in angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 87: 3092-3096
- 12) Gorospe WC, Spangelo BL (1993) Interleukin-6 production by rat granulosa cells in vitro: Effects of cytokines, follicle-stimulating hormone, and cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate. *Biol Reprod* 48: 538-543
- 13) Gorospe WC, Hughes Jr FM, Spangelo BL (1992) Interleukin-6: effects on and production by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinology* 130: 1750-1752
- 14) Alpizar E, Spicer LJ (1993) Effects of interleukin-6 on proliferation and follicle-stimulating hormone-induced estradiol production by bovine granulosa cells in vitro: Dependence on size of follicle.

- Biol Reprod 49: 38-43
- 15) Brännström M, Norman RJ, Seamark RF, et al. (1994) Rat ovary produces cytokines during ovulation. *Biol Reprod* 50: 88-94
- 16) Maruo N, Morita I, Shirao M, et al. (1992) IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology* 131: 710-714
- 17) Pitzel L, Jarry H, Wuttke W (1993) Effects and interactions of prostaglandin F_{2α}, oxytocin, and cytokines on steroidogenesis of porcine luteal cells. *Endocrinology* 132: 751-756
- 18) 山舖昌由, 西村 晃, 伊藤早苗 他(1994) 癌患者における末梢血単核球のin vitroでのサイトカイン産生能に及ぼす小柴胡湯の影響について. *漢方医学* 18: 201-204
- 19) 原中勝征, 里見信子, 桜井明子 他(1985) 和漢薬の抗腫瘍効果とTNF(腫瘍壊死因子)産生能について. *現代東洋医学*, 6: 85-91
- 20) 早川 智, 千島史尚, 白石尚美 他(1987) 漢方薬による化学療法後の骨髄障害防御は内因性サイトカインを介する. *産婦人科漢方研究のあゆみXI*, 診断と治療社, 東京, pp64-69
- 21) 飯島宏治, 田中盛久, 丁 宗鐵(1990) 免疫複合体除去能に対する当帰芍薬散の作用. *和漢医薬学会誌* 7: 284-285
- 22) 飯島宏治, 鳥居塚和生, 田中盛久 他(1992) 免疫複合体除去能に対する当帰芍薬散の作用(Ⅲ)一当婦と蒼朮の相互作用一. 第9回和漢医薬学会要旨集 pp136
- 23) 伊藤敬三, 宮田美佐子, 小須田美雪 他(1985) グルチルリチン製剤投与による健常人インターフェロン誘発能の検討. *医学のあゆみ* 135: 1089-1090
- 24) 秋元 実, 木村道夫, 沢野 彰 他(1986) 乳癌の術後補助化学療法の副作用に対するグリチルリチン製剤の効果, *癌の臨床* 32: 869-872
- 25) Ota H, Fukushima M (1988) Stimulation by Kampo prescriptions of aromatase activity in rat follicle cell cultures. *Recent Advances in the Pharmacology of Kampo (Japanese Herbal) Medicines. Excerpta Medica, Tokyo*, pp177-183
- 26) 田中俊誠, 古田伊都子, 桜田芳弘 他(1990) 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Ⅶ*, 診断と治療社, pp34-40
- 27) 太田博孝, 福島峰子, 真木正博(1989) ラット卵胞アロマターゼ活性に対する芍薬の刺激作用. *日産婦誌* 41: 525-529
- 28) 太田博孝, 田中秀則, 児玉英也 他(1995) 顆粒膜細胞のステロイド生合成, 特にアロマターゼ活性に及ぼす各種生薬の影響. *日不妊会誌*, 40: 355-361

(受付: 1995年9月1日特掲)

(受理: 1995年10月2日特掲)

Effect of the kampo prescriptions and crude drugs on the secretion of Interleukin-6 in human granulosa cells

Hiroataka Ota, Hidenori Tanaka, Hideya Kodama,
Jun Fududa, Hiroko Karube and Toshinobu Tanaka

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

We investigated the effect of the kampo prescriptions and crude drugs used for the infertile patients on interleukin-6 (IL-6). Granulosa cells were obtained from the patients performed the treatment of an in vitro fertilization and embryo transfer, and cultured for 48 hours. In each well the kampo prescriptions such as Tokishakuyaku-san, Shakuyaku-kanzo-to or Unkei-to or the crude drugs with or without aromatase inhibitor (4-hydroxyandrostenedione; 4-OHA, 10⁻⁷ M), then IL-6 levels in the media were measured using ELISA kit.

Various amounts of kampo prescriptions significantly increased IL-6 level with or without the addition of 4-OHA. While the addition of the crude drugs, glycyrrhizae radix, angelicae radix or paeoniae radix significantly increased the IL-6 levels, whereas cinnamon cortex, atractylodis lanceae rhizoma or hoelen tended to reduce the levels.

It was revealed that the kampo prescriptions could stimulate IL-6 secretion from human granulosa cells, as well as the action on the hypothalamic-pituitary system. Furthermore, the crude drugs share their roles by stimulating, inhibiting or not affecting IL-6 secretion, thus integrating the ovarian function.

Key words: human, granulosa cell, kampo prescription, interleukin-6, cytokine

Triple stain法による男性不妊症の検討

A Comparison between Semen Parameters and the Acrosome Reaction Evaluated by Triple Stain Technique

千葉大学医学部泌尿器科学教室

中村 剛
Takeshi NAKAMURA

市川 智彦
Tomohiko ICHIKAWA

始 関 吉 生
Yoshio SHISEKI

島 崎 淳
Jun SHIMAZAKI

Department of Urology

School of Medicine Chiba University Chiba 260, Japan

ヒト精子における先体反応の有無を評価する Triple stain法で先体反応陽性率と、精子数、精子運動率、精子速度および精子直進性との関係を臨床的に検討した。

先体反応陽性率と精子数、精子運動率は、相関が認められた。正常群 (Fertile Male) の先体反応陽性率は、男性不妊症の正常精液所見を示す先体反応陽性率より有意に高く、また妊娠歴のある先体反応陽性率は、妊娠歴のないものより有意に高いことから、先体反応陽性率は受精能をよく示していた。精子速度および精子直進性と先体反応陽性率は相関しなかった。精索静脈瘤の手術は先体反応陽性率を上昇させたが、正常群までは至らなかった。

以上より、Triple stain法は精子の受精能の評価に有用であることが示唆された。

キーワード：トリプルステイン法、男性不妊症、精液所見、先体反応

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 82 - 88, 1996)

緒 言

精子の形態学的な検索は男性不妊症診断の重要な方法であり、従来精液検査として、精液量、精子数、精子運動率および形態学的奇形率が、光学顕微鏡を用いて施行されてきた¹⁻⁴⁾。しかし、精液検査が正常であるにもかかわらず男性不妊症である症例があり、受精能についての検索が必要となり、種々の方法が考案されてきた⁵⁾。精子は受精前段階に受精能獲得 (capacitation) と先体反応 (acrosome reaction) を完了することが必要である⁶⁻⁹⁾。このような受精能力を判定する検査として、Hypoosmotic swelling test¹⁰⁾、Sperm survival test¹¹⁾、Zona-free hamster egg sperm penetration test^{12, 13)}、Hemizone assay¹⁴⁾、Penetrak test¹⁵⁾、Acrobeads test¹⁶⁾などがあり、いずれも精子機能検査としての一面を有しているが、判定の難しいもの、手技の煩雑さなどにより標準的なものが少ない。今

回、Talbotら¹⁷⁾によって報告された Triple stain法を応用して、in vitroで培養したヒト精子の先体反応を光学顕微鏡下に観察し、従来の精液検査の結果とあわせ、男性不妊症の臨床的検討を行った。

対象および方法

千葉大学泌尿器科を受診した男性不妊を主訴とする患者の精液218検体と、正常群 (Fertile Male) として45歳以下の挙児を確認されている19検体を用いて、精液検査と Triple stain法を行った。精液検査は、禁欲5日以上後に用手法により検査対象者の精液を採取し、室内で約30分間放置後、自動精液分析装置 (Cell soft series 3000 CRYO Resource 社) を用いて、精子数・精子運動率・精子速度および精子直進性を測定した。男性不妊症は、さらに妊娠歴や精索静脈瘤の手術前後で分類した。自動精液分析装置で、精子数300万/ml以下、または精子速度の標準誤差5%以上

の精液所見の症例は、今回の検討から除外した。

Triple stain法は、培養液にmodified Biggers, Whitten and Whittingham's medium (mBWW)¹⁸⁾を用いた。染色液の調整および洗浄精子を作製する際にはhuman serum albuminを除いたalbumin free mBWW液を用いた。精子数・精子運動率・精子速度および精子直進性を測定後、精液にalbumin free mBWW液を約2ml加えて、250×gの遠沈と上清除去の操作を2回行い、洗浄精子を作製した。この洗浄精子についてTriple stain法を行った。洗浄精子にmBWW液を加えて原精液量にし、37℃ 5% CO₂内で15時間培養した。その後、培養精子をalbumin free mBWW液で3回の洗浄を行った。この洗浄培養精子に、トリパンブルー染色液を加え37℃ water bath内で正確に15分間染色し、albumin free mBWW液で3回の洗浄を行い、3% glutaraldehydeを含む0.1 M cacodylate buffer pH 7.4を用いて、0℃約40分間の固定を行った。固定された精子に室温の脱イオン水を加え、250×gで3回遠沈し、固定液の除去を行い、少量の脱イオン水で懸濁しacid cleaned glass上に均一に塗抹し、室内で一晩風乾した。翌日この標本を40℃のビスマルクブラウン

染色液中で正確に5分間染色し、脱イオン水で水洗した。さらに、乾燥しないうちに、25℃のローズベンガル染色液中で30分間染色し、脱イオン水で水洗した。上昇エタノール系列で脱水、キシレンで透徹し、resinとcover glassにより封入し、標本を作製した。鏡検は、1000倍油浸レンズ下で1検体あたり300個以上の精子について観察した。ローズベンガル液により、先体反応を起こした精子の先体は透明となり、先体反応を起こしていない精子の先体はピンクとなった。死滅精子はトリパンブルー液で尾部が黒く染色され、生存精子はビスマルクブラウン液で褐色に染まった。

先体反応陽性率は、先体反応をおこした死滅精子と生存精子を合計し、全体の精子数で割ることにより求めた。精液所見や先体反応陽性率の解析は、平均値±SDで表示し、t検定を行った。

結 果

男性不妊症と正常群を比較すると、表1のごとく精子数、精子運動率と先体反応陽性率は、男性不妊症より正常群のほうが有意に高かったが、精子速度

表1 男性不妊症と正常群の比較

		男性不妊症	正常群	
精子数	(×10 ⁶ /ml)	55.8 ± 48.5	97.0 ± 64.2	p < 0.05
精子運動率	(%)	39.8 ± 24.6	66.1 ± 14.5	p < 0.05
精子速度	(μm/s)	35.4 ± 7.7	35.9 ± 7.8	
精子直進性		4.94 ± 1.18	4.95 ± 0.90	
先体反応陽性率	(%)	52.7 ± 17.4	71.8 ± 12.4	p < 0.01

(t検定)

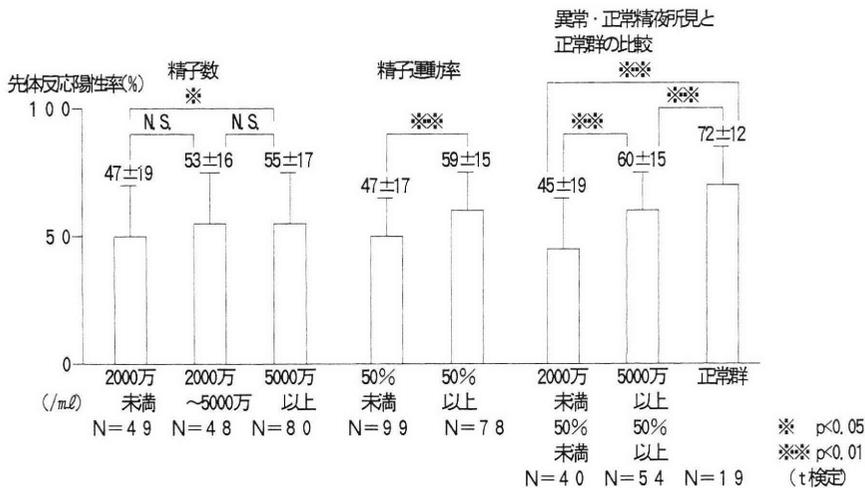


図1 精液所見と先体反応陽性率 (%)

表2 精索静脈瘤手術前後の精子所見

		前	後	
精子数	($\times 10^6/ml$)	34 \pm 51	49 \pm 44	p < 0.05
精子運動率	(%)	27 \pm 19	36 \pm 22	p < 0.05
精子速度	($\mu m/s$)	34 \pm 7	36 \pm 6	N.S.
精子直進性		4.7 \pm 1.3	5.0 \pm 0.8	N.S.
先体反応陽性率	(%)	41 \pm 13	53 \pm 14	p < 0.01
先体反応陽性率 60%以上		4%	34%	
症例数		24例	23例	

t-検定

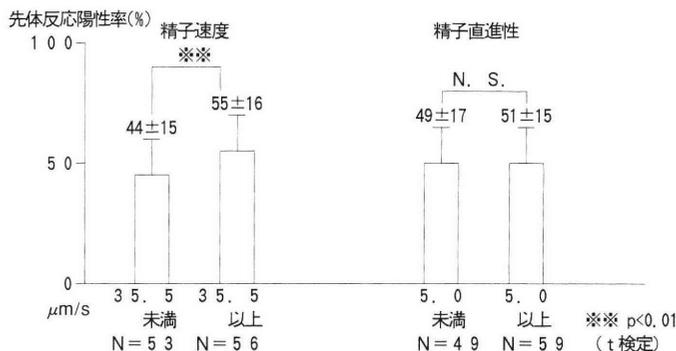


図2 精子速度・精子直進性と先体反応陽性率 (%)

と精子直進性は差を認めなかった。つぎに精液の各所見と先体反応との関係を見た(図1)。精子数が増加するほど先体反応陽性率も上昇しており、精子運動率と先体反応陽性率の関係も同様であった。したがって精子数2000万/ml未満で運動率50%未満の精液所見では、先体反応陽性率は著しく低下していた。しかし、従来より正常精液所見といわれている精子数5000万/ml以上で精子運動率50%以上の症例の先体反応陽性率は、正常群の先体反応陽性率より有意に低下していた。このことにより、正常精液所見でも男性不妊症の患者には、精子機能の低下している症例があることが示された。精子速度と精子直進性について、その約平均値で2群に分けてみると、精子速度が上昇すると先体反応陽性率は増加したが、精子直進性は差をみとめなかった(図2)。妊娠歴の有無と先体反応陽性率との関係を見ると両者はよく相関していた(図3)。

男性不妊症の原因の代表的疾患である精索静脈瘤の手術前および手術後6か月以上の症例での、精液所見と先体反応陽性率について比較した(表2)。精液所見の精子数と精子運動率は、精索静脈瘤手術により改善しているが、先体反応陽性率も上昇していた。先体反応陽性率60%以上に上昇していた精液

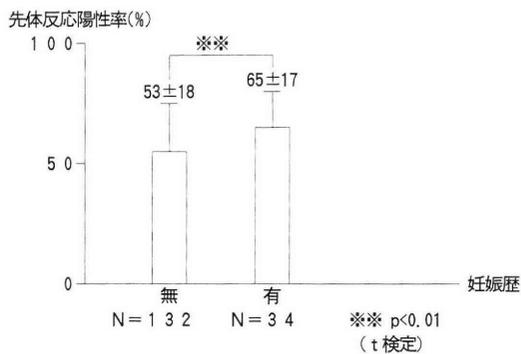


図3 妊娠歴と先体反応陽性率 (%)

は、精索静脈瘤手術前約4%で、手術後約34%になった。しかし、精索静脈瘤手術後の症例でも、図3の妊娠歴有の先体反応陽性率までは及ばなかった。精索静脈瘤手術は、精子機能のある程度の改善が見込まれるが、精子機能の面からは、その効果は充分でなかった。

考 察

精子は女性生殖器を通過している間に受精能獲得(capacitation)をする。しかし、受精能を獲得した精子

でも、卵の透明帯を通過することができない。透明帯を通過するためには精子は、アクロシンを中心とするタンパク分解酵素を放出しなければならない¹⁹⁾。このタンパク分解酵素の放出によって精子頭部に空胞変性が認められる。この空胞変性の存在を確認するのが、Triple stain法である。先体反応とは、タンパク分解酵素の放出に至るまでの前段階である精子頭部の細胞膜の変化から、空胞変性までの一連の変化であり、in vitroで、TMPA²⁰⁾やBWW²¹⁾などの培養液で、精子に先体反応を惹起しうることは各種の哺乳動物で見出された^{7,8,22)}。光学顕微鏡を用いたヒト精子の先体反応の観察法では、今までにFITC-RCAを用いた蛍光法²³⁾が報告されているが、ヒト精子頭部は長さ4~5 μm 、幅2.5~3.5 μm と小さく、その膜の変化を充分にとらえることができず、臨床応用に至っていない。Triple stain法は、先体反応を起こした精子の結果である精子頭部の空胞変性を観察することにより、この精子の大きさによる欠点を解決する方法である。先体反応の結果のみを観察しているTriple stain法により、どの精液所見の精子が先体反応を起こしやすいかを判定し、それを男性不妊症の治療に応用することが可能となった。

最近、Triple stain法は精子数、精子運動率やTriple stain法以外の精子機能検査との比較において、その関連性が報告されている^{17,26)}。今回の検討も、他の報告と同様に、精液所見の精子数と精子運動率は先体反応陽性率と、よく相関していた。さらに従来の方法による正常精液所見と判定されたうち、先体反応陽性率の低下例が示唆された。この精子機能が低下した精子は、卵の透明帯を通過できないことが示唆される。これは、IVF-ET (in vitro fertilization + embryo transfer)^{24,25)}における受精不能の診断の一助となる。それでは、何%以下で、卵の透明帯を人工的に通過させる顕微受精の適応となるのかが問題となる。生存精子の先体反応は、培養後5~7時間でピークをむかえたとされ¹⁷⁾、この精子は、短時間で死滅するとされている。数時間の培養による先体反応陽性率は、20~30%程度²⁶⁾であると報告されているが、我々は培養時間を15時間とした。このことは自験の先体反応陽性率は、先体反応を起こし得るほとんどの精子を網羅していることとなっていると思われる。一方、死滅精子の先体反応の判定においては、タンパク分解酵素が放出されずに死滅したのものにもかかわらず、染色過程でこの酵素が脱落することによって、先体反応を起こしていない精子も先体反応陽性と診断してしまう可能性も論じられている¹⁷⁾。

したがって、自験の先体反応陽性率は高値となるだろう。一方、論理的には先体反応陽性率が0%でなければ透明帯通過が不可能であるとは言い切れない。そこで、臨床的に検討するにあたって、透明帯を通過することのできる精子の先体反応陽性率を妊娠歴有の精液の平均先体反応陽性率を2SDと拡大して、30%以上として検討してみた。男性因子が不妊の主な原因と考えられる、最も精液所見の不良な精子数2000万/ml未満かつ運動率50%未満の患者では、先体反応陽性率30%以上は約8割が含まれ、この症例はIVF-ETで受精できる確率が高いと推測できる。約2割の残りの先体反応陽性率30%未満の精子では、IVF-ETで受精できない可能性が高く、顕微受精^{27~29)}も考慮すべきかもしれない。男性因子のためにIVF-ETを行い、受精不可能であった割合は約70~90%と報告されており^{30~33)}、自験例より推測した精液所見の不良な精液のIVF-ETで受精不可能は約2割という結果以上の悪い成績だが、受精に至るまでの様々の要因を考えると我々の仮定した透明帯通過不可能な精子の先体反応陽性率は30%未満であるということは、矛盾しない仮定であろう。しかし、先体反応陽性率が30%未満であるからといって、必ずしもIVF-ETで受精しないと断言できないと思われる。また、Triple stain法に類似する先体反応を評価するアクロシン活性とIVF-ETによる受精成功率は良く相関する報告^{34,35)}と相関しないという報告^{36~38)}がある。後者は、1個の精子が受精するので、精液全体の評価をしても有用でないというが、アクロシン活性と受精能が相関するほうが妥当であろう。

精索静脈瘤は男性不妊症の原因のひとつとされている^{39~46)}。精索静脈瘤が造精機能障害をおこすメカニズムのうち有力とされているものとして、精巣温度上昇によるという説と、有害物質逆流によるという説がある。精索静脈切断により、精子数と精子運動率が改善することは定説となっており、当教室の成績でもみられている^{39,45,46,47)}。今回の症例でも平均精子数を約 $15 \times 10^6/\text{ml}$ 、平均精子運動率を約9%上昇させていた。さらに、精索静脈瘤は、先体反応陽性率を低下させ、精索静脈瘤手術で有意に先体反応陽性率は約12%上昇した。しかし、精索静脈瘤手術後においても、先体反応陽性率は妊娠歴のない男性不妊症のそれと同程度であった。正常群の平均先体反応陽性率-SDの約60%以上の先体反応陽性率が妊娠可能である正常な先体反応陽性率と考えると、表2に示した如く、精索静脈瘤手術後の正常な先体反応陽性率60%までの改善は約34%であった。

これは、偶然にも我々の報告した⁴⁵⁾精索静脈瘤手術の妊娠率と同程度であり、先体反応陽性率60%以上は妊娠と深い関係をもつものと思われた。しかし、先体反応陽性率が60%未満であっても、必ずしも妊娠不可能であるとは言いきれないであろう。以上より、精子機能の面では、精索静脈瘤を持つ症例の精子は、たとえ手術を受けても、Triple stain法からみた精子機能の正常化に至るのは約3割であることより、精索静脈瘤を持つ不妊症に対しては、精索静脈瘤手術と同時に他の治療が必要であろう。

精子機能の評価法として、種々の検査法が報告されている。精子尾部細胞膜機能を観察するHypoosmotic swelling test¹⁰⁾とウシ頸管粘液貫通能で精子尾部の直進運動能を評価するPenetrak test¹⁵⁾、精子の耐久能を評価する長時間培養後の精子運動能を評価するSperm survival test¹¹⁾、Triple stain法と同様に精子頭部の評価をしているのはHemizona assay¹⁴⁾とAcrobeads test¹⁶⁾などがある。Hemizona assayは、ヒト透明帯に付着する精子数を判定する検査法で、精子頭部細胞膜と透明帯の付着による先体反応をみるものであり、Triple stain法で観察している精子機能とはほぼ同じ評価法である。先体反応を引き起こした精子頭部と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いたAcrobeads testは、Triple stain法と同様に先体反応を起こしたあとの精子を観察しているが、運動精子がこの抗体に凝集しなければならず、精子無力症などの運動能の悪化している精子には適さない検査法である。精子Zona-free hamster egg sperm penetration test^{12, 13)}は、精子のhamster eggの細胞膜への通過性と卵内での精子頭部の膨化を観察する精子機能の総合的な検査法であり、透明帯を除いているので先体反応が有効に起こらない精子の判定は困難である。今回Triple stain法につき検討したが、受精能の評価に有用とおもわれた。

文 献

- 1) Speroff L, Glass RH, Kase N (1973) Male infertility. In: Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Williams and Wilkins, Baltimore, pp204-213
- 2) Nelson CM, Bunge R (1974) Semen analysis; Evidence for changing parameters of male fertility potential. Fertil Steril 25: 503-507
- 3) Rehan NE, Sobrero H, Fertig JW (1975) The semen of fertile men. Statistical analysis of 1,300 men. Fertil Steril 26: 492-502
- 4) Melvin L, Taymer MD (1978) Semen analysis. In: Infertility. Grung & Stratton, New York, San Francisco, London, pp78-88
- 5) Holden CA (1990) Assessment of the human sperm acrosome reaction using concanavalin A lectin. Mol Reprod Dev 25: 247-257
- 6) Zahler WL, Deak GA (1975) Isolation of outer acrosome membrane from bull sperm. Biochim Biophys Acta 406: 479-488
- 7) Yanagimachi R (1984) The status of acrosomal caps of Hamster spermatozoa immediately before fertilization In vivo. Gamete Res 9: 1-19
- 8) Cummins J (1986) Development of ability to penetrate cumulus oophorus by Hamster spermatozoa Capacitated In vivo, in relation to the Timing of the acrosome reaction. Gamete Res 15: 187-212
- 9) Jean P, Gérard R, Gérard V, et al. (1995) Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability. Fertil Steril 63: 598-603
- 10) Jeyendran RS (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. J Reprod Fertil 70: 219-228
- 11) 布施正樹 (1990) 長期培養後の精子運動能評価としての sperm survival test に関する研究. 日産婦誌 42: 1678-1684
- 12) Yanagimachi R (1976) The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. Biol Reprod 15: 471-476
- 13) Felice F, Marco V, Rossella R, et al. (1995) Relationship between acrosome reactions and hamster egg penetration after ionophore challenge in absence of teratozoospermia. Fertil Steril 63: 1301-1305
- 14) Burkman LJ (1988) The hemizona assay (HZA): Development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to a human hemizona pellucida to predict fertilization potential. Fertil Steril 49: 688-697
- 15) Alexander NJ (1981) Evaluation of male infertility with an in vitro cervical mucus penetration test. Fertil Steril 36: 201-208
- 16) Ohashi K (1992) Evaluation of acrosomal status using MH61-beads test and its clinical application. Fertil Steril 58: 803-808
- 17) Talbot P, Chacon RS (1981) A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. J Exp Zool 215: 201-208
- 18) Biggers JD, Whitten WK, Whittingham DG (1971) The culture of mouse embryos in vitro. In: Methods in Mammalian Embryology Daniel JC (ed), Freeman, San Francisco, pp86-95

- 19) Yanagimachi R, Usui N (1974) Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. *Exp Cell Res* 89: 161-174
- 20) Barros C, Gonzalez J, Herrera E, et al. (1979) Human sperm penetration into zona free hamster oocytes as a test to evaluate sperm fertilizing ability. *Andrologia* 11: 197-210
- 21) Yanagimachi R (1978) Sperm-egg association in mammals. In: current topics in developmental biology. Moscona AA, Monroy A (eds), Vol 12, New York, pp83-105
- 22) Storey B (1984) Mechanisms involved in the ability of human chorionic gonadotropin to increase the responsiveness of the infant rat's testis to follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod* 31: 1119-1125
- 23) Talbot P, Chacon RS (1980) A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human sperm. *Gamete Research* 3: 211-216
- 24) Tsuchiya K (1989) Correlation of serum inhibin concentrations with results in an ovarian hyperstimulation program. *Fertil Steril* 52: 88-94
- 25) Steptoe PC, Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 2: 366
- 26) 松岡逸子, 藤野祐司, 伊藤文俊 他 (1995) ヒト精子の Acrosome reaction 簡易染色法の検討. 日受精着床学会誌 12: 116-118
- 27) Iritani A (1991) Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. *Molec Reprod Dev*, 28: 199-207
- 28) 神野正雄, 生方良延, 羽生一朗 他 (1995) 顕微授精の技術改良による妊娠率の改善: 重症男性不妊に対する有効性. 日受精着床学会誌 12: 47-49
- 29) 山田清彦, 関 守利, 竹内 巧 他 (1995) 当科における顕微授精の臨床成績. 日受精着床学会誌, 12: 21-24
- 30) Drosch K, Jones GS, Rosenwaks ZR (1988) Timing of oocyte retrieval in cycles with a spontaneous luteinizing hormone surge in a large in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 50: 451-456
- 31) 井上正人, 小林善宗, 本田育子 他 (1991) GIFT, IVF-ETR (ZIFT). 産婦実録 40: 349-354
- 32) Medical Research International, the Society for Assisted Reproductive Technology, and The American Fertility Society (1991) In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1989 results from the IVF-ET Registry. *Fertil Steril* 55: 14-22
- 33) 森 崇英 (1994) 体外受精の現況と問題点. 日不妊会誌 39: 479
- 34) Kennedy WP, Kaminiski JM, van-der-Ven HH et al. (1989) A simple, clinical assay to evaluate the acrosome activity of human spermatozoa. *J Androl* 10: 221-231
- 35) Tummon IS, Yuzpe AA, Daniel SAJ, et al. (1991) Total acrosin activity correlates with fertility potential after fertilization in vitro. *Fertil Steril* 56: 933-938
- 36) Kruger TF, Haque D, Acosta AA, et al. (1988) Correlation between sperm morphology, acrosin, and fertilization in an IVF program. *Arch Androl* 20: 237-241
- 37) Liu DY, Baker HWG (1990) Relationships between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro. *Hum Reprod* 5: 298-303
- 38) 清水 靖, 児玉英也, 福田 淳 他 (1995) 体外受精患者における精子アクロシン活性測定の意義. 日不妊会誌 40: 34-39
- 39) 伊藤晴夫, 布施秀樹, 島崎 淳 他 (1986) 精索静脈瘤は男性不妊の原因か. 西日泌尿 48: 1105-1111
- 40) Dubin L, Amelar RD (1978) Valicocele. *Urol Clin N Amer* 5: 563-572
- 41) Mordel N (1990) Spermatic vein ligation as treatment for male infertility. *J Reprod Med* 35: 123-127
- 42) 石田 章, 友吉唯夫 (1995) 男子不妊症における精索静脈瘤の手術成績—妊娠例と非妊娠例の比較. 日不妊学会誌 40: 216-219
- 43) WHO (1992) The influence of valicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 57: 1289-1293
- 44) Cockett ATK, Takihara H, Cosentino MJ (1984) The varicocele. *Fertil Steril* 41: 5-11
- 45) 角谷秀典, 小竹 忠, 始関吉生 他 (1990) 精索静脈瘤の手術成績—妊娠例と非妊娠例の比較—. 日不妊会誌 35: 732-736
- 46) Ichikawa T, Takahara M, Shiseki Y, et al (1993) Pathogenesis and treatment of latent varicocele. *Hum Reprod* 57: 393-397
- 47) 始関吉生, 角谷秀典, 高原正信 他 (1991) 精子自動分析装置による精液検査. 日不妊会誌 36: 655-659

(受付: 1995年7月27日特掲)

(受理: 1995年10月3日特掲)

**A comparison between semen parameters and the acrosome reaction evaluated
by Triple stain technique**

Takeshi Nakamura, Tomohiko Ichikawa, Yoshio Shiseki
and Jun Shimazaki

Department of Urology
Chiba University School of Medicine, Chiba 260, Japan

The acrosome reaction of human sperm evaluated by Triple stain technique was compared with semen parameters and the fertility of sperm was discussed. Following results were obtained.

1) The acrosome reaction of human sperm was corellated with sperm count and motility. 2) The acrosome reaction of male infertility with normozoospermia was lower than that of fertile male. 3) The operation of varicocele testis improved semen parameters and the acrosome reaction.

From the results, it is concluded that the examination of the acrosome reaction of human sperm by Triple stain technique is valuable for diagnosing of ability of fertility.

Key words: Triple stain technique, male infertility, semen parameters, acrosome reaction

射精障害の臨床的検討

A Clinical Study of Ejaculatory Dysfunction

岡山大学医学部泌尿器科学教室

永井 敦 大森 弘之
Atsushi NAGAI Hiroyuki OHMORI

Department of Urology
Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

東邦大学医学部第1泌尿器科学教室

永尾 光一 高波 真佐治 石井 延久
Koichi NAGAO Masaharu TAKANAMI Nobuhisa ISHII

三浦 一陽 白井 將文
Kazukiyo MIURA Masafumi SHIRAI

First Department of Urology
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

東邦大学医学部第2泌尿器科学教室

澤村 良勝

Yoshikatsu SAWAMURA

Second Department of Urology
Toho University School of Medicine, Tokyo 153, Japan

射精障害を臨床症状より分類し検討した。

1994年に東邦大学医学部附属大森病院リプロダクションセンター泌尿器科部門を受診した射精障害患者は57例であった。内訳は腔内射精不能症例が21例(36.8%)、早漏・遅漏が12例(21.1%)、逆行性射精が12例(21.1%)に認められ、射精がまったくない症例が11例(19.3%)、その他が1例であった。マスターベーションでは射精可能、しかし腔内射精は不能の症例では47%が誤ったマスターベーション方法であった。この症例に対しては正しいスラスト運動によるマスターベーション指導を行った。

今回の検討では機能的原因による射精障害が約65%に認められ、これらに対する治療法を含め検討した。
キーワード：射精障害、男性不妊症、マスターベーション、セックス・セラピー

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 89 - 94, 1996)

緒言

性機能障害のひとつである射精障害は男性不妊の原因のみならず、性生活を営むうえでの大きな問題となる。射精障害は大きく器質的なものと機能的なものに分けられる。しかし厳密には機能的か否か分類できない症例も多い。そこで我々は射精障害につ

いて臨床症状により新たな分類を設け、それぞれについて検討したので報告する。

対象および方法

対象は1994年1月より12月までの1年間に東邦大学医学部附属大森病院リプロダクションセンター・インポテンス部門を受診した336名の患者のうち、

射精障害を訴えた57名(17.0%)である。年齢は23～69歳、平均35.3歳である。同一患者で射精障害の他に障害を訴える場合は、インポテンスでないかぎりは統計に含めた。

今回、射精障害をその症状に応じて 1) 腔内射精不能 a) 腔内射精不能、マスターベーションにて射精可能(マスターベーションにて射精は可能であるが、来院時点で腔内射精は不可能なもの) b) 腔内射精不能、マスターベーションにて射精不能、夢精あり(腔内射精不能、マスターベーションにても射精不能であるが夢精は認めるもの) 2) 早漏・遅漏 3) 逆行性射精(オルガスムを認めるが精液の射出を認めず、オルガスム後の尿検査にて尿中に精子が証明されたもの) 4) 射精がまったくない a) 射精感あり(射精感はあるが射精はまったく認めず、逆行性射精も認めない) b) 射精感なし(射精も射精感も認めない) 5) その他に分類した(表1)。

初診時にインポテンス診療用カルテリに従い、現病歴、性歴などの問診を行った。また、Cornell Medical Index (CMI)、Manifest Anxiety Scale (MAS)

表1 射精障害の分類と結果

1) 腔内射精不能	
a) マスターベーションにて射精可能	15
b) マスターベーションにて射精不能、夢精あり	6
2) 早漏	10
遅漏	2
3) 逆行性射精	12
4) 射精がまったくない	
a) 射精感あり(造精機能障害、精路閉塞を含む)	7
b) 射精感なし	4
5) その他	1
計	57

やSelf rating Questionnaire for Depression (SRQ-D) などの簡易心理テストを施行した。陰茎長、陰茎周径、精巣容積の計測、精巣上体、精管、前立腺の触診を行った。

内分泌学的検索は、血清LH、FSH、Testosterone、free Testosterone、Estradiol、Prolactinを測定した。また一般生化学、血液検査も施行した。症例によってはNocturnal Penile Tumescence (NPT) 測定、Audio Visual Sexual Stimulation (AVSS) Rigiscan、prostaglandin E₁ (PGE₁) 陰茎海綿体注入テスト、bulbocavernosus reflex latency time (BCRL) 測定、亀頭部振動覚テストなどを行った。

結 果

射精障害の分類

今回、臨床症状によって射精障害を分類したところ以下のような結果を得た(表1、図1)。

1) 腔内射精不能

a) 腔内射精不能、マスターベーションにて射精可能

15例(26.3%)に認められた。平均年齢33.7歳、既婚者12名、そのうち2名は射精障害が原因ですすでに離婚が成立していた。過去に、かろうじて腔内射精が可能であったものが5例であった。心理テストでは何らかの異常を示したものが7名に認められたが、いずれも軽度のノイローゼ傾向、不安傾向、うつ傾向あるいはその混合であった。内分泌学的検査では1例にFSHの上昇を認め、2例にPRLの高値を認めた。この群の患者は勃起機能は正常であり、他の理学的検査は行っていない。

陰茎長は7～11 cm、平均9 cm、陰茎周径(環状溝部)は7.5～11 cm、平均8.9 cm、仮性包茎が12例に認められた。残る3例は包茎手術既往があった。既往に精神疾患を有するものは認めなかった。

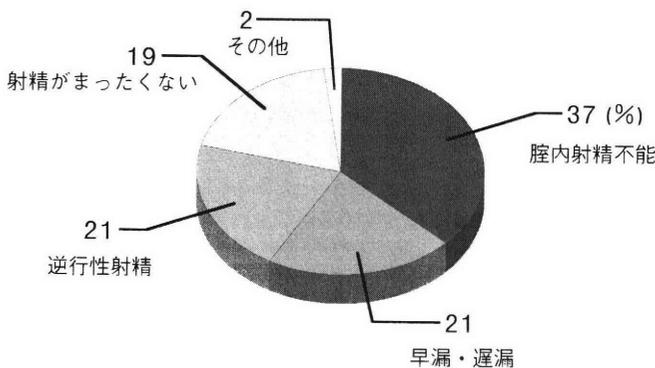


図1 射精障害の分類と結果

この15名のマスターベーション開始年齢は10～15歳、平均12.9歳であった。マスターベーション方法では布団や手の平にペニスを強くこすりつける方法が6例、指で龟头を強く圧迫する方法が1例で、通常のスラスト運動ではない誤ったマスターベーション方法が合計7例(47%)に認められた。この中には半勃起状態にて射精に至る習慣を持つものもいた。また、マスターベーションは正常であるが陰茎挿入後性行為に集中できないため射精に至らないものが3例に認められた。他の5例に関しては挿入後持続しないものが2例に認められ、残る3例はとくに異常を認めず原因不明であった(図2)。これらの症例は射精が認められ、勃起機能も正常であり、機能的な射精障害と考えられた。

b) 腔内射精不能、マスターベーションにて射精不能、夢精あり

6例(10.5%)に認められた。平均年齢34.2歳、既婚者は2名であった。心理テストでは異常が3名に認められた。2名はノイローゼ、不安、うつ傾向があり、1名は不安傾向であった。内分泌学的検査異常は認めなかった。陰茎長は7～10cm、平均8.1cm、陰茎周径(環状溝部)は7.5～9cm、平均8.2cmであった。うつ病の治療中が2名であった。

この6名の性歴であるが、夢精は13ないし14歳で見られ、マスターベーションもほぼ同時期に開始しているが射精には至っていない。マスターベーションの方法は通常のスラスト運動であり、異常なマスターベーションを行っているものは認めなかった。他の検査所見にてもとくに異常を認めず、勃起機能も正常であり、機能的射精障害と考えられた。

2) 早漏・遅漏

a) 早漏

客観的な判定は困難であるが、主訴が早漏であるものが10例(17.5%)に認められた。平均年齢29.8歳、

既婚者は2名でそのうち1名は早漏と男性不妊が原因で離婚している。4名は外国人患者であった。早漏の程度は挿入前に射精に至るものが4名、他も挿入後数秒から3分以内で射精に至っている。心理テストでは外国人患者を除く6名に施行したが、1名にノイローゼ、うつ傾向が認められた。既往歴として1名に交通事故による骨盤骨折があるが、神経障害などは認めていない。触診し得た6名で仮性包莖、包莖術後がそれぞれ1名、残る4名には包莖は認めなかった。陰茎長は7～11cm、平均8.9cm、陰茎周径(環状溝部)は8～9.5cm、平均8.8cmであった。

マスターベーション開始年齢は13～17歳、平均14.2歳。異常なマスターベーションを行っているものは認めなかった。なお、外国人患者に関しては宗教上の理由からマスターベーションの習慣がなかったようである。

b) 遅漏

やはり客観的な判定は困難であり、主訴によって分類に加えた。2名に認められ、年齢は37歳と40歳。その程度は挿入から射精に至るまで20分以上かかり、途中で性行為を中止する場合もあった。陰茎長は平均9.0cm、陰茎周径(環状溝部)平均8.5cmで2名とも仮性包莖、心理テストには異常を認めなかった。その他の検査所見にも異常は認めなかった。

早漏・遅漏とも器質的異常は認めず、機能的射精障害と考えられた。

3) 逆行性射精

12例(21.1%)に認められた。平均年齢は35.9歳、糖尿病治療中の患者が8名、経尿道的前立腺摘除術後が2名、分裂病治療中および直腸癌術後が各1名であった(図3)。心理テストの結果では7名に異常を認め、そのうち4名はノイローゼ、不安、うつ病傾向が認められた。内分泌学的検査ではとくに異常は認めず、高プロラクチン血症を示した症例も認め

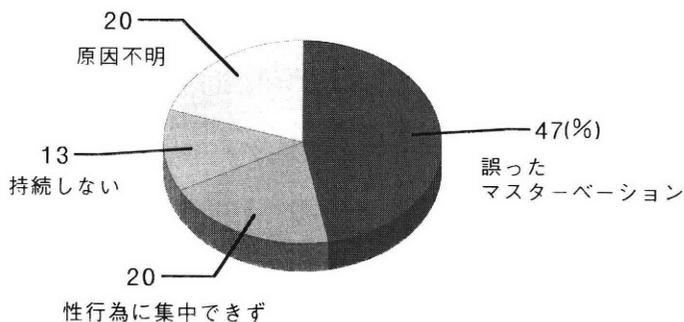


図2 マスターベーションにて射精可能、腔内射精不能症例の原因

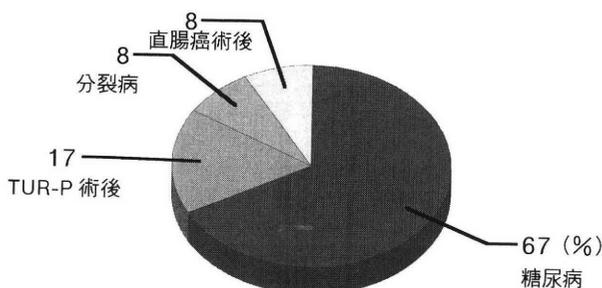


図3 逆行性射精の原因

なかった。陰茎長は平均10.0 cm, 陰茎周径(環状溝部)は平均8.6 cmであった。マスターベーション開始年齢は平均13.2歳であり、その当時は射精は正常であった。逆行性射精の出現時期は、糖尿病患者の8例では糖尿病の診断と同時期に発現したものが4例に認められた。他の4例も6か月から8年で逆行性射精が出現している。これらの症例は基礎疾患があり、器質的射精障害と考えられた。

4) 射精がまったくない

a) 射精感あり

7例(12.3%)に認められた。原因として考えられるものでは4例に糖尿病が認められたが、これは逆行性射精も認めなかった症例である。この4名の平均年齢は36歳、4名とも性行為あるいはマスターベーションで射精感を認めている。心理テストでは3名にノイローゼ傾向、不安傾向、うつ傾向あるいはその混合型の異常が認められた。陰茎長は平均10.3 cm, 陰茎周径(環状溝部)は平均8.6 cmであった。2名にBCRL測定を行ったが、33 msecおよび36.6 msecで正常であった。他の2名はNPT正常あるいはAVSS Rigiscanで異常を認めていない。また、残る3例は低ゴナドトロピン性性腺機能不全症が1例、直腸癌低位前方切除術後が1例、原因不明が1例である。原因不明の1例を除いて器質的射精障害と思われた。

b) 射精感なし

4例に認められ、年齢は26～54歳、平均41.3歳。陰茎長平均8.2 cm, 陰茎周径(環状溝部)平均8.8 cmであった。2例は明らかに器質的射精障害と考えられ、交通事故後の中枢性障害と考えられたものが1例、骨盤骨折後が1例であった。原因不明が2例であったが、1例はPRLの軽度上昇を認め、1例は軽度の勃起障害にとまうものであった。

5) その他

1例に緊張すると射精に至る症例が認められた。23歳の学生で高校生の時テストの時間に緊張して射

精して以来、緊張にて射精が起きるようになっている。陰茎長9.0 cm, 陰茎周径(環状溝部)8 cm, 仮性包茎なし。マスターベーションでは普通の射精が得られている。心因性と考えられた。

治療

分類別に主な治療法を示す。

1) 腔内射精不能

a) 腔内射精不能, マスターベーションにて射精可能
誤ったマスターベーション方法の7例においては、正しいスラスト運動によるマスターベーション指導を行った。症例によってはリユーズゼリーの使用も促した。性行為に集中できない症例では、性的空想を行うなどの指導を行った。正しいマスターベーションにて2名が射精可能となり、そのうち1名が腔内射精可能となり妊娠が成立した。

b) 腔内射精不能, マスターベーションにて射精不能, 夢精あり

マスターベーション時にリユーズゼリーを使用し、リラックスしてアダルトビデオを見ながらスラスト運動をするように指導した。1例にマスターベーションにて射精可能となった症例を認めた。

2) 早漏・遅漏

a) 早漏

セマンズ法^{2,3)}を指導した。さらに、精神的指導として射精にこだわらず、ストレスを感じないように指導した。早漏患者については経過観察可能症例がほとんどないため、治療効果については明らかではない。

b) 遅漏

検査所見に異常のないことを説明し、性交時に性的空想を行い、性行為に集中するよう指導した。2名ともに経過観察不能であった。

3) 逆行性射精

糖尿病性神経障害が疑われた症例にはビタミン

B₁₂, ビタミンE, カリジノゲナーゼなどの薬剤を投与した。不妊症例には尿中精子を回収し, AIHを施行した。同時に勃起力低下を認めた1例は患者の希望によりプロステース挿入を行った。逆行性射精の改善は現時点では認めていない。

4) 射精がまったくない

a) 射精感あり

糖尿病性神経障害が考えられたものにはビタミンB₁₂, ビタミンE, カリジノゲナーゼなどの投与を行った。低ゴナドトロピン性性腺機能不全症の1例はhCG, hMG投与により射精が認められた。

b) 射精感なし

中枢性と考えられた1例にはL-dopaを投与したが、現時点では射精を認めていない。

考 察

射精障害は大きく器質的なものと機能的なものに分けられる。白井ら⁴⁾の報告によると器質的射精障害は22.6%に見られている。射精障害の分類に関しては従来より木村ら⁵⁾による分類が主に用いられている。射精とオルガスムに重点を置いた分類であるが、今回の検討では厳密には機能的か器質的かを分類できない症例も認められた。推測を含めて検査結果より考えると57症例中37例、約65%が機能的射精障害と思われた。しかし、機能的射精障害と思われる症例の中には、射精もオルガスムも正常であるが腔内射精は不能であるといった症例も多く認められ、従来の分類法では分類困難であった。そこで我々は射精障害について主に射精の臨床症状により新たな分類を設け、それぞれについて検討した。

今回の検討ではマスターベーションにて射精は可能であるが、腔内射精が不可能なものももっとも多く26.3%に認められた。とくに器質的障害を疑わせる症例もなく、マスターベーション開始年齢も平均的と思われる。しかし、マスターベーションの方法が布団や手の平にペニスを強くこすりつけるなど、通常のスラスト運動ではない方法が47%に認められている。あまりにも強い刺激を陰茎に与え続けた結果、腔内の環境では射精しなくなったと思われる。治療法として正しいスラスト運動によるマスターベーション指導を行い、陰茎に対するより質の高い刺激を与えるためにリューブゼリーの使用も促した。2例が正しいスラスト運動で射精可能となり、そのうち1例に妊娠が成立した。これらの症例はこの指導が有効であったと思われる。しかし、マスターベーション指導にもかかわらずいまだに腔内射精が不

能の症例もあり、不妊が問題となる場合には、妻の年齢も考え、人工授精も並行して行うことも多い。マスターベーションは他人から指導を受けて始めるものではないが、一度誤った方法を身につけると将来不妊の原因にもなりかねない。可能であれば正しいマスターベーションの方法を思春期から指導する必要があると思われる。

腔内射精およびマスターベーションでの射精も不能、しかし夢精はある症例も器質的異常はないと考える。今回の検討では心因性的のものも含まれている。マスターベーション時にリューブゼリーを使用し、リラックスしてアダルトビデオを見ながらスラスト運動をするように指導したところ1例にマスターベーションにて射精が可能となっている。したがって、器質的原因のない腔内射精不能例にはマスターベーション指導は有用な治療法のひとつであると考える。

早漏に関してはセマンズ法の指導の他に、精神的指導として射精にこだわらず、ストレスを感じないように指導している。阿部⁶⁾によると早漏の患者はマスターベーションを手早くすませてしまい、楽しもうという気持ちが希薄であると述べている。

宗教上の理由によりマスターベーションの習慣がなかった患者にも早漏が認められた。これらのことより、マスターベーションは将来正常な性生活を営む上で思春期において必要不可欠なものであり、しかも正しい方法でゆとりをもって行う必要があると思われる。

遅漏に関しては症例が少なく今後の症例の集積が必要であるが、Rouleau⁷⁾は射精までに時間がかかるものをdelayed ejaculation、腔内射精ができないものをretarded ejaculationと分類し、それぞれについて治療方針を述べている。delayed ejaculationに関してはパートナーのオルガスムを気にしないなどの心理的な指導が必要であり、retarded ejaculationに関しては腔内射精可能になるまでの7ステップからなる訓練を挙げている。これは以下の方法である。1)夜眠っているパートナーのそばでマスターベーションにて射精し、パートナーを起こす。2)朝パートナーが目覚める前にマスターベーションし、その後パートナーを起こす。3)パートナーにペニス以外を愛撫してもらいながらマスターベーションをする。4)パートナーがマスターベーションを手伝う。5)パートナーの体で腔内やその近くでない部分に射精する。6)彼女の膣の近くに射精する。7)パートナーの腔内に射精する。以上のような方法で最終的には腔内射精

を成功させるものであるが、この方法は遅漏に限らず、今回経験した多くの腔内射精不能例の治療にも有効であると思われる。阿部⁶⁾は腔内射精困難例において妻側の要因として不潔恐怖症があった例を挙げているが、今回の検討では離婚例を除いては妻は性行為に協力的であった。したがって、腔内射精困難症例においてはマスターベーション指導ならびにパートナーに対する指導を十分に行えば、効果的と思われる。

逆行性射精に関しては糖尿病との関連性が大きく、また射精がまったく認められない群に関しては器質的障害の存在が考えられる。これらの症例に関してはさらに今後の検討が必要と思われる。

結 語

射精障害について臨床症状より分類し、主に機能的射精障害症例につき検討した。本分類は今後症例の集積により変化する可能性はあるが、本論文に述べた分類法により、射精障害患者における検査および治療についてある程度方向付けができるものと思われる。

文 献

- 1) 今川章夫, 荒木 徹, 石井延久 他 (1986) インポテンス診療カルテ. *Impotence* 1: 17-27
- 2) Semans JH (1956) Premature ejaculation: A new approach. *Southern Med J* 49: 353-357
- 3) Semans JH (1959) Premature ejaculation (ejaculatio praecox): A new method of therapy. *Z Urol* 52: 381-389
- 4) 白井將文, 高波真佐治, 牧 昭夫 他 (1987) マスターベーションの方法が原因と考えられる射精障害. *思春期学* 5: 514-518
- 5) 木村行雄, 安達国昭, 木崎 徳 他 (1974) 射精の研究. 第7報 射精障害症例の検討. *日泌尿会誌* 65: 218-228
- 6) 阿部輝夫 (1993) インポテンス—最近の治療法 8. 勃起障害に対する精神面からの治療—ノン・エレクト法を中心にして. *臨泌* 47: 667-672
- 7) Rouleau JL (1989) Sexotherapy and disorders of ejaculation. *Acta Urologica Belgica* 57: 191-194
(受付: 1995年7月10日)
(受理: 1995年10月4日)

A clinical study of ejaculatory dysfunction

Atsushi Nagai and Hiroyuki Ohmori

Department of Urology
Okayama University Medical School, Okayama 700, Japan

Koichi Nagao, Masaharu Takanami, Nobuhisa Ishii,
Kazukiyo Miura and Masafumi Shirai

First Department of Urology
Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

Yoshikatsu Sawamura

Second Department of Urology
Toho University School of Medicine, Tokyo 153, Japan

Ejaculatory dysfunction was clinically classified and examined.

57 patients with the ejaculatory dysfunction examined at the Reproduction Center of Toho University Ohmori Hospital in 1994 served as subjects. 21 (36.8 %) of the 57 patients could not ejaculate into the vagina, 12 (21.1 %) suffered from premature or retarded ejaculation, 12 (21.1 %) had retrograde ejaculation, 11 (19.3 %) had malemission and one patient did not fit into any other category. 47 % of the 15 patients who could not ejaculate into the vagina but could ejaculate during masturbation, masturbated incorrectly. These patients were instructed to masturbate properly with the correct thrusting movement.

There were many patients (about 65 %) who suffered from the ejaculatory dysfunction caused by functional disorders, and this paper examines these patients and treatment methods.

Key words: ejaculatory dysfunction, male infertility, masturbation, sextherapy

腹腔鏡施行症例における 抗クラミジア抗体と卵管障害についての検討

Correlation of Antibodies to Chlamydia Trachomatis and Laparoscopically Diagnosed Tubal Damages

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

矢野 義明
Yoshiaki YANO

森田 峰人
Mineto MORITA
平川 舜
Shun HIRAKAWA

久保 春海
Harumi KUBO

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

当科にて腹腔鏡を施行した不妊症患者80例および子宮外妊娠患者15例を対象とし、血中抗クラミジア抗体をイバザイム法およびセロイパライザクラミジア法を用いて測定した。不妊歴のない正常産分娩80例を対照とした。

抗クラミジア抗体陽性者は若年層に多く、既往妊娠別では人工妊娠中絶既往例で陽性率が高く、正常分娩既往例では陽性者は認めなかった。抗クラミジア抗体陽性率は不妊症でIgA 36.3% ($p < 0.01$)、IgG 53.8% ($p < 0.001$)、子宮外妊娠でIgA 60.0% ($p < 0.001$)、IgG 80.0% ($p < 0.001$)と、対照のIgA 16.3%、IgG 13.8%に比較し有意に高率であった。不妊症における卵管異常陽性率はIgA (+)、IgG (+)群で93.1%とIgA (-)、IgG (+)群の35.7%、IgA (-)、IgG (-)群の32.4%に比べ有意 ($p < 0.001$) に高率であった。付属器周囲癒着症、卵管閉塞症ともにIgA陽性群で高率に認められ、IgA陽性群の卵管閉塞例では卵管留水症を多く認めた。抗クラミジア抗体、とくにIgA抗体陽性例では高率に卵管異常が認められ、卵管障害のスクリーニングとしての意義が示唆された。

キーワード：抗クラミジア抗体、不妊症、子宮外妊娠、卵管障害、腹腔鏡

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 95 - 99, 1996)

緒 言

Chlamydia trachomatis (以下CT) は当初泌尿器科領域において、非淋菌性尿道炎の原因として注目された。その後子宮付属器炎や骨盤腹膜炎のなかでCT感染が重要な原因となっていることが報告されて以来、産婦人科領域においてもCT感染症が注目されている。また、卵管のCT感染後に卵管周囲癒着症や卵管閉塞症が引き起こされ、不妊症²⁾や子宮外妊娠³⁾の原因となることも知られるようになった。CT感染症は、臨床症状に乏しい状態で骨盤内感染症にまで波及し、いわゆるSilent PIDといわれる病態のまま経過していることも多く^{4,5)}、一方抗原検出の困難さから

診断に苦慮することも少なくない。今回はCT感染と卵管障害との関係を調べるため、腹腔鏡施行患者を対象に血清抗クラミジア抗体の測定を行い、腹腔鏡所見と比較検討した。

対象および方法

1991年12月から1994年4月までの期間に、腹腔鏡検査を施行した開腹手術既往のない不妊症患者80例(年齢 31.1 ± 4.1 歳)および子宮外妊娠患者15例(年齢 29.1 ± 4.0 歳)を対象とした。腹腔鏡施行前に採血を行い、血清抗クラミジアIgG、IgA抗体を1991年12月から1992年9月まではイバザイムクラミジアAG (Savyon Diagnostics Ltd., 明治乳業：以下イバザイ

ム)により, 1992年10月以降はセロイパライザクラミジアIgA, IgG (Savyon Diagnostics Ltd., 明治乳業:以下セロイパライザ)により測定した. イパザイムではIgG×64(+), IgA×16(+を示す症例を陽性とし, セロイパライザクラミジアではCut off index (COI)が1.0以上を示すものを陽性とした. また対照として, 当院で分娩した不妊歴のない正常産症例80例(年齢29.6±4.9歳)を選択しクラミジア抗体を測定した. 腹腔鏡は全身麻酔下にthree puncture techniqueにて行った. 不妊症症例については卵管, 卵巣周囲の癒着の有無を確認し, インジゴカルミン通色素試験により卵管通過性の有無を調べた. また上腹部の観察を行い, 肝臓表面の癒着の有無を調べた.

統計分析はχ²検定を用いて検定し, 危険率5%未満を有意差ありとした.

結 果

IgA抗体陽性率は不妊症患者で36.3%(p<0.01), 子宮外妊娠患者にて60%(p<0.001), IgG抗体陽性率は前者で53.8%(p<0.001), 後者で80%(p<0.001)と, いずれも対照の分娩例に比べ有意な高率を示した(表1).

図1は不妊症患者における年齢別のクラミジア抗体陽性者数を示したものである. 35歳未満では陽性例が多いのに対し, 35歳以上では陰性例を多く認めた. 図2は既往妊娠別の陽性者数を示したものである. 人工妊娠中絶既往例では13例中11例(84.6%)がクラミジア抗体陽性であるのに対し, 分娩あるいは自然流産の既往例では, 8例全例が陰性であった.

表2は不妊症における卵管異常と抗クラミジア抗体陽性率の関係をみたものである. 抗クラミジア抗

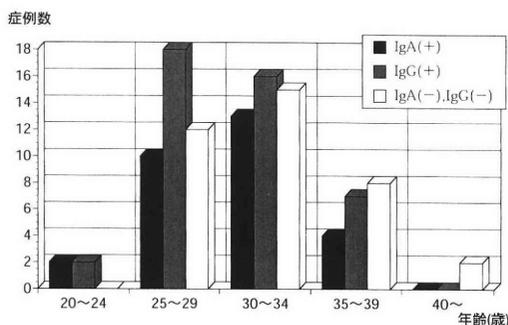


図1 年齢別抗クラミジア抗体陽性者数

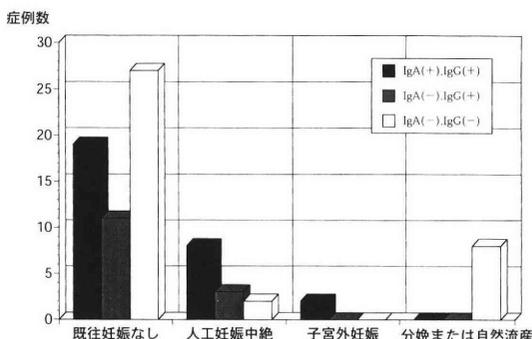


図2 既往妊娠別抗クラミジア抗体陽性者数

表1 抗クラミジア抗体陽性率

	不妊症	子宮外妊娠	対照
IgA	29/80* (36.3%)	9/15** (60.0%)	13/80 (16.3%)
IgG	43/80* (53.8%)	12/15** (80.0%)	11/80 (13.8%)

*p<0.01 vs. control **p<0.001 vs. control

表2 不妊症患者における抗クラミジア抗体と卵管異常

抗クラミジア抗体		卵管異常
IgA	IgG	
+	+	27/29 (93.1%)
-	+	5/14 (35.7%)
-	-	12/37 (32.4%)

*p<0.001

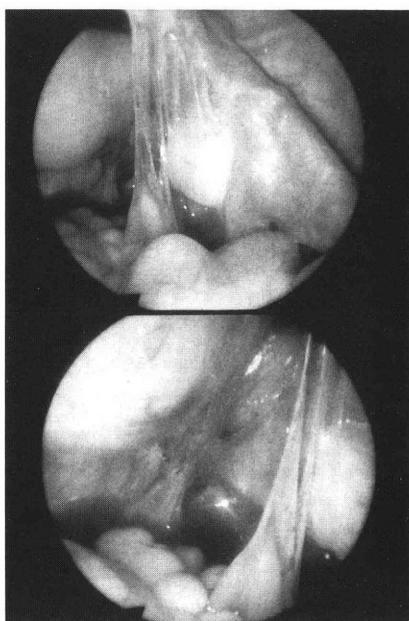


写真1 付属器周囲癒着症例

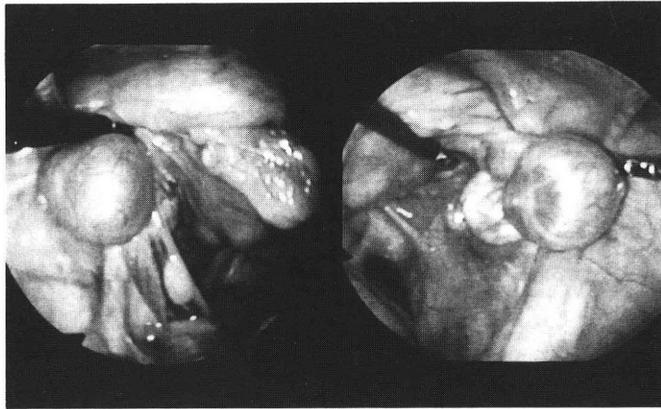


写真2 両側卵管閉塞症例

表3 卵管異常の詳細

抗クラミジア抗体		卵管閉塞		卵管癒着	卵巣癒着	計
IgA	IgG	両側	片側			
+	+	9 (31.0)	8 (27.6)	27 (93.1)	21 (72.4)	29 (100%)
-	+	1 (7.1)	2 (14.3)	3 (21.4)	4 (28.6)	14 (100%)
-	-	2 (5.4)	5 (13.5)	8 (21.6)	12 (32.4)	37 (100%)

表4 卵管閉塞部位と抗クラミジア抗体

IgA	IgG	卵管 留水症	近位卵管 閉塞症
+	+	16	1
-	+	1	2
-	-	1	6

表5 肝周囲癒着をともなう症例における抗クラミジア抗体

IgA	IgG	不妊症	子宮外 妊娠
+	+	9	1
-	+	0	1
-	-	1	1

体陽性例43例のうちIgA陽性例は29例であり、そのうち27例(93.1%)に異常を認めた。これに対し、IgGのみ陽性であった14例では35.7%、両者ともに陰性であった37例では32.4%のみに異常を認め、IgA陽性例で有意に高率(p<0.001)であった。

表3は卵管異常の詳細を示したものである。卵管閉塞症、卵管・卵巣周囲癒着症いずれもIgA陽性例において高率に認められ、とくに、卵管癒着における陽性率が高かった。

抗クラミジア抗体陽性例における卵管、卵巣周囲癒着では膜様癒着を多く認めた(写真1)。

卵管閉塞例における閉塞部位について検討したところ、IgA陽性例では写真2に示すような卵管留水症が多かったのに対し、IgA、IgG陰性症例では子宮近位における閉塞例が多かった(表4)。

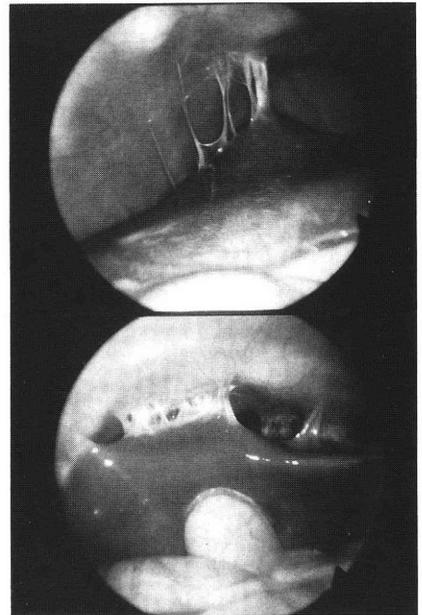


写真3 肝周囲癒着症例(肝表面と壁側腹膜との間にviolin string adhesionを認める)

また、肝臓表面と壁側腹膜との間に癒着(写真3)を認める症例は13例あったが、13例中10例(76.9%)はIgA陽性であった(表5)。

考 察

卵管因子を有する不妊症患者や子宮外妊娠患者では高率にクラミジア感染が認められており⁶⁾、卵管障害とCTとの関係が注目されている。CTの診断法として、Chlamydiazyme法、DNA-probe法、IDEIA法などの抗原検出法とセロイパライザ法、ヒタザイム法などによる抗体測定法が汎用されている。

CT感染症の診断においては、抗体検出のみではその特異性の問題などから不確実で、抗原検出が不可欠とされている。しかし卵管障害が疑われる不妊婦人において血清クラミジア抗体価が高値であるにもかかわらず、子宮頸管や腹腔内からCT抗原が検出される例は少なかったとの報告⁷⁾が多く、したがって卵管性不妊のスクリーニングには抗体測定がより有用と考えられる。また、IgA抗体の存在が活動性感染の指標になるとの指摘⁸⁾もあることから抗体の測定により卵管障害の有無をある程度推定できると考えられる。そこで今回著者は、IgG、IgA抗体と卵管障害との関係について検討した。

抗クラミジア抗体陽性率の検討では、不妊症および子宮外妊娠では対照群に比較して、有意に高率に認められ、クラミジア感染により卵管障害が起こり、不妊や外妊の原因となっていることが示唆された。

年齢別のクラミジア抗体陽性者数の検討では、35歳未満では陽性例が多く、35歳以上で陰性例を多く認めた。また既往妊娠別の陽性者数の検討では、人工妊娠中絶既往例で陽性者が多いのに対し、分娩あるいは自然流産のみの既往例では全例が陰性であった。野口は30歳未満の性活動年齢において陽性率が高いことを示し、不特定多数のパートナーとの性交渉により感染の機会が増し、将来の不妊症につながることを警告している⁹⁾。

また、不妊症患者における抗クラミジア抗体と卵管異常との検討では、IgA抗体陽性例に高率に卵管異常が認められ、IgG抗体のみ陽性症例では、陰性例とほぼ同様の陽性率であった。このことよりIgA抗体の測定が卵管障害の推定に有用であることが示唆された。CT抗体測定による疫学的調査の報告では、未治療のまま放置された感染患者からは抗原が消失せず、IgA抗体は陽性のまま長期間存在していたとされ¹⁰⁾、この結果からはIgA抗体の存在は感染の継続を示唆している。

付属器周囲癒着の原因としてはクラミジア感染以外に子宮内膜症も多く認められる。表3に示す如く、IgA抗体陰性例では卵管癒着に比べ卵巣癒着が多い傾向にあったが、これらの症例の中には卵巣チョコレート嚢胞をとともうものが多かった。しかし、クラミジア感染による癒着と子宮内膜症による癒着を客観的に鑑別することは必ずしも容易ではなく、術者の主観に影響されるため、癒着組織すべてを病理学的に検討しない限り不可能と思われる。よって今回は、癒着の有無のみにて検討した。IgA陽性例では卵管閉塞例のほとんどが卵管采部の閉塞であった

が、Mooreら¹¹⁾もHSG所見の検討から遠位卵管閉塞例が多かったと報告している。IgA抗体陽性の不妊症例29例のうち9例(31%)に肝周囲癒着を認め、IgA抗体陽性例では、広範囲に炎症が及んでいることが示唆された。骨盤内炎症性疾患に肝周囲炎を併発したものをFitz-Hugh-Curtis症候群と呼び、本邦においても山下らの報告¹²⁾以後散見される。今回の結果から典型的な右季肋部痛のない症例においても、重症例の典型像といわれるviolin string adhesionを呈する症例が多数存在することが確認された。肝周囲癒着を認めた症例中2例はクラミジア抗体が陰性であり、淋菌など他の原因菌検索の必要性が示唆された。

著者はCT感染不妊症例に対し、腹腔鏡下に癒着剥離術、卵管開口術¹³⁾を施行後、クラリスロマイシンにより追加治療し、パートナーへの投与を原則としている。

イバザイム法とセロイパライザ法は、ほぼ同等の感度、特異性を示すこと¹⁴⁾、また著者らのイバザイム法のみでの検討成績¹⁵⁾と今回の両方法による成績を総括したものが、ほぼ類似していることより、臨床像は共通しているものと考えられる。今後は、測定者による判定誤差の比較の少ないセロイパライザ法を用いて症例を追加し、血清抗クラミジア抗体と卵管異常の関係を、抗体Cut off index値、付属器癒着スコアなどを用い、さらに詳細に検討する予定である。

本論文要旨は、第39回日本不妊学会総会(富山1994)において発表した。

文 献

- 1) 野口昌良, 秋田敏行, 山崎 健 他 (1986) Chlamydiazyme法による産婦人科領域における骨盤腹膜炎を中心としたChlamydia trachomatis感染症の検討. 産婦の世界 38: 459-466
- 2) Sweet RL (1982) Chlamydial salpingitis and infertility. Fertil Steril 38: 530-533
- 3) Chaim W, Sarov B, Sarov I, et al. (1989) Serum IgG and IgA antibodies to chlamydia in ectopic pregnancies. Contraception 40: 59-71
- 4) Sellors JW, Mahony JB, Chernesky MA, et al. (1988) Tubal factor infertility: An association with prior chlamydial infection and asymptomatic salpingitis. Fertil Steril 49: 451-457
- 5) Patton DL, Moore DE, Spadoni LR, et al. (1989) A comparison of the fallopian tube's response to overt and silent salpingitis. Obst Gynecol 73: 622-630
- 6) Kosseim M and Brunham RC (1986) Fallopian tube obstruction as sequela to chlamydia trachoma-

- tis infection. *Eur J Clin Microbiol* 5: 584-590
- 7) 武内裕之, 岩佐 剛, 宇津野栄 他(1990) 不妊症と *Chlamydia trachomatis* 感染. *日不妊会誌* 35: 415-419
 - 8) 笠松高弘, 菅生元康, 吉川裕之 他(1989) *Chlamydia trachomatis* 女性性器感染症の診断および治療における血清特異的IgA抗体の意義. *日産婦誌* 41: 479-486
 - 9) 野口昌良(1992) クラミジア感染症. *臨婦産* 46: 1317-1319
 - 10) 林 謙治, 熊本悦明, 酒井 茂 他(1988) *Chlamydia trachomatis* 感染症の診断および疫学調査における特異血清IgA, IgG抗体測定に関する検討. *感染症学雑誌* 62: 355-362
 - 11) Moore DE, Spadoni LR, Foy HM, et al. (1982) Increased frequency of serum antibodies to *chlamydia trachomatis* in infertility due to distal tubal disease. *Lancet* 11: 574-577
 - 12) 山下幸孝, 梶村幸三, 梶山 徹 他(1986) *Chlamydia trachomatis* 感染による肝周囲炎(Fitz-Hugh Curtis症候群)と考えられた3例. *日本消化器病学会雑誌* 83: 2612-2615
 - 13) 森田峰人, 矢野義明, 久保春海 他(1993) 卵管性不妊症患者の腹腔鏡下レーザー手術. *日産婦内視鏡学会誌* 9: 27-29
 - 14) 中田博一, 本多昭仁, 押尾好浩 他(1992) クラミジア抗体測定試薬「セロイパライザクラミジア」(ELISA法)の有用性について. *医学と薬学* 28: 148-156
 - 15) 矢野義明, 森田峰人, 久保春海 他(1992) 血清クラミジア抗体陽性例における腹腔鏡所見の検討. *日産婦内視鏡学会誌* 8: 47-49
- (受付: 1995年3月29日)
(受理: 1995年10月4日)

Correlation of antibodies to *chlamydia trachomatis* and laparoscopically diagnosed tubal damages

Yoshiaki Yano, Mineto Morita, Harumi Kubo and Shun Hirakawa

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

Ninety-five patients who were laparoscopically examined at our hospital were the subjects for the present study. Eighty infertile women and 15 women with ectopic pregnancy were studied for the presence of antibodies to *Chlamydia trachomatis*. Serum IgG and IgA antibodies were measured by indirect immunoperoxidase assay (IPAzyme) and enzyme-linked immunosorbent assay (Sero IPALIZA *Chlamydia*).

The anti-chlamydial IgG antibody was positive in 53.8 % of infertile women and in 80 % of women with ectopic pregnancy. Among 80 healthy fertile women, used as controls, positive rates were significantly low (13.8 %). The incidence of IgA antibody positive cases was higher among patients with tubal abnormality. The IgA antibody was positive in more patients having hydrosalpinx than without it. Violin-string adhesions were often observed between the liver capsule and parietal peritoneum in IgA antibody positive cases.

It was concluded that chlamydial infection may cause latent tubal damage and thus a chlamydial antibody study should be involved in predicting tubal abnormalities.

Key words: *chlamydia trachomatis*, tubal damage, chlamydial antibody, infertility, ectopic pregnancy

単一精子受精機構異常における顕微操作： 余剰雄性前核除去法と卵細胞質内精子注入法

Micromanipulation on Oocytes for the Defect of Monospermic Fertilization: Intracytoplasmic Sperm Injection and Extra Male Pronuclear Extraction

Kiel大学医学部産婦人科教室

千 田 智*

Satoru CHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology
Kiel University Hospital, Kiel 24105, Germany

体外受精において単一精子受精機構異常と思われる症例により得られた多精子受精卵54個(3-PN. 43個, 4-PN. 11個), 未受精卵39個に対し, 前者には余剰雄性前核除去法, 後者には1日遅れの卵細胞質内精子注入法(ICSI)を試みた。第2極体より遠位にある大きい前核を目標として吸引する除去法において, 4-PNから2個の雄性前核除去はすべて失敗に終わったが3-PNからの1個の雄性前核除去群において生存率67.4%, 正常2-PN60.5%, 分割率53.5%であった。1日遅れのICSI群では生存率94.9%, 正常2-PN56.4%, 分割率48.7%であった。

単一精子受精機構異常における3-PNからの雄性前核除去, 未受精卵へのICSIともに可能であり有効と思われた。しかし, 前者においては除去核が雄性である正確性の問題があり, 後者においては卵の培養過熟変化により新鮮卵でのICSIに比し受精率および分割率は低くなる欠点がある。

キーワード: 受精機構異常, 多精子受精卵, 雄性前核除去法, 未受精卵, 卵細胞質内精子注入法

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 100 - 105, 1996)

緒 言

体外受精における顕微操作法は, 重症男性不妊症治療での卵細胞質内精子注入法(ICSI)に代表されるが^{1,2)}, 多精子受精卵からの余剰雄性前核除去にも用いられその臨床応用について検討されている³⁻⁵⁾。

ヒト体外受精において通常精子濃度での媒精では多精子受精となり, 低精子濃度媒精では多精子受精ないし未受精となる単一精子受精(正常受精)機構異常と考えられる症例が経験される。多精子受精防御機構には透明帯反応と卵細胞膜阻止の2つがあり動物種により特異性がある。ヒトでは前者が主役となっている⁶⁾といわれるが詳細は不明である。このような症例の通常体外受精施行後の対策としては多精子受精卵からの余剰雄性前核の吸引除去と未受精卵

への1日遅れのICSIが考えられる。本研究では以上の2つの方法における接合子配偶子顕微操作後の生存率, 胚発育率について検討した(写真1)。

研究対象と方法

1. 対象と体外受精法

Kiel大学病院産婦人科における体外受精治療⁷⁾において単一精子受精機構異常と思われた6症例9周期で得られた多精子受精卵54個(3-PN. 43個, 4-PN. 11個), 未受精卵39個について検討した。当院倫理規定によりこれらの顕微操作卵の胚移植は施行されなかった。

卵巣刺激法はGn-RH analogのlong protocolでpure FSH, hMG併用法, 採卵は経膈超音波下で施行された。精子はswim-up後 $5 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ に調整され媒精

*現所属: 高浜産婦人科医院

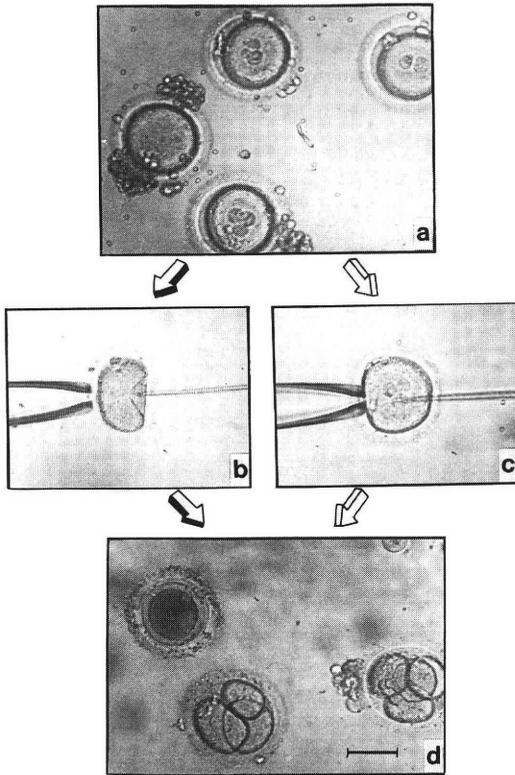


写真1 単一精子受精機構異常における体外受精
多精子受精卵と未受精卵が得られる (a). 未受精卵
に対して1日遅れのICSI (b), 多精子受精卵に対して
は雄性前核除去 (c) が可能である. (d) は操作後の胚発
育状態 (×150; スケールバーは100 μ m).

に供された. 培養液はHam's F-10, HTF, Menezo B₂ を使用した.

2. 器具の作製と顕微操作法

卵保持用, 前核吸引除去用, および精子注入用各
ピペットはGB100T-8 Pガラス毛细管 (Science products
GMBM, Hofheim, FRG) を puller (P-87, Sutter Inst,
U.S.A.) にて引き Microforge (MF-9, Narishige, Japan)
にて切断, 保持用ピペットは先端外径60 μ m, 内
径30 μ m, 前核吸引除去用ピペットは外径9 μ m, 内径
7 μ m, 精子注入用ピペットは外径7 μ m, 内径5 μ m
とした. 前核除去用および精子注入用ピペットは先
端開角度を50度として研磨後先端に spike をつけた.
各ピペットは先端より1 mmの所を約30度曲げベ
トリディッシュ (Falcon 1000) 底部と並行になるよう
にした.

顕微操作にはオリンパス倒立顕微鏡に Joystick
Micromanipulator System (MM-188, MO-189, Narishige,
Japan) および吸引注入用 Microinjector (IM-6, Narishige,
Japan) を取りつけて使用した. 顕微操作法における
雄性前核除去法はCohenら⁵⁾, ICSIはブリュッセルの
グループ^{1,2)}の方法に準じた.

器具の作製とICSIの手技の詳細については他誌に
記した⁸⁾.

雄性前核除去法

多精子受精卵はベトリディッシュ上の軽量パラフ
インオイルで被われた培養液5 μ l小滴内へ移され, 9
時方向からの保持用ピペットで最も良く全前核と第

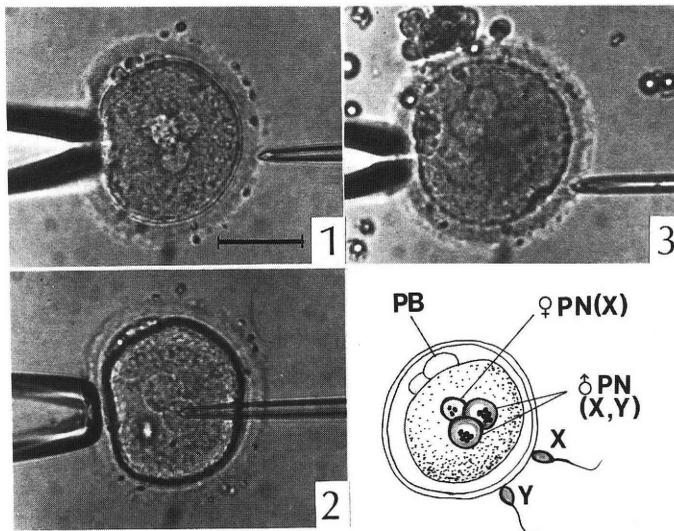


写真2 雄性前核吸引除去法

多精子受精卵において雄性前核は雌性前核より大きく第2極体より遠位にある (×200; スケールバーは50 μ m).

2極体の観察される位置にて固定。除去目標となる雄性前核は雌性前核より大きく、第2極体より遠位にあることを基準にし⁵⁾、3時方向から除去用吸引ピペットを卵細胞質内に深く刺入し除去目的前核まで入れる。ゆっくり陰圧をかけ前核全体をピペット内へ吸引しそのまま抜去する。あとは1個の雄性前核と1個の雌性前核が残る。操作後卵を2回洗浄し通常の体外培養を施行、4時間後に2つの前核の状態、24時間後に分割の状態を観察した。本研究においては細胞膜弛緩剤 (membrane relaxants) は使用していない (写真2)^{4,5)}。

ICSI法

前日採精、swim-up処理後の運動精子を軽量パラフィンオイルで被われた10% PVP (ポリビニルピロリドン) 5 μ l小滴内へ移しICSI直前に注入ピペット先端でたたき、回転振盪させ尾部圧迫にて不動化後、尾部より吸引、同ペトリディッシュ上の5 μ l培養液小滴内で保持用ピペットに固定された未受精卵細胞質内へ注入した⁸⁾。操作後卵を2回洗浄し18時間の体外培養後に雌雄両前核と極体、42時間後に分割の状態を観察した。また1日遅れのICSI法の有効性を検討するため、同時期同方法にて施行された新鮮卵でのICSI法と比較した (写真3)。

統計処理には χ^2 検定を用いた。

結 果

余剰雄性前核吸引除去法と1日遅れの未受精卵に対するICSI法の結果を表1に示した。

雄性前核除去法において4-PNからの2個の雄性前

核除去は11個すべて失敗に終わった。43個の3-PNからの1個の雄性前核除去において生存率67.4%、形態的正常2-PN 60.5%、分割率53.5%であった。

未受精卵へのICSI法においては生存率94.9%、受精率(2-PN) 56.4%、分割率48.7%、各々の生存卵あたりの2-PN (22/37=59.5%、26/29=89%)、および分割率 (19/37=51.4%、23/29=79.3%) は3-PNから

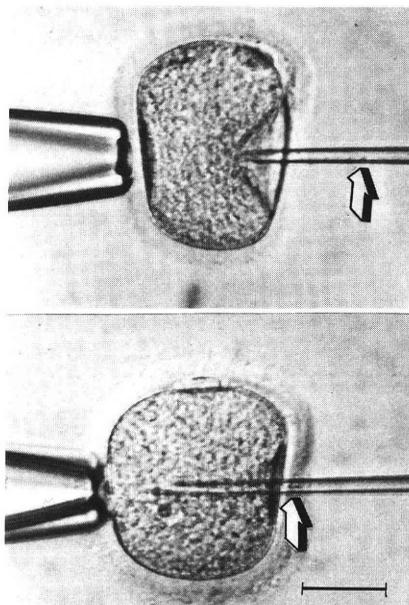


写真3 卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

1日遅れのICSIでは卵の過熟性のため卵細胞質や細胞膜の弾性が増す (矢印は精子) ($\times 200$; スケールバーは50 μ m)。

表1 未受精卵に対する1日遅れのICSI法と多精子受精卵からの余剰雄性前核除去法の結果

	ICSI	雄性前核除去法 (3-PN)	雄性前核除去法 (4-PN)
操作卵総数	39	43	11
生存卵数 (%)	37 (94.9 %)	29 (67.4 %)	4 (36.4 %)
2-PN卵数 (%)	22 (56.4 %)	26 (60.5 %) a,b	0 a
分割卵数 (%)	19 (48.7 %)	23 (53.5 %) b	0

a 顕微操作4時間後における正常形態2-PN.

b ICSI群と比較して有意差なし (χ^2 検定).

表2 同時期同方法による未受精卵での1日遅れのICSI法と新鮮卵でのICSI法の比較

	1日遅れのICSI	新鮮卵でのICSI
操作卵総数	65	103
生存数 (%)	58 (89.2 %)	96 (93.2 %)
2-PN数 (%)	22 (33.8 %)	52 (50.5 %) a
分割卵数 (%)	16 (24.6 %)	41 (39.8 %)

a $p < 0.05$ (χ^2 検定).

の雄性前核除去法において高値であったが生存率はICSI法が高く、総操作卵数での比較では有意差がなかった。

同時期同方法による新鮮卵と1日遅れの未受精卵に対するICSIの比較を表2に示した。新鮮卵での

ICSI群において受精率、分割率ともに1日遅れのICSI群に比し高値をとる傾向にあった。

考 察

通常の体外受精においては多精子受精をきたし、低精子濃度媒精においては多精子受精か未受精となる受精調節機構異常と考えられる症例がある。

ヒト卵では、透明帯を通過した先体反応完了精子が卵表面に結合後融合し卵細胞質内Ca²⁺が増加、卵細胞表層顆粒の囲卵腔への放出(表層反応)を誘発し、透明帯(ZP-3)にある精子レセプターや透明帯の質的变化で後から来た精子はZP-3と結合不能となり多精子受精防御機構は形成されるとされる(透明帯反応: zona reaction)⁶⁾。この機構のどこかに破綻を生じると多精子受精をおこし2個以上の精子由来の雄性前核を形成することになる。その余剰な雄性前核を除去することで理論的には正常な1個の雄性前核と1個の雌性前核を有する接合子にすることは可能である³⁻⁵⁾。

本研究において4-PNから2個の雄性前核吸引除去はすべて失敗に終わった。ピペットが細く吸引力が弱いと途中でつまったり、逆にピペットが太く吸引が強いと3個以上の前核を一度に吸引したり卵を破壊してしまう(写真4)。また雄性雌性前核の区別が難かしくなる。除去目標とする雄性前核は一般的に

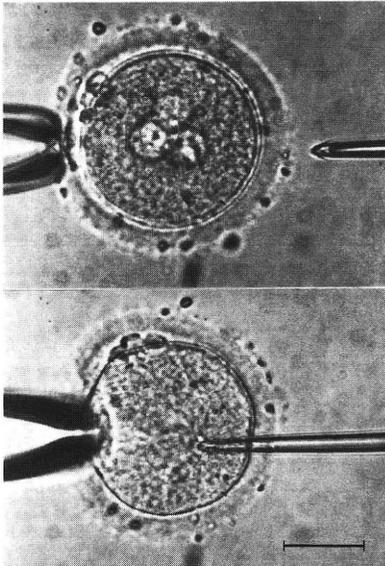


写真4 4-PNからの2個の雄性前核除去失敗例
吸引が強すぎてすべての前核を吸引してしまった
(×200; スケールバーは50μm)。

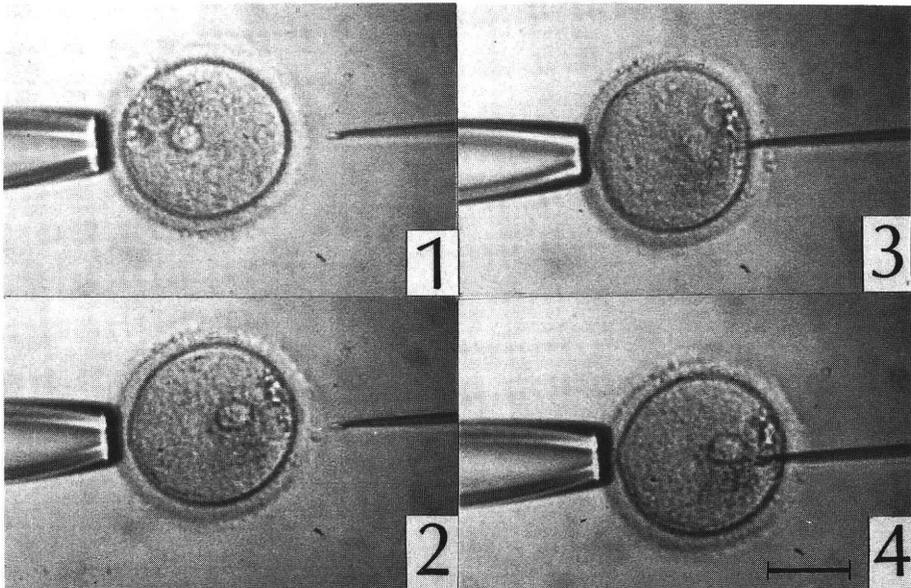


写真5 多精子受精卵を遠心し前核を卵細胞質辺縁によせる
吸引除去が容易となるが除去目標となる雄性前核の位置関係が不明瞭になる欠点がある(×200; スケールバーは50μm)。

雌性前核より大きく第2極体より遠位にあることを基準としたが⁵⁾, 3-PNでは卵を回転させたり動かしながら観察すると比較的わかり易い。またこの基準の正当性について前核除去後の胚の染色体分析により検討されているが⁹⁾, 除去前核が雄性である確証はなく今後の課題と思われる。3-PNからの1個の余剰雄性前核除去においては操作がうまくいくとその後の胚発育は良いと言われており^{4,5)}, 本研究においても同様の傾向を認めた。

受精卵を高速遠心することで前核を卵細胞質辺縁に寄せることが可能であり¹⁰⁾, 浅いピペット刺入で容易に吸引除去ができ, 卵への侵襲が少なく生存率の向上が期待できる。しかし, 前核と極体との位置関係が不明確となり除去核が雄性である正確性が下がる。また遠心程度, 時間の設定が難かしく固体差もあり検討中である(写真5)。

未受精卵への1日遅れのICSI法は前核除去法より生存率が高かった。それに比して前核除去後の卵の生存率が低いのはピペットも太く吸引による卵細胞質の欠損が多く, 卵細胞質への侵襲が大きいためと考えられる。しかし, 1日遅れのICSIでは卵の追加培養過熟性によると思われる卵細胞質や細胞膜, 透明帯の弾性の変化が刺入を困難にし, 精子注入が不十分で困卵腔に押しもどされることがある。また操作後の胚発育も新鮮卵でのICSIと比較して不良であった。

単一精子受精機構異常と思われる症例での余剰雄性前核除去とICSIの2方法とも形態学的正常胚の獲得が可能と考えられた。しかし総操作卵数あたりの胚発育率においては両者間に有意差を認めなかった。また体外受精における多前核では数%であるが雌性前核(極体)放出不全のため, 雌性前核が2個となっている場合もあり多精子受精との鑑別は難かしく今後の課題である。

謝 辞

本研究のために十分な設備を提供していただいた

Kiel大学産婦人科, K. Semm教授およびL. Mettler教授, さらに培養に協力していただいたS. Buck助手, A. Salmassi研究室長に感謝致します。

文 献

- 1) Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, et al. (1993) Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. A report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* 8: 1055-1060
- 2) Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, et al. (1993) High fertilization rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 8: 1061-1066
- 3) Rawlins RG, Binor Z, Radwanska E, et al. (1988) Microsurgical enucleation of tripronuclear human zygotes. *Fertil Steril* 50: 266-272
- 4) Gordon JW, Navot D, Grunfeld L, et al. (1989) Successful microsurgical removal of a pronucleus from tripronuclear human zygotes. *Fertil Steril* 52: 367-372
- 5) Malter HE, Cohen J (1989) Embryonic development after microsurgical repair of polyspermic human zygotes. *Fertil Steril* 52: 373-380
- 6) Yanagimachi R (1989) Mammalian Fertilization. In: Knobil E, Neill J, Ewing LL, et al. (eds), *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, PP167-185
- 7) Ingerman TH, Buck S, Mettler L (1989) Down-Regulation der Hypophyse zur in-vitro-Fertilisation. *Gynäkol* 2: 257-260
- 8) Chida S (1995) Immobilized and hypo-osmotic swollen spermatozoa on intracytoplasmic sperm injection. *J Assisted Reprod Genetics* 12: 453-455
- 9) Cohen J, Tang Y, Munne S, et al. (1993) The parental origin of the distal pronucleus in dispermic human zygotes. *Hum Reprod (Supplement)* 10: 189
- 10) Kinis A, Vergos E, Gordon A, et al. (1994) Effect of centrifugation on bovine oocytes. *Hum Reprod (Supplement)* 9: 171

(受付: 1995年5月17日)

(受理: 1995年10月18日)

Micromanipulation on oocytes for the defect of monospermic fertilization: Intracytoplasmic sperm injection and extra male pronuclear extraction

Satoru Chida*

Department of Obstetrics and Gynecology, Kiel University Hospital, 24105 Kiel, Germany

Micromanipulation is one of the most potent procedure for the treatment of male infertility as intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and it is also useful for microsurgical repair of polyspermic zygotes through pronucleus

extraction. In the human oocytes of the defect of monospermic fertilization, only unfertilized oocytes or polyspermic zygotes are obtained following in vitro fertilization (IVF). In such cases, two methods of microsurgical treatments are possible. One is ICSI with 1 day-old unfertilized oocytes and the other is removal of extra male pronuclei after conventional IVF treatment. The purpose of this study was to compare the survival and in vitro developing capacity of manipulated embryos with two methods, and to attempt which treatment can rescue oocytes and/or zygotes from a breach.

The rate of normal fertilization and cleavage were 56.4 % and 48.7 % respectively, when ICSI was carried out on 1 day-old unfertilized oocytes. The rate of normal two-pronucleate zygotes and cleavage were 60.5 % and 53.5 % respectively, when one pronuclear extraction was carried out on tripronuclear zygotes. The in vitro developing capacity of manipulated embryos following ICSI was lower than the embryos following pronuclear extraction, on the other hand the survival capacity of embryos after ICSI was higher than after removal of pronuclei. Particularly, all of four-pronucleate zygotes resulted in failure to remove of two male pronuclei depending on the size of the needle and the force of suction applied, and also on the difficulty to distinguish between male and female pronuclei. It is not possible to remove the two or more male pronuclei correctly. Removal of extra male pronuclei should be applied only after it is firmly established that female and male pronuclei can be reliably distinguished from each other.

Several improvements can be suggested for increasing survival rates after micromanipulation in clinical management of IVF cases. Although both treatments that ICSI with 1 day-old unfertilized oocytes and male pronuclear extraction are possible, ICSI with freshly prepared oocytes is also recommended when the case of the defect of fertilization has been already demonstrated by previous IVF treatment.

Key words: fertilization defect, polyspermic zygote, male pronuclear extraction, one day-old oocyte, intracytoplasmic sperm injection

*Present address: Takahama Clinic, Sendai 981, Japan

男性不妊, 原因不明不妊に対する腹腔内人工授精の 有用性についての検討

Direct Intra Peritoneal Insemination for Male Factor Infertility and Unexplained Infertility

聖マリアンナ医科大学産婦人科学教室

石田 徳 人 Norito ISHIDA	栗 林 靖 Yasushi KURIBAYASHI	近 藤 俊 彦 Toshihiko KONDO
平 井 邦 彦 Kunihiko HIRAI	代 田 琢 彦 Takuhiko SHIROTA	押 田 守 弘 Morihiro OSHIDA
渡 邊 潤一郎 Junichiro WATANABE	大 野 祐 子 Yuko OHNO	松 本 一 彦 Kazuhiko MATSUMOTO
石 塚 文 平 Bunpei ISHIZUKA	雨 宮 章 Akira AMEMIYA	

Department of Obstetrics and Gynecology

St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki 261, Japan

AIH, IVF-ETにより妊娠に至らなかった症例のうち, 男性因子および原因不明不妊にDIPIを施行し妊娠例を検討した.

対象は男性因子9組と原因不明不妊31組で94周期にDIPIを施行した. HSGまたは腹腔鏡で少なくとも片側の卵管の疎通性を認め, ダグラス窩の閉鎖のないものとし, 施行周期は自然周期36周期, Clomiphene周期16周期, hMG周期42周期の3方法を用い, hCG 5000 IU/ml筋注後, 約40時間で施行した. 排卵の推定は基礎体温, 頸管粘液検査, 超音波断層法, 血中progesterone値により総合的に判断した. 精液の調整は運動精子数の向上と腹腔内への雑菌の混入を軽減させることを目的とし, percoll法後さらにswim-up法を用いて行い, 精子浮遊液0.5 mlを22 Gカテラン針にて後腔円蓋よりダグラス窩へ注入した.

対患者妊娠率は, 男性因子55.6% (5/9), 原因不明不妊12.9% (4/31), 対周期妊娠率は同様に17.9% (5/28), 6.1% (4/66)であった. また, 妊娠例はhMG周期のみに認めた. Percollとswim-up後の精子濃度が800万/ml, 運動率13%の症例も妊娠した.

以上よりDIPIは, AIHおよびIVT-ET妊娠不成立例, IVF-ET待機例に施行する意義のある治療法であると思われた.

キーワード: 人工授精, 体外受精, 腹腔内人工授精, 男性不妊, 原因不明不妊

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (1), 106 - 110, 1996)

緒 言

乏精子症(精子濃度 $20 \times 10^6/ml$), 精子無力症(精子運動率50%以下)などの男性因子による不妊および原因不明不妊に対し, 人工授精(artificial insemination with husband's semen: 以下AIH)^{1,2)}を施行しても妊娠

に至らない場合には, 配偶子卵管内移植(gamete intrafallopian transfer: 以下GIFT)^{3,4)}や, 体外受精(in vitro fertilization embryo transfer: 以下IVF-ET)^{5,6)}が選択される傾向がある. 一方, 近年そのような症例に対しての治療法として腹腔内人工授精(direct intra peritoneal insemination: 以下DIPI)⁷⁻¹⁴⁾の有用性に関

する報告がみられる。今回我々は、AIH、IVF-ETにより妊娠に至らなかった症例のうち、男性因子および原因不明不妊にDIPIを施行し妊娠例を得たので、解析を行いその意義について検討した。

対象および方法

平成4年4月から平成5年6月の間に当院不妊外来受診中の不妊症例のうち、6回以上AIHを施行しても妊娠に至らなかった男性因子による不妊9組と原因不明不妊31組を対象とした。男性因子の診断はDIPI施行前3回の精液所見の平均値をWHOの分類¹⁵⁾に準じて診断し、他の不妊因子を認めない症例とした。原因不明不妊の診断は、腹腔鏡検査を含めた不妊一般検査において異常を認めない症例とした。これら計40組に対し94周期にDIPIを施行した。対象症例は、HSGまたは腹腔鏡で少なくとも片側の卵管の疎通性が確認され、かつダグラス窩の閉鎖のないものとした。

DIPIは以下の3通りの周期に施行した。

1) 自然周期

Percoll-AIH (以下P-AIH) を6回以上施行しても妊娠に至らず、自然排卵を認める症例(14例, 36周期)に、主席卵胞径が16 mmに発育した時点でhCG 5000 IUを筋注しDIPIを施行した。

2) Clomiphene周期

自然周期にてDIPIを3回以上施行しても妊娠に至らない症例(5例, 13周期)および、無排卵症でClomipheneにて卵胞発育・排卵を認めP-AIHを6回以上施行しても妊娠に至らない症例(1例, 3周期)に、Clomiphene 100 mg/日を月経開始5日目より5日間投与し、主席卵胞径が20 mmに発育した時点でhCG 5000 IUを筋注しDIPIを施行した。

3) hMG周期

自然周期、Clomiphene周期にてDIPIを3回以上施行しても妊娠に至らない症例(19例, 39周期)および、Clomipheneによる反応が不良の症例(1例, 3周期)には月経開始7日目からhMG 150 IUの筋注を開始し、主席卵胞径が18 mmに発育した時点でhCG 5000 IUを筋注しDIPIを施行した。DIPIは全例、hCG筋注後24~48時間後に施行した。また、hCG投与時の主席卵胞径を自然周期16 mm、Clomiphene周期20 mm、hMG周期18 mmとした根拠は、我々の臨床経験では一般に自然周期、hMG周期、Clomiphene周期の順で主席成熟卵胞径は大きくなる傾向があり、各パラメータによる排卵時の、基礎体温・頸管粘液・超音波・エストラジオールなどによる判断と、他の

論文^{12,13)}を参考とした。なお、P-AIH妊娠不成立例4例、8周期はP-AIH周期にhMGによる卵胞刺激を受けていた。排卵時期の推定は、基礎体温測定、経腔超音波断層法、頸管粘液検査、血中プロゲステロン値の測定を併用しretrospectiveに判断した。超音波断層法は月経周期の10日目前後より行った。

精子の調製は、運動精子数の向上と腹腔内への雑菌の混入を軽減させることを目的とし、Percoll法後にさらにswim-up法を用いて行い、精子浮遊液0.5 mlを22 Gカテラン針を用い、経腔超音波下に後陰門蓋よりダグラス窩に穿刺し注入した。カテラン針の腹腔内への進入はloss of resistance法または腹水の吸引により確認した。穿刺前後は塩化ベンゼトニウム(0.02%ハイアミン®液)にて腔内を消毒し、抗生物質を4日間投与した。

結 果

各例とも、DIPI施行後に骨盤内感染に由来すると思われる発熱・腹痛などの症状は認められなかった。妊娠率は全症例で対患者22.5% (9/40)・対周期9.6% (9/94)、男性不妊群では対患者55.6% (5/9)・対周期17.9% (5/28)、原因不明不妊群では対患者12.9% (4/31)・対周期6.1% (4/66)であった。妊娠例の9例中8例はDIPI3回以内の施行で妊娠成立した。1例は7回目の施行で妊娠に至った。自然周期、Clomiphene周期、hMG周期別に検討すると、妊娠例はhMG周期のみに認められた。対hMG周期あたりの妊娠率は21.4% (9/42)であった。DIPI施行による妊娠周期と非妊娠周期の比較では、夫年齢、妻年齢、不妊期間、ハムスター試験(zona-free hamster egg sperm penetration test; 以下ZSPT)、精子超生体染色法(eosin-Y supravital staining of human spermatozoa; 以下EOY)、精子膨化試験(hypoosmotic swelling test; 以下HOST)、AIH回数、IVF-ET回数、DIPI施行時の精液所見のいずれにも有意差は認められなかった(表1)。また、hMG周期において妊娠群・非妊娠群とも主席卵胞数は1~3個と差はなく、妊娠群9例は全例単胎であり、主席卵胞数は4例が1個、3例が2個、2例が3個であった。

DIPIで妊娠成立した男性不妊5例(表2)は過去にAIHを7~18回施行しており、そのうちの2例はIVF-ETの既往があった。1例は妊娠時のpercoll法後さらにswim up法により調整した精子所見が、精子濃度 $8 \times 10^6/\text{ml}$ ・運動率13%であった。現在流産例は無く、20週以降の2例も順調に経過している。また、男性不妊は全例、泌尿器科にて補中益氣湯、カリク

表1 DIPIによる妊娠例の臨床所見

症例	男性不妊					原因不明不妊			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
不妊歴	3年・ 原発性	6年・ 原発性	8年・ 原発性	7年・ 原発性	5年・ 原発性	6年・ 続発性	5年・ 原発性	4年・ 続発性	5年・ 原発性
夫年齢	29	35	33	35	34	34	41	34	33
妻年齢	27	33	32	35	33	33	31	32	32
%ZSPT	78	100	37	65	97	87	100	79	15
%EOY	75	60	80	30	65	70	70	95	30
%HOST	48	96	70	45	40	94	56	10	44
AIH回数	13	18	7	10	15	17	13	10	21
IVF回数	1	0	0	0	2	1	0	0	0
HSG ・腹腔鏡	正常 骨盤腔								
抗精子抗体	陰性								
DIPI回数	3	1	1	3	7	2	3	2	1
卵巣刺激法	hMG								
推定排卵日 からの差(日)	0	+1	+1	+1	0	0	0	0	0
精子濃度 (10 ⁶ /ml)	79	55	8	15	132	33	89	80	166
運動率(%)	37	81	13	27	80	70	77	80	59
奇形率(%)	3	5	8	24	6	3	4	7	10
妊娠予後	NVD	NVD	20w	22w	NVD	14w	13w	S.A. (7w)	S.A. (9w)

DIPI: direct intra peritoneal insemination

HOST: hypoosmotic swelling test

ZSPT: zona-free hamster egg sperm penetration test

NVD: normal vaginal delivery

EOY: eosin-Y (supravital staining of human spermatozoa)

S.A.: spontaneous abortion

精液所見はDIPI施行時のpercoll&swim-up法を示す。

表2 DIPIによる妊娠例と非妊娠例の比較

	妊娠例 (n=9)	非妊娠例 (n=31)	
夫年齢	34.0 ± 3.1	32.3 ± 3.3	N.S.
妻年齢	32.1 ± 2.1	29.4 ± 3.6	N.S.
不妊期間(年)	5.4 ± 1.5	4.0 ± 2.2	N.S.
推定排卵日からの差(日)	-0.2 ± 0.6	-0.1 ± 2.1	N.S.
施行時の月経周期(日)	14.8 ± 2.1	15.9 ± 2.5	N.S.
%ZSPT	72.6 ± 29.2	56.7 ± 35.6	N.S.
%EOY	60.0 ± 18.2	59.7 ± 21.1	N.S.
%HOST	61.6 ± 21.1	56.4 ± 19.9	N.S.
AIH回数	12.7 ± 5.4	13.4 ± 8.1	N.S.
IVF回数	2.6 ± 1.8	2.6 ± 1.7	N.S.
精子濃度(10 ⁶ /ml)	70.2 ± 57.2	58.6 ± 56.9	N.S.
運動率(%)	59.8 ± 24.9	42.6 ± 28.5	N.S.
奇形率(%)	8.5 ± 6.8	10.0 ± 10.9	N.S.

DIPI: direct intra peritoneal insemination

Mean ± S.D.

ZSPT: zona-free hamster egg sperm penetration test

EOY: eosin-Y (supravital staining of human spermatozoa)

HOST: hypoosmotic swelling test

精液所見はDIPI施行時のpercoll&swim-up法を示す。

レイン, メチコバラミンの投与を受けており, 症例1, 2, 5, とくに症例5は精子濃度と運動率に測定日による変動がみられた。

DIPIで妊娠成立した原因不明不妊4例(表2)は, 過去にAIHを10~21回施行しており, うち1例はIVF-ETによる妊娠・分娩の既往があり, 1例は自然妊娠・分娩の既往があった。また, 妊娠した4例中2例はそれぞれ現在14週, 13週で経過順調, 他の2例は7週と9週で流産となった。

考 察

乏精子症, 精子無力症などの男性不妊および原因不明不妊に対し, AIHを施行しても妊娠に至らない場合には, IVF-ETが選択される傾向がある。しかし, IVF-ETの妊娠率はおおそ15~30%と決して高いとはいえず, その反面, 経済的, 身体的, 精神的負担が多大であり拳児を諦める例も少なくない, 一方, DIPIはそのような症例に対しての治療法としても選択され, 患者の負担は大幅に軽減される。今回我々は, AIH, IVF-ETにより妊娠に至らなかった症例のうち, 男性不妊9組および原因不明不妊31組に計94周期のDIPIを施行し9例の妊娠を得たので, 妊娠例について解析を行いその意義について検討した。

精液所見は, 妊娠周期・非妊娠周期間に有意差を認めなかった。男性因子におけるDIPI施行時の精子濃度と運動率は変動を認め, 症例1は精子濃度が正常域であり, 症例2, 5においては精子濃度および精子運動率ともに正常域であった。このことは, 正常男性にも見られる経日的な精液所見の変動によるもの¹⁵⁾で, DIPI妊娠周期に偶然改善が認められたものとも考えられるが, 本症例の精液所見の診断は全例, DIPI施行以前の3回の平均により行っており, また, 男性不妊症例は全例とも泌尿器科にて補中益気湯, カリクレイン, メチコバラミンの投与を受けていたことから, 薬物療法の効果も考慮されなければならない。しかし, 一般に薬物療法の精液所見に対する効果の有無については充分解析されておらず, 今後検討されなければならない。また, P-AIHにより精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ の症例でも8%前後の妊娠率が得られるとの報告もある^{16,17)}が, 我々もAIH妊娠不成立例にDIPIを施行し, Percoll法, swim-up法を用いて精子濃度 $8 \times 10^6/\text{ml}$ ・運動率13%の精液所見で妊娠例を得ている。よって, 妊孕性において精子濃度・精子運動率の下限を設定することは困難であり, 男性因子によるP-AIH不成立例にもDIPIは試

みるべき方法と思われた。

DIPIにより妊娠が成立するメカニズムは, 腹腔内にinseminationされた精子が卵管内に輸送されることや, 腹腔内での受精によるものと考えられ, 我々の得た結果ではAIHよりもDIPIがさらに容易にするものと推察された。栗林¹⁴⁾は, AIH後, 経ダグラス窩精子回収試験を用いて精子卵管通過性を検討し, 排卵日前後のみ通過性のあることを示唆する結果を報告した。

今回我々は, DIPIによる妊娠例がhMG投与周期に限って見られることを示した。これらの結果はhMG投与により, 卵胞発育にともなう何らかの腹腔内の局所因子または内分泌学的因子が精子卵管通過性を助長することを示唆するものと思われる。その上, hMG周期に妊娠例が集中している理由として, 過排卵刺激による複数個の排卵, 卵胞液・腹水の増加による腹腔内での精子環境の変化, 卵管因子の改善, 子宮内膜の肥厚などの要因も考慮されなければならない。

Clomiphene周期において妊娠成立例を得られなかった理由として, Clomipheneの抗エストロゲン作用による子宮内膜増殖の抑制, 卵管運動性の抑制などの関与も考えられる。今回の我々の検討では, hMG刺激下P-AIH妊娠不成立例4例中2例にDIPIで妊娠が成立しており, このことはDIPIでの妊娠が単にhMG投与の影響によるものではないことを示すものと思われる。また, hMG-hCG周期に比しGnRH-analog-hMG-hCG周期がより有効であり, Clomiphene-hMG-hCG周期は妊娠率が低いとの報告⁹⁾もあるが, その2方法については未検討であるため, それらの有効性の有無については今後の課題としたい。

結 語

男性不妊・原因不明不妊40組, 94周期にDIPIを施行し妊娠9例を得た。男性不妊・原因不明不妊におけるAIH妊娠不成立例, IVF-ET待機例およびIVF-ET妊娠不成功例に対し, DIPIを施行する意義と有用性が認められた。その際, hMGによるhyperstimulationを行うことがより妊娠成立のための重要な因子であることが示唆された。

なお, 本論文の要旨は第108回日本不妊学会関東地方部会において報告した。

文 献

- 1) 飯塚理八, 兼子 智(1991)精子洗浄濃縮. 産婦治療 62: 976-979

- 2) 飯塚理八, 朴 圭勲, 水本 弘 他 (1970) 人工授精の実際. 産婦治療 21: 637-642
- 3) Asch RH, Ellsworth LR, Balmaceda JP, et al. (1984) Pregnancy after gamate intrafallopian transfer. Lancet 11: 1034-1035
- 4) Asch RH, Balmaceda JP, Ellsworth LR, et al. (1985) Gamate intrafallopian transfer : A new treatment for infertility. Int J Fertil 30: 41-46
- 5) Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM (1980) Establishing full-term pregnancies using cleaving embryos grown in vitro. Br J Obstet Gynecol 87: 737-741
- 6) Leeton J, Trounson A, Wood C, et al. (1983) In vitro fertilization and embryo-transfer. Acta Eur Fertil 14: 95-98
- 7) Forrler A, Dellenbach P, Nisand I (1986) Direct intraperitoneal insemination in unexplained and cervical infertility. Lancet 1: 916-917
- 8) Forrler A, Badoc E, Moreau L, et al. (1986) Direct intraperitoneal insemination: first results conferred. Lancet 2: 1468-1468
- 9) Cimino C, Guastella G, Compuretto G (1988) Direct intraperitoneal insemination (DIPI) for the treatment of refractory infertility unrelated to female organic pelvic disease. Acta Eur Fertil 19: 61-68
- 10) Lasec G, Manhes H, Hardy RI (1989) In-vivo transperitoneal fertilization. Hum Reprod 4: 521-526
- 11) Studd J, Lim-Howe D (1987) Direct intraperitoneal insemination. Lancet 1: 326-326
- 12) 津田朋男, 小林善宗, 中村加代子 他 (1991) 卵管内精子輸送障害に対する腹腔内人工授精の試み. 日不妊誌 36: 396-401
- 13) 蔵本武志, 高崎彰久, 藤井洋治 他 (1993) 難治性不妊症に於ける腹腔内人工授精の有用性についての検討. 日本受精着床会誌 10: 59-61
- 14) 栗林 靖 (1992) ヒト精子卵管通過性に関する研究. 聖マリアンナ医大誌 20: 797-813
- 15) World Health Organization (1992) Collection and examination of human semen, WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 3 ed, WHO
- 16) 飯塚理八, 小林俊文, 遠藤勝英 (1986) 人工授精の実際 53: 264-271
- 17) 鯨島義弘, 上浦祥司, 谷澤 修 他 (1988) 当科不妊外来における14年間の検査・治療成績の検討—AIHを中心として—日不妊会誌 33: 77-83
(受付: 1995年3月25日)
(受理: 1995年10月19日)

Direct intra peritoneal insemination (DIPI) for male factor infertility and unexplained infertility

Norito Ishida, Yasushi Kuribayashi, Toshihiko Kondo,
Kunihiko Hirai, Takuhiko Shirota, Morihiko Oshida,
Junichiro Watanabe, Yuko Ohno, Kazuhiko Matsumoto,
Bunpei Ishizuka and Akira Amemiya

Department of Obstetrics and Gynecology
St. Marianna University School of Medicine, Kawasaki 216, Japan

We performed 94 direct intraperitoneal insemination (DIPI) s in 40 infertile couples (9 with male factors and 31 with unexplained infertility). All couples had undergone more than 6 unsuccessful artificial insemination with husband's semen (AIH). They had, at least, unilateral tubal patency demonstrated either by hysterosalpingography or laparoscopy.

DIPIs were performed either in natural cycles (36 cycles in 14 cases), in cycles with clomiphene citrate (100 mg for 5 days, 16 cycles in 6 cases) or in hMG stimulated cycles (42 cycles in 20 cases). In all DIPI cycles, follicular growth was monitored by ultrasonography and hCG 5000 IU was administered when the diameter of the dominant follicle reached 16 mm ~ 20 mm. Sperms were prepared by standard swim up method following percoll method and 0.5ml of suspension was introduced into the Douglas' pouch through 22 G needle. Consequently, we obtained 9 pregnancies. Pregnancy rate was 22.5 % (9/40) per patient and 9.6 % (9/94) per cycle. 5 out of 9 patients with male factors became pregnant [55.6 % (5/9) per patient, 17.9 % (28) per cycle], while 4 out of 31 patients with unexplained infertility achieved pregnancy [12.9 % (4/31) per patient, 6.1 % (4/66) per cycle]. All pregnancies were obtained during hMG stimulated cycles.

Thus, we conclude that DIPI is an effective treatment of infertile patients with male and unexplained factors who had failed to conceive by AIHs.

Key words: AIH, IVF-ET, DIPI, oligozoospermia, unexplained infertility

地方部会講演抄録

第112回 日本不妊学会関東地方部会

日時：平成7年7月29日(土)午後1時30分～

会場：(横浜市)「関内ホール(横浜市民文化会館)」

1. 機能性不妊に対する腹腔鏡下大量通水についての検討

○橋本 栄, 植村次雄, 白須和裕
水口弘司 (横浜市大産婦)

平成3年5月から平成6年7月までの3年2か月間に行った機能性不妊患者38例の腹腔鏡下大量通水所見について検討を行ったので報告する。

原発性不妊症は27例, 続発性不妊症は11例であり, 平均年齢は31.9歳, 平均不妊期間は4.5年であった。必要に応じ, 癒着剝離, レーザー凝固などを行った。大量通水で両側とも卵管疎通性がみられたものは31例, 片側のみのもの6例, 両側とも疎通性不良であったもの1例であった。子宮内膜症の合併例は11例, 子宮腺筋症の合併例が3例存在した。1年以内の妊娠は9例(23.6%)であった。通水圧は100～500 mmHgで, 内膜症例はなかった。

妊娠例と非妊娠例の通水圧を比較してみると, 妊娠例は平均276 mmHgであり, 非妊娠例は平均214 mmHgで, 両者の間に有意差はなかったが, 妊娠例には明らかに大量通水によって妊娠したと考えられる症例が存在し, さらに回数を重ねて行うべき有効な方法と考えられた。

2. 腹腔鏡下子宮外妊娠手術の術式による適応と限界についての検討

○中熊正仁, 矢野義明, 森田峰人
安部裕司, 久保春海, 平川 舜
(東邦大第1産婦)

1988年1月から1994年12月まで, 当科にて腹腔鏡下で子宮外妊娠手術を施行した124例につき, 術式ごとの検討を行った。

対象は, MTX局所注入法が12例, 線状切開術73例, 卵管采圧出術9例, 卵管切除術22例であった。

腹腔内出血量400 ml以上では開腹例が83%と多く, 400 ml未満が腹腔鏡下手術の適応と考えられた。血腫径5 cm以上の症例では約半数が卵管切除術を施行されたが, 5 cm未満では87%に卵管保存手術が可能であった。MTX局所注入法の適応症例は限定されるが, 線状切開術は血腫径, 術前尿中hCGともに制限

なく, 保存手術を要するMTX適応外の症例に対しても有効と考えられた。

腹腔鏡下手術手技や周辺機器の発達により, 腹腔鏡下の子宮外妊娠に対する手術が安全で容易に行えるようになった。腹腔内出血量が少なく, 全身状態が良好であれば, ほとんどの症例で腹腔鏡下の外妊手術は可能である。

3. 一側卵管切除後の卵管妊娠に対する保存的治療の成績

○金井督之, 川内博人, 釘持 稔
石井尊雄, 飯野讓二, 中居光生
西島正博 (北里大産婦)

1975年から1994年までの20年間に当科で治療した子宮外妊娠523例のうち, 一側卵管をすでに切除されていた症例に発症した卵管妊娠41例について検討した。

41例の既往手術の内訳は, 36例が子宮外妊娠, 2例が卵巣嚢腫, 1例がPID, 不明が2例であり, このとき片側卵管が切除されていた。これら41例に対し, 開腹による卵管保存手術を11例に, Methotrexate(以下MTX)全身投与療法を6例に, MTX局所注入療法を2例に, 腹腔鏡下卵管切除内容除去術を2例に保存的治療として行い, 他の20例は卵管を切除した。

保存的治療例における治療後の卵管疎通性は, 開腹保存手術で5例中4例に, MTX全身投与で4例中2例に, MTX局注で2例中2例に認められた。治療後の妊娠は, 開腹保存手術で11例中4例(36.4%)に, MTX療法群(全身投与+局注)では8例中3例(37.5%)に認められた。

4. 不妊症スクリーニングとしてのクラミジア抗原検査

○児島孝久 (アモルクリニック)

当クリニックで不妊症のスクリーニングとして頸管クラミジア抗原検査を実施し, 陽性を示した17症例の臨床的背景, 卵管病変の有無, 不妊治療予後を検討した。

抗原検査はイデイヤクラミジア®を使用し, 抗原陽性者には, ミノマイシンまたはクラリスロマイシンを夫と同時期に2週間投与した。

1) 1994年4月から翌年3月までに当院を受診した不妊症例533例のうち, クラミジア抗原陽性症例は

17例(3.2%)であった。2)対象年齢は 31.2 ± 3.3 歳、結婚年齢は 27.6 ± 3.5 歳、不妊期間は 2.5 ± 1.0 年、原発性不妊13例、続発性不妊4例で、帯下・不正出血・腹痛など症状の症例はなかった。3)sex開始年齢は平均20.6歳(18歳~24歳)、夫以外の性的パートナー数は、平均2.8人(0人~7人)であった。4)17例中8例にクラミジア抗体価を測定し、IgA(+)/IgG(+)が0例、IgA(-)/IgG(+)が8例であった。5)HSG検査を受けた12例中、卵管の閉塞所見は2例で、水腫1例と閉塞1例であった。他の10例は卵管の疎通性は正常であった。6)17例中5例(29.4%)が治療後妊娠が成立し、治療内容は、自然妊娠3例、クロミッド妊娠1例、AIH妊娠1例であった。

5. 当院不妊外来における妊娠例の検討

○代田琢彦, 平井邦彦, 石田徳人
押田守弘, 房間茂由, 藤脇伸一郎
斎藤寿一郎, 渡辺潤一郎, 松本一彦
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・対象) 対象は、当院不妊外来通院中に平成6年1月より平成7年6月までの間に妊娠した112名で、不妊原因を子宮、卵管、排卵、黄体機能不全、子宮内膜症、男性因子、不明の7つの因子に分類し、妊娠に結びついた治療について検討した。

(結果) 妊娠例の69%が原発性、31%が続発性不妊であった。初診後1年以内の妊娠は原発性78%、続発性74%であった。原発性不妊での妊娠例の要因は排卵因子が57%を占め、子宮内膜症は6%であった。続発性不妊は、卵管、排卵因子がそれぞれ42%、45%で子宮内膜症は8%であった。治療としては、タイミング指導のみの妊娠が40%以上を占めた。また、高プロラクチン血症の妊娠例の半数が潜在性高プロラクチン血症でプロモクリプチン投与により妊娠した。

(結論) 適切なタイミング指導、潜在性高プロラクチン血症の検索が重要である。また、子宮内膜症は難治性不妊の原因と考えられた。

6. 卵巣嚢腫摘出術後の卵巣機能と妊孕性の検討

○杉本公平, 斉藤絵美, 松本和紀
小田原靖, 楠原浩二, 篠塚正一
(慈恵医大産婦)

IVF-ET施行時の卵巣刺激に対して反応不良な症例群がある。また、自然排卵周期でも卵巣手術により卵巣実質の減少や術後の癒着により卵巣機能が低下

することがある。今回、卵巣嚢腫摘出術後にIVF-ETを施行した11例13周期についてGnRHaによる卵巣刺激法による反応性を検討した。

その結果、両側手術例は3例5周期すべて反応不良で1周期のみ採卵可能だった。片側手術例は8例10周期で、5例5周期は反応良好ですべて採卵可能であり、3例5周期は反応不良で3周期のみ採卵可能であった。反応不良群では血中FSHの基礎値が高く、cancel率も高かった。そこで反応不良群に対してクロミド/hCG法を試みたところ比較的良好な結果を得た。

以上より手術侵襲のため卵巣のゴナドトロピンに対する反応性は低下し、それにとまって妊孕性も低下する。しかしクロミド/hCG法など、従来とは異なる排卵誘発法によって妊孕性の向上が期待できると考えられた。

7. 不妊患者の血中プロラクチン値についての研究

○茂井美紀子, 荒田与志子, 沢井かおり
楊箸岳人, 飛鳥井邦雄, 片桐信之
(横浜南共済病院産婦)

高PRL血症が卵巣機能を抑制し、プロモクリプチン(以下BCP)が奏効するが、血中PRL値が15 ng/ml以下のBCP有効例も多いことに関し、不妊症患者におけるTRHテストのデータ解析により若干の知見を得たので報告する。

対象を当院を受診した不妊患者254人と90人の正常群とし、全員にTRHテストを施行した。その結果、正常群と不妊群の血清PRL値に有意差をみた。また、血清PRLの正常域上限を平均値 $\pm 2SD$ より基礎値10 ng/ml、TRH負荷後30分86 ng/mlと定義した。

不妊患者のPRL分泌異常の割合は約20%で黄体機能不全や排卵障害が高い頻度で発生しており不妊因子としての影響は大きい。BPCの投与で改善傾向があり、不妊治療に際し血清PRL値10 ng/ml以上を高PRL血症とするのが妥当で、通常正PRL性とあつかわれるOHPにも高率に卵巣機能障害がありBCPの投与で改善が見られたためこの診断が不妊治療に有益であると考えた。

8. 妊娠成立周期における子宮内膜組織診の検討

○善方菊夫, 小林善宗, 淡路英雄
本田育子, 鈴木隆弘, 井上正人
牧野恒久 (東海大産婦)

不妊症の原因は様々であるが、しばしば黄体機能

不全を合併する。今回我々は、当院にて1984年から1995年にかけて自然排卵周期で自然妊娠が成立した周期に内膜組織診を施行した35例について検討した。

年齢は25歳～43歳、平均30.7歳であった。内膜採取および採血は、高温期5～9日目で平均6.2日目に施行した。プロゲステロン濃度は6.1～41.0、平均18.8 ng/mlであった。内膜組織はNoyesの基準により日付診を行い、基礎体温高温開始日からの日数と比較した。

±1日以内を一致群、±2日以上を不一致群とした。一致群28例、不一致群7例であったが両者間の黄体ホルモン値に有意差はなかった。また、流産率についても一致群28例中6例(21.4%)、不一致群7例中1例(14.2%)と有意差は認められなかった。一致群においてプロゲステロン10 ng/ml以下の症例が2例認められたが正常な妊娠経過を示した。

黄体機能不全の診断はまだ統一されておらず、今後さらに検討が必要であると思われる。

9. 多胎妊娠発生率減少におけるhMG律動的皮下投与法の意義

○野口顕一, 神野正雄, 佐藤 学
勝又木綿子, 吉村泰典, 中村幸雄
(杏林大産婦)

(目的) hMG律動的皮下投与法における各種無排卵症治療の多胎妊娠発生率とOHSS発生率を検討した。

(方法) 各種無排卵症例においてhMG 1日量150～300単位を携帯ポンプを用いて90分間隔で律動的皮下投与した。

(結果) 排卵率および妊娠率は、症例あたり100%・66%、周期あたり87%・16%と高率であった。妊娠45例中5例が多胎妊娠で、多胎妊娠発生率は11%と筋注投与法の約2分の1であった。OHSSの発生率は、症例あたり70%、周期あたり31%と減少効果は認めなかった。しかしながら、全例軽症であり、重症度の軽減効果が示唆された。

(結論) 本法は、各種無排卵症に対して排卵率・妊娠率が高いにもかかわらず、多胎妊娠率が低率であり、有用な方法と考えられた。

10. IVF-ETにおける子宮外妊娠例の検討

○村瀬真理子, 堀 裕雅, 山口 肇
近藤芳仁, 石川雅彦, 植村次雄
水口弘司 (横浜市大産婦)

子宮外妊娠は、IVF-ETの重要な合併症のひとつで

あり、自然妊娠に比べその発生率が高いことが知られている。今回IVF-ETにおいて1例の内外同時妊娠を含む4例の子宮外妊娠を経験したのでこれについて検討を加えた。

当科でのIVF-ET妊娠31例における子宮外妊娠の頻度は、12.5%と諸家の報告と比べ大きな差は認めなかった。

子宮外妊娠となった4症例のうち3例のIVF-ETの適応は卵管因子によるものであった。

IVF-ETにおいて子宮外妊娠を予防する方法として、当科では胚移植時の培養液の量・移植胚の数・ETチューブ先端の位置により移植胚が卵管に逆流するのを防ぐよう配慮している。また、子宮内膜内胚移植法、腹腔鏡検査時に予防的に機能していない卵管を結紮するといった方法も今後検討の必要があると考えられた。

11. Office ART (IVF, ICSI) の臨床的検討

○福田 勝 (福田ウイメンズクリニック)

当クリニックは開院2年になり、ビル内で外来診療のみを行う診療所で、一般診療と不妊治療を行っている。外来診療前に採卵、昼休みに精子処理、媒精、診療終了後に顕微授精を行い、また胚移植は昼休み時間に行っている。このように外来診療とARTであるIVFとICSIの時間をうまく調節してきた。

約2年のIVFの治療周期は、341例で採卵総回数は309例であった。移植総回数は255例で移植あたりの胚数は3.5個で、妊娠数は90例で、うちGS、FHBが確認されたものは76例であった。移植あたりの臨床的妊娠率は29.8%、採卵あたりの臨床的妊娠率は24.6%であった。

ICSIは重度乏精子・運動不良症か数回のIVFでも受精が認められなかった11症例に対し施行した。総卵数68個で受精率34.5%、分割率90%、胚移植率100%で2例の妊娠(妊娠率18.2%)を確認した。

以上のようにofficeで一般外来をやりながらIVF, ICSIを行うことは十分可能であった。ICSIで妊娠例を得ることができたが、受精率が低く、さらなる技術の向上が必要である。

12. 先天性精管欠損症に対して顕微鏡下精巣輸尿管穿刺術で得られた精子による体外受精成功例について

○岩本晃明, 矢島通孝, 西田茂史
馬場克幸, 長田尚夫
(聖マリアンナ医大泌尿器)
渡辺潤一郎, 石塚文平, 石田徳人
平井邦彦, 雨宮 章 (同 産婦)

症例は30歳, 3年間の不妊。触診上両側精管を触れない。精巣サイズは正常大。無精子症。内分泌検査正常。精巣生検はほぼ正常造精所見。先天性精管欠損症と診断した。

MESAの方針として手術日と採卵日とを合わせた。精子は精巣輸尿管のみより運動精子が採取できた。卵は20個採卵し, 精子濃度 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 未満, 運動率10%の内容で体外受精を行った, 第1日目は5/20前核形成し, 第2日目1個のみ2細胞期胚となり, 4個は前核のままでこれらを胚移植した。14日目に月経が初来し妊娠に至らなかった。

精巣輸尿管でも運動精子を採取することが可能で精巣上体頭部で精子が採取できない場合でも諦めてはいけな。

13. IVF-ETにおける固定日採卵法 一卵胞成熟速度による7日群と10日群の存在一

○根元 央, 正岡 薫, 河津 剛
星野恵子, 北澤正文, 稲葉憲之
(獨協医大産婦)

IVF-ET業務の簡易化を図る目的で週2回の固定日のみ計画的に採卵した過去2年間の成績と, なぜ週2回の採卵が必要であるかについて報告する。

Long protocol下にて毎週月曜のみにhMG投与を開始し, 翌週の月曜に卵胞が成熟した例では水曜に採卵(hMG7日群), 木曜に成熟した例では土曜に採卵(10日群), 翌々週の月曜に成熟した例では水曜に採卵(14日群), 14日投与しても成熟しない例はキャンセルとした。

189名283周期中280周期(98.9%)が固定日に採卵可能であり, 水曜(7日群, 51.5%)と土曜(10日群, 47.1%)がほぼ1対1の割合であった。ETあたりの妊娠率は7日群40.3%, 10日群42.7%, 14日群(4例)25.0%であった。7日群と10日群では明らかな卵巣所見の違いはなく, hMG開始日の卵胞径 $\geq 5 \text{ mm}$ が前者に多く, 後者に少なかった。

以上から水曜と土曜の週2回の固定日採卵で満足

すべき妊娠率が得られ, 7日群と10日群が生じる原因としてhMG開始日の卵胞径が 5 mm 以上か否かによることが判明した。

14. 体外受精卵巣刺激法における酢酸リュープロレリンの使用経験

○久慈直昭, 宮崎豊彦, 黒島正子
橋場剛士, 末岡 浩, 小林俊文
野澤志朗 (慶應大産婦)

皮下投与型GnRHアゴニスト, リュープロレリンを体外受精時の卵巣刺激に用い, その臨床的有用性を検討した。

(方法) リュープロレリン使用群36例(3.75 mgを一回皮下注), プセレリン使用群42例(900 μg 連日投与)について, 前周期高温期よりGnRH開始, 3週間でdown-regulationを確認後hMG投与, 最大卵胞径20 mmでhCG筋注, 採卵術を施行した。

(結果) リュープロレリン使用群ではGnRH3週間投与後E₂, FSH, LHはいずれも有意に低く, hMG投与日数, 総投与量は有意に高値であった。採卵数, および成熟卵率(採卵5時間後に第一極体放出)には有意差はなかった。

(結論) リュープロレリンはhMG使用量が多くなり, 採卵数は増加しなかったが, 患者のコンプライアンスの面からは1回投与ですむために良好であり, 卵巣刺激に使用可能なGnRHとして検討の価値があると考えられた。

15. 胚の形態的gradingからみたviabilityの評価と至適移植胚数の検討

○星野恵子, 正岡 薫, 河津 剛
根本 央, 北澤正文, 稲葉憲之
(獨協医大産婦)

IVF-ETにおける単胎妊娠率の向上のための胚のviabilityの正しい評価と, 適切な移植胚数の設定を, 胚の形態的gradingをもとに検討した。

306名306周期を対象とし, 胚のgrade(G)はVeeckのgradingに従った。1) 各患者の移植胚の中で最良の胚のGをもってETを分類すると, G I群48.7%, G II群32.7%, G III群8.2%, G IV群13.8%, G V群1.0%であった。2) 臨床的妊娠率はG I群60.4%, G II群38.0%, G III群20.0%, G IV群13.8%, G V群0%であり, 移植された最良胚のGと妊娠率の間には強い相関関係があった。3) G I胚の移植数別の妊娠率は1個(48.8%), 2個(60.5%), 3個(57.1%)の間には有意差はなかった。多胎率は2個(53.8%)と3個(62.5%)

で差はなかったが、3個で品胎が37.5%であった。4) G II群胚の個数別妊娠率は1個(15.6%)に比べ2個(45.5%)、3個(46.7%)で明らかに増加した。多胎率は2個で20.0%、3個で42.9%であり、3個でも品胎はなかった。5) G III, G IV群胚では4個以上移植された例に単胎妊娠がみられた。

16. 最近経験した染色体異常をともなわない streak gonad 症例

○橋本芳美, 栃木明人, 水谷美樹
高橋範子, 吉永陽樹, 石井裕子
宮川康司, 古屋清英, 坂元秀樹
津端捷夫, 佐藤和雄 (日本大産婦)

性腺形成異常症はまれな疾患で、性染色体に異常が認められる場合と、認められない場合がある。今回我々は、染色体異常をともなわない卵巣性無月経の2症例を経験したので報告する。

症例1は23歳、身長163cm、症例2は27歳、身長158cm、2症例とも主訴は原発性無月経で家族歴に特記すべきことなく、両症例ともに正常月経を有する妹がいる。内分泌学的には第Ⅱ度無月経、LH、FSHの基礎分泌は高く、LH-RHテストの反応は良好であった。腹腔鏡検査では発育不良の子宮と卵管および両側の索状卵巣を認めた。卵巣の病理組織学的検査では原始卵巣を認めず、間質組織と繊維性組織のみでpure gonadal dysgenesisと診断した。

症例1はその後も身長増加を認めた。これら症例については、社会的要素を考慮して今後治療する予定である。

17. 不育症症例にみられた染色体異常の検討

○武居麻紀, 平原史樹, 安藤紀子
平吹知雄, 沢井かおり, 杉浦 賢
石川雅彦, 植村次雄, 水口弘司
(横浜市大産婦)

当科不育症外来症例300組の夫婦600名中29例、4.8%に染色体異常を認めた。これらの症例の内訳は、均衡型相互転座10例、ロバートソン転座6例、染色体逆位13例であった。

妊娠症例は、均衡型相互転座が6例、ロバートソン転座4例、染色体逆位9例であった。羊水染色体分析により、均衡型転座3例のうち1例に、ロバートソン転座4例のうち2例に転座保因者が認められた。妊娠例17例21妊娠のうち自然流産に至ったものは4例で、17妊娠においては全例で生児を得ている。精査、加療後の妊娠が分娩に至るケースが多くみら

れたのは合併するその他の不育要因に対する治療が積極的に行われたためと考えられた。

流産症例にて流産検体での染色体検査は施行されていないが、分析が可能であれば、さらに重要な知見が得られると思われる。今後、検討を重ねたい。

18. 無精子症における染色体異常の頻度

○吉田 淳, 中島耕一, 西見大輔
原 啓, 永尾光一, 黒田加奈美
高波真佐治, 石井延久, 三浦一陽
白井將文 (東邦大第1泌尿器)

研究対象は、1987年1月から1994年12月までの8年間に不妊を主訴として東邦大学大森病院リプロダクションセンターを受診した無精子症患者の中で、染色体分析が可能であった401人で、染色体検査の方法は、末梢血リンパ球培養によるGバンド法、一部の例ではQバンド法、Cバンド法、DYZ1とDYZ3プローブによるFISHを併用した。

1) 無精子症の染色体異常の発生頻度は、性染色体異常が57例(14.2%)、常染色体異常が5例(1.3%)、合計62例(15.5%)に染色体異常を認めた。また、正常変異は9例(2.2%)に認めた。

2) 46,XX Maleを4例認めたが、簡単に述べると46,XX Maleとは47,XXYからAZF遺伝子を引いた状態だと考えられた。

3) DNAレベルまで含めると染色体異常が精子形成障害の主要因であると考えられた。

19. サラゾピリン服用中止後に妊娠が得られた乏精子症の1例

○斉藤竜一, 岩崎 皓, 小林一樹
石塚榮一 (横浜赤十字病院泌尿器)

サラゾピリン服用中止後に妊娠が得られた乏精子症の1例を報告する。

症例は30歳の男子。潰瘍性大腸炎の診断にて4年間、維持療法としてサラゾピリン1日2gを投薬されていた。平成2年4月に結婚後、不妊のため当科を受診した。精巣容積は両側ともに約15mlであり、内分泌学的検査では異常を認めなかった。精液検査所見では極度の乏精子症を認めた。そのためサラゾピリン服用を中止したところ精液所見に著明な改善は認めなかったが服用中止後1か月で妻の妊娠が確認された。

以上の症例について若干の文献的考察を加え報告する。

20. 当科におけるAIH成績の検討

○鈴木隆弘, 小林善宗, 本田育子
善方菊夫, 淡路英雄, 井上正人
牧野恒久 (東海大産婦)

配偶者間人工授精(AIH)は男性不妊に対する有力な治療法であるが, その成績は決して良いとは言えない。当科では1985年10月から1995年5月までのAIHにおける対周期妊娠率は3.2%(560妊娠/17764回)であった。AIHの限界を検討する観点から, 妊娠560例のうちAIH施行時乏精子症(精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下)であった96例を分析した。

妊娠に至るまでのAIH施行回数は平均6.4回(1~25回)であった。精子数は $10 \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ が65例(67.7%), $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下が31例(32.3%)で, $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 以下が3例あり, 最低は $0.2 \times 10^6/\text{ml}$ での妊娠成立であった。子宮内注入運動精子数では 1.0×10^6 以上が84例(87.5%)であったが, 最低 0.05×10^6 で2例が妊娠成立した。精子無力症合併は71例(74.0%)であった。

精子受精能力検査(ZSPT)では, 妊娠例は通常の乏精子症例に比べ, 受精率が良好であり, また治療により, 良好化した例に多数妊娠が成立した。

21. AIH妊娠の児の予後

○永井聖一郎, 水野薫子, 笠井 剛
木下俊彦, 加藤順三 (山梨医大産婦)

(目的) AIHを繰り返すことは性路感染を増加させ, 早産, 破水の誘因となることがいわれている。そこで, 当科のAIH妊娠の転帰について検討した。

(対象) 1991年1月以降当科でAIHにより妊娠し, 分娩した25例である(12週以前の流産は除外)。

(方法) 当科で1994年に分娩した538例(不妊治療後妊娠を除く)をコントロール群とし, 流産率, 早産率, 多胎率, アプガースコア(AP)5分後4点以下について検討した。

(結果) 対象群: コントロール群, 流産率2/25(8.0%): 8/538(1.5%), 早産率3/23(13.0%): 58/530(10.9%), 多胎率5/25(20.0%): 9/538(1.7%), APスコア4点以下1/29(3.4%): 13/548(2.4%)であった。流産の1例は感染によるものであった。

(結論) 1) AIHが流産の誘因となる結果は得られなかった。2) 排卵誘発による多胎が対象群では高値であった。3) 過排卵による多胎, 少数ではあるが感染による流産が存在したことから, AIHにおいて卵胞刺激の工夫, 感染予防が必要と思われた。

22. パーコール洗浄精子におけるATP測定

○菅野ひとみ, 木下裕三, 齋藤和男
佐藤和彦, 岩崎 皓, 穂坂正彦
(横浜市大泌尿器)

近年 luciferin-luciferase 反応を利用して, 簡便にATPを測定できるようになった。

我々はTCA(トリクロロ酢酸)で精子の細胞膜を破壊し, EDTAで精子や精漿に含まれるATP分解酵素を失活し, Bio-Orbit社の1251 Luminometerで精子のATP値を測定した。

その結果, 精子のATP値は運動率と逆相関を示した。このことより運動率の高い精液ではATP消費量が大きいことが予想された。

精液原液とパーコール洗浄精子の1時間までのATP値の変動を検討した結果, 精液原液では速やかに減衰したのに対し, パーコール洗浄精子は1時間にわたり, 安定した蛍光を発した。EDTA, TCA, で失活が不十分なATP分解酵素の影響は精漿成分を除くことで除去可能であった。

23. 癌化学療法前の精子凍結保存の試みと解析

○齋藤和男, 木下裕三, 菅野ひとみ
岩崎 皓, 穂坂正彦
(横浜市大泌尿器)

若年者の白血病が20例, 悪性リンパ腫が2例, 骨軟部組織肉腫が3例, 精巣腫瘍が4例, 直腸癌が2例, 下垂体腫瘍が1例の計32例の精液所見を検討した。

精巣腫瘍の4例は化学療法前であるが平均精子濃度 $25.1 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率50.4%で2例は乏精子症であった。非精巣腫瘍のうち化学療法前の10例の精子濃度, 運動率は平均 $68.4 \times 10^6/\text{ml}$, 54.1%であったが, 何らかの抗癌剤の治療を受けている18例は, 精子濃度, 運動率が $22.1 \times 10^6/\text{ml}$, 32.2%に低下し, FSHも8.5 mIU/mlに上昇していた。このうち, 6か月以上抗癌剤の投与を受けている9例はすべて精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下で, 6例は無精子症であった。

32例中精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の21例の精子を凍結保存している。

24. 人工授精により妊娠した逆行性射精の一例

○荷見よう子, 岡垣竜吾, 藤原敏博
百枝幹雄, 矢野 哲, 堤 治
武谷雄二 (東京大産婦)

逆行性射精による男性不妊に対する従来の治療法

は、膀胱内に射精された精液を回収し、AIHを行うものが基本的である。今回、逆行性射精に対して膀胱内からの回収精子にパーコール処理を加えた初回AIHで妊娠を得ることができた症例を経験したので報告する。

症例は32歳の未妊婦。原発性不妊を主訴に近医で不妊検査、排卵誘発を行ったが妊娠に至らず当科受診した。精査の結果、夫(34歳)が逆行性射精と診断された。排卵誘発は自然周期で経膈超音波で卵胞発育を観察し、hCG筋注により行った。さらに、夫の膀胱内にHanks液を注入し、導尿により精子を回収、遠心後、パーコール処理(modified cushion法)を加え、AIHを施行した。

4週後、経膈超音波で6Sが確認され、5週後、児心拍が確認され、現在妊娠継続中である。

今回の成果をもとに、今後、この治療法の有効性を検討したい。

25. 逆行性射精症例における妊娠成功例の検討

○永尾光一, 吉田 淳, 上田 建
野澤英雄, 桑原 孝, 高波真佐治
石井延久, 三浦一陽, 白井將文
(東邦大第1泌尿器)

膀胱内に射出された精子の回収により4例が妊娠した。

方法は、まず妻の排卵日にあわせて、夫に7日前より1日重曹9g/分3の服用をさせ、5日前より禁欲後、当日は飲水を制限して来院させる。生理的食塩水と精子培養液にて数回膀胱洗浄し、精子培養液を100ml膀胱内に注入し、直ちに自慰行為をさせオーガズムに達した後に排尿させる。排尿液を遠沈し、最下層より約1mlの沈殿液を回収しAIHを行う。

妊娠に成功した4例の年齢は26歳～35歳、平均30.8歳であった。基礎疾患は、2例が糖尿病、2例は特記事項はなかった。AIHの回数は2回～15回、平均9回であった。そのうち2例が15回、13回と10回以上であった。回収精液所見は、全般的に良好であった。妻の状態は全例が正常であり妊娠しない症例でも回収精液所見が良好なものも多く、妻の状態も影響しているものと思われる。

この方法は安全で確実に精子を回収できるため、産婦人科と協力して積極的に行うべき治療法であると考えられる。

26. 幼児期のヘルニア手術に起因する閉塞性無精子症 一単精巢例での妊孕性回復について一

○湯村 寧, 齊藤一隆, 漆原正泰
千葉喜美男, 岩崎 皓, 広川 信
(藤沢市民病院泌尿器)
朝倉 茂夫 (朝倉病院)

成績不良といわれる閉塞後10年以上を経過した閉塞性無精子症の1例を経験したので報告する。

症例は初診時28歳、結婚1年9か月で不妊を主訴とし来院した。既往歴として生後10か月での鼠径ヘルニア根治術、1歳時停留精巣で右精巣を摘出して

いる。内分泌、染色体検査は正常であったが精液量2.0ml、無精子症であった。精査の結果鼠径ヘルニアに起因すると思われる閉塞性無精子症と診断、精管精管吻合術を施行し術後1年6か月後に男児を得た。術後精子運動率が改善せずVitB₁₂、ATPなどの薬物治療を併用した。

特別講演

単一卵胚におけるエネルギー代謝機構

加藤 尚彦(横浜市大生化学)

卵胞卵が排卵され胞胚まで発育する過程で、そのエネルギー代謝のための代謝経路やブドウ糖取り込み機構が発達する。これらエネルギー代謝のメカニズムを、単離したマウスおよびラット卵胚を用いて明らかにした。

PMSとhCGにより過排卵処理したラットより、卵胞卵と排卵された未受精卵を単離し、凍結乾燥試料とした。超微量技術を用いてその乾燥重量とエネルギー代謝経路の酵素活性を測定し、1)卵胞卵では五単糖経路が活発に働き、2)未受精卵の成熟にともなって解糖経路とTCA回路が発達してブドウ糖を利用できるようになることがわかった。

デオキシグルコースを用いるブドウ糖利用速度の超微量測定法を開発し、過排卵されたマウス卵胚を用いて分析した。1)卵胞卵は周囲の卵丘顆粒細胞が取り込んだブドウ糖をgap junctionを通じて利用する。2)1細胞期から胞胚期までの成熟過程で、ブドウ糖の取り込みと利用速度は8細胞まではゆっくりと、それ以後は急激に増加する。3)受精卵を培養すると、形態的には卵胞まで成熟するが、ブドウ糖の取り込みと利用速度はin vivoの1/3にしか達しなかった。上皮成長因子(EGF)10ng/mlはin vivoの1/2に促進し

た。4) EGFの新鮮卵胚形質膜への結合は、胞胚まで直線的に増加した。

Microelectrophoresisとmicro-western blot法を開発し、卵胚発育にともなうglucose transporterの発現を調べた。80~500個の卵胚を用い、isoformのうちGLUT1が発現しており、発育成熟にともなって増加し、胞胚では未受精卵の25倍に増加していた。

新たに開発したマイクロ二次元電気泳動法により、20個試料を用いて、卵胚には特異的な蛋白質が数多く発現していることを見いだした。

第33回 日本不妊学会中国四国支部学術講演会

日時：平成7年7月29日(土)

会場：(米子市)米子国際ホテル

1. 体重減少性無月経患者の夜間メラトニン分泌とLH律動分泌との関連について

○森岡信之, 岡谷祐二, 相良祐輔

(高知医大産婦)

(目的) 体重減少にともなう性腺系内分泌環境の詳細は未だ明らかではない。教室では夜間に増量するメラトニン(M)と性腺系機能との関連性について報告しているが、今回、体重減少性無月経患者の夜間M分泌動態とLH律動分泌の関連性について検討した。

(方法) 体重減少性第I度無月経9例、第II度無月経5例についてDay 6~8に21時~6時消灯下に20時~8時のM分泌動態、18時~2時のLH律動分泌を正常月経婦人と比較検討した。

(成績) 1) 正常月経婦人のLH律動分泌は18時~22時に比べM分泌の増量する22時~2時には有意に抑制された。2) 体重減少性無月経患者では18時~2時までLHパルスの発現をみるA群、18時~22時にパルスはあるがM分泌の増量する22時~2時にパルスの消失するB群、18時~2時にまったくパルスのないC群に群別された。第I度無月経はA群5例、B群4例であり、第II度無月経はC群のみであった。3) E₂値はA群28.8±2.4 (pg/ml)、B群14.3±3.1と有意に低下しC群ではさらに低下した。4) 夜間M分泌ピーク値はA群176.0±38.8 (pg/ml)と正常群より高くB群290.9±45.2、C群295.7±54.9と分泌増量はさらに著明となった。5) E₂値とMピーク値間には有意な負の相関を認めた。

(結論) 体重減少性無月経の夜間M分泌は著明に亢進し、その亢進度はE₂値に規制される可能性が示唆

された。このM分泌の亢進が夜間ゴナドトロピン分泌の抑制を一層増強する可能性が示唆された。

2. 思春期発来過程における松果体Melatonin産生能動態に関する検討 —特に卵巣摘除の影響について—

○岡谷裕二, 渡辺員枝, 林 和俊

相良祐輔

(高知医大産婦)

(目的) Gonadotropin分泌に抑制的に作用するMelatonin (M)と思春期発来との関連が注目されているが未だ明確ではない。そこで、今回ラットを対象に腔開口周辺期の松果体中のM産生能動態と、卵巣摘除の影響を検討した。

(方法) 2~12週齢のSprague Dawley系雌ラットを対象とし、明(21~11時)、暗(11~21時)の環境下に飼育した。Mid darkの16時に松果体中のSerotonin (5-HT), M, Norepinephrine (NE)をHPLCを用いて測定した。卵巣は6週に摘除し、7, 8, 10, 12週に松果体を採取した。

(成績) Control群では1) 松果体の総蛋白質量は6週で成熟レベルに達した。2) Mは3週より増量し、腔開口期の6週でピーク(7.38±0.46 ng/mg. prot)に達し、排卵周期確立過程の7~8週に減少し以後同一レベルで推移した。3) M産生を刺激するNE活性の増加はMより早期にみられ4週で成熟レベルに達した。4) 5-HTよりMへの転換能をM/5-HT ratioで検討すると、Mと同一のパターンであった。

一方、卵巣摘除群では、1) NE活性はcontrol群と差はなかった。2) Mは6週以後増加し、8週でピーク(11.58±1.78 ng/mg. prot)に達し、12週でcontrol群と同一レベルに達した。3) M/5-HT ratioもMと同一パターンであった。

(結論) M産生能は6週までは臓器発育とともに増加するが、排卵周期確立の過程で減少することが示された。NE neuron活性は臓器発育より早期に発達し4週で成熟することが示された。また排卵周期の確立により5-HTよりMへの転換酵素活性を規制する何らかの因子の存在が強く示唆された。

3. 摂食調節物質2-butene-4-olideの性機能抑制機序についての検討

○梶 博之, 斎藤誠一郎, 山田正代

漆川敬治, 苛原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

(目的) 我々はラットを用いて、絶食すると血中に増加する摂食調節物質2-butene-4-olide (2-B4O)が、

視床下部一下垂体系に作用して、LHのパルス状分泌を抑制することにより性機能を低下させることを報告した。一方、2-B4Oの抑制作用はCRHあるいはオピオイドを介する可能性が報告されている。そこで、CRH antagonistあるいはオピオイドのantagonistであるnaloxone (NLX)を投与し、2-B4OのLHのパルス状分泌抑制機構にCRHあるいはオピオイドが関与しているかどうかを検討した。

(方法) 実験動物として両側卵巣を摘出したラットを用いた。1) 実験開始1時間前に前処置としてCRH antagonistを第3脳室内に投与した後、2-B4Oを第3脳室内に投与しLHのパルス状分泌の変化を検討した。2) 実験開始と同時に2-B4Oを第3脳室内に投与した後、6分ごとの採血時にNLX (0.5 mg/kg/時間)を経静脈的に投与し、LHのパルス状分泌の変化を検討した。

(結果) 1) LHパルス状分泌の頻度は対照群に比べて、2-B4O群で有意に減少した。この作用はCRH antagonistの投与でも回復しなかった。2) 一方、2-B4O+NLX群では対照群とほぼ同じであり、NLX投与によりLHのパルス状分泌の頻度が回復することが示唆された。

(結果) CRH antagonistの前処置によりLHのパルス頻度は回復せず、NLXの投与によりLHのパルス頻度が回復したことから、2-B4OによるLHのパルス状分泌の抑制にCRHではなくオピオイドが関与している可能性が示唆された。

4. 多嚢胞卵巣症候群の糖代謝に関する検討

○齋藤誠一郎, 牛越賢治郎, 山田正代
宮本誠一郎, 梶 博之, 上村浩一
米田直人, 田村紀子, 桑原 章
漆川敬治, 安井敏之, 東 敬次郎
苛原 稔, 青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 多嚢胞卵巣症候群(PCOS)例には高インスリン血症や耐糖能異常が高率にみられるが、その頻度や程度を肥満の有無別に比較検討した報告は本邦では少なく、またPCOSの診断基準が報告者により一定でなかった。今回、日産婦学会から発表されたPCOSの診断基準に基づいて診断した症例と正常月経周期婦人に75g経口糖負荷試験(75g OGTT)を施行し糖代謝能を比較検討した。

(対象と方法) 日産婦の診断基準案により診断されたPCOS 18例(正常体重10例, 肥満8例), 正常月経周期を有し肥満を有しないコントロール婦人9例に消退出血または月経開始5日後に75g OGTTを行

いBS, IRIを測定した。また、同時期に血中性ステロイドホルモン(E₁, T, androstendioneなど)を測定した。

(成績) 非肥満PCOS, 肥満PCOS, コントロール群のBMIはそれぞれ、20.1±2.0, 29.4±3.8, 20.4±2.4であった。BSの反応は各群4/10, 5/8, 4/9例の糖尿病境界型が存在し、肥満PCOSでは2例が糖尿病型と判定された。75g OGTTにおけるIRIは肥満PCOSは他の2群に比べて有意に高値であった。IRIの反応は肥満PCOSで高値で遅延も観察された。また、Tは肥満PCOS, 非肥満PCOSでコントロール群に比べ有意に上昇していた。

(結論) BMIで補正するとPCOSとコントロール群の間には血中IRI分泌に差がなかった。肥満のPCOSでは非肥満PCOSに比べてIRIの分泌は増加しており、PCOSにおけるインスリン分泌の亢進には体重の関与が大きいと思われる。

5. 変異LHを有したPCOSの2症例

○牛越賢治郎, 齋藤誠一郎, 山田正代
宮本誠一郎, 梶 博之, 上村浩一
米田直人, 田村紀子, 桑原 章
漆川敬治, 安井敏之, 東 敬次郎
苛原 稔, 青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 最近、LHの測定について、従来から一般的に使用されているIRMAではほとんど測定感度以下になる変異LHの存在が指摘されている。ホモタイプの場合には、測定感度以下となるためその存在に容易に気づく反面、ヘテロタイプでは測定値が約半分程度となりその存在に気づかない可能性がある。そこで、当科不妊外来を受診した患者のLH鎖の変異の有無についてrestriction fragment length polymorphism (RFLP)を用いて検討した。

(方法) 当科不妊外来を受診した患者22例にインフォームドコンセントの上、末梢白血球よりゲノムDNAを抽出し、LHβ鎖部分をPCRで増幅しNco I, Fok Iを用いてRFLPを行い異変の有無について検討した。

(結果) 22例中2例がヘテロタイプのLHβ鎖を有することが判明した。2例とも思春期より排卵障害を有し、超音波断層法にて多嚢胞卵巣が確認され、LH値以外はPCOSと考えられるが、LHは高値を示していなかった。しかし、ヘテロタイプの変異が発見されたことで実際の生物学的活性を有したLH分泌は亢進していることが想像された。

(結論) 22例中2例に変異LHを持った症例が存在

し、いずれもPCOSの症例であった。PCOSの診断に際しては、変異LHがある場合LH値が見かけ上低値となる症例があるので注意を払わねばならない。

6. hMGに対する卵巣の反応性と加齢の関係

○田村博史, 中村康彦, 滝口修司
小野美央子, 嶋村勝典, 杉野法広
加藤 紘 (山口大産婦)

(目的) 加齢にともない妊孕能は低下するといわれている。今回我々は中枢の関与を無視しうる体外受精胚移植(IVF-ET)患者を対象として同一プロトコルでのhMGに対する卵巣の反応性と加齢との関係を検討した。

(方法) 平成5年1月から平成7年4月までに当科にて施行したIVF-ET 60周期を対象として、発育卵胞数、E₂値、分割卵数、妊娠率についてA群: 30歳未満, B群: 30~34歳, C群: 35歳以上の3群に分けて比較検討した。

(成績) hMGの総投与量(IU)はA群: 1475±90, B群: 1820±91, C群: 1651±96であった。10mm以上の発育卵胞数(個)はA群19.9±3.9, B群13.7±1.2, C群10.8±1.7, 18mm以上の成熟卵胞数(個)はA群5.3±1.1, B群4.5±0.4, C群3.3±0.5と発育・成熟卵胞数は加齢にともない減少した。E₂値(pg/ml)もA群3146±781, B群2574±436, C群1049±173と同様の傾向を示した。分割卵数(個)はA群3.6±0.8, B群3.5±0.5, C群2.9±0.5であり加齢にともないやや減少した。周期当たり妊娠率(%)はA群22.2, B群28.6, C群16.7, 患者あたり妊娠率(%)はA群40, B群40, C群27.3であり, 35歳以上で低値を示した。

(結論) 加齢にともないhMGに反応できる卵胞の数が減少しE₂分泌, 分割卵数も低下した。妊娠率も35歳以上で低値を示し, 卵巣の反応性の低下が, 加齢にともなう妊孕性の低下に大きく関与していると思われる。

7. 排卵誘発法としてのLate pure FSH法の有用性について

○内田昭弘, 高橋健太郎, 岡田正子
尾崎智哉, 金崎春彦, 栗岡裕子
北尾 學 (鳥根医大産婦)

(目的) 不妊症治療として種々の排卵誘発法が行われている。しかし, 症例によっては十分な効果が得られないばかりでなく, 副作用だけが目立つ場合を経験することがある。今回, 排卵誘発法として, late pure FSH療法を施行し, その有用性について若干の

知見を得たので報告する。

(対象および方法) 当科において, 既往治療として, clomiphene療法(C療法)およびhMG-hCG療法(H療法)を施行し, 排卵が認められたが妊娠に至らなかった24例を対象とした。月経周期の7~9日目に超音波を施行し, 11mm以上の卵胞が認められた場合にpure FSHを投与(L-F療法)し, 卵胞径18mm以上でhCGに切り替えた。各治療周期で, 超音波断層法により排卵期の卵胞数および卵胞径を計測した。また, 排卵期および黄体期のestrogen (E₂) およびprogesterone (P) を測定した。

(結果) 1) 卵胞数については, H療法が他の治療法と比較して有意に高値であった。2) 排卵期および黄体期のE₂値はH療法が他の療法と比較して有意に高値であった。また, L-F療法はC療法よりも有意にE₂値が高値であった。3) 黄体期のPは, L-F療法ではC療法と比較して有意な高値を認めたが, H療法と比較すると有意な差は認められなかった。

(結論) Late pure FSH療法は, clomiphene療法では排卵が認められるが十分な効果が得られない場合, また, hMG-hCG療法ではOHSSなどの特有の副作用を繰り返す場合などに有効な排卵誘発法と考えられる。

8. 体外受精における胚移植後のプレドニン投与の検討

○田口俊章 (鳥取県立中央病院産婦)

当院における体外受精-胚移植後の治療として平成7年11月から, 受精卵の着床障害における免疫因子を抑制する目的でプレドニン投与を行い, プレドニン未投与周期(n=59)では, 採卵可能率98%, 分割率77%, 妊娠率は, 対周期6.8%, 対移植9.3%であったが, プレドニン投与周期(n=39)では, 採卵率85%, 受精率59%, 妊娠率は, 20%(対周期), 40%(対移植)と著明な成績の改善を認めたので報告する。

9. 当院における体外受精成績の解析

○見尾保幸
(ミオ・ファティリティクリニック)

(目的) 当院における体外受精成績の解析から, 重症不妊症に対する治療法としての体外受精の有効性と限界を把握することを目的とした。

(方法) 1993年11月より1994年12月までに当院において体外受精を実施した130症例, 234周期を対象とした。不妊原因および卵巣の反応性から, 5種類(SR, MR, LR, Big-pulse, GH併用)の卵巣刺激法を

個別的に用いて体外受精を行い、その治療成績を解析した。

(成績) 対象症例中44症例が妊娠し、対症例妊娠率33.8%、対周期妊娠率18.8%であった。卵管因子、子宮内膜症での妊娠率は36.6%/症例、37.0%/症例といずれも良好であった。PCOD症例に対するBig-pulseにて高い妊娠率(66.7%/症例)が得られた。卵巣の反応不良症例に対するGH併用にて妊娠率の改善が認められた。加齢にともなう治療成績の推移の検討では、高い妊娠率が30歳後半まで維持されたが、流産率は加齢とともに著明に増加した。

(結論) 本検討から、卵巣の反応性に応じた卵巣刺激法の個別化により治療成績を改善し得ること、また、患者の年齢を念頭に置き治療実施を決定する必要性があることが明らかとなった。

10. 体外受精周期における free steroid hormone の変動と妊娠の成立との関係

○青江尚志, 新谷恵司, 木村吉宏
中塚幹也, 工藤尚文 (岡山大産婦)

(目的) 同一排卵刺激方法を用いた体外受精周期で、estradiol (E₂), progesterone (P), およびその蛋白非結合型の割合である% free E₂, % free Pを測定し、妊娠成立との関係について検討した。

(方法) 対象は、当科で体外受精を施行した妊娠例7例、非妊娠例6例とし、排卵刺激法はGnRHa-hMG-hCGを用いた。採卵日をDay 0として、Day -4, -1, 0, 6, 9, 15に採血し、E₂, PはEIAにて測定し、% free E₂, % free Pの測定は、今までに我々が報告してきた³H-E₂, ³H-Pを用いた方法で行った。

(成績) E₂, % free E₂は、Day -4~15において、妊娠例は非妊娠例に比較して高値を示したが、有意差は認めなかった。PはDay -1, 0では非妊娠例の2.15, 8.45 ng/mlに対して、妊娠例は1.68, 2.37 ng/mlと低値を示したが、反対にDay 9, 15では、非妊娠例の65.6, 17.0 ng/mlに対して妊娠例は99.5, 93.91 ng/mlと高値を示した。% free Pは、Day -1, 0, 6, 15で、非妊娠例の1.83, 1.96, 1.97, 1.58%に対して、妊娠例では2.40, 2.75, 2.64, 2.69%と有意に高値を示し、妊娠例では全期間を通して高値を示していたのに対して、非妊娠例では高値を示すこともあるが、全期間を通して高値を示すことはなかった。

(結論) 妊娠の成立のためには、血中Pは採卵日までには低く、着床期の頃には高いことが好条件であると思われ、また、% free Pは全期間を通して高値を示すことが必要であることが示唆された。

11. IVF-ET周期における酢酸リユープロレリン徐放性製剤併用の試み

○高尾成久, 金森康展, 石原幸一
辰村正人 (山口赤十字病院産婦)

IVF-ETの卵巣刺激周期において、卵胞期血中Progesterone値の軽度な上昇(P上昇)が認められると、妊娠率が低下することが報告されている。今回、我々はP上昇を認めた3例に対し、次周期に酢酸リユープロレリン徐放性製剤(リユープロレリン)を併用した卵巣刺激によるIVFを施行した。

3例ともリユープロレリン周期では、P上昇を認めず、1例に妊娠が得られた。妊娠例は27歳、腹腔鏡検査により子宮内膜症Ⅳ期と診断した。前周期では酢酸ブセレリンを用いたが、hCG投与日の血中LH, E₂, P₄値は(<2 mIU/ml, 1280 pg/ml, 1.0 ng/ml)と高かったが、リユープロレリン周期では(<2 mIU/ml, 898 pg/ml, 0.4 ng/ml) P上昇は認めなかった。

以上からP上昇が認められる症例に対し、酢酸リユープロレリン徐放性製剤の併用が有用と思われた。

12. LPA (lysophosphatidic acid) の胚輸送に及ぼす影響

○山野修司, 名護可容, 山崎 淳
國方建児, 青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) LPA (lysophosphatidic acid) は、ラット子宮と腸管の平滑筋の収縮を促進するなど様々な生理活性を有することが報告されている。今回我々は子宮と同様に平滑筋を有する卵管の胚輸送に対するLPAの影響とその作用機序について検討した。

(方法) 6週齢のICR雌マウスをPMSGとhCGで過排卵誘起し同系の雄と交配させ、hCG投与48時間後に卵管を摘出し、以下の実験を行った。1) 摘出した卵管を10⁻⁵~10⁻⁸MのLPAを加えた培養液(Whittingham's T6+0.4%BSA)中で24時間培養し、LPA濃度と卵管外への胚輸送率(卵管外へ排出された卵数/回収卵数)との関係を検討した。さらにLPA10⁻⁵M加培養液中で培養している卵管の胚輸送能に対する2) indomethacin 10 μ Mおよびverapamil 10 μ Mの培養液への添加の影響ならびに3) Pertussis toxin (PT) 200 ng/mlの前処置の影響を検討した。

(成績) 1) 卵管の胚輸送率はLPA10⁻⁵M群では60.5%であり対照群の33.1%に比し有意に高率であった(p<0.05)。2) LPA10⁻⁵Mにverapamil 10 μ Mを添加することにより、LPAの胚輸送促進作用は消失した

(LPA群 vs LPA + verapamil群: 60.1% vs 20.4%, $P < 0.01$) が, LPA 10^{-5} M に indomethacin 10μ M を添加しても, LPA の胚輸送促進作用を抑制しなかった (LPA群 vs LPA indomethacin群: 62.6% vs 56.0%). 3) PT 200 ng/ml の前処置により LPA の胚輸送促進作用は消失した (LPA群 vs LPA + PT群: 58.0% vs 21.6%, $P < 0.05$). (結論) LPA はマウス卵管における胚輸送能を促進し, その作用は G 蛋白に連結した受容体を介し, Ca チャンネルを作動させることにより起こると考えられる.

13. 抗精子抗体陽性患者に対する IVF-ET の成績

○山崎 淳, 名護可容, 山野修司
鎌田正晴, 青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 抗精子抗体陽性患者に対する IVF-ET の妊娠率を高率としている因子を検討した.

(対象および方法) 対象は当科にて精子不動化抗体が陽性のため IVF-ET を受けた患者 17 症例 38 周期である. 当該周期の卵胞数, 採取卵数, 受精卵数および受精率, 分割卵数および分割率, 胚の grade, 胚着床率などを, 他の不妊原因で IVF-ET を受けた 135 症例 163 周期 (卵管性不妊 54 症例 66 周期, 原因不明不妊 24 症例 31 周期, 男性不妊 57 症例 66 周期) のそれと比較した.

(結果) 1) 卵胞数, 採取卵数は各群の間で差を認めなかった. 2) 受精率は 46.3% と, 卵管性不妊, 原因不明不妊の 71.9%, 70.3% に比べ有意に低率であった ($p < 0.0001$). これにともない周期あたりの受精卵数, 分割卵数も卵管性不妊のそれに比し有意に低かった (受精卵数: 2.9 個 vs 4.3 個; $P < 0.05$, 分割卵数: 2.7 個 vs 3.9 個; $P < 0.05$). しかし移植胚数は, 卵管性不妊, 原因不明不妊との間には有意な差はなかった. 3) 移植した胚の grade は 5.4 点と, 卵管性不妊, 原因不明不妊の 6.2, 6.6 点に比べ低い傾向にあった. 4) 胚着床率は 27.3% と高率で, 卵管性不妊の 11.3%, 原因不明不妊の 6.3%, 男性不妊の 8.0% に比べ有意に高かった ($p < 0.01$).

(結論) 抗精子抗体陽性患者に対する体外受精胚移植では, 移植胚数, 移植した胚の grade など妊娠に直接かかわる因子がとくに良好ではないにもかかわらず, 胚着床率が高率であるため, 高い妊娠率を示すと考えられる.

14. 重症受精障害例に対する卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の有用性について

○高崎彰久, 田島里奈, 野口博史
森岡 均 (済生会下関総合病院産婦)

(目的) 重症男性不妊や受精障害に対し, 最近, 卵細胞質内精子注入法 (ICSI) による顕微授精が多く行われるようになってきている. 当科でも重症受精障害例に対し ICSI を行っており, 今回 ICSI の有用性について検討した.

(方法) 対象は, 従来の IVF では受精が不可能と考えられる重症男性不妊例や, 数度の IVF や顕微授精 (SUZI) でも受精しなかった症例 58 例, 58 周期である. 採卵後, 精子を洗浄し, 成熟卵に ICSI を行った. ICSI は HEPES-HTF の microdrop 下にナリシゲ IM6 を用いて行った.

(結果) 総計 517 個の卵を採取し, そのうち成熟卵 346 個に対し ICSI を行い, 168 個, 54 周期に受精を認めた. 受精率は ICSI あたり 48.6%, 採卵周期あたり 93.1% であった. また, 分割率は 96.4% であった. 53 周期に ET を行い, 18 周期に妊娠を認め, 妊娠率は胚移植あたり 34% であった. 採取精子の性状別の受精率, 妊娠率を検討すると, 受精率は運動精子濃度が 10 万/ml 以上または精子運動率が 0.1% 以上では 40~64% とほぼ一定であったが, 運動精子濃度 10 万未満, 運動率 0% の精子ではともに 29% と低率であった. 妊娠率は, 精子濃度および精子運動率との間に一定の傾向は認められなかった.

(結論) ICSI は, 重症男性不妊を含む受精障害例に対し, 非常に有用な治療法であることがわかった.

15. 精巣上体精子成熟過程における sperm acrosin system の変化に関する検討

○山本泰久, 小野孝司
ニコラオス ソフィキティス
宮川征男 (鳥取大泌尿器)

(目的) 精巣上体精子成熟過程において精子は多様な変化をするが sperm acrosin system の変化に関する報告はない. 今回我々は精巣上体精子成熟過程における sperm acrosin system (free acrosin, proacrosin, acrosin inhibito) の変化についてモルモットを用いて検討した.

(方法) 成熟雄モルモットの精巣, 精巣上体頭部, 体部, 尾部より精子を採取し, Goodpasture の方法を用いてそれぞれの部位の sperm acrosin system を測定した.

(結果) free acrosinは精巢上体尾部において精巢, 精巢上体頭部, 体部に比べ上昇しており, とくに精巢と尾部の差は有意であった。また proacrosinは精巢に比べ精巢上体頭部, 体部において低下しており尾部と精巢の差は有意であった。inhibited total acrosinは精巢において尾部より有意に高かった。

(考察) 精巢上体精子成熟過程において sperm acrosin system内の量的な変化が生じ, 精巢上体尾部の精子は精巢上体の他の部位の精子より高い妊孕性を持つことが示唆された。

16. ヒト精漿中イムノグロブリン結合因子の精子付着抗原としての意義

○平野正志, 滝川雅也, 山本哲史
森 英俊, 前川正彦, 鎌田正晴 (徳島大産婦)
青野敏博 (阿南共栄病院産婦)
前田信彦 (阿南共栄病院産婦)

(目的) 我々は, ヒト精漿中にイムノグロブリン結合因子(IgBF)の存在することを見出し, 精子に対する抗体産生を抑制する作用のあることを報告してきた。しかし, IgBFが女性生殖器内で作用を発揮するには女性生殖器内に, 精子付着抗原として持ち込まれる必要がある。また, 精子付着抗原は抗精子抗体の対応抗原として不妊症の発症に関与することが知られている。本研究では, IgBFが精子付着抗原として存在することを明らかにし, さらに精子付着抗原としての不妊症の発症に関与する可能性を検討した。

(方法) 1) 抗IgBF抗体を用いて, 精子不動化試験, 凝集試験および精子の蛍光抗体染色を行った。2) 家兎抗血清のヒト卵透明帯貫通試験(ZPT)に及ぼす影響を検討した。3) IgBF(10 μ g/ml)をcoatしたELISA法を開発し, 精子不動化抗体陽性不妊婦人および陰性不妊婦人につき血清中抗IgBF活性を検討した。

(成績) 1) 2種類の家兎抗血清は強い精子不動化および凝集を示した。また, 8種のモノクローナル抗体も種々の程度の不動化を示した。蛍光抗体法により精子頭部の全周にわたってIgBFの存在が認められた。2) 検討した家兎抗IgBF抗体はZPTに影響を与えなかった。3) 妊娠婦人18例の吸光度の平均値+2SD以上を陽性とした場合抗IgBF抗体の陽性率は, 抗精子抗体陽性群で5.3%(2/38)陰性群7.5%(3/40)と両群に差を認めなかった。

(結論) IgBFは精子付着抗原として存在することがわかった。しかし不妊症に関与する抗精子抗体の対応抗原としての意義は少ないと考えられる。すなわちIgBFは精子付着抗原として存在することにより女

性生殖器内に持ち込まれ, 同種抗原精子に対する抗精子抗体の産生を抑制していることが示唆された。

17. 精漿中の補体制御因子

○滝川雅也, 國見幸太郎
ナシマ・チャウドリー, 山本哲史
平野正志, 森 英俊, 前川正彦
鎌田正晴, 青野敏博 (徳島大産婦)

(目的) 我々は, 精漿中の補体抑制活性の低下と運動精子数の減少とが相関することから, 補体と不妊症発症との関係を示唆してきた。今回, この精漿中の補体制御因子について検討したので報告する。

(方法) 当科および関連病院に通院中の不妊症男性患者より用手法にて精液を採取し, 精液検査施行後の精漿を, 患者の同意を得て以下の検査に供した。補体抑制活性は, 抗体感作羊赤血球を用いたclassical pathwayおよびウサギ赤血球を用いたalternative pathwayに対する影響をそれぞれ測定した。さらに, 以下の方法を用いて補体制御因子の性状を検討した。すなわち, 1) 分子量10kDをcut off値とするミリポアフィルター(UFCP3GC)を用いて遠心濾過, 2) 精漿200 mlを, 10 mM sodium periodate 10 mlで15分処理, 3) 精漿200 mlを90 $^{\circ}$ C 30分加熱, 4) 精漿200 mlを10 mg/ml trypsinを加え37 $^{\circ}$ C 30分加熱, 5) 精漿200 mlを1 mg/mlの抗MCP抗体10 mlあるいは50 mg/mlの抗DAF抗体10 mlで処理, 6) Con Aカラムを用いたaffinity chromatographyをそれぞれ行い, 各処理前後の補体抑制活性(classical pathway)を測定した。

(結果) 精漿は補体活性をclassical pathway, alternative pathwayともに抑制し, その抑制効果は両系路において正の相関を示した。精漿中の補体抑制活性は, 分子量10kD以上の分画に認められた(60.0 \pm 17.9%; 分子量10kD以下の分画; 3.0 \pm 15.9%)。また, 加熱処理で失活したが, sodium periodate処理, trypsin処理では変動を認めなかった。Con Aカラムクロマトグラフィーでは, 吸着分画に(62.8 \pm 6.3%; 非吸着分画; 1.8 \pm 10.9%)抑制活性を認めた。さらに, 抗MCP抗体および抗DAF抗体処理によりそれぞれ6例中4例, 5例中3例で補体抑制活性の低下が認められた。

(結論) 精漿中の補体抑制因子は, 分子量10kD以上のトリプシン耐性の糖蛋白質であり, 各抗体を用いた中和実験からも, MCPおよびDAFが主要な因子であることが示唆された。これらの因子の低下が, 精子運動障害による不妊症発症機序のひとつとして重要であると考えられる。

18. 幼少時の鼠径ヘルニア根治術によると思われる閉塞性無精子症に対する精路再建術

○瀧原博史, 井本勝彦, 石津和彦

中根比呂志, 内藤克輔 (山口大泌尿器)

馬場良和 (周東総合病院)

鎌田清治 (徳山中央病院)

白瀧 敬 (小倉記念病院)

精路通過障害による閉塞性無精子症の中で精管切断術について高頻度に認められる, 幼少時の鼠径ヘルニア根治術に起因する精管の閉塞や断裂に対する再建術の術後成績を検討した. 精路再建術を施行した11例は, 年齢23~36歳, 11例中5例に片側精巣の障害を認めた. 長期間の精管閉塞により精巣側精管は拡張し, 逆に尿道側精管は萎縮しているため精管同士の確実な吻合のためには顕微鏡下2層縫合法が必須であり, 術式としてLeonard法を用いた.

術後成績は, 精子出現率11例中6例(54%), 運動精子出現率3例(27%), 妊娠率2例(18%)で, 入院期間は13~33日であった.

これらの症例は, 幼少時の精管閉塞のため閉塞期間も長く, 術後成績は精管切断術後の精管精管再吻合(妊娠率38%)よりも劣り, 尿道側精管断端検索のため開腹術が必要になる症例もあり, 手術時間が精管切断術後の精管精管再吻合よりも長くなり, 入院期間も長期となる傾向にあった. さらに, 拳児に至らなかった症例には, 精巣上体吸引精子を用いた人工授精(MESA)が適応と考えられた.

19. 思春期前停留精巣症例におけるhCG負荷試験の検討

○大橋洋三, 澤田耕治, 小松文都

森岡政明 (高知医大泌尿器)

(目的) 思春期前期停留精巣症例におけるtestosterone産生能を検討するためにhCG負荷試験を行った.

(対象および方法) 1988年4月~1995年3月までに高知医大泌尿器科で手術を施行した停留精巣のうち, 年齢が10歳以下(平均3.4歳)の45例に対して, hCG 3000単位を3日間連続投与し前後でのtestosteroneを測定した.

(結果) 停留精巣の内訳は, 偏側28例, 両側11例, 単精巣6例であった. 精巣の位置は, 腹腔内2例, 鼠径管内8例, 外鼠径輪22例, 陰囊起始部18例であった. 精巣上体付着異常は50精巣中16例(32%)に認め, 尿道下裂の合併が2例にあった. hCG負荷によるtestosteroneの値は200 ng/dl未満4例, 200~300

ng/dl 6例, 300~400 ng/dl 16例, 400 ng/dl以上は19例であった. 200 ng/dl未満の低反応を示した4例の内訳は, 平均年齢が6.2歳, 両側例が4例中3例あり停留部位は腹腔内1例, 鼠径管内1例, 外鼠径部4例, 陰囊起始部1例で, 精巣上体付着異常は, 7精巣中1精巣のみであった. 尿道下裂をとまうものはそれぞれ298, 386 ng/dlと1例にやや低反応のものがあつた.

(結語) 両側停留精巣例にtestosterone産生低下例が多く, 術後のフォローアップが大切である.

20. 精子特性分析機(SQA)による精子運動性能の評価 —computed sperm analyzer (HTM)との相関性の検討—

○福井敬介, 谷口文章, 山中研二

北川博之, 矢野樹里, 松浦俊平

(愛媛大産婦)

(緒言) SQAは精子運動を光学装置を用いて自動的かつ定量的に測定する簡易的機器であり, 運動精子濃度と運動の種類から精子運動性指数(SMI)という独自のindexを算出して精子受精能を評価する. 今回我々はSMI値とcomputed sperm analyzer (HTM)による精子運動性の各パラメーターとの相関を解析することによりSMI値が精子のいかなる運動性を反映しているかを検討したので報告する.

(対象と方法) 1995年3月~4月に当科不妊外来にて精液検査あるいは子宮内人工授精を行った精液(n=30)を対象とした. 精液をSQAの専用キャピラリーに吸引し, これをSQAにて4回測定することにより, 平均SMI値を自動算定した. ひき続いてcomputed sperm analyzer (HTM)にて総精子数, 運動精子数, 運動率, 低速~高速運動精子比率, path velocity (VAP), straight line velocity (VSL), lateral head displacement (ALH), curvilinear velocity (VCL), head oscillation frequency (BCF), lineality (LIN)を算定し, これらのパラメーターとSMI値との相関について検定した.

(結果) SMI値と総精子数(r=0.47), 運動精子数(r=0.41), 不動精子数(r=0.50), 運動率(r=0.57), 高速運動精子比率(r=0.57)との間に有意な相関関係を認めた. しかし中速運動精子比率(r=0.26), BCF(r=0.29), ALH(0.36)との相関は弱く, VAP, VSL, VCL, LINとの間に相関を認めなかった.

(結語) 以上よりSMI値と精子運動の個々のパラメーターとの関連性は認められなかったが, SMI値は高速運動精子の精子濃度を主に反映している可能性が示唆され, 精子受精力を評価する上での臨床的スクリーニング検査として有用と考えられた.

21. 慢性腎不全ラットにおける精巣機能とプロラクチン分泌調節機能に関する検討

○山本泰久, 小野孝司

ニコラオス ソフィキティス

宮川征男 (鳥取大泌尿器)

(目的) 我々はかつて慢性腎不全が視床下部, 下垂体, 精巣機能に及ぼす影響を報告した (J.Andorol 1992, P45). 本研究は慢性腎不全が精巣機能とプロラクチン分泌調節機能に及ぼす影響をラットを用いて検討した.

(方法) Wister系雄8週ラットを用いかつて報告した (Fertil Steril 1991, s-104) 方法に準じて慢性腎不全ラットモデルを作製した (A群; n=25). 同齡のラットに sham operation を行い対照群とした (B群; n=20). 手術の8週間後血清尿素, クレアチニン, プロラクチン, テストステロンを測定し, さらに chlorpromazine, thyrotropin releasing hormone による刺激試験, L-dopa による抑制試験を施行した. また, 精巣, 精巣上部, 精嚢, 前立腺, coagulation gland の重量を測定し体重あたりの割合を求め, さらに精巣上部尾部より精子を採取し精子数, 運動率を測定した.

(結果) B群に比べA群では血清尿素, クレアチニン, プロラクチンは有意に上昇していた ($p < 0.05$). chlorpromazine, thyrotropin releasing hormone による刺激試験, L-dopa による抑制試験ではA群はB群と同様の正常反応を呈した. また, A群ではB群に比べ精巣, 精巣上部, 精嚢, 前立腺, coagulation gland の体重あたりの重量, 血清テストステロン値, 精子数, 運動率の有意な低下がみられた ($p < 0.05$).

(考察) 慢性腎不全はラットの精巣機能を障害すると考えられた. また慢性腎不全ラットにおけるプロラクチンの上昇は下垂体分泌調節機能の不全によるのではなく主に腎の代謝機能の低下によるものであることが示唆された.

22. 無精子症における染色体異常の臨床的検討

○永井 敦, 大枝忠史, 秋山博伸

小澤秀夫, 市川孝治, 大森弘之

(岡山大泌尿器)

男性不妊を主訴に岡山大学泌尿器科不妊外来を受診した無精子症患者85例のうち, 閉塞性無精子症を除く49例に対して染色体検査を施行した. 患者の年齢は22~47 (平均32.1) 歳であり, 染色体検査でなんらかの異常を示したのは20例 (40.8%) と高頻度であった.

その内訳はすべて性染色体異常であり, 47,XXYのKlinefelter症候群が16例と最も多く認められた. 他の4例は47,XYY, 46,X,del (Y) (q11), 46,X,dic (Y) (q11), 45,X/46,X,del (Y) (q11)/46,X,dic (Y) (q11)であった. 精巣容積は染色体正常群 (以下正常群) では右 12.8 ± 5.0 ml, 左 12.5 ± 4.5 ml. 染色体異常群 (以下異常群) では右 5.25 ± 3.5 ml, 左 5.25 ± 3.5 ml と異常群で両側とも有意に低下を認めた ($p < 0.01$). 精巣生検では Johnsen's Score Counts (JSC) は正常群で 2.56 ± 1.19 , 異常群で 2.20 ± 1.04 と有意差は認めなかった. 内分泌学的検査では Testosterone (T) は異常群で有意に低下し, LH, FSH は異常群で有意に高値を示した.

今回の検討ではすべて性染色体異常であり, その20例中Klinefelter症候群が16例 (80%) と大半を占めていた. Klinefelter症候群以外の症例では3例にYq11の異常が認められ, Yq11に存在するといわれているAZFとの関連が示唆された. また, 染色体異常のない無精子症においても高度に精子形成障害が認められ, AZFを含めた分子生物学的検討を要すると思われる.

23. 精子細胞を用いた顕微授精に対する新たな医学的対応 —AIDの適応と関連して—

○上田克憲, 津田幹夫, 児玉尚志

三春範夫, 竹中雅昭, 新甲 靖

濱田朋子, 絹谷正之, 大濱紘三

(広島大産婦)

(目的) ヒト精子細胞を用いた顕微授精による妊娠成立の報告により, 今後医療側にはAIDの適応決定などの面で新たな対応が求められると思われる. そこで, 当科AID外来における無精子症患者の実態を調査して, これに関する問題点を検討した.

(方法) 平成6年にAID目的で当科を紹介された無精子症患者54名について, 初診時の紹介状に記載された検査所見を分析した.

(成績) 顕微授精の可能性という観点から54例を, I群: Klinefelter症候群 (11例), II群: 精巣生検実施例 (28例), III群: 精巣生検未実施例 (15例) の3群に分類した. II群での生検の結果は, 23例 (82.1%) では精子細胞を欠くと判断されたが, 残る5例は精子細胞の存在が示唆される成績であった. III群のうち血中FSHの測定が行われていたものは約半数の7例で, 残る8例は全例精巣容量の記載もなく精液検査のみ実施されていた症例であった.

(結論) 無精子症患者のうちKlinefelter症候群患者や精子細胞を欠如する高度な造精機能障害例を除いた例

に対しては、将来、精子細胞を用いた顕微授精が検討される可能性がある。今回の調査では、精巣生検で精子細胞の存在が示唆された症例や血中FSHの測定が行われていなかった症例が全体の約1/4を占めていたが、今後はこのような症例に対する十分な検査の実施と顕微授精の可能性を含めたインフォームド・コンセントが求められる。

24. 当科における不妊治療妊娠例の検討

○清水健治, 廣瀬 徹, 新居田一尚
関場 香 (鳥取市立病院)

(目的) 近年の生殖関連技術の開発にともない不妊治療は格段の進歩を見せており、当科でも平成4年5月より専門外来を開設し体外受精・胚移植を含む不妊治療を行っている。今回我々は当科における妊娠例の治療内容を検討し、一般病院における治療限界に関して考察を加えた。

(方法) 検討対象は平成4年より平成6年12月の間に当科を受診した331例のうち妊娠が成立した104例である。これらの症例に対し妊娠周期に行った治療内容を解析し、同時に腹腔鏡下および子宮鏡下手術もあわせて検討した。

(成績) 妊娠/初診例数は平成4年13/81例、平成5年40/119例、平成6年51/124例であった。妊娠周期の主治療は排卵誘発が最も多く(27.5~38.4%)、ついで人工授精(21.5~30.8%)・体外受精(15.4~27.5%)の順であった。また、妊娠周期のすべての治療内容を合計して分析すると排卵誘発および黄体賦活は全妊娠症例の47.5~61.5%に行われており、ついで人工授精(21.6~38.5%)・体外受精の順であった。免疫療法やプロモクリプチン療法は低率であった。特殊治療として体外受精妊娠例は22例、種々の腹腔鏡下手術後の妊娠例は17例認められたが子宮鏡下手術後の妊娠例は3例のみであった。

(結論) 比較的容易な排卵誘発や人工授精による妊娠例は全体の約半数であり、体外受精や腹腔鏡下手術など特殊技術や入院治療を要する不妊症例が多く認められたことは今後の一般病院における不妊治療の困難さを示していると考えられた。

25. 基礎体温の下降と月経様出血をみた子宮外妊娠の症例

○高橋 晃, 浮田昌彦, 諏訪美鳥
馬岡 陽, 江見信之, 長谷川雅明
中堀 隆, 片山富博, 中村光彰
(倉敷中央病院産婦)

(諸言) 基礎体温(BBT)は簡便な排卵の有無の判定

法として一般に用いられており、BBTの下降にともなう出血を見た場合は、通常、消退性出血と解釈される。今回、BBTの下降にともなう月経様出血がありながら子宮外妊娠であった症例を経験したので報告する。

(症例) 症例は28歳、不妊期間5年を有する原発性不妊症である。平成5年8月16日からの月経の後、clomiphene citrate 150 mgを5日間服用した。月経周期の17日目に人工授精を施行、hCG投与を行った。13日間の高温相の後、9月16日よりBBTは下降し、それに一致して月経様出血が5日間あった。前周期と同様にclomiphene citrateを服用し、月経様出血の開始日から16日目にBBTは再び高温相となった。高温相11日目より下腹部痛が起り、しだいに増強してきたため入院管理となった。高温相14日目の尿中hCG値は5,092 IU/lであり、貧血の進行、超音波断層法での腹腔内液体貯留像から子宮外妊娠を疑って開腹した。拇指頭大に腫大した左卵管狭部の表面が破綻しており、腹腔内に約800 mlの血液貯留を認めた。左卵管切除術を行ったが、病理検査の結果も卵管妊娠であった。

(考察) 今回の子宮外妊娠は9月2日の人工授精で成立したものと考えられたが、BBTの下降と消退性出血が性steroid hormoneの減少により生じるとすれば、絨毛性gonadotropinの存在にもかかわらず妊娠黄体の機能に消長があったこととなり、子宮外妊娠の際には注意が必要であると考えられた。

26. 子宮内膜異型増殖症を合併した不妊症患者でMPA療法のhMG-hCG療法で再発が認められた1例

○尾崎智哉, 高橋健太郎, 内田昭弘
栗岡裕子, 岡田正子, 金崎春彦
北尾 學 (鳥根医大産婦)

不妊症と子宮内膜異型増殖症の合併婦人の治療はしばしば我々を悩ませるものである。今回、子宮内膜異型増殖症が認められた不妊症患者に対して、medroxyprogesterone acetate (MPA)を投与し、異型内膜腺の消失を確認した後、排卵誘発を行ったが異型病変の再発が認められた症例を経験したので報告する。

症例は31歳で、10年間の不妊期間を経て挙児希望を主訴に当科を初診した。初診時内分泌学的検査では、estrone 111 pg/ml, estradiol-17β 41 pg/mlでE₁/E₂比は2.7と高値を示したほかは、FSH, LH, progesterone, testosteroneはそれぞれ正常範囲であった。経膈超音波断層法では、卵巣には多嚢胞性変化は認められな

かったが、子宮内膜が25 mmと肥厚が認められたため、子宮内膜全面搔爬術施行したところ、子宮内膜組織に強い構造異型が認められ、子宮内膜異型増殖症と診断した。MPA 600 mg/dayを3か月間、800 mg/dayを3か月間連日投与したところ、組織学上異型内膜腺の消失が認められたため、不妊治療を開始し、clomiphene therapyを3周期、pure FSH+hCG therapyを2周期施行したが妊娠には至らなかった。その後、少量の持続性性器出血が認められたため、子宮内膜全面搔爬術施行したところ子宮内膜組織の一部に軽度構造異型を示す部分が認められ、現在MPA 800 mg/dayを追加投与中である。

27. 続発性無月経を主訴に来院した非典型的なTurner症候群の1例

○金崎春彦, 高橋健太郎, 内田昭弘
栗岡裕子, 岡田正子, 北尾 學
(鳥根医大産婦)

Turnerが1938年に記載した性腺發育不全、翼状頸、外反肘、低身長の4つの症状を呈するものをTurner症候群と称し、外表奇形がそろわず、性腺發育不全と尿中ゴナドトロピン高値を示す例は性腺形成不全症(gonadal dysgenesis)と呼ばれてきた。今回、我々は続発性無月経と挙児希望を主訴に来院した低身長をとまなわなない非典型的なTurner症候群の1例を経験したので報告する。

症例は19歳。結婚予定のある患者であるが、高校2年生(平成2年)2月3日より5日間の初経を認めるが、以後無月経であったため続発性無月経の精査と、挙児希望のため、当科を初診。身長159 cm, 体重43 Kg。基礎体温は低温-相性。恥毛、外性器および乳房の發育は不良。また翼状頸および外反肘はともなわなかった。内分泌値は、LH 60.1 mIU/ml, FSH 176.9 mIU/ml, E₂ 10 pg/ml未満と hypergonadotropic hypogonadismを呈していたが、下垂体、副腎系機能は正常であった。腹腔鏡検査所見では、子宮は存在するが發育不良で、卵管は認められるものの卵巣は索状性腺であった。卵巣の組織検査ではprimary follicleは認められなかった。染色体は46,X,del(X)(q24)で、Turner症候群と診断した。

28. 尿中LH測定キット「ゴールドサインLHワンステップ」の使用経験

○武田康成, 矢野樹里, 福井敬介
谷口文章, 山中研二, 松浦俊平
(愛媛大産婦)

「ゴールドサインLHワンステップ」(森永乳業、ニッポンジーン)は「ゴールドサインLH」を改良した新しい尿中LH測定キットである。本キットを従来の「ゴールドサインLH」と比較し、その有用性を検討したので報告する。

(方法) 1)操作法について比較検討した。2)判定の正確さを比較検討した。3)不妊患者9例の随時尿中LH濃度を本キットとEIA法(セロザイム)で測定し比較した。

(結果) 1)本キットの操作法は、検体尿診断カセットフィルター上に添加するだけのワンステップ操作のみで、「ゴールドサインLH」より簡便であった。2)判定は判定窓に赤紫色のスポットが出現すれば陽性でLH surgeありと判定するが、この点は「ゴールドサインLH」と違いはなかった。スポット色調の経時的変化はなかったが、薄い色調の場合に判定に苦慮する場合があった。3)本キット陰性4例のEIA法でのLHは3.5~18.3 IU/l(最低~最高)、陽性5例では22.0~90.5 IU/lであった。cut off値は20 IU/lと考えられた。

(考察) 本キットは鋭敏性と安定性が高く、「ゴールドサインLH」より操作が簡便であった。しかし判定が困難な場合があり、この点の改良が求められる。

29. インターシード使用とearly second look laparoscopyによる子宮筋腫核出術後の癒着防止

○吉岡宏記, 谷口文紀, 吉田壮一
片桐千恵子, 大野原良昌, 谷川正浩
原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

子宮筋腫核出術に際してフィブリン糊塗布による癒着防止を試みたが、大部分の症例において強固な術後癒着を認めた。そこで、1993年より切開創縫合部に癒着防止剤インターシードを貼付し、early second look laparoscopyを行って術後癒着の程度を観察した。

子宮筋腫核出術後2週間以内にsecond laparoscopyが施行できた6症例(うち不妊症患者5例)を対象とした。患者の平均年齢は36歳であった。second laparoscopyの結果、癒着を認めなかったものは2例、

膜状の癒着を認めたものは4例であった。膜状癒着を認めたすべての症例において容易に癒着剥離がなされた。インターシードの使用とearly second laparoscopyは術後癒着の軽減と術後早期の癒着剥離を可能にし、筋腫核出術後の癒着防止に役立つものと考えられた。

30. 不妊症患者におけるクラミジア抗体価と付属器癒着スコア

○谷口文紀, 谷川正浩, 吉岡宏記
 吉田壮一, 片桐千恵子, 大野原良昌
 原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

(目的) ELISA法を用いたクラミジア抗体検査は、その抗体価によって不妊症患者の付属器癒着病変を推定できるか否かについて検討した。

(方法) 当科不妊外来通院患者のうち、血清抗クラミジア抗体と腹腔鏡検査を施行した148症例を研究対象とした。クラミジア抗体(IgG, IgA)はELISA法にて測定し、抗体価はカットオフインデックスで表した。抗体の保有と卵管通過障害の有無、抗体価と付属器癒着病変との関連を検討した。付属器癒着はアメリカ不妊学会分類に従ってスコア化した。

(成績) 卵管通過障害は抗体陽性症例の46%、抗体陰性症例の24%に認められ、抗体陽性例で有意に高率であった。癒着スコアの平均は抗体陽性症例で12.9と抗体陰性症例の0.3に比して有意に高かった。癒着スコアと抗体価には有意な相関を認めた(IgG, $r=0.6$, $p=0.001$, IgA, $r=0.6$, $p=0.001$)。付属器癒着に対するクラミジアIgGとIgA抗体検査のspecificityは79%と83%、positive predictive value (PPV)は58%と63%であった。IgGならびにIgAの抗体価を2以上に設定して検討すると、specificityはともに92%、PPVは77%と69%となった。

(結論) ELISA法によるクラミジア抗体検査は不妊症患者の付属器癒着スクリーニングとしてきわめて有用であることを明らかにした。同時に、クラミジア抗体陽性者の過半数に付属器癒着が存在すること、高い抗体価保有者には高度な癒着病変のあることを念頭において診療を進めるべきであると考察された。

特別講演

生殖生理における細胞増殖因子の意義

倉智博久(大阪大産婦)

細胞増殖因子が発見されてすでに30年以上になる。現在非常に多くの因子が知られているが、これらは元来in vitroで文字どおり細胞を増殖させる因子として、発見され研究されてきた。それぞれの因子の受容体の構造と機能の解析が進み、さらに細胞内の情報伝達機構についても多くの知見が得られつつある。一方、その生体内での意義については、癌の増殖因子として、あるいは動脈硬化の発症因子としてむしろ疾患の関与が研究されてきたが、最近、血球細胞の増殖と分化におけるサイトカインの役割の解明を始めとして、細胞増殖因子の生理的な役割が次々と明らかにされつつある。その中でも最も研究の進んでいる分野のひとつが生殖生理における増殖因子の意義である。

生殖生理の分野では、細胞増殖因子は精子形成など男性(オス)の生殖機能にも、また下垂体機能などの中枢での機能にも重要な役割をになっているが、最も良く研究されまた重要だと思われるのが女性(メス)の末梢生殖器官における役割である。胚発育にはアクチビン、卵胞発育にはインスリン様増殖因子などが、また子宮や卵管においてはEGFファミリーが重要な役割を果たしている。

本講演では“生殖生理における細胞増殖因子の意義”についてのひとつのモデルとして、私たちがもっぱら研究を進めてきた卵管と子宮における上皮成長因子EGFとトランスフォーミング増殖因子TGF α の発現の制御、さらに卵管でこれらの因子が胚発育やエストロゲン作用の媒介に重要な役割をになっていることについてお話しする。

関連学会のお知らせ

第37回 日本哺乳動物卵子学会

下記により第37回日本哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員の参加をお願い致します。

記

I 日時：1996年6月20日(木)・21日(金)

II 会場：明治記念館 〒107 東京都港区元赤坂2-2-23 Tel.03-3403-1171

III 学術講演会内容：

招待講演：1. L. Mastroianni (ペンシルバニア大)

「Fallopian Tube-roles in Gametes Research」

2. E. Wallach (ジョンズ・ホプキンス大)

テーマ(未定)

特別講演：御子柴克彦(東京大学)

テーマ(未定)

教育講演：1. 山口寿夫(慶應義塾大学)

「実験病理からみたマトリックスの研究」(仮題)

2. 館 鄰(東京大学)

「胚発育からみた着床のメカニズム」(仮題)

3. S. C. Ng (シンガポール大学)

テーマ(未定)

4. K. Y. Cha (Cha総合病院)

「Cryopreservation of immature oocytes」

IV 一般演題

講演申込み要領：講演の申込みは、下記宛にお問合せ下さい

申込締切日：1996年2月29日(必着)

〒252 藤沢市亀井野1866

日本大学農獣医学部内 Tel. 0466-81-6241 内線2125

日本哺乳動物卵子学会事務局 遠藤 克宛

(講演時間は1題7分、討論時間3分野予定です。スライドプロジェクターは各会場1台としスライドは10枚以内とします。)

V 参加申込方法：学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費 7,000円 懇親会参加費 6,000円

VI 連絡先：〒160 東京都新宿区信濃町35

慶應義塾大学医学部産婦人科内 第37回大会事務局

Tel. 03-3353-1211 内線2396

第37回 日本哺乳動物卵子学会

大会長 鈴木 秋悦

日本医学会だより

JAMS News

1995年10月 No. 14

第103回日本医学会シンポジウム

1995年8月25日～27日に、「アポトーシス—概念と実態—」との課題のもとに、パレスホテル箱根においてクローズド形式で開催した。

本シンポジウムは、玉置憲一、長田重一、金澤一郎各氏がシンポジウム組織委員としてプログラムの編成その他を行ってきたものである。

プログラムは、I) 発生・分化とアポトーシス、II) 病態とアポトーシス、III) アポトーシスの分子機構、の3セッションから構成され、アポトーシスの定義を含めた最近の研究成果につき参加者が活発に論議した(参加者総数39名)、記録集は、平成8年3月頃に刊行の予定。

第104回日本医学会シンポジウム

「消化管癌における最近の話題—胃癌と大腸癌—」が、1995年12月1日(金、10:00～17:30)に日本医師会館大講堂で開催される予定である。

本シンポジウムの組織委員は、三輪 剛、小堀 鷗一郎、中村祐輔の3氏からなる、参加希望者は、日本医学会に葉書で申し込まれたい。参加費用は無料。プログラムの概要は、下記のとおり。

I) 胃癌・大腸癌の分子生物学

1. ジーンターゲットングを用いたヒト大腸癌発癌過程の解析/野田哲生(癌研・細胞生物学)
2. 胃癌の多段階発癌機構とその臨床応用/田原榮一(広島大・病理学)
3. 大腸癌の多段階発癌機構とその臨床応用/中村祐輔(東大・医科研)

II) 臨床のトピックス—内科系—

4. ここまでできる内視鏡治療—胃癌—/吉田茂昭(国立がんセンター東病院)
5. ここまでできる内視鏡治療—大腸癌—/工藤進英(秋田赤十字病院)
6. 胃癌・大腸癌の化学療法とQOL評価/栗原 稔(昭和大学豊洲病院)
7. *Helicobacter pylori*感染と胃癌のかかわり/浅香正博(北大・内科学)

III-I) 臨床のトピックス—外科系—/機能温存手術(縮小手術)

8. 胃癌/丸山圭一(国立がんセンター)
9. 大腸癌に対する縮小手術および機能温存手術/斎藤幸夫(国立国際医療センター)

III-II) 臨床のトピックス—外科系—他臓器合併切除(拡大手術)

10. スキルス胃癌に対する拡大根治手術「左上腹内臓全摘術+Appleby手術」/古河 洋(大阪府立成人病センター)
11. 直腸癌手術における機能温存と拡大郭清の両立/森 武生(都立駒込病院)

医学賞・医学研究助成費授賞の決定

医学賞・医学研究助成費授賞の選考は、日本医師会から本会に委託されており、本年度は9月11日にそのための委員会が開催された。授賞は、日本医師会設立記念医学大会(11月1日)の場において行われる。

日本医師会医学賞は、候補17件から下記の3氏を選考し、日本医師会に推薦した(敬称略)。

「喫煙の発がん影響解明と対策に関する研究」渡邊 昌(国立がんセンター・疫学)

「消化器癌の増殖、浸潤、転移に関連する遺伝子の研究」谷内 昭(札幌医大・内科学)

「先天性心疾患に対する新しい外科治療法の開発」川島康生(国立循環器病センター・外科)

また日本医師会医学研究助成費は、応募71件中、次の15氏を選考した。

「視交叉上核における概日リズム発現および同調の分子機構に関する研究」岡村 均(神戸大・解剖学)

「新たな補体活性化経路、レクチン経路に関する研究」藤田禎三(福島医大・免疫学)

「ストレス応答による免疫制御の分子機構の解析」吉開泰信(名古屋大・免疫学)

「開発途上国における母子保健向上のための方法論」倉辻忠俊(国立小児医療センター・小児科学)

「前白血病状態から白血病への進展の分子機構の解析」三谷絹子(東大・内科学)

「アンジオテンシンII受容体サブタイプ遺伝子の発現調節と新しい転写抑制蛋白の構造決定に関する研究」松原弘明(関西医大・内科学)

「HTLV-I型関節症の分子生物学的病因解明と遺

伝子治療の開発」北島 勲(鹿児島大・内科学)

「インスリン依存性糖尿病 (IDDM) の予知・予防を目的とした分子遺伝学的研究」池上博司(大阪大・内科学)

「多機能器官再生因子HGFcDNA導入による肺線維症遺伝子治療に関する研究」八重柏政宏(東北大加齢医学研・内科学)

「IgA腎症における糸球体障害の細胞生物学的研究」吉岡加寿夫(近畿大・小児科学)

「ヒト遺伝子組換え型bFGF (Basic fibroblast growth factor) を用いた虚血性心疾患に対する外科的血管新生療法の基礎的研究」小塚 裕(東大・外科学)

「遺伝子の多型性分析からみた癌発生および転移の予知と人種間での発癌特異性の解析」加藤俊二(日医大・外科学)

「微量癌細胞検出のための遺伝子学的診断法の確立」森 正樹(九州大生体防御医学研・外科学)

「網膜虚血に基づく遅発性神経細胞死の細胞内機構の解明と保護物質の開発」柏井 聡(京大・眼科学)

「尿路性器癌における抗癌剤耐性の機序と克服に関する研究」内藤誠二(九大・泌尿器科学)

新規加盟学会審査制度検討委員会

日本医学会では、小泉 明委員長のもとで、新規加盟を希望する学会に対する従来の審査のあり方が見直されつつあり、既報のとおり第62回日本医学会評議員会(平成7年2月)において、その中間報告が承認された。現在、本報告作成のためできるだけ広い視野からの審議を続け、評議員会で承認された新規加盟学会審査のための常置委員会の設置を含め、審査手続き、審査基準などにつき検討している。

医学用語管理事業

本会の医学用語管理委員会は、文部省「医学用語標準化の調査研究」によって、文部省学術用語集医学編の原案作成に努力中である。今夏は、用語選択・記載方法などに関する問題点について、日本医学会分科会の用語委員にアンケート調査を行った。このアンケート調査の結果に基づき、今後、医学用語標準化の問題点が整理され、より明確になると期待される。文部省に対しては、本年度末に報告する予定。

日本不妊学会会員名簿(平成7年9月発行) 正誤表

28ページ 17人目 自宅住所

正 千葉県旭市

誤 千葉市旭区

63ページ 24人目 勤務先電話番号

正 0552-73-1111

誤 0555-72-3304

98ページ 13人目 勤務先名称

正 藤澤フラウエンクリニック

誤 藤澤フラウエンクリニック

投 稿 規 定

(1995年10月5日改定)

1. 本誌掲載の論文は、原則として会員のものに限る。
2. 投稿論文は、本会の目的に関連のある原著、総説、論説、臨床報告、その他で、他誌に未掲載のものに限る。
3. 臨床例(もしくは臨床材料)または動物を対象とした実験的研究においては倫理面を考慮すること。なお、被験者からインフォームド・コンセントを得た場合は論文内にその旨を記載する。
4. 投稿論文は編集委員会が依頼する複数の審査委員の審査を受け、採否、掲載順位、その他の編集に関する事項は編集会議でこれを決定する。掲載は原則として受理順とする。
5. 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。なお超過ページならびに費用を要する図、表、写真、カラー印刷は実費を著者負担とする。
6. 投稿原稿はB5版横書き4000字詰のものを使用し清書する。なお、ワープロ使用の場合もこれに準じ、文書フロッピー(MS-DOS、テキストファイル出力)を添付し、機種名とソフト名を明記する。原稿は原本1部に査読用コピー2部を添える。写真は原稿を含めて3部とする。
7. 原著、総説、論説、臨床報告などには、必ず600字以内の和文抄録ならびに、200 words以内の各抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付する。各抄録の下に和文ならびに英語5語以内のKey wordsを付記する。英文はあらかじめ専門家の校閲を受けておくこと。ただし編集委員会で校閲が必要と認めた場合は、その費用を著者負担とする。
8. 投稿原稿は表紙(題名、著者名、所属、住所、ランニングタイトルを和文ならびに英文で明記)、英文抄録、和文抄録、本文(緒言、材料および方法、結果、考察、引用文献)の順に並べ、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。ランニングタイトルは和文で25字以内、英文で40 letters以内とする。
9. 記述は和文または英文とし、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。
10. 海外の人名、地名などは原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの関連学会用語集に従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
11. 文献は次の形式により、引用順に末尾に一括記載する。著者、編者名は3名までとし、以下は他(et al.)とする。

a) 雑誌の場合

著者名(年次) 題名. 誌名 巻数: 頁-頁 とする。
和文誌名は該当誌の規定または慣用の略名に従い、

英文誌名はIndex Medicusに従って略したものをを用いる。ページは通巻のページ数で最初と最終ページを記入する。

英文例) Daitoh T, Kamada M, Yamano S, et al. (1995) High implantation rate and consequently high pregnancy rate by in vitro fertilization-embryo transfer treatment in infertile women with anti-sperm antibody. Fertil Steril 63: 87-91

和文例) 宮崎豊彦, 久慈直昭, 末岡 浩 他(1995) 体外受精・胚移植不成功例に対する卵巢刺激前ダナゾール投与の効果. 日不妊会誌 40: 104-109

b) 単行本の場合

著者名(年次) 題名. 書名. 編者名, 発行所, 発行地, pp頁-頁 とする。(英文の場合は編者名, 書名. の順)

英文例) Collins JA (1995) Unexplained infertility. In: Keye WR Jr, Chang RJ, Rebar RW, et al (eds), 1st ed, Infertility: Evaluation and Treatment. WB Saunders Co, Philadelphia, pp249-262

和文例) 三浦一陽(1994) 男性不妊症. アンドロロジーマニュアル. 白井將文編, 第1版, 新興医学出版, 東京, PP 152-166

12. 投稿論文の著作権は、掲載が決定した時点で日本不妊学会に譲渡される。投稿原稿、図表、写真は返却しない。
13. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
14. 著者校正は原則として初校のみとする。なお、校正は字句の訂正にとどめる。校正の責任は全面的に著者に帰す。
15. 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を全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
16. 掲載論文に対しては、別冊30部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿表紙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。
17. 項目5, 15, 16にある掲載に要した経費, 30部を越える別刷印刷費などは、学会から著者に直接請求書を送付する。諸費用は速やかに下記口座に送金する。郵便振替口座: 00170-3-93207
銀行預金口座: 三和銀行麹町支店 普: 3706039
社団法人日本不妊学会宛
18. 投稿原稿には、巻末に縦じ込みの投稿申込み票を添付し、簡易書留にて下記へ送付する。
(送付先) 東京都千代田区麹町5丁目4番
クロスサイド麹町ビル8階
社団法人 日本不妊学会
Tel, Fax : 03-3288-7266

日本不妊学会雑誌 投稿申込み票

(この用紙をコピーしてご利用下さい)

タイトル：

和文or英文タイトル：

掲載希望： [特別掲載：普通掲載]

種別： [原著：総説：論説：臨床報告：その他]

著者名：(6名以上の場合は、別紙に同様の様式でご記入下さい)

フリガナ 氏名	会員番号 [所属機関名]	フリガナ 氏名	会員番号 [所属機関名]
	No.		No.
演者	[]	2.	[]
	No.		No.
3.	[]	4.	[]
	No.		No.
5.	[]	6.	[]

本文ページ数：

文献件数：

和文抄録ページ数：

英文抄録ページ数：

表の数：

図の数：

写真の数：

[カラー印刷：白黒印刷]を希望する

ランニングタイトル：

(和文25字以内、英文40 letter以内)

キーワード： 和文

(各5語以内) 英文

別刷希望数：

フロッピーの添付 [有：無] → 機種名：

ソフト名：

その他ご希望事項がありましたらお申し出下さい：
.....
.....
.....

連絡先：代表者名：

連絡先住所：

電話番号：

ファクシミリ番号：

編 集 委 員

白 井 将 文 (委員長)

味 香 勝 也
遠 藤 克
楠 原 浩 二
穂 坂 正 彦

石 島 芳 郎
押 尾 茂
小 林 俊 文
三 浦 一 陽
毛 利 秀 雄

岩 本 晃 明
久 保 春 海
平 川 舜 樹
三 橋 直 樹

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 41 卷 1 号

1996 年 1 月 10 日 印 刷
1996 年 1 月 20 日 発 行

編集兼発行者 白 井 将 文

印 刷 者 岩 田 光 正

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