

ISSN 0029-0629 CODEN: NFGZAD

Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌

Vol. 41 No. 2 April 1996

第41卷第2号 平成8年4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3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.
(The Clayton Foundation Laboratories for Peptide Biology, The Salk Institute)
座長 青野敏博 教授(徳島大学医学部産科婦人科)
"Roles and signalling mechanisms of activin and inhibin"
- II 特別講演 森 崇英 教授(京都大学医学部婦人科学産科学)
座長 入谷 明 教授(近畿大学生物理工学部)
「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)
座長 飯塚理八 先生(リプロダクション・アカデミー)
「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)
座長 永田行博 教授(鹿児島大学医学部産科婦人科)
「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)
座長 片山 喬 教授(富山医科薬科大学泌尿器科)
「性の分化と性染色体」
 3. 仲野良介 教授(和歌山県立医科大学産科婦人科)
座長 広井正彦 教授(山形大学医学部産科婦人科)
「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)
座長 毛利秀雄 教授(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所)
「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(昭和大学医学部産婦人科)
座長 佐藤和雄 教授(日本大学医学部産婦人科)
「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)
座長 島崎 淳 教授(千葉大学医学部泌尿器科)
「胚の性判別の基礎と応用」

V シンポジウム

1. 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)

- 1) FSHの糖鎖と卵胞発育(桜木範明 北海道大学産科婦人科)
- 2) IGF-1と卵胞発育(岩下光利 東京女子医科大学母子総合医療センター)
- 3) 卵の体外発育培養(宮野 隆 神戸大学農学部応用動物学科)
- 4) OMIと卵の成熟(佐藤英明 東京大学医科学研究所獣医学研究部)
- 5) 卵胞におけるアポトーシスの調節因子(久具宏司 東京大学産科学婦人科学)

2. 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)

- 1) 受精能獲得と精子膜の変化(山野修司 徳島大学産科婦人科)
- 2) 透明帯への精子侵入機構(馬場 忠 筑波大学応用生物化学系)
- 3) ICSIと卵の活性化(柳田 薫 福島県立医科大学産科婦人科)
- 4) 精子核の膨化(末岡 浩 慶応大学産科婦人科)
- 5) 多精子受精の拒否機構(永井 卓 農林水産省東北農業試験場)

VI ワークショップ

1. 機能性不妊症の取り扱い

座長：水口弘司 教授(横浜市立大学医学部産婦人科)

- 1) 子宮内膜症と機能性不妊症(石川雅彦 横浜市立大学産婦人科)
- 2) 腹腔鏡下大量通水法(関 守利 群馬大学産科周産母子センター)
- 3) COH-AIH療法(漆川敬治 徳島大学産科婦人科)
- 4) STDによる機能性不妊症への対応(野口昌良 愛知医科大学産婦人科)
- 5) ART療法(小林善宗 国際医療福祉大学山王病院産婦人科)

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)

- 1) MESA(瀧原博史 山口大学泌尿器科)
- 2) 射精障害の治療(小谷俊一 中部労災病院泌尿器科)
- 3) 精索静脈瘤の手術(田村雅人 徳島大学泌尿器科)
- 4) 経鼻LH-RH少量持続療法(松宮清美 大阪大学泌尿器科)
- 5) インポテンス(高波真佐治 東邦大学附属佐倉病院泌尿器科)

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打ち、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)で行います。是非ご出席下さい。

1996年4月

第41回日本不妊学会

会長 青野敏博

日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・交通のご案内

第41回日本不妊学会総会が開催されるにあたり、ご参加会員の皆様の航空券・宿泊のお世話を、近畿日本ツーリスト株式会社が取り扱いさせていただくことになりました。全国各地よりの徳島大会へのご参加が有意義なものになるよう企画いたし、お待ち申し上げておりますので多数ご利用いただきますようよろしくお願い申し上げます。

近畿日本ツーリスト株式会社 徳島支店
支店長 富永博昭

お申し込み・お問い合わせ先

〒770 徳島市八百屋町1-14
近畿日本ツーリスト株式会社徳島支店
第41回日本不妊学会総会係 担当者：有吉，濱田，春日，出張
TEL (0886) 22-0985 FAX (0886) 52-1414
営業時間 10:00～18:00 (月～金) 10:00～13:00 (土)

※ご案内の詳細および申し込み用紙は不妊学会雑誌7月号に準備させていただきます。

「新しい生殖医療技術のガイドライン」発刊のお知らせ

先にお知らせ致しました通り、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アウトライン」を発刊致します。今春発刊の予定で編集作業を進めておりましたが、7月上旬に完成の運びとなりました。

下記にその概要をお知らせ致します。

記

装丁：B5サイズ、ビニールカバー、約200頁

出版社：金原出版株式会社

定価：6,000円

- 収録内容：
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. 胚偶子卵管内移植 (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. まとめ

学会会員の先生方への配布は予定しておりませんのであらかじめご了承下さい。

全国の、医学専門書店にてご購入下さい。

会 告

平成8年度日本不妊学会学術奨励賞について

日本不妊学会雑誌第40巻1～4号に掲載された原著論文で、その筆頭著者が掲載時に満40歳以下である論文を対象に、平成8年度日本不妊学会学術奨励賞の推薦を受付けます。

推薦資格は、本学会の理事、評議員、大学教授、学会誌レフリーに限り、所定の書式による推薦は平成8年4月末日まで受付けます。

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

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

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

推薦は、平成8年4月30日(火)までに(社)日本不妊学会事務局へお送り下さい。(消印有効)
(お問い合わせ・書式請求・推薦書送付先)

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

日本不妊学会学術奨励賞推薦書

日本不妊学会理事長 殿

下記の論文を日本不妊学会学術奨励賞に推薦いたします。

(論文名)

日本不妊学会雑誌 第40巻 号 ~ 頁 (平成7年 月)

(筆頭著者氏名 生年月日)

生年月日： 年 月 日

(推薦理由)

平成 年 月 日

推薦者所属・現職

氏名

印

日本不妊学会雑誌

第41巻 第2号

平成8年4月1日

—目 次—

原 著

特発性男性不妊症の治療法としてのカリクレインの有効性について：

- 偽薬を対照とした無作為二重盲検法による検討 (英文).....山本・他1
- ハムスターテスト不良症例における体外受精-胚移植 (IVF-ET) による治療成績の検討 ..満尾・他7
- 両側精管欠損症にみられた46,XY/47,XY,+dic (15) (q11)の1例.....釜井・他13
- 夫婦間HLA類似性と習慣流産について多養・他17
- 男性不妊症における実虚証判定と補中益気湯療法の効果について.....風間・他23
- hMGによる排卵誘発治療時の各種因子の解析：多胎妊娠発生との関連から千石・他31
- 無精子症における染色体異常の研究吉田 淳36
- 体外受精・胚移植における子宮動脈循環と子宮内膜の胚受容能に関する検討.....内海・他42
- 簡便化体外受精胚移植 (IVF-ET) システムの有用性原・他46
- 反復核移植による特定の性の牛クローン作出について (英文).....林・他50
- 単為発生マウス胚盤胞の微細構造新村・他58
- 体外受精胚移植法におけるPrednisoloneの着床率改善効果矢野・他63
- マイクロドプラを使った精索静脈瘤に対する動脈保存高位結紮術.....齋藤・他68
- Klinefelter症候群の臨床的検討.....寺田・他72
- 抗精子抗体測定スクリーニング法の検討
- SpermCheck およびSpermMarの比較検討—斉藤誠一77
- 体外受精・胚移植治療により生児を得た卵管形成不全をともなった単角子宮の1例.....利井・他80
- 精子のATP量と精子濃度、運動率の関係菅野・他84
- 地方部会講演抄録.....91

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 41, No. 2, 1996)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- The Lack of Effectiveness of Kallikrein in the Treatment of
Idiopathic Oligozoospermia: A Double-Blind, Randomized,
Placebo-Controlled Study *M. Yamamoto, S. Katsuno,*
H. Hibi & K. Miyake 1
- Pregnancy Outcome of Infertile Couples with Poor Results
of the Sperm Penetration Assay (SPA) in IVF-ET Treatment *M. Mitsuo,*
H. Shibahara, M. Funabiki, M. Inoue,
A. Hasegawa, M. Shigeta & K. Koyama 7
- A Case of 46,XY/47,XY, + dic (15) (q11) with Absence of the Bilateral Vasa Deferens
..... *T. Kamai, G. Arai, K. Saito & M. Hirokawa* 13
- Association of Sharing of Human Leukocyte Antigens
with Recurrent Spontaneous Abortion *T. Taya, N. Yamasaki,*
M. Shigeta & K. Koyama 17
- Relationship between Kampo Sho Diagnosis using the Jitsu Kyo Score System
and the Effect of Hochu-Ekki-To Therapy in Male Infertility *T. Kazama, T. Takamine,*
I. Mizuno, M. Iwasaki, A. Okumura,
H. Fuse & T. Katayama 23
- An Evaluation of Clinical Characteristic and Monitored Parameters Associated
with Multiple Pregnancy Following Superovulation *K. Sengoku, Y. Takaoka,*
N. Takuma, T. Yoshida,
K. Tamate & M. Ishikawa 31
- A Cytogenetic Study of Azoospermic Males *A. Yoshida, K. Miura, H. Hara,*
D. Nishimi, K. Nagao & M. Shirai 36
- Uterine Blood Flow Assessed by Transvaginal Color Doppler:
A Possible Predictor of Uterine Receptivity
in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer *T. Utsumi, H. Kodama, J. Fukuda,*
H. Karube & T. Tanaka 42
- Evaluation of Simplified IVF-ET System *I. Hara, H. Kimura, A. Yoshinaga,*
T. Ooyama, H. Sato, S. Kaneko,
T. Matsuda & S. Akihama 46
- Acquisition of Cloned Bovines of Defined Sex by Repeated Cycles of Nuclear Transfer
..... *K. Hayashi, T. Katoh,*
J. Sakane, S. Ogawa, M. Iwaya
H. Ushijima, N. Tada & M. Sato 50

Ultrastructure of Parthenogenetic Mouse Blastocysts ·····	<i>S. Niimura & T. Asami</i> ···	58
Improvement of Implantation Rate of IVF-ET by Using Prednisolone ·····	<i>J. Yano, K. Fukui, F. Taniguchi, K. Yamanaka, R. Hori, Y. Takeda & S. Matsuura</i> ···	63
Artery Preservation in High Ligation for Varicoceles Using Microdoppler Method ·····	<i>K. Saito, T. Kamai, A. Nagamoto, K. Chiba, M. Hirokawa & A. Nozaki</i> ···	68
A Clinical Observation of Klinefelter's Syndrome ···	<i>H. Terada, Y. Yamaguchi, T. Ushiyama, K. Suzuki, K. Fujita, A. Tajima & K. Kawabe</i> ···	72
Evaluation of the Screening Test for Antisperm Antibody — A Comparison of the Usefulness of SpermMar and SpermCheck — ·····	<i>S. Saito</i> ···	73
A Case Report of Successful Pregnancy Following In Vitro Fertilization and Embryo Transfer in a Woman with a Unicornuate Uterus and a Hypoplastic Fallopian Tube ·····	<i>Y. Rii, T. Yamashita, A. Hasuo, Y. Miyamura, M. Kawano, A. Fujishita & T. Ishimaru</i> ···	80
Adenosine Triphosphate in Human Semen: Correlation with Sperm Concentration and Motility ·····	<i>H. Kanno, Y. Kinoshita, K. Saito, K. Sato, A. Iwasaki & M. Hosaka</i> ···	84

THE LACK OF EFFECTIVENESS OF KALLIKREIN IN THE TREATMENT OF IDIOPATHIC OLIGOZOOSPERMIA: A DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED, PLACEBO-CONTROLLED STUDY

Masanori YAMAMOTO, Satoshi KATSUNO, Hatsuki HIBI
and Koji MIYAKE

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

Abstract: In order to elucidate the potential efficacy of kallikrein for treatment of patients with idiopathic oligozoospermia, a double-blind, randomized, placebo-controlled study was conducted.

A total of 52 patients were treated with 600 IU/day kallikrein and 50 patients with placebo for 12 weeks. Before and after treatment, three semen samples were collected. The highest sperm density and percentage of motile sperm and normal form sperm before treatment were defined as the baseline value of each subject. The lowest sperm density and percentage of motile sperm and normal form sperm after treatment were defined as the value over the treatment period of each subject.

No significant changes in sperm concentration, sperm motility and normal sperm morphology were detected. Within the observation period of 6 months after termination of drug administration five pregnancies in kallikrein group and seven pregnancies in placebo groups were observed. There was no significant difference in pregnancy rate between two groups. It is concluded that kallikrein treatment at a dose of 600 IU/day has no significant effect on semen parameters or pregnancy rate, and should therefore not used as a standard therapeutic modality for treatment of idiopathic male infertility.

Key words: kallikrein, idiopathic oligozoospermia, infertility, treatment

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 41 (2), 129 - 134, 1996)

Introduction

Infertility, defined as the inability to conceive after 1 year of unprotected intercourse, is a problem that currently affects approximately 15 % of couples, and the incidence appears to be increasing. A male factor is involved in about 50 % of these cases. Despite the growing interest and research in the field of fertility, medical treatment for infertility can often be a frustrating problem because no identifiable cause can be found in the vast majority of subfertile males. Empiric therapy is employed when the underlying pathophysiologic mechanisms are not understood and when no proven treatment exists.

Kallikrein has been widely used as one of such an empiric therapy. Ishigami et al.¹⁾ have postulated that kallikrein and its released effectors, kallidin and

bradykinin, not only increase sperm count and sperm motility but are also responsible for their morphological integrity. Acrosin, kallikrein, and kinin, along with seminolisin, may play a role in the penetration and migration through cervical mucus²⁾. In 1974, Schill et al.³⁾ reported that porcine pancreatic kallikrein favorably influences the motility of human spermatozoa. Subsequently, numerous experimental studies suggested that components of the kallikrein-kinin system together with seminal plasma factors possess a regulatory function in the maintenance of spermatozoan motility⁴⁾. Over the past 15 years, many clinical studies performed in andrologic centers throughout the world have indicated that kallikrein therapy may be beneficial for patients with idiopathic infertility^{5 ~ 6)}.

Because the drug may improve semen quality,

pregnancy can be expected for couples in which the male partner is being treated with kallikrein. The aim of the present study was to clarify the question as to whether kallikrein has an effect on seminal parameters and pregnancy rate of patients with idiopathic male infertility.

Materials and Methods

Research subject

The study was performed as a randomized, placebo-controlled, double-blind examination. One hundred two adult males, ranging in age from 23 to 41 years of age, participated in this study. These men had no evidence of major systemic illness. None of the patients had a previous history of urogenital infection or any other surgical history. None had a palpable varicocele. All were diagnosed as having idiopathic infertility. Testicular biopsy was not performed in any of the patients. The sterility of the couples lasted from 1 to 9 years (mean, 3.8 years). These male partners fulfilled the following criteria: 1) three semen analyses in which highest sperm density ranged between 5 and 20 million/ml, normal sperm morphology was $> 60\%$, and sperm motility was $> 10\%$; 2) normal serum values for LH, FSH, T, and PRL; and 3) a female partner who was determined to be fertile on the basis of history, physical examination, basal body temperature determination, menstrual history, sexual hormone levels, and when performed, a normal hysterosalpingogram. Examinations of hysterosalpingography were even distributed between the kallikrein group and placebo group. All couples included in this study were fully informed about the nature and aims of the study, an essential prerequisite for obtaining accurate information. They were provided with a written description of the protocol, including any potential adverse effects of the drug and the information that one of the drugs to be administered was a placebo. All participants gave written informed consent.

Study Design

The patients were randomly and blindly assigned treatment with oral administration of kallikrein or a placebo tablet three times daily. The test drugs consisted of kallidinogenase (Carnaculin; Sanwa, Co., Ltd., Tokyo, Japan) and were supplied in the form

of tablets containing each 50 kallikrein units. Placebo was supplied in identically looking, tasting and packed tablets. The dosage of the study medication (either kallidinogenase or placebo) was 12 tablets three times daily. Patients were instructed to ingest the tablets approximately 30 minutes after each meal with a glass of water. The double-blind treatment period was 12 weeks. Before and after treatment, three semen samples on separate occasion after 5 days abstinence and one blood sample were collected. Semen was evaluated for a standard semen analysis. All semen analyses were carried out by the same examiner in a blind protocol. Blood was evaluated for LH, FSH, T and PRL, and the routine laboratory test. The highest sperm density and percentage of motile sperm and normal form sperm before treatment were defined as the baseline value of each subject. The lowest sperm density and percentage of motile sperm and normal form sperm after treatment were defined as the value over the treatment period of each subject. If the patient lost the semen specimen due to improper collection devices or techniques, the result of semen analysis was excluded from the study.

Semen Analysis

Each subject was asked to abstain from ejaculation for 5 days prior to submission of the specimen. Semen sample collections were scheduled to coincide with the partner's menses, but semen samples after the period of treatment were obtained within one month of stopping treatment. The specimens were obtained by masturbation into a clean, dry, wide-mouth glass container and delivered to the examiner within 30 minutes of collection. Samples were evaluated in the fashion described by the World Health Organization manual for semen analysis⁹⁾.

Toxicologic Studies

Electrolytes, liver and kidney function tests, and a complete blood count were performed before and after treatment.

Physical Examination

Physical examinations including the measurement of blood pressure were performed on each subject before and after treatment to document any side effects and possible changes in physical examination.

Statistical Analysis

Means and standard errors were calculated on all the variables measured in the two groups. To assess the efficacy of treatment on seminal parameters, we compared, for each patient, the after treatment value with the before treatment value. This comparison was performed by subtracting the before treatment value from the after treatment value. The difference in these values between placebo group and treatment group was statistically analyzed by using the Wilcoxon's rank sum test (for nonparametric statistics). The chi square test was used to compare the pregnancy rate in the kallikrein and placebo groups. A P value of less than 0.05 was considered to indicate a statistically significant difference. Statistical calculations were performed by a personal computer (IBM Corp., Boca Raton, FL) using Systat software (SYSTAT, Inc., Evanston, IL).

Results

Of the 120 men who were eligible for randomization, 10 did not provide informed consent, 6 discontinued taking drug and 2 were randomly assigned to a kallikrein group and found to achieve pregnancy during treatment course. The study therefore included 102 men: 52 in the kallikrein group and 50 in the placebo group.

Physical Examination

No significant changes in physical examination were observed in any of the patients in the kallikrein or placebo group. There was no significant change in blood pressure between before and after treatment in placebo or kallikrein group.

Toxicologic Studies

No adverse effects were noted in either group throughout the study. There was no significant alteration in the parameters measured.

Treatment Versus Placebo Group

Before treatment, there were no significant differences in the semen analyses or hormonal values between the two groups. After treatment, there were no significant differences in hormonal values between the two groups. These statistical comparisons were made by student t-test. The changes in semen parameters after treatment in both groups are shown in Table 1. The mean baseline for sperm concentration was $11.4 \times 10^6/\text{ml}$ (median, 9.8) and $12.31 \times 10^6/\text{ml}$ (median, 10.7) for patients receiving placebo and for those treated with kallikrein, respectively. There was no significant difference in sperm concentration between patients treated with Kallikrein and placebo ($p = 0.34$). The mean baseline for total motile sperm count was 14.5×10^6 (median, 13.0) and 15.2×10^6 (median, 13.2) for patients receiving

Table 1 Changes in semen parameters after administration of kallikrein or placebo

	Kallikrein (n = 52)	Placebo (n = 50)	p value
Sperm concentration (million/cc)			
Base-line value	11.4 ± 3.8	12.3 ± 4.2	
Change from base line	21.1 ± 2.8	25.3 ± 3.1	0.34
Total motile sperm count (million)			
Base-line value	14.5 ± 4.2	15.2 ± 4.9	
Change from base line	32.1 ± 3.2	35.2 ± 2.9	0.27
Seminal volume (cc)			
Base-line value	3.85 ± 2.5	4.21 ± 2.9	
Change from base line	0.52 ± 2.4	0.53 ± 2.8	0.32
% Motility			
Base-line value	42.8 ± 3.4	41.5 ± 2.7	
Change from base line	9.82 ± 3.5	8.72 ± 3.3	0.32
% Normal morphology			
Base-line value	72.3 ± 3.8	75.1 ± 2.2	
Change from base line	0.38 ± 2.9	0.41 ± 3.6	0.21

All values are given as mean plus or minus standard error. Change denotes after treatment value minus before treatment value. P values are for differences between the two treatment groups.

Table 2 Pregnancy rate after administration of kallikrein or placebo

	Pregnancy (+)	Pregnancy (-)	Total
Kallikrein	5 (9.6 %)	47	52
Placebo	7 (14 %)	43	50

placebo and for those treated with kallikrein, respectively. There was no significant difference in the total motile sperm count in the kallikrein treatment group compared with the control group ($p = 0.27$). There were no significant differences in seminal volume or sperm motility between the two groups ($p = 0.32$). No significant difference was noted in the percentage of normal morphology between the two groups ($p = 0.21$). There were no significant differences in semen quality or hormone factors between the patients who achieved pregnancy and those who did not achieve pregnancy.

Pregnancy Rates

The cumulative pregnancy rate was determined within the observation period of 6 months after cessation of kallikrein treatment. This rate in the partners of men taking kallikrein was 9.6 % (five pregnancies), compared with 14 % in the partners of men taking placebo (seven pregnancies). The difference between the pregnancy rates was not significant ($p = 0.12$) (Table 2).

Discussion

We have conducted the placebo-controlled, double blind trial to evaluate the promise of kallikrein as a potential therapeutic modality for idiopathic oligozoospermic men. Kallikrein has been used in the treatment of male infertility for two decades³. The kallikrein-kinin system is involved in tissue proliferation and is interrelated with coagulation, fibrinolysis, the complement system, prostaglandins, and the renin-angiotensin system. Kinins are biologically active polypeptides released by proteinases called kallikreins (or kallidinogenases) that act on the precursor kininogens. Components of the kallikrein-kinin system have been shown to be present in the secretions of both the male and female reproductive tracts and have been postulated to be involved in transport of sperm through the female

genital tract, stimulation of sperm motility, and stimulation of spermatogenesis¹⁰. Pancreatic kallikrein is a kinin-releasing enzyme that has been used both orally and parenterally in the treatment of idiopathic oligozoospermia. Proposed mechanisms of action include enhancement of sperm metabolism, increase in testicular blood flow, stimulation of Sertoli cell function, and stimulation of the secretory activity of the accessory sexual glands³. Oral porcine pancreatic kallikrein (600 IU daily) generally has been used in the clinical studies.

Initial studies showed improvement in sperm motility *in vitro* after treatment with kallikrein¹¹. Subsequent uncontrolled clinical trials demonstrated efficacy for oral kallikrein in patients with asthenospermia⁵. Schill¹² then performed a placebo-controlled study of kallikrein in 90 subfertile men with idiopathic oligozoospermia. Significant improvements were noted in the kallikrein-treated patients in sperm density, motility, and forward progression. Pregnancy occurred in 38 % of couples in the treatment arm compared with 16 % in the placebo arm. Other placebo-controlled studies have confirmed these results^{13, 14}. A recent meta-analysis of the five placebo-controlled, randomized studies of oral kallikrein revealed a statistically significant increase in pregnancy rates for the kallikrein-treated patients¹⁵.

On the other hand, most recent report of Keck et al. suggested that kallikrein treatment at a dose of 600 IU/day resulted in neither improvement of semen parameters nor increase in pregnancy rate¹⁶. Our present results are quite consistent with their results. The present study was conducted to evaluate in a double-blind fashion the efficacy of kallikrein on semen parameters. In this trial we used the dosage most commonly used in many previous clinical studies (600 kallikrein units per day). Twelve weeks were chosen because this time period covers more than one spermatogenetic cycle and is therefore often the basis for medical treatment of male infertility. The patients' compliance was good and there were virtually no adverse effects of kallikrein. Nevertheless, our results were disappointing: neither sperm count nor sperm motility increased after treatment with kallikrein in ordinary dose. As evidenced by recent

absorption studies^{17, 18)}, serum levels and intratesticular levels of kallikrein after oral administration at the usual doses (600 kallikrein units per day) are only marginally increased. Therefore, probably a much higher dose of kallikrein might be used to obtain a therapeutic benefit.

In conclusion, on the basis of our data of kallikrein at the recommended dose by previous investigators did not have any significant effect on semen parameters or pregnancy rate. Until effectiveness of kallikrein at higher dose has been established, it should not be used in the basis of clinical studies.

References

- 1) Ishigami J, Matsumoto O, Hazama M, et al. (1981) Kallikrein and male infertility. In: Haberland GL, Rohen JW (eds), Kininogenases 5. Schattauer Verlag, Stuttgart, pp65-79
- 2) Schill WB, Preissler G (1997) Improvement of cervical mucus spermatozoal penetration by kinins: a possible therapeutic approach in the treatment of male subfertility. In: Insler V, Bettendorf G (eds), The uterine cervix in reproduction. Thieme, Stuttgart, pp134-146
- 3) Schill WB, Braun-Falco O and Haberland GL (1974) The possible role of kinins in sperm motility. *Int J Fertil* 19: 163-167
- 4) Schill WB (1982) Kinin-releasing pancreatic proteinase kallikrein. In: Bain J, Schill WB, Schwarzstein L (eds), Treatment of male infertility. Springer-Verlag, Berlin, pp125-142
- 5) Hommonai TZ, Shilon M and Paz G (1978) Evaluation of semen quality following kallikrein treatment. *Gynecol Obstet Invest* 9: 132-138
- 6) Hofmann N, Schoenberger A, Gall H (1975) Investigations on kallikrein treatment of male fertility disturbances (German). *Z Hautkr* 50: 1003-1012
- 7) Toeroek L (1979) Behandlung der Subfertilitaet des Mannes mit Kallikrein. *Munch Med Wochenschr* 121: 1047-1049
- 8) Schirren C, Schill WB and Hofmann N (1975) The influence of kallikrein on semen parameters of subfertile patients. In: Haberland GL, Rohen J, Schirren C, et al. (eds), Kininogenases, kallikrein 2. Schattauer Verlag, Stuttgart, pp111-127
- 9) World Health Organization (1992) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, pp123-138
- 10) Palm S, Schill W, Walner O, et al. (1976) Occurrence of components of the kallikrein-kinin system in human genital secretions and their possible function in stimulation of sperm motility and migration. In: Sicuteri F, Back N, Haberland G (eds), Kinins: Pharmacodynamics and biological roles. Plenum Press, New York, pp271
- 11) Leidl W, Prinzen R, Schill W, et al. (1975) The effect of kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro. In: Haberland GL, Rohen JW, Schirren C, et al. (eds), Kininogenases Kallikrein. Schattaur Verlag, New York, pp33-40
- 12) Schill W (1979) Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: Results of a double-blind study. *Arch Androl* 2: 163-170
- 13) Bedford N, Elstein M (1981) The effect of kallikrein on male infertillity: A double blind study. In: Insler V, Bettendorf G (eds), Diagnosis and Treatment of Infertility. Elsevier, Amsterdam, p339
- 14) Izzo P, Canale D, Bianchi B, et al. (1984) The treatment of male subfertility with kallikrein. *Andrologia* 16: 156-161
- 15) O'Donovan P, Vandekerckhove P, Lilford R, et al. (1993) Treatment of male infertility: Is it effective? Review and meta-analyses of published randomized controlled trials. *Hum Reprod* 8: 1209-1214
- 16) Keck C, Behre HM, Nieschlag E (1994) Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod* 9: 325-329
- 17) Miska W, Geiger R (1989) Luciferin derivatives in bioluminescence-enhanced enzyme immunoassays. *J Biolumin Chemilumin* 4: 119-128
- 18) Miska W, Schill WB (1991) Resorptionsstudie mit Schweinepankreas-Kallikrein am Menschen. *Arzneimittelforschung* 41: 1061-1064

(受付：1994年12月12日)

(受理：1995年4月3日)

特発性男性不妊症の治療法としてのカリクレインの有効性について：
偽薬を対照とした無作為二重盲検法による検討

名古屋大学医学部泌尿器科学教室
山本雅憲，勝野 暁，日比初紀，三宅弘治

特発性男性不妊症に対するカリクレインの有効性を検証する目的で，偽薬を対照とした無作為二重盲検法による研究を行った。

52人の特発性乏精子症患者に1日600単位のカリクレインを，50人の同症患者に偽薬をいずれも12週間経口投与した。投与前後で，3回の精液採取を行った。投与前では，最も高い，精子濃度，運動率，正常形態精子率を基礎値とし，投与後では，それらの値のうち最も低いものを選びその差を統計学的に検討した。

その結果，カリクレイン投与群では，対照群に比し，精子濃度，運動率，正常形態精子率いずれにおいても有意な改善は認められなかった。投与終了後から6か月以内に認められた妊娠例は，カリクレイン投与群で5例，偽薬投与群で7例であった。妊娠率において，両群に有意な差は認められなかった。したがって，カリクレイン1日600単位の投与量でも精液所見や妊娠率は，偽薬群に比し有意な改善は認められないため，この薬剤を特発性男性不妊症の標準治療として用いるべきではないと思われる。

キーワード：男性不妊症，特発性，カリクレイン，二重盲検法

ハムスターテスト不良症例における 体外受精-胚移植(IVF-ET)による治療成績の検討

Pregnancy Outcome of Infertile Couples with Poor Results of the Sperm Penetration Assay (SPA) in IVF-ET Treatment

兵庫医科大学産科婦人科学教室

満尾 瑞
Mizumi MITSUO
井上 みゆき
Miyuki INOUE

柴原 浩章
Hiroaki SHIBAHARA
長谷川 昭子
Akiko HASEGAWA
香山 浩二
Koji KOYAMA

船曳 美也子
Miyako FUNABIKI
繁田 実
Minoru SHIGETA

Department of Obstetrics and Gynecology
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663, Japan

ハムスターテスト(SPA: sperm penetration assay)の結果が不良(精子侵入率15%未満)と判定される男性不妊症患者に対しては、人工授精を含めた一般の不妊治療法には限界がある。しかも通常の媒精法による体外受精-胚移植術(IVF-ET)でも受精率が著しく低率であることから、その治療法には苦慮しているのが現状である。一方、最近の顕微授精の技術的進歩により、このような重症の男性不妊症患者の中にも妊娠例の報告が見られるようになってきた。そこで、最近の当科におけるSPA成績不良症例に対するIVF-ETおよび顕微授精(透明帯開孔法=PZD: Partial zona dissection)導入までの治療成績につき検討を加えた。

SPAにおける精子のハムスター卵への侵入率の結果により、再検によっても成績不良であった24例の患者を、A群(精子侵入率0%)15例、B群(同1%以上15%未満)9例に分類した。一方、対照としてSPAの成績が良好と判定された27例の患者を、C群(同15%以上30%未満)10例、D群(同30%以上50%未満)6例およびE群(同50%以上)11例に分類した。

その結果、IVF-ETによる症例あたりの妊娠率は、A群で0%(0/15)、B群で0%(0/9)、C群で10.0%(1/10)、D群で50.0%(3/6)、E群で27.2%(3/11)であった。また、A、B群での妊娠不成功の理由として症例あたりの受精率に注目すると、C、D、E群では症例あたり100%の受精率であったのに対して、A群では53.3%(8/15)、B群でも77.8%(7/9)と低率であることが判明し、通常のIVF-ETに関しては従来の精子侵入率のcut-off値15%は、術前に受精率を予測する上で妥当であることが確認された。C群でもなお妊娠率が低値であった理由として、卵子あたりの受精率が30.4%(14/46)とD、E群より有意に低率で($p < 0.005$)、胚移植できた胚数の低下がその原因と考えられた。PZDによる症例あたりの受精率は、A、B両群ともに66.7%であった。ただし卵子あたりの受精率は、A群で19.4%(7/36)、B群で50.0%(3/6)と有意差を認めた($p < 0.05$)。これはSPAの結果ともよく相関しており、今後A群に対する顕微授精法として、PZDに代わりICSIが適応となる可能性が示唆された。

キーワード: ハムスターテスト, IVF-ET, 顕微授精, 透明帯開孔法(PZD), 不妊症

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 135 - 140, 1996)

緒言

透明帯除去ハムスター卵への精子侵入テスト(以下SPA: sperm penetration assay)¹⁾は、男性不妊症診療を行う上で、精子の受精能力を判定する検査法のひとつとして普及している。SPAが臨床上有用であるとする報告^{2~6)}が多数見られる反面、SPAの結果からではその後の妊娠は予知できなかったとする報告⁷⁾も見られる。しかし、一般的には先体反応を終了した精子だけが卵子に侵入できることから、一般精液所見からでは予測しがたい精子の受精能力を、SPAにより推察できることに異論はない。

一方、顕微授精をはじめとする最近の生殖補助技術(ART: assisted reproductive technology)の飛躍的な進歩にとともに、従来の通常の培精法によるIVF-ETなどとSPAとの相関性に加え、顕微授精法とSPAとの相関性についても検討を加える必要性も生じてきているものの、いまだその報告をみない。そこで今回我々は、通常のIVF-ETによる治療法とSPAとの関係についてと、さらに1994年より導入した透明体開孔法(PZD: partial zona dissection)による治療成績とSPAとの相関性についても分析し、SPA不良症例に対する体外受精治療法につき考察を行った。

対象および方法

1) 対象

対象は、当科不妊外来に受診中の不妊症患者のうち、1991年から1993年までの3年間にSPAでハムスター卵への精子侵入率が15%未満と異常値を示し、かつIVF-ET治療を行った24例である。このうち、精子侵入率が再検査の結果からも0%とまったく精子の侵入が不能であった症例をA群(15例)、また当科のcut-off値(精子侵入率15%未満)までの1%以上~15%未満を示した症例をB群(9例)とした。同時期にSPAでの精子侵入率が15%以上を示し、かつIVF-ET治療を受けた27例を対照とし、うち精子侵入率が15%以上~30%未満の症例をC群(10例)、30%以上~50%未満の症例をD群(6例)、50%以上の症例をE群(11例)として比較検討した。

2) SPAの方法

SPAはすでに我々が報告した手順により行った⁸⁾。すなわち用手法により採取した精液を、液化の後Biggers-Whitten-Whittingham(BWW)培養液を用いて洗浄、 $40 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した後、 37°C 、5%炭酸ガス培養器内で5時間培養することによってcapacitationを誘起した。ハムスター卵は、ゴールデンハムスター

をPMS-hCGにて過排卵処理した後開腹し、卵管から採取した。回収した卵は0.1%ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去し、0.1%トリプシン溶液中に反応させ透明帯を溶解除去した。 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整して前培養した精子浮遊液0.2 mlに透明帯除去ハムスター卵を加え、 37°C の5%炭酸ガス培養器内で反応させた。18時間後に卵を取り出して、5%ホルマリン液で固定を行い、0.25%ラクモイド液で染色した後、位相差顕微鏡下に卵細胞質内の膨化精子頭部の存在の有無を判定した。

3) IVF-ETの方法

当科におけるIVF-ETの方法は、すでに詳細に報告している⁹⁾が、排卵刺激法としてGn-RH agonist (buserelin)-HMG併用療法を行った。経腔超音波断層法による卵胞発育のモニタリングを行い、最大卵胞径が18 mm以上、16 mm以上の卵胞が3個以上、血中E₂値が600 pg/ml以上に達した段階でbuserelinの投与を中止し、hCG 5000 IUを投与した。約36時間後に超音波ガイド下に経腔採卵を行った。B₂ medium (Menezo, France)にて調整した運動精子を、最終精子濃度が $5 \sim 10 \times 10^4/\text{ml}$ となるように、採卵後約5~6時間後に媒精した。採卵から約48時間後に、正常に分割した2~8細胞胚を経頸管的に子宮腔内に移植した。

4) PZDの方法

通常の培精によるIVFではまったく受精が成立しなかったA群9例、B群3例の計12例に対してCohen et al.の方法¹⁰⁾に準じて、PZDを行った。採卵した卵は、0.1%ヒアルロニダーゼで10分間処理し、顆粒膜細胞を除去した。ミネラルオイルで覆ったHepes緩衝HTF medium $10 \mu\text{l}$ 中に卵を移し、保持用ピペットで卵を保持した。必要に応じて囲卵腔を拡大するため、最終濃度0.2 Mのsucroseを添加した。穿刺針をベトリ皿の底面に平行に保持し、まず透明帯の外側から囲卵腔まで穿刺した。つぎに卵細胞を傷つけないよう針の方向を調節しながら透明帯の外まで穿刺針を貫通させた。保持ピペットの吸引をゆるめて卵を自由にする一方、透明帯を穿刺した針を保持ピペットの手前に移動した。保持ピペットと穿刺針をこすり合わせるにより、透明帯を部分的にカットした。以上の操作は、三次元油圧マイクロマニピュレーター(Narishige, MO-188)を用いた。穿刺針は微小電極作製器(Narishige PN-3)とマイクロフォーシ(Narishige MF-9)を使って作製した。処理した卵はただちにCO₂培養器内の受精用培地に移し、sucroseを用いた場合には卵細胞容積が通常に戻るのを待つ

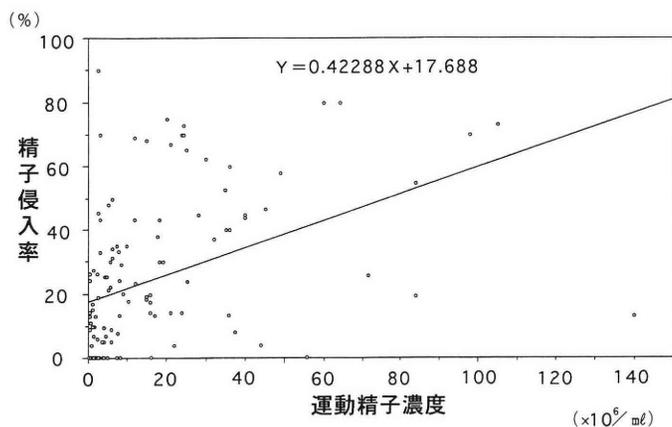


図1 運動精子濃度と精子侵入率の関係

て媒精した。運動精子が極端に少ない場合には、ミネラルオイルで覆った100 μ lの受精培地を用いて媒精した。

5) 統計処理法

検定には、Student's t-testを用いた。

結 果

1) 運動精子濃度と精子侵入率の関係

SPA検査時の精液所見の各パラメーターと精子侵入率の相関性につき検討した。その結果、精子濃度、運動率および奇形率と精子侵入率との間に相関性は認められなかった。精子濃度に運動率を乗じた運動精子濃度と精子侵入率との相関性も検討したが、両者の間に有意な相関性は認めなかった(図1)。

2) 精子侵入率群(A~E群)別のIVF-ETによる妊娠率の比較

A~E群別にIVF-ETによる妊娠率を検討した。その結果、図2に示すように、精子侵入率が不良であったA群およびB群での妊娠例はなかった。一方、対照として選んだ精子侵入率が正常と判定されたC, D, E群における妊娠率は、各々10.0%(1/10), 50.0%(3/6), 27.2%(3/11)であったが、各群間に有意差を認めなかった。

これらをSPA異常群(A+B)とSPA正常群(C+D+E)とに分けて検討すると、表1に示すようにIVF-ETによる妊娠率は前者において0%(0/24)、後者において25.9%(7/27)と両群間に有意差を認めた(p<0.01)。

3) 精子侵入率群(A~E群)別のIVFにおける受精率の比較

A~E群別に、IVFにおける症例あたり、卵子あた

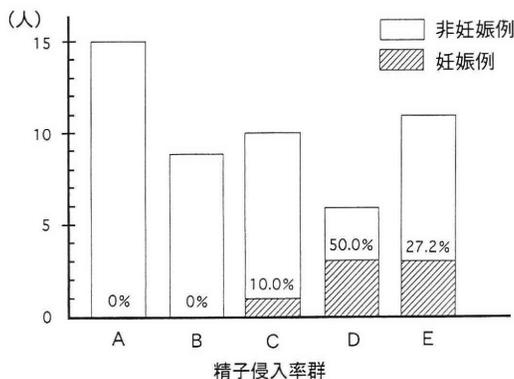


図2 精子侵入率群(A~E群)別のIVF-ETによる妊娠率の比較

表1 SPA異常(A+B)群と正常(C+D+E)群におけるIVF-ETによる妊娠率の比較

SPA	症例数 (人)	妊娠数 (人)	妊娠率 (%)
(A+B)群	24	0	0 *
(C+D+E)群	27	7	25.9 *
合計	51	7	13.7

* p<0.01

りの受精率を比較した。その結果、表2に示すように症例あたりで見ると、SPA異常値を示したA, B群においては、各々53.3%(8/15), 77.8%(7/9)と、SPA正常群(C, D, E)がいずれも100%(9/9, 6/6, 12/12)であったのに比較して不良であった。卵子あたりの受精率は、SPA異常群(A+B)に加えて、SPA正常群のうちC群までもが、受精率25.6~30.4%と低受精率を示していた。

表2 精子侵入率群(A~E群)別のIVFにおける受精率の比較

Group	症例あたり受精率	卵子あたり受精率
A	53.3 (8/15)	25.6 (31/121)
B	77.8 (7/9)	28.0 (21/75)
C	100 (9/9)	30.4 (14/46)
D	100 (6/6)	76.7 (23/30)
E	100 (12/12)	56.3 (36/64)
合計	82.4 (42/51)	37.2 (125/196)
A+B	62.5 (15/24)*	26.5 (52/196)**
C+D+E	100 (27/27)*	52.1 (73/140)**

*, **: $p < 0.005$

表3 精子侵入率異常群(A, B群)におけるPZDによる受精率の比較

Group	症例あたり受精率	卵子あたり受精率
A	66.7 (6/9)	19.4 (7/36)*
B	66.7 (2/3)	50.0 (3/6)*

*: $p < 0.05$

なお、SPA異常群(A+B)とSPA正常群(C+D+E)とに分けてIVF-ETにおける症例あたりの受精率、卵子あたりの受精率を比較したところ、いずれにおいても後者において有意に高率であった(表2, $p < 0.005$)。

4) 精子侵入率異常群(A, B群)におけるPZDによる受精率の比較

A群9例, B群3例の計12例に対しPZDを行い、症例あたりの受精率、卵子あたりの受精率を検討した。その結果、表3のように症例あたりの受精率はA群, B群ともに66.7%(各々6/9, 2/3)であったが、卵子あたりの受精率はA群19.4%(7/36)、B群50%(3/6)と有意差を認めた($p < 0.05$)。

考 察

一般に、男性不妊症診療が整然としない原因として、精子濃度や精子運動率などのいわゆる精液所見が検査のたびに一定しない症例が存在したり、あるいはそれらの結果と体外受精率や妊娠予後との間の相関性が低いことなどが考えられる。そこでより正確な診断を目的とし、精子の運動能力や受精能力まで分析する方法が、いくつも考案されてきている¹⁾。その中でもYanagimachi R.らによるSPA¹⁾は、異種動物間においてもcapacitationと先体反応を起こした精子だけが、透明帯除去ハムスター卵に侵入できることを利用した精子の受精能力を判定できる検査法であり、その後も臨床的に検討が加えられてきた²⁻⁸⁾。

一方、男性不妊症の治療法は顕微授精法の技術的進歩により、これまで妊娠がきわめて困難であった重症例における良好な妊娠率の報告がみられるようになってきた¹²⁾。それによると、卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)を用いると、精液所見が極端に悪い場合でも受精し、妊娠に至るというものである。このように、男性不妊症のいわば革命的な治療法が出現した反面、その確実性や出生児の長期予後を含む安全性にはまだ未知数の点もあり、現段階においては、その適応の決定には慎重である必要がある。

我々は、精液検査の結果により男性不妊症と診断した症例や、精液所見が正常であってもなかなか妊娠に至らない症例に対してSPAを行っており、IVF-ETの適応決定時には参考所見としてきた。IVF-ETでもなお受精が成立しない症例に対して、我々も1994年よりPZDによる治療を開始した。そこで、PZDを含めたこれまでの治療成績とSPAとの相関性をみるにより、各治療法の有効性と限界を分析し、今後さらにICSIを導入する際の参考とする目的で、SPA不良症例の治療成績を分析した。

まず通常のIVF-ETによる治療成績を検討したところ、SPAにおける精子侵入率のcut-off値を15%とすることは、術前に受精率を予測する上で適当であることが判明した。すなわちSPA異常群(A+B)とSPA正常群(C+D+E)との間に、IVFにおける症例あたり、卵子あたりの受精率に差を認めた(表2)。

またA, B群で妊娠が不成功であった(表1, 図2)理由としては、症例あたりの受精率がA群で53.3%(8/15)、B群で77.8%(7/9)と、C, D, E群の100%受精より低率であったためと判明した(表2)。C群でもなお妊娠率が低値であった理由として、卵子あたりの受精率が30.4%(14/46)とD, E群より有意に低率で($p < 0.005$)、ETできた胚数の低下がその原因と考えられた。

PZDによる症例あたりの受精率は、A, B両群ともに66.7%であった。ただし卵子あたりの受精率は、A群で19.4%(7/36)、B群で50.0%(3/6)と有意差を認めた(表3, $p < 0.05$)。これはSPAの結果ともよく相関しており、今後A群に対する顕微授精法として、PZDにかわりICSIを適応として良い可能性も示唆された。現在、通常のIVFおよびPZDによる不成功に対しICSIによる治療を開始し、さらに検討を重ねている。

本論文の要旨は第39回日本不妊学会(1994年、富山)において発表した。

文 献

- 1) Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ (1976) The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capability of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15: 471-476
- 2) Aitken RJ, Best FS, Warner P, et al. (1984) A prospective study of the relationship between semen quality and fertility in cases of unexplained infertility. *J Androl* 5: 297-303
- 3) Corson SL, Batzer FR, Marmor J, et al. (1988) The human sperm-hamster egg penetration assay: prognostic value. *Fertil Steril* 49: 328-334
- 4) Margalioth EJ, Feinmesser M, Davot D, et al. (1989) The long-term predictive value of the zona-free hamster ova sperm penetration assay. *Fertil Steril* 52: 490-494
- 5) Kremer J and Jager S (1990) The significance of the zona-free hamster oocyte test for the evaluation of male fertility. *Fertil Steril* 54: 509-512
- 6) 井上正人, 小林善宗, 本田育子 他 (1993) 精子機能検査法—zona-free hamster egg sperm penetration test. *産と婦* 60: 1429-1432
- 7) O'Shea DL, Odem RR, Cholewa C, et al. (1993) Long-term follow-up of couples after hamster egg penetration testing. *Fertil Steril* 60: 1040-1045
- 8) 高田喜嗣, 長谷川昭子, 香山浩二 他 (1981) 乏精子症患者精子の受精能に関する研究: 洗浄濃縮精子による受精率および透明帯除去ハムスター卵に対する *in vitro* における受精能について. *日産婦誌* 33: 2041-2046
- 9) 別所健史, 繁田 実, 小林真一郎 他 (1990) 体外受精-胚移植における busarelin-HMG 併用による卵巣刺激法の有効性. *日本受着会誌* 7: 57-60
- 10) Cohen J, Malter H, Wright G, et al. (1989) Partial zona dissection of human oocytes when failure of zona pellucida penetration is anticipated. *Hum Reprod* 4: 435-442
- 11) 柴原浩章 (1993) 精子機能検査法. *臨婦産* 47: 1216-1219
- 12) Palermo G, Joris H, Devroy P, et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 340: 17-18
(受付:1995年 8月9日)
(受理:1995年 9月28日)

**Pregnancy outcome of infertile couples with poor results
of the sperm penetration assay (SPA) in IVF-ET treatment**

Mizumi Mitsuo, Hiroaki Shibahara, Miyako Funabiki, Miyuki Inoue,
Akiko Hasegawa, Minoru Shigeta and Koji Koyama

Department of Obstetrics and Gynecology
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663, Japan

In the treatment of male infertility, zona-free hamster penetration assay (SPA) have been widely used for testing sperm fertilizing ability. In this study, we examined the relationship between SPA and pregnancy outcome. Over a three year period, 51 separate cases were entered into this study. 24 cases had unacceptably poor results of SPA and remaining 27 cases were rated as being acceptable. In SPA, 0 % (group A) and 1 ~ 15 % (group B) penetration were regarded as poor, while 16 ~ 30 % (group C), 31 ~ 50 % (group D) and over 50 % (group E) penetration were regarded as good. Sperm penetration rates were calculated according to the Yanagimachi's method. Pregnancy outcome of infertile couples in group A and B was analyzed and compared with those in group C, D and E.

There was no significant correlation between sperm penetration rates and sperm analysis data including sperm density, sperm motility and motile sperm density. The pregnancy rate (PR) treated with IVF in each group was 0 % (group A), 0 % (group B), 10.0 % (group C), 50.0 % (group D) and 27.2 % (group E) respectively. There was a significant difference of the PRs between poor SPA group (A and B, 0 %) and good SPA group (C, D and E, 25.9 %) ($p < 0.01$). The fertilization rate (FR) per patient in IVF with a standard insemination technique in each group was 53.3 % (group A), 77.8 % (group B), 100 % (group C), 100 % (group D) and 100 % (group E) respectively. The FR per oocyte in IVF with a standard insemination technique in each group was 25.6 % (group A), 28.0 % (group B), 30.4 % (group C), 76.7 % (group D) and 56.3 % (group E) respectively. There was a significant difference of FRs both per patient and oocyte between poor SPA group (A and B, 62.5 % and 26.5 %) and good SPA group (C, D and E, 100 % and 52.1 %) ($p < 0.005$, $p < 0.005$).

Patients who failed fertilization by using a standard insemination technique were treated with PZD. The FRs per patient was same in group A and group B, while the FRs per oocyte was much higher in group B (50.0 %) than group A (19.4 %) ($p < 0.05$).

These results suggest neither IVF nor PZD should be recommended for group A patients, but the latter might be valuable for group B patients. For the former patients, ICSI should be recommended.

Key words: sperm penetration assay (SPA), IVF-ET, microinsemination, partial zona dissection (PZD), infertility

両側精管欠損症にみられた46,XY/47,XY,+ dic (15) (q11)の1例

A Case of 46,XY/47,XY,+ dic (15) (q11) with Absence of the Bilateral Vasa Deferens

藤沢市民病院泌尿器科

釜井 隆 男*
Takao KAMAI

新井 学
Gaku ARAI

斉藤 和 男
Kazuo SAITO

広川 信
Makoto HIROKAWA
Department of Urology

Fujisawa City Hospital, Fujisawa 261, Japan

無精子症の精査で、両側の精管欠損と常染色体に異常の認められた1例を観察した。

身体所見および内分泌学的検査成績に異常はなく、精巣の大きさも正常であった。精路の造影を試みたところ精管は存在しなかった。精巣生検にて左右差はなく、精細管基底膜の肥厚は認められなかった。精子の形成は著明ではないが認められた。精祖細胞、精母細胞、精子細胞の形成は正常であった。染色体検査で、常染色体の構造異常がみられ、正常核型46,XYとq11を切断点とする15番染色体由来の過剰染色体47,XY,+ dic (15) (q11)とのモザイクを示した。

キーワード：無精子症、精管欠損、染色体異常

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 141 - 144, 1996)

緒 言

Klinefelter症候群やYq(-)に代表される性染色体異常が造精障害をきたすことはよく知られているが、近年常染色体異常も男性不妊症の原因として注目されている。我々は、無精子症の精査で、両側精管の欠損に常染色体の異常を認めた1例を経験したので、その臨床像を述べる。

症 例

30歳、男性

主訴：不妊

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：1991年3月の結婚で、2年におよぶ不妊期間が認められ、当院を紹介された。妻は、婦人科的に異常を認めていない。入院時の現症と検査成

績：身長171.3 cm、体重75 kg、通常の体型である。

血液一般と血液生化学検査は、異常を認めなかった。内分泌学的検査はLH 4.70 mIU/ml (1.1~8.8), FSH 7.20 mIU/ml (1.8~13.6), PRL 6.70 ng/ml (1.5~9.7), テストステロン 5.13 ng/ml (2.70~10.7)と正常域であった。

画像所見：IVPでは上部尿路に異常は見られなかった。

精液検査：精液量1.5ml、精子は認められなかった。

精巣の大きさ：外表計測(山口大式 orchidometer)で、右：4.2×2.0×2.4 cm (17 ml)、左：4.0×2.0×2.4 cm (17 ml)。

精巣生検：左右の精巣で差はなく、精細管の径は大小不均一で、間質の占める割合が多く、精細管基底膜の肥厚は認められなかった。精子の形成は著明ではないが認められた。精祖細胞、精母細胞、精子細胞の形成は正常であった(図1)。

*現所属；公立昭和病院泌尿器科

精路造影：精巢生検の際、精管を探索したが、存在しなかった。

末梢血染色体検査：46,XY/47,XY,+ dic (15) (q11). 正常核型46,XYとq11を切断点とする15番染色体由

来の過剰染色体47,XY,+ dic (15) (q11)とのモザイクを示した(図2). 構成比は総分析細胞数30個に対し、正常核型が23個、異常型が7個であった。

上記の結果から、両側の精管欠損と常染色体に異常の見られた男性不妊症と診断された。

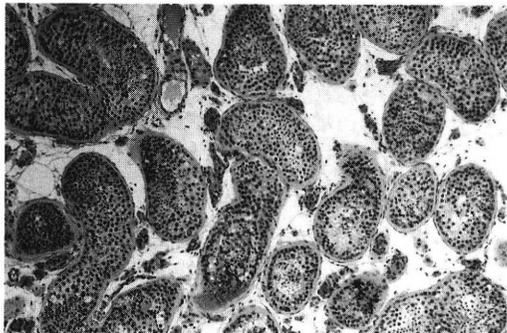


図1a 精巢組織像(H・E染色10倍)

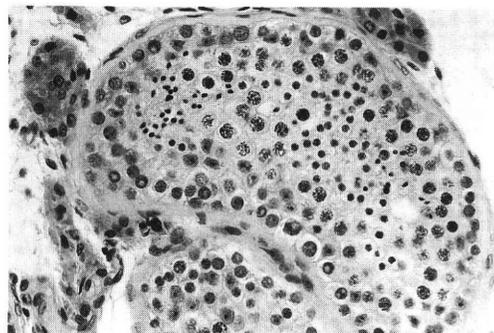


図1b 精巢組織像(H・E染色40倍)

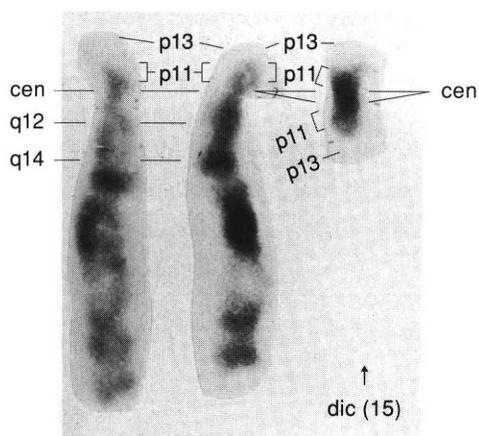
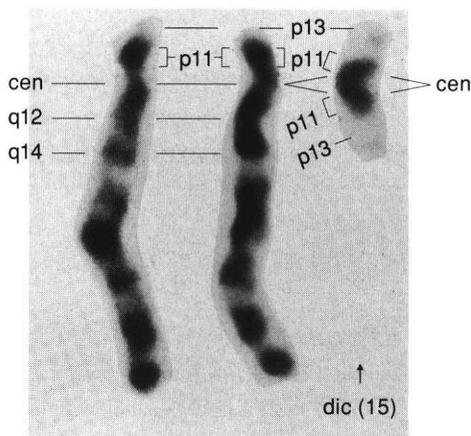
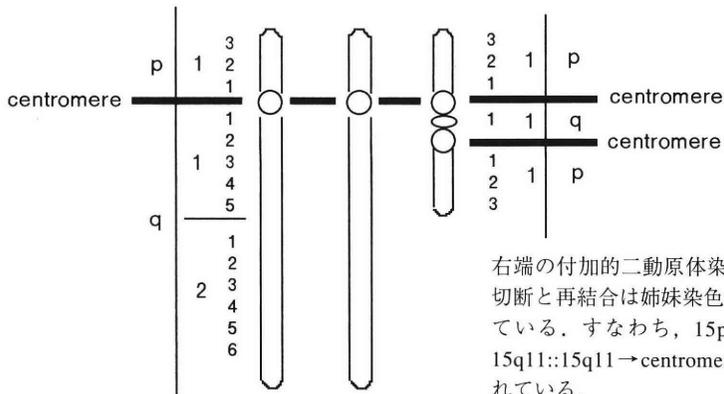


図2a 15番染色体

47,XY,+ dic (15) (q11)付加的二動原体染色体は15q11バンドで切断を持つ15番染色体により構成されている。



右端の付加的二動原体染色体の形成に際し、切断と再結合は姉妹染色体上の15q11で生じている。すなわち、15pter→centromere→15q11::15q11→centromere→15pterが形成されている。

図2b 図2aのシェーマ

考 察

染色体異常は、DNAのある部分に変化が起きた時に、ある遺伝子の働きが抑制されたり、必要以上に賦活化されたりして、形質の発現に影響を及ぼす。

染色体異常による男性不妊症の原因に、Klinefelter症候群に代表される性染色体異常、性染色体の構造異常¹⁾、Y染色体の部分的欠損²⁾などが知られ、精子形成を障害をしている。最近では常染色体の構造異常も男性不妊の原因になり得るとされている^{3,4)}。常染色体の構造異常には、転座、逆位、環状染色体などがある。このうち高頻度で見られるのは転座例で、大部分が相互転座である。その臨床所見として、無精子症、あるいは、乏精子症が認められているが、精巢容積や内分泌学的検査所見は正常のことが多い。精巢生検像はさまざまであるが、maturation arrestを示すことが多く、転座による減数分裂の障害に起因する可能性が高いと考えられている⁵⁾。しかし常染色体転座で精子形成が障害される機序については不明な点も多い。

本症例は、切断と再結合を有する過剰染色体(付加的二動原体染色体)という常染色体の構造異常を持ち、正常染色体とのモザイクである。造精機能については精祖細胞、精母細胞、精子細胞の形成は正常であったが、精子の形成はやや低形成であった。

両側性の精管欠損症は、男性不妊症の約1%に見られ⁶⁾、無精子症の約10%を占めるといわれている⁷⁾。胎生期の発生異常に起因することから、精囊の欠損や嚢胞状の腫大、あるいは、腎の發育不全などの合併を認めることが多い^{8,9)}。精管欠損例と染色体異常の合併については、46,XY/47,XXYのモザイク例での両側精管欠損の報告例をみるのみである¹⁰⁾。しかし精管欠損症に關与する染色体は同定されておらず、自験例でみられた15q11の常染色体異常と両側精管欠損の合併は、興味がある症例と思われる。

近年、15番染色体を過剰にもつ症例が多数報告されている^{11,12)}。知能障害、筋緊張低下、顔貌異常などがみられるが、身体發育はほぼ正常で生命予後も良い。また15q11の分子遺伝学的な異常としてはPrader-Willi症候群とAngelman症候群が有名であり、前者では性腺機能減退が知られているが、そのほかの報告でも妊孕能や精路系についての報告はない¹³⁾。自験例と同様の染色体異常、47,XX,+dic(15)(q11)を認めた3歳女児のPrader-Willi症候群の例でも、性腺機能についての記載はない¹⁴⁾。

自験例は性腺機能減退への関与が疑われる15q11の

構造異常を認め、精子の軽度な低形成と両側精管欠損の合併がみられたが、染色体はモザイクであった。46,XY/47,XXY、Klinefelter症候群のモザイクに見られるように、病態はモザイクの程度で修飾を受ける。したがって染色体異常と造精機能や精管形成の障害についての正確な病態を判定するには、末梢血からの検査のみならず、組織染色体や遺伝子の検査が必要である。

謝 辞

論文のご校閲をいただいた恩師東京医科歯科大学泌尿器科教授大島博幸先生と精巢生検像に対しご指示していただいた藤沢市民病院中検病理科栗林宣雄先生に深謝申し上げます。なお要旨は日本泌尿器科学会第8回神奈川地方会で報告した。

文 献

- 1) Chandley AC, Edomond P, Chrisrie S, et al. (1975) Cytogenetic and infertility in man. 1. Karyotype and seminal analysis. *Ann Hun Genet* 39: 231-254
- 2) Tiepolo L and Zuffar di O (1976) Localization of factors controlling spermatogenesis in the non-fluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hun Genet* 34: 119-124
- 3) 立木 仁, 熊本悦明, 斉藤誠一 他 (1991) 男性不妊症における染色体異常の検討. *日不妊誌* 36: 157-164
- 4) 松田公志, 堀井泰樹, 小倉啓司 他 (1992) 男性不妊症における染色体異常頻度と染色体異常症例の臨床的検討. *泌尿紀要* 38: 803-809
- 5) Matsuda T, Horii Y, Hayashi K, et al, (1991) Quantitative analysis of seminiferous epithelium in subfertile carriers of chromosomal translocation. *Int J Fertil* 36: 344-351
- 6) Charny CW, Gillenwater JY (1965) Congenital absence of the vas deferens. *J Urol* 93: 399-401
- 7) Rubius S (1975) Congenital absence of the vas deferens. *Scand J Urol Nephrol* 9: 94-99
- 8) Kenny PJ, Lesson MD (1983) Congenital anomalies of the seminal vesicles: spectrum of computed tomographic finding. *Radiology* 149: 247-251
- 9) Goldstein M, Schlossberg S (1988) Men with congenital absence of the vas deferens often have seminal vesicle. *J Urol* 140: 85-86
- 10) Padron RS, Mas J (1991) Familial bilateral vas deferens agenesis. *Int J Fertil* 36: 23-25
- 11) Parker CE and Alfi OS (1972) Partial trisomy of chromosome 15. *Lancet* i: 1073

- 12) Wisniewski L, Hassold T, Heffelfinger J (1979) Cytogenic and clinical studies in five cases of inv dup (15). *Hum Genet* 50: 259-270
- 13) Wagstaff J (1992) maternal but not paternal transmission of 15q11-13-linked nondeletion syndrome leads to phenotypic expression. *Nature Genet* 1: 291-294
- 14) Fujita H, Sakamoto Y and Hamamoto Y (1980) An extraidic (15) (q11) chromosome in Prader-Willi syndrome. *Hum Genet* 55: 409-411
- (受付: 1995年 8月24日)
(受理: 1995年10月23日)

A case of 46,XY/47,XY, + dic (15) (q11) with absence of the bilateral vasa deferens

Takao Kamai, Gaku Arai, Kazuo Saito and Makoto Hirokawa

Department of Urology
Fujisawa City Hospital, Fujisawa 261, Japan

A 30-year-old infertile man with azoospermia revealed absence of bilateral vas deferens and autosomal chromosomal anomalies. Physical examination was normal. Plasma hormone LH, FSH, Prolactin, Testosterone levels were within the normal range. Both testes were normal size. Both vasa deferens did not exist. Light microscopy showed that basement membrane is normal, but diameter is not uniform in the seminiferous tubules in both testes. The histological changes in the germinal epithelium in both testes corresponded with hypospermatogenesis, mainly at the spermatozoon stage. Chromosomal analyses revealed mosaic type of 46,XY/47,XY, + dic (15) (q11).

Key words: azoospermia, chromosomal anomaly, absence of vas deferens

夫婦間HLA類似性と習慣流産について

Association of Sharing of Human Leukocyte Antigens with Recurrent Spontaneous Abortion

西宮回生病院産婦人科

多 養 哲 治

Tetsuji TAYA

Department of Obstetrics and Gynecology

Nishinomiya Kaisei Hospital, Nishinomiya 662, Japan

兵庫医科大学産科婦人科学教室

山 崎 則 行

Noriyuki YAMASAKI

繁 田 実

Minoru SHIGETA

香 山 浩 二

Koji KOYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology

Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663, Japan

原因不明習慣流産と母児間のHLA類似性との関係を検討するために、原因不明習慣流産患者の配偶者間HLA共有抗原数をコントロール群と比較した。

1981年4月から1988年12月までに兵庫医科大学附属病院不育外来にて検索し得た3回以上連続して反復する自然流産患者26例(初診時平均年齢30.0歳)に対して流産の原因となり得る種々の要因について検討し、13例の原因不明習慣流産患者を選出した。これらの原因不明習慣流産症例について、配偶者ともHLA-A, B, C, DR, DQのtypingを行い、同じ施設でtypingを行った少なくとも1人以上の生児を得ている32組の夫婦と比較した。両者の共有抗原数の分布には有意差は認められず、HLA類似性と流産との因果関係は否定的である結果が得られた。

キーワード：習慣流産, HLA類似性

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 145 - 150, 1996)

緒 言

習慣流産患者のうち従来原因不明とされていた症例の中には、母児間の免疫学的不適合により発症しているものがあると考えられ、昨今、これらの症例に対し、いわゆる免疫療法が行われるようになってきた¹⁻²⁾。原因不明習慣流産患者に対する免疫療法の有用性について諸家から報告がなされてはいるが¹⁻⁶⁾、免疫療法の作用機序をはじめ、副作用、その適応患者の選択方法についてもまだ一定した見解は得られていない。一方、母児間の免疫学的異常による流産を考える上で、習慣流産患者の配偶者間のHLA類似性(母児間のHLA類似性)の有無についても、諸家に

よりさまざまな報告がなされてきたが^{1,4,6-12,15-18)}、いまだ一定の見解は得られていない。そして免疫療法の適応決定に夫婦間のHLAを考慮するか否かも施設ごとに異なるのが現状かと思われる。

今回我々は、流産と母児間のHLA類似性との関係を調べるために、我々の施設を訪れた習慣流産患者夫婦と、分娩し生児を得た正常夫婦とのHLAの類似性について比較検討を行った。

対象および方法

対象は1981年4月から1988年12月までに兵庫医科大学附属病院の不育外来にて検索をし得た3回以上連続して反復する自然流産患者26例(初診時平均年

表1 初診時年齢

年齢	症例数
～19	0
20～24	1
25～29	13
30～34	7
35～39	5
40～	0
計	26
平均	30.0歳

表2 初診時での流産回数

回数	症例数
3	14
4	7
5	2
6	3
計	26

年齢30.0歳(表1)で、反復する流産回数は3回ものが14名と最も多く、以下4回、6回、5回の順であった(表2)。なお、26名中、4名は反復する3回以上の自然流産を経験する以前に妊娠の既往があり、内訳は人工流産2名、9か月の早産1名、正常産1名であった。

まずこれら習慣流産患者26例について流産の原因と成り得ると考えられる種々の異常の有無を検索し原因不明と考えられる習慣流産患者を選出した。つぎに選出した原因不明習慣流産患者について、患者夫婦の同意のもと夫婦間のHLA共有抗原数を調べ、その総数をコントロールと比較した。HLAのtypingは兵庫県立西宮病院・腎移植センターに依頼し、typingを行ったHLAはclass IはA, B, C, class IIはDR, DQで、今回の検索で取り扱った各座の抗原の種類を表3に示す。なおコントロールとして、同センターでtypingを行った少なくとも1人以上の生児を得ている無作為に抽出された32組の夫婦のデータを用い、HLA共有抗原数の分布の比較には χ^2 検定を用いた。

結 果

1. 流産の原因検索

上記の26例に対し流産の原因に関係すると考えられる種々の異常について検索を行った(表4)。

感染症については、結核に関しては臨床的に判断し、その他は血清学的診断法により判定した。子宮異常については超音波断層法もしくは子宮卵管造影

表3 検索したHLAの抗原の種類

A	B	C	DR	DQ
A1	B5	Cw1	DR1	DQw1
A2	B7	Cw2	DR2	DQw2
A3	B8	Cw3	DR3	DQw3
A9	B12	Cw4	DR4	DQw4
A10	B13	Cw5	DR5	DQw5 (w1)
A11	B14	Cw6	DRw6	DQw6 (w1)
Aw19	B15	Cw7	DR7	DQw7 (w3)
A23 (9)	B16	Cw8	DRw8	DQw8 (w3)
A24 (9)	B17	Cw9 (w3)	DR9	DQw9 (w3)
A25 (10)	B18	Cw10 (w3)	DRw10	
A26 (10)	B21	Cw11	DRw11 (5)	
A28	Bw22		DRw12	
A29 (w19)	B27		DRw13 (w6)	
A30 (w19)	B35		DRw14 (w6)	
A31 (w19)	B37		DRw15 (2)	
A32 (w19)	B38 (16)		DRw16 (2)	
Aw33 (w19)	B39 (16)		DRw17 (3)	
Aw34 (10)	B40		DRw18 (3)	
Aw36	Bw41			
Aw43	Bw42		DRw52	
Aw66 (10)	B44 (12)			
Aw68 (28)	B45 (12)		DRw53	
Aw69 (28)	Bw46			
Aw74 (w19)	Bw47			
	Bw48			
	B49 (21)			
	Bw50 (21)			
	B51 (5)			
	Bw52 (5)			
	Bw53			
	Bw54 (w22)			
	Bw55 (w22)			
	Bw56 (w22)			
	Bw57 (17)			
	Bw58 (17)			
	Bw59			
	Bw60 (w40)			
	Bw61 (w40)			
	Bw62 (15)			
	Bw63 (15)			
	Bw64 (14)			
	Bw65 (14)			
	Bw67			
	Bw70			
	Bw71 (w70)			
	Bw72 (w70)			
	Bw73			
	Bw75 (15)			
	Bw76 (15)			
	Bw77 (15)			
	Bw4			
	Bw6			

法により診断し、子宮卵管造影上、必要を認めた症例は子宮鏡も行った。甲状腺機能障害については血中T₃、T₄値より診断した。黄体機能不全については、高温相中期の血清プロゲステロン値が5.0 ng/ml以下、あるいは子宮内膜日付診で2日以上不規則がある場合、黄体機能不全と診断した。排卵異常については、

表4 流産原因の検索結果

		頻度 (%)
感染症	梅毒	0/25 (0.0)
	トキソプラズマ症	1/14 (7.1)
	サイトメガロウイルス感染症	0/8 (0.0)
	結核	1/26 (3.8)
子宮異常	奇形	3/25 (12.0)
	Asherman症候群	2/25 (8.0)
	筋腫	2/25 (8.0)
	その他	3/25 (12.0)
内分泌異常	甲状腺機能異常	0/26 (0.0)
	糖尿病	0/26 (0.0)
	黄体機能不全	4/25 (16.0)
	排卵異常	4/25 (16.0)
精子異常		2/11 (18.2)
免疫学的異常	ATPP延長	2/11 (18.2)
	その他 自己抗体	1/21 (4.8)
染色体異常	転座	1/26 (3.8)
	その他 (逆位 他)	1/26 (3.8)

月経周期10日目以前の早期排卵あるいは月経周期20日目以降の遅発排卵を認める場合、排卵異常と診断した。精子異常については、精子数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下、運動率60%以下、奇形率15%以上を精子異常と診断した。APTT延長については、APTTが正常血清に対し1.3倍以上の延長が認められた場合、APTT延長症例と判定した。

感染症については、全例に検索を行えなかったが、トキソプラズマ抗体陽性者1名と結核の既往者1名のみ認められた。子宮異常についてはほぼ全例に検索がなされ、奇形を認めた3例はいずれも双角子宮の症例であった。なお子宮卵管造影上、子宮壁の不整あるいは卵管の通過障害を認めた症例は、その他

の項目に含めた。甲状腺機能障害、糖尿病の症例は認められなかった。精子異常の2例はいずれも精子無力症の症例であった。免疫学的異常としてはAPTT延長を2例、その他、抗白血球抗体陽性例を1例認めた。染色体異常は配偶者も含め染色体核型の同定(Gバンド分染法)を行い、転座1例、逆位1例、計2例(7.7%)を認めた。

原因不明習慣流産の診断基準は一定したものはなく、施設ごとに独自に設定しているのが現状であると思われる。今回、調査対象患者の原因検索を行った時点で、流産と高い相関性を持つと考えられた子宮異常、黄体機能不全、APTT延長、染色体異常、これらのいずれかに該当する13例を除外し、残る13例を原因不明習慣流産患者として扱った。なお13例中1例のみ反復する自然流産前に妊娠の既往(人工流産)がある。

2. 夫婦間HLA sharing

まず習慣流産26例全例について夫婦間のHLA共有抗原数を検索しコントロール集団と比較してみた(表5)。Class I抗原については習慣流産患者では共有抗原数が0のものが39.4%と最も多く、共有抗原数が多くなるにつれて患者の分布は減少する傾向がみられる。平均共有抗原数は習慣流産患者 0.8 ± 1.0 に対しコントロール 1.5 ± 1.2 であった。Class II抗原については各共有抗原数と患者分布に明らかな傾向はみられず、平均共有抗原数でも習慣流産患者 1.3 ± 1.3 に対しコントロール 2.2 ± 1.4 と、class I抗原、class II抗原いずれについても平均共有抗原数についてみればむしろコントロールのほうが高い値を示した。

つぎに先に選出した原因不明習慣流産患者13名のみについて同様に夫婦間のHLA共有抗原数をコントロール集団と比較した(表6)。Class I抗原については共有抗原数が0のものが53.8%と最も多く、以下、共有抗原数の増加につれて患者の分布は減少し、平均

表5 習慣流産患者夫婦間HLA共有抗原数

class I 抗原			class II 抗原		
共有抗原数		control	共有抗原数		control
0	13/26 (39.4%)	9/32 (28.1%)	0	11/26 (33.3%)	5/32 (15.6%)
1	8/26 (24.2%)	8/32 (25.0%)	1	5/26 (15.2%)	4/32 (12.5%)
2	3/26 (9.1%)	7/32 (21.9%)	2	4/26 (12.1%)	9/32 (28.1%)
3	1/26 (3.0%)	7/32 (21.9%)	3	4/26 (12.1%)	10/32 (31.3%)
4	1/26 (3.0%)	1/32 (3.1%)	4	2/26 (6.1%)	2/32 (6.3%)
			5	0/26 (0.0%)	1/32 (3.1%)
			6	0/26 (0.0%)	1/32 (3.1%)
平均共有抗原数	0.8 ± 1.0	1.5 ± 1.2	平均共有抗原数	1.3 ± 1.3	2.2 ± 1.4

表6 原因不明習慣流産患者夫婦間HLA共有抗原数

共有抗原数	class I 抗原		共有抗原数	class II 抗原	
		control			control
0	7 / 13 (53.8 %)	9 / 32 (28.1 %)	0	5 / 13 (15.2 %)	5 / 32 (15.6 %)
1	3 / 13 (23.1 %)	8 / 32 (25.0 %)	1	2 / 13 (6.1 %)	4 / 32 (12.5 %)
2	2 / 13 (15.4 %)	7 / 32 (21.9 %)	2	1 / 13 (3.0 %)	9 / 32 (28.1 %)
3	0 / 13 (0.0 %)	7 / 32 (21.9 %)	3	4 / 13 (12.1 %)	10 / 32 (31.3 %)
4	1 / 13 (7.7 %)	1 / 32 (3.1 %)	4	1 / 13 (3.0 %)	2 / 32 (6.3 %)
			5	0 / 13 (0.0 %)	1 / 32 (3.1 %)
			6	0 / 13 (0.0 %)	1 / 32 (3.1 %)
平均共有抗原数	0.8 ± 1.2	1.5 ± 1.2	平均共有抗原数	1.5 ± 1.4	2.2 ± 1.4

共有抗原数は原因不明習慣流産患者 0.8 ± 1.2 に対しコントロール 1.5 ± 1.2 、class II 抗原については、各共有抗原数と患者の分布には明らかな傾向はみられず、平均共有抗原数では原因不明流産患者 1.5 ± 1.4 、コントロール 2.2 ± 1.4 と、コントロールの方が高い値を示した。さらに、class I 抗原、class II 抗原とも、原因不明習慣流産患者とコントロールとの比較において、共有抗原数の分布に有意な差は見られなかった。これらの結果は夫婦間のHLAの類似性と流産との相関性を否定的とするものである。

なお、今回typingを行ったHLA各座の抗原の出現頻度を検索してみたが、コントロール集団との比較において、習慣流産患者および原因不明習慣流産患者に、有意に出現する抗原を見いだすことはできなかった。

また、今回、原因不明と診断した13例のうち、8症例についてはその後の追跡調査が可能であった。8症例中7症例に再妊娠(11妊娠)が確認され、そのうち4症例(6妊娠)はとくに原因不明習慣流産に対する治療が行われることなく生児が得られていた。

考 察

原因不明習慣流産の発症要因として母児間の免疫学的異常を考える際に、以前より、配偶者間(母児間)のHLA類似性の有無が流産の発症に関与しているか否か論議されている^{4,6-12,15-18}。原因不明習慣流産症例に配偶者間のHLAの類似性が高いとする報告がある一方で^{1,6,15-18}、原因不明習慣流産と配偶者間HLA類似性は無関係とする報告とがあり⁷⁻¹²、いまだ一定の見解は得られていない。今回の我々の検索では、原因不明習慣流産患者の夫婦間HLAの類似性は、同じ検査センターで得られた少なくとも1人以上の生児を得ている同地域の正常夫婦間のHLA類似性ととの比較において、有意な差を認めなかった。こ

れは母児間のHLA類似性と流産との関連性が否定的であることを示唆する。

最近の諸家からの報告でも原因不明習慣流産と配偶者間HLA類似性との因果関係を否定的とするものは多い⁷⁻¹²。Coulam⁹は母児間の免疫異常による習慣流産の診断方法について検討を行い、HLAの類似性は妊娠予後の判定には有用でなく、さらに母体のlymphocytotoxic antibodyならびにMLR抑制因子は妊娠の結果により産生され、その欠如自体は妊娠予後の判定には有用でないことを報告している。また近年、原因不明習慣流産に対し免疫療法が行われてきているが、治療前の患者配偶者間HLA類似性の有無と治療効果には関係がみられないとの報告がある¹³。Christiansenら^{7,14}は原因不明習慣流産と配偶者間HLA類似性との関係は否定的であることを示し、さらに原因不明習慣流産患者と患者同胞についてHLAと流産率を調査し、HLA遺伝子に近接した遺伝子により流産が生じている可能性を報告している。

一方、最近の報告でも流産とHLAの関係を肯定的とするものも少なからずみられ¹⁵⁻¹⁸、なかでもOberら¹⁸は原因不明習慣流産では配偶者間のHLA-DQA1のsharingが高いこと、さらに免疫療法施行後に再流産に至った流産児のHLAの検索から、母児間のHLA-DQA1の一致が流産に関係する可能性を報告している。

原因不明習慣流産と母児間のHLAとの因果関係を論議するためには、まず対象とする症例の選択が問題となる。原因不明と診断するための明確な基準は確立されておらず、施設ごとに独自の基準を設けて判断しているものと考えられる。患者の予後を検討するためには長期の調査期間が必要であるが、その間にも臨床的知見は変化し、調査された時期の違いによっても診断基準は異なり、対象とする症例の選び方に差異を生じる。また、HLA各抗原の一般出現

頻度は、地域、人種などにより異なり、各施設がコントロールに用いるデータについても違いを生じる。これらのことが施設間の客観的なデータの比較を困難にしていると考えられる。今回、我々の検索では、同じ施設で、同時期に同地域に在住する少なくとも1人以上の生児を得た夫婦について typing を行い、コントロールデータとして用いた。これは臨床的に比較する対象としては適切であると考ええる。

今回の我々の検索では、原因不明と判断した13症例のうち8症例についてその後の追跡調査が可能であった。8症例中、再妊娠が確認されたのは7症例(11妊娠)で、免疫療法後に妊娠した1症例(1妊娠)以外はとくに原因不明習慣流産に対する治療はなされていない。原因不明習慣流産の診断後の初回の妊娠で、再度流産を経験した症例は3例あったが、うち1例は流産児に染色体異常が確認され、その後のさらなる2回の妊娠では、いずれも生児を得ている。なお免疫療法後に妊娠に至った1例はその後生児を得ている。再妊娠例7例中、4例(57.1%)は免疫療法を行うことなく生児が得られている。Houwert-de Jongら¹²⁾も夫婦間のHLA類似性と習慣流産との関係が否定的であることを報告すると同時に、原因不明の習慣流産患者は無治療でもその予後は良いことを報告している。これらのことは原因不明習慣流産に対して免疫療法が行われ良好な結果が得られた症例のなかには、その治療の有無にかかわらずに妊娠分娩に至った症例も少なからず含まれるであろうことを示唆し、原因不明習慣流産の診断には、今後さらなる慎重さが要求されるものと考ええる。

謝 辞

HLA typing を施行していただいた兵庫県立西宮病院腎移植センターの福西孝信部長、橋本光夫先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JWT, et al. (1981) Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortions in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141: 987-999
- 2) Taylor C, Faulk WP (1981) Prevention of recurrent abortion with leukocyte transfusions. *Lancet* 2: 68-69
- 3) Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, et al. (1985) Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunisation with paternal

- cells. *Lancet* 1: 941-943
- 4) 八神喜昭, 青木耕治(1987)原因不明習慣流産の免疫学的背景と免疫療法. *日産婦誌* 39(4): 702-707
- 5) 竹内正七, 高桑好一(1988)不育症(習慣性流産)に対する免疫療法. *産婦人科治療* 56(3): 287-291
- 6) 佐治文隆, 鮫島義弘(1990)習慣流産に対する免疫療法の問題点. *産婦の進歩* 42(2): 213-216
- 7) Christiansen OB, Riisom K, Lauritsen JG, et al. (1989) No increased histocompatibility antigen-sharing in couples with idiopathic habitual abortions. *Hum Reprod* 4(2): 160-162
- 8) Chang MY, Soong YK, Huang CC (1991) Comparison of Histocompatibility between couples with idiopathic recurrent spontaneous abortion and normal multipara. *J Formosan Med Assoc* 90(2): 153-159
- 9) Coulam CB (1992) Immunologic tests in the evaluation of reproductive disorders: A critical review. *Am J Obstet Gynecol* 167: 1844-1851
- 10) Eroglu G, Betz G, Torregano C (1992) Impact of histocompatibility antigens on pregnancy outcome. *Am J Obstet Gynecol* 166: 1364-1369
- 11) Laitinen T, Koskimies S, Westman P (1993) Foeto-maternal compatibility in HLA-DR, -DQ, and -DP loci in Finnish couples suffering from recurrent spontaneous abortions. *Eur J Immunogen* 20: 249-258
- 12) Houwert-de Jong MH, Termijtelen A, Estes TK, et al. (1989) The natural course of habitual abortion. *Eur J Obstet Gynecol* 33: 221-228
- 13) Carp HJA, Toder V, Gazit E, et al. (1990) Selection of patients with habitual abortion for paternal leucocyte immunization. *Arch Gynecol Obstet* 248: 93-101
- 14) Christiansen OB, Riisom K, Lauritsen JG, et al. (1989) Association of maternal HLA haplotypes with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 34: 190-199
- 15) Ho HN, Gill TJ 3rd, Nsieh RP, et al. (1990) Sharing of human leukocyte antigens in primary and secondary recurrent spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 163: 178-188
- 16) Kilpatrick DC, Liston WA, Neill G, et al. (1989) Immune profile of women experiencing recurrent spontaneous abortions of unknown aetiology. *Dis Markers* 7: 87-94
- 17) Laitinen T, Lokki ML, Tulppala M, et al. (1991) Increased frequency of complement C4 'null' alleles in recurrent spontaneous abortions. *Hum Reprod* 6: 1384-1387
- 18) Ober C, Steck T, van der Ven K, et al. (1993)

- MHC class II compatibility in aborted fetuses and term infants of couples with recurrent spontaneous abortion. *J Reprod Immunol* 25: 195-207
- 19) Bodmer JG, Marsh SGE, Albert ED, et al. (1992)

Nomenclature for factors of the HLA system, 1991. *Human Immunol* 34: 4-18
(受付: 1995年 8月 9日)
(受理: 1995年 10月 25日)

Association of sharing of human leukocyte antigens with recurrent spontaneous abortion

Tetsuji Taya

Department of Obstetrics and Gynecology, Nishinomiya Kaisei Hospital, Nishinomiya 662, Japan

Noriyuki Yamasaki, Minoru Shigeta and Koji Koyama

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663, Japan

The purpose of this study was to investigate HLA sharing in couples suffering from unexplained recurrent spontaneous abortion (RSA) and to compare it with that in normal fertile couples.

Thirteen couples with unexplained RSA were selected from 26 couples (mean age 30.0 years) suffered from three or more consecutive miscarriages, who were referred to our clinic from April 1981 to December 1988. Typings for HLA class I antigens (HLA-A, B and C) and class II antigens (HLA-DR and DQ) were performed for these 13 couples with unexplained RSA. For control, 32 couples, who were in the same area, had one or more children and were typed at the same laboratory, were taken into the study. No significant differences in the distribution of HLA sharing were found between unexplained RSA couples and normal fertile couples. This result suggests that HLA sharing in spouses has no relationship to RSA.

Key words: habitual abortion, HLA sharing

男性不妊症における実虚証判定と補中益気湯療法の効果について

Relationship between Kampo Sho Diagnosis using the Jitsu Kyo Score System and the Effect of Hochu-Ekki-To Therapy in Male Infertility

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

風間 泰蔵

Taizo KAZAMA

岩崎 雅志

Masashi IWASAKI

高峰 利充

Toshimitsu TAKAMINE

奥村 昌央

Akiou OKUMURA

片山 喬

Takashi KATAYAMA

Department of Urology

水野 一郎

Ichiro MIZUNO

布施 秀樹

Hideki FUSE

Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

特発性男性不妊症患者32名について、10の設問に対する回答から実虚スコアを算出して実証虚証の判定を行い、補中益気湯投与(7.5 g/日、3か月間)が精子機能検査を含む各種精液所見に及ぼす効果との関連について検討した。

あらかじめ行った不妊主訴患者54名の実虚スコアの分布から49点以下を虚証、60点以上を実証と分類したところ虚証と判定された者が12名(22.2%)、虚実間証が23名(42.6%)、実証が19名(35.2%)であった。虚証患者における精子濃度、hyposmotic swelling testでの総精子膨化率およびpenetrak値に対する有効率はそれぞれ67%、50%、67%で、実証患者の30%、0%、0%より高かった。精子運動率および精液自動分析装置による運動能パラメーターには証の違いによる有効率の差は認められなかった。

以上より不妊主訴者の中にはかなりの割合で虚証以外の証の者が含まれていることが明らかとなり、精子濃度や精子機能に関しては、患者の証を考慮して他の薬剤との使い分けを計ることでさらに成績の向上が期待できる可能性が示された。

キーワード: 特発性男性不妊, 実虚スコア, 補中益気湯

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 151 - 158, 1996)

緒言

本邦においては、特発性男性不妊症に対する薬物療法には様々なものが用いられているが、その効果は残念ながら満足できるものではないのが現状である。このため最近本症に対しての漢方薬治療が注目されている。

漢方薬は、多くの成分からなりその作用点が多様であること、および比較的安全性が高いことなどの特長をもっている。特発性男性不妊症も同じように多様な原因の関与が考えられ、また一般に長期の投

薬が必要とされる。すなわち、特発性男性不妊症の治療薬として必要ないくつかの条件を漢方薬が満たしていることが、注目を集めている理由と考えられる。

しかし、ここに、本来漢方の処方、不妊という病名によって決定されるのではなく、虚実証あるいは陰陽などの患者の病態に応じて行われるべきものとされているにもかかわらず、この病態を判断するという作業は、いわゆる西洋医学の教育を受けた者には難しいという問題が存在する。このため、従来泌尿器科医、産婦人科医による男性不妊症に対す

様々な漢方薬の治験は、この証の判定を経ずに行われてきたのが実情である²⁻¹⁰⁾。今回我々は、この実証虚証の判定をいくつかの質問により簡便に判定可能なシステムを使用する機会を得た。そこで、漢方薬を投与した男性不妊症患者の証を本システムを用いて判定し、その結果と精子機能および精子運動能を含む各種精液検査所見に見られた効果との関連に関する検討を試みたので報告する。使用した漢方薬は、現在我々が男性不妊症外来において用いており、東洋医学的には虚証患者に適応とされる薬剤である補中益気湯である。

対象および方法

対象は、不妊を主訴として富山医科薬科大学付属病院泌尿器科を受診し、一般精液検査にて精子濃度4,000万/ml未満あるいは運動率50%未満であった特発性男性不妊症患者32名である。内訳は、精子濃度4,000万/ml未満の精子減少症患者が4名、運動率50%未満の精子無力症患者が12名、両方の基準を満たす精子減少症かつ精子無力症患者が16名であった。

方法としては、ツムラ補中益気湯エキス7.5gを分3として食前もしくは食間に投与、投与開始時と投与開始後3か月後に、一般精液検査、精液自動分析装置セルソフトシリーズ3000による運動能評価、また hypoosmotic swelling test (HOST)で測定した総精子膨化率と penetrak test による精子機能評価を行った。また投与開始時に証判定のための10個の質問よりなるアンケートに回答してもらいソフトを用いて得点化した。

証判定のために投与前に回答させた10個の設問(実虚問診表)を表1に示す。これらの質問に対する回答には、それぞれの設問に対して両極端にある2つの回答の間に引いた線上の自分はこのあたりだろうと

いうところを適当に選んでもらう形で回答させた。後にこの回答をソフトに入力し100点を満点とする実虚スコアを算定した(0点に近いほど虚証, 100点に近いほど実証)。このソフトは、「漢方診療ハンドブック」萩田善一編, 黄 兆勝/黄 愛萍著(医歯薬出版株式会社)¹³⁾に従って著者らにより作成されたもので、作成者によるとその特長として、1)設問に対する点数のつけ方に基本的にファジー理論の頭切り方法を使用している、2)ファジー理論の採用により漢方診断の「曖昧さの中の正確さ」というべきものを計数化し、より臨床の場に近づけた、そして3)点数の重みには中医学における4つの診察法である望診、聞診、問診、切診の優先順位をできるだけ反映した、などが挙げられている。ただ本ソフトではスコアが何点以上・以下ならば実証・虚証という基準は設けられておらず、今回証の違いによる薬剤の効果の差を検討するという目的のために独自の実証・虚実問証・虚証のクライテリアを設定した。分類の基準は、本来50点で2つに分けそれ以下を虚証、それ以上を実証とするのがシンプルであろう。虚証に関してはこの通りの判定法を採用したが、結果の項でも述べるように不妊を主訴として当科を受診した54名の不妊主訴男性でこのスコアを見た場合、50点から60点の間であった者が多かった。そこで今回は試みとしてこの50点から60点の間の者を虚実問証、60点以上の者を実証として3群に分けて検討を行うこととした。

精液検査は原則として5日間の禁欲期間をおき用手法にて採取した。採取した精液は室温にて30~60分放置して十分に液化させた後精液量およびMakler chamberを用いて精子濃度、運動率を算定した。また、精液自動分析装置セルソフトシリーズ3000を用いて、平均運動速度、平均運動直進性、精子頭部の

表1 実虚問診表

1.	病人として元気がない方である	←—————→	病人として元気のある方である
2.	虚弱体質または貧血性体質	←—————→	筋肉質または堅太り気味の体質
3.	話し声に力と張りが無い	←—————→	話し声に力と張りがある
4.	疲れやすい方である	←—————→	疲れることはない
5.	人より汗をかき易い方である	←—————→	人より汗をかかない方である
6.	食欲不振、動悸する	←—————→	食欲旺盛、動悸なし
7.	下痢気味、大便量多い (1日に2回以上)	←—————→	便秘気味、大便量少ない (2~3日に1回)
8.	飲酒すると時々下痢する	←—————→	のみすぎても下痢しない
9.	尿量が多い、尿の回数が多い	←—————→	尿量が少ない、尿の回数が少ない
10.	咳をするとき弱々しい	←—————→	咳をするとき力強く激しい

平均振幅値および精子頭部の振り周波数を同時に測定した。HOSTおよびpenetrak testの手技に関しては我々がすでに報告した通り¹¹⁾に行った。

薬剤の効果判定は、投与前後の各パラメーターの平均値の比較および以下の効果判定基準による改善

度評価によった。すなわち、精子濃度については寺田の基準¹²⁾(投与前2,000万/ml未満の症例では1,000万/mlの増加、減少をそれぞれ有効、悪化と判定し、また2,000万/ml以上の症例では2,000万/ml以上の増加、減少をそれぞれ有効、悪化と判定)を用いた。運

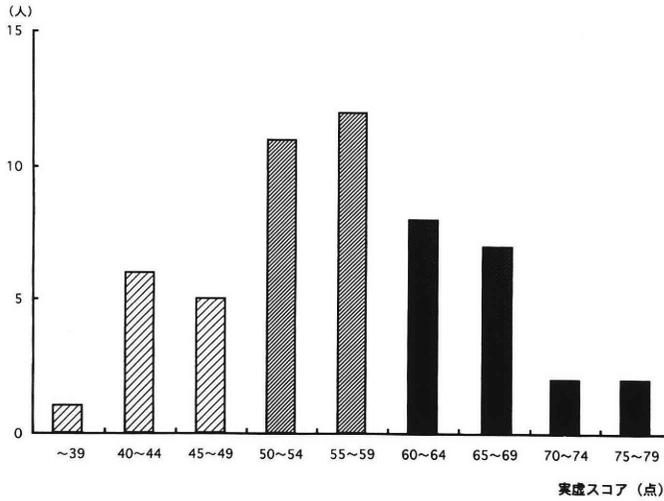


図1 実虚スコアの分布

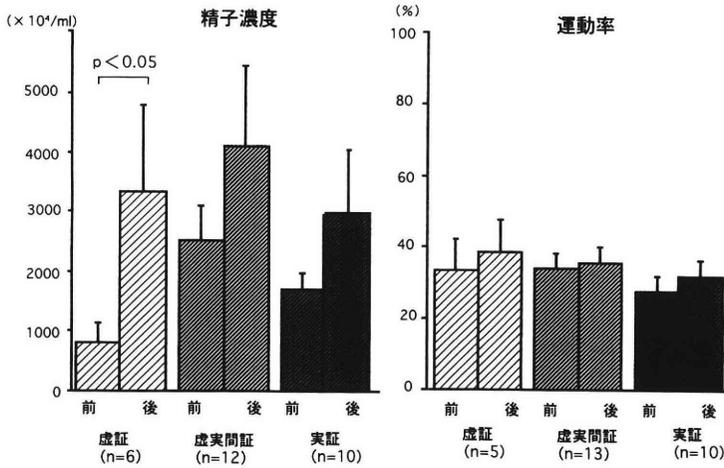


図2 投与前後での精子濃度・精子運動率の変化

表2 精子濃度に対する効果

	虚証 (n=6)	虚実証 (n=12)	実証 (n=10)	計 (n=28)
改善	4	2	3	9
不変	2	8	7	17
悪化	0	2	0	2
有効率	67%	17%	30%	32%

p < 0.05

表3 精子運動率に対する効果

	虚証 (n=5)	虚実証 (n=13)	実証 (n=10)	計 (n=28)
改善	1	5	4	10
不変	4	6	5	15
悪化	0	2	1	3
有効率	20%	38%	40%	36%

動率については10%以上の増減があった場合を有効、悪化と判定した。HOSTによる総精子膨化率とpenetrak値については、それぞれ10%以上、5mm以上の増減を有効、悪化の根拠とした。

統計学的有意差検定にはMann-Whitney's U-testと χ^2 -testを用いた。

結 果

1. 実虚スコアの分布

当科外来を不妊を主訴として受診した男性患者54名の得点の分布状況を図1に示した。この図より49点以下を虚証、50点以上59点以下を虚実間証、そして60点以上を実証と分類して、以下の検討における各証別の比較を行った。

2. 精子濃度に対する効果

補中益気湯投与前後での精子濃度の変化を図2に示した。虚証、虚実間証、実証いずれの患者群においても改善の傾向が認められたが、とくに虚証患者では投与の前後で有意の差が認められた ($p < 0.05$)。改善度では、患者全体での有効率が32%であるのに対し、やはり虚証患者で最も有効率が高かった(表2)。

3. 運動率に対する効果

図2右に投与前後での運動率の変化を示したが、虚証、虚実間証および実証の3群間で投与前後の運動率の変化に差はなかった。改善度では患者全体での有効率は36%であり、やはり証の別による有効率に差は見られなかった(表3)。

4. Hypoosmotic swelling test (総精子膨化率) に対する効果

治療前後の総精子膨化率の変化では、虚証群のみで改善が見られたが、有意のものではなかった(図3左)。改善度では虚証患者で有効率50%であり、実証患者の有効率0%との間に有意差が認められた(表4)。

5. Penetrak値に対する効果

虚証患者では、治療後に有意の差をもってpenetrak値が改善した(図3右)。改善度でも虚証患者で有効率が最も高く、虚実間証患者群、実証患者群の順で低くなるという総精子膨化率と同様の傾向が認められた(表5)。

6. 精子運動能に対する効果

セルソフトシリーズ3000を用いて得られた4つの運動能パラメーターの治療前後の変化を図4および

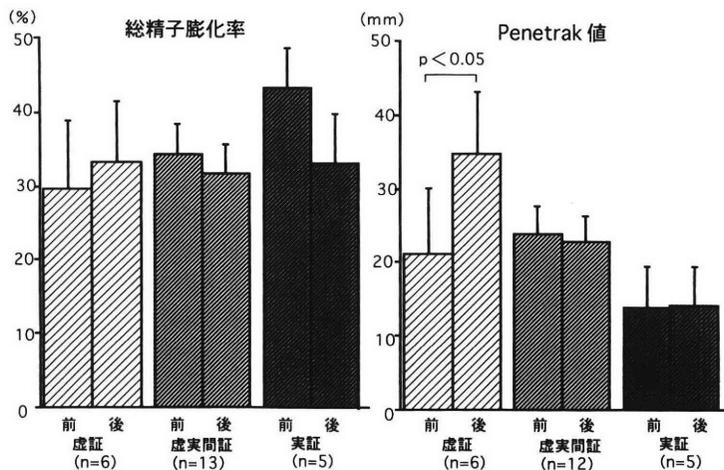


図3 投与前後での総精子膨化率・penetrak値の変化

表4 総精子膨化率に対する効果

	虚証 (n=6)	虚実証 (n=13)	実証 (n=5)	計 (n=24)
改善	3	4	0	7
不変	3	4	2	9
悪化	0	5	3	8
有効率	50%	31%	0%	29%

$p < 0.05$

表5 Penetrak値に対する効果

	虚証 (n=6)	虚実証 (n=12)	実証 (n=5)	計 (n=23)
改善	4	3	0	7
不変	1	6	4	11
悪化	1	3	1	5
有効率	67%	25%	0%	30%

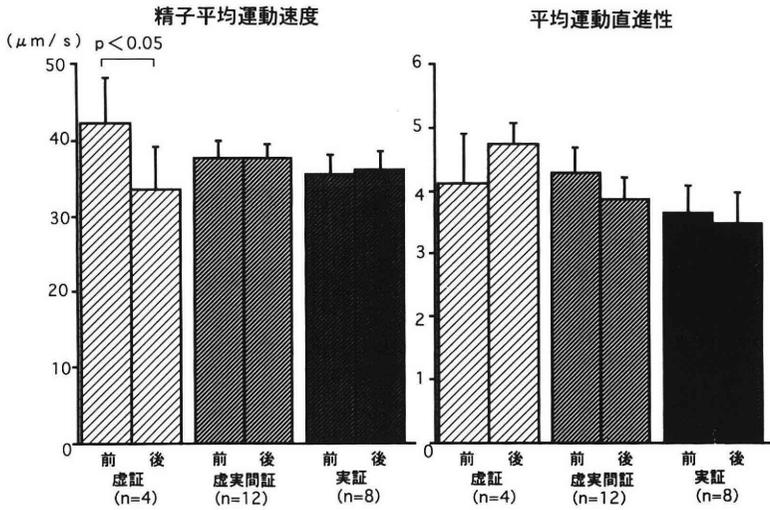


図4 投与前後での精子平均運動速度・平均運動直進性の変化

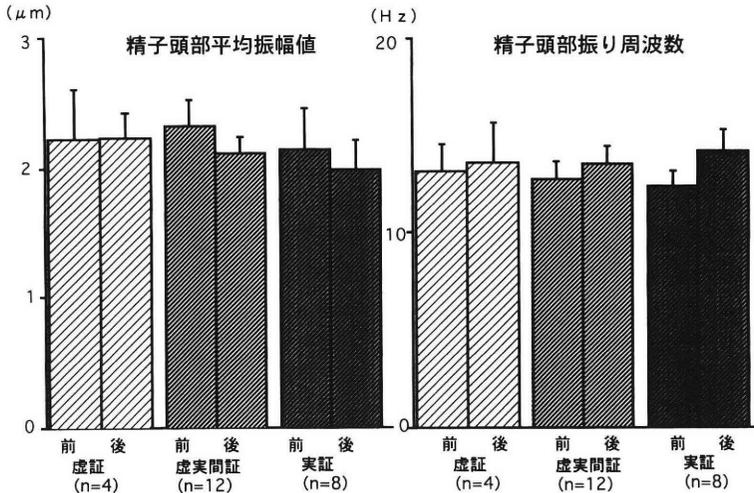


図5 投与前後での精子頭部平均振幅値・精子頭部振り周波数の変化

図5に示した。精子平均運動速度において虚証患者のみ有意の低下が認められたが、その他精子平均運動直進性、精子頭部平均振幅値および精子頭部振り周波数の3つについては投与前後での変化や各証別の変化は明らかでなかった。

考 察

現在、男性不妊症に対してその効果が報告され、また使用される機会の多い漢方薬剤は、補腎療法としての八味地黄丸や補気療法としての補中益気湯など、そのほとんどが虚証患者に適応があるとされているものである。しかし、日常の男性不妊症診療に

において漢方の専門家でない我々が接していても、気力も体力も充実しておりとても漢方医学にいう虚証とは思えない患者も決して少なくないという印象が強く、こういった患者のすべてに虚証に適応のある薬剤を処方するというのはやはり漢方薬の使い方として本来正しくないのではないかと考えがつかねにあった。

また、我々も西洋医学に携わる者とはいえ漢方薬にその可能性を期待して実際の診療に用いる以上、漢方薬を投与しようと考えた患者については、どういった薬剤を使用したらいいのかを、病名のみから選択するのでなく漢方医学的にも判断することが当然

必要であろうと考えていた。しかし、緒言にも述べたごとく、漢方医学の体系が我々がこれまで学んできた医学とかなり異なりその習得が難しいことが最大の理由となって、これまでの男性不妊に対する漢方薬療法の報告は当科からのものも含めて、仕方なくその男性不妊症という病名のみを頼りとして薬剤を選んで行われているものがほとんどというのが現状であると思われる。

今回我々が使用した証判定システムは簡単な問診に対する患者の回答をコンピューターに入力するだけで得点によるおおまかな実証虚証の判定が行えるため、実際に患者を見ながら即座に判定ができる便利なシステムである。舌診、腹診など漢方診断に重要とされる所見は考慮されておらず最終的に完全な証の判定を行えるものではないが、西洋医学的な考え方に慣れた我々にとって点数による判定が得られることは大きな魅力である。

本システムを用いてまず得られた結果のひとつは、むしろ男性不妊症患者の証は虚証から実証にまで広く分布し、50点未満を虚証とした場合にはむしろ虚証の患者の割合は実証患者よりも少ないということである。今回の虚証、虚実間証および実証の判定基準に関しては我々が独自に設けたものではあるが患者の分布傾向は十分に反映されているものと考えられる。つまり、これまでのように虚証に適應のある漢方薬のみをただ単に病名を頼りとして使用しているより、一步進んで実証患者には実証に適應のある別の薬剤を使い分けるなどの方法を用いることにより、有効性がより改善される可能性が示されたものである。ただやはり本システムによる虚証、虚実間証、実証のクライテリアの正確さに関しては今後症例を重ねて治療効果との関係などから検討すべき点が多いものと考えられる。

従来より男性不妊症に関する動物実験あるいは臨床試用でいくつかの漢方薬の有効であることが報告されているが、これは、男性不妊症には、これらの漢方薬に含まれる何らかの成分が西洋薬的なメカニズムで主に作用したためという説明と、有効であった患者に虚証の人が多かったという説明の2つが可能である。

そこで今回の結果をみると、一般精液検査における精子濃度や、HOST, penetrak test などの精子機能検査などは虚証の患者でより改善されることが判明し、虚証、実証の判定を治療薬の選択に反映させることでさらに成績の向上が見込めるものと思われる。

逆に、運動率については、セルソフトシリーズ3000

を用いて求めた運動能のデータとともに、他のパラメーターと異なり証の別による有効率の差は認められなかった。従来より実証虚証というモデルを作成して行われたわけではない動物での実験あるいはin vitroの成績で、漢方薬あるいはその成分の添加により非常に精子運動性に対して有効性が高かったとする成績が報告されていることに、この結果をあわせて考えると、漢方薬の持つ運動率改善作用は先程述べた2つの可能な説明のうちの前者、すなわちこれらの漢方薬に含まれる何らかの成分が、虚証、実証というものに関係なく精子に作用しているという可能性が考えられる。

今回の結果より、乏精子症あるいはこれに精子機能の低下をともなっている場合には、証を考慮して使用する漢方薬を決定すること、また運動率の低下が唯一の所見である場合には補中益気湯あるいは従来運動性の改善に有効とされている八味地黄丸や牛車腎気丸を使用することという簡単な使い分けを行うのがよいと思われた。先にも述べたように、実際に現在男性不妊関連疾患に対して主に使用されている漢方薬の中で実証患者に適應のあるものは柴胡加竜骨牡蛎湯しか見あたらず、虚実証あるいは実証と判定された者についてはカリジノゲナーゼ製剤など従来西洋薬として有用性の報告されているものを使用するという使い分けも一例として可能と思われる。今後は是非この使い分けに関して検討を加えたいと考えている。

最後に、このほかに検討すべき課題として、まず今回使用した証判定のシステムの妥当性という点があげられる。漢方診断がこのような簡便なシステムですべて代行できるとは当然ながら考えにくい。さらに詳細で漢方医のコンセンサスの得られる、かつ多忙な外来診療の中でも使用できるものという非常に注文の多いシステムの開発が課題であろう。しかし舌診、腹診などが漢方診断に不可欠であるとすれば、これらの判定はやはり人間が行うしかなく、完全無欠な証判定のシステムができたとしてもやはり漢方医にのみしか扱えないものになるのかも知れない。また、同じ漢方医であっても熟練の度合いあるいは流儀などによる判定の違いもあると思われる。同様の証判定システムに関する報告¹⁴⁾も他に見られているが、この中でもこの証という評価が絶対的なものでないことと、検者間の判定のreproducibilityの問題が述べられている。したがって我々としては、今回使用したシステムにより治療法の選択を行って実際に治療を試み、その有効性からそのシステムの妥

当性を判定してゆくしかないものとする。また、いくつかの証判定システムの優劣の比較という点に関しても興味のあるところではあるが、同様にそれらに従って治療した結果で評価するしかないものと思われる。

さらに、漢方薬の使い分けを行うにあたって今回触れたいくつかの漢方薬は、いずれも従来何らかの形でその有効性が述べられたものばかりであり、これら以外にも有効性を持つものが存在する可能性があるであろう。新たにそれらを発見する努力、さらには既存の薬剤に、たとえば精子運動率に有効な成分を加えるなどしてまったく新しい漢方薬を作り出すなどの試みも考えられるところである。

我々不妊を扱う医師、研究者、漢方医そして漢方薬メーカーなどの協力による今後の進展が望まれるところである。

文 献

- 1) 田代眞一 (1993) 男性不妊と漢方. 産婦治療 67: 424-431
- 2) 吉田英機 (1982) 男性不妊—男性不妊症に対する漢方療法—. 産婦の世界 34: 114-117
- 3) 光川史郎, 木村正一, 石川博夫 他 (1984) 男子不妊症患者に対する補中益気湯の使用経験. 日不妊会誌 29: 458-465
- 4) 高山秀則, 小西 平, 神波照夫 他 (1984) 男性不妊症に対する牛車腎気丸の効果. 泌尿紀要 30: 1685-1689
- 5) 太田博孝, 福島峰子, 児玉英也 他 (1987) 乏精子症に対する補中益気湯の効果. 日不妊会誌 32: 624-629
- 6) 田代眞一 (1988) 補中益気湯の精子運動持続化作用. 漢方医学 12: 13-18
- 7) 風間泰蔵 (1988) 最近の漢方治療の話題 男性不妊. カレントセラピー 6: 1683-1686
- 8) 平松正義, 前原郁夫, 高橋 勝 他 (1993) 男性不妊患者に対する柴胡加竜骨牡蛎湯, 補中益気湯治療の経験. 漢方医学 17: 246-248
- 9) 柴原浩章, 塩谷朋弘, 伊熊健一郎 (1993) 補中益気湯の精子運動機能に対する作用—Penetrak test, hypoosmotic swelling test, computer-assisted semen analyzerによる検討—. 日不妊会誌 38: 654-660
- 10) 大橋正和, 石川博通, 矢内原仁 他 (1994) 男子不妊症に対する牛車腎気丸療法の効果—精液自動分析装置を用いた精液所見. 日不妊会誌 39: 204-209
- 11) Fuse H, Iwasaki M, Kazama T, et al. (1992) Comparative diagnostic markers: cervical mucus penetration test/hypoosmotic swelling test/zona-free hamster penetration test/routine semen analysis. Mol Androl 4: 355-361
- 12) 寺田為義, 里見定信, 風間泰蔵 他 (1985) 男子不妊症の治療成績. 日不妊会誌 30: 481-488
- 13) 萩田善一 (1989) 漢方診療ハンドブック, 医歯薬出版, pp1-126
- 14) 田中大也 (1989) 整形外科医・リウマチ科医・老年科医のための現代漢方医学 第1回 Shorealization Method. Pharma Medica 7 (4): 101-111
(受付:1995年10月19日)
(受理:1996年1月5日)

Relationship between kampo Sho diagnosis using the Jitsu Kyo score system and the effect of Hochu-Ekki-To therapy in male infertility

Taizo Kazama, Tosimitsu Takamine, Ichiro Mizuno, Masashi Iwasaki,
Akiou Okumura, Hideki Fuse and Takashi Katayama

Department of Urology, Toyama Medical and Pharmaceutical University, Toyama 930-01, Japan

In 32 patients with idiopathic male infertility, the Kampo Sho diagnosis (Kyo-Sho, Kyo/Jitsu-Kan-Sho, or Jitsu-Sho) was made using the Jitsu Kyo score system. They were also orally given a herbal medicine, 7.5 g of Hochu-Ekki-To, which is said to be suitable for Kyo-Sho patients, daily for 3 months regardless of the Sho diagnosis. The treatment outcome was compared with the Kampo diagnosis, retrospectively.

1) In a preliminary study, 22.2 % of 54 patients with male infertility was diagnosed as Kyo-Sho, 42.6 % as Kyo/Jitsu-Kan-Sho, and 35.2 % as Jitsu-Sho.

2) The sperm concentration, the sperm swelling rate in the hypoosmotic swelling test, and the penetrak value improved in 67 %, 50 %, and 67 % of the patients diagnosed as Kyo-Sho respectively. They were higher than those of the patients diagnosed as Jitsu-Sho.

3) The improvement rate of the sperm motility was similar between the Kyo-Sho and Jitsu-Sho patients.

These data suggest that if we select Kampo prescription according to the Kampo Sho diagnosis, we can

obtain even better treatment results particularly in the sperm concentration and the sperm function test in patients with idiopathic male infertility.

Key words: idiopathic male infertility, Jitsu Kyo score, Hochu-ekki-to

hMGによる排卵誘発治療時の各種因子の解析： 多胎妊娠発生との関連から

An Evaluation of Clinical Characteristic and Monitored Parameters Associated with Multiple Pregnancy Following Superovulation

旭川医科大学産科婦人科学教室

千石 一雄	高岡 康男	田熊 直之
Kazuo SENGOKU	Yasuo TAKAOKA	Naoyuki TAKUMA
吉田 俊明	玉手 健一	石川 睦男
Toshiaki YOSHIDA	Kenichi TAMATE	Mutsuo ISHIKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology
Asahikawa Medical College, Asahikawa 078, Japan

hMG排卵誘発時の多胎妊娠発生予知に関する諸因子の解析を目的として、単胎妊娠35例と多胎妊娠13例の臨床背景、排卵誘発法に関し比較検討するとともに、超音波断層法による多胎妊娠発生予知が可能か否かに関して検討した。

多胎妊娠、単胎妊娠両群間で年齢、hMG投与量、投与日数には有意差は認められなかった。一方、排卵を有する症例に比し排卵障害例で多胎発生が有意に高率に認められた($p < 0.05$)。また、血中E₂値は両群間で差は認められず、超音波による卵胞数に関しても10 mm以下、11~14 mm、15 mm以上のすべての大きさの卵胞において両群間で卵胞数に有意差は認められなかった。

以上より、卵胞発育モニタリングによる多胎妊娠発生予知は現在のところ困難であり、多胎発生予防には、不妊因子を加味したhMG投与法の個別化などの必要性が示唆された。

キーワード：多胎妊娠、排卵誘発、超音波断層法

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 159 - 163, 1996)

緒 言

近年、ゴナドトロピン(hMG, FSH)による排卵誘発治療は、排卵障害症例のみならず排卵周期を有する機能性不妊、子宮内膜症などによる不妊症例にも汎用されるに至っている。しかし、その副作用として従来より多胎妊娠、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)発生頻度の増加が指摘されており、とくに近年の多胎妊娠による未熟児、低出生体重児出産の増加は全国的なNICUの不足問題とも関連し、社会的にも大きな問題のひとつになってきている。一方、超音波断層装置の飛躍的な進歩により、超音波断層法による詳細な卵胞発育モニタリングが可能となってきたが、発育卵胞数から多胎妊娠発生の予知が可能か否かに関しては相反する報告が認められ、統一した見

解が得られていない。今回、当科不妊外来でゴナドトロピン排卵誘発治療により妊娠が成立した症例を対象とし、単胎妊娠症例と多胎妊娠症例の臨床背景の比較検討から、多胎発生に関与する諸因子ならびに超音波断層法により多胎発生の予知が可能か否かに関して検討した。

対象および方法

1992年4月より1995年3月までの期間に旭川医科大学産婦人科不妊外来においてhMGまたはGnRH agonist(GnRH_a)併用hMG療法により妊娠が成立した48例を対象とした。48例中単胎例は35例、多胎は13例で、内訳は双胎11例、品胎1例、要胎1例である。不妊因子は機能性不妊11例、子宮内膜症4例、卵管因子4例、男性因子4例、多嚢胞性卵巣(PCO)によ

表1 単胎妊娠と多胎妊娠の臨床背景

	単胎	多胎
年齢	29.5 ± 3.7 (22 ~ 36)	28.1 ± 4.2 (23 ~ 36)
不妊期間 (月)	36.8 ± 21.8 (5 ~ 85)	38.8 ± 31.4 (24 ~ 144)
原発性不妊	26	11
続発性不妊	9	2
hMG投与量 (IU)	1369.3 ± 39.0	1288.5 ± 126.1
hMG投与日数	8.1 ± 2.0	8.0 ± 1.7
E ₂ (pg/ml)	1866.3 ± 1108.2	1830.0 ± 523.3

表2 hMG投与量と多胎妊娠率

hMG投与量 (IU)	単胎	多胎
平均hMG投与量 (IU) (range)	1369.3 ± 339.0 (750 ~ 2250)	1288.5 ± 126.1 (600 ~ 2400)
< 1000	5	3 (37.5 %)
1000 ~ 1500	15	6 (28.6 %)
> 1500	15	4 (21.1 %)

る排卵障害例19例, PCO以外の排卵障害例9例である(重複あり).

排卵誘発はhMGとしてパーゴナル®(帝国臓器), FSHとしてフェルティノームP®(セローノジャパン)を用い1日150~300単位を連日投与した. 超音波断層法により卵胞径が16mmを越えた時点でhCG(持田製薬)10,000単位を投与した. また黄体機能賦活を目的としhCG10,000単位投与後隔日にhCG3000単位を2回追加投与した. GnRHa併用hMG療法では酢酸ブセレリン900 μ g(スプレキュア®, ヘキストジャパン)を月経または消退出血後1~2日目より点鼻投与しhMGを3日目より投与するshort protocol, または酢酸ブセレリンを2週間程度投与し下垂体のdown regulationを確認後hMG投与を開始するlong protocolのいずれかを用いた.

卵胞径, 発育卵胞数はhCG投与日の測定値とした. 妊娠の診断, 胎児数の評価は超音波断層法による胎嚢像(GS)の確認とFetal Heart Movement (FHM)が観察された数により判定した. 超音波断層装置は横河RT4800, 5MHzの経陰プローブを使用した. また, 血中estradiol (E₂)の測定はDainabot社製のRIAキットにより測定し, 変動係数はいずれも10%未満であった. 統計学的検討は χ^2 , Fisher's exact testまたはstudent t-testによりp<0.05以下を有意差ありと判定した.

成績

妊娠例48例中hMG単独による妊娠は30例, GnRHa併用による妊娠は18例で多胎妊娠はそれぞれ10例(33.3%), 3例(16.7%)に認められた. 多胎妊娠の内訳は, hMG単独療法で胎胎, 要胎が各々1例でその他は双胎であった. 単胎妊娠例35例, 多胎妊娠例13例の臨床的背景を表1に示した. 両群間で平均母体年齢, 平均不妊期間, 原発性不妊頻度, hMG投与量, 投与日数の平均値およびhCG投与日の血中E₂値に有意差は認められなかった. さらにhMG投与量別の多胎発生頻度の検討においても, hMG投与量と多胎発生の間に相関は認められなかった(表2). 同様に母体年齢を25歳以下, 26~30歳, 31歳以上の3群に分類した検討においても, 母体年齢と多胎発生率に相関は認められなかった(表3). 不妊因子別の多胎発生率の検討では, PCO症例, PCO以外の排卵障害例の多胎妊娠率は各々36.8%(7/19), 44.4%(4/9)

表3 母体年齢と多胎妊娠率

年齢	単胎	多胎	多胎率 (%)
~ 25	7	4	36.4
26 ~ 30	15	7	31.8
31 ~	13	2	13.3
平均年齢	29.5 ± 3.7 (22 ~ 36)	28.1 ± 4.2 (22 ~ 36)	

表4 不妊因子別多胎発生率

不妊因子*	単胎妊娠数	多胎妊娠数	多胎妊娠率 (%)
原因不明	9	2	18.2
子宮内膜症	4	0	0
卵管因子	4	0	0
男性因子	4	0	0
排卵障害	5	4	44.4
		(品胎1 要胎1)	
P.C.O	12	7	36.8

* 重複あり

表5 排卵の有無と多胎率

	排卵 (+)	排卵 (-)	
		排卵障害	P.C.O
症例数	20	9	19
単胎妊娠	18	5	12
多胎妊娠	2	4	7
多胎妊娠率 (%)	10.0*	44.4	36.8
		39.3 *	

* p < 0.05

表6 発育卵胞と多胎発生率

発育卵胞	単胎	多胎
> 15 mm	6.1 ± 2.8 (1 ~ 10)	6.0 ± 2.4 (2 ~ 9)
11 ~ 14 mm	2.8 ± 1.4 (0 ~ 5)	3.5 ± 2.5 (0 ~ 9)
< 10 mm	2.7 ± 2.0 (0 ~ 10)	2.6 ± 2.6 (0 ~ 8)

を示し、他の原因不明不妊18.2% (2/11)、男性因子、子宮内膜症、卵管因子0% (0/4) の多胎妊娠率と比較し高い傾向が認められた(表4)。この成績を排卵障害例と排卵を有する例の2群に大別し比較検討すると多胎妊娠率はそれぞれ39.3% (11/28)、10.0% (2/20) と排卵障害を有する例で多胎発生が有意に高率に認められた (Fisher's exact test p = 0.024, 表5)。超音波断層法による発育卵胞数と多胎発生の検討では、単胎妊娠群と多胎妊娠群との間に15 mm以上の卵胞数、11 ~ 14 mmならびに10 mm以下の卵胞数のいずれにおいても有意差は認められなかった(表6)。

考 察

排卵障害例に対するhMG療法はきわめて有効性の高い治療法であるが、25 ~ 40%程度に多胎発生が生

じると報告されている^{1,2)}。本邦においても多施設の集計から平野らは23.5%³⁾、倉智ら⁴⁾は20.5%の多胎発生率を報告している。また近年、排卵障害例以外の機能性不妊など排卵周期を有する不妊症例に対するhMGによる排卵誘発治療の有用性が報告されるようになり、排卵誘発治療にともなう多胎発生増加の問題は解決すべき重要な課題となってきている。本研究は排卵誘発治療時の多胎妊娠予防の観点から、hMG療法により妊娠が成立した単胎妊娠例と多胎妊娠例の臨床的背景、治療内容を比較し、多胎発生に関与する因子を明らかにするとともに、超音波断層法ならびに血中E₂値による卵胞モニタリングによる多胎発生の予知が可能か否か解析を試みた。

今回の検討では全体の多胎頻度は27.1%と従来の排卵障害例で報告された結果と同様であった。単胎妊娠群と多胎妊娠群の臨床的背景の比較においては、母体年齢、hMG投与量、投与日数と多胎発生との間に相関は認められなかった。また、今回の検討ではhCG投与量は全例で同量であり、多胎妊娠発生とhCG投与量との相関に関しては不明であるが、一般に多胎妊娠発生率とhCG投与量に相関は認められないとする報告が多い。一方、不妊因子に関しての検討では、排卵障害例は排卵を有する機能性不妊、子宮内膜症、男性因子による不妊症例に比し高い多胎発生率を示した。従来のhMG療法による多胎発生率に関する報告の対象は大部分が排卵障害症例であり、排卵を有する症例のhMG療法時の多胎発生率に関する報告は少ない。Dodsonら⁵⁾は排卵の有無、不妊因子の違いにより多胎発生率に相違は認められないと報告している。一方、石原ら⁶⁾は本成績と同様、排卵を有する症例の多胎率は8.8%と無排卵例の39%に比し低値であると述べており、その原因として、排卵を有する例の卵のqualityの問題をあげている。排卵障害例では、主要な不妊要因は排卵障害であり、したがってhMG療法によりその障害が是正され、しかも過排卵が誘起されることにより多胎頻度が増加するものと推測される。一方、排卵を有する例では卵のqualityをはじめ、卵管における卵のpick up、輸送の障害、ならびに着床障害など診断不能種々の要因が不妊原因として複雑に関与している可能性が考えられる。したがって、同様に過排卵を誘起した場合でも個々の卵子の受精率、着床率の低下が推測され、このことが排卵障害症例に比し多胎率が低値を示す一因であると推測される。

血中E₂値のモニタリングによる多胎発生予知に関して、今回の検討では多胎群と単胎群のhCG投与日

の血中E₂値に有意差は認められなかった。E₂値のdoubling timeが短く、指数関数的増加を示す場合、多胎妊娠が発生しやすいとする報告を認めるが、Navotら⁷⁾は多胎妊娠例と単胎妊娠例の血中E₂値の上昇profileは同様であり、hCG投与日の血中E₂値も両群間で差は認められないと報告している。同様に、Ben-Nunら⁸⁾も胎児数と血中E₂値の検討から、E₂最大値およびhCG投与日の血中E₂値と胎児数に有意な相関は認められないと報告している。さらに、血中E₂値が排卵に至らないと考えられる小卵胞を含めた全卵胞のsteroid産生能を反映することを考えあわせれば、現在のところ血中E₂値による多胎妊娠発生の予知は困難であると考えられる。

一方、超音波断層法により観察される発育卵胞による多胎発生の予知の可能性に関しては相反する報告が認められる。Navotら⁷⁾は18 mm以上の卵胞数と多胎発生の相関は認められないが、15～18 mmの中卵胞数が多胎妊娠群では有意に多く、多胎発生の予知に有用であると報告している。一方、Ben-Nunら⁸⁾は卵胞を大きさにより10～12 mm, 13～15 mm, 16～18 mm, 19 mm以上の4群に分類し胎児数との相関を検討した結果、4群のいずれの卵胞数とも胎児数と相関が認められず、さらにNavotら⁷⁾の成績は18 mm以上の卵胞数が3個を越える場合hCG投与を控えており、バイアスがかかっている可能性があるとして述べている。本研究では、10 mm以下, 11～14 mm, 15 mm以上の卵胞数のいずれも多胎群と単胎群で差は認められず、また、卵胞数によりhCG投与を控えた例がないことから超音波による卵胞モニタリングから多胎妊娠発生を正確に予知することは容易ではないものと考えられる。Silverbergら⁹⁾は超音波上の卵胞径15～16 mmの卵胞の排卵率は37.4%, 17 mm以上では70%以上が排卵すると報告している。したがって、超音波によるモニタリングにより排卵卵子数の予測は可能であるものの、排卵した卵子が受精、正常な胚発育を示し、着床に至る過程にはさまざまな要因の関与が考えられ、超音波による排卵卵子数から、これらの諸因子を正確に評価し、その後の胚発育ならびに着床数を予測することは困難であると考えられ、このことが超音波法または血中E₂値による卵胞発育モニタリングによる多胎発生の予知を困難にしている原因と推測される。

以上より、排卵障害例のみならず排卵を有する症

例に対してもhMGによる排卵誘発治療の有用性は高いものと考えられるが、多胎妊娠発生に関しては超音波断層法また血中E₂値からの予測は困難である結果を得た。今後多胎妊娠予防の観点からhMG投与量、投与方法の工夫、hCG投与の回避、さらには、不妊因子を加味した治療法の個別化の重要性が示唆される。

文 献

- 1) Schenker JG, Yarkoni S, Granat M (1981) Multiple pregnancies following induction of ovulation. *Fertil Steril* 35: 105-123
- 2) Schwarts M, Jewelewicz R, Dyrenfurth I, et al. (1980) The use of human menopausal and chorionic gonadotropins for induction of ovulation. *Am J Obstet Gynecol* 138: 801-807
- 3) 平野睦男, 鈴木雅洲 (1977) 本邦におけるhMGによる副作用に関するアンケート調査の集計成績. *臨婦産* 31: 830-834
- 4) 倉智敬一, 鈴木雅洲, 小林拓郎 他 (1980) hMG (Humegon) - hCG療法による排卵誘発効果と妊娠の転機. *産と婦* 47: 1146-1152
- 5) Dodson WC, Hughes CL Jr, Haney AF (1988) Multiple pregnancies conceived with intrauterine insemination during superovulation: An evaluation of clinical characteristics and monitored parameters of conception cycles. *Am J Obstet Gynecol* 169: 382-385
- 6) 石原 理, 飯野好明, 斉藤正博 他 (1994) 排卵を有する不妊婦人に対するhMG療法の有用性に関する検討. *日産婦誌* 46: 221-226
- 7) Navot D, Goldstein N, Mor-Josef S, et al. (1991) Multiple pregnancies: risk factors and prognostic variables during induction of ovulation with human menopausal gonadotrophins. *Hum Reprod* 6: 1152-1155
- 8) Ben-Nun I, Cohen I, Schulman A, et al. (1993) The inability of preovulatory ovarian scan to predict multipfetal pregnancy occurrence in a follow-up of induction of ovulation with menotropins. *Fertil Steril* 60: 781-785
- 9) Silverberg KM, Olive DL, Burns WN, et al. (1991) Follicular size at the time of human chorionic gonadotropin administration predicts ovulation outcome in human menopausal gonadotropin-stimulated cycles. *Fertil Steril* 56: 296-300

(受付: 1995年9月21日)

(受理: 1996年1月8日)

An evaluation of clinical characteristics and monitored parameters associated with multiple pregnancy following superovulation

Kazuo Sengoku, Yasuo Takaoka, Naoyuki Takuma, Toshiaki Yoshida,
Kenichi Tamate and Mutsuo Ishikawa

Department of Obstetrics and Gynecology, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078, Japan

In order to identify clinical characteristics and monitored parameters associated with multiple pregnancy after gonadotropin therapy, we compared 13 multiple pregnancy cycles (11 twins, 1 triplet, 1 quadruplet) with 35 singleton pregnancy cycles.

There were no significant differences in age, duration or amount of human menopausal gonadotropin requirements, serum estradiol concentrations or number and sizes of follicles on the day of human chorionic gonadotropin administration between the two groups. Regarding with the causes of infertility, significantly reduced incidence of multiple pregnancy was observed in ovulatory patients (10.0 %) compared with in anovulatory patients (39.3 %, $p < 0.05$).

This study suggests that monitoring of the follicular development has no predictive value for the occurrence of a multiple pregnancy and each patient should be individually assessed during gonadotropin therapy, especially in anovulatory patients.

Key words: multiple pregnancy, ultrasonography

無精子症における染色体異常の研究

A Cytogenetic Study of Azoospermic Males

東邦大学医学部泌尿器科学第1講座

吉田 淳

Atsumi YOSHIDA

西見大輔

Daisuke NISHIMI

三浦一陽

Kazukiyo MIURA

永尾光一

Koichi NAGAO

原 啓

Hiroshi HARA

白井將文

Masafumi SHIRAI

First Department of Urology

Toho University School of Medicine, Tokyo 143, Japan

不妊を主訴として1987年から1994年までの8年間に当院リプロダクションセンターを受診した無精子症患者401人に主にGバンド染色法による染色体検査を行った。

性染色体異常を57例(14.2%)、常染色体異常を5例(1.3%)、合計62例(15.5%)に染色体異常を認めた。正常変異は9例(2.2%)であった。なおこの9例はすべて9番染色体の腕間逆位であった。性染色体異常は47,XXYが47例と最も多く、ついで46,XX Maleが4例であった。精子形成という点から考えると、46,XX Maleとは47,XXYからAZF遺伝子を引いた状態であると推測された。常染色体異常は全例が構造異常で、異数性のものはなかった。

キーワード：無精子症、染色体異常、46,XX男性、47,XXY、SRY遺伝子

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 164 - 169, 1996)

緒言

絶対不妊症の原因として、男性では47,XXY、女性では45,Xによる染色体異常が多いとされている。今回401例の無精子症患者の染色体検査を行い、無精子症患者での染色体異常の発生頻度ならびにその病態とくに46,XX Maleと47,XXYとの比較について報告する。

対象および方法

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401人を対象とした。

染色体検査は末梢血リンパ球培養によるGバンド染色法を行い、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法を併用した。

精液は5日間以上禁欲の後、外来にて用手的に採取した。精液量を測定した後、精子濃度はThoma血球算定板を用いて測定した。

精巢生検は局所麻酔下に陰嚢部小切開にて採取し

た精巢組織をカルノア液とホルマリン液にて固定しhematoxylin-eosin染色とPAS染色を行った。

精巣容積はオーキドメーターを用いて計測した。

血清FSH、LHはantibody radio immunoassay法を使用して測定し、その正常値は4~42 mIU/ml、2~32 mIU/mlとした。1988年10月からは、血清FSH、LHは、immunoradiometric assayを使用して測定し、正常値は1.8~13.6 IU/ml、1.1~8.8 IU/mlとした。血清testosterone (T)は、double antibody radioimmunoassay法を使用して測定し、正常値は3.0~8.0 ng/mlとした。1989年11月からはRIA tube solid phase法を使用して測定し、正常値は2.7~10.7 ng/mlとした。血清prolactin (PRL)は、double antibody radioimmunoassay法を使用して測定し、正常値は4.4~30.0 ng/mlとした(なお血清PRLの測定はimmunoradiometric assay法に途中で変更していない)。

統計はMacintosh LC475にてExcel 5.0を使用して集計し、統計用ソフトDA-Statsを使用して分析をした。46,XX Male群と47,XXY群との比較は、等分散の検査を行い2群の分散が等しいとみなせるときにはStu-

Table 1 Chromosome abnormalities of 401 infertile men with azoospermia

	No. of patients	Frequency
Sex chromosomal abnormalities	57	14.2 %
Autosomal chromosome abnormalities	5	1.3 %
Total of major chromosome abnormalities	62	15.5 %
Normal variant	9	2.2 %

Table 2 Chromosome abnormalities of 275 infertile men with non-obstructive azoospermia

	No. of patients	Frequency
Sex chromosomal abnormalities	56	20.4 %
Autosomal chromosome abnormalities	3	1.1 %
Total of major chromosome abnormalities	59	21.5 %
Normal variant	4	1.5 %

dent's t-testを用い、2群の分散が明らかに異なるときにはWelch's t-testを用いた。

結 果

401例の無精子症の染色体異常の発生頻度はTable 1のように、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%)であった。正常変異は9例(2.2%)であった。なおこの9例はすべて9番染色体の腕間逆位であった。

精巣組織の所見、精管精囊造影、中間尿中精子の有無により、閉塞性無精子症88例(先天性精管欠損18例を含む)、完全逆行性射精8例、不明30例、閉塞性を除いた無精子症275例に分類した。

275例の閉塞性を除いた無精子症の染色体異常の発生頻度はTable 2のように、性染色体異常が56例(20.4%)、常染色体異常が3例(1.1%)、合計59例(21.5%)であった。正常変異は4例(1.5%)であった。なおこの4例はすべて9番染色体の腕間逆位であった。

Table 3に性染色体異常の内訳を示す。47,XXYが43例認められたがモザイクは1例もなく、1例は9番染色体の腕間逆位が合併したものであった。

表現型は男性型だが、染色体の核型は女性型の46,XX Maleを4例認めた。その中の1例は16番染色体の短腕の延長をともなっていた。Sex-determining region of the Y chromosome (SRY) 遺伝子が、どの染色体上にあるのかの検索は行っていない。4例全例に精巣生検を行ったが、2例はSertoli cell only、2例はSertoli cellも消失していた。Fig. 1に46,XX Maleの精巣組織を示した。精細管の構造は認められるが、すべての精細管でgerm cellとSertoli cellは見られず硝子化していた。

Y染色体の構造異常を6例で認めたが、モザイクも

Table 3 Sex chromosomal abnormalities

Karyotype	No. of patients
47,XXY	42
47,XXY,inv (9) (p11q13)	1
46,XX	3
46,XX,16p+	1
46,X,dic (Y) (pter→q11::q11→pter)	2
45,X/46,X,dic (Y)	1
46,X,inv (Y) (p11q11)	1
46,X,t (Yq+;1q-)	1
46,X,+ marker (FISH; DYZ 1-, DYZ 3+)	1
46,X,+ marker	3
45,X/46,XY	1

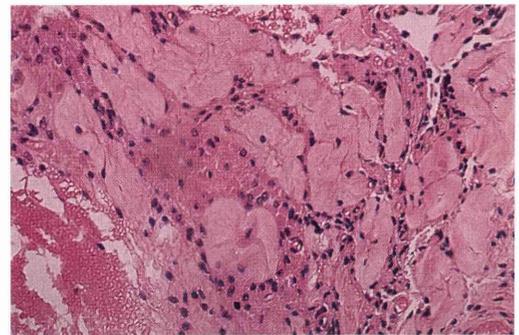


Fig. 1 A photograph of a testicular specimen with 46,XX male shows Leydig cells only. Hematoxylin-eosin, OM × 200.

含めると3例が46,X,dic (Y)であった。Y染色体の腕間逆位を1例で認めたが、他院にて行われた精巣生検の結果はmild hypospermatogenesisであり、血清ホルモン値正常、精巣容積も正常、精管精囊造影も正

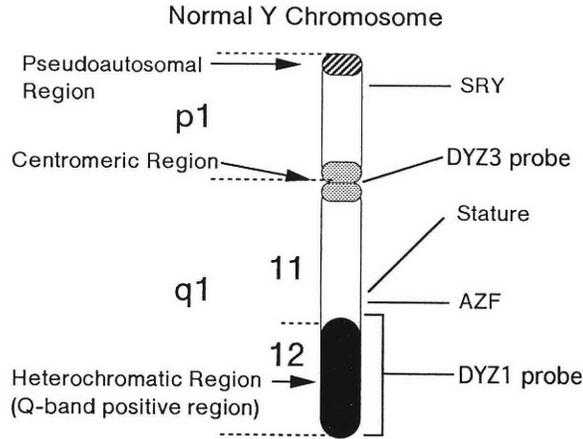


Fig. 2 The position of the pseudoautosomal region, the sex-determining region of the Y chromosome (SRY), the azoospermic factor gene (AZF), the DYZ1 probe, and the DYZ3 probe are shown.

常で、精巣上体レベルの閉塞性無精子症と診断した。Y染色体長腕と1番染色体長腕との相互転座を1例認めたが、この染色体異常は性染色体と常染色体間の転座で非常にまれな異常であった。また46,X,+markerでY染色体長腕のQ蛍光陽性部が陰性、FISH法にてDYZ1陰性、DYZ3陽性のものを1例認めた(Fig. 2にDYZ1とDYZ3プローブのY染色体上の位置を示した)。この症例の精巣生検の結果はSertoli cell onlyであった。また46,X,+markerをあと3例で認めたが3例全例でY染色体長腕のQ蛍光陽性部が陰性であったが、DYZ1とDYZ3プローブによるFISH法は行っていない。3例とも精巣生検の結果はSertoli cell onlyであった。

45,X/46,XYを1例認めたが、モザイクの割合は

8:17であった。精巣容積は右5ml、左6mlで、精巣生検の結果はSertoli cell onlyであった。腹腔内の検索は行っていない。

Table 4に常染色体異常の内訳を示す。5例全例が構造異常で、異数性のものはなかった。3番と14番染色体との相互転座が1例、1番染色体の腕間逆位が

Table 4 Autosomal chromosome abnormalities

Karyotype	No. of patients
46,XY,t(3;14)(p13;q13)	1
46,XY,inv(1p+q-)	1
46,XY,inv(9)(p11q13),inv(11)(p14q11)	1
46,XY,r(15)	1
46,XY,r(21)	1

Table 5 Clinical and endocrine features of 47,XXY and 46,XX Male

	47,XXY* (n = 31)	46,XX Male* (n = 4)	Significance
Age	32.9 ± 4.0	33.3 ± 5.0	NS †‡
Ejaculative volume (ml)	2.1 ± 1.4	3.7 ± 1.9	P<0.05 ‡
FSH (mIU/ml)	45.3 ± 18.5	45.4 ± 1.2	NS †‡
LH (mIU/ml)	18.4 ± 8.4	19.1 ± 0.3	NS †§
PRL (ng/ml)	19.5 ± 16.3	20.1 ± 8.1	NS †‡
T (ng/ml)	2.65 ± 1.23	3.12 ± 0.68	NS †‡
Right testis volume (ml)	3.2 ± 1.2	4.0 ± 1.2	NS †‡
Left testis volume (ml)	3.2 ± 1.2	3.5 ± 1.0	NS †‡

* Volumes are Means ± S.D.

† NS, not significant.

‡ Student's t-test.

§ Welch's t-test.

Number of 46,XX Male's FSH, LH and T are two.

1例, 11番染色体の腕間逆位が1例, ヘテロの15番のリング染色体が1例, ヘテロの21番のリング染色体が1例であった。

現行法によるホルモン検査が行われていた1989年11月以降の31例の47,XXYの血清FSHは全例が上昇, 血清LHは27例が上昇, 4例が正常, 血清PRLは6例が上昇, 25例が正常, 血清テストステロンは18例が低下, 13例が正常であった。テストステロン低下症例でテストステロンの補充療法が行われた症例はなかった。

47,XXY群31例と46,XX Male群4例とを比較すると(Table 5)年齢には有意差を認めなかったが, 精液量は46,XX Male群で有意に多かった。つぎに血清FSH, LH, PRL, Tは両群間で有意差を認めなかった(46,XX Male群の血清FSH, LH, PRL, Tについては現行法でホルモン検査が行われていた2例のみを対象とした)。左右の精巣容積は両群間で有意差を認めなかった。

考 察

今回の我々の検討では, 無精子症の患者401例中,

性染色体異常を57例(14.2%)に, 常染色体異常を5例(1.3%)に, 合計62例(15.5%)に染色体異常を認めしたが, その中で47,XXYが染色体異常の69.4%を占めた。無精子症の患者の染色体異常の発生頻度(正常変異を除く)についてTable 6のような報告^{1)~11)}がある。今回の結果も含めて, これらの報告をまとめてみると性染色体異常を14.9%, 常染色体異常を1.2%, 合計16.1%に染色体異常を認めた。無精子症における染色体異常は性染色体異常が全体の92.5%を占め, 常染色体異常はまれであった。

つぎに無精子症患者(閉塞性を除いた)の染色体異常の発生頻度については, 今回の結果以外に近藤ら¹²⁾の報告がある。Table 7に今回の結果を含めた閉塞性を除いた無精子症患者における正常変異を除いた染色体異常の発生頻度をまとめた。性染色体異常を19.2%に, 常染色体異常を1.1%に, 合計20.3%に染色体異常を認めた。閉塞性を除いた無精子症の患者では約5人に1人が染色体異常であるという結果であった。

Nagafuchiら¹³⁾は無精子症患者の中で, 染色体にはまったく異常を認めない例の約13%にY染色体長腕

Table 6 Major chromosome abnormality of infertile men with azoospermia in different informative surveys

Reporter	Year	Banding	No. of Patients	Sex chromosomal abnormalities	Autosomal abnormalities	Total
Dutrillaux ¹⁾	1982	0/R	278	33 (11.9%)	4 (1.4%)	37 (13.3%)
Chandley ²⁾	1975	0/Q,C,G	108	17 (15.7%)	2 (1.9%)	19 (17.6%)
Croquette ³⁾	1980	R	69	11 (15.9%)	0 (0%)	11 (15.9%)
Faed ⁴⁾	1979	0/G	34	2 (5.9%)	0 (0%)	2 (5.9%)
Kjessler ⁵⁾	1972	0	190	39 (20.5%)	1 (0.5%)	40 (21.1%)
Laurent ⁶⁾	1973	0	36	5 (13.9%)	1 (2.8%)	5 (16.7%)
Taillemite ⁷⁾	1979	R/G	33	7 (21.2%)	0 (0%)	7 (21.2%)
Bourrouillou ⁸⁾	1985	G (Q)	383	54 (14.1%)	5 (1.3%)	59 (15.4%)
Hori ⁹⁾	1987	?	85	21 (24.7%)	2 (2.4%)	23 (27.1%)
Tachiki ¹⁰⁾	1991	?	153	26 (17.0%)	2 (1.3%)	28 (18.3%)
Matsuda ¹¹⁾	1992	G	154	14 (9.1%)	2 (1.3%)	16 (10.4%)
This study	1995	G (Q,C)	401	57 (14.2%)	5 (1.3%)	62 (15.5%)
Total			1,924	286 (14.9%)	24 (1.2%)	310 (16.1%)

Table 7 Major chromosome abnormality of infertile men with non-obstructive azoospermia in different informative surveys

Reporter	Year	Banding	No. of Patients	Sex chromosomal abnormalities	Autosomal abnormalities	Total
Kondoh	1992	G (Q)	85	13 (15.3%)	1 (1.2%)	14 (16.5%)
This study	1995	G (Q,C)	275	56 (20.4%)	3 (1.1%)	59 (21.5%)
Total			360	69 (19.2%)	4 (1.1%)	73 (20.3%)

上にある精子形成を支配する azoospermic factor (AZF) 遺伝子の欠失が見られると報告しており、今後は DNA レベルまで含めた染色体検査の必要があると考えられた。

46,XX Male を無精子症患者中 4 例 (1.0%) に認めたが、諸外国の報告¹⁴⁾によると 46,XX Male の発生頻度は男子新生児 1 万 7 千人あたり 1 人であるとされており、本邦での前田ら¹⁵⁾の報告では男子新生児 7,608 人中 0 人であった。この染色体異常では表現型は男性であるが、染色体の核型は 46,XX と女性型のもので、本来 Y 染色体の短腕上にある sex-determining region of the Y chromosome (SRY) 遺伝子¹⁶⁾が、X 染色体上または常染色体上に座位しているものである。SRY 遺伝子は pseudoautosomal region (PAR) のすぐ横にあるため、PAR の部分で減数分裂の時にキアズマが形成され SRY 遺伝子が X 染色体上に移ったものが原因としては最も多いとされている¹⁷⁻²¹⁾ (Fig. 2)。SRY 遺伝子は intronless の構造で、204 個のアミノ酸によるタンパクをコードしており、DNA-binding motif として作用する HMG-box を有している²²⁾。精巣決定因子 TDF (Testis Determining Factor) は、Y 染色体上のみが存在するのではなく、ヒトゲノム中に精巣決定因子が複数有り SRY 遺伝子は性腺決定の過程で精巣決定因子群の機能の発現をコントロールしているとされている。しかし TDF 群があるだけでは精巣化されず性腺の精巣への分化には、ホルモン (Leydig 細胞による testosterone) とホルモン様物質 (Sertoli 細胞による抗ミューラー管物質) が必要とされている。今回の 4 例の 46,XX Male は全例で萎縮しているが精巣を陰嚢内で触知しており、性腺の精巣への分化はほぼ正常に行われたと考えられた。しかし、精巣生検の結果は 2 例が Sertoli cell only, 2 例が Sertoli cell も消失しており、X 染色体が 2 本あることに加えて AZF 遺伝子も欠失している可能性が強いため精子形成が障害されていると推測された。Table 5 のように 47,XXY 群と 46,XX Male 群とを比較してみると精液量は 46,XX Male 群が多いという結果であったが、他の臨床的ならびに内分泌学的所見に有意差は認められなかった。以上の結果より、精子形成という観点から見ると 46,XX Male とは 47,XXY から AZF 遺伝子を引いた状態であると推測された。

文 献

1) Dutrillaux B, Rotman J, Gueguen J (1982) Chromosomal factors in the infertile male. In: Liberto JA (ed), Williams and Wilkins, Baltimore and

London, pp89-102

- 2) Chandley AC, Edmond P, Christie S, et al (1975) Cytogenetics and infertility in man. I. Karyotype and seminal analysis: results of a five-year survey of men attending a subfertility clinic. *Annals of Hum Genet* 39: 231-254
- 3) Croquette MF, Fourlinnie JC (1980) Interet du caryotype dans les azoospermies et les oligoasthenospermies severes. *J Gyn Biol Repr* 9: 177-178
- 4) Faed MJ, Robertson J, Lamont MA, et al. (1979) Cytogenetic survey of men being investigated for subfertility. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 209-216
- 5) Kjessler B (1972) Facteurs genetiques dans la subfertilité male humaine. Paris, Acquisitions: 205-225
- 6) Laurent C, Papatthanassiou Z, Haour P, et al. (1973) Facteurs genetiques dans la sterilité masculine. *Lyon Med* 229: 883-887
- 7) Taillemite JL, Marmor D, Delafontaine D, et al. (1979) The correlation between the results of karyotype studies and sperm counts. 119 cases. *Journal de Gynecologie, Obstetrique et Biologie de la Reproduction* 8: 293-298
- 8) Bourrouillou G, Dastugue N, Colombies P (1985) Chromosome studies in 952 infertile males with a sperm count below 10 million/ml. *Hum Genet* 71: 366-367
- 9) 堀 夏樹, 山本逸夫, 林 宜男 他 (1987) 無精子症における染色体異常の検討. *泌尿紀要* 33: 187-192
- 10) 立木 仁, 熊本悦明, 斉藤藤一 他 (1991) 男性不妊症における染色体異常の検討. *日不妊会誌* 36: 157-164
- 11) 松田公志, 堀井泰樹, 小倉啓司 他 (1992) 男性不妊症における染色体異常頻度と染色体異常症例の臨床的検討. *泌尿紀要* 38: 803-809
- 12) 近藤宜幸, 目黒則男, 清原久和 他 (1992) 男性不妊症における染色体異常の研究. *日泌尿会誌* 83: 1442-1447
- 13) Nagafuchi S, Namiki M, Nakahori Y, et al. (1993) A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. *Journal of Urology* 150: 1155-1157
- 14) Nielsen J, Sillesen I. (1975) Incidence of chromosome aberrations among 11,148 newborn children. *Hum Genet* 30: 1-12
- 15) Maeda T, Ohno M, Matsunobu A, et al. (1991) A cytogenetic survey of 14,835 consecutive live-borns. *Jap J Hum Genet* 36: 117-129
- 16) Su H, Lau YF (1993) Identification of the tran-

- scriptional unit, structural organization, and promoter sequence of the human sex-determining region Y (SRY) gene, using a reverse genetic approach. *Am J Hum Genet* 52: 24-38
- 17) Page DC, Brown LG, de la Chapelle A, et al. (1987) Exchange of terminal portions of X- and Y-chromosomal short arms in human XX males. *Nature* 328: 437-440
- 18) Andersson M, Page DC, de la Chapelle A, et al. (1986) Chromosome Y-specific DNA is transferred to the short arm of X chromosome in human XX males. *Science* 233: 786-788
- 19) Petit C, de la Chapelle A, Levilliers J, et al. (1987) An abnormal terminal X-Y interchange accounts for most but not all cases of human XX maleness. *Cell* 49: 595-602
- 20) Müller U, Lalande M, Donlon T, et al. (1986) Moderately repeated DNA sequences specific for the short arm of the human Y chromosome are present in XX males and reduced in copy number in an XY female. *Nucleic Acids Res* 14: 1325-1340
- 21) Affara NA, Ferguson SM, Tolmie J, et al. (1986) Variable transfer of Y-specific sequences in XX males. *Nucleic Acids Res* 14: 5375-5387
- 22) Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244
(受付: 1995年12月4日)
(受理: 1996年1月9日)

A cytogenetic study of azoospermic males

Atsumi Yoshida, Kazukiyo Miura, Hiroshi Hara, Daisuke Nishimi,
Koichi Nagao and Masafumi Shirai

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

The subjects consisted of 401 azoospermic males who visited the Reproduction Center of Toho University Hospital with the chief complaint of infertility during the eight-year period between January 1987 and December 1994.

Karyotyping was conducted by analysis of G-banding using the peripheral blood lymphocyte culture technique. Major chromosome abnormalities were observed in 62 patients (15.5 %) in total, and consisted of sex chromosome abnormalities in 57 patients (14.2 %) and autosomal chromosome abnormalities in 5 patients (1.3 %). An inversion chromosome 9 was observed as a normal variant in 9 patients (2.2 %). Among the sex chromosome abnormalities, 43 cases were 47,XXY and 4 cases were 46,XX Male. From the viewpoint of spermatogenesis, we surmised that the 46,XX Male had resulted from the loss of AZF from 47,XXY. All autosomal chromosome abnormalities were structurally abnormal.

Key words: azoospermia, chromosome abnormality, 46,XX Male, 47,XXY, SRY gene

体外受精・胚移植における子宮動脈循環と 子宮内膜の胚受容能に関する検討

Uterine Blood Flow Assessed by Transvaginal Color Doppler: A Possible Predictor of Uterine Receptivity in In Vitro Fertilization and Embryo Transfer

中通総合病院産婦人科

内海 透

Tohru UTSUMI

Department of Obstetrics and Gynecology
Nakadoori General Hospital, Akita 010, Japan

秋田大学産科婦人科学教室

児玉英也

Hideya KODAMA

福田 淳

Jun FUKUDA

軽部裕子

Hiroko KARUBE

田中俊誠

Toshinobu TANAKA

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

体外受精・胚移植において着床に関する知見は十分には得られていない。本研究は、着床の成立を予知するうえで、胚移植前の子宮動脈系血流環境がどの程度の意義を有しているのかを前方視的に明らかにすることを目的とした。

対象は、形態良好な4細胞期卵を2個移植した34周期(妊娠成立群; P群13例, 妊娠非成立群; NP群21例)の体外受精・胚移植実施例であり、胚移植前日の子宮動脈上行枝のpulsatility index (PI) を検討項目とした。

その結果、1) P群およびNP群の子宮動脈PI値はそれぞれ、 2.86 ± 0.75 および 3.33 ± 0.63 であり、P群で有意に($p < 0.05$)低値を示した。2) 子宮動脈PI値が3.0未満の場合の妊娠率が75%であるのに対し、3.0を超えた場合の妊娠率は18%であり、両群間で有意差($p < 0.01$)を認めた。3) 子宮動脈PI 3.0をカットオフ値とすると、PI値が3.0を超えた場合、sensitivity 82%, specificity 75%で妊娠は成立せず、胚移植には適さない子宮環境であると考えられた。

キーワード: 経腔カラードプラ法, 子宮動脈循環, 胚受容能

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 170 - 173, 1996)

緒言

着床は、受精卵が正常な発育を遂げて胞胚期に達した受精後6~7日目に、卵巣ホルモンの影響下で着床準備状態にある子宮内膜上皮と接着を開始した時に始まる。その後、胞胚は子宮内膜上皮を貫通、

間質内に侵入し、子宮壁との間に器質的な結合が成立する。この一連の過程は、受精卵と子宮内膜の複雑な相互作用と協調作用によって遂行されと考えられている。

しかし、着床現象に関する十分な知見はいまだに得られていない。胚培養技術の進歩にとともに多く

の症例で形態良好胚が得られるようになったが、子宮内膜の胚受容能に関する情報は皆無に等しく、生殖医学におけるブラックボックスになっている。毎年、膨大な数の不妊カップルがIVF-ET治療を受けるようになった昨今、着床率の上昇は重要な課題である。患者側、医療側がともに苦心して得た受精卵の移植の場が、はたして着床に適した子宮環境なのか否かを事前に予知することは重要であるが、この点に関しての十分な情報はない。胚移植の時点で、ある程度妊娠の成立に寄与する臨床的な因子と考えられているのは、現時点では、子宮内膜の厚さ^{1,2)}など、わずかなものである。

近年、産婦人科領域に超音波カラードブラ法が導入され、種々の生理的あるいは病態生理的現象を、循環動態の面から解明しようとする試みがなされている。生殖医学の領域にも応用されてきており、着床現象に関連した論文も認められるようになった。本研究は、着床の成立を予知するうえで、胚移植前の子宮動脈循環が、どの程度の意義を有しているのかを、前方視的に明らかにすることを目的とした。

対象および方法

1. 対象

秋田大学付属病院産婦人科において、1995年2月から6月までにIVF-ETを行った症例のうち、形態が良好な4細胞期卵(我々の分類³⁾におけるgrade A)を2個移植した34周期を対象とした。対象の平均年齢は33.2歳(範囲26~36歳)、平均不妊期間は6.2歳(範囲1~12年)であった。37歳以降では、妊娠率が極端に低下する³⁾ため、今回の検討は37歳未満の症例に限定した。対象者には、あらかじめ本研究の趣旨を十分説明し、同意を得た。症例の背景を表1に示した。

2. 方法

IVF-ETは、以前に報告した方法⁴⁾によって行った。卵巣刺激法は、主としてgonadotropin-releasing hormone agonist(酢酸ブセレリン)とhuman menopausal gonadotropin(hMG)の併用によるlong protocol⁵⁾に従って行い、hMGに対する反応不良例にはshort protocol⁵⁾を採用した。hMGは、月経周期の2日目から1日150~300 IUを、患者の反応に応じて連日筋肉内投与(筋注)した。経腔超音波断層法により、最大卵胞径が18 mmに達した段階でhuman chorionic gonadotropin(hCG)に切り替え、10000 IUを筋注した。hCG投与後34時間で、経腔超音波断層法を用いて採卵を行った。採卵から約一時間後に媒精を行い、媒精20時間後に受

精を確認した。今回の対象症例では、媒精48時間後に、形態が良好な4細胞期卵を2個、移植用カテーテルを用いて子宮腔内に移植した。移植当日および7日目に、黄体ホルモン(カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン125 mg)の筋注によるluteal supportを行った。

すべての対象患者に対し、胚移植16~20時間前に、経腔超音波カラードブラ法(Aloka SSD-2000およびAloka UST-980P-5.5 MHzプローベを使用)を施行した。両側の子宮動脈上行枝を描出し、パルスドブラ法による血流速度波形からPulsatility index (PI)を算出し、左右の平均値をとって統計処理に供した。なお、測定手技によるばらつきを回避するため、血流計測はすべて同一検者が行った。

胚移植から3週間後に経腔超音波断層法を行い、子宮内に胎嚢を認めた場合に妊娠成立と判断した。妊娠率は、妊娠成立数を対象総数で除した値とした。

統計解析は、Mann-Whitney U検定および χ^2 検定により行った。

結 果

1) 対象34例中13例(38.2%)に妊娠が成立した。いずれも単胎であった。妊娠成立群(P群, 13例)と妊娠非成立群(NP群, 21例)の胚移植前日の子宮動脈PIは、それぞれ 2.86 ± 0.75 および 3.33 ± 0.63 であり、P群で有意に($p < 0.05$)低値を示した(表2)。

2) 子宮動脈のPI値によって患者を分類し、それぞれのPIにおける妊娠率を表3に示した。PIが3.0未満

表1 臨床的背景

年齢(歳)	32.9 ± 2.7 (範囲26~36歳)
不妊期間(年)	6.2 ± 3.3 (範囲1~12年)
体外受精の適応	
卵管因子	15
男性因子	6
子宮内膜症	5
原因不明	8

Mean ± S.D.

表2 妊娠成立群と妊娠非成立群との比較

	妊娠成立群	妊娠非成立群
症例数	13	21
年齢(歳)	33.9 ± 1.6	32.3 ± 3.1
hMG総投与量(IU)	1979 ± 464	1864 ± 505
採卵個数	6.7 ± 4.2	7.4 ± 3.3
子宮動脈PI	2.86 ± 0.75*	3.33 ± 0.63

* $p < 0.05$

Mean ± S.D.

表3 各子宮動脈PI値における妊娠率

子宮動脈PI値	妊娠率
2.0 < PI ≤ 2.5	6 / 7 (86%)
2.5 < PI ≤ 3.0	3 / 5 (60%)
3.0 < PI ≤ 3.5	2 / 11 (18%)
3.5 < PI	2 / 11 (18%)

*p < 0.01

の場合には75%に妊娠が成立したが、3.0を超えた場合の妊娠率は18%であり、両群間に有意差(p < 0.01)を認めた。

3) 子宮動脈PI 3.0をカットオフ値とすると、PI値が3.0を超えた場合、sensitivity 82%, specificity 75%で妊娠の成立は否定的であった。

考 察

生殖医学が高度に発達した今もなお、着床現象に関しては、不明な点が多い。とくにヒトにおいては研究の制約があって、in vitroの手法や動物実験などに頼らざるをえないなどの事情から、その解明が遅れている。

Assisted reproductive technologyの発達にともない、体外受精症例の多くに受精卵が得られるようになったが、子宮内膜の胚受容能に関する情報は乏しい。胚受容能を推測するうえで、ある程度有用と考えられている臨床レベルの情報は、子宮内膜の厚さ^{1,2)}などごくわずかなものである。しかし、最近、経膈超音波カラードブラ法によって非侵襲的に子宮・卵巣の血行動態を解析し、ヒトの着床現象の解明に応用しようとする試みがなされるようになった。

Goswamy et al.⁶⁾は、過去3回IVF-ETを実施したが妊娠が成立しなかった153例について子宮動脈上行枝の血流計測を行ったところ、その48%に黄体期中期の子宮循環障害を認めたと報告している。Sterzik et al.⁷⁾は、体外受精周期においてP群12例とNP群33例の採卵時の子宮動脈のresistance indexを比較し、P群で有意に低値であったと述べている。Fujino et al.⁸⁾は、73例の自然周期の子宮動脈の血流速度波形を観察し、P群6例は、NP群67例に比べ、排卵期のPIが有意に低値であったと報告している。

以上のように、体外受精周期においても自然周期においても、P群はNP群に比べ、子宮循環が良好であったとする報告が散見される。子宮動脈血流については、主に卵巣ホルモンである血清E₂との関連において研究が進められてきた。Weiner et al.⁹⁾は、子宮動脈PI値と血清E₂濃度との間には負の相関があると

述べ、Goswamy et al.⁶⁾、Tinkanen et al.¹⁰⁾もこれと類似の成績を報告している。一方、Fujino et al.⁸⁾、Steer et al.¹¹⁾は、子宮動脈血流とE₂の間にはとくに相関はなかったと述べている。このように、子宮循環と血清E₂との関連については、まだ一定の見解は得られていない。また、最近になって、着床現象には、細胞外マトリックスや成長因子、各種のサイトカインなどが影響を及ぼしていることが明らかにされつつあるが、今後、これらの因子の子宮内膜における局在と子宮動脈循環との因果関係を解明していく必要があろう。

今回の我々の検討によれば、体外受精周期において、胚移植前日の子宮動脈PI値が3.0未満の場合、妊娠率が75%に達したのに対し、PI値が3.0を超える症例での妊娠率は18%であり、両群間に有意差(p < 0.01)を認めた。Steer et al.¹¹⁾は、体外受精2周期において、移植直前の子宮動脈PIが3.0を超えた場合、妊娠が成立した症例は一例もなかったと報告している。今回の我々の成績ときわめて類似しており興味深い。

我々の成績およびSteer et al.¹¹⁾の成績から、体外受精周期においては、胚移植前日あるいは直前の子宮動脈循環の良否は着床の成立に重大な意義を有しているものと推察される。子宮動脈PIが3.0を超えるような循環不全の周期には、子宮内膜の胚受容能は不良であり、移植には適さないと考えられる。個々の症例について慎重な検討を要するが、胚移植前の子宮動脈PI値が3.0を超えるような循環不全の周期には、移植を見合わせて胚を凍結保存し、循環の良好な周期に移植を行うなどの方法も検討されるべきであろう。さらに、将来的には、このような症例に対して子宮動脈循環を改善する何らかの薬剤を投与するなど、より積極的な治療法の確立が期待される。子宮動脈血流速度波形の解析は、子宮内膜の胚受容能の有力な評価法になり得ると考えられる。

文 献

- 1) 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
- 2) Smith B, Porter R, Ahuja K, et al. (1984) Ultrasonic assessment of endometrial changes in stimulated cycles in an in vitro fertilization and ET program. *J In Vitro Fert Embryo Transfer* 1: 233-238
- 3) 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
- 4) 児玉英也, 加藤充弘, 福田 淳 他 (1991) 秋田大学における体外受精, 1988~1990年の成績. *秋田医学* 18: 391-397
 - 5) Frydman R, Forman R, Belaisch-Allart J, et al. (1988) Comparizon between flare up and down regulation effects of lutenizing hormone-releasing hormone agonists in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 50: 471-475
 - 6) Goswamy RK, Williams G, Steptoe PC (1988) Decreased uterine perfusion - A cause of infertility. *Human Reprod* 3: 955-959
 - 7) Sterzik K, Grab D, Sasse V, et al. (1989) Doppler sonographic findings and the correlation with implantation in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 52: 825-828
 - 8) Fujino Y, Ito F, Matsuoka I, et al. (1993) Pulsatility index of uterine artery in pregnant and non-pregnant women. *Human Reprod* 8: 1126-1128
 - 9) Weiner Z, Thaler I, Levron J, et al. (1993) Assessment of ovarian and uterine blood flow by transvaginal color Doppler in ovarian-stimulated women: correlation with number of follicles and steroid hormone levels. *Fertil Steril* 59: 743-749
 - 10) Tinkanen H, Kujansuu E, Laippala P (1995) The association between hormone levels and vascular resistance in uterine and ovarian arteries in spontaneous menstrual cycles - A Doppler ultrasound study. *Acta Obstet Gynecol Scand* 74: 297-301
 - 11) Steer CV, Campbell S, Tan SL, et al. (1992) The use of transvaginal color flow imaging after in vitro fertilization to identify optimum uterine conditions before embryo transfer. *Fertil Steril* 57: 372-376

(受付: 1995年9月19日)

(受理: 1996年1月12日)

Uterine blood flow assessed by transvaginal color Doppler: A possible predictor of uterine receptivity in in vitro fertilization and embryo transfer

Tohru Utsumi

Department of Obstetrics and Gynecology, Nakadoori General Hospital, Akita 010, Japan

Hideya Kodama, Jun Fukuda, Hiroko Karube and Toshinobu Tanaka

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

We performed the study to clarify the hypothesis that poor uterine blood flow is a cause of failure of implantation of embryos.

In 34 infertile women from an in vitro fertilization (IVF) program, the uterine arterial pulsatility indices (PI) were measured by transvaginal color Doppler sonography one day before embryo transfer (ET).

The mean PI values (\pm SD) were 2.86 ± 0.75 who became pregnant ($n = 13$) and 3.33 ± 0.75 who failed to conceive ($n = 21$), respectively, showing a significant difference ($p < 0.05$). When the patients were grouped according to whether the PI was low (< 3.0) or high (≥ 3.0), significantly higher pregnancy rate was observed in the low PI group than in the high PI group (75 % and 18 %, respectively; $p < 0.01$). These data support the hypothesis that the poor uterine blood flow is a cause of infertility. The results of this study suggest that the uterine PI value could be a useful parameter to evaluate the uterine receptivity.

Key words: transvaginal color Doppler, uterine blood flow, uterine receptivity

簡便化体外受精胚移植 (IVF-ET) システムの有用性

Evaluation of Simplified IVF-ET System

立川病院産婦人科

原 唯 純

Izumi HARA

木 村 裕 幸

Hiroyuki KIMURA

吉 永 明 里

Akari YOSHINAGA

大 山 俊 雄

Toshio OOOYAMA

佐 藤 博 久

Hirohisa SATO

Department of Obstetrics and Gynecology

Tachikawa Hospital, Tokyo190, Japan

東京歯科大市川病院産婦人科

兼 子 智

Satoru KANEKO

Department of Obstetrics and Gynecology

Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital, Chiba 272, Japan

明治薬科大学学生化学教室

松 田 兆 史

Yoshifumi MATSUDA

秋 浜 澄 行

Sumiyuki AKIHAMA

Department of Biochemistry

Meiji College of Pharmacy, Tokyo 158, Japan

我々は以前より体外受精胚移植をいかに簡便化するか考え実践してきた。すなわち、体外受精胚移植 (IVF-ET) における、排卵誘発・モニタリングの画一化、IVF用ユニットの改良、ディスプレイ製品、市販品の使用などにより、一般臨床の中にIVF-ETを組み込むことが可能となった。

この簡便化体外受精胚移植システムでの成績は、初年が対周期あたり11.1%、対胚移植14.3%、2年目では対周期あたり16.7%、対胚移植25.0%であった。

この結果から、この方法でのIVF-ETは、従来行われてきたIVF-ETと同等の結果が得られるものと考えられた。今後、婦人科腫瘍や産科診療と並列して不妊症診療を行う施設での少数例IVF-ETとしても、小規模臨床施設でのIVF-ETとしても本法でのIVF-ETで対応できるものとする。

キーワード：体外受精・胚移植，オオサイトハンドリングチャンバー，ペントキシフィリン，精子凍結保存
(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 174 - 177, 1996)

緒 言

不妊症治療において、今やIVF-ETは手技的には確立したものとなっており、今後は従来のAIHのように一般的な手技となっていくものと考えられる。しかしIVF-ETを実施するためには、1) 胚培養設備の設

営にかなりの費用を要する、2) 採卵に多くの人手を必要とする、3) 排卵誘発・モニタリングに日常臨床の時間をとられるなど、多くの問題点を有している。我々はIVF-ETが一般臨床として広汎に行われるためには、採卵、培養設備の改善、とくに機器の性能向上と操作の簡易化が不可欠と考えた。これがIVF-ET

が一般臨床に組み込まれない理由であると考え、以前から個々の問題について考え装置の改良などを行い報告した^{1,2)}。すなわち、1) IVF-ETの設備費用の軽減を計り、また設備の性能を向上させることにより取り扱う人による成績のばらつきを少なくした。2) 排卵誘発、モニタリングを画一化することにより日常外来診療における繁雑さを軽減した。3) 採卵は、基本的にはひとりで可能な装置設計としたことにより外来診療、手術、分娩などのルーチンワークに支障のないよう人的配置に気を遣う必要がなくなった。このような改良を加えた装置と方法によりIVF-ETを行った結果、従来からの方法での成績りと比べ同等の成績を得たので報告する。

対 象

1993年2月から1994年12月までに、立川病院婦人科において27例に対し、十分な説明のもとにIVF-ETを行った。適応の内訳を表1にまとめた。

表1 IVF-ETの適応

女性因子		男性因子	(例)
卵管因子	2	乏精子症	2
子宮奇形	1	精子無力症	7
子宮内膜症	2	乏精子無力症	10
機能性不妊	3		

(女性、男性ともに適応がある場合はそれぞれに1ずつ加えた)

方 法

IVF-ETは、GnRH α -hMG-hCGにより排卵誘発し、超音波下に経膈法で採卵、培養後、胚移植を実施したが、本研究において簡易化した点を以下にまとめた。

1) 排卵誘発：GnRH analog (900 μ g/day)を排卵誘発前周期から用いるlong protocolを用い、排卵誘発は初めの5日間はPure FSH 150 IUを、その後はhMG 150 IUを超音波断層検査により卵胞径23 mm以上の卵胞が3個以上となるまで投与した。

2) 採卵：卵胞径23 mm以上の卵胞が3個以上となった時点でhCG 10,000単位を投与し、36時間後に経膈的に採卵した。採卵時における卵検索、以後の卵、胚操作はhandling chamber内で行った。HTF培養液を使用した。

3) 前培養：採卵後は、swim-up完了までの時間を利用して同時に吸引した血液の除去のため3回培養液を移しながら洗浄を行った。洗浄後は、HTF培養液に浮遊させculture box中で管理する。

4) 媒精：精液はPercoll攪拌密度勾配法³⁾により運動精子を濃縮した。男性不妊例では全例、反復実施例の一部ではあらかじめ凍結保存しておいた精子と新鮮精液をあわせて用いた。精子凍結保存は、前報⁴⁻⁸⁾に従い、洗浄濃縮精子にpentoxifyllineを添加し、KS-II凍結保護剤を用いる液体窒素蒸気法により行った。解凍精子および新鮮精液は各々Percoll攪拌密度勾配法により運動精子を濃縮し、両者をあわせてHTF培養液1 mlの底部に静置し、約1時間swim-upさせた。swim-up後上清を約0.6 ml吸引し、Haemocytometer (日臨)を用いて精子濃度、運動率を観察した。媒精は単にswim up上清をHTF培養液で2倍に希釈し、精子濃度調整は行わなかった。卵は卵丘細胞の除去は行わなかった。

5) 卵培養：卵培養はCO₂ Incubatorを用いず、培養ボトルに封入したdishを簡易培養槽内に静置し、約44時間培養した。この間、卵の観察や培養液交換などは行わなかった。約44時間後卵割の有無、胚の形態を実体顕微鏡下に観察し、4個を限度として胚移植を行った。

6) Luteal support：採卵直後と胚移植終了後、および隔日に2回オオホルミルテウムデポー[®](帝国臓器)62.5 mgを投与し、その翌日からデュファストン[®](第一製薬)20 mg/日を投与した。

以上の操作のうち、3)、4)、5)での、卵の取り扱い、精子のswim-up、および媒精はhandling chamber (Octo M&D)内で行った。また、卵培養は、embryo culture box (Octo M&D)内で行った。HTF培養液(GIBCO)には、抗精子抗体がなければ患者血清を20%添加した。血清作製に際して、採血の約1時間前に抗生物質(セフェム系抗生物質を常用量)内服させた。採血後、血清分離フィブリン析出分離ミリポアフィルターで濾過しHTF培養液に添加した。いわゆる非動化は行わなかった。

採卵に用いる卵胞洗浄用液は、PBS培養液(GIBCO)100 mlにヘパリン600単位を加え作成した。両培養液とも、前日または遅くとも採卵3時間前までに調整を行いCO₂ Incubatorに入れて保温とGas平衡を保つようにした。また、culture box内は20 mlの蒸留水を入れ、混合ガスを10分以上吹き込んでからculture dishを入れることとした。

結 果

1993年から1994年末までの全症例数は、27例で、表2に示すように総採卵率は96.3%、平均採卵数4個、総妊娠率は14.8%であった。各年の症例数、妊

表2 1993年～1994年の症例

	1993年	1994年
症例数	7	12
平均年齢	33	33
施行回数	9	18
反復例	2	4
平均採卵数(個)	3.3	4.4
採卵率(%)	100	91.7
総採卵率(%)	—	96.3
卵割率(%)	88.9	61.1
平均(%)	—	70.4
妊娠率(%) (IVFあたり)	11.1	16.7
(ETあたり)	14.3	25.0
総妊娠率(%) (IVFあたり)	—	14.8
(ETあたり)	—	21.1
単胎	0	2
双胎	1	1

妊娠率は、それぞれ9例11.1%、18例25.0%であった。妊娠の内訳は単胎2例、双胎2例であった。全例現在までに出生し、胎児異常は認めなかったが2例に前期破水(妊娠35週3日、妊娠33週4日)が見られた。娩出方法は、全例とも帝王切開であった。適応は、胎児仮死、子宮内胎児発育不全、軟産道強靱などであった。また、卵巣過剰刺激症候群の発生は、1例も経験せず、腹腔内出血、細菌感染なども経験しなかった。妊娠例には、流産や絨毛性疾患は認めなかった。媒精時の精子濃度は、平均 $5 \times 10^5/\text{dish}$ であった。

考 察

不妊症治療において、今やIVF-ETは手技的には確立したものとなっており、今後は従来のAIHのように一般的な手技となっていくものと考えられる。しかしながら現在のところ、IVF-ETを行うためには、設備にかなりの費用を必要とし、排卵誘発・採卵などに日常臨床の時間をとられ、また多くの人手を必要とする。我々はこれがIVF-ETが一般臨床に組み込まれない理由であると考え、1)IVF-ETの設備、費用の軽減を図り、また設備の性能を向上させることにより取り扱う人による成績のばらつきを少なくした。2)排卵誘発、モニタリングを画一化することにより日常外来診療における複雑さを軽減した。3)採卵は、基本的にはひとりで可能な装置設計としたことにより人的配置に気を遣う必要がなくなった。このような改良を加えた装置と方法によりIVF-ETを行った

結果、従来からの方法での成績と比べ同等⁸⁾の成績を得た。設備に関しては以前に報告したように、省設備費、省力化、簡易化が図られた。

Estradiolその他のホルモン検索は、結果報告までに約2日を要するため採卵を決定する指標としては用いていないが、これまでの採卵結果から超音波検査のみでのモニタリングで十分だと考える。また、本院では、超音波検査を次のような時期に行っている。すなわち、排卵誘発直前に1回(卵巣囊腫その他の今後の卵胞計測に支障がありそうなものの鑑別)、排卵誘発5日目、8日目、その後は隔日に卵胞計測を行い、前述のように卵胞径が23mmを越えるまで行っている。その後、hCG投与に切り替えている。

排卵誘発には、Pure FSHとhMGとの漸減法ではなく、単純にPure FSHを5日間その後はhMGを上述のような卵胞径となるまで続ける方法をとった。これも簡便化のひとつであり、採卵率、採卵数の結果から現在の24時間ごとのPure FSH、hMG投与方法では、漸減法を取るることによる複雑さを上回る利点はないと考えられた。

採卵は、全例経膈超音波ガイド下に行った。卵は、吸引ピンに一括して採集し採卵終了後にまとめて検索する。このため採卵は、一人で行えるようになった。また、卵丘除去は行わずに媒精し、培養液の交換や24時間後の前核確認は行わない。これらにより、培養中の複雑さを減らすことができた。抗生物質内服後の血清を添加することにより、培養液中に細菌の繁殖を見ることはなかった。精子調整はPercoll攪拌密度勾配法とswim up法をあわせて行い、良好な精子回収が得られた。一般に媒精に供する精子濃度は $5 \sim 20 \times 10^4/\text{ml}$ 程度に調整されるが、本研究では、精子濃度調整を行わず媒精した。しかし、卵分割率は平均70.4%と従来の報告と同程度の値が得られた。

Luteal supportは、オオホルミンルテウムデポー®(62.5mg)を体外受精直後、胚移植後および隔日に2回投与する。その後は、デュファストン®20mg/dayを14日投与した。これにより、患者の来院回数を減らすことができた。この方法でも上述のような結果を得たことから、十分なLuteal supportであると考えられた。

以上に述べたような装置と方法で、従来報告されている結果⁸⁾と遜色ない結果を得たので報告した。今後このような簡易化されたIVF-ETが、広範に行われていくものと考えられる。

文 献

- 1) 原 唯純, 青木啓光, 木村裕幸 他(1933)体外受

- 精胚移植用ハンドリングチャンバーユニットの使用経験. 日産婦東京会誌 42: 550-553
- 2) 兼子 智, 郡山 智, 吉田丈児(1995) IVFの簡易化を目的とした採卵, 培養システムの開発. 日本受精着床雑誌 12: 89-91
- 3) Kaneko S, Sato H, Kobanawa K, et al. (1987) Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. Arch Androl 19: 75-84
- 4) 原 唯純, 小林俊文, 兼子 智(1991) 浸透圧負荷に対する精子抵抗性に及ぼすペントキシフィリンの影響. 日本アンドロロジー学会第10回学術大会講演抄録集: 61
- 5) Hara I, Kobayashi T, Kaneko S, (1990) Cryopreservation human sperm with poor quality; Freezing by liquid nitrogen vapor With World congress on human reproduction abstract: 184
- 6) Kobayashi T, Kaneko S, Hara I, (1991) Concentrating human sperm before cryopreservation. Androl 23: 25-28
- 7) 小林俊文, 兼子 智, 原 唯純(1992) 性状不良精子の凍結, 融解に及ぼすペントキシフィリンの影響. 日本受精着床雑誌 9: 230-232
- 8) 小林俊文, 兼子 智, 原 唯純(1993) 不妊治療—特に男性不妊—. 産婦世界 44 (8): 551-557
- 9) 平成4年度, 生殖医学の登録に関する委員会報告(1993) 平成3年度分の臨床実施成績, 平成2年度分の治療による出生児の追跡調査成績, 全追跡調査児の総合解析成績. 日産婦会誌 45: 397-410
(受付: 1995年12月26日)
(受理: 1996年1月16日)

Evaluation of simplified IVF-ET systems

Izumi Hara, Hiroyuki Kimura, Akari Yoshinaga, Yoshio Ooyama and Hirohisa Sato

Department of Obstetrics and Gynecology, Tachikawa Hospital, Tokyo 190, Japan

Satoru Kaneko

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Dental College Ichikawa General Hospital, Chiba 272, Japan

Yoshifumi Matsuda, Sumiyuki Akihama

Department of Biochemistry, Meiji College of Pharmacy, Tokyo 158, Japan

We developed new IVF-ET systems to simplify the procedure. From this point, we made a newly developed handling chamber unit for IVF-ET. Furthermore, simplified our ovarial stimulation methods and insemination procedures were used. We have used this system for 2 years and get these outcomes, such as mean retrieved oocytes: 4 oocytes/case, mean getting cleavage rate: 70.4 %, and mean pregnancy rate (/ET) : 21.1 %.

From these results, we think this system is useful to simplify the IVF-ET procedures.

Key words: IVF-ET, oocyte handling chamber, dry block culture box, human sperm cryopreservation, pentoxifylline

ACQUISITION OF CLONED BOVINES OF DEFINED SEX BY REPEATED CYCLES OF NUCLEAR TRANSFER

Katsuhiko HAYASHI, Takashi KATOH, Junta SAKANE
and Shyoso OGAWA

Laboratory of Reproduction Engineering
Ikuta-Campus, Meiji University, Kawasaki 214, Japan

Makoto IWAYA

Laboratory of Bacteriology
National Children's Medical Research Center, Tokyo 154, Japan

Hitoshi USHIJIMA

Mineoka Livestock Experimental Center, Chiba 299-26, Japan

Norihiro TADA and Masahiro SATO

Laboratory Animal Center, Pharma Research and Development Division
Hoechst Japan, Limited, Saitama 350-11, Japan

Abstract: The aim of this study was to confirm the usefulness of and expand multiple generational cloning, so-called repeated cycles of nuclear transfer (RNT).

In vitro matured bovine oocytes were enucleated and then parthenogenetically activated. These oocytes were electrically fused with blastomeres from morulae whose sex had been determined by polymerase chain reaction (PCR) detection of a male-specific SRY DNA sequence. The in vitro developmental rate (13.5 %, 12 of 89) of the resulting fusion embryos (first generation embryos) to the morula stage was comparable to that (22.1 %, 95 of 429) of control oocytes which had been activated but not fused. In each case, sex of the examined first generation clones was identical to that of the donor nuclei. When a blastomere from the first generation clone (morula) was fused to an enucleated oocyte to create a second generation embryo, the rate of development of the resulting fusion embryos to the morula stage was found to be significantly reduced (7.0 %, 3 of 43). The sex of each of the second generation clones tested was identical to that of the initial donor nuclei.

These findings indicate that PCR-mediated sex determination is useful for predicting the sex of RNT embryos.

Key words: repeated nuclear transfer, bovine embryos, PCR, male-specific primers, sexing

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 178 - 185, 1996)

Introduction

Recently, successful repeated cycles (multiple generations) of nuclear transfer (RNT) procedures with bovine embryos were reported^{1, 2)}. This tech-

nique uses the nuclear transfer embryo (clone) itself as donor for the next generation of cloning. If the first cloning cycle produces five embryos of 8 cells or more advanced stages, the subsequent cycles of recloning can probably result in more than 30 addi-

tional second generation clones. By this technique, it is thus possible to produce at once a large number of genetically identical, "cloned" animals. This technique also enables acquisition of animals of defined sex at once, although use of a rapid and simple method of sexing of donor nuclei is required before and after RNT.

In this study, we re-examined the findings of previous experiments^{1,2)} and showed that 1) polymerase chain reaction (PCR)-mediated sex determination is useful for identification of the sex of a nuclear transfer embryo, and 2) bovine embryonic nuclei retain their developmental potential even after 2 cycles of nuclear transfer.

Materials and Methods

Source of Embryos

Late morulae (consisting of 16 ~ 64 cells) were obtained by in vitro maturation (IVM), in vitro fertilization (IVF) and subsequent cultivation as described previously³⁾. Briefly, bovine ovaries from Holstein cows, aged 3 to 11 years, were collected at a slaughterhouse and transferred to the laboratory within 4 hours. Follicular oocytes with cumulus cells were aspirated from small vesicular follicles (1 ~ 5 mm in diameter) of ovaries using a 10 ml disposable syringe with an 18-gauge needle. They then underwent IVM by culture in droplets (400 μ l) of TCM-199 medium (Nissui Pharma. Co., Ltd., Tokyo, Japan) [containing 25 mM HEPES (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), heat-inactivated 5% calf serum (CS) (GIBCO, Gland Island, NY), 0.5 mM sodium pyruvate and antibiotics (100 units/ml of penicillin and 100 μ g/ml of streptomycin)] in mineral oil (Squibb and Sons, Inc., Princeton, NJ) for approximately 24 hours at 39°C in 5% CO₂ in air. These IVM oocytes were washed twice with BO medium⁴⁾ containing 10 mg/ml BSA, then placed in a 0.5 ml droplet of sperm suspension (about 25 oocytes/2.5 ~ 5.0 \times 10⁷ sperm cells/droplet). The IVF was carried out for 5 hours at 39°C with the spermatozoa which had been capacitated in the presence of 20 μ g/ml heparin and 5 mM caffeine after freezing and thawing⁵⁾. After washing with TCM-199, the fertilized embryos were transferred to TCM-199 medium on a monolayer of cumulus cells which

had been prepared by the method of Kajihara et al.⁶⁾ and cultured for 5 days to late morula stage.

Production of Bisected Embryos

Bovine late morulae derived from IVM/IVF oocytes at 5 days after fertilization were microscopically bisected with a single downward motion of a microblade through the zona pellucida (ZP) to obtain halved embryos, using the method of Ushijima et al.⁷⁾ with slight modifications. One half of the embryo was immediately subjected to PCR analysis to determine whether PCR was useful for sex determination, as described below, and the other part was cultured for 24 hours and then underwent cytogenetic sex determination. In some cases, late morulae were bisected; one half of each such embryo was tested by PCR for sex determination, and the other was disaggregated into single blastomeres for nuclear transplantation.

Nuclear Transfer

The nuclear transfer protocol used in this study involves enucleation of metaphase II oocytes by micromanipulation and introduction of donor nuclei by fusion.

All procedures were carried out at room temperature (21 \pm 1°C) using Nikon Diaphot microscopy and Narishige micromanipulators. The micropipettes, a holding pipette, and a sharpened, beveled pipette required for enucleation and reconstitution were manufactured as described by Barton et al.⁸⁾

After an approximately 24 hours maturation period, the IVM oocytes with cumulus cells were denuded by gentle pipetting of PBS containing hyaluronidase (300 U/ml; Sigma), and washed three times in Dulbecco's PBS (GIBCO) supplemented with 20% (v/v) CS (mPBS). Oocyte ZP were slit along 10 ~ 20% of their circumference with a fine glass needle. The recipient oocytes were then placed in 25 μ l drops of manipulation medium [mPBS + 5 mg/ml cytochalasin B (CB) (Sigma) and 0.1 μ g/ml of colcemid (GIBCO), drugs which disrupt microfilaments] in mineral oil for 15 minutes at 39°C prior to the start of and during enucleation. Only oocytes with a clearly visible first polar body were used for enucleation. For preparation of donor blastomeres, halved embryos (consisting of 8 ~ 20 cells) were transferred after microdissection to mPBS contain-

ing 5 mg/ml CB for 15 minutes before dissociated by pipetting of individual blastomeres.

Enucleation and subsequent nuclear transfer were carried out as described previously^{9, 10}. Enucleation was performed by removing 40 ~ 50% of cytoplasm directly below the polar body of the recipient oocytes with an enucleation pipette (40 μ m in diameter). To confirm that the method of enucleation was reliable, oocytes were stained with 5 μ g/ml of acridine orange (Wako Pure Chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) for 5 minutes at room temperature and examined by fluorescence microscopy. More than 90% of the enucleated oocytes were devoid of metaphase II chromosomes (data not shown). The donor blastomere was inserted with a microinjection pipette into the perivitelline space of the enucleated recipient oocyte through the slit on the ZP. The eggs with inserted blastomeres and intact oocytes (control) that had been incubated in normal TCM-199 medium for 25 ~ 27 hours at 39 °C after isolation from ovaries were then exposed to TCM-199 medium containing 7% ethanol for 7 minutes at 39 °C to induce parthenogenetic activation¹¹. After washing three times with mPBS, they were cultured for at least 1 hour at 39 °C.

After transfer of the blastomeres into the perivitelline space and subsequent parthenogenetic activation, the two cells were fused by electrofusion using a SSH-12 fusion chamber (Shimazu, Kyoto, Japan) as described previously⁹. Those eggs with inserted blastomeres were washed in 0.3 M sucrose fusion solution containing 0.1 mM MgSO₄ and 0.05 mM CaCl₂. The fusion plane of an enucleated egg + a blastomere was oriented parallel to electrodes with alternating current (AC; 0.5 MHz, 10 V/mm) for about 20 seconds. Then direct current (DC; 75 V/mm for 50 μ sec) was applied to the fusion plane via the electrodes. Orientation and fusion were then repeated twice. After electrofusion, the eggs were incubated for 1 hour at 39 °C in TCM-199 medium containing 7.5 μ g/ml of CB and then washed 3 times in mPBS. Successful fusion was judged by the disappearance of the injected blastomere; embryos without successful fusion remained unfused. These fused embryos (designated "first generation embryos") were cultured on the cumulus cell layer⁶) in normal TCM-199 medium for 5 days up to the moru-

la stage, and the number of developing embryos was determined. Some embryos underwent sex determination by PCR. The resulting developing morulae were dissociated into single blastomeres to create fusion embryos (designated "second generation embryos").

Transfer of RNT Embryos into Recipients

After the first and second generation embryos had been allowed to develop into morulae, a total of eight morulae randomly (Table 1) were nonsurgically transferred into the uterine horns of 3 Holstein cows (the 1st to 3rd recipient) on Day 7 or 8 of the estrus; two and three of the first generation morulae were transferred to the 1st and 2nd recipients, respectively and three of the 2nd generation morulae to the 3rd recipient.

Cytogenetic Analysis

Embryos were cultured in the presence of 0.04 μ g/ml of colcemid for 4 hours at 37 °C. Cytogenetic analysis was carried out at room temperature as described previously¹⁰. Briefly, the colcemid-treated embryos were immersed in 0.9 % sodium citrate for 3 ~ 5 minutes, transferred to a fixative (methanol: acetic acid: water = 3 : 2 : 1, v/v) for 0.5 minutes, spread out and fixed on a grease-free slide, to which 1 or 2 drops of acetic acid was then added. The slides were stained with 5 % Giemsa for 6 minutes. Sex was determined by observing whether two (female) or three (male) shortest chromosomes were present in those specimens with normal numbers of metaphase chromosomes.

Extraction of Embryonic DNA

Extraction of DNA from preimplantation bovine embryos was carried out basically using the method of Herr and Reed¹². After removal of ZP with 0.5 % pronase treatment, the embryos were washed 3 times with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. They were then lysed by incubation in 20 μ l of PBS containing 1 μ g/ml DNase I (Sigma), 10 mM MgCl₂ and 5 mM CaCl₂ for 2 minutes at 38 °C. The specimens were next transferred to a 0.5 ml microfuge tube containing 10 μ l of sterilized water and boiled for 10 minutes to inactivate DNase I. They were then stored at -20 °C prior to PCR analysis.

PCR Analysis

Gender-neutral primers (Y1.1, 5'-TCC ACT TTA

TTC CAG GCC TGT CC-3'; Y1.2, 5'-TTG AAT GGA ATG GGA ACG AAT GG-3') corresponding to nucleotides 3512-3534 (Y1.1) and 78 ~ 100 (Y1.2) of the human Y chromosome-specific repeated DNA family (DYZ1) gene¹³⁾ were used as a control to detect the presence of genomic DNA from bovine cells, since these primers yield a 154 base-pair (bp) PCR product which can be detected in humans only in males¹³⁾, but which is commonly found in both males and females of mammals including cattle, pigs, rats and mice¹⁴⁾. Primers (MI434, 5'-AAG CGA CCC ATG AAC CCA TTC ATC GTG TGG T-3'; MI434, 5'-GAG GCT GAT ACT TAT AAT TCG GGT ATT TCT CTC TGT G-3') corresponding to nucleotides 511 ~ 544 (MI434) and 735 ~ 758 (MI434) of the male-specific SRY gene^{15, 16)} on the bovine Y chromosome were used to detect male embryos^{10, 12, 16)}. These primers yield a give a 214 bp PCR product. Other male-specific primers (BS-3, 5'-GTG GCT CTA GAC AAT CCC AAA-3'; BS-4, 5'-AGC GCC CAT TCT TTG AGG AGG-3') corresponding to a bovine DNA sequence (the more internal portion recognized by the MI434/MI435 primer set) of the bovine SRY gene were also used^{10, 12)}. These primers yield a 106 bp PCR product.

For sexing of bovine embryos, the "dual PCR" method of Innis and Gelfand¹⁷⁾ was employed. Two sets of primers, Y1.1/Y1.2 and MI434/MI435, were used for the first PCR. With the first PCR, a sufficient amount of template embryonic DNA corresponding to a region of the bovine SRY gene could be produced. For the second PCR, one set of primers, BS-3/BS-4, was used for amplification of a region of the bovine SRY gene. The first amplification was performed in 50 μ l of reaction mixture containing 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 1.5 mM MgCl₂, 5 mM KCl, 0.1 % Triton X-100, 200 μ M dNTPs, 50 pmol of each DNA primer, 10 μ l of embryonic DNA and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Wako Pure Chemicals Co., Ltd.) with a Mini Cycler (MJ Research, Inc., Watertown, MA). The second amplification was performed in 50 μ l of a reaction mixture whose components were the same as those of the first amplification, except for the addition of 10 μ l of the solution for first amplification as a DNA template. PCR was carried out as follows: 30 cycles for the

first PCR and 15 cycles for the second PCR with denaturation (95 $^{\circ}$ C, 1 minute), annealing (54 $^{\circ}$ C, 1 minute) and extension (72 $^{\circ}$ C, 2.5 minutes). Amplification products (10 μ l) were subjected to electrophoresis on a 4 % agarose gel. The amplified sequences were identified under ultraviolet illumination after staining with ethidium bromide, and photographed.

Statistical Analysis

The significance of differences between experimental groups was determined using the χ^2 -test.

Results

Sexing of Bisected Embryos by PCR and Cytogenetic Analysis

In a preliminary experiment, cytogenetic analysis was carried out to determine whether PCR analysis was useful for detection of male preimplantation embryos. A total of 9 bovine morulae were bisected; one demi-embryo was studied with PCR, and the other by cytogenetic analysis. The results of the two types of analysis were identical (4 males and 5 females) (data not shown), indicating that PCR is a reliable technique for embryo sexing. Since PCR analysis is simpler and quicker than cytogenetic analysis for embryo sexing, PCR was employed for sex determination of RNT embryos in the following experiments.

Sexing of RNT Embryos

To determine RNT embryos possessed the phenotype(s) characteristic to the donor nuclei, sexing of the RNT embryos were carried out. The sexes of four different donor nuclei (designated Nos. 1 to 4) were determined by PCR of halved embryos using the male-specific SRY primers; two (Nos. 1 and 3) were found to be male, and the other two (Nos. 2 and 4) to be female. A typical example of embryo sexing is shown in Fig. 1. All the embryos subjected to the first PCR yielded a 154 bp fragment containing a portion of the DYZ1 gene (Fig. 1, first PCR), indicating that no loss of embryonic DNA had occurred during the DNA extraction process. When both first and second generation embryos underwent PCR-mediated sex determination, each embryo was found to be the same sex as the initial donor nucleus (Fig. 1, second PCR). This indicated that nuclear transfer

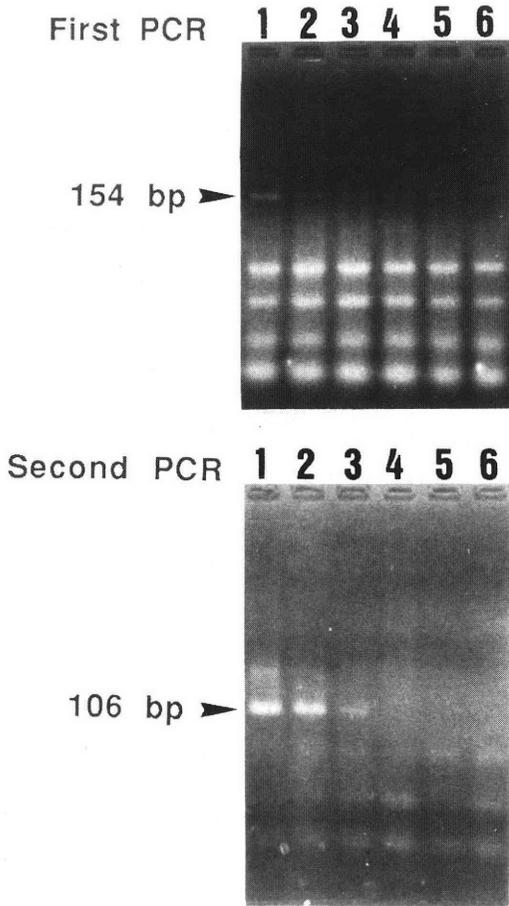


Fig. 1 Sexing of a single nuclear transfer embryo by a dual PCR method for detection of male-specific SRY sequence

A halved or whole embryo was subjected to a first PCR (upper panel) for detection of embryonic DNA. This PCR yielded a 154 bp product, as expected. The products of the first PCR were then subjected to a second PCR (lower panel) for detection of male-specific bovine SRY sequence. This PCR yielded a 106 bp product. Lane 1, demi-embryo (No.3) as donor for nuclear transfer; lane 2, first generation whole morula after reconstitution with No.3 nucleus; lane 3, second generation whole morula after reconstitution with first generation No.3 nucleus; lane 4, demi-embryo (No.4) as a donor for nuclear transfer; lane 5, first generation whole morula after reconstitution with No.4 nucleus; lane 6, second generation whole morula after reconstitution with first generation No.4 nucleus. A male-specific SRY sequence was observed in lanes 1 to 3, but not in lanes 4 to 6, indicating that the sex of No.3 donor embryo is male and that of No.4 female.

could be carried out without contamination of residual nuclear fragments of oocyte origin, and suggested that sex could be controlled before transfer of preimplantation embryos to recipients.

Developmental Potential of RNT Embryos In Vitro and In Vivo

We next examined the developmental potential of multiply-transferred bovine nuclei. Late morulae derived from IVM/IVF oocytes were bisected by micromanipulation; one half of each such embryo was sexed by PCR, and the other was disaggregated into single cells for nuclear transplantation. In this experiment, a total of 10 morulae were studied, 9 of which underwent successful identification of sex; identification of the one remaining morula failed for unknown reasons. The results are summarized in Table 1. Of 117 oocytes that received initial donor blastomeres of 9 lines, 89 (76.1 %) were judged to be successfully fused eggs after electrofusion. These fused eggs were then cultured for 5 days to morula stage in the presence of cumulus cells. Of 89 fused eggs examined, respectively 56 (62.9 %) and 12 (13.5 %) developed to the 2-cell and morula stages. For the control embryos, which were derived from IVM/IVF, the in vitro developmental rates to 2-cell and morula stages were 80.7 % and 23.9 %, respectively. When the developmental rates of the first generation embryos and the control embryos were compared, no significant difference was found, though there was a tendency for the developmental potential of the nuclear transfer embryos to be reduced. When first generation nuclei were transferred to the enucleated oocytes, 43 of 54 (79.6 %) embryos were successfully fused. Of these 43, 23 (53.5 %) and 3 (7.0 %) developed to the 2-cell and morula stages, respectively. There was a significant reduction ($P < 0.05$, compared to control) in the rate of development of the second generation embryos to morula stage. Three to 4 and 1 to 3 transferable cloned embryos were yielded from a single donor embryo in the first and second generation, respectively.

When a total of 8 cloned morulae were nonsurgically transferred to three recipient cows, two recipients became pregnant; one delivered a normal calf (derived from the second generation clone), but the other one aborted fetus at 75 days of gestation. The

Table 1 Developmental rates of enucleated oocytes which received nuclei to morula stage

Generation of nuclear transfer examined	No. of fused embryos/ No. of embryos (%) 2-cell stage	No. of fused embryos developed to morula stage	
		(%)	(%)
0	— / 88	71 (80.7)	22 (25.0)a
1	89 / 117 (76.1)	56 (62.9)	12 (13.5)
2	43 / 54 (79.6)	23 (53.5)	3 (7.0)b

Significant difference between a and b ($P < 0.05$).

sexes of the delivered calf and one aborted fetus were of donor origin, as expected. These findings indicate that bovine embryonic nuclei retain their developmental potential even after RNT.

Discussion

In this study, we showed that 1) PCR analysis is useful for determining the sex of preimplantation bovine embryos, and 2) embryonic nuclei can retain their developmental potential after RNT, although this potential seems to be reduced over the course of RNT.

Cytogenetic analysis has been widely employed for preimplantation embryo sexing. However, this technique requires at least 10 blastomeres for accurate evaluation of metaphase chromosomes. In contrast, only 5 blastomeres are required for sexing by PCR, which will thus be particularly useful when a limited number of blastomeres are available for examination. Confirming the findings of previous studies^{12, 18, 19}), we found that PCR analysis using male-specific SRY primers yields results comparable with the traditional cytogenetic analysis for embryo sexing. Using PCR, we showed here that each embryo after RNT had the same sex as that of the initial donor nucleus.

We found that 13.5 % of enucleated bovine oocytes reconstituted with the initial donor nuclei were able to develop to morula stage in vitro. This rate did not differ significantly from that of control embryos (22.1 %), suggesting that the developmental potential of first generation nuclei was not reduced. Similar findings have already been obtained for reconstituted bovine embryos¹¹). When several first generation morulae were dissociated for use in second generation RNT, 7.0 % of oocytes receiving first generation blastomeres developed to the morula stage. This is in contrast with the studies of Stice

and Keefer¹), in which 19 % of second generation bovine embryos developed to morula stage. The difference between our survival rates and those of Stice and Keefer may be due to differences in manipulation procedures (i.e., enucleation, transfer of blastomere into recipient oocytes and subsequent electrofusion), incomplete nuclear reprogramming by us, differences in embryo culture conditions, or a combination of all three of these.

We noted that the developmental potential of bovine nuclei tended to be decreased after RNT. For example, 22.1 % of control oocytes developed to morulae, while only 7 % of the second generation embryos did (Table 1). The frequency of the production of the transferable embryos, cloned from one donor embryo, showed a tendency to decrease in the second generation. This decrease may be explained in part by alteration of the cloned nuclei, which often fail to be reprogrammed to support normal development after nuclear transfer. It would be of interest to determine how many times RNT can be used to perform successful nuclear transfer. An attempt to overcome such problems has been made by treating RNT embryos with cycloheximide and then the Ca^{2+} ionophore A23187²⁰), both of which had previously been used for parthenogenetic activation of bovine oocytes^{2, 11}). Using this treatment, a relatively high survival rate (25 %) was obtained for bovine embryos after the second cycle of nuclear transfer²).

Sexing of preimplantation embryos is useful in the production of identical offspring of defined sex by RNT. In this study, we proved that the PCR method for detection of the male-specific SRY sequence is reliable and more useful than traditional cytogenetic analysis. At present, the RNT technique itself appears to be impractical for producing large numbers of genetically identical clones, since the

survival rate of embryos after RNT is lower than that of intact control embryos (Table 1). Therefore, further improvements will be needed to increase the survival rate of nuclear transfer bovine embryos.

References

- 1) Stice SL and Keefer CL (1993) Multiple generational bovine embryo cloning. *Biol Reprod* 48: 715-719
- 2) Takano H, Kozai C, Shimizu S, et al. (1993) Effect of the multiple generational cloning on production of bovine nuclear transfer embryos. *J Reprod Dev* 40'a3 (abstr.)
- 3) Funahashi H, Aoyagi Y, Takeda T, et al. (1991) Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized in vitro. *Theriogenology* 36: 427-434
- 4) Brackett BG, Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol Replod* 12: 260-274
- 5) Parrish JJ, Susuko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, et al. (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenol* 25: 591-600
- 6) Kajihara Y, Goto K, Kosaka S, et al. (1987) In vitro fertilization of bovine follicular oocytes and their development up to hatched blastocysts in vitro. *Jpn J Anim Reprod* 33: 173-180
- 7) Ushijima H, Eto T, Hayakawa S, et al. (1986) In vitro survival of bovine embryos bisected by vertical incision of early embryos applying the simplified micromanipulation of glass needle, metallic needle and razor blade. *Bull Pref Livest Exp Stn* 11: 13-18 (in Japanese)
- 8) Barton SC, Norris ML and Surani MAH (1987) Nuclear transplantation in fertilized and parthenogenetically activated eggs. In: Monk M (ed) *Mammalian Development - A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 235-253
- 9) Ushijima H and Eto T (1992) Production of a calf from a nuclear transfer embryo using in vitro matured oocytes. *J Reprod Dev* 38: 61-65
- 10) Ushijima H, Eto T and Ogawa S (1989) Sexing of bovine halved embryos by karyotyping and transfer of the sexed demiembryos. *Jpn J Anim Reprod* 35: 63-68 (in Japanese)
- 11) Ushijima H and Eto T (1994) Bovine nuclear transplantation using a parthenogenetically activated oocytes as the recipient cytoplasm. *J Reprod Dev* 40: 117-124
- 12) Herr CM and Reed KC (1991) Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenol* 35: 45-54
- 13) Nakahori Y, Mitani K, Yamada M, et al. (1986) A human Y-chromosome-specific repeated DNA family (DYZ1) consists of a tandem array of pentanucleotides. *Nucl Acid Res* 14: 7569-7580
- 14) Higashi Y, Iwaya M, Saga M, et al. (1992) The base sequence corresponding to DYZ1 is detectable in the DNA from many animal species. *J Reprod Dev* 38: 55-59
- 15) Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. (1990) A gene from the human sex-determination region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244
- 16) Iwaya M, Ishikawa I, Hosokawa T, et al. (1992) DNA sequence of sex determining region Y from bovine, pig and rat determined by polymerase chain reaction. *Report Inst Sci Tech Meiji Univ Special Proj No.21*: 13-25
- 17) Innis MA and Gelfand DH (1990) Optimization of PCRs. In: Gelfand DH (ed) *PCR Protocols*. Academic Press Inc, New York, pp 3-12
- 18) Kudo T, Sato S and Sutou S (1993) Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Cloning and characterization of bovine male-specific repetitive DNA. *J Reprod Dev* 39: 55-63
- 19) Itagaki Y, Sato S, Shitanaka Y, et al. (1993) Sexing of bovine embryos with male-specific repetitive DNA by polymerase chain reaction: Sexing of bovine embryos and production of calves with predicted sex. *J Reprod Dev* 39: 65-72
- 20) Sakane J, Ushijima H, Eto T, et al. (1994) Developmental potential of nuclear transfer bovine embryo after parthenogenetical activation with cycloheximide and subsequent Ca-ionophore treatment at M-II phase. *J Reprod Dev* 40: a12 (abstract)

(受付：1995年10月12日)

(受理：1996年1月17日)

反復核移植による特定の性の牛クローン作出について

明治大学農学部生殖工学研究室

林 克彦, 加藤孝志, 坂根淳太, 尾川昭三

国立小児病院研究センター細菌学研究室

岩谷 誠

千葉県嶺岡牛試験場

牛島 仁

ヘキストジャパン医学総合研究所病態生物学研究室

多田昇宏, 佐藤正宏

牛の継代核移植によるクローンの生産性を確かめるとともに, その方法の“性判定された核の反復継代移植”によるクローニングへの適用を試みた。

体外成熟された卵子を除核した後に, 単為発生的な活性化処置を施した。これらの卵子は, あらかじめ雄特異的 (SRY) DNA 塩基配列の存在を polymerase chain reaction (PCR) により決定された桑実胚の割球と電気融合された。この融合胚 (第一世代胚) の培養による発達率 (12/89; 13.5%) は活性化のみで融合処置しなかった対照卵子の発達 (95/429; 22.1%) に比肩するものであった。いずれの場合も, 第一世代クローンで調べた性と供与核で調べた性は一致した。第一世代クローン (morula) からの割球を除核卵子と融合させ第二世代胚を作り出した場合には, この融合に由来する胚の桑実胚にまで発達する割合は明らかに減少した (3/43; 7.0%)。第二世代クローンの各々で調べられた性は最初の供与核の性と一致した。

以上の知見は, 1) PCR を適用した性決定は RNT 胚の性を予知するのに有効であり, 2) 選択的性の第一および第二世代クローン牛生産の可能性を示唆している。

キーワード: 継代核移植, クローン胚の性判定, 雄特異的配列, クローン牛生産

単為発生マウス胚盤胞の微細構造

Ultrastructure of Parthenogenetic Mouse Blastocysts

新潟大学農学部家畜生産学教室

新村 末雄

Sueo NIIMURA

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

新潟大学大学院自然科学研究科

浅見 貴恵

Takae ASAMI

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

エタノールとサイトカラシンBで処置して発生させた2倍体の単為発生マウス胚盤胞の微細構造を調べ、受精卵子から発生した胚盤胞のものと比較した。

単為発生胚盤胞では、受精卵子から発生した胚盤胞に比べ、核小体に占める核小体系の割合が大きいとともに、空胞状のクリステをもつミトコンドリアは多いが、表面の細胞ヒダ、ゴルジ装置、多胞体、自家食胞、ミエリン像、ライソソーム様小体、リボソームおよびポリソームは少なかった。

以上の結果から、単為発生胚盤胞では、受精卵子から発生した胚盤胞に比べ、エネルギー産生能、タンパク合成能および養分の吸収・消化能が低いことが示唆された。

キーワード：マウス、単為発生胚盤胞、微細構造

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 186 - 190, 1996)

緒 言

単為発生は、精子の侵入刺激なしに卵子が活性化されて発生する現象で、これを人為的に引き起こすことは、卵母細胞の活性化の機構を解明するためや、胚発生に及ぼす精子の役割を調べるために有用な手段である。

一方、単為発生卵子の胚盤胞までの発生速度は、移植した場合には受精卵子と相違はないが、培養した場合には受精卵子よりも遅いことが確かめられている¹⁾。また、単為発生胚から産仔は得られていないが、マウスの単為発生胚を移植すると、着床し、半数体の胚では卵円筒期、2倍体の胚では体節を形成し、肢芽期まで発生する^{2,3)}。さらに、単為発生胚の死亡率は、着床前および着床後の両者で受精して発

生した胚に比べて高い¹⁾。このような単為発生胚の高死亡率、体外での発生遅延および単為発生胚から生存産仔が得られない理由として、単為発生胚には正常な胚発生に必要な精子由来の父系ゲノムの刷り込みが行われていないためであると考えられている^{4,5)}。

マウスの単為発生胚の微細構造を観察して正常性を検討したSolterら⁶⁾によると、このような胚では、受精して発生した胚に比べ、核小体に占める核小体系の割合が大きいとともに、空胞状のクリステを持つミトコンドリアは多いが、遊離リボソームが少なく、ポリソームと粗面小胞体はみられなかったと述べており、これら微細構造上の障害が単為発生胚の発生を阻害している原因ではないかと考えている。一方、マウスの単為発生胚盤胞では、核小体、ミトコンドリア、リボソームおよび粗面小胞体の形態と数

は、受精卵子から発生した胚盤胞のものと相違なかったという報告⁷⁾もあり、単為発生胚の微細構造の結果には研究者によって相違がみられる。

最近、エタノールとサイトカラシンBで処置して2倍体の単為発生胚を作出する方法が用いられているが⁸⁻¹¹⁾、このような方法で単為発生させた胚盤胞の微細構造を調べ、受精卵子から発生した胚盤胞のものと比較した報告はみられない。本研究は、エタノール処置により単為発生誘起し、サイトカラシンB処置で2倍体化して発生させたマウス胚盤胞の微細構造を調べ、受精卵子から発生した胚盤胞のものと比較したものである。

材料および方法

供試動物として、ICR系の成熟雌マウス135匹を使用した。飼育は24℃に調節した室内で行い、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。まず、これらの雌にPMSG(セロトロピン[®], 帝国臓器)とhCG(ゴナトロピン[®], 帝国臓器)それぞれ5IUを48時間間隔で腹腔内に注射して過排卵を誘起し、hCG注射後14時間に卵管から未受精卵子を採取した。

単為発生を誘起するために、採取した未受精卵子を、EDTA-2Na(和光純薬)を100 μ M含むM2¹²⁾(EDTA-M2)培養液に7.5%のエタノールを含む液に室温で7分間、ついで、EDTA-M2培養液1ml中に5 μ gのサイトカラシンB(Sigma Chemical Co., U.S.A.)を含む液に37℃で6時間、それぞれ浸漬した。これらの処置を施した卵子は、0.1%のヒアルロニダーゼ(Sigma Chemical Co.)を含むEDTA-M2培養液に浸漬して卵丘細胞を除去し、EDTA-M2培養液で、37℃でCO₂5%

空気95%の気相下で22時間培養して2細胞胚に発生させた。2細胞胚は、M16培養液¹³⁾で3回洗浄した後、M16培養液で68ないし72時間培養して胚盤胞に発生させた。なお対照として、成熟雄と交配させた過排卵処置雌マウスから、hCG注射後14時間に採取した精子侵入卵子を、EDTA-M2培養液で28時間培養して2細胞胚まで発生させ、それ以降M16培養液で68ないし72時間培養して発生させた胚盤胞を用いた。

微細構造を観察するために、直径が80ないし100 μ mに発生した胚盤胞を、4%グルタルアルデヒドと2%パラホルムアルデヒドを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に4℃で3時間前固定した。ついで、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を3回交換しつつ一晩洗浄した後、1%四酸化オスミウムを含む0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)に4℃で1時間後固定した。脱水はアセトン上昇系列で行い、包埋はQuetol 812に行った。超薄切片は、JUM-7型超マイクローム(日本電子)を用いて作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で電子染色を施した。観察と写真撮影はJEM-100B型電子顕微鏡(日本電子)で行った。

結 果

マウスの未受精卵子をエタノールとサイトカラシンBで処置して22時間培養したところ、88%が2細胞胚に、さらに、これらの胚をM16培養液に移して68ないし72時間培養したところ、33%が胚盤胞(図1)に発生した。一方、受精卵子を培養したところ、65%が胚盤胞(図2)に発生した。

マウスの単為発生胚盤胞および受精卵子から発生

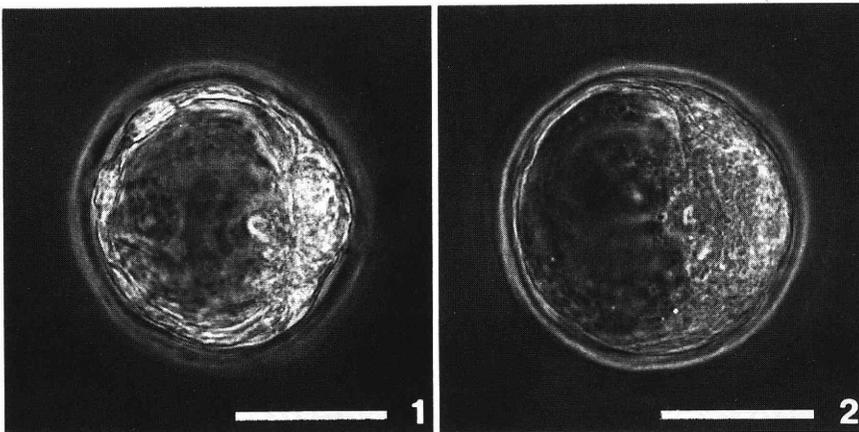


Fig. 1 A parthenogenetic mouse blastocyst. Scale indicates 55 μ m.

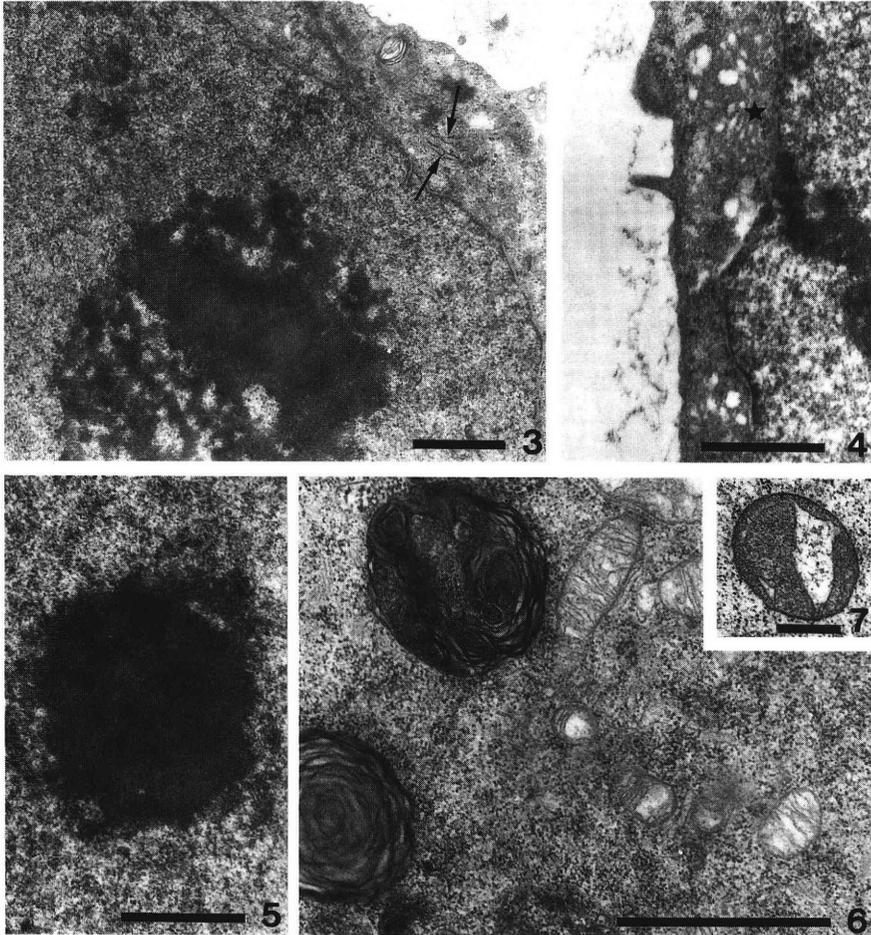
Fig. 2 A mouse blastocyst developed from a fertilized egg. Scale indicates 55 μ m.

した対照の胚盤胞の微細構造を観察したところ、以下のような結果が得られた。

細胞表面：両者の胚盤胞において、栄養膜細胞の透明帯側には短い微絨毛が密生しており(図3), 栄養膜細胞の胚盤胞腔側と内細胞塊細胞の表面には細胞ヒダがみられた(図4). 栄養膜細胞の胚盤胞腔側の細胞ヒダは、対照の胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞

で少なかった. また、栄養膜細胞間には閉鎖帯、接着帯、デスモソーム、デスモソーム前駆体およびギャップ結合がみられ、これら接合装置の種類と数は両者の胚盤胞で相違なかった。

細胞核：両者の胚盤胞で、栄養膜細胞の核は楕円形、内細胞塊細胞の核は円形を呈しており、細胞のほぼ中央に位置していた(図3,5). これらの核はへ



- Fig. 3 A trophoblast cell of a parthenogenetic blastocyst. Microvilli are observed on the cell surface facing zona pellucida, and cisternal rough-surfaced endoplasmic reticula (arrowed) are observed in the cytoplasm. The most portion of nucleolus is occupied by nucleolonema. Scale indicates $1\mu\text{m}$.
- Fig. 4 A trophoblast cell of a control blastocyst developed from a fertilized egg. A cytoplasmic fold is observed on the cell surface facing blastocoele, and a Golgi apparatus (starred) is observed in the cytoplasm. Scale indicates $1\mu\text{m}$.
- Fig. 5 A nucleus in an inner-cell-mass cell of a control blastocyst developed from a fertilized egg. The most portion of nucleolus is occupied by pars amorpha. Scale indicates $1\mu\text{m}$.
- Fig. 6 An inner-cell-mass cell of a control blastocyst developed from a fertilized egg. Mitochondria with lamellar cristae, Myelin bodies, and many ribosomes are observed in the cytoplasm. Scale indicates $1\mu\text{m}$.
- Fig. 7 A mitochondrion in a trophoblast cell of a parthenogenetic blastocyst. A crista is vacuolated. Scale indicates $0.3\mu\text{m}$.

テロクロマチンに乏しく、核小体を一個含んでいた。核小体は核小体糸と無形部からなっていたが、核小体糸の占める割合は対照の胚盤胞(図5)に比べ単為発生胚盤胞(図3)で大きかった。

細胞質小器官：ミトコンドリアは、球状あるいは桿状を呈して細胞質全域に多数分布していた。クリステは板状であったが、このようなクリステに混じって空胞状のクリステがみられた(図6,7)。空胞状のクリステは対照の胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞で多かった。ゴルジ装置(図4)は、細胞質に少数みられ、両者の胚盤胞で未発達であった。数は対照の胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞で少なかった。粗面小胞体(図3)は、槽状を呈して細胞質に少数みられ、両者の胚盤胞で形態や数に相違はなかった。また、リボソーム(図3,6)は、ほとんどがポリソームを形成していたが、数は対照の胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞で少なかった。さらに、多胞体、自家食胞、ミエリン像(図6)および高電子密度のライソソーム様小体が細胞質にみられたが、これらはいずれも対照の胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞で少なかった。

考 察

緒言で述べたように、単為発生胚の発生阻害は父系ゲノムの刷り込みが行われていないためであると一般に考えられている^{4,5)}。一方、Solterら⁶⁾は、単為発生胚では微細構造上にいくらかの障害がみられることから、これらが単為発生胚の発生を阻害している原因ではないかと考えている。しかし、単為発生胚の微細構造については半数体のものについてのみ観察が行われているとともに、得られている結果は研究者^{6,7)}によって異なっている。

本実験において、2倍体の単為発生マウス胚盤胞の微細構造を観察したところ、このような胚盤胞では、対照の胚盤胞に比べ、核小体がほとんど核小体糸で占められているとともに、空胞状のクリステを持つミトコンドリアは多いが、細胞の表面ヒダ、リボソーム、ライソソーム様小体などは少ないことが確かめられた。単為発生胚の微細構造が受精卵子から発生した胚のものとは異なっていることは、半数体の胚を観察したSolterら⁶⁾によっても確かめられているので、単為発生胚の微細構造が受精して発生した胚のものとは相違なかったというVan BlerkomとRunnerの結果⁷⁾には疑問が持たれる。一方、本実験の単為発生胚盤胞では、ポリソームと粗面小胞体も少数観察され、Solterらの結果⁶⁾と異なっていた。この相違の理由については明らかではないが、単為発生を誘起す

るための方法の相違によることも考えられた。すなわち、我々はエタノールとサイトカラシンBを用いて作出した単為発生胚を観察に用いているが、Solterら⁶⁾はヒアルロニダーゼと低浸透圧液を用いて作出した単為発生胚を観察に用いている。一般に、半数体のものに比べ2倍体の単為発生胚の方が発生能力が高いことが知られているので²⁾、本実験の2倍体の単為発生胚の方が微細構造的に受精卵子から発生した胚盤胞に似かよっていたものと思われた。なお、マウスの生殖道内で自発的に活性化して発生した単為発生胚盤胞でも、ミトコンドリアのクリステは少なく、空胞状であったといわれているので¹⁴⁾、単為発生胚のミトコンドリアが空胞状のクリステを持つことは間違いのないことのように思われた。また、ミトコンドリアの形態には遺伝的要因が関与していることが知られており¹⁴⁾、単為発生胚でミトコンドリアのクリステが受精胚のものとは異なるのは、単為発生胚では受精による精子との遺伝的結合がなされていないためであることも考えられた。なお本実験の結果から考えると、ミトコンドリア以外の細胞小器官の形態や数の発現にも父系ゲノムが関与していることがうかがわれた。

本実験の微細構造に関する結果から、単為発生胚盤胞では、受精卵子から発生したものに比べ、エネルギー産生能、タンパク合成能および養分の吸収・消化能が低いことが推察された。しかし、単為発生胚盤胞のこれら機能の低下が発生障害に直接関与しているのかどうかは明らかでないので、単為発生胚の発生阻害については今後さらに形態学的な検討を進める必要があると思われた。

文 献

- 1) Whittingham DG (1980) Parthenogenesis in mammals. In: Finn CA (ed), 2nd ed, Oxford Reviews of Reproductive Biology. Clarendon Press, Oxford, pp205-231
- 2) Kaufman MH (1978) Chromosome analysis of early postimplantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. J Embryol Exp Morph 45: 85-91
- 3) Kaufman MH, Barton SC, Surani MAH (1977) Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. Nature 265: 53-55
- 4) Mc Grath J, Solter D (1994) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. Cell 37: 179-183
- 5) Surani MAH, Barton SC, Norris ML (1994) De-

- velopment of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548-550
- 6) Solter D, Biczysko W, Graham C, et al. (1974) Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones. *J Exp Zool* 188: 1-24
 - 7) Van Blerkom J, Runner MN (1976) The fine structural development of preimplantation mouse parthenotes. *J Exp Zool* 196: 113-124
 - 8) Cuthbertson KSR (1983) Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J Exp Zool* 226: 311-314
 - 9) Schatten G, Simerly C, Schatten H (1991) Maternal inheritance of centrosomes in mammals? Studies on parthenogenesis and polyspermy in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6785-6789
 - 10) Tada T, Takagi N (1992) Early development and X-chromosome inactivation in mouse parthenogenetic embryos. *Molec Reprod Dev* 31: 20-27
 - 11) Fukui Y, Sawai K, Furudate M, et al. (1992) Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. *Molec Reprod Dev* 33: 357-362
 - 12) Whittingham DG, Fulton BP (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273: 149-151
 - 13) Whittingham DG (1971) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl* 14: 7-21
 - 14) Anderson E, Hoppe PC, Lee GS (1984) The karyotype and ultrastructural characteristics of spontaneous preimplantation mouse parthenotes. *Gamete Res* 9: 451-467

(受付: 1995年11月9日)

(受理: 1996年1月17日)

Ultrastructure of parthenogenetic mouse blastocysts

Sueo Niimura

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

Takae Asami

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

The ultrastructure of diploid parthenogenetic mouse blastocysts derived from the oocytes activated and diploidized by the treatment of ethanol and cytochalasin B was observed.

In the blastocysts developed from fertilized eggs, trophoblast cells facing zonae pellucidae were covered with thickly growing short microvilli, and the surfaces facing blastocoeles and those of inner-cell-mass cells had cytoplasmic folds, and there were zonula occludens, zonula adherens, desmosome, predesmosome and gap junction between adjacent trophoblast cells. And the blastocysts had nucleoli consisted of the pars amorpha and nucleolonema, and mitochondria with lamellar and vacuolated cristae, cisternal rough-surfaced endoplasmic reticula, undeveloped Golgi apparatuses, multivesicular bodies, autophagic vacuoles, Myelin bodies, lysosome-like bodies, free ribosomes and polysomes.

On the other hand, the parthenogenetic blastocysts had nucleoli occupied by nucleolonemas to a large extent and many mitochondria with vacuolated cristae, but showed less cytoplasmic folds on the surface, Golgi apparatus, multivesicular bodies, autophagic vacuoles, Myelin bodies, lysosome-like bodies, free ribosomes, and polysomes, as compared with those developed from fertilized eggs.

From these results, it was inferred that energy production, protein synthesis, and absorption and ingestion of nutrient were restricted in parthenogenetic blastocysts, as compared with blastocysts developed from fertilized eggs.

Key words: mouse, parthenogenetic blastocyst, ultrastructure

体外受精胚移植法における Prednisolone の着床率改善効果

Improvement of Implantation Rate of IVF-ET by Using Prednisolone

愛媛大学医学部産科婦人科学教室

矢野 樹理
Juri YANO

福井 敬介
Keisuke FUKUI

谷口 文章
Fumiaki TANIGUCHI

山中 研二
Kenji YAMANAKA

堀 玲子
Reiko HORI

武田 康成
Yasunari TAKEDA

松浦 俊平
Shumpei MATSUURA

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

体外受精胚移植法 (IVF-ET) の着床率改善の目的で prednisolone (PSL) による短期免疫抑制療法を施行し、その効果を検討した。

平成4年より3年間に当科にて胚移植を施行した138周期に対し、採卵後1日目より5日間PSL 15～60 mgを内服させ、対胚移植妊娠率、胚着床率を非投与群と比較検討した。

PSL非投与群およびPSL 15, 30, 60 mg投与群間の、年齢、不妊期間、精子濃度、精子運動率、成熟卵胞数、採取卵数、受精分割卵数、移植胚数にはとくに有意差を認めなかったが、PSL投与群の対胚移植妊娠率は、非投与群よりも有意に改善した。胚着床率も、PSL投与により約2倍に向上した。移植胚数別検討では、移植胚数2個までは有意差を認めなかったが、3～4個の群で有意に対胚移植妊娠率が向上した。なおPSL 60 mg群で13.3%に副作用が出現した。

以上の結果より、PSL投与はIVF-ETの着床率改善に効果があると思われた。

キーワード：糖質コルチコイド、免疫抑制療法、着床、体外受精胚移植法

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 191 - 195, 1996)

緒 言

体外受精胚移植法 (IVF-ET) の妊娠率を高めることは、不妊症治療の大きな課題のひとつであり、これまでさまざまな試みがなされてきた。最近、黄体期に glucocorticoid (GC) を投与して短期免疫抑制療法を行うことにより、顕微授精法¹⁾やIVF-ET施行患者²⁾の妊娠率や胚着床率が改善したとの報告がなされた。そこで今回我々は、IVF-ET施行患者にGCのひとつである prednisolone (PSL) をIVF-ET施行時の着床期に投与する短期免疫抑制療法を試み、その対胚移植妊娠率、胚着床率に与える影響について検討した。

対象および方法

対象は平成4年1月より平成6年12月までの間に、当科にてIVF-ETを受けた197周期のうち、胚移植を行い得た138周期である。なお高度精子異常所見を示す症例は対象から除外した。卵胞発育促進法は原則として GnRH agonist/FSH/hMG 法にて行い、主席卵胞径が18 mmを越えた時点でhCG 10000単位筋注し、その36時間後に経膈超音波断層法にて採卵した。培養環境は5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂, 37℃, 100% humidityにて行い、培養液は10%患者血清添加 α -MEMを用いた。媒精後、40時間後に正常分割胚のみを胚移植した。

胚のグレード分類には Veeck 分類³⁾を用い、grade I

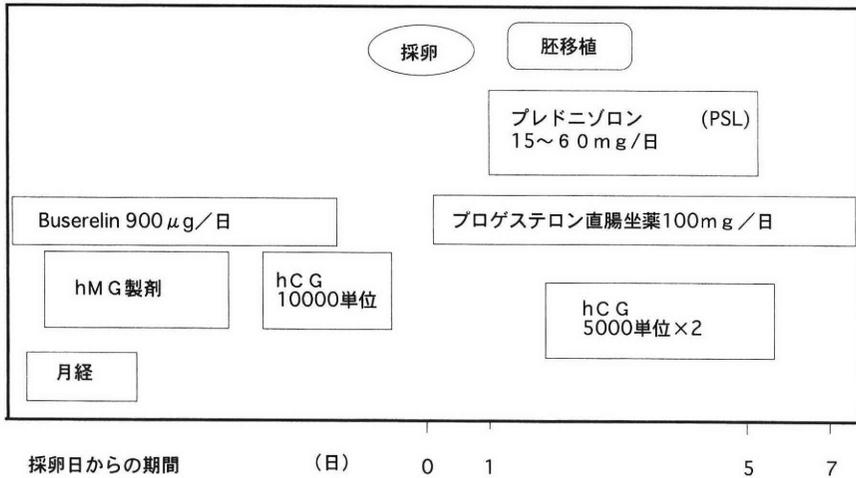


図1 当科におけるIVF-ETのプロトコール

およびⅡの胚のみを子宮内移植した。黄体期ホルモン補充療法として採卵直後より経直腸プロゲステロン(P₄)座薬⁴⁾を100mg/日2週間投与し、かつ胚移植後1日および5日目にhCG5000単位筋注投与を行った(図1)。

PSLがIVF-ETの対胚移植妊娠率、胚着床率に与える影響を検討するため、採卵直後に患者をcontrol群、PSL15mg群、PSL30mg群、PSL60mg群に分け、それぞれ採卵後1日目より5日間PSL0、15、30、60mg/日経口投与した。PSL60mg投与群のうち一部は3日ごとにPSLを減量していくPSL漸減法にて行った。また同時にセファロsporin系抗生物質の経口投与を行った。PSL投与量は平成4年1月より平成6年7月まではphase別に、平成6年8月以降はrandomizedで行った。

妊娠の判定は、採卵後10日目および14日目の血中hCG値の有意の上昇、および採卵後3~4週目の経腔超音波断層法によるGS確認で行った。血中hCG値の測定にはミニバイダス(バイオミリユー社)を使用した。すべてのデータは平均値±標準誤差(Mean±S.E.)で表し、統計学的有意差検定はStudent's unpaired t-testまたはchi-square testにて行い、p<0.05をもって有意と判定した。

結 果

今回検討を行ったIVF-ET138周期の平均患者年齢は32.6±0.3歳、平均不妊期間は6.8±0.3年、平均AIH回数は3.3±0.6回、平均精子数90.0±5.5×10⁶/ml、平均精子運動率51.8±1.9%であった(表1)。この患者をPSL投与量の違いにより、control群、PSL15mg

表1 対象患者とその内訳

当院でのIVF-ET施行患者	197例
実施期間	平成4年1月~平成6年12月
胚移植施行患者	138例
平均年齢	32.6±0.3歳
平均不妊期間	6.8±0.3年
平均AIH回数	3.3±0.6回
平均精子数	90.0±5.5×10 ⁶ /ml
平均精子運動率	51.8±1.9%
不妊原因	
卵管因子	74例
子宮内膜症	31例
男性因子	51例
子宮筋腫	12例
免疫因子	23例
原因不明	7例

(Mean±S.E.)

群、PSL30mg群、PSL60mg群に分け、さらにPSL投与群全体をall-PSL群として解析を行った。表2に示すように、各群の症例数は21例から62例の間に分布し、各群の年齢、不妊期間、精子濃度、精子運動率はそれぞれ32.5歳前後、7年前後、90.0×10⁶/ml前後、50%前後であり、とくに有意差を認めなかった。また各群の成熟卵胞数、採取卵数、受精分割卵数、移植胚数についてもとくに有意差を認めなかった(表3)。各群の対胚移植妊娠率は、control群が14.3%(8/56)であるのに対し、PSL投与群では各群とも29~42.3%と良好な成績を示したが、症例数が少ないこともあってPSL15mg群、およびall-PSL群のみ有意差が得られた(図2)。つぎに移植胚総数に対する着床胚数の割合を胚着床率として算定し、各群で比較した。Control群では移植した正常分割胚151個に

表2 control群, PSL投与群の不孕プロフィール

	PSL量 (mg/日)	症例数	年齢 (歳)	不妊期間 (年)	精子数 ($\times 10^6$)	運動率 (%)
control群	0	56	32.6 \pm 0.5	6.3 \pm 0.5	82 \pm 7	49 \pm 3
PSL 15 mg群	15	21	32.4 \pm 0.7	6.9 \pm 0.7	120 \pm 21	50 \pm 4
PSL 30 mg群	30	31	32.2 \pm 0.8	6.9 \pm 0.6	93 \pm 10	54 \pm 4
PSL 60 mg群	60	30	33.6 \pm 0.7	7.6 \pm 0.5	82 \pm 11	56 \pm 4
all-PSL群	15~60	82	32.7 \pm 0.4	7.1 \pm 0.3	95 \pm 8	54 \pm 2

(Mean \pm S.E.)

表3 各群の卵胞, 卵, および移植胚数の比較

	卵胞数	採取卵数	受精卵数	移植胚数
control群	8.1 \pm 0.7	5.7 \pm 0.4	2.8 \pm 0.2	2.8 \pm 0.2
PSL 15 mg群	6.0 \pm 0.7	5.2 \pm 0.7	2.5 \pm 0.3	2.5 \pm 0.3
PSL 30 mg群	7.7 \pm 0.8	5.9 \pm 0.6	2.9 \pm 0.4	2.5 \pm 0.2
PSL 60 mg群	7.0 \pm 0.7	5.4 \pm 0.4	2.4 \pm 0.3	2.6 \pm 0.3
all-PSL群	7.0 \pm 0.4	5.5 \pm 0.3	2.6 \pm 0.2	2.5 \pm 0.2

(Mean \pm S.E.)

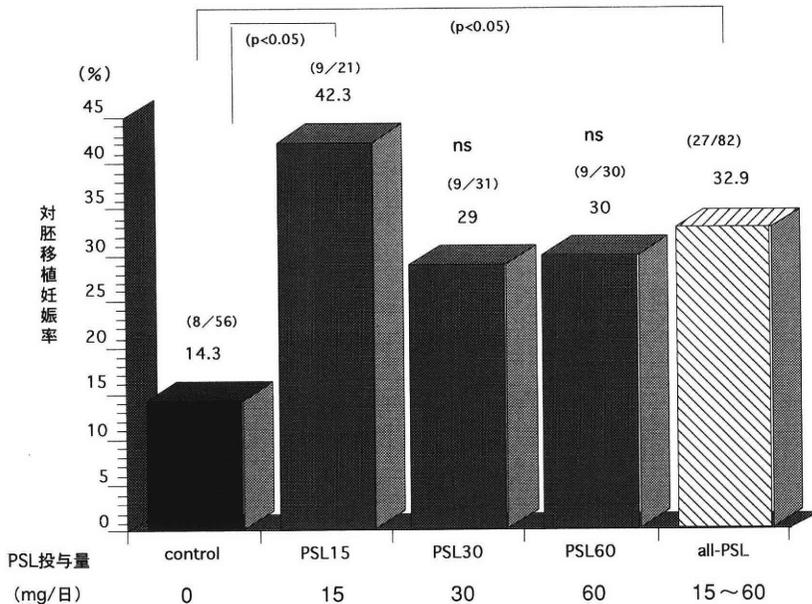


図2 IVF妊娠率に与えるプレドニゾロン (PSL) の効果

対して着床胚11個であり, 胚着床率は7.3%であった (表4)。一方, PSL 15 mg群の胚着床率は26%であり, PSL 30 mg群では16.9%, PSL 60 mg群では14.5%, all-PSL群では18.4%とPSL 60 mg群を除くすべての群で有意 ($p < 0.05$) に胚着床率改善が認められた。つぎに移植胚数別に対胚移植妊娠率の検討を行ったところ, 移植胚数2個までは, control群の対胚移植妊娠率は23.6%, all-PSL群20.6%と, PSL投与の効果は認められなかった。しかし移植胚数3~4個の群で

表4 体外受精胚移植法における胚着床率に与えるPSLの影響

	総移植胚数	着床胚数	着床率
control群	151	11	7.3%
PSL 15 mg群	50	13	26%*
PSL 30 mg群	77	13	16.9%*
PSL 60 mg群	69	10	14.5% ns
all-PSL群	196	36	18.4%*

ns: not significant * : $P < 0.01$ vs. control群

表5 PSLがIVF妊娠率に与える効果に関する移植胚数別検討

移植胚数	control群	all-PSL群
1～2個	23.5% (4/17)	20.5% (9/44) ^{NS}
3～4個	12.9% (4/31)	51.5% (17/33)*

ns: not significant *: P<0.01 vs. control群

表6 PSL投与時の副作用発生頻度

プレドニゾロン量	症例数	副作用発生患者	副作用発生頻度
15 mg	5	0	0%
30 mg	19	0	0%
60 mg	30	4 ^a	13.3%

a 全身倦怠感2名 顔面紅潮1名 PID1名

は、control群12.9%に対し、all-PSL群51.5%と有意に対胚移植妊娠率の改善が認められた(表5)。PSLの副作用の有無について検討すると、PSL 15 mg群およびPSL 30 mg群では目立った副作用は認められなかったが、PSL 60 mg群では30周期中4周期(13.3%)に副作用と思われる症状が現れた(表6)。その内訳は投与終了後の全身倦怠感2例、顔面紅潮1例およびPID1例であった。

考 察

GCとヒトIVFの着床率向上との関係はCohenらにより最初に報告された。彼らはpartial zona dissection (PZD)を施行した患者に対して、採卵当日より4日間GCのひとつであるmethyl prednisolone (16 mg/日)を抗生物質とともに投与し、有意に妊娠率、胚着床率の改善効果を認めたと報告した(妊娠率:非GC群7% (1/14), GC群39% (7/18)(胚着床率:非GC群7% (2/31), GC群28% (11/39))。さらにFriedらは通常のIVF-ET患者に対して比較的大量のGC (methyl prednisone 60 mg/日)を同様に4日間投与することにより、やはり有意な妊娠率(非GC群11.1%, GC群42.3%), 胚着床率(非GC群3.4%, GC群18.9%)の改善を報告した。

今回の検討でも、同じGCの一種であるPSLをIVF-ET時の黄体期早期に短期間投与する短期免疫抑制療法により、同様に対胚移植妊娠率、胚着床率が改善するのを確認した。投与量による効果の差を検討するため15 mg, 30 mg, 60 mgの3段階の投与群を設定したが、1日量15 mgで十分な改善効果を確認できた。逆に、高用量投与の成績に有意差が得られなかったのは、症例数が少ないこともあるが、phase別にPSL

投与量を増加させたため、前回妊娠できなかった重症度の高い難治症例が高用量群に多く含まれたためと思われる。GCが妊娠率、胚着床率改善効果を示す理由についてははまだその詳細は未知であるが、そのメカニズムについては現在いくつかの考察があげられる。そのひとつはGCが黄体化顆粒膜細胞からのエストロゲンやP₄の分泌を促進⁵⁾し、このP₄が子宮内膜からの何らかの免疫抑制物質の分泌に重要な役割をになっているとする説⁶⁾である。また妊卵の着床にはフィブロネクチンがトロホプラストと子宮との接着に重要な働き⁷⁾をしており、GCはこのフィブロネクチンの分泌を促進する。またIVFの胚移植の際、子宮内膜に炎症性変化を起こし、マクロファージその他の免疫担当細胞の遊走を引き起こすが、これによりインターロイキンや酸素フリーラジカル、プロスタグランジンなどを介して着床が阻害される可能性がある。GCはこれらの悪条件を改善し、結果として着床率向上をきたすとも考えられる。また今回の検討では、移植胚数が多い場合にGCの着床率改善効果が顕著に現れた。今回は内分泌学的検討は行っていないが、多数の成熟卵胞が得られる症例では血清ステロイドホルモンやその他の物質が生理的状态を越えて高値となるために、何らかの着床阻害状態が形成されるのをGCが阻止するものとも考えられる。

一方最近相ついでGCの効果を疑問視する報告⁸⁻⁹⁾が行われた。しかしいずれの報告も、統計学的有意差は得られないまでも、GC投与群の妊娠率が非投与群より優っていた。このことは、IVF-ET患者の中で、一部の特定の条件下の症例に対してGC投与が有効であることを示唆している。

実際、今回の検討でも、当院または他院にて複数回のIVF-ETによる治療を受けても妊娠できなかった難治性症例が、PSL投与により妊娠成立に至った事例をいくつか経験した。このことから、どのような不妊患者にPSLを投与すべきか、その適応条件についてさらに詳細な検討を加える必要がある。

結 論

PSL投与によりIVF-ETにおける対胚移植妊娠率、胚着床率の改善効果を確認できた。PSLの投与量は1日15 mg経口投与で十分の効果があると思われた。そのメカニズムについてはまだ未知の部分も多く、その適応については今後さらに詳細な検討が必要と思われた。

文 献

- 1) Cohen J, Malter H, Elsner C, et al. (1990) Immunosuppression supports implantation of zona pelucida dissected human embryos. *Fertil Steril* 53: 662-665
- 2) Fried EP, Blanco L, Lancuba S, et al. (1993) Improvement of clinical pregnancy rate and implantation rate of in vitro fertilization-embryo transfer patients by using methylprednisone. *Human Reprod* 8: 393-395
- 3) Veeck LL (1991) Atlas of the human oocyte and early conceptus Vol.2, Williams & Wilkins Co., Baltimore
- 4) 福井敬介, 武田康成, 藤岡 徹 他 (1994) IVF-ET およびPOSTにおけるProgesterone座薬直腸内投与の有用性に関する検討. *産婦中四会誌* 42: 217-220
- 5) Wurfel W, Steck T, Hertwig IV, et al. (1990) Prednisolone promotes the secretion of progesterone and oestradiol by luteinized granulosa cells independent of human chorionic gonadotropin. *Gynecol Obstet Invest* 29: 188-191
- 6) Wang HS, Kanzaki H, Tokushige M, et al. (1988) Effect of ovarian steroids on the secretion of immunosuppressive factor (s) from human endometrium. *Am J Obstet Gynecol* 158: 629-637
- 7) Feinberg RF, Kilman HJ, and Lockwood CJ (1991) Is oncofetal fibronectin a trophoblast glue for human implantation? *Am J Pathol* 188: 537-543
- 8) Catt JW, Ryan JP, Saunders DM, et al. (1994) Short-term corticosteroid treatment does not improve implantation for embryos derived from subzonal insertion of sperm. *Fertil Steril* 61: 565-566
- 9) Lee KA, Koo JJ, Yoon TK, et al. (1994) Immunosuppression by corticosteroid has no effect on the pregnancy rate in routine in-vitro fertilization and embryo transfer patients. *Human Reprod* 9: 1832-1835
- 10) Moffitt D, Queenan JT Jr, Veeck LL, et al. (1995) Low-dose glucocorticoids after in vitro fertilization and embryo transfer have no significant effect on pregnancy rate. *Fertil Steril* 63: 571-577
(受付: 1996年1月5日)
(受理: 1996年1月17日)

Improvement of implantation rate of IVF-ET by using prednisolone

Juri Yano, Keisuke Fukui, Fumiaki Taniguchi, Kenji Yamanaka,
Reiko Hori, Yasunari Takeda and Shumpei Matsuura

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

To investigate the effect of glucocorticoid on clinical implantation rate in in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET), 15 ~ 60 mg/day of prednisolone (PSL) was administered to patients for 4 days in the early luteal phase and clinical pregnancy rate (PR) and implantation rate (IR) were studied. Patients (n = 138) were divided into several groups as follows: control group (n = 56), PSL 15 mg group (n = 21), PSL 30 mg group (n = 31), PSL 60 mg group (n = 30), all-PSL group (PSL 15 ~ 60 mg) (total number = 82).

There were no differences on patients' infertility profiles among the groups. Significantly higher PR and IR were obtained in most of PSL treated groups compared to the control group (PR: control group 14.3 % vs PSL 15 mg group 42.3 %, all-PSL group 32.9 %, IR: control group 7.3 % vs PSL 15 mg group 26 %, all-PSL group 18.4 %).

Furthermore, PSL administration improved PR when 3 ~ 4 instead of 1 ~ 2 embryos were transferred. In the patients treated with 60 mg of PSL, 13.3 % showed some mild side effects. In conclusion, PSL might have some effects on the improvement of IR in IVF-ET.

Key words: glucocorticoid, immunosuppression, implantation, IVF-ET

マイクロドプラを使った精索静脈瘤に対する動脈保存高位結紮術

Artery Preservation in High Ligation for Varicoceles Using Microdoppler Method

藤沢市民病院泌尿器科

齋藤 和男
Kazuo SAITO

釜井 隆男
Takao KAMAI

長本 章裕
Akihiro NAGAMOTO

千葉 喜美男
Kimio CHIBA

広川 信
Makoto HIROKAWA

Department of Urology
Fujisawa City Hospital, Fujisawa 251, Japan

野崎医院

野崎 明
Akira NOZAKI

Nozaki Urology Clinic, Kamakura 247, Japan

精索静脈瘤に対する高位結紮術で内精静脈が一部でも残存すると再発の危険性がある。内精動脈は保存すべきであるが、動静脈を正確に識別することは非常に難しい。今回9例の精索静脈瘤に対し、顕微鏡下でマイクロドプラを使い動脈を温存する高位結紮術を試みた。

4例は剥離終了時点まで動脈拍動が見られたが、5例は拍動が消失し動静脈の識別が困難となった。しかしこのうち3例はマイクロドプラによって動脈波が得られたため動脈を保存することができた。最終的に9例中7例はすべての静脈を切断し動脈を保存した。術後静脈瘤は消失し、最長3年経過しているが再発していない。マイクロドプラを使うことにより、動脈を温存しすべての静脈を確実に結紮する手術が可能となる。

キーワード：精索静脈瘤，高位結紮術，動脈保存，血管攣縮，マイクロドプラ

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 196 - 199, 1996)

緒言

精索静脈瘤の治療は内精静脈を結紮することによって腎静脈の血流が精巣に逆流することを防ぎ、精巣や陰囊内からの血流を obturator vein や vasal vein などに迂回させることにある。伴走する内精動脈は温存すべきであるが、動静脈を正確に識別することは難しいため、ともに結紮切断する Palomo 法^{1,2)}を行ってきた。

今回、顕微鏡下でマイクロバスキュラードプラ血流速度測定装置を使い内精動脈を保存する高位結紮術を試みたので報告する。

対象および方法

対象は12歳から30歳までの精索静脈瘤9例で、主訴は陰囊部痛や陰囊部腫痛などであった。静脈瘤はすべて左側で鈴木³⁾で grade II～III、陰囊血流センチで静脈瘤を確認した症例である(表1)。

手術方法は吸入麻酔または硬膜外麻酔で通常の高位結紮術と同じように左上前腸骨棘より約2横指内側で約3cmの斜切開を加えた。内精動静脈群を後腹膜より剥離し、1%リドカインを散布しながら手術用顕微鏡(カール・ツァイス社製、5～20倍)下でMF20マイクロバスキュラードプラ血流速度測定装置(EME

表1 症例と結果

症例	年齢	動脈保存	動脈拍動	マイクロドプラ による動脈波 (cm/sec.*)	手術時間 (min)
1	18	可	○	○ (4)	150
2	20	可	○	○ (8)	120
3	13	可	○	○(-†)	167
4	14	可	○	○(-†)	156
5	29	可	消失	○(-†)	140
6	30	可	消失	○ (5)	177
7	24	可	消失	○ (11)	85
8	20	不可	消失	消失(0)	160
9	12	不可	消失	消失(0)	148

○ 確認

* 剥離終了時点での血流速度

† 測定せず



図1 付随するすべての静脈を切断した後に内精動脈(中央三角矢印)波をマイクロドプラ(径1mm)(左側矢印)で測定中の術中写真(症例7)

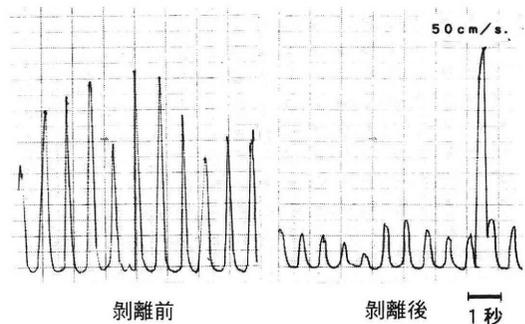


図2 マイクロドプラで得られた動静脈剥離前後の内精動脈波. 剥離操作により血流速度が46 cm/sec.から11 cm/sec.に低下した(症例7).

社製, 20 MHz, プローベ直径1mm)(以下マイクロドプラ)で動脈を確認しながら動静脈の剥離を進めた. 拍動がなくマイクロドプラでも動脈波が得られない脈管は静脈またはリンパ管と判断し順次4-0絹糸で結紮切断した. 付随している脈管をすべて剥離した時点で, 動脈拍動が見られるか, マイクロドプラで動脈波が得られた場合は保存した(図1).

結 果

動静脈剥離前は9例とも動脈拍動が見えたが, 5例は剥離操作中に動脈拍動が消失し動静脈の識別が困難になった. しかしこのうち3例はマイクロドプラ

で動脈波が得られたため動脈を保存できた. 最終的に9例中7例(78%)はすべての静脈を切断し動脈のみを保存した. 症例4と6は動脈が2本認められた. 動脈保存例の剥離終了時点での血流速度はピーク値で4~11 cm/sec.であった(表1). 剥離前後に血流速度を測定した症例7では, 剥離操作により動脈拍動は消失し, 血流速度も低下したが, 最後まで動脈波が得られた(図2). 手術時間は85分から177分(平均145分)であった. 術後静脈瘤は全例消失し, 1年から3年の観察期間内では静脈瘤の再発や精巣萎縮は見られていない.

考 察

従来より内精動脈を保存するために顕微鏡下で高位結紮術が行われている. しかしKassら⁴⁾は動静脈ともに結紮した32例では1例も再発していないのに

対し、動脈を保存した17例のうち2例は術後再発したと述べている。またGillら⁵⁾も、内精静脈結紮後に術中静脈造影を行ったところ24%は静脈が残存していたと述べている。内精静脈群は1~2本の拡張した静脈の他にも数本の細静脈から成っている。このうち一部でも残存すると、いずれ側副血行路が形成され再発の危険性がある^{4,6)}。一方内精動脈は直径約0.4~0.5mm^{7,8)}と細く、動脈周囲の静脈を剥離する際に血管攣縮がおこる危険性がある。自験例でも剥離操作中に血流速度が低下し、9例中5例は動脈拍動が消失したが、このうち3例はマイクロドプラで動脈波が得られたため保存できた。

高位結紮術にドプラを併用する報告はある^{8,9)}が、非常に細い内精動脈の脈波を得るためには、プローベの先端が細く血管に直接接触させる必要がある。この点、マイクロドプラのプローベは周囲の視野を妨げることがなく容易に動脈波を得ることが可能である。

当科では従来から精索静脈瘤に対し動静脈をとものに結紮するPalomo法を行ってきた。当科での男性不妊症患者58例の術後妊娠率は55.2%で、1例も精巣萎縮は見られなかった²⁾。しかし手術後も精液所見が改善しない症例も多い。一方、高位結紮術において内精動脈を保存することの意義は明らかにされていないが、可能ならば温存するべきである。しかし一部でも静脈を残存させたのでは再発の危険があり、すべての静脈を確実に結紮する必要がある。内精静脈の壁は動脈と同程度に肥厚していることが多く²⁾、肉眼的には動静脈の識別が困難な症例がある。このため、マイクロドプラを併用して高位結紮術を行ったところ、9例中7例はすべての静脈を切断し動脈のみを保存することができた。しかしこの方法はPalomo法と比べて手術時間が長くなることが最大の欠点である。今後、顕微鏡下での手術に習熟することによって、短時間で可能になると考えている。また今回

の経験から動脈攣縮を防ぐためには、動静脈を後腹膜から剥離する距離を短くすること、動静脈群を創外に牽引せず創内で愛護的に剥離操作を行うことが重要であると推測された。

顕微鏡下でマイクロバスキュラードプラを使うことにより、すべての静脈を切断し動脈を保存する高位結紮術が可能になると考えられる。

文 献

- 1) Palomo A (1949) Radical cure of varicocele by a new technique: preliminary report. *J Urol* 61: 604-607
- 2) Hirokawa M, Matsushita K, Iwamoto T, et al. (1993) Assessment of Palomo's operative method for infertile varicocele. *Andrologia* 25: 47-51
- 3) 鈴木良徳 (1967) 精索静脈瘤の研究. *日泌会誌* 58: 1105-1114
- 4) Kass EJ, Marcol B (1992) Results of varicocele surgery in adolescents: a comparison of techniques. *J Urol* 148: 694-696
- 5) Gill B, Kogan SJ, Maldonado J, et al. (1990) Significance of intraoperative venographic patterns on the postoperative recurrence and surgical incision placement of pediatric varicoceles. *J Urol* 144: 502-505
- 6) Rothman CM, Newmark H, Karson RA (1981) The recurrent varicocele — a poorly recognized problem. *Fertil Steril* 35: 552-556
- 7) 広川 信, 岩本晃明, 佐藤和彦 他 (1982) 精索静脈瘤の臨床的研究: 内精索動脈からみた手術方法. *日泌会誌* 73: 110
- 8) Wosnitzer M, Roth JA (1983) Optical magnification and doppler ultrasound probe for varicoelectomy. *Urology* 22: 24-26
- 9) 守殿貞夫, 羽間 稔, 松本 修 (1983) 超音波ドップラ血流計の高位結紮術への応用. *臨泌* 37: 943
(受付: 1995年10月12日)
(受理: 1995年1月18日)

Artery preservation in high ligation for varicoceles using microdoppler method

Kazuo Saito, Takao Kamai, Akihiro Nagamoto, Kimio Chiba and Makoto Hirokawa

Department of Urology, Fujisawa City Hospital, Fujisawa 251, Japan

Akira Nozaki

Nozaki Urology Clinic, Kamakura 247, Japan

High ligation for varicoceles entails a risk of postoperative recurrence should a small portion of the inter-

nal spermatic vein be left intact. Although it is best to preserve the spermatic artery, it is difficult to distinguish the artery from the vein accurately. Up until now, we employed Palomo's method, in which the spermatic artery and vein are severed en bloc.

Recently we treated nine cases of varicoceles by separating the artery and vein using the microdoppler method. In four cases, artery pulsation was confirmed at the end of separation, while in five cases pulsation disappeared during separation, so that we found it difficult to separate the artery from the vein. But in three of these five cases the microdoppler detected the arterial waves, enabling us to preserve the artery successfully. In the remaining two cases we ligated the artery because no arterial waves were confirmed by the microdoppler. Postoperatively, varices have disappeared in all nine cases, for periods of up to three years at the longest.

It is our impression that the microdoppler method can be of use in identifying and preserving the spermatic artery in high ligation for varicoceles.

Key words: varicocele, high ligation, microdoppler, artery preservation, vasospasm

Klinefelter症候群の臨床的検討

A Clinical Observation of Klinefelter's Syndrome

浜松医科大学泌尿器科学教室

寺田 央 巳
Hiroshi TERADA

山口 安 三
Yasuzoh YAMAGUCHI

牛山 知 己
Tomomi USHIYAMA

鈴木 和 雄
Kazuo SUZUKI

藤田 公 生
Kimio FUJITA

Department of Urology

Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-31, Japan

東京大学医学部泌尿器科学教室

田 島 惇
Atsushi TAJIMA

河 邊 香 月
Kazuki KAWABE

Department of Urology, Faculty of Medicine

University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

当院泌尿器科において1987年から1994年までの7年間にKlinefelter症候群と診断された19症例を対象として検討した。

主訴は男性不妊症が15例と多く、初診時の平均年齢は31.9歳。出生時の両親の年齢は父親が 28.5 ± 4.6 (22~34)歳、母親が 25.9 ± 4.9 (21~34)歳と30歳未満での出産が多かった。身長、体重の平均は170.9 cm, 60.1 kg, body mass indexは22.6と長身、細身は少なかった。精巣容量は全例5 ml以下、精液所見は無精子症、染色体検査では1例が47,XXY,inv(9)(p11q13)と腕間逆位を認めた他は47,XXYでありモザイク例はなかった。内分泌検査では血清FSH, LH値は13例が高値、testosterone値は11例が低値であった。LH-RH負荷試験ではLH, FSHとともに低反応であり、hCG負荷試験では上昇率は低値を示した。精巣生検組織像は、精細胞の欠如、線維化、間質の肥厚、Leydig細胞の増殖を認め、Johnsen's scoreは1もしくは2であった。治療はandrogen補充を行い、二次性徴発育、精神的効果の点では有効であったが、症例に応じて適宜用量と投与間隔を調節する必要があると考えられた。

キーワード：Klinefelter症候群、男性不妊症

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 200 - 204, 1996)

緒 言

1942年にKlinefelterら¹⁾は小さい精巣、無精子症、女性化乳房を主徴候とし、組織学的には精細管の硝子化とLeydig細胞の増生を示す症候群を報告した。本症は泌尿器科領域における原発性男性不妊症、とりわけ無精子症の原因疾患においてとくに頻度の高い疾患で一般男性の0.2%、男性不妊患者の約4~5%、無精子症患者においては約20%と高率に認めら

れる²⁾。その発症機序については現在なお不明な点が多い。我々は1987年から1994年までの7年間に経験した19症例のKlinefelter症候群について臨床的に観察を行い、若干の文献的検索を行ったので報告する。

対象および方法

1987年から1994年までの7年間に浜松医科大学附属病院泌尿器科を受診し、Klinefelter症候群と診断された症例は20例であった。そのうち尿道下裂を主訴

とした6歳男子の1例を除いた19例を対象とした。主訴、初診時年齢、平均不妊期間、出生時の両親の年齢、理学的所見、精巣重量、精液所見、染色体検査、内分泌学的検査、LH-RH試験、hCG試験、精巣生検組織像について検討した。肥満度は、身長と体重からbody mass index (BMI) を算出して評価した。

LH-RH試験はLH-RH (LH-RH注射液タナベ®, 田辺製薬) 100 µg 静注後、30, 60, 90, 120分の血中LH, FSH値で、hCG 負荷試験はヒト胎盤絨毛上皮性gonadotropin (Gonadotropin®, 帝国臓器) 1日5000単位4日連続筋肉内注射による血中testosterone値(以下、T)の変動でみた。T補充療法はTestosterone-Enanthete (Enarmon Depot®, 帝国臓器) 125 mg ~ 250 mgの2 ~ 5週間隔で筋肉内注射を原則とした。LH, FSH, T値の測定はSRL社に依頼しRIA法で行った。精巣生検組織はBouin液に固定してHE染色を行い鏡検した。また、その量的な評価はJohnsen's scoreを用いた。

結 果

1) 初診時年齢は24から36歳で平均29.9 ± 2.7歳。出生時の両親の年齢は父親が平均28.5 ± 4.6歳、母親が平均25.9 ± 4.9歳であった(表1)。主訴は停留精巣

表1 本症例19例の特徴

初診時年齢	31.9 ± 2.7 (27 ~ 36) 歳	
出生時の両親の年齢		
父親	28.5 ± 4.6 (22 ~ 36) 歳	
	30歳未満7例, 30歳以上12例	
母親	25.9 ± 4.9 (21 ~ 34) 歳	
	30歳未満13例, 30歳以上6例	
平均不妊期間	2.9 ± 2.2 (1 ~ 9) 年	
精巣容量	左1.6 ± 1.4 ml, 右1.7 ± 1.1 ml	
	(0.5 ~ 3 ml) (0.5 ~ 3 ml)	
二次性徴		
恥毛	女性型14例, 男性型5例	
女性化乳房	2例	
身長	170.9 ± 6.5 (158 ~ 182.5) cm	
体重	60.1 ± 8.7 (42.0 ~ 90.0) g	
BMI	22.6 ± 2.93 (17.9 ~ 25.7)	
精液検査所見	全例, 無精子症	
染色体検査	47,XXY	18例
	47,XXY,inv (9) (p11q13)	1例
内分泌検査所見		
LH	45.4 ± 27.3 (8.4 ~ 104.2) mIU/ml	
FSH	47.5 ± 21.1 (6.6 ~ 87.1) mIU/ml	
Testosterone	257.5 ± 159.7 (61 ~ 519) ng/ml	
	値は最高値の平均±標準誤差	

2例, 陰茎發育不全2例, 男性不妊が15例であった。不妊期間では既婚者16例の平均は2.9 ± 2.2年であった。

2) 初診時理学的所見では女性化乳房は2例にみられ、身長は平均170.9 ± 6.5 cm (160.2 ~ 182.5 cm), 体重は平均65.7 ± 8.7 kg (42 ~ 90 kg) と長身の傾向はあるがとくに高身長のは認められず、指極長も2例以外長くはなかった。BMIの平均は22.6でBMIが30以上の高度肥満を示すものはなかった。

精巣容量は平均が右約1.6 ± 1.4 ml, 左が約1.7 ± 1.1 ml, 15例が石様硬と従来の身体的特徴と一致して小さく硬い精巣であり、さらに陰茎も成長が悪かった。精液所見は全例無精子症。染色体検査では18例が47,XXY, 1例に47,XXY,inv (9) (p11q13) と腕間逆位を認めた。精巣生検組織所見では本症に特徴的な精細管壁の肥厚、精細胞の欠如、線維化を示し、間質も肥厚しLeydig cellの増殖を認め、精子は認めなかった。Johnsen's score countは全例1もしくは2だった。

合併疾患としては停留精巣, 糖尿病の2例の他に、緑内障1例があった。

内分泌検査所見では、LHが平均値では45.4 mIU/mlと高値だが正常例も6例認めた。FSHは正常例は6例で平均47.5 mIU/mlと高値だった。T値の平均は257.5 ng/dlと低値であった (Normal range: LH (2 ~ 35 mIU/ml), FSH (2 ~ 20 mIU/ml), T (300 ~ 850 ng/ml))。LH-RH試験およびhCG試験の結果はLH-RH負荷試験では、正常人において負荷後30分で最高となり、そのとき前値に比べLHが約7 ~ 10倍, FSHが約2倍となるが³⁾、本症例では血清LHが約3.7倍, FSHが約1.5倍とLH, FSHともにむしろ低反応であった。また、hCG試験におけるTの上昇率も1.5倍と低反応であった。

治療は二次性徴の発現を目的としてTの補充を行った。Testosterone Depot剤を125 ~ 250 mg, LH, FSH, T値を参考に2 ~ 5週間隔で適宜増減し投与した。

なお、成人例では挙児希望者が5例ありAID (artificial incemination by donor) を依頼したが⁴⁾、3例の配偶者に妊娠が確認されている。

考 察

Klinefelter症候群は1942年の報告¹⁾後、多くの症例が報告され、その病因、病態に対する検討が加えられた。1959年にJacobsら²⁾が、胸骨骨髓細胞の検索により染色体構成が47,XXYであることを証明した。その後モザイクの報告もなされ、現在ではKlinefelter症候群の約9%にモザイクをみるといわれている⁵⁾。本症

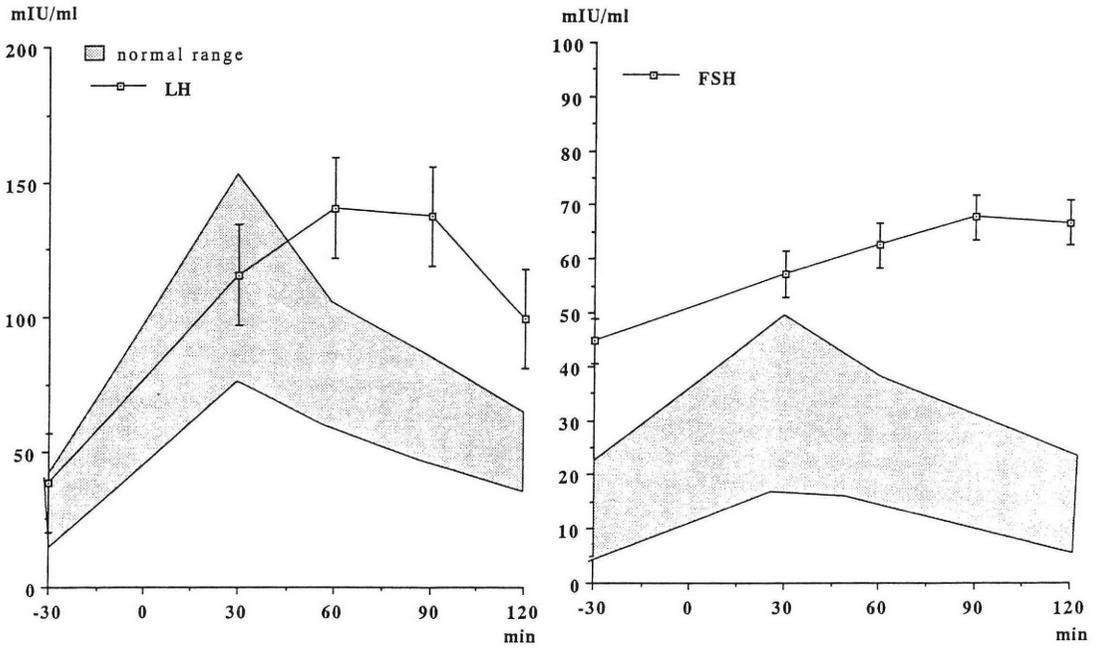


図1 LH-RH負荷試験

の定義は、2個以上のX染色体と1個以上のY染色体を同一細胞内に持ち表現型が男子である性染色体異常とされている⁶⁾。性染色体のXの数が増えるに従い、身体奇形率と知能障害の頻度が高くなる傾向にある⁷⁾。

初診時理学的所見では、本症の一般的な特徴⁸⁾とされる高身長、痩せ型、指極長が身長より長い症例は少なく、むしろ平均的な成人男性の体型であった。外陰部所見では陰毛は男性型が多く陰茎の発育が悪く、精巣は、いわゆる小さくて硬いとされている⁹⁾。この点では本検討と一致した。

精巣機能自体の障害は性成熟までは問題なく、顕著になるのは性成熟が完成した後、つまり思春期以降において血中FSHの上昇により誘発される精細管基底膜の肥厚や変性のほか、精細管内の栄養障害も加われば障害は一層増悪し、完全に硝子化する¹⁰⁾。

また、精巣のLeydig細胞の増生はあくまでも絶対的なものではなく実際、各症例により相違があり¹¹⁾ T産生能および予備能はすでに低下していることが示唆されている¹²⁾。さらにFSHが上昇すれば精細管は完全な硝子化を起こす¹³⁾。

そのほかの身体的特徴として女性化乳房があるが、この合併は20~30%といわれる諸家の報告¹¹⁾に比べ約10%と少なかった。

以上より、今日的なKlinefelter症候群は、従来より

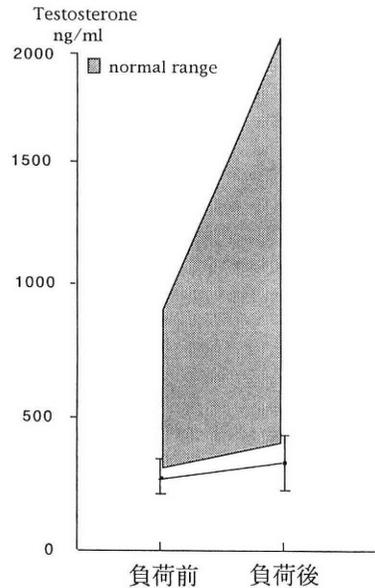


図2 hCG試験

指摘されてきた高身長、やせ形体型という身体的特徴による発見は少なく、男性不妊主訴として受診し、精巣が小さく硬いという身体的特徴、もしくは無精子症の原因精査のため行った染色体検査で診断されるケースの方が多いと考えられる。

一般にKlinefelter症候群の染色体異常の発生機序は、父親の精子形成過程で減数分裂の時期に、性染色体が不分離をおこす場合と、第一卵割の際、X染色体上で同様な不分離がおこる場合の2つが考えられている¹³⁾。その不分離の原因として、母親の高年齢、放射線被曝、慢性疾患、遺伝子異常を誘発するウイルスの存在、自己免疫機序の関与があげられるが、X染色体の長腕の一定領域であるq11～q22の重複が本性の原因であるという報告もある¹⁵⁾。

内分泌所見では本症の血中LH、FSH値は正常男性に比べて有意に高値を示すものが多かったが、正常値を示すものを認めた。hCG試験はLeydig細胞の予備能検査だが、上昇率は一般に低値もしくは無反応で、Leydig細胞がすでに極限状態にあり、Leydig細胞自身の機能的な異常が考えられる¹⁴⁾。これは、下垂体は予備能を有しているが、精巣のT産生能には余力が残っていないことを示唆している¹²⁾。

合併症は主に停留精巣、糖尿病、緑内障があげられるが、布施ら¹¹⁾の検討によれば停留精巣は56例中2例であった。本症候群の乳癌の発生率は0.9%と高く、正常男性に比べ約20倍の頻度で¹⁶⁾、女性化乳房との関連性が考えられている。その他の悪性新生物では慢性骨髄性白血病、Hodgkin病、非Hodgkin病などの合併があり、発生率としてはPatil¹⁵⁾らの報告によれば1.9%という。悪性腫瘍以外、脳血管病変が同年代の男性の6倍に認められ¹⁷⁾、ほかに自己免疫疾患などの合併も報告されている。

治療法：本症候群についての造精機能に関する有効な治療法は現時点ではないが、男性ホルモン不全徴候に関しては外因性のテストステロン製剤の投与により改善が認められる。

これについて補充中のHormone値は、LH、FSHの平均値は正常であったが、治療前にT値が正常であったにもかかわらず治療によってLH、FSHが上昇したもの、あるいは、feedbackが強すぎむしろ治療前より低下してしまったものも認め、諸家の報告と一致した^{3,11)}。前者は長期間外因性にTを投与したために間脳-下垂体系へnegative-feedbackがかかり抑制閾値が上がるためではないかと推測されている¹⁸⁾。また長期投与で内因性のT値が低下する原因については、長期間、大量の外因性T投与によって、Leydig細胞機能が障害されると考えられている¹⁸⁾。したがって、治療の長期化にともない症例に応じて定期的にLH、FSH、Tの測定を行い漸次治療薬の用量、投与間隔を調節する必要がある。

結 語

Klinefelter症候群19症例について臨床的検討を行った。

1) 初診時年齢は平均31.9歳、出生時の両親の年齢は父親が平均28.5歳、母親が平均25.9歳と高齢出産は少なかった。主訴は男性不妊15例、平均不妊期間は2.9年であった。

2) 精液所見は全例無精子症、染色体は18例が47,XXY、1例に47,XXY,inv(9)(p11q13)と腕間逆位を認めた。

3) 理学的所見においては精巣容量は全例5ml以下と小さく硬かった。女性化乳房の合併は2例14%と少なく、身長、体重の平均も170.9cm、60.1kg(BMI:22.6)と平均的な体型であり、いわゆる長身やせ型といわれる本症候群の今日的な特徴とは一致しなかった。

4) 合併症は、停留精巣、糖尿病2例、緑内障1例であった。なお糖尿病の1例は、Depot剤投与後のものであった。

5) 内分泌検査成績ではLH、FSHともに高値例が13例であったが異常高値例はなく正常例も6例認めた。T値は11例が低値、8例が正常であった。LH-RH試験における上昇率は、血清LHは約3.4倍、FSHは約7.4倍とLH、FSHともに上昇率は低く、hCG試験における上昇率も1.5倍と低反応であった。

6) 治療は、二次性徴発現を目的として外因性Tの補充療法を行った。同時に二次性徴発現による精神的効果も考慮に入れた。挙児希望の5名にはAIDを依頼し、3名の配偶者に妊娠が確認された。

本稿の要旨は第81回日本泌尿器科学会総会において発表した。

文 献

- 1) Klinefelter HF Jr, Reifenstein DC Jr, Albright F, et al. (1942) Syndrome characterised by gynecomastia, aspermatogenesis without a Leydigism and increased excretion of follicle stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2: 615-627
- 2) Nielsen J (1969) Klinefelter's syndrome and XYY syndrome. A genetical, endocrinological and psychiatric-psychological study of thirtythree severely hypogonadal male patients and two patients with Karyotype 47,XXY. *Acta Psychiat Scand Supple* 209: 1-353
- 3) 笹川五十次, 風間泰蔵, 梅田慶一 他 (1985) Klinefelter症候群の臨床的・内分泌学的検討. 西

- 日泌尿 47: 687-694
- 4) Jacobs PA and Strong JA (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. *Nature* 183: 302-303
 - 5) 空本慎慈, 吉田裕之, 安本章浩 他 (1992) Klinefelter症候群の臨床的検討. *西日泌尿* 54: 1674-1676
 - 6) Castro-Magana M, Bronsther B and Angulo MA (1990) Genetic forms of male hypogonadism. *Urology* 35: 195-204
 - 7) 篠原 充, 原 慎, 箕和田滋 他 (1989) Klinefelter症候群における思春期の内分泌学および睾丸組織学的変化の検討. *日泌尿会誌* 80: 574
 - 8) Roboch J (1964) A clinical study of 100 chromatin positive men. *Fertil Steril* 15: 331-337
 - 9) Ratcliffe SG, Skakkebeak NE (1989) Cytogenic in male hypogonadism. In: Burger H, de Kretser D (eds), *The Testis* 9, 2nd ed. Raven Press, New York, PP493-497
 - 10) Winter JSD (1990) Androgen therapy in Klinefelter's syndrome during adolescence. *Birth Defects* 26: 235-238
 - 11) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴男 他 (1983) Klinefelter症候群の臨床的観察. *日泌尿会誌* 74: 226-234
 - 12) 伊藤直樹 (1993) 下垂体ゴナドトロピンの基礎と臨床: ゴナドトロピンと精巣機能. *日不妊会誌* 38: 498-499
 - 13) 岩動孝一郎 (1984) 睾丸機能不全および類宦官症. *新臨床泌尿器科全書*, 市川篤二他監修, 8版, 金原出版, 東京, PP123-132
 - 14) Regadera J, Codesat J, Paniagua R, et al. (1991) Immunohistochemical and quantitative study of interstitial and Leydig and intratubular Leydig cells in normal men, cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 164: 299-306
 - 15) Patil SR (1981) Association of the X chromosomal region q11-q22 and Klinefelter's syndrome. *Clin Genet* 19: 343-346
 - 16) Scheike O (1973) Male breast cancer, III. Breast carcinoma in association with the Klinefelter syndrome. *Acta Pathol Microbiol Scand* 81: 352-358
 - 17) Price WH (1985) Causes of death in X chromosomal positive males. *J Epidemiol Community Health* 39: 330-334
 - 18) 福谷恵子 (1976) Klinefelter症候群における間脳-下垂体-睾丸系の内分泌学的研究. *日泌尿会誌* 67: 954-967

(受付:1995年6月3日)

(受理:1996年1月29日)

A clinical observation of Klinefelter's syndrome

Hiroshi Terada, Yasuzoh Yamaguchi, Tomomi Ushiyama,
Kazuo Suzuki and kimio Fujita

Department of Urology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-31, Japan

Atsushi Tajima and Kazuki Kawabe

Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Twenty patients with Klinefelter's syndrome were treated at the Hamamatsu University, between 1987 to 1994. Their average age was 31.9 (24 to 36) years old. Male infertility was the chief complaint in 15 patients. Eunuchohidism and cryptorchidism were observed in two cases. All of them had small testes and two had gynecomastia (14 %). Chromosomal analysis revealed the karyotype of 47,XXY in 18 cases and one had a normal variant (47,XXY,inv (9) (p11q13)). Serum luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) were high in 13 cases and testosterone (T) were significantly low in 11 cases. Intravenous administration of synthetic LH-releasing hormone (LH-RH, 100 μ g) provoked increases of serum FSH levels and slightly increases of serum LH in these patients.

The increased T levels after a four days administration of human chronic gonadotropin (h-HCG, 5000 IU) was lower than normal. Suppression of gonadotropins by the exogenous T load on was slightly exaggerated comparing with normal adult males. The substitution of T with intramuscular injection of 125 ~ 250 mg depot T (Testosterone enanthete: ENARMONR depot) once two to five weeks gradually decreased of the LH and FSH levels to the normal range less within several weeks.

Key words: Klinefelter's syndrome, male infertility

抗精子抗体測定スクリーニング法の検討 — SpermCheck および SpermMar の比較検討 —

Evaluation of the Screening Test for Antisperm Antibody — A Comparison of the Usefulness of SpermMar and SpermCheck —

芸術の森泌尿器科

斉藤 誠一

Seiichi SAITO

Art Park Urology, Sapporo 005, Japan

抗精子抗体スクリーニング検査として、immunobead test をキットとした SpermCheck および mixed anti-globulin reaction test をキットとした SpermMar を施行し、その精度および測定方法の簡便度を比較検討した。

対象として、不妊症例23例、血精液症2例の精液と精漿、および精管結紮例11例の精漿の計36例、61検体に対し、両方法を行った。その結果、精子に対する直接法で25例中3例(12.0%)が陽性であり、その精液所見の特徴として精子運動率の低下および精子凝集があげられた。精漿に対する間接法では36例中5例(13.9%)が陽性であり、とくに精管結紮後長期経過している症例に認められた。

SpermCheck および SpermMar の測定結果の比較では両者ともに同じ結果であった。測定手技で比較すると、SpermCheck は精子洗浄などで約20分程度を要したが、SpermMar はスライドグラス上での混和のみで測定可能であり、非常に簡便であった。

以上の検討より、日常診療における外来スクリーニングとしての抗精子抗体測定は手技が簡単で迅速な SpermMar が有用と考えられた。

キーワード：抗精子抗体、スクリーニング、精管結紮

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 205 - 207, 1996)

緒 言

原因不明の男性不妊症例の約10%に、また精管結紮再開例の約50%²⁾に抗精子抗体が陽性であり、妊娠成立に苦慮することより、その測定方法、とくにスクリーニング法の確立が急がれている。数々の方法が考案され、試みられているが、正確性および簡便性がスクリーニングとして要求される。今回の検討では、比較的手技が簡単であり、測定結果も評価の得られている immunobead test をキット化した SpermCheck³⁾ および mixed antiglobulin reaction test をキット化した SpermMar⁴⁾ を行い、比較検討を行った。

対 象

測定対象は、過去3年間に当施設を受診した不妊を主訴とする無精子症以外の症例が23例である。こ

れら症例に合併する異常所見としては、精索静脈瘤が8例(34.8%)、精液中に 100×10^6 個以上の白血球を認める感染症例が12例(52.2%)、精巣外傷の既往が1例(4.3%)、停留精巣の手術既往が1例(4.3%)、精巣腫瘍の手術既往が1例(4.3%)、精管結紮再開後1例(4.3%)が存在する(重複例あり)。その他に前立腺炎を原因とした血精液症2例、精管結紮例11例を対象とした。したがって測定材料は精液25検体、精漿36検体であった。なお、あくまでスクリーニングを目的とした検討であるため、今回は血清の測定は行っていない。

不妊を主訴とした症例の精液所見は、WHO基準で、乏精子症4例、精子運動率低下例7例、正常精液所見12例であった。なお、正常精液所見でも、不妊を主訴としているため、原因不明の不妊症として測定対象に供した。また、これら症例のうちで、部

位を問わず、一箇所でも精子凝集のみられた症例は5例であり、これらを精子凝集陽性として検討した。

方 法

精液検査は北里サプライ製精子測定チャンパーSP ACE Gを使用し、最低2回の測定を行い、平均を用いた。抗精子抗体測定にはBiorad製SpermCheck assayおよびFertipro製SpermMarを使用した。

直接法の場合、SpermCheckの方法は精液を2倍量のbufferで混和後500G、5分間の遠心分離による洗浄を3回ほど行い、スライドガラス上でラテックスビーズ試薬と反応させ、鏡検する。SpermMarはスライドガラス上でウサギ抗ヒトIgG-Fc抗血清とIgG coatedラテックスビーズの試薬を混和し、鏡検する。

間接法の場合、両者ともに、サンプルを非働化処理し、洗浄した抗精子抗体陰性精子と37℃、30分間インキュベートする。SpermCheckはさらに3回の洗浄を行い、試薬と反応させて鏡検する。SpermMarは洗浄なしに試薬と混合して鏡検する。

測定結果は40%以上の運動精子にビーズが付着している場合を陽性とした。

結 果

測定結果(表1)では、不妊症例および血精液症25例の精子を対象とした直接法で3例(12.0%)が陽性であった。この25例に精管結紮例11例を加えた精漿計36例を対象とした間接法の結果では5例(13.9%)が陽性であった。SpermCheckおよびSpermMarは直接

表1 測定結果

直接法 (25例)	Immunobead test (IgG, A, M)			
		陰性	陽性	計
MAR test (IgG, A)	陰性	22	0	22
	陽性	0	3	3
	計	22	3	25
間接法 (35例)	Immunobead test (IgG, A, M)			
		陰性	陽性	計
MAR test (IgG, A)	陰性	30	0	30
	陽性	0	5	5
	計	30	5	35

表2 不妊症例における抗精子抗体陽性例

年齢	精子数	運動率	感染の有無	凝集
28	8 × 10 ⁶ /ml	25 %	+	+
33	10 × 10 ⁶ /ml	39 %	-	+
47	62 × 10 ⁶ /ml	42 %	+	+

法および間接法で一致した結果であった。

不妊症例の抗精子抗体陽性3例の結果(表2)では3例ともに精子凝集および精子運動率の低下を認めた。なお、28歳の症例は停留精巣で手術の既往があり、47歳の症例は精管結紮再開後の症例であった。

精管結紮例精漿中の抗精子抗体陽性例2例は、結紮期間は9年と14年であった。他の陰性例9例は2週間から3年と比較的短期間であった。

考 察

社会情勢の変化にともない、男性不妊症への対応が、より完全な診断治療へと発展してきている。その原因のひとつとして抗精子抗体が存在し、いわゆるunexplained infertilityの10%前後に存在することが知られている。また、過去に受けた精管結紮を再開すべく精管再建術を希望する症例が増加している。しかし、手術に成功して精液中に精子が出現しても、妊娠に至るのはわずか50%である²⁾。その原因としても、抗精子抗体の存在が明らかとされている。さて、その測定にあたっては、古くから、数々の試みがなされており、sperm immobilization test, sperm agglutination test, indirect immunofluorescence, ELISA, radiolabelled antiglobulin assay, immunobead test, mixed agglutination reactionが行われている。しかし、この中で日常診療で簡単に行え、しかもパートナーの協力なくとも施行できるものはimmunobead testおよびmixed agglutination reaction testである。近年、この2法の測定を簡便にしたassay kitが供給されている^{3,4)}。

SpermCheckはimmunobead testをkitにしたものであり、IgG, A, Mの抗血清がすべて混和された状態で反応を行い、bufferも付属している。しかし、手技的に数度の精子洗浄が必要であるため、この操作に約20分程度要する。

SpermMarはIgGおよびIgAのFc componentに対する抗血清を用いたキットで、ウサギ抗ヒトIgG-Fc抗血清をIgG coatedラテックスビーズとともに精液に混和するのみで測定可能となる。他にMarScreenというkitも他社から発売されている。

今回、この2法を行い、比較検討し、スクリーニングとしての有用性を検討した。その結果、症例が限られているものの、両者ともにまったく同じ結果であった。したがって、測定結果に関しては統計的比較検討はできなかったが、測定の簡便さでは比較可能であった。SpermCheckは3回の精子洗浄が必要であるのに対し、SpermMarは精液と2種類の試薬を混和するだけで測定可能であった。Sedorら⁵⁾も、

MAR test と direct immunobead test を 102 検体に行い、その測定結果に大差はなく、測定手技の簡便さからオフィススクリーニングとして MAR test がすぐれていると報告している。

最近、Flow Cytometry を用いた抗精子抗体測定の有用性も報告⁶⁾されているが、手技的には immunobead test と大差なく、特殊な装置も要することからスクリーニングには適さないと考えられる。

以上より、スクリーニングとしての抗精子抗体測定には SpermMar が簡便で適すると考えられた。また、今回の検討では、精子無力症や精子凝集のみられる症例には抗精子抗体の測定が望ましいと考えられた。さらに、精管結紮例では、結紮期間が長いほど陽性例が多く、他の報告²⁾と同様の結果であった。

文 献

- 1) Halim A, Antoniou D (1973) Autoantibodies to spermatozoa in relation to male infertility and va-

sectomy. *Brit J Urol* 45: 559-562

- 2) Meinertz H, Linnert L, Fogh-Andersen P, et al. (1990) Antisperm antibodies and infertility after vasovasostomy: a follow-up study of 216 men. *Fertil Steril* 54: 315-321
- 3) McClure RD, Tom RT, Watkins M, et al. (1989) SpermCheck: A simplified screening assay for immunological infertility. *Fertil Steril* 52: 650-654
- 4) Hellstrom WJ, Samuels S, Waites AB, et al. (1989) A comparison of the usefulness of SpermMar and immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 52: 1027-1031
- 5) Sedor J, Hirsch IH (1994) Office based screening of sperm autoimmunity. *J Urol* 152: 2017-2019
- 6) Ke RW, Buster JE, Docker ME, et al. (1995) Flow cytometry provides rapid and highly accurate detection of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 63: 902-906

(受付：1996年1月10日)

(受理：1996年1月29日)

Evaluation of the screening test for antisperm antibody — A comparison of the usefulness of SpermMar and SpermCheck —

Seiichi Saito

Art Park Urology, Sapporo 005, Japan

I compared the usefulness of SpermCheck (assay kit of immunobead test) and SpermMar (assay kit of mixed antiglobulin reaction test) for the screening of antisperm antibody. Both assays were performed on semens and seminal plasmas of 23 infertile patients and 2 hematospermias, and seminal plasmas of 11 vasectomized patients. In direct method for the sperm, 3 out of 25 (12.0 %) were positive reactions, and their backgrounds were lower motility and agglutination of sperms. In indirect assays for the seminal plasma, 5 out of 36 (13.1 %) were positives. Positive vasectomized cases had long time after vasectomy.

The results of both assays were same. Although SpermCheck needed about 20 minutes for the sperm washing, SpermMar didn't need any washing and was easier to perform the test.

Above all, it is suggested that SpermMar can be easily incorporated into routine semen analysis as a screening of antisperm antibody.

Key words: antisperm antibody, screening, vasectomy, immunobead test, mixed antiglobulin reaction

体外受精・胚移植治療により生児を得た 卵管形成不全をともなった単角子宮の1例

A Case Report of Successful Pregnancy Following In Vitro Fertilization and Embryo Transfer in a Woman with a Unicornuate Uterus and a Hypoplastic Fallopian Tube

長崎大学医学部産婦人科学教室

利井陽子 Youku RII	山下隆則 Takanori YAMASHITA	蓮尾敦子 Atsuko HASUO
宮村泰豪 Yasutake MIYAMURA	河野雅洋 Masahiro KAWANO	藤下晃 Akira FUJISHITA
	石丸忠之 Tadayuki ISHIMARU	

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

体外受精・胚移植治療により生児を得た卵管形成不全をともなった単角子宮の1例を経験したので報告する。

症例は36歳の原発性不妊患者で、子宮卵管造影にて単角子宮および卵管閉塞が疑われ、当科を紹介され受診した。腹腔鏡検査にて子宮は右単角子宮で左側に母指頭大の副角を認めた。右卵管は卵管膨大部付近で盲端に終わっており、左卵管は索状であった。左右の卵巣はいずれも正常大であった。以上の所見より無機能性の副角を持ち、卵管形成不全を合併した単角子宮と診断した。このため体外受精・胚移植治療の適応と判断し、6回目の治療にて単胎妊娠に成功した。妊娠経過は、切迫流産徴候を認めたものの比較的順調に経過し、妊娠38週6日にて正常分娩に至った。

今回、本症例の経過の詳細と単角子宮と流早産の関係について若干の文献的考察を加え報告する。

キーワード：単角子宮、卵管形成不全、体外受精-胚移植

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 208 - 211, 1996)

緒言

ミューラー管の分化異常は、全女性の約0.1%に発生し^{1,2,3)}、その中で単角子宮の発生頻度は約1~2%といわれている⁴⁾。単角子宮は、双角子宮や中隔子宮などとともにな妊の原因となったり⁵⁾、妊娠した場合、流産や早産が高率に発生するともいわれている^{6,7,8)}。卵管の先天異常はまれといわれるが³⁾、今回、我々は、体外受精・胚移植治療により生児を得た卵管形成不全を合併した単角子宮の1例を経験したので報告する。

症例

症例： 36歳，主婦
既往歴，家族歴：特記すべきことなし
月経歴：初経11歳，月経周期28日型，整
妊娠歴：なし
現病歴：平成2年(30歳)結婚。結婚後1年経過しても妊娠しないため近医を受診し，子宮卵管造影にて単角子宮および卵管閉塞が疑われ， 6月当科へ紹介された。内診所見では子宮は前傾前屈，右側へ偏位しており，大きさは正常に比しやや小さ

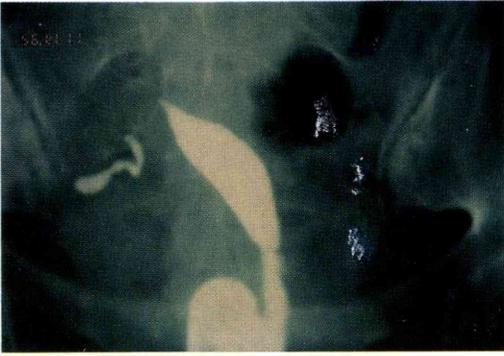


写真1 子宮卵管造影像

子宮はbanana like cavityを呈し、右卵管は膨大部付近より遠位端は描出されず。

く、両側付属器は触知しなかった。月経周期は28日型で順調、基礎体温も二相性であった。卵胞期の血中プロラクチン値、黄体期の血中エストラジオールおよびプロゲステロン値はいずれも正常範囲で、夫の精液所見も正常であった。

前医で施行された子宮卵管造影では典型的なbanana like cavityを示し、左卵管は描出されず、右卵管は描出されるものの膨大部付近より遠位端は描出されなかった(写真1)。

診断を確定するため平成3年6月、腹腔鏡検査を施行した。子宮は右単角子宮で、左側に母指頭大の副角を認めた(写真2)。右卵管は通常の約3分の2の長さで、卵管膨大部付近で盲端に終わっており、卵管采は認められなかった(写真3)。左副角には左卵管と思われる索状物を認めた。左右の卵巣はいずれも正常大であった。なお骨盤内に炎症性の癒着や子宮内膜症の所見は認めなかった。

以上の所見よりAmerican Fertility Societyの分類⁹⁾に基づき無機能性の副角を持ち、卵管形成不全をともなった右単角子宮と診断した。患者の希望もあり、体外受精・胚移植治療を選択した。

平成3年より体外受精・胚移植治療を開始し、卵が採取できなかった周期や、low responseのため採卵術をキャンセルした周期も含めて、6回目の治療を平成6年11月に施行した。Short protocol法にて卵巣刺激を行い11個の卵を採取し、7個が受精分割した。受精卵の質はやや不良であったため4個の受精卵を胚移植し、この周期に単胎妊娠が成立した。妊娠8週時、性器出血のため一時入院し、また妊娠36週時、軽度の子宮収縮を認めたため一時的に入院管理した以外は、胎児発育は良好、妊娠中毒症や頸管の開大

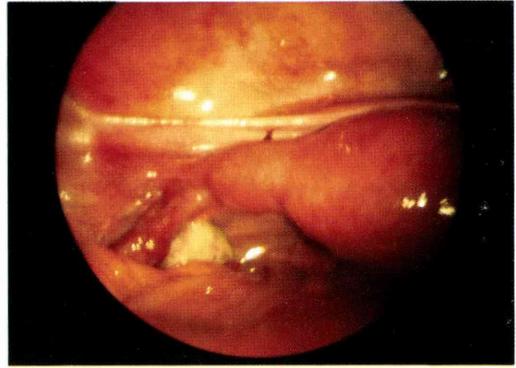
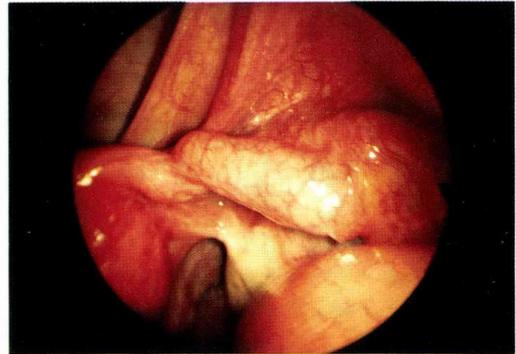


写真2 左子宮副角および左卵巣

写真3 右卵管および右卵巣
右卵管は盲端に終わっている。

も認められずほぼ順調に経過した。平成7年7月18日、妊娠38週6日にて陣痛発来し、8時間後3140g、Apgar score 9点の男児を正常分娩した。産褥経過にも異常なく、母児ともに産褥7日目に退院した。

考 察

体外受精治療による単角子宮の妊娠例の報告はいくつかあるが^{10,11)}、今回我々が経験した卵管形成不全をともなう単角子宮での妊娠成功例の報告は、調べた範囲内では見あたらなかった。また、子宮奇形に卵管形成不全をともなう症例に卵管形成術を施行したという報告も調べた範囲内では見あたらなかった。Goldbergら¹¹⁾は、右単角子宮で対側の卵管が一部形成不全をともなっている症例に体外受精治療を行い、生児を得たと報告している。しかしながら、この症例は、右卵管妊娠の既往があり、我々が経験した例とは異なっていた。今回報告した症例では、盲端部内腔の上皮を観察していないため、卵管形成術が可能であったかどうか判断できないが、卵管膨大部より遠位端が形成されておらず、顕微鏡による卵

管形成術を行ったとしても成功率は低いと考え、また患者夫婦も体外受精治療を希望したため、体外受精・胚移植治療を選択した。

一般に単角子宮では妊孕性が低く、Fedeleら¹²⁾は31.6%が不妊であったと報告している。また、単角子宮では妊娠した場合でも、高い流産率が知られている。明らかな原因は不明であるが、単角子宮では子宮腔が小さいことや子宮動脈の走行異常のため、子宮内胎児発育遅延(IUGR)や早産をひきおこすといわれている⁶⁾。そのほか高率に胎位異常をきたすともいわれている^{13,14)}。また頸管無力症になりやすいとの報告もある¹⁵⁾。単角子宮での妊娠例の転帰についてMoutosら⁷⁾がまとめた報告によると流産は12~86%にもほり、平均48%に達している。早産も平均14%に発生し、正期産は37%しかなく、生児を得るのは48%と報告している。

今回の症例は、妊娠経過中、切迫流産・切迫早産のため一時的に入院加療を要したが、頸管無力症、IUGRおよび胎位異常は認められず、妊娠38週まで比較的順調に妊娠が継続し自然分娩に至った。

近年のassisted reproductive technologyの発達にともない、従来の治療では妊娠できなかった子宮や卵管の先天異常例に対して体外受精治療が行われ、今後、今回報告したような妊娠例が増加してくると思われる。従来からの報告のように、子宮奇形では流産やIUGR、胎位異常、早産などの周産期異常が高率に発生することから、新生児医療チームとの綿密な連携をとりながら嚴重な妊娠分娩管理が必要と思われる。

文 献

- 1) Rock JA and Schlaff WD (1985) The obstetric consequences of utero-vaginal anomalies. *Fertil Steril* 43: 681-692
- 2) Pinsonneault O and Goldstein DP (1985) Obstructing malformations of the uterus and vagina. *Fertil Steril* 44: 241-247
- 3) Golan A, Langer R, Bukovsky I, et al. (1989) Congenital anomalies of the mullerian system. *Fertil Steril* 51: 747-755
- 4) Semmens JP (1962) Congenital anomalies of female genital tract: Functional classification based on review of 56 personal cases and 500 reported

cases. *Obstet Gynecol* 19: 328-350

- 5) Buttram VC (1983) Mullerian anomalies and their management. *Fertil Steril* 40: 159-163
- 6) Mason A and Jones H (1982) Impaired reproductive performance of the unicornuate uterus: Intrauterine growth retardation, infertility, and recurrent abortion in five cases. *Am J Obstet Gynecol* 15: 173-177
- 7) Moutos DM, Damewood MD, Schlaff WD, et al. (1992) A comparison of the reproductive outcome between women with a unicornuate uterus and women with a didelphic uterus. *Fertil Steril* 58: 88-93
- 8) Ludmir J, Samuels P, Brooks S, et al. (1990) Pregnancy outcome of patients with uncorrected uterine anomalies managed in a high-risk obstetric setting. *Obstet Gynecol* 75: 906-910
- 9) The American Fertility Society (1988) The American Fertility Society classifications of adnexal adhesions, distal tubal occlusion, tubal occlusion secondary to tubal ligation, tubal pregnancies, Mullerian anomalies and intrauterine adhesions. *Fertil Steril* 49: 944-955
- 10) Check JH, Lee G, Nowrozi K, et al. (1992) Successful delivery of twins in a woman with a unicornuate uterus. *Gynecol Obstet Invest* 34: 124-125
- 11) Goldberg JM and Friedman CI (1995) Noncanalization of the fallopian tube. A case report. *J Reprod Med* 40: 317-318
- 12) Fedele L, Zamberletti D, Vercellini P, et al. (1987) Reproductive performance of women with unicornuate uterus. *Fertil Steril* 47: 416-419
- 13) Michalas SP (1991) Outcome of pregnancy in women with uterine malformation: evaluation of 62 cases. *Int J Gynecol Obstet* 35: 215-219
- 14) Ben-Rafael Z, Seidman DS, Recabi K, et al. (1991) Uterine anomalies. A retrospective, matched-control study. *J Reprod Med* 36: 723-727
- 15) Abramovici H, Faktor JH, Pascal B (1983) Congenital uterine malformation as indication for cervical suture (cerclage) in habitual abortion and premature delivery. *Int J Fertil* 28: 161-164

(受付: 1996年1月8日)

(受理: 1996年1月30日)

A case report of successful pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer in a woman with a unicornuate uterus and a hypoplastic fallopian tube

Youko Rii, Takanori Yamashita, Atuko Hasuo, Yasutake Miyamura,
Masahiro Kawano, Akira Fujishita and Tadayuki Ishimaru

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

We report a successful pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer in a 36 year-old woman with a unicornuate uterus and a hypoplastic fallopian tube. She had a unicornuated uterus with a hypoplastic fallopian tube and a noncavitary rudimentary horn. She was conceived at 6th in vitro fertilization and embryo transfer treatment. Although abnormal genital bleeding occurred at the first trimester, after then, her gestation progressed satisfactorily and her fetus grew well. She delivered a healthy boy transvaginally at the 38 weeks gestation.

Key words: unicornuate uterus, hypoplastic fallopian tube, IVF-ET, pregnancy

精子のATP量と精子濃度、運動率の関係

Adenosine Triphosphate in Human Semen: Correlation with Sperm Concentration and Motility

横浜市立大学泌尿器科学教室

菅野 ひとみ

Hitomi KANNO

佐藤 和彦

Kazuhiko SATO

木下 裕三

Yuzo KINOSITA

岩崎 皓

Akira IWASAKI

齋藤 和男

Kazuo SAITO

穂坂 正彦

Masahiko HOSAKA

Department of Urology

Yokohama City University School of Medicine, Yokohama 236, Japan

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 10% トリクロロ酢酸 (TCA) で精子の細胞膜を破壊し、2mM EDTA で精子や精漿中の ATP 分解酵素を失活させ、Luminometer で精子の ATP 量を測定した。

その結果精子の含有する ATP 量は精子運動率と逆相関を示し、運動率の高い精子では 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 60 分までの 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値を示し、精漿成分に局在する物質が ATP 減衰を起こすことが考えられ、TCA と EDTA で失活不十分な精漿中の ATP 分解酵素の存在が考えられた。この ATP 減衰速度は、精子運動率、濃度と正の相関関係を示し ($p < 0.0001$)、ATP 減衰速度が速いほど、精子濃度が高く運動率も高かった。

キーワード：精子、ATP、精子濃度、精子運動率

(Jpn. J. Fertil. Steril., 41 (2), 212 - 218, 1996)

緒言

近年 luciferin-luciferase 反応を利用しての ATP 測定が可能となり、簡便に ATP を測定できるようになった。精子の ATP 量測定においては、精子の細胞膜を破壊し細胞内の ATP を遊離させると同時に、精漿や精子に含まれる各種の ATP 分解酵素を不活化させる必要がある。従来精漿中や精子尾部の ATP 分解酵素の影響を除くため、煮沸やパーコール処理、また酸などによる酵素失活の方法がとられてきた。今回我々はトリクロロ酢酸 (TCA) で細胞膜を破壊し、EDTA で酵素活性を阻害し、bioluminescence assay を用いて、精子の ATP 量を測定した。精子の ATP 量と精液所見について検討した。

対象

横浜市立大学泌尿器科不妊外来患者より得た精液 36 例を対象とした。これらの平均精子濃度は $42.9 \pm 9.0 \times 10^6/\text{ml}$ (Mean \pm S.E.) (3.9 ~ 235.8)、精子運動率は $31.7 \pm 3.3\%$ 、精子速度は $42.9 \pm 2.2 \mu\text{m/s}$ 、精子直進性は 4.8 ± 0.2 、精子頭部振幅は $2.8 \pm 0.2 \mu\text{m}$ である。この 36 例の精液、およびこのうち任意の 14 例ではさらにパーコール処理を加えその上清、25 ~ 60 間、60 ~ 80 間、沈渣中、の精子の ATP 量の測定を行った。精子運動の測定はコンピュータ精子解析装置 Cell soft 3000 (CRY RESOURCE 社) を用いて解析した。精子のパーコール処理法

パーコール液 (Sigma, New York, USA) 19 ml に Heps saline solution (Heps 10 mM, fructose 14mM, NaCl 130 mM, KCl 4 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.5 mM, PH 7.5)

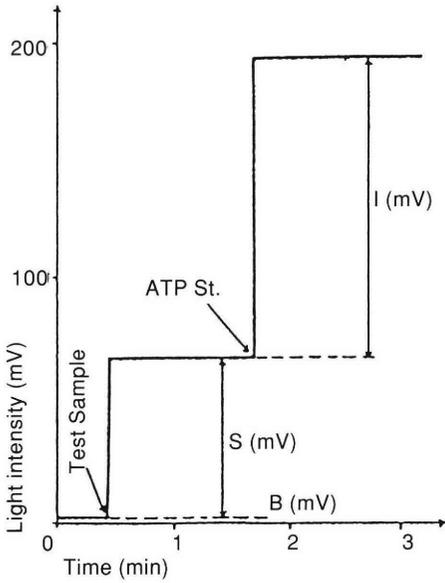


図1 ATP測定法

S = ATPモニタリング試薬添加後の試料の読み取り値, B = 試料ブランク, I = ATP内部標準試薬添加後の読み取り値.

ATP量はつぎの式で計算される.

$$ATP (mol) = \frac{S (mV) - B (mV)}{I (mV)} \times 1.83 \times 10^{-11}$$

20X を 1 ml 加え等張化パーコール液を作成した. 同液に 5% bovine serum albumin 含有 Heps saline solution を加え, 80%, 60%, 25% パーコールを作成した. 80%, 60%, 25% パーコール液 2 ml ずつの 3 層パーコールに, 充分液化した精液 2 ml を重層し, 400G 30 分間遠心し, 各層間の精子を回収した.

ATP測定法

精液またはパーコール処理後の精子浮遊液 50 μl に, 20% TCA 50 μl を加え除蛋白後に, トリス酢酸緩衝液 (0.1 mM Tris 2 mM EDTA) を 4 ml 加えた. 同液 400 μl に ATP モニタリング試薬 (0.5% bovine serum albumin, 50 mM magnesium acetate, 10 μM inorganic pyrophosphate, 100 mM tris acetate, 2 mM EDTA, PH 7.75, luciferase, D-luciferin; 1243-200, BioOrbit, Finland) 100 μl を加えルミノメーター (1251-Luminometer System BioOrbit) で発光強度を測定した. さらに ATP 標準試薬 (BioOrbit) を 10 μl (ATP 1.83 × 10⁻¹¹ mol 含有) 添加し, 発光強度を測定した. 両者の発光強度の差 (I) と試料の発光強度 (S), 試料ブランク (B) から ATP 量は次の式で算出される (図 1).

$$ATP (mol) = \frac{S (mV) - B (mV)}{I (mV)} \times 1.83 \times 10^{-11}$$

さらに発光強度の経時的な変化をみるため, 標準試薬添加後, 60分まで発光強度を測定した.

motility

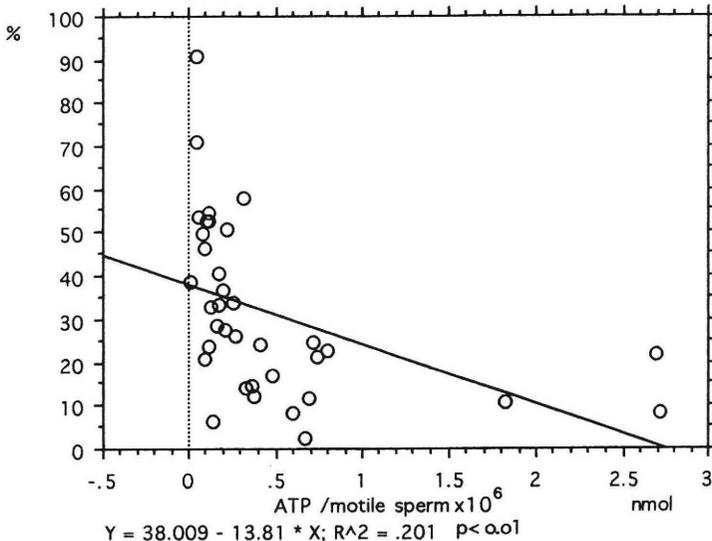


図2 精子運動率と運動精子数100万あたりのATP量の関係

運動率と運動精子数100万あたりのATP量は, 逆相関を示し (P < 0.05), 運動率の高い精液ほど, 精子のATP量は少ない傾向にあった.

結 果

精液原液36例のATP測定値の平均は、 0.088 ± 0.017 nmol/ 10^6 spermであった。生存精子数と運動精子数は近似値を示すため、これを、便宜上運動精子数100万あたりに換算すると、 0.457 ± 0.108 nmol/ 10^6 motile sperm (Mean \pm S.E.)となり、文献値の 0.49 nmol/ 10^6 living sperm と非常に近い値を示した。

この換算値は図2に示すように運動率とよく逆相関を示し ($P < 0.05$)、運動率の高い精液ほど、運動精子数100万あたりのATP量が少ない傾向にあった。精子濃度、速度、直進性、精子頭部振幅とATP量の間には有意な相関関係は認められなかった。

パーコール処理を行った14例の、各層における精子100万あたりのATP測定値の平均は表1に示すとおりである。精子100万あたりのATP量を求めると、各層で有意差は認められなかった。しかし、上層における精子にはほとんど運動性が認められず、不良な精子や死んだ精子が多く含まれることを考慮すると、実際にATPを含有する生存精子あたりのATP量は、沈渣の精子の方が各層間や原液よりも少ない傾

表1 三層パーコール処理精液14例の各層における精子中のATP平均値

25 ~ 60 %	0.054 ± 0.012 nmol/ 10^6 sperm
60 ~ 80 %	0.036 ± 0.006 nmol/ 10^6 sperm
沈 渣	0.038 ± 0.008 nmol/ 10^6 sperm
原 液	0.052 ± 0.008 nmol/ 10^6 sperm

Mean \pm S.E.

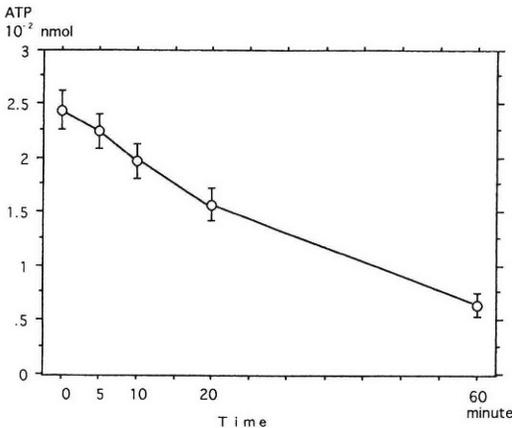


図3 TCA処理およびEDTA添加後の精液原液(36例)における経時的なATPの減衰

TCA, EDTA添加後の精液原液のATP値は60分にわたり減衰した。

向にあることが予測された。

TCA, EDTA処理後の精液原液36例における、ATP標準試薬添加後のATPの経時的な変化を図3に示す。ATPはグラフに示すとおり一時間にわたり減衰を続けた。

パーコール処理を行った各層で同様の測定を行った結果を図4, 5, 6, 7に示す。図4は三層パーコール処理を行った上清におけるATPの経時変化を示す。初期のATP値を100%として、一時間後には約50%に減衰している。なお鏡見した結果、この上清にはまったく精子は含まれなかった。一方図5, 6, 7に示すように、25~60%パーコール間の精子層、60

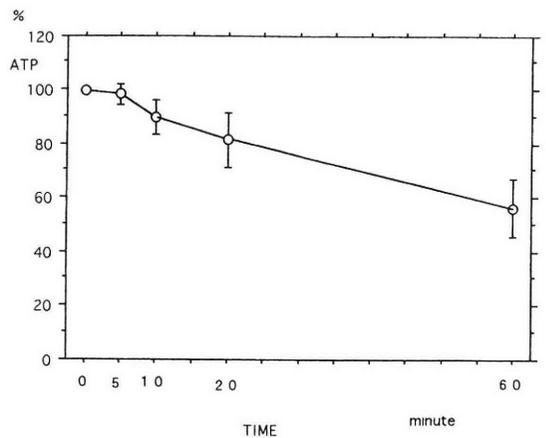


図4 三層パーコール処理により得られた上清における外因性ATPの経時変化
ATP値は60分にわたり減衰した。

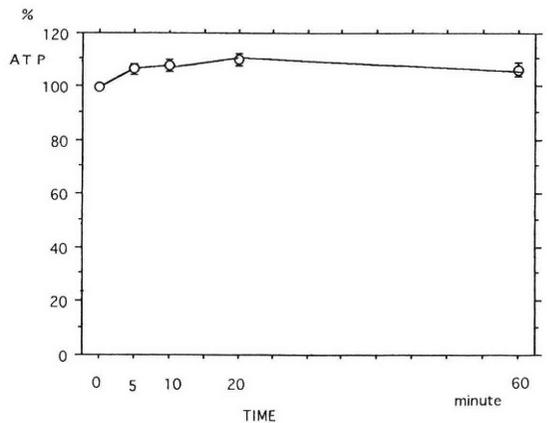


図5 25~60%パーコール層における外因性ATPの経時的変化

60分にわたりATP値の変化は認められなかった。

～80%パーコール間の精子層、および沈渣の精子層では、一時間にわたり、安定した蛍光を発し、ATPの減衰はほとんど見られなかった。

また、図3に示した36例におけるATPの経時の変化からATP減衰速度と精液所見との関係を検討した。図8は、ATP減衰速度と精子運動率の関係を示す。両者は相関関係を示し(p<0.0001)、ATP減衰の速い精液ほど、精子運動率が高い傾向にあった。図9に示すようにATP減衰速度と精子濃度も、正の相関関

係を示し(p<0.0001)、ATP減衰が速いほど、精子濃度が高い傾向にあった。精子速度、直進性、精子頭部振幅とATP減衰の間には有意な相関関係は認められなかった。

考 察

近年 luciferin-luciferase 反応を利用してのATP測定が可能となり、Gottliebらは1987年、TCA処理後にbio-luminescence assayを用いた簡便な精子のATP測定法

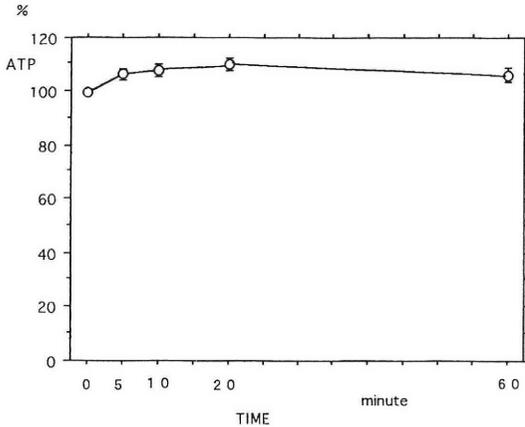


図6 60～80%パーコール層における外因性ATPの経時の変化
60分にわたりATP値の変化は認められなかった。

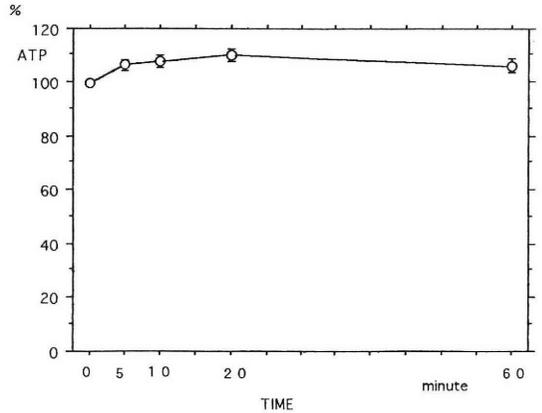


図7 三層パーコール処理により得られた沈渣における外因性ATPの経時の変化
60分にわたりATP値の変化は認められなかった。

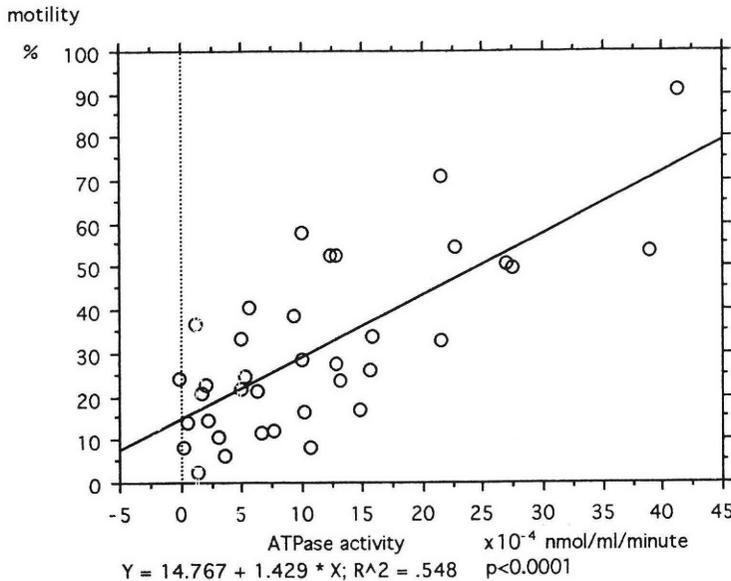


図8 ATP減衰速度と精子運動率の関係
両者は正の相関関係を示し(p<0.0001)、ATP減衰が速いほど、精子運動率が高い傾向にあった。

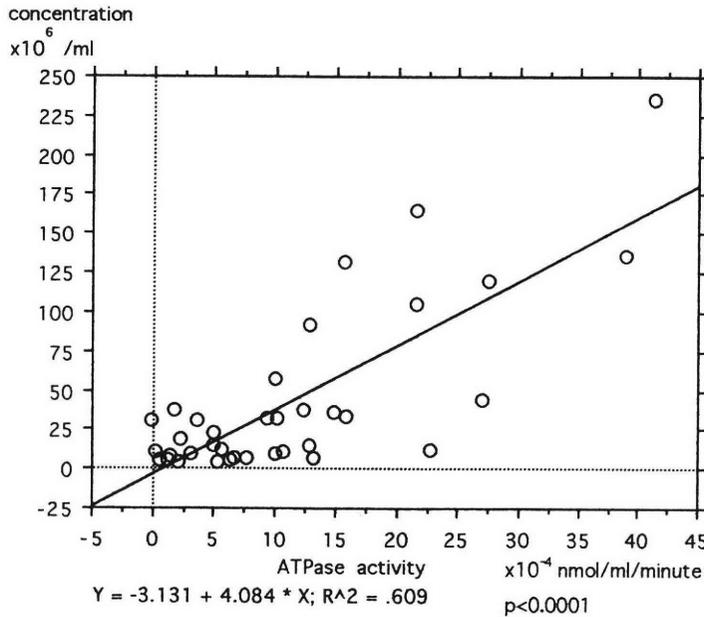


図9 ATP減衰速度と精子濃度の関係

両者は正の相関関係を示し ($p < 0.0001$), ATP減衰が速いほど, 精子濃度が高い傾向にあった。

を報告している。彼らは精漿中には前立腺由来の Ca^{2+} - Mg^{2+} dependent ATPaseが存在し細胞外のATPを速やかに分解するため, 精漿にATPを添加しても15分後の測定ですでにATPを検出しないと報告している。このため精液に検出されるATPはすべて生存精子細胞内由来のものと考えられ, 精子細胞膜破壊と, ATP分解酵素の失活を同時に行うことがATP測定上重要となる。今回我々は, TCAで細胞膜の破壊とATP分解酵素の不活化を行い, さらにATP分解酵素阻害剤として知られるEDTAを添加して精子のATPを測定した。

不妊外来患者36例のATP測定値は, 0.088 ± 0.017 nmol/ 10^6 sperm (0.457 ± 0.108 nmol/ 10^6 motile sperm)で, 運動精子あたりのATP量は生存精子における文献値とはほぼ一致し^{1,2)}, 運動率と逆相関を示した。

精子運動率と精子のATP含有量に関しては, さまざまな報告がある。両者が無関係とする報告の中には, 1983年のComhaireら³⁾や1992年のHofmannら⁴⁾のように, 精子数あたりのATP量でなく, 精液容量あたりのATP量で述べているものもある。1994年McLaughlinらは冷凍保存前後で精子運動率は低下するのに対し, 精子数あたりのATP量は不変であったと報告し, 精子運動率とATP含有量の間に関係がみられなかったとしているが, これは死んだ精子や生存するが動かない精子, また白血球などの細胞の混

入による影響もあるのではないかと言及している⁵⁾。一方, Gottliebらは, 精子運動率の高い精液における, 精子数あたりのATP含有量は, 運動率の低い精子に比べ低いことを報告しており²⁾, 運動率の高い精液では精子のATP消費量が高いのではないかと推察している。

1992年Iwamotoらはboarの精漿中から精子運動を阻害する物質を分離同定し, これは精子運動に対して直接の原動力を提供すると考えられているdynein ATPaseの阻害剤であると報告している⁶⁾。また1994年Romacらは精子無力症と正常者のdynein ATPaseは, 前者で有意に低いと報告している⁷⁾。これらの報告から, 精子のATP含有量と精子運動は, やはり何らかの関係があるのではないかと考えられる。

精液のATP値と, 妊孕力との関係についても, いくつかの報告がある。1983年Comhaireらは, 精液1mlあたりのATP量と, ハムスターテストとの相関関係を報告している⁸⁾が, これは後年Irvineら⁹⁾や, Chanら¹⁰⁾が指摘したように, 精液1mlあたりのATP量が精子運動率や精子濃度に比例することによるもので, 単純なATPの測定値のみでは, 精子の機能を評価する上で不十分であるとしている。これらの影響を取り除く上で, Gottliebら^{1,2)}の報告のようにATPを含有する生存精子数あたりのATP値に換算しての評価は意義のあることと思われ, 我々の検討でも運動率

の高い精液中の精子のATP含有量は運動率の低い精液中の精子ATP含有量よりも、低い傾向にあると考えられた。

パーコール処理後の精子浮遊液における精子ATP含有量と、精液の精子ATP含有量に有意な差は認めなかったが、パーコール処理における各層には死んだ精子も含まれることを考慮すると、沈渣の精子のATP含有量が低い傾向にあることが推察された。

今回の我々の検討では精液原液およびパーコール処理で精子を除去した精漿ではATPが経時的に減少することがわかった。またこの影響は400 G, 30分の遠心分離により上清に分離され、除去可能であった。このATP減少速度は、精子濃度や運動率と正の相関関係を認め、ATP減少が速い精液では、有意に($p < 0.0001$)精子濃度が高く、精子運動率が高い傾向にあった。ATP減少の原因として、精漿中に多量に存在するATP分解酵素が、最終濃度10%のTCA、および2 mM濃度のEDTAでは充分失活されなかった可能性が推察された。キレート剤である2 mMのEDTA、蛋白変性作用を持つ10%のTCAで完全に失活できないATP分解酵素が、精子をまったく含まない精漿中に存在すると仮定すると、この活性は、精子の濃度や運動率と密接な関係があることが考えられた。

ATP分解酵素は、精子尾部や精漿中に多く存在し、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Mg}^{2+}$ ATPase, Mg^{2+} ATPase, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase, などが知られる。乏精子症患者の精漿中の $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase活性が、正常者のそれに比し有意に低いことは、以前より報告されている^{11,12)}。1984年Karacagilらは、精子中だけでなく、精漿中の三種類のATP分解酵素活性($\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{Mg}^{2+}$ ATPase, Mg^{2+} ATPase, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase)が、不妊患者では有意に正常者よりも低いと報告している¹³⁾。精漿中のATP分解酵素と妊孕性との関係を報告する文献もいくつかあり、1985年のRonquistらの報告では、低い酵素活性下においては、精漿中の $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}$ ATPase活性は、sperm penetration testに比例する¹⁴⁾としている。また、この活性は超遠心(105000×g)で完全に除去されたと報告している¹⁵⁾。これらの報告から前立腺などの副性器由来のATP分解酵素活性と精液所見との関連性が示唆されたことは興味深く、さらに検討すべき課題と思われた。

本論文の要旨は、第83回日本泌尿器科学会総会(千葉)において発表した。

文 献

1) Gottlieb C, Svanborg K, Eneroth P, et al. (1987)

- Adenosine triphosphate in human semen: a study on conditions for a bioluminescence assay. *Fertil Steril* 47: 992-999
- 2) Gottlieb C, Svanborg K, Bygdeman M (1991) Adenosine triphosphate (ATP) in human spermatozoa. *Andrologia* 23: 421-425
- 3) Comhaire F, Vermeulen L, Ghedira K, et al. (1983) Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil Steril* 40: 500-504
- 4) Hofmann R, Lehmer A, Gurster E, et al. (1992) Adenosine triphosphate and adenosine diphosphate in human semen: correlation with sperm count and motility. *Urol Int* 48: 391-394
- 5) McLaughlin EA, Ford WCL and Hull MGR, (1994) Adenosine triphosphate and motility characteristics of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Int J Androl* 17: 19-23
- 6) Iwamoto T, Tsang A, Luterma M, et al. (1992) Purification and characterization of a sperm motility-dynein ATPase inhibitor from boar seminal plasma. *Mol Reprod Dev* 31: 55-62
- 7) Romac P, Zanich-Grubisic T, Culic O, et al. (1994) Sperm motility and kinetics of dynein ATPase in astheno- and normozoospermic samples after stimulation with adenosine and its analogues. *Hum Reprod* 9: 1474-1478
- 8) Comhaire F, Vermeulen L, Ghedira K, et al. (1983) Adenosine triphosphate in human semen: a quantitative estimate of fertilizing potential. *Fertil Steril* 40: 500-504
- 9) Irvine DS and Aitken RJ (1985) The value of adenosine triphosphate (ATP) measurements in assessing the fertilizing ability of human spermatozoa. *Fertil Steril* 44: 806-813
- 10) Chan SYW and Wang C (1987) Correlation between semen adenosine triphosphatase and sperm fertilizing capacity. *Fertil Steril* 47: 717-719
- 11) Stegmayr B, Gottfries A, Ronquist G, et al. (1980) Reduced activity of Mg^{2+} and Ca^{2+} dependent adenosine triphosphatase in seminal fluid of patient with oligozoospermia. *Scand J Urol Nephrol* 14: 192-194
- 12) Brody I, Ronquist G, Gottfries A, et al. (1981) Abnormal deficiency of both Mg^{2+} and Ca^{2+} -dependent adenosine triphosphatase and secretory granules and vesicles in human seminal plasma. *Scand J Urol Nephrol* 15: 85-90
- 13) Karacagil M, Sade M and Turkyilmaz RK (1984) Reduced activities of triple adenosine triphosphatase in seminal plasma and spermatozoa of patients with oligoasthenospermia. *Eur Urol* 10: 405-407

- 14) Ronquist G, Stegmayr B and Niklasson F (1985) Sperm motility and interactions among seminal uridine, xanthine, urate, and ATPase in fertile and infertile men. Arch Androl 15: 21-27
- 15) Ronquist G (1987) Effect of modulators on prostatic membrane-bound ATPase in human seminal plasma. Eur J Clin Invest 17: 231-236
(受付: 1995年10月6日)
(受理: 1995年2月2日)

Adenosine triphosphate in human semen: correlation with sperm concentration and motility

Hitomi Kanno, Yuzo Kinoshita, Kazuo Saito,
Kazuhiko Sato, Akira Iwasaki and Masahiko Hosaka

Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine, Yokohama 236, Japan

The seminal adenosine triphosphate (ATP) content was determined by bioluminescence after treatment with 10 % trichloroacetic acid (TCA) and 2 mM disodium salt of ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA).

The ATP concentration per motile spermatozoa showed a negative correlation to sperm motility ($p < 0.05$). Time-dependent ATP decrease was measured in whole ejaculates and in percoll-treated spermatozoa up to 60 minutes. ATP concentration decreased rapidly in the former group, but remained unchanged in the latter group, suggesting that some seminal factor participates in the instability of ATP. This may be due to the residual activity of ATPase in seminal plasma which is not inactivated completely by 10 % TCA and 2mM EDTA. The rate of ATP decrease was inversely related with sperm motility ($p < 0.0001$), and sperm concentration ($p < 0.0001$).

Key words: spermatozoa, ATP, motility, concentration

地方部会講演抄録

第33回日本不妊学会東北支部総会

日時：平成7年9月9日(土)13:10～
会場：(秋田市)秋田キャッスルホテル

1. 排卵誘発におけるE₂測定の意義

○田村正毅, 飯田修一, 渡辺洋子
熱海 泰, 武田信好, 立花郁雄
森 滋, 鈴木雅洲 (スズキ病院)

現在体外受精・胚移植の排卵誘発において、獲得成熟卵数・受精卵数の予測やOHSSの予測など改善・検討すべき点は多く残されている。我々は誘発時にE₂を測定しており、この意義について当院で施行した275例について検討したので報告する。

結果として、獲得成熟卵数とE₂値の間に有意な相関関係は認められなかった。しかし、E₂値が高すぎる場合には、受精卵が得にくい傾向が認められた。これはPCOタイプが多く含まれていたためと思われる。PCOではE₂が高値となるが受精能の低い卵子が多いという説を裏付ける結果と思われた。

さらに誘発6日目のE₂値が1000前後、採卵直前のE₂値が2000～3000の時にOHSSを認めず妊娠している症例が多かった。逆に採卵直前のE₂値が3000～4000以上の時にOHSSの発症頻度が有意に高く、妊娠率は低下する傾向が認められ、OHSSの発症の予測にはE₂測定が重要と思われた。

2. 黄体維持療法におけるhCGとプロゲステロンの相違について

○清水 靖, 児玉英也, 福田 淳
軽部裕子, 村田昌功, 利部徳子
池田雅人, 田中俊誠 (秋田大産婦)

黄体維持療法が妊娠率、流産率に影響を及ぼすか否かについて検討することを目的にした。

対象は形態学的に良好な胚を2個移植できた280周期で、hCG投与を行った130周期、hCG投与を行わなかった150周期に分類した。hCG投与周期では移植当日、3日目、6日目にhCG 2000単位を筋注し、6日目に子宮内膜の計測、ホルモン測定を行った。hCG非投与周期では移植日と6日目にプロゲデポー250mgを筋注し、同様に子宮内膜計測、ホルモン測定を行った。

両群に患者年齢、不妊期間、採卵数、受精卵数、妊娠率、着床率ともに差はなかったが、流産率はhCG

非投与周期の方が有意に高率であった。また、E₂、プロゲステロン、E₂/P ratioは各項目とも有意差はなかった。

hCGによる黄体維持療法は流産率を低下させていると考えられた。

3. 卵胞内精子注入法による妊娠症例の検討

○横山良仁, 福井淳史, 土橋義房
藤井俊策, 斎藤良治 (弘前大産婦)

平成6年1月から平成7年7月までに32例・85周期に卵胞内精子注入法(DIFI法)による治療を行った。

4例に妊娠を認め、症例あたり妊娠率は12.5%、周期あたり妊娠率は4.7%であった。妊娠症例と非妊娠症例とに分けて、臨床的背景を比較すると、年齢・既往IUI、DIFI回数に有意差はなく、hMGの使用頻度は妊娠症例が有意に高率であった。卵胞径(22.0±5.0 vs 20.5±3.3)、内膜厚(9.8±1.7 vs 9.1±2.0)には差はなく、注入精子数に関し、妊娠例で多い傾向(48.8±53.1 vs 27.1±28.0)にあったが有意差はなかった。DIFI法施行当日のP₄値が妊娠例で有意に高く(2.7±1.4 vs 1.4±1.0)、妊娠症例では的確な排卵時期にDIFI法が施行されたことが推察されたが、hMG周期のためのP₄高値であったことも否定できない。

以上より、1) DIFI法にはhMGによる排卵誘発が有効であった。2) 排卵時期をコントロールし、排卵時期を的確に設定することが必要。3) 至適な注入精子数は不明であった。

4. 子宮腺筋症にて病巣部のWedge-resectionを施行した1例

○陳 偉業, 古橋信之, 田中幹夫
河野秀昭, 渡辺英子

(太田西ノ内病院産婦)

吉田仁秋, 藤田信弘

(竹田総合病院産婦)

子宮腺筋症を合併した不妊症の治療においては、腫瘍の大きさ、部位などによる外科的療法の適応も不明確であり、かつ病巣部核出術の不確実さの点で、内分泌療法を主とした保存的療法を選択せざるを得ないのが現状であると思われる。

今回我々は、10年間の子宮内膜症の治療歴を有し、子宮腺筋症による子宮内腔の変形のため、体外受精・胚移植術施行においても胚移植時に困難を示した症例に対し、Gn-RHa(リュープリン; 3.75 mg/month)を

使用し、投与前・中・後にMRIを施行し、腫瘍の縮小を確認するとともに子宮内腔の偏位を確認。投与終了後子宮腺筋症部位のWedge-resectionを施行しえた症例を経験したので報告した。

今後、MRIなどによる画像診断の適切性やGn-RHaの登場により、子宮腺筋症の外科的治療の可能性が高まるものと考えられるので、その臨床経過を中心に報告した。

5. 当科の夫婦不妊外来(めおと外来)の現況

○小川比呂志, 松田秀雄, 木村和彦

大野 勉, 小田隆晴

(山形県立河北病院産婦)

不妊症はいうまでもなく夫婦をひとつの単位とする病態であり、不妊診断を行うにあたっては男女両側面から見て最も適切な治療が必要である。我々は1987年より夫婦ともに受診する夫婦不妊外来(めおと外来)を開設し、8年が経過したのでその現況につき報告する。

1) 不妊外来受診者294組のカップルのうち、夫婦の集中的な同時治療で108組(36.7%)に妊娠が成立した。2) 不妊因子別からみた妊娠率では、頸管因子、卵巣・内分泌因子が高い妊娠率を示したが、卵管因子、腹腔因子をもつ症例では10%程度と低率であった。3) 妊孕係数(F.I.)40未満の男性不妊を有する87組の夫婦のうち妻側の因子を有するものが44例(50.6%)に認められ、同時治療により15組(34.1%)が妊娠に至った。

以上より不妊症の原因の検索は夫婦同時にスタートすべきで、夫婦の集中的同時治療により高い妊娠率の向上をもたらすことが示唆された。

6. 体外受精・胚移植における子宮環境の着床に与える影響

○内海 透, 加藤充弘, 大山則昭

鍋倉浩子

(中通総合病院)

体外受精・胚移植において着床に関する知見は十分には得られていない。本研究は、着床の成立を予知するうえで、胚移植時の子宮動脈系血流環境がどの程度の意義を有しているのかを明らかにすることを目的とした。

対象は、形態良好な4細胞期胚を2個移植した34周期(妊娠成立群; P群13例, 妊娠非成立群; NP群21例)の体外受精・胚移植実施例であり、胚移植前日の子宮動脈上行枝のpulsatility index (PI)を検討項目とした。

その結果、1) P群およびNP群の子宮動脈PI値はそれぞれ、 2.86 ± 0.75 および 3.33 ± 0.63 であり、P群で有意に($p < 0.05$)低値を示した。2) 子宮動脈PI値が3.0未満の場合の妊娠率が75%であるのに対し、3.0を超えた場合の妊娠率は18%であり、両群間で有意差($p < 0.01$)を認めた。3) 子宮動脈PI 3.0をカットオフ値とすると、PI値が3.0を超えた場合、sensitivity 82%, specificity 75%で妊娠は成立せず、胚移植には適さない子宮環境であると考えられる。

7. マウス精巢精子, 精子細胞の卵細胞質内注入

○木村康之, 柳田 薫, 片寄治男

矢沢浩之, 星 和彦, 佐藤 章

(福島医大産婦)

柳町隆造

(ハワイ大学)

(目的) マウスの精巢精子および円形精子細胞を卵細胞質内に注入し、卵の活性化、受精、その後の発生につき検討した。

(方法) 精巢精子および精子細胞の卵細胞質内注入方法は既報の手順で行った。精子細胞注入の際、卵は注入前1時間、あるいは30分後、90分後に電気刺激を加え活性化し、一部は電気刺激を行わなかった。

(結果) 精巢精子注入後の受精率、胚盤胞、産仔への発生率は精巢上体精子を用いた場合(既報)とほぼ同様であった。精子細胞を注入するだけでは卵子は活性化されず、注入前1時間に卵子を活性化し、裸核化した精子細胞核を注入した場合に最も高い(77%)受精率を得た。またその後の移植により、28%が正常な産仔へと発育した。

(結論) マウス精子細胞の卵細胞質内注入では卵子の人為的な活性化が不可欠で、適切な活性化時間は注入前1時間~注入直後であること、そして裸核化処理が受精率を向上させるという結論を得た。また精巢精子および円形精子細胞はともに産仔までの発育に関与する能力を有していることが確認された。

8. 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

(Kiel大学産婦)

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1個の雄性前核除去群において生存率67.4%, 正常2-PN 60.5%, 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-PN 56.4%, 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。

9. Piezo micromanipulatorを用いたICSIの臨床応用

○矢沢浩之, 木村康之, 片寄治男
吉松宣弘, 柳田 薫, 星 和彦
佐藤 章 (福島医大産婦)

重症男性不妊症例にとって顕微授精は画期的な治療法であるといえる。当科でも1992年よりICSIによる治療を行っており, 妊娠率の向上を目的としてこれまでにその方法に種々の工夫を加えて行ってきた。今回, マウス卵での有効性が報告されたPiezo micromanipulatorを用いたICSIの臨床応用により良好な成績が得られるか否かの検討を行った。

A群: 従来法によるICSI, B群: Piezo ICSIをそれぞれ, 90周期, 471個の卵およびB群24周期, 150個の卵に対して施行したときの, 生存率, 受精率, 分割率, 妊娠率は, A群は77%, 70%, 61%, 20%。B群は85%, 85%, 71%, 10%であり, Piezo ICSIにおいて有意に高い受精率, 分割率が得られた。また, 分割卵のqualityの検討では, 形態学的良好卵(Grade 1)獲得率は, A群17%, B群9%であり, Piezo ICSIにおける低妊娠率は, 形態学的良好胚獲得率が低いことが一因である可能性が示唆された。今後その方法の改良により高妊娠率が期待できるものと思われる。

10. 超急速凍結法を用いた胚凍結による妊娠例

○小島原敬信, 野原 理, 太田信彦
伊藤真理子, 斎藤隆和, 中原健次
手塚尚広, 斎藤英和, 広井正彦
(山形大産婦)

Vitrification法により凍結させた胚の妊娠継続例を得たので報告する。

症例は39歳の両側卵管切除による続発性不妊の女性である。当科でのVitrification法による凍結胚を含む胚移植5回施行後, 双胎を妊娠した。現在妊娠32

週で入院管理中であるが, 染色体異常・奇形などは認められず, 推定体重も2187g, 2208gと順調に发育している。

この症例で用いた胚凍結法は従来の方法と異なり, プログラムフリーザーを用いず, かつ短時間でできる。具体的には, 8細胞卵をエチレングリコールとトレハロースを含む培養液に4℃で10分間平衡させたのち, 液体窒素中に入れ, 瞬間的に凍結させる。

当院ではVitrification法による妊娠例が本例を含め現在まで3例あるが, うち2例は子宮外妊娠に終わっている。成績が安定すれば本法はその手軽さにより広く一般に普及するものと思われる。

11. 卵巣におけるVLDL receptorの発現

○村田昌功, 児玉英也, 福田 淳
軽部裕子, 池田雅人, 清水 靖
利部徳子, 田中俊誠 (秋田大産婦)

卵巣でのステロイドホルモン産生におけるVLDLの関与について検討することを目的とした。

(実験方法)ノザンプロット法: ヒト胎盤および卵巣, 子宮筋, 子宮内膜RNAを対象とし, ヒトVLDLおよびLDLcDNAプローブを用いた。リボ蛋白添加実験: IVF採卵時に得られた顆粒膜細胞を, 2×10^4 /mlの濃度でコラーゲンプレートに蒔き, 37℃, 5% CO₂下にGIT培地で72時間培養した。その後10 IU/mlのhCGとVLDLおよびLDLを10および10² μg/mlの濃度で培地に添加し24時間培養を行い, プロゲステロン濃度を測定した。

(結果考察)ノザンプロット法: LDLレセプターmRNAの発現は胎盤, 卵巣, 子宮筋, 子宮内膜においてほぼ同等であったが, VLDLレセプターmRNAの発現は, 他臓器と比較して強い発現が, 卵巣で認められた。リボ蛋白添加実験: プロゲステロンの産生はコントロールを100%とすると, LDL添加により227% (10 μg添加)および224% (10² μg), VLDLの添加により177%および190%の増加が認められた。

以上より卵巣でのプロゲステロン産生においても, LDLのみならずVLDLが用いられている可能性が示唆された。

12. Polycystic ovaryにおけるステロイド合成酵素の発現

○高山和人, 深谷孝夫, 戸澤秀夫
矢嶋 聡 (東北大産婦)
笹野公伸 (同第二病理)

Polycystic ovary (PCO)の病態および内分泌動態に

については完全には解明されていない。今回、臨床的にPCOと診断され、卵巣楔状切除術を施行された5例(39個の卵胞)を用い、性ステロイド合成酵素(P450_{scc}, 3 β -HSD, P450_{c17}, P450_{arom})および細胞増殖の指標であるKi67の発現を免疫組織化学的に検討した。

卵胞は顆粒膜(G)層の発達状態により、A)Gが3層以上、B)Gが1~2層、C)Gを認めない、に分類した。

結果は莢膜細胞(T)層においてはC)→B)→A)の順で、P450_{arom}を除くステロイド合成酵素が発現する頻度が増加した。G層ではステロイド酵素についてはその発現はまったく認められなかった。Ki67の陽性率は正常と比べてとくに有意な差を認めなかった。

PCOにおけるステロイド合成酵素の発現動態は正常卵巣での非優位卵胞での発現と同様であった。またKi67の検討より、いわゆる閉鎖卵胞のみではなく、活発な増殖能を持つものが含まれることが示された。

13. 卵巣顆粒膜細胞におけるNOのluteolysis作用

○利部徳子, 児玉英也, 福田 淳
軽部裕子, 池田雅人, 村田昌功
清水 靖, 田中俊誠 (秋田大産婦)

一酸化窒素(NO)合成酵素が、卵巣に存在することからNOの卵巣機能における役割が注目されている。そこで今回我々は、ヒト黄体化顆粒膜細胞のin vitro cultureにおいてNO関連物質を添加し、プロゲステロン産生に及ぼす影響を検討した。

(実験方法) 体外受精時に採取したヒト黄体化顆粒膜細胞をGIT培地にて2×10⁴個ずつ各wellに分配し、37℃、5%CO₂の条件下で24時間培養した。培養液を交換し、各種NO関連物質(NO donor: SNAP, NOS inhibitor: L-NMMA, NO scavenger: carboxy-PTIO)を添加した後24時間追加培養し、培養液中のプロゲステロン産生量を測定した。

(結果と考察) ヒト顆粒膜細胞のプロゲステロン産生は高濃度(10⁻³M)のNO donorの暴露により抑制された(p<0.05)。NO donorの抑制作用はNO scavengerの添加により一部減弱することから、NOそのものがプロゲステロン産生を抑制していると考えられる。ただし、完全には改善されないことから、NO代謝産物も一部プロゲステロン産生の抑制に関与している可能性が考えられる。

14. 子宮内膜症病変におけるHepatocyte Growth Factor, およびそのレセプターc-metの遺伝子発現

○菅原準一, 深谷孝夫, 渡辺 正
吉田英宗, 戸澤秀夫, 矢嶋 聡

(東北大産婦)

(目的) 子宮内膜症の発生機序に関しては、諸説が提唱されているが、いまだ結論が出ていない。また、子宮内膜症の自然史自体が明らかになっていないためその進行度分類、および薬物治療の意義に関しても再検討の時期にきている。Hepatocyte Growth Factor (HGF) は肝細胞初代培養系の増殖因子として発見されたが、レセプターc-metを介して上皮系細胞の増殖、形態形成、運動促進因子として働き、上皮-間葉相互作用を担う重要なmediatorとして注目されている。今回我々は、reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法により、子宮内膜症病変および腹膜におけるHGFおよびc-metの遺伝子発現を検討した。(方法) 腹腔鏡または開腹術施行症例において、インフォームド Consentのもと子宮内膜症病変(n=10)、腹膜(n=10)を採取しmRNAを抽出、RT-PCR法さらにsouthern blot hybridizationを行い、増幅されたDNA fragmentがHGF, c-metに特異的であることを確認した。

(結果) RT-PCR法による検討では、腹膜初期病変、正常腹膜にc-metの遺伝子発現が認められた。一方HGFの遺伝子発現は、腹膜初期病変に認められたのみであった。

(結論) HGF遺伝子発現が、そのレセプターc-metを介して子宮内膜症発生に関与している可能性が示唆された。

15. 卵管水腫貯留液が胚発生に及ぼす影響の検討

○藤井俊策, 横山良仁, 土橋良房
福井敦史, 齋藤良治 (弘前大産婦)

(目的と方法) 1) 当科でIVF-ETを実施した卵管性不妊患者をpersistent HYD群(USGで卵管留水腫(HYD)を確認)、occult HYD群(HSGや腹腔鏡でHYDを確認)、non HYD群(HYD以外の卵管因子)の3群に分類し、HYDの存在が治療成績に与える影響を検討した。2) HYD貯留液、その粗蛋白分画および10%ヒト非働下血清を各10%濃度で添加したHTFMで、ヒト8細胞期余剰胚を培養しHYD貯留液がヒト胚の初期発生に与える影響を検討した。

(結果) 1) 移植あたりの妊娠率は、persistent HYD群で

2.8% (1/36), occult HYD群で20.0% (5/25), non HYD群で20.9% (32/153)であり, persistent HYD群で有意に低かった。2) 胚盤胞発生率は血清添加HTFMの66.6% (4/6)に対し, HYD貯留液および粗蛋白分画添加はいずれも0.0% (0/6, 0/4)であった。

16. Enhanced acridine orange (mBr-AO染色) による精子機能評価

○片寄治男, 柳田 薫, 吉松宣弘
鈴木留美, 星 和彦, 佐藤 章

(福島医大産婦)

蛍光色素アクリジンオレンジ(AO)は精子核の成熟度の解析に有用であり, また体外受精における精子の受精能判定の一方法としても利用できることをこれまでに報告してきた。しかし, 観察の際の色調の判定には客観性の点で問題がないとはいえ, 何らかの工夫が必要である場合がある。今回は, 精子核蛋白プロタミン分子内のSH基のプロープである蛍光色素モノプロモバイメイン(mBr)を組み合わせることによりAO染色像を鮮明にすることが可能か否かを検討した。

精子塗沫標本をまず1mMのmBrで5分間反応させたのちに既報のごとくAO染色し, 検体はmBr用のexcitation filterで観察した。

励起されたmBrの蛍光(450nm)によりAOの染色像はより一層鮮明になり, グリーンおよびレッドの判定がAO単独よりも容易となり, フローサイトメトリなど高価な機器を用いずとも効果的に判定することが可能であることが示唆された。

17. Flow cytometryを使用したラット精細胞の細胞障害過程の解析

○池田雅人, 児玉英也, 福田 淳
軽部裕子, 村田昌功, 清水 靖
利部徳子, 田中俊誠 (秋田大産婦)

(目的) In vitroにおけるラット精細胞の障害機序をflow cytometryを用いて検討する。

(方法) 生後32日目のラット精巣より精細胞を抽出した後, propidium iodideによる核染色を行い, 精細胞のDNA histogramをflow cytometryで測定した。

(結果) 抽出直後の精細胞のDNA histogramでは1c, 2c, 4cの細胞がそれぞれのピークを形成し, 培養により経時的に低分子量DNAのピークの増加および1cの細胞の減少がめだって観察された。また, 過酸化水素(100mM)による酸化的ストレスを精細胞に負荷すると1cおよび4cのピークがきわだって減少し

た。同様に, 活性酸素のscavengerであるSOD, catalaseを添加した場合, やや低分子量DNAの頻度が減少する傾向を認めたがPMSGやepinephrineなどのホルモンの添加では変化を認めなかった。

(結論) DNA合成期および減数分裂以降の精細胞が酸化的ストレスに脆弱である可能性が示唆された。

特別講演

「Molecular Characterization of the Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor」

Prof. Peter C. K. Leung

British Columbia University

第40回 日本不妊学会九州支部会

会期: 平成7年11月26日(日)9:00~

会場: (佐賀市) 佐賀県医師会メディカルセンター

1. 卵巣チョコレート嚢胞例の術後妊娠率の検討

○西村宏祐, 氏岡威史, 小野田 親

西村佳代子, 田中信幸, 松浦講平

岡村 均

(熊本大産婦)

我々は, チョコレート嚢胞は病理組織に基づく組織診断名と考えており, 嚢胞摘出と妊孕性温存・向上を考慮した手術を積極的に行っている。チョコレート嚢胞症例の術後妊孕性を明らかにする目的で, 当科における平成6年までの過去10年間の子宮内膜症例保存手術のうち, チョコレート嚢胞を有する症例の術後妊娠率を検討した。

対象は挙児を希望する98例で, 手術時の平均年齢は32±4歳(平均±SD), 未婚婦人15例, 既婚挙児希望不妊83例であった。現在まで計22周期18例(18/98=18%)の妊娠が確認され, 内訳は未婚婦人が2周期2例(2/15=13%)と, 挙児希望不妊婦人が20周期16例(16/83=19%)であった。このうち9例に合併手術(6例; 筋腫核出術, 2例; 子宮腺筋症の縮小術-1例は重複)を行っており, 妊娠周期の内訳は, 自然周期の15周期11例, 排卵誘発剤周期の4周期4例, IVF-ET3周期3例であった。

2. 当科における子宮内膜症保存手術の長期的予後に関する検討

○中村佐知子, 沖 利通, 伊集院博文

山元慎一, 堂地 勉, 永田行博

(鹿児島大産婦)

子宮内膜症の根治療法は外科的療法である。しか

し、子宮内膜症は性成熟女性に発生し、不妊を訴えることが多いことから保存手術などが選択される。しかし子宮内膜症は術後再発も少なくない。そこで、今回我々は20～40歳までの未婚、あるいは挙児希望のある子宮内膜症患者における保存手術後の再発率について検討したので若干の考察を加えて報告する。

対象は保存療法(手術、手術+薬物療法)を行った23名である。R-AFS分類ではⅠ期:2例、Ⅱ期:0例、Ⅲ期:8例、Ⅳ期:14例であった。その後の再発はⅠ期:1例、Ⅱ期:0例、Ⅲ期:3例、Ⅳ期:12例であった。全体での再発率は16/23(69.6%)であった。stageが進むほど術後再発率が高かった。再発が最も早いものでは治療後半年で再発していた。

以上より子宮内膜症の保存手術は再発する可能性が高く、とくに進行した症例では重症と思われる片側卵巣を思い切って摘出することもひとつの方法と考えられた。

3. 術後早期腹腔鏡および子宮卵管造影法による子宮筋腫摘出術あるいは子宮形成術後の骨盤内癒着症の評価

○堅山 均, 佐野正敏, 井上善仁

橋本和法, 野崎雅裕, 中野仁雄

(九州大産婦)

挙児希望婦人の術後の子宮や付属器の癒着の有無を調べるため、当科で子宮筋腫摘出術や子宮形成術などの保存的手術を受け、その後に術後早期腹腔鏡(ESLL)あるいは子宮卵管造影法(HSG)にて卵管通過性などを評価した45例89卵管について報告する。

術後にHSGのみを受けた29例58卵管(HSG群)では、正常と診断された卵管は、手術開始時では50卵管、手術終了時では52卵管であったが、術後HSGでは、32卵管であった。一方、術後にESLLを受けた16例31卵管(ESLL群)では、正常と診断された卵管は、手術開始時には24卵管であり、手術終了時では29卵管、ESLL開始時では21卵管、ESLL終了時では27卵管、術後HSGでは23卵管であった。またESLL開始時には16例中12例に骨盤内癒着を認めたが、うち8例は付属器の癒着ではなく、子宮創部への腸管や大網の癒着であった。その12例中11例に癒着剥離術が行われた。

以上の結果から子宮の保存的手術では術後に骨盤内癒着症を発症する可能性が高く、術後早期腹腔鏡は術後癒着の防止に有効であると考えられた。

4. 腹腔鏡検査時の術中循環動態について

○宇都宮隆史, 玉井君枝, 安東桂三

(セント・ルカ産婦)

(目的) CO₂気腹による腹腔鏡検査時の術中循環動態を検討する。

(対象, 方法) 当院において行ったCO₂気腹による32例に対し、1)挿管後気腹前、2)気腹終了時、3)トレンデレンブルグ体位直後、4)その後15分後の4ポイントの動脈血中pH, pCO₂, pO₂, BEなどを測定した。(成績) 1)では挿管麻酔であるためと思われるが、pHはやや高めで、pCO₂はやや低めであった。2)では1)と大きな差は見られなかった。しかし3)ではpHの低下が見られはじめ、それにとまってpCO₂の上昇が始まっていた。4)の時点ではその傾向が進行し、pHは7.37まで下降し、pCO₂は39まで上昇していた。そして血圧は収縮時、拡張期ともに30%程度上昇していた。これらの傾向は1分当たり呼吸回数が12回と20回の間で差はなかった。

(結論) 腹腔鏡検査は短時間であっても全身状態に注意を払わねばならない。

5. 卵管留水症に対する腹腔鏡下卵管開口術の有効性に関する検討

○野見山真理, 有馬 薫, 宗 完子

岩坂 剛, 杉森 甫 (佐賀医大産婦)

松本ゆみ, 中村加代子

(高邦会高木病院産婦)

(目的) 当科における卵管留水症に対する腹腔鏡下卵管開口術の治療効果を検討した。

(対象・方法) 対象は1990年5月より1995年4月までに不妊症精査のため当科で施行した腹腔鏡検査のうち色素通水法にて卵管留水症と診断した27例である。1992年6月以降は腹腔鏡下卵管開口術を開始した。開口術を施行したのは19例、他8例は開口術を施行していない。開口術後の自然およびAIHの妊娠率を算出した。また開口術施行群と未施行群とのIVF-ETの妊娠率を比較した。

(結果) 卵管開口術後の自然およびAIH妊娠は、3/16例(18.8%)に成立した。IVF-ET妊娠成績は開口術施行群3/9例(33.3%)、開口術未施行群4/6例(66.7%)であった。

(まとめ) 卵管留水症に対する腹腔鏡下卵管開口術後の自然およびAIHの妊娠率は18.8%であった。卵管開口術の有無とIVF-ETの妊娠成績には関連性は確認できなかった。

6. 不妊診療における腹腔鏡の有用性—子宮内膜症の頻度と妊娠成績—

○窪田真知, 田村理子, 詠田由美

本庄 考, 倉島雅子, 白川光一

(福岡大産婦)

(目的) 難治性不妊症例に対して, 腹腔鏡検査を施行し, 子宮内膜症(以下E)の頻度, およびその後の妊娠成績について検討した。

(方法) 1995年5月までに腹腔鏡検査を施行した難治性不妊症例150例(年齢 31.4 ± 3.8 歳, 不妊歴 50.6 ± 38.9 月)を対象とした。検査時にはEの診断とともに, Eの有無にかかわらず積極的に直视下手術を施行した。その後の妊娠成績についてEの有無により検討した。

(結果) Eの頻度は52.7%(79/150)であった。検査後の妊娠率は41.3%(62/150)であったが, E(+)群の妊娠率32.5%はE(-)群の51.4%に比較し有意に低かった($p < 0.05$)。また, 検査から妊娠成立までの平均期間は, E(+)群(11.8 ± 10.9 月)がE(-)群(6.5 ± 5.5 月)に比較し有意に長かった($p < 0.05$)。

(考察) 腹腔鏡検査は難治性不妊症の原因精査ならびに不妊治療として有用であるが, Eの存在は妊娠成立の上で影響を及ぼすことが示唆された。

7. 腹腔鏡検査前後の患者の心理状態や精神ストレス

○柴田令子, 倉橋千鶴美, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦人科)

(目的) 当院では不妊症の診断および治療として腹腔鏡検査を行っており, 腹腔鏡検査前後の患者の心理状態や精神ストレスを把握する。

(対象・方法) 当院で平成7年4月1日~平成7年8月15日の間に腹腔鏡検査を受けた患者57例についてアンケート方式(記述式)で調査を行った。

(結果) 腹腔鏡検査を勧められた時, 「すぐに受けよう」と思ったのが72%でその理由でも「先生に勧められて仕方なく」の人が6%と少なかった。相談者も「夫だけに相談」は36%で「夫以外の家族」は53%であった。入院してからの一番の不安は「検査結果」で61%あり手術後の痛みや麻酔に対する不安は35%だった。手術前夜の「良く眠れたか?」という質問には眠れた人が75%であった。抜管後の息苦しさについては「眠っていたので気づかない」「苦しくない」が80%だった。

(まとめ) 腹腔鏡検査を受けようとする患者の意識は

治療に対して積極的であり手術に対する痛みや, 麻酔の恐怖よりも検査結果が一番ストレスに感じていると思われた。

8. 不妊治療後に発生し早期に診断し得た腹腔妊娠の3例

○小野田 親, 岩政 仁, 松浦講平

岡村 均

(熊本大産婦)

子宮外妊娠の中で腹腔妊娠の頻度は約0.1%前後との報告が多いが当科の最近10年間の頻度は3.3%(3/90)と若干高い。いずれも不妊治療後に発生しているため早期に診断・治療し得たので報告する。

症例1は腹腔鏡検査後2周期目に妊娠し, 症例2, 3はCOH-AIH後に妊娠したが3例ともIUD使用の既往や子宮内膜症の合併は認めなかった。症例1, 2が下腹部痛, 症例3は無症状だったが経腔超音波により子宮外胎児心拍が確認された。着床部位は症例1と3が直腸前面, 症例2は左広間膜後葉であった。3例とも付属器・子宮に異常を認めず, 原発性腹腔妊娠の診断とした。

症例1は術直後, 症例2は尿中hCGの下降が悪いためMTX全身投与を追加しているが, その後症例1は2回の自然経腔分娩で児を得ている。腹腔妊娠は, その診断の遅れにより母体に致命的な結果をもたらすため早期発見とその後の適切な治療が重要と思われる。

9. 低用量ドーパミン療法が著効した卵巣過剰刺激症候群の2症例

○管野輝勝, 藤澤佳代, 松井尚彦

吉松 淳, 植原久司, 宮川勇生

(大分医大産婦)

卵巣過剰刺激症候群(Ovarian Hyperstimulation Syndrome; OHSS)は不妊治療の排卵誘発にともなって起こる医原性疾患である。重症化すると, 著明な卵巣腫大, 多量の胸水, 腹水の貯留, 血液濃縮が見られる。重症OHSSの治療の基本は, 循環血液量の増加と血液濃縮の改善, そして尿量の維持である。

最近, このOHSSに対する低用量ドーパミン(DOA)療法が注目されている。DOAは, 少量投与ではD1-receptorのみの作動で, 血圧や脈拍を上昇させることなく腎血流量を増加させ, 貯留した水分やNaの排泄を促進してOHSSの症状を軽減する。

今回, 重症OHSSの2症例(ともにWHO分類でgrade III, 第1例は21歳でIVF-ET後の妊娠例, 第2例は28歳でhMG-hCG療法後の症例)にアルブミン投与

を併用した低用量DOA療法を施行したところ、2症例とも急速に症状が改善し、その有用性が確認された。

10. 多胎妊娠の回避目的であえて単一胚移植を行い単胎妊娠の成立をみた体外受精・胚移植の1例

○岡本純英, 和田 文, 水町恵美
(岡本ウーマンズクリニック)

妊娠率の向上にともない体外受精・胚移植での多胎妊娠回避が緊急課題となっている。単一胚移植で多胎を回避し、単胎妊娠の成立をみたので報告する。症例は33歳の続発性不妊患者で30歳時3年不妊で当院初診、イムノビーズ妻血清IgA陽性を認め、配偶者間人工授精するも妊娠せず、体外受精・胚移植を行い妊娠が成立、双胎の女児を出産している。平成7年4月再び挙児を希望して受診。配偶者間人工授精を3度行うも妊娠せぬため再び体外受精・胚移植を行った。GnRH hMG hCG short regimenにて刺激。28個採卵し27個が受精分割した。家族構成上、単胎妊娠を強く希望したので発育良好な胚を選別すべく8細胞期胚移植を企図し移植日を1日延期、採卵後3日目とした。G1, 9個, G2, 7個の8細胞期胚を得たが、単胎妊娠を確実にするためあえてG1の8細胞期胚1個のみを胚移植した。採卵14日目、血中hCG 169 IU/lを確認した。特殊な事例ではあるが、多胎妊娠を回避する上で示唆に富む経過を示したので報告する。

11. 体外受精・胚移植治療により生児を得た卵管形成不全をともなった単角子宮の1例

○利井陽子, 山下隆則, 蓮尾敦子
宮村泰豪, 河野雅洋, 藤下 晃
石丸忠之 (長崎大産婦)

症例は36歳の原因性不妊患者で、挙児希望にて近医を受診し、子宮卵管造影にて単角子宮および卵管閉塞を疑われ平成2年5月当科を受診した。基礎体温は2相性で、卵胞期の血中prolactin、黄体期の血中estradiolおよびprogesteroneはいずれも正常範囲であった。また夫の精液所見は、正常であった。平成2年6月腹腔鏡検査を施行したところ子宮は左単角子宮で右側に母指頭大の副角を認めた。左卵管は卵管膨大部で盲端に終わっており、右卵管は形成されていなかった。左右の卵巣はいずれも正常大であった。

以上の所見より無機能性の副角を持ち、卵管形成不全を合併した単角子宮と診断した。このため体外受精・胚移植治療の適応と判断し、6回目の治療にて

単胎妊娠に成功した。妊娠経過は、切迫流産徴候は認められたものの比較的順調に経過し、平成7年7月18日、妊娠38週6日にて正常分娩に至った。今回、本症例の経過の詳細と単角子宮と流早産の関係について若干の文献的考察を報告する。

12. 当院におけるICSI成績

○安東桂三, 玉井君枝, 長木美幸
広津留恵子, 宇都宮隆史
(セント・ルカ産婦)

現在までにいくつかのICSI手法の変更を行ってきた。今回各手法ごとに受精成績・分割成績・妊娠成績などをretrospectiveに検討した。臨床応用開始から現在までをphase 1:精子注入のみ, phase 2:細胞質吸引と精子注入, phase 3:精子不動化後吸引注入, phase 4:精子不動化後中辺部打撃吸引注入の4群に分けた。

各群の周期数, 妻の年齢はp1:44周期32.2歳, p2:102周期32.4歳, p3:39周期33.4歳, p4:19周期34.1歳であり採卵時のE₂値はそれぞれ2803/2307/1758/1830 (pg/ml) でP₄値は1.0/0.7/0.9/0.8 (ng/ml) となった。採卵時の卵胞数は11.2/13.0/12.9/10.3個, 採卵数8.7/9.6/9.2/6.5個, metaphase-2は6.5/7.0/7.3/5.0個, 受精卵数3.2/3.0/4.5/3.3個, 分割卵数2.9/2.8/4.2/3.3個となった。妊娠率は9.1% (4/44), 8.8% (9/102), 17.9% (7/39), 21.1% (4/19) となった。

尾部打撃による精子不動化後再度中辺部打撃によるICSIが受精および分割・妊娠率において優れ、有用な治療法であることがわかった。

13. ICSI (卵細胞質内精子注入法) の臨床成績—卵子の成熟度分類による比較検討—

○永吉 基, 田中 温, 栗田松一郎
馬渡善文, 田中威づみ, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子
井上綾子, 岩本智子
(セントマザー産婦人科医院)

ICSIは重症男性不妊症において、有力な治療法であり、数多くの新生児が誕生している。今回我々は、ICSIにおける卵子の成熟状態と臨床成績を検討したので報告する。

(目的) 卵子の成熟状態を採卵時とICSI時とで観察し、これを4群について分類し、各群の妊娠率、各種排卵誘発法との関係について検討した。

(結果) 1) 採卵時ICSI時の卵子の成熟度判定の一致率

は、68.3%であり、不一致例の大半は、採卵時不良でICSI時良好であった。2) ICSI卵子良好例はShort 900法が70.7%と一番高く、不良例ではクロミッド+HMG法が67.9%と一番悪い結果となった。3) 妊娠率は全体で26.2%であった。

(結論) 1) 採卵時とICSI時の卵子の成熟度判定はおおむね一致していた。2) 排卵誘発法別では、Short 900法が一番卵の成熟度が良好である一方、クロミッド+HMG法が一番不良であった。3) ICSI時の卵子の良好例は妊娠率が高く(32.5%)、不良例は低値であった(16.5%)。

14. 卵細胞質内精子注入(ICSI)後の高い受精率とSperm factorとの関連について

○田中威づみ, 田中 温, 永吉 基
粟田松一郎, 馬渡善文, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子
井上綾子, 岩本智子

(セントマザー産婦人科医院)

(目的) 卵細胞質内精子注入(ICSI)後の卵子の活性化率・受精率は高く、さらに異常受精の発生率は低い。この現象は精子より出現してくるsperm factorが直接卵細胞質に作用し、卵子の活性化を惹起しているためと推測される。今回我々はこのsperm factorに関して実験を行い有用なる結果を得たので報告する。

(方法) 良好精子をPBSで2回洗浄、濃度を8~10×10⁶/ccに調整した。この精子浮遊液を細胞破碎器で処理した。この上清を10plあたり精子5匹分となるように希釈した。これをIVF-ETの症例で受精に至らなかった2-D oldの卵子のA) 卵細胞質、B) 囲卵腔に注入した(患者の同意を得て)。

(結果) 1) A), B)における活性化率は61%(35/57)、0%(0/25)であった。2) A)における前核の数の割合は1PNは31%(11/35)、2PNは29%(10/35)、2PN以上は40%(14/35)であった。3) 卵細胞質のみの吸引、注入における活性化率は15%(5/34)であった。

(結論) ICSI後の高い受精率にはsperm factorの関与が大であることが推測された。

15. 原発性無精子症の組織・細胞学的検討

○田中 温, 永吉 基, 粟田松一郎
馬渡善文, 田中威づみ, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 有本恭子
井上綾子, 岩本智子

(セントマザー産婦人科医院)

(目的) 閉塞性無精子を除外した原発性無精子症に対

しては妊娠は不可能であると考えられてきた。しかし顕微授精の技術の進歩により、精巣内精子や精子細胞を分離、採取できるならば妊娠は可能であることが確認されている。今回我々は、この原発性無精子症の中で治療が対象となりうる症例の割合について検討したのでその結果について報告する。

(方法) 当院において無精子症の診断の目的で精巢生検を行い、精巣上体に精子(精子細胞)を認めなかった67例を対象とした。採取した精巢組織は1) 倒立顕微鏡下にspermatogenic cellの分離、2) 光顕用に固定、3) 電顕用に固定、4) 細胞診を行った。

(結果) 1) 精巣内精子を認めた症例は14例(21%)であった。2) 精巣内精子は認めず、精子細胞を認めた症例は6例(9%)であった。3) 精巣内精子の大半は弱いながらも運動性を認める。4) 確認された精子細胞のほとんどは円形精子細胞であり、後期精子細胞はまれであった。

16. 精巣上体洗浄による精子採取法

○緒方俊一 (大分県立病院泌尿器)
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦人科)

無精子症患者にはかなりの割合で精管の通過障害が存在する。顕微授精の進歩によってわずかな精子で妊娠可能となり、泌尿器科医は精子採取という部分で不妊症へのかかわり合いが深くなってきた。現在採精法は精巣精子採取(TESA)、精巣上体精子採取(MESA)、経皮的精巣上体精子採取(PESA)などが行われている。今回我々は逆行性射精による射精不能の2例に精巣上体洗浄法を試みた。

精巣上体の遠位側精管より25Gサフロー針を刺入。1mlの生食を精巣上体内に圧入し逆流する精子の混入した生食を吸引した。濃度500×10⁶/ml。運動率80%、奇形率5%の精子が0.2ml採取された。

TESA、MESAとも有効な採精法であるが患者への負担は大きく反復する採取は困難である。MESA、PESAは精巣上体が緊満するほどの精子の貯留が必要である。その点精巣上体洗浄法では精管の露出のみで可能で穿刺も細径の針で行われるため侵襲は少なく反復する採取にも耐えうる。また脊損患者や、射精不能患者など精巣上体への精子の貯留の少ない症例にも適応は広いと考えられた。

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)
「Local Mediators of Mammalian ovulation」
- 特別講演：御子柴克彦 (東京大学)
「受精におけるCa²⁺動態とIP₃ レセプター」
- 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」
2. 館 鄰 (東京大学)
「胚発育からみた着床のメカニズム」
3. S. C. Ng (シンガポール大学)
「New Perspectives in Understanding Fertilization in the Era of Microinjection」
4. K. Y. Cha (Cha総合病院)
「Cryopreservation of immature oocytes」
- IV 一般演題：申し込みは締切らせていただきました。多数の演題をお寄せいただきありがとうございました。
- 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

第14回日本受精着床学会

第14回日本受精着床学会を下記の通り開催いたしますので、奮ってご参加下さいますようお願い申し上げます。

期 日：平成8年7月11日(木)、12日(金)

会 場：ホテルはまつ 福島県郡山市虎丸町3-18 TEL 0249-35-1111

内 容：招請講演：Overview of mammalian fertilization

座長 入谷 明(近畿大学生物理工学部教授)

演者 Ryuzo Yanagimachi (University of Hawaii, Professor)

特別講演：不妊症の診療経験 ー過去・現在・未来ー

座長 佐藤和雄(日本大学医学部産婦人科教授)

演者 鈴木雅洲(スズキ病院理事長)

教育講演：ハイライトセッション ー生殖の流れー『配偶子の成熟から着床』をめぐる新発見

座長 毛利秀雄(岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所長)

- | | |
|--|----------------|
| 1) 精子運動のメカニズム | 石島純夫(東工大理学部) |
| 2) 卵子の成熟・退化と排卵 | 佐藤英明(東大医科研) |
| 3) 受精と卵細胞内情報伝達機構 | 宮崎俊一(東京女子医大生理) |
| 4) 雄性前核形成と卵形質因子 | 薄井紀子(帝京大解剖) |
| 5) 着床におけるLocal Response-Nidus Formation- | 館 鄰(東大大学院農生命) |

シンポジウム：卵細胞質内精子注入法(ICSI)の現状と将来

座長 香山浩二(兵庫医科大学産婦人科教授)

後藤和文(鹿児島大学農学部家畜繁殖学助教授)

- | | |
|-----------------------------------|--------------------|
| 1) 円形精子細胞と第2精母細胞の卵細胞質内注入の基礎的検討 | 木村康之(福島県立医大産婦) |
| 2) ICSIにおける顕微操作の卵細胞に及ぼす影響の検討 | 浅田義正(名古屋大分院産婦) |
| 3) ICSIにおける精子の不動化処理が前核形成に及ぼす影響の検討 | 小林一彦(加藤レディースクリニック) |
| 4) ARTとしてのICSIの有効性 | 荒木重雄(自治医大産婦) |
| 5) ICSIの臨床成績の検討 ー特に無精子症を中心としてー | 田中 温(セントマザー産婦人科医院) |

連絡先：〒960-12 福島県福島市光が丘1番地

福島県立医科大学産科婦人科学講座内

第14回日本受精着床学会事務局

TEL 0245-48-2111 (内2372)

FAX 0245-48-3878

会 長 佐 藤 章
(福島県立医科大学産科婦人科)

第16回日本性科学学会

第16回日本性科学学会を下記の通り開催いたします。多数のご参加をお願い申し上げます。

期日：平成8年10月5日(土)、6日(日)

会場：札幌共済ホール 札幌市中央区北4条西1丁目 共済ビル6階

TEL 011-251-7333

サテライト・シンポジウム：

「老人養護施設における性の問題—全国老人福祉施設における性の問題の調査結果をもとに—」

[全国老人養護施設大会との共同シンポジウム(学会前日、平成8年10月4日(金))]

シンポジウム：

A. 青・壮年期の性

1. 「エイズ時代におけるピルとコンドームの使い分け」

司会 熊澤浄一(九州大泌尿器科教授)

玉田太朗(自治医大産婦人科名誉教授)

B. 中・高年期の性

2. 「人生80年時代における生と性」

司会 松本清一(自治医大産婦人科名誉教授)

熊本悦明(札幌医大泌尿器科名誉教授)

3. 「中高年男女の性機能低下への医学的対応」

司会 野末源一(山王病院理事)

熊本悦明(札幌医大泌尿器科名誉教授)

4. 「中高年男女の性機能低下への精神・心理学的対応」

司会 白井蔭文(東邦大泌尿器科教授)

阿部輝夫(順天堂大浦安病院精神科助教授)

一般演題(公募)：締切期日 1996年6月30日

日本性科学学会会員へは、演題申込用紙を配付いたします。会員以外の方が演題提出をご希望の場合は下記事務局へご請求下さい。

連絡先・事務局：〒060 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学泌尿器科学教室内
第16回日本性科学学会事務局
TEL:011-611-2111(内線3472)
FAX:011-612-2709

会長 熊本悦明
(札幌医科大学名誉教授)

第5回 世界子宮内膜症学会

第5回世界子宮内膜症学会を下記の通り開催いたします。奮ってご参加下さいますようお願い申し上げます。

期日：平成8年10月21日(月)～24日(木)

会場：パシフィコ横浜 横浜市西区みなとみらい1-1

TEL 045-221-2155

内容：主な講演者 Evers, J. L. H. (Netherlands) Thomas, E. J. (UK)
Gleicher, N. (USA) Smith, S. K. (UK)
Healy, D. (Australia) Schenken, R. S. (USA)
Dmowski, W. P. (USA) Lemay, A. (Canada)
Brosens, I. (Belgium) Donnez, J. (Belgium)
Sutton, C. J. G. (UK)

シンポジウム Etiology and natural history
Basic endometrial physiology
Endometriosis and Pain
Regulatory mechanisms, growth factor and cell adhesion molecule in
pathogenesis of endometriosis; New Data (First, second and third part)
Critical evaluation of laparoscopic and laparotomic surgery
Immunology and endometriosis (Debate)
Medical treatment of infertility
Surgical treatment of infertility
Peritoneal environment and endometriosis
Role of ART in infertility associated with endometriosis (Debate)
How can we improve current classification? (Debate)
Medical treatment of Endometriosis

登録費：

	平成8年7月31日まで	平成8年8月1日から
登録費	35,000円	40,000円
同伴者	10,000円	10,000円

一般演題：一般演題締切 平成8年4月30日

演題申込・お問合せ 横浜市立大学産婦人科学教室内
第5回世界子宮内膜症学会事務局
〒236 横浜市金沢区福浦3-9
TEL 045-787-2691 FAX 045-701-3536

第5回世界子宮内膜症学会
会長 杉本 修
水口 弘 司

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400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。ただし編集委員会が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。學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:頁一頁 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頁一頁 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), *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の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、巻末に綴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	会員番号	フリガナ	会員番号
氏名	[所属機関名]	氏名	[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	石 島 芳 郎	岩 本 晃 明
遠 藤 克	押 尾 茂	久 保 春 海
楠 原 浩 二	小 林 俊 文	平 川 舜 樹
穂 坂 正 彦	三 浦 一 陽	三 橋 直 樹
	毛 利 秀 雄	

EDITORIAL BOARD

Masafumi SHIRAI (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Yoshiro ISHIJIMA	Teruaki IWAMOTO
Tsuyoshi ENDO	Shigeru OSHIO	Harumi KUBO
Koji KUSUHARA	Toshihumi KOBAYASHI	Shun HIRAKAWA
Masahiko HOSAKA	Kazukiyo MIURA	Naoki MITSUHASHI
	Hideo MORI	

日本不妊学会雑誌 41 卷 2 号

1996年 3月25日 印 刷

1996年 4月 1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