

ISSN 0029-0629 CODEN: NFGZAD

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

Vol. 42 No. 1 January 1997
第42卷第1号 平成9年1月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. / 日不妊会誌

第42回日本不妊学会総会および学術講演会

(第2回予告)

下記により第42回日本不妊学会総会および学術講演会を開催いたしますので多数の方々をご参加下さいますようお願い申し上げます。

I 期 日：平成9年11月12日(水)理事会、幹事会

13日(木)学術講演会、評議会、総会、総懇談会

14日(金)学術講演会

II 会 場：京王プラザホテル

〒160 東京都新宿区西新宿2-2-1 (TEL：03-3344-0111)

III 学術講演会

会長講演

男性不妊症とインポテンス

演者：白井将文(東邦大学医学部第1泌尿器科教授)

招請講演

1) Limited resources ; Infertility must be treated.

演者：Alan H. DeCherney, M. D.

(Professor, Department of obstetrics and Gynecology, UCLA School of Medicine, U.S.A.)

2) Endometriosis; What to do and when to do it.

演者：Robert Israel, M.D.

(Professor, Department of Obstetrics and Gynecology,

Unibersity of Southern California School of Medicine, U.S.A.)

3) Microsurgery for male infartility.

演者：Stuart S. Howards, M.D.

(Professor, Department of Urology, Unibersity of Virginia,

School of Medicine, U.S.A.)

4) Ejaculatory dysfunction and infertility.

演者：Hung Ki Chai, M.D.

(Professor, Department of Urology, Yonsei University.

College of Medicine, Seoul. Korea.)

特別講演

「成長ホルモン・成長因子と不妊」

演者：野口鉄也(東邦大学医学部第2生理学教授)

教育講演

1) 「性分化をめぐる」

演者：中込弥男(順天堂大学医学部公衆衛生学教授)

2) 「受精過程における精子中心子の役割」

演者：年森清隆(宮崎医科大学解剖学教授)

3) 卵子の成熟と妊孕性

演者：鈴木秋悦(慶応義塾大学医学部産婦人科助教授)

シンポジウム

1 「不妊症と染色体異常」

司会：松田公志(関西医科大学泌尿器科教授)

荒木重雄(自治医科大学看護短期大学教授)

2 「ICSI—今後の展開—」

司会：星 和彦(山梨医科大学産婦人科教授)

佐藤嘉兵(日本大学獣医学部応用生物学科教授)

フロンティアシンポジウム

1) 「データよりみたICSIの現状」

司会：香山浩二(兵庫医科大学産婦人科教授)

2) 「ゴナドトロピン療法の副作用対策」

司会：矢内原 巧(昭和大学医学部産婦人科教授)

3) 「不育症(習慣流産)の機序, 診断, 治療」

司会：牧野恒久(東海大学医学部産婦人科教授)

4) 「着床と子宮内膜機能, 一着床率をどのようにして上げるか?—」

司会：畑 俊夫(埼玉医科大学産婦人科教授)

5) 「男性性機能と不妊, 一基礎と臨床—」

司会：宮川征男(鳥取大学医学部泌尿器科教授)

6) 「不妊症の実験モデル」

司会：西宗義武(大阪大学微生物病研究所付属感染動物実験施設教授)

7) 「配偶子・胚のQualityと妊孕性の評価」

司会：吉村泰典(慶応義塾大学医学部産婦人科教授)

8) 「着床前診断法の基礎と展開」

司会：永田行博(鹿児島大学医学部産婦人科教授)

ビデオシンポジウム

「不妊の外科的治療」

司会：三浦一陽(東邦大学医学部第1泌尿器科教授)

星合 昊(近畿大学医学部産婦人科教授)

コンセンサスミーティング

「精子回収法をめぐる」

司会：守殿貞夫(神戸大学医学部泌尿器科教授)

青野敏博(徳島大学医学部産婦人科教授)

V 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、1997年度会費(8,000円)を納入の上会員になってください。

演題申込み要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロでうち、書類郵便にて下記へお送りください。
〒143 大田区大森西6-11-1
東邦大学医学部第1泌尿器科学教室内 第42回日本不妊学会総会事務局
TEL: 03-3762-4151 (内線3600, 3605)
FAX: 03-3768-8817
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：1997年(平成9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。

総懇親会は学術講演会初日の11月13日(木)に京王プラザホテルで行います。是非ご出席下さい。

1997年1月

第42回日本不妊学会会長

白 井 將 文

平成8年度第2回通常総会

平成8年度第2回通常総会は下記の如く徳島市において開催され、入谷理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った。

日 時 平成8年11月7日(木) 13時～13時50分

場 所 徳島市 徳島県郷土文化会館

開会当時の会員数 4307名 当日の出席会員数 2173名(含委任状)

議 事

第1号議案：名誉会員推薦の件

理事会および評議員会より推薦された別記8名につき審議の結果、全会一致にて名誉会員とすることを承認した。

第2号議案：功労評議員推薦の件

理事会および評議員会より推薦された別記22名につき、審議の結果全会一致にて功労評議員とすることを承認した。

第3号議案：日本不妊学会学術奨励賞に関する件

理事会および評議員会より推薦された下記の3名に平成8年度日本不妊学会学術奨励賞を授与することを全会一致にて承認した。

菅野良恵「凍結保存ヒト卵管上皮細胞を用いた初期胚の共培養」

児玉英也「Investigation of Cytotoxic Effect of Reactive Oxygen Species on Mouse Spermatozoa」

成田 成「Endogenous Factors Affecting Sterility in oocytes of Aged Animals」

第4号議案：平成11年度学術講演会および総会に関する件

平成11年度学術講演会および総会は、理事会および評議員会の原案通り、下記の如く開催することを全会一致にて承認した。

平成11年度 担当支部 関東支部

会 長 矢内原 巧

開 催 地 東京都

第5号議案：役員改選の件

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

第6号議案：評議員改選の件

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

北海道支部 4名、東北支部 5名、関東支部 16名、中部支部 5名、

北陸支部 4名、関西支部 8名、中国・四国支部 6名、九州支部 7名

新名誉会員、功労評議員および新役員について

11月7日開催された平成8年度第2回通常総会において次の8名の方々が新たに名誉会員として、また、22名の方々が功労評議員として推薦、承認された。また役員(理事および監事)の改選が行われたので、11月8日臨時理事会を開き、互選により下記の如く理事長、副理事長、常任理事を選出するとともに、新評議員および幹事を選任した。

名誉会員	入谷 明	片山 喬	熊本悦明
	杉本 修	高橋克幸	浜田 宏
	平野睦男	八神喜昭	

理 事	理 事 長	森 崇 英 (関西支部)
	副 理 事 長	白 井 將 文 (関東支部)
	〃	毛 利 秀 雄 (〃)
	〃	矢 内 原 巧 (〃)
	理 事 (常任)	青 野 敏 博 (中国四国支部)
	〃 (〃)	伊 藤 晴 夫 (関東支部)
	〃 (〃)	守 殿 貞 夫 (関西支部)
	〃 (〃)	小 林 俊 文 (関東支部)
	〃 (〃)	佐 藤 和 雄 (〃)
	〃 (〃)	白 井 将 文 (〃)
	〃 (〃)	武 谷 雄 二 (〃)
	〃 (〃)	百 目 鬼 郁 夫 (〃)
	〃 (〃)	平 川 舜 (〃)
	〃 (〃)	広 井 正 彦 (東北支部)
	〃 (〃)	水 口 弘 司 (関東支部)
	理 事	井 上 正 樹 (北陸支部)
	〃	内 海 恭 三 (関西支部)
	〃	岡 村 均 (九州支部)
	〃	工 藤 隆 一 (北海道支部)
	〃	永 田 行 博 (九州支部)
	〃	中 西 正 美 (中部支部)
	監 事	島 崎 淳 (関東支部)
	〃	玉 田 太 朗 (〃)
	〃	豊 田 裕 (〃)

功勞評議員

飯田和質	生駒文彦	尾川昭三	長田尚夫
落合寛	加藤順三	河田啓一郎	菊川寛
北尾学	樫木勇	鈴置洋三	高邑昌輔
谷沢修	寺内弘知	富永敏郎	信永利馬
長谷川眞常	肥田木孜	平井博	福島峰子
松浦俊平	美川郁夫		

定款評議員

北海道支部

石川陸男	金川弘司	塚本泰司	藤本征一郎
------	------	------	-------

東北支部

折笠精一	斉藤英和	菅原七郎	田中俊誠
深谷孝夫			

関東支部

麻生武志	雨宮章	伊吹令人	遠藤克
大島博幸	河邊香月	木下勝之	久保春海
佐藤英明	佐藤嘉兵	津端捷夫	中村幸雄
穂坂正彦	森沢正昭	吉田英機	吉村泰典

中部支部

河上征治	玉舎輝彦	寺尾俊彦	友田豊
三宅弘治			

北陸支部

泉徳和	舘野政也	並木幹夫	布施秀樹
-----	------	------	------

関西支部

奥山明彦	萩田幸雄	神崎秀陽	香山浩二
沢田勉	野田洋一	星合昊	吉田修

中国・四国支部

大森弘之	加藤紘	相良祐輔	竹中生昌
寺川直樹	丹羽皓二		

九州支部

石丸忠之	金澤浩二	杉森甫	立山浩道
中村元一	松浦講平	宮川勇生	

なお、定款評議員上記55名については、1997年1月1日より1998年12月31日まで評議員を委嘱します。本誌面をもって委嘱状とさせていただきます。また、支部評議員については次号(42巻2号)に掲載致します。

幹事

平和 治 浩 一
文俊 英 弘
塚藤 藤 原 上
石遠 芥 堤 藤 村
肇克 海 三 一 樹
春隆 元 直
田藤 保 原 村 橋
石遠 久 田 中 三
也明 茂 浩 勉 陽
勝晃 一
香本 尾 岡 地 浦
味岩 押 末 堂 三
興稔 弘 明 夫 彦 昭
光 英 捷 美 正
井原 田 藤 端 井 沢
浅苛 岡 佐 津 細 森

会 告

平成9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41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9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9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9年4月30日(水)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 東京都千代田区麴町5-4 クロスサイド麴町ビル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41巻 号 _____ ~ _____ 頁(平成8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42巻 第1号

平成9年1月1日

—目 次—

原 著

- 不妊診療における子宮鏡的卵管口所見の意義に関する検討
—子宮卵管造影後の妊娠率の予測— ……神山 他 …… 1
- 子宮内膜症r-AFS分類Ⅰ期およびⅡ期不妊症患者における
腹腔鏡後AIHの有用性 ……有馬 他 …… 5
- インスリン様成長因子-I (IGF-I) の卵巢内アンギオテンシンⅡ(Ang Ⅱ) 産生刺激を
介した卵胞発育促進効果(英文) ……久慈 他 …… 9
- 無月経患者における子宮内膜厚とクロミフェンに対する反応の関連性(英文) ……中村 他 …… 22
- 卵管性不妊症患者におけるクラミジア・トラコマティス抗体の検討
—セロ・イバライザ クラミジアIgA, IgG, IgMを用いて— ……野口 他 …… 27
- 体外受精により得られたヒトおよびマウス3前核胚の発生と染色体の分析(英文) ……吉澤 他 …… 34
- プレドニゾロン投与による反復過排卵誘起マウスの排卵反応低下の阻止(英文) ……金山 他 …… 39
- Swim-upで分離した運動良好精子の数的染色体異常率に関する検討
—fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて—(英文) ……呼 他 …… 44
- 習慣流産(反復流産を含む)に対する免疫学的評価と免疫療法の有効性について ……中野 他 …… 50
- PCNA法を用いたラット精細胞DNA合成能の定量的解析(英文) ……井本勝彦 …… 59
- 精子運動自動分析装置を用いた男性不妊症患者精子運動性の分析 ……四倉 他 …… 67
- Ficollを用いたウマ精子運動性の評価方法 ……宮澤 他 …… 74
- 単為発生マウス胚盤胞における各種酵素の組織化学的研究 ……新村 他 …… 78
- 反復流産症例における免疫療法と抗HLA抗体産生について ……斉藤 他 …… 83
- 視床下部性無月経および多嚢性卵巣症候群婦人におけるプロラクチンおよび
甲状腺刺激ホルモン分泌(英文) ……嘉藤 他 …… 90
- 症例報告
先天性精管部分欠損と思われた精管通過障害の3例 ……江口 他 …… 96
- 地方部会講演抄録 …… 100

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 42, No. 1, 1997)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- A Correlation between Hysteroscopic Feature of Intrauterine Tubal Ostium and Pregnancy Rate after HSG *S. Kamiyama, H. Miyagi, Y. Teruya, T. Iha, H. Masamoto, M. Miyara, M. Higashi & K. Kanazawa* 1
- Clinical Usefulness of Artificial Insemination with Husband's Semen after Laparoscopic Treatment in Infertile Patients with Minimal or Mild Endometriosis *K. Arima, M. Nomiyama, H. Sou, Y. Matsumoto, H. Sugimori & K. Nakamura* 5
- Insulin-Like Growth Factor- I Induces Follicular Development by Stimulating Ovarian Production of Angiotensin II *N. Kuji, T. Miyazaki, K. Sueoka, M. Tanaka, K. Kiyokawa, Y. Kitaoka, J. Yamauchi, T. Hashiba, T. Nemoto, T. Kobayashi & Y. Yoshimura* 9
- Prediction of the Response to Clomiphene Citrate by Ultrasonographic Assessment of Endometrial Thickness in Amenorrheic Patients *S. Nakamura, T. Douchi, H. Ijuin, T. Oki, S. Yamamoto & Y. Nagata* 22
- Correlation between Serum Antichlamydia Antibodies and Infertile Women *M. Noguchi, T. Okamoto, T. Hojo, K. Nakabe, Y. Nagata, S. Nakamura, J. Yasuda, H. Hoshiai, M. Mukoubayashi, S. Matsuda, Y. Taketani, O. Tsutsumi, Y. Oosuga, T. Kawana, O. Nishii, A. Yajima, T. Fukaya, K. Takayama, T. Aono, M. Kamata, K. Tanaka, R. Kato, K. Sato, H. Osada, N. Masaoka, T. Terao, N. Kanayama, T. Asahina, M. Maeda, S. Kawakami, T. Aoki, S. Fujimoto & H. Yoshida* 27
- Analyses of Early Development and Chromosomal Constitution of Trippronuclear Human and Mouse Eggs Fertilized In Vitro *M. Yoshizawa, Y. Araki & M. Motoyama* 34
- Effects of Prednisolone in Repeated Superovulation Induction in Mice *K. Kanayama, M. Izumi, K. Nariai, T. Endo, T. Sankai, K. Yabe and H. Kada* 39

Detection of Aneuploidy Rate in Human Spermatozoa Selected by Swim-up Using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)	<i>H. Hu, N. Miharū,</i> <i>O. Samura & K. Ohama</i> ...44
The Clinical Significance of Blocking Effect in Patients with Recurrent Spontaneous Abortion	<i>T. Nakano, M. Nakashima,</i> <i>H. Ishikawa, Y. Ametani, S. Ohta,</i> <i>A. Ohkuchi, S. Satake, Y. Kojima,</i> <i>H. Funamoto & M. Tateno</i> ...50
Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in the Rat Using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ...	<i>K. Imoto</i> ...59
Semen Analysis of Male Infertility Patients Using a Computer Aided Semen Analyzer	<i>M. Yotsukura, Y. Tohyama, M. Iwabuchi,</i> <i>S. Oshio, H. Tomomasa,</i> <i>T. Yazaki & T. Umeda</i> ...67
Evaluation of Equine Sperm Motility Using Ficoll Solution	<i>K. Miyazawa, T. Shimizu,</i> <i>K. Ohsaki & K. Sato</i> ...74
Histochemical Studies of Enzymes in Parthenogenetic Mouse Blastocysts	<i>S. Niimura, T. Asami</i> ...78
Production of Anti-HLA Antibody in the Cases of Recurrent Spontaneous Abortion after Immunotherapy	<i>M. Saitoh, O. Ishihara, H. Seki,</i> <i>S. Takeda, K. Kinoshita,</i> <i>R. Hirata & H. Maeda</i> ...83
Prolactin and Thyroid Stimulating Hormone Secretion in Women with Hypothalamic Amenorrhea and Women with Polycystic Ovary Syndrome	<i>T. Kato, K. Seki & S. Sekiya</i> ...90
Case report	
Three Cases of Vas Deferens Obstruction which seemed to be Congenital Partial Aplasia of the Vas Deferens	<i>J. Eguchi, K. Nomata, T. Igawa,</i> <i>N. Nishimura, T. Hirose,</i> <i>H. Kanetake & Y. Saito</i> ...96

不妊診療における子宮鏡的卵管口所見の意義に関する検討 —子宮卵管造影後の妊娠率の予測—

A Correlation between Hysteroscopic Feature of Intrauterine Tubal Ostium and Pregnancy Rate after HSG

琉球大学医学部産科婦人科学教室

神 山 茂	宮 城 博 子	照 屋 陽 子
Shigeru KAMIYAMA	Hiroko MIYAGI	Yoko TERUYA
伊 波 忠	正 本 仁	宮 良 美 代 子
Tadashi IHA	Hitoshi MASAMOTO	Miyoko MIYARA
東 政 弘	金 澤 浩 二	
Masahiro HIGASHI	Koji KANAZAWA	

Department of Obstetrics and Gynecology
University of the Ryukyus School of Medicine, Okinawa 903-01, Japan

子宮鏡的に観察した卵管の子宮腔内開口部所見(卵管口所見)と、その後に施行した子宮卵管造影検査HSGの所見との関連、さらに妊娠率との関連について後方視的に解析した。

あらかじめ子宮鏡検査を行い、その後に引き続きHSGを行った不妊婦人287例を解析対象とした。卵管口所見は、良好と判断される順に、陥凹、狭窄、閉鎖に分類した。

287例について、計476個の卵管口所見が得られ、その所見別の割合は、陥凹が39.1%(186/476)、狭窄25.6%(122/476)、閉鎖35.3%(168/476)であった。卵管口所見別にその後に施行したHSG上の卵管間質部閉塞率をみると、陥凹では2.7%(5/186)、狭窄4.1%(5/122)、閉鎖11.3%(19/168)であり、閉鎖では陥凹と狭窄に比較し、有意に高い閉塞率であった($p < 0.01$, $p < 0.05$)。つぎに、両側の卵管口所見が得られ、かつ、HSGにて両側卵管の疎通所見が確認された153例について、卵管口所見の組み合わせによって6群に分けて妊娠率を比較すると、少なくとも一側が陥凹か狭窄である症例では30~55%であるのに対し、両側とも閉鎖である症例では11.1%と低率であった。この153例を両側閉鎖以外の症例全体126例と両側閉鎖症例27例とに分けて比較すると、後者の妊娠率は有意に低率であった($p < 0.05$)。

以上より、子宮鏡的卵管口所見は、HSG上の卵管間質部の通過所見が得られるか否かの予測、通過所見が得られた症例での妊娠成立の可能性の予測に有用であることがわかった。

キーワード: 卵管口所見, 子宮鏡, 子宮卵管造影検査, 卵管間質部閉塞率, 妊娠率

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42(1), 1-4, 1997)

緒 言

不妊症の原因は多岐にわたるが、中でも卵管の通過障害は不妊因子のひとつとして大きな位置を占めている。卵管通過障害の有無を確かめる方法として、従来から子宮卵管造影法(hysterosalpingography, HSG)が汎用されてきている。このHSG施行後には、20~

40%の妊娠率が得られており、その治療効果としての意義も重要視されてきている^{1,2)}。しかし一方では、待機していても、その60~80%には妊娠が成立しないことになる。このような妊娠の成立しにくい症例を何らかの方法であらかじめ選別できるならば、何周期かにわたる無駄な待機を回避できることになる。晩婚傾向の強くなった今日、不妊診療を無駄なく

効率的に進めることは重要である。

当科では、不妊症外来において、子宮鏡検査をルーチンの検査項目のひとつとして行ってきており、HSGは子宮鏡検査の後に施行する方針としてきた。そこで、子宮鏡的に観察した卵管の子宮腔内開口部所見について、それがその後に施行したHSGの所見とどのように関係しているか、さらにHSG後の妊娠率とどのように関係しているか、について後方視的に解析した。

対象および方法

1. 対象

1989年1月から1994年6月までの期間に、当科不妊症外来においてあらかじめ子宮鏡検査を行い、引き続きHSGを行った287例を解析対象とした。

2. 方法

子宮鏡検査は、原則として、高温相中期に行った。これは、同時に、着床期子宮内膜所見を得ることも目的としてきたためであった³⁾。子宮鏡は灌流式硬性子宮鏡を、灌流液には5%ブドウ糖を使用した。得られた子宮内の卵管開口所見は、良好と判断される順に、陥凹、狭窄、閉鎖に分類した(写真1)。

引き続き、HSGは、月経終了後数日以内に、油性造影剤を使用して施行した。

なお、妊娠成立の診断は、経陰超音波断層検査による胎嚢の確認をもって行い、ここでは、HSG施行後6周期以内の妊娠を妊娠成立、それから遅れた妊娠は妊娠不成立とした。

成 績

1. 子宮鏡的卵管口所見、およびHSG所見との関係

287例について、計476個の卵管口所見が得られた。正常ないし良好と判断される陥凹は39.1%、以下、狭窄が25.6%、閉鎖が35.3%であった(表1)。なお、両側とも卵管口所見が得られた214例について、両側の所見が一致しているものは64.5%(138/214)、一致していないものは35.5%(76/214)であった。

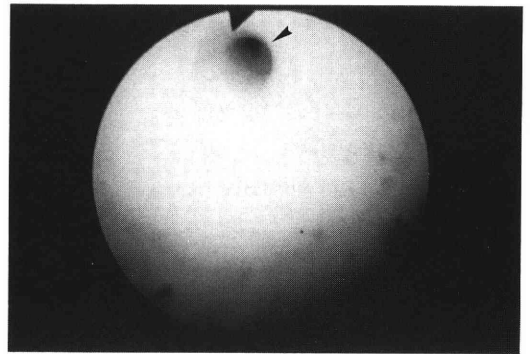
つぎに、これら計476個の卵管口所見とその後にに行ったHSG所見との関係を検討した。すなわち、HSG上の卵管間質部閉塞率は、陥凹では2.7%、狭窄では4.1%、閉鎖では11.3%であり、閉鎖であっても90%弱に通過所見が得られた。しかし、閉鎖ではなお、陥凹と狭窄に比較し、有意に高い閉塞率であった(表1)。

2. 卵管口所見とHSG後の妊娠率との関係

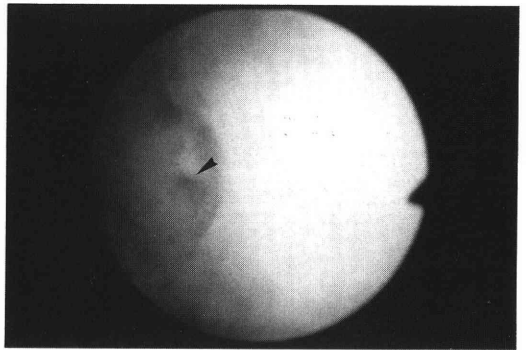
ここでは、子宮鏡により両側の卵管口所見が得ら

れ、かつその後施行したHSGにて両側の疎通所見が確認された症例のうち、さらに卵管の通過性に影響を及ぼし得る検査や治療を加えることなく、少なくとも連続4周期以上経過を観察した153例について検討した(表2)。なお、排卵障害など明らかな不妊原因がある症例は、あらかじめ除外した。

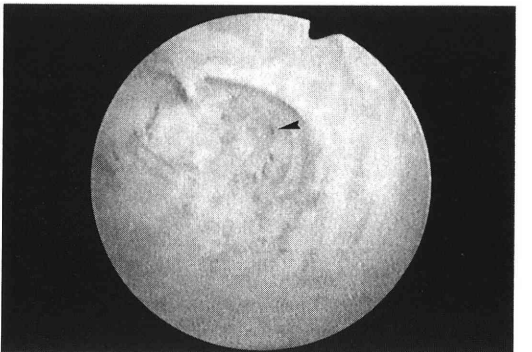
両側の卵管口所見の組み合わせによって6群に分けて比較した。妊娠率は、少なくとも一側が陥凹か



陥凹



狭窄



閉鎖

写真1 卵管口所見

表1 卵管口所見とHSGでの間質部閉塞率

卵管口所見	卵管口数(割合)	HSGでの間質部 閉塞卵管数	HSGでの間質部 閉塞率(%)
陥凹	186 (39.1%)	5	2.7
狭窄	122 (25.6%)	5	4.1
閉鎖	168 (35.3%)	19	11.3
合計	476 (100%)	29	6.1

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

表2 両側卵管口所見とHSG後妊娠率

両側卵管口所見	症例数	妊娠数	妊娠率(%)
陥凹と陥凹	46	17	37.0
陥凹と狭窄	14	5	35.7
陥凹と閉鎖	20	7	35.0
狭窄と狭窄	26	8	30.8
狭窄と閉鎖	20	11	55.0
閉鎖と閉鎖	27	3	11.1
合計	153	51	33.3

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

狭窄である症例では30～55%であるのに比較し、両側とも閉鎖である症例では11.1%と低く、両側陥凹群および狭窄+閉鎖群と両側閉鎖群との間に有意差をみた($p < 0.05$, $p < 0.01$)。また、両側閉鎖以外の群全体126例と両側閉鎖群27例との比較でも、後者は有意に低い妊娠率であった($p < 0.05$)。

考 察

当科の不妊症外来においては、子宮鏡検査をルーチンの検査項目のひとつとして取り上げ、これを分泌期中期に施行することによって、着床期内膜の子宮鏡の評価、および卵管口の子宮鏡の評価を解析し、その臨床的意義を検討してきた^{3,4)}。子宮鏡そのものは外来で簡便に行える検査であり、原則として無麻酔科にて5～10分程度で終了する。過去に重大な合併症を経験していない。

まず、子宮鏡の卵管口所見を良好と判断される順に、陥凹、狭窄、閉鎖に分類してみると、不妊を主訴とする婦人の卵管口の約1/3に閉鎖所見が得られ、また一方で、約1/3では両側の卵管口所見が一致していないことも観察された。不妊でない婦人、あるいは、いわば正常な婦人において、このような卵管口所見がそれぞれどのような頻度で分布しているのかはわからないが、一方、両側卵管口所見が一致しない症例の存在することは、炎症などの周辺病変は必ずしも両側卵管口に同じ形態の変化を引き起こ

さないということを示しており、HSG所見の左右不一致症例の存在と同様に理解してよいと考えられる。

つぎに、陥凹、狭窄、閉鎖所見とHSG上の卵管間質部閉塞率との関係を見ると、この順に閉塞率が上昇し、とくに閉鎖では有意に高い閉塞率であった。このことは、卵管口所見を陥凹、狭窄、閉鎖と分類することの臨床的有用性を指摘している。一方、閉鎖所見であっても、その後に行ったHSG上で90%弱の卵管通過所見が得られたことは、この所見を示す卵管口の多くはHSGの造影剤注入圧(最高約1,000 mmHgまで上昇しうる⁵⁾)によって再疎通が得られる程度の軽い膜様閉鎖であることを指摘しており、従来からのHSGの治療的意義をも明確にしたと理解される。しかし、閉鎖所見である場合には、その10%強にHSG上通過所見の得られない症例が存在することを指摘している。

さて、これら陥凹、狭窄、閉鎖所見と最終的な妊娠率との関係は、不妊症診療上もっとも重要な情報を提供することになる。今回の解析では、少なくとも一側の所見が陥凹ないし狭窄であり、かつその後のHSGにて両側の通過所見が得られれば、4周期以内に30～55%の妊娠率が期待できることが明らかになった。しかし、一方で、両側の所見が閉鎖である場合には、その後のHSGにて両側の通過所見が得られたとしても、わずか10%程度の妊娠率しか期待できないことも明らかとなった。したがって、両側の

所見が閉鎖である症例では、HSG、卵管通水法、通気法などよりも、卵管Catheterization^{6,7)}、卵管形成術など、卵管の疎通性を改善するような治療を積極的に進めるのが望ましいと判断される。

以上、子宮鏡的卵管口所見は、陥凹、狭窄、閉鎖に分類できること、これらの所見は、HSG上で卵管間質部の通過所見が得られるか否かの予測、通過所見が得られた症例での妊娠成立の可能性の予測に有用であることを指摘した。そして、両側の所見が閉鎖である症例では、卵管の疎通性を改善するような治療を積極的に進めるべきであると考えられた。

なお、本論文の要旨は第40回日本不妊学会学術講演会(山形、1995年)において発表した。

文 献

- 1) Alan HD, Hilton K, Jay BB, et al. (1980) Increased pregnancy rate with oil-soluble hysterosalpingography dye. *Fertil Steril* 33: 407-410
- 2) 八重樫信生, 倉本雅規, 星合 昊 他(1987) 子宮卵管造影後の妊娠率. *日産婦誌* 39: 1812-1814
- 3) 稲福 薫, 中山道男(1992) ヒト子宮内膜の分泌中期における子宮鏡像 内膜腺開口と血管パターンによる機能的評価. *日産婦誌* 44: 79-83
- 4) Sakumoto T, Shinkawa T, Kanazawa K, et al. (1993) Treatment of infertility associated with endometriosis by selective tubal catheterization under hysteroscopy and laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 169: 744-747
- 5) Norbert G, Donna P, Michael P, et al. (1992) Standardization of hysterosalpingography and selective salpingography. *Fertil Steril* 58: 1136-1141
- 6) David MH, Joseph B, David JE, et al. (1994) Fallopian tube recanalization in an unrestricted patient population. *Radiology* 190: 137-140
- 7) Robert W, Arpas P, Penny O, et al. (1995) Differential impact on pregnancy rate of selective salpingography, tubal catheterization and wire-guide recanalization in the treatment of proximal Fallopian tube obstruction. *Human Reprod* 10: 1423-1426

(受付: 1996年6月17日)

(受理: 1996年8月22日)

A correlation between hysteroscopic feature of intrauterine tubal ostium and pregnancy rate after HSG

Shigeru Kamiyama, Hiroko Miyagi, Yoko Teruya, Tadashi Iha,
Hitoshi Masamoto, Miyoko Miyara, Masahiro Higashi and Koji Kanazawa

Department of Obstetrics and Gynecology
University of the Ryukyus School of Medicine, Okinawa 903-01, Japan

The study was performed to analyze retrospectively a correlation among hysteroscopic feature of intrauterine tubal ostium, obstruction rate of proximal Fallopian tube in hysterosalpingography (HSG) and pregnancy rate after HSG in 287 infertile women whose medical records of hysteroscopy and subsequent HSG were available. The results as follows; 1) 476 hysteroscopic findings obtained in 287 women could be categorized in 186 (39.1 %) of "funnel" - shape, 122 (25.6 %) of "stenosis" - shape and 168 (35.3 %) of "occlusion" - shape. 2) Non-patency rate of proximal portion in HSG was 2.7 %, 4.1 %, and 11.3 % in the tubes with funnel, stenosis and occlusion-shaped ostium, respectively. 11.3 % in occlusion-shaped tubes was significantly higher than those in others ($p < 0.01$, $p < 0.05$). 3) In 153 women with bilateral patent tubes confirmed by HSG, pregnancy rate observed during 4 consecutive ovulation cycles after HSG was 11.1 % in 27 with bilateral occlusion-shaped tubal ostia, which was significantly lower than 38.1 % in the remaining 126 with funnel- or stenosis-shaped ostia ($p < 0.05$).

In conclusion, hysteroscopic findings of tubal ostium is informative for predicting non-patency rate of proximal tube in HSG and pregnancy rate after HSG.

Key words: hysteroscopy, feature of intrauterine tubal ostium, HSG patency, pregnancy rate

子宮内膜症r-AFS分類Ⅰ期およびⅡ期不妊症患者における 腹腔鏡後AIHの有用性

Clinical Usefulness of Artificial Insemination with Husband's Semen after Laparoscopic Treatment in Infertile Patients with Minimal or Mild Endometriosis

佐賀医科大学産婦人科学教室

有馬 薫

Kaoru ARIMA

野見山 真理

Mari NOMIYAMA

宗 完子

Hiroko SOU

松本 ゆみ

Yumi MATSUMOTO

杉森 甫

Hajime SUGIMORI

Department of Obstetrics and Gynecology
Saga Medical School, Saga 849, Japan

高邦会高木病院産婦人科

中村 加代子

Kayoko NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
Takagi Hospital, Okawa 831, Japan

本研究は子宮内膜症 revised AFS 分類Ⅰ期・Ⅱ期不妊症患者に対する腹腔鏡後AIHの有用性を明らかにすることを目的とした。対象は、1990年5月より1995年5月までに佐賀医科大学産婦人科において不妊症精査のため施行した腹腔鏡検査により発見された子宮内膜症Ⅰ期・Ⅱ期症例のうち、腹腔鏡後6周期をAIHあるいはtimed intercourseのいずれかで管理された35症例である。症例の内訳はAIH群14例、timed intercourse群21例であり、排卵誘発法はclomiphene citrateを使用した症例のみとし、卵管閉塞や男性不妊など他の不妊因子を合併するものは除外した。子宮内膜症病巣に対しては腹腔鏡下電気焼灼、付属器周囲癒着剥離を行い腹水吸引、腹腔内生食洗浄を施行した。腹腔鏡後6周期の累積妊娠率はAIH群57.2%、timed intercourse群14.3%とAIH群が有意に高率であった($p < 0.05$)。また、timed intercourse群で腹腔鏡後6周期以内に妊娠が成立しなかった症例のうち7周期以降にAIHを開始した症例の妊娠率は45.5%、AIH未施行群の妊娠率は28.6%であり、AIH施行群において有意に高かった($p < 0.05$)。

以上の結果から子宮内膜症Ⅰ期・Ⅱ期不妊症患者に対して腹腔鏡後にAIHを早期に開始することは不妊治療として有用であると考えられる。

キーワード：子宮内膜症，不妊症，腹腔鏡，AIH

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 5 - 8, 1997)

緒言

当科では不妊症精査を目的として積極的に腹腔鏡検査を施行している。その約30%の症例に子宮内膜

症 revised AFS 分類Ⅰ期およびⅡ期が認められる。軽症子宮内膜症合併不妊における腹腔鏡後の取り扱いについての詳細な検討は少ない。そこで今回、軽症子宮内膜症合併不妊患者に対するAIHの有用性を

表1 対象の背景

腹腔鏡後6周期 の治療法	AIH (n=14)	Timed intercourse (n=21)	有意差検定
r-AFS分類 (I期)	10	16	N.S.
(II期)	4	5	
原発不妊	10	14	N.S.
続発不妊	4	7	
年齢(歳)	29.7 ± 9.0	29.7 ± 7.7	N.S.
不妊期間(年)	4.7 ± 3.1	3.8 ± 2.3	N.S.

(Mean ± S.D.) N.S.: not significant

検討するために、腹腔鏡後のAIHおよびtimed intercourseによる不妊治療の妊娠成績を比較した。

対象および方法

1990年5月から1995年5月までの間に佐賀医科大学産婦人科において不妊症精査を目的とした腹腔鏡検査によって発見されたI期およびII期子宮内膜症患者100症例のうち、以下の3項目を満たすものを本研究の対象とした。

- 1) 腹腔鏡後6周期をAIH、またはtimed intercourseのいずれか一方で管理した症例。
- 2) 腹腔鏡後6周期の上記治療周期における排卵誘発法としてclomiphene citrateのみを使用した症例。
- 3) 卵管閉塞、男性不妊など他の不妊因子を合併しない症例。

以上を満たした症例はAIH群14例、timed intercourse群21例であった。これら2群を比較した。

子宮内膜症病巣に対しては腹腔鏡下電気焼灼、付属器周囲癒着剥離を施行し、腹水吸引、腹腔内生食洗浄を行った。

AIH群14症例中、性交後試験が陰性であり、頸管因子が原因でAIHを選択したものが5例あるが、この中に抗精子抗体を有する症例はなかった。他は高齢あるいは不妊期間、治療歴が長期であったため積極策としてAIHを選択した症例である。

月経周期の5日目よりclomiphene citrate 100mg/dayを5日間内服投与して排卵誘発を行い、経腔超音波断層法にて首席卵胞径が20mmに達した時点でhCG 5,000 IUを筋注し、その36~40時間後にAIHを施行するか、または性交を指示した。

AIHの精子処理法は主にswim-up精子洗浄濃縮法を用いた。まず7.5%非働化臍帯血血清添加HTF液内に液化精液を静置し、5% CO₂下に60分間培養しdirect swim-up法により良好運動精子を回収する。つぎに600g 5分間遠沈した後上清を除去し、pelletを7.5%

表2 timed intercourse群における腹腔鏡後7周期以降の妊娠成績

	症例数	妊娠数	妊娠率
AIH施行	11	5	45.5%
AIH未施行	7	2	28.6%

p < 0.05

非働化臍帯血血清添加HTF液で再懸濁し約10 × 10⁶/mlに調整し子宮腔内に0.02 ml注入する。

AIH群とtimed intercourse群の背景をrevised-AFS分類、不妊歴、平均年齢、平均不妊期間について比較した。つぎに腹腔鏡後6周期の累積妊娠率を比較した。さらにtimed intercourse群において腹腔鏡後6周期に妊娠が成立しなかった症例のうち7周期以降にAIHを開始した11症例についても検討を加えた。

データの数値は平均±標準偏差で示し、統計学的解析は、unpaired student's t-test、あるいはχ²検定を用い有意差を検定した。また累積妊娠率はKaplan-Meier法を用いて求め、有意差検定にはWilcoxon検定を用いた。なお、p < 0.05をもって有意とみなした。

結 果

AIH群とtimed intercourse群の背景の比較を表1に示す。Revised-AFS分類I期、II期の分布、および原発不妊、続発不妊の比率に有意差はなかった。対象2群間の平均年齢にも有意差はなかった。平均不妊期間はAIH群がやや長い傾向にあったが有意差はなかった。腹腔鏡後6周期の累積妊娠率(図1)はAIH群で57.2%、timed intercourse群で14.3%であり、AIH群で有意に高率(p < 0.05)であった。

timed intercourse群において6周期中に妊娠成立しなかった18症例のうち腹腔鏡後7周期以降にAIHを開始した11症例とAIHを行わなかった7症例について妊娠率を比較した(表2)。前者における妊娠率は45.5% (5/11)であり、いずれもAIH開始後4周期

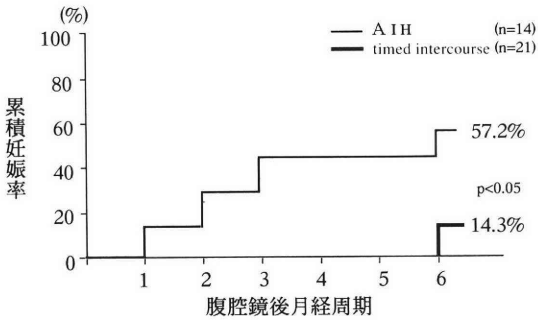


図1 腹腔鏡後6周期の累積妊娠率

以内の妊娠であった。一方、AIHを行わなかった症例の7周期以降の妊娠率は28.6% (2/7)であり、AIHを開始した症例で高率に妊娠が成立した ($p<0.05$)。

考 察

子宮内膜症合併不妊患者に腹腔鏡下治療を行うことにより、妊娠成績は向上するといわれている^{2,3)}。しかしながら腹腔鏡下治療から1年以上を経過すると妊娠率は横ばい状態となり⁴⁾、in vitro fertilization-embryo transfer (IVF-ET)に頼らざるを得なくなる傾向にある⁵⁾。よって腹腔鏡下治療後早期に妊娠を成立させることが望ましい。我々はこのような考え方を踏まえ、腹腔鏡後早期にAIHまたはtimed intercourseを開始している。

今回、「方法」に示した条件を満たす症例を対象としAIHの有用性を検討した結果、AIH群はtimed intercourse群に比べ腹腔鏡後早期に妊娠が成立し6周期の累積妊娠率は有意に高率であった。また、timed intercourse群において6周期以内に妊娠が成立しなかった症例のうち、その後AIHを行った症例の妊娠率も未施行群に比べ高率であった。これらの結果は子宮内膜症Ⅰ期、Ⅱ期不妊症患者に対して、AIHが妊娠成立に有効であることを示している。

Escuderoら⁶⁾はminimal endometriosisを有する不妊患者において待機療法群(40人)とartificial insemination with donor semen (AID)群(21人)の2群に分け腹腔鏡による診断後、3, 6, 12か月の累積妊娠率を比較した。その結果、AID群の累積妊娠率がそれぞれ47.6%, 71.4%および80.9%であったのに対し、待機療法群では20%, 30%および47.5%とAID群において有意に高率であったこと、そしてこの成績が正常腹腔と同程度であったことを報告している。

井上ら⁷⁾は腹腔鏡前にAIHを施行し腹水中精子回

収試験により子宮内膜症患者腹水中の運動精子の有無を調べたが、正常腹腔と差がなかったと報告している。本研究対象症例の腹水中精子回収試験の結果は、32例中27例(84.4%)と高率に運動精子が確認された。子宮内膜症の不妊原因は定性的な運動精子輸送の有無のみでは説明できない。

子宮内膜症を有する不妊症患者では腹水中のマクロファージ^{8,9)}、プロスタグランジンの増加¹⁰⁾、IL-1およびIL-6などサイトカインの上昇¹¹⁻¹³⁾が報告されている。また、軽症子宮内膜症患者の腹水中のtumor necrosis factor alpha (TNF α)によりin vitroで精子運動性の著しい低下およびhyposmotic swelling testの低下を認め、精子機能への悪影響が指摘されている^{14,15)}。

軽症子宮内膜症合併不妊において、腹腔鏡後早期にAIHを開始することにより妊娠率が上昇するという本研究の結果は、このような受精を取り巻く環境が腹腔鏡後に改善され、さらにAIHにより精子運動率が向上し、受精能力を獲得した精子の濃度が卵管内、および腹腔内で増加することに起因すると考えられる。

軽症子宮内膜症と不妊との因果関係は明らかにされてはいないが多方面からの検討が今後の課題であろう。

文 献

- 1) The American Fertility Society (1985) Revised American Fertility Society classification of endometriosis. *Fertil Steril* 43: 351-352
- 2) Fayeze JA, Collazo LM, Vernon C (1988) Comparison of different modalities of treatment for minimal and mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 159: 927-932
- 3) Sulewski JM, Curcio FD, Bronitsky C, et al. (1980) The treatment of endometriosis at laparoscopy. *Am J Obstet Gynecol* 138: 128-132
- 4) Buttram VC (1979) Conservative surgery for endometriosis in the infertile female: a study of 206 patients with implications for both medical and surgical therapy. *Fertil Steril* 31: 117-123
- 5) Inoue M, Kobayashi Y, Honda I, et al. (1992) The impact of endometriosis on the reproductive outcome of infertile patients. *Am J Obstet Gynecol* 167: 278-82
- 6) Escudero FJR, Neyro JL, Benito JA, et al. (1988) Does minimal endometriosis reduce fecundity? *Fertil Steril* 50: 522-524
- 7) 井上正人(1989)子宮内膜症性不妊に対する治療法

- の検討. 日産婦会誌 41: 960-970
- 8) Haney AF, Muscato JJ, Weinberg JB (1981) Peritoneal fluid cell populations in infertility patients. *Fertil Steril* 35: 696-698
- 9) Halme J, Becker S, Hammond MG, et al. (1983) Increased activation of pelvic macrophages in infertile woman with mild endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 145: 333-337
- 10) Bancroft K, Williams CAV, Elstein M (1989) Minimal/mild endometriosis and infertility. A review. *Br J Obstet Gynecol* 96: 454-60
- 11) Fakin H, Baggett B, Holtz G, et al. (1987) Interleukin-1: possible role in the infertility associated with endometriosis. *Fertil Steril* 47: 213-217
- 12) Buyalos RP, Watson JM, Funari VA, et al. (1992) Elevated interleukin-6 levels in peritoneal fluid of patients with pelvic pathology. *Fertil Steril* 58: 302-306
- 13) Keenan JA, Chen TT, Chadwell NL, et al. (1994) Interferon-gamma (IFN- γ) and Interleukin-6 (IL-6) in peritoneal fluid and macrophage-conditioned media of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* 32: 180-183
- 14) Eisermann J, Register KB, Strickler RC, et al. (1989) The effect of tumor necrosis factor on human sperm motility in vitro. *J Androl* 10: 270-274
- 15) Liang XS, Hu LN, Wu P (1994) Tumor necrosis factor in peritoneal fluid of infertile women with endometriosis and its relation to sperm motility. *Chinese J Obstet Gynecol* 29: 524-526
- (受付: 1996年6月17日)
(受理: 1996年9月2日)

Clinical usefulness of artificial insemination with husband's semen after laparoscopic treatment in infertile patients with minimal or mild endometriosis

Kaoru Arima, Mari Nomiya, Hiroko Sou, Yumi Matsumoto
and Hajime Sugimori

Department of Obstetrics and Gynecology
Saga Medical School, Saga 849, Japan

Kayoko Nakamura

Department of Obstetrics and Gynecology
Takagi Hospital, Okawa 831, Japan

The purpose of this study is to clarify the clinical usefulness of artificial insemination with husband's semen (AIH) after laparoscopy in infertile patients with minimal or mild endometriosis.

The subjects were 35 patients that include 14 cases for AIH group and 21 cases for timed intercourse group. AIH was done in the first 6 cycles after laparoscopy. For ovarian stimulation clomiphene citrate was used. The patients with the following factors were excluded; tubal occlusion, male infertility and other infertile factors. Endometriosis was treated by electrocauterization, periaadnexal adhesiolysis, aspiration of peritoneal fluid, and pelvic toiletting under laparoscopy.

The cumulative pregnancy rates were compared between these two groups. Within-group comparisons were made by Kaplan Meier life-table analysis. The difference of cumulative pregnancy rates was statistically significant between AIH group (57.2 %) and timed intercourse group (14.3 %) ($p < 0.05$).

In timed intercourse group 18 patients did not conceive within the first 6 cycles after laparoscopy. Among them 11 patients started AIH after seventh cycle following the laparoscopy. Significant difference was observed in pregnancy rates between AIH group (45.5 %) and timed intercourse group (28.6 %) (χ^2 -test, $p < 0.05$).

This study suggests that immediate AIH is recommended after laparoscopy for the treatment of infertile patients with minimal or mild endometriosis.

Key words: mild endometriosis, infertility, laparoscopy, AIH

INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR- I INDUCES FOLLICULAR DEVELOPMENT BY STIMULATING OVARIAN PRODUCTION OF ANGIOTENSIN II¹

Naoaki KUJI, Toyohiko MIYAZAKI, Kou SUEOKA,
Mamoru TANAKA, Kaoru KIYOKAWA, Yoshihisa KITAOKA,
Jun YAMAUCHI, Tsuyoshi HASHIBA, Taiko NEMOTO,
Toshifumi KOBAYASHI and Yasunori YOSHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
Keio University School of Medicine, Tokyo 160, Japan

Abstract: We evaluated the effects of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on insulin-like growth factor I (IGF- I)-stimulated follicular growth, oocyte maturation, ovarian steroidogenesis and angiotensin II (Ang II) production, and intrafollicular plasminogen activator (PA) activity using an in vitro perfused rabbit ovary preparation.

Exposure to 10^2 ng/ml of IGF- I significantly stimulated follicular development, oocyte maturation, and the secretion rate of Ang II-like immunoreactivity (Ang II-IR) in perfused rabbit ovaries. The concomitant addition of IGFBP-3 (1 to 10^3 ng/ml) to the perfusate blocked the stimulatory effects of IGF- I in a dose-dependent manner. The percent increase in follicle diameter in IGF- I-treated ovaries with or without IGFBP-3 for 12 h was significantly correlated with the secretion rate of Ang II-IR at 12 h after exposure to IGF- I. The secretion rate of estradiol (E_2), but not progesterone, was significantly increased in response to IGF- I administration, with IGFBP-3 reduced the IGF- I-induced secretion rate of E_2 in a dose-dependent manner. A monoclonal antibody recognizing the type I receptor, α IR-3, also significantly blocked IGF- I-stimulated follicular growth, oocyte maturation, and Ang II-IR secretion. The addition of either 10^3 ng/ml of IGFBP-3 or 1μ g/ml of α IR-3 to the perfusate significantly inhibited the intrafollicular PA activity stimulated by IGF- I.

In conclusion, these results indicate that IGF- I stimulates follicular growth, at least in part, by stimulating the ovarian production of Ang II. Thus, IGF- I and Ang II may interact in the mechanisms that control follicular development.

Key words: insulin-like growth factor I, angiotensin II, follicular growth, oocyte maturation, insulin-like growth factor binding protein-3

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 9 - 21, 1997)

Introduction

Locally produced intraovarian growth factors are involved in the autocrine/paracrine control of folliculogenesis¹⁻⁴. Insulin-like growth factor- I (IGF- I) is a multifunctional, monomeric polypeptide which has been implicated in ovarian physiology^{2, 5}. IGF- I messenger RNA (mRNA) has been identified in granulosa cells of the developing follicles

in the rat ovary⁶. Rat granulosa cells possess specific IGF type I receptors that bind IGF- I with a higher affinity than that for either IGF- II or insulin⁷. In the previous study, IGF- I stimulated follicular development, estradiol (E_2) production, and oocyte maturation by interacting with its specific receptor on rabbit ovarian membranes⁸. We also found that IGF- I enhanced ovarian angiotensin II (Ang II) production by stimulating intrafollicular plasminogen

activator (PA) activity. Locally produced Ang II functions as a significant autocrine or paracrine modulator in the processes that lead to ovulation¹⁰⁻¹⁴). These findings suggest that IGF- I and Ang II may interact with each other in the mechanisms that control follicular development and ovulation.

The biological effects of IGF- I are modulated by a family of IGF binding proteins (IGFBPs) in a complex, incompletely understood manner. To date, six IGFBPs have been identified in the ovaries of human^{15, 16}) and five in the ovaries of rats^{17, 18}) by immunoblot analysis, Northern blot analysis, and *in situ* hybridization procedures. These IGFBPs either inhibit¹⁹) or stimulate²⁰) the action of IGF- I on mammalian cells depending on the circumstances, but their main effect on ovarian follicular cells *in vitro* appears to be inhibitory^{21, 22}). A recent study showed that the ovarian intrabursal administration of IGFBP-3 inhibited follicle rupture in gonadotropin-treated immature rats, suggesting that locally produced ovarian IGFBPs may modulate follicular function *in vitro*²³). Perfusion of isolated ovaries provides an opportunity to conduct detailed studies of the intact organ under carefully regulated conditions independent of systemic influences^{24, 25}). The present study was undertaken to investigate the effects of IGFBP-3 on IGF- I -stimulated follicular growth, oocyte maturation, ovarian steroidogenesis and Ang II production, and intrafollicular PA activity in an *in vitro* perfused rabbit ovary preparation. By using a monoclonal antibody to the type I IGF receptor, we also examined whether IGF- I exerted its biological actions through the type I IGF receptor in the ovary.

Materials and Methods

Animals

A total of 96 sexually mature female Japanese white rabbits weighing 3.5 ~ 4.5 kg were used in the present study and were cared for according to the guidelines of Keio University School of Medicine. They were isolated for a minimum of 3 weeks before the experimental procedure caged individually, and fed water and a diet of Purina rabbit chow *ad libitum* under controlled light and temperature conditions. Prior to surgery, the rabbits were anes-

thetized with iv sodium pentobarbital (32 mg/kg), were administered heparin sulfate (120 U/kg) for anticoagulation, and subjected to laparotomy. Ovaries were excluded from further study if they had fewer than three mature follicles or if 50 % or more of the surface follicles were hemorrhagic.

Biochemical Materials

Recombinant human IGF- I was obtained from Amersham International (Amersham, UK). Nonglycosylated recombinant human IGFBP-3 was kindly provided by Dr. C.A. Maack (Celtrix Pharmaceuticals, Santa Clara, CA). A mouse monoclonal antibody to the type I IGF receptor, α IR-3, was obtained from Oncogene Science (Uniondale, NY). ¹²⁵I -Ang II (2,200 Ci/m mol) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA).

Ovarian Perfusion

The cannulation procedure and the perfusion technique have previously described in detail^{24, 25}). Briefly, the ovarian artery and vein were cannulated *in situ* after the major anastomotic connections were ligated. The ovary, with its artery, vein, and supporting adipose tissue, was removed and immediately placed in a perfusion chamber. The perfusion fluid consisted of 150 ml of Medium 199 (GIBCO, Grand Island, NY) containing 1 % BSA (Fraction V powder, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), which was supplemented with heparin sulfate, streptomycin, and penicillin G and adjusted to a pH of 7.4. The perfusate was introduced through the ovarian artery cannula, collected from the unligated ovarian vein, and recycled. Ovaries were observed every 15 min during the 12 h of perfusion for evidence of follicular growth and rupture. At the end of the perfusion period, follicular oocytes were recovered by aspiration from mature follicles with a diameter > 1.2 mm. The stage of maturity and signs of degeneration of follicular oocytes were determined as previously described²⁶). Oocytes were placed on a slide, fixed in 2.5 % glutaraldehyde, and then stained with 0.25% lacmoid in 45 % acetic acid for microscopic evaluation. The degree of ovum maturity was expressed as the percentage of ova achieving germinal vesicle breakdown (GVBD). Ova were also assessed for degenerative changes, including vacuolization, cytolysis, necrosis, fragmentation, and

loss of spherical shape.

Experimental Design

The first experiment was undertaken to assess the effects of IGFBP-3 on IGF- I -induced follicular growth, oocyte maturation, and the production of progesterone (P), E₂, and Ang II. One ovary from each rabbit was perfused with recombinant human IGF- I at a concentration of 10² ng/ml and served as a control. The contralateral ovary was simultaneously placed in a separate chamber with medium containing 10² ng of IGF- I plus IGFBP-3 at a concentration of 1, 10, 10², or 10³ ng/ml. Six ovaries were treated with each dose of IGFBP-3. Ovarian perfusion was carried out for 12 h after beginning administration of IGF- I. In ovaries perfused with 10² ng/ml of IGF- I, the concentration of IGF- I in the perfusate ranged from 70 to 80 ng/ml 12 h after perfusion. Follicles with a diameter greater than 1.2 mm were measured at the onset of perfusion by using a pair of slide calipers (Mitsutomo Co., Tokyo, Japan). The mean number of mature follicles per ovary was 5.34 ± 0.28 (range, 4 to 7). The follicle diameter of the ovary before perfusion was defined as 100%. The follicle diameter was also determined at 12 h after the onset of perfusion, and the percent increase for each follicle was calculated. Both arterial and venous samples were obtained before perfusion and at 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h after perfusion to determine the ovarian secretion rate of P, E₂ and Ang II-like immunoreactivity (Ang II-IR). The perfusate was introduced through the ovarian artery cannula, was collected from the cannulated vein, and recycled. The arterial samples were taken from the apparatus at a site just before perfusate entered the cannulated ovarian artery, while the venous samples were collected from effluent through the cannulated vein. The ovarian secretion rate of Ang II-IR was calculated by determining the difference in concentrations between the venous and arterial samples, as described previously²⁵). Samples were stored at -80 °C until the concentrations of P, E₂, and Ang II-IR were determined.

The second experiment was undertaken to assess whether IGF- I exerted its biological actions through the type I IGF receptor in the ovary. One ovary from each rabbit was perfused with 10² ng/ml of

IGF- I or 1 μg/ml of αIR-3. The contralateral ovary was simultaneously placed in a separate chamber containing medium alone to serve as a control. In another 6 rabbits, one ovary was perfused with IGF- I at a concentration of 10² ng/ml. The contralateral ovary was perfused with 10² ng/ml of IGF- I plus 1 μg/ml of αIR-3. The mean number of mature follicles per ovary was 5.71 ± 0.32 (range, 4 ~ 8). The follicle diameter was determined both before perfusion and 12 h after the onset of perfusion, and the percent increase in size for each follicle was calculated. Both arterial and venous samples were obtained before perfusion and at 1, 2, 4, 6, 8, and 12 h after perfusion to determine the ovarian secretion rate of Ang II-IR.

The third experiment was conducted to examine the effect of IGFBP-3 or αIR-3 on IGF- I -induced intrafollicular PA activity in perfused rabbit ovaries. Ovaries were perfused with medium alone, 10² ng/ml of IGF- I, 10² ng/ml of IGF- I plus 10³ ng/ml of IGFBP-3, or 10² ng/ml of IGF- I plus 1 μg/ml of αIR-3. Ovarian perfusion was terminated before the administration of IGF- I and at 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h after exposure to IGF- I. At least 3 ovaries from 3 different rabbits were examined at each interval. Ovaries were removed immediately after each perfusion interval, and mature follicles with a diameter greater than 1.2 mm were excised and stored -80 °C until needed for the determination of the PA activity in the follicle.

Measurement of Ang II-like Immunoreactivity in Perfusates

Ang II-IR was extracted by using the method described by Beadwell²⁷) with minor modifications²⁸). After ¹²⁵I-Ang II was added to perfusion samples to estimate the recovery rate, the samples (0.1 ~ 0.6 ml) were suspended in 30 mg of florisil to absorb any Ang II-IR in the samples. The mixtures were then centrifuged at 400 × g for 10 min and washed twice with 1 ml of distilled water. The precipitates were eluted twice with 0.5 N hydrochloric acid-acetone solution and centrifuged at 400 × g for 5 min. One ml of petroleum ether was added to the resulting supernatants to separate unsubstituted fatty acids and the aqueous extracts were evaporated to dryness under a stream of nitrogen gas. The extracts con-

taining Ang II -IR were reconstituted in 500 μ l of 0.05 M borate buffer (pH 8.5) containing 0.2 % bovine serum albumin, 0.5 % NaCl, and 0.1 % EDTA-2Na. Aliquots of these extracts were used for RIA of Ang II -IR and for the determination of recovery rates. The average recovery rate for Ang II -IR was 89.5 %. The Ang II -IR in the perfusate was examined by RIA using 125 I -Ang II purchased from New England Nuclear Co. (Boston, MA) and rabbit antiserum against an Ang II -BSA conjugate²⁹). The antiserum cross-reacted as follows: 0.3 % with angiotensin I, 10^{-4} % with [Sar¹-Ala⁸] -Ang II, 30.8 % with angiotensin III, 46.0 % with des-[Arg¹, Asp²] -Ang II, and 100 % with [Val⁵] -Ang II. The standard curve for this assay ranged from 0.75 ~ 500 pg per tube. The intra-assay and interassay coefficients of variation for Ang II -IR were 11.7 % and 12.9 %, respectively.

Assays for Steroids and PA Activity

Concentrations of P and E₂ in the perfusate were determined by using direct, solid-phase, 125 I -labeled steroid RIA kits manufactured by Diagnostic Products Corporation (Nippon DPC, Tokyo, Japan). The measurements were made in duplicate. P and E₂ were measured without extraction. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 7.2 % and 7.9 %, respectively, for P and 5.3 % and 6.4 %, respectively, for E₂. Intrafollicular PA activity was determined by using the Spectrolyse tissue PA (t-PA) activity assay kit produced by American Diagnostica Inc. (New York, NY), as described previously³⁰). Briefly, the follicles were excised, minced, and homogenized in 0.1 M Tris-HCl buffer (4 vols) and 0.5 M potassium thiocyanate (1 vol) at pH 7.4

in a homogenizer. The homogenate was centrifuged at $2,900 \times g$ at 4 °C for 20 min and the supernatant was used in the assay. This assay is based on the functional parabolic rate assay. The standard curve for PA ranged from 0.2 to 3.0 IU/ml. Intra-assay and interassay coefficients of variation were 6.3 % and 7.8 %, respectively.

Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Normal distributions for the data on the percent increase in follicle diameters, oocyte maturation (% GVBD) and oocyte degeneration (% degeneration) were obtained by arcsine transformation and assessed by analysis of variance. Differences in PA activity in follicular tissues and in the concentrations of P, E₂, and Ang II -IR among the treatment groups during perfusion were assessed by two-way analysis of variance, with the two independent variables being the time of perfusion and the treatment group. This analysis was followed by Scheffé's test to determine the difference between two groups. The correlation between follicular growth and the secretion rate of Ang II -IR was also evaluated by performing an analysis of variance. The regression line was estimated by using the least-squares method of curve fitting. Differences were considered statistically significant if the P value was < 0.05.

Results

In the first experiment, ovulation failed to occur in control ovaries treated with IGF- alone or in experimental ovaries treated with IGF- I plus IGFBP-3 (Table 1). The addition of IGF- I to the perfusate significantly increased in the mean diameter of fol-

Table 1 Effects of IGFBP-3 on IGF- I -induced follicular growth

	IGF- I	IGF- I (10^2 ng/mk) + IGFBP-3			
	(10^2 ng/ml)	1 ng/ml	10 ng/ml	10^2 ng/ml	10^3 ng/ml
No. of ovaries perfused	24	6	6	6	6
No. of ovaries ovulating	0	0	0	0	0
Follicle diameter (mm) ^a					
Before perfusion	1.35 ± 0.05	1.32 ± 0.06	1.38 ± 0.06	1.34 ± 0.04	1.37 ± 0.05
12 h after perfusion	1.89 ± 0.07^b	1.59 ± 0.05^c	1.54 ± 0.05^d	1.41 ± 0.07	1.43 ± 0.06

^a Mean \pm SEM.

^b P < 0.001 compared with values before perfusion.

^c P < 0.01 compared with values before perfusion.

^d P < 0.05 compared with values before perfusion.

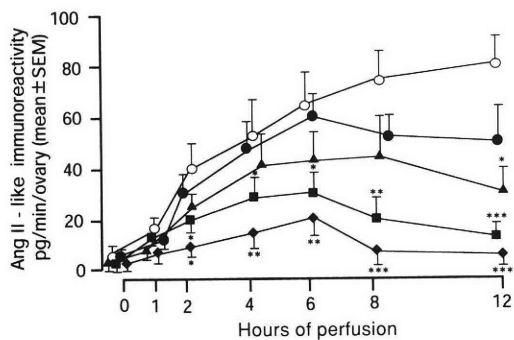


Fig. 1 Effects of IGFBP-3 on the IGF- I -stimulated secretion rates of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries. Rabbit ovaries were perfused with 10² ng/ml of IGF- I (○-○), or with 10² ng/ml of IGF- I plus IGFBP-3 at a concentration of 1 ng/ml (●-●), 10 ng/ml (▲-▲), 10² ng/ml (■-■), or 10³ ng/ml (◆-◆). The ovarian secretion rate (pg/min/ovary) was calculated by measuring the difference in concentrations of Ang II -IR between venous and arterial samples. Data represent the Mean ± SEM of at least six ovaries from six different rabbits. Values with asterisks differed significantly from values in ovaries perfused with IGF- I alone; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

licles 12 h after perfusion. In the presence of IGF- I and IGFBP-3 (10² to 10³ ng/ml), however, the follicle diameter 12 h after perfusion did not differ significantly from that before perfusion. Exposure to 10² ng/ml of IGF- I significantly enhanced the secretion rate of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries within 2 h, increasing steadily throughout the entire perfusion periods (Fig. 1). The concomitant addition of IGFBP-3 to the perfusate significantly reduced the ovarian secretion rate of Ang II -IR stimulated by IGF- I . In addition, IGFBP-3 inhibited the secretion of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries in a dose-dependent manner. The relationship between follicular growth and the secretion rate of Ang II -IR in rabbit ovaries perfused with IGF- I alone or with IGF- I plus different concentrations of IGFBP-3 is shown in Fig. 2. The percent increase in follicle diameter in the ovaries perfused with IGF- I in the presence or the absence of IGFBP-3 for 12 h was significantly correlated with the secretion rate of Ang II -IR at 12 h after exposure to IGF- I . The addition of IGFBP-3 to the perfusate inhibited the IGF- I -stimulated oocyte maturation in a dose-de-

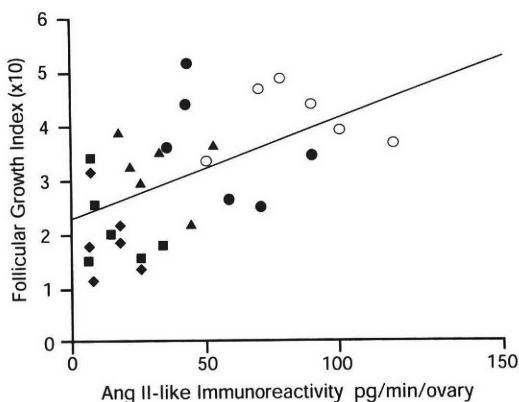


Fig. 2 Relationship between follicular growth and the secretion rate of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries. Ovaries were perfused with 10² ng/ml of IGF- I (○), or with 10² ng/ml of IGF- I plus IGFBP-3 at a concentration of 1 ng/ml (●), 10 ng/ml (▲), 10² ng/ml (■), or 10³ ng/ml (◆). Six ovaries from six different rabbits were used in each treatment group. The ovarian secretion rate of Ang II -IR was calculated by measuring the difference in concentrations of Ang II -IR between venous and arterial samples at 12 h after IGF- I administration. The diameter of each follicle was measured at the onset of perfusion and 12 h later, and the percent increase in each follicle was determined. Data on the mean percent increase in mature follicles in one ovary were subjected to arcsine transformation (follicular growth index). A significant correlation between the percent increase in follicle diameter and the secretion rate of Ang II -IR was noted (r = 0.5714, P < 0.005).

pendent manner (Fig. 3). There was no significant difference in the percentage of follicular oocytes showing evidence of degeneration between IGF- I -treated and IGF- I plus IGFBP-3-treated ovaries.

The secretion rate of P in ovaries perfused with IGF- I did not change significantly throughout the entire perfusion periods (Fig. 4). In addition, the addition of IGFBP-3 to the perfusate did not affect P production. In contrast, exposure to IGF- I significantly stimulated E₂ production by perfused rabbit ovaries. The secretion rate of E₂ reached maximal levels 4 to 6 h after IGF- I administration and declined gradually thereafter, returning to levels similar to that before IGF- I administration. The addition of IGFBP-3 to the perfusate significantly reduced the IGF- I -stimulated ovarian secretion rate

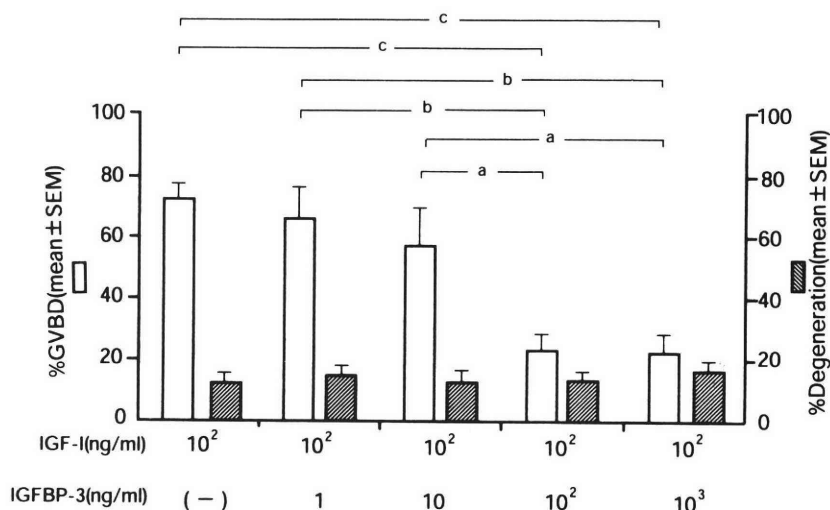


Fig. 3 Effects of IGFBP-3 on meiotic maturation (□) and degeneration (▨) of follicular oocytes in IGF- I - treated ovaries. Rabbit ovaries were perfused with 10² ng/ml of IGF- I , or with 10² ng/ml of IGF- I plus IGFBP-3 at a concentration of 1, 10, 10², or 10³ ng/ml. The degree of oocyte maturation in follicular oocyte is expressed as the percentage of oocytes that achieved germinal vesicle breakdown (GVBD). The maturity of oocytes and signs of degeneration were determined in each ovary. At least 34 oocytes were analyzed in each treatment group. Data represent the Mean ± SEM of six ovaries from six different rabbits. a, P < 0.05; b, P < 0.01; c, P < 0.001.

Table 2 Effects of α IR-3 on IGF- I -induced follicular growth and oocyte maturation

	IGF- I (10 ² ng/ml)	α IR-3 (1 μ g/ml)	IGF- I (10 ² ng/ml) + α IR-3 (1 μ g/ml)	medium alone
No. of ovaries perfused	12	6	6	12
No. of ovaries ovulating	0	0	0	0
Follicle diameter (mm) ^a				
Before perfusion	1.30 ± 0.07	1.32 ± 0.06	1.35 ± 0.06	1.34 ± 0.05
12 h after perfusion	1.92 ± 0.09 ^d	1.40 ± 0.07	1.43 ± 0.08	1.44 ± 0.06
Follicle oocyte ^a				
GVBD (%) ^b	74.4 ± 8.1 ^e	8.4 ± 2.5	22.5 ± 4.7 ^f	7.6 ± 3.3
Degeneration (%) ^c	12.0 ± 4.1	16.4 ± 5.8	17.5 ± 5.6	18.0 ± 5.6

^a Mean ± SEM.

^b Percentage of oocytes that achieved germinal vesicle breakdown (GVBD).

^c Percentage of oocytes that showed evidence of degeneration.

^d P < 0.001 compared with values before perfusion.

^e P < 0.001 compared with values of ovaries treated with medium alone.

^f P < 0.001 compared with values of ovaries treated with IGF- I alone.

of E₂. The inhibitory action of IGFBP-3 on the secretion rate of E₂ was dose-dependent between 4 and 6 h after exposure to IGF- I .

In the second experiment, neither ovulation nor follicular growth was observed in ovaries perfused with medium alone or with 1 μ g/ml of α IR-3, a monoclonal antibody to the type I IGF receptor

(Table 2). However, exposure to IGF- I resulted in a significant increase in the mean diameter of follicles. The concomitant addition of α IR-3 to the perfusate significantly inhibited the IGF- I -induced follicular growth, because the mean diameter of follicles 12 h after perfusion did not differ from that before perfusion. The majority of follicular oocytes

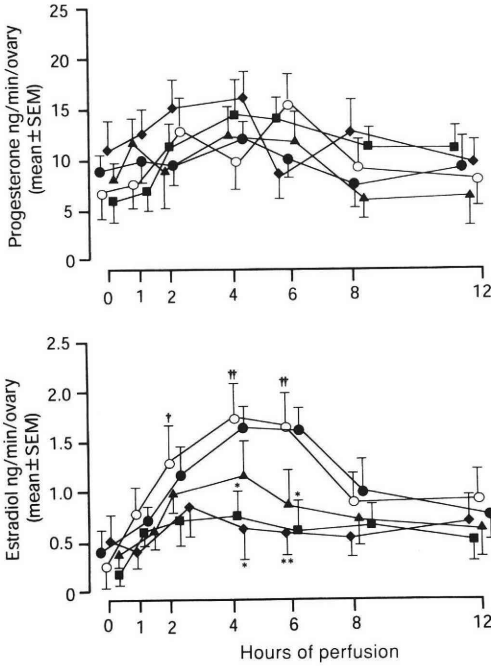


Fig. 4 Effects of IGFBP-3 on the ovarian secretion rates of P and E₂ in IGF- I -treated ovaries. Rabbit ovaries were perfused with 10² ng/ml of IGF- I (○-○), or with 10² ng/ml of IGF- I plus IGFBP-3 at a concentration of 1 ng/ml (●-●), 10 ng/ml (▲-▲), 10² ng/ml (■-■), or 10³ ng/ml (◆-◆). Ovarian secretion rates of P and E₂ (ng/min/ovary) were calculated by measuring the difference in concentrations between venous and arterial samples. Data represent the Mean ± SEM of at least six ovaries from six different rabbits. Values with *asterisks* differed significantly from values in ovaries perfused with IGF- I alone; *P < 0.05, **P < 0.01. Values with *daggers* differed significantly from values in ovaries before perfusion; †P < 0.05, ††P < 0.01.

(> 90 %) did not progress beyond the GVBD stage in ovaries perfused with medium alone or 1 μg/ml of αIR-3. Exposure to IGF- I significantly stimulated the resumption of meiosis in follicular oocytes compared with the contralateral control ovaries. The IGF- I -stimulated oocyte maturation was significantly inhibited by the concomitant addition of αIR-3 to the perfusate. There was no significant difference in the percentage of follicular oocytes showing evidence of degeneration among the four treatment groups. The ovarian secretion rate of Ang

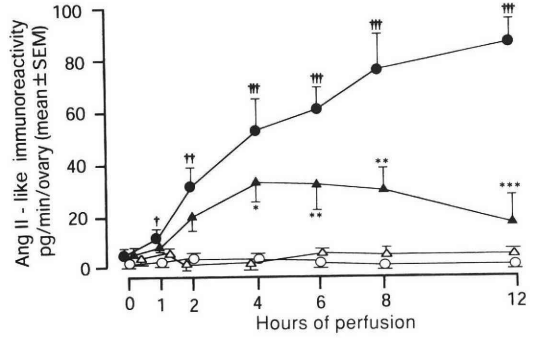


Fig. 5 Effects of αIR-3 on the IGF- I -stimulated secretion rates of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries. Rabbit ovaries were perfused with medium alone (○-○), 1 μg/ml of αIR-3 (△-△), 10² ng/ml IGF- I (●-●), or 10² ng/ml of IGF- I plus 1 μg/ml of αIR-3 (▲-▲). The ovarian secretion rate (pg/min/ovary) was calculated by measuring the difference in concentrations of Ang II -IR between venous and arterial samples. Data represent the Mean ± SEM of at least six ovaries from six different rabbits. Values with *asterisks* differed significantly from values in ovaries perfused with IGF- I alone; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. Values with *daggers* differed significantly from values in ovaries perfused with medium alone; †P < 0.05, ††P < 0.01, †††P < 0.001.

II -IR in ovaries perfused with medium alone or with αIR-3 remained low throughout the 12-h perfusion period (Fig. 5). Exposure to IGF- I significantly stimulated the secretion rate of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries compared with control ovaries perfused with medium alone at each duration of perfusion. The addition of αIR-3 to the perfusate significantly inhibited the IGF- I -stimulated secretion rate of Ang II -IR from 4 h of perfusion.

Intrafollicular PA activity in ovaries perfused with medium alone remained low throughout the 12 h perfusion period (Fig. 6). The PA activity increased significantly 2 h after exposure to 10² ng/ml of IGF- I compared with control ovaries perfused with medium alone. This PA activity reached maximal levels 6 h after exposure to IGF- I and declined gradually thereafter, returning to levels similar to that in controls by 12 h. The addition of either 10³ ng/ml of IGFBP-3 or 1 μg/ml of αIR-3 significantly inhibited the IGF- I -stimulated intrafollicular PA activity. There was no significant difference in the PA ac-

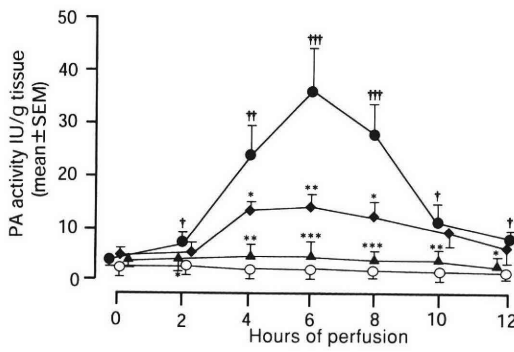


Fig. 6 Changes in intrafollicular PA activity in perfused rabbit ovaries. Rabbit ovaries were perfused with medium alone (○-○), 10^2 ng/ml of IGF- I (●-●), 10^2 ng/ml of IGF- I plus 10^3 ng/ml of IGFBP-3 (◆-◆), or 10^2 ng/ml of IGF- I plus $1 \mu\text{g/ml}$ of $\alpha\text{IR-3}$ (▲-▲). Ovarian perfusion was terminated before and 2, 4, 6, 8, 10, and 12 h after exposure to IGF- I. Values with asterisks differed significantly from values in ovaries perfused with IGF- I alone; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Values with daggers differed significantly from values in ovaries perfused with medium alone; † $P < 0.05$, †† $P < 0.01$, ††† $P < 0.001$.

tivity between the IGF- I plus $\alpha\text{IR-3}$ -treated and control ovaries throughout the 12 h perfusion period.

Discussion

The present study confirmed previous data showing that IGF- I significantly enhanced follicular development, ovarian production of E_2 , and oocyte maturation in the *in vitro* perfused rabbit ovaries in the absence of gonadotropin^{8, 31}. In addition, the exposure to IGF- I *in vitro* significantly stimulated the secretion rate of Ang II-IR in perfused rabbit ovaries. A functional local renin-angiotensin system (RAS) is known to exist in the ovary¹⁰⁻¹⁴. The findings of higher follicular concentrations of prorenin, renin, angiotensinogen and Ang II than their serum levels in humans and the identification of angiotensinogen and renin mRNA in the rat ovary support the presence of a local RAS in the ovary^{10, 13, 32, 33}. We previously demonstrated a direct effect of Ang II on the rabbit ovary, implying that Ang II plays a critical role in the processes leading to ovulation^{14, 28, 34}. The results of the present study suggest that the effects of IGF- I are either exerted directly on the ovary or are mediated by an IGF- I -

dependent process in rabbits, supporting the hypothesis that Ang II and IGF- I, which are thought to be important local regulators in the ovary, interact with one another in the processes of follicular growth and ovulation. By using standard radioligand binding and affinity cross-linking techniques, we also demonstrated that the relative affinity of the IGF- I receptor for IGF- I, IGF- II, and insulin in rabbit ovarian membranes exhibited typical type I binding characteristics⁸). In the present study, $\alpha\text{IR-3}$ inhibited both the IGF- I-induced follicular growth and the ovarian secretion rate of Ang II-IR, indicating that IGF- I exerts effects through the type I receptor in the ovary. However, exogenously administered IGF- I did not induce ovulation *in vitro* in the absence of gonadotropin, despite the significant increase in ovarian secretion of Ang II-IR. This implies that components, other than Ang II, within the preovulatory follicular environment may also be required for follicles to reupte.

IGFBPs have been shown to enhance^{20, 35}) or to inhibit³⁶⁻³⁸) the biological actions of IGF- I on various cells *in vitro*. The synthesis and secretion of IGFBPs critically regulates IGF- I action at the target cell level even when the extracellular concentration of IGF- I remains constant. Although this development adds a new level of complexity to the interaction of IGF- I at the cellular level, the precise biological roles of IGFBPs in the ovulatory process remain to be clarified. We recently showed that IGFBP-3, but not IGFBP-1, significantly inhibited human chorionic gonadotropin (hCG)-induced ovulation and oocyte maturation in the *in vitro* perfused rabbit ovaries³¹). Additionally, the increase in IGF- I mRNA levels in response to hCG³¹) was consistent with the increases in the ovarian concentration of IGF- I and the production of IGF- I by perfused rabbit ovaries after exposure to hCG³⁹). In the present study, IGFBP-3 significantly inhibited IGF- I-induced follicular growth and oocyte maturation in rabbit ovaries. Neither IGFBP-1 nor IGFBP-3 potentiated stimulatory effect of IGF- I on follicular growth³¹), indicating that IGFBP-3 is a potent inhibitor of IGF- I. These findings suggest that IGFBP-3 may block the stimulatory effects of hCG in the ovulatory process by neutralizing endoge-

nously produced IGF- I . In IGF- I -treated ovaries with or without IGFBP-3, as determined in the present study, a significant correlation was observed between follicular growth and the secretion rate of Ang II -IR in perfused rabbit ovaries, suggesting that IGF- I may enhance follicular development by stimulating ovarian production of Ang II .

In the present study, IGF- I stimulated the meiotic maturation of follicle-enclosed oocytes in the absence of gonadotropin, which is consistent with previous data showing that IGF- I enhanced the meiotic maturation of cumulus-enclosed oocytes in rats⁴⁰) and humans⁴¹). The concomitant addition of IGFBP-3 to the perfusate inhibited IGF- I -induced oocyte maturation in a dose-dependent manner, suggesting a possible role for IGF- I as a mediator of a positive signal that triggers oocyte maturation in mammals. Furthermore, IGF- I -stimulated oocyte maturation was significantly blocked by the concomitant addition of α IR-3, suggesting that the maturation-promoting action of IGF- I may be mediated through the type I IGF receptor. An immunohistochemical study using a monoclonal antibody to type I IGF receptors revealed the localization of IGF receptors in oocytes⁴²). The present findings, as well as those of previous studies^{40, 41}), suggest that these receptors in the oocyte are functional. A study conducted in *Xenopus* oocytes showed that IGF- I induces oocyte maturation through a mechanism dependent on a reduction in the intraoocyte cAMP content caused by the regulation of both oocyte phosphodiesterase and adenylyl cyclase⁴²). Although most investigations of the biological action of IGF- I have focused on the somatic cells of the ovary, it seems highly likely that IGF- I interacts with oocytes. The expression of IGF ligands and receptor genes has been observed in the growing oocytes of human infant ovaries as well as in mature oocytes of adult ovaries, suggesting that IGF may be involved in the process of oocyte growth and maturation^{43, 44}). The potential for IGF- I to act at the oocyte level, as indicated by the presence of receptors in oocytes, and by the IGF- I -induced stimulation of the meiotic maturation, suggests that in the presence of endogenous follicular factors and gonadotropins, IGF- I may regulate the selection and meiotic maturation

of oocytes during follicular development *in vivo*. In addition, IGFBP-3 may exert an inhibitory signal for IGF- I -induced oocyte maturation.

Several studies with mammalian models have demonstrated the involvement of PA in ovulation and have indicated its participation in several additional physiological processes occurring within the ovary, including oocyte maturation, cumulus cell expansion, and cellular remodeling and differentiation.^{30, 45 ~ 48}) In addition to the well-known association of PA with the ovulatory processes, PA activity has been shown to participate in the process of follicular development; the administration of a serine protease inhibitor into the rat ovarian bursa not only reduced the number and size of antral follicles but also caused an overall reduction in ovarian size⁴⁷). We recently showed that intrafollicular PA activity was significantly correlated with follicular growth in IGF- I -treated ovaries, suggesting that IGF- I may enhance follicular growth by stimulating PA activity⁸). Although growth factors are well-known regulators of PA production, modulation of PA activity by specific growth factors varies widely depending on cell type^{50 ~ 54}). The stimulatory effect of IGF- I on PA activity in preovulatory follicles is consistent with data showing that IGF- I significantly enhances PA activity in rat astrocytes⁵⁴). The increase in PA activity appears to be mediated by the type I receptor in the ovary because the addition of α IR-3 to the perfusate significantly blocked the IGF- I stimulated intrafollicular PA activity. The present study also suggests that IGFBP-3 may contribute to the regulation of intrafollicular PA activity during follicular development evoked by IGF- I . Recent findings have demonstrated that proteolysis of IGFBPs by various serine proteases, including plasmin, appears to be a fundamental mechanism in regulating the bioavailability of IGF- I ^{55, 56}). Proteolysis of IGFBP-3 markedly reduces its affinity for IGF- I and increases its dissociation rate, thereby increasing the proportion of free IGF- I and its availability to cells⁵⁶). Ovarian granulosa cells in pigs also secrete glycosylated IGFBP-3 *in vitro*^{55, 57}). The increase in PA and plasmin activities in preovulatory follicles after exposure to IGF- I may promote the proteolytic degradation of

IGFBP-3. The postsynthetic regulation of IGFBP-3 by plasmin may result in an increase in the bioavailability of IGF- I during follicular development.

Erickson et al.⁵⁸⁾ have demonstrated that IGF- I is a potent positive regulator of aromatase activity in human granulosa cells, and that the effect of IGF- I is markedly enhanced by physiological amounts of FSH or hCG. This suggests that IGF- I may be an important component in the network of hormones that ensures the generation of maximal rates of estrogen biosynthesis during follicular maturation. IGFBP-3 has been shown to inhibit FSH-induced E₂ and P production by rat and human granulosa cells *in vitro*^{21, 59, 60}. Treatment with IGF- I alone increased the secretion rate of E₂ but not P, in perfused rabbit ovaries. The selective effect on ovarian E₂ production has also been observed in rabbit ovaries perfused with GH³⁹ or Ang II¹⁴). In addition, IGFBP-3 significantly inhibited the IGF- I -stimulated ovarian E₂ secretion, whereas IGFBP-3 had no significant effect on P secretion. These results suggest that IGFBP-3 and IGF- I may be important in the control of ovarian E₂ production. Although these data provide a new insight into the control of E₂ synthesis in the ovary, further studies are needed to elucidate the relative contribution of intraovarian IGF- I/IGFBP-3 in gonadotropin-stimulated E₂ synthesis in the ovulatory process.

In summary, our results showed that IGF- I significantly enhanced follicular development, oocyte maturation, intrafollicular PA activity, and the ovarian secretion rate of E₂ and Ang II -IR. The stimulatory effects of IGF- I were blocked by IGFBP-3 in a dose-dependent manner. The ovarian secretion rate of Ang II -IR in IGF- I -treated ovaries, with or without IGFBP-3, was significantly correlated with follicular growth. In addition, α IR-3 significantly inhibited the IGF- I -stimulated follicular growth and intrafollicular PA activity, indicating that IGF- I exerts its stimulatory effects through a type I receptor in the ovary. Our results suggest that IGF- I may stimulate follicular growth, at least in part, by stimulating ovarian Ang II production. Thus, IGF- I and Ang II may interact with each other in the control of follicular development.

This work was supported in part by Grant-in-Aid Scientific Research (B) 07457393 (to Y.Y.) from the Ministry of Education, Science and Culture, Tokyo, Japan.

References

- 1) Mondschein JS, Schomberg DW (1989) Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science* 211: 1179-1180
- 2) Adashi EY, Resnick CE, D'Ercole AJ, et al. (1985) Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. *Endocr Rev* 6: 400-420
- 3) May JV, Buck PA, Schomberg DW (1987) Epidermal growth factor enhances ¹²⁵I-follicle stimulating hormone binding by cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 120: 2413-2420
- 4) Carson RS, Zhang Z, Hutchinson LA, et al. (1988) Growth factors in ovarian function. *J Reprod Fert* 85: 735-746
- 5) Adashi EY, Resnick CE, Hernandez ER, et al. (1988) Insulin-like growth factor- I as an amplifier of follicle-stimulating hormone action: studies on mechanism (s) and site (s) of action in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 122: 1583-1591
- 6) Oliver JE, Aitman TJ, Powell JF, et al. (1989) Insulin-like growth factor I (IGF- I) gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. *Endocrinology* 124: 2671-2679
- 7) Davoren JB, Kasson BG, Li CH, et al. (1986) Specific insulin-like growth factor (IGF) I -and II -binding sites on rat granulosa cells: relation to IGF action. *Endocrinology* 119: 2155-2162
- 8) Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, et al. (1996) Effects of insulin-like growth factor- I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity. *Biol Reprod* 55: 152-160
- 9) Yoshimura Y, Aoki N, Sueoka K, et al. (1996) Interactions between insulin-like growth factor- I (IGF- I) and the renin-angiotensin system in follicular growth and ovulation. *J Clin Invest* (In press)
- 10) Culler MD, Tarlatzis BC, Fernandez LA, et al. (1986) Angiotensin II -like immunoreactivity in human ovarian follicular fluid. *J Clin Endocrinol Metab* 62:613-615
- 11) Husain A, Bumpus FM, DeSilva P, et al. (1987) Localization of angiotensin II receptors in ovar-

- ian follicles and the identification of angiotensin II in rat ovaries. Proc Natl Acad Sci USA 84: 2489-2493
- 12) Pucel AG, Bumpus FM, Husain A (1987) Rat ovarian angiotensin II receptors. J Biol Chem 262:7076-7080
- 13) Lightman A, Tarlatzis BC, Rzasz PJ, et al. (1987) The ovarian renin-angiotensin system: renin-like activity and angiotensin II/III immunoreactivity in gonadotropin-stimulated and unstimulated human follicular fluid. Am J Obstet Gynecol 156: 808-816
- 14) Yoshimura Y, Karube M, Oda T, et al. (1993) Locally produced angiotensin II induces ovulation by simulating prostaglandin production in *in vitro* perfused rabbit ovaries. Endocrinology 133: 1609-1616
- 15) Cataldo NA, Giudice LC (1992) Insulin-like growth factor binding protein profiles in human ovarian follicular fluid correlated with follicular functional status. J Clin Endocrinol Metab 74: 821-829
- 16) Zhou J, Bondy C (1993) Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. Biol Reprod 48: 467-482
- 17) Nakatani A, Shimasaki S, Erickson GF, et al. (1991) Tissue-specific expression of four insulin-like growth factor binding proteins (1, 2, 3, and 4) in the rat ovary. Endocrinology 129: 1521-1529
- 18) Liu X-J, Malkowski M, Guo Y, et al. (1993) Development of specific antibodies to rat insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBP-2 to -6): analysis of IGFBP production by rat granulosa cells. Endocrinology 132: 1176-1183
- 19) Clemmons DR, Elgin RG, Han VKM, et al. (1986) Cultured fibroblast monolayers secrete a protein that alters the cellular binding of somatomedin-C/insulin-like growth factor I. J Clin Invest 77: 1548-1556
- 20) Elgin RG, Busby WH, Clemmons DR (1987) An insulin-like growth factor (IGF) binding protein enhances the biological response to IGF-I. Proc Natl Acad Sci USA 84: 3254-3258
- 21) Bicsak TA, Shimonaka M, Malkowski M, et al. (1990) Insulin-like growth factor-binding protein (IGF-BP) inhibition of granulosa cell function: effect on cyclic adenosin 3', 5'-monophosphate, deoxyribonucleic acid synthesis, and comparison with the effect of an IGF-I antibody. Endocrinology 126: 2184-2189
- 22) Giudice LC (1992) Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. Endocr Rev 13: 641-669
- 23) Bicsak TA, Ling N, DePaolo LV (1991) Ovarian intrabursal administration of insulin-like growth factor-binding protein inhibits follicle rupture in gonadotropin-treated immature female rats. Biol Reprod 44: 599-603
- 24) Lambertson Jr CJ, Greenbaum DF, Wright KH, et al. (1976) *In vitro* studies of ovulation in the perfused rabbit ovary. Fertil Steril 27: 178-187
- 25) Yosimura Y, Nakamura Y, Shiraki M, et al. (1991) Involvement of leukotriene B4 in ovulation in the rabbit. Endocrinology 129: 193-199
- 26) Yoshimura Y, Nakamura Y, Oda T, et al. (1990) Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists on meiotic maturation of follicle-enclosed oocyte in rabbits. Biol Reprod 43: 1012-1018
- 27) Beadwell CG (1971) Radioimmunoassay for arginine vasopressin in human plasma. J Clin Endocrinol Metab 33: 254-260
- 28) Yoshimura Y, Koyama N, Karube M, et al. (1994) Gonadotropin stimulates ovarian renin-angiotensin system in the rabbit. J Clin Invest 93: 180-187
- 29) Morimoto T, Aoyama M, Gotoh E, et al. (1983) A method of radioimmunoassay of plasma angiotensin II using florisol. Folia Endocrinol Jap 59: 215-229
- 30) Yoshimura Y, Maruyama K, Shiraki M, et al. (1990) Prolactin inhibits plasminogen activator activity in the preovulatory follicles. Endocrinology 126: 631-636
- 31) Yoshimura Y, Nagamatsu S, Ando M, et al. (1996) Insulin-like growth factor binding protein-3 inhibits gonadotropin-induced ovulation, oocyte maturation, and steroidogenesis in rabbit ovary. Endocrinology 137: 438-446
- 32) Ohkubo H, Nakayama K, Tanaka T, et al. (1986) Tissue distribution of rat angiotensinogen mRNA and structural analysis of its heterogeneity. J Biol Chem 261: 319-323
- 33) Kim SJ, Sinjo M, Fukamizu A, et al. (1987) Identification of renin and renin messenger RNA sequence in rat ovary and uterus. Biochem Biophys Res Commun 142: 169-175
- 34) Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, et al. (1992) Angiotensin II directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. FEBS Lett 307: 305-308
- 35) DeVroede MA, Tseng LY-H, Katsoyannis PG, et al. (1986) Modulation of insulin-like growth factor I binding to human fibroblast monolayer cultures by insulin-like growth factor carrier proteins released to the incubation media. J Clin Invest 77:

- 602-613
- 36) Ritvos O, Ranta T, Jalkanen J, et al. (1988) Insulin-like growth factor (IGF) binding protein from human decidua inhibits the binding and biological action of IGF- I in cultured choriocarcinoma cells. *Endocrinology* 122: 2150-2157
 - 37) Burch WM, Correa J, Shively JE, et al. (1990) The 25-kilodalton insulin-like growth factor (IGF)-binding protein inhibits both basal and IGF- I -mediated growth of chick embryo cartilage *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 70: 173-180
 - 38) Liu L, Brinkman A, Blat C, et al. (1991) IGFBP-1, an insulin-like growth factor binding protein, is a cell growth inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 174: 673-679
 - 39) Yoshimura Y, Iwashita M, Karube M, et al. (1994) Growth hormone stimulates follicular development by stimulating ovarian production of insulin-like growth factor- I . *Endocrinology* 135: 887-894
 - 40) Feng P, Catt KJ, Knecht M (1988) Transforming growth factor- β stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology* 122: 181-186
 - 41) Gómez E, Tarín JJ, Pellicer A (1993) Oocyte maturation in humans: the role of gonadotropins and growth factors. *Fertil Steril* 60: 40-46
 - 42) Sadler SE, Maller JL (1987) *In vivo* regulation of cyclic AMP phosphodiesterase in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 262: 10644-10650
 - 43) Zhou J, Chin E, Bondy C (1991) Cellular pattern of insulin-like growth factor- I (IGF- I) and IGF- I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology* 129: 3281-3288
 - 44) Zhou J, Bondy C (1993) Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol Reprod* 48: 467-482
 - 45) Reich R, Miskin R, Tsafiri A (1985) Follicular plasminogen activator: involvement in ovulation. *Endocrinology* 116: 516-521
 - 46) Liu Y-X, Hsueh JW (1987) Plasminogen activator activity in cumulus-oocyte complexes of gonadotropin-treated rats during the periovulatory period. *Biol Reprod* 36: 1055-1062
 - 47) Pellicer A, Lightman A, Ariza A, et al. (1988) Follicular development is impaired by inhibitors of serine proteases in the rat. *Am J Obstet Gynecol* 158: 670-676
 - 48) Milwidsky A, Kaneti H, Finci Z, et al. (1989) Human follicular fluid protease and antiprotease activities: a suggested correlation with the ability of oocytes to undergo *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 52: 274-280
 - 49) Yoshimura Y, Jinno M, Oda T, et al. (1994) Pro-lactin inhibits ovulation by reducing ovarian plasmin generation. *Biol Reprod* 50: 1223-1230
 - 50) Laiho M, Keski-Oja J (1989) Growth factors in the regulation of pericellular proteolysis: a review. *Cancer Res* 49: 2533-2553
 - 51) George F, Porreau-Schneider N, Arnoux D, et al. (1990) Concomitant secretion by A431 cells of tissue plasminogen activator and a specific inhibitor masks EGF modulating of tPA activity. *Thromb Haemostas* 64: 407-411
 - 52) Fattal PG, Schneider DJ, Sobel BE, et al. (1992) Post-transcriptional regulation of expression of plasminogen activator inhibitor type I mRNA by insulin and insulin-like growth factor-1. *J Biol Chem* 267: 12412-12415
 - 53) Pfeilschifter J, Krempien R, Naumann A, et al. (1992) Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on plasminogen activator activity in fetal rat osteoblasts due to isoform-specific receptor functions. *Endocrinology* 130: 2059-2066
 - 54) Tranque P, Naftolin F, Robbins R (1994) Differential regulation of astrocyte plasminogen activators by insulin-like growth factor- I and epidermal growth factor. *Endocrinology* 134: 2606-2613
 - 55) Grimes RW, Hammond JM (1994) Proteolytic degradation of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 by porcine ovarian granulosa cells in culture: regulation by IGF- I . *Endocrinology* 134: 337-343
 - 56) Lalou C, Silve C, Rosato R, et al. (1994) Interactions between insulin-like growth factor- I (IGF- I) and the system of plasminogen activators and their inhibitors in the control of IGF-binding protein-3 production and proteolysis in human osteosarcoma. *Endocrinology* 135: 2318-2326
 - 57) Mondschein JS, Smith SA, Hammond JM (1990) Production of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) by porcine granulosa cells: identification of IGFBP-2 and -3 and regulation by hormones and growth factors. *Endocrinology* 127: 2298-2306
 - 58) Erikson GF, Garzo VG, Magoffin DA (1989) Insulin-like growth factor- I regulates aromatase activity in human granulosa and granulosa luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 716-724
 - 59) Ui M, Shimonaka M, Shimasaki S, et al. (1989) An insulin-like growth factor-binding protein in ovarian follicular fluid blocks follicle-stimulat-

- ing hormone-stimulated steroid production by ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 125: 912-916
- 60) Mason HD, Willis D, Holly JMP, et al. (1992) Inhibitory effects of insulin-like growth factor-binding proteins on steroidogenesis by human granulosa cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 89: R1-R4
- (受付: 1996年9月10日)
(受理: 1996年9月26日)

インスリン様成長因子-I (IGF-I) の卵巣内アンジオテンシン II (Ang II) 産生刺激を介した 卵胞発育促進効果

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

久慈直昭, 宮崎豊彦, 末岡 浩, 田中 守,
清河 薫, 北岡芳久, 山内 潤, 橋場剛士,
根本泰子, 小林俊文, 吉村泰典

IGF-I 依存性の卵胞発育, 卵成熟, 卵巣ステロイド合成および Ang II 産生, 卵巣内プラスミノゲンアクチベーター (PA) 活性促進に及ぼすインスリン様成長因子結合蛋白 (IGFBP-3) 作用を、家兔卵巣灌流モデルを用いて *in vitro* に検討した。

1) 10^2 ng/ml の IGF-I 添加により, 卵胞発育, 卵成熟, Ang-II 産生は有意に増加した。IGFBP-3 添加により, IGF-I の刺激効果は用量依存性に減弱した。2) IGF-I 刺激卵巣における卵胞径増加は, IGF-I 投与12時間後の卵胞 Ang II 産生量と有意な正の相関を認めた。3) エストラジオールの分泌量は IGF-I 投与により増加したが, プロゲステロン分泌量は増加しなかった。この卵巣ステロイド合成刺激効果は IGFBP-3 投与により用量依存性に減弱した。4) IGF type I 受容体に対するモノクロナル抗体 (α IR-3) 投与により, IGF-I 刺激による卵胞発育, 卵成熟, Ang II 分泌は有意に抑制された。さらに 10^3 ng/ml の IGFBP-3 または 1μ g/ml の α IR-3 投与は IGF-I の卵巣内 PA 活性を抑制した。

このことより, IGF-I は卵巣内 Ang II 産生を亢進させることにより卵胞発育を促進することが明らかとなった。

キーワード: インスリン様成長因子-I, アンジオテンシン II, 卵胞発育, 卵成熟, インスリン様成長因子結合蛋白

PREDICTION OF THE RESPONSE TO CLOMIPHENE CITRATE BY ULTRASONOGRAPHIC ASSESSMENT OF ENDOMETRIAL THICKNESS IN AMENORRHEIC PATIENTS

Sachiko NAKAMURA, Tsutomu DOUCHI, Hirofumi IJUIN,
Toshimichi OKI, Shinichi YAMAMOTO and Yukihiro NAGATA

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

Abstract: To investigate whether the response to clomiphene citrate (CC) can be predicted by endometrial thickness at the first visit in patients with secondary amenorrhea, 29 patients with response to CC (CC responders) and 22 patients who had no response to CC (CC non-responders) were enrolled. Endometrial thickness was measured by transvaginal ultrasonography (US), and serum estradiol (E₂) level was measured before the entire treatment regimen, and then all subjects were tested with progestin withdrawal. To compare the capability of discrimination between the CC responders and the CC non-responders among these three modalities, the sensitivity, specificity, positive predictive values, and negative predictive values were calculated. Endometrium was thicker in CC responders than CC non-responders ($P < 0.001$). When the endometrial thickness predictable of the response to CC was set at 6.0 mm, the sensitivity was 86.2 %, specificity 77.3 %, positive predictive value 83.3 %, and negative predictive value 81.0 %. The positive predictive value of endometrial thickness for response to CC was not inferior to the predictive value of 30 pg/ml in serum E₂ and progestin withdrawal.

Ultrasonographic endometrial thickness may be useful in discriminating CC responders from CC non-responders before treatment.

Key words: Endometrial thickness, prediction, response to clomiphene citrate, ultrasonography

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 42 (1), 22 - 26, 1997)

Introduction

It is exceedingly difficult to determine whether amenorrheic patients will respond to clomiphene citrate (CC) on their first visit. Progestin has long been advocated to predict the response to CC^{1,2)}. Three previous reports³⁻⁵⁾ demonstrated that progestin-withdrawal bleeding can be predicted by endometrial thickness measured ultrasonographically. This also suggests that the response to CC can be predicted by endometrial thickness at the first visit. However, there have been no studies on the relationship between endometrial thickness and the response to CC in amenorrheic patients.

The purpose of the present study was to investigate whether the response to CC can be predicted by

endometrial thickness measured by US in first visit patients with amenorrhea.

Materials and Methods

Twenty-nine secondary amenorrheic patients with response to CC (CC responders) and twenty-two secondary amenorrheic patients who had no response to CC (CC non-responders) were enrolled in the study. All the subjects were consecutively recruited from the Department of Obstetrics and Gynecology, Kagoshima University Hospital from January, 1994 to December, 1994. Once menstruation had become established, cessation of menstruation for more than 6 months was defined as secondary amenorrhea. None of these patients had received hormonal treatment for at least 3 months before the study. Pa-

tients with hypergonadotropic hypogonadism and hyperprolactinemia were excluded from the study. CC responders included 20 cases with chronic anovulation and 9 cases with polycystic ovarian syndrome (PCOS). CC non-responders included 13 cases with chronic anovulation, 5 cases with PCOS, and 4 cases with amenorrhea associated with weight loss. The diagnosis of chronic anovulation was clinical, made in the absence of other obvious causes of normogonadotropic or hypogonadotropic amenorrhea. PCOS was diagnosed by the presence of perimenarchal oligomenorrhea combined with an elevated serum LH level and a normal FSH level, with an LH:FSH ratio of at least 1.5. US was performed for all PCOS women. However, the presence of enlarged or polycystic ovaries was not mandatory for the diagnosis of PCOS. All patients were subsequently treated with CC to induce ovulation. CC was administered initially at a dose of 50 mg/day for 5 days from the 5th to the 9th day of the cycle; this was gradually increased, if necessary, each month to 150 mg/day for 5 days. The ovulation was confirmed by US and later by midluteal serum progesterone concentration of 10 ng/ml or higher. Patients who never ovulated after any dose of CC were defined as CC non-responders.

Baseline characteristics such as age (years), height (cm), body weight (BW, kg), body mass index (BMI, weight (kg)/height (m)²), and duration of amenorrhea (months) were recorded in each case. Serum LH, FSH, PRL, estradiol (E₂), progesterone levels, and endometrial thickness were compared between the two groups. These amenorrheic patients were assessed with regard to the following: endometrial thickness measured by US, serum E₂ level, and response to progestin testing. Discrimination between CC responders and CC non-responders was compared among these three modalities. The cutoff thickness of the endometrium was determined by the response to CC. The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value were calculated and compared to those of the serum E₂ levels and the progestin withdrawal test.

Progestin testing

After endometrial assessment and blood sampling for hormones, each subject received dydrogesterone 10 mg orally daily for 5 days, and a follow up visit

was scheduled for 3 to 4 weeks later to record the presence or absence of withdrawal bleeding. Withdrawal bleeding found within 3 ~ 7 days of completion was defined as progestin positive. Patients with spotting or no bleeding were defined as negative.

Measurement of endometrial thickness

Endometrial thickness was measured in each patient by an experienced transvaginal ultrasonography examiner (S.N.) using a Mochida Sonovista-SL, Model MEU 1577 (Mochida Inc., Tokyo, Japan) with a 6-MHZ transvaginal transducer. The maximal anterior and posterior endometrial thickness in the direction of the major axis of the uterine body were measured⁶.

Hormones assay

Serum E₂, LH, FSH, PRL, and progesterone levels were determined, by commercially available radioimmunoassay kits in blood collected at the first visit (Daiichi-E₂, LH, FSH, PRL, and progesterone kits, respectively: Daiichi Radioisotope Co., Ltd., Tokyo, Japan). Before sampling, we confirmed that the patients had received no hormone preparation for 2 months or more.

Full informed consent was obtained from each subject and the study was approved by the Hospital Ethics Committee.

Statistical analysis

The statistical significance of the differences was assessed by Student's t-test or Chi-square test, as appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Table 1 presents patient characteristics, hormonal data, and endometrial thickness by response to CC. No significant differences were observed in age, duration of amenorrhea, height, body weight, serum LH, FSH, and PRL levels. Serum progesterone levels at an initial visit in all patients were less than 1 ng/ml. However BMI were significantly lower in CC non-responders ($P < 0.05$). This is probably because the CC non-responders included patients with long-standing amenorrhea associated with weight loss. Serum E₂ level was significantly higher in CC responders ($P < 0.001$). The endometrium was sig-

Table 1 Patient characteristics, hormonal data, and endometrial thickness by response to clomiphene citrate

	CC responders	CC non-responders	P
N	29	22	
Age (y)	26.5 ± 7.0	25.2 ± 5.2	NS
Duration of amenorrhea (m)	14.0 ± 7.2	16.5 ± 8.1	NS
Height (cm)	154.0 ± 5.8	156.2 ± 6.1	NS
Body weight (kg)	54.7 ± 11.3	51.2 ± 10.1	NS
BMI (kg/m ²)	23.1 ± 4.7	20.5 ± 4.4	< 0.05
LH (mIU/ml)	8.9 ± 6.3	9.1 ± 6.4	NS
FSH (mIU/ml)	5.5 ± 1.9	7.1 ± 2.1	NS
PRL (ng/ml)	18.7 ± 5.9	19.2 ± 6.2	NS
E ₂ (pg/ml)	51.9 ± 22.9	21.8 ± 11.7	< 0.001
Endometrial thickness (mm)	9.7 ± 4.1	5.4 ± 3.2	< 0.001

CC = clomiphene citrate.

BMI = body mass index (weight (kg) /height (m)²).

NS = not significant.

Data are presented as Mean ± S.D. or N.

nificantly thicker in CC responders ($P < 0.001$).

Table 2 shows the response to CC and endometrial thickness. When the endometrial thickness predictable of the response to CC was set at 6.0 mm, the accuracy was superior to the values found with the endometrial thickness at 5.0 mm or 7.0 mm. Five cases with endometrial thickness ≥ 6.0 mm were CC nonresponders, with 4 showing evidence of PCOS, and one case showing chronic anovulation. Table 3 shows the response to CC and serum E₂ levels. When the serum E₂ level predictable of the response to CC was set at 30 pg/ml, the accuracy of 30 pg/ml was superior to the values found with the serum E₂ level of 20 pg/ml and 40 pg/ml. Table 4 shows the response to CC and progestin withdrawal test.

Positive predictive values of endometrial thickness were not inferior to serum E₂ and progestin withdrawal. However, negative predictive values were significantly lower in endometrial thickness and serum E₂ than progestin withdrawal ($P < 0.05$).

Discussion

CC has been widely used as a primary treatment for ovulation induction in anovulatory patients. CC is indicated for anovulatory patients with evidence of follicular function and adequate endogenous estrogen but lacking adequate and cyclic stimulation by pituitary gonadotropic function⁷⁾. Both progestin

Table 2 Response to clomiphene citrate and endometrial thickness

	Endometrial thickness (mm)	
	≥ 6.0	< 6.0
CC responders	25	4
CC non-responders	5	17

sensitivity = 86.2 %

specificity = 77.3 %

positive predictive value = 83.3 %

negative predictive value = 81.0 %

Table 3 Response to clomiphene citrate and serum estradiol levels

	Serum estradiol levels (pg/ml)	
	≥ 30	< 30
CC responders	22	7
CC non-responders	8	14

sensitivity = 75.9%

specificity = 63.6%

positive predictive value = 73.3%

negative predictive value = 66.7%

Table 4 Response to clomiphene citrate and progestin withdrawal test

	Positive progestin withdrawal test	Negative progestin withdrawal test
	CC responders	29
CC non-responders	6	16

sensitivity = 100%

specificity = 72.7%

positive predictive value = 82.9%

negative predictive value = 100%

testing and direct assay of serum E₂ level have been clinically used as indicators of the likely success of CC administration^{1, 2)}. However, there have been no indicators to predict whether amenorrheic patients would respond to CC at the first visit. In this regard, Takahashi et al.⁸⁾ reported that ultrasonographic ovarian features can in part discriminate the CC responders from the CC non-responders in PCOS patients. However, the relationship between endometrial thickness and the response to CC in anovulatory patients has not been previously studied.

In the present study, we demonstrated that the response to CC can be predicted by endometrial thickness at the first visit in amenorrheic patients. The positive predictive value of endometrial thickness was not inferior to serum E₂ and progestin withdrawal. Our observation supports the concept that endometrial thickness is similar to a bioassay for serum E₂ levels during stimulated and spontaneous menstrual cycles^{9 ~ 11)}, and also persistent during anovulation^{3 ~ 5)}. To establish serum E₂ level in amenorrheic patients, complicated and expensive laboratory tests must be performed⁷⁾. A single determination may not accurately reflect the overall E₂ production and secretion because of fluctuations in serum E₂ levels³⁾. These findings suggest that measured endometrial thickness appears to be a better assay of endometrial estrogen response than serum E₂. In addition, the technique is painless and safe and can be performed in the office quickly. Taking these findings into consideration, the clinical usefulness of US assessment of endometrium is superior to that of one point E₂ assay in predicting the response to CC.

Five cases with endometrial thickness ≥ 6.0 mm were CC non-responders, with 4 showing evidence of PCOS. Most patients having clomiphene failure in spite of progestin withdrawal may be related to PCOS¹²⁾. Indeed, in the present study, 6 cases were CC non-responders despite positive progestin withdrawal, with 4 showing PCOS. Thus, in patients with PCOS, ovarian features (ovarian volume and number of follicles) by US may become an adjunct indicator of the response to CC⁸⁾.

Though the differences in endometrial thickness are highly significant between responder and non-

responders groups, 4 patients had an endometrial thickness of < 6.0 mm, yet responded to CC therapy. This indicates that even patients with a relatively thin endometrium should have a trial of CC therapy, especially in view of the fact that the alternative regimen with gonadotropin is associated with higher cost, as well as significant complications and side effects. On the other hand, no patients with negative progestin withdrawal responded to CC. This finding suggests that progestin withdrawal is a better predictor of response to CC than US. Additionally, ultrasound is expensive, whereas giving a progestin withdrawal test is much less expensive and seems to measure the same endocrinologic properties that the endometrial thickness measures^{3, 5)}. Today, most clinicians would try the clomiphene even if there was no response to the progestin withdrawal. When the clomiphene trial is not successful, the clinician can move on to gonadotropin therapy. Thus, it makes sense to try clomiphene without regard to endometrial thickness.

On the basis of these results, we conclude that ultrasonographic endometrial thickness can distinguish clomiphene responders from non-responders before the treatment regimen is begun. The clinical usefulness of endometrial thickness in predicting ovulation with CC may be superior to one point E₂ assay.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Martin Gore, Kagoshima University, for his help with the English.

References

- 1) Kletzky OA, Davajan V, Nakamura RM, et al. (1975) Clinical categorization of patients with secondary amenorrhea using progesterone-induced uterine bleeding and measurement of serum gonadotropin levels. *Am J Obstet Gynecol* 121: 695-703
- 2) Hull MGR, Knuth VA, Murray MAF, et al. (1979) The practical value of the progesterone challenge test serum oestradiol estimation on clinical examination in assessment of the oestrogen state and response to clomiphene citrate in amenorrhoea. *Br J Obstet Gynaecol* 86: 799-805
- 3) Shulman A, Shulman N, Weissenglass L, et al.

- (1989) Ultrasonic assessment of the endometrium as a predictor of oestrogen status in amenorrhoeic patients. *Hum Reprod* 4: 616-619
- 4) Morcos RN, Leonard MD, Smith M, et al. (1991) Vaginosonographic measurement of endometrial thickness in the evaluation of amenorrhoea. *Fertil Steril* 55: 543-546
- 5) Nakamura S, Douchi T, Oki T, et al. (1996) Relationship between sonographic endometrial thickness and progestin-induced withdrawal bleeding. *Obstet Gynecol* 87: 722-725.
- 6) Fleischer AC, Kalemeris GC, Machin JE, et al. (1986) Sonographic depiction of normal and abnormal endometrium with histologic correlation. *J Ultrasound Med* 5: 445-452
- 7) Brown JB, Beischer NA (1972) Current status of estrogen assay in gynecology and obstetrics. I. Estrogen assay in gynecology and early pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 27: 205-212
- 8) Takahashi K, Uchida A, Yamasaki H, et al. (1994) Transvaginal ultrasonic assessment of the response to clomiphene citrate in polycystic ovarian syndrome. *Fertil Steril* 62: 48-53
- 9) Smith B, Porter R, Ahuja K, et al. (1984) Ultrasonic assessment of endometrial changes in stimulated cycles in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer* 1: 233-238
- 10) Fleischer AC, Kalemeris C, Entmann SS. (1986) Sonographic depiction of the endometrium during normal cycles. *Ultrasound Med Biol* 12: 271-277
- 11) Sakamoto C, Yoshimitu K, Nakamura G, et al. (1988) Sonographic study of the endometrial response to ovarian hormones in patients receiving ovarian stimulation. *Int J Gynecol Obstet* 27: 407-414
- 12) O'Herlihy C, Pepperell R, Brown JB, et al. (1981) Incremental clomiphene therapy: A new method for treating persistent anovulation. *Obstet Gynecol* 58: 535-542.

(受付: 1996年9月26日)

(受理: 1996年10月9日)

無月経患者における子宮内膜厚とクロミフェンに対する反応の関連性

鹿児島大学医学部産婦人科学教室
中村佐知子, 堂地 勉, 伊集院博文
沖 利通, 山元慎一, 永田行博

続発性無月経患者の初診時の子宮内膜厚からクロミフェンに対する反応が予知できるか否かを検討した。クロミフェン反応群 (29例) とクロミフェン抵抗群 (22例) を対象とした。初診時の経腔超音波断層法による子宮内膜厚, 血清E₂値およびプロゲステロン・チャレンジテストによる消退出血の有無とクロミフェンに対する反応の有無との関連を検討した。クロミフェン反応群の子宮内膜厚は9.7±4.1 (mm) でありクロミフェン抵抗群の5.4±3.2 (mm) に比較して有意に厚かった (P<0.05)。子宮内膜厚6.0 mmをcut off値にした場合, クロミフェンに対する反応の感度は86.2%, 特異性は77.3%, positive predictive value は83.3%, negative predictive value は81.0%であった。子宮内膜厚によるpositive predictive value は血清E₂値30pg/mlをcut off値にした時のそれやプロゲステロン・チャレンジテストのそれに比較して優るとも劣らなかつた。

無月経患者の初診時子宮内膜厚からクロミフェンに対する反応の有無を予知できる可能性が示された。

キーワード: 子宮内膜厚, 経腔超音波断層法, クロミフェン, 排卵, 予知

卵管性不妊症患者におけるクラミジア・トラコマティス抗体の検討
—セロ・イパライザ クラミジアIgA, IgG, IgMを用いて—

Correlation between Serum Antichlamydial Antibodies
and Infertile Women

愛知医科大学産婦人科学教室

野口昌良 岡本俊充
Masayoshi NOGUCHI Toshimichi OKAMOTO
保條説彦 中部健
Tatsuhiko HOJO Ken NAKABE
Department of Obstetrics and Gynecology,
Aichi Medical University, Aichi 480-11, Japan

京都府立医科大学産婦人科学教室

保田仁介
Jinsuke YASUDA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602, Japan

江東病院

松田静治
Seiji MATSUDA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Koto Hospital, Tokyo 136, Japan

東京大学分院産科婦人科

川名尚 西井修
Takashi KAWANA Osamu NISHII
Department of Obstetrics and Gynecology,
University of Tokyo Branch Hospital, Tokyo 112, Japan

徳島大学医学部産科婦人科学教室

青野敏博 鎌田正晴
Toshihiro AONO Masaharu KAMATA
Department of Obstetrics and Gynecology,
The University of Tokushima, Tokushima 770, Japan

日本大学医学部産婦人科学教室

佐藤和雄 長田尚夫
Kazuo SATO Hisao OSADA
正岡直樹
Naoki MASAOKA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Nihon University, Tokyo 173, Japan

鹿児島大学医学部産婦人科学教室

永田行博 中村佐知子
Yukihiro NAGATA Sachiko NAKAMURA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kagoshima University, Kagoshima 890, Japan

近畿大学医学部産婦人科学教室

星合昊 向林学
Hiroshi HOSHIAI Manabu MUKOUBAYASHI
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kinki University School of Medicine, Osaka 381, Japan

東京大学医学部産科婦人科学教室

武谷雄二 堤治
Yuji TAKETANI Osamu TSUTSUMI
大須賀 穰
Yutaka OOSUGA
Department of Obstetrics and Gynecology,
University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

東北大学医学部産科婦人科学教室

矢嶋聰 深谷孝夫
Akira YAJIMA Takao FUKAYA
高山和人
Kazuto TAKAYAMA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Tohoku University, Miyagi 980-77, Japan

新潟大学医学部産婦人科学教室

田中憲一 加藤龍太
Kenichi TANAKA Ryuta KATO
Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University, Niigata 951, Japan

浜松医科大学医学部産婦人科学教室

寺尾俊彦 金山尚裕
Toshihiko TERAO Naohiro KANAYAMA
朝比奈俊彦
Toshihiko ASAHINA
Department of Obstetrics and Gynecology,
Hamamatsu University School of Medicine,
Shizuoka 461-31, Japan

浜松医療センター産婦人科

前田 真

Makoto MAEDA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hamamatsu Medical Center, Shizuoka 432, Japan

藤田保健衛生大学医学部産婦人科学教室

河上 征治

Seiji KAWAKAMI

青木 豊和

Toyokazu AOKI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Fujita Health University School of Medicine,
Aichi 470-11, Japan

北海道大学医学部産婦人科学教室

藤本 征一郎

Seiichiro FUJIMOTO

吉田 博

Hiroshi YOSHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hokkaido University, Hokkaido 060, Japan

Chlamydia trachomatis 感染症は頻度の高い性感染症として注目されている。この感染症は女性においては無症候性に経過することが多いにもかかわらず、卵管への感染が卵管の疎通性を損ない、子宮外妊娠や卵管性不妊症を招きやすいとの報告が多数発表されている。初感染時の自覚症状の乏しさから、子宮頸管における抗原検出の機会がすでになく、しかも腹腔内の抗原検出が困難であるため、クラミジア・トラコマティスによる卵管性不妊症の診断には血清学的診断の有用性が期待される。そのため、我々は不妊症女性を対象としてセロ・イパライザ クラミジア IgA, IgG, IgM を測定することにより、抗体価陽性率および抗体価と卵管性不妊症との関連性を検討し、卵管性不妊症の診断に対する抗体測定の有用性もあわせて検討した。卵管通過障害の有無による検討では、疎通性のある128例中、卵管采周囲癒着(43.8%)、卵管周囲癒着(33.6%)と有意に高く、疎通性のないものでは間質部閉塞(36.1%)と卵管留水腫(17.6%)において抗クラミジア抗体陽性率は有意に高率であった。また、腹腔鏡検査を行った141例中卵管とその周辺の異常を確認できた112例では、IgA, IgGともに陽性は49例(43.8%)であり、有意に高率であった。

以上の結果より、不妊症例における抗クラミジア・トラコマティス IgA, IgG, IgM 抗体陽性が経過の長いクラミジア・トラコマティスの骨盤内感染の継続とそれともなう卵管性不妊症の発症を裏付けるための指標になり得ることが明らかとなった。

キーワード: クラミジア・トラコマティス, 卵管性不妊症, 抗クラミジア抗体

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 28 - 33, 1997)

緒 言

近年、Chlamydia trachomatis 感染症は頻度の高い性感染症として注目されている。この感染症は女性においては無症候性に経過することが多いにもかかわらず、卵管への感染が卵管の疎通性を損ない、子宮外妊娠や卵管性不妊症を招きやすいとの報告が多数発表されている¹⁻⁵⁾。初感染時の自覚症状の乏しさから、子宮頸管における抗原検出の機会がすでになく、しかも腹腔内の抗原検出が困難であるため、クラミジア・トラコマティスによる卵管性不妊症の診断には血清学的診断の有用性が期待される。そのため、著者らは全国13施設において不妊症女性を対象としてセロ・イパライザ クラミジア IgA, IgG, IgM を測定することにより、抗体価陽性率および抗体価と卵管性不妊症との関連性を検討し、卵管性不妊症

の診断に対する抗体測定の有用性もあわせて検討したので報告する。

対 象

1993年9月より1994年9月までに全国13施設においてHysterosalpingography (HSG)、腹腔鏡もしくは開腹により卵管とその周辺の状態を検討できた485例の不妊症患者を対象とした。対象の平均年齢は31.0歳、不妊期間は最長14年、平均4.0年であった。対象の卵管所見は、左右とも正常と判断された221例と、卵管の疎通性は認めるも周囲に癒着など異常が認められた128例および疎通性のないもの136例であった(Table 1)。対象例の卵管異常所見を分類すると、疎通性がありながら卵管周囲もしくは卵管采周辺に癒着のあるものが約80%を占め最も多く、疎通性のない136例については、その閉塞部位は間質部閉塞が最

も多く49例36.1%であり、他はほぼ同程度であった (Table 2). これらはHSGによる判定であるため必ずしもすべてがクラミジア・トラコマティス感染による異常所見ではない。そこで、子宮内膜症などによる子宮および卵管周辺に発症した癒着を除くために、過去に手術既往のない腹腔鏡を施行できた141例についての検討も加えた。

方 法

クラミジア感染の検査方法は、子宮頸管のクラミジア・トラコマティス抗原をDNAプローブ法にて検索し、血清の抗クラミジア・トラコマティス抗体IgA, IgG, IgMをセロ・イバライザ法により測定した。セロ・イバライザ法の測定原理は、クラミジア・トラコマティスL2株の精製EB (基本小体) を抗原として固相化したマイクロプレートを使用する酵素免疫測定法であり、感度、特異性に優れている抗クラミジア抗体測定方法である (Fig. 1)。

結 果

1) 抗原陽性率

対象例のうち子宮頸管におけるクラミジア抗原検出を行い得た462例のうち、陽性例は16例3.5%に存在した。また、卵管正常群では221例中3例1.4%、卵管異常群では241例中13例5.4%に陽性が認められた (Table 3)。

2) 抗体陽性率

抗IgA, IgG抗体陽性率についてみると、卵管正常群では221例中33例14.9%がIgA, IgGとも陽性であったのに対して、卵管異常群では264例中100例37.9%がIgA, IgGともに陽性で、有意に高率に陽性が存在し、その中では疎通性のない群ではIgA, IgGともに

Table 1 Tubal findings of infertility

Tubal abnormality (-)		221
Tubal abnormality (+)	patency (+)	128
	patency (-)	136
(N: 485)		

Table 2 Classification of tubal abnormality

patency (+) (128)	peri fimbrial adhesion	56 (43.8%)
	peri tubal adhesion	43 (33.6%)
	peri adnexal adhesion	6 (4.7%)
	omental adhesion	4 (3.1%)
	others	19 (14.8%)
patency (-) (136)	occlusion of interstitial portion	49 (36.1%)
	occlusion of fimbria (hydrosalpinx)	24 (17.6%)
	occlusion of isthmus	21 (15.4%)
	occlusion of ampulla	18 (13.3%)
	others	24 (17.6%)

Table 3 Positive rate of Chlamydial antigen in infertility

		normal tubes	abnormal tubes
patients	462	221	241
positive	16	3	13*
positive rate	3.5%	1.4%	5.4%

(*p < 0.05)

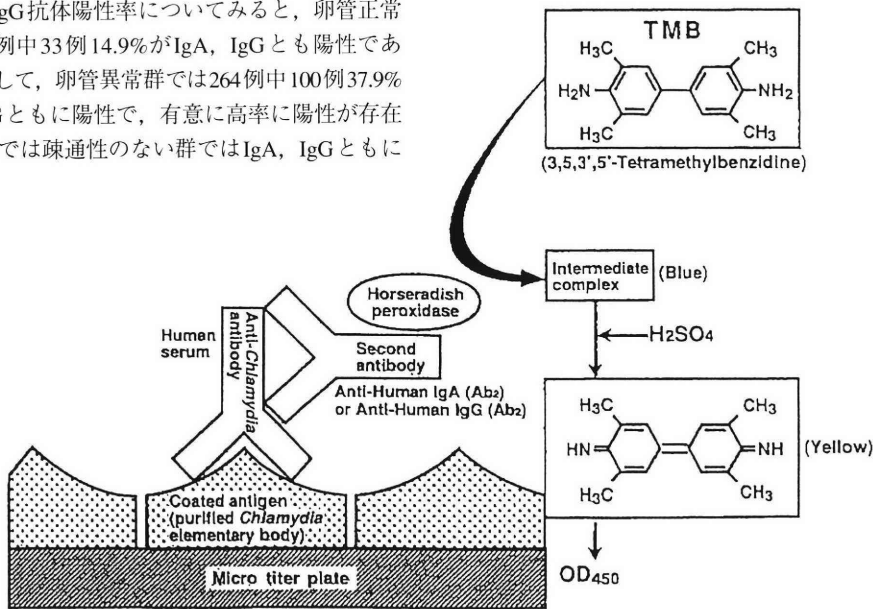


Fig. 1 Principle of Sero IPALISA Chlamydia™

陽性例が高率に認められた (Table 4).

3) 抗原陽性例の抗体価

つぎにクラミジア抗原陽性群の IgA, IgG, IgM 抗体価について検討を加えた. 抗原陽性例の 75% (12/16) が IgA 陽性であり, IgG については 93.8% (15/16) が陽性であった. IgM に関しては, 抗原陽性 16 例中 4 例のみ陽性で, IgM 抗体の特徴である感染後短期間は陽性を示すが, すみやかに抗体価が低下するためこのような結果が得られたものと思われる. これら 3 種の抗体と抗原陽性とのもつ意味は, 子宮頸管に抗原が現存しているもの他は初感染からの時間の経過が子宮頸管の抗原の消失となり, 一方腹腔内にはなおクラミジア感染が継続しているケースがあり, 加えて感染後の治療により感染が終息しても抗体価の消長には長時間を要するため, このような結果が示されたものと思われる (Table 5).

4) 腹腔鏡による骨盤内所見と抗体価

多施設において多くの症例を対象として検討を試

みるため, HSG による卵管とその周辺の評価により卵管の状態を評価したものを含めて検討を行ったが, より確実な骨盤内所見との検討ということで, ラパロスコブ所見により骨盤内所見が明確にされた 141 例について, 卵管異常群と正常群に分けて検討を行った. この結果, 腹腔鏡により卵管の異常が認められた 112 例において, IgA, IgG 抗体ともに有意に高率に陽性例が存在した (Table 6). なお, 今回の検討は, 多施設において行われたため, AFS の癒着スコアによる分類は行っていない.

5) 卵管所見と IgA, IgG 抗体の COI 値

腹腔鏡検査の施行された 141 例について, 抗クラミジア IgA, IgG 抗体価のカットオフインデックス (COI) について検討すると, COI が高くなるほど腹腔鏡所見に異常があるものが正常より有意に多くなるが, これは不妊期間や抗クラミジア抗体が治療後も陽性に出ることなど複雑な背景があり, COI 高値ということだけで卵管所見の重症度と結び付けるには, なお十分な検討が必要であると思われる (Fig. 2).

Table 4 Anti-Chlamydial antibody in infertility

N: 485

antibody		normal tubes	abnormal tubes
IgA	IgG	221	264
+	+	33 (14.9%)	100 (37.9%) *
+	-	12 (5.4%)	25 (9.5%) *
-	+	8 (3.6%)	21 (8.0%) *
-	-	168 (76.0%)	118 (44.6%)

(*p < 0.001)

Table 5 Relationship between antigen and antibody in infertility

		IgA		IgA positive rate
		+	-	
antigen (cervix)	+	12	4	75 %
	-	158	311	33.7 %
total		170	315	485

		IgG		IgG positive rate
		+	-	
antigen (cervix)	+	15	1	93.8 %
	-	147	322	31.3 %
total		162	323	485

		IgM		IgM positive rate
		+	-	
antigen (cervix)	+	4	12	25 %
	-	62	407	13.2 %
total		66	419	485

考 察

不妊症を原因別に分けると卵管性不妊症が半数以上を占めるとされているが, 近年, その原因の大半が *Chlamydia trachomatis* 感染が腹腔内に波及し, 卵管周囲癒着を中心とした卵管閉塞症をも含めた卵管障害の結果であると考えられるようになった. いくつかの報告や状況証拠がこれらの見解を支えてきたが, ここ数年さらに確実な研究が積み上げられてきた⁶⁻¹⁰⁾. その結果, クラミジア感染と卵管不妊との関連は, より確かなものとされたため, 不妊症患者を前にしたとき, クラミジア感染の有無あるいはクラミジア感染の既往についての検査が望まれるようになった. しかしながら, 抗原検出がほとんどの場合子宮頸管において行われるため, 不妊症患者を対象とする腹腔内のクラミジア感染の有無の判定には

Table 6 Laparoscopic findings and positive rate of anti-Chlamydial antibody in infertility

N: 141

antibody		normal tubes	abnormal tubes
IgA	IgG	29	112
+	+	5 (17.2%)	49 (43.8%) *
+	-	1 (3.4%)	12 (10.7%) *
-	+	2 (6.9%)	11 (9.8%) *
-	-	21 (72.4%)	40 (35.7%)

(*p < 0.01)

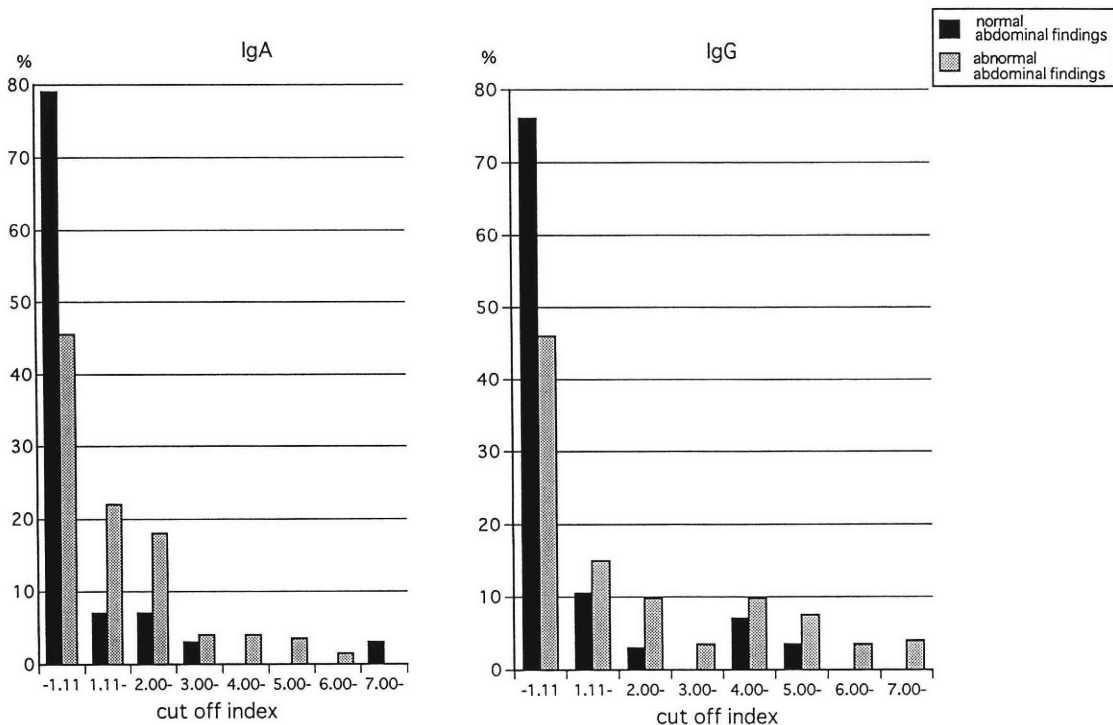


Fig. 2 Laparoscopic findings and cut of index

不向きである。このため、いくつかの評価の高い抗クラミジア抗体検査の登場により、不妊症患者に関するクラミジア感染についての情報獲得のため血清学的診断の応用が強く期待されるようになった。

このような状況のもとで、クラミジア抗体が卵管障害とどのようなかわりをもつかについて、多施設による検討を行った。母集団を拡げるため Hysterosalpingography (HSG) による卵管異常所見のある症例をまず対象とし、その上で可視的に卵管周囲の状況を確認し得た症例について検討を行った。その結果、HSG 異常例では、クラミジア感染は有意に高率に存在し、腹腔鏡所見の異常群はさらに高率にクラミジア感染の存在を示すことが確かめられた。

IgA 抗体と IgG 抗体に関しては、一部において IgA 抗体は活動性感染を示し、IgG 抗体は感染の既往を示すといわれたこともあるが、治療後もすみやかに消退せず、明確な消退パターンをとるとはいいがたい。また、IgM 抗体は感染直後には上昇するもののその後は治療と関連なく消退するため、これもいまひとつ確かな判定規準とはなりがたい。

抗体価の評価は、陰性コントロールをおき cut off index (COI) を決定するが、多くの不妊症患者の中で不妊歴が長いものが COI が高値となるか、不妊歴は

短くとも感染後の経過が短いものほど高値であるという見解も今回の我々の対象例 485 例ではまったく相関が得られなかった。したがって、COI 値が高いほど癒着が高度であるというような証明は当然のことながらできるものではなかった。

不妊症患者だけではなく、あらゆる開腹症例の腹腔内のクラミジア抗原と血清抗体価の検討を行った、評価の高い島田ら¹¹⁾の報告によっても、定かにはされていない。したがって、不妊症患者においてクラミジア感染の既往がある場合に、卵管周囲の障害や腹腔内癒着の存在は十分に推察できるが、抗体価の COI 値は腹腔内の状況まで評価するにはなお今後の検討が必要と思われた。

文 献

- 1) Punnonen R, Terho P, Nikkanen V, et al. (1979) Chlamydial serology in infertile women by immunofluorescence. *Fertil Steril* 31: 656
- 2) Sweet RL (1982) Chlamydial salpingitis and infertility. *Fertil Steril* 38: 530-533
- 3) Jones RB, Ardery BR, Hui SL, et al. (1982) Correlation between serum antichlamydial antibodies and tubal factor as a cause of infertility. *Fertil Steril* 38: 553-558

- 4) 野口昌良 (1994) 婦人科感染症と不妊. クラミジア感染症以外の感染症も含めて. 日産婦誌 46: N-107-110
- 5) 中部 健, 野口昌良, 岡本俊充 他 (1995) Chlamydia trachomatis 感染症と妊孕性障害に関する検討. 日本性感染症誌 6: 30-34
- 6) 保條説彦 (1994) 女性性器 Chlamydia trachomatis 感染症における卵管性不妊症の発生機序に関する研究. 愛知医大誌 22:1-17
- 7) 野口靖之, 中部 健, 岡本俊充 他 (1995) 卵管機能障害の発症とクラミジア・トラコマトイス感染. 産婦人科マイクロサージャリー学会雑誌 8: 21-24
- 8) 高橋敬一, 永井聖一郎, 塩田恭子 他 (1993) 抗クラミジア抗体診断キット, セロ イパライザ クラミジア IgA・IgG® の臨床的検討. 日不妊会誌 38: 704-708
- 9) 大橋一友, 佐治文隆, 富山達大 他 (1994) 不妊夫婦の血中抗クラミジア抗体. 日不妊会誌 39: 49-52
- 10) 矢野義明, 森田峰人, 久保春海 他 (1996) 腹腔鏡施行症例における抗クラミジア抗体と卵管障害についての検討. 日不妊会誌 41: 95-99
- 11) 島田逸人, 高島英世, 山田 良 他 (1995) 産婦人科領域の開腹手術所見とクラミジア感染. 日不妊会誌 40: 307-312
- (受付: 1996年 8月28日)
(受理: 1996年10月14日)

Correlation between serum antichlamydial antibodies and infertile women

Masayoshi Noguchi, Toshimichi Okamoto, Tatsuhiko Hojo and Ken Nakabe

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University, Aichi 480-11, Japan

Yukihiro Nagata and Sachiko Nakamura

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

Jinske Yasuda

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto 602, Japan

Hiroshi Hoshiai and Manabu Mukoubayashi

Department of Obstetrics and Gynecology, Kinki University School of Medicine, Osaka 381, Japan

Seiji Matsuda

Department of Obstetrics and Gynecology, Koto Hospital, Tokyo 136, Japan

Yuji Taketani, Osamu Tsutsumi and Yutaka Oosuga

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo, Tokyo 113, Japan

Takashi Kawana and Osamu Nishii

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo Branch Hospital, Tokyo 112, Japan

Akira Yajima, Takao Fukaya and Kazuto Takayama

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University, Miyagi 980-77, Japan

Toshihiro Aono and Masaharu Kamata

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

Kenichi Tanaka and Ryuta Kato

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

Kazuo Sato, Hisao Osada and Naoki Masaoka

Department of Obstetrics and Gynecology, Nihon University, Tokyo 173, Japan

Toshihiko Terao, Naohiro Kanayama and Toshihiko Asahina

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Shizuoka 461-31, Japan

Makoto Maeda

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu Medical Center, Shizuoka 432, Japan

Seiji Kawakami and Toyokazu Aoki

Department of Obstetrics and Gynecology, Fujita Health University School of Medicine, Aichi 470-11, Japan

Seiichiro Fujimoto and Hiroshi Yoshida

Department of Obstetrics and Gynecology, Hokkaido University, Hokkaido 060, Japan

In order to clarify correlation between serum antichlamydial antibodies and infertile women, IgA, IgG and IgM antibody titers against chlamydia trachomatis were measured using single antigen (L2) immunoperoxidase assay. (Sero ELISA Chlamydia; Savyon Diagnostics Ltd.) We classified tubal abnormality with HSG or laparoscopic findings in infertile women. In 221 patients of the normal tubal group 45 patients (20.3%) were IgA positive and 41 patients (18.5%) were IgG positive. In 264 patients of the abnormal tubal group, 125 patients (47.4%) were IgA positive and 121 patients (45.9%) were IgG positive. It is clarified that antichlamydial IgA and IgG positive rates were significantly higher in the abnormal tubal patients ($p < 0.001$).

In 141 patients were investigated with laparoscopic findings, abnormal salpinx findings were seen in 54.5% (61 / 112) of serum antibody positive cases ($p < 0.01$).

The results of this study clarified the antichlamydial antibodies indicated to previous chlamydial infection in tubal infertility patients. These results suggest that laparoscopic examination is necessary to be performed in chlamydial antibody-positive infertile women.

Key words: chlamydia trachomatis, tubal infertility, antichlamydial antibody

ANALYSES OF EARLY DEVELOPMENT AND CHROMOSOMAL CONSTITUTION OF TRIPRONUCLEAR HUMAN AND MOUSE EGGS FERTILIZED *IN VITRO*

Midori YOSHIZAWA

Department of Animal Breeding and Reproduction,
Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Utsunomiya 321, Japan

Yasuhisa ARAKI and Mitsuhiro MOTOYAMA

Institute of Advanced Medical Technology, Tochigi 329-04, Japan

Abstract: Developmental ability and numerical constitution of chromosomes were analyzed in human and mouse eggs, which were determined to be trippronuclear eggs at the 1-cell stage after *in vitro* fertilization and incubation.

Most mouse blastocysts developed from these eggs showed normal diploidy, while only 18.4% (7/38) of the blastocysts showed triploidy. In trippronuclear human embryos, some embryos showed triploidy also. In seven out of sixteen human embryos judged as trippronuclear eggs at the 1-cell stage by the number of pronucleus, chromosomal anomalies were found as follows: five embryos showed triploidy, one mixoploidy of 2n/n, and one aneuploidy. No correlation was found between the cleavage patterns and karyotype of trippronuclear eggs in the resultant of human embryos.

The results of the present study showed that only a part of trippronuclear eggs develop into triploids.

Key words: *in vitro* fertilization, human embryos, mouse embryos, trippronuclei, triploid

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 34 - 38, 1997)

Introduction

Advanced reproductive technology in mammals has wide application to many fields including human reproduction, especially *in vitro* fertilization techniques routinely used as a therapy for human sterility. However, increasing abnormalities in the process of fertilization and development have been seen in *in vitro* fertilization of mammals, including polyspermy, polygyny, fragmentation and degeneration, due to high sperm-concentration, aging of eggs, and other causes (Trounson et al.¹). It is well known that high sperm-concentration causes high polyspermy (Fraser et al.², Englert et al.³). However, in human *in vitro* fertilization programs, a higher sperm-concentration than that of *in vivo* environment is needed to gain a high fertilization rate.

Therefore, in human eggs fertilized *in vitro*, incidence of trippronuclear eggs is higher than that in *in vivo* fertilization (Dandekar et al.⁴). These trippronuclear eggs have never been retransferred to the mother's uterus because they will become triploids, which have a possibility of developing into potentially abortive embryos. Almost all the triploids cease developing until mid-pregnancy (Niemierko⁵). A human triploid is very rarely found as a newborn (Blackwell et al.⁶). However, there has not been enough research to know whether all of the trippronuclear eggs become triploids or not, although there are some studies related to trippronuclear human eggs (Kola et al.⁷).

To give insight into the development of trippronuclear human eggs, the present study undertook to determine the incidence of the resultant triploidy in

mouse tripronuclear eggs and to compare the survivorship of tripronuclear human eggs to that of mouse eggs. To accomplish this purpose, we analyzed chromosomes of tripronuclear mouse and human eggs divided after *in vitro* fertilization.

Materials and Methods

Female mice of (BALB/c × C57BL/6) F₁, 2- to 4-months old, were superovulated by an injection of 5 IU PMSG followed approximately 48 hours later by a 5 IU hCG injection.

The technique of *in vitro* fertilization in the mouse was made basically according to the previous report of Yoshizawa et al.⁸⁾ TYH medium used in the present study (Toyoda et al.⁹⁾ was a modified Krebs-Ringer bicarbonate solution containing 119.37 mM NaCl, 4.78 mM KCl, 12.6 mM CaCl₂ · 2H₂O, 1.19 mM KH₂PO₄, 1.19 mM MgSO₄, 25.07 mM NaHCO₃, 1.0 mM sodium pyruvate, 5.56 mM glucose and 4 mg crystalline bovine serum albumin/ml, supplemented with 50 μg/ml streptomycin sulphate and 75 μg/ml potassium penicillin G. Sperm suspensions from cauda epididymides of ICR male mice were incubated for 2 hours. To induce polyspermy, 2 mM caffeine was administered to medium (Yoshizawa et al.⁸⁾ and high final sperm-concentrations (2000 sperm/μl) of 10 times the conventional level were adopted. At 2 hour intervals, beginning 10 hours after insemination, the pronuclei of eggs were closely observed for counting, by means of rolling the eggs to avoid a mistake for a polar body, by a stereomicroscope of 140 times magnification. The eggs with polypronuclei were classified by the number of pronuclei, and they were incubated until the blastocyst stage. When the classification was difficult, the eggs were excluded from

incubation. We consider that the classification of polypronuclear eggs is reliable enough because of the correct judgement (92 %, 23 / 25) in the eggs fixed immediately after counting the number of pronuclei.

After treatment with 30 ng/ml vinblastine sulfate for 10 hours, many mouse blastocysts but some of them for embryo-transfer were made as chromosome samples. Chromosome preparation was performed by the method reported previously with mouse embryos (Yoshizawa et al.¹⁰⁾.

Until now, whenever tripronuclear human eggs were caused by conventional *in vitro* fertilization, all of them were discarded. In the present study, however, human eggs were checked for the number of pronuclei at 18 to 20 hours after insemination, the tripronuclear eggs were observed for their cleavage pattern for 1 or 2 days and then treated in 30 ng/ml vinblastine sulfate solution for 10 to 14 hours to accumulate metaphase figures. For chromosome preparation, embryos were placed in 1 % sodium citrate solution for 15 minutes and fixed mildly with a small volume of a mixture of 1 part acetic acid to 1 part methanol (Yoshizawa et al.¹¹⁾. Each embryo was individually put onto a glass slide and refixed with several drops of the fixative. After staining chromosomes with 2 % Giemsa solution for 10 minutes, the embryos were checked by a microscope for their normality and number of chromosomes.

All of the data obtained was statistically analyzed by the χ^2 -test.

Results

Almost every tripronuclear mouse egg, which was classified by the number of pronuclei at the pronuclear stage, divided into 2 cells at a rate of 94.3 %

Table 1 Development of mouse eggs classified by the number of pronucleus after fertilization in high sperm-concentration and caffeine-containing medium

	No of eggs fertilized	No. of embryos developed to		
		2-cell (%)	morula (%)	blastocyst (%)
2PN	294	251 (85.4) ^a	206 (70.1)	125 (42.5) ^b
3PN	159	150 (94.3) ^a	121 (76.1)	103 (64.8) ^b

a, b: Significant differences between the values marked by the same superscript letters at P < 0.05.

Table 2 Incidences of triploidy in mouse blastocysts derived from embryos classified by the number of pronucleus

	No. of embryos			
	prepared	with metaphase plates (%)	diploidy (%)	triploidy (%)
2PN	125	92 (73.6%)	92 (100%)	0
3PN	64	38 (59.4%)	31 (81.6%)	7 (18.4%)

Table 3 Chromosomal analysis of trippronuclear human eggs

No. of blastomeres	No. of eggs					
	examined	with metaphase	2 n	3 n	2 n/n	others
1 cell	1	1		1		
2 cells	6	3	2	1		
(2 cells+extrusion)	(1)		(1)			
3 cells	5	4	2		1	1
4 cells	13	5	4	1		
5, 6 cells	6	0				
7, 8 cells	8	3	1	2		
fragmented	1	0				
Total	40	16 (40%)	9	5	1	1

(150/159), and developed into the morula (76.1 %, 121/159) and blastocyst stages (64.8 %, 103/159) (Table 1). The dividing rate into the 2-cell stage and the development rates into the morula and blastocyst stages in dipronuclear eggs were 85.4% (251/294), 70.1 % (206/294) and 42.5 % (125/294), respectively. The dividing rate into the 2-cell stage and the development rate into the blastocyst stage were significantly higher in the trippronuclear eggs than the dipronuclear eggs, but there was no significant difference between the two groups in the development rate to the morula stage.

Many of blastocysts examined as chromosome samples showed metaphases, 73.6 % (92/125) in dipronuclear eggs and 59.4 % (38/64) in trippronuclear eggs. All of the blastocysts derived from normal dipronuclear eggs were determined to be diploids by chromosomal analysis. Of the embryos derived from trippronuclear eggs, only a few showed triploidy (18.4 %, 7/38), while the rest showed diploidy (Table 2).

The results of chromosomal analysis of human embryos derived from pronuclear eggs are shown in Table 3. Only 16 out of the 40 embryos examined had mitotic metaphase chromosomes; of these, 9 em-

bryos were normal diploids (Fig. 1), 5 embryos showed triploidy, one was a mixoploid of 2 n/n, and one was an aneuploid. With respect to cleavage stages and chromosomal composition, one undivided egg showed triploidy, while diploidy and triploidy were observed in every embryo group that divided into various cleavage patterns. No significant relationship was found between cleavage patterns and chromosomal composition in human eggs.

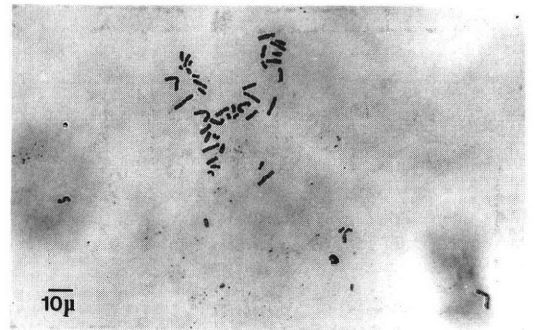


Fig. 1 A mitotic metaphase figure showing normal diploidy ($2n = 46$) in a 3-cell embryo derived from a trippronuclear egg. Every metaphase of three cells of this human embryo was diploidy. (Giemsa stain)

Discussion

It has been reported that incidences of triploidy become higher with the usage of *in vitro* fertilization techniques, high sperm-concentrations of *in vitro* fertilization (Fraser et al.²⁾), superovulation treatment with PMSG (Maudlin et al.¹²⁾), egg-aging (Takagi et al.¹³⁾), and administration of caffeine to media of *in vitro* fertilization (Yoshizawa et al.⁸⁾). In human *in vitro* fertilization, the diagnosis of normal eggs is done at the pronuclear stage by observation of the number of pronuclei (Trounson et al.¹⁾). When eggs having more than three pronuclei were found, all of the eggs were discarded because these triploids would eventually die by the middle stage of pregnancy (Trounson et al.¹⁾). In the present study, the dividing rate to 2 cells and the development rate to blastocysts in the tripronuclear mouse eggs were significantly higher than those of dipronuclear eggs, however, we have had the different result that there was no significant difference between dipronuclear mouse eggs and tripronuclear ones in the pre-experiment of the present study. These results suggest normality of the developmental ability of tripronuclear mouse eggs, although it has been reported that polyploidy balefully affects development of the embryos (Boyers et al.¹⁴⁾).

The resulting tripronuclear human eggs in the present study have shown a low incidence of triploidy, and Kola et al.⁷⁾ have also demonstrated that only 24 % of tripronuclear human oocytes develop into triploid embryos after the first cleavage division. It is a very difficult and important problem to clarify how many tripronuclear eggs develop into the resultant triploids. However, if we can know how the survivorship of triploids is determined we will be able to establish more useful and safe procedures of *in vitro* fertilization programs used for human sterility. With respect to tripronuclear mouse eggs, the present study also shows that only a minority of the tripronuclear eggs developed as triploids into the blastocyst stage. It is well known as physiological polyspermy that many spermatozoa enter large yolky eggs, such as those of birds, reptiles, etc. These spermatozoa entering the cytoplasm form pronuclei, but only one of the male pronuclei unites with the

female pronucleus, and excess male pronuclei do not join in syngamy (Austin¹⁵⁾). This similar mechanism may be present also in the mouse eggs. By chromosomal analysis of first cleavage mouse embryos classified as tripronuclear ones, we are finding that each embryo has the alternative chromosome complement of three haploid groups, one diploid and one haploid, or a triploid (unpublished data). A more detailed chromosomal study of tripronuclear embryos at the 2-cell stage or more developed stages is needed to ascertain whether an excess of pronuclei is excluded from syngamy of male and female pronuclei at fertilization, or if the development of the tripronuclear eggs stops during cleavage. These results will be published elsewhere.

In the present study, no correlation was found between the cleavage patterns and karyotype of tripronuclear eggs in the resultant of human embryos, although it has been reported that there is a correlation between the pattern of the first cleavage division and the subsequent karyotype in triploid embryos (Kola et al.⁷⁾). For example, Kola et al.⁷⁾ have described that 3-cell embryos derived from tripronuclear eggs showed severely abnormal chromosome composition, not diploid and not triploid. However, similar 3-cell embryos in the present study have shown normal chromosome composition: 46 chromosomes. Furthermore, in the present study triploids were found in various stages: 1-cell, 2-cell, 4-cell and 7- or 8-cell stages, while Kola et al.⁷⁾ showed 2-cell embryos to be triploids. Therefore, the accumulation of more tripronuclear human embryos and further basic studies in the mouse are needed, even though it has been reported that the cleavage patterns from fertilization to the first cleavage division differ between tripronuclear human eggs and mouse eggs (Sathananthan et al.¹⁶⁾).

Acknowledgments

We thank Ms. E. Fukui, Ms. K. Kageyama and Mr. T. Uchiyama for their help to the accomplishment of the present study.

References

- 1) Trounson A and Osborn J (1993) *In vitro* fertilization and embryo development. In: Trounson A

- and Gardner DK (Eds) Handbook of *in vitro* fertilization. CRC Press Inc, Florida, pp57-84
- 2) Fraser CR and Maudlin I (1978) Relationship between sperm concentration and the incidence of polyspermy in mouse embryos fertilized *in vitro*. J Reprod Fertil 52: 103-106
 - 3) Englert E, Puissant F, Camus M, et al. (1986) Factors leading to trippronucleate eggs during human *in vitro* fertilization. Human Reprod 1: 117-119
 - 4) Dandekar PV, Martin M C and Glass RH (1990) Polypronuclear embryos after *in vitro* fertilization. Fertl Steril 53: 510-514
 - 5) Niemierko A (1981) Postimplantation development of CB-induced triploid mouse embryos. J Embryol exp Morph 66: 81-89
 - 6) Blackwell NL, Keeling JW and Lindenbaum RH (1977) Dispermic origin of a 69, XXY triploid. Hum Genet 37: 121-124
 - 7) Kola I, Trounson A, Dawson G, et al. (1987) Trippronuclear human oocytes: Altered cleavage patterns and subsequent karyotypic analysis of embryos. Biol Reprod 37: 395-401
 - 8) Yoshizawa M, Nakamoto S, Fukui E, et al. (1992) Chromosomal analysis of first-cleavage mouse eggs fertilized in caffeine-containing medium. J Reprod Dev 38: 107-113
 - 9) Toyoda Y, Yokoyama M and Hoshi T (1971) Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. II. Effects of *in vitro* pre-incubation of spermatozoa on time of sperm penetration of mouse eggs *in vitro*. Jpn J Anim Reprod 16: 152-157 (in Japanese)
 - 10) Yoshizawa M, Zhang W and Muramatsu S (1996) G-band staining of mouse embryo chromosomes by urea treatment. J Mamm Ova Res 14: 44-47
 - 11) Yoshizawa M, Muramatsu T and Okamoto A (1990) An analysis of chromosome abnormalities and sex ratio in 1-cell stage golden hamster embryos. Jpn J Zootech Sci 61: 824-830
 - 12) Maudlin I and Fraser CR (1977) The effect of PMSG dose on the incidence of chromosomal anomalies in mouse embryos fertilized *in vitro*. J Reprod Fert 50: 275-280
 - 13) Takagi N and Sasaki M (1976) Digynic triploidy after superovulation in mice. Nature 264: 278-281
 - 14) Boyers S, Russell JB, Diamond MP, et al. (1987) The effect of polyploidy on embryos cleavage after *in vitro* fertilization in humans. Fert Steril 48: 624-627
 - 15) Austin CR (1965) Unusual and abnormal forms of fertilization. In: Austin C R (Ed), Fertilization. Prentice-Hall International Inc. London, pp 109-123
 - 16) Sathananthan AH, Kola I, Osborne J, et al. (1991) Centrioles in the beginning of human development. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4806-4810
- (受付:1996年 9月13日)
(受理:1996年10月14日)

体外受精により得られたヒトおよびマウス3前核胚の発生と染色体の分析

宇都宮大学農学部,
吉澤 緑

高度医療技術研究所・中央クリニック産婦人科
荒木康久, 本山光博

ヒトの体外受精において、受精率を向上させるため一定濃度以上の精子を媒精せざるを得ないことから、多精子侵入が増加し、3前核受精卵の出現率が体内受精に比べ高くなることが知られている。これら3前核受精卵は、将来3倍体になる危険性を有していることから移植はなされない。

本実験において、ヒトおよびマウス3前核受精卵の発生と染色体の分析を行った。(BALB/c × C57BL/6) F₁雌マウスへPMSGとhCGそれぞれ5 IUを48時間間隔で腹腔内投与し、過排卵を誘起して卵子を得た。培地への2 mMのカフェイン添加および通常の10倍(2 × 10⁶精子/ml)の精子濃度により、3前核受精卵を得た。体外受精後卵子を経時的に観察し、前核数によって受精卵を分類し、その後胚盤胞期までの発生過程を数時間おきに観察し、胚盤胞へ発生したマウス3前核胚を染色体標本とした。2前核と判定された胚では、92個すべての胚が2倍体、3前核と判定された胚では、38個の胚のうち31個は2倍体であり、3倍体胚は7個(18.4%)であった。体外受精後3前核と判定されたヒト体外受精卵を1～2日発生過程を観察した後、染色体標本としたところ、合計16個のうち9個が2倍体、7個が染色体異常の個体で、このうち3倍体は5個であった。ヒト3前核胚における分割球数と染色体構成について一定の関連はみられなかった。

本実験結果では、体外受精で得られた3前核胚のすべてが3倍体になるのではなく、多くの胚が2倍性を示した。
キーワード: 体外受精, ヒト胚, マウス胚, 3前核胚, 3倍体

EFFECTS OF PREDNISOLONE IN REPEATED SUPEROVULATION INDUCTION IN MICE

Kiichi KANAYAMA, Masaaki IZUMI*, Koichi NARIAI and Tuyoshi ENDO

Department of Veterinary Physiology
College of Bioresource Sciences, Nihon University, Kanagawa 252, Japan

Tadashi SANKAI

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

Katsuhiro YABE

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

Hidemi KADA

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

Abstract: In repeated superovulation induction in mice, the authors administered prednisolone to inhibit anti-gonadotrophin antibody production and evaluated the usefulness of the immunosuppressant for preventing the decrease in ovulatory response. Prednisolone was subcutaneously injected simultaneously with PMSG and hCG, and the superovulation induction was repeated at 20-day intervals. In the mice injected with prednisolone, no decrease was observed in the ovulation rate and in the number of ovulated eggs, even at the third superovulation induction. Anti-PMSG and anti-hCG antibody levels were below the detection limit. These findings suggest that the decrease in ovulatory response after repeated superovulation can be prevented by the administration of an immunosuppressant that inhibits the production of anti-gonadotrophin antibodies.

Key words: superovulation, PMSG, hCG, antibody, mouse

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 39 - 43, 1997)

Introduction

It has been reported that repeated superovulation by gonadotrophin (GTH) in the same individuals decreases ovulatory response in domestic^{1,2)} and experimental animals^{3,4)}. This may be caused by a decrease in ovarian follicles that can react with GTH since a large number of follicles is ruptured at a time in superovulation induction. In addition, anti-GTH antibody production is considered to be closely in-

involved in the decrease in ovulatory response^{1,3~6)}. We succeeded in detecting the anti-GTH antibody using indirect hemagglutination reaction in the mouse blood after repeated superovulation induction⁷⁾.

To inhibit the production of anti-GTH antibody, we administered an adrenocortical hormone with immunosuppressive action and evaluated its usefulness for preventing the decrease in ovulatory response in repeated superovulation in mice.

*Present address: Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd., Kanagawa 222, Japan

Materials and Methods

Eight-week-old ddY nulliparous mice were housed in metal cages (eight mice per cage) and continuously given water and solid stock food under artificial illumination (14 light hours: 05:00 a.m. ~ 07:00 p.m.; 10 dark hours). For the superovulation induction, 5 iu of PMSG (Serotropin; Teikoku Hormone Mfg., Co., Tokyo, Japan) and 5 iu of hCG (Gonotropin; Teikoku Hormone Mfg., Co., Tokyo, Japan) were subcutaneously injected at 48-hour intervals. To inhibit the anti-GTH antibody production, 1 mg of prednisolone, an adrenocortical hormone, was subcutaneously injected as immunosuppressant into the neck of each mouse at the time of each GTH injection.

Animals were divided into two groups (control and immunosuppression group) in the present study. In the control group, superovulation induction was

repeated 4 times at 20-day intervals without prednisolone, and changes in the ovulatory response and anti-GTH antibody titer were examined. In the immunosuppression group, prednisolone was injected simultaneously with PMSG and hCG, superovulation induction was repeated at 20-day intervals, and the superovulation induction in this group was repeated 3 times for technical reasons.

To examine the number of ovulated eggs, the mice were killed 20 hours after the final hCG injection. The oviduct was then removed, and the ovulated eggs in the ampulla of the oviduct were counted under a stereoscopic microscope. For assay of anti-GTH antibody titer, serum was obtained after blood collection from the orbital venous plexus some hours before the final GTH injection in each group. The serum was stored at -50°C until assay of the antibody titer. The antibody titer was determined by indirect hemagglutination reaction using the microtiter

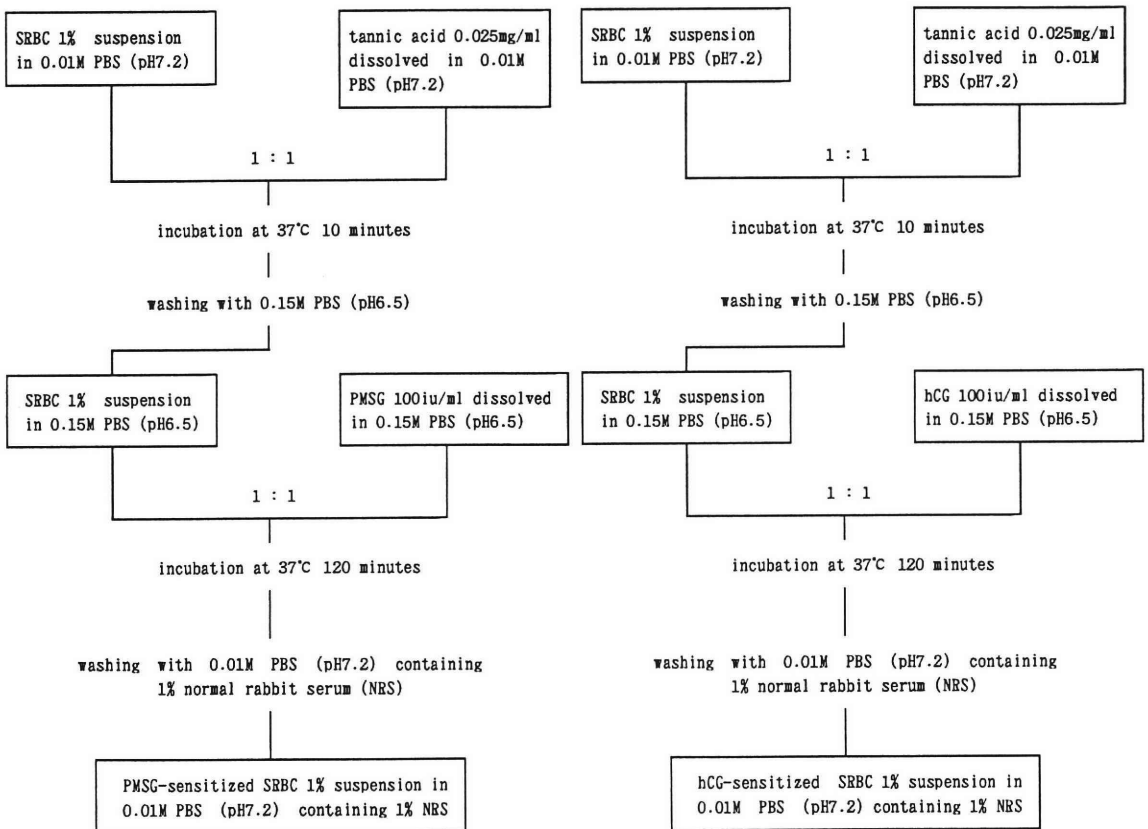


Fig. 1 Preparation for PMSG-sensitized or hCG-sensitized SRBC

method. Sheep erythrocytes (SRBC) sensitized with PMSG or hCG were prepared according to a previously reported method⁷⁾ (Fig. 1). The serum sample for the antibody assay, pooled sera, were obtained by mixing an equal volume of the collected serum from mice in each experimental group. The pooled serum was diluted stepwise with 0.01M PBS (pH 7.2) containing 1 % of normal rabbit serum. For each experimental group, 2 lines of pooled serum were prepared in the microtiter plate. The serum in the first line was mixed with SRBC sensitized with PMSG or hCG, and the second line as control was mixed with SRBC not sensitized with the GTH. The microtiter plate was left at room temperature for SRBC precipitation, and agglutination at the bottom of the tube was observed. The antibody titer was expressed as the logarithm of the maximum dilution of serum showing agglutination.

Number of ovulated eggs and weight of ovaries were analyzed by analysis of variance followed by Duncan's multiple-range test, and differences were considered significant when p -values were less than 0.05 ($p < 0.05$).

Results and Discussion

The results in the control mice are shown in Table 1. Ovulation was induced in the first superovulation

in all 15 mice. The mean number of ovulated eggs was 31.1. In the second superovulation, ovulation was induced in 11 of the 15 mice, showing a decrease in the ovulation positive rate. However, the mean number of ovulated eggs was 31.5, similar to that of the first superovulation induction. The third superovulation treatment did not induce ovulation in any of the 7 mice. In this experimental group, anti-hCG antibody was first detected. In the fourth superovulation treatment, 3 of the 7 mice ovulated, and the mean number of ovulated eggs was 9.3. In this group, anti-PMSG antibody was also first detected. The anti-hCG antibody titer was higher than that in the third superovulation induction. The weight of the ovaries reached a peak in the second superovulation and decreased with further superovulation induction.

Table 2 shows the results of the immunosuppression group that received prednisolone simultaneously with PMSG and hCG. Even in the third superovulation induction, there was no decrease in the ovulation rate and in the mean number of ovulated eggs. The anti-PMSG and anti-hCG antibody titers were also below the detection limit. In the immunosuppression group, the weight of the ovaries slightly increased with repetition of superovulation induction.

Table 1 Ovulatory response and the anti-gonadotrophin antibody titer in the control mice

Times of treatment	No. of mice examined	No. of mice ovulated	% ovulated	Number of eggs/mice ovulated (Mean \pm SD)	Weight of ovaries (Mean \pm SD)	Anti-PMSG titer	Anti-hCG titer
1	15	15	100	31.1 \pm 10.3 ^a	22.0 \pm 5.0 ^a	1 >	1 >
2	15	11	73	31.5 \pm 11.2 ^a	34.0 \pm 7.0 ^b	1 >	1 >
3	7	0	0	—	20.0 \pm 9.0 ^a	1 >	64
4	7	3	43	9.3 \pm 3.5 ^b	14.5 \pm 2.3 ^c	128	256

Values with different superscript in each column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 2 Ovulatory response and the anti-gonadotrophin antibody titer in the immunosuppression mice

Times of treatment	No. of mice examined	No. of mice ovulated	% ovulated	Number of eggs/mice ovulated (Mean \pm SD)	Weight of ovaries (Mean \pm SD)	Anti-PMSG titer	Anti-hCG titer
1	15	15	100	24.1 \pm 11.3 ^a	18.0 \pm 2.9 ^a	1 >	1 >
2	15	14	93	16.9 \pm 6.9 ^b	19.5 \pm 4.8 ^a	1 >	1 >
3	15	15	100	22.3 \pm 8.6 ^{a,b}	25.3 \pm 3.9 ^b	1 >	1 >

Values with different superscript in each column are significantly different ($P < 0.05$).

Ishijima et al.^{8~10)} studied repeated superovulation in mice and suggested the presence of anti-GTH antibodies, without detecting the antibody. Improvement in the methodology of the detection sensitivity for the anti-GTH antibody was needed⁶⁾.

Indirect hemagglutination reaction used in this study may markedly improve the detection sensitivity for anti-GTH antibodies. Anti-hCG antibody was first detected in the third superovulation induction and anti-PMSG antibody in the fourth induction. With detection of anti-hCG and anti-PMSG antibodies, the ovulation response (ovulation rate and the mean number of ovulated eggs) markedly decreased in the control mice. On the other hand, anti-PMSG and anti-hCG antibodies were not detected by the injection of prednisolone simultaneously with PMSG and hCG. In addition, prednisolone almost completely inhibited the decrease in ovulation rate and the mean number of ovulated eggs even in the third superovulation induction. These results strongly support the close association of the anti-GTH antibody production with a decrease in the ovulatory response after repeated superovulation induction.

Thus, in this study, inhibition of the anti-GTH antibody production by an immunosuppressant prevented a decrease in the ovulatory response until the third superovulation induction in mice.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. T. Matsuda and Dr. H. Koie for their valuable help and advice.

References

- 1) Jainudeen NR, Hafez ESE, Gollnick PD, et al, (1966) Antigonadotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare

- serum injections. *Am J Vet Res* 27: 669-675
- 2) Willet EL, Buckner PJ, McShan WH (1953) Refractoriness of cow repeatedly superovulated with gonadotrophins. *J Dairy Sci* 36: 1083-1088
- 3) Lin TP, Bailey DW (1965) Difference between two inbred strains of mice in ovulatory response to repeated administration of gonadotrophins. *J Reprod Fertil* 10: 253-259
- 4) Maurer RP, Hunt WL, Foote RH (1968) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits. *J Reprod Fertil* 15: 93-102
- 5) Sakuma Y, Ishijima Y, Ishida K (1964) Repeated superovulation test by FSH on the same rabbits with special reference to antihormone production. *Jpn J Fertil Steril* 9: 1-4
- 6) Yasuda Y, Takase M, Hosaka Y (1961) Experimental studies on antigonadotrophin formation followed on repeat injection with gonadotrophin. II. Experimental studies on mice. *Jpn J Animal Reprod* 7: 21-24
- 7) Endo T, Ito N, Kanayama K, et al. (1987) The ovulation response and changes in antigonadotropic hormone antibody levels associated with repeated inducement of superovulation in rabbits and mice. *Jpn J Fertil Steril* 32: 643-648
- 8) Ishijima Y, Sakuma Y (1977) Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in mice. *Jpn J Fertil Steril* 22: 245-250
- 9) Ishijima Y, Anabuki K, Hirabayashi T, et al. (1979) Biological analysis of anti-hormone activity in the serum of mice following repeated superovulation-treatment. *Jpn J Fertil Steril* 24: 1-4
- 10) Ishijima Y, Komatsu H, Ito M, et al. (1981) Effect of repeated preinjection of PMS or HCG on superovulation in mice. *Jpn J Fertil Steril* 26: 263-266

(受付：1996年9月19日)

(受理：1996年10月14日)

プレドニゾロン投与による反復過排卵誘起マウスの排卵反応低下の阻止

日本大学生物資源科学部獣医学科生理学教室
金山喜一, 泉 政明*, 成相孝一, 遠藤 克

国立予防衛生研究所筑波医学実験用霊長類センター
山海 直

埼玉医科大学法医学教室
矢部勝弘

東京農業大学短期大学部生物生産技術学科畜産学教室
加田日出美

マウスの反復過排卵誘起において、抗性腺刺激ホルモン抗体の産生を抑える目的で用いたプレドニゾロンが排卵反応の低下を阻止できるか検討した。プレドニゾロンはPMSG, hCGと同時にマウスに皮下注射する方法で、20日間隔で過排卵誘起を反復した。

その結果、プレドニゾロン投与区では対照区と異なり、過排卵誘起の3回目の反復においても排卵陽性率・排卵数の低下は認められなかった。また、抗PMSG抗体と抗hCG抗体も検出感度以下であった。

以上のように、免疫抑制剤を用いることによって、反復過排卵誘起における排卵反応の低下を阻止できることを明らかにした。

キーワード: 過排卵誘起処理, PMSG, hCG, 抗体, マウス

*現所属: 明治製菓(株)薬品総合研究所

DETECTION OF ANEUPLOIDY RATE IN HUMAN SPERMATOZOA SELECTED BY SWIM-UP USING FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION (FISH)

He HU, Norio MIHARU, Osamu SAMURA and Koso OHAMA

Department of Obstetrics and Gynecology
Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, 734, Japan

Abstract: Four normal semen samples were analyzed to examine the effect of swim-up method on aneuploidy rate in sperm using fluorescence in situ hybridization (FISH). Highly motile and poorly motile sperm populations were selected by swim-up method, and motility rate was assessed according to standard procedure (WHO, 1992). Dual color fluorescence in situ hybridization was performed using alpha-satellite DNA probes; D17Z1 (biotin labelled) and D18Z1 (digoxigenin labelled). A total of 36,512 sperm were analyzed and the hybridization efficiency was 99.9%. The average frequencies of disomy for chromosomes 17 and 18 were 0.13% and 0.09% in the highly motile population, and 0.16% and 0.11% in the poorly motile sperm population. The diploidy rate in the highly motile population was 0.09%, and 0.17% in the poorly motile sperm. There was no significant difference observed between highly motile and poorly motile populations for both disomic and diploid sperm.

This data indicate that swim-up method may offer advantages in terms of sperm motility, morphology and maturity, but does not imply for chromosomal normal sperm selection. FISH is a simple and accurate method in the study of sperm aneuploidy.

Key words: sperm, chromosome, swim-up, motility, fluorescence in situ hybridization (FISH)

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 42 (1), 44 - 49, 1997)

Introduction

In vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) has been used for the treatment of male infertility. It is known that semen quality affects the success rates of IVF outcomes. One of the most important predictors of sperm fertilizing ability is high motility. The swim-up method has been developed to provide highly motile sperm populations, and has been widely used in many clinical programs. Many studies reported that selection of motile sperm by swim-up can also improve the quality of recovered sperm with respect to morphology, acrosome integrity, and velocity¹⁻³⁾. Colleu-D et al.⁴⁾ reported that nuclear maturity level is also improved by the swim-up technique. Some studies have shown that the prevalence of sperm with normal nuclear chromatin assessed by acridine orange (AO) stain

and aniline blue methods were significantly increased by selection of motile sperm by swim-up^{5,6)}. Assessment of DNA normality of motile sperm may aid prediction of fertility rates. Only a few studies have been done on the chromosome constitution of highly motile human sperm selected by swim-up compared with unselected populations. Whether the selection of sperm alters the frequency of chromosomally normal sperm remains to be determined. FISH is promising applications for investigating an extremely large number of sperm. In the present study, we examined the effect of swim-up method on aneuploidy rates of chromosomes 17 and 18 using this technique. Alpha satellite DNA probes specific for chromosomes 17 and 18 were simultaneously used to identify chromosomes in selected sperm populations. A total of 36,512 sperm nuclei from both upper and lower layers were studied. We found no

difference in the frequencies of disomic and diploid sperm between the two layers. Our study suggests that sperm selected by the swim-up procedure has the same genetic risk as unselected sperm.

Materials and Methods

Semen samples and swim-up procedure

Single semen samples were obtained from four normal healthy donors and the ejaculates allowed to liquefy. Sperm concentration, motility rate and volume were then assessed using a Makler counting chamber according to standard procedure (WHO 1992)⁷⁾ (Table 1). Highly motile sperm were then selected by the swim-up technique and washed with modified Biggers, Whitten and Whittingham (BWW) medium contain 0.3% human serum albumin (Sigma). After centrifuging at 300g for 5 min, 0.5 ml of pellet was carefully expelled into the bottom of a tube containing 2 ml BWW medium then incubated at 37 °C for 60 min. After incubation, 0.25 ml of the upper layer (highly motile sperm population) was removed without disturbing the medium and transferred to a tube. Then 1.0ml of middle layer was extracted, the bottom semen layer (poorly motile sperm population) being collected and transferred to a tube. The motility rates of both populations were analyzed as described above.

Slide preparation

Slides were prepared and pretreated as follows. The upper and lower layers were washed with balanced Hanks solution, centrifuged at 300g for 8 min then fixed with fixatives (ethanol: acetic acid = 3 : 1) for 20 min at -20 °C. After washing twice with fresh fixatives, the sperm pellets were dropped onto a clean slide, air dried, then stored at -80 °C until used. Pretreatment of sperm was done before hy-

bridization. The prepared slides were treated with 0.6 ~ 1.6% dithiothreitol solution for 3 ~ 5 min at 37 °C, rinsed with water and air dried.

Fluorescence in situ hybridization

Chromosome specific alpha-satellite DNA probes, D17Z1 (biotin labelled) and D18Z1 (digoxigenin labelled) were used for chromosomes 17 and 18 detection. Hybridization and detection were essentially performed according to the manufacture's instructions with minor modification of the hybridization washing steps for detection. After 60 min incubation at 37 °C with fluorescence-labelled avidin (FITC), the signal was amplified with additional anti-avidin antibody and FITC (fluorescein isothiocyanate). The nuclei were counter stained with 4'-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma).

Fluorescence microscopy and analysis

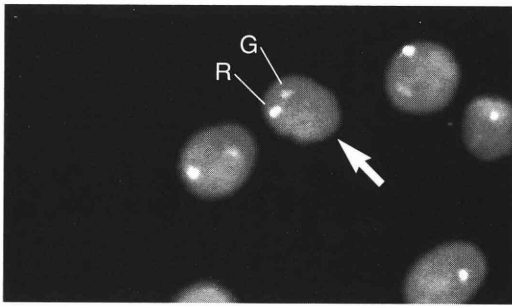
Hybridization signals on sperm nuclei were examined under a fluorescence microscopy (Nikon Optiphot 2) using triple-band-pass filter (D-F-T, Nikon). Sperm nuclei were scored as having two signals, when there were two distinct signals separated by at least the diameter of the chromatin of one signal. Sperm nuclei with one red and green signal were scored as normal (Fig. 1a). Sperm nuclei with two red and one green signal were scored as disomy for chromosome 18 (Fig. 1b). Sperm nuclei with two green and one red were scored as disomy for chromosome 17. Sperm nuclei with two green and two red signals were scored as diploid (Fig. 1c). Each slide was scored blindly by two persons. At least 6,000 sperm were scored for each chromosome from each sample. Very large round cells without clear tails were considered as somatic cells. Statistical analysis (T-test) was used to compare disomy and diploidy rates between the two populations.

Table 1 Semen parameters for the four donors

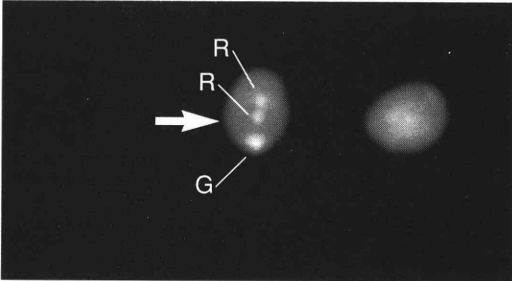
Donor	Concentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	Motility (%)	Volume (ml)	Motility (%) (after swim-up)	
				(A)	(B)
1	110	89	2.0	95	80
2	100	69	1.8	90	63
3	54	69	2.6	85	63
4	99	62	2.2	91	36

(A) Upper layer (highly motile sperm)

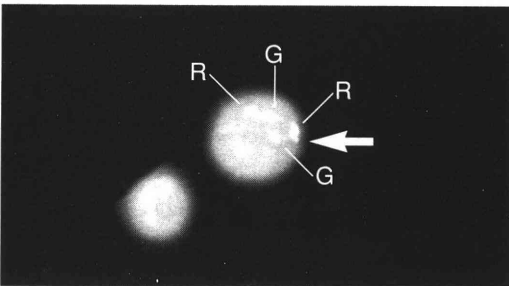
(B) Bottom layer (poorly motile sperm)



a) Normal sperm with one red and one green signals (arrowed).



b) A disomy 18 sperm with two red and one green signals (arrowed).



c) A diploid sperm with two red and two green signals (arrowed).

Fig. 1 Fluorescence in situ hybridization of human sperm. R indicates red signal for chromosome 18 and G indicates green signal for chromosome 17.

Results

Motility rates in both highly motile and poorly motile populations are summarized in Table 1. A total of 36,512 sperm were scored, of which 36,475 (99.9%) exhibited very clear double labelling signals. There was no difference observed in hybridization efficiency between the two sperm populations.

Disomy rates and diploidy rates and counts for each chromosome are summarized in Table 2. The mean frequency of disomic sperm was 0.13% (range 0.08% ~ 0.18%) in highly motile sperm, and 0.16% (range 0.08% ~ 0.28%) in poorly motile sperm for chromosome 17. For chromosome 18 this was 0.09% (range 0.05% ~ 0.15%) in highly motile sperm and 0.11% (range 0.07% ~ 0.16%) in poorly motile sperm. There was no significant difference in disomy rates between highly motile and poorly motile sperm for chromosome 17 and 18 ($P > 0.1$).

The diploidy rate was 0.09% (range 0.06% ~ 0.10%) in highly motile sperm and 0.17% (range 0.12% ~ 0.23%) in poorly motile sperm. There was no statistical difference between these two populations ($P > 0.1$).

Discussion

One of the most important predictors of sperm fertilizing ability is high motility. Sperm must be motile to penetrate cervical mucus and to migrate through the female genital tract to the site of fertilization. Sperm need to be motile to penetrate the cumulus and the zona pellucida of the oocyte. Studies of the influence of sperm characteristics on the success rate of fertilization show that sperm motility usually de-

Table 2 Summary of aneuploidy rates for four donors after swim-up

Donor	Disomy rate (%)				Diploidy rate (%)	
	chromosome 17		chromosome 18		(A)	(B)
	(A)	(B)	(A)	(B)		
1	0.12	0.15	0.15	0.07	0.10	0.13
2	0.08	0.08	0.05	0.13	0.06	0.18
3	0.12	0.12	0.05	0.10	0.10	0.12
4	0.18	0.28	0.11	0.16	0.10	0.23
Total	0.13	0.16	0.09	0.11	0.09	0.17

(A) Upper layer (highly motile sperm)

(B) Bottom layer (poorly motile sperm)

defines the limits of achieving IVF. If semen samples with less than 20% motility rate are used, fertilization dose not occur⁸⁾. Even though there have been developments in IVF technique, success rates are still low. Chromosomal abnormality might be one of the reasons for this. An interesting unanswered question is whether highly motile sperm has better genetic characteristics than poorly motile sperm.

Acridine orange stain has been used to distinguish between sperm containing normal (double stranded DNA) and abnormal (denatured, single stranded DNA) nuclear chromatin. Using this method some studies found that selection of motile sperm by swim-up can provide better morphology, increased normal nuclear chromatin and mature nuclei. However, this method can not fully reflect true genetic quality. To date, there are few reports of aneuploidy rates in sperm selected by the swim-up method. Using mouse embryos fertilized in vitro, Estop et al.⁹⁾ found no difference in the frequency of chromosomal abnormalities between selected motile sperm and unselected sperm. In human sperm, Brandriff et al.¹⁰⁾ analyzed 334 selected sperm by swim-up and 296 unselected sperm from 5 donors. They utilized zona free hamster egg penetration system to study the frequency of chromosomal abnormalities of sperm. They were unable to find any statistical difference in the frequency of chromosomal abnormalities between the two populations. Benet et al.¹¹⁾ performed similar study, analyzing 505 motile sperm from three donors by zona-free hamster penetration system. They also were unable to detect any significant difference in the frequency of chromosomal aberrations between the motile sperm they studied and the sperm in neat semen previously reported. Two possible reasons that no differences were found by these workers are a) the small number of sperm studied and, b) they compared selected (highly motile) and unselected (neat semen) sperm, the latter which also includes motile sperm.

The zona-free hamster egg penetration system of analyzing human sperm chromosome constitution permits analysis of both numerical and structural abnormalities. However, the technique is difficult, labor intensive and expensive, and only a limited number of cells can be studied at one time. In addition, as

only sperm that can penetrate hamster-egg can be studied by this method, poorly motile and immotile sperm might not be analyzable.

The recent introduction of FISH proves an efficient approach to aneuploidy screening in sperm^{12,13)}. Very large numbers of sperm can be scored quickly, and the availability of chromosome specific probes makes it possible to evaluate aneuploidy levels for specific chromosomes in all sperm including those which are inanimate. As alpha-satellite probes, D17Z1 and D18Z1, can produce clear signals, we utilized these probes in the present study. We analyzed 36,512 sperm from four donors in which hybridization efficiency is 99.9%. This indicates that our technique for sperm decondensation consistently allows access of the probes to the sperm chromatin. We compared highly motile and poorly motile sperm populations which included dead sperm. No significant difference was observed in the frequency of either disomy or diploidy between the two populations. This is consistent with the results of previous studies using hamster egg penetration system. Han et al.¹⁴⁾ performed dual-color FISH using X and Y specific probes and compared the frequencies of disomy and diploidy in selected sperm with the sperm of neat semen. They found no difference in the frequency of XX, XY, YY sperm between two populations of normal head sized sperm, but did find significant differences in large head sized sperm. Even using dual-color FISH, they were unable to differentiate between XX, XY, YY disomy and XX, XY, YY diploidy. Therefore, whether disomy and diploidy rates were different in the two populations is uncertain. Our data indicate that any differences in the disomy rate occur between highly motile and poorly motile sperm, and that aneuploidy is not a major contributor to poor sperm motility. Although no significant differences were observed, diploid sperm rate in selected populations was relatively higher than in the poorly motile populations. It may be that poorly motile populations include immature germ cells, and leucocytes. One ejaculate contains an enormous number of sperm and there may be chromosome-specific disomy rates among chromosomes¹⁵⁾. To estimate the true genetic risk in highly motile sperm population, large number of sperm and

all chromosomes need to be studied. Development of technique to select sperm with normal chromosomes may improve the results of IVF and reduce the genetic risk.

Acknowledgments

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan (No. 07671788).

References

- 1) Liu DY, Baker HW (1992) Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertil Steril* 58: 465-483
- 2) Andolz P, Bielsa MA, Genesca A, et al. (1987) Improvement of sperm quality in abnormal semen samples using a modified swim-up procedure. *Hum Reprod* 2: 99-101
- 3) Le Lannou D, Blanchard Y (1988) Nuclear maturity and morphology of human spermatozoa selected by percoll density gradient centrifugation or swim-up procedure. *J Reprod Fertil* 84: 551-556
- 4) Collet D, Lescoat D, Gouranton J (1996) Nuclear maturity of human spermatozoa selected by swim-up or by Percoll gradient centrifugation procedure. *Fertil Steril* 65: 160-164
- 5) Tejada RI, Mitchell JC, Norman A, et al. (1984) A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42: 87-91
- 6) Dadoune JP, Mayaux MJ, Guihard Moscato ML (1988) Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia* 20: 211-217
- 7) World Health Organization WHO (1992) Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, pp123-138
- 8) Mahadevan MM, Trounson AO (1984) The influence of seminal characteristics on the success rate of human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 42: 400-405
- 9) Estop A, Catala V, Santalo J (1990) Chromosome constitution of highly motile mouse sperm. *Mol Reprod Dev* 27: 168-172
- 10) Brandriff BF, Gordon LA, Heandel S, et al. (1986) The chromosomal constitution of human sperm selected for motility. *Fertil Steril* 46: 686-690
- 11) Benet J, Genesca A, Navarro J, et al. (1992) Cytogenetic studies in motile sperm from normal men. *Hum Genet* 89: 176-180
- 12) Wyrobek AJ, Robbins WA, Mehraein Y, et al. (1990) Fluorescence in situ hybridization to Y chromosome in decondensed human sperm nuclei. *Mol Reprod Dev* 27: 200-208
- 13) Guttenbach M, Schmid M (1991) Non-isotopic detection of chromosome 1 in human meiosis and demonstration of disomic sperm nuclei. *Hum Genet* 87: 261-265
- 14) Han TL, Flaherty S, Ford JH, et al. (1993) Detection of X-bearing and Y-bearing spermatozoa after motile sperm isolation by swim-up. *Fertil Steril* 60: 1046-1051
- 15) Abruzzo MA and Hassold TJ (1995) Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen* 25 Suppl 26: 38-47

(受付：1996年9月27日)

(受理：1996年10月14日)

Swim-upで分離した運動良好精子の数的染色体異常率に関する検討
—fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて—

広島大学医学部産婦人科学教室
呼 和, 三春範夫, 佐村 修, 大濱紘三

Swim-up法は運動良好精子を分離する方法として広く利用されているが本法によって分離される精子が細胞遺伝学的にも良好であるかを確かめるためにfluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて数的染色体異常の頻度を分析した。

4人の健康男性から精液を採取し、そのパラメーター(精子の濃度、運動率、精子量)検査した後、1時間swim-upし上層の運動良好精子(A群)と下層の(B群)を回収し、両群の精子について運動率を検査した。A群精子はB群精子より良好な運動率を示した。FISH法はD17Z1 (biotin labelled) とD18Z1 (digoxigenin labelled) 2種類のDNAプローブを用いたdual-color法で行い、総数36,512個の精子のうち36,475個(99.9%)で判断可能なスポットが得られた。その結果、17番、18番のdisomy精子の頻度はA群では0.13%と0.09%、B群では0.16%と0.11%で両群間にまったく差異を認めず、一方、diploid精子の頻度はA群で0.09%、B群で0.17%と、A群で低い傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

以上より、swim-up法は運動良好精子の分離には有効であるがdiploid精子やdisomy精子の分離に有効な方法ではないことが示唆された。FISH法は多数の精子について数的染色体異常の検討に有用であることが確認された。
キーワード：精子, 染色体, swim-up, 運動率, fluorescence in situ hybridization (FISH)

習慣流産(反復流産を含む)に対する 免疫学的評価と免疫療法の有効性について

The Clinical Significance of Blocking Effect in Patients with Recurrent Spontaneous Abortion

富山県立中央病院産婦人科

中野 隆 Takashi NAKANO	中島 正雄 Masao NAKASHIMA	石川 博士 Hiroshi ISHIKAWA
鉛谷 由佳 Yuka AMETANI	大田 悟 Satoru OHTA	大口 昭英 Akihide OHKUCHI
佐竹 紳一郎 Shin-ichirou SATAKE	小嶋 康夫 Yasuo KOJIMA	舟本 寛 Hiroshi FUNAMOTO
	館野 政也 Masaya TATENO	

Department of Obstetrics and Gynecology
Toyama Prefectural Central Hospital, Toyama 930, Japan

1990年12月より現在までに富山県立中央病院産婦人科において、反復・習慣流産患者121例に対して系統的に原因精査を行った。その結果、HLAの一致性はDR座において、Koyamaらの一般集団の基礎一致性率と比較して有意に高率であった(49.6対35.1%)($p < 0.01$)が、A, B, C座では差がみられなかった。MLC抑制テストで22%以上のBlocking Effect(以下BE)のみられなかったカップルを夫婦間免疫不適合と診断すると、71例(68.9%)に認められた。そのうち68例に夫リンパ球の輸注による免疫療法を施行した。47例に70回の妊娠が成立し、34人が分娩、18妊娠が継続中であり、妊娠継続率は74.3%(52/70)であった。免疫療法前後でのBEの変化をみると、74.1%(44/58)でBE(+)となった。免疫療法でBE(+)の妊娠継続率は76.6%(36/47)、BE(-)では、64.3%(9/14)であった。

HLA-DRの一致があり、免疫療法後にBE(+)の場合の妊娠継続率は93.3%(14/15)であり、BE(-)の場合は、60%(6/10)であった($p = 0.12$)。

スクリーニングでBE(+)のため、免疫療法の対象とならなかった群での妊娠継続率は、17/19(89.5%)であり、免疫療法の適応にあたっては、BEの有無による選択が適切と考えられた。

キーワード：習慣流産、免疫療法、HLA-DR、遮断抗体

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 50 - 58, 1997)

緒言

従来は習慣流産の半数以上は原因不明とされ、治療の対象とならなかったものが、夫婦間免疫不適合の概念が登場し、免疫療法の優れた報告^{4,5)}がみられるようになった。しかし、この免疫療法の効果について、randomized controlled trialを施行し、対象群と

の間に有意差を認めないとの批判的意見^{14,15)}もみられるようになった。

現在免疫療法の対象となる患者の基準は施設間でまちまちであり、また免疫療法の実施方法も統一されていないのが現状である。

そこで、現在我々が実施している免疫療法の治療成績について検討し、適応の正当性について考察し

表1 患者背景121例

年齢	29.6 ± 4.4 歳
原発性or続発性	
原発性	101 (83.5%)
続発性	20 (16.5%)
既往流産回数	
2 回	69 (57%)
3 回	38 (31.4%)
4 回	9 (7.4%)
5 回	4 (3.3%)
6 回	1 (0.8%)

た。なお解析にはSPSSを用い、有意差検定には、 χ^2 検定ならびに1群が5以下である場合は、Fisher's exact testを行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意とみなした。

対 象

平成2年12月より現在までに富山県立中央病院産婦人科にて、系統的に検査した習慣流産(反復流産を含む)患者は121例あった。患者背景を表1に示す。平均年齢は29.6歳であった。既往に22週以降の分娩のないものを原発性、あるものを続発性とするとり、原発性は101例(83.5%)、続発性は20例(16.5%)であった。また既往流産回数は、2回; 69例(57%)、3回; 38例(31.4%)、4回; 9例(7.4%)、5回; 4例(3.3%)、6回; 1例(0.8%)であった。

方 法

検査内容

当院における検査の一覧を表2に示す。

表2 習慣流産指示項目

1. 基礎体温
2. HBs抗原, ガラス板法, TPHA, HCV抗体
3. 血液型 (ABO, RhD) [夫婦共]
4. 間接クーモス
5. 空腹時血糖
6. T3, T4, TSH
7. 抗核抗体, 抗DNA抗体, 抗SS-A抗体
8. APTT, PT, LAC, 抗カルジオリピン抗体 (IgM, IgG) β 2GP-I依存性抗カルジオリピン抗体
9. クラミジアザイム
10. 経膈超音波断層法
11. プロゲステロン, プロラクチン
12. HSG
13. 夫婦の染色体
14. 夫婦のHLA検査 (A, B, C, DR), MLC抑制テスト
15. HYS-F

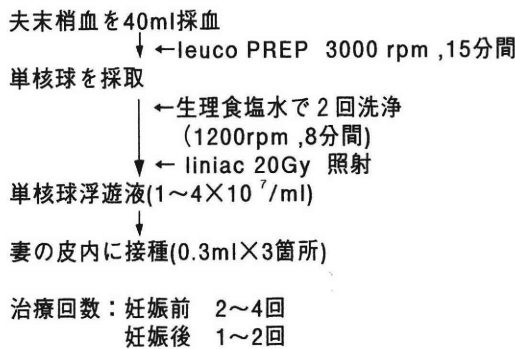
MLC抑制テスト

妻単核球を responder として、夫単核球を stimulator とした。one-way MLCに、10%、20%の妻血清を添加し下記の式にて*抑制効果 (BE: Blocking Effect) を求めた。なお、コントロール血清として、AB型血清を用いた。[*抑制効果 = (1 - 妻血清加培養における cpm / コントロール血清加培養系における cpm) × 100]

夫婦間免疫不適合の診断は、10%、20%の濃度においても抑制効果 (22%以上)^{7,19)}のみられないものとした。そしてHLAの一致率も参考とした。HLA, MLC抑制テストは、SRL社に依頼して検査した。

免疫療法の実施方法 (図1)

免疫療法は夫婦間免疫不適合の診断のついた症例



効果判定:
治療後にMLC抑制テストを施行し、抑制効果を確認する。

図1 当院における免疫療法の実施手技

を対象とし、インフォームドコンセントの得られた68症例に実施した。

当院においては、夫リンパ球を免疫原として用いており、GVHDを防止する目的で、必ずリニアック照射20Gyを加えている。

また免疫療法の回数は、妊娠前に2～4回、妊娠後早期に1～2回追加している。

そして免疫療法の効果判定には、妊娠前の免疫療法終了後2週間後に、MLC抑制テストを施行している。

結果

1. MLC抑制テスト(図2)

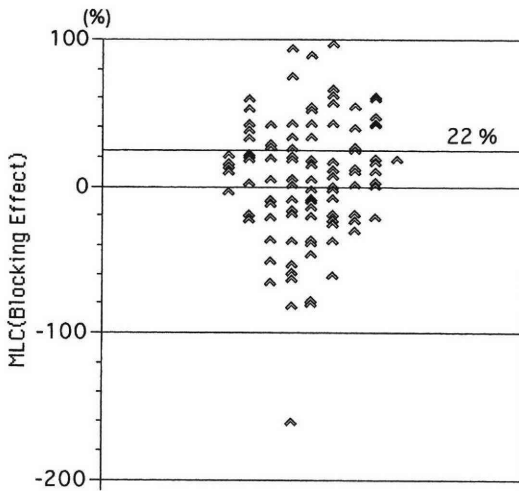


図2 習慣流産患者におけるMLC抑制テスト

夫婦間免疫不適合は71例(68.9%)にみられた。また、他の因子と複合して原因となっているものは71例中47例(66.2%)であり、一方単独で原因となっているものは71例24例(33.8%)であった。

抑制効果は、-160%から98%の範囲であった。

2. HLA各座の一致率(図3)

HLAクラスI (A, B, C), クラスII (DR) 各座で、少なくとも1つ以上の共有する抗原がみられる場合を、一致性有りとした。

習慣流産患者におけるHLA各座の一致率はそれぞれHLA-A; 65%, HLA-B; 25.6%, HLA-C; 32.5%, HLA-DR; 49.6%であった。この成績をKoyamaらが日本人約1500人のHLAタイピングを施行し、無作為のHLA一致率を計算した⁹⁾結果を基礎一致率として、我々の成績を比較検討した。その結果、HLA-A, -B, -Cの各座には有意差はみられなかったが、HLA-DRにおいて明らかな有意差が認められた(p<0.01)。つぎにDR座において共有した抗原を検討した。2つ一致したカップルは5組にみられ、DR4とDR9が2組、DR4とDR6が1組、DR2とDR4が1組、DR4とDR8が1組であり、いずれのカップルもDR4の一致を認めた。つぎにDR座が1つ一致したカップルは54組であり、DR4が19組、DR2が16組、DR6が7組、DR9が6組、DR8が3組、DR12(5)が2組、DR11(5)が1組であった。

3. MLC抑制テストとHLAの一致率(表3)

MLC抑制テストにおける抑制効果の有無とHLAの一致率について検討した。HLA-A, -B, -Cでは関連はみられなかった。

HLA-DRにおいては、一致をみない夫婦でMLC抑

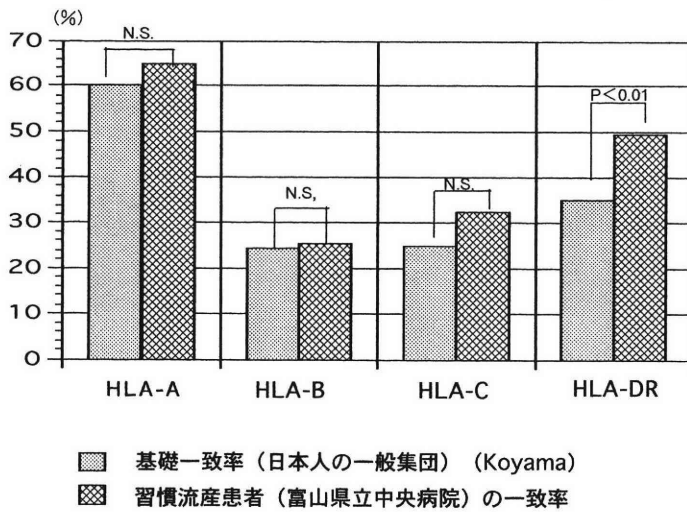


図3 習慣流産患者におけるHLAの各座の一致率

表3 MLCの抑制効果とHLA-DRの一致との関連

HLA-DRの一致	抑制効果有り	抑制効果無し	計
有り	10	38	48
無し	21	33	54
計	31	71	102

P < 0.05

表4 免疫療法後の妊娠の転帰

	妊娠継続	流産	妊娠継続率
原発性不育症	46	14	76.7%
続発性不育症	6	3	66.7%
計	52	17	75.4%

制テストがより高率に陽性であった(38.9%対20.8%) (p < 0.05).

4. 免疫療法後の妊娠の転帰 (表4)

原発性不育症57例に、免疫療法が施行された。免疫療法後41例に61回の妊娠が成立した。30人が分娩を終了し、16妊娠が継続中である。なお、現在妊娠中の場合は、妊娠12週以降の症例を妊娠継続症例とした。流産は11例に計14妊娠でみられたが、いずれも初期流産であった。原発性不育症に対する免疫療法による妊娠継続率は、60妊娠中46妊娠(76.7%)であった。

一方、続発性不育症では11例に免疫療法が施行され、6例に9回の妊娠が成立した。4人が分娩を終了し、2妊娠が継続中である。流産は2例に3回みられ、いずれも初期流産であった。続発性不育症に対する免疫療法による妊娠継続率は、9妊娠中6妊娠(66.7%)であった。以上より全体としての妊娠継続率は、69妊娠中52妊娠(75.4%)であった。

5. 既往流産回数と免疫療法の成績との関連 (表5, 表6)

原発性不育症においては、妊娠継続率は、既往流産回数2回では、87%(20/23)、3回では78.6%(22/28)、4回では57.1%(4/7)、5回では0%(0/2)であった。一方、続発性不育症では既往流産回数2回では100%(4/4)、3回では40%(2/5)であった。

6. 免疫療法後のMLC抑制テストの変化

免疫療法前後で、MLC抑制テストを施行し得た58症例中44例(74.1%)で、抑制効果を認めるようになった。

7. 免疫療法後の抑制効果の有無と妊娠の転帰について

免疫療法に抑制効果のあった47妊娠の内36妊娠(76.6%)が継続し、抑制効果のみられなかった14妊娠

表5 既往流産回数と免疫療法の成績との関連 (原発性不育症)

既往流産回数	妊娠継続	流産	妊娠継続率
2回	20	3	87%
3回	22	6	78.6%
4回	4	3	57.1%
5回	0	2	0%
計	46	14	76.7%

表6 既往流産回数と免疫療法の成績との関連 (続発性不育症)

既往流産回数	妊娠継続	流産	妊娠継続率
2回	4	0	100%
3回	2	3	40%
計	6	3	66.7%

表7 HLA-DRの一致性のあるカップルの免疫療法の治療成績

MLC抑制テスト	妊娠継続	流産	計
抑制効果(+)	14	1	15
抑制効果(-)	6	4	10
計	20	5	25

P = 0.12

の内9妊娠(64.3%)が継続した。抑制効果のみられたカップルで妊娠継続率は高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。

8. HLA-DRの一致性のあるカップルの免疫療法の治療成績 (表7)

HLA-DRが1つ以上一致した31例について検討した。免疫療法後のMLC抑制テストの陽性群(19例)、陰性群(12例)に分けて検討すると、陽性群では妊娠継続は14妊娠、流産は1妊娠であり、妊娠継続率は93.3%であった。一方、陰性群では妊娠継続は6妊娠、流産は4妊娠であり、妊娠継続率は60%であった。統計的には有意差はないものの、今後症例が増えることにより有意差をみだせる可能性があるものと思われる(p=0.12)。

9. LACの有無と免疫療法の成績との関連 (図4)

LACは、当院で検索し得た習慣流産患者106例中14例(13.2%)で陽性であった。

LAC陽性の奨励には、全例にプレドニゾロン + アスピリンあるいは柴苓湯が投与されていた。LAC陽性の6例に夫婦間免疫不適合と診断し、免疫療法を施行した。5例に計15回の妊娠が成立した。5人は分娩を終了し2妊娠は継続中である。8妊娠が流産し

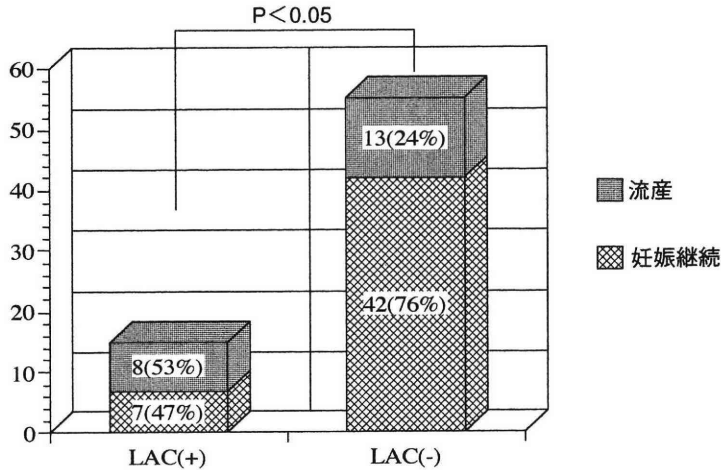


図4 LACの有無と免疫療法の治療成績との関連

た。すなわちLAC陽性の免疫療法の妊娠継続率は46.7%(7/15)であった。一方、LAC陰性の41例に免疫療法後55回妊娠が成立をした。29人は分娩を終了し、14妊娠が継続中である。流産は12妊娠であり、妊娠継続率は78.2%(43/55)であった。LAC陽性群と陰性群における免疫療法の治療成績を比較検討すると両群間に有意差を認めた(p<0.05)。

10. 免疫療法後に出生した新生児 (表8, 表9)

現在までに出生した34人の新生児について検討した。8人(23.5%)が低出生体重児であった。なお、SFD

は2人(5.9%)であった。また、早産は5人(14.7%)であった。外表奇形は1人も認められず、現在の所順調に発育している。

考 察

1970年代に腎移植の前に輸血の既往があると、移植された腎の生着が有意に延長することが報告された²⁾。また1980年代に入り、移植前のドナーからの輸血が、腎移植の生着率を向上させることがみだされた³⁾。

このメカニズムは、特異的suppressor cellおよびリンパ球混合培養におけるレシピエントの反応を抑制する免疫グロブリン(IgG)やレシピエントのT細胞receptor (TCR) に対する抗idiotypе抗体の誘導によるものと考えられている^{16,17)}。この事実が発端となり、semiallograftである胎児が拒絶されないメカニズムのひとつとして、重要な役割を果たしていることが想定されるようになった¹⁸⁾。そこで免疫的拒絶が深く関与していると考えられる妊娠初期に流産を繰り返している原因不明の習慣流産に対して、1981年にTaylorらが、第三者リンパ球を用いて免疫療法を4例に施行し、免疫療法の有用性を初めて報告した⁴⁾。一方Beerらは、夫リンパ球を用いた免疫療法を2例に施行し有用性を報告した⁵⁾。その後各国で免疫療法が積極的に試みられるようになり、最近の報告では免疫原として夫リンパ球を用いるものが多い。最近の夫リンパ球を用いた免疫療法の諸家の報告を、Carolynのレビューより引用したのが表10である⁶⁾。治療群での成功率は73%、対照群(無治療)では30%であり、免疫療法の有用性を示唆していると思われる。

表8 免疫療法後に出生した新生児の体重分布

出世体重 (g)	新生児数
~ 999	1
1000 ~ 1499	1
1500 ~ 1999	2
2000 ~ 2499	4
2500 ~ 2999	13
3000 ~	13
計	34

表9 免疫療法後に出生した新生児の分娩週数

分娩週数	新生児数
26	1
27	1
32	1
35	1
36	1
37 ~	29
計	34

表10 夫リンパ球を用いた免疫療法の諸家の報告

報告者	妊娠継続率 (%)	
	夫リンパ球移入	無治療
Mowbray (1985)	17 / 22 (78)	
Reznikoff-Etievant (1988)	28 / 33 (85)	2 / 5 (40)
Ho (1991)	40 / 49 (82)	
Cauchi (1991)	13 / 21 (62)	
Clark (1991)	7 / 11 (64)	
Beer (1988)	28 / 39 (72)	16 / 44 (36)
Beer (1988)	100 / 121 (83)	13 / 51 (25)
Smith and Cowchock (1988)	27 / 34 (79)	2 / 9 (22)
Smith and Cowchock (1988)	16 / 40 (40)	6 / 16 (38)
Carp (1990)	60 / 79 (76)	11 / 37 (30)
Takakuwa (1990)	28 / 35 (80)	4 / 12 (30)
Regan (1988)	34 / 46 (74)	0 / 4 (0)
Mowbray (1988)	19 / 22 (86)	
Mowbray (1988)	5 / 13 (68)	
Mowbray (1987)	164 / 229 (72)	
Clark and Daya (1991)	6 / 8 (75)	
Gatenby (1989)	12 / 20 (60)	
Total	604 / 822 (73)	54 / 178 (30)

しかしHoら¹⁴⁾、Cauchiら¹⁵⁾のrandomized controlled trialにおいては、対照群との間に有意差は認められなかった。

このように習慣流産に対する免疫療法の有効性については、必ずしも一定の評価を受けていなかった。

そこで原因不明の習慣流産患者を対象に国際規模で多施設共同研究が施行され、1994年に分析結果が報告された¹³⁾。この報告では1700例以上のデータが集積され、2人の分析者による解析がそれぞれ独立して行われ、いずれも400例以上の完全症例データに基づいて結論に導いている。その結果、免疫療法の有効性の95%信頼限界は1.16 (1.01 ~ 1.34; $p=0.031$) または1.21 (1.04 ~ 1.37; $p=0.024$) で、治療によって生児獲得率を7.6% (4.6 ~ 11.7) または10% (6.5 ~ 14.5) 上昇させることが判明した。また免疫療法により夫リンパ球抗体は、28.2%に出現し、抗体の有無により生児獲得率は55.7%対71%で夫リンパ球抗体の存在が有意に良好な結果に結びついていると報告されている ($P=0.038$)。さらには出生した新生児の早産、子宮内発育遅延、子宮内胎児死亡、新生児血小板減少症の頻度は対照群と差がなかった。

今回我々の検討では、免疫療法後の妊娠継続率は、69妊娠中52妊娠 (75.4%) であり、諸家の報告と何ら遜色のない成績と考える。原発性不育症と続発性不

育症に分けて検討すると、原発性での妊娠継続率は60妊娠中46妊娠 (76.7%)、続発性では9妊娠中6妊娠 (66.7%) であった。原発性の方が妊娠継続率が高かったが、続発性においても66.7%の妊娠継続が認められたことから、続発性不育症の患者に対しても免疫療法は試みられるべき治療法と思われた。また免疫療法後に出生した新生児は現在の所34人であり、低出生体重児が8人 (23.5%)、早産が5人 (14.7%) と高率であり、前述の多施設研究の結果とは相違がみられる。今後症例を増やして検討したい。

通常免疫療法の適応にあたっては、免疫の評価を施行した上で実施することが多い。免疫の評価には、HLAの一致²⁰⁾、MLC¹⁰⁾、MLC抑制テスト^{7,11,19)}、補体依存性細胞障害性試験^{21,22)} (CDC) などが用いられている。

原因不明の習慣流産患者のHLAの一致性が高いことがこれまでに多く報告されている⁸⁾。Beer¹⁰⁾らはHLA-A, B, DR, Gerancer¹¹⁾らはHLA-B, DR, Johnson¹²⁾らはHLA-B, そしてKoyama⁹⁾らはHLA-DRの一致率が有意に高いことを報告した。これは遮断抗体ができにくいとともに、Wegmannの提唱するplacental immunotrophism (免疫反応によって産生されるサイトカインが胎盤の増殖・分化を調節する) を惹起しにくいものと考えられる⁸⁾。

今回の我々の検討では、図3に示されたように、Koyamaらにより報告された日本人の一般集団のHLAの基礎一致率を参考にして習慣流産患者の一致率を比較検討するとHLA-A, B, Cでは一致性はみられなかったが、HLA-DRにおいて有意の一致性を認めた($p < 0.01$)。この結果から我々は、Beer, Gerancer, Koyamaらと同様、HLA-DRの一致が習慣流産の病態と深く関連しているものと考えている。

遮断抗体は、これまでに抗HLA-DR抗体、絨毛とリンパ球の共通抗原(Trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigens: TLX抗原)に対する抗TLX抗体(夫リンパ球を標的としたCDC活性として測定)、HLA-DR抗原に対する母体T細胞receptor (TCR)に対する自己抗体としての抗idiotypic抗体、Cold-B抗体(4℃でB細胞を標的としたCDC活性として測定)などが考えられている²³⁾。

MLC抑制テストにおける遮断抗体の判定として、高桑ら^{7,19)}は妻血清添加により22%以上の抑制、Hofmannら¹⁴⁾は20%以上の抑制のある場合を、遮断抗体陽性としている。

我々は高桑らの基準に従い、22%以上を抑制効果(遮断抗体)ありと判断した。

今回の我々の検討では、表3に示したようにHLA-DRの一致がみられるとMLC抑制効果の陽性率は有意に低かった($p < 0.05$)。しかしHLA-DRの一致性の無いカップルにおけるMLC抑制効果の陽性率も、高々38.9%であり、MLC抑制効果の発現には複数の因子が関連しているものと思われる。

今回我々が免疫療法の対象としたのはMLC抑制効果の認められないカップルとしたため、一部に染色体異常(均衡転座型)あるいはLAC陽性の患者が含まれている。今回の検討ではLAC陽性で免疫療法を施行した場合の妊娠継続率は15妊娠中7妊娠(47%)であり、LAC陰性に比べて有意に妊娠継続率は低い($p < 0.05$)。しかしLAC陽性で妊娠前より柴苓湯あるいはプレドニゾロン + アスピリン療法を継続し、免疫療法後に妊娠の成立した5例のうち4例に生児を得たことから当分はこの方針を続けてみようと思っている。

また免疫療法後の効果判定として我々は、今回MLC抑制効果陽性となった群で、妊娠継続率が高い傾向にあることをみいだしたが、maruyamaらは、flow cytometryを用いた夫リンパ球抗体の有無を検討し、抗体陽性例で有意に予後良好であることを報告している²²⁾。また表8に示したようにHLA-DRの一致性があり、免疫療法後に抑制効果が認められた場合、

93.3%の妊娠継続率が得られた。一方、抑制効果があったため、免疫療法を施行しなかった群では19回の妊娠で17回の妊娠継続を認め、妊娠継続率は89.5%と高率であった。このことから免疫療法の適応にMLC抑制テストを用いることは正当なものと考ええる。そしてHLA-DRの一致があり、免疫療法により遮断抗体の出現のみられるもので、高い妊娠継続が期待できるものと思われる。

最近Higuchiら²⁴⁾により、妊娠初期におけるNK活性の抑制が妊娠継続と関連しており、習慣流産患者では、妊娠5週において流産の既往のない妊婦と比較して有意にNK活性が高いことを報告した($p < 0.01$)。そして妊娠継続例では有意なNK活性の低下を認めた($p < 0.05$)。このことから今後免疫療法後の効果判定にNK活性の変化を検討する必要がある。

本論文の要旨は、第39回日本不妊学会学術講演会(富山, 1994)において発表した。稿を終えるにあたり本研究に終始ご協力をいただいた薬剤部、検査部の諸氏に感謝する。

文 献

- 1) 堤 紀夫, 田中忠夫, 伊藤功一 他(1992) 習慣流産とその免疫学的治療. 周産期医学 22: 1254-1258
- 2) Opelz G, Sengar GPS, Mickey MR, et al. (1973) Effect of blood transfusions on subsequent kidney transplants. Transplant. Proc 4: 253-257
- 3) Salvatierra O, Amend W, Vincenti F, et al. (1981) Pretreatment with donor-specific blood transfusions in related with high MLC. Transplant Proc 13: 142-149
- 4) Taylor CG, Faulk WP (1981) prevention of recurrent abortion by leukocyte transfusions. Lancet 2: 68-70
- 5) 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
- 6) Coulam CB, Coulam CH (1992) Update on immunotherapy for recurrent pregnancy loss. Am J Reprod Immunol 27: 124-127
- 7) 高桑好一, 丸橋敏宏, 後藤重則 他(1986) 原因不明習慣流産患者に対する免疫療法. 40 (5): 349-351
- 8) 佐治文隆, 古山将康(1996) 不育症. 生殖免疫学的異常. 八神喜昭, 武谷雄二編, 第1版, メジカルビュー社出版, 東京, pp150-160

- 9) Koyama M, Saji F, Takahashi M (1991) Probabilistic assessment of the HLA sharing of recurrent spontaneous abortion couples in the Japanese population. *Tissue Antigens* 37: 211-217
- 10) Beer AE, Semprini AE, Xiaoyu Z, et al. (1985) Pregnancy outcome in human couples with recurrent spontaneous abortions: HLA antigen profiles; HLA antigen sharing; female serum MLR blocking factors; and paternal leukocyte immunization. *Expl Clin Immunogenet* 2: 137-153
- 11) Gerencer M, Singer Z, Pfeifer S, et al. (1988) HLA and red blood group antigens in pregnancy disorders. *Tissue Antigens* 32: 130-138
- 12) Johnson PM, Chia KV, Risk JM, et al. (1988) Immunological and immunogenetic investigation of recurrent spontaneous abortion. *Disease Markers* 6: 163-171
- 13) The recurrent miscarriage immunotherapy trialist group (1994) Worldwide collaborative observational study and meta-analysis on allogenic leukocyte immunotherapy for recurrent spontaneous abortion. *Am J Reprod Immunol* 32: 55-72
- 14) Ho HN, Gill TJ III, Hsieh HJ, et al. (1991) Immunotherapy for recurrent spontaneous abortions in a Chinese population. *Am J Reprod Immunol* 25: 10-15
- 15) Cauchi MN, Lim D, Young DE, et al. (1991) Treatment of recurrent aborters by immunization with paternal cells-controlled trial. *Am J Reprod Immunol* 25: 16-17
- 16) Singal DP, Joseph S (1982) Role of blood transfusions on the induction of antibodies against recognition sites on T lymphocytes in renal transplant patient. *Hum Immunol* 4: 93-108
- 17) 安尾美年子, 東間 紘, 齊藤典子 他 (1989) ドナー・レシピエント間Mixed Lymphocyte Reactionに及ぼすDonor Specific Blood Transfusion後患者血清中の抑制因子の検討. *移植* 24: 249-254
- 18) Fault WP, Temple A, Lovins RE, et al. (1978) Antigens of human trophoblasts: A working hypothesis for their role in normal and abnormal pregnancies. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1947-1951
- 19) Takakuwa K, Kanazawa K, Takeuchi S (1986) Production of blocking antibodies by vaccination with husband's lymphocytes in unexplained recurrent aborters: The role in successful pregnancy. *Am J of Reprod Immunol Microbiol* 10: 1-9
- 20) 佐治文隆, 古山将康, 鮫島義弘 他 (1990) 習慣流産と免疫療法. *産婦人科治療* 60 (3): 296-302
- 21) McIntyre JA, Faulk WP, Nicholas-Johnson VR, et al. (1986) Immunological testing and immunotherapy in recurrent spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 67: 169-175
- 22) Maruyama T, Makino T, Sugi T, et al. (1993) Flow cytometric and early pregnancy loss in women with a history of recurrent spontaneous abortions who underwent paternal leukocyte immunotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 168: 1528-1536
- 23) 中塚幹也, 錦織恭子, 長谷川 淳 他 (1993) 習慣流産の免疫療法前後における免疫学的変化について. *日不妊会誌* 38: 72-79
- 24) Higuchi K, Aoki K, Kinbara T, et al. (1995) Suppression of natural killer cell activity by monocytes following immunotherapy for recurrent spontaneous aborters. *Am J Reprod Immunol* 33: 221-227

(受付: 1996年 9月20日)

(受理: 1996年10月15日)

The clinical significance of blocking effect in patients with recurrent spontaneous abortion

Takashi Nakano, Masao Nakashima, Hiroshi Ishikawa, Yuka Ametani,
Satoru Ohta, Akihide Ohkuchi, Shin-ichirou Satake, Yasuo Kojima,
Hiroshi Funamoto and Masaya Tateno

Department of Obstetrics and Gynecology
Toyama Prefectural Central Hospital, Toyama 930, Japan

Immunotherapy using husband lymphocytes has been generally accepted as an efficacious treatment for recurrent spontaneous abortion (RSA). The purpose of this study was to evaluate a clinical significance of HLA sharing and a presence of blocking effect (BE) in predicting the effect of immunotherapy for RSA. We evaluated HLA sharing and BE in 121 couples with RSA who consulted our hospital from December 1990 to May 1996.

We compared HLA sharing of RSA with the basal sharing rate (BSR) in Japanese general population (Koyama et al.); antigen sharing rate of RSA (49.6%) was higher than BSR (35.1%) in the HLA-DR locus ($p < 0.01$), but not in HLA-A, B, C loci. HLA sharing rate in the HLA-DR locus was higher in the couples without BE as compared with those with BE ($p < 0.05$). 68 women with RSA who lacked BE were treated by immunotherapy. 47 out of 68 women had 70 pregnancies, in which 52 (74.3%) were successful. Seroconversion after treatment occurred in 44/58 women (74.1%). The success rate of pregnancy in patients who responded to the treatment was 76.6% (36/47), while 64.3% (9/14) were successful in women whose BE remained negative. Patients with BE as well as HLA-DR sharing after treatment had a very high success rate of pregnancy (14/15, 93.3%).

These data suggest that HLA-DR sharing and BE are useful clinical markers in predicting the outcome of the immunotherapy for RSA.

Key words: recurrent spontaneous abortion, immunotherapy, HLA sharing, blocking effect

QUANTITATIVE ANALYSIS OF SPERMATOGENIC DNA SYNTHESIS IN THE RAT USING A MONOCLONAL ANTIBODY AGAINST PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (PCNA)

Katsuhiko IMOTO

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

Abstract: We previously showed that monoclonal anti-5-bromodeoxyuridine antibodies (monoclonal anti-BrdUrd antibodies) are useful for quantitatively analyzing spermatogenic DNA synthesis in the rat and objectively evaluating spermatogenic function. However, the labeling technique using the BrdUrd method is complicated and requires preadministration of carcinogenic agents, making it difficult to apply clinically. Therefore, we explored the possibility of replacing the BrdUrd method with the proliferating cell nuclear antigen method (the PCNA method), which permits *in vitro* staining.

This study used the PCNA method on rat testes to determine its potential for application to the biopsies of human testes. Spermatogenic DNA synthesis in the rat was quantitatively analyzed and the results were compared with those obtained with the BrdUrd method. Subjects consisted of 10-week-old male Sprague-Dawley rats. At each stage, the ratio of the number of stained cells to that of Sertoli cells (Sertoli cell ratio) was calculated for PCNA- and BrdUrd-labeled cells. The Sertoli cell ratio in BrdUrd-labeled cells displayed two marked peaks in stages V and VIII. In contrast, the Sertoli cell ratio in PCNA-labeled cells exhibited high values in all stages. However, leptotene spermatocytes, zygotene spermatocytes, and pachytene spermatocytes up to stage VI, which are all negative by the BrdUrd method and positive by the PCNA method, can be clearly differentiated morphologically. Thus, it was possible to exclude these PCNA-positive cells and correct the ratios. An analysis of the Sertoli cell ratios in PCNA-labeled cells after correction showed that the results were very similar to those obtained from the analysis of BrdUrd-labeled cells: both contained high values for stages V and VIII.

We conclude that it is feasible to apply the PCNA method of analyzing spermatogenic DNA synthesis quantitatively to the biopsy samples of human testes in clinical studies.

Key words: spermatogenesis, DNA synthesis, PCNA, rat

(*Jpn. J. Fertil. Steril.*, 42 (1), 59 - 66, 1997)

Introduction

We previously showed that the monoclonal anti-BrdUrd antibody labeling method (the BrdUrd method) was useful for analyzing spermatogenic DNA synthesis quantitatively in the rat and evaluating spermatogenic function objectively¹⁾. Johnsen's mean score count using hematoxylin-eosin (HE) staining²⁾ and analysis of germ cell DNA contents using flow cytometry^{3,4)} are other techniques used for histopathological analysis of spermatogenesis in

clinical studies. However, quantitative analysis of spermatogenic DNA synthesis using flow cytometry cannot be used without dissociating testicular germ cells from their tissue context, and the BrdUrd method involves complicated procedures and preadministration of carcinogenic agents⁵⁾, which make both these methods difficult to apply clinically. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a DNA polymerase- δ auxiliary protein synthesized from late G1 phase to S phase of the cell cycle. PCNA labeling can be performed on ordinary paraffin spec-

imens fixed with Bouin's solution by an immunohistochemical staining method (the PCNA method) using PC-10, a monoclonal antibody to PCNA. Comparative studies between BrdUrd and PCNA methods have already been reported using several organs⁶⁻¹²). In this study, the PCNA method was used on rat testes to quantitatively analyze DNA synthesis in rat germ cells and the results were then compared with those obtained by the BrdUrd method to determine whether the PCNA method could be applied to clinical biopsies of human testes *in vitro*.

Materials and Methods

Rats

Ten-week-old male Sprague-Dawley rats were used (Seiwa Company, Fukuoka, Japan). The mean body weight was $345.3\text{g} \pm 12.5\text{g}$ and the mean testicular weight was $1.54\text{g} \pm 0.09\text{g}$.

BrdUrd incorporation and histological procedures

Rat testicles were labeled with 100 mg/kg of BrdUrd (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO, USA) solved in 2 ml of phosphate buffered saline (PBS) by a single intraperitoneal injection. The testicles were removed 1 hour after injection and were fixed in Bouin's solution for 9 hours at room temperature. The tissues were dehydrated, embedded in paraffin, and sliced into 5 μm thin sections for immunohistochemical staining of PCNA and BrdUrd.

PCNA staining

Tissue sections were immunostained by the avidin-biotin complex immunoperoxidase technique as follows. After tissue sections were dewaxed for 25 minutes in xylene and rinsed twice in 100 percent ethanol followed by 90 percent ethanol, 80 percent ethanol and 70 percent ethanol for 2 minutes each, the sections were incubated in 0.3% H_2O_2 for 30 minutes. After a brief wash in phosphate-buffered saline (PBS), sections were incubated in a 1: 100 dilution of PCNA monoclonal antibody, PC 10 (Dakopatts, Copenhagen, Denmark), in a PBS/TritonX-100/normal horse serum solution (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) for 2 hours in the dark. The slides were then washed in PBS three times for 5 minutes and incubated in a 1: 100 dilution of a biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab.) in PBS/Triton X-100 for 1 hour, washed three times in

PBS for 5 minutes and incubated with an avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Vector Lab.) for 1 hour. The slides were again washed three times in PBS for 5 minutes and were reacted with 10 mg of 3, 3'-diaminobenzidine tetrachloride (DAB) (Wako Junyaku, Osaka, Japan) in 10 μl of 30% H_2O_2 and 100 μl 5 mol imidazole (Wako) in 50 ml of PBS for 2 minutes. All incubation steps were carried out in a moist chamber at room temperature. The slides were subsequently counterstained by the periodic acid-Schiff-hematoxylin method followed by dehydration and mounting.

BrdUrd staining

Following deparaffinization, slides were incubated in 4 N HCl for 20 minutes and then neutralized with 0.1 mol sodium tetraborate. After washing twice in PBS for 5 minutes, sections were incubated with a 1: 100 dilution of the anti-BrdUrd monoclonal antibody (Becton Dickinson Co., San Jose, CA, USA) in a PBS/Tween-20/normal horse serum solution (Vector Lab.) for 1 hour in the dark. Slides were subsequently washed in PBS three times for 5 minutes and incubated with a 1: 100 dilution of a biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector Lab.) in PBS/Tween-20 for 1 hour. The slides were washed in PBS three times for 5 minutes and then incubated with an avidin-biotin horseradish peroxidase complex (Vector Lab.) for 1 hour. The slides were again washed three times in PBS for 5 minutes and reacted with 10 mg of DAB (Wako) in 10 μl of 30% H_2O_2 and 100 μl 5 mol imidazole (Wako) in 50 ml of PBS for 2 minutes. All incubation steps were carried out in a moist chamber at room temperature. Slides were subsequently counterstained by the periodic acid-Schiff-hematoxylin method followed by dehydration and mounting.

Results

Staining was confined to the nuclei for both BrdUrd- and PCNA-labeled cells, showing a diffuse or granular brown pattern. In both methods, cells displaying strong staining as compared with the background were counted as positive. Thus, by the BrdUrd method, spermatogenesis was detected in cells from spermatogonia to preleptotene spermatocytes [Figs. 1 (a), (b)]. However by the PCNA

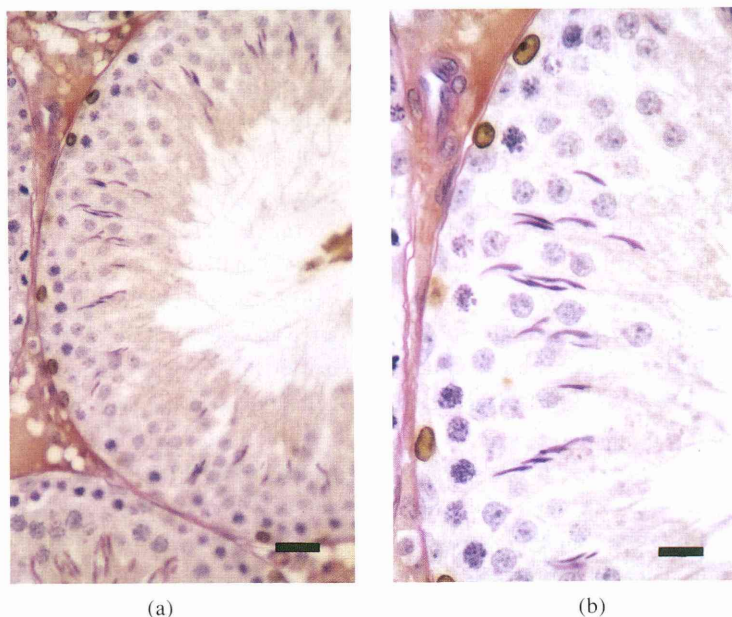


Fig. 1 (a): Immunohistochemical staining of a testis from a Sprague-Dawley rat with an anti-BrdUrd monoclonal antibody. Nuclei of cells that incorporated BrdUrd were brown in color while unincorporated nuclei were blue. BrdUrd-labeled cells were found on the periphery of the seminiferous tubule in stage II - III. $\times 200$. Bar: $30 \mu\text{m}$.

(b): Intermediate spermatogonia labeled with BrdUrd in stage II - III. $\times 400$. Bar: $15 \mu\text{m}$.

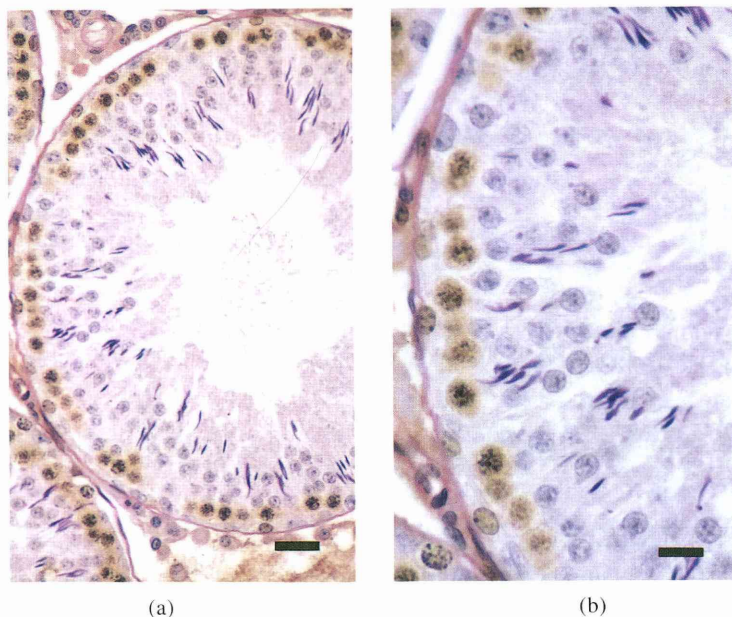


Fig. 2 (a): Immunohistochemical staining of a testis from a Sprague-Dawley rat with an anti-PCNA monoclonal antibody. Nuclei of cells that incorporated PCNA were brown in color while unincorporated nuclei were blue. PCNA-labeled cells were found on the periphery of the seminiferous tubule in stage II - III. $\times 200$. Bar: $30 \mu\text{m}$.

(b): Intermediate spermatogonia and pachytene spermatocytes labeled with PCNA in stage II - III. $\times 400$. Bar: $15 \mu\text{m}$. Pachytene spermatocytes were stained in their nuclei as well as their surrounding cytoplasm.

method, spermatogonia and preleptotene spermatocytes, leptotene spermatocytes, zygotene spermatocytes, and pachytene spermatocytes up to stage VI were judged as positive in spermatogenesis [Figs. 2 (a), (b)]. Furthermore, the nuclei of the pachytene spermatocytes as well as the surrounding cytoplasm were stained light brown by the PCNA method [Fig. 2(b)].

A quantitative analysis of spermatogenesis using the PCNA method was also performed. The stages of the cycle of the seminiferous epithelium were defined using the criteria developed by Leblond and Clermont¹³⁾ and modified by Russell et al.¹⁴⁾. Since it is difficult to define the boundary between stage II and III, Russell et al. recommended combining these stages¹⁴⁾. The ratio of the number of BrdUrd and PCNA-labeled cells to that of Sertoli cells (Sertoli cell ratio) was calculated as an index of spermatogenic DNA synthesis during each stage of the seminiferous epithelial wave. The Sertoli cell ratio by the PCNA method revealed high values for all stages,

ranging from 1.88 to 3.48 (Fig. 3), while the BrdUrd method showed high Sertoli cell ratios in stages V and VIII, with values of 0.84 and 2.07, respectively (Fig. 4). Thus, the results of the PCNA method clearly differed from those of the BrdUrd method. We then excluded leptotene spermatocytes, zygotene spermatocytes, and pachytene spermatocytes up to stage VI in the assessment of DNA synthesis in germ cells because these cells are definitely BrdUrd negative and can be clearly distinguished morphologically. This Procedure changed the corrected Sertoli cell ratio in PCNA-labeled cells and the results were very similar to the results obtained using the BrdUrd method (Fig. 5). There were high values in stages V and VIII by both methods.

Discussion

Three methods have previously been used for histological evaluation of spermatogenesis: (1) Nelson's method¹⁵⁾, which generally classes histological pictures on the basis of a pathological diagnosis

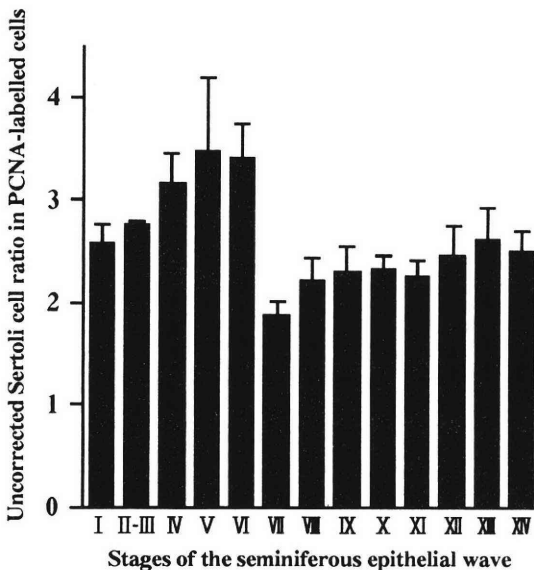


Fig. 3 : Uncorrected Sertoli cell ratio in PCNA-labeled cells in different stages. The Sertoli cell ratio was calculated by the following formula: number of PCNA-labeled cells/number of Sertoli cells. The Sertoli cell ratio assessed by the PCNA method revealed high values for all stages, ranging from 1.88 (stage VII) to 3.48 (stage V). Values are means + S.D. of 5 separate experiments.

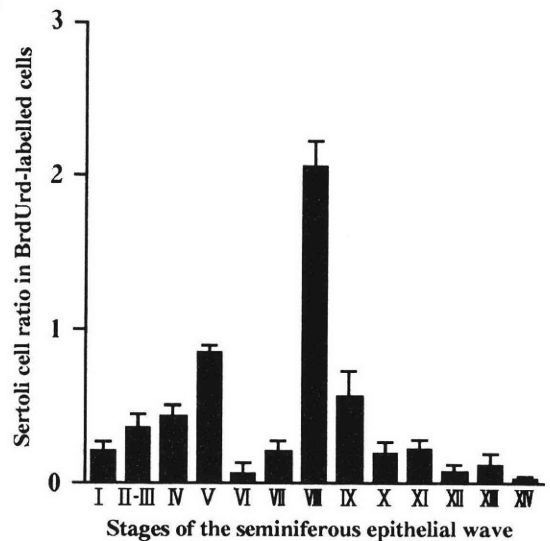


Fig. 4 : Sertoli cell ratio in BrdUrd-labeled cells in different stages. The Sertoli cell ratio was calculated by the following formula: number of BrdUrd-labeled cells/number of Sertoli cells. Definite peaks were found in stages V and VIII, whereas ratios were low in stage VI and XIV. Values are means + S.D. of 5 separate experiments.

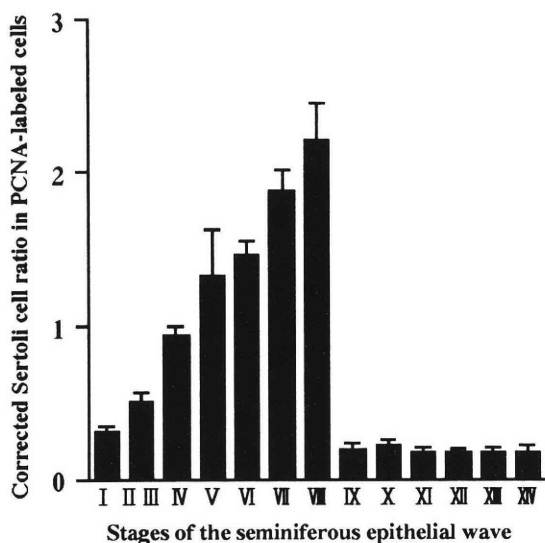


Fig. 5 : Corrected Sertoli cell ratio in PCNA-labeled cells in different stages. Leptotene spermatocytes, zygotene spermatocytes, and pachytene spermatocytes up to stage VI were excluded from the counting. The Sertoli cell ratio was calculated as described in Fig. 3. Definite peaks were again found in stages V, VI, VII and VIII. The Sertoli cell ratio in PCNA-labeled cells after correction was very similar to the results of analyzes using the BrdUrd method. Values are means+S.D. of 5 separate experiments.

of seminiferous tubules; (2) Johnsen's mean score count²⁾, which evaluates seminiferous tubules by stages according to the stage to which they have matured, scores them based on this criterion, and indicates spermatogenetic maturity with mean scores; and (3) the method developed by Steinberger et al.¹⁶⁾, which enumerates the numbers of cells in each stage of maturity in seminiferous tubules and analyzes spermatogenetic capabilities according to the numbers and stages of cells present. Of these techniques, Nelson's method is easy to apply under clinical conditions, but its general classification system makes it difficult to use for quantitatively evaluating spermatogenetic capabilities because the evaluator's subjectivity can easily affect the results. The latter two methods have been used for quantitative analysis but they cannot directly evaluate DNA synthesis in the spermatogenetic process. For this purpose, several immunohistochemical staining techniques incorpo-

rating cellular proliferation markers have been used: the flow cytometric DNA contents analysis method^{3,4)}, the tritiated-thymidine autoradiography method^{17~19)} and the bromodeoxyuridine (BrdUrd) method¹⁾. However, the contents of DNA synthesis can not be analyzed by flow cytometry without dissociating testicular germ cells from their tissue context. Both the tritiated-thymidine autoradiography and BrdUrd methods involve complicated procedures, and the BrdUrd method requires preadministration of carcinogenic agents⁵⁾, making their clinical application difficult.

We used the PCNA method on rat testes to assess its potential for application to the biopsy of human testes. Spermatogenic DNA synthesis in the rat was quantitatively analyzed by PCNA and the results were compared with those derived by the BrdUrd method.

Proliferating cell nuclear antigen is a non-histone nuclear protein. Miyachi et al. first reported that it was recognized by an autoantibody in the serum of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)²⁰⁾. Synthesized from the late G1 phase to S phase of the cell cycle, PCNA acts as an auxiliary protein of DNA polymerase- δ during DNA synthesis⁵⁾. Therefore, the PCNA level in cells is thought to reflect the proliferative capacity of the cells²¹⁾. Many researchers have already documented high correlations between the BrdUrd method and the PCNA method in a variety of organs^{6~12)}. Development of a monoclonal antibody to PCNA called PC-10 has made it possible to assess PCNA expression by immunohistochemical staining. After the treatment of tissue sections with Triton X-100, the PC-10 reaction can be used as an S-phase marker^{22,23)}. This study was performed using ordinary paraffin specimens fixed with Bouin's solution. Preliminary investigations revealed that fixing for 9 hours using Bouin's solution was optimal under our conditions. Some other studies have shown the detrimental effect of formaldehyde-based fixatives for PCNA-immunoreactions^{24,25)}. However, there was no difference in PCNA-immunoreactions between Bouin's fixation and methacarn in rat testes in our study (unpublished data).

We used several stages of the cycle of the semi-

niferous epithelium, which were defined using the criteria developed by Leblond and Clermont²⁶⁾ and modified by Russell et al.¹⁴⁾, to classify seminiferous tubule stages. The ratio of the number of positive cells to that of Sertoli cells (Sertoli cell ratio) for each stage using the PCNA and BrdUrd methods was then assessed to quantitatively analyze the two methods.

In our previous study Shirataki et al. reported that spermatogenesis could be quantitatively analyzed by assessing DNA synthesis using the BrdUrd method, and showed that the Sertoli cell ratio was a useful parameter of DNA synthesis capacity in rat testes¹⁾. A comparative study of the Sertoli cell ratio using the BrdUrd method and the PCNA method revealed that the PCNA method yielded high ratios ranging from 1.88 to 3.48 in every stage. Conversely, the results of analyzes using the BrdUrd method revealed high Sertoli cell ratios of 0.84 and 2.07 for stages V and VIII, respectively, not obtained by the PCNA method. The difference among these results may be explained by the fact that leptotene spermatocytes, zygotene spermatocytes and pachytene spermatocytes up to stage VI were not stained by the BrdUrd method but were stained with the PCNA method. Therefore, we excluded these spermatocytes, as they were easily differentiated morphologically, and corrected the Sertoli cell ratios. Comparison between the Sertoli cell ratios in PCNA-labeled cells before and after correction showed that the latter clearly bore a much stronger resemblance to the Sertoli cell ratio derived from the BrdUrd method.

Even after correction, the Sertoli cell ratio obtained using the PCNA method had higher values for stages IV, V, VI, VII, and VIII than the Sertoli cell ratio using the BrdUrd method; this may reflect the finding that the PCNA method has a wider range of cell-cycle detection than the BrdUrd method. However, correcting the ratio obtained using the PCNA method according to the morphological features of the germ cells, resulted in similar data from both the PCNA and BrdUrd methods. Therefore, quantitative analysis of DNA synthesis in germ cells by the PCNA method provides an index for objectively evaluating spermatogenesis. In conclusion, the

PCNA method may now be assessed for its feasibility in assessing spermatogenesis in the biopsies of human testes *in vitro*.

Acknowledgments

The author wishes to thank Professor Katsusuke Naito (Director, Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine) and Associate Professor Hiroshi Takihara (Department of Urology, Yamaguchi University School of Medicine) for their helpful advice.

References

- 1) Shirataki S, Takihara H, Imoto K, et al. (1994) Quantitative analysis of spermatogenic DNA synthesis in the rat using a monoclonal anti-5-bromodeoxyuridine antibody. *Andrologia* 26: 343-349
- 2) Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25
- 3) Takihara H, Ishizu K, Ueno T, et al. (1990) Pathogenesis of varicocele: Experimental study using flow cytometric DNA analysis. *Andrologia* 22: 137-143
- 4) Takihara H, Sakatoku J, Cockett ATK (1991) The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril* 55: 861-868
- 5) Bravo R, Frank R, Blundell PA, et al. (1987) Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase δ . *Nature* 326: 515-517
- 6) Wada T, Shimabukuro T, Matsuyama H, et al. (1994) Optimal conditions of fixation for immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen in tumour cells and its cell cycle related immunohistochemical expression. *Cell Prolif* 27: 541-551
- 7) Weisgerber UM, Boeing H, Nemitz R, et al. (1993) Proliferation cell nuclear antigen (clone 19A2) correlates with 5-bromo-2-deoxyuridine labeling in human colonic epithelium. *Gut* 34: 1587-1592
- 8) Sanders EJ, Varedi M, French AS (1993) Cell proliferation in the gastrulating chick embryo: a study using BrdUrd incorporation and PCNA localization. *Development* 118: 389-399
- 9) Wijsman JH, Van Dierendonck JH, Keijzer R, et al. (1992) Immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen compared with bromodeoxyuri-

- dine incorporation in normal and neoplastic rat tissue. *J Pathol* 168: 75-83
- 10) Sasaki A, Naganuma H, Kimura R, et al. (1992) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunostaining as an alternative to bromodeoxyuridine (BrdU) immunostaining for brain tumours in paraffin embedded sections. *Acta Neurochir (Wien)* 117: 178-181
 - 11) Lee KS, Yang WI (1992) Comparison of brain tumor growth kinetics by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and bromodeoxyuridine (BrdU) labeling. *Yonsei Medical J* 33: 265-271
 - 12) Hall PA, Levison DA, Woods AL, et al. (1990) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162: 285-294
 - 13) Clermont Y, Harvey SG (1965) Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinol* 76: 80-89
 - 14) Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, et al. (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, 63-118
 - 15) Nelson WO (1953) Interpretation of testicular biopsy. *JAMA* 151: 449-454
 - 16) Steinberger E, Tjioe DY (1968) A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. *Fertil Steril* 19: 960-970
 - 17) Markewitz M, Fingerhut B, Veenema RJ (1966) Radioautographic studies in vitro of DNA and RNA synthesis in experimentally produced cryptorchidism in the Fischer rat. *Fertil Steril* 17: 386-395
 - 18) Lambert B, Eriksson G (1979) Effects of cancer chemotherapeutic agents on testicular DNA synthesis in the rat. *Mutation Res* 68: 275-289
 - 19) Parvinen M, Soder O, Mali P, et al. (1991) In vitro simulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule segments by interleukin-1 α . *Endocrinol* 129: 1614-1620
 - 20) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 121: 2228-2234
 - 21) Mathews B, Bernstein RM, Franza BR Jr, et al. (1984) Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature* 309: 374-376.
 - 22) Sasaki K, Kurose A, Ishida Y (1993) Flow cytometric analysis of the expression of PCNA during the cell cycle in HeLa cells and effects of the inhibition of DNA synthesis on it. *Cytometry* 14: 876-882
 - 23) Sasaki K, Kurose A, Ishida Y, et al. (1994) Estimation of S-phase fraction in tumor tissue sections by immunohistochemical staining of PCNA. *J Histochem Cytochem* 42: 957-960
 - 24) Casasco A, Casasco M, Cornaglia AI, et al. (1994) Tissue fixation for immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen with PC10 monoclonal antibody. *Biotech & histochem* 69: 112-117
 - 25) Casasco A, Giordano M, Danova M, et al. (1993) PC10 monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. *Histochem* 99: 191-199
 - 26) Leblond CP, Clermont Y (1952) Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the periodic acid-fuchsin sulfuric acid technique. *Am J Anat* 90: 167-216

(受付: 1996年 9月25日)

(受理: 1996年10月17日)

PCNA法を用いたラット精細胞DNA合成能の定量的解析

山口大学医学部泌尿器科学教室
井本勝彦

ヒト精巢生検組織に応用の目的で、抗PCNAモノクローナル抗体を用い(PCNA法)ラット精細胞DNA合成能の定量的解析を行った。10週齢雄性SDラットを対象にPCNA法と抗BrdUモノクローナル抗体(BrdU法)を用い、各ステージにおける、染色された精細胞数とセルトリ細胞数との比(Sertoli cell ratio (SCR))を算出し、定量的解析を行い比較検討した。

BrdU法を用いたSCR (BSCR)はステージVとⅦで高値をとる2峰性のピークを示した。一方、PCNA法を用いたSCR (PSCR)ではすべてのステージで高値を示した。しかし、BrdU法では陰性でPCNA法では陽性である細糸期精母細胞、合糸期精母細胞、ステージⅥまでの厚糸期精母細胞は形態学的に識別可能なため、これらを除外しPSCRを補正することが可能であった。その結果PSCRは補正前に比較すれば補正後には明らかにBSCRに近似し、ステージVとⅦが高値となり、両者のSCRはよく一致した。

以上より、PCNA法を用いた精細胞DNA合成能の定量的解析はin vitroで染色が可能であり、ヒト精巢生検組織に臨床応用ができると考えられた。

キーワード：精子形成、DNA合成能、PCNA、ラット

精子運動自動分析装置を用いた 男性不妊症患者精子運動性の分析

Semen Analysis of Male Infertility Patients Using a Computer Aided Semen Analyzer

帝京大学医学部泌尿器科学教室

四倉正己
Masaki YOTSUKURA

押尾茂
Shigeru OSHIO

遠山裕一
Yuichi TOHYAMA

友政宏
Hiroshi TOMOMASA

梅田隆
Takashi UMEDA

岩淵正之

Masayuki IWABUCHI

矢崎恒忠

Tsunetada YAZAKI

Department of Urology

Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

不妊症患者80名、延べ141回の精液を対象とし、精子自動分析装置 (CASA: CellSoft 4000) を用いて精子運動性を分析した。

全体の精液検査の結果は、精子濃度 $39.8 \pm 28.0 \times 10^6/\text{ml}$ 、総運動率 $32.8 \pm 12.7\%$ であった。運動率を本機器で測定可能なWHO分類に基づいて検討すると前進運動率 $24.9 \pm 10.3\%$ 、速い直進運動率 $6.2 \pm 4.6\%$ とともに正常値に比べて低値を示した。つぎに、精子運動性の变化を詳細に分析する目的で、本研究期間中に複数回のCASAによる精液検査が可能であった18例について、最も運動率が良好であった時と不良であった時の各パラメーターの変化を検討した。運動率、前進運動率、速い直進運動率、非前進運動率は両者の平均値同士を比べるとそれぞれ、1.8、1.9、2.4、1.9倍の変化をし、速い直進運動率が最も鋭敏に運動率の変化を反映していた。一方、同様に重要なパラメーターである運動速度、直進性はそれぞれ、1.1、1.3倍と運動率に比べると少ない変化であった。

本機器は近年のコンピューター技術の改良により、従来のバージョンに比べて処理速度の大幅な改善がなされており、また、一般の運動率、運動速度と同時に前進運動率などを瞬時に測定可能なことから、今後、精子運動性の評価法として重要な位置を占めると考えられた。

キーワード：男性不妊症、精液検査、精子運動率、CASA、直進運動

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 67 - 73, 1997)

緒言

顕微鏡を用いた精液検査は男性不妊症の基礎的検査法として汎用され、通常は精子濃度、精子運動率、精子奇形率、精子生存率などが測定されている。これらのパラメーターのなかでも特に精子運動率は簡便に測定可能で受精率などとの関係も比較的推定しやすいことから、男性不妊症の診断に際して重要な

検査項目のひとつとなっている。しかし、現状では精液検査全般に関して肉眼の方法で測定している施設がほとんどであり、その定量化が望まれている。

近年、パーソナルコンピューターを用いた精子運動自動分析装置 (CASA) が発表され、その初期から使用法やその限界に関して多くの報告²⁻⁶⁾があるが、国際的に見るとCASAは事実上精子検査の標準的な手法になりつつある⁷⁾。今回、我々は、WHOのマニ

ュアル⁸⁾に準拠した前進運動性の分類も可能となった最新式のCASA (CellSoft system 4000, ARTIST: Cryo Resource 社)を使用する機会を得たので、不妊症患者精子を対象に検討を加えた。

対象と方法

対象

1995年9月より1996年3月までに当科不妊外来を受診し、精子濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率10%以上の症例で、CASAを用いて分析可能であった80名(年齢:18~50歳,平均33.4歳),延べ141回分の精液を対象とした。

精子自動分析装置

CPUにPentium 90MHzを使用したCellSoft ARTIST (Cryo Resource Inc., USA)を用いた。本システムにおいて、1回の運動測定は2/3秒間で行われるように設定し、他のパラメーターは機器のマニュアルに基

づいて設定した。

方法

十分液化した精液を厚さ $20 \mu\text{m}$ の精子運動測定用チャンパー Micro Cell (Conception Technologies, Inc., USA)に入れ、保温板(MP-40, 北里サプライ(株))を用いて 37°C に保温した位相差顕微鏡下で測定した。なお、 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の場合は測定誤差が大きくなることから、 20mM -HEPES buffered Hanks液 (pH7.4)を用いて適当な倍率に希釈して測定した。

運動率の表記法

分類法の詳細は表1に示した。また、各運動率は以下の数式に基づいて計算した。総運動率=前進運動率+非前進運動率。前進運動率=速い直進運動率+遅い直進運動率/非直進運動率+分類不能な前進運動率。

統計処理

検討する数値は、正規分析をせず、等分散もしな

表1 精子直進運動率の分類

- | |
|--|
| (1) Rapid Linear Progressive Motile : 速い直進運動精子 |
| ・ 7フレーム以上トラックした運動精子 |
| ・ Vclが $20 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上 |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 25 以上 |
| ・ Straightness (Linearity Index) が 0.9 以上 |
| (2) Slow/Nonlinear Progressive Motile : 遅い直進運動率/非直進運動率 |
| ・ 7フレーム以上トラックした運動精子 |
| ・ Vclが $20 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上 |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 10 以上 25 未満 |
| *または |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 25 以上でも Straightness (Linearity Index) が 0.9 未満 |
| (3) Non Progressive Motile : 非前進運動率 |
| ・ 7フレーム以上トラックした運動精子 |
| ・ Vclが $20 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上 |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 10 未満 |
| *または |
| ・ 3フレーム以上6フレーム未満トラックした運動精子 |
| ・ Vclが $20 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上 |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 10 未満 |
| (4) Unclassified Progressive Motile : 分類不能な前進運動率 |
| ・ 3~6フレーム未満トラックした運動精子 |
| ・ Vclが $20 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上 |
| ・ $Vcl \times (Vsl/Vcl)$ が 10 以上 |
| *または |
| ・ 2ポイントしかトラックしていない運動精子 |
| ・ Vclが $10 \sim 20 \mu\text{m}/\text{sec}$ |

注:(1) Vcl = curvilinear velocity, Vsl = straight line velocity, Straightness (Linearity Index) = Vsl/Average Path Velocity

(2) 1秒間に30フレーム測定する設定になっているので、ここで7フレーム以上トラックしたということは、この一秒間30フレームのうち7フレーム以上で動いていたことを意味する。

かったので、ノンパラメトリック検定として、Mann-Whitney検定を用いた統計処理を行った。

結 果

精液検査の結果をまとめると、精子濃度は6.5～120.9×10⁶/ml、平均39.8±28.0×10⁶/mlであった。精子濃度の分布をみると、20×10⁶/m以下のoligozoospermiaに分類されるものが約35%であり、他はnormozoospermiaであった(図1)。総運動率(前進運動率+非前進運動率)は5.4～63.1%、平均32.8±12.7%であった。総精子運動率の分布をみると、運動率20

～29%のところは全体の31.9%が集中しており、運動率50%以上を示したものは全体の13.5%に過ぎなかった(図2)。

運動率をWHO分類に基づいて詳細に検討すると前進運動率24.9±10.3%、速い直進運動率6.2±4.6%と低値を示した(表2)。さらに、前進運動率では運動率の低下はより顕著にあらわれ、前進運動率10～30%の群で全体の65%以上を占め、50%以上の前進運動率を示す正常例は1名で、他は全例asthenozoospermiaであった(図3)。WHOの診断基準のひとつである速い直進運動率をみると、約半数が速い直進運動率0

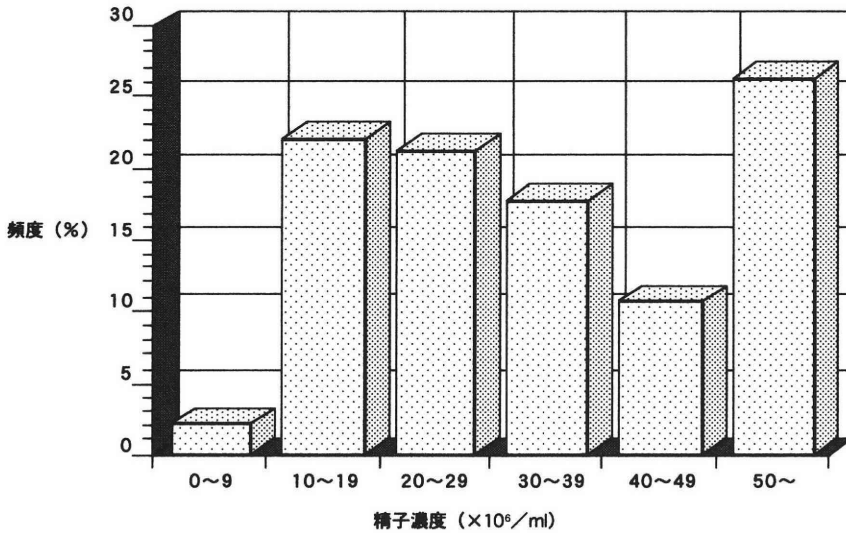


図1 精子濃度の分布

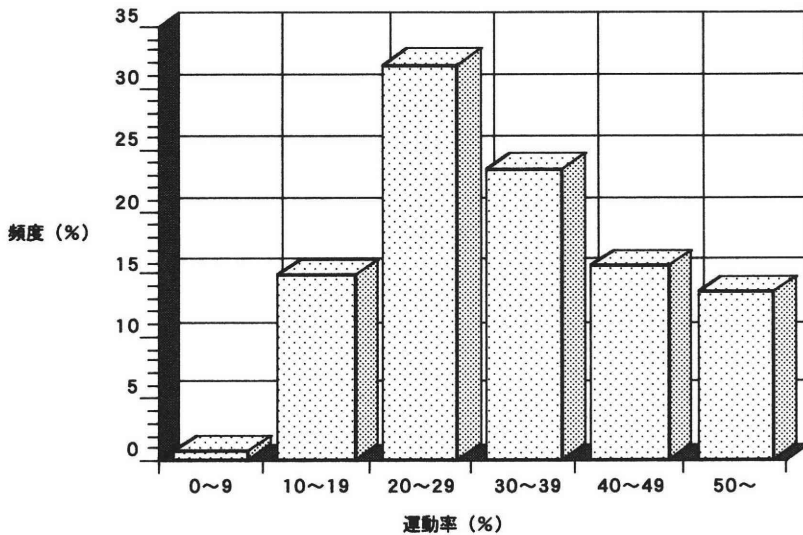


図2 総精子運動率の分布

～4%に分布し、全例が25%以下であった(図4)。なお、同時に平均運動速度(図5)と直進性(図6)についても検討したが、前者では運動速度30～39 μm/sに属するものが約50%を占めており(平均35.3 ± 2.4 μm/s),

後者では直進性4～7を示すものがほぼ90%を占め(平均5.6 ± 0.4), 両者ともほぼ標準値を示した(平均運動速度や直進性についての標準値は決定していないが、本研究においては運動速度に関しては35 μm/s,

表2 精液検査の結果

	精子濃度 (×10 ⁶ /ml)	総運動率 (%)	前進運動率 (%)	速い直進運動率 (%)
平均値±SD	39.8 ± 28.0	32.8 ± 12.7	24.9 ± 10.3	6.2 ± 4.6
範囲	6.5～120.9	5.4～63.1	4.6～52.1	0～22.1

*対象者80名, 延べ141回分

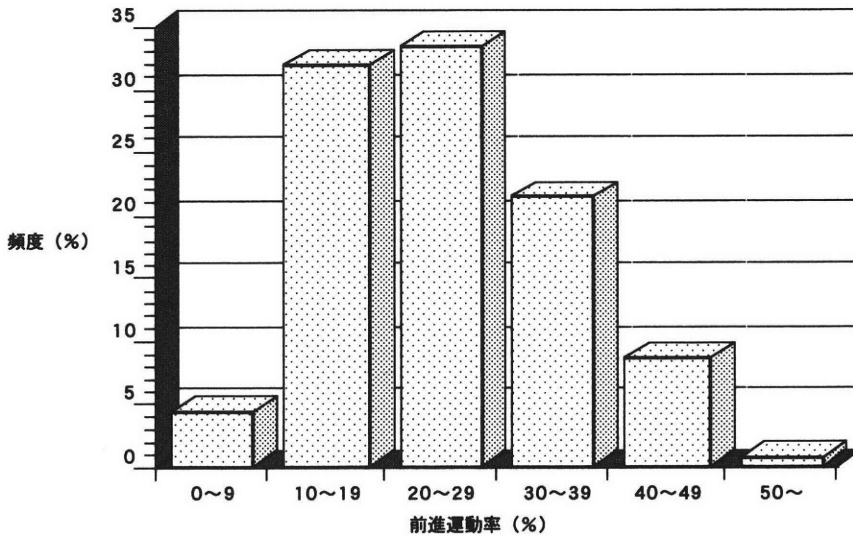


図3 前進運動率の分布

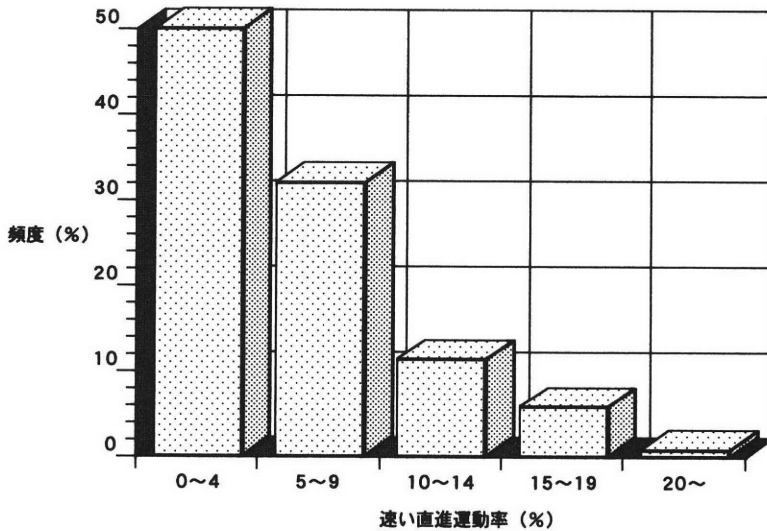


図4 速い直進運動率の分布

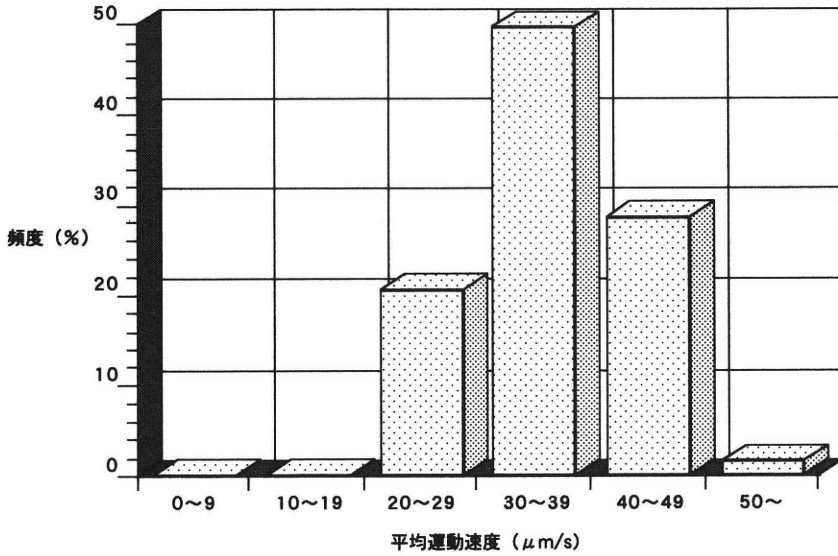


図5 運動速度の分布

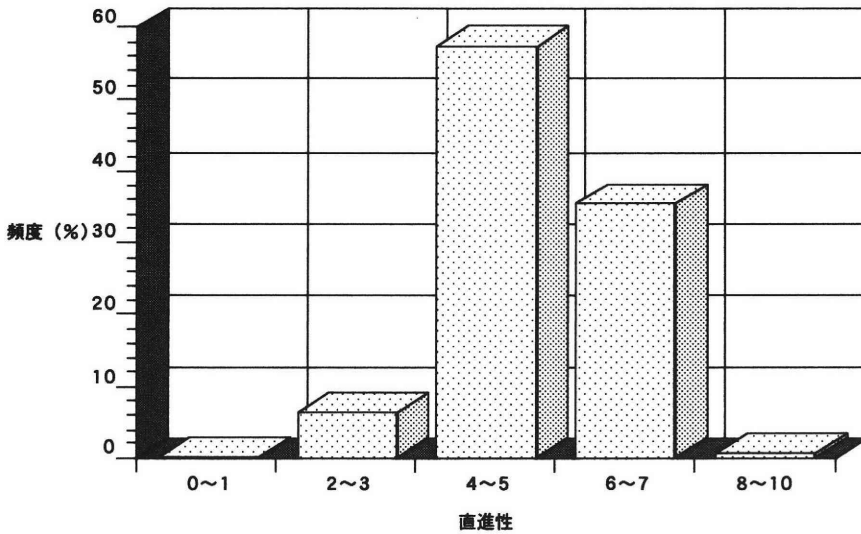


図6 直進性の分布

直進性に関しては5を標準値と考えた).

つぎに、精子運動性の変化を詳細に分析する目的で、本研究期間中に複数回のCASAによる精液検査が可能であった18例について、最も運動率が良好であった時と不良であった時の各パラメーターの変化を観察した結果(表3)、すべての項目が1%の危険率で有意差を示した。さらに運動率、前進運動率、速い直進運動率、非前進運動率は両者の平均値同士を比べるとそれぞれ、1.8、1.9、2.4、1.9倍に変化し、速い直進運動率が最も鋭敏に運動率の変化を反映して

表3 運動性の変化と各種パラメーター

	不良時	良好時
総運動率 (%)	20.0 ± 8.6	36.2 ± 11.6*
前進運動率 (%)	14.5 ± 6.5	27.9 ± 9.1*
速い直進運動率 (%)	2.6 ± 2.5	6.2 ± 3.3*
非前進運動率 (%)	4.0 ± 2.8	7.6 ± 2.6*
運動速度 (μm/s)	31.9 ± 5.0	36.1 ± 6.1*
直進性	4.7 ± 1.0	5.9 ± 0.7*

*p < 0.01
(n = 18, Mean ± S.D.)

いた。一方、同様に重要なパラメーターである運動速度、直進性はそれぞれ、1.1, 1.3倍と運動率に比べると小さい変化であった。

考 察

精子運動性はその測定の簡便性と受精能力とよく一致する^{9,10}ことなどから、男性不妊症の診断上重要な検査法となっている。しかし、その測定には測定者の主観による方法を採用している施設がほとんどであり、信頼性には問題があるとされている^{11,12}。1984年にCASAが発売されて以来、その有用性や限界が報告されている²⁻⁶が、製造会社がおのの機器の限界、すなわち $10 \sim 50 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度が測定可能領域であることを公表していないこと、多くの報告において機器の設定値が適切でないこと、関連学会や機関が適切な評価や標準値を示していないことなどから、現在のところCASAはそれ自身の持つ可能性について妥当な評価を受けていない⁷。しかしながら、適切な設定を行い限界を考慮してトレーニングを積んだ者が使用すれば再現性も良好で得られる情報は主観法に比べて多い¹³⁻¹⁵。不妊症患者精液を対象とした本研究においても、総運動率に比べて、平均すると前進運動率は約3/4程度の低値を示し、WHOの基準で診断をすると今回検討した症例ではほぼ99%がasthenozoospermiaに分類され、主観法や旧来のCASAに比べてより厳しい判定が可能であった。

精子運動能の変化をCASAを用いて検討することは、受精における精子運動の役割を考察する上で重要である。Lenziら¹⁶は、無精子症であったhypogonadotropic hypogonadism患者にFSH-hCG投与を行い継続してCASAを用いて精液検査を行ったところ、総運動率が発現したときではなく前進運動率が現れたときに妊娠に至ったと報告している。また、精索静脈瘤患者精液を対象にした研究において、始関ら⁵は旧式のCASAを用いた検討で特発性不妊症患者精液に比べて運動精子数の減少はみられるが、直進性や運動速度には変化が認められず、個々の運動精子能は精索静脈瘤患者において保持されていると報告している。これに対して、最近、Parikhら¹⁷は、精索静脈瘤高位結紮術前後の精液性状の変化をCASAを用いて詳細に分析し、術後、精子運動率の回復と同時に前進運動率や速い直進運動率が回復し、その回復の割合は後2者の方が高く、精索静脈瘤患者精子の運動性回復を観察する際にCASAを用いることによって、定量的かつ客観的な測定が可能になると報告

している。本研究においても、運動性の各パラメーターの変化を観察した結果、運動率、前進運動率、速い直進運動率、非前進運動率のなかで、速い直進運動率が最も鋭敏に運動率の変化を反映していたが、同様に重要なパラメーターである運動速度、直進性の変化は少なかった。このように、CASAで測定可能なパラメーターのうち、前進運動率と速い直進運動率は運動性の変化を観察するうえでとくに有効な指標となると考えられた。

我々は1988年より旧型CASAのひとつであるCellSoft 3000を使用しているがその印象は、1)高価格(購入当時約800万円)、2)分析速度が遅い(1検体の検査終了までに5~10分程度かかる)、というものである。しかし、この新しいバージョンは近年のコンピューター技術の改良により、従来に比べて処理速度の大幅な改善がなされており、2~3分で1検体の検査が終了($10 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度の検体に対して500個程度の精子を測定するのに要する時間)するまでに処理時間の短縮がなされている。CellSoft 4000および同様の機能を持つCASAは依然として高価格(1,000万円以上)であり、一層の低価格化が望まれるが、CASA自体の利用は検査時間の大幅な短縮、また得られる情報も従来の主観法や旧型CASAに比べて多いことなど、今後、精子運動能測定の標準的な方法になるものと考えられた。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金一般研究(C)課題番号06671617の援助を得て行われた。なお、CellSoft 4000を貸与された、(株)ニューロサイエンスに感謝いたします。

文 献

- 1) Sigman M, Howards SS (1995) Male infertility. In: Walsh PC, Retig AB, Stamey TA, et al. (eds) Campbell's Urology 6th ed. W.B.Saunders Company, Philadelphia, USA pp661-708
- 2) Ginsburg KA, Moghissi KS, Abel EL (1988) Computer-assisted human semen analysis sampling errors and reproducibility. J Androl 9: 82-90
- 3) Mortimer D, Goel N, Shu MA (1988) Evaluation of the CellSoft automated semen analysis system in a routine laboratory setting. Fertil Steril 50: 960-968
- 4) 植野卓也, 石津和彦, 林田英嗣 他(1989)精子自動分析装置と顕微鏡下精子算定法との比較検討—精子濃度別各パラメーターの比較—. 日不妊誌 34: 465-469

- 5) 始関吉生, 角谷秀典, 高原正信 他 (1991) 精子自動分析装置による精液検査. 日不妊誌 36: 655-659
 - 6) Davis RO, Katz DF (1992) Standardization and comparability of CASA instrument. J Androl 13: 81-86
 - 7) Davis RO, Katz DF (1993) Computer-aided sperm analysis: technology at a crossroads. Fertil Steril 59: 953-955
 - 8) World Health Organization (1992) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge University Press, Cambridge, UK
 - 9) Holtz WV, Moore HDM, Hiller SG (1985) Computer assisted measurement of sperm swimming speed in human semen: Correlation of results with in vitro fertilization rate. Fertil Steril 44: 112-119
 - 10) Fetterolf PM, Rogers BJ (1990) Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. Mol Reprod Dev 27: 326-331
 - 11) Jequier AM, Ukome EB (1983) Errors inherent in the performance of a routine semen analysis. Br J Urol 55: 434-436
 - 12) Dunphy BC, Kay R, Barratt CLR, et al. (1989) Quality control during the conventional analysis of semen, an essential exercise. J Androl 10: 378-385
 - 13) Holt W, Watson P, Curry M, Holt C (1994) Reproducibility of computer-aided semen analysis: comparison of five different systems used in a practical workshop. Fertil Steril 62: 1277-1282
 - 14) Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW (1996) Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. Fertil Steril 65: 150-155
 - 15) Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW (1996) Manual versus computer-automated semen analyses. Part II. Determination of the working range of a computer-automated semen analyzer. Fertil Steril 65: 156-159
 - 16) Lenzi A, Lombardo F, Gandini L, et al. (1993) Computer assisted sperm motility analysis at the moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. J Endocrinol Invest 16: 683-686
 - 17) Parikh FR, Kamat SA, Kodwaney GG, et al. (1996) Computer assisted semen analysis parameters in men with varicocele: is surgery helpful? Fertil Steril 66: 440-445
- (受付: 1996年9月27日)
(受理: 1996年10月17日)

Semen analysis of male infertility patients using a computer aided semen analyzer

Masaki Yotsukura, Yuichi Tohyama, Masayuki Iwabuchi, Shigeru Oshio,
Hiroshi Tomomasa, Tsunetada Yazaki and Takashi Umeda

Department of Urology
Teikyo University School of Medicine, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

One hundred and forty one human semen specimens from 80 male infertility patients were analyzed using a newly developed computer aided semen analyzer (CASA: CellSoft system 4000).

Sperm concentration and total sperm motility were $39.8 \pm 28.0 \times 10^6/\text{ml}$ and $32.8 \pm 12.7\%$, respectively. By means of WHO classification for sperm motility, progressive motility and rapid linear progressive motility were $24.9 \pm 10.3\%$ and $6.2 \pm 4.6\%$, respectively. Both of them showed lower values than the normal values. To investigate sperm motility more precisely, we examined the changes of the quality of sperm motility (total motility (M), progressive motility (P), rapid linear progressive motility (R), non progressive motility (N), velocity (V), linearity (L)) for the specimens from the patients which can examine more than two times during the research period. Mean values of M, P, R and N were about 1.8, 1.9, 2.4 and 1.9 times, respectively, when compared its higher value with its lower one. On the other hand, V and L were about 1.1 and 1.3 times, respectively.

These results suggest that CASA measurement provide an important information about the quality of sperm motility which cannot be obtained by manual method.

Key words: male infertility, semen analysis, sperm motility, CASA, progressive motility

Ficollを用いたウマ精子運動性の評価方法

Evaluation of Equine Sperm Motility Using Ficoll Solution

帯広畜産大学畜産学部家畜臨床繁殖学教室

宮澤 清志
Kiyoshi MIYAZAWA

清水 徹
Tohru SHIMIZU

大崎 和栄
Kazue OHSAKI

佐藤 邦忠
Kunitada SATO

Department of Theriogenology

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan

精子の運動性を客観的に評価する方法について検討するため、重種ウマ22頭の精液を使用し、諸濃度のFicoll溶液中の精子運動性について観察した。

27.5%Ficoll溶液中で運動性+3～+2の精子のうち93.4%が運動性±を示した。本検査法の変動係数は、平均1.6%であった。Ficoll溶液添加前後の生存率に変化はなかった。以上の結果から本検査法は、ウマ精子運動性の評価に使用できることがわかった。

キーワード：Ficoll液、ウマ、運動性、精子

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 74 - 77, 1997)

緒言

精子運動性の客観的検査法には、雌ウシの発情粘液を用いた子宮頸管粘液通過試験¹⁻³⁾、フィルター通過試験⁴⁾、細胞培養液を用いた希釈液通過試験⁵⁾、分光光度計を用いた比濁法⁵⁻¹⁰⁾、Marker counting chamber法¹¹⁾ならびに精液自動分析装置を用いた判定法¹²⁻¹⁶⁾などがある。これらの検査法はヒト、ウシ、ヒツジならびにウマについて報告されており、ヒトでは広く臨床で応用されているにもかかわらずウシおよびウマの臨床では実際の使用例は少ない。その理由は、大動物では飼育場所で精液検査をする場合が多いため、機器を用いた複雑な検査法を避け、主観に頼る検査法が用いられているためである。そこで、末次ら¹⁷⁾はウシの精子について客観的かつ簡便な検査をするため、Ficollの粘性を利用して精子の前進運動を振り運動に変化させ顕微鏡下で判定する方法を考案した。著者らはこの方法に基づきウマの精子の検査法について検討した。

材料および方法

Ficoll溶液の濃度の選択

重種ウマ22頭から精液を採取し、滅菌ガーゼを用いて膠様物を濾過除去後ただちにSwim-up法¹⁸⁾により運動性+3～+2の精子を分離した。また試験管の底部に残った精子をそのまま放置し、運動性+～-の精子を作成した。BWW培地¹⁹⁾が精子の運動性を低下させたためスキムミルク希釈液¹⁹⁻²¹⁾を使用したところ精子運動性の低下はみられなかった。そこでスキムミルク希釈液を用いて作製した26, 27, 27.5ならびに28%Ficoll溶液それぞれ1mlに、同希釈液を用いて精子数 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した運動性+3～+2および+～-精子懸濁液0.1mlを加え軽く混和し、37℃の加温下で精子の運動性の変化を観察した。運動性は精子の動きを+3～+2, +, ±ならびに-の4段階に分類し、百分率で表示した。

再現性

Ficollの濃度を選択した結果から、最適濃度と認められた27.5%Ficoll溶液を用いて5頭のウマの精液に

ついてそれぞれ4回精子の運動性を測定し再現性を求めた。

生存率

精子を最適濃度と認められた27.5% Ficoll溶液に添加する前と添加5分後のエオジン塗沫標本を作製し生存率を求めた。

結 果

Ficoll溶液の濃度

26% Ficoll溶液中にSwim-up法により選別した運動性+3~+2の精子(97%以上)を加えたところ23.3%が運動性+に、75.4%が±に、1.3%が-に低下した。27% Ficoll溶液中に運動性+3~+2の精子を加えたところ4.4%が運動性+に、89.8%が±に、5.8%が-

に低下した。27.5% Ficoll溶液中に運動性+3~+2の精子を加えたところ2.3%が運動性+に、93.4%が±に、4.3%が-に低下した。28% Ficoll溶液中に運動性+3~+2の精子を加えたところ1.4%が運動性+に、84.2%が±に、14.4%が-に低下した。この結果27.5% Ficoll濃度が最適であることがわかった。またSwim-up法で残留した運動性+~-の精子を26, 27, 27.5ならびに28% Ficoll溶液中に添加したところ運動性-を示した精子の比率は、それぞれ85.9, 99.8, 99.9ならびに99.6%であった(図1, 図2)。

再現性

Ficoll濃度の検討結果から27.5% Ficollを用いて本測定法の変動係数を求め表1に示した。変動率の平均値は1.6%であった。

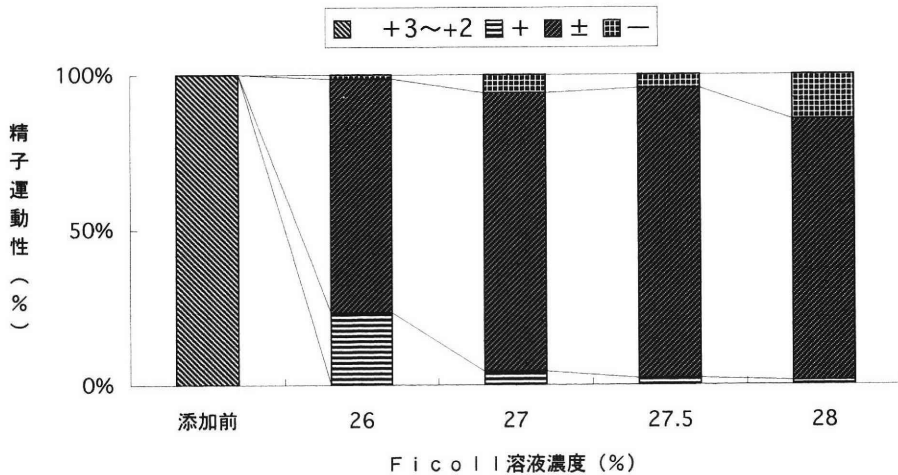


図1 26%~28% Ficoll溶液に添加した運動性+3~+2精子の運動性の変化

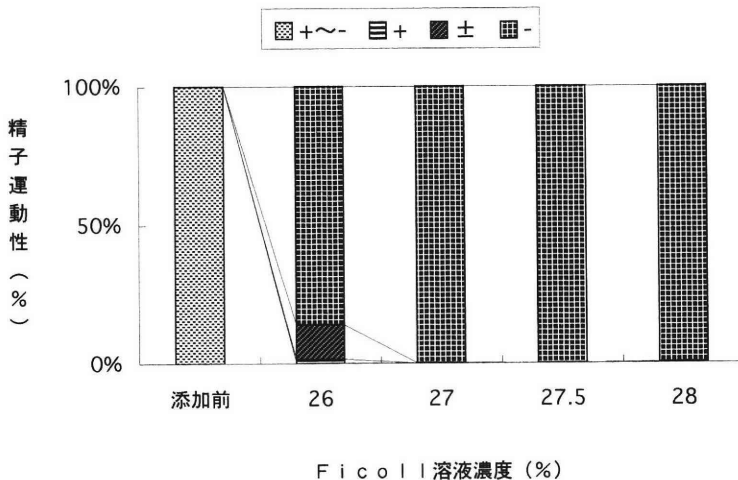


図2 26%~28% Ficoll溶液に添加した運動性+~-精子の運動性の変化

表1 27.5% Ficoll 溶液を用いて測定した精子運動性の再現性

検体	測定回数	精液中の運動性 +3 ~ +2 精子% (Mean \pm S.D.)	変動係数
A	4	55.7 \pm 0.7	1.3
B	4	57.5 \pm 1.6	2.8
C	4	71.6 \pm 1.1	1.5
D	4	72.6 \pm 0.8	1.0
E	4	65.1 \pm 0.8	1.2

生存率

27.5% Ficoll 溶液に添加する前の精子の生存率は 90.3 \pm 4.1%, 添加後は 89.3 \pm 4.2% で両者の間に有意な差はなかった (0.1 > P).

考 察

ウマ精子は、急速に運動性が低下するため試験に用いる希釈液を選択する必要がある。末次ら¹⁷⁾は本法によるウシ精子の検査に Dalbeco の Eagle 培地を、また Jasko ら⁷⁾はウマ精子に BWW 培地を用いていたため本試験でも使用してみたが精子運動性が著しく低下した。Jasko ら⁷⁾が使用した BWW 培地が、本試験では、なぜ精子の運動性を維持できなかったのか明らかではないが、培地の製造条件の差、あるいは精液の個体差が考えられる。

精液に他の物質を添加すると精子運動性および生存率が影響を受けることは良く知られているが¹⁸⁾、本試験に用いた Ficoll については、ヒト精子の選別に用いられ、精子に対する影響はないと報告されている^{18,22,23)}。今回の結果からも生存率に影響のないことが確認できた。したがって、運動性の検査に使用することには問題はないが、この精子を洗浄し Ficoll を除去後受精に使用する場合には、催奇性の恐れもあるため実験動物による検討が必要である。

再現性について検討したところ変動係数は小さく、安定した測定法であると考えられた。しかしウマ精子の運動性は、ウシと異なり急速に低下する個体があるため、1 回目の検査の後、再検査を行う必要が生じた場合には直ちに実施することが肝要である。

文 献

- 1) Murase T, Braun JW (1990) Impact of methodological factors on sperm penetration into cervical mucus in cattle. *Theriogenology* 34: 73-80
- 2) William WH, Jeffrey MG, Megan SK, et al.

- (1992) The effect of cocaine on sperm motility characteristics and bovine cervical mucus penetration. *Fertil Steril* 57: 178-182
- 3) Bologh L, Szasz F, Zoldog L, et al. (1995) In vitro and in vivo motility studies of 99mTc HM-PAO labelled sperm cells. *Acta Veterinaria Hungarica* 43: 63-77
- 4) Strzemienski PJ, Sertich PL, Varner DD, et al. (1987) Evaluation of cellulose acetate/nitrate filters for the study of stallion sperm motility. *J Reprod Fertil-Suppl* 35: 33-38
- 5) Suttiyotin P, Thwaires CJ, Baillie ND (1992) Relationships between the results of a modified sperm penetration test and a swim-up technique and the fertility of ram semen. *Theriogenology* 37: 851-857
- 6) Suttiyotin P, Thwaires CJ (1992) Comparison of a Swim-up technique with the Hamilton Thorn Motility Analyser for measurement of sperm velocity and motility. *Reprod Fertil Dev* 4: 153-160
- 7) Jasko DJ, Smith K, Little TV, et al. (1989) A spectrophotometric procedure for the determination of objective measurements of equine spermatozoan motility. *Theriogenology* 31: 945-954
- 8) Joseph ES, Luis B, Bayard TS, et al. (1977) Thrbidimetric analysis of human sperm motility. *Fertil Steril* 28: 1337-1341
- 9) Levin RM, Hypolite JA, Wein AJ (1984) Clinical use of the turbidimetric analysis of sperm motility. *Andrologia* 16: 434-438
- 10) Robert WA (1975) An objective method for evaluating angus and hereford sperm motility. *Int J Fertil* 20: 109-112
- 11) 柳田 薫, 星 和彦, 月川 奏 他 (1989) 精液分析の方法 (Semen Auto Analyzer による分析法と Marker counting chamber の特性). *日不妊会誌* 34: 893-901
- 12) Budworth PR, Amann RP, Hammerstedt RH (1987) A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. *J Dairy Sci* 70: 1927-1936
- 13) Jasko DJ, Little TV, Smith K, et al. (1988) Objective analysis of stallion sperm motility. *Theriogenology* 30: 1159-1167
- 14) Mathur S, Carlton M, Ziegler J, et al. (1986) A computerized sperm motion analysis. *Fertil Steril* 46: 484-488
- 15) Knuth UA, Yeung C, Nieschlag E (1987) Computerized semen analysis: objective measurement of semen characteristics is based by subjective parameter setting. *Fertil Steril* 48: 118-124
- 16) Jasko DJ, Lein DH, Foote RH (1990) A compar-

- ison of two computer-automated semen analysis instruments for evaluation of sperm motion characteristics in the stallion. *J Androl* 11: 453-459
- 17) Suetsugu K, Miyazawa K, Ohsaki K, et al. (1994) Evaluation of bovine sperm motility using ficoll solution in high concentration. *Jpn J Fertil Steril* 39: 46-48
- 18) Ariff B, Ho L, Soon-Chye N, et al. (1989) Improved sperm concentration, motility and fertilization rates following ficoll treatment of sperm in a human in vitro fertilization program. *Fertil Steril* 51: 850-854
- 19) Kenny RM, Bergmann RV, Cooper WL, et al. (1975) Minimal contamination techniques for breeding mares: Technique and preliminary findings. *Proc Am Ass in Equine Practitioners*: 327-336
- 20) Franci AT, Amann RP, Squires EL, et al. (1987) Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender after 12 or 24 hours at 20 °C. *Theriogenology* 27: 517-525
- 21) Douglas-Hamilton DH, Osol R, Osol G, et al. (1984) A field study of the fertility of transported equine semen. *Theriogenology* 22: 291-304
- 22) 兼子 智, 森脇千秋, 佐藤博久 他 (1980) ヒト精子の客観的運動能解析法の開発—とくにFicoll溶液を用いた洗浄精子について— *日不妊会誌* 25: 491-496
- 23) 谷川正浩, 蓮沸智恵子, 高尾成久 他 (1992) 体外受精・胚移植時の精子処理における3層密度勾配法の有用性について—Swim-up法との比較検討— *日不妊会誌* 37: 232-236
(受付: 1996年8月28日)
(受理: 1996年10月21日)

Evaluation of Equine Sperm Motility Using Ficoll Solution

Kiyoshi Miyazawa, Tohru Shimizu, Kazue Ohsaki and Kunitada Sato

Department of Theriogenology

Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro 080, Japan

An objective method for evaluation of stallion sperm motility using 27.5 % ficoll solution was developed. With 27.5 % ficoll solution, 93.4 % of sperm changed their +3 ~ +2 original motility to \pm motile sperm. Mean value of coefficient of variation in precision of sperm motility was 1.6 %. No significant difference in sperm viability was observed before and after addition of ficoll solution.

The results suggest that ficoll solution method is useful for objective analysis of stallion sperm motility.

Key words: ficoll, horse, motility, sperm

単為発生マウス胚盤胞における各種酵素の組織化学的研究

Histochemical Studies of Enzymes in 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倍体のマウス胚盤胞について、各種酵素の活性を組織化学的に検出して物質代謝を検討し、受精卵子から発生した胚盤胞のものと比較した。

acid phosphatase, α -glycerophosphate dehydrogenase および NADH_2 dehydrogenase の活性は、単為発生胚盤胞および受精卵子から発生した胚盤胞のいずれにも弱度ないし強度に認められたが、強度の活性を示す胚盤胞の数は単為発生させたもので有意に少なかった。一方、cytochrome oxidase, alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase, non-specific esterase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, β -hydroxybutyrate dehydrogenase, Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase および NADPH_2 dehydrogenase の活性は、単為発生させた胚盤胞と受精卵子から発生した胚盤胞の間で有意な差はみられなかった。

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物質の消化能、糖と脂質の相互転換能、NADHの酸化能力が低いことが考えられた。

キーワード：マウス、単為発生胚盤胞、酵素、組織化学

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 78 - 82, 1997)

緒 言

マウス胚の微細構造を観察した報告¹⁻³⁾によると、単為発生胚では、受精卵子から発生した胚に比べ核小体に占める核小体糸の割合が高いとともに、空胞状のクリステをもつミトコンドリアは多いが、ゴルジ装置、ライソソーム、リボソームなどの細胞質小器官は少ないといわれている。また、発生のためのエネルギー源として細胞質に蓄積している脂質およびタンパク質性封入体の量は、受精卵子から発生した胚盤胞に比べ単為発生胚盤胞では少ないこと

もマウスで形態学的に調べられている^{1,4)}。これらのことから、単為発生胚の物質代謝は受精卵子から発生した胚に比べ低下していることが推察されている^{1,3,4)}。

単為発生胚の物質代謝については、これまでにグルコースとピルビン酸の代謝⁵⁾およびタンパク合成⁶⁾がいずれもマウスで生化学的に調べられており、これらの代謝あるいは合成はいずれも受精卵子から発生した胚に比べ低かったといわれている。しかし単為発生胚において、これら以外の物質の代謝を観察して受精卵子から発生した胚と比較した報告はみら

れない。

本研究は、エタノールとサイトカラシンBの処置を施して発生させた2倍体のマウス胚盤胞について、各種酵素の活性を組織化学的に検出して物質代謝を検討し、受精卵子から発生した胚盤胞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100μM含むM2⁷⁾(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5μg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⁸⁾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。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。観察に用いた胚盤胞は、単為発生させたものおよび受精卵子から発生させたもの、ともに直径が80ないし100μmのものである。

観察した酵素は、cytochrome oxidase, alkaline phosphatase (ALPase), acid phosphatase (ACPase), adenosine triphosphatase (ATPase), non-specific esterase (Etase), succinate dehydrogenase (SDH), lactate dehydrogenase (LDH), α-glycerophosphate dehydrogenase (α-GDH), β-hydroxybutyrate dehydrogenase (β-HbDH), Δ⁵-3β-hydroxysteroid dehydrogenase (Δ⁵-3β-HSD), NADH₂ dehydrogenase (NADH₂-DH) およびNADPH₂ dehydrogenase (NADPH₂-DH)である。これらの酵素活性の検出に用いた基質と方法はTable 1に示した通りである。なお、いずれの種類の酵素の検出においても、基質を含まない液に浸漬した胚盤胞を対照として使用した。

処置した胚盤胞はあらかじめワセリン・パラフィンのスポットをカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し、カバーガラスをかぶせ静かに押して胚を押し、顕微鏡下で観察した。

数値の統計処理はχ²検定法を用いて行った。

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、70%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、40%が胚盤胞に発生した。一方、受精卵子を培養したところ、58%が胚盤胞に発生した。

Table 1 Enzymes and their substrates

Enzymes	Substrates	Methods
Cytochrome oxidase	p-Aminodiphenylamine	Burstone ⁹⁾
ALPase	Naphthol AS-BI phosphate	Burstone ⁹⁾
ACPase	Naphthol AS-BI phosphate	Burstone modified by Barka ¹⁰⁾
ATPase	Adenosine triphosphate	Ogawa and Mayahara ¹¹⁾
Etase	Naphthol AS-LC acetate	Burstone ¹⁰⁾
SDH	Sodium succinate	Nachlas et al. ⁹⁾
LDH	Sodium DL-lactate	} Barka and Anderson ¹²⁾
α-GDH	DL-α-Glycerophosphate	
β-HbDH	DL-β-Hydroxybutyric acid	
NADH ₂ -DH	NADH	
NADPH ₂ -DH	NADPH	
Δ ⁵ -3β-HSD	Dehydroepiandrosterone	Dickmann and Dey ¹³⁾

Table 2 Enzyme activities in mouse blastocysts

Blastocysts	Enzymes											
	Cytochrome oxidase	ALP ase	ACP ase	ATP ase	Etase	SDH	LDH	α -GDH	β -HbDH	Δ^5 -3 β -HSD	NADH ₂ -DH	NADPH ₂ -DH
Parthenogenone												
Strong	21 (35.0)	22 (53.7)	13 ^a (32.5)	22 (68.8)	0 (0)	14 (33.3)	26 (59.1)	11 ^a (30.6)	17 (54.8)	22 (55.0)	8 ^c (29.6)	15 (41.7)
Weak	39 (65.0)	19 (46.3)	27 ^b (67.5)	10 (31.2)	35 (100.0)	28 (66.7)	18 (40.9)	25 ^b (69.4)	14 (45.2)	18 (45.0)	27 ^d (70.4)	21 (58.3)
Control (Fertilized)												
Strong	28 (52.8)	25 (62.5)	23 ^a (67.5)	21 (70.0)	0 (0)	20 (55.6)	25 (59.5)	20 ^a (62.5)	23 (74.2)	22 (56.4)	23 ^c (69.7)	24 (63.2)
Weak	25 (47.2)	15 (37.5)	17 ^b (32.5)	9 (30.0)	38 (100.0)	16 (44.4)	15 (40.5)	12 ^b (37.5)	8 (25.8)	17 (43.6)	10 ^d (30.3)	14 (36.8)

The numbers in parentheses show the percentages of blastocysts.

Values with same superscripts in the same column are significantly different(a,b,p < 0.05, c,d;p < 0.01).

マウスの単為発生胚盤胞および受精卵から発生した胚盤胞を、各種酵素の活性検出のための基質液に浸漬したところ、すべての胚盤胞に反応産物の沈着が認められた (Fig. 1 ~ 3)。反応産物は、基質を除いた液に浸漬した対照の胚盤胞には出現しなかったため、反応産物が酵素活性の存在を示していることが確かめられた。本実験では、酵素活性の強さを反応産物の沈着量によって強度と弱度の2段階に分類した。

酵素活性の強さについて得られた成績はTable 2に示した通りである。

Cytochrome oxidase: Burstone法⁹⁾によって胚盤胞を処理すると、cytochrome oxidaseの活性部位には基質とカップリングしたピラゾロンの赤褐色顆粒が沈着した。この顆粒は栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞質に認められたが、その量は内細胞塊細胞が多かった。強度の活性を示す胚盤胞の割合は、単為発生させたものと受精卵から発生したものと間で相違なかった。

Phosphatase: Burstone法のBarka改良法¹⁰⁾あるいはBurstone法¹⁰⁾によって胚盤胞を処理すると、ACPaseの活性部位には基質とカップリングしたレッドバイオレットLBの褐色顆粒 (Fig. 1 a, b) が、Etaseの活性部位には基質とカップリングしたガーネットGBCの褐色顆粒が細胞質に沈着した。これらACPaseおよびEtaseの活性を示す反応産物は栄養膜と内細胞塊の両種細胞の細胞質にみられ、反応産物の沈着量は両種細胞間で相違なかった。また、Burstone法⁹⁾あるいはOgawaとMayahara法¹¹⁾に従って胚盤胞を処理すると、

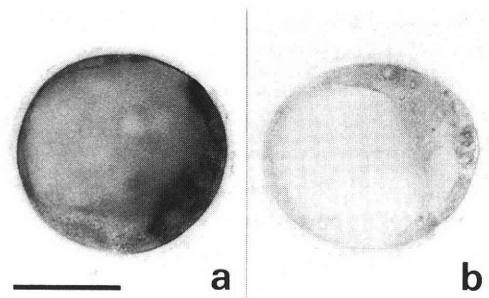


Fig. 1 The activity of acid phosphatase in control (a) and parthenogenetic (b) mouse blastocysts. Scale indicates 50 μ m. a. Strong activity. b. Weak activity.

ALPaseの活性部位には基質とカップリングしたレッドバイオレットLBの褐色顆粒が、ATPaseの活性部位には硫化鉛の黒色顆粒が、それぞれ細胞膜に沈着した。ALPaseの活性を示す反応産物は栄養膜細胞の細胞膜にのみみられたが、ATPaseの活性を示す反応産物は栄養膜細胞と内細胞塊細胞の両者の細胞膜に認められた。Table 2に示したように、強度のACPase活性を示す胚盤胞の割合は、単為発生させたものでは受精卵から発生したものに比べ有意に低かったが、ALPase、ATPaseおよびEtaseについては両者の胚盤胞で活性に有意な差はみられなかった。

Dehydrogenase: Nachlasらの方法⁹⁾、BarkaとAnderson法¹²⁾あるいはDickmannとDey法¹³⁾によって胚盤胞を処理すると、SDH、LDH、 α -GDH (Fig. 2 a, b)、 β -HbDH、 Δ^5 -3 β -HSD、NADH₂-DH (Fig. 3 a, b) お

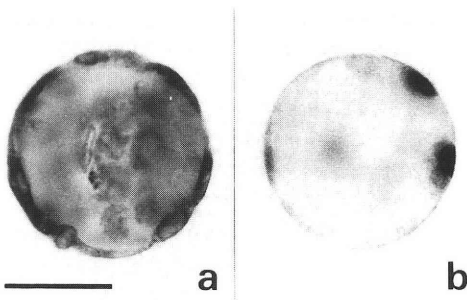


Fig. 2 The activity of α -glycerophosphate dehydrogenase in control (a) and parthenogenetic (b) mouse blastocysts. Scale indicates $50\mu\text{m}$. a. Strong activity. b. Weak activity.

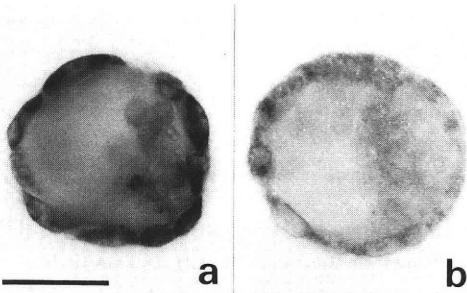


Fig. 3 The activity of NADH_2 dehydrogenase in control (a) and parthenogenetic (b) mouse blastocysts. Scale indicates $50\mu\text{m}$. a. Strong activity. b. Weak activity.

よび NADPH_2 -DHの活性を示す青色のジホルマゼン顆粒が栄養膜細胞と内細胞塊細胞の細胞質に出現した。この顆粒の沈着量は、LDHでは内細胞塊細胞に比べ栄養膜細胞で多かったが、LDH以外の脱水素酵素では両細胞間で沈着量に相違はみられなかった。表2にみられるように、強度の α -GDHと NADH_2 -DHの活性を示す胚盤胞の割合は、受精卵子から発生したものに比べ単為発生させたもので有意に低かったが、それら以外の脱水素酵素については両者の胚盤胞で活性に有意な差はみられなかった。

考 察

マウスの単為発生胚において、グルコースとピルビン酸の代謝⁵⁾およびタンパク合成⁶⁾はいずれも受精卵子から発生した胚に比べると低いことが生化学的に調べられているとともに、代謝活性が低いことを示唆する形態学的な報告^{1,3,4)}もみられる。

単為発生胚盤胞を用いた本実験において、各種酵素の活性を組織化学的に検出して物質代謝を調べた。

その結果、単為発生胚盤胞では受精卵子から発生したものに比べ、ACPase、 α -GDHおよび NADH_2 -DHの活性が低下していることが確かめられ、単為発生胚では上述のグルコース、ピルビン酸およびタンパクの代謝ばかりでなく、物質の消化能、糖と脂質の転換能およびNADHの酸化能も受精卵子から発生した胚に比べて低いことが推察された。一般に、哺乳動物の単為発生胚では発生能が低いことが知られている¹⁴⁾。このような単為発生胚の発生能の低さの原因については明らかではないが、本実験の各種酵素の活性に関する観察結果から考えると、上述のような代謝活性の低さがその一因のように思われた。なお少数の単為発生胚盤胞では、強いACPase、 α -GDHおよび NADH_2 -DHの活性が観察され、このような胚では受精卵子から発生した胚盤胞と同様に物質の消化、糖と脂質の転換およびNADHの酸化が行われていることも考えられた。

先に著者ら⁴⁾はマウスの単為発生胚盤胞において、受精卵子から発生した胚盤胞との間でグリコゲン含量には有意な差はみられなかったが、脂質含量は有意に少ないことを観察して報告した。今回単為発生胚盤胞で α -GDHの活性が有意に低下していることが確かめられたことから考えると、単為発生胚盤胞で脂質含量が少ないのは、糖から脂質への転換量が少ないためであることが推察された。また、本実験の単為発生胚盤胞でACPaseの活性が低い理由として、単為発生胚盤胞のライソソームの数は受精卵子から発生した胚盤胞よりも少ないことが電子顕微鏡的に確かめられているので^{1,3)}、このことが単為発生胚盤胞のACPase活性の低さの原因のように思われた。

単為発生胚のミトコンドリアは、受精卵子から発生したものに比べ空胞状のクリステをもつものが多いといわれており¹⁻³⁾、単為発生胚のミトコンドリアの機能低下が推察されている¹⁻³⁾。本実験において、ミトコンドリアに存在する酵素として細胞呼吸に関係しているSDHとcytochrome oxidase、脂肪酸代謝に関与している β -HbDH、NADおよびNADP依存性の脱水素酵素によって産生されるNADHおよびNADPHの酸化に役割を果たしている NADH_2 -DHと NADPH_2 -DHの活性を検出してミトコンドリア機能について検討した。その結果、単為発生胚盤胞では NADH_2 -DHの活性が有意に低いとともに、これ以外の酵素の活性も有意差はみられないものの受精卵子から発生した胚盤胞に比べ低かった。本実験の単為発生胚盤胞のミトコンドリア機能に関する組織化学的な結果は、既述の電子顕微鏡による観察結果¹⁻³⁾

を反映したもので、このような単為発生胚盤胞におけるミトコンドリアの機能低下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に起こるものであることが考えられた。

文 献

- 1) Solter D, Biczysko W, Graham C, et al. (1974) Ultrastructure of early development of mouse parthenogenones. *J Exp Zool* 188: 1-24
- 2) Anderson E, Hoppe PC, Lee GS (1984) The karyotype and ultrastructural characteristics of spontaneous preimplantation mouse parthenotes. *Gamete Res* 9: 451-467
- 3) 新村末雄, 浅見貴恵 (1996) 単為発生マウス胚盤胞の微細構造. *日不妊会誌* 41:186-190
- 4) 新村末雄, 浅見貴恵 (1996) 単為発生マウス胚盤胞の細胞質封入体の量. *日不妊会誌* 41: 234-239
- 5) Ryan JP, Waite KM, Catt JW (1994) Metabolism of energy substrates following fertilization or parthenogenetic activation of mouse oocytes. *Theorogenology* 41: 288
- 6) Petzoldt U, Hoppe PC (1980) Spontaneous parthenogenesis in *Mus musculus*: Comparison of protein synthesis in parthenogenetic and preimplantation embryos. *Molec Genet* 180: 547-552
- 7) Whittingham DG, Fulton BP (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273: 149-151
- 8) Whittingham DG (1971) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Supple* 14: 7-21
- 9) Burstone MS (1962) *Enzyme Histochemistry*. Academic Press, New York and London, pp275-276, 461, 512-513
- 10) Bancroft JD (1967) *An Introduction of Histochemical Techniques*. Butterworths, London, pp192-194, 207-208
- 11) Ogawa K, Mayahara H (1969) Intramitochondrial localization of adenosine triphosphatase activity. *J Histochem Cytochem* 17: 487-490
- 12) Barka T, Anderson PJ (1965) *Histochemistry*. Hoeber Medical Division, Harper and Row, Publishers, Inc., New York, Evanston and London, pp296-333
- 13) Dickmann Z, Dey SK (1973) Two theories: the preimplantation embryo is a source of steroid hormone controlling (1) morula-blastocyst transformation, and (2) implantation. *J Reprod Fert* 35: 615-617
- 14) Whittingham DG (1980) Parthenogenesis in mammals. In: Finn CA (ed), 2nd ed, *Oxford Reviews of Reproductive Biology*. Clarendon Press, Oxford, pp205-231

(受付: 1996年 9月 18日)

(受理: 1996年 10月 22日)

Histochemical studies of enzymes in 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 activities of various enzymes in parthenogenetic mouse blastocysts derived from the eggs activated and diploidized by the treatment of ethanol and cytochalasin B were histochemically examined, and were compared with those in control blastocysts developed from fertilized eggs.

The activities of acid phosphatase, NADH₂ dehydrogenase and α -glycerophosphate dehydrogenase were weaker in parthenogenetic blastocysts than in control blastocysts, showing lower abilities of digestion, NADH oxidation and interconversion between carbohydrates and lipids in parthenogenetic blastocysts. On the other hand, no differences were found between parthenogenetic blastocysts and control blastocysts in the activities of cytochrome oxidase, alkaline phosphatase, adenosine triphosphatase, non-specific esterase, succinate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, β -hydroxybutyrate dehydrogenase, Δ^5 -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and NADPH₂ dehydrogenase.

Key words: mouse, parthenogenetic blastocyst, enzyme, histochemistry

反復流産症例における免疫療法と抗HLA抗体産生について

Production of Anti-HLA Antibody in the Cases of Recurrent Spontaneous Abortion after Immunotherapy

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

齊藤 正博 石原 理 関 博之
Masahiro SAITOH Osamu ISHIHARA Hiroyuki SEKI

竹田 省 木下 勝之
Satoru TAKEDA Katsuyuki KINOSHITA

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

埼玉医科大学総合医療センター輸血部

平田 蘭子 前田 平生
Ranko HIRATA Hiroo MAEDA

Department of Blood Transfusion Service
Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

反復流産患者に対するリンパ球輸血(免疫療法)の有用性については数多くの報告があるが、そのメカニズムには不明な点が多い。そこで、免疫療法による抗HLA抗体の産生の有無とその産生要因などについて検索し、妊娠継続の可否との関連を検討した。

反復流産症例32例に夫リンパ球による免疫療法を施行し24例の35妊娠中28妊娠で生児を得た(妊娠継続率80%)。抗HLA抗体は32例中12例(37.5%)に認められたが、抗HLA抗体の産生と妊娠継続に関連はなかった。抗HLA抗体産生例は夫婦間のHLA-B抗原共有数が0である場合に有意に多く認められた。さらに、抗HLA抗体産生者12例のうち10例(83.3%)がHLA-A抗原に対する特異性を示した。また、反復流産患者の夫婦間のHLA抗原共有数は健常対照群と有意な差を認めなかった。

キーワード：反復流産，免疫療法，リンパ球細胞傷害試験(LCT)，HLAタイピング

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 83 - 89, 1997)

緒 言

Komlos¹⁾などが1977年に反復流産患者の夫婦間におけるHLA抗原の共有数が多いことをはじめ報告して以来、産婦人科領域の母児免疫におけるHLA抗原の役割が注目されてきた。今日まで習慣流産症例におけるHLA抗原に関してさまざまな検討がなされてきたばかりでなく、Taylorら²⁾およびBeerら³⁾が1981年に原因不明の習慣流産患者に夫リンパ球を用いた免疫療法をはじめて施行して以来、本療法の有効性に関する報告^{4-7,9)}が多数なされている。しかし、免

疫療法の作用機序についてはいまだ明らかでない点が多く、免疫療法の有効性を評価する指標として、臨床的には妊娠の継続率、検査学的には抗HLA抗体の産生、blocking factorの産生、NK活性の変化などが用いられてきたが、いまだ、臨床経過と検査所見との間に一定の見解を得るに至っていない。今回、我々は、免疫療法を行った反復流産夫婦について妻血清中の抗HLA抗体を測定し、抗HLA抗体の産生の有無と妊娠の転帰および夫婦間のHLA共有率の関係について検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

1989年12月より1993年12月までの約4年間に原因不明の妊娠12週以前の初期流産を2回以上繰り返した挙児希望を有する32例を対象とした。これらの反復流産症例に対して夫婦両者の染色体検査, 抗核抗体, 抗SS-A抗体, 抗SS-B抗体, 抗ds-DNA抗体, ループスアンチコアグラント, 抗カルジオリピン抗体や β 2-glycoprotein Iなどの検索によりSLEや抗磷脂質抗体症候群などの自己免疫疾患の可能性を調査した。また, 他の内科基礎疾患(糖尿病, 甲状腺機能亢進症, 凝固異常)の検索, LH-RHテスト, TRHテストによる内分泌学的スクリーニング, HSGによる子宮奇形の有無を検証し, 反復流産の原因を検索した。以上の検索により異常を認めず, 原因不明と判断した反復流産症例に対して夫リンパ球による免疫療法を施行した。

2. 免疫療法

夫リンパ球による免疫療法は, 夫の感染症検査(梅毒血清反応, HBs抗原, HCV抗体, HTLV-I抗体, HIV-I抗体など)に異常のないことを確認後に, 以下のように施行した。夫より採取したヘパリン加静脈血40 mlよりFicoll-Conrayを用いた比重遠沈法によりリンパ球を分離し, 滅菌生理食塩水で洗浄後, $2 \sim 4 \times 10^7$ 個/mlに濃度を調製した。これを妻の前腕皮内4か所に接種し, 同様の接種を2週ごとに計4回繰り返した。

3. HLAタイピングと抗HLA抗体の検出

対象症例全例において夫婦両者のHLAタイピング

を既報のように施行した¹⁴⁾。さらに, 免疫前後の患者血清中の抗HLA抗体の存在についてパネルリンパ球を用いたLymphocyte cytotoxicity test (LCT)法により検討した。この結果, LCTにおいてT細胞およびB細胞に反応した抗リンパ球抗体をLCT-T, B細胞のみに反応したものをLCT-Bと表現した。さらに, 29名のすでにHLAタイピングをされたパネル細胞に対する反応性をみて産生された抗HLA抗体の抗原特異性を検討した。

以上に述べた検索と治療後の妊娠についてその妊娠継続率, 抗HLA抗体産生率, 抗HLA抗体の産生と夫婦間のHLA共有抗原数の関係や反復流産夫婦と健常対象群のHLA共有抗原数について検討を加えた。この際, 流産の既往歴のない2人あるいはそれ以上の子供を有する対照coupleのHLA抗原のデータを有しないため, すでに, HLAタイピングを施行している健常日本人男女各183例をランダムに組み合わせた仮想のcoupleを作り, 男女のHLA抗原共有率を算出し健常対照群とした。

4. 統計学的検討

統計学的検討は, χ^2 検定により行い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

成績

1. 患者背景

習慣流産患者の年齢は20歳より40歳に分布し, その平均年齢は 32.0 ± 4.4 歳であった(Table 1)。また, 流産歴として既往流産回数は最高5回, 平均流産回数は 2.6 ± 0.7 回, 3回以上の流産既往症例は17例(53%)であった。

Table 1 Characteristics of couples with recurrent spontaneous abortion

Frequency of abortion	More than 3 times	More than twice
Number of couples	17	32
Material age (Mean \pm S.D.) (range: 20 and 40 y.o.)	32.0 ± 3.4	32.0 ± 4.4
Number of abortions (Mean \pm S.D.) (range: 2 and 5 times)	3.2 ± 0.5	2.6 ± 0.7

Table 2 Subsequent pregnancies after immunotherapy

	Pregnant women	Non-pregnant women
Number of patients	24	8
Subsequent pregnancies	35	(-)
Live births	28	(-)
Subsequent abortions	7	(-)
Proportion of live birth (%)	80 %	(-)

2. 妊娠継続率

免疫療法施行者32例中、非妊娠症例8例を除いた24例の35妊娠に対して妊娠継続率を検討した。35妊娠中、28妊娠(80%)は妊娠が継続されたが、7妊娠(20%)は妊娠初期の流産となった(Table 2)。これらのうち、児心拍確認後の流産が2例に認められた。

3. LCT (lymphocyte cytotoxicity test)

抗HLA抗体の産生と妊娠継続率について検討した(Table 3)。免疫療法前のLCT検査は、全例において陰性であった。治療後、LCT-T抗体を産生した症例は12例(37.5%)で、そのうち、妊娠した9症例12妊娠の妊娠継続率は75.0%(9/12)であった。また、LCT-

Table 3 Correlation between pregnancy outcome and production of anti-HLA antibodies (N = 32)

1. Production of anti-T cell antibodies (anti-HLA class I antibodies)			
anti-T cell antibodies	Positive	Negative	
No. of patients immunized (%)	12 (37.5%)	20 (62.5%)	
No. of pregnant patients	9	15	
No. of subsequent pregnancies	12	23	
Live births	9	20	
Subsequent abortions	3	3	
Proportion of successful pregnancies (%)	75.0%	87.0%	
N.S			
2. Production of anti-B cell antibodies (anti-HLA class II antibodies)			(Ab: antibodies)
Anti-T cell and anti-B cell antibodies	Ab for T cell and B cell positive	Ab for B cell positive	Ab for T cell and B cell negative
No. of patients immunized (%)	12 (37.5%)	7 (21.9%)	13 (40.6%)
No. of pregnant patients	9	6	9
No. of subsequent pregnancies	12	9	13
Live births	9	8	11
Subsequent abortions	3	1	2
Proportion of successful pregnancies (%)	75.0%	88.9%	84.6%
N.S			

Table 4 Correlation between HLA-A, B, DR antigen sharing and production of anti-HLA antibodies

1. LCT-T (anti-HLA class I)						
HLA antigen shared	LCT-T negative (n = 20)			LCT-B positive (n = 12)		
	HLA A antigen	HLA B antigen	HLA DR antigen	HLA A antigen	HLA B antigen	HLA DR antigen
0	5	10	10	5	12	7
1	10	9	7	7	0	4
2	5	1	3	0	0	1
N.S						
p = 0.0127						
N.S						
2. LCT-B (anti-HLA class II)						
HLA antigen shared	LCT-B negative (n = 13)			LCT-B positive		
	HLA A antigen	HLA B antigen	HLA DR antigen	HLA A antigen	HLA B antigen	HLA DR antigen
0	2	5	7	3	5	3
1	7	7	4	3	2	2
2	4	1	2	1	0	2
N.S						
N.S						
N.S						

LCT: lymphocyte cytotoxicity test

T抗体を産生しなかった症例は20例(62.5%)であり、そのうち、妊娠した15症例の23妊娠の妊娠継続率は87.0%(20/23)であった。

LCT-B抗体を産生した症例は19例(59.4%)であったが、このうち12例はLCT-T抗体も産生しており、LCT-B抗体のみを産生した症例は7例(21.9%)であった。LCT-B抗体陽性症例のうち、妊娠した6症例9妊娠の妊娠継続率は88.9%(8/9)であった。LCT-BおよびT抗体のいずれも産生しなかった症例は13例(40.6%)であった。そのうち、妊娠した9例の13妊娠の妊娠継続率は84.6%(11/13)であった。また、LCT-T抗体あるいはLCT-B抗体を産生した症例についても同様に検討した。抗体産生した症例19例うち、妊娠した15症例の21妊娠の妊娠継続率は81.0%(17/21)であった。

以上の結果、抗HLA抗体の産生の有無と妊娠継続

率との間に統計学的に有意な関係は認められなかった。

4. 夫婦間のHLA-A, B, DR抗原の共有数と抗HLA抗体産生との関係

夫婦間のHLA-A, B, DR抗原の共有数と抗HLA抗体産生との関係を検討すると、LCT-T抗体を産生した症例は抗体非産生症例に比し夫婦間のHLA-B抗原の共有数が0である症例が有意に多く存在した(12例/12例)(p=0.0127)。一方、その他のHLA-A, DR抗原に関しては両者間に有意差は認められなかった(Table 4)。LCT-B抗体については、抗体産生の有無と夫婦間のHLA共有抗原数との間に関連を認めなかった。また、今回免疫療法を施行した反復流産夫婦におけるHLAタイピングではコントロールとした健常者に比べて特定の傾向は認められなかった。

Table 5 Specificities of anti-HLA antibodies
* reactivities of serial two-fold dilution of wife's sera
(8, strong positive; 6, positive; 4, weakly positive; 2, 1, negative)

No. Hus. HLA		抗体特異性													
Wife	A	B	C	DR	DR52	DR53	DQ	LCT-T	相関係数	LCT-B					
9 H	11	26	13	67	10	7	2	12	52	1	7	A26 + A11			
9 W	2		62	60	9		8.1	9		53	1	3	888640*	0.932	888880
12 H	2	11	52	54	1		2	4.1		53	1	4	A2		
12 W	24	33	44	61	10		13	12	52		1	7	466421	0.925	888641
20 H	2		35		4		4.2	8.1		53	1	3	A2 + B35		
20 W	24		52	61	9		2	14	52		1		888886	0.744	888886
5 H	24	26	61	39	10	7	9			53	3		A26		
5 W	2	24	46	44	1	10	13	8.1	52		1		888864	0.608	888888
14 H	24	31	35	55	1	4	2	9		53	1	3	A31		
14 W	3	24	44	54	1	5	13	14	52		1		442111	1	888642
23 H	24	26	61	39	7		2	9		53	1	3	A24		
23 W	11	26	48	55	1		4.1	14	52	53	3	4	888842	0.786	888884
33 H	2	26	62		9		9	11	52	53	7	3			
33 W	2	33	46	44	1		13	8.1	52		1		644444		888888
28 H	2		61	54	1		2	9		53	1	3	A2		
28 W	24	26	35	51			9	HR6	52	53	7	(3)	441111	0.761	441111
32 H	26		61				9			53	3		A26		
32 W	11	24	60	62	4	10	9	11	52	53	3		888888	0.704	888888
1 H	24	31	52	61			2	9		53	1	3			
1 W	11	24	62	54	1	9	2	8.1			1		422110		421110
30 H	2	24	51	52			2	9		53	1	3	A2		
30 W	24	33	62	44	1		2	13	52		1		888888	0.925	888664
29 H	26	31	55		4	9	4.1	9		53	3	4	A31		
29 W	11	26	35	51	9		4.1	9		53	3	4	888821	0.778	888881

Table 6 HLA antigen sharing in 32 couples with recurrent spontaneous abortion (RSA) and 183 healthy couples

No. of HLA antigen sharing	The group of RSA (N = 32 couples)			The control group (N = 183 couples)			r
	0	1	2	0	1	2	
HLA antigen							
A	10 (31.3%)	17 (53.1%)	5 (15.6%)	73 (39.9%)	94 (51.4%)	16 (8.7%)	N.S.
B	22 (68.8%)	9 (28.1%)	1 (3.1%)	131 (71.6%)	50 (27.3%)	2 (1.1%)	N.S.
DR	17 (53.1%)	11 (34.4%)	4 (12.5%)	106 (57.9%)	71 (38.8%)	6 (3.3%)	N.S.

5. 抗HLA抗体の特異性

既知のHLAタイピングされたパネル細胞を用いて抗HLA抗体の特異性について検討したところ (Table 5), LCT-T抗体産生者12例中10例 (83.3%) にHLA-A抗原に対する特異性が認められた。

6. 反復流産症例群と健常対照群のHLA抗原共有数

今回の対象とした反復流産症例の夫婦間のHLA-A, B, DR抗原の共有率と健常対照群の男女におけるHLA抗原共有率を比較したが, HLA抗原共有数の間に有意差は認められなかった (Table 6)。

考 察

習慣流産に対する夫リンパ球を用いた免疫療法は, 1981年にTaylorら²⁾やBeer³⁾らが施行して以来, その有効性が明らかなることから多くの施設において施行されてきた。しかし, その作用機序にはいまだ不明な点が多く, その解明は急務である。

原因不明の習慣流産に対する免疫療法の成功率 (妊娠継続率) は, 諸家の報告では71.4~86.7%^{4~6)}である。当科では32例の2回以上の反復流産症例に対して夫リンパ球を用いた免疫療法を施行し, 24例の35妊娠中28例が生児を得, その妊娠継続率は80%であった。これは, 諸家の報告と同等であり, その有効性が示唆された。ただし, 免疫療法の適応にはさまざまな報告^{1~6)}がなされ, 当科では免疫療法開始当初, 患者の治療を熱望する心理的背景を考慮し, 2回以上の原因不明の反復流産症例に対して施行していた。しかし, 免疫療法の作用機序が不明な点, 2回連続する流産歴を有する患者の3回目の妊娠継続率などを検討した結果, 1994年以降は, 初期流産を3回以上連続して繰り返した原因不明の反復流産症例を対象とすることに変更したが, 今回の検討では2回の反復流産症例も含めて検討した。

夫リンパ球を用いた免疫療法による生体の反応, あるいは, 免疫療法の効果判定法として, MLR (mixed lymphocyte reaction) やT細胞サブセット, B.E. (blocking effect), 遮断抗体, リンパ球細胞傷害試験 (LCT), NK活性, あるいは接種時の皮内反応など^{4~7, 9~12, 15)}

が存在する。しかし, これまでの報告ではこれらの検査結果と治療後の妊娠の転帰の関係が必ずしもパラレルに推移しておらず, その解釈は困難である。しかし, この免疫療法を行うことにより何らかのかたちで免疫系が修飾され妊娠が成立, 維持されていると考えられる。

今回, 我々は夫リンパ球による免疫療法によって産生される抗HLA抗体に着目し, まず, 抗HLA抗体と妊娠継続率について検討を行った。これまで, 抗HLA抗体の産生と妊娠の継続率に関する報告として, 抗HLA抗体の産生がみられた症例において次回の妊娠継続率が上がるとする報告^{7, 9)}, 抗HLA抗体は妊娠継続率に寄与しないとする報告^{4, 8)}, 抗HLA抗体により妊娠継続率が低下する報告^{11, 12)}などがある。今回の我々の検討では, この抗体の産生は妊娠継続率に影響を与えなかった。

つぎに, 免疫療法を施行した夫婦間のHLA抗原の共有数と抗HLA抗体産生の有無の関係について検討した。Emma L. L.などの心臓, 腎移植後の抗HLA抗体の産生の検討では, 抗HLA抗体の産生はHLA-DR抗原の一致しない症例で有意に多く産生されるという¹³⁾。しかし, HLA抗原共有数と抗HLA抗体の産生に対する別の報告^{6, 9, 11)}では, Kilpatrick¹⁰⁾などの抗HLA抗体産生とHLA-B8の関連に関する報告を除いて, HLA抗原共有数と抗HLA抗体の産生の間に一定の相関を認めなかった。今回の我々の検討において, LCT-TあるいはB抗体の産生の有無とHLA-DR抗原共有数の関係に有意差は認めず, 抗HLA抗体産生群では夫婦間のHLA-B抗原共有数0 (B抗原2 mismatch) が有意に多く認められた ($p=0.0127$)。このことから, 抗HLA抗体の産生は, 夫婦間のHLA抗原の共有度に影響される可能性が示唆された。つまり, 抗HLA抗体の産生を検討することのみでは免疫療法の有効性の指標とはなり得ないと思われた。

抗HLA抗体の特異性の検討では, LCT-T抗体産生者12例中10例 (83.3%) にHLA-A抗原に対する特異性が認められた。また, HLA-B抗原の共有数が0の時, 産生されたLCT-T抗体の特異性がHLA-B抗原ではな

く、A抗原に対するものであったことなどが明らかになった。これらのことから、同じクラスI抗原でありながらHLA-A抗原とB抗原では、LCT-T抗体産生における役割が異なることが示唆され、今後さらに検討する必要がある。

現在までに妊娠の継続に成功した28例の全例が分娩を終えており、全例において出生時体重、Apgar scoreなどに異常を認めなかった。今回の検討で、妊娠継続率は80.0%であり、臨床予後に関しては良好な成績であったが、免疫療法の作用機序を解明するためには、今後さらに症例を追加するとともに新たなパラメーターの導入が必要であると思われる。

文 献

- 1) Komlos L, Zamir R, Joshua H, et al. (1977) Common HLA antigens in couples with repeated abortions. *Clin Immunol Immunopathol*, 7: 330-335
- 2) Taylor C and Faulk WP (1981) Prevention of recurrent abortion with leukocyte transfusion. *Lancet* 2: 68
- 3) Beer AE, Quebbeman JF, Ayers JWT, et al. (1981) Major histocompatibility complex antigens, maternal and paternal immune responses, and chronic habitual abortion in humans. *Am J Obstet Gynecol* 141: 987-999
- 4) 中込 才, 川村 良, 伊原佐江子 他 (1994) 習慣流産に対する低濃度リンパ球による免疫療法. *日産婦関東連会報* 31: 17-21
- 5) 中塚幹也, 錦織恭子, 長谷川 淳 他 (1993) 習慣流産の免疫前後における免疫学的変化について. *日不妊会誌* 38: 72-79
- 6) 鮫島義弘, 亀田 隆, 木村 正 他 (1990) 当科における習慣流産の検査成績と夫リンパ球を用いた免疫療法による治療成績. *日不妊会誌* 35: 112-119
- 7) 小林淳一 (1988) 習慣流産夫婦のHLA抗原共有数

と夫リンパ球免疫療法. *慶應医学* 65: 477-489

- 8) Hwang JL, Hsieh CY, Ho HN, et al. (1992) The role of blocking factors and antipaternal lymphocytotoxic antibodies in the success of pregnancy in patients with recurrent spontaneous abortion. *Fertility and Sterility* 58: 691-696
- 9) Howard JA, Vladimir T, Ephraim G, et al. (1990) Immunization by paternal leukocytes for prevention of primary habitual abortion: Results of a matched controlled trial. *Gynecol Obstet Invest* 129: 16-21
- 10) Kilpatrick DC, Liston WA (1993) Influence of histocompatibility antigens in recurrent spontaneous abortion and its relevance to leukocyte immunotherapy. *Human Reproduction* 8: 1645-1649
- 11) Smith JB and Cowchock FS (1988) Immunological studies in recurrent spontaneous abortion: effects of immunization of women with paternal mononuclear cells on lymphocytotoxic and mixed lymphocyte reaction blocking antibodies and correlation with sharing of HLA and pregnancy outcome. *Journal of Reproductive Immunol* 14: 99-113
- 12) Unander AM (1992) The role of immunization treatment in preventing recurrent abortion. *Transfusion Medical Reviews* 6: 1-16
- 13) Lagaaij EL, Hennemann IPH, Ruigrok M, et al. (1989) Effect of one-HLA-DR-antigen-matched and completely HLA-DR-mismatched blood transfusions on survival of heart and kidney allografts. *New Engl J of Med* 321: 701-705
- 14) Maeda H and Juji T (1982) A new B-cell alloantigen, TB21, coded for in the HLA-D/DR region. *Tissue Antigens* 20: 327-334,
- 15) 佐治文隆, 古山将康, 鮫島義弘 他 (1990) 習慣流産と免疫療法. *産婦人科治療* 60 (3): 296-302
(受付: 1996年10月1日)
(受理: 1996年10月28日)

**Production of anti-HLA antibody
in the cases of recurrent spontaneous abortion after immunotherapy**

Masahiro Saitoh, Osamu Ishihara, Hiroyuki Seki,
Satoru Takeda and Katsuyuki Kinoshita

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

Ranko Hirata and Hiroo Maeda

Department of Blood Transfusion Service
Saitama Medical Center, Saitama Medical School, Saitama 350, Japan

Production and specificities of anti-HLA antibodies were analyzed in 32 patients with recurrent spontaneous abortion. The patients were immunized with their husband's lymphocytes and serological studies were carried out before and after the immunotherapy.

Anti-HLA antibodies were positive in twelve out of 32 patients (37.5 %) after the immunotherapy and 28 out of 35 pregnancies (80 %) resulted in successful. However, there was no statistical correlation between the presence of antibodies and the fate of pregnancy. Though the distinctive pattern of HLA sharing was not found in these couples, anti-HLA antibodies were solely produced in the patients who has no common HLA-B locus antigens with their husbands. From analysis of anti-HLA antibody specificity, 10 out of 12 anti-HLA antibodies were directed against HLA-A locus antigens.

These results suggest that the production of anti-HLA antibodies may reflect the HLA sharing between wives and husbands and the antibodies may not be a good indicator for the successful course of immunotherapy.

Key words: recurrent spontaneous abortion, immunotherapy, lymphocyte cytotoxicity test (LCT), HLA typing

PROLACTIN AND THYROID STIMULATING HORMONE SECRETION IN WOMEN WITH HYPOTHALAMIC AMENORRHEA AND WOMEN WITH POLYCYSTIC OVARY SYNDROME

Takako KATO, Katsuyoshi SEKI and Souei SEKIYA

Department of Obstetrics and Gynecology
Chiba University School of Medicine, Chiba 260, Japan

Abstract: Dopamine (DA) exerts an inhibitory influence on both prolactin (PRL) and thyroid stimulating hormone (TSH) secretion. Women with hypothalamic amenorrhea (HA) may have increased central DA activity, while women with polycystic ovary syndrome (PCOS) may have decreased central DA activity. The regulation of PRL and TSH secretion may, therefore, be altered in these patients.

We evaluated PRL and TSH secretion in 14 women with HA and 13 normoprolactinemic women with PCOS. Ten normal women in the early follicular phase served as controls. The mean basal free T₄ (fT₄), free T₃ (fT₃) and TSH concentrations were significantly lower in HA than in normal women. The mean basal PRL concentration was not significantly different between the 2 groups. PRL and TSH responses to the combined administration of TSH releasing hormone (TRH) 500 μg and gonadotropin releasing hormone (GnRH) 100 μg were significantly lower in HA than in normal women. The low basal TSH concentration, and reduced PRL and TSH responses to TRH/GnRH in HA are compatible with the presumably increased central DA activity. The mean basal fT₄ and fT₃, TSH and PRL concentrations, PRL and TSH responses to TRH/GnRH were not significantly different between PCOS and normal women.

Thus, PRL and TSH secretion do not seem to be altered in the women with PCOS, and central DA activity may not be decreased in all patients with PCOS.

Key words: prolactin, thyroid stimulating hormone, hypothalamic amenorrhea, polycystic ovary syndrome

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 90 - 95, 1997)

Introduction

Dopamine (DA) exerts an inhibitory influence on both prolactin (PRL) and thyroid stimulating hormone (TSH) secretion¹⁻³. Women with hypothalamic amenorrhea (HA) may have increased dopaminergic activity⁴⁻⁶. Decreased basal levels of PRL and diminished PRL and TSH responses to a dopamine (DA) antagonist, metoclopramide, were found in patients with hypothalamic amenorrhea. Blunted PRL responses to TRH were also observed in women with functional HA⁷, and therefore, PRL secretion may be decreased in these patients. How-

ever, basal TSH levels and TSH responses to TRH were normal though free T₄ (fT₄) and free T₃ (fT₃) levels were low. Thus, regulation of TSH secretion in patients with HA still remains to be studied.

There is a report that suggests a decreased dopaminergic inhibition of LH secretion in women with polycystic ovary syndrome (PCOS)⁸. Although this hypothesis has yet to be established, exaggerated PRL responses to TRH have been reported in patients with PCOS⁹. Therefore, regulation of TSH secretion may also be altered in such patients. In the present study, we evaluated basal PRL and TSH levels and PRL and TSH responses to TSH releasing

hormone (TRH) in two groups of amenorrheic women, one with HA and the other with PCOS.

Materials and Methods

With institutional review approval, 14 consecutive patients with HA were studied. The criteria used to select women with HA were 1) secondary amenorrhea; 2) normal age of menarche and development of secondary sexual characteristics; 3) psychological problems; 4) low or normal basal levels of pituitary and ovarian hormones; 5) on no medications, 6) no strenuous exercise. The diagnosis of HA was established by excluding organic causes of amenorrhoea including hyperprolactinaemia, thyroid and adrenal disease, premature ovarian failure and hyperandrogenism. In 10 of the 14 patients with HA, possible precipitating factors (family problems, problems related to boy friends or marriage, and living in the dormitory) for the psychological problems were identified. None of them were likely to cause specific changes in TSH and PRL secretion. In the other 4 patients with HA, the precipitating factor was unknown. Thirteen secondary amenorrheic patients with PCOS were also studied. The diagnosis of PCOS was based on the criteria proposed by Yen; clinical or laboratory evidence of hyperandrogenism, oligo or amenorrhea, elevated luteinizing hormone (LH)/follicle stimulating hormone (FSH) ratio and no evidence of late onset congenital adrenal hyperplasia¹⁰). None of the patients with PCOS had organic causes of amenorrhea, including hyperprolactinemia, thyroid and adrenal disease, and premature ovarian failure. None of the subjects had goiters or a family history of autoimmune thyroid disease. Ten normal women served as controls. The normal women had documented menstrual cycle lengths of 27 ~ 31 days and were studied in the early follicular phase (days 2 ~ 5) of their cycles. None of the subjects was taking any medication at the time of studies.

After an overnight fast, starting at 9:00 ~ 10:00 h, each received 500 μ g TRH and 100 μ g gonadotropin releasing hormone (GnRH) as an iv bolus dose after two baseline samples had been obtained; additional blood samples were obtained 30, 60 and 120 min after TRH/GnRH administration. The serum

sample was stored at -20 C until assay.

Serum FSH, LH, TSH and PRL were measured by immunoradiometric assay using kits obtained from Nichols Institute (San Juan Capistrano, CA, USA). The sensitivity was 0.2 IU/l in the FSH assay, 0.1 IU/l in the LH assay, 0.04 mIU/l in the TSH assay, and 0.2 μ g/l in the PRL assay. Serum estrone was determined by radioimmunoassay using kits obtained from Diagnosticts Biochem Canada (London, Ontario, Canada). Serum estradiol (E₂), total testosterone (T), androstenedione (A), free T₄ (fT₄) and free T₃ (fT₃) were determined by radioimmunoassay using kits obtained from Diagnostic Products Corporation (Los Angeles, CA). The sensitivity was 90 pmol/l in the E₁ assay, 5 pmol/l in the E₂ assay, 0.3 nmol/l in the T assay, 330 pmol/l in the A assay, 0.2 pmol/l in the fT₄ assay, and 0.3 pmol/l in the fT₃ assay. Serum sex hormone binding globulin (SHBG) was measured by immunoradiometric assay using kits obtained from Famos Diagnostica (Oulunsalo, Finland). The sensitivity was 6.25 nmol/l. The within- and between-assay coefficients of variation were less than 10% in each assay. FSH, LH, TSH and PRL were determined in all samples, and E₁, E₂, T, A, SHBG, fT₄ and fT₃ on baseline samples only. For all hormones measured, all samples for a single subject were analyzed in duplicate in the same assay. Mean basal concentrations were obtained by averaging two baseline samples collected prior to the combined administration of TRH/GnRH. Statistical analyses were performed using analysis of variance. P < 0.05 was taken to indicate statistical significance.

Results

Women with HA

The mean percent ideal body weight (IBW) was significantly ($p < 0.01$) lower in HA than in normal women (Table 1). The mean basal E₂ ($p < 0.05$), fT₄ ($p < 0.05$), fT₃ ($p < 0.05$), FSH ($p < 0.05$) and TSH ($p < 0.01$) concentrations were significantly lower in HA than in normal women, while the mean basal E₁, T, A, SHBG, LH and PRL were not significantly different between HA and normal women. The LH response to TRH/GnRH was not significantly different in HA and normal women (Fig. 1). Al-

Table 1 Clinical and basal hormone data in normal women during the early follicular phase (n = 10), women with hypothalamic amenorrhea (HA) (n = 14) and women with polycystic ovary syndrome (PCOS) (n = 13)

	Normal Women	HA	PCOS
Age (ys)	27.1 ± 3.5	26.5 ± 4.1	28.8 ± 3.6
Wt (% of IBW)	102.5 ± 6.2	94.8 ± 4.1 ^b	108.3 ± 8.7 ^{a,d}
Estrone (pmol/l)	157.5 ± 36.5	178.8 ± 47.0	260.3 ± 89.8 ^{b,d}
Estradiol (pmol/l)	87.3 ± 19.1	65.5 ± 9.3 ^a	146.9 ± 31.9 ^{b,d}
Testosterone (nmol/l)	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.7	3.0 ± 0.9 ^{b,d}
Androstenedione (nmol/l)	6.0 ± 2.2	7.1 ± 2.1	13.6 ± 4.5 ^{b,d}
SHBG (nmol/l)	64.8 ± 21.5	63.0 ± 29.1	29.0 ± 17.2 ^{b,d}
free T ₄ (pmol/l)	19.3 ± 2.8	15.3 ± 4.2 ^a	18.8 ± 4.3 ^c
free T ₃ (pmol/l)	6.2 ± 1.4	5.0 ± 1.1 ^a	5.9 ± 1.2
LH (U/l)	3.1 ± 0.7	3.3 ± 1.5	13.8 ± 6.7 ^{b,d}
FSH (U/l)	5.8 ± 0.9	3.8 ± 0.8 ^a	4.7 ± 2.1
PRL (μg/l)	6.6 ± 2.0	4.6 ± 2.2	8.3 ± 3.4
TSH (mU/l)	1.4 ± 0.3	0.3 ± 0.2 ^b	1.6 ± 0.8

Values are the Mean ± S.D. IBW, ideal body weight.

^a p < 0.05, ^b p < 0.01 vs. normal women.

^c p < 0.05, ^d p < 0.01 vs. HA.

Table 2 Maximal net increases in LH, FSH, TSH and PRL after TRH/GnRH administration in normal women (n = 10), women with hypothalamic amenorrhea (HA) (n = 14) and women with polycystic ovary syndrome (PCOS)(n = 13)

	Normal Women	HA	PCOS
LH (U/l)	8.3 ± 3.0	18.8 ± 10.9	65.5 ± 27.5 ^{b,c}
FSH (U/l)	3.2 ± 1.2	5.2 ± 2.3 ^a	5.1 ± 2.0 ^a
PRL (μg/l)	53.7 ± 11.5	30.7 ± 14.1 ^a	61.5 ± 29.3 ^c
TSH (mU/l)	17.2 ± 4.9	7.3 ± 3.4 ^b	16.4 ± 6.6 ^c

Values are the Mean ± S.D.

^a p < 0.05, ^b p < 0.01 vs. normal women.

^c p < 0.01 vs. HA.

though the FSH response in HA was not significantly different from that in normal women, the maximal net increase of FSH was significantly ($p < 0.05$) greater in HA than in normal women (Table 2). The TSH and PRL responses were significantly ($p < 0.01$) lower in HA than in normal women (Fig. 1), and the maximal net increases of TSH ($p < 0.01$) and PRL ($p < 0.05$) were significantly decreased (Table 2).

Women with PCOS

The mean percent IBW was significantly ($p < 0.05$) greater in PCOS than in normal women (Table 1). The mean basal E₁, E₂, T, A and LH concentrations were significantly ($p < 0.01$) higher, and the mean basal SHBG was significantly ($p < 0.01$) lower

in PCOS than in normal women (Table 1). The mean basal fT₄, fT₃, FSH, TSH and PRL concentrations were not significantly different in PCOS and normal women. The LH response to TRH/GnRH was significantly ($p < 0.01$) increased in PCOS than in normal women (Fig. 1), and the maximal net increase of LH was significantly ($p < 0.01$) increased compared to normal women (Table 2). Although the FSH response in PCOS was not significantly different from that in normal women (Fig. 1), the maximal net increase of FSH was significantly ($p < 0.05$) increased (Table 2). The TSH and PRL responses were not significantly different between PCOS and normal women.

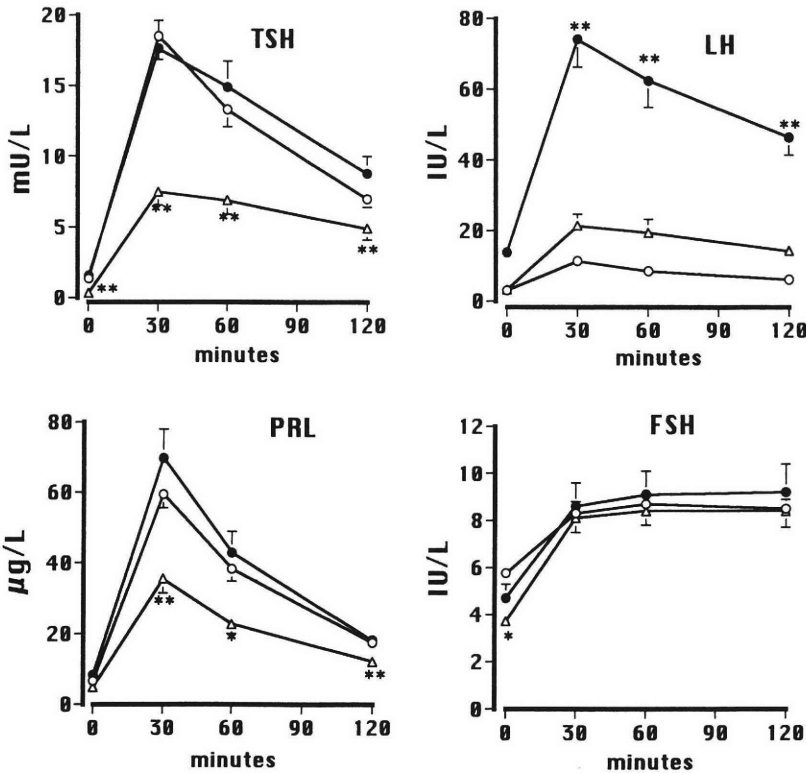


Fig. 1 Mean (\pm S.E.) serum TSH, PRL, LH and FSH levels in normal women (n = 10) (open circle), women with hypothalamic amenorrhea (n = 14) (triangle) and women with polycystic ovary syndrome (n = 13) (solid circle) before and after the administration of TRH/GnRH. * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. normal women.

Discussion

In women with HA, the mean basal E₂ and gonadotropin levels were low or normal, and the gonadotropin responses to TRH/GnRH were normal or slightly increased. These findings are in general agreement with the results of other reported studies^{4-7,11}). The net increase of FSH after LHRH was greater in the patients with HA than in normal women. An increased pituitary FSH capacity was also observed in patients with hypothalamic chronic anovulation by Lachelin and Yen¹¹). They contended that it may be explained by the somewhat lower E₂/T ratio in these patients. The reduced PRL response is also in keeping with the results of Berga et al.⁷), and may be, in part accounted for by the low estrogen level in the patients with HA. Furthermore, fT₃ and fT₄ levels were low in HA. Hypothyroidism

may be associated with weight loss. Although HA patients were thinner than normal women, they ranged between 90 % and 100 % of their ideal body weight. Thus, the low thyroid hormones are not likely to be due to the slightly low body weight in the patients with HA. Basal TSH levels and TSH responses were low in the patients with HA in the present study. However, basal TSH levels and TSH responses to TRH in HA were reported to be normal by others^{7,11}). Although the reason for the discrepancy between the results of others and ours is not entirely clear, it may be, in part, due to the different TSH assays used. Basal TSH levels were undetectable even in some normal women by conventional radioimmunoassays for TSH, while the immunoradiometric assay for TSH used in the present study is sensitive enough to measure serum TSH in normal women. TSH secretion may have

been reduced in the patients with HA studied previously, since their thyroid hormones were reported to be low⁷⁾. Serum E₂ levels were low in our HA patients, while E₂ levels in the HA patients studied by Berga et al⁷⁾. were not significantly different from those in normal women during the early follicular phase. The degree of hypothalamic-pituitary-ovarian impairment may be more severe in our HA patients compared to those previously studied, and the hypothalamic-pituitary-thyroid function may also be more compromised in our HA patients. Consequently, the different basal TSH level and TSH response to TRH may be accounted for by the different degree in the impairment of hypothalamic-pituitary-thyroid function.

A proportion of patients with functional amenorrhea seems to have increased central DA activity⁴⁻⁶⁾. Diminished PRL and TSH responses to DA receptor blockade have been found in these patients⁶⁾. Furthermore, doses of DA considered physiological inhibit PRL and TSH secretion and larger doses inhibit their responses to a DA antagonist, metoclopramide (MCP), in normal women¹²⁾. Thus, low TSH levels and diminished PRL and TSH responses to TRH/GnRH observed in our patients are compatible with their presumably increased central DA activity.

Recently, patients with HA were treated with acetyl-L-carnitine that has a specific effect on central cholinergic, serotonergic, dopaminergic and opioid systems, and it was effective in some patients with HA¹³⁾. Thus, further understanding neuroendocrine aberrations in patients with HA may help to develop a definite therapeutic strategy for this disease.

In patients with PCOS, basal E₁, E₂, T, A and LH levels, and LH responses to TRH/GnRH were increased compared to the normal women in early follicular phase. Serum SHBG levels were decreased, while serum FSH levels and FSH responses were normal. Thus, they showed hormonal changes compatible with PCOS¹⁰⁾. The net increase of FSH after GnRH was greater in the patients with PCOS than in normal women. This is in agreement with the result of Rebar et al.¹⁴⁾, and the pituitary FSH capacity seems to be increased in PCOS. In PCOS, basal

PRL, TSH, fT₄ and fT₃ levels, and PRL and TSH responses to TRH/GnRH were normal. Thus, PRL and TSH secretion are not likely to be altered in women with PCOS.

Although TSH secretion in PCOS has not previously been studied by others, increased PRL responses to TRH were found in normoprolactinemic women with PCOS by Falashi et al.⁹⁾. The reason for the discrepancy between the results of Falashi et al.⁹⁾ and ours is unclear. They found normal E₂ and increased E₁ levels in their patients with PCOS, and contended that augmented estrogen production in PCOS could sensitize the pituitary lactotroph to overrespond to secretagogue agents. E₁ and E₂ levels were increased in PCOS compared to the normal women in the present study. Thus, the different PRL responses to TRH in PCOS studied by Falashi et al.⁹⁾ and us cannot be accounted for by the different estrogen production.

The basal levels of PRL and TSH, and their responses to TRH were normal in the patients with PCOS, and evidence for the decreased central DA activity was not obtained in the present study. This is not in keeping with the contention of Cumming et al.⁸⁾ that endogenous dopaminergic inhibition of LH secretion is decreased in PCOS. The discrepancy between the results of Cumming et al.⁸⁾ and ours is not clear. Vetr et al. reported that PCOS patients could be classified into 2 groups in terms of the PRL responsiveness to a DA antagonist, MCP¹⁵⁾. The maximum PRL value after MCP was significantly higher in the group 1 patients with PCOS than in the group 2 patients. Thus, it may be that central DA activity is not decreased in all patients with PCOS.

References

- 1) Besses GS, Burrow GN, Spaulding SW, et al. (1975) Dopamine infusion acutely inhibits the TSH and prolactin response to TRH. *J Clin Endocrinol Metab* 41: 985-988
- 2) Leblanc H, Lachelin GCL, Abu-Fadil S, et al. (1976) Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 43: 668-674
- 3) Scanlon MF, Weightman DR, Mora B, et al. (1977) Evidence for dopaminergic control of thyrotropin secretion in man. *Lancet* 2: 421-423

- 4) Quigley ME, Sheehan KL, Casper RF, et al. (1980) Evidence for increased dopaminergic and opioid activity in patients with hypothalamic hypogonadotropic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 50: 949-954
- 5) Hagen C, Petersen K, Djursing H, et al. (1984) Evidence of altered dopaminergic modulation of Prl, LH and TSH secretion in patients with normoprolactinaemic amenorrhoea. *Acta Endocrinol* 106: 8-14
- 6) Berga SL, Loucks AB, Rossmanith WG, et al. (1991) Acceleration of luteinizing hormone pulse frequency in functional hypothalamic amenorrhea by dopaminergic blockade. *J Clin Endocrinol Metab* 72: 151-156
- 7) Berga SL, Mortola JF, Girton L, et al. (1989) Neuroendocrine aberrations in women with functional hypothalamic amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 68: 301-308
- 8) Cumming DC, Reid RL, Quigley ME, et al. (1984) Evidence for decreased endogenous dopamine and opioid inhibitory influences on LH secretion in polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol* 20: 643-648
- 9) Falaschi P, Del Pozo E, Rocco A, et al. (1980) Prolactin release in polycystic ovary. *Obstet Gynecol* 55: 579-582
- 10) Yen SSC (1991) Chronic anovulation caused by peripheral endocrine disorders. In: Yen SSC, Jaffe RB (eds). *Reproductive Endocrinology*, 3rd ed. Saunders, Philadelphia, pp 593-601
- 11) Lachelin GCL, Yen SSC (1978) Hypothalamic chronic anovulation. *Am J Obstet Gynecol* 130: 825-831
- 12) Agner T, Hagen C, Andersen AN, et al. (1986) Increased dopaminergic activity inhibits basal and metoclopramide-stimulated prolactin and thyrotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 62: 778-782
- 13) Gennazani AD, Petraglia F, Algeri I, et al. (1991) Acetyl-L-carnitine as possible drug in the treatment of hypothalamic amenorrhea. *Acta Obstet Gynecol Scand* 70: 487-492
- 14) Rebar R, Judd HL, Yen SS, et al. (1976) Characterization of the inappropriate gonadotropin secretion in polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 57: 1320-1329
- 15) Vert M, Talas M, Sobek A, et al. (1991) Metoclopramide test in women with PCO syndrome after ovarian wedge resection. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 130: 257-264

(受付：1996年7月24日)

(受理：1996年10月29日)

視床下部性無月経および多嚢胞性卵巣症候群婦人における プロラクチンおよび甲状腺刺激ホルモン分泌

千葉大学医学部産科婦人科学教室

嘉藤貴子, 関 克義, 関谷宗英

ドバミン (DA) はプロラクチン (PRL) および甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌に抑制的に作用する。中枢のドバミン活性は視床下部性無月経 (HA) の婦人において亢進し、一方、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の婦人で低下していることが想定される。したがって、これらの患者において PRL および TSH の分泌調節が変化している可能性がある。

我々は14名のHAおよび13名の血中PRLが正常のPCOS患者のPRLおよびTSH分泌について検討した。10名の卵胞期初期の正常婦人をコントロールとして採用した。HA患者のfree T₄ (fT₄), free T₃ (fT₃) およびTSHの平均値は正常婦人と比較して有意に低かった。PRLは両群で有意差はなかった。HA患者のTSH放出ホルモン (TRH) 500 μg およびゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 100 μg に対するPRLおよびTSHの反応は正常婦人と比較して有意に低かった。HA患者におけるTSHの基礎値の低下およびGnRH/TRHに対するPRLおよびTSHの反応の低下は亢進していると考えられる中枢性DA活性と合致する。fT₄, fT₃, TSH およびPRLの基礎値, TRH/GnRHに対するTSHおよびPRLの反応はPCOS患者と正常婦人と同様であった。

したがって、PRLおよびTSH分泌は今回検討したPCOS患者で変化していないと考えられ、中枢性DA活性は必ずしもすべてのPCOS患者で低下しているわけではないようである。

キーワード：プロラクチン, 甲状腺刺激ホルモン, 視床下部性無月経, 多嚢胞性卵巣症候群

先天性精管部分欠損と思われた精管通過障害の3例

Three Cases of Vas Deferens Obstruction which seemed to be Congenital Partial Aplasia of the Vas Deferens

長崎大学医学部泌尿器科学教室

江口 二郎

Jiro EGUCHI

西村 直樹

Naoki NISHIMURA

野 俣 浩一郎

Koichiro NOMATA

広瀬 建

Takeshi HIROSE

斎藤 泰

Yutaka SAITO

井川 掌

Tsukasa IGAWA

金武 洋

Hiroshi KANETAKE

Department of Urology

Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852, Japan

先天性精管部分欠損と思われた精管通過障害の3例を報告する。

精巣上体での閉塞が疑われた閉塞性無精子症に対して、顕微鏡下精巣上体精管吻合術を予定し、精管精囊造影を施行したところ、精管が鼠径部から後腹膜部で途絶していたため、精路の再建を断念した。いずれも陰嚢内精管は認められ、骨盤内精管の先天性部分欠損と思われた。このうち1例は精巣上体回収精子による卵細胞質内精子注入法(ICSI)で正常児を得ており、残りの2例にも同様の治療を行っている。

キーワード：顕微鏡下精巣上体精管吻合術、精管の部分的欠如、精巣上体精子回収、卵細胞質内精子注入法

(Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 96 - 99, 1997)

緒 言

近年の男性不妊症の治療は格段の進歩を遂げており、精巣や精巣上体からの回収精子による顕微授精では多くの妊娠出産例が報告されている。しかしながら、精巣上体や精管が閉塞している閉塞性無精子症に対する再建術も、顕微鏡手術の導入により良好な成績が報告され、再建可能であれば、まずは精路再建術を試みて自然妊娠を期待すべきだと思われる。今回我々は、精巣上体での閉塞が疑われ顕微鏡下精巣上体精管吻合術を予定のうえ精管精囊造影を施行したところ、精管通過障害が判明し精路再建を断念した3例を経験したので報告する。なお症例1についてはすでに第39回日本不妊学会総会(1994年、富山市)において発表した。

症 例

症例1：31歳、男性

既往歴：特記すべき事項なし

現病歴：11月30日、4年間の不妊を主訴に当科を受診した。

現症：両側精巣上体に硬結などなく、精巣容量は左20 ml右24 mlであった。陰嚢内精管は左右とも触知できた。

精液所見：精液量1.2 ml、無精子、pH 6.2であった。

内分泌学的検査：FSH 7.0 mIU/ml (正常値1.8～13.6)、LH 4.2 mIU/ml (正常値1.1～8.8)、PRL 5.7 ng/ml (正常値1.5～9.7)、testosterone 458 ng/dl (正常値250～1100)、estradiol 14 pg/ml (正常値20～59)、染色体は46XYであった。

臨床経過：射精管閉塞を疑い1月25日経直

腸の超音波検査 (TRUS) および右精巣生検を施行した。前立腺にはmidline prostatic cystを認めず、射精管は右のみ描出され、右精嚢はやや小さく、左精嚢は描出できなかった (図1)。精嚢生検ではJohnsen's mean score 9.2と正常造精機能であった。以上より、左精嚢欠損・右精巣上部での閉塞を疑って、右精巣上部精管吻合術を予定し両側精管精嚢造影を施行した。両側精管を精巣上部寄りで切断したが、その切断端に精子は認められなかった。左精管精嚢造影では、精管は後腹膜部で途絶し精嚢は造影されなかった。右精管は細く24G針が挿入困難、造影不十分だが発育が乏しい精管精嚢が描出された (図2)。よって、右精巣上部精管吻合術も断念した。精巣上部回収精子による顕微授精に備え、精巣上部には手をつけなかった。他院において、精巣上部または精巣からの回収精子により卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の予定である。

症例2: 27歳, 男性

既往歴: 特記すべき事項なし

現病歴: 6月6日, 1年6か月間の不妊を主訴に当科を受診した。

現症: 両側精巣上部に硬結などなく、精巣容量は左右とも14 mlであった。陰嚢内精管は左右とも触知できた。

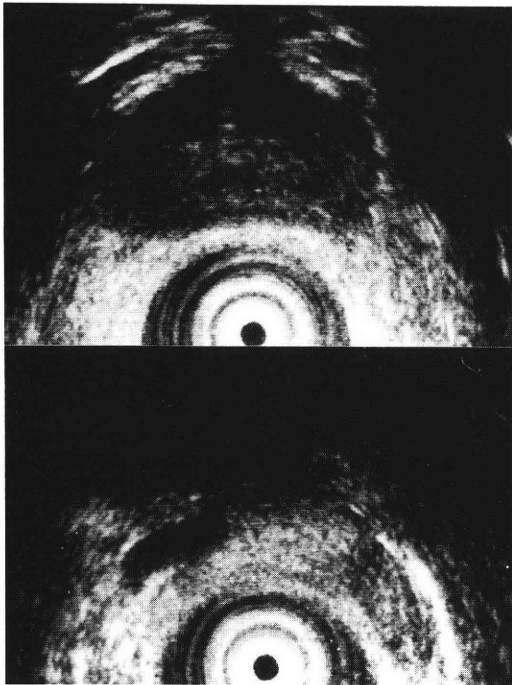


図1 症例1 経直腸的超音波検査所見

精液所見: 精液量2.0 ml, 無精子, pH 7.2であった。

内分泌学的検査: FSH 4.3 mIU/ml, LH 2.2 mIU/ml, PRL 3.2 ng/ml, testosterone 503 ng/dl, estradiol 40 pg/ml, 染色体は46XYであった。

臨床経過: 無精子症の検索のために1994年6月10日TRUSおよび右精巣生検を施行した。前立腺・精嚢にはとくに異常は認められず、精嚢生検ではJohnsen's mean score 8.3と軽度の造精機能低下であった。以上より、両側精巣上部での閉塞を疑って、精巣上部精管吻合術予定し精管精嚢造影を施行した。両側精管を精巣上部寄りで切断したところ、両側ともその切断端に運動性のない精子が多数認められた。精管精嚢造影では、両側とも精管は鼠径部から後腹膜部で途絶し精嚢は造影されなかった (図3) ので、精巣上部精管吻合術は断念した。他院において、精巣上部回収精子によるICSIで1995年10月、2628 gの女児が得られた。

症例3: 33歳, 男性

既往歴: 25歳時に精巣上部炎

現病歴: 1月19日, 1年6か月間の不妊を主訴に当科を受診した。

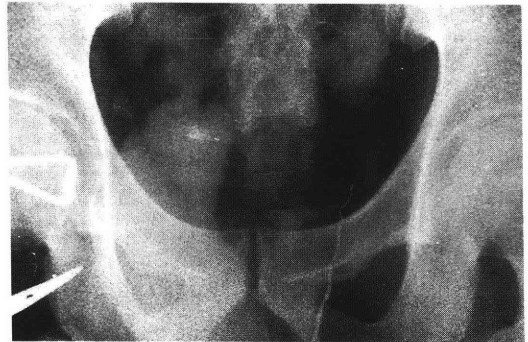


図2 症例1 精管精嚢造影像

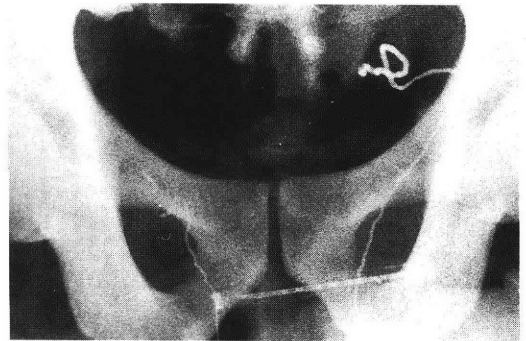


図3 症例2 精管精嚢造影像

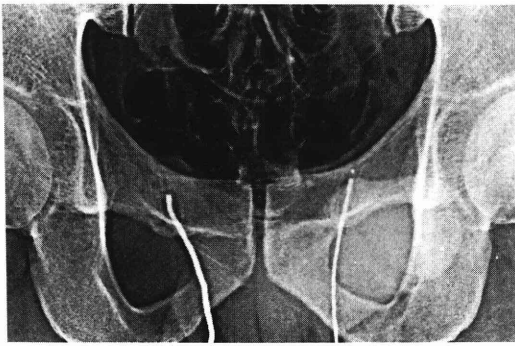


図4 症例3 精管精囊造影像

現症：両側精巣上体に硬結などなく、精巣容量は左右とも12mlであった。陰嚢内精管は左右とも触知できた。

精液所見：精液量4.8 ml，無精子，pH 8.0であった。

内分泌学的検査：FSH 6.5 mIU/ml，LH 1.4 mIU/ml，PRL 5.7 ng/ml，testosterone 612 ng/dl，estradiol 29 pg/ml，染色体は46XYであった。

臨床経過：無精子症の検索のために1996年1月24日TRUSおよび右精巣生検を施行した。前立腺・精嚢にはとくに異常は認められず、精巣生検ではJohnsen's mean score 8.4と軽度の造精機能低下であった。以上より、両側精巣上体での閉塞を疑って、精巣上体精管吻合術予定し精管精囊造影を施行した。両側精管を精巣上体寄り切断したところ、右側にはその切断端に運動性のない精子が認められたが、左側には認められなかった。精管精囊造影では、両側とも精管は鼠径部で途絶し精嚢は造影されなかった(図4)ので、精巣上体精管吻合術は断念した。他院において、右精巣上体からの回収精子によりICSI施行中である。

考 察

長崎大学医学部泌尿器科では、1990年10月より精巣上体における閉塞性無精子症に対して、松田ら¹⁾の方法に準じ顕微鏡下精巣上体精管側端吻合術を施行している。その際、鼠径ヘルニア根治術等の既往がないことを確認後、術前検査としてはまず陰嚢内容の触診で、精巣容量測定と精巣上体の硬結や精管の有無などを、直腸診で場合によっては精嚢の拡張の有無を触知する。とくに、造精能に関しては内分泌学的検査と精巣生検を、精路に関しては経直腸超音波検査(TRUS)により射精管閉塞などの診断が可能で、精管精囊造影は施行していない。というのは、医原性の精管閉塞を来す恐れがあるからで、当科で

も他院からの紹介例に穿刺部精管の閉塞を経験している。精管精囊造影は、顕微鏡下精巣上体精管吻合術の際に、精巣上体寄り切断した後に行っており、今回の3症例において、術前に精管通過障害の診断はできなかった。

精管精囊造影において、精管通過障害と診断された場合は、精管の欠如か閉塞が考えられ、いずれであるかは試験手術によらなければ確認できない。今回の3症例は鼠径ヘルニア根治術などの既往がないことより、後天性の精管閉塞は考えにくかったが、病因や精管精管吻合による精路再建の可能性を考える上でも、せめて鼠径部までは精管の手術的検索をすべきだったと反省される。

精管の先天性欠如は、発生学的見地からWolff管系の欠如であるから、精巣上体以下の全臓器すなわち精管、精管膨大部、精嚢、射精管の全欠如を意味する²⁾といわれていた。ところが、TRUSやCTスキャンが、精嚢の画像診断を容易にした現在では、触診上、精管欠損と診断された症例にも、TRUSでしばしば精嚢が認められるとの報告³⁾やTRUSで精嚢欠損と診断された約半数に、触診で陰嚢内精管が認められたとの報告⁴⁾がある。

今回の我々の症例1は、左精管の一部分、精嚢、射精管欠如と右精管、精嚢発育不全、症例2, 3は、両側精管の部分欠如、精嚢は正常と思われた。先天性精管欠損の場合にはその尾側端より膨出、発生する精嚢の存在は理論的にはありえず、臨床的に精管欠損例に精嚢が認められた症例があるとすれば、精嚢の発生後何らかの障害因子により、一旦発生した精管が萎縮、消失したものと考えざるをえない²⁾といわれている。酒徳ら⁵⁾は、精管の部分的欠如について、精索部および鼠径部を欠如し、骨盤部のみ存在する「外型欠如」と、精索部に精管の存在が確認されるが骨盤部を欠如する「内型欠如」の2型に分類した。我々の3症例は「内型欠如」と思われた。

またWolff管由来の精管が先天性に欠損すれば、同じWolff管より発生する尿管芽由来の尿管ひいては腎の先天異常を合併しやすい。今回の3症例は、腎盂造影などにおいて尿路の異常は指摘できなかった。

治療に関しては、精路再建不可能と思われる閉塞性無精子症に対し、現在主に3通りの治療法が施行されている。1)人工精液瘤造設術、2)精巣上体あるいは精巣内精子回収法、3)精巣上体開窓術⁶⁾と、いずれも精子を採取するための手段であり、顕微授精まで含めた人工授精が必要となる。

今回の症例2は、精巣上体回収精子による卵細胞

質内精子注入法 (ICSI) で正常児を得ており、残りの2例にも同様の治療を行っている。治療法を選択理由は、人工精液瘤は顕微授精ではなかったとはいえ、成績が非常に悪く、精巣上体開窓術は、本邦でも平井ら⁸⁾が試みているが、精子採取法も含めて技術的にまだ確立されていないと思われたからである。今後、精巣上体開窓術の改良も含め、より確実に、くり返しが可能な精子回収法が待ち望まれる。

文 献

- 1) 松田公志, 堀井泰樹, 野々村光生 他 (1991) 顕微鏡下精巣上体精管吻合術 (side-to-end 法) の経験. 泌尿紀要 37: 607-612
- 2) Charny CW and Gillenwater JY (1965) Congenital absence of the vas deferens. J Urol 93: 399-401
- 3) Goldstein M and Schlossberg S (1988) Men with congenital absence of the vas deferens often have seminal vesicles. J Urol 140: 85-86
- 4) Dominguez C, Boronat F, Cunat E, et al. (1991) Agenesis of seminal vesicles in infertile males: ultrasonic diagnosis. Eur Urol 20: 129-132
- 5) 酒徳治三郎, 吉田 修, 小松洋輔 他 (1967) 先天性精管欠如症について. 泌尿紀要 13: 769-784
- 6) Moni VN and Lalitha PA (1992) Moni's window operation: a new surgical technique to create a sperm reservoir in congenital vasal agenesis. J Urol 148: 843-844
- 7) Belker AM, Jimenez-Cruz DJF, Kelami A, et al. (1986) Alloplastic spermatocele: poor sperm motility in intraoperative epididymal fluid contraindicates prosthesis implantation. J Urol 136: 408-409
- 8) 平井 景, 高崎 登, 岩本勇作 他 (1996) 先天性精管欠損症に対する精巣上体開窓術の試み—精巣鞘膜内精子貯留法—. 日本不妊会誌 41: 36-40
(受付: 1996年 8月21日)
(受理: 1996年10月16日)

Three cases of vas deferens obstruction which seemed to be congenital partial aplasia of the vas deferens

Jiro Eguchi, Koichiro Nomata, Tsukasa Igawa, Naoki Nishimura
Takeshi Hirose, Hiroshi Kanetake and Yutaka Saito

Department of Urology
Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852, Japan

Three cases of vas deferens obstruction which seemed to be congenital partial aplasia of the vas deferens are reported.

Microsurgical epididymovasostomy was initially planned for three azoospermic men in whom blockade at the epididymis was suspected. However, their vasographies during operation indicated vas deferens obstruction from the inguinal portion to the retroperitoneal portion. As a result reconstruction of the genital duct was aborted in all three. Vas deferens in the scrotum was recognized in all three, and congenital aplasia was considered in only the pelvic portion of the vas deferens.

A healthy baby was born to one of the three after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with epididymal sperm. Likewise, the other two are planning to undergo similar treatment.

Key words: microsurgical epididymovasostomy, partial aplasia of the vas deferens, epididymal sperm collection, intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

地方部会講演抄録

平成8年度日本不妊学会中部支部学術集会

日時：平成8年5月25日(土)午後2時～
会場：(津市)三重県教育文化会館 5階大会議室

1. 当院における卵細胞質内精子注入法の治療成績

○浅田義正, 岡村尚子, 森脇崇之
北川武史, 安藤智子, 安藤寿夫
石原 豊, 近藤育代, 菅沼信彦
(名古屋大分院産婦)
山本雅憲 (同泌尿器)

卵細胞質内精子注入法(ICSI)の臨床応用により, 男性不妊症の治療は大きく変わろうとしている。

当院においても, 1995年4月より, 顕微授精法としてはすべてICSIを適用している。そこで, この1年間の当院におけるICSIの治療成績につき報告する。射出精子を用いたICSI(n=79)では, 受精率68.4%, 卵割率87.8%であった。そのうち, Swim-up法が可能であった場合, その受精率は77.4%, 卵割率は91.2%であったが, 十分な精子が得られず, Swim-up法が不可能であった場合では, 受精率58.3%, 卵割率89.2%と受精率の低下が認められた。また, 精巣上体精子(n=10), あるいは, 精巣精子(n=13)を用いた場合には, それぞれ, 受精率66.3%, 70.4%, 卵割率87.2%, 79.6%であった。

ICSIにおいて, 射出精子と精巣上体精子または精巣精子の間に受精率の差は認められなかった。

2. IVF-ETにより妊娠し末期に腹腔内出血をきたした2症例

○松下真弓, 浅井光興, 正橋鉄夫
佐藤英子, 平田正人, 保條説彦
岡本俊充, 藪下廣光, 鈴木正利
野口昌良, 中西正美 (愛知医大産婦)

IVF-ETにより妊娠し末期に腹腔内出血をきたした2症例を経験した。

症例1は妊娠36週に突然の下腹痛とショック症状を呈し胎児仮死所見を認めたために帝王切開術を施行した。800gの腹腔内出血があり左子宮動脈の破綻が原因であった。症例2は妊娠37週に下腹痛と陣痛発来を主訴に来院した。2日間経過観察したが分娩進行せず, 胎児仮死所見を認めたため帝王切開術を施行した。800gの腹腔内出血があり右parametrium部に出血点を認めた。2症例ともIVF-ET後の妊娠であり,

障害部位も採卵穿刺針の進路付近であり, そこが癒着・瘢痕化し脆弱化していたと考えられる。また症例1は子宮内膜症と骨盤内炎症の既往も関係していると考えられる。

経腔採卵による早期合併症としては出血・感染などが報告されているが, 妊娠時の合併症として本症例のように腹腔内出血を起こす可能性が示唆された。

3. 習慣流産夫婦におけるHLAの検討

○細川知俊, 篠原雅美, 馬島秀泰
(慶應大伊勢慶應病院産婦)

習慣流産の原因はホルモン異常, 子宮奇形など多岐にわたるが, 今回我々は, 不育症患者夫婦のHLAを検討し若干の知見を得たので報告する。

1989年1月から1993年2月に慶應義塾大学を受診し, HLAを検査した651組の不育症夫婦を患者群とした。対照は各抗原の陽性者数では第10回国際組織適合性ワークショップで公認された日本人のHLA出現頻度を用い, 抗原共有数では第11回国際組織適合性ワークショップでのHLA共有率を用いた。

いくつかのHLA出現頻度で患者群と対照群の間に有意差が見られた。共有数についても患者群においてDQ抗原を2個以上共有しているものが対照群に比し有意に多かった。

あるHLAが流産と関連している可能性が示唆され, また, HLAクラスII抗原の共有数が習慣流産と関連している可能性が示唆された。

4. 子宮内膜における着床環境とIL-8

○岡田喜親, 朝比奈俊彦, 後藤淳子
小林隆夫, 寺尾俊彦 (浜松医大産婦)

人工授精や体外受精では, 精液は処理され精漿は使用されない。しかし, 精漿に頸管軟化作用があることは経験的に知られている。またサイトカインであるIL-8には妊娠末期頸管熟化作用があることが最近の知見により明らかとなっている。今回は精漿中のIL-8の測定, および子宮内膜に対する作用について検討した。

人工授精および体外受精時に採取した精液より精漿中のIL-8を測定した。またGn-RHaにて下垂体摘出の状態としたマウスにIL-8を投与し, 子宮内膜の変化をみた。

精漿中のIL-8は平均3,152 pg/mlと血清に比して有意に高かった。IL-8を投与したマウスにおいては子

宮内膜上皮下間質の浮腫状変化が著明であった。

IL-8は子宮内膜に対し着床期と類似した変化を引き起こすことが判明した。また精漿中にも大量に存在し、着床期の子宮内膜に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

5. HSG 卵管閉塞例の1 考察

○塚田和彦, 岡本雅嗣, 強口芳明
服部政博, 古川雄一

(静岡赤十字病院産婦)

子宮卵管造影は、卵管の疎通性を知るうえで、不可欠な検査であるが、その診断には限界があるといわれている。

今回我々は、従来の子宮卵管造影にて卵管閉塞と診断されたにもかかわらず、自然妊娠に至った症例を経験し、卵管閉塞症例の取り扱いにつき考察した。

症例は両側卵管閉塞を診断されたが、子宮卵管造影施行2周期後に自然妊娠に至った症例と、片側の卵管閉塞で閉塞側の子宮外妊娠をきたした症例であった。近年試みられている選択的卵管造影では、これらの機能的卵管閉塞の疎通性が多く確認されている。今回の反省をもとに、従来の子宮卵管造影にて閉塞が認められた場合の対応について、検討を行った。

6. Kallmann症候群患者のゴナドトロピン療法

○今井篤志, 堀部進次, 高木敦志
玉舎輝彦 (岐阜大産婦)

Kallmann症候群は、ゴナドトロピンの欠損にともなう性腺機能低下と嗅覚異常をともなう。その病態は胎生期において、ゴナドトロピン放出因子(GnRH)産生細胞が視床下部へ遊走できなかつたためと考えられている。治療にはGnRHあるいはゴナドトロピンが用いられているが、その有効性の比較は男性でのみなされている。

今回、Kallmann症候群の女性患者3例を経験したのでGnRHとゴナドトロピン療法の比較を試みた。2症例は5～8年間のエストロゲン・プロゲステン療法の後、挙児希望のため排卵誘発を行った。3か月間のGnRH(10～20 μ g/パルス/90分)に無反応であったが、hMG(150～300IU)連日投与・hCGによって排卵に至った。1症例は16歳であるが、hMG(150IU)7日投与によってエストロゲン値が上昇し、卵胞発育が示唆された。

つまり、男性患者とは異なり、女性Kallmann症候群患者の性腺刺激にGnRHよりはむしろゴナドトロピンが有効であった。パルス投与装置やGnRHの費

用を考慮するまでもなく、Kallmann症候群の性腺刺激を再考する必要があるのかもしれない。

7. 過排卵刺激を併用した人工授精法の卵巣刺激方法相違による治療成績の検討

○松原寛和, 林 由佳, 鈴木規敬

岡田英幹, 生田克夫 (名古屋市大産婦)

平成6年1月より平成8年2月までに原因不明不妊症39症例143周期で、過排卵刺激を併用した人工授精法を施行した。卵巣刺激方法はclomiphene citrate54周期、hMG89周期で同一症例に対して両方法をat randomに使用した。

妊娠率はclomiphene citrateでは周期あたり1.9%(1/54)、症例あたり2.6%(1/39)、hMGではそれぞれ12.4%(11/89)、23.1%(9/39)でhMGを併用した人工授精周期で有意に妊娠率が高かった(p<0.05)。また、妊娠に至った12周期はすべて治療2周期目までに得られた。

過排卵刺激を目的とした不妊治療を原因不明不妊症例に対して行うにあたっては、clomiphene citrateよりもhMGを併用の方が有意に妊娠率が高く適していると考えられる。しかし、妊娠例は治療早期に得られているので、hMGを併用した人工授精法はIVF-ETやGIFTなどの採用を考慮しながら回数を限って行うべきであると考えられる。

8. 経腔超音波断層法による子宮内膜蠕動様運動の解析

○黒木 遵, 廣田 穰, 門脇 恵

西尾瑞香, 佐藤匡昭, 奥村貴子

吉田麻里子, 青木豊和, 服部公博

河上征治 (藤田保健衛生大産婦)

経腔超音波断層法を用い、各排卵周期における子宮内膜蠕動様運動とsteroid hormone分泌動態との関係を検討した。

対象は自然周期47例58周期、CC周期40例51周期、Gn周期27例43周期、計114例152周期である。内膜の運動は、内子宮口から子宮底部に向かう規則的な蠕動様運動として観察された。また、その運動は卵胞期後期に40%前後と高率に認められたが排卵日以後は急速に沈静化し、+3day以降の運動例は皆無であった。蠕動様運動の活発な症例の背景因子としては、子宮内膜の成熟、修正内膜体積の高値が特徴的ではあったが、卵胞期後期においては血中steroid hormone値との関連は認めなかった。

しかし、黄体期における蠕動様運動の沈静化と血

中P値とは密接な関連があり、10 ng/ml前後になると蠕動様運動が抑制されるものと考えられた。

9. 当科におけるDIPIの有用性に関する検討

○竹内茂人, 箕浦博之, 豊田長康

(三重大産婦)

田窪伸一郎, 二村典孝

(鈴鹿回生病院不妊センター)

不妊症の中には原因不明の場合はもちろん、原因が判明した場合でも、controled ovarian hyperstimulation (COH) や、子宮内人工授精 (IUI) で年月を重ね、その対応に苦慮することが多い。これらの症例では、体外受精・胚移植 (IVF-ET) が、考慮されるが、肉体的、精神的のみならず、経済的にも負担がかかる。

今回我々は、過去に3回以上IUIを施行されるも、妊娠に至らなかった50症例に、直接的腹腔内人工授精 (DIPI) を施行し、若干の知見を得たので報告する。

対象症例は、50症例、88周期で、年齢は24歳から38歳、不妊期間は2年から11年。COHは1) clomiphene citrate/hCG, 2) hMG/hCG, 3) GnRHa/hMG/hCGの3つのプロトコルで施行した。hCGの切り換えは経膈超音波検査にて、最大卵胞径18 mm以上、もしくは卵胞径15 mm以上が3個以上、または血中E 2300 pg/ml以上で、hCG 10000 IUを投与した。hCG投与後40～44時間で経膈超音波検査にて排卵を確認し、ダグラス窩に80%パーコールで調整した精子浮遊液を1 ml注入した。

1996年日本不妊学会北陸支部学術総会

日時：平成8年6月8日午後1時30分～

会場：(金沢市) シティーモンドホテル

1. 不妊を主訴とした46XYq-の2例

○太田昌一郎, 岩崎雅志, 布施秀樹

(富山医薬大泌尿器)

緒方 勤

(東京電力病院小児)

性染色体異常としてY染色体の長腕欠損はまれである。我々は不妊を主訴として来院した46XYq-の2例を経験したので報告する。

症例1：33歳男性会社員。主訴は不妊。結婚後6年になるが挙児を得ず近医受診し無精子症といわれたため精査目的で富山医科薬科大学附属病院泌尿器科を受診した。身長161 cm, 体重54 kg, 前立腺、精巢上体、精管に異常を認めず。精巢容積は右6 ml, 左7 ml, 内分泌学的にはLH, FSHの軽度上昇、テ

ストロンの低下を認めた。LHRH負荷テストではLHは反応したが、FSHは反応が低下していた。

症例2：33歳男性会社員。主訴は不妊。2年間挙児を得ず近医を受診し無精子症といわれたため精査希望で当科受診した。身長176 cm, 体重64 kg, 前立腺、精巢上体精管に異常を認めず。精巢容積は右11 ml, 左12 ml, 内分泌学的にはLH, FSHの軽度上昇、テストステロンの軽度低下を認めた。LHRH負荷テストではLH, FSHとも反応を認めた。

2症例ともGバンド法での染色体検査で性染色体の長腕の欠損を認めた。サザンブロット法、PCR法で症例1で身長決定に関与していると考えられている遺伝子DYS 140, 273, 275の欠損を認めたが、症例2では、それらの遺伝子が存在していた。

2. 精子運動率に対する補中益気湯の効果と蛍光スペクトル学的検討

○天野俊康, 平田昭夫, 高 栄哲

並木幹夫

(金沢大泌尿器)

補中益気湯の精子運動率に対する直接作用につき検討し、蛍光スペクトル解析から作用機序につき考察を加えた。

健康ボランティア14例(26～39歳, 平均29.7歳)より16精液検体を採取し、30分間室温にて放置し液状化させた。一般精液検査後、無処置精液、およびPBSまたは補中益気湯添加(1, 10および100 μg/ml) 精液をインキュベーター(5% CO₂, 37°C)内に置き、1, 2, 4および6時間後にそれぞれの精子運動率を測定した。さらに6時間後の各サンプルをPBSにて3回洗浄(各3,000 rpm, 10分間)後、精液0.1 mlあたりの精子成分の蛍光強度(excitation 488 nm, emission 622 nm)を分光蛍光光度計(850型, 日立)にて測定した。

10および100 μg/mlの濃度の補中益気湯エキス溶液添加群での精子運動率は、無処置精液およびPBSのみを添加したものに比べ、1～6時間後において有意に高かった。1 μg/ml添加にても、コントロール群に比べ4～6時間後の精子運動率は有意に高かった。また、6時間後の精子成分からの蛍光強度は、各群において有意差はなかった。

以上より、補中益気湯を精液に添加することにより、精子運動率の低下抑制効果が認められた。ヒト精漿および精子成分の蛍光スペクトル強度は、精子運動率と正の相関関係があるが、今回の結果で精子成分の蛍光強度が各群間で差がなかったことにより、この補中益気湯による精子運動率保持効果は、精子自体への作用よりも、精子周囲の環境への作用によ

るものと推察された、したがって補中益気湯は男性不妊症患者のみでなく、そのパートナーへの使用も有用である可能性を示すものと考えられた。

3. Obstructive azoospermiaの治療変遷とnew-A.R.T.の現状

○加藤 修 松山毅彦 道倉康仁
(永遠幸マタニティクリニック)
風間泰蔵 布施秀樹
(富山医業大泌尿器)

精巣正常なる無精子症すなわち閉塞性無精子症に対し、当初人工精液瘤埋没→精子採取→人工授精が用いられた。しかしながら異物反応、感染による膿精液→再閉塞ならびに、婦人科医との関係不十分などで良好な成績が得られなかった。その後、精管・精巣上体管吻合などの手術療法もかなり行われたが、私共を訪れる術後患者の精液所見をみるに最良の方法とは思われない。

1987年Silber et al. が報告したMESA + IVF-ETは、その後我々も国内初の成功例(1991)を出し、その時点では夢の治療法と鼓舞した。

1992年ベルギーのグループが報告したICSI法は受精率60%を示し、顕微授精法の成功率向上に苦しむ我々に驚異を与えた。しかし、1994年我々の小林らが受精率97%をimproved ICSI法で達成、妊娠率も45%(刺激周期)を超えた。

1匹の運動精子で受精→妊娠が得られる究極の治療法であるこのimproved ICSI法が私自身のobstructive azoospermiaに対するnew-A.R.T.にも大きな変遷をもたらしたのである。blind-E.S.A. (PESA) needle-T.S.C. (TESE)などのoriginal new-A.R.T.を紹介したい。

4. 体外受精・胚移植における多胎妊娠防止についての1考察

○高塚亮三, 松山毅彦, 道倉康仁
加藤 修
(永遠幸マタニティクリニック)

近年の補助生殖技術の進歩は、不妊症に悩む夫婦がその恩恵にあずかれる機会を確実に増やしてきたが、他方で多胎妊娠の頻度の増加という新たな難問も派生させるに至った。多胎妊娠の頻度を左右する因子については、主に従来法での体外受精・胚移植における移植胚数、妻の年齢、胚移植の施行回数などでこれまでは議論されてきたが、本研究においては、手技の違いによる移植胚数と多胎妊娠率との関係について検討したので報告する。

対象は当院において1994年中に施行し出産にまで至った、従来法での体外受精・胚移植の60例、顕微授精(ICSI)・胚移植の59例、凍結・融解胚移植の17例、GIFTの70例である。多胎妊娠の発生は71例(34.5%)にみられ、その内訳は五胎が1例、要胎が2例、品胎が17例、双胎が51例であった。

従来法による体外受精・胚移植では、移植胚数1個の群(n=14)では多胎妊娠はなく、移植胚数2ないし3個の群の多胎妊娠率28.6%(6/21)に比べ、移植胚数4個以上の群の多胎妊娠率56.0%(14/25)が有意に高くなった。顕微授精(ICSI)・胚移植では移植胚数2個以上の群では多胎妊娠率47.5%(19/40)と高かった。凍結・融解胚移植では実施した移植胚数1個から5個までの全体としての多胎妊娠率は23.5%(4/17)と低かった。GIFTでは移植卵子数3ないし4個の群の多胎妊娠率9.1%(1/11)に比べ5個以上の群では45.8%(27/59)と多胎妊娠率は有意に高かった。

顕微授精(ICSI)・胚移植には、とくに多胎妊娠になりやすい症例が含まれるため、それを防止するためには胚の凍結保存を多用するなどの工夫が必要ないように思われた。

5. 当科における顕微授精の臨床成績

○小嶋康夫, 中島正雄, 石川博士
館谷由佳, 大田 悟, 大口昭英
佐竹紳一郎, 舟本 寛, 中野 隆
館野政也 (富山県立中央病院産婦)

当科では1994年2月より顕微授精を開始した。当初囲卵腔内精子注入法(SUZI)を選択していたが1995年からは卵細胞質内精子注入法(ICSI)を開始し受精率、妊娠率の向上を認めたのでその臨床成績について報告する。

SUZIは12症例、20周期、ICSIは54症例、69周期に行った。いずれも重度の男性不妊やconventional IVFでは受精しなかった症例を対象とした。

精子の調整はswim-up法を主として用いたが、ICSIでは運動精子が数万/ml以下の症例にmodified migration method (D. Dozortsev et al. 1994)を用い運動精子を回収した。採取した卵子は8%非働化血清添加HTFで4~8時間培養後ヒアルロナーゼ処理により裸化した。SUZIではスクロースを添加して囲卵腔を拡大し、3~5個の運動精子を注入した。ICSIではmidpieceあたりをマイクロピペットで接触してimmobilizedさせた運動精子を尾部より吸引し、卵細胞質吸引刺激を行った後に注入した。受精の確認は精子

注入から12～14時間後に行い、受精卵が多く得られた場合は前核期に凍結保存とした。

SUZIは12症例20周期122卵に行い、受精率50.8% (62/122)、多精子受精率33.8% (21/62)、分割率91.2% (31/34)、胚移植率65.0% (13/20)で、妊娠率(移植あたり)は15.4% (2/13)であった。ICSIは54症例69周期506卵に行い無傷率85.8%、受精率82.3%、分割率93.6%、胚移植率97.1%で、妊娠率(採卵あたり)は46.4%であった。

SUZIに比較して、機械的刺激でimmobilizedさせた運動精子を卵細胞質吸引刺激の後注入する方法で行うICSIでは、より高い受精率、妊娠率が得られた。また運動精子が数万/ml以下の症例でもmodified migration methodによりICSIに十分な運動精子が回収可能であった。

6. 当科における付属器疾患に対する腹腔鏡下手術の検討

○舟本 寛, 石川博士, 中島正雄
 鈴谷由佳, 大口昭英, 佐竹紳一郎
 小嶋康夫, 中野 隆, 館野政也
 (富山県立中央病院産婦)

当科では1985年12月より腹腔鏡を導入し、1995年6月までに372例に施行した。

1992年10月までは不妊症および子宮外妊娠の診断が主であり、腹腔鏡下手術も癒着剥離や内膜症の電気焼灼程度であった。しかし1992年11月より付属器疾患に対しても積極的に腹腔鏡下手術を行い、1995年6月までに81例に施行した(癒着剥離術は除く)。その内訳は良性卵巣腫瘍34例(嚢腫核出術28例、付属器切除術5例、卵管摘出術1例)、チョコレート嚢胞のアルコール固定術17例、PCO14例(卵巣楔上切除術10例、電気焼灼術4例)、子宮外妊娠16例(MTXの局注2例、卵管線状切開9例、卵管摘出術5例)であった。

卵巣腫瘍34例のうち体内法は28例、体外法は5例、体内+体外法は1例であった。平均手術時間は嚢腫核出術体内法128分、体外法112分、付属器切除術体内法70分、体外法50分と体内法が長時間を要した。とくに固形成分の多い大きな皮様嚢腫や癒着の強いチョコレート嚢腫では時間のかかるものが多く、術前に十分検討する必要があると考えられた。

チョコレート嚢胞エタノール固定術の平均手術時間は88分、エタノールの平均注入量は28.8 ml、不妊症12例中3例(33%)が妊娠した。

PCO楔状切除術10例中3例(30%)、電気焼灼術4

例中1例(25%)に妊娠が成立した。

子宮外妊娠卵管線状切開術は9例に施行したが、1例は術後のhCGtiterの下降が悪く、MTX全身投与を行ったが貧血と下腹痛が増強したため、やむなく開腹して卵管摘出術を施行した。このように子宮外妊娠の卵管線状切開術やMTX局注例では術後persistent pregnancyに注意する必要があると考えられる。

7. 体重減少性無月経患者の臨床的検討

○村上弘一, 中川俊信, 鈴木信孝
 寺田 督, 井上正樹 (金沢大産婦)

体重減少にともなう無月経は若年女性に多くみられ、日常の診療においてはその対応に苦慮することが多い。今回、我々は体重減少性無月経患者における内分泌学的背景と治療過程での体重回復と月経周期の回復の関係について検討した。

1994年1月より1995年12月までの体重減少性無月経患者について、初診時身体所見、血中ホルモン値、ホルモン負荷試験の反応性、治療に対する反応性を第I度無月経と第II度無月経に区別して検討した。

第I度無月経症例では、第II度無月経症例に比べて受診時Kaup指数、血中E₂、血中LH、FSHがやや高値であり、血中cortisolはやや低値であった。ホルモン負荷試験では、第I度無月経症例は7例中6例がLH、FSHとも正常反応を示したが、第II度無月経症例では全例低反応であった。治療に対する反応においては、第I度無月経症例ではKaufmann療法に7例中3例が反応し、clomiphene療法に4例中3例が反応した。第II度無月経症例ではKaufmann療法は全例無効であり、clomiphene療法では4例中2例、clomiphene 2段投与療法では4例中3例が反応したが、いずれもKaup指数が20前後に上昇していた症例が治療に反応していた。

体重減少性無月経患者に対する治療においては、体重の回復が重要であるが、Kaup指数で約20となることが治療に対する反応性の境界と考えられた。

8. 着床前胚性診断の試み

○副田善勝, 道又敏彦, 山川義寛
 泉 陸一 (富山医業大産婦)

体外受精・胚移植などの生殖医療技術の進歩と、DNA解析など分子生物学の発展は、着床前の初期胚における遺伝子診断を可能にした。我々は、着床前初期胚の生検による遺伝子診断が、安全かつ正確に行い得るか検討した。

1) マウス初期胚(8細胞期胚)を用いて、Tyrode液

またはcutting pipetにより透明帯を切開し、つぎにaspiration pipetにて割球を1～2個吸引した。それぞれの透明帯切開法における破裂胚率、胚盤胞形成率を検討した。また、割球採取数による胚盤胞形成率を検討した。

2) 同意を得て用いたヒト余剰卵(初期胚)にて、FISH法(probe: CEP Y)およびnested PCR法(primer: SRY)による胚性別診断を行った。

Tyrode液による胚生検法とcutting pipetによる方法において、破裂胚率は25.0%と26.6%であった。また、胚盤胞形成率はそれぞれ73.3%と81.8%でありコントロール(80.0%)と差を認めなかった。割球細胞を1個採取した場合の胚盤胞形成率は81.3%、2個では77.8%であった。FISH法によってY染色体を診断することが可能であった。nested PCR法にてもY染色体特異領域を検出することができた。

我々が施行した胚生検法は、簡便で有用性に優れており、また割球数1～2個の胚生検では胚の発育に影響を及ぼさないと考えられた。FISH法およびnested PCR法による遺伝子診断は今後応用するためには、その信頼性を高めることが必要と思われた。

9. 副角妊娠の早期診断とその取り扱い

○後藤健次, 西島浩二, 辻 隆博
竹内 譲, 紙谷尚之, 小辻文和
(福井医大産婦)

副角妊娠はきわめてまれな疾患である。その診断は必ずしも容易ではなく、ほとんどの症例は破裂後の開腹時に診断される。妊娠9週という早期に診断され、破裂前に副角切除術を施行し得た1症例を経験したので報告する。

27歳主婦、既往歴、妊娠歴なし。1995年6月15日を最終月経とし、同年8月1日初診(妊娠6週)。内診上子宮頸部は単頸、体部は鶯卵大で両側付属器には腫瘤を触知せず。経膈超音波で子宮体部内膜にはGSを認めず、子宮体部左側に内膜エコーに連続しない約2cm径のbuddingが描出され、その中にGS様エコーを認めた。両側付属器には異常所見は認めなかった。何らかの異所性妊娠が示唆されたがはっきりとはしなかった。しかし2週間後の8月17日(妊娠8週)には、これらの所見が劇的に変化した。内診上右傾した子宮の左側に可動性のある超クルミ大の弾性腫瘤を触知するようになった。超音波検査では腫瘤は子宮に連続し、内部に心拍をともなう胎児エコーを認めた。なお腫瘤内部のGS様エコーと子宮内膜エコーには連続性は観察されなかった。MRI冠状断では、

腫瘤は“くびれ”をもって子宮体部に連続し、T₂強調により右側子宮内脱膜と左側腫瘤内胎児をともなうGSが、それぞれ別個の“junctional zone”で鮮明に描出された。以上より左側副角妊娠と診断し、8月21日副角切除術を施行した。Buttram分類Class II A(単角副角妊娠)で、副角側卵巣に黄体を認めた。術後の組織学的精査により副角内腔と子宮内腔には交通がないことが確認され、妊娠成立機序に精子の腹膜移動が推察された。なお本症例には尿路系や聴覚の異常は認められなかった。

注意深い診察と画像診断にて副角妊娠の早期診断が可能であった。本症例のように、妊娠副角は短期間に劇的に本態を変化させるものと推察され、厳重な経過観察が肝要と考察された。

10. 卵胞囊腫の乳牛における卵胞と卵子の対比成長測定学的(allometric)検討

○泉 徳和, 柿田星史, 島 由里香
二俣ナナ (石川県農業短大生物生産学)

卵胞囊腫(FCと略)は、10～20%の乳牛で観察される内分泌異常のひとつで、繁殖効率を大幅に低下させている。この異常条件下にある囊腫卵胞(CFと略)を有する卵巣内の卵胞や卵子の発育がいかなる状況にあるのか不明である。本研究では、FC乳牛と正常な乳牛の卵巣から卵胞や卵子を回収し、それらの発育を比較検討したので報告する。

ホルスタイン種のFC乳牛と正常乳牛、それぞれ147頭と41頭から、屠殺後30分以内に卵巣を摘出し、37℃で研究室に持ち帰り材料とした。卵胞や卵子の直径の計測はノギス、マイクロメータで、卵子や卵丘細胞の形態観察はLeibfried(1979)に従って実施した。なお、卵子はCarnoy液で5日間固定、酢酸オルセインで染色し、位走査顕微鏡などで観察した。FC乳牛と正常な乳牛の新鮮な卵胞と卵子の計測値について対比成長測定学的(allometric)に検討した。

FC乳牛の卵子の直径(Y)とその卵胞の直径(X)の相対的な発育を推定する回帰式は、 $Y = 160.6X / (X + 0.089)$; $R^2 = 0.99$ (298例)であり、正常な乳牛では、 $Y = 160.8X / (X + 0.165)$; $R^2 = 0.99$ (159例)となった。FCと正常な乳牛の卵子のうち、正常な核を有する卵子のみを抜き出した際の回帰式は、FC乳牛: $Y = 161.5X / (X + 0.219)$; $R^2 = 0.99$ (99例)、正常乳牛: $Y = 161.6X / (X + 0.194)$; $R^2 = 0.99$ (134例)となった。

これら四式の漸近線から、FCと正常な乳牛の卵子が同じ大きさにまで成熟すること、さらに、両者ともに異常な卵子を含んだ前二式は、正常な卵子のみ

からなる後二式よりもわずかではあるが小さな漸近線値を示した。この縮小から卵子の退行過程にアポトーシスが関与しているものと推察される。

シンポジウム

「不妊症に対する手術療法の最近の進歩」

1) 内視鏡手術 (腹腔鏡, 子宮鏡)

村上弘一 (金沢大産婦)

不妊症の診療においては、腹腔鏡や子宮鏡などの内視鏡は診断のための検査として頻用されてきた。近年、内視鏡下手術器具の開発と改良がなされ、手術に対する健康保険も適用されたことにより、内視鏡下手術が急速に普及しつつある。今回、我々は不妊症症例に対する内視鏡下手術の中で、腹腔鏡下手術と子宮鏡下手術における最近の進歩と当科での症例の検討を行った。

1) 腹腔鏡下手術。今回は、主に子宮内膜症に対する手術療法を検討した。腹腔鏡下手術では、全例KTPレーザーを用いた。腹腔鏡下手術を行うに際しては選択基準を設けたため、腹腔鏡下手術症例では開腹症例に比べて、rAFSスコアは低値であり、術中出血量も少量であったが、手術時間はやや延長した。術後経過においては排卵周期の回復は差を認めなかったが、観察期間が短いためか、妊娠率には変化がみられなかった。

2) 子宮鏡下手術。今回は、主に粘膜下筋腫と内膜ポリープに対する手術療法を検討した。子宮鏡下手術としては、レゼクトスコープを用いた腫瘍の切除を行った。症例の平均年齢は34.1歳で、不妊期間は平均4.0年であった。Gn-RHアナログを使用した症例では、腫瘍体積は平均44.7%に縮小しており、手術の簡便化と手術時間の短縮に有用と思われた。平均手術時間は2時間20分であり、術後Hb値の低下はみられなかった。術後観察期間は2～11か月であるが、1例のみに腫瘍基部の残存がみられた以外、子宮内腔の所見は良好であった。

以上より、内視鏡下手術では手術時間の延長がみられるものの、術後の経過は良好であり、患者の負担も軽減されていた。しかし、今回の検討では経過観察期間が短いため、妊娠率に関しては今後の検討を要すると思われた。

2) 当院における顕微授精の変遷

道倉 康仁 (永遠幸マタニティクリニック)

重度男性不妊や受精障害への対応として、近年、

PZD, SUZI, ICSIなどの顕微授精法が各施設で臨床応用され、当院でも1992年1月よりPZDとSUZI、同年10月よりICSIを実施してきた。PZDには適応症例に限界があり、SUZIには多精子受精を避けるための注入精子数の決定に難点があったため、当初よりICSIには大きな期待をかけていたが、最初の1年半の臨床成績は決して満足できるものではなく、SUZIの併用を余儀なくされていた。1994年7月より従来のICSIに対して、注入精子の機械的不動化や卵細胞質内への確実な注入など、いくつかの改良を施したところ、射出精子、精巣上体精子、精巣精子を問わず、飛躍的に高い受精率が得られるようになった。当院ではこれをimproved ICSIと称し、その後、顕微授精はimproved ICSIのみの実施となり、現在に至っている。

ICSIによる妊娠症例のうち、1996年5月までに出産状況を確認できたのは142例で、出生児総数は213人であったが、先天異常は3人(1.4%)にのみ認められた。また、自然流産例において染色体異常が占める割合はICSI妊娠例と自然妊娠例との間に有意差は認めなかった。

射出精子、精巣上体精子、精巣精子を問わず、また新鮮精子、凍結保存精子も問わず、同等に高い受精率をもたらし、母児の予後についても安全と考えられるimproved ICSIが確立されたことによって、当院のART計画も変化してきている。たとえば、MESAからblind (needle) ESA or TSCへの移行や、1回の手術での回収余剰精子を少量分別凍結することによる夫への侵襲の低減と治療機会の増加、あるいは過排卵処置周期の減少による妻への侵襲の低減など、簡便で安全なART計画が可能になりつつある。

3) IVF-ET (採卵法を中心として)

舟本 寛 (富山県立中央病院産婦)

当科では1990年10月よりIVF-ETを開始したが、本年4月までに施行したARTは499周期であった。その内訳はIVF-ET365周期、GIFT45周期、SUZI20周期、ICSI69周期であった。当初はGIFTの22例に腹腔鏡下採卵を行ったが、その他はすべて経腔採卵であり、そのうちの4例はaccessibilityが悪く経腹採卵を併用した。

IVF-ET365周期について検討すると、総穿刺卵胞数は3637個、総回収卵胞数は3056個で採卵率は84.0%であった。また採卵不成功は2周期であった。

当科での経腔採卵の手技に関しては他施設とほとんど変わりはないと思われるが、注意している点は、1) 血管や腸管の横断面を卵胞と誤らないこと、2) ac-

cessibilityの悪い症例は無理をしないこと, 3) 血液の混入をできるだけ減らし, 吸引液の量を多くしないこと, 4) チョコレート嚢胞は最後に穿刺吸引すること, 5) 10 mm以上の卵胞はできるだけ穿刺しておくことなどである. また, 採卵による合併症では膀胱出血が5周期に, 卵巣膿瘍が1周期に認められ, 開腹を必要とした腹腔内出血, 血管や腸管の損傷は1例もなかった. とくに卵巣膿瘍に関しては, 他院での採卵後に発生し, 当科で手術した症例も経験しており, 採卵後は抗生剤の投与と厳重なfollow upが必要である.

4) 精路通過障害に対する手術療法

風間泰蔵(富山医大泌尿器)

富山医科薬科大学附属病院泌尿器科において閉塞性無精子症と診断された患者49名の治療成績を中心として最近の治療の進歩に関する若干の検討を加えた.

1979年10月より1995年12月の間に不妊を主訴として当科を受診した患者は1,336名であり, うち236名(17.7%)が無精子症, さらに49名(3.7%)が閉塞性無精子症と診断された. この49名を原因別に見ると, 両側精管欠損症患者が14名(28.6%)と最も多く, ついで両側鼠径ヘルニア術後10名(20.4%), 両側精巣上体炎9名(18.4%), 両側精管切断術後8名(16.3%)そして精管末端拡張症2名(4.1%)の順であった.

精管末端拡張症の2例に対して射精管口切開術を行い1例で術後精液中への精子の出現をみたが妊娠には至らなかった. 精管精管吻合術を行った7例(うち1例は対側に精管精巣上体吻合術を施行)では, 全例で術後精液中への精子出現をみ, 3例(42.9%)で妊娠に至った. 精管精巣上体吻合術は4例に対して行われ, 1年以上経過を観察できた2例では術後精子の出現はみられなかった. 人工精液嚢造設術を行った7例では, 術後穿刺液中に精子の認められたものが4例(57.1%)あったが妊娠に至ったものはなかった. 顕微鏡手術による精巣上体精子吸引術(MESA)は, 14例に行われ, うち3例(21.4%)で妊娠をみ, うち2例で挙児を得るに至った.

全体としてみると全49名中妊娠に至ったものは6名(12.2%), うち出産に至ったものは5名(10.2%)という成績であった. 治療法の選択や技術的な問題などに関して今後さらに検討を加え成績の向上を目指す.

5) 精索静脈瘤に対する手術療法

天野俊康(金沢大泌尿器)

精索静脈瘤の発生頻度は, 正常者5~16%に対し男性不妊症患者では19~41%に認められる. 精索静脈瘤による造精機能障害の機序は, 精巣温度の上昇, 有害物質の精巣への逆流, 精巣代謝物の停滞などさまざまな因子が挙げられ, その診断には触診, 視診, 超音波, ドップラー, シンチグラフィ, サーモグラフィなどが有用である.

治療の適応としては, 不妊の原因になっている可能性の高いもの, 痛みのあるもの, 思春期以前で精巣発育障害が考えられるものなどが挙げられる. 精索静脈瘤の治療には, さまざまな手術療法が行われるが, 本来良性の疾患であるため, 手術侵襲の少ない安全な術式で, 再発や合併症のないものが求められる.

術式としては高位結紮術, 腹腔鏡下結紮術, 精索静脈塞栓術, 低位結紮術(直視下, 顕微鏡下)などが挙げられる. 高位結紮術は, 術式が普及しており妊娠率も良好と考えられるが, 再発の可能性が高いという欠点がある. 腹腔鏡下結紮術は, 手技の修得, 妊娠率などの問題があるが, 同時に両側施行可能という利点がある. 精索静脈塞栓術は入院期間が短い, 肺塞栓などの重篤な合併症が起こる可能性もある. 低位結紮術は, 精巣動脈の損傷を生じやすいが, 再発率が低い. さらに顕微鏡下低位結紮術は, 合併症はほとんどないものの, 手術時間が問題となる.

現在のところ, どの術式が最良であるかを断定するには時期尚早である. それぞれの術式の長所, 短所を把握し, 各施設での状況に応じて術式を選択していくことが必要であろう.

第114回 日本不妊学会関東地方部会

日時:平成8年6月22日(土) 午後2時~6時
会場:(つくば市)つくば文化会館アルス(つくば市立中央図書館2階)

1. 肥満女性に対する中枢性食欲抑制薬マジンドールの体重減少効果と内分泌環境改善効果

○樋口泰彦, 菅原新博, 荻部正隆
塩川滋達, 小川典宏, 葉梨秀樹
中村幸雄 (杏林大産婦)
河上征治 (藤田保健衛生大産婦)

肥満女性に対し中枢性食欲抑制薬マジンドールを

投与し、その体重減少効果と内分泌環境改善効果を検討した。

肥満婦人15名にマジンドール1T~3T/日、3か月投与を1クールとして1~3クール、計31クール投与した。各クールの前後で血中Estrone (E₁), Estradiol (E₂), free Testosterone (free T), Androstenedione (A), Sex Hormone Binding Globulin (SHBG), LH, FSHを測定した。

BMIは1クール目で3.4, 2クール目で2.0減少したが、3クール目では減少しなかった。1クール目においてA, free T, LH, LH/FSH比に有意な低下がみられたが、2~3クール目では、どの項目においても有意な変化は認められなかった。マジンドールの主な副作用は便秘と口渇で、薬物依存や禁断症状は見られなかった。

マジンドール投与により肥満婦人において体重減少と高アンドロゲン型内分泌環境の改善がみられた。しかし反復投与の効果は弱く、漫然と長期間投与すべきではないと考えられた。

2. クラミジア感染不妊症の検討

○伊地知律子, 安達知子, 原 誠
小野寺潤子, 網野幸子, 武田佳彦

(東京女子医大産婦)

岩下光利 (同 母子総合医療センター)

近年C.trachomatisによる卵管性不妊が不妊症の原因として注目されている。今回、クラミジア抗原陽性不妊患者に対して卵管所見などについて検討したので報告する。

平成5年1月より平成7年10月の間に、当科不妊外来を初診した患者1,173例のうち8例、0.6%がクラミジア抗原陽性であった。HSGでは両側閉塞を3例、片側閉塞および周囲癒着を1例、周囲癒着のみを1例に認め、クラミジア抗原陽性症例中71%に卵管またはその周囲における障害を認めた。

8例中4例について、治療開始前にクラミジアIgA, IgG抗体価を測定したが、卵管疎通障害のある3例はIgGがCut-off値の3.5倍以上の高値を示し、一方疎通障害のない1例は2倍未満の値を示した。前例クラミジア抗原陽性であることからクラミジアの活動時期であると考えられたがIgGが高い症例は履病期間が長いのか、クラミジアの抗原刺激が強いことが推測された。

3. クロミド妊娠例の検討:

児島孝久 (アモルクリニック)

不妊治療で最も繁用されているクロミド(CC)を投与し、妊娠に至った症例を検討した。

1994年4月から1996年4月までに、不妊治療後妊娠の311例中、CC妊娠は104例(33.4%)であった。対象症例の年齢は30.2±3.4歳、不妊期間は2.3±1.6年間、初診よりCC妊娠までの期間は5.2±3.6か月であった。CC投与の適応は黄体機能不全と卵胞発育不良例で、投与方法は月経5日目より内服開始し、最大卵胞径が20mmを超えた時点でhCGを投与、翌日に性交渉またはAIHを実施した。投与量は1日50mgから開始し、最高200mgまで増量し、途中休薬周期をおき必要に応じてhMG, AIH, ステロイドを併用した。

その結果、CC単独の妊娠は半数で、他はhMG, AIH, ステロイドなどを併用していた。CC投与量は、100mgが半数を占め、50・150・200の順であった。成熟卵胞数は1個だけが半数を占め、最大卵胞径は23mm以上が多く、また排卵日は月経14日目以降が大多数を占めた。CC妊娠例は35歳以下が大部分を占め、38歳以上には妊娠例がなかった。

4. 不妊診療におけるSonohysterographyを用いた子宮内膜、筋層観察の意義

○代田琢彦, 藤脇伸一郎, 渡辺潤一郎
平井邦彦, 押田守弘, 房間茂由
栗林 靖, 松本一彦, 石塚文平
兩宮 章 (聖マリアンナ医大産婦)

子宮病変を疑った不妊症218例にSonohysterography (SHG)を行い、その有用性について検討した。

SHG診断は子宮内膜ポリープが64例、29.4%と最も多く、以下筋層内筋腫・漿膜下筋腫10例、粘膜下筋腫9例、子宮腔内癒着9例、子宮奇形5例であった。

SHGを施行することにより、子宮内膜ポリープはその大きさ・数・部位が、子宮筋腫では筋腫核の位置・形状が、中隔子宮では子宮腔の広さ・中隔の厚さ・左右内腔容積差・子宮全体像が容易に観察できた。また、従来の経腔超音波断層法で正常子宮内膜所見を呈したが、SHGで子宮腔内癒着のある症例が認められた。

以上より、SHGは病変部位、とくに子宮内膜との位置関係など、従来の経腔超音波断層法では得られにくい情報も容易に観察可能であり、また侵襲も少

なく、繰り返し行えるため、不妊症例の子宮病変検査法として有用であると思われる。

5. 体外受精におけるpure FSH隔日投与卵巣刺激法の臨床的有用性

○岩橋和裕, 久慈直昭, 高橋 純
小林紀子, 黒島正子, 田島泰宏
橋場剛士, 宮崎豊彦, 末岡 浩
小林俊文, 吉村泰典 (慶応大産婦)

患者の通院負担軽減を目的としたpure FSH隔日投与法を, 従来の連日投与法と比較検討した。

GnRH analogを用いたlong protocolにて, A群(30例)ではpure FSH 450単位を第1, 3日目に, 300単位を第5, 7, 9日目に投与, B群(30例)ではhMG 225単位を連日投与した。A群は第9日目夜, B群は最大卵胞径20mmでhCGを投与, 34時間後経腔的に採卵した。

A群, B群それぞれの来院日数は5.23日, 7.50日($p < 0.01$), 採卵数は10.6個, 7.0個($p < 0.05$), 妊娠率は30% (9/30), 33% (10/30)であった。

ICSI施行例中, A群, B群それぞれの成熟卵数は7.9個, 4.0個($P < 0.01$), 受精卵数は2.2個, 1.8個であった。

本法は, 受精率, 妊娠率を低下させず, 患者の通院負担を軽減できることが示唆された。しかし, over-matureによると思われる採卵不可例があり, hCGへの切り替え時期に注意を要すると思われた。

6. 当院における体外受精胚移植

○山内 宏, 奥野鈴鹿, 佐藤兼加子
杉田匡聡, 岡本 一
(波崎済生病院産婦)

1991年10月から1996年3月までに, 波崎済生病院産婦人科でIVF-ETによる不妊治療を81例(147周期)に対し行った。このうちの56例(111周期)は他施設からの紹介患者であった。147周期に排卵誘発剤投与がなされ, 141周期に採卵を試み(6例がキャンセル)136周期から採卵できた。紹介患者の排卵誘発剤投与はすべて紹介先の病院で行われた。

受精に成功したのは84周期で, これらの症例に対し移植が行われた。このうち21例に妊娠が成立したが8例が子宮外妊娠1例を含む流産に終わった。(対症例妊娠率20.3%, 対移植妊娠率25%)9例が分娩に至り, 4例が現在妊娠継続中である。妊娠が成立した21例の適応は14例が卵管因子, 3例が卵管因子+男性因子, 男性因子と原因不明が各2例, 子宮内膜症では妊娠例はなかった。

7. 同一患者精子によるハムスターテストとヒト卵卵割率の比較

○染谷勝巳, 岡本 一, 岡根夏美
山内 宏, 西田正人, 久保武士
(筑波大産婦)

IVF-ETなどの生殖医学の進歩により不妊における男性因子の関与はますます重要視されているが, 当院ではハムスターテストをルーチン検査として以前より行ってきた。本検査はIVF-ETの成績を予測する上できわめて有用であると考えられるが, 実際のヒト卵でのIVFの成績との間の相関関係を検討してみた。

ハムスターテストは凍結ハムスター卵日本農産工業を使用した。患者ごとに各IVF周期で採取された卵数を合計, そのうち実体顕微鏡下で卵割が確認された卵数を合計し, 卵割率を求めた。

両者の間には正の相関($p < 0.01$, $r = 0.387$)が認められた。GS以上の臨床的妊娠例はハムスターテストおよび卵割率の一方が少なくとも50%以上の群に存在し, 両者ともに50%未満の群との間に統計学的有意差($p < 0.05$)を認めた。また, ハムスターテストは良好だが卵割率が低い症例ではヒト卵側に何らかの受精・卵割阻害因子が存在する可能性が示唆された。

8. 体外受精, 顕微授精における受精成績と精液所見, 先体反応誘起率の相関

○小嶋 清 (小嶋医院)
兼子 智, 羽生久美子, 小田高久
(東京歯大市川病院産婦)
石川博通 (同泌尿器科)
松田紀子, 真田利男
(群馬総合太田病院産婦)

体外受精, 顕微授精における受精成績と精子先体反応誘起能の関連を検討するため, 検査時における精液所見, in vitroにおける先体反応誘起率と受精成績の相関を検討した。

精液はキャピラール攪拌密度勾配法を用いて洗浄濃縮後, 20 mMヘベス緩衝化ハンス液, pH 7.4に懸濁して37°Cで培養した。精液および洗浄濃縮精子の精子濃度, 運動率はコンピューター画像解析装置を用いて測定した。先体反応誘起率は培養2時間後に精子を20 mMピベス緩衝化生食で洗浄後, 修正FITC-コンカナバリンA法で観察した。

検討に用いた原精液(100標本)の所見は $32 \pm 33 \times 10^6$ 精子/ml(平均±S.D.), 運動率 $24.2 \pm 23.9\%$ であつ

た。培養2時間後の先体反応誘起率は0~25% (7.1±7.5%)であった。原精液の精子濃度、運動率、洗浄後の精子濃度、運動率と先体反応誘起率の相関を検討した結果、それぞれ $r=0.329, 0.278, 0.473, 0.674$ と洗浄後運動率と最も高い相関が得られた。検討を行った100症例のうち57症例にIVF-ETを、31症例にICSIを施行した。少なくとも1個の分割卵が得られた症例(分割群)と分割しなかった症例(未分割群)に分類し、検査時の精子所見との相関を検討した。IVF-ET例では分割群(23例)の先体反応誘起率(13.0±6.2%)は未分割群(34例, 5.60±7.5%)に比して有意($p<0.005$)に高く、洗浄前後の運動率とも分割群が有意($p<0.05$)に高値であったが、精子濃度は相関しなかった。一方、ICSIにおける分割群(15例)、未分割群(16例)の先体反応誘起率は6.71±6.16%、3.25±4.43%であったが、有意差はなく、精子濃度、運動率とも両群間に差はなかった。

精子自身により受精するIVF-ETでは運動率、先体反応誘起率が精子受精能に反映されるが、受精をbypassするICSIではこれらの精子機能の関与は低い可能性が考えられた。

9. FSH製剤における分子量と等電点を中心とした分子多様性の比較検討

○三木玄方, 戴 鶴峰, 牛島廣治
福岡秀興 (東京大発達医科学)

我々は一次元平板等電点電気泳動ウエスタンブロットング法を開発し、あわせてSDS-PAGEにより、hMG製剤の生化学的比較検討を行った。

対象として日研HMG, ヒュメゴン75IU, パーゴグリーン, フェルティノームPを用いた。各製剤には異なる共雑蛋白が含まれていること、製剤間でFSHの分子量が少しずつ異なり、ニューラミニダーゼで脱シアル化するとバンドの幅が減少するなど糖鎖構造の多様性が示された。FSH分画の等電点は、ヒュメゴンがpH 3.7~5.2, 日研hMGが3.7~4.5, フェルティノームPおよびパーゴグリーンが3.8~5.3であった。脱シアル化するとpH 5.1, 5.9, および7.2に収束し、等電点の違いはシアル酸含量の違いに由来することが示された。各製剤にはhCG $\alpha\beta$ 複合体, hCGフリー β サブユニットおよび少量のLH $\alpha\beta$ 複合体がみられた。ヒュメゴン75IUにはさらに2分子種のhCG β コアフラグメントがみられ、妊娠性hCGが添加されていることが示された。

以上、製剤間にはFSHのシアル酸含量だけでなくhCG, LHの存在様式や含量も異なっていることが示

された。

10. サル類円形精子細胞の凍結保存

○越後貫成美, 山海 直, 土屋英明
長 文昭, 吉川泰弘
(国立予研筑波霊長類センター)
小倉淳郎 (国立予研獣医科)

マウスでは、円形精子細胞(spermatid)を用いた顕微授精で、正常な受精および個体発生が進行することが確認されている。また、凍結保存された円形精子細胞を用いた場合でも同様の結果が得られることが報告されている。我々は、本法のサル類への応用を考え、カニクイザルおよびアカハラタマリンの円形精子細胞の凍結保存条件について検討した。さらに、その前核形成能についても検討を加えた。

摘出した精巣から精細胞を採取し、各種耐凍剤を添加した凍結用mediumに浮遊させたのち、凍結、保存した。融解した精細胞中の円形精子細胞の生存性について検索した結果、7.5% ethylene glycolおよび7.5% glycerolを耐凍剤とした試験区で良好な生存性(70%以上)が示された。

また、凍結融解したカニクイザル円形精子細胞をマウス卵細胞質内に顕微注入したところ、前核の形成を認め、凍結保存されたサル円形精子細胞が前核形成能を有していることが確認された。

11. 顕微鏡下精管精管吻合術の検討

○永尾光一, 川上稔史, 上田 健
西見大輔, 松橋 求, 石井延久
三浦一陽, 白井將文
(東邦大第1泌尿器)

平成4年5月~平成8年4月の4年間に55例の顕微鏡下精管精管吻合術および精管精巣上体管吻合術を施行した。閉塞原因は、鼠径ヘルニア術後31例、パイプカット術後21例、原因不明3例であった。吻合法は精管の全層縫合と筋層縫合を行い、吻合直後の造影で開通性を確認し、短縮した精管の断裂予防のために2-0ナイロンにて精巣を釣り上げサポーターを2か月使用している。

術後精子出現症例は、鼠径ヘルニア群12例、パイプカット群14例であった。年齢は、パイプカット群のほうが高く、閉塞期間は、鼠径ヘルニア群のほうが長かった。術中精管内精子を確認できなくても術後射出精子を得ることができることがわかった。自然妊娠可能な精液所見は、運動精子濃度350万/ml以上と考えられた。精子出現と自然妊娠可能までの必

要観察期間はそれぞれ鼠径ヘルニア群で約5か月、約1年、パイプカット群では約4か月、約7か月となった。必要観察期間観察できた症例で精子出現率、自然妊娠可能症例の割合および妊娠率は、それぞれ鼠径ヘルニア群で75%、100%、62.5%、パイプカット群では93.3%、100%、11.1%であった。

12. 男性不妊を主訴に来院した47,XY,+dic (15) (q11.2) の1例

○吉田 淳, 中島耕一, 野澤英雄
永尾光一, 黒田加奈美, 石井延久
三浦一陽, 白井将文
(東邦大第1泌尿器科)

男性不妊を主訴に来院した15番染色体由来の二動原体染色体が1本余分にあるまれな常染色体の構造異常を経験したので報告する。

症例は、39歳、男性。学歴は高卒。主訴は不妊。現病歴は、平成8年1月9日、不妊のため他院を来院し、精子無力症を指摘され当院を受診。結婚期間は53か月。不妊期間は36か月。現症は、身長172cm、体重69kg、指極172cm。外表奇形なし。精巣容積は、左15ml、右20ml。左精索静脈瘤あり。精液検査は、精液量3.0ml、精子濃度は $42 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は49%。血清FSH、LH、testosteroneは正常、PRLは軽度上昇。染色体の核型は、47,XY,+dic (15) (q11.2)であった。

今回の症例では15番染色体の短腕末端から長腕の11.2の部分までを余分に2倍持っているケースであったが、長腕については11.2までのごくわずかな部分であったため外表奇形や精神発達障害などが発生しなかったと推測された。

13. 逆行性射精における妊娠成立例

○石川博通, 大橋正和, 早川邦弘
畠 亮
(東京歯科大市川総合病院泌尿器)
兼子 智, 小田高久 (同産婦)

逆行性射精の2例に対してAssisted Reproductive Technique (ART)を用いて妊娠が成立したので報告する。ARTの内容は以下のごとくである。

1) 尿の悪影響を除去するために排尿後ペントキシフィリンを含有した精子培養液を膀胱内に注入して精子を回収した。2) クッション法にて精子を洗浄濃縮した。3) 液体チツ簡易凍結法を用いて精子を凍結備蓄した。4) 攪拌密度勾配法を用いて運動精子のみを選択的に回収して人工授精を行った。

症例1は37歳で4年前に逆行性射精を指摘された。1991年8月より8回精子を回収し凍結保存を行い人工授精にて妊娠が成立した。

症例2は35歳で6か月前に逆行性射精を指摘された。1991年11月に2回精子の凍結備蓄を行い、同様に人工授精によって妊娠が成立した。

14. Sperm Quality Analyzer (SQA) の使用経験

○武島 仁, 真鍋文雄, 赤座英之
(筑波大泌尿器)

SQAにより測定されるSperm Motility Index (SMI) と通常の精液検査所見を比較しSQAの有用性を検討した。

1995年2月より1996年3月の間に、男性不妊症を主訴として筑波大学泌尿器科外来を受診した55症例より採取された精液213検体を対象とした。

SMIは3回測定し、平均値をとった。精液検査では精液量・精子濃度・精子運動率・精子奇形率を測定した。相関の有無はSpearmanの順位相関係数によった。

SMIは精子濃度・精子運動率と正の相関を示し、精子奇形率と負の相関を示した。精子濃度と精子運動率の積である運動精子濃度とは最も高い相関($r = 0.743$)を示した。この傾向は精子濃度 $2000 \times 10^6/\text{ml}$ 以下、および精子運動率50%以下でも同様であった。

以上より、SMIは精液検査所見を反映し得る指標と考えられた。

15. 当院における習慣性流産のHLAの解析

○善方菊夫, 勝沼潤子, 鈴木隆弘
淡路英雄, 牧野恒久 (東海大産婦)

1981年Taylorらは、原因不明習慣流産夫婦間でHLA適合が多く、免疫的機序が関与しているものと考えた。今回我々は1989年12月～1992年12月まで当院を受診し、一般習慣流産スクリーニング検査において異常所見を示さなかった、いわゆる原因不明および免疫学的習慣流産夫婦62組(原発性33組・続発性29組)について解析を加えた。

コントロールは子供のいる近郊の夫婦77組とした。HLAクラスI抗原(A・B・C)およびクラスII抗原(DR・DQ)について比較したところ、HLA特異性の表現型頻度は各群有意差を認めず、夫婦2人の個人が偶然に特異性を各座で1個以上共有する確率においても、またクラスII抗原において各座で2個以上共有する確率および各座で3個以上共有する確率においても習慣流産群・コントロール群間に有意差を

認めなかった。同時に夫婦間リンパ球混合培養試験の結果とHLAクラスII抗原の共有数との関連についても検討した。

16. 胎児心拍動を認める子宮外妊娠の保存的治療

○田口雅之, 川内博人, 釵持 稔
石井尊雄, 飯野譲二, 西島正博
中居光生 (北里大産婦)

17. 反復した子宮鏡下手術およびIVF-ETにより 生児を得た興味ある症例

○大原 聡, 林 保良, 山本百合恵
蔵本欧美, 小澤伸晃, 岩田壮吉
木挽貢慈, 宮本尚彦, 関 賢一
岩田嘉行 (川崎市立川崎病院)
中野真佐男, 吉村慎一
(済生会神奈川県病院)

18. CIN合併不妊症に対するLaser治療後の妊娠 症例の検討

○高木章美, 石原 理, 斉藤正博
竹田 省, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)

不妊症症例の高齢化にともない, Smear異常やCIN合併例の散見されることがあり, 子宮保存の目的でLaser手術(円錐切除術あるいは蒸散術)を施行している。このような子宮頸部手術の既往のある不妊症例のうち妊娠成立例の治療法について調査し, 頸管因子の存在する可能性について検討した。

過去5年間の不妊症初診症例1,374例のうち, 当科においてCIN治療後に妊娠に至った症例は6例あり, その背景・治療法について検討した。患者の平均年齢は34.7歳, 平均不妊期間は2.2年, 細胞診異常はclass III 4例, class IV 2例で, 組織は中等度または高度

異形成4例, 上皮内癌2例であった。CO₂Laserによる蒸散術が3例, 円錐切除が3例行われた後, 不妊治療として6例中4例にAIHが施行され, いずれも1回目で妊娠に至った。

不妊症症例のスクリーニング検査として細胞診は不可欠であり, CIN症例の治療としてLaser手術は有用であるが, 頸管因子が問題となる可能性が示唆された。

19. 子宮奇形は不妊原因になり得る

○西田正人, 岡本 一, 染谷勝巳
山内 宏, 久保武士 (筑波大産婦)

1982年から1994年の13年間に, 筑波大学附属病院産婦人科で子宮形成術を受けた子宮奇形患者のうち, 既婚で挙児希望のある63例を対象とした。

子宮奇形の種類は中角子宮46例, 双角子宮6例, 単角子宮7例, T型子宮, 弓状子宮各2例であった。これらのうち原発不妊で他に不妊原因のないもの(A群)が11例, 不妊原因のあるもの(B群)が14例, 妊娠既往があり, 他に不妊原因のないもの(C群)が19例, 他に不妊原因があるもの(D群)が19例であった。C群の術後妊娠率は89.5%であった。したがって, 子宮形成術後の妊娠率は約90%と考えることができる。一方, A群の術後妊娠率は90.8%とC群と同率だった。このことは形成術によって不妊因子が完全に取除かれたことを示している。

以上から, 子宮奇形は単独で不妊原因になり得ると考えられた。

特 別 講 演

『精巣上体における精子の成熟機構』

岡村直道(筑波大基礎医学系生化学)

関連学会のお知らせ

第38回 日本哺乳動物卵子学会

下記により第38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 会 期：1997年5月13日(火)・14日(水)
II 会 場：岩手県民会館中ホール 〒020 岩手県盛岡市内丸13-1 Tel. 019-624-1171

III 学術講演会内容：

- 特別講演 1. (講演者・テーマ未定)
2. 「ゲノム・インプリンティング」(仮題)
演者：河野友宏(東京農大総合研究所)
シンポジウム「岩手県におけるウシ胚移植の現状と課題」(仮題)
1) 岩手県下のETの実情と課題
2) ウシ胚移植技術利用例
3) 新しい技術の利用と応用例

IV 一般演題

講演申込み要領：講演の申込みは、下記宛にお問合せ下さい

申込締切日：1997年2月15日(必着)

〒252 藤沢市亀井野1866

日本大学生物資源科学部内 Tel. 0466-84-3646

日本哺乳動物卵子学会事務局 遠藤 克宛

(講演時間は1題7分、討論時間3分の予定です。スライドプロジェクターは各会場1台としスライドは10枚以内とします。)

V 参加申込方法：学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費 7,000円 懇親会参加費 7,000円

VI 連絡先：〒020 岩手県盛岡市上田3-18-8

岩手大学農学部応用生物学科内

第38回大会事務局

Tel. 019-621-6160(直)

第38回 日本哺乳動物卵子学会
大会長 安田 泰久

日本性機能学会第8回学術総会

日本性機能学会第8回学術総会を開催いたしますので、ご案内申し上げます。多数ご参加下さいますようお願い申し上げます。

I 会 期：1997年10月10日(金)・11日(土)

II 会 場：パシフィコ横浜 3階

〒220 横浜市西区みなとみらい1-1-1

Tel (045) 221-2121 Fax (045) 221-2136

III 学術総会特別プログラム：

招請講演；「Surgical treatment of transsexuals」

Prof. S.S. Ratnam (National University, Singapore)

特別講演；「仙髄副交感神経と勃起」

河谷 正仁教授(秋田大学医学部生理学第2)

会長講演；「IMP患者の心理特性(精神分析)ークラインフェルター症候群との比較」

甲斐 祥生教授(昭和大学藤が丘病院泌尿器科)

シンポジウム；1, 「インポテンス診断の現状」

2, 「漢方療法の適応と限界」

市民公開講座；「性機能障害をめぐって」

11日学術総会終了後、引き続き、午後4時より開催いたします。

IV 一般演題：演題募集要項は、3月中に会員の皆様に送らせていただきますが、会員でない先生方にも事務局までご連絡いただければ、必要書類をお送りいたします。

申込締め切り 1997年5月31日(土)

V 連絡先：〒227 横浜市青葉区藤が丘1-30

昭和大学藤が丘病院泌尿器科

第8回日本性機能学会学術総会事務局

池内隆夫, 小野寺恭忠

Tel (045) -974-6264, Fax (045) -971-5868

日本性機能学会第8回学術総会

会長 甲斐 祥生

(昭和大学藤が丘病院泌尿器科教授)

日本医学会だより

JAMS News

1996年10月 No.16

第106回日本医学会シンポジウム

1996年8月23日～25日、「情報化社会と医学」との課題の下に、パレスホテル箱根においてクローズド形式で開催された。

本シンポジウムは、玉置憲一、小泉 明、牛尾恭輔各氏がシンポジウム組織委員として、プログラムの編成、演者の選定、その他を準備してこられたものである。

プログラムは、Ⅰ. 医療と情報化(1)－国立がんセンターの現状と未来像－、Ⅱ. 医療と情報化(2)－地域医療と情報化－、Ⅲ. 医学教育と情報化、Ⅳ. 遺伝情報とプライバシー、の4セッションにより構成された。

遠隔医療の問題なども含め、情報ならびにその利用が医学・医療に大変役立っている反面、情報過多とも言われる昨今、いかに情報を生理・選択し、ますます専門分化されていく医学・医療にそれらをどのように採り入れていくかもまた大きな問題である。本シンポジウムでは、病院の情報システム、遠隔医療、地域医療、医学教育、遺伝情報などにおける情報関連の論議が広く行われ、意義ある成果が得られた。記録集は、平成9年3月頃に刊行の予定。希望者は当学会あて、官製葉書で3月末日までに申し込まれたい。(無料)。

第107回日本医学会シンポジウム

「細胞接着－基礎から臨床へ－」が、1996年11月29日(金、10:00～17:00)、日本医師会館大講堂で開催される予定である。

本シンポジウムの組織委員は、石川春律、月田承一郎、広橋説雄、玉置憲一の4氏で、目下諸準備が進行中、参加希望者は、日本医学会に葉書で申し込まれたい。参加費は無料。

プログラムならびに演者の概要は、下記のとおり。

Ⅰ. 細胞基質間接着

1. インテグリンを介した細胞基質間接着とそのシグナル伝達／佐邊壽孝(京大ウイルス研・生体応答学)

2. インテグリンを介した細胞基質間接着の調節機構／成宮 周(京大・薬理学)

3. 細胞外基質の破壊とがん転移／清水元治(金沢大がん研・ウイルス部)

Ⅱ. 細胞間接着－1

4. 細胞間接着の分子機構とシグナル伝達／月田承一郎(京大院・分子細胞情報学)

5. カドヘリンの異常とがん転移／広橋説雄(国立がんセンター研・病理部)

6. カドヘリンの自己免疫病としての皮膚疾患／天谷雅行(慶應大・皮膚科学)

Ⅲ. 細胞間接着－2

7. 細胞間接着に関連する分子とがん／今井浩三(札幌医科大・内科学)

8. セレクチンと炎症反応／宮坂昌之(阪大バイオ研・臓器制御)

9. 臓器移植と接着分子／磯部光章(信州大・内科学)

医学賞・医学研究助成費授賞の決定

医学賞ならびに医学研究助成費についての選考は、日本医師会から本会に委託されており、本年度は9月9日にそのための委員会が開催された。授賞・授与の式は、日本医師会設立記念医学大会(11月1日)の場において行われる。

日本医師会医学賞は、選考委員会として候補15件の中から下記の3氏を選び、日本医師会に推薦した(敬称略)。

・哺乳類中枢神経系の発生・分化の分子生物学的解析／御子柴克彦(東大医科研・分子生物学)

・パーキンソン病の発症機序と治療に関する総合的研究／水野美邦(順天堂大・内科学)

・後天性心疾患の外科治療の開発と確立／鈴木章夫(医歯大・胸部外科学)

また日本医師会医学研究助成費は、応募73件中、次の15氏を選考した。

・神経シナプス後部の神経特異的細胞骨格の研究／白尾智明(群馬大・行動分析学)

・視神経再生と視覚機能回復／福田 淳(大阪大・生理学)

・家族性アルツハイマー病の分子病態の解明と拮抗物質の研究／西本育夫(慶應大・薬理学)

・プリオン蛋白の機能とプリオン病の病態解明／宮本 勉(長崎大・ウイルス学)

- ・動脈硬化発症におけるスカベンジャー受容体ファミリー遺伝子の機能／兎玉龍彦(東大先端科学技術研究センター・分子生物学)
- ・移植心冠動脈硬化症の分子機序と遺伝子治療／磯部光章(信州大・内科学)
- ・インスリン依存型糖尿病(IDDM)における細胞傷害性T細胞の脾B細胞傷害機構の解明／伊藤直人(大阪大・内科学)
- ・利尿剤の開発へ向けたバゾプレシン水チャネルの構造と機能の解析／伏見清秀(医歯大・内科学)
- ・Helicobacter pylori感染による胃粘膜障害の発生機序—特に胃癌との関わりを中心に—／浅香正博(北大・内科学)
- ・固形癌局所に浸潤，集積しているT細胞の抗原レセプター機能の試験管内再構築／山本一彦(九大生体防御研・内科学)
- ・シェーグレン症候群の特異的制御へのアプローチ—自己反応性T細胞と自己抗原の解析／住田孝之(聖マリ医大・内科学)
- ・カンピロバクター腸炎後ギラン・バレ症候群の発症機序／結城伸泰(獨協医大・内科学)
- ・血管内皮保護を目的とした新しい肺保存液の開発／和田洋巳(京大胸部疾患研・外科学)
- ・肺癌におけるがん関連遺伝子の異常とその外科臨床腫瘍学への応用／光富徹哉(愛知県がんセンター・外科学)
- ・網膜色素上皮移植による網膜・脈絡膜萎縮症治療を目指して／玉井 信(東北大・眼科学)

新規加盟審査委員会

日本医学会では、従来の新規加盟審査の方式を見直すこととして、既報の第63回日本医学会定例評議員会(平成8年2月)承認の新規加盟学会審査制度検討委員会報告に基づき、今年度から新たな制度で加盟審査を行うこととした。

なお本年度に関しては応募を締め切ったが、新制度では、本会へ加盟を希望する学会の審査を毎年行うことになっている。

医学用語管理事業

本会の医学用語管理委員会から、文部省に、「医学用語標準化の調査研究報告書」を提出したことは既報のとおりである。これを今後の医学用語標準化進展のための更なる基盤としたいため、現在、各分科会の用語委員に関連用語の追加・訂正を依頼している。

いずれ、その結果が日本医学会医学用語辞典の改訂の際には、反映されてゆくであろうことを期待している。

編集委員会からのお知らせ

41巻1号(1月)から41巻4号(10月)に掲載された論文は、以下の先生方にご審査をお願いしました。(敬称略)

足	高	善	彦	麻	生	武	志	天	野	俊	康	荒	木	重	雄
荒	木	文	勤	石	川	博	通	石	島	芳	郎	石	田	智	肇
石	塚	正	平	石	丸	忠	之	岩	動	孝	一	市	川	俊	彦
井	上	次	人	岩	田	嘉	行	岩	本	晃	明	植	木	博	実
植	村	博	雄	上	山	正	護	内	海	恭	三	遠	藤	明	博
太	田	啓	孝	大	橋	高	和	岡	田	耕	市	奥	野	博	男
小	倉	史	司	小	田	友	久	風	間	泰	蔵	片	寄	治	之
加	藤	征	郎	河	野	直	宏	北	川	博	之	木	下	勝	海
木	下	裕	三	久	慈	惣	昭	楠	原	浩	二	久	保	春	宗
久	保	俊	郎	桑	原	英	隆	小	寺	重	行	小	林	善	次
斉	藤	真	一	斉	藤	博	和	佐	賀	正	彦	笹	川	五	夫
眞	田	俊	吾	佐	藤	秋	章	佐	藤	孝	道	澤	田	富	行
沢	村	良	勝	島	木	博	基	白	須	和	裕	菅	崎	徹	登
菅	原	七	郎	鈴	原	博	悦	多	賀	理	吉	高	田		鄰
高	橋	芳	幸	瀧	中	啓	史	竹	田	清	省	館	田		均
館	野	政	也	田	端	捷	幹	田	辺	廉	男	丹	田		裕
角	田	幸	雄	津	田	由	夫	友	成	皓	平	豊	口	和	美
中	村	幸	生	詠	田	洋	美	丹	羽	征	二	野	田		省
野	々	光	雄	野	福	島	一	花	田	儔	治	原	原		浩
平	山	寿	樹	福	正	橋	子	藤	井	講	子	藤	下		彦
布	施	秀	修	正	丸	田	夫	松	浦	一	平	松	尾	洸	幸
松	本	英	樹	丸	和	田	浩	三	浦	征	陽	見	宅	保	侃
水	沼	弘	治	毛	毛	利	滋	宮	川	浩	男	三	水	洸	彦
三	宅	亮	二	矢	矢	野	雄	矢	沢	峯	之	安	川	文	彦
安	本	英	機	吉	吉	村	典	横	山	介	介	吉			

ご協力ありがとうございました。
今後とも宜しくお願い申し上げます。

正 誤 表

新しい生殖医療技術のガイドライン(第1版)に下記の誤りがありました。訂正いたします。

「胚凍結保存」

75頁6行目から77頁7行目は78頁18行目の後につながり、
77頁8行目から78頁18行目は75頁5行目の後につながります。

新しい生殖医療技術の ガイドライン

1996年11月 第1版

日本不妊学会 編



November 1996. The 1st Edition

Japan Society of Fertility and Sterility

このガイドラインは、その一部を除くと現在本邦で新しく生殖医療技術ガイドラインとして実施されているもの、あるいは近い将来になされようとしているものなど生殖医療領域に占める先端技術と、その背景ならびにその具体的実施法に関して集大成したものである。

近年、顕微授精が急速に増加し、出生児数も増加してきている特徴があり、妊娠分娩率も徐々に上昇する傾向があり本邦の生殖技術の進歩といえよう。

したがって今後は本ガイドラインを一層活用することがのぞましく、これによってより一層良好な成績、結果が得られるものと思われる。

おもな内容

総論 歴史的展望 生殖医療技術のガイドライン 配偶者間人工授精(AIH)／非配偶者間人工授精(AID)／体外受精・胚移植(IVF-ET)／配偶子卵管内移植(GIFT)／受精卵卵管内移植(PROST, ZIFTなど)／ヒト精子凍結保存／胚凍結保存／顕微授精／男女生み分け／精子・卵・胚の研究(限界)／精子採取法／排卵誘発 現況と問題点 胚生検／卵および胚のdonation／代理母／減数(胎)手術 付 日本不妊学会会告・倫理委員会報告／日本産科婦人科学会会告／略語一覧

B5判 252頁 10図 定価6,500円(本体6,311円・税189円)

最寄りの書店または発行所にてお求め下さい。

発行所(金原出版株式会社 〒113 東京都文京区湯島2-31-14 ☎営業部: 03-3811-7184)

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。学術用語および諸単位は、それぞれの関連学会用語集に従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
11. 文献は次の形式により、引用順に末尾に一括記載する。著者、編者名は3名までとし、以下は他(et al.)とする。
 - a) 雑誌の場合
著者名(年次)題名。誌名 巻数:頁一頁 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巣刺激前ダナゾール投与の効果. 日不妊会誌 40: 104-109
 - b) 単行本の場合
著者名(年次)題名。書名。編者名、発行所、発行地、pp頁一頁 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), 1st ed, Infertility: Evaluation and Treatment. WB Saunders Co, Philadelphia, pp249-262
和文例) 三浦一陽(1994) 男性不妊症. アンドロロジーマニュアル. 白井將文編, 第1版, 新興医学出版, 東京, PP 152-166
12. 投稿論文の著作権は、掲載が決定した時点で日本不妊学会に譲渡される。投稿原稿、図表、写真は返却しない。
13. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
14. 著者校正は原則として初校のみとする。なお、校正は字句の訂正にとどめる。校正の責任は全面的に著者に帰す。
15. 特別掲載を希望する論文は、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合は掲載に要する実費を全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
16. 掲載論文に対しては、別冊30部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿表紙に別刷総部数を朱記する。なお、30部を越す分について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
クロスサイト麹町ビル8階
社団法人 日本不妊学会
Tel, Fax: 03-3288-7266

日本不妊学会雑誌 投稿申込み票

(この用紙をコピーしてご利用下さい)

タイトル：

和文or英文タイトル：

掲載希望： [特別掲載：普通掲載]

種別： [原著：総説：論説：臨床報告：その他]

著者名：(6名以上の場合は、別紙に同様の様式でご記入下さい)

フリガナ 氏名	会員番号 [所属機関名]	フリガナ 氏名	会員番号 [所属機関名]
	No. []		No. []
演者	No. []	2.	No. []
	No. []		No. []
3.	No. []	4.	No. []
	No. []		No. []
5.	No. []	6.	No. []

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

平 川 舜 (委員長)

味 香 勝 也	石 塚 文 平	岩 本 晃 明
遠 藤 克	押 尾 茂	佐 藤 英 明
白 井 將 文	末 岡 浩	百 目 鬼 郁 夫
三 浦 一 陽	三 橋 直 樹	

EDITORIAL BOARD

Shun HIRAKAWA (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Bunpei ISHIZUKA	Teruaki IWAMOTO
Tsuyoshi ENDO	Shigeru OSHIO	Eimei SATO
Masafumi SHIRAI	Kou SUEOKA	Ikuo DOUMEKI
Kazukiyo MIURA	Naoki MITSUHASHI	

日本不妊学会雑誌 42巻1号

1997年1月10日 印刷

1997年1月20日 発行

編集兼発行者 平 川 舜

印刷者 内 藤 錦 樹

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