

ISSN 0029-0629 CODEN: NFGZAD

Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌

Vol. 43 No. 2

第43卷 第2号

April 1998

平成10年4月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. / 日不妊会誌

編集委員会よりお知らせ

日本不妊学会雑誌43巻2号(平成10年4月1日発行)より投稿原稿の送付先を、日本不妊学会事務局から当分の間、編集委員長(東邦大学医学部第1産科婦人科学教室)宛に送付くださいますようお願い致します。なお、原稿を受領しましたら直ちに受領証を送付しますので、2週間以内に未着の場合はご連絡ください。万が一事務局に送付された原稿は編集委員長に転送されます。

論文の掲載については改めて編集委員会よりご通知致します。

原稿送付先：〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1
東邦大学医学部第1産科婦人科学教室内
日本不妊学会編集委員会
平川 舜
Tel 03-3762-4151(代) 内線3585(伊藤)
Fax 03-3765-7671

会 告

本学会では、生殖医療技術に関する学術的、倫理的、社会的に留意すべき事項について、これまですでに理事会報告、倫理委員会報告などを会員に公示してきました。ここに改めて、これ迄に公表してきた見解ならびに報告をまとめて掲載し、会員各位の注意を喚起し、これらの公示内容を遵守されることを求めます。

平成10年3月24日

社団法人日本不妊学会
理事長 森 崇 英

(付1) 日本不妊学会理事会・倫理委員会の見解および報告

顕微授精法の臨床応用に関する見解

「顕微授精法 (microinsemination)」(以下本法と称する)は、極めて高度な技術を要する不妊症の治療行為であり、わが国における倫理・法律・社会的な基盤を考慮し、本法の有効性と安全性を十分に評価した上で慎重に実施されなくてはならない。

1. 本法は、難治性の受精障害で、これ以外の医療技術によっては夫婦間における妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断されるものを対象とする。
2. 実施者は生殖医学に関する高度の知識・技術を習得した医師であり、また実施協力者は本法の技術に十分習熟したものでなければならない。
3. 本法を実施する医療機関は、すでに体外受精・胚移植 (I V F ・ E T) などによる妊娠・分娩の成功例を有するなど、一定の技術水準以上の機関であることを必要とする。
4. 被実施者に対しては、現在まで本法によって出生した児の染色体異常などの報告はないが、未だ確立された技術とはいえないので、本法の内容と予想される成績について十分に説明し、了解を得る。

社団法人 日本不妊学会理事会
平成2年11月15日

倫理委員会報告

『代理母』の問題についての理事会見解

代理母（ホストマザー・サロゲイトマザー）については本学会倫理委員会で検討し、さらに不妊患者および本会役員、評議員に対しアンケート調査を行った。

本法以外には解決できない不妊症患者に対し、現在の医学的技法をもって対処することは可能であるが、なお本法の実施に関しては、

- 1) 医学的適応と社会的、倫理的妥当性との間に認識の差がある。
- 2) 本法は婚姻関係以外の受精・妊娠・出産であるため、ホストマザー等の受精・妊娠・出産に際しての医学的リスクや、社会的、心理的問題点に関しての議論をつくす必要がある。
- 3) 法的解決にも様々な意見がある。
- 4) 本法の実施に際し、第三者による金銭の授受が介在する可能性がある。

従って、この問題には社会的、倫理的、法律的要素が大きく、本委員会においてはその実施について明確な結論を得るに至らなかった。現時点においては本学会を含めて各関連学会にこの問題を提言した上、討議を依頼し、広く社会のコンセンサスを得る必要がある。

アンケート結果

サロゲイトマザーに関しては反対意見が約70%であったが、ホストマザーに関しては約45%が賛意を示した。（アンケート調査結果 39 巻 1 号に掲載）

平成 4 年 11 月 5 日

社団法人日本不妊学会

理 事 長 飯塚 理八

倫理委員会委員長 高木 繁夫

倫理委員会報告

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

「ヒト円形精子細胞を用いた授精法について」

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

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

平成 7 年 10 月 26 日

社団法人日本不妊学会倫理委員会

委員長 廣井 正彦

日本不妊学会倫理委員会報告

最近、生殖医療に非医療従事者が精子提供を含め、営利目的で関与していることが報道されている。

これらの事態は、倫理的・社会的にも憂慮すべきことであり、本委員会では生殖医療関係者である本学会会員はこれに関与すべきでないという結論に達した。

平成8年5月28日

社団法人日本不妊学会倫理委員会

委員長 廣井 正彦

倫理委員会報告

社団法人日本不妊学会倫理委員会は、その下にワーキンググループを組織し、「ヒト円形精子細胞を培養する授精法」についての検討を託したところ、下記のような答申を得ましたので、報告致します。

「ヒト円形精子細胞を培養する授精法について」

現時点において、動物実験で円形精子細胞から鞭毛をもつ精子細胞にまで培養した例はあるものの、完成した精子にまで至った報告はなされていない。またこの過程には、数多くの遺伝子が関与することが知られてきている。円形精子細胞を出発点とする以上、それを培養したものを卵子へ注入する場合にも、「ヒト円形精子細胞を用いた授精法について」の倫理委員会報告（平成7年10月26日）に指摘されている問題点はそのまま残る。また新たに長時間培養することによる異常発生などの危険の可能性も考えられる。

このような現況に鑑み、上記の授精法の臨床応用については、さらに複数の研究機関で動物実験を含む基礎的研究を重ねた上で、その結果を再検討し、改めて臨床応用の適否を判定する必要があると考える。

以 上

平成9年10月17日

社団法人日本不妊学会

理事長 森 崇 英

理事会報告

日本不妊学会理事会は、日本産科婦人科学会の「非配偶者間人工授精と精子提供に関する見解」について検討致しました。結果として、その主旨と内容に賛同致します。

平成9年2月14日

社団法人日本不妊学会

理事長 森 崇 英

(注：詳細は日本不妊学会雑誌42巻4号をご参照下さい)

第43回日本不妊学会総会および学術講演会 (第3回予告)

第43回日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領で開催いたします。多数の方々をご参加下さいますようお願い申し上げます。

記

- I 期 日：平成10年11月11日(水) 理事会，幹事会
12日(木) 学術講演会，評議員会，総会，総懇親会
13日(金) 学術講演会，新理事会

- II 会 場：鹿児島市民文化ホール
〒890-0062 鹿児島市与次郎2-3-1 (TEL：099-257-8111)
鹿児島サンロイヤルホテル
〒890-0062 鹿児島市与次郎1-8-10 (TEL：099-253-2020)

III 学術講演会予告：

招請講演

- 1) Preimplantation genetic diagnosis, present and future
演者：Dr. Yury Verlinsky (Reproductive Genetic Institute, Illinois Masonic Medical Center, Chicago, U.S.A.)
- 2) The Assisted Reproductive Technology in Korea
演者：Prof. Chan-Ho Song (Department of Obstetrics and Gynecology, Yonsei University, Seoul, Korea)

特別講演

- 21世紀への提言—環境ホルモンと生殖
演者：井口泰泉(横浜市立大学理学部教授)

理事長講演

- 着床率の向上を目指して
演者：森 崇英(京都大学名誉教授)

会長講演

- 生殖医療と倫理
演者：永田行博(鹿児島大学医学部産科婦人科教授)

教育講演

- 1) クローン動物研究の現況
演者：角田幸雄(近畿大学農学部畜産学科教授)
- 2) 精巢内分子シャペロンと不妊
演者：大迫誠一郎(国立環境研究所環境健康部研究員)
- 3) メラトニンと排卵機構
演者：相良祐輔(高知医科大学産科婦人科教授)
- 4) レプチンと生殖生理
演者：佐川典正(京都大学医学部産科婦人科助教授)
- 5) 体脂肪分布異常と性機能異常の関連性
演者：堂地 勉(鹿児島大学医学部産科婦人科助教授)

6) 卵・卵胞の発育と細胞外基質

演者：齊藤英和（山形大学医学部産科婦人科助教授）

7) ART 受精卵における染色体異常の遺伝的荷重について

演者：久保春海（東邦大学医学部第1産科婦人科教授）

8) 精子形成関連遺伝子をめぐって—AZFを中心に—

演者：並木幹夫（金沢大学医学部泌尿器科教授）

9) 精漿中の精子運動抑制因子の生理的役割について

演者：岩本晃明（聖マリアンナ医科大泌尿器科教授）

シンポジウム

1. 着床不全の病態解明へのアプローチ —基礎から臨床へ—

座長：吉村泰典（慶應義塾大学医学部産科婦人科教授）

寺川直樹（鳥取大学医学部産科婦人科教授）

シンポジスト：

1) 着床成立時の胚，子宮内膜相互作用に関連する物質の分子生物学的解析

樋口壽宏（京都大学医学部産科婦人科助手）

2) 着床における子宮内膜細胞膜硫酸化脂質の役割

百枝幹雄（東京大学医学部産科婦人科助手）

3) トロホプラストの機能的分化

山本敏也（大阪大学医学部産科婦人科助手）

4) 胚着床過程における細胞増殖因子の役割

原田 省（鳥取大学医学部産科婦人科講師）

5) 着床における $\alpha v \beta_3$ インテグリンの役割

宮崎豊彦（慶應義塾大学医学部産科婦人科講師）

2. 精子妊孕能の情報と評価

座長：伊藤晴夫（千葉大学医学部泌尿器科教授）

シンポジスト：

1) ヒト造精機能障害とテロメレーズ活性

藤沢正人（神戸大学医学部泌尿器科助手）

2) 補体制御因子（CD46）の精子卵結合における役割

北村雅哉（大阪大学医学部泌尿器科助手）

3) 内分泌所見よりみた精子形成能の評価と限界

伊藤直樹（札幌医科大泌尿器科講師）

4) 各種精子機能検査と妊孕能

太田昌一郎（富山医科薬科大学医学部泌尿器科助手）

5) 精子運動能と妊孕能

市川智彦（千葉大学医学部泌尿器科講師）

6) 自然妊娠の限界

原 啓（東邦大学医学部泌尿器科第1講座講師）

ワークショップ

1. OHSSの病態とその対応

座長：青野敏博（徳島大学医学部産科婦人科教授）

1) OHSSの疫学とリスク因子の解析

安藤一道（群馬大学医学部周産母子センター講師）

2) OHSSの発生と重症化のメカニズム

田原隆三（昭和大学医学部産科婦人科講師）

3) 排卵誘発に伴うOHSSの治療

田中信幸（熊本大学医学部産科婦人科講師）

4) ARTにおけるOHSSへの対応

深谷孝夫 (東北大学医学部附属病院周産母子センター部助教授)

5) OHSSの予防は可能か

松崎利也 (徳島大学医学部産科婦人科助手)

2. 閉塞性無精子症の外科的対応

座長: 奥山明彦 (大阪大学医学部泌尿器科教授)

1) 閉塞性無精子症の診断

永尾光一 (東邦大学医学部泌尿器科第1講座講師)

2) 射精管閉塞に対する経尿道的処置

岩崎 皓 (横浜赤十字病院泌尿器科部長)

3) 精管精管吻合術

奥野 博 (京都大学医学部泌尿器科助手)

4) 精管精巢上体吻合術

奈路田拓史 (徳島大学医学部泌尿器科助手)

5) MESA

近藤宣幸 (健保大阪中央病院泌尿器科)

6) TESE

岡田 弘 (神戸大学医学部泌尿器科講師)

IV 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、1998年度会費(8,000円)を納入のうえ、会員になってください。

演題申込み要領

1. 抄録を所定の抄録用紙にタイプまたはワープロで打ち、書留郵便にて下記へお送りください。
〒890-8520 鹿児島市桜ヶ丘8-35-1
鹿児島大学医学部産科婦人科学教室内
第43回日本不妊学会事務局
TEL: 099-275-5423 FAX: 099-265-0507
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発表として応募ください。
5. 別紙演題申込書、受領書、採用通知書に所定の事項を記入して切手を貼り、抄録用紙(原本)および抄録用紙のコピー4部と共にお送りください。
6. 申込み締切日: 1998年(平成10年)5月30日(土)(必着)

演題発表形式

口演発表のみといたします。

なお、演題の採否、分類の決定は会長にご一任下さい。

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 10,000円
懇親会費 6,000円

総懇親会は学術講演会初日の11月12日(木)に鹿児島サンロイヤルホテルで行います。是非ご出席下さい。

1998年(平成10年)4月

第43回日本不妊学会

会長 永田行博

第43回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・航空のご案内

史と景の街、鹿児島市で第43回日本不妊学会総会が開催されますことを心よりお慶び申し上げます。学会期間中の宿泊・航空・観光のご案内をJTB鹿児島支店で取扱いさせていただきますことになりました。

つきましては、ご案内の内容をご検討のうえ、早目にお申し込みを賜りますようご案内申し上げます(鹿児島市内のホテルは相当の混雑が予想されます)。

記

1. 宿泊ご案内期間 平成10年11月11日(水)～11月13日(金)
2. 申し込み方法
 - (1) 所定の申込書にてFAXまたは郵送にてお申し込み下さい。
 - (2) 必ず第2希望のホテルランクのご記入をお願いします。
3. 申し込み締切 (平成10年10月5日)
4. 予約の回答
正式な回答につきましては、10月中旬(予定)に関係書類・請求書・郵便振替用紙をお送りいたします。
5. 清算(お支払)
予約の回答時に同封しております、振込振替用紙にて10月30日(金)までにお支払い下さい。
6. 取消
お申し込み後、ご都合で予約を取消される場合は、お1人様につき下記の取消料を申し受けます。
なお、変更・取消の連絡は、郵送またはFAXにてお願いいたします。

取消料	30日前～15日前	14日前～7日前	6日前～4日前	3日前～2日前	前日	当日以降
宿泊	無料	10%	20%	20%	50%	100%
東京便	無料	3,000円	3,000円	6,000円	6,000円	6,000円
名古屋便	無料	3,000円	3,000円	6,000円	6,000円	6,000円
大阪便	無料	2,000円	2,000円	4,000円	4,000円	4,000円

7. 申込先・お問合せ
〒892-0842 鹿児島市東千石町2-12 Kフラットビル2F
JTB鹿児島支店「日本不妊学会」係
TEL：099-227-5205・226-9467
FAX：099-239-6090・224-4456
担当：塚本・飯塚・前村
営業時間：月～金 9：30～18：00
土 9：30～13：00

◎宿泊のご案内(鹿児島市内)

申込記号	客室タイプ	料金(1人当り)	宿泊ホテル名
A-1	シングル	12,000円～13,000円	城山観光ホテル
A-2	ツイン	9,000円～11,000円	サンロイヤルホテル
A-3	ツイン (シングルユース)	16,000円～18,000円	東急ホテル
B-1	シングル	10,000円	鹿児島林田ホテル 鹿児島ワシントンホテルプラザ
B-2	ツイン	8,500円	鹿児島東急イン チサンホテル鹿児島
B-3	ツイン (シングルユース)	15,000円	レクストンイン鹿児島 アーバンポートホテル
C-1	シングル	7,000円～9,000円	ステーションホテル・タイセイアネックス ホテルタイセイ
C-2	ツイン	6,000円～8,000円	第一ホテル鴨池・第一ホテル西駅 パルセスイン鹿児島・法華クラブ など
C-3	ツイン (シングルユース)	10,000円～12,000円	

※料金は、1泊朝食付、税・サービス料込の料金です。

※シングルには、部屋数に制限がございますので、申込み受付順と致しますのでご了承下さい。

◎航空のご案内

*往 路

記号	搭乗日	区 間	出発時間帯	特別料金
A	11/11・12	東 京→鹿児島	8:00～9:00	18,000円
B	11/11	東 京→鹿児島	14:00～15:00	18,000円
C	11/11	東 京→鹿児島	17:00～18:00	18,000円
D	11/11・12	名古屋→鹿児島	7:30～8:30	16,000円
E	11/11	名古屋→鹿児島	14:00～15:00	16,000円
F	11/11・12	大 阪→鹿児島	9:00～10:00	12,000円
G	11/11	大 阪→鹿児島	15:00～16:00	12,000円
H	11/11	大 阪→鹿児島	17:00～18:00	12,000円

*復 路

記号	搭乗日	区 間	出発時間帯	特別料金
イ	11/14	鹿児島→東 京	11:00～12:00	18,000円
ロ	11/13・14	鹿児島→東 京	18:00～19:30	18,000円
ハ	11/14	鹿児島→名古屋	9:00～10:00	16,000円
ニ	11/13・14	鹿児島→名古屋	18:00～19:00	16,000円
ホ	11/14	鹿児島→大 阪	11:00～12:00	12,000円
ヘ	11/13・14	鹿児島→大 阪	17:00～18:00	12,000円

*特別料金は、15名以上の団体割引を適用いたしております。

*お申込みは、1名様から受付いたしておりますので、記号と搭乗日をご記入下さい。

*各便集約後、10名未満の場合は普通料金となります。

*便の指定につきましては、こちらで決定させていただきます。

*鹿児島空港～鹿児島市内間は、シャトルバス(10分毎・所要50分)が運行いたしております(料金:1,200円)。

*大阪便は伊丹空港発着となります。

第 43 回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・航空 申込書

(コピーしてご利用下さい。)

お申込先：JTB 鹿児島支店 (担当：塚本・飯塚・前村)

TEL：(099)227-5205・(099)226-9467 FAX：(099)224-4456

お申込締切日：平成10年10月5日(月)

申 込 み 代 表 者		フリガナ						勤務先名			
								TEL			
								FAX			
関係書類 送付先		〒									
フリガナ 氏 名		年 齢	性 別	宿泊日				航空		宿泊第2 希 望	備 考
				11/11	11/12	11/13	11/14	往路	復路		
例	カゴシマヤスオ 鹿 児 島 安 雄	45	男	A-1	A-1	A-1	A-1	11/11 B	11/14 口	A-3	
1											
2											
3											
4											
5											
										受付日	回答日

*人数が5名様を超える場合は、この申込書を複数コピーしてご利用下さい。

*航空の申込みは、搭乗日と出発時間帯の記号を必ずご記入下さい。

会 告

平成10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42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10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10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10年4月30日(木)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)

〒102-0083 東京都千代田区麹町5-4 クロスサイド麹町ビル8階
(社)日本不妊学会事務局
TEL 03-3288-7266(ファクシミリ兼用)

日本不妊学会学術奨励賞推薦書

日本不妊学会理事長 殿

下記の論文を日本不妊学会学術奨励賞に推薦いたします。

(論文名)

日本不妊学会雑誌 第42巻 号 _____ ~ _____ 頁(平成9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43巻 第2号

平成10年4月1日

—目次—

原 著

- PCNA法を用いた左精索静脈瘤患者における精細胞DNA合成の定量的解析
..... 中根比呂志・石津和彦・白石晃司
内藤克輔・井本勝彦・瀧原博史 75
- ヒト卵胞液中に見いだされたトリプシン様酵素インヒビター(HFF-TI): アルギニン
アミダーゼ活性, プラスミノーゲンおよびエストリオールとの相互作用 (英文)
..... 山口武仁・片山昌勅・中根理恵子・松田兆史
原 唯純・佐藤博久・李 賢銚 81
- 卵細胞質内精子注入前精子不動化操作による胚発生率・妊娠率の向上
..... 小山伸夫・長谷川昭子・繁田 実・香山浩二 87
- バイオプシガンによる経皮的精巣針生検の経験 —その手技と有用性について— (英文)
..... 天野俊康・新倉 晋・加藤浩章 93
- 遅延性排卵とTRH負荷テストによる潜在性高プロラクチン血症との関連性
..... 康 文豪・三橋玉枝 97
- 精子膨化試験 (Hypoosmotic Swelling Test: HOST) と精液所見との関係
および凍結・融解精子への応用に関する検討
..... 高野陽子・佐藤真紀・広津留恵子・長木美幸
牛島千秋・安東桂三・宇都宮隆史 103
- プロゲステロン投与家兎における抗プロゲステロン製剤, RU486を用いた
分娩時刻調節の試み (英文)
..... 遠藤 克・金山喜一 109
- Fluorescence in Situ Hybridizationによるヒト精子の攪拌連続密度勾配処理法の検討
..... 浅田弘法・末岡 浩・橋場剛士
黒島正子・土屋慎一・吉村泰典 113
- 出生前診断における医療実施者の意識と着床前診断の意義
..... 松田紀子・末岡 浩・土屋慎一
篠原雅美・小林紀子・吉村泰典 119
- ニホンザル精子の凍結保存法 (英文)
..... 鳥居隆三・細井美彦・入谷 明
増田善行・和 秀雄 125
- LHとhCGの排卵誘発能および黄体形成能の比較検討 (英文)
..... 劉 麗・山辺晋吾・丸尾 猛・西村隆一郎 133
- 地方部会講演抄録 141

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 43, No. 2, 1998)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in Varicocele Using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen
..... *H. Nakane, K. Ishizu, K. Shiraishi*
K. Naito, K. Imoto & H. Takihara 75
- Trypsin Like Proteinase Inhibitor in Human Follicular Fluid (HFF-TI) : Relationship Among HFF-TI, Arginine Amidase, Plasminogen and Estriol
..... *T. Yamaguchi, M. Katayama, R. Nakane, Y. Matsuda*
I. Hara, H. Sato & H. Lee 81
- Improvement of the Embryo Cleavage and Pregnancy Rate by Mechanical Immobilization of Spermatozoa before Intracytoplasmic Sperm Injection
..... *N. Koyama, A. Hasegawa, M. Shigeta & K. Koyama* 87
- Percutaneous Testicular Needle Biopsies Using a Spring-Driven Biopsy Gun: Technique and Usefulness
..... *T. Amano, S. Niikura & H. Kato* 93
- Correlation between Delayed Ovulation and Occult Hyperprolactinemia by TRH Loading Test
..... *B. Koh & T. Mitsuhashi* 97
- The Correlation between the Results of HOST(Hypoosmotic Swelling Test)and Routine Semen Analysis and the Study of Frozen-Thawed Sperm
..... *Y. Takano, M. Sato, K. Hirotsuru, M. Nagaki*
C. Ushijima, K. Ando & T. Utsunomiya 103
- A Trial for Control of Birth Timing by RU486, an Antiprogestosterone Compound in Progesterone-Treated Rabbits.
..... *T. Endo & K. Kanayama* 109
- Effects of a Continuous Percoll Gradient Procedure for Sperm Separation
..... *H. Asada, K. Sueoka, T. Hashiba*
M. Kuroshima, S. Tsuchiya & Y. Yoshimura 113
- The Significance of Preimplantation Diagnosis and Awareness of Medical Workers towards Prenatal Diagnosis
..... *N. Matsuda, K. Sueoka, S. Tsuchiya*
M. Shinohara, N. Kobayashi & Y. Yoshimura 119
- Establishment of Routine Cryopreservation of Spermatozoa in the Japanese Monkey (*Macaca fuscata*)
..... *R. Torii, Y. Hosoi, A. Iritani*
Y. Masuda & H. Nigi 125
- Comparison of the Efficacy of Luteinizing Hormone (LH) and Human Chorionic Gonadotropin (hCG) for Ovulation Induction and Corpus Luteum Formation in Gonadotropin-Primed Immature Rats.
..... *L. Liu, S. Yamabe, T. Maruo & R. Nishimura* 133

PCNA法を用いた左精索静脈瘤患者における 精細胞DNA合成の定量的解析

Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in Varicocele Using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen

山口大学医学部泌尿器科学教室

中根比呂志 石津和彦
Hiroshi NAKANE Kazuhiko ISHIZU,
白石晃司 内藤克輔
Koji SHIRAIISHI Katusuke NAITO

Department of Urology
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755-8505, Japan

小郡第一総合病院泌尿器科

井本勝彦
Katsuhiko IMOTO
Ogori Daiichi General Hospital, Ogori 754-0002, Japan

小野田市立病院泌尿器科

瀧原博史
Hiroshi TAKIHARA
Onoda City Hospital, Onoda 756-0094, Japan

精索静脈瘤患者における精細胞の細胞動態を検討する目的で proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織化学染色を用いて精細胞のDNA合成を定量的に解析した。

対象は左精索静脈瘤患者36例で内訳はgrade Iが15例, grade IIが13例, grade IIIが8例であった。PCNAの陽性率は精細管基底膜に接する全精細胞のうちPCNA陽性精細胞の占める割合を Labeling Index (以下L.I.) として算定した。L.I.はいずれのgradeにおいても左精巣が右精巣に比べて有意に低値であった。また、左精巣のL.I.はgrade III群においてgrade I群およびgrade II群よりも有意に低値であった。さらに、右精巣のL.I.もgrade III群においてgrade I群よりも有意に低下していた。

以上より、左精索静脈瘤患者では患側の精細胞のDNA合成がより低下し、その程度は静脈瘤が高度になるほど強くなること、また、高度の静脈瘤では対側の精細胞のDNA合成障害をもひき起こすことが示唆された。

キーワード：精索静脈瘤, PCNA, 精細胞DNA合成

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 75 - 80, 1998)

緒 言

精索静脈瘤が造精機能を障害し、男子不妊症の原因の一つであることは以前より知られている。その造精機能障害の発生機序については未だに十分には解明されていないが、血液のうっ滞および逆流による精巣温度の上昇によるとする説^{1,2)}が有力視されている。また、近年のDNA合成に関する研究の進歩に伴い、高温環境下では精細胞のDNA合成が低下することが報告されている^{3,4)}。従って、精巣温度の上昇による精細胞のDNA合成障害が精索静脈瘤患者における造精機能障害の一因を担っていると考えられる。一方、片側性の精索静脈瘤が左右精巣の造精機能をどの程度障害するのか、あるいは、静脈瘤の程度によって造精機能障害に差があるのかという点についても一定の見解は得られていない。当科では精巣容量、Johnsen's mean score count (JSC) および flowcytometryによる精巣内DNA量分布の解析から精索静脈瘤患者では患側により強い造精機能障害があり、加えて、静脈瘤の程度が高度となるほど造精機能障害も強くなることを示唆してきた⁵⁻⁸⁾。そのため、精細胞のDNA合成障害が造精機能障害の一因と仮定するならば静脈瘤の程度によって精細胞のDNA合成に差があると推定される。そこで今回我々は左精索静脈瘤患者精巣において、DNA合成を反映する proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の発現率を測定することにより、精索静脈瘤が左右精巣の精細胞DNA合成に与える影響および精索静脈瘤の程度による精細胞DNA合成の差について検討した。

対象および方法

1992年7月から1996年8月までに男子不妊症を主訴として山口大学医学部泌尿器科を受診し、精巣生検を施行された左精索静脈瘤患者36例を対象とした。染色体異常症例、血中FSH高値症例(13.0mIU/l以上)および右精索静脈瘤が認められる症例は対象から除外した。年齢は24歳から42歳で、平均33.0歳であった。精索静脈瘤を理学的所見によりgrade分類⁸⁾すると、grade Iが15例、grade IIが13例、grade IIIが8例であった。手術は全例、顕微鏡下内精索静脈低位結紮術を施行した。患者の同意のもと、手術時に両側精巣生検を行い、得られた精巣組織をBouin液で1時間固定後、厚さ5μmのパラフィン切片を作製した。免疫組織化学染色は当科より報告した方法⁹⁾に準じ、抗PCNAモノクローナル抗体(PC-10, DAKO社)を使用し、avidin-biotin peroxidase

complex法を用いて行った。免疫組織化学染色と同時にPAS-hematoxylin染色を施行した。PCNAの陽性率は当科より報告したPCNAのLabeling Index⁹⁾(以下L.I.)、すなわち、精細管基底膜に接する全精細胞のうちPCNA陽性精細胞の占める割合として算出し、同時にJohnsen's mean score count(以下JSC)も測定した。L.I.およびJSCについて精索静脈瘤のgrade別に平均値を算出し左右精巣間における差異、および同側精巣での各grade間における差異について比較検討した。

測定値はすべて平均値±標準偏差で示した。統計学的検討は、左右精巣間における差異についてはWilcoxon検定を、各grade間における差異についてはMann-WhitneyのU検定を用い、 $p<0.05$ で有意差ありと判定した。

結 果

1) L.I.

精祖細胞および精母細胞の一部にPCNA陽性細胞が認められた。Sertoli細胞、精子細胞および精子にはPCNA陽性細胞は全く認められなかった(図1)。L.I.は全体として左精巣では $29.4 \pm 2.8\%$ 、右精巣では $32.6 \pm 3.0\%$ であり、左精巣では右精巣よりも有意に低値を示した($p<0.01$)。grade別のL.I.は左精巣においてgrade I群が $30.9 \pm 1.8\%$ 、grade II群が $29.5 \pm 3.0\%$ 、grade III群が $26.4 \pm 1.8\%$ であり、右精巣においてはgrade I群が $34.1 \pm 2.6\%$ 、grade II群が $32.2 \pm 3.1\%$ 、grade III群が $30.5 \pm 2.0\%$ であった。すべてのgradeにおいて左精巣のL.I.は右精巣のL.I.に比べ有意に低値を示した(grade IおよびII群： $p<0.01$ 、grade III群： $p<0.05$) (図2)。また、同側の各grade間でL.I.を比較したところ、左精巣ではgrade III群はgrade I群($p<0.01$)およびgrade II群($p<0.05$)よりも有意に低値であった。右精巣においてもgrade III群はgrade I群よりも有意に低値であった($p<0.01$) (図2)。

2) JSC

全体として左精巣では 7.4 ± 1.0 、右精巣では 7.5 ± 1.1 であり、両群間に有意差は認められなかった。grade別のJSCは左精巣においてgrade I群が 7.7 ± 1.0 、grade II群が 7.5 ± 0.8 、grade III群が 6.8 ± 1.4 であり、右精巣においてはgrade I群が 7.6 ± 1.0 、grade II群が 7.6 ± 0.9 、grade III群が 7.0 ± 1.5 であった。両側ともgradeが高い群ほどJSCは低値であったが統計学的には有意差は認められなかった(図3)。なお、L.I.とJSCの間には一定の相関は認めら

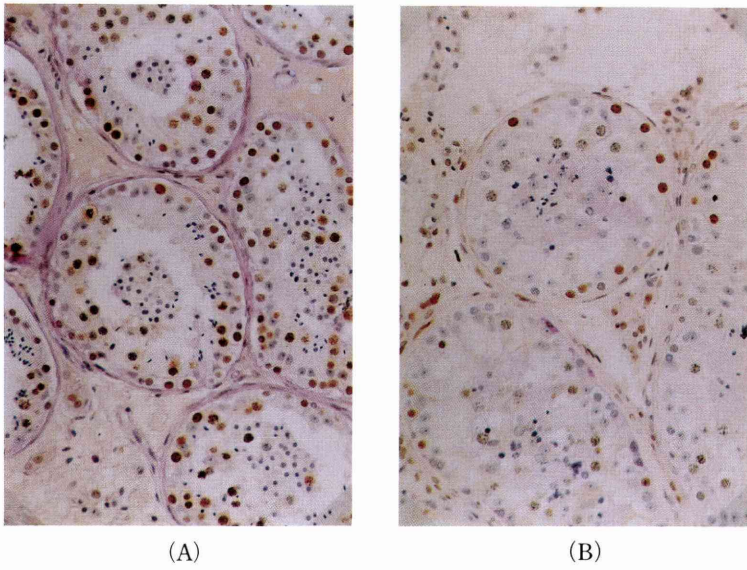


図1 左精索静脈瘤患者左精巣のPCNA免疫組織化学染色像 (100倍)。PCNA陽性細胞の核は茶褐色に染色されている。
 (A) grade I 症例。L.I. 35.0, JSC8.5 (B) grade III 症例。L.I. 26.3, JSC7.7

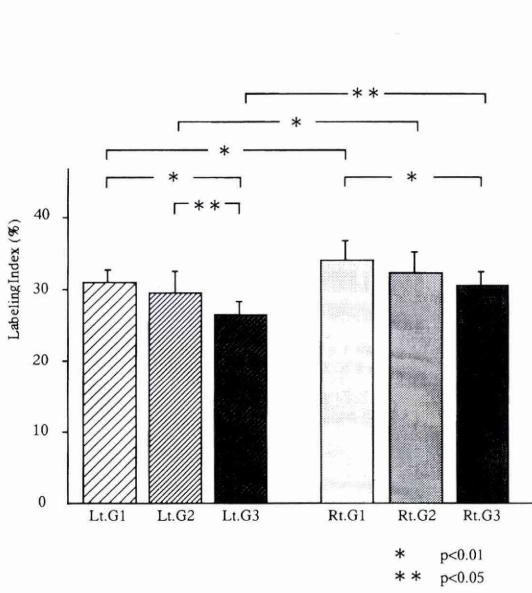


図2 左右精巣における grade 別 Labeling Index

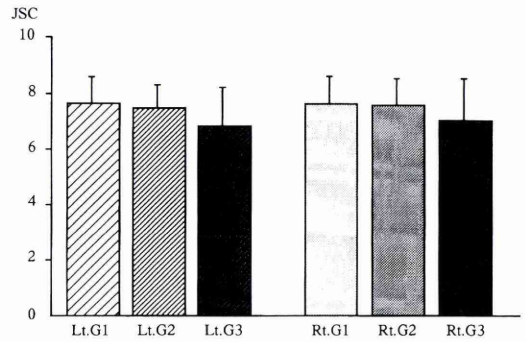


図3 左右精巣における grade 別 JSC

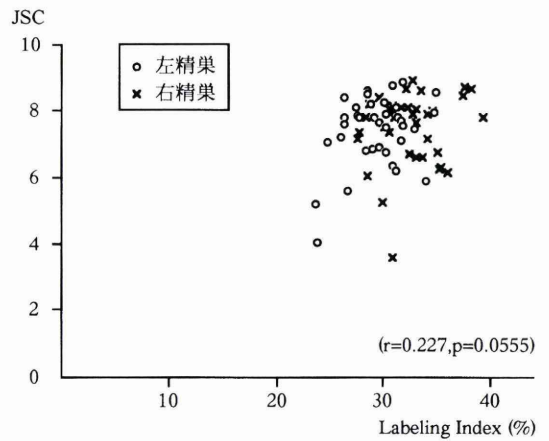


図4 Labeling Index と JSC の関係

れなかった (図4)。

考 察

ヒトの精子形成過程においては精祖細胞が増殖して精母細胞に分化する段階で、盛んにDNA合成が行われており、精細胞のDNA合成は精子形成に必要不可欠な一過程である。そのため、精子形成過程の障害の解明に精細胞のDNA合成能の解析は有用であると考えられており、従来から精細胞のDNA合成能の解析には³H-thymidine autoradiography法¹⁰⁾、DNA合成関連酵素の測定³⁾、bromodeoxyuridine (BrdU)¹¹⁾ およびPCNAの免疫組織化学染色^{9, 12)}などが行われている。前二者の方法ではいずれも新鮮材料が必要であり、BrdUは生体への前投与を必要とするためPCNA以外の方法はretrospectiveな研究には応用できなかった。一方、PCNAはDNA複製に関与するDNA polymerase- δ の補助蛋白質でG1後期からS期にかけて合成され核内に蓄積される内因性物質であり、パラフィン切片で検出可能である¹³⁾。当教室では既にラット精細胞でBrdUとPCNAの免疫組織化学染色との比較を行った結果、両者がよく相関し、PCNAの免疫組織化学染色が精細胞のDNA合成能の評価に有用であることを報告した¹⁴⁾。そこで今回我々は左精索静脈瘤患者における精細胞のDNA合成能の指標としてPCNAを利用した。

ヒト精巣においてはPCNA陽性率の測定法は異なる方法がいくつか提唱されているが、現在まではどの測定法が最も有用であるか未だ確立されていない。南部ら¹⁵⁾はすべてのPCNA陽性の精細胞数を同じ精細管内のSertoli細胞数で除した値でPCNA陽性率を算定しているが、PCNAの半減期は約20時間であり¹⁶⁾、pachytene spermatocyteも染色されることがあるため、この方法ではDNA合成を行っていないleptotene spermatocyte以降の精細胞¹⁷⁾をもPCNA陽性細胞として計測する可能性がある。一方、田中ら¹⁸⁾はimage cytometryを用い、PCNA発現の認められる細胞核の総面積と染色濃度からPCNA陽性率を算定している。この方法は染色濃度の違いも数値化できる方法であるが、特殊な装置が必要とされる。我々が考案したL.I.はDNA合成期にない精細胞はすべて除外されており、また、特殊な装置を使用することなく容易に測定できる点より、PCNA陽性率の算定法として、臨床的に有用性の高い方法であると考えられる。そのため、男子不妊症を主訴とする精索静脈瘤患者における精細胞のDNA合成能の評価にこのL.I.を用いた。

今回の検討ではすべてのgradeにおいて左精索静脈瘤患者での左精巣のL.I.は右精巣と比較して有意に低下していた。ラット精索静脈瘤モデルやヒト精索静脈瘤患者における造精機能評価においては患側精巣では対側精巣に比較してより強い造精機能障害が認められることが報告されており⁵⁻⁸⁾、今回の結果から、左精索静脈瘤患者では造精機能と同様に精細胞のDNA合成についても患側精巣がより強く障害されることが示唆された。

また、左精巣においてgrade III群のL.I.はgrade I群のL.I.よりも有意に低値であった。この結果から、精索静脈瘤の程度が高度になるほど患側精巣での精細胞のDNA合成の障害も強くなることが示唆された。当科では精巣部深部温を測定した結果、静脈瘤のgradeが高いほど精巣部深部温が上昇することを報告した¹⁹⁾。加えて、Okuyamaら²⁰⁾は精巣DNA分画への³H-Thymidineの取り込みが31°C以上では温度依存性に取り込みが低下することを報告している。従って、精索静脈瘤の程度が高度になるほど精巣温度が上昇し、精細胞のDNA合成能がより低下すると推察される。

さらに、右精巣においてもgrade III群のL.I.はgrade I群のL.I.と比較して有意に低値を示した。この結果から、精索静脈瘤が高度であるほど対側の精細胞のDNA合成の障害も強くなると示唆された。今回の検討では倫理上の制限により正常対照群を設定できず、軽度の精索静脈瘤が対側の精細胞のDNA合成に与える影響については検討し得なかったが、田中ら¹⁸⁾はimage cytometryを用いた精細胞のPCNA発現に関する研究で左精索静脈瘤患者では対側精巣も患側と同様に正常精巣より精細胞のDNA合成が低下していたと報告している。精索静脈瘤が対側の精細胞のDNA合成を低下させる機序として精索静脈瘤による患側陰嚢内の温度上昇が対側に直接伝播し対側の精巣温度を上昇させるとする説^{1, 2)}や視床下部-下垂体-精巣間の調整機構の障害が生じるためとする説^{21, 22)}などが考えられているが十分には解明されていない。

今回の検討では精巣機能の評価法の一つとしてJSCを算定しL.I.と対比したが、L.I.とJSCの間には一定の相関は認められなかった。田中ら¹⁸⁾も我々と同様に精細胞のPCNA陽性率とJSCの間には一定の相関は認められなかったと報告している。この原因としてはJSCが精細胞の分化、成熟度を表わす指標であるのに対し、L.I.は精細胞のDNA合成能、すなわち、精子形成過程における初期段階の精細胞の分

裂能を表わすためと考えられた。

(本論文の要旨は第41回日本不妊学会総会において発表した。)

文 献

- 1) Kay R, Alexander N, Baugham W. (1979) Induced varicoceles in rhesus monkeys. *Fertil Steril* 31:195-199
- 2) Green F, Turner T, Howards S. (1984) Varicocele: Reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol* 131:1208-1211
- 3) Fujisawa M, Kojima K, Yoshida S, et al. (1988) Deoxyribonucleic acid polymerase activity in the testes of infertile men with varicocele. *Fertil Steril* 50:795-800
- 4) Nakamura M, Namiki M, Okuyama A, et al. (1988) Optimal temperature for synthesis of DNA, RNA, and protein by human testis in vitro. *Arch Androl* 20:41-44
- 5) 瀧原博史, 植野卓也, 石津和彦 他 (1989) 精索静脈瘤. 病理と臨床 7:311-316
- 6) 石津和彦 (1990) 片側性精索静脈瘤による両側精巣の造精機能障害 - 実験的研究. 日不妊会誌 35:142-149
- 7) Takihara H, Ishizu K, Ueno T, et al. (1990) Pathogenesis of varicocele: experimental study using flow cytometric DNA analysis. *Andrologia* 22:137-143
- 8) Takihara H, Sakatoku J, Cockett A. (1991) The pathophysiology of varicocele in male infertility. *Fertil Steril* 55:861-868
- 9) 井本勝彦, 瀧原博史, 島袋智之 他 (1996) PCNA法を用いた閉塞性無精子症の精細胞DNA合成能の定量的解析. 日不妊会誌 41:70-75
- 10) 寺田雅生 (1973) 睾丸機能の研究. 第4報. 睾丸の精細胞DNA合成能の研究 (spermatogenic activity index を中心にして). 日泌尿会誌 64:949-970
- 11) Shirataki S, Takihara H, Imoto K, et al. (1994) Quantitative analysis of spermatogenic DNA synthesis in the rat using a monoclonal anti-5-bromodeoxyuridine. *Andrologia* 26:343-349
- 12) Schlatt S, Weinbauer G (1994) Immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen as a tool to study cell proliferation in rodent and primate testes. *Int J Androl* 17:214-222
- 13) 田中一成 (1991) 抗PCNA抗体による増殖細胞核の染色-パラフィン切片への応用-. 病理と臨床 9:791-798
- 14) Imoto K (1997) Quantitative analysis of spermatogenic DNA synthesis in the rat using a monoclonal antibody against proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Jpn J Fertil Steril* 42:59-66
- 15) 南部明民, 熊本悦明 (1995) 抗癌剤および抗androgen剤によるspermatogenesis障害の実験的研究. 日泌尿会誌 86:1221-1230
- 16) 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
- 17) Heller G, Clermont Y (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Prog Horm Res* 20:545-575
- 18) 田中宏和, 藤澤正人, 岡田 弘 他 (1996) 精索静脈瘤患者精巣におけるDNA合成-Image cytometryによる精細胞DNA発現に関する研究-. 日泌尿会誌 87:885-891
- 19) 山口政俊 (1989) 精索静脈瘤患者における睾丸部深部温測定. 日不妊会誌 34:207-213
- 20) Okuyama A, Kou E, Kondoh N, et al. (1991) In vitro temperature sensitivity of DNA, RNA, and protein synthesis throughout puberty in human testis. *Arch Androl* 26:7-13
- 21) Weiss D, Rodrigues-Rigau J, Smith K, et al. (1978) Leydig cell function in oligospermic men with varicocele. *J Urol* 120:427-430
- 22) Hudson R (1988) The endocrinology of varicoceles. *Fertil Steril* 49:199-208

(受付: 1997年9月5日)

(受理: 1998年1月9日)

**Quantitative Analysis of Spermatogenic DNA Synthesis in Varicocele
Using a Monoclonal Antibody Against Proliferating Cell Nuclear Antigen**

Hiroshi Nakane, Kazuhiko Ishizu, Koji Shiraishi and Katusuke Naito

Department of Urology
Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755-8505, Japan

Katsuhiko Imoto

Ogori Daiichi General Hospital, Ogori 754-0002, Japan

Hiroshi Takihara

Onoda City Hospital, Onoda 756-0094, Japan

In order to investigate the effect of a unilateral varicocele on spermatogenic DNA synthesis in both testes, we quantitatively analyzed the immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in the testes of infertile men with left varicocele.

A total of 36 men with left varicocele were enrolled in this study, of which 15 had grade I varicocele, 13 grade II and 8 grade III. The rate of cells positive for PCNA was expressed as the labeling index, which is the ratio of the number of positively stained germ cells with PCNA to the total number of germ cells on the periphery of the seminiferous epithelium. The labeling index of the left testes was significantly lower than that of the right testes for all grades of varicocele. In the left testes, the labeling index showed significantly lower values in the grade III group than in the grade I and II groups, and in the right testes, the labeling index was significantly different in the grade III and I groups.

These results suggest that unilateral varicocele severely impairs spermatogenic DNA synthesis in the ipsilateral side and that spermatogenic DNA synthesis is significantly decreased not only in the ipsilateral side but also in the contralateral side of the testes.

Key words: varicocele, PCNA, spermatogenic DNA synthesis

Trypsin Like Proteinase Inhibitor in Human Follicular Fluid (HFF-TI) : Relationship Among HFF-TI, Arginine Amidase, Plasminogen and Estriol

Takehito YAMAGUCHI, Masatoki KATAYAMA, Rieko NAKANE and Yoshifumi MATSUDA

Department of Functional Bioanalysis,
Meiji College of Pharmacy,
Tokyo 154-0003, Japan.

Izumi HARA and Hirohisa SATO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tachikawa Kyouzai Hospital,
Tokyo 190-8531, Japan.

Hsien-Kung LEE

Keiai Clinic,
Tokyo 171-0014, Japan.

Abstract: We performed quantitative and biochemical analysis of 37 samples of normal mature human follicular fluid (HFF) in this study and the trypsin like proteinase inhibitor tentatively called HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen and estriol in HFF were measured. The mean HFF sample volume was 4.75 ± 2.22 ml. The mean concentrations of HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity measured by relative to Glu-Gly-Lys-pNA amidolytic activity of plasmin and estriol in HFF were 2416 ± 870 trypsin inhibitor units (TIU)/ml, 0.859 ± 0.308 n mol/min/ml, 18.71 ± 7.48 n mol/min/ml, and 1.40 ± 1.08 ng/ml, respectively. HFF-TI concentration showed negative correlation with the plasminogen concentration in individual samples. The total amount of HFF-TI also showed relatively good correlation with total amounts of Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity and estriol, respectively. Present results may suggest that the amount of free plasminogen which can be converted to the plasmin in the proteinase cascade for final stage leading to ovulation is controlled by HFF-TI

Key words: human follicular fluid trypsin like proteinase inhibitor (HFF-TI); plasminogen; estriol; proteinase cascade; ovulation.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 81 - 86, 1998)

Introduction

Ovulation is one of the most interesting phenomenon in the female reproductive field. In order to investigate the mechanisms of this event, numerous enzymological study have been done in the past. We have reported that human follicular fluid (HFF) contains certain serine proteolytic enzymes, such

as plasminogen/plasmin (EC 3.4.21.7), tissue plasminogen activator (t-PA, EC 3.4.21.68)¹⁾ and plasma kallikrein (EC 3.4.21.43) like enzyme²⁾, which may play an important role in the follicular wall rupture seen during ovulation^{3,4)}. It is evident that the other proteinases in HFF including collagenase (EC 3.4.24.7) like metalloproteinases such as azocoll digesting enzyme^{5,6)}, and arginine amidases^{1,7)} are also

important enzymes for the final stage leading to ovulation. It is supposed that the proteinase cascade for this stage is regulated by t-PA inhibitors (PAIs) through the control of the t-PA activity in HFF^{3,4)}. On the other hand, a trypsin like proteinase inhibitor in HFF (tentatively named HFF-TI) was newly found by us during studies on proteinase cascade for final stage leading to ovulation⁹⁾, and it may be conjectured that this proteinase inhibitor combines with plasminogen/plasmin in HFF reversibly. Furthermore, Katayama et al. presented recently that the estrogens, especially the estriol in human plasma, constitute an important factor in ovulation and in spontaneous abortion⁹⁾.

This paper presents a study of the associations among HFF-TI and arginine amidases including plasminogen and estriol in HFF.

Materials and Methods

Human follicular fluid

Mature HFF samples were collected from volunteers who consuetude our in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program¹⁰⁾ at Tachikawa Kyosai Hospital and Keiai Clinic/Keiai Institute for Infertility. In each subject ovarian stimulation using human menopausal gonadotropin was followed by ovulation induction with human chorionic gonadotropin. Uncontaminated follicular fluid was centrifuged at 1,500g for 30 minutes at 4°C, then the supernatant was filtered through 0.45 μ m Millipore filter and stored at -40°C until use.

Enzyme assays

Amidolytic activity was measured using D-valyl-L-leucyl-L-arginine-p-nitroanilide (Val-Leu-Arg-pNA, Kibi Diagnostica Co.) as a substrate employing the method described by Amundsen et al.¹¹⁾ with some modifications for adaptation to the microplate use. The amidolytic assay was carried out as follows: 50 μ l of sample solution and 50 μ l of 1 m mol/l substrate solution in 50 m mol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5) were mixed and incubated in a microplate for 37°C and 30 to 60 min. After the enzyme reaction, 100 μ l of 30% acetic acid solution was added to stop the reaction. The absorbance at 405 nm of p-nitroaniline (pNA) was a result of the release of the amidolytic enzyme action from the substrate that was detected by

a microplate reader, (Multiskan Bichromatic Labsystems Co.). The amidolytic activity was expressed in terms of n mol/min of substrate hydrolyzed/min (n mol/min).

Plasminogen was measured as the amidolytic activity relative to plasmin using L-glutamyl-L-glycyl-L-lysine-p-nitroanilide (Glu-Gly-Lys-pNA, Kabi Diagnostica Co.) as a substrate, with the assay carried out as follows: 25 μ l of sample, 25 μ l of 50 international unit (IU) of human urinary urokinase (UK, EC 3.4.21.73, Mochida Pharmaceutical Co., Japan) in 50 m mol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5) and 50 μ l of 1 m mol/l Glu-Gly-Lys-pNA as a substrate in same buffer were mixed and incubated in a microplate at 37°C for 30 min. The relative plasmin activity released from the sample plasminogen preparation, it was necessary to subtract spontaneously activated plasmin activity in the sample and the urokinase from the measured Glu-Gly-Lys-pNA amidolytic activities. The plasminogen activity was expressed as n mol/min of Glu-Gly-Lys-pNA amidolytic activity of relative plasmin.

Inhibitor assay

The activity of HFF-TI was measured in terms of inhibition of N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (Bz-Arg-pNA, 1 m mol/l, Peptide Institute, Japan) hydrolyzing activity of trypsin (EC 3.4.21.4, Sigma chemical Co.) assayed by the above described amidolytic assay method, and the inhibitor of trypsin activity at the rate of 1 n mol/min was designated as 1 trypsin inhibitor unit (TIU)¹²⁾.

Estriol assay

Separate determination of estrogens, notably estriol (E3), was carried out using a high performance liquid chromatography (HPLC) method with chemical luminescence as described by Katayama et al.¹³⁾, with amount of estriol expressed in ng.

Statistical analysis

Data was expressed the mean \pm SD, and the coefficient of correlation was evaluated the parametric test method with StatView J 4.5 software for use with a Macintosh computer.

Reagents

Table 1. Mean values for HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity and estriol in human follicular fluid

	HFF-TI	Val-Leu-Arg-pNA activity	Plasminogen activity	estriol
HFF concentration (/ml HFF)	2416 ± 870	0.859 ± 0.308	18.71 ± 7.48	1.40 ± 1.08
Total HFF amount (/HFF sample)	12279 ± 8042	3.823 ± 2.007	79.29 ± 30.48	6.50 ± 6.23

The Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity and plasminogen activity are expressed as n mol of substrates hydrolyzed/min and n mol of substrates hydrolyzed/min of relative plasmin, respectively. HFF-TI and estriol levels are expressed in terms of trypsin inhibitor unit (TIU) and ng, respectively. The mean HFF sample volume was 4.75 ± 2.22 ml (n = 37).

All reagents used including substrates and proteins were of analytical grades and medical products.

Results

All HFF (n = 37 samples) parameters tested, including the levels of HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity measured by relative to Glu-Gly-Lys-pNA amidolytic activity of plasmin and the estriol, are summarized in Table I. The HFF sample volume was 4.75 ± 2.22 ml, and the volume ranged from 1.2 to 9.0 ml. For the measurement of HFF-TI, the sample HFF solution was diluted to be 10-fold by 50 m mol/l Tris-HCl buffer (pH 8.5).

The mean concentrations of HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity measured by relative amidolytic activity of plasmin and the estriol in HFF were 2416 ± 870 TIU/ml with distribution ranging from 1142 to 3562 TIU/ml, 0.859 ± 0.308 n mol/min/ml (range 0.080 and 1.680 n mol/min/ml), 18.71 ± 7.48 n mol/min of Glu-Gly-Lys-pNA hydrolysis of relative plasmin/ml (range, 9.58 and 39.66 n mol/min/ml) and 1.40 ± 1.08 ng/ml with distribution ranging from 0.10 to 3.46 ng/ml, respectively. The variation of the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic and the plasminogen activities in HFF was relatively broader than that of the estriol concentration.

Total amounts of HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity and estriol in HFF were calculated to be 12279 ± 8042 TIU with distribution ranging from 1340 to 27420 TIU, 3.823 ± 2.007 n mol/min (range 0.672 and 8.274 n mol/min), 79.29

± 30.48 n mol/min of relative plasmin (range, 24.42 and 164.90 n mol/min) and 6.50 ± 6.23 ng with distribution ranging from 0.35 to 22.29 ng, respectively.

Figure 1 shows individual values for the concentration (per ml of HFF) of HFF-TI plotted against the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity (A), the plasminogen activity (B) and the estriol (C) concentrations in HFF. While low correlation coefficients were observed of the HFF-TI concentration with the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity concentration ($r = 0.110$) and with the estriol concentration ($r = 0.089$), a negative correlation was found between the HFF-TI concentration and the plasminogen activity concentration ($r = -0.463$, $p < 0.01$).

The individual values for total amounts (per HFF sample) of HFF-TI plotted against each of the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity (A), the plasminogen activity (B) and the estriol (C) are shown in Fig. 2. The respective was $r = 0.734$ ($p < 0.01$) (A), $r = 0.753$ ($p < 0.01$) (B) and $r = 0.396$ ($P < 0.05$) (C).

Discussion

Ovulation is one of the most important and interesting phenomenon in gynecological physiology. At present, the proteinase cascade theory is widely accepted as accounting for the final stages of ovulation mechanism^{3,4}. According to this theory, the rise in the pressure in the follicle and the LH surge, following the rise in FSH level in the blood which

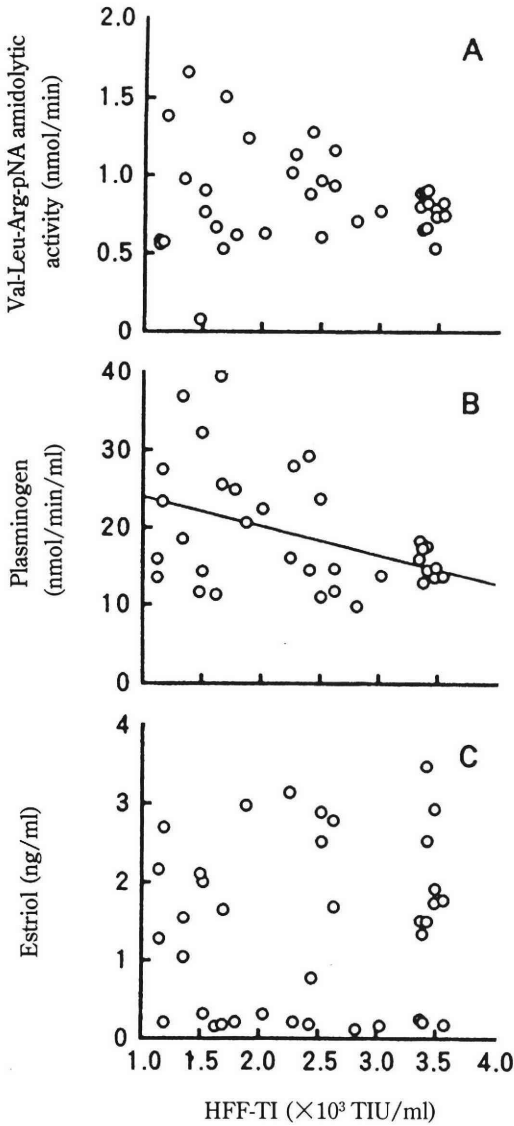


Fig.1. Relationship of HFF-TI concentration to each of Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity and estriol in HFF

The Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity and plasminogen activity are expressed as n mol/min/ml and n mol/min/ml of relative plasmin, respectively. HFF-TI and estriol levels are expressed in terms of TIU/ml and mg/ml, respectively. The correlation coefficient values were $r = 0.110$ (A), $r = -0.463$ (B) and $r = 0.089$ (C).

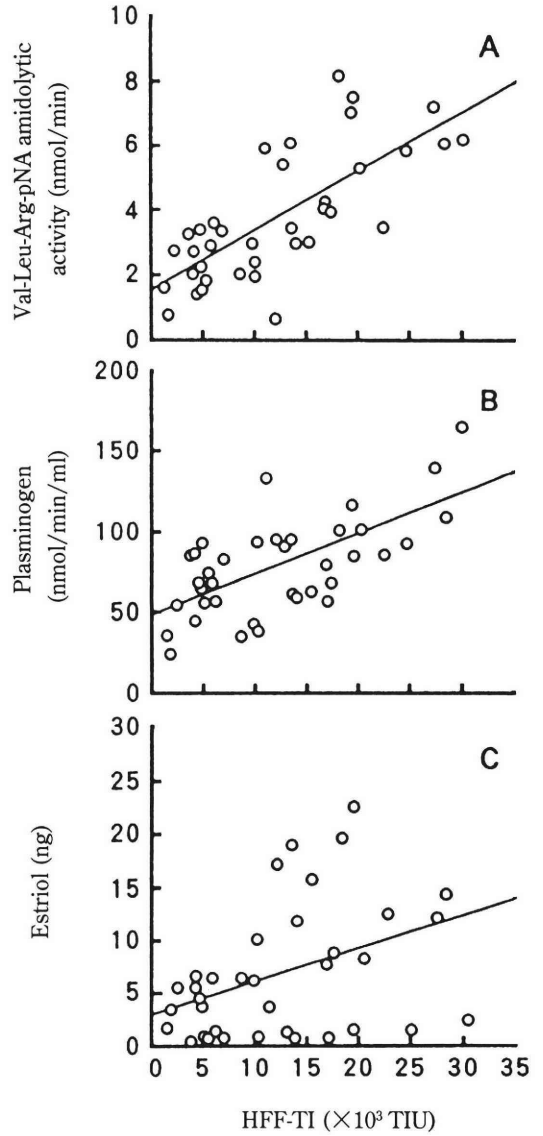


Fig.2. Quantitative relationship among total amounts of HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen activity and estriol in HFF

The Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity and plasminogen activity are expressed as n mol/min and n mol/min of relative plasmin, respectively. HFF-TI and estriol levels are expressed in terms of TIU and mg, respectively. The correlation coefficients values were $r = 0.734$ (A), $r = 0.753$ (B) and $r = 0.396$ (C).

activates the t-PA causes the conversion of plasminogen to plasmin. The plasmin then activates collagenase. The produced collagenase digests collagen fabrics in the connective tissue at the top of the Graffian follicle. The rise in the pressure of the fluid in the follicle, and the interactions in the proteinase cascade system, cause the rupture of the follicle that leads to ovulation^{3,4,14}. The importance of the enzymatic reaction for the final stage of ovulation of the formation of plasmin from plasminogen by t-PA in HFF was observed in our previous study, and a part of the proteinase cascade in HFF was elucidated^{1,15}. On the other hand, a trypsin like proteinase inhibitor (HFF-TI) was found in HFF, and it is estimated that this inhibitor is combined with plasminogen and plasmin in HFF reversibly⁸. We have also noted recently that the plasminogen activity had good correlation with the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity which included some serine proteinases such as plasma kallikrein like enzyme activity² and t-PA, and with estrogens in HFF^{15,16}.

In this study we accordingly investigated the relationships among HFF-TI, Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, plasminogen and estriol in HFF to elucidate the proteinase cascade at the final stage leading up to ovulation. A good correlation was observed between the total amount of HFF-TI and the Val-Leu-Arg-pNA amidolytic activity, and the total amount of HFF-TI had relatively good correlations with the total amounts (per HFF sample) of estriol and plasminogen activity in the present study (Fig. 2). These results showed that the HFF-TI clearly related to the plasminogen activity and estriol. Katayama et al.⁹ presented that estriol in human plasma is a factor more than important estradiol for the ovulation and the spontaneous abortion. It may be suggested from these observations that the amount of free plasminogen which can be converted to the plasmin in the proteinase cascade at the final stage leading to ovulation is controlled by HFF-TI through the estriol level in HFF.

On the other hand, a negative correlation was seen between the concentration of HFF-TI and plasminogen (Fig. 1). This phenomenon is considered arise when HFF-TI concentration in HFF is high, the decreased simultaneously free plasminogen and

increased levels of HFF-TI · plasminogen complex (enzyme-inhibitor complex) are seen. We have already showed the direct detection of arginine amidase activity, including plasminogen/plasmin activity and HFF-TI in HFF⁷. In that study, we also noted that the plasminogen activity, measured relative to plasmin, was markedly increased by treatment of dilution of HFF, and we concluded based on these results that the markedly increased plasminogen activity in HFF was due to dissociation of enzyme-inhibitor complex by dilution of HFF. This is consistent with our present finding of a negative correlation between HFF-TI and plasminogen (Fig. 2).

We concluded based on present results that the proteinase cascade system in HFF is controlled respectively by HFF-TI through the regulation of the amounts of free plasminogen and through the tissue plasminogen activator inhibitors which regulate the activity of tissue plasminogen activator, and we also speculate that HFF-TI is controlled by the estriol in HFF.

References

- 1) Mukaida T, Yemini M, Matsuda Y, et al. (1995) Relationship between arginine amidases including tissue plasminogen activator and estrogens in human follicular fluid. *Jpn J Fertil Steril* 40 : 26 - 33
- 2) Takahashi T, (1993) Proteinases in ovarian follicular maturation. *Seikagaku* 65 : 1425 -1429 (in Japanese).
- 3) LeMaire WJ, Curry TE, Morioka N, et al. (1987) Regulation of ovulation processes. In : *Primate Ovary*. Plenum Publishing, New York, pp 91 - 109.
- 4) Morioka N, Zhu C, Brannstrom M, et al. (1989) Mechanism of mammalian ovulation. *Prog Clin Biol Res* 294 : 65 - 85
- 5) Mukaida T, Morioka N, Zhu C, et al. (1992) Plasminogen activation of collagenase during ovulation in perfused rat ovary. *Matrix (Suppl 1)* 402 - 403
- 6) Matsuda Y, Mukaida T, Kaneko S, et al. (1996) Azocoll digesting enzymes in human follicular fluid. *J Fertil Implant (Tokyo)*, 13 :192 - 195 (in Japanese).
- 7) Kobayashi T, Park J-Y, Matsuda Y, et al. (1991) Detection of arginine esterase activity in human follicular fluid. *Human Reprod* 8 : 1030 - 1033.
- 8) Yamaguchi T, Matsuda Y, Akihama S, et al. (1995) Evidence of trypsin like proteinase inhibitor in

- human follicular fluid. Jpn J Fertil Steril 40 : 658 (in Japanese)
- 9) Katayama M, Nakane R, Matsuda Y, et al. (1997) Monitoring of estrogens in serum from in-vitro fertilization embryo transfer (IVF-ET) treatment patients by high performance liquid chromatography with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethylbenzazole as pre-labeling reagent. Anal Biochem in press
- 10) Hara I, Kimura H, Yoshinaga A, et al. (1996) Evaluation of simplified IVF-ET system. Jpn J Fertil Steril 41 :174 - 177
- 11) Amundsen E, Putter J, Firberger P, et al. (1979) Method for determination of glandular kallikrein by means of chromogenic tripeptidyl substrate. In : Fujii S., Moriya H. and Suzuki T (eds), Adv Exp Med Biol Vol 120A, Kinin III, Plenum press, New York, pp 83-95
- 12) Hara I, Matsuda Y, Kaneko S, et al. (1993) Human seminal plasma proteinase inhibitor: Action toward some trypsin like arginine amidases from humans. Arch Androl 31 : 23 - 29
- 13) Katayama M, Taniguchi H, (1993) Determination of estrogens in plasma by high performance liquid chromatography after pre-column derivatization with 2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethyl-benzimidazole. J Chromatog 616 : 317 - 322.
- 14) Yoshimura Y, Hanashi H, Sakai K, et al. (1994) Mechanisms of ovulation. Horm Front Genecol 1 : 315 - 326
- 15) Mukaida T, Yemini M, Matsuda Y, et al. (1995) Separation of some arginine amidases including tissue plasminogen activator and plasminogen, and their plasminogen activation ability. Jpn J Fertil Steril 40 : 445 - 451
- 16) Lee H-K, Matsuda Y, Katayama M, et al. (1996) Behaviors of arginine amidases, plasminogen and estrogens in individual human follicular fluid. Jpn J Fertil Steril 41 : 311 - 316 (in Japanese)

(Received September 30, 1997)

(Accepted January 8, 1998)

ヒト卵胞液に見いだされたトリプシン様酵素インヒビター(HFF-TI):
アルギニンアミダーゼ活性、プラスミノージェンおよびエストリオールとの相互作用

明治薬科大学生体機能分析学教室

山口武仁、片山昌勅、中根理恵子、松田兆史

立川共済病院産婦人科

原 唯純、佐藤博久

慶愛クリニック

李 賢銑

37名のヒト成熟卵胞液を用いエストリオール、プラスミノージェン、アルギニンアミダーゼ活性およびヒト卵胞液中に存在するプロテイナーゼインヒビター(HFF-TI)の相互作用の検討を行った。用いたヒト卵胞液量は4.75 mlであり、エストリオール、プラスミノージェンおよびHFF-TIの量はそれぞれ 1.40 ± 1.08 ng/ml, 0.859 ± 0.308 n mol/min/ml, 18.71 ± 7.48 n mol/min/ml および $2,416 \pm 870$ trypsin inhibitor units (TIU)/ ml 卵胞液であった。卵胞液中のHFF-TI濃度はプラスミノージェン濃度に対し負の相関性を示した。一方卵胞液総量あたりではHFF-TIはエストリオール、プラスミノージェンに対し良好な相関性を示した。以上の結果、卵胞液中のHFF-TI濃度の上昇により卵胞液中でHFF-TIとプラスミノージェンの複合体の形成量が増加し、遊離プラスミノージェン量が減り、組織プラスミノージェンアクチベーターインヒビターと共に、排卵の最終段階を司るプロテイナーゼカスケードを制御していると推定した。

キーワード：ヒト卵胞液；トリプシン様酵素インヒビター(HFF-TI)；プラスミノージェン；エストリオール；プロテイナーゼ；カスケード；排卵

卵細胞質内精子注入前精子不動化操作による 胚発生率・妊娠率の向上

Improvement of the Embryo Cleavage and Pregnancy Rate by Mechanical Immobilization of Spermatozoa before Intracytoplasmic Sperm Injection

兵庫医科大学産婦人科学教室

小山 伸夫
Nobuo KOYAMA

長谷川 昭子
Akiko HASEGAWA

繁田 実
Minoru SHIGETA

香山 浩二
Koji KOYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663-8131, Japan

重症男性不妊症の治療法として顕微授精法が導入され、とくに卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の有効性が報告されている。ICSIにおいて受精率、妊娠率の向上のために機械的操作等による精子不動化処理が試みられているが、その治療成績は各施設によって異なっている。今回、我々は通常の体外受精で受精しない重症男性不妊症および原因不明受精障害患者をICSI治療の対象として(1)運動精子無処理群35症例(48周期、治療卵数290個)、(2)ICSI直前に注入用ピペット先端で精子尾部を圧迫、摩擦して得た精子不動化処理群46症例(56周期、治療卵数335個)における卵分割率、妊娠率について比較検討した。ICSI後の分割率(分割卵数/治療卵数)、治療周期あたりの妊娠率(妊娠数/治療周期数)はいずれも無処理群(67/290; 23.1%, 2/48; 4.2%)と比較して、不動化処理群(208/335; 62.1%, 16/56; 28.6%)において有意に高率であった。ICSI直前に精子不動化操作を施行することは、分割率、妊娠率の向上に極めて有効であることが確認された。

キーワード：ICSI, 精子不動化, 男性不妊症, 分割率, 妊娠率

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 87-91, 1998)

緒言

重症男性不妊症の治療法として顕微受精が応用され、その方法としてpartial zona dissection (PZD), subzonal insemination (SUZI), intracytoplasmic sperm injection (ICSI)の3法が報告されているが、その中で受精率が高く、理論的に多精子受精もないICSIが主流となってきている。その際、受精率、妊娠率の向上のためにPiezo micromanipulatorの使用や細胞質の吸引法、機械的操作による精子不動化が試みられているが、その治療成績は各施設によって異なっている。今回、我々はICSIにおける精子不動化処理

の有効性につき、無処理精子と不動化精子を用いたICSIの結果を胚発生率、妊娠率について比較検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象

1994年6月から1996年7月までの2年1カ月の間、兵庫医大産婦人科でICSIを施行した64症例、104周期を研究対象とし精子無処理群が35症例48周期、精子不動化処理群が46症例56周期においてその結果をretrospectiveに分析した。治療時の平均年齢は各々34.0歳、34.2歳で2群間に有意差はなかった。

ICSIの適応は(1)通常の体外受精で全く受精しないかまたは受精率が著しく低下している場合(男性因子および原因不明による受精障害を含む。)(2)受精能検査(ハムスター検査等)で著しく不良のため通常の体外受精で受精の可能性が著しく低いと考えられる場合である。

2. ICSI および精子不動化の方法

IVF-ICSIは既に報告した方法¹⁾に準じて施行した。概説するとGn-RH agonist (buserelin) + FSH, hMG療法(long protocol)による過排卵刺激を用い、卵胞径が17mm以上の卵胞が2個以上に達した段階でGn-RHaの投与を中止し、hCG5000IUを投与し、約36~38時間後に経腔的超音波ガイド下に採卵を行った。培養液にはB₂medium (Menezo, France)を用いた。用手法あるいはMESA (microsurgical epididymal sperm aspiration)によって採精し洗浄した運動精子を用い、ヒトアルブミン含有hepes緩衝化HTF中に精子浮遊液を作製した。この精子浮遊液をミネラルオイルで被覆された10%PVP滴の上に一滴滴下し、swim downした運動精子をICSIに使用した。精子不動化処理群においては精子の尾部をinjection needleで2~3回こすり不動化させ、それをICSIした。採卵から18時間後に前核の形成を確認しさらに約48時間後に、正常に分割した2~8細胞胚を経頸管的に子宮内に移植した。

3. 精液検査

IVFに供する精液の一部を室温に約30分放置して液化させた後、血球算定盤を用いて精子濃度、精子

運動率を測定した。

4. 統計学的処理法

検定には、Student's t-testを用いた。

成 績

1. 精子不動化操作と胚発生率

ICSIに供した平均MetaphaseII (MII)卵数は無処理群で平均6.04個、精子不動化処理群で5.98個と両群間に有意差はなかった。MESAによる精子採取例が無処理群で6例(12%)、処理群で4例(7%)含まれている。精子無処理群は48周期でMII卵数が合計290個、そのうち67個が2分割以上に分割しており、分割率は23.1%であった。一方、精子不動化処理群は56周期でMII卵数が合計335個、そのうち208個が分割しており、分割率は62.1%で精子不動化によって有意に(P<0.001)分割率は増加した(表1)。

2. 精子不動化操作と妊娠率

精子無処理群は48周期のうち36周期(75%)にETを行なった。平均胚移植数は1.4個であった。2周期に妊娠が成立した(妊娠率4.2%/治療周期)。このうち1例は分娩に至り、1例は子宮外妊娠であった。一方、精子不動化処理群ではICSIした56周期全例(100%)にET可能で、平均移植胚数は3個であり、うち16周期(28.6%)に妊娠が成立した。このうち12例がongoing, 4例がabortion(20%)であった。移植数および妊娠率は共に精子不動化処理群が有意に(P<0.01, P<0.01)高率であった(表2)。

表1 精子不動化操作による胚発生率の変化

精子不動化操作	治療周期数	ICSI実施 MII 卵数	分割胚数 (%)
無し	48	290	67(23.1%)*
有り	56	335	208(62.1%)*

*P<0.001

表2 精子不動化操作による妊娠率の変化

精子不動化操作	治療周期数	胚移植周期数 (%)	臨床的妊娠数 (%)	分娩または継続妊娠数 (%)	流産	子宮外妊娠
無し	48	36 (75)	2 (4.2)*	1 (2.1)	0	1
有り	56	56 (100)	16 (28.6)*	12 (21.4)	4	0

*P<0.01

3. 術者による胚発生率、妊娠率への影響

ICSIの操作は熟練を要し、術者によってその成績は著しく異なる。よって、当施設で異なった術者で成績が変わらないか検討した。精子無処理によるICSIを術者A, Bでそれぞれ27, 21周期施行したが、分割率はそれぞれ26.6%, 19.1%と共に低率で妊娠もほとんど成立しなかったが、術者Bの不動化処理精子を用いたICSIでは分割率、妊娠率の有意な増加を認めた。よって、術者の相違ではなく、不動化操作を行うことによってICSIの成績は有意に向上した(表3)。なお、術者Bの成績は時間的経過によって向上せず、精子無処理群と精子不動化処理群における手技の熟練度に差は少ないと思われた。

4. 精子濃度と胚発生率

いかなる精子濃度においても精子無処理より精子不動化処理の方が胚分割率、妊娠率共に有意に($P<0.01$)良好であった(表4)。

考 察

重症男性不妊症に対しては従来のIVF-ET治療は困難であり、その受精困難例に顕微授精が試みられ

てきた。顕微授精の中でも卵透明帯に操作を加えるPZD, SUZIはその有効性が低く、一方ICSIはその技術修得が容易ではなかった。最近、そのICSIを行う前に精子不動化操作を施行すれば成績が向上したと報告がなされた²⁻⁶⁾。今回我々の成績もICSI前に精子不動化操作を施行することによって、有意に胚分割率、妊娠率は増加した。この妊娠率の向上は胚分割率の増加によって良好胚移植数が増えたためと考えられた。とくに本研究では術者を変えても、精子不動化操作をしないICSIにおいて胚分割率に有意差はなく同一術者における不動化操作により著明に成績の向上をみた事は、今回の胚分割率の増加は術者の技術より、精子不動化操作の効果によると考えられた。

精子不動化処理としていくつかの方法が試みられており、immatureな精子(精巣上体)をaggressiveに不動化することによって受精、妊娠率は向上したとの報告もある⁷⁾。一般に精子尾部のneck/mid-pieceの下方をinjection pipetteの先端で数回こすり、永久的に不動化させる方法が成績が良く⁵⁾、我々も同方法を用いた。この精子不動化操作によって操作が容易になり操作時間が短縮されるだけでなく、精子原

表3 術者による胚発生率、妊娠率の相違

精子不動化操作	術者	周期数	治療MII卵数	分割胚数(%)	妊娠数(%)
無し	A	27	154	41 (26.6)	2 (7.4)**
無し	B	21	136	26 (19.1)*	0 (0)**
有り	B	56	335	208 (62.1)*	16 (28.6)**

* $P<0.001$ ** $P<0.01$

表4 各精子濃度における胚発生率、妊娠率と精子不動化操作の関係

精子濃度 ×10 ⁶ /ml	精子無処理群			精子不動化群		
	周期数	胚発生率 (%)	妊娠数 (%)	周期数	胚発生率 (%)	妊娠数 (%)
≥40	4	20.5* ±18.2	0 (0)	8	75.0* ±28.9	2 (25)
20~40	4	38.4 ±37.2	1 (25)	14	64.1 ±22.0	7 (50)
5~20	12	30.5* ±21.0	1 (8)	17	53.1* ±22.0	4 (24)
1~5	11	29.8* ±10.0	0 (0)	5	83.8* ±14.9	1 (20)
<1	17	20.1* ±24.3	0 (0)	12	61.3* ±25.9	2 (17)

* $P<0.01$

形質膜を損傷し、先体反応を誘発したり、sperm factor, Ca等を放出して卵を活性化させたり、運動精子による卵細胞質障害を防いだりしてICSIによってバイパスされた自然の受精現象に起こるような物理、生化学的変化を引き起こし、受精率を向上させると考えられているが、その詳細は不明である。

ICSIの成績に影響を与える因子として、精子濃度による胚分割率を調べたが、濃度にかかわらず精子不動化処理の効果が認められた。ICSIにおける受精、妊娠に関与する因子としては精子濃度は重要ではないと考えられる。さらに精子濃度だけでなく精子運動率、精子奇形率もICSIの治療成績に影響を与えないという報告が多い^{8,9)}。しかし、完全な精子無力症はsperm cytosolic componentが欠損しており、受精率の低下をもたらす^{10,11)}という報告があり、精子のqualityがICSIの成績に影響を与えると考えられる。今回精子不動化操作を伴ったICSIを施行後妊娠した症例において、胎児の染色体検査に異常は認められなかった。今回の結果より、ICSIにおいて精子不動化操作は臨床的に有用な操作と考えられた。

文 献

- 1) Koyama N, Hasegawa A, Alibrahim N, et al. (1997) Chromosomal analysis of fetuses conceived by intracytoplasmic sperm injection. Proceeding of the 10th World Congress of in Vitro Fertilization and Assisted Reproduction 985-989
- 2) Palermo G, Joris H, Derde MP, et al. (1993) Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 59:826-835
- 3) Gerris J, Mangelschots K, Van Royen E, et al. (1995) ICSI and severe male-factor infertility: breaking the sperm tail prior to injection. Hum Reprod 10:484-486
- 4) Antinori S, Panci C, Caffa B, et al. (1995) The R.A.P.R.U.I. Center experience: from SUSI, through lasers to ICSI using spermatozoa with broken tails. Hum Reprod 10:489-491
- 5) Fishel S, Lisi F, Rinaldi L, et al. (1995) Systematic examination of immobilizing spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection in the human. Hum Reprod 10:497-500
- 6) Catt J and O' Neill C (1995) Manipulation of sperm before intracytoplasmic sperm injection improves fertilization rates. Fertil Steril 64:1210-1212
- 7) Palermo GD, Schlegel PN, Colombero LT, et al. (1996) Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. Hum Reprod 11:1023-1029
- 8) Mansour RT, Aboulghar MA, Serour GI, et al. (1995) The effect of sperm parameters on the outcome of intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 64:982-986
- 9) Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al. (1995) The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. Hum Reprod 10:1123-1129
- 10) Tesarik J, Susa M, Testart J (1994) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 9:511-518
- 11) Homa ST and Swann K (1994) A cytosolic sperm factor triggers calcium oscillations and membrane hyperpolarizations in human oocytes. Hum Reprod 9:2356-2361

(受付：1997年10月17日)

(受理：1997年11月13日)

Improvement of the embryo cleavage and pregnancy rate by mechanical immobilization of spermatozoa before intracytoplasmic sperm injection

Nobuo Koyama, Akiko Hasegawa, Minoru Shigeta and Koji Koyama

Department of Obstetrics and Gynecology
Hyogo College of Medicine, Nishinomiya 663-8131, Japan

The clinical application of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become more popular for severe male infertility. The sperm immobilization by the mechanical procedure just before ICSI may be a very important procedure for improving the fertilization and pregnancy rate. The result of the ICSI treatment is different according to each institutions due to several reasons including technical improvement for microinjection. We applied ICSI treatment for severe male infertility or unexplained infertility with fertilization failure by conventional IVF and compared the fertilization, cleavage and pregnancy rate between two groups of patients with or without mechanical sperm immobilization procedure just before ICSI. The cleavage and pregnancy rate after

ICSI were significantly higher in immobilized spermatozoa group than in intact spermatozoa group. It was confirmed that mechanical immobilization of spermatozoa before ICSI was certainly very effective procedure for ICSI treatment.

Key words: ICSI, immobilizing spermatozoa, male infertility, cleavage rate, pregnancy rate

Percutaneous Testicular Needle Biopsies Using a Spring-Driven Biopsy Gun: Technique and Usefulness

Toshiyasu AMANO, Susumu NIIKURA and Hiroaki KATO

Department of Urology,
Nagano Red Cross Hospital,
Nagano, 380-8582, Japan.

Abstract: Testicular biopsies using a spring-driven biopsy gun with an 18G or 16G biopsy needle were performed in 15 suspected subfertile men (azoospermia in 8 patients, varicocele with associated severe oligospermia in 2 and severe oligospermia in 5). Simultaneously, standard open surgical biopsy was performed in 9 patients, and no serious complications of needle biopsy, such as bleeding or extrusion of the testis, were disclosed. The results of histological examinations from needle and open biopsies specimens were identical in these patients. Twelve of 15 percutaneous biopsies had sufficient quantity of tissue for adequate histological examination. However, insufficient specimens were obtained by percutaneous biopsies in 3 patients. To obtain adequate samples for histological diagnosis, the scrotal skin incision and tight attachment of the needle tip to the tunica albuginea of the testis seem to be important technical points. Accordingly, the testicular needle biopsy is considered to be a safe and useful technique to make a histological diagnosis of the testis.

Key words: testicular needle biopsy, testicular histological diagnosis, spring-driven biopsy gun
(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 93 - 96, 1998)

Introduction

Azoospermia with normal testis volume and normal serum follicle-stimulating hormone (FSH) levels is the most common indication for testicular biopsy¹⁾. Open biopsy has been used for testicular biopsy. However, several recent reports have discussed the relative merits of percutaneous needle biopsy compared with open surgical testicular biopsy²⁾. We report the usefulness of percutaneous needle biopsy using a spring-driven biopsy gun. The technique and new indication are also discussed.

Materials and Methods

A total of 15 suspected subfertile men underwent a percutaneous needle biopsy. Diagnosis was azoospermia in 8 patients, varicocele with associated severe oligozoospermia in 2 and severe oligozoospermia in 5. Testicular volumes in this study were more than 10 ml, and serum FSH levels were normal or only

mildly elevated. The mean age of the 15 men was 33.1 years (range 28-41 years).

The percutaneous biopsy was performed using a spring-driven biopsy gun (PRO-MAG BIOPSY SYSTEM; Manan Medical Products, Northbrook, IL, USA) with an 18G × 20cm or 16G × 10cm biopsy needle (Manan Medical Products, Northbrook, IL, USA) (Figure 1).

Lidocaine (1%) was injected into the skin of the scrotum. A small skin incision was made by a blade. The tip of the biopsy needle was guided to lie adjacent to the tunica albuginea of the testis. The testis was grasped by an assistant who positioned the epididymis posteriolaterally so as not to injure the epididymis (Figure 2). Then the biopsy gun was fired. Specimens were placed immediately into a container of Bouin's solution.

Direct digital pressure was applied to the biopsy site for 2 minutes. One suture on the skin incision site was made, if needed. The patients were advised to

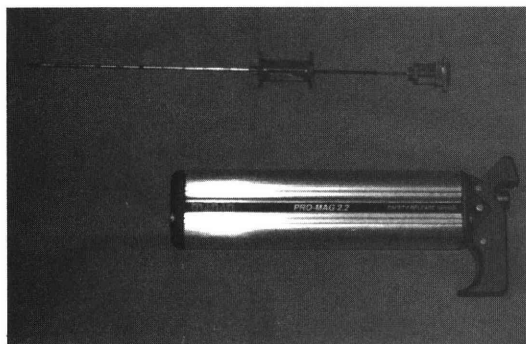


Figure 1: Spring-driven biopsy gun (PRO-MAG BI-OPSY SYSTEM; Manan Medical Products, Northbrook, IL, USA) and a 16G \times 10cm biopsy needle (Manan Medical Products, Northbrook, IL, USA).

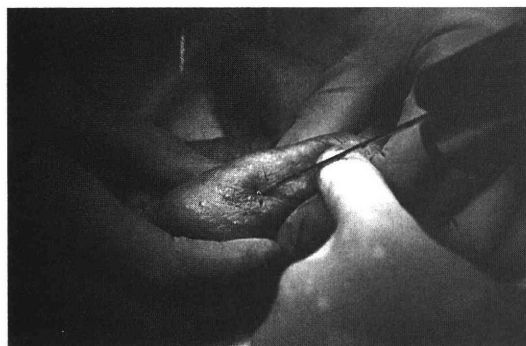
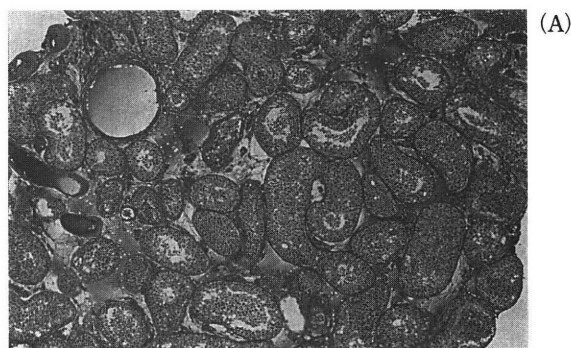


Figure 2: Percutaneous needle biopsy of testis using a spring-driven biopsy gun. The tip of the biopsy needle was guided to lie adjacent to the tunica albuginea of the testis. The testis was grasped by an assistant who positioned the epididymis posteriolaterally so as not to injure the epididymis. Then the biopsy gun was fired.

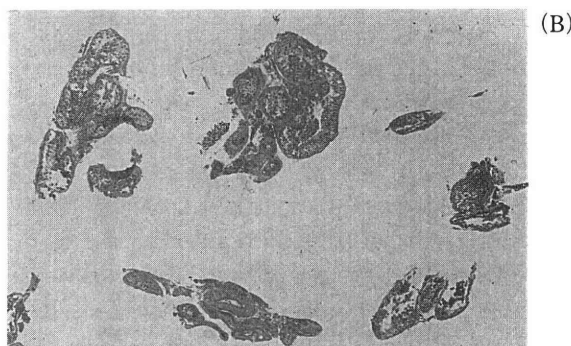
rest in bed overnight. Needle biopsy was performed in bilateral testis, and the biopsy gun was fired only one time per testis to prevent testicular damage. It took 2 to 3 minutes to obtain testicular sample by needle biopsy.

Simultaneously, standard open surgical biopsy was performed in 9 patients, and the testicular condition after needle biopsy was immediately observed.

The procedure was performed in all patients with informed consent.



(A)



(B)

Figure 3: Testicular biopsy specimens from obstructive azoospermia patient. (A) Specimen obtained by open biopsy and (B) needle biopsy. H&E, reduced from \times 13. Total amount of sample from needle biopsy was smaller than that from open biopsy.

Results

Of the 15 percutaneous biopsies, 12 had sufficient quantity of tissue for adequate histological examination. The total amount of sample from the needle biopsy was smaller than that from the open biopsy (Figure 3 A, B). However, there was an identical correlation between the percutaneous and open biopsy histological diagnosis in 9 patients (Figure 4 A, B). No massive hemorrhage or extrusion of tubules was observed in these cases (Figure 5). The other initial 3 of the 15 percutaneous biopsies had insufficient specimens. No serious side effects, such as scrotal hemorrhage, pain or infection were observed in any patient 1 week after needle biopsy.

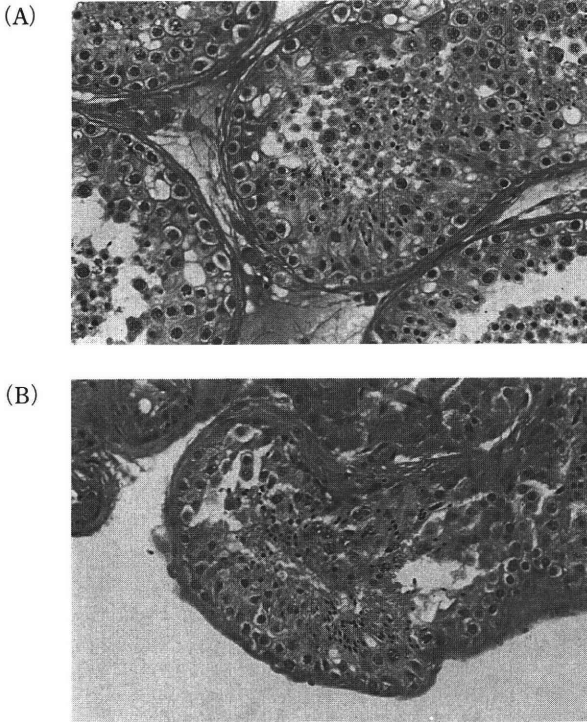


Figure 4: Testicular biopsy specimens from obstructive azoospermia patient. (A) Specimen obtained by open biopsy and (B) needle biopsy. H&E, reduced from $\times 80$. There was an identical correlation between the percutaneous and open biopsy histological diagnosis, and spermatozoa were observed.

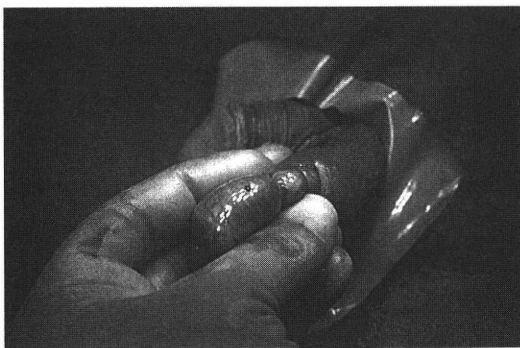


Figure 5: A small hole was observed after needle testicular biopsy. However, no massive hemorrhage or extrusion of tubules was seen.

Discussion

Several recent reports have discussed the usefulness of percutaneous needle biopsy^{1,3-6)}. In our experience, testis needle biopsy with a spring-driven biopsy gun has been safe. In 9 patients who underwent both needle biopsy and open biopsy, no massive hemorrhage or extrusion of tubules was observed. Serious side effects were not seen in any patient 1 week after biopsy.

The total amount of samples from the needle biopsy was less than that from the open biopsy. However, 12 of 15 samples had sufficient quantity of tissue for adequate histological examination. The histological findings were identical between the needle and open biopsy in all patients who received both biopsies. Thus, the needle biopsy using a spring-driven biopsy gun was considered to be a safe and useful technique to make a histological testis diagnosis.

However, initial 3 of 15 needle biopsies provided insufficient quantity of tissue for adequate histological diagnosis. In the 2 cases, an 18 gauge needle was used. In addition, the tip of the biopsy needle was placed very loosely to the tunica albuginea of the testis. After the needle tip was applied very tightly to the tunica albuginea with a 16 gauge needle, sufficient material was obtained. Failure in the other case occurred because a scrotal skin incision was not made. Therefore, the scrotal skin incision and tight attachment of the needle tip to the tunica albuginea of the testis were considered to be an important keys to the success of this procedure. After using these technique, sufficient specimens were obtained by needle biopsy in all cases.

Furthermore, spermatozoa were well observed in the testicular specimen from obstructive azoospermia patients by needle biopsy (Figure 4 B). Therefore, when spermatozoa from the testis are applied to assisted reproductive technology (intracytoplasmic sperm injection: ICSI), this testis needle biopsy technique may be one of the most convenient methods of testicular sperm extraction (TESE) to obtain spermatozoa with minimum damage to the testis.

References

- 1) Kessarar DN, Wasserman P, Mellinger BC. (1995) Histopathological and cytopathological correlations of percutaneous testis biopsy and open biopsy in infertile men. J Urol 153: 1151-1155.
- 2) Coburn M, Wheeler TH. (1991) Testicular biopsy in male infertility evaluation. In: Lipshultz LL, Howards SS. (eds), 2nd edition. Infertility in the man. Mosby-Year Book, St. Louis, pp 223-253.
- 3) Cohen MS, Frye S, Warner R, et al. (1984) Testicular needle biopsy in diagnosis of infertility. Urology 24: 439-442.
- 4) Cohen MS, Warner R. (1987) Needle biopsy of testis: A safe outpatient procedure. Urology 29: 279-281.
- 5) Rajfer J, Binder S. (1989) Use of biopsy gun for transcutaneous testicular biopsies. J Urol 142: 1021-1022.
- 6) Morey A, Deshon GE, Rozanski T, et al. (1993) Technique of biopsy gun testis needle biopsy. Urology 42: 325-326.

(Received November 6, 1997)

(Accepted January 12, 1998)

バイオプシガンによる経皮的精巣針生検の経験

—その手技と有用性について—

長野赤十字病院泌尿器科

天野俊康, 新倉 晋, 加藤浩章

男子不妊症を訴えた15例に対し、バネ式バイオプシガンと18または16ゲージの生検針を用いた経皮的精巣針生検を施行した。15例の内訳は、無精子症8例、高度乏精子症を伴った精索静脈瘤2例、高度乏精子症5例であった。15例中9例には引き続き精巣開放生検を行ったところ、針生検施行部位には出血や精巣内容の逸脱などの合併症は認められず、組織学的にも針生検と開放生検との間で同一であった。しかしながら、3例の針生検においては十分な組織が得られなかった。これらの不成功例の検討から、十分な精巣組織を得るためには、陰囊皮膚の切開と、生検針を精巣白膜上に密着させてから生検を行うことが重要と考えられた。以上の点を留意することにより、経皮的精巣針生検は、安全かつ有用な方法であることが示唆された。

キーワード：精巣針生検、精巣組織診断、バネ式バイオプシガン

遅延性排卵と TRH 負荷テストによる 潜在性高プロラクチン血症との関連性

Correlation between Delayed Ovulation and Occult Hyperprolactinemia by TRH Loading Test

大阪市立総合医療センター産科婦人科

康 文 豪 三 橋 玉 枝

Bungoh KOH Tamae MITSUHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology

Osaka City General Hospital, Osaka 534-0021, Japan

軽症排卵障害である遅延性排卵は、経験的に不妊因子と考えられており、その内分泌学的背景にプロラクチン(PRL)の関与が考えられる。そこで、この遅延性排卵をもたらすPRLの状態を、とくに潜在性高PRL血症(OHP)との関係につきTRH負荷テストを用いて検討を行った。

当科不妊内分泌外来通院患者500例中129例(25.8%)に遅延性排卵が認められた。うち10例(7.8%)に高PRL血症が認められた。これら10例を除く118例中101例の遅延性排卵にTRH負荷テストを行ったところ、TRH負荷後のPRL30分値50ng/ml以上をOHPと設定した場合、49例(48.5%)にOHPが認められた。また、PRL30分値70ng/ml以上をOHPと設定した場合19例(18.8%)にOHPが認められた。しかし、いずれの設定においてもプロモクリプチンの排卵効果は同様であり、PRL30分値50ng/ml以上をOHPとする事の妥当性が認められた。

遅延性排卵における内分泌学的PCOタイプの例では、OHPの発現頻度が高い傾向にあった。

また、遅延性排卵と黄体機能不全を示す例と、OHPとの関係には、遅延性排卵101例中69例(68.3%)に黄体機能不全が合併しており、そのうち37例(53.6%)にOHPが認められた。

以上より、遅延性排卵における内分泌学的背景として、OHPの関与が示唆され、PRL30分値50ng/ml以上をOHPとするTRH負荷テストの有用性が示唆された。

キーワード：遅延性排卵、TRH負荷テスト、潜在性高プロラクチン血症、プロモクリプチン、黄体機能不全

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 97-102, 1998)

緒 言

軽症排卵障害である遅延性排卵は、経験的に不妊因子と考えられ、その病態は、主として卵の質的・機能的異常に基づく卵受精分割能の低下に求められる。また、一方では黄体機能不全を伴い、それは不妊・不育症の原因にもなり、その内分泌学的背景に、プロラクチン(以下PRL)の関与が考えられている。そこで今回、この遅延性排卵をもたらすPRLの動態を、とくに潜在性高PRL血症(以下OHP)との関係

につきTRH負荷テストを用いて検討を行い、遅延性排卵の病態を明らかにせんとした。

対象および方法

1. 対象

平成5年12月より平成9年9月迄に当科不妊内分泌外来通院患者500名(既婚例452名、未婚例48名)を対象とし、初診後3周期または3か月間の観察期間をもって、無月経(第一度・第二度)、無排卵周期症、稀発排卵、遅延性排卵、正常排卵(黄体機能不

全の有る例、ない例)に病態分類し、うち高 PRL 血症30例を除き、TRH 負荷テストを施行し得た293例を今回の検討対象とした。

2. 推定排卵日の決定

既婚例では、主に経腔超音波断層法を用い、未婚例では、基礎体温曲線を用いて推定排卵日を決定した。経腔超音波断層法上では、卵胞の消失あるいは卵胞径の明らかな縮少が認められた日を、また基礎体温曲線では、低温最終日をそれぞれ推定排卵日とした。そして、推定排卵日が、月経周期第19日目以前の場合を正常排卵とした。そして月経周期第20日目以降第29日目までの場合を遅延性排卵、月経周期第30日目以降の場合を稀発排卵とした。なお、正常排卵のうち、黄体期の長さが10日以内、または黄体期中期血中プロゲステロン値が10ng/ml以下の場合を、黄体機能不全とした。

3. TRH 負荷テストの方法

月経または消退出血発来7日目前後の午前10時頃、安静下にてTRH500μgを静脈内投与、その投与前のPRL(以下PRL(0))値、LH値、FSH値と投与後30分のPRL(以下PRL(30))値をIRMA法(スパッカー-Sプロラクチン、LH、FSHキット)にて測定した。PRL(0)値15ng/ml以上を高PRL血症、そしてPRL(0)値15ng/ml未満かつPRL(30)値50ng/ml以上の例を今回OHPとした。

なお、本法によるOHPの診断基準に関する妥当性については、プロモクリプチン(以下BCP)1.25mgか

ら5.0mgを3か月間投与による排卵効果により行った。すなわちBCP投与3か月以内に排卵障害の程度の改善または妊娠の成立をみた場合、これらの症例をOHPとして妥当性があると判断した。

なお、統計学的処理は、 χ^2 検定およびフィッシャーの直接確率計算法を用いた。

結 果

1. 図1に、排卵時期による症例の分類を示す。不妊内分泌外来通院患者500例中129例(25.8%)に遅延性排卵が認められた。
2. 表1に、各病態別における高PRL血症の頻度を示すが、正常排卵での3.0%に比し、無排卵周期症16.7%、稀発排卵15.2%、黄体機能不全9.6%、遅延性排卵7.8%の順に高PRL血症が見られた。
3. 高PRL血症例を除いた293例の、各病態別TRH負荷前後のPRLの変化(表2)は、PRL(0)値は、平均6.6±2.9ng/mlを示し、負荷30分後の変化率も平均8.0±4.8を示し、いずれも各病態間において差が認められない。
4. 同一症例におけるTRH負荷前のLH、FSHの血中濃度の比較(表3)では、負荷前のLH・FSHの血中濃度は、それぞれ、平均4.91±3.05mIU/mlと7.72±4.30mIU/mlを示し、そのLH/FSHも0.69±0.45を示し、いずれも各病態間に差を認めていない。しかし、LH/FSH比1以上の頻度が、正常排卵11.8%、遅延性排卵12.9%に比し、排卵障害が高度な第一度無月経26.5%(P<0.05)、無排卵周期症26.9%、稀発排卵21.4%に頻度が増加

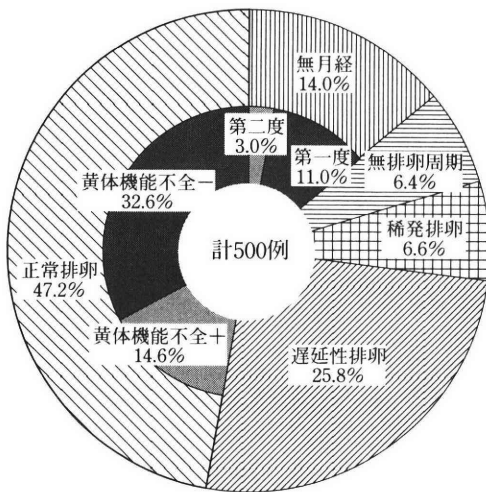


図1 排卵時期による分類

表1 各病態別高PRL血症の頻度

	n	高PRL血症 (%)
無月経	70	3 (4.3)
第二度無月経	15	0 (0.0)
第一度無月経	55	3 (5.5)
無排卵周期症	30	5 (16.7) ¹⁾
稀発排卵	33	5 (15.2) ¹⁾
遅延性排卵	129	10 (7.8) ²⁾
正常排卵	236	7 (3.0)
黄体機能不全(+)	73	7 (9.6)
黄体機能不全(-)	163	0 (0.0)

1) vs 正常排卵 P<0.01
2) vs 正常排卵 P<0.05

表2 各病態におけるTRH 負荷によるPRLの変動

	n	PRL(0) (ng/ml)	PRL(30) (ng/ml)	PRL(30)/PRL(0)
無月経	62	5.3±2.4	41.8±23.2	9.4±6.7
二度無月経	13	4.8±1.5	43.7±18.7	10.2±6.1
一度無月経	49	5.4±2.6	41.3±24.2	9.2±6.8
無排卵周期症	25	6.1±2.9	37.8±18.5	7.6±3.6
稀発排卵	28	6.8±2.7	45.9±22.8	7.5±3.8
遅延性排卵	101	6.9±2.9	49.7±20.4	8.3±4.7
正常排卵	76	7.3±2.9	43.9±21.2	6.6±3.2
黄体機能不全(+)	43	7.0±2.9	46.5±23.8	7.3±3.5
黄体機能不全(-)	33	7.8±2.9	40.5±16.7	5.8±2.7
全 体	293	6.6±2.9	45.1±21.7	8.0±4.8

* 高PRL血症を除く

表3 各病態におけるTRH 負荷前のLH, FSHの血中濃度

	n	LH (mIU/ml)	FSH (mIU/ml)	LH/FSH	LH/FSH ≥ 1 の頻度
一度無月経	49	4.68±3.86	6.37±1.96	0.72±0.54	13/49 (26.5)
無排卵周期症	26	6.02±3.62	8.06±2.64	0.83±0.56	7/26 (26.9)
稀発排卵	28	6.32±3.62	7.11±2.10	0.95±0.57	6/28 (21.4)
遅延性排卵	101	5.05±2.69	7.81±2.04	0.67±0.37	13/101 (12.9) ¹⁾
正常排卵	76	3.97±1.87	8.59±7.32	0.56±0.33	9/76 (11.8) ¹⁾
黄体機能不全(+)	43	3.74±1.70	7.81±5.64	0.56±0.33	5/43 (11.6)
黄体機能不全(-)	33	4.28±2.03	9.62±8.97	0.56±0.33	4/33 (12.1)
全 体	280	4.91±3.05	7.72±4.30	0.69±0.45	57/293 (19.5)

1) vs 一度無月経 P<0.05

* 高PRL血症を除く

表4 各病態におけるOHPの比率

PRL(30)の設定	n	PRL(30) ≥ 50 (ng/ml)	PRL(30) ≥ 70 (ng/ml)
無月経	62	18 (29.0%) ²⁾	7 (13.5%)
二度無月経	13	6 (46.2)	1 (7.7)
一度無月経	49	12 (24.5) ¹⁾	6 (12.2)
無排卵周期症	26	5 (19.2) ¹⁾	2 (7.7)
稀発排卵	28	10 (35.7)	3 (10.7)
遅延性排卵	101	49 (48.5)	19 (18.8)
正常排卵	76	19 (25.0) ¹⁾	7 (9.2)
黄体機能不全(+)	43	12 (27.9%) ²⁾	5 (11.6)
黄体機能不全(-)	33	7 (21.2) ¹⁾	2 (6.1)

1) vs 遅延性排卵 P<0.01

2) vs 遅延性排卵 P<0.05

表5 各病態におけるPRL(30) (ng/ml)の設定別BCPの効果

PRL(30)の設定	50 ≤ PRL(30) < 70	PRL(30) ≥ 50	PRL(30) ≥ 70	PRL(30) < 50
無月経	1/6 (16.7%) ¹⁾	3/12 (25.0%) ¹⁾	2/6 (33.3%) ¹⁾	0/1 (0.0%)
第二度無月経	0/2 (0.0) ²⁾	0/3 (0.0) ¹⁾	0/1 (0.0)	— (—)
第一度無月経	1/4 (25.0) ²⁾	3/9 (33.3) ¹⁾	2/5 (40.0) ²⁾	0/1 (0.0)
無排卵周期症	2/2 (100.0)	3/4 (75.0)	1/2 (50.0)	0/1 (0.0)
稀発排卵	3/6 (50.0)	4/9 (44.4) ¹⁾	1/3 (33.3) ²⁾	0/1 (0.0)
遅延性排卵	22/25 (88.0) ²⁾	40/44 (90.9) ¹⁾	18/19 (94.7) ¹⁾	4/9 (44.4)
正常排卵	5/9 (55.6)	8/15 (53.3) ¹⁾	3/6 (50.0) ²⁾	1/4 (25.0)
黄体機能不全(+)	3/4 (75.0)	6/8 (75.0)	3/4 (75.0)	1/2 (50.0)
黄体機能不全(-)	2/5 (40.0) ²⁾	2/7 (28.6) ¹⁾	0/2 (0.0) ²⁾	0/2 (0.0)
全体	34/49 (68.8) ¹⁾	58/84 (69.0) ¹⁾	25/36 (69.4) ²⁾	5/16 (31.3)

* 高PRL血症を除く

1) vs 遅延性排卵 P < 0.01

① vs PRL(30) < 50 P < 0.01

* 有効例/投与例(有効率%)

2) vs 遅延性排卵 P < 0.05

② vs PRL(30) < 50 P < 0.05

表6 内分泌学的PCOタイプとOHPの関係

	LH/FSH ≥ 1		LH ≥ 8mIU/ml, LH/FSH ≥ 1	
	n	OHP	n	OHP
第一度無月経	13	4	8	2
無排卵周期症	7	3	7	3
稀発排卵	6	2	4	2
遅延性排卵	13	7	6	3
黄体機能不全	5	2	0	0

* 高PRL血症を除く

し、ゴナドトロピン分泌異常の関与が認められた。

- 各病態における OHP の比率を表4に示す。PRL(0)値15ng/ml以下でPRL(30)値50ng/ml以上をOHPとした場合、遅延性排卵の48.5%にOHPが認められ、正常排卵(25.0%)、無排卵周期症(19.2%)、無月経(29.0%)に比して有意に高かった。しかし、従来から行われているPRL(30)値70ng/ml以上をOHPと設定した場合は、差は認めなかった。この事より、遅延性排卵の場合、PRL(30)値50ng/ml以上、70ng/ml未満の例が比較的多いという結果を得た。
- 次に、PRL(30)値50ng/ml以上を呈した症例のうち、BCPを投与しえた84例について、各病態別におけるBCPの効果(排卵障害の程度の改善または妊娠の成立をもって有効とした。ただし、正常排卵で黄体機能不全を有しない例は妊娠の成立をもってのみ有効とした。)の内訳をPRL(30)値のレベル別に検討した。併せて、少数例ではあ

るが、PRL(30)値50ng/ml未満でBCPを投与した16例との比較も行った(表5)。PRL(30)値50ng/ml以上70ng/ml未満、50ng/ml以上、70ng/ml以上のいずれにおいても、全体で69%前後のBCP有効率が得られており、PRL(30)値50ng/ml未満のBCP有効率31.3%に比して有意に高かった。また各病態別BCPの効果では、とくに遅延性排卵においては、PRL(30)値50ng/ml以上70ng/ml未満では無月経、黄体機能不全(-)より、50ng/ml以上または70ng/ml以上では無月経、稀発排卵、黄体機能不全(-)より有意に高い有効率が得られた。また、PRL(30)値50ng/ml以上では、PRL(30)値50ng/ml未満に比して有意に高い有効率が得られた。

- 次に、ゴナドトロピン分泌異常の一つである内分泌学的PCOタイプを、LH/FSH比1以上と、LHの基礎値が8mIU/ml以上で、しかもLH/FSH比1以上の2群に分けて、それらとOHPの関係を検討した。その結果、いずれの群においても、

表7 遅延性排卵と黄体機能不全例におけるOHPとの関係

遅延性排卵	黄体機能不全(+)	黄体機能不全(-)
OHP(+)	37(36.6%)	12(11.9%)
OHP(-)	32(31.7%)	20(19.8%)
全 体	69(68.3%)	32(31.7%)

n=101
*高PRL血症を除く

遅延性排卵における内分泌学的PCOタイプではOHPの発現頻度が50%以上であった(表6)。

8. 遅延性排卵と黄体機能不全症例における、OHPとの関係について検討した(表7)。遅延性排卵101例中69例(68.3%)に黄体機能不全が合併しており、そのうち37例(53.6%)にOHPが認められた。

考 察

遅延性排卵は、不妊因子の一つであり、軽度の排卵障害として捉えられ、通常排卵促進療法が一定の効果をあげている^{2,3)}。遅延性排卵の成因の一つとして、内分泌学的背景にPRLの関与が考えられている⁴⁾。今回、この両者の関係をTRH負荷テストにて判定したOHPとの関わりについて検討した。さらにTRH負荷30分後のPRL(30)値50ng/ml以上、70ng/ml以上の診断的意義についても検討した。

高PRL血症やOHP等のPRL分泌亢進は、排卵障害や黄体機能不全などの各種排卵機能障害の原因となる⁵⁻⁷⁾。その機序はいまだ十分には明らかにされていないが、結果としてゴナドトロピンの分泌抑制が引き起こされる。遅延性排卵の原因の一つとして、ゴナドトロピン、とくにFSHの分泌異常が考えられており⁸⁾、PRL分泌亢進がその一因と考えられる。また、ゴナドトロピン分泌異常の一つであるPCOにおいては、視床下部において、PRL分泌抑制因子であるドーパミン低下がLH-RHに対する感受性を上昇させLH分泌増加を引き起こし、PRL増加を引き起こすという事や、高エストロゲン状態がPRL増加をも引き起こすという事が推測されている⁹⁾。今回の検討で、遅延性排卵において高PRL血症の頻度は7.8%であったが、PRL(30)値50ng/ml以上のOHPの頻度は48.5%と高く、さらに内分泌学的PCOタイプを示す遅延性排卵では50%以上にOHPが認められた。このようなPRLの潜在的分泌亢進状態を捉えるうえで、TRH負荷テストは必要不可欠であることが認められた。

次に、OHPの判定基準に関し、病態は違うが、正常PRL血症性視床下部性排卵障害において、PRL(30)値50ng/ml以上をOHPとしたほうが妥当性があるという報告があり¹⁰⁾、今回我々も、PRL(30)値50ng/ml以上をOHPとすることの意義を求めてみた。従来のPRL(30)値70ng/ml以上をOHPと診断する方法と、今回50ng/ml以上をOHPとした場合で、それぞれのBCPの排卵効果を比較した結果、PRL(30)値50ng/ml以上70ng/ml未満ではBCP1.25mgから開始し適宜増量、70ng/ml以上ではBCP2.5mgから開始し適宜増減量する事によりそれぞれ同様な有効率が得られ、それらは、PRL(30)値50ng/ml未満でBCPを投与された場合に比し有意に高かった。この事よりPRL(30)値50ng/ml以上をOHPとすることの妥当性が認められる。なお、原因不明不妊にBCPの大量投与を行うと、内分泌動態が乱れ、かえって排卵障害が起こる危険性があると言われ、低用量での有効性が報告されている¹¹⁾。従ってBCPの投与量は最小有効量で投与することが望ましい。

遅延性排卵が不妊因子となる背景として、一般に不妊因子には、黄体機能不全¹²⁾や卵の質的・機能的異常による卵の受精・分割能の低下がその主たる原因と考えられる。つまり、遅延性排卵においては、卵胞期初期のFSHレベルが低いため、FSHに誘導されるLH receptor数が少なく、排卵前から分泌されだすプロゲステロンが低いためにLH、FSHのpeakが発来し難く、また一方では、これらのpeakが低いことから黄体機能不全が引き起こされると考えられている⁴⁾。今回の検討でも、遅延性排卵の68.3%に黄体機能不全が認められており、うち53.6%にOHPが認められた。不妊因子の主原因の一つとして黄体機能不全が考えられるが、そのみで一元的に捉えることには無理がある。動物実験では、排卵の遅れや受精の遅延が病的な卵子、異常受精卵の発生を助長し、また増加させるという報告¹³⁻¹⁵⁾から、卵の卵胞内過成熟による卵のAgingも主原因の一つとして考えられる^{2,16)}。

以上より、遅延性排卵における内分泌学的背景として、OHPの関与が示唆され、TRH負荷テストにより負荷後30分値50ng/ml以上の診断基準の有用性が認められた。

文 献

- 1) 三宅 侃 (1989) 排卵時期の診断. 日産婦誌 41: N22 - N25
- 2) 康 文豪 (1992) 遅延性排卵の病態に関する研究 - とくに不妊因子としての検討 -. 日不妊会誌 37: 279 - 287
- 3) 志村研太郎, 友田昭二, 康 文豪 他 (1990) 機能性不妊婦人における背景因子の解析と対策. 産婦進歩 42: 93 - 98
- 4) 麻生武志, 田中俊誠 (1989) 卵胞発育の異常と遅延排卵. Wave on OB-GY 20: 1 - 13
- 5) 友田昭二, 康 文豪, 中野昌芳 他 (1989) プロモクリプチンを用いた下垂体PRLの合成・分泌能の検討. 産婦進歩 40: 599 - 601
- 6) Koike K, Aono T, Tsutsumi H, et al. (1982) Restoration of estrogen positive feedback effect on LH release in women with prolactinoma by transsphenoidal surgery. Acta Endocrinol 100: 492 - 498
- 7) Cutie ER, Andino NR (1988) Prolactin inhibits steroidogenesis in mid follicular phase human granulosa cell culture in a chemically defined medium. Fertil Steril 49: 632 - 637
- 8) 山下三郎, 伊藤武久, 野見山宏寿 他 (1984) 遅延性排卵症の内分泌学的背景と治療成績. 日不妊会誌 29: 348 - 353
- 9) 森 宏之 (1992) プロラクチン分泌異常, 不妊の診断と治療 - 最近の動向 -. 森 崇英編, 金原出版, 東京, pp83-94
- 10) 合阪幸三, 吉田浩介, 香山文美 他 (1995) 正常プロラクチン血症性視床下部性排卵障害に対するbromocriptineの有用性の検討. 日不妊会誌 40: 107 - 114
- 11) 杉並 洋, 神崎秀陽, 菅沼信彦 (1995) 機能性不妊. Wave on OB-GY 46: 1 - 17
- 12) Juan B, Montserrat C, Juan AV (1986) Luteal function after delayed ovulation. Fertil Steril 45: 342 - 344
- 13) Fugo NW and Butcher RL (1966) Overripeness and the mammalian ova: I. Overripeness and early embryonic development. Fertil Steril 17: 804 - 814
- 14) Butcher RL and Fugo NW (1967) Overripeness and the mammalian ova: II. Delayed ovulation and chromosome anomalies. Fertil Steril 18: 297 - 302
- 15) Butcher RL, Blue JD, Fugo NW (1969) Overripeness and the mammalian ova: III. Fetal Development at midgestation and term. Fertil Steril 20: 223 - 231
- 16) 美甘和哉 (1989) 初期発生における胚の淘汰. 日医会誌 101: 221 - 226

(受付: 1997年12月17日)

(受理: 1998年1月13日)

Correlation between Delayed Ovulation and Occult Hyperprolactinemia by TRH Loading Test

Bungoh Koh and Tamae Mitsuhashi

Department of Obstetrics and Gynecology
Osaka City General Hospital, Osaka 534-0021, Japan

This study was performed to investigate the relation of delayed ovulation and occult hyperprolactinemia (OHP). The 129 cases (25.8%) of the infertile patients (500 cases) were evaluated to have delayed ovulation. There were hyperprolactinemia in the 10 cases (7.8%) of delayed ovulation. We performed the TRH loading test in the 101 cases of delayed ovulation. When serum PRL level at 30 minutes after TRH administration (PRL30) is more than 50ng/ml, we defined it as OHP. According as this definition, the 49 cases (48.5%) were found to have OHP, which was significantly higher rate than normal ovulation. When PRL30 is more than 70ng/ml, we defined it as OHP. The 19 cases (18.8%) were found to have OHP. But in the two groups the effect of the bromocriptine administration was not difference. And the 69 cases (68.3%) in delayed ovulation were found to have luteal insufficiency. In these cases there were OHP in the 37 cases (53.6%). In conclusion, OHP is the one of etiology of delayed ovulation.

Key words: delayed ovulation, TRH loading test, occult hyperprolactinemia, bromocriptine, luteal insufficiency

精子膨化試験(Hypoosmotic Swelling Test : HOST)と精液所見との関係および凍結・融解精子への応用に関する検討

The Correlation between the Results of HOST(Hypoosmotic Swelling Test) and Routine Semen Analysis and the Study of Frozen-Thawed Sperm

セント・ルカ産婦人科

高野 陽子

佐藤 真紀

Yoko TAKANO

Maki SATO

広津留 恵子

長木 美幸

牛島 千秋

Keiko HIROTSURU

Miyuki NAGAKI

Chiaki USHIJIMA

安東 桂三

宇津宮 隆史

Keizo ANDO

Takafumi UTSUNOMIYA

St. Luke Clinic

Oita 870-0947, Japan

Hypoosmotic Swelling Test (HOST) は精子の膜機能を評価する簡便な方法であり、その一般精液検査との相関性が報告されている。今回、当院の IVF (in vitro fertilization) 患者および精液検査患者計 76 例に HOST を施行し、低浸透圧溶液の選択、精液所見と各パラメーターとの関係、さらに凍結・融解精子への有用性を検討した結果、

- 1) 低浸透圧溶液は HTF (human tubal fluid) を調製したものをを用いた方が運動率を損なわなかった。
- 2) 総精子膨化率の運動率と精子濃度に対する相関は低く、それぞれ $r=0.28, 0.21$ であった。
- 3) 凍結・融解後に HOST を施行したところ、膨化精子に占める生存精子の割合が、HOST 前に比べ減少した。
- 4) 融解後の生存率は、全精子より膨化精子の方が高かった。

これらの成績より、低浸透圧溶液は HTF を調製した方が良好な結果が得られ、また膨化率と精液所見とは関連性が低いことが明らかとなった。さらに凍結・融解後に不動となった精子の HOST は生存判定が困難であること、顕微授精 (ICSI) の際に融解後運動精子が全く確認されない場合は、膨化精子から選択したほうがよいことが示唆された。

キーワード：精子膨化試験(hypoosmotic swelling test:HOST), 膨化精子, 生存精子

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 103 - 108, 1998)

緒言

今日、不妊症の治療には多くの進展がみられるが、今でもなお不明な点が多いのは男性因子の評価である。最も一般的に精液検査として行われるのは、精液量、精子濃度、運動率、奇形率、白血球濃度、赤

血球濃度等であるが、当院ではそれらに加えてブルートスタン染色による acrosome reaction (AR) 能力の判定、ウシ頸管粘液 (CM) 貫通試験、また SQA (sperm quality analyzer) を行っている。しかし、そのどれも受精能を判定するうえで決定的ではないのが現状である。

他にもさまざまな精子機能を判定するための検査が行われている。hyposmotic swelling test (HOST)¹⁾, hamster oocyte penetration test²⁾, 精子 adenosine triphosphate 測定³⁾, human hemizona attachment assay⁴⁾, triple stain 法⁵⁾, 精子 acrosin 活性法⁶⁾などがその例であろう。HOSTは精子に低浸透圧負荷を与えることによって生じる尾部細胞膜の形態学的変化を観察し、精子機能を間接的に判定する検査法であるが、この方法は次の2点から顕微授精 (ICSI) に応用できることで興味深い⁷⁾。

1. 精子の危険な変化をもたらす染料や化学薬品を使う必要がないこと。
2. ICSIで用いられるのと同じ光学システムで測定が実施できること。

今回我々は、HOSTが一般の精液検査に与える臨床的意義と、HOSTが凍結・融解後に不動となった精子の生存判断の根拠になりうるか否かを検討したので報告する。

対象および方法

1) 対象

当院の体外受精 (IVF) 患者および精液検査患者計76例 (IVF患者56例, 精液検査患者20例) を対象とした。

2) HOSTの方法

用手法により採取された射出精液を室温で約30分液化させた後、150mOsmolの試薬300 μ lに1滴(約30 μ l)ずつ加えよく混和し、37°Cで約2時間静置した。その後400倍にて少なくとも100精子の尾部の形態を観察し、総精子膨化率およびとくに尾部全体が膨化したg型精子膨化率を算出した。

3) HOST用試薬の調製

Sodium citrate 0.735g, fructose 1.351g, H₂O 100mlより調製した150mOsmol溶液 (溶液A), 生理的食塩水100ml, H₂O 94mlより調製した150mOsmol溶液 (溶液B), さらにHTF (human tubal fluid) 20ml, H₂O 18.1mlより調製した150mOsmol溶液 (溶液C) の3種類の試薬を調製し、HOST実施に際しての至適試薬の選定に供した。

4) AR率算定用精子染色試薬の調製

ニューメチレンブルー, クレシルバイオレット酢酸塩, エタノールより精子染色用試薬ブルートスタン液を調製する。

5) ウシCM貫通試験

ウシ頸管粘液キャピラリーの一端を液化した精液に90分間浸し、その到達距離から精子の運動性を評価する。

6) 精子凍結・融解の手順

精液検査患者14例の射出精液を用い、それらを液化させた後、10%血清添加HTFを加えて遠心洗浄し、TYB (refrigeration medium-TYB; Irvine Scientific社) を等量添加し、4°Cで10分、-20°Cで10分、液体窒素蒸気下で10分と段階的に冷却した後、液体窒素中に凍結保存した。凍結後2日以上経過したものを室温で融解した。

7) 凍結・融解精子のHOSTの実施

融解した精子を遠心洗浄しHOSTを行い、凍結前HOST後、融解後、融解後HOST後の3条件下で観察を行い膨化率を算出した。また融解後、融解後HOST後においてはエオシンY染色により生存精子を算定した。

結果

1) HOST用試薬の検討

溶液A,B,Cを使用した場合における精子の運動率 (対象は6例) および総精子膨化率 (対象は先の6例を含む11例) を調べた。各試薬による運動率の変動は大きい (表1, $P < 0.01$) が、総精子膨化率の変動はわずかである (表2, Not Significant) ことが明らかとなり、HTFから調製した溶液CがHOSTには至適であると評価された。

2) HOSTと一般精液検査所見の比較検討

HTF添加150mOsmol溶液 (溶液C) を用いHOSTを実施し、得られた総精子膨化率と良好な膨化形態とされているg型精子膨化率に着目し、一般精液所見の各パラメーターと比較した結果、精子濃度と総精子膨化率の間で $r=0.21$ (図1), 運動率と総精子膨化率の間で $r=0.28$ (図2), AR率, ウシCM貫通試験 (IVF患者36例) との間でも良好な相関は認められなかった (表3)。

3) 凍結・融解精子のHOSTの検討

凍結・融解という極端な環境の変化により、融解後にすでに尾部の膨化が観察されることがある。そこで凍結前HOST, 融解後, 融解後HOSTにおける総精子膨化率の変化を調べた (図3)。その結果, 融

表1 溶液の種類による精子の運動率の比較

症例(1~6)	1	2	3	4	5	6
精液所見 運動率(%)	72	84	31	34	51	51
溶液Aでの運動率(%)*	2.3	0	0	0	0	0
溶液Bでの運動率(%)*	1.1	23	0	2.5	10	38
溶液Cでの運動率(%)*	16	53	2.9	3.8	11	12

(* P<0.01)

表2 溶液の種類による総精子膨化率の比較

症例(1~11)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
溶液Aでの膨化率(%)	60	53	29	54	62	68	57	47	63	65	61
溶液Bでの膨化率(%)	51	53	41	44	79	71	72	51	77	74	63
溶液Cでの膨化率(%)	52	53	50	55	77	59	67	60	86	71	67

(Not Significant)

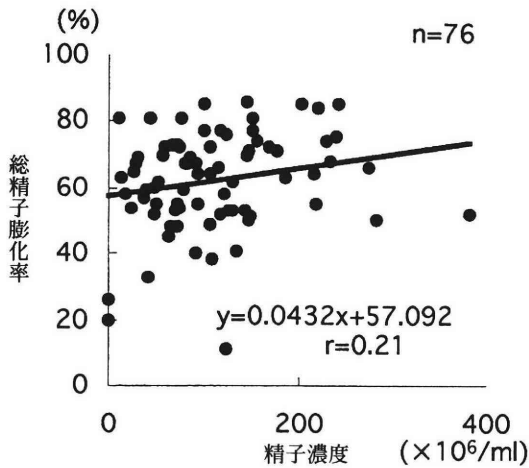


図1 精子濃度と総精子膨化率

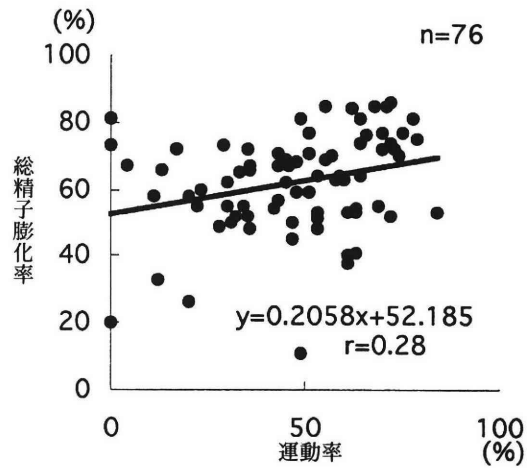


図2 運動率と総精子膨化率

解後に低い例で18%, 高い例で52%の膨化がみられたが, その後のHOSTにより, ほぼすべての例で凍結前HOSTの値にまで膨化率は上昇した。

また融解後, 融解後HOSTそれぞれの時点での生存率, および膨化精子に占める生存精子の割合をエオシンY染色によって調べた結果, 14例すべてにおいて, 融解後HOSTで有意に生存率が低下し(図

4, P<0.001), さらに膨化精子に占める生存精子の割合も低下する(図5, P<0.01)ことが明らかとなった。

さらに, 図4, 図5の「融解後」の値については, 融解後全精子における生存率よりも膨化精子における生存率の方が高値を示した(表4, P<0.05)。

表3 精液所見各パラメーターとの相関

総精子膨化率(%)	回帰式	r
濃度(×10 ⁶ /ml)	y=0.043x+57.09	0.21
運動率(%)	y=0.21x+52.19	0.28
AR率*(%)	y=0.033x+60.34	0.022
ウシCM貫通試験(mm)	y=0.66x+21.53	0.12
g型膨化率(%)	回帰式	r
濃度(×10 ⁶ /ml)	y=0.016x+15.34	0.12
運動率(%)	y=-0.15x+25.47	0.30
AR率*(%)	y=-0.27x+28.27	0.28
ウシCM貫通試験(mm)	y=-0.029x+18.18	0.017

*AR率はブルートスタン精子染色液を用いて算定した。

考 察

一般の精液検査において得られる運動率、奇形率などのデータは、精子の受精機能まで踏み込んだものではない。一方HOSTは、精子の運動機能または精子が卵子の透明帯を貫通した後に必要な細胞膜機能を間接的に知ろうとするものであり、一般精液所見のデータと相関を示すようであれば興味深い。

低浸透圧溶液は sodium citrate, fructose, 水とから作製するのが一般的であるが、NaCl溶液を150mOsmolに調製したものや、HEPES-buffered EBSSを100mOsmolに調製したものを用いて100%不動精子にICSIした例もあり、それぞれ、76.4%, 48.8%の受精率が報告されている^{8,9)}。培養時間についての検討で、1時間がbestであるがそれ以降は運動率が低下するもののほぼ一定の膨化率が認められたと報告されている¹¹⁾ことより、今回我々は培養時間を2時間とし、原法である「30～60分」¹¹⁾よりも長時間行い、3種類の溶液を用いて比較検討した。その結果、HTFを150mOsmolで調製した溶液の方が膨化率に影響せず、精子運動率の低下を最小にしたため、精子への障害が低いと思われた。

また総精子膨化率、g型膨化率と精子運動率、精子数、受精率の有意な相関について、これまで多数の報告があるが、いずれも一致した見解ではない¹⁰⁾。今回の我々の結果では、総精子膨化率、運動率と精子濃度との相関性は低く、また他のパラメーターと

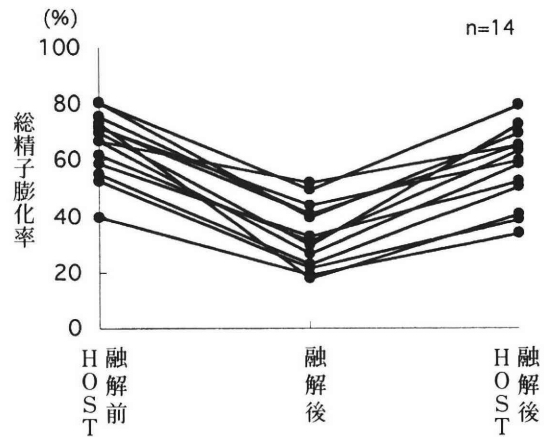


図3 凍結・融解操作とHOSTによる膨化率の移り変わり

も相関は認められず、g型膨化率との相関も認められなかった。

またHOSTは精子の個々を評価でき、先に述べたようにICSIにそのまま用いることができるため、凍結・融解操作で不動となった精子の生存判断基準としても有用であると考えられる。だが今回、融解後膨化した精子のなかでの生存率は、高いもので71%であったが、それからHOSTを施行することによって、その値は半減した(図5)。すなわち融解後HOSTを行うことによって死滅した膨化精子が増加すると

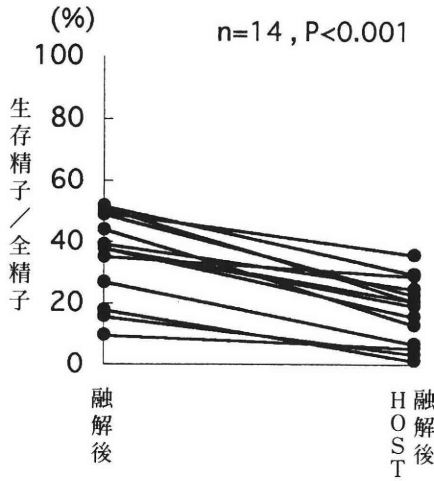


図4 融解後・融解後 HOSTの生存率の変化

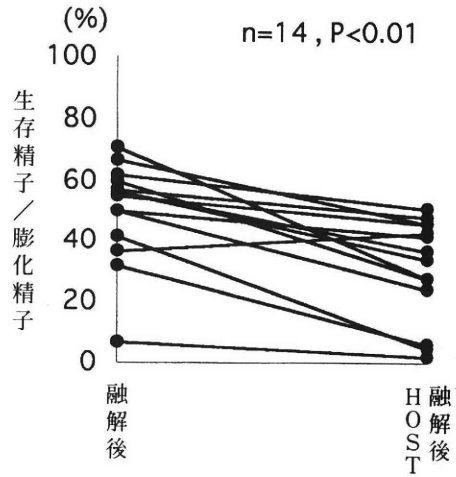


図5 膨化精子に占める生存精子の割合の変化

表4 融解後の生存率の状況

症例(12~25)	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
生存/全体(%)*	44	38	27	50	38	38	9.8	52	49	18	39	35	16	51
生存/膨化(%)*	78	50	56	62	57	56	7.0	37	67	32	55	50	42	60

(*P<0.05)

いう結果が得られた。今回用いた凍結保護剤 TYBの浸透圧は2,278mOsmolと非常に高値であり、精子浮遊液を等量加えることを考慮しても、この保護剤がHOSTの役目を果たしているとは考えにくい。精子が融解後膨化したように見えるのは溶液によるものではなく、極端な温度差によるものと推察される。これらの成績から、凍結・融解後のHOST施行によって生存精子の判定を行うのは、困難であると思われる。

100%不動精子を用いたICSIにおいて、HOSTを行うことによりランダムに選択した場合よりも、受精率、分割率が有意に高値であったという報告がある¹²⁾。その妊娠例のなかには凍結精巣上体精子を用いた例も含まれていたが、融解後の膨化については述べられていない。凍結・融解精子は、新鮮精子に比べ運動性と共に生存性もかなり低下するのが現状である。今回、融解後の生存率を検討した結果(表4)から、もし凍結・融解精子を用いたICSIの際に全く運動精子が確認されない場合は、融解後に膨化した精子を選

択した方が生存の確率が高く、有効であると考えられる。しかしこれは確率的な見解で、精子個々の生存性を判別したものではない。凍結・融解精子に限らず、100%不動精子を用いてのICSI施行の際、生存精子の判定は困難であり、今後の大きな課題といえる。年々増加傾向にある深刻な男性不妊患者のIVF成功のために、今後もより確実な生存精子判定のための研究が望まれる。

文 献

- 1) Jeyendran RS, Van der Ven HH, Perez-Pelaez M, et al.: (1984) Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. J Reprod Fertil 70:219-228
- 2) Margalioth, E.J., Navot, D., Laufer, N., et al.: (1983) Zona-free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for in vitro fertilization, Fertil Steril 40:386-388

- 3) Comhaire, F. H., Vermeulen, L., Schoonjans, F.: (1987) Reassessment of the accuracy of traditional sperm characteristics and adenosine triphosphate (ATP) in estimating the fertilizing potential of human semen in vivo. *Int J Androl* 10:653-662
- 4) Oehninger, S., Coddington, C. C., Scott, R., et al.: (1989) The hemizona assay (HZA): a predictor of human sperm fertilizing potential in vitro fertilization (IVF) treatment. *J In Vitro Fertil Embryo Trans* 6:44
- 5) Talbot, P. and Chacon, R. S.: (1981) A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human spermatozoa. *J Exp Zool* 215:201-208
- 6) Zaneveld, L. J. D., Jeyendran, R. S., Kaminski, J. M., et al.: (1990) Biochemistry: Acrosin. In *Human Spermatozoa in Assisted Reproduction*, Williams & Wilkins, p189
- 7) Barros A, Sousa M, Tesarik J., et al.: (1997) Efficient modification of intracytoplasmic sperm injection technique for cases with total lack of sperm movement. *Hum Reprod* 12,1227-1229
- 8) Liu J, Comptom G, Baramki TA., et al.: (1997) High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. *Fertil Steril* 68:373-376
- 9) Ahmadi A, Ng SC.: (1997) The single sperm curling test, a modified hypo-osmotic swelling test, as a potential technique for the selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 68:346-350
- 10) 柴原浩章, 辺見貴至, 赤井マリ子ら: ヒト精子 Hypoosmotic Swelling Testの精子機能検査法としての臨床的意義. *日不妊会誌* 38:241-249, 1993
- 11) 内田昭弘, 高橋健太郎, 吉野和男ら: ヒト精子における hypoosmotic swelling test の時間的変化に関する研究. *日受着会誌* 7:88-90, 1990
- 12) Casper RF, Cowan L, Jarvi KA., et al.: The hypoosmotic swelling test for selection of viable sperm in intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* 65: 972-976, 1996

(受付: 1997年12月20日)

(受理: 1998年1月15日)

The Correlation between the Results of HOST (Hypoosmotic Swelling Test) and Routine Semen Analysis and the Study of Frozen-Thawed Sperm

Yoko Takano, Maki Sato, Keiko Hirotsuru, Miyuki Nagaki, Chiaki Ushijima,
Keizo Ando and Takafumi Utsunomiya

St. Luke Clinic
Oita 870-0947, Japan

The hypoosmotic swelling test (HOST) is a convenient method for evaluation of sperm membrane function. There are several reports concerning the correlation with routine semen analysis.

HOST was performed with seventy-six patients as subjects for IVF and semen analysis, and we examined the effects of different types of hypoosmotic solutions, the correlation with several parameters of semen analysis, and the effects of freeze-thawing on the results obtained by HOST.

The results were as follows:

- 1) A hypoosmotic solution made from human tubal fluid (HTF) caused the least damage as indicated by sperm motility.
- 2) The total rate of swelling had little correlation with motility rate or total sperm concentration ($r=0.28, 0.21$).
- 3) The proportion of live sperm among swollen sperm decreased after the HOST procedure following freeze-thawing.
- 4) After thawing, the proportion of live sperm among swollen sperm was higher than that among total sperm.

These results indicate that the hypoosmotic solution should be made from HTF, and that there is little correlation between the rate of swelling and routine semen analysis. When HOST is performed using frozen-thawed sperm it may be difficult to distinguish viable sperm and our findings suggest that it is appropriate to select swollen sperm, when no motile sperm are recovered after thawing, for ICSI.

Key words: hypoosmotic swelling test, swollen sperm, viable sperm

A Trial for Control of Birth Timing by RU486, an Antiprogestosterone Compound in Progesterone-Treated Rabbits.

Tuyoshi ENDO and Kiichi KANAYAMA

Department of Veterinary Medicine
College of Bioresource Sciences, Nihon University,
Kanagawa 252-8510, Japan

Abstract: The authors examined whether parturition can be induced by RU486 in rabbits to which progesterone had been continuously administered from the end of pregnancy to the period after the pregnancy term, and the variation in the timing of parturition in these animals was investigated. From the 25th day of pregnancy (Day 25), 5 mg progesterone was intramuscularly injected at 24-hour intervals. In addition, 50 mg RU486 was injected at 24-hour intervals from Day 31. In the control group, sesame oil was injected according to the same time table.

None of the animals in the control group stated parturition up to Day 35. On the other hand, 8 of the 9 animals in the RU486 administration group started parturition up to Day 35, and 21 live newborn were obtained. In these 8 animals, the mean time between the first administration of RU486 and the onset of parturition was 50.6 hours.

Key words: parturition control, RU486, rabbit

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 109 - 112, 1998)

Introduction

In many species, the blood progesterone level decreases before the onset of parturition¹⁻⁶⁾. Recently, attempts have been made to induce parturition by administration of RU486, anti-progesterone compound, to animals in the end of pregnancy⁷⁾. The induction of parturition by RU486 can be explained by binding of RU486 to progesterone receptors causing the same effects as reduction of progesterone.

The authors have attempted to reduce the variation in the timing of parturition using RU486⁸⁾. In this study, we examined whether parturition can be induced by administration of RU486 to rabbits which had been continuously administered progesterone from the end of pregnancy beyond the pregnancy term, and the variation in the timing of parturition in these animals was investigated.

Materials and Methods

The animals used in this study were mature female Japanese white rabbits weighing 2.8 - 3.2 kg. The animals were purchased from a commercial breeder, and fed in individual cages for one month before use. These animals were mated with mature male rabbits, and immediately afterwards, 75 iu hCG was intravenously injected to induce ovulation. The day of induction of ovulation was designated as Day 0. On day 11, the animals were laparotomized by excision of 3 - 5 cm on the median line under general anesthesia with barbital, and the presence of implanted fetuses in the uterus was confirmed. From Day 25 to the onset of parturition, 5 mg progesterone was intramuscularly injected to the animals at 24-hour intervals. In addition, 50 mg RU486 (Mifepristone, 17 β hydroxyl-11 β -(4-dimethyl-aminophenyl)-17 α -(prop-1-ynyl)-estra-4,9-diene-3-one developed by Roussel-Uclaf, Paris, France) was subcutaneously injected at 24-hour inter-

vals from Day 31 to the onset of parturition. Sesame oil (2.5 ml), which was the solvent of RU486, was injected to the animals in the control group.

RU486 was dissolved according to the method described in our previous report⁷⁾. RU486 was first dissolved in ethanol, to which sesame oil was added, and ethanol was evaporated by heating in water bath. The concentration of RU486 in sesame oil was adjusted to 20 mg/ml.

The normal pregnancy period is 30 - 31 days in rabbits. We previously reported that newborn were alive on Day 33 but most were stillbirths on day 34⁸⁾. In the present study, therefore, observation of parturition was ended on Day 35.

Results

Table 1 shows the results of parturition in the control and RU486 administration groups. None of the 6 animals in the control group started parturition until Day 35. On the other hand, parturition was induced up to Day 35 in 8 of the 9 animals in the RU486 administration group. The total number of implanted fetuses in the 9 animals of the RU486 administration group was 73, but the number of live newborn was 21.

Table 2 shows the time up to the onset of parturition in the 8 animals which gave birth in the RU486 administration group. Parturition was started 38.0 - 74.5 hours after the first administration of RU486, and

Table 1 Effects of RU486 administration on the delivery and the number of live newborn

Group	No. of rabbits examined	Total No. of fetuses implanted*	No. of rabbits giving birth by Day 35	Total No. of live newborn**
Control (oil-injected)	6	31	0	0
RU486-injected	9	73	8	21

* Fetuses implanted in the uterus were examined by laparotomy on Day 11.

** No. of live newborn delivered by Day 35.

Table 2 Birth distribution of rabbits treated with RU486

No. of rabbits examined	No. of rabbits giving birth by Day 35	Birth distribution after the first RU486 injection	Cumulative No. of rabbits	% cumulated	Average interval between the first RU486 injection and the onset of parturition ± SD (hrs.)
9	8	~ 30hrs. ~ 40hrs. ~ 50hrs. ~ 60hrs. ~ 80hrs.	0 2 5 6 8	0 25 63 75 100	50.6 ± 14.4

the mean was 50.6 hours. Table 2 shows the time of birth distribution and number of rabbits giving birth.

Discussion

In spontaneous parturition, the progesterone level in blood^{9,10} and uterus^{10,11} is known to decrease before its onset. On the other hand, the pregnancy period can be prolonged by administration of progesterone in the end of pregnancy¹²⁻¹⁴. This study demonstrated that the onset of parturition was prolonged up to Day 35 at least by daily administration of progesterone. Thus, the blood progesterone level is closely involved in the maintenance of pregnancy and the onset of parturition. In the control group, parturition was completely inhibited up to Day 35 by continuous administration of progesterone from the end of pregnancy. On the other hand, parturition was started up to Day 35 in 8 of the 9 animals in the RU486 administration group. These results indicated that RU486 is a strong competitive progesterone antagonist.

The authors attempted to reduce the variation in the timing of parturition in rabbits using RU486⁹. This study demonstrates that parturition can be induced by RU486 even in rabbits to which progesterone had been continuously administered beyond the pregnancy term. However, the variation in the timing of parturition was found to be smaller if progesterone was administered in the limited period before the end of the pregnancy term, as was shown in a previous report⁸, than if it was administered beyond the pregnancy term.

Acknowledgment

The authors would like to thank Dr. K. Taniguchi for his excellent technical help. The authors are also grateful to Roussel-Uclaf, Paris, France, for supplying RU486 for this research.

References

- 1) Hashimoto I, Henricks DM and Anderson LL (1968) Progesterone and pregn-4-en-20 α -ol-3-one in ovarian venous blood during various reproductive states in the rat. *Endocrinology* 82: 333-341
- 2) Donaldson LE, Bassett JM and Thorburn GD (1970) Progesterone concentration of cows during puberty, oestrous cycles, pregnancy and lactation,

and the effects of undernutrition or exogenous oxytocin on progesterone concentration. *J Endocrinol* 48: 599-614

- 3) Fylling P (1970) The effect of pregnancy, ovariectomy and parturition on plasma progesterone level in sheep. *Acta Endocrinologica* 65: 273-283
- 4) Thorburn GD, Dianne H, Nicol J, et al. (1972) Parturition in the goat and sheep: change in corticosteroids, progesterone, oestrogens and prostaglandin F. *J Reprod Fertil (Suppl)* 16: 61-84
- 5) Challis JRG, Davies IJ and Ryan KJ (1973) The relationship between progesterone and prostaglandin F concentrations in the plasma of pregnant rabbits. *Prostaglandins* 4: 509-516
- 6) Ash RW and Heap BB (1975) Oestrogen, progesterone and corticosteroid concentrations in peripheral plasma of sows during pregnancy, parturition, lactation and after weaning. *J Endocrinol* 64: 141-154
- 7) Kanayama K, Nariai K and Endo T (1995) A trial for controlling birth timing by RU486, an antiprogesterone compound in pig. *Jpn J Fertil Steril* 40: 296-298
- 8) Endo T and Kanayama K (1998) Control of parturition timing in rabbits using RU486, a progesterone antagonist. *Jpn J Fertil Steril* 43: 9-12
- 9) Bartholomeusz RK, Bruce NW, Martin CE, et al. (1976) Serial measurement of arterial plasma progesterone levels throughout gestation and parturition in individual rats. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 82: 436-443
- 10) Puri CP and Garfield RE (1982) Changes in hormone levels and gap junctions in the rat uterus during pregnancy and parturition. *Biol Reprod* 27: 967-975
- 11) Davies IJ and Ryan KJ (1973) The modulation of progesterone concentration in the myometrium of the pregnant rat by changes in cytoplasmic "Receptor" protein activity. *Endocrinology* 92: 394-401
- 12) Edgren RA and Peterson DL (1966) Delay of parturition in rats by various gestational steroids. *Proc Soc Exp Biol Med* 123: 867-869
- 13) Pepe G and Rothchild I (1972) The effect of hypophysectomy on day 12 of pregnancy on the serum progesterone level and time of parturition in the rat. *Endocrinology* 91: 1380-1385
- 14) Garfield RE, Puri CP and Csapo AI (1982) Endocrine, structural and functional changes in the uterus during premature labor. *Am J Obstet Gynecol* 142: 21-27

(Received December 10, 1997)

(Accepted January 20, 1998)

プロゲステロン投与家兎における抗プロゲステロン製剤,
RU486を用いた分娩時刻調節の試み

日本大学生物資源科学部獣医学科

遠藤 克, 金山喜一

妊娠末期から妊娠満期を越えて持続的にプロゲステロンを投与した家兎にRU486で分娩を誘起できるか否か、また、その分娩発来時刻について検討した。妊娠25日(Day 25)から24時間間隔で5mgのプロゲステロンを筋肉内に投与し続けた。その後Day 31からは24時間間隔で50mgのRU486の投与を開始した。また、対照区にはRU486の溶媒であるゴマ油を同様に投与した。

対照区ではDay 35までに分娩が発来した家兎は認められなかった。一方、RU486投与区ではDay 35までに供試9例中8例に分娩が発来し、21胎の生存産子を得た。この8例におけるRU486の初回投与から分娩発来までの平均時間は50.6時間であった。

キーワード：分娩調節, 抗プロゲステロン製剤, 家兎

Fluorescence in Situ Hybridization によるヒト精子の 攪拌連続密度勾配処理法の検討

Effects of a Continuous Percoll Gradient Procedure for Sperm Separation

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

浅田 弘 法	末 岡 浩	橋 場 剛 士
Hironori ASADA	Kou SUEOKA	Tsuyoshi HASHIBA
黒 島 正 子	土 屋 慎 一	吉 村 泰 典
Masako KUROSHIMA	Shinichi TSUCHIYA	Yasunori YOSHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

パーコールによる精子洗浄は調製が容易であり、また、運動精子および形態が正常な精子を集め、精子以外の細胞や異物を除去できるため、顕微授精に供する精子の洗浄や人工授精に使用する精液の洗浄方法として広く国内外で使用されてきた。コロイドシリカゲルであるパーコールを用いた精子洗浄が主として用いられている顕微授精の臨床応用によって、これまでは受精に至ることのできなかった運動能を持たない精子や、奇形精子を用いても、妊娠に至る症例も多く見られるようになってきた。顕微授精においては精子の選択が人為的に行われるため、その安全性について多面的な検討が必要である。今回、我々は80%パーコールを用いた攪拌連続密度勾配法により洗浄した精子と Phosphate Buffered Saline (PBS) により洗浄した精子を用いて、(1) 80%パーコールによる精子洗浄が disomy 精子を増加させるかどうか、および、(2) X染色体を持つ精子の頻度に偏りが起こるかどうか、について fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて検討した。遺伝子プローブとしては、常染色体に対しては D18Z1 を使用し、X染色体には DXZ1 を使用した。検体としては、3例の精子数および精子形態の正常な被検者精子を用いた。X精子の比率は1例の症例では洗浄後にX精子がやや増加したが、残りの2例ではX精子の比率には変化を認めなかった。また、D18Z1のシグナルを2個認める精子の数は、3例のどの症例においても、80%パーコール攪拌密度勾配法による洗浄およびPBSの洗浄の両者において洗浄前後において変化を認めなかった。

キーワード: パーコール, 精子, 攪拌密度勾配法, FISH (fluorescence in situ hybridization) 法, disomy
(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 113 - 118, 1998)

緒 言

体外受精や人工授精に供する精子の処理方法としては、swim up 法、swim down 法、攪拌密度法などのパーコールを用いた精子回収法などが主として用いられている¹⁾。とくに、パーコールを用いた精子洗浄法については、エンドトキシンの混入などの問題が指摘されはしたが²⁾、体外受精とくに顕微授精に

おいては有効な精子回収法として国内外で広く用いられている方法である。顕微授精の臨床応用により、今までの不妊治療では妊娠に至ることの無かった高度の乏精子症や奇形精子症の患者の精子を用いても受精卵が得られるようになってきた。顕微授精が不妊症の治療に応用された当初より、男性不妊の遺伝的な側面や顕微授精の卵や精子に直接および影響については議論されてきた。とくに、精管欠損症例

の一部にcystic fibrosisの遺伝子異常が認められたり³⁾、また、無精子症の症例の中にはY染色体長腕上に微小欠損を認めることがあることも報告されている⁴⁾。このように、不妊症の治療によりまだ明らかになっていない不妊症にかかわる遺伝的素因が次世代に影響を及ぼす可能性があるため、顕微授精によって生まれた新生児について、外表奇形や染色体異常の有無が検討されている⁵⁾。顕微授精によって生まれた新生児について調べた報告では、外表奇形については一般の新生児集団と頻度が変わらないが、性染色体の異常については発生頻度が高いと報告されているものが散見される⁶⁾。顕微授精操作においては、受精させる精子は人為的に選択されているため、精子の処理法によって染色体異常をもった精子が多く選択されている可能性が否定できない。また、パーコールによる精子の洗浄⁷⁾や、albumin gradientによる洗浄方法⁸⁾によって、X染色体を持つ精子(X精子)とY染色体を持つ精子(Y精子)の比率に偏りが生じることも報告された。これらの報告では精子の判定はキナクリン染色によって行われていたためX精子とY精子の判別は不確実であったが⁹⁾、その後FISH法により検討された報告によると、albumin gradientでは精子の性の偏りは生じず¹⁰⁾、また、多層パーコールによる精子の選別では、過去の報告ほどX精子の頻度は高くないものの、X精子が集まる傾向があるとされている¹¹⁾。

ここでは、パーコール攪拌密度勾配法およびPBSによる洗浄を行った精子において、disomy精子が増加していないか、また、X精子の頻度が洗浄の前後で変化することがないかどうかについて検討した。

対象と方法

正常精液所見¹²⁾を呈する精子提供者3名の精子を用いた。提供された精子は検査および研究に用いることがあるとのインフォームドコンセントを得た上で使用した。精子はまず、精子数および奇形率の検査を行い、精子数は $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の濃度であり、奇形率は50%以下であるものを使用した。同一の提供者から得られた精子を2分して、一方をPBSにて洗浄し、残りの精子を80%パーコールにて洗浄を行った。PBSによる洗浄は、 $300 \times g$ 、10分間の遠心で行い、パーコール攪拌密度勾配法による洗浄は80%パーコールにPBSを加えた精液を積層し、パーコールと精液の分かれている部分を攪拌棒で攪拌してから $400 \times g$ 、20分間の遠心で行った¹³⁾。

DXZ1、D18Z1の遺伝子プローブを用いて single

color FISHを行い、DXZ1のシグナルを有する精子を検出するとともに、D18Z1のシグナルを2個持つ精子を検出した。

1, FISH法について

(1) 精子の処理

精子はPBSおよびパーコールによる洗浄に続いて、カルノア液でそれぞれ2分間、2000rpmで2回遠心した。カルノア液で固定した後、濃度を調整し、スライドガラス上で風乾させた。精子のdecondensationには20mMのdithiothreitol (DTT)を用いた。DTTによる精子の処理は検体に応じて10分間~60分間行った。干渉顕微鏡にて精子頭部の膨化を確認し、膨化が不十分な場合にはDTTによる処理時間を延長した。

(2) DNAプローブ

ジゴキシゲニン標識されたX染色体および18番染色体の α -サテライトに対するプローブDXZ1、およびD18Z1(Oncor社)を使用した。

(3) Fluorescence in situ hybridization

DTT処理した精子の処理は、分裂期のリンパ球と同様の方法で行った。精子DNAの変性は70%ホルムアミド/2×SSC (standard saline citrate, 1×SSC; 150mM NaCl/15mM クエン酸ナトリウム)、70°Cで2分間行い、その後70%エタノール、100%エタノールで脱水した。プローブは溶解した後、一枚のスライドガラス当り $1.5 \mu\text{l}$ をとり、Hybisol $\cdot 30 \mu\text{l}$ (Oncor社)に加えてよく攪拌し、70°Cで5分間変性させた後、4°Cで急冷した。変性させたプローブを $30 \mu\text{l}$ 各スライドに播種した後、パラフィルムをかけて湿潤箱に入れ、37°Cで約12時間ハイブリダイズした。スライドは65%ホルムアミド/2×SSC、43°Cで15分間洗浄した後、2×SSCで5分、1×SSCで5分、4×SSCで5分洗浄した。検出にはFITC (fluorescein isothiocyanate)で標識された抗ジゴキシゲニン抗体を用いて行った。標識された抗ジゴキシゲニン抗体を含む溶液 $30 \mu\text{l}$ を標本に播種し、パラフィルムをかけて湿潤箱の中で45分間染色した。染色終了後、4×SSCで5分、4×SSC/0.1%Tween20で5分、4×SSCで5分洗浄し、さらに2×SSCで5分間洗浄した。染色体および精子頭部のDNAへの対比染色はPropidium iodide (PI; $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$)で行った。

2, シグナルの検出法について

シグナルの検出は蛍光顕微鏡 (Nikon FXA) を用いて行った。FITC用のシングルバンドパスフィルタを使用してシグナルの検出を行った。

FISH法を使用して染色体の数を算定する場合、とくに、核の大きさが小さい細胞においては、蛍光顕微鏡によって検出しているシグナルが一つなのか二つなのか判別に困難な場合がある。Williamsら(1993)の方法¹⁴⁾に従いシグナル検出のための基準を設定した。2個のシグナルがコンパクトであり、少なくともシグナル一つの大きさ以上距離が離れている場合に、シグナルが2個である判定した。シグナルがにじんではっきりとは判定できない検体や、核の表面がぼやけて境界がはっきりしていないものについては、判定不能な検体として除外した。

精子のシグナルのカウントは一つの染色体プロ

ブあたり2,000以上の精子において検出し、症例あたりは4,000以上の精子においてシグナルを検出した。

3, 統計処理について

洗浄前後のX精子の数は χ^2 適合度検定によって検定し、洗浄前後のD18Z1のシグナルを2個有する精子の数は、Fisherの直接確率計算法を用いて検定した。

結 果

PBSおよび80%パーコールを攪拌連続密度勾配法で洗浄処理した精子のX精子の頻度、および、D18Z1のシグナルを2個有する精子の頻度を表1に示した。PBSで洗浄した精子においてDXZ1陽性の精子は48.0%~53.7%、80%パーコールを用いて洗浄した精

表1. PBS洗浄精子と80%パーコール洗浄精子におけるX精子の頻度、およびD18Z1のsignalを2個認める精子の頻度

	Donor	A	B	C	A-p	B-p	C-p
精子比率 (%)	DXZ1 単一の signal	48.0*	53.7	51.2	58.2*	52.7	50.3
	D18Z1 2個の signal	0.23	0.17	0.36	0.33	0.20	0.27

A, B, CはPBSにて洗浄した精子であり、A-p, B-p, C-pは80%パーコール攪拌密度勾配法にて洗浄した精子である。

* $p < 0.01$ 洗浄前後のX精子の数を χ^2 適合度検定によって検討した。
donor Aは洗浄前後で有意なX精子数の変動をみとめた。

表2. 18番染色体disomy精子の頻度および、性染色体disomy精子の頻度 についての主だった報告 (FISH法による)

Reference	disomy (%)			
	18	XX	YY	XY
Williams et al. (1993)	0.08	0.04	0.06	0.09
Bischoff et al. (1994)	0.25	0.38	0.08	0.13
Guttenbach et al. (1994)	0.36			
Lu et al. (1994)	0.20			
Springs et al. (1995)	0.11	0.07	0.21	0.15
Coignet et al. (1996)	0.31	0.15		
Pellestor et al. (1996)	0.34			
本報告	0.25			

子においてDXZ1陽性精子は50.3%～58.2%であった。症例のAにおいてはPBSによる洗浄に比べてパーコールの洗浄によってX精子がやや増加する傾向を示した ($P<0.01$)。症例B, Cにおいては、パーコールの洗浄でX精子の比率に変化を認めなかった。またD18Z1を用いてD18Z1のシグナルを2個有する精子の頻度を検討したが、PBSで洗浄した精子においてはD18Z1のシグナルを2個有する精子は0.17～0.36%、80%パーコールを用いて洗浄した精子では0.20～0.33%であった。どの症例においても、D18Z1のシグナルを2個持つ精子は、PBSの洗浄とパーコールによる洗浄で変化を認めなかった ($P>0.05$)。

考 察

X精子とY精子の選別については、パーコール多層不連続密度勾配法⁷⁾、albumin gradientによる方法⁸⁾などが報告されていた。これらの方法が報告された時点では、精子の分離効率の評価法としてキナクリン染色を用いてX精子とY精子の判別がなされていた。しかし、DNAプローブを用いたFISH法が精子や卵子に応用されるようになり、精子の選別法がより特異性の高い方法を用いて改めて検証され、また、キナクリン染色によるX精子とY精子の判別の不確実であることも指摘されてきた⁹⁾。精子分離による検討ではalbumin gradientによる精子の選別はFISH法の解析結果によると効果はないという報告があり¹⁰⁾、また、多層パーコールによる精子の選別もX精子が集まる傾向はあるものの、過去の報告ほどの性の偏りはないとの報告も見られる¹¹⁾。今回の検討は精子の性分離を目的とした処理法ではなく、異物や精漿除去を目的として行われている攪拌連続密度勾配法に関する検討であるが、X精子の頻度は症例Aでパーコールの洗浄によってX精子の増加を認めたが、他の症例では洗浄の前後で有意差を認めなかった。このことは、80%パーコールの精子処理において、症例によっては性の偏りがわずかに生じる可能性があるものの、すべての症例に認められる傾向ではないと考えられた。また、80%パーコール攪拌連続密度勾配法洗浄によるX精子の増加があるとすれば、X精子がY精子に比べて選択的に集められた機序は、DNA量増加による比重の増加によるのか、精子形態や細胞表面の極性などの個体差によって生じているのか、今後も検討する必要があると考えられた。

精子と染色体異常についてはいくつかの報告があるが、不妊症の患者の精子にdisomyが増加していな

いという報告¹⁵⁾と、高度の乏精子症と奇形精子を持つ患者の精子にはdisomy精子が多く含まれているとの報告¹⁶⁾の両者があり、まだ明らかな結論は出ていない。また、顕微授精によって生まれてきた新生児の疫学的な報告をみても、顕微授精と体外受精および一般の新生児集団とを比べて、顕微授精による新生児の中には、染色体異常でもとくに性染色体の異常が増加するとの報告⁶⁾がある一方で、外表奇形および染色体異常の頻度は変わらないとの報告もある⁵⁾。ここでは、体外受精の精子洗浄および人工授精における精子洗浄によく用いられている80%パーコールを用いた攪拌密度勾配法による精子洗浄により、disomy精子が、選択的に集められてしまう可能性はないかについて検討したが、18番染色体のシグナルを2つ持つ精子の増加は、パーコール処理によっては認められなかった。表2に過去のFISH法による18 disomyおよび性染色体のdisomyを検索した主な報告をまとめた^{14,17-22)}。18番染色体disomy精子の頻度は0.08～0.36%となっている。今回我々の示した結果はsingle-color FISHによる検討であるため、disomy精子とdiploidy精子の判別ができなため、真の18 disomyの精子の頻度は表1の結果より低いと考えられる。このことを考慮に入れて表2の報告と比べてみると、本報告と過去の報告の間に際だった差は認められないと考えられる。また、表2に示したようにmulti-color FISH法を用いれば、XX精子、YY精子、XY精子を判別することができる。multi-color FISH法によりswim-up法、glass wool法、パーコール法によって処理をした精子におけるdisomy精子の頻度を検討した報告によると、パーコール法によって処理をした精子ではややX染色体を持つ精子が増加するものの、性染色体のdisomyは増加していないとされている²³⁾。今後、顕微授精においては性染色体異常の頻度が高い可能性があり、顕微授精に供する乏精子症や奇形精子症の精子におけるdisomy精子の頻度を検討し、どのような症例において、disomy精子の頻度が高いかを明らかにしていく必要がある。

ここで得られた結果は、80%パーコールを用いた攪拌密度勾配法による精子洗浄により処理が行われた精子を用いて人工授精および体外受精を行った場合に、性の偏りは症例によってはやや生じる可能性があるものの、精子が原因となった18 trisomyの頻度は増加しないことを示している。流産や周産期異常を呈する可能性のある、13 trisomy、16 trisomy、21 trisomyや性染色体異常の原因となるdisomy精子

の頻度も、三春ら¹⁹⁾が検討しているように、種々の精子処理法によって影響されることがないかどうか今後検討していくことが必要であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに際し、本研究にご協力いただいた慶應義塾大学産婦人科の時澤公子、堀井雅子、茂木 香、斎藤栄美各氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Punjabi U, Gerris J, van Bijlen J, et al. (1990) Comparison between different pre-treatment techniques for sperm recovery prior to intrauterine insemination, GIFT or IVF. *Hum Reprod* 5 : 75-83
- 2) Scott L, Smith S (1997) Mouse in vitro fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation for assisted reproduction. *Fertil Steril* 67 :372-381
- 3) De Braekeleer M, Ferec C (1996) Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 2 : 669-677
- 4) Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, et al. (1996) Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia gactor gene on Y chromosome. *Lancet* 347: 1290-1293
- 5) Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A et al. (1996) Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI), with ejaculated epididymal and testicular spermatozoa and after replacement of cryopreserved embryos obtained after ICSI. *Hum Reprod* 11:121-155.
- 6) Liebaers I, Bonduelle M, Vanassche E et al. (1995) Sex chromosome abnormalities after intracytoplasmic sperm injection. *Lancet* 346: 1095
- 7) Kaneko S, Yamaguchi J, Kobayashi T et al (1983) Separation of human X- and Y-bearing sperm using percoll density gradient centrifugation. *Fertil Steril* 40: 661-665
- 8) Quinlivan WL, Preciado K, Long TL (1982) Separation of human X and Y spermatozoa by albumin gradients and Sephadex chromatography. *Fertil Steril* 37: 104-107
- 9) van Kooij R, van Oost B (1992) Determination of sex ratio of spermatozoa with a deoxyribonucleic acid-probe and quinacrine staining : a comparison. *Fertil Steril* 58: 384-386
- 10) Vidal F, Moragas M, Catala V (1993) Sephadex filtration and human serum albumin gradients do not select spermatozoa by sex chromosome: a fluorescent in-situ hybridization study. *Hum Reprod* 8 : 1740-1743
- 11) Wang HX, Flaherty SP, Swann NJ (1994) Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* 9 : 1265-1270
- 12) WHO (1992) WHO laboratory Manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus Interaction, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge
- 13) Kaneko S, Sato H, Kobanawa K, et al. (1987) Continuous-step density gradient centrifugation for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husband's semen. *Arch Androl* 19 :75-84
- 14) Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE (1993) Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2 : 1929-1936
- 15) Miharu N, Best RG, Young SR (1994) Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 93 : 502-506
- 16) In't Veld PA, Broekmans FJ, de France HF, et al. (1997) Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Human Reproduction* 12: 752-754
- 17) Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. [published erratum appears in *Cytogenet Cell Genet* 1995;69(3-4):189] *Cytogenet Cell Genet* 66: 237-243
- 18) Guttenbach M, Schakowski R, Schmid M (1994) Incidence of chromosome 3, 7, 10, 11, 17 and X disomy in mature human sperm nuclei as determined by nonradioactive in situ hybridization. *Hum Genet* 93: 7-12
- 19) Lu PY, Hammit DG, Zinsmeister AR, et al. (1994) Dual color fluorescence in situ hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;4;8) (a23;q27;q21). *Fertil Steril* 62: 394-399
- 20) Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH (1995) Aneuploidy in human sperm: results of two-and three-color fluorescence in situ hybridization using centromeric probes for chromosomes 1, 12, 15, 18, X, and Y. *Cytogenet Cell Genet* 71: 47-53
- 21) Coignet L, Girardet A, Andreo B, et al. (1996) Double and triple in situ chromosomal labeling of human spermatozoa by PRINS. *Cytogenet Cell*

- Genet 73: 300-303
- 22) Pellestor F, Quennesson I, Coignet L, et al. (1996) Direct detection of disomy in human sperm by the PRINS technique. *Hum Genet* 97: 21-25 (受付: 1997年12月15日)
- 23) Samura O, Miharu N, He H, et al. (1997) Assessment of sex chromosome ratio and aneuploidy rate in motile spermatozoa selected by three different methods. *Hum Reprod* 12: 2437-2442 (受理: 1998年1月14日)

Effects of a Continuous Percoll Gradient Procedure for Sperm Separation

Hironori Asada, Kou Sueoka, Tsuyoshi Hashiba, Masako Kuroshima,
Shinichi Tsuchiya and Yasunori Yoshimura

Department of Obstetrics and Gynecology
Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

The purpose of this study was to determine the effects of a continuous 80% Percoll density gradient procedure for sperm separation to the ratio of X-bearing sperm and the frequency of disomic sperm for chromosome 18. Semen samples were obtained from normal three donors. Controls and processed sperms (80% percoll fraction) were subjected to fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis with DNA probes. FISH was carried out with X-specific DNA probe (DXZ1) and chromosome 18 specific DNA probe (D18Z1). The X-bearing sperm rate of controls ranged from 48.0% to 53.7%. The X-bearing sperm rate of processed spermatozoa ranged from 50.3% to 58.2%. A significantly higher frequency of X-bearing sperm was observed in Percoll washed spermatozoa of one subject (the X-bearing sperm frequency was 48.0 : 58.2). No significant difference was found between control sperm and processed sperm for each donor in the distribution of disomy of chromosome 18.

Key words: percoll, sperm, continuous density gradient procedure, FISH (fluorescence in situ hybridization), disomy

出生前診断における医療実施者の意識と 着床前診断の意義

The Significance of Preimplantation Diagnosis and Awareness of Medical Workers towards Prenatal Diagnosis

慶應義塾大学産婦人科学教室

松田紀子	末岡浩	土屋慎一
Noriko MATSUDA	Kou SUEOKA	Shinichi TSUCHIYA
篠原雅美	小林紀子	吉村泰典
Masami SHINOHARA	Noriko KOBAYASHI	Yasunori YOSHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

出生前診断に伴い、異常児の診断を受けた際に生じる人工妊娠中絶の選択をめぐる問題が新たに浮き彫りになってきた。中絶に際して患者が受ける精神的、肉体的負担や苦痛は言うまでもないが、患者の選択に従って中絶を施行する医療従事者の側のストレスも無視することはできない。また、このような人工妊娠中絶を回避する手段として、新たに体外受精による初期胚から一部の細胞を採取して診断を行う着床前遺伝子診断技術が、欧米各国で臨床応用されてきている。我が国では未だ臨床実施はされておらず、臨床の場への導入にあたっては倫理問題等の解決すべき問題が残されている。

人工妊娠中絶施行における実施者側の意識を知る目的で、産婦人科医師、助産婦を対象としたアンケート調査を施行した。その結果、実施者は理由によっては中絶を容認する考えは持っているものの、中絶に際して何らかの精神的ストレスを感じている場合が多いことが明らかにされた。特に実際の施行者である医師においてその傾向が強かった。

また、中絶を回避し得る手段としての着床前遺伝子診断の導入に対して、高い割合の者が積極的な考えを抱いていることが明らかになった。ただし、これに賛意を示す者の多くがその条件として、倫理、社会的問題や、技術の精度、安全性の問題の解決を前提として挙げた。

キーワード：出生前診断、着床前診断、人工妊娠中絶、医師、助産婦

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 119-124, 1998)

緒言

妊娠成立後に実施する出生前診断が我が国に導入されて、既に30年以上の歴史を有している。しかし、出生前診断は結果によっては出産か人工妊娠中絶かの選択を迫られることを前提として行われおり、それに伴う様々な問題が新たに生じてきた。

法的矛盾を問題として、優性保護法における胎児条項の導入に関する必要性が1970年代より常に論じ

られてきたが、未だ解決をみていない。1996年に優性思想に基づく規定の削除を目的にその一部が改正され、「母体保護法」と改められた際にも胎児条項の導入は認められなかった¹⁾。

また、羊水穿刺を中心とする出生前染色体検査は、診断が完了した時には既に妊娠中期に達しており、限られた時間内での出産、人工妊娠中絶の選択や、実際の中期中絶の施行に伴う母体の精神的、身体的な負担や侵襲が重要な課題と考えられてきた²⁾。実

際にイギリスの報告では、ダウン症と診断された者の92%は人工妊娠中絶を選択したという。

しかし、人工妊娠中絶の施行にあたり精神的ストレスを感じるのは、患者のみではないであろう。実際に中絶を施行する医師やそれに立ち合う助産婦などは人工妊娠中絶施行にあたっての決定権を持ち合わせておらず、彼らが受ける精神的負担や人工妊娠中絶に対する倫理的、職務的意識は多様にわたるであろうことが推測される。

出生前診断は妊娠が成立してからその妊娠に対しての正常性を診断する方法であり、その帰結として中絶の問題が生じるのに対して、体外受精技術の急速な発展と普及によって新たな概念が生まれた。それが着床前遺伝子診断である。1989年にイギリスのHandysideらがX連鎖劣性遺伝性疾患を対象にPCR法によって性別診断を行ったのを臨床応用の初めとして³⁾、1992年にはCystic fibrosisの疾患遺伝子診断を着床前診断で行い、正常な女兒を誕生させている⁴⁾。現在、着床前診断に関する規制のないイギリス、アメリカを中心に次々に胚生検、体外受精の技術を用いた着床前遺伝子診断が臨床の場ですすめられ、その安全性、信頼性が裏づけられてきている^{8,9)}。しかし我が国においては、まだその臨床応用にあたって倫理的、社会的問題や診断技術の精度など解決すべき多くの問題を抱えているのが現状である。

以上より今回我々は医師、助産婦を対象として、今まで顧みられる機会の少なかった人工妊娠中絶実施者側の意識調査を行い、その精神的負担や抵抗の有無について検討した。また、人工妊娠中絶を回避するための新しい技術として、近い将来我が国においても臨床応用の可能性がある着床前診断に関する質問を同時に行い、施行する側の医師や助産婦がこれに関してどのような意識や理解を有しているのかを調査した。

対象および方法

アンケート調査は、慶應義塾大学病院、市中の総合病院、産婦人科専門病院、および個人の診療所に現在勤務している産婦人科医師、助産婦の中から各60名を無作為抽出し、調査の対象とした。アンケートの質問事項は、主として人工妊娠中絶の施行に関する現状や意識を問う内容と、出生前診断および着床前診断に関する内容との2部より構成される。質問に対する回答は主に、提示した選択肢の中からひとつの回答を選んでもらう形式をとり、該当するものがない場合には「その他」として自由記述を求め

ることとした。

結 果

1. 回答者の属性

対象となった医師の平均年齢は41.51 ± 11.62(M ± SD)歳、男女比3 : 1、医師としての経験年数は1年未満から45年にわたり、一方助産婦の平均年齢は30.05 ± 8.56歳(M ± SD)、経験年数は1年未満から30年であった。

2. 人工妊娠中絶の施行に関する実態

人工妊娠中絶の施行の有無に関する質問に対し、実際に施行していると答えた医師は60人中37人(61.7%)、施行している施設に勤務していると答えた助産婦は60人中52人(86.7%)であった。施行していない医師、助産婦はその理由として所属している施設の方針であることを挙げており、個々の意志によると答えた者はいなかった。

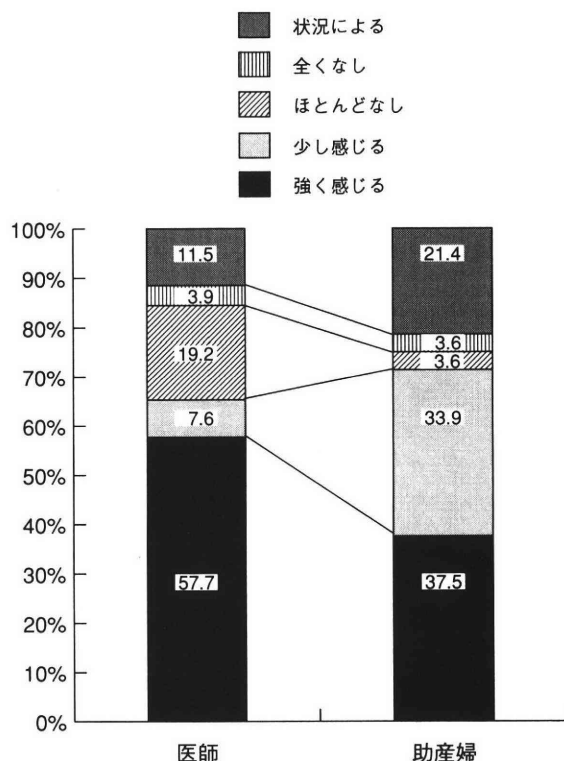


図1. 人工妊娠中絶に対して実施者が感じる精神的負担度とその割合：精神的負担度は5段階で評価した。

3. 人工妊娠中絶の施行に対する意識、および精神的負担

実際に人工妊娠中絶を施行している医師、およびそれに立ち合う機会のある助産婦を対象に、「人工妊娠中絶を施行することに対して、あなた自身、精神的負担を感じますか」という質問をし、その答えとして5つの選択肢を提示した。その結果として、人工妊娠中絶を施行するにあたって何らかの精神的負担を感じている者が半数以上におよび、とくに実際の施行者である医師における負担がより強いという傾向を認めた。(図1)

次に「人工妊娠中絶に対してどう考えますか」という問いに、中絶を認めるものから強く反対するものまで5つの選択肢を用意したところ、図2に示す結果を得た。医師、助産婦とも、「如何なる理由によっても施行すべきではない」と強い否定的意識を持っている者は約3%に過ぎなかったが、逆に「施行してもよいと思う」との肯定的な考えである者も医師、助産婦においてそれぞれ14.8%、3.1%にとどまり、理由により、あるいは仕事であるために仕方がないという意識を持っている者が大きな割合を占めた。

さらに、実際に人工妊娠中絶を施行する場合に、実施者が強くストレスを感じる中絶の適応を、提示

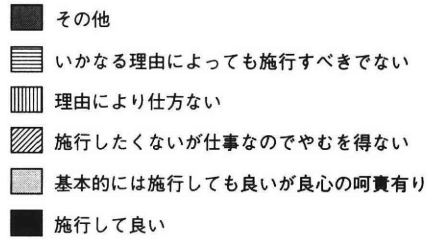


図2. 実施者が人工妊娠中絶施行に対する意識

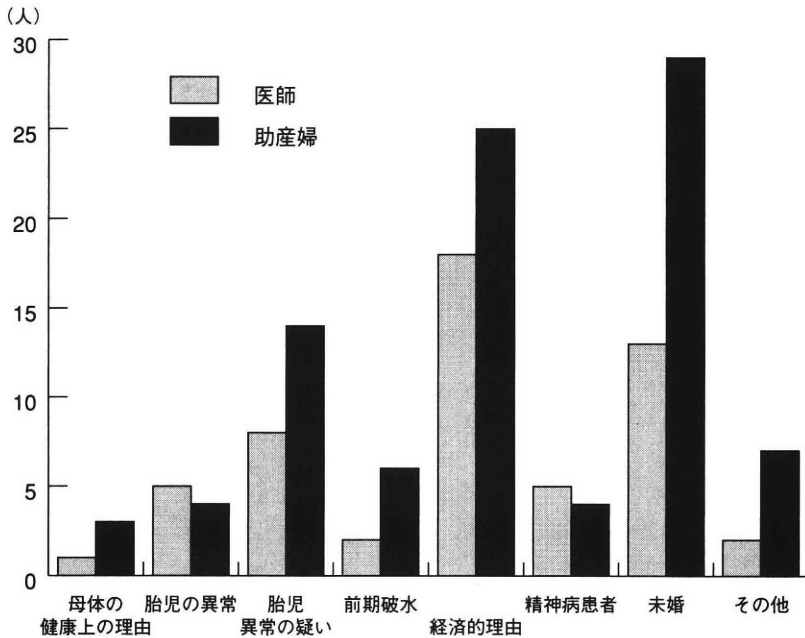


図3. 人工妊娠中絶の適応によって実施者が精神的ストレスを感じる頻度

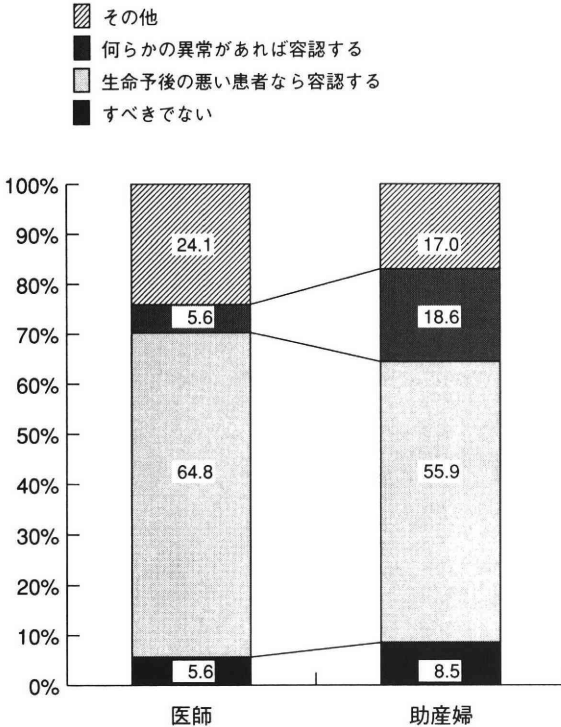


図4. 出産前診断で児に異常を有すると判断された場合の中絶に関する実施者の意識

したいいくつかの選択肢の中から複数回答可能という形式で選んでもらう質問についての結果を図3に示す。医師に比べ助産婦の方が、より複数の答えを選択する傾向を認めたものの、いずれにおいても、経済的理由、未婚など母体やそのカップルの個人的、社会的適応における中絶に強いストレスを感じているという共通の結果を得た。またその他として挙げられた回答の中にも「母体の自分勝手な理由」、「予想外の妊娠」等、同様の内容を意味するものが多く認められた。逆に胎児の異常や前期破水など、胎児の母体外での生存が困難である場合や、母体側の理由であってもそこに医学的な原因を認める場合の中絶におけるストレス度はそれ程高くはないという傾向も医師、助産婦において共通していた。

4. 出生前診断の施行状況、およびそれに伴う人工妊娠中絶に対する意識

回答者のうち、出生前診断を実際に行っている施設に勤務する医師、助産婦の割合は合計すると85.0%（うち医師においては76.7%、助産婦においては93.3%）であり、そのほとんどが実際の診断方法と

して超音波断層法（98.3%）、羊水穿刺（86.4%）を挙げており、臍帯血穿刺（17.5%）、絨毛採取（5.8%）がこれに続いた。

次に、出生前診断によって胎児に異常を有すると判断された場合の人工妊娠中絶に関する意識を調査した結果は図4のとおりであった。医師、助産婦のいずれにおいても、診断された胎児の疾患が生命予後の悪いものである場合は中絶を容認するという回答が大きな割合を占めた。また、「その他」とする回答の中では、ケースバイケースであることを強調する回答、あるいは結論を迷っている回答が目立った。

5. 着床前遺伝子診断、選択的胚移植に関する意識

着床前診断に関しては、まず「着床前遺伝子診断をご存じですか」という形で関心度を問う質問をしたところ、知っていると答えた者の割合は医師、助産婦においてそれぞれ84.5%、73.7%であった。続いて着床前遺伝子診断による選択的胚移植についての賛否を尋ね、図5に示す結果を得た。「条件により賛成」と答えた者の占める割合は医師、助産婦のいずれにおいても半数を超えており、「賛成」と答えた

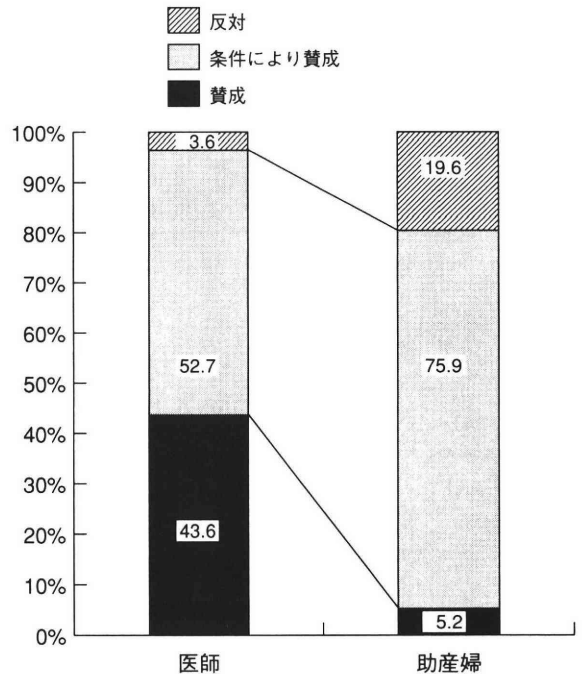


図5. 着床前遺伝子診断による健全胚の選択的胚移植についての賛否

者と合わせると、医師においては98.3%、助産婦においても80%以上と高率であった。「条件により賛成」と答えた者はその条件として、倫理的社会的問題の解決、診断精度の向上、安全性の確立を挙げる者が大部分を占めた。反対者も一様に、これらの問題の未解決をその理由として挙げていた。

考 察

我が国における人工妊娠中絶件数の動向は諸外国と異なり、年々減少傾向にある^{5,6)}。これは、正しい避妊法の普及と出生率の減少によるところが大きいと考えられる。しかしその一方で、出生前診断が普及しつつあることによって異常児の診断を受けた結果としての妊娠中期における人工妊娠中絶の増加が問題となってきた。とくに治療法の確立していない重篤な遺伝性疾患のキャリア夫婦においては、この悲しい選択を繰り返し強いられる可能性があり、中絶に伴う精神的、肉体的負担の大きさを考えると、現実的には出産をあきらめることに解決法を見出す以外に術がないと考えられる場合もあったことは事実である。中絶によって患者自身やその家族が受ける苦痛は想像以上のものがあり、それに関する意識調査や心理的研究は近年盛んに行われてきた。しかし、今回の調査により、中絶を実施する側である医師や助産婦にも、その適応や状況によって程度の違いはあるものの、中絶の施行に際して何らかの精神的負担を感じていることが明らかになった。とくに実際に中絶を施行する医師においてその傾向が強く表れたことは注目に値する結果といえよう(図1)。また、人工妊娠中絶に対して医師においては、仕事であるがために止むを得ず施行しているという意識を持っている者が多かったのに対して、女性である助産婦においては、「理由によっては仕方ない」と同じ女性の立場を考慮する意見が多数を占めたことは興味深い。中絶の適応の中では、胎児の異常がある場合に実施者の感じるストレスは高くはなく、中絶により生じる優生思想の問題が取りざたされているなか、実施者においては胎児の異常を中絶の適応として容認する傾向を示したといえる。

しかし、その一方で、出生前診断によって児に異常が認められた場合でも、その異常が生命予後の悪い疾患でなければ中絶を容認し難いという結果も得られており(図4)、胎児の生命権や、障害児を出産することの危惧から中絶を希望するという患者の傾向に対する問題意識を窺わせる。また、その他の回答の中に、「本人の希望が強ければ容認する」という

意味合いのものが多く存在したことはこれに対立するものであり、女性の自己決定権に基づく考えであるといえる。

図5において着床前遺伝子診断に賛成を示した者の割合が高かったことは過去の調査の結果を裏付けるものとなった⁷⁾。しかし、医師において、新しい技術を積極的に受け入れようとする傾向がより強く表れたことは、図1で医師の方が中絶に対して強い精神的負担を感じているという結果と考え併せると注目すべき事実である。恐らく人工妊娠中絶にあたってより強くストレスを感じている医師の方が中絶を回避する手段である新しい技術の導入を切望しているのであろう。

出生前診断実施の賛否に関する議論は時代的な背景の変遷とともに遂時変化を遂げている。異常であるという診断の帰結として出産を断念する例がないとはいえないが、障害者でも社会生活が可能である社会の建設を求めべきことは理想である。しかし現実の問題を回避するために、着床前診断の意義は極めて強いと認識された。着床前診断の臨床応用にあたり、倫理的、社会的問題、診断技術の精度、安全性などの問題について我が国では様々な因子を十分考慮したうえで、着床前診断の実施に向けて慎重な討議が切望される。

文 献

- 1) 日本母性保護産婦人科医会：指定医必携（臨時版）：1-6.1998
- 2) 柘植あづみ：出生前診断の受診をめぐる状況・生殖技術研究チーム 研究報告書.生命倫理研,1992
- 3) Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, et al (1989): Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1:347-349
- 4) Handyside AH, Lesko JG, Tarin JJ, et al: (1992) Birth of a normal girl after in vitro fertilization and preimplantation diagnostic testing for cystic fibrosis. *N Engl J Med* 332:905-909
- 5) Demographic Yearbook.1993
- 6) 厚生省児童家庭局母子衛生課監修：母子保健の主なる統計.1994
- 7) 白井泰子(1996)：受精卵の着床前診断に内在する倫理的・社会的問題の検討. *精神保健研究* 42：61-69
- 8) 櫛島次郎他(1994)：先進諸国における生殖技術への対応. *Studies 生命・人間・社会* No.2, 三菱化学生命科学研究所
- 9) Iakovos Soussis, Joyce C. Harper, Alan H. Handyside et al. (1996) *Obstetric outcome of pregnancies re-*

sulting from embryos biopsied for pre-implantation diagnosis of inherited disease. *Brit J Obstet Gynecol* 103:789-794

(受理：1997年12月18日)

(受付：1998年1月15日)

The Significance of Preimplantation Diagnosis and Awareness of Medical Workers towards Prenatal Diagnosis

Noriko Matsuda, Kou Sueoka, Shinichi Tsuchiya,
Masami Shinohara, Noriko Kobayashi and Yasunori Yoshimura

Department of Obstetrics and Gynecology
Keio University, School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan

With the increase in prenatal diagnosis, attention has focused on the ethical problems surrounding abortions following diagnosis of an abnormal fetus. The emotional burden and physical pain of the patient is understandable; however, the stress endured by medical workers performing the abortion under the patient's discretion cannot be ignored. Clinical applications of new preimplantation genetic diagnosis techniques have been introduced in western countries as a means to avoid unnecessary abortions. Various issues centering on these diagnostic methods must be resolved in Japan prior to their clinical application.

In order to correctly interpret the discernment of medical workers who perform abortions, a questionnaire towards gynecologists and midwives was carried out. The results showed that most medical workers, although they may understand the necessity of abortions for various reasons, felt some level of emotional stress towards the abortion procedure. A tendency towards greater stress was found among physicians who actually carry out the procedures.

This survey also found that a large percentage of these workers strongly agreed to the introduction of preimplantation genetic diagnosis. However, the majority who agreed also consented on the need to correctly resolve the ethical, social, technical accuracy, and safety problems surrounding these new diagnostic techniques.

Key words: prenatal diagnosis, preimplantation diagnosis, abortions, gynecologists, midwives

Establishment of Routine Cryopreservation of Spermatozoa in the Japanese Monkey (*Macaca fuscata*)

Ryuzo TORII

Institute for Experimental Animals, Shiga University of Medical Science
Shiga 520-2192, Japan

Yoshihiko HOSOI and Akira IRITANI

Department of Genetic Engineering, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology,
Kinki University, Faculty of Human Sciences
Wakayama 649-6493, Japan

Yoshiyuki MASUDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Shiga University of Medical Science
Shiga 520-2192, Japan

Hideo NIGI

Faculty of Human Sciences, Osaka University
Osaka 565-0871, Japan

Abstract: Routine methods for cryopreservation of spermatozoa in the Japanese monkey were investigated. Semen collection by rectal electro-stimulation was carried out in 15 male monkeys during the mating season. Coagulated semen was liquefied in a CO₂ incubator at 37°C for 30 min. A multi-layered Percoll solution of 60 and 80% separated conveniently dead sperms and other impurities, isolating sperms with high motility. After BSA/BWW medium rinse, glycerol equilibration was carried out and the sperms were cooled for liquid nitrogen storage with TTE-G medium or commercially available TYB medium. Average thawed sperm motility vis-à-vis pre-freezing motility was 70.5±9.1% versus 82.9±8.5% for TTE-G and 66.5±11.6% versus 80.3±9.6% for TYB, respectively. Both of TTE-G and TYB were useful in the cryopreservation of Japanese monkey spermatozoa.

Key words: cryopreservation, spermatozoa, Japanese monkey

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 125 - 131, 1998)

Introduction

The Japanese monkey is a seasonal breeder and both sexes experience a general decline of sexual function during the summer non-mating season for depression of the hypothalamo-pituitary-gonad axis^{1,2)}. The decrease of sperm count and sperm motility in the male, cessation of ovulation and menstruation in the female, clearly depressed reproductive activity and

failure of pregnancy in the non-mating season were well documented¹⁻¹⁰⁾. The Japanese monkeys don't become pregnant except for 3 to 5 months in the winter mating season, and they give births generally every other year. Artificial breeding is essential for domesticating and maximizing its use as a research model in the Japanese monkey.

In some attempts to establish the year round indoor artificial breeding method, we previously investigated

vaginal artificial insemination during the mating season and got successful pregnancies and deliveries¹¹ but in non-mating season, only one female became pregnant and resulted in early abortion¹⁰. The reason of reduction of insemination rate during the non-mating season was thought to be lowered sexual function in both sexes. Especially in the males, the reduction of sperm survival, motility and count were very important problems. The collection and preservation of great quantity of high grade semen from fit breeders during the mating season are thought to be a basic procedure integral to the success of future advances in artificial breeding method, i.e., in-vitro fertilization (IVF), intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI), etc.. Sperm or semen preservation methods have already been established in some macaca species (the rhesus monkey^{12,13}; the cynomolgus monkey¹⁴⁻¹⁷; the Japanese monkey¹⁸), the baboon¹⁹, the gorilla²⁰, the chimpanzee²¹. Sankai et al.¹⁷ collected sperms from the cynomolgus monkey epididymis and cryogenically preserved it. He applied the same procedure to the Japanese monkey¹⁸. We will now report successful results of routine semen collection method via electro-stimulation and cryopreservation method of spermatozoa in the Japanese monkey expanding on Sankai et al.'s method¹⁷.

Materials and Methods

1. Subjects and Environments

The investigation was carried out in the period from November to February, which was corresponded to the mating season of the Japanese monkey. Fifteen adult male Japanese monkeys were used in the study. All of them were over seven years old, weighing from 9.6 to 15.7 kg. All animals were captured as the pest in Shiga prefecture and placed in the custody of Shiga University of Medical Science. Husbandry of animals was carried out in accordance with the guidance of the Japanese Association for Laboratory Animal Science and the Primate Society of Japan, and the provisions laid out in Guide for Animal Experimentation at Shiga University of Medical Science and Guidelines for the Husbandry and Management of Laboratory Animals.

Temperature and humidity in the animal room was

maintained at $23 \pm 1^\circ\text{C}$ and $55 \pm 5\%$, respectively. Animals were housed in individual cages with size of $W655 \times D750 \times H1,250$ or $W920 \times D700 \times H850$ mm. A 12-hour artificial light cycle (0800 to 2000) was maintained. Each animal was fed 20g/kg of commercial pellet monkey chow (CMK-1, Japan CLEA, Co., Ltd.) in a.m., supplemented by 50 to 100g of sweet potato and one banana in p.m.. Water was supplied *ad libitum* by automatic watering system.

2. Sperm Collection and Cryopreservation Procedures (Fig. 1)

Rectal electro-stimulation method^{10,24} was conducted for semen collection under the anesthesia by intra-muscular injection of a mixture of ketamine hydrochloride (Ketalar, Sankyo Co., Ltd.) of 5mg/kg and xylazine hydrochloride (Seractal, Bayer Japan Co., Ltd.) of 1mg/kg. Briefly, the rectal probe was inserted into the anus and AC at 5v was applied three times in an on-off pattern of three and five seconds, respectively. If collection failed at 5v, the same procedure was repeated at 10v, 15v, and finally 20v until collection was completed. A coagulate was observed in most of collected semen. Coagulated semen was liquefied in a CO₂ incubator at 37°C for 30min. The liquefied part of semen was diluted to 2 to 2.5 ml with BWW containing 0.3% BSA medium (hereinafter referred to as BWW/BSA medium), and then treated with Percoll (Pharmacia Co., Ltd.). Percoll was diluted with Hank's solution (Nissui Co., Ltd.) and distilled water to make solutions of 50, 60, 70, 80 and 90% concentrations. We investigated firstly multi-layering of 50, 60, 70, 80 and 90% Percoll to examine the best layer including the living spermatozoa with good motility, and investigated next only two layers of 60 and 80% to simplify the method. One ml of Percoll solution of each concentration in the former and 2.5ml of 60% and 80% solution in the latter were put in the test tube in order of height of concentration and finally the semen-medium mixture was carefully placed on the surface of last percoll layer. The multi-layered solution was centrifuged at 1,300 rpm (300g) for 20min at room temperature. The layer of BWW/BSA medium and each layer of Percoll solution were aspirated, and the contents of each layer was observed microscopically. The layer including spermatozoa was washed by adding 5 to

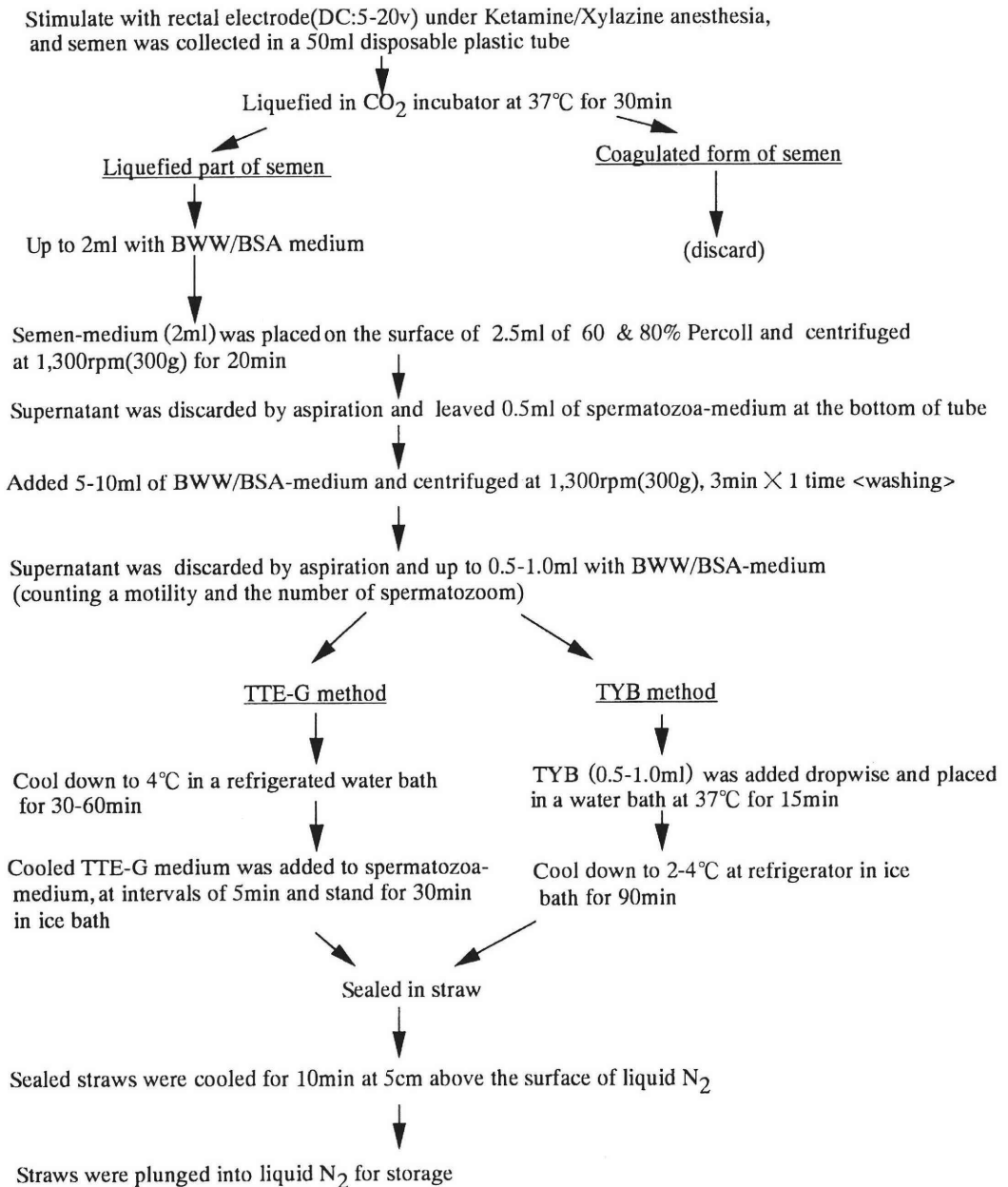


Fig.1 Flow chart of cryopreservation method of spermatozoa for the Japanese monkey

10ml of BWW/BSA medium and centrifuging at 1,300 rpm (300g) for 3min. Spermatozoa were prepared in concentrations of $1-2 \times 10^7$ sperm/ml. In the case of TTE-G⁽⁶⁾ for cryopreserving medium, spermatozoa-medium were cooled down in a refrigerated water bath at 4°C for 30, 60, 90 and 120min to examine the thawed sperm motility in each cooling down period. After cooling down, an equal volume of cooled TTE-G to the spermatozoa-medium was divided into five portions, each of which was added at five minutes intervals to the cooled spermatozoa-medium. After mixing, the spermatozoa-freezing medium mixture was left for 30 minutes in the ice bath and glycerol equilibration was carried out. In the case of the commercially available TYB (TEST Yolk Buffer with Glycerol; Irvine Scientific Co., Ltd.) for cryopreserving medium, glycerol equilibration was carried out in accordance with the reagent's instructions, i.e., TYB was added in equal volume to the spermatozoa-medium by dropping, then spermatozoa-freezing medium mixture was placed in a water bath at 37°C for 15min, left in an ice bath for 90 minutes and finally glycerol equilibration was carried out. Immediately after glycerol equilibration spermatozoa-freezing medium was sealed in 0.25 or 0.5 ml straws, suspended over liquid nitrogen for approximately 10min then thrust into the liquid nitrogen.

3. Spermatozoa Thawing Method

At first, two thawing methods were investigated: In the one method the straw was plunged into a water bath at 37°C immediately after removal from the liquid nitrogen and in the another the straw was set at room temperature for 30 seconds before plunging it into the water bath. We confirmed that the latter method was better in the motility of recovered sperm. So, the latter method was used in the present study. After thawing the straw was cut, the sperm was transferred to a schale pre-heated to 37°C, and the sperm motility was evaluated in a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments Co., Ltd.).

Results

1. Electro-stimulation

Most of 15 individuals ejaculated via rectal electro-stimulation at 10v or 15v. Volumes of collected semen varied from individual to individual ; 0.2 to 0.5g in in-

dividuals with small volume, and 3-8g in ones with large volume. The semen was liquid wholly in some individuals but it was only coagulate in others. Collection was carried once or twice per lunar month but the volume/condition of the sample from the same individual did not vary significantly from procedure to procedure.

2. Management and Cryopreservation of Sperms

Multi-layering of 50, 60, 70, 80 and 90% Percoll was investigated in order to determine the ideal concentration to remove dead spermatozoa and impurities from the semen sample. After centrifuging at 1,300 rpm (300g) for 20min living spermatozoa displaying the best motility were found between the 80 and 90% layers. Dead spermatozoa and other impurities were found between 60 and 80%. Nutritive fluids, etc., was found above 50% and nothing was found below 90%, i.e., the bottom of the test tube. By centrifuging at 300g for 20min using two levels of 60 to 80% Percoll we could isolate the live, most highly motile spermatozoa at the bottom of the test tube from dead spermatozoa or other impurities included in 60 and 80% layers.

The best cooling down period ranging from 30min to 120min were investigated using the TTE-G buffer. Significant differences in the sperm motility after thawing were not found between 30min ($78.80 \pm 5.45\%$) and 60min ($77.75 \pm 6.72\%$) cool down period. However, the sperm motility slightly reduced for spans of over 90min ($64.80 \pm 18.47\%$ in 90min and $60.60 \pm 12.60\%$ in 120min). Therefore, we found 30-60min as an appropriate cool down period for TTE-G. Good results were obtained by using TYB in accordance with commercial instructions.

3. Post Cryopreservation Sperm Motility (Table 1)

Motility of TTE-G and TYB buffered spermatozoa immediately following recovery from the liquid nitrogen are indicated in Table 1. Average thawed sperm motility vis-à-vis pre-freezing motility for TTE-G were $70.5 \pm 9.1\%$ versus $82.9 \pm 8.5\%$ and 66.5 ± 11.6 versus $80.3 \pm 9.6\%$ for TYB. Significant difference in performance between the two buffers was not indicated.

Table 1 The comparison between before and after cryopreservation of sperm motility using TTE-G or TYB medium in Japanese monkeys at mating season

	n	before	after
TTE-G	15	82.9 ± 8.5%	70.5 ± 9.1%
TYB	6	80.3 ± 9.6%	66.5 ± 11.6%

Discussion

The severe decline in sexual function and contingent reduction in sperm motility and survivability in the Japanese monkey during the non-mating season necessitates the development of preservation methods for spermatozoa collected during the mating season for artificial insemination/in vitro fertilization (IVF) during the non-mating season. Various problems of cryopreservation methods in the Japanese monkey were resolved in the course of this investigation.

The collection method of semen have already been established in some macaca species (the rhesus monkey^{12,13,22,23}); the cynomolgus monkey^{14,16}); the Japanese monkey^{10,18,24}); the Taiwan monkey²⁵); the Lion tail macaque²⁶). Sankai et al.^{17,18} collected spermatozoa from the tail of epididymis in cynomolgus monkey and Japanese monkey and cryogenically preserved it. Those epididymides were removed from male¹⁸). This method seemed not to be appropriate for animal welfare because the male sexual function will be damaged after removing. We could collect semen routinely and repeatedly from the same animal by the semen collection method via electro-stimulation in the present study. The sperm collection via rectal electro-stimulation, as opposed to the penile method, does not require training and may be carried out whenever necessary. However, most of semen obtained by this method were coagulated due to introduction of products of the prostate and seminal vesicle. We incubated the coagulate for 30min at 37°C for liquefaction and collected only swim-up sperms.

The sample was Percoll-treated to segregate dead spermatozoa, impurities, etc.. Sankai et al.^{17,18} reported that 90% Percoll was suitable for collection of good spermatozoa in cynomolgus monkeys and Japanese

monkeys. We used a 60 and 80% multi-layered Percoll because no sperm was found below 90%. The present multi-layered method separated completely dead spermatozoa and impurities and isolated conveniently highly motile and viable spermatozoa at the bottom of the test tube after 20min in the centrifuge at 300g. The difference in Percoll concentration between our investigation and Sankai et al. may be due to their centrifuging method. The gravity of 800g by Sankai et al. was about three times as high as that in the present study. We also investigated preliminary high gravity centrifuging, and we experienced high morbidity and low motility of sperms at high gravities and therefore we selected the present gravity of 300g.

Glycerol equilibration was carried out using the same TTE-G buffer used by Sankai et al.^{17,18}. However, our method was slightly different from that of Sankai et al.. We did not add TTE to the spermatozoa solution. We found that the spermatozoa were diluted by the later addition of TTE and entire replacement of BWW with TTE was very difficult if the spermatozoa were put in BWW firstly at percoll treatment. And more, the repeated centrifuges for replacement burdened the sperms excessively. Additionally, our goal is to establish an easier routine procedure. So, we adopted the method to add TTE-G to the BWW directly by eye dropper.

70.5/82.9% for TTE-G and 66.5/80.3% for TYB of thawed sperm motility were exceedingly good. Successful inseminations and divisions of the zygote were achieved in a preliminary IVF study by using the sperms cryogenically preserved by the present methods. Average rate of insemination and cleavage of fresh spermatozoa vis-à-vis thawed spermatozoa was 65% versus 50% for insemination and 91% and 78% for cleavage (reported elsewhere). We regarded our cryogenic preservation method as actualized one.

While the thawed sperm motility for the commercial buffer TYB was slightly lower than those for TTE-G, the spermatozoa obtained by TYB method were sufficiently available for IVF. Now, we will collect Japanese monkey spermatozoa during the winter mating season by the present method and prepare a spermatozoa bank for IVF.

Acknowledgments

This investigation was made possible by Ministry of Education Grant in Aid for Scientific Research (c) No. 07680914. We would also like to express our gratitude to Mr. T. Nakagawa for his ceaseless efforts managing animal care and assisting in the investigation.

References

- 1) Torii R and Nigi H (1993) Hypothalamo-pituitary-ovarian function in female Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) in the non-mating season. *Exp Anim* 42:143-149
- 2) Torii R and Nigi H (1994) Hypothalamo-pituitary-testicular function in male Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) in non-mating season. *Exp Anim* 43:381-387
- 3) Tiba T and Nigi H (1975) Unregelmäßig aufgebaute Zellgemeinschaften des Samenepithels beim free-ranging Japanischen Makak (*Macaca fuscata*) in der Paarungszeit. *Primates* 16:379-398
- 4) Nigi H (1975) Menstrual cycle and some other related aspects of Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Primates* 16:207-216
- 5) Nigi H (1976) Some aspects related to conception of the Japanese monkey (*Macaca fuscata*). *Primates* 17:81-87
- 6) Nigi H, Tiba T, Yamamoto S, et al. (1980) Sexual maturation and seasonal changes in reproductive phenomena of male Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) at Takasakiyama. *Primates* 21:230-240
- 7) Tiba T and Nigi H (1980) Jahreszeitliche Schwankung in der Spermatogenese beim "free-ranging" Japanischen Makak (*Macaca fuscata*). *Zool Anz* 204:371-387
- 8) Matsubayashi K and Enomoto T (1983) Longitudinal studies on annual changes in plasma testosterone, body weight and spermatogenesis in adult Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) under laboratory conditions. *Primates* 24:521-529
- 9) Matsubayashi K, Watanabe G, Taya K, et al. (1991) Seasonal changes in plasma concentration of immunoreactive inhibin and testicular activity in male Japanese monkeys. *Biol Reprod* 44: 822-826
- 10) Torii R and Nigi H (1992) The artificial fecundation in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*) by induced ovulation and artificial insemination in nonmating season. *Exp Anim* 41:243-246
- 11) Torii R and Nigi H (1998) Successful artificial insemination for indoor breeding in the Japanese monkey (*Macaca fuscata*) and the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*), *primates* 39(4), in press
- 12) Roussel JD and Austin CR (1967) Preservation of primate spermatozoa by freezing. *J Reprod Fertil* 13:333-335
- 13) Leverage WE, Valerio DA, Shultz AP, et al. (1972) Comparative study on the freeze preservation of spermatozoa. *Primates, Bovine and human. Lab Anim Sci* 22:882- 889
- 14) Cho F and Honjo S (1969) A simplified method for collecting and preserving cynomolgus macaque semen. *Jap J Med Sci Biol* 26:261-268
- 15) Mahone JP and Dukelow WR (1978) Semen preservation in *Macaca fascicularis*. *Lab Anim Sci* 28: 556-561
- 16) Tollner TL, VandeVoort CA, Overstreet JW, et al. (1990) Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 90:347-352
- 17) Sankai T, Terao K, Yanagimachi R, et al. (1994) Cryopreservation of spermatozoa from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 101:273-278
- 18) Sankai T, Shimizu K, Cho F, et al. (1997) In vitro fertilization of follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Lab Anim Sci* 47: 58-62
- 19) Kraemer DC and Vera Cruz NC (1969) Collection, gross characteristics and freezing of baboon semen. *J Reprod Fertil* 20:345-348
- 20) Lambert H, Citino S, Collazo I, et al. (1991) Penetration of zona-free hamster oocytes by ejaculated cryopreserved gorilla spermatozoa. *Fertil Steril* 56: 1201-1203
- 21) Gould KG and Styperek RP (1989) Improved methods for freeze preservation of chimpanzee sperm. *Am J Primatol* 18:275-284
- 22) Dede JA and Plentl AA (1966) Induced ovulation and artificial insemination in a rhesus colony. *Fertil Steril* 17:757-764
- 23) Czaja J A, Eisele SG, Goy RW (1975) Cyclical changes in the sexual skin of female rhesus: relationships to mating behavior and successful artificial insemination. *Federation Proceedings* 34:1680-1684
- 24) Nigi H (1985) Methods of semen collection in non-human primates. In: Izuka R, Iritani A, Suzuki S, et al. (Eds), *Manual on Experimental method in reproduction*. Kodansha, Tokyo, pp.31-35 (in Japanese)

- 25) Peng M, Lai Y, Yang C, et al. (1973.) Reproductive parameters of the Taiwan monkey (*Macaca cyclopis*). *Primates* 14:201-213
- 26) Cranfield MR, Bavister BD, Boatman DE, et al. (1993) Assisted reproduction in the propagation management of the endangered Lion-tailed macaque (*Macaca silenus*). In: *Primates*. Wolf DP (Ed), Springer-Verlag, New York, pp.331-348
- (Received December 26, 1997)
(Accepted January 16, 1998)

ニホンザル精子の凍結保存法

滋賀医科大学医学部附属動物実験施設

鳥居隆三

近畿大学生物理工学部

細井美彦, 入谷 明

滋賀医科大学産科婦人科学講座

増田善行

大阪大学人間科学部

和 秀雄

ニホンザル精子のルーチンな凍結保存法について検討した。精液は冬の交尾期に15頭のニホンザル・オスから直腸法による電気刺激法によって採取した。採取後凝固した精液は37℃の炭酸ガス培養器にて30分間静置し液化した。液化した精液は、60%および80%パーコールを用いて、死んだ精子、夾雑物などを除去し、運動性の高い精子のみを集めた。パーコール処理後、0.3%BSAを含むBWW培養液によって洗浄した後、精子凍結保護溶液としてTTE-G溶液および市販のTYB溶液を用いてグリセリン平衡を行い、液体窒素下に投入し凍結保存した。凍結精子の融解後の運動性は、TTE-G溶液では、凍結前 $82.9 \pm 8.5\%$ に対して $70.5 \pm 9.1\%$ 、TYB溶液では凍結前 $80.3 \pm 9.6\%$ に対して $66.5 \pm 11.6\%$ とであった。これらの成績から、TTE-GあるいはTYB溶液をもちいた精子の凍結方法はニホンザルの精子の凍結保存法として有用であることが分かった。

キーワード：ニホンザル，精子，凍結保存

Comparison of the Efficacy of Luteinizing Hormone (LH) and Human Chorionic Gonadotropin (hCG) for Ovulation Induction and Corpus Luteum Formation in Gonadotropin-Primed Immature Rats.

Li LIU, Shingo YAMABE and Takeshi MARUO

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kobe University, School of Medicine,
Kobe 650-0017, Japan.

Ryuichirou NISHIMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Hyogo Medical Center for Adults,
Akashi 673-0021, Japan.

Abstract: The aim of this study is to compare the effect of LH and hCG on inducing ovulation and corpus luteum formation in immature female rats pre-treated with PMSG. According to the inhibition curve of ¹²⁵I-hCG binding to rat testicular homogenate, the ED₅₀ of LH was 800 mIU/ml while that of hCG was 200 mIU/ml. Both LH and hCG were able to induce ovulation in the rat and the threshold doses of inducing ovulation were LH 10 IU and hCG 5 IU, respectively. Neither LH nor hCG showed dose dependency in the number of ovulated oocytes. At 18 hours after LH 20 IU or hCG 5 IU injection, serum estradiol levels in hCG-treated group were significantly higher than those in LH-treated group. From 18 to 72 hours after the LH/hCG injection, progesterone levels in the hCG-treated group were significantly higher than LH-treated group. From these results, LH was found to be as effective as observed with hCG for ovulation induction, whereas the corpus luteum formation following administration of LH was shown to be less on the basis of estradiol and progesterone levels in serum compared with hCG treatment. This may suggest that LH rather than hCG decreases the occurrence of ovarian hyper-stimulation syndrome in ovulation induction.

Key Words: LH, hCG, ovulation induction, luteal function and OHSS.

(Jpn. J. Fertil. Steril., 43(2), 133 - 139, 1998)

Introduction

With the assisted reproductive technologies progress and spread, ovarian hyper-stimulation syndrome (OHSS) which is one of the major iatrogenic complications of ovulation induction has caused extensive attentions. The pathogenesis of OHSS is still unclear. However, it is well known that hCG administration exacerbates OHSS and that following administration of human menopausal gonadotropin (hMG) alone OHSS does not occur, except in sporadic

cases¹⁾. In infertility treatment, hCG was used in regard of its LH-like action, because isolated or purified human LH was not practically available. LH and hCG are two gonadotropins with similar biological actions and common receptor (LH/hCG-R). They share the same α -subunit and similar β -subunit, nevertheless, β -subunit of hCG contains 31 additional amino acids (i.e. amino acids 115 - 145) at the C-terminal end of the molecule associated with four O-linked glycosylation sites. Compared to LH, the presence of these four additional glycosylation sites contributes

to the greater stability of the hCG molecule and its longer elimination half-life²⁻⁴). In ovarian stimulatory cycle, hCG has been routinely administered to substitute for LH to trigger the final stages of follicular maturation, induce ovulation and corpus luteum formation because an endogenous LH surge is infrequent or attenuated in women treated with gonadotropins. As hCG has a much longer circulating half-life than LH and therefore, a longer biological effect⁵, it is considered that the occurrence of OHSS may be associated with the excessive stimulation by hCG administration during the post-ovulation interval⁶. Consequently, some authors suggested that LH should replace hCG for ovulation induction, so that to lessen the occurrence of OHSS⁷. The aim of this study is to compare the effects of LH and hCG on inducing ovulation and corpus luteum formation in gonadotropin primed immature female rats.

Materials and Methods

Pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) was purchased from Sigma Co. (G-4877, 1000IU/vial). Purified urinary luteinizing hormone (LH;608 IU/mg protein) was obtained from Denka Pharmaceutical Co.,LTD. (Kawasaki, Japan). Urinary human chorionic gonadotropin (hCG;3000IU/vial) was obtained from Nikken Chemicals Co. LTD. (Tokyo, Japan).

Radioligand receptor binding assay.

To normalize receptor-binding characteristics and measure ED₅₀ of LH and hCG used in this study, a comparative displacement study was performed using rats' testicular homogenate. Briefly, the testes obtained from aged 8-week-old male rats were homogenized in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) using glass homogenizer. The homogenate was centrifuged for 15 min at 200 g and the supernatant was removed. The pellets were then suspended again in PBS and used as LH/hCG receptor preparation (testicular tissue: 300 mg/ml). Highly purified hCG was iodinated using the lactoperoxidase method^{8,9}. The reaction of the rat testicular homogenate with radioiodinated hCG was carried out in the following system: increasing concentrations of unlabeled LH or hCG (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1,000, 10,000 mIU/ml); ¹²⁵I-hCG: 100 ml (100,000 cpm); receptor homogenate: 300 ml;

additional PBS to make a total volume 1 ml. The reaction mixtures were incubated for 18 hours at room temperature. After incubation, the reaction was stopped by adding 1 ml ice-cold PBS to each tube. The mixtures were centrifuged at 400 g for 30 min. The pellets were then resuspended in the buffer solution and centrifuged again. The supernatant was removed and the radioactivity in the pellets was determined using a gamma counter.

Ovulation induction of immature rats.

Immature female Wistar rats were used in this study. The animals were kept in a 12 hours light:12 hours darkness schedule and an ordinary laboratory diet was available *ad libitum*. At the age of 25 days (weight about 50 g), a single dose subcutaneous injection of PMSG 10 IU was administered to rats to initiate follicular development. Forty-eight hours later, the animals received various doses of LH, hCG (5, 10, 20 IU/rat) or saline alone injection subcutaneously. Each treatment group was consisted of 12 rats. Eighteen hours after ovulation inducing injection, these animals were killed by decapitation and bilateral ovaries, oviducts and uteri were removed. The oviducts were carefully separated from ovaries and uteri and examined under a stereomicroscope to find the ovulated oocytes. The expanded part of oviducts were punctured and the number of ovulated oocytes flew out with the oviductal mucus was counted.

Evaluation of the corpus luteum function after administration of ovulatory dose of LH or hCG.

PMSG-primed immature female rats treated with LH 20 IU or hCG 5 IU (in the same condition as above) were killed by decapitation in batches (4-6 rats of every group) at selected intervals (18, 48, 72, 96 hours after LH or hCG injection). The blood samples were collected, then the sera were separated by 400 g centrifugation for 20 min and stored at -20°C until sex steroids and gonadotropins assay. The bilateral ovaries of each rat were removed and weighted (accuracy: 0.1mg). The serum concentrations of estradiol and progesterone were measured using Coat-A-Count radioimmunoassay kits (Diagnostic Products Corporation. Los Angeles, CA, U.S.A.). The concentrations of human LH and hCG in rats' sera were also measured

using EIA kits (IMX LH Dinapack, Dinabot, and IMX hCG Dinapack, Dinabot Tokyo, Japan).

This experiment was approved by the ethical committee of animal experiments at Kobe University School of Medicine.

The data were analysed with Students't-test to compare the number of ovulated oocytes and the weights of the ovaries per rat, and the serum concentrations of estradiol and progesterone.

Results

1. Binding assay and ED₅₀ of LH and hCG

The displacement curve of ¹²⁵I-hCG binding to rat testicular homogenate by LH and hCG showed that increasing amounts of LH and hCG inhibited ¹²⁵I-hCG binding to LH/hCG-R of testes (Fig.1). The specific activity and maximal binding capacity of the iodinated hCG were 24.2% and 25.8%, respectively. The 50% inhibition (ED₅₀) of the ¹²⁵I-hCG was attained with the concentration of 800 mIU/ml of LH and 200 mIU/ml

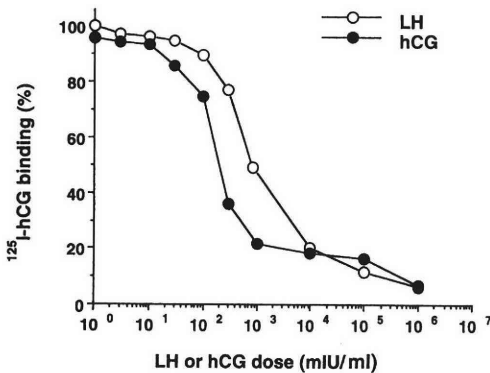


Fig.1 Inhibition of ¹²⁵I-hCG binding by LH and hCG to testis homogenate. LH inhibition was indicated by open circles and hCG inhibition was indicated closed circles. 50% inhibition of ¹²⁵I-hCG binding was attained with the concentration of 200 mIU/ml of hCG and 800 mIU/ml of LH, respectively.

of hCG, respectively. The binding affinity of LH is 4-fold less than hCG in terms of the international unit.

2. Ovulation induction by LH and hCG in PMSG-primed immature rats.

At 25 days of age, rats received a subcutaneous injection of PMSG 10 IU to stimulate follicular growth.

Forty-eight hours after the PMSG injection, these rats received a subcutaneous injection of LH, hCG or saline alone to induce ovulation. Eighteen hours later, the animals were killed and examined for signs of ovulation based on the presence of oocytes in the oviducts to determine the number of ovulating rats and the number of ovulated oocytes. Although none of the saline-treated rats (n=12) ovulated, 100% of the rats injected more than LH 10 IU or hCG 5 IU ovulated (n=72, more than 12 rats in each treatment group). Fifty percent of rats (6 of 12) treated with LH 5 IU ovulated and the mean number of ovulated oocyte per ovulating rats was 16.5. Thus, both of LH and hCG utilized in our study were able to induce ovulation in PMSG-primed immature rats and the threshold doses of inducing ovulation for these rats were LH: 10 IU and hCG: 5 IU, respectively. As shown in Fig.2, in neither LH-treated group nor hCG-treated group the mean number of ovulated oocytes per rat showed dose dependency. Only the number of oocytes ovulated in the group treated with LH 5 IU showed significant decrease, because half of the rats in that group didn't

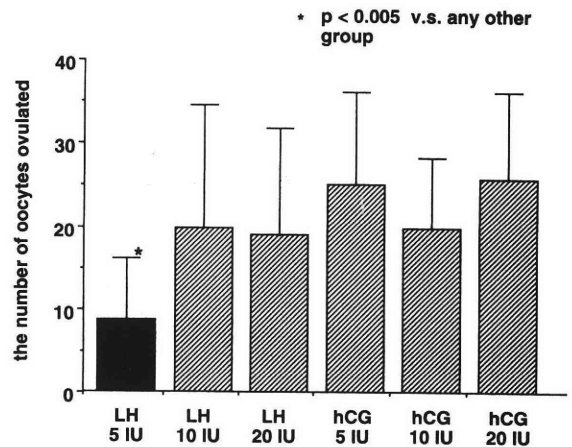


Fig.2 The mean number of oocytes ovulated after the treatment with LH or hCG.

Error bars indicates SD. No significant differences were found among the mean numbers of ovulated oocytes in each treatment group except for the LH 5 IU treated group (p < 0.005, LH 5 IU treated group v.s. any other group). In that group only 50% of rats ovulated and the mean number of oocytes ovulated per ovulating rats was 16.5.

ovulate. The capability of LH for inducing ovulation was not different from that of hCG.

3. Effect of ovulatory dose of LH and hCG on the luteal function.

According to the result of binding assay in vitro, the ED₅₀ of LH was 4-fold more than hCG. Our experiments in vivo presented the minimal dose of hCG for inducing ovulation was 5 IU/rat. Therefore, 5 IU hCG-treated group and 20 IU LH-treated group were used in this study. Following treatment with LH and hCG for ovulation induction, the time course of luteal function was studied by ovarian weight and serum estradiol and progesterone concentrations.

Ovarian weights of both groups increased gradually until 72 hours after treatment of LH and hCG. The ovarian weights of LH group were lower than those of hCG group. Especially in 72 hours after LH or hCG

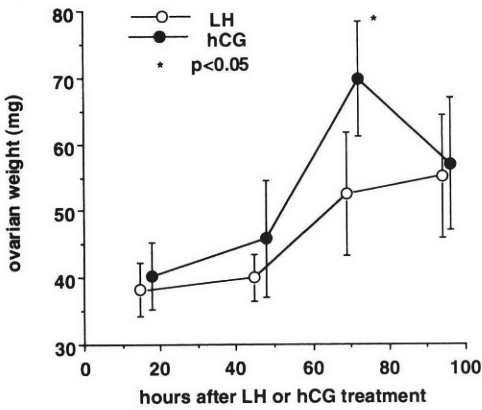


Fig.3 The changes of the ovarian weight after treatment with LH or hCG.

LH group is indicated by open circles and hCG group is indicated closed circles. The error bars show SD. AT 72hrs after injection the ovarian weight in hCG group was significantly heavier than in LH group.

administration, the ovaries of LH group weighed significantly lighter than those of hCG group ($p < 0.05$) (Fig.3).

At 18 hours after treatment, serum estradiol levels in hCG group were significantly higher than those in LH group ($p < 0.05$) (Fig.4). From 48 to 96 hours after

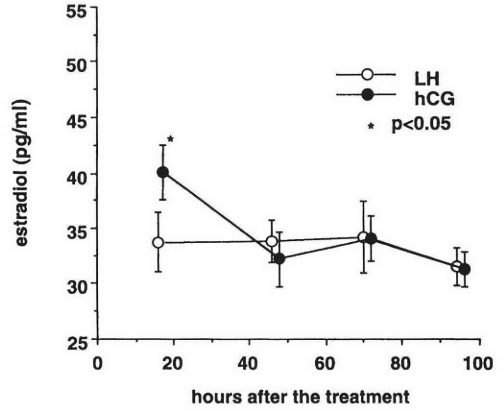


Fig.4 Serum estradiol levels after ovulation induction by LH or hCG injection.

LH group is indicated by open circles and hCG group is indicated closed circles. Serum estradiol levels in hCG group were significantly higher than those in LH group at 18 hours after the treatment.

treatment, the serum concentrations of estradiol showed no significant difference between the two groups.

The levels of serum progesterone after LH or hCG injection in each time point are shown in Fig.5. Progesterone concentrations in both groups increased gradually from 18 to 48 hours after ovulation induction. From 48 to 72 hours after treatment, the progesterone levels in the hCG group continuously in-

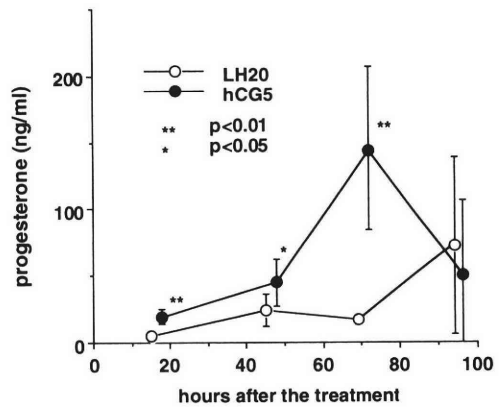


Fig.5 Changes in serum progesterone concentration after treatment with LH or hCG.

LH group is indicated by open circles and hCG group by closed circles. The serum progesterone levels in hCG-treated group were significantly higher than those in LH-treated group between 18 to 72 hours after the treatments.

creased, while those in LH group slightly decreased. This resulted in higher serum progesterone concentrations in hCG group than LH group ($p < 0.05$ in 48 hours after treatment and $p < 0.01$ in 72 hours after treatment). The sustained duration of progesterone elevation was longer in hCG group than LH group. At 96 hours after treatment the serum progesterone levels in both groups had wide variation among the samples and those in LH group showed increasing again.

4. Serum clearance of LH and hCG.

The levels of administrated human LH or hCG in rats' sera were also determined in time course experi-

ovarian responses. To prevent these iatrogenic complications we hypothesized that LH might be useful for the ovarian stimulation in infertility patients because of its short-half life and that the ovulation induction by LH might be more similar to physiological conditions than those by hCG.

Based on our results, LH, as same as hCG, represented its effectiveness for ovulation induction in the immature rats pretreated with PMSG. The minimal doses for ovulation induction were 5 IU in the hCG treatment and 10 IU in the LH treatment. As the 25 day-old rat used in this experiment weighed about 50 g, it may be estimated that hCG 5,000 IU or LH 10,000 IU will be needed to induce ovulation in a patient with body weight about 50 kg.

Although hCG was thought to have the potency of inducing greater number of oocytes to ovulate than that of LH^{10, 11}, our results did not show significant differences in the number of ovulated oocytes between hCG-treated and LH-treated groups. Neither hCG group nor LH group presented the dose dependency in the number of ovulated oocytes when administering doses were above threshold levels. These results indicate that the number of ovulated oocytes induced by hCG or LH depends on the number of growing follicles in which there are the oocytes ready to ovulate. In 25 day-old immature rats the number of growing follicle was decided by PMSG dose and the schedule of PMSG administration, because in these rats endogenous gonadotropin was lack¹². In this regard to avoid multiple pregnancy in patients treated by hMG-hCG for ovulation induction, especially for the patients with hypopituitarism, clinicians have to pay more attention to the dose or the regimen of hMG, rather than hCG dose.

According to the result of the binding assay in vitro, the hCG used in our experiment had 4-fold higher affinity to LH/hCG receptor of homogenated testes than that of LH in terms of the international unit. Therefore, we adopted the result of 5 IU hCG-treated group and 20 IU LH-treated group to compare the luteal function after the ovulation induction. One of the reasons of the higher estradiol levels in the hCG group at 18 hours after the treatment seems to be caused from the longer half-life of hCG. Actually hCG still remained at 18 hours after administration, while LH was unde-

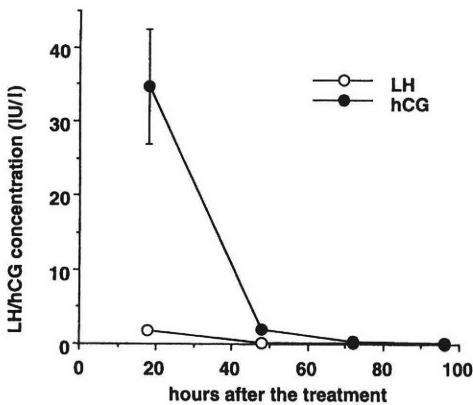


Fig.6 Changes in serum concentrations of human LH or hCG following ovulation induction in PMSG-primed immature rats.

LH group is indicated by open circles and hCG group by closed circles. Serum human LH levels were very low at 18 hours after LH injection, while serum hCG levels were detectable at 48 hours after hCG injection.

ments (Fig.6). The serum LH levels were undetectable at 48 hours after injection while those of hCG were still measurable at the same time.

Discussion

The development of ovulation-inducing drugs has enabled clinicians to treat more effectively infertility women caused by the hypothalamic, pituitary, and ovarian abnormalities. However, with the spread of the superovulation method, OHSS and multiple pregnancies have become more frequent, clinicians are, therefore, looking for a new protocol more earnestly for ovulation induction which can control strictly the

tectable in serum at that time point. The target cells of hCG and LH were reported to lose its ability to bind hCG or LH during 48 hours after the high dose treatment to induce ovulation, because of the insensitivity of LH/hCG receptor and the lack of production of the receptor^{13, 14}. The high serum concentration of estradiol caused by the longer half-life of hCG is inconsistent with those reports. Our speculation is that hCG with the longer half-life might simultaneously stimulate the small follicles to produce estradiol, resulting in higher concentrations of estradiol in serum at the time point of ovulation.

As shown in Fig.5, following administration of a ovulatory dose of LH or hCG, the serum progesterone concentrations increased gradually in both groups. These may result from the formation of corpora lutea following LH and hCG injection. However, the progesterone levels were higher and sustained duration of elevated progesterone concentration was longer in hCG group than those in LH group. Since estradiol is one of the luteotrophic factors as well as LH and hCG¹⁵, one reason responsible for the higher progesterone production in hCG group than that in LH group may be the elevated estradiol levels in hCG group at 18 hours after the treatment, and the other reason may be the longer duration of action of hCG which still remained at 48 hours after the injection. On the other hand, it may be indicated that the action of LH is transient and limited. The elevated serum progesterone level implies the occurrence of some degree of ovarian hyperstimulation. OHSS is known to be associated not only with an increased number of preovulatory follicles but also with excessive levels of circulating sex steroid hormones such as estradiol and progesterone¹⁶. Our data showed that hCG administration for inducing ovulation caused higher serum estradiol and progesterone levels compared with LH administration. Ujioka et al. have recently studied the relationship between higher local progesterone concentrations induced by hCG administration and capillary permeability, indicating that progesterone has a vital role in the enhancement of capillary permeability and ovarian enlargement and may contribute to the pathophysiology of OHSS¹⁷. Our results also showed that the ovarian weight observed in both groups had a positive correlation with the progesterone produc-

tion.

In the infertility treatment, the estradiol/progesterone ratio after the ovulation induction is important because it influences the decidualization of endometrium at the period of the implantation¹⁸. Our results suggest that the ovulation induction with LH may offer an alternative condition for a successful conceptus in contrast to hCG in infertility treatment and that it may lessen the possible occurrence of hyperstimulation syndrome by preventing excessive stimulation of the corpus luteum during the postovulatory period.

Acknowledgement

We gratefully acknowledge the generous gifts of urinary LH from Denka Pharmaceutical Co. LTD. and hCG from Nikken Chemicals Co. LTD.

Reference

- 1) Schenker JK, Weinstein D. (1978) Ovarian hyperstimulation syndrome : A current survey. *Fertil Steril* 30:255-268.
- 2) Speroff L, Glass RH, and Kase NG. (1994) Hormone biosynthesis, metabolism, and mechanism of action. In: *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 31-92.
- 3) Pierce JC, Parsons TF. (1981) Glycoprotein hormones: structure and function. *Annu Rev Biochem* 50:455-495.
- 4) Porchet HC, Le JY, Cotonnec, Neuteboom B, et al. (1995) Pharmacokinetics of recombinant human luteinizing hormone after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration in monkeys and comparison with intravenous administration of pituitary human luteinizing hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 80:667-673.
- 5) Moyle WR, Bahl OP, and Marz L. (1975) Role of carbohydrate of human chorionic gonadotropin in the mechanism of hormone action. *J Biol Chem* 25:9163-9169.
- 6) Brinsden PR, Wande I, and Jacobs HS. (1995) Diagnosis, prevention and management of ovarian hyperstimulation syndrome. *Br J Obstet Gynaecol* 102:767-772.
- 7) Empeaire JC. (1994) Therapeutic induction of ovulation : towards the replacement of hCG with LH. *Contracept Fertil Sex* 22 :459-467.
- 8) Amano J, Nishimura R, Sato S et al. (1990) Altered glycosylation of human chorionic gonadotropin de-

- creases its hormonal activity as determined by cyclic-adenosine 3'5'-monophosphate production in MA-10 cells. *Glycobiology* 1:45-50.
- 9) Thorell J.I. and Johansson B.G. (1971) Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim Biophys Acta* 251:363-369.
 - 10) Molina I, Pla M, Vicente JS, et al. (1991) Induction of ovulation in rabbits with pure urinary luteinizing hormone and human chorionic gonadotrophin: comparison of oocyte and embryo quality. *Human Reprod* 6:1449-1452.
 - 11) Molina I, Santana AG, Pla M, et al. (1994) Induction of ovulation in rabbits by pure urinary luteinizing hormone. *Human Reprod* 9:413-416.
 - 12) Kraulis I, Traikov H, and Sharpe M. (1978) Steroid induction of gonadotropin surge in the immature rat: Priming effects of androgens. *Endocrinol* 103:1822-1828.
 - 13) Lapolt PS, Oikawa M, and Hsueh AJW. (1990) Gonadotropin-induced up- and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and lutealization. *Endocrinol* 126:3277-3279.
 - 14) Nakamura K, Minegishi M, and Igarashi M. (1990) Regulation of LH/hCG receptor by gonadotropins in rat ovary. *Biochem Biophys Res Commun* 172:786-792.
 - 15) Gibori G, and Keyes PL. (1978) Role of intraluteal estrogen in the regulation of the rat corpus luteum during pregnancy. *Endocrinol* 102:1176-1182.
 - 16) Blankstein J, Shalev J, Saadon T, et al. (1987) Ovaian hyperstimulation syndrome: prediction by number and size of preovulatory ovarian follicles. *Fertil Steril* 47:597-602.
 - 17) Ujioka T, Matsuura K, Kawano T, et al. (1997) Role of progesterone in capillary permeability in hyperstimulated rats. *Human Reprod* 12:1629-1634.
 - 18) Hearn JP, Webley GE, and Gidley-Baird AA. (1988) Embryo implantation in primates. In: Chapman M, Grudzinskas G, and Chard T. (eds) *Implantation: biological and clinical aspects*. Springer-Verlag, London, pp3-13.

(Received December 22, 1997)

(Accepted January 11, 1998)

LH と hCG の排卵誘発能および黄体形成能の比較検討

神戸大学医学部産科婦人科学教室

劉麗, 山辺晋吾, 丸尾 猛

兵庫県立成人病センター

西村隆一郎

現在、排卵の誘発にはhCGを用いるのが一般的であるが、hCG投与によるOHSSが高頻度で起こっていることも否めない。そこでhCGとLHの生物活性の違いに着目し、LHの排卵誘発とその後の黄体機能に対する効果をhCGの効果と比較した。

ヒト尿中より抽出されたLHとhCGのLH/hCGレセプターに対する結合能はラット辜丸のホモゲナイズと ^{125}I -hCGを用いて検討した。また、3週齢のWister系雌ラットにPMSG 10 IUとLH/hCG 5~20 IUで排卵を誘発し、LH/hCGの投与18時間後に排卵数を確認した。LH 20 IUとhCG 5 IU投与群においては投与18、48、72、96時間後における黄体機能を血中 E_2 値、 P_4 値の測定により検討した。

使用したLH、hCGはLH/hCGレセプターに対する結合能を有し、その ED_{50} はLH 800 mIU/ml、hCG 200 mIU/mlであった。排卵を誘発するための最少量はLH 10 IU、hCG 5 IUであったが、それ以上にLH/hCGの投与では投与量を増加しても排卵数に差を認めなかった。血中 E_2 値はhCG投与群の投与18時間後がLH投与群に比較して有意に高値を示し、また、血中 P_4 値もhCG投与群では投与72時間後までLH投与群に比較して高値を示した。

LH投与はhCG投与と同様に排卵誘発に有効であり、LHによる排卵誘発ではhCGのそれに比較して排卵後の E_2 、 P_4 産生、分泌が少なく、OHSSの予防に役立つと考えられた。

キーワード: LH, hCG, 排卵誘発, 黄体機能, 卵巣過剰刺激症候群

地方部会講演抄録

第35回日本不妊学会東北支部総会

日時：平成9年10月4日（土）

会場：プラザチアーズ（山形市）

1. 体外受精の過排卵刺激における GnRH agonist 継続投与法の検討

○藤井俊策，福井淳史，坂本知巳
齋藤良治（弘前大産婦）

IVF-ET施行前周期から投与したGnRHaを妊娠判定時まで継続する continuous long protocol (cL法, n = 62) と通常の long protocol (L法, n = 60) とで randomized study を行った。

患者の背景，採卵数，受精卵数，移植胚数は両群間で差はなかった。内分泌的変動では，採卵時，胚移植時並びに黄体中期のLH値と，黄体中期のFSH値はL法で有意 ($P < 0.05$) に低値であった。また，胚移植時の末梢血中NK細胞活性がcL法で有意に低かった ($P < 0.05$)。移植当り妊娠率はL法で35.0% (21/60)，cL法で51.6% (32/62) であり，cL法で有意に高かった ($P < 0.05$)。GnRHaを黄体期に継続することによりIVF-ETの治療成績が向上したが，その原因として，1) GnRHa中止後は血清LH値が低下すること，2) GnRHa投与により末梢血NK細胞活性が低下することが推測された。

2. ラット顆粒膜細胞における activin receptor の変動

○福田 淳，児玉英也，村田昌功
清水 靖，池田雅人，利部徳子
熊谷 仁，齋藤暁子，田中俊誠
(秋田大産婦)

Activinは顆粒膜細胞で生産され，下垂体細胞でのFSHの合成，分泌に関与することが知られている。一方，近年activin receptorが顆粒膜細胞にも発現していることが報告され，卵巣内でのparacrine, autocrineの作用についても検討されてきている。しかし，activin receptorの調節機構については未だ明らかにされていない。そこで今回は，activin receptor (Act-R)がどのように調節されているのかをとくに黄体化に関連して検討することにした。

21日齢の幼若ラットをPMSG 10 IU皮下注射にて卵胞発育を行い，48時間後に卵巣穿刺法にて顆粒膜

細胞を採取した。顆粒膜細胞を無血清のM 199培地で16時間培養した後，hCG，PMA，cAMPにて24時間刺激し，western blot法にてActivin receptor II aの量的比較を行った。一方hCGによる β A-inhibin subunit, Act-R I a, Act-R II a, Act-R II bの各mRNAの量的変動をsemiquantitative RT-PCR法により検討した。

蛋白レベルではAct-R II aは，hCGによりup regulateされ，PMAによりdown regulateされていると考えられた。時間的には24時間後まで増加し，48時間後には減少した。一方，mRNAの検討ではhCG刺激後，10時間後に β A-inhibin subunit, Act-R II aが増加し，24時間後に減少する傾向が認められた。しかし，Act-R I a, Act-R II bでは変動がみられなかった。RT-PCRについてはsouthern blotでも確認された。

ラット卵胞後期顆粒膜細胞においては，hCGの刺激により， β A-inhibin subunit, Act-R II aが増加することが示された。このことから黄体化においてActivinがAct-R II aを介してparacrine, autocrineに何らかの作用を示すものと推測された。

3. 細胞外顆粒膜細胞のアポトーシス

○金子智子，戸屋真由美，西川香苗
高橋俊文，太田信彦，伊藤真理子
齋藤隆和，中原健次，齋藤英和
広井正彦（山形大産婦）

外因性に投与したヒアルロン酸が顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現を抑制するかどうかについて検討した。

体外受精の採卵時に採取された顆粒膜細胞をヒアルロニダーゼにて処理しHamsF10にて培養した。ヒアルロン酸を50ng/mlより50 μ g/mlの濃度で加え，48時間培養皿で培養した。培養後ホルマリンにて固定し，Hoechst 33258にて染色し，蛍光顕微鏡にて観察し，アポトーシスを起こした顆粒膜細胞の数をカウントした。

壁側顆粒膜細胞群は，対照に比較し，ヒアルロン酸50ng/mlから5 μ g/mlの濃度でアポトーシス小体の出現率の低下傾向を認めたが有為な差ではなかった。卵丘顆粒膜細胞群では対照に比較し，ヒアルロン酸50ng/mlから5 μ g/mlの濃度でアポトーシス小体の出現率が有為 ($p < 0.05$) に低下していた。

これらのことから、ヒアルロン酸が至適濃度でアポトーシスを抑制する可能性があるとして唆された。

4. 重症 OHSS の一例

○坂本知巳, 福井淳史, 藤井俊策
齋藤良治 (弘前大産婦)

人工換気を要した重症の OHSS を経験した。症例は32歳の女性で、前医でhMG-hCG療法を行ったところ、hCG投与約36時間後から下腹部痛が出現し、OHSSの疑いとして入院となった。入院当初は胸腹水の貯留は見られなかった。補液をおこなっていたが、次第に脱水症状が進行し、ショック状態となった。生理食塩水の急速輸注などでショック状態は改善されたが、腹水増加など OHSS が重症化するため当科へ搬送となった。搬送後はアルブミン、デキストラン、ドーパミン、マンニトールなどの使用と、腹腔および卵巣穿刺により経過を観察していた。しかしながら、胸水貯留が顕著となり、その後急激にARDSとなった。人工換気を行うことで胸腹水の減少がみられ、2日後には抜管可能となった。

治療における反省点を含め報告する。

5. 体外受精・胚移植における末梢血および子宮内膜NK細胞活性値の検討

○福井淳史, 藤井俊策, 坂本知巳
齋藤良治 (弘前大産婦)

末梢血および子宮内膜におけるNK細胞活性値がIVF-ETの治療成績に与える影響を検討した。

当科にてIVF-ETを施行した226例につき、胚移植時の末梢血NK細胞活性を測定した。long protocolで過排卵刺激を行った118例につき、GnRH agonist投与開始時であるIVF-ET前周期の黄体中期にも末梢血NK細胞活性を測定するとともに、子宮内膜のCD56ならびにCD16活性を測定した。

胚移植時の末梢血NK細胞活性は妊娠例、非妊娠例間に有意差はなかった。また流産例では、正常妊娠例に比して有意に高値であった。long protocol例でのIVF-ET実施前周期と胚移植時の比較では有意差はなかった。子宮内膜のCD56陽性細胞は、非妊娠例で高値の傾向が認められた。

末梢血中、子宮内膜のNK細胞活性等の免疫系がIVF-ETの治療成績に関与しているであろうと思われる。

6. ヒト射出精子の膜付着蛋白質 (calphobindin) に関する検討

○清水 靖, 児玉英也, 福田 淳
村田昌功, 池田雅人, 利部徳子
熊谷 仁, 斎藤暁子, 田中俊誠
(秋田大産婦)

Calphobindin (CPB) は凝固抑制物質であり、CPBは精液中に血漿の約100倍含有されている。

①精液中のCPB濃度をELISA法にて測定し、精液所見と比較する。②射出精子におけるCPBの存在部位をwestern blot法で検討する。③先体反応後精子に対するCPBの結合についてFlowcytometryで検討する。

①精子無力症のCPBは有意に高値であった。②CPBは精子膜上にCaを介して結合する。③先体反応後精子にはCPBは結合できなくなる。

CPB-1は精子無力症症例に高濃度に含有される。先体反応に何らかの関与をしている可能性がある。

7. ICSI実施時の際の高濃度 serum 培養液が成績に与える影響

○鈴木和夫, 近内勝幸, 橋本志奈子
山田宏子, 柳田 薫, 佐藤 章
(福島県立医大産婦)

ICSI実施時の培養液に高濃度のserumを加えたときのICSI後の生存性、受精、発生への影響をマウスをモデルとして検討した。

卵と精子はB6D2F1マウスから採取してICSIに供した。ICSIは次の2つの方法で行った。HEPES-CZBのドロップ(低濃度群)とこれに20%のFBSを加えたドロップ(高濃度群)の中でICSIを行った。ICSIの後に培養を行い、両群での生存率、受精率、さらにその後の発生率を比較検討した。

①生存率は低濃度群で26%、高濃度群で52%と有意差を求めた($P < 0.001$)。②受精率は低濃度群で84%、高濃度群で87%と有意差を認めなかった。③2細胞期胚から胚盤胞までの発生率は低濃度群で59%、高濃度群で50%と有意差を認めなかった。

生存率は高濃度群で有意に高く高濃度のserumがICSIの際に卵細胞膜に対して保護的に働くことが示唆された。

8. Piezo-ICSIの際の卵細胞膜穿破様式と受精、初期発生および卵の質との関連について

○近内勝幸, 鈴木和夫, 片寄治男
橋本志奈子, 山田宏子, 鳴瀬夕子
柳田 薫, 佐藤 章

(福島県立医大産婦)

Piezo-ICSIの際の卵細胞膜穿破様式とその後のICSIの成績との関連性, および膜の穿破様式の違いに関する因子について検討した。

ICSIを実施した患者163名を対象とした。卵に精子を注入する時にニードルが透明帯を穿過後卵細胞膜が(a)すぐ(b)卵の直径1/3で(c)卵の中央で(d)卵の直径3/4まで押しこみPiezoのパルスで穿破される卵の4つに分類した。この分類とICSI後の生存率, 受精率, 胚発生率との関連を調べた。次に患者の年齢と卵の形態的良否と胚の穿破様式との関連を調べた。

(a)群では生存率が著しく低下したが生存卵に対する受精率は有意差がなかった。年齢別および卵の形態的良否と穿破様式の間には関連性は認められなかった。

高齢者の膜の伸展性は若年者と差がなかった。卵の形態的变化や年齢は膜の伸展性に影響せず、今後はいかに膜の伸展性の良好な卵を採取するかが重要と考えられた。

9. ヒト精子のハムスター卵細胞質内注入法による精子染色体分析

○木原香織, 三浦明香, 森亜紀子
小宮雄一, 小田隆晴

(山形県立河北病院産婦)

平山寿雄, 廣井正彦 (山形大産婦)

ICSI法, SPA法による精子染色体異常発現率を比較することにより, 人為的配偶子操作のヒト精子染色体に対する影響を検討した。

ヒト精子を精子調整, 前培養後, ハムスター卵にICSI法, SPA法を施行。受精卵培養後, 精子染色体標本の作製を行った。

染色体異常発生率はICSI法6.7%, SPA法6.9%であり, 精子調整後においても両法による異常発生率に有意な差は認められなかった。

ICSI法, 精子調整法などの人為的配偶子操作により精子染色体異常が誘発される危険性は少ないことが示唆された。

10. *rdw* rats derived from superovulated-oocytes in immature *rdw* rats following fertilization *in vitro* and embryo transfer

○J.Y.Jiang, K.Miyoshi, M.Umezu, E.Sato

(Laboratory of Animal Reproduction,
Faculty of Agriculture,

Tohoku University)

rdw rat is a new strain of dwarf animal with defects of several hormone levels such as growth hormone, prolactin and thyroine hormones and with infertility in both male and female. We reported that it was difficult in inducing ovulation in *rdw* rats with gonadotropin procedures, however, superovulation could be successfully induced by the gonadotropins combined with thyroxine therapy. In this study we investigated the ability of *in vitro* fertilization and following development *in vitro* and *in vivo* of oocytes superovulated in immature *rdw* rats. Animals were administrated intraperitoneally by thyroxine daily at the dose of 10 μ g per 100g body weight beginning at 21 days old and ending at 30 days old, 10 IU PMSG was injected subcutaneously at day 28 and 10 IU hCG intraperitoneally 48 hours later. 11 hours after hCG injection cumulus-oocytes complexes in ampulla of oviducts were released into insemination drop containing F1 (normal F344 female \times dwarf male) epididymal sperm preincubated for 6 hours. 10 ~ 15 hours after insemination the oocytes with male and female pronuclei and corresponding tails were transferred to the development medium and cultured for further 5 days. The embryos were examined every 24 hours. mR1ECM containing 100mM NaCl and 4mg/ml BSA instead of PVA (mR1ECM-BSA) was used as insemination medium, and mR1ECM as culture medium in the study. 1-cell and 2-cell embryos were transferred to the oviducts of Day 1 recipients (ovulation day) and morula and blastocysts to the uterine horns of Day 4 recipients. The results showed that all inseminated oocytes except fragmented ova were fertilized *in vitro*. Of fertilized oocytes cultured *in vitro*, 100%, 77.8%, 46.7% developed to 2-, 4-cell stage and blastocysts respectively. After transfer, 21% (14/66) of 1-cell and 22% (8/37) of 2-cell embryos developed to fetuses, 62% (8/13) of fetuses were determined *rdw* rats. None of morula or blastocysts developed to terms although 41%

of them implanted in the uterine horns of recipients. The study demonstrated that oocytes derived from immature *rdw* rats could developed to terms after in vitro fertilization followed by embryo transfer.

11. マウス一次精母細胞の受精・発生能に関する検討

- 呉竹昭治, 片寄治男, 柳田 薫
佐藤 章 (福島県立医大産婦)
柳町隆造
(ハワイ大学解剖学・生殖生物学教室)

BDF1雌マウスのGV卵を培養した第一減数分裂中期卵に, 同系統の雄マウス精細管より回収した一次精母細胞核を注入し, 10時間培養した後電気刺激により卵を活性化, 6~7時間後に雌雄前核の有無により受精を判定した. 一部は染色体分析を行い, その後24時間培養し, 2細胞期胚を妊娠マウスに移植した. 584個の卵に注入し514個が生存(88%), その後極体を2個放出した卵が398個(82%)であった. このうち133個の卵を活性化し, 2個の前核を形成した卵は80個(60%)であった. 染色体分析の結果, ほぼすべての卵に2n diploidの染色体が認められた. 69個の卵が2細胞期胚へ発生し(86%), これを10匹のマウスに移植したが産仔は得られなかった. マウス一次精母細胞を用いて2n diploidの卵を得ることができた. 産仔を得ることはできなかったものの, 一次精母細胞の受精能および初期胚までの発生能を確認できた.

12. ヒト精囊および精管におけるカテコールアミン含量の検討.

- 矢口博理, 安達裕一, 都丸政彦
鈴木 仁, 笹川五十次, 久保田洋子
中田瑛浩 (山形大泌尿器)

射精において重要な臓器である精囊および精管のカテコールアミン含量を測定し, 検討することを目的とした.

精囊は, 10例の前立腺癌患者(平均年齢65歳)より摘出し neck, body, baseの分けHPLCにてカテコールアミン含量を測定した. 精管は44例のBPHおよび前立腺癌患者(平均年齢41歳)から摘出し, HPLCにて測定し年齢とカテコールアミン含量の関係を検討した.

精囊, 精管には高濃度のカテコールアミンが存在した. 精囊では, neckに多い傾向がみられたが有意差は認めなかった. 精管では, 加齢とともにノルエ

ピネフリン含量は低下をみた. 精囊の neck, body, baseのノルエピネフリン含量はそれぞれ精管の39.5%, 29.7%, 25.0%であった.

13. MRSを用いたラット実験的停留精巣における造精機能の評価

- 都丸政彦, 安達裕一, 沢村俊宏
笹川五十次, 久保田洋子, 中田瑛浩
(山形大泌尿器)

ラットに実験的停留精巣を作製し, ^{31}P -magnetic resonance spectroscopy (MRS) の変化について検討した.

雄性SDラットを用い, 両側精巣を腹腔内に留置した後, 鼠径管を結紮した. 術前, 術後, 7および14日目において静磁場強度4.7 Tの実験動物用MR装置(BEN170/200:大塚電子)を用いてMRスペクトルを繰り返した.

PM/ATP比は, 術後1週間で一過性に上昇した. PD/ATP比は, 術後2週間で低値を示した. Pi/ATP比は, 術後2週間で高値を示した.

In Vivo ^{31}P -MRSは造精機能の指標となり得ることが示唆された.

14. 遺伝性小人症 rdw ラットの精巣機能および諸生理・生化学値について

- 梅津元昭, 江 金益, 佐藤英明
(東北大農)
利部 聡 (山口大農)

*rdw*ラットは当研究室で生産飼育している遺伝的甲状腺機能低下症の小人ラットで, 雌雄ともに不妊である. また, このラットは生後15~16週齢で, 精巣肥大が生じ, 同低下症で精子形成不全の少年での同様な現象のモデル動物になると思われる. 加齢の進んだ rdw ラットでは精巣中の精子形成不全は顕著となり, 血液の生理・生化学値でも慢性甲状腺機能低下の症状を示し, T4(チロキシンの)の投与によりその値は, 有意に正常ラット(Nラット)の方向に回復した. 今回は加齢の進んだ rdw ラットを用いて, 精巣上体尾部の精子数とその生存性について, Nラットと比較し, また, T4投与の影響も調べた.

実験動物として, 30~40週齢のNラットと rdw およびT4(10 μg /100 g bw)を1日1度2週間処理した rdw ラット($rdw+T4$)を用い, 精巣上体尾部から精子を回収し, Makler Counting Chamberによりそれぞれの群の精子濃度と精子の生存について調べた.

Nラット, rdwラット, rdw+T4ラットで, 総精子数 (x 100万) は, それぞれ29.6, 4.77, 4.46でNに比べrdw, rdw+T4ともに有意に低い値を示した. 生存精子を持つ個体の割合は6/6, 4/7, 3/7であり, rdw, rdw+T4では低かった. 生存精子を持つ個体の精子の生存率はそれぞれ50.8, 56.0, 49.0%であった.

第42回日本不妊学会九州支部会

日時:平成9年11月9日(日) 午前9時~
場所:パシフィックホテル(那覇市)

1. 月経異常と体脂肪分布の関連性に関する検討

○中村佐知子, 堂地 勉, 沖 利通
丸田邦徳, 伊集院博文, 桑波田理樹
中江光博, 安藤五三生, 山元慎一
永田行博 (鹿児島大産婦)

肥満は月経異常を伴うが, 月経異常と体脂肪分布の関係は明らかでない. 本研究は月経異常に体脂肪分布が関わっているか否かを検討することを目的とした.

40歳未満の87名の患者およびボランティアを対象に, 希発月経や無月経を呈する月経異常群55例と正常月経周期を有する正常群32例に分けた. 年齢, 身長, 体重, BMIおよびDEXAで躯幹脂肪率(躯幹脂肪量/体脂肪量), 下肢脂肪率(下肢脂肪量/体脂肪量)を測定した. 群間でこれらの因子を比較した. 全体で月経異常と関連する責任因子を多変量解析で求めた.

月経異常群で体脂肪率と躯幹脂肪率が有意に高かった. BMI, 年齢も月経異常群で有意に高かった. 多変量解析では, 躯幹脂肪率>年齢の順に月経異常の有無と相関した($R^2=0.133$)が, 体脂肪率, 体重およびBMIは相関しなかった.

体脂肪分布が体脂肪率よりも月経異常の有無に関連することを明らかにした.

2. 子宮頸管拡張器(ダイラパン)破損・子宮内遺残による不妊症の一例

○大城三千代, 北条 宏, 神谷 仁
上原清昇, 佐久本哲郎, 金城忠雄
(沖縄県立那覇病院産婦)

頸管拡張器(ダイラパン)はその速攻性から子宮内容除去術において多用されているがその脆弱性も

指摘されている. 今回我々はダイラパンの破片・遺残が原因と考えられた不妊症例を経験したので報告する.

症例:38歳 2回経妊 0回経産

現病歴:平成7年自然妊娠するも枯死卵のため子宮内容除去術施行. 以後不妊となり当院不妊外来を受診. 来院時より子宮腔内に超音波断層法にて液体貯留様の像(low echoic lesion)を認めた. 当初はAsherman症候群を疑い子宮鏡および子宮内容除去術を施行したがその時初めて超音波断層法でのlow echoic lesionがダイラパン遺残によるものと判明し, 異物除去を行った. しかしその後も同様の所見持続するため腰椎麻酔下に子宮鏡を用い異物を除去した. 術後, low echoic lesionは消失した. その後排卵障害あるためクロミフェンによる排卵誘発を行ったところ, 妊娠成立し, 現在双胎妊娠継続中である.

3. コンタクトラパロスコピーによる腹膜子宮内膜症病変の観察

○小濱正彦, 中村恒一, 宮村泰豪
藤下 晃, 鮫島哲郎, 増崎英明
石丸忠之 (長崎大産婦)

子宮内膜症は主として腹腔鏡検査または開腹時の肉眼所見により診断されるが, 腹膜子宮内膜症は時に多彩な所見を呈し, 肉眼的観察による診断は困難な症例に遭遇することも稀ではない. 一方, 子宮内膜症性不妊においてはその妊娠予後は病変の程度や広がりのみとは必ずしも相関せず, 色調に代表されるような個々の病変の性状が目目されている. 当科では子宮内膜症病変の性状をより正確に捉える目的で, 接触型のヒステロスコープを腹腔鏡下に用いて子宮内膜症腹膜病変の拡大観察を行っている(コンタクトラパロスコピー). この方法を用いると, 血性嚢胞への流入血管の明瞭な同定, 漿液性嚢胞内の血性色素の描出および脂肪肉芽との鑑別などが可能となり, 病変の活性度の評価や発生病理の研究にも有用と思われる. 今回は代表的なコンタクトラパロスコピー所見を通常の腹腔鏡所見と対比させながら供覧する.

4. 精液中サイトカインと精液所見との関連

○榎原久司, 田中雄一郎, 河野康志
松井尚彦, 江藤靖子, 宮川勇生
(大分医大産婦)

精液中には多くのサイトカインが存在するが, それらの精子機能におよぼす影響については不明な点

が多い。今回、精液中のIL-8, MCP-1, IL-6を測定し、精液所見との関連を検討した。

精液の性状に関するWHO基準を用いて①正常群(n=10), ②乏精子症または精子無力症群(n=6), ③濃精子症群(n=15)に分類した。精液中サイトカインはELISA法にて測定した。

濃精子症群では精液中IL-8, MCP-1, IL-6は他の2群に比較して有意に高値であった(いずれも $p < 0.01$)。また、IL-8, MCP-1, IL-6と精子運動率の間には有意な負の相関(それぞれ $r = -0.416$, $p < 0.01$; $r = -0.589$, $p < 0.01$; $r = -0.538$, $p < 0.01$)を認めた。

以上の結果より精液中IL-8, MCP-1, IL-6は濃精子症および精子運動率低下に強く関与していることが示唆された。

5. 子宮内膜波状運動と妊孕性の関係—第2報—

○沖 利通, 丸田邦徳, 伊集院博文
中村佐知子, 桑波田理樹, 山崎英樹
中江光博, 堂地 勉, 永田行博
(鹿児島大産婦)

子宮内膜波状運動と妊孕性の関係について検討した。

自然周期, クロミフェン周期, hMG周期の3群で、妊娠例の妊娠周期と非妊娠周期, 妊娠経験のない非妊娠周期に3群に分けて、子宮内膜波状運動パターンを観察した。

子宮内膜波状運動の出現率では、3群とも、排卵期に90%以上出現したが、黄体期では60%以上、妊娠周期では10~30%にしか出現しなかった。子宮内膜波状運動が認められた周期での検討では、自然周期・クロミフェン周期では、妊娠周期の波自体の周期Tが長く、頻度の少ないゆっくりした波であるのが特徴があった。hMG周期では妊娠周期とその他の周期との差は全くなく、黄体期でも活発な内膜運動が見られた。黄体期の後半に子宮内膜運動が出現した症例は、妊娠しても流産や切迫流産などの異常が起りやすかった。

黄体期の子宮内膜波状運動の消失の有無は妊孕性を評価する上で非常に有用である。

6. 妊娠成立月経周期の子宮内膜と流産の関連性についての検討

○神山 茂, 宮城博子, 當間 敬
東 政弘, 金澤浩二 (琉球大産婦)

妊娠が成立した月経周期(妊娠周期)の子宮内膜(EM)の厚さと、その後の流産の関連性について検討した。

一般不妊症治療にて妊娠が成立した症例で、妊娠周期の排卵日から排卵2日前の間に経腔超音波検査(USG)にてEMの所見が得られた50例を対象とした。妊娠の判定はUSG上の胎嚢確認にて行った。

EMが10mm未満のI群(n=13)と10mm以上のII群(n=37)の2群間において流産率を比較した。各群の流産率は、I群で53.8%(7/13)、II群で8.1%(3/37)であり、I群で有意に高率であった($p < 0.01$)。I群とII群の平均年齢は各々、 33.9 ± 6.1 歳、 32.8 ± 5.0 歳、排卵誘発施行率は各々、38.5%(5/13)、37.8%(14/37)であり、この2群間で平均年齢や排卵誘発施行率に差は無かった。

一般不妊症治療において、妊娠が成立した月経周期における排卵直前の経腔超音波検査上の子宮内膜所見は、その後の流産と関連性があることが示された。

7. 絨毛膜下血腫と染色体異常に関する検討

○山崎健太郎, 増崎英明, 中山大介
牟田邦夫, 蓮尾敦子, 河野雅洋
石丸忠之 (長崎大産婦)

染色体異常児が流産に至る背景には、絨毛膜下血腫が関与している可能性がある。そこで、絨毛膜下血腫と染色体異常の関連について検討した。

当科で流産と診断され、染色体分析を行った61例(流産群)のうち絨毛膜下血腫が認められたのは66%で、このうち75%に染色体異常が検出された。一方、絨毛膜下血腫が認められなかった21例のうち、52%に染色体異常が検出された。両者における染色体異常の頻度に有意差は認められなかった($\chi^2 = 3.197$)。さらに、生児を得て、かつ新生児に異常のみられなかった61例の絨毛膜下血腫の有無を調査した(正常群)。

正常群61例のうち絨毛膜下血腫が認められたのは49%であった。正常群と流産群における絨毛膜下血腫の発生頻度に有意差は認められなかった($\chi^2 = 3.352$)。すなわち、絨毛膜下血腫は妊娠初期において、そのおよそ半数に認められるが、染色体異常や

流産との直接的な関連は少ないと考えられた。

8. 着床前遺伝子診断における8細胞期胚の biopsy の有用性の検討

○丸田邦徳, 沖利通, 中村佐知子
伊集院博文, 堂地 勉, 永田行博
(鹿児島大産婦)

着床前遺伝子精度の向上を目的に, マウス8細胞期胚から1個から4個の割球を biopsy し, 胚の生存性と生仔獲得率を検討した。

8細胞期胚のうち biopsy 割球数0個: A群, 1個: B群, 2個: C群, 3個: D群, 4個: E群, 4細胞期胚からの biopsy 割球数0個: F群, 1個: G群とした。

72時間後の expanded blastocyst 率は, A群: 68.0%, B群: 64.0%, C群: 40.7%, D群: 22.7%, E群: 0.0%, F群: 68.2%, G群: 57.1%であった。生仔獲得率は, A群: 27.2%, B群: 20.0%, C群: 21.4%, D群: 0.0%, E群: 0.0%, F群: 25.0%, G群: 22.2%であった。得られた生仔に全く異常は認めなかった。8細胞期胚でも biopsy 割球数が2個までなら, 4細胞期胚から1割球 biopsy の場合と胚発育と生仔獲得率は同等であった。

以上より, 4細胞期胚から1割球 biopsy の場合より8細胞期胚から2割球 biopsy の方が, DNA量が2倍となり複数回の遺伝子の診断が可能になる点で有用であると思われる。

9. IVF-ET におけるピルビン酸除去培養液の有用性の検討

○園田桃代, 田村理子, 詠田由美
本庄 考, 沖 俊江, 瓦林達比古
(福岡大産婦)

培養液作製試薬の中で最も lot の不安定なピルビン酸 (PA) を除去した培養液を作製してヒト IVF-ET に使用し, その有用性を検討した。

HTF を作製する過程において PA を添加しない modified HTF (mHTF) を作製し, IVF の際には蛋白として患者血清を添加した。mHTF を使用した 61 症例 103 採卵周期 (mHTF 群) と, 従来の HTF を使用した 34 症例 39 採卵周期 (cHTF 群) の IVF-ET 成績を比較検討した。

10%血清加 mHTF の PA 濃度は 0.16 ± 0.05 mg/dl で, 20%血清加 mHTF の PA 濃度は 0.22 ± 0.04 mg/dl であった。cHTF 群と mHTF 群の間には採卵数, 受精率, 移植胚数に差は認めなかった。mHTF 群の対

胚移植周期妊娠率は 24.1%, 早期流産率は 16.7% で, cHTF 群の対胚移植周期妊娠率は 18.4%, 早期流産率は 14.3% で両群に有意差は認めなかった。

PA 除去培養液はヒト IVF-ET 培養液として有用であると考えられた。

10. 体外受精胚移植における quality control としてのエンドトキシンおよび β -D グルカン測定の意味

○岩政 仁, 田中信幸, 西村宏祐
小野田親, 永田康志, 松浦講平
岡村 均 (熊本大産婦)

IVF-ET における培養液のエンドトキシン (E) 測定は胚発育環境にとって重要であるとの報告が多いが, β -D グルカン (D) に関する報告は少ない。そこで今回, 媒精後の 10% 非働化血清加 HTF (IM) の E および D 濃度を検討した。

IVF-ET 16 症例を対象に, 採卵後 3 時間の前培養後に媒精し, その 12~16 時間後に受精を確認した。この際の IM における E・D 濃度を各々エンドスペー法, ファンギテック G テストにて測定し, 胚発育の形態学的評価 (Fragmentation) との相関より検討した。

E 濃度は 21.07 ± 12.2 pg/ml, D 濃度は 3.28 ± 0.85 pg/ml であった。D は胚の fragmentation と相関 (相関係数 0.74) がみられたが, E との相関は認められなかった。

D 測定は IVF-ET の胚発育環境把握に有用であると考えられた。

11. 卵胞液のガス分析—卵の成熟との関係—

○吉山賢一, 肥後貴史, 河崎良和
永井義雄, 長峰由香里, 加藤明彦
小池弘幸, 池ノ上克 (宮崎医科大産婦)
戸枝通保
(とえだウィメンズクリニック)

体外受精を行うにあたって, 卵の成熟度の評価は過排卵法の妥当性の検討, 前培養時間の決定等に重要な意味を持つ。我々は客観的な卵の成熟度の評価方法として, 卵胞液のガス分析に注目して検討した。

平成 9 年 2 月から 7 月までの間に当科で行った 75 周期を対象とした。採卵時に卵胞液を採取し, 卵胞液の量, ガス分析を行った。また卵の成熟度を肉眼的に判断し, 過熟 (G0) 成熟 (G1) 未熟 (G2) の判定を行った。

分析した卵胞総数は244であった。卵の得られなかったもの46(18.8%)、変性卵12(4.9%)、G0 17(7.0%)、G1 126(51.6%)、G2 43(17.6%)であった。卵胞液の量は、G0: 5.23 ± 1.61 ml (mean \pm SD), G1: 3.64 ± 1.38 ml, G2: 2.78 ± 1.09 ml, ガス分析では、pH: G0: 7.333 ± 0.039 , G1: 7.393 ± 0.048 , G2: 7.464 ± 0.083 , PCO₂: G0: 34.87 ± 6.42 mmHg, G1: 29.96 ± 6.96 mmHg, G2: 23.50 ± 8.34 mmHg, PO₂: G0: 131.8 ± 21.2 mmHg, G1: 138.6 ± 14.9 mmHg, G2: 148.8 ± 16.3 mmHgであった。

卵の成熟度とガス分析、とくにpH, PCO₂の間に関連性が認められた。

12. The Relationship between Sperm Morphology determined by Strict Criterion and Embryo Quality in Conventional IVF and ICSI patients.

○ Paul E. Kihale, Takafumi Utsunomiya,
Keiko Hirotsuru and Keizo Ando
(St. Luke Clinic)

The aim was to find out the relationship between sperm morphology determined by strict criterion and embryo quality in patients undergoing conventional IVF (c-IVF) and ICSI. Thirty six couples took part in this study. It was found out that when the normal sperm morphology was <4%, both the rates of fertilization and embryo cleavage per retrieval were low in c-IVF, namely 7% and 8% respectively but relatively high in ICSI patients ie 50% and 45% respectively. Also when the morphology was <4%, the embryo quality as represented by Gd. I, II, III and IV was poor in c-IVF patients ie 0.7%, 0, and 0 respectively but relatively good in ICSI patients ie 0.22%, 18% and 22% respectively. These results also suggest that patients with poor sperm morphology should undergo ICSI right away instead of waiting until c-IVF fails.

13. 顕微授精胚の質に影響を及ぼす卵および精子性状についての検討

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

ICSI施行後の妊娠率に影響する所見を卵および精子性状の点から検討を行った。

対象は1995年5月から1997年3月迄にICSIにより4回以上不妊治療を受けた患者181周期とし、常にグレードが高い胚ができる群を良好胚群、常にグ

レードが低い胚ができる群を不良胚群、それ以外を中間群とし検討した。

181周期中60周期が良好胚群、36周期が中間群、85周期が不良胚群となった。HNG総投与量、E₂値、穿刺卵胞数、受精率、射出精液の精子濃度(P<0.01)、ペネトラック値、良好精子率(P<0.05)、で有意差があり、各群間の値は、良好胚群で2675IU, 1777pg/ml, 13個, 78%, 109×10^6 /ml, 54mm, 15%, 中間群で2811IU, 1988pg/ml, 13個, 65%, 49×10^6 /ml, 46mm, 11%, 不良胚群で3587IU, 1075pg/ml, 8個, 66%, 59×10^6 /ml, 48mm, 7%であった。ICSIにおいて移植時の胚のグレードは、精子性状は良好精子率が高いほうが良く、卵の側からは、HMG総投与量は少なく、E₂値の低い方が良好胚が得られた。

14. 体外受精/胚移植における多胎発生防止のための至適移植胚数の検討

○ 松田和洋, 平野隆博, 前田康貴
伊藤正信, 糸野陽子, 波多江正紀
(鹿児島市立病院産婦)

多胎発生を防止し、かつ妊娠率の低下をきたさない至適移植胚数の検討。

1995年1月から1997年4月の期間に、顕微授精を含む体外受精症例のうち胚移植が可能であった253周期について、移植胚数別の妊娠率、多胎率について検討した。

253周期のうち79周期(31.2%)に妊娠が成立した。移植胚数を1個群、2個群、3個以上群に分けると、妊娠率は1個群で12.5%(4/32)、2個群で34%(17/50)、3個以上群で33.3%(57/171)となり、移植胚1個群では他の群に比べて妊娠率が低い傾向にあったが、移植胚2個群と3個以上群では同等の妊娠率であった。一方、双胎以上の多胎発生率は2個群では5.9%(1/17)、3個以上群では28.1%(16/57)と、移植胚3個以上群において多胎発生率が5倍近く高い傾向にあった。

IVF/ETにおいて多胎の発生を抑え、かつ妊娠率を低下させないための至適移植胚数は2個が妥当である可能性が示唆された。

15. 凍結融解胚移植法における胚の Grade と妊娠・非妊娠例との関係について

○安東桂三, 広津留恵子, 長木美幸
佐藤真紀, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦)

1996年5月20日より本年7月4日までの間に当院にて凍結融解による胚移植を施行した74症例を対象とし, 凍結時および融解時の胚の Grade と妊娠の関係を検討した.

凍結法は前核期胚凍結および分割胚凍結で, 凍結保護剤として Propanediol および Sucrose を使用, プ

ログラムフリーザーによる急速凍結法を用いた. 融解は自然周期およびhMGによる刺激周期にて行い, 融解後2時間の培養を行い, 移植した.

平均 Grade は凍結時 1.96 ± 0.39 であったが, 融解時 2.37 ± 0.44 となった. 妊娠は12周期に成立し, 妊娠率は16.4% (12/73) となった. また妊娠例はいずれも凍結時に最良胚 grade は2以上であり, 移植時にもその最良 grade が2となっている周期が83.3% (10/12) であった. 妊娠例と非妊娠例では子宮内膜厚さ (1.17 ± 0.22 vs 0.96 ± 0.29 , $P < 0.01$) およびhCG切替え時の E_2 値 (549 ± 373 vs 372 ± 328 , $P < 0.05$) に有意な差が存在した.

倫理委員会議事録

平成 10 年 2 月 16 日，日本不妊学会事務局において，第 32 回倫理委員会が開催された。

出席者：森理事長，廣井倫理委員長，矢内原，佐藤，小林，伊藤，久保の各委員。

本委員会における検討および合意事項

- 1) これまですでに理事会報告，倫理委員会報告などで代理母を含む生殖医療に関する倫理的，社会的な留意事項について公示してきたが，ここに会員の注意を改めて喚起するために会告として再度掲載することとした。
- 2) 生殖医療としての代理母に関しては，現時点では会員はこれに関与すべきではないとの意見で一致した。
- 3) 不妊治療に対する生殖医療の役割と限界について総括的議論が必要であるという意見が出され，今後の検討項目とすることが承認された。

関連学会開催のご案内

第21回 産婦人科マイクロサージャリー学会学術講演会

会 期：平成10年8月6日（木）
会 場：川崎市産業振興会館
〒210-0913 神奈川県川崎市幸区堀川町66-20
TEL 044-548-4114

プログラム：

ワークショップ1：外来診療における卵管性不妊の診断と治療

座長 高山雅臣（東京医科大学教授） 雨宮 章（聖マリアンナ医科大学教授）

- | | |
|-----------------------------------|-------------------|
| 1) 子宮卵管造影法の有用性とその限界 | 齊藤 真一（東邦大学） |
| 2) 超音波卵管疎通性検査 | 藤脇伸一郎（聖マリアンナ医科大学） |
| 3) 微細子宮鏡を用いた卵管疎通性検査 | 高田 淳子（東京医科大学） |
| 4) office laparoscopy による卵管性不妊の診断 | 武内 裕之（順天堂大学） |
| 5) 外来卵管鏡 | 末岡 浩（慶応大学） |

ワークショップ2：卵管性不妊治療—今後の展望

座長 星合 昊（近畿大学教授） 野口昌良（愛知医科大学教授）

- | | |
|------------------------------|--------------|
| 1) ARTかマイクロサージャリーか？ | 高瀬規久也（近畿大学） |
| 2) マクロサージャリーかマイクロサージャリーか？ | 西田正人（筑波大学） |
| 3) IVFかGIFTか？ | 荒木重雄（自治医科大学） |
| 4) 卵管炎とその取り扱い：クラミジア感染による卵管障害 | 野口靖之（愛知医科大学） |
| 5) Laparoscopic tuboplasty | 小林善宗（山王病院） |
| 6) 卵管形成術における術後癒着防止法の進歩 | 長田尚夫（日本大学） |

一般演題：

下記事務局へ申込方法など詳細をお問合せ下さい

申込締切日：平成10年4月24日（当日消印有効）

学術集会事務局・一般演題申込先：

〒216-0015 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1

聖マリアンナ医科大学産科婦人科学教室

第21回産婦人科マイクロサージャリー学術集会事務局

担当：石塚文平

TEL 044-977-8111 FAX 044-977-2944

産婦人科マイクロサージャリー学会

会長 雨宮 章

第38回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会

会 期：平成10年8月7日（金）・8日（土）
会 場：川崎市産業振興会館
〒210-0913 神奈川県川崎市幸区堀川町66-20
TEL 044-548-4114

プログラム：

特別講演：子宮鏡

Rafael F.Valle (Professor of North West University)

座長 高山雅臣（東京医科大学教授）

会長講演：内視鏡の発展

岩田嘉行（第38回日本産科婦人科内視鏡学会会長）

座長 佐藤和雄（日本大学教授）

招請講演：アジア、オセアニアにおける進歩

座長 桑原慶紀（順天堂大学教授） 座長 星合 昊（近畿大学教授）

- 1) 韓国の現状 Min Hur (Professor of Chung-Ang University)
- 2) 中国の現状 夏 恩蘭（北京 首都医科大学教授）
- 3) 台湾の現状 丘 林和（台湾 秀伝病院部長）
- 4) オーストラリアの現状 W.S.Felix Wong (Professor of New South Wales University)

シンポジウム：内視鏡下手術の予後と評価

座長 武谷雄二（東京大学教授） 座長 石丸忠之（長崎大学教授）

- 1) 不妊症に対する内視鏡下手術 三橋洋治（近畿大学）
- 2) 子宮筋腫に対する内視鏡下手術 大須賀穠（東京大学）
- 3) 付属器腫瘍に対する内視鏡下手術 澤田富夫（藤田保健衛生大学）
- 4) 子宮内腔病変に対する内視鏡下手術（子宮鏡手術） 井坂恵一（東京医科大学）
- 5) 救急疾患に対する内視鏡下手術 木挽貢慈（川崎市立川崎病院）

一般演題：

下記事務局へ申込方法など詳細をお問合せ下さい

申込締切日：平成10年4月24日（当日消印有効）

学術集会事務局・一般演題申込先：

〒210-0013 神奈川県川崎市川崎区新川通12-1

川崎市立川崎病院 産婦人科

第38回日本産科婦人科内視鏡学会学術集会事務局

担当：関 賢一

TEL 044-233-5521 FAX 044-245-9600

日本産科婦人科内視鏡学会

会長 岩田 嘉行

第3回日本内分泌学会生殖内分泌分科会

第3回日本内分泌学会生殖内分泌分科会を以下のごとく開催いたしますので、奮ってご参加賜われますようご案内申し上げます。

会 期：平成10年11月27日（金）
会 場：大阪大学コンベンションセンター（学術集会）
〒565-0871 吹田市山田丘6（大阪大学吹田キャンパス内）

招請講演：Spermatogenesis and endocrine system（仮題）
Dr.M.L.Meistrich（Department of Experimental Radiotherapy,
University of Texas M.D.Anderson Cancer Center, Houston, U.S.A.）

シンポジウム：卵と精子の相互作用（仮題）
座長：吉村泰典（慶應大学産婦人科教授）

- | | |
|----------------------------|-------------------|
| 1) 卵母細胞の後天的遺伝修飾と発生 | 河野友宏（東京農業大学） |
| 2) 精子形成における転写制御機構の分子遺伝学的解析 | 藤本弘一（三菱化学生命科学研究所） |
| 3) 卵精子接合とインテグリン分子 | 佐藤英明（東北大学農学部） |
| 4) 卵精子接合とCD46 | 北村雅哉（大阪大学泌尿器科） |
| 5) 卵表層顆粒エキメサイトーシス | 増本伸之（大阪通信病院産婦人科） |
| 6) 卵の活性化とICSI | 柳田 薫（福島医科大学産婦人科） |

連絡先：大阪大学泌尿器科内
第3回生殖内分泌分科会事務局
担当：松宮清美，北村雅哉
〒565-0871 吹田市山田丘2-2
TEL：06-879-3531 FAX：06-879-3539
E-mail:kmatsu @ uro.med.osaka-u.ac.jp

第3回日本内分泌学会生殖内分泌分科会
会長 奥山 明彦

投稿規定

(1997年12月20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、原則として刷り上がり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、200words以内の各抄録（題名、著者名、所属を含む）を添付する。各抄録の下に和文ならびに英語5語以内のKey wordsを付記する。英文はあらかじめ専門家の校閲を受けておくこと。ただし編集委員会で校閲が必要と認めた場合は、その費用を著者負担とする。
8. 投稿原稿は表紙（題名、著者名、所属、住所、ランニングタイトルを和文ならびに英文で明記）、英文抄録、和文抄録、本文（緒言、対象/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40letters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, 白井将文編, 第1版, 新興医学出版, 東京, pp152-166
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. 別刷は著者負担とし、50部を単位とする。原稿表紙に別刷総部数を朱記する。
17. 項目5、15、16にある掲載に要した経費などは、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）〒143-8541
東京都大田区大森西6-11-1
東邦大学医学部第1産科婦人科学教室内
日本不妊学会編集委員会
平川 舜
Tel 03-3762-4151(代) 内線3585
Fax 03-3765-7671

日本不妊学会雑誌 投稿申込票

(この用紙をコピーしてご利用ください)

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：症例報告：その他]

著者名：(6名以上の場合は、別紙に同様の様式でご記入下さい)

フリガナ	会員番号	フリガナ	会員番号
氏名	[所属機関名]	氏名	[所属機関名]
	No.		No.
1.	[]	2.	[]
	No.		No.
3.	[]	4.	[]
	No.		No.
5.	[]	6.	[]

本文ページ数：

文献件数：

和文抄録：600字以内(題名、著者名、所属を含む)

英文抄録：200words以内(題名、著者名、所属を含む)

表の数： 個

図の数： 個

写真の数： 枚

[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字以内)

別刷希望数：()部 50部を単位とし、希望部数を記入。(別刷は有料です。)

フロッピーの添付 [有：無] →機種名：

ソフト名：

※フロッピー添付のない原稿は、初期入力時にミスタッチが生じる事があります。その為、校正時にご迷惑をおかけする場合がありますので、できるだけ原稿フロッピーを添付して下さい。

※フロッピー(あるいは他メディア)への文書登録はできるだけMS-DOSテキストファイル形式で行なってください。

※図・表組のデータは編集変換時にくずれますので、必ずクリアーなプリントを添付してください。

投稿者の資格：本誌への投稿資格は、日本不妊学会会員に限定されていますので、非会員の方は、共著者共に本会事務局宛入会手続を取ってください。

連絡先：代表者名：

連絡先住所(郵便番号)：

電話番号：

ファクシミリ番号：

編集後記

ここ数年、不妊学会雑誌への投稿論文数が減少しています。ちなみに昨年の掲載論文は43篇で100篇以上あった10年前に比較すると半減しています。現在、編集委員会は定例会が基本的に1、4、7、10月に開催され、次号掲載論文の最終決定を行います(たとえば1月の会議で4月号掲載論文の決定を行う)。したがって、審査期間を考慮して定例会のほぼ1ヶ月前までに投稿していただければ、現在のところ次号への掲載が可能で、最短の掲載期間は投稿4ヶ月後です。和文論文が評価されない現状から、基本的に和文誌である本誌への投稿論文数の減少はある意味ではやむを得ない面もありますが、是非、多数の論文の投稿をお願いいたします。

(編集委員 押尾 茂)

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 第43巻第2号

1998年3月25日印刷
1998年4月1日発行

編集発行人 平川 舜
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8F
TEL・FAX (03) 3288-7266
郵便振替 00170-3-93207
印刷・製本 株式会社 パンメディア
東京都新宿区早稲田鶴巻町110
TEL (03) 3209-1810