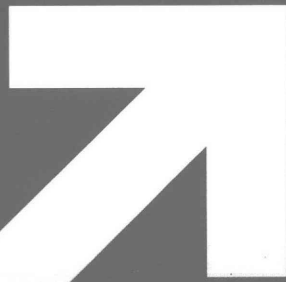


Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌



Vol.44 No.1

January 1999

第44巻 第1号

平成11年1月1日

日本不妊学会・学会誌への投稿についてのお願い

近年、本誌への原著論文の投稿数が減少傾向にあり、このままでは学会誌の編集が困難な状況です。今後優れた論文をこの分野の専門誌である日本不妊学会雑誌へ是非御投稿下さるようお願いいたします。

なお、日本不妊学会では、1995年より本会機関誌の日本不妊学会雑誌に掲載された原著論文を選考対象として、毎年3編の学術奨励賞を授与しています。

本賞は若手研究者の研究を奨励する主旨で、筆頭著者の年齢が掲載時に満40歳以下であることが条件になっており、産婦人科学、泌尿器科学および基礎生物学の3部門より推薦された計3名を、前年度に刊行された1～4号収載の論文の中から選び授与されます。

受賞された方には、

- 1) 日本不妊学会学術奨励賞賞状
- 2) 日本不妊学会オルガノン学術奨励賞賞状
- 3) 記念品 ブロンズの母子像
- 4) 学術奨励金 50万円

が、秋に開催される日本不妊学会総会の席上で表彰、授与され、名誉ある賞です。

なお、日本不妊学会学術奨励賞の推薦方法の詳細は本誌44巻1号、2号に掲載されていますので、ご参照下さい。

1999年1月1日

日本不妊学会学術委員会
委員長 青野敏博

第44回日本不妊学会総会および学術講演会 (第2回予告)

下記により第44回日本不妊学会総会および学術講演会を開催しますので多数の方々がご参加下さいますようお願い申し上げます。

記

期 日：平成11年11月10日(水) 役員会，会長招宴

11日(木) 学術講演会，評議員会，総会，総懇親会

12日(金) 学術講演会

会 場：赤坂プリンスホテル 新宴会場「五色」

〒102-8585 東京都千代田区紀尾井町1-2

TEL：03-3234-1111 FAX：03-3262-5154

演題募集要項，特別講演，教育講演，シンポジウム，その他詳細につきましては次号に予告いたします。一般演題の締め切りは平成11年5月下旬の予定です。

1999年(平成11年)1月

第44回日本不妊学会

会長 矢内原 巧

連絡先：〒142-8666 東京都品川区旗の台1-5-8

昭和大学医学部産婦人科学教室内

第44回日本不妊学会総会事務局

(田原隆三，藤間芳郎，岩崎信爾)

TEL. 03-3784-8551 (医局)

FAX. 03-3784-8355 (医局)

平成10年度第2回通常総会

平成10年度第2回通常総会は下記の如く鹿児島市において開催され、森理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採決を行った。

日 時 平成10年11月12日(木) 13時～14時

場 所 鹿児島市：鹿児島市民文化ホール

開会当時の会員数 4,115名 当日の出席会員数 2,074名(含委任状)

議 事

第1号議案：平成11年度事業計画および予算案に関する件

定款第36条に定める平成11年度事業計画および予算案は、理事会、評議員会の原案通りとすることを全会一致にて承認した。

第2号議案：役員改選の件

役員の支部別定数は従来通りとすることとし、評議員会で承認された候補者につき審議の上、全会一致にて別記の如く次期理事(20名)、監事3名を選出した。

第3号議案：名誉会員推薦の件

理事会および評議員会より推薦された別記5名につき審議の結果、全会一致にて名誉会員とすることを承認した。

第4号議案：功労評議員推薦の件

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

第5号議案：平成13年度学術講演会および総会に関する件

平成13年度学術講演会および総会開催地ならびに会長は、理事会および評議員会の原案通り、下記の如く開催することを全会一致にて承認した。

平成13年度 担当支部 関東支部

会 長 中村 幸雄

開 催 地 東京都

第6号議案：日本不妊学会学術奨励賞に関する件

理事会および評議員会より推薦された下記2名に平成10年度日本不妊学会学術奨励賞を授与することを全会一致にて承認した。

久慈直昭「Insulin-like growth factor-I induced follicular development by stimulating ovarian production of angiotensin II¹」

(42巻1号9頁)

野澤英雄「順行性内精静脈造影による精索静脈瘤の検討」

(42巻2号141頁)

新名誉会員，功労評議員および新役員について

平成10年11月12日開催された平成10年度第2回通常総会において次の5名の会員が新たに名誉会員として，また22名の会員が功労評議員として推薦，承認された。また役員（理事および監事）の改選が行われたので，11月13日臨時理事会を開き，互選により下記の如く理事長，副理事長，常任理事を選出するとともに新評議員および幹事を選任した。

名誉会員 桑 原 惣 隆 島 崎 淳 菅 原 七 郎
 玉 田 太 朗 森 純 一

理 事	理 事 長	森 崇 英	(関西支部)
	副 理 事 長	伊 藤 晴 夫	(関東支部)
	〃	岡 村 均	(九州支部)
	〃	廣 井 正 彦	(東北支部)
	理 事(常任)	青 野 敏 博	(中国四国支部)
	〃 (〃)	守 殿 貞 夫	(関西支部)
	〃 (〃)	小 林 俊 文	(関東支部)
	〃 (〃)	佐 藤 和 雄	(〃)
	〃 (〃)	永 田 行 博	(九州支部)
	〃 (〃)	平 川 舜	(関東支部)
	理 事	石 川 睦 男	(北海道支部)
	〃	井 上 正 樹	(北陸支部)
	〃	今 井 裕	(関西支部)
	〃	武 谷 雄 二	(関東支部)
	〃	百目鬼 郁 夫	(〃)
	〃	中 西 正 美	(中部支部)
	〃	中 村 幸 雄	(関東支部)
	〃	三 浦 一 陽	(〃)
	〃	毛 利 秀 雄	(〃)
	〃	矢内原 巧	(〃)
	監 事	白 井 將 文	(関東支部)
	〃	豊 田 裕	(〃)
	〃	水 口 弘 司	(〃)

功勞評議員

阿 曾 佳 郎	天 野 久 夫	王 丸 鴻 一	大 森 弘 之
岡 田 弘 二	金 岡 毅	川 倉 宏	新 武 三
鈴 木 秋 悦	武 田 佳 彦	都 野 政 也	都 竹 理
寺 島 芳 輝	南 後 千 秋	西 川 春 潔	西 谷 弘
比 嘉 国 郎	平 尾 和 義	三 宅 弘 治	
望 月 眞 人	薬師寺 道 明		

定款評議員

北海道支部

工 藤 隆 一	高 橋 芳 幸	塚 本 泰 司	藤 本 征一郎
---------	---------	---------	---------

東北支部

折 笠 精 一	斉 藤 英 和	佐 藤 英 明	田 中 俊 誠
深 谷 孝 夫			

関東支部

麻 生 武 志	雨 宮 章	伊 吹 令 人	岩 本 晃 明
遠 藤 克	大 島 博 幸	木 下 勝 之	久 保 春
佐 藤 嘉 兵	津 端 捷 夫	星 田 英 彦	穗 坂 正
森 沢 正 昭	横 山 峯 介	吉 田 機	吉 村 泰 典

中部支部

河 上 征 治	川 村 寿 一	玉 舎 輝 彦	寺 尾 俊 彦
水 谷 栄 彦			

北陸支部

泉 徳 和	並 木 幹 夫	布 施 秀 樹	舟 本 寛
-------	---------	---------	-------

関西支部

奥 山 明 彦	萩 田 幸 雄	神 崎 秀 陽	香 山 浩 二
沢 田 勉	野 田 洋 一	星 合 晃	松 田 公 志

中国・四国支部

加 藤 紘	相 良 祐 輔	竹 中 生 昌	田 中 啓 幹
寺 川 直 樹	丹 羽 皓 二		

九州支部

石 丸 忠 之	金 澤 浩 二	杉 森 甫	立 山 浩 道
堂 地 勉	中 村 元 一	宮 川 勇 生	

なお、定款評議員上記55名については、平成11年1月1日より平成12年12月31日まで評議員を委嘱します。本誌面をもって委嘱状とさせていただきます。また、支部評議員については次号（44巻2号）に掲載致します。

幹 事

浅石岩押末永松	井田本尾岡尾浦	光晃光講	興肇明茂浩一平	味石遠久田中森	香塚藤保原村沢	勝文春隆元正	也平克海三一昭	安市遠齐堤藤横	部川藤藤原山	裕智俊英峯	司彦明和治浩介	石苛岡生津細	川原田水端井	博真捷美	通稔弘夫彦
---------	---------	------	---------	---------	---------	--------	---------	---------	--------	-------	---------	--------	--------	------	-------

会 告

平成11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43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11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11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11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43巻 ____号 ____～ ____頁 (平成10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44巻 第1号

平成11年1月1日

—目 次—

原 著

Strict Criteria による精子形態評価の IVF に対する有用性

..... 高野陽子, ポール・キハイレ, 広津留恵子
宇津宮隆史 1

対卵巣の形態的選別により得られた卵母細胞の体外受精における牛胚の発生的比較(英文)

..... M.D.Varisanga, 村上正夫, M.Fahrudin
鈴木達行, C.Sumantri 7

精子凍結保存の臨床応用

..... 石川博通, 早川邦弘, 青柳貞一郎
大橋正和, 畠 亮, 宮地系典 15

鼠径ヘルニア手術後閉塞性無精子症に対する顕微鏡下精路再建術

..... 市川智彦, 小宮 顕, 鈴木啓悦, 伊藤晴夫
湯浅譲治, 鈴木規之, 村上信乃, 始関吉生 21

Lewis 系ラットにおける片側性精管結紮の両側精巣の造精機能へおよぼす影響

..... 石津和彦, 白石晃司, 中根比呂志
内藤克輔, 馬場良和, 瀧原博史 29

着床前期のマウス卵管, 子宮におけるマクロファージの分布と Ia 抗原

および酸フォスファターゼの発現

..... 飯田修一, 高橋重智, 鈴木雅洲
増田高行, 名倉 宏, 笠井憲雪 35

マウスにおける反復過排卵誘起の処理間隔と異常分割像を示す未受精卵子の

出現率との関係(英文)

..... 金山喜一, 遠藤 克, 内山 寛, 佐藤嘉兵 43

不死化ヒト顆粒膜細胞株の樹立ならびにその細胞性格の検討

..... 新田 慎, 片渕秀隆, 大場 隆, 永井隆司
田中信幸, 松浦講平, 岡村 均
藤間芳郎, 清水幸子, 矢内原 巧 47

卵管間質部閉塞症例に対する Gn-RHa 療法の有用性についての検討

..... 矢野義明, 森田峰人, 中熊正仁
内出一郎, 久保春海, 平川 舜 57

卵管所見別に見た腹腔鏡下卵管形成術の治療成績

..... 中熊正仁, 森田峰人, 矢野義明
内出一郎, 久保春海, 平川 舜 61

症例報告

男性不妊以外の臨床症状を認めなかったPrimary Ciliary Dyskinesiaの1例

..... 野澤英雄, 吉田 淳, 永尾光一, 原 啓
石井延久, 三浦一陽, 北澤吉昭 67

地方部会講演抄録

..... 73

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 44, No. 1, 1999)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- The Effect of Sperm Morphology Evaluation Using Strict Criteria
..... Y. Takano, P. E. Kihale, K. Hirotsuru and T. Utsunomiya 1
- Developmental Competence of Bovine Embryos *in vitro* Derived from Morphologically
Classified Ovarian Pairs
..... M. D. Varisanga, M. Murakami, M. Fahrudin
T. Suzuki and C. Sumantri 7
- Clinical Application of Sperm Cryopreservation
..... H. Ishikawa, K. Hayakawa, T. Aoyagi,
M. Ohashi, M. Hata and K. Miyaji 15
- Microsurgical Reanastomosis for Obstructive Azoospermia Caused by Inguinal Herniorrhaphy
..... T. Ichikawa, A. Komiya, H. Suzuki, H. Ito, J. Yuasa
N. Suzuki, S. Murakami and Y. Shiseki 21
- The Effect of Unilateral Vasectomy on Spermatogenesis in the Bilateral Testes in Lewis Rats
..... K. Ishizu, K. Shiraishi, H. Nakane
K. Naito, Y. Baba and H. Takihara 29
- The Distribution of Macrophages and The Expression of Ia Antigen and Acid Phosphatase
in the Uterus and Oviduct of Mice During the Preimplantation Period
..... S. Iida, S. Takahashi, M. Suzuki
T. Masuda, H. Nagura and N. Kasai 35
- Relationship between Intervals of Repeated Induced-Ovulation and Appearance of
Unfertilized Eggs Showing Abnormal Cleavage in Mice
..... K. Kanayama, T. Endo, H. Uchiyama and K. Sato 43
- Establishment and Characterization of Human Granulosa Cells Immortalized with SV40
Large T Antigen
..... M. Nitta, H. Katabuchi, T. Ohba, R. Nagai, N. Tanaka,
K. Matsumura, H. Okamura, Y. Toma, Y. Shimizu and T. Yanaihara 47
- Treatment of Proximal Tubal Occlusion Using a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists
..... Y. Yano, M. Morita, M. Nakakuma
I. Uchida, H. Kubo and S. Hirakawa 57

Laparoscopic Appearance and Fertility Outcome after Laparoscopic Surgery in Tubal
Infertility Patients

..... *M. Nakakuma, M. Morita, Y. Yano*

I. Uchide, H. Kubo and S. Hirakawa 61

Case report

A Case of Primary Ciliary Dyskinesia with No Clinical Symptom other than Male Infertility

..... *E. Nozawa, A. Yoshida, K. Nagao, H. Hara*

N. Ishii, K. Miura and Y. Kitazawa 67

Strict Criteria による精子形態評価の IVF に対する有用性

The Effect of Sperm Morphology Evaluation Using Strict Criteria

セント・ルカ産婦人科

高野 陽子

Yoko TAKANO

広津留 恵子

Keiko HIROTSURU

ポール・キハイレ

Paul E. Kihale

宇津宮 隆史

Takafumi UTSUNOMIYA

St. Luke Clinic

Oita 870-0947, Japan.

男性不妊因子のなかでもとくに精子の異常形態率は増加傾向にあり、厳密な評価による正常形態精子率はIVFの成果に何らかの関連をもつと思われる。そこで、体外受精200周期(conventional-IVF施行117周期、ICSI施行71周期、両方法施行12周期)において、精子の形態と一般精液検査所見との関係および受精率、胚の形態との関係について検討した。KrugerらのTygerberg strict criteriaに基づき精子の形態観察を行い、strict criteria正常形態率(s.c.正常形態率)とした。

s.c.正常形態率は、一般精液所見の濃度、運動率、正常形態率、BR(Blutstan Reactivity)陽性率、良好精子率(形態および運動性が良好である精子)とのあいだに各々 $r=0.52, 0.48, 0.52, 0.64, 0.55$ の相関を示した。受精率に関して、conventional-IVFにおいてはs.c.正常形態率と $r=0.45$ の相関を示し、ICSIにおいては相関を示さなかった。また胚の形態のグレードに関しては両者ともs.c.正常形態率と相関を認めなかった。

conventional-IVF83周期において、s.c.正常形態率6%未満(9周期)、6%以上15%未満(31周期)、15%以上(43周期)の3群に分けたところ、受精率が順に $56.0 \pm 25.7\%$ 、 $75.7 \pm 25.5\%$ 、 $87.8 \pm 14.5\%$ であり、s.c.正常形態率が高くなると受精率は有意に増加した($P < 0.001$)。s.c.正常形態率を測定することにより、conventional-IVFにおいて受精率を予測することができ、またそれが6%未満の症例はICSI施行が望ましいと思われた。

キーワード：strict criteria, 正常形態率, 受精率, 精子形態

(日不妊会誌 44:1-6 1999)

緒 言

近年、不妊症に占める男性因子の頻度は約1/3とも約1/2ともといわれ¹⁾、精子の数、運動率、奇形率の増加が問題になっている。WHOが1987年に定めた正常精子基準である濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率50%以上、奇形率50%以下という値は、1992年に奇形率70%以下と改定され²⁾、とくに異常形態精子が増加傾向にあることがうかがわれ、精子の形態についての研究は今後必須であろうと思われる。

1986年Krugerらによって導入されたTygerberg strict criteria³⁾は、精子をPapanicolaouやDiff-Quik、Spermac染色等によって染色し、油浸下1000倍にて観察するという方法で、とくに精子の頭部を厳密に評価できるとして知られており(Table 1)⁴⁾、conventional-IVF(in-vitro fertilization)において従来のWHO基準よりも受精率を予測するために有効であると考えられている。

今回我々は、Tygerberg strict criteriaに基づき精子の形態を観察し、strict criteria(以下s.c.と略す)正常

Table 1 Comparison of evaluation criteria for morphologically normal spermatozoa according to the strict criteria used in this atlas and WHO criteria.

Criteria for Morphologically Normal Spermatozoa		
	Strict Atlas Criteria	WHO Criteria
Head	Smooth oval configuration. Acrosome should comprise about 40 to 70% of anterior sperm head. Normal head dimensions are: Pap ^b D-Q ^c Length 3—5 μ m 5.0—6.0 μ m Width 2—3 μ m 2.5—3.5 μ m Head width should be between three-fifths and two-thirds of the normal head length Borderline normal head forms and/or nearly oval heads with no gross abnormalities are regarded as abnormal.	Oval-shaped head with a regular outline. Acrosome cap should cover more than one-third of the head surface. Normal head dimensions are: Length 3—5 μ m Width 2—3 μ m Head width must be between one-half and two-thirds of head length Borderline normal head forms and/or nearly oval heads with no gross abnormalities are regarded as normal.
Neck	No abaxial implantations and must be intact.	
Midpiece	Slender (axially attached), approximately 1 μ m in width and approximately 1½ times the head length. No cytoplasmic droplets of more than half the head size.	Slender, less than one-third of the width of the head, straight and regular in outline, aligned with the longitudinal head axis and approximately 7 to 8 μ m long. No cytoplasmic droplets more than half the head size.
Tail	Uniform, slightly thinner than the midpiece, uncoiled, approximately 45 μ m long.	Slender, uncoiled and should present a regular outline. At least 45 μ m long.

^b Papanicolaou stain.^c Diff-Quik stain.

形態率と一般精液検査所見との関係およびconventional-IVF, ICSI(intracytoplasmic sperm injection)における受精率, 胚の形態のグレードとの関係を検討し, またconventional-IVF施行時において受精率を予測するためのカットオフ値について検討したので報告する。

対象および方法

1 対 象

当院にて1997年12月から1998年4月までに体外受精を行った157症例200周期についてretrospectiveに分析した。そのうちconventional-IVF施行は97症例117周期, ICSI施行は54症例71周期, 両方法施行は6症例12周期であった(1周期ではあるが2周期とみなした)。また, 凍結精子を用いたIVF施行例は除外した。

2 方 法

Krugerら⁵⁾の方法に従い行った。すなわちIVFの媒精に用いる射出精液が十分に液化した後, スライド

ガラスに約5 μ lのドロップを滴下し, スメアを作成した。室温にて乾燥後Diff-Quikで染色し, 油浸下1000倍にて少なくとも200精子を観察し, 全精子数に対する形態良好精子数の割合を正常形態率とした。全症例はswim-up法により精液処理を行い, IVFの媒精に供した。inseminationから約18時間後の雌雄前核の確認をもって受精成立と判断した。

結 果

1 一般精液検査所見各項目との関係

s.c.正常形態率と一般精液検査所見各項目との関係を表2に示す。濃度, 運動率, WHO基準に従った正常形態率, BR(Blutstan Reactivity)陽性率⁶⁾, swim-up処理後の鏡検において, 形態かつ運動性が良好であるとみられる良好精子率とのあいだにそれぞれ $r=0.52, 0.48, 0.52, 0.64, 0.55$ の相関が認められ, とくにBR陽性率とでは良好な相関を示した。

2 conventional-IVFとstrict criteria正常形態率

conventional-IVFを行った123周期のうち, 卵子数

表2 strict criteria正常態率と一般精液検査所見の関係

n=200		
精液検査所見		相関係数
濃度(×10 ⁶ /ml)	y=5.83x+43.72	0.52
運動率(%)	y=1.30x+28.53	0.48
正常形態率(%)	y=1.16x+34.52	0.52
BR陽性率(%)	y=1.00x+18.97	0.64
良好精子率(%)	y=1.52x+11.96	0.55

表3 conventional-IVFにおける
一般精液検査所見と受精率の関係

n=83		
精液検査所見		相関係数
濃度(×10 ⁶ /ml)	y=0.037x+74.77	0.12
運動率(%)	y=0.31x+63.60	0.22
正常形態率(%)	y=0.67x+42.54	0.31
BR陽性率(%)	y=0.91x+47.29	0.38
良好精子率(%)	y=0.31x+68.06	0.23

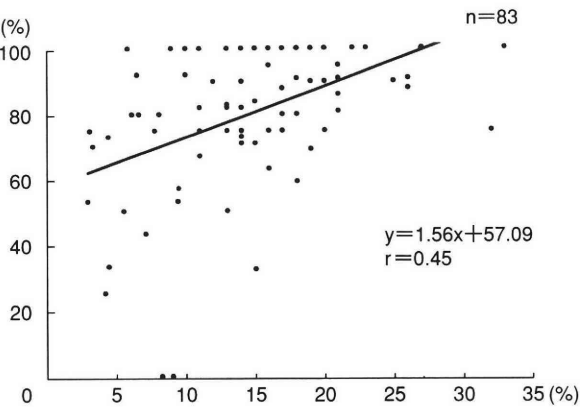


図1 strict criteria正常形態率と受精率の関係
(conventional-IVF)

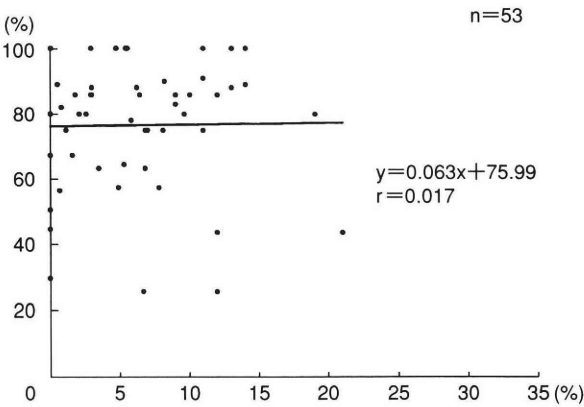


図2 strict criteria正常形態率と受精率の関係
(ICSI)

が4個以上であった83周期について受精率を検討したところ、s.c.正常形態率と $r=0.45$ の相関が認められた(図1)。また同周期における、一般精液検査所見各項目と受精率との関係についても検討したところ、BR陽性率とのあいだに $r=0.38$ の弱い相関がみられたが、それ以外は認められなかった(表3)。

またその周期のうち、ET(embryo transfer)を行った65周期について、ET時の胚のグレードを検討した。当院では胚の形態のグレードをBourn Hall Clinicの評価法を用い^{7,8)} 4段階に分類している。そこで、全分割胚数に対するグレード1または2の良好胚数の割合を良好胚率として算出し、s.c.正常形態率との相関を検討したが、相関は認められなかった。

著者らは、conventional-IVF周期に受精率が30%未

満であった症例には、次の周期からICSIを施行している。そこで卵子数4個以上の83症例のうち、受精率30%未満群($n=4$)、30%以上群($n=79$)に分けると、s.c.正常形態率はそれぞれ $6.4\pm2.6\%$ 、 $15.0\pm6.4\%$ を示し、受精率が低い場合、s.c.正常形態率は有意に低く($P<0.01$, 表4)、逆にs.c.正常形態率が低ければ受精率も低いことが示唆された。

3 ICSIとstrict criteria正常形態率

著者らは、ICSI施行の約18時間後の雌雄前核の確認をもって受精成立と判定しているが、ICSIを行った77周期のうち、卵子数が4個以上であった53周期について受精率を検討したところ、s.c.正常形態率とのあいだに相関は得られなかった(図2)。前核期胚

表4 受精率30%未満群、30%以上群におけるstrict criteria正常形態率

n=83			
	n	受精率(%)	strict criteria正常形態率
受精率30%未満群	4	12.5±14.4	6.4±2.6
受精率30%以上群	79	83.2±16.9	15.0±6.4

} $P<0.01$

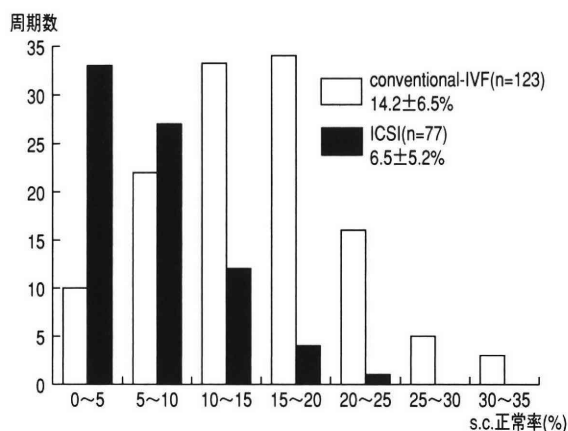


図3 conventional-IVF周期, ICSI周期の
strict criteria正常形態率の分布

を凍結した9周期を除外した44周期についてETを行ったが, conventional-IVFと同様に良好胚率に相関は認められなかった。

4 カットオフ値の検討

conventional-IVF, ICSIの全周期のs.c.正常形態率の分布を図3に示す。conventional周期は $14.2 \pm 6.5\%$, ICSI周期は $6.5 \pm 5.2\%$ であり, 各々15~20%, 0~5%に最も多い分布を示した。

初めてIVFを施行する症例や, WHO基準に基づく

鏡検ではconventionalでよいと思われるがs.c.正常形態率が低値である場合, また良好精子が非常に少ない場合など, ICSIかconventionalかを判断しかねる症例に対して, 著者らは, 採卵数が多い場合, conventionalとICSIの両方法を施行している(split cycles⁵⁾)。本研究では, 6症例に対し両方法を施行し, その結果を表5に示す。s.c.正常形態率は $6.6 \pm 2.5\%$ であり, 6例中5例(83%)においてICSI施行の方が高い受精率が得られ, そのうち2例(40%)が, conventionalでは受精しなかった(各々正常形態率は9.0%, 9.2%であった)。

表4, 図3, 表5で示されたs.c.正常形態率から, ICSI施行かconventional施行かの判定基準値は6%, 15%であろうと思われ, それらをカットオフ値とした。6%未満群(n=9), 6%以上15%未満群(n=31), 15%以上群(n=43)の3群に分類すると, それぞれの受精率は $56.0 \pm 25.7\%$, $75.7 \pm 25.5\%$, $87.8 \pm 14.5\%$ を示し, 3群間に有意差が認められた($P < 0.001$, 表6)。よって, 6%未満群をpoor prognosis group, 6%以上15%未満群をgood prognosis group, 15%以上群をnormal form groupとし, 受精率の予測可能なカテゴリーとして臨床に応用している。

考 察

Tygerberg strict criteriaを用いた精子の機能評価の目安については, Krugerらによると, 形態良好精子

表5 split cyclesのstrict criteria正常形態率および受精率

症例	conventional-IVF		ICSI	
	strict criteria 正常形態率(%)	卵子数	卵子数	受精率(%)
1	8.5	3	2	100
2	3.7	3	2	100
3	9.0	4	3	67
4	6.2	5	8	100
5	3.0	15	17	88
6	9.2	3	3	33
$6.6 \pm 2.5\%$				

表6 3グループにおける受精率

n=83

	strict criteria 正常形態率(%)	n	受精率(%)
poor prognosis group	4.3 ± 1.0	9	56.0 ± 25.7
good prognosis group	10.7 ± 2.5	31	75.7 ± 25.5
normal form group	19.5 ± 4.3	43	87.8 ± 14.5

$P < 0.001$

が4%未満, 4~14%, 14%以上の3つの予測カテゴリーを設け, それぞれ 'poor prognosis' 'good prognosis' 'normal form' とし, 受精率に有意差を認め, 妊娠率にも差があったと報告している⁹⁾。しかしそのカットオフ値, および受精率, 妊娠率への影響についての見解は各施設により若干, あるいは大きな違いがある。Lundinら¹⁰⁾はカットオフ値を5%, 10%とし, 受精率に有意差を認めたが, 妊娠率には差がないと報告しており, 同様にVawdaら¹¹⁾はカットオフ値を4%, 12%としている。またZollnerら¹²⁾は, asthenozoospermia の症例で, s.c.正常形態率が8%以下であればmicromanipulationの必要があると述べている。Svalanderら¹³⁾は, ICSIを行えばs.c.正常形態率は受精率に影響せず, そのため, s.c.正常形態率が4%未満の場合はconventional-IVFではなくICSI施行が望ましいとし, Oehningerら¹⁴⁾も同様に報告している。一方, 神野ら¹⁵⁾は, Krugerらの基準を若干修正し独自の判断基準を設け, 12%, 40%をカットオフ値とし, 妊娠率に有意差を認め, また胚移植率, 流産率にも差があると報告している。

今回の我々の研究では, s.c.正常形態率は一般精液検査所見と相関を示し, とくにBR陽性率と良好な相関が得られた。またconventional-IVFにおいて, 一般精液検査所見は受精率と相関しないか, あるいは弱い相関を示すにとどまった。一方, s.c.正常形態率と受精率とのあいだでは $r=0.45$ の相関を示した。ICSIでは受精率はs.c.正常形態率に相関せず, 胚の形態については, 両者ともs.c.正常形態率は影響しないと思われた。

Tygerberg strict criteriaは, 精子の頭部を厳密に評価するもので, それはacrosomeの形態も含んでいる。Menkveldら¹⁶⁾は, 1250倍でstrict criteriaとは別にacrosomeの観察を行い, acrosome indexとmorphologyとのあいだで良好な相関を得, さらにacrosome index単独でも受精率の低値群, 高値群の間に有意差があると報告した。著者らのacrosome観察は, swim-up処理後に400倍にて行っており, Menkveldらと条件・方法は異なるが, 本結果からもacrosomeの形態観察は重要でありまた, strict criteriaの有効性がうかがわれた。

当院では, 前のサイクルでconventional-IVFの結果受精率が30%未満だった症例には勿論, 初周期の症例に対しても, 処理前の数や運動率が低かったり, また処理後, 有効精子がなかったり濃度が低い場合はICSIを施行してきたが, 実際にはWHO基準によるパラメーターのみではICSIの適用を決定することが

困難な場合が多かった。そこでまず表4で, conventional-IVFで受精率30%未満, 以上であった周期のs.c.正常形態率がそれぞれ6.4%, 15.0%であることが, また図3からICSIとconventional-IVFそれぞれのs.c.正常形態率をretrospectiveに分析した結果, 6.5%, 14.2%であることが明らかとなり, さらにconventionalかICSIかの判断困難例に対し両方法を施行するとICSIの方が良好な結果が得られ, s.c.正常形態率は6.6%であることが明らかとなった。以上3点から, 判断基準値は6%, 15%であろうと推察され, $P<0.001$ の有意差を得た。

形態観察において, strict criteriaよりWHO基準の方が受精率の予測に有効であるという報告¹⁷⁾がある。しかし我々が今回検討した結果, WHO基準に従った正常形態率は, s.c.正常形態率と相関があった($r=0.52$)が, 受精率との相関はなかった($r=0.31$)。そしてs.c.正常形態率の方が受精率と相関がある($r=0.45$)ことが明らかとなり, 精子のより厳密な形態観察, 評価はIVFの成果に影響すると思われた。

conventional-IVF施行かICSI施行かの判断に悩む症例はまれではなく, 精液所見からみたICSIの適用については, 未だ明確な基準がないのが現状である。本研究で我々は, s.c.正常形態率のカットオフ値を6%, 15%と定め, 受精率の予測が可能であることを明らかにした。Oehningerら¹⁴⁾は, s.c.正常形態率が4%以下の症例を対象とした研究で, HIC(high insemination concentration)-IVFよりもICSIのほうが胚のquality, 着床率, 妊娠率が良好な結果を得たと報告している。以上から, poor prognosis groupに該当する症例はICSI施行が望ましいと考えられる。また, split cyclesの6例中4例(症例1, 3, 4, 6)がgood prognosis groupに属し, そのうち2例(症例3, 6)で受精が得られなかったという事実も注目すべきことであり, よってgood prognosis groupである症例は, ときにはsplit cyclesとして慎重に扱うべきであるということも示唆される。

文 献

- 1) 斉藤英和, 斉藤隆和, 廣井正彦(1998) 不妊症の原因と治療。産婦治療 76: 281-286
- 2) World Health Organization (1992) WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp 43-44.
- 3) Kruger T F, Menkveld R, Stander F S H, et al. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. Fertil.Steril. 46: 1118-1123

- 4) Menkveld R., Oette E E, Kruger T F, et al. (1991) Atlas of human sperm morphology, pp 115-118
- 5) Kruger T F, Acosta A A, Simmons K F, et al. (1987) New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*. 30 : 248-251
- 6) 藤野祐司, 伊藤文俊, 松岡逸子 他(1996) ヒト体外受精における精子Acrosome reaction簡易染色法の有用性. *日受着会誌* 13 : 91-93
- 7) 宇津宮隆史(1997) ICSI受精卵の着床・流産. *ICSIの手技と臨床* 150-157
- 8) Brinsden P R and Rainsbury P A (1992) A textbook of *in vitro* fertilization and assisted reproduction. The Parthenon Publishing Group Ltd, pp 187-204
- 9) Kruger T F, Acosta A A, Simmons K F, et al. (1988) Predictive value of abnormal sperm morphology in *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 49 : 112-117
- 10) Lundin K, Soderlund B and Hamberger L (1997) The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 12 : 2676-2681
- 11) Vawda A I, Gundy J and Younglai E V (1996) Sperm parameters as predictors of in-vitro fertilization: the importance of strict criteria sperm morphology. *Hum. Reprod.* 11 : 1445-1450
- 12) Zollner U, Schleyer M and Steck T (1996) Evaluation of a cut-off value for normal sperm morphology using strict criteria to predict fertilization after conventional in-vitro fertilization and embryo transfer in asthenozoospermia. *Hum. Reprod.* 11 : 2155-2161
- 13) Svalander P, Jakobsson A-H, Forsberg A-S, et al. (1996) The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. *Hum. Reprod.* 11 : 1019-1022
- 14) Oehninger S, Kruger T F, Simon T, et al. (1996) A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing in-vitro fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 11 : 1086-1089
- 15) 神野正雄, 大澤淑子, 杉村和男 他(1992) ヒト体外受精における精子形態分析の重要性. *日産婦会誌* 44 : 203-307
- 16) Menkveld R, Rhemrev J P T, Franken D R, et al. (1996) Acrosomal morphology as a novel criterion for male fertility diagnosis: relation with acrosin activity, morphology (strict criteria), and fertilization in vitro. *Fertil. Steril.* 65 : 637-644
- 17) Morgentaler A, Fung M Y, Harris D H, et al. (1995) Sperm morphology and in vitro fertilization outcome : a direct comparison of World Health Organization and strict criteria methodologies. *Fertil. Steril.* 64 : 1177-1182

(受付: 1998年6月29日)

(受理: 1998年9月20日)

The Effect of Sperm Morphology Evaluation Using Strict Criteria

Yoko Takano, Paul E. Kihale, Keiko Hirotsuru and Takafumi Utsunomiya

St. Luke Clinic

Oita 870-0947, Japan

Two hundred *in vitro* fertilization (IVF) cycles (117 conventional-IVF cycles, 71 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles and 12 split cycles) were studied in order to evaluate the correlation between sperm morphology and semen analysis parameters and between fertilization rate and embryo quality. Sperm morphology was evaluated using the Tygerberg strict criteria reported by Kruger et al.

The normal form rate was correlated with each semen parameter: concentration ($r=0.52$), motility ($r=0.48$), the normal form rate according to WHO criteria ($r=0.52$), BR (Blutstan Reactivity) positive rate ($r=0.64$) and good sperm rate ($r=0.55$).

In conventional-IVF cycles, the normal form rate was correlated with the fertilization rate ($r=0.45$). As for the other cycles, there was no correlation between the normal form rate and the fertilization rate in ICSI cycles. Embryo quality was not correlated with normal form rate in either the conventional or ICSI cycles.

The 83 conventional-IVF cases were separated into 3 groups: the normal form rate $< 6\%$ (9 cycles), $6\% \leq$ the normal form rate $< 15\%$ (31 cycles), the normal form rate $\geq 15\%$ (43 cycles). The fertilization rate in the three groups was found to be $56.0 \pm 25.7\%$, $75.7 \pm 25.5\%$, $87.8 \pm 14.5\%$ respectively. As the normal form rate increased, the fertilization rate also significantly increased ($P < 0.001$).

The results suggested that the fertilization rate in conventional-IVF might be estimated from the normal form rate and cases in which the normal form rate is under 6% should be treated by ICSI.

Key words: strict criteria, normal form rate, fertilization rate, sperm morphology

(Jpn. J. Fertil. Steril., 44:1-6 1999)

Developmental Competence of Bovine Embryos *in vitro* Derived from Morphologically Classified Ovarian Pairs

Modest Diamond VARISANGA, Masao MURAKAMI,
Mokhammad FAHRUDIN and Tatsuyuki SUZUKI

The United Graduate School of Veterinary Sciences,
Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515, Japan.

Cece SUMANTRI

Faculty of Animal Husbandry, Bogor Agricultural University,
Bogor 16151, Indonesia.

Abstract: With an objective of establishing ovarian morphological classes as an indicator of the subsequent oocyte quality for an IVF- or live cow aspiration-produced embryos, 40 pairs of ovaries from 5 morphological classes (Nor-CL; DF-CL; DF+CL-Nor; DF-Nor; and Nor-Nor) were studied. Comparisons were made between the members of the 3 subgroups formed (CL; Nor; and DF-subgroups). In CL-subgroup, the ovaries of CL-Nor pairs yielded a higher ($P<0.01$) number of oocytes per ovary compared to the CL-DF and CL+DF-Nor pairs (9.5 ± 2.4 vs 7.9 ± 2.0 and 6.2 ± 1.9 , respectively). In the Nor-subgroup, Nor-CL pairs resulted into a higher ($P<0.01$) oocyte yield than that of Nor-DF (8.3 ± 2.2 vs 6.6 ± 1.9 , respectively), but the later was lower ($P<0.01$) compared to the pairs of Nor-Nor (8.2 ± 2.1). And, in the DF-subgroup, the DF-CL pairs gave higher ($P<0.05$) number of oocytes than that of DF-Nor (6.9 ± 1.9 vs 6.0 ± 1.6 , respectively). Similarly, the number of cleaved embryos in CL-Nor pairs was higher ($P<0.01$) compared to that of CL-DF and DF+CL-Nor (75% vs 72% and 65%, respectively). Further, the number of cleaved embryos in CL-DF pair was higher ($P<0.01$) than that obtained in the DF+CL-Nor pairs. For the Nor-subgroup, the number of cleaved embryos in Nor-CL pairs was higher ($P<0.01$) than that observed in the Nor-DF (6.1 ± 1.7 vs 4.5 ± 1.5 , respectively); the later being inferior ($P<0.05$) to that of Nor-Nor (5.5 ± 1.5). In the DF-subgroup, the number of cleaved embryos in DF-CL pairs was superior ($P<0.01$) to that obtained from DF-Nor (4.9 ± 1.6 vs 4.1 ± 1.1 , respectively). Regarding the number of fertilized oocytes which developed to blastocyst stage, the pairs of CL-Nor resulted into a higher ($P<0.01$) blastocyst rate than both CL-DF and DF+CL-Nor pairs [46% (3.3 ± 1.0) vs 35% (2.0 ± 1.0) and 33% (1.4 ± 1.9), respectively]. The Nor-CL pairs gave a higher ($P<0.01$) rate of blastocyst than the Nor-DF+CL; Nor-DF; and Nor-Nor [43% (2.6 ± 1.1) vs 27% (1.6 ± 0.7) and 33% (1.5 ± 0.7), respectively]. No significant difference was observed among the members in the DF-subgroup. Although not tested, the tendency observed in these results shows that there is a correlative relationship between oocyte yield and the subsequent developmental competence of the recovered oocytes in an IVF system. Not surprisingly, the number of oocytes collected, cleaved and developed to blastocyst portrayed by the 5 ovarian classes in this experiment in a decreasing order was: CL-Nor; Nor-Nor; CL-DF; DF+CL-Nor; and DF-Nor. Therefore, these results collectively suggest that the morphological classification of the pairs of ovaries could be used as a handy means of predicting the developmental competence of the oocytes in an *in vitro* system, and that the presence of a dominant follicle in either one or both ovaries in a pair has a negative effect on the productive effience of IVF-produced bovine embryos.

Key Words: ovary; morphology; estrous cycle; dominant follicle; corpus luteum; ; cleavage; blastocyst

(Jpn. J. Fertil. Steril., 44:7-14 1999)

Introduction

The production of embryos by *in vitro* maturation (IVM), fertilization (IVF) and culture (IVC) of oocytes aspirated directly from ovarian follicles is performed for therapeutic reasons in humans, for production in domestic animals, and for experimental research in laboratory animals. Together with the IVF production of bovine embryos, another area of particular interest in this field is the aspiration of oocytes from a live cow, by the use of ultrasound-guided equipments. The commercial value of this method over the IVF lies in that it would allow breeders to produce a high number of embryos from their best cows even when these animals are old, having reproductive disorders such as adhesions or blocked fallopian tubes, in their early pregnancy terms, not responding to induced multiple ovulations or are no longer capable of becoming pregnant¹⁻⁵⁾.

Ultrasonography studies have revealed the fact that ovarian follicular development during the bovine estrous cycle occurs in 2 to 3 waves^{2, 6-8)} and that, during each wave, a single follicle becomes dominant whereas other follicles in the same wave regress⁹⁻¹¹⁾. From this event, it is believed that the dominant follicle of ovulation exerts an inhibitory effect over the growth and development of other follicles in the cohort. "Dominance" is therefore a process whereby the large, potentially ovulatory follicle escapes atresia, whereas subordinate follicles undergo regression. Depending on these morphological and endocrinological aspects of the ovaries at a particular moment of the estrous cycle of a cow, various studies have been conducted to determine the reproductive performance both *in vivo*^{1, 12-16)} and in an *in vitro*-produced bovine embryos^{1, 17-21)}.

However, regarding the *in vitro*-produced embryos, many of the studies conducted so far relied heavily on the individual cow's performance or on a pooled classification of the ovaries from an abattoir (i.e., with same morphological characteristics but somehow unidentical since the morphology of the other ovary making a pair is not known, and on top of that, such ovaries are basically from different sources/animals). Bearing in mind that intraovarian activities are mainly of endocrinological nature and occurs bilaterally

rather than in a unilateral manner, the best way of studying the quality of oocytes for an IVF production of embryos on an individual basis should be based on the separation of each pair of ovaries from each cow right away from the beginning.

Therefore, the aim of the present experiment was to establish morphological classification of the ovaries and study how these morphological aspects of an ovary could influence on both the quality of the oocytes recovered and their developmental capacity *in vitro*.

Materials and Methods

Experimental Design

Ovaries from Holstein cows were collected separately from each cow using perforated small polythine bags and transported from the abattoir in Ringer's solution supplemented with penicillin-G (100 IU/ml) and streptomycin sulfate (0.2 mg/ml) at 30 to 32°C. Ovaries were classified according to their morphological aspect such as the presence or absence of the corpus luteum, dominant follicle and cyst (be it singularly or in a conjuncture per given ovary). It should be noted that an ovary was classified as normal (Nor) when there was apparently none of the characteristics mentioned above, and the distinction between dominant follicle (DF) and cystic ovary (Cys) was mainly based on their respective size and surface texture. Also, an ovary was considered a corpus luteum one (CL) irrespective to the corresponding size and stage within the cycle.

In Vitro Maturation (IVM)

Oocytes from follicles between 2 to 5 mm in diameter were aspirated with an 18-G needle using as an aspiration medium, modified PBS (PBS supplemented with 3% BSA) solution. The aspirated oocytes were separately collected and washed 3 times in a maturation medium which consisted of TCM-199 (Earle's salt; Gibco, Grand Island, NY USA) supplemented with 5% day-7 superovulated cow serum [SCS; Matsuoka et al.²⁰⁾,], 0.01 mg/ml of follicle stimulating hormone (FSH; Denka Pharmaceutical Co., Kawasaki, Japan) and 50 µg/ml gentamicin (Sigma Chemicals Co., St. Louis MO, USA). The cumulus oocytes complexes (COCs) were then incubated in the maturation me-

dium for 22h at 38.5°C in 5% CO₂ in air.

In Vitro Fertilization (IVF) and Culture (IVC)

Frozen semen were thawed in water-bath (37°C), washed 2 times using 2.5 mM Caffeine in Bracket and Oliphant's medium (Caff-BO), according to the standard procedure²², by centrifugation at 500g for 5 min. This was followed by suspending the contents in Caff-BO supplemented with 1% bovine serum albumin (BSA; Sigma) and 20 µg/ml heparin (Shimizu Pharmaceutical Co., Shimizu, Japan) to yield a final sperm concentration of 5×10^6 /ml. A 100 µl aliquot of sperm suspension was covered with mineral oil and then preincubated for 1 h at 38.5°C in 5% CO₂ in air. Matured oocytes were transferred into sperm microdrops (individually, i.e., oocytes from each ovary separately) for insemination.

Five hours after insemination, the COCs were washed 3 times and transferred into culture medium for further development. The culture medium was made up of TCM-199 supplemented with 5% SCS, 5 µg/ml insulin (Wako Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japan) and 50 µg/ml gentamicin. At 48 h later, the cumulus cells surrounding the embryo were removed by repeated pipetting, while the cumulus cell layer attached to the bottom of the culture dish was used as a co-culture. The culture medium (approximately 700 µl/each well) was changed every 96 h. Cleavage (2-, 4-, and 8-cell) rate was recorded starting from the 48 h after fertilization (Day=0), and so do the number of cleaved embryos that had developed to blastocyst stage on days 7, 8, and 9 post insemination.

Data Analysis

Although the number of classes formed from the morphological aspect of the ovaries did follow somewhat a normal distribution, due to the wide disparity on the number of observations among them, only 5 classes were considered for analysis of oocyte yield, cleavage and blastocyst rates. For this, 40 pairs of ovaries were used from each morphological class, and binomial data were analysed by χ^2 test (per pair) with overall data compared by ANOVA among the subgroups formed. Means or averages, are presented as least square mean $\pm$ SEM.

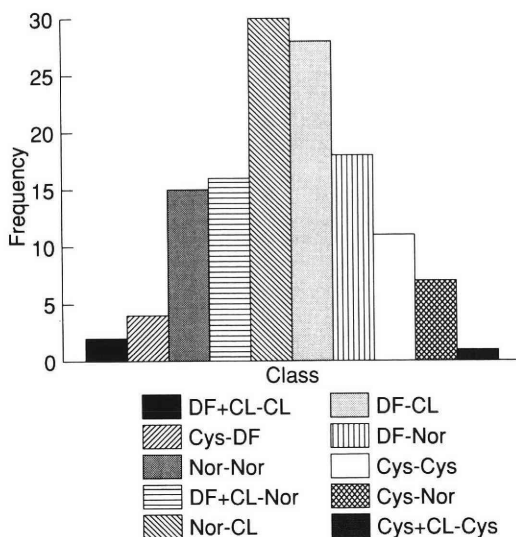


Figure 1. Frequency (distribution) of the ovarian morphological classes observed in this study

Results

Table 1 summarizes the oocyte yield, cleavage and blastocyst rates for the five ovarian morphological classes analyzed in this experiment. For simplicity purposes, those data were analyzed separately (as shown in Figs. 2 to 4), by comparing the three indices above between the 3 (i.e., CL-, Nor-, and DF-subgroups). When the CL-bearing (CL-subgroup) pairs were compared (Fig 2), the pair of CL-Nor ovaries yielded a higher ($P < 0.01$) number of oocytes per ovary than that of CL-DF and CL+DF-Nor (9.5 ± 2.4 vs 7.9 ± 2.0 and 6.2 ± 1.9 , respectively). Moreover, the later two pairs also differed significantly ($P < 0.01$). Similarly, members in the Nor-subgroup varied in accordance to the other component of the other ovary making a pair. Hence, Nor-CL ovaries gave a higher ($P < 0.01$) oocyte yield compared to the pair of Nor-DF (8.3 ± 2.2 vs 6.6 ± 1.9 , respectively); and the later pair resulted to a lower ($P < 0.01$) yield of oocytes than that of Nor-Nor (8.2 ± 2.1). When the DF-CL pairs were compared to those of DF-Nor (in the DF-subgroup), the former yielded a higher ($P < 0.05$) number of oocytes than the later (6.9 ± 1.9 vs 6.0 ± 1.6).

As seen in Fig 3, the highest cleavage indice among the three subgroups belonged to one component pair

Table 1. Oocyte yield, cleavage and blastocyst rates for the five ovarian morphological classes

Group		Oocyte yield			Cleavage rate			Blastocyst rate		
		x ± SEM	Total	Range	x ± SEM	%	Range	x ± SEM	%	Range
I	Nor	8.3 ± 2.2d	332	5 – 18	6.1 ± 1.7i	73	3 – 13	2.6 ± 1.1u	43	1 – 5
	CL	9.5 ± 2.4a	380	6 – 16	7.1 ± 1.8l	75	4 – 12	3.3 ± 1.0r	46	2 – 5
II	DF	6.9 ± 1.9h	276	3 – 12	4.9 ± 1.6q	71	2 – 8	1.6 ± 0.7	33	0 – 3
	CL	7.9 ± 2.0b	316	3 – 14	5.7 ± 1.8j	72	3 – 11	2.0 ± 1.0s	35	0 – 4
III	DF+CL	6.2 ± 1.9c	248	3 – 13	4.2 ± 1.4k	65	2 – 8	1.4 ± 0.9t	33	0 – 3
	Nor	7.6 ± 1.8	304	4 – 11	5.4 ± 1.4	71	3 – 8	1.6 ± 0.7v	27	0 – 3
IV	DF	6.0 ± 1.6g	240	3 – 10	4.1 ± 1.1p	68	2 – 7	1.4 ± 0.7	34	0 – 3
	Nor	6.6 ± 1.9e	263	4 – 14	4.5 ± 1.5m	68	2 – 10	1.5 ± 0.7w	33	0 – 2
V	Nor	8.2 ± 2.1f	326	5 – 14	5.5 ± 1.5n	67	3 – 8	1.9 ± 0.8x	35	0 – 4
	NOR	8.1 ± 2.4	322	4 – 16	5.6 ± 1.8	69	3 – 10	1.9 ± 0.9	34	1 – 5

Oocyte yield : i) a-b; a-c; b-c; d-e; e-f (P<0.01) and ii) g-h (P<0.05).

Cleavage: i) i-j; i-k; j-k; l-m; p-q (P<0.01) whereas ii) m-n (P<0.05).

Blastocyst: i) r-s; r-t; u-v; u-w; u-x (P<0.01) and ii) s-t (P<0.05).

The overall oocyte yield from the five ovarian morphological classes were, arranged in a descending order, as follows: Nor-CL; Nor-Nor; CL-DF; Df+CL-Nor; and DF-Nor.

of the CL-subgroup (i.e., the CL-Nor pair). Comparisons made between this CL-subgroup showed that the CL-Nor pair of ovaries gave a higher (P<0.01) number of cleaved embryos than both the CL-DF and DF+CL-Nor pairs (7.1 ± 1.8 vs 5.7 ± 1.8 and 4.2 ± 1.4, respectively). Further, in a similar manner as to that of oocyte yield, the number of cleaved embryos in the CL-DF pairs was higher (P<0.01) than that of DF+CL-Nor pairs in this CL-bearing ovaries. There was also significant differences among the pairs of ovaries com-

posing the Nor-subgroup. The cleavage rate from the CL-Nor pairs was higher (P<0.01) compared to Nor-DF (6.1 ± 1.7 vs 4.5 ± 1.5, respectively); while that of Nor-Nor pairs differed (P<0.05) to that of Nor-DF (5.5 ± 1.5 vs 4.5 ± 1.5, respectively). In the DF-subgroup, cleavage rate obtained from the DF-CL pairs was superior (P<0.01) to that of DF-Nor (4.9 ± 1.6 vs 4.1 ± 1.1, respectively).

Regarding the number of fertilized oocytes per ovary which succeeded to develop up to blastocyst

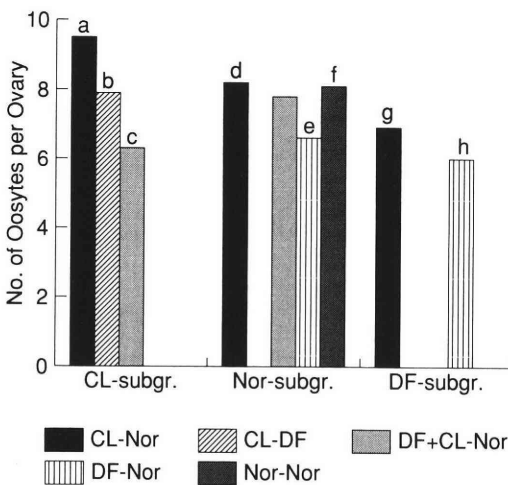


Figure 2. Comparisons of oocytes recovery among the subgroups
a-b; a-c; b-c; d-e; e-f (P<0.01) and g-h (P<0.05)

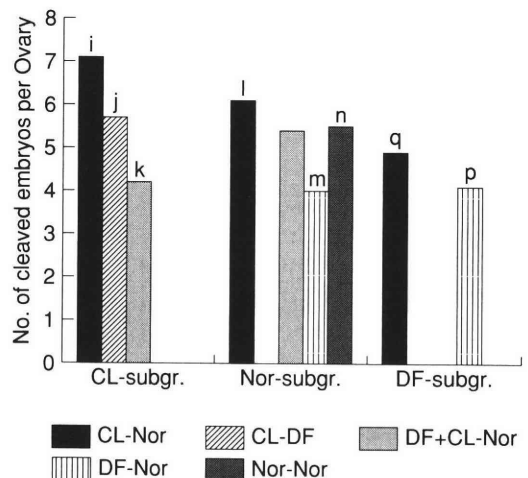


Figure 3. Number of cleaved embryos among the three subgroups
i-j; i-k; j-k; l-m; p-q (P<0.01) whereas m-n (P<0.05)

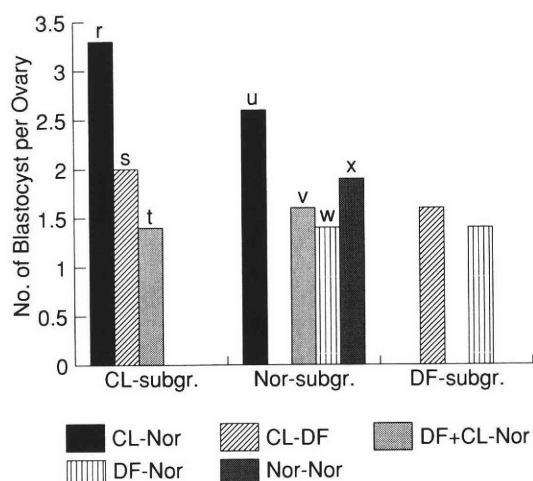


Figure 4. Blastocyst rate among the subgroups
r-s; r-t; u-v; u-w; u-x ($P<0.01$) while s-t ($P<0.05$)

stage (Fig. 4), starting with the CL-subgroup, the pairs of CL-Nor resulted into higher ($P<0.01$) blastocyst rate than both CL-DF and DF+CL-Nor pairs of ovaries [46% (3.3 ± 1.0) vs 35%, (2.0 ± 1.0) and 33% (1.4 ± 0.9), respectively]. Moreover, the cleavage rate of the later pairs was also inferior ($P<0.05$) to that of CL-DF. When the same indice was analyzed among the components of Nor-subgroup, the Nor-CL pairs gave higher ($P<0.01$) rates of blastocyst than both Nor-DF+CL, Nor-DF, and Nor-Nor [43% (2.6 ± 1.1) vs 27% (1.6 ± 0.7) and 33% (1.5 ± 0.7), respectively]. However, there was no significant difference observed among the members of DF-subgroup. Again, the overall blastocyst rate from the five ovarian morphological classes in a decreasing order was: Nor-CL; Nor-Nor; CL-DF; DF+CL-Nor; and DF-Nor.

Discussion

Although some attempts have been made to collect the ovaries from individual cows/heifers^{19, 23} for an IVF production of blastocysts, morphological classification of these ovaries prior to being aspirated and the subsequent oocyte quality for the *in vitro*-systems remains yet to be elucidated. In this experiment we tried to classify the ovaries (on individual basis) according to their morphological aspects, proceeding ahead to see whether such characteristics could influence on both the number of oocytes recovered and their subsequent quality to cleavage and blastocyst

development *in vitro*.

The distribution of the ovarian morphological classes in this experiment indicates that the ability of an ovary to yield viable oocytes is a function which depends on its morphological characteristics. This confirms previous data showing that even under hormonal stimulations (such as superovulatory treatments), ovulatory response may occur up to between 75-80% of the treated animals²⁴. Further, the best superovulatory response tends to be among the 30% of treated donors, such as in our case, the first ovarian morphological class (CL-Nor).

The results obtained in this experiment show that, oocyte yield, the number of embryos cleaved and developed to blastocyst are a function of ovarian morphological status, which in turn depends on the stage of estrous cycle of the cow. Starting with the yield of oocytes per ovary, our results indicate that there is a wide variability among the ovarian morphological classes formed, a fact that confirms the results previously reported^{8, 23} when they studied the *in vitro* developmental capacity of the oocytes collected from individual cows. Indeed, together with the fact that this variation might be due to the idiosyncratic differences between the individual cows (genetic, age, and management back grounds), the prevailing condition of the estrous cycle of a cow at a given time should not be overlooked. We observed that the pair of Nor-CL ovaries yielded the highest number of oocytes per ovary, followed by that of Nor-Nor; DF+CL-Nor; and the last was from DF-Nor pairs. By considering the first and last pairs of these classes in terms of oocyte yield, fewer oocytes were obtained from the DF-Nor pair of ovaries due to the atresia of small follicles as a result of the presence of a dominant follicle. Similar observations have been documented⁹⁻¹⁰, that the development of a dominant follicle is closely associated with the regression of subordinate follicles, and new growth of small follicles occurs only once the large dominant follicle has ceased growth. Besides, similar negative effect of the presence of dominant follicle on the superovulatory response in donor animals have also been reported^{4, 16, 25-27}.

On the other hand, the combination or simply the presence of corpus luteum in the pair of ovaries seems to: i) indicate that the cow is apparently cycling nor-

mally (like in our case, the Nor-CL pairs), and ii) counteract the negative effects caused by the presence of a dominant follicle (such as the DF-CL; DF+CL-Nor pairs), hence relatively improving their rates of oocyte recovery. Although the precise endocrine control of the patterns of follicular recruitment, selection, growth and regression, particularly during the early and mid-luteal phase of the estrous cycle are not fully understood, it is thought that the secretion of high levels of estradiol, progesterone and inhibin by the corpus luteum results in a prolonged suppression of FSH and consequently the inhibition of the development of large follicles²⁸⁻³⁰⁾.

Our results also support the concept that the intraovarian environment to which oocytes are exposed is a major cause of the variability in developmental competence of the oocytes^{12, 31)}, because the same pattern as that of oocyte yield (per morphological classes) was followed through cleavage to the blastocyst stages. These results are in contrast to those obtained by Smith et al.¹⁾, with regards to the developmental competence of the oocytes obtained in the presence or absence of a dominant follicle. The disagreement may be due to the differences on the number of cows used, breed, seasonal effects, culture media and the fact that different personnel performed the fertilization/maturation procedures (while in our case it was the same person who did it). Nevertheless, although the morphological classification of the ovaries prior to follicular aspiration (be it from a live cow or abattoir sources) could be used as an indicator of the developmental ability of the oocytes collected as intended in this experiment, caution should be taken since there ought to be some variations on the individual cows^{18, 23)}, probably due to both genetic and management factors.

In summary, the present study shows that: i) the morphological classification of the ovaries prior to follicle aspiration could be used an indicator of the developmental competence of the oocytes collected, and ii) the presence of a dominant follicle in either one or both ovaries in a pair has a negative effect on the reproductive efficiency of the IVF-produced bovine embryos.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Hiroshima and Kita Kyushu abattoirs for the supply of ovaries and the Yamaguchi Prefecture Zootechnic Experimental Station for providing the superovulated cow's serum.

References

- 1) Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, et al. (1996) Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of large follicle in cattle. *J Reprod Fertil* 106 : 193-199
- 2) Ireland JJ and Roche JF (1987) Hypotheses regarding development of dominant follicles during a bovine oestrus cycle. In *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals* Eds. J.R.Roche and D.O'Callaghan. Martinus Nijhoff, Dordrecht : pp1-18
- 3) Kruip ThAM, Pierterse MC, van Beneden TH, et al. (1991) A new method for bovine embryo production : a potential alternative to superovulation. *Veter Rec* 128 : 208-210
- 4) Pierterse MC, Vos PLAM, Kruip ThAM, et al. (1991) Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35 : 857-862
- 5) Stroud BK and Myers MW (1992) Clinical results in commercial IVF facility. *Proceedings of the 11th Annual Convention of American Embryo Transfer Association, Atlanta, Georgia, October 8-10*, pp31-39
- 6) Matton P, Adelakoun V, Countre Y, et al. (1981) Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the oestrous cycle. *J Anim Sci* 52 : 813-820
- 7) Pierson RA and Ginther OJ (1987) Intraovarian effect of the corpus luteum on ovarian follicles during early pregnancy in heifers. *Anim Reprod Sci* 15 : 53-60
- 8) Ginther OJ, Knopf L and Kastelic JP (1989) Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. *Anim Reprod Sci* 20 : 187-200
- 9) Sirois J and Fortune JE (1988) Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. *Biol Reprod* 39 : 308-317
- 10) Savio JD, Keenan L, Boland MP, et al. (1988) Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 83 : 663-671
- 11) Savio JD, Boland MP and Roche JF (1990) Development of dominant follicles and length of ovarian

- cycles in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil* 88 : 581-591
- 12) Callesen H, Greve T and Hyttel P (1986) Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25 : 71-86
- 13) Lavoie M and Fortune JE (1990) Follicular dynamics in heifers after injection of PGF_{2a} during the first wave of follicular development. *Theriogenology* 33 : 270-270 (abst)
- 14) Guilbault LA, Grasso F, Lussier JG, et al. (1991) Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 91 : 81-89
- 15) Lu KH, Shi DS, Jiang HS, et al. (1991) Comparison of the developmental capacity of bovine oocytes from superovulated and non stimulated heifers. *Theriogenology* 35 : 234-234 (abst)
- 16) Bungartz L and Niemann H (1994) Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J Reprod Fertil* 101 : 583-591
- 17) De Loos F, Van Vliet C, Van Maurik P, et al. (1989) Morphology of the immature bovine oocytes. *Gamete Res* 24 : 197-204
- 18) Goto K, Takuma Y, Ooe N, et al. (1990) *In vitro* development of bovine oocytes collected from ovaries of individual cows after *in vitro* fertilization. *Jpn J Anim Repro* 36(2) : 110-113
- 19) Funahashi H, Aoyagi Y, Takeda T, et al. (1991) Developmental capacity of bovine oocytes collected from ovaries of individual heifers and fertilized *in vitro*. *Theriogenology* 36 : 427-434
- 20) Matsuoka K, Sakata S, Ichiro K, et al. (1992) Effect of superovulated cow serum for culture of bovine oocytes to the blastocyst stage. *Theriogenology* 37 : 254 (abst)
- 21) Brackett BG and Zuelke (1993) Analysis of factors involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 39 : 43-64
- 22) Brackett BG and Oliphant G (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12: 260-274
- 23) Mermillod PC, Massip A and Dessy F (1992) Collection of oocytes and production of blastocysts *in vitro* from individual, slaughtered cows. *J Reprod Fertil* 96 : 717-723
- 24) Rusbridge SM and Webb R (1991) Control of the lifespan of the corpora lutea induced during early luteal phase of the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fertil* 8 : 21 (abst)
- 25) Goodman A and Hodgen L (1983) The ovarian triad of the primate menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36 : 1-73
- 26) Driancourt MA (1987) Follicular dynamics and intraovarian control of follicular development in the ewe. In *Follicular Growth and Ovulation Rate in Farm Animals* Eds. J.F Roche and D. O'Callaghan. Martinus Nijhoff, Dordrecht pp87-105
- 27) Grasso F, Guilbault LA, Roy GL, et al. (1987) Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-p at the beginning of the oestrus cycle. *Theriogenology* 31 : 1209-1219
- 28) Spicer L, and Zinn SA (1987) Relationship between concentrations of cortisol in ovarian follicular fluid and various biochemical markers of follicular differentiation in cyclic and anovulatory cattle. *J Reprod Fertil* 81 : 221-226
- 29) Alila HW and Dowd JP (1991) The control of corpus luteum function in domestic animals. In *Oxford Reviews of Reproductive Biology* Eds. S.R. Milligan. Vol 13, Oxford Univ Press pp203-237
- 30) Webb R, Gong JG, Law AS, et al. (1992) Control of ovarian function in cattle. *J Reprod Fertil* 45 : 141-156 (supp)
- 31) Monniaux D, Chupin D and Saumande J (1983) Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19 : 55-81

(Received March 27 : 1998)

(Accepted September 22 : 1998)

対卵巣の形態的選別により得られた卵母細胞の体外受精における牛胚の発生的比較

山口大学大学院連合獣医学研究科

バリサンガ モデスト ダイヤモンド, 村上正夫, ハウルディン モハマド, 鈴木達行

ボゴール農業大学畜産学部

スマントリ チェチュ

卵巣の形態的選別がその後の卵母細胞の体外受精または生体からの卵母細胞採取により作出した胚の品質の指標となりうるかを検討するため5つの形態的選別[Nor(優勢卵胞と黄体の存在しないもの)-黄体, 優勢卵胞-黄体, 優勢卵胞と黄体が共存-Nor, 優勢卵胞-Nor, Nor-Nor]から40対の卵巣を実験に供した。比較は3つの選別群(黄体, Norと優勢卵胞群)間で行った。

黄体-Norでは黄体-優勢卵胞と黄体+優勢卵胞とNor(各々 9.5 ± 2.4 vs 7.9 ± 2.0 と 6.2 ± 1.9 個)に比較して卵巣別卵母細胞数が有意($p < 0.01$)に多かった。そしてNorと3つの選別群ではNor-黄体がNor-優勢卵胞(各々 8.3 ± 2.2 vs 6.6 ± 1.9 個)よりも卵母細胞数が有意($p < 0.01$)に多かった。しかし後者はNor-Nor(8.2 ± 2.1 個)よりも有意($p < 0.01$)に少なかった。優勢卵胞と3つの選別群のうち優勢卵胞-黄体は優勢卵胞-Nor(各々 6.9 ± 1.9 vs 6.0 ± 1.6 個)よりも多かった。同様に黄体Norは黄体優勢卵胞と優勢卵胞+黄体-Nor(各々 7.1 ± 1.8 vs 5.7 ± 1.8 と 4.2 ± 1.4 個)に比べて胚の分割率が高かった($p < 0.01$)。さらに黄体優勢卵胞の分割率は優勢卵胞Norの対に比べて有意($p < 0.01$)に高かった。Norと3つの選別群ではNor-黄体の分割率がNor-優勢卵胞(各々 6.1 ± 1.7 vs 4.5 ± 1.5 個)よりも高く、後者はNor-Nor(5.5 ± 1.5 個)よりも低かった。優勢卵胞と3つの選別群では優勢卵胞-黄体から得られた分割卵数は優勢卵胞-Nor(各々 4.9 ± 1.6 vs 4.1 ± 1.1 個)よりも多かった。胚盤胞へ発育した受精卵母細胞数をみると黄体-Norは黄体-優勢卵胞と優勢卵胞+黄体-Nor[各々46% (3.3 ± 1.0) vs 35% (2.0 ± 1.0)と 33% (1.4 ± 1.9 個)]よりも有意($p < 0.01$)に多かった。Nor-黄体はNor-優勢卵胞+黄体, Nor-優勢卵胞とNor-Nor[各々43% (2.6 ± 1.1) vs 27% (1.6 ± 0.7)と 33% (1.5 ± 0.7 個)]よりも胚盤胞率が高かった。優勢卵胞と3つの選別群では有意な差がみられなかった。5つの組み分けによって卵巣の選別を行った本研究では回収卵母細胞数、分割卵数と胚盤胞発生率は黄体-Nor, Nor-Nor, 黄体-優勢卵胞, 優勢卵胞+黄体-Norと優勢卵胞-Norの順序で低下した。これらの結果から対卵巣のクラス分けが体外受精における卵母細胞の発生の予想手段になること、優勢卵胞の一方または両方の卵巣への存在は体外受精胚の作出効率にネガティブな影響をおよぼしていることを明らかにした。

キーワード：卵巣, 形態, 性周期, 優勢卵胞, 黄体, 分割, 胚盤胞

(日不妊会誌 44:7-14 1999)

精子凍結保存の臨床応用

Clinical Application of Sperm Cryopreservation

東京歯科大学市川総合病院泌尿器科

石川 博通	早川 邦弘	青柳 貞一郎
Hiromichi ISHIKAWA	Kunihiro HAYAKAWA	Teiichiro AOYAGI
大橋 正和	畠 亮	
Masakazu OHASHI	Makoto HATA	

Department of Urology, Ichikawa General Hospital,
Tokyo Dental College, Ichikawa 272-8513, Japan

けいゆう病院泌尿器科

宮地 系典
Keisuke MIYAJI

Department of Urology, Keiyu Hospital,
Yokohama 220-0012, Japan

最近2年間に配偶者間人工授精の目的で精子凍結保存を行った29例を分析してその有用性を検討した。29例のうち不妊症例が11例で、癌化学療法例が18例であった。不妊症例の年齢は27歳から46歳、平均36.5歳であった。不妊期間は最短1年から最長17年、平均4.9年であった。凍結保存の理由は逆行性射精が8例、精液所見不良が3例であった。凍結回数は1回から32回、平均11.1回であった。このうち6例に対してIUI, IVFによる授精法を行い1例に妊娠が成立した。

癌化学療法例の年齢は19歳から45歳、平均27.9歳であった。配偶者のあるものは4例であったが、凍結保存後2例が結婚した。原疾患は精巣腫瘍8例、白血病5例、悪性リンパ腫2例、骨髄異形成症候群2例、膀胱腫瘍1例であった。凍結回数は1回から4回、平均2.9回であった。2年間で授精の実施に至ったものは1例もなかった。

不妊症例では凍結不適例が多く、また融解後の精液所見が良好であった症例においてもIVF, IUIを数周期行った症例では妊娠が成立しなかったことから、凍結精子を用いる授精の実施方法などに関しても十分考慮する必要があると考えられた。また癌化学療法例における精子凍結保存は児を得るための唯一の方法であり極めて有用性は高いが、実施にあたって原疾患の主治医および患者と関係を緊密にすることが重要と考えられた。

キーワード：精子凍結保存、男性不妊、癌化学療法

(日不妊会誌 44:15-20 1999)

結 言

ヒト精子凍結保存法は、主に非配偶者間人工授精ドナー精液の備蓄のために用いられてきた。最近、凍結技術の改善が図られ、融解後の蘇生率が向上し

たためこの方法が広く男性不妊症例に用いられるようになった。一方、悪性腫瘍における化学療法の成績が向上し、生命予後が改善したため生殖能力を考慮することが可能になり、患者が拳児を希望したときにはこの方法は重要な意味を持つようになった。

このような観点から我々は不妊症例および癌化学療法例において配偶者間人工授精を目的とした精子凍結保存を積極的に行っている。本研究では最近2年間に行った精子凍結保存症例の分析を行い、その有用性と問題点を明らかにした。

対 象

1996～1997年の2年間に29例に対して配偶者間人工授精を前提とした精子凍結保存を行った。このうち11例が不妊症例であり、18例が癌化学療法例であった。

1 不妊症例の背景(表1)

年齢は 36.5 ± 5.4 歳(mean $\pm$ SD, 27～46歳, 以下土のある数値はmean $\pm$ SDを表す)であった。不妊期間は最短1年から最長17年で、 4.9 ± 4.7 年であった。凍結保存の理由は8例が射精障害であり、すべて逆行性射精であった。また3例が精液所見不良であった。

2 癌化学療法例の背景(表2)

年齢は 27.9 ± 7.2 歳(19～45歳)であった。18例のうち配偶者のあるものは5例であったが、凍結保存後2例が結婚した。原疾患の内訳は精巣腫瘍8例、白血病5例、悪性リンパ腫2例、骨髄異形成症候群2例、膀胱腫瘍1例であった。このうち3例は化学療法開始後に来院した。

方 法

1 精子の採取

射精障害のない症例では、3～5日間の禁欲後に用手的に精液を採取した。また癌化学療法予定者では禁欲期間を限定せずになるべく頻回に精液を採取するようにした。逆行性射精例では図1に示す方法で採精した。すなわち排尿後、患者を碎石位にして生理的食塩水200mlで膀胱を洗浄した。Hanks液50mlを膀胱に注入後、直ちにマスターベーションをして射精感があったら排尿してもらい、後述の洗浄濃縮法で精子を回収した(図1)。

2 精子の洗浄濃縮

運動精子の分離には撹拌密度勾配法を用いた¹⁾。また高度乏精子症例では精子の回収率をあげることを第一義的に考え、クッション法を用いた²⁾。

3 凍結保存法

精子の凍結保存は液体窒素蒸気法で行った³⁾。精子はあらかじめ洗浄濃縮した後、得られた精子懸濁液(0.2 ml)とKS-II精子保存液⁴⁾を等量混合して凍結用チューブに充填した。発泡スチロール容器に液体窒素を注ぎ温度平衡とした後、チューブを液面上3 cmに静置して凍結し、約5分後に液体窒素に投入して凍結を完了し、液体窒素タンク中で保存した。

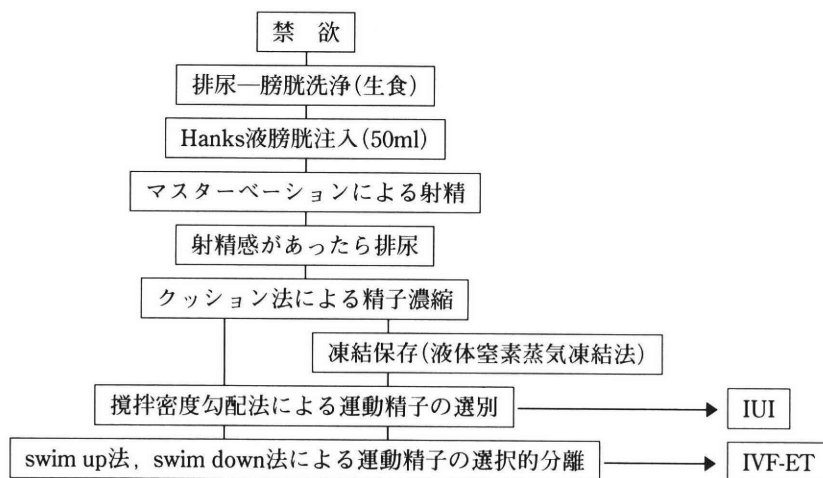


図1 逆行性射精症例における精子回収法

4 授精法

凍結精子の融解は微温湯中(30℃)で振盪して行った。その後凍結保存液の除去および再濃縮の目的で

密度勾配遠心法を行い子宮腔内人工授精(IUI)または体外受精・胚移植(IVF・ET)に供した。

表1 不妊症例における精子凍結保存

症例	年齢	不妊期間 (年)	凍結理由	凍結回数	精子濃度 ^{a)} ($\times 10^6$ /ml)	運動率 ^{b)} (%)	凍結期間 ^{c)} (月)	受精法	妊娠
1	36	9	射精障害	1	50	70	22	IVF 1回	—
2	35	3	射精障害	27	60 $\pm$ 37	44 $\pm$ 30	22	IVF 3回	—
3	40	2	精液所見不良	2	90, 38 (64)	20, 40 (30)	21		
4	35	1	精液所見不良	21	10 $\pm$ 4	17 $\pm$ 15	20		
5	39	2	射精障害	32	130 $\pm$ 41	35 $\pm$ 20	20	IUI 19回	+
6	38	7	精液所見不良	8	18 $\pm$ 8	40 $\pm$ 15	19	IUI 5回	—
7	37	4	射精障害	4	27 $\pm$ 23	43 $\pm$ 26	9		
8	40	5	射精障害	9	96 $\pm$ 42	56 $\pm$ 17	11		
9	27	3	射精障害	12	112 $\pm$ 32	81 $\pm$ 16	9	IUI 1回	—
10	28	1	射精障害	4	84 $\pm$ 38	48 $\pm$ 30	5	IUI 1回	—
11	46	17	射精障害	2	150, 60 (105)	20, 10 (15)	4		

a) 凍結回数が3回以上の場合はmean $\pm$ SDを、2回以下では実測値(mean)を記載

b) a)と同様に記載

c) 凍結開始から1997年12月までの期間

表2 化学療法例における精子凍結保存

症例	年齢	配偶者	原疾患	凍結回数	精子濃度 ^{a)} ($\times 10^6$ /ml)	運動率 ^{b)} (%)	凍結期間 ^{c)} (月)	その他
1	45	無	精巣腫瘍	2	80, 170(125)	50, 60(55)	24	
2	22	無	骨髄異形成症候群	4	150 $\pm$ 47	40 $\pm$ 29	24	
3	45	無	精巣腫瘍	3	100 $\pm$ 20	77 $\pm$ 6	22	
4	28	無	骨髄異形成症候群	2	1/全視野, 1/全視野	1/全視野, 1/全視野	21	化学療法後来院
5	25	無	精巣腫瘍	4	15 $\pm$ 9	45 $\pm$ 13	21	
6	19	無	精巣腫瘍	3	47 $\pm$ 14	42 $\pm$ 38	19	化学療法後来院
7	32	無	精巣腫瘍	1	1/20視野	1/全視野	18	
8	31	無	精巣腫瘍	4	67 $\pm$ 32	73 $\pm$ 15	17	
9	27	有	白血病	2	15, 3(9)	40, 10(25)	16	化学療法後来院
10	21	有(凍結後)	悪性リンパ腫	3	76 $\pm$ 82	70 $\pm$ 10	16	
11	28	有	膀胱腫瘍	3	65 $\pm$ 44	60 $\pm$ 0	15	
12	28	有(凍結後)	白血病	3	82 $\pm$ 22	80 $\pm$ 0	14	
13	24	無	白血病	5	53 $\pm$ 6	74 $\pm$ 9	12	
14	32	有	白血病	2	25, 20(23)	1/30視野, 1/30視野	12	凍結保存中死亡
15	23	無	精巣腫瘍	4	18 $\pm$ 4	23 $\pm$ 15	11	
16	24	無	悪性リンパ腫	4	43 $\pm$ 26	33 $\pm$ 5	10	
17	27	有	精巣腫瘍	3	34 $\pm$ 17	77 $\pm$ 15	9	
18	22	有	白血病	1	200	30	1	

a) 凍結回数が3回以上の場合はmean $\pm$ SDを、2回以下では実測値(mean)を記載

b) a)と同様に記載

c) 凍結開始から1997年12月までの期間

結 果

1 凍結の状況

1) 不妊症例

凍結回数は 11.1 ± 10.8 回(1~32回)であった。内訳は5回以下のものが5例で、5~20回のが3例、20回以上のが3例であった。逆行性射精例では、精子濃度が最も高かったのは症例5の $130 \times 10^6/\text{ml}$ で、最も低かったのは症例7の $27 \times 10^6/\text{ml}$ であり、全例とも $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上であった。運動率が最も高かったのは症例9の81%で、最も低かったのは症例11の15%であった。また8例中6例が40%以上であった。精液所見不良例では、精子濃度はそれぞれ $64 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $18 \times 10^6/\text{ml}$ であり、運動率はそれぞれ30%、17%、40%であった。それぞれの症例の第1回目の凍結から1997年12月までの期間(凍結期間)をみると、最長が22カ月で、最短のものが4カ月(14.7 ± 7.1 カ月)であった(表1)。

2) 癌化学療事例

凍結回数は1~4回で、 2.9 ± 1.1 回であった。複数回の凍結のうち精子濃度は18例中16例で算定可能であったが、症例4および症例7に関しては精子数が極端に少ないため(1/全視野および1/20視野)不可能であった。16例中の精子濃度の最高値は症例1の $150 \times 10^6/\text{ml}$ で最低値は症例9の $9 \times 10^6/\text{ml}$ であった。運動率をみると、症例4、7および14は算定不能で、その他の15例中最高値は症例3の77%で最低値は症例15の23%であった。凍結期間は最短1カ月で最長24カ月(15.6 ± 5.9 カ月)であった。また白血病の1例は死亡したため、第1回目の凍結から12カ月後保存を中止した(表2)。

2 妊娠成績

癌化学療事例(18症例)に対して2年間に延べ53回凍結保存を行ったが、授精の施行に至ったものはなかった。不妊症例のうち逆行性射精の2例に体外受精を行い(症例1が1回および症例2が3回)、3例に子宮腔内精子注入法を行った(症例5が19回および症例9、10がそれぞれ1回)。また精液所見不良の1例(症例6)に子宮腔内精子注入法を5回行った。このうち逆行性射精で19回子宮腔内精子注入法を行った症例5で妊娠が成立した(表1)。

考 察

ヒト精子の凍結保存は1950年代初期から実用化され、本邦でも1958年に凍結保存精子を用いた非配偶

者間人工授精によって児が得られている⁵⁾。この成功以後、精子凍結保存法は専ら非配偶者間人工授精において被授精者に適合する精子の備蓄目的で用いられてきた。しかし男性不妊の病態解明が進み、その治療法が多様化したことと、一部の悪性腫瘍では化学療法成績が著しく向上し、生殖能力を考慮する必要性が高まったことにより、本法が男性側の治療、すなわち配偶者間人工授精に応用されるようになった。

このような流れのなかで精子凍結保存法の適応を考えると、まず前述のように不妊症例と癌化学療事例とに大別できる。さらに不妊症例は精液所見不良例、射精障害例、閉塞性無精子症例に分けられる。すなわち精液所見不良症例に対する応用では、1回の射精で媒精に十分な精子数が得られない場合に精子数を増やす目的でこの方法を用いる。また同時に推定排卵日周辺で頻回に人工授精を行うことが可能になり妊娠の確率を上げることもできる。逆行性射精、脊髄損傷などの射精障害例では性交で児を得ることは不可能な上に、排卵当日に精液採取が困難なことが多い。このため可能な時に精子を採取して凍結備蓄する必要がある。閉塞性無精子症では病変部に応じて種々の手術を行うが、症例によっては精子疎通性が得られなかったり、それが確認されても妊娠に至らないことがある。このため術中に得られた精子を凍結保存する必要がある。また人工精液瘤を造設した場合は、リザーバーの穿刺によって回収できる精子数は少なく、ほとんどの症例で3カ月以内に再閉塞がおきて精子が得られなくなるので、手術直後頻回に採取して凍結保存することが重要である⁶⁾。また白血病、精巣腫瘍を中心とした悪性腫瘍では、救命のために強力な化学療法を行わざるを得ないので造精機能が廃絶する可能性が高く、それが回復しても精子の遺伝子レベルの異常を含めた障害が残ることは避けられない。このため将来挙児を望む症例では、化学療法施行前の精子凍結保存が必須になる^{7,8)}。

日常診療の中で多症例の凍結を能率よく行うためにはその方法を十分に検討する必要がある。一般的にヒト精子凍結保存法として液体窒素直接浸漬法、プログラムフリーザー法⁹⁾、ドライアイス錠剤化法¹⁰⁾、液体窒素蒸気法³⁾などが知られている。このうち液体窒素直接浸漬法は精子蘇生率が極めて低いために現在は用いられない。ドライアイス錠剤化法はドライアイス上に精子と保存液との等量混合物を滴下するもので容器を使用しないため熱伝導率がよく精子の蘇生率が最も高いという利点がある。しかし個々

の症例ごとに精密な操作を繰り返すので多症例の凍結には適さない。またプログラムフリーザー法はシステムが高価である。そこで我々は精子を簡易かつ迅速に凍結し得る液体窒素蒸気法を用いている。我々はこの方法を用いて逆行性射精の2例の妊娠に成功しているが、そこで膀胱からの回収後、洗浄濃縮後(凍結前)、融解後、再濃縮後(授精前)の精液所見を検討した。その結果2症例の精子濃度および運動率は洗浄濃縮後と再濃縮後の間で大きな変動のないことがわかり、液体窒素蒸気法の有用性は高いものと考えられた¹¹⁾。

不妊症例で凍結を行ったものは逆行性射精8例、精液所見不良3例であり、逆行性射精例が多かった。この成績は精液所見不良例や閉塞性無精子症例において凍結を試みたが、精子運動性が極度に低いか、採取できなかったため凍結保存に至らなかった症例が多かったことの結果である。また逆行性射精5例、精液所見不良1例に子宮腔内人工授精または体外受精・胚移植を施行したが、精子濃度、運動率が良好であったにもかかわらず、妊娠に至ったのは逆行性射精症例で19回子宮腔内人工授精を行った1例のみであった。この原因として、精液所見不良例および閉塞性無精子症例では造精機能障害が大きく係わっていることが考えられた。一方逆行性射精例では元来精液所見が良好なものが多い上に膀胱内精子回収法も射精後の直接排尿によるものからpH緩衝作用のあるHanks液を添加する方法へと進歩したために¹¹⁾、授精に供される精子は機能的に優れているものと推測される。それにもかかわらず妊娠率が低いのは授精法自体に問題があるものと思われ、今後成績向上のためには顕微授精法を考慮すべきと考えられる。

癌化学療法例について分析した結果、3つの問題点が考えられた。第一は、2年間で人工授精施行例が一例もなかったことである。この原因としては患者年齢が低く既婚者も少なかったこと、原疾患に対して強力な化学療法を行わざるを得なかったために患者の状態が安定するのに時間がかかること、患者自身が寛解期に入るまでは人工授精を希望しないことなどが考えられる。第二は、化学療法開始後に来院した例があったことである。これは患者自身や主治医の精子凍結保存療法に対する認識不足のために起ったものと思われるが、前述したように抗腫瘍剤の精子への影響を考慮すると、投与前における精子保存が不可欠である^{7,12)}。第三は、癌化学療法例では不妊症例と異なり、凍結の機会が原疾患の確定診断から化学療法開始までの短期間に限られるためにそ

の回数が少なくなることである。

癌化学療法予定者が児を望んだ場合、その可能性を追及することはQOLを考える上で極めて重要なことである。またその目的を達成するには、現在のところ治療前の精子凍結保存が唯一の手段である。このため癌化学療法予定者にとって、この方法の持つ意味は不妊症例に比べてより大きいものとなる。このような観点から癌化学療法例でこの方法を行わせるには下記を考慮する必要があると思われる。

1、主治医が化学療法開始までにある程度余裕があると判断した場合、患者に精子凍結保存について説明する。患者が希望すれば、薬剤投与後の実施を避けるため直ちに原疾患の状態、今後の治療方針などを記した紹介状とともに当該施設を受診させる。

2、今回の成績からわかるように癌化学療法では寛解期に至るまでに時間を要するため、少なくとも3年間の凍結保存期間が必要と思われるが、その間は人工授精を行わなくとも一定期間毎に患者または代理人が来院して原疾患の治療状況などを報告する。

3、患者は既婚であることが望ましいが、独身者の場合には治療状況とともに結婚の可能性についても報告してもらう。

4、主治医にこれらの内容および不妊治療一般について文書で確実に伝え、定期的に治療状況を報告してもらう。

5、患者に対して凍結の意義や前述の内容について文書で伝え、同時に口頭でも説明してこの方法をよく理解してもらう。また人工授精が可能になったら配偶者を直ちに産婦人科に紹介してそれを伝える。

上述した点を考慮し、凍結設備を充実させるとともに、より良い条件下に精子を採取、凍結し、精子の状態に応じて適切な授精法を選択することが重要であろう。

文 献

- 1) Kaneko S, Sato H, Kobanawa K, et al. (1987) Continuous-step density gradient for the selective concentration of progressively motile sperm for insemination with husbands semen. Arch. Androl. 19: 75-84
- 2) Lee K. (1989) Studies on human sperm cryopreservation using the dry ice pellet method; its application to artificial insemination with husbands semen (AIH). J. Keio Med. Soc. 66: 845-856
- 3) Kobayashi T, Kaneko S, Hara I, et al. (1991) A simplified technique for freezing of human sperm for AIH cryosyringe-floating platform on liquid nitro-

- gen vapor. Arch. Androl. 27: 55-60
- 4) 翁 文開, 小林俊文, 兼子 智 他(1988) 洗浄濃縮精子の凍結保存に関する研究. 日不妊会誌 33: 639-644
 - 5) 飯塚理八, 沢田嘉彰(1958) 凍結保存精子による人工授精成功例. 日不妊会誌 3: 241-246
 - 6) 石川博通, 吉田英機(1992) 精巣上体尾部精子の応用—とくに人工精液瘤について— 臨婦産 46: 470-471
 - 7) Rothmann SA, Jenkins MS and Thomas AJ (1986) Rationale for sperm banking in men with cancer. Cleve. Clin. Q. 53: 89-94
 - 8) Shekariz M, Tolentino MV, Ayzman I, et al. (1995) Cryopreservation and semen quality in patients with Hodgkins disease. Cancer 75: 2732-2736
 - 9) Won WK. (1989) Studies on cryopreservation of washed and concentrated human sperm, and its application to artificial insemination with donors semen. J. Keio. Med. Soc. 66: 679-688
 - 10) 永瀬 弘(1962) 牛精子の耐凍性機構に関する研究—錠剤化凍結法におけるグリセリン濃度および糖質の保護効果について— 日獣会誌 24: 505-507
 - 11) Ishikawa H, Ohashi M, Hayakawa K, et al. (1996) Successful pregnancies using improved method of sperm recovery from bladder and cryopreservation in 2 cases of retrograde ejaculation. Jpn. J. Fertil. Steril. 41: 365-369
 - 12) Bracken RB and Smith KD (1980) Is semen cryopreservation helpful in testicular cancer? Urology 15: 581-583

(受付: 1998年6月22日)

(受理: 1998年9月30日)

Clinical Application of Sperm Cryopreservation

Hiromichi Ishikawa, Kunihiro Hayakawa, Teiichiro Aoyagi, Masakazu Ohashi and Makoto Hata

Department of Urology, Ichikawa General Hospital,
Tokyo Dental College, Ichikawa 272-8513, Japan

Keisuke Miyaji

Department of Urology, Keiyu Hospital,
Yokohama, 220-0012, Japan

During the past 2 years, sperm cryopreservation was done in 29 cases for intrauterine insemination (IUI) with husband's semen. In 11 of these cases husbands were suffered from male infertility (retrograde ejaculation in 8 cases, poor semen quality in 3 cases), and in the others the patients had malignancy and were scheduled to have anti cancer chemotherapy. In cases of male infertility, the mean age of patients, duration of sterility and frequency of cryopreservation were 36.5 years, 4.9 years and 11.1 times, respectively. The mean age of patients with malignancy was 27.9 years. Among these patients, 4 cases had spouses and 2 cases got married during treatment. Their underlying diseases were testicular tumor (8 cases), leukemia (5 cases), malignant lymphoma (2 cases), myelodysplastic syndrome (MDS) (2 cases) and bladder tumor (1 case). Frequency of cryopreservation was 1~4 times with a mean of 2.9 times. Pregnancy was obtained in the case with retrograde ejaculation through 19 cycles of repetitive IUI. Assisted reproduction technology could not be performed in patients with malignancy.

Key words: cryopreservation of sperm, male infertility, anti cancer chemotherapy

(Jpn. J. Fertil. Steril., 44:15-20 1999)

鼠径ヘルニア手術後閉塞性無精子症に対する 顕微鏡下精路再建術

Microsurgical Reanastomosis for Obstructive Azoospermia Caused by Inguinal Herniorrhaphy

千葉大学医学部泌尿器科学教室

市川 智彦 小宮 顕

Tomohiko ICHIKAWA Akira KOMIYA

鈴木 啓悦 伊藤 晴夫

Hiroyoshi SUZUKI Haruo ITO

Department of Urology,
Chiba University School of Medicine,
Chiba 260-8670, Japan

千葉県がんセンター泌尿器科

湯浅 譲治

Joji YUASA

Department of Urology,
Chiba Cancer Center, Chiba 260-0801, Japan

旭中央病院泌尿器科

鈴木 規之 村上 信乃

Noriyuki SUZUKI Shino MURAKAMI

Department of Urology,
Asahi General Hospital, Asahi 289-2511, Japan

川崎製鉄千葉病院泌尿器科

始 関 吉 生

Yoshio SHISEKI

Department of Urology,
Kawasaki Seitetsu Chiba Hospital,
Chiba 260-0842, Japan

両側鼠径ヘルニア手術後における閉塞性無精子症12例に対し、一層縫合による顕微鏡下精管精管吻合術、および精巣上体精管吻合術により精路再建を試み、その成績について検討した。12例のうち1例は1側が膀胱尿管逆流症に対する膀胱尿管新吻合手術後の精管閉塞であった。

初診時の平均年齢は30.5歳、平均閉塞期間は27.7年であった。初回の吻合術により、12例中3例に精子が出現し、それら3例とも挙児を得た。他の9例のうち5例については初回手術後吻合部の通過性を確認したが、5例中3例は精管が開通していた。このうち1例はその後精巣上体精管吻合術を施行し精子が出現した。しかし妊娠には至っていない。5例中2例は吻合部の精管が萎縮し閉塞していたため再吻合を行った。2例とも精子は出現せず1例は挙児をあきらめた。他の1例は再吻合術による精管開通を確認後、陰嚢内で交叉性に対側精管と吻合した。その後精子が出現したが、妊娠には至らなかった。

初回手術後の精管の開通率は75%[8例中6例(初回吻合部の通過性を確認しなかった4症例を除く)]であった。再々手術まで含めると、精管の開通率は100%[7例中7例(術後吻合部の通過性を確認しなかった5症例を除く)]となった。また精子出現率は42%(12例中5例)、妊娠率は25%(12例中3例)であった。

ヘルニア手術後の閉塞性無精子症においても、精路再建術はまず考慮すべき治療法であると考えた。
キーワード：閉塞性無精子症、鼠径ヘルニア手術、顕微鏡下精管精管吻合術、顕微鏡下精巣上体精管吻合術

(日不妊会誌 44:21-27 1999)

緒 言

男性不妊症の5～7%は閉塞性無精子症によるものといわれている¹⁾。精路閉塞をきたす原因として先天性精管欠損症、精巣上体炎、小児期の鼠径ヘルニア手術、不妊希望の精管結紮術などがある。これらのうち、閉塞部位が短いものは精管精管吻合術あるいは精巣上体精管吻合術による精路再建により妊娠性の回復が期待できる²⁻⁵⁾。

小児期に鼠径ヘルニア手術を受けた場合、どの程度の確率で精管閉塞が生じるかを知ることは困難と考えられる。Matsudaらは男性不妊症外来を受診した患者について検討し、ヘルニア手術の既往のあった54人のうち、15人(27.8%)に閉塞があったと報告している⁶⁾。従って鼠径ヘルニアのある男性不妊症では、精管閉塞について考慮する必要がある。

今回我々は、小児期に鼠径ヘルニア手術の既往のある無精子症患者に対して精路再建術を施行し、その術後成績について検討したので報告する。

対象および方法

1984年1月から1998年8月までの14年8カ月間に、不妊を主訴として千葉大学医学部附属病院泌尿器科を受診した無精子症患者のうち小児期に両側鼠径ヘルニア手術の既往があり、顕微鏡下精管精管吻合術を施行した12例を対象とした。このうち1例は1側を20歳時に受けていた。また1例は1側が膀胱尿管逆流症に対する膀胱尿管新吻合手術後の閉塞であった。

初診時年齢は27歳から44歳、平均30.5歳であった。各患者における左右精路の閉塞期間の平均年数は、17年から43年、平均27.7年であった(表1)。

術前血清ホルモン値の測定では、症例2, 5, 12においてFSHがやや高値を示した他は、各症例ともほぼ基準値の範囲であった(表1)。全症例とも精巣生検または精管断端からの分泌物の検鏡を行ったが、それらのすべてにおいて精巣内あるいは精管内のいずれかに精子が存在しており、造精機能は維持されていた。

症例5以降は、顕微鏡下精管精管吻合術後6カ月が経過しても精子の出現がない場合、原則として再吻合術の準備のもとに、まず生理食塩水を注入し吻合部の通過性をみた。生理食塩水が注入できず、精管吻合部が閉塞していた場合、同部位に対して再び顕微鏡下精管精管吻合術を施行した。生理食塩水が抵抗なく注入できた場合、続いて精管造影を行い、吻合部狭窄等の有無を確認した。異常がないことを確認後、精巣上体を観察し、精巣上体管に精子を認めた場合、顕微鏡下精巣上体精管吻合術を行った。

精管精管吻合術：一層縫合法による顕微鏡下精管精管吻合術を施行した。鼠径部をヘルニア手術創に沿って切開し、精索周囲を剥離した後、精巣側の健常精管を露出した。この精管に24Gエラストー針を尿道側に向かって刺入し、生理食塩水の注入および3-0ナイロン糸を挿入することにより、精管閉塞の有無および閉塞部位を確認した。ついで精管周囲の血管を損傷しないよう注意しながら尿道側に向かって

表1 術前所見

症例	初診時 年齢	閉塞期間 (年)	精巣容積(cc)		血中 FSH* (mIU/ml)
			右	左	
1 H.T.	31	29	14	14	3.1
2 T.T.	44	43	20	20	11.9
3 Y.Y.	27	26	20	20	3.2
4 Y.K.	31	30	26	26	2.7
5 K.N.	31	30	18	16	11.3
6 R.H.	28	右8, 左25	24	24	2.9
7 H.O.	31	30	24	24	4.1
8 S.O.	30	27	20	20	5.9
9 N.H.	29	28	26	24	5.1
10 T.T.	30	27	24	24	4.1
11 S.K.	27	右24, 左17**	20	24	5.8
12 T.U.	27	25	24	欠損	10.6
平均	30.5	27.7	21.7	21.5	5.9

* 基準値: 2.9 ~ 10.2 mIU/ml.

** 左: 膀胱尿管逆流症に対する逆流防止術後精管閉塞.

剥離を進めた。尿道側精管が発見できないものや、閉塞または欠損部位が長く吻合不可能なものを除き、剥離した精巣側および尿道側の精管を健常部位で切断した。精巣側断端からの分泌物は、初期の症例を除き原則として術中検鏡し精子の有無を確認した。また精子を認めない場合も吻合可能な精管はすべて吻合した。尿道側の内腔は狭小化しており、3-0 ナイロン糸を通しこれをガイドとして24Gおよび22Gのエラスターを用いて内腔の拡張を行い粘膜の吻合が容易となるようにした。同時にエラスターより精管精囊造影を行い、異常の有無を確かめた。吻合は手術用顕微鏡下に両端角針9-0モノフィラメントナイロン糸にて、まず4~8針の全層縫合を行った。ついで必要に応じて、同様の糸を用いて2~4針外壁のみの縫合を行った。

精巣上体精管吻合術: まず精管より生理食塩水を注入した。抵抗なく注入できれば精管造影を行い、精管精管吻合術により精管が開通していることや、吻合部狭窄がないことを確認した。手術用顕微鏡下に拡張した精巣上体管の直上の精巣上体漿膜を直径約1mm切除し、精巣上体管を開窓。白色の分泌液を検鏡し精子を確認した後、精管を剥離し吻合部の高さで切断。精管造影を行い再度精管の通過性を確かめた。精巣上体開窓部の漿膜と精管外壁を両端角針9-0ナイロンモノフィラメントにて1カ所固定。10-0 ナイロンモノフィラメント片端丸針(先端のみ角)にて精巣上体管と精管粘膜をside-to-endに4針吻合。精

巣上体漿膜と精管外壁を両端角針9-0ナイロンモノフィラメントにて6~8針吻合した。

結 果

両側とも吻合できた症例は5例であった(表2)。このうち3例は1回目の手術で3カ月以内に精子が出現し、その後自然妊娠、挙児を得るに至った。これらの妊娠直前の精液所見では、精子濃度は1例において $13 \times 10^6/\text{ml}$ と乏精子症であったが、他の2例ではそれぞれ $102 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $61 \times 10^6/\text{ml}$ と良好であった(表3)。しかし運動率は3例とも10%以下と不良であった。症例10では、初回手術後精子を認めなかったが、精管吻合部は両側とも開通していた。しかし精巣上体に精子を認めず、精巣上体精管吻合術を断念し、夫婦の希望によって、精巣精子採取 (testicular sperm extraction: TESE) および卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) を施行した。その後この症例は2回妊娠し、1回目は流産したが、2回目には順調に経過し男児を得た。

一方の精管において尿道側の精管が発見できず片側のみしか吻合できなかった7症例では、初回手術後精子の出現をみたものは1例もなかった。7例のうち4例はその後精管の通過性を確認し、症例5と11では吻合部が開通していた。症例5はartificial insemination of donor (AID) を希望したが、症例11では顕微鏡下精巣上体精管吻合術を施行し精子が出現、夫婦の年齢も20歳代と若く現在も自然妊娠を期待し経過観

表2 手術時所見および術後経過

症例	断端精子		吻合側	術後3ヵ月		初回精管精管吻合後妊娠の有無	初回吻合後精管通過性	第二回目治療	第二回精管精管吻合後精管通過性	最終的精子出現の有無
	右	左		精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	運動率 (%)					
1	不明		両側	0.2	0	妊娠	開通とみなす			
2	不明		右	0	—	不明	確認せず			
3	不明		両側	0	—	不明	確認せず			
4	不明		左	0	—	不明	確認せず			
5	不明		左	ND			開通	AID		
6	+	+	両側	48	4	妊娠	開通とみなす			
7	+	+	両側	36	2	妊娠	開通とみなす			
8	—	+	右	0	—		閉塞	右精管精管再吻合	開通	有(3回目吻合後)*
9	—	+	右	0	—		閉塞	右精管精管再吻合	確認せず	無
10	—	—	両側	0	—		両側開通	TESE		
11	—	ND	右	0	—		開通	精巣上体精管吻合		有
12	—	ND	右	0	—	観察中	未確認			

* 第三回目の手術として陰嚢内において対側精管と交叉性精管精管吻合術を施行した後精子が出現。

表3 妊娠例における妊娠直前の精液所見

症例	手術から妊娠までの期間 (月)	妊娠直前の精液所見 精子濃度($\times 10^6/\text{ml}$)	運動率(%)
症例1	6	13	0
症例6	10	102	4
症例7	18	61	4

察中である(表4)。症例8, 9では初回手術により精管が開通せず, 同部位に対し再度顕微鏡下精管精管吻合術を施行した。これらの症例では, 初回吻合部の精管は約3cmの長さにわたって索状に萎縮しており, 吻合部精管周囲の血流不全が原因で精管が開通しなかったと思われた。2例とも再手術後も精子は出現しなかった。症例8では2回目の手術により吻合部が開通していたので, 精子の確認されていた対側精管断端と交叉性に, すなわち右末梢側精管左精巣側精管吻合術を施行した。その後精子が出現したが乏

精子症であり妊娠には至っていない(表4)。症例9でも対側の精管断端に精子を認めていたが, 2回目の吻合術後夫婦が挙児を断念し, 以降来院していない。

現時点における再手術を含めた12例の術後精子出現率は, 12例中5例で42%であった。また妊娠率は12例中3例で25%であった。初回の吻合術後の精管開通率は, 術後通過性未確認の症例2, 3, 4および12を除いた8症例中6例と75%であった。また再手術までの成績を含めるとその開通率は, 2回目の吻合術後通過性を確認しなかった症例9を除いた7症例中7例と100%であった。

考 察

鼠径ヘルニア術後の閉塞性無精子症に対する精路再建術の手法は, 精管切断術後症例に対するものよりも難しい⁷⁾。これは前者においては, 吻合部が鼠径部の深部であること, 精管の一部が切除されていたり精管への血流が不十分であり欠損や閉塞部分が

表4 再手術症例の精液所見と経過

症 例	再手術内容	最終手術後3ヵ月精液所見		転 帰
		精子濃度($\times 10^6/\text{ml}$)	運動率(%)	
症例 8	再手術: 右精管精管吻合 再々手術: 右末梢側精管左精巣側精管吻合	2	2	9ヵ月後妊娠無し
症例 9	右精管精管吻合	0	—	6ヵ月後精子認めずその後不明
症例11	右精管精巣上体管吻合	11	10	19ヵ月後妊娠無し(経過観察中)

長い症例が多いこと、精巣側と尿道側の精管断端内径に差が大きいことなどがその理由である。しかし手術用顕微鏡下に丁寧に吻合することにより精管の開通率そのものは比較的良好である。

顕微鏡下精管精管吻合術は、一層縫合と二層縫合の2通りの吻合がある^{3,4,7-9)}。精管切断術後症例に対して、我々は従来から一層縫合を行ってきたが、顕微鏡下に粘膜同士をきっちり合わせて吻合すれば、内径に多少の差があっても一層縫合でよいと考えている^{3,4)}。Belkerらは精管切断術後の再吻合症例の成績ではあるが、一層縫合でも二層縫合でも開通率に有意な差はないと述べている⁸⁾。我々の症例では、初回手術後の開通率は術後確認し得た8例中6例(75%)であった。しかしこの閉塞していた2例に対しても再手術を施行し、その後1例では精管が開通したことから(他方は検索をしていないため不明)、再手術まで含めれば一層縫合によっても100%(7例中7例)の開通率が得られたことになる。また、初回手術後の閉塞原因は吻合部の血流不全によると思われる精管の索状の萎縮によるものであり、一層か二層かの違いに起因したものではないと考えられた。従って、ヘルニア術後の顕微鏡下精管精管吻合術においても、一層縫合と二層縫合との間に明らかな成功率の差はみられないと考えている。

顕微鏡下精管精管吻合術による高い精管開通率にも関わらず、術後の精子出現率は決して高いとはいえない。我々の症例でも精管精管吻合術に限ると再手術まで含めても、精子出現率は12例中4例(33%)であった。この原因として、一部に造精機能そのものが低下している症例が含まれているかもしれない。また精管閉塞による精路内圧上昇などに起因した二次的な精巣上体管の閉塞が合併している症例があるためと考えられる¹⁰⁾。我々の症例においても、顕微鏡下精巣上体精管吻合術を施行することにより精子の出現をみた症例が1例あった。Silberは、精管精管吻合術において術中精子の確認できなかった症例は、全例術後も精子の出現を認めなかったと報告している¹¹⁾。またSharlipらも精管断端の分泌物の肉眼的性状だけではなく、顕微鏡検査による精子の有無の確認をすべきであると報告している¹²⁾。我々の症例においても、現在は断端からの分泌液を顕微鏡にて観察し、精子の有無を確認している。吻合部精管断端に精子を確認できなかったものでは、再手術により最終的に精管が開通した症例であっても精子が出現しなかった。従って、断端に精子が確認できない場合、精巣上体精管吻合術も同時に行うべきかも

しれない。しかし、我々の症例でも示されているとおり、初回の精管精管吻合術による開通率が75%と100%の開通率が得られていない以上、とりあえず鼠径部で精管精管吻合術を行い、精子が出現しないときには後日吻合部の通過性をみた上で、精巣上体精管吻合術を施行する方がよいと考える⁹⁾。

我々の症例では、現在までのところ12例中3例において挙児を得ている。これらの症例の精液所見に共通している点は、妊娠直前の精子濃度は上昇しているにもかかわらず、運動率は依然低いということである。これらの症例に対してハムスターテストなどの精子受精能を検討していないため詳細は不明であるが、運動率は低くても受精能は高いと思われる。後藤らも、閉塞期間が31年の鼠径ヘルニア術後閉塞性無精子症症例に対して精管精管吻合術を行い、術後精子濃度が上昇したにもかかわらず運動率が低かったと報告している¹³⁾。この症例は術後7年で妊娠しているが、運動率が低くても妊娠は期待できると考えられる。Pardananiらは、精管精管吻合術後、精巣機能が正常であっても精巣上体障害の回復が不十分であれば精子濃度の改善に比べ運動率の改善は遅延すると述べている¹⁴⁾。いずれにしても、assisted reproductive technology (ART)の応用については、運動率が低くても妊娠が期待できることを考慮に入れて、その適応を検討する必要があると思われる。

TESEやICSIなどに代表されるARTの進歩と普及により、精路再建術が不可能な症例においても挙児が期待できるようになった^{7,15,16)}。鼠径ヘルニア手術後の閉塞性無精子症では、精子は正常な遺伝子を持っていると考えられ、良好な精子を精巣から得ることにより、ICSIによる妊娠・挙児が期待できる。我々の症例でもTESEとICSIにより挙児を得たものが1例あった。とくに女性の年齢が高くARTを用いた治療期間が限られる場合は、早期に考慮すべきかもしれない。精管吻合部の開通率は再手術まで行くとすれば100%の結果が期待できるが、断端に精子を認めない症例では精巣上体精管吻合術も必要となる可能性がある。従ってこの中には初診から精子の出現まで1年以上経過する症例も多く出てくる。またこの場合、働き盛りである男性が入退院を繰り返すことになり、患者夫婦の背景なども考慮した上で夫婦が納得できる治療法を助言する必要がある。しかし、顕微鏡下手術が成功し良好な精液所見となれば、複数回の自然妊娠が可能となり、また治療には入院が必要となるが保険治療であることより、利点も多い。我々の成績でも、1回目の手術後の妊娠率は25%であり、

ARTとほぼ同等の成績である。とくに患者の妻の年齢が若い場合は、再手術や精巣上体精管吻合術までも含めた、精路再建術をまず考慮すべきと考える。

文 献

- 1) Dubin L and Amelar RD (1971) Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril* 22 : 469-474
- 2) Silber SJ (1984) Microsurgery for vasectomy reversal and vasoepididymostomy. *Urology* 23 : 505-524
- 3) 伊藤晴夫, 川村健二, 片海善吾 他(1984) 顕微鏡使用による精管再吻合術. *日泌尿会誌* 75 : 934-939
- 4) 角谷秀典, 布施秀樹, 高原正信 他(1988) 閉塞性無精子症に対する顕微鏡下一層縫合による精管精管吻合術. *日不妊会誌* 33 : 661-667
- 5) 松田公志, 六車光英, 小松洋輔 他(1993) 精路閉塞症に対する精管精管吻合術および精巣上体精管吻合術. *日泌尿会誌* 84 : 1665-1674
- 6) Matsuda T, Horii Y and Yoshida O (1992) Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril* 58 : 609-613
- 7) Matsuda T, Muguruma K, Hiura Y, et al. (1998) Seminal tract obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: results of microsurgical reanastomosis. *J Urol* 159 : 837-840
- 8) Belker AM, Thomas AJ, Fuchs EF, et al. (1991) Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasostomy study group. *J Urol* 145 : 505-511
- 9) Fuse H, Kimura H and Katayama T (1995) Modified one-layer microsurgical vasovasostomy in vasectomized patients. *Int Urol Nephrol* 27 : 451-456
- 10) Silber SJ (1979) Epididymal extravasation following vasectomy as a cause for failure of vasectomy reversal. *Fertil Steril* 31 : 309-315
- 11) Silber SJ (1989) Pregnancy after vasovasostomy for vasectomy reversal: a study of factors affecting long-term return of fertility in 282 patients followed for 10 years. *Hum Reprod* 4 : 318-322
- 12) Sharlip ID, Belker AM, Konnak JW, et al. (1984) Relationship of gross appearance of vas fluid during vasovasostomy to sperm quality, obstructive interval and sperm granuloma. *J Urol* 131 : 681-683
- 13) 後藤百万, 吉川羊子, 辻 克和 他(1993) 閉塞31年後の精管精管吻合により挙児をえた鼠径ヘルニア根治術後精管閉塞の1例. *泌尿紀要* 39 : 773-775
- 14) Pardanani DS, Patil NG and Pawar HN (1976) Some gross observations of the epididymides following vasectomy: a clinical study. *Fertil Steril* 27 : 267-270
- 15) Silber SJ, Van Steirteghen AC, Liu J, et al. (1995) High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 10 : 148-152
- 16) 岩崎雅志, 太田昌一郎, 布施秀樹 他(1997) 閉塞性無精子症に対する手術療法の成績. *日不妊会誌* 42 : 286-291

(受付: 1998年8月28日)

(受理: 1998年10月13日)

Microsurgical Reanastomosis for Obstructive Azoospermia Caused by Inguinal Herniorrhaphy

Tomohiko Ichikawa, Akira Komiya, Hiroyoshi Suzuki and Haruo Ito

Department of Urology, Chiba University School of Medicine, Chiba 260-8670, Japan

Joji Yuasa

Department of Urology, Chiba Cancer Center, Chiba 260-0801, Japan

Noriyuki Suzuki and Shino Murakami

Department of Urology, Asahi General Hospital, Asahi 289-2511, Japan

Yoshio Shiseki

Department of Urology, Kawasaki Seitetsu Chiba Hospital, Chiba 260-0842, Japan

We investigated the outcome of microsurgical reanastomosis for 12 men with obstructive azoospermia caused by bilateral inguinal herniorrhaphy. In one case, obstruction was caused by surgical treatment for vesicoureteral reflux in one side. Microsurgical 1 layer vasovasostomy and/or epididymovasostomy was performed.

The average age of the patients and the average duration of obstruction were 30.5 years old and 27.7 years, respectively. Three of the 12 patients (25%) showed sperm in the ejaculate and achieved pregnancy after initial

vasovasostomy. In 5 of the 9 patients who were unsuccessful in the initial operation, patency of the vas deferens was examined. Three of the 5 patients showed patency. One of the 3 underwent epididymovasostomy, which resulted in the presence of sperm in the ejaculate, whereas no pregnancy was achieved. The other two patients with re-obstruction of the vas deferens underwent second reanastomosis, whereas no sperm was observed in the ejaculate. One of them underwent 3rd reanastomosis of crossed vasovasostomy, which resulted in the presence of sperm, whereas no pregnancy was achieved.

The patency rate after initial vasovasostomy was 75%[6/8 (4 cases without examination of patency after initial vasovasostomy was excluded)]. The overall rates of patency, presence of sperm, and pregnancy after vasovasostomy including second and third operation were 100%[7/7 (5 cases without examination of patency after vasovasostomy were excluded)], 42%(5/12), and 25%(3/12), respectively.

Key words: obstructive azoospermia, inguinal herniorrhaphy, microsurgical vasovasostomy, microsurgical epididymovasostomy

(Jpn. J. Fertil. Steril., 44:21-27 1999)

Lewis系ラットにおける片側性精管結紮の 両側精巣の造精機能へおよぼす影響

The Effect of Unilateral Vasectomy on Spermatogenesis in the Bilateral Testes in Lewis Rats

山口大学医学部泌尿器科学教室

石 津 和 彦	白 石 晃 司
Kazuhiko ISHIZU	Koji SHIRAISHI
中 根 比呂志	内 藤 克 輔
Hiroshi NAKANE	Katsusuke NAITO

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

周東総合病院泌尿器科

馬 場 良 和
Yoshikazu BABA

Department of Urology, Syuto General Hospital,
Yanai 742-0032, Japan

小野田市立病院泌尿器科

瀧 原 博 史
Hiroshi TAKIHARA

Department of Urology, Onoda City Hospital,
Onoda 756-0094, Japan

精管結紮後に精管再吻合術を施行しても妊孕性を必ずしも回復できない原因のひとつとして、精管結紮による精巣での造精機能障害が考えられている。しかし、精管結紮が造精機能を障害するか否かは完全には解明されていない。今回、精管結紮は造精機能を障害するか否かを調べる目的で動物実験を行った。10週齢Lewis系雄性ラットに左側精管結紮術あるいはsham operationのいずれかを施行した。術後1および3カ月に精巣重量およびpercentages of haploid cells(%1C)を測定し、両側精巣の造精機能を定量的に評価した。術後3カ月においてvasectomy群(n=10)の精巣重量および%1Cは、sham operation群(n=10)と比較して両側共に減少していた(左側： $p<0.05$ ，右側： $p<0.1$)。術後3カ月において、vasectomyを行った10匹のラットは、造精機能低下を示す3匹と精巣障害が認められない7匹に分類できた。これらの結果から精管結紮は一部の個体に限って造精機能を障害することが示唆された。

キーワード：精管結紮，造精機能

(日不妊会誌 44:29-34 1999)

緒 言

ヒトでは、精管結紮後に精管再吻合術を施行し精管を再開通させても、妊孕性は必ずしも回復できない¹⁾。精管再吻合後に妊娠成立を阻止する因子のひとつとして、精管結紮による精巣での造精機能障害が考えられている¹⁾。しかし、精管結紮が造精機能を障害するか否かは完全には解明されていない。今回我々は、Lewis系ラットに片側性精管結紮を行い、精管結紮が両側精巣の造精機能におよぼす影響を検討した。

対象および方法

1 実験材料

10週齢Lewis系雄性ラット(体重250~300g)を用いた。ラットは実験7日前より山口大学医学部附属動物実験施設で飼育した。8:00~20:00までの一定した明暗サイクルとし、飲料水や飼料は自由摂取とした。ラットは無作為に以下に示す2群に分けた。

2 方 法

1) vasectomy群(V群)

麻酔はペントバルビタールナトリウム5mg/100g体重を腹腔内に投与して行った。ラット20匹に対し、下腹部正中切開で左陰嚢内容を脱転し、左精管を鼠径輪の高さから約1cm中枢側まで剥離した。精管を2箇所で4-0絹糸を用い結紮し、結紮間の精管を切除した。左陰嚢内容を回転が生じないように環納し、腹壁を2層に縫合閉鎖した。

術後1および3カ月に10匹づつを、先と同様の麻酔下で心臓からの瀉血により屠殺した。精巣側精管断端の精子肉芽腫の有無を確認した。精巣を摘出し、wet weightを測定した。精巣の一部は、flow cytometry測定用試料とし、EPICS753 (Coulter Electronics, Inc)を用いて精巣内DNA量を測定した²⁾。さらに精巣の一部は、ブアン氏液に固定した後、HE染色を行い、病理組織学的検討に供した。

2) sham operation群(S群)

ラット20匹に対し、精管の結紮切除以外はV群と同様な操作を加えた。術後1および3カ月に10匹づつをV群と同様に処置した。

3 造精機能の評価

定量的評価は、精巣重量および精巣内のpercentage of haploid cells(%1C)³⁾から行った。定性的評価は、HE染色した精巣組織像から行った。

4 統 計

測定した値は平均値±標準偏差で示した。統計学的解析にはStudent t-testを用い、危険率 $p < 0.05$ を有意差あり、危険率 $p < 0.1$ を傾向ありと判定した。

結 果

1 ラット体重

V群の術後1カ月および3カ月での体重は、それぞれ 312 ± 9 g, 366 ± 9 g, S群のそれらは、それぞれ 311 ± 10 g, 363 ± 15 gであった。術後3カ月までは両群間に体重の有意差は認められなかった。

2 精子肉芽腫

V群では術後1および3カ月で左側(結紮側)の精巣側精管断端に直径3~30mm大の精子肉芽腫が全例に認められた。V群の右側(非結紮側)およびS群の両側精管に精子肉芽腫は認められなかった。

3 術後1カ月の造精機能

S群では左側精巣重量は 1.41 ± 0.05 g, 右側のそれは 1.40 ± 0.05 gであった。V群では左側精巣重量は 1.41 ± 0.04 g, 右側のそれは 1.41 ± 0.05 gであった。S群では左側の%1Cは $76.3 \pm 3.5\%$, 右側のそれは $75.9 \pm 4.6\%$ であった。V群では左側の%1Cは $74.8 \pm 4.5\%$, 右側のそれは $75.0 \pm 3.8\%$ であった。V群とS群の間に精巣重量および%1Cの有意差は両側精巣ともに認められなかった。

V群10匹20精巣およびS群10匹20精巣において、病理組織的な異常所見は認められず、合計40精巣はほぼ同一所見であった。

4 術後3カ月の精巣重量(Fig. 1)

S群では左側精巣重量は 1.42 ± 0.09 g, 右側のそれは 1.41 ± 0.08 gであった。V群では左側精巣重量は 1.14 ± 0.31 g, 右側のそれは 1.18 ± 0.35 gであった。それぞれの群で左精巣と右精巣の間に精巣重量の有意差は認められなかった。V群とS群の間で精巣重量を比較すると、V群の左側精巣重量はS群のそれに比べ有意な低値($P = 0.012$)で、V群の右側精巣重量はS群のそれより低値の傾向($P = 0.052$)を示した。

5 術後3カ月の%1C(Fig. 2)

S群では左精巣の%1Cは $77.3 \pm 3.4\%$, 右精巣のそれは $78.5 \pm 2.4\%$ であった。V群では左精巣の%1Cは $63.7 \pm 17.7\%$, 右精巣のそれは $64.4 \pm 24.6\%$ であった。それぞれの群で左精巣と右精巣の間に%1Cの有意差は

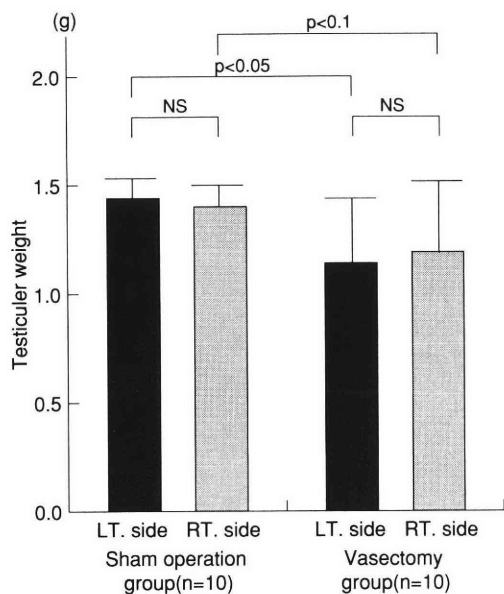


Fig. 1 Testicular weight (mean $\pm$ SD) 3 months after the operation

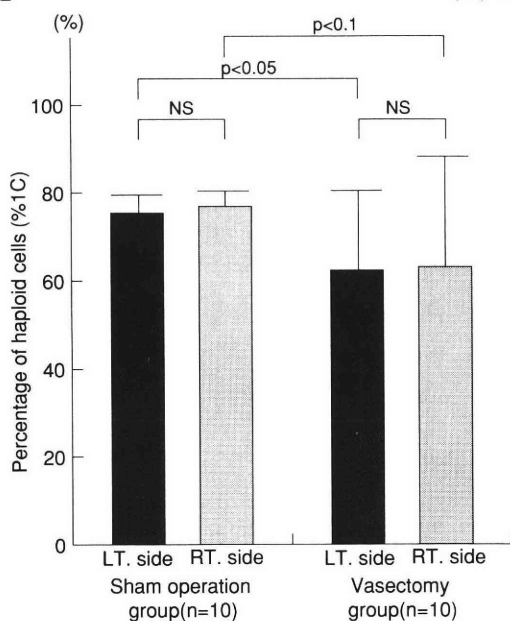


Fig. 2 Percentage of haploid cells (mean $\pm$ SD) 3 months after the operation

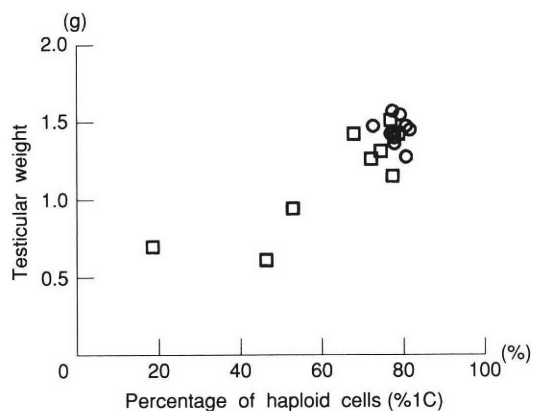


Fig. 3 Scatter plot of mean testicular weight and mean percentage of haploid cells for sham operation group (□) and vasectomy group (○) 3 months after the operation

認められなかった。V群とS群の間で%1Cを比較すると、V群の左側精巣の%1CはS群のそれに比べ有意な低値 ($P=0.028$) で、V群の右側精巣の%1CはS群のそれより低値の傾向 ($P=0.089$) を示した。

6 術後3カ月の精巣重量—%1Cの分布 (Fig. 3)

それぞれの群で左精巣と右精巣の間に精巣重量および%1Cの有意差を認めなかったため、左右の平均

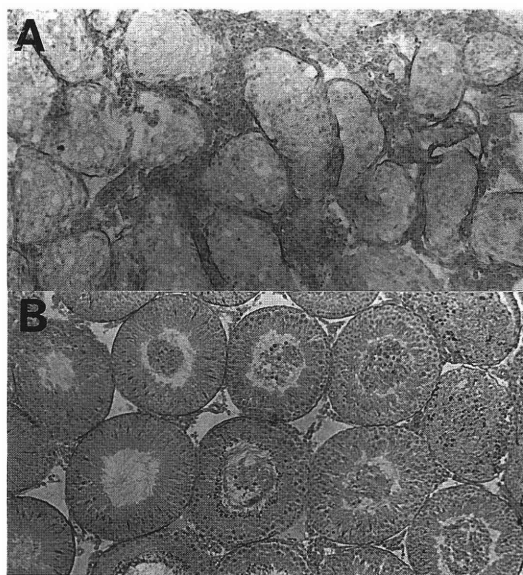


Fig. 4 Some testes showed the alterations (A) and others were histologically normal (B) 3 months after vasectomy. ($\times 40$)

値を各個体の精巣重量および%1Cとし、術後3カ月における精巣重量と%1Cの関係を検討した。V群10匹中3匹が精巣重量および%1Cともに著明な低値を示した。

7 術後3カ月の精巣組織像 (Fig. 4)

V群の中で精巣重量および%1Cが著明な低値を示した3匹の6精巣では病理組織学的に精細胞の脱落が認められた。一方、他のV群7匹14精巣の組織像はS群10匹20精巣の組織像と差を認めなかった。

考 察

ヒトでは、避妊を目的として両側精管を結紮した後に再び挙児を希望し、精管再吻合術を受けることがある。しかし、精管再吻合術により60～90%の症例で精液中に精子が出現するが、妊娠が成立するのは50～78%にすぎない¹⁾。精管吻合後に妊娠成立を阻害する因子として、精巣の造精機能障害、精巣上体機能異常による精子成熟障害、吻合部狭窄による精子輸送能低下、精漿中抗精子抗体の出現および女性側因子などが考えられている¹⁾。

精管結紮が精巣の造精機能を障害する根拠のひとつとして、精管再吻合時の精巣組織検査において23%の症例で局所性間質性線維化が認められたこと⁴⁾が挙げられる。しかし、すべてのヒトで精管結紮により造精機能障害が生じるわけではない。また、実験動物では動物種や系統によって精管結紮による造精機能障害に関して異なった結果が報告されている^{5, 6)}。従って、精管結紮が造精機能を障害するか否かは完全には解明されていない。

本実験では、術後3カ月ではvasectomyを施行したラットの精巣重量および%1Cは、sham operationを施行したラットのそれらと比較して、左右精巣ともに低値を示した。その結果、術後3カ月では片側性精管結紮が両側精巣の造精機能を障害することが示唆された。Neavesも、両側精管結紮術または切除術を行った3カ月後にラットの精巣重量および精巣内精子濃度を測定し、造精機能障害が認められたと報告している⁷⁾。

一方、ラットでは精管結紮は造精機能へ影響をおよぼさないという報告^{5, 8)}もある。本実験では術後1カ月では造精機能障害は認められなかったが、精管結紮後3カ月では造精機能障害が認められた。また、Flickingerらも、精管結紮後3カ月では20%のLewis系ラットに、精管結紮後7カ月では60%のそれに造精機能障害が認められた報告しており、観察期間が長いほど造精機能障害の生じる割合が増加する^{6, 9)}。従って、精管結紮後の観察期間の差が、精管結紮の造精機能への影響に関する結論が実験により異なる原因のひとつとして考えられる。また、Lewis系ラットはSprague-Dawley系ラットに比べ精管結紮

により造精機能障害が生じやすい¹⁰⁾と報告されており、ラットの系統により精管結紮に対する造精機能の反応に差も、動物実験での結論が一致しない原因のひとつと考えられる。

本実験では、精管結紮3カ月後のラットは、精巣重量-%1Cの分布および精巣組織像からみて明らかに造精機能が低下した3匹(30%)と造精機能障害の認められない7匹(70%)の2群に分類できた。その結果、精管結紮はすべての個体ではなく、一部の個体に限り造精機能を障害すると推定された。McDonaldらも、片側性精管結紮後6カ月では、ラット9匹中3匹では両側精巣の著明な萎縮を認めたのに対し、他の6匹の精巣組織像では造精機能障害は認められなかったと報告している¹¹⁾。また、Flickingerらも、両側精管を結紮したラットの精巣重量および精巣組織像を検討し、造精機能が障害された個体と造精機能障害が認められない個体の2群に分類できたと報告している^{6, 9, 10)}。

仮に精管結紮が造精機能を障害するならば、その原因として精細管内圧上昇を代表する局所的因子および血中抗精子抗体を代表とする全身的因子が推定されている^{7, 10, 12)}。本実験のように片側精管だけを結紮した場合、局所的因子が造精機能障害に関与すると仮定するならば、結紮側精巣では非結紮側精巣よりも強く造精機能は障害されると予測される。しかし、本実験では、結紮側精巣と非結紮側精巣の間に定量的には造精機能の差は認められなかった。また、Chehvalらも、片側性精管結紮後6カ月にラットの精巣組織像を定性的に検討したところ、結紮側精巣と非結紮側精巣の間で造精機能障害の程度に差を認めなかったと報告している¹³⁾。従って、ラットにおいて精管結紮による造精機能障害の原因は、局所因子よりもむしろ全身的因子であると推定された。

本実験では、精管結紮後すべてのラットにおいて精巣側精管に精子肉芽腫が生じた。Kwartらも、思春期以降のラットに精管結紮を行い、術後6カ月では全例に精子肉芽腫が認められたと報告している¹⁴⁾。Howardsらは、ラットの精管結紮に種々の結紮糸、金属クリップあるいは電気凝固法を用いても精子肉芽腫の出現頻度は変わらなかった報告している¹⁵⁾。

精子肉芽腫は、精管結紮による造精機能障害の原因のひとつと考えられている精細管内圧上昇を阻止すると推定される。事実、ラットにおいては精管結紮による精細管内圧の上昇は、微小穿刺法による圧測定では認められなかったと報告されている¹⁶⁾。一方、精子肉芽腫を通じて漏出した精子は精管結紮に

よる造精機能障害の原因のひとつと考えられている抗精子抗体を惹起する¹⁷⁾と推定される。Lewis系ラットでは精管結紮3カ月後では血中抗精子抗体が80%に認められたと報告されている¹⁸⁾。また、造精機能障害が生じたラットでは、造精機能障害が生じなかったラットと比較して、抗精子抗体価が高値であったことより、ラットにおいては抗精子抗体が造精機能障害に関与している可能性があると報告されている^{10, 12)}。本実験では、結紮側精巣と非結紮側精巣の間で造精機能障害の程度に差を認めなかった結果から、ラットでの精管結紮による造精機能障害の原因は、精細管内圧上昇を含む局所因子よりもむしろ抗精子抗体を含む全身的因子であると推定された。

一方、ヒトにおいては精子肉芽腫は5~18%にしか認められない¹⁴⁾。精管再吻合時に精子肉芽腫が認められない症例は、精子肉芽腫が認められた症例に比較して、精管内径は太く、精巣側精管の精子は不良であったと報告されている¹⁹⁾。そのため、多くのヒトでは、精管結紮により精子肉芽腫が生じないために、精細管内圧が上昇し、造精機能が障害されると推定される。一方、精子肉芽腫が形成されにくいヒトでは精管結紮後の抗精子抗体出現率は低いと推定される。事実、我々が、精子凝集試験および精子不動化試験から検討した血中抗精子抗体陽性率は、精管結紮後では44%であった²⁰⁾。

従って、ラットにおいては、ヒトと比較して、精管結紮による精細管内圧上昇が造精機能へおよぼす影響はあってもわずかであるのに対して、精管結紮により生じる抗精子抗体が造精機能へおよぼす影響は大きいと推測される。そのため、ラットを用いた本実験の結果からは、精管結紮は一部の個体に限って造精機能を障害し、その障害は局所的因子よりはむしろ全身的因子が原因であると推定されたが、必ずしもヒトに該当するとは限らないことを考慮しなければならない。

(本論文の要旨は第85回日本泌尿器科学会総会および第34回日本不妊学会中国四国支部学術講演会で発表した。本研究の一部は、文部省科学研究費補助奨励研究(A)からの助成金により行った。)

文 献

- 1) Yabro ES and Howards SS (1987) Vasovasostomy. *Urol Clin North Am* 15:515-526
- 2) 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
- 3) 川井修一(1985) Flow cytometryによる睾丸内精子形成能の評価判定 第2報: 男子不妊症患者の精子形成能の評価. *泌尿紀要* 31:87-95
- 4) Jarow JP, Budin RE, Dym M, et al. (1985) Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy: a controlled study. *N Engl J Med* 313: 1252-1256
- 5) Lohiya NK, Dixit VP and Arya M (1976) Long-term effects of vasectomy on the pituitary-gonadal system of rat and mouse. *Endokrinologie* 67:152-159
- 6) Flickinger CJ, Herr JC, Howard SS, et al. (1987) The influence of vasovasostomy on testicular alterations after vasectomy in Lewis rats. *Anat Rec* 217: 137-145
- 7) Neaves WB (1978) The effect of vasectomy on the testes of inbred Lewis rats. *J Reprod Fert* 54:405-411
- 8) Neaves WB (1974) The androgen status of vasectomized rats. *Endocrinology* 96:529-534
- 9) Flickinger CJ, Herr JC, Howard SS, et al. (1990) Early testicular changes after vasectomy and vasovasostomy in Lewis rats. *Anat Rec* 227:37-46
- 10) Flickinger CJ, Howards SS, Carey PO, et al. (1988) Testicular alterations are linked to the presence of elevated antisperm antibodies in Sprague-Dawley rats after vasectomy and vasovasostomy. *J Urol* 140: 627-631
- 11) McDonald SW and Scothorne RJ (1988) A quantitative study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rats. *J Anat* 159:219-225
- 12) Herr JC, Flickinger CJ, Howard SS, et al. (1987) The relation between antisperm antibodies and testicular alterations after vasectomy and vasovasostomy in Lewis rats. *Biol Reprod* 37:1297-1305
- 13) Chehval MJ, Martin SA, Alexander NJ, et al. (1995) The effect of unilateral injury to the vas deferens on the contralateral testis in immature and adult rats. *J Urol* 153:1313-1315
- 14) Kwart AM and Coffey DS (1973) Sperm granulomas: an adverse effect of vasectomy. *J Urol* 110:416-422
- 15) Howards SS, Jessee S and Johnson A (1975) Micropuncture and microanalytic studies of the effect of vasectomy on the rat testis and epididymis. *Ferti Steril* 26:20-28
- 16) 山本雅憲(1995) 精巣および精巣上体における精路閉塞の造精機能におよぼす影響. *日不妊会誌* 40:564-564
- 17) 田中啓幹, 徳永 葉(1996) 精子形成と自己免疫. *臨泌* 50:459-463
- 18) Bigazzi PE, Kosuda L and Harnick L (1977) Sperm autoantibodies in vasectomized rats of different inbred strains. *Science* 197:1282-1283

- 19) Silber SJ (1977) Sperm granuloma and reversibility of vasectomy. *Lancet* 2:588-589 日泌尿 57:421-427 (受付: 1998年 8 月27日)
- 20) 瀧原博史, 井本勝彦, 白瀧 敬 他(1995) 精路通過障害に対する精路再建手術の臨床的研究. 西 (受理: 1998年10月19日)

The Effect of Unilateral Vasectomy on Spermatogenesis in the Bilateral Testes in Lewis Rats

Kazuhiko Ishizu, Koji Shiraishi, Hiroshi Nakane and Katsusuke Naito

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

Yoshikazu Baba

Department of Urology, Syuto General Hospital,
Yanai 742-0032, Japan

Hiroshi Takihara

Department of Urology, Onoda City Hospital,
Onoda 756-0094, Japan

The aim of this study is to determine whether vasectomy impairs spermatogenesis. Either left vasectomy or sham operation was performed in 10-week-old male Lewis rats. One and 3 months after the operation, the spermatogenesis in both testes was quantitatively evaluated by measuring testicular weight and percentage of haploid cells(%1C). After 3 months, the testicular weight and the %1C in the vasectomy group(n=10) were bilaterally decreased in comparison with the sham operation group(n=10) (left side: $p<0.05$, right side: $p<0.1$). After 3 months, the vasectomized 10 rats were divided into 3 animals showing reduction of spermatogenesis and 7 lacking testicular damage. These results suggest that vasectomy impairs spermatogenesis only in some individuals.

Key words: vasectomy, spermatogenesis

(Jpn J Fertil Steril 44:29-34 1999)

着床前期のマウス卵管，子宮におけるマクロファージの 分布と Ia 抗原および酸フォスファターゼの発現

The Distribution of Macrophages and The Expression of Ia Antigen and Acid Phosphatase in the Uterus and Oviduct of Mice During the Preimplantation Period

飯 田 修 一
Shuichi IIDA

スズキ病院産婦人科
高 橋 重 智
Shigetomo TAKAHASHI

鈴木 雅 洲
Masakuni SUZUKI

M.Suzuki Memorial Hospital,
Iwanuma 989-2481, Japan

東北医療短期大学
増 田 高 行
Takayuki MASUDA
College of Medical Science, Tohoku University,
Sendai 980-8575, Japan

東北大学医学部病理学教室
名 倉 宏
Hiroshi NAGURA
Department of Pathology, Tohoku University School of Medicine,
Sendai 980-8575, Japan

東北大学医学部動物実験施設
笠 井 憲 雪
Noriyuki KASAI
Institute for Experimental Animal, Tohoku University School of Medicine,
Sendai 980-8575, Japan

着床前後のreproductive organの免疫環境の変化を検討するために，マウスの交尾から着床までの卵管，子宮のF4/80陽性マクロファージの局在およびIa抗原の発現について免疫組織化学的手法で調べた。さらに，酸フォスファターゼの発現を酵素組織化学的手法で調べた。その結果，1) 卵管では非妊娠時と交尾直後(D0～D1)にマクロファージとIa抗原陽性細胞が卵管間膜内および卵管上皮直下に認められた。その後は減少し，着床期にはほとんど認められなかった。2) 子宮では，非妊娠時と交尾直後には子宮内膜内にびまん性にマクロファージ，Ia抗原陽性細胞を認めた。3) 交尾後2～3日目(D2～D3)には子宮内膜上皮側にマクロファージ，Ia抗原陽性細胞の増加および酸フォスファターゼ陽性細胞

の出現を認めた。また、Ia抗原陽性細胞および酸フォスファターゼ陽性細胞の一部はマクロファージの分布と一致していた。4) 着床により脱落膜が形成されるとマクロファージは脱落膜の周辺および非着床部位に存在するも、脱落膜内にはほとんど認められなかった。5) Ia抗原陽性細胞は、着床時(D4~D7)にはほとんど認められなかった。

これらの結果より、着床前期には卵管では胚、精子などの異物侵入に対し、局所的な免疫反応がほとんど生じない状態で胚は卵管内を通過すると考えられる。子宮内では精子に対する炎症免疫反応が消失あるいは免疫活性は低下している状態で着床が開始されると考えられる。さらにマクロファージは着床初期には脱落膜内にほとんど存在せず、脱落膜が形成されるに従って、周辺より侵入してくると推測される。

キーワード：マクロファージ、Ia抗原、酸フォスファターゼ、免疫担当細胞、着床

(日不妊会誌 44:35-41 1999)

緒 言

近年、体外受精・胚移植(IVF-ET)は不妊症治療として急速に普及したが、その妊娠率は20~30%とあまり向上していない。その一因として着床不全が残された問題となっているが¹⁾、着床は子宮内膜における胚の受容能に左右される^{2,3)}。そして、着床に必要な子宮内膜の増殖と分化には、性ステロイドホルモンの影響が大きいことがわかっているが⁴⁾、それだけでなく母体にとってsemi-allograftである胚が子宮内で免疫的に拒絶されないことも必要である。そのためには、卵管・子宮において免疫環境が変化することによって卵管で胚が正常に発育し、子宮内で着床するように免疫的に制御されていると考えられる⁵⁾。しかし、着床前後のreproductive organの免疫環境の変化を調べた文献はあまり見られない。そこで、着床前後の免疫環境の変化の指標として、主要な免疫担当細胞であるマクロファージに注目して、交尾から着床までのマウス卵管、子宮におけるマクロファージの分布と数の変化を調べた。また、マクロファージは活性化段階によって、機能が著しく異なっている⁶⁾。そこで、マクロファージの機能の指標として、抗原提示能としての機能を示す時に発現するIa抗原と貪食能をもった活性化マクロファージ内に含まれる酸フォスファターゼの分布を調べることによって、マウス卵管、子宮内膜に存在するマクロファージの機能がどのように変化しているかを検討した。

対象および方法

1 動物および標本作成

8~10週齢の雌マウス(C57BL/6N)を同系雄マウスと一晩同居後、陰栓の有無により交尾を確認した日

をD1とし、その後の日数をD2~D7とした。また、交尾をしていないマウスをD0として、D0からD7までのマウスを3匹ずつ頸椎脱臼にて屠殺し卵管、子宮を摘出した。摘出した卵管・子宮は4%PLP液(4℃)に24時間固定した後、実体顕微鏡下で卵管、子宮にそれぞれ分離した。卵管、子宮の組織切片はOCT-compoundにて包埋し、ドライアイスアセトン溶液にて急速冷凍した。この凍結ブロックより、クリオスタットで6μmの薄切切片を作成し、室温にて30分風乾した。

2 免疫組織化学染色

染色法は、ABC法を用いた。切片は、0.1%PBS溶液にて洗浄後、ウサギ正常血清にて30分処理し、非特異的反応を防止した。そして、成熟マウスマクロファージの1次抗体としてF4/80, rat IgG2b (IgG2b) anti mouse Macrophage antibody (大日本製薬)を20倍に希釈し、また、H-2(Ia)抗原はrat IgG2 (IgG2b) anti mouse H-2I-A (class II polymorphic) antibody (大日本製薬)を40倍に希釈し、4時間(4℃)反応させた。0.1%PBS溶液にて洗浄後、ビオチン標識2次抗体biotinylated rabbit anti rat Ig (DAKO)を200倍に希釈し2時間(4℃)反応させ、600倍に希釈したHRP標識アビジン-ビオチン複合体(DAKO)と2時間(4℃)反応させた。発色は、PBSにて洗浄後、3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)にて5~10分間反応させ、メチルグリーンにて核染色を行い、検鏡した。陰性対照試験には正常ラット血清を20倍および40倍に希釈し、一次抗体の代りとして用いた。

3 酵素組織化学染色(酸フォスファターゼ)

切片はイオン交換水にて十分洗浄した。発色には発色液としてBarka-Anderson反応液にて20分間反応

させ、ヘマトキシリンにて核染色を行ない、検鏡した。

Barka-Anderson反応液は、以下のように作成した。

A液：naphthol AS-BI phosphate sodium salt 20mg
+ 0.2M Macetate buffer (PH5.0) 38ml

B液：5%parafuchsin液 1ml + 4% nitrite sodium液 1ml

A液とB液を使用直前に混和し、濾過して使用した。

結 果

1 卵管におけるマクロファージの分布とIa抗原、酸フォスファターゼの発現

非妊娠時(D0)およびD1には、卵管上皮下に少数および卵管間膜内に多数のマクロファージ(Fig.1:A, B), Ia抗原陽性細胞(Fig.1:C, D)を認めるも、D2以後は減少し、D4以後はほとんど認められなかった。酸フォスファターゼ陽性細胞は卵管には認められなかった。

2 子宮内膜内のマクロファージの経時変化とIa抗原、酸フォスファターゼの発現

子宮内膜上皮より200 μ m以内の子宮内膜内において、75 μ m平方内のマクロファージ、Ia抗原陽性細胞、酸フォスファターゼ陽性細胞の数を数カ所、カウントし平均値を求めた。そして、0～1個を(－)、2～4個を(±)、5～9個を(+), 10～19個を(⦿), 20個以上を(⦿)として表1に示した。

1) マクロファージ

非妊娠時(D0)には、子宮内膜内にびまん性にマクロファージが認められた(+).

この分布はD1においても変化はなかった(Fig.2:A). D3には子宮内膜の内腔側にマクロファージの増加(+) $\rightarrow$ (⦿)が認められた(Fig.2:B). D4, D5では、マクロファージは子宮内にびまん性に認められるも数はD3のときより少し減少(⦿) $\rightarrow$ (+)していた。D6, D7では脱落膜の形成が見られるがマクロファージは脱落膜の周辺には認められるも、脱落膜内にはほとんど認められなかった(Fig.2:C). 脱落膜化していない部分では、マクロファージはびまん

性に認められるも間質が浮腫状になっているため、数はD4, D5のときより減少(⦿) $\rightarrow$ (+)していた(Fig.2:D).

2) Ia抗原陽性細胞

非妊娠時D0およびD1では子宮内膜内に少数(±)のIa抗原陽性細胞が認められるだけであった(Fig.3:A).

D2～D3には、マクロファージと同様に子宮内膜の内腔側に陽性細胞の増加(±) $\rightarrow$ (⦿)が認められた(Fig.3:B). さらに、子宮内膜上皮に近接した部位で

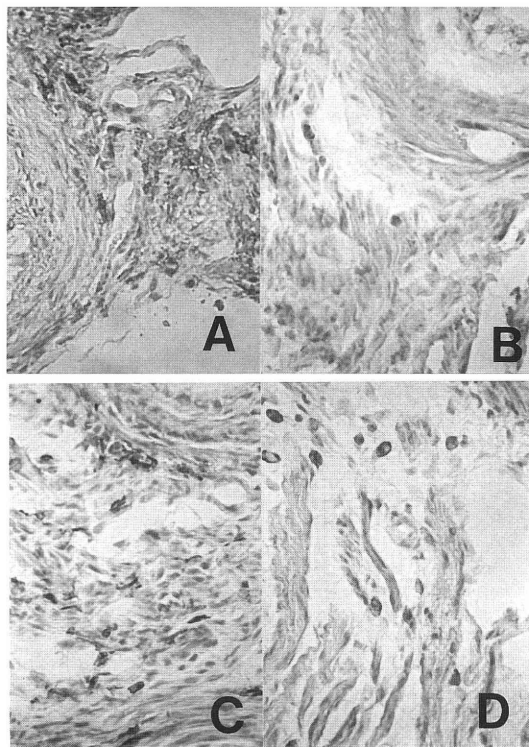


Fig.1

A: Many macrophages are detected in the mesosalpinx immediately after mating (day 1). $\times 100$

B: Little macrophages are observed mesosalpinx (day 5). $\times 100$

C: Many Ia antigen-positive cells on non-pregnant stage (day 0). $\times 100$

D: Expression of Ia antigen are not observed nearly (day 5). $\times 100$

表1 子宮内膜間質のマクロファージの数とIa抗原および酸フォスファターゼの発現の変化

交尾後の日数	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7
F4/80 (macrophage)	(+)	(+)	(⦿)	(⦿)	(+)	(+)	(+)	(+)
Ia Antigen	(±)	(±)	(+)	(+)	(±)	(－)	(－)	(±)
Acid Phosphatase	(－)	(－)	(±)	(+)	(±)	(－)	(－)	(－)

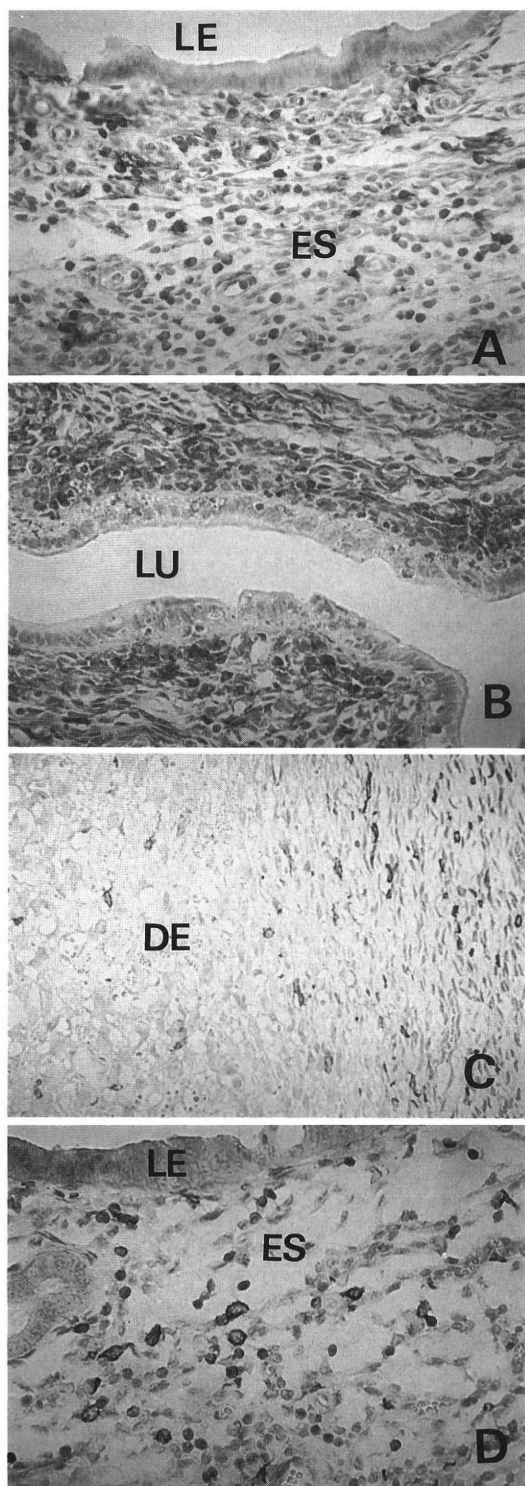


Fig.2

- A : Many macrophages are homogeneously distributed in the endometrium (day 1). $\times 100$
 B : Macrophages are increased on the lumen side of the endometrium (day 3). $\times 100$
 C : There are many macrophages around decidua and little macrophages within the decidua (day 7). $\times 50$
 D : There are many macrophages in the edematous stroma of endometrium (day 6). $\times 100$
 LE: luminal epithelium, ES: endometrial stroma, DE: decidua, LU: lumen

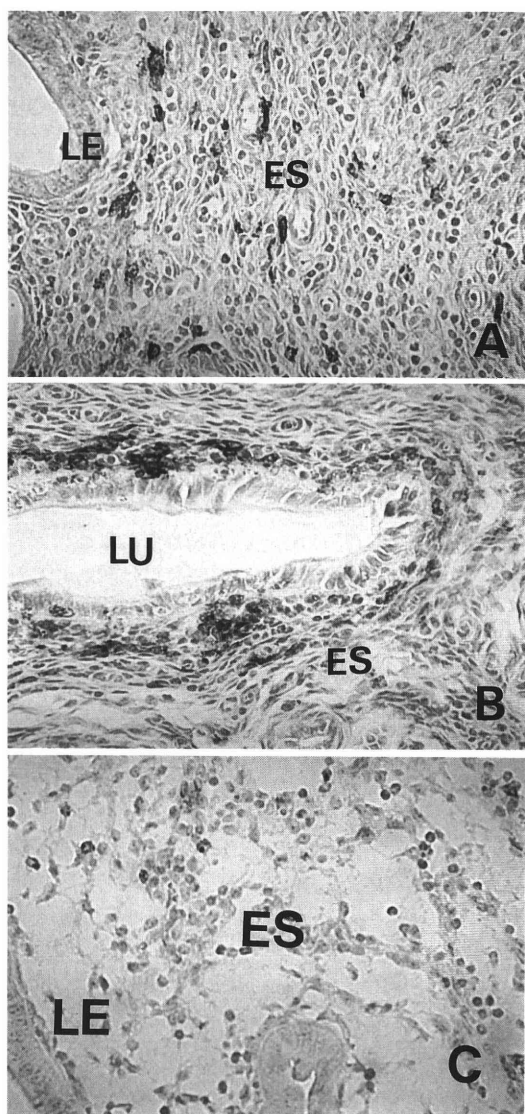


Fig.3

- A : There are a little Ia antigen positive cells in the endometrium on non-pregnant stage (day 0). $\times 100$
 B : The number of Ia antigen-positive cells are increased on the lumen side of the endometrium as well macrophages (day 3). $\times 100$
 The localization of Ia antigen-positive cells are fairly consistent with that of macrophages.
 C : Ia antigen positive cells are sporadically in the endometrial stroma (day 4). $\times 100$ (Legend appears on Fig. 2)

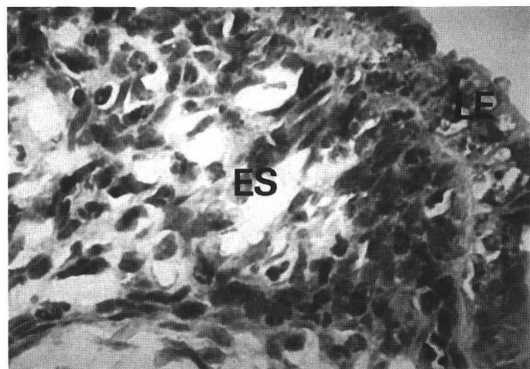


Fig.4

Many acid phosphatase-positive cells appear on the lumen side of the endometrium, and those cells are suggested acid phosphatase-positive macrophages (day 3). But the number of those cells are less than Ia antigen-positive cells. $\times 200$ (Legend appears on Fig. 2)

はマクロファージとIa抗原陽性細胞の分布は類似していた。D4～D7では、ほとんどIa抗原陽性細胞は認められなかった(Fig.3:C)。

3) 酸フォスファターゼ陽性細胞

D2, D3に子宮内膜の内腔側に酸フォスファターゼ陽性細胞が認められた(Fig.4)。

酸フォスファターゼ陽性細胞は、その局在からほとんどがマクロファージであると考えられる。

考 察

マウス卵管では卵管上皮下および卵管間膜内に非妊娠時(D0)および交尾直後(D1)にF4/80陽性マクロファージとIa抗原陽性細胞を認めるが、D1以後、次第に減少し、D4以後はほとんど認められなかった。さらに卵管には、酸フォスファターゼの発現はなく、貪食能をもった細胞は認められなかった。マウスでは卵子は卵管内で受精し、8細胞期あたりまで卵管で成長することが知られている。精子や受精卵は異物であり、これらの刺激に対する免疫反応としてマクロファージの数およびIa抗原、酸フォスファターゼの発現の増加が生じると考えられたが、卵管ではそのような現象は認められなかった。Petersら⁷⁾によると正常のヒト卵管には、マクロファージはごく少数しか認められず、そのマクロファージも間質に少数認められるのみで卵管上皮には認められなかったと報告されている。さらに、ヒト卵管に分布するリンパ球は少数であり、suppressor T cell 優位にあるとの文献もあり⁸⁾、もともと卵管は、免疫反応が起こりにくい器官であると考えられる。しか

し、子宮外妊娠のときの卵管の着床部位の周囲にはIa抗原陽性細胞やマクロファージを主とした免疫細胞浸潤がみられるので⁹⁾、決して卵管は免疫的に無反応の器官ではないことも明らかである。また、不妊症の女性の卵管では精子を貪食したマクロファージが多く認められると、卵管のマクロファージと妊娠性の関連を示唆している文献もある¹⁰⁾。

非妊娠時(D0)の子宮内膜には、F4/80陽性マクロファージ、Ia抗原陽性細胞はびまん性に認められたが、Ia抗原陽性細胞の数は少なく、その大部分が活性化されていない定住マクロファージと考えられた。D6以後、着床部位には、脱落膜の形成が見られ、その周辺にF4/80陽性マクロファージが集簇して認められた。D6, D7の非着床部位にはF4/80陽性マクロファージは数は少ないがびまん性に存在しており、脱落膜化の過程で、脱落膜の周辺に圧迫されたものと考えられる。脱落膜内には、妊娠のごく初期からF4/80陽性マクロファージ、Ia抗原陽性細胞が存在することが知られている^{11, 12)}、それらは着床時より存在したものでなく、着床後、脱落膜内に侵入してきたと思われる。

また、D2～3あたりに、子宮内膜上皮に近接した間質にF4/80陽性マクロファージ、Ia抗原陽性細胞の増加が見られ、さらに内腔側のF4/80陽性マクロファージには酸フォスファターゼ陽性のものも見られた。F4/80陽性マクロファージとIa抗原陽性細胞の分布は類似しており、マクロファージが活性化され、Ia抗原を強く発現していることが示唆された。以上から子宮内膜は卵管とは対照的に精子の侵入に対して敏感に反応したのと考えられる。交尾後2～3日目には、顆粒球、リンパ球も子宮内膜の内腔側に増加することが知られており、一種の異物侵入に対する免疫炎症反応と考えられている¹³⁾。しかし、子宮内膜におけるF4/80陽性マクロファージ、Ia抗原陽性細胞の増加はD3までであった。D4以後はF4/80陽性マクロファージは認められるも、Ia抗原陽性細胞はほとんど見られなくなり、マクロファージのIa抗原の発現は消失したのと考えられた。また、脱落膜内にはF4/80陽性マクロファージ、Ia抗原陽性細胞は見られなかった。以上の所見から、着床は子宮内が免疫的に抑制された状態で開始されると推測される。しかし、免疫応答を抑制させる因子として、リンパ球、とくにhelper T-1細胞、CD8+T細胞を介した抑制作用や抗体を介した抑制作用があり、同時にこれらのfactorも考慮する必要があると考えられる。免疫抑制剤として臓器移植に用いられる

cyclosporin投与によってもIa抗原の減少、消失が同様に観察されており¹⁴⁾、免疫抑制を目的として体外受精・胚移植時にプレドニン投与なども試みられているが、十分な効果は得られていない¹⁵⁾。

さらに、着床には胚の発育能も関係しており、その発育能には、局所免疫細胞あるいは子宮、卵管上皮細胞から分泌されるサイトカインや増殖因子などが関与していると推測されており¹⁶⁾、今後、種々のサイトカイン、増殖因子などの局所因子を介した胚の発育能に対する影響を含めて検討していくことが必要である。

文 献

- 1) Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, et al. (1998) Rescue of implantation potential in embryos with poor prognosis by assisted zona hatching. *Hum Reprod* 13:1331-1335
- 2) Morita Y, Tsutsumi O and Taketani Y (1994) *In vitro* treatment of embryos with epidermal growth factor improves viability and increases the implantation rate of blastocysts transferred to recipient mice. *Am J Obstet Gynecol* 171:406-409
- 3) Fischer B (1989) Effects of asynchrony on rabbit blastocyst development. *J Reprod Fertil* 86: 479-491
- 4) Psycos A (1973) Endocrine control of egg-implantation. In: Greep RO, Astwood EB, et al. (eds), "Handbook of Physiology", Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland section 7: Endocrinology, vol. II, Part 2
- 5) Beer AE and Billingham RE (1974) Host responses to intrauterine tissue, cellular and fetal allografts. *J Reprod Fertil* 21:59-88
- 6) Adams DO and Hamilton TA (1984) The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 2: 283-318
- 7) Peters WM (1986) Nature of "basal" and "reserve" cells in oviductal and cervical epithelium. *J Clin Pathol* 39:306-312
- 8) Michael B (1992) Identification of lymphocyte subsets in the human fallopian tube. *Am J Reprod Immunol* 28:81-84
- 9) Earl U, Lunny DP and Bummer JN (1987) Leucocyte populations in ectopic tubal pregnancy. *J Clin Pathol* 40:901-905
- 10) Haney AF, Misukonis MA and Weinberg JB (1983) Macrophages and infertility: Oviductal macrophages as potential mediators of infertility. *Fertil Steril* 9:310-315
- 11) De M and Wood GW (1991) Analysis of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from implantation through parturition. *J Leukoc Biol* 50:381-392
- 12) De M and Wood GW (1989) Influence of oestrogen and progesterone on macrophage distribution in the mouse uterus. *J Endocrinol* 126:417-424
- 13) De M, Choudhuri R and Wood GW (1991) Determination of the number and distribution of macrophages, lymphocytes and granulocytes in the mouse uterus from mating through implantation. *J Leukoc Biol* 50:252-262
- 14) Haba T, Takagi H and Nagura H (1991) An immunohistochemical study on the effects of cyclosporin on the gut associated lymphoid tissue of rats. *Gastroenterol Jpn* 26:593-602
- 15) Fried EP, Blanco L, Lancuba S, et al. (1993) Improvement of clinical pregnancy rate and implantation rate of *in vitro* fertilization embryo transfer patients by using methylprednisone. *Hum Reprod* 8:393-395
- 16) Cohen PE and Pollard JW (1996) Cytokines and growth factors in reproduction. In: Bronson R A, Alexander N J, Anderson D, et al. (eds), *Reproductive Immunology*. Blackwell Science Inc Cambridge MA, pp52-102

(受付：1998年8月27日)

(受理：1998年11月9日)

The Distribution of Macrophages and The Expression of Ia Antigen and Acid Phosphatase in the Uterus and Oviduct of Mice During the Preimplantation Period

Shuichi Iida, Shigetomo Takahashi and Masakuni Suzuki

Department of Obstetrics and Gynecology, M.Suzuki Memorial Hospital,
Iwanuma 989-2481, Japan

Takayuki Masuda

College of Medical Science, Tohoku University,
Sendai 980-8557, Japan

Hiroshi Nagura

Department of Pathology, Tohoku University, School of Medicine,
Sendai 980-8557, Japan

Noriyuki Kasai

Institute for Experimental Animals, Tohoku University, School of Medicine,
Sendai 980-8557, Japan

The concentration and distribution of F4/80-positive macrophages and Ia antigen-positive cells in the uterus and oviduct of mice during the preimplantation period (between day 1 and 7 of pregnancy) were assessed immunohistochemically. Furthermore, the expression of acid phosphatase was assessed enzyme histochemically. 1) In the oviduct, a few macrophages and Ia antigen-positive cells were present below the tubal epithelium and in the mesosalpinx in non-pregnant mice and in mice immediately after mating (day 0~1). After day 1, few macrophages were found. 2) In the endometrium, macrophages and Ia antigen-positive cells were found diffusely on day 0~1 and the number of these cells increased on the lumen side on day 2 and 3. Acid phosphatase-positive cells also appeared and the occurrence of cells expressing Ia antigen and a portion of the acid phosphatase-positive cells was nearly consistent with the localization of macrophages. 3) Upon initiation of implantation (day 4~7), significant numbers of macrophages were found on the outside of the decidua formed around the implantation site, but macrophages were not found within the decidua. In the endometrium without decidualization, macrophages were found diffusely on day 0~1. 4) Few Ia antigen-positive cells were observed in the endometrium, including the decidua, on day 4~7. From these results, it can be suggested that embryos are transported through the oviduct without activation of the local immune response, an inflammation-like cellular response occurs in the uterus following mating, and thereafter implantation of blastocysts initiates the process of immune tolerance. Furthermore, this study demonstrates that, during pregnancy, macrophages are not present within the decidua at the early stage of decidualization, but they migrate from a deep layer of the endometrium following the proliferation of the decidua.

Key words: macrophage, Ia, antigen, acid phosphatase, immunocompetent cells, implantation

(Jpn J Fertil Steril 44:35-41 1999)

Relationship between Intervals of Repeated Induced-Ovulation and Appearance of Unfertilized Eggs Showing Abnormal Cleavage in Mice

Kiichi KANAYAMA and Tuyoshi ENDO

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

Hiroshi UCHIYAMA and Kahei SATO

Department of Applied Biological Science, College of Bioresource Sciences,
Nihon University, Kanagawa 252-8510, Japan

Abstract: Using mice, authors examined the relationship between the interval of the first and second ovulation induced by PMSG/hCG and the appearance of abnormal unfertilized eggs showing cleavage. 1.5% of the total number of ovulated eggs after induced ovulation once were morphologically abnormal unfertilized eggs showing cleavage. In the groups treated for the second induced ovulation at intervals of 5, 10 and 20 days, the rate of abnormal unfertilized eggs was 6.9%, 1.8% and 1.5%, respectively. Thus, it was found that the occurrence of abnormal unfertilized eggs showing cleavage in the oviduct is reduced by prolongation of the interval of repeated induced-ovulation by gonadotrophins.

Key words: repeated induced-ovulation, abnormal unfertilized-eggs, mice

(Jpn. J. Fertil. Steril., 44:43-46 1999)

Introduction

Gonadotrophins (GTH) are widely used for treatment of ovulation disorder^{1,2)}. However, the pregnancy rate after induced ovulation by repeated administration of GTH is not always satisfactory. Although several factors may be involved, the main reason for this is considered to be abnormalities of eggs obtained from repeated induced-ovulation³⁾.

In our studies using animals, authors have shown that unfertilized eggs showing abnormal cleavage are often observed in the oviduct after repeated induced-ovulation by GTH³⁾. In the present study, authors examined whether the rate of eggs showing abnormal cleavage can be reduced by prolongation of intervals of GTH administration in repeated induced-ovulation.

Materials and Methods

The subjects of this study were 8-week-old mature ddY mice. Induced ovulation was performed by the following conventional method. Without considering

the estrus cycle of mice, 5 iu PMSG was subcutaneously injected at 5 p.m., and 5 iu hCG was also subcutaneously injected 48 hours later. Dose of PMSG and hCG was determined considering the papers previously reported⁴⁻⁶⁾.

In this experiment, the animals were divided into 2 groups; one group in which the animals were treated for induced ovulation once and the other twice. As shown in Table 1, the latter group was further divided into 3 groups. The interval of treatment for induced ovulation in the 3 groups was 5, 10 and 20 days respectively. The animals were euthanized 48 hours after the last administration of hCG, and the oviducts were excised. In the oviduct specimens, the number of ovulated eggs in the ampulla of the oviduct and their morphological abnormalities were microscopically examined.

The percentage of unfertilized eggs that showed cleavage was analyzed by χ^2 test, comparing each group. Differences were considered significant when P values were < 0.05 .

Table 1 Effects of intervals of re-superovulation following the first treatment on cleavage rate of unfertilized eggs in mice

	Treatment times of superovulation			
	Once	Twice		
		Intervals from the first treatment (days)		
		5	10	20
No. of mice examined*	10	10	10	10
Ave. no. of eggs examined	33.8	13.1	17.1	19.5
Total no. of eggs examined	338	131	171	195
No. of eggs showing abnormal cleavage	5	9	3	3
% cleave**	1.5	6.9 ^a	1.8 ^b	1.5 ^b

* All of mice examined were found to have ovulated.

** The percentage of unfertilized eggs that showed cleavage was analyzed by χ^2 test, comparing each group in re-superovulation treatments. Values with different superscripts are significantly different ($P < 0.05$).

Results

The results are shown in Table 1. When ovulation was induced by PMSG/hCG once 33.8 ovulated eggs were obtained in average. The total number of ovulated eggs in this group (once induction group) was 338, of which 5 eggs (1.5%) were unfertilized eggs showing abnormal cleavage in the ampulla of oviduct. In the group treated for the second induced ovulation after an interval of 5 days, the rate of eggs showing abnormal cleavage increased to 6.9%. This rate was more than 4-fold higher than that in the first induced ovulation. On the other hand, in the group with administration intervals of 10 and 20 days, the rate of abnormal eggs was 1.8% and 1.5%, respectively, showing significantly lower rates than 6.9% in the group with an interval of 5 days. The rates of abnormal eggs in these two groups (10 and 20 days) were at the same level as that in the group treated once (1.5%), suggesting that there is no effect of repeated administration of GTH on the appearance of abnormal eggs.

Those unfertilized eggs showing cleavage were in more than 8-cell stage. The blastomeres were heterogeneous in their sizes, and clearly differed from the blastomeres of fertilized eggs. These morphological abnormalities of the eggs were the same as those observed in our previous study³⁾.

Discussion

In experiments using animals, most eggs obtained

from ovulation induced by GTH are normal eggs with normal fertility and developmental potential⁷⁾. There have been reports, on the other hand, that a few abnormal ones are included among eggs obtained from animals subjected to induced ovulation^{8,9)}. We showed that in repeated induced-ovulation in mice by administration of GTH, abnormal unfertilized eggs showing cleavage are often observed in the oviduct³⁾. Unfertilized eggs showing cleavage are considered to be in the degenerating processes¹⁰⁾.

Unfertilized eggs which are already in the process of degeneration and in the ampulla of oviduct where fertilization is performed are unable to be fertilized. The results of experiment using animals [3] suggest that the low rate of pregnancy in women repeatedly administered with GTH for treatment of ovulation disorder results from abnormalities of the ovulated eggs.

The present study showed that the rate of abnormal eggs decreased with prolongation of the interval of the first and second induced by PMSG/hCG. As shown in Table 1, prolongation of the interval from 5 to 10 days reduced the rate of abnormal eggs to under 1/3. Since the estrus cycle of mice used in this experiment is 4-5 days, a period of 10 days is equivalent to 2 cycles. If GTH is administered to women with ovulation disorder at an interval of 2-3 menstrual cycles at the shortest, the rate of pregnancy may be improved.

It is reported that ovarian follicle atresia represents a physiological process in which 99.9% of the follicles

undergo apoptosis¹¹⁻¹³. It is also suggested that the action of GTH is to prevent follicular atresia¹⁴. The authors are now investigating whether or not the evidence of apoptosis can be obtained from the unfertilized eggs showing abnormal cleavage. The results could be reported in due course.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Y. Nakatsuka for his valuable help. This study was supported in part by Nihon University joint research grant for 1998.

References

- 1) Thompson CR and Hansen LM (1970) Pergonal (Menotropins): A summary of clinical experience in the induction of ovulation and pregnancy. *Fertil Steril* 21: 844-853
- 2) O'Herlihy C, Pepperell RJ and Robinson HP (1982) Ultrasound timing of human chorionic gonadotropin administration in clomiphene-stimulated cycle. *Obstet Gynecol* 59: 40-45
- 3) Kanayama K, Sankai T, Endo T, et al. (1989) Appearance of unfertilized ova cleaving in the ampulla of the uterine tube after repeated ovulation induction. *Jpn J Fertil Steril* 34: 340-344
- 4) Fowler RE and Edwards RG (1957) Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. *J Endocrin* 15: 374-384
- 5) Edwards RG and Gates AH (1959) Timing of the stage of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins. *J Endocrin* 18: 292-304
- 6) Wilson ED and Zarrow MX (1962) Comparison of superovulation in the immature mouse and rat. *J Reprod Fertil* 3: 148-158
- 7) Kasai K, Sugimoto M and Toyoda Y (1979) Normal progeny produced by the parents derived from mouse eggs fertilized *in vitro*. *Jap J Zootech Sci* 50: 885-890
- 8) Austin CR and Braden AWH (1954) Anomalies in rat, mouse, and rabbit eggs. *Aust J Biol Sci* 7: 537-542
- 9) Averill RLW (1958): The production of living sheep eggs. *J Agric Sci* 50: 17-33
- 10) Ishibashi I (1961) Cytological observations on cleavage of the unfertilized ovum of rat. *Jpn J Zootech Sci* 32: 291-300
- 11) Hsueh AJW, Billig H and Tsafiri A (1994) Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr Rev* 15: 707-724
- 12) Zeleznik AJ, Ihrig LL and Bassett SG (1989) Developmental expression of Ca^{++}/Mg^{++} -dependent endonuclease activity in rat granulosa and luteal cells. *Endocrinology* 125: 2218-2220
- 13) Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, et al. (1991) Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129: 2799-2801
- 14) Peter H, Byskov AG, Himelstein-Braw R, et al. (1975) Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fert* 45: 559-566

(Received October 17 : 1998)

(Accepted November 24 : 1998)

マウスにおける反復過排卵誘起の処理間隔と異常分割像を示す未受精卵子の出現率との関係

日本大学生物資源科学部獣医学科

金山喜一・遠藤 克

日本大学生物資源科学部応用生物科学科

内山 寛・佐藤嘉兵

マウスを供試動物に用いてPMSGとhCGによる過排卵誘起を2回反復する際、その反復間隔と異常分割像を示す未受精卵子の出現率を検討した。初回の過排卵誘起では、排卵卵子総数の1.5%が異常分割像を示す未受精卵子であった。2回目の誘起排卵を5日、10日、20日後に反復すると、異常分割を示す未受精卵子の出現率はそれぞれ6.9%、1.8%、1.5%であった。このように、性腺刺激ホルモンによる誘起排卵を反復する場合、反復間隔を長くあけることによって、退行・変性過程にあると思われる分割像を示す未受精卵子の出現を抑制できることを示した。

キーワード：反復誘起排卵・異常未受精卵子・マウス

(日不妊会誌 44:43-46 1999)

不死化ヒト顆粒膜細胞株の樹立ならびにその細胞性格の検討

Establishment and Characterization of Human Granulosa Cells Immortalized with SV40 Large T Antigen

熊本大学医学部産科婦人科学教室

新 田 慎

Makoto NITTA

永 井 隆 司

Ryuji NAGAI

片 渕 秀 隆

Hidetaka KATABUCHI

田 中 信 幸

Nobuyuki TANAKA

岡 村 均

Hitoshi OKAMURA

大 場 隆

Takashi OHBA

松 浦 講 平

Kohei MATSUURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kumamoto University School of Medicine,
Kumamoto 860-8556, Japan

昭和大学医学部産科婦人科学教室

藤 間 芳 郎

Yoshiro TOMA

清 水 幸 子

Yukiko SHIMIZU

矢内原 巧

Takumi YANAIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Showa University School of Medicine,
Tokyo 142-8666, Japan

ヒト顆粒膜細胞の増殖・分化，とくにステロイドホルモン産生機構の解明を目的とした不死化株の樹立を行った。

自然周期のヒト卵巣より採取した顆粒膜細胞にSV40 large T抗原遺伝子を導入し，2株の不死化株(GC1a, GC1b)を得，それらの細胞性格について検討した。GC1aでは，継代早期の細胞(GC1a E)にはestradiol(E₂), progesterone(P)の産生が認められたが，継代を重ねた細胞(GC1a L)での産生は低下した。一方，GC1bでは，継代早期よりE₂, P産生はみられなかった。FSH, cAMPやM-CSFによる刺激ではGC1a E, GC1a LともにE₂, P産生に変化は認められなかったが，androstenedione 50ng/mlの添加では24時間後にP産生は増加を示した。また，steroidogenic acute regulatory protein (StAR)とsterol carrier protein 2 (SCP2)のmRNAレベルの発現をRT-PCRを用いて検討したが，両者の発現はGC1a Eでみられたが，GC1a Lでは低下し，aromatase活性も継代とともに低下した。さらに，matrix metalloproteinase 1 (MMP-1)産生はGC1a Eで時間依存性に増加したが，GC1a Lでは低下した。

我々の樹立したGC1aは，継代を重ねることによってコレステロール輸送系およびステロイド合成系蛋白，さらに排卵機序に関与するMMP-1の発現が一様に低下していることが示された。

キーワード：顆粒膜細胞，不死化，SV40 large T抗原，ステロイド合成系，StAR

(日不妊会誌 44:47-55 1999)

緒 言

顆粒膜細胞は、下垂体ホルモンであるLHやFSHのみならず、interleukin(IL)-1, IL-6, tumor necrosis factor(TNF)- α 等の成長因子・サイトカインによるautocrineあるいはparacrineの制御を含む、複雑且つ精緻な機構によって卵胞の発育に伴い増殖・分化する¹⁾。そして、estradiol (E_2)ならびにprogesterone (P)の産生を行い、排卵の後に黄体細胞へ分化し、最終的には退行変性による細胞死を迎える。この顆粒膜細胞の増殖・分化そして退行の一連の過程を解明する手段のひとつとして、この不死化細胞の樹立が挙げられる。Amsterdam et al.は、ラットの顆粒膜細胞にsimian virus 40 (SV 40) large T抗原遺伝子とhuman activated (Ha) - ras遺伝子をco-transfectionした不死化細胞株を樹立している²⁾。一方、Rainey et al.はヒト顆粒膜細胞にhuman papilloma virus (HPV) type16のE6, E7遺伝子をtransfectionし³⁾、また、Lie et al.はSV40 large T抗原遺伝子を用いて、不死化ヒト顆粒膜細胞株を作成している⁴⁾。しかし、これらはいずれも*in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF-ET)時の卵胞穿刺液より得られた顆粒膜-黄体細胞から樹立された細胞株であった。

今回我々は、排卵誘発を受けていない卵巣から採取されたヒト顆粒膜細胞の不死化を試み、合計28株の増殖良好な細胞株を得、その中から2つの不死化細胞株を樹立した。この細胞株について形態学ならびに内分泌学の両面から観察を行ったので報告する。

対象および方法

1 材 料

熊本大学医学部附属病院産科婦人科において、婦人科疾患のために開腹術を行った4名の患者(34歳, 38歳, 38歳, 39歳)から得られた卵巣を材料とし、患者の承諾下に顆粒膜細胞を実験に供した。これらの患者はすべて排卵誘発の行われていない自然月経周期を有していた。摘出された卵巣はいずれも正常外観を呈し、最大径8~20mmの卵胞を含有していた。さらに、顆粒膜細胞採集後の標本において組織学的に異常のないことを確認した。なお、手術当日の月経周期は4日, 7日, 14日, 18日であった。

2 細胞培養とtransfection

摘出された卵巣を、無菌的にHanks' balanced salt solutionで洗浄した後、23ゲージ針を用いて直視下に卵胞を穿刺し、卵胞内を0.125% trypsin+0.01%

EDTA液を用いて洗浄を行い、顆粒膜細胞を採取した。得られた顆粒膜細胞は、10% fetal bovine serum (FBS; ICN), penicilin G (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml)を添加したDMEM/F-12 (Gibco BRL)液を用いて、37°C, 5% CO₂+95%大気の下で培養を行った。24時間の前培養の後、mammalian transfection kit (Stratagene)を用いたリン酸カルシウム法で、Human Science Research Resources Bank(大阪)より購入したSV40 large T抗原遺伝子を含むプラスミド(pSVori-8-16⁵⁾)のtransfectionを行った。初代ヒト顆粒膜細胞の培養可能な期間は短く、且つ、多くの細胞は自然増殖しないことから、neomycin等の薬剤による選択を行わず、増殖良好なコロニーを選択する方法をとった。安定した細胞増殖が得られた後は1/4~1/32の希釈で培養を継続した。

3 形態学的観察

継代培養後の細胞の形状の観察を、位相差顕微鏡を用いて行った。また、滅菌したカバーガラス上に細胞を培養し、70% ethanol液で固定し、一次抗体に抗SV40 large T抗原ハムスターモノクローナル抗体(30倍希釈; Flow Lab.)を、二次抗体にFITC標識抗ハムスターIgGマウス抗体(30倍希釈; Cappel)を用い、蛍光抗体法にてSV40 large T抗原の発現を検討した。さらに、細胞を0.125% trypsin+0.01% EDTA液1 mlの中に浮遊させ、この細胞浮遊液に4% glutaraldehyde液を等量混入して30分間の前固定した後、細胞をビームカプセルへ移し、10% (最終濃度)BSAを含む細胞懸濁液とし、遠沈した後に4% glutaraldehyde液で再固定し、ペレットを作成した。このペレットから透過型電子顕微鏡観察のためのブロックを作成し⁶⁾、超薄切片に酢酸ウраниウム+クエン酸鉛染色を施し、日立製12-A型電子顕微鏡を用いて超微形態学的観察を行った。

4 ステロイドホルモン産生能の検討

1) FSH, cAMP刺激による変化

4 well multidish (Nunc)を用い、1 well当たり 1×10^5 個の細胞を24時間前培養した後、androstenedione (Sigma) 50ng/mlを加えてさらに培養し、6~24時間後に培養上清を回収した。さらに、androstenedioneとともにFSH(フェルチノームP; Serono) 100mIU/mlあるいはN⁶,2'-O-dibutyryl adenosine 3':5'-cyclic monophosphate (dBt cAMP; Sigma) 1mMを添加し、6時間後に培養上清を回収した。培養上清中の E_2 の濃度をエストラジオール二抗体キット(DPC)を用いて

radioimmuno assay (RIA)にて測定した(cut off値: 10pg/ml). また, 培養上清中のPの濃度をプロゲステロンキット(DPC)を用いて同様の方法で測定した(cut off値: 0.2ng/ml).

2) macrophage colony stimulating factor (M-CSF)添加による変化

1)と同じ実験系を用いて, recombinant human M-CSF (rhM-CSF; 森永乳業) 2,000U/mlを添加し, 6時間後に培養上清を回収した. E₂ならびにPの濃度の測定は1)と同じ方法を用いた.

5 aromatase活性の検討

培養細胞がconfluentになった時点で無血清培地に交換し, 24時間の前培養を行った. その後, [1β -³H] androstenedione (New England Nuclear Corp.) 43nMを含む無血清培地3mlに置き換え, 6時間培養した後に培養液を回収し, 0.5mlの30%trichloroacetic acidおよび1.5mlの10% charcoalを加えて30分間振盪させた. 1,500rpmで5分間遠沈し, 上清3mlに対し10mlのaquasol-2 (New England Nuclear Corp.)を加え, 液体シンチレーションカウンターにて³H-water生成量を測定した. aromataseの比活性はfmol/hour/mg proteinにて算出した.

6 コレステロール輸送系の検討

1) 20 α -OH-cholesterol添加による変化

4, 1)と同じ実験系を用い, 拡散によりミトコンドリア内に取り込まれる基質である20 α -OH-cholesterol (Sigma)を10 μ g/ml添加し, 24時間の培養後に培養上清を回収した. E₂ならびにPの濃度の測定は4, 1)と同じ方法を用いた.

2) コレステロール輸送系蛋白のmRNAレベルの発現の検討

コレステロール輸送に関与する蛋白であるsteroidogenic acute regulatory protein (StAR), sterol carrier protein 2 (SCP2)のそれぞれについて特異的なプライマーの組を作成し, RT-PCR法(denaturation 95 $^{\circ}$ C, 60秒, annealing 65 $^{\circ}$ C, 45秒, extension 72 $^{\circ}$ C, 45秒, 計30cycles)により増幅した後, 1.0%アガロースゲル上で電気泳動し, mRNAレベルの発現の検討をエチジウムブロマイド染色を用いて行った.

7 matrix metalloproteinase 1 (MMP-1)産生の検討

1) 細胞株によるMMP-1産生の比較

4, 1)と同じ実験系を用いて, 24時間の前培養を行った後, androstenedione 50ng/mlを加え, 6時間

後に培養上清の回収を行った. 培養上清中のMMP-1の濃度をマウス抗ヒトMMP-1モノクローナル抗体(富士薬品工業)を用いたサンドイッチEIA法のキット(富士薬品工業)で測定した(cut off値: 1ng/ml).

2) 培養時間によるMMP-1産生の検討

MMP-1産生の認められた細胞株について, androstenedione添加後, 6, 24, 48時間後に培養上清の回収を行い, MMP-1の濃度の測定を7, 1)と同様の方法で行った.

結 果

1 不死化ヒト顆粒膜細胞株の樹立

直視下に卵胞を穿刺する方法によって, 片側の卵巣から0.5~2.0 $\times 10^6$ 個の顆粒膜細胞が採取された. 4名の患者より採取した顆粒膜細胞の各々にSV40 large T抗原遺伝子をtransfectionすることによって合計28株の増殖良好なクローンを得た. これらクローンの中の2つの細胞株は集団倍加レベル(population doubling level)が100を越えても安定した増殖能を示し, 不死化細胞株と判断した. これら2つの細胞株は同一卵巣(38歳, 月経周期14日目)より得られたもので, GC1a, GC1bと命名し, 先に述べた各検討は, この2つの不死化顆粒膜細胞株を用いて行った.

2 不死化ヒト顆粒膜細胞株の形態学的特徴

不死化したヒト顆粒膜細胞は, 継代初期にはまばらに配列し(写真1a), その後, 核分裂像が多数認められ, 細胞密度が増加した(写真1b). しかし, 細胞

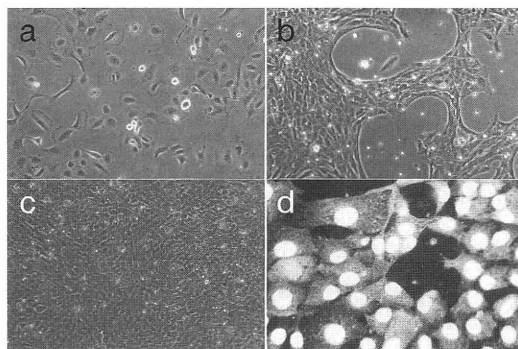


写真1 不死化ヒト顆粒膜細胞の位相差顕微鏡的観察ならびに蛍光抗体染色

位相差顕微鏡による観察では, 継代培養後4日目の細胞はまばらであるが(a), 7日目には細胞は互いに接触しながら増殖し, 分裂像を多数認める(b). 継代培養後14日目では, 細胞は密に増殖しているが, contact inhibitionは保たれている(c). 蛍光抗体法を用いたSV40 large T抗原の発現の検討では, すべての細胞の核において強陽性像を示す(d). $\times 10$ (a,b,c), $\times 40$ (d).

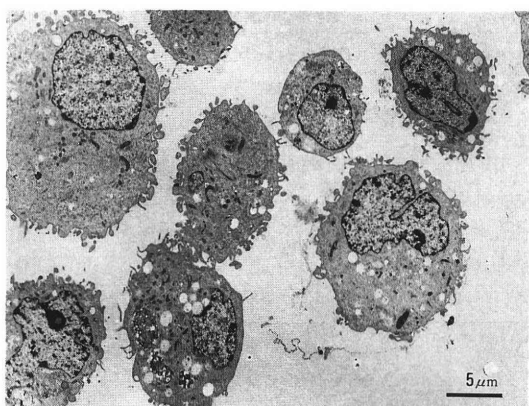


写真2 不死下ヒト顆粒膜細胞の透過型電子顕微鏡的観察

円形から楕円形を示す細胞の核は多形性を示し、細胞質は豊富である。×1,000；酢酸ウラニウム＋クエン酸鉛染色。

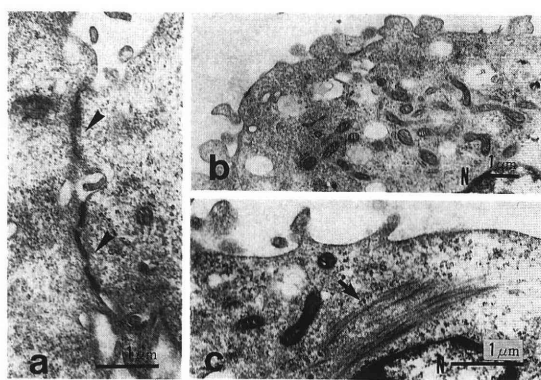


写真3 不死下ヒト顆粒膜細胞の透過型電子顕微鏡的観察

不死化ヒト顆粒膜細胞は、細胞間にはtight junction様の構造(▶)が観察され(a)、細胞質にはミトコンドリアや滑面あるいは粗面小胞体が発達し(b)、束状のフィラメント(←)も認められる(c)。N: 核、×8,000(a)、×8,000(b)、×12,000(c)；酢酸ウラニウム＋クエン酸鉛染色。

がconfluentな状態になってもpile upは認められず、contact inhibitionは保たれていることが確認された(写真1c)。蛍光抗体法を用いたSV40 large T抗原の検討では、すべての細胞の核において強い陽性を示した(写真1d)。超微形態学的には、個々の不死化顆粒膜細胞は円形から楕円形を成し、細胞質は豊富で、核は楕円形から不整型を示した(写真2)。また、細胞表面には絨毛状あるいは棍棒状の突起がみられた(写真2)。一部の細胞間にはtight junction様の接着構造が観察され(写真3a)、楕円形のミトコンドリアや短い滑面あるいは粗面小胞体を中心とした細胞内小器官が発達し(写真3b)、束状の細フィラメントも認められた(写真3c)。しかし、今回検討した2つの細胞株(GC1a, GC1b)の間では明らかな形態学的な違いは観察されなかった。

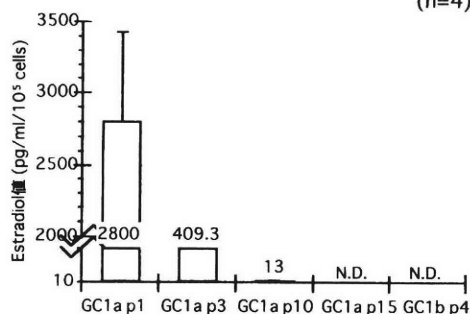
3 不死化ヒト顆粒膜細胞のステロイドホルモン産生能

継代数1のGC1aの培養上清中のE₂、Pは、各々2,800pg/ml、18.9ng/mlとともに高値を示したが、継代数5のGC1aでは各々350pg/ml、10.6ng/mlと低い傾向を示した(以下、継代数15未満のGC1aをGC1a early passage；GC1a Eとする)。15以上の継代数(GC1a late passage；GC1a L)ではE₂、Pともに測定感度以下となり、継代を重ねることによりステロイドホルモン産生能の低下・消失が認められた。一方、GC1bでは、継代初期よりステロイドホルモンの産生は認められなかった(図1a, b)。また、GC1aでは同一継代数においても、細胞の凍結保存および融解の操作によってステロイドホルモン産生能の低下・消失が認められた。

これら細胞株の各々に、androstenedioneを添加すると、24時間後にGC1a Eに加えてGC1a Lおよび

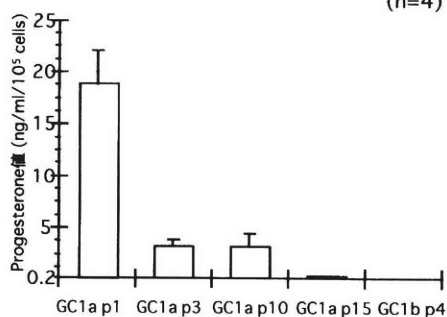
a 継代数に伴うE₂産生能の変化

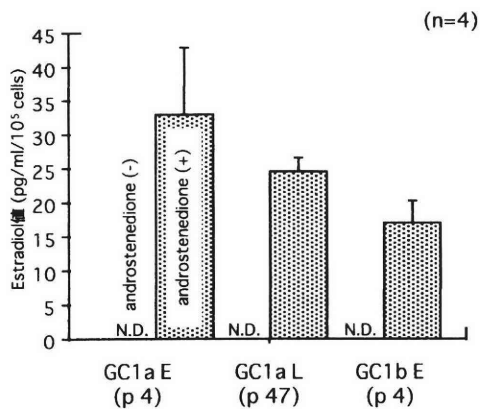
(n=4)



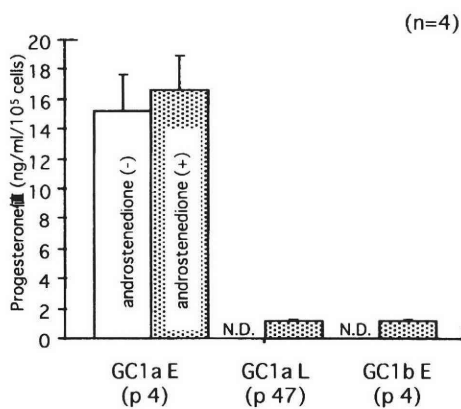
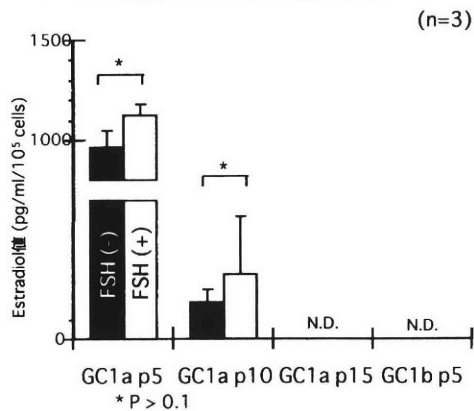
b 継代数に伴うP産生能の変化

(n=4)

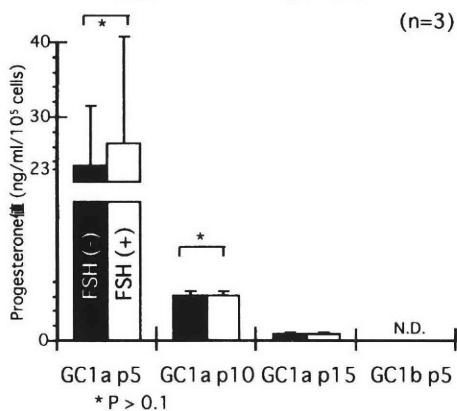


c androstenedione添加によるE₂産生能の変化

d androstenedione添加によるP産生能の変化

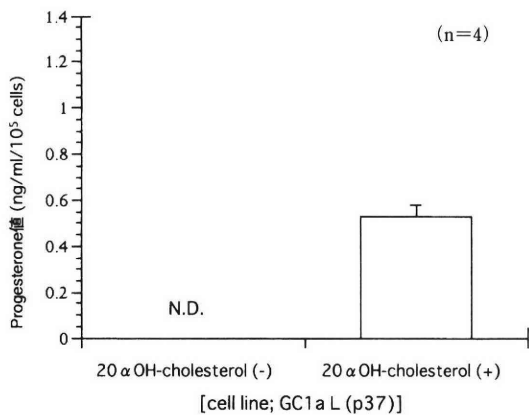
e FSH刺激によるE₂産生能の変化

f FSH刺激によるP産生能の変化



N.D.: not detected

図1 不死化ヒト顆粒膜細胞のステロイドホルモン産生能



N.D.: not detected

図2 20αOH-cholesterol添加によるP産生の変化

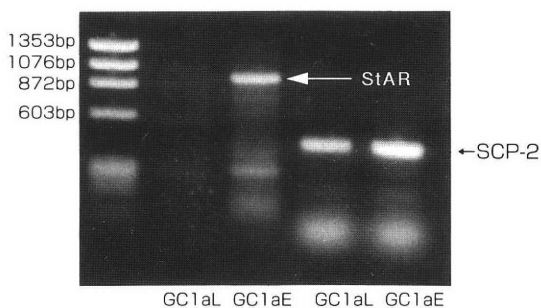


図3 継代数によるStAR, SCP2の発現の比較

GC1aEとして継代数3の, GC1aLとして継代数30の細胞を用いた。

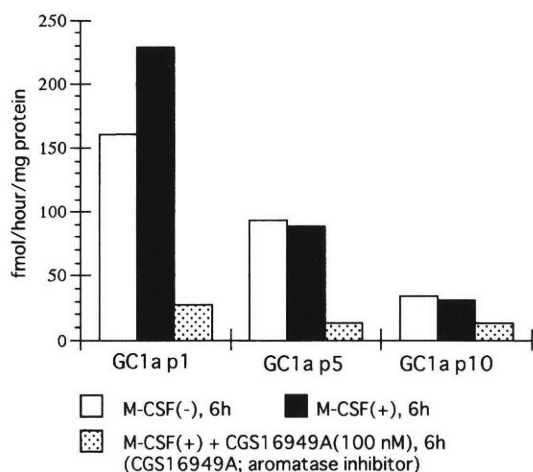


図4 M-CSF添加によるaromatase活性の変化

GC1bにおいてもE₂ならびにPの産生の出現あるいは増加がみられた(図1c, d). 次に, GC1aにFSHによる刺激を行うと, GC1a EではE₂, Pの産生が若干上昇したが, FSH無刺激との間に有意差は無かった. さらに, 継代数の増加に従ってFSHに対する反応が減弱する傾向を認め, 継代初期よりステロイドホルモンの産生が認められなかったGC1bでは, FSH刺激を行ってもE₂, Pともに検出されなかった(図1e, f). 一方, GC1aのcAMPやM-CSFによる刺激では, GC1a E, GC1a Lともにそれらのステロイドホルモン産生に影響を与えなかった.

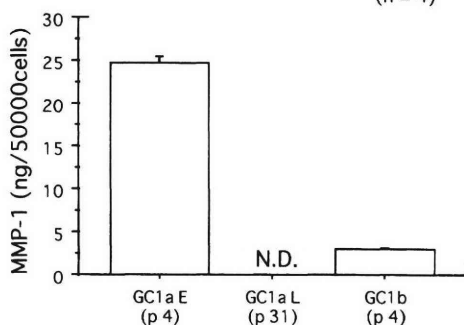
ステロイドホルモン産生能の低下したGC1a Lに20 α -OH-cholesterolを添加すると, Pの産生が認められた(0.53 ± 0.05 ng/ml)(図2). さらに, StARならびにSCP2のmRNAレベルの発現は, GC1a Eとともに認められたものの, GC1a LではStARの発現はほとんどみられず, SCP2の発現は低下していた(図3). また, GC1a Eではaromataseの高い活性が認められたが, 継代により活性の漸減がみられた. 測定結果はaromatase inhibitorであるCGS16949Aの存在下で抑制されることから, aromatase活性であることが示された. さらに, GC1aの継代数1においてのみM-CSFの添加によりaromatase活性の上昇がみられた(図4).

4 不死化ヒト顆粒膜細胞株のMMP-1産生能

不死化ヒト顆粒膜細胞株のMMP-1産生は, GC1a Eで高値を示し, GC1a Lでは測定感度以下であった. また, GC1bでは, GC1a Eと比較すると値が低いものの, MMP-1の産生が認められた(図5a).

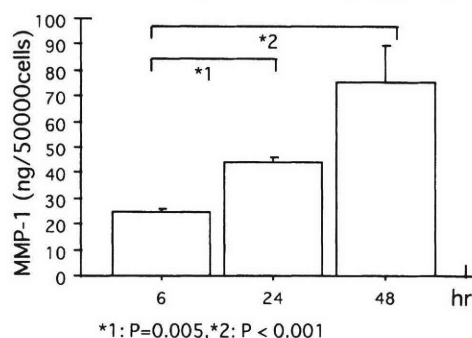
a 細胞株によるMMP-1産生能の検討

(n = 4)



b 培養時間におけるMMP-1産生の検討

[cell line; GC1a E (p4)] (n = 4)



*1: P=0.005, *2: P < 0.001

N.D.: not detected

図5 不死化ヒト顆粒膜細胞におけるMMP-1産生能

GC1a Eを用いた培養上清中のMMP-1濃度の経時的変化の検討では, MMP-1は時間依存性に増加した(図5b).

考 察

不死化顆粒膜細胞の樹立は, 1988年にAmsterdam et al.によって初めての報告がなされている²⁾. 彼らは, diethylstilbestrolで処理した幼若雌ラットの卵巢から得られた顆粒膜細胞にSV40 large T抗原遺伝子と癌遺伝子であるHa-ras遺伝子のco-transfectionを行い, ステロイドホルモン産生能を有する不死化顆粒膜細胞株を作成した. 一方, ヒト顆粒膜細胞の不死化株は, IVF-ET時に採取された顆粒膜細胞を用いたものが報告されている^{3,4)}. しかし, この種の細胞はhCG刺激後であるため既に黄体化が始まっており, *in vitro*での顆粒膜細胞の増殖・分化の研究を行うためには適当な材料とはいえなかった. そこで, 我々は顆粒膜細胞の増殖・分化, とくにステロイドホル

モン産生のメカニズムの解明を行う上で、より優れていると考えられる系を確立するために、排卵誘発を行っていない卵胞より採取したヒト顆粒膜細胞を用い、SV40 large T抗原遺伝子をtransfectionすることにより不死化ヒト顆粒膜細胞株を作成した。SV40 large T抗原遺伝子は、宿主細胞のDNAに組み込まれ、SV40 large T抗原蛋白を発現する。この蛋白は、主要な癌抑制遺伝子産物であるp53、pRbと結合し、その作用を不活化することが知られている。SV40 large T抗原による不死化のメカニズムはまだ明らかになっていないが、SV40 large T抗原によって不死化された細胞は、元来の細胞性格を保っていると考えられている⁷⁾。

我々の樹立した不死化ヒト顆粒膜細胞株は、超微形態学的には生体内にある顆粒膜細胞の性格を保持していた。しかし、内分泌学的には、継代数の進んでいないGC1a Eでは高いステロイド産生能が認められたが、継代数の進んだGC1a Lではその産生能が失われた。今回作成した細胞株は、薬剤による選択によって得られたものではない。このことから、GC1a Eは多クローンの状態にあり、その一部の分化した細胞にステロイドホルモンの産生がみられ、さらに、GC1a Lでは増殖良好な細胞が選択的に継代された結果、脱分化に向かった細胞が蓄積されたものと考えられる。一方、GC1bは継代初期からステロイド産生能を失っており、同一卵巣でも採取された卵胞により、細胞性格の異なった細胞株が得られることが示された。これらの細胞株のFSH受容体を介した細胞内情報伝達系であるcAMP-protein kinase Aの経路を検討するために、FSHあるいはcAMPによる刺激を行った結果、すべての細胞株にステロイドホルモンの有意な上昇は認められなかった。以上より、FSH受容体を介した細胞内情報伝達系は、不死化により継代早期から失われることが確認された。

コレステロール輸送系蛋白であるStAR、SCP2は、GC1a Eでは両者ともに強い発現が認められたが、GC1a Lでは発現が低下していた。さらに、自然拡散によりミトコンドリア内に取り込まれる 20α -OH-cholesterolの添加により、GC1a LにおいてPの産生が認められたが、無添加のGC1a Eと比較してかなり低値であった。また、aromatase活性も継代が進むとともに低下した。以上の結果から、GC1aでは、継代とともにコレステロール輸送系およびミトコンドリア内でのステロイド合成系の機能が一様に低下した結果、ステロイドホルモンを産生しなくなったことが示唆され、このことは、cAMPを介したいわゆ

るacute regulationも作動しなかったことと符合する。Amsterdam et al.は、SV40 large T抗原遺伝子をtransfectionした細胞株と、SV40 large T抗原遺伝とHa-ras遺伝子のco-transfectionを行った細胞株の比較を行った⁸⁾。その結果、SV40+Ha-ras株ではステロイド合成系の一連の遺伝子の発現を促進する転写因子であるSF-1の発現が高く、FSH、forskolin刺激によるP産生が認められたのに対して、SV40単独株では、SF-1の発現がみられず、FSH、forskolin刺激によるP産生も認められなかった。Ha-ras遺伝子とSF-1の発現の関係は現在のところ明らかになっていないが、我々の樹立したGC1a LでもSF-1の発現の低下がステロイド産生能の低下に関与している可能性は否定できない。少なくとも、GC1a LおよびGC1bにおいて、androstenedioneが E_2 のみならずPの産生を惹起したことから、ステロイドホルモン産生能を喪失した細胞にある種の刺激を加えることにより、ステロイドホルモン産生系に関与する蛋白、酵素の協調的な発現⁹⁾を惹起しうることが示され、この機構の解明は今後の課題であると思われる。

卵胞発育・排卵・黄体形成といった一連の現象は、血管新生や組織の破壊と再構築を伴い、炎症反応に類似した変化であり、また、排卵前の卵胞液中には様々なサイトカインが存在していることから、サイトカインが卵胞発育に関与していることが示されている¹⁾。その中でも血液細胞の増殖・分化刺激因子として知られているM-CSFは、卵胞発育に影響を与える因子の一つと考えられている^{10, 11)}。そこで、今回、M-CSFが不死化ヒト顆粒膜細胞のステロイドホルモン産生に与える影響を検討した結果、すべての細胞株において反応は認められなかった。しかし、GC1a Eの継代数1の細胞においてaromatase活性の上昇が認められたことから、卵胞発育の限られた一時期において、M-CSFは顆粒膜細胞の分化・増殖に対して影響を与えているのかもしれない。

一方、排卵の最終段階である卵胞壁頂部組織の離解と成熟卵の排出は、卵巣内線溶系やコラーゲン分解酵素の関与が指摘されており、家兔卵胞において排卵直前の卵胞壁頂部の顆粒膜細胞にとくにMMP-1が強く発現していることが示されている^{12, 13)}。そこで、不死化ヒト顆粒膜細胞のMMP-1産生について検討を行ってみると、GC1a Eでは時間依存性にMMP-1産生の増加が認められた。さらに、GC1a Lでは、ステロイドホルモン産生能とともにMMP-1産生の低下も認められたことから、ステロイドホルモン産生に関与する蛋白のみならず、排卵に関与する蛋白も

同時に抑制されていることが示唆された。

今回我々は、ステロイドホルモン産生能を有する細胞株を樹立したが、得られた細胞株は継代数を重ねることによってステロイドホルモン産生能を失っていった。しかし、蛋白合成を介したステロイドホルモン産生系の調節機構は保たれていることが示され、本細胞株は今後のステロイドホルモン産生の局所調節機構の解明に有用であると考えられる。

本論文の要旨は第71回日本内分泌学会学術総会(1998年6月6日、福岡市)において発表した。

文 献

- 1) 松浦講平, 田中信幸, 岡村 均 (1998) 卵胞の发育と閉鎖 サイトカイン. 新女性医学大系12 排卵と月経, 岡村 均編, 中山書店, 東京, pp246-255
- 2) Amsterdam A, Zauberman A, Meir G, et al. (1988) Cotransfection of granulosa cells with simian virus 40 and Ha-RAS oncogene generates stable lines capable of induced steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:7582-7586
- 3) Rainey WH, Sawetawan C, Shay JW, et al. (1994) Transformation of human granulosa cells with the E6 and E7 regions of human papillomavirus. *J Clin Endocrinol Metab* 78:705-710
- 4) Lie BL, Leung E, Leung PCK, et al. (1996) Long-term growth and steroidogenic potential of human granulosa-lutein cells immortalized with SV40 large T antigen. *Mol Cell Endocrinol* 120:169-176
- 5) Gluzman Y, Sambrook JF and Frisque RL. (1980) Expression of early genes of origin-defective mutants of simian virus 40. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:3898-3902
- 6) 片瀝秀隆, 前山昌男, 内藤 真 他 (1985) 胎盤絨毛マクロファージの細胞病理学的研究 第1編; Hofbauer細胞の細胞性状を中心として. 日網会誌 26:27-43
- 7) Reddel RR, Malan-Shibley L, Gerwin BI, et al. (1989) Tumorigenicity of human mesothelial cell line transfected with EJ-ras oncogene. *J Natl Cancer Inst* 81:945-948
- 8) Dantes KA, Plehn-Dujowich D and Amsterdam A (1997) Association of Ad4BP/SF-1 transcription factor with steroidogenic activity in oncogene-transformed granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 127:49-57
- 9) Guraya SS (1985) Granulosa : Cytological, histochemical and biochemical features. In : Guraya SS (ed), *Biology of Ovarian Follicles in Mammals*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp104-129
- 10) Nishimura K, Tanaka N, Ohshige Y, et al. (1995) Effect of macrophage colony-stimulating factor on folliculogenesis in gonadotrophin-primed immature rats. *J Reprod Fertil* 104:325-330
- 11) Araki M, Fukumatsu Y, Katabuchi H, et al. (1996) Follicular development and ovulation in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (*op*) mutation. *Biol Reprod* 54:478-484
- 12) 田中信幸, 岡村 均, 久慈直昭 他 (1998) 排卵機構. 新女性医学大系12 排卵と月経, 岡村 均編, 中山書店, 東京, pp263-281
- 13) Tadakuma H, Okamura H, Kitaoka M, et al. (1993) Association of immunolocalization of matrix metalloproteinase I with ovulation in hCG-treated rabbit ovary. *J Reprod Fertil* 98:503-508

(受付: 1998年10月16日)

(受理: 1998年11月25日)

**Establishment and Characterization of Human Granulosa Cells
Immortalized with SV40 Large T Antigen**

Makoto Nitta, Hidetaka Katabuchi, Takashi Ohba, Ryuji Nagai, Nobuyuki Tanaka,
Kohei Matsumura and Hitoshi Okamura

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kumamoto University School of Medicine,
Kumamoto 860-8556, Japan

Yoshiro Toma, Yukiko Shimizu and Takumi Yanaihara

Department of Obstetrics and Gynecology,
Showa University School of Medicine,
Tokyo 142-8666, Japan

Primary cultures of human granulosa cells have been deficient due to limited numbers and a short life span of cells. Using SV40 large T antigen, we immortalized human granulosa cells freshly obtained from the follicular aspirates of ovaries in women with a natural ovulatory cycle. Of 28 independently isolated clones, two clones established from one patient grew progressively into lines; GC1a and GC1b. Progesterone and estradiol were secreted by the GC1a line at early passages (GC1a E), but not by the GC1a line at the late passages (GC1a L) or the GC1b line. All three lines tested showed no response to stimulation with FSH, cyclic AMP, or M-CSF. The addition of 50 ng/ml androstenedione increased progesterone and estradiol production in all three lines. The mRNAs of steroidogenic acute regulatory protein and sterol carrier protein 2 were observed in the GC1a E line but decreased in the GC1a L line, as determined by RT-PCR. Aromatase activity was reduced as each passage of the three lines was advanced. The production of matrix metalloproteinase 1 was observed in the GC1a E line but not detected in the GC1a L line. These results show that individual human granulosa cell lines transformed with SV40 differ in their differentiation and steroidogenesis and that GC1a preserves the capacity to produce steroid hormones. These lines provide a new experimental model to study the biological events that control granulosa cell differentiation and function.

KeyWords : granulosa cell, immortalization, SV40 large T antigen, steroidogenesis, StAR

(Jpn J Fertil Steril 44:47-55 1999)

卵管間質部閉塞症例に対する Gn-RHa 療法の 有用性についての検討

Treatment of Proximal Tubal Occlusion Using a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

矢野 義明

Yoshiaki YANO

内出 一郎

Ichiroh UCHIIDE

森田 峰人

Mineto MORITA

久保 春海

Harumi KUBO

中熊 正仁

Masahito NAKAKUMA

平川 舜

Shun HIRAKAWA

First Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143-8541, Japan

卵管間質部閉塞症の原因として、卵管子宮内膜症の存在は知られているものの、その診断が必ずしも容易でないためか、薬物療法に関する報告は少ない。そこで今回我々は、卵管間質部閉塞症と診断された不妊症例に対してGn-RHagonist(Gn-RHa)療法を行い、治療後に卵管の再疎通が得られるかを検討した。前医における子宮卵管造影検査にて両側卵管が造影されずに、両側卵管間質部閉塞症と診断され、その精査加療目的で当院に紹介受診した不妊症例5例を対象とした。そのうち3例については当院にて腹腔鏡を施行し、インジゴカルミン水溶液による通色素検査を行い、両側卵管が青変しないことを確認した。酢酸ブセレリン(900 μ g/日)あるいは酢酸リュープロレリン(1.88mg/4週)を4カ月間投与後、透視下に子宮卵管造影検査を行い卵管通過性を調べた。5例中3例は酢酸ブセレリン、2例は酢酸リュープロレリンにて加療した。Gn-RHa療法後、対象5例中4例(80%)に両側卵管の再疎通を認めた。残りの1例については、片側のみの再疎通を認めたが、注入圧が高く、十分な効果が得られたとはいえなかった。また、3例(60%)はGn-RHa療法後6カ月以内に妊娠が成立した。

卵管間質部閉塞症例の中には、卵管子宮内膜症や子宮腺筋症に起因するものも多く存在することが推測され、Gn-RHa療法は卵管通過性の改善に有用であることが示唆された。

キーワード：Gn-RHagonist(Gn-RHa)、卵管間質部閉塞症、子宮卵管造影法、腹腔鏡、卵管性不妊症
(日不妊会誌 44:57-60 1999)

緒 言

不妊症の中で卵管因子の占める割合は全体の30%以上といわれ¹⁾、その中で卵管間質部閉塞症は10～25%存在すると報告されている²⁾。その治療は従来より体外受精、マイクロサージェリーによる卵管形成術、カテーテルを用いた非観血的な再疎通術などが行われている。卵管間質部閉塞症の原因として、

卵管子宮内膜症の存在は知られているものの、その診断が必ずしも容易でないためか、薬物療法は普及していない。そこで今回我々は、卵管間質部閉塞症例に対してGn-RHaにより治療を行い、卵管の再疎通が得られるか検討したので報告する。

対象および方法

1995年4月より1997年6月までの間に、前医での子

表1 対象症例の背景

	年齢	妊娠歴	抗クラミジア抗体	腹腔鏡
症例1	28	なし	IgG(-)IgA(-)	施行
症例2	32	なし	IgG(-)IgA(+)	施行
症例3	23	なし	IgG(-)IgA(-)	施行せず
症例4	31	中絶1回	IgG(+)IgA(+)	施行
症例5	40	なし	IgG(-)IgA(-)	施行せず

宮卵管造影検査にて両側卵管が造影されないため、両側卵管閉塞症の診断を受け、精査加療目的で当院へ紹介された不妊症患者5例を対象とした。対象の5例は、23歳から40歳までの不妊症症例であり、中絶歴のある1例を除き妊娠の既往はなく、抗クラミジア抗体陽性例は2例に認めた。また、5例中3例では当院にて腹腔鏡を施行し、卵管通過性のないことを再確認した(表1)。酢酸ブセレリン(900 μ g/日)または酢酸リューププロレリン(1.88mg/日)にて4ヶ月間加療後、透視下に子宮卵管造影検査を行い卵管の疎通性を検討した。

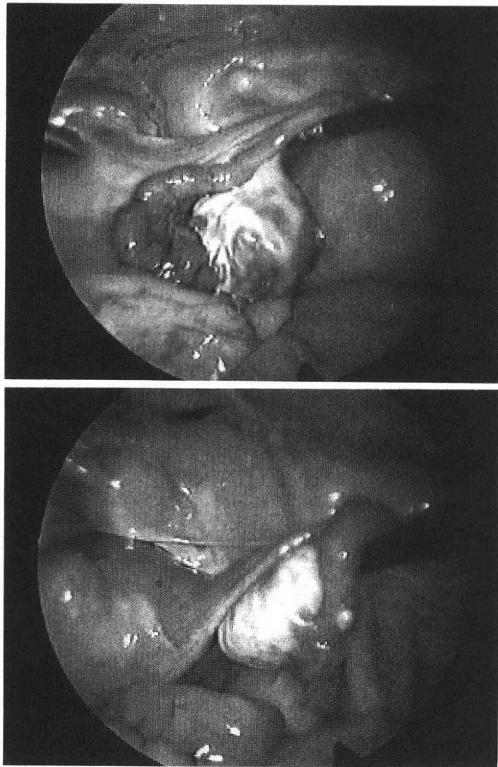


写真1 症例1の腹腔鏡所見
(上：左付属器、下：右付属器)

症 例

症例1の経過を示す。症例は28歳の未経妊であり、不妊を主訴に前医を受診し子宮卵管造影検査にて両側卵管が造影されずに、当院へ紹介受診となった。その後当院にて腹腔鏡を施行した。症例1の腹腔鏡写真を供覧する(写真1)。両側卵管周囲に癒着は認めず、インジゴカルミン水溶液による卵管通色素検査を行うも卵管の通過性は認められず、間質部付近がわずかに青くなるのみで、膨大部、峡部は全く青変しなかった。また骨盤腔に子宮内膜症を疑う所見は認めなかった。腹腔鏡施行後、酢酸ブセレリン(900 μ g/日)を4カ月間投与した。治療後に施行した子宮卵管造影検査では両側卵管の通過性が確認され(写真2)、月経周期回復後2周期目に妊娠反応陽性となった。

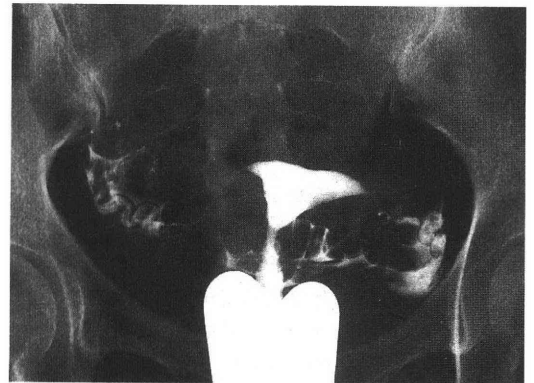


写真2 症例1の治療後の子宮卵管造影検査

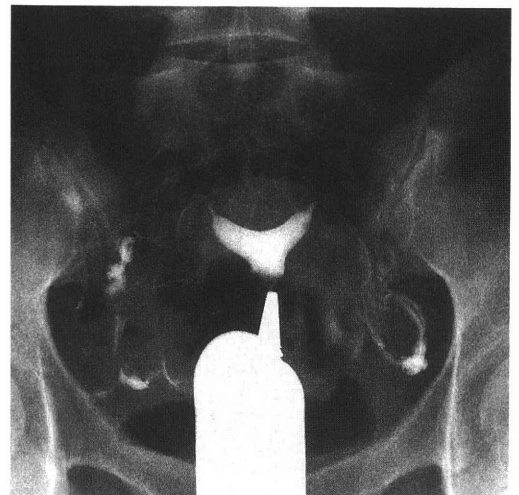


写真3 症例3の治療後の子宮卵管造影検査

表2 Gn-RHa療法の内容および成績

	Gn-RHa治療	治療成績
症例1	酢酸ブセレリン (900 μ g/日, 4カ月)	両側卵管通過性良好 治療後2周期目に妊娠
症例2	酢酸ブセレリン (900 μ g/日, 4カ月)	両側卵管通過性あり 治療後6周期目に妊娠
症例3	酢酸ブセレリン (900 μ g/日, 4カ月)	両側卵管通過性良好 治療後1周期目に妊娠
症例4	酢酸リユープロレリン (1.88mg/4週, 4回)	左卵管通過も注入圧高い
症例5	酢酸リユープロレリン (1.88mg/4週, 4回)	両側卵管通過性良好

症例3は23歳の未妊妊であり、前医での子宮卵管造影検査にて通水用バルーンカテーテルを使用するも両側卵管が造影されず、注入圧上昇のため造影剤を8ml以上注入できずに当院へ紹介受診となった。酢酸ブセレリン(900 μ g/日)を4カ月間投与した。治療後の子宮卵管造影検査では造影剤3ml注入により両側卵管は良好な通過性を示した(写真3)。月経周期回復後1周期目に妊娠が成立した。

成 績

5症例のうち3例は酢酸ブセレリンで、2例は酢酸リユープロレリンにて加療した。治療後の子宮卵管造影検査では、5例中4例(80%)で両側卵管の再疎通が確認されたが、1例は片側卵管の通過性を認めたものの、注入圧が高く、治療効果は不明であった。5例中3例(60%)は、治療後早期に妊娠が成立した(表2)。

考 察

一般に卵管間質部閉塞症の治療は困難とされ、体外受精の適応となることが多いのが現状である。今回我々は両側卵管間質部閉塞症と診断された5例の不妊症例に対して、Gn-RHaを用いて加療したところ、治療後80%に卵管の再疎通を認め、60%には治療後早期に妊娠が成立した。卵管性不妊の原因の多くは、上行性感染による炎症によるもの、子宮内膜症によるもの、術後癒着によるものである。長田らは、間質部閉塞の原因のうち卵管子宮内膜症の占める割合は17.8%と報告しており¹⁾、子宮内膜症による卵管間質部閉塞の発生は少ないとの報告³⁾もあるが、今回の検討から、5例と症例数は少ないものの、80%の症例で卵管の再疎通を認めたことより、薬物

療法が奏功する症例は予想以上に多いことが示唆された。今回の対象症例は全例他院にて子宮卵管造影検査を受けており、機能的閉塞も否定できないが、そのうち3例は当院にて腹腔鏡を施行し、両側の間質部閉塞であることを再確認した。また、他の2例についても通水用バルーンカテーテルを使用も卵管は造影されず、注入圧上昇にて中止していることを確認している。百瀬は未妊婦の84.9%までが5ml以内の注入量で両側卵管像が出現していると報告⁴⁾しており、症例3では8ml注入するも卵管は造影されなかったことより、検査の信頼性は高いと考えている。しかし、Gn-RHa療法が有効であったといっても閉塞原因が卵管子宮内膜症であったとは限らない。卵管ポリープによる間質部閉塞例も報告されており^{5,6)}、星合らも薬物療法に奏功する多くの症例が卵管ポリープによるものではないかと述べている³⁾。Gn-RHaを用いて卵管間質部閉塞症例を加療した報告はほとんど見当たらない。1989年にGardnerらは2例の子宮角部閉塞症例に対して、Gn-RHaであるゴセレリンを用いて加療したところ、2症例とも卵管通過性が回復し、1例は妊娠に成功したと報告している⁷⁾。彼らはこれらの症例の閉塞原因について子宮筋腫であったと述べている。今回の我々の症例では閉塞原因は特定できないが、腹腔鏡所見で子宮がやや腫大し、子宮線筋症を思わせる症例が多かったことより、卵管間質部における筋層よりの圧迫によって閉塞していた可能性も考えられる。笠井らは、卵管子宮内膜症症例では臨床症状、血中CA125値、開腹所見のいずれからも子宮内膜症を疑わせる所見がなかったと臨床的な診断の難しさを報告している⁸⁾。今回の我々の腹腔鏡施行症例においても子宮内膜症の所見を認めなかった。従って卵管間質部閉塞症例全例に治療を試みない限り、有効例と無効例の鑑別は難しいと思われる。しかし、今回無効であった1症例は抗クラミジア抗体強陽性の症例であり、クラミジア感染の有無の検索が治療効果の推定に有用である可能性も示唆され、今後症例を重ね検討を加える必要があると思われる。

文 献

- 1) 長田尚夫, 角田郁夫, 山田祐士 他(1994) 卵管閉塞の原因と治療. 産と婦 61:649-655
- 2) Sulak PJ, Letterie GS, Coddington CC et al. (1987) Histology of proximal tubal occlusion. Fertil Steril 48:437-440
- 3) 星合晃, 斉藤佳孝, 矢嶋聰 他(1987) 卵管間質部吻合術. 産婦人科MOOK39 マイクロサージェ

- リー. 藤井明和編, 金原出版, 東京, pp115-123
- 4) 百瀬和夫(1987) 子宮卵管造影法. 産婦人科MOOK 39 マイクロサージェリー. 藤井明和編, 金原出版, 東京, pp56-72
- 5) 森良一郎, 星合晃, 今泉英明 他(1985) 卵管間質部ポリープの2症例. 日産婦誌 37:820-823
- 6) Menachem PD, David B, Leah L et al. (1981) Tubal intramural polyps and their relationship to infertility. *Fertil Steril* 35:526-531
- 7) Gardner RL and Shaw RW (1989) Cornual fibroids: a conservative approach to restoring tubal patency using a gonadotropin-releasing hormone agonist (goserelin) with successful pregnancy. *Fertil Steril* 52:332-334
- 8) 笠井剛, 塩田恭子, 為近慎司 他(1991) 卵管間質部・峡部閉塞における病理学的検討. 産婦人科マイクロサージェリー学会誌 4:51-53
(受付: 1998年10月29日)
(受理: 1998年11月27日)

Treatment of Proximal Tubal Occlusion Using a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonists

Yoshiaki Yano, Mineto Morita, Masahito Nakakuma,
Ichiroh Uchiide, Harumi Kubo and Shun Hirakawa

First Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143-8541, Japan

Though tubal endometriosis is known as a cause of proximal tubal occlusion, there are not many chemotherapeutic reports on this treatment. So we tried gonadotropin-releasing hormone agonists (Gn-RHa) therapy for patients with infertility diagnosed as proximal tubal occlusion and examined whether canalization of the tubes was made after the treatment. We used 5 patients with infertility, who were diagnosed with bilateral proximal tubal occlusion as a result of hysterosalpingography (HSG). In 3 cases out of 5, laparoscopy was conducted in our hospital and a hydrotubation was conducted with a solution of indigocarmine. We confirmed that there was not a change of color to blue at both tubes. After administering either buserelin acetate (900 μ g/day) or leuprolide acetate depot (1.88mg/4weeks) for 4 months, we carried out HSG to check the status of canalization of the tubes. In 3 cases out of 5, buserelin acetate was used and in the other 2 cases leuprolide acetate depot was used. After the Gn-RHa therapy, canalization of both tubes was realized in 4 cases out of 5 (80%). Three patients out of 5 (60%) had successful pregnancies within 6 months of Gn-RHa therapy. It is supposed that there are many cases of proximal tubal occlusion due to tubal endometriosis and adenomyosis, which suggests that Gn-RHa therapy is effective for improving canalization of the tubal occlusion.

Key words : hysterosalpingography (HSG), laparoscopy, gonadotropin-releasing hormone agonists (Gn-RHa), proximal tubal occlusion, infertility

(Jpn J Fertil Steril 44:57-60 1999)

卵管所見別に見た腹腔鏡下卵管形成術の治療成績

Laparoscopic Appearance and Fertility Outcome after Laparoscopic Surgery in Tubal Infertility Patients

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

中 熊 正 仁	森 田 峰 人	矢 野 義 明
Masahito NAKAKUMA	Mineto MORITA	Yoshiaki YANO
内 出 一 郎	久 保 春 海	平 川 舜
Ichiro UCHIIDE	Harumi KUBO	Shun HIRAKAWA

First Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143-8541, Japan

卵管性不妊症患者に対する腹腔鏡下手術の治療効果と手術時の卵管所見を比較検討した。腹腔鏡下手術は、卵管周囲癒着症に対する癒着剥離術：23例、卵管采周囲癒着症に対する卵管采形成術：18例、卵管留水症に対する卵管開口術：46例を行い、1～2年間のフォローアップにより術後妊娠率を検討し、妊娠群と未妊娠群における手術時の卵管所見を米国不妊学会分類で評価した。妊娠率は、癒着剥離術後で47.8%、卵管采形成術後で33.3%、卵管開口術後で28.2%であった。卵管周囲、卵管采周囲癒着症の妊娠予後と米国不妊学会分類での付属器癒着スコアとの関係において、妊娠群の癒着スコアは未妊娠群に比べて有意に低値であった。卵管留水症では、米国不妊学会分類での付属器癒着スコア、遠位卵管閉塞スコアの各パラメータにおいて、妊娠群と未妊娠群の間に有意差を認めなかった。腹腔鏡下卵管形成術は卵管性不妊症患者に対する有用な治療法であると考えられる。卵管周囲癒着症や卵管采周囲癒着症では手術時の卵管所見が妊娠の予後を左右し、その後の不妊治療方針を決定する重要な因子と考えられた。

キーワード：腹腔鏡下手術，卵管形成術，卵管性不妊，卵管周囲癒着症，卵管留水症

(日不妊会誌 44:61-65 1999)

結 言

腹腔鏡周辺機器の発達に伴い、腹腔鏡下手術の適応範囲が広がり、現在では不妊症患者における卵管形成術(卵管周囲癒着症に対する癒着剥離術、卵管采周囲癒着症に対する卵管采形成術、遠位卵管閉塞における卵管開口術)もその適応と考えられるようになった。また、これらの腹腔鏡下手術が増加傾向にある一因としては、手術処置の一貫として切開や縫合が以前に比べて安全で容易に行えるようになったことが挙げられる¹⁾。今回、卵管性不妊症患者に対する腹腔鏡下手術の治療効果と手術時の卵管所見を

比較検討した。

対象および方法

1991年1月から1997年12月までの期間に、東邦大学医学部附属大森病院において、不妊の精査のために行った子宮卵管造影法で卵管の異常を指摘され腹腔鏡検査を行い、引き続き腹腔鏡下に卵管形成術を行った87例を検討した。これらは腹腔鏡所見により、卵管周囲癒着症23例、卵管采周囲癒着症18例、卵管留水症46例に分類した。

腹腔鏡は全身麻酔下に気腹法にて行い、卵管卵巣周囲の癒着の有無を確認し、インジゴカルミン通色

表1: 腹腔鏡下手術後の妊娠率

	(Follow up期間: 1~2年)			
	症例数	妊娠例	妊娠率(%)	
卵管周囲癒着症	23	11	47.8	41.5
卵管采周囲癒着症	18	6	33.3	
卵管留水症	46	13	28.2	34.5

素試験により卵管通過性の有無を調べ、米国不妊学会分類に従って、付属器癒着スコアと遠位卵管閉塞スコア算出した。

癒着剥離や留水症卵管の切開には、YAGレーザーの接触照射法を用いた²⁾。切開を行うための接触照射用プローブは、先端径0.4mmのものを出力20Wで使用した。卵管開口術ではさらに、卵管開口部の翻転および縫合操作を行った。十分な開口部を造った後に開口部卵管を翻転し、腹腔鏡手術用の針付PDS-IIまたはオペポリックスの4-0を用いて3~4カ所縫合した。これらの縫合はすべてintracorporeal法を用いた。

統計学的検討はMann-Whitney U-testを用い、 $p<0.05$ を有意であるとした。

成績

術後、12~24カ月のフォローアップによる妊娠率を表1に示す。癒着剥離術後には23例中11例(47.8%)に妊娠が成立した。卵管采形成術後には18例中6例(33.3%)に妊娠が成立した。卵管開口術後には46例中13例(28.2%)に妊娠が成立した。癒着剥離術および卵管采形成術を合わせた平均妊娠率は41.5%、全症例での妊娠率は34.5%であった。

疾患別の累積妊娠率を図1に示す。卵管周囲癒着症では術後12カ月目まで妊娠率は急激に上昇し、その後も緩やかな上昇を示した。術後12カ月目までの妊娠数は9例で全体の82%を占めている。卵管采周囲

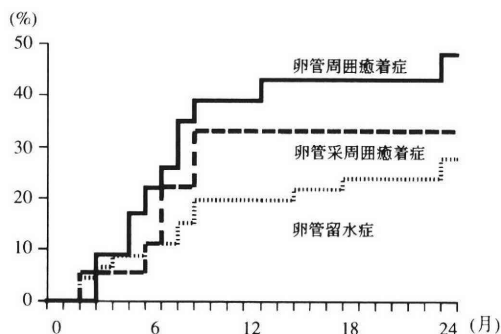


図1: 疾患別累積妊娠率

癒着症では術後9カ月目で妊娠例の6例すべてが妊娠した。卵管留水症では術後24カ月目までほぼ一定の上昇傾向を示した。

図2に卵管周囲、卵管采周囲癒着症の妊娠の予後と米国不妊学会分類での付属器癒着スコアを示す。妊娠例において卵管、卵巣およびこれらの合計である付属器癒着スコアは、未妊娠例と比較して有意(卵管: $p=0.039$, 卵巣: $p=0.015$, 付属器: $p=0.013$)に低

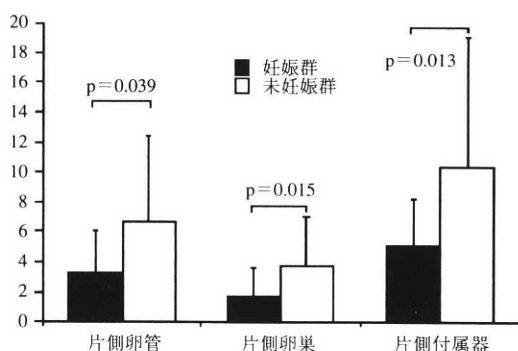


図2: 卵管周囲、卵管采周囲癒着症のAFS付属器癒着スコア

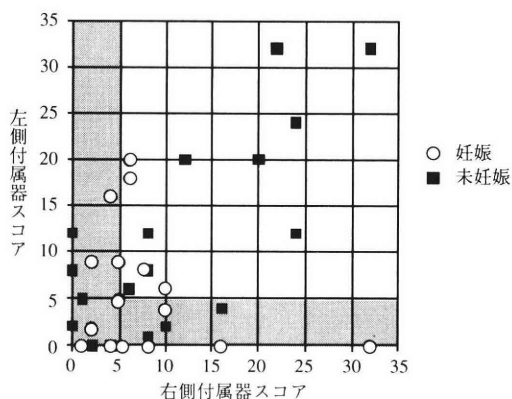


図3: 卵管周囲、卵管采周囲癒着症の症例別片側付属器癒着スコア

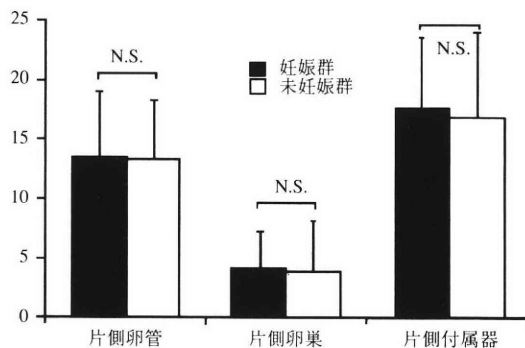


図4: 卵管留水症のAFS付属器癒着スコア

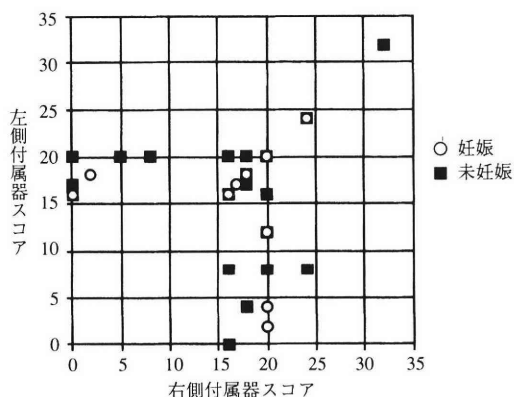


図5：卵管留水症の症例別片側付属器癒着スコア

値を示した。

図3に卵管周囲、卵管采周囲癒着症の症例別片側付属器癒着スコアと妊娠の関係を示す。片側付属器癒着スコアが5点以下の場合、26例中13例(50%)に妊娠が成立したが、片側付属器癒着スコアが5点を上回る場合は、15例中4例(26%)にしか妊娠は成立しなかった。

図4に卵管留水症の妊娠の予後と米国不妊学会分類での付属器癒着スコアを示す。卵管、卵巣およびこれらの合計である付属器癒着スコアは、妊娠例と未妊娠例の間に有意差を認めなかった。

図5に卵管留水症の症例別片側付属器癒着スコアと妊娠の関係を示す。片側付属器癒着スコアと妊娠の間に有意な関係を認めなかった。

図6に卵管留水症の妊娠の予後と米国不妊学会分類での遠位卵管閉塞スコアを示す。各パラメータおよびこれらの合計スコアは、妊娠例と未妊娠例の間に有意差を認めなかった。

考 察

不妊症の原因として、卵管因子の占める頻度は他の因子と比較して最も多く、近年の性行為感染症(STD)、骨盤内感染症(PID)などの増加に伴い、卵管因子の頻度は年々増加傾向にあると考えられる。しかしながら、現在のように極めて簡便に体外受精・胚移植が行われるようになった現状で、患者の疾患に対する考え方も様々であり、妊娠のためにどのような治療法を選択するかは十分に検討する必要がある。腹腔鏡により卵管、卵巣周囲の状況を把握することは、その後の治療方針を決定する上でも非常に重要となり、患者が手術的治療を望む場合には積極的に腹腔鏡下手術を行ってきた。そこで今回著者らは、卵管性不妊症患者に対する腹腔鏡下手術の

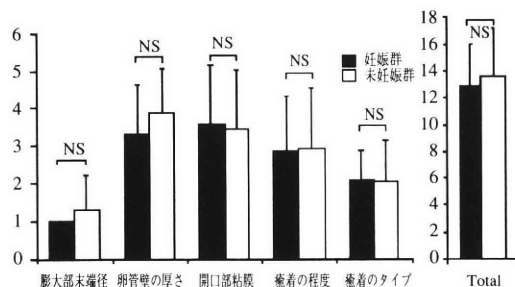


図6：卵管留水症の遠位卵管閉塞スコア

治療効果と米国不妊学会分類を用いた手術時の卵管所見を比較検討した。

卵管周囲、卵管采周囲癒着症患者の癒着スコアと妊娠の予後との関係を検討したところ、妊娠例は未妊娠例に比べて癒着スコアが有意に低値であり、またそのスコアが5点以下の場合、26例中13例(50%)に妊娠が成立したが、スコアが5点を上回る場合は、15例中4例(26%)にしか妊娠は成立しなかった。さらに、累積妊娠率をみると、卵管周囲癒着症で術後12カ月、卵管采周囲癒着症で術後9カ月までが最も妊娠しており、癒着スコアが高く、一定期間までに妊娠しない症例には体外受精などの次のステップに進む準備が必要であると考えられた。

卵管留水症の検討では、癒着スコア、遠位卵管閉塞スコアともに妊娠例と未妊娠例の間に差を認めず、累積妊娠率を見ても、長期にわたって妊娠の可能性が認められることから、手術時の卵管所見に関係なく長期間のフォローアップが必要であると考えられた。

各疾患別の術後妊娠率をみると、卵管周囲癒着症で最も高く47.8%、ついで卵管采周囲癒着症で33.3%、卵管留水症では最も低く28.2%であった。これらの疾患に対する手術は、以前はマイクロサージャリーにより行われてきたが、近年の腹腔鏡下手術手技の発達により腹腔鏡下で盛んに行われるようになった。卵管不妊に対するマイクロサージャリーと腹腔鏡下手術の成績の比較では³⁾、癒着剥離術ではマイクロサージャリーの妊娠率が30～60%であるのに対し、腹腔鏡手術でも30～80%⁴⁻⁶⁾と同等以上の成績が得られている。卵管采形成術ではマイクロサージャリーの妊娠率が40～60%であるのに対し、腹腔鏡手術では30%前後^{4,7)}とマイクロサージャリーがやや優位な成績である。卵管開口術ではマイクロサージャリーで30～40%であるのに対し、腹腔鏡手術で20～30%^{4,7)}、なかには60%⁶⁾の報告もあ

り、ほぼ同等である。著者らの成績でもマイクロサージャリーと比べて遜色のない成績が得られており、卵管周囲癒着、卵管采周囲癒着、卵管留水症に対しての手術療法としては腹腔鏡下手術が第一選択であり、妊娠しない場合には配偶子操作を考慮する必要があると考えられた。

卵管周囲癒着症、卵管采周囲癒着症、卵管留水症の卵管障害の部位、程度を比較すると、卵管の機能に最も影響を与えると考えられる卵管采や卵管粘膜上皮細胞の障害の程度は、卵管周囲癒着症が最も軽く、ついで卵管采周囲癒着症であり、卵管留水症を呈する卵管では、長期にわたる卵管炎症の影響により、粘膜上皮細胞が破壊され、卵管の機能障害から器質的障害へ移行するため、最も重い卵管障害が発生すると考えられる。今回の検討でも、卵管周囲癒着症、卵管采周囲癒着症、卵管留水症の順で妊娠率が高く、さらに卵管周囲癒着症や卵管采周囲癒着症では、癒着スコアの低いもので高い妊娠率が得られた。しかしながら、卵管留水症では米国不妊学会分類の癒着スコアや遠位卵管閉塞スコアによる卵管障害の程度と妊娠予後の関係は認められなかった。卵管障害患者の妊娠予後に関して、卵管鏡所見の重要性を指摘する報告⁸⁾もあり、卵管粘膜が高度に障害される卵管留水症の妊娠予後判定には、卵管鏡などによる卵管粘膜の状態の評価が必要であると考えられた。

腹腔鏡下手術は、従来の開腹手術に比べて手術の侵襲性が少ないことから、術後疼痛が軽減され、早期離床や早期退院、早期の社会復帰を可能にし、美容性にも優れるなど様々な利点がある。しかしながら、腹腔鏡下手術は、術者の技術レベルによる手術内容の差が成績を大きく左右するため、手術技術の習熟、手法と手順の確立が治療成績の向上につながる

るものと考えられる。今後は、癒着剥離術や卵管形成術、卵管開口術などは開腹によるマイクロサージャリーから腹腔鏡下手術に取って変わられるといっても過言ではないと思われる。しかし、現在の腹腔鏡手術レベルでは卵管端端吻合などの微細な手術はいまだ一般的なものとはいえず、今後microlaparoscopic surgeryの進歩により可能になることと思われる。

文 献

- 1) 森田峰人, 矢野義明, 久保春海 他(1996)卵管性不妊に対する腹腔鏡下手術. 産と婦 63:29-33
- 2) Yanagibori A, Kojima E, Ohtaka K, et al. (1989) Nd:YAG laser therapy for infertile women with a contact-type probe. J Reprod Med 34:456-460
- 3) 小島栄吉, 矢野義明, 森田峰人 他(1992)レーザーによる癒着剥離. 産と婦 59:549-554
- 4) Mettler L, Giesel H and Semm K (1979) Treatment of female infertility due to tubal obstruction by operative laparoscopy. Fertil Steril 32:384-388
- 5) Gomel V (1983) Salpingo-ovariolysis by laparoscopy in infertility. Fertil Steril 40:607-611
- 6) Reich H (1987) Laparoscopic treatment of extensive pelvic adhesions, including hydrosalpinx. J Reprod Med 32:736-742
- 7) Dubuisson JB, Bouquet de Joliniere J, Aubriot FX, et al. (1990) Terminal tuboplasties by laparoscopy: 65 consecutive cases. Fertil Steril 54:401-403
- 8) Marana R, Rizzi M, Muzii L, et al. (1995) Correlation between the American Fertility Society classifications of adnexal adhesions and distal tubal occlusion, salpingoscopy, and reproductive outcome in tubal surgery. Fertil Steril 64:924-929

(受付: 1998年10月22日)

(受理: 1998年11月30日)

Laparoscopic Appearance and Fertility Outcome after Laparoscopic Surgery in Tubal Infertility Patients

Masahito Nakakuma, Mineto Morita, Yoshiaki Yano,
Ichiro Uchide, Harumi Kubo and Shun Hirakawa.

First Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine, Tokyo 143-8541, Japan

We carried out a comparative study on the therapeutic effects of laparoscopic surgery performed on tubal infertility patients and the laparoscopic appearance of fallopian tubes at the time of surgery.

Laparoscopic adhesiolysis (23 cases) and fimbrioplasty (18 cases) were performed on cases of peritubal and perifimbrial adhesions, and salpingostomy were carried out on 46 cases of hydrosalpinx. We investigated post-

operative conception rates through follow-up studies over 1~2 years, and evaluated the laparoscopic appearance of the fallopian tubes at the time of surgery in conceiving and non-conceiving groups in accordance with AFS classifications.

The postoperative conception rates for the adhesiolysis, fimbrioplasty, and salpingostomy patients were 47.8%, 33.3% and 28.2% respectively. Analysis of the relationships between the prognosis for conception in the cases of peritubal and tubal fimbriae adhesion patients and the AFS classified adnexal adhesion scores showed a significantly lower adhesion score for patients in the conceiving group when compared to the non-conceiving group.

In the case of the hydrosalpinx patients, we were unable to confirm any significant difference in any of the parameters of the AFS classified adnexal adhesion scores and distal tubal occlusion scores between the conceiving and non-conceiving groups. We therefore consider that laparoscopic salpingoplasty procedures are a valuable method of treatment for tubal infertility patients, and that the laparoscopic appearance of the fallopian tubes at the time the operative procedure is performed, may provide an indication of what the prognosis for conception is in patients with peritubal and fimbrial adhesion. It is therefore believed that laparoscopic observations made during the operation, are an important factor in deciding the future direction of treatments for infertility patients.

Key words: laparoscopic surgery, salpingoplasty, tubal infertility, peritubal adhesion, hydrosalpinx

(Jpn J Fertil Steril 44:61-65 1999)

男性不妊以外の臨床症状を認めなかった Primary Ciliary Dyskinesia の 1 例

A Case of Primary Ciliary Dyskinesia with No Clinical Symptom other than Male Infertility

東邦大学医学部泌尿器科学第 1 講座

野澤 英雄

Eiyu Nozawa

原 啓

Hiroshi HARA

吉田 淳

Atsumi YOSHIDA

石井 延久

Nobuhisa ISHII

永尾 光一

Koichi NAGAO

三浦 一陽

Kazukiyo MIURA

First Department of Urology, Toho University School of Medicine
Tokyo 143-8541, Japan

東邦大学医学部病理学第 2 講座

北澤 吉昭

Yoshiaki KITAZAWA

Second Department of Pathology, Toho University School of Medicine
Tokyo 143-8541, Japan

症例は36歳で男性。5年5カ月間の不妊を主訴に当科を受診した。血液生化学尿検査および内分泌学的検査に異常を認めず、精液所見は精液量0.7ml、精子濃度 $75 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率5%であった。胸部X-P、腹部CTでは完全内臓逆位を認めた。陰嚢部超音波検査で著明な右精索静脈瘤を認めたため、右内精静脈高位結紮術を施行した。術後6カ月の精液所見は精液量1.1ml、精子濃度 $31 \times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率5%で、精子運動率の改善を全く認めなかった。しかしeosinY-nigrosine染色にて生存性のある精子を46%認めた。そこで精子鞭毛と鼻粘膜線毛の電顕的検索を行ったところ、前者にouterおよびinner dynein armの欠損を、後者にinner dynein armの欠損を認めた。以上から精子無力症の原因は全身の線毛系の超微細構造的異常に起因するものと考えICSIを施行し挙児を得た。本症例は呼吸器系などの臨床症状を伴っておらず、線毛運動の完全な欠落ではないと考えられ、primary ciliary dyskinesiaと考えられた。精子無力症の中には気管支拡張症や慢性副鼻腔炎などの臨床症状は示さないが、全身の線毛系の超微細構造的異常に起因した症例の存在が示唆された。

キーワード：男性不妊症、精子無力症、primary ciliary dyskinesia

(日不妊会誌 44:67-71 1999)

緒 言

線毛系は人体において気道防衛機構、生殖機能、発生などに深いかかわりを持つとされている。1977年Eliassonら¹⁾は全身の線毛系の系統的な超微細構造学的異常により慢性呼吸器感染や男性不妊症を呈する病態を、immotile cilia syndromeとして報告した。

今回我々は、呼吸器系などの臨床症状は認めないが、全身の線毛系の超微細構造学的異常に起因すると思われた精子無力症の1例を経験し、intracytoplasmic sperm injection (ICSI)にて挙児を得たので若干の文献的考察を加え報告する。

症 例

患 者：36歳、男性。

主 訴：男性不妊症。

家族歴：特記すべきことなし。

既往歴：内臓逆位。

現病歴：9月結婚。5年5カ月の不妊後、1994年2月東邦大学大森病院リプロダクションセンター泌尿器科部門を受診した。

現 症：体格は中等度で全身状態は良好であった。精巣は左右とも容積15mlで硬度正常であり、触

診上著明な精索静脈瘤を右側に認めた。

検査所見：血液生化学尿検査に特記すべきことはなかった。染色体検査は46XYと正常核型を示し、内分泌学的検査値はLH 3.4mIU/ml, FSH 3.8mIU/ml, PRL 9.7ng/ml, testosterone 551ng/dlであった。精液所見は精液量0.7ml, 精子濃度 75×10^4 /ml, 精子運動率5%であり、精子形態は85%が正常であった。また陰囊皮膚温度測定検査では、臥位から立位への体位変換で右側は34.3℃から35.9℃と1.6℃の上昇を、左側は34.2℃から35.6℃と1.4℃の上昇を認めた。

画像診断：胸部X-Pにて右側に心陰影を認めた(図1)。また腹部CTでは肝臓を左側に認めるとともに腹部大動脈は右側、下大静脈は左側に位置し、完全内臓逆位の所見であった(図2)。また陰囊部超音波検査では右側にGroup C、左側にGroup Aの精索静脈瘤を認めた²⁾。

入院後経過：右精索静脈瘤の診断のもと1994年5月6日腰椎麻酔下にて右内精静脈高位結紮術を施行した。術中の右内精静脈造影では、右内精静脈は右腎静脈に流入し通常の左内精静脈造影像と鏡面像をなすものであった。また精巣生検では精子形成の各段階の細胞が認められるが全体的に減少しており、germ cell hypoplasiaであった。

術後6カ月の精液所見は精液量1.1ml, 精子濃度 31×10^6 /ml, 精子運動率5%、術後12カ月では精液量1.0ml, 精子濃度 39×10^6 /ml, 精子運動率5%であり、精子運動率の改善および変化を全く認めなかった。しかしeosinY-nigrosine染色にて生存性のある精子を46%認めた。そこで精子鞭毛の超微細構造学的異常を疑い電顕的検索を行ったところ、検索し得たすべての鞭毛断面においてouterおよびinner dynein

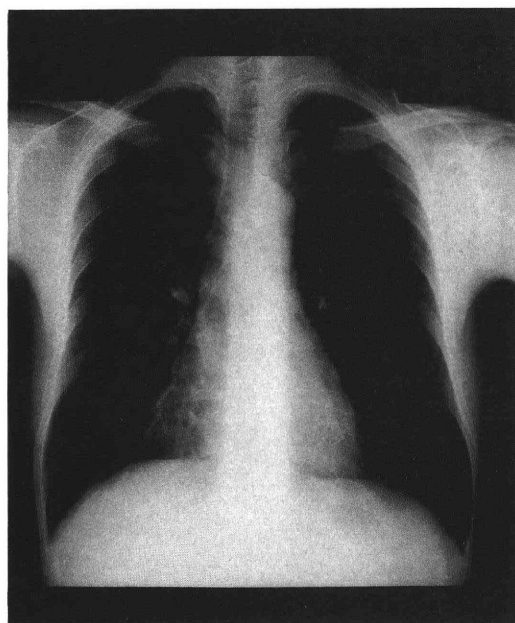


図1：胸部X-P

右側に心陰影を認めるも、肺野および鏡像心陰影には異常を認めない。

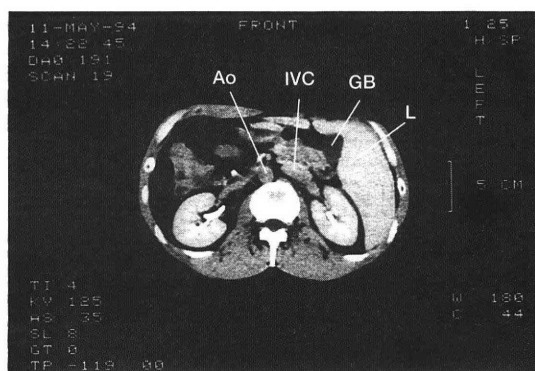


図2：腹部CT

腹部内臓器はすべて左右逆に位置している。(Ao: 腹部大動脈, IVC: 下大静脈, GB: 胆嚢, L: 肝臓)

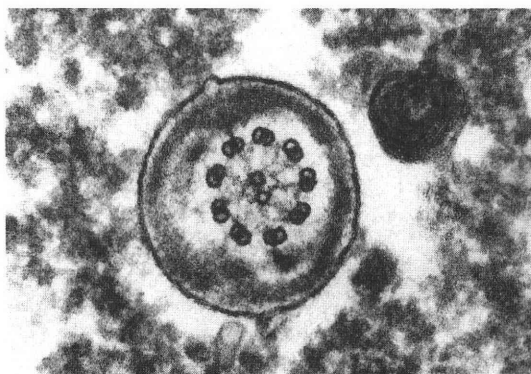


図3：精子鞭毛(電顕)

Outerおよびinner dynein armの欠損を認める。

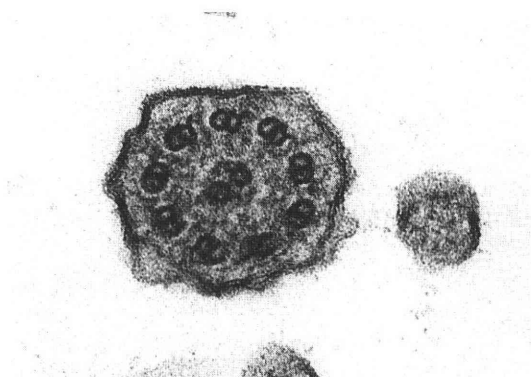


図4：鼻粘膜線毛(電顕)

Inner dynein armの欠損を認める。

表1：Immotile cilia syndromeの診断基準

① 小児期早期からの難治性の気道感染症 慢性副鼻腔炎，慢性気管支炎，気管支拡張症
② 気道クリアランスの低下 サッカリンテスト 吸入トレーサー (radioaerosol) によるクリアランステスト
③ 気道線毛運動の欠落 生検資料の鏡検による観察
④ 男性不妊 生きてはいるが動かない精子の観察
⑤ 気道線毛，精子鞭毛における特徴的な超微細構造学的異常
⑥ 内臓逆位
①～② suspected, ①～④ highly suspected ①～⑤ definite ⑥ not definitely necessary, but important suggestive finding

armの欠損を認めた(図3)。また鼻粘膜の線毛の電顕的検索においては、検索し得たすべての線毛断面においてinner dynein armの欠損を認めた(図4)。このことは、この異常が全身の線毛系の超微細構造学的異常に起因する可能性を示唆するものであり、精子運動率の改善は困難と考え、ICSIを施行し、2回目の実施にて1998年1月12日拳児を得た。

考 察

線毛(鞭毛)とは細胞表面に存在する常在性突起で、活発な自動性運動能を有している。精子のような可動性の細胞に付着する鞭毛は細胞が液体中を運動する上で推進機として役立ち、気道上皮のような固定した細胞に付着する線毛は細胞表面を覆う液体を運搬する役目を果たしている。線毛構造は精子鞭毛の他、鼻腔、副鼻腔、中耳、気管、気管支、卵管、脳室、網膜(感覚細胞)などに存在している。そのために先天的に線毛の超微細構造に欠陥をもつimmotile cilia syndromeの患者では、男性不妊、慢性鼻炎、慢性副鼻腔炎、嗅覚の鈍麻、中耳炎、慢性気管支炎、気管支拡張症、子宮外妊娠、頭痛、色素性網膜炎などの多彩な臨床症状を呈する。

本症候群に最も基本的、かつ特徴的な超微細構造学的変化はdynein armの欠損である。正常胎児において胎生期の上皮に存在する線毛運動は一定の方向性をすでに有しており、これが内臓の位置決定に重要な役割を果たしていると考えられている。つまりdynein armの欠損により線毛運動の欠如した胎児では、内臓の位置決定も単なる偶然に支配され左右同等の比率で出現するため、約半数が内臓逆位になると考えられている³⁾。そのため従来より広く知られていた気管支拡張症、慢性副鼻腔炎、内臓逆位を三主徴とするKartagener's syndrome⁴⁾は今日ではimmotile cilia syndromeの部分症と捉えられるようになっている。また最近では線毛運動の完全な欠落を呈する症例のみならず、協調運動性を欠きつつも微弱的な線毛運動を示す症例が見出されるようになりprimary ciliary dyskinesia⁵⁾という名称が提唱されている。

本症例はimmotile cilia syndromeの診断基準(表1)⁶⁾からすると呼吸器系などの臨床症状を伴っており、線毛運動の完全な欠落ではないと考えられ、primary ciliary dyskinesiaと捉えた方が妥当であると思われる。

一方本症例において精子鞭毛と鼻粘膜線毛の構造異常が同一でないことの理由は不明である。しかしPedersenら⁷⁾はouter dynein armの欠損するものでは

運動性のすべてが低下するが、inner dynein armの欠損のみでは線毛運動の協調運動性が低下するだけで線毛打数は正常であったと報告している。このことは本症例においてinner dynein armの欠損のみであった呼吸器系では臨床症状が明らかではなく、outer dynein armの欠損を認めた精子鞭毛では精子運動率の低下が見られた理由となるかもしれない。しかし本症例と全く同様の電顕的異常を認めたにもかかわらず、呼吸器系の臨床症状を伴っていたとの報告も認める⁸⁾。この臨床症状発現の相連の理由について明確に答えを出すことは困難だが、全線毛における協調運動障害の程度とともに障害年数がかわっているのではないかと考えている。さらに田口⁹⁾は、Kartagener's syndromeにおいて気管支拡張症は生下時から存在するものではなく線毛の異常により気道線毛輸送系の障害を来とし、二次的な感染の繰り返しのよって進行していくもので、十数年の歳月のうちに徐々に形成されていくと報告している。このため本症例においても、今後何かしらの臨床症状が出現してくる可能性も考えられる。

このように男性不妊症の診療において、①内分泌学的検査でFSHは正常で、精液検査で精子数は正常あるいはそれに近い数値にも関わらず精子運動率が低い、②EosinY-nigrosine染色にて生存性のある精子を認める、という2つの所見を認めた場合は、慢性呼吸器感染の既往や内臓逆位の所見を認めなくともprimary ciliary dyskinesiaを念頭におく必要があると考えられた。また今後このような症例に対し精子鞭毛の電顕的検索を行うと同時に、鼻粘膜の線毛の電顕的検索を施行することにより本症候の病態がさらに明らかになると思われた。

またPrimary ciliary dyskinesiaに関しては不明な点が多いが、immotile cilia syndromeの発生頻度は20,000人に1人とされており¹⁰⁾、家族内発生の報告¹¹⁾もあって、常染色体劣性遺伝と考えられている¹²⁾。本症例の出生児は3975gの正常男児であり、内臓逆位や明らかな臨床症状は認めていないが、現時点では全身の線毛系の超微細構造学的異常の有無については不明である。精子鞭毛の超微細構造学的異常に起因した精子無力症に対する根本的治療法が確立していない現在、本症候群の患者精子から挙児を得る

にはassisted reproductive technology (ART)に依存せざるを得ないのが現状であるが、その施行に際してはこの異常が遺伝する可能性について両親に十分説明することが必要がある。

(本論文の要旨は第118回日本不妊学会関東地方部会において発表した。)

文 献

- 1) Eliasson R, Mossberg B, Camner P, et al. (1977) The immotile cilia syndrome, A congenital ciliary abnormality as a etiologic factor in chronic airway infection and male infertility. *New Engl J. Med* 297: 1-6
- 2) 澤村良勝, 三浦一陽, 田島政晴 他(1982) 陰囊内腫瘍の超音波診断法, 第5報, 精索静脈瘤の診断と臨床分類, *日超医論文集* 41:697-698
- 3) 滝沢敬夫(1982) Immotile-cilia症候群, *呼吸* 1:30-35
- 4) Kartagener M (1933) Zur pathogenese der Bronchiektasien: Bronchiektasien bei Situs viscerum inversus. *Beitr Klin Tuberk* 83:489-501
- 5) Van As A(1982) "Immotile-cilia syndrome"? *Am Rev Respir Dis* 125:269
- 6) 滝沢敬夫(1984) 気道線毛系の構造とその異常, *日胸会誌* 22:833-843
- 7) Pedersen M (1983) Specific types of abnormal ciliary motility in Kartagener's syndrome and analogous respiratory disorders. *Eur J Respir Dis* 64 (Suppl.127):78-90
- 8) 伊藤晴夫, 皆川秀夫, 布施秀樹 他(1982) Immotile-Cilia Syndrome. *日泌尿会誌* 73:206-210
- 9) 田口善夫, 岩田猛邦, 種田和清 他(1987) 10年後の気管支造影像を検討し得たKartagener症候群の1例, *日胸会誌* 46:592-595
- 10) Afzelius BA (1976) A human syndrome caused by immotile cilia. *Science* 193:317-319
- 11) Afzelius BA et al. (1975) Lack of dynein arms in immotile human spermatozoa. *J Cell Biol* 66:225-232
- 12) Sturgess JM, Thompson MW, Czegledy-Nagy E, et al. (1986) Genetic aspects of immotile cilia syndrome. *Am J Med Gen* 25:149-160

(受付: 1998年10月19日)

(受理: 1998年11月26日)

**A Case of Primary Ciliary Dyskinesia with No Clinical Symptom
other than Male Infertility**

Eiyu Nozawa, Atsumi Yoshida, Koichi Nagao,
Hiroshi Hara, Nobuhisa Ishii and Kazukiyo Miura

First Department of Urology, Toho University School of Medicine,
Tokyo 143-8541, Japan

Yoshiaki Kitazawa

Second Department of Pathology, Toho University School of Medicine,
Tokyo 143-8541, Japan

This report describes a case of a 36-year-old male who visited our department with the chief complaint of infertility over a period of 5 years and 5 months. Blood biochemistry tests, urinalysis and endocrinological tests demonstrated no abnormalities; the seminal findings included a seminal volume of 0.7ml, a sperm count of 75×10^4 cells/ml and a sperm motility of 5%. Chest X-P and abdominal CT demonstrated complete situs inversus. Since a marked right varicocele was identified on scrotal ultrasound, right radical varicocelectomy was performed. The seminal findings on 6 months after surgery were a seminal volume of 1.1ml, a sperm count of 31×10^6 cells/ml and a sperm motility of 5%, showing an improvement in the count, but no improvement in the motility. Subsequent electron microscopic observations on the sperm flagella and nasal cilia demonstrated defects of the outer and inner dynein arms for the former and a defect of only the inner dynein arm for the latter. Since the above-described findings suggested that asthenozoospermia in this patient resulted from abnormal systemic ciliary microstructure, ICSI was performed with the result that he was able to produce a child. Complete loss of ciliary movement appeared least likely in this patient because of the absence of respiratory clinical signs and symptoms and primary ciliary dyskinesia was considered. These findings suggested that some patients with asthenozoospermia may develop this disease due to abnormalities of the systemic ciliary microstructure with no clinical symptoms, such as bronchiectasis and chronic sinusitis.

Key words: male infertility, asthenozoospermia, primary ciliary dyskinesia

(Jpn J Fertil Steril 44:67-71 1999)

地方部会講演抄録

平成10年度 日本不妊学会中部支部学術集会

日時：平成10年 5月30日(土)午後2時～

場所：鶴友会館(名古屋市)

1. 卵胞発育におけるKunitz型プロテアーゼインヒビターの役割

○小林 浩, 寺尾俊彦

(浜松医大産婦)

Cumulus-oocyte complex(COC)expansion 現象を分子生物学的に解明した。未成熟マウスに5単位のPMSGを注射した後、48時間後に5単位のhCGを注射し、その1, 2, 4, 8時間後に卵巣を摘出した。ヒアルロン酸(HA)、その結合蛋白であるリンク蛋白(LP)およびもう一つのヒアルロン酸結合蛋白であるInter- α -trypsin inhibitor(I α I)heavy chainの局在を免疫組織学的に検討した。ヒトIVF-ET protocolの患者に同意を得て、採卵時に得た顆粒膜細胞を培養し、上記の3種類の産生を*in vitro*で検討した。hCG投与後より卵胞液、卵丘細胞膜にHA、LPおよびI α Iが出現し、6時間後に最高に達した。HAおよびLPは顆粒膜細胞より時間依存性に分泌されたが、I α Iは細胞より分泌されなかった。hCGにより卵丘細胞膜上でHA-LP-I α Iの3量体が形成されることが、COC expansionに関与すると考えられた。

2. 体外受精・胚移植時の卵胞発育とインヒビンの関連

○佐藤 剛, 浅野順子, 田中由佳

鈴木規敬, 松原寛和, 生田克夫

鈴木 薫 (名古屋市立大産婦)

【目的】体外受精・胚移植プログラムにおいて、GnRHa使用中の外因性ゴナドトロピン投与前後の血中インヒビン値を測定し、ゴナドトロピンに対する卵胞の発育状態との関係を検討した。【方法】当科においてlong protocol法でhMGを使用して体外受精・胚移植を施行した53症例を対象とした。hMG刺激前後の血中インヒビン値を測定し、これとhMG刺激前後の血中FSH、Estradiol値、発育卵胞数、回収卵子数などを比較検討した。血中インヒビン値はRIA2抗体法にて測定した。【成績】hMG刺激前、刺激後の血中インヒビン値と発育卵胞数の間にそれぞれ有意な正の相関を、また、hMG刺激後の血中インヒビン

値とEstradiol値、回収卵子数の間にそれぞれ有意な正の相関を認めた。【結論】GnRHa使用中の血中インヒビン値もhMG刺激に対する卵巣の反応性を予測する指標となりうると考えられた。

3. 新婚インポテンスの臨床的検討

○小谷俊一, 伊藤裕一, 武田宗万

(中部労災泌尿器)

甲斐司光

(西尾市民泌尿器)

1985.1～1998.3に当科を受診の新婚インポテンス106名(初めから明らかに器質性インポテンスと判断できる例は除外)を対象、年齢は24から51歳(平均34.6歳)、初婚102名、離婚後に再婚4名。結婚動機は恋愛結婚25名、見合い結婚71名、不明10名。41名(43%)が実子を希望。心理テストで約50%が抑うつ傾向を示した。リジスキャンモニターや、PGE₁テストなどの性機能検査の結果77名(73%)は心因性インポテンス、4名(4%)は精神病的インポテンス、7名(7%)は器質性インポテンス、残る18名は診断不能であった。治療は陰圧式勃起補助用具を27名、PGE₁トレーニング18名、PGE₁自己注射10名、カウンセリング7名。この内17名が性交可能となった。新婚インポテンスの中にも数%の器質性インポテンスが含まれている可能性があるため十分な性機能検査が重要である。放置すると離婚にいたる可能性があるため、治療は早急にしたいほうが良い。特に自己注射法は有用である。

4. 当院におけるAIHの成績について

○保條佳子, 浅井光興, 岡本俊充

澤口啓造, 数下廣光, 正橋鉄夫

鈴木正利, 野口昌良, 中西正美

(愛知医大産婦)

1993年1月～1997年12月の5年間に当院において施行したAIH651周期について、AIHにて妊娠した群(妊娠群)、妊娠に成功しなかった群、AIHでは妊娠せず自然に妊娠した群の3群に分け検討した。3群間の精液所見に有意な差は認めなかった。妊娠率は対症例あたり29.5%、対周期あたり4.0%であった。妊娠群における妊娠周期と非妊娠周期の比較より、パーコールによる精子洗浄濃縮法は、Fertility Indexを良好にしAIHの成功率を有意に向上させ、また有意差はないものの排卵誘発剤を使用した方が妊娠率

は高くなった。妊娠群における累積妊娠率は、6回までに76%であったが、妊娠周期と同一の方法では6回までに約90%が妊娠していた。以上の検討より、排卵誘発剤を使用し、洗浄濃縮精子によるAIHが妊娠率を向上させることが示された。また、6回施行しても妊娠しない場合には、次のステップを考慮すべきと思われる。

5. 両側巨大卵巣ルテイン嚢胞を合併した自然妊娠の一例

○坂田麻理子, 平井 強, 山本信博

望月 修, 宇津正二, 野田恒夫

(聖隷三方原病院産婦)

症例は26歳女性。未経妊未経産。最終月経を1月5日より7日間として妊娠。3月2日(妊娠8週)下腹痛のため近医を受診したところ、卵巣腫瘍を指摘され、翌日当科紹介となった。初診時、両側の多房性卵巣腫大(右約13cm, 左約8cm)を認めた。少量の腹水は認めたものの胸水は認めず、血液濃縮も認められなかった。また、hCG-EIA: 69000 mIU/ml, CA125: 61 U/ml, CA19-9: 42 U/mlであった。入院後軽快した腹痛が3月27日より再度増強し、卵巣も上縁が臍上4横指まで増大した。本人、家族の妊娠継続希望も強く、MRIにて術前評価を行ったのち4月9日(14週2日)両側卵巣部分切除および形成術を施行した。術後標本にてこの卵巣腫瘍はルテイン嚢胞と判明した。現在(妊娠20週)妊娠経過は順調である。本症例で腫瘍内溶液内のVEG(21000pg/ml)は、informed consentを得て採取した別の正常妊娠のルテイン嚢胞液中のVEGF(126pg/ml)と比較して高値を示した。多嚢胞性ルテイン嚢胞と卵巣過剰刺激症候群との鑑別についても考察したので報告する。

6. 分泌期子宮内膜超音波像の輝度に関する研究

○北村公也, 武隈宗孝, 岡田喜親

松山 薫, 後藤淳子, 藤城 卓

朝比奈俊彦, 小林隆夫, 寺尾俊彦

(浜松医大産婦)

【目的】従来の子宮内膜の超音波輝度の表現は、主観的判定であるため、定量性に欠け、その本体も不明のままであった。今回、超音波子宮内膜輝度を定量的に表現し、摘出子宮標本を用いてその高輝度領域の本体を明らかにし、着床期における変化を検索した。【方法】超音波断層装置はAloka SSD-1200(5

MHz経腔プローベ)。測定時GAINは85に固定、STCは全て中央基準値。測定範囲は6cmの深さまで(5MHz波の解像度の信頼限界)ピクセル数が400以上になるようにトレースと、ピクセル強度の平均値と標準偏差を算出。また、高輝度領域の起源の組織学的検索も行った。【結論】組織標本との対比により、高輝度の起源は、内膜腺管の強い拡張と蛇行である可能性が示唆された。高輝度領域は増殖期後期より着床期に向かい内腔に向けて広がり、輝度比も増加してくる。この輝度比の上昇が、子宮内膜の妊孕性と関係があると考えられる。着床期の超音波子宮内膜像の表現方法は、高輝度領域の割合と子宮筋層の輝度の比で表現するのが適切だと思われる。

7. 重症子宮筋症のIVF-ETによる妊娠例

○伊藤美穂, 操 良, 川崎市郎

玉舎輝彦

(岐阜大産婦)

今回我々は、重症子宮筋症に対しリュープロレリン6カ月間投与にひきつづくIVF-ETで妊娠、生児を得た症例を経験したので報告する。症例は初診時31才女性、未経妊、7年間の不妊、近医にて子宮筋腫を指摘されたため1月、当科を初診した。2月子宮筋腫核出術、10月左側チョコレート嚢胞核出術を施行、その後もチョコレート嚢胞が再発し、経腔的に穿刺アルコール固定を3回行った。には他医で子宮筋腫核出術、チョコレート嚢胞核出術、癒着剥離術を施行された。より超音波上子宮の腫大を認め子宮筋症と診断、リュープロレリン3.75mgを4週毎に6回投与し、ひきつづきブセレリン併用しhMG、pureFSHで卵胞刺激hCG投与後IVF-ETを行ったところ妊娠が成立した。妊娠30週、血流計測により血流再分配効果の消失を認めたため、腹式帝王切開術で822gの女児を分娩した。分娩後1年で児は体重5.5kgで順調に経過している。

8. 医師一人で行う体外受精の手順

○稲垣資郎 (徳川レディースクリニック)

従来体外受精は、多数のスタッフと培養液など特殊な機材に加え滅菌処理に用いる超純水が必要とされ、小規模施設では施行し難いものであった。しかしながら、近年消耗品の殆どは流通され、超純水による処理の必要もなくなり、個人施設でも簡単に体外受精を行えるようになった。当院は医師1名検査技師1名ポーター1名で月間10例前後の体外受精を行い、良好な結果を得ているので報告する。卵子の

培養に用いる培養液をはじめ、卵胞洗浄用のPBS、滅菌パスツールピペットも全て市販のものをを用い、多くの操作にはディスポの注射器を用いている。クロミフェン単独周期がほとんどなので採卵も1～2分で終了し2時間の安静の後にて帰宅させている。現在まで、この方法で移植周期あたり23.1%(34/147)患者あたり47.9%(34/71)の妊娠率を得ている。OHSSの心配もほとんどなく体外受精は従来の人工授精の感覚に近づいている。

9. IVF-ET後の黄体補充療法としてのプロゲステロン腔坐薬の有効性についての検討

○西垣 新, 西村 満, 岡田 久
鳥居裕一 (聖隷浜松病院産婦)

【目的・対象】体外受精・胚移植(IVF・ET)後の黄体補充療法としてのプロゲステロン(P)腔坐薬150mgの有効性を検討した。97年9月～12月の3カ月間に黄体補充療法としてP腔坐薬150mg×3/日、連日12日間を使用した25例(A群)と、P50mg/日、連日12日間筋注した16例(B群)とを比較検討した。【方法】IVF・ETはlong protocol法を用いた。P腔坐薬150mgは院内で作成した。採卵後7日目にE₂、Pを測定した。それぞれの血中ホルモン値と、妊娠率を比較検討した。【結果・考察】ET後7日目のP、P/E比、妊娠率はA群が174.2±89.2ng/ml, 81.5±34.3, 28.0%, B群が177.6±108.6ng/ml, 75.16±37.84, 37.5%で、いずれにも有意差は認められなかった。【結論】黄体補充療法としてのP腔坐薬150mgの有効性が示唆された。

10. 貴重な卵にICSIを行う意義はあるか?

○二村典孝, 芝原隆司, 田窪伸一郎
(鈴鹿回生総合病院産婦 不妊センター)
築城友加子, 竹中由起子, 竹内茂人
箕浦博之, 豊田長康
(三重大附属病院産婦)

今回は、特に採卵数が少ない貴重な卵に対してICSIをする意義があるのかを検討した。

対象は96年1月より98年3月の間に当院で施行された通常のIVF-ET69周期とICSI-ET102周期である。採卵数、2PN受精率、3PN受精率、分割率について検討した。また、IVF採卵104周期とICSI採卵116周期で受精卵を検討した。さらに、採卵が3個以下であったIVF25周期、ICSI18周期についても受精卵を検討した。

IVF-ETでは採卵数537個、2PN受精361個、3PN

受精44個、2PN分割353個であった。ICSI-ETでは採卵数853個、ICSI662個、2PN受精526個、3PN受精5個、2PN分割521個であり、ICSIはIVFと同等の受精卵が得られて、3PN受精が少なかった。IVF採卵104周期中10周期(9.6%)は受精卵ができない周期であった。ICSI採卵116周期では、1周期のみ受精卵は得られなかった。採卵3個以下の周期を比較すると、IVFでは25周期中7周期に受精卵はなかったが、ICSIでは全周期受精卵は得られた。

ICSIは受精能力のあるIVFと同等の受精卵が得られ、周期ごとには分割胚の得られる確立が高く、貴重な卵にICSIをする意義はあると思われた。

11. 当院におけるPESA, TESEの検討

○吉川文彦, 富田和彦, 滝沢洋美
宮坂美穂, 小松真由美, 根津八紘
(諏訪マタニティークリニック 諏訪
リプロダクションセンター)

当院では96年8月より体外受精による治療を開始。体外受精児出産を待って、97年6月より顕微授精を開始。とともにPESA(percutaneous epididymal sperm aspiration)およびTESE(testicular sperm extraction)を開始した。今回無精子症症例が10例をこえ、少ない症例ながらも臨床的な検討を加えたので報告する。対象は97年6時より98年3月までに当院において治療を受けた閉塞性無精子症患者6名と非閉塞性無精子症患者5名。閉塞性無精子症患者ではFSHはすべて12mIU/ml以下で、全例よりPESAで精子回収可能であった。非閉塞性無精子症患者ではFSHはすべて10mIU/ml以上であったが、TESEにて精子回収可能例と不能例との間にFSH、およびJohnsen's scoreにおいて一定の傾向は認められず、精子有無の指標にはならないと考えられた。臨床的妊娠は閉塞性無精子症患者で移植周期あたり4/14(28.6%)、对患者あたり4/6、非閉塞性無精子症患者では对患者あたり1/5であった。

12. Piezo併用ICSIの臨床検討

○竹内茂人, 箕浦博之, 築城友加子
豊田長康 (三重大産婦)
二村典孝, 田窪伸一郎
(鈴鹿回生総合病院不妊センター)

【目的】重症男性不妊、受精障害など正常の体外受精では受精が成立しない不妊症患者にとって卵細胞内精子注入法(ICSI)は画期的な治療法である。今回我々はconventional ICSIとpiezo併用ICSIの臨床成績

について比較検討した。【方法】男性因子および通常の体外受精にて受精障害の認められた92症例、150周期を対象とした。conventional群は39症例、44周期、piezo併用群は53症例、106周期。conventional群では、injection needleは外径 $5\mu\text{m}$ に加工したものをを用い、運動精子を10%PVPのドロップ中で不動化した後injection needleを卵細胞内に刺入し、細胞質を少量吸引した後精子を注入した。一方、piezo併用群ではinjection needleはconventional群と同様のneedleを用いるが、透明帯のみをpiezo pulseにより穿破し、卵細胞膜の穿破は吸引により行い精子を注入した。【成績】conventional群、piezo併用群各々：①受精率：66.7% (174/261), 84.6% (601/710) ($p<0.001$)。②生存率：90.0% (234/261), 97.6% (693/710) ($p<0.001$)。③分割率：91.4% (159/174), 98.2% (535/545) (NS)。④良好胚獲得率：52.2% (83/159), 48.0% (257/535) ($p<0.001$)。⑤対症例妊娠率、対胚移植妊娠率各々30.8% (12/39), 30.0% (12/40), 46.9% (30/64), 32.3% (30/93)。【成績】piezo併用群は、受精率、生存率は有意に高く、妊娠率も高い傾向がみられ、有用な方法と思われた。

13. Piezo-micromanipulatorを用いた顕微授精に関する検討

—PMM-MB-B型とPMM-MB-U型との比較—

○菅谷 健, 森本 誠, 鈴木孝明

中山愉紀子, 高倉哲司

(済生会松阪総合病院産婦)

豊田長康

(三重大産婦)

MB-B型(スライドステージ型)とMB-U型(円筒同軸型)のトライブユニットを用いたPiezo-ICSI施行例で、透明帯穿通所要時間、卵細胞質膜穿破様式、および受精・初期発生について比較検討した。対象は34症例、51周期で得られた314個のM II卵でMB-B型を用いた180個とMB-U型を用いた134個について検討した。透明帯穿通所要時間は、MB-B群 39.2 ± 3.5 秒、MB-U群 21.0 ± 2.9 秒(mean $\pm$ SEM)とMB-U群が有意に短かった。卵細胞膜の穿破様式はType1:穿刺のみ、Type2: Piezoのpulseで穿破、Type3: 吸引とPiezoを併用、の3タイプに分類した。Type1, Type2, Type3の比率はMB-B群: 18%, 38%, 44%, MB-U群: 23%, 62%, 15%でType2, Type3において両群間に有意差を認めた。生存率・正常受精率・分割率・良好胚の割合はMB-B群: 90.0%, 84.6%, 96.4%, 37.1%, MB-U群: 85.8%, 85.2%, 92.9%, 41.8%で両群間に有意差を認めなかった。対胚

移植妊娠率はMB-B群: 28.6% (8/28), MB-U群: 36.8% (7/19)であった。MB-U型はMB-B型に比しインパクト効率高く、透明帯穿通所要時間は有意に短縮し、卵細胞膜穿破も容易でPiezo-ICSIにより有効と考えられた。

14. One-day-old ICSIは有効か?

○浅田義正

(ナカジマクリニック 不妊センター)

羽柴良樹, 山原 昇, 安藤智子

近藤育代, 菅沼信彦, 水谷栄彦

(名古屋大産婦)

ICSIの適応には乏・無精子症と受精障害とがある。One-day-old ICSIは、通常の媒精法で受精卵が得られなかった場合に、患者の負担を考慮し、次回まで待つことなく、採卵翌日にone-day-old oocyteを用いてICSIを施行するものである。今回1996年5月から1998年2月までに経験した12例のone-day-old ICSIについてretrospectiveに検討した。適応では子宮内膜症4例、高FSH排卵障害3例が目立った。精子濃度は媒精には十分であったが、12例中10例が運動率が50%以下であった。受精率は75.9% (60/79), 卵割率は85.7% (36/42)であったが、妊娠率は8.3% (1/12)と著しく低値であった。1例の妊娠例は子宮内膜症のため両側卵巣手術後の症例で双胎妊娠し、既に2児を得ている。今後もこの方法の有効性は継続して検討されるべきと思われる。

第118回 日本不妊学会関東地方会

日時: 平成10年6月27日(土)午後1時30分～6時
場所: 幕張メッセ国際会議場(千葉市)

1. 不妊を主訴に来院した46, XXmaleの一例

○小宮 顕, 鈴木啓悦, 細木 茂

市川智彦, 伊藤晴夫 (千葉大泌尿器)

始関吉生 (川崎製鉄千葉病院)

症例は39才男性。主訴は育児希望。家族歴既往歴に特記事項無。現病歴: []に結婚。妊娠を認めず近医受診。精液検査にて無精子症のため当科初診。現症: 外性器は男性型だが精巣は左6ml右5mlと両側とも萎縮していた。内分泌学的検査ではLH 17.60mIU/ml, FSH 33.89mIU/mlと高値を認めた。染色体検査では46, XXであった。そこで末梢血よりDNAを抽出しSRY遺伝子の有無を検索したところ陽性で同様にazoospermia factor region(Yq11.23)

は欠失していた。本症例はY染色体のSRY遺伝子を含む領域がいずれかの染色体に転座していたため男性型としての性分化をしたが、azoospermia factor regionが存在しなかったために、無精子症となったものと思われた。

2. 男子不妊外来で経験した精液アレルギーの一例

○友田岳志, 千葉喜美男, 榛葉隆文
松岡 陽, 広川 信
(藤沢市民病院泌尿器)
朝倉茂夫 (朝倉医院)

症例：夫33才妻32才。主訴：挙児希望。現病歴：1992年10月、28才で結婚。以後挙児に恵まれず。8月、男性不妊外来初診。精液所見、5～6ml、精子数・883～930万/ml、正常形態率・14～24%、運動率・27～30%。左側の精索静脈瘤所見認められ、96年12月左内精静脈高位結紮術施行し、精液所見、量・4～6.5ml、精子数・1460～2870万/ml、正常形態率・20～39%、運動率・33～63%と精液所見の改善が認められた。しかし、1月には性交後に結婚当初は認められていなかったような、全身性の掻痒感を伴う膀胱疹、呼吸苦、心悸亢進などの精液アレルギーの症状が妻に認められるようになり、性交そのものが困難となった。患者は体外受精を希望している。

3. 鼠径ヘルニア手術時精管断裂症例の精管精管吻合術における膀胱側精管の同定に、腹腔鏡が有用であった1例

○大橋正和, 石川博通, 青柳貞一郎
早川邦弘, 畠 亮
(東京歯科大市川総合病院泌尿器)
中村 薫 (川崎市立病院泌尿器)
村井 勝 (慶應大泌尿器)

症例は36歳、男性。挙児希望。92年結婚。3月に左精巣腫瘍で高位徐精巣術の既往あり。診断はSeminoma, Stage Iで、放射線照射24Gyを施行。小児期右鼠径ヘルニア手術の既往あり。1月精液検査は無精子症。右精巣容積は16ml。FSH, LH, PRL, テストステロン値は全て基準範囲内。精巣生検では右精巣の造精機能良好。精管造影では右精管は鼠径管の高さで閉塞。以上より小児期鼠径ヘルニア手術時精管損傷による閉塞性無精子症の診断にて、5月13日全麻下に手術を施行。右鼠径管を開けると、精巣側精管は鼠径管内で断裂。腹腔外より

膀胱側精管を求めるも発見できず。そこで腹腔鏡にて腹腔内より内鼠径輪付近を観察すると、通常的位置に膀胱側精管を腹膜を透して発見。腹腔内より観察して、精管鉗子で腹腔内より膀胱側精管を保持し、全層一層精管精管吻合術を施行。鼠径ヘルニア手術時精管断裂症例の膀胱側精管の同定困難時には、腹腔鏡を試みるべきである。

4. 内臓逆位をともなった精子無力症の出産

○野澤英雄, 鈴木良二
(水戸赤十字病院泌尿器)
荒木康久, 本山光博
(高度医療技術研究所・中央クリニック)
吉田 淳, 永尾光一, 三浦一陽
(東邦大泌尿器)

36歳、男性。5年5カ月間の不妊を主訴に2月14日当科を受診した。血液生化学尿検査および内分泌学的検査に異常を認めず、精液所見は精液量0.7ml、精子濃度 75×10^4 /ml、精子運動率5%であった。胸部X-P、腹部CTでは完全内臓逆位症を認めた。陰嚢部超音波検査では右精索静脈瘤を認めた。同年5月6日右内精静脈高位結紮術を施行したが、術後6カ月の精液所見は精液量1.1ml、精子濃度 31×10^6 /ml、精子運動率5%で、精子濃度の改善を認めたが運動率の改善を認めなかった。そこで精子鞭毛と鼻粘膜線毛の電顕的検索を行ったところ、前者にouterおよびinner dynein armの欠損を、後者にinner dynein armの欠損を認めた。以上から精子無力症の原因は全身の線毛系の超微細構造的異常に起因するものと考えICSIを施行し、1月12日男児を得た。難治性呼吸器感染症などの臨床症状のみられないprimary ciliary dyskinesiaの1例を報告した。

5. 2細胞期から24時間のPKC activator 処理がマウス胚の発生におよぼす影響

○本橋秀之
(東京農業短大生物生産技術)

マウス2細胞期胚を、phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)または1-oleoyl 2-acetyl-sn-glycerol(OAG)を含むM16中で24時間培養した。その結果濃度依存的に二重核割球を有する胚の割合が増加し、1nM PMA, 100 μ M OAGでは82%に達した。これらの胚は比較的高率に胚盤胞へ発生した(70～81%)が、構成細胞核数は1nM PMA, 100 μ M OAGで、controlの1/3以下に減少した。胚盤胞をレシピエントに移植したところ、着床率は有意に低下し(1nM PMA 23

%, 100 μ M OAG 25%), 着床胚のほとんどが吸収されていた。outgrowth ではICM欠損胚の割合が, 0.1 nM PMA 13%, 1nM PMA 48%, 100 μ M OAG 47% と有意に増加し, ALP活性を示すICMの割合は減少した。このように2細胞期から24時間のPMA, OAG 処理は, 割球数の減少および倍数化を誘起し, 処理後の胚発生能を低下させる結果となった。

6. 正常および不妊マウス精巣におけるベシジン の局在

○前川真見子, 外山芳郎, 湯浅茂樹
(千葉大第二解剖)
門松健治, 村松 喬
(名古屋大第一生化)

ベシジンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞接着分子で, この遺伝子を欠損した雄マウスは減数分裂が進行せず不妊となる。そこで, 抗ベシジン抗体を用いて正常及び不妊マウスの精巣におけるベシジン蛋白の局在について調べた。免疫組織染色の結果, 正常マウスではベシジン蛋白の免疫陽性反応は精母細胞および精子細胞に局在した。また免疫電顕により, ベシジン蛋白は精母細胞・球形精子細胞の細胞膜およびこれらの細胞に接するセルトリ細胞の細胞質突起の細胞膜にも局在することがわかった。精子形成を阻害した停留精巣や雄性不妊の突然変異マウス(W/W^v, jsd/jsd)精巣において, 精細管内に精母細胞・精子細胞が存在しない時, ベシジン蛋白は検出されなかった。以上の結果からベシジンは, マウス精子形成過程において特定の段階の生殖細胞とセルトリ細胞間の相互作用に関与することが示唆された。

7. 正常および無精子症精巣におけるベシジン の発現

○湯浅譲治, 鈴木啓悦, 市川智彦
伊藤晴夫 (千葉大泌尿器)
外山芳郎, 湯浅茂樹
(千葉大第二解剖)
宮内照雄 (日本抗体研究所)

ベシジン遺伝子欠損マウスの造精細胞は第一次減数分裂で分化が止まり, 無精子症をきたす。一方ヒトでは無精子症の原因は不明のため, 正常および無精子症精巣におけるベシジンの発現を調べた。

千葉大学泌尿器科で過去3年間の無精子症精巣48例(Sertoli cell only syndrome以下SOSと略す10例, germ cell arrest 8例, その他30例), および正常精巣

(前立腺癌にて去勢した検体1例)を, 抗ヒトベシジン抗体にて染色した。

正常であれ, 無精子症であれ, 精母細胞・球形精子細胞があればその細胞膜にベシジン蛋白が発現されていた。一方, セルトリ細胞の細胞膜においてもベシジン蛋白が発現されているが, SOSではその発現は完全ではなく, ベシジンもしくはベシジン蛋白が造精細胞の分化に関係している可能性が示唆された。

8. 体外受精の妊娠成否予測に関する体インピー ダンスの重要性

○星合敏久, 神野正雄, 小菅浩章
尾崎恒男, 菅原新博, 中村幸雄
(杏林大産婦)

【目的】体外受精において体インピーダンス(IMP), ホルモンおよび妊娠成否の関係を分析した。【方法】対象は, 妊娠例68周期と非妊娠例70周期とした。IMPは, 体外受精前周期高温4日, hMG開始日からET日まで測定し, basal FSHは, 自然周期低温3日に測定した。高温4日IMPとbasal FSHの最適閾値を, ROC曲線分析で決定し比較した。【結果】妊娠群のIMPは, 高温4日, hMG開始日, hCG投与+1日で非妊娠群に比し有意に高く, また, hMG開始日からhCG投与日へと有意に減少し, +1日に有意に増加した。妊娠成否予測のための高温4日IMP最適閾値は600 Ω で, 感度, 特異度は, basal FSHに勝っていた。高温4日IMP600 Ω 以上の妊娠率は, 600 Ω 未満より有意に高かった。【結論】IMPの高値とhCG投与後の上昇は, 妊娠成功と関連する。高温4日のIMPは, 体外受精の成否をbasal FSHより鋭敏に予測することができる。

9. 脳梗塞既往の抗リン脂質抗体症候群妊婦の1 例

○松本譲二, 阿部俊之, 三宅秀彦
越野立夫, 荒木 勤 (日本医大産婦)

抗リン脂質抗体症候群の妊婦の胎児に関する治療はまだ意見の一致はみられていないが, 血栓既往の妊婦の治療は是非必要とされている。今回私達は脳梗塞既往の妊婦の妊娠分娩を経験したので報告する。

症例. 28才の時, 旅行先にて右半盲, 半身麻痺, 感覚傷害にて近医に入院, 2日後には麻痺消失, 上1/4同名半盲となり, 感覚も戻り, 当院内科へ転院となる。CT, MRI, MRAで左視床, 左後頭葉内

側の脳梗塞と診断する。31才の時、無月経で当科を受診、妊娠と診断する。アスピリンを投与して、止血学的分子マーカーでモニターした。妊娠39週で分娩後凝固線溶系マーカーが上昇したためヘパリンを投与した。MRI、MRAで骨盤内血管に血栓はみられず、分娩1カ月後のMRIでは脳病変に変化は全くみられなかった。

脳梗塞既往の抗リン脂質抗体症候群の妊婦には抗血小板療法のみでは不十分で、特に分娩後には抗凝固療法が必要と思われる。

10. 機能性不妊症に対する効果的な排卵誘発法の検討

—clomiphene+hMG-hCG療法の検討—

○桜井加那子、武内裕之、中野義宏
三橋直樹、桑原慶紀

(順天堂大産婦)

【目的】clomiphene療法とAIHで妊娠に至らない機能性不妊の患者に対してclomiphene+hMG-hCG療法を行いhMG-hCG療法と比較検討した。【対象と方法】対象は11例でclomiphene100mg/日をD3から5日間投与し、D7からhMG150単位を連日投与した。clomiphene+hMG-hCG療法、hMG-hCG療法では次席卵胞が20mmを越えた時点でhCG5000単位を投与し、24時間後にAIHを施行した。【結果】使用したhMGの量、外来通院日数はclomiphene+hMG-hCG療法で有意に減少が認められた。またclomiphene+hMG-hCG療法で妊娠しなかった8例はhMG-hCG療法でも妊娠にいたらなかった。【結論】clomiphene療法とAIHで妊娠にいたらない機能性不妊の患者にはclomiphene+hMG-hCG療法がその効果や患者の負担の面からも有用と思われる。

11. 卵巣機能不全患者の骨塩定量(DXA法)の意義

○近藤真帆、松本和紀、杉本公平
舞床和洋、大浦訓章、許山浩司

田中忠夫 (東京慈恵会医大産婦)
篠塚正一 (茅ヶ崎市立病院産婦)

若年者の原発性無月経や長期の続発性無月経では、性機能や将来の妊孕性に重大な問題があるばかりでなく、低エストロゲン状態により、骨塩量の低下を引き起こすことが考えられ、現在および将来の骨粗鬆症の発症が問題となってくる。そこで、16歳から37歳までの3カ月以上の無月経を主訴とする患者37例を対象に、DXA法により骨塩量の精査を行い、今までにデータの少ない若年者の無月経患者の

骨塩量の実態について調査した。

結果：無月経患者の27%に骨量減少、2.7%に骨粗鬆症が認められた。さらに、骨量減少および骨粗鬆症の症例の91%が第2度無月経であった。また、体重減少性無月経の85%は第2度無月経であった。体重減少率が高い患者ほど骨塩量が少なかった。若年者の長期無月経、特に体重減少性無月経においては、卵巣機能のみならず、骨塩量の低下に対する対策も考慮することが肝要であると考えられた。

12. 不妊診療における精子凍結保存の実際

○兼子 智、郡山 智、吉田丈児、

赤星晃一、黒島正子、小田高久

(東京歯科大市川総合病院産婦)

吉村泰典

(慶應義塾大産婦)

ヒト精子の凍結保存は従来の精子備蓄のみならず、化学療法、精巣除去術予定者のQOL、また感染症回避などの観点から応用の範囲が広がっている。

ヒト精子凍結保存する際、高い蘇生率を得るためには凍結保存液、凍結条件(凍結方法、凍結速度)の改良とともに精子代謝を凍結に適した状態に誘導することが重要である。さらに精液所見不良例においてはあらかじめ精子を洗浄濃縮しておく必要がある。

我々は攪拌密度勾配法により濃縮した精子をKS11m精子保存液と等量混合して液体窒素蒸気凍結法により凍結し、液体窒素中で保存している。融解は微温湯中で行う・KS11m精子保存液においてグリセリンは凍結保護の主体をなすが、その高浸透圧は精子に傷害的に作用する。従って、混合後直ちに凍結を行うとともに、融解後は直ちに保存液を洗浄除去する必要がある。キサンチン誘導体ペントキシフィリンは、精子運動を賦活するとともに精子の浸透圧抵抗性を向上し、凍結融解に伴う低下を軽減する。

13. 原因不明の射精障害に対するelectroejaculationの1例

○馬場克幸、松下知彦、星野孝夫

矢島通孝、岩本晃明

(聖マリアンナ医大泌尿器)

原因不明の射精障害に対し、Seager型電気射精装置を用いてelectroejaculation(EE)を施行した。順行性に射出された精液3mlと逆行性の射出液を合わせて遠心し、パーコール処理して精子濃度 1.0×10^6 /ml、運動率5%の結果を得、直ちにAIHに使用し

た、本法の問題点としては、運動良好の精子が得られないこと、また強い疼痛を伴うため脊髄麻酔か全身麻酔が必要となることである。本症例は今回妊娠には至らなかったが、原因不明の射精障害に対してEEは、有用な治療法の1つになるものと思われた。

14. 電気射精法で得た脊髄損傷者の精子を用いての体外受精の経験

○柳 重行 (千葉労災病院泌尿器)
赤間晴雄, 内藤正文
(川鉄千葉病院産婦)

症例は35歳の男子脊髄損傷者(第12胸髄以下完全麻痺, 受傷後1年2か月经過)で, 拳児希望にて受診, 射精不可にて経直腸の電気刺激による人工射精法(電気射精法)を施行, 得られた精液(逆行性射精)は精子数は十分なるも運動率は0.1%程度と極めて低く, 体外受精を試みた, 妻は25歳で, 不妊因子はなく, long protocoleによる卵巣刺激後採卵し, 細胞質内直接精子注入法により顕微受精を2回施行した, 2回とも受精には成功, 子宮内移植したが, いずれも着床には至らなかった, 電気射精法で得られた精子の運動性は一般に極めて低く, この運動性低下の原因について考察を加えた。

15. 新しい精子運動自動分析装置C-menの使用経験

○岩淵正之, 遠山裕一, 足立陽一
田倉正己, 友 政宏, 押尾 茂
矢崎恒忠, 梅田 隆 (帝京大泌尿器)

新型の精子数・運動能自動分析装置(CASA)であるC-Menの性能を従来型のCASAであるCell Softと比較検討した。対象は当科不妊外来患者精液54例, 同一検体を同時にそれぞれのCASAに取り込み分析した。また, 14例については目測法(計算盤による精子数算定, CASAと同一画像のビデオコマ送りによる運動率測定)による測定も行った。その結果, 精子濃度($\times 10^6/\text{ml}$)はC-Men 45.7 ± 13.9 , Cell Soft 37.1 ± 19.8 と前者が後者に対して有意に高値を示した。一方, 運動率(%)はC-Men 25.3 ± 12.0 , Cell Soft 38.1 ± 18.0 と前者が後者に対して有意に低値を示した。目測法と比較すると濃度はC-Menで 48.3 ± 13.6 , Cell Soft 40.4 ± 12.1 , 目測法 46.5 ± 11.1 , 運動率はC-Men 28.5 ± 8.2 , Cell Soft 42.0 ± 11.1 , 目測法 32.9 ± 9.0 であり, 濃度, 運動率共にC-Menは目測法に近い値を示した。以上の結果より, C-Menは目測法との値の一致もよく価格安く今後CASAとして有用であると

考えた。

16. 不妊治療における自然妊娠例の検討

○児島孝久 (アモルクリニック)

対象は当クリニックにて過去4年間で不妊後妊娠に至った909例中, 自然妊娠の223例, 年次別には1994年46例, 95年183例, 96年85例, 97年85例の計223例(24.5%)みられた。平均年齢は30.3歳, 不妊期間は2.3年, 妊娠迄の期間は7.3カ月で原発性不妊は61例(72.7%), 流産例は23例(10.3%)であった。自然妊娠例を分類すると, 多い順にタイプ1)誘発剤投与後の自然妊娠: 79例, タイプ2)未治療のまま: 56例, タイプ3)通院中断後: 39例, タイプ4)HSG後: 35例, タイプ5)IVF後: 14例であった。タイプ1の妊娠例を検討すると, hMG-hCG療法(15例)よりもクロミド投与後(49例)に多くみられ, タイプ2は, 初診時妊娠例22例を含み, 単なるタイミング指導だけの妊娠例は34例と少なく, また流産率が16.1%と高かった。タイプ3は, 妊娠成立までの期間が長く, 続発性不妊例に多くみられた。タイプ5は, IVF直後の妊娠が14例中7例と半数を占めた。以上より, クロミドやHMGを投与した後治療を休み自然周期に戻すことは不妊治療に有用であることが示唆された。

17. 単頸単角子宮にIVFを施行し双胎妊娠となった1例

○伊東宗毅, 石原 理, 五十嵐健治
斎藤正博, 林 直樹, 田谷順子
堀竜邦子, 平手ひとみ, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)

単頸単角子宮での多胎妊娠は流産, 子宮破裂等の危険性がある。多胎妊娠の可能性の高いIVFは避けるべきとする報告もされている。今回, 他の治療法では妊娠の可能性が低い単頸単角子宮症例に対し, IVFを施行し, 双胎妊娠となった症例を経験したので報告する。

症例は32歳, 0回経妊0回経産, 3年間の不妊を主訴に当科初診。USG, HSG, Laparo等により左単頸単角子宮, 左卵巣囊腫と診断した。2個の胚を移植した2回めのIVF周期で双胎妊娠となる。妊娠13週5日, 頸管無力性の可能性を考え, 予防的シロkker手術を施行した。妊娠29週4日, 前置胎盤管理目的にて入院。入院後, 特に問題なく経過し, 妊娠34週6日, 前置胎盤にて, 帝王切開術施行, 男児(1762g, Ap 7/8), 女児(1868g, Ap 6/9)の生児

を得た。単頸単角子宮症例では多胎妊娠は好ましくないが、胚移植数を制限すればIVF-ETは必ずしも禁忌と考える必要性はないと思われた。

18. Transport ARTにより妊娠した2症例

○高梨安弘, 市川雅男, 金 栄淳

(国立横須賀病院産婦)

安部裕司, 橋田 英, 伊藤嘉奈子

雀部 豊, 池永秀幸, 間崎和夫

久保春海 (東邦大第1産婦)

近年ARTによる不妊治療は広く普及しルーチン化しつつあるが、どこの施設でも実施可能なわけではない。現在ヨーロッパで行われているトランスポート方式が一部改良され国内でも行えるようになった。1995年7月より当院をサテライト施設とし、大学をセンターとして臨床応用を開始した。その結果2例の妊娠に成功したので報告する。

症例1は26歳の原発不妊、AIHを5回行ったが妊娠せず、原因不明不妊にてIVF-ETを選択し2回目で妊娠した。症例2は25歳の原発不妊、子宮内膜症、男性因子を認めAIHで妊娠せずIVF-ETを選択し1回目で妊娠した。

トランスポートARTはまだ臨床例が少なく改善すべき点もあると思われるが、最小限の設備投資で、体外受精やセンター病院の高度技術を生かした顕微授精、凍結胚移植等も可能であり、今後さらなるポータブル輸送器の小型軽量化と共に広く浸透していくものと思われる。

19. 当院における体外受精の現況(7年間の臨床成績)について

○内藤正文, 赤間晴雄, 布山隆史

(川鉄千葉病院産婦)

○始関吉生 (川鉄千葉病院泌尿器)

当院で91年10月より98年3月までに行ったART治療の臨床成績を報告する。1)C-IVFはトータルで541周期に採卵を、うち469周期にETを行い、105周期が妊娠した。年度別にみると、95年度より妊娠率が良くなり、97年度には採卵あたりで30%、ETあたりで37%と大幅に良くなった。妊娠率向上の第1の理由は精液の処理法をMS管法にしたこと、第2の理由はET法を経腹超音波下にETチューブの先端を確認して胚を確実に子宮腔内に注入するようにし、ET後12時間のベッド上安静としたこと等が考えられる。2)ICSIは96年度から妊娠が得られるようになり、97年度の妊娠率はETあたり35%(15/43)とC-IVFと同等

となった。また、MESAおよびTESE-ICSIを8例、11周期に行い、5周期で妊娠した。3)凍結胚融解ETでは20.6%(9/34)の妊娠率であった。4)ARTによる127妊娠のうち87例(69%)が分娩となった。多胎数は27例で、87分娩中31%であった。106児中2例に先天異常を認めた。

20. 当科におけるICSIとIVF-ETの比較

○根本 央, 正岡 薫, 河津 剛

星野恵子, 北澤正文, 稲葉憲之

(獨協医大産婦)

21. 顕微授精時における異なる針を使用した成績の検討

○横田のぞみ, 小出美香, 白井 彰

(白井医院)

安部裕司, 久保春海 (東邦大第一産婦)

不妊症の治療において、顕微授精法は飛躍的に進歩し、ICSIは、高い受精率、妊娠率により急速に普及している。ICSIを実施して、質の高い胚を得る為には、卵子と精子の質に加えて、短時間に卵にダメージを出来るだけ少なく、精子を確実に卵実質内に注入する事が重要である。このため、使用する針、特にインジェクションピペットの役割が大きいと考え、市販の3社の針を用いてICSIを行い、比較検討した。

1997年8月より1998年5月まで、当院にてICSIを行った57周期を対象とし、3社のインジェクションピペットを用いて、生存率、受精率、形態良好胚率について比較検討した結果、針の選択によって、有意差はなかった。

市販の針を使用する場合、経済的には高価であるが、すぐにICSIの実施が可能である。市販の針は、切れ味や腰の強さ等、各社に特徴があり、安定した針を得る事が出来る。市販の針を選択する際には、コストや実施者の好みによる選択も、十分可能と思われる。

特 別 講 演

着床とインテグリン

吉村泰典(慶應義塾大産婦)

着床とは受精、初期胚発生の過程を経て発育した胞胚が、受精後6~7日目に子宮内膜上皮と接着することにより始まり、胞胚が子宮内膜上皮を貫通し、間質に侵入、子宮壁との間に器質的な結合が成

立した状態をいう。着床過程において中心的役割を果たしているのは、トロホプラストの子宮内膜上皮細胞の接着と移動である。この巧妙かつ精密に営まれる細胞間相互作用にかかわる分子は、大きく二つに分類される。その一つは細胞表面に存在し、細胞間接着や認識に関与するインテグリンなどの接着分子であり、もう一つは細胞間に介在する細胞外マトリックス(ECM)である。近年、細胞接着の研究が急速に進歩し、多くの着床にかかわる知見が集まりつつある。本講演では、生殖生理の中で一つの重要な過程である受精卵の着床における接着分子、特にインテグリンの役割について概説する。

教 育 講 演

男性不妊症の病態

一精子形成障害を中心に

田中啓幹(川崎医大泌尿器)

男性不妊の病因は、精子形成障害が約90%を占め、その40~60%は特発性障害、約20~40%は精索静脈瘤、5~6%が染色体異常である。治療成績を妊娠率から見ると、精索静脈瘤手術が30~50%と最もよいものの、残りの50~70%が問題であり、特発性不妊の薬物療法はプラシボと著差なく、染色体異常ではまず期待できない。従って、極めて少ない精子が精子細胞を用いてのICSIを含めたARTに頼らざるを得ないのが現状である。

精子形成には、mitosis, meiosis, 精子成熟と複雑な過程を営む必要があり、分子生物学的手法を用いての最近の研究も緒についたばかりで、病態生理学的解明には今後の成果を待たざるを得ない。現在、spermatogenic arrestに見られるapoptosisとBaxやCREMなどの遺伝子メディエータ、さらに、Y染色体長腕に認められるAZF, RBM, DAZなどの候補遺伝子のmicrodeletionとの関係などが解明されて来ている。また、臓器特異的自己免疫疾患として、動物モデルに実験的自己免疫性精巣炎を発症させ免疫学的側面からの解明も試みられている。

第35回 日本不妊学会中国四国支部

日時：平成10年8月22日(土)午後1時~

会場：岡山国際交流センター

1. 腹水濾過静注法が有効であった重症卵巣過剰刺激症候群の1例

○泉谷知明, 林 和俊, 森岡信之

岡谷裕二, 相良祐輔

(高知医大産婦)

卵巣過剰刺激症候群(OHSS)は、排卵誘発剤の使用に付随して発症し、重症化した場合、有用な治療法がなく、その対処に苦慮する。今回、腹水濾過静注法が有効であった重症OHSSを経験したので報告する。【症例】31歳、続発性不妊症、PCOS。AIH目的でhMG(フェルティノームP)225単位を4日間、150単位を6日間投与し、多数の卵胞発育を認めた。インフォームドコンセントを得た後、hCG5000単位を投与し、翌日にAIHを施行した。AIH後9日目より卵巣腫大、腹水貯留を認め、OHSS重症化の可能性が高く入院となり、その後急速に増悪した。AIH後13日目、尿中hCG陽性となり妊娠が判明した。治療として、補液、マンニトール、アルブミン、新鮮凍結血漿、ドーパミン投与、腹水穿刺、卵胞穿刺を行ったが、症状の軽減は一時的なものであった。AIH後25日目腹水穿刺を施行し、得られた腹水2ℓを輸血用白血球除去フィルターを用いて点滴静注した。腹水静注による副作用はなく、Ht低下、TP上昇を認めたため、4日後再度腹水穿刺を行い、腹水2.5ℓを点滴静注した。その後、血液濃縮、低蛋白血症は軽減し、腹水の再貯留もなく、全身状態は著明に改善した。妊娠は、現在順調に経過している。【考察】腹水濾過静注法は簡便であり、OHSSの諸症状を著明に改善しうる方法であり、今後、重症OHSSに対して考慮すべき治療法であると考えられた。

2. クロミフェン併用ステロイド療法にて妊娠に至ったlate onset congenital adrenal hyperplasiaの1例

○尾崎智哉, 高橋健太郎, 栗岡裕子

神農 隆, 宮崎康二

(島根医大産婦)

今回我々は、ステロイド投与により高アンドロゲン血症が著明に改善し、クロミフェン療法で排卵・妊娠に至ったlate onset congenital adrenal hyperplasia (CAH)の1例を経験したのでその治療経過につい

て報告する。患者は30歳、原発性無月経と挙児希望を主訴に5月当科を初診した。初診時患者には多毛(Ferriman score: 23点)、ざ瘡、低声といった男化徴候が認められた。内診所見では著明な陰核肥大(4×1.5cm)と子宮發育不全が認められた。内分泌学的検査では血中testosterone: 226ng/dl, androstenedione: 26ng/ml, DHEA-S: 5530ng/ml, 尿中17OHCS: 7.8mg/l, 17KS: 42.8mg/lと高アンドロゲン血症が認められた。また血中17-OH-progesterone: 87ng/mlであったが、cortisolは14 μ g/mlと正常範囲内であった。dexamethazone (2mg)抑制試験では血中testosterone, androstenedione, DHEA-S, 17-OH-progesterone, 尿中17KSのいずれも抑制された。また腹部CT検査で副腎に腫瘍形成は認められなかった。以上の検査結果よりlate onset CAH(21-hydroxylase deficiency^{mild})と診断した。治療は高アンドロゲン血症改善目的で、7月よりhydrocortisone 30mg/日の投与を開始し、20mg/日で持続した。あわせて子宮發育促進目的でKaufmann療法を6周期施行した。ステロイド投与開始2週間目には血中testosterone: 22.4ng/dlと著明な低下が認められ、男化徴候も徐々に改善された。3月よりclomiphene療法(100mg/日)を開始したところ、投与1周期目で排卵が認められ、2周期目で妊娠が成立した。現在妊娠6週でhydrocortisone 20mg/日を継続投与し経過観察中である。

3. 排卵前に上昇するProlactin (PRL)の生理的意義について

○ 樫田史郎, 中村康彦, 山縣芳明

滝口修司, 杉野法広, 加藤 紘

(山口大産婦)

【目的】過排卵周期では排卵前にPRLが上昇するがその生理的意義については未だ明確ではない。本研究では、IVF治療におけるBromocriptine (Br)の併用効果、およびPRLとestradiol (E)との関係につき検討した。【方法】①IVF-ETを施行した患者12例に対し、Br併用がホルモン値および治療成績に与える効果を検討した。②自然排卵のある婦人14例にクロミッドを投与し、卵胞期初期および排卵前における血中PRL、E値を自然周期のそれらと比較した。③早発卵巣不全患者5例に対し、GnRHa(900 μ g/日)投与開始2週間後よりE₂パッチ製剤(4mg/日)を併用し、パッチ投与前後の血中PRL、E値を測定した。④卵胞期後期ヒト顆粒膜細胞をandrostenedione, FSH、各濃度のPRL存在下で48時間培養し、培養液中E値を測定

した。【結果】①hCG投与前において、Br併用周期のE値は非併用周期に比し高値を示した。②クロミッドの併用により、PRLの増加は抑制された。③E₂パッチ投与後の血中E値と Δ PRL(パッチ投与によるPRL値の増加)には有意($p < 0.01$)な正相関を認めた。④培養液中のE濃度はPRLの濃度依存的に有意($p < 0.01$)に減少した。【結論】過排卵周期における卵胞後期など高E環境下では、EとPRLは互いにその分泌を調節している可能性が示唆された。

4. ラット卵巣におけるGrowth-regulated gene product/cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (GRO/CINC-1)の産生と調節

○ 牛越賢治郎, 福持光男, 田村貴央

桑原 章, 松崎利也, 安井敏之

東敏次郎, 苛原 稔, 鎌田正晴

青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】排卵期には卵胞周囲に好中球が増加することが観察されているが、その特異的な走化因子は同定されていない。そこで今回我々は、好中球に対し走化性を有し、構造的及び機能的にラットにおいてヒトIL-8に相当するchemokineであるGRO/CINC-1のラット卵巣における産生とその調節につき検討した。【方法】生後3週齢のWistar系雌ラットを用いて以下の実験を行った。(1)PMMSG-hCG刺激を行い、排卵誘発過程でのラット卵巣におけるGRO/CINC-1の産生量の変化を検討した。(2)未処置のラットより卵巣を摘出しコラゲナーゼ処理後、無血清培養液中で卵巣細胞培養を行い、FSH, hCG, Progesteroneを添加し、48時間後の培養液中のGRO/CINC-1濃度をELISA法にて測定した。【結果】(1)PMMSG-hCG投与したラットでは、hCG投与後GRO/CINC-1の産生量が急激に増加し、6時間後でピークに達し、その後徐々に減少した。(2)ラット卵巣細胞培養系においてFSH及びhCGはGRO/CINC-1の産生量を用量依存性に増加させたがProgesteroneはGRO/CINC-1の産生量に影響を与えなかった。【結論】ラット卵巣においてGRO/CINC-1はゴナドトロピンによりその産生が促進され、排卵の数時間前で最も産生量が増加することが示され、GRO/CINC-1が排卵時の好中球の走化に関与している可能性が示唆された。

5. 卵巣性無排卵症の排卵, 妊娠予後に関する検討

○北川博之, 福井敬介, 吉本 勲

伊藤昌春 (愛媛大産婦)

【目的】卵巣性無排卵症は難治性不妊症として, その治療方法の選択に苦慮する疾患である. 今回, 高ゴナドトロピン血症を示す卵巣性無排卵症に対する各種排卵誘発の有効性について検討を加えた. 【方法】高FSH血症, 低 E_2 血症を示す卵巣性無排卵症12症例を対象とした. K法(3周期以上のKaufmann療法後の経過観察), K-hMG法(3周期以上のKaufmann療法後の1日1回bolus投与によるhMG-hCG療法), K-Pul-hMG法(3周期以上のKaufmann療法後の律動的投与によるhMG-hCG療法), Gn法(2カ月以上のGnRHa併用下でのKaufmann療法後の経過観察), Gn-hMG法(2カ月以上のGnRHa併用下でのKaufmann療法後のhMG-hCG療法)による E_2 の上昇または基礎体温上の排卵の有無と妊娠成立の有無を検討した. 一部の症例ではゴナドトロピンの変動についても検討を加えた. 【成績】 E_2 の上昇または排卵を認めて治療周期, 症例数, また妊娠が成立した症例数はそれぞれ(K法: 7/90, 4/12, 2/12)(K-hMG法: 0/11, 0/5, 0/5)(K-Pul-hMG法: 2/9, 1/2, 0/2)(Gn法: 2/6, 1/3, 0/3)(Gn-hMG法: 0/3, 0/2, 0/2)であった. Kaufmann療法単独では十分なゴナドトロピンの低下が認められない症例が存在した. GnRHa併用で, より強いゴナドトロピンの低下が認められた. 【結論】いずれの方法も卵巣性無排卵症に対して, 排卵誘発効果は低いものであった. 周期的なKaufmann療法(症例によってはGnRHa併用)がQOL, 排卵誘発効果からみて良いと考える.

6. 排卵誘発における血中レプチン濃度の変化

○山田正代, 岡田典子, 松崎利也

安井敏之, 東敬次郎, 苛原 稔

青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】肥満遺伝子産物である食欲調節蛋白のレプチンは, 性機能及びエストラジオールの関与の可能性が示唆されている. 今回我々は, 血中レプチンの特異的ラジオイムノアッセイ(RIA)系を用いて, 排卵誘発周期でのレプチンとエストラジオール(E_2)の変動を検討した. 【方法】正常性周期($n=11$, 29.5 ± 4.8 歳, $BMI=20.7 \pm 2.4$)及び排卵誘発周期($n=19$, 32.8 ± 4.7 歳, $BMI=21.1 \pm 6.1$)($mean \pm SD$)について卵胞期, 排卵前期, 黄体期に血中の E_2 及びレプチン値を

RIAにて測定した. 【結果】正常性周期中, レプチンと E_2 は, 卵胞期, $23.9 \pm 3.9ng/ml$ ($mean \pm SE$), $65.6 \pm 12.0ng/ml$, 排卵前期, $22.7 \pm 3.2ng/ml$, $243.1 \pm 10.3pg/ml$, 黄体期, $23.7 \pm 2.9ng/ml$, $156.4 \pm 35.4pg/ml$ と, E_2 は排卵前期と黄体期で有意に上昇しているが, レプチン値は有意な変動を認めなかった. 一方, 排卵誘発周期のレプチンと E_2 は, 卵胞期, $28.8 \pm 3.7ng/ml$, $24.5 \pm 3.2pg/ml$, 排卵前期, $39.2 \pm 4.3ng/ml$, $660.1 \pm 189.4pg/ml$, 黄体期, $45.3 \pm 4.6ng/ml$, $514.4 \pm 167.6pg/ml$ であり, レプチンは E_2 同様排卵前期及び黄体期において有意に上昇していた. 【結論】排卵誘発時などかなり E_2 が高値を示す場合, レプチン産生が増加する可能性が考えられる.

7. 肥満に伴う排卵障害患者における内分泌環境の特徴

～特に, メラトニンと性腺系ホルモンとの関連性について～

○林 和俊, 森岡信之, 岡谷裕二

相良祐輔 (高知医大産婦)

【目的】単純性肥満に伴う排卵障害例を対象に, 夜間Melatonin(M)分泌と血中Estradiol(E_2), LH律動分泌及びProlactin(P)分泌との関連性につき検討した. 【方法】PCOを除く肥満排卵障害例(A群: 無排卵周期症6例, B群: 第1度無月経10例)と正常月経9例(N群)に, 消退性出血6～9日目, 21～6時の暗条件下に2時間毎に採血しM, Pを測定した. 13～18時及び22～3時に15分毎に採血しLHを測定した. MはHPLC法で, E_2 , P, LHはRIA法で測定した. 【成績】1) Body mass indexはN群に比しAB両群とも有意に高値であった. 2) E_2 値はN群: $33.1 \pm 3.8pg/ml$, A群: 35.5 ± 3.4 , B群: 19.5 ± 6.3 とB群が有意に低値であった. 3) Mpeak値はN群: $118.6 \pm 21.1pg/ml$, A群: 102.8 ± 25.4 , B群: 165.5 ± 27.1 とB群が有意に高値で, A, B両群の E_2 -Mpeak値間には有意の負の相関を認めた. 4) LHpulse頻度は3群とも昼間に比べ夜間に減少したが, 3群間ではB群で夜間の頻度に低下傾向を認めるのみであった. 5) 夜間P分泌は3群とも亢進したが, B群が他の2群に比し有意の分泌亢進を示した. P-M分泌間には正の相関を認めた. 【結論】単純性肥満排卵障害例の夜間M分泌は E_2 値の低下度に応じ亢進したが, LH律動分泌を抑制する程高度ではなかった. 一方, M分泌の亢進がP分泌をより亢進させ, 排卵障害を更に助長する可能性が示唆された.

8. 正常血糖クランプ法を用いたPCOS患者のインスリン抵抗性

○福持光男, 岡田典子, 山田正代
松崎利也, 安井敏之, 東敬次郎
苛原 稔, 青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】最近PCOSの病態に糖代謝異常の関与が示唆され、欧米婦人のPCOS患者でインスリン抵抗性を認めることが報告されている。しかし本邦婦人での検討は少ない。そこで今回我々は、人工臓器を用いて、PCOS患者におけるインスリン抵抗性を直接的に検討した。【方法】非PCOS患者($n=8$, 29.5 ± 2.4 歳, $BMI=23.2 \pm 4.6$), 及びPCOS患者($n=10$, 27.5 ± 4.1 歳, $BMI=23.8 \pm 5.7$)について、正常血糖クランプ法にてインスリン抵抗性の指標であるブドウ糖注入速度(gulucose infusion rate :GIR)を測定した。【結果】GIRは、非PCOS($GIR=13.4-0.33BMI$, $r=0.79$, $p<0.05$), PCOS($GIR=13.6-0.38GMI$, $r=0.83$, $p<0.01$)ともに、BMIと有意な負の相関を示した。両者間には有意な差は認められなかったが、PCOSの方が非PCOSに比べてGIRが低い傾向にあった。又、PCOS患者では、GIR、空腹時インスリン及び、75g OGTT時の Σ インスリンとのいずれの指標でも、非PCOS患者に比較してインスリン抵抗性を認める例が多かった。【結論】欧米婦人と同様、本邦婦人のPCOS症例においても、肥満症例を中心に糖代謝異常やインスリン抵抗性を示す症例が多いことが示唆された。

9. 顆粒膜細胞腫の合併が子宮内膜症の進行および子宮筋腫の発生に関与したと思われる不妊症患者の1症例

○栗岡裕子, 高橋健太郎, 尾崎智哉
神農 隆, 宮崎康二 (島根医大産婦)

症例は42歳。31歳の時に当科で不妊症の精査を施行。基礎体温は2相性であり、卵胞期初期のホルモン値も正常であった。術前のHSGで双角子宮が認められたため、腹腔鏡施行。両側付属器は正常であったが双角子宮とrevised AFS分類Ⅰ期の子宮内膜症性病変が腹膜に認められた。その後、人工授精を試みるも妊娠に至らず、治療を断念していた。40歳ごろから、月経不順、不正出血、腹痛を伴うようになり、当科を再び受診。内診、超音波断層法で多発する子宮筋腫と両チョコレート嚢胞と診断した。MRIでは子宮筋腫と右側チョコレート嚢胞、左付属器領域の腫瘍は筋腫の赤色変性が疑われた。術前腫瘍マ-

ーカーは正常で、ホルモン値はDay38でLH8.2mIU/ml, FSH0.98mIU/ml, E_2 は474.7pg/mlであった。平成8年12月24日、腹式単純子宮全摘術、両側付属器切除術を施行した。術後診断は多発する子宮筋腫と右卵巣にはチョコレート嚢胞、左卵巣には顆粒膜細胞腫が合併しており、子宮内膜症はrevised AFS分類Ⅲ期であった。術後、PVP(pepleomycin, vinblastine, cisplatin)3コース施行し、現在外来follow中である。本症例は子宮内膜症の進行度のnatural historyから考えると急速な進展を示したので、顆粒膜細胞腫のestrogen effectが約11年の間に子宮内膜症の進行および子宮筋腫の発生に何らかの影響を及ぼしたと推察された。

10. 子宮内膜症活動性病変と腹水中サイトカイン濃度

○伊藤雅之, 江夏亜希子, 永野順恵
津戸寿幸, 光成匡博, 吉岡宏記
谷口文紀, 岩部富夫, 谷川正浩
原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

【目的】子宮内膜症患者腹水中に存在するサイトカインが妊孕能低下を惹き起こすことが示唆されている。子宮内膜症の赤色表在性病変と腹水中に存在するサイトカイン(IL-6, IL-8, $TNF\alpha$)濃度との関連の有無を検索し、サイトカインが妊孕能に及ぼす影響を知ることを本研究の目的とした。【方法】不妊原因精査のため腹腔鏡検査を施行した際に腹水を採取した40例を対象とした。子宮内膜症をR-AFS分類によって評価するとともに、gland-like lesion, red flame-like lesion, red vesicles等の赤色活動性病変をその存在と数によりスコア化した。腹水中のサイトカイン濃度はELISA法で測定した。【成績】40例中24例に子宮内膜症が存在した。腹水中のIL-6, IL-8および $TNF\alpha$ 濃度は子宮内膜症患者において有意に高かった。サイトカイン濃度とR-AFS分類との間に相関は認めなかったが、活動性病変スコアが高くなるに従ってサイトカイン濃度は高値となった。【結論】内膜症患者における妊孕能低下は活動性病変と関連したサイトカインによって惹き起こされる可能性が示唆された。

11. 子宮内膜症由来間質細胞におけるinterleukin-6の遺伝子発現と産生

○津戸寿幸, 原田 省, 江夏亜希子
伊藤雅之, 永野順恵, 光成匡博
谷口文紀, 岩部富夫, 谷川正浩
寺川直樹

(鳥取大産婦)

【目的】子宮内膜症活動性病変を有する患者腹水中には高濃度のInterleukin-6(IL-6)が存在し、妊孕能低下に関与することを明らかにしてきた。IL-6の主要な産生源は免疫細胞と考えられているが、本研究では子宮内膜症病変がIL-6遺伝子を発現し、IL-6を産生するか否かについて検討を行った。【方法】患者の同意のもと、手術時に摘出した子宮(10例)および卵巣チョコレート嚢腫(5例)から正所性内膜および異所性内膜間質細胞を分離培養し、IL-6遺伝子発現をRT-PCRにより検索した。培養間質細胞におけるIL-6発現を免疫染色にて検索した。それぞれの培養間質細胞をE₂(10~1000pg/ml), P₄(1~100ng/ml)あるいはTNF α (10~100pg/ml)の存在下あるいは非存在下に24時間培養し、培養上清中のIL-6をELISA法で測定した。【成績】子宮内膜間質細胞においては、増殖期および分泌期ともに5例中2例にIL-6遺伝子の発現がみられた。子宮内膜症では5例中4例にIL-6遺伝子の発現を認めた。培養上清中のIL-6濃度は、子宮内膜では検出レベル以下であったが、IL-6遺伝子を発現する子宮内膜症の3例においては、それぞれ220, 216, 776pg/ml/wellのIL-6産生を認めた。E₂, P₄およびTNF α の添加は正所性内膜のIL-6産生に有意な影響を及ぼさなかった。異所性内膜間質細胞においてE₂はIL-6産生に影響を及ぼさなかったが、P₄はIL-6産生を抑制し、TNF α はIL-6産生を有意に促進した。【結論】子宮内膜症由来の間質細胞はIL-6遺伝子を発現しIL-6を産生することを明らかにした。同時に、IL-6の産生はP₄やTNF α によって調節されることが示された。

12. 卵巣チョコレート嚢腫のGnRHaに対する反応性の予測

○大森一吉, 中塚幹也, 高田雅代
木村吉宏, 鎌田泰彦, 羽原俊宏
浅桐和男, 田淵雅子, 工藤尚文

(岡山大産婦)

上者郁夫 (岡山大放射)

卵巣チョコレート嚢腫は若年女性に好発し妊孕性

保存のため、根治的手術が困難な場合が多い。GnRHa治療が有効な症例もあるが、縮小が見られず核出術やEthanol注入が必要となることも多い。そこで今回、私達は各種parameterにより、卵巣チョコレート嚢腫に対するGnRHa治療の効果予測が可能か検討した。【対象・方法】初回治療としてGnRHa単独療法が施行された12症例、21嚢腫を対象とした。MRI施行後、GnRHa投与を開始し、経時的に経腔超音波検査にて嚢胞径を計測、血清CA125値を測定した。治療効果の評価は嚢胞径縮小、CA125値低下により行った。【結果】症例の年齢、両・片側性の差、治療前CA125値、治療前嚢腫径と嚢胞径縮小率、CA125値低下率との間に有意な相関は認められなかった。MRIでT1-WI high, T2-WI highの嚢腫とT1-WI high, T2-WI lowの嚢腫に分けて検討すると、前者は後者に比して嚢胞径縮小率が有意に高かった。また、症例別でもT1-WI high, T2-WI highの嚢腫を有する症例の方が、T1-WI high, T2-WI lowの嚢腫を有する症例よりCA125値の低下率も大きかった。【考察】卵巣チョコレート嚢腫のGnRHaによる治療効果の予測には超音波検査や血清CA125値よりもMRI検査が有意義であると考えられた。縮小が予測されない場合、他の治療法の選択も考慮すべきであろう。

13. 子宮筋腫核出術による妊娠成功例の不妊因子に関する検討

○田村貴央, 牛越賢治郎, 山田正代
國見幸太郎, 前川正彦, 安井敏之
東敬次郎, 苛原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】子宮筋腫核出術(以下核出術)により妊娠した不妊患者において不妊因子を調査し、不妊治療としての核出術の有用性について検討した。【方法】平成4年1月から平成9年5月までに核出術を施行した不妊婦人(30例)のうち術後に妊娠した16例において、①妊娠率、②筋腫核の大きさと数、③卵管因子の改善、④術前の子宮内膜組織診、⑤子宮内膜症の頻度について検討した。【結果】①術後妊娠率は53.3%(16/30例)で、術後1年以上観察しえた例では64.0%(16/25例)であった。②摘出した筋腫核の最大径、個数の平均値は妊娠群(6.4cm, 8.4個)と非妊娠群(7.6cm, 7.2個)で差はなかった。③核出術の前後に施行したインジゴカルミン疎通試験の結果から23例中2例(8.7%)で卵管の機械的閉塞を解除できたと考えられた。④術前の子宮内膜診で組織学的黄体機能不全を認めた症例の頻度(40.0%)は子宮筋腫の無い

不妊患者(43.0%)と差はなかった。⑤妊娠例における子宮内膜症の頻度(46.7%)は非妊娠例(21.4%)よりも高い傾向があった。【結論】核出術は不妊治療として高い有効性を有していた。これは卵管因子の改善および術中に併用した子宮内膜症に対する治療などによると考えられた。

14. 妊娠例における子宮内膜に関する検討

○新谷恵司, 高取明正, 小川達博
(広島赤十字・原爆病院産婦)

【目的】妊娠の成立の場として重要な子宮内膜は、各種不妊治療によりその状態を変化させることはよく知られている。その子宮内膜と治療の関連について、妊娠例を対象に検討した。【方法】当科不妊外来において、妊娠(子宮内にGSを確認)の成立した6例を対象とした。そのうち、妊娠成立周期7周期(妊娠継続5周期、流産2周期)と非妊娠周期18周期について子宮内膜厚、子宮内膜パターンなどを検討した。【結果】その結果、排卵誘発なしの周期(無治療周期)で妊娠の成立した3周期では排卵時の子宮内膜厚は平均10.3mm(9~13mm)、クロミッド投与(治療周期)にて妊娠成立した4周期では排卵時の子宮内膜厚は平均で9.2mm(7~13mm)であった。同一症例の非妊娠周期の子宮内膜厚は無治療周期で平均8.2mm(5~15mm)、治療周期で平均7.9mm(5~10mm)と非妊娠周期では内膜厚は薄かった。しかし、同一症例では治療の有無で子宮内膜の厚さには一定の傾向がみられなかった。【結論】今回の検討より、妊娠の成立した周期では排卵時の子宮内膜厚は非妊娠周期より厚かった。また、排卵誘発を行うと妊娠周期も非妊娠周期も内膜厚は非治療周期より薄くなった。

15. 子宮頸管粘液中のmigration inhibitory factor-related protein 8(MRP 8)の同定

○國見幸太郎, 滝川稚也, 山本哲史
吉川修司, 前川正彦, 鎌田正晴
青野敏博 (徳島大)
儀間裕典 (儀間クリニック)

【目的】子宮頸管は女性内性器における局所免疫の場としてきわめて重要な部位である。今回、頸管粘液中に、マクロファージなどの免疫細胞あるいは上皮細胞が産生する炎症マーカー、migration inhibitory factor-related protein 8(MRP 8)の存在することを初めて明らかにした。【方法】排卵期の不妊症患者より同意を得た上で頸管粘液を採取し、100mlの頸管粘液から0.66M NaClを用いた塩溶および90%硫酸を用

いた塩析等にて部分精製を行い、N末端アミノ酸配列を決定した。また同意を得た上で不妊女性より排卵期および排卵期の頸管粘液を採取し、ELISA法にてMRP 8を測定した。【結果】1)還元条件下のSDS-PAGEで分子量12kDの蛋白を認めた。2)N末端より20残基までのアミノ酸をホモロジー検索をしたところMRP 8と完全に一致していた。3)頸管粘液中に高濃度のMRP 8を認めた。また7例中5例(71%)では排卵期に頸管粘液MRP 8濃度が上昇していた。【結論】頸管粘液中に、分子量12kDのMRP 8の存在することを初めて明らかにした。また、MRP 8には抗細菌作用も証明されており、女性内性器における局所免疫に重要な役割を果たすと考えられる。

16. クラミジア感染に伴う卵管機能の変化：卵管通気検査の数量化による評価

○羽原俊宏, 中塚幹也, 木村吉宏
鎌田泰彦, 高田雅代, 浅桐和男
工藤尚文 (岡山産大産婦)

クラミジア感染症は増加傾向にあり、不妊の主要原因の一つである。クラミジア感染の診断は、クラミジア抗体価、抗原、DNAの検出により行われるが、同時に卵管機能の評価も必須である。私達は、卵管通気検査での通気圧波形を数量化し解析することでクラミジア感染に伴う卵管機能の変化を検討したので報告する。【対象・方法】クラミジア抗体検査後に卵管通気検査を施行した73例をA群：抗体陰性、B群：IgA陽性、C群：IgGのみ陽性の3群に分けて検討した。B、C群は治療後、卵管通気検査を施行した。通気圧波形の初期圧、平均圧、振幅、波動数について数値化した。【結果】初期圧はA群78.3±47.8mmHgでB群との有意差はなく、C群はB群と比較し有意に低値を示した。振幅も同様にA群24.8±11.8mmHgでB群と差はなく、C群は両群に比し有意に低値であった。平均圧はA群の53.9±22.6mmHgに比しB群が有意に高値を示し、C群は反対に有意に低値であった。振動数は各群において有意差は認められなかった。【考察】比較的新しいクラミジア感染と考えられるB群の初期圧、振幅はA群と有意差はないが、平均圧は有意に高値をとった。IgGのみ陽性となったC群では初期圧、振幅、平均圧ともに有意に低値を示し、これらはクラミジア感染卵管の経時的な機能変化を反映していると考えられた。

17. FTカテーテルによる卵管鏡下卵管形成術の治療経験

○矢野浩史, 矢野知恵子, 大橋いく子
久保敏子 (矢野産婦)

卵管性不妊に対してFTカテーテルによる卵管形成術を行ったので、その治療成績につき報告する。
【対象】HSGにより両側あるいは片側の卵管閉塞と診断された10症例16卵管である。【方法】FTカテーテルを経子宮的に卵管口より卵管内腔へ挿入し、卵管鏡下に卵管形成術を行った。なお、今回は全症例においてFTカテーテルが卵管内腔を通過しやすい様に腹腔鏡下に卵管を把持しながら行った。卵管周囲癒着や子宮内膜症などの病変が存在する場合は、FTカテーテルを行う前にKTPレーザーにより治療を行った。【結果】10例中6例が両側卵管閉塞であった。3例は両側の卵管を、2例は片側の卵管の通過性を回復させる事に成功した。1例は両側とも卵管穿孔を来とし、通過させる事ができなかった。片側卵管閉塞は4例であり、2例が通過に成功した。対側の閉塞していない卵管にもFTカテーテルを挿入して内腔の拡張、洗浄を行った。7症例10卵管において通過性が回復した。通過成功率は症例あたり70% (7/10)、卵管あたり62.5% (10/16)であった。両側及び、片側卵管閉塞のそれぞれ1例ずつ、計2例に術後3ヶ月以内に自然妊娠が成立した。【結論】FTカテーテルによる卵管形成術は卵管性不妊に有用であり、IVF-ETの前に試みる価値のある治療と思われた。

18. 性分化異常患者における腹腔鏡下手術の経験

○上田克憲
(広島大周産母子センター)
岡野真一郎, 大濱絃三
(広島大周産母子センター産婦)

われわれは、第27回(平、元)の本学会において、原発無月経や性分化異常の患者における腹腔鏡検査の有用性を報告するとともに、腹腔鏡下に性腺摘出術を行いうる可能性を述べた。その後、機器や手技の進歩により腹腔鏡下手術は急速に普及し、性分化異常患者への応用も報告されている。今回、精巣性女性化症候群患者に対して腹腔鏡下性腺摘出術を実施する機会を得たので、その内容を報告する。【症例】20歳、未婚。家族歴として2人の従姉妹が精巣性女性化症候群の診断、開腹手術を受けている。16歳時に原発無月経を主訴に当科受診。乳房発育を認めるが、膣は盲端に終わり陰毛を欠き、そけい部、外

陰部に腫瘍は触知せず。染色体核型は46, XY, テストステロンは男性の正常値。以上から、腹腔内に性腺(精巣)を有する完全型精巣性女性化症候群と臨床診断した。

平成9年8月、腹腔鏡下手術を行ったところ、子宮、卵管は欠損し、骨盤壁の左右内そけい輪付近に超母指頭大の性腺を認めた。性腺周囲の骨盤腹膜と結合組織を切開して十分な可動性を得た後、エンドルーブで茎部を結紮し両側の性腺を切除した。摘出性腺はエンドポーチに収納し、10mm径のトロッカー穿刺孔から腹腔外に取り出した。病理診断はSertoli cell tumorであった。患者は翌日から歩行を開始し、術後3日目に退院した。

19. 男性不妊症患者に対する精索静脈瘤手術の治療成績

一低位結紮術と腹腔鏡下手術の妊娠率の比較一

○渡部昌実, 永井 敦, 秋山道之進
真鍋和史, 岡部浩典, 公文裕巳
(岡山大泌尿)

【目的】精索静脈瘤手術には種々の方法が存在するが、最近では低位結紮術が主流になりつつある。今回我々は、低位結紮術の術後妊娠率に関して腹腔鏡下手術と比較し、統計学的検討を行ったので報告する。【対象および方法】不妊を主訴に当科外来を受診し手術を行った59例を対象とした。内訳は低位結紮術が26例(以下A群)、腹腔鏡下手術が33例(以下B群)であった。【結果】患者年齢、妻年齢、不妊期間に関しては両群で有意差を認めなかった。術前testosterone値、LH値、FSH値および両側精巣容量に関しては、両群間での有意差を認めなかった。精子濃度はA群術前 $1789.0 \pm 2334.4 (\times 10^4/\text{ml})$ 、A群術後3カ月 $2093.8 \pm 2296.9 (\times 10^4/\text{ml})$ 、B群術前 $2194.4 \pm 2221.1 (\times 10^4/\text{ml})$ 、B群術後3カ月 $4236.5 \pm 3971.1 (\times 10^4/\text{ml})$ であり、両群共に有意に改善した。運動率は両群とも治療前後で有意差を認めなかった。Kaplan-meier法での術後2年妊娠率は、A群58.7%、B群40.4%であり、両群妊娠例19例中8例に生殖医療技術が施された。【結論】低位結紮術は腹腔鏡下手術に比してより低侵襲性であり、術後妊娠率が同等であったことより、本法は精索静脈瘤に対して有用であると思われた。

20. 腹腔鏡にて確認し得た単睾丸症例

○佃 文夫, 黒田 功, 桑田善弘
竹中生昌 (香川医大泌尿)

目的: 今回、腹腔鏡にて精巣の有無を確認し得た単睾丸症例を経験したので、その有用性について報告する。

患者は、36歳男性で結婚後3年間の不妊を主訴に来院。

触診にて、左精巣を認めず、右精巣は代償性肥大のためか30ml以上であった。超音波・MRIによる検索にても鼠径部および腹腔内に明らかな停留精巣は認めなかった。精液検査では、精子数5000万/ml、運動率75%で、1視野に10～20個の白血球を認めた。内分泌検査では、LH1.5(1.8～5.2)mIU/ml、FSH3.1(2.9～8.2)mIU/ml、テストステロン542ng/dlとLHの軽度の低下を認めるのみだった。腹腔鏡検査は、全身麻酔下に臍直下の小切開でopen laparoscopyにて施行した。右側では正常な精管と精巣動静脈を認めたが、左側は外腸骨動脈付近で盲端に終わる精管様組織を認めるのみで停留精巣・血管系は明らかではなかった。盲端部の組織を一部採取し検査を終了した。病理組織診では、不完全な精管組織と神経、筋肉などを認めたが、精巣組織は認めなかった。精液所見からは妊娠可能と思われるが、現在妻とともに不妊の原因を検索中である。

単睾丸症は、臨床的に時として見ることがあるが、その確定診断は容易ではない。今後、腹腔鏡検査はnonpalpable testisに対する臨床診断に有用であると思われる。

21. 精子抗原rSMP-Bの精子不動化抗体対応抗原としての可能性の検討

○吉川修司, 國見幸太郎, 滝川稚也
山本哲史, 前川正彦, 鎌田正晴
青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】精子抗原rSMP-Bの精子不動化抗体の対応抗原としての可能性を検討する。【背景】rSMP-Bは70kDの家兎精子膜表面タンパク質で、家兎の他ヒト及びマウス精子膜表面に存在する。同抗体は受動免疫によりマウスを不妊とし、さらにrSMP-B抗原の親水性部分の一部をペプチド合成したrSMP230は能動免疫によりラットに不妊を引き起こす。今回rSMP-Bが不妊患者血中に見出される精子不動化抗体の対応抗原である可能性を検討した。【対象と方法】1. 抗精子抗体陽性不妊患者79例、抗精子抗体陰性不妊患者42

例、妊婦・褥婦30例について血清中の抗rSMP230抗体活性をELISA法を用いて測定した。2. 合成ペプチドを家兎に免疫し抗rSMP230抗体を作製した。3. 同抗体のヒト精子への作用及びヒト卵子を用いた透明帯貫通試験への影響を検討した。【結果】1. 抗精子抗体陽性血清における抗rSMP230抗体活性(0.7 ± 0.4)は他群(抗精子抗体陰性血清 0.5 ± 0.2 、妊婦・褥婦血清 0.3 ± 0.2)に比し有意($p < 0.01$)に高値であり、抗体陽性頻度(28%)も有意に高率であった。2. 抗rSMP230抗体は補体存在下でヒト精子の不動化を引き起こした。3. 抗rSMP230抗体は透明帯貫通試験を著明に抑制した。【結論】rSMP-Bは精子不動化抗体の対応抗原である可能性が示唆された。

22. 川崎医科大学付属病院泌尿器科不妊外来における無精子症の検討(1981年～1997年)

○徳永 葉, 伊東史雄, 田中啓幹
(川崎医大泌尿)

1981年3月から1997年12月の間に当科不妊外来において無精子症と診断され、精査加療した症例の臨床統計を報告する。症例は174例、そのうち染色体異常を21例(47.XXY 16例、46.XY/47.XXY 1例、46.XYq 1例、46.XYh(3P21) 1例、45.X/46.XYq 1例)、閉塞性無精子症を40例(両側精管欠損症 18例、精管閉塞症 16例、精巣上体閉塞症 4例)に認めた。特に閉塞性無精子症については、機械的閉塞(両側鼠径ヘルニア術後、両側精管結紮術後)と先天的精路通過障害(両側精管欠損症、精巣上体閉塞症)の2病因の点からその手術方法および術後成績について報告する。

23. TESE/ICSIにおけるpentoxifyllineによる精巣内生存精子選別法の臨床的有用性

○吉本 勲, 福井敬介, 北川博之
伊藤昌春 (愛媛大産婦)

【緒言】精巣内精子を用いたICSIにおいてviable-spermの選別は受精率向上に重要である。本研究は患者の同意を得てpentoxifyllineの精巣内精子に対する運動性賦活作用を検討すると共に同方法のICSI受精率、妊娠率、生産率に対する有用性を検討することを目的とした。【対象と方法】平成7年7月～平成10年3月までに精巣内精子を用いICSIを施行した非閉塞性無精子症19症例を対象とした。精巣組織より細胞浮遊液を作成し、これをpentoxifylline添加群(1mg/ml)と非添加群に分け、倒立型顕微鏡にて1視野あたりの平均運動精子数を算定比較した。またpentoxifylline処理にて運動精子を注入した9症例(90卵子)と未処理にて

精子をrandom注入した10症例(82卵子)の受精率, 妊娠率, 生産率について比較した。【結果】pentoxifylline添加群の平均運動精子数は 5.3 ± 11.5 個/視野であり, 非添加群の 0.4 ± 0.5 個/視野に比して有意に高値を示した。pentoxifylline処理にて生存精子を注入した卵受精率, 対周期妊娠率, 対周期生産率(含む継続妊娠)はそれぞれ60.3% (44/73), 67.6% (6/9), 44.4% (4/9)であり, random注入の28.6% (20/70), 20.0% (2/10), 0% (0/10)に比して有意に高率であった。【結語】精巣内精子のpentoxifylline処理はviable精子の運動性を賦活化させ, これにより精子選別を容易にすることが明らかとなった。また生存精子を用いることで妊娠率のみならずその後の妊娠予後も改善されることが示唆された。

24. 非閉塞性無精子症に対するTESE-ICSIの検討

○大橋いく子, 久保敏子, 矢野浩史

(矢野産婦)

小田剛士

(小田ひ尿)

非閉塞性無精子症に対して凍結保存精巣精子を用いたTESE-ICSIを行い, その臨床成績につき検討したので報告する。

【対象】1996年9月から1998年5月までにTESE(精巣内精子回収法)を行った非閉塞性無精子症14症例を対象とした。【方法】TESEを行った後, 精子が確認されたら凍結保存を行った。採卵当日に凍結精子を融解してICSIに供し, 良好胚が得られた場合, 胚移植を行った。【結果】TESEを行った14例の内9例に精子が回収でき, 症例あたり精子回収率は64.3% (9/14)であった。その内6例に運動精子が確認され, 症例あたりの運動精子回収率は42.8% (6/14)であった。残り5例の内, 3例には円形精子細胞のみが存在し, 2例はセルトリ細胞のみであった。運動精子が得られた5例9周期に対してICSIを行ったところ5例7周期に良好胚が得られ移植を行った。症例あたりの移植率は100% (5/5), 周期あたり移植率は77.8% (7/9)であった。妊娠は3例4周期に成立した。症例あたり妊娠率は60% (3/5), 移植周期あたり妊娠率は57.1% (4/7)であった。一方, 運動精子が得られなかった2例3周期にICSIを行い, 1例2周期に移植を行ったが妊娠に至らなかった。【結論】非閉塞性無精子症に対する凍結保存精巣精子を用いたTESE-ICSIは運動精子が回収された場合, 特に有効な治療と思われた。

25. 電解質除去培養液で冷蔵保存したマウス精子の受精能に関する検討

○中坂尚代, 檜尾健二, 小松淳子

中川浩次, 山野修司, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】マウス精子を電解質除去培養液(electrolyte-free solution, EF solution)中に冷蔵保存することで精子の運動率ならびに先体を受ける影響について検討し, また受精能ならびに胚発育能について検討した。【方法】①マウス精子をEF solutionまたはmHTF中で14日間4℃で保存し, 運動率を連日測定した。②冷蔵保存前後の先体の状態をCTC染色にて評価した。③冷蔵保存精子を用いて体外受精を行い, 胚盤胞への発育率を検討した。【結果】①EF solution中で冷蔵保存した場合, 運動率は4日目57.7%, 7日目45.2%, 14日目12.9%で, mHTFの28.2%, 7.3%, 0%に比べ有意に高い値を示した($p < 0.01$)。②mHTFで2日間冷蔵保存した精子ではBパターン32.4%, ARパターン22.4%と新鮮精子の9.2%, 2.8%に比して有意に高い値($p < 0.01$)を示したが, EF solutionではBパターン11.0%, ARパターン6.2%と新鮮精子と差がなかった。③EF solution中で2, 4日間冷蔵保存した場合, 受精率は各79.0%, 83.2%と対照の79.6%と差がなかったが, 胚盤胞への発育率は4日冷蔵精子では38.4%と対照の48.6%に比べ有意に低率であった($p < 0.05$)。【結論】①マウス精子をEF solution内で保存した場合, 低温はcapacitationを促進しなかった。②EF solution内で冷蔵保存した精子は, 長期保存では受精能や胚発育能が傷害される可能性が示唆された。

26. ウシおよびヒト精子ならびに精子抽出液の顕微注入による体外成熟ウシ卵子の活性化

○沖津 摂, 安部和美, 杉原由美

栗井啓子, 國方建児, 三宅 馨

(三宅医院)

山野修司, 青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】Sperm Factor(SF)は精子内に存在する卵子活性化物質であるが, ウシではその存在は確認されていない。本実験は, ウシ精子のSFの存在を明らかにすることを目的に行った。【方法】ウシ卵巣より卵母細胞を採取し, 22~24時間成熟培養(38.5℃, 5% CO₂ in air)した。裸化後M-II期卵子を選抜し, 650xgで5分間の遠心処理後, 不動化ヒト, ウシ精子あるいは両者の精子抽出液(約10pl)を顕微注入し

た。注入後卵子を18~20時間培養し、核相を調べた。精子抽出液は以下の方法で得た。ウシ凍結融解精子およびヒト新鮮射出精液を遠心、洗浄後、1% BSA添加HTF内で濃縮(それぞれ8~13億sperm/ml, 6~8億sperm/ml)し、液体窒素中で凍結した。サンプルを室温にて融解し、4℃に氷冷した超音波発生装置内で精子細胞を1分間粉碎後、1時間室温放置し、MWCO=100Kの限外濾過膜で細胞残渣を遠心除去した。【成績】1)ウシ精子注入群の卵子活性化率はウシSham注入群と比較して有意に高かった(67.8% vs 43.0%, $P<0.05$)が、ヒト精子注入群(40.0%)とヒトSham注入群(22.9%)の間には差はなかった。2)ウシ精子抽出液注入群における卵子活性化率(75.9%)は、Sham注入群(20.4%)、ヒト精子抽出液注入群(14.8%)と比較し、有意($P<0.01$)に高率であった。【結論】以上の結果、ウシ精子内にはSFが存在しており、またSFの卵子活性化作用の発現には種特異性がある可能性が示唆された。

27. ICSI後未受精と判定されたヒト卵に対する活性化の効果

○中川浩次, 中坂尚代, 小松淳子

檜尾健二, 山野修司, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】我々は、ヒト卵で第2極体(2ndPB)の放出を伴ったhaploidの単為発生胚を高率に形成する活性化法を報告した。今回、ICSI後未受精と判定された卵に対して同様の方法で活性化処置を施しその効果を検討したので報告する。【方法】ICSI施行後16~18時間後に未受精と判定された卵を患者の同意を得た後実験に供した。①50 μ g/mlのHoechst 33342中で30分間染色し、蛍光顕微鏡下にM II plate 及び精子の有無を観察した。②5 μ M Ca ionophore中で5分間処理した後、10 μ g/mlのPuromycin中で5時間培養し、引き続き4%HSA含むHTF中で13時間培養した。培養終了後前核(PN)形成および2ndPB放出の有無をノルスキー型顕微鏡で検討し、PNの存在した卵を活性化卵と判定した。活性化された卵は15%患者血清含HTF中で引き続き24時間培養し、分割の有無を検討した。【結果】①M II plateが存在するかまたは終期の未受精卵29個のうち23個(79.3%)に精子を認め、そのうち14個(48.3%)で精子頭部の膨化が認められた。②32個の未受精卵に対して卵活性化を行った結果、25個(78.1%)の卵が活性化され、10個(33.7%)は2PN2PB、13個(40.6%)は1PN2PBを示し、2個(6.3%)はmulti PNであった。2PN2PBの卵6個のうち3個

は2~4cellへと分割した。【まとめ】ICSI後に未受精と判定した卵を活性化することにより約3分の1が2PN2PBとなり、そのうち半分が分割した。

28. 配偶者間人工授精の妊娠率

○林 伸旨

(岡山二人クリニック)

【目的】配偶者間人工授精の妊娠率から実施方法を検討した。【方法】当院にて1996年5月から1997年12月に、洗浄濃縮精子液の子宮腔内注入をおこなった279例:737周期を分析した。【結果】74例:78周期に妊娠成立し、妊娠率は対症例26.5%、対周期10.6%であった。年齢別の妊娠率は、35歳未満($n=466$)13.7%、35歳以上($n=271$)5.2%であった。男性因子有無による妊娠率は、なし($n=159$)16.4%、あり($n=578$)9.0%であった。実施回数別の妊娠率は、1回目($n=283$)13.1%、2回目($n=176$)13.1%、3回目($n=110$)6.4%、4回目($n=67$)7.5%、5回目($n=39$)2.6%で、妊娠例の85.9%は3回目までに妊娠していた。卵胞刺激方法別の妊娠率は、なし($n=149$)9.4%、セキシピッド($n=181$)9.4%、クロミッド($n=329$)9.7%、hMG($n=74$)20.3%であった。刺激なし+セキシピッド+クロミッド例の実施時期決定方法別の妊娠率は、LHサージ確認($n=317$)11.7%、LHサージ確認できず前日hCG注射($n=144$)9.7%、LHサージ確認できず当日hCG注射($n=168$)7.1%であった。【結論】人工授精は、35歳以上では妊娠率が低下することから、卵胞刺激方法、実施時期設定方法を考慮し、3回までを原則として早期に実施することが望ましい。

29. IVF-ET治療成績に及ぼす年齢因子の検討

○柳谷千絵

(鳥取大生命)

谷本司砂, 加藤由加里, 岩浅ゆき穂

見尾保幸

(ミオ・ファティリティ・クリニック)

【目的】体外受精・胚移植(IVF-ET)が不妊症の重要な一治療法として定着している中で、女性側の年齢因子はその治療成績に影響を及ぼす不可避な問題として注目されている。そこで、過去4年間のIVF-ET治療成績の後方視的検討から、年齢因子が及ぼす影響について検討したので報告する。【方法】1993年11月より1997年12月までにIVF-ETを行った339症例、682周期を対象とした。対象症例を、1群:30歳未満($n=39$)、2群:30歳以上35歳未満($n=136$)、3群:35歳以上40歳未満($n=126$)、4群:40歳以上($N=38$)に分け、各群間で採卵数、受精率、受精卵のGrade(Veek分類)、着床率、妊娠率、流産率について検討した。【結果】

採卵数は、1群 11.2 ± 7.2 個(Mean $\pm$ SD)から4群 4.1 ± 2.8 個へと加齢と共に明らかに低下した($P < 0.01$)。受精率は各群ともに70%前後、Grade 1の形態良好胚の割合も30%内外でいずれも差を認めなかった。着床率は、1群から3群に比して4群で有意に低下し($P < 0.01$)、妊娠率も同様の結果であった。流産率は明らかに加齢と共に増加した。【結論】年齢因子はIVF-ETの受精率、受精卵のGradingには影響を与えないが、Folliculogenesis、子宮内の着床環境、さらに胚のQualityに大きく関与することが示された。

30. 当院における卵細胞質内精子注入法(ICSI)の臨床成績

○安部和美、杉原由美、粟井啓子
沖津 摂、國方建児、三宅 馨

(三宅医院 IVFセンター)

【目的】当院では、男性不妊症および通常の体外受精で受精しなかった症例に対し、ICSIを行っている。今回、我々は平成8年5月から平成10年4月までの間に当院にて施行した35例(62症例)について報告する。【方法】対象の平均年齢は 35 ± 4.9 歳、GnRHαとhMGを併用したlongあるいはshort protocol法により卵巣刺激後、経腔的に採卵を行った。その後卵を前培養し、第一極体が認められたM-II期卵を選抜、ICSIを施行した。なお、運動精子はswim up法にて回収、パーコールは使用していない。【結果】総回収卵数は537個(平均回収卵数 8.7 ± 6.5 個)、うち432個がM-II卵であった(80.4%)。432個のM-II卵に対してICSIを施行し、受精率は76.2%(329/432)、分割率は98.3%(285/290)であった。52周期に胚移植を行い(5周期はsevere OHSSのriskがあったため全胚凍結を行った)16周期に妊娠が成立し、移植当たりの妊娠率は30.8%であった。妊娠16例中5例は流産(流産率31.3%)4例は多胎妊娠(全て双胎、多胎率25%)であった。【結果】男性不妊症や通常の体外受精で受精しない症例にICSIは非常に有効な治療法であることが示唆され、今後、我々は脊損などの射精障害や閉塞性無精子症の症例に対してもICSI導入を検討している。

31. ART反復施行例におけるAssisted hatchingの有用性

○加藤由加里、谷本司砂、岩浅ゆき穂
見尾保幸

(ミオ・ファティリティ・クリニック)

【目的】従来、ARTにおける透明帯肥厚例、菲薄子宮

内膜症例、そしてART反復施行症例などに対してAssisted hatching (AHA)の有用性が報告されている。そこで今回、ART反復施行例に対する着床率改善の手段としてAHAを試み、その成績を解析したので報告する。【方法】平成9年10月より平成10年4月までに当院においてARTを施行した症例のうち、形態良好胚の胚移植にもかかわらず妊娠に至らず、これまでに3回以上のART反復施行した27症例41周期に対してAHAを試みた。形態良好な2~6細胞期胚の3時方向より酸性Tyrode液を吹き付け、透明帯外層の1/6~1/4の範囲を溶解、菲薄化した。胚はAHA施行後約3時間の追加培養の後胚移植に供した。【成績】AHAを施行した症例の年齢は平均35.0歳(Range: 28~43歳)で、過去に行った胚移植は平均6.1回(Range: 3~11回)であった。ARTの内訳は、IVFが8症例9周期、ICSIが5症例6周期、融解胚移植が16症例26周期であった。形態良好胚102個にAHAを行い、妊娠率は29.6%/症例(8/27)、19.5%/周期(8/41)、着床率(GS数/移植胚数)は10.8%(11/102)であった。妊娠した8症例のうち7症例(87.5%)は初回AHA施行周期であった。また、妊娠した8症例の内訳は品胎1例、双胎1例、単胎6例であった。【結論】AHAは形態良好胚を有するART反復施行例に対して、妊娠率・着床率を向上させる有力な方法であることが示唆された。

32. 体外受精・胚移植における黄体期プロゲステロン膈坐薬投与の有用性

○吉本真奈美、絹谷正之、香月孝史
金子朋子、土田克憲、大濱紘三

(広島大産婦)

【目的】体外受精・胚移植(IVF-ET)において、胚移植後の黄体賦活に関してはこれまでに一定した見解はなく、施設ごとに様々な方法が行われている。当科では平成9年9月より胚移植後の患者に対してそれまでのhCG投与に加えてプロゲステロン膈坐薬の投与を開始した。今回その有用性および安全性を検討したので報告する。【方法】対象は平成9年9月より平成10年4月までに当科でIVF-ETを施行し、2個以上の胚を移植した37例である。プロゲステロン膈坐薬は1個あたりのプロゲステロンが150mgになるように作製した。プロゲステロン膈坐薬を採卵翌日から12時間毎に採卵数15日目まで投与した群(P群)と移植当日、2日後、5日後、8日後にそれぞれhCG 3000IUを筋肉注射にて投与した群(hCG群)とその両方を併用した群(P+hCG群)に分けて検討した。【結果】妊娠

率はP群が38.9%(7/18), hCG群が30.0%(3/10), P+hCG群が22.2%(2/9)とP群が最も高かった。一方プロゲステロン膣坐薬投与による副作用は2例(11.1%)に子宮腔部びらんからの少量の出血を認めたのみで投薬中止例はなかった。【結論】黄体賦活法としてプロゲステロン膣坐薬投与が有用であることが確認できた。また膣坐薬は自己投与が可能な点や注射のような疼痛がないことから患者の負担を軽減でき、積極的に使用していくべきと考えられた。

33. ダナゾール投与前後における体外受精・胚移植治療成績の比較

○中掘 隆, 玉井彦明, 梅岡弘一郎

岡田雅美, 本田徹郎, 高橋 晃

(倉敷中央病院産婦)

馬岡 陽

(小野レディースクリニック)

【目的】IVF-ETにおいて、形態良好胚を移植したにもかかわらず妊娠が成立しない症例に対するダナゾール投与の有効性が報告されており、今回これについて当科の症例を対象として検討した。【方法】当科にて1997年12月までにIVF-ET治療を施行し形態良好胚を1~8回(平均3.7回)移植したものの生産に至らなかった30症例を対象とし、ダナゾール(400mg/day)を約12週間経口投与したのち再度IVF-ET治療を施行した。投与前後における採卵数、受精率、移植胚数、形態良好胚(Veeck分類G1-2)の移植数、臨床妊娠率、生産率につき検討した。【結果】30症例の平均年齢は 34.9 ± 4.5 (Mean $\pm$ SD)歳であった。採卵数は投与前 8.3 ± 5.2 個、投与後 7.5 ± 4.5 個、受精率は投与前 $84.9 \pm 17.6\%$ 、投与後 $82.3 \pm 19.6\%$ 、移植胚数は投与前 3.0 ± 0.9 個、投与後 2.8 ± 0.9 個、形態良好胚移植数は投与前 2.1 ± 1.2 個、投与後 2.1 ± 0.8 個であり、有意差はなかった。臨床妊娠率は投与前10.0%、投与後40.0%($p < 0.01$)、生産率は投与前0%、投与後30.0%($p < 0.01$)で、いずれも投与後に高率であった。【結論】ダナゾール投与後に臨床妊娠率と生産率の向上が認められた。移植胚数及び形態良好胚移植数には有意差はなく、治療成績の向上は着床因子にある可能性が示された。原因不明の着床障害に対してIVF-ET治療前におけるダナゾール投与の有効性が示唆された。

34. 体外受精で良好胚移植を繰り返すも妊娠せず、リュープリンを使用したホルモン補充周期に凍結受精卵で妊娠した1例

○田口俊章, 岡田直子, 加藤千春

松ノ谷真智子

(鳥取県立中央病院産婦, 検査)

症例: 33歳 結婚 1月 11.2 育児希望にて初診。HSG: で左卵管周囲癒着を疑う。精液検査: 20×10^6 /ml運動率5%のためパコーラAHを施行し、2回目で6月妊娠する。左卵管膨大部流産のため、6月8日腹腔鏡下に左卵管切除術を施行。その後AHを7回繰り返すも妊娠せず、運動精子数が 3×10^6 /mlと少なく、体外受精の適応と考え、5.29 short法で第1回目の体外受精をし、4cellG1の受精卵を3個移植するも妊娠せず。10.16 short法で4cellG1の受精卵を3個移植するも妊娠せず。5月採卵12個中10個分割し、4cellG1の受精卵を3個移植し、7個凍結保存したが、その周期は妊娠せず。9月リュープリン(1.88)プレマリン、黄体ホルモンのホルモン補充周期で凍結受精卵(8cell以上G1 3個)を移植したが、妊娠せず。2月ニュープリン(1.88)、エストラダームTTS、黄体ホルモンのホルモン補充周期で凍結受精卵(8cellG1 3個)を胚移植し、3.13 妊娠反応陽性、3.192絨毛性双胎と診断。4.21現在両児のCRL33mm(10w2d相当)で順調である。

第43回 日本不妊学会九州支部会

日時: 平成10年11月22日(日) 午前9時~11時

場所: 第一ホテル(大分市)

1. IVF-ET周期におけるhMG投与開始日の血中FSH, LH, E₂測定とその意義

○松井尚彦, 川寄史子, 河野康志

植原久司, 宮川勇生 (大分医大産婦)

【目的】体外受精・胚移植(IVF-ET)周期においてhMG投与開始日の血中FSH, LH, E₂を測定し、妊娠への影響を検討した。【方法】対象は平成10年1月から7月までにIVF-ETを施行した28例とした。前周期の高温相7日目よりGnRHa 900 μ g/dayを連日投与し、月経周期の3日目よりhMG投与を行い、最大卵胞の平均径が18mmに達したらhCG投与、36時間後に採卵した。この周期のhMG投与開始日に血中FSH, LH, E₂を測定した。【成績・結論】28例中9例(32.1

%)が妊娠し、19例が妊娠しなかった。妊娠群と非妊娠群のFSH、LH、 E_2 の平均値は、妊娠群がそれぞれ6.3mIU/ml、4 mIU/ml、21.9pg/ml、非妊娠群が7.5mIU/ml、8 mIU/ml、53.4pg/mlであり、FSHとLHは両群間に差を認めなかったが、 E_2 は妊娠群が非妊娠群に比べて有意に低値であった。これらの結果は、hMG投与開始時のGnRHaの抑制効果および2次卵胞数が、妊娠へ影響をおよぼす可能性を示唆した。

2. IVF-ET待機中に妊娠成立した症例の検討

○岩政 仁、松浦講平、小野田親
永田康志、本田律生、田中信幸
岡村 均 (熊本大産科婦)

平成7年1月1日から平成9年12月31日までにIVF-ETを施行した283例の中で治療待機中に妊娠成立し児を得た5症例について検討を行った。5症例の妊娠成立はいずれも自然周期妊娠であった。その適応は男性因子が1症例、子宮内膜症が1症例、卵管因子が3症例であった。男性因子の程度は軽度で、最終IVF-ETの約6カ月後に妊娠が成立した。子宮内膜症症例はr-AFS 1期(4点)で、最終IVF-ETの次周期に妊娠成立が認められた。卵管因子の3症例はいずれも卵管周囲癒着を有する症例で最終IVF-ET後の次周期が1例、2周期後が2症例と治療後短期間で妊娠が成立している。5症例の妊娠予後はいずれも正期産であった。結論：IVF-ET待機中の妊娠率は283例中5症例(1.8%)と低い。卵管因子および子宮内膜症症例においてはIVF-ETが骨盤内の環境を改善する可能性が考えられた。

3. ヒト胚培養において培養液の組成の差が胚発育におよぼす影響について

○牛島千秋、広津留恵子、宇都宮隆史
(セント・ルカ産婦)

【目的】ヒト体外受精・胚移植のために使用される培養液にはさまざまなものが試みられているが、未だ最良と思われるものは確立されていない。今回我々は市販のHTFと当院作製HTF、および α -MEMについて胚発育におよぼす影響を比較検討した。【方法】胚移植後の余剰胚(発育不良胚)、異常受精卵を患者の同意のもとに使用した。受精後3日目の胚をそれぞれの培養液に移し、経過観察を行った。培養液には10%血清を添加した。【結果】発育不良胚の胚盤胞発生率は、市販HTFで27.0%(10/37)、当院作製HTFで27.7%(13/47)、 α -MEMで55.6%(10/18)と α -

MEMが有意に高かった。また、異常受精卵の胚盤胞発生率は22.6%(12/53)だった。【考察】移植時に発育不良胚と判定しても32.4%(33/102)が胚盤胞まで成長したことから、従来の胚移植日における胚の質の判定には限界があることが示唆された。また胚盤胞まで培養する培養液としては α -MEMが有効であると思われた。

4. 動物実験モデルを用いた術後癒着に関する基礎的検討

○岩本英熙、藤下 晃、北島道夫
宮村泰豪、中村久良、石丸忠之
(長崎大産婦)

術後癒着は、妊孕性温存を目的とした手術後に付属器周囲の癒着をきたし、不妊症の原因にもつながる重要な課題のひとつである。現在、さまざまな癒着防止対策が試みられているが、いまだ完璧な癒着防止が確立されているわけではない。

今回、私どもはNew Zealand White rabbitを用いて、癒着をいかに確実に発生させることができるかを検討した。週齢3~4カ月(体重2.5~3.5kg)のウサギを用い、左右の子宮角に人工的な擦過群(金網ブラシVS電動器)とメスによる切開、縫合群で検討した。さらに外科的損傷部位にヨードチンキ、アンモニア水、10%および50%の塩酸および硫酸を3分、5分、7分間塗布させた後、1週間後に再開腹して癒着の状態を評価した。その結果、子宮をメスで切開、縫合した後に、10%塩酸を5分間以上塗布する方法がもっとも強い癒着を認めた。

5. 精液中secretory leukocyte protease inhibitorと精子機能

○浦田憲一郎、田中雄一郎、有馬和代
檜原久司、富川勇生 (大分医大産婦)

【目的】精液中のinterleukin-8(IL-8)、顆粒球エラストラーゼ(GE)、GEのinhibitorであるsecretory leukocyte protease inhibitor(SLPI)の精子機能にもたらす影響について検討した。【方法】*in vitro*において正常精液にIL-8、GE、SLPIを直接添加し、SMIの変化をSQAIIBで測定した。【結果】IL-8による精子への直接作用ではcontrol群に比べいずれの濃度のIL-8添加群にも有意な運動率の低下は認めなかった。GEを添加し、SMIの経時的変化をみると、control群に比べ、GE添加群では濃度依存性に精子運動率が低下した($p<0.01$)、つぎにSLPIをGEに同時添加したところ精子運動率抑制作用が有意に解除された($p<0.01$)。【結

論】精液中にはGEに対するinhibitorであるSLPIが存在し、GEの作用を抑制することにより精子機能の調節に重要な役割を担っていることが示唆された。

6. strict criteria による精子正常形態評価のIVFにおける媒精法への有用性

○高野陽子, Paul E. Kihale, 広津留恵子
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)

【目的】strict criteria 正常形態率がICSI施行可否かの判断基準として有効であるかを検討した。【対象と方法】97年12月から98年8月までに体外受精を施行した250症例373周期(凍結および射出以外により精子を採取した例、凍結卵のET施行例を除く)のうち、conventional-IVFとICSIを同時に施行した10症例を対象とした。【結果】WHO基準に基づく精液検査所見は、濃度 $93.3 \pm 29.9 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 $39.1 \pm 12.6\%$ 、正常形態率 $46.9 \pm 8.8\%$ であり、strict criteria 正常形態率は $6.2 \pm 3.3\%$ であった。受精率に関して、conventional-IVF施行群は $38.5 \pm 33.8\%$ であったのに対し、ICSI施行群は $84.7 \pm 22.0\%$ であり、10例中7例において前者施行による受精率が50%未満だった。【結論】WHO基準の精液検査所見ではconventionalでよいと思われる症例でも、strict criteria正常形態率が低値の場合はsplitcyclesとし慎重に扱う必要性が示唆された。

7. Partial Zona Dissection (PZD) によるAssisted hatching の有効性についての検討

○佐藤真紀, 長木美幸, 広津留恵子
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)

【目的】IVF-ET反復無効症例に対してAssisted hatching(以下AHA)が有効とされている。AHAの方法としてPartial Zona Dissection(以下PZD)を施行後追加培養し、その培養経過を検討した。【対象】1998.5.25~8.31に患者の同意のもとにPZDを施行後、胚移植を行わなかった余剰胚の2~8細胞期胚18個について行った。同時期に培養した2PN群の胚をコントロール群とした。【方法】PZD施行後HTFでday7まで培養し胚盤胞発生率、胚の完全脱出率を検討した。【結果】胚盤胞発生率及び胚の完全脱出率はPZD群で66.7%(7/18)及び38.9%(23/84)、コントロール群で27.3%(23/84)及び2.4%(2/84)でありPZD群で有意($p < 0.001$)に高かった。【考察】PZDによるAHAは胚のhatchingを促進させるのに有効であるといえる。

8. 脊椎損傷患者における顕微授精法の応用

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

症例は夫35才、妻33才である。妻29才で結婚したが、夫は18才時にプールの飛び込みで脊椎損傷となり射精障害を認めた。挙児希望があり当院泌尿器科で保存療法を行ったが、効果無くARTの適応で98年5月、当科へ紹介となる。7月16日、泌尿器科で人工精液造設術施行。TESEおよびMESAから得られた凍結精子と精液瘤の経皮的穿刺で回収した凍結精子と採卵日に回収した精液瘤精子の合計4種類の精子を準備したが、所見の良かった当日回収精液瘤精子を用いて、合計25個にICSIを行い、ICSI4回分の精子を凍結保存することができた。ICSI施行18時間後には、20個に正常な受精を確認できたため、4個はそのまま胚移植用に追加培養し、その他の胚は凍結保存した。翌日、4細胞期胚3個を子宮内に移植した。1回の精子回収で複数回の受精チャンスが得られる凍結保存と数匹の精子で受精が可能なICSIの組み合わせは、脊椎損傷患者に大きな福音となる。

9. 不妊治療により妊娠に至った患者への日常生活に関する質問紙調査

○宮崎美奈, 指山実千代, 宇都宮隆史
(セント・ルカ産婦)

【目的】不妊治療を専門としている当院で、妊娠に至り治療を終えた患者に対し、治療中の日常生活等についてのアンケート調査を施行したので報告する。【対象と方法】1997年12月13日より1998年8月31日までの間に他院へ紹介となった挙児希望患者149名に対し、記述式によるアンケート調査を行った。【結果】全体の回収率は38.9%(ART患者では43.6%, ART以外の患者では36.2%)であり、日常生活においては、仕事や趣味など活動的に過ごしたとの回答が多く、精神的な面では気分転換やリラックスを心掛けたとの回答が多かった。回答の文中には夫、医療スタッフ、友人の順で支えとなっている様子がうかがえた。【考察】精神的な安定を図ることが、患者が不妊治療を受ける上で最も有用であると考えられ、当院において行われている様々な患者サポートは功を奏している事がART患者の回答から示唆された。

10. 不妊症患者の「悩み」について質問紙調査による検討

○渡辺利香, 倉橋千鶴美, 指山実千代
宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)
青木一雄, 三角順一
(大分医大公衆衛生)

【目的】「どれほど不妊に悩んでいるのか」患者さんの本音を知る。【対象】1997年8月～10月の間に当院に来院した患者354名に質問紙による調査【結果】子供が欲しいと願う患者さんに「子供が欲しい」といつ頃から思うようになりましたか」と問うと37%が結婚してすぐ, 28.8%が結婚前からと答えた。自分の意志から治療を始めたのは86.2%となり, 14.7%が夫の勧めであった。不妊治療において夫の存在は大きく94.6%が夫とのコミュニケーションはうまくいっていると答えた。しかし, 少数ではあるが不妊が原因で離婚を考えた事のある夫婦も存在した。夫以外の治療の相談相手として不妊治療の経験のある友人が49.2%となった。74.9%は夫婦で治療の終りを考えた事があると答え, さらに, 約半数は養子やAID・子供のいない生活を考えていた。【結論】不妊治療は女性側のみでなく夫婦一緒に身体的・精神的ケアをしていくことが望ましい。

11. GnRHアナログ使用中に脳梗塞を起こした子宮腺筋症の一例

○丸岡慶子, 稲津哲子, 古恵良桂子
緒方りか, 野崎雅裕, 中野仁雄
(九州大産婦)

症例は43歳, 経妊7回経産3回, 〇〇〇〇に高血圧, 糖尿病を指摘され, 〇〇〇〇9月より糖尿病の治療のため当院内科に入院していた。月経痛の増強を主訴に当科外来を紹介受診し, 子宮腺筋症の診断を受けた。同年10月より酢酸リュープロレリン皮下注を開始したが, 更年期障害様症状が高度であったため, 12月より酢酸プセリン点鼻に変更した。〇〇〇〇3月2日, 内科入院中に左中大脳動脈領域に脳梗塞を起こし, グリセリンとオザグレルナトリウムにて加療したが, 3月9日には左前頭葉に脳出血を併発したため, オザグレルナトリウムは中止した。現在, プセリンは中止している。本症例は比較的若年であり, 高血圧, 糖尿病に関しては他臓器の障害も軽度でコントロール良好であるにもかかわらず脳梗塞をおこしており, GnRHアナログが何らかの影響をおよぼした可能性も否定できないため,

文献的考察を加えて報告する。

12. 大学新入生の月経異常に関する検討

○嶋田貴子, 河野雅洋, 中村恒一
石丸忠之 (長崎大産婦)
大坪敬子, 石井伸子
(長崎大保健管理センター)

【目的】大学新入生には受験勉強や生活環境の変化などによるストレスが多く, 月経異常の頻度も高いと推察される。そこで, 大学新入生における月経異常の頻度を明らかにすることを目的とした。【対象および方法】平成8年度および9年度に当大学へ入学した女子学生1339名を対象とし, 入学時にアンケート調査を行い, 必要と思われる学生については精査を施行した。【結果】アンケート回収可能は1331名(99.4%)であった。その結果は, 頻発月経79名(5.9%), 希発月経49名(3.7%), 無月経28名(2.1%), 過短月経1名(0.1%), 過長月経56名(4.2%), 月経時鎮痛剤使用533名(40.0%)などであった。無月経はすべて続発性無月経であり, その内訳は, 多嚢胞性卵巣症候群13名, 視床下部性無月経10名, 体重減少性無月経4名および高プロラクチン血症1名であり, ストレスが原因と考えられる視床下部性無月経とほぼ同じ頻度で多嚢胞性卵巣症候群がみられた。

関連学会のお知らせ

第40回 日本哺乳動物卵子学会開催のご案内

下記により第40回日本哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員の参加をお願い致します。

第40回 日本哺乳動物卵子学会
大会長 久保 春海

記

期 日：1999年5月27日(木)・28日(金)

会 場：シェーンバッハ・サボー(砂防会館別館)

〒102-0093 東京都千代田区平河町 2-7-5 (電話)03(3261)8386

連絡先：東邦大学医学部第1産科婦人科学教室内 第40回日本哺乳動物卵子学会事務局

〒143-8541 東京都大田区大森西 6-11-1 (電話)03(3762)4151 (Fax)03(3765)7671

担当者：安部裕司・菅 睦雄

学術講演会

招待講演：Ⅰ：Ronger A.Pedersen, Ph.D. Prof. & Director, Reproductive Genetic Unit,
University of California, San Francisco, USA

Ⅱ：A.Henry Sathanathan, Ph.D A.Professor, La Trobe University, Victoria, Australia

Ⅲ：Paul Katayama, M.D.Ph.D & Alyce Katayama, J.D., Advanced Institute of Fertility,
St.Lukes Medical Center, Milwaukee, USA

特別講演：杉村 隆 東邦大学学長、国立ガンセンター名誉総長

教育講演：角田 幸雄 近畿大学農学部教授

Symposium：2～3題を予定しております。

一般演題

発表の形式には口演・ポスターセッション・ビデオセッションがあります。申し込み要領は次のとおりです。

講演申し込み要領

演題の申込みは、本誌15巻3号に綴じ込みの所定の原稿用紙にタイプまたはワープロで印字したもの、およびそのコピー2部を、申込用紙、通知用ハガキとともに書留郵便で上記連絡先宛お送り下さい。その際、希望する発表形式(口演・ポスター・ビデオ)のいずれか1つを○で囲んでください。なお、ポスター・ビデオセッションの詳細につきましては、直接、上記担当者までお問い合わせください。また、原稿をそのまま写真印刷した抄録集を16巻2号として発行する予定です。

演題の申込みは会員1人1題とさせていただきます。

申込み締切日：1999年2月15日(必着)

発表時間：講演時間は1題7分、討論時間は3分の予定です。スライドプロジェクターは各会場1台とし、スライドは10枚以内とします。

参加申込み方法：学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費 7,000円・懇親会参加費 7,000円

公開講座：本会終了後、一般を対象と致します公開講座が予定されております。

第25回日本医学会総会

第25回日本医学会総会(平成11年4月2日～4日)の開催が半年後に迫り、「社会とともにあゆむ医学—開かれた医療の世紀へ—」をメインテーマに、学術プログラムの概要が決定した。

開会講演は「医学の新たな枠組みを求めて」と題し伊藤正男氏(理研)が、閉会講演は題名「医学の人間化と非人間化」で、立花隆氏が行う。また市民公開講座、テーマシリーズ、レクチャー、シンポジウム等が豊富に予定されており、20世紀末の医学・医療が広く紹介されることになろう。

なお、レクチャー、シンポジウム、パネル、ならびにレクチャーシリーズのテーマは、以下のごとき25の柱立から編成されている。1. 脳と神経、2. 心臓と血管、3. 血液と免疫、4. 癌、5. 発生と生殖、6. 加齢と老化、7. 分子細胞生物学、8. 細胞内情報伝達、9. エイズと感染、10. 医薬と薬理、11. 注目される病態と疾患、12. 検査と診断、13. 治療の最前線、14. プライマリ・ケア、15. 緩和医療、16. 移植医療、17. 精神医学、18. 21世紀の医療、19. 環境と健康、20. 医療における教育と福祉、21. 看護とチーム医療、22. 社会と経済、23. 情報と生命倫理、24. 園学、25. 緊急テーマ。

医学展示・博覧会についても着々と準備が進められている。総会の登録はすでに開始され、多くの方々の参加を募っている。登録料は払い込みに便宜が図られ、クレジットでの支払いも可能。また団体割引も行っている。問い合わせは総会事務局(TEL 03-5800-5524)まで、ホームページは、<http://square.umin.ac.jp/isoukai/>で開設しているのをご覧いただきたい。

第111回日本医学会シンポジウム

1998年8月21日～23日、パレスホテル箱根においてクローズド形式のシンポジウム「再生医学—基礎と治療への応用—」を開催した。組織委員は、秦順一(慶應大・病理)、西川伸一(京大・分子遺伝)、中村敏一(阪大・バイオメディカル教育センター)の各氏が務めた。

プログラムは、Ⅰ. バイオミメティックスと再生医学、Ⅱ. 器官形成と再生の分子制御その1、Ⅲ.

器官形成と再生の分子制御その2、Ⅳ. 臓器再生/治療への展望その1、Ⅴ. 臓器再生/治療への展望その2。以上の5セッションから構成された。

昨今、医学と工学の連携による新たな分野として、「再生医学」にたいなる関心が寄せられている。人体が本来持つ再生能の増強と、人工的な素材により再生を促すことの両者につき、またそれらを組み合わせた形での臨床応用が、種々、今回のシンポジウムで発表された。また演者間でも討議が熱心に行われ、今後の研究の出発点につながったものと信じられる。シンポジウムの詳細は、記録集として1999年2月頃に刊行予定である。希望者は日本医学会宛、郵便はがきで申し込まれたい(無料)。

第112回日本医学会シンポジウム

1998年12月4日(金10:00～17:00)、日本医師会館において「内分泌攪乱物質(環境ホルモン)と健康障害—仮説の検証と対策—」をテーマにシンポジウムを開催する。組織委員は、鈴木継美(元環境研所長)、石川春律(群馬大・解剖)、田中平三(東京医科歯科大・難治疾患研)の各氏、参加希望者は、日本医学会に郵便はがきで申し込まれたい。参加費無料。

プログラムの概要は下記のとおり。

Ⅰ. 問題の発端

1. 野生動物の生殖異常/井口泰泉(横浜市大・理学部)、2. 内分泌攪乱物質の環境への放出と残留/森田昌敏(国立環境研・地域環境グループ)、3. 関連の疑われる健康影響/香山不二雄(自治医大・衛生学)

Ⅱ. 内分泌・生殖毒性のメカニズム

4. ダイオキシンの初期胚発育への影響/堤 治(東京大・産婦人科学)、5. 内分泌攪乱物質によるシグナル伝達系の活性化—コプラナーPCBを例として/青木康展(国立環境研・環境健康部)、6. 精子形成と内分泌攪乱/森 千里(京都大・生態構造医学)、7. Ah(ダイオキシン)リセプターの生物機能と調節機構/藤井義明(東北大・理学研究科)、〈指定発言〉内分泌毒性からその他の毒性へ/黒田洋一郎(東京都神経科学研・神経生化学)

Ⅲ. 内分泌攪乱物質のリスク評価とリスク管理

8. 内分泌毒性のスクリーニングと生殖毒性試験/松尾昌幸(住友化学・生科研/大阪大・先端科技共研センター)、9. 内分泌攪乱物質および外来性ホルモン

様物質のリスク評価／渡邊 昌(東京農大・公衆栄養学), 10. 内分泌攪乱物質の健康リスクの評価／遠山千春(国立環境研・環境健康部)

医学賞・医学研究助成費の決定

医学賞・医学研究助成費選考委員会が9月7日に開催され、平成10年度の授賞者が決定した。授与式は10月31日の第51回日本医師会設立記念医学大会にて行われる。

今年度の応募数は医学賞21件、医学研究助成費84件であった。本選考は、日本医学会が日本医師会から委任されているもので、下記の方々に決定した。

〈日本医師会医学賞〉

- ・血清肝炎ウイルスの基礎的研究と臨床応用／真弓忠(自治医大・微生物学)
- ・先天性脂質代謝異常症の分子生物学的研究並びに治療法の開発／衛藤義勝(慈恵医大・小児科学)
- ・食道癌外科治療の向上と術式の確立／磯野可一(千葉大名誉・外科学)

〈日本医師会医学研究助成費〉

- ・阪中雅広(愛媛大・神経学)

- ・遠藤正彦(弘前大・生化学)
- ・矢部(西村)千尋(京都府医大・薬理学)
- ・野田哲生(東北大・分子生物学)
- ・塩野 寛(旭川医大・法医学)
- ・金倉 譲(大阪大・血液学)
- ・後藤信哉(東海大・内科学)
- ・伊藤貞嘉(東北大・内科学)
- ・松崎恒一(関西医大・内科学)
- ・戸辺一之(東京大・内科学)
- ・橋本 薫(都精神医総研・外科学)
- ・田中雅夫(九州大・外科学)
- ・小口芳久(慶應大・眼科学)
- ・村上信五(名市大・耳鼻咽喉科学)
- ・加藤聖子(九州大生体防医研・産婦人科学)

日本医学会医学用語辞典(英和)第2版改訂

標記の改訂作業については、昨年、各分科会から提出された追加用語等を、医学用語管理委員会(草間悟委員長他8名)が整理・校正中、2001年3月刊行を目指している。

編集委員会からのお知らせ

43巻1号から4号(平成10年度)に掲載された論文は、以下の先生方に審査をご担当いただきました。誌上にご氏名を掲載し、謝辞に代えさせていただきます。

麻生武志	安達知子	安部裕司	荒木泰久
石川博通	石田肇	石丸忠之	伊藤雅夫
井上正人	苛原稔	植村次雄	梅咲直彦
遠藤俊明	太田博孝	岡田詔子	岡田弘孝
荻野雅弘	長田尚夫	押尾茂男	堀内俊紘
可世木久幸	片山進晴	片寄治陽	加藤勝之
金子智二	鎌田正隆	神崎秀海	木下高弘
楠原浩二	工藤基昭	久保藤孝	熊坂藤英
香山浩英	小杉治文	佐藤孝七	齐藤幸明
坂元富夫	山海啓直	菅田辺清男	角田明雄
澤橋芳幸	田中野良	田中村幸雄	栃南部明
高友村末彦	仲西田正省	野口山寿彦	野嶽原幸
新林和彦	原谷健一	平星智人	藤井美彦
布施正樹	古牧野田	星牧野田	細三浦一
細田弘敬	牧森田峰	柳田謙一郎	三矢本希
峯岸敬介	吉沢	吉田	吉村泰典

(敬称略)

平成10年12月

日本不妊学会編集委員会

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、文書フロッピー（MS-DOS、テキストファイル出力）を添付し、機種名とソフト名を明記する。原稿は原本1部に査読用コピー2部を添える。写真は原稿を含めて3部とする。
7. 原著、総説、論説、臨床報告などには、必ず600字以内の和文抄録ならびに、200words以内の英文抄録（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ください。

※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

日本不妊学会雑誌の第44巻1号をお届けいたします。
1999年を迎え21世紀への新たなステップの年となることと存じますが、本会誌の果たす役割も大きく変わろうとしております。他の多くの学会で投稿論文数が激減しており、この対策に苦慮しているのが現状であります。当学会におきましても同じことが起きており、対応が遅れましたことは否めません。

この背景の一つには、1990年以降に各大学において自己評価・自己点検が開始されるようになり、研究成果を依りgradeの高いJournal(例: Subject Category Listingに掲載されているImpact Factorの高い雑誌)に投稿する傾向が強まっていることによるものと考えられます。教員もこのことを放置しますと教育者・研究者としての評価にもつながりますので真剣です。

本会誌もこのままでは、消滅につながりかねませんので今後における会誌のあり方を検討する委員会が設置され、英文化も含めた検討が開始されたところであります。この件に関しましてご意見がございましたら、是非編集委員会の方へお寄せ下さいますようお願い申し上げます。

(編集委員: 遠藤 克)

編集委員

平 川 舜 (委員長)

味 香 勝 也	安 部 裕 司	石 川 博 通
石 塚 文 平	岩 本 晃 明	遠 藤 克
押 尾 茂	末 岡 浩	田 原 隆 三
百目鬼 郁 夫	永 尾 光 一	三 浦 一 陽

Editorial Board

Shun HIRAKAWA (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Yuji ABE	Hikomichi ISHIKAWA
Bunpei ISHIZUKA	Teruaki IWAMOTO	Tuyoshi ENDO
Shigeru OSHIO	Kou SUEOKA	Ryuzo TAHARA
Ikuo DOUMEKI	Koichi NAGAO	Kazukiyo MIURA

日本不妊学会雑誌 第44巻第1号

1998年12月25日印刷
1999年1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 パンメデア
東京都新宿区早稲田鶴巻町110
TEL (03) 3209-1810