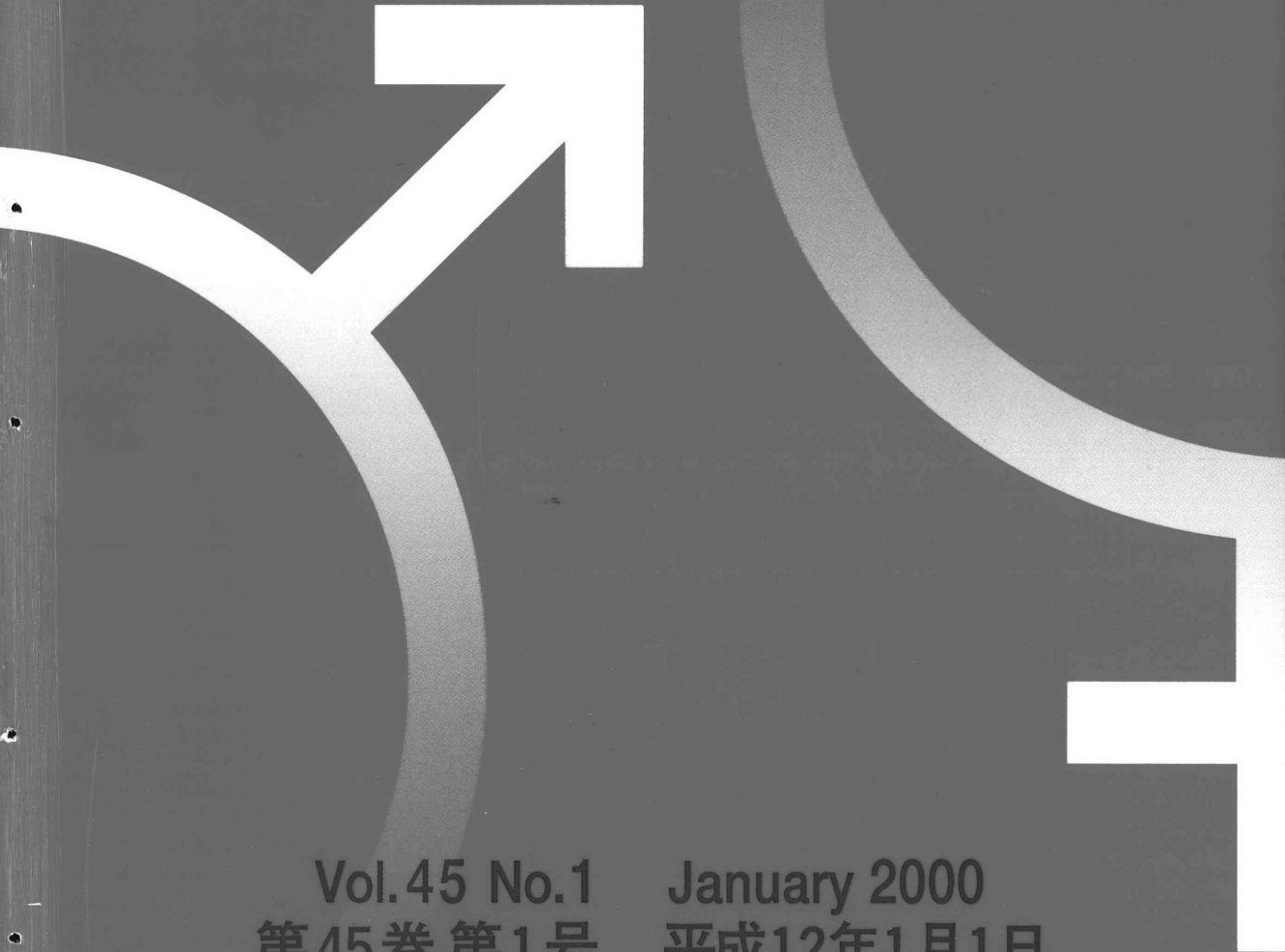


Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌



Vol.45 No.1 January 2000
第45巻 第1号 平成12年1月1日

第45回日本不妊学会総会および学術講演会 (第2回予告)

日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領にて開催いたしますので、奮ってご参加頂きますようお願い申し上げます。

記

期 日：平成12年11月22日（水）市民公開講座，幹事会，理事会
23日（木）学術講演会，評議員会，総会，総懇親会
24日（金）学術講演会，各種フォーラム

会 場：神戸国際会議場

〒650-0046 神戸市中央区港島中町6丁目9-1 (TEL: 078-302-5200)

神戸ポートピアホテル

〒650-0046 神戸市中央区港島中町6丁目10-1 (TEL: 078-302-1111)

メインテーマ

真の意味での不妊治療はどこまで進んだか

招請講演

Prof. Felice Petraglia (University of Pisa)

教育講演

佐藤 孝道（虎の門病院産婦人科部長）

佐藤 英明（東北大学農学部教授）

特別講演

1) 堤 治（東京大学医学部産婦人科教授）

2) 岡田 弘（神戸大学医学部泌尿器科講師）

シンポジウム

1. 病態からみた不妊治療の適応と限界

松田 公志（関西医科大学泌尿器科教授）

香山 浩二（兵庫医科大学産婦人科教授）

2. 不妊と内分泌因子

奥山 明彦（大阪大学医学部泌尿器科教授）

吉村 泰典（慶應義塾大学医学部産婦人科教授）

ワークショップ

1. 精液検査の標準化

吉田 英機（昭和大学医学部泌尿器科教授）

2. 不育症

牧野 恒久（東海大学医学部産婦人科教授）

市民公開講座

低用量ピル

北村 邦夫（日本家族計画協会クリニック所長）

丸尾 猛（神戸大学医学部泌尿器科教授）

一般演題の締切りは平成12年5月下旬を予定いたしております。

平成12年1月

第45回日本不妊学会総会および学術講演会

会長 守殿 貞夫

連絡先：〒650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-1
神戸大学医学部泌尿器科学教室内
第45回日本不妊学会総会事務局
（担当：岡田 弘、藤澤正人）
TEL：078-382-6155
FAX：078-382-6169
e-mail：okada@med.kobe-u.ac.jp

平成 11 年度第 2 回通常総会

平成 11 年度第 2 回通常総会は下記の如く東京都港区において開催され、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 11 年 11 月 11 日 (木) 13 時～13 時 30 分

場 所 東京都港区 赤坂プリンスホテル『五色』2 階「橙光」

開会当時の会員数 4,138 名 当日の出席会員数 2,116 名 (含委任状)

議 事

第 1 号議案：平成 12 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 12 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。

なお、平成 12 年度より、事務局業務を株式会社 MA コンベンションコンサルティングへ委託することとこれに伴い本学会定款の事務局所在地を以下の如く改定することも全会一致にて承認した。

旧：この法人は、事務局を東京都千代田区麹町 5-4 クロスサイド麹町ビル 8 階におく。

新：この法人は、事務局を東京都千代田区麹町 5-2 K-WING ビル 3 階におく。

第 2 号議案：名誉会員推薦の件 (定款施行細則第 25 条)

理事会および評議員会より推薦された次の 1 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。

名誉会員 Philip Troen

第 3 号議案：平成 14 年度学術講演会および総会に関する件 (定款第 11 条)

平成 14 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 14 年度 担当支部 中部支部

会 長 玉舎 輝彦 (岐阜大学医学部産婦人科教授)

開 催 地 岐阜市

第 4 号議案：日本不妊学会学術奨励賞に関する件 (定款施行細則第 14 条)

理事会および評議員会より推薦された下記 2 名に平成 11 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。

小田 力「機能性不妊における子宮内膜日付診と子宮内膜 Estrogen Receptor および Progesterone Receptor 発現との関係」

中根比呂志「PCNA 法を用いた左精索静脈瘤患者における精細胞 DNA 合成の定量的解析」

第 5 号議案：役員・評議員の支部別定数に関する件

役員・評議員の支部別定数は、理事会および評議員会の原案通り、平成 12 年の役員改選時より下記の如く改定することを全会一致にて承認した。

役 員：北海道支部 1 名 中部支部 2 名 中国四国支部 2 名 東北支部 1 名

北 陸 支部 1 名 九州支部 2 名 関 東 支部 8 名 関西支部 3 名

評議員：北海道支部 2 名 中部支部 6 名 中国四国支部 6 名 東北支部 4 名

北 陸 支部 2 名 九州支部 6 名 関 東 支部 21 名 関西支部 8 名

平成 11 年度日本不妊学会学術奨励賞授賞者発表

平成 11 年度日本不妊学会学術奨励賞選考過程について報告致します。

平成 11 年 9 月 6 日に青野敏博学術委員長のもと授賞論文予備選考委員会において、産婦人科領域 4 編，泌尿器科領域 2 編，基礎生物学領域 3 編の推薦論文について、厳正な審査の結果，基礎生物学領域では授賞該当論文はなく，産婦人科領域より 3 編，泌尿器科領域より 2 編の授賞候補論文が選出されました。引き続き平成 11 年 9 月 7 日森 崇英理事長のもと授賞論文選考委員会において最終審査を行い，下記 2 編の論文が今年度の栄えある授賞論文と決定されました。

小田 力（昭和大学産婦人科）

「機能性不妊症における子宮内膜日付診と子宮内膜 Estrogen Receptor および Progesterone Receptor 発現との関係」（日本不妊学会雑誌 43 巻 3 号 P235）

中根 比呂志（山口大学泌尿器科）

「PCNA 法を用いた左精索静脈瘤患者における精細胞 DNA 合成の定量的解析」（日本不妊学会雑誌 43 巻 2 号 P75）

平成 11 年 11 月 11 日の第 44 回日本不妊学会学術講演会総会において，両受賞者の授賞式が挙行され，賞状と賞金 50 万円が授与されました。

社団法人日本不妊学会

理事長 森 崇 英

会 告

動物の精巢を用いたヒト精祖細胞の研究について

最近、マウスやラットなどの動物精巢内でのヒト精祖細胞の分化・成熟に関する研究が進展し、そこから得られた成熟過程の、あるいは成熟したヒト精子を用いた受精や胚発生に関する研究が国内外で報告・報道されています。本学会は、倫理委員会による表記の問題についての数回にわたる慎重な検討に基づいて、理事会においてさらに審議した結果、次のような結論に達したので会告として会員にお知らせ致します。

1. 基礎的研究であっても、ヒト精巢組織を得るために手術的侵襲を加えるので、被験者に研究の目的・方法・副作用および研究の限度などについて十分に説明し、理解を得たうえで、文書によるインフォームド・コンセントを得ておく。
2. 本研究において、成熟した精子を用いる受精実験では、受精卵への外来遺伝子の偶発的導入などの可能性を否定できない。したがって、前核期を確認したらただちにその後の実験は中止し、生殖生物学的にその安全性が立証されるまでは得られた受精卵（胚）をヒト生殖器内に移植するなどの臨床研究は行ってはならない。
3. 研究内容および得られた結果については、本学会に報告する。

平成 11 年 11 月 11 日

社団法人日本不妊学会

理事長 森 崇 英

解 説

「動物の精巢を用いたヒト精祖細胞の研究について」の考え方

ヒト生殖に関する研究は、生殖医学発展のために必要な全ての研究が包含されることが原則である。また、これらの研究は倫理に基づいて、研究者としての良識に立脚して行うことが基本であり、このような態度がさらに次の研究を推進し発展させていくうえで不可欠である。本学会は表記の研究を実施するにあたり会告を制定した。以下に会告の解釈を記述し、その考え方を示した。

1. 受精実験に用いるヒト卵の提供者は、この実験で使用する精子提供者の妻か、あるいは第三者である。とくに後者においては、実験の意義を十分に説明し、理解を得たうえで提供を受ける。さらに、いずれの場合においても、日本産科婦人科学会会告「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解」（日産婦誌37巻3号 pp. 465-466, 1985）に則ってそれを遵守し、その範囲内で実施すべきである。
2. 前核形成による受精を確認したら、ただちに実験を中止し、その後の発生実験に供してはならない。このことがこの会告の重要なポイントである。それはその後の胚移植などの臨床研究を禁止していることと関連している。したがって、得られた受精卵は受精確認実験を終了したら、その時点で廃棄し、凍結保存してはならない。
3. この実験で得られた研究成果は、結果の如何にかかわらず、逐次本学会に文書で報告することとする。それは情報の開示によって、この研究の透明性を確保することを意図したものである。

社団法人 日本不妊学会 事務所移転について

このたび、平成12年4月1日より社団法人日本不妊学会の業務委託を株式会社MAコンベンションコンサルティングにいたします。

つきましては、事務所の所在地ならびにFAX番号が下記のとおり変更されますので、お知らせいたします。

なお、電話番号は従来どおりです。

社団法人 日本不妊学会
理事長 森 崇 英

記

新 事務所：〒102-0083

東京都千代田区麹町5丁目2番 K-WING 3階
(株)MAコンベンションコンサルティング内
社団法人 日本不妊学会
TEL 03-3288-7266 (従来のまま)
FAX 03-5275-1192 (新)
(平成12年4月1日より)

旧 事務所：〒102-0083

東京都千代田区麹町5丁目4番
クロスサイド麹町ビル8階
社団法人 日本不妊学会
TEL 03-3288-7266
FAX 03-3288-7266
(平成12年3月31日まで)

編集委員会より投稿原稿送付先変更のお知らせ

日本不妊学会雑誌の投稿に際しましては、会員各位には2年間にわたりご不便をお掛けしましたが、平成12年4月1日より本誌の投稿原稿の送付先が、新事務局のMAコンベンションコンサルティングへ変更になりますので、お知らせ致します。

新投稿原稿送付先：〒102-0083

東京都千代田区麹町5-2 K-WING 3F

(株) MA コンベンションコンサルティング内

社団法人 日本不妊学会

TEL 03-3288-7266

FAX 03-5275-1192

*旧投稿原稿送付先の東邦大学医学部第1産科婦人科学教室宛へ送付されました原稿は、新事務所へ転送致します。

*投稿原稿を受領しましたら、直ちに受領証を発行致しますので、1週間以内に受領証が未着の場合は、事務局までお問い合わせ下さい。

日本不妊学会編集委員長

平 川 舜

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。会員の皆様には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、前年度に刊行された1～4号収載の論文の中から産婦人科学、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) 学術奨励金 50万円
- 4) 記念品 ブロンズの母子像

が、秋に開催される日本不妊学会総会の席上で表彰、授与される名誉ある賞です。

なお、日本不妊学会学術奨励賞の推薦方法の詳細は本誌45巻1号、2号に掲載されていますので、ご参照下さい。

2000年1月1日

日本不妊学会学術委員会
委員長 青野敏博

会 告

平成12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44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12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12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12年4月30日(日)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)

社団法人日本不妊学会

理事長 森 崇 英

編集委員長 青 野 敏 博

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44巻 ____号 ____～ ____頁 (平成11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45巻 第1号

平成12年1月1日

—目 次—

原 著

- 子宮内膜症による不妊患者に対する体外受精・胚移植時のGnRHaによる前治療の有用性
..... 中川浩次・山野修司・中坂尚代
小松淳子・檜尾健二・青野敏博 1
- クラミジア感染に伴う卵管機能の変化：卵管通気波形の数値化による評価
..... 羽原俊宏・中塚幹也・木村吉宏
鎌田泰彦・高田雅代・浅桐和男
野口聡一・新谷恵司・工藤尚文 7
- 受精卵および桑実胚を培養して発生させたマウス胚盤胞の収縮運動（英文）
..... 新村末雄・若狭良子 13
- 体外成熟卵子に対するICSIによる受精率と胚の質に関する検討
..... 高橋和政・林 明美・鈴木香織
荒木康久・本山光博 19
- 卵管注入圧パターン解析による卵管機能評価法の基礎的検討
..... 可世木久幸・貝原賢二・松島 隆
石原楷輔・荒木 勤 25
- 簡易炭酸ガス培養器を用いた牛体外受精胚の作出
—陰圧気相条件が胚の発生におよぼす影響—
..... 董 雅娟・野田史子・音井威重・鈴木達行 31
- ヒト桑実期／胞胚期移植の臨床的検討
..... 安部裕司・中野由起子・渋谷幸裕・塩川素子
橋田 英・伊藤嘉奈子・中野英之・雀部 豊
池永秀幸・間崎和夫・菅 睦雄・久保春海
平川 舜・高梨安弘 37
- アザチオプリンによるラットLeydig細胞障害に関する検討
..... 岩崎雅志・池原葉子・村上康一
水野一郎・永川 修・布施秀樹 43

症例報告

非モザイク型 Klinefelter 症候群男性の精液内精子を用いた ICSI による男児出産の 1 症例

..... 本田徹郎・玉井彦明・梅岡弘一郎・中堀 隆

高橋 晃・大久保和俊・小倉啓司・荒井陽一

磯崎八重子・高橋 司 49

幼児期の一側停留精巣切除と対側のヘルニア手術に起因した閉塞性無精子症の一例

..... 湯村 寧・岩崎 皓・千葉喜美男

斎藤一隆・漆原正泰・広川 信 55

地方部会講演抄録 59

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 45, No. 1, 2000)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Effectiveness of Pre-treatment with Gonadotropin-releasing Hormone Agonist to the Patients with Endometriosis in *in vitro* Fertilization and Embryo Transfer
..... K. Nakagawa, S. Yamano, H. Nakasaka
J. Komatsu, K. Hinokio & T. Aono 1
- Evaluation of Developing Damages in Fallopian Tubes Infected with Chlamydia Trachomatis : Analysis of Waveform in Tubal Insufflation
..... T. Habara, M. Nakatsuka, Y. Kimura
Y. Kamada, M. Takata, K. Asagiri
S. Noguchi, K. Shintani & T. Kudo 7
- Contractions of Mouse Blastocysts Cultured from Fertilized Ova or Morulae
..... S. Niimura & R. Wakasa 13
- Fertilization Rate and Embryo Quality of *in vitro* Matured Oocytes Treated by ICSI
..... K. Takahashi, A. Hayashi, K. Suzuki
Y. Araki & M. Motoyama 19
- Evaluation of Oviduct Function by Pattern Analysis of Intra-oviduct Injection
..... H. Kaseki, K. Kaibara, T. Matushima, K. Ishihara & T. Araki 25
- Production of Bovine IVF Embryos using Portable Carbon Dioxide Incubator
— Effect of Negative Air Pressure on Embryonic Development —
..... Y. J. Dong, N. Noda, T. Otoi & T. Suzuki 31
- Clinical Value of Human Morula / Blastocyst Transfer
Following *In-Vitro* Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection
..... Y. Abe, Y. Nakano, Y. Shibui, M. Shiokawa
E. Hashida, K. Itoh, H. Nakano, Y. Sasabe
H. Ikenaga, K. Masaki, M. Suga, H. Kubo
S. Hirakawa & Y. Takanashi 37
- Analysis of Leydig Cell Dysfunction Caused by Azathioprine in Rats
..... M. Iwasaki, Y. Ikehara, K. Murakami,
I. Mizuno, O. Nagakawa & H. Fuse 43

Case report

Birth of a Male Baby after Intracytoplasmic Injection of Spermatozoa Obtained
from a Nonmosaic Klinefelter Patient

..... *T. Honda, H. Tamai, K. Umeoka, T. Nakahori*
A. Takahashi, K. Okubo, K. Ogura, Y. Arai
Y. Isozaki & T. Takahashi 49

Obstruction of Vas Deferens with "Single Testis" Due to Unilateral Orchiectomy and Contralateral
Inguinal Herniorrhaphy in Childhood : A Case Report.

..... *Y. Yumura, A. Iwasaki, K. Chiba*
K. Saito, M. Urushibara & M. Hirokawa 55

子宮内膜症による不妊患者に対する体外受精・胚移植時の GnRHaによる前治療の有用性

Effectiveness of Pre-treatment with Gonadotropin-releasing Hormone Agonist to the Patients with Endometriosis in *in vitro* Fertilization and Embryo Transfer

中 川 浩 次

Koji NAKAGAWA

小 松 淳 子

Junko KOMATSU

山 野 修 司

Shuji YAMANO

檜 尾 健 二

Kenji HINOKIO

中 坂 尚 代

Hisayo NAKASAKA

青 野 敏 博

Toshihiro AONO

徳島大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
the University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan

子宮内膜症による不妊患者に対してGnRHa(酢酸ナファレリン)で子宮内膜症を治療した後、月経の発来を待って体外受精・胚移植(IVF-ET)を行った前治療群(13症例13周期)と、過去1年間子宮内膜症の治療を行わずIVF-ETを行った群(対照群:15症例15周期)との間でIVF-ETの成績を比較し、前治療の効果を検討した。前治療群の採取卵数、受精卵数、分割卵数、移植胚数はそれぞれ平均値で7.5個、4.8個、4.4個、2.4個であり、対照群ではそれぞれ5.5個、3.7個、3.2個、2.3個と両群間に有意な差はなかった。受精率、分割率、移植した胚のgrading scoreならびに移植した胚全体に占める形態良好胚の割合は前治療群でそれぞれ65.6%(63/96)、93.7%(59/63)、5.9、28.1%(9/32)であり、対照群のそれぞれ75.3%(61/81)、86.9%(53/61)、5.7、17.6%(6/34)との間に有意な差を認めなかった。胚移植あたりの妊娠率は前治療群で30.8%(4/13)と、対照群の7.1%(1/14)と比較して有意な差はないものの高い傾向が認められた。胚着床率は前治療群で21.9%(7/32)と対照群の2.9%(1/34)と比較して有意に高い値を示した。

以上のことから子宮内膜症患者のIVF-ET治療前にGnRHaを用いて子宮内膜症の治療を行うことにより、卵ならびに胚の数や良好胚の割合を増加することなく胚着床率が改善することが示唆され、それは子宮内膜症の前治療が胚の着床に対する子宮の環境を改善し着床率が向上したものと推察された。

キーワード: IVF-ET, 子宮内膜症, 前治療, GnRHa, 着床率

(日不妊会誌 45:1-6 2000)

緒 言

子宮内膜症による不妊に対する治療としては、手術療法、薬物療法、排卵誘発、人工授精およびIVF-ETなど様々な方法が行われているが、手術療法の適応、手術と薬物療法の組み合わせやIVF-ETの開始時

期については異論が多く、統一した見解がない。しかし、長期不妊症例については通常の治療法に限界があり、IVF-ET等の補助生殖医療が必要となる。子宮内膜症による不妊に対するIVF-ETの成績は報告者によって様々であるが、重症症例では決して満足のいく成績を残していない現状にある¹⁾。そのような症

例に対してIVF-ETの治療周期の前にGnRHaで前治療を施した後、IVF-ET治療周期を行う方法がNakamuraら²⁾、Dickerら^{3,4)}により試みられ良好な成績が得られている。しかし、IVF-ETの刺激開始直前にgonadotropin-releasing hormone agonist (以下GnRHa)を長期間使用することによる副作用として、卵胞発育に要するゴナドトロピンの総使用量や投与日数が増加することが報告されている²⁾。そこで今回我々は、子宮内膜症性不妊患者に対してIVF-ET治療を行う前に少なくとも90日間GnRHaを用いて前治療を行い、一旦月経を来させてからその次周期で当科で行っている採卵日固定法を用いてIVF-ETを行い、前治療を行わなかった子宮内膜症性不妊患者のIVF-ETの成績と比較した。

対象および方法

平成6年1月から平成10年6月までの間に徳島大学医学部附属病院産婦人科で子宮内膜症による不妊(子宮内膜症による卵管通過障害を含む)の適応で体外受精・胚移植を施行した28名28周期を対象とした。受精率等に影響を与える男性不妊および抗精子抗体陽性による不妊を合併した症例は対象から除外した。対象患者28名は全例、開腹あるいは腹腔鏡にて子宮内膜症の診断およびrAFSによる臨床進行期分類を行った。対象患者はすべて子宮卵管造影で子宮の形態異常のないことを確認しており、また子宮内腔の形態異常を来す疾患(子宮内膜ポリープ、子宮粘膜下筋腫等)も認めなかった。前治療を行った1例に軽度

表1 両群における患者背景

	前治療群 (13症例)	対照群 (15症例)	有意差
年齢(歳)*	34.7±4.5	35.4±2.8	n.s.
不妊期間(年)*	6.6±2.7	8.3±3.8	n.s.
rAFS			
I, II期	2(15.4%)	2(13.3%)	n.s.
III, IV期	11(84.6%)	13(86.7%)	n.s.
外科的処置			
腹腔鏡(電気焼灼含む)	7	7	
嚢腫摘出術(両側/片側)	4	6	
片側付属器摘出術	2	2	

*平均値±SD.

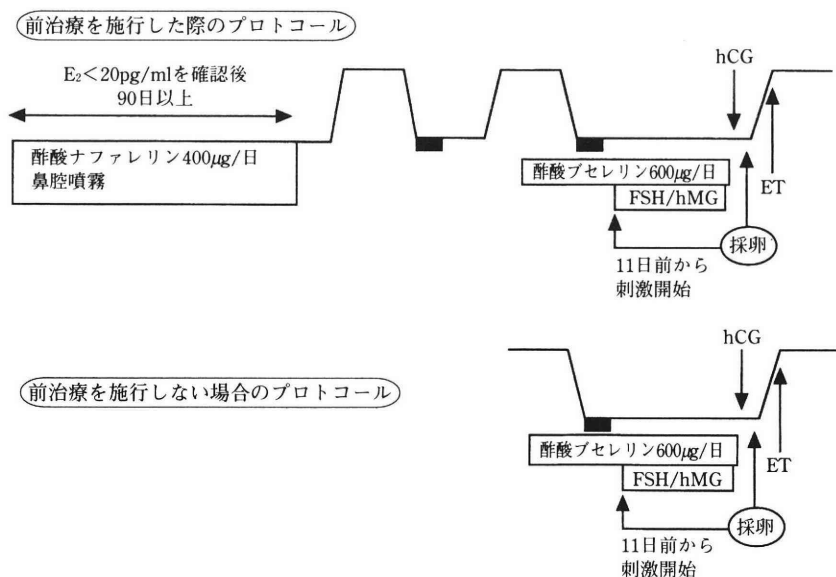


図1 前治療を行った際のプロトコールと行わない際のプロトコール
(いずれも採卵日固定法を用いる)

の子宮腺筋症を認めた。対象患者の年齢、不妊期間、臨床進行期および外科的処置について表1に示した。

子宮内膜症の前治療としては、IVF-ET治療周期前に酢酸ナファレリン(ナサニール®, 山之内製薬)を1日400 μ g(200 μ g/回を1日2回)鼻腔噴霧した。投与期間は酢酸ナファレリン投与開始により、血中エストラジオール値が20pg/ml以下になったことを確認した時点から90日以上(平均91.3 $\pm$ 1.1日)使用した。酢酸ナファレリン投与終了後、自然月経の発来を待ち、初回月経発来後基礎体温の測定を開始し、その周期の黄体期中期から酢酸ブセレリンの投与を開始し、IVF-ET治療周期とした(図1)。

卵巣刺激は、全例GnRHaを用いたlong protocol法を用い、原則として当科で行っている採卵日固定法を用いた⁵⁾。まず、IVF-ET治療周期の前周期の黄体期中期から酢酸ブセレリン(スプレキュア®, ヘキスト・マリオン・ルセル社)600 μ g/日の経鼻投与を開始し、月経開始後、あらかじめ決めた採卵日の11日前よりpure FSH(follicle stimulating hormone, フェルチノームP®, セロノ社)225単位を4日間、続いてhMG(human menopausal gonadotropin, ヒュメゴン®, 日本オルガノン社)150単位を5日間連日筋注した。卵巣刺激開始後9日目に経腔超音波にて卵胞発育のモニタリングを行い、平均径が18mmを越える卵胞が2個以上存在した場合、GnRHaおよびhMGの投与を中止し、あらかじめ決めた採卵時間の35時間前にhuman chorionic gonadotropin(hCG, ゴナトロピン®, 帝国臓器)5000単位を投与した。なお、卵巣刺激開始後9日目の主席卵胞の平均径が14mm以下の時はhCGの投与を遅らせ、また反応不良例に対してはpure FSHならびにhMGの投与量をそれぞれ450単位、300単位と2倍の量を用いて刺激を行った。

採卵は経腔超音波ガイド下に行い、採卵5時間後に運動良好精子 5×10^4 /卵で媒精した。卵の培養ならびに媒精は培養液として非働化した患者血清7.5%を含むHuman Tubal Fluid(HTF, HTF-medium®, Irvine Scientific.)を用いた。媒精18時間後に雌雄両前核の形成ならびに第2極体の放出の有無を観察し、正常受精と判定した卵は患者血清15%を含むHTF-mediumへ移し、さらに24時間培養した。培養終了後、実体顕微鏡下に胚のgradingを行った後、胚移植用カテーテル(ファイコンETチューブ®, 富士システム)を用いて子宮内に移植した。なお移植胚数は3個を上限とした。黄体賦活法として、胚移植日、胚移植後3日目、6日目、9日目にhCG 1500単位を筋注した。胚移

植後14日目以降に尿中hCGを定性試験し、経腔超音波にて胎嚢を確認した症例を妊娠と判定した。

IVF-ET治療の前に酢酸ナファレリンで治療を行った群を前治療群として、IVF-ET治療前少なくとも1年間子宮内膜症に対する治療(手術療法、薬物治療)を行わなかった対照群との間で、使用したゴナドトロピンの使用量および使用期間、採卵キャンセル率、穿刺卵胞数、採取卵数、受精卵数、分割卵数、移植胚数、受精率(受精卵数/採取卵数)、分割率(分割卵数/受精卵数)、移植胚のgrading、形態良好胚の割合(形態良好胚数/総移植胚数)、移植あたりの妊娠率および胚着床率(着床胚数/総移植胚数)を比較した。黄体期中期の血中エストラジオール値も比較した。さらに前治療群では治療前と治療後での血中CA125値をRIA法で測定した。

なお、統計学的検討は、unpaired t-test, paired t-testおよびカイ2乗検定を用いて行った。

結 果

前治療群は13症例13周期、対照群は15症例15周期であった。前治療群での血中CA125値は、酢酸ナファレリン投与前は75.8IU/mlであったものが治療後15.8IU/mlまで低下した($P < 0.05$)。対照群の平均血中CA125値は56.8 IU/mlであった。使用したゴナドトロピンの平均使用量は前治療群で27.1アンブル、対照群で27.2アンブル、平均使用日数はそれぞれ8.9日、9.1日であり両群間に有意な差は認めなかった(表2)。キャンセル率も両群間で差は認めなかった。

穿刺卵胞数、採取卵数、受精卵数、分割卵数および移植胚数は前治療群でそれぞれ平均11.2個、7.4個、4.8個、4.5個および2.5個であり、対照群のそれぞれ9.0個、5.4個、4.1個、3.5個および2.3個と比較して有意な差は認めなかった。受精率、分割率は前治療群で65.6%(63/96)、93.7%(59/63)、対照群で75.3%(61/81)、86.9%(53/61)であり両群間に有意な差を認めなかった。黄体期中期の血中エストラジオール値は対照群553.8pg/ml、前治療群603.7pg/mlと両群間に差を認めなかった(表2)。胚のgradeは表3の基準に従って行ったが、移植した胚のgradeの平均スコアは前治療群で5.9、対照群で5.7と両群間に差はなく、移植した胚全体に占める形態良好胚(grading scoreで7点以上)⁶⁾の割合も前治療群で28.1%(9/32)、対照群で17.6%(6/34)と両群間に有意な差を認めなかった。胚移植あたりの妊娠率は前治療群で30.8%(4/13)、対照群で7.1%(1/14)と有意な差はないが直前治療群が高い傾向を示し、胚着床率は前治

表2 両群における体外受精の成績

	前治療群	対照群	有意差
キャンセル	0	0	n.s.
ゴナドトロピン使用量(A) *	27.1	27.2	n.s.
〃 使用日数(日) *	8.9	9.1	n.s.
穿刺卵胞数 *	11.2	9.0	n.s.
採取卵数 *	7.4	5.4	n.s.
受精卵数 *	4.8	4.7	n.s.
分割卵数 *	4.5	3.5	n.s.
移植胚数 *	2.5	2.3	n.s.
受精率 (%)	65.7 (63/96)	75.3 (61/81)	n.s.
分割率 (%)	93.7 (59/63)	86.9 (53/61)	n.s.
黄体期中期 E ₂ 値 (pg/ml) *	603.7	553.8	n.s.

* 平均値

表3 徳島大学における胚のgrading score

点数	0	2	3	5
発育速度 (割球数)	1	—	2~3	4≤
fragmentation (%)	50≤	25≤, <50	<25	0
減点 (-2点)	透明帯変形, 細胞質黒色, 空胞変成, 割球大小不同			

* 合計点で胚のgradeを評価する

表4 両群における移植胚のgrading, 妊娠率および胚着床率

	前治療群	対照群	有意差
移植胚のgrade	5.9	5.7	n.s.
形態良好胚の割合 (%)	28.1 (9/32)	17.6 (6/34)	n.s.
妊娠率 (/ET) (%)	30.8 (4/13)	7.1 (1/14)	n.s.
胚着床率 (%)	21.9 (7/32)	2.9 (1/34)	p<0.01

療群で21.9% (7/32), 対照群で2.9% (1/34)であり前治療群が有意に高値を示した ($p<0.05$) (表4). 妊娠の転帰に関しては, 前治療群では妊娠4例全例より7名の生児を得ており, 対照群では1例の妊娠より生児を1名得ている.

考 察

子宮内膜症の病因として免疫異常があることが以前から指摘されており⁷⁾, この免疫異常が子宮内膜にも影響^{8,9)}をきたし, 妊娠が成立しにくくなると言われている. 子宮内膜症の存在がIVF-ETの成績にどのように影響するかについては異論のあるところであるが, Ariciら¹⁰⁾は軽度の子宮内膜症があってもIVF-ETの妊娠率は低くなると報告している. さらに海外で行われている卵子提供プログラムにおいて, 子宮内膜症のドナーから得られた卵を用いた場合,

着床率が有意に低率であったと報告しており¹¹⁾, 子宮内膜症の存在が卵のqualityにも影響を与えることが示唆されている. このような事実から, 子宮内膜症による不妊症に対して, IVF-ETを行う前にGnRHa等で治療してからIVF-ETを実施したとの報告がみられる^{2-4), 12-14)}. Nakamuraら²⁾は, 一般的な治療で妊娠しなかった子宮内膜症による不妊患者に対して, 卵巣刺激に先立ち少なくとも60日間GnRHaを投与するultralong法でIVF-ETを行い良好な成績を得ている. Dickerら⁴⁾は重症の子宮内膜症による不妊患者に対して6カ月のGnRHa治療後にIVF-ETを行ったところ, 臨床妊娠率が有意に向上し, これは胚のqualityが良好でpreclinical abortionが減少したためであると考察している. また, Marcusら¹²⁾は重症の(rAFSでⅢ期, Ⅳ期)子宮内膜症に対して2カ月から7カ月のGnRHa治療をした後, IVF-ETを施行した結果, 未治

療の対照群に比して有意に高い妊娠率を示したと報告している。しかし、Nakamuraら²⁾はlong法に比較してultralong法ではゴナドトロピンの使用量が有意な差はないものの多く必要であったこと、ゴナドトロピンの使用日数は有意に長くなったと報告していることや、Marcusら¹²⁾もGnRHaで治療してからIVF-ETを行った場合ゴナドトロピンの使用量が有意に増加したなどの報告から長期間のGnRHa投与は卵巣の反応性を低下させると考えられる。

我々の施設では以前からあらかじめ採卵日を決めてから刺激を開始する採卵日固定法⁵⁾でIVF-ETの卵巣刺激を行っている。この方法ではゴナドトロピンの投与量、投与日数を固定しているので、GnRHaを長期間使用した場合、卵巣の反応性の悪い症例では、キャンセルになってしまう可能性がある。そこで、GnRHaを長期間(90日以上)使用した後、1度排卵周期に戻してから、IVF-ETのための刺激を行うprotocolを試みた。その結果キャンセル症例はなく、ゴナドトロピンの使用量や使用日数も前治療群と対照群とで全く差を認めなかった。さらに、妊娠率は両群間で有意な差を認めなかったが、対照群に比して高率を示し、着床率は有意に高率であった。この結果は、移植胚数あたりの着床胚数はlong法よりultralong法の方が高値であったとするNakamuraら²⁾、Marcusら¹²⁾の報告と一致する。この機序として、Marcusら¹²⁾は子宮内膜症による不妊患者にGnRHaを長期間用いることにより長期間無月経となり、子宮の胚の着床に対する感受性が亢進し、その結果胚の着床、さらに妊娠率が改善すると推察している。Nakamuraら²⁾、Dickerら⁴⁾は長期間のGnRHaの使用によって胚あるいは子宮内膜のqualityが改善し、その結果妊娠率、胚着床率が改善すると推察している。我々の検討では、移植した胚の数、その胚のgrade、さらに良好胚の頻度に差は認められないにもかかわらず、胚着床率が有意に高率であったことから、前治療によって着床にかかわる環境(子宮内環境)が改善したと推測している。Edwardsら¹⁵⁾は、性腺欠損婦人や長期間の無月経婦人に対してホルモン補充を行い卵子提供により得た卵を移植すると月経周期を有する同年代の婦人より妊娠率が高く、長期間無月経であることが着床に有利に働いていると報告している。我々の行った前治療によって着床にかかわる環境(子宮内環境)が改善した機序としては、Marcusら¹²⁾の考察のごとく、GnRHaで前治療を行っている間(約90日)に血中エストラジオールが低下し、無月経となることにより、子宮内膜のステロイ

ド感受性システムが休止状態になり、pinopods(細胞が液体を飲み込む過程で形成される細胞質の突出¹⁶⁾)のようなステロイド感受性の構造物がその機能を回復するために子宮内膜の胚受容性が治療前に比べて改善するため考えている。

結論として、子宮内膜症による不妊症患者ではIVF-ETをする前にGnRHaで治療することにより、胚着床率が改善することが判明した。その機序については、現時点では不明であり、今後検討する必要がある。

文 献

- 1) Matson PL and Yovich JL (1986) The treatment of infertility associated with endometriosis by *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 46:432-434
- 2) Nakamura K, Oosawa M, Kondou I, et al. (1992) Menotropin stimulation after prolonged gonadotropin releasing hormone agonist pretreatment for *in vitro* fertilization in patients with endometriosis. *J Assist Reprod Genet* 9:113-117
- 3) Dikkers D, Goldman GA, Ashkenazi J, et al. (1990) The value of pre-treatment with gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue in IVF-ET therapy of severe endometriosis. *Hum Reprod* 4:418-420
- 4) Dikkers D, Goldman JA, Levy T, et al. (1992) The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing *in vitro* fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 57:597-600
- 5) Nakagawa K, Yamano S, Senuma M, et al. (1997) Avoidance of oocyte retrieval on the weekend through the use of scheduled ovarian hyperstimulation for *in vitro* fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 68:787-790
- 6) 山崎 淳(1998) 受精の確認・胚のgrading. ARTスタッフマニュアル, 青野敏博編, 医学書院, 東京, pp81-84
- 7) 梅咲直彦, 藤野祐司(1996) 子宮内膜症と免疫. 産婦の実際 45:177-186
- 8) Weed JC and Arquembourg PC (1980) Endometriosis: can it produce an autoimmune response resulting in infertility? *Clin Obstet Gynecol* 23:885
- 9) Isaacson KB, Galmas M and Coutifaris C (1990) Endometrial synthesis and secretion of complement component-3 by patients with and without endometriosis. *Fertil Steril* 53:836-841
- 10) Arici A, Oral E, Bukulmez O, et al. (1996) The effect of endometriosis on implantation: results from

- the Yale University in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 65: 603-607
- 11) Simon C, Gutierrez A, Vidal A, et al. (1994) Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction : results from *in vitro* fertilization and oocyte donation. *Hum Reprod* 9:725-729
 - 12) Marcus SF and Edwards RG (1994) High rates of pregnancy after long-term down-regulation of women with severe endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 171:812-817
 - 13) Remorgida V, Anserini P, Croce S, et al. (1990) Comparison of different ovarian stimulation protocols for gamete intrafallopian transfer in patients with minimal and mild endometriosis. *Fertil Steril* 53:1060-1063
 - 14) Chedid S, Camus M, Smitz J, et al. (1995) Comparison among different ovarian stimulation regimens for assisted procreation procedures in patients with endometriosis. *Hum Reprod* 10: 2406-2411
 - 15) Edwards RG, Marcus S, Macnamee M, et al. (1991) High fecundity of amenorrhoeic women in an embryo transfer programme. *Lancet* 338:292-294
 - 16) Weitlauf HM (1988) *Biology of implantation. The Physiology of Reproduction* : Konbil E, Neill J et al (eds), Raven Press,Ltd., New York, pp231-251
- (受付 : 1999年 8 月 2 日)
(受理 : 1999年10月 2 日)

Effectiveness of Pre-treatment with Gonadotropin-releasing Hormone Agonist to the patients with Endometriosis in *in vitro* Fertilization and Embryo Transfer

Koji Nakagawa, Shuji Yamano, Hisayo Nakasaka, Junko Komatsu,
Kenji Hinokio and Toshihiro Aono

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
the University of Tokushima, Tokushima 770-8503, Japan

The effectiveness of pre-treatment with GnRHa on outcomes of IVF-ET in the patients with endometriosis was studied. In the pre-treatment group (n=13), GnRHa (Nafarelin acetate 400 μ g/day) was administered for more than 90 days prior to the IVF-ET treatment cycle. After the first menstrual flow, the nasal administration of GnRHa (Buserelin acetate 600 μ g/day) was started and ovarian stimulation was commenced 11 days before the scheduled day for oocytes retrieval. In the control group (n=15), patients have not been received any treatment for endometriosis in recent one year. The pregnancy rate per ET in the pre-treatment group (30.8%) was higher than that in the control group (7.1%), but not statistically significant. However the implantation rate in the pre-treatment group (21.9%) was significantly higher than that in the control group (2.9%) in the face of the same grading score of transferred embryos. The treatment with GnRHa prior to IVF-ET treatment was effective for improving the implantation rate of IVF-ET in the infertile patients with endometriosis.

Key words : IVF-ET, endometriosis, pre-treatment, GnRHa, implantation rate

(Jpn J Fertil Steril 45:1-6 2000)

クラミジア感染に伴う卵管機能の変化： 卵管通気波形の数値化による評価

Evaluation of Developing Damages in Fallopian Tubes Infected with Chlamydia Trachomatis : Analysis of Waveform in Tubal Insufflation

羽 原 俊 宏

Toshihiro HABARA

鎌 田 泰 彦

Yasuhiko KAMADA

野 口 聡 一

Soichi NOGUCHI

中 塚 幹 也

Mikiya NAKATSUKA

高 田 雅 代

Masayo TAKATA

新 谷 恵 司*

Keiji SHINTANI,

木 村 吉 宏

Yoshihiro KIMURA

浅 桐 和 男

Kazuo ASAGIRI

工 藤 尚 文

Takafumi KUDO

岡山大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Okayama University Medical School
Okayama 700-8558, Japan

卵管通気検査での通気圧波形を数値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および妊娠予後との関連を検討した。

クラミジア抗体検査後に卵管通気検査を施行した102例をA群：抗体陰性，B群：IgA抗体陽性，C群：IgG抗体のみ陽性の3群に分け，通気圧波形の初期圧，平均圧，振幅について数値化し，検討した。

1. クラミジア抗体陽性群(B, C群)では，抗体陰性群より初期圧200mmHg以上の症例が高頻度に見られた。2. 比較的新しいクラミジア感染と考えられるIgA陽性のB群は抗体陰性群のA群に比較し平均圧および平均圧/初期圧の比は有意に低値を示した。3. 陳旧性の感染と考えられるIgGのみ陽性のC群ではA群に比較し初期圧が有意に高く，平均圧/初期圧の比は有意に低値を示した。4. B, C群で妊娠しない症例には平均圧/初期圧の比が低値の症例が高頻度に見られた。

これらの各種パラメーター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。また，妊娠しにくい症例の抽出には平均圧/初期圧の比などのparameterが有意義であることが示唆され，これらの値が妊娠群の示す値よりより大きく逸脱した症例については早期に腹腔鏡，卵管鏡などで卵管の詳細な検査や不妊治療法の変更も考慮する必要があると考えられた。

キーワード：クラミジアトラコマチス，卵管，卵管通過性

(日不妊会誌 45:7-12 2000)

緒 言

Chlamydia trachomatis感染はSTDのひとつとして増加傾向にあり子宮頸管炎ののち卵管への上行性感染により，卵管周囲の癒着や卵管の閉塞などを残

し，卵管性不妊の主要原因となる^{5,6)}。クラミジア感染の診断は，クラミジア抗体価，抗原，DNAの検出などにより行われているが¹⁻⁴⁾，挙児希望の症例では感染の診断と同時に卵管機能の評価も必要である⁷⁾。卵管通気検査は低侵襲で，外来で簡易に行える検査

*現 広島日赤病院産婦人科

法であり、卵管機能の評価に頻用されているが、従来の波形分類では各臨床医の主観による診断に頼る面が大きく、その判定に明確な基準がない。そこで今回、私達はこれを客観的に評価することを目的として、卵管通気検査での通気圧波形の数値化を試みた。さらに、この方法を用いて感染後、種々の時期のクラミジア感染症例における卵管通気圧波形を解析し、卵管機能の変化を検討した。

対象および方法

当院不妊外来で1994年4月から1998年8月の間にクラミジア抗体検査を施行した後、卵管通気検査を施行し、その後6カ月以上follow upできた102例を対象とした。クラミジア抗体は血清中のIgG抗体とIgA抗体についてEIA法(ペプタイドクラミジア)にて測定し、いずれもインデックス0.9以上を陽性とした。IgA抗体陽性例は比較的新しい活動性のクラミジア感染であり、またIgG抗体のみ陽性例では既往のクラミジア感染であると考えられる^{3,8)}。そこで、102例を抗体陰性例(IgA(-)IgG(-))のA群、IgA抗体陽性例のB群、IgG抗体のみ陽性(IgA(-)IgG(+))のC

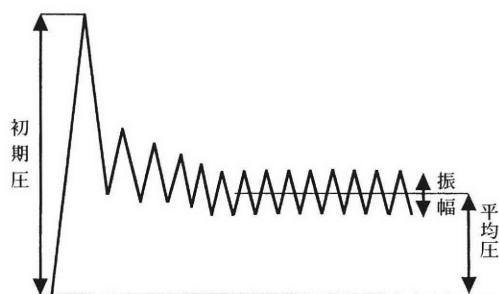
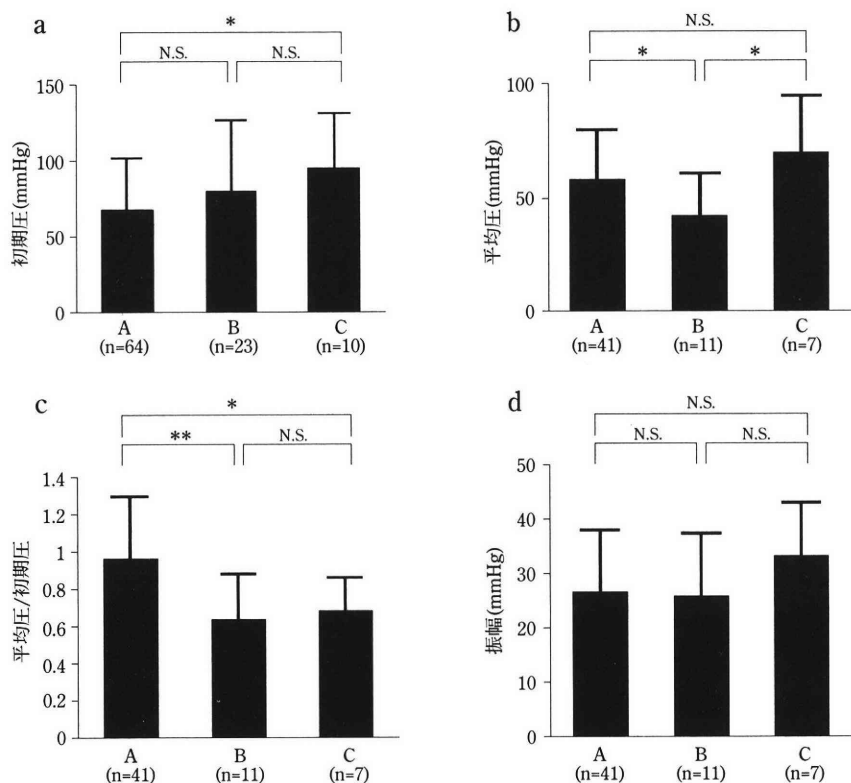


図1 通気圧波形の各種parameter

群の3群に分けて検討した。A群66例、B群25例、C群11例であり、抗体陽性率(IgG抗体とIgA抗体のいずれかが陽性)は35.3%であった。抗体陽性例にはクラリスロマイシン400mg/日を2週間投与した後、卵

表1 各群の内訳と卵管閉塞症例

	症例数	mean±S.D.(歳)	初期圧≥200mmHg
A群: 抗体陰性	66	31.8±4.5	2(3.0%)
B群: IgA抗体陽性	25	30.3±6.2	2(8.0%)
C群: IgG抗体のみ陽性	11	29.6±5.2	1(9.1%)
計	102	31.2±4.8	5(4.9%)



a: 初期圧 b: 平均圧 c: 平均圧/初期圧 d: 振幅 Values are mean±S.D. *p<0.05 **p<0.01

図2 卵管通気検査における各parameterの分布

管通気検査を施行した。

卵管通気検査はアトム社のPA-200を使用し、月経終了後、卵胞期中期に施行した。通気波形の数値化には、以下の各パラメーターを定義した(図1)。初期圧は第1波形の通気圧とした。また平均圧および振幅は、通気圧が一定となるまで計測されていたもののみを対象とし、通気圧が一定に安定した部位で、5つ分の波形の振幅の平均を振幅とし、また平均圧はその振幅の中央での通気圧を平均した。

統計学的解析にはunpaired t-testを用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

1. クラミジア感染と卵管閉塞症例

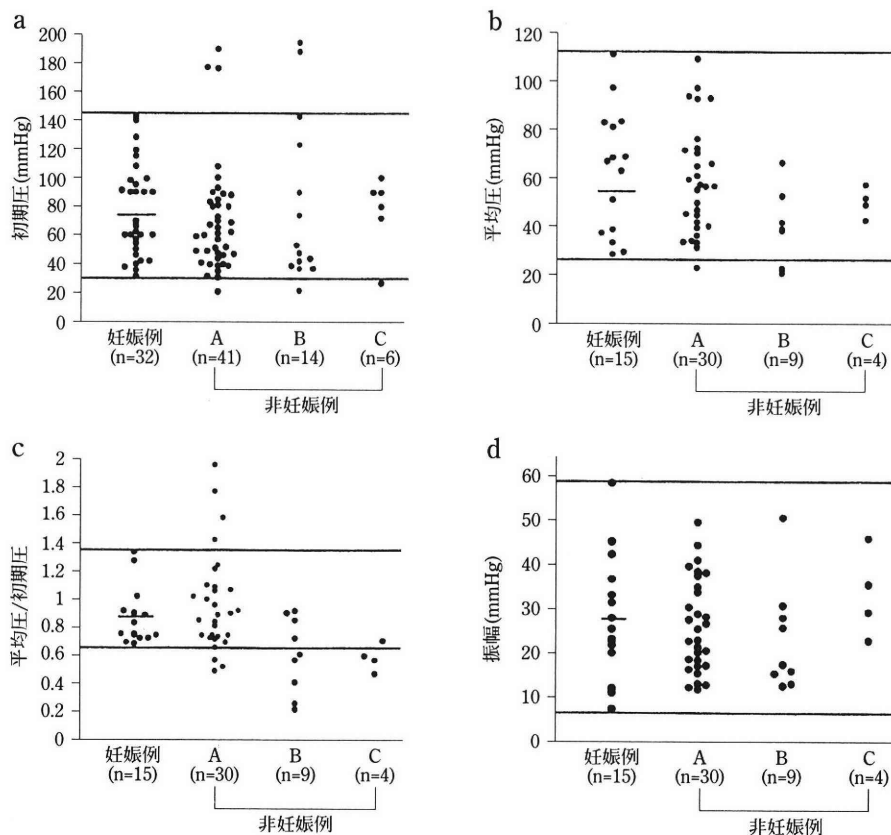
表1はA, B, Cの3群の内訳と卵管通気検査の初期圧が200mmHgを越え、両側卵管閉塞と診断した症例を示したものである。卵管閉塞症例は、A群で2例(3.0%), B群2例(8.0%), C群1例(9.1%)にみられ、各群に有意差はなかった。

2. クラミジア感染と通気圧波形の各種parameter

初期圧が200mmHg以上となり波形の検討ができなかった例を除外した97例(A群64例, B群23例, C群10例)について3群間での各種parameterを比較検討した。

初期圧(図2a)に関しては比較的新しい感染であるB群では 81.6 ± 47.7 mmHg(mean $\pm$ S.D.)でA群の 68.9 ± 34.9 mmHgより高値であったが有意差はなかった。しかし陳旧性の感染であるC群では 97.1 ± 37.3 mmHgとA群に比して有意に高値をとっていた($p < 0.05$)。

平均圧(図2b)は逆にB群では 41.4 ± 18.9 mmHgでA群 56.9 ± 22.5 mmHgに比し有意に低値をとっていたが($p < 0.05$)、C群は 68.7 ± 25.8 mmHgでありA群と有意差はなかった。平均圧/初期圧(図2c)の比は波形が変動するパターンを示し、この値が低ければ初期圧が上昇した後に大きく圧が下降し急峻な山のような形をとる。A群の 0.96 ± 0.33 に対しB群は 0.63 ± 0.25 、C群は 0.68 ± 0.18 でありB, C群ともにA群に比較し有意に低値を示していた。振幅(図2d)に関してはA群で 26.1 ± 11.8 mmHg, B群で 25.4 ± 12.0 mmHg, C群



a: 初期圧 b: 平均圧 c: 平均圧/初期圧 d: 振幅

図3 卵管通気検査における妊娠例、非妊娠例における各parameterの分布

で 32.9 ± 10.1 mmHgであり、3群間で有意差を認めなかった。

3. 妊娠例、非妊娠例と通気圧波形の各種parameter

次に体外受精やFTカテーテルによる再疎通術後に妊娠した例を除外するとA群の妊娠例は22/63例(34%)、B群7/21例(33.3%)、C群3/9例(33.3%)であった。これらの妊娠した症例の通気波形のparameterがどのような値をとっていたかを見てみた。図3a, 3b, 3c, 3dはともに一番左列が全妊娠例のparameterの値を示しておりその右側にA, B, C群別に妊娠に至らなかった症例のparameterを示している。横線は妊娠例でのparameterの最高値と最低値および平均値を示している。

初期圧(図3a)を見てみると妊娠例は32から143 mmHgに分布しており非妊娠例では170 mmHg以上の極端に高値のものが含まれ、これらの症例では卵管通過障害が不妊に関与している可能性があると考えられる。

平均圧(図3b)では妊娠例もかなり広く分布しており、これにより妊娠しにくい例を抽出することは困難と思われる。

平均圧/初期圧の比(図3c)では妊娠例は0.6から1.4に分布しており、0.6より低値を示す例には妊娠は見られなかった。クラミジア感染群のB, C群では妊娠例が分布するこの範囲を逸脱して低値を示す例、すなわち通気波形では最初に高いpeakを示した後大きく通気圧が低下して、一定となる形を示す症例が比較的多く、それらの症例が妊娠せず残っていると思われる。

振幅(図3d)を見ると妊娠例が広範囲に分布しており、振幅によっても妊娠しにくい例を抽出することは困難であると思われる。

考 察

卵管に異常のある症例について検討すると、土岐ら⁵⁾は73.5%にIgG抗体陽性を認め、その中でとくに、卵管水腫症例は82.4%に抗体陽性を認めたとしている。また武内ら¹⁰⁾はHSGの所見から癒着、狭窄、閉塞などが疑われる症例ではIgG陽性、IgA陽性の頻度は各53.1%, 34.7%であり、HSG正常例の各27.9%, 4.4%に比較して明らかに高頻度であったと報告している。今回の検討でも卵管閉塞症例は、クラミジア抗体陰性のA群が3%, IgA陽性のB群が8%, IgGのみ陽性のC群9.1%と、クラミジア感染例では2~3倍と高頻度であった。

不妊症患者全体でも抗体陽性の頻度はIgG抗体が

33.3~43%, IgA抗体が7.8~13.1%と報告されている^{2,9)}。今回の対象症例全体の抗体陽性率はIgG抗体28.4%(29例/102例)、IgA抗体24.5%(25例/102例)であり、最近の感染を疑わせるIgA抗体の陽性率は従来の報告と比較して高かった。妊婦での抗体陽性率はIgG抗体が22.2~27.5%, IgA抗体が10.1%と不妊症患者に比較して低く^{10,11)}、やはりクラミジア感染症の不妊症への関与が推測される。

クラミジア抗体検査IgA, IgGの結果により、すなわちクラミジア感染成立後の時間的経過により、卵管機能が変化していくことが推測されるため私達の設定した卵管通気検査の波形の各parameterによりその変化がとらえられるかを検討した。初期圧は比較的新しい感染と思われるB群よりも、陳旧性感染のC群で有意に高値をとっていた。逆に平均圧はB群で有意に低値となっていたが、C群ではA群と有意差は無かった。このようにクラミジア感染後の経過によりparameterが変化していくことが示唆され、これは卵管機能の変化を反映していると考えられた。野口ら^{12,13)}は家兎の卵管にChlamydia trachomatisを接種した感染モデルにおいて時間的経過とともに卵管上皮は線毛細胞の配列の異常、分泌細胞に存在するvilliの変性がみられることを報告している。感染初期には卵管上皮の障害は強くなく、修復可能であるが、感染が継続すると腹腔内に拡がったクラミジアが、感染により貯溜した腹水とともに卵管采側から卵管に逆流して卵管炎、卵管周囲癒着、卵管采癒着、卵管水腫等へと慢性経過をたどり、症例によっては卵管閉塞を来すことを報告している。

この報告と私達の検討した通気検査の結果を総合して考えると感染後比較的早い時期の卵管上皮の線毛細胞の配列異常、分泌細胞のvilliの変性などは卵管上皮の運動の低下、卵管の虚脱を引き起こしB群で見られる平均圧の低下に関与している可能性がある。その後の卵管の慢性的変化は初期圧の上昇を起こし、症例によっては卵管閉塞へと進行すると考えられる。

平均圧/初期圧(初期圧に対する平均圧の比)を見てみると、A群に比較しB群、C群は有意に低値をとっていた。これはクラミジア感染により通気波形は第1波が高くその後圧は下降し、急峻な山のような形をとることを示している。このような同じ平均圧/初期圧の低下でもB群とC群とでは違いがあり、B群では平均圧が有意に低下していることが影響し、一方、C群では初期圧が有意に上昇していることが影響していた。また今回の検討では各群間の振幅には

差が無く、クラミジア感染症による卵管障害との関連を推定出来なかったがその値が卵管機能の何を反映しているか、さらなる検討が必要である。

次に通気検査の波形の各parameterと妊娠予後について解明する第1歩として各parameterの値がどの範囲に分布していれば自然妊娠の可能性があるかという視点で検討した。平均圧も、振幅も単独では妊娠例が広範囲に分布しているため、妊娠しにくい例を抽出することは困難と考えられた。しかし初期圧が極端に高値の例は妊娠しておらず、また平均圧/初期圧が0.6より低値を示す症例に妊娠例は見られず、クラミジア感染群のB、C群ではかなりこの範囲を逸脱し低値を示す例が妊娠せず残っていると考えられる。このような症例に対しては少なくとも感染後の卵管機能の経時的变化、すなわち卵管通気検査の各parameterが正常化するかどうかのfollow upが必要であり、また腹腔鏡、卵管鏡等の追加検査も考慮する必要があると思われる。さらに体外受精などの治療法の選択のための指標となるかどうかについても今後、検討が必要である。

本論文の要旨の一部は第43回日本不妊学会(1998年11月、鹿児島)で報告した。

文 献

- 1) 桜田芳弘, 林 宏, 藤本征一郎 他(1989) 不妊カップルにおけるクラミジア感染について。日不妊会誌 34:682
- 2) 大須賀 稯, 鈴木尚子, 水野正彦 他(1990) 不妊外来における抗クラミジア抗体測定の意義。日不

妊会誌 35:979

- 3) 野口昌良, 岡本俊充, 保條説彦 他(1990) クラミジアIgA抗体の臨床的意義。産婦の実際 39:1701-1705
- 4) 保田仁介(1995) クラミジア感染の診断。産科と婦人科 62:633-638
- 5) 土岐一宏, 中村元一, 中野仁雄 他(1989) クラミジア感染症と卵管障害の検討。日不妊会誌 34:680
- 6) 野口昌良, 岡本俊充, 中西正美 他(1990) 卵管性不妊症とクラミジアトラコマチス感染に関する検討。日不妊会誌 35:547-551
- 7) 田中広一(1991) Chlamydia trachomatis検査陽性例の卵管機能。日不妊会誌 36:1111
- 8) B.Piura, I.Sarov, V.Insler et al.(1985) IgG and IgA antibodies specific for Chlamydia trachomatis in salpingitis patients. Eur.J. Epidemiol. 1:110-115
- 9) 越後谷朋子, 植村次雄, 水口弘司 他(1990) 当科不妊症及び不育症例におけるクラミジア感染について。日不妊会誌 35:979
- 10) 武内裕之, 岩佐 剛, 宇津野栄 他(1990) 不妊症とChlamydia trachomatis 感染。日不妊会誌 35:415-419
- 11) 北川博之, 中橋徳文, 杉並 洋 他(1991) 不妊症におけるChlamydia trachomatis感染症と腹腔鏡所見。日不妊会誌 36:1110
- 12) 保條説彦, 野口昌良, 中西正美 他(1989) 実験的卵管炎に関する組織学的検討。産婦人科マイクロサージェリー学会雑誌 5:42-45
- 13) 野口昌良, 秋田敏行, 石原実他(1986) Chlamydia trachomatisによる実験的卵管炎の検討。日不妊会誌 31:417-420

(受付: 1999年9月2日)

(受理: 1999年10月15日)

**Evaluation of Developing Damages in Fallopian Tubes Infected with Chlamydia Trachomatis :
Analysis of Waveform in Tubal Insufflation**

Toshihiro Habara, Mikiya Nakatsuka, Yoshihiro Kimura, Yasuhiko Kamada,
Masayo Takata, Kazuo Asagiri, Soichi Noguchi, Keiji Shintani and Takafumi Kudo

Department of Obstetrics and Gynecology,
Okayama University Medical School
Okayama 700-8558, Japan

Chlamydial infection leads to dysfunction of fallopian tubes and sterility. We investigated tubal damage caused by Chlamydial infection by analyzing waveforms in tubal insufflation test.

After serological test for Chlamydia trachomatis tubal insufflation test was performed in 102 patients. We measured pressure of the initial peak (Pi), and mean pressure of steady state (Ps), and mean amplitude of steady state (As). Patients were divided into three groups; group A (IgA (-) IgG (-)), group B (IgA (+) IgG (-), or IgA (+) IgG (+): recent infection) and group C (IgA (-) IgG (+): past infection).

1. Both average Ps and average Ps/Pi ratio in group B were lower than those in group A.
2. Average Pi in group C was higher than that in group A. Average Ps/Pi ratio in group C was lower than that in group A.
3. Patients with decreased Ps/Pi ratio (less than 0.6) had low pregnancy rate.

Analysis of waveforms in tubal insufflation test was useful to evaluate tubal damage. Patients who have abnormality in parameters (Pi, Ps, and Ps/Pi ratio) have low pregnancy rate. Further examination and treatment of fallopian tubes should be performed for these patients.

Key words: Chlamydia trachomatis, fallopian tubes, tubal insufflation

(Jpn J Fertil Steril 45:7-12 2000)

Contractions of Mouse Blastocysts Cultured from Fertilized Ova or Morulae

Sueo NIIMURA and Ryoko WAKASA¹⁾

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture,
Niigata University, Niigata 950-2181, Japan

¹⁾ Graduate School of Science and Technology,
Niigata University, Niigata 950-2181, Japan

Abstract: Contractions were observed in blastocysts cultured from fertilized ova or morulae using time-lapse videomicrography, in order to determine whether contractions differed according to developmental stages of culture initiation. Contractions were also examined in blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova, and the results were compared with those in blastocysts cultured from *in vivo* fertilized ova.

Until 32 hrs after blastocyst formation, the numbers of weak and strong contractions in blastocysts cultured from fertilized ova were 4.00 and 1.40 times, respectively, which were not significantly different from 4.18 and 1.32 times observed in blastocysts cultured from morulae. The hatching rate did not differ between those blastocysts; namely, 43.3% and 53.0%, respectively. The numbers of weak (3.97 times) and strong (1.84 times) contractions, and the hatching rate (34.6%) in blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova were not significantly different from those in blastocysts cultured from *in vivo* fertilized ova.

From these results, it was revealed that contractions of blastocysts do not differ according to developmental stages of culture initiation, and it was also inferred that the occurrence of contractions in blastocysts is not influenced by culture. In addition, it was clarified that the number and degree of contractions in blastocysts derived from *in vitro* fertilized ova are identical to those from *in vivo* fertilized ova.

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

(Jpn J Fertil Steril 45:13-18 2000)

Introduction

The presence of contractions in mammalian blastocysts was first reported by Lewis and Gregory¹⁾ in 1929. They observed, by time-lapse microcinematography, the repeated contraction and expansion in cultured rabbit blastocysts. The contraction has since been observed by time-lapse microcinematography or time-lapse videomicrography in cultured blastocysts of mice²⁻¹⁰⁾, rats¹¹⁾, guinea pigs¹²⁾, hamsters¹³⁻¹⁵⁾ and cattle^{16, 17)}. While the physiological roles of contraction in blastocysts are unknown, the contractions have been considered to participate in the process of blastocyst hatching^{5, 6, 9-11)}.

Since Checiu and Checiu¹⁸⁾, who collected mouse

blastocysts from uteri, observed elimination or compaction of blastocoel only in 2.2% of embryos, they thought that blastocysts developed *in vivo* have no contractions, and frequent contractions observed in cultured blastocysts occur by the influence of culture, but are not related to hatching. Provided that contractions of blastocysts are induced due to the influence of culture, as reported by Checiu and Checiu¹⁸⁾, contractions should become more remarkable in blastocysts developed in culture for a longer period of time. However, there have been no reports determining what difference is present according to the duration of culture.

In the present study, the relationship between contractions and the duration of culture was studied in

blastocysts cultured from fertilized ova or morulae using time-lapse videomicrography, in order to determine whether contractions of blastocysts occurred by the influence of culture. Contractions in blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova were also examined, and were compared with those in blastocysts cultured from *in vivo* fertilized ova.

Materials and Methods

Animal

Ninety female mice of the ICR strain were used in the present study. These mice were kept and fed normally in a room at 24°C and lit 14 hrs a day, from 4 a.m. to 6 p.m., and were superovulated with 5 i.u. PMSG (Serotropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd., Japan), and with 5 i.u. hCG (Gonatropin, Teikoku Hormone Manufacturing Co. Ltd.) injected 48 hrs apart. Immediately after the hCG injection, about two thirds of superovulated females were mated with mature males of the same strain.

Influence of duration of culture on contractions in blastocysts

In order to observe the influence of duration of culture on contractions of blastocysts, fertilized ova and morulae were collected from oviducts or uteri of superovulated and mated females at 15 or 80 hrs after the hCG injection, respectively. The ova were cultured in M2 medium¹⁹⁾ containing 100μM EDTA-2Na (EDTA-M2 medium) for 28 hrs at 37°C in a CO₂ incubator (5% CO₂ in air) for development to the 2-cell stage. Two-cell embryos developed from the ova and morulae collected from uteri were cultured separately in M16²⁰⁾ medium in a CO₂ culture chamber (5% CO₂ in air: SK-1, Sankei, Japan) equipped with an inverted microscope (DIAPHOT, Nikon Corporation, Japan) at 37°C.

To analyze contractions of blastocysts, observations were performed on the images which were taken at 4-sec intervals by a CCD color camera (Hitachi Electronic Co., Japan) connected with an inverted microscope and a time-lapse video cassette recorder (Victor Co., Japan). The analyses of contraction were done until 32 hrs after blastocyst formation, according to our previous reports^{9, 10)}. The degree of contractions was evaluated as follows: the volume of each blasto-

cyst was calculated from its diameter on a display, measured with a micrometer according to the method of Hurst and MacFarlane²¹⁾; the percentage of volume reduction at the time of contraction from the volume before contraction was classified as weak when the percentage was less than 20% and as strong when 20% or more. Since blastocysts are not completely sphere in shape, the mean value of short and long axes of each embryo was used as the diameter of that embryo.

Completion of hatching in cultured blastocysts was observed until 140 hrs after blastocyst formation.

Observation of contractions in blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova

In order to observe contractions of blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova, recently ovulated ova were collected from oviducts of superovulated females 15 hrs after hCG injection and inseminated *in vitro*. Sperm suspension was prepared by minutely cutting caudal epididymis of mature males in TYH medium²²⁾, and spermatozoa were preincubated in TYH medium for 1 hr at 37°C in a CO₂ incubator. Small volume of the sperm suspension was introduced into 100μl droplets of TYH medium, so that the final concentration of spermatozoa was adjusted to 3~5×10⁵/ml. Recently ovulated ova surrounded by cumulus cells were introduced into the droplets of sperm suspension and cultured at 37°C in a CO₂ incubator. After 6 hrs, fertilized ova were cultured in EDTA-M2 medium for 22 hrs, and then successively cultured in M16 medium for development to the blastocyst stage. The contraction of blastocysts developed from *in vitro* fertilized ova was analyzed using the same equipment and procedure as mentioned above.

Statistical analysis

Concerning the hatching rate of blastocysts, statistical analysis was performed using Chi-square test. The number of times of contraction in cultured blastocysts was statistically analyzed by one-way analysis of variance.

Results

When blastocysts cultured from fertilized ova and morulae were observed by time-lapse videomicro-

Table 1. The number of times of contraction in cultured mouse blastocysts

Developmental stages of culture initiation		No. of blastocysts observed	Hatching rates (%)	Degrees of contraction		
				Weak	Strong	Total
1-cell	<i>in vivo</i> fertilization	30	43.3	4.00±0.40 *	1.40±0.16	5.40±0.43
	<i>in vitro</i> fertilization	32	34.6	3.97±0.42	1.84±0.19	5.81±0.38
	Morula	34	53.0	4.18±0.28	1.32±0.16	5.50±0.28

* Values represent means±S.E.

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

The hatching rate, the number of weak and strong contractions, and total number of contractions in blastocysts cultured from *in vivo* fertilized ova are not significantly different from those in blastocysts cultured from morulae and *in vitro* fertilized ova.

graphy in the present study, it was confirmed that both blastocysts begin to contract and expand repeatedly during the expanded stage from 10 hrs after blastocyst formation.

The numbers of contractions in blastocysts cultured from fertilized ova and morulae until 32 hrs after blastocyst formation are shown in Table 1. The numbers of weak (Fig.1) and strong (Fig.2) contractions and

the total number of contractions in blastocysts cultured from fertilized ova were not significantly different from those in blastocysts cultured from morulae. The hatching rate also did not differ between blastocysts cultured from fertilized ova and morulae.

On the other hand, the numbers of weak and strong contractions in blastocysts cultured from *in vitro* fertilized ova were 3.97 and 1.84 times, respectively,

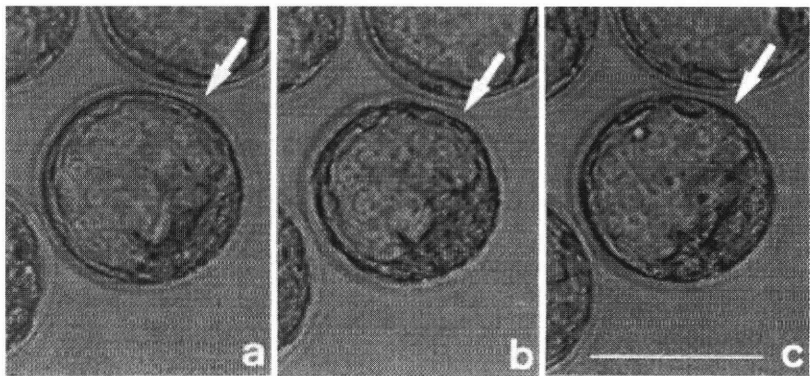


Fig.1 Time-lapse videomicrographs of a mouse blastocyst (arrows) cultured from an *in vivo* fertilized ovum, showing the weak contraction. Scale indicates 100μm.
a: before contraction, b: at the time of contraction, c: at the time of re-expansion.

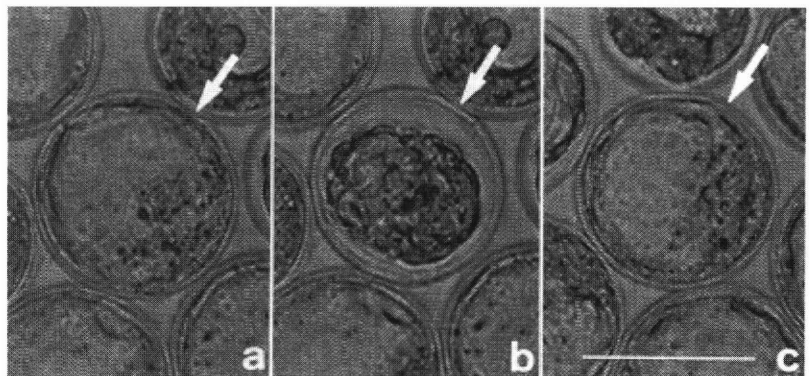


Fig.2 Time-lapse videomicrographs of a mouse blastocyst (arrows) cultured from an *in vivo* fertilized ovum, showing the strong contraction. Scale indicates 100μm.
a: before contraction, b: at the time of contraction, c: at the time of re-expansion.

which were not different from 4.00 and 1.40 times observed in blastocysts cultured from *in vivo* fertilized ova. The hatching rates were 43.3 and 34.6% in blastocysts cultured from *in vivo* and *in vitro* fertilized ova, respectively, disclosing no difference.

Discussion

In the previous studies^{1-8, 11-17}, the number of blastocysts observed as to contractions was as small as 6. Therefore, detailed features of the contraction and its physiological role in blastocysts have not yet been clarified. On the other hand, Niimura and Takahashi⁹, who observed 30 mouse blastocysts by time-lapse videomicrography, have recently reported that a few blastocysts showing no contraction were present during the pre-hatching period, while all of the blastocysts showed repeatedly contractions of different degrees during hatching and until 10 hrs post-hatching periods. Those authors have also reported that the number of contraction in blastocysts was more during hatching period than the periods of pre- and post-hatching, and that the number of strong contraction was less in blastocysts completing hatching than in those incomplete hatching until 32 hrs after blastocyst formation. Therefore, it has been suggested that the contraction, particularly the weak contraction played a role in hatching, whereas the strong contraction was not concerned in hatching, but occurred in blastocysts unable to complete hatching.

On the other hand, Checiu and Checiu¹⁸ have reported that almost no *in vivo* blastocysts showed contractions, while almost all of cultured blastocysts showed contractions, but only 8.9% of such blastocysts could complete hatching. From these results, Checiu and Checiu¹⁸ have thought that contractions of blastocysts are induced due to the influence of culture.

In the present study, the numbers of weak and strong contractions were comparable between blastocysts cultured from fertilized ova and morulae. The hatching rate also did not differ between those blastocysts, namely, 43.3% and 53.0%, respectively, which were remarkably high as compared with that obtained by Checiu and Checiu¹⁸. A similar hatching rate observed in blastocysts cultured from fertilized ova and morulae was thought to be due to similar numbers of weak and strong contractions in those blastocysts. The

results of the present study also suggested that frequent contractions in cultured blastocysts observed by Checiu and Checiu¹⁸ would result from their unsuitable culture condition, indicating that contractions are not influenced by culture if culture of embryos is carried out in a proper condition. Thus their conception that contractions of blastocysts occur by the influence of culture is questionable.

There have been no reports describing the quality of embryos derived from *in vitro* fertilized ova, i.e. ability to hatch in blastocysts, based on contractions. When contractions of blastocysts derived from *in vitro* fertilized ova were observed for the first time in the present study, it was proved that the number of contractions did not differ from that of blastocysts derived from *in vivo* fertilized ova. In addition, it was clarified that the hatching rate is comparable between blastocysts derived from *in vitro* and *in vivo* fertilized ova. Therefore, it was suggested that blastocysts derived from *in vitro* fertilized ova do not differ in quality from those derived from *in vivo* fertilized ova.

References

- 1) Lewis WH and Gregory PW (1929) Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science* 69: 226-229
- 2) Kuhl W and Friedrich-Freksha H (1936) Richtungskörperbildung und Furchung des Eies sowie das Verhalten des Trophoblasten der weißen Maus. *Zool Ans Suppl* 9:187-195
- 3) Borghese E and Cassini A (1963) Cleavage of mouse egg. In: Rose GG (ed.), *Cinematography in Cell Biology*. Academic Press, New York and London, pp263-277
- 4) Cole RJ and Paul J (1965) Properties of cultured preimplantation mouse and rabbit embryos, and cell strains derived from them. In: Wolstenholme GEW, O'Connor M (eds.), *Preimplantation Stages of Pregnancy*. J. & A. Churchill LTD, London, pp82-112
- 5) Cole RJ (1967) Cinematographic observations on the trophoblast and zona pellucida of the mouse blastocyst. *J Embryol Exp Morph* 17:481-490
- 6) Mulnard JG (1967) Analyse microcinématographique du développement de l'œuf de souris du stade II au blastocyste. *Arch Biol Liège* 78:107-138
- 7) Bin L and Mulnard J (1980) Analyse cinématographique et morphométrique du comportement *in vitro* du blastocyste de la souris. *Arch Biol Bruxelles*

- 91:37-48
- 8) Checiu M, Schlechta B, Checiu I, et al. (1990) *In vitro* studies on normal and pathological preimplantation development. I. Events of normal mouse preimplantation development as revealed by microcinematography. *Morphol-Embryol* 36:101-111
 - 9) Niimura S and Takahashi E (1995) Time-lapse videomicrographic observations of the contraction in cultured mouse blastocysts. *Anim Sci Technol* 66:713-719
 - 10) Niimura S and Takahashi E (1996) The *in vitro* influence of indomethacin and prostaglandins on the contraction of mouse blastocysts. *Jpn J Fertil Steril* 41:13-17
 - 11) Bitton-Casimiri V, Brun JL and Psychoyos A (1970) Comportement *in vitro* des blastocystes du 5e jour de la gestation chez la Ratte; étude micro-cinématographique. *CR Acad Sc Paris* 270:2979-2982
 - 12) Blandau RJ (1971) Culture of guinea pig blastocyst. In: Blandau RJ (ed.), *The Biology of the Blastocyst*. The Univ of Chicago Press, Chicago and London, pp59-70
 - 13) Bavister BD (1987) Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. In: Bavister BD (ed.), *The Mammalian Preimplantation Embryo: Regulation of Growth and Differentiation In Vitro*. Plenum Press, New York and London, pp219-249
 - 14) Kane MT and Bavister BD (1988) Vitamin requirements for development of eight-cell hamster embryos to hatching blastocysts *in vitro*. *Biol Reprod* 39:1137-1143
 - 15) Gonzales DS and Bavister BD (1995) Zona pellucida escape by hamster blastocysts *in vitro* is delayed and morphologically different compared with zona escape *in vivo*. *Biol Reprod* 52:470-480
 - 16) Massip A and Mulnard J (1980) Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fert* 58:475-478
 - 17) Massip A, Mulnard J, Vanderzwalm P, et al. (1982) The behaviour of cow blastocyst *in vitro*: cinematographic and morphometric analysis. *J Anat* 134:399-405
 - 18) Checiu I and Checiu M (1996) There are no *in vivo* pulsations of mouse blastocysts. *Morphol-Embryol* 42:147-154
 - 19) Whittingham DG and Fulton BP (1978) Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature* 273:149-151
 - 20) Whittingham DG (1971) Culture of mouse ova. *J Reprod Fert Suppl* 14:7-21
 - 21) Hurst PR and MacFarlane DW (1981) Further effects of nonsteroidal anti-inflammatory compounds on blastocyst hatching *in vitro* and implantation rates in the mouse. *Biol Reprod* 25:777-784
 - 22) Toyoda Y, Yokoyama M and Hosi T (1971) Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jap J Anim Reprod* 16:147-151

(Received August 27 : 1999)

(Accepted October 19 : 1999)

受精卵および桑実胚を培養して発生させたマウス胚盤胞の収縮運動

新村末雄, 若狭良子¹⁾

新潟大学農学部家畜生産学教室

¹⁾ 新潟大学大学院自然科学研究科

受精卵および桑実胚を培養して発生させたマウス胚盤胞について、収縮運動の回数をタイムラプスビデオを用いて観察し、培養時間によって収縮運動に違いがみられるのかどうかを検討した。また、体外受精卵から発生させた胚盤胞についても収縮運動の回数を観察し、体内受精卵から発生させた胚盤胞のそれと比較した。

胚盤胞形成後32時間までの期間において、受精卵を培養して発生させた胚盤胞の弱度と強度の収縮回数は、それぞれ4.00および1.40回であり、桑実胚を培養して発生させた胚盤胞の4.18および1.32回との間に有意な差はみられなかった。また、これらの胚盤胞の孵化率にも差はみられず、43.3および53.0%であった。一方、体外受精卵を培養して発生させた胚盤胞の弱度と強度の収縮運動の回数(3.97および1.84回)および孵化率(34.6%)は、上述の体内受精卵を培養して発生させた胚盤胞のそれと差はなかった。

以上の結果から、培養の期間によって胚盤胞の収縮運動に相違がみられないことが明らかになるとともに、胚盤胞の収縮運動は培養の影響によって出現するものではないことが推察された。また、収縮運動の回数と程度は、体外受精卵に由来する胚盤胞と体内受精卵に由来する胚盤胞との間で相違のないことが確かめられた。

キーワード：胚盤胞，マウス，収縮運動，タイムラプスビデオマイクログラフィー

(日不妊会誌 45:13-18 2000)

体外成熟卵子に対する ICSI による受精率と胚の質に関する検討

Fertilization Rate and Embryo Quality of *in vitro* Matured Oocytes Treated by ICSI

高橋 和政
Kazumasa TAKAHASHI

林 明美
Akemi HAYASHI

鈴木 香織
Kaori SUZUKI

荒木 康久
Yasuhisa ARAKI

本山 光博
Mitsuhiro MOTOYAMA

高度医療技術研究所・中央クリニック

Institute of Advanced Medical Technology Central Clinic,
Tochigi 329-0431, Japan

体外成熟卵子の体外受精、とくに卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) への適応の有効性を検討するため、未成熟の状態で採卵された卵子の体外成熟培養で得られた成熟卵子に ICSI を実施し、受精率および分割胚の形態評価を行った。

採卵時に未成熟であった卵子 162 個 (GV 期: 73 個, M I 期: 83 個) を 24 時間から 30 時間培養したところ、GV 期から培養した卵子の 61.6%, M I 期から培養した卵子の 80.9% が成熟 (第二減数分裂中期) に至った。体外成熟培養によって M II 期に成熟した卵子 83 個 (GV 期由来: 35 個, M I 期由来: 48 個) に ICSI を実施した結果、2 前核が認められものは GV 期由来で 51.4%, M I 期由来で 58.3% であった。さらに ICSI を実施した体外成熟卵子のうち、分割に至ったものは GV 期由来で 42.9%, M I 期由来で 56.3% であり、2 前核が認められた卵子のうち、GV 期由来で 38.9%, M I 期由来で 57.1% が形態的に良好な分割胚 (フラグメント 30% 以下) に至った。

体外成熟卵子に対する ICSI で正常な受精卵および良好胚が得られることから、採卵時に未熟卵子であっても、体外成熟培養により成熟させ ICSI に供することは有用な手段と考えられる。

キーワード: GV 期卵子, M I 期卵子, 未成熟卵子, 体外成熟, ICSI

(日不妊会誌 45:19-23 2000)

緒 言

採卵に適した卵巣刺激の卵胞であっても、採卵された卵子に未熟な卵子 (卵核胞期 (GV 期)、第一成熟分裂の中期 (M I 期)) が含まれることがしばしばある。さらに極少数ではあるが、採卵された複数の卵子のすべてが未成熟な卵子である症例も存在する。通常ではこのような卵子は体外受精に供することはできないが、採卵数の少ない場合はこれらの未成熟卵子を体外受精に用いる場合が生じる。

一般に哺乳動物の未成熟卵子は体外成熟培養により減数分裂が再開し、自然成熟することが知られている。ヒトにおいても同様に未成熟卵子は体外成熟培養によって自然成熟する。従って、採卵時に未成熟卵子であっても、体外成熟培養によって成熟させ体外受精に供することは可能であり、実際にこのような体外成熟卵子を受精させ、生児を得たとの報告もある^{1,2)}。しかしながら、体外成熟卵子の受精率、分割率、さらに着床率は現在のところ低調である。そこで本研究では、体外成熟卵子の体外受精、と

くに卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)への適応の有効性を検討するため、未成熟の状態では採卵された卵子を体外成熟培養で自然成熟させ、ICSIを試みた。その際、受精率および分割胚の形態評価を行った。

対象および方法

1 対象

1998年11月から1999年3月までに当院においてICSIを実施した237周期のうち、118周期で採取された未成熟卵162個(GV期:73個, M I 期:89個)について体外成熟培養による成熟率を検討した。なお、対象とした118周期はすべて異なる患者の周期であり、対象とした周期における患者の重複はなかった。また体外成熟卵の受精率および分割胚の形態評価を行うため、患者の同意を得た83個(GV期:35個, M I 期:48個)の成熟卵にICSIを試みた。なお、ICSIに用いた精子は各々の配偶者のものを用いた。

2 未熟卵の確認および成熟培養

採卵された卵子は、患者本人血清を10%添加したHTF培養液で2時間から3時間前培養した後、ヒアルロニダーゼを用いて顆粒膜細胞の除去を行い、修正HTF(m-HTF)培養液のドロップに移して成熟段階を確認した。卵子の成熟段階の確認は、通常ICSIで使用しているホフマン・モジュレーションコントラスト装置を装着した倒立顕微鏡下で行い、マイクロマニピレータを用いて卵核胞の有無、ならびに第一極体の有無を丹念に確認した。未成熟卵子であると確認された卵子は直ちに10%血清添加HTF培養液のドロップに戻し、37℃, 5%O₂, 5%CO₂, 90%N₂の培養器内で24時間から30時間成熟培養を行った。

3 卵子の成熟の確認

成熟の確認は未成熟卵子の確認のときと同様に行い、卵核胞の有無および第一極体放出の有無を確認した。成熟と確認された卵子は、通常の方法に従ってICSIを実施した。なお、30時間まで培養しても成熟に至らないものは、さらに培養を継続し、経過を観察した。

4 ICSI卵子の受精率と分割胚の評価

ICSI実施後16時間から18時間で前核の形成を確認し、さらに分割した胚は48時間後に割球の評価を行った。胚の評価はフラグメントの胚に占める割合

により形態的に行った。胚に占めるフラグメントの割合が30%以下のものを良好胚、30%以上のものを不良胚とした。

結 果

1 体外成熟培養による未成熟卵子の成熟

採卵時に未成熟であった卵162個(GV期:73個, M I 期:83個)を24時間から30時間培養したところ、GV期から培養した卵子の61.6%, M I 期から培養した卵子の80.9%が成熟(第二減数分裂中期)に至った。GV期からの培養で卵核胞崩壊(Germinal Vesicle Break Down:GVBD)を起こしたもののM I 期以降の成熟が停止したものは23.3%であり、GV期の状態を維持して成熟分裂の再開をしなかったものは6.8%であった。M I 期から培養したものでM I 期以降の成熟が認められず成熟分裂停止状態または変性だったものは15.7%であった(図1)。24時間から30時間の培養によって成熟に至らなかったこれらの卵子については、さらに継続して培養を行ない経過を観察したが、成熟したものは存在しなかった。

2 体外成熟卵へのICSI

体外成熟培養によってM II 期に成熟した卵83個(GV期由来:35個, M I 期由来:48個)にICSIを実施した結果、2前核が認められものはGV期由来で

培養後 培養前	GV期	M I 期	M II 期
GV期卵子 73個	発育停止 5(6.8%)	17(23.3%)	45(61.6%)
	変性6(8.2%)		
M I 期卵子 89個		発育停止 13(14.6%)	73(82.9%)
		変性1(1.1%)	その他2(2.2%)

図1 未成熟卵子の体外培養成熟度

表1 体外成熟卵を用いたICSIの結果

	成熟卵子の由来		計
	GV	M I	
ICSI実施数	35	48	83
2前核期胚数	18(51.4%)	28(58.3%)	46(55.4%)
非受精卵子数	6(17.1%)	7(14.6%)	13(15.7%)
変性卵子数	10(28.6%)	8(16.7%)	18(21.7%)
3前核期胚数	1(2.9%)	2(4.2%)	3(3.6%)
その他	0(0.0%)	3(6.3%)	3(3.6%)

表2 2前核期胚からの分割状況

胚の状況	成熟卵子の由来		計
	GV	M I	
	18	28	46
良好胚数	7 (38.9)	16 (57.1)	23 (50.0)
不良胚数	8 (44.4)	11 (39.3)	19 (41.3)
非分割	3 (16.7)	1 (3.6)	4 (8.7)

良好胚：フラグメント≦30%、不良胚：フラグメント>30%

51.4%、M I 期由来で58.3%であった(表1)。さらに ICSIを実施した体外成熟卵子のうち、分割に至ったものはGV期由来で35個中18個の42.9%、M I 期由来で48個中28個の56.3%であり、2前核が認められた卵子のうち、GV期由来で38.9%、M I 期由来で57.1%が形態的に良好な分割を示した(表2)。

考 察

通常、ICSIを含む体外受精では、卵巣刺激により複数の卵子を得ている。卵巣刺激による採卵で回収される卵子は受精が可能な成熟卵子(第二減数分裂中期)であるが、採卵された卵子に未成熟卵子が含まれることがしばしばある。また極稀であるが採卵された複数の卵子すべてが未成熟である症例も存在する。採卵数が少ないときや、未成熟卵子が極端に多い場合では採卵された未成熟卵子を受精可能な段階まで体外成熟培養で成熟させ、体外受精に供する必要性が生ずる。また、卵巣過剰刺激症候群などの卵巣刺激により誘発される副作用を避ける手段として、積極的に未成熟卵子を採取して体外成熟培養により成熟させることが注目されつつある。

本研究では上述したような未成熟の状態では採卵された卵子の体外成熟培養に10%患者血清添加HTFを用いて成熟率を検討した。さらに体外成熟卵子に対してICSIを行い得られた胚の質を検討することで、体外成熟卵子の臨床応用への有効性を検討した。

GV期から61.6%、M I 期から82.9%の未成熟卵子が体外成熟培養でM II 期に至った。未成熟卵子の体外成熟培養における成熟率に関しては、Beckersら³⁾が卵巣刺激を行わない多嚢胞性卵巣(PCO)患者より得られた未成熟卵子の体外成熟培養において68%、Chaら¹⁾が手術時に卵巣より得た未成熟卵子を50%卵胞液を添加した条件下で成熟培養した場合で55.8%、Prinsら⁴⁾がhMGを添加した条件下で73.5%、Nagyら²⁾が顆粒膜細胞との共培養により64%、Wynnら⁵⁾がFSH投与による刺激を与えた卵巣より得た未成熟卵子をFSHおよびhCGを添加した条件下で培養するこ

とで71.1%が成熟したと報告している。Prinsら⁴⁾、Wynnら⁵⁾の値が多少高いものの本研究において得られたGV期からの成熟率はこれらの値とほぼ一致する。一方、Trounsonら⁶⁾はPCO患者より自然周期で採取した未成熟卵子の体外成熟培養において、最終的には81%がM II 期に至ったと報告しており、Janssenswillenら⁷⁾は卵巣刺激後に採取されたGV期卵子をVero細胞と共培養することで30時間後には82%がM II 期に至ったと報告している。Beckerら³⁾、Trounsonら⁶⁾は成熟培養に際して培養液にhMG、hCGおよびE₂を添加しており、Wynnら⁵⁾も成熟培養にはFSHおよびhCGを添加している。また、Prinsら⁴⁾は培養液へhMGを添加することにより成熟率が35.6%から73.5%へ向上したことを報告している。一方、Chaら¹⁾は培養液にホルモンの添加は行っていないが、培養液に成熟卵胞液を添加することで成熟率が35.9%から55.8%に向上したと報告しており、これについてChaら¹⁾は成熟卵胞液中のゴナドトロピンやステロイドの存在によるものであると推察している。Nagyら²⁾やJanssenswillenら⁷⁾はホルモンの添加は行っていないが、顆粒膜細胞あるいはVero細胞との共培養系を用いており、Janssenswillenら⁷⁾は共培養系を用いることで成熟率が38%から82%に向上したことを報告している。本研究では培養液中にホルモンの添加は行っておらず、また共培養も行っていない。しかし培養液に添加した患者血清は卵巣刺激後に採取されたものであり、血清中にhMGや比較的多量のE₂が存在していることが考えられ、添加した血清中のホルモンが卵成熟に促進的に作用した可能性がある。本研究では体外成熟培養に先立ち顆粒膜細胞の除去を行っているが、成熟率における卵子と顆粒膜細胞の関係についてWynnら⁵⁾は卵丘細胞を除去して体外成熟培養を行うと成熟率が71.1%から46.6%に低下することを報告しており、このことからWynnら⁵⁾は卵丘細胞と卵子の接触による作用が卵子の成熟に重要であり、さらに卵丘細胞との共培養ではこの作用を得るのには不十分であると述べている。しかしながら、卵丘細胞を除去したGV期卵子を対象としたNagyら²⁾やJanssenswillenら⁷⁾はそれぞれ64%、82%の成熟率を報告し、本研究でも61.6%のGV期卵子が成熟している。Nagyら²⁾やJanssenswillenら⁷⁾の対象とした未成熟卵子は卵巣刺激でhCG投与後36時間で採取されている。本研究で対象とした未成熟卵子も同様の処置後に採取したものであり、顆粒膜細胞を除去しても比較的高い率でM II 卵が得られる理由としてhCGによる刺激が関係していると思われる。得られたGV期卵子の成熟まで

の時間を上記の諸報告と比較すると、Beckerら³⁾、Chaら¹⁾、Wynnら⁵⁾の報告した成熟率はそれぞれ72時間、32から48時間、48時間の培養によるものであり、さらにBeckersら³⁾は48時間での成熟率は52%、Trounsonら⁶⁾も43から47時間の培養では成熟率は60%と報告している。これに対して本研究では24から30時間で60%以上のGV期卵子が成熟している。これに対する理由としてBeckerら³⁾、Chaら¹⁾、Trounsonら⁶⁾の対象とした未成熟卵子がいずれも卵巣無刺激のPCO患者の卵巣や手術時に得られた卵巣から採取したものであり、Wynnら⁵⁾の対象とした未成熟卵子もFSH投与刺激のみ与えて採取したものと本研究とは対象が異なる点が考えられる。本研究と同様に通常の体外受精で卵巣刺激後に得られたGV期卵子を対象にしたNagyら²⁾やJanssenswillenら⁷⁾の報告では、30時間の培養でそれぞれ64%、82%が成熟したと報告しており、同様に、卵巣刺激後に得られた卵子を対象としたPrinsら⁴⁾の報告においても24から34時間の培養で73.5%が成熟したとされていることから、成熟までの時間の差は対象とした未成熟卵子の質の違いに起因している可能性がある。

体外成熟培養により成熟した卵子にICSIを実施した結果、GV期から成熟させた卵子の51.4%、M I期から成熟させた卵子の58.3%が2前核を形成し、それぞれのICSI実施卵子の42.9%、56.3%が分割に至り、GV期由来分割胚の46.7%、M I由来分割胚の59.3%が形態的に良好な胚であった。同じ対象から得られた卵子で、採卵時に成熟していた卵子のICSIによる2前核形成率は66.6%であり、2前核を形成した卵子の76.4%が形態的に良好な胚に発生しており、これらの値と比較すると、体外成熟卵子の受精率および形態良好胚の発生率はいずれも低い値を示している。本研究での体外成熟卵子の受精はICSIによるものであり、通常の媒精による受精率とは一概に比較は出来ないが、本研究で得られた受精率は、体外成熟卵子の受精は認められなかったとするCohenら⁸⁾の報告や、Beckersら³⁾の、13個の体外成熟卵子を媒精した結果、2前核を形成したのは1個であり、胚の発生は認められなかったとする報告や、Trounsonら⁸⁾のホルモンの添加や顆粒膜細胞との共培養による4つの培養条件での体外成熟卵子の受精率は20%から約30%であったとする報告と比較すると明らかに高い受精率である。しかし一方で、Dandekarら⁹⁾、Prinsら⁴⁾、Chaら¹⁾はそれぞれ体外成熟培養において顆粒膜細胞との共培養、hCGの添加、成熟卵胞液の添加を試みることにより、それぞれ20.0%、36.4%、31.6%であっ

た体外成熟卵子の受精率が54.0%、64.0%、81.0%に向上することを報告しており、さらにPrinsら⁴⁾は得られた受精卵で分割を確認した8個すべてが良好あるいは25%程度のフラグメントを含む胚であったと報告しており、Chaら¹⁾は刺激周期より得た卵子由来の受精卵の78.7%、非刺激周期より得た卵子由来の受精卵の61.4%が正常胚に発生したと報告している。またNagyら²⁾は顆粒膜細胞との共培養により成熟させた卵子にICSIを実施したところ受精率は78%であり、受精卵の71%が分割に至り、得られた分割卵のすべてがフラグメントの占める割合が20%以下の胚であったと報告している。このことより、本研究で得られた受精率・胚の質は体外成熟培養液へのホルモンの添加や顆粒膜細胞との共培養などによりさらに向上する可能性があり、体外成熟培養時の培養条件を改めることで向上が期待できるものと思われる。

以上のことから、成熟培養の条件に多くの改良・改善の余地があるものの、採卵時に未成熟であった卵子を体外成熟させICSIに供することは可能であり、とくに採卵時において未成熟卵子の多い症例に対しては有用な手段であると考えられる。PCOの治療に際し、卵巣過剰刺激症候群を予防する意味でも未成熟卵子の体外成熟培養は今後の重要な研究課題といえる。

文 献

- 1) Cha KY, Choi DH, Koo JJ, et al. (1991) Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril* 51:109-113
- 2) Nagy ZP, Loccufier A, Cecile J, et al. (1996) Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 65:1047-1050
- 3) Beckers NGM, Pieters MHEC, Ramos L, et al. (1996) Transvaginal retrieval of immature oocytes from unstimulated patients with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 11:Abstract Book 1, 4-5
- 4) Prins GS, Wagner C, Weidel L, et al. (1987) Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured *in vitro*. *Fertil Steril* 47:1035-1037
- 5) Wynn P, Picton HM, Krapez JA, et al. (1998) Pre-treatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by *in vitro* maturation. *Hum Reprod* 13:3132-3138

- 6) Trounson A, Wood C, Kausche A, et al. (1994) *In vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil Steril* 62: 353-362
- 7) Janssenswillen C, Nagy ZP and Steirteghem VA (1995) Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Ver cells. *Hum Reprod* 10:375-378
- 8) Choen J, Mandelbaum JWE and Planchot M (1980) Maturation et fécondation *in vitro* d'ovocytes humains prélevés avant ovulation spontanée ou induite par les gonadotrophines (résultats préliminaires). *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)* 9:523-530
- 9) Dandekar PV, Martin MC and Glass RH (1991) Maturation of immature oocytes by coculture with granulosa cells. *Fertil Steril* 55:95-99
- (受付: 1999年9月9日)
(受理: 1999年11月2日)

Fertilization Rate and Embryo Quality of *in vitro* Matured Oocytes Treated by ICSI

Kazumasa Takahashi, Akemi Hayashi, Kaori Suzuki, Yasuhisa Araki and Mitsuhiro Motoyama

Institute of Advanced Medical Technology Central Clinic,
Tochigi 329-0431, Japan

In order to examine *in vitro* maturation and the fertilization and developmental competence of immature oocytes, immature oocytes retrieved from patients attending IVF program were incubated for *in vitro* maturation, and ICSI was carried out on oocytes matured *in vitro*.

A total of 162 immature oocytes (GV stage 73, MI stage 89) were incubated for *in vitro* maturation. After 24-30h of incubation, 61.6% of GV stage oocytes and 80.9% MI stage oocytes matured. ICSI was carried out on 83 *in vitro* matured MII oocytes (35 from GV stage, 48 from MI stage). Normal fertilization was observed 16~18h after ICSI in 51.4% of oocytes derived from GV stage and in 58.3% of oocytes derived from MI stage. After 48h of further incubation, 38.9% (derived from GV stage) and 57.1% (derived from MI stage) of fertilized oocytes developed into good quality embryos with <30% fragmentation.

In vitro maturation of immature oocytes together with ICSI results in normal fertilization and embryo development. Therefore, even if the oocytes are retrieved at an immature stage, incubating them for *in vitro* maturation and carrying out ICSI on them is considered to be an effective method.

Key words : GV stage, MI stage, *in vitro* maturation, ICSI

(Jpn J Fertil Steril 45:19-23 2000)

卵管注入圧パターン解析による卵管機能評価法の基礎的検討

Evaluation of Oviduct Function by Pattern Analysis of Intra-oviduct Injection

可世木 久 幸
Hisayuki KASEKI

貝 原 賢 二
Kenji KAIBARA

松 島 隆
Takashi MATUSHIMA

石 原 楷 輔
Kaisuke ISHIHARA

荒 木 勤
Tsutomu ARAKI

日本医科大学産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,

Nippon Medical School Second Hospital, Kawasaki 211-0063, Japan

外来レベルでの卵管機能検査は主に子宮卵管造影と炭酸ガス通気検査が中心である。両検査とも卵管通過性の診断には有効であるが、卵管采機能の診断は困難である。卵管通過性と卵管采機能の両者を診断する外来レベルでの検査法を確立するために以下の研究を行った。【方法】20卵管を対象とした。卵管峡部(UTJから卵管側2cm)に細径のテフロンチューブ先端を挿入して10%インジゴカルミン添加生食水を1ml/minの速度で卵管内に注入した。注入に要する圧力を自動的に記録し、卵管注入圧パターンを分析した。同時に腹腔鏡にて卵管采の形状、注入液の腹腔への色素の流出状況を詳細に観察した。【結果と考察】卵管通過性良好、卵管采正常な卵管注入圧パターンは注入開始後2分でプラトーに達した後ピーク形成を示す2相性パターンとなった。卵管通過性を認めるも卵管采に癒着がある卵管では卵管注入後2分で注入圧はプラトーに達した後、ピーク形成の認められない1相性パターンとなった。卵管通過性が認められない卵管の圧パターンは注入開始後3分で測定限界圧(300mmHg)に達する限界圧パターンを示した。卵管采の卵子捕獲機能は従来腹腔鏡にて診断してきた。今回の卵管注入圧パターン解析の結果は腹腔鏡による卵管采分類と良く一致した。将来的には卵管注入圧パターン解析は腹腔鏡の併用を必要としない外来で行い得る卵管機能検査にする予定でいる。

キーワード：卵管、圧力、卵管采、癒着、通過性

(日不妊会誌 45:25-29 2000)

緒 言

卵管はヒトの生殖に重要な役割を果たす臓器である。すなわち、卵管采は卵巣から排出された卵子の捕獲を行い、膨大部は卵子と精子の出会いの場ともいべき受精を行う部位である。また、卵管峡部と間質部はこれらの配偶子を輸送する機能を有している。

従来、卵管機能検査法¹⁾として子宮卵管造影およびルビンテストが一般的に行われてきた。子宮卵管造影とルビンテストは卵管通過性を調べるためには

有効である。しかし、卵管機能は卵管通過性だけではないはずである。

一方、我々は子宮鏡下卵管内カテテリゼーション(Hysteroscopic intra-fallopian catheterization)の技法^{2,3)}を用いて卵管内に色素を注入し卵管注入圧の時間的変化パターンを解析する方法^{4,5)}を卵管機能検査として発表してきた。しかしながらこれまで発表してきた方法は卵管通過性検査としては良好な結果を示したが卵管機能とくに卵管采機能を反映するものではなかった。

今回我々は大きく分けて2つの目的にて研究をし

た、第1目的：卵管内に一定の速さで色素を注入し卵管注入圧の時間的変化パターンを解析する。この解析法の再現性を含めて検討する。第2目的：卵管注入圧の時間的変化パターン解析はこれまでスタンダードとされてきた腹腔鏡検査、子宮卵管造影(HSG)と比較して新しい卵管機能検査、とくに卵管采機能検査となる可能性について追究する。

対象と方法

【対象】

挙児希望にて、腹腔鏡検査を施行した10症例20卵管を対象として月経終了後排卵までの時期に延べ28回の卵管注入圧パターン解析を行った。症例の年齢は27歳から41歳、平均年齢は33歳である。なお、本研究に際して対象とした症例全員からインフォームドコンセントを得てから検査を実施した。なお、Gn-RH analogue、あるいは排卵誘発剤を使用しない周期に本検査を行った。

28回の内訳は初期に行った4症例8卵管に対して各卵管2回ずつの繰り返し、計16回の測定を行い、後期に行った6症例12卵管には各1回、つまり12回の測定を試みた。

【使用器具】

本研究に用いた器具を(表1)に示した。なお、初期に行った3症例には子宮鏡としてHYF type XPを、後期に行った7例にはEHYを用いた。

表1 使用器具

① 子宮鏡
1) (オリンパス社製HYF type XP)
2) (ペンタックス社製EHY)
② ヒステロファイバースコープカテーテル (北里サプライ社製フレスポイトヒステロ ファイバースコープカテーテル)
③ 卵管注入圧測定装置 (アトム社製HSGシステム)
④ 腹腔鏡装置 (ストライカー社製システム)

【卵管注入圧パターン解析法】

最初に、子宮鏡を使いながら子宮腔を観察する。卵管子宮口を確認後、子宮鏡ガイド下に、卵管内にカテーテルを挿入し、その先端を卵管子宮口から2cmに設置する。カテーテルが卵管の中に入っていることを確認後、卵管注入圧測定装置に付設しているインフュージョンポンプにセットされた10%濃度のインジゴカルミン添加生理食塩液(色素)を、一定の速

度1ml/minでカテーテル内に注入を開始する。注入開始と同時に、卵管注入圧測定装置は自動的に注入抵抗を圧として測定を開始し、記録紙に記録する。限界圧はあらかじめ300mmHgに設定した。測定は4分間以上行い、色素注入中の圧変化パターンと計測圧(mmHg)を求めた。

【腹腔鏡による卵管采観察】

卵管注入圧測定時に腹腔鏡にて同時観察を行い、卵管采に注目して色素流出状況を観察し卵管采をA、B、Cの3つのパターンに分類した(表2)。腹腔鏡による卵管采分類と卵管注入圧パターンを比較検討し卵管注入圧パターン解析を行った。

表2 卵管注入圧パターン測定法施行中の卵管采分類
(腹腔鏡による形態的分類)

分類	定義
1) A型卵管采	卵管采形態は正常、卵管采から勢い良く色素流出開始
2) B型卵管采	卵管采ヒダに一部癒着を認め、滲み出るように色素流出開始
3) C型卵管采	卵管采の癒着の有無に関わらず、色素流出を全く認めない

なお、卵管采癒着の腹腔鏡的診断は以下のように行った。骨盤腔内に満たした生理食塩液中に卵管采を埋没せしめ卵管采のヒダの観察をした。この際、卵管采の総てのヒダが水中で自然に開き、振動を与えるとヒダが水中で自在に動く場合に卵管采癒着はなく卵管采の形態を正常とみなした。また、卵管壁と卵巣あるいは子宮壁との癒着の有無は分類基準には加えないことにした。なお、腹腔鏡は全身麻酔、気腹法で行い、腹腔内圧は10mmHgに設定した。

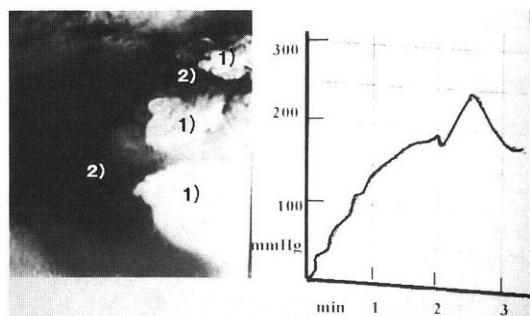
さらに、従来行われている子宮卵管造影と卵管注入圧パターン解析の結果を比較検討した。なお、子宮卵管造影では造影剤の腹腔内流出著明なものを良好卵管、流出をわずかししか認めないものを不良卵管、流出を認めないものを閉塞卵管とした。

結 果

【卵管注入圧パターン解析】

卵管注入圧の計時的変化のパターンはⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型の3種類に分類できた。

Ⅰ型の特徴(図1、表3、表4)：測定開始緩やかに注入圧上昇を来し測定開始後2分で注入圧は、180mmHgのプラトーを形成する。その後さらに、注入圧は上昇し測定開始後2分30秒で231mmHgの

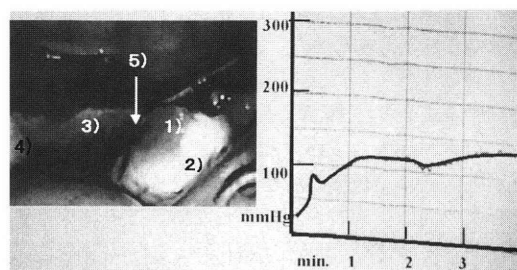


左：腹腔鏡-卵管采のヒダの確認が容易でありかつ色素の腹腔内流出の勢が良い。

1) 卵管采ヒダ 2) 色素

右：卵管注入圧パターン-測定開始約2分でプラトーに達したとピークを形成しその後安定した値をとる。

図1 良好卵管の腹腔鏡所見と卵管注入圧パターン

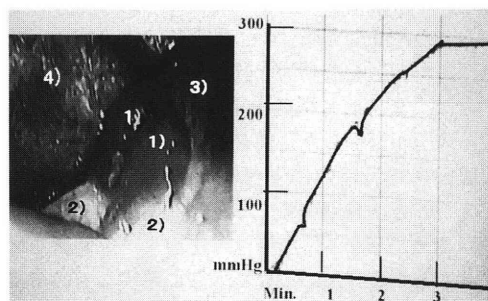


左：腹腔鏡-卵管采のヒダが一部癒着しているが色素の腹腔内流出は認められる。

1) 卵巣と一部癒着している卵管采 2) 卵巣 3) 卵管 4) 子宮 5) 色素

右：卵管注入圧パターン-測定開始後約2分でプラトーを迎えた後ピーク形成を認めずそのまま一定値をとる。

図2 不良卵管の腹腔内所見と卵管注入圧パターン



左：腹腔鏡-色素注入後の腹腔内色素流出を認めない。

1) 卵管采 2) 卵巣 3) 卵管

右：卵管注入圧パターン-測定開始後上昇を続けて一気に限界圧(300mmHg)にたどり着く。

図3 閉塞卵管の腹腔鏡所見と卵管注入圧パターン

ピークを迎える。注入圧はピーク形成の後、低下し最終的には165 mmHgの一定値に落ち着く。つまりI型の特徴はプラトー形成後、新たなピーク形成を迎える2相性パターンを示した。今回卵管注入圧パ

表3 卵管注入圧

	I型卵管	II型卵管	III型卵管
プラトー	180±49	183±93	(-)
ピーク	231±56	(-)	(-)
安定状態	165±61	111±83	300

平均値±標準偏差

単位: mmHg

I型卵管: n=8 II型卵管: n=4 III型卵管: n=7

表4 卵管注入圧パターン解析, 腹腔鏡, 子宮卵管造影(HSG)結果の比較

症例	年齢	卵管	注入圧	腹腔鏡	HSG
1	27	1	I	A	良好
		2	I	A	良好
2	39	3	III	C	良好
		4	III	C	閉塞
3	31	5	I	A	不良
		6	III	C	不良
4	38	7	II	B	良好
		8	II	B	良好
5	35	9	I	A	良好
		10	I	A	良好
6	36	11	III	C	閉塞
		12	II	B	閉塞
7	41	13	III	C	不良
		14	I	A	良好
8	29	15	I	A	良好
		16	III	C	良好
9	29	17	X	X	閉塞
		18	I	A	不良
10	30	19	III	C	良好
		20	II	B	良好

注入圧: 注入圧パターン解析。 腹腔鏡: 腹腔鏡卵管采分類, HSG: 子宮卵管造影。 卵管番号は奇数は左卵管, 偶数は右卵管。

HSG結果が他の検査結果と異なった場合には網掛けで現した。そのうち, HSGにて他の方法よりも重度な卵管機能障害と診断した場合には下線を引いて示した。症例9の左卵管にはカテーテル挿入ができなかった。

ターン解析を行い得た19卵管のうち, I型に属する卵管は8卵管であった。このパターンを腹腔鏡で観察するとプラトーに達したときに卵管内に色素が充満, ピークに達したときに腹腔内に色素が勢よく飛び出した。この結果は腹腔鏡による卵管采分類A型卵管に一致した。

II型の特徴(図2, 表3, 表4): 測定開始緩やかに注入圧上昇を来し測定開始後2分で注入圧は180mmHgに達してプラトーを形成した。ここまでの注入圧パターンは良好卵管とほぼ同様であったが, その後の卵管注入圧パターンは良好卵管のようなピークは認めず, 緩やかに下降する。最終的には111mmHgまで低下した。つまりII型は1相性パター

ンを示した。今回卵管注入圧パターン解析をおこなった19卵管中Ⅱ型は4卵管であった。このパターンは腹腔鏡分類のB型卵管に一致した。

Ⅲ型の特徴(図3、表3、表4)：閉塞卵管の注入圧パターンは徐々に上昇し、測定開始3分後に限界圧(300 mmHg)に達し測定終了まで限界圧を保った。つまり閉塞卵管は限界圧までほぼ直線的に到達する限界圧到達パターンとなった。今回の研究では19卵管中7卵管がⅢ型であった。このパターンは腹腔鏡分類のC型卵管に一致した。

【卵管注入圧パターン解析の再現性】

カテーテル挿入の成功率は28回の試みのうち27回挿入できた。カテーテルが卵管内に挿入できた場合にはすべての卵管で注入圧パターン解析を行うことができた。従って実験全体の解析成功率は96.4%であった。個々の卵管に関しては20卵管中、19卵管測定でき、成功率は95%であった。

子宮鏡としてHYF type XP使用時は100%(6/6)、EHY使用時は90%(13/14)の測定成功率であった。カテーテルを挿入できなかった1卵管(表4：症例9左卵管)は子宮鏡にて卵管子宮口を確認できなかった。

今回の研究では4症例8卵管(表4：症例1-4)に対して各2回の繰り返し測定を行った。その結果、第1回目と第2回目の注入圧パターンは8卵管とも同様の結果を示した。なお、繰り返し測定を行った8卵管の卵管注入圧パターン解析の結果はⅠ型3卵管、Ⅱ型3卵管、Ⅲ型2卵管であった。

【腹腔鏡および子宮卵管造影との比較】

卵管注入圧パターンと腹腔鏡による卵管採分類、および子宮卵管造影の結果を比較した(表4)。その結果、卵管注入圧パターン解析でⅠ型を示した8卵管はすべて腹腔鏡ではA型であった。また、卵管注入圧パターン解析でⅡ型を示した4卵管はすべて腹腔鏡ではB型であった。さらに、卵管注入圧パターン解析でⅢ型を示した7卵管はすべて腹腔鏡ではC型であった。従って、今回行った19卵管の卵管注入圧パターンは、腹腔鏡卵管採分類と完全に一致した(一致率100%)。

これに対して子宮卵管造影の結果は、19卵管中わずかに8卵管の結果が一致した(一致率42.1%)。不一致であった11卵管中8卵管の子宮卵管造影の卵管機能検査結果は、注入圧パターン解析あるいは腹腔鏡検査結果よりも卵管機能障害を軽微に判定していた。

考 察

従来、我々は本法と同様な方法を開発し卵管内圧測定法と呼んできた^{4,5)}。しかし、正確には本法では卵管内の自然な圧力を測定したものではなく、卵管内に機械的に注入した液体の注入圧を経時的に測定評価したものである。従って、我々は本法に対して卵管注入圧パターン解析法と新しく命名した。

今回の研究では、卵管子宮口から卵管側に2cmほどカテーテルを挿入して卵管注入圧パターン解析を行った。卵管子宮口から卵管側に2cmの位置は卵管峡部に位置する。従って今回の研究では1ml/minの速度で卵管内に色素を注入したときの卵管峡部の感受する圧力を測定したものと考えられる。

卵管注入圧パターン解析の結果、パターンは3種類に分けられた。すなわち、2相性のパターンを示すⅠ型卵管はすべて腹腔鏡による卵管採分類でA型つまり、卵管採の形態、機能とも良好と判定できた。卵管内に色素を注入していくと卵管採まで色素が充満してから勢いよく色素が飛び出す卵管は卵管採のヒダとヒダの間に癒着が認められない。この結果は正常な卵管採は普段、卵管口を閉ざしており、卵管内圧が閾値に達した時点で急激に開口するものと思われる。我々はこの卵管採の動きを卵管注入圧として卵管峡部間でとらえたものと推定している。

このA型卵管に比べて卵管採のヒダ同士に微細な癒着のあるB型卵管では卵管採に色素が到達した瞬間から、色素が腹腔内に漏出した。B型卵管の卵管注入圧パターンはピークをひとつだけ認めるⅡ型卵管であった。Ⅱ型卵管は、Ⅰ型卵管のように卵管内に色素をため込む能動的な動きが認められなかった。さらに、Ⅱ型卵管では色素注入を続行するに連れて卵管注入圧が減少した。従来、我々は卵管採の形態は腹腔鏡にて骨盤内に生食水を満たして観察してきた。この方法を用いると卵管ヒダ間に意外に癒着が多いことがわかる。卵管注入圧パターン解析を同時に行うと、腹腔鏡の所見をさらに確実なものにできると思われる。Ⅱ型卵管が真の不妊原因になりうるか今後の検討が必要である。

今回、卵管注入圧の上限を300mmHgと設定したので、カテーテル設置位置よりも遠位の卵管内に閉塞あるいは強度の狭窄が見られたときには腹腔鏡および卵管注入圧パターン解析法の両者とも閉塞卵管の診断となった。今回の研究は、卵管閉塞の治療を目的と考えなかったので注入圧の限界を300mmHgとした。卵管注入圧パターン解析あるいは腹腔鏡に

て卵管閉塞と診断された7卵管のうち、5卵管は子宮卵管造影では卵管閉塞と診断されていない。これら5卵管に関しては注入圧上限をより高く設定すれば子宮卵管造影の結果との一致率も増加したものと思われる。

今回の卵管注入圧パターン解析による卵管機能評価は腹腔鏡による評価と完全に一致した。しかし、子宮卵管造影結果と大きく異なってしまった。その理由の一つはは子宮卵管造影の場合には手動的に造影剤を注入したためと考えられる。また、卵管注入圧パターン解析と腹腔鏡は同時に行ったが、子宮卵管造影は同時でないばかりか異なった周期で行ったことも理由として考えられる。さらに、腹腔鏡は麻酔下に行っているなのでその影響も考慮されるべきであろう。

今回は腹腔鏡と卵管注入圧パターン解析を同時に行った。この結果を踏まえて、今後は外来レベルで子宮鏡下選択的卵管造影と卵管注入圧パターン解析を同時に行い、後に行う腹腔鏡による卵管機能評価と比較する予定である。

今回の卵管注入圧パターン解析の結果は、以前我々が卵管内圧測定法と称していたときの結果と大きく異なっている。その理由は卵管内に挿入したカテーテルの距離が以前は1cmであったので前回の方法では卵管間質部の感受する圧力をモニターしてい

た。さらに、カテーテルの内径、圧力感受装置などが今回のものとは大きく異なっているのでデータに差異ができたものと考えられる。今回我々が用いたカテーテルは卵管内に癒着がない場合には腹腔まで容易に達することができる。従って、卵管内の異なる部位での卵管注入圧パターン解析も今後に行うべき重要な課題となるであろう。

文 献

- 1) 可世木久幸, 峯 伸也, 荻原弘光 他(1996) 卵管機能検査. 産婦治療 73:99-106
- 2) Kaseki H, Igarashi T, Toyama K, et al(1987) New approach for infertility treatment. Clinical application of flexible hysteroscope and teflon tubing intra uterotubal junction (UTJ). VIth World Congress on Human Reproduction (Abstract), 235,
- 3) 可世木久幸, 大村 浩, 五十嵐俊夫 他(1987) 子宮鏡下卵管内精子注入法(HIT)による不妊治療の試み. 産婦治療 36:1889
- 4) 可世木久幸, 明楽重夫, 荒木 勤(1991) 子宮鏡下卵管機能検査. 産婦実録 40:1145-1150
- 5) 可世木久幸, 明楽重夫, 荒木 勤(1992) ヒトおよび実験動物の卵管内圧測定法の開発. 日受着会誌 9:270-273

(受付: 1999年 8月30日)

(受理: 1999年11月25日)

Evaluation of Oviduct Function by Pattern Analysis of Intra-oviduct Injection

Hisayuki Kaseki, Kenji Kaibara, Takashi Matushima, Kaisuke Ishihara and Tsutomu Araki

Department of Obstetrics and Gynecology,

Nippon Medical School Second Hospital, Kawasaki 211-0063, Japan

Oviduct has two functions. One is the gametes transportation, and another is the ovum pick up. Our final goal is to establish a method for evaluating both oviduct functions at outpatient clinic. The purpose of this study was a basic research on the patterns of the minimum injection pressure during intra-oviduct patency test. Twenty oviducts were investigated in order to obtain patterns. Saline containing indigo carmine was injected from a top of teflon catheter at the isthmus part under hysteroscopic and laparoscopic control. The patterns were compared between laparoscopic and HSG evaluation. The pattern of good oviduct having both functions showed a bi-phase with first plateau and subsequent peak. The pattern of the oviduct with partial adhesion among fimbrial folds showed a plateau without subsequent peak. Worse oviduct without intra-oviduct patency showed the pattern that pressure was risen up to limited pressure (300mmHg). The result coincided with laparoscopic evaluation. But the result was differed with HSG evaluation. The classification of the patterns for minimum injection pressure is considered as effective method for evaluating both oviduct functions at outpatient clinic.

Key words : Oviduct , Pressure, fimbria, Adhesion, patency

(Jpn J Fertil Steril 45:25-29 2000)

簡易炭酸ガス培養器を用いた牛体外受精胚の作出 —陰圧気相条件が胚の発生におよぼす影響—

Production of Bovine IVF Embryos using Portable Carbon Dioxid Incubator — Effect of Negative Air Pressure on Embryonic Development —

董 雅 娟

Ya Juan DONG

音 井 威 重

Takeshige OTOI

野 田 史 子

Noriko NODA

鈴 木 達 行

Tatsuyuki SUZUKI

山口大学大学院連合獣医学研究科繁殖学研究室

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

市販の炭酸ガス培養器や炭酸ガスの供給が困難な地域において牛の体外受精胚の作出を可能にするために、簡易炭酸ガス培養器を用いて胚発生における陰圧気相の効果と培地の単純化を検討した。

牛卵母細胞の体外成熟培養後のMII期の割合は、TCM-199では常圧、陰圧の-150、-300mmHg間に差異がみられなかったが、CR1aaでは、常圧で有意($P<0.05$)に低い値となった。受精48時間後の分割率は、両培養液とも陰圧気相の方が有意に高かった。市販の炭酸ガス培養器における分割率はTCM-199液でも、CR1aa液でも、試作培養器の常圧気相条件下のものと比べて有意差は認められなかった。受精後8日目に発生した胚盤胞の割合は、TCM-199の場合、容器内の気相圧による差異は認められなかった。しかし、CR1aa液では、陰圧気相で有意に高かった。市販の炭酸ガス培養器における胚盤胞の発生率はTCM-199液でも、CR1aa液でも、試作培養器の常圧気相の成績と差異はなかった。これらの結果から、簡易炭酸ガス培養器を用いた体外受精胚の作出には陰圧気相が胚の発生に有効であることが示唆された。

キーワード：牛、卵母細胞、体外受精、陰圧気相、胚発育

(日不妊会誌 45:31-36 2000)

緒 言

牛体外受精胚は凍結保存後の生存性が低く¹⁾、安定的な受胎が望めない²⁾など多くの課題がある。GalliとLazzari³⁾は、体外受精後4～8細胞期に達した牛胚をメソ羊の卵管へ仮移植することによって、体内受精胚と同等の品質が得られたと述べている。また、Minato⁴⁾は、完全体外培養系より作り出した体外受精胚の移植による受胎率は、家兎卵管内培養で得られた胚盤胞の移植による受胎率に比べて、約15

%低いと報告している。Wagtendonk-de Leeuw⁵⁾は体外受精胚の移植による産子は人工授精による産子よりも生時体重が大きく、妊娠中に誘起される流産や胎子の過大化を指摘した。このように、牛の体外受精胚の移植で生じる受胎率の低下、流産や過大子などの分娩事故は、市販の炭酸ガス培養器における胚の培養環境が体内と異なるため、正常な胚の発育を支持できないためと考えられる。

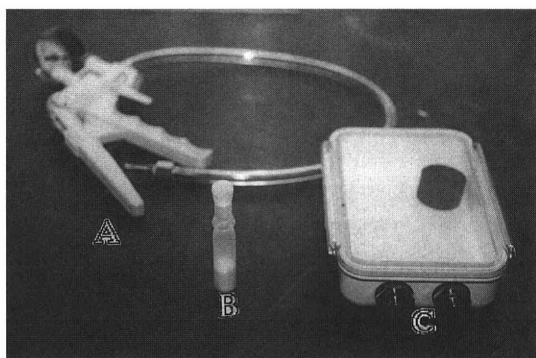
そこで、本研究では、卵母細胞の体外における培養条件の改善を目的に、牛の発情時に子宮や卵管が

緊縮する現象から、これらの内部環境が加圧気相下にあるという仮説を立てて、既法⁶⁾の簡易炭酸ガス培養器を改良して用い、牛卵母細胞の成熟、受精、発生培養のすべての段階を陰圧気相条件下で行い、卵子の成熟、分割および胚盤胞率を、市販の炭酸ガス培養器の常圧気相条件下の成績と比較した。その結果、幾つかの興味ある所見を得たので、その概要を報告する。

材料および方法

1. 培養気相条件の設定

本研究では、体外成熟、受精、発生培養の全行程を試作した簡易炭酸ガス培養器を改良して用いた。試作炭酸ガス培養器はプラスチック製小型容器(627ml容量、富士平工業製)で、この容器内に小型シャーレ(35×20mm、Becton Dickinson製)を置き、0.35gの炭酸ガスパウダー(バロス発泡顆粒-s、堀井薬品工業製；1g中に炭酸水素ナトリウム460mg、酒石酸420mg、シリコン樹脂10mgを含む)を5mlの蒸留水に溶解して炭酸ガスを発生させた。容器内の気相は無処理(0mmHg)とするか、あるいは容器内の空気を陰圧弁からアスピレーターで吸引除去することにより、-150および-300mmHgの陰圧とした。ついで、容器内の温度を38.5℃に保つ金属製の携帯型保温器(29×26×21cm、富士平工業製)内に収めて成熟、受精および発生培養の全行程を行った。なお、各気相条件とも48時間ごとに炭酸ガスパウダーを入れ替えた。また、比較試験として市販の炭酸ガス培養器(サンヨー製)も38.5℃、5%炭酸ガス、100%湿度の気相に設定して使用した。



A: 陰圧用ポンプ B: 炭酸ガスパウダー
C: 簡易炭酸ガス培養器

図1. 試作炭酸ガス培養器関連装置

2. ガス気相の測定

炭酸ガスの測定：小型容器内の炭酸ガス濃度は常圧、陰圧気相の38.5℃で1、48時間別に炭酸ガス濃度測定器(新コスモ電気製)により測定した。

酸素濃度の測定：小型容器内に酸素モニター(秦栄商工製)を置き、0、-150および-300mmHgの気相中の酸素濃度を38.5℃の温度で1、48時間別に測定した。なお、酸素モニターは使用前に室内の酸素濃度を21.0%に設定し、これを基準とした。

pH濃度の測定：培養開始後48時間目にpHメータ(HORIBA M・8E)により培地のpH濃度を測定した。

牛卵巢の採取：北九州市立食肉センターでと畜されたホルスタイン種、褐毛種および黒毛種から得られた卵巢を、34~35℃に保温した生理食塩水中に保管して、卵巢採取開始から6時間後に研究室へ持ち帰った。

卵母細胞の採取：卵巢を滅菌した紙タオルに取り出し、直径2~6mmの卵胞から18G針付、5mlのシリンジを用いて卵母細胞を吸引採取した。採取した卵母細胞を含む卵胞液はセラピッツ(小野薬品工業製)に移して35℃のウォーターバス内で保温し、静置後上澄みを除去した。沈澱はエンブリオテック液(日本全薬工業製)を注いだシャーレ(90×20mm、日本製薬製)内に移して実体顕微鏡下で卵母細胞を採取した。卵母細胞は顆粒層細胞が付着し、細胞質が均一で形態的に良好なものを選択して実験に供した。

体外成熟(*In Vitro Maturation*; IVM)：25mM Hepes緩衝TCM-199(TCM-199, Earle's salt, Gibco製)またはCR1aa⁷⁾を基礎培地とし、両者に5%過剰排卵処置牛血清(Superovulated Cow Serum; SCS)⁸⁾+0.01mg/mlの豚由来卵胞刺激ホルモン(Follicles Stimulating Hormone; FSH)+ゲンタマイシン50μg/mlを添加し成熟培地とした。選択した卵母細胞は、これらの成熟培養液でそれぞれ洗浄後、培養液の各々2mlを含む小型シャーレ(35×10mm、Falcon製)内に移し、38.5℃、22時間、試作炭酸ガス培養器の各種気相条件下で成熟培養を行った。なお、TCM-199液にはタウリン(Sigma製)を14mM/mlの濃度で添加して用いた。成熟培養後一部の卵母細胞は300IU/mlのHyaluronidase(Sigma製)で2分間処置したのち、2mg/mlのHoechst33342(Calbiochem製)により染色してMII期への発生を観察した。

体外受精(*In Vitro Fertilization*; IVF)：体外受精液はBrackett and Oliphant液(Caf-BO)⁹⁾またはCR1aa液を基礎培地とし、これにカフェイン2.5mM/ml十へ

パリン10 μ g/ml+ゲンタマイシン50 μ g/mlを添加して用いた。ストロー内に凍結保存したキメラ牛精液¹⁰⁾を30～32℃の微温水中で融解したのちセラピッツに移し、これに体外受精液を入れて1800rpm, 5分間遠心分離し、洗浄した。ついで精子濃度が 2×10^6 /mlとなるように、Caf-BO液またはCRLaa液の基礎培地に0.6%BSA(Bovine Serum Albumin)とヘパリン10 μ g/mlを添加した液で希釈、調整した。作成した精子調整液は35mmシャーレ内に100 μ lのドロップとし、上面をミネラルオイルで覆った。ついで成熟培養を終えた卵母細胞をBO液またはCRLaa液に0.3%BSAとヘパリン10 μ g/mlを添加して洗浄し、各精子ドロップにつき約10個を入れて38.5℃, 5時間、試作炭酸ガス培養器の各種気相条件で培養した。

体外培養(In Vitro Culture; IVC)：体外受精液はTCM-199またはCRLaa液を基礎培地に5%SCS+インスリン5 μ g/ml+ゲンタマイシン50 μ g/mlを添加して用いた。体外受精を終えた卵母細胞はそれぞれの体外培養液で洗浄し精子を除去した後、同液を含む4-well multidish(Nuncclon社製)の各wellの500 μ l中に20～30個の卵母細胞を入れて38.5℃で8日間、試作炭酸ガス培養器の各種気相条件で体外培養を行った。なお、各wellの培養液上面は500 μ lのミネラルオイルで覆った。

顆粒層細胞からの胚の遊離：発生培養の48時間後、ピペッティングによりシャーレ底面に付着した顆粒層細胞から胚を遊離させた。胚はそのまま単層を形成した顆粒層細胞とともに共培養を継続した。

胚発育の観察：各実験区とも受精の48時間後に分

表1. 各種気相条件下におけるCO₂, O₂とpH濃度

気相圧(mmHg)	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	pH
0	5.0 $\pm$ 0.1	20.9 $\pm$ 0.1	7.4 $\pm$ 0.1
-150	6.7 $\pm$ 0.1	16.1 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.1
-300	7.0 $\pm$ 0.1	14.9 $\pm$ 0.1	7.1 $\pm$ 0.1

割率を、受精後8日目に胚盤胞への発生率を調べた。

3. 統計処理

得られた胚の発生成績はStat View 4.02(Macintosh Software: Abacus Concept社製)を用いて分析を行った。分析には2 $\times$ 2分割を用い、カイ二乗検定を行った。また、期待値が5以下のセルがある場合には、Fisherの直接確率法で検定を行った。

結 果

炭酸ガス, 酸素, pH濃度：表1に示したとおり、炭酸ガスは陰圧気相で濃度が上昇し、逆に酸素は5～6%減少した。これに伴いpHは陰圧で低下したが、各間に大きな差異はみられなかった。

成熟率：TCM-199を基礎培地として用いた場合MII期卵の割合は、表2に示したとおり容器内の気圧により差異がみられなかった。しかしCRLaaでは常圧で有意(P<0.05)に低い値となった。

分割率：表3に示したとおり分割胚の割合は、TCM-199およびCRLaa液の両培養液とも陰圧気相の方が有意(P<0.05 & P<0.01)に高かった。しかし、陰圧試験区間には差異が認められなかった。市販の炭酸ガス培養器における分割胚の割合は、TCM-199液でもCRLaa液でも試作培養器の常圧気相の成績と比

表2. 各種気相条件下における卵母細胞の成熟率

気相圧(mmHg)	供試卵母細胞数	Metaphase II (%)
TCM-199		
0	30	24(80.0) ^a
-150	30	27(90.0) ^a
-300	30	26(87.0) ^a
CRLaa		
0	30	15(50.0) ^b
-150	30	23(77.0) ^a
-300	30	22(73.0) ^a

a-b: P<0.05

表3. 各種気相条件下における胚発生成績

培養器	培地(気相圧)	供試卵母細胞数	分割胚数(%)	胚盤胞数(%)
簡易CO ₂	TCM199	0	238	167(70.2) ^a
		-150	218	194(89.0) ^b
		-300	234	206(88.0) ^b
	CRLaa	0	213	91(42.7) ^c
市販CO ₂	TCM199	-150	259	189(73.0) ^a
		-300	251	181(72.1) ^a
		0	243	157(64.6) ^a
	CRLaa	0	236	109(46.2) ^c

a-b; P<0.05, a-b, b-c; P<0.01

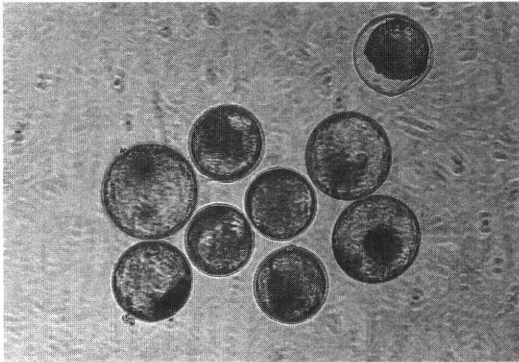


図2. CRlaa液により体外受精後7日目に発生した胚盤胞

べて有意差は認められなかった。

胚盤胞率：TCM-199を用いた場合の胚盤胞の割合は表3に示したとおり気相の違いによる差異を認めなかった。これに対してCRlaaを用いて培養した場合の胚盤胞への発生率は陰圧気相条件下の培養の方が有意($P<0.05$)に高かった。しかし、陰圧試験区間には差異が認められなかった。市販の炭酸ガス培養器における胚盤胞への発生率はTCM-199液でも、CRlaa液でも試作培養器の常圧気相条件の成績に比べて有意差は認められなかった。

考 察

本研究において卵母細胞が成熟培養後MII期に達した割合はTCM-199液では差異がみられなかったが、CRlaa液では常圧処置が陰圧気相条件下に置いたものに比べて有意($P<0.05$)に低かった。CRlaa液にはTCM-199に含まれるグルコース、酢酸ナトリウム、グルタチオン、ATP、アミノ酸のうちタウリン、アラニンが添加されていないなど組成に違いがある。CRlaaの場合、陰圧気相条件下に置くことで卵子成熟率が改善できたことは大変興味深い。CRlaaの常圧気相条件下で成熟率の低かった原因は、成熟液内にタウリンを添加しなかったためではないかと推察される。タウリンは酸素毒性除去剤として効果があり、20%酸素気相下でも、タウリンの7~14mM/mlを培養液に添加することによって卵母細胞の成熟率を高めたという報告¹¹⁾がある。このことは本研究のタウリンを添加したTCM-199を用いた培地で卵子を培養した場合、常圧の気相でも卵母細胞の成熟率が高かったことから支持される。また、酸化障害から細胞を守るグルタチオンは卵母細胞の成熟過程でも合成され、自ら細胞を守る機能が働くことが言われている¹²⁾ことから、常圧気相条件下におけ

るCRlaa液の組成ではグルタチオンが支持できず、核の成熟が促進されなかったことも考えられる。

本研究では陰圧気相条件を得るため、小型容器内から空気を除去したが、これに伴い酸素濃度が5~6%も減少した。このことが細胞への酸素毒性を軽減し、陰圧という物理的現象も手伝って卵母細胞の培養環境に改善が加えられたものと考えられる。酸素は哺乳動物細胞のエネルギー代謝にとって不可欠であるが、細胞が過度の酸素濃度に晒されると、活性酸素(Reactive Oxygen Species)を自己産生し酸化ストレスを受ける。Thompsonら¹³⁾は、4~12%の低い酸素濃度の気相中で牛の2~4細胞および8細胞期胚を培養すると桑実胚や小型化した桑実胚への発生率が改善されたと述べている。また、Fisherら¹⁴⁾はアカゲザル、ハムスター、ウサギの卵管および子宮内の酸素分圧を測定したところ、発情周期の間の酸素分圧は非常に低い値(11~14mmHg)であったと報告している。LiuとFoote¹¹⁾は20%酸素気相下であっても酸素毒性除去剤としてスーパーオキシドジスムターゼやタウリンを培養液に添加することによって5%酸素気相下と同等の胚発生成績を得ることが出来た。これに対してPinyopummintra¹⁵⁾は、牛卵母細胞を卵丘細胞と共培養した場合2.5%または5%炭酸ガスと空気を含む気相で体外成熟、体外受精を行った場合に最も良好な受精率を得た。そして5%酸素の条件では、受精率が有意に低下し、低い酸素濃度が体外で成熟、受精した牛卵母細胞に障害を与えること、卵丘細胞に囲まれた卵母細胞の成熟にとって最適な酸素濃度は、おそらく卵丘細胞の酸素要求量によって決まると述べている。このように卵母細胞の成熟および受精は、培養環境における酸素濃度によって大きく影響されることが示唆される。これらの酸化障害を避けるため卵丘細胞自体から合成されるグルタチオンの産出を如何に旨く導くかが体外成熟率を高める重要な鍵を握っていると思われる。

本研究における胚の分割率および胚盤胞への発生率をみると、陰圧気相条件下のものが常圧気相条件下に比べて高い傾向がみられた。TCM-199液では、常圧気相条件下の成績と陰圧気相条件下の成績との間に有意差は認められなかったが、CRlaa液では、陰圧気相条件下のものが常圧気相条件下のものに比べて有意に高かった。

このように培養液の組成の違いが卵母細胞の成熟や受精後の発育に微妙な差となって現れてくるが、陰圧気相条件は卵母細胞の成熟のみならず、初期胚

の発育にも有効であることが本研究で明らかにできた。このことは、Suzukiら⁶⁾が、本研究に準じた簡易炭酸ガス培養器の590ml容量を用いて牛体受精胚の作出を行った実験で、炭酸ガスパウダーを0.25g添加した常圧気相条件下と30mmHgの陰圧気相条件下では、分割と胚盤胞率が、いずれも後者で有意に高かったという成績から支持される。しかし、本研究で用いた炭酸ガス培養器は既報⁶⁾のものよりも容量が大きかったため、炭酸ガスパウダーを常圧で5%に調整して用いたが、陰圧では炭酸ガス濃度が上昇し、pH濃度が低下した。このことは陰圧での炭酸ガス濃度が初期胚発生のための最適条件を満たしているとは言えず、今後課題を残した。

本研究では体外成熟-受精-発生の各行程を簡略化するために、すべての行程をCRLaa液で処置し、TCM-199-BO-TCM-199液とを比較したが、両者に差異は認められなかった。しかし、CRLaa液では陰圧気相条件下に置くことによって成熟、分割、胚盤胞率が向上するという新発見が得られた。今後は卵母細胞の成熟、受精後の発育にとって、より理想的な培養液ならびに気相条件を探し出し、簡易化炭酸ガス培養器の実用性を高めて行きたい。

文 献

- 1) Polland JW and Lebio SP. (1994) Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 41:101-106
- 2) Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, et al. (1995) Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 43:141-152
- 3) Galli C and Lazzari G. (1996) Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Anim Reprod Sci* 42:371-379
- 4) Minato Y. (1988) An application of *in vitro* fertilization to beef cattle production from dairy cow. *East Jpn Anim ET Tech* 5:11-14
- 5) Wagtendonk LAM, Aerts BJG and Daas JHG. (1998) Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology* 49:8889-8894
- 6) Suzuki T, Sumantri C, Khan NHA, et al. (1999) Development of a simple portable carbon dioxide incubator of production of bovine IVF embryos. *Anim Reprod Sci* 54:149-157
- 7) Rosenkrans CF Jr, Zeng GR, Mcnamara GT, et al. (1993) Development of bovine embryos *in vitro* as affected by energy substrates. *Biol Reprod* 49:459-462
- 8) Suzuki T and Shimohira I. (1985) Cultivation *in vitro* of bovine embryos in a medium supplemented with bovine serum collected 7-8 days after superovulation. *Jpn J Anim Reprod* 31:1-4
- 9) Brackett BG and Oliphant G. (1975) Capacitation of rabbit spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod* 12:260-274
- 10) Sumantri C, Boediono A, Ooe M et al. (1997) Fertility of sperm from a tetraparental chimeric bull. *Anim Reprod Sci* 46:35-45
- 11) Liu Z and Foote RH (1995) Development of bovine embryos in KSOM with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O₂. *Biol Reprod* 53:786-790
- 12) Critser ES, Leibried-Rutledge ML, Eyestone WE, et al. (1986) Acquisition of developmental competence during maturation *in vitro*. *Theriogenology* 25:150 abstr
- 13) Thompson JGE, Simson AC, Pugh PA, et al. (1990) Effect of oxygen concentration on *in vitro* development of pre-implantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fert* 89:573-578
- 14) Fisher B and Bavister BD. (1993) Oxygen tension in the oviduct and uterus orhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fert* 99:673-679
- 15) Pinyopummintr T and Bavister BD. (1995) Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology* 44:471-477

(受付: 1999年9月24日)

(受理: 1999年11月26日)

Production of Bovine IVF Embryos using Portable Carbon Dioxid Incubator
— Effect of Negative Air Pressure on Embryonic Development —

Ya Juan Dong, Noriko Noda, Takeshige Otoi and Tatsuyuki Suzuki

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

The objective of this study was to examine the effect of negative air pressure for *in vitro* production of bovine embryos with CRlaa or TCM-199 culture medium using 0.35g of effervesscnet granulus added to maintain an optimum level of CO₂ in an improved portable carbon dioxide incubator.

In this eperiment, the Metaphase II observed at 22 hours after maturation were significantly ($P<0.05$) lower for 0 mmHg compared with -150 or -300mmHg air pressure in CRlaa, however these rates were not significantly difference in TCM199. The cleavage rates observed on day 2 after *in vitro* fertilization were significantly ($P<0.05$) higher for -150 or -300mmHg than those for 0mmHg air pressure in CRlaa and TCM-199. The blastocyst production rates observed on day 8 after insemination were significantly ($P<0.05$) higher for -150, -300mmHg than those for 0mmHg air pressure in CRlaa, however these rates were not significantly difference in TCM-199. These results indicate that the negative air pressure is effective for production of *in vitro* production of bovine embryos using simple portable incubator.

Key word : bovine, oocyte, IVF, negative air pressure, embryo development

(Jpn J Fertil Steril 45:31-36 2000)

ヒト桑実期／胞胚期移植の臨床的検討

Clinical Value of Human Morula / Blastocyst Transfer Following *In-Vitro* Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection

安 部 裕 司 Yuji ABE	中 野 由起子 Yukiko NAKANO	渋谷 幸 裕 Yukihiro SHIBUI
塩 川 素 子 Motoko SHIOKAWA	橋 田 英 Ei HASHIDA	伊 藤 嘉奈子 Kanako ITOH
中 野 英 之 Hideyuki NAKANO	雀 部 豊 Yutaka SASABE	池 永 秀 幸 Hideyuki IKENAGA
間 崎 和 夫 Kazuo MASAKI	菅 睦 雄 Mutuo SUGA	久 保 春 海 Harumi KUBO
平 川 舜 Shun HIRAKAWA	高 梨 安 弘 ¹⁾ Yasuhiro TAKANASHI	

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

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

¹⁾国立横須賀病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, National Yokosuka Hospital,
Kanagawa 238-0017, Japan

近年ヒトにおいても培養技術の向上により、桑実胚/胞胚期移植の臨床応用が可能となり、その良好な成績が報告されている。今回反復ART不成功症例を中心に桑実胚もしくは胞胚期移植(D4/5ET)の臨床成績を従来の2ないし3日目の胚移植(D2/3ET)と比較検討し、その臨床的意義を検討した。対象は1997年11月より1999年1月までにインフォームドコンセントの得られた45症例45周期としDay4/5ETを施行し、Day2/3ETを施行した187症例211周期と、その臨床成績を比較検討した。その結果、胚当たりの着床率は27.3%vs 19.5%であり、妊娠率は採卵周期当たり31.1%vs 27.4%、胚移植症例当たり40.0% vs 30.4%、胚移植周期当たり40.0% vs 28.4%とD4/5ETにおいて統計的有意差はないものの良好な成績が得られた。この結果より、IVF-ET反復不成功症例が多いにもかかわらずDay4/5ETの臨床成績よりDay2/3ETと比較して良好な妊娠率が得られたことは、桑実胚、胞胚期段階での子宮内への移植は、より自然の妊娠環境に近いこと、また、培養期間延長のため胚の淘汰による良好胚の選別が可能であることが示唆された。

キーワード：体外受精-胚移植、卵細胞質内精子注入法、胞胚、桑実胚、胚移植

(日不妊会誌 45:37-41 2000)

緒 言

体外受精胚移植(*In vitro* fertilization-embryo transfer: IVF-ET)をはじめとする生殖補助技術(Assisted reproductive technology: ART)は不妊治療として一般的になっており、その技術の進歩は目覚ましいものがある。しかし、胚移植は1978年ヒトIVF-ETにおいて初の妊娠成功例以来、受精後2~3日後の2~8細胞期に行われることが一般的である。しかし通常この時期は*in-vivo*においてはまだ卵管内にあり、非生理的状态といわざるを得ない。我々はマウスを用いた実験において8細胞期以前の胚を子宮内に移植してもその着床率は低いことをすでに報告している^{1,2)}。近年、培養液の改良によりヒト受精卵における胞胚形成率も向上し、この時期に移植することにより高い妊娠率が得られる事が報告されてきている。そこで今回我々は反復ART不成功例を中心に、生理的状态において子宮内に存在する媒精またはICSI後4から5日目の桑実期胚および胞胚期胚を子宮内に移植するD4/5ETを、従来の2~8細胞期胚移植D2/3ETと臨床成績を比較し、その有用性を検討した。

対象および方法

1997年10月より1999年1月まで当院をART目的にて通院中の不妊カップル219症例243周期を対象に、インフォームドコンセントの得られた45症例45周期に対しD4/5ETを施行した。適応は過去3回以上の反復ART不成功症例20症例20周期、またD2/3ET予定であったが移植時Veeckの分類³⁾にてGrade2以上の形態良好胚を認めず、移植を延期することによりviabilityの高い胚を選択する目的でD4/5ETを行った移植胚選択困難症例16症例16周期、さらに本人の希望や重症OHSS発症の危険性が高く移植を延期した症例9症例9周期とした。対照群は通常のD2/3ETを施行した187症例211周期とし、成績を比較検討した。

卵巣刺激法(図-1)

我々の開発した固定日採卵刺激法(7-days schedule法)を用いた⁴⁾。すなわち前周期の黄体期3日目よりGnRHa (Buserelin acetate, Sprecur, ヘキスト・マリオン・ルセル)を900 μ g/dayを点鼻し下垂体の脱感作終了後、hMG (Humegon, 日本オルガノン)300IU/dayを連日7日間投与した。

採卵はhCG投与36時間後に経腔超音波ガイド下にてダブルルーメン採卵針(K-OPSD-1635, Cook IVF)

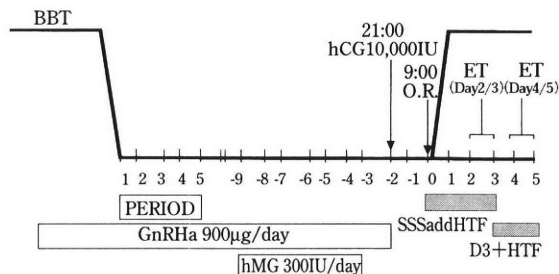


図1 卵巣の刺激方法

を用いた。

採卵後Human tubal fluid (HTF; Irvine scientific) + 10% synthetic serum substitute (SSS; Irvine scientific)にて4~6時間の前培養の後、Swim up法によって得られた運動良好精子 10×10^4 /mlにて媒精を行った。また重症男性不妊および受精障害症例ではICSIを行なった⁵⁾。媒精またはICSI施行後18時間目に雌雄前核を確認し得た正常受精卵のみ培養液交換を行ない、胚移植まで5%CO₂ in airにて培養器内へ静置した。なおDay4/5ET群では、さらに媒精後3日目でD3+HTF medium (Irvine scientific) + 10%SSSへ培養液交換を行なった。

胚移植時D2では2~4細胞期胚、D3で8細胞期胚、D4で桑実期胚、D5で胞胚期に至ったものを正常発育胚とし、その着床率および妊娠率を比較検討した。なお桑実期胚はD4でcompactionを形成したものの、胞胚期は胞胚腔を形成したものとした。

胚移植用培養液はHEPES buffered HTF (m-HTF; Irvine scientific) + 30%SSSを用い、Edwards-Wallace embryo replacement catheter (REF1816, Wallace)を用い経腹超音波ガイド下にて行なった。

結 果

45症例45周期より285個の受精卵(雌雄前核胚)が得られ、D4にて桑実期、D5にて胞胚期の胚が少なくとも1個以上移植可能であった周期(胚移植率)は、35周期(77.8%)であった。またD4にて桑実期までの発育(桑実胚形成率)は91胚(31.9%, 91/285)、D5に

表1 桑実胚/胞胚形成率

Day4/5ET 対象症例数	45
Day4/5ET 対象周期数	45
Day4/5ET 施行周期数	35 (77.8%)
2PN数	285
桑実胚形成率(%)	31.9 (91/285)
胞胚形成率(%)	28.1 (62/221)

表2 Day4/5ETとDay2/3ETの臨床成績の比較

	Day4/5ET	Day2/3ET
年 齢	34.8 (24~42)	35.3 (23~47)
既往ART回数	2.8 (0~9)※	0.8 (0~8)※
移植数	2.2	2.0
着床率(%) (対胚)	27.3	19.5
妊娠率(%) (対症例)	40.0 (14/35)	30.4 (57/187)
(対周期)	40.0 (14/35)	28.4 (60/211)
流産率(%)	21.4 (3/14)	23.3 (14/60)

※ $p<0.05$

表3 Day4/5ET 対象群の臨床成績

	周期数	ET	妊娠例数	妊娠率(%)
反復不成功症例群	20	15	6	40.0
移植胚選択困難症例群	16	14	5	35.7
その他(本人希望など)	9	6	3	50.0
合 計	45	35	14	

て胞胚期までの発育(胞胚形成率)は62胚(28.1%, 62/22.1)であった(表1)。

D4/5ET群, D2/3ET群の平均年齢は各々34.8, 35.3歳であり, 有意差は認めなかった。また既往ART回数はD4/5ET群において反復不成功例を中心に行ったため2.8回とD2/3ET群の0.8回に比し有意($p<0.05$)に多かった。胚移植率は77.8%, 96.3%と統計的有意差はないもののD4/5ETにおいて低下傾向にあった。また胚当たりの着床率は27.3%, 19.5%であり, 妊娠率は採卵周期当たり31.1%(14/45), 27.4%(60/219), 胚移植症例当たり40.0%(14/35), 30.4%(57/187), 胚移植周期当たり40.0%(14/35), 28.4%(60/211)とD4/5ETにおいて統計的有意差はないものの, 採卵周期当たりの妊娠率を除き良好な成績が得られた(表2)。

D4/5群の適応別妊娠率は反復不成功群20症例20周期で胚移植可能周期は15周期であった。妊娠は6周期に成立し, 症例当たり30%, 胚移植周期当たり40.0%であった。移植胚選択困難群では16症例16周期中14周期で胚移植が可能であり5周期に妊娠が成立し, 症例当たり31.3%, 胚移植周期当たり35.7%であった。本人希望群では9症例9周期中6周期で胚移植が可能であり3周期に妊娠が成立し, 症例当たり33.3%, 胚移植周期当たり50%であった(表3)。

考 察

D4/5移植の利点の一つは胚のステージと生理的環境との一致にある。現在中心に行なわれているD2/3ETは通常2~8細胞期であり生体内では卵管に存在

するとされている。しかしヒトIVF-ETの妊娠成功以来, 2~8細胞期移植が一般的となり, さらに体外環境への暴露を最小限抑える目的で前核期胚移植など早期移植が検討されていた。我々は以前よりマウスを用いヒトと同様に同じ個体で採卵と移植を行う採卵同一個体間移植モデルを作成し, 移植胚のステージによる妊娠率の比較を行い至適移植時期を検討してきた。その結果8細胞期以前の胚を子宮内に移植してもその着床率は低く, 培養期間を桑実期胚~胞胚期まで延長すると着床率が向上することを報告した^{1,2)}。同様にBusterらも子宮還流をし得られたヒト自然胞胚を移植すると, 着床率は60%と高率であると報告している⁶⁾。これらの結果をもとに反復不成功症例を中心にヒト桑実期胚/胞胚期移植(D4/5ET)の臨床検討を開始した。その結果, 移植胚当たりの着床率, 胚移植当たりの妊娠率は2~4細胞期胚移植(D2/3ET)に比し良好な成績を得た。このことより移植胚のステージに対する子宮内環境への適応性が, 着床率および妊娠率向上の鍵を握ることが示唆された。

次の利点としてより良好な移植胚の選択が可能となることが挙げられる。今回の症例において通常のD3ETを行う予定であったが胚のVeeck分類が8細胞期Grade3~4で胚の数も10個と多かったため, 移植胚の選択に苦慮していた。そこでD5ETを説明し了解が得られたため培養を延長したところ, late expanded blastocystまで2胚が発育しこれを移植し妊娠が成立した。染色体異常や遺伝的異常のある胚は胞胚までの発育途中で淘汰されるとの報告があり^{7,8)}この様に培養期間を延長することにより胚発育の自然淘汰がかかり, より生存性の高い胚を移植できる可能性が示唆された。これらのことより胞胚期移植は移植胚数を減らし, 多胎妊娠の予防に有効な手段であるとの報告も有る⁹⁾。今回我々は移植胚数をD2/3ET, D4/5ET両群とも原則2個までとしたが, 多胎妊娠率については次報で報告する。しかし胚当たりの着床率はD4/5ETで高い結果が得られているため, 今後単一胚移植の可能性が示唆された。

しかしながら採卵から胚移植までの期間が延長する本法は様々な問題点を抱えている。その一つは胚の発育に対する患者の精神的重圧が増すことであり, また体外環境に対する暴露時間が延長することによる胚のダメージなどが挙げられる。とくに著者はマウス胚における実験で複製期染色体のDNA損傷を鋭敏に検出する方法として知られている姉妹染色分体交換(SCE)スコアを用い検討したところ, 生体

内発育胚に比べ体外培養胚において有意に上昇したことを報告している²⁾。前述したように培養期間を延長することにより生存性の高い胚を選択できるという利点の反面、非生理的環境におけるDNA損傷などの危険性も孕んでいる。これらのことより我々は反復不成功例など適応を十分検討し、D4/5ETの利点、欠点および起こり得る問題点などを中心とし、インフォームドコンセントを行い症例を選択し行っている。

今回の検討における胞胚形成率は、他家¹⁰⁻¹⁴⁾の報告に比し低い傾向にあるが、これは対象症例が反復ART不成功例を中心に選択されたためと思われる。現在ヒト胞胚期移植用に様々な培養液が開発され、これらの組み合わせにより胞胚形成率が向上し、さらに着床率および妊娠率の向上が報告されている¹⁴⁾。我々は引き続き適応症例別および種々の培養液による胞胚形成率を検討中である。

おわりに、この方法は培養期間が長期に亘るため、今まで以上の厳格な培養条件のQuality controlが必要となり、さらに症例あたりの培養器の占有期間が増えるため設備投資も必要となる。またヒト早期胚に対する培養環境の至適性が確立されていない現在において、D4/5ETは安易に行うべきではなく、症例を選択し施行すべきと思われる。従って現在我々はD2/3ETを原則とし反復ART不成功症例や移植胚の選別困難症例を中心に行っており、さらに本法の有効な適応症例の選別と培養期間延長による胚の正常性につき検討中である。

本論文の要旨は第17回日本受精着床学会および第44回日本不妊学会学術講演会で発表した

文 献

- 1) 安部裕司, 林 鴻程, 片山 進 他(1986) 胚移植成績におよぼすマウス体外受精の諸条件について, 受精・着床'85:107-111
- 2) 安部裕司 (1988) マウス体外受精卵の移植成績におよぼす環境因子と子宮内膜相関の検討, 日産婦会誌 40:821-827
- 3) 安部裕司, 池永秀幸, 中野英之 他(1995) ARTプログラムにおける採卵日固定刺激法の効果について, 日不妊会誌 40:211-215
- 4) 安部裕司, 久保春海(1996) ICSIの実際, ICSI SEMINAR & DEMONSTRATIONS, p25-41, オリジナル販売, 東京
- 5) Veeck LL (1991) Atlas of the Human Oocytes and Early Conceptus, Vol.2, Williams & Willikins Co. Baltimore
- 6) Buster JE, Bustillo M, Rodi IA, et al (1985) Biologic and morphologic development of donated human ova by nonsurgical uterine lavage. Am J Obstet Gynecol 153:211-217
- 7) Edwards RG and Hollands P (1988) New advances in human embryology: implication of the preimplantation diagnosis of genetic disease. Hum Reprod 3: 549-556
- 8) Menezo YJ and Ben-khalifa M(1995) Cytogenetic and cryobiology of human co-cultured embryos: a 3-year experience. J Assist Reprod Genet 12:35-40
- 9) Gardner DK and Schoolcraft WB (1998) Elimination of high order multiple gestations by blastocyst culture and transfer. In Shoham Z, Howles C and Jacobs H (eds), Female Infertility Therapy: Current Practice. Martin Dunitz Press, London, pp267-274
- 10) Gardner DK, Vella P, Lane M et al(1998) Culture and transfer of human blastocysts increase implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. Fertil Steril 69:84-88
- 11) Jones GM, Trounson AO, Lolatgis N, et al (1998) Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 70:1022-1029
- 12) Alves da Motta EL, Alegretti JR, Baracat EC, et al (1998) High implantation and pregnancy rates with transfer of human blastocysts developed in preimplantation stage one and blastocyst media. Fertil Steril 70:659-663
- 13) Behr B, Pool TB, Milki AA, et al(1999) Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. Hum Reprod 14:454-457
- 14) Gardner DK and Lane M(1998) Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Hum Reprod Jun;13 Suppl 3:148-59; discussion 160

(受付: 1999年10月15日)

(受理: 1999年11月27日)

Clinical Value of Human Morula / Blastocyst Transfer
Following *In-Vitro* Fertilization or Intracytoplasmic Sperm Injection

Yuji Abe, Yukiko Nakano, Yukihiro Shibui, Motoko Shiokawa, Ei Hashida,
Kanako Itoh, Hideyuki Nakano, Yutaka Sasabe, Hideyuki Ikenaga, Kazuo Masaki,
Mutuo Suga, Harumi Kubo, Shun Hirakawa and Yasuhiro Takanashi¹⁾

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

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, National Yokosuka Hospital,
Kanagawa 238-0017, Japan

Recent improvements in cultivation techniques in human have enabled clinical applications of ET (embryo transfer) in the morula/blastocyst stage, and good results have been reported. In our study, we studied mainly among unsuccessful cases of repeated ART, the clinical result in morula/ blastocyst stage ET (D4/5ET) comparing with ET (D2/3ET) on second or third day, and then, examined its clinical significance. 45 cases/45 cycles objects were selected among those whose informed consent was obtained during the period between November 1997 and January 1999, and Day 4/5 ET was carried out, and the clinical results were compared with that of 187 cases/211 cycles which Day 2/3ET was carried out. Although there was no statistical significance observed, the result was favorable at D4/5ET than Day 2/3 ET, with implantation rate per embryo of 27.3% vs. 19.5%, and a pregnancy rate of 31.1% vs. 27.4% per oocyte retrieval and 40.0% vs.30.4% and 40.0% vs. 28.4% per ET cycle respectively. These results suggest that Day 4/5 ET obtained better clinical results than Day2/3ET in pregnancy rate, despite many unsuccessful cases of repeated IVF-ET, since ET to the uterus in morula/ blastocyst stage resembles more the environment of natural pregnancy. In addition, it is also possible to select healthy embryos due to extension of the cultivation period.

Key words: IVF-ET, ICSI, blastocyst, morula, embryo transfer

(Jpn J Fertil Steril 45:37-41 2000)

アザチオプリンによるラット Leydig 細胞障害に関する検討

Analysis of Leydig Cell Dysfunction Caused by Azathioprine in Rats

岩 崎 雅 志
Masashi IWASAKI

池 原 葉 子
Yoko IKEHARA

村 上 康 一
Koichi MURAKAMI

水 野 一 郎
Ichiro MIZUNO

永 川 修
Osamu NAGAKAWA

布 施 秀 樹
Hideki FUSE

富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and
Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan

アザチオプリンによるLeydig細胞障害機転についてアザチオプリンを投与されたラットよりLeydig細胞を分離培養してその機能面より検討を加えた。

8週齢のSprague-Dawley系ラットを用い、アザチオプリンを使用し以下のような実験群に分けた。すなわち、蒸留水を投与したコントロール群、アザチオプリンを5～20mg/kg投与した群とし、投与方法は2週間連日経口投与とした。投与終了時に精巣および精巣上体の重量測定、精巣上体尾部の精子数、精子運動率および血中ホルモン値の測定を施行した。また、摘出した精巣よりLeydig細胞を分離採取して培養後各種濃度のhCGを添加し、その反応を培養液中のテストステロン値にて測定した。

血中LHおよびFSH値には変動はみられないものの、血中テストステロン値はアザチオプリン各投与群ともコントロール群に比べて有意な低下がみられた。また、hCG各濃度存在下の培養液中のテストステロン値は、アザチオプリン投与群でコントロール群に比べてhCGに対する反応性の低下がみられ、アザチオプリンによるLeydig細胞障害が裏付けられた。

キーワード：アザチオプリン、Leydig細胞、ラット、テストステロン

(日不妊会誌 45:43-47 2000)

緒 言

以前、我々はシクロスポリン、アザチオプリンおよびミゾリピンのラット造精機能への影響について検討を行ない、3剤とも造精機能へ障害を与えることを報告した。また、障害をうける精細胞はラット精子発生過程の主として精祖細胞であることを示した。一方アザチオプリンは他の2剤と異なりLeydig細胞へも障害を与える可能性が示唆された。そこで、アザチオプリンのLeydig細胞障害機転についてアザチオプリンを投与されたラットよりLeydig細胞を分離培養してその機能面より検討を加えたので報告する。

対象および方法

実験動物として8週齢のSprague-Dawley系ラットを用いた。免疫抑制剤としてアザチオプリン(Sigma社)を使用し以下のような実験群に分けた。すなわち、蒸留水を投与したコントロール群、アザチオプリンを5、10、および20mg/kg投与した計4群とした。なお、投与量の設定は臨床初期量の約6倍を最高用量とし、投与方法は経口にて2週間連日投与とした。投与終了時に断頭にて屠殺した後、精巣、精巣上体の臓器重量測定、精巣上体尾部の精子数および精子運動率の算定を行なった。後者の方法は摘出した精巣上体尾部をシャーレ内にて生食5mlを加えて

細切し²⁾、その浮遊液をThomaの血球算定盤にて鏡検し精子数および精子運動率を測定した。なお、精子数は精巣上体尾部100mgあたりに換算した。血中ホルモン値としてLH、FSHおよびテストステロン値を測定した。LH、FSHの測定はUCB社およびHazleton社より入手したラットLH、FSHの抗原と抗血清によるradioimmunoassay法によった³⁾。テストステロンは栄研のテストステロン栄研キットによるradioimmunoassay法により測定した。一方、摘出した精巣よりLeydig細胞を分離採取して培養し各種濃度のhCG(帝国臓器)を添加し、その反応を培養液中のテストステロン値にて判定した。Leydig細胞の分離採取については、Browningら⁴⁾の方法に準じて施行した。すなわち、摘出した白膜を除去した後、collagenase(Worthington typeI)、bovine serum albumin(以下BSA, Sigma)を含むmedium199(M199, Flow laboratory)内にてcell dispersionを行なった。その後、ポアサイズ100 μ のナイロンメッシュ(13-XX:日本理化学器械(株))にて精細管を除去し、250 $\times$ gで15分間遠沈した。上清を除くと、得られた沈渣は主にLeydig細胞を含むcrude interstitial cellよりなる。percollおよび1.8倍濃縮M199-BSAをそれぞれ9:11に混合した液をあらかじめ20,000 $\times$ gにて遠沈しておき、これに前述のcrude interstitial cellを静かに添加後、800 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C下で20分間遠沈した。これにより細胞は3層に分離され、その中間層のみを採取し、M199-BSAにて2回洗浄し95%O₂、5%CO₂混合ガス下2時間のpreincubationを施行した。得られた細胞をtrypan blueにより染色し死滅した細胞は染色されることよりcell viabilityを確認した。全細胞の95%以上にviabilityが得られた場合、以下の実験に供した。すなわち、Steinbergerら⁵⁾の方法に準じてLeydig細胞に特異的である3- β hydroxysteroid dehydrogenaseの染色をおこない、濃青の顆粒を確認し当該細胞の90%以上がLeydig細胞であることを確認した。Leydig細胞は各投与群とも1ウェルあたり3 $\times$ 10⁵cells/mlに調製し、hCG 0, 1, 3, 10, 30, 100お

よび1000IU/mlの各濃度存在下に3時間のincubationを行ない培養液中のテストステロン値を測定した。なお測定は、テストステロン栄研キットにて行なった。

有意差検定はすべてunpaired Student's t testを用いた。

結 果

1. 臓器重量

精巣および精巣上体の重量は各群とも差はみられなかった。

2. 精巣上体尾部の精子数および精子運動率

アザチオプリン投与終了時の精子数および精子運動率はいずれも各群間に明らかな差を認めなかった(図1)。

3. 血中ホルモン値

血中LHおよびFSH値は各投与群とも明らかな差を認めなかったが、テストステロン値はアザチオプリンのいずれの投与量ともコントロール群に対して有意な低下を認めたが、投与量による差は認められなかった(表1)。

4. hCG各濃度存在下の培養液中のテストステロン値

コントロール群ではhCG濃度が1mIU/mlでは培養液中のテストステロン値に変動を認めなかったが、3mIU/mlで553 $\pm$ 98.2ng/3 $\times$ 10⁵cellsと高値を示し、10mIU/mlでは1012 $\pm$ 135.4ng/3 $\times$ 10⁵cellsとさらに高値を呈した。しかし、hCG濃度30,100および1000mIU/mlの高濃度では10mIU/mlの場合と差を認めなかった。一方、hCG10mIU/mlの濃度存在下で、アザチオプリン5mgおよび10mg/kg投与群はコントロール群に対して培養液中のテストステロン値が有意に低値を示した(いずれもp<0.05)。hCG30mIU/ml存在下では培養液中のテストステロン値はいずれの投与群ともコントロール群に比べ有意な低下がみら

表1 アザチオプリン投与終了時の血中LH、FSHおよびテストステロン値

	LH値 (ng/ml)	FSH値 (ng/ml)	テストステロン値 (ng/dl)
コントロール群	0.88 $\pm$ 0.21	12.9 $\pm$ 3.2	359.5 $\pm$ 89.0
AZP5mg/kg投与群	0.77 $\pm$ 0.17	10.2 $\pm$ 3.8	180.5 $\pm$ 80.4*
AZP10mg/kg投与群	0.72 $\pm$ 0.25	11.5 $\pm$ 3.5	183.2 $\pm$ 104*
AZP20mg/kg投与群	0.95 $\pm$ 0.30	12.3 $\pm$ 4.1	160.3 $\pm$ 121*

それぞれn=5 mean $\pm$ S.D.

*P<0.05(コントロール群に対して)

AZP: Azathioprine

れた(5mgおよび20mg, $p<0.05$; 10mg, $p<0.01$). 一方, hCG100および1000mIU/ml存在下ではいずれの投与群でも, コントロール群に比べて培養液中のテストステロン値の低下傾向を示したが有意差は認めなかった(図2).

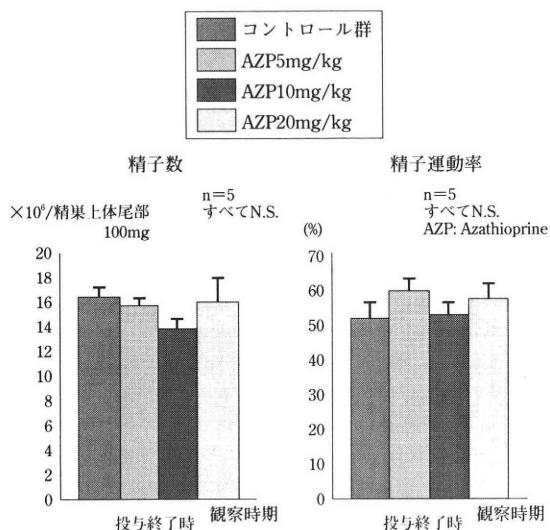


図1 アザチオプリン投与終了時の精巣上体尾部の精子数および精子運動率

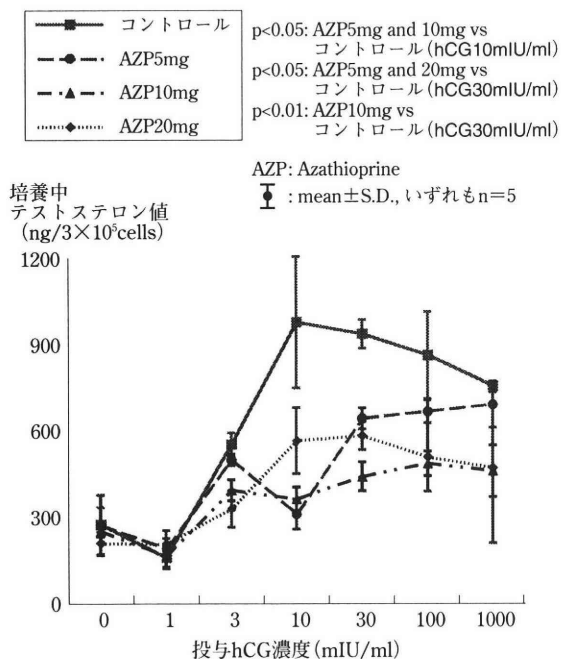


図2 hCG各濃度存在下の培養液中のテストステロン値

考 察

アザチオプリンは6-メルカプトプリンの誘導体であり, 1970年代まで腎移植における免疫抑制療法において中心的役割を果たしてきた^{6,7)}. その後, シクロスポリンが登場し移植腎の生着率の改善がみられ⁸⁾, 現在ではシクロスポリンが腎移植における免疫抑制剤の主流を占めている. しかし最近ではシクロスポリンの腎毒性など副作用が問題となり⁹⁾, シクロスポリンの投与量を減量して本剤を併用する方法がしばしば用いられている^{10,11)}. 従ってアザチオプリンが使用される頻度はまだまだ多く, その副作用について検討することは意義深いものと考えられる.

本剤の副作用としては, 一般には骨髓抑制および肝機能障害などが問題となる¹²⁻¹⁴⁾. 造精機能への影響をみた報告は少なく, 腎移植後に本剤を用いてその精液所見から無精子症あるいは乏精子症をきたしたとの報告¹⁵⁾や, 逆に精液所見に異常を認めなかったとの報告¹⁶⁾などいずれも臨床例におけるものが散見されるにすぎない. 以前報告した結果¹⁾と同様に, ラットにアザチオプリンを経口投与したところ投与終了時に血中テストステロン値の有意な低下がみられたが血中LHおよびFSH値には明らかな変動は認められなかった. このことはアザチオプリンが間脳-下垂体抑制を介してLeydig細胞の機能低下をもたらした可能性は低いものと推定される. そこでラットにおいてアザチオプリンを投与し, 摘出した精巣よりLeydig細胞を分離採取して*in vitro*でhCGに対する反応よりLeydig細胞機能をみたところ, hCG各濃度存在下の培養液中のテストステロン値では, アザチオプリン投与群でコントロール群にくらべてhCGに対する反応性の低下がみられ, とくに10mIU/mlおよび30mIU/mlでは有意差が認められた. このことよりアザチオプリンによってLeydig細胞のテストステロン分泌能が障害されたことが裏付けられた. なお, 本剤がLeydig細胞によるテストステロン分泌に障害を与える機序としてはテストステロン合成に関与する酵素のうち, 17, 20-desmolaseあるいは17 α -hydroxylaseの活性低下^{17,18)}やhCGレセプター数の低下¹⁹⁾などを介する可能性があるが, この点につき現在検討中である.

なお, 精巣ではマクロファージなどの免疫担当細胞が存在し, 局所の免疫機能の調節に加えて精細胞, Sertoli細胞, Leydig細胞などの造精にかかわる細胞の機能も調節しており, 種々のサイトカインやgrowth factorなどがこれら細胞間の相互作用に重要

な役割を果たしている²⁰⁾。ちなみにinterleukin-1は精巣において精祖細胞および精母細胞の分裂を促進する作用をはじめとして精細胞の成熟過程に至る調節に関与しており、同様にinterleukin-6もinterleukin-1と協調的に働くと考えられている²¹⁾。従って免疫抑制剤であるアザチオプリンが精巣の免疫担当細胞に作用してサイトカインなどの分泌に影響をおよぼし二次的にLeydig細胞の障害をもたらしたことも否定はできないだろう。今回の実験ではラットにアザチオプリンを投与して分離採取したLeydig細胞を用いて*in vivo*で生じた障害を観察するという方法を行ったが、前述のことを明らかにするためには、サイトカインなどのLeydig細胞機能に影響を与える因子を除外できるような実験系、すなわち無処置のラットよりLeydig細胞を分離し、*in vitro*でアザチオプリンの影響をみるなどの検討も必要と思われる今後の検討課題と考えている。

文 献

- 1) 岩崎雅志, 布施秀樹, 片山 喬(1996) シクロスポリン, アザチオプリン, およびミゾリピンのラット造精機能へ及ぼす影響. 日泌尿会誌 87:42-49
- 2) Seethalakshmi L, Menon M, Malhotra RK, et al. (1987) Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. J Urol 138:991-995
- 3) 浦田和樹, 荒井正明, 沼田香代子 他(1990) ラット下垂体ホルモン(TSH, LH, FSH, PRL)のRadioimmunoassay測定法の基礎的検討. 医学と薬学, 23: 127-134
- 4) Browning JY, D'Agata R, Grotjan HE, et al. (1981) Isolation of purified rat Leydig cells using continuous percoll gradients. Endocrinol 109:667-669
- 5) Steinberger H. (1971) Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol Rev 51:1-22
- 6) Calne RY, Alexandre GPJ and Murry JE. (1962) A study of the effects of drugs in prolonging survival of homologous renal transplants in dogs. Ann NY Acad Sci 99:743-761
- 7) Murry JE, Merrill JP, Harrison JH, et al. (1963) Prolonged survival of human-kidney homografts by immunosuppressive drug therapy. New Engl J Med 268:1315-1323
- 8) European Multicentre Trial Group. (1983) Cyclosporine in cadaveric renal transplantation. One-year follow-up of a multicentre trial. Lancet ii 29:986-989
- 9) Klintmalm G, Ringden O and Groth CG. (1983) Clinical and laboratory signs in nephro-toxicity and rejection in cyclosporin-treated renal allograft recipients. Transplant Proc 15:2815-2820
- 10) Inou T, Kusada R, Sugimoto H, et al. (1981) Clinical trial of bredinin in renal transplantation. Transplant Proc 13:315-318
- 11) 安村忠樹, 岡 隆広(1995) 特集 腎移植と免疫抑制薬 アザチオプリン. 腎と透析 39:855-861
- 12) Murray JE, Merrill JP and Dammin GJ. (1962) Kidney transplantation in modified recipients. Ann Surg 156:337-355
- 13) Starzl TE. (1964) Experiences in renal transplantation. WB Saunders Co, Philadelphia
- 14) Hamburger J, Crosnier J, Dormont J, et al. (1972) Renal transplantation-Theory and Practice. The Williams & Wilkins Co, Baltimore
- 15) Lingardh G, Anderson L and Osterman B. (1974) Fertility in men after renal transplantation. Acta Chir Scand 140:494
- 16) Phadke AG, Mackinnon KJ and Dossetor JB. (1970) Male fertility in uremia: restoration by renal allografts. Can Med Assoc J 102:607-608
- 17) Rajfer J, Turner TT, Rivera F, et al. (1987) Inhibition of testicular testosterone biosynthesis following experimental varicocele in rats. Biol Reprod 36:933-937
- 18) LeVier RR and Spaziani E. (1968) The influence of temperature on steroidogenesis in the testis. J Exp Zool 169:113-120
- 19) 風間泰蔵(1995) 実験的精索静脈瘤の精巣Leydig細胞機能に及ぼす影響. 日泌尿会誌 86:308-315
- 20) 吉田謙一郎(1996) 綜説 精巣内構成細胞のパラクリン・オートクリン作用と精巣機能. 臨泌 50: 95-103
- 21) 田中雄一郎, 榎原久司, 宮川勇生(1997) 特集/男性不妊-精子形成とその機能- 精子機能とサイトカイン. 産婦の世界 49:65-71

(受付: 1999年 9 月23日)

(受理: 1999年12月 4 日)

Analysis of Leydig Cell Dysfunction Caused by Azathioprine in Rats

Masashi Iwasaki, Yoko Ikehara, Koichi Murakami, Ichiro Mizuno, Osamu Nagakawa and Hideki Fuse

Department of Urology, Faculty of medicine, Toyama medical and
Pharmaceutical University, Toyama 930-0194, Japan

Influence of azathioprine on Leydig cell function in rats was examined. Azathioprine was orally administered every day for 14 days at following doses; 5~20mg/kg. Serum testosterone level decreased immediately after azathioprine administration, although serum LH and FSH levels were not changed. It was demonstrated that, in azathioprine treated groups, testosterone production and its responsiveness to hCG in isolated Leydig cell decreased significantly compared to control group. It was therefore concluded that azathioprine impaired Leydig cell function.

Key words: azathioprine, leydig cell, rat, testosterone

(Jpn J Fertil Steril 45:43-47 2000)

非モザイク型 Klinefelter 症候群男性の精液内精子を用いた ICSI による男児出産の 1 症例

Birth of a Male Baby after Intracytoplasmic Injection of Spermatozoa Obtained from a Nonmosaic Klinefelter Patient.

本 田 徹 郎
Tetsuro HONDA

中 堀 隆
Takashi NAKAHORI

小 倉 啓 司¹⁾
Keiji OGURA

玉 井 彦 明
Hikoaki TAMAI

高 橋 晃
Akira TAKAHASHI

荒 井 陽 一¹⁾
Yoichi ARAI

高 橋 司²⁾
Tsukasa TAKAHASHI

梅 岡 弘一郎
Kouichiro UMEOKA

大久保 和 俊¹⁾
Kazutoshi OKUBO

磯 崎 八重子²⁾
Yaeko ISOZAKI

倉敷中央病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Central Hospital,
Kurashiki 710-8602, Japan

¹⁾倉敷中央病院泌尿器科

Department of Urology, Kurashiki Central Hospital,
Kurashiki 710-8602, Japan

²⁾倉敷中央病院臨床検査科

Department of Laboratory Medicine, Kurashiki Central Hospital,
Kurashiki 710-8602, Japan

Klinefelter症候群 (KS) は無精子症ないしは高度乏精子症を呈する。近年精巣内精子あるいは精液内精子を用いた intracytoplasmic sperm injection (ICSI) によって、妊娠・出産に至った症例が8例報告されている。今回、47,XXY非モザイク型KS男性の射出精液から運動精子が回収され、ICSIにて妊娠・出産に至った1症例を経験したので報告する。症例は29歳男性と29歳女性の夫婦で不妊にて他院を受診し、夫の無精子症を指摘され当院に紹介された。染色体分析の結果、末梢血リンパ球50細胞のすべてが47,XXYであり、非モザイク型KSと診断された。3回の精液検査(非濃縮状態)にて無精子であったが、濃縮後にはごく少数の運動精子が認められたので凍結保存した。妻にはとくに不妊原因を示唆する所見は認められなかった。KS患者の精子には異常精子の頻度が通常より高いことを説明したうえでICSIの同意を得た。Long protocolによる排卵誘発にて5個の成熟卵を回収した。採卵当日の射出精液をパーコール法で濃縮したところごく少数(精液全体で総数約200に相当)の運動精子が認められ、凍結精子を利用せずにICSIを施行した。5卵中3個が受精し、2個が正常に分割したのでこの2個を移植したところ、単胎妊娠が成立した。妊娠18週の羊水染色体検査では46,XYで、妊娠39週に2540gの男児を正常

分娩した。KSに対するICSIは有効な治療であり、また治療前には遺伝に関する十分なカウンセリングが必要であると考えられた。

キーワード：Klinefelter症候群、非モザイク、卵細胞質内精子注入法、羊水検査、妊娠

(日不妊会誌 45:49-53 2000)

緒 言

Klinefelter症候群(KS)は染色体異常による原発性精巣機能不全の代表的疾患である。その基本核型は47,XXYであるが、モザイク(47,XXY/46,XYが最も多い)も約10%に認められる。KSの頻度は比較的高く、出生男児の1/500~1000にみられる。典型的には高身長、うすい体毛、女性化乳房、などの身体的所見がみられるが、このような典型例はむしろ少数であり、外見上は正常で男性不妊の精査によって初めて明らかになることが多い。一般に精巣は小さく硬く、組織学的には精子形成は全くあるいはほとんど認められず、無精子症ないしは高度の乏精子症を呈し、とくに非モザイク症例において、精子形成が乏しい¹⁾。過去に4例のKS男性の妻の自然妊娠・出産例も報告されているが、これはきわめて稀である²⁾。

近年、卵細胞質内精子注入法(Intracytoplasmic sperm injection; ICSI)の安全性が認められ技術が一般に普及した背景のもと、KS男性の精巣あるいは射出精液から回収された精子を用いたICSIが試みられるようになった。しかし我々の知るところでは出産報告は8例にとどまっている。今回、非モザイクKS男性の射出精液から回収された精子のICSIにより妊娠・分娩に至った1症例を経験したので報告する。

症 例

症 例：29歳男性と29歳女性の夫婦。

既往歴：夫婦ともに特記すべきことなし。

家族歴：夫婦ともに特記すべきことなし。

現病歴：結婚後3年間の不妊にて他院を受診したところ、夫の無精子症を指摘され、1998年8月当院に紹介された。

所見(夫)：身長175cm、体重75kg、体毛は正常、女性化乳房なし、精巣は左右とも容量3.0mlと小さかった。血清FSH、LHはそれぞれ36.2、25.0mIU/mlと高値で、Testosteroneは179ng/dlと低値であった。当院で染色体検査を施行したところ、末梢血リンパ球は50細胞すべてが47,XXY(G-band法にて検討)であり、非モザイク型KSと診断された。精液検査(非濃縮状態)では、精子は認められなかった。

所見(妻)：基礎体温は二相性で、不妊原因を示唆する所見はとくに認められなかった。

治療経過：不妊治療としては、精巣内精子を用いたICSI以外の方法では妊娠は困難であることを説明した。その際、KSにおいては、染色体異常精子の頻度が通常よりも若干高いこと、よって受精卵に染色体異常が起こる可能性が通常よりも若干高いこと、また海外では患者の希望があれば移植前に胚の染色体診断を行い正常染色体を有する胚を移植することが行われているが、日本では原則として行われていないこと、および妊娠が成立した場合には希望があれば羊水検査にて胎児の染色体分析を受けることが可能であること、などを説明した。夫婦はICSIを受けることに同意し、また妊娠が成立した場合の羊水染色体検査を希望した。

10月、妻にlong protocolにて排卵誘発を行った。すなわち、予定月経の7日前から酢酸ブセレリン 900 μ g/dayを投与し、月経3日目からhMG製剤を8日間投与したところ卵胞成熟が認められ、採卵の36時間前にhCGを投与した。排卵誘発中に2回の精液検査を行った。1回目は液量3.0mlで、非濃縮状態でマクラーチェンバーにて観察したところ精子が認められなかったが、1,200rpm、5分間の遠心濃縮をしたところごく少数の運動精子が認められた。2回目は液量1.8mlで、1回目同様精子は認められなかったが、80%パーコール法にて濃縮したところ、ごく少数の運動精子が認められた。1回目、2回目とも精子の凍結保存を行った。月経周期14日目に行われた採卵では5個の成熟卵(metaphase II)が回収された。採卵当日の精液を80%パーコール法にて濃縮したところ少数(精液全体で総数約200に相当)の運動精子が認められたので、念のために予定されていたTESE(Testicular sperm extraction)を中止し、また凍結精子も利用せずにICSIを施行した。5卵中3個が受精し、2個が正常に分割したので採卵後2日目にこの2胚(Veeck Grade 2の4細胞 およびGrade 3の6細胞)を移植したところ、単胎妊娠が成立した。妊娠18週の羊水検査では胎児染色体は46,XYであった。1999年7月、妊娠39週に2540gの男児を正常分娩した。夫染色体検査の追加：妊娠24週に、胎児染色体が正

常型で妊娠が順調に経過していることもあり、研究の意義から夫のリンパ球以外の細胞の染色体分析を施行したい旨を話したところ快く同意が得られた。右鼠径部皮膚から採取された線維芽細胞の染色体核型は、G-band法にて検討された40細胞すべてにおいて47, XXYであり、またFISH (Fluorescence in situ hybridization) 法にて性染色体について検討したところ1000細胞すべてにおいてXXYであった。

考 察

KSにおいては、一般に精子形成が全くあるいはほとんど認められないために、非閉塞性の無精子症ないしは高度の乏精子症を呈する。松田らによると、男性不妊患者のうち、無精子症の10.4%に、また乏精子症($<20 \times 10^6/\text{ml}$)の4.6%に染色体異常がみられることが報告されており、この染色体異常のなかで最も頻度が高いのがKSである³⁾。

従来KSに対する不妊治療方法はなかったが、近年ICSIが普及してきたなかKSにおける治療の可能性が検討されるようになった。1995年、Harariらは高度乏精子症の47, XXY/48, XXXY/46, XYモザイク症例の精液から運動精子をパーコール法にて分離、ICSIを施行し、受精・分割したことを報告した²⁾。妊娠には至っていないが、これがKSにおけるICSIの最初の報告である。1996年には、Tournayeらが、非モザイク症例においてTESEによって受精能をもつ精子が回収されうることと、1例の化学妊娠例を報告した⁴⁾。1997年、Hinneyらは非モザイクの1症例の精液内精子を用いたICSIにての妊娠例を報告した。この症例は妊娠9週に流産したが、絨毛染色体は46, XXと正常であった⁵⁾。ついで、Tournayeらは、非モザイク型15症例中8例からTESEによって精子を回収してICSIを行い、FISH法による胚の性染色体診断を行ったう

えで胚移植を行い、3例に妊娠が成立し2例が出産したことを報告した⁶⁾。さらに出産報告がつづき⁷⁻¹¹⁾、我々がMedlineを用いて検索した範囲では国内の1例を含めて合計8例の出産が報告されている(表1)。

本症例の末梢血リンパ球と、線維芽細胞の染色体はいずれも47, XXYであり、非モザイクKSと診断された。文献的に非モザイクKSにおいて、TESEにより運動精子が回収されICSIが可能となる症例はおおむね半数程度のものであり^{6, 9, 11)}、本症例のように精液内に運動精子が認められる症例はごく一部のものである。現在まで、KSの出産例は上記のように数例にとどまっているが、精巣内精子あるいは精液内精子が回収された場合には、ICSIは有効な治療法であると考えられ、ICSIの普及に伴い今後KSの出産例は増加していくと考えられる。

そこで、KSにおける精子の性染色体異常の可能性が問題となる。KSにおいて精子形成をするgerm cellの核型については大きく分けてふたつの意見があり、ひとつは一本のX染色体を失って正常核型になった46, XY germ cellのみが精子形成をするという意見で¹²⁾、もうひとつはそれに加えて47, XXY germ cellも精子形成を行うという意見である¹³⁾。この点についてはいまだ不明であるが、非モザイクKSにおいてもまたモザイクKSにおいても、精子の性染色体異常が正常男性に比べて有意に高率に現れることが報告されている。多数の精子が解析できる症例が少ないため報告は限られているが、24, XY, 24, XX, 24, YY, などhyperhaploid精子の出現率は非モザイク症例において2.5~36.9%、またモザイク症例において0.9~7.5%であり、これは正常男性におけるhyperhaploid精子の出現率0.4%に比して有意に高率である(総括12~14)。さらに非モザイクXXYマウスにおいても、XY, XX, YYなどの精子の出現率は1.16%でコ

表1 Klinefelter症候群におけるICSIによる受精・妊娠報告例

著 者	患者核型	精 子	結 果
Harariら ²⁾	(1995) モザイク	精液内精子	受精・分割
Tournayeら ⁴⁾	(1996) 非モザイク	精巣内精子	化学妊娠
Hinneyら ⁵⁾	(1997) 非モザイク	精液内精子	妊娠9週流産
Tournayeら ⁶⁾	(1997) 非モザイク	精巣内精子	出産
	非モザイク	精巣内精子	出産
Bourneら ⁷⁾	(1997) 非モザイク	精液内精子	出産、男女の双胎1例
Palermoら ⁸⁾	(1998) 非モザイク	精巣内精子	出産、男児1例
	非モザイク	精巣内精子	出産、男女の双胎1例
	非モザイク	精巣内精子	出産、男児1例
Reubinoffら ⁹⁾	(1998) 非モザイク	精巣内精子	出産、男児1例
Ron-Elら ¹⁰⁾	(1999) 非モザイク	精巣内精子	出産、男児1例
見尾保幸 ¹¹⁾	(1999) 非モザイク	精巣内精子	出産、女児1例
本症例	非モザイク	精液内精子	出産、男児1例

ントロールマウスにおけるそれ(0.15%)に比して有意に高いことが報告されている¹²⁾。

現在まで KS の精子を用いた ICSI による染色体異常児の出産報告例はないものの、KS の精子には正常男性よりも高率に染色体異常が認められることから、胚・胎児に 47,XXY, 47,XXX, 47,XYY などの染色体異常が正常よりも高率に生じる可能性がある。胚・胎児の染色体診断法として、技術的には羊水を用いた出生前診断と、胚の一部を用いた着床前診断とがある。羊水検査の長所は多数の細胞を分析するため診断の正確性が高いことであるが、短所としてはまれに流産を起こすこと、および異常が認められた場合に夫婦に苦悩を与えることが挙げられる。一方、胚の着床前診断は母体に対する侵襲性はないが、部分生検である以上、胚のモザイク性という性質から診断結果の解釈に注意が必要である⁹⁾。現在のところ日本産婦人科学会では胚の着床前診断は、重篤な遺伝性疾患にのみ適応となり、夫婦の希望と学会の承認が必要であるとしている¹⁵⁾。従って胚・胎児の染色体検査を夫婦が希望した場合、日本では少なくとも今後しばらくは羊水検査が主流であると思われる。我々の知る範囲では羊水検査にて染色体異常が認められたという例は報告されていないが、染色体異常が認められた場合のことをあらかじめよく相談しておくことが必要であろう。今回の症例では羊水検査で胎児染色体が正常であることが判明して以後、妊娠継続に対する夫婦の安心感が高まった。羊水検査には、正常と診断された場合に以後の妊娠継続が心理的に安定するという長所もあるといえよう。

胚の着床前診断が許可されている国では、夫婦の希望があれば検査が行われている。Reubinoﬀらは、1症例から得られた2胚について7~8細胞期にFISH法にて着床前診断を行ったところ、1胚は46,XYで他方は47,XXYであり、後者の胚形態が不良であることもあり夫婦は前者のみの移植を希望し、妊娠し分娩に至った1症例を報告している⁹⁾。一方、胚の着床前診断が許可されている国の報告例でも、着床前診断は希望しない、という夫婦も多い。羊水検査でも胚生検でも、検査の意義、結果の解釈、異常が判明した場合の対応、などについて治療前に十分にカウンセリングをしておくことが重要であると考えられる。

文 献

- 1) 寺田央巳, 山口安三, 牛山知己 他(1996) Klinefelter 症候群の臨床的検討. 日不妊会誌 41:

200-204

- 2) Harari O, Gronow M, Bourne H, et al. (1995) High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 63:182-184
- 3) 松田公志, 堀井泰樹, 小倉啓司 他(1992) 男子不妊症における染色体異常頻度と染色体異常症例の臨床的検討. 泌尿紀要 38: 803-809
- 4) Tournaye H, Staessen C, Liebaers I, et al. (1996) Testicular sperm recovery in nine 47,XXY Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11:1644-1649
- 5) Hinney B, Engel W, Guttenbach M, et al. (1997) Pregnancy after intracytoplasmic sperm injection with sperm from a man with a 47,XXY Klinefelter's karyotype. *Fertil Steril* 68:718-720
- 6) Tournaye H, Camus M, Vandervorst M, et al. (1997) Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* 20 Suppl 3: 69-73
- 7) Bourne H, Stern K, Clarke G, et al. (1997) Delivery of normal twins following the intracytoplasmic injection of spermatozoa from a patient with 47,XXY Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 12: 2447-2450
- 8) Palermo GD, Schlegel PN, Scott Sills E, et al. (1998) Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *New Engl J Med* 338:588-590
- 9) Reubinoﬀ BE, Abeliovich D, Werner M, et al. (1998) A birth in non-mosaic Klinefelter's syndrome after testicular fine needle aspiration, intracytoplasmic sperm injection and preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 13: 1887-1892
- 10) Ron-El R, Friedler S, Strassburger D, et al. (1999) Birth of a healthy neonate following the intracytoplasmic injection of testicular spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Hum Reprod* 14:368-370
- 11) 見尾保幸(1999) クラインフェルター症候群に対する精巣内精子を用いた顕微授精の有用性と問題点. 産婦の実際 48:715-721
- 12) Mroz K, Hassold TJ and Hunt PA (1999) Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. *Hum Reprod* 14:1151-1156
- 13) Kruse R, Guttenbach M, Schartmann B, et al. (1998) Genetic counseling in a patient with XXY/XXXY/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 69:482-485
- 14) Okada H, Fujioka H, Tatsumi N, et al. (1999) Klinefelter's syndrome in the male infertility clinic.

Hum Reprod 14: 946-952

する見解.日産婦誌 50(10):21-25

15) 日本産婦人科学会会告(1998)「着床前診断」に関

(受付: 1999年 8月13日)

(受理: 1999年 9月27日)

**Birth of a Male Baby after Intracytoplasmic Injection of Spermatozoa Obtained
from a Nonmosaic Klinefelter Patient**

Tetsuro Honda, Hikoaki Tamai, Kouichiro Umeoka, Takashi Nakahori, Akira Takahashi,
Kazutoshi Okubo¹⁾, Keiji Ogura¹⁾, Yoichi Arai¹⁾, Yaeko Isozaki²⁾ and Tsukasa Takahashi²⁾

Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Central Hospital
Kurashiki 710-8602, Japan

¹⁾Department of Urology, Kurashiki Central Hospital,
Kurashiki 710-8602, Japan

²⁾Department of Laboratory Medicine, Kurashiki Central Hospital,
Kurashiki 710-8602, Japan

Klinefelter's syndrome is a common sex chromosome abnormality, resulting in azoospermia or severe oligozoospermia. There have been 8 cases of pregnancy and delivery after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in Klinefelter patients. We present a case where delivery was successful after ICSI with spermatozoa obtained from the ejaculate of a nonmosaic Klinefelter patient. A 29-year-old Japanese man was referred to our hospital with primary infertility. Investigations showed azoospermia and a 47,XXY karyotype in all 50 analyzed lymphocyte metaphases. After Percoll gradient centrifugation, a few motile sperms were observed in the ejaculates. His wife had a regular ovulatory cycle. The couple requested ICSI after being informed that the incidence of hyperhaploid sperm is higher in Klinefelter patients than in normal men and that preimplantation diagnosis for Klinefelter patients has not been generally accepted in Japan. Motile sperm obtained from the ejaculate were injected into 5 mature oocytes. Three oocytes fertilized and two cleaved embryos were transferred, resulting in a singleton pregnancy. Amniocentesis at 18 weeks of gestation showed a 46,XY karyotype and a male baby was delivered at 39 weeks. The present case suggests that ICSI with genetic counseling is an effective treatment for Klinefelter patients who have viable spermatozoa.

Key words: Klinefelter's syndrome, nonmosaic, intracytoplasmic sperm injection (ICSI), amniocentesis, pregnancy

(Jpn J Fertil Steril 45:49-53 2000)

幼児期の一侧停留精巣切除と対側の ヘルニア手術に起因した閉塞性無精子症の一例

Obstruction of Vas Deferens with "Single Testis" Due to Unilateral Orchiectomy and Contralateral Inguinal Herniorrhaphy in Childhood : A Case Report

湯 村 寧
Yasushi YUMURA

岩 崎 皓
Akira IWASAKI

千 葉 喜美男
Kimio CHIBA

斎 藤 一 隆
Kazutaka SAITO

漆 原 正 泰
Masayasu URUSHIBARA

広 川 信
Makoto HIROKAWA

藤沢市民病院泌尿器科

Department of Urology, Fujisawa City Hospital
Fujisawa 251-8550, Japan

ヘルニア手術に起因する精管閉塞は閉塞期間が長期で、精管の欠損部の長いもの、血流が不十分なものがあり精管結紮術後例に比べ手術がさらに困難になる。今回、無精子症の不妊例で、幼児期に一侧の停留精巣が切除されたいわゆる“単精巣”で、鼠径ヘルニアの手術に起因した閉塞性無精子症を経験した。患者は28歳、1年9カ月の不妊であった。生後10カ月で右の精巣を切除され、1歳の時に左の鼠径ヘルニア手術を行っていた。左の精巣は大きさ、硬度ともに正常であった。血中のFSHは8.70mIU/mlと正常範囲内であった。精液中に精子はみられず精管造影では精管の断絶・拡張像・精巣側への逆流が認められた。精巣生検では造精機能の若干の低下が認められたが精子は存在していた。閉塞性の無精子症の診断でVasovasostomyを施行し、術後半年で運動精子の出現を認め10カ月後に自然妊娠した。

小児期のヘルニア手術に伴う閉塞性無精子症では閉塞期間が長期におよんでいても妊娠に到るケースがある。条件としてFSHが正常域・精巣の大きさと硬度が正常・精管断端からの流出液中の精子の確認があれば妊娠の可能性があり、積極的に手術を進めるべきである。

キーワード：精管閉塞、精管精管吻合術、ヘルニア手術

(日不妊会誌 45:55-58 2000)

緒 言

無精子症の不妊例で、幼児期に一侧の停留精巣が切除され、鼠径ヘルニアの手術に起因した閉塞性無精子症を経験した。いわゆる“単精巣”で27年間の閉塞期間があったがVasovasostomyにより精子の出現が見られ、妊娠に到った症例を報告する。

症 例

患 者：28歳男性

主 訴：1年9カ月の不妊

現病歴：結婚後1年9カ月の不妊で、1月に当科を受診した。性生活は月2回。

既往歴：生後10カ月、鼠径ヘルニア根治術施行。1歳、右停留精巣を切除。

家族歴：特記することなし。妻は26歳で産婦人科学

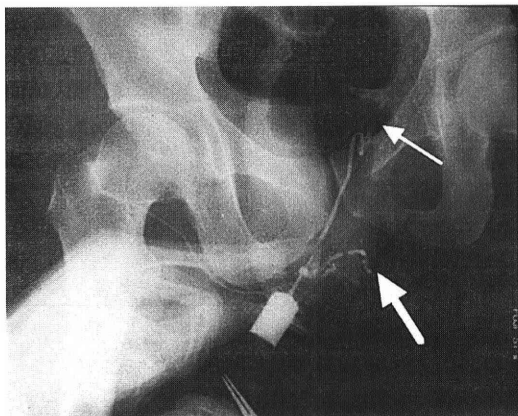


図1 精管造影

精管の断絶(細い矢印)と精巣側への逆流(太い矢印)を認める。

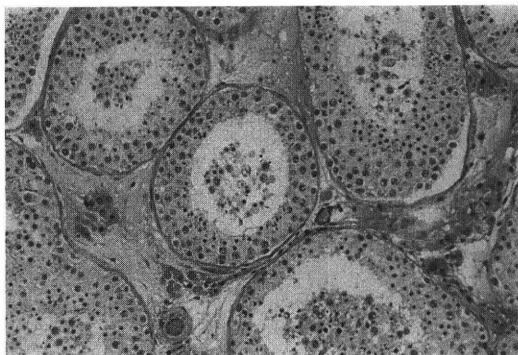


図2 精巣生検像

Jonsen's scoreの平均は6.86であった。

的に異常が認められていない。

身体所見：一般の身体所見は正常で、外陰部や陰茎に異常をみない。髭、恥毛なども正常。左精巣の大きさ(外表計測)：3.7×2.0×2.5cm(21cc)、硬度正常。精索静脈瘤は認めなかった。左陰嚢内に精管を触知した。

臨床検査所見：尿所見、末梢血、血液生化学的に異常は見られなかった。

内分泌検査：血中テストステロン6.23ng/ml(2.70～10.7)、FSH8.70mIU/ml(1.8～13.6)、LH2.40mIU/ml(1.1～8.8)

精液所見：精液量2.0ml、無精子症。

染色体検査：46XY

精管造影と精巣生検の所見：精巣側の精管はマッチ

表2：精液所見の推移

days	術前	22	36	180
vol (cc)	2.5	6.5	5.0	6.0
conc (mil/ml)	0	0	4.71	11.46
motile (%)	0	0	0	1.38

棒大に怒張しており、精管穿刺で精管内より白色の液体が多量にみられ、精子の存在が確認された。(図1)造影検査で精管の断絶と拡張がみられ、精巣側へ逆流する像が認められた。精巣生検像では(図2)部位でも異なるが精子の形成能は維持されていた。Jonsen's Scoreではscore 8以上の精細管は22%と少なかったが精子細胞の成熟度を示す精細管score 7が最も多く分布していた(精細管の平均score 6.86)(表1)。

臨床経過：鼠径ヘルニア手術に起因した精管閉塞と診断して、同年12月22日Vasovasostomyを行った。鼠径管を開くと通常的位置に遠位側の精管を認め、近位側の断端とは約1.5cmの欠損部分が認められた。近位側の断端を切除すると白色液の流出がみられた。遠位側の断端を切除し生理食塩水を注入したが抵抗なく流入した。両精管の断端吻合を顕微鏡下に7～0ナイロン糸により全層縫合で2針、外膜筋層の縫合を4針行った。手術後にATP、メチコパールの薬物療法を併用した。手術後の精液所見を表2に示す。術後36日目に精子の出現が見られ精子濃度は $4.71 \times 10^6/\text{ml}$ であったが運動精子は認められなかった。術後6カ月目の精液所見は精子濃度 $11.46 \times 10^6/\text{ml}$ で運動率は1.38%だった。その後、仕事の都合で秋田県に転居されたため、精液所見の追跡が不可能となったが、9月に妊娠の朗報があり、翌94年6月末に男児を無事に出産した。

考 察

閉塞性無精子症のなかでヘルニア手術に起因する精管閉塞は意外と多い。Matsuda¹⁾によると小児期に鼠径ヘルニア根治術をおこなった既往のある男子不妊症患者54人のうち片側の精管に閉塞が認められたもの15名が集計され、小児のヘルニア手術で精管損傷が注意されなくてはならない。

Vasovasostomyの成績を左右する因子として手術手技、閉塞期間等があげられる。手術手技にMicro-

表1：精細管のJonsen's score分布(n=50)

Score	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	average
No. of tubules	0	0	0	0	5	11	23	8	3	0	6.86

surgeryが導入されてから、精子出現率、妊娠率は向上がみられている^{2,3)}。Vasectomy後の精管開存率・妊娠率は閉塞期間が10年未満ではそれぞれ86~88%、38~64%、10年以上では54~71%、31~41%と10年以上の閉塞期間で成績は不良の傾向がある⁴⁻⁶⁾。この原因としては長期間の閉塞で造精機能障害、抗精子抗体の出現⁷⁾、精管の圧上昇に伴う精巣上体の繊維化・閉塞・機能障害^{3,8)}などがあげられる。さらにヘルニア手術に起因する精管閉塞では閉塞期間が20年以上が多く、吻合部の多くは鼠径部で精管が切除されて欠損部の長いものや精管の血流が不十分なものもある。これが精管結紮例に比べ手術を困難にしている^{9,10)}。Matsudaら¹¹⁾は本疾患による不妊症の患者22名に対しまずVasovasostomyを、精液所見の改善しなかった患者にはEpididymovasostomyを行い最終的には7名の妊娠に成功した。彼らのVasovasostomyの精管開存率は88.9%であった。また市川ら¹⁰⁾も12例の患者に吻合を行い3例の妊娠をみている。かれらのVasovasostomyの精管開存率は75.0%であった。後藤ら¹²⁾は31年間の閉塞症例の妊娠を報告している。いずれの報告も精管の閉塞期間は平均20年を越えている。精管結紮例でのVasovasostomyの臨床成績には閉塞期間が大きな予後因子と考えられているが、小児期のヘルニア手術に伴う閉塞性無精子症では不思議なことに閉塞期間があまり問題とならない。閉塞期間が長期に及んでいても1)FSHが正常域にある、2)精巣の大きさと硬度が正常、3)精管断端からの流出液中の精子確認、4)精巣生検で精子の確認できる精細管が認められるなどの条件をみたせば、妊娠の可能性があり積極的に手術を進めるべきである。

本症例の場合、術後6カ月以降の精液所見の追跡ができなかったが通常、術後の精子運動率は1年間程度で徐々に改善してくる^{6,13)}。これは精子の運動率は精巣上体を通過する際に獲得されるもので精巣上体の機能は閉塞解除後直ちに回復しないためだとされる¹⁴⁾。

Vasovasostomyは患者への(患者の妻への)侵襲が少ないこと、自然妊娠を期待できることから泌尿器科医が駆使するわけではない必要な技術であると思う。

文 献

- 1) Matsuda T, Horii Y and Yoshida O (1992) Unilateral obstruction of the vas deference caused by childhood inguinal heniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril* 58:609-613
- 2) Phadke GM and Phadke AG (1967) Experiences in the re-anastomosis of the vas deferences. *J Urol* 97:888-890
- 3) Silber SJ (1978) Vasectomy and vasectomy reversal. *Fertil Steril* 29:125-140
- 4) Kabalin J.N and Kessler R (1991) Macroscopic vasovasostomy re-examined. *Urology* 38:135-138
- 5) M Fox (1994) Vasectomy reversal-microsurgery for best results. *Br J Urol* 73:449-453
- 6) Belker AM, Thomas AJ Jr, Fuchs EF, et al. (1991) Result of 1469 microsurgical vasectomy reversals by the vasovasostomy study group. *J Urol* 145:505-511
- 7) Hendry WF (1988) Unilateral testicular obstruction in subfertile males. *Andrology and human reproduction*. New York:Raven Press:311-316
- 8) Silber SJ (1979) Epididymal extravasation following vasectomy as a cause for failure of vasectomy reversal. *Fertil Steril* 31:309-316
- 9) Miyake K, Yamamoto M and Mitsuya H (1987) Vasovasostomy for obstructive azoospermia due to herniorrhaphy in childhood. *Nagoya J Med Sci* 49:53-59
- 10) 市川智彦, 小宮 顕, 鈴木啓悦 他(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. *日不妊会誌* 44:22-27
- 11) 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
- 12) 後藤百万, 吉川羊子, 辻 克利 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
- 13) Silber SJ (1984) Microsurgery for vasectomy reversal and vasoepididymostomy. *Urology* 23:505-524
- 14) Pardanani DS, Parti NG and Pawar HN (1976) Some gross observations of the epididymides following vasectomy ;a clinical study. *Fertil Steril* 27:267-272
(受付: 1999年10月6日)
(受理: 1999年11月15日)

**Obstruction of Vas Deferens with "Single Testis" Due to
Unilateral Orchiectomy and Contralateral Inguinal Herniorrhaphy in Childhood : A Case Report.**

Yasushi Yumura, Akira Iwasaki, Kimio Chiba, Kazutaka Saito, Masayasu Urushibara and Makoto Hirokawa

Department of Urology, Fujisawa City Hospital
Fujisawa 251-8550, Japan

We reported on a case of obstruction of the vas deferens. A 28 years old man visited our clinic for primary infertility for 21 months. He had received left herniorrhaphy and the removal of right testis in his childhood. Semen analysis showed azoospermia. Serum FSH, LH, and testosterone levels were within normal limits. Vesiculography showed the obstruction of left vas deferens. Testicular biopsy showed some spermatozoa observed in a few seminiferous tubules (mean Jonsen's score 6.86). He received a microsurgical left vasovasostomy. Six months later, his semen analysis showed $11.46 \times 10^6/\text{ml}$ of a concentration, and 1.38% of a motility rate. His wife became pregnant and delivered a healthy infant 18 months after the operation. The long-term obstruction of vas deferens often induced the secondary irreversible injuries to testis and epididymis, resulting in poor outcome of treatments. However, the treatment for patients with normal serum FSH level and normal testicular volume are expected to be a good outcome.

Key words: vas deferens obstruction, vasovasostomy, herniorrhaphy

(Jpn J Fertil Steril 45:55-58 2000)

地方部会講演抄録

平成11年度 日本不妊学会中部支部学術集会

日時：平成11年6月5日(土)

午後2時～4時

場所：三重県医師会館 (津市)

1. 当院におけるクロミフェン治療の成績について

○保條佳子, 浅井光興, 澤口啓造

藪下廣光, 鈴木正利, 野口昌良

中西正美 (愛知医大産婦)

無排卵症の不妊患者に対しクロミフェンはよく使用されている排卵誘発剤のひとつである。今回、1993年3月～1998年3月までの間に、当科にてクロミフェンを投与した不妊症患者226症例1308周期を対象とし、適応疾患別投与頻度、妊娠率、併用薬などについて検討した。その結果、妊娠率は対症例あたり30.5%、対周期あたり5.3%であり、妊娠例における平均投与周期数は 4.4 ± 4.5 周期であった。黄体機能不全、無排卵症など排卵因子によるものの妊娠率は35.6%であった。黄体機能不全での流産率は30.3%と高率であり、さらなる黄体補充療法が必要と思われる。また、温経湯併用により、対周期あたりの妊娠率(8.2%)は、クロミフェン単独投与(6.3%)よりも上昇した。累積妊娠率による検討では、6周期投与で80～90%の症例が妊娠していた。

2. 岐阜地区における体外受精胚移植の成績

○松波和寿, 高木 博, 野田克己

(松波総合病院産婦)

伊藤美穂, 玉舎輝彦 (岐阜大産婦)

現在岐阜県内では7施設が体外受精を行っている。そのうち、松波総合病院と岐阜大学医学部附属病院における1995年から1998年までのデータをまとめ、岐阜地区における体外受精の現状を報告する。不妊治療患者にしめる体外受精患者の割合は両施設平均で23.1%であり、施行回数は年々増加し1998年は両施設で170回。適応は卵管因子(松波27%/岐阜17.9%)男性因子(36.8%/20.5%)原因不明(34.2%/41%)であった。胚移植あたりの妊娠率は1998年では(24.3%/23.2%)であり、症例あたりの妊娠率は(48%/45%)、妊娠の転帰では多胎妊娠は(33%/16%)であった。これらはほぼ日本の平均的な成績と思われる。岐阜県内において潜在体外受精適応者はかな

り存在すると推測される。未だ体外受精に対して消極的な考えが有りさらに啓蒙が必要である。

3. Conventional IVFにおける媒精所見と受精率の検討

○中西 豊, 近藤育代, 梶山広明

戸田 繁, 小崎 均, 山原 昇

藤村秀彦, 吉田誠哉, 正橋鉄夫,

水谷栄彦 (名古屋大産婦)

安藤寿夫 (同 周産母子センター)

【目的】ICSIの普及、技術的向上により、受精率に関してはConventional IVFとICSIとの間にほとんど差はみられなくなってきた。どの様な症例に対しICSIが必要なのか、媒精の時点で受精率を予測し判断する必要があると思われる。今回我々は、Conventional IVFの受精率に影響を及ぼす媒精因子を検討しICSIの適応を再考した。【対象および方法】当院において1996年1月より1998年12月までにConventional IVFを行った156例を対象とした。成熟卵あたりの受精率を、swim-up処理前後の精子所見、媒精精子数の各因子でt-検定を用いて検討した。【結果】処理後の全精子濃度 10×10^6 /ml未満、運動精子濃度 7.5×10^6 /ml未満、精子運動率60%未満の各群で受精率平均が有意に低い傾向が認められた。【結論】以上の結果より、媒精の時点において処理後の精子所見を検討し、積極的にICSIを考慮してもよいと思われた。

4. 体外受精胚移植において低採卵率を示した周期の内分泌学的背景の検討

○鈴木由佳, 青山和史, 鈴木規敬

佐藤 剛, 松原寛和, 生田克夫

鈴木 薫 (名古屋市大産婦)

【目的】体外受精胚移植(IVF-ET)において、予測されたよりもはるかに少数の卵子しか回収できない周期が存在し対応に苦慮することがある。これらの低採卵率を示す周期の内分泌学的背景につき検討した。

【方法】対象は当科にて1997年1月から1999年3月までにlong protocol法にてIVF-ETを施行した111症例224周期である。採卵率は超音波断層法にて観察された14mm以上の卵胞数に対する回収卵子数とし、mean-1.0SD以下の採卵率であったものを低採卵率周期とした。【成績】対象の平均採卵率は $80.0 \pm 41.2\%$ で、低採卵率周期は19周期(平均採卵率 $21.3 \pm 13.4\%$)で

あった。低採卵率周期となる危険因子として(1)月経発来中の血中 $E_2 \geq 30\text{pg/ml}$, (2)hCG投与日-1日の卵胞1個当たりの血中 $P < 0.1$ または $\geq 0.3\text{ng/ml}$, (3)採卵当日の卵胞1個当たりの $E_2 < 40\text{pg/ml}$, (4)採卵当日の卵胞1個当たりの血中 $P < 0.6\text{ng/ml}$ が判明した。低採卵率周期も受精率には差を認めずETさえできれば妊娠率には差はなかった。しかし採卵当日の卵胞1個当たりの血中 $P \geq 3.0\text{ng/ml}$ の周期では採卵できても受精率が有意に低く妊娠率も有意に低下した。

5. 体外受精胚移植におけるmultinucleated blastomeresの発生要因と妊娠率におよぼす影響の検討

○森脇崇之, 日比博子, 鈴木正樹

小口秀紀, 三輪忠人

(トヨタ記念病院産婦不妊センター)

【目的・方法】multinucleated blastomere(MNB)は胚の個々の細胞に複数核を認めるものである。IVF-ET周期でMNB胚を観察し従来の方法でgradeを評価し、MNB胚を認めたがこれを移植しなかった群(A群)とMNBを認めなかった群(B群)、移植胚にMNB胚を含む群(C群)について比較検討した。【成績】41%がMNB胚を認める周期で、16%の胚でMNBが確認された。MNB胚のうち良好胚は45%であった。A群はB群よりhMGの反応が良好であった。精巣上体・精巣精子を使用した周期はすべてA群に属し、57%が妊娠した。妊娠率はA群50%、B群25.6%、C群12.5%であった。【結論】MNB胚の半数は良好胚として評価される危険がある。MNBを認める症例でもこれを移植しなければ妊娠に影響を与えない。hMGへの反応性と、精子側因子がMNBの発生に関係している。MNBを同定しこれを移植しないようにすることは極めて有意義である。

6. Interleukin-8 (IL-8) 投与によるOHSS様卵胞腫大の惹起に関する研究

○松浦俊樹, 朝比奈俊彦, 後藤淳子

北村公也, 松山 薫, 西口富三

小林 浩, 金山尚裕, 小林隆夫

寺尾俊彦 (浜松医大産婦)

【目的】排卵過程の一つに、類炎症反応に基づく血管透過性の亢進が生じており、その重要なmediatorにIL-8が存在することがわかっている。そこで我々は、OHSS様卵胞腫大惹起に関する研究において、IL-8に着目し、ラットの卵巣における排卵過程ある

いはOHSS発生過程を検討した。【方法】過剰卵胞刺激後のIL-8の作用を検討し、卵胞面積、卵巣血管構築、卵の成熟度の解析によって施行した。【成績】過剰卵胞刺激下においてIL-8は、卵胞腫大現象および血管透過性亢進現象に関してはhCGと同様の作用を持つことが判明した。過剰卵胞刺激の卵巣に対して、卵の成熟に関してはhCG様の作用はほとんどないことが判明した。【結論】IL-8の卵胞液貯留現象における作用機序は、卵胞血管の拡張およびその透過性の亢進による血清成分の卵胞内移動と考えられた。この機序は腹水貯留現象においても同様なものとする。

今後は、IL-8の制御を中心に、フリーラジカル等も対象にしながら、卵の成熟に影響をあたえることのないOHSS予防策を研究していく方針である。

7. Premature Ovarian Failure (POF) 症例での腹腔鏡下卵巣生検は必要か。

○西尾永司, 塚田和彦, 廣田 稜

大原 聡, 水川 淳, 加藤利奈

館山祐子, 多田 伸, 澤田富夫

(藤田保健衛生大産婦)

Premature Ovarian Failure (POF) 症例における卵巣生検の臨床的意義について検討した。対象は、POFと診断した19症例とした。この中で腹腔鏡を実施したものは12症例で、そのうちの21卵巣について卵巣生検を行った。上述の12症例の内訳は、排卵誘発不成功例が8例、排卵誘発成功例が4例であり、両群間で腹腔鏡下卵巣形態所見と卵巣生検結果を比較検討した。排卵誘発成功例のうち同一治療による排卵誘発の再現性を認めたものは、37.5%であった。排卵誘発の再現性を認めた症例でも、原始卵胞を確認できず原始卵胞の有無による治療効果の予測は困難と思われた。また硬化型卵巣以外では卵巣生検で原始卵胞を同定する頻度は低く、卵巣組織の減少を招く卵巣生検の意義は少ないと考えられた。POFの治療法には画一的なものはないが、E-P cyclic therapyとGnRHa(long protocol)+pFSH-hCGを併用した排卵誘発の有用性が示唆された。

8. Coasting法により卵巢過剰刺激症候群の発症を回避し得た2例

○与那覇斉, 野田直美, 竹内茂人
箕浦博之, 豊田長康 (三重大産婦)
築城友加子, 田窪伸一郎
(鈴鹿回生総合病院)

排卵誘発, 過排卵刺激に伴う重要な合併症として, 時として生命の危険を伴う卵巢過剰刺激症候群(OHSS)がある。OHSSが発症した場合の適切な治療法のみならず, その発症をどのように予防するかが重要な問題であると考えられる。今回, 我々はcoasting法を試み, OHSS回避に成功した体外受精・胚移植, 顕微授精の妊娠例を経験したので報告する。重症のOHSSの既往のある2症例に対して, GnRHa/hMG/hCG療法により, 過排卵刺激を施行したところ, 多数の未成熟卵胞の集簇発育を認めた。さらに, hMGを投与し成熟卵胞を得た後, 血清E₂値の下降を確認した上で, hCG5000単位を投与し, 採卵を行った。1例は体外受精, もう1例は顕微授精により受精卵を得, 胚移植を施行したところOHSSの発症を招くことなく, 継続妊娠に至った。Coasting法は不妊治療の中断を伴うことなく, かつ, 簡便であり, 通常の過排卵刺激に比し採卵数は減少するものの良好胚獲得率, 妊娠率の劣化を招くことがない。とくに多数の卵胞の集簇発育のため卵巢刺激に苦慮する症例では極めて有効な手段であると考えられる。

9. 血中 von Willebrand factor 値の推移と卵巢過剰刺激症候群

○浅田義正, 長嶋有希子, 鈴木瑞穂
安保智子, 浅田美佐, 中島貞利
(ナカジマクリニック不妊センター)

von Willebrand factor(vWF)は第Ⅷ因子のcarrier proteinであるが, 血管内皮活性化マーカーとして, 卵巢過剰刺激症候群(OHSS)の診断にも有効な検査として注目されてきた。体外受精・胚移植患者において, 血中vWF値の測定がOHSSの発症予知に有効か, OHSS病態の推移を反映するかについて検討した。ナカジマクリニック不妊センターにて体外受精・胚移植を施行した患者に対し, 採卵時と胚移植時に血中vWF(VIDAS vWF)値を測定した。OHSSを発症しなかった群では, 血中vWF値比(移植時/採卵時)は1以下で, OHSS2度以上の群では, vWF値比は1.2以上を示し, OHSS発症を予知できることが示唆

された。また, エストラジオール値, Ht値と比較し, vWF値の推移はOHSSの重症度をよく反映し, 治療方針の決定, 治療効果の判定の指標として有効であることが示唆された。

10. 精巣上体, 精巣内精子による顕微授精の臨床成績

○竹内茂人, 与那覇斉, 野田直美
二村典孝, 箕浦博之, 豊田長康
(三重大産婦)
築城友加子, 田窪伸一郎
(鈴鹿回生総合病院不妊センター)
木瀬英明, 川村壽一 (三重大泌尿)

【目的】我々は無精子症の患者に対し, 精巣上体精子吸引法(MESA)または精巣内精子採取法(TESE)にて得られた精子を用いて, 卵細胞内精子注入法(ICSI)を行い, その成績を検討した。【方法】1999年3月までに無精子症と診断された22症例で, 胚移植はMESAを施行し精子を得た5症例, 8周期およびTESEを施行した17症例のうち, 精子の得られた9症例, 11周期に施行した。比較対照群として新鮮射出精子によるICSIの89症例, 179周期を用いた。【成績】①受精率; 精巣上体精子: 91.4% (32/35) (新鮮), 95.0% (38/40) (凍結保存), 精巣精子: 74.4% (29/39) (新鮮), 63.2% (24/38) (凍結保存), 新鮮射出精子: 90.8% (1061/1169)。②生存率; 精巣上体精子: 97.1% (34/35) (新鮮), 100% (38/38) (凍結保存), 精巣精子: 97.4% (38/39) (新鮮), 96.4% (27/28) (凍結保存), 新鮮射出精子: 96.1% (1123/1169)。③分割率; 精巣上体精子: 100% (32/32) (新鮮), 100% (38/38) (凍結保存), 精巣精子: 100% (25/25) (新鮮), 100% (18/18) (凍結保存), 新鮮射出精子: 86.1% (833/967)。④対胚移植妊娠率; 精巣上体精子: 75.0% (3/4) (新鮮), 100% (4/4) (凍結保存), 精巣精子: 42.9% (3/7) (新鮮), 40.0% (2/5) (凍結保存), 新鮮射出精子: 34.0% (55/162)。【結論】精巣上体精子, 精巣精子の新鮮, 凍結保存のいずれも, 新鮮射出精子と同様の受精率, 生存率, 分割率, および妊娠率が得られた。

11. 当院における不妊患者のための病院外サポートシステムについて

○鈴木晴彦, 杉本利幸

(聖隷三方原病院臨床検査)

高林香代子, 中西洋乃, 平出理恵子

塩沢直美 (同 看護)

平井 強, 坂田麻理子, 岡田喜親

望月 修 (同 産婦)

生殖医療が複雑化している中で不妊コーディネーターの役割は重要である。そこで、病院の短い診療時間をカバーし、患者さんの疑問や不安の解消の助けになればと考え、平成11年1月より電話および電子メールによる相談を開始した。今回、4カ月間の相談内容を分析したので報告する。

相談件数は60件で、電話が35件、電子メールが25件であった。男性の相談は22%を占め、とくに電子メールの相談者が36%と高かった。また、年齢は35歳未満が多く、不妊期間では二峰性を示し、1~2年の方と5年以上の方が多かった。一方、不妊期間を2群で比較すると、5年以上群では7例中4例、57%が複数の病院で治療を受けていたのに対し、5年未満群では複数の病院受診者は皆無であった。また、不妊専門施設の紹介依頼や当院より病院を紹介したケースが全体の71%を占めており、当院独自に県内不妊専門施設の把握および病院間のネットワーク作りが必要と思われた。

12. 高度乏精子症を有する均衡型転座 t(2;3)(q31;q21)保因男性のFISH法による精子染色体解析

○菅谷 健, 森本 誠, 鈴木孝明

高倉哲司 (済生会松阪総合病院産婦)

【目的】高度乏精子症を有する均衡型転座 t(2;3)(q31;q21)保因男性の精子染色体をFISH法を用いて分析し、精子染色体異常率について検討した。【方法】保因男性および正常核型男性から採取した精液をPercoll法にて処理し回収した精子を用いた。カルノア固定後、dithiothreitol, LISで前処理し、Oncor社のDNA probe 3q29(digoxigenin 標識), D2Z(digoxigenin標識+biotin標識), D3Z1(biotin標識)を用いたtriple-color法にてFISH法を施行し、蛍光顕微鏡下にシグナルを検出した。【結果】保因男性精子3025個、正常核型男性精子3020個を分析した結果、交互分離、不均衡型分離(隣接1型分離、隣接2型分離、3:1分離)の割合は、保因男性精子:49.4%、

50.4%(13.9%, 31.6%, 4.9%)、正常核型男性精子:97.4%, 2.3%であった。【結論】今回検討した均衡型転座 t(2;3)(q31;q21)保因男性の精子分析の結果、交互分離、不均衡型分離の割合は、ほぼ1:1であった。

13. 不妊を主訴とした精索静脈瘤に対する経皮的塞栓術の治療成績

○木瀬英明, 神田英輝, 山川謙輔

林 宣男, 有馬公伸, 柳川 真

川村壽一

(三重大泌尿)

不妊症を主訴とした精索静脈瘤患者35例に対して、エタノールを用いた経皮的内精索静脈塞栓術を施行した。診断法は触診とドップラーエコーで行った。grade別ではGⅠ:7例, GⅡ:12例, GⅢ:16例で全例左側であった。塞栓術後に精子数が1000万/ml以上の改善を認めたのは68%, 運動率が10%以上の改善をみとめたのは64%であった。GⅡで精子数および運動率で有意な改善を認め、GⅢでは運動率のみ有意な改善を認めた。全体の妊娠率は57.1%であった。術後合併症は重篤なものはなく、再発率は14.3%であった。精索静脈瘤患者に対する経皮的内精索静脈塞栓術は低侵襲的で重篤な合併症もなく、高い妊娠率を得ており、非常に有効な治療法と考えられた。

第120回 日本不妊学会関東地方会

日時: 平成11年6月12日(土)

午後2時~5時40分

場所: ツムラ本社ビル 大ホール(東京都)

1. 不妊外来にて診断された47, XYY症候群の1例

○植木貞一郎, 馬場克幸, 西田智保

松下和彦, 星野孝夫, 矢島通孝

岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿)

星野真世子

(浅川産婦)

症例は26歳男性。結婚後10カ月たつとも妻が妊娠しないため当科不妊外来を受診した。精液検査所見で乏精子症をみとめた。性機能障害なく、内分泌検査も正常であったが、染色体検査ではY染色体が過剰であり、47, XYYであった。高身長、軽い知能障害、行動異常が三主徴とされる47, XYY症候群としては、比較的低身長であり(158cm)、通常の社会生活を営んでいた。不妊をきっかけに発見された47, XYY症候群としては本邦7例目であり、若干の文献的考察を

加えて報告した。

2. 不妊を主訴とした47, XYYの3症例

○鈴木康太, 麻生太行, 五十嵐 敦
北村朋之, 坂本英雄, 渡辺政信
吉田英機 (昭和医大泌尿)

【症例】3症例とも主訴は不妊。既往歴、家族歴に特記すべきことはなかった。1症例には、正常女兒が1人いた。3症例とも175cm以上の高身長を示していた。社会的背景から3症例とも知能正常と考えられた。

【考察】47, XYYの精子染色体構成をFISH法により分析するとXX, XY, YYの精子はKlinefelter's syn.より頻度は低く自然妊娠による正常拳児が得られている例もあり、Klinefelter's syn.よりリスクは低いと考えるが、47, XYYでもICSIを施行する際には遺伝相談を考慮する必要があるのではないかと考えられた。【結語】従来の47, XYYの3主徴の中で高身長を認めるのみであった。1名女兒正常分娩があった。

3. 乏/無精子症患者にみられた染色体異常

○藤沢典子, 大野道子, 荒木康久
本山光博 (高度医研中央クリニック)

'96年3月より'99年3月までの3年間に乏精子症68例、無精子症100例の染色体分析を行った。染色体異常出現頻度は乏精子症から10.3% (7/68)、無精子症からは22.0% (22/100)が検出された。乏精子症に見られた常染色体異常は3例(4.4%)認められ、1例の相互転座と2例のロバートソン型転座であった。性染色体異常は4例(5.9%)認められ、2例がYの形態以上、1例がモザイクのKlinefelter症候群、1例はXYYであった。また、無精子症からの常染色体異常は3例(3.0%)認められた。7番とX染色体の相互転座、14; 15番のロバートソン型転座、1番の腕間逆位が各1例ずつ認められた。性染色体異常は19例(19.0%)認められ、そのうちの17例はKlinefelter症候群で性染色体異常の89.6%をしめていた。乏/無精子症患者からはさまざまな染色体異常が認められたことから、男性不妊患者におけるART施行前の染色体検査は必要であると考えられる。

4. XOマウスにおける卵巣組織像

○石田恵理, 谷内麻子, 斉藤 要,
阿部有子, 代田琢彦, 斉藤寿一郎,
栗林 靖, 石塚文平, 雨宮 章
(聖マリアンナ医大産婦)

佐藤嘉兵

(日本大生物資源動物細胞)

加齢に伴ったXOマウスの卵巣機能変化について検討した。対象は、ICR系雌マウスに放射線照射し同型正常雄マウスと交配させ、FISH法によりXO核型を確認したもので4~51週齢とした。対照群は同型正常核型マウスを用いた。性周期は腔スメアにより確認。性周期に関係なく卵巣摘出し、一切片あたりの卵胞数と黄体数について、3群に分けて検討した。体重変化は正常核型マウスは加齢に伴った体重増加が認められたが、XOマウスは認められなかった。性周期は、51週齢未満での検討において正常核型マウス、XOマウスともにその発現率に変化はなかった。卵胞数は、正常核型マウス、XOマウスともに加齢に伴って有意に減少、さらに36週齢以降でXOマウスでは有意に少なかった。黄体数は、19週齢未満でXOマウスの方が有意に少なかった。XOマウスではfolliculogenesisは保たれ、卵胞閉鎖が亢進していることが推察された。

5. 余剰初期胚の染色体分析

○大野道子, 鈴木香織, 林 明美
高橋和政, 荒木康久, 本山光博
(高度医研中央クリニック)

IVF, ICSI, TESE-ICSI後の余剰胚で、患者の同意が得られた188周期から提供された538個の染色体分析を行い122個(22.7%)の分析が可能であった。染色体異常はIVFの52.0%に比べ、ICSIの74.5%とTESE-ICSIの75.1%は高い傾向にあったが有意差は認められなかった。ICSI, TESE-ICSIからは数値異常が多く、IVFでは染色体の細粉化等の形態的な変異が多く見られる傾向があった。2PN由来胚は形態的に良好胚、遅延胚、形態不良胚に分類し、胚の形態と染色体異常について検討した。胚の形態別に見た場合の異常出現率は良好胚で69.4%、遅延胚で71.1%、形態不良胚で50.0%と遅延胚でやや高いものの形態と染色体異常の間の関連性は見られなかった。今後さらに解析率を上げ、分析数を増やし検討する必要があると考える。

6. 保存的に治癒し得た子宮頸管妊娠の1例

○青木 茂, 石川雅彦, 長瀬寛美
横井夏子, 近藤芳仁, 仲沢経夫
多賀理吉, 植村次雄, 平原史樹
(横浜市立大産婦)

子宮頸管妊娠は子宮外妊娠の中でも極めてまれな疾患であり, 不注意な子宮内操作により大出血をきたし, 子宮全摘を余儀なくされることもある. 今回我々は, 胎児心拍陽性の頸管妊娠に対して保存的に治療することに成功したので報告する. 症例は25歳の1回経妊0回経産の方で, 妊娠6週2日に子宮頸管妊娠の疑いで当院紹介受診となった. 入院時の超音波にて子宮頸管部に22mmの胎嚢がみられその中に頭殿長7mm, 胎児心拍陽性の胎芽陰影が観察でき, MRIでも頸管内に胎嚢と思われる嚢胞像を確認し, 頸管妊娠と診断. 妊孕性温存のため, 入院当時よりMTX20mg筋注5日間および第5病日にMTX10mg局注を施行. MTX局注直後より胎児心拍陰性となったが, 胎嚢の縮小傾向もなく尿中hCGの低下もみられなかったためエトポシド200mg経口5日間を1クールとして2クール施行. 第48週病日には尿中hCG15iu/l以下となったためHASシンチにて, 頸管部の血流が粗であることを確認した後, 頸管内容清掃術を施行. 出血を伴うことなく施行でき第75病日には退院となった. 治療終了1カ月後より月経および排卵の回復が確認されている.

7. 精巣腫瘍化学療法後に精子染色体異常をきたした1症例

○友政 宏, 足立陽一, 岩渕正之
遠山裕一, 四倉正巳, 押尾 茂
梅田 隆 (帝京大泌尿)

症例は27歳男性, 左精巣腫瘍に対し高位精巣摘除術施行. 転移巣は認めなかったが病理学的に被膜への浸潤を認めたためシスプラチン, VP-16, プレオマイシンによる化学療法を3コース施行した. 外来での経過観察中, 化学療法施行約2年後に精液検査および蛍光in situハイブリダイゼーション法(FISH法)による精子染色体の分析を行った. ボランティアではほとんど見られなかった性染色体や18番染色体のdisomyが高率に観察された. こうした精子染色体の異常が精巣腫瘍そのものによるものか抗癌剤によるものかは現在のところ不明である. 今後症例を重ねて検討が必要と思われる.

8. 父親のDNAも検索しえた無精子症2例のY染色体上のmicrodeletion

○小宮 顕, 鈴木啓悦, 細川 茂
清水亮行, 市川智彦, 伊藤晴夫
(千葉大泌尿)
川名庸子, 始関吉生
(川崎製鉄千葉病院泌尿)
鈴木孝一, 高原正信
(上都賀総合病院泌尿)
鈴木規之, 村上信乃
(旭中央病院泌尿)

【抄録】非閉塞性無精子症のY染色体上の微少欠失について, 同時に父親のDNAも検索できた2例を経験したので報告する. 【対象と方法】患者本人とその父親から同意を得て末梢血を採取後ゲノムDNAを抽出した. Y染色体上のSTSマーカーを用いて増幅したPCR産物の電気泳動により欠失地図を作成した. 【結果】症例1ではYqのAZFc領域から遠位に欠失を認めたが, 父親に欠失を認めなかった. 症例2では検体を再度採取して検討したが患者父親とも欠失は認めなかった. 【考察】親子間でのY染色体の微少欠失を認めた場合はその領域の相違の検索によりAZF領域を同定しうるが, 今回の検討では有用な情報を得られなかった. 微少欠失の検出では, 結果がはっきりしない場合検体を再採取して検討することも肝要と思われた. 症例1での欠失は妊孕性のある父親の精子形成の課程で起きたde-novo microdeletionであると考えられた.

9. 不妊精巣におけるテロメラーゼ活性測定を試み

○千葉浩司, 堀見博之, 吉田謙一郎
(獨協医大泌尿)
北原聡史 (獨協医大越谷病院泌尿)

【目的】不妊精巣の造精機能については組織の形態学から, すなわち生殖細胞の分化度とその量的面から評価されてきた. 今回我々はこれを生化学的手法にて計量化できるかにつき検討を行った. 【対象】男子不妊症の8症例を対象とした. 【方法】生検精巣につき鏡検にて組織学的検討をおこなうとともに, テロメラーゼ活性は凍結保存した生検組織を用いFluorescence-based TRAP法にて行った. なお活性値はU/ μ g proteinで表現した. 【結果】8症例のテロメラーゼ活性は0.00から231.08 U/ μ g proteinまでの値を示し, Scrtoli cell onlyではテロメラーゼ活性は検出され

ず、造精機能の高い症例ほど高値を示した。これらは不妊精巣の造精機能評価にテロメレース活性が有用であることを示唆するものと思われた。

10. 1 経産後不妊症(2人目不妊)の検討

○小島孝久 (アモルクリニック)

1994年4月から1998年12月当クリニックにて妊娠に至った1344例中、経産既往を有する不妊症例は112例であった。これらの2人目不妊治療の内容を検討した。対象症例の平均年齢は 33.0 ± 3.4 歳、不妊期間は 2.4 ± 1.6 年、妊娠成立までの期間は 7.4 ± 6.8 カ月間、既往妊娠分娩歴は1G1Pが76例、2G1Pが21例、3G1Pが7例、4G1Pが6例、5G1Pが2例であった。治療内容をみると前回クロミド妊娠は11例、今回のクロミド妊娠は33例に、IVP-ET妊娠は3例から7例に、ICSI妊娠は1例から4例にいずれも増加を示した。逆に、自然妊娠例は74例から32例と減少し、AIH妊娠(15→18例)とhMG-hCG妊娠(4例→3例)はほぼ同数であった。前回と今回妊娠の治療レベルを較べると、約半数の62例で治療を一步進めた治療方法で妊娠に至り、また年齢と共に治療レベルの上昇が推測されたが、年齢と治療レベルの相関は認められなかった。

11. 当科におけるLHMP-GLAIS(腹腔鏡超音波ガイド下レーザー子宮形成術)について

○渡辺昇一、大下知子、鈴木俊治
深見武彦、明楽重夫、竹下俊行
可世木久幸、石原楷輔、荒木 勤
(日本医大産婦)

近年、子宮腔内病変、とくに粘膜下筋腫、中隔、弓状子宮などが不妊、不育症の原因と考えられる症例に遭遇する。こうした症例に対して従来から様々な治療法があるが、より少ない侵襲と確実性を求めて、我々は、LHMP-GLAISを用いてこれらの症例の治療にあたっている。症例は33歳、妊娠歴4経妊、0経産。既往に3度の子宮外妊娠。今回IVF-ET目的にて当科、紹介受診。内診所見、内分泌学的検査所見、男性因子とも異常はなかった。2度のIVF-ET施行するも妊娠に至らなかった。子宮卵管造影にて弓状子宮が疑われた為、LHMP-GLAISを用いて子宮底部形成を施行した。LHMP-GLAISでは、腹腔鏡を併用するため子宮鏡手術の欠点である子宮穿孔の可能性がほとんど皆無であるばかりか、レーザーの持ち味を活かした詳細な手術を行うことが可能である。本法は患者侵襲も少なく今後、不妊、不育症の原因

となり得る子宮突出病変に対して試みるに十分有効な治療法だと考えられた。

12. 基礎体温表の体温上昇時にはすでに妊娠が成立していたと考えられる2症例

○染谷勝己、辻 佐和子
(浜崎済生病院産婦)
西田正人、久保武士
(筑波大臨床産婦)

BBTは排卵測定や妊娠成立、分娩予定日の計算など不妊症の管理・治療に不可欠なものであるが、その信頼性を考えさせる2症例を経験した。明瞭な体温上昇点を有するにもかかわらずそこから計算される胎児CRL等と全く合致しないものである。症例1は産褥8カ月の月経不順例であるが、BBT上の体温上昇時の約2週間前に排卵が起こり妊娠が成立していた。症例2はPCOS・潜在性高プロラクチン血症のゴナドトロピン療法中で、最終体温上昇時の約4週間前すなわち前周期の排卵により妊娠が成立、その後通常月経様の性器出血があり、体温は低温相を形成したにもかかわらず妊娠が継続した。1st Trimesterに黄体機能不全と考えられる大量性器出血を起こしたが正常産に至った。これらの2症例は後のCRL測定等により排卵時期が修正されたものであるが、実際のBBTおよびB-Scope像が存在する希少な症例のため今回の供覧とした。

13. AIHの妊娠例における精液所見と累積妊娠率の検討

○島貫洋人、糸賀知子、佐藤雄一
竹内裕之、桑原慶紀 (順天堂大産婦)

AIHは不妊治療の中で最初に施行される比較的簡便な治療法であるが、その有効性と限界についての見解は一定していない。1993年1月から1999年5月までにAIHを施行した545症例2314周期の成績を検討した。不妊スクリーニング検査で少なくとも1側の卵管通過性が確認できた症例を対象とし、自然周期または過排卵刺激周期(clomiphene, hMG-hCG周期)でAIHを施行した。Perco1 12層法により運動良好精子を回収し、0.5mlの精子浮遊液を作製して子宮腔内に注入した。妊娠率は周期あたり6.5%、症例あたり22.9%であった。女性の年齢が40歳以上、運動精子濃度が 10×10^6 /ml未満では妊娠率が低下する傾向が見られ、累積妊娠率はAIH 5回目で90%に達した。妊娠の転帰では流産率が27%とやや高い傾向が認められた。AIHは簡便かつ有効な方法であり、不妊治

療においては5回を目途に施行すべきであると思われた。

14. ICSIでの受精能を予知できる精子機能検査の試み

—マウス卵子を用いたマイクロマニピュレータ技術の応用—

○高橋和政, 荒木康久, 本山光博
(高度医研中央クリニック)

ヒト精子をマウス卵子に注入したときの受精率を利用して、ICSIにおけるヒト精子の受精能の検査を試みた。通常のインジェクションニードルを用いたICSIではマウス卵子を破壊・変性させる率が高いため、マウス卵子へのヒト精子のICSIはピエゾマニピュレータを用いて行った。2前核の形成を受精として、ヒト卵子へのICSI時に受精率および良好胚獲得率との相関について検討したところ、ヒト精子注入後のマウス胚の70%が解析可能な生存卵子であり、インジェクションニードルを使用したICSIの生存率よりも優れたものであった。マウス卵子における受精率と、ヒト卵子における受精率の間の相関係数は $r=0.588$ であり、有意な相関が認められた。これに対し、良好胚獲得率との間には相関は認められなかった。これらの結果から、ピエゾマニピュレータを用いてマウス卵子にヒト精子をICSIし、その受精率を検討することは、臨床でのICSIにおける精子の機能について、少なくとも受精率を予知するための検査法となりうると考えられる。

15. 50%を越える妊娠率をあげたICSIの成績

○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)

【目的】当教室では1997年より本格的にICSIの臨床応用を開始したが、50%を越える妊娠率が得られたのでその成績について報告する。【方法】1997年1月から1998年12月までの2年間に当教室で重症男性不妊症にてICSIを受けた患者数92名を対象とした。【成績】①平均年齢は 33.4 ± 4.0 歳、採卵周期数114周期に対し112周期にICSIが可能であった。そのうち106周期に胚移植し、ET率はICSIあたり94.6%であった。②採取卵あたり成熟卵(MⅡ卵)の比率は72.1%で、正常受精(2PN)率はMⅡ卵あたり69.3%であった。③分割率はICSI卵あたりでは66.1%であったが、2PN卵あたりでは94.5%であった。④胚の形態学的Grade(G;Veeck分類)の比率はGⅠ胚18.5%、GⅡ胚

22.2%で良好胚の出現率は40.7%であった。⑤妊娠率は採卵あたり50.9%、ETあたり54.7%、患者あたり63.0%であった。【結論】当教室では1997年より重症男性不妊症に対しICSIの臨床応用を開始したが50%を越える妊娠率が得られ、conventional IVFに匹敵する高いARTが得られた。

16. TESEにおける精子の有無と内分泌学的所見との関連

○酒井 謙, 神野正雄, 小菅浩章
星合敏久, 菅原新博, 尾崎恒男
岩下光利, 中村幸雄

(杏林大産婦)

非閉塞性無精子症の精巣精子の有無を予測する内分泌負荷試験を見いだした。非閉塞性無精子症10例にhMG 150単位とhCG 5000単位を週2回2週間筋注し、投与前後で血清 17α -OH-P, T, DHT, E_2 , FSH, LHとPRL値を分析しその後TESE&ICSIを施行した。精巣精子はTESE 10例中5例で有り(十群)、5例で無かった(一群)、DHTの前値は一群で有意に高かった。hMG-hCG投与により、 17α -OH-P, T, DHT, E_2 とPRLは増加し、FSHとLHは低下した。 17α -OH-Pの投与後値は一群で有意に高かった。TESEの精子回収成功率は、 17α -OH-P ≤ 3 のとき83%、 >3 のとき0%と、 ≤ 3 のとき有意に高かった。7回のICSIで 7.9 ± 1.9 個の卵に精子を注入し、胚 3.1 ± 1.2 個を得、2例が妊娠した。精巣精子のない無精子症例では、Leydig細胞機能の低下により内分泌負荷で増産した 17α -OH-Pを充分にTに転換できず、 17α -OH-P値が上昇すると考えられる。

17. ART施行前の夫婦双方の染色体検査

○渋井幸裕, 雀部 豊, 西村崇代
伊藤嘉奈子, 中野由紀子, 竹下直樹
池永秀幸, 間崎和夫, 安部裕司
久保晴海, 平川 舜(東邦大第一産婦)
吉田 淳, 三浦一陽(東邦大第一泌尿)

近年ARTの治療成績の向上に伴い、ARTとくにICSIにおける遺伝子的カウンセリングの必要性が認識されつつある。我々もART施行前に夫婦の核型分析を施行しており、今回その結果を後方視的に検討することを目的とした。1997年9月より1998年12月までに当院不妊外来にてART予定となったもののうちインフォームドコンセントの得られた31組の夫婦(IVF:7組, ICSI:24組)に対して核型分析を施行した。女性31症例中2例(6.5%)、男性27症例中2例(7.4

%)に核型異常を認めた。一般に男性不妊患者に染色体変異を高率に認めることは以前よりいわれているが、女性側にも高率に変異を認めた。ART、とくにISCI症例においては男性因子のみならず女性因子の検討も必要と思われた。今後さらに多角的なカウンセリングについて検討中である。

18. クエン酸シルデナフィル(バイアグラ)による男性不妊治療

○永尾光一, 上田 建, 吉田 淳
原 啓, 三浦一陽, 石井延久

(東邦大第一泌尿)

白井將文 (博慈会記念総合病院)

【対象】挙児を希望しているが勃起障害(ED)のため腔内挿入や腔内射精ができず子供に恵まれない患者(射精障害を除く)【方法】投与前の勃起機能評価は、①ED(不妊)の期間、夫・妻の年齢②性交の試みの頻度(何週、1カ月、3カ月、6カ月、年などに何回)③性交を試みた回数のうち何回腔内挿入できたか④性交を試みた回数のうち何回腔内射精できたか⑤妊娠・出産の有無で評価する。また、一般男性不妊症患者数、挙児希望のED患者数、挙児希望のED患者のうちSildenafilを使用した患者数などを調査する。【結果】平成11年3月23日から2カ月間のED患者数は167人で挙児希望ED患者数は32人(ED患者の約20%)、男性不妊患者数218人(一般男性不妊患者数178人・挙児希望ED患者数32人・挙児希望射精障害患者数8人)で挙児希望ED患者は男性不妊の約15%で精索静脈瘤について多い頻度であった。挙児希望ED患者でのSildenafil効果は腔内挿入で100%、腔内射精で90%の有効性を示し、1例妊娠している。

19. 経尿道的半精阜切開術後に両側精巣上体炎を併発したミューラー氏管嚢胞の1例

○澤田卓人, 岩崎 皓

(横浜赤十字病院泌尿)

湯村 寧, 菅野ひとみ, 小川毅彦

斉藤和男, 佐藤和彦, 穂坂正彦

(横浜市立大泌尿)

症例は34歳の男性。主訴は6年の不妊と血精液症と精液量の減少。内分泌的に異常なく、精液検査では精液量1.0mlと少なく、赤血球・運動精子を多数認めた。MRIで前立腺正中部に嚢状構造物を認め、左精囊造影にて射精管遠位端に嚢状の変化を認めた。以上からミューラー管嚢胞による遠位射精管狭窄の診断にて、左精巣生検・経尿道的半精阜切開術施

行。造精機能は正常であった。術後6日で退院。術後24日目に左精巣上体炎のため入院。パニペナム投与開始したが発症9日目に右精巣上体炎を併発した。イセパマシン追加投与して軽快し発症21日目に退院。再発を認めず精液所見も改善された。以上若干の文献的考察を加えて報告した。

20. 幼児期のそけいヘルニア手術に基因した閉塞性無精子症—最近経験した2例の不妊—

○石岡淳一郎, 千葉喜美男, 榛葉孝文
友田岳志, 北見一夫, 広川 信

(藤沢市民病院泌尿)

朝倉茂夫 (朝倉医院)

○岩崎 皓 (横浜赤十字病院泌尿)

症例は34歳と35歳の男性。主訴はいずれも不妊。精液所見、内分泌学的検査、精巣容量いずれも正常。精液検査で無精子症。各々2歳、0歳時に鼠径ヘルニアの既存歴あり、精管造影にて精管閉塞による無精子症と診断された。症例1は両側精管閉塞、右精管内精液に精子を認め右精管精管吻合術施行。症例2は右精管閉塞、左精子形成不全のため左精管右精管交叉新吻合術を施行。いずれも術後精液所見の改善なし。両者とも精管吻合部に精管造影にて閉塞を認め、吻合部摘出、再吻合術を施行したが、術後の精液所見は改善しなかった。

特 別 講 演

Signal Transduction Pathways and Reactive Oxygen Species in Human Spermatozoa

Claude Gagnon

(Urology Research Laboratory, McGill University)

All cells living under aerobic conditions produce reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($OH^\cdot$). When present at elevated concentrations they can even endanger cell viability.

In the clinic, 25% of the semen samples from men attending an infertility clinic produce ROS. There is an inverse correlation between the percentage of motile cells and the level of ROS produced by semen samples.

Polymorphonuclear leukocytes (PMN) are the primary source of ROS in semen but ROS are also produced by morphologically damaged and normal sper-

matozoa. ROS produced by as little as 0.6×10^6 stimulated PMN can generate sufficient ROS to decrease sperm motility by 40%.

ROS responsible for this detrimental effect are not O_2^- but rather hydrogen peroxide and 1OH since catalase and dimethylsulfoxide prevent the effects produced by PMN.

The mode of action of ROS on sperm motility involves a rapid drop in flagellar beat frequency caused by an even faster decrease in intracellular ATP concentration. The low levels of ATP do not allow an adequate level of cAMP-dependent phosphorylation of axonemal protein that are essential for sperm motility.

ROS do not only have detrimental effects on sperm function they may as well be beneficial effects. These beneficial effects are linked to sperm capacitation. During capacitation, spermatozoa encounter a series of biological modifications that transform spermatozoa incapable of fertilization into a fertile gamete. Sperm hyperactivation is one of the characteristics of spermatozoa undergoing capacitation, a phenomenon but the acrosome reaction.

Spermatozoa incubated with an external source of O_2^- will initiate capacitation that can be blocked by O_2^- scavengers such as superoxide dismutase (SOD). Known inducer of sperm capacitation also initiates the synthesis of O_2^- within minutes after the onset of incubation. cAMP analogues or phosphodiesterase inhibitors are also capable of inducing capacitation of human spermatozoa through protein kinase-A (PKA)-dependent serine/threonine phosphorylation of proteins. However, capacitation initiated via the cAMP/PKA pathway is not inhibited by SOD, suggestion that the cAMP/PKA pathway lay downstream to the ROS pathway.

Capacitation is also associated with the increase in tyrosine phosphorylation of two proteins of 81 and 105 kDa that are associated with the fibrous sheath. The proteins p81 and p105 share similarities with A-Kinase Anchoring proteins (AKAP) found in mouse spermatozoa. However, the mechanism by which they participate in the capacitation process remains to be established.

In conclusion, depending on the time, concentration and type of ROS exposure, ROS may have

detrimental or beneficial effects on sperm function. Both types of effects are generated through different pathways.

第36回 日本不妊学会中国四国支部学術講演会

日時：平成11年 8月21日(土)

午後1時～

会場：ホテルグランヴィア広島(広島市)

1. メラトニンとNOの排卵期顆粒膜に対する影響

○山縣芳明, 中村康彦, 荻部綾子

高山尚子, 樫田史郎, 杉野法広

加藤 紘

(山口大産婦)

【目的】ラット顆粒膜細胞をhCG存在下にNO供与剤であるSNAPと培養すると、プロゲステロン(P)産生能が低下し、アポトーシスが誘導される事を我々は報告した。一方、細胞内に存在するメラトニン(M)は抗酸化作用を有し、また性ステロイド産生に影響を及ぼす事が知られている。本研究では、排卵過程における顆粒膜細胞のP産生とアポトーシス発現に対するMおよびNOの作用について検討した。【方法】①体外受精を目的にhCG投与で排卵を誘発した不妊症患者20例を対象とした。インフォームド ConsentのもとにhCG投与後36時間目の採卵時に卵胞液および顆粒膜細胞を採取し、卵胞液内P, M, NO_x 濃度および顆粒膜アポトーシスの出現頻度を検討した。②手術時に発育卵胞(直径15mm)より調整した顆粒膜細胞をhCG (1IU/ml)存在下にSNAP($10^{-4}M$)と種々の濃度のM(10~1000pg/ml)の存在下で48時間培養し、P産生能を検討した。【結果】①卵胞を直径により大卵胞(直径 $\geq 18mm$)、中卵胞(直径15~18mm)、小卵胞(直径10~15mm)に分類すると卵胞内PおよびM濃度は大卵胞、中卵胞、小卵胞の順に低下し、顆粒膜アポトーシス発現は大卵胞、中卵胞、小卵胞の順に増加した。卵胞内 NO_x 濃度には差を認めなかった。②顆粒膜細胞からのP産生はSNAPにより低下するが、この低下はMにより抑制された。【考察】MはNOの作用に拮抗し、顆粒膜細胞の黄体化(P産生亢進)に関与する可能性が示唆された。

2. ラット排卵機構におけるGRO/CINC-1の産生とその調節

○守屋麻知子, 牛越賢治郎, 福持光男
田村貴央, 松崎利也, 安井敏之
苛原 稔, 青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】排卵期の卵胞周囲には好中球をはじめとする白血球の増加が観察されている。そこで我々は卵胞周囲に好中球を遊走させる因子として、構造的およ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の存在を想定し、ラットの排卵機構におけるGRO/CINC-1の産生およびその調節について検討した。【方法】生後3週齢の雌ラットを用いて以下の実験を行った。(1)PMSG-hCG刺激を行い、排卵過程での卵巣におけるGRO/CINC-1の産生量の変化をELISA法にて検討した。(2)卵巣細胞培養系に排卵に関与する各種ホルモンやサイトカインを添加し、48時間後の培養上清中のGRO/CINC-1濃度を測定した。(3)hCG投与後の卵巣を用い免疫組織化学染色によりGRO/CINC-1の局在について検討した。【成績】(1)PSMG-hCG投与したラット卵巣では、hCG投与後GRO/CINC-1の産生が急激に増加し、排卵の数時間前にピークに達した。(2)卵巣細胞培養系においてFSH, hCG, IL-1 β およびTNF α の添加はGRO/CINC-1の産生を用量依存性に増加させたが、estradiol, progesteroneの添加はGRO/CINC-1の産生に影響を与えなかった。(3)成熟卵胞の莢膜間質細胞領域にGRO/CINC-1の免疫染色を認めた。【結論】ラット卵巣においてGRO/CINC-1は排卵現象に一致して増加しており、GRO/CINC-1がヒトにおけるIL-8と同様に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。

3. ヒト卵巣でのエンドセリン1(1-31)とその活性酵素キマーゼ、およびエンドセリン1(1-21)の存在の検討

○福持光男, 牛越賢治郎, 松崎利也
安井敏之, 苛原 稔, 鎌田正晴
青野敏博 (徳島大産婦)

【目的】エンドセリン(ET)は卵巣において卵胞発育を調節する因子のひとつであることが報告されている。最近、ヒト肥満細胞から分泌されるキマーゼによって活性化され、ET1(1-21)とは分子量の異なるET1(1-31)にET活性があることが発見された。ET1(1-31)は、生殖機能でもET1(1-21)と同様な役割を果たしている可能性が考えられる。そこで今回は、ET1

(1-31)とキマーゼ、およびET1(1-21)のヒト卵巣における存在について検討した。【方法】良性疾病で卵巣を摘出した患者に、書面で同意を得た後、摘出した卵巣を抗ヒトETモノクローナル抗体および抗ヒトキマーゼモノクローナル抗体を用いて免疫組織染色法で、ET1(1-31)とキマーゼおよびET1(1-21)の局在を検討した。【成績】患者から採取した卵巣(卵胞期)において、キマーゼ陽性細胞を卵胞の周囲、血管の周囲、および卵胞の結合織に認めた。また、ET1(1-31)の局在はキマーゼ陽性細胞と同様であった。一方、ET1(1-21)は血管内皮細胞および血管周囲の間質に認められた。閉経期婦人の卵巣ではキマーゼ陽性細胞、ET1(1-31)およびET1(1-21)はほとんど認めなかった。【結論】活性化酵素キマーゼ、活性化されたET1(1-31)およびET1(1-21)がヒト卵巣に存在することを示した。ET1(1-31)は、ヒトの生殖機能に関係している可能性が示唆された。

4. ヒト卵巣におけるHGF遺伝子発現と卵胞液中HGF濃度

○伊藤雅之, 山内延広, 福田靖子
江夏亜希子, 永野順恵, 光成匡博
津戸寿幸, 吉田壮一, 岩部富夫
原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

【目的】HGF(hepatocyte growth factor)は間質系細胞で産生され、上皮系細胞の増殖や機能調節を行う増殖因子である。ウシ卵巣では、莢膜細胞より産生されたHGFが顆粒膜細胞の増殖およびステロイドホルモン産生に影響をおよぼすことが示されている。本研究ではヒト卵巣におけるHGFとその受容体であるc-met遺伝子の発現を検索し、卵胞液中のHGF濃度を測定した。【方法】患者の同意のもと、体外受精時に顆粒膜細胞を手術時に莢膜および卵巣間質細胞を採取した。それぞれの細胞においてHGF遺伝子とc-met遺伝子の発現をRT-PCR法にて検索した。体外受精を施行した5例から採取した卵胞液(n=51)のHGF濃度をELISA法で測定した。【成績】莢膜および卵巣間質細胞においてHGF遺伝子の発現を、顆粒膜、莢膜および卵巣間質細胞においてc-met遺伝子の発現を認めた。卵胞液中のHGF濃度は0.15~8.84ng/mlで、平均値は4.10ng/mlであった。【結論】ヒト卵巣におけるHGFおよびc-metの局在と卵胞液中のHGFの存在を明らかにした。HGFはヒト卵巣機能の調節に関与する可能性が示唆された。

5. PCOS患者のレプチン濃度の検討

○松崎利也, 守屋麻知子, 岡田典子
福持光男, 山田正代, 牛越賢治郎
田村貴央, 上村浩一, 漆川敬治
安井敏之, 苅原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】レプチンは脂肪細胞由来のホルモンで, ギナドトロピン分泌促進作用を有するが, PCOSの病態に関与するか否かは明らかでない. 今回我々は, レプチンとPCOSの病態を形成する各種因子との相関について検討した. 【方法】PCOS群($n=15$, BMI=22.4 $\pm$ 5.2, M $\pm$ SD), および非PCOS群($n=9$, BMI=22.2 $\pm$ 4.6)に対し, 患者の同意を得た上で, 空腹時レプチン, 血中ギナドトロピン, 空腹時インスリン(IRIO), 75gOGTT時の Σ IRI, 正常血糖クランプ法によるブドウ糖注入速度(GIR)を測定し検討した. 【結果】空腹時レプチンは, PCOS群(8.3 $\pm$ 6.3ng/ml)非PCOS群(8.7 $\pm$ 7.7)と二群間に差はなかった. レプチンはBMIと強い正の相関(PCOS群: $r=0.94$, 非PCOS群: $r=0.88$)を認めたので, BMIを共変量としてレプチン濃度を二群間で比較したが有意差はなかった. PCOS群において, レプチン($r=-0.52$)およびBMI($r=-0.46$)はそれぞれLH/FSH比と負の相関を示した. レプチンはIRIO(PCOS群: $r=0.59$, 非PCOS群: $r=0.67$), Σ IRI($r=0.64, 0.59$), GIR($r=-0.88, -0.68$)と相関したが, これらを共変量として解析しても二群間に差は認めなかった. 【結論】①血中レプチン濃度は体脂肪量を反映するが, PCOS, 非PCOSの間に差はない. ②PCOSにおいて, LH/FSH比は血中レプチン濃度と相関するが, BMIとも相関し因果関係については今後の検討を要する.

6. PCOS患者に対する低容量FSH長期連日投与法の有用性の検討

○堀 玲子, 福井敬介, 吉本 勲
越智 博, 伊藤昌春 (愛媛大産婦)

【目的】多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)症例のギナドトロピン療法において如何に卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の発生率を減少させ, 高い排卵率を得るかが重要な課題である. 今回我々は, クロミフェン無効のPCOS症例に対してpureFSH製剤の低容量長期連日投与法を行い, その臨床的有用性について検討したので報告する. 【方法】当科にてPCOSと診断され, クロミフェン療法が無効であった8症例12周期に対して, 月経周期3日目よりpureFSH製剤75単位を

連日投与し, 主席卵胞径が18mmに達した時点でhCG製剤5000単位を注射した. 排卵の有無はhCG投与後2~3日目の超音波検査および黄体期5~7日目の血清progesterone, estradiolのレベルで判定した. 【結果】FSHの平均投与日数は13.2 $\pm$ 3.8日(7~19日間)であった. 対周期排卵率は100%(12/12), 対周期単一排卵率は75.0%(9/12)であり, 対周期OHSS発症率は0%(0/12)であった. 対周期妊娠率は25.0%(3/12), 対症例妊娠率は42.9%(3/8). また前回pureFSH製剤150単位投与法にて重症OHSSを発症した3症例においても単一排卵が可能であった. 【結論】低容量FSH長期連日投与法はOHSSの発症率が非常に低く, また単一排卵率が高いことからPCOSのギナドトロピン療法において非常に有用であると考えられた.

7. 排卵誘発に抵抗性を示す変異LH症例の経験

○江田芳美, 高橋健太郎, 岡田正子
尾崎智哉, 宮崎康二 (島根医大産婦)

我々はLH β 鎖遺伝子の塩基配列の点突然変異を伴う変異LHを有する症例が排卵障害患者で高率に認められることを報告した. 今回, 排卵誘発に苦慮した変異LH症例を経験し, 排卵誘発を行う際の問題点と工夫について考察したので報告する. 症例は39歳の原発性不妊症で, 初診時のホルモン基礎値はLH<0.5mIU/ml, FSH 10.5mIU/ml, E₂ 47pg/ml, PRL 10.5ng/ml, T 32.0ng/dlであった. 卵巣チョコレート嚢胞のため腹腔鏡下嚢腫摘出術後GnRH analog(リュープリン)3.75mgを6回施行した. その後, 遅発排卵と乏精子症のためclomid+IUI+hCG療法を開始し, 5コース施行するも妊娠に至らなかった. 再度ホルモン基礎値を測定したところLH<0.5mIU/ml, FSH 6.7mIU/ml, でありLH β 鎖遺伝子のDNA解析を行ったところ, 2カ所の塩基の点変異を伴うアミノ酸配列の変化(Trp⁸→Arg⁸, Ile¹⁵→Thr¹⁵)が認められるhomozygoteの変異LH症例と考えられた. 次にIVF-ETを施行するためhMG(ヒュメゴン)300IUを11日間投与したが, E₂ 54.8pg/mlであり卵胞発育が全く認められなかった. 変異LH症例においては黄体機能不全やPOFを来しやすく, また排卵誘発に抵抗する症例がみられることを我々は報告してきた. 本症例においては, EP剤やGnRH analogで内因性gonadotropinを抑制した後に排卵誘発を試みる予定である.

8. 腹腔鏡検査により診断されたFitz-Hugh-Curtis症候群

○本元正和, 泉谷知明, 林 和俊

森岡信之, 深谷孝夫 (高知医大産婦)

【緒言】Fitz-Hugh-Curtis(FHC)症候群は、骨盤内感染症と肝周囲炎を合併したもので近年ではクラミジア感染がその主因と考えられている。今回、平成11年3月から6月までの4カ月間に不妊症検査として施行した腹腔鏡検査により診断されたFHC症候群3例を経験したので報告する。【症例】不妊症のルーチン検査のうち子宮卵管造影で卵管因子が原因と考えられた10例に対して、腹腔鏡検査を施行した。術前のクラミジア抗体検査では、10例中9例が陽性であった。腹腔鏡所見では、クラミジア抗体陽性9例中4例は子宮内膜症による卵管周囲癒着と考えられた。他の5例中4例はクラミジア感染による卵管異常が考えられ、うち3例では、骨盤内癒着、さらに肝周囲癒着を合併しFHC症候群と診断した。いずれの症例も、電気メス、ハーモニクスカルペル、YAGレーザー等を用いて癒着剥離を行った。FHC症候群3例のうち、術前に上腹部痛を訴えていたものは2例で、1例は無症状であった。【結論】近年のクラミジア感染症の広がりとともに、FHC症候群は決して稀な疾患ではなく、今後遭遇する機会は増加すると考えられる。不妊症での腹腔鏡検査を行う際にも、とくにクラミジア抗体陽性例では卵管因子の問題は勿論のこと、FHC症候群の存在も念頭におき、検査、治療を進める必要がある。

9. FISH法にて診断されたモザイク型Turner症候群の検討

○吉本真奈美, 三春範夫, 本田 裕

大橋容子, 大濱紘三 (広島大産婦)

【目的】非典型的な表現型を呈したモザイク型Turner症候群の細胞遺伝学的分析。【症例】症例は25歳女性で、原発性無月経を主訴にて19歳時に近医受診し、kaufmann療法施行されていた。染色体検査で45, X/46, X, del(X)(q24)と異常を指摘されたため当科遺伝外来を受診した。外表奇形としては翼状頸を認めたのみで、身長は172cmと比較的高身長を呈していた。経腔超音波の所見では子宮は萎縮しており両側卵巣は確認できなかった。構造異常X染色体について、fluorescence in situ hybridization(FISH法)を用いた詳細な分析を施行した結果、Xp末端に存在する身長関連遺伝子(SHOX gene)は正常X染色体短腕末

端に認められる他に、構造異常X染色体の両端に認められた。またXpに特異的なpainting probeを用いたFISH法では構造異常X染色体の着糸点近傍の一部を除いた両側が染色させた。最終的にはG分染法とFISH法による核型分析の結果45, X, der(X)(pte→q21.2::p21-pter)と診断された。腹腔鏡検査では子宮は鳩卵大で両側卵巣は確認できず索状性腺を認めた。索状性腺の精検ではfollicular tissue, testis tissueは認められなかった。【結論】本症例で高身長を呈したのはSHOX geneの量的効果によるもの(SHOXを3個もつ細胞がモザイクで存在した為)と考えられた。

10. 月経モリミナを契機に発見された腔横隔膜症の1例

○上田克憲, 藤東猶也, 本田奈央

津田幹夫, 中野正明, 藤原久也

伊達健二郎, 水之江知哉, 占部 武

(県立広島病院産婦)

寺本三枝

(福島生協病院産婦)

腔長軸に直角な隔膜である腔横隔膜症は8~9万人に1人の発生頻度とされ、月経モリミナを来す腔閉鎖症の中でも比較的稀な疾患である。本症は、ミューラー管と癒合して腔管を形成すべき腔板が完全に空洞化しないため発生すると考えられるが、空洞化不全の程度すなわち横隔膜の厚さは症例により大きく異なり腔のほぼ全長におよぶ例も知られている。今回我々は、比較的厚い横隔膜であった1例を経験したので報告する。【症例】14歳、157cm、46.0kg。乳房や陰毛の発育は正常であるが、月経は未発来。12月頃から時々下腹痛を訴え内科を受診したが、便秘と診断されていた。11年5月に再び下腹痛を訴え、婦人科で超音波検査を受けたところ腔上部に血腫を疑わせる腫瘍が認められたため当科を紹介された。MRでは同部に約4cmの血腫像とダグラス窩に血性腹水を認め、直腸診では入口部から約5cmの部位に有痛性腫瘤の下端を触知した。麻酔下に視診を行ったところ、腔は約5cmの長さで盲端に終わり、この部位(腫瘤の下端)を経腔超音波ガイド下に16G針で穿刺を試みたが壁が厚く貫通できなかった。そこで、メスで切開を加えつつ切開口を拡張、延長したところ、血液と粘液の排出を認め子宮腔部を触知した。結果的に、横隔膜の厚さは約2cmであることが判明した。

11. 卵管妊娠に対する腹腔鏡下卵管温存手術の有用性に関する臨床的検討

○尾崎智哉, 高橋健太郎, 江田芳美

岡田正子, 宮崎康二 (島根医大産婦)

妊孕性温存が必要な患者における卵管妊娠の取り扱い, その後の卵管不妊の原因となるため注意を要する。近年, 腹腔鏡下手術の普及により, より低侵襲の卵管温存手術が可能となった。今回我々は, 卵管温存手術を施行した卵管妊娠患者のearly second-look laparoscopy (ESLL)時の子宮付属器の状態および術後の妊娠率について, 腹腔鏡下手術と開腹手術とを比較検討した。【対象および方法】当科にて卵管妊娠の診断で卵管温存手術施行し, 術後7日目にESLLを施行した12例を対象とした。対象を開腹手術群(5例), 腹腔鏡下手術群(7例)に分類し, ESLL時の腹膜および子宮の癒着の状態, 付属器癒着スコア(AFS adnexal score), 術後HSGでの卵管閉塞および妊娠率を比較検討した。【結果】腹腔鏡下手術群では, 開腹手術群に比し腹膜(術創部)癒着および子宮癒着発生頻度が低率であったが, 付属器癒着スコアおよび初回手術からの付属器癒着スコアの変化には有意差は認められなかった。術後のHSGでの卵管閉塞発生数は患側卵管および健側卵管ともに両群間に有意差は認められなかった。【結論】腹腔鏡下卵管温存手術を施行した患者では腹膜(術創)の癒着が開腹手術に比し低頻度であった。さらに子宮付属器の術後癒着および妊娠率は同等であったことより, 卵管妊娠手術は, より侵襲の少ない腹腔鏡下手術を選択すべきであると考えられた。

12. 卵管機能に関する基礎検討

新谷恵司, 高取明正

(広島赤十字・原爆病院産婦)

卵管は受精の場として, また受精卵の輸送器官として重要な働きを持っている。その卵管機能検査のうち簡便な方法として通気検査がある。従来通気検査の判定はそのパターンに基づいておこなわれてきた。通気検査を数量化することにより, その初期圧や振幅が卵管機能の重要な働きを示す指標になることを示した。その初期圧や振幅の持つ意味を検討するために子宮手術例で検討した。対象は同意が得られた子宮摘出例3例で, 麻酔施行前, 麻酔施行後, 開腹後と卵管把持後, 卵管切断後に通気検査をおこない比較検討した。通気検査の結果には, 麻酔や開腹による影響はみられなかった。また卵管を一方把持

した後にも影響はみられなかった。両側の卵管把持後に卵管を峡部で切断すると初期圧は低下し振幅もほとんどみられなくなった。今回の検討から通気検査は両側の卵管機能を示しているわけではないこと。また, 通過する圧力の大部分や振幅は卵管峡部から卵管采にかけての機能を反映していると考えられた。

13. 子宮内膜症の頻度ならびに診断に関する前方視的調査研究

○山内延広, 福田靖子, 江夏亜希子

伊藤雅之, 永野順恵, 光成匡博

津戸寿幸, 吉田壮一, 岩部富夫

原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

【目的】子宮内膜症の頻度を知るとともに診断に際して有用な症状と検査所見は何かを明らかにするため, 全国規模の多施設共同による前方視的研究を行った。【方法】全国13施設において, 平成9年10月から平成10年2月までの5カ月間の腹腔鏡および開腹手術症例で月経周期を有するすべての患者を対象とした(妊娠関連疾患を除く)。あらかじめ作成した調査表に基づいて, 術前に得られた自覚症状, 診察ならびに検査所見と子宮内膜症診断との関連を前方視的に検討した。【成績】対象患者803例中, 子宮内膜症と確定診断された症例は287例(35.7%)であった。子宮内膜症患者では年齢が若く, 不妊歴を有するものが多かった。また自覚症状では, 下腹痛, 性交痛, 腰痛, 排便痛が多かった。内診所見と本症の存在との関連性を検討すると, 圧痛, 卵巣腫大, 子宮後屈の順で高かった。超音波所見では, 卵巣チョコレート嚢胞, 子宮腺筋症およびダグラス窩癒着所見が子宮内膜症の存在と関連した。血清CA-125およびCA19-9濃度が正常範囲を超えて上昇していた症例は子宮内膜症患者で高率に認められた。【結論】前方視的検討を行った本研究成績から, 手術症例を対象とした際の生殖年齢女性における子宮内膜症の頻度は35.7%と高率であることが明らかとなった。本症の診断に際して有意な症状, 診察ならびに検査所見を提示することができた。

14. 精子先体反応から見たHITの適応と限界

○香月孝史, 上田克憲, 岡野真一郎

絹谷正之, 金子朋子, 原 鐵晃

大濱絃三

(広島大産婦)

己斐秀豊

(己斐産婦人科)

【緒言】受精障害が原因する不妊例にはまずAIH(配偶

者間人工授精法)やHIT(子宮鏡下卵管内授精法)が行われ、それによる妊娠が期待できない場合には体外受精を行うこととなるが、体外受精に移行する明確な判断基準は示されていない。そこで今回我々は、精子受精能の指標とされる%ARがHITによる妊娠率と如何なる相関を有するか、さらに%ARがどの値であれば早期に体外受精を選択すべきかについて検討した。【方法】不妊外来受診した男性のうち、HITを施行した245名について、患者の同意の下に以下の検査を行った。精液パラメーターをMakler計算盤により測定した後、残る検体からswim-up法(1時間)で運動性良好な精子を回収し、5時間培養した後にCa ionophore (10 μ M)で1時間処理して精子を固定しHoechst33258とFITC-PSAの二重蛍光染色を行って生存かつ先体反応完了直後の精子の比率を求めこれを%ARとした。また233例についてはHSGを撮影しTubal scoreを算定した。【結果】HITで妊娠した群は妊娠しなかった群に比べてTubal Scoreが有意に高かった。HITを施行した245例のうち47例が妊娠した。%AR正常群20%以上では180例中43例が妊娠した。一方不良群20%以下では65例中妊娠例は4例であり、正常群が有意に妊娠率が高かった。とくに10%以下の群では1例も妊娠しなかった。HIT不成功でIVFに移行した65例のうち16例が妊娠し、その内訳は20%以上は40例で、そのうち8例妊娠し、20%以下が25例で、そのうち8例が妊娠した。【結論】HITでは%ARが20%以上であれば妊娠する可能性が高いが、その際卵管の状態を把握しておくことが重要である。また%AR不良群に対しても体外受精により妊娠することは可能であり、とくに%AR10%以下の症例では早期に体外受精を選択した方がよいと考えられた。

15. 配偶者間人工授精(AIH)の成績

○竹中雅昭 (竹中産婦人科クリニック)

1997年10月から99年4月までに配偶者間人工授精(AIH)を125例、463周期で行い、40例が妊娠し、うち9例が流産した。患者あたりの妊娠率は、25歳以下4/8(50.0%)、26~30歳15/42(35.7%)、31~35歳12/45(26.7%)、36~40歳8/23(34.8%)、41歳以上1/7(14.3%)で、周期あたりの妊娠率は25歳以下4/24(16.7%)、26~30歳15/128(11.7%)、31~35歳12/163(7.4%)、36~40歳8/89(9.0%)、41歳以上1/32(3.1%)であった。新鮮精液を用いた432周期の精液所見別(WHO基準)の妊娠率は、正常精液23/225(10.2%)、乏精子症4/28(14.3%)、精子無力症7/115

(6.1%)、乏精子無力症6/64(9.4%)であった。総精子濃度500万/ml以上1000万/ml未満の28周期では3周期(10.7%)で妊娠したが、500万/ml未満の17周期では妊娠例はなかった。排卵誘発法別の周期あたりの妊娠率は、誘発剤なし11/177(6.2%)、クロミフェン20/219(9.1%)、hMG5/25(20.0%)、クロミフェン+hMG4/13(30.8%)、その他0/2(0%)であった。LHサージを確認した341周期でのAIHのタイミングからみた妊娠率は、LHサージの日5/108(4.6%)、翌日21/194(10.8%)、翌々日3/39(7.7%)であった。以上より、AIHでは、妊娠率は30歳未満で比較的高率であること、精液所見が不良の場合にもある程度の妊娠率が期待できること、hMGを用いた周期では自然排卵やクロミフェンを用いた周期よりも高い妊娠率が期待できること、LHサージの翌日の授精で比較的高率の妊娠率が高いことが判明した。

16. 生殖医療に対する大学生の意識

○佐々木愛子、中塚幹也、野口聡一
岡本和夫、杉原早葉子、西口園恵
舩本明生、松尾 環、羽原俊宏
高田雅代、浅桐和男、工藤尚文

(岡山大学産婦人科)

日本では、諸外国との文化的、宗教的背景の違いから、生殖医療における種々の倫理的な問題への対応に差異が見られる。また国内でも世代間において倫理的な問題の捉え方が違う点を考慮すると、今後、子供を持ち、社会の中心となっていく年齢層の意識を知ることが、これからの日本の生殖医療における倫理的な問題を扱う上で重要であると考えられる。このため私達は、大学生を対象にアンケート調査を行った。【対象・方法】調査は1999年5月に岡山大学の学生147名(うち医学部生108名)を対象に行った。アンケートは、無記名、自己記述式で、回収率は75.0%であった。【結果】以下の生殖医療技術を一般論として「認めて良い」または「条件付きで認めて良い」と回答した率は、AID72%、第三者の精子を使用した体外受精68%、第三者の卵子を使用した体外受精67%、第三者男女の受精卵を使用した胚移植51%、surrogate mother 49%、host mother 62%であった。また、余剰卵を他の不妊患者に無償で提供することは49%であったが、有償で提供することは9%と低率であった。クローン技術の動物への応用は70%、ヒトへの応用は24%、ヒト不妊症治療への応用は20%であった。【考察】第三者の配偶子を使用した体外受精-胚移植に関しては過半数が条件付きながら認

めてよいとした。しかし商業的な受精卵の使用は認められないとする意見が強かった。

17. 精子抗原ペプチドYAL-198発現サルモネラ菌を用いた遺伝子経粘膜ワクチン

○山本哲史, 笠井由佳, 吉川修司

滝川稚也, 前川正彦, 鎌田正晴

青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】Yan, Koideらによって同定された精子膜表面タンパク(YWK-II抗原)に対するモノクローナル抗体はヒト精子のハムスターテストを阻害することが知られている。我々は、同抗原の親水性部分を合成したペプチド(YAL-198)が能動免疫によりラットに不妊を引き起こすことを示し、YAL-198の避妊ワクチンとしての可能性を明らかにした。本研究では、YAL-198を発現する無毒化サルモネラ菌を用いた経粘膜ワクチンの有効性を検討した。【方法】①プラスミドpLS408-HIにYAL-198のcDNA断片を組み込み無毒化サルモネラ菌に導入した(SL5928)。対照としてpLS408-HIを導入したサルモネラ菌(SL5930)を用いた。②体重200gのウイスター系雌ラットに、0.7ml (10⁸CFU/ml)および0.2mlのサルモネラ菌溶液をそれぞれ経口および経腔的に投与した。さらに4週および10週後に同様の方法にて追加免疫を行った。③血清および腔分泌液を採取し、YAL-198をコートしたmicrotiter plateを用いてIgGおよびIgAクラスの抗体価をELISAにて測定した。④初回免疫14週、23週および40週後に雄ラットを交配させ、避妊効果を検討した。【結果】①SL5928の経口および経腔投与により、血清および腔分泌液中のYAL-198に対するIgGおよびIgA抗体価は共に上昇し、14週で最高値を示したのち緩やかに減少した。SL5930の投与では全く抗体産生は認められなかった。②SL5928の初回免疫後14週の時点では、経口免疫で60%(3/5)、経腔免疫で80%(4/5)の避妊効果を示したが、23週では経口、経腔ともに40%(2/5)に低下した。40週後では避妊効果は認められなかった。SL5930の投与では、いずれの時期においてもすべての雌ラット(各5匹)に妊娠を認めた。【結論】精子抗原ペプチドYAL-198cDNAを導入した無毒化サルモネラ菌を用いた経粘膜避妊ワクチンの有効性が示唆された。

18. ハムスターにおける円形精子細胞核注入(ROSNI)への電気刺激の影響と円形精子細胞注入(ROSI)の比較

拝郷浩佑, 高橋美奈子, 堀内俊孝

(広島県立大生物資源)

【目的】ハムスター円形精子細胞核注入(ROSNI)での低い前核形成率は、ROSNI直前に活性化処理を行うことで高まると報告されている。最近、マウス卵子へのハムスター円形精子細胞注入(ROSI)によってハムスター円形精子細胞の細胞質に卵活性化因子が存在することが示唆された。そこで、まずハムスター未受精卵の電気刺激の至適条件を決定し、ROSNIにおいて電気刺激が前核形成率と卵割率におよぼす影響を明らかにした。ついでROSIとの比較を行った。

【方法】実験1. 過剰排卵した成熟雌ハムスターから卵子を採取し、方形波高電圧パルス(0~2.5kV/cm, 25~150μsec)の組み合わせで卵子に印加した。印加溶液にはZimmerman's CFMを用いた。ついで卵子はM199+5%FBSで3h培養後、固定染色し活性化率を調べた。実験2. 成熟雄ハムスターから精巣を摘出し、曲精細管を細切して円形精子細胞を採取した。円形精子細胞核はOguraらの方法に従い分離した。これら円形精子細胞核または円形精子細胞はPiezo-micro-manipulatorで顕微受精した。そして、M199+5%FBSで3h培養後の前核形成率と24h培養後の卵割率を調べた。【結果】ハムスター未受精卵の活性化率は、1.5kV/cm・100μsecの組み合わせで85%と最も高かった。この条件の電気刺激によりROSNIの前核形成率・卵割率は共に高くなった(75% & 53% vs. 32% & 18%)。一方、ROSIでの前核形成率・卵割率は、69%と56%で、電気刺激を行ったROSNIと有意な差はなかった。

19. 新鮮マウス成熟卵の活性化

○中坂尚代, 山下瑞穂, 小松淳子

中川浩次, 山野修司, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】Ca ionophoreおよび各種蛋白リン酸化阻害剤でマウス新鮮卵を活性化し活性化卵の活性化率とその種類を検討した。【方法】6~9週齢のB6C3F1雌マウスをPMSG 5IUおよびhCG 5IUで過排卵刺激し、hCG投与13時間後に卵管より採取した新鮮卵を以下の実験に供した。①、卵をCa ionophore 5μMで5分間前処置する群としない群に分けた。両群の卵を洗浄し、それぞれの卵を3群にわけ、puromycin 10μg/

ml(puromycin群)または2mMDMAP(6DMAP群)を含むTYH液中,またはTYH液中(コントロール群)で4時間培養した。培養終了後に前核および第二極体の有無を観察し,前核を認める卵を活性化卵と判定した。②,①で得られた1PN2PB胚の前核,MⅡ期の卵をピコグリーンにて染色し共焦点レーザー顕微鏡にて前核とMⅡplateの相対蛍光強度を比較した。③,①で得られた1PN2PB胚をvinblastine 30ng/ml中で培養し,前核が消失した後,カルノア液で固定した。ギムザ液で染色し,染色体分析を行った。【結果】①Ca ionophoreで前処置しなかった群はpuromycin, 6DMAPで処理してもほとんど活性化されなかった(それぞれ7.0%, 0.0%)。Ca ionophoreにて前処置した群では6DMAP群で活性化率は46.2%, puromycin群では90.0%であり,コントロール群に比べそれぞれ有意に高率であった($p<0.0001$)。また, puromycin群の活性化卵のうちの91.6%は1PN2PB卵であった。②1PN2PB卵の前核の相対蛍光強度はMⅡplateの約1/2(0.512 ± 0.0708)であった。③14個のうち12個で染色体数は20本で,残り2個で19本または20本であった。【結論】Ca ionophoreとpuromycinによって1PN2PBマウス活性化卵(haploid)を高率に作製することができた。

20. フタル酸エステルとラット精巣障害

○石原 勝

(香川医大泌尿, 人間環境医学衛生・公衆衛生)

伊藤正裕 (香川医大第一解剖)

黒田 功, 竹中生昌

(香川医大泌尿)

實成文彦

(香川医大人間環境医学衛生・公衆衛生)

【目的】プラスチックの可塑剤であるフタル酸エステルのうち,ジエチルヘキシルフタレート(DEHP)をラットに投与し,精巣障害等の発現と,ビタミンEとCによる精巣障害の抑制について検討を行った。【方法】実験動物としてはオスSDラット(5週齢)を用いた。(実験1)ラットを3群に分けDEHP2%混合食餌投与群,DEHP1%混合食餌投与群,対照群とした。投与開始後2週目,4週目,6週目に屠殺,精巣,肝臓,腎臓を摘出,組織学的変化を検索するとともに,精巣についてはフローサイトメトリーにより造精障害を調べた。(実験2)ビタミン剤の予防効果を確認することを目的として,ラットをDEHP2%混合食餌投与群,DEHP2%混合食餌+ビタミンE,C投与

群の2群に分け投与開始後2週目に屠殺,実験1と同様の検討を行った。【結果】(実験1)DEHP投与により精巣および体重が著明に減少し,6週目でDEHP2%投与群は対照群に比べて体重で23%,精巣で56%減少した。組織学的にも,精祖細胞とセルトリ細胞は残存するものの,その他の細胞はほとんどの段階で障害を受けていた。フローサイトメトリーでは,投与群ではハプロイドの細胞は極めて小さなpeakを形成していた。また肝臓では肥大がみとめられた。(実験2)ビタミンE,C投与群は非投与群に比べて精巣萎縮ならびに,肝肥大の抑制がみとめられた。【結論】DEHPの投与によって精巣の萎縮と肝肥大を確認した。また,DEHPとビタミンEとCの同時投与により精巣の萎縮と肝肥大を抑制する事ができた。

21. 補助診断法(陰嚢シンチグラフィー,カラードプラー,深部温測定)により診断が確定された精索静脈瘤の治療成績

○白石晃司, 内藤克輔 (山口大泌尿)

瀧原博史 (小野田市立病院泌尿)

【目的】触診と補助診断(陰嚢シンチグラフィー,カラードプラー,深部温測定)の併用により検出または診断が確定された精索静脈瘤についてのvaricocelectomy後の精液所見の改善率について検討した。【方法】術前に2回以上の精液検査,陰嚢シンチグラフィー,カラードプラーおよび深部温測定のすべてを施行し,術後6カ月以上経過観察可能であった50例を対象とした。各検査法の陽性率および各検査法の陽性例別に改善率(精子濃度,運動率)を算出した。またsubclinicalおよびGrade 1の症例についても同様の検討を行った。【結果】全症例における改善率は精子濃度:54%,運動率:56%であった。陰嚢シンチグラフィーはどのGradeにおいても90~100%の陽性率を示した。各検査法別およびそれらの組み合わせによる陽性率によりvaricocelectomy後の精液所見の改善率に一定の傾向は認められなかった。触診にてsubclinicalおよびgrade 1の症例について,陰嚢シンチグラフィーのみ陽性でvaricocelectomyを施行した群においても改善率は精子濃度:83.3%,運動率:66.7%であった。【考察】触診上,明らかに診断できなくても,感度の高い検査法である陰嚢シンチグラフィーで検出された精索静脈瘤においてvaricocelectomyを施行することは意義があると考えられた。

22. 精漿中のsecretory leukocyte protease inhibitorおよび顆粒球エラスターゼと精子運動率との関連性

○前川正彦, 笠井由佳, 吉川修司
山本哲史, 鎌田正晴, 青野敏博
(徳島大産婦)
儀間裕典 (儀間クリニック)

【目的】精液中の白血球由来である顆粒球エラスターゼ(elastase)は、膿精液症の指標のひとつであるが、精子運動率の低下作用が報告されている。secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) がelastaseと1:1の複合体を形成してelastase活性を阻害することはよく知られており(0.45gのSLPIが1.06gのelastaseを抑制)、精漿中ではelastaseによる精子機能障害を抑制していると考えられている。本研究では精漿中のSLPI濃度およびelastase濃度と精子運動率との関係について検討を加えた。【方法】3施設(当科、沖縄、ドイツ: Dr. Thaler提供)の不妊外来を受診した患者356名から精液を採取し、精液検査の後、精漿を遠心分離し、精漿中のSLPI濃度およびelastase濃度をELISA法で測定した。またJochum(1986)らの方法に従い、精漿をelastase濃度によって陰性群(<250ng/ml)、中等度炎症群(250-999ng/ml)、高度炎症群(≥ 1000 ng/ml)の3群に分類した。【結果】精子運動率は、陰性群(n=65): $63.5 \pm 28.4\%$ 、中等度炎症群(n=37): $54.6 \pm 31.1\%$ 、高度炎症群(n=13): $64.7 \pm 30.0\%$ であり、各群間で有意差を認めなかった。SLPI濃度は、陰性群: $12.8 \pm 10.9 \mu\text{g/ml}$ 、中等度炎症群 $18.5 \pm 16.4 \mu\text{g/ml}$ 、高度炎症群 $20.1 \pm 14.2 \mu\text{g/ml}$ と増加傾向を認めたが($p=0.07$)、精子運動率やelastase濃度との間に相関を認めなかった。SLPI/elastaseは115症例中111例(96.5%)で0.42(0.45/1.06)以上を示し、SLPI/elastaseが0.42以下であった4症例のうち3例は運動率正常、1例は無精子症であった。【結論】精漿中SLPI/elastaseがelastase値に関係なくほとんどの症例で0.42以上を示したことは、精漿中には十分量のSLPIが存在し炎症によって増加したelastaseを抑制でき、精子や粘膜上皮を防御していることを示唆している。

23. 岡山大学泌尿器科における脊髄損傷患者に対する電気射精の現状

○渡辺昌実, 永井 敦, 真鍋和史
井口裕樹, 渡辺豊彦, 小澤秀夫
公文裕巳 (岡山泌尿器)

【緒言】脊髄損傷患者の約90%に生じる射精障害は、患者のQOLの点から考えて重要な問題である。我々は、挙児を希望する射精障害患者に対し電気射精(Electroejaculation: EE)を施行しており、今回その成績を報告する。【対象および方法】1997年9月より1999年6月までにEEを施行した脊髄損傷患者10例および1例の射精障害患者(平均年齢: 26.3歳)を対象とした。EEにはSeager NRH Model 14を用いた。得られた精液は、assisted reproductive technology (ART)に供した。【結果】EEは11例の患者に対し、のべ25回施行した。麻酔は全身麻酔が3例、他は無麻酔で採精を行った。順行性射精を誘発できたのは10例(90.9%)であり、その平均精液量は $1.2 \pm 1.1 (0.3 \sim 4.0)$ mlであった。8例(72.7%)において精子の出現を認め、その平均精子濃度は $23.9 \pm 23.2 \times 10^6 (0.2 \sim 71.7 \times 10^6)$ /ml、平均運動率は $9.5 \pm 16.7 (0 \sim 50)\%$ であった。2例(18.2%)が卵細胞質内精子注入法によって妊娠が成立し、そのうち一例は出産、一例は妊娠継続中である。副作用は、降圧薬を要する血圧上昇が3例、採精を中止するに至った腹部痛が11例であったが、重篤なものは認めなかった。【結論】EEは順行性射精の誘発率が高く、脊髄損傷患者をはじめとする射精障害患者の採精法として有用な方法であると考えられる。

24. ICSIにて妊娠に至ったYoung症候群の1例

○大久保和俊, 寺田直樹, 松田陽介
前川信也, 小倉啓司, 荒井陽一
(倉敷中央病院泌尿)
磯崎八重子, 高橋 司, 中堀 隆
本田徹郎, 高橋 晃
(倉敷中央病院産婦)

症例は32歳男性、31歳時に結婚後挙児なし。妻が受診した産婦人科で無精子症を指摘され当科紹介。2度の精液検査でも無精子症で、精液フルクトースおよび内分泌学的検査はすべて正常範囲内であった。精巣容積は両側とも18ml、両側のsubclinical varicoceleを認めた。精管は触診では精巣上体へと連続しておりとくに異常はなかった。精巣上体は左右とも頭部にのみ軽度の腫大を認めた。両精巣生検では

JSCは左8.16右8.45であった。生下時に内臓逆位を指摘され、また小児期より気管支喘息として加療を受けていた。副鼻腔炎を認めたが、サッカリンテストは正常、気管支上皮の電顕像では綿毛構造に異常なかった。in vitro beat frequencyおよびmucociliary clearance testは検査しなかった。Young症候群を疑い、精巣上体精子吸引術(MESA)および精路再建術を試みた。左精巣上体は頭部のみが腫大しており、精巣上体管内には黄色のDebrisのみで精子はなかった。さらに輸精管を露出し切開すると多量の運動精子が得られた。以上より精巣上体頭部での閉塞と考えられた。吻合部位が深く精路再建が困難であることなどから一侧のMESAのみで手術を終えた。凍結保存した精子を後日ICSIに供した。2度目のICSIにて妊娠し、平成11年6月現在妊娠32週で継続中である。

25. 当科におけるIVF-ET通常媒精とICSI併用の成績

○今田奈美、絹谷正之、香月孝史

原 鐵晃、大濱紘三 (広島大産婦)

【目的】IVF-ETの授精法として通常媒精(以下C)とICSIのいずれかを選択するかについて現在一定の基準はなく、その選択に苦慮することがある。今回我々はIVF-ET施行時にCとICSIの併用を試みたのでその成績を報告する。【方法】1997年8月から1999年5月までに当科にてIVF-ETを施行し6個以上の卵を採取できた症例のうち、患者の同意を得て通常媒精とICSIを併用した18症例20周期を対象とした。ICSIで受精しなかった症例はなく、Cでも受精した群(C(+))群、8周期)とCでは受精しなかった群(C(-))群、12周期)の二群に分け、総精子濃度(TC)、運動精子濃度(MC)、直進運動精子濃度(PMC)、運動率(Mo)、Sperm Quality AnalyzerによるSperm motility index(SMI)などについて比較検討した。またWHOの基準により正常精液所見群(N群、9周期)と異常精液所見群(A群、11周期)に分け、C(+))群とC(-))群の比率を検討した。【結果】二群間にTC、MC、PMC、SMIの有意な差は認められなかったが、C(+))群はC(-))群に比べMoが有意に高かった。一方、N群とA群でC(+))群とC(-))群の比率に有意な差は認められなかった。【結論】授精法を選択する際に最も重要な精液パラメーターはMoと考えられた。しかしICSIが必要かどうかをあらかじめ正しく判断する事は困難であり、CとICSIの併用は治療効率の維持に有用であると考えられた。

26. TESE-ICSI により妊娠に至ったtesticular microlithiasis合併男性不妊症の1例

○奈路田拓史、宮本忠幸、香川 征

(徳島大泌尿)

中川浩次、山野修司、青野敏博

(徳島大産婦)

【緒言】Testicular microlithiasis(TM)は、超音波検査の普及により、現在ではまれな病態ではないと考えられている。今回、TMを伴った無精子症～高度乏精子症の症例に対して、TESE-ICSIを行ったので、文献的考察を含めて報告する。【症例】33歳、男性。左精巣腫瘍(Seminoma, pT1NOMO)にて前医で左高位精巣摘除術を施行。4年間の不妊を主訴に前医より紹介で当科受診。化学療法、放射線療法は施行されていない。右精巣は17ml、複数回の精液検査所見は、無精子症もしくは高度乏精子症($<0.1 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率0%)、LH 5.4mIU/ml、FSH 12.6mIU/ml、testosterone 3.1ng/ml、右精巣のエコー所見は、精巣内に多数のhigh echoic spotsがびまん性に認められた。右精巣生検の結果、CISはなく、精細管の一部に、精細管内を閉塞するように層状の石灰化が認められ、別の精細管内では精子までの分化が認められた(JSC8)。精細管のfocal micro-obstructionによるazoospermiaと考え、夫婦の希望・同意のもと、TESE-ICSIを行い、妊娠に至った。【考察】TMは精巣腫瘍、男性不妊、停留精巣、精巣捻転など様々な病態に合併するとされているが、そのすべてにTMが認められるものではなく、原因については明らかにされていない。しかしながら、TMの程度(精細管の部分的微小閉塞の程度)と精液所見には関連があるものと考えられ、TMを合併した無精子症に対する不妊治療には、TESE-ICSIが有効である。

27. 当院における着床障害例に対するBlastocyst ETの成績

○高崎彰久、石松正也、森岡 均

(済生会下関総合病院産婦)

【目的】3回以上の胚移植でも妊娠に至らなかった9症例に対しblastocyst ETを行いその効果を検討した。また、一部の受精卵に対しassisted hatchingを行い、assisted hatching未施行卵との間でhatching率に差があるかを検討した。【方法】9症例43個の受精卵に対しblastocystまでの培養を試みた。培養液はD-2まではHTFを用いD-3からは α MEMを使用した。また、assisted hatchingはD-2に行い、胚移植はD-6または7

に行った。【結果】43個の受精卵のうち20個(46.5%)がblastocystに至った。9症例中4例(44.4%)で妊娠が認められ、着床率は23.5%(4/17)であった。また、hatching率はassisted hatching施行卵では100%(13/13)、assisted hatching未施行卵では42.9%(3/7)であった。また、妊娠例4例はすべてhatchingが完了した受精卵を胚移植しており、hatchingが起こっていない受精卵を移植した場合の妊娠例は認められなかった。【結論】Blastocyst ETは着床障害例において妊娠率および着床率を改善させた。また、今回の検討ではblastocystまで発育してもhatchingに至らない受精卵が42.9%に認められ、それらの症例では妊娠例が認められなかったことより、assisted hatchingの併用が望ましいと思われた。

28. 経子宮筋層の胚移植にて妊娠に至った症例

○ 苅部綾子, 中村康彦, 高山尚子
山縣芳明, 檜田史郎, 杉野法広
加藤 紘 (山口大産婦)

【緒言】経子宮筋層の胚移植は、通常の経子宮頸管的胚移植が困難な症例における代用法として報告されている。今回我々は、経子宮頸管的胚移植が困難な症例にて本方法を用い妊娠に至った症例を経験したので報告する。【症例】38歳、女性、[redacted]。および平成8年に筋腫核出術の既往がある。[redacted]結婚。挙児希望あるも、2度の開腹手術時に子宮内膜症による両側付属器の癒着を指摘されていたため、[redacted]より当科不妊外来にて管理を開始した。子宮卵管造影にて、両側卵管閉塞の所見を認め、また経過観察では妊娠に至らないため、体外受精胚移植(IVF-ET)を開始した。経子宮頸管的胚移植による通常のIVF-ETを3回行うも、強度の子宮前屈と子宮筋腫の存在のためETチューブが内子宮口までしか挿入できず、妊娠に至らなかった。[redacted]9月に4回目のIVF-ETとなり、再度経子宮頸管的アプローチを試みたがETチューブが全く挿入できないため、経子宮筋層の胚移植の適応と判断した。専用のフレスポイトETカテーテルにて、前腔円蓋より子宮筋層を貫き、子宮内腔にカテーテルを挿入し胚移植を行った。胚移植2週間後に妊娠反応が陽性となり、3週間後に子宮内に胎嚢を確認した。前置胎盤のため37週4日帝王切開となったが、母児ともに異常を認めていない。【結語】経子宮筋層の胚移植は通常の経子宮頸管的アプローチが困難な症例に対して有効な胚移植方法であると考えられた。

29. 体外受精／顕微授精の卵巣刺激直前の小卵胞計測によるpoor responder予測の試み

○ 山下瑞穂, 中川浩次, 中坂尚代
小松淳子, 山野修司, 青野敏博
(徳島大産婦)

【目的】補助生殖医療(ART)では過排卵刺激法としてはGnRHaを用いたlong法が一般的に用いられている。以前我々は、発育卵胞数が4個以下の症例をpoor responderとした場合、その例はARTの妊娠成績が有意に不良であることを報告した。今回、卵巣刺激前の卵巣内の小卵胞数を計測することにより、ART治療周期におけるpoor responderの予測が可能か否かを検討した。【方法】平成10年6月から平成11年1月までに徳島大学産婦人科にてIVF-ET/ICSIを施行するために卵巣刺激を行った61症例61周期(平均年齢: 34.6歳)を対象とした。過排卵刺激法はすべてGnRHa併用のlong法(採卵日固定法)を用いた。ゴナドトロピン投与を開始する前の左右卵巣における直径3mm以上7mm以下の卵胞数(小卵胞数)、卵巣刺激開始後8または9日目の平均径14mm以上の卵胞数(発育卵胞数)を経腔超音波にて計測した。また胚移植時の穿刺卵胞数を記録した。【結果】①小卵胞数と発育卵胞数との間に $R=0.651$ ($P<0.001$)の有意な正の相関関係が認められた。また、小卵胞数と穿刺卵胞数との間に $R=0.651$ ($P<0.001$)の有意な正の相関関係が認められた。②発育卵胞数が4個以下のpoor responder症例を予測するため、卵巣刺激前の小卵胞数を縦軸とするROC曲線を描いた。この曲線から求めたcut off値は小卵胞数6個以下であった。このcut off値でpoor responderを予測した場合、感度=77.8%、特異度=76.5%、陽性適中率=72.4%、陰性適中率=81.3%であった。【結語】ART治療周期の卵巣刺激直前に卵巣の7mm以下の小卵胞数を計測することにより、poor responderを予測できることが示唆された。

特別講演

体細胞クローン牛作出の現状について

居在家 義昭
(農林水産省畜産試験場繁殖部生殖工学研究室)

同一な遺伝的形質を有する優良家畜の増殖は、胚移植技術の高度化に伴い、切断2分割胚による双子生産から、胚の割球細胞を用いた受精卵クローンによる多子生産へと進化してきた。わが国ではこれまでに32機関で460頭の受精卵クローン牛が誕生してい

る。しかし、効率的に同一胚から三つ子以上の産子を得ることは困難であり、世界的にもその進捗状況は一進一退であった。ロスリン研究所で誕生した体細胞クローン羊ドリーを始めとして、わが国でも70頭を越えるほど誕生している体細胞クローン牛によって、成長した個体由来の分化した体細胞であっても核移植によって新たな個体を作出することができることを立証した。培養体細胞数は無限に近く、作出できる体細胞クローン胚の数も無限に近くなる。それを受けて、我々は優良形質を有し、かつ遺伝形質が均一な個体の大量作出あるいは家畜における形質転換動物の作出技術の開発を目的として、未分化細胞や体細胞などの培養細胞を用いた核移植の研究を行っている。

これまでに体細胞クローン胚を作出するための細胞の種類、細胞周期の動態とクローン胚の作出効率、ミトコンドリアのミスマッチを回避するために経腔採卵と組み合わせた体細胞クローン胚作出の可能性などについて検討を加えている。卵丘細胞を用いた体細胞クローン胚の作出状況では、体細胞と除核レシピエント卵子との融合率は70~80%、融合卵子数に対する分割率は約70%、7日間体外培養後の桑実胚~胚盤胞期胚の割合は50%前後となっている。これは、胎子あるいは成牛の皮膚由来繊維芽細胞を用いた場合に比べて、それぞれ10%程度高い値を示している。さらに、体細胞核移植胚を作成する際に、血清飢餓培養によってドナー体細胞の細胞周期をG1/G0期に厳密に同調させる必然性は必ずしもないとの結果も得られつつある。

体細胞クローン胚を移植した結果では、胚死減や全妊娠期間に渡る流死産の発生や、分娩発来が遅延による分娩誘起や帝王切開に至る例も少なくない。また、過大子や産子の虚弱例もあることから、これらの諸問題の解決に向けてプロジェクト研究を開始した。しかしながら、受精卵クローン牛肉の安全性報道にみられるように、社会的合意なくしては技術の進歩も受け入れられないことを示しており、その骨格作りが急務となっている。

平成11年度日本不妊学会東北支部総会

日時：平成11年11月6日(土)

午後1時5分~

会場：エスポワールいわて(盛岡市)

1. マウス卵細胞質内ATPレベルによるカルシウムオシレーションの変化

○松田秀雄, 高橋俊文, 斎藤英和

廣井正彦

(山形大産婦)

哺乳動物卵細胞の受精時に見られるカルシウムオシレーションは、卵の活性化、細胞周期の進行に深く関与している。我々は、マウス卵は加齢により受精時のカルシウムオシレーションが変化し、その原因として細胞内カルシウムの取り込みの低下、小胞体カルシウムストアの減少、カルシウム放出量の低下が要因であることを明らかにした。今回ミトコンドリア脱共役剤である2,4-dinitrophenol(DNP)により細胞内ATPを枯渇させ、カルシウムオシレーションの変化を検討した。2,4-DNP投与後オシレーションは変化し、高濃度の2,4-DNPによりオシレーションは消失した。これは、加齢卵におけるオシレーションの変化は、細胞内ATPレベルの低下またはミトコンドリア機能の低下を示唆する。

2. Microvascular characteristics of porcine ovarian follicles and its changes with follicular development and atresia

○J.Y.Jiang, N.Kimura, M.Umezu

E.Sato

(Graduate School of Agricultural

Science, Tohoku University)

【Introduction】In female, during the reproductive period, the whole ovarian vascular bed undergoes specific and complex alterations, which are related to the development of the luteofollicular complex. The present study was carried out to investigate the microvascular architecture of porcine ovaries with emphasis on its changes during follicular development and atresia by scanning electron microscopy study of vascular corrosion casts. 【Materials and Methods】Porcine ovaries were perfused with heparinized saline solution followed by a solution of Mercocor. Casted ovaries were then warmed in hot water, corroded in 10% NaOH, washed overnight in warm running tap water and dried in a hot oven. Dried samples were

observed with a scanning electron microscope at low voltage and deep working distance. To observe inner wall of follicular microvasculature, the examined samples were frozen and cracked. These cracked samples were dried before further coating and observation. 【Results】 The surface of the vascular corrosion casts revealed numerous regularly or irregularly rounded structures located within the ovarian cortex, these structures being the vascular plexuses of the theca layers of various types of follicles. The vascular plexuses varied in size, having diameters from 180 to 4465 μm . The follicles of 180 to 500 μm in diameter were surrounded by a polygonal meshwork of a few large capillaries meshes, but no basket-like structure was visible. Some follicles of 500 to 700 μm in diameter were shaped with spherical meshwork with few or some capillaries, where as others were supplied with an obvious, spherical microvascular network. The network was arranged as a thin, single layer of capillaries. The microvascular architecture follicles of 1000 to 2000 μm in diameter was composed of three layer vascular plexuses. The inner plexus consisted of a small, spherical, basket-like capillary network that was not well developed. The density of capillaries varied from location to location. The middle was the layer of small arterioles and venules. The outer one was a coarse capillary plexus. With a diameter of more than 2000 μm , the microvasculature of the antral follicles was arranged as an inner vascular plexus of about 25 μm with dense capillaries, a middle of about 100 μm and an outer capillary plexus of about 30 μm in thickness. However, most of these large antral follicles observed were degenerative in microvasculature. Most of oocytes collected from ovaries were degenerative, supporting our morphological observations. 【Acknowledgment】 This work was supported by grants from the Program for Promotion of Basic Research Activities for Innovative Biosciences.

3. EPFとchaperonin10の相同性について

○河村和弘, 福田 淳, 熊谷 仁
熊谷暁子, 児玉英也, 田中俊誠

(秋田大産婦)

【目的】受精卵から分泌される免疫関連物質である early pregnancy factor (EPF) と熱ショックタンパクのひとつである cpn10 の相同性について検討した。

【方法】①ラット未受精卵, 受精卵より RT-PCR, nested PCR を行い cpn10, 60 の発現を検討した。② rosette inhibition test で, native cpn10 の活性を測定した。③非妊娠, 妊娠ラット血清において, 抗 cpn10 抗体で中和試験を行った。【結果】①cpn10, 60 の発現は, 未受精卵およびすべての stage の受精卵において認められた。②native cpn10 は 10 倍希釈系列の各濃度でいずれも EPF 活性を示さなかった。③抗 cpn10 抗体の免疫沈降による中和試験は陰性であった。【結論】以上より EPF と cpn10 の相同性が否定された。

4. 採卵後に生じた卵巣腫瘍と思われる3症例

○佐藤由美, 渡辺 正, 野田隆弘
中村聡一, 松崎幸子, 村上 節

(東北大産婦)

昭和58年から現在まで, 当院での経膈超音波下採卵のうち, 3例の採卵後感染症例を経験したので報告する。①29歳0妊0産, 過去2回の腹腔鏡下左卵巣チョコレート嚢腫穿刺吸引術の既往あり r-AFS 分類Ⅲ。平成5年4月採卵後23日目より発熱。妊娠反応陽性。抗生剤使用するも解熱せず。開腹術施行し, 左卵巣ドレナージ施行後解熱。12月自然分娩。②35歳2妊1産, 両側卵巣チョコレート嚢腫核出術の既往あり。r-AFS 分類Ⅵ。平成7年採卵時約3cmのチョコレート嚢腫あり, 3日後より発熱。抗生剤抵抗性があり開腹両側卵巣ドレナージを施行し, 解熱。③31歳0妊0産, 多嚢胞性卵巣症候群, 抗生剤点滴のみで解熱したが妊娠10週IUFD。チョコレート嚢腫や骨盤内癒着症例は採卵後骨盤内膿瘍発症のリスクが高まることを念頭におく必要がある。

5. 凍結胚移植の成績について

○佐藤智子, 千葉せつよ, 松尾優子
福永憲隆, 針生光夫, 京野廣一

(レディースクリニック京野)

【目的】ホルモン補充周期は implantation window が広いとの報告があるため, 自然周期とホルモン補充周期(エストラダーム, プレマリン)を IVF と ICSI に分けて妊娠率を比較検討した。【方法】平成10年1月より平成11年9月までの111症例122周期を対象とした。1) エストラダーム周期①IVF, ②ICSI, 2) プレマリン周期③IVF, ④ICSI, 3) 自然周期⑤IVF, ⑥ICSI の6群の周期あたりの妊娠率を検討した。【結果】妊娠率, ①21.9% (7/32), ②22.7% (5/22), ③21.4% (6/28), ④17.4% (4/23), ⑤25.0% (1/4), ⑥23.1% (3/

13)と有意差はみられなかった。【結論】有意差がみられなかったことより、自然周期とホルモン補充周期を上手に使い分けていきたい。

6. 当病院における不妊外来のあり方

—特に難治性不妊の問題点—

○宮川コウ、武田正美

(松園第一病院産婦)

当外来統計上、内分泌性妊娠は52.2%と過半数を占め、卵管性不妊、男性不妊、機能性(原因不明群)の妊娠率は極めて低率であった。これら難治性不妊症例に検討を試みた。①器質性卵管不妊は通水法、肉眼的および顕微鏡下卵管形成術による治療法実施例71例中19例妊娠(26.7%)、体外受精実施例26例中6例妊娠(23.1%)であった。器質性卵管不妊治療症例97例の妊娠率は25例妊娠25.7%であった。②男性不妊症例はAIH、AIDを施行した9例中妊娠は1例で極めて低率で、体外受精施行例23例中6例妊娠(26.0%)であった。③機能性不妊の診断により興味ある経過を示した10例(うち7例妊娠)について検討した。これらの症例は不妊期間がすべて5年以上の長期で、すべて医師歴訪の前歴あり。7例の妊娠症例中4例が体外受精予定者で前処置として検査、説明中に妊娠した示唆に富む症例であった。IVF-ETは一般臨床にも実施されるようになったが、未だ妊娠率が低率であり臨床的にも多くの問題がある。我々は患者の時間的経済的浪費などを考慮してIVF法を採用した52例(妊娠率26.9%)について検討したが、患者の肉体的経済的負担および未だ低率な妊娠率などを考慮すると安易に行われる方法ではなく、実施に当たっては不妊外来—患者—高度不妊治療施設の緊密な医療チームの上に治療を進めることが重要である。

7. 不妊外来における抗甲状腺抗体測定の意義

○盛合佳代、東梅久子、吉崎 陽

利部輝雄 (岩手医科大産婦)

不妊症症例における抗甲状腺抗体測定の有用性について検討した。過去1年間に当科不妊外来を受診した212人を対象に、抗サイログロブリン抗体(TGAb)、抗サイロペルオキシダーゼ抗体(TPOAb)、TSH、FT₄、PRL、LH、FSHを測定し、抗甲状腺抗体陽性群と陰性群と比較検討した。また、抗甲状腺抗体陽性例のうち、触診で異常所見を認める症例に超音波検査を施行し、必要に応じて吸引細胞診を施行した。212例中抗甲状腺抗体陽性例は103例で全体の48.5%であった。抗甲状腺抗体陽性群における甲状腺機能

異常14.4%で、陰性群の4.4%と比較して有意に高率であった。また23例に超音波検査を施行し、21例に異常所見を認めた。結節性腫瘍を認めた4例に吸引細胞診を施行し、そのうち1例は甲状腺癌であった。しかし、抗甲状腺抗体の有無による妊娠率の有意差は認めなかった。以上より甲状腺機能異常を伴わない抗甲状腺抗体陽性例は妊娠に影響しないと考えられた。

8. 当院における精巣内精子を用いた顕微授精の成績

○福永憲隆、千葉せつよ、松尾優子

佐藤智子、針生光夫、京野廣一

(レディースクリニック京野)

【目的】男性不妊症に対する精巣精子を用いた顕微授精の有用性が報告されている。当院においても96年4月よりTESE-ICSIを開始し、今回その臨床的検討を行ったので報告する。【方法】局所麻酔下で採取された組織片は細切、圧挫、遠心後精子を回収した。回収した精子は簡易凍結法により冷凍保存した。【成績】閉塞性無精子症は受精率67.6%、妊娠率16.1%、非閉塞性無精子症では受精率41.7%、妊娠率5.6%、脊髄損傷では受精率55.2%、妊娠率30.8%となった。【結論】精子の採取率は脊髄損傷と閉塞症で100%、非閉塞症では36.4%であった。凍結精子を用いたICSIでは新鮮精子を用いたICSIと同様の成績が得られた。妊娠率は脊髄損傷で数値的に高く、次いで閉塞症、非閉塞症の順になった。夫が脊髄損傷である5症例のうち4症例に妊娠が確認された。

9. 尿道下裂患者におけるY染色体微小欠失の検討

○館野 正、笹川五十次、矢沢 広

鈴木泰宏、中田瑛浩 (山形大泌尿)

【目的】現在、精子形成能に関係していると報告されているAZF(Azoospermia factor)部位のDAZ(Delta in Azoospermia)とRBM(RNA-binding motif)を含むY染色体微小欠失の存在が知られている。また、最近尿道下裂の発生が父親の精子異常や環境因子の変化で高くなっている。今回我々は尿道下裂のY染色体微小欠失について調べてみた。【方法】DAZとRBMを含む32箇所のY染色体微小欠失部位を尿道下裂患者32名についてPCR(polymerase chain reaction)法を用いて比較検討した。【結果】尿道下裂においては、Y染色体微小欠失は認められなかった。尿道下裂患者の精子形成能についてはほとんど報告されていないが、本研究において尿道下裂患者の精子形成障害

の可能性は低いと考えられた。また尿道下裂における責任遺伝子はY染色体微小欠失ではないことが推測された。

10 ラット停留精巣モデルの造精障害に対する抗酸化剤の抑制効果

○熊谷暁子, 熊谷 仁, 河村和弘
村田昌功, 福田 淳, 児玉英也
田中俊誠 (秋田大産婦)

ラット停留精巣モデルに、作用機序の異なる抗酸化剤(allopurinol(Allo), vit.E, vit.C, N-acetyl-cysteine, rebamipide, dimercaprol)を投与し、アポトーシス抑制効果をHE染色, TUNEL法により評価し、さらに、精巣重量比(重量比: 停留精巣/正常精巣)を検討した。非投与群に比し、Allo群とvit.E+C群が有意に重量比の減少を抑制し、HE染色で精細胞の残存を認めた。また、Alloは、1mg/kg以上の投与で用量依存性に重量比の減少を抑制し、apoptotic indexの上昇を抑制した。xanthine oxidase(XO)特異的阻害剤BOF-4272もAllo同様に重量比減少を抑制した。AlloのXO活性阻害により停留精巣モデルの精細胞アポトーシスの抑制の可能性が示唆された。

11. Sperm chromatin structure assay(SCSA)としてのdiamide-acridine orange染色の有用性

○橋本志奈子, 片寄治男, 山田宏子
林 章太郎, 矢澤浩之, 柳田 薫
佐藤 章 (福島医科大産婦)

精子成熟度解析に有用であるAcridine orange(AO)染色とSH基の特異的酸化剤であるDiamide(D)を併用してヒト射出精子を染色(D-AO染色)すると、精子成熟障害は精子核内のS-S結合形成障害(精巣上体機能異常)およびSH基すらない未熟型(精巣における核蛋白置換障害)にさらに分類可能で、後者はIVF-ETにおける受精率が低い。今回はD-AO染色により核蛋白置換障害に分類された症例および妊孕性の確認されている症例の射出精子から核蛋白を抽出、SDS-PAGEによる核蛋白分析を行い両者を比較検討した。両者の蛋白組成には明らかな量的質的差異を認め、D-AO染色法のSCSAとしての有用性が示唆された。

12. 亜鉛, 銅がヒト精子運動性に与える影響とキレート剤の効果

○山田宏子, 片寄治男, 橋本志奈子
林 章太郎, 矢澤浩之, 柳田 薫
佐藤 章 (福島医科大産婦)

【目的】金属が*In Vitro*で精子運動性に与える影響を亜鉛, 銅の添加およびキレート剤処理により検討した。【方法】卵管性不妊症を適応に加療されている患者の余剰運動精子を対象とした。運動精子はmHTFでswim-up処理により回収し、Znは $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Cuは $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を用い蒸留水を溶媒に500mg/ml, 50mg/mlの濃度でそれぞれのstock solutionを作り、予備実験からZn100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Cu25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, の濃度で調整し使用した。精子浮遊液には10%SSS添加HTFを選び、対象には2 μl の蒸留水を加え精子濃度は $20 \times 10^5/\text{ml}$ に調整した。精子運動性をCASAを用いて培養開始0, 3, 5および24時間後に計測した。また、培養開始3時間で6mM EDTA処理(300g, 5min遠心洗浄)を300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Zn群と50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cu群に施し、その後の運動性の変化についても検討した。【結果】(1)Zn: 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では運動性が1時間後から対照と比較し有意に低下しはじめ(%mot, $85.9 \pm 13.1\%$ vs $98.5 \pm 1.58\%$ (mean $\pm$ SD, $n=10$), $p=0.0075$), 24時間では0%となった。100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では24時間後で有意に低下した($6.1 \pm 13.0\%$ vs $78.7 \pm 16.2\%$, $p>0.0001$)。 (2)Cu: 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のみ5時間後から対照と比較し有意な運動性の低下が観察され($38.0 \pm 34.1\%$ vs $95.3 \pm 3.3\%$, $p=0.0002$), 24時間では0%となった。 (3)EDTA処理の効果: EDTA処理のみの精子運動性への影響はなく、Zn添加群のみ精子運動性の回復が観察された。【結論】ヒト精子運動性に対するZn, Cuの濃度および曝露時間に依存した制御効果が示唆された。300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ の3時間曝露まではキレート剤で精子運動性を回復でき、射出直後のEDTA処理は精漿中に亜鉛が高濃度に存在する男性不妊患者に有効である可能性が示唆された。

13. 子宮内膜症における腹水中の一酸化窒素が精子運動能におよぼす影響

○東梅久子, 盛合佳代, 吉崎 陽
利部輝雄 (岩手医科大産婦)

【目的】子宮内膜症における腹水中のNitric Oxide(NO)が精子運動能におよぼす影響について検討した。【方法】卵胞期に腹腔鏡または開腹所見にて子宮内膜症と診断された22症例より腹水を採取し、腹水

中のNO, IL-1 β , IL-6, CA125濃度を測定した。また正常精液所見の精子をHTFで洗浄後に腹水を添加し、12, 24時間後の精子運動率を検討した。IL-1 β , IL-6濃度はELISA法、NO濃度はGriess法にて評価し、腹腔内に異常所見を認めなかった16例の腹水を対照として検討した。【成績】①子宮内膜症群(EM群)のNO濃度は非内膜症群(nonEM群)より有意に高値であった($p<0.05$)。IL-6はEM群で高い傾向がみられた。②腹水を添加培養後の精子運動率は12時間および24時間ともにEM群ではnonEM群より有意に低下した($p<0.05$)。【結論】子宮内膜症の腹水ではNO濃度が増加し、このNOが精子運動能に対して抑制的に作用することが示唆された。

特別講演 I

未成熟卵および未成熟精子のARTへの応用とその問題点

荒木康久

(高度医療技術研究所・中央クリニック)

卵細胞質内精子注入法(ICSI)の出現は、超難治性男性不妊に画期的な福音をもたらしたといえる。ICSIに用いる細胞は成熟精子にとどまらず、未成熟生殖細胞の体外培養によるものまで臨床応用は拡大されつつある。しかし、成熟精子を用いたICSI以外の臨床成績は必ずしも満足のいく結果ではない。

日本では臨床に供することはできないが、ヒト円形精子細胞による生児の成功はまだ世界で10例程度にすぎない。実験動物以外、ヒトで第2精母細胞の成功例の報告もあるが真のところは不明である。

無精子症の治療に精巣精子が用いられている。精巣精子の分離状況、妊娠率を含め後期精子細胞や円形精子細胞の染色体分析の検査方法の開発などについて述べたい。一方、卵子についても卵巣過剰刺激症候群(OHSS)予防目的で未成熟卵を採卵し体外培養後、成熟させた卵をICSIに供することが試みられている。また、卵巣(原卵母細胞)組織を冷凍保存し、融解後体外成熟培養の検討もされている。ここでは我々の経験したOHSS予防のため、hCG投与前後で採卵した卵の体外成熟培養とICSIの結果について述べたい。hCG投与前、採卵した未成熟卵の96%は第2成熟分裂中期(M II期)に成熟しICSIで50%に受精が確認され、受精卵の92%は良好分割胚に発生した。またhCG投与後、卵核胞を有するGV期もしくは第1成熟分裂中期(M I)の卵であっても、各々62%、83%がM II期に体外成熟し、それぞれにICSIした結

果、受精率(51%、58%)、良好胚(40%、57%)が得られ、臨床に体外培養成熟卵が利用されることが判明した。

特別講演 II

生殖細胞の凍結保存

久慈直昭

(慶應義塾大学医学部産婦人科学教室)

医療技術が進歩するに従い、生殖細胞(卵子・胚、あるいは精子)の凍結保存はその意義と重要性をさらに増している。それぞれの分野のトピックスを中心に、最近の変化と凍結保存の現状について考察を加えてみたい。

1. 受精卵

受精卵凍結保存は多胎妊娠防止、卵巣過剰刺激症候群予防のために不妊症治療において必須の技術であり、現在広く行われている。

現在不妊症臨床において最も普及している胚凍結法は、前核期～桑実胚期(採卵後24～72時間)の受精卵を透過性および非透過性凍結保護物質を含む媒液中で、 $-30\sim-40^{\circ}\text{C}$ の低温まで緩速冷却を行う方法である。体外受精法により得られた卵子を媒精後24ないし72時間(前核期～桑実胚期)で凍結保存する。凍結保存の凍結・融解過程においては細胞内外で水分が出入・結晶化するため、これらのことに留意して凍結融解を行う必要がある。

受精卵凍結保存を臨床応用する上で、出生児の予後調査は重要である。しかし我々が検討した範囲では、出生後の身体的発育・精神運動的発達是一般の出生児と差はなく、また明らかな先天異常の増加や特徴的な異常の集積は認められなかった。

2. 未受精卵子

未受精卵子凍結は、医原性卵巣不全(悪性腫瘍治療等)時の妊孕性温存のために必要となり、骨髄移植が普及しつつある現在患者のニーズは高まってきている。

未受精卵子は、受精卵と異なり第2減数分裂中期で停止した不安定な状態である。このため凍結融解後の受精率は低く世界的にみても妊娠・出産の報告は極めて少ないが、近年凍結融解未受精卵子に顕微授精を用いることにより高い妊娠率が報告されている。一方卵子凍結の場合通常は分裂中期で凍結保存を施行するため、染色体異常への影響も考慮しなければならない。

3. 精子の凍結保存

献血血液からHIV感染が複数例報告され、体液からの感染症の危険性がクローズアップされている。このような状況で、精子凍結保存はとくに提供者精液を用いる非配偶者間人工授精で絶対必要となってきた。

とくにHIVについては血清抗体陰性期の感染者(いわゆるwindow period)からの水平感染が報告されている。また精液洗浄のみではHIVは除去不可能であり、実際我々も感染者精液の洗浄後分画からHIVDNAを低頻度であるが検出している。

精液の凍結保存は古くから行われており、その安全性は出生児の予後調査などからはほぼ確立しているといつて良い。しかし非凍結精液を使用した場合に比較して妊娠効率は低下し、治療のためのコストを押し上げる原因となっている。

第44回 日本不妊学会九州地方支部会

日時：平成11年11月14日(日)

午前8時30分～

会場：長崎県医師会館(長崎市)

1. タバコ抽出液の精子運動能におよぼす影響

○浦田憲一郎、植原久司、田中雄一郎

宮川勇生 (大分医大産婦)

【目的】喫煙の精子機能への影響を明らかにするため、タバコ抽出液(CSE)の精子運動能への影響および、これに対するスカベンジャーの作用について検討した。【方法】CSEはYokode et al.の方法で作成した。正常精液(n=15, WHO基準)にCSEを直接添加し、精子運動能の指標(SMI)の変化、およびこの変化へのアスコルビン酸、グルタチオンの作用をSQA II Bにより測定した。【結果】CSE添加群では時間依存性、濃度依存性にSMIは有意に低下した($p < 0.01$)。アスコルビン酸、グルタチオンをそれぞれ同時添加したところ、CSEの精子運動能抑制作用がスカベンジャーにより有意に改善された($p < 0.01$)。

【結論】CSEによりSMIは有意に低下し、またスカベンジャーによりSMIの低下が有意に改善したことにより、喫煙により精子機能の障害がおこるが、その作用には活性酸素が関与していることが示唆された。

2. 精液検査所見と生活習慣、ストレス、環境との関係について

○熊迫陽子、平井香里、渡辺利香

後藤孝子、広津留恵子、宇津宮隆史

(セント・ルカ産婦)

【目的】精液検査所見に与える夫の生活習慣などについて調査した。【対象および方法】1997年8月～10月に当院を訪れた夫158名に対し質問紙およびSMI健康調査表、Cox & Mackayのストレス判定検査表を渡し、郵送によって回答を得た。精液検査については、WHOが定める濃度、運動率、奇形率の正常範囲に1項目でもあてはまらない場合を「異常」と定義した。【結果】飲酒状況、喫煙状況、職場の環境、または精神的ストレスにおいて精液検査所見との関連は認められなかった。また、全体の34%が不妊治療を受けていることに精神的ストレスを感じ、CMIとCox & Mackayの判定では全体の24%に神経症の傾向があることが明らかとなった。【考察】環境や生活習慣が男性不妊の一因になるといわれているが、今回の結果では明らかな関係は認められなかった。しかし、夫も不妊治療に対し精神的ストレスを感じていることがわかり、夫側へのケアの必要性が示唆された。

3. strict criteriaによるsmall head精子と受精率低下との関係

○Paul E. Kihaila, 平井香里, 熊迫陽子

広津留恵子, 三角順一, 宇津宮隆史

(セント・ルカ産婦)

今回我々は、7月に原因不明因子によってIVFを行った33歳の妻と34歳の夫について報告する。この症例は、過去に5回AIHを施行しており、その後1回目のconventional-IVFで受精率は60%だった。2, 3, 4, 6回目のstrict criteriaによる精液検査は、80%以上が頭部の長さが3 μ m以下のsmall headの奇形精子であった。2回目は、10個の卵子が採卵され、6個にconventional-IVFを施行し、4個にICSIを施行したが、その結果、それぞれ1個ずつしか受精しなかった。さらに3回目、4回目、6回目の周期はICSIを施行したが、受精率は0～20%であった。一方5回目のサイクルでは、正常形態の精子が多く(small headは10%以下)、ICSIで受精率が55%だった。この結果から、small headの精子は受精率に悪影響をおよぼしていることが示唆された。

4. 癒着防止剤の有効性に関する比較検討

○山本伸一, 江上りか, 永田英明
安藤文隆, 野崎雅裕, 中野仁雄

(九州大産婦)

【目的】ペリプラスト(B), およびセプラフィルム(S)について, 癒着防止効果を検討する。【方法】1997年1月から1999年7月の期間に当科で子宮形成術, および筋腫核出術を施行した19例を対象とし, 8例にB, 6例にSを子宮切開創に使用し, 他の5例には使用しなかった。術後7日目に, 術後早期腹腔鏡(ESLL)を行い, 子宮切開創および付属器に対する癒着を評価した。付属器の癒着はAmerican Fertility Society (AFS)の付属器スコアを用いた。【結果】子宮切開創の癒着は, 前壁, 底部, 後壁の順に非使用例で0%, 33%, 100%, B使用例で, 10%, 0%, 50%, S使用例で20%, 50%, 20%であった。付属器の癒着はB使用例のみ1.12ポイントから0.75ポイントと低下した。【結論】B使用例は付属器癒着, S使用例は切開創癒着にそれぞれ有効と考えられた。

5. ラット実験モデルを用いたOHSSの病態および発症予防の検討

○鄭 俊明, 石川勝康, MUNIR Iqbal
氏岡威史, 大場 隆, 田中信幸
松浦講平, 岡村 均 (熊本大産婦)

【目的】ラットOHSS実験モデルを作成し, プロゲステン(P)およびVEGFの役割を検討した。またhCGの代わりにLHを用いることでOHSS発症を予防できるかを検討した。【方法】①幼若雌ラットにeCG10IUを4日間投与後, 5日目にhCG30IUを投与してOHSSモデルⅠを作成した。6日目にRU486(R)を投与し, 7日目にエバンスブルー(EB)を用いて血管透過性の評価を行った。またR投与後に卵巣を摘出しVEGFの発現を検討した。②同系雌ラットにeCG15IUを2日間投与し3日目にhCG10IU, 5日目に30IUを投与してOHSSモデルⅡを作成した。3日目にhCGの代わりにLH20~40IUまたはhCG5~10IUを投与し血管透過性の評価を行った。【結果】①R投与後は腹腔内のEB量が有意に低値であった。またRの投与によりVEGF mRNAに変化はなかったが, VEGF蛋白の発現は抑制された。②LH群はhCG群と比べEB量が低い傾向にあった。PおよびVEGFはOHSS発症に関与する因子でありPがVEGFを調節していることが考えられた。hCGの代わりにLHを投与することによりOHSS発症を予防できる可能性が示唆された。

6. 水腫卵管摘出術後症例のIVF-ET成績

○小野田 親, 本田律生, 西村佳代子
田中信幸, 松浦講平, 岡村 均

(熊本大産婦)

【目的】IVF-ET成績におよぼす卵管水腫の影響についてretrospectiveに検討を行った。【対象】平成8年から10年までの過去3年間に当科で卵管水腫と診断しIVF-ETを施行したのは22例(49周期)で, そのうち14例(22周期)は水腫卵管摘出後にIVF-ETを施行した。同期間に水腫のない卵管因子でIVF-ETを施行したのは75例(114周期)で, これら3群間において成績を比較検討した。さらに, 同一症例6例において卵管摘出前(21周期)後(11周期)のIVF-ET成績を検討した。【結果】妊娠率(対周期)についてみると, 卵管水腫群は3.7%で, 摘出群13.6%, 卵管水腫以外の卵管因子群15.8%と比べ低値であった。また, 同一症例6例の水腫卵管摘出前後における比較では, 摘出前には妊娠例はなく, 摘出後に妊娠1例(9.1%)を認めた。【考察】卵管水腫の存在はIVF-ETの成績を低下させることが示され, 子宮内環境に悪影響をおよぼす可能性が示唆された。

7. 卵管妊娠温存手術後の卵管閉塞例に子宮鏡下卵管再疎通術を施行し妊娠した1例

○神山 茂, 野原 理, 松田貴子
當間 敬, 金澤浩二 (琉球大産婦)

近年, 卵管妊娠に対して腹腔鏡下手術による卵管温存治療が普及してきているが, 術後の子宮卵管造影検査(HSG)所見が閉塞の場合, 体外受精-胚移植法(IVF)を選択することが多いと思われる。今回, このような症例に卵管再疎通術を目的とした選択的卵管造影法(SSG)を行い妊娠の成立を経験したので報告する。症例は30歳, 1回経妊0回経産, 不妊期間4年で挙児希望にて当科を受診した。外来通院にて妊娠が成立したが右卵管膨大部妊娠であり, 腹腔鏡下卵管切開術を施行した。その際の左卵管采は形態廃絶の状態であった。術後のHSGでは右卵管閉塞所見であり, その後IVFを2回施行したが妊娠に至らなかった。その後子宮鏡下にSSGにて卵管再疎通に成功し, 術後3周期目に右排卵にて妊娠成立し, 満期産にて健児が得られた。卵管妊娠の温存治療後に卵管が閉塞所見であった場合, 簡便なSSGによる卵管再疎通術も検討すべきであると思われた。

8. 当科における子宮鏡下手術の現況

○今石裕人, 友成康平, 宮嶋 諭

田島紀和子, 牛嶋公生, 堀 大蔵

杉山 徹, 西田 敬, 嘉村敏治

(久留米大産婦)

内視鏡機器の発達により産婦人科領域でも腹腔鏡・子宮鏡下手術が頻繁に行われ, 当科でも1994年から子宮鏡下手術を開始した. 教室の現況と注意点および機器の選択について若干の考察を加えて報告する. 子宮鏡下手術の適応(重複含む)は, 粘膜下筋腫22例, 子宮内膜ポリープ18例, 子宮腔癒着症6例, 中隔子宮3例, 先天性子宮奇形による子宮留血腫1例であった. 手術は, 当初は腹腔鏡を併用していたが, 翌年には超音波断層法に変更し, 現在では子宮奇形等で穿孔の可能性がある場合を除いては子宮鏡単独である. また, 1998年より症例により外径22Frと24Frの子宮鏡を使い分け, 初心者でも安全に手術が可能で, 時間も短縮できた. 不妊症患者の術後の妊娠例は8例であり, 子宮腔癒着症では術後子宮内膜の菲薄化により妊娠困難な症例も認められた. 過多月経は全例とも消失した. 今後症例を重ね, 適応および術後の治療については再検討の必要があると考えた.

9. 不妊患者における子宮卵管造影法(HSG)と腹腔鏡下通色素検査に関する検討

○北島道夫, 藤下 晃, 竹ノ下由昌

宮村泰豪, 蓮尾敦子

カレク・ネワズ・カーン, 石丸忠之

(長崎大産婦)

過去10年間, 当科で腹腔鏡を施行し, 卵管疎通性検査を施行した不妊症患者を対象とし, 通色素結果とHSGによる所見を比較検討した. 腹腔鏡下に通色素検査を施行した239例中, 腹腔鏡前にHSGを施行し, その所見を再評価できたのが182例(364卵管)である. その結果, HSGにて疎通性ありと判定された246卵管中, 通色素でも疎通性ありと判定されたのが207卵管, 逆に疎通性なし(false positive)と判定されたのが31卵管であった. HSGにて疎通性なしと判定された112卵管中, 通色素でも疎通性なしであったのが66卵管であったが, 46卵管(false negative)は通色素で疎通性が確認された. また, 通色素検査を行った239例中内膜症が146例であり, 内膜症群では両側開通が78%, 少なくとも一側開通が13%, 両側閉塞は6%, 残り5例(3%)は癒着などのために疎通性が確認できなかった. また進行期別に検討したが疎通率と進行期には推計学的有意差を認めなかった.

関連学会のお知らせ

第41回 日本哺乳動物卵子学会開催のご案内

下記の要領で第41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いたします。

第41回 日本哺乳動物卵子学会
大会長 石島 芳郎

記

期 日：2000年6月1日(木)・2日(金)・3日(土)・4日(日)
会 場：東京農大学生物産業学部(オホーツクキャンパス)
〒099-2493 北海道網走市八坂196 (代表TEL)0152(48)2116
連 絡 先：東京農大学生物産業学部内 第41回日本哺乳動物卵子学会事務局
〒099-2493 北海道網走市八坂196 (FAX)0152(48)2940
担当者：伊藤雅夫 (TEL)0152(48)3830 e-mail:m-ito@bioindustry.nodai.ac.jp
学会参加申し込み：学会当日会場にて受け付けます。参加費は次の通りです。
学会参加費 7,000円・懇親会参加費 7,000円

1. 学術集会：6月2日(金)・3日(土)の両日、一般講演とシンポジウムを行います。

シンポジウム：「妊娠率向上のためのART」 座長：鈴木秋悦先生

このほかに、生殖細胞系のシンポジウム1題を予定しています。

一 般 講 演：講演の形式は口頭発表のみと致します。

[演題申し込み]

演題の申し込みは、本誌16巻3号綴じ込みの原稿用紙にタイプまたはワープロで印字した講演要旨、およびそのコピー2部を、申込用紙、通知用はがきと共に上記連絡先宛書留郵便にてお送り下さい。原稿はそのまま写真印刷して、本誌17巻2号に講演要旨として掲載されます。なお会員1人1題とさせていただきますのでご了承下さい。

申し込み締切日：2000年2月15日(必着)

[発表要領]

口演時間は1題につき10分、討論3分の予定です。各会場には35mmスライドプロジェクター1台を用意いたします。

2. 理事会・評議員会・編集委員会・懇親会：次の通り開催する予定です。

理 事 会：6月1日(木) 18:30より、市内ホテル会議室

評 議 員 会：6月2日(金) 12:00より、学会会場内

編集委員会：6月3日(土) 12:00より、学会会場内

総 会：6月3日(土) 13:00より、大講義室

懇 親 会：6月2日(金) 19:00より、市内ホテル宴会場

3. エクスカーション：6月4日(日)、「知床・摩周湖」観光を行います。

参加費は無料です。お誘い合わせて是非ご参加下さい。

Aコース：6月4日の朝、市内のホテルを出発し「知床・摩周湖」を観光します。

17時迄に女満別飛行場に戻り、札幌、東京への最終便に間に合わせます。

Bコース：6月4日まで当地にお泊まり頂ける方に、「知床・摩周湖・美幌峠」周りの1日コースを準備いたします。

会場への交通：飛行機：最寄りの飛行場は女満別空港です。

女満別空港より網走市内まではバスで約30分(750円)です。

JR：札幌～網走(石北線)は特急でおよそ6時間です。

日本医学会だより

JAMS News

1999年10月 No.22

第25、26回日本医学会総会

1999年4月2日～4日に東京で第25回日本医学会総会が開催され、盛会裡に終了した。

第26回日本医学会総会は、4年後の2003年、4月4日～6日に福岡での開催を予定している。

会頭に杉岡洋一九州大学総長、副会頭に平野実久留米大学学長ならびに片山仁順天堂大学学長、準備委員長に名和田新九州大医学部教授、幹事長に高柳涼一九州大学医学部講師がそれぞれ決定している。

近々、準備委員会が開催され、総会にむけての組織化が具体的に行われる予定である。

日本医学会総会百年のあゆみ

第25回日本医学会総会記録委員会が、「日本医学会総会百年のあゆみ」を、単行本として刊行した。日本医学会総会の前史に始まり、第1回総会からの歴史を丹念に調べたもので、編纂にあたった執筆者の姿勢は記録性を第一とし、資料としては総会の会務記録に限った。また詳細な年譜作製を試みたとしている。

総会登録者には既に第25回総会の資料として配布したが、多少の残部が日本医学会にある。入手希望の方は、送料の切手340円を添えて日本医学会まで申し込まれたい。無料頒布。

第114回日本医学会シンポジウム

1999年9月3日～5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「血管障害—発症機序の解明から治療まで—」を開催した。組織委員は、石川春律(群馬大・解剖)、秦順一(慶應大・病理)、矢崎義雄(国立国際医療センター)の各氏であった。

プログラムは、Ⅰ. 血管壁と整理活性物質、Ⅱ. 血管細胞の機能と病態、Ⅲ. 血管病の分子遺伝学、Ⅳ. 血管治療の新しい展開、とそれぞれ題した4セッションから構成された。

血管の機能異常および病態が、昨今、分子・遺伝子レベルで明らかにされつつある現状を踏まえ、血管障害に際しての組織変化に関する最近の研究成果が発表された。またそれに基づいた治療法が論じられ、熱心に討議された。

シンポジウムの詳細は、記録集として2000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115回日本医学会シンポジウム

平成11年12月2日(木)10:00～17:00、日本医師会館において「神経筋難病のupdate」をテーマにシンポジウムが開催される。組織委員は、廣川信隆、水野美邦、金澤一朗の各氏。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. パーキンソン病をめぐる

1. パーキンソン病と遺伝子／水野美邦(順天堂大・脳神経内科)
2. パーキンソン病の薬物療法／近藤智善(和歌山県医大・神経内科)
3. パーキンソン病の外科的治療／横地房子(東京都立神経病院・神経内科)

Ⅱ. アルツハイマー病をめぐる

4. アルツハイマー病の病態—アミロイド β 蛋白を中心に—／柳澤勝彦(国立長寿医療研究センター・痴呆疾患研究部)
5. 家族性アルツハイマー病とプレセニリン／岩坪威(東京大・臨床薬学)
6. アルツハイマー病と τ 蛋白／井原康夫(東京大・神経病理学)

Ⅲ. 神経筋難病をめぐる

7. 脊髄小脳変性症／金澤一朗(東京大・神経内科)
8. 多発性硬化症／山村 隆(国立精神・神経センター神経研・免疫研究部)
9. 筋ジストロフィー／荒畑喜一(国立精神・神経センター神経研・疾病研究第1部)

医学用語管理事業

医学用語管理委員会では、草間悟委員長はじめ9名の委員により、「日本医学会用語辞典—英和—」第2版編集の最終構成が行われており、近々、その編集作業が終了する。

その後、継続して出版作業に取りかかり、刊行は平成13(2001)年3月を目指している。

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10日に開催され、平成11年度の受賞者が決定した。授与式は11月1日の第52回日本医師会設立記念医学大会に際して行われる。

今年度の応募件数は医学賞29件、医学研究助成費86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、受賞者は下記の方々に決定した。

〈日本医師会医学賞〉

- ・ MHCによる免疫応答，免疫システム枠組み，および免疫疾患の制御機構に関する研究／笹月健彦（九大防御研・免疫学）
- ・ 福山型先天性筋ジストロフィー—臨床病型の確立から遺伝子クローニングまで／福山幸夫（東女医大（名誉）・小児科）

- ・ 尿道下裂に対する形成術式の開発と確立／小桝知彦（北海道大・腎泌尿器外科）

〈日本医師会医学研究助成費〉

- ・ 杉山俊博（秋田大・生化学）
- ・ 廣田誠一（大阪大・病理病態学）
- ・ 成田正明（筑波大・神経科学）
- ・ 大島 徹（金沢大・法医学）
- ・ 小澤敬也（自治医大・血液学）
- ・ 森下竜一（大阪大・遺伝子治療学）
- ・ 中尾一和（京都大・臨床病態医科学）
- ・ 中村秀範（山形大・内科）
- ・ 三浦総一郎（防衛大・内科）
- ・ 宮坂信之（医歯大・内科）
- ・ 谷口英樹（筑波大・外科）
- ・ 市川智彦（千葉大・泌尿器科）
- ・ 小椋祐一郎（名古屋市大・眼科）
- ・ 市村恵一（自治医大・耳鼻咽喉科）
- ・ 藤村直幸（札幌医大・麻酔学）

編集委員会からのお知らせ

44巻1号から4号(平成11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。

東	敬次郎	荒	木重雄	井	坂恵一	伊	熊健一郎
石	川博通	石	原理	石	丸忠之	市	川智彦
伊	藤直樹	伊	藤晴夫	岩	崎皓	植	村次雄
上	山護	遠	藤克	大	橋一友	太	田博孝
奥	田喜代司	奥	山明彦	長	田尚夫	片	山進
兼	子智	假	野隆司	神	崎秀陽	木	内弘道
北	井啓勝	久	慈直昭	久	保田俊郎	倉	智博久
斉	藤英知	佐	藤英明	末	岡浩	高	木耕一郎
武	内裕之	田	中温	田	中忠夫	田	中啓幹
角	田幸雄	永	井敦	永	尾光一	永	田行博
中	村幸雄	並	木幹夫	原		原	田省
藤	井俊策	布	施秀樹	星	和彦	星	合昊
細	井美彦	堀	内俊孝	正	岡薫	松	田公志
宮	崎豊彦	森	田峰人	柳	田薫	山	田清彦
山	野修司	横	山峯介	吉	田淳	渡	辺政信

(敬称略)

平成 11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以内の各抄録（題名、著者名、所属を含む）を添付する。各抄録の下に和文ならびに英語5語以内のKey wordsを付記する。英文はあらかじめ専門家の校閲を受けておくこと。ただし編集委員会で校閲が必要と認めた場合は、その費用を著者負担とする。
8. 投稿原稿は表紙（題名、著者名、所属、住所、ランニングタイトルを和文ならびに英文で明記）、英文抄録、和文抄録、本文（緒言、対象/材料および方法、結果、考察、引用文献）の順に並べ、図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。ランニングタイトルは和文で25字以内、英文で40letters以内とする。
9. 記述は和文または英文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
10. 海外の人名、地名などは原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの関連学会用語集に従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
11. 文献は次の形式により、引用順に末尾に一括記載する。著者、編者名は3名までとし、以下は他（et al.）とする。

a) 雑誌の場合

著者名（年次）題名、誌名 巻数：頁一頁 とする。
和文誌名は該当誌の規定または慣用の略名に従い、

英文誌名はIndex Medicusに従って略したものを用いる。ページは通巻のページ数で最初と最終ページを記入する。

英文例) Daitoh T, Kamada M, Yamano S, et al. (1995) High implantation rate and consequently high pregnancy rate by in vitro fertilization-embryo transfer treatment in infertile women with anti-sperm antibody. Fertil Steril 63: 87-91

和文例) 宮崎豊彦, 久慈直昭, 末岡 浩 他 (1995) 体外受精・胚移植不成功例に対する卵巣刺激前ダナゾール投与の効果. 日不妊会誌 40: 104-109

b) 単行本の場合

著者名（年次）題名、書名、編者名、発行所、発行地、pp頁一頁 とする。（英文の場合は編者名、書名、の順）

英文例) Collins JA (1995) Unexplained infertility. In: Keye WR Jr, Chang RJ, Rebar RW, et al (eds), 1st ed, infertility: Evaluation and Treatment. WB Saunders Co, Philadelphia, pp249-262

和文例) 三浦一陽 (1994) 男性不妊症. アンドロロジーマニュアル. 白井将文編, 第1版, 新興医学出版, 東京, pp152-166

12. 投稿論文の著作権は、掲載が決定した時点で日本不妊学会に譲渡される。投稿原稿、図表、写真は返却しない。
13. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
14. 著者校正は原則として初校のみとする。なお、校正は字句の訂正にとどめる。校正の責任は全面的に著者に帰す。
15. 特別掲載を希望する論文は、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合は掲載に要する実費を全額著者負担とし、かつ特別掲載料を納付する。
16. 別刷は著者負担とし、50部を単位とする。原稿表紙に別刷総部数を朱記する。
17. 項目5、15、16にある掲載に要した経費などは、学会から著者に直接請求書を送付する。諸費用は速やかに下記口座に送金する。
郵便振替口座： 00170-3-93207
銀行預金口座： 三和銀行麹町支店 普：3706039
社団法人日本不妊学会宛
18. 投稿原稿には、巻末に綴じ込みの投稿申込み票を添付し、簡易書留にて下記へ送付する。
（送付先）〒143-8541

東京都大田区大森西6-11-1

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室内

日本不妊学会編集委員会

平 川 舜

Tel 03-3762-4151(代) 内線 3585

Fax 03-3765-7671

日本不妊学会雑誌 投稿申込票

(この用紙をコピーしてご利用ください)

タイトル：

和文 or 英文タイトル：

掲載希望：[特別掲載：普通掲載] 種別：[原著：総説：論説：症例報告：その他]

著者名：(6名以上の場合は、別紙に同様の様式でご記入下さい)

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

本文ページ数： 文献件数：

和文抄録：600字以内(題名、著者名、所属を含む) 英文抄録：200words以内(題名、著者名、所属を含む)

表の数： 個 図の数： 個

写真の数： 枚 [カラー印刷：白黒印刷]を希望する

ランニングタイトル：

(和文 25 字以内、英文 40 letter 以内)

キーワード： 和文

(各 5 字以内)

別刷希望数：()部 50部を単位とし、希望部数を記入(別刷は有料です)。

フロッピーの添付 [有：無] →機種名： ソフト名：

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

※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きを取ってください。

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

日本不妊学会誌第45巻1号が出版にこぎ着けほっと一息と言うところです。

平川編集委員長以下のご努力で学会誌の編集業務もやっと正規の軌道に戻りつつあります。投稿論文の減少に対する対策は今後に残された問題です。英文誌化への動きも理事会で討議され具体的な検討に入る段階となっております。21世紀を間近に、生殖医学、生殖医療の領域は倫理問題をはじめとして、前進するうえで解決して行かなければならない多くの問題をかかえております。それらは医学そのものの直面する問題と言えます。不妊学会誌は学会の機能の中心として働いていかなければなりません。この学会誌の重みを実感しつつ、多くの投稿をお願いして、編集後記とさせていただきます。

(編集委員 石塚文平)

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	Hiromichi 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45巻第1号

編集発行人 平川 舜
発行所 社団法人 日本不妊学会
〒102-0083
東京都千代田区麹町 5-4
クロスサイド麹町ビル 8F
TEL・FAX (03) 3288-7266
郵便振替 00170-3-93207
印刷・製本 株式会社 パンメディア
〒162-0043
東京都新宿区早稲田鶴巻町 110
TEL (03) 3209-1810
FAX (03) 3209-1863

1999年 12月 25日印刷
2000年 1月 1日発行