

ISSN 0029-0629 CODEN: NFGZAD

Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌

Vol.45 No.2

第45卷 第2号

April 2000

平成12年4月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. / 日不妊会誌

第45回日本不妊学会総会および学術講演会 (第3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

- I 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(祝日)(木) 学術講演会、評議員会、総会、総懇親会
24日(金) 学術講演会、新理事会、各種フォーラム

- II 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)

- III 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

IV 学術講演会予告：

招請講演

- 1) "FSH receptor mutation and male infertility."
演者：Prof. Juha Tapanainen (Department of Obstetrics and Gynecology University of Oulu, Finland)
- 2) "Inhibin and activin and female reproductive function."
演者：Prof. Felice Petraglia (Department of Reproductive Medicine and Child Development Pisa University, Italy)

特別講演

- 1) 内分泌攪乱物質と生殖能
演者：堤 治 (東京大学医学部女性外科教授)
- 2) 男性不妊治療を振りかえって
演者：岡田 弘 (神戸大学医学部泌尿器科学教室講師)

教育講演

- 1) genetic counseling の目的と限界
演者：佐藤 孝道 (虎の門病院産婦人科部長)
- 2) 卵形成と排卵
演者：佐藤 英明 (東北大学農学部動物生殖科学教室教授)

シンポジウム

1. 病態からみた不妊治療の適応と限界

座長：松田 公志（関西医科大学泌尿器科学教室教授）

香山 浩二（兵庫医科大学産科婦人科学教室教授）

シンポジスト：

- 1) hMG-hCG療法の問題点
山辺 晋吾（神戸大学医学部産科婦人科学教室）
- 2) 卵胞発育刺激法における Low responder の治療の試み
斎藤 英和（山形医科大学産科婦人科学教室）
- 3) 造精機能障害の評価と ART への応用
小森 慎二（兵庫医科大学産科婦人科学教室）
- 4) 精索静脈瘤の外科的治療の適応と限界
藤澤 正人（神戸大学医学部泌尿器科学教室）
- 5) 精路閉塞および性機能障害による男性不妊
永尾 光一（東邦大学医学部泌尿器科学教室）

2. 不妊治療における内分泌学の関わりとその進歩

座長：奥山 明彦（大阪大学医学部器官制御外科学〈泌尿器科学〉教室教授）

吉村 泰典（慶應義塾大学医学部産科婦人科学教室教授）

シンポジスト：

- 1) 摂食調節障害と視床下部機能
苛原 稔（徳島大学医学部産科婦人科学教室）
- 2) 不妊と甲状腺ホルモン—卵胞発育と絨毛機能へのかかわり—
松尾 博哉（神戸大学医学部産科婦人科学教室）
- 3) 成長ホルモンの新しい標的臓器としての精巣
神崎 正徳（神戸大学医学部泌尿器科学教室）
- 4) 生殖機能とレプチン
佐川 典正（京都大学医学部器官外科学〈婦人科産科学〉教室）
- 5) 不妊症におけるインヒピン、アクチピンの意義
伊藤 理廣（群馬大学医学部産科婦人科学教室）

ワークショップ

1. 精液検査の標準化はどこまで可能か

座長：吉田 英機（昭和大学医学部泌尿器科学教室教授）

パネリスト：

- 1) 精液採取条件にかかわる諸問題
奥野 博（京都大学医学部泌尿器科学教室）
- 2) 精子濃度測定における目視下と自動化での比較
松宮 清美（大阪大学医学部器官制御外科学〈泌尿器科学〉教室）
- 3) 精子運動能測定と精子形態判定の自動化へ向けて
岩本 晃明（聖マリアンナ医科大学泌尿器科学教室）
石島 純夫（東京工業大学生命理工学部）
- 4) 新しい尿中有形細胞測定装置の精液検査への応用
岡田 弘（神戸大学医学部泌尿器科学教室）
- 5) 精液検査の標準化へ向けての将来展望
兼子 智（東京歯科大学市川総合病院産婦人科）

2. 明日の不育症診療へ

座長：牧野 恒久（東海大学医学部産婦人科学教室教授）

パネリスト：

- 1) 抗リン脂質抗体症候群を中心に
松林 秀彦（東海大学医学部産婦人科学教室）
- 2) 内分泌機能失調と不育症
安藤 紀子（横浜市立大学医学部産婦人科学教室）
- 3) 不育症における免疫機構の関与
杉浦 真弓（名古屋市立大学医学部産科婦人科学教室）
- 4) 染色体異常と不育症
小澤 伸晃（慶応義塾大学医学部産婦人科学教室）

V 一般演題：

演題申込み資格

演者(共同演者を含む)は本学会会員に限ります。会員以外の方は演題申込み時に入会の手続きをお取りいただきますようお願い申し上げます。

演題申込み要領

1. 抄録を所定の用紙にタイプまたはワープロで作成し、書留郵便で下記までお送りください。
〒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回日本不妊学会事務局
TEL：078-382-6155 FAX：078-382-6169
2. 抄録は800字以内、図・表は付けないでください。
3. 倫理面に充分考慮した発表を心掛けてください。
4. 演題申込書、受領書、採用通知書に所定の事項をご記入のうえ、切手を貼り、抄録用紙(原本)および抄録用紙のコピー4部と共にお送りください。
5. 申込み締切日：2000年6月17日(土曜日)必着
6. 演題の採否・発表形式・分類の決定は会長にご一任ください。

VI 参加申込み方法：

学会当日会場にて受け付けます。 学会参加費 10,000円

懇親会費 6,000円

総懇親会は学術講演会初日の11月23日に神戸ポートピアホテルで行ないます。

多数の皆様方のご参加をお待ちいたしております。

2000年4月

第45回日本不妊学会

会長 守 殿 貞 夫

第45回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊のご案内

会期：平成12年11月22日（水）～24日（金）
会場：神戸国際会議場

この度は「第45回日本不妊学会総会および学術講演会」が神戸にて開催されますことを心よりお喜び申し上げます。学会期間中のご宿泊の手配を（株）日本旅行神戸支店にて担当させて頂くことになりました。ご参加される皆様にご満足いただけるような快適なホテルをご用意させていただきました。

つきましては、下記の案内をご検討いただき、別紙申込用紙に必要事項をご記入の上、所定の申込先までFAXをお願い申し上げます。

尚、期間中神戸市内のホテルは相当の混雑が予想されますので、お早い目のお申し込みをお待ち申し上げます。

宿泊のご案内

■神戸市内、各ホテルの予約を学会料金にて承ります。

* 下記料金は1泊朝食付き税・サ込の一人様当たりの料金です。

* 宿泊確保日 平成12年11月21日～11月25日

| 記号 | ホテル名 | 宿泊料金・1泊朝食税込 | | アクセス |
|----|---------------|------------------|------------------|--|
| | | シングル | ツイン | |
| A | ホテルオークラ神戸 | 16,200円 (A-S) | 14,175円 (A-T) | JR元町駅から徒歩8分 会場まで約40分(JR・*トライク) |
| B | 新神戸オリエンタルホテル | 12,600円 (B-S) | 11,550円 (B-T) | JR新神戸駅から徒歩1分 会場まで約30分(地下鉄・*トライク) |
| C | 神戸ポートピアホテル | 12,600円 (C-S) | 11,550円 (C-T) | *トライク-市民広場駅から徒歩3分 会場まで徒歩1分 |
| D | ホテルパールシティ神戸 | 11,550円 (D-S) | 9,450円 (D-T) | *トライク-中埠頭駅から徒歩2分 会場まで徒歩5分 |
| E | 三宮ターミナルホテル | 11,130円 (E-S) | 10,920円 (E-T) | 三宮駅から徒歩1分 会場まで約20分(*トライク) |
| F | 神戸東急イン | 11,025円 (F-S) | 9,975円 (F-T) | 三宮駅から徒歩3分 会場まで約25分(*トライク) |
| G | ホテルサンルートソブラ神戸 | 10,500円 (G-S) | 8,925円 (G-T) | *トライク-貿易センタービル駅から徒歩2分 会場まで約25分(*トライク) |
| H | 神戸三宮ユニオンホテル | 8,715円 (H-S) | 7,665円 (H-T) | *トライク-貿易センタービル駅から徒歩5分 会場まで約30分(*トライク) |
| I | マークスホテル神戸 | 7,980円 (I-S) | 7,770円 (I-T) | *トライク-貿易センタービル駅から徒歩3分 会場まで約25分(*トライク) |

※別紙申込書に上記宿泊料金の下に申込記号（例：A-S）をご記入の上、お申込下さい。

※ご希望のホテルが満室の場合は、他のホテルに振り替えさせて頂く場合がございますので、第2希望ホテルも必ずご記入下さい。

※ツインルームご利用の方は、申込書に同室の方のお名前もご記入下さい。

※他のホテルをご希望の方は、備考欄にホテル名をご記入下さい。予約をお取りします。

申込み方法

①別紙申込書に必要事項をご記入の上、FAXにて下記日本旅行神戸支店E&Cチームまでお送り下さい。

申込先
株式会社日本旅行神戸支店 E&Cチーム
〒650-0037 神戸市中央区明石町48
神戸グランドビル6階
TEL 078-391-4651
FAX 078-391-4622
担当：足立・青野・佐之井

②申込締め切り日：平成12年10月20日(金)必着

③申込締切後、14日以内に予約確認書(バウチャー券)と請求書を代表者宛へ送付させていただきます。
尚、手配事務費・郵便通信料として1件当たり525円(消費税込)を合わせてご請求させていただきます。

支払方法

請求書が到着次第、銀行振込又はクレジットカード決済にてお支払い下さい。

クレジットカードは下記のものがご利用頂けます。

1. JCB 2. VISA 3. UC 4. DC 5. AMEX 6. 日本信販 7. オリコ 8. ミリオン

【お振込先】東京三菱銀行 神戸支店
普通預金口座 0288937
(株)日本旅行 神戸支店

お支払い期限：平成12年11月10日(金)

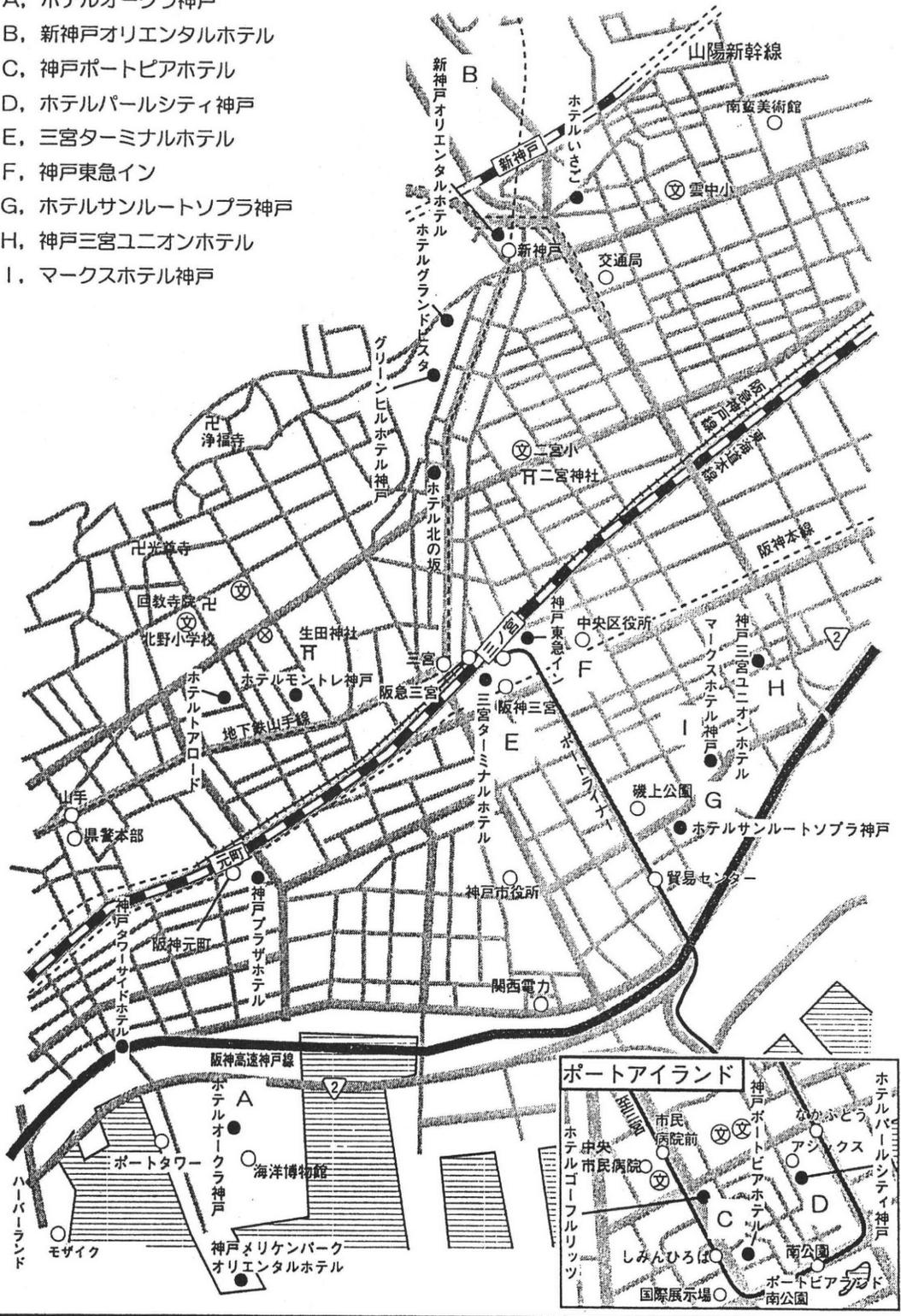
予約変更・取消について

- ①予約の変更・取消につきましても、FAXにてご連絡下さい。お電話での変更取消はお受けできません。
- ②取消料金は下記の通りです。
- ③予約の変更・取消にともなうご返金は学会終了後となりますので、予めご了承下さい。

| 宿泊日の前日から起算して、 取消お申出日が | 宿泊取消料 (宿泊代金の～%) |
|--------------------------|--------------------|
| 21日前以降 14日前まで | 無料 |
| 13日前以降 8日前まで | 30% |
| 7日前以降 3日前まで | 50% |
| 2日前以降 前日まで | 80% |
| 当 日 | 100% |

■ 神戸市内ホテル所在地図

- A, ホテルオークラ神戸
- B, 新神戸オリエンタルホテル
- C, 神戸ポートピアホテル
- D, ホテルパールシティ神戸
- E, 三宮ターミナルホテル
- F, 神戸東急イン
- G, ホテルサンルートソブラ神戸
- H, 神戸三宮ユニオンホテル
- I, マークスホテル神戸



諸々の事情により位置等が変更になる場合があります。

第45回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊申込書

日本旅行神戸支店 E&Cチーム 宛

(FAX 078 - 391 - 4622 / TEL 078 - 391 - 4651)

平成 年 月 日

| | | | |
|--|-------------|----------|--|
| 所属 (大学名・病院名など) | (詳しくご記入下さい) | | |
| 申込代表者名 (フリガナ) | | | |
| 所属先住所 (請求書送付先) <small>※送付先変更の場合は備考欄にご記入下さい。</small> | 〒 | | |
| 所属先TEL | () | | |
| 所属先FAX | () | | |
| 緊急連絡先 (自宅・携帯) | () | | |
| 返金時の振込口座名 | 銀行 | 支店 (普・当) | |
| | 口座 No. | 口座名義人 | |

【宿泊申込】

| N O | フリガナ 氏 名 | 性 別 | 宿 泊 日 (11月) | | | | | 申込記号 (第一希望) | 申込記号 (第二希望) | 同室者名 |
|--------|----------------|--------|-------------|------------|------------|------------|------------|----------------|----------------|------|
| | | | 21日 (火) | 22日 (水) | 23日 休 祝 | 24日 休 日 | 25日 (土) | | | |
| 例 | 二井 夕昴 日旅 太郎 | 男 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ | A-S | B-S | |
| 1 | | | | | | | | | | |
| 2 | | | | | | | | | | |
| 3 | | | | | | | | | | |
| 4 | | | | | | | | | | |

※申込書が足りない場合は、コピーしてご利用ください。

【その他ご希望欄】

【お支払方法】 (該当番号を○で囲って必要事項をご記入下さい。)

1. 銀行振込 (別紙振込口座へ) 2. クレジットカード (下記へ)

| | | |
|-----------------------------|-------|----------|
| 利用カード会社 (該当カードを○で囲って下さい) | 有効期限 | 引落しカード番号 |
| JCB VISA 1-カード 日本信販 | 年 月 日 | |
| DCカード AMEX 利カード ミリカード | ご署名 | |

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4月1日

日本不妊学会学術委員会
委員長 青野敏博

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

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

東京都千代田区麴町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

東京都千代田区麴町5丁目4番
クロスサイド麴町ビル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)

会 告

染色体の数異常や構造異常による男性不妊の精子の 臨床応用について

染色体の数異常や構造異常に起因する高度乏精子症あるいは無精子症の男性不妊では、通常の方法での妊娠成立は困難である。最近になって、顕微授精 (ICSI) などの生殖補助医療技術 (ART) を応用することによって、極めてわずかしか存在しない射出精液中あるいは精巣上体または精巣より採取した精子による受精・妊娠の報告がみられるようになった。

しかし、これらの精子を用いた不妊症への臨床応用は新たな医学的、倫理的問題を惹起する可能性がある。したがって、その臨床応用にあたっては、次のような事柄に十分に留意し、慎重であることが望ましい。

- (1) 染色体の数異常や構造異常と不妊との関連について十分に説明する。
- (2) このような精子によって成立した妊娠では、児に同様の染色体の数異常や構造異常の形質を伝える可能性があることを十分に説明する。
- (3) 遺伝カウンセラーを交えた説明や情報提供が望ましい。
- (4) 文章によるインフォームド・コンセントを夫婦から得ておく。

平成 12 年 3 月 27 日

社団法人日本不妊学会
理事長 森 崇 英

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 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
FAX 03-5275-1192

社団法人日本不妊学会
理 事 長 森 崇 英
学術委員長 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2号

平成12年4月1日

—目 次—

原 著

- ラットの実験的停留精巣における組織学的構築とクラステリン分布の変化
..... 北村朋之, 麻生太行, 五十嵐 敦
渡辺政信, 石崎良太郎, 吉田英機
九島巳樹, 太田秀一 1
- ヒト精子の運動能力と形態異常が IVF-ET における受精率および妊娠率に与える影響について
..... 島田知代, 野尻恵子, 原田真木子
浜井晴喜, 加藤浩志, 半田雅文
小林真一郎, 磯島晋三 9
- 免疫抑制剤によるラット造精機能障害 —PCNAの免疫組織染色による検討—
..... 岩崎雅志, 池原葉子, 村上康一
太田昌一郎, 永川 修, 布施秀樹 15
- 月経周期内におけるヒト生殖臓器でのラクトフェリンの局在 (英文)
..... 矢内原 敦, 藤間芳郎, 齋藤 裕, 矢内原 巧 21
- 父親リンパ球移植は不育症(反復流産)の女兒を救う (英文)
..... 假野隆司, 古殿正子, 加納万里子
石井みさ子, 前田 豊, 植木 實 27
- 神経終末タンパク質 Amphiphysin I のヒト精巣における発現
..... 渡部昌実 33
- 体外受精における卵胞液中各種 steroid 濃度比と卵胞径および embryo quality との関係
..... 岩崎信爾, 田原隆三, 藤間芳郎
齋藤 裕, 矢内原 巧 41
- hMG 製剤投与時の Adverse Effect に関する検討 —とくに皮膚症状について—
..... 木下俊彦, 大高 究, 伊藤元博 47
- 不妊症患者の「不妊による悩み」の実態調査
..... 渡辺利香, 後藤孝子, 倉橋千鶴美
指山実千代, 宇津宮隆史 51

閉塞性無精子症に対する精路再建術の成績：全国多施設での調査報告

..... 松田公志, 岩本 晃明, 伊藤直樹
市川智彦, 宮地系典, 友政 宏
渡辺政信, 永尾光一, 岩崎 皓
天野俊康, 並木幹夫, 日比初紀
佐々木昌一, 奥野 博, 松宮清美
岡田 弘, 永井 敦, 徳永 葉
小倉啓司, 瀧原博史, 白石晃司
小松 潔, 江口二郎 57

子宮外妊娠における腹腔鏡下卵管線状切開術の有用性

..... 佐藤雄一, 武内裕之, 桑原慶紀 65

症例報告

潰瘍性大腸炎の男性不妊症患者におけるサラゾスルファピリジンからメサラジンへの変更
による造精機能の改善

..... 鈴木啓悦, 小宮 顕, 清水亮行, 川名庸子
鈴木孝一, 市川智彦, 伊藤晴夫 71

地方部会講演抄録 75

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 45, No. 2, 2000)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- The Histological Changes and the Distribution of Clusterin in Experimental Cryptorchid Testes of Rats
..... *T. Kitamura, T. Aso, A. Igarashi, M. Watanabe*
R. Ishizaki, H. Yoshida, M. Kushima & H. Ota 1
- Influence of Human Sperm Motility Ability and Sperm Morphology on Fertilization Rate and Pregnancy Rate in Conventional IVF
..... *T. Shimada, K. Nojiri, M. Harada, H. Hamai,*
H. Katoh, M. Handa, S. Kobayashi & S. Isojima 9
- Quantitative Analysis of Rat Spermatogenic Injury by Immunosuppressive Drugs Using the Method of Proliferating Cell Nuclear Antigen
..... *M. Iwasaki, Y. Ikehara, K. Murakami*
S. Ohta, O. Nagakawa & H. Fuse 15
- Localization of Lactoferrin in Human Reproductive Tract During the Menstrual Cycle
..... *A. Yanaihara, Y. Toma, H. Saito & T. Yanaihara* 21
- Immunostimulation with Paternal Lymphocytes Saves Female Fetuses from Recurrent Abortion
..... *T. Kano, M. Furudono, M. Kano*
M. Ishii, Y. Maeda & M. Ueki 27
- Expression of Amphiphysin I, a Nerve Terminal-enriched Protein, in the Human Testis
..... *M. Watanabe* 33
- Correlation between Steroid Environment in Follicular Fluid, Follicular Diameter and Embryo Quality in *in vitro* Fertilization
..... *S. Iwasaki, R. Tahara & Y. Toma*
H. Saito, T. Yanaihara 41
- Adverse Effects of Injection Site with hMG
..... *T. Kinoshita, K. Ootaka & M. Itou* 47
- The Emotional Stress of Patients with Infertility Problems
..... *R. Watanabe, T. Goto, C. Kurahashi*
M. Sashiyama, T. Utsunomiya 51

Outcome of Seminal Tract Reanastomosis for Obstructive Azoospermia:

A Multi-Institutional Study

..... *T. Matsuda, T. Iwamoto, N. Ito, T. Ichikawa*
K. Miyaji, H. Tomomasa, M. Watanabe, K. Nagao
A. Iwasaki, T. Amano, M. Namiki, H. Hibi
S. Sasaki, H. Okuno, K. Matsumiya, H. Okada
A. Nagai, Y. Tokunaga, K. Ogura, H. Takihara
K. Shiraishi, K. Komatsu & J. Eguchi 57

Efficacy of Laparoscopic Linear Salpingotomy for Ectopic Pregnancies

..... *Y. Sato, H. Takeuchi & Y. Kuwabara* 65

Case report

Reversal of Male Infertility on Changing Treatment from Sulphasalazine to

5-aminosalicylic Acid in Ulcerative Colitis Patients: Report of Two cases

..... *H. Suzuki, A. Komiya, A. Shimizu, Y. Kawana,*
K. Suzuki, T. Ichikawa & Haruo Ito 71

ラットの実験的停留精巢における組織学的構築と クラステリン分布の変化

The Histological Changes and the Distribution of Clusterin in Experimental Cryptorchid Testes of Rats

| | | |
|---------------------|---------------------|------------------|
| 北村 朋之 | 麻生 太行 | 五十嵐 敦 |
| Tomoyuki KITAMURA | Takayuki ASO | Atsushi IGARASHI |
| 渡辺 政信 | 石崎 良太郎 | 吉田 英機 |
| Masanobu WATANABE | Ryotaro ISHIZAKI | Hideki YOSHIDA |
| 九島 巳樹 ¹⁾ | 太田 秀一 ²⁾ | |
| Miki KUSHIMA | Hidekazu OTA | |

昭和大学医学部泌尿器科学教室

Department of Urology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

¹⁾昭和大学病院病理部

Department of Hospital Pathology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

²⁾昭和大学第二病理学教室

Second Department of Pathology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

精巢障害時のSertoli cellにおけるクラステリン分泌動態は不明であるため、ラットの実験的停留精巢作成後、早期の組織学的変化に伴うクラステリン分布の変化を検討した。ラットに左停留精巢を作成し3日目、5日目、7日目の精巢を用い、1)停留精巢と対側精巢の重量とその比、精細管径とその比 2)PAS染色による組織学的評価 3)クラステリン免疫組織化学染色 4)Western blotによる蛋白の定性について検討した。1)精巢重量比、精細管径比とも経時的に有意に減少したが、停留精巢重量の減少はなかった。2)3日目よりround spermatid、spermatocyteの精細管腔への逸脱、elongate spermatidの核濃縮といった組織学的変化が観察され、7日目では生殖細胞数の減少とMultinucleated Giant Cellの出現、Sertoli cellの空胞形成が観察された。3)コントロール精巢と対側精巢ではSertoli cellの細胞質とspermのみクラステリンが染色され、停留精巢ではさらにspermatocyteとround spermatidにクラステリンが染色された。クラステリン陽性spermatocyte数は変化しなかったが、クラステリン陽性round spermatid数は有意に減少した。4)対側精巢、停留精巢とも48.7KDaと33.4KDaの間にすべての日数でバンドが観察された。停留精巢では早期から生殖細胞に組織学的変化が出現することが再確認され、それに伴ってクラステリンが生殖細胞にも出現することが認められた。このことはheat stressによりクラステリンの分布が変化するものと考えられた。

キーワード：クラステリン、実験的停留精巢、heat stress

緒 言

クラステリンは、最初にram rete testesより抽出された約80KDaの糖蛋白であり¹⁻³⁾様々な種、組織⁴⁻⁶⁾に存在する。クラステリンの働きとしては細胞の凝集、補体C5b-7に結合し細胞溶解の阻害作用⁴⁻⁶⁾などが報告されている。

我々は精液中のクラステリン濃度が血清中より高濃度であることを報告したが精液中クラステリン濃度と造精機能との関係を示すことは出来なかった⁷⁾。精巣内のクラステリン濃度も他の組織より高濃度に存在しSertoli cellにより分泌されており⁸⁻¹⁰⁾、精巣内クラステリンは精子の発育、分化に関係していると推測されているが^{8,11-13)}、障害された精巣でのクラステリンの検討はほとんどされていない。heat stressにより培養Sertoli cellからのクラステリン分泌がheat shock proteinと同様に早期に増加することが示唆されており⁸⁾、今回、heat stressのひとつと考える停留精巣をラットに作成し、作成後比較的早期と考える1週間以内における精巣の組織学的変化に伴うクラステリンの分布の変化を免疫組織化学染色により検討した。

対象および方法

1 実験動物

動物は、6週齢雄性Sprague-Dawley系ラットを用いた。処置前ラット3匹をコントロールとし、エーテル麻酔下に両側精巣を摘出した。左停留精巣作成法として、エーテル麻酔下に陰茎左側を切開し精索を固有漿膜に包まれたまま剥離した後精巣導帯を切開し脱転させた精巣を血流障害が起らないように腹壁に固定した。右側精巣を対側精巣とした。術後3日目、5日目、7日目に各々6匹ずつ両側精巣を摘出し、重量を測定した。

PAS染色とクラステリンの免疫組織化学染色にはBouin液に固定した精巣を用いた。固定は24時間としパラフィン包埋後薄切しPAS染色とクラステリンの免疫組織化学染色に使用した。

Western blotには、-80℃で凍結保存した精巣を用いた。

2 クラステリン免疫組織化学染色法

クラステリン免疫組織化学染色法は、脱パラフィン後、マイクロウェーブにて95℃、30分加熱し抗原性を賦活化させた後1次抗体として100倍希釈の抗ラットクラステリン抗体(Upstate Biotech Co.)を用

いて4℃、over nightで反応させた。2次抗体以降の反応は、LSAB2キット(DAKO Japan Co.)を使用した。

3 蛋白電気泳動法

Western blotには10%SDS-PAGEを用いた。サンプル15μl(蛋白濃度1.0g/dl)にサンプルbuffer5μl(0.125MTris-塩酸, PH6.8, 4%SDS, 20%glycerol, 10%2-mercaptoethanol)を加え、65℃、10分反応させた。マーカー5μl(Bio-Rad Laboratories)と調整したサンプル20μlを泳動した。ニトロセルロース膜(Bio-Rad Laboratories)にblotし400倍抗ラットクラステリン抗体を4℃、over nightで反応させた。1000倍希釈2次抗体で1時間反応させ、DABにて30分発色させ反応を止めた。

測定項目

1 精巣重量と精巣重量比

コントロール精巣、対側精巣、停留精巣における重量と精巣重量比%(停留精巣重量/対側精巣重量×100)の経時的変化を計測した。

2 精細管径と精細管径比

1精巣あたり40個の比較的円形に保たれている精細管の管径をマイクロメーターで計測した。コントロール精巣、対側精巣、停留精巣における精細管径と精細管径比%(停留精巣の精細管径/対側精巣の精細管径×100)の経時的変化を計測した。

3 組織学的評価

PAS染色した精巣組織を精細管のステージによりstage I-VI, VII-VIII, IX-XI, XII-XIVの4つに分けて、それぞれのステージ毎に観察した。

4 クラステリン免疫組織化学染色の定量的評価

クラステリン免疫染色が陽性となる生殖細胞数を検討するために精細管100個におけるクラステリン陽性生殖細胞を含む精細管数とクラステリン陽性生殖細胞数を種類別に計測した。

統計処理は、FisherのPLSD法を用いた。測定値はmean±SDで表した。

結 果

1 精巣重量と精巣重量比の経時的変化

対側精巣重量は日齢とともに増加しているが、停留精巣重量は経時的に有意な減少も増加も示さなかった。対側精巣重量と停留精巣重量を比較すると

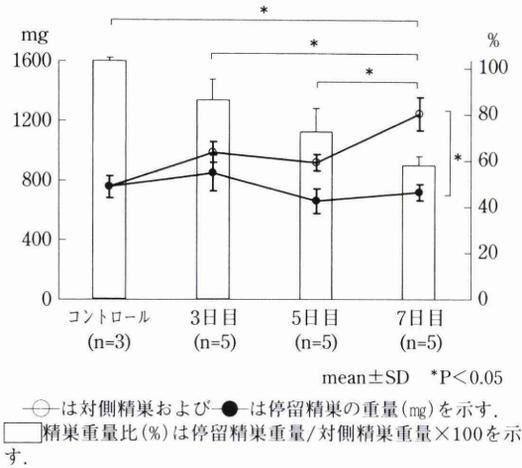


図1 精巣重量と精巣重量比の経時的変化

停留精巣重量は有意に小さく、さらに重量比(%)は経時的に有意に減少した(図1)。

2 精細管径と精細管径比の経時的変化

停留精巣の精細管径は3日目にはコントロール精巣

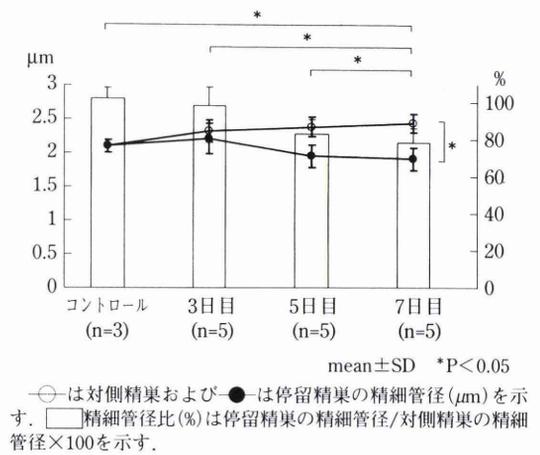
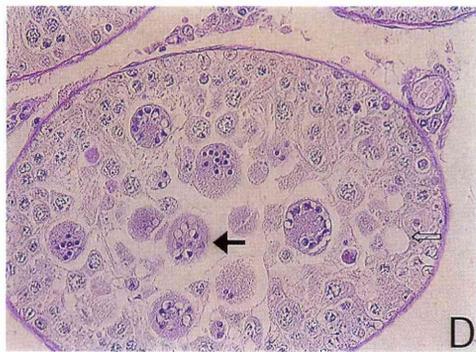
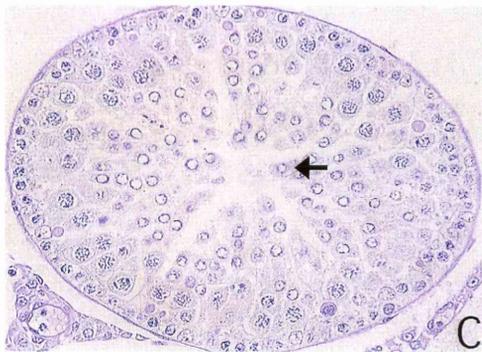
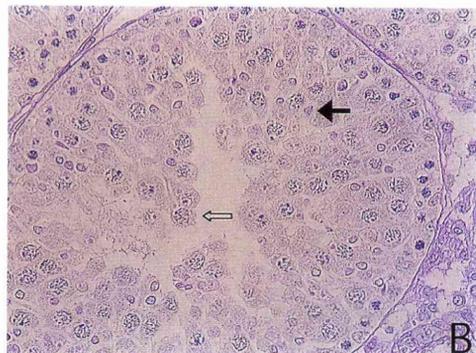
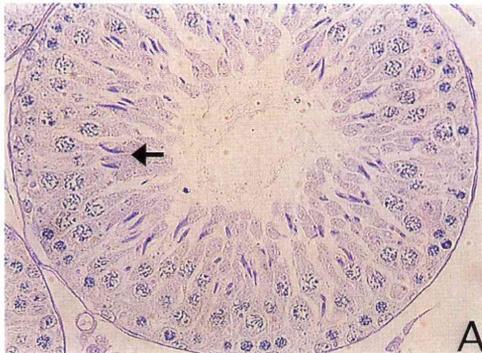


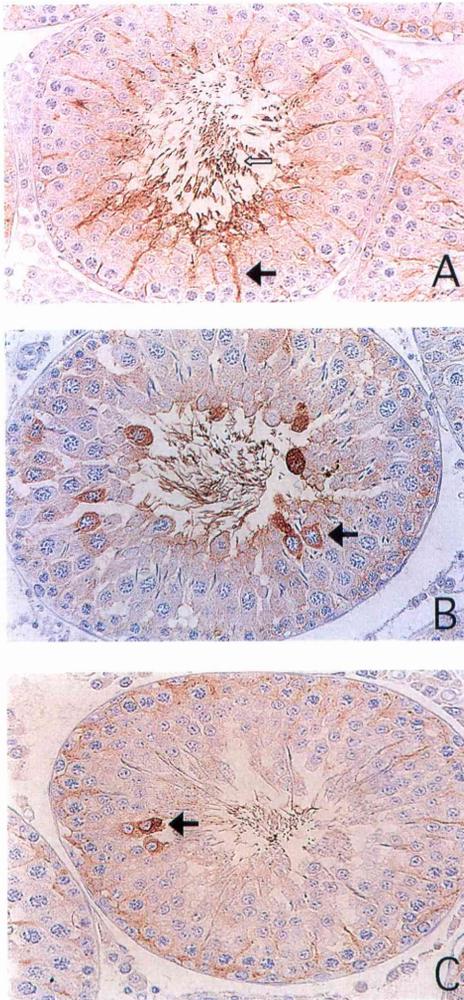
図2 精細管径と精細管径比の経時的変化

に対して変化を認めなかったが5日目、7日目には有意に減少した。対側精巣の精細管径に対しては有意に小さく、さらに精細管径比(%)は経時的に有意に減少した(図2)。



A: コントロール精巣stage XII-IIIではelongate spermatid(◀)を認め精子形成が確認される。
 B: 停留精巣3日目stage IX-XIではelongate spermatidの核濃縮(◀)とspermatocyteの精細管腔へ逸脱(⇨)が出現する。
 C: 停留精巣5日目stage VII-VIIIではround spermatidが精細管腔へ逸脱(◀)する。
 D: 停留精巣7日目においてSertoli cellに空胞形成(⇨)を認め、MGC(◀)が出現する。

図3 PAS染色による精巣組織障害の経時的変化(×400)



- A : コントロール精巣ではsertoli cellの細胞質(◀)とsperm(⇨)のみ染色された。
 B : 停留精巣3日目stage XII-ⅩⅣクラステリン陽性spermatocyte (◀)を示した。
 C : 停留精巣3日目stage VII-Ⅷのクラステリン陽性round spermatid (◀)を示した。

図4 クラステリン免疫組織化学染色(×400)

3 組織所見

6週齢のコントロール精巣では、すべてのステージでelongate spermatidが観察されspermiogenesisが確認された(図3, A)。停留精巣作成後3日目、5日目、7日目の対側精巣では日齢が進むにつれさらに分化は進み、精上皮細胞は6から7層となり精細管腔内に成熟したspermが観察された。停留精巣作成ラットの対側精巣の精子形成障害は観察されなかった。

停留精巣作成3日目の停留精巣において、stage VII-Ⅷの生殖細胞には変化がなく、stage I-VIのround

spermatidが精細管腔へ逸脱し、stage IX-Ⅹ(図3, B)とstage XII-ⅩⅣではelongate spermatidの核濃縮とspermatocyteの精細管腔への逸脱を認めた。停留精巣作成5日目の停留精巣では、stage I-VIのelongate spermatidとround spermatidの減少が著明となった。stage VII-Ⅷ(図3, C)で新たにround spermatidの精細管腔への逸脱を認めた。stage IX-Ⅹとstage XII-ⅩⅣではelongate spermatidの減少とspermatocyteの精細管腔への逸脱がさらに著明となった。停留精巣作成7日目の停留精巣では、すべてのstageでさらに細胞数が減少し、精細管腔へ逸脱したround spermatidによりMultinucleated Giant Cell(以下MGC)が形成された(図3, D)。Sertoli cellでは、細胞質に空胞形成が観察された(図3, D)。

4 クラステリン免疫組織化学染色

コントロール精巣と対側精巣では、Sertoli cellの細胞質とspermにクラステリンが染色され、生殖細胞ではクラステリンは染色されなかった(図4, A)。

停留精巣においてすべての日数で、Sertoli cellとspermでクラステリンが染色され、一部のspermatocyte(図4, B)とround spermatid(図4, C)の細胞質でクラステリンが染色されたが、spermatogoniaには認められなかった(図4, B, C)。染色されたround spermatidとspermatocyteは光顕上形態学的に正常な細胞であった。また、コントロール精巣、対側精巣、停留精巣のLeydig cellにはクラステリンは染色されなかった(図4)。

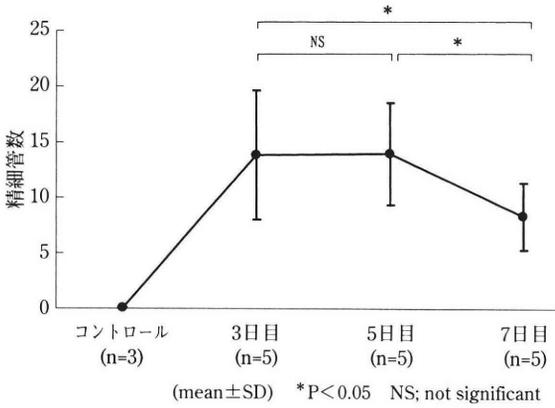
精細管ステージ毎の評価はクラステリン免疫染色陽性生殖細胞が少なかったため出来なかった。

5 クラステリン陽性生殖細胞を含む精細管数

コントロール精巣と対側精巣ではクラステリン陽性生殖細胞を含む精細管数は0個であったが、停留精巣では3日目 13.8 ± 5.8 個、5日目 13.9 ± 4.6 個を認めたが3日目と5日目との間には有意な差はなかった。7日目には 8.2 ± 3.0 個と3日目と5日目に対し有意に減少した(図5)。

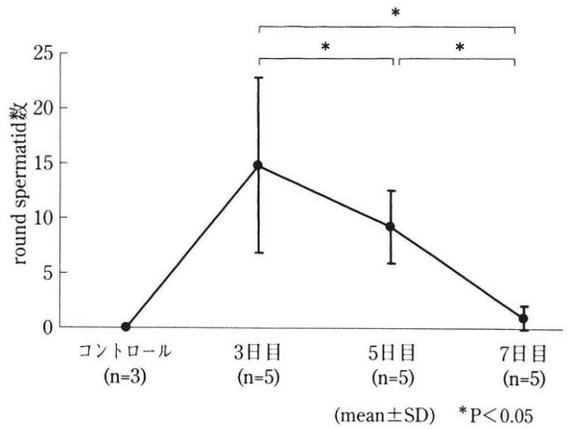
6 クラステリン陽性spermatocyte数

コントロール精巣と対側精巣ではクラステリン免疫染色されたspermatocyte数は0個であったが、停留精巣では3日目 9.5 ± 5.9 個、5日目 9.9 ± 5.6 個、7日目 9.3 ± 4.2 個を認め3日目以降には経時的変化は認めなかった(図6)。



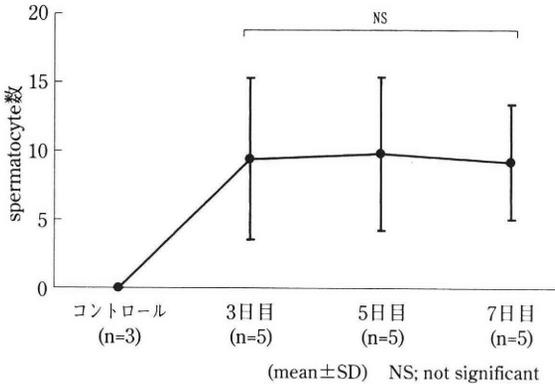
●は精細管100個に対するクラステリン陽性生殖細胞を有する精細管数を示す。

図5 クラステリン陽性生殖細胞を有する精細管数の変化



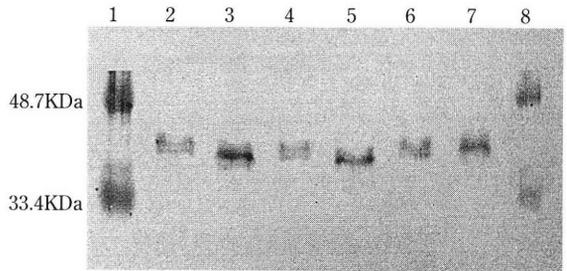
●は精細管100個に対するクラステリン陽性round spermatid数を示す。

図7 クラステリン陽性round spermatid数の変化



●は精細管100個に対するクラステリン陽性spermatocyte数を示す。

図6 クラステリン陽性spermatocyte数の変化



Lane 1, 8: マーカー, Lane 2: 対側精巣3日目, Lane 3: 停留精巣3日目, Lane 4: 対側精巣5日目, Lane 5: 停留精巣5日目, Lane 6: 対側精巣7日目, Lane 7: 停留精巣7日目

図8 Western blot

考 察

7 クラステリン陽性round spermatid数

コントロール精巣と対側精巣ではクラステリン免疫染色されたround spermatid数は0個であったが、停留精巣では3日目15.0±8.0個と著明な増加を認め、5日目9.3±3.4個、7日目0.9±1.1個とその後は経時的に有意に減少した(図7)。

8 Western blot

クラステリンは約40KDaの2つのsubunitが5つのジスルフィド結合により形成されている。2-mercaptoethanolによりジスルフィド結合が切断され対側精巣、停留精巣ともすべての日数で48.7KDaと33.4KDaの間にバンドが観察され対側精巣に対し停留精巣では濃く観察された(図8)。

停留精巣によるheat stressがもたらす精巣障害は以前から報告されているが^{14, 15)}、停留精巣による早期の組織学的変化の報告はDavisら¹⁶⁾以外にほとんど報告されておらず、クラステリンの分布についても検討されていない。今回我々は停留精巣作成後の比較的早期に精巣障害が起きることや、クラステリンがSertoli cellとsperm以外の生殖細胞に出現したことを初めて観察した。停留精巣作成後8週間の停留精巣の重量に有意な減少は認めなかったと報告されており¹⁴⁻¹⁶⁾、我々の早期の停留精巣でもコントロール精巣に対して有意な経時的減少は示していなかったが、対側精巣重量に対する重量比(%)で検討したところ有意に減少し、明らかに発育が抑制されたことが判明した。一方、精巣障害の指標でもある精細管径は早期から経時的減少を認め対側精巣の精細管径より有

意に小さくなっているが、精巣発育障害を容易に判断できるのは精巣重量とくに重量比(%)であると考えられた。

停留精巣によるheat stressがもたらす生殖細胞の変化はspermatocyte, round spermatid, elongate spermatidの核濃縮や精細管腔への逸脱であり、術後日数が進むに従いその組織障害が著明となり生殖細胞数が減少した。しかし、spermatogoniaには組織学的変化は観察されなかった。heat stressによる障害の変化をステージごとに比較すると、停留精巣3日目ではstage VII-VIII以外のすべてのステージでround spermatidやspermatocyteの精細管腔への逸脱やelongate spermatidの核の濃縮が観察された。比較的heat stressによる変化が少ないと言われているstage VII-VIIIでも7日目にはDavisら¹⁶⁾と同様にround spermatidの精細管腔への逸脱と生殖細胞数の減少が観察された。Sertoli cellの変化は7日目に観察され、その組織学的変化としてはtight junction complexの障害が原因と考えられている¹⁵⁾細胞質の空胞形成とMGCの出現であった。

精巣内クラスチリンはSertoli cellから分泌され⁸⁻¹⁰⁾、免疫染色とin situ hybridizationなどの検討からSertoli cellの細胞質とspermに存在することが確認されている^{12, 13, 17)}。我々の免疫組織化学的検討においてもコントロール精巣と対側精巣ではSertoli cellの細胞質とspermに染色され、生殖細胞には染色されなかった。一方、停留精巣では形態学的変化が生じたSertoli cellでもクラスチリンが染色され、さらに形態学的に保たれているround spermatidとspermatocyteにクラスチリンを認めた。精巣内クラスチリンはSertoli cellからのみ分泌されることが確認されており⁸⁻¹⁰⁾、round spermatidとspermatocyteに認められたクラスチリンはSertoli cellから移行したものと考えられた。生殖細胞数の減少に伴いクラスチリン陽性round spermatidも減少したが、クラスチリン陽性spermatocyteには変化なかった。クラスチリン陽性を示したround spermatidとspermatocyteの経時的変化に差があったことは興味深い結果であるが、その理由は今後の課題である。

Sertoli cellのクラスチリン分泌はtestosterone, LH, FSHには影響されずcell-cell interactionのautocrine, paracrineにより調節されていると考えられている^{10, 18-20)}が、他組織のクラスチリン分泌の増加は様々なstressにより誘導され^{21, 22)}、heat stressでもクラスチリン分泌が亢進することが観察されている。ラット

sertoli cell培養時に41℃のheat stressを加えるとsertoli cellから数時間でクラスチリンmRNAが増加することが観察され、クラスチリンの働きとしてheat stressにより変性した細胞から誘導される毒性物質や細胞の破片にクラスチリンが結合することにより細胞を保護していると考えられている⁸⁾。pachytene spermatocyte選択的阻害剤であるMethoxyacetic Acidをラットに投与すると組織学的な変化やapoptosisが出現する前の早い段階の光顕上正常なpachytene spermatocyteにクラスチリンが認められたことから、クラスチリンは変性した細胞から放出される有害な細胞成分を浄化したり、生殖細胞の細胞膜の再構築に関係しstressから生殖細胞の保護に関与しているのではないかと考えられている¹¹⁾。また、Human epidermoid carcinoma A431cellに45℃のheat stressを加えた場合と紫外線120J/cm²によるoxidative stressを加えた場合に出現するapoptosisがクラスチリンにより抑制され、クラスチリンがapoptosisを抑制する作用機序として1)heat shock proteinと同様に蛋白に結合しシャペロンとして働き細胞を保護すること、2)stressはreactive oxygen speciesを発生させたり、脂質の過酸化を起こすことによりapoptosisを誘導するが、クラスチリンは酸化を抑制することにより細胞を保護するという2つの仮説が報告されている²³⁾。さらにクラスチリンはheat stressを受けた蛋白に結合しHigh Molecular Weight Complexesを形成することにより蛋白の凝集を抑制し、シャペロンと同様な働きを示したと報告されている²⁴⁾。

以上のようにクラスチリンは細胞の保護に関与していることが示唆されており、今回の我々の実験において光顕上形態学的に正常なround spermatidとspermatocyteにクラスチリンが存在したのはheat stressに暴露された早期に生殖細胞を保護するためにクラスチリンがsertoli cellから生殖細胞に移行したものと推測した。

クラスチリン分泌量の定量的検討は行っていないが、Western blotにおいても停留精巣のクラスチリン分泌は確認され、停留精巣の方が対側精巣と比較してバンドの移動がわずかながら早く濃く観察されたので分泌が亢進し、低分子化の可能性もあるのではないかと考えられたので、停留精巣における経時的なクラスチリンの分泌量と低分子化については今後さらに検討する予定である。

文 献

- 1) Blaschuk O, Burdzy K and Fritz IB (1983) Purification and Characterization of a Cell-aggregating Factor (Clusterin), the Major Glycoprotein in Ram Rete Testis Fluid. *J Biol Chem* 258: 7714-7720
- 2) Collard MW and Griswold MD (1987) Biosynthesis and Molecular Cloning of Sulfated Glycoprotein 2 Secreted by Rat Sertoli Cells. *Biochemistry* 26: 3297-3303
- 3) Fritz IB, Burdzy K, Setchell B, et al. (1983) Ram Rete Testis Fluid Contains a Protein (Clusterin) Which Influences Cell-Cell Interactions In Vitro. *Biol Reprod* 28: 1173-1188
- 4) Rosenberg ME, Dvergsten J and Rotter RC (1993) Clusterin: An enigmatic protein recruited by diverse stimuli. *J Lab Clin Med* 121: 205-214
- 5) Jenne DE and Tschopp J (1992) Clusterin: the intriguing guises of a widely expressed glycoprotein. *TIBS* 17: 154-159
- 6) Rosenberg ME and Silkensen J (1995) Clusterin: Physiologic and Pathophysiologic Considerations. *Int. J Biochem Cell Biol* 27: 633-645
- 7) 金正民, 劉滬隆, 小橋川啓 他.(1996)男性不妊症におけるClusterin(SP-40,40)に関する研究. *昭和医学会誌* 56:133-139
- 8) Clark AM and Griswold MD (1997) Expression of Clusterin/Sulfated Glycoprotein-2 Under Conditions of Heat Stress in Rat Sertoli Cells and a Mouse Sertoli Cell Line. *Journal of Andrology* 18: 257-263
- 9) Roberts KP, Santulli R, Seiden J, et al. (1992) The Effect of Testosterone Withdrawal and Subsequent Germ Cell Depletion on Transferrin and Sulfated Glycoprotein-2 Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Adult Rat Testis. *Biol Reprod* 47: 92-96
- 10) Roberts KP, Awoniyi CA, Santulli R, et al. (1991) Regulation of Sertoli cell Transferrin and Sulfated Glycoprotein-2 Messenger Ribonucleic Acid Levels during the Restoration of Spermatogenesis in the Adult Hypophysectomized Rat. *Endocrinology* 129: 3417-3423
- 11) Clark AM, Maguire SM and Griswold MD (1997) Accumulation of Clusterin/Sulfated Glycoprotein-2 in Degenerating Pachytene Spermatocytes of Adult Rats Treated with Methoxyacetic Acid. *Biol Reprod* 57: 837-846
- 12) O'bryan MK, Mallidis C, Murphy BF, et al. (1994) Immunohistological Localization of Clusterin in the Male Genital Tract in Humans and Marmosets. *Biol Reprod* 50: 502-509
- 13) Ahuja HS, Tenniswood M, Lockshin R, et al. (1994) Expression of clusterin differentiation and cell death. *Biochem Cell Biol* 72: 523-530
- 14) Chowdhury AK and Steinberger E (1970) Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J Reprod Fert* 22: 205-212
- 15) 中村芳文 (1989) ラットの実験的停留精巢における精細管および精細管上皮の組織学的研究. *西日泌尿* 51: 1871-1880
- 16) Davis JR and Firlit CF (1966) The Germinal Epithelium of Cryptorchid Testes Experimentally Induced in Prepubertal and Adult Rats. *Fertil Steril* 17: 187-200
- 17) Tung PS and Fritz IB (1985) Immunolocalization of Clusterin in the Ram Testis, Rete Testis, and Excurrent Ducts. *Biol Reprod* 33: 177-186
- 18) Frasoldati A, Zoli M, Rommerts FFG, et al. (1995) Temporal changes in sulfated glycoprotein-2 (clusterin) and ornithine decarboxylase mRNA levels in the rat testis after ethane-dimethane sulphate-induced degeneration of leydig cells. *Int J Androl* 18: 46-54
- 19) Onoda M and Djakiew D (1990) Moduration of Sertoli cell function by rat round spermatid protein (s). *Mol Cell Endocrinol* 73: 35-44
- 20) Onoda M and Djakiew D (1991) Pachytene spermatocyte protein (s) stimulate sertoli cells grown in bicameral chambers: dose-dependent secretion of ceruloplasmin, sulfated glycoprotein-1, sulfated glycoprotein-2, and transferrin. *In Vitro Cell Dev Biol* 27A: 215-222
- 21) Silkensen JR, Schwochau GB and Rosenberg ME (1994) The role of clusterin in tissue injury. *Biochem Cell Biol* 72: 483-488
- 22) Michel D, Chatelain G, North S, et al. (1997) Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* 328: 45-50
- 23) Viard I, Wehrli P, Bullani R, et al. (1999) Clusterin gene expression mediates resistance to apoptotic cell death induced by heat shock and oxidative stress. *J Invest Derm* 112: 290-296
- 24) Huphreys DT, Carver JA, Easterbrook-Smith SB, et al. (1999) Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *J Biol Chem* 274: 6875-6881

(受付: 1999年10月22日)

(受理: 2000年1月22日)

The Histological Changes and the Distribution of Clusterin in Experimental Cryptorchid Testes of Rats

Tomoyuki Kitamura, Takayuki Aso, Atsushi Igarashi, Masanobu Watanabe,
Ryotaro Ishizaki, Hideki Yoshida, Miki Kushima¹⁾ and Hidekazu Ota²⁾

Department of Urology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

¹⁾Department of Hospital Pathology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

²⁾Second Department of Pathology, School of Medicine, Showa University,
Tokyo 142-8666, Japan

The purpose of this study was to investigate the histological changes and the distribution of clusterin in experimental cryptorchid testes of rats. We examined the cryptorchid testes and the opposite testes at 3, 5, and 7 days after the creation of experimental cryptorchidism. Relative to the opposite testes, the weight and the seminiferous tubule diameter were significantly decreased in the cryptorchid testes after the operation, but the actual weight of the cryptorchid testes were not changed. Prominent histological findings were exfoliation of round spermatids and spermatocytes toward the lumens of the seminiferous tubules, as well as pyknosis of elongate spermatids. Vacuoles in the Sertoli cells and Multinucleated Giant Cell were observed at 7 days. Clusterin immunostaining was positive on the sperm and throughout the cytoplasm of Sertoli cells in the normal testes. In addition, clusterin was localized in the cytoplasm of spermatocytes and round spermatids after 3, 5, and 7 days in the cryptorchid testes. We counted the number of clusterin-positive germ cells per hundred seminiferous tubules. The number of clusterin-positive spermatocytes were not changed, but the number of clusterin-positive round spermatids were decreased. All testes at each time after the operation showed migration to about 40 KDa by Western blot. In conclusion, testicular damage developed and clusterin was localized to the spermatocytes and the round spermatids at an early period in experimental cryptorchid testes. These results suggest that the distribution of clusterin is changed by heat stress induced in the experimental cryptorchid testes.

Key words: clusterin, experimental cryptorchidism, heat stress

(Jpn J Fertil Steril 45:87-94 2000)

ヒト精子の運動能力と形態異常がIVF-ETにおける受精率 および妊娠率に与える影響について

Influence of Human Sperm Motility Ability and Sperm Morphology on Fertilization Rate and Pregnancy Rate in Conventional IVF

| | | |
|-----------------------|----------------|----------------|
| 島田 知代 | 野尻 恵子 | 原田 真木子 |
| Tomoyo SHIMADA | Keiko NOJIRI | Makiko HARADA |
| 浜井 晴喜 | 加藤 浩志 | 半田 雅文 |
| Haruki HAMAI | Hiroshi KATO | Masafumi HANDA |
| 小林 真一郎 | 磯島 晋三 | |
| Shin-ichiro KOBAYASHI | Shinzo ISOJIMA | |

生長会 府中病院不妊センター

Advanced Fertility Center, Fuchu Hospital,
Osaka 594-0076, Japan

IVF-ETを施行するにあたり、あらかじめ精子の受精能力を判定しておくことは重要である。当センターでは、一般精液検査に加えて、1996年11月から客観的に精液のQualityを評価するSperm Quality Analyzer (SQA)を用いたSperm Motility Index (SMI)の測定を行い、1998年3月からは正常形態精子14%以上で受精率が有意に高値をとることが報告されているKruger's strict criteria (KSC)を新たに導入した。今回、SMI、KSCがIVF-ETの受精を予測する指標となり得るか検討したので報告する。1996年11月から1997年7月の間に当センターにてIVF-ETを施行した157症例のSMIと運動精子濃度の関係を検討したところ、強い相関がみられた。また、SMI100以上をG群、50以上100未満をM群、50未満をP群の3グループに分類し、受精率、妊娠率との関係を検討したところ、P群では受精率13.7%、妊娠率0%、M群では34.9%、10.5%、G群では68.5%、28.8%でありSMI100以上で受精率、妊娠率共に有意に高値を示した。また、1998年3月から同年8月の間にIVF-ETを施行した55症例をSMI100以上でKSC14%以上、SMI100以上でKSC14%未満、SMI100未満でKSC14%以上、SMI100未満でKSC14%未満の4グループに分類し、受精率、良好胚形成率、妊娠率との関係を検討したところ、SMI100以上でKSC14%以上のグループでは受精率84.0%、良好胚形成率41.0%、妊娠率42.9%に対し、SMI100以上でKSC14%未満のグループではそれぞれ67.3%、14.7%、6.7%であり、両グループ間に有意な差がみられた。以上の結果より、IVF-ET施行にあたり精子の受精能力、さらに妊娠の可能性の評価を行う場合は、SMIのみならずKSCを参考にすることが重要であると思われた。

キーワード：精子受精能力、体外受精、sperm quality analyzer、sperm motility index、Kruger's strict criteria

(日不妊会誌 45:95-100 2000)

緒 言

近年、顕微授精：Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI)の技術確立により、男性不妊患者に対する治療成績は飛躍的に向上した。高度の乏精子症や精巣精子を用いる場合は無条件にICSIの適応となり得るが、採卵当日の精液所見によりIVF施行が可能であるか否か極めて疑問であるような、いわばIVFとICSIのボーダーライン上の症例も数多く存在し、より適切な治療法を決定する必要性が生じてきている。そこで、精子濃度や運動率などの一般精液検査に加えて、精子の受精能力をあらかじめ判定しておくことが重要である。当センターではSperm Quality Analyzer (SQA)を用いてSperm Motility Index (SMI)を測定しており、精子のQualityを示す指標としている。SMIは精子濃度と運動速度が上昇するほど高値を示し、SMI160以上では受精率が有意に高値を示すことが報告されている¹⁾が、実際にはSMIが良好の場合でも通常のIVF-ETでは受精が成立しない場合とか、あるいは受精率が極めて低い症例も存在する。そこでさらに、正常形態精子14%以上でIVF-ETの受精率が有意に高値を示すことが報告されている²⁾Kruger's Strict Criteria (KSC)を新たに受精能の指標として用い、SMI、KSCがIVF-ETの受精率を予測する指標となり得るか検討したので報告する。

対象および方法

1 対象-(1)

1996年11月から1997年7月の間に府中病院不妊センターにおいてIVF-ETおよびSQAによる精液検査を施行した157症例を対象として、SMIと運動精子濃度との関係を調べた。また、同時期にSMIとIVFにおける受精率、妊娠率との関係も調べた。患者(妻)の平均年齢は33.3±4.1歳、IVFの適応は卵管因子が50例、男性因子が22例、子宮内膜症が17例、免疫因子(精子不活化抗体保有婦人)が5例、原因不明が63例であった。

2 対象-(2)

1998年3月から同年8月の間に府中病院不妊センターにおいて一般精液検査を施行した115症例を対象として、SMIとKSCとの関係を調べた。また、同時期にIVF-ETを施行した55症例を対象として、SMI、KSCとIVFにおける受精率、良好胚形成率、妊娠率との関係を調べた。患者(妻)の平均年齢は33.8±3.5歳、IVFの適応は卵管因子が17例、男性因子が

5例、子宮内膜症が3例、免疫因子(精子不活化抗体保有婦人)が2例、原因不明が28例であった。

3 方法

1) 精液検査

IVFを施行する患者より得られた精液を室温にて約30分放置して充分液化させた後、精液量、粘性、色調、精子濃度、運動率、奇形率を測定した。

2) SMIの測定

Sperm Quality Analyzer (SQA: United Medical Systems, USA)を用いてSperm Motility Index (SMI)を測定した。概要を以下に示す。液化した精液を十分に攪拌し、精子を均一にした後、毛細管現象により精液をSQA専用キャピラリー内に注入する。キャピラリーを本体測定部に挿入し、測定を開始する。キャピラリーはガラスで出来ており、読みとり孔に10秒間光を照射し続ける間にこの光を遮断する精子の影を光学密度波動の変化としてとらえ、それをデジタル化してSMIとして表示する。総運動精子数が上昇するほどSMIは高くなる。

3) Kruger's Strict Criteria

T.F.Krugerら²⁾の方法に従って行った。以下にその手順を簡単に示す。Swim-up法により回収した精子調整液をスライドガラス上に1滴滴下し、精子が重ならないようカバーガラスで軽く引き伸ばした後、室温にて自然乾燥させた。その後、Diff-Quik染色キット(国際試薬株式会社)を用いて染色した。固定液(Methyl Alcohol)で15秒固定、Solution1(Xanthene)で10秒、Solution2(Azuru A+Methylene Blue)で5秒染色し、過剰な液は蒸留水でゆっくりと除去した。室温で自然乾燥後、その日のうちに位相差顕微鏡倍率1000倍で1検体あたり200個の精子を観察した。正常形態精子の判定基準は、T.F.Krugerら²⁾の基準に従った。

4) IVF-ET

Gn-RH agonist(スプレクチャー®:ヘキスト薬品工業)をロングプロトコールで使用し、月経周期3日目からFSH(フェルティノーム-P®:セローノジャパン)150IUを3日間投与(患者年齢が35歳以上の場合はFSH225IUを3日間投与)し、その後、hMG(パーゴグリン®:セローノジャパン)150IUを連日投与した。直径17mm以上の卵胞が2個以上認められた時点でhCG(プロファシー®:セローノジャパン)5000単位を投与し、その37時間後に経膈超音波ガイド下に採卵を行った。得られた卵はEarle's Balanced Salt Solution(EBSS:GIBCO BRL,U.S.A)で十分に洗浄

し、約2時間の前培養後INRA Menezo B₂ Medium (LABORATOIRE C.C.D., France)に交換して媒精を行った。媒精に用いた精子は、用手的に採取した精液を充分液化後、EBSSで3回遠心洗浄し、Swim-up法により運動精子を回収した。媒精に用いる最終精子濃度は5~10×10⁶/mlに調整した。採卵の2~3日後に正常に分割した2~8細胞胚を患者子宮腔内に移植した。移植胚数は3個以下とした。

5) 統計学的検討

SMIと運動精子濃度、SMIとKSCの相関については回帰分析を、その他の差異についてはカイ2乗検定を用い、P<0.05で有意差ありと判定した。

結 果

1 結果(1)-1 SMIと運動精子濃度との関係

当センターで精液検査を受けた157症例におけるSMIと運動精子濃度の相関をみたグラフを図1に示す。相関係数R=0.723、危険率Pは0.01未満で強い正の相関がみられた。

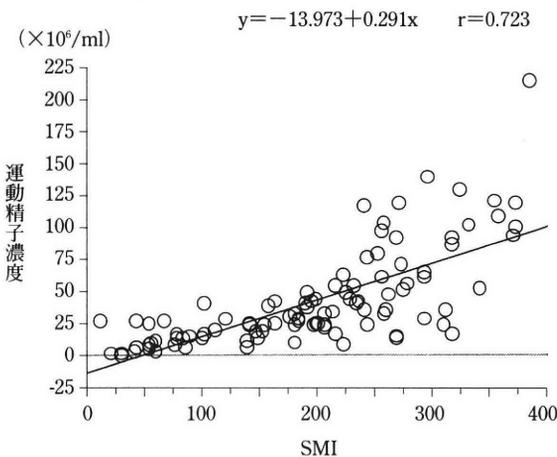


図1 SMIと運動精子濃度との関係

2 結果(1)-2 IVF-ETにおけるSMIと受精率との関係

IVF-ETを施行した157症例のうちSMI100以上をG群(132症例)、50以上100未満をM群(19症例)、50未満をP群(6症例)に分類した。それぞれの採卵個数あたりの受精率は、G群では68.5%(575/840)、M群では34.9%(45/129)、P群では13.7%(7/51)であり、M群とP群の間(P<0.01)と、M群とG群の間(P<0.01)、G群とP群の間(P<0.01)にそれぞれ有意差がみられた(図2)。

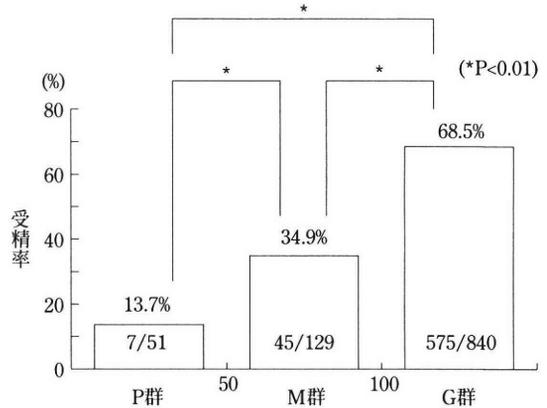


図2 IVF-ETにおけるSMIと受精率との関係

3 結果(1)-3 IVF-ETにおけるSMIと妊娠率との関係

各群の採卵あたりの妊娠率は、G群では28.8%(38/132)、M群では10.5%(2/19)、P群では0%(0/6)であった(図3)。各群間において統計学的有意差は認められなかったが、G群において妊娠率が他群よりも高い傾向が認められた。

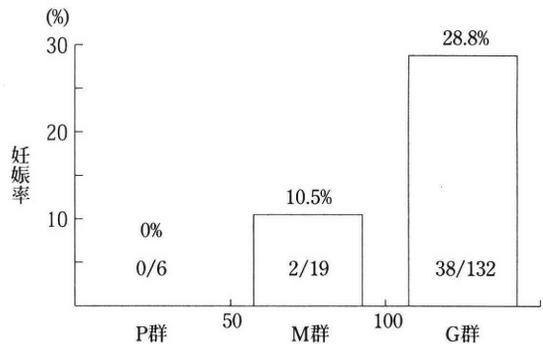


図3 IVF-ETにおけるSMIと妊娠率との関係

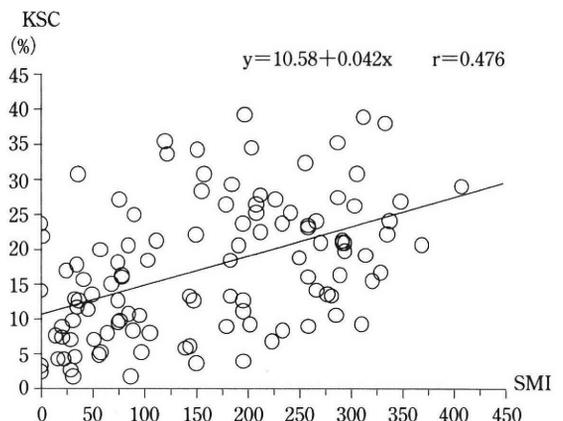


図4 SMIとKSCとの関係

4 結果(2)-1 SMIとKSCとの関係

当センターで精液検査を受けた115症例におけるSMIとKSCの相関をみたグラフを図4に示す。相関係数 $r=0.476$ 、危険率 P は0.01で弱い相関がみられた。

5 結果(2)-2 IVF-ETにおけるSMI、KSCと受精率との関係

IVF-ETを施行した55症例を、SMI100以上KSC14%以上、SMI100以上KSC14%未満、SMI100未満KSC14%以上、SMI100未満KSC14%未満の4グループに分類した。それぞれの採卵個数あたりの受精率は、SMI100以上KSC14%以上で84.0%(200/238)、SMI100以上KSC14%未満で67.3%(68/101)であり、両グループ間に有意差がみられた($P<0.01$)。同様に、SMI100未満KSC14%以上で95.0%(19/20)、SMI100未満KSC14%未満で56.3%(9/16)でありこの両グループ間にも有意差がみられた($P<0.01$) (表1)。

表1 IVF-ETにおけるSMI、KSCと受精率との関係

| | 100 \leq SMI | 50 \leq SMI<100 |
|----------------|---------------------|---------------------------|
| 14% \leq KSC | 84.0%* (200/238) | 95.0%** (19/20) |
| KSC<14% | 67.3%* (68/101) | 56.3%** (9/16) |
| | | * $P<0.01$ ** $P<0.01$ |

6 結果(2)-3 IVF-ETにおけるSMI、KSCと良好胚形成率との関係

Veeck分類³⁾のgrade1以上を良好胚と定義し、受精卵あたりの良好胚形成率を各グループ間で検討したところ、SMI100以上KSC14%以上で41.0%(82/200)、SMI100以上KSC14%未満で14.7%(10/68)、SMI100未満KSC14%以上で26.3%(5/19)、SMI100未満KSC14%未満で22.2%(2/9)であり、SMI100以上の両グループ間に有意差がみられた($P<0.01$) (表2)。

表2 IVF-ETにおけるSMI、KSCと良好胚形成率との関係

| | 100 \leq SMI | 50 \leq SMI<100 |
|----------------|--------------------|-------------------|
| 14% \leq KSC | 41.0%* (82/200) | 26.3% (5/19) |
| KSC<14% | 14.7%* (10/68) | 22.2% (2/9) |
| | | * $P<0.01$ |

7 結果(2)-4 IVF-ETにおけるSMI、KSCと妊娠率との関係

採卵あたりの妊娠率は、SMI100以上KSC14%以上

表3 IVF-ETにおけるSMI、KSCと妊娠率との関係

| | 100 \leq SMI | 50 \leq SMI<100 |
|----------------|-------------------|-------------------|
| 14% \leq KSC | 42.9%* (15/35) | (1/3) |
| KSC<14% | 6.7%* (1/15) | (1/2) |
| | | * $P<0.02$ |

で42.9%(15/35)、SMI100以上KSC14%未満で6.7%(1/15)であり、両グループ間に有意差がみられた($P<0.02$) (表3)。

今回の対象症例中、SMIが100以上を示したのにも関わらず、IVFでの受精率が著しく低率で、しかも受精卵のgradeも不良な症例に対して、その後、正常形態精子を用いてICSIを施行したところ妊娠に至った症例が2例存在した。この2例ともKSCは10%未満と不良であった。

考 察

ICSIという画期的な治療法の開発により、極度の男性不妊においても挙児を得る事が可能になったが、同時に精液所見がIVFとICSIのボーダーライン上の患者に対して、早期に、より適切な治療法を決定する必要性が生じてきた。IVF開始当初から、精子濃度と運動性は、IVFの成功を予測する上で重要なパラメーターであり、IVF可能か否かのLimiting factorと成り得ると考えられていた⁴⁾。しかしながら、精子濃度と運動率の測定は観察者の主観にも左右されやすく、ある一定以上の活動を有する運動精子数の判定には不十分であった。実際、精子濃度と運動率だけではIVFにおける受精能力の予想は困難な事が多い。最近では、コンピューターを用いて客観的に精液のクオリティーを評価するComputer Assisted Semen Analyzer (CASA)が開発され、臨床的に応用されているが、このシステムは非常に高価であるため、一般病院では導入が困難である。そこで、当センターでは1996年より安価でかつ操作が簡便なSperm Quality Analyzer (SQA)を取り入れた。SQAの測定値であるSMIは一般精液検査値に加え、他の精子機能検査(CASA, HOS Test, ハムスターテスト)や、受精率・妊娠率とも相関があると報告されており^{1,5,6)}、今回の我々の結果でも、SMIは運動精子濃度と強い相関を示し、SMI100以上の場合IVF-ETにおいて受精率、妊娠率が有意に上昇することが明らかとなった。しかし、実際治療を行っていく上で、精子濃度、運動率そしてSMIが良好であるにも

関わらず、IVFにおいて受精が成立しない原因不明受精障害もまれではあるが存在する。従って、ヒト精子が受精するためには、ある一定以上の運動能力を有することが必要条件ではあるが、さらに、アクロゾームの比率まで含めたmorphologyも考慮しなければならないと考え、今回、正常率が14%以上で受精率が有意に高値を示すことが報告されている²⁾

Kruger's Strict Criteria (KSC)を使用した。KSCとは、精子を染色してアクロゾームの形態により精子を正常、奇形に分類する評価法で、KSCと受精率の相関を示す論文も数多く報告されている⁷⁻⁹⁾。

最初に、SMIとKSCの関係を検討したところ、弱い相関はみられるものの、臨床応用可能な強い相関はみられなかった。このことは、SMIは精子の運動性を、一方KSCは精子の形態を観察しており、別の観点から精子機能を評価しているためと考えられる。次に、1998年3月から同年8月の間にIVE-ETを施行した55症例を、SMI100以上KSC14%以上、SMI100以上KSC14%未満、SMI100未満KSC14%以上、SMI100未満KSC14%未満の4グループに分類し、受精率、良好胚形成率、妊娠率を比較検討したところ、SMI100以上KSC14%以上の受精率は84.0%、良好胚形成率は41.0%、妊娠率は42.9%、一方SMI100以上KSC14%未満ではそれぞれ67.3%、14.7%、6.7%であり、このSMIが100以上を示す2つのグループ間において、KSCが14%未満であれば受精率、良好胚形成率、妊娠率はすべてKSC14%以上のグループより低率となった。以上のことより、SMIが100以上を示す場合はIVFにおいて受精成立を見る確立は高いと予測してよいが、良好胚形成率や妊娠率の予測まではやや困難であると思われた。今後、IVF-ETを施行するに際して、精子の受精能力の評価にSMIとKSCを用いるcombination評価により、よりの確かな予測が可能になることが考えられた。

また、KSCが不良な症例で、IVF-ETにおいて受精率が低く、さらに良好胚が形成されない場合は、ICSIを施行することも考慮されるべきであると考えられる。Oehningerら¹⁰⁾はKSC不良な症例に対して、conventional-IVFよりもICSIの方が胚のgrade、着床率、妊娠率が良好であったと報告している。また、Svalanderら¹¹⁾およびLundinら¹²⁾は、ICSI施行症例をsperm morphologyにより分類し、受精率、着床率、妊娠率につき検討しているが、各々のグループ間に有意差は認められず、極力正常形態精子を選別した上でICSIを施行することにより、精子の形態異常に基づく妊孕性の低下は克服できると報告してい

る。我々も今回の対象検討中、2症例においてそれを経験した。今後、さらに精子の運動能力および形態の両者に注目し、検討を加えた上でIVF-ETあるいはICSIの適応基準を考えていく必要があるものと考えられる。

文 献

- 1) 内藤子来, 柴原浩章, 長谷川昭子 他(1996) 精子受精機能評価法としてのSperm Quality Analyzer (SQA)の有用性の検討. 日不妊会誌 41:280-284
- 2) Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, et al. (1986) Sperm morphologic features as a prognostic factor in *in vitro* fertilization. Fertil Steril 46:1118-1123
- 3) Veeck LL (1991) Atlas of Human Oocyte and Early Concepts. Vol.2, Williams & Wilkins Co, Baltimore, MD, USA.
- 4) Mahadevan MM and Trounson AO (1984) The influence of seminal characteristics on the success rate of human *in vitro* fertilization. Fertil Steril 42: 400-405
- 5) 風間泰蔵, 太田昌一郎, 岩崎雅志 他(1998) 精液検査におけるSperm Quality Analyzerの有用性. 日不妊会誌 43:17-21
- 6) 森 明人, 中村佐知子, 沖 利通 他(1995) Sperm Quality Analyzerによる精子受精能の評価. 日不妊会誌 40:14-17
- 7) Kobayashi T, Jinno M, Sugimura K, et al. (1991) Sperm morphological assessment based on strict criteria and *in-vitro* fertilization outcome. Hum Reprod 6:983-986
- 8) Enginsu ME, Dumoulin JCM, Pieters MHEC, et al. (1991) Evaluation of human sperm morphology using strict criteria after Diff-Quik staining: correlation of morphology with fertilization *in vitro*. Hum Reprod 6:854-858
- 9) 高野陽子, ポール・キハイレ, 広津留恵子 他 (1999) Strict Criteriaによる精子形態評価のIVFに対する有用性. 日不妊会誌 44:1-6
- 10) Oehninger S, Kruger T F, Simon T, et al. (1996) A comparative analysis of embryo implantation potential in patients with severe teratozoospermia undergoing *in-vitro* fertilization with a high insemination concentration or intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 11:1086-1089
- 11) Svalander P, Jakobsson AH, Forsberg AS, et al. (1996) The outcome of intracytoplasmic sperm injection is unrelated to 'strict criteria' sperm morphology. Hum Reprod 11:1019-1022
- 12) Lundin K, Soderlund B and Hamberger L (1997) The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous

abortion in an *in-vitro* fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. Hum Reprod 12:2676-2681

(受付: 1999年10月25日)

(受理: 2000年1月25日)

Influence of Human Sperm Motility Ability and Sperm Morphology on Fertilization Rate and Pregnancy Rate in Conventional IVF

Tomoyo Shimada, Keiko Nojiri, Makiko Harada, Haruki Hamai,
Hiroshi Katoh, Masafumi Handa, Shin-ichiro Kobayashi and Shinzo Isojima

Advanced Fertility Center, Fuchu Hospital,
Osaka 594-0076, Japan

Kruger's Strict Criteria (KSC) and Sperm Motility Index (SMI) calculated by a Sperm Quality Analyzer were used to evaluate the fertilization ability of sperm in conventional IVF. Patients between November 1996 and July 1997 were divided into 3 groups by SMI on oocyte aspiration day. The fertilization and pregnancy rates were 68.5% (575/840) and 28.8% (38/132) respectively in group G ($SMI \geq 100$). They were 34.9% (45/129) and 10.5% (2/19) in group M ($100 > SMI \geq 50$) respectively. In group P ($50 > SMI$), they were 13.7% (7/51) and 0% (0/6). Higher fertilization and pregnancy rates were recognized in group G than other groups. The fertilization ability of sperm taken from patients between March 1998 and August 1998 were also examined using SMI and KSC. In the normal KSC group ($KSC \geq 14\%$, $SMI \geq 100$), fertilization and pregnancy rates were 84.0% (200/238) and 42.9% (15/35) respectively, but in the subnormal KSC group ($14\% > KSC$, $SMI \geq 100$), they were 67.3% (68/101) and 6.7% (1/15). The normal and subnormal groups showed statistical differences between the fertilization rate ($P < 0.01$) and pregnancy rate ($P < 0.02$). Combined estimations using KSC and SMI could predict the fertilization and pregnancy possibilities for conventional IVF.

Key words : fertilization ability, IVF, sperm quality analyzer, sperm motility index, Kruger's strict criteria

(Jpn J Fertil Steril 45:95-100 2000)

免疫抑制剤によるラット造精機能障害 —PCNAの免疫組織染色による検討—

Quantitative Analysis of Rat Spermatogenic Injury by Immunosuppressive Drugs Using the Method of Proliferating Cell Nuclear Antigen

岩崎 雅志
Masashi IWASAKI
太田 昌一郎
Shoichiro OHTA

池原 葉子
Yoko IKEHARA
永川 修
Osamu NAGAKAWA

村上 康一
Koichi MURAKAMI
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

免疫抑制剤であるCyclosporine (Cs), Azathioprine (AZP) およびMizoribine (MZR) のラット造精機能への影響をproliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫組織染色を用いて検討した。

8週齢のSprague-Dawley系ラットをコントロール群, Cs (10~80mg/kg), AZP (5~20mg/kg) およびMZR (2.5~20mg/kg) を投与した群に分けた。投与終了時, 投与終了後2週, 4週および6週において精巣, 精巣上体重量の測定および精祖細胞でのPCNA陽性細胞の比率の算定を行なった。

臓器重量はCsでは投与終了時に40mg/kg投与群で精巣上体尾部の重量低下 ($p < 0.05$) がみられたが投与終了後2週より回復した。AZPおよびMZRでは変化はみられなかった。精巣重量はいずれの時点でも3剤とも変化はみられなかった。精祖細胞におけるPCNA陽性率では3剤とも投与終了時にそれぞれの最高投与量にて有意な低下を認めており, 少なくとも3剤とも精祖細胞への障害が推定された。

キーワード: 免疫抑制剤, 造精機能, PCNA, ラット

(日不妊誌 45:101-105 2000)

緒 言

強力な免疫抑制剤の開発により腎移植の治療成績は飛躍的に向上している¹⁻³⁾。一方で種々の副作用も報告されており, とくに生殖期の男性にとっては重大なものとして造精機能障害の報告⁴⁻⁶⁾もあり注目されている。以前, 免疫抑制剤のCyclosporine (Cs), Azathioprine (AZP) およびMizoribine (MZR) を用いてラット造精機能への影響を検討したが^{7,8)}, 今回造精機能障害を評価する上でその有用性が注目されている⁹⁻¹¹⁾ proliferating cell nuclear antigen (以下PCNA) の免疫組織染色を用いてその障害をDNA合成能の観

点から検討したので報告する。

対象および方法

8週齢のSprague-Dawley系ラットを用いた。免疫抑制剤としてCs (Sandoz社), AZP (Sigma社), MZR (旭化成工業) を使用し, 以下のようにグループ分けした。すなわちコントロール群 (vehicleのみ投与: 蒸留水およびオリーブ油), Cs を体重1kgあたり10, 20, 40および80mg投与した群, AZPを5, 10および20mg, MZRを2.5, 5, 10および20mg投与した群に分けた。投与方法は経口にて2週間連続投与した。投与終了時, 投与終了後2週, 4週および6週において断

- 1) パラフィン包埋組織による切片作成(5 μ m)
- 2) 脱パラフィン後, エタノール処理
- 3) 3% H_2O_2 溶液にて, 内因性ペルオキシダーゼをブロッキング後TBS(Tris Buffered Saline)にて洗浄
- 4) 抗PCNAモノクロナール抗体(EPOS-PC10)にて30~60分間反応後, TBSにて洗浄
- 5) DAB(diaminobenzidine tetrahydrochloride)にて発色後, 洗浄
- 6) メチルグリーンにて対比染色
- 7) 脱水, 透徹, 封入
- 8) 光学顕微鏡下, それぞれの検体20個の精細管を観察, 精祖細胞における陽性細胞の比率を算定

図1 Proliferating cell nuclear antigen(PCNA)免疫組織染色法

頭にて屠殺した後, 精巣および精巣上体を摘出して重量測定を行なった。また, 精巣組織に対してPCNAを用いた免疫組織染色を図1の如く施行した。すなわち, ブアン液にて固定後パラフィン包埋組織による5 μ mの切片を作製し脱パラフィン後, 内因性ペルオキシダーゼおよび非特異反応をブロッキングした。抗PCNAモノクロナール抗体(EPOS-PC10, Sigma)を用いて反応後, DAB(diaminobenzidine tetrahydrochloride)にて発色させ, その後メチルグリーンにて対比染色を施行した。陰性コントロールは抗PCNAモノクロナール抗体のかわりに同量のTris Buffered Salineを反応させ, 以後まったく同様に処理したものとした。組織所見の評価には光学顕微鏡下にてそれぞれの検体で20個の精細管を観察し, 精祖細胞におけるPCNA陽性細胞の比率を算定した。

有意差検定は各観察時期においてunpaired Student's t-testを用いてコントロール群(Csはオリーブ油, AZPおよびMZRは蒸留水)に対して施行した。なお, 危険率5%以下を有意差ありとした。

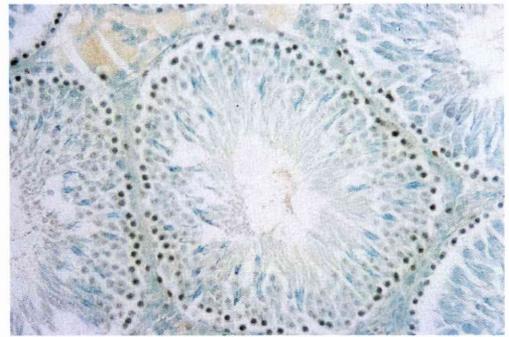
結 果

1 臓器重量

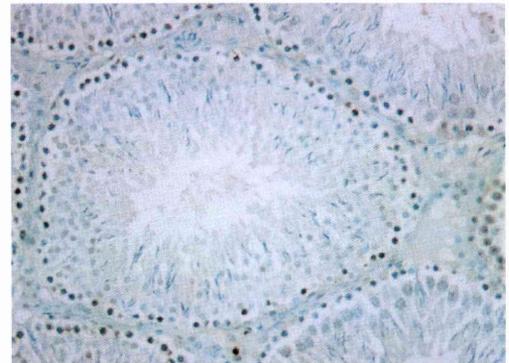
投与終了時にCs40mg/kg投与群で精巣上体尾部の重量に有意の低下($p<0.05$)が認められたが, 投与終了後2週より回復した。AZPおよびMZRでは変化はみられなかった。精巣重量はいずれの時点でも3剤とも変化はみられなかった。

2 精祖細胞におけるPCNA陽性率

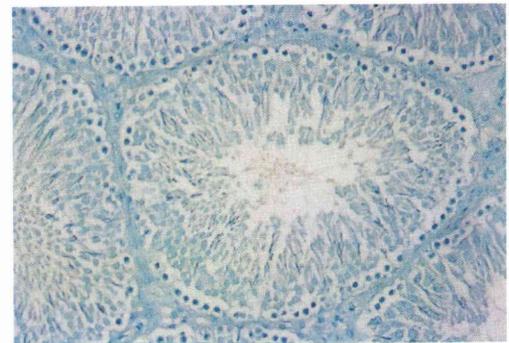
PCNA陽性細胞の核は茶褐色に染色され, 図2Aは投与終了時のコントロール群の標本を示すが, Cs80mg/kg投与群(図2B)に比べてPCNA陽性細胞の数が多し。なお, 図2Cは陰性コントロールを示し, 褐色に染色された細胞はみられず陰性細胞は緑色に



A 投与終了時のコントロール群



B 投与終了時のCs80mg/kg投与群



C 陰性コントロール

図2 精祖細胞におけるPCNA陽性細胞

染色されていた。

Csでは投与終了時に80mg/kg投与群において有意な低下($p<0.01$), および投与終了後2週において40mg/kg, 80mg/kg投与群において有意な低下(それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$)がみられた(図3)。

AZPでは投与終了時および投与終了後2週における20mg/kg投与群において有意な低下(それぞれ $p<0.05$, $p<0.01$)が認められた(図4)。

MZRでは投与終了時および投与終了後2週においていずれも20mg/kg投与群で有意な低下(それぞれ $p<0.05$)がみられたが, その後, 回復した(図5)。

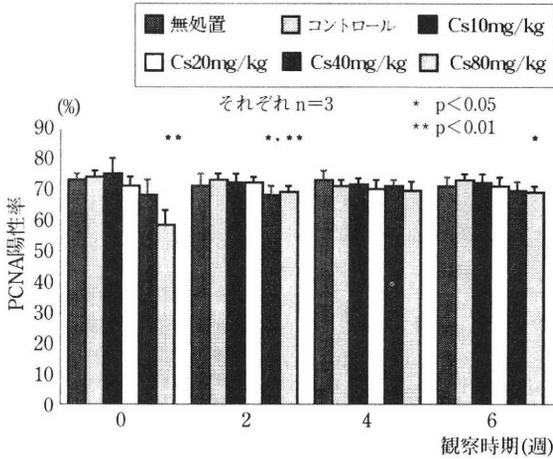


図3 Cyclosporine投与後の精祖細胞におけるPCNA陽性率の変動

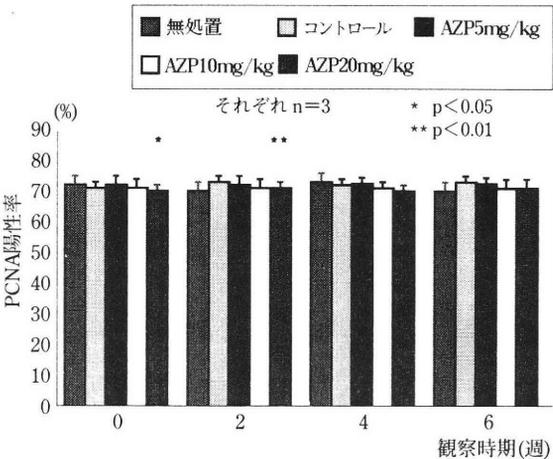


図4 Azathioprine投与後の精祖細胞におけるPCNA陽性率の変動

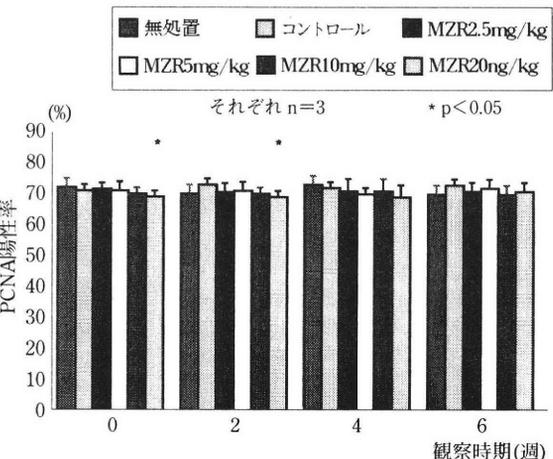


図5 Mizoribine投与後の精祖細胞におけるPCNA陽性率の変動

考 案

今回、免疫抑制剤のラット造精機能へおよぼす影響について検討するにあたり、精細胞のDNA合成能の評価法として精祖細胞におけるPCNA陽性率を検討した。PCNAは細胞周期のG1後期からS期にかけて合成されるDNA polymerase- δ の補助蛋白質であり、核内に蓄積され細胞増殖において重要な役割を果たしている¹²⁾。精細胞のDNA合成能の評価法としてはそれ以外にflow cytometry, bromodeoxyuridine (以下BrdU)法などがあるが、flow cytometryは客観性が高く定量的評価も可能であり組織学的所見とも相関が認められたとの報告¹³⁾もあるが、新鮮標本が必要である。BrdU法はラットの造精機能の定量的解析に有用であるが、手技が煩雑で発癌性薬剤の前投与が必要である。一方、PCNA法はブアン液固定後のパラフィン切片でも検出可能であり、BrdU法とほぼ同様の結果が得られるとの報告^{9, 10)}もあり今回我々はPCNA法を用いた。

Csの造精機能への影響については、ラットにおいて間脳-下垂体系に抑制的に働き造精機能障害をおこしたとの報告¹⁴⁾および造精機能障害とともに精巣上体への影響も推定されたとの報告¹⁵⁾などがみられる。以前我々の施行した経口投与の実験⁸⁾では精巣上体尾部の精子数においては変動を認めなかったが、精子運動率は投与終了時に各投与群とも有意な低下を認め、精巣上体への本剤の影響と推察した。ちなみに今回の実験で精巣上体尾部の重量で投与終了時に80mg/kg投与群では変動はみられなかったものの、40mg/kg投与群において有意な低下がみられた。一方、精巣組織像では投与終了後6週においてdose dependentな精細管障害を認め、ラット精子発生過程より考えると主として精祖細胞への障害を推定したが⁸⁾、今回、精祖細胞への障害を精祖細胞におけるPCNA陽性率において検討を加えたところ、投与終了時および投与終了後2週においてdose dependentな低下がみられたことより、Csが精祖細胞に障害を与えたことをDNA合成能の観点からも示したものと見える。

AZPの造精機能への影響については、腎移植後に本剤を使用した臨床例についての報告が散見される。すなわち、腎移植後の本剤の投与により無精子症あるいは乏精子症をきたしたとの報告¹⁶⁾がある一方、造精機能への影響はみられなかったとの報告¹⁷⁾もある。しかし、これらの報告はいずれもAZPの投与前後と比較したものではない。一般的に慢性腎不

全で透析を受けている患者は、造精機能が低下しており、腎移植後腎機能が改善することが造精機能の回復に関与する可能性がある。従って臨床例において、本剤の造精機能への障害を評価するに際してそのような要因なども念頭におく必要があろう。一方、以前行なったラットを用いた成績では精巣組織像はCsと同様、投与終了後6週において精細管障害を認めたことより精祖細胞への障害が推定された⁸⁾。今回の精祖細胞におけるPCNA陽性率の検討でも20mg/kg投与群にて、投与終了時および投与終了後2週においてその有意な低下を認めたことよりAZPが各造精段階のうちCsと同様、精祖細胞に障害を与えることを裏付けるものであった。一方、低用量投与群においては精祖細胞におけるPCNA陽性率に低下を認めないにもかかわらず、精巣組織におけるa type精細管の割合は低下しており⁸⁾、両者の結果は一致するものではなかった。このことの説明としてPCNAによるDNA合成能の評価の限界ということも否定はできないが、本剤の投与終了時に高用量のみならず低用量投与群においても血中テストステロン値が有意に低下しており⁸⁾、ライディッヒ細胞障害による低アンドロゲン状態もあいまって造精機能に障害をきたし投与終了後6週の精巣組織所見をもたらしたことも考えられよう。

MZRはラットを用いた実験では亜急性毒性試験で精細胞の減少を認めたとの報告¹⁸⁾があり、ヒトにおいては微少ネフローゼ症候群の患者で投与したところ精子数および精子運動率の低下を認めたが、投与中止後すみやかに改善がみられたとの報告¹⁹⁾がある。以前の実験でも精巣上体尾部の精子数が投与終了時より6週までの観察期間を通じて有意な低下を認め⁸⁾、このことは、MZRが基底膜を超えて種々の精細胞に直接障害を与えて精子数の低下をきたした可能性が考えられる。同様にある種の抗癌剤でも血液精巣関門内に存在する精細胞への障害が報告されている²⁰⁾。一方、今回の精祖細胞におけるPCNA陽性率の低下は少なくとも他の2剤と同様に精祖細胞への障害を示すものである。

以上、PCNA法を用いた精細胞のDNA合成能の評価から、3剤ともラット精子発生過程の段階で精祖細胞に障害を与えていることが示された。このことは、我々の以前の実験におけるa type精細管の割合を用いた評価法や精巣上体尾部の精子数算定の結果とも一致しておりPCNAを用いた免疫組織染色法は造精機能の評価に有用であり、今後造精機能障害のさまざまな病態に対する客観的評価法としてその応

用が期待される。

文 献

- 1) Borel J (1976) Comparative study of in vitro and in vivo drug effects on cellmediated cytotoxicity. *Immunology* 31:631-641
- 2) Borel J, Feurer C, Gubler H, et al. (1976) Biological effects of cyclosporin A: A new antilymphocytic agent. *Agents Actions* 6: 468-475
- 3) Starzl T, Weil R, Iwatsuki S, et al. (1980) The use of cyclosporin A and prednisolone in cadaver kidney transplantation. *Surg Gynecol Obstet* 151: 17-26
- 4) Thomson A, Whiting P, Cameron I, et al. (1981) A toxicological study in rats receiving immunotherapeutic doses of cyclosporin A. *Transplant* 31: 121-124
- 5) Handelsman D, McDowell I, Catterson I, et al. (1984) Testicular function after renal transplantation: Comparison of cyclosporin A with azathioprine and prednisone combination regimens. *Clin Nephrol* 22: 144-148
- 6) 朴 勺, 友吉唯夫, 野村康之 他 (1987) Cyclosporinの腎毒性に関する研究. *泌尿紀要* 33: 1966-1974
- 7) 岩崎雅志, 布施秀樹, 風間泰藏 他 (1991) シクロスポリンのラット造精機能へおよびす影響. *日泌尿会誌* 82:1059-1066
- 8) 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およびす影響. *日泌尿会誌* 87:42-49
- 9) 井本勝彦, 瀧原博史, 島袋智之 他 (1996) PCNA法を用いた閉塞性無精子症の精細胞DNA合成能の定量的解析. *日不妊会誌* 41:70-75
- 10) 中根比呂志, 石津和彦, 白石晃司 他 (1998) 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. *日不妊会誌* 43:75-80
- 11) 上条利幸, 佐藤俊和, 柳沢良三 他 (1994) 腎盂尿管癌におけるProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)の発現と予後の関係について. *日泌尿会誌* 85:938-944
- 12) 田中一成 (1991) 抗PCNA抗体による増殖細胞核の染色—パラフィン切片への応用—. *病理と臨床* 9: 791-798
- 13) 布施秀樹 (1997) 綜説; 薬剤による精巣障害. *臨泌* 51:803-814
- 14) Rajfer J, Sikka S, Lemmi C, et al. (1987) Cyclosporine inhibits testosterone biosynthesis in the rat testis. *Endocrinol* 121:586-589
- 15) Seethalakshmi W, Menon M, Malhotra R, et al. (1987) Effect of cyclosporine A on male reproduction in rats. *J Urol* 138:991-995

- 16) Lingårdh G, Anderson L and Osterman B (1974) Fertility in men after renal transplantation. *Acta Chir Scand* 140:494
- 17) Phadke A, MacKinnon K and Dossetor J (1970) Male fertility in uremia: restoration by renal allografts. *Can Med Assoc J* 102:607-608
- 18) 齊藤 実, 佐野正樹, 奈良間 功(1983) ラットにおけるMizoribine (Bredinin®)の亜急性毒性試験. *応用薬理* 26: 293-306
- 19) 石川敏子, 竹村克己, 石井久美子 他(1989) Mizoribin (Bredinin®)の臨床効果(1)—一次性疾患— 腎と透析 26: 1109-1113
- 20) Seethalakshmi L, Flores C and Kinkead T (1992) Effects of subchronic treatment with cis-platinum on testicular function, fertility, pregnancy outcome, and progeny. *J Androl* 13:65-74
- (受付: 1999年 9月 8日)
(受理: 2000年 2月 7日)

Quantitative Analysis of Rat Spermatogenic Injury by Immunosuppressive Drugs Using the Method of Proliferating Cell Nuclear Antigen

Masashi Iwasaki, Yoko Ikehara, Koichi Murakami, Shoichiro Ohta,
Osamu Nagakawa and Hideki Fuse

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

The effects of cyclosporine (Cs), azathioprine (AZP) and mizoribine (MZR) on male reproduction in rats were examined. In order to examine the effect of immunosuppressive drugs on spermatogenic DNA synthesis, we analyzed the immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Each drug was orally administered every day for 14 days.

Organ weights of the testis and the cauda epididymis were measured. In the weight of the cauda epididymis, a significant decrease was observed in 40mg/kg dose group among the Cs-treated groups at the end of the administration, but the other treated groups were not changed. The rate of cells positive for PCNA in the spermatogonia significantly decreased in the most high dose-treated groups of all 3 drugs immediately after the administration.

These results suggest that Cs, AZP and MZR impair spermatogenic DNA synthesis and at least impair spermatogonia.

Key words: immunosuppressive drug, spermatogenesis, PCNA, rat

(*Jpn J Fertil Steril* 45:101-105 2000)

Localization of Lactoferrin in Human Reproductive Tract During the Menstrual Cycle

Atsushi YANAIHARA, Yoshiro TOMA, Hiroshi SAITO and Takumi YANAIHARA

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

Abstract: To clarify the existence and localization of lactoferrin in the human reproductive tract, the immunohistochemical staining of lactoferrin was investigated.

The proliferative and secretory phases of cervix of uteri, fallopian tube and endometrium were obtained from patients undergoing an operation for a benign disorder and the tissues were stained by streptavidin-biotin method (ABC) using monoclonal mouse anti-human lactoferrin antibody. Lactoferrin was localized in the cytoplasm of epithelial cells of endometrium, fallopian tube and uterine cervix. The positive-staining of cells for lactoferrin out of 300 cells were counted. When the percent of the positive staining cells was calculated in the proliferative phase and compared to that in secretory phase of the endometrium, staining in the proliferative phase (84.6%) was higher than that in the secretory phase (60.4%). However, there was no different in staining between proliferative and secretory phases in fallopian tube and uterine cervix. The localization of lactoferrin in human reproductive tract was histochemically demonstrated and the changes of expression in menstrual cycle were studied.

Key words: lactoferrin; human; reproductive tract; immunohistochemical staining

(Jpn J Fertil Steril 45:107-112 2000)

Introduction

It is known that lactoferrin, an iron-binding glycoprotein presented in body fluids, has a variety of functions and is distributed in a variety of tissue¹. Lactoferrin mRNA and protein expression appears to be an early and sensitive bioassay for estrogen action in the epithelium of the mouse uterus and vagina². It is also reported that lactoferrin is regulated by estrogen³. Sex steroids exert their actions on the female reproductive tract including endometrium, fallopian tube and cervix of uteri. Lactoferrin concentrations in human vaginal mucus are highest just after menses and lowest just before menses⁴. In the human endometrium, Walmer et al. reported that lactoferrin is expressed in a region of normal endometrium that is not shed with menstruation and is frequently overexpressed by progesterone receptor-negative cells in endometrial adenocarcinomas⁵. On the other hand, Kelder et al. reported that the mean

serum lactoferrin concentration during the proliferative phase was significantly higher than in the secretory phase⁶. They also demonstrated that immunohistochemical analysis of the endometrium revealed greater expression of lactoferrin in proliferative endometrium than in secretory endometrium. Though the expression of lactoferrin in epithelial cells of the human cervix⁷ and mouse oviduct⁸ has been previously reported, change of the lactoferrin expression during the menstrual cycle was not fully understood.

With the changes in sex steroids during the menstrual cycle, different expressions of lactoferrin in reproductive tracts may occur. In the present study, localization of lactoferrin in human reproductive tract including cervix endometrium and fallopian tube during the menstrual cycle was investigated.

Materials and Methods

Materials

Informed consent was obtained from all patients

who participated in this study. Human tissues which included endometrium, fallopian tube and uterine cervix were obtained from 5 patients (35-41 years old) in proliferative phase and 5 patients (35-41 years old) in secretory phase during hysterectomy due to a benign gynecological disorder. These patients have not received any hormonal therapy before the surgery.

Reagents

The monoclonal mouse anti-human lactoferrin antibody was purchased from Hytest (Turku Finland). Phosphate-buffered saline (PBS) and diamino-benzidine (DAB) were obtained from Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Tokyo Japan).

Methods

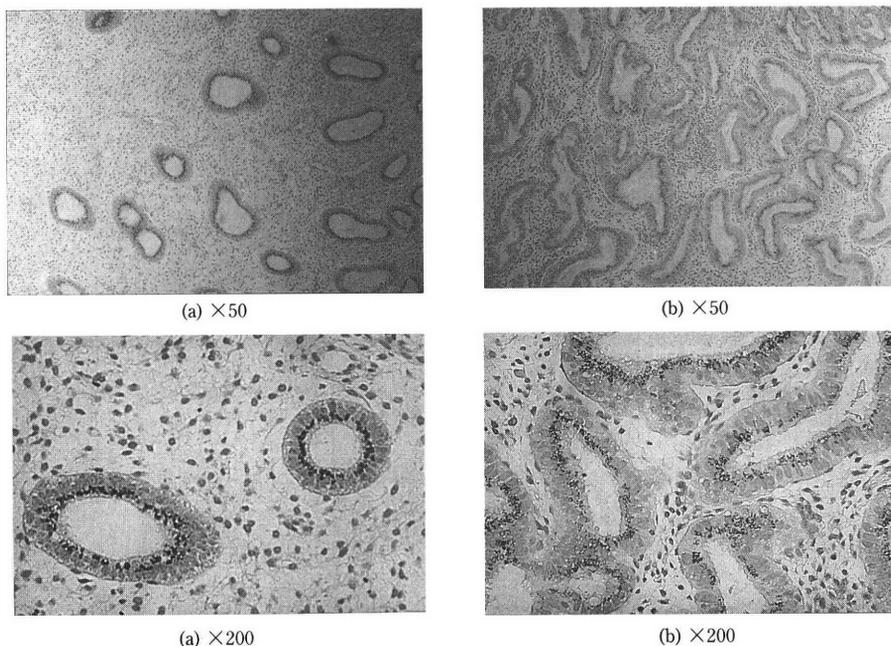
All specimens, fixed in 10% neutral formalin at room temperature, were embedded in paraffin and cut into thin sections by routine histological procedure. The immunohistochemical localization of lactoferrin was investigated using the streptavidin-biotin method (ABC). After rehydrating and washing with PBS, the

section ($1.5\mu\text{m}$) was stained first with a monoclonal mouse anti-human lactoferrin antibody. The sections were then stained with antibody using Histifine SAB PO (M) Kit (Nichirei Corporation). Finally, ABC staining was performed using DAB. Negative controls for the immunostaining were carried out without primary antibody. The positive staining cells in 300 cells were counted and the positive rates were calculated. All the data were analyzed statistically using one-way ANOVA with multiple comparison test.

Results

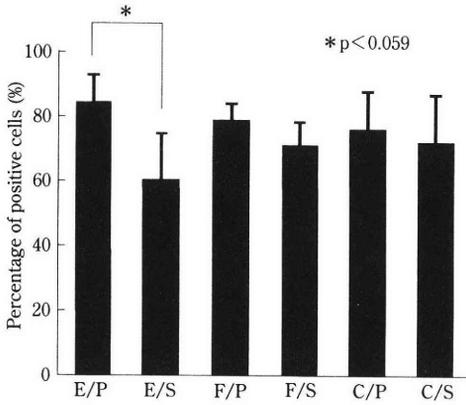
Immunohistochemical staining of human endometrium

Lactoferrin was localized in the cytoplasm of epithelial cells of the endometrium. When the positive-staining cells in the glandular epithelium were counted, the positive rate in endometrial tissue during the proliferative phase ($84.6\pm 8.53\%$, range 70-92%) was higher than that in the secretory phase ($60.4\pm 14.6\%$, range 41-75%) though the difference was not statistically significant (Figure 1a, 1b) (Figure



(a); Lactoferrin staining in the proliferative phase (50 \times magnification and 200 \times magnification). (b); Lactoferrin staining in the secretory phase (50 \times magnification and 200 \times magnification). Immunohistochemistry was performed with a specific monoclonal antibody. Lactoferrin was localized in cytoplasm of epithelial cells, but not in the stroma. Staining in the secretory phase of endometrium appears heterogeneous.

Figure 1 Immunohistochemical staining of human endometrium.



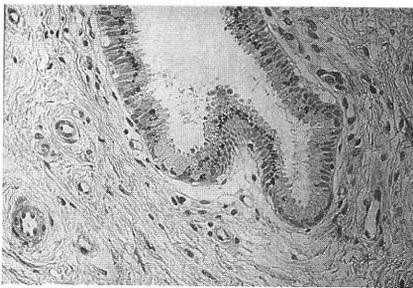
Each value expresses the mean \pm SD for five samples. E/P; Proliferative phase of endometrium. E/S; Secretory phase of endometrium. F/P; Proliferative phase of fallopian tube. F/S; Secretory phase of fallopian tube. C/P; Proliferative phase of cervix. C/S; Secretory phase of cervix.

Figure 2 The percentage of counted cells staining positive for lactoferrin in endometrium, fallopian tube and cervix of uteri during the menstrual cycle.

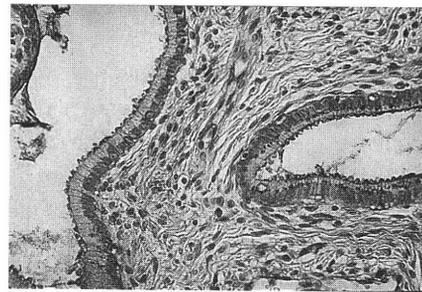
2). Under the conditions used, the endometrial stroma cells were not stained.

Immunohistochemical staining of human fallopian tube

The ampulla region of the oviduct was subjected to the study. Staining of lactoferrin was observed in cytoplasm of epithelial cells of the human fallopian tube. Lactoferrin protein did not appear to cycle in a predictable pattern as was noticed in the endometrium. There was no significant difference in staining between the samples obtained from the patient in proliferative phase and secretory phase (Figure 3a, 3b). Secretions from the lumen of epithelium were also stained positively suggesting the secretions of lactoferrin from the fallopian tube.



(a)



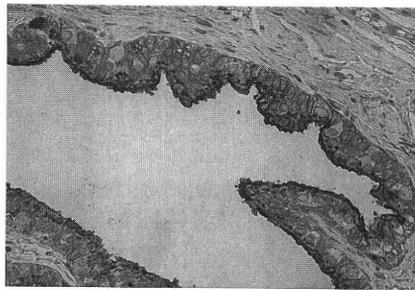
(b)

(a); Lactoferrin staining in the proliferative phase (200 \times magnification).
 (b); Lactoferrin staining in the secretory phase (200 \times magnification). Lactoferrin was observed in cytoplasm of epithelial cells.

Figure 3 Immunohistochemical staining of human cervix of uteri during the menstrual cycle.



(a)



(b)

(a); Lactoferrin staining in the proliferative phase (200 \times magnification).
 (b); Lactoferrin staining in the secretory phase (200 \times magnification). Lactoferrin was also observed in luminal contents of oviduct.

Figure 4 Immunohistochemical staining of human fallopian tube during the menstrual cycle.

Immunohistochemical staining of human uterine cervix

Lactoferrin was stained in the cytoplasm of epithelial cells of the cervix (Figure 4a, 4b). As was observed in the fallopian tube, there was no significant difference in staining between tissues in proliferative phase and secretory phase. Lactoferrin was also observed in some luminal contents of glands.

Discussion

In this study, lactoferrin protein was stained immunohistochemically using mouse anti-lactoferrin monoclonal antibody to epithelial cells of the reproductive tract including uterine cervix, endometrium and fallopian tube of naturally cycling woman. Immunohistochemical staining of the endometrium revealed greater expression of lactoferrin in the proliferative phase than in the secretory phase. This result suggests that regulation of lactoferrin expression may be related to estradiol. Similar results have been reported by Kelder et al⁶), though the localization of lactoferrin was not been identified. On the other hand Walmer et al. demonstrated less intense immunostaining in the proliferative phase of endometrium than in the secretory phase. The difference of these result can not be explained at present only due to the difference of the antibodies used. Regulatory mechanism of lactoferrin expression has to be clarified to dissolve this discrepancy. Tourville et al. reported no staining for lactoferrin in human fallopian tube and uterine cervix⁹). In the present study, localization of lactoferrin was observed in both human fallopian tube and cervix. No study has been reported in regard to the different expression of lactoferrin in human oviduct during menstrual cycle. As a result, there was no difference between proliferative phase and secretory phase in lactoferrin staining under the condition used. In mouse oviduct, prominent immunostaining in secretory epithelial cells was noted for lactoferrin⁸). The finding of lactoferrin in the luminal contents of the glands suggests the secretion of lactoferrin from the oviduct. Physiological role of lactoferrin in the oviduct has not been clarified. Several growth factors with lactoferrin are reported to be synthesized from the tissue²).

The expression of lactoferrin in human endocervi-

cal epithelium has been demonstrated by Farley et al⁸). However changes of histochemical staining is not clear yet. In our present study, lactoferrin was localized in cervical epithelium, and there was no difference during menstrual cycle in staining. McMaster et al. reported that the lactoferrin gene, induced by estrogen, is expressed during early pregnancy in mouse uterus¹⁰).

Although the localization of lactoferrin in human reproductive tract is demonstrated, the major physiological role of lactoferrin is not yet known. The lactoferrin content in cervical mucus is lower in chorioamnionitis (CAM) positive patients than CAM negative patients¹¹). Lactoferrin seems to exert its biological action as a self-defense mechanism against intrauterine infection¹²) since lactoferrin suppresses amniotic IL-6 production during amniotic infection. In addition, lactoferrin administration suppresses the production of inflammatory cytokines¹³⁻¹⁵). Therefore, it is suggested that lactoferrin may be involved in a self-defense mechanism against infection of reproductive tract. Hagiwara et al. reported that lactoferrin has a cell proliferative effect in rat intestinal epithelial cell line, IEC-18¹⁵). We have demonstrated the proliferative effect of lactoferrin on human endometrial stroma cells in culture.¹⁶) As mentioned above, it is suggested that lactoferrin is a multi-functional protein that may change the functions or effects including an antibacterial effect, resistance to infection, release of interleukins¹⁷), and cell-growth promotion activity depending on the tissue in which lactoferrin is localized. Walmer et al. suggested that lactoferrin may have intracellular regulatory function as well as a role in the extracellular environment of the reproductive tract³). It is known that lactoferrin is one of the component of the sperm protein coat^{18, 19}) and has also been demonstrated to have an immunosuppressive action²⁰). Although similar effect of lactoferrin in reproductive tract may be speculated, further studies are needed to investigate the significance of lactoferrin in the human reproductive tract.

Acknowledgements

We wish to thank Miss H. Kurihara for her technical assistance.

Reference

1. Christina TT, Youhua L, Nengyu Y, et al. (1992) Differential molecular mechanism of the estrogen action that regulates lactoferrin gene in human and mouse. *Molecular Endocrinology* 6:1969-1981
2. David KW, Mark AW, Claude LH, et al. (1992) Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: Correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology* 131:1458-1466
3. Nemet K and Simonovits I (1985) The biological role of lactoferrin. *Haematologia* 18:3-12
4. Myron SC, Bradley EB, Martha F, et al. (1987) Preliminary observation on lactoferrin secretion in human vaginal mucus: Variation during the menstrual cycle, evidence of hormonal regulation, and implication for infection with *Neisseria gonorrhoeae*. *Am J Obstet Gynecol* 157:1122-1125
5. David KW, Cheryl JP, Mark AW, et al. (1995) Malignant transformation of the human endometrium is associated with overexpression of lactoferrin messenger RNA and protein. *Cancer Research* 55:1168-1175
6. Kelder ME, Kaul A, Nowicki B, et al. (1996) Estrogen regulation of lactoferrin expression in human endometrium. *Am Reproductive Immunology* 36:243-247
7. Dalton T, Kover K, Dey S K, et al. (1994) Analysis of the expression of growth factor, interleukin-1, and lactoferrin genes and the distribution of inflammatory leukocytes in the preimplantation mouse oviduct. *Biol Reprod* 51(4):597-606
8. Farley J, Loup D, Nelson M, et al. (1997) Neoplastic transformation of the endocervix associated with downregulation of lactoferrin expression. *Mol Carcinog* 20(2):240-250
9. Tourville DR, Ogra SS, Lippes J, et al. (1970) The human female reproductive tract: Immunohistological localization of γ A, γ G, γ M, secretory "piece" and lactoferrin. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 108:1102-1108
10. Michael TM, Christina TT, Sudhansu KD, et al. (1992) Lactoferrin in mouse uterus: Analyses of the preimplantation period and regulation by ovarian steroids. *Mol Endocrinology* 6(1):101-111
11. Teturo C and Toshio H (1993) Lactoferrin in cervical mucus of patients with chorioamnionitis. *The Japanese J Antibiotics* 46(4):318-322
12. Katufumi O, Aki Y, Yuichi M, et al. (1999) Amniotic lactoferrin in intrauterine infection. *Placenta* 20(2):175-179
13. Machnicki M, Zimecki M and Zagulski T (1993) Lactoferrin regulates the release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 in vivo. *Int J Exp Pathol* 74:433-439
14. Crouch, SPM, Slater KJ and Fletcher J (1992) Regulation of cytokine release from mononuclear cells by the iron-binding protein lactoferrin. *Blood* 80:235-240
15. Tomoyuki H, Ichizo S, Yasuo F, et al. (1995) Effect of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC-18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotech Biochem* 59(10):1875-1881
16. Yanaihara A, Matuoka R, Toma, et al. (1999) Effect of Lactoferrin on Human Endometrial cell Proliferation. *Proceeding of 4th International Conference on Lactoferrin.*
17. Lönerdal B and Iyer S (1995) Lactoferrin: Molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr* 15:93-110
18. Toby CR, Ronald W, James JS, et al. (1997) An innate natural antibody is reactive with a cryptic sequence of lactoferrin exposed on sperm head surface. *P. S. E. B. M.* 216:404-409
19. Goodman SA and Young LG (1981) Immunological identification of lactoferrin as a shared antigen on radioiodinated sperm surface and in radioiodinated human seminal plasma. *J Reprod Immunol* 21:99-108
20. Gentile P and Broxmeyer HE (1991) Interleukin-6 ablates the accessory cell-mediated suppressive effects of lactoferrin on human hematopoietic progenitor cell proliferation in vitro. *Ann NY Acad Sci* 628:74-83

(Received November 25, 1999)

(Accepted February 9, 2000)

月経周期内におけるヒト生殖臓器でのラクトフェリンの局在

矢内原 敦, 藤間芳郎, 齋藤 裕, 矢内原 巧

昭和大学産科婦人科学教室

月経周期内におけるヒト生殖臓器でのラクトフェリン(Lf)の局在を免疫組織化学的染色にて検討した。Lfは乳汁より発見された鉄結合性糖蛋白で生体内の至る所に発現している。その作用は多彩で、抗菌作用をはじめサイトカインの産生の促進、細胞増殖作用などが報告されている。Lfは頸管粘液中に含まれている事は知られているが、生殖器官における局在や月経周期内での変動は明らかではない。そこで、ホルモンなどの治療を行っていない婦人より患者の同意を得た後、良性疾患の手術時に、増殖期(Day5-12)、分泌期(Day16-23)のそれぞれ子宮内膜、卵管、頸管を5例ずつ得、10%のホルンマリン固定後にLf monoclonal抗体を用いstreptavidin-biotin method (ABC)法にて免疫組織化学的染色を行った。Lfは子宮内膜、卵管、頸管のそれぞれ細胞質に認められた。300個の細胞中に染色陽性の細胞率を計算したところ、子宮内膜においては増殖期に84.6%、分泌期は60.4%と増殖期に高い傾向を示した。卵管、頸管においては有意な差は認められなかった。今回初めて、ヒト生殖臓器におけるLf局在を月経周期内で検討し、Lfが生殖に関与している可能性を示唆した。

キーワード：ラクトフェリン、ヒト、生殖器官、免疫組織化学的染色

(日不妊会誌 45:107-112 2000)

Immunostimulation with Paternal Lymphocytes Saves Female Fetuses from Recurrent Abortion

Takashi KANO, Masako FURUDONO, Mariko KANO, Misako ISHII,
Yutaka MAEDA¹⁾ and Minoru UEKI²⁾

Medical Corporation Kano Clinic, Osaka 542-0073, Japan

¹⁾FALCO Biosystems, Ltd, Kyoto 606-8357, Japan

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka Medical College,
Osaka 569-0008, Japan

Abstract: Chromosomal study of aborted fetuses was conducted for the purposes to justify the cause of abortion. We thought that study of dead fetuses would contribute to saving the lives of fetuses. Among the aborted fetuses with autoantibody-negative recurrent abortion indicated to immunostimulation with paternal lymphocytes, 73.9% (17/23) had normal karyotypes and, 16 had 46,XX (94.1%). The girls accounted for 43.3% (29/67) of the cases in which abortion was prevented by immunostimulation with paternal lymphocytes and 44.6% (75/168) of control without a past history of abortion, which were significantly lower than the rate of 46,XX in aborted fetuses. The aborted fetuses with autoantibody-negative recurrent abortion were mostly female. Because of the high rate of shared HLA class II antigens between parents, and/or the small number of father-specific antigens, immune response of the host mother to the graft was low, and host mother reject the female conceptus as a consanguineous baby. However, abortion of the above female conceptus with viable karyotypes can be prevented by immunostimulation with paternal lymphocytes.

Key words: recurrent abortion, chromosome, HLA, lymphocyte

(Jpn J Fertil Steril 45:113-118 2000)

Introduction

Recurrent abortion which is repeated abortion for which parental chromosomal abnormalities, anatomic abnormalities, endocrinologic problems and infections have been ruled out, can be classified into immunological recurrent abortion or so-called unexplained recurrent abortion. The former is considered as an immunological rejection due to impaired maternal immunological tolerance to a semiallogenic conceptus¹⁾. Such cases are further classified into autoantibody-positive and -negative cases. Not all autoantibody-negative cases are categorized as unexplained recurrent abortion, since recurrent abortion, due to allogeneic immune abnormality can be diagnosed based on the number of HLA class I²⁾ and II³⁾

antigens shared by the parental couple. In any case, immunosuppression with adrenal cortical hormone therapy (antinuclear antibody; ANA⁴⁾, (anti-cardiolipin antibody; aCL⁵⁻⁷⁾) low-dose aspirin (aCL^{5,7)}, and Sairei-To⁸⁾ therapy (ANA, aCL) is given to patients with autoantibody-positive recurrent abortion, whereas immunostimulation with paternal lymphocytes is given to the latter and effective clinical results have been reported⁹⁻¹³⁾.

There are few reports on sexual differences of aborted fetuses. We considered it possible that immune response might differ by sex of the fetus acting as a graft to the host mother, and investigated sexual difference in the prevention of abortion after immunostimulation with paternal lymphocytes.

Materials and Methods

Materials

352 aborters were enrolled in this study between 1991 and 1998 at Medical Corporation Kano Clinic. All were recurrent aborters who had experienced two or more consecutive spontaneous abortions (twice: 231 cases, more than 3 times: 121 cases [12 times at the most]). Of 119 ANA (by FA method, cut off: 40 times) and aCL (IgG, IgM: ELISA method, cut off: 1.0OD, β 2GP: EIA method, cut off: 3.5U/ml) negative patients given immunostimulation with paternal lymphocytes with a diagnostic criterion of more than 2 HLA class II antigen (lymphocyte cytotoxicity test) shared by the parental couple and/or less than 2 father-specific class II antigens^{3,14}, 67 patients (56.3%) had successful live birth. Chorionic samples were collected from 23 patients (mother's age varied between 28 and 36 years), who were autoantibody-negative aborters and who had not been given the immune therapy. All examinations were performed under informed consent obtained from patients.

Chromosomal analysis

Villi obtained by D&C were washed in a culture solution containing antibiotics, minced to a gruel and stirred with 0.25% trypsin solution for 20 minutes at 37°C. Subsequently, they were placed in a culture solution (20% FBS MEM) and incubated at 37°C for 2 to 8 weeks under 5% CO₂. After confirming sufficient cell growth, colcemid solution was added to a final concentration of 0.1 μ g/ml and allowed to react for 3 hours. Cells were harvested by trypsin treatment and subjected to hypotonic processing with 0.075M KCl for 25 minutes. The cells were fixed with Carnoy's solution (methanol : acetic acid = 3:1), and the specimens were microscopically examined.

Immunostimulation with paternal lymphocytes

For isolation of lymphocytes, 10ml of heparinized venous blood from the father was added to 25ml of a phosphate buffer in a 50-ml centrifuge tube and mixed slowly, with turning upside-down. In another 50-ml centrifuge tube, 12ml of lymphocyte separating solution (Lymphoprep, NYCOMED PHARMA) was added, and 10ml of the solution in the first centrifuge tube

was layered without co-mixing. Then, this compound was centrifuged at 1600rpm for 30minutes, and only the aspirated lymphocyte layer was centrifuged at 1600rpm for an additional 10minutes. The precipitate was washed twice with a phosphate buffer (1000rpm for 10 minutes) and suspended in 0.4ml of physiological saline solution.

The amount of blood collected in one session was 80ml, and the isolated peripheral monocytes were X-irradiated (10 Rad) and, after division into 4 portions, frozen at $-35 \pm 1^\circ\text{C}$. After a period of 1 week or longer, the monocytes were thawed at room temperature and injected intradermally to the inner side of the mother's forearm.

The number of cells injected was $1500-3200 \times 10^4$ each time, with a 2-week interval between each grafting. If pregnancy was not established, the procedure was repeated at 3-month intervals until pregnancy. If pregnancy was established, the double amount was grafted at 2-week intervals until the 12th week of pregnancy.

Statistical analysis

Chi-square analysis with Yate's collection was used for analysis of significant difference in sexual difference among the cases with abortion of fetuses having normal chromosomes, those with non-treated autoantibody-negative recurrent abortion, cases without a past history of abortion, and those acquiring live infants by immunostimulation with paternal lymphocytes.

Results

Results of immune therapy

Immunostimulation with paternal lymphocytes was given to 119 autoantibody-negative recurrent aborter of who 67 (56.3%) obtained live infants. The rate of prevention of abortion (No. of pregnancies-No. of abortions/No. of pregnancies) X100 was 77.9%. Sairei-To therapy was given to 130 ANA and aCL-positive patients, of who 38 (29.2%) obtained live infants. They included 20 with positive ANA (25.9%), 8 with positive IgG aCL (36.4%) and 10 with positive IgM aCL (58.8%), for which the rates of prevention of abortion were 69.0, 72.7, and 58.8%, respectively.

Chromosomal karyotypes of aborted conceptuses

Of the 23 patients with successful chromosomal examination of aborted conceptuses of autoantibody-negative recurrent abortion (rate of success: 88.5%), 6 (26.1%) had chromosomal abnormality. Of the aborted conceptuses with normal chromosomes, 16 (94.1%) was 46,XX and remaining one (5.9%) was

46,XY. Of these cases, HLA class II antigen typing was performed in 10, and immunostimulation with paternal lymphocytes was performed in 4 of the patients with more than 2 HLA class II antigen shared by the parental couple or less than 2 father-specific class II antigens. Of the cases in which the karyotype of the fetus was 46,XX, live infants were born by sub-

Table 1 Chromosomal karyotypes of aborted conceptuses with autoantibody-negative recurrent abortion

| Case | age | Number of abortions | Gestational week at D & C | Heart beat | Chromosomal karyotype of aborted conceptuses | HLA class II sharing (husband-specific) | Next pregnancy |
|------|-----|---------------------|---------------------------|------------|--|---|----------------|
| 1 | 33 | 2 | 13 | (+) | 47,XX,+16 | 2(1) | — |
| 2 | 33 | 3 | 8 | (+) | 92,XXXX | 0(4) | — |
| 3 | 32 | 3 | 6 | (-) | 46,XX | 2(2) | ♂ |
| 4 | 34 | 2 | 11 | (+) | 46,XY | — | — |
| 5 | 36 | 2 | 12 | (+) | *46,XX | — | — |
| 6 | 28 | 2 | 11 | (+) | 46,XX | 3(2) | ♂ |
| 7 | 29 | 2 | 9 | (+) | 46,XX | — | ♂ |
| 8 | 28 | 2 | 13 | (-) | 69,XXX | — | ♂ |
| 9 | 34 | 2 | 8 | (+) | 69,XXX | — | (abortion) |
| 10 | 32 | 2 | 10 | (+) | 46,XX | 2(3) | — |
| 11 | 30 | 2 | 9 | (-) | 46,XX | — | ♂ |
| 12 | 31 | 5 | 10 | (-) | 46,XX | — | — |
| 13 | 33 | 2 | 9 | (+) | 46,XX | — | — |
| 14 | 36 | 2 | 7 | (-) | 46,XX | — | — |
| 15 | 34 | 2 | 10 | (-) | 46,XX | — | — |
| 16 | 32 | 2 | 7 | (-) | 47,XXX | 2(2) | (-) |
| 17 | 31 | 2 | 12 | (+) | 46,XX | — | (-) |
| 18 | 28 | 2 | 8 | (+) | 46,XX | †1(3) | ♀ |
| 19 | 31 | 2 | 9 | (-) | 46,XX | 2(2) | — |
| 20 | 29 | 3 | 10 | (+) | 46,XX | 2(3) | ♂ |
| 21 | 28 | 3 | 9 | (-) | 45,X[7]/46,X,i(X)(q10)[3] | — | — |
| 22 | 35 | 2 | 8 | (+) | 46,XX | — | — |
| 23 | 31 | 3 | 10 | (+) | 46,XX | 3(2) | (♀) |

*: twin

(): Immunostimulation with paternal lymphocytes

Table 2 Sexual differences in the respective groups

| | Sex differences of aborted conceptuses and live-born children | |
|--|---|------------|
| | 46,XX or ♀ | 46,XX or ♂ |
| Abortion without immunotherapy ^{a)} | 16(94.1) | 1(5.9) |
| Live birth without immunotherapy ^{b)} | 1(14.3)** | 6(85.7)** |
| Live birth without immunotherapy ^{c)} | 75(44.6)** | 93(55.4)** |
| Immunostimulation with paternal lymphocytes | 29(43.3)** | 38(56.7)** |
| Sairei-To therapy (total) | 20(52.7) | 18(47.3) |
| ANA-positive | 9(56.2) | 7(43.8) |
| IgG aCL-positive | 5(45.5) | 6(54.5) |
| IgM aCL-positive | 6(54.5) | 5(54.5) |

a) ANA-, aCL-negative recurrent abortion
 b) post 46,XX recurrent abortion
 c) no prior abortion

** : P < 0.001

sequent pregnancy in 7 although no treatment was given, and one of them (14.3%) was a girl (Table 1).

Sexual differences in the respective groups

Compared to the rate of 46,XX in the aborted fetuses with normal chromosomes, those in the non-treated autoantibody-negative recurrent abortion group, the group without a past history of abortion, and the number of live female babies in the immunostimulation with paternal lymphocytes were significantly lower (χ^2 and χ^2 p values; 11.675 and 0.0006, 13.214 and 0.0003, 12.118 and 0.0005, respectively, Table 2)

Discussion

Chromosomal study of aborted fetuses was conducted with emphasis on chromosomal abnormality, particularly of the karyotypes of infants not viable after birth, for the purposes to justify the cause of abortion. The rate of chromosomal abnormality is high for sporadic abortion (59.3% <16/27>¹⁵), 54.9% <140/255>¹⁶), 60.1% <89/148>¹⁷) and 60.0% <3/5>¹⁸). Even if the parental chromosomes are normal, there is considerable likelihood of recurrence, as indicated in the report¹⁹) that trisomy in the initial episode is associated with trisomy in the following episode in 42.9% of cases and the cause of recurrence in ovum has been established, as shown in the IVF study²⁰). In such a case, treatment is impossible. We thought that study of dead fetuses would contribute to saving the lives of fetuses with viable karyotypes.

It has been reported that, compared with sporadic abortion, the rate of chromosomal abnormality is low in recurrent abortion, at 34.4% (43/125; New York City), 49.3% (73/148; Honolulu)¹⁹), and 47.4% (9/19)²¹). Furthermore, Takakuwa, et al.¹⁷) reported that this rate was 20.0% (2/10) for patients with aCL-positive recurrent abortion, and Aoki, et al.¹⁸) reported that it was 16.7% (2/12) for patients with recurrent abortion with high levels of natural-killer activity, whose pathology is essentially considered as allogeneic immune abnormality; they indicated that the pathology of immunologic recurrent abortion was immunologic rejection to a normal fetus. In the present study, the fetuses with chromosomal abnormalities accounted for only 26.1% of cases even for autoantibody-negative

recurrent abortion indicated to immunostimulation with paternal lymphocytes.

Attention should be paid to determine whether the aborted fetus has a normal or viable karyotype, since what are useful for evaluation of efficacy of various immune therapies. The abortion despite use of various immune therapies in a cases in which the occurrence of fetus has a viable karyotype means that the treatments used are not effective.

We observed sexual differences in aborted fetuses. We assumed that a fetus which was immunologically a non-self graft had the Y chromosome absent in the mother would influence the immune response of the host, had a significant role in the cause of abortion and therapeutic effect of the immune therapy. As the report of a high rate of sexual coincidence of 66.7% (14/21) in cases of recurrent abortion with normal chromosomes²¹) demonstrated, it is likely that the immunologic pathology of abortion differs depending on the sex of the fetus.

Although there are few reports on sexual differences of aborted fetuses, our retrospective analysis of the contents of past reports revealed that there was no sexual differences in sporadic abortions as 46,XX was founded in 42.8% (9/21)²¹) or 54.2% (32/59)¹⁷) whereas, in recurrent abortion, the rate of occurrence of 46,XX was as high as 70.0% (7/10) in cases with chromosome abnormality in previous episodes and 61.9% (13/21) in cases with normal chromosomes in previous episodes²¹). However, the rate of 46,XY was 75.0% (6/8) in aCL-positive cases¹⁷). The above results suggest that the rate of female fetuses with autoantibody-negative recurrent abortion is high. In the present study, there were 16 cases (94.1%) with 46,XX among 17 with normal chromosomes as predicted, and this rate was significantly higher than for 46,XX in sporadic abortion and aCL-positive recurrent abortion reported by Takakuwa, et al.¹⁷); it was also significantly higher than the rate for female infants in the control group. Thus a high abortion rate of female fetuses was considered in the autoantibody-negative recurrent abortion. The abnormal cases included female fetuses with 47,XXX, 45,X[7]/46,X,i(X)(q10)[3] who were viable. Of the seven 46,XX cases in which parent HLA typing was performed, 6 (85.7%) had more than 2 class II antigens shared between the parental couple and 4 (57.1%)

had less than 2 father-specific antigens, both criteria were indicated to immunostimulation with paternal lymphocytes by our diagnostic criteria^{14, 22)}.

The female fetuses accounted for 43.3% of the cases in which abortion was prevented by immunostimulation with paternal lymphocytes, which was significantly lower than the rate of 46,XX in aborted fetuses ($P < 0.001$) though there was no significant difference in the rate of 46,XX from the control. This finding indicated abortion of a female fetus can be prevented by immunostimulation with paternal lymphocytes.

The reason for the sexual difference in allogeneic immune abnormal recurrent abortion (unexplained recurrent abortion) might be as follows. Because of the high rate of shared HLA class II antigens between parents (with few father-specific antigens), the number of father-specific antigens in children was small, immunologic responses in the mother (host) were low, and the mother tended to reject the fetus (graft) as a consanguineous baby. In the above immunologic condition, a genetically homologous female conceptus who was more consanguineous than male conceptus, was rejected when implanted in the host mother. However, abortion of a female fetus can be prevented by raising the immunologic response of the host by immunostimulation with paternal lymphocytes.

If the above assumption is correct, a male fetus having a Y chromosome which is heterogeneous to the host mother may be liable to rejection in an autoantibody-positive case which is under excess immunologic condition.

Of the 7 cases in which the aborted fetuses were 46,XX and the subsequent pregnancy resulted in live birth despite absence of immunotherapy, only one (14.3%) was a girl and the rate was significantly lower than the ratio of 46,XX in the aborted fetuses ($P < 0.001$). This finding suggested that, in a patient with autoantibody-negative recurrent abortion, a live baby could be obtained without immunostimulation with paternal lymphocytes if the fetus is male.

While clinical evaluation of immunostimulation with paternal lymphocytes has declined by the world-wide studies²³⁾, the reason for this may be that the sexual difference is not taken into consideration.

The results of the present study aid understanding of the pathology of allogeneic immune abnormal re-

current abortion and support the efficacy of immunostimulation with lymphocytes, and also verify the diagnostic criteria using numbers of shared HLA class II and/or father-specific antigens.

Our findings suggest that it is possible to prevent abortion by immunostimulation with paternal lymphocytes as long as the fetus has a viable chromosomal karyotypes (for example, 46,XX, 47,XXX, 45,XO, 47,XX,+21).

References

- Hill JA (1990) Immunological mechanisms of pregnancy maintenance and failure: a critique of theories and therapy. *Am J Reprod Immunol* 22:32-42
- Komlos L, Zamir H, Joshua H, et al. (1977) Common HLA antigens in couples with repeated abortion. *Clin Immunol Immunopathol* 17:330-335
- Aoki K (1982) HLA-DR compatibility in couples with recurrent spontaneous abortions. *Acta Obst Gynaec Jpn.* 3:1773-1780
- Susan C, Ralph DD, Ronald JW, et al. (1984) Subclinical autoimmune disease and unexplained abortion. *Am J Obstet Gynecol* 150:367-371
- Lubbe WF, Butler WS, Palmer SJ, et al. (1983) Fetal survival after prednisone suppression of maternal lupus-anticoagulant. *Lancet* 1:1361-1363
- Gleicher N and El-Roeiby A (1988) The reproductive autoimmune failure syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 159:223-227
- Hasegawa I, Takakuwa K, Goto S, et al. (1992) Effectiveness of prednisolone/aspirin therapy for recurrent aborters with antiphospholipid antibodies. *Hum Reprod* 7:203-207
- Takakuwa K, Yasuda M, Hataya I, et al. (1996) Treatment for patients with recurrent abortion with positive antiphospholipid antibodies using a traditional Chinese herbal medicine. *J Perinat Med* 24: 489-494
- Taylor C and Faulk W P (1981) Prevention of recurrent abortion with leukocyte transfusion. *Lancet* 2:68-70
- Mowbray JF, Gibbings C, Liddell H, et al. (1985) Controlled trial of treatment of recurrent spontaneous abortion by immunostimulation with paternal cell. *Lancet* 1:941-943
- Cuchi M, Lim D, Yong DE, et al. (1991) The treatment of recurrent aborters by immunization with paternal cells: controlled trials. *Am J Reprod Immunol* 25:16-17
- Ho HN, Gill TJ3rd, Hsieh HJ, et al. (1991) Immu-

- notherapy for recurrent abortion in a Chinese population. *Am J Repro Immunol* 25:10-15
- 13) Gatenby PA, Cameron K, et al. (1993) Treatment of recurrent spontaneous abortion by immunization with paternal lymphocytes: results of a controlled trial. *Am J Reprod Immunol* 29, 88-94
 - 14) Kano T (1999) Efficacy of Sairei-To therapy in cases of allogeneic immunoabnormal recurrent abortion in which lymphocyte transplantation from the husband was ineffective or contraindicated. *Adv Obstet Gynecol* 51:337-343
 - 15) MacConell HD, and Carr DH (1976) Recent advances in the cytogenic study of human spontaneous abortion. *Obstet Gynecol* 45:547-552
 - 16) Lauritsen JG (1976) A etiology of spontaneous abortion. *Acta Obstet Gynecol (Scand Supplement)* 52:1-29
 - 17) Takakuwa K, Yasuda M, Asano K, et al. (1997) Chromosome analysis of aborted conceptuse of recurrent aborters positive for cardiolipin antibody. *Fertil Steril* 68:54-58
 - 18) Aoki K, Kajiura S, Ogasawara, M, et al. (1995) Preconceptual natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 345:1340-1342
 - 19) Warburton D, Kline J, Stein Z, et al. (1987) Does the karyotype of a spontaneous abortion predict the karyotype of subsequent abortion? Evidence from 273 woman with two karyotyped spontaneous abortions. *Am J Hum Genet* 4:465-483
 - 20) Plachot M, Veigo A, Montagut J, et al. (1980) Are clinical and biological IVF parameters correlated with chromosomal disorders in early life: a multicentric study. *Hum Reprod* 3:627-635
 - 21) Hassold TG (1980) A cytogenetic study of repeated abortion. *Am J Hum Genet* 2:723-730
 - 22) Kano T, Furudono M, Okuyama K, et al. (1994) A study of factors associated with habitual abortion in patients with unexplained infertility. *Jpn J Fertil Steril* 39:24-31
 - 23) The recurrent miscarried immunotherapy trialists group (1994) Worldwide collaborative observational analysis on allogeneic leucocyte immunotherapy for recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 32:55-72
- (Received December 21, 1999)
(Accepted February 22, 2000)

父親リンパ球移植は不育症(反復流産)の 女児を救う

假野隆司, 古殿正子, 加納万里子, 石井みさ子, 前田 豊¹⁾, 植木 實²⁾

医療法人 假野クリニック

¹⁾株式会社ファルコバイオシステムズ

²⁾大阪医科大学産婦人科学教室

死亡胎児の染色体研究は次回妊娠胎児の生存に寄与しなければならない。夫(父親)のリンパ球移植によって阻止される流産胎児の性差を調べる目的で、免疫治療を行ったことがない23例の自己抗体陰性不育症(反復流産)の流産胎児の染色体と、夫リンパ球移植によって生児を獲得した67例の性差を、不妊症治療によって生児を獲得した流産の既往がない168例をコントロールとして臨床統計学的に検討した。

流産胎児のなかで正常染色体児は73.9%であり、そのなかで46,XXが16例(94.1%)を占めた。それらの症例のなかで免疫治療を行わないで生児を獲得した7例中1例(14.3%)が女児で、正常染色体流産胎児の46,XXに対して有意($P < 0.001$)に低率であった。夫リンパ球移植によって生児を獲得した67例のうち女児は43.3%で、正常流産胎児の46,XX比率に対して有意($P < 0.001$)に高率であった。流産胎児染色体が46,XXであった7例のなかで、我々が夫リンパ球移植の適応と考える夫婦のHLA class II抗原のsharing 2個以上は6例(85.7%)、夫固有2個以下の症例は4例(57.1%)であった。

以上の結果より、以下の結論が得られた。自己抗体陰性不育症の流産胎児の染色体核型は46,XX等の女児が多数を占める。女児の流産率が高い原因は夫保有のHLA class II 抗原の免疫作用に関係した移植片(胎児)に対する宿主(母体)の低応答性の免疫状況下に、母体にとって遺伝子的にホモである、出生すれば生存できる核型の女児が着床すると近親児として拒絶されるためと推察された。しかし、以上の女児の流産は夫リンパ球移植によって阻止できる。

キーワード：染色体、不育症、HLA、リンパ球

(日不妊会誌 45:113-118 2000)

神経終末タンパク質 Amphiphysin I のヒト精巣における発現

Expression of Amphiphysin I, a Nerve Terminal-enriched Protein, in the Human Testis

渡部昌実

Masami WATANABE

岡山大学医学部泌尿器科学教室

Department of Urology, Okayama University School of Medicine,
Okayama 700-8558, Japan

Amphiphysin(amph) I はニューロンの軸索終末部に局在し、dynamamin GTPase と結合してシナプス小胞膜の clathrin-mediated endocytosis の過程に重要な役割を果たすタンパク質である。我々はウェスタンブロット法を用いて amph I のヒト精巣での発現を検索した。精巣腫瘍2例、停留精巣2例、および無精子症3例の計7精巣において、amph I に対する特異抗体により128kDaのバンドを、amph I が結合するタンパク質と考えられているdynamaminの特異抗体により100kDaのバンドをそれぞれ認めた。amph I およびdynamaminの精子発生への関与を調べるために、それぞれの発現量と精子発生度を組織学的に計測し、Johnsen's score との相関を解析した。amph I の発現量と Johnsen's score の間には統計学的に有意な正の相関を認めたが、dynamamin については有意な相関を認めなかった。今回の結果より、ヒトの精巣において amph I が精子発生に重要な役割を果たしている可能性がある。

キーワード：アンフィファイジン、ダイナミン、エンドサイトーシス、精子発生、男性不妊症

(日不妊会誌 45:119-125 2000)

緒言

Amphiphysin(amph) I はニワトリの神経終末部から見つかった128kDaのタンパク質であるが¹⁾、同部に局在するdynamaminと結合してシナプス小胞膜の clathrin-mediated endocytosis(以下、エンドサイトーシス)に重要な役割を果たすとされている^{2,3)}。また、乳癌や肺小細胞癌などに随伴して様々な神経症状を呈するparaneoplastic syndromeの存在が以前より報告されているが、近年、amph I はparaneoplastic syndromeを引き起こす自己抗原のひとつであることが証明された⁴⁻⁶⁾。

amph I の非神経性組織での発現に関しては、ラットでの解析がなされており、とくに精巣で強く発現していることが報告されている^{4,6,7)}。このことか

ら、amph I と男性不妊症との関連性も示唆されている⁸⁾。我々はこれまでに、amph I がラット精巣のセルトリ細胞に局在し、その発現レベルが精子発生と密接に関係していることを見出している⁹⁾。また、amph I が結合するdynamaminもラット精巣のセルトリ細胞で発現しており¹⁰⁾、セルトリ細胞でこれらのタンパク質が発現し、エンドサイトーシスによる精細胞への栄養供給機構を介して精子発生に関与している可能性は強い。一方、ヒトの精巣においてamph I が発現しているかどうかの報告はこれまでになく、我々はウェスタンブロット法を用いてamph I のヒト精巣での発現を明らかにするとともに、様々な状態におけるヒト精巣でのamph I の発現を解析した。また、amph I と結合してエンドサイトーシスに重要な働きをするdynamaminについても同様の解析を加えた。

対象と方法

対象は、精巣腫瘍による高位除睾術の際に得られた正常部の精巣組織2検体(症例1,セミノーマ; 症例2, 複合組織型胚細胞腫瘍), 停留精巣の患者で摘出された精巣組織2検体(症例3, 4), および無精子症患者の精巣生検組織3検体(症例5-7)の計7検体である。Malignant lymphomaに対して化学療法が行われていた症例5を除いて、抗癌剤などの造精障害を惹起する薬剤は投与されていなかった。当院不妊外来を受診した5例(症例3-7)では、血清中のtotal testosterone値とFSH値を測定した。また、精巣の組織学的評価としてJohnsen's scoreを算出し¹¹⁾、ウェスタンブロット法で定量したamph I およびdynaminの発現量との間で統計学的検討を行なった。

1 抗体

amph I に対する抗体は、乳癌に伴いparaneoplastic sensory neuropathyを示した患者血清中に含まれる自己抗体をIgGに精製して使用した⁶⁾。Dynaminに対する抗体は、市販の抗dynaminモノクローナル抗体(Transduction Laboratories(Lexington, KY))を使用した。

2 ウェスタンブロット法

摘出したヒト精巣組織は、付着した血液を除去し直ちに液体窒素で凍結し-80℃で保存した。各精巣組織片(20~50mg)をlysis buffer[62.5mM Tris-HCl, pH6.8; 0.25M sucrose; 2% sodium dodecyl sulfate (SDS); 1.25% 2-mercaptoethanol; Iu/ml Aprotinin (Boehringer Mannheim); 1mM 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride, hydrochloride (Pefabloc SC, Boehringer Mannheim)]中で超音波処理してcell lysateとした。このlysateをCoomassie plus Protein Assay Reagent(Pierce)でタンパク質定量し、その30μgタンパクを6%SDS-PAGEで分離した。ニトロセル

ロース膜にblotting後、10%正常ウマ血清と5%skim milkを含むTBS(10mM Tris-HCl, pH7.6, 150mM NaCl)で2時間ブロッキングし、1%gelatinを含むTTBS(20mM Tris-HCl, pH7.5, 500mM NaCl, 0.05% Tween-20)溶液で稀釈した一次抗体と37℃で2時間反応した。Horseradish Peroxidaseをconjugateした二次抗体(Bio-Rad)を1%gelatinを含むTTBSで稀釈し、25℃で1時間反応させた後、methoxynaphtholにより発色させた。発色されたバンドはBio Image Intelligent Quantifier 2.2.1.(Genomic Solutions, Ann Arbor, MI)を用いて定量化した。なお、タンパク質分子量マーカーとしてMolecular Weight Standard-High (Bio-Rad)を用いた。

amph I およびdynaminの発現が既に報告されている成熟ラットの精巣組織をpositive controlとして、各症例の精巣組織についてamph I およびdynaminの発現を検討した^{6, 12)}。

3 血清中testosterone値とFSH値の測定

血清中のtestosterone値をトータルテストステロンキット(日本DPCコーポレーション)、FSH値をスパック-S FSHキット(第一ラジオアイソトープ研究所)を用いてそれぞれ測定した。

4 Johnsen's scoreの算出と統計学的検討

Bouin液で浸潤固定した各症例の精巣組織をパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、Johnsen法¹¹⁾に準じてJohnsen's scoreを算出した。ウェスタンブロット法で定量したamph I およびdynaminの発現量とJohnsen's scoreとの間で、回帰分析を用いてそれぞれの相関関係を検討した。

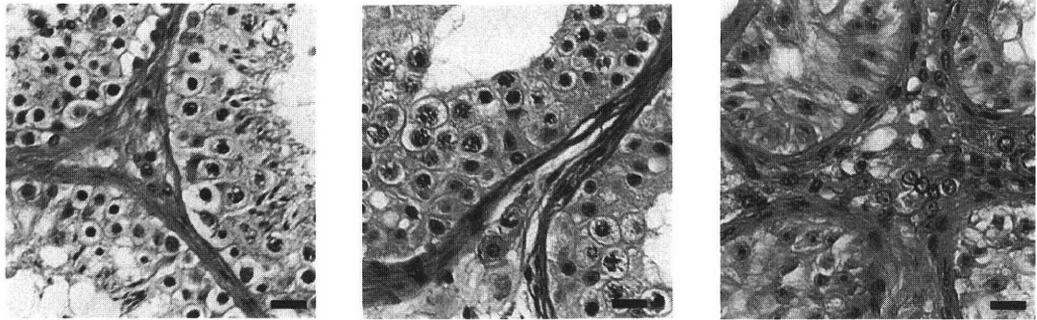
結 果

1 患者背景

患者年齢、病名、血清中testosterone値とFSH値、Johnsen's scoreの結果をTable 1に示した。患者の年

Table 1 Characteristics of cases examined

| 症例 | 病名 | 年齢 | 血清中T値 (ng/ml) | 血清中FSH値 (mIU/ml) | 組織学的検索 | Johnsen's score |
|----|-----------|----|------------------|---------------------|--------|-----------------|
| 1 | 精巣腫瘍 | 48 | — | — | 非腫瘍部精巣 | 8.1 |
| 2 | 精巣腫瘍 | 33 | — | — | 非腫瘍部精巣 | 5.2 |
| 3 | 停留精巣 | 32 | 5.4 | 22.2 | 精巣 | 4.1 |
| 4 | 停留精巣 | 31 | 3.8 | 8.9 | 精巣 | 4.5 |
| 5 | 化学療法後無精子症 | 39 | 6.2 | 10.8 | 精巣 | 2 |
| 6 | 特発性無精子症 | 29 | 4.7 | 17.7 | 精巣 | 2 |
| 7 | 特発性無精子症 | 31 | 4.7 | 29.7 | 精巣 | 2 |



A. 症例1 成熟精子を認め、ほぼ正常の精子発生が認められる。
 B. 症例3 精母細胞までの精子発生しか認められない。
 C. 症例7 精細管内に精細胞は存在せずセルトリ細胞のみ認める。

Fig. 1 Histological changes in the patient's testis (HE staining, Bar=20µm)

年齢は29歳から48歳(平均34.7歳)で、測定し得た5症例のtestosterone(T)値は全症例で正常範囲にあったが、FSH値はいずれの症例においても高値を示した。Johnsen's scoreは、症例1では8.1でありほぼ正常の精子発生が認められたが(Fig.1A)、症例2および停留精巣の2例においてはscoreは4~5であり、観察したほとんどの精細管において精母細胞までの精子発生しか確認できなかった(Fig.1B)。また、当科不妊外来の精液検査で無精子症であった症例5~7の患者の精巣ではいずれもJohnsen's scoreが2であり、観察したすべての精細管において精細胞は存在せず、セルトリ細胞のみを認めた(Fig.1C)。

2 ヒト精巣における amph I, dynamin の発現

amph I 特異抗体を使用するウェスタンブロット法により、ラット精巣組織で検出される128kDaの単一バンドに一致するバンドがヒト精巣組織でも検出され、ヒト精巣においても128kDaのamph Iが発現していることが証明された(Fig.2A)。amph Iの各症例の精巣での発現を定量したところ、ほぼ正常の精子発生を示した症例1で最も高い値を示し、停留精巣、無精子症精巣の症例では発現が低下する傾向を認めた(Fig.2B)。症例2の精巣は、症例1と同様に精巣腫瘍患者より摘出された精巣組織であるが、amph Iの発現量は症例1と比して低値を示した。

また、dynaminもラットおよびヒトの精巣組織で100kDaのバンドが検出され、ヒト精巣でのdynaminの発現も明らかとなった(Fig.3A)。Dynaminの発現量を各症例間で比較すると、amph Iの場合と異なり

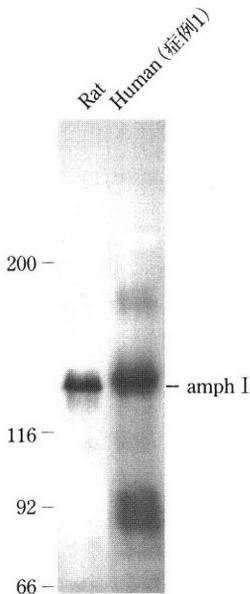


Fig.2A Expression of amph I in the rat and human testis

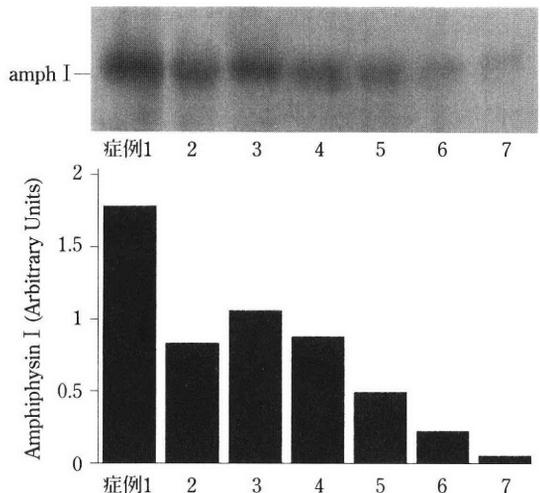


Fig. 2B Expression of amph I in each case

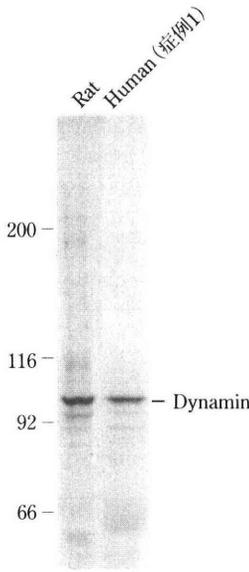


Fig.3A Expression of dynamin in the rat and human testis

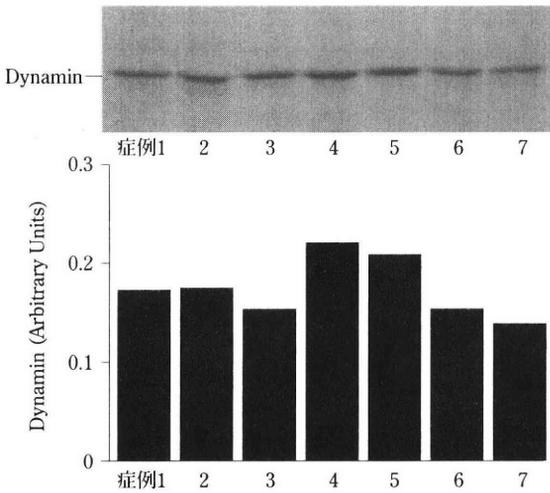


Fig. 3B Expression of Dynamain in each case

その発現量に大きな差は認められなかった(Fig. 3B).

3 amph I, dynaminの発現とJohnsen's scoreとの関係

ヒト精巣でのamph Iの発現と精子発生との関係を明らかにするために、その発現量と精子発生の組織学的指標となるJohnsen's scoreとの相関を検討した(Fig.4A). 相関係数は0.89(p=0.0014)と有意な相関が認められ、精子発生がより進んだ精巣ほどamph Iの発現量が増加していることが示された。一方, dyna-

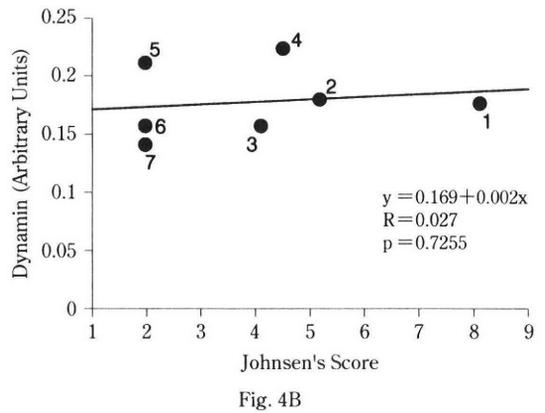
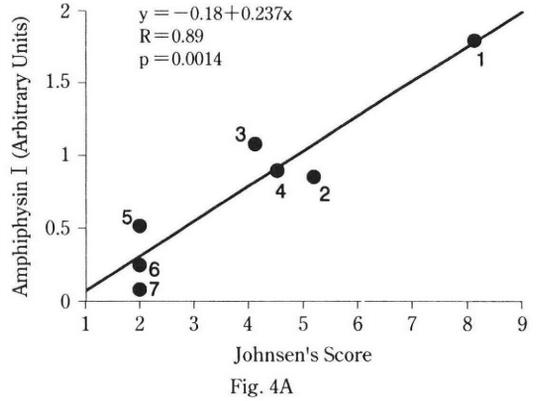


Fig. 4 Correlation between Johnsen's score and the expression of amph I (A) and dynamin (B) (Number attached to each dot represents the case number in Table 1)

minの発現とJohnsen's scoreとの間では、相関係数0.027(p=0.7255)で、精子発生度とその発現量との間には有意な相関は認められなかった(Fig.4B).

考 察

amph I はニューロンの軸索終末部に発現している128kDaのタンパク質であるが¹⁾、何らかの原因で乳癌や肺小細胞癌の癌細胞で発現した場合、その自己抗体によりparaneoplastic syndromeを引き起こす^{4, 6)}。実際、241人のparaneoplastic syndrome患者の血清の2.9%から抗amph I抗体が検出されている¹³⁾。amph Iはニューロンの軸索終末部においてdynamainおよびclathrin adaptor AP2 adaptinと結合する^{2, 3)}。後者は clathrin-coated vesicleの構成タンパク質で^{2, 14)}、amph Iは細胞膜よりclathrin-coated vesicleを切り取る機能を持つdynamain^{15, 16)}をcoated vesicle周辺に補充する機能を有すると考えられている³⁾。ラッ

ト精巣においてamph Iが発現していること^{4,6,7)}およびニューロンの軸索終末部でamph Iと結合するdynaminもラット精巣内で発現していること^{12,17)}は既に報告されているので、精巣内でこれらのタンパク質がエンドサイトーシスに関与している可能性は高いと考えられる。amph Iは多くの非神経性組織でもその発現が報告されており⁶⁾、amph Iとdynaminの結合を阻害することにより、transferrin¹⁷⁾、epidermal growth factor¹⁷⁾、GLUT4 glucose transporter¹⁸⁾などの物質の細胞内への取り込みが減少することが培養細胞を用いて示され、amph Iは非神経細胞でもdynaminをその作用部位へ補充することによりエンドサイトーシスに重要な役割を果たすと考えられている¹⁷⁾。

今回我々は、抗amph I特異抗体を用いて、amph Iがヒト精巣においても高度に発現していることを見出した。既に我々は、ラット精巣においてはamph Iがセルトリ細胞に局在し精細胞や間質細胞には認められないことを免疫組織化学的に証明しており⁹⁾、ヒト精巣でもamph Iがセルトリ細胞に発現している可能性が高い。セルトリ細胞は支持細胞と呼ばれ、精細胞の間に複雑な細胞質突起を出して分化中の生殖細胞を取り囲み、精子発生を円滑にするための様々な特殊機能を果たすと考えられている。また、セルトリ細胞同士は血液精巣関門として働く特殊な密着結合で結ばれ、これにより精細管は基底区画と傍腔区画として分けられている¹⁹⁾。血液精巣関門を高分子物質は通過することができないため、傍腔区画内にある精細胞への栄養物質の輸送はセルトリ細胞を介して行われると考えられている²⁰⁾。実際、血流に近いセルトリ細胞の基底部ではエンドサイトーシスが盛んに行なわれており²¹⁻²⁴⁾、精細胞に対する栄養輸送のひとつの手段となっていることが想像されている。ヒト精巣でamph Iおよびdynaminが発現していることは、ヒトのセルトリ細胞でも神経終末部同様、これらのタンパク質を介してのエンドサイトーシスにより精子発生に必要な栄養物質が取り込まれ、精子発生過程にある精細胞に送られる可能性を示唆する。

今回の検討で、症例数が少ないながらもamph Iの発現が精子発生の状態と極めて密接な相関をもつことを示した意義は極めて大きい。症例1では精子発生は形態学的にほぼ正常であり、amph Iの発現も極めて高かった。一方、停留精巣、特発性および化学療法による無精子症の精巣では、精子発生の指標としての血清中FSH値がいずれも異常値であり、また、

症例2と共に組織学的にも精子発生障害が証明され、これらの精子発生の障害された精巣でamph Iの発現が低かったことは、amph Iの発現量の低下が精子発生に影響を与えた可能性を示す。しかしながら、セルトリ細胞でのFSH、LDHの発現を免疫組織化学的に解析した報告によると²⁵⁻²⁷⁾、精子発生の障害されたヒト精巣ではセルトリ細胞の機能が低下していることが示されており、精子発生障害後の精細管内の環境変化により二次的にセルトリ細胞でのamph Iの発現が障害された可能性も考えられる。amph Iの発現の低下が精子発生障害の結果惹起されたものなのか、amph Iの発現低下が誘因となって精子発生が障害されたのか、さらに検討が必要である。

今回我々がヒトの精巣において発現を確認したamph Iおよびdynaminは、いずれもニューロンにおいてその機能が詳しく解析されているタンパク質である。同様に、精巣と神経組織では、これ以外にも共通のタンパク質が発現していることが知られている²⁸⁾。これらの共通するタンパク質の精巣における機能解析は、不明な部分が多い精子発生の分子機構を明らかにし、依然、その原因が不明である特発性男性不妊症の病態解明への突破口になる可能性が高い。少なくとも、精巣におけるamph Iの機能解析は、セルトリ細胞のエンドサイトーシスおよびセルトリ細胞による精子発生機構を解明する手がかりのひとつになると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導ならびに御校閲を賜った恩師公文裕巳教授(岡山大学医学部泌尿器科学講座)に深謝いたします。また直接御指導頂いた徳永 叡教授(同解剖学第三講座)および筒井公子講師(同解剖学第三講座)、筒井 研助教授(同分子細胞医学研究施設、病態分子生物学部門)、そして実験に御協力頂いた竹内玲子技術員(同解剖学第三講座)に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lichte B, Veh RW, Meyer HE, et al. (1992) Amphiphysin, a novel protein associated with synaptic vesicles. *Embo J* 11:2521-2530
- 2) David C, McPherson PS, Mundigl O, et al. (1996) A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:331-335
- 3) Marsh M and McMahon HT (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285:215-220

- 4) De Camilli P, Thomas A, Cofield R, et al. (1993) The synaptic vesicle-associated protein amphiphysin is the 128-kD autoantigen of Stiff-Man syndrome with breast cancer. *J Exp Med* 178:2219-2223
- 5) David C, Solimena M and De Camilli P (1994) Autoimmunity in stiff-Man syndrome with breast cancer is targeted to the C-terminal region of human amphiphysin, a protein similar to the yeast proteins, Rvs167 and Rvs161. *FEBS Lett* 351:73-79
- 6) Floyd S, Butler MH, Cremona O, et al. (1998) Expression of amphiphysin I, an autoantigen of paraneoplastic neurological syndromes, in breast cancer. *Mol Med* 4:29-39
- 7) Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, et al. (1997) Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J Biol Chem* 272:16700-16706
- 8) Yamamoto R, Li X, Winter S, et al. (1995) Primary structure of human amphiphysin, the dominant autoantigen of paraneoplastic stiff-man syndrome, and mapping of its gene (AMPH) to chromosome 7p13-p14. *Hum Mol Genet* 4:265-268
- 9) 渡部昌実, 筒井公子, 徳永 勲 他(1999) Amphiphysin I のラット精巣における免疫組織学的局在. *解剖学雑誌* 74:95(B121)
- 10) Nakata T, Takemura R and Hirokawa N (1993) A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J Cell Sci* 105:1-5
- 11) Johnsen SG (1970) Testicular biopsy score count-A method for registration of spermatogenesis in human testis: Normal value and results in 335 hypogonadal males. *Hormone* 1:2-25
- 12) Okamoto PM, Herskovits JS and Vallee RB (1997) Role of the basic, proline-rich region of dynamin in Src homology 3 domain binding and endocytosis. *J Biol Chem* 272:11629-11635
- 13) Saiz A, Dalmau J, Butler MH, et al. (1999) Anti-amphiphysin I antibodies in patients with paraneoplastic neurological disorders associated with small cell lung carcinoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:214-217
- 14) Wang LH, Sudhof TC and Anderson RG (1995) The appendage domain of alpha-adaptin is a high affinity binding site for dynamin. *J Biol Chem* 270:10079-10083
- 15) Takei K, McPherson PS, Schmid SL, et al. (1995) Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gamma S in nerve terminals. *Nature* 374:186-190
- 16) Liu JP and Robinson PJ (1995) Dynamin and endocytosis. *Endocr Rev* 16:590-607
- 17) Wigge P, Vallis Y and McMahon HT (1997) Inhibition of receptor-mediated endocytosis by the amphiphysin SH3 domain. *Curr Biol* 7:554-560
- 18) Volchuk A, Narine S, Foster LJ, et al. (1998) Perturbation of dynamin II with an amphiphysin SH3 domain increases GLUT4 glucose transporters at the plasma membrane in 3T3-L1 adipocytes. Dynamin II participates in GLUT4 endocytosis. *J Biol Chem* 273:8169-8176
- 19) Dym M and Fawcett DW (1970) The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biol Reprod* 3:308-326
- 20) Burger H and Kretser DD (1981) The testis. In : Martini L. (eds), 1st ed, *Comprehensive endocrinology*. Raven Press, pp171-194
- 21) Clermont Y, Morales C and Hermo L (1987) Endocytic activities of Sertoli cells in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences* 513:1-15
- 22) Morales C and Clermont Y (1986) Receptor-mediated endocytosis of transferrin by Sertoli cells of the rat. *Biol Reprod* 35:393-405
- 23) Dai RX, Djakiew D and Dym M (1987) Endocytic activity of Sertoli cells grown in bicameral culture chambers. *Anto Rec* 218:306-312
- 24) Forti G, Barni T, Vannelli BG, et al. (1989) Sertoli cell proteins in the human seminiferous tubule. *J Steroid Biochem* 32:135-144
- 25) Goslar HG, Hilscher B, Hilscher W, et al. (1982) Enzyme histochemical studies on the pathological changes in human sertoli cells. *J Histochem Cytochem* 30:1268-1274
- 26) Yoon DJ, Golimbu M, David R, et al. (1987) Immunocytochemical localization of hFSH as an index of Sertoli cell function in the human testis. *Acta Endocrinologica* 116:333-338
- 27) Steger K, Rey R, Bergmann M, et al. (1996) Immunohistochemical detection of immature sertoli cell markers in testicular tissue of infertile adult men : a preliminary study. *Int J Androl* 19:122-128
- 28) 湯浅茂樹 (1997) NeurogenesisとSpermatogenesisの接点. *千葉医学* 73:323-330

(受付: 1999年12月24日)

(受理: 2000年2月23日)

Expression of Amphiphysin I , a Nerve Terminal-enriched Protein, in the Human Testis

Masami Watanabe

Department of Urology, Okayama University School of Medicine,
Okayama 700-8558, Japan

Amphiphysin (amph) I is a SH3 domain-containing 128kDa protein, concentrated in nerve terminals. The protein plays an essential role in clathrin-mediated endocytosis through an interaction with GTPase dynamin.

Western blot analyses using anti-amph I specific antibody and anti-dynamin monoclonal antibody clearly detected their specific expressions in the testicular tissues from patients with testicular cancer (N=2), cryptorchidism (N=2), or azoospermia (N=3). At the same time, we investigated relationship between the expression levels of these proteins and Johnsen's score, a biopsy score indicating spermatogenesis in the human testis. A significant positive correlation between amph I expression and Johnsen's score was observed, but not between dynamin expression and Johnsen's score. The appropriate expression of amph I appears to play an important role in spermatogenesis by controlling the environment milieu within the seminiferous tubules through clathrin-mediated endocytosis.

Key words: amphiphysin, dynamin, endocytosis, spermatogenesis, male infertility

(Jpn J Fertil Steril 45:119-125 2000)

体外受精における卵胞液中各種 steroid 濃度比と卵胞径 および embryo quality との関係

Correlation between Steroid Environment in Follicular Fluid, Follicular Diameter and Embryo Quality in *in vitro* Fertilization.

岩崎 信爾

Shinji IWASAKI

齋藤

Hiroshi SAITO

田原 隆三

Ryuzo TAHARA

裕

Takumi YANAIHARA

藤間 芳郎

Yoshiro TOMA

巧

昭和大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,

Showa University School of Medicine, Tokyo 142-8666, Japan

卵胞の発育にともない卵胞液中steroid(St)濃度が変化することが知られている。IVF-ET症例(4例)の採卵時に得られた卵胞液(n=68)中St濃度を測定し、St代謝酵素活性の評価としてSt濃度比を求め、卵胞径(FD)およびembryo quality(EQ)を比較検討した。なお、EQは媒精後42時間における分割球(n=26)をfragmentの状態よりG1(分割球とfragmentとの見分けがつかないもの)、G2(平等分割球だが20~30%のfragmentを含んでいるもの)、G3(平等分割球でfragmentがほとんど見られないもの)の3群に分類した。17 α -hydroxylase活性(17 α -hydroxyprogesterone/progesterone(P₄)比)はFDとの間に負の相関(p<0.05)を認めた。17 β -hydroxysteroid dehydrogenase活性(testosterone(T)+estradiol(E₂)/androstenedione(A)+estrone(E₁)比)およびaromatase活性(E₁+E₂/A+T比)はFDと正の相関を認めた(p<0.05)。St代謝酵素活性とEQとの間には有意差を認められず、またEQとFDの間にも有意差は見られなかった。しかし採卵時において21mm以上の大卵胞よりも16~20mmの卵胞でG3の発生率が高かった。さらにE₂/P₄比においてG3群はG1群より有意(p<0.05)に高値を認めた。以上より過度に発育した卵胞においてはsteroidogenesisの変化によりE₂/P₄比の低下を招き、胚のqualityを低下させる可能性が示唆された。

キーワード：IVF-ET、卵胞径、steroidogenesis、embryo quality、steroid濃度比

(日不妊会誌 45:127-132 2000)

緒 言

従来より卵胞の発育に伴い卵胞液中steroid濃度が変化することが知られている。体外受精・胚移植(IVF-ET)の採卵時に得られた卵胞液中のsteroid濃度と卵の成熟度およびembryo qualityの関係を推察する試みがなされており¹⁻³⁾、卵胞液中のsteroid濃度と卵および胚のqualityとの関連が示唆されている。しか

し卵胞液中steroid濃度およびそれらの比から類推した卵胞内steroid環境と胚の質についての検討はされていない。そこで今回IVF-ETの採卵時に得られた卵胞液中の各種steroid濃度を測定し、卵胞におけるsteroid代謝酵素活性の評価として代謝物濃度/基質物濃度比を求め、このsteroid濃度比と卵胞径およびembryo qualityとの関係を検討した。

対象および方法

対 象

当院不妊外来において、卵管性不妊と診断し、IVF-ETをおこなった患者4名を対象とした。患者年齢は30歳から38歳であり(33.5±4.1歳: mean±SD)、不妊期間は2年4カ月から12年8カ月(5.5±4.8年: mean±SD)であった。IVF-ET周期で卵胞液68検体と卵54検体を採取した。また各症例間には採卵時の血中ステロイド値、卵胞径およびembryo qualityにおいて有意差はなかった。なお、本研究は患者の同意のもと行われた。

方 法

1 IVF-ET療法

1) 卵巣刺激法

long-protocolとして、前周期の黄体期7日目よりGnRH analog (Spurecur®, アベンティス) 1,200μg/dayの連日投与を行い、血中LH、FSHおよびestradiol (E₂) のdown regulationを確認後、FSH製剤(フェルティノームP®, セローノ・ジャパン) 300IUを連日皮下投与した。超音波検査にて次席卵胞径が18~20 mmに達した時点でhCG(ゴナトロピン®, 帝国臓器) 10,000IUを投与した。

2) 採卵方法

hCG投与35時間後に経膈超音波にて卵胞径(3方向の平均)を計測した後、経膈超音波下卵胞穿刺により卵(n=54)を採取し、同時に卵胞液(n=68)を採取した。卵胞液中に卵を認めない場合は3回までmodified human tubal fluid (m-HTF®: アーバイン社)にて卵胞内をflushし、各々のflushed medium中で再度卵の確認を行った。卵胞液は直ちに遠心分離により細胞成分を除去後、steroid濃度測定まで-20℃にて保存した。夫の精子数および運動率、奇形率はいずれも正常範囲内であった。

3) 媒 精

得られた卵はO₂:CO₂:N₂=5:5:90のインキュベーター内で5時間の前培養後、媒精を行った。精子処理は採精後約30分間、37℃のCO₂インキュベーター内で液化し、m-HTF(8ml)を加え、転倒混和後遠心し、沈殿した精子ペレットを0.5mlの精子浮遊液としてからSM管(ケンメディカル社)にてswim up・沈降法により良好精子を回収した⁴⁾。媒精は5×10⁴/卵にて行った。

4) 受精の確認

媒精18時間後に前核の有無により受精の確認を

し、受精卵についてはさらに24時間の培養を行った。

5) 胚の評価

媒精後42時間後に卵分割球数およびembryo qualityを確認し、良好胚を3個移植した。なおembryo qualityの評価はBolton⁵⁾の方法をもとに媒精後42時間における分割球とfragmentの状態よりG1(分割球とfragmentとの見分けがつかないもの)、G2(平等分割球だが20~30%のfragmentを含んでいるもの)、G3(平等分割球でfragmentがほとんど見られないもの)、の3群に分類した。

2 steroid濃度の測定

卵胞液中のpregnenolone(P₅)、progesterone(P₄)、17α-hydroxyprogesterone(17P₄)、androstenedione(A)、testosterone(T)、estrone(E₁)およびE₂を清水らの方法⁶⁾によりRIA法で測定した。すなわち卵胞液0.3mlに水飽和ジエチルエーテル(3ml)を加え攪拌後、遠心分離し、各種steroidを含む上清をスナップフリーズ法にて抽出した。各種steroidをLH-20 カラムクロマトグラフィーにて分離し、特異的抗体を用いたRIA法にて測定した。本法におけるintraassay、interassay、coefficient variation はいずれも10%以下である。

3 卵胞液内steroid濃度比

卵胞におけるステロイド代謝に関する酵素活性の評価として、3β-hydroxysteroid dehydrogenase(3β-HSD)活性、17α-hydroxylase(17Hy)活性、C₁₇₋₂₀lyase活性、17β-hydroxysteroid dehydrogenase(17β-HSD)活性およびaromatase活性のそれぞれに介在する代謝物濃度/基質濃度比を求めた⁷⁾。すなわち3β-HSD活性はP₄/P₅比、17Hy活性は17P₄/P₄比、C₁₇₋₂₀lyase活性はA/17P₄比、17βHSD活性はT+E₂/A+E₁比、aromatase活性はE₁+E₂/A+T比とした。

結 果

1 卵胞液中各種steroid濃度と卵胞径との関係

卵胞液中各種steroid濃度、卵胞径およびembryo qualityを表に示した(表1)。卵胞液中のP₅、P₄、17P₄、A、T、E₁、E₂濃度と卵胞径との間には有意な相関を認めなかった。受精卵を認めた卵胞(26個)より得られた卵胞液中のsteroid濃度とembryo qualityとの間に有意差を認めなかった。G1、G2、G3の各群間において卵胞径の有意差は認めなかった。しかし16mm~20mmの卵胞から得られた受精卵の75.0%がG3胚で

表1 採卵時卵胞径とsteroid濃度, embryo quality

| 卵胞径 (mm) | n | | P ₅ ng/ml | P ₄ ng/ml | 17P ₄ ng/ml | A ng/ml | T ng/ml | E ₁ ng/ml | E ₂ ng/ml | embryo quality | | | |
|-------------|----|-------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|----------------|--------------|-------------------------|-------------------------|----------------|----|----|----|
| | | | | | | | | | | n | G1 | G2 | G3 |
| ~10 | 1 | mean ±SD | 46.3 | 2952.5 | 263.6 | 351.5 | 18.8 | 6.9 | 77.4 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 11~15 | 6 | mean ±SD | 90.9 73.0 | 4182.9 2069.9 | 471.2 88.8 | 277.8 205.3 | 28.2 21.4 | 10.5 8.9 | 165.9 63.8 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| 16~20 | 24 | mean ±SD | 90.2 65.8 | 4353.0 1553.8 | 374.9 172.5 | 204.3 297.7 | 25.4 14.4 | 8 5.6 | 158.4 62.6 | 8 | 1 | 1 | 6 |
| 21~25 | 19 | mean ±SD | 82.3 55.0 | 5262.9 2277.5 | 342.2 147.3 | 302.7 141.4 | 23.8 14.4 | 9.5 5.6 | 188.2 48.6 | 9 | 3 | 3 | 3 |
| 26~ | 18 | mean ±SD | 53.2 24.7 | 4764.9 1988.8 | 383.7 196.5 | 249.6 149.3 | 21.6 7.1 | 8.6 3.6 | 168.6 53.1 | 8 | 3 | 2 | 3 |
| 計 | 68 | mean ±SD | 71.0 50.3 | 4648.7 1917.2 | 370.9 165.3 | 250.8 136.4 | 24.4 13.2 | 8.6 5.3 | 169.1 56 | 26 | 7 | 7 | 12 |

あり、21mm以上の卵胞では受精卵におけるG3胚の割合は35.3%であった。

2 卵胞液中各種steroid濃度比と卵胞径との関係

1) 17Hy活性(17P₄/P₄比):17Hy活性は卵胞径の増大にともない減少し卵胞径との間に負の相関(p<0.05)を認め(図1)、大卵胞ほど17Hy活性が低下することが示された。

2) 17β-HSD活性(T+E₂/A+E₁比):17β-HSD活性と卵胞径との間に正の相関(p<0.05)がみられ、大卵胞ほど17β-HSD活性が上昇することが示された(図2)。

3) aromatase活性(E₁+E₂/A+T比):aromatase活性と卵胞径との間においても正の相関を認め(p<0.05)(図3)、大卵胞ほどaromatase活性が上昇していることが判明した。

一方、他のsteroid濃度比から換算した3β-HSD活性およびC₁₇₋₂₀lyase活性においては卵胞径との間には有意な相関は認められなかった。

3 卵胞液中steroid濃度比とembryo qualityとの関係

受精卵が得られた卵胞(26個)より得られた卵胞液中の各種steroid濃度比とembryo qualityとの間には

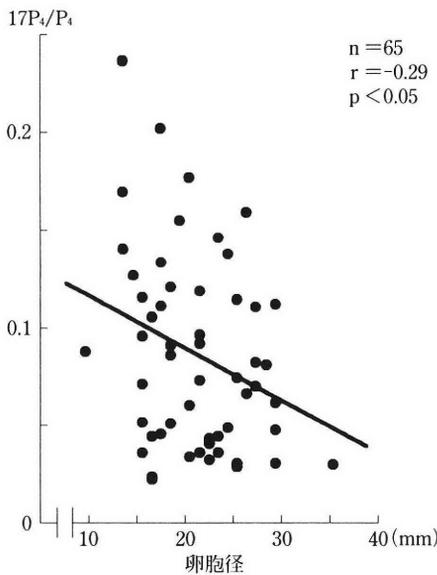


図1 卵胞液中17α-hydroxyprogesterone/progesterone比と卵胞径との関係

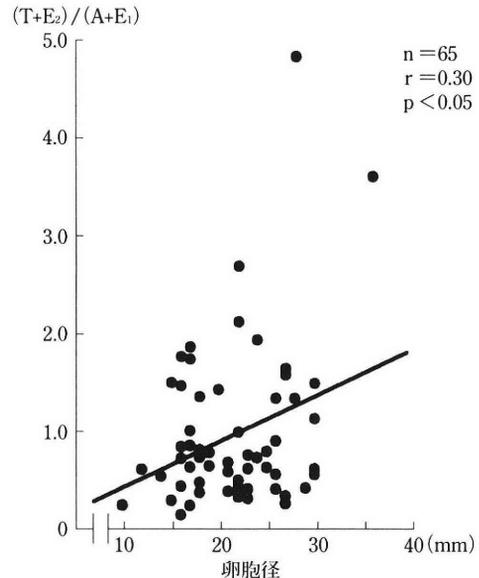


図2 卵胞液中(testosterone+estradiol)/(androstenedione+estrone)比と卵胞径との関係

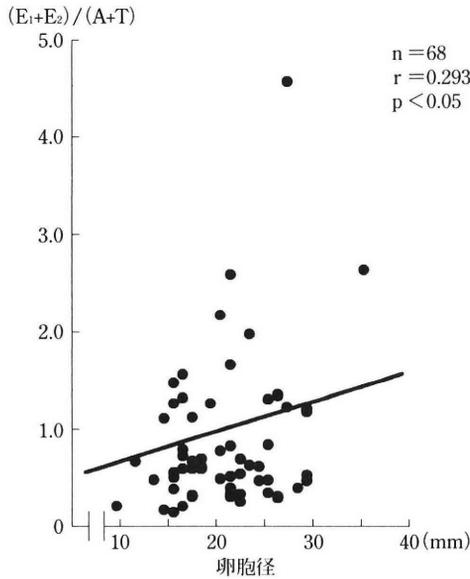


図3 卵胞液中 (estrone+estradiol) / (androstenedione+testosterone) 比と卵胞径との関係

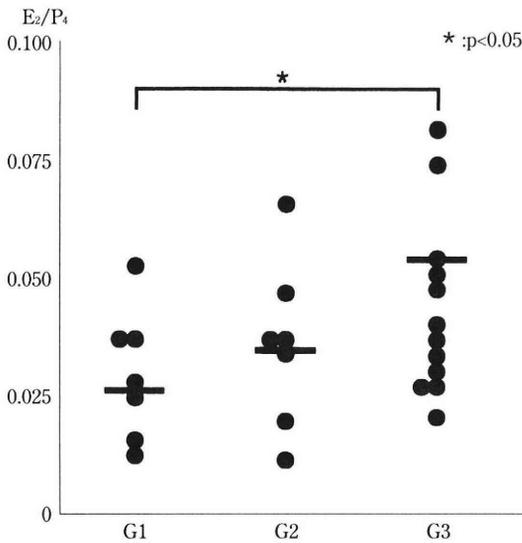


図4 卵胞液中estradiol/progesterone比とembryo qualityの関係

有意差は認められなかった。一方卵胞の早期黄体化の指標となる E_2/P_4 と embryo quality の関係において G3群はG1群に比べて有意に高値 ($p<0.05$) を示した (図4)。

考 察

1978年初の体外受精児が誕生して以来20年以上が

経過し、この間、体外受精・胚移植およびその関連技術、いわゆる assisted reproductive technology は急速な技術改良がなされ、そのため現在の体外受精における採卵率、受精率は格段の進歩を遂げてきた。しかしながら依然として胚移植当たりの妊娠率の上昇が認められず⁸⁾、この原因として胚移植後の低着床率が考えられている。着床に関しては子宮内膜環境を初めとして依然不明な点が多いが、良好な卵や胚を得ることが重要であることは異論を待たない。

卵胞には顆粒膜細胞と莢膜細胞が存在し莢膜では LH作用下でcholesterolからandrogenを合成し、このandrogenが顆粒膜細胞においてFSHの作用下に芳香化を受けてestrogenが生合成され(two cell-two gonadotropin theory)⁹⁾。この卵巣におけるsteroid代謝は周期内変動を有している。すなわち P_5 から P_4 合成に関与する 3β -HSD や、 P_4 から A に至る過程での $17Hy$ 、 $C_{17-20}lyase$ などの酵素活性は卵胞期の初期から中、後期にかけて漸増傾向をとる¹⁰⁾。一方aromatase活性は卵胞発育につれてしだいに増強し、卵胞の黄体化によってaromatase活性はさらに増強する。 $17Hy$ 、 $C_{17-20}lyase$ 活性は排卵後に低下するため¹⁰⁾estrogenの基質となる C_{19} steroidの供給が乏しくなり、estrogenの産生は増強せず、一方 3β -HSDの活性がこの時期に増強するため P_4 産生優位となる¹¹⁾。このように卵胞の発育および黄体化により卵胞におけるsteroid代謝が変化し、このことが卵および胚の質に関与している可能性が考えられる。

今回IVF-ETにおける採卵時に採取した卵胞液のsteroid濃度比からsteroid代謝酵素活性を求めsteroidogenesisと卵胞径との関係を検討した。 $T+E_2/A+E_1$ から換算した 17β -HSD活性および $E_1+E_2/A+T$ より求めたaromatase活性は、卵胞径の増大とともに上昇する。一方、 $17P_4/P_4$ より計算した $17Hy$ 活性は低下を認めた。aromataseや 17β -HSD活性が上昇したことは、顆粒膜細胞の酵素活性の増加によるものか、細胞数の増加によるものかは不明であるが、卵胞径の増大に伴い卵胞全体でのaromatase活性および 17β -HSD活性が亢進していることが示された。 3β -HSD活性は卵胞成熟に伴いはじめ莢膜細胞にその局在を認め、成熟卵胞においては莢膜細胞・顆粒膜細胞双方に局在を認めるようになる^{12,13)}。さらに黄体化により P_4 産生が急増する。一方、 $17Hy$ は卵胞期から黄体期を通じて莢膜細胞のみに発現する¹⁴⁾ことより、卵胞径の増大に伴う顆粒膜細胞数と莢膜細胞数の増加の差により $17Hy$ ($17P_4/P_4$)の低下した可能

性が考えられる。

Embryo qualityと卵胞液中steroid濃度との関係についてFranchimont et al.¹⁾は、受精しなかった、もしくは受精後卵分割異常を認めた胚よりも移植可能な良好な卵分割を認めた卵を採卵し得た卵胞液の方が P_4 濃度が低い傾向を認めたとし、さらに良好な卵を採取できた卵胞液において E_1+E_2/P_4 比が高い傾向を認めたと報告している。一方Rosenbusch et al.³⁾は受精卵と未受精卵および正常胚と異常胚との間には、卵胞液中 E_2/P_4 比に差は見られなかったと報告している。

今回卵胞液中の各種steroid代謝酵素活性とembryo qualityとの間に有意差を示すものはなかったが、 E_2/P_4 比においてG3群はG1群より有意に高値を示した。卵胞径とembryo qualityとの間には有意差は認めないものの大卵胞の胚ではG3(良好胚)の発生率低下が示された。今回、卵胞径と各種steroid活性との関連を検討したところ、卵胞径の増大に伴い17Hy活性が低下することから、過度に発育した卵胞においては E_2/P_4 比の低下を招き、その後の胚のqualityの低下に関与している可能性が示された。しかしステロイドホルモンの卵への直接的な影響は不明であり今後の研究が待たれる。今回の体外受精におけるhCG投与のタイミングは次席卵胞径18~20mmで行ったが、採卵時の卵胞が過度に大きくなる卵胞があり、これらの卵胞より良好胚を得られる確率も低率であった。これは卵胞径の増大に伴う卵胞内steroidogenesisの変化により E_2/P_4 比が低下し、卵および胚のqualityを下げている可能性が考えられた。このことから、hCG投与の時期を次席卵胞径16mmにするなどの工夫により採卵時の卵胞径を至適な大きさにコントロールすることで多くの良好胚を獲得し、ひいては妊娠率の向上につながると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始御協力いただきました当教室千葉博氏に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Franchimont P, Frydman R, Hagelstein MTH, et al. (1989) Correlation between follicular fluid content and the results of *in vitro* fertilization and embryo transfer. I Sex steroids. Fertil Steril 52: 1006-1011
- 2) Sutter PD, Dhont M, Vanluchene E, et al. (1991) Correlation between follicular fluid steroid analysis and maturity and cytogenetic analysis of human

oocytes that remained unfertilized after *in vitro* fertilization. Fertil Steril 55: 958-963

- 3) Rosenbusch B, Djalali M, Sterzik K, et al. (1992) Is there any correlation between follicular fluid hormone concentrations, fertilizability, and cytogenetic analysis of human oocytes recovered for *in vitro* fertilization. Fertil Steril 57:1358-1360
- 4) 荒木重雄, 本山光博, 佐藤 正 他(1990) ヒト卵胞発育機序から見た個別的調節卵巣刺激法について—体外受精・胚移植およびGIFT療法への応用—。産と婦 57:2341-2348
- 5) Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, et al. (1989) Development of spare human preimplantation embryos *in vitro*: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. J IN Vitro Fert Embryo Transf. 6: 30-35
- 6) 清水 篤, 平戸久美子, 日高輝幸 他(1982) 卵巣周期による卵巣ステロイド代謝像の相違。日産婦誌 34:693-700
- 7) Akamatu T, Chiba H, Kamiyama H, et al. (1992) Menopause related changes of adrenocortical steroid production. Asia-Oceania J.Obstet.Gynaecol. 18:271-276
- 8) 青野敏博(1998) 平成9年度 診療・研究に関する倫理委員会報告(平成8年分の体外受精・胚移植の臨床実施成績および平成10年3月における登録施設数)日産婦誌 50:267-273
- 9) Dorrington JH, Moon YS, Armstrong DT, et al. (1975) Estradiol-17 β biosynthesis in cultured granulosa cells from hypophysectomized immature; stimulation by follicle-stimulating hormone. Endocrinology 97:1328-1335
- 10) Sano Y, Suzuki K, Arai K, et al. (1981) Changes in enzyme activities related to steroidogenesis in human ovaries during the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab 52:994-1000
- 11) 川越慎之助(1991) 卵巣におけるステロイド代謝。産婦の世界 43:709-716
- 12) 藤間芳郎, 土屋直子, 齋藤 裕 他(1998) 卵巣におけるホルモン合成と分泌。98冬期増刊号「卵巣—機能と病態生理—」。産婦の世界 35-34
- 13) 深谷孝夫(1995) ヒト卵胞の発育・選択・成熟・閉鎖の局所因子。日産婦誌 47:726-737。
- 14) Tamura T, Kitawaki T, Osawa Y, et al. (1992) Immunohistochemical localization of 17 α -hydroxylase/C₁₇20lyase and aromatase cytochrome P-450 in the human ovary during the menstrual cycle. J Endocrinol 135:589-595

(受付:2000年1月20日)

(受理:2000年2月24日)

Correlation between Steroid Environment in Follicular Fluid, Follicular Diameter and Embryo Quality in *in vitro* Fertilization.

Shinji IWASAKI, Ryuzo TAHARA, Yoshiro TOMA,
Hiroshi SAITO and Takumi YANAIHARA

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

This experiment was undertaken to study the relationship between steroidogenesis in follicles, follicular diameter (FD), and quality of embryo fertilized at IVF procedure. Sixty-eight of follicular fluids (FF) were obtained from 4 patient who were undergone an IVF-ET procedure. The enzyme activities of steroidogenesis were estimated by the ratio of corresponding to steroid (St) contents (product/substrate). Embryo quality (EQ) was classified into 3 groups (G1: Oocyte which is difficult to distinguish between blastomere and fragments., G2: Oocyte, which has well and equally cleavaged blastomere but contained 20-30% fragments., G3: Oocyte, which has well and equally cleavaged blastomere without fragment.). 17α -hydroxyprogesterone/progesterone (P_4) ratio; 17α -hydroxylase activity ($p < 0.05$), testosterone (T)+estradiol (E_2)/androstenedione (A)+estrone (E_1) ratio; 17β -hydroxysteroid dehydrogenase activity ($p < 0.05$) and $E_1 + E_2 / A + T$ ratio; aromatase activity ($p < 0.05$) were significantly correlated with follicular diameter, respectively. There were no significant relation between EQ and FD. However 75% of embryos from follicle of 16-20mm diameter developed into G3 embryo, and 35% of embryos from follicle with over 21mm diameter developed into G3. E_2 / P_4 ratios of G3 group were significantly higher than those of G1 group ($p < 0.05$), while no significant relation between St ratio and EQ was noticed. These data indicated that follicles which were grown excessively resulted in low E_2 / P_4 which consequentially might decrease EQ.

Key words: IVF-ET, follicular fluid, steroidogenesis, embryo quality, steroid ratio

(Jpn J Fertil Steril 45:127-132 2000)

hMG 製剤投与時の Adverse Effect に関する検討 —とくに皮膚症状について—

Adverse Effects of Injection Site with hMG

木下俊彦 大高 究 伊藤元博
Toshihiko KINOSHITA Kiwamu OOTAKA Motohiro ITOU

東邦大学佐倉病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Sakura Hospital,
Toho University, Chiba 285-0841, Japan

hMG製剤の投与にあたっては筋肉内注射が行われるが、注射部位に発赤や、疼痛、硬結、掻痒感などの皮膚症状を認めることがある。hMG製剤を投与された100名(115周期)を対象として注射後の皮膚症状の発現について検討した。hMG製剤としてヒュメゴン®とパーゴナル®を用いた。

注射部位の疼痛は38.3%(44/115)、掻痒感は15.7%(18/115)、発赤は12.1%(14/115)に認められた。全身症状として頭痛が8.7%(10/115)、発熱2.6%(3/115)、倦怠感が7.0%(8/115)に認められた。

アレルギー反応検査からこれらの症状はhMG製剤に対するアレルギー反応であることが推定された。

hMG製剤にアレルギーがみられた例では、精製FSH製剤を用いることでアレルギー反応なしに排卵誘発の継続が可能であった。アレルギーが心配される例では精製FSH製剤を用いて排卵誘発を行うのが望ましい。

キーワード：アレルギー反応、hMG製剤、不妊症、排卵誘発

(日不妊会誌 45:133-136 2000)

緒 言

hMG製剤の投与にあたっては筋肉内注射が行われるが、注射部位に発赤や、疼痛、硬結、掻痒感などの皮膚症状を認めることがある。hMG製剤が不妊治療において広く利用されている現状を鑑みれば、adverse effectに対しても理解を深める必要がある。しかしながら、我国では皮膚症状については報告が少なく、頻度などについても明らかにはされていない。

そこで、我々はhMG製剤の投与にあたってadverse effectとしての皮膚症状について注目し、検討を加えたので報告する。

対 象

平成8年11月から平成10年11月まで当科で治療し

た患者100名、115周期を対象とした。患者は体外受精・胚移植に際しhMG製剤を投与された。hMG製剤はヒュメゴン®(100単位、ないし150単位、オルガノン社、オランダ)とパーゴナル®(150単位、帝国臓器、日本)を投与した。ヒュメゴン®投与を53例(60周期)、パーゴナル®投与を47例(55周期)に行った。

注射方法

投与直前に粉末の注射剤を添付された0.9%の生理食塩水1ccにて溶解し、患者臀部に23ゲージ針を用いて筋肉内注射を行った。

調査方法

hMG製剤投与初日に患者へ調査票を渡し、毎回の注射後の注射部位の疼痛、掻痒感、24時間以上持続する発赤の有無および全身状態の観察として倦怠

感、頭痛、発熱(37.5°C以上)の有無について記載させた。疼痛などの自覚症状については患者自身に強い、中等度、弱い、なしのいずれかを判断させた。問診から他の薬剤アレルギーを有する患者はあらかじめ調査より除外した。調査に当たっては患者の同意を得た。

結果は周期あたりの比率として評価した。薬剤間の比率の分析はカイ2乗検定を行った。

結 果

投与患者の平均身長、体重は155.9±5.9 cmと55.9±4.7kgであった。各使用製剤間には身長、体重に差を認めなかった(ヒュメゴン®例156.2±3.8cm, 56.5±4.3kg, パーゴナル®例155.5±2.3cm, 55.4±6.0kg)。一日平均投与単位数はヒュメゴン®で306.6±46.0IU, パーゴナル®で161.6±32.7IUであった。hMG製剤は平均9.1日投与された(表1, mean±SD)。注射部位の疼痛は38.3%(44/115)、搔痒感は15.7%(18/115)、発赤は12.1%(14/115)に認められた。全身症状として頭痛が8.7%(10/115)、発熱2.6%(3/115)、倦怠感が7.0%(8/115)に認められた。ヒュメゴン®投与例では疼痛43.3%(26/60)、搔痒感は18.3%(11/60)、発赤は11.7%(7/60)、頭痛は13.3%(8/60)、発熱が3.3%(2/60)、倦怠感が6.7%(4/60)に認められた。パーゴナル®投与例ではそれぞれ33.0%(18/

55), 12.7%(7/55), 12.7%(7/55), 3.6%(2/55), 1.8%(1/55), 7.3%(4/55)であった。統計学的にヒュメゴン®投与とパーゴナル®投与には各症状の発現率に相違は認められなかった(表2)。

ヒュメゴン®投与例で2例が強い搔痒感と発赤を訴えたが(2/60=3.3%)。他の例ではいずれも軽度の皮膚症状であった。2例中1例は初回投与中に生じたものであった。既に報告したように、皮膚症状発現の機序を知る目的で強い搔痒感と発赤を訴えた1例にアレルギー反応検査を行ったところ、この皮膚症状はI型アレルギー反応であり、抗原との接触後数時間を経て発症する遅発型タイプであることが推定された(Kinoshita¹⁾)。また2例ともに精製FSH製剤投与には副作用を示さなかった。

考 察

ヒュメゴン®とパーゴナル®の筋肉内投与により注射部位に疼痛が38.4%にみられた。また搔痒感、発赤が15.7%と12.1%にみられた。注射剤の添付文書によればこういった皮膚症状の発現頻度は0.1%以下であり、我々の結果は著しく高い頻度である。しかしVerhoeff²⁾らも注射部位に疼痛を訴える頻度を44.9%~48.9%、発赤発現頻度を15.5%~24.0%と述べておりほぼ我々と同様の結果を報告している。本邦では宇都宮³⁾が疼痛の頻度については23.3%としており、皮膚症状の発現度は効能書に記載されているものより高いとの認識を持つべきであると考えられた。今回対象とした2製剤間には皮膚症状発現頻度に相違はみられなかった。

尿より抽出されたhMG製剤には多くの夾雑蛋白質が含まれ、FSH成分は全蛋白質の3%以下にすぎない(Biffoni⁴⁾)。夾雑蛋白を除去した精製FSH製剤はhMG製剤にアレルギーを有する症例にも使用が可能であったことから、これらの夾雑蛋白がアレルギー反応における抗原となっている可能性がある。また、hMG製剤にアレルギーを有する症例で、蛋白成分が0.1%以下であるrecombinant FSH剤により排卵誘発に成功した報告⁵⁾もある。しかしtransferrin, 免疫グロブリン, TNF-binding protein-Iなどが含まれる夾雑蛋白のうち、どの成分を抗原としたアレルギー反応であるかは不明である。

これらのアレルギー反応は局所的なことが多いが、全身浮腫や多呼吸をきたすような全身症状をきたすような例も報告されている⁶⁾。従って、日常診療においてhMG製剤の使用にあたってはアレルギー反応に起因すると思われる症状に十分注意を払う必

表1 hMG製剤投与と症例背景(mean±SD)

| | パーゴナル | ヒュメゴン | 計 |
|---------|----------|----------|----------|
| 症例数 | 45 | 55 | 100 |
| 周期数 | 55 | 60 | 115 |
| 年齢(歳) | 32.5±2.3 | 31.7±3.8 | 32.0±2.7 |
| 投与日数(日) | 8.9±1.7 | 9.4±1.7 | 9.1±1.4 |

表2 hMG製剤投与時にみられたadverse effect

| | パーゴナル | ヒュメゴン | 計 | P値 |
|-----|------------------|------------------|-------------------|-----|
| 疼 痛 | 33.0% (18/55) | 43.3% (26/60) | 38.3% (44/115) | 0.2 |
| 搔痒感 | 12.7% (7/55) | 18.3% (11/60) | 15.7% (18/115) | 0.7 |
| 発 赤 | 12.7% (7/55) | 11.7% (7/60) | 12.1% (14/115) | 0.9 |
| 頭 痛 | 3.6% (2/55) | 13.3% (8/60) | 8.7% (10/115) | 0.1 |
| 発 熱 | 1.8% (1/55) | 3.3% (2/60) | 2.6% (3/115) | 0.2 |
| 倦怠感 | 7.3% (4/55) | 6.7% (4/60) | 7.0% (8/115) | 0.9 |

要がある。薬剤アレルギーではアレルギー機序の証明は困難なことが多く、すべての人に発症するわけでもない。発症には体質や素因が関与すると考えられアレルギー体質者に薬剤アレルギーが発症しやすいことが経験的に知られる。hMG製剤の投与にあたっては過去のアレルギーの有無を問診により確認しておく必要がある。

hMG製剤にアレルギーがみられた例では、これまでの症例報告や自験例からは精製FSH製剤を用いることで排卵誘発は継続が可能であり、また卵胞の発育にも影響していない。アレルギーが心配される例では精製FSH製剤を用いて排卵誘発を行うのが望ましい。

従来hMG療法の副作用としては多胎妊娠の発生、卵巣過剰刺激症候群の発生が広く認識されてきている。それに加えて、今回の結果を見ると投与後の皮膚症状も無視できない副作用であると判断される。しかし症状としては軽度であることが多く、これまでは漫然と投与されていたために、医療側も患者側も見逃していたことが多いと推察される。わが国においてhMG製剤が使用されるようになって30年以上を経ているにもかかわらず、多胎妊娠やOHSS以外の副作用報告がほとんどなされていないことは医療側がいかにこの問題を軽視していたかを裏付けるものである。たとえ軽度であっても患者にとっては苦痛をしいられることは好ましくなく、副作用無く投与することを心がけるべきである。具体例として、見逃しを避けるため我々の施設ではhMG療法時には患者へ記録用紙を渡している。患者自身に気のついた症状について毎日記録してもらっているが、これは患者への啓蒙とともに皮膚症状発生の有無を知るために役立つ。また、即時型反応のチェックには投与後30分間は患者の観察が必要である。

以上よりhMG療法時にはアレルギー反応に起因する副作用が出現することがあることを十分に認識し、日常診療にあたるべきである。

(本論文の要旨は第42回日本不妊学会学術講演会にて発表した)

文 献

- 1) Kinoshita T, Ootaka K and Ito M (1999) Delayed-type hypersensitivity reactions to human menopausal gonadotrophin. J Obstet Gynaecol Res 25: 437-438
- 2) Verhoeff A, Schmutziguer APE, Doesburg WH, et al. (1997) A randomized study on the effects of intramuscular injections with urinary gonadotrophins (Humegon or Pergonal) on pain, local redness and fever in infertile women opting for *in vitro* fertilization. Hum Reprod 12:1427-1429
- 3) 宇都宮隆史, 指山実千代, 足達明子 他 (1995) 不妊症外来における注射の副作用について. 臨婦産 49:1325-1329
- 4) Biffoni M, Battaglia A, Borelli F, et al. (1994) Allergenic potential of gonadotrophic preparations in experimental animals: relevance of purity. Hum Reprod 9:1845-1848
- 5) Albano C, Smits J, Camus M, et al. (1996) Pregnancy and birth in *in vitro* fertilization cycle after controlled ovarian stimulation in a women with a history of allergic reaction to human menopausal gonadotrophin. Hum Reprod 11:1632-1634
- 6) Harika G, Garbriel R, Quereux C, et al. (1994) Hypersensitization to human menopausal gonadotrophin with anaphylactic shock syndrome during a fifth *in vitro* fertilization cycle. J Assist Reprod Genet 11:51-52

(受付: 2000年1月6日)

(受理: 2000年2月29日)

Adverse Effects of Injection Site with hMG

Toshihiko Kinoshita, Kiwamu Ootaka and Motohiro Itou

Department of Obstetrics and Gynecology, Sakura Hospital,
Toho University, Chiba 258-0841, Japan

The objective of this open study was to investigate adverse effects after IM injection of human menopausal gonadotrophin (hMG) preparation in women opting for in vitro fertilization. The incidences after injection of pain, redness, itching and erythema at the injection site and of fever, headache, general fatigue were 38.3%, 12.1%, 15.7%, 8.7%, 2.6% and 7.0%. The results showed that injections of hMG led to unwanted side effects. There was no statistically significant difference between Humegon and Pergonal in incidence of any adverse effects. Urinary hMG preparations contain a high amount of non-active proteins, which can give rise to local side effects after injection. We experienced the cases that had local adverse reaction to hMG but no reaction to highly purified FSH. If any adverse effect is present after injection of hMG it is advisable to use highly purified FSH.

Key words: allergic reaction, human menopausal gonadotrophin, adverse reaction, infertility

(Jpn J Fertil Steril 45:133-136 2000)

不妊症患者の「不妊による悩み」の実態調査

The Emotional Stress of Patients with Infertility Problems

渡辺 利香

Rika WATANABE

後藤 孝子

Takako GOTO

倉橋 千鶴美

Chizumi KURAHASHI

指山 実千代

Michiyo SASHIYAMA

宇津宮 隆史

Takafumi UTSUNOMIYA

セント・ルカ産婦人科

St.Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

近年の生殖補助技術の進歩には目を見張るものがある。しかし、不妊症夫婦の女性への世間の目は未だに厳しく、不妊症および不妊治療に対する偏見は、今もなお存在する。我々の以前の研究では、不妊女性へ与える社会的・経済的・身体的苦痛は想像以上に大きいことが判明した。そこで我々はこのような環境に対して不妊患者に、サポートを行う必要性を感じた。そこで今回、「不妊による悩み」の実態調査を行い、不妊患者の精神面について検討した。その結果不妊患者の多くは、挨拶がわりになげかけられる何気ない言葉に傷ついている場合が多く、親戚56.5%、夫の家族50.6%、近所の人26.3%から重圧を感じている場合が多かった。しかし、その反面「あととりのため」に子供が欲しいと感じているのは12.7%であった。夫を「人生のパートナー」と感じており、「二人の子供を抱かせてあげたい」、「家族を作りたい」という気持ちが強かった。不妊を「夫婦の問題」として考えることは大切であり、74%が不妊治療を続けるうえで心の支えは、「夫の存在」と答えていた。また、94.9%が悩みを軽くする方法を自分なりに持っていた。当院ではAIH・IVFともに夫婦間のみを原則としており、患者自身も夫との子供を授かるよう、夫婦でともに力を合わせ、不妊治療にのぞんでいる姿を確認することができた。

キーワード：不妊症、患者の悩み、夫の支え

(日不妊会誌 45:137-142 2000)

緒 言

近年の生殖補助技術の進歩には目を見張るものがある。しかし患者自身の悩みや精神面の調査・サポート面に関する研究においては、やっと学会報告がみられるようになってきた。以前は「嫁して三年子なきは…」などと言われたほど不妊症夫婦の女性に対して世間は厳しかった。不妊症が「病氣」と認められ、一部ではあるが不妊治療に保険が適用されたものの、不妊治療に対する偏見は昔ほどでなくとも、今もなお受け継がれているようである。このような社会において、不妊症の女性は「不妊」であることの

悩みに加え、周囲の「子どもはまだ？」といった視線と期待をあび、一部のみの保険適用にすぎず、高度な治療にともなう高額な治療費は全額私費負担といった現状に置かれている。また、治療にともなう苦痛などと、様々な面で不妊女性への負担は大きい。今、直ちに社会的・経済的・身体的側面のバランスをとりながら、技術の進歩に患者自身がついていけるように、サポートを行う必要がある。高齢化社会・少子化問題と同様、不妊症患者の実態を社会全体のこととして考えることが望まれる。以上より、今回我々は、不妊症患者のもつ「悩み」精神面に関する調査を行った。

表1 不妊症患者の年齢および不妊期間

| 年 齢 | | | 不妊期間 | | |
|----------|------|--------|----------|------|--------|
| (質問紙調査時) | | | (質問紙調査時) | | |
| 20～24歳 | 19人 | 5.40% | ～2年 | 98人 | 27.70% |
| 25～29歳 | 106人 | 29.90% | 3～4年 | 143人 | 40.40% |
| 30～34歳 | 144人 | 40.70% | 5～6年 | 58人 | 16.40% |
| 35～39歳 | 66人 | 18.60% | 7～8年 | 22人 | 6.20% |
| 40～44歳 | 18人 | 5.10% | 9～10年 | 10人 | 2.80% |
| 無回答 | 1人 | 0.30% | 11年以上 | 23人 | 6.50% |
| 合 計 | 354人 | 100% | 合 計 | 354人 | 100% |

対象と方法

1997年8月～1997年10月に当院外来を訪れた挙児希望患者の女性501名に質問紙を配布，無記名による記入とし，院内に回収ボックスを設置し，354名より回収した。回収率は70.7%であった。質問項目は54項目で，各質問を選択形式にして回答を回収した。

結 果

1 患者背景

表1に示すように，調査時の年齢は，30～34歳が40.7%，不妊期間は，3～4年が40.4%と最も多かった。

図1に示すように，「病院に行こう」と思って実際に受診するまでに要した期間は，1～3カ月が最も多く33.1%で，次に4～11カ月22.6% 1年以上22.3%であった。次に「なぜ子供が欲しいのか」との問いには図2に示すように59.9%が「家族が欲しい」，50.6%が「理屈なく子供が欲しい」，40.1%が「親になりたい」と答えていた。また以前言われていたような「あとのため」などという理由は12.7%と少数であった。

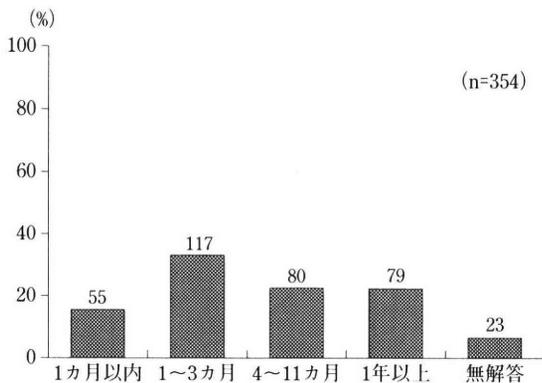


図1 「病院に行こう」と思って，実際に受診するまでの期間

2 不妊症患者の悩みの実態

さて，不妊症患者はどのような言葉に傷ついているのかを調査したところ，挨拶がわりになげかけられる，なにげない言葉に傷ついている場合が多く，61.9%が「お子さんまだ？」，34.7%が「作らないの？」，31.6%が「〇〇さんは〇人目ができたのよ」といった場合であった(図3)。図4に示すように周囲の目に対して重圧を感じていないのは0.8%にとどまり，プレッシャーを感じるのは親戚56.5%，夫の家族50.6%，近所の人26.3%，職場23.4%であった。「不妊治療に関する悩み」については図5に示すように61%が「治療費が高い」，51.4%が「不妊治療のゴールがみえない」，22%が「プレッシャーが大きすぎる」と答えていた。

3 悩みの解決方法

図6に示すように夫とのコミュニケーションについては94.6%が「うまくいっている」と答えていた。また「夫以外に不妊治療のことを話せる人がいるか」の問には93.8%が「いる」と答え，その内訳は59.6%が「友

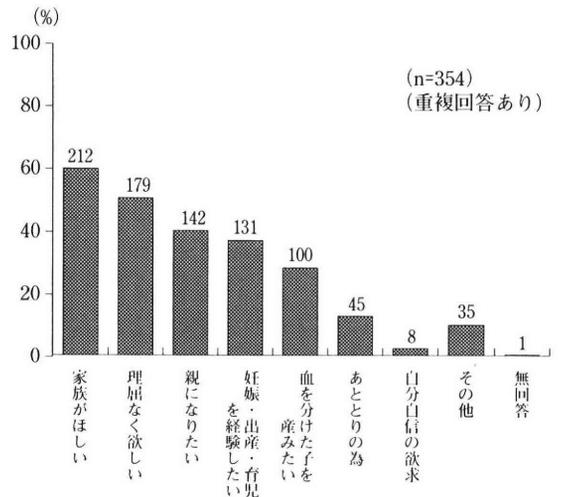


図2 「なぜ子どもが欲しいのか」

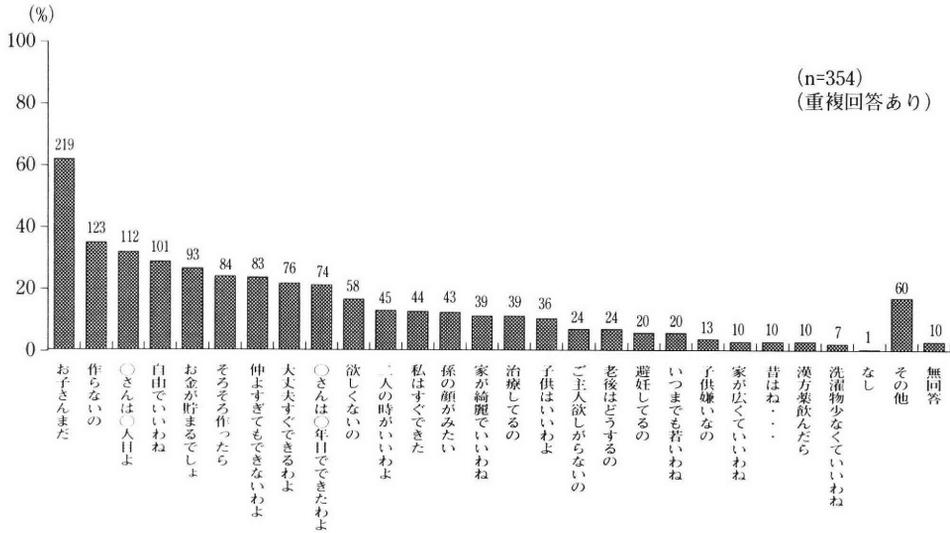


図3 どのような言葉に傷ついたことがありますか

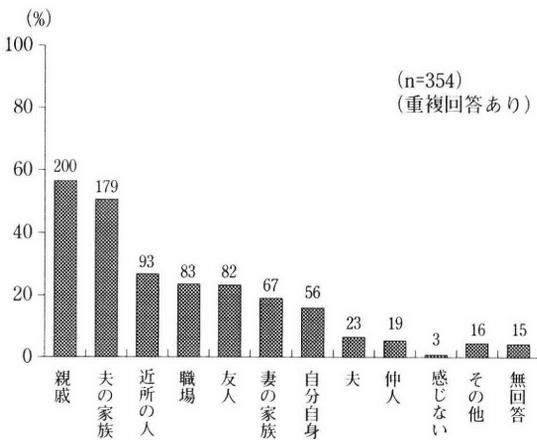


図4 誰からプレッシャーを感じるか

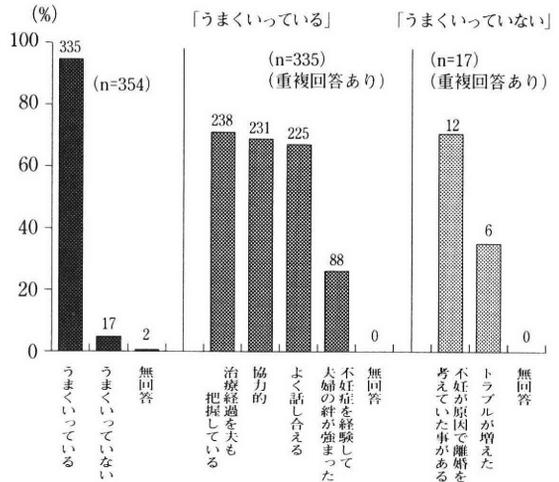


図6 夫とのコミュニケーションは「うまくいっている」「うまくいっていない」

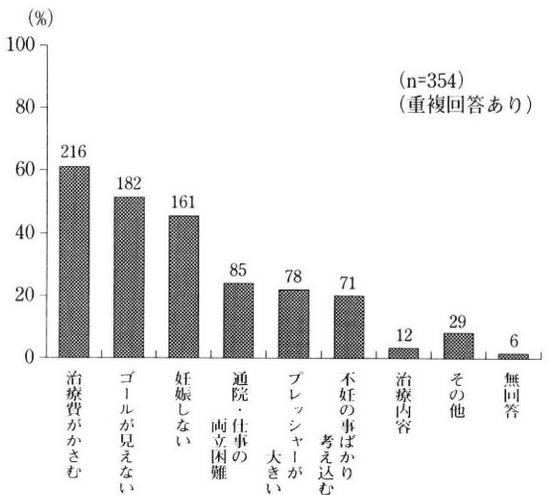


図5 現在の不妊治療に関する悩み

人・知人」, 53.6%が「自分の両親」, 52.4%が「不妊経験のある友人・知人」であった(図7).

さらに図8に示すように「悩みを軽くする方法をもっているか」の間に94.9%が「持っている」と答え、その内訳は72.3%が「夫に話す」、44.0%が「夫以外の人に話す」、27.1%が「ショッピングを楽しむ」であった。不妊治療を続けるうでの心の支えは、図9に示すように74%が「夫の存在」であり、次に42.4%が「医師・看護婦」、同じく42.4%が「院内に掲示されている治療成績」等であった。そしてあなたにとって「夫婦とは」の間に95.5%が「人生のパートナー」と答えていた。(図10)

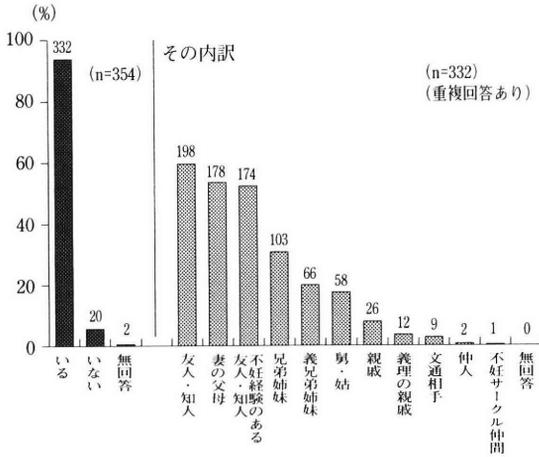


図7 夫以外に不妊治療のことを話せる人の有無

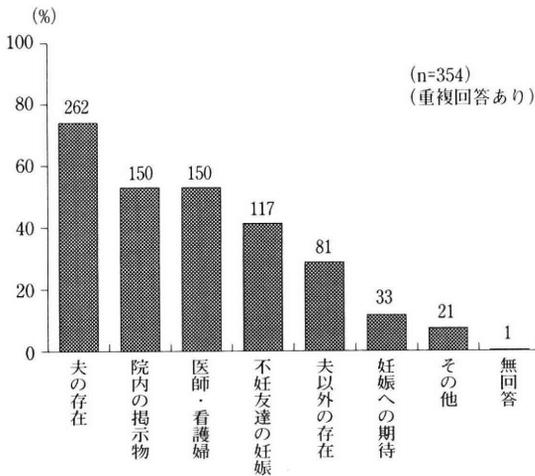


図9 不妊治療を続けるうえでの心の支え

考 察

不妊の検査・治療を考えたから来院するまでの期間については、当院では71.2%が1年未満に受診しているものの、1カ月以内に受診した者は15.5%であった。フィンレージの報告¹⁾によると、子供が欲しいと思ってから病院へ行くまでの期間は、26.9%が1年未満に受診しており、1年～2年未満が34.6%と最も多く、また4年以上要した者が5.9%と報告している。しかし、「年齢的に時間がない」と実感し受診する者もいたが、なかには10年以上要した者もいた。このように「病院に行こう」と思って実際に受診するまでに大多数は数カ月を要しており、不妊の検査・治療を躊躇している姿がうかがえた。子供は欲しい

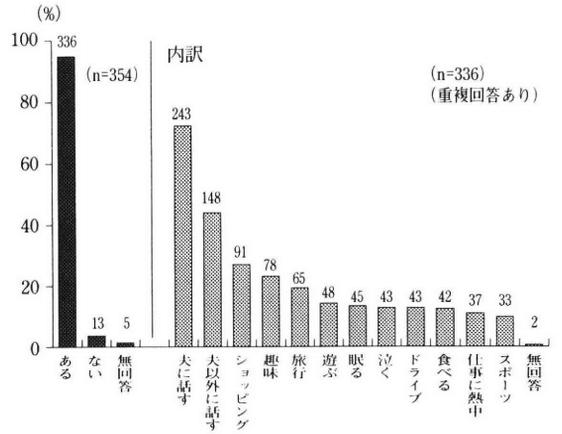


図8 悩みを軽くする方法

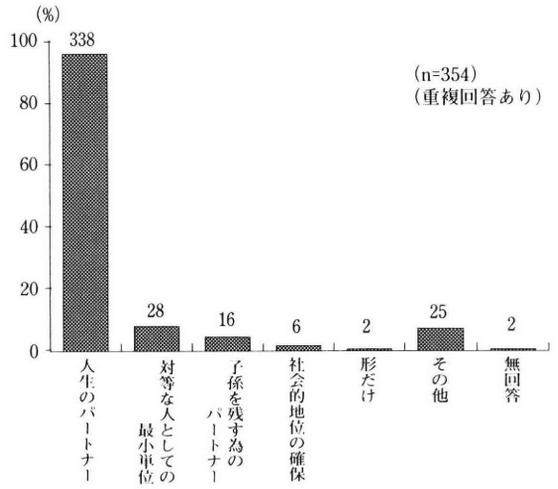


図10 あなたにとって「夫婦」とは

が「まさか自分が不妊とは・・・」「今度こそ妊娠したかも・・・」など様々な心の葛藤を繰り返しながら実際に受診するまでに期間を要するケースが多く、さらに近年の晩婚化も加わり、ますます不妊症患者の高齢化に拍車をかけているとも思われる。

「不妊治療における悩み」については、まず患者の多くは高額な治療費を負担と感じていた。我々が前回行った経済面での調査²⁾でも患者の抱える経済的負担は深刻であり、不妊治療の保険適用など、早急な社会的援助が必要と思われた。また、心理的な面では、不妊女性の多くは周囲からの重圧を程度の差こそあれ感じている。あしたばくらぶの報告³⁾によると「赤ちゃんはまだ？」という言葉に84%が圧力を感じたことがあり、それは「夫の親・親戚」37%、「妻の親・親戚」29%、「友人」10%、「職場の人」9%と報告している。今回の我々の調査では、「夫の親・親戚」

83.9%、「自分の親・親戚」42.1%、「近所の人」26.3%、「職場の人」23.4%であった。あしたばくらぶの報告³⁾では重圧を感じているのは84%に対し、当院の調査では99.2%と、ほぼ全員が重圧を感じている結果であった。森本⁴⁾は「不妊患者の回りにはおせっかいな干渉者が溢れていて、意識的にも無意識的にも種々の干渉をして患者の心のなかにストレスを生じせしめる。」と述べている。この様に不妊治療をとりまく環境は決して良好とは言えず、早急に不妊治療中の人々に対する世の中の雰囲気良くなる方法を考えねばならない時期に来ていると思われる。

次に、以前、我々⁵⁾はCMIによる心理評価において、神経症グループの患者に通院期間が短いという事実を得、不妊治療している患者で神経症になりやすいのは、不妊期間よりもその人本来の性格が大きく影響しているという結果を報告した。また調査を通じて⁵⁾「不妊であることの悩み」と様々なプレッシャーとの関連があることが示唆された。今回の結果では、むしろ身近な人間関係にある人が重圧をあたえていた。このような状況のなかで治療を続けるうえでの「心の支え」は、今回の調査では夫の存在が最も重要であった。次に医師・看護婦、院内に掲示してある当院の治療成績であった。廣井⁶⁾は不妊症患者では子供を持たないことへの焦燥感・母性喪失感・劣等感や治療に対する不安等がこれらの得点を高くしていると述べている。また、平山ら⁷⁾は患者にとっての一番の理解者として、夫95%、次に友人・両親を挙げていた。我々⁸⁾も夫との関係が最も重要と考えるため、治療のオリエンテーションや不妊相談、勉強会など夫婦で参加する場を数多く設けている。今回の調査において、夫婦とは「人生のパートナー」であると95.5%が答えているが、そのパートナーである夫に「ふたりのこどもを抱かせてあげた

い」との思いが強いことがわかった。このように治療中から不妊を夫婦間の問題として考え、接していくべきであり、お互いが良き話し相手となり、支えあっていくことは不妊治療にとっても最も大切なことであると思われる。また、医療側としては自院の妊娠率や、どのような治療方法で妊娠したのか、問題点はなにか、などを患者へ詳細に公表することにより、良好な結果を生じるという効果が確信できた。不妊治療だけが独り歩きするのではなく、よりよい結果を得るためにも、医療側の不妊症患者への精神的なかかわりは重要である事が再確認された。

文 献

- 1) フィンレージの会(1994) レポート不妊。フィンレージの会活動報告書 112-113
- 2) 宇津宮隆史, 指山実千代, 渡辺多鶴子 (1998) 不妊症診療における経済的側面の検討。日不妊会誌 43:177-183
- 3) 主婦の友生活シリーズ (1997) Balloon赤ちゃんが欲しい。PART 3:36-37
- 4) 森本欽晴(1997) インターネットによるIVF患者とのコミュニケーション。産婦の実際 46:1075-1082
- 5) 渡辺利香, 後藤孝子, 倉橋千鶴美 他 (1999) 不妊患者の「悩み」についての実態調査およびCMI健康調査による心理評価。日不妊会誌 44:247-251
- 6) 廣井正彦 (1999) 生殖補助医療の倫理的側面 生殖補助医療。新女性医学体系 16:108-116
- 7) 平山史朗, 吉岡千代美, 出口美寿恵 他 (1998) ARTに対する患者の心理調査。日受精着床誌 15:145-149
- 8) 宇津宮隆史 (1998) 不妊患者へのケア。ペリネイタルケア 17:795-801

(受付：2000年1月28日)

(受理：2000年2月29日)

The Emotional Stress of Patients with Infertility Problems

Rika Watanabe, Takako Goto, Chizumi Kurahashi, Michiyo Sashiyama and Takafumi Utsunomiya

St.Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

In this past 10 to 20 years, the knowledge and techniques in treatments for infertility patients have progressed steadily. However, the circumstances surrounding infertile couples, especially infertile women require an enormous amount of patience on their part.

Previous studies show that one of the most pressing issues for an infertile couple is the economic issue. Generally speaking there is no insurance coverage for infertility and when coverage might apply, it is grossly insufficient.

Also, using the Cornell Medical Index (CMI), we attempted to evaluate the psychological stress of infertility patients. Although the rate of psychological abnormalities in the CMI did not differ from the control group, individual counseling results show the tremendous amount of emotional stress suffered when infertility exists.

In the above study we evaluated stress in infertile women in detail by means of questionnaires. Results showed that patients were often deeply hurt by insensitive questions from friends, relatives, coworkers and neighbors.

The inherent biological stress of being unable to conceive a child when patients are constantly asked when they will is emotionally draining no matter what alternative methods or hobbies patients employ to reduce these effects.

In general patient's emotional relationships with their husbands were better than initially expected, producing a good family environment. Also the desire to have a child did not seem to be based on wanting an inheritor.

Compassionate and helpful advice from hospital staff was useful for infertile patients to continue treatment. In addition we try to keep patients informed regarding the latest treatments and results at the hospital in hopes of increasing optimism.

We provide whatever aid we can with our special knowledge and data in an effort to produce a successful pregnancy.

Key words: Infertility, stress of patient, relationships with husbands.

(Jpn J Fertil Steril 45:137-142 2000)

閉塞性無精子症に対する精路再建術の成績：
全国多施設での調査報告

Outcome of Seminal Tract Reanastomosis for Obstructive Azoospermia:
A Multi-Institutional Study

| | | |
|-------------------|------------------|------------------|
| 松田公志 | 岩本晃明 | 伊藤直樹 |
| Tadashi MATSUDA | Teruaki IWAMOTO | Naoki ITO |
| 市川智彦 | 宮地系典 | 友政宏 |
| Tomohiko ICHIKAWA | Keisuke MIYAJI | Hiroshi TOMOMASA |
| 渡辺政信 | 永尾光一 | 岩崎皓 |
| Masanobu WATANABE | Koichi NAGAO | Akira IWASAKI |
| 天野俊康 | 並木幹夫 | 日比初紀 |
| Toshiyasu AMANO | Mikio NAMIKI | Hatsuki HIBI |
| 佐々木昌一 | 奥野博 | 松宮清美 |
| Shoichi SASAKI | Hiroshi OKUNO | Kiyomi MATSUMIYA |
| 岡田弘 | 永井敦 | 徳永葉 |
| Hiroshi OKADA | Atsushi NAGAI | Yo TOKUNAGA |
| 小倉啓司 | 瀧原博史 | 白石晃司 |
| Keiji OGURA | Hiroshi TAKIHARA | Koji SHIRAISHI |
| 小松潔 | 江口二郎 | |
| Kiyoshi KOMATSU | Jiro EGUCHI | |

男性不妊症手術手技フォーラム

Male Infertility Surgical Forum

c/o Department of Urology, Kansai Medical University, Osaka 570-8507, Japan

男性不妊症手術手技フォーラム参加の全国29泌尿器科において、1981年から1999年に、閉塞性無精子症に対して精路再建術が行われた580例の治療成績を検討した。36例は再手術を施行されていた。精子出現率は、精管精管吻合術64.8%、精巣上体精管吻合術47.3%であった。初回および最終手術後の自然妊娠率は、術後6カ月以上経過観察できた392例において、それぞれ22.4%、24.2%で、手術後妊娠までの期間は、中央値10.5カ月であった。閉塞原因別の最終自然妊娠率は、精管切断術後28.9%、鼠径ヘルニア術後22.6%、精巣上体炎後29.7%、閉塞原因不明21.4%、その他6.9%であった。閉塞性無精子症に対する精路再建術は、自然妊娠の期待できる治療法として有用と考えられる。

キーワード：閉塞性無精子症、精路再建術、精管精管吻合術、精巣上体精管吻合術

(日不妊誌 45:143-149 2000)

緒 言

補助生殖技術(Assisted reproductive technology: ART), とりわけ卵細胞質内精子注入法(Intracytoplasmic sperm injection: ICSI)の開発普及は, 男性不妊症の治療を大きく変革した。ICSIの開発により, 今日では数個の生存精子さえ入手できれば受精の可能性があり, 精巣精子を用いたICSIにより, これまで絶対不妊とされたKlinefelter症候群においてさえ妊娠拳児が報告されるようになった¹⁾。ICSIによって男性不妊症のすべての問題が解決されたとの風潮さえ一部に見られる。しかし, 不妊症治療の最終目標は, やはり夫婦の自然の性行為による妊娠である。また, ICSIには, 多胎, 流産, 出生児の奇形率など, 解決されていない問題もある²⁾。自然妊娠に至る治療法のあるときは, ARTの前にその治療法を選択するのが順当と思われる。

閉塞性無精子症は, 無精子症患者の約20%を占め³⁾, 精巣機能が正常であることから, 適切な精路再吻合術により自然妊娠が期待できる。とりわけ精路顕微鏡手術の開発普及により, 開通率, 妊娠率の向上を見ている^{4,5)}。この分野でも, ARTの普及は著しく, 顕微鏡下精巣上体精子吸引術(Microsurgical epididymal sperm aspiration: MESA)や精巣精子採取術(Testicular sperm extraction: TESE)で得られた精子を用いてICSIが行われ, 特に先天性両側精管形成不全など, 精路吻合不能な症例にとって福音となっている⁶⁾。

再吻合が可能な閉塞性無精子症において, 精路吻合術とARTのいずれを選択すべきか, 議論の多いところである。両者の長所短所をよく説明し, インフォームド・コンセントのもとに患者夫婦が選択すべきであるが, そのためには治療成績の公表が不可欠である。ICSIについては, 日本産科婦人科学会倫理委員会から毎年全国登録施設の成績が公表されており, 1998年は, 採卵あたり21.1%である⁷⁾。精路再吻合術については, 多数症例を行っている施設毎にこれまでも成績の報告がなされているが⁸⁻¹⁶⁾, 全国規模での集計, 公表は行われていなかった。この度, 男性不妊症に対する手術手技の向上を目指して勉強会を行っている男性不妊症手術手技フォーラム参加施設において, これまでに行った精路再吻合術580例の成績を集計し, 初回手術後の自然妊娠率22.4%との結果を得たので報告する。

対象および方法

男性不妊症手術手技フォーラム(世話人代表: 岩本晃明, 松田公志)参加施設を対象に, 1999年7月までに行われた閉塞性無精子症に対する精路再建術の治療成績を調査した。調査参加施設は, 札幌医科大学, 千葉大学, 東京歯科大学市川総合病院, 昭和大学, 帝京大学, 東邦大学, 横浜市立大学, 聖マリアンナ医科大学, 横浜赤十字病院, 藤沢市民病院, 長野赤十字病院, 金沢大学, 刈谷総合病院, 八千代病院, 名古屋大学, 名古屋市立大学, 愛知医科大学, 済生会音羽病院, 京都大学, 関西医科大学, 大阪大学, 神戸大学, 岡山大学, 川崎医科大学, 倉敷中央病院, 小野田市立病院, 山口大学, 原三信病院, 長崎大学の計29施設の泌尿器科である。

術後精液所見は, 精液所見安定時の平均とし, 術後一時的な精子出現は無精子症と判定した。妊娠方法として, 自然妊娠のほかARTによるもの, またその際に用いた精子として精巣上体精子や精巣精子についても調査した。妊娠確認日が不明の場合は出産日の8カ月前の月の1日とした。各症例についての調査方法(カルテ調査または電話調査)は参加施設に一任した。

術後経過観察期間の中央値は11カ月で, 6カ月未満の177例(30.5%)は妊娠率の計算から除外した。

結 果

1981年から1999年7月までの間に精路再建術が行われた閉塞性無精子症, 総計580例が集計された。1963年に精管精管吻合術が行われた1症例も報告されたが, 1例のみ施行時期が隔たっていたので集計からは除外した。術前無精子症でない片側閉塞症例も22例報告されたが, 交叉性吻合を行った4例, 部分閉塞を疑って両側吻合した2例は集計に加えたが, 片側吻合のみの症例は除外した。患者年齢は18歳から67歳, 中央値35歳, 妻年齢は19歳から46歳, 中央値29歳(不明症例159例)で, 妻年齢35歳以上は年齢の判明している症例の15.9%であった。妻に異常を認めたのは29例, 異常なし269例, 不明282例であった。施設あたりの症例は1例から86例, 中央値8例であった。

閉塞原因別に, 夫年齢, 血清FSH, 閉塞期間, 初回手術術式を表1に示す。夫年齢は, 精管切断術群が他群より有意に高かった($p < 0.0001$: 分散分析)。血清FSHが10IU/ml以上は488例中77例15.8%をしめた。原因不明の精路閉塞症例の大半は精巣上体の閉

表1 閉塞原因別対象症例内訳

| 閉塞原因 | 症例数 | 年齢 | 血清FSH (IU/ml) | 閉塞期間(年) | 術式 | | |
|--------|-----|----------|---------------|-----------|---------|-----------|------|
| | | | | | 精管精管吻合術 | 精巣上体精管吻合術 | 混合*1 |
| 精管切断術 | 241 | 41.8±7.7 | 7.0±4.1 | 10.4±6.2 | 226 | 7 | 8 |
| ヘルニア術後 | 146 | 32.3±6.1 | 6.3±4.0 | 27.7±6.5 | 138 | 6 | 2 |
| 精巣上体炎 | 53 | 33.7±5.2 | 5.9±3.4 | 7.3±4.8 | — | 53 | — |
| 原因不明 | 104 | 32.4±5.1 | 5.9±4.4 | — | 6 | 97 | — |
| その他*2 | 36 | 32.4±4.9 | 10.6±13.1 | 29.3±7.5 | 7 | 27 | 2 |
| 計 | 580 | 36.4±8.0 | 6.7±5.2 | 16.4±10.7 | 377 | 190 | 12 |

*1: 片側精管精管吻合術, 反対側精巣上体精管吻合術

*2: 先天性片側精管形成不全8例, 先天性の閉塞13例, 精管閉塞による二次性精巣上体閉塞2例, Young症候群7例, 左右別々の閉塞原因3例, その他3例

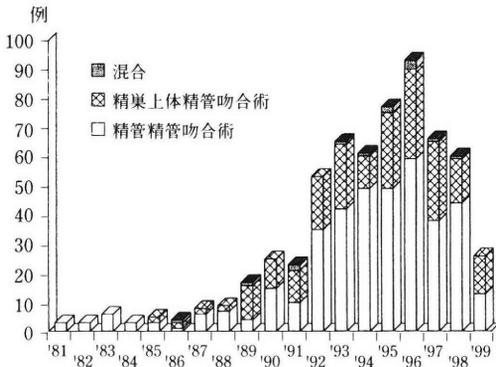


図1 年度別精路再建術施行回数

塞で精巣上体精管吻合術が行われていた。抗精子抗体は血清で92例において測定されており、28例30.4%で陽性であった。測定方法は76例が精子不動化抗体であった

580例に、精管精管吻合術392回、精巣上体精管吻合術214回、片側精管精管吻合反対側精巣上体精管吻合13回、術式不明1回、計620回の手術が行われた。36例6.2%は再手術を、4例は再々手術を受けて

いた。両側吻合389回、片側吻合175回、交叉性吻合54回、不明2回であった。精管精管吻合術は、顕微鏡下二層吻合術230回、顕微鏡下一層吻合術164回、ルーペによる一層または二層吻合術8回、肉眼的手術5回、精巣上体精管吻合術は顕微鏡下側端吻合術196回、顕微鏡下端端吻合術20回、肉眼的側端吻合術9回であった。年度別手術回数を、精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術別々に図1に示す。術中に少なくとも片側の吻合部精巣側断端で精子を確認できたのは、精管精管吻合術331回中239回72.2%、精巣上体精管吻合術203回中191回94.1%、全体では546回中441回80.8%であった。

手術後精液検査の行われた547例について、初回手術後および最終手術後の精液所見を表2に示す。全体として、初回手術後58.9%で精子が出現、33.8%で精子濃度が正常化し、さらに運動率30%以上をも満たしたのは25.0%であった。これとは別に6.4%で、術後一時的に精子が出現したが、その後再び無精子症となった。再手術を行った36例(再々手術4例を含む)の最終成績は、精子出現25例(69.4%)、精子濃度正常化17例(47.2%)であった。これらを含め

表2 初回手術後および再手術後の精液所見

| 閉塞原因 | 症例数 | 初回手術後精液所見 | | | 再手術 症例 | 再手術術式*3 | 再手術後精液所見 | | |
|--------|-----|-----------|------|-----------|-----------|-------------|----------|------|----------|
| | | 無精子症*1 | 乏精子症 | 精子濃度正常*2 | | | 無精子症*1 | 乏精子症 | 精子濃度正常*2 |
| 精管切断術 | 223 | 42 (14) | 69 | 112 (90) | 9 | V4,E6,EV1 | 3 (1) | 2 | 4 (3) |
| ヘルニア術後 | 140 | 81 (10) | 29 | 30 (15) | 17 | V11,E8 | 4 | 4 | 9 (6) |
| 精巣上体炎 | 47 | 24 (4) | 8 | 15 (12) | 2 | E2 | 0 | 1 | 1 (1) |
| 原因不明 | 101 | 59 (7) | 18 | 24 (19) | 5 | E5 | 3 (1) | 0 | 2 (2) |
| その他*4 | 36 | 19 | 13 | 4 (1) | 3 | E3 | 1 | 1 | 1 (1) |
| 計 | 547 | 225 (35) | 137 | 185 (137) | 36 | V12,E23,EV1 | 11 (2) | 8 | 17 (13) |

*1 () : 一時的に精子出現するもその後無精子症となった症例数

*2 () : 精子濃度正常かつ精子運動率30%以上の症例数

*3 V: 精管精管吻合術, E: 精巣上体精管吻合術, EV: 片側精管精管吻合術, 反対側精巣上体精管吻合術, 再々手術4件を含む

*4 : 先天性片側精管形成不全8例, 先天性の閉塞13例, 精管閉塞による二次性精巣上体閉塞2例, Young症候群7例, 左右別々の閉塞原因3例, その他3例

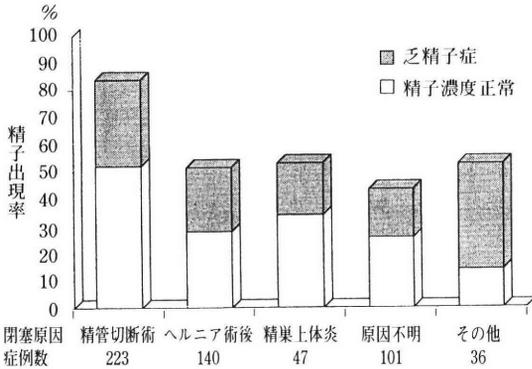


図2 閉塞原因別最終精子出現率

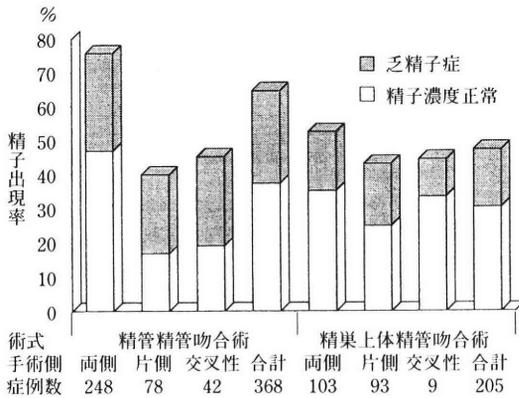


図3 術式別精子出現率

て、最終手術後の精子出現率は、精管切断術後83.0%、ヘルニア術後50.7%、精巣上体炎53.2%、原因不明43.6%、その他52.8%、全体で62.7%となった。閉塞原因ごとに、最終精子出現率、精子濃度正常化率を図2に示す。

手術術式別、両側手術片側手術別の精子出現率を図3に示す。精管精管吻合術は全体として精子出現率64.8%、精子濃度正常化率37.2%、精巣上体精管吻

合術ではそれぞれ47.3%、30.2%であった。両群で、精子出現率に有意差を認めた(p=0.0001:カイ二乗検定)。精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術をあわせた全体で、両側手術、片側手術および交叉性吻合術の精子出現率は、それぞれ69.2%、40.9%、45.1%、精子濃度正常化率はそれぞれ42.3%、21.1%、21.6%で、両側手術が片側手術より有意に良好であった(p<0.0001:カイ二乗検定)。

一時的精子出現は、全体として586回の手術の内38回6.5%で認められたが、精子出現中の最高精子濃度は0.01~144×10⁶/ml、中央値10.5×10⁶/ml、再び無精子症となるまでの期間は0カ月~89カ月、中央値7.5カ月であった。

術後6カ月以上経過観察できた392例のうち、初回手術後88例22.4%、最終手術後95例24.2%で自然妊娠が成立した。自然妊娠例の手術後妊娠までの期間は、判明している92例で1~75カ月、中央値10.5カ月で、75%が術後17.5カ月以内に妊娠していた。その他に、射出精子を用いた人工授精、体外受精(ICSIを含む)、妊娠経過不明の妊娠があり、また、精巣上体精子採取法(MESA)または精巣精子採取法(TESE)を用いたICSIによる妊娠も認めた(表3)。392例のうち169例43.1%で、何らかの方法で妊娠が成立した。自然妊娠95例のうち63例で出産が確認され、流産は2例、人工授精による妊娠10例のうち出産6例、流産1例、体外受精での妊娠全53例では出産28例、流産1例が確認された。

考 察

今回、男性不妊症手術手技フォーラム参加129施設において、580例の精路再吻合術の治療成績を集計した。これは、わが国での多施設の治療成績としては初めての報告であり、また、症例数からみると米国Vasovasostomy Study Groupの1469例の集計¹⁷⁾に次

表3 閉塞原因と最終妊娠症例数

| 閉塞原因 | 症例数 | 射出精子による妊娠 | | | 妊娠方法不明 | MESA/TESE -ICSI |
|--------|-----|-----------|--------|--------|--------|--------------------|
| | | 自然妊娠 | 人工授精 | 体外受精*1 | | |
| 精管切断術 | 149 | 43 (2) | 2 | 6 (2) | 7 | 2 (1) |
| ヘルニア術後 | 93 | 21 (3) | 4 (2) | 5 (1) | 1 (1) | 10 (1) |
| 精巣上体炎 | 37 | 11 (1) | 0 | 0 | 0 | 4 |
| 原因不明 | 84 | 18 (1) | 3 | 2 | 2 | 18 |
| その他*2 | 29 | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 |
| 計 | 392 | 95 (7) | 10 (2) | 14 (3) | 11 (1) | 39 (2) |

() : 再手術後の妊娠

*1 : IVFとICSIを含む

*2 : 先天性片側精管形成不全7例、先天性の閉塞9例、精管閉塞による二次性精巣上体閉塞2例、Young症候群7例、左右別々の閉塞原因2例、その他2例

ぐ大規模な多施設調査結果である。Retrospective studyであること、精管切断術後症例では経過観察の困難な症例が少ないこと、患者夫婦が若年者で住居移動の頻度が高いなど、種々の理由により、6カ月以上の経過観察ができた症例が69.5%と多くない点が問題ではあるが、わが国における精路再吻合術の治療成績の概要を把握できたものと考えられる。

術後の自然妊娠率は、再手術後も含めて24.2%であった。この他に、妊娠経過不明の症例が11例2.8%存在した。このうち、3例は射出精子によることが確認されており、また11例の精液所見は精子濃度 $29.0 \pm 17.0 \times 10^6/\text{ml}$ (全例 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上)、運動率 $43.5 \pm 21.5\%$ (1例を除いて20%以上)と比較的良好で、自然妊娠の可能性も高いと思われる。射出精子を用いたAIHによる妊娠2.6%も精路吻合術の成果と考えれば、3群併せて29.6%となる。1998年のわが国のICSIの妊娠率(採卵あたり21.1%)⁷⁾と比較すると、精路再吻合術の成績は、初回手術後でほぼ同等かやや良好、再手術後を含めると良好と思われる。

閉塞原因別に自然妊娠率を見ると、精巣上体炎後29.7%と精管切断術後28.9%が良好であり、ヘルニア術後22.6%と原因不明21.4%がやや劣り、雑多な原因を含むその他群は6.9%ときわめて悪かった。Young症候群や片側精管形成不全など、手術手技として困難な症例が含まれていること、術前血清FSH値がその他群のみ他群より有意に高値であったことなどが関与しているかもしれない。精管切断術後症例の妊娠率は、米国Vasovasostomy Study Groupの成績52%¹⁷⁾と比べるとかなり悪いが、精子出現率で見るとわが国も81.2%とさほど悪くない(米国86%)。経過観察不十分な症例の多いことが妊娠率低率の一因かもしれない。

術後精子出現率は、精管精管吻合術が精巣上体精管吻合術より良好であった。精巣上体精管吻合術は技術的に難しいことが改めて明らかになった。10例以上の経験のある施設だけで施設別に精子出現率を見ると、精管切断術後の精管精管吻合術では70.0~100%(中央値86.9%)と差が小さいのに対し、精巣上体精管吻合術では18.2~77.8%(中央値50.0%)と差が大きかった。また、両側手術例に比べて片側手術例では、精子出現率、精子濃度正常化率、術後精子濃度、精子運動率すべて不良であった。技術的に開通率がまだあまり高くない状況では、両側手術を同時に行うことによって術後の成績改善に努めるべきと考えられる。

精路吻合術の成績は、顕微鏡手術の導入により飛

躍的に改善した^{4,5)}。今回の調査でも大半の手術が顕微鏡下に行われており、肉眼的吻合術は620手術の内わずかに2.4%を占めるにとどまった。今後も手術手技の向上に向けて、勉強会の継続など、努力していかなければならないと考えている。

再手術施行症例を36例6.2%認めた。再手術施行率は鼠径ヘルニア手術後の症例で12.1%と高く、その47.1%では、長期間の精管閉塞による二次的精巣上体閉塞に対して精巣上体精管吻合術を追加されていた。ヘルニア術後群では再手術後の精子出現率が76.5%と、初回の精管精管吻合術後の精子出現率42.1%より高かった。2回の手術が必要なものの、自然妊娠を強く希望する夫婦にとって有用な治療法と考えられる¹⁸⁾。

精路再吻合術では、術後一時的に精子が出現するも、その後再び無精子症となる症例が少なからず存在することが報告されている¹⁹⁾。今回の集計でも6.5%に認められた。これらの半数は最高精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上であり、症例によっては精子凍結保存も考慮されるかもしれない。また、再び無精子症になるまでの期間は中央値で7.5カ月であったが、89カ月と長期間の症例もあり、このような症例では一時的精子出現と言うより何らかの別な原因による再閉塞と考えるべきかもしれない。

閉塞原因として注目されるのは、小児期鼠径ヘルニア術後の精管閉塞症例の多さである。全手術症例の25.2%をしめた。男性不妊症外来受診者での検討で、小児期鼠径ヘルニア手術の既往のある症例の26.7%で精管閉塞を認めたとの報告もある²⁰⁾。診断の際に留意すべきであるとともに、小児外科医、一般外科医への啓蒙が求められる。

閉塞原因不明症例も17.9%と多数を占めた。原因不明症例の病理組織の検討から、精巣上体尾部から精管曲部にいたる部分で閉塞の生じていることが多いと報告されている²¹⁾。今回の集計でも閉塞原因不明症例の93%で精巣上体精管吻合術が施行されており、同様の結果と思われる。

閉塞性無精子症に対する治療方法は、精路再建術とART(MESA/TESEによって得られた精子を用いたICSI)の二つに大別される。いずれが治療法として優れているか、また個々の症例でいずれを選択すべきか、議論の多いところである。精路再建術の長所は、自然妊娠が期待できる唯一の治療法であること、複数回の妊娠が期待できること、女性への侵襲がないこと、などであろう。実際に今回の調査でも、少なくとも8例で2人目の妊娠を確認した。短所

は、男性への侵襲が大きいこと、自然妊娠までの期間がARTに比べて長いこと(中央値10カ月)、術式、閉塞原因によっては精子出現率、妊娠率が低いことなどであろう。一方ARTの長所は、短期間で妊娠が得られること、精路吻合不能の症例でも妊娠可能なことなどであり、短所は、女性への侵襲が大きいこと、治療費が高いこと、流産率が一般に高いことなどであろう。治療法の選択は、妻の年齢(35歳以上でARTによる妊娠率が低下することが知られている²²⁾、閉塞原因、予想される術式と術者の成績、ART施行施設の治療成績、患者の経済状態などを考慮しながら、十分なインフォームド・コンセントのもとに、患者夫婦が行うべきと考える。

文 献

- 1) Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, et al. (1998) Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* 338:588-590
- 2) Bui TH and Wrambsy H (1996) Micromanipulative assisted fertilization - still clinical research. *Hum Reprod* 11: 925-926
- 3) 松田公志, 堀井泰樹, 吉田 修(1990) 閉塞性無精子症の診断と治療. *産と婦* 57:1325-1330
- 4) Silber SJ (1976) Microscopic technique for reversal of vasectomy. *Surg Gynecol Obstet* 143: 630-631
- 5) Silber SJ (1978) Microscopic vasoepididymostomy: specific microanastomosis to the epididymal tubule. *Fertil Steril* 30:565-571
- 6) Tournaye H, Devroey P, Liu J, et al. (1994) Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 61: 1045-1051
- 7) 藤本征一郎(1999) 平成10年度診療研究に関する倫理委員会報告(平成9年度分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および平成11年3月における登録施設名). *日産婦誌* 51:361-367
- 8) 角谷秀典, 布施秀樹, 高原正信 他(1988) 閉塞性無精子症に対する顕微鏡下一層縫合による精管精管吻合術. *日不妊会誌* 33:661-667
- 9) 松田公志, 六車光英, 小松洋輔 他(1993) 精路閉塞症に対する精管精管吻合術および精巣上体精管吻合術:閉塞原因と手術成績の検討. *日泌尿会誌* 84:1665-1674
- 10) 瀧原博史, 井本勝彦, 日瀧 敬 他(1995) 精路通過障害に対する精路再建手術の臨床的検討. *西日泌尿* 57:421-427
- 11) 岩崎 皓, 石塚栄一, 穂坂正彦 他(1995) 閉塞性無精子症に対するConventional epididymovastostomyの臨床的検討. *日不妊会誌* 40:45-49
- 12) 渡辺政信, 吉田英樹(1995) 顕微鏡下の精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術. *泌尿外科* 8:291-294
- 13) 秋山博伸, 永井 敦, 市川孝治 他(1996) 閉塞性無精子症の臨床的検討. *日不妊会誌* 41:229-233
- 14) 岩崎雅志, 太田昌一郎, 布施秀樹 他(1997) 閉塞性無精子症に対する手術療法の成績. *日不妊会誌* 42:286-291
- 15) Yamamoto M, Hibi H, Yokoi K, et al. (1997) Surgical outcome of microscopic vasectomy reversal: an analysis of 30 cases. *Nagoya J Med Sci* 60:37-42
- 16) Inaba Y, Fujisawa M, Okada H, et al. (1999) Clinical outcome of microsurgery for obstructive azoospermia. *Int J Urol* 6: 139-144
- 17) Belker AM, Thomas AJ Jr., Fuchs EF, et al. (1991) Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. *J Urol* 145:505-511
- 18) 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
- 19) Matthews GJ, Schlegel PN and Goldstein M (1995) Patency following microsurgical vasoepididymostomy and vasovasostomy: temporal considerations. *J Urol* 154:2070-2073
- 20) Matsuda T, Horii Y and Yoshida O (1992) Unilateral obstruction of the vas deferens caused by childhood inguinal herniorrhaphy in male infertility patients. *Fertil Steril* 58:609-613
- 21) Matsuda T, Horii Y and Yoshida O (1994) Obstructive azoospermia of unknown origin: sites of obstruction and surgical outcomes. *J Urol* 151: 1543-1546
- 22) Schieve L, Peterson H, Meikle S, et al. (1999) Live-birth rates and multiple-birth risk using in vitro fertilization. *JAMA* 282:1832-1838

(受付:2000年2月18日)

(受理:2000年2月29日)

**Outcome of Seminal Tract Reanastomosis for Obstructive Azoospermia:
A Multi-Institutional Study**

Tadashi Matsuda, Teruaki Iwamoto, Naoki Ito, Tomohiko Ichikawa, Keisuke Miyaji,
Hiroshi Tomomasa, Masanobu Watanabe, Koichi Nagao, Akira Iwasaki, Toshiyasu Amano, Mikio Namiki,
Hatsuki Hibi, Shoichi Sasaki, Hiroshi Okuno, Kiyomi Matsumiya, Hiroshi Okada, Atsushi Nagai,
Yo Tokunaga, Keiji Ogura, Hiroshi Takihara, Koji Shiraishi, Kiyoshi Komatsu and Jiro Eguchi

Male Infertility Surgical Forum
c/o Department of Urology, Kansai Medical University,
Osaka 570-8507, Japan

Treatment outcome was reviewed for 580 patients with obstructive azoospermia who underwent seminal tract reanastomosis between 1981 and 1999 at 29 urological institutes attending the Male Infertility Surgical Forum. Thirty-six patients received reoperation. Sperm appeared in 64.8% and 47.3% of the patients who underwent vasovasostomy or epididymovasostomy, respectively. Natural conception occurred in 22.4% and 24.2% of 392 patients with more than 6 months follow-up after the initial or final surgery, respectively. Final rates of natural conception in patients after vasectomy, patients after inguinal herniorrhaphy, patients after epididymitis, patients with unknown etiology, and patients with the other etiologies were 28.9%, 22.6%, 29.7%, 21.4%, and 6.9%, respectively. Seminal tract reanastomosis is a useful treatment modality for obstructive azoospermia even in the era of assisted reproductive technology.

Key words: obstructive azoospermia, seminal tract reanastomosis, vasovasostomy, epididymovasostomy
(Jpn J Fertil Steril 45:143-149 2000)

子宮外妊娠における 腹腔鏡下卵管線状切開術の有用性

Efficacy of Laparoscopic Linear Salpingotomy for Ectopic Pregnancies

佐藤 雄一
Yuichi SATO

武内 裕之
Hiroyuki TAKEUCHI

桑原 慶紀
Yoshinori KUWABARA

順天堂大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology
Juntendo University School of Medicine
Tokyo 113-0033, Japan

近年、腹腔鏡下手術の進歩により、子宮外妊娠の手術的治療のほとんどが腹腔鏡下に行われるようになってきた。当科のプロトコールの妥当性を検討するため、卵管線状切開術の成績を卵管切除術を対照として評価した。

1991年2月より1999年7月まで、当科で腹腔鏡下治療を施行した59症例を対象とした。拳児希望を有する未破裂卵管妊娠で外妊腫瘍径が5cm以下のものに対しては卵管線状切開術を施行し(29例)、それ以外の症例には卵管切除術を行い(30例)、手術成績と術後経過を比較した。

線状切開群と卵管切除群の平均年齢、妊娠週数、術前血中hCG値に差は見られなかった。妊娠腫瘍径、腹腔内出血量、手術時間に差が見られた。線状切開群の2例(6.7%)が術後外妊存続症となり腹腔鏡下に卵管切除を行った。術後に行った子宮卵管造影で20例中15例(75.0%)に卵管の通過性を認め、17例中11例(64.7%)に子宮内妊娠が成立した。卵管切除群での妊娠は18例中11例(61.1%)であり有意差は認めなかった。子宮外妊娠の反復は線状切開群で対側卵管に1例、卵管切除群で3例認めた。

子宮外妊娠における卵管温存術で高い卵管通過率と妊娠率が得られ、我々のプロトコールの妥当性が示された。妊孕性を温存する見地からも卵管温存の可能な症例には卵管線状切開を積極的に施行することが重要であると考えられる。

キーワード：子宮外妊娠、腹腔鏡、線状切開術

(日不妊会誌 45:151-155 2000)

緒 言

近年、腹腔鏡下手術の技術の進歩により、子宮外妊娠の手術的治療のほとんどが腹腔鏡下に行われるようになってきている。腹腔鏡下手術は開腹術と比べ侵襲も小さく、また術後の妊孕能にも差がないことが報告されている¹⁾。さらに高感度hCG測定法の開発と経腔超音波法の進歩により、子宮外妊娠の早期診断が可能になり、未破裂や腫瘍径の比較的小さ

な状態で発見されることも多く、妊孕能温存を目的とした保存手術が行われるようになってきた。当科では卵管妊娠の腹腔鏡下取り扱いプロトコールを作成し²⁾、適応となる症例には卵管線状切開による保存手術を積極的に行ってきた。今回そのプロトコールの妥当性を検討するため、卵管線状切開の成績を卵管切除術を対照として評価した。

対象および方法

1991年2月より1999年7月までに、当科において子宮外妊娠の疑診で腹腔鏡を施行した79例中、卵巣妊娠1例、腹膜妊娠1例、間質部妊娠4例、methotrexate (MTX)局注療法2例、観察・血腫除去のみ6例、開腹術に移行した6例を除いた59例を対象とした。腹腔鏡下手術に際しては、卵管破裂をおこし卵管切除術を施行した2例に対し、吊り上げ法を用い、他はすべて気腹法を用いた。当科における卵管妊娠の取り扱いプロトコルを図1に示す。子宮外妊娠の疑いで腹腔鏡下に確定診断を行い、卵管妊娠未破裂で、現在または将来の挙児希望があり、外妊腫瘍最大径が5cm未満の場合卵管線状切開術を施行した。それ以外の卵管妊娠に対しては、卵管切除術を行った。59例中破裂症例は11例、挙児希望のない者が2例、腫瘍径が5cm以上あった症例は8例であった。残りの38例中、術前の経膈超音波で子宮外に胎児心拍が確認された2例、外妊卵管周囲に強固な癒着の認められた5例、卵管妊娠流産で卵管采よりの持続的な出血があった1例、夜間緊急手術で術者の手技的な問題のため卵管切除を行った1例を除いた29例に卵管線状切開術を施行し、30例に卵管切除術を施行した。また術後、外妊存続症の症例には再度腹腔鏡を施行し、卵管切除術を施行した。

卵管線状切開は、まず外妊腫瘍部位を把持鉗子で把持し、卵管間膜に出血防止のためピトレスシン™ (vasopressin)を3-5IU(ピトレスシン20IUを生食100mlで希釈)局注した。卵管間膜の対側の卵管腫瘍に電気メスにて小切開を加え、ハサミ鉗子で小切開部より卵管漿膜のみを長軸方向に切開した。次に卵管筋層を同様にハサミ鉗子で長軸方向に切開し、aquadissectionにより絨毛組織を剥離した後、把持鉗子で外妊内容を除去した。卵管色素通水により卵管

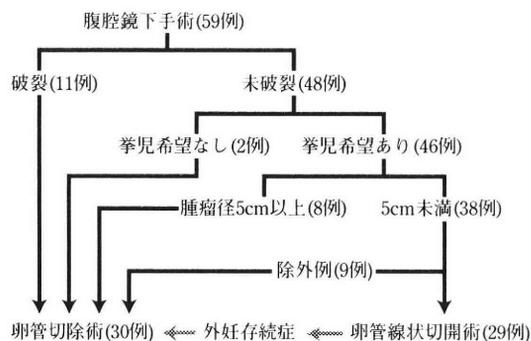


図1 当科における卵管妊娠取り扱いプロトコル

近位端の通過性および卵管筋層の断裂の程度を確認した。前期25例は縫合せずにフィブリン糊(ペリプラスト3ml:アベンティス社)で筋層、漿膜を接着し、さらに卵管漿膜面をcoatingした。後期4症例では4-0バイクリルにて筋層を単結紮縫合した後、漿膜をフィブリン糊で同様の処置を行った。

卵管切除術はEndo-GIA(オートスーチャー・ジャパン社)にて卵管を切断、縫合、またはEndo-loop(エチコン社)で外妊腫瘍を含む卵管を2重結紮した後、ハサミ鉗子で切除した。卵管線状切開術を施行した29例(線状切開群)と、卵管切除術を行った30例(卵管切除群)を対照として手術成績と術後経過を比較した。統計学的処理にはt検定および χ^2 検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

成績

線状切開群29例と卵管切除群30例の平均年齢は 30.4 ± 3.9 歳、 29.3 ± 5.5 歳、平均妊娠週数 6.8 ± 1.1 週、 7.2 ± 1.3 週、術前の平均血中hCG値は 2901 mIU/ml ($87 \sim 8738$)、 3642 mIU/ml ($136 \sim 10640$)であり、両群間に有意差は見られなかった。線状切開群の10例に妊娠の既往があり、うち2人は子宮外妊娠にて当科で腹腔鏡下卵管切除術施行後の対側卵管への妊娠であった。卵管切除群には9例の妊娠の既往があった(表1)。妊娠部位はほとんどが膨大部であり、峡部妊娠は線状切開群3例、卵管切除群1例であった。

手術結果を表2に示す。卵管線状切開群の平均腫瘍径は $2.6 \pm 0.9 \text{ cm}$ で、卵管切除群の $4.0 \pm 1.6 \text{ cm}$ と比べ有意に($P<0.01$)小さかった。これは線状切開を5cm以下のものに行っているためであるが、卵管切除を行った症例でも未破裂で腫瘍径5cm以上のものは8例のみであった。腹腔内出血は、破裂例があるため卵

表1 患者背景

| | 線状切開群(n=29) | 卵管切除群(n=30) |
|---------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 年齢(歳) | $30.4 \pm 3.9(21 \sim 39)$ | $29.3 \pm 5.5(16 \sim 40)$ |
| 週数(week) | $6.8 \pm 1.1(5 \sim 9)$ | $7.2 \pm 1.3(5 \sim 10)$ |
| 術前hCG(mIU/ml) | $2901 \pm 2965(87 \sim 8738)$ | $3642 \pm 5338(136 \sim 10640)$ |
| 妊娠の既往(例) | 10 | 9 |

表2 手術結果

| | 線状切開群(n=29) | 卵管切除群(n=30) |
|-----------|--------------------------------|---------------------------------|
| 腫瘍径(cm) | $*2.6 \pm 0.9(1 \sim 4)$ | $4.0 \pm 1.6(1 \sim 8)$ |
| 腹腔内出血量(g) | $*108.6 \pm 73.8(20 \sim 200)$ | $539.1 \pm 440.4(30 \sim 1300)$ |
| 手術時間(min) | $*74.2 \pm 22.8(46 \sim 130)$ | $51.7 \pm 21.4(24 \sim 110)$ |
| 術中出血量(g) | $19.8 \pm 16.4(3 \sim 50)$ | $63.2 \pm 89.5(5 \sim 230)$ |

* $P<0.01$

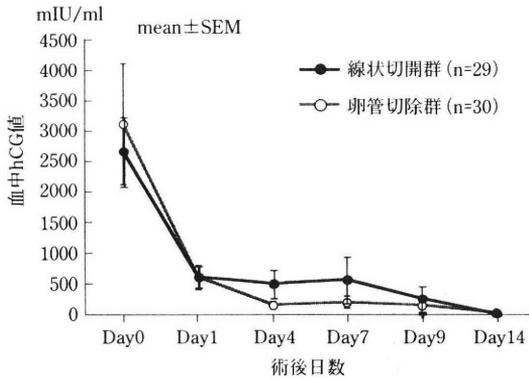


図2 血中hCGの推移

表3 術後成績

| | 線状切開群 (n=29) | 卵管切除群 (n=30) |
|---------|---------------|---------------|
| 外妊持続症 | 2例 (6.7%) | — |
| 卵管通過性 | 15/20 (75.0%) | — |
| 子宮内妊娠例 | 11/17 (64.7%) | 11/18 (61.1%) |
| 子宮外妊娠再発 | 1例 (対側卵管) | 3例 (対側卵管) |

管切除群で多かった。卵管切除群のうち破裂例で500ml以上の腹腔内出血が5例に認められた。手術時間は線状切開群でより多くの手術操作を要するため、74.2±22.8分と有意に(P<0.01)長かった。術中の出血量に有意差は認められなかった。卵管切除術自体の手術時間は数分から十数分だが、腹腔内の出血、凝血塊の吸引除去に時間を要したため、卵管切除群の平均手術時間はさほど短くならなかった。

術前、術後の血中hCG値は、両群ともほぼ同様の推移を示した(図2)。術前の値にも差はなく、術後低下の推移も線状切開群と卵管切除群で同様であった。線状切開後のhCG値は2週間後には、ほとんどの症例において50mIU/ml以下となり、平均61.7±133.3mIU/mlまで低下した。50mIU/ml以上であった症例が4例にみられたが、術後28日から46日の間に50mIU/ml以下となった。術後成績を表3に示す。外妊持続症となった2例は、1例目は術前3147mIU/mlだったhCG値が術直後にも低下せず、7日目には5228mIU/mlに上昇してきたため、再度腹腔鏡下に卵管切除術を施行した。2例目は、術前7200mIU/mlのhCG値は術後4日目には156mIU/mlまで低下したものの、術後14日目に189mIU/ml、さらに術後22日目には303mIU/mlと再上昇したため、卵管切除術を行った。2例ともhCG値は、再手術後速やかに低下した。線状切開術を施行したうち20例に術後2カ月

から3カ月目に子宮卵管造影を行い、卵管の通過性を確認したところ、15例(75.0%)に通過性を認めた。峡部妊娠の3例では2例に子宮卵管造影を行ったが、通過性のあったものとなかったものと1例ずつであった。術後挙児希望があり、経過観察し得た症例について、妊娠率を検討した。線状切開群では17例中11例(64.7%)に、卵管切除群では18例中11例(61.1%)に子宮内妊娠を確認した。子宮外妊娠の反復は、線状切開群では1例が対側卵管に認められたが、手術側卵管への反復はなかった。一方、卵管切除群でも対側卵管への反復外妊が3例に認められた。

考 察

子宮外妊娠の治療は、薬物療法と手術療法に大きく分けられる。薬物療法はMTX、やprostaglandin (PG)を用いる方法が代表的であり、手術療法には開腹術と腹腔鏡下手術がある。近年の腹腔鏡下手術の普及はめざましく、当院において1991年より1999年7月までに81例の子宮外妊娠疑診例に対し腹腔鏡下手術を施行してきたが、開腹術に移行したのは6例のみであった(初期症例2例、間質部妊娠3例、腹腔内出血が2000ml以上で血腫除去困難であった1例)³⁾。最近では間質部妊娠の外妊腫瘍摘出術も腹腔鏡下に行っており、技術的には子宮外妊娠のほとんどの症例が腹腔鏡下手術で完遂できると思われる。Maruiら⁴⁾は全子宮外妊娠の80%が腹腔鏡下に手術できるようになったと言っており、現在子宮外妊娠の手術療法の主流は侵襲の小さな腹腔鏡下手術であることは疑いないと思われる。

さて腹腔鏡により診断された子宮外妊娠が卵管妊娠だった場合、選択しうる術式として卵管切除術と線状切開による保存手術があるが、妊孕能を温存する必要のある症例では積極的に保存手術を行っていくべきであると思われる。Hallatt⁵⁾の卵管妊娠時の対側卵管開存率はおよそ90%であり、保存手術の外妊再発例の50%は対側卵管に認められるという報告からも、卵管摘出をおこなった場合にはすでに10%の卵管性不妊をつくることになり、対側卵管への外妊再発率を考えると保存手術が必要になると考えられる。

図1に当科のプロトコールとして卵管線状切開術の適応を示したが、それ以外の要因として循環動態に影響をおよぼすような腹腔内出血を伴わないことや、卵管妊娠部周囲が隣接臓器と強い癒着がないこと等を考慮に入れている。Vermesh⁶⁾の保存手術の適応を卵管腫瘍5cm以下としているという報告や、

Nezhatら⁷⁾の卵管腫瘍6cm以上、卵管破裂、同側での再発卵管妊娠では卵管切除術が適応であるという報告などを参考に、当科における線状切開の適応は卵管妊娠、未破裂で5cm未満の腫瘍としてきた²⁾。しかし、術前のhCG値や経腔超音波による胎児心拍の有無等のいわゆるvilliのviabilityについては術式決定項目に入れていない。このプロトコルは、腹腔内の所見のみで術式を決定するため簡便ではあるが、術後の卵管通過性や外妊存続症(persistent ectopic pregnancy)の検討を行った上でhCG値や胎児心拍の有無を要約に追加するか決定していこうと考えている。

線状切開術後2~3カ月以内に子宮卵管造影が施行できた20症例中15例(75%)に患側卵管の通過性を認めた。通過性が見られなかった5例の平均術前hCG値は3596.5mIU/ml(140~8738)であり、通過性が見られた症例との間に有意差はなかった。5例中3例では、高度の卵管周囲癒着が認められ、3例とも抗クラミジア抗体が陽性であり、うち1例は対側の卵管も閉塞していた。

保存手術の問題点は術後の外妊存続症であるが、腹腔鏡下卵管線状切開術の場合その頻度はSeifer⁸⁾は3~29%と、Donnezら⁹⁾は4~13%程度であると報告している。一般に外妊存続の症例とそうでない症例の背景因子(妊娠週数、術前hCG値、腫瘍径)に差はなく、術前に外妊存続症を予知することは困難であることが多い。今回の2例も術前hCG値はやや高めであったが、術前検査や術中所見から外妊存続症の発生を予知することはできなかった。そのため術後hCG値の推移には十分な注意が必要である。石丸¹⁰⁾は術後7日目のhCG値の減少率が50%以上ならば外妊存続症の発生はきわめて少ないとしていたが、その後術後10日目以降にhCG値が再上昇してくる晩発性外妊存続症というべき症例が存在することがあり、hCG値が100mIU/ml以下になるまで経過観察する必要があると考えを新たにしている。今回経験した外妊存続症のうち1例は、一旦は50%以下になったにもかかわらず術後14日目から再上昇してきており、まさに晩発性外妊存続症と思われる症例であった。今回の検討で外妊存続症の2例を除くと、術後14日目にhCG値が100mIU/ml以上の症例は20%あり、このような症例についてはさらなる経過観察が必要と考えられた。

今回、線状切開の行われた29例中、胎児心拍が認められた症例はなかったため、胎児心拍の有無による検討はできなかったが、術前hCG値により、線状切開が可能か否かを決定することは困難であると思

われた。さらなる症例の追加による検討が必要であるが、現在のところ当科のプロトコルの妥当性が示されたと思われる。

線状切開後の子宮内妊娠率は52~60%、卵管妊娠の反復率は10~22%と報告されている^{1, 11, 12)}。しかし、今回の検討でも妊娠率64.7%と良好な結果が得られ、卵管切除群とも差は見られなかった。反復外妊は対側卵管へ2例(6.7%)のみであり、諸家の報告よりも低率であった。この要因は、線状切開時必ずインジゴカルミンによる卵管色素通水を行い、切開部までの近位側の卵管通過性を確認したことによると思われる。卵管切除群の3例に対側卵管への反復外妊が認められており、妊娠率に差のないこと、対側卵管の再発を考慮すると挙児希望症例にはできるだけ保存療法を施行したほうが良いと考えられた。

当科においては、線状切開部は開放のままとしたり、フィブリン糊のみにて接着する方法を行ってきた^{13, 14)}。しかし、最近では卵管筋層を4-0バイクルで単結紮縫合をしている。さらに外妊腫瘍を切開する際に、卵管漿膜と筋層を別々に切開し2層に分けて縫合、または漿膜面は、フィブリン糊による接着を行っている。佐藤¹⁵⁾によれば、マイクロサージェリーの場合、絨毛を除去した後欠損した粘膜面を8-0程度の吸収糸で縫合し、続いて漿膜面を縫合するよう勧めている。腹腔鏡下でも粘膜面の欠損部を縫合することにより卵管機能は保たれ止血効果も得られると考え、2層に分けて縫合するようにしている。また、縫合による止血操作が行えることにより、切開創を大きくすることができると考えられる。さらに、より大きな外妊腫瘍にも保存療法を適応としていくためには、大きな切開創と細かい縫合が必要となると思われる。

文 献

- 1) Dubuisson JB, Morice P, Chapron C, et al. (1996) Salpingectomy-the laparoscopic surgical choice for ectopic pregnancy. Hum Reprod 11:1199-1203
- 2) 淡路正則, 武内裕之, 中野義宏 他(1995) 当教室における子宮外妊娠に対する腹腔鏡下治療の現状. 日産婦内視鏡学会誌 12:102-107
- 3) 武内裕之, 淡路正則, 中野義宏 他(1993) 子宮外妊娠における腹腔鏡下治療. 日産婦内視鏡学会誌 9:78-83
- 4) Marui F and Azziz R (1993) Laparoscopic surgery for ectopic pregnancies: technology assesment and public health implication. Fertil Steril 59:487-498

- 5) Hallatt JG (1986) Tubal conservation in ectopic pregnancy; A study of 200 cases. *Am J Obstet Gynecol* 154:1216-1221
- 6) Vermesh M (1989) Conservative management of ectopic gestation. *Fertil Steril* 51:559-567
- 7) Nezhat C, Winer W and Nezhat C (1991) Salpingectomy via laparoscopy : A new surgical approach. *J Laparosc Surg* 1:91
- 8) Seifer DB (1997) Persistent ectopic pregnancy : An argument for heightened vigilance and patient compliance. *Fertil Steril* 68:402-404
- 9) Donnez J and Nisolle M (1994) Endoscopic management of ectopic pregnancy. *Baillieres Clin Obstet Gynecol* 8:707-722
- 10) 石丸忠之 (1997) 子宮外妊娠の保存療法. *産婦治療* 75:447-452
- 11) Decherney AH and Diamond MP (1987) Laparoscopic salpingostomy for ectopic pregnancy. *Obstet Gynecol* 70:948
- 12) Pouly JL, Mahnes H, Mage G, et al. (1986) Conservative laparoscopic treatment of 321 ectopic pregnancies. *Fertil Steril* 46:1093-1097
- 13) Jain A, Solima E and Luciano AA (1997) Ectopic pregnancy. *J Am Asso Gynecol Laoparoscopists* 4: 515-530
- 14) Rudelstorfer B and Loidl K (1995) Pelviscopic organ-preserving treatment of ectopic pregnancy using fibrin sealant. *J Am Asso Gynecol Laoparoscopists* 3:81-85
- 15) 佐藤孝道 (1992) 子宮外妊娠の保存的手術に関する検討：とくに手術手技について. *日不妊会誌* 37:341-346

(受付：2000年1月27日)

(受理：2000年3月6日)

Efficacy of Laparoscopic Linear Salpingotomy for Ectopic Pregnancies

Yuichi Sato, Hiroyuki Takeuchi and Yoshinori Kuwabara

Department of Obstetrics and Gynecology

Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-0033, Japan

The purpose of this study is to compare the efficacy of laparoscopic linear salpingotomy with salpingectomy in ectopic pregnancies (EP) and to assess our management protocol of EP.

Among 59 patients with tubal pregnancies who were treated laparoscopically at our institution between February 1991 and July 1999, 29 patients were underwent linear salpingotomy who will desire pregnancy and had an unruptured and less than 5cm in diameter gestation, other 30 patients were performed salpingectomy. No statistically significant differences were observed regarding average age, gestational weeks, and preoperative serum hCG levels in both groups. Two of 29 (6.7%) patients were recognized persistent EP after salpingotomy. Postoperative hysterosalpingography revealed patency of the treated tube in 15 of 20 (75.0%) linear salpingotomy-treated patients. Subsequently the rates of intrauterine pregnancy were also similar, 64.7% and 61.1%, and the numbers of recurrent ectopic pregnancies were 1 and 3 for the salpingotomy and the salpingectomy group, respectively.

Linear salpingotomy for EP is suitable for patients who hope to be with a baby. The protocol used at our institution is also useful for the management of EP.

Key words: ectopic pregnancy, laparoscopy, linear salpingotomy

(Jpn J Fertil Steril 45:151-155 2000)

潰瘍性大腸炎の男性不妊症患者における
サラゾスルファピリジンからメサラジンへの
変更による造精機能の改善

Reversal of Male Infertility on Changing Treatment from Sulphasalazine to
5-aminosalicylic Acid in Ulcerative Colitis Patients: Report of Two cases

| | | |
|-------------------|----------------|-----------------|
| 鈴木 啓悦 | 小宮 顕 | 清水 亮行 |
| Hiroyoshi SUZUKI | Akira KOMIYA | Akiyuki SHIMIZU |
| 川名 庸子 | 鈴木 孝一 | |
| Youko KAWANA | Kouichi SUZUKI | |
| 市川 智彦 | 伊藤 晴夫 | |
| Tomohiko ICHIKAWA | Haruo ITO | |

千葉大学医学部泌尿器科

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

炎症性腸疾患の治療薬としては、副腎皮質ホルモンとサラゾスルファピリジン(SASP)を含む5-アミノサリチル酸(5-ASA)製剤が中心的に使用されている。SASPは高頻度に男性不妊症を引き起こすことが知られている。最近、新しい5-ASA製剤であるメサラジンが使用可能となった。今回、潰瘍性大腸炎の男性不妊症患者2例でSASPからメサラジンへの治療薬の変更によって造精機能の改善をみたので報告する。症例1は、37歳男性で13年前より潰瘍性大腸炎にてSASPを使用していた。理学的所見およびホルモン値に異常を認めないものの、精子運動率が低く、ハムスターテストで精子侵入率0%であった。SASPからメサラジンへ変更したところ、運動率は正常化し、4カ月目で自然妊娠が得られた。症例2は、30歳男性で3年前より潰瘍性大腸炎にてSASPを使用していた。理学的所見およびホルモン値に異常を認めないものの、運動率が低く、ハムスターテストで精子侵入率8.1%であった。SASPからメサラジンへ変更したところ、2カ月目で自然妊娠が得られた。欧米ではSASPからメサラジンへの切り替えによって造精機能が改善された症例が報告されている。今回我々の経験した2例でも同様のことが観察され、今後SASP服用中の男性不妊症患者ではメサラジンへの変更を考慮する必要があるものと考えられた。

キーワード：潰瘍性大腸炎、男性不妊症、造精機能、サラゾスルファピリジン、メサラジン

(日不妊会誌 45:157-159 2000)

緒 言

炎症性腸疾患の治療薬としては、副腎皮質ホルモンとサラゾスルファピリジン (SASP: サラゾピリン[®]) を含む5-アミノサリチル (5-ASA) 製剤が中心的に使用されている。SASPは高頻度に男性不妊症を引き起こすことが知られている^{1,2)}。1996年より新しい5-ASA製剤であるメサラジン (ペンタサ[®]) が使用可能となった。最近我々は、潰瘍性大腸炎の男性不妊症患者2例でSASPからメサラジンへ治療薬の変更によって造精機能が改善し、自然妊娠に至ったので報告する。

症 例

症例1：37歳、男性

現病歴：平成2年4月に結婚。その後1年間の避妊期間はあったものの妊娠に至らないため、平成5年8月、当科男性不妊外来を受診した。なお配偶者は30歳で婦人科的検査で異常のないことが確認されていた。

既往歴：昭和60年より潰瘍性大腸炎にてSASPを使用していた。

現 症：身長170cm、体重64kg。理学的所見は異常なし。精巣容積は両側とも20ml。陰茎長72mm。検査所見：内分泌学的検査は、LH3.67mIU/ml、FSH9.35mIU/ml、テストステロン8.54ng/mlと異常はなかった。精液検査は、精液量3.4ml、精子濃度 28×10^6 /ml、精子運動率36%、精子奇形率58%と精子運動率・奇形率の異常をみた(表1)。

経 過：ハムスターテストで精子侵入率0% (0/27)であった。10月よりクエン酸クロミフェン25mg/日を、11月よりカリジノゲナーゼ6錠/日を投与したが、精子運動率の改善はみなかった。10月よりSASPからメサラジンへ変更したところ、精液検査では精液量5.0ml、精子濃度 74×10^6 /ml、精子運動率54%、精子奇形率17%と正常化し、精子濃度も上昇した。ハムスターテストで精子

表1 症例1の精液検査およびハムスターテストの結果の変化

| | 変更前 | 変更後 |
|----------|----------------------|----------------------|
| 精液検査 | | |
| 精液量 | 3.4ml | 5.0ml |
| 精子濃度 | 28×10^6 /ml | 74×10^6 /ml |
| 運動率 | 36% | 54% |
| 奇形率 | 58% | 17% |
| ハムスターテスト | | |
| 精子侵入率 | 0% (0/27) | 100% (36/36) |
| 多精子侵入率 | | 97% (35/36) |

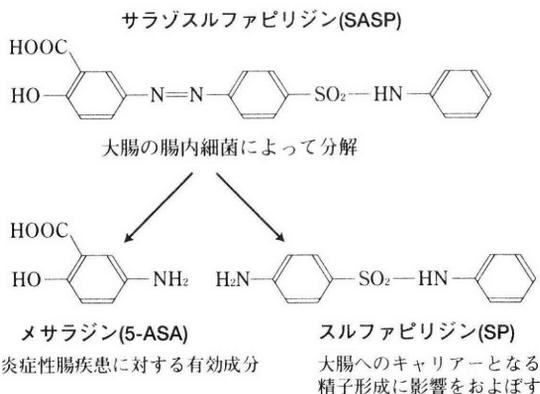


図1 サラゾスルファピリジン (SASP)の体内代謝

侵入率100% (36/36)と著明な改善をみた。平成11年2月に配偶者の自然妊娠が確認された。

症例2：30歳、男性

現病歴：平成8年4月結婚。すぐに配偶者は妊娠したものの自然流産という結果であった。以後不妊のため平成11年1月、当科男性不妊外来を受診した。なお配偶者は31歳で婦人科的検査で異常のないことが確認されていた。

既往歴：10月より潰瘍性大腸炎にてSASPを使用していた。

現 症：身長172cm、体重68kg。理学的所見は異常はなかった。精巣容積は両側とも22mlで陰茎長は62mmであった。

検査所見：内分泌学的検査は、LH2.94mIU/ml、FSH7.54mIU/ml、テストステロン4.29ng/mlと異常はなかった。精液検査は、精液量2.0ml、精子濃度 23×10^6 /ml、精子運動率34%、奇形率44%と精子運動率・奇形率の異常をみた。

経 過：ハムスターテストで精子侵入率8.1% (3/37)と低値であった。その後AIH (artificial insemination with husband's semen) を6回施行したが妊娠はなかった。平成11年3月よりSASPからメサラジンへ変更したところ、2カ月後の平成11年5月に配偶者の自然妊娠が確認された。なお薬剤変更後の精液検査およびハムスターテストは、自然妊娠があったため施行していない。

考 察

SASPは男性患者において、精子運動能の低下を中心とした造精機能の低下を引き起こすことが報告されている。Toovey¹⁾はSASP内服中の炎症性腸疾患

患者28名の精液検査を行い、うち18名(64%)に異常所見を見たと報告した。このうち14名でSASPの内服を中止し11名(79%)に精液所見の改善が得られ、うち8名に合計11回の自然妊娠が確認された。また彼らはSASPによる精液異常は可逆的でホルモン異常などによるものではないと報告している。

SASPの代謝は図1に示すように大腸の腸内細菌によって5-アミノサリチル酸(5-ASA)とスルファピリジン(SP)に分解される³⁾。このうち5-ASAが炎症性腸疾患に対する有効成分であり、SPは精子形成に影響を及ぼすとされる。5-ASAのみを製剤化したメサラジン(ペンタサ[®])が開発され、1996年に本邦でも市販されている。

欧米では、メサラジンへの切り替えによって造精機能が改善された症例が報告されている^{4,5)}。Rileyら⁴⁾は緩解期潰瘍性大腸炎患者9名でSASPから5-ASA製剤へ変更したところ、精液所見が改善され、変更後平均3.7カ月で合計5回(4組)の妊娠が確認されたと報告した。今回我々の経験した2例でも同様のことが観察された。本邦ではメサラジン発売後約3年が経過したが、SASPからメサラジンへの変更による自然妊娠の報告は我々の知る限り初めてである。今後SASP服

用中の男性不妊症患者ではメサラジンへの変更を積極的に考慮する必要があるものと考えられた。

本論文の要旨は第4回日本内分泌学会生殖内分泌分科会(1999年9月、仙台市)で発表された。

文 献

- 1) Toovey S, Hudson E, Hendry WF, et al. (1981) Sulphasalazine and male infertility: reversibility and possible mechanism. *Gut* 22:445-451
- 2) Levi AJ, Fisher AM, Hughes L, et al. (1979) Male infertility due to sulphasalazine. *Lancet* 2: 276-278
- 3) 日比紀文(1997) サラゾスルファピリジン誘導体の開発と海外の臨床応用の成績. *BIO Clinica* 12: 59-62
- 4) Riley SA, Lecarpentier J, Mani V, et al. (1987) Sulphasalazine induced seminal abnormalities in ulcerative colitis: results of mesalazine substitution. *Gut* 28: 1008-1012
- 5) Cann PA and Holdsworth CD (1984) Reversal of male infertility on changing treatment from sulphasalazine to 5-aminosalicylic acid. *Lancet* 1: 1119

(受付: 1999年11月16日)

(受理: 2000年1月26日)

Reversal of Male Infertility on Changing Treatment from Sulphasalazine to 5-aminosalicylic Acid in Ulcerative Colitis Patients: Report of Two cases

Hiroyoshi Suzuki, Akira Komiya, Akiyuki Shimizu, Youko Kawana,
Kouichi Suzuki, Tomohiko Ichikawa and Haruo Ito

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

Sulphasalazine (SASP) and adrenal steroid hormone have been used in the treatment of inflammatory bowel disease. Seminal abnormalities are commonly found during SASP treatment. Recently, a new 5-aminosalicylic acid (mesalazine) was developed. This report shows reversal of male infertility on changing treatment from SASP to 5-aminosalicylic acid in 2 patients with ulcerative colitis. Semen analyses of both cases showed decreased sperm motility and increased percentage of abnormal sperm forms. In case No. 1, mesalazine substitution was associated with an improvement in all seminal parameters. Both cases had successful pregnancies after 4 and 2 months after mesalazine substitution, respectively. These results confirm the previous reports suggesting that mesalazine allows the recovery of seminal abnormalities induced by SASP in patients with ulcerative colitis.

Key words : sulphasalazine, 5-aminosalicylic acid, male infertility, ulcerative colitis

(*Jpn J Fertil Steril* 45:157-159 2000)

地方部会講演抄録

1999年日本不妊学会北陸支部学術総会

日時：平成11年6月5日(土)
午後2時～

場所：金沢都ホテル(金沢市)

1. 当院での最近のAIHの成績について

○新 博美, 向橋貴美子, 豊北美穂
橋爪淳子, 藤波隆一, 山崎裕行
道倉康仁
(永遠幸マタニティクリニック)

【目的】Oligozoospermiaや原因不明で長期にわたり配偶者間人工授精(AIH)を行うも妊娠に至らず、体外受精にも踏み切れない患者に対し、体外受精移行へのタイミングを見極めるため、最近のAIHの成績を検討した。【対象】平成9年7月から平成10年6月までの1年間に当院で不妊治療のためAIHを行った354症例、979周期を対象とした。AIHは3層(50、70および90%)percollによる密度勾配法で調整した。【結果】354症例のうち妊娠に至ったのは、57周期57症例で、症例あたりの妊娠率は16.1%、周期あたりの妊娠率は5.8%であった。年齢別の妊娠率は30歳代前半までは15%を越えたが30歳代後半から減少し、40歳以上での妊娠例はみられなかった。妊娠に至るまでのAIH回数は、5回以下が91.2%を占め9回以上行っている妊娠はみられなかった。percoll処理前の精子濃度では、 5×10^6 /ml以下で1例妊娠したが、妊娠例の殆どは 20×10^6 /ml以上であった。percoll処理後の運動精子数では、 40×10^6 までは精子数増加と共に妊娠数は増加したが、 40×10^6 では精子数が増加しても妊娠数は増加しなかった。【結論】AIHは精子濃度が良好な場合でも5回までを適応とし、運動精子が少ない場合や女性の年齢が高い場合(35歳以上)では、より早期に体外受精に治療方法を変更した方がよいと考えられる。

2. 当科におけるday5-ET(blastocyst stage transfer)の検討

○副田善勝, 高木紀美代, 津田 恵
(済生会高岡病院産婦)

【目的】体外受精・胚移植(IVF・ET)において、従来day2/3の2～8細胞期にETが行われてきた。しかし、着床率や妊娠率は低く、その改善に様々な試み

がなされてきた。近年、胞胚期胚移植(blastocyst stage transfer)が妊娠率を改善することが報告されている。今回、当科においてdays5-ETを試み、その臨床形跡について検討した。【方法】1998年6月から1999年4月まで採卵、媒精(ICSIを含む)後、5日間培養(sequential culture media)し胚移植を施行した31症例42周期を対象とした。Day1～3(12～72時間)HTF培養液(Irvine)またはP-1培養液(Irvine)を、day3～5(65～120時間)はBlastocyst培養液(Irvine)またはD3培養液(Quinn)を用いて培養した。すべての培養液には10%SSS(Irvine)を加えた。その分割率、胚盤胞率、着床率、妊娠率について検討した。なお、妊娠は胎囊の確認にて判定した。【結果】受精卵214個が得られ、day2における4細胞胚までの分割率は71.4%(152/214)、day5における桑実胚率は35.5%(54/152)、胞胚率は27.6%(42/152)であった。全症例における胚移植は平均 2.1 ± 1.06 個であり、妊娠率/ETは21.7%(9/42)であった。妊娠群と非妊娠群に分けて検討すると、妊娠群において、分割卵数と胞胚数が、非妊娠群に比して有意に多かった。胞胚を2個以上ET可能であった症例では、妊娠率/ETは45.7%(5/11)で、桑実胚までの胚のみのET症例では妊娠/ETは8.3%(2/24)で、有意差が認められた。【結論】Day5-ETにおいて、胞胚までに发育した胚を2個以上移植した場合、良好な着床率・妊娠率を認めた。胞胚まで发育させ胚移植することがIVE・ETの妊娠率の改善につながる事が示唆された。

3. AITの工夫～Fallopian tube sperm perfusion (ESP)法の有用性について～

○折坂 誠, 吉井久美子, 仙田 享
小辻文和 (福井医科大産婦)

【目的】人工授精(artificial insemination with husband's semen: AIH)は一般不妊治療として広く行われているが、その治療成績は決して満足できるものとはいえない。AIHの治療効果の更なる向上を目指し、バルーンカテーテルを用いて機械的に精子を卵管内へ灌流するFallopian tube sperm perfusion (ESP)法によるAIHを施行し、その有用性を検討した。【方法】対象は1996年9月から1999年4月の間に、当科にてAIHを施行した35症例129周期である。FSP法は、(1)調整した精子液を約4mlの培養液(GPM)に懸濁、(2)子宮卵管造影検査用バルーンカテーテル(ヒス

キヤス)を子宮腔内に挿入、(3)カテーテル先端部のバルーンを生食1mlで満たして固定留置、(4)精子懸濁液を緩徐に注入した。【成績】対症例妊娠率は、従来法21.9%(7/32)、FSP法33.3%(6/18)、計37.1%(13/35、一部重複あり)であった。また対周期妊娠率は、従来法9.4%(8/85)、FSP法13.6%(6/44)、計10.9%(14/129)であった。なおFSP法による妊娠例6例のうち5例は、従来法を繰り返すも妊娠しなかった症例である。また従来法のみ行っていた1996年9月から1998年1月の対周期妊娠率が8.2%(4/49)であるのに対し、FSP法を取り入れた1998年2月以降の対周期妊娠率は12.5%(10/80)であった。【結論】FSP法は、従来法で妊娠に至らない症例にも有用であり、IVF・ETへ移行する前に試みる価値があると思われる。

4. 子宮筋腫核出術後のEarly Second Look Laparoscopy (ESLL)有用性に関する検討

○道又敏彦、津田 博、種部恭子
齋藤 滋 (富山医科大産婦)

【目的】子宮筋腫核出術は妊孕性温存を目的として行われる手術であるが、術後に高頻度で癒着を起こす。この術後癒着は不妊の原因にもつながり、臨床的に問題となっている。今回は、我々は子宮筋腫核出術にEarly Second Look Laparoscopy (ESLL)を行い、インターシードRおよびセプラフィルム®の術後癒着防止効果およびESLLの有用性を検討した。【対象と方法】1998年4月から1999年4月までの期間、子宮筋腫核出術を施行し、癒着防止対策を行い、かつESLLにて癒着の評価が可能であった12症例を対象とした。検討項目として、手術時間、出血量、既存癒着および子宮内膜症の有無、核出筋腫個数、子宮切開創数および癒着防止対策と術後癒着の状態を検討した。癒着防止対策としては、インターシードRあるいはセプラフィルム®を用いた。なお、癒着の評価は、More Comprehensive Adhesion Scoring Method (MCASM)を用いてスコア化した。【結果】ESLLにて、12症例中11例(91.7%)に術後癒着を認めしたが、そのうち9例(81.8%)は、容易に癒着剥離が可能であった。手術時間、出血量、既存癒着および子宮内膜症の有無、核出筋腫個数、子宮切開創数と術後癒着スコアとの相関は認めなかった。一方、癒着防止対策としてセプラフィルム®を用いた6症例においては、術後癒着スコアは 9.5 ± 4.5 とインターシード®を用いた5症例の 32.0 ± 23.2 より癒着スコアが低かった。【結論】子宮筋腫核出術後の癒着防止対

策として、セプラフィルム®は癒着軽減効果を認め有用であった。また、ESLLは術後癒着の評価のみならず、癒着に対する治療効果も得られ有用と考えられた。

5. 男子不妊症に対する補中益気湯による治療成績・実虚スコアとの関係

○岩崎雅志、村上康一、太田昌一郎
布施秀樹 (富山医薬大泌尿)

【目的】男子不妊症の治療薬として補中益気湯を使用し、その治療成績と実虚スコアにより判定した患者の証との関係を検討した。【対象および方法】1996年6月より1998年12月まで不妊を主訴に富山医科薬科大学附属病院泌尿器科を受診し、精液検査にて精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満あるいは精子運動率50%未満であった39例(25~43歳；平均35.1歳)を対象とした。ツムラ補中益気湯7.5gを食前に3カ月間服用し投与前および投与後3カ月において、一般精液検査、hypoosmotic swelling test, penetrak test, Sperm Quality Analyzerおよび精液自動分析装置セルソフトシリーズ3000による検査を施行し、各種パラメーターの変動を検討した。また、前述の時点で10個の質問よりなる実虚問診表による実虚スコアを算出し、60点以上を実証、50~59点を虚実問証および49点以下を虚証に分けてその治療効果も合わせて検討した。【結果】治療前の実虚スコアの分類では実証19例、虚実問証14例、虚証6例であった。治療前後の各種パラメーターの変動では、精子膨化率b-g型および精子平均運動速度、amplitude of lateral head displacementにおいて虚証症例で有意な増加が認められたが、その他のパラメーターでは明らかな変動はみられなかった。一方、治療効果では精子濃度および精子運動率において全体の有効率はそれぞれ23%、35%であり、虚証および虚実問証の症例ではすべて有効あるいは不変で悪化の症例は認められず実証症例にくらべて良好な結果であった。治療前後で測定した実虚スコアでは、評価可能であった20例中1例のみ虚証から虚実問証へ変化した(14例(70%))において証に変化は認められなかった。

6. 機械的、酵素的处理で分離した卵胞洞形成前卵胞を含んだネコの卵胞、卵子の相対的成長について

○榊田星史, 泉 徳和, 大西基子

織田雅子, 高氏つぐみ

(石川県農短大生物生産)

宮本 元 (京大院・農・生体機構)

ネコの新鮮な卵胞, 卵子の相対的成長様式の全容は明らかではない。ウシに比べて最大卵胞が小さく, 成長様式解明に0.4mm以下の微小卵胞の分離が不可欠である。ヒト(Shyamalら, 1993)やウシ(Figueiredoら, 1994)で酵素処理後に微小卵胞を分離していたが, 本研究ではこの方法でネコの微小卵胞を分離し, 卵胞, 卵子の相対的成長の全容を明らかにした。

避妊術後の摘出卵巣49対を材料とし, うち34対は解剖針で卵胞を分離した, 残り15対は微小卵胞分離用に約0.5mm角に細切後, 酵素処理方法を検討し, 卵胞を分離した。卵胞の直径(FDと略)をX軸, 卵子の透明帯を含む直径(OD)と含まない直径(ID)をY軸にとり回帰分析した。得られた双曲線回帰式($y: R^2 > 0.98$)を微分し, 成長率曲線式(y)とした。

最適条件はcollagenase濃度1,050units/ml, 反応時間30分で, 1卵巣対当たり微小卵胞25個を得た。卵子核, 卵丘細胞の状況から正常と判定した卵胞, 卵子611対のFDに対するODとIDの関係は各々, $y=191.2x/(x+0.111)$ と $y=123.4x/(x+0.045)$, 微分方式は $y=21.2/(x+0.111)^2$ と $y=5.60/(x+0.045)^2$ であった。ODとIDの成長が停止するFDは各々, 600と400 μ mで, これらの値以上のFDに対するOD, IDの関係は, y軸の切片が177.119 μ m($P < 0.001$), 勾配0の一次回帰式で示された。ウシではFDが6.0mmに達するまでOD, IDが成長するが, ネコではFDが0.6mmになる前にOD, IDの成長が停止した。

7. Differential AP-PCR法を用いたY染色体上における無精子症責任領域の同定の試み

○高 栄哲・金谷二郎・並木幹夫

(金沢大泌尿)

【目的】無精子症患者とその父のゲノムDNAの差を利用したフィンガープリント法によるY染色体上のゲノム異常の検索を行い, その責任領域を確定する。

【方法】我々は, すでにSTS(sequence-tagged sites) mappingによりY染色体上の一部に共通欠失領域を同定し, この両者のDNA配列の差より微小な差を新規

AZF(Azoospermia factor)領域と想定している。無精子症とその親のDNAに対して, 任意の一方向プライマーを用い, 緩やかな条件下で増幅させたAP-PCR(arbitrarily primed polymerase chain reaction)法を用いて, 親子の差, 正常男女の増幅パターンから, Y染色体上のものを選択し, 配列特異性を検討している。任意プライマーは20mer前後の約80個で検証した。【結果】DNAの多型性(polymorphism)も含めて, バンドの増強および, 欠失がバンドの差として現れる。親に現れ, 子にないもの, さらに正常男子に現れ, 女子にないものを選択した。2)親になく, 子に現れるものに分けられる。これらのバンドパターンを比較し, 数個のY特異領域を選択した。【結論】個体間に存在するDNAの多型性(polymorphism)がバンドパターンの多様性として現れてくる。これらの多型性を差し引いた無精子症関連特異塩基配列を同定している。現在gene bankに登録されていない4種類を確認している。また, gene bank検索上Y染色体特異性の様々なpseudogeneやsatellite repeatなどが現れた。現在, このゲノム領域において遺伝子の存在の有無について検討中である。

8. 多嚢胞性卵巣症候群に対する腹腔鏡下手術の有用性

○館谷由佳, 橋本 学, 毎多佳子

新井 昇, 佐竹紳一郎, 小嶋康夫

舟本 寛, 中野 隆, 館野政也

(富山県立中央病院産婦)

多嚢胞性卵巣症候群は排卵障害をきたし不妊の原因となる代表的な疾患である。排卵誘発を目的としてクロミフェンやゴナドトロピンの投与を行うことが多いが, 無反応の症例もある。これらに対する外科的治療法としての卵巣楔状切除術は従来は開腹して行われたが, 近年では腹腔鏡下手術が主流となっている。そこで当科における平成5年5月1日から平成9年12月31日までの腹腔鏡下手術, 27症例について, 術後の排卵, 妊娠を中心について検討した。27症例のうち卵巣楔状切除術が18例, multiple punctureが9例で, 術後排卵が認められたもの22例, 自然妊娠は3例, クロミフェン投与による妊娠は5例, 体外受精による妊娠は7例であった。分娩に至ったのは8例, 現在2例が妊娠継続中であり腹腔鏡下手術は有用であると考えられる。

9. 子宮内膜症組織におけるエストロゲン合成酵素の発現

○炭谷 宏志, 揚 惠娟, 瀬川 智也

生水真紀夫, 井上 正樹

(金沢大産婦)

子宮内膜症は臨床的に卵巣由来のエストロゲンに依存性して発育を示すことが知られており, エストロゲンは内膜症細胞内のエストロゲンレセプターを介して細胞内のIFG-Iなどの増殖因子を増加させることにより細胞増殖を促進しているものと考えられている。最近, 子宮内膜症病変組織にエストロゲン合成酵素であるアロマターゼが発現していることが明らかとなった。アロマターゼ遺伝子には複数のプロモーターが存在するが, 子宮内膜での発現には, PII(卵巣型)プロモーターが関与していることが報告されている。この卵巣型プロモーターの発現には転写因子であるSE1が関与している可能性が示唆されている。今回我々は, 1)SF1が*in vivo*でアロマターゼの発現調節に関与しているかどうか, 2)局所で産生されるエストロゲンが内膜症細胞の増殖促進に関与しているかどうかについての検討を行った。卵巣子宮内膜症病変組織を1cm²大の小片に分割し各々の組織におけるIL-1 β , SF1, アロマターゼPII, アロマターゼI.4, IGF-I, G3PDHの各遺伝子の発現量quantitative RT-PCR法により定量した。これらの遺伝子の発現量を同一病巣内の各所で比較したところ, アロマターゼ遺伝子の発現量は同一患者の病巣内でも部位により大きく異なっていることが明らかとなった。従って, アロマターゼの発現には局所因子が大きく関与しているものと推察された。さらに, 各遺伝子の発現量の相違を検討したところ, SF1の発現量とアロマターゼPIIの発現量と②は有意の相関が認められた。従って, SF1は*in vivo*においてもアロマターゼの発現を促進的に制御している因子であると考えられた。ついで, アロマターゼ発現量(PIIとI.4との総和)とIFG-Iとの相関を検討したところ, 両者に相関は認められなかった。この成績は, 少なくとも卵巣子宮内膜症において内因性に産生されるアロマターゼが内膜症細胞の増殖に関与している可能性を否定するものであると考えられた。

10. 排卵前期におけるGranulocyte-colony stimulating factor(G-CSF)卵胞内局所産生について

○藤井亮太郎, 郭 一琳, 富沢英樹

金子利朗, 牧野田 知

(金沢医科大産婦)

【目的】排卵現象は炎症反応と類似性を有しており, 白血球やサイトカインがメディエーターとして深く関与していることが報告されている。我々は白血球の中でも炎症の際に最も増加する好中球に対し, 特異的かつ強力な正の作用を有することが知られている造血系サイトカインG-CSFに着目し, ヒト排卵現象との関連性を調査するため排卵期におけるG-CSF卵胞内局所産生の可能性を検討した。【方法】金沢医科大学産婦人科において体外受精-胚移植を施行した患者を対象に, ①採卵時に得られた卵胞液および血清中のG-CSFをwestern blottingにより確認した。②卵胞液および血清中G-CSF濃度を①と同様の一次抗体を用いてCLEIA法で測定した。③卵胞液中に浮遊する顆粒膜細胞を材料にnested RT-PCR法でG-CSFmRNA発現の有無を検討した。【成績】①卵胞液・血清中ともにG-CSF蛋白が検出された。②卵胞液中のG-CSF濃度は73.75 \pm 5.51pg/ml(Mean \pm S.E.)であり, 同時期の血清中濃度(30.7 \pm 3.55pg/ml)と比較して有意に高濃度(P<0.00001)であった。③対象とした全検体からG-CSFmRNA由来のバンドが確認された。【結論】排卵直前の卵胞液中にG-CSFが血清中よりも高濃度に存在し, 同時期の顆粒膜細胞検体全例からG-CSFmRNAの発現が確認されたことより, G-CSFが排卵前卵胞内で局所産生され, 排卵現象と何らかの関連性を有している可能性が推察された。

特別講演

顆粒膜・莖膜細胞間の相互作用による卵巣機能調節 小辻文和(福井医科大学産婦人科学教室)

上皮細胞と間質細胞が基底膜を介して接する構築は実質臓器に見られる基本的なものである。このような細胞構築の持つ生物学的役割は, 半世紀に渡り特に形態学者の関心を集めてきたが, なお明らかではない。私どもはこの点を研究する目的で“上皮細胞と間質細胞とが基底膜を介して接する”という細胞環境を実験室内で再現することを試みた。卵巣とは排卵周期という短い期間に極めて著しい機能形態変化を呈する特異的な臓器である。卵胞の機能単位は卵

胞であり、ここでは上皮由来と考えられる顆粒膜細胞と間質細胞の莢膜細胞が基底膜を介して接している。講演では、両細胞の相互作用は卵胞本来の機能・形態・細胞構築の維持に不可欠であること、さらには卵胞発育の過程で両細胞の相互作用による卵巣機能調節がどのように変化するかを紹介する。この実験システムは他の臓器の研究にも応用可能であり、会員の皆様の参考になれば幸いである。

第42回 日本不妊学会北海道地方部会

日時：平成12年2月11日(金)

午後1時～

場所：タケダ札幌ビル(札幌市)

1. ウシ子宮内膜間質細胞にとけるプロスタグランジンの合成制御：プロジェステロン，エストロジェンおよび上皮成長因子の役割

○山下傑夫，片桐成二，永野昌志
高橋芳幸

(北海道大大学院獣医研繁殖)

プロジェステロン(P)，エストラジオール(E_2)および上皮成長因子(EGF)が，ウシ子宮内膜間質細胞でのプロスタグランジン(PG) E_2 および $F_{2\alpha}$ 産生制御におよぼす影響を検討した。発情後5～10日目の子宮由来間質細胞は，ホルモン処理により $P+E_2$ ，P， E_2 および無処理の4群に分けた。P処理は PGE_2 および $F_{2\alpha}$ の産生量を増加させたが， $PGE_2/PGE_{2\alpha}$ 産生量比には影響をおよぼさなかった。つづいて，上記4群を前処理群とし，EGFがPG産生におよぼす効果を検討した。EGFはPおよび $P+E_2$ で前処理した同質細胞の PGE_2 産生量を増加させた。P処理は $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ 産生量比の増加はP前処理群で高かった。以上の結果より，Pは黄体期の間質細胞におけるPG産生量を増加させ，EGFはPで感作された間質細胞での $PGE_2/PGF_{2\alpha}$ 産生量比を増加させると考えられた。

2. ウシ一次卵胞の発育能の検討

○山本直人，永野昌志，片桐成二
高橋芳幸

(北海道大大学院獣医研繁殖)

現在，体外培養のためのウシ一次卵胞の選抜基準は確立されていない。本研究では，まず採取した一次卵胞を形態的に分類し，卵胞の生存性を調べた。卵母細胞および顆粒層の形態が正常な卵胞は，いず

れか一方の形態が異常な卵胞に比べて卵母細胞生存率が高かった。次に，形態的に正常な卵胞を8日間培養した。45%の卵胞は培養後も正常な形態を維持しており，これらの卵胞の卵母細胞はすべて生存していた。正常な形態を維持した卵胞の総顆粒層細胞数は，同一長径の体内で発育した卵胞と同等であった。一方，形態に異常の認められた卵胞は正常な形態を維持した卵胞と同程度に長径が増加したが，総顆粒層細胞数は少なかった。以上の結果より，卵胞の形態的分類は生存卵胞の選択に有効であり，形態的に正常な卵胞は正常な発育能をもつことが示唆された。さらに，卵胞の発育は大きさだけでなく総顆粒層細胞数も考慮して評価すべきことが示された。

3. 初期胞状卵胞由来ウシ卵母細胞の体外発育および成熟

○猪川真紀，永野昌志，片桐成二
高橋芳幸

(北海道大大学院獣医研繁殖)

初期胞状卵胞由来ウシ卵母細胞に減数分裂再開能を獲得させるため以下の実験を行った。卵胞の形態と卵母細胞の直径の関係を調べた結果，直径0.5～1.0mmの卵胞は90%以上が卵胞腔を有し，これらの初期胞状卵胞から得られた卵母細胞(平均直径 $92\mu m$)は，成熟培養のみでは減数分裂を再開しなかった。初期胞状卵胞由来の卵丘卵母細胞顆粒層細胞複合体を4～14日間発育培養したのち成熟培養を行った結果，8日間発育培養した卵母細胞(平均直径 $113\mu m$)の約40%が第二減数分裂中期(MII)に達した。10および14日間培養では顆粒層および卵丘細胞が遊走し，裸化および変性卵母細胞が増加したためMIIに達した卵母細胞は得られなかった。以上の結果から，初期胞状卵胞由来ウシ卵母細胞は成熟培養のみでは減数分裂を再開しないが，8日間の発育培養で直径 $110\mu m$ 前後に発育し，成熟培養によりMIIに達することが示された。

4. ウマにおける子宮内膜下小動脈の硬化性変化に関する検討

○井上裕士，伊藤克巳，寺田 有
西村信義，畠添 孝，佐藤和茂

(日高軽種馬農協エクワインメディカルセンター)

ウマの子宮内膜の内視鏡検査時において，特に老齡馬では子宮内膜下に走行する小動脈(SAUE)が白く明瞭に観察されることがある。今回は，その組織学的特徴の解明と，年齢および慢性的な子宮内膜の

退行性変化(CDE)との関連について検討した。まず7頭の実験馬を用いて、SAUEの内視鏡所見と組織像を比較したところ、白く明瞭に観察されるSAUEでは内膜と外膜を中心に弾性線維が増加しており、硬化性変化を示していると推察された。次に、不受胎の原因を救命するために来院した432頭において、SAUEの内視鏡所見と年齢およびバイオプシーにより評価されたCDEの程度を比較したところ、加齢とともにSAUが白く明瞭に観察されるものの割合が増加し、SAUEが明瞭に観察されるものでは、CDEが進行しているものの割合が多かった。以上の結果から、SAUEの硬化性変化は加齢とともに進行し、CDEの進行に直接的あるいは間接的に関連している可能性があることが示唆された。

5. ウサギ卵母細胞の体外成熟および射出精子による体外受精

○趙 野, 亀山祐一, 石島芳郎
(東京農大生物生産)

射出精子を用い、卵母細胞の体外成熟・受精法を検討した。PMSG処理(40IU×5日)後48時間に採取した卵母細胞は、90.5%が卵核胞を有していた。これら卵母細胞はBO液で10時間以上培養すると、約65%が第2成熟分裂中期に移行した。射出精子をBO液で子宮上皮細胞と2~6時間共培養し、受精能獲得誘起を試みた。共培養精子は活力が大幅に低下し、先体反応誘起率が変化しなかった(18~24%)。非共培養精子は活力が徐々に低下したが、先体反応誘起率は経時的に上昇した(2時間:9.9%, 4時間:14.1%, 6時間:17.8%)。共培養精子はハムスターテストで17~21%の精子侵入率を示し、この成績は非共培養精子(11~16%)と差がなかった。射出精子をPAF添加(1×10^{-6} M)BO液で15分間処理し、10時間培養した卵母細胞と媒精した。媒精8時間の受精率は71.8%であり、培養卵の76.4%が2細胞期、15.2%が8細胞期、2.4%が桑実胚に発育した。

6. リコンビナントGDF-9(Growth differentiation factor-9)は培養前胞状卵胞の成長を促進する

○林 正路, 工藤正尊, 藤本征一郎
(北海道大産婦)

【目的】GDF-9は、卵子で発現される卵胞発育に極めて重要な成長因子である。今回、生物活性を有するリコンビナントGDF-9を作製し、前胞状卵胞培養系を用いてその生物活性について検討したので報告す

る。【方法】(1)完全長ラットGDF-9cDNAをクローニングし、293T細胞を用いたリコンビナントラットGDF-9分泌細胞株を樹立した。卵胞培養には、この無血清培養上清を用いた。(2)14日齢のラットより単離した直径約140 μ mの前胞状卵胞を200ng/mlのGDF-9(G群)、5IU/mlのFSH(F群)およびそれぞれ同量のGDF-9+FSH(G+F群)添加無血清培地中で72時間培養し、24時間毎に卵胞径を測定した。対照群(C群)として遺伝子導入していない293T細胞の培養液上清を同様に用いた。【結果】培養72時間後の卵胞径はC群、143 \pm 2.5 μ m(n=28, mean \pm se)に対して、G群、161.4 \pm 2.8 μ m(n=34)と、卵胞径は有意(p<0.01)に増大した。この効果はF群(162.3 \pm 2.9 μ m, n=33)とほぼ同等であった。またG+F群では相加的な増大(182.0 \pm 2.8 μ m, n=38)を認めた。【結論】本研究により、リコンビナントGDF-9が培養前胞状卵胞の成長を促進することが示された。

7. 一酸化窒素(NO)のマウス卵子成熟・初期胚発育におよぼす影響

○千石一雄, 田熊直之, 堀川道晴
小森春美, 槌谷恵子, 中野 香
玉手健一, 石川睦男

(旭川医科大産婦)

NOが生殖生理機能に深く関与することは種々報告されている。今回、NOのマウス卵子成熟、初期胚発育におよぼす影響に関し、SNP(NO供与剤)、L-NAME(NOS阻害剤)、Hb(NO scavenger)を使用して検討し、以下の成績を得た。1)MIIへの成熟率は、L-NAMEの添加により抑制されたが、低濃度のSNPにより促進された。2)マウス1細胞期から胎胚期までの発育はSNP、L-NAMEの添加により容量依存性に抑制され、Hb添加により促進した。以上の成績より、卵子成熟、初期胚発育にNOが関与し、卵の発育段階でその影響が異なることが示唆された。

8. PCOラットの卵巣におけるMMP, Lysyl oxidaseの発現について

○逸見博文, 遠藤俊明, 芥川典之
北島義盛, 木谷 保, 西川 鑑
真名瀬賢吾, 工藤隆一

(札幌医科大産婦)

【目的】Matrix metalloproteinase(MMP)は各種コラーゲンの分解活性作用があり、排卵過程においても重要な働きをする事が知られている。多嚢胞性卵巣症候群(PCO)と排卵障害の関係を明らかにする目的

で、今回ラットPCOモデルを用い、卵巣におけるMMPの発現を検討した。またlysyl-oxidase (LOX)はcollagenをcross linkする酵素でこの強発現はタンパク分解酵素に抵抗性を示す事になる。PCOの排卵障害とこのLOXの関係をラットモデルで検討した。【方法】Leeらの方法に従い、22日齢の幼若雌ラットdehydroepiandrosterone (DHEA)を6mg/100g/dayを15日間連日投与しPCOを作製した。またcontrolとして22日齢ラットにsesame oilを15日間連日投与し、24時間後、卵巣を採取し、MMP、LOXの発現を検討した。また、MMP2活性はzymographyで検討した。【成績】MMP2-mRNA発現と活性はcontrolに比べてPCOラットの卵巣で約1/3に抑制されていた。またLOX mRNAの発現はcontrolに比べてPCOラットの卵巣で約2倍に強く発現していた。【結論】PCOラットの卵巣で、MMP2の発現の抑制が認められた事からMMP2がPCOの排卵障害の一因となっている事が推察された。また、LOXの発現の増強がPCOラットの卵巣で認められた事はこれがMMPに対する抵抗性の原因となっている可能性が示唆された。

9. ゴナドトロピン受容体と相同性を有する線虫(C.elegance)における新しい受容体のクローニングとその機能解析

○工藤正尊, 藤本征一郎
(北海道大産婦)

近年ゴナドトロピン受容体と相同性を有する新しい受容体がヒト、ラット、ハエなどでクローニングされたが、それらのリガンドやセカンドメッセンジャーに関しては未だ不明である。既に解析されているC.eleganceのゲノムにも同様の受容体が存在しているため、そのクローニングならびに機能解析を試みた。mRNAを用いたRT-PCR、5'-RAGEにより得られた完全長の受容体cDNAを発現ベクターに組み込み、ヒト293T細胞にトランスジェクションすることにより発現させた。またこの受容体とヒトLH受容体とのキメラ受容体を作製し同様に発現させた。この受容体は膜7回貫通すると考えられ、293T細胞の膜表面に発現し、cAMP産生において恒常的活性化状態であることが示された。さらに、キメラ受容体を用いた実験により、この恒常的活性化には第1から第7膜貫通領域が重要であることが示された。これらの結果は、他の相同性を有する受容体の機能解析に役立つものと考えられた。

10. 無精子症例における精巢内精子回収(TESE)の成績

○伊藤直樹, 塚本泰司 (札幌医科大泌尿)
遠藤俊明, 工藤隆一 (札幌医科大産婦)
神谷博文 (神谷レディースクリニック)
幡 洋 (東豊病院産婦)

現在当科では無精子症例に対しては診断的精巢生検と同時にTESEを行っており、今回その成績を報告する。対象は無精子症例14例、精子回収は腰椎麻酔下でopen-TESEにて行った。14例中6例で精子回収に成功した。精子回収率の平均血中FSHは5.1mIU/ml、組織学的にはhypospermatogenesisあるいはnormal spermatogenesisであった。非回収群の平均FSHは30.5mIU/mlと高値で、1例を除きSertoli cell only tubules (SCO)であった。1例はnormal spermatogenesisであり、精子回収に失敗したのは技術的問題と考えられた。この例では同時にvasoepididymostomyを行い精液中に精子の出現が認められている。SCOでも精子回収は可能な症例があると報告されているが、FSH高値例では精子回収は難しいと考えられた。

11. 無精子症の精巢内精子回収法(TESE)による妊娠

○東口篤司, 高階俊光, 野田雅也
本間寛之, 金沢朋扇, 梶尾和美
(斗南病院産婦)
鈴木龍弘, 日岡隆矢 (斗南病院泌尿)

射出精液に精子がない無精子症では、従来、妊娠をあきらめるか、非配偶者間人工受精(AID)以外には方法がなかった。しかし無精子症の半数以上に精巢内には精子が存在することが明らかとなってきており、精子が存在すれば精巢内精子回収法(TESE)で精子を得ることが可能である。TESEは外来的に局所麻酔下に精巣を穿刺、微量採取された精巣組織を細切、ろ過、遠沈し精子を洗い出す方法である。当科では当院泌尿器科にTESEを依頼、得られた精子で1996年12月より2000年1月までに37例のべ53周期にICSIをおこない、419個の卵のうち215個(51.3%)が受精、60周期にETし11例(ETあたり18.3%、症例あたり29.7%)が妊娠した。またTESEによって得られた精子を凍結して使用することの影響、ICSI後何日にETすべきか、Assisted Hatchingの効果などについても考察したので報告する。

12. 男性不妊症の診断, 治療における精巣針生検

○鈴木龍弘, 三井貴彦, 佐藤聡秋
 町野倫太郎, 守屋仁彦, 山下 登
 日岡隆矢, 松村欣也, 後藤敏明
 (斗南病院泌尿)
 野々村克也, 小柳知彦 (北海道大泌尿)
 東口篤司, 神谷博文 (斗南病院産婦)

男性不妊症の診断, 治療における精巣針生検の妥当性について検討した. 1996年12月より1999年11月までに, 男性不妊症の診断及び精巣内精子抽出 (TESE) 材料採取を目的とした精巣針生検を, 41症例に延べ61回行った. 年齢は26~53歳, 平均35.2歳, 射精障害を含む閉塞例が15例, 非閉塞例が26例, このうち非閉塞性無精子症は18例であった. 精巣針生検は外来的に局所麻酔下で行われ, 1回の生検で3~4検体を採取した組織学的診断率は1検体で95.1%, 検体不良2例の別検体ではTESE可能であった. TESE成功率は全体で80.5%, 非閉塞例では73.1%, 非閉塞性無精子症では61.1%であった. 入院を必要とする合併症は無かった. TESE不能7例中血清FSH値が測定されていた5例では, 全例精巣容量10cc未満かつFSH値26mIU/ml以上であった. 以上より一定の限界があるものの, 精巣針生検は男性不妊症の診断, 治療において有用, 簡便かつ安全と考えられた.

13. 当科不妊症外来における臨床統計

○中野 香, 槌谷恵子, 小森春美
 堀川道晴, 田熊直之, 玉手健一
 千石一雄, 石川睦男 (旭川医科大産婦)

以前より我々は当科不妊症外来患者に関し, 本学会においてその臨床統計を隔年毎に報告してきた. 今回はその第4報として, 1995年1月から1996年12月の2年間の不妊症外来初診患者に関し初診時年齢, 不妊期間, 不妊因子, 治療方法, 治療期間, 妊娠率などについて検討したので報告する.

14. 当科における不妊治療 (漢方薬を併用して)

○武井弥生, 齊藤 剛, 越田高行
 山田 俊, 津村宣彦, 川口 勲
 (帯広厚生病院産婦)

当科では週1回不妊外来を設け診療を行っている. H9年6月よりH11年12月の2年間に妊娠が成立した12症例の臨床的分析を行った. 妊娠成立時の年齢は23歳から41歳. 妊娠成立するまでの不妊期間

は2年から8年. 当科初診から妊娠成立するまでの期間は2カ月から2年半であった. 患者が妊娠に至った主となる方法は排卵時期の指導によるものが4例, 経口排卵誘発剤の使用によるものが4例, FSH-hCGによるものが1例, 人工授精によるものが2例, 腹腔鏡施行術が1例であった. 全ての症例に漢方薬を併用した. 使用した薬剤は当帰芍薬散, 桂枝茯苓丸, 補中益気湯, 温経湯, 八味地黄丸 (夫へ) である. 排卵に関する内分泌ホルモンの改善や精子の活動性の改善を期待して使用した. これらの症例に若干の考察を加えて報告する.

15. 不妊症例における腹腔鏡・卵管鏡を用いた卵管所見の検討

○佐藤 修, 和田真一郎, 南 真志穂
 高後裕匡, 首藤聡子, 日下 剛
 三國雅人, 工藤正尊, 藤本征一郎
 (北海道大産婦)

【目的】腹腔鏡・卵管鏡検査により得られる卵管の異常所見として卵管周囲癒着 (PTA) 卵管周囲癒着 (PFA), 卵管采の変形, 卵管内腔変化に着目し, その発生に關与する因子について検討を行った. 【方法】1996年9月から1999年9月までに腹腔鏡・卵管鏡検査を施行した19歳~42歳 (平均32.0歳) の不妊症例163例を対象として, PTA, PFAを3段階, 卵管采形態, 卵管内腔所見を4段階にgradingした. これらの卵管所見のgradがchlamydia trachomatis (CT) IgA・IgG抗体の有無, 開腹手術の既往の有無, 子宮外妊娠保存手術の有無, 子宮内膜症の重症度 (RAFS stage) により受ける影響をlogistic解析により検討した. 【成績】卵管所見を有意に悪化させる因子として, 子宮内膜症がPTA, PFA, 卵管采形態, 卵管内腔所見のすべてに影響し, CTIgA抗体がPTA, PFAに, CTIgG抗体がPTA, 卵管采形態, 卵管内腔所見にそれぞれ影響していた. 開腹手術の既往および子宮外妊娠手術は卵管の異常所見の発生に影響を与えなかった. 【結論】子宮内膜症およびCT感染が卵管所見の悪化と関連した.

16. 悪性卵巣腫瘍を合併したチョコレート嚢腫の検討

○井上行信, 藤井美穂, 逸見博文
 木谷 保, 西川 鑑, 林 卓宏
 遠藤俊明, 工藤隆一 (札幌医科大産婦)

不妊症合併の卵巣チョコレート嚢腫の外科的処置には嚢腫摘出術, 嚢腫吸引, アルコール固定, 無処

置などが選択されるが、それぞれに利点と欠点があり、臨床的には嚢腫径、周囲組織との癒着の程度など症例によって選択される。一方卵巣チョコレート嚢腫には2～5%、高率のものでは14%程度にendometrioid adenocarcinomaなど悪性腫瘍の合併が報告されており、慎重に対処すべきである。

今回1994年1月から1998年12月までに当科で手術を施行した卵巣チョコレート嚢腫116例について術前および術後診断、摘出病理組織型、術前腫瘍マーカー値および画像所見などを解析し、悪性腫瘍との合併率、術前に合併の有無が診断可能かどうかについて検討を試みた。116例中8例(6.9%)に中間群および悪性卵巣腫瘍が合併し、術前に合併を診断できなかったのは中間群卵巣腫瘍との合併例1例であった。

特別講演

『体細胞クローン牛の現状と課題』

高倉 良, 岸 昌生, 首藤朋子

(雪印乳業(株)受精卵移植研究所)

板垣康治, 今村美生

(雪印乳業(株)札幌研究所)

近年の発生工学の進歩はめざましく、体細胞クローンヒツジ“ドリー”の誕生はまさに生物学史上の一大ブレイクスルーであり、我々酪農・畜産分野においても大きな福音であった。すなわち、従来の受精卵クローン技術では“受精卵”を利用するため、家畜の能力がばらついたり生産数にも限りがあったが、この技術では、経済価値の明らかな元畜(種雄牛、高泌乳牛、霜降り和牛など)のコピー生産が大量に期待できる。また、高齢で繁殖供用できない元畜であっても、細胞さえ保存していればいつでも再現できる。それ故、国内でも牛を用いた研究が加速し、現在では100頭以上のクローン牛が生産されている。最近では、成育したクローン牛の妊娠やクローン牛からの再クローンの誕生予定も報道されている。当社も札幌研究所と共同で、初乳由来の乳腺上皮細胞および耳の繊維芽細胞から4頭の産子を獲得した。特に前者の細胞は、搾乳牛では体を傷つけることなく、安全かつ容易に採取できるメリットがある。

しかしながら、この技術の実用化への課題も多い。一つには、クローンの作出率の低さにある。100個の体細胞を核移植しても、生存産子が得られるのは当社では1頭程度にすぎない。クローン胚の

作出効率や移植後の受胎率が低く、流産も多いためである。核移植操作の労力や代理母牛に係わる経済的負荷も現場では無視できない問題である。また、成育したクローン牛が正常かつ期待通りの能力を発揮するのかという点も重要である。ミトコンドリアの影響や寿命の問題など、興味深い話題も多い。しかし、最大の課題はクローン牛に対する一般消費者の理解かもしれない。家畜のクローン研究は情報公開しつつ適宜推進との指針はあるものの、体細胞クローンの商業的出荷は当面自粛の状況にある。このように、酪農・畜産での有効利用にはまだ時間を要するものの、我々は効率性の高いクローン技術の開発に向けて努力していきたい。

第121回日本不妊学会関東地方部会

日時：平成12年2月19日(土)

午後2時30分～6時00分

場所：帝京大学 臨床大講堂(東京都)

1. Kruger's strict criteriaからみたAIH およびIVF-ET治療成績の検討

○小原ひろみ, 柴原浩章, 種市明代

藤原寛行, 小川修一, 出居貞義

佐藤郁夫 (自治医科大産婦)

荒木重雄 (同 看護護大)

【目的】Krugerの strict criteriaによる精子形態正常率とIVF-ET, AIH治療成績との関連を検討した。【対象】1995年～99年にIVF-ETを施行した99人137周期, AIHを施行した382人1493周期。【成績】形態正常率15%以上をnormal群, 5～14%をgood prognosis群, 4%以下をpoor prognosis群とした。IVF-ETにおいてnormal群が110周期と比較しgood prognosis群27周期では有意に受精率が低かった(80.5%vs55.4%; $p<0.01$)。両群でETあたりの妊娠率に差はなかった(31.0%vs26.1%)。次にAIH成績を検討した。normal群, good prognosis群, poor prognosis群において対周期妊娠率は11.3%(123/1088), 6.1%(21/345), 1.7%(1/60)であり、後二者で有意に妊娠率は低かった($p<0.01$)。精子濃度, 運動率ともに正常だが形態のみ不良($\leq 14%$)であった94周期ではAIHの妊娠率は4.3%と有意に低かった。【考察】strict criteriaによる精子形態評価とAIHおよびIVF-ET治療成績の間に密接な関係を認めた。

2. Immotile cilia syndrome による不動精子を ICSIして妊娠に至った1症例

○田中壯一郎, 正岡 薫, 根本 央
河津 剛, 稲葉憲之(獨協医科大産婦)

Immotile cilia症候群は1977年Eliassonらによって、全身の繊毛あるいは精子鞭毛の先天的な超微構造異常に起因する系統的疾患として提唱された。常染色体劣性遺伝で頻度は男女問わず2万例に1例、病因は繊毛あるいは鞭毛を構成するダイニン蛋白の合成障害であり精子鞭毛の運動障害による男性不妊となることが知られている。今回我々は本症候群の不動精子をICSIすることにより妊娠に至った症例を経験したので報告する。精子所見は運動率0%であり、不動精子のうちエオジンに染まらなかった生存精子は60%であった。電顕では精子鞭毛のダイニン腕の欠損が認められた。平成11年6月26日、10個の成熟卵にICSIを施行し6個が正常受精、Grade Iの胚3個を移植し妊娠に至った。Immotile cilia症候群の不動精子を用いたICSIにて妊娠に至った症例の報告は海外で2例、国内で1例にすぎず、希少な症例である。本症例は現在妊娠33週で経過順調である。

3. 精子数10万/ml 未満症例における射出精子を用いたICSIについて

○遠藤詩織, 赤間晴雄, 布山隆史
内藤正文 (川崎製鉄千葉病院産婦)
始関吉生, 川名庸子 (同 泌尿)

【対象】1997年から1999年9月までの10万/ml未満精子を用いてICSIを行った7症例11周期と、その間の全ICSI190周期について報告する。【方法】原精液を2回洗滌後、MS管でswim upを行い、精子が回収できれば、この浮遊液を用いる。回収不可の場合、単層パーコール法を行い、約15分の遠心後、最下層の0.5mlを回収し、2回洗滌を行ったものでICSIする。【結果】10万/ml未満症例11周期と、同時期にICSIを施行した190周期において、それぞれ、受精率が39/50(78.0%)、1061/1316(80.6%)、妊娠率は4/11(36.4%)、67/190(35.3%)であった。10万/ml未満症例における妊娠4例の予後は、3例が分娩に至り、1例は現在妊娠継続中である。【結論】精液中に精子が存在すれば、運動精子を回収できる可能性はあり、原精液中の精子濃度に関係なく、約80%の安定した受精率が得られる。また、妊娠率も精子濃度による変化はなく、精子数10万/ml未満の症例において、射出精子を用いたICSIで妊娠できる可能性は十分に

あると考えられる。

4. 当科における精巣上体および精巣由来精子を用いたICSIの検討

○田谷順子, 斎藤正博, 伊東宗毅
三木明德, 林 直樹, 石原 理
堀籠邦子, 清水香子, 木下勝之
(埼玉医大総合医療センター産婦)
谷沢晶子, 内島 豊 (同 泌尿)

【目的】近年、閉塞性無精子症および非閉塞性無精子症例において精巣由来精子を用いた顕微授精(ICSI)の有用性が報告されている。当科では95年11月より精巣上体精子吸引法(MESA)ならびに精巣内精子採取法(TESE)で得られた精子によるICSI治療を開始し、今回その臨床成績に検討を加えた。【方法】無精子症と診断された20症例を対象とし、9症例にMESA、11症例にTESEを施行して精子の回収を試みた。卵子はGn-RH analogue/hMG/hCG法で卵巣刺激後に採取した。また、ICSIは既報に準じて実施した。【結果】MESA症例の全例から精子が回収され、凍結保存精子を含む15周期の13周期(86.7%)で胚移植が可能であった。4例に妊娠が成立し、妊娠率は30.8%であった。1例は流産となり、残りの3例はすべてが双胎妊娠となった。TESEを施行した11症例のうち1例からは精子の回収ができなかった。また、凍結保存精子を用いた1周期で受精卵が得られなかった。胚移植を施行した14周期の8周期(57.1%)で妊娠が認められ、多胎妊娠率は37.5%であった。精巣上体ならびに精巣から回収した精子を用いたICSI治療により誕生した児には異常は認められず、本法は無精子症の治療法として有用であることが示唆された。

5. 無精子症患者の臨床的検討

○清水亮行, 小宮 顕, 鈴木孝一
鈴木啓悦, 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)
鈴木規之, 村上信乃(旭中央病院泌尿)

1986年1月より1998年12月の間に千葉大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来に不妊を主訴として受診した1174症例中精液検査で無精子を示した者は192症例(16%)であった。これらの症例について原因検索のため既往歴、精巣容積、内分泌学的検査、染色体検査、精巣生検などを行った。精路通過障害と診

断した者は59例(31%)であり、そのうち精巣生検を施行したのは33例でありJohnsen scoreが5.1以上の症例は24例(89%)であった。非閉塞性だったのは124例(65%)であり、そのうち精巣生検を施行したのは81例でありJohnsen scoreが5.1以上の症例は12例(16%)であった。鼠径ヘルニア術後および精管結紮術後の症例では顕微鏡下精管精管吻合術により前者では12例中4例、後者では全例に精子の出現がみられた。また治療により低ゴナドトロピン性5例中4例で精子出現がみられた。

6. SSRI内服が著効した、早漏を主要因とする不妊カップルの一例

○加藤龍太 (新潟こばり病院産婦)

【抄録】選択的セロトニン再取り込み阻害剤である抗うつ剤SSRIには、副作用としてしばしば射精遅延・性欲減退・勃起障害などの性機能障害が報告されている。今回、その射精遅延作用に着目し、早漏が主要因と考えられた不妊カップルに適用したところ著明な効果が得られ、妊娠成立に有用だったと考えられたのでその臨床経過を報告する。夫34歳、妻27歳。結婚後2年経過したが、夫の早漏(膣へ挿入する前に射精してしまう)のために性交が不成立に終わる事態が続いていた。早漏のきっかけ等は明らかではなく、またペニス・陰囊・前立腺の局所所見・基礎ホルモン値および精液性状は正常であり、体調不良・疲労感およびストレス等は自覚していなかった。カウンセリングではその原因を明確に出来なかったが、夫婦とも性交に対して積極的であり、挙児希望も強かった。Diazepam・漢方薬等、従来の薬物療法を2カ月間試みたが効果は得られなかったため、Fluvoxamine 25mg/日を処方したところ内服5日目に膣内挿入および射精が可能となった。同周期に妊娠が成立し、現在まで順調に経過している。本剤内服に伴う副作用は認められなかった。

7. ARTにおける初期流産の染色体異常出現頻度

○大野道子, 藤澤典子, 荒木康久

本山光博

(高度医療技術研究所・中央クリニック)

ART施行後の妊娠の流産における染色体異常出現頻度を自然妊娠(AIH含む)の流産と比較検討した。対象: 22週未満の流産, GIFT6例, cIVF11例, ICSI32例, 対象: AIH32例, 自然妊娠76例。方法は絨毛の短期培養法を用いた。染色体分析率は96.9%であった。染色体異常出現頻度は体内培養であり、

症例数も少ないGIFT(33.3%)を除くと, cIVF(70.0%), ICSI(71.0%)の平均70.7%はAIH(71.9%), 自然妊娠(69.7%)の平均70.4%と同様の値が得られた。種類別では異数性の異常が大半を占め, cIVF40.0%, ICSI51.6%, AIH46.9%, 自然妊娠44.7%で, 倍数性, 45,X, 構造異常等の出現頻度にも差は認められなかった。ARTに特有な染色体異常の出現傾向は見られず, ARTにおいても初期流産を引き起こす最大の因子は胚の染色体異常であると考えられる。

8. 習慣流産夫婦に見られた染色体異常

○藤澤典子, 大野道子, 荒木康久

本山光博

(高度医療技術研究所・中央クリニック)

'96年3月より'99年12月までの3年10カ月間に習慣流産と診断された夫婦153組の染色体分析を行った。流産回数は2回から7回で平均2.3回であった。染色体異常出現頻度はカップルあたり9.8%(15/153)検出され、男性は1.3%(2/153)、女性は8.5%(13/153)と女性に高く有意差が認められた($p<0.01$)。構造異常では相互転座が5例、ロバートソン型転座が1例見られた。性染色体異常は女性のみ、9例(5.9%)の低頻度モザイクが認められた。この低頻度モザイクが持つ一例では、その後2回の流産から、転座型14トリソミーと2トリソミーが検出された。最近、性染色体の低頻度モザイクと習慣流産との因果関係が指摘されているが、染色体異常を引き起こす機序は不明である。今回の症例から低頻度モザイクが他の染色体異常を誘発する可能性も考えられ、さらに症例を増やし検討していきたいと考えている。

9. ヒトIVF/ICSI胚の体外培養法の検討

○内山一男, 桑山正成, 寺元章吉

加藤 修 (加藤レディースクリニック)

【目的】ヒトIVF/ICSI胚の有効な体外培養法の確立のため、市販培地のスクリーニングを行った。【方法】インフォームドコンセントが得られた31名の患者より、IVF/ICSI由来の正常な4細胞期胚をIrvine Blastocyst Medium, IVF Science G2.2およびCook Blastocyst Mediumで培養した。5ないし6日目までの培養後、胚盤胞の発生状況ならびに、移植後の妊娠率を調べた。【結果】Irvine B.M., G2.2およびCook B.M.区での胚盤胞への発生率はそれぞれ50, 65および44%であった。1胚移植の妊娠率は全ての区で40%以上と高く、特にG2.2で63%と極めて高い値が得られた。【まとめ】ヒトIVF/ICSI胚の体外培養法として、

高い胚盤胞発生率および妊娠率が得られたG2.2の有効性が示唆された。

10. ヒト胚盤胞におけるガラス化保存法の検討

○青山麻紀子, 桑山正成, 林 輝明
 倪 暁文, 寺元章吉, 加藤 修
 (加藤レディスクリニック)

【目的】ヒト胚盤胞の凍結保存法の確立を目的とし、ガラス化保存法の有効性を検討した。【方法】インフォームドコンセントの得られた患者胚盤胞を15% EGで平衡後、ガラス化液(30%EG, 0.5MSシヨ糖)を用いて凍結した。融解は1Step法では0.5M, 2Step法は1.0MSの液で胚を融解(37°C)し希釈洗浄後回復培養した。生存胚を患者に移植し、移植可能胚率および着床率を比較した。【結果】移植可能胚率は1Step法では53.7%, 2Step法では75.0%であった。また着床率は2Step法が他区より高い値であった。【まとめ】2Step法を用いたガラス化保存法はヒト胚盤胞の凍結に有効であることが示唆された。

11. 急速凍結法(ガラス化法)による胚盤胞の妊娠例

○佐藤節子, 横田美賀子, 横田佳昌
 (横田産婦人科医院)
 荒木康久 (高度生殖医療技術研究所)

体外培養技術の進歩で胚盤胞中期胚(胚盤胞)まで培養が可能になって来た。このことより、初期胚のみならず胚盤胞の余剰胚の凍結が必要となり、より簡便な急速凍結法(ガラス化法)が検討されている。

今回、胚盤胞の急速凍結、融解、移植後に妊娠に成功した2症例を報告する。症例1, 症例2とも培養3日目までGrade良好胚を新鮮胚移植し、余剰胚を5日目まで追加培養したところ胚盤胞まで発生した。この胚盤胞をエチレングリコール(EG), ジメチルサルフォキシド(DMSO)とシヨ糖を凍結保護剤とするIshimoriらの方法をもとに急速凍結した。融解後、追加培養して移植したところ妊娠が成立した。現在(平成12年2月の時点で、症例1は20週齢, 症例2は9週齢)どちらも順調な妊娠経過中である。我々の用いた耐凍剤および手技が、胚盤胞の凍結に、より適していたのではないかと考えられる。症例を重ねて検討していく必要がある。この方法によるヒト胚盤胞の急速凍結法では、本邦最初の妊娠報告と思われる。

12. 胚盤胞期凍結胚移植による妊娠例

○児島孝久 (アモルクリニック)

多胎やOHSSなどのARTの副作用を防止するために胚凍結は用いられている。今回効果的な胚凍結として胚盤胞期(BL)凍結を実施したので報告する。対象は授卵後5日目に余剰胚を凍結胚移植(ET)を実施した18症例。当クリニックにおけるARTは採卵、媒精(or ICSI)後、3日目、一部は5日目にETを実施。胚凍結はDAY-3ET例はDAY5まで追加培養、DAY-5ET例は当日に凍結可能かを判断、凍結方法はPROHで脱水後、+20°Cから-180°Cまで緩徐に凍結、融解はET前日にPROH除去し融解後、翌日ET実施。ET時の誘発は原則は自然周期で、無排卵例はクロミドやhMGを最小限に使用、ET実施した18例中、5例(27.7%)が妊娠に至り、全例がONGOINGで単胎4例、双胎1例であった。BLとCOMの生存率は58.4%/17.4%で、凍結・融解後のBL個数は妊娠例4.8個/3.0個、非妊娠例は2.2個/1.2個であった。PROHによる緩徐凍結法を用いBL凍結を実施した18例中5例に妊娠がみられた。BLに達していた症例のみに妊娠がみられたことより胚の発育速度が重要と思われた。

13. 交叉性精管精管吻合術後に非吻合側に発生した精巣腫瘍の一例

○野澤英雄, 鈴木良二
 (水戸赤十字病院泌尿)
 永尾光一, 三浦一陽, 原 啓
 石井延久 (東邦大泌尿第1)

我々は小児期鼠径ヘルニア手術による右側精管閉塞と左側造精機能障害の合併による高度乏精子症に対する左尿道側精管と右精巣側精管との交叉性精管精管吻合術の施行(1992年)により、精液所見は改善し2人の拳児を得たが、1999年非吻合側の左精巣より腫瘍(seminoma)の発生をみた症例を経験した。

症例は31歳男性。初診時、精巣容積は右側25ml, 左側10ml, 内分泌学的所見はFSH5.2mIU/ml, LH5.3mIU/ml, 精液所見は精液量4.4ml, 精子濃度17万/ml, 精子運動率41%, 精巣生検は右側は正常、左側は高度な精子形成能の低下を認めた。腫瘍発生時、腫瘍マーカーはhCG256mIU/ml, hCG-β1.4ng/ml, 内分泌学的所見はLH, FSHともに0.5mIU/ml以下、精液所見は精液量7.5ml, 精子濃度11万/ml, 精子運動率50%と再び悪化を認めた。

男性不妊症の診察にあたっては、精巣腫瘍との関

連について認識しておく必要がある。

14. 男性不妊症における補中益気湯の有用性

- 大野貴史, 柴原浩章, 小原ひろみ
小川修一, 出居貞義, 佐藤郁夫
(自治医大産婦)
森田辰男 (同 泌尿)
荒木重雄 (同 看護短大)

【目的】生存精子がわずかに存在すればICSIで妊娠可能だが男性不妊に対しては系統的診療も重要である。今回は補中益気湯による精液所見・精子機能への有用性を検討した。【方法】CASA(濃度・運動率), Kruger(形態), Sperm fertility index(SFI=総精子数×高速運動精子率×Kruger[a+b1+b2]):受精機能と相関)を評価法とした。特発性および原因診断の拒否例を投薬適応(1日7.5g)とした。投与前と投与1カ月後を23例で比較した。判定は寺田らの基準(精子濃度[×10⁶/ml]20未満で10以上, 20以上で20以上, 精子運動率20%以上の増加), 形態とSFIはcut off値(15%・3×10⁶)を上回った場合改善とした。4項目中1つでも改善した場合有効とした。【結果】65.2%で精液所見が改善し, 妊娠率は13.0%であった。有効例でSFIの改善傾向を認め, 本剤による精子の質的向上が示唆された。【結論】本剤は精液所見不良例の治療の一選択肢となりえるが, 適応・治療機関など今後control studyが必要である。

15. 精子ミトコンドリア活性と精子機能に関する検討

- 笠井 剛, 小川恵吾, 水野薫子
永井聖一郎, 内田雄三, 大田昌治
山中智哉, 星 和彦
(山梨医科大産婦)

【目的】精子のミトコンドリア膜電位活性は精子運動活性と関連しているという報告がある。そこで, 膜電位活性を反映する蛍光色素JC-1を用いて, その蛍光パターンと, 精子自動分析装置(CASA)で分析しうる運動性パラメーターとの関連を検討した。【方法】一般精液検査で正常と診断された患者からインフォームド・コンセントを得た後, 得られた精液を10%SSS添加HEPES-HTFにて洗浄し, 精子浮遊液を作成した。最終濃度2 μ MのJC-1色素を加え, 遮光し, 大気圧下37°Cで30分培養しPBSで洗浄した後, Flow Cytometryにて10,000eventsを測定した。JC-1色素は, ミトコンドリア外膜に結合し, 緑色を呈した場合, 膜電位が低いことを, 赤・橙色を呈した場合

は, 膜電位が高いことを示す。その蛍光パターンより赤・橙色が多いものをA群(n=19), 緑色が多いものをB群(n=11)として分類した。同時にCASAで運動率, 前身運動率, average path velocity(VAP), straight line velocity(VSL), curvilinear velocity(VCL), Linearity(LIN)を測定した。【成績】A群, B群で, %Mはそれぞれ, 84.8±10.1%(mean±SD), 76.3±10.8%, %PMは, 49.2±23.5%, 49.0±21.0%, VAPは62.6±13.5 μ m/s, 53.1±13.7 μ m/s, VSLは, 49.4±14.3 μ m/s, 45.0±14.3 μ m/s, VCLは, 105.8±27.5 μ m/s, 81.7±22.6 μ m/s, LINは, 0.474±0.11, 0.554±0.11を示し, 両群間で, %M(p<0.05)とVCL(p<0.05)に有意差を認めた。【結論】精子ミトコンドリア膜電位活性が高いほど精子の運動性は高くなることが明らかになった。

16. 精子運動速度と受精率に関する検討

- 小川恵吾, 笠井 剛, 水野薫子
内田雄三, 大田昌治, 山中智哉
星 和彦 (山梨医科大産婦)

精子自動分析装置(医科CASA)の各パラメータの何をどのように用いて精子機能を評価すべきかは, まだ一定の見解がない。IVFでの精子受精能とCASAによって測定された精子運動速度の関係を検討した。まず, AIH35周期, IVF22周期において, CASA(Hamilton社, HTM-IVOS)を用いて精子機能検査を施行したところ, 精液処理により精子運動率, 精子運動速度のパラメータであるVAP:average path velocity, VSL:straight line velocity, VCL:curvilinear velocity, %HA:Burkmanの定義に基づくhyperactivation精子割合は全て有意な改善がみられた。また, IVF21周期において, 受精率70%未満の受精不良群5例と同70%以上の受精良好群16例間で, CASAの各パラメータを比較したところ, 特にVAP, VSL, VCLが受精良好群に高い傾向を認めたが, 統計学的に有意差を認めたものはVSLだけだった。VSL, すなわち, 精子の縦軸方向の速度がIVFの受精には最も重要な因子ではないかと思われた。

17. 不妊精巣組織中テロメラーゼ活性の検討

- 内島 豊 (赤心堂病院泌尿)
齊藤 博, 谷澤晶子
(埼玉医科大総合医療センター泌尿)

【目的】無精子症では精巣生検でSertoli cells onlyの場合, 従来体外受精の適応から除外されてきた。しかし, 精子形成は各精細管で分化度が異なり, 生検組

織のみの体外受精適応の決定は確実でないと思われる。そこで、精巣中テロメラーゼ活性が従来の検査法と比較して精子形成能をより反映するかどうか検討した。【対象】無精子症患者29例。【方法】生検精巣を鏡検にて組織学的検討を行うとともに、凍結保存した生検組織をTRAP法でテロメラーゼ活性を測定した。活性値はU/ μ g proteinで表現した。【結果】テロメラーゼ活性とJohnsen's scoreの間には高い相関関係を認め、精子形成が進むにつれてテロメラーゼは高い値を示した。したがって、テロメラーゼ活性測定は精子形成能評価に有効であり、Sertoli cells onlyでもテロメラーゼ活性が高い場合は精子回収の可能性について再検討する価値がある。

18. hCG, hMG 療法にて自然妊娠したKallmann症候群の一例

○西見大輔, 三浦一陽, 原 啓
永尾光一, 吉田 淳, 石井延久
(東邦大第1泌尿)

33歳男性。17歳時に他院にてKallmann症候群の診断をうけ、hCG, hMG療法を施行されていた。結婚後、拳児を希望し、当院リプロダクションセンターを紹介受診した。患者の精巣はやや萎縮し、血中ホルモン値はLH0.3IU/ml, FSH1.3IU/mlとhypogonadotropic hypogonadismを生じていた。血中テストステロン値は2.60ng/mlであった。精液検査は精液量2.2ml, 濃度 8.0×10^6 , 運動率63%で染色体検査は46, XYと正常核型を示した。前医でのhCG, hMG療法を続行し、さらに各週hCG3000単位, hMG450単位に増量し1年間の継続投与を行ったところ精液検査は精液量5.0ml, 濃度 14×10^6 , 運動率60%となり血中テストステロン値は正常レベルまで改善し、H11年7月に自然妊娠が成立した。妊娠経過は順調で患者に対してはhCG, hMG療法を続行中である。

19. PCOS症例の排卵誘発におけるFSH 製剤初期投与量の意義

○伊東宗毅, 石原 理, 斉藤正博
三木明德, 林 直樹, 田谷順子
堀籠邦子, 清水香子, 木下勝之
(埼玉医科大総合医療センター産婦)

【目的】PCOSの排卵誘発時、卵巣過剰刺激症候群や多胎妊娠の発生頻度が高くなることが知られている。これを避ける有効な方法の可能性につき検討した。【対象】1999年1月から12月の間に当科に通院していた不妊症カップルでPCOSを有する12症例16周

期。【方法】フェルチノームP(セローノジャパン, 1A75IU)またはヒュメゴン100(日本オルガノン, 1A100IU)を用いた投与量漸増法。【結果】4例が第1周期で妊娠、両周期を比較検討できたのは4例であった。卵巣過剰刺激症候群や多胎妊娠の発生はなかった。全12例でみると総投与日数, 総投与量, 卵胞数, E₂に有意差は認めなかった。両周期を施行した例に限ると初期投与量100IUの周期において、投与日数の短縮, 総投与量の減少が認められた。症例によりFSH製剤に対する閾値が異なることが示唆され、症例ごとに個別化した投与方法が必要であると考えられた。

20. 子宮内膜症治療前後におけるIVF 治療成績の比較検討

○鈴木圭子, 中島潤子, 羽生久美子
大庭三紀子, 金城 洋, 小嶋 清
(小嶋医院)
明楽重夫 (日本医科大産婦)

【目的】平成9年度における当院のIVF成績を子宮内膜症を有する症例と有しない症例で比較検討した結果、有意に内膜症合併のない症例で良好な成績を示したことはすでに報告している。今回、子宮内膜症を有した症例でのIVF不成功例に対し、6カ月間の子宮内膜症治療を行い、治療前後の血中ホルモン値(M₃), 受精率, 分割率, ET数等について検討した。【方法】内膜症を有したIVF不成功例に対して、症状, 超音波断層法, MRI, HSG, 腫瘍マーカーの状況によりGnRHアゴニスト, 腹腔鏡下手術を施行した。【結果】治療前後の月経3日目のP₄, LH, PRLの値は、有意に低下した。使用したhMG総投与量は治療前後で差はなかったが、採卵した卵子のグレードにおいて、グレードⅢの良好卵子数が治療後に有意に増加した。そのため受精率, 分割率も上がり、移植胚数も増え凍結できる余剰胚も増えた。

21. 子宮内膜症に対するLH・RHアナログ(4種類)治療後、腹腔鏡下手術後における各々のIVF・ET成績の比較検討

○小嶋 清, 大庭三紀子 (小嶋医院)
兼子 智, 石川博通
(東京歯科大市川総合病院)
明楽重夫 (日本医科大産婦)

【目的】子宮内膜症にGnRHアゴニスト(4種類)治療後、腹腔鏡手術後の各々のIVF-ET成績を治療前後で比較検討した。【方法】内膜症を有する不妊症例に対

して、酢酸リュープロレリン1.88-4症例、酢酸リュープロレリン3.75-5症例、酢酸ブセレリン-13症例、ナファゴニストは6カ月治療後3カ月内で、手術は3カ月内でIVF-ETを施行し、各々の採卵数、Veeckの分類、受精率、分割率、ET数を比較検討した。【結果】IVF-ET前後での各4種類のGnRHアゴニスト、腹腔鏡術後の採卵数、Veeckの分類、受精率、分割率、ET数で有意差を認めなかった。治療前後、術前後の総合的な比較検討では治療後に著明に有意差を認めた。【考察】妊娠例は30症例(全)中16症例得た。内膜症は治療後にIVFを施行した方が良いと考える。

22. 選択的2個形態良好胚移植による単胎妊娠率向上の工夫

○田中寧子、柴原浩章、出居貞義
田村奈津子、小原ひろみ、藤原寛行
小川修一、佐藤郁夫 (自治医大産婦)
荒木重雄 (同看護短大)

【目的】上限を3個とする胚移植を行う限り、品胎発生を避けることはできない。そこで多胎発生をできる限り予防し、かつ妊娠率を低下させないことを目的とする選択的2個胚移植を導入するための適応基準設定を試みた。【方法】1999年8月までのIVF-ET128周期の成績を分析し、多胎発生に関与す諸因子を分析した。翌月以降のIVF-ET23周期のうち適応8周期に選択的2個胚移植を実施した。【結果】年齢層の上昇とともに妊娠率・多胎率は低下した。初回治療に多胎が好発した。続発性不妊症の妊娠率は良好であった。形態良好胚の移植数は2個以上で妊娠率がプラトーに達した。選択的2個形態良好胚移植の基準(40歳未満・経妊・初回治療)を導入前の妊娠率・多胎率は各々26.6%・23.5%であったが、導入後は各々26.1%・0%であった。【結論】本法により妊娠率を低下することなく多胎発生を抑制できる可能性がある。

23. 重症子宮内膜症例に対するGnRHa-エタノール固定-腹腔鏡下手術併用療法の効果

○右島富士男、川内博人、本橋恵美子
中村水緒、西島正博 (北里大産婦)

内膜症性嚢胞を有する重症子宮内膜症例に対しGnRHa、エタノール固定、腹腔鏡下手術の三者併用療法の有用性を検討した。対象はGnRHa開始1-2カ月後、経腔超音波下に内容吸引エタノール固定を施行、6カ月間GnRHaを継続し腹腔鏡を実施した40例。平均年齢30.1歳、片側性37例、両側性3例、平均

径46.4mm、平均吸引内容47.6ml、注入エタノール量は平均14.9mlであった。GnRHa終了後の腹腔鏡下手術時R-AFSスコアは平均13.1点、平均径10.7mm、エタノール漏出に起因する癒着はなかった。Lost to collow 2例を除いた38例中8例(21.1%)に再発、拳児希望例31例中16例(51.6%)に妊娠が成立した。内膜症嚢胞に対するGnRHa、エタノール固定、腹腔鏡下手術の併用療法は内膜症性嚢胞の改善、妊孕性の回復・温存に優れた治療法である。

24. 経腔的薬物局注療法により治癒した間質部妊娠の4例

○本橋恵美子、川内博人、右島富士男
中村水緒、望月純子、西島正博
(北里大産婦)

今回我々は経腔的薬物局所注入療法により、保存的治療に成功した間質部妊娠の4例を経験したので報告する。2例は胎児心拍動を認めず、間質部の胎嚢内にメソトレキセート(以下MTX)を経腔超音波断層法下に局注療法を行った。胎児心拍動を有した例では胎児にKCI、胎嚢にエタノール、絨毛にMTXを局注した。これら3例では、血中hCG値の陰性化に46-61日を要した。症例4は他院で卵管性不妊のためIVF-ETを施行していた。9回目のIVF-ETで妊娠成立したが、子宮内外同時妊娠のため妊娠10週で当科へ紹介された。子宮内妊娠継続を考慮し、経腔的に、間質部妊娠の絨毛組織に50%グルコース、胎児にKCI、胎嚢内にエタノール注入を行った。その後経過は順調で36週0日に選択的帝切で生児を得た。間質部妊娠に対する各種薬物局注療法の有用性が確認された。

25. 体外受精児の発育に関する検討

○小野寺潤子、神野正雄、星合敏久
菅原新博、酒井 謙、尾崎恒男
中村幸雄 (杏林大産婦)

当院で1991年10月-1998年10月までにIVF/ICSIを施行し、妊娠、出産した母親272人の児の発育、発達に関する調査を行った。発育の評価は厚生省の乳幼児身体発育曲線を用い、発達の評価は津守式乳幼児精神発達診断法による質問を郵送によるアンケート調査で行った。130人より173児の回答が得られ、アンケート回収率は62%であった。173児の内訳は、男児78児(45%)、女児95児(55%)で、単胎児91児(53%)、多胎児82児(47%) (双胎72児、品胎6児、要胎4児)であった。IVF/ICSI児の発育は単胎児では

男女ともに出生時より50~75パーセントイル曲線にほぼ一致した発育を示した。多胎児では出生時は男女とも3パーセントイル未満であったが、6~9カ月以降は50パーセントイルにほぼ一致して発育した。IVF/ICSI児の発育は生後4~6カ月、18~30カ月、48~60カ月において、対照群と差はないと考えられた。

26. 不妊症患者の腹腔鏡下手術におけるラリゲルマスクの有用性

○辻内陽子, 石山 巧, 森田 豊
木戸道子, 小泉佳男, 竹内 亨
西井 修, 小島俊行, 加藤賢朗
堤 治

(東京大学医学部附属病院分院産婦)

長田 理, 上地 富, 田上 恵

(同 麻酔)

不妊症の検査や小手術において、腹腔鏡の重要性は今後ますます高くなると考えられ、より侵襲の少ない方法で行うことは、患者のQOLを高めることになる。今回我々は、当院で行っている低侵襲化の試みとして、第一にラリゲルマスクを用いた麻酔について検討し、第二に細径化の試みとして、最近導入した16ゲージ穿刺針による腹腔内操作器械を紹介する。ラリゲルマスクは気管内挿管より侵襲が少ないと思われるが、気腹、骨盤の高い体位を必要とする婦人科腹腔鏡手術においては、誤嚥性肺炎などの危険性があるといわれる。当科においては不妊症患者15例を含む62例において現在のところ合併症は見られていない。16ゲージ穿刺針を用いた腹腔鏡操作器械は、トロッカー挿入を必要としないため手技が容易であり、不妊症の検査や軽い癒着の剥離などに有効であると考えられる。当科では今後もより侵襲の少ない方法での腹腔鏡手術を検討して行く予定である。

27. 当院における日帰り手術

○吉田 淳, 神山 洋
(本場公園クリニック)
西井 修, 堤 治
(東京大学医学部附属病院分院産婦)
佐々木健, 藤岡 丞
(上尾中央総合病院麻酔)

最近の不妊治療の進歩や麻酔法の変化に伴って、日帰りの手術を行う機会が増加してきた。今回我々は男性・女性不妊症の患者に実施した日帰り手術(検

査)についてまとめたので報告する。1999年1月から2000年2月までに、45例の日帰り手術(検査)を行った。その内訳は、腹腔鏡下手術6例、精索静脈瘤の手術6例、精巣内精子回収法33例(閉塞性無精子症の精巣内精子回収法(single biopsy)13例、非閉塞性無精子症の精巣内精子回収法(multiple biopsy)11例、非閉塞性無精子症の顕微鏡下精巣内精子回収法9例)であった。日帰りの腹腔鏡下手術を実施する時は、癒着が強く手術時間が長くなると予想される症例、両側卵巣腫瘍の症例、太っている症例、合併症のある症例は日帰り手術の適応から除外した。また、帰宅後でもすぐに患者から医師に連絡ができる体制をとった。今後は粘膜下子宮筋腫に対する子宮鏡下手術も実施する予定である。

28. 不妊患者のメンタルヘルスと社会的要因

○酒井のぞみ, 堀口 文, 山本百合恵
浜谷敏生, 吉村泰典 (慶應大産婦)

不妊治療には社会的要因を考慮した心身医学的配慮が必要と思われるが、患者へのより良い接近を考え、患者が家族や医師などへの対応に対しどのように感じているかについて、無記名によるアンケート調査を行った。対象は当科ホルモン外来を受診し、排卵誘発中の不妊患者42名で、年齢は30歳代が74%、家族は夫のみが71%を占めていた。治療期間は2~10年が74%、全体の76.2%は避妊歴はなかった。子供を産む動機は、新しい女性の意識として自己実現や人生の励みとするものが半数以上を占め、子供ができないのではないかという不安や通院時間の束縛にストレスを感じていた。排卵誘発中はそれに伴う身体症状やメンタルヘルス上の問題を示していたが、妊娠不成立時の心理的苦痛に対し、夫や医師の言葉に勇気付けられていた。また、患者はより多くの情報提供を望んでおり、共感による不安の解消や積極的な心身の苦痛への対応も必要と思われた。

29. 助産婦学生の受胎調節に関する意識調査

—4年前と今回(平成11年)との比較—

○木村好秀 (三楽病院産婦)
菅 陸雄 (同 リプロ情報センター)

今回、助産婦学生の受胎調節に関する意識調査を行ない、前回(1995年)と比較した。昨年5月、“受胎調節指導の実際”の合同講義後、都内・近県の助産婦学生291名に前回と同一のアンケート調査を行なった。平均年齢は24.0歳で、未婚92%、看護経験48%であった。避妊法の条件は安全性92.8%・確実性

86.3%で、産む・産まないの決定はお互いが87.3%で前回より高くなっていた。避妊の責任は両者が98.3%を占めた。未婚女性の避妊法はコンドーム92%・ピル52%、既婚女性にはコンドーム74%・ピル57%でいずれもピルが増加していた。授乳中はコンドーム96%・殺精子23%、産み終え女性には1UD66%・ピル46%であった。低用量ピルの自己使

用は29.6%・使用しない21.6%で、低容量ピルのリスクは、副作用が心配38.1%・性感染症24.1%・体重増加17.9%などで、認可後の勧奨は、積極的3.1%・状況に応じて87.3%で、勧めないは1.7%であり、助産婦学生の受胎調節指導の意識に変化がみられた。

関連学会のお知らせ

The Pacific Rim Society for Fertility and Sterility

Assisted Reproductive Technologies in 2000

May 19-22, 2000, Cheju Island, Korea

Post-Conference Workshop

Laparoscopic Tubal Anastomosis

In Vitro Maturation and The Vitrification of Oocytes

May 23, 2000, Pochon CHA University Hospital, Pundang, Korea

Invitation

Dear Colleagues,

On behalf of the organizing committee, we welcome you to the Second Meeting of The Pacific Rim Society for Fertility and Sterility (PRSFS), presented by CHA General Hospital, Korea, and Reproductive Partners Medical Group in California, USA. The first meeting for the PRSFS held in Hawaii, USA in March 1996 proved to be an outstanding success and it is hoped that we can build on the experience of that event to produce an even better result this time. This Symposium, titled "Assisted Reproductive Technologies in 2000", will bring participants up to date with the latest developments in infertility treatment. We hope that attendance at the Symposium also allows you the opportunity to appreciate the culture and tourist sights of a truly fascinating land of the "Morning Calm".

With best regards,

Kwang-Yul Cha & Bill Yee

The Pacific Rim Society for Fertility and Sterility

Organizing Committee

Kwang-Yul Cha, M.D. (Korea)

Jung-Jae Ko, Ph.D. (Korea)

Hidekazu Saito, M.D. (Japan)

Shuetu Suzuki, M.D. (Japan)

Chii-Ruey Tzeng, M.D., MPH (Taiwan)

Bill Yee, M.D. (USA)

Conference Secretariat

Kyung-Ah Lee, Ph.D.

Infertility Medical Center, CHA General Hospital

606-5, Yeoksam 1-dong, Gangnamgu, Seoul 135-081, Korea

Tel: 822-557-3937 Fax: 822-501-8704

e-mail: kal1227@hitel.net or leeka@nuri.net

Faculty

The Pacific Rim Society for Fertility and Sterility

Toshihiro Aono, M.D.

University of Tokushima, Tokushima, Japan

Ariff Bongso, Ph.D.

National University Hospital, Kent Ridge, Singapore

Kwang-Yul Cha, M.D.

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Masahiko Hiroi, M.D.

Yamagata University, Yamagata, Japan

Moon Kim, M.D.

University of California, Irvine, California, USA

S Samuel Kim, M.D.

University of Washington, Seattle, Washington, USA

Sook Hwan Lee, M.D., Ph.D.

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Tsunehisu Makino, M.D.

Tokai University, Kanagawa, Japan

Shin Yong Moon, M.D.

Seoul National University, Seoul, Korea

Hitoshi Okamura, M.D.

Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

Richard Scott, M.D.

RMANJ, New Jersey, USA

Shuetu Suzuki, M.D.

Keio University, Tokyo, Japan

Chii-Ruey Tzeng, M.D., MPH.

Taipei Medical College and Hospital, Taipei, Taiwan

Andre Van Steriteghem, M.D.

Center for Reproductive Medicine, Vrije Universiteit, Brussels, Belgium

Bill Yee, M.D.

University of California, Irvine, California, USA

Tae-Ki Yoon, M.D.

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Howard A Zacur, M.D.

Johns Hopkins University Medical Center, Maryland, USA

Hands-on-Workshop

Tae-Ki Yoon, M.D., Se-Yul Han, M.D., & Hyung-Min Chung, Ph.D.

Infertility Medical Center, CHA General Hospital, Pochon CHA University, Seoul, Korea

Program

Friday, May 19, 2000

6:00 - 7:00 pm Registration & Welcome Reception

Saturday, May 20, 2000

7:00 - 7:15 am Opening Address

Clinical ART 1

7:15 - 7:45 am Cryopreservation of the Female Gametes
Kwang-Yul Cha, M.D.

7:45 - 8:15 am Clinical Use of the Cryopreserved Human Ovary
Samuel Kim, M.D.

8:15 - 8:55 am Stimulating the Low Responders
Richard Scott, M.D.

8:55 - 9:30 am The Effect of Macrophage Colony-Stimulating Factor on Ovarian Poor Responder to Gonadotropins
Hitoshi Okamura, M.D.

Coffee Break

Clinical Endocrinology 1

10:00 - 10:45 am Polycystic Ovary Syndrome: Old and New
Moon Kim, M.D.

10:45 - 11:30 am Testing and Predicting Ovarian Reserve
Richard Scott, M.D.

11:30 - 12:15 pm Prolactin Disorders
Howard A Zacur, M.D., Ph.D.

12:15 pm Adjourn

Program

Sunday, May 21, 2000

Research in Reproductive Biology 1

7:30 - 8:10 am Follicular Development and Apoptosis
Masahiko Hiroi, M.D.

8:10 - 8:50 am Nitric Oxide as a Regulator in Preimplantation Embryonic Development
Chii-Ruey Tzeng, M.D., MPH.

8:50 - 9:30 am Advances in Oral Contraceptives
Howard A Zacur, M.D., Ph.D.

Coffee Break

Challenges of ART 1

10:00 - 10:40 am Preimplantation Genetic Diagnosis
Andre Van Steriteghem, M.D.

10:40 - 11:20 am Reproductive Wastage and Assisted Reproductive Technologies
Tsunehisu Makino, M.D.

11:20 - 12:00 pm Blastocyst Culture and Transfer
Ariff Bongso, Ph.D.

Lunch

Clinical ART 1

1:30 - 2:10 pm The Impact of Hydrosalpinx on IVF Success
Bill Yee, M.D.

2:10 - 2:40 pm Laparoscopic Tubal Anastomosis vs. In Vitro Fertilization
Tae-Ki Yoon, M.D.

2:40 - 3:20 pm Intracytoplasmic Sperm Injection, 8 Years from the First Birth
Andre Van Steriteghem, M.D.

3:20 - 4:00 pm Human Embryonic Stem Cells: Their Future
Ariff Bongso, Ph.D.

4:00 pm Adjourn

Program

Monday, May 22, 2000

Research in Reproductive Biology 2

7:00 - 7:40 am Ovum Research for Future ART
Shuetu Suzuki, M.D.

7:40 - 8:20 am Mitochondrial Gene in Reproductive System
Sook-Hwan Lee, M.D., Ph.D.

- 8:20 - 9:00 am Chromosomal Constitution of Embryos
Derived from Triprenuclear Zygotes
Shin Yong Moon, M.D.

Coffee Break

Challenges of ART 2

- 9:30 - 10:15 am Immunological Testing for ART
Bill Yee, M.D.
- 10:15 - 11:00 am High Implantation Rate by IVF-ET Treatment
in Infertile Women with Antisperm Antibody
Toshihiro Aono, M.D.
- 11:00 - 11:45 am Cytoplasmic and Nuclear Transfer
- New Life for Old Eggs?
Richard Scott, M.D.
- 11:45 - 12:00 pm Closing Remarks
- 12:00 pm Adjourn

General Information

Venue of Congress

The Shilla Cheju
3039-3 Saekdal-Dong, Seogwipo-Shi, Cheju, Korea
Tel: 82-64-38-4466 Fax: 82-64-35-5415

Commercial Exhibition

There will be commercial exhibition during the symposium presented by sponsors.

Official Language

The official language of the symposium is English.

Hotel Accommodation

The Shilla Cheju is an official hotel for the conference. Participants may stay in other hotels at own choices. Please contact directly for your own reservation. May is the busiest season in Cheju for touring. Please hurry to book your hotel accommodation before the end of April for guarantee.

- ① Haytt Regency Cheju: Tel: 82-64-733-1234 Fax: 82-64-732-2039
Room Rates: ₩225,000 (Sea View) ₩195,000 (Mountain View)
- ② Hotel Green Villa Cheju: Tel: 82-64-738-3800 Fax: 82-64-738-9990
Room Rates: ₩184,000 (Sat. & Sunday) ₩129,150 (Friday)
- ③ Hana Hotel: Tel: 82-64-738-7001~12 Fax: 82-64-738-7000
Room Rates: ₩110,000

Web Sites for Your Review

- www.chamc.co.kr
- www.knto.or.kr
- www.chejuinfo.net
- www.provin.cheju.kr
- www.chejushilla.com
- www.hyatt.com/south-korea
- www.green.kol.net

Important to Note

- April 7, 2000 / deadline for guaranteed hotel reservation
- April 20, 2000 / deadline for registration
- May 1, 2000 / deadline for written cancellation for registration

Cheju Island

Climate

Though designated as having a 'sub-tropical, oceanic' climate, the island enjoys four distinct seasons. The average yearly temperature ranges on the temperate side at 59 degrees Fahrenheit or 15 degrees centigrade. The average temperature in spring (March through May) is 55.4oF (13° C).

Seasonal Characteristics and Suggested Clothing

Forsythia and cherry blossoms announce through the end of March into early April, cherry trees from the beginning of April, Azaleas dye in reddish hues, the slopes of Mt. Halla. However, spring's climax is the all prevailing fragrance of the rape seed flowers that cover the open fields in deep yellow. Suitable cloths : light jackets or sweaters.

Transportation in Cheju

There is Airport Bus (No. 600, ₩3,000 per person) every 15 minutes between airport and the venue. It costs around ₩30,000 for TAXI.

Tours

Chungmun Air Travel Service, the travel agency at The Shilla Cheju will offer the optional tours for participants and their accompanying persons who wish to see more of Cheju Island during their stay.
Tel: 82-64-738-4500 or 82-64-38-4466 (ext. 530) Fax: 82-64-738-4580

Program

for Hands-on-Workshop

Tuesday, May 23, 2000

- 8:00 - 8:30 am Registration
- 8:30 - 8:40 am Opening Address
- 8:40 - 9:00 am Lecture: Laparoscopic Tubal Anastomosis
Tae-Ki Yoon, M.D.
- 9:00 - 9:20 am Lecture: Immature Oocyte Maturation
Se-Yul Han, M.D.
- 9:20 - 9:30 am Break
- 9:30 - 11:30 am Operation : Laparoscopic Tubal Anastomosis
Tae-Ki Yoon, M.D.
- 11:30 - 11:40 am Break
- 11:40 - 12:00 pm Operation: Immature Oocyte Aspiration
Se-Yul Han, M.D.
- Noon - 1:30 pm Lunch
- 1:30 - 2:00pm Lecture: Cryopreservation of Oocytes
Hyung Min Chung, Ph.D.
- 2:00 - 4:00pm Demonstration
Ditrification of Oocytes
In Vitro Maturation of Immature Oocytes
- 4:00 - 4:30pm Questions & Discussion
- 4:30 pm Adjourn

Information

on Workshop

Venue of The Hands-on-Workshop

Pochon CHA University Hospital, Pundang
351, Yatap-Dong, Pundang-gu, Sungnam, Kyonggi-Do, 463-070, Korea
Tel: 82-342-780-5000

Hotel Accommodation

Participants may stay in hotels near Infertility Medical Center, CHA General Hospital, in Seoul, Korea. There will be shuttle transportation from the Infertility Medical Center to the Venue on May 23.
Please contact Conference Secretariat (Kyung-Ah Lee, Tel: 822-557-3937, Fax: 822-501-8704, e-mail: kal1227@hitel.net) for your staying in Seoul to participate the workshop.

Official Language

The official language of the workshop is English.

Supporting Academic Societies

The Korean Society of Obstetrics and Gynecology

Sponsors

Aventis Pharma
Biospace Co., Ltd.
Bukwang Pharm. Co., Ltd.
Deail Science Co., Ltd.
Korea Life Science(KLS) Inc.
LG Chem. Ltd.
Medical Supply Co., Ltd.
Organon Korea Ltd.
Serono, Korea
Serpentem Aeneum Co.
Seyoung General Trading Co.
Shinhan Scientific Co.

Organizing Committee

Kwang-Yul Cha, MD *Korea*
Jung-Jae Ko, PhD *Korea*
Hidekazu Saito, MD *Japan*
Shuetu Suzuki, MD *Japan*
Chii-Rhez Tzeng, MD, MPH *Taiwan*
Bill Yee, MD *USA*

Conference Secretariat

Kyung-Ah Lee, PhD *Korea*
Infertility Medical Center, CHA General Hospital
606-5 Yeoksam-1-dong, Gangnamgu, Seoul 135-081, Korea
Tel: 822-557-3937 Fax: 822-501-8704
e-mail: kal1227@hitel.net or leeka@nuri.net

第41回 日本哺乳動物卵子学会開催のご案内(第二報)

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

会 期：2000年6月1日(木)・2日(金)・3日(土)・4日(日)

会 場：東京農業大学生物産業学部(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：東京農業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、教育講演、シンポジウム、一般講演を行います。

教育講演：6月3日(土曜日) 13:50~14:50

座長：河野 友宏(東京農業大学農学部)

「マウス始原生殖細胞の体外培養系における増殖制御と卵母細胞への分化」

中辻 憲夫(京都大学再生医科学研)

シンポジウムⅠ：6月2日(金曜日) 13:00~15:25

「体外受精の応用」

座長：丹羽 皓二(岡山大学)・今井 裕(京都大学)

基調講演「体外受精の応用：21世紀の展望」

豊田 裕(帯広畜産大学)

1. 豚における体外受精

永井 卓(農水省東北農業試験場)

2. ウマにおける体外受精研究の現状

保地 真一(信州大学繊維学部)

3. 水中における体外受精

高橋 芳幸(北海道大学獣医学部)

4. ミンククジラにおける体外受精

福井 豊(帯広畜産大学)

5. サル類における体外受精

山海 直(感染研霊長類センター)

シンポジウムⅡ：6月3日(土曜日) 15:00~17:20

「妊娠率向上のためのART」

座長：鈴木 秋悦(WHO)

1. 排卵(自然周期、過排卵処理)からみたARTの向上

安部 裕司(東邦大学産婦人科)

2. 胞胚期移植の効果

京野 廣一(レディースクリニック京野)

3. 凍結胚の移植

東口 篤司(斗南病院産婦人科)

4. 着床率向上のためのホルモン

正岡 薫(獨協医科大学産婦人科)

5. 基礎からの提言

梅津 元昭(東北大学農学部)

佐藤 嘉兵(日本大学生物資源科学)

葛西孫三郎(高知大学農学部)

一般講演：6月2日(金曜日)、6月3日(土曜日)

21群59題の口演があります。

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、ホテル友愛荘会議室

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、セントラルホテル宴会場

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帰り、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。

第18回 日本受精着床学会学術講演会開催の御案内

第18回日本受精着床学会学術講演会を下記の通り開催しますので、奮って御参加下さいませよう御願ひ申し上げます。

第18回 日本受精着床学会
会長 毛利秀雄
(日本受精着床学会理事長・基礎生物学研究所所長)

記

会 期：平成12年7月6日(木)～7日(金)

会 場：岡崎市民会館(愛知県岡崎市)

〒444-0072 岡崎市供町字出崎15-1 (TEL)0564(21)9121

参加申込締切：平成12年4月10日(月)(消印有効)

特別講演：J. M. Cummins (Murdoch University, Australia)

“Reproductive Technology : Has technique overtaken understanding?”

J. L. Tilly (Massachusetts General Hospital, U.S.A.)

“Genetics of programmed cell death in mammalian oocytes”

T. Wakayama (University of Hawaii, U.S.A.)

“Cloning of mice from adult somatic cell nucleus”

教育講演：岡部 勝(大阪大学遺伝情報実験施設)

「受精機構の分子生物学と遺伝子操作動物」

諸橋 憲一郎(基礎生物学研究所)

「生殖腺の性分化を支える転写調節」

シンポジウム：「ARTにおける最近の話題」

司会：名古屋市立大学医学部産科婦人科 鈴森 薫(オーガナイザー)

三重大学医学部産科婦人科 豊田 長康

1. Spermatid *in vitro* maturation

鳥取大学医学部泌尿器科

ソフィキチス・ニコラオス

2. 精子および精巣組織の保存

福島県立医科大学産科婦人科

柳田 薫

3. 卵子の凍結保存

旭川医科大学生物学教室

上口勇一郎

4. 卵子細胞質移植

日本大学生物資源科学部応用生物学科 佐藤 嘉兵

5. 極体診断法の検討

慶應義塾大学医学部産科婦人科

末岡 浩

6. 初期胚の形態と染色体異常の検討

名古屋市立大学医学部産科婦人科

佐藤 剛

特別発言：直接的腹腔内精子注入法—ART適応の再評価

三重大学医学部産科婦人科 箕浦 博之

ワークショップ：「着床をめぐる諸問題」

司会：名古屋大学医学部産科婦人科 水谷 榮彦(オーガナイザー)
東海大学医学部産科婦人科 牧野 恒久

1. 着床前後期におけるサイトカイン遺伝子群の発現調節
東京大学大学院農学部生命科学研究科 今川 和彦
2. 胎盤の発生分化とNotch2シグナリングの分子機構
基礎生物学研究所 濱田 義雄
3. 受精着床における新しいアプローチ—自己抗体と凝固—
東海大学医学部産科婦人科 松林 秀彦
4. 着床期子宮内膜とプロテアーゼ
名古屋大学医学部産科婦人科 安藤 寿夫

連絡先：基礎生物学研究所内 第18回日本受精着床学会事務局

〒444-8585 岡崎市明大寺町字西郷中38

TEL：0564-55-7668

FAX：0564-53-3299

E-mail：jsfi-18@nibb.ac.jp

第23回産婦人科マイクロサージャリー学会 学術講演会開催のご案内

第23回産婦人科マイクロサージャリー学会を下記の通り開催致しますので、奮ってご参加下さいますよう、お願い申し上げます。

会 期：平成12年 8月3日(木)
会 場：日本都市センター会館

プログラム

特別講演Ⅰ：『性転換手術の倫理的判断はどのようになされたか』

演者 山内 俊雄(埼玉医科大学精神医学教室教授)
座長 野口 昌良(愛知医科大学産婦人科学教室教授)

特別講演Ⅱ：『性同一性障害とは—特に手術療法を中心に—』

演者 原科 孝雄(埼玉医科大学総合医療センター形成外科教授)
座長 木下 勝之(埼玉医科大学総合医療センター)

教育講演：『テレ・マイクロサージャリー・システムの開発』

演者 藤原 一夫(岡山大学医学部整形外科医員)
座長 永井 宏(永井産婦人科病院長)

シンポジウム：『子宮・卵管・卵巣に対するReproductive Surgeryの現状と将来への展望』

座長 永田 行博(鹿児島大学医学部産科婦人科学教室教授)
座長 西島 正博(北里大学医学部産科婦人科学教授)

シンポジスト

| | |
|-----------------|-------------------|
| 子宮奇形と子宮鏡下手術(仮題) | 林 保良(川崎市立病院) |
| 子宮腫瘍と子宮鏡下手術(仮題) | 斎藤寿一郎(聖マリアンナ医科大学) |
| 子宮内膜症(仮題) | 岩部 富夫(鳥取大学) |
| 子宮筋腫(仮題) | 奥田喜代司(大阪医科大学) |
| 卵管(仮題) | 澤田 富夫(藤田保健衛生大) |
| 卵管(仮題) | 浅井 光興(愛知医科大学) |
| 卵巣(仮題) | 中熊 正仁(東邦大学) |

学術集会事務局：

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室
〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1
TEL:03-3762-4151(内線3580) FAX:03-3765-7671
担当：森田峰人

第40回日本産科婦人科内視鏡学会 学術講演会開催のご案内

第40回日本産科婦人科内視鏡学会を下記の通り開催致しますので、奮ってご参加下さいませよう、お願い申し上げます。

会 期：平成12年8月4日(金)・5日(土)
会 場：日本都市センター会館

プログラム

招請講演Ⅰ：『コンピュータ外科の内視鏡下手術への応用』
演者 土肥 健純(東京大学大学院新領域創成科学研究科教授)

招請講演Ⅱ：『内視鏡下手術の現状からRobotic Surgeryまで』
演者 大上 正裕(慶應義塾大学医学部外科助手)

特別講演：『腹腔鏡下子宮筋腫核出術の適応と術式の選択 Minimally Access Surgeryを目指して』
演者 森田 峰人(東邦大学医学部第1産婦人科講師)

教育講演Ⅰ：『婦人科内視鏡下手術の麻酔で何に留意すべきか』
演者 釘宮 豊城(順天堂大学麻酔科教授)

教育講演Ⅱ：『内視鏡下手術をめぐる医療事故と医療訴訟』
演者 加藤 済仁(東邦大学顧問弁護士)

シンポジウムⅠ：『内視鏡下手術の普及に伴う新人教育の問題点—医育機関を中心に』
座長 荒木 勤(日本医科大学産婦人科学教室教授)
座長 堤 治(東京大学医学部産科婦人科学教室教授)

シンポジスト

明菜 重夫(日本医科大学) 伊熊健一郎(宝塚市立病院) 井坂 恵一(東京医科大学)
寒河江 悟(札幌医科大学) 塩田 充(近畿大学) 西井 修(東京大学分院)
村上 節(東北大学)

シンポジウムⅡ：『子宮外妊娠・内視鏡下手術の適応と術式の選択—その選択基準を中心に』
座長 星合 昊(近畿大学医学部産科婦人科学教室教授)
座長 石丸 忠之(長崎大学医学部産科婦人科学教室教授)

シンポジスト

卵管切除術の適応と管理 関 守利(群馬大学)
卵管線状切開の適応と管理 武内 裕之(順天堂大学)
卵管間質部妊娠に対する腹腔鏡下手術の適応と管理 大高 究(東邦大学佐倉病院)
Persistent ectopic pregnancyの取り扱い 浜崎 哲史(長崎大学)
子宮外妊娠の薬物療法 川内 博人(北里大学)

ランチオンセミナー：4題 (各日昼食時間に予定しております。)

学術集会事務局：東邦大学医学部第1産科婦人科学教室
〒143-8541 東京都大田区大森西6-11-1
TEL:03-3762-4151(内線3580) FAX:03-3765-7671
担当：森田峰人

リサーチフェロー募集のお知らせ

Advanced Research in Human Reproduction and Infertility Fellowship Program

詳細は下記addressにお問い合わせください。

Mrs Robin Verdi
Department of Urology/A.19.I
The Cleveland Clinic Foundation
9500 Euclid Avenue, Cleveland, Ohio 44195 USA
TEL 216/444-9485, FAX 216/445-6049
E-mail Verdir@ccf.org

投稿規定

(2000年4月1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、巻末に縦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) 〒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

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、必ずクリアなプリントを添付してください。

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

連絡先：代表者名：

連絡先住所(郵便番号)：

電話番号：

ファクシミリ番号：

編集後記

日本不妊学会誌第45巻2号は、比較的多くの論文数をもって出版できました。昨今少子化は重大な社会問題であるため医学全般の中で生殖学の占める位置は益々大きくなってきました。一方生殖医療は、その急激な発展に伴い倫理面のことをはじめとして多くの問題を抱え込んでしまいました。このようなことを踏まえ我々は生殖医学または生殖医療をよりよい方向へと導いていく責任がありますが、会員の方々にこれらに関連する様々な研究成果や問題を論ずる場としてもっばら本誌を考えていただくことにより投稿論文の増加および内容の充実につなげたいと思います。また現在進行中の英文誌化が本誌の発展にとってよい方向で作用するように編集委員のひとりとして努力したいと思います。

(編集委員 石川博通)

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2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 5-2 K-WING 3F
(株)MAコンベンションコンサルティング内
TEL (03) 3288-7266
FAX (03) 5275-1192
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
E-mail pan@panmedia.co.jp

2000年3月25日印刷
2000年4月1日発行