

Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌



Vol.45 No.3 July 2000
第45卷 第3号 平成12年7月1日

第45回日本不妊学会総会および学術講演会 (第4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ビン、アクチビンの意義

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 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7月

〒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

第45回日本不妊学会

会長 守 殿 貞 夫

日本不妊学会雑誌

第45巻 第3号

平成12年7月1日

—目 次—

初期卵胞発育を考える —卵細胞からのシグナル?—

..... 岡村 均 1

閉塞性無精子症の診断と治療: ART時代の再吻合術の意義

..... 松田公志 7

体細胞クローンと核の初期化

..... 黒坂 哲・今井 裕 13

原 著

多嚢胞性卵巣症候群患者における血清レプチンと卵胞液レプチンの比較検討

..... 結城広光・村上 節・渡辺 正
..... 横溝 玲・岡村州博・矢嶋 聰 19

子宮内膜症に対する低用量ダナゾール長期治療の臨床効果と骨密度への影響

..... 安達知子・塩之入亜矢・斉藤理恵・太田博明 25

各種hMG製剤におけるゴナドトロピン組成とその臨床的意義

..... 合阪幸三・大岡史子・渡邊剛也・定月みゆき
..... 梁 善光・貝原 学・森 宏之 33

非配偶者間人工授精により挙児に至った男性不妊患者の意識調査

..... 久慈直昭・堀井雅子・雨宮 香・高垣栄美
..... 田中宏明・松田紀子・福地智恵
..... 谷垣礼子・土屋慎一・浜谷敏生
..... 小澤伸晃・末岡 浩・吉村泰典 41

不妊治療後に発症した子宮外妊娠に関連する因子の検討

..... 斉藤正博・石原 理・五十嵐健治・林 直樹
..... 田谷順子・堀籠邦子・竹田 省・木下勝之 49

人工精液瘤より採取した凍結精子を用いた卵細胞質内精子注入法 (英文)

..... 蔵本武志・Arief Boediono・杉岡美智代
..... 梅林ツナ・福田貴美子・元石睦郎
..... 小松 潔・瀧原博史・斎藤英和 55

精巣上体微小穿刺法; 7年間の経験 (英文)

..... 日比初紀・深津英捷・浅田義正・山本雅憲 61

PCOS 症例に対するゴナドトロピン製剤初期投与量についての検討	伊東宗毅・石原 理・斉藤正博 林 直樹・木下勝之	67
ラット精巣網液および精巣上体液中の 2 種のガラクトシルトランスフェラーゼ活性(英文)	飯田美登里・浦島 匡・松澤時弘	73
子宮腺筋症と子宮筋腫に対する GnRH agonist (GnRH-a)の縮小効果(英文)	福原正生・稲津哲子・丸山章子 渡辺良嗣・佐野正敏・中村元一	81
胚盤胞移植：妊娠率向上のための Key Point	京野廣一・福永憲隆・千葉せつよ 佐藤智子・拝郷浩佑・松尾優子	87
Controlled Ovarian Hyperstimulation における GnRH agonist 徐放製剤の有用性について	斉藤正博・石原 理・林 直樹・田谷順子 堀籠邦子・竹田 省・木下勝之	95
症例報告		
Non-mosaic XYY 患者の精子を用いた ICSI による正常児分娩例(英文)	荒木康久・大野道子・本山光博・荒木重雄	101
低用量ピル服用中に末梢血管拡張と浮腫で投与中止に追い込まれた症例	吉田耕治・倉橋敦也・石 明寛・柏村正道	107
地方部会講演抄録		113

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 45, No. 3, 2000)

Japan Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Insight into the Early Folliculogenesis — Signaling from Germ Cells? —	
.....	<i>H.Okamura</i> 1
Diagnosis and Treatment of Obstructive Azoospermia : Reanastomosis in the Era of Assisted Reproductive Technology	
.....	<i>T. Matsuda</i> 7
Cloned Animal from Somatic Cells and Nuclear Reprogramming in Nuclear Transferred Embryos	
.....	<i>S. Kurosaka & H. Imai</i> 13
Originals	
A Comparative Study between Serum Leptin and Follicular Fluid Leptin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome	
.....	<i>H. Yuki, T. Murakami, T. Watanabe</i> <i>R. Yokomizo, K. Okamura & A. Yajima</i> 19
Clinical Effect and Change in Bone Mineral Density by Long-term, Low-dose Danazol in Women with Endometriosis	
.....	<i>T. Adachi, A. Shionoiri, R. Saito & H. Ohta</i> 25
Composition of Various Types of Commercial hMG (FSH) Preparations and Clinical Significance	
.....	<i>K. Aisaka, F. Ooka, T. Watanabe, M. Sadatsuki,</i> <i>S. G. Liang, M. Kaibara & H. Mori</i> 33
Emotional Reaction of Male Partners to Donor-insemination Pregnancy	
.....	<i>N. Kuji, M. Horii, K. Amemiya, E. Takagaki</i> <i>H. Tanaka, N. Matsuda, T. Fukuchi</i> <i>R. Tanigaki, S. Tsuchiya, T. Hamatani</i> <i>N. Ozawa, K. Sueoka & Y. Yoshimura</i> 41
The Analysis of Infertility Therapy-Induced Ectopic Pregnancy	
.....	<i>M. Saitoh, O. Ishihara, K. Igarashi, N. Hayashi</i> <i>J. Taya, K. Horigome, S. Takeda & K. Kinishita</i> 49
The Use of Frozen-thawed Spermatozoa Obtained from Alloplastic Spermatocoele for Intracytoplasmic Sperm Injection	
.....	<i>T. Kuramoto, A. Boediono, M. Sugioka</i> <i>T. Umebayashi, K. Fukuda M. Motoishi</i> <i>K. Komatsu, H. Takihara & H. Saitoh</i> 55
Epididymal Micropuncture; Our Experience During the Past Seven Years	
.....	<i>H. Hibi, H. Fukatsu, Y. Asada & M. Yamamoto</i> 61

The Comparison of the Initial Dose of Gonadotrophin in Ovulation Induction for the Patients with Polycystic Ovary Syndrome.	 <i>M. Itoh, O. Ishihara, M. Saitoh</i> <i>N. Hayashi & K. Kinoshita</i>	67
Two Kinds of Galactosyltransferases in Fluids from Rat Rete Testis and Epididymis	 <i>M. Iida, T. Urashima & T. Matsuzawa</i>	73
Effects of Gonadotropin Releasing Hormone Agonist on Uterine Volume in Patients with Adenomyosis, Leiomyomata or Both	 <i>M. Fukuhara, T. Inazu, A. Maruyama</i> <i>Y. Watanabe, M. Sano & G. Nakamura</i>	81
Blastocyst Transfer(BT): The Key Point for Improving Pregnancy Rate	 <i>K. Kyono, N. Fukunaga, S. Chiba</i> <i>T. Sato, K. Haigou & Y. Matsuo</i>	87
Efficacy of Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH agonist Depot	 <i>M. Saitoh, O. Ishihara, N. Hayashi, J. Taya</i> <i>K. Horigome, S. Takeda & K. Kinoshita</i>	95

Case report

Birth of a Healthy Baby Following the Intracytoplasmic Injection of Ejaculated Spermatozoa from a Non-Mosaic XYY Patient	 <i>Y. Araki, M. Ohno, M. Motoyama & S. Araki</i>	101
Report of a Case Discontinued the Administration of Low Dose Oral Contraceptive Pills because of Generalized Vascular Teleangiectasia and Edema	 <i>K. Yoshida, A. Kurahashi, M. Seki & M. Kashimura</i>	107

初期卵胞発育を考える —卵細胞からのシグナル?—

Insight into the Early Folliculogenesis — Signaling from Germ Cells? —

岡 村 均

Hitoshi OKAMURA

熊本大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,

Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860-8556, Japan

緒 言

卵胞は生殖細胞である卵細胞と、それを取り囲む体細胞である顆粒膜細胞・莢膜細胞から構成される特異な構築を示す。この卵胞の発育が主として、gonadotropin releasing hormone (GnRH)—ゴナドトロピンによって調節されていることは周知の事実である。一方、primordial follicleからpreantral follicleにかけての卵胞発育、すなわち、ゴナドトロピンに依存しない時期の初期卵胞発育についてはblack boxの中といった状態であった。しかし、最近の分子生物学のこの方面への応用は、この問題に少しづつ光を当てつつある。従来、卵胞発育は顆粒膜細胞の増殖・分化という点から解析されてきたが、近年、卵細胞からのシグナルがこの顆粒膜細胞の増殖・分化に大きく影響を与え、卵細胞自身が積極的に卵胞発育を制御しているとの知見も得られている。本稿では現在までの知見をレビューし、その臨床応用への可能性についても触れたい。

1 ゴナドトロピン依存性・非依存性発育

初期卵胞の名称については多少の異同があるものの、一般的には、扁平な一層の上皮様細胞に取り囲まれたものをprimordial follicle(原始卵胞)、立方化した細胞、すなわち顆粒膜細胞に取り囲まれたものをprimary follicle(一次卵胞)、それが2~3層化し、周囲の莢膜細胞との間に基底膜が形成された段階のもの

のをsecondary follicle(二次卵胞)、それ以上に多層化するものの、まだ卵胞腔が形成されていないものをpreantral follicle(前卵胞腔卵胞)、卵胞腔が形成されたものをantral follicle(卵胞腔卵胞)と呼ぶ¹⁾。

卵胞発育は大きく分けると、ゴナドトロピンに依存せずに、自立的に発育しているようにみえる時期と、ゴナドトロピンに依存して発育する時期とに分けることができる。どの段階からゴナドトロピン依存性かという点については、今なお議論のあるところであるが、以下に示すような知見からpreantral stageの頃と考えるのが妥当のようである。

FSH receptorの発現時期あるいは結合性の点から、ゴナドトロピン依存性の開始時期を検討するという方法がまず考えられる。FSH receptorの発現時期に関する報告の中で最も早い段階での発現を報告しているのはZhengらであろう。彼らのヒトにおけるFSH receptor mRNAの発現をin situ hybridizationで検討しているデータによると²⁾、顆粒膜細胞が2~3層のsecondary follicleの時期に既に発現を認めている。しかし、一方、FSH receptorとの結合性からの検討では、卵胞腔形成直前のpreantral stageからFSHとの結合が認められ、次第にその結合性が強くなることが報告されている³⁾。すなわち、FSH receptor messageの発現が、直ちにFSH依存性に結びつくとも言えないようである。

1990年から92年にかけてヒトFSH・LH receptorのクローニングがなされ、そのcDNA配列からアミノ

酸構造が明らかとなった。その後、ヒトFSH・LH receptorに種々のmutationが存在することが報告されている⁴⁾。フィンランド人で見つかった566番目の塩基のシトシンがチミンに変異したmutationでは、receptor上の189番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変異しており、そのホモ接合体ではFSH receptorの活性化が障害され、卵胞発育の停止、原発性無月経、不妊を呈す。このような症例の卵巣中にもpreantral stageまでの卵胞は認められるので、ヒトではこの時期まではゴナドトロピン非依存性に発育すると考えられる。

次に、FSH receptorノックアウトマウスにおける卵胞発育から、ゴナドトロピン依存性・非依存性の時期を検討するという方法が考えられる。FSH receptorノックアウトマウスでは、卵巣は小さく、不妊であり、その卵胞発育をみると、preantral stageまでの発育は認められるが、それ以上に発育した卵胞は認められない⁵⁾。また、GnRHの遺伝子の異常によりFSHが全く分泌されないhpg/hpg mutantマウスでもpreantral stageまでの卵胞発育はみられる⁶⁾。すなわち、マウスでもpreantral stageまでの卵胞発育にはFSHは必須の因子ではないことを示している。

最近、免疫不全とゴナドトロピン分泌の低下したSCID/hpgマウスの腎臓被膜下にヒト卵巣組織を移植する方法で、ヒトの初期卵胞発育をex vivoで検討した報告がなされている⁷⁾。この報告によると、FSHを投与しない場合には、顆粒膜細胞が2層の段階までしか認められないが、FSH刺激を行うとantral stageまでの発育が認められている。

以上述べたようなデータから考えて、FSH receptorの発現はかなり早い段階から認められるが、実際にFSH依存性に発育していくのはもう少し後の段階で、やはりpreantral stageからと考えられる。

FSHと並んでestrogenも卵胞発育・顆粒膜細胞増殖に重要なことはよく知られている。estrogen receptorには α と β の2種類が同定されており、estrogen receptor α ノックアウトマウスにおける卵胞発育についてみると、大きな出血性のcystic follicleが認められるのが特徴で、発育卵胞数は少ないものの、発育自体には抑制は認められない。しかし、排卵障害、黄体の欠如が観察される⁸⁾。一方、estrogen receptor β ノックアウトマウスにおける卵胞発育については、adultマウスではwild typeとほとんど差を認めないが、immatureマウスを過排卵刺激して比較すると、ノックアウトマウスでは黄体数が少なく、未破裂卵胞が多数観察される⁸⁾。P₄₅₀ aromatase ノッ

クアウトマウスにおける卵胞発育についての検討では、antral stageまでの発育しか認められず、やはり出血性の変化が特徴的で、黄体形成は認められないことが報告されている⁹⁾。

以上のように、antral follicle以降の卵胞発育および排卵にはFSHのみならずエストロゲンが必須と考えられる。

2 初期卵胞発育

primordial~preantral follicleまでの初期卵胞発育、すなわちゴナドトロピン非依存性の時期の発育は如何なる機序によって調節されているのであろうか。これを解明する手段の一つとして、初期卵胞に発現している遺伝子、あるいはその遺伝子産物について検討する方法が挙げられる。現在までの報告をまとめたのが図1である。卵については、まず最も早く、原始卵胞の段階から認められるものは、stem cell factor(SCF)のレセプターであるc-kitである。ついで、TGF- β ファミリーに属するgrowth differentiation factor-9(GDF-9)およびc-myc、その後macrophage colony-stimulating factor(M-CSF)のレセプターであるc-fmsなどの発現が認められている。一方、顆粒膜細胞には、卵での遺伝子発現に呼応して、扁平な上皮様細胞として観察される時期からSCFの発現がまず認められる。ついでmullerian inhibitory substance(MIS)、c-myc、その後M-CSFなどの発現が認められる。

従来、卵胞発育の研究は、体細胞からのシグナルを中心に解析が進められてきたが、今日、卵からのシグナルが、とくに初期の卵胞発育において、重要なことが次第に明らかになりつつある。

c-kit遺伝子に異常をもつW mutantマウスでは、貧血、色素細胞欠損、不妊を示すが、その不妊の原因はgerm cellの増殖不全と初期卵胞発育不全によることが明らかにされている。一方、c-kitのligandであるSCF遺伝子に異常をもつSl mutantマウスにおいても、同様にgerm cell増殖と初期卵胞発育に異常を認め、不妊となることが示されている¹⁰⁾。マウス卵巣におけるSCF、c-kitの発現について検討すると、SCFは初期卵胞の顆粒膜細胞に認められる。一方、c-kitはprimordial~secondary follicleの卵細胞にのみ認められ、その後、卵胞腔を形成する頃には英膜細胞にも認められる。c-kitの機能を特異的に阻害する抗c-kit抗体、ACK2を出生日から生後12日目まで隔日投与すると、primary follicle以降への卵胞発育が認められない、ACK2を出生日から生後4日目まで投

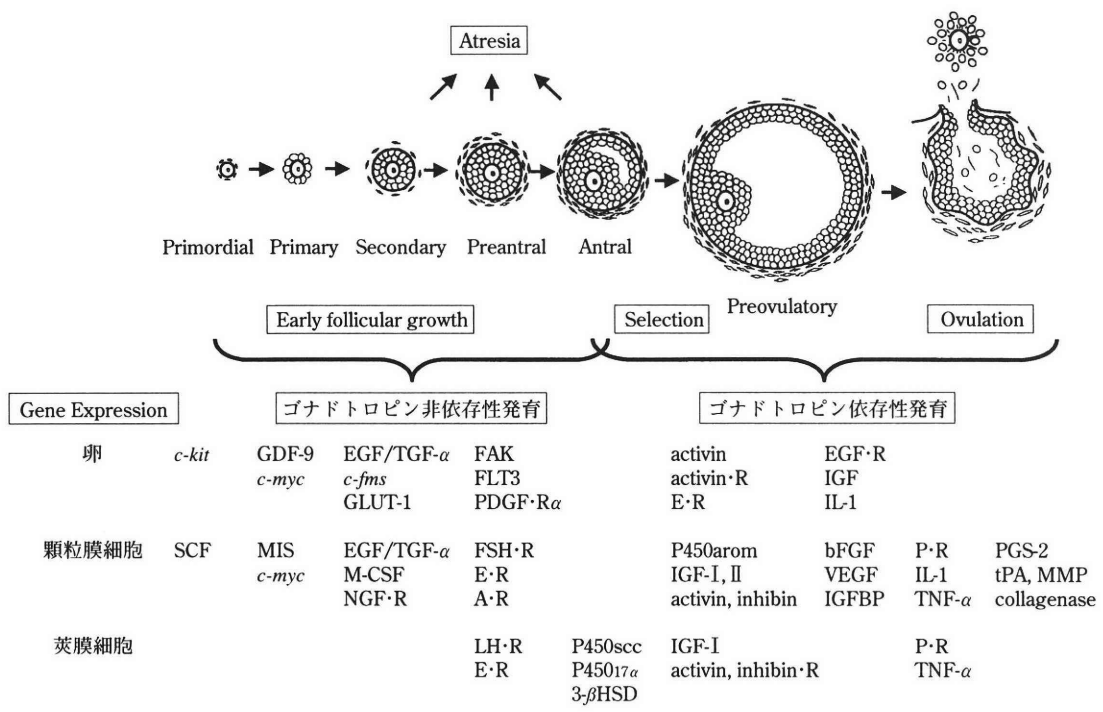


図1. 卵胞発育に関する因子の遺伝子発現時期

与しても、同様にprimary stage以降への卵胞発育は認められない。しかし、出生当日を除く生後12日までの投与では卵胞発育の阻害効果は観察されない。種々の投与時期を設定して、c-kitの活性化が重要な時期を詳細に検討した結果、まず第1段階として、ごく初期の限られた期間のc-kitの活性化が原始卵胞の活性化とその後の卵胞発育を支配していることが明らかとなった¹¹⁾。その後、卵胞腔形成直前の時期ならびに成熟過程においてもc-kitの活性化が再び必要である。ここで注目すべき点は、先に述べたように初期卵胞ではc-kitは卵細胞にのみ発現しているにもかかわらず、その阻害効果が卵成熟のみならず、卵胞発育自体をも阻害していることである。すなわち、c-kitの活性化に引き続いて、卵細胞から体細胞へ何らかのシグナルが産生されていることが考えられる。その一つとして、現在注目を集めているのがGDF-9である。実際、ACK2を投与すると、卵におけるGDF-9の発現が消失する。

GDF-9はTGF- β スーパーファミリーに属し、マウスでは原始卵胞を除くすべての段階の卵細胞に発現していることが報告されている¹²⁾。一方、羊・牛においては原始卵胞の段階から卵細胞にGDF-9 mRNAの発現が認められる¹³⁾。免疫組織化学的に蛋白レベルでラット卵巣におけるGDF-9の局在を検討する

と、原始卵胞を除くprimary follicle以降の卵にGDF-9蛋白の局在が認められる。GDF-9ノックアウトマウスでは、primary follicle以降の卵胞発育がみられず、不妊であることが示されている¹⁴⁾。そこで、リコンビナントGDF-9を作成し、follicle cultureに添加して、その生物学的効果を検討すると、GDF-9により卵胞径は有意に増大する。しかも、GDF-9とFSHの同時添加により相乗効果が認められる。顆粒膜細胞の増殖に対する効果について、³H thymidine uptakeを指標に検討すると、GDF-9添加により用量依存性にuptakeが増加する¹⁵⁾。

以上のことから、卵細胞におけるc-kitの活性化により、卵からGDF-9が産生され、このGDF-9は顆粒膜細胞増殖と卵胞発育を促進すると考えられる。この際、刺激された顆粒膜細胞からのSCF産生が、さらにc-kitの活性化を促進することによって、一段と卵胞発育に拍車がかかると考えられる。

表1は卵胞発育に関する主な因子について、その結合するレセプターによって分類・整理したものである。FSHはG蛋白共役型レセプターに結合し、GDF-9などはセリン/スレオニンキナーゼ型レセプターに結合する。SCF・M-CSFのレセプターは各々c-kit・c-fmsであり、チロシンキナーゼ型レセプターに分類される。近年、チロシンキナーゼ活性は細胞

表1. 卵胞発育に関与する主な因子

()内はそのレセプターを示す

1. G蛋白共役型レセプターに結合する因子
FSH, LH
2. セリン/スレオニンキナーゼ型レセプターに結合する因子
GDF-9, MIS, activin, inhibin, TGF- β
3. チロシンキナーゼ型レセプターに結合する因子
SCF(c-kit), M-CSF(c-fms), PDGF, NGF, EGF, TGF- α , IGF-I, IGF-II, bFGF
4. サイトカインレセプター型レセプターに結合する因子
GH, IL-1, IL-6, PRL
5. ステロイドレセプターファミリー
estrogen, progesterone, androgen, glucocorticoid

の増殖・分化・シグナル伝達に重要な役割を果たすことが明らかとなっている。そこで、卵に特異的に発現するチロシンキナーゼ活性を有する遺伝子群について検討を行ったところ、ブタの卵においてはPDGFR α , IGF-1R, FAKなどの発現が多く認められた。一方、顆粒膜細胞ではPDGFR α が多く発現しており、これらを介した卵と顆粒膜細胞とのシグナル伝達が卵胞発育に重要な役割を果たしている可能性が示唆された¹⁶⁾。

3 臨床への帰納

これら初期卵胞発育に関する研究の臨床への帰納について言及したい。

まず、若年卵巣癌患者などにおける卵巣機能温存を目的とした卵巣組織の凍結保存の試みへの応用が考えられる。卵巣組織の凍結保存、移植、その後の取り扱い方には図2に示すような方法が考えられる¹⁷⁾。

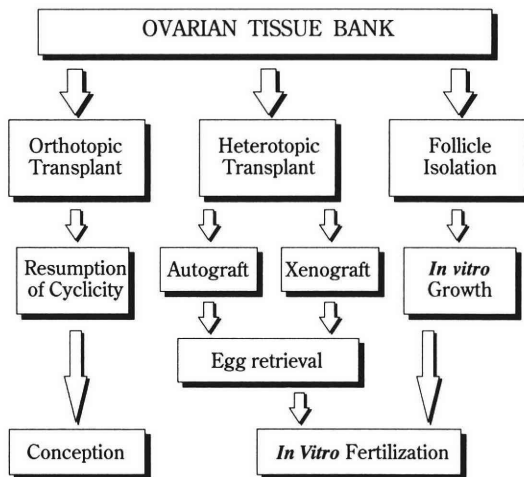


図2. 卵巣組織の凍結保存とその後の取り扱い方法
(K. Oktay, et al., Fertil Steril, 69:1-7, 1998)

最も理想的なのは、卵巣組織を正所性に移植し、卵巣機能・卵胞発育の再開とともに自然妊娠を期待する方法であるが、実技上の問題が多い。体外受精を念頭に置いた場合、異所性に移植し、卵胞発育を刺激した後、採卵を試みる方法や、一旦異種動物に移植して、卵胞発育後、採卵を行い、体外受精する方法も考えられるが、異種動物に移植する方法は倫理的問題を含んでいる。以上は*in vivo*において卵胞発育を期待する方法であるが、卵巣から卵胞を分離して保存した場合、*in vitro*に卵胞の発育を促し、体外受精を行う方法が考えられる。この方法は、*vivo*で卵胞発育が停止したと考えられるpremature ovarian failure(POF)の症例などへの応用も考えられる。環境の悪い*vivo*から*vitro*へ卵胞を移して、卵胞成熟を試みるのが可能となる。最近、Oktayらはヒト卵巣組織を凍結保存移植後に卵巣機能の再開を認めた症例を報告しており¹⁸⁾、今後、こうした試みが活発化すると考えられるが、その根底には、やはり初期卵胞発育の研究の進展が必須である。

最後に、M-CSFの卵胞発育・排卵への関与とその臨床応用について紹介する。M-CSFは分子量85kDaの糖蛋白質で、マクロファージ系前駆細胞に作用して、その分化や増殖を促進する因子として発見、同定されたが、その後、破骨細胞の増殖や絨毛細胞の分化誘導作用など多彩な作用を有することが明らかとなってきた。

正常なM-CSFの発現を欠くop/op mutantマウスでは、不妊あるいは妊娠率が低いことが知られている。その原因の一つには、ヘテロ接合体に比べ卵胞発育が悪く、排卵数が低いことが挙げられる。このマウスに生後10日目より連日M-CSFを投与すると、発育卵胞数の増加とともに排卵数の改善がみられる¹⁹⁾。ラットにおいてもM-CSF投与により排卵数が増加し、抗M-CSF抗体の投与によって排卵数が減少する²⁰⁾。

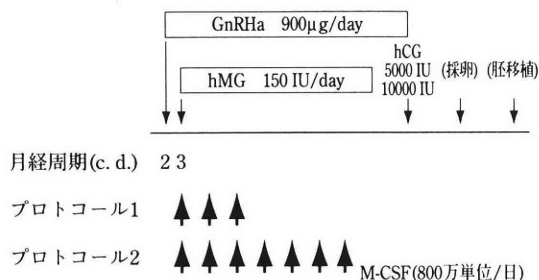


図3 M-CSF併用排卵誘発方法

このような基礎的検討を踏まえて、過去のhMG療法において成熟卵胞発育が全く認められないか、認められてもわずか1個であったpoor responder症例で、informed consentの得られた18例、21周期に対して、hMGとともにM-CSF(ロイコプロール)の併用療法を試みた²¹⁻²³⁾。図3に示すようにhMGとともにM-CSF 800万単位をday 3より隔日3回、あるいは隔日7回点滴静注した。事前に、各症例の内因性growth hormone (GH) の分泌予備能をみるためにクロニジテストを行い、無反応群、低反応群および正常群に分けて検討した。その結果、クロニジテスト無反応群5例、6周期において、18mm以上の成熟卵胞発育を認めたのは1周期のみであったが、低反応群5例、6周期では、3例、3周期に2個以上の成熟卵胞を得ることができた。正常群8例、9周期では、7例、7周期において2個以上の成熟卵胞がみられ、しかも、hMG使用量は減少した。このようにM-CSFは卵胞発育に促進的に作用し、とくにGH分泌予備能が保たれているpoor responder症例に対して有効と考えられた。近年、poor responderに対してGH併用療法が試みられ、一部には有効例があることが報告されており、この結果と考え併わせた場合、hMGに対するpoor responseの原因にはM-CSFやGHの作用不全などが関与していることが推測され、卵胞発育機構を解明する上でも興味深い。

結 語

以上述べてきたように、ゴナドトロピン以外に、単独で、あるいはゴナドトロピンと協力して、卵胞発育の個々の段階で促進的に働く新たな物質が見出され、臨床への応用が考えられつつある。この方面の研究がさらに進展すれば、卵巣に卵細胞さえあれば、その個体の遺伝子をもった受精卵を得ることも可能になると考えられ、安易なoocyte donationに走らなくても済む時がやがて来ることが期待される。

謝 辞

本論文の要旨は、第44回日本不妊学会学術講演会教育講演において講演した内容であり、講演の機会を与えて頂いた会長の矢内原 巧教授、ならびに座長の労をお取り頂いた武谷雄二教授に深謝致します。

共同研究者

熊本大学医学部産科婦人科学教室
松浦講平、田中信幸、本田律生、小野田 親、西村佳与子、岡村佳則、鄭 俊明
京都大学大学院医学研究科分子遺伝学教室
吉田尚弘
北海道大学医学部産科婦人科学教室
藤本征一郎、林 正路
愛媛大学医学部産科婦人科学教室
伊藤昌春、福井敬介

文 献

- 1) Gougeon A (1996) Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 17:121-155
- 2) Zheng W, Magid MS, Kramer EE, et al. (1996) Follicle-stimulating hormone receptor is expressed in human ovarian surface epithelium and fallopian tube. *Am J Pathol* 148:47-53
- 3) Yamoto M, Shima K and Nakano R (1992) Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycles. *Horm Res* 37(S1):5-11
- 4) Layman LC (1999) Mutations in human gonadotropin genes and their physiologic significance in puberty and reproduction. *Fertil Steril* 71:201-218
- 5) Dierich A, Sairam MR, Monaco L, et al. (1998) Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling *in vivo*: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13612-13617
- 6) Halpin DM, Jones A, Fink G, et al. (1986) Postnatal ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) and normal mice and associated changes in the hypothalamic-pituitary ovarian axis. *J Reprod Fertil* 77:287-292
- 7) Oktay K, Newton H, Mullan J, et al. (1998) Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 13:1133-1138

- 8) Couse JF and Korach K (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20:358-417
- 9) Fisher C, Graves KH, Parlow AF, et al. (1998) Characterization of mice deficient aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the *cyp19* gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6965-6970
- 10) Kuroda H, Terada N, Nakayama H, et al. (1988) Infertility due to growth arrest of ovarian follicles in Sl/Slt mouse. *Dev Biol* 126:71-78
- 11) Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, et al. (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184: 122-137
- 12) McGrath SA, Esquela AF, and Lee S-J (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 9:131-136
- 13) Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, et al. (1999) Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 60:381-386
- 14) Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 383:531-535
- 15) Hayashi M, McGee EA, Min G, et al. (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* 140:1236-1244
- 16) Okamura Y, Myoumoto A, Gao X, et al. (1998) The role of protein tyrosine kinase in ovarian folliculogenesis. In *Reproductive Biology Update—Novel Tools for Assessment of Environmental Toxicity—*, edited by Miyamoto H and Manabe N, Shoukadoh Booksellers Co, Kyoto, pp37-42
- 17) Oktay K, Newton H, Aubard Y, et al. (1998) Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue; an emerging technology? *Fertil Steril* 69:1-7
- 18) Oktay K, Karlikaya G, Gosden R, et al. (1999) Ovarian function after autologous transplantation of frozen-banked human ovarian tissue. *ASRM/CFAS Conjoint Annual Meeting, Abstracts O-054*
- 19) Araki M, Fukumatsu Y, Katabuchi H, et al. (1996) Follicular development and ovulation in macrophage colony-stimulating factor-deficient mice homozygous for the osteopetrosis (*op*) mutation. *Biol Reprod* 54:478-484
- 20) Nishimura K, Tanaka N, Ohshige A, et al. (1995) Effects of macrophage colony-stimulating factor on folliculogenesis in gonadotrophin-primed immature rats. *J Reprod Fertil* 104:325-330
- 21) Nishimura K, Tanaka N, Kawano T, et al. (1998) Changes of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) concentration in serum and follicular fluid in *in-vitro* fertilization and embryo transfer cycles. *Fertil Steril* 69:53-57
- 22) Nishimura K, Tanaka N, Kawano T, et al. (1995) Effectiveness of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) on the clonidine-positive poor ovarian responders. In *The Proceedings of the IXth World Congress on In Vitro Fertilization and Assisted Reproduction*, edited by Aburumieh A et al., Monduzzi Editore, Bologna, pp227-231
- 23) Tanaka N, Nishimura K, Matsuura K, et al. (1999) Supplementary macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) treatment on poor ovarian responders to gonadotropins—a new approach of ovulation induction—. *Front Endocrinol* 21:43-49

閉塞性無精子症の診断と治療：ART時代の再吻合術の意義

Diagnosis and Treatment of Obstructive Azoospermia : Reanastomosis in the Era of Assisted Reproductive Technology

松 田 公 志

Tadashi MATSUDA

関西医科大学泌尿器科学教室

Department of Urology, Kansai Medical University,
Moriguchi 570-8507, Japan

緒 言

病因に即した治療が困難なことの多い男性不妊症の中で、精路の閉塞による無精子症(閉塞性無精子症)は、精路再建術により治療可能である。無精子症は男性不妊症の約20%を占め、そのうち精路閉塞によるものは約20%であり¹⁾、男性不妊症患者全体では約4~5%を占めることになる。閉塞性無精子症の診断と精路再建術の要点、治療成績を述べる。

閉塞性無精子症の診断

1. 閉塞性無精子症の診断

典型的な閉塞性無精子症の診断は困難ではない。精子形成が正常で精液中に精子が存在しなければ精路閉塞と診断される。精子形成能の診断は、(1)精巣容積が正常、(2)血清FSHが正常、さらに(3)精巣生検で精子形成を確認することによりなされる。精巣生検組織で、各精細管での精子形成の程度は必ずしも均一ではないが、ほぼすべての精細管で成熟精子までの精子形成を見ることが、閉塞性無精子症の診断では必須と考える。

一部の精細管で成熟精子までの形成を見るが、過半数の精細管では著しく精子形成能が低下している場合は、閉塞性無精子症には当たらない。また、精巣容積、血清FSHの条件を満たしても、spermatogenic arrestの症例もあり、何らかの形で成熟精子の存在を確認する必要がある¹⁾。

精巣組織の定量的な検討の結果、精路閉塞症は精子形成を障害する可能性が示されている²⁾、とくに

閉塞期間の長い症例では、精巣組織への影響は強いと考えられる³⁾。

2. 閉塞部位の診断

精路のどの部位で閉塞しているかは、主に精液量と既往歴から推定できる。閉塞部位の鑑別診断手順を図1に示す。精液量が極端に少ない(<1ml)場合は、射精管閉塞、精管形成不全、逆行性射精のいずれかであり、経直腸超音波断層法や射精後の尿検査が参考となる。精管閉塞と精巣上体閉塞の鑑別は、既往歴の聴取がポイントである。

精路閉塞症における精管精囊造影の意義は、超音波などの他の診断技術の開発や閉塞症の病態理解の進歩により、小さくなったと考える。精管精囊造影

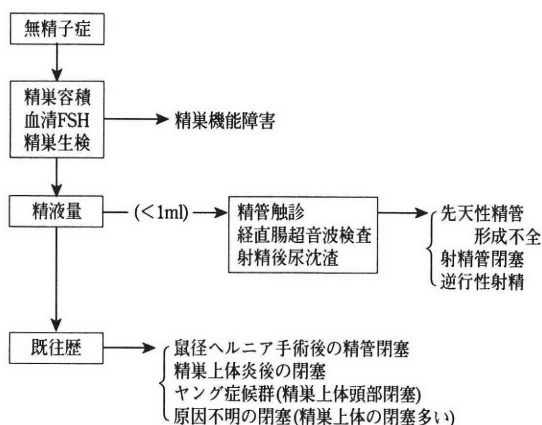


図1 閉塞性無精子症の診断手順

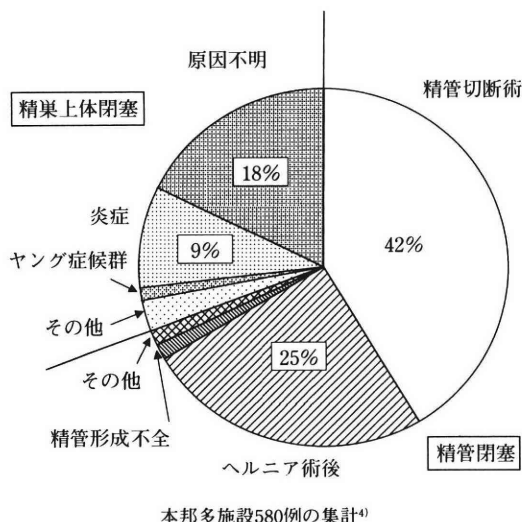


図2 精路再吻合術症例の閉塞原因

は、射精管閉塞に対する経尿道的切除術の術中モニターのため、あるいは、精管精管吻合術や精巣上位精管吻合術の際に吻合部より末梢の通過性の確認のためなどに用いられている。閉塞部より精巣側から高圧で薬液を注入すると、精巣上位管が破裂し二次的閉塞を生じる恐れがあり、注意すべきである。

本邦多施設集計による、精路再吻合術の対象となる閉塞性無精子症580例の閉塞原因を図2に示す⁴⁾。精管切断術とともに小児期鼠径ヘルニア手術による閉塞症例の多いことがわかる。

以下、各部位での閉塞について診断の要点を述べる。

(1) 射精管閉塞

精液量の減少(<1ml)、射精後尿中精子(-)で射精管閉塞または先天性両側精管形成不全を疑う。射精管閉塞では経直腸の超音波断層法で拡張した射精管を認める。確定診断は精管造影による。また、部分的な射精管閉塞という概念も近年注目されている⁵⁾。射精管閉塞の発生機序は、先天性、感染、外傷などがあるが、先天性の症例が多いと考えられている⁶⁾。

(2) 精管閉塞

精管閉塞の主要な原因は、精管切断術と小児期鼠径ヘルニア手術である。わが国では、小児期鼠径ヘルニア手術の既往のある症例での精管閉塞の頻度が極めて高い。男性不妊外来を受診した患者での著者らの検討では、片側閉塞症例を含めると27.8%で精管が閉塞していた(表1)⁷⁾。閉塞部位は内鼠径輪が最も多い(表2)。原因不明の閉塞性無精子症患者で、両側鼠径ヘルニア手術の既往があれば、鼠径部での精管

表1 小児期鼠径ヘルニア手術による精管閉塞：男性不妊外来受診患者での検討

(文献7)より引用)

男性不妊外来患者総数	724
小児期鼠径ヘルニア手術の既往あり	55
片側精管閉塞	12
両側精管閉塞	4
計	16

表2 小児期鼠径ヘルニア手術後の症例における精囊側精管断端の位置

精囊側断端の位置	精管数
骨盤内～内鼠径輪	16
鼠径管内	9
外鼠径輪～陰囊内	2
末梢側精管を認めず	1
計	28

閉塞と考えてほぼ間違いないと思われる。片側のヘルニア手術により片側精管が閉塞している症例も少なくない。片側閉塞の診断には、閉塞している側の陰嚢部精管が閉塞していない反対側より太くふれることが参考になる⁷⁾。

(3) 精巣上位閉塞

精巣上位での閉塞原因は、精管のそれに比べて多岐にわたる。精巣上位炎、精管閉塞後の精路内圧上昇による精巣上位破裂⁸⁾、慢性気道疾患を合併する原因不明のヤング症候群⁹⁾、先天性、原因不明などがあげられる。

ヤング症候群は、一時期英国やオーストラリアから多数症例が報告された⁹⁾。気管支拡張症や副鼻腔炎の既往があり、精巣上位は両側とも頭部での閉塞である。わが国や中国では頻度が高くない¹⁰⁾。時に呼吸器疾患の既往がなく、全身麻酔での手術中に異常が発見されることもあるので注意を要する¹⁰⁾。原因は不明であるが、近年発生頻度が低下しており、歯磨きに混入していた水銀を原因とする意見がある¹¹⁾。

全く原因不明あるいは先天性を疑わせる閉塞症例も多い。著者らの経験では、全く原因がわからない閉塞性無精子症例の多くは精巣上位での閉塞で、6例中5例は精巣上位尾部から精管曲部にかけての閉塞であった¹²⁾。本邦多施設580症例の集計でも、閉塞原因不明104例のうち93%で精巣上位精管吻合術が行われていた⁴⁾。

長期間の精管閉塞による二次的な精巣上位閉塞を経験することも少なくない⁸⁾。発生要因としては、

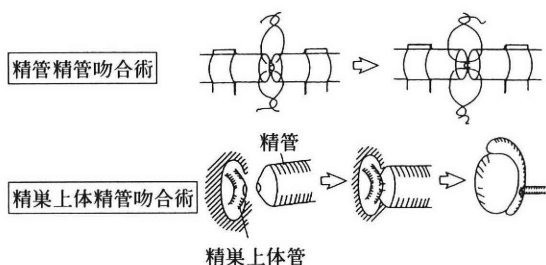


図3 顕微鏡下精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術

閉塞期間、閉塞部断端のsperm granulomaの有無⁸⁾、精巣側精管断端の長さ¹³⁾、などが指摘されており、これらの要因が精管精管吻合術後の精子出現率にも影響する。

(4) 先天性精管形成不全

先天性精管形成不全は嚢胞性線維症の一亜型であることが明らかになった。診断は、陰嚢部触診で精管をふれないこと、精液量、精漿中フルクトースなどの検査で通常は容易に行える。本邦における無精子症患者での頻度は3.6%と報告されている¹⁴⁾。

精路再建術の実際

閉塞性無精子症に対する精路再吻合術には、精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術がある(図3)。手術成績は手術用顕微鏡の導入により飛躍的に改善した。

1. 精管精管吻合術

手技の要点は、精管断端の粘膜同士を10-0などの細径のナイロン糸で確実にwater-tightに吻合することにある。手術用ルーペによる方法や一層縫合なども行われているが、内径の違う断端を確実に吻合するには、手術用顕微鏡を用いた二層吻合が勧められる。近年は、レーザーを用いた方法、fibrin glueを用いた方法なども開発されつつある¹⁵⁾。手術に際しては、精管の血流に留意することが大切で、精管を長距離にわたって周囲結合組織から裸にするのは避けるべきである。

鼠径ヘルニア手術後の症例は、閉塞期間が長く、精巣側断端にsperm granulomaがないことから、二次的な精巣上体閉塞を合併している頻度が高い。鼠径部での精管精管吻合術後に、精巣上体精管吻合術を追加して、初めて精子の出現をみる症例もある¹⁶⁾。

2. 精巣上体精管吻合術

精巣上体精管吻合術は、顕微鏡手術が不可欠であ

る。従来の肉眼的吻合術は、精巣上体漿膜と精管壁とを肉眼的に吻合し、sperm granulomaの間に瘻孔が形成されるのを期待するような術式で、手術成績は不良であった。現在は、精巣上体の側壁と精管断端粘膜を側端吻合する術式が広く行われ、良好な成績が得られている¹⁷⁾。

精路再吻合術の成績

1. 精管精管吻合術の成績

著者らの成績では、初回手術での精子出現率は、精管切断術後症例85%、鼠径ヘルニア術後症例47%、最終精子出現率はそれぞれ88%、84%、最終妊娠率はそれぞれ37%、53%、自然妊娠率37%、35%である(表3)。鼠径ヘルニア手術後の症例では、精管の剥離、吻合いずれも大変難しく、片側4時間近くかかっている。精巣側断端の精子の有無と開通率については、精管切断術後症例において、精子が認められず液がクリーミーな場合には、術後精子が出現する確率が26%と低いことが報告されている¹⁸⁾。陰嚢部での吻合では、精巣上体精管吻合術を選択すべきかもしれない。鼠径部での吻合ではそのまま精管精管吻合術を行い、術後経過によっては後日精巣上体精管吻合術が必要となることもある。我々は鼠径ヘルニア手術後の症例で精管精管吻合術と精巣上体精管吻合術を同じ側に行った症例を6例経験し、いずれも精子が出現、5例で妊娠が成立した(表4)。

表3 精管閉塞症例に対する精路再吻合術の成績

原因/術式	症例数	精子出現		妊娠		再手術
		初回	最終	初回	最終	
精管切断術	35	29/34	30/34	9/27	10/27	3
鼠径ヘルニア	19	9/19	16/19	4*/17	9**/17	7#

* 射出精子を用いたICSI1例を含む

** 射出精子を用いた人工授精(AIH)1例、ICSI1例を含む

精巣上体の二次的閉塞に対して精巣上体精管吻合術を追加

表4 鼠径部精管精管吻合術に、同側精巣上体精管吻合術を追加した症例

症例	閉塞期間 (年)	術後精子濃度 (mil/ml)	術後精子運動率 (%)	妊娠
1	3	62.3	65	AIH
2	28	23.0	42	ICSI
3	28	35.2	1	—
4	33	29.5	60	自然妊娠
5	23	29.0	61	自然妊娠
6	28	17.0	47	自然妊娠
7	17	36.0	0	—

表5 精巣上体精管吻合術の成績

閉塞原因	症例数	精子出現	妊娠成立
精巣上体炎	7	7 (1)	5 (1)
精管閉塞	13	11	7*
ヤング症候群	3	3 (1)	0
原因不明その他	11	8	4
計	34	29	16

* 射出精子を用いた人工授精(AIH)1例, ICSI1例を含む

() 再手術によって精子が出現した症例

2. 精巣上体精管吻合術の成績

著者の精巣上体精管吻合術の成績は、初回手術での開通率79%、最終の妊娠率47%、そのうち自然妊娠41%であった(表5)。ヤング症候群で妊娠の成立した症例の報告はない。術後精子の出現は精管精管吻合術よりやや遅く、術後6ヶ月以上経過してから出現する場合もある。

精路再建術と補助生殖技術

体外受精、とりわけ卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)の開発は、男性不妊症の治療を大きく変えたが、閉塞性無精子症においてもこのような補助生殖技術(assisted reproductive technology: ART)が用いられる。射出精子の得られないこれらの症例では、精巣上体や精巣から直接精子を採取し、ICSIに供する。精巣機能が正常なので、精子の採取はほぼ100%可能である。ARTの閉塞性無精子症への応用は、精路再建の不可能な先天性両側精管形成不全症例にも妊娠率の道を開いた。

一方、精路再建可能な症例においても、精巣上体精子や精巣精子を用いたICSIが行われる風潮にある。ARTと精路再建術と、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。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(全国調査での中央値10ヵ月⁴⁾)、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)、

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である。

精路再吻合術とARTの成績を比較すると、日本産婦人科学会倫理委員会が公表している全国登録施設の成績では1998年のICSIの妊娠率は採卵あたり21.1%であるのに対し¹⁹⁾、精路再吻合術は、全国泌尿器科29施設での精路再吻合術580例の初回手術後の自然妊娠率22.4%であった⁴⁾。両者に大きな差はないと考えられる。

精路閉塞症の診療における我々泌尿器科医の役割は、侵襲の大きい検査をできるだけ避けるながら精路閉塞患者を正しく診断すること、患者の希望に従って質の高い治療を提供すること、精路再建術が成功しなかったときや精子が出現しても妊娠が成立しないときには時機を失しないで体外受精グループと協議すること、などであろう。泌尿器科医と婦人科医が十分協議し、最も適切な治療法を行うことが、精路閉塞による不妊に悩む夫婦にとって重要である。

文 献

- 1) 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
- 2) Jarow JP, Budin RE, Dym M, et al. (1985) Quantitative pathologic changes in the human testis after vasectomy: a controlled study. N Engl J Med 313: 1252-1256
- 3) Matsuda T, Hiura Y, Muguruma K, et al. (1996) Quantitative analysis of testicular histology in patients with vas deferens obstruction caused by childhood inguinal herniorrhaphy: comparison to vasectomized men. J Urol 155:564-567
- 4) 松田公志, 岩本晃明, 伊藤直樹 他(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. 日不妊会誌 45:143-149
- 5) Hellerstein DK, Meacham RB and Lipshultz LI (1992) Transrectal ultrasound and partial ejaculatory duct obstruction in male infertility. Urology 39: 449-452
- 6) Pryor JP and Hendry WF (1991) Ejaculatory duct obstruction in subfertile males: analysis of 87 patients. Fertil Steril 56:725-730
- 7) 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
- 8) Silber SJ (1979) Epididymal extravasation follow-

- ing vasectomy as a cause for failure of vasectomy reversal. *Fertil Steril* 31:309-315
- 9) Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, et al. (1984) Young's syndrome: obstructive azoospermia and chronic sinopulmonary infections. *N Engl J Med* 310:3-9
- 10) Matsuda T, Horii Y, Nishimura K, et al. (1991) Young's syndrome: report of two Japanese cases. *Urol Int* 47:53-56
- 11) Hendry WF, A'Hern RP and Cole PJ (1993) Was Young's syndrome caused by exposure to mercury in childhood? *Brit Med J* 307:1579-1582
- 12) Matsuda T, Horii Y and Yoshida O (1994) Obstructive azoospermia of unknown origin: sites of obstruction and surgical outcomes. *J Urol* 151:1543-1546
- 13) Witt MA, Heron S and Lipshultz LI (1994) The post-vasectomy length of the testicular vasal remnant: a predictor of surgical outcome in microscopic vasectomy reversal. *J Urol* 151:892-894
- 14) 岡伸 俊, 浜口毅樹, 岡田 弘 他(1985) 先天性精管欠損症の臨床的検討. *日不妊会誌* 30:173-179
- 15) Silverstein JI and Mellinger BC (1991) Fibrin glue vasal anastomosis compared to conventional sutured vasovasostomy in the rat. *J Urol* 145:1288-1291
- 16) 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
- 17) Thomas AJ Jr. (1987) Vasoepididymostomy. *Urol Clin North Am* 14:527-538
- 18) 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
- 19) 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

**Diagnosis and Treatment of Obstructive Azoospermia : Reanastomosis
in the Era of Assisted Reproductive Technology**

Tadashi Matsuda

Department of Urology, Kansai Medical University,
Moriguchi 570-8507, Japan

Obstructive azoospermia is caused by vasectomy, vas deferens injury at childhood inguinal herniorrhaphy, epididymitis, or unknown etiology. The majority of obstruction with unknown etiology are epididymal obstruction. Patients with obstructive azoospermia can restore their fertility by microsurgical seminal tract reanastomosis. From our experiences, sperm appeared postoperatively in 88% of 35 post-vasectomy patients, in 84% of 19 post-herniorrhaphy patients after adding ipsilateral epididymovasostomy in 7 of them, and in 85% of 34 patients with epididymal obstruction. Natural conception was achieved in 37%, 35% and 41%, 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* 45:185-189 2000)

体細胞クローンと核の初期化 Cloned Animal from Somatic Cells and Nuclear Reprogramming in Nuclear Transferred Embryos

黒 坂 哲
Satoshi KUROSACA

今 井 裕
Hiroshi IMAI

京都大学大学院農学研究科応用動物科学専攻動物生殖生理学研究室
Laboratory of Reproductive Physiology, Graduate School of Agriculture,
Kyoto University, Kyoto 606-8502, Japan

受精卵は胚発生を経て、すべての組織、臓器に分化できることから、全能性細胞とよばれている。細胞分化後の体細胞からの個体発生は、通常的环境下においては起こり得ず、細胞分化は不可逆的な現象といえる。しかし、細胞核を未受精卵または受精卵に導入する核移植という技術によって、分化程度によっては全能性を再獲得できることが明らかにされてきた。両生類の核移植実験では幼生(オタマジャクシ)の小腸上皮細胞から正常な成体が得られており¹⁾、哺乳類では卵割期の初期胚細胞由来のクローン個体(受精卵クローン)の作出も可能である²⁾。しかし、両生類において、成体体細胞からは正常な個体は得られておらず³⁾、哺乳類においても、体細胞の核移植で妊娠の成功例はなかった。分化細胞が個体発生に必要なすべての遺伝情報を有しており、さらに体細胞分化の可逆性が実験的に初めて証明されたのは、1996年のヒツジにおける上皮細胞様に分化した胚由来培養細胞からのクローン個体の作出⁴⁾、さらに1997年の成体由来乳腺細胞からの個体(体細胞クローン)の作出⁵⁾である。

細胞核が全能性を獲得する現象は初期化(リプログラミング)とよばれる。すなわち、細胞核(ドナー核)が初期化されることによって核移植胚の個体発生が可能となる。しかし、初期化の機構については明らかでなく、核移植にともなう核や染色体の様々な変化が確認されているものの、個体発生の成否以外に初期化を直接証明できる手段がないのが現状である。本稿では、核移植胚の発生能に深く関連していると考えられる事象について述べ、核の初期化の理解へのアプローチを試みる。

未受精卵細胞質と受精卵細胞質

ドナー核が初期化される場合、全能性を有する細胞質内であることには疑いの余地はない。全能性細胞質(レシピエント細胞質)としては、受精卵と未受精卵が考えられる。マウスでは、1983年に受精卵の前核置換による個体の作出が報告されている⁶⁾。しかし、除核した前核期卵に2細胞期以降の核を移植した場合には、個体発生に至っていない⁷⁾。この結果は、前核期卵の細胞質が2細胞期以降の核を初期化できなかったことを示唆している。1986年に、除核未受精卵をレシピエント細胞質として用いて、8細胞期胚の割球からヒツジ個体が作出された⁸⁾。ヒツジの8細胞期胚はすでに全能性を消失していることが知られているので⁹⁾、8細胞期の割球が未受精卵の細胞質へ移植されることにより全能性を再獲得したと考えられる。その後、マウスにおいても除核未受精卵を用いた核移植により、4細胞期および8細胞期由来の個体発生が報告されていることから¹⁰⁾、未受精卵を用いることは核移植による個体作出に有効といえる。しかし、マウスにおいて、未受精卵を用いた核移植胚の核を受精卵へ再核移植することによりクローン個体が得られるという報告もある^{11, 12)}。再核移植のレシピエント細胞質として単為発生卵を用いた場合には個体が得られないことから、単為発生卵と受精卵の細胞質は核の初期化に関連する異なる因子(おそらく精子由来の因子か、精子の侵入によって出現する因子)を有していると考えられる。しかし、体細胞核を直接細胞質へ注入する方法では、未受精卵の細胞質単独でクローン個体の作出が可能であり¹³⁾、再核移植による方法との矛盾を説明することは現時

点では難しい。再核移植法では、未受精卵への核移植のみでは初期化が不十分で、受精卵の細胞質が初期化をより促進している可能性がある。

レシピエント細胞質の細胞周期が核移植胚の発生能におよぼす影響

核移植胚の発生能は、ドナー細胞とレシピエント細胞質の細胞周期に大きく依存する。そこで、まずレシピエント細胞質の細胞周期が核移植胚の発生能におよぼす影響について述べる。

未受精卵をレシピエント細胞質とする核移植には、以下の3種類の方法がある(図1)。1)第二減数分裂中期(metaphase II; MII)にある未受精卵を用い、核の導入と同時にまたは直後に活性化刺激を与える方法(fusion and activation; FA法)、2)あらかじめ活性化刺激を施した卵子を用いる方法(preactivated; PRE法)、3)卵子に活性化刺激を与えずに核移植後、ドナー核をM II期の卵細胞質に一定時間さらした後に活性化刺激を与える方法(post-activation; POST法)である。M II期の卵子のMPF(maturation promoting factor)活性は非常に高く、受精または活性化刺激により、その活性は急激に低下することが知られている¹⁴⁾。したがって、レシピエント細胞質に移植されたドナー核は、FA法では短時間、POST法では長時間MPF活性の影響を受け、PRE法では影響を受けない。MPF活性の高い細胞質に導入された核は、自身の細胞周期に関係なく核膜崩壊および染色体凝縮を起こし、M期に誘導される¹⁵⁻¹⁹⁾。その際に、S期のドナー核の染色体は断片化してしまい大きなダメージを受けると考えられる。その後、MPF活性が低下して核膜が構築されると、それに続いてDNAの複製が

開始されるので、本来DNA複製を終了しているG2期のドナー核はDNAを再複製することになり、倍数性異常が生じる^{17,20)}。従って、FA法ではG1期のドナー核を用いる必要があると考えられ、実際に、G1期のドナー核を用いると最も高い発生率が得られている²¹⁾。一方、PRE法の場合、ドナー核は自身の細胞周期に従った挙動を示し、G2期のドナー核のDNA再複製は起こらない¹⁷⁾。また、核膜崩壊や染色体凝縮を起こさない^{17,19)}。ドナー核へのダメージは軽減され、G1期の核は自身の細胞周期に従って1回だけDNAを複製することになる¹⁷⁾。すなわち、PRE法は使用できるドナー核の細胞周期を限定しない^{17,20)}。初期胚割球はS期にある割合が高いため²²⁾、受精卵核移植ではPRE法が有効であり、この原理が理解されることによって、家畜の受精卵クローンの作出効率は飛躍的に高まった。ところが、体細胞核移植では、PRE法では胚盤胞発生率が非常に低く^{23,24)}、さらに個体発生となるとFA法でしか確認されていない。また、マウスは初期化が困難な動物種であると考えられており、PRE法では受精卵クローンすら得られていない。このことから、M II期の卵細胞質が分化の進んだ核の初期化に必要なと考えられるようになり、ドナー核をM II期の卵細胞質に長時間さらす方法として、POST法が体細胞核移植において試みられるようになった。この手法を用いて、1998年には、マウス¹³⁾とウシ²⁵⁾でそれぞれ体細胞クローン個体が得られている。ウシ体細胞核移植においてはPOST法がFA法よりも高率な胚盤胞発生率を示す傾向があるが、受胎後の発生能を直接比較した報告はない。いずれにしても、体細胞の初期化にはM II期の卵細胞質が必要であり、とくにMPF活性は初期化に重要な役割を果たすと予想できる。ところが、ヒツジの胚由来培養細胞を用いた核移植において、ドナー細胞が明らかに分化していたにもかかわらずPRE法、FA法、POST法のいずれにおいても産仔が得られるという報告は⁴⁾、MPF活性だけで初期化をすべて説明できないことを示している。最近になり、卵子の除核法を工夫することによってPRE法で高率に体細胞クローンマウスが得られ²⁶⁾、ウシでは活性化卵子を除核してレシピエント細胞質とするPRE法の変法で²⁷⁾、FA法と差のない胚盤胞発生率を示すことが報告された²⁸⁾。また、筆者らも上述とは異なるPRE法の変法でFA法と遜色のない胚盤胞発生率を得ている²⁹⁾。従って、PRE法をうまく改変すれば体細胞核の初期化にMPF活性の高い未活性化卵の細胞質が必ずしも不可欠ではなくなり、ドナー核の

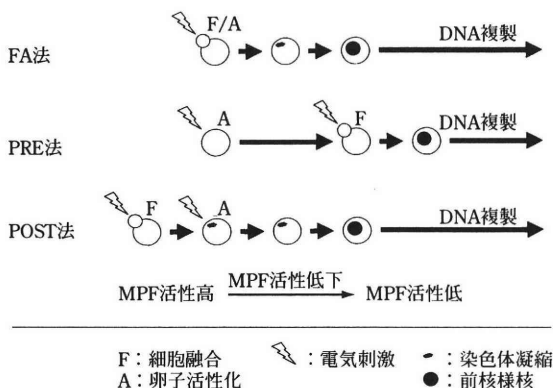


図1 3種類の核移植法の比較

細胞周期に関わらず体細胞クローンが作出できる可能性がある。しかし、これまでのところ、どのような卵細胞質因子が体細胞核の初期化誘導に関与しているのかについては全く明らかにされていない。

ドナー細胞の細胞周期と血清飢餓培養

ドナー細胞の細胞周期も核移植後の個体発生に影響をおよぼす。上述したように、核移植胚の倍数性を正常に保ち、かつ正常な発生を支持するためには、FA法とPOST法の場合はG1期のドナー細胞が必要であり、PRE法の場合はG1、S、G2期のどの周期のドナー細胞を用いてもよい。M期のドナー細胞は、M期にあるレシピエント細胞質と細胞周期上最もよく適合すると考えられる。実際、M期のドナー細胞を用いたPOST法で、マウスの受精卵および体細胞クローンの作出例¹¹⁾もあることから、M期のドナー核を核移植に用いることは有効な手段のひとつであろう。

細胞周期にはG1、S、G2、M期の他にG0期とよばれる休止期が存在する。ヒツジでは、血清飢餓培養によってG0期に誘導した細胞をドナー細胞として用いることにより、胚由来培養細胞⁴⁾や体細胞⁵⁾由来のクローン個体が得られている。G0期への誘導の意義については明らかではないが、G0期の核が分化や脱分化のコントロールを受けやすく、G0期の染色体構造が改変されやすいなど、G0期の核は初期化されやすいのではないかと想像されている³⁰⁾。その後、体細胞核移植において血清飢餓培養が必ずしも不可欠ではないことが示唆されたが^{31, 24)}、この時の体細胞がG0期ではないという根拠もない。ヒツジ胚由来培養細胞の核移植では、継代初期の細胞からは血清飢餓培養なしでも個体が得られているが³²⁾、継代を重ねると血清飢餓培養が必要となっていることから⁴⁾、ドナー核をG0期に誘導することが初期化に少なからず影響をおよぼしている可能性はある。

核移植にともなうドナー核の形態、染色体構造および遺伝子発現の変化

FA法およびPOST法では、ドナー核はレシピエント細胞質中へ導入直後に核膜崩壊、染色体凝縮を起こし、活性化刺激によるMPF活性の低下後に核膜を再構築し、前核様の核を形成する^{13, 15-19)}。PRE法では核膜崩壊、染色体凝縮が起こらず、前核様核の形成のみが起こる^{17, 19)}。このような核の形態的变化が初期化とどのように関連するのかは明らかでない。しかし、FA法とPOST法がPRE法よりも体細胞核移

植に適している理由として、仮に初期化に関連する因子が卵細胞質中に存在するのであれば、核膜崩壊によって染色体が細胞質中に露出するためにその因子の染色体へのアクセスが容易になり、初期化がより効率的に起こる可能性はある。

核移植にともなう染色体構造の変化、なかでも染色体構成タンパク質であるヒストンの変化については主に両生類を用いて調べられてきた³³⁾。通常の胚発生では、胚ゲノムの活性化(zygotic gene activation; ZGA)後に、染色体を構成するリンカーヒストンは胚型ヒストン(ヒストンB4)から体細胞型のヒストンH1、H1⁰に置換される。核移植後の核の再構築にともない、体細胞型から胚型ヒストンへの置換が起こるとともに、ヒストンH1とクロマチンとの結合・解離がDNA複製能および転写能を調整することがアフリカツメガエルにおいて確認されている³³⁾。最近、ウシにおける受精卵核移植³⁴⁾および体細胞核移植²⁸⁾においても、核移植後に体細胞型のヒストンH1が検出されなくなり、通常の発生プログラムにおけるZGAの時期以降に再検出されることが報告された。また、レシピエント細胞質中のドナー核が転写活性を失い、通常ZGAが見られる時期以降に再度転写活性を獲得することがウサギ³⁵⁾、ウシ³⁶⁻³⁸⁾において確認されている。これらの事実から、体細胞型ヒストンから胚型ヒストンへの置換が、体細胞の遺伝子発現を胚型の遺伝子発現へ変化させる引き金となっていることが考えられる。

着床後の異常

核移植産仔、とくに体細胞クローンでは流死産、異常産仔が非常に多く見られる。流死産は妊娠の全期間にわたり発生し、胎仔および産仔の異常は免疫系、呼吸・循環器系、臍帯、胎盤等、多岐にわたる^{39, 40)}。このような異常発生の原因は、核移植直後のドナー核が初期胚発生に必要な程度には初期化されたとしても、その後の発生にともなって異常が蓄積し、着床後の胎仔発生を支配する複雑なメカニズムが正常に機能できない、すなわち個体発生への初期化が不完全であると考えられる。哺乳類の正常な個体発生には、両親由来のゲノムの存在が不可欠であり⁴¹⁾、両者の役割分担は配偶子形成過程の一次インプリンティングと胚発生過程の二次インプリンティングによるインプリンティング遺伝子の発現量の差により制御されている⁴²⁻⁴⁴⁾。インプリンティング遺伝子の発現異常による胚発生異常はヒトでよく知られた現象であり⁴⁵⁾、少なくともそのいくつかはクローン動

物で見られる異常と一致していることから、核移植産仔ではインプリンティングの制御が不十分である可能性が高い。しかし、これまでのところ、核移植による胚発生異常とインプリンティング遺伝子の発現異常を関連づける直接的な証拠はない。

核移植によるクローン、とくに体細胞クローンについては、優良家畜の育種、医薬品や移植用臓器を生産する遺伝子組換え動物の効率的生産などへの応用が期待されている。しかし、現時点での体細胞クローンの作出効率は非常に低く、実用化技術としての利用には多くの課題を残している。核の初期化という現象は、基礎生物学としても、実用的にも重要な研究課題であるが、初期化の成否は個体形成という結果でしか判断できないことが、研究を進める上で大きなネックとなっている。本稿で述べたように、核の初期化に関連していると考えられる事象が断片的に明らかとなりつつあり、これらの相互関係から初期化のメカニズムがより明確になれば、単にクローン動物の効率的な作出にとどまらず、細胞の老化やガン化をリプログラムする機構の解明などにも重要な糸口を提供することになるだろう。

文 献

- Gurdon JB (1966) "Fertile" intestine nuclei. *Nature* 210:1240-1241
- 加藤容子, 角田幸雄 (1998) 哺乳動物細胞核の個体への発生能。蛋白質核酸酵素 43:397-404
- DiBerardino MA, Orr NH and McKinnell RG (1986) Feeding tadpoles cloned from *Rana erythrocyte* nuclei. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8231-8234
- Campbell KHS, McWhir J, Ritchie WA, et al. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 380:64-66
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385:810-813
- McGrath J and Solter D (1983) Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion. *Science* 220:1300-1302
- McGrath J and Solter D (1994) Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226:1317-1319
- Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320:63-65
- Willadsen SM (1989) Cloning of sheep and cow embryos. *Genome* 31:956-962
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1993) Birth of mice after transplantation of early cell-cycle-stage embryonic nuclei into enucleated oocytes. *Biol Reprod* 48:958-963
- Kwon OY and Kono T (1996) Production of identical sextuplet mice by transferring metaphase nuclei from four-cell embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:13010-13013
- Tsunoda Y and Kato Y (1997) Full-term development after nuclear transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse. *J Exp Zool* 278:250-254
- Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, et al. (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394: 369-374
- 佐方功幸 (1996) 減数分裂。生殖細胞一形態から分子へ。岡田益吉, 長濱嘉孝編著, 共立出版, 東京, pp186-201
- Collas P and Robl JM (1991) Relationship between nuclear remodeling and development in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 45:455-465
- Collas P, Pinto-Correia C, Ponce De Leon FA, et al. (1992) Effect of donor cell cycle stage on chromatin and spindle morphology in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 46:501-511
- Campbell KHS, Ritchie WA and Wilmut I (1993) Nuclear-cytoplasmic interactions during the first cell cycle of nuclear transfer reconstructed bovine embryos: implications for deoxyribonucleic acid replication and development. *Biol Reprod* 49:933-942
- Cheong HT, Takahashi Y and Kanagawa H (1994) Relationship between nuclear remodeling and subsequent development of mouse embryonic nuclei transferred to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 37:138-145
- 外丸祐介, 河野友宏, 中原達夫 (1994) ウシ活性化未受精卵への核移植におけるドナー核の形態的变化とヒストンH1キナーゼ活性。J Reprod Dev 40:j25-j30
- Campbell KHS, Loi P, Otaegui PJ, et al. (1996) Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. *Rev Reprod* 1:40-46
- Collas P, Balise JJ and Robl JM (1992) Influence of cell cycle stage of the donor nucleus on development of nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 46:492-500
- Barnes FL, Collas P, Powell R, et al. (1993) Influence of recipient oocyte cell cycle stage on DNA synthesis, nuclear envelope breakdown, chromosome constitution, and development in nuclear transplant bovine embryos. *Mol Reprod Dev* 36:33-

41

- 23) Takahashi S, Kubota C, Nakahara H, et al. (1998) Importance of cytoplasmic factor after oocyte activation on development of somatic cell-nuclear transferred bovine embryos. In *Gametes: Development and Function* (Eds. Lauria A, et al), Spono Symposia, 607
- 24) Shiga K, Fujita T, Hirose K, et al. (1999) Production of calves by transfer of nuclei from cultured somatic cells obtained from Japanese black bulls. *Theriogenology* 52:527-535
- 25) Wells DN, Misica PM, Tervit HR, et al. (1998) Adult somatic cell nuclear transfer is used to preserve the last surviving cow of the Enderby Island cattle breed. *Reprod Fertil Dev* 10:369-378
- 26) Baguisi A and Overstrom EW (2000) Induced enucleation in nuclear transfer procedures to produce cloned animals. *Theriogenology* 53:209
- 27) Bordignon V and Smith LC (1998) Telophase enucleation: An improved method to prepare recipient cytoplasts for use in bovine nuclear transfer. *Mol Reprod Dev* 49:29-36
- 28) Bordignon V, Clarke HJ, Nicola E, et al. (2000) Chromatin remodeling and developmental potential of bovine somatic cell nuclei after nuclear transplantation: Effect of donor cell culture conditions and oocyte activation status. *Theriogenology* 53:212
- 29) Kurosaka S, Ohashi A, Nagao Y, et al. (2000) Effect of recipient cytoplasm following oocyte activation on the development of nuclear transferred embryos from somatic cells in the bovine. *Biol Reprod* 60 suppl.1, in press
- 30) Campbell KHS (1999) Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1:3-15
- 31) Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. (1998) Cloned transgenic calves from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 280:1256-1258
- 32) Campbell KHS, McWhir J, Ritchie B, et al. (1995) Production of live lambs following nuclear transfer of cultured embryonic disc cells. *Theriogenology* 43:181
- 33) Kikyo N and Wolffe AP (2000) Reprogramming nuclei: insights from cloning, nuclear transfer and heterokaryons. *J Cell Sci* 113:11-20
- 34) Bordignon V, Clarke HJ and Smith LC (1999) Developmentally regulated loss and reappearance of immunoreactive somatic histone H1 on chromatin of bovine morula-stage nuclei following transplantation into oocytes. *Biol Reprod* 61:22-30
- 35) Kanka J, Hozak P, Heyman Y, et al. (1996) Transcriptional activity and nucleolar ultrastructure of embryonic rabbit nuclei after transplantation to enucleated oocytes. *Mol Reprod Dev* 43:135-144
- 36) Kanka J, Fulka J Jr, Fulka J, et al. (1991) Nuclear transplantation in bovine embryo: fine structural and autoradiographic studies. *Mol Reprod Dev* 29:110-116
- 37) Smith SD, Soloy E, Kanka J, et al. (1996) Influence of recipient cytoplasm cell stage on transcription in bovine nucleus transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 45:444-450
- 38) Kanka J, Smith SD, Soloy E, et al. (1999) Nucleolar ultrastructure in bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev* 52:253-263
- 39) Hill JR, Roussel AJ, Cibelli JB, et al. (1999) Clinical and pathologic features of cloned transgenic calves and fetuses (13 case studies). *Theriogenology* 51:1451-1465
- 40) 高橋清也(2000) クローン技術の現状と展望. 日本畜産学会第97回大会シンポジウムプロシーディングス 21世紀の畜産学研究の方向と展望 94-98
- 41) McGrath J and Solter D (1984) Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37:179-183
- 42) 高木信夫(1996) 刷り込み, 生殖細胞一形態から分子へ. 岡田益吉, 長濱 嘉孝編著, 共立出版, 東京, pp112-125
- 43) Tilghman SM (1999) The sins of the fathers and mothers: genomic imprinting in mammalian development. *Cell* 96:185-193
- 44) Feil R and Khosla S (1999) Genomic imprinting in mammals. *Trends Genet* 15:431-435
- 45) De-Groot N and Hochberg A (1993) Gene imprinting during placental and embryonic development. *Mol Reprod Dev* 36:390-406

多嚢胞性卵巣症候群患者における血清レプチンと 卵胞液レプチンの比較検討

A Comparative Study between Serum Leptin and Follicular Fluid Leptin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome

結 城 広 光

Hiromitsu YUKI

横 溝 玲

Rei YOKOMIZO

村 上 節

Takashi MURAKAMI

岡 村 州 博

Kunihiro OKAMURA

渡 辺 正

Tadashi WATANABE

矢 嶋 聰

Akira YAJIMA

東北大学医学部産科学婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,

Tohoku University, Sendai 980-0872, Japan

レプチンはヒト卵巣顆粒膜細胞(GC)でも分泌され、 E_2 産生を*in vitro*で抑制する。*in vivo*において E_2 産生は卵胞発育の指標であり、レプチンが卵胞発育を抑制する可能性について検討するため、卵胞発育不全から排卵障害を呈する多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)婦人での卵胞液および血清中のレプチン濃度を測定した。内分泌学的疾患を認めず非肥満正常月経周期婦人($n=7$)と日本産婦人科学会多嚢胞性卵巣症候群の診断基準を満たす非肥満PCOS婦人($n=8$)を対象とした。患者の同意を得て手術時に採取した血液と卵胞液上清を用い、ELISA法で血清レプチン濃度および卵胞液レプチン濃度を測定し比較検討した。PCOSの小卵胞と比較するため正常婦人の検体採取時期は主席卵胞径10mm前後の卵胞期とし、PCOSは2カ月以上ホルモン治療を施行されていない時期とした。測定の結果、1)各群において血清と卵胞液レプチン間に強い正の相関を認めた。2)血清レプチンおよび卵胞液レプチンには各々有意差を認めなかった。3)卵胞液レプチン/血清レプチン比はPCOSで有意に低値を示した。すなわち、PCOSでは卵胞液中レプチンの血清中に対する相対的値は決して高くなくむしろ低値を示した。以上よりPCOSにおける局所のレプチン産生増加がその病態にかかわっている可能性は低く、逆にGCのレプチン分泌低下或いは卵胞内へのレプチン透過性低下の可能性が考えられた。

キーワード：多嚢胞性卵巣症候群、血清レプチン、卵胞液レプチン

(日不妊会誌 45:197-201 2000)

諸 言

1994年にFriedmannら¹⁾がレプチンを発見して以来、レプチンに関する研究は各分野で精力的に行われている。レプチンは主に脂肪細胞から分泌され、BMIと血清レプチン濃度が正の相関を示す²⁾ことが知られている。このペプチドホルモンは、視床下部に作用し食欲抑制と基礎代謝亢進による抗肥満作用

を有する他に、性腺刺激作用^{3,4)}も認められることが明らかとなってきた。このレプチンの発見により脂肪細胞が単にエネルギー貯蔵だけではなく、内分泌器官としても機能するということが認識されつつある。またヒトGC⁵⁾での分泌や受容体⁶⁾の存在も判明し、不妊症との関連性についても検討がなされてきた。一方、PCOSにおいては、GCに対するFSH作用の減弱が存在し、卵胞発育過程でのselection blockに

より卵胞発育が停止しているもの⁷⁾と考えられている。Zachowら⁸⁾やSanjayら⁹⁾は、GCのIGF-1添加培養実験系でレプチンはFSH刺激によるE₂産生を濃度依存的に直接抑制すると報告しているため、GCに対しレプチンはendocrine作用の他にautocrine/paracrine作用も有していることが推測され、*in vivo*でも卵胞発育の抑制に関与している可能性がある。この点を検討するため正常発育卵胞と卵胞発育が停止するPCOSにおいて、血清レプチンおよび卵胞液レプチン濃度の比較検討を行った。

対象および方法

1 対 象

内分泌疾患を認めず正常月経周期を有する婦人(n=7)を正常群とし、PCOS群は日本産婦人科学会多嚢胞性卵巣症候群診断基準(①月経異常②LH基礎値高値、FSH正常③超音波検査上多嚢胞性卵巣)を満たし2カ月以上ホルモン治療を施行されていない症例(n=8)とした。対象の概要を表1に示す。

2 検体採取時期

正常群は、PCOSの小卵胞状態を考慮し卵胞径が10mm前後の時期とし、子宮内膜症、子宮筋腫、子宮頸部上皮内癌あるいは良性卵巣腫瘍の手術時に検

体を採取した。また、PCOS群は、腹腔鏡下卵巣散術時に検体を採取した。検体採取はすべての患者の同意を得た上で施行した。

3 検体採取方法

手術当日の朝あるいは術中の空腹時に採血し、遠心分離(250×g 5分間)後血清を採取した。また、22~24Gの針で卵胞穿刺し卵胞液を吸引して同様に遠心分離後上清を採取した。正常群の標的卵胞は主席卵胞ひとつのみで、PCOSでは複数個の卵胞を標的卵胞とした。卵胞液吸引時にはできるだけ血液の混入を避ける事を心掛け、得られた検体は測定時まで-80℃で凍結保存した。

4 測定方法

検体を室温下で融解後、ELISA法により吸光度を測定し各々の濃度を測定した。(ヒトLeptin測定キット<JIMRO>)

5 統計処理

得られたデータの処理はMann-Whitney's U testにより検定し、危険率0.05未満をもって有意と判定した。

表1 対象の概要

	年齢	BMI	LH	E ₂	テストステロン
control n=7	34.4±5.2	21.8±3.4	1.83±0.72	100.0±58.8	0.51±0.36
PCOS n=8	30.6±2.8	23.0±4.0	12.4±5.23	43.7±12.5	0.82±0.41
P	0.096	0.566	0.0001	0.020	0.153

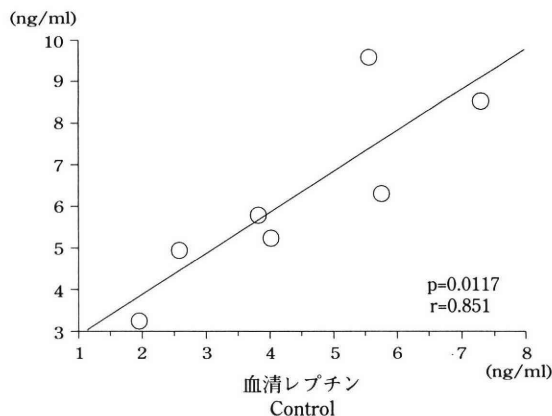
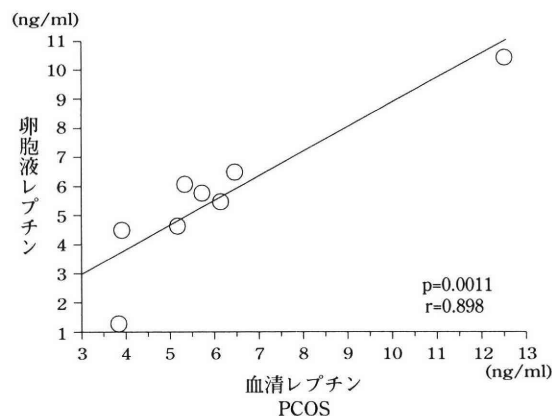


図1 血清レプチン濃度と卵胞液レプチン濃度の相関

結 果

1 血清レプチン濃度と卵胞液レプチン濃度の相関関係(図1)

卵胞液レプチン濃度に対する血清レプチン濃度の相関関係を検討した。コントロール群では相関係数が0.851($p=0.0012$)であったのに対し、PCOS群では相関係数が0.898($p=0.0011$)であった。卵胞液レプチン濃度と血清レプチン濃度は、コントロール群とPCOS群において共に有意で強い相関を有することが明らかとなった。

2 血清レプチン濃度(図2)

正常群の血清レプチン濃度は $4.394 \pm 1.846 \text{ ng/ml}$ に対し、PCOS群の血清レプチン濃度は $6.062 \pm 2.720 \text{ ng/ml}$ でPCOS群で、2群間に有意差を認めなかった($p=0.247$)。

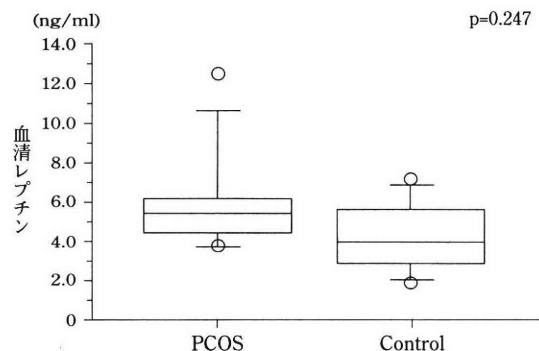


図2 血清レプチン濃度の比較

3 卵胞液レプチン濃度(図3)

正常群の卵胞液レプチン濃度は $6.163 \pm 2.104 \text{ ng/ml}$ であったのに対し、PCOS群では $5.556 \pm 2.537 \text{ ng/ml}$

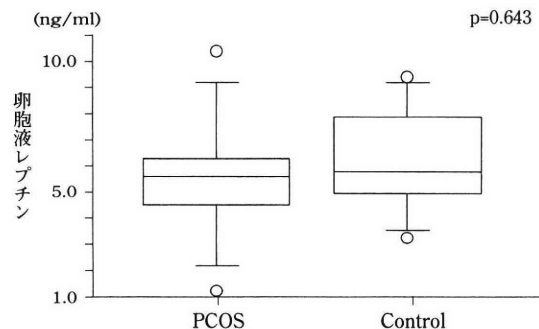


図3 卵胞液レプチン濃度の比較

で、PCOS群でやや低い傾向を示したが、2群間には有意差を認めなかった($p=0.643$)。

4 卵胞液レプチン濃度/血清レプチン濃度比(図4)

GCに対する影響因子として、卵胞液および血清が挙げられるが、各々のレプチン濃度バランスを比較するため、卵胞レプチン濃度を血清レプチン濃度で除した値を検討した。正常群では、 1.476 ± 0.299 であったのに対しPCOS群では 0.912 ± 0.264 であり、危険率は0.0038であった。これにより、PCOS群において卵胞液レプチン濃度/血清レプチン濃度比が有意に低いことが判明した。

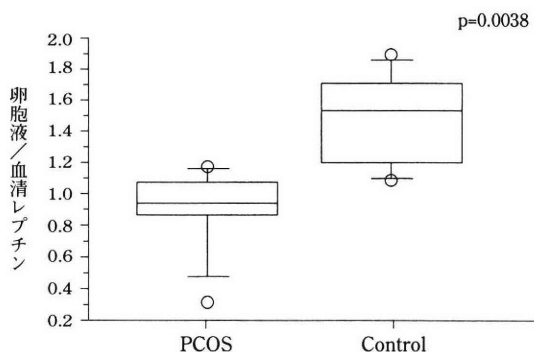


図4 卵胞液/血清レプチン

考 察

PCOSとレプチンに関するこれまでの報告では、血清レプチンと体脂肪に関する報告が多く、PCOSにおいて血清レプチンが有意に上昇しているとする報告¹⁰⁾や、健常者と有意差を認めないとする報告¹¹⁾もあり、まとまった見解は得られていない。現在のところ、血清レプチン濃度は体脂肪量によって規定されるとみなされており、肥満合併PCOS症例を対象とした報告では肥満によるbiasが生じるため、PCOS本来の病態を反映しているとは考えにくい。また、本邦のPCOS婦人の肥満合併率は10~20%と欧米に比べ低く、肥満によるレプチン濃度の偏りを是制するため、今回の検討ではBMIが26.5以下の非肥満者を対象とした。

PCOSの外科的治療法に卵巣蒸散術があり、この卵巣のみに対する手術によって、PCOSのホルモン状態が改善され自然排卵周期が得られる。このことからPCOSの病因が卵巣局所にも存在し、しかもそれは卵胞内環境、つまり顆粒膜細胞と卵胞液に起因することが考えられる。PCOSとレプチンに関し、

卵胞液についての検討は未だ報告されておらず、今回我々は、血清と卵胞液に着目し各々のレプチン濃度を測定した。その結果、血清レプチン濃度および卵胞液レプチン濃度はPCOSとコントロールでは共に有意差を認めず、また卵胞液/血清レプチン濃度比を検討したところ、PCOS群において有意に低いという結果を得た。

今回の検討の仮説として、*in vitro*のGC培養実験^{8,9)}の結果からPCOSでは、血清レプチン濃度あるいはとくに卵胞液レプチン濃度が正常婦人と比べ高濃度になっているため、その卵胞発育を抑制しているのではないかと考えた。しかし、結果は血清および卵胞液レプチン濃度には有意差を認めず、またPCOSでは卵胞液中レプチンの血清中に対する相対的値も決して高くはなくむしろ低値を示した。以上のことから、PCOSでの卵胞内局所のレプチン産生増加がその病態にかかわっている可能性は低く、PCOSではGCのレプチン分泌低下或いは卵胞内へのレプチン透過性低下が起こっている可能性が考えられた。

今後はE₂濃度やIGF-1濃度とレプチンとの検討やPCOS患者のGC培養実験等多角的な検討が望まれる。

本論文の要旨は第44回日本不妊学会学術講演会において発表した。

文 献

- 1) Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372:425-432
- 2) Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. (1995) Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nature Med* 1:1155-1161
- 3) Chehab FF, Mounzih K, Lu R, et al. (1997) Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. *Science* 275:88-90
- 4) Strobel A, Issad T, Camoin L, et al. (1998) A leptin missense mutation associated with hypogonadism and morbid obesity. *Nature Genet* 18:213-215
- 5) Michael A, Jonathan VB and Andrew C (1997) A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor- β 2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum Reprod* 12:2226-2234
- 6) Karlsson C, Lindell K, Svensson E, et al. (1997) Expression of functional leptin receptors in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4144-4148
- 7) Takayama K, Fukaya T, Sasano H, et al. (1996) Immunohistochemical study of steroidogenesis and cell proliferation in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 11:1387-1392
- 8) Rob JZ and Denis AM (1997) Direct intraovarian effects of insulin-like growth factor-1 on follicle-stimulating hormone-dependent estradiol-17 β production by rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology* 138:847-850
- 9) Sanjay KA, Klara V, Stacy R, et al. (1999) Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-1 augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1072-1076
- 10) Brzechffa PR, Jakimiuk AJ, Agarwal SK, et al. (1996) Serum immunoreactive Leptin concentration in women with polycystic ovarian disease. *J Clin Endocrinol Metab* 81:4166-4169
- 11) Christos SM, Andrea D and Jeffery SF (1997) Leptin concentrations in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1687-1691

(受付：2000年2月14日)

(受理：2000年3月23日)

**A Comparative Study between Serum Leptin and
Follicular Fluid Leptin Levels in Women with Polycystic Ovary Syndrome**

Hiromitsu Yuki, Takashi Murakami, Tadashi Watanabe,
Rei Yokomizo, Kunihiro Okamura and Akira Yajima

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Tohoku University, Sendai 980-0872, Japan

This study was conducted to assess the leptin concentrations of serum and follicular fluid (FF) in anovulatory women with polycystic ovary syndrome (PCOS). Control women (n=7) were not obese (BMI $\leq$ 26.5), had normal menstrual cycle, but no endocrinological diseases. Non-obese PCOS patients (n=8) were diagnosed by LH elevation, amenorrhea, and ultrasonographic PCO. After we obtained their informed consent, blood samples and FF were obtained during operations. Both serum and FF leptin concentrations were measured by ELISA.

1) A strongly positive correlation was seen between serum and FF leptin concentrations in both groups. 2) Serum and FF leptin concentrations were not different between the control and PCOS groups. 3) The ratio of leptin concentration of FF to serum leptin concentration was significantly lower in the PCOS group. These results indicate that FF leptin concentration relative to serum level significantly decreased in the PCOS group. Our results suggest that a high leptin level in follicular fluid does not contribute to the pathogenesis of PCOS and that there is an unbalanced state of serum-FF leptin concentration in PCOS. In conclusion, PCOS ovarian granulosa cells may produce less leptin than the normal level, or the leptin transport capacity may be lower in women with PCOS.

Key word: polycystic ovary syndrome (PCOS), serum leptin, follicular leptin

(Jpn J Fertil Steril 45:197-201 2000)

子宮内膜症に対する低用量ダナゾール長期治療の臨床効果と 骨密度への影響

Clinical Effect and Change in Bone Mineral Density by Long-term, Low-dose Danazol in Women with Endometriosis

安 達 知 子

Tomoko ADACHI

斉 藤 理 恵

Rie SAITO

塩之入 亜 矢

Aya SHIONOIRI

太 田 博 明

Hiroaki OHTA

東京女子医科大学産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokyo Women's Medical University, Tokyo 162-8666, Japan

子宮内膜症(以下、内膜症)に対する低用量ダナゾール長期療法の臨床効果と骨密度への影響を検討した。本治療に同意を得て1年以上行った患者は15例で、治療開始時年齢は28~46歳であった。15例の内訳は、3例は子宮全摘出後の内膜症で、残りの12例は子宮腺筋症7例、卵巣チョコレート嚢胞7例(両者の合併3例)、月経随伴性気胸1例であった。低用量ダナゾール治療は原則として、400mg/日4週間、200mg/日4週間後、100mg/日を継続した。治療導入1年以上たった任意の時期(27.1 ± 8.8 カ月, $M \pm SD$)に、血中ホルモン値およびDEXA法による腰椎2-4の骨密度を測定した。すべての症例に疼痛をはじめとする月経に随伴する諸症状の消失または軽減を認め、内膜症病変の増悪はなかった。月経は、過少月経となり、ほとんどの症例で20~40日型の周期となった。 E_2 は 149.4 ± 90.3 pg/mlと高値、テストステロン(T)は正常範囲、free-Tは高く、SHBGは低値を示した。骨密度は同年齢の正常女性の平均値を100%として計算すると、 $101.3 \pm 10.3\%$ と高い値を維持した。以上より、長期の低用量ダナゾール治療は有効で安全性が高く、GnRHa治療と異なり血中 E_2 、free-Tが高値であり、高い骨密度が維持された。

キーワード：低用量ダナゾール長期治療、子宮内膜症、血中ホルモン、骨密度

(日不妊誌 45:203-210 2000)

緒 言

子宮内膜症、子宮腺筋症は生殖年齢の女性に好発し、女性の社会生活に対し、月経痛を初めとする月経随伴症状と、不妊症のふたつの重要な障害を引き起こす。治療としては、エストロゲン依存性の疾患であることと、基本的には悪性腫瘍でないことから、ホルモン療法を第一選択とする施設も多い。また、近年の腹腔鏡手術の発達とともに、比較的低侵襲で外科的手術を行うことが可能となり、個々の症

例に応じた治療法を施設ごとに計画して行っているのが現状である。一方、本疾患は完治が難しく、再発、再燃がきわめてしばしば認められ、とくに、挙児を希望しない女性にとっては、疼痛や月経随伴症状への対応が最も解決されなければならない問題であるが、従来のホルモン療法や対症療法のみでは限界がある。すなわち、汎用されるGnRHアナログ(GnRHa)治療はその低エストロゲン状態により、更年期様症状や骨密度の低下^{1,2)}がおりやすく、治療期間を6カ月以内と限定するのが通常である。ダナ

ゾールも400mg/日の投与は、体重増加をきたすことが好まれず、また、種々の程度の男性化症状(アクネ、多毛、声の低音化)、脂質代謝異常や肝機能障害を代表とする副作用³⁾により、長期間継続するのは難しい。そこで、我々は、子宮内膜症の再発、再燃症例で、月経随伴症状が強く、すでに開腹手術の既往のある症例や外科的処置を望まない症例で、挙児希望のないものに対し、低用量ダナゾール治療(100mg/日)を行っている。本研究では、低用量ダナゾール長期治療の治療効果、月経状況、血中ホルモンの状態と骨密度への影響、副作用などを評価し、とくに、本治療による骨密度への影響をホルモン分析から検討した。

対象および方法

対象は子宮内膜症または強い月経随伴症状のため、通常の社会生活を送ることに不安があり、本治療を希望した15症例で、平成7年1月から11年12月までに本治療を少なくとも1年以上行っている症例である。治療開始年齢は、28～46歳(38.5±5.3歳；M±SD)である。

15例の臨床背景を表1に示した。症例の内訳は、11例が開腹手術または画像にて診断した子宮腺筋症7例および卵巣チョコレート嚢胞7例(両者の合併3例)、3例は子宮全摘出(TAH)後の子宮内膜症で、残りの1例は月経随伴性気胸であった。子宮腺筋症および卵巣チョコレート嚢胞(径6cm以下)の11例はいずれも月経困難症が著明であった。TAH後の3例のう

ち、症例8、10は骨盤内子宮内膜症で、月経周期に一致した激しい腰痛、腹痛、排便痛のみられる症例であった。また、症例15は腔壁子宮内膜症例で、基礎体温上月経周期に一致した性器出血を認めるものであった。症例11は月経随伴性気胸で、月経周期に一致した気胸を8回反復し、胸腔鏡下手術を行ったが、切除肺嚢胞の組織検査からは明らかな子宮内膜症の所見は得られなかった。しかし、手術後も月経に随伴した気胸を反復した症例であった。

過去にGnRHa治療が行なわれていたものは10症例で、4～6カ月を1クールとして、1～6クール、のべ6～34カ月行われており、治療後も上記自覚症状が再燃していた。なお、GnRHa治療終了から休薬期間を置かずに本研究に入ったものは4例、6カ月以内に入ったものは2例、12カ月以内は2例、1年以上が2例であった。

低用量ダナゾール治療は原則として、月経周期1～3日より400mg/日を4週間、200mg/日を4週間後、100mg/日を継続し、TAH後の症例およびGnRHa治療後に休薬期間をおかなかった症例ははじめから100mg/日のダナゾールを投与した。

観察項目として、月経随伴症状や子宮内膜症の自他覚所見(内診、エコー検査、CA125値を含む)、月経の状態および不正出血の有無、体重増加、男性化徴候(アクネ、多毛など)の有無、骨塩量(BMD)などを検討した。CA125値およびBMDについては、表1の対象の背景にも示したごとく、手術やGnRHa治療をはじめとする多様な治療の既往があるため、本研

表1 対象の臨床背景

症例	年齢	BMI (m/kg ²)	既往GnRHa 治療期間(カ月)	GnRHa終了 からD開始(カ月)	D100mg/日* 治療期間(カ月)	病 名	開腹既往
1	44	21.1	22	0	38	卵巣嚢胞	(－)
2	35	24.0	8	0	38	卵巣嚢胞	(＋)
3	42	22.8	19	0	24	腺筋症	(－)
4	39	19.8	0	(－)	19	卵巣嚢胞	(＋)
5	41	22.4	8	8	22	腺筋症＋卵巣嚢胞	(－)
6	35	20.4	12	0	32	卵巣嚢胞	(－)
7	30	22.6	0	(－)	18	腺筋症＋卵巣嚢胞	(－)
8	44	20.1	20	12<	24	TAH後内膜症	(＋), TAH
9	46	20.1	0	(－)	36	腺筋症	(－)
10	39	23.1	6	6	24	TAH後内膜症	(＋), TAH
11	28	20.5	0	(－)	25	月経随伴性気胸	(－), 開胸
12	38	22.0	6	12<	20	腺筋症	(＋)
13	36	20.3	12	4	31	腺筋症＋卵巣嚢胞	(＋)
14	36	22.0	34	10	12	腺筋症	(＋)
15	45	18.4	0	(－)	43	TAH後腔壁内膜症	(＋), TAH

D：ダナゾール治療、*：症例1～12は、骨密度測定までのダナゾール100mg/日投与期間
卵巣嚢胞；卵巣チョコレート嚢胞、腺筋症；子宮腺筋症、TAH；腹式子宮全摘出術

究直前の値は対照値とはなりえない。従って、CA125およびBMDは本治療による変動を評価する代わりに、治療導入後平均 27.1 ± 8.8 カ月(M $\pm$ SD)を経過した時点(治療を開始後の任意の時期)の1点で示した。その他、同時期に、血算、肝機能を中心とした血液生化学、脂質代謝(総コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪)の測定を全例に、12例(症例1→12)に血中ホルモン値、経腔エコーによる卵胞径を測定した。なお、血中ホルモン値は、LH、FSH、エストラジオール(E₂)はEIA(EテストTOSOH 2, 東ソー株式会社)で、テストステロン(T)、free-TはRIA(それぞれ、トータル・テストステロンキット、DPC・フリーテストステロンキット；日本DPCコーポレーション)で、性ホルモン結合グロブリン(SHBG)は時間分解蛍光イムノアッセイ(Time Resolved Fluoro Immuno Assay; TR-FIA) (DELFLIA SHBGキット；ファルマシア社)で測定し、BMDは二重エネルギーX線吸収法(dual energy X-ray absorptiometry; DEXA法) (QDR-2000, Hologic社製造、東洋メディック社販売)による腰椎2-4の前後方向スキャンおよび側面方向のスキャンでの測定値を、同年齢の正常女性の測定平均値を100%とした相対値で表示した。

結 果

1 月経随伴症状、子宮内膜症の自他覚症状(表2)

すべての症例に疼痛をはじめとする月経に随伴する諸症状の消失または著明な軽減を認めた。なお、

腔壁子宮内膜症の症例は周期的性器出血が消失し、月経随伴性気胸の症例も気胸を発生しなくなった。

子宮腺筋症および卵巣チョコレート嚢胞の11例の内、両者を合併している症例5のみ、子宮腺筋症の軽度増大を認めたが、この症例の卵巣チョコレート嚢胞は縮小していた。残りの10例では、病巣の軽度縮小ないしは少なくとも増大はみられなかった。

CA125値は、全例正常範囲(35U/ml以下)を示した。

2 月経周期および状況(表2)

TAH症例を除く12例の月経は、100mg/日に導入した3カ月以内はしばしば不正性器出血を認めたが、その後20～40日周期の過少月経となり、2例はさらに希発月経となり、そのうち1例は4カ月以上の無月経となった。希発月経～無月経となった症例は、症例1、9であった。不正出血(spotting)は、症例11と12にのみ認めたが、その頻度は極めて少なかった。

3 血中ホルモン値および卵胞径

表3に12症例の血中ホルモン値を示した。続発無月経となった2例は、FSH値が、72.0および83.5mIU/mlと高く、採血時の年齢は47歳と49歳(治療開始時年齢は44歳と46歳)であった。また、この2例を除く、10例のホルモン値のM $\pm$ SDは、FSHは 8.4 ± 4.3 mIU/ml、LHは 3.2 ± 1.3 mIU/ml、E₂は 149.4 ± 90.3 pg/ml、Tは正常範囲、SHBGは低値を示し、free-Tは高値を示した。また、卵胞径は 18.3 ± 8.5 mm

表2 本治療による自他覚症状の変化

症例	年齢	病名	自覚症状	病巣への効果 (増大↑縮小↓不変→)	月経周期	CA125値 (U/ml)	体重増加
1	44	卵巣嚢胞	著明改善	軽度↓	60—95日	20	0
2	35	卵巣嚢胞	著明改善	軽度↓	20—40日	8	≤1kg
3	42	腺筋症	著明改善	軽度↓	35日型	18	0
4	39	卵巣嚢胞	著明改善	軽度↓	30—40日	20	0
5	41	腺筋症+卵巣嚢胞	著明改善	腺筋症軽度↑、嚢胞↓	28日型	24	0
6	35	卵巣嚢胞	著明改善	→	30—40日	7	0
7	30	腺筋症+卵巣嚢胞	著明改善	軽度↓	30日型	31	0
8	44	TAH後内膜症	著明改善	評価不可	なし(TAH)	5	0
9	46	腺筋症	著明改善	→	希発→無月経	5	≤1kg
10	39	TAH後内膜症	著明改善	評価不可	なし(TAH)	8	3—4kg
11	28	月経随伴性気胸	著明改善	気胸(—)	30日型*	5	0
12	38	腺筋症	著明改善	→	22—36日*	17	3—4kg
13	36	腺筋症+卵巣嚢胞	著明改善	腺筋症→、嚢胞軽度↓	30—40日	5	0
14	36	腺筋症	著明改善	→	40日型	19	0
15	45	TAH後腔壁内膜症	著明改善	腔硬結↓	なし(TAH)	19	≤1kg

*；時に少量不正出血がみられる。TAH；腹式単純子宮全摘出術

表3 低用量ダナゾール治療中の血中ホルモン値

FSH (3.4~13.9mIU/ml)a	19.9±27.4 (8.4±4.3)b
LH (1.1~18.3mIU/ml)a	8.2±12.3 (3.2±1.3)b
E ₂ (40.7~220.4pg/ml)a	186.5±59.2
T (10~60ng/dl)	28.5±16.4
fT (<3pg/ml)	16.2±9.4
SHBG (20~100nmol/l)	13.0±4.9

()は単位および正常値, a; 卵胞期の正常値 M±SD; n=12, b; 症例1と9を除くn=10

E₂; エストラジオール, T; テストステロン,

fT; free-テストステロン, SHBG; 性ステロイド結合グロブリン

表4 血算、脂質代謝および肝機能への影響

白血球数	(5000~8000/ μ l)	6295±1422
ヘマトクリット	(35~43%)	41.7±2.5
ヘモグロビン	(12~16g/dl)	14.0±0.8
血小板数	(15~35×10 ⁴ / μ l)	21.7±5.3
総コレステロール	(120~219mg/dl)	179.6±38.2
HDLコレステロール	(50~72mg/dl)	52.0±11.7
中性脂肪	(40~149mg/dl)	60.9±30.4
AST	(10~31IU/l)	20.0±3.5
ALT	(4~31IU/l)	18.0±9.9

()は正常値および単位

M±SD, n=15

であった。基礎体温の記録は、TAH後の3症例、症例11の月経随伴性気胸、症例12の子宮筋症症例の計5例に行ったが、5例共に本治療中は低温一相性を示した。

4 血算および血液生化学への影響

表4に血算、脂質代謝および肝機能の数値を示した。過少月経となるため、貧血例はなく、白血球および血小板数も正常範囲であった。総コレステロール値および中性脂肪は正常範囲であったが、HDLコレステロール値は正常範囲の下限を示した。なお、ASL, ALTの上昇は全く認めなかった。

5 男性化徴候および体重増加の副作用

男性化徴候として多毛、アクネや明らかな声の低音化は認めなかった。体重増加については、ダナゾール100mg/日に維持する前の、400~200mg/日投与中に2~3kgの体重増加を認めた症例はあったが、低用量ダナゾールを1年以上継続した時点では、最終的に3~4kgの増加を2例に、1kg以内の増加を3例に認めたが、残りの10例に体重増加は認めず、平均体重増加は0.75±1.34kgであった(表2)。

6 骨密度への影響

図1にダナゾール治療期間と骨密度の関係(腰椎の前後方向スキャン)を示したが、両者の間に相関($r=0.212$)はなかった。同様に、データは示さないが、ダナゾール治療期間と腰椎側面方向のBMDとの間にも相関($r=0.000$)はなかった。また、治療導入1年以上たった任意の時期(27.1±8.8カ月, M±SD)におけるBMDは同年齢の正常女性に比較して、腰椎前後方向スキャンの相対値で101.3±10.3%, 腰椎側面方向スキャンの相対値で103.3±10.4%と高い値を示し、前後方向と側面方向の評価には大きな差はな

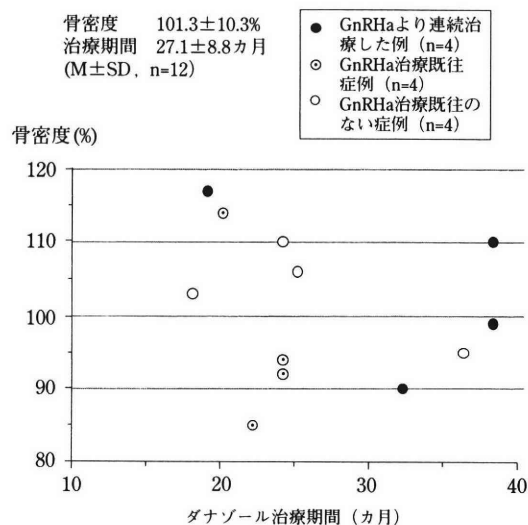


図1 腰椎前後方向スキャンによる骨密度と本治療期間との関係

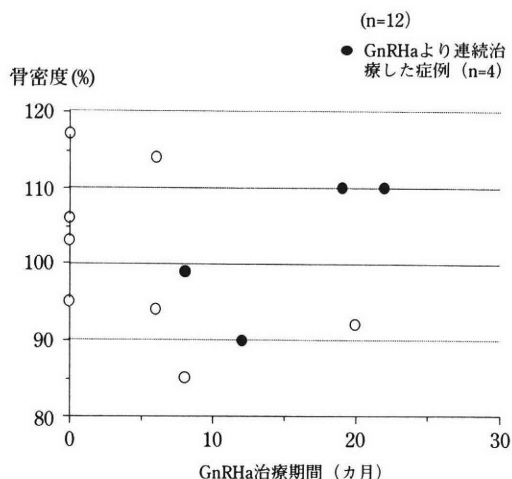


図2 GnRHa既往治療期間と本治療中の骨密度との関係(骨密度は腰椎前後方向スキャンの相対値で示す)

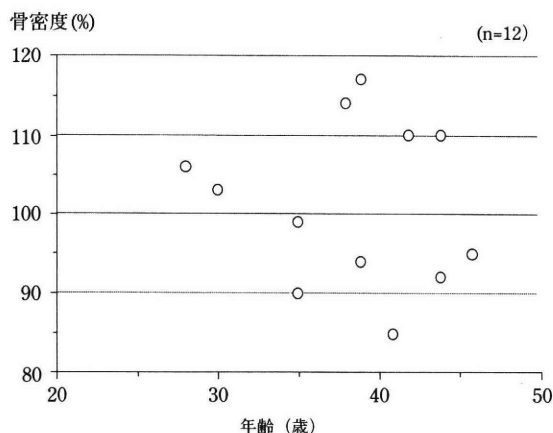


図3 本治療症例の年齢と骨密度との関係
(骨密度は腰椎前後方向スキャンの相対値で示す)

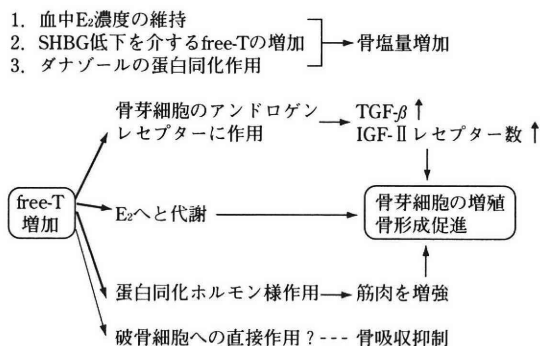


図4 低用量ダナゾールの骨量に対する作用

かった。また、過去のGnRHa治療との関係では、GnRHa治療期間と骨密度との間に相関($r=0.084$)はなく(図2)、さらにGnRHa治療終了から本治療までの期間との間にも明らかな関係は認めなかった。加齢によって本治療の骨密度へ与える影響の差をみるため、症例の年齢と本治療中の骨密度(相対値)との関係を検討したが(図3)、加齢に伴う影響は認められなかった。

考 察

ダナゾールの段階的減量ないしは低用量治療は以前より試みられてきた方法であり、1日量400mgを数カ月続けて200mgを継続する方法^{4,5)}、50~100mgの投与量で維持するもの⁶⁻⁸⁾やGnRHaと組み合わせた方法^{8,9)}など種々のバリエーションがみられている。しかし、1年以上の長期低用量治療の報告は極めて少なく⁸⁾、有効性や副作用についての検討は十分でな

い。

子宮内膜症病変への効果としては、Beecham分類での軽度改善や、子宮の大きさがやや縮小するなどの報告はみられるものの、その効果は400mg/日投与と比較して不十分である⁸⁾。従って、低用量ダナゾールの最も期待される治療効果は、月経困難症や過多月経などに対するものであり、50~100mg/日の投与でこれらの症状は明らかに軽減されており⁶⁻¹⁰⁾、さらに、柳沼ら⁷⁾は50mg/日に比較して、100mg/日投与でより効果があると報告している。ダナゾールの400mg/日投与中は、無月経を導入することにより月経に伴う症状が消失するが、低用量ダナゾールでは、少量の月経様出血をみながら、その月経随伴症状が軽減されている。しかし、ダナゾールの減量に伴い不正出血の出現がみられ^{4,6)}、これがしばしば女性のQuality of lifeを低下させ、長期治療に耐えられないことも多いのが現状である。

我々の研究では、ダナゾールを100mg/日に導入した3カ月以内はしばしば不正性器出血を認めた。しかし、その後20~40日周期の比較的規則正しい過少月経となった。2例はさらに希発月経や無月経となったが、この2例のみFSH値が極めて高値を示したことから加齢に伴う卵巣機能低下による無月経と考えられた。最終的に2例にspottingとして少量の血性帯下を時に見たが、頻度が少ないことおよび月経随伴症状の消失によるQOLの改善が著しいため、患者の希望により引き続き本治療を行っている。

本研究で子宮内膜症への効果として、子宮腺筋症および卵巣チョコレート嚢胞は他の報告^{8,9)}と同様、著明な縮小効果はなかった。しかし、少なくとも明らかな増大はなく、CA125値も全例正常範囲であり、子宮内膜症が増悪している所見はなかった。

次に、体重増加については、今回の対象では、高用量から漸減していくためか、初期に多少の体重の変動は認められたものの、最終的に体重増加を認めない症例は15例中10例、67%であり、平均体重増加は0.75kgであった。これはLauersenらの報告¹¹⁾とほぼ同様である。なお、Lauersenら¹¹⁾は、200mg/日で4kg、100mg/日で0.5kg、50mg/日で0.4kgの平均体重増加を、本邦1981年の報告¹²⁾では、400mg/日で6kg、200mg/日で4kgの平均体重増加を報告している。

なお、種々の男性化症状や肝機能障害はなかった。脂質代謝異常については、400mg/日投与や200mg/日投与ではHDLコレステロールの低下⁵⁾が報告されているが、今回の検討では、正常値下限に留

まっており、100mg/日長期投与治療での副作用は少ないといえる。

血中ホルモン値については、先に述べた無月経の2例を除き、FSH値は卵胞期初期レベルを、LHも同様ないしはやや低値を示した。一般に、ダナゾールは低エストロゲン+高アンドロゲン環境を誘導するといわれ、 E_2 値は400mg/日で30~70pg/ml、200mg/日でも同様の値を示すとの報告⁴⁾があるが、本研究の100mg/日では、卵胞期後期から排卵前期にあたる予想外の高値(149.4pg/ml)を示した。従って、本治療中の血中 E_2 はかなり上昇しており、このホルモン値からは子宮内膜症病変に対する増悪作用も懸念される。しかし、ダナゾールは複雑な作用機序を有しており¹³⁾、低エストロゲン状態をつくらなくても、子宮内膜症に対する治療効果を持っているため、本対象は子宮内膜症の増悪をみとめなかったものと考ええる。一方、経膈エコーで測定した卵胞径は18.3mmであった。血中の E_2 値はこの卵胞径から予想する値と合致するといえる。そのため、これらの発育卵胞が治療期間中に排卵する可能性が十分考えられる。低用量ダナゾール治療中の排卵の報告としては、50mg/日投与中の21例中11例⁶⁾、18例中15例⁷⁾、100mg/日投与中の10例中5例⁷⁾に少なくとも1回以上の排卵が認められている。また、治療中の妊娠例の報告¹¹⁾もみられていることから、本研究の5例で記録した基礎体温は低温一相性を示してはいるものの、治療中の排卵、妊娠の可能性を考慮した避妊指導は必ず行わなければならない。また、Tは正常範囲であったが、SHBGは低値を示し、free-Tは高値を示した。しかし、ダナゾール400~200mg/日投与中で報告⁴⁾されているSHBG(10nmol/l)およびfree-T(20~30pg/ml)に比較して、本研究では前者は高く、後者は低い値であった。従って、100mg/日投与は、通常投与量のダナゾール経口治療に比較して、高アンドロゲン状態の形成は弱いと考えられ、これは、体重増加やアクネをはじめとする男性化徴候が認められにくかったこととも合致する所見である。

ダナゾールの骨密度への影響としては多くの報告があり、骨密度は増加しつつも有意な変動ではないという報告^{2,14,15)}、有意に増加するという報告¹⁶⁾、低下傾向はあっても有意な変動ではないとする報告¹⁷⁾、低下するという報告¹⁸⁾がみられている。これらの評価には、BMDの評価方法、人種による差、年齢による差などの影響があり、同一基準による評価は難しいが、大多数の報告をまとめると、GnRHaに比較して、ダナゾール治療はBMDの減少は認めにくいと結

論できる。その機序としては、エストロゲン低下が比較的緩徐であるため、骨吸収がおきにくい、その根拠として骨吸収マーカーの有意な上昇がおきていない、また、ダナゾールそれ自体の持つ蛋白同化作用により、骨格筋を増強させ骨の支持機構の強化(筋肉による骨への荷重の増加による間接的な骨形成の促進)がおきる、などの説^{17,19)}が考えられている。さらに、ダナゾールによって、free-Tが増加するが、Tは従来、蛋白同化作用のほか、アロマトーゼによって E_2 に代謝されることにより、 E_2 を介して骨代謝に影響すると考えられていた。しかし、近年、骨芽細胞のアンドロゲンレセプターの報告²⁰⁾がなされ、Tの骨形成促進作用は、アンドロゲンレセプターを介した直接作用が主体であると考えられてきている^{20,21)}、アンドロゲンレセプターに結合することにより、骨芽細胞の形質転換成長因子(TGF)- β の産生促進²²⁾、インスリン様成長因子(IGF)-IIのレセプター数を増加させ²³⁾、また、線維芽細胞成長因子(FGF)への感受性を増加させる²³⁾ことにより、骨形成作用に促進的に働くと考えられている。さらに、アンドロゲンの破骨細胞への直接作用(骨吸収の抑制)の可能性も示唆されている²⁴⁾。図5に低用量ダナゾールのBMDに対する作用をまとめた。本研究では、十分に低用量ダナゾールの作用を受けたと考えられる時期にBMDを評価したが、正常健康同年齢の女性に比較して、平均値で100%以上を示したことより、本治療はBMDをやや増加させる可能性が示された。なお、低値を示した症例、高値を示した症例について、本治療の期間、既往GnRHa治療の影響や年齢因子を考慮した検討をおこなったが、明らかな関連はなかった。今後も、さらに本治療を継続した際のBMDの変化など、長期治療の影響を検討していく必要がある。

最後に、ダナゾール使用中の血栓症(頻度:1.6/10万人²⁵⁾)が報告^{4,26,27)}されていることから、ダナゾール治療中の内膜症患者の血液凝固学的性状について現在までの知見をまとめた。種々の報告があり、凝固系に関しては、第XIII因子、第IX因子の増加の報告²⁸⁾もあるが、凝固系の上昇はないとする報告^{4,26,29)}が多い。むしろ、アンチトロンビン(AT)-IIIをふくめてプロテインC,Sなどの凝固制御系(抗血栓因子)が上昇するとの報告²⁹⁻³⁵⁾が多く、一方、これらの抗血栓因子の変動も正常範囲であるとする報告⁴⁾もある。総じて、凝固線溶系の有意な変動の報告は、ダナゾールの投与量が600~800mg/日などの高用量のものであり、減量により変動が低下している。一

方、血算に関しては、血小板数の増加はないとする報告^{29,31)}もあるが、血小板数および血小板凝集能の上昇、ヘモグロビン、ヘマトクリット値の明らかな増加の報告^{27,35,36)}は多く、一般に、ヘマトクリット45%以上、血小板数40万/ μ l以上は、血栓症のリスク因子となりうる³⁷⁾ことから注意を要する。本研究では凝固線溶系の測定(活性化部分トロンボプラスチン時間、AT-Ⅲ、トロンビン-AT-Ⅲ複合体、FDP)は一部の症例に対してしか行われていないが(データは示していないが、その値は正常範囲にあった)、100mg/日と低用量の治療では、血液凝固線溶系の変動は少ないことが推測される。さらに、今回の検討で、ヘマトクリット値や血小板数も正常範囲にあり、脂質代謝への影響も少なかったことから、血栓症に対する安全性は高いと考えられる。しかし、本治療を行うに当たり、低用量治療とはいえども、血栓症関連の家族歴や既往歴のスクリーニングを行うなど、ダナゾールの添付文書³⁷⁾に記載されている注意事項に従い、禁忌対象は除外すべきである。

本論文の要旨は、第44回日本不妊学会(1999年11月、東京)で報告した。

文 献

- Devogelaer JP, Nagant de DC, Donnez J, et al. (1987) LHRH analogues and bone loss[letter]. *Lancet* 1:1798-1798
- Dawood MY, Lewis V, Ramos J, et al. (1989) Cortical and trabecular bone mineral content in women with endometriosis: Effect of gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol. *Fertil Steril* 52: 21-26
- Spooner JB (1977) Classification of side-effects to danazol therapy. *J Int Med Res* 5:15-17
- 松尾博哉, 山辺晋吾, 大谷徹郎 他(1998) 子宮内膜症ならびに子宮腺筋症に対するDanazol新二段階投与法の臨床評価—多施設における検討—。産と婦 65:1822-1832
- 徳岡 普, 水本賀文, 石川尚顕 他(1995) 当院における子宮内膜症に対するDanazolの二段投与療法の試み。エンドメトリオーシス研究会会誌 16: 126-129
- Vercellini P, Trespidi L, Panazza S, et al. (1994) Very low dose danazol for relief endometriosis-associated pelvic pain: a pilot study. *Fertil Steril* 62: 1136-1142
- 柳沼 恣, 岡村 隆, 竹内 亨 他(1987) 月経困難症と月経過多症に対する低用量Bonazolの効果。日不妊会誌 32:581-587
- 坂本和利, 古山準一, 古堂俊哉 他(1993) 子宮内膜症に対するダナゾール長期少量漸減療法についての検討。エンドメトリオーシス研究会会誌 14: 56-61
- Morgante G, Ditto A, La Marca A, et al. (1999) Low-dose danazol after combined surgical and medical therapy reduces the incidence of pelvic pain in women with moderate and severe endometriosis. *Hum Reprod* 14:2371-2374
- Moore EE, Harger JH, Rock JA, et al. (1981) Management of pelvic endometriosis with low-dose danazol. *Fertil Steril* 36:15-19
- Lauersen NH, Wilson KH (1977) Evaluation of danazol as an oral contraceptive. *Obstet Gynecol* 50:91-96
- Danazol研究会(1981) Danazolの子宮内膜症に対する臨床評価。産と婦 48:1809-1832
- Taketani Y, Yano T, Osuga Y(1994) Hormone therapy for endometriosis. *Asian Med J* 37:448-454
- Tummon IS, Ali A, Pepping ME, et al. (1988) Bone mineral density in women with endometriosis before and during ovarian suppression with gonadotropin-releasing hormone agonists or danazol. *Fertil Steril* 49:792-796
- 出口 純, 浜本 保(1992) ダナゾールとブセレリンによる骨密度への影響(QCT法による検討)。エンドメトリオーシス研究会会誌 13:170-173
- Whitehouse RW, Adams KE, Bancroft K, et al. (1990) The effects of nafarelin and danazol on vertebral trabecular bone mass in patients with endometriosis. *Clin Endocrinol* 33:365-373
- 佐本玲子, 森川 肇, 小原範之 他(1993) 子宮内膜症患者に対するダナゾールならびにスプレキュア投与時におけるカルシウム代謝および骨代謝動態の検討。産婦の進歩 45:1-10
- 田中博之, 川合健之, 木口幹雄(1991) 子宮内膜症に対する偽閉経療法に伴う骨量減少についての検討—DIP法を用いて—。エンドメトリオーシス研究会会誌 12:394-399
- Purdie DW, Hay A, Abbas SK, et al. (1987) Effects of danazol on mineral homeostasis in normal postmenopausal women; preliminary communication. *J Roy Soc Med* 80:681-682
- Oursler MJ, Kassem M, Riggs BL, et al. (1996) Regulation of bone cell function by gonadal steroids. In Marcus R, Feldman D, Kelsey J, et al. (eds), 1st ed, *Osteoporosis*. Academic Press, San Diego, pp237-260
- 水野有三(1999) その他-蛋白同化ホルモンなど。最新骨粗鬆症 下。折茂肇編, 第1版, ライフサイエンス出版, 東京, pp513-518
- Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, et al. (1991)

- High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(1)-procollagen and transforming growth factor-beta steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinol* 128: 2723-2730
- 23) Kasperk C, Fitzsimmons R, Strong D, et al. (1990) Studies of the mechanism by which androgens enhance mitogenesis and differentiation in bone cells. *J Clin Endocrinol Metab* 71:1322-1329
- 24) Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, et al. (1994) Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int* 54:325-326
- 25) 北村邦夫(1996) ピルと血栓症. *臨婦産* 50:1308-1311
- 26) 新井麻美子, 松浦豊明, 山田興徳 他(1993) 子宮内膜症治療剤服用中に発症した脳静脈洞血栓症およびうっ血乳頭を示した症例. *臨眼* 47:754-755
- 27) 日比野敬明, 松原充隆, 蒲沢秀洋 他(1993) Danazol投与中に脳梗塞をきたした1例. *神経内科* 38:179-182
- 28) Gralnick HR, Rick ME (1983) Danazol increases factor VIII and factor IX in classic hemophilia christmas disease. *N Engl J Med* 308:1393-1395
- 29) Schweppe KW, Ebert C, Cirkel U (1988) Auswirkungen der danazol-therapie bei endometriose auf blutbild und gerinnung. *Geburtsh u Frauenheilk* 48:634-636
- 30) Eyster ME, Parker ME (1985) Treatment of familial antithrombin-III deficiency with danazol. *Haemostasis* 15:119-125
- 31) 新名主宏一, 丸山征郎, 納光 弘(1990) Danazolの抗血栓作用機序の検討. *血栓止血誌* 1:235-246
- 32) Fairfax AJ, Ibbotson R (1984) Danazol raises antithrombin III levels in cases of familial deficiency *Lancet* II:1272-1273
- 33) Gonzalez R, Alberca I, Sala N, et al. (1985) Protein C deficiency responds to danazol and DPAVP. *Thromb Haemost* 53:320-322
- 34) Thorisdottir H, Evans JA, Schwartz HJ, et al. (1992) Some clotting factors in plasma during danazol therapy: free and total protein S, but not C 46-binding protein, are elevated by danazol therapy. *J Lab Clin Med* 119:698-701
- 35) Ford TCL, Cooke ID, Preston FE (1994) Changes in haematological indices, blood viscosity and inhibitors of coagulation during treatment of endometriosis with danazol. *Thromb Haemost* 72:218-221
- 36) Fraser IS, BurrIDGE JC (1980) Danazol treatment and platelet function. *Med J Aust* 1:313-314
- 37) 日本母性保護産婦人科医会(1996) ダナゾール投与の留意点について. *日母産婦医報* 48(1):17
(受付:2000年2月15日)
(受理:2000年4月19日)

Clinical Effect and Change in Bone Mineral Density by Long-term, Low-dose Danazol in Women with Endometriosis

Tomoko Adachi, Aya Shionoiri, Rie Saito and Hiroaki Ohta

Department OB/GYN, Tokyo Women's Medical University,
Tokyo 162-8666, Japan

The aim of the study was to investigate the efficacy and the safety, especially the effect on bone mineral density (BMD), of long-term, low-dose danazol in women with endometriosis. Fifteen women with endometriosis, aged from 28 to 46 years old, were enrolled in this study with informed consent. Patients were started on 400 to 200mg/day of danazol for 8 weeks, and then maintained at 100mg/day. Serum hormone levels and bone mineral density (BMD) were measured at 27.1 ± 8.8 months ($M \pm SD$) from the initiation of this study. By this treatment, every patient had hypomenorrhea with less pain or relief from other deleterious symptoms. The severity of endometriosis did not worsen. Relatively high E_2 , normal testosterone (T), low SHBG, and higher free-T were shown. BMD values, calculated by comparing with mean values of normal women at the same age, were $101.3 \pm 10.3\%$. In conclusion, long-term, low-dose danazol in women with endometriosis was effective and safe.

Key words: long-term low-dose danazol, endometriosis, hormone levels, BMD

(Jpn J Fertil Steril 45:203-210 2000)

各種 hMG 製剤におけるゴナドトロピン組成とその臨床的意義

Composition of Various Types of Commercial hMG (FSH) Preparations and Clinical Significance.

合 阪 幸 三

Kohzo AISAKA

大 岡 史 子

Fumiko OOKA

渡 邊 剛 也

Takaya WATANABE

定 月 みゆき

Miyuki SADATSUKI

梁 善 光

S. G. LIANG

貝 原 学

Manabu KAIBARA

森 宏 之¹⁾

Hiroyuki MORI

帝京大学医学部附属市原病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University School of Medicine,
Ichihara Hospital, Ichihara 299-0111, Japan

¹⁾帝京大学医学部産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173-8605, Japan

重症の視床下部障害性排卵障害患者(PCO: 14例, 非PCO: 17例)に対して, ヒュメゴン100, パーゴナル, フェルティノーム Pのいずれかによる排卵誘発を行い, その臨床成績, 血中各種ホルモン動態および各製剤中のFSH, LH, hCG含有量について検討した。排卵誘発中は薬剤の変更を行わず, 経腔超音波断層法にて少なくとも1個以上の卵胞が直径18mm以上に発育した段階でhCG 10,000IUを注射し排卵を惹起した。PCOではフェルティノーム P投与群で, 非PCOではパーゴナル投与群でhMG総投与量が増加する傾向を示した。卵胞発育個数はPCO, 非PCOともパーゴナルで増加する傾向を示した。OHSS発生頻度はPCO, 非PCOでいずれもパーゴナルで増加する傾向を示した。妊娠率には有意の差はなかった。血中ゴナドトロピン, estradiol値には変化は認められなかったが, hCG, androstenedioneおよびprogesterone値はパーゴナル投与群で有意に高値を示した($p<0.05-0.001$)。各製剤中のゴナドトロピン組成をみると, FSHはフェルティノームでやや少なく, LH, hCGはパーゴナルで有意に多く含まれていた。ヒュメゴン100はPCO, 非PCOのいずれに対しても同等の効果を有し, 使いやすい製剤であると考えられた。またゴナドトロピン製剤中のhCGは卵胞発育に好ましくない影響をおよぼす可能性が示唆された。

キーワード: hMG, hCG, ゴナドトロピン, アンドロステンジオン, PCOS

(日不妊会誌 45:211-217 2000)

緒 言

hMG-hCG療法は、clomiphene無効の重症排卵障害の治療に現在幅広く施行されている。世界的には遺伝子組換えによって合成されたrecombinant gonadotropin製剤が中心となりつつあるが、わが国では閉経期婦人の尿より精製した製剤が使用されている。hMG製剤は現在、大きく2つのグループに分けられている。すなわち、FSH、LH成分を共に含む通常のhMG製剤とLH成分を大幅に除外して精製したurinaryFSH製剤である。以前報告したように、gonadotropin製剤はメーカーからとくに予告されることがなくその製剤組成が変更されることがある^{1,2)}。通常の排卵誘発ではgonadotropin製剤の成分が多少変わっても、その臨床効果に大きな影響をおよぼすことは少ないが、血中のLHが高値を示す多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)にLHの含有量の多いhMG製剤を用いた場合は、卵巣過剰刺激症候群(OHSS)を来す場合があることから注意が必要となる³⁻⁶⁾。

一方、最近発売されたヒュメゴン100IU(以下ヒュメゴン100)は、hCGを添加せずpure FSH製剤に近いFSH:LH比(1:0.016)を有するとされており、PCOSなどの排卵誘発に使いやすい薬剤であるとされている⁷⁾。そこで、多数例の重症視床下部障害に基づく排卵障害患者に各種hMG製剤を用いた排卵誘発を施行し、その臨床効果および血中各種ホルモン値におよぼす影響を検討したので報告する。

対象および方法

Clomiphene無効の重症の視床下部障害に基づく排卵障害患者31例を対象とした。なお今回の検討では、全例にプロゲステロンテストを施行しなかった。第1度、第2度無月経についての分類は行わなかった。すべての症例において月経期にLH-RH、TRH負荷テストを施行し、前値の血中LH>FSHを示すもの(高LH血症性排卵障害、内分泌学的PCO、以下PCO typeと略す、14例)、およびLH≤FSHを示すもの(non-PCO type、17例)の2群に分類し⁶⁾、各種hMG

(FSH)製剤を周期毎に交互に用い血中ホルモン動態、臨床効果を比較検討した。本研究では、PCOSについては、筆者らが以前より用いている血中のゴナドトロピン値のみで判定する方法により分類した。各群の治療開始前の血中各種ホルモン値を表1に示す。

なお、今回の検討では、各種hMG(FSH)製剤の効果のみを厳密に比較することを目的としたので、事前のホルモン検査によりプロラクチン関連疾患(高プロラクチン血症、潜在性高プロラクチン血症および乳漏症)を合併していた症例はすべて除外した。また、同様の理由により、hMG-hCG療法中はプロモクリプチンの併用は行わなかった。

今回使用した薬剤は、ヒュメゴン100(1アンプル:100単位)、パーゴナル(1アンプル:75および150単位)、フェルティノームP(1アンプル:75単位)の3種類で、これらをそれぞれの症例に周期毎にat randomに投与した。投与開始は月経周期3~4日目からに統一し、ヒュメゴン100は100単位、他の2剤は150単位/dayより漸増法によりそれぞれ最高500、450単位/dayまで投与した。まずinitial doseを4~5回継続し、卵胞発育が不良の場合は、ヒュメゴン100では100単位ずつ、他の2製剤では75単位ずつ増量し、その投与量を3~4回継続、さらに発育不良の場合は同様に増量するといった漸増法によった。なお、1種類のhMG(FSH)製剤を投与する毎に、OHSSによる影響を除外する目的で1周期以上の休薬期間を置くよう配慮した。

卵胞の発育は経腔超音波断層法により観察し、卵胞の最大直径が18mm以上に発育した時点でhCGを10,000単位投与し排卵を惹起した。各薬剤投与群において、hCG切り替え時の成熟卵胞個数、hCG切り替えまでのhMG(FSH)総投与量、OHSSの発生頻度(超音波断層法でmulti-follicular patternを呈し、卵巣全体の直径が10cm以上となったものをOHSSありとした)および妊娠率について比較検討した。

さらに内分泌学的検討として、hCGへの切り替え直前(切り替え当日、hCG注射前)に採血し、血中のFSH、LH、estradiol、androstenedione(ASD)、hCGおよびprogesterone値を測定した。各種ホルモンの測定はSRL社に依頼し、FSH、LHに関しては第一ラジオアイソトープ社製のSPAC-Sキットを用いてIRMA法により、hCGに関してはhCG-CTP(C-terminal peptide、武田薬品工業、LHとの交差反応はほとんどなし)を指標としたEIA法により、estradiol、progesteroneおよびASDに関してはRIA法により施行

表1 本研究対象の治療開始前の血中各種ホルモンデータ

	non-PCO	PCO
FSH (IU/ml)	4.1±2.5	3.3±1.8
LH (IU/ml)	3.4±2.0	4.0±2.2
LH/FSH	0.84±0.57	1.21±0.52
E ₂ (pg/ml)	35.8±22.6	36.5±20.9
ASD (ng/ml)	1.12±0.52	2.13±1.04

された^{1,2,5,6)}。この際のintraおよびinter assay varianceは、FSH、LHおよびhCGに関しては5%未満、estradiolおよびASDに関しては10%未満といずれも満足すべき値であった。

なお、本研究では今回使用した各種hMG(FSH)製剤についてそれぞれ5アンプルずつを任意に抽出し、各アンプル内に含有されるFSH、LHおよびhCGの量を測定して各製剤間で比較した。それぞれのロット番号は、ヒュメゴン100:17118088、パーゴナル75:k050、パーゴナル150:k091、フェルティノームP75:17341098であった。

推計学的検討は、Studentのt検定および χ^2 検定により、 $P<0.05$ 以下を有意差ありとした。

研究成績

1) hMG総投与量の比較

hMGの総投与量は、表2のようにnon-PCO typeではフェルティノームP投与群で、PCO typeではパーゴナル投与群で増加する傾向が得られたが、PCO、non-PCO typeのいずれも推計学的有意差は認められなかった。

表2 hMG総投与量の比較

単位: IU

	non-PCO	PCO
Humegon	1,826.2±428.6	1,759.4±453.2
Pargonal	1,964.5±430.2	2,145.7±394.1
Fertinorm P	2,105.3±486.0	1,985.6±495.3

non-PCOではフェルティノームP、PCOではパーゴナル投与群で増加する傾向を示した。

2) 成熟卵胞数の比較

TVプローベにより観察し得たhCG切り替え直前における成熟卵胞(最大直径 ≥ 18 m)の個数は、表3に示すようにnon-PCO type、PCO typeともパーゴナル投与群で若干増加する傾向を示したが、いずれも推計学的に有意差は認められなかった。

表3 成熟卵胞数の比較

単位: 個

	non-PCO	PCO
Humegon	3.9±3.6	4.6±3.8
Pargonal	4.4±4.2	5.3±3.2
Fertinorm P	4.0±3.8	4.2±3.3

PCOではパーゴナルで増加傾向を示したが有意差は認められなかった。

3) OHSS発生頻度

non-PCO type、PCO typeに分けてOHSSの発生頻度を比較した。表4に示すように、前者ではパーゴナルおよびフェルティノームP投与群で、後者ではパーゴナル投与群でいずれも増加する傾向を示したが、今回の検討では症例数が少なかったことから、推計学的な有意差は認められなかった。

表4 OHSS発生頻度の比較

単位: cycles/cycles

	non-PCO	PCO
Humegon	5/14(35.7%)	4/12(33.3%)
Pargonal	8/15(53.3%)	3/5(60.0%)
Fertinorm P	7/14(50.0%)	5/14(35.7%)

non-PCOではパーゴナル、フェルティノームP、PCOではパーゴナル投与群で増加する傾向を示した。

4) 各製剤に含まれるgonadotropinおよびhCGの量

表5に今回使用した4種類の製剤の組成を示す。いずれも各製剤75単位あたりの値に換算したものである。一般的にhMG製剤中に含有するLHの量はいずれもかなり少なく、その分をhCG添加により補っているものと考えられた。なおヒュメゴン100は、hCGを添加せずpure FSH製剤に近いFSH:LH比(1:0.016)を有するとされているが、今回の検討でもLH活性をかなり落とした精製度の高い製剤であることが明かとなった。ただ、その含有率はメーカーのいう1:0.016よりかなりpure FSHに近いものであったが、原料の尿に由来すると思われる微量のhCGも検出された。フェルティノームPは、pure FSH製剤であるので、LH活性はヒュメゴン100よりさらに低く、hCG活性も今回の検討では検出できなかった。

表5 各製剤に含まれるFSH、LHおよびhCG量の比較

	FSH(IU/ml)	LH(IU/ml)	hCG(IU/ml)
Humegon 100	31.8±1.4	0.54±0.014 ($\times 10^{-2}$)	1.64±0.011
Pargonal 75	27.6±1.3	0.75±0.087	12.3±0.25
Pargonal 150	30.1±1.6	0.87±0.043	24.4±0.48
Fertinorm P	22.4±0.6	0.76±0.055 ($\times 10^{-4}$)	N.D.

いずれも各製剤75単位あたりに含まれる量に換算したもの。

N.D.: not detectable

5) 排卵直前における血中各種ホルモン動態

排卵直前(hCG切り替え当日)において、当日の注射を行う前に採血し、血中各種ホルモン値を比較した。まず血中FSH値について、non-PCO type, PCO typeで比較したところ、表6に示すようにどの薬剤を使用した際も有意の差は認められなかった。

LH値に関してはフェルティノームPにLH成分が含まれていなかったことから、前者、後者とも他の2製剤に比べて低下する傾向を示した。PCO typeでは、hMG (FSH) 製剤投与前はLH>FSHであったが、いずれの薬剤の投与によってもFSH>LHとなることが明かとなった。

血中estradiol値は、表7に示すように、non-PCO type, PCO typeとも各製剤により有意の差は認められなかったが、血中ASD値は表8のようにnon-PCO type, PCO typeともパーゴナル投与群で有意に高値をとることが明かとなった。一方、血中hCG値は

表8に示すようにフェルティノームPで有意に低値となった(図1)。

今回みられたパーゴナル投与群における血中ASD値の上昇は、添加されていたhCGの体内における蓄積により血中hCG値が上昇したことによるものと考えられた。

hCG投与前の血中progesterone値は表9に示すようにnon-PCO, PCO typeともパーゴナル投与群で高値をとることが明かとなった。とくにPCO typeにおいて、ヒュメゴン投与群に比べて有意差が認められた(図2)。

表6 hCG切り替え直前の血中FSH, LH値
単位: IU

FSH	non-PCO	PCO
Humegon	18.2±4.3	17.6±5.4
Pargonal	16.4±4.0	15.2±5.3
Fertinorm P	17.8±4.6	18.4±6.5

LH	non-PCO	PCO
Humegon	9.5±4.1	10.5±5.2
Pargonal	10.8±4.7	12.3±4.9
Fertinorm P	4.7±4.5	9.6±4.5

血中LH値はフェルティノームP投与群で低下する傾向を示したが、推計的な有意差は認められなかった。

表7 hCG切り替え直前の血中estradiol値
単位: pg/ml

	non-PCO	PCO
Humegon	1,832.6±332.9	1,810.4±365.8
Pargonal	1,984.5±345.2	2,104.4±372.9
Fertinorm P	1,856.2±314.6	1,825.7±341.2

PCOでパーゴナル投与群において高値を示す傾向が得られた。

表8 hCG投与前における血中ASDおよびhCG値

Androstenedior(ng/ml)	non-PCO	PCO
Humegon	1.0±0.6	1.1±0.5
Pargonal	2.1±1.0	2.2±1.1
Fertinorm P	1.3±0.4	1.1±0.8

hCG (mIU/ml)	non-PCO	PCO
Humegon	2.0±0.9	1.8±1.1
Pargonal	3.5±1.5	3.4±1.5
Fertinorm P	0.6±0.5	0.5±0.6

いずれもパーゴナル投与群で有意差が認められた。

*: p<0.001, **: p<0.005, ***: p<0.05

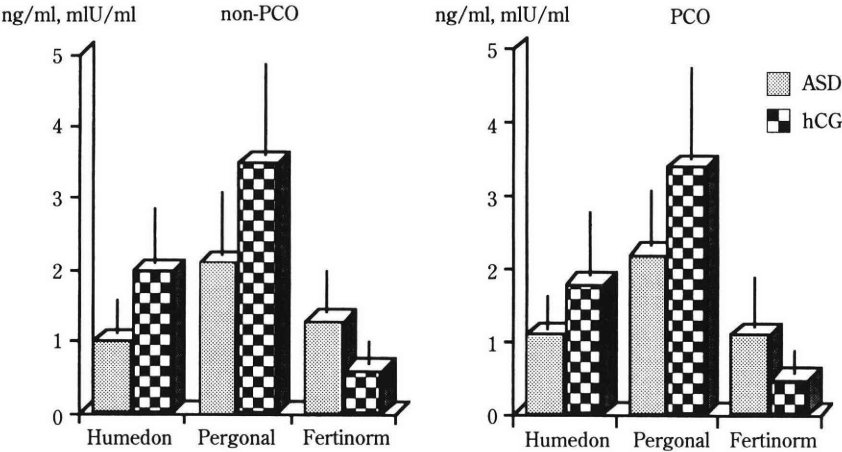


図1 排卵直前における血中androstenedioneおよびhCG値の比較

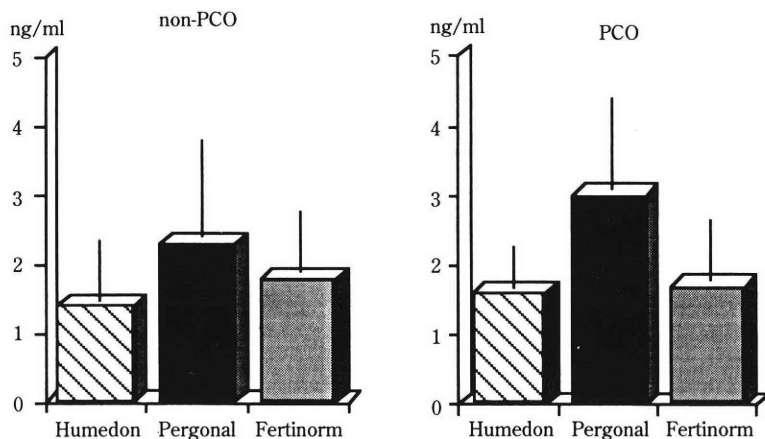


図2 排卵直前における血中progesterone値の比較

表9 hCG切り替え直前における血中progesterone値
単位: ng/ml

	non-PCO	PCO
Humegon	1.4±0.9	1.6±0.8
Pargonal	2.3±1.4	3.0±1.6
Fertinorm P	1.8±1.1	1.7±0.9

p<0.05

PCOでパーゴナル投与群で有意に高値を示した。

以上のことから、パーゴナルに含有されるhCG成分は、PCO typeの排卵障害例では排卵直前における血中のASDおよびprogesterone値を上昇させ、一部の卵胞で卵胞内黄体化を起している可能性が示唆され、卵の成熟という観点から望ましくない影響をおよぼしている可能性が示唆された。

6) 妊娠率の検討

本研究期間中に、ヒュメゴン投与群で2例、パーゴナル投与群で1例、フェルティノーム P投与群で2例の計5例に妊娠が成立した。いずれも単胎で妊娠継続中である。排卵障害の型でみると、PCO typeで2例、non-PCO typeで3例であった。症例が少なかったこともあり、今回の検討では、これらの薬剤間で妊娠率に有意差は認められなかった。

考 察

排卵障害の治療薬としてhMG製剤は今日幅広く用いられている。発売当初は製剤の量に限りがあったこともあり、下垂体機能不全に限定して使用されていたが、現在では比較的軽症の排卵障害患者や、男女ともに明らかな不妊因子を特定できない、いわゆる機

能性不妊婦人に対しても過排卵を惹起して着床率を向上させるといった目的で使用され、良好な成績が報告されている¹¹⁾。近年に至るまでいずれの製剤もその組成は生物学的活性でFSH:LH=1:1となるよう調整されていたが、IVF-ETの普及により、卵の成熟、質という観点から、卵胞期(とくにその初期)にはFSH優位の方が好ましいとする報告がなされ^{3,4,8)}、さらに血中のgonadotropin動態がmonoclonal抗体を用いた鋭敏なassay系を用いることにより明らかになるにつれて、正常性周期においても、排卵期以外は常にFSH優位となっていることから⁹⁾、hMG製剤においてもFSH活性を高めた(LH活性を低下させた)製剤が開発され、臨床に应用されるようになった。そこで今回我々は、市販されている各種hMG製剤を同一症例に用いることにより、臨床効果にどのような差が生じるか、血中ホルモン動態はどのように変化するかを検討してみた。

対象の選択に際しては、FSH活性の高いフェルティノーム PなどがPCOSに有効との報告がみられるので^{8,11)}、clomiphene無効の重症視床下部障害に基づく排卵障害をPCO type, non-PCO typeの2群に分け、それぞれの薬剤の効果を比較するという方法をとった。

なお、今回の研究では薬剤の効果を検討し、それぞれの薬剤の使い分けを明らかにする目的もあったため、下垂体機能不全は対象に含めなかった。

まず、成熟卵胞が確認されるまでのhMG(FSH)総投与量について検討したところ、PCO typeではパーゴナル投与群で増加する傾向を示した。実際にTVプローベにて連日観察していると、パーゴナル投与の

場合は多数の卵胞が同時に発育してくる傾向がみられた。このことは、成熟卵胞個数、OHSS発生率がいずれもパーゴナル投与群に多くみられたことから裏付けられた。血中ホルモン動態では、血中のFSH、LH値は全症例とも各種薬剤投与によりFSH>LHを示し、有意差は認められなかった。しかしながら、血中estradiol値はパーゴナル投与群で高値を示す傾向が得られた。これはパーゴナル投与群でhMG総投与量が増加する傾向を示したことによるものと思われた。

一方、血中のhCG値は、パーゴナル投与群で有意に高値を示したが、これは製剤中に含有されるhCG成分(hCG immunological activity)がヒュメゴンに比べて多かったことによるものと考えられた。さらに、高hCG血症に基づくと思われる血中ASD値の上昇もパーゴナル投与群に認められた。

本邦のPCOS婦人では、高LH血症の他に、これによると考えられる高ASD血症が挙げられている^{5,6)}。今回の検討では、hMG製剤の投与により多数の卵胞が発育したため血中のestradiol値が著明に高値を示したので、高ASD血症に伴う好ましくない症状(ASDはestrone, testosteroneの前駆物質であるため、これらの上昇を伴い、子宮内膜の萎縮、男性化などが生じる)は認められなかったが、hCG高値に伴い、卵胞の内葉膜細胞のhyperstimulationを生じ、hyperthecosisを促進する可能性も考えられるので^{8,11,12)}、PCOS症例に対してはhCGを添加したhMG製剤は使用しないほうがよいのではと考えられた。

hCGは、その生物学的活性はLHと同等であるが、半減期は大幅に異なっている。すなわち、LHでは、first component: 20分、second component: 3時間であるのに対し、hCGでは、first component: 6~8時間、second component: 24~36時間と報告されており、hCGの方が約10倍長い^{11,12)}。hMG製剤による排卵誘発を漸増法により施行した今回の研究では、排卵直前には450~500IU/dayの投与を行うことになるが、このような場合には半減期の長いhCGのみが体内に蓄積することになる。パーゴナル投与の際にみられた血中hCG値の上昇は以上のような機序によるものと思われた。

また血中hCG値の上昇は、排卵直前期における血中progesterone値の上昇も引き起こしていることが明かとなった。このことは製剤に含まれている過剰のhCG成分(hCG immunological activity)は卵胞内黄体化の誘因となる可能性を示唆しており、卵のqualityという点から好ましくない影響をおよぼすことが

考えられる^{12,13)}。とくにPCOSに対してはhCG成分を多く含む製剤の投与は慎重に行わなければならないものと思われた。

本研究の結果、PCO typeの排卵誘発にはFSH優位製剤が有用であることが判明し、pure FSHに近いヒュメゴン100はフェルティノームPとほぼ同等の効果があることが明らかとなった。Recombinant FSHを用いた*in vitro*の研究では、少量のLHが存在しなければ顆粒膜細胞からのestradiol分泌は起こらないとされている。以前の我々の報告でも、下垂体機能不全に基づくgonadotropin分泌が全く欠損していた症例では、フェルティノームPによる排卵誘発は不成功で、排卵を惹起するためにはある程度のLHが必要不可欠であると考えられた^{2,11)}。今回対象とした症例はいずれも重症の視床下部障害に基づく排卵障害であったが、投与前の血中LH値もある程度保たれていたためフェルティノームPにより排卵誘発が成功したものと考えられた。

一方、ヒュメゴン100は今回の成分分析において、微量のLHおよびhCGを含むFSH:LH=1:0.016のpure FSHに近い製剤であることが明かとなった。ヒュメゴン100のhCG量はパーゴナルの1/10~15と少ないが、non-PCO、PCO typeを問わず卵胞発育に有効であり、OHSSの発生率からみても、いずれのtypeの排卵障害に対しても有用である薬剤であると思われた。

以上より、pure FSHに近いヒュメゴン100は、PCOSのみならず下垂体機能不全などにも有効であると思われ、臨床的に幅広く応用可能な薬剤であると考えられた。

本論文の要旨は第44回日本不妊学会総会(1999年11月、東京)において発表した。各種ホルモンの測定にご協力頂いたSRL社に深謝する。

文 献

- 1) 合阪幸三, 都築浩雄, 金田幸枝 他(1992) 各種hMG製剤使用時の血中各種ホルモン動態および臨床効果の比較検討。日不妊会誌 37:501-508
- 2) 合阪幸三, 都築浩雄, 金田幸枝 他(1992) 各種hMG製剤におけるゴナドトロピン組成とその臨床的意義。一更年期婦人血中・尿中ゴナドトロピン値と比較して。産婦実録 41:1971-1977
- 3) Scott RT and Hodgen GD (1990) The ovarian follicle: Life cycle of a pelvic clock. Clin Obstet Gynecol 33:551-562
- 4) 合阪幸三, 都築浩雄, 金田幸枝 他(1991) Pure

- FSH製剤(フェルティノームP)の新しい投与法の開発. 産婦世界 43:911-916
- 5) 合阪幸三(1993) 排卵障害の診断と頻度. 不妊診療ハンドブック 新興医学出版, 東京, pp35-55
- 6) 合阪幸三, 金田幸枝, 都築浩雄 他(1990) 内分泌学的PCO症例の臨床的背景およびbromocriptineの効果に関する研究. 日内分泌会誌 66:101-109
- 7) 日本オルガノン株式会社, 社内資料(1999)
- 8) Speroff L, Glass RH and Kase NG (1999) The polycystic ovary. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (6th edition). Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, pp487-521
- 9) Aisaka K, Tsuzuki H, Kaneda S, et al. (1991) Effect of the LH : FSH ratio in the late luteal phase on follicular growth of the next menstrual cycle. Follicle Stimulating Hormone. Hunzicker-Dumm, M. and Schwartz, N. B. (eds.) Springer-Verlag, New York, pp388-391
- 10) Mannaerts B, De Leeuw R, Geelen J, et al. (1991) Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the biological characteristics of recombinant human follicle stimulating hormone. Endocrinol 129:2623-2629
- 11) 合阪幸三(1993) 排卵障害の治療. 不妊診療ハンドブック 新興医学出版, 東京, pp95-114
- 12) Filicori M (1999) The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. Fertil Steril 71:405-414
- 13) Speroff L., Glass RH and Kase NG (1999) Induction of ovulation. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (6th edition). Lippincott, Williams and Wilkins, Baltimore, pp1097-1132
- (受付: 2000年2月17日)
(受理: 2000年4月25日)

Composition of Various Types of Commercial hMG (FSH) Preparations and Clinical Significance.

Kohzo Aisaka, Fumiko Ooka, Takaya Watanabe, Miyuki Sadatsuki,
S. G. Liang, Manabu Kaibara and Hiroyuki Mori¹⁾

Department of Obstetrics and Gynecology, Teikyo University School of Medicine,
Ichihara Hospital, Ichihara 299-0111, Japan

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University School of Medicine, Tokyo 173-8605, Japan

Present study was performed to analyze the compositions of various types of commercial gonadotropin preparations and to elucidate the clinical effects of them for the treatment of the ovulatory disturbances. Seventeen cases of non-PCO type and 14 cases of PCO type hypothalamic anovulations were subjected. Then, Humegon100 (lower hCG containing), Pergonal (higherhCG containing) and Fertinorm-P (highly purified urinary FSH) were administered for the induction of ovulations by turns. There were no significant differences among them in the total doses of hMG(FSH), the numbers of matured follicles. The incidences of the OHSS inclined to increase in the Pergonal group of the PCO types. The pregnancy rate among these groups were almost the same. There were no significant changes in serum levels of FSH and LH. There were almost the same values in serum estradiol levels among these groups. However, serum hCG and androstenedione levels in Pergonal administered group ($p<0.05-0.001$). Serum levels of progesterone also increased significantly in the Pergonal group ($p<0.05$). From these results, it was concluded that the hCG component which was included in the hMG preparations might have an undesirable effect on the occurrence of the OHSS through the harmful alteration of the steroidogenesis in the ovaries.

Key words: hMG, hCG, gonadotropin, androstenedione, PCOS

(Jpn J Fertil Steril 45:211-217 2000)

非配偶者間人工授精により拳児に至った 男性不妊患者の意識調査

Emotional Reaction of Male Partners to Donor-insemination Pregnancy

久 慈 直 昭

Naoaki KUJI

高 垣 栄 美

Emi TAKAGAKI

福 地 智 恵

Tomoe FUKUCHI

堀 井 雅 子

Masako HORII

田 中 宏 明

Hiroaki TANAKA

谷 垣 礼 子

Reiko TANIGAKI

雨 宮 香

Kaori AMEMIYA

松 田 紀 子

Noriko MATSUDA

土 屋 慎 一

Shinichi TSUCHIYA

浜 谷 敏 生

Toshio HAMATANI

末 岡 浩

Kou SUEOKA

小 澤 伸 晃

Nobuaki OZAWA

吉 村 泰 典

Yasunori YOSHIMURA

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

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

我が国において配偶子提供が受容者にどのような心理的影響を与えているかを検討する目的で、非配偶者間人工授精により最近5年間に児を得た夫婦のうち、男性配偶者(夫)に対して調査を行った。アンケートを依頼した夫190人中146人(77%)から回答を得ることができた。本治療施行決定については、夫婦以外には相談しなかったとの答えが114例(78%)と大多数であり、また施行を決定した理由としては夫婦継続のため(20例)、家を残したいから(17例)という回答が比較的多数存在した。治療施行中、出産前に感じた不安(複数回答)で最も多かったのは子供の外見が自分と似ていないのではないかとということ(87例)であったが、出産後の人生観の変化として「家族をより大切に思うようになった」(106例)が最多であった。「2児目を本治療で希望する」と答えた夫が約80%である一方で、将来本治療の事実を子供に告知する事を積極的に考えている父親は1%のみであった。現代の日本における一般的な家族観の中で、決して特殊ではない一般的な夫婦が拳児希望と社会生活上の必要との両面の必要性により、極めて慎重に治療を選択・施行し、一定の満足を得ていることが明らかとなった。

キーワード：非配偶者間人工授精，出自を知る権利，告知，妊娠，不妊

(日不妊会誌 45:219-225 2000)

緒 言

非配偶者間人工授精(Artificial insemination with donor's semen, 以下AID)は男性配偶者が無精子症であるカップルに対し、提供者からの精子を子宮内に注入して挙児を得る医療技術である。AIDは1960年代にアメリカで普及し、本邦では1948年当教室において初めて実施され¹⁾、本治療により多数の不妊カップルが児を得ている。

しかしAIDが第三者の配偶子を用いる治療法であることから、治療中夫婦双方に生じる心理的・情緒的葛藤は少なくない。特に男性配偶者(以下、夫)にとって、出生児が自己と遺伝的につながりがないこと、また夫側に不妊原因があるにも関わらずタイミング指導・授精など実際の治療に頻回に通うことになるのは女性配偶者(以下、妻)であることなどから、精神的重圧が非常に大きいことが予想され、さらにそのことは出生してくる児を含む将来の家族関係にまで負の影響をおよぼす可能性がある。

近年体外受精・着床前遺伝子診断など生殖補助技術が急速に進歩した結果、不妊症治療をとりまく社会の関心は急速に高まっている。このような状況で1996年日本産科婦人科学会は「非配偶者間人工授精と精子提供に関する見解」を公表し、社会的に受け入れられる必要最小限の人為的操作の範囲を規定している。しかし、実際に治療を受けている夫婦がこの治療をどのように受け止めているかを検討することは、これを認める社会の側にも、またこの治療を実際に受ける夫婦の側にも非常に重要な情報となる。

そこで今回我々は、我が国において配偶子提供による生殖医療が受容者にどのような心理的影響を与えているかを検討するため、AIDにより児を得た夫婦のうち、とくに夫側の心理状態および児出生前後におけるその変化について調査を行った。

対象および方法

対象は慶應義塾大学病院産婦人科において、AIDにより平成6年1月より平成10年12月に妊娠が成立、生児を得た夫婦とした。当院における非配偶者間人工授精の適応は原則として無精子症であるが、顕微受精・精巣内精子利用などが無効である極めて重度の乏精子症・精子無力症も含んでおり、また当然の事ながら夫婦双方が本治療を強く希望していることをその前提条件としている。

連続した210例の出生児の父親(治療を受けた夫)宛に、無記名・自由意志による調査を郵送により依頼

した。アンケートは複数回答を含む選択形式にて行った(表1-文末(アンケート))。

結 果

1 返信率・出生児の男女比

発送から集計までの期間は2カ月間とした。宛先不明その他の理由により返送されたものを除き、夫へ連絡できたと考えられるアンケート依頼190通中、146通(76.8%)に返信があった。出生児の性別は男児が55%(80人)であった。

2 出産前;治療開始時の相談相手、および出産前に感じた不安(図1~3)

AID治療施行を決心する際、夫婦以外誰にも相談しなかったとの答えが114例(78%)と多数であり、一方夫婦以外で相談した相手がいると答えたカップル32例のうち、相談相手として最も多かったのは夫側の両親(13例)であった。

AIDを希望した理由(複数回答)は子供が好きだから(86例)、生活に張りがほしいから(46例)などが多かったが、養子縁組には抵抗があるから(28例)、夫婦継続のため(20例)、家を残したいから(17例)という回答も多く、本邦では「子供を残してこそ家族」という考え方や社会的構造がまだ強く残っていることを示唆する傾向もみられた。

AID施行中、出産前に感じた不安(複数回答)で最も多かったのは子供の外見が自分と似ていないのではないかということ(87例)であった。その他感染症を含む精液諸検査の確実性(59例)、血液型(50例)、提供者への機密保持(58例)等である。一方、親とし

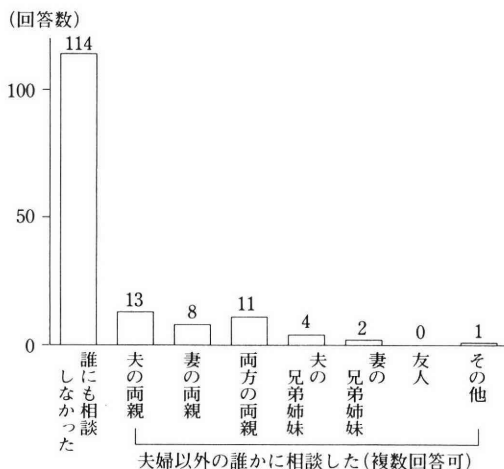


図1 治療開始時の相談相手

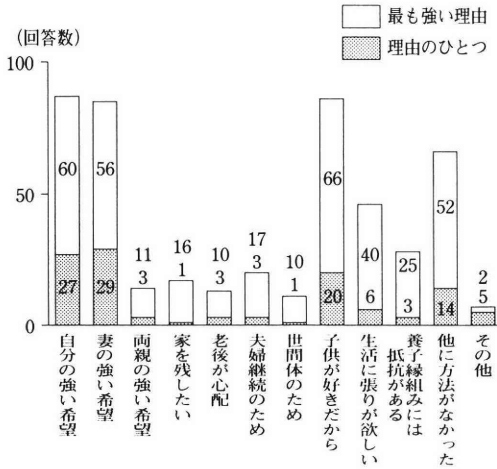


図2 AIDを希望した理由(複数回答可)

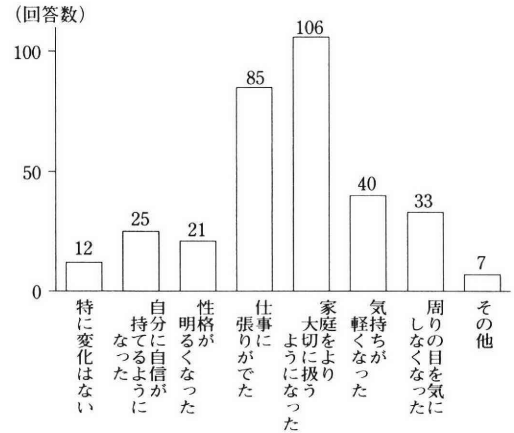
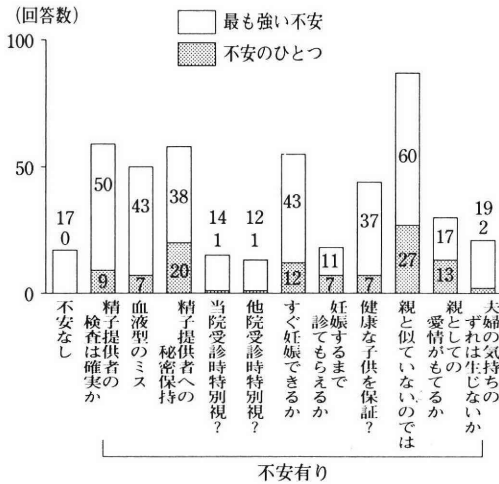
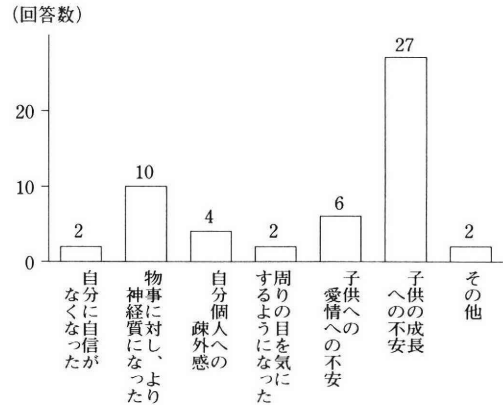
図4 人生観の変化
(複数回答可；プラス面と考えられるもの)

図3 治療中感じた不安(複数回答可)

図5 人生観の変化
(複数回答可；マイナス面と考えられるもの)

での愛情がもてるか(30例)、夫婦間の気持ちのずれは生じないか(21例)等は出産前であっても比較的少数であった。

3 児出生後の人生観の変化(図4, 5)

児出生後人生観が変化したかとの問い(複数回答)に対し多かった回答は、「家族をより大切に思うようになった」(106例)、「仕事に張りがでた」(85例)などであった。

一方マイナス面ともとれる変化のうちでは、「子供の成長への不安」(27例)、「物事に対しより神経質になった」(10例)などが比較的多く見られた。後者については家族を持ったという責任感の発現とみることもできるが、子供の成長への不安という回答には自

分との身体的類似性への不安、AIDの事実を告知するかどうかという葛藤が原因とも考えられる。

4 2児目希望、告知、AID治療への評価(図6, 7)

2児目を希望するかとの問いに対して、積極的・消極的を含めて80%がAIDによる第2子を希望した。一方将来子供にAID治療の事実を話す、いわゆる告知の問題については「絶対にしない」「できればしたくない」をあわせると81%となり、告知を積極的に考えている父親は1%に過ぎなかった。

自分たちが治療をしたことについて、あるいはAID治療そのものについて、現時点ではいずれも9割が肯定的意見であった。

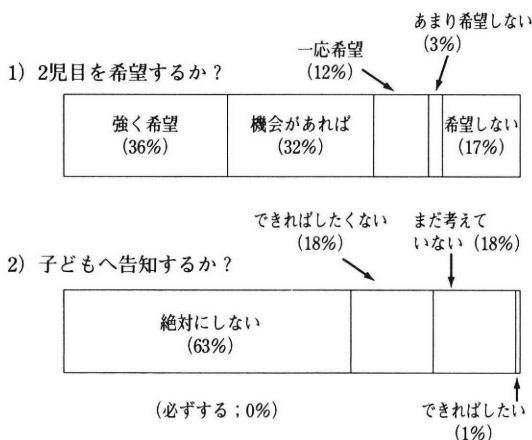


図6 将来にむけて

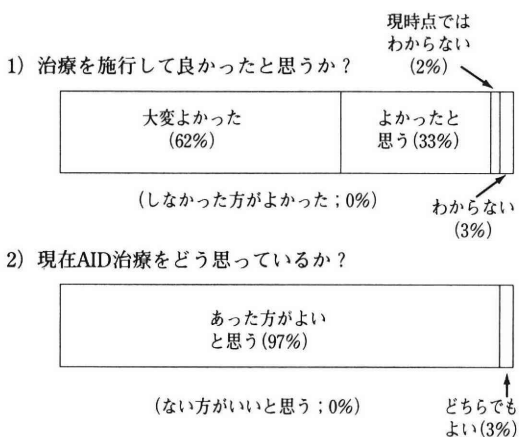


図7 現時点でのAIDに対する見方

考 察

非配偶者間人工授精は、現在我が国で第三者の配偶子を用いることが認められている唯一の不妊治療法である。自己と遺伝的には他人である子供をもうけるこのような治療が夫婦におよぼす精神的影響は、社会の文化的・宗教的背景、あるいは結婚・家庭・親子といった人間関係に対するその社会の一般的な見方に大きく影響される。諸外国ではAID施行前後の夫婦の精神的影響に関する検討がいくつかなされているが、例えばキリスト教的博愛主義の家族観の中で養子縁組がかなりオープンに行われ、かつ多民族国家であるアメリカ合衆国と我が国では、まったく状況が異なる可能性が大きい。従って今回のアンケート結果を諸外国の報告と比較する場合も、アンケートが行われた社会・国家の特性を考慮する必要がある。

今回の結果から、AID施行を決心した理由として純粋に拳児を夫婦が希望したという答えの他、家を残したい、しかしそのための養子縁組には抵抗があるという回答が比較的多数存在した。個人を尊重すると共に家族の絆を重んじ、それ故「イエ」の存続を重要視する日本人の伝統的な価値観が根底ではそれほど変化していないことをこの結果は示唆しているとも考えられる。そのことが少数のカップルではこの治療を選択する一つのプレッシャーになっていることが推察される。しかしこのことはまた、夫婦のみの希望や都合だけではなく家族や周囲の人間関係をも考慮する、普通の堅実なカップルがこの治療を選択していることを示しているともいえる。

一方AIDを選択したカップルのほとんどが夫婦二人だけで決定した場合が多かったこと、また施行していて感じた不安に秘密保持に関する項目をあげた夫が多かったことから、この治療をできれば誰に対しても知らせず夫婦だけの秘密にしておきたいという強い希望があるものと推測される。Klockら¹⁾は合衆国でAID治療を受けたカップルの調査において、この治療を決定した夫婦の60%が夫婦以外の少なくとも1人にこの治療を施行すべきかどうか相談していることを報告している。相談相手として最も多かったのは夫婦の両親であったが、誰かに相談した夫婦の81%が、もしもう一度ははじめからやり直せるとしたら誰にも相談しないで(夫婦だけで)AID施行を決定すると答えている²⁾。この調査では合衆国の国情を反映し、相談相手に親友、兄弟姉妹に加えて職場の同僚、上司といった答えもみられるが、比較的オープンに心理的サポートをうけたり、与えたりしている合衆国でさえも、AIDに関しては夫婦だけで決めた方がよいと考えているのである。本邦のように親友より夫婦・家族を重視する傾向の強い社会において、この傾向がさらに強く出たとしても意外な事ではないと思われる。同様に、子供にAIDの事実を告知するか否かが、治療を選択した夫にとって最大の問題であり、かつそれを本人達が自覚していることも今回の調査から明らかである。養子縁組が一般的かつオープンに行われている合衆国でも、積極的にAIDの事実を告知すると答えたカップルは半数に満たないと報告されている。

一方他人へのAIDの事実の公開や子供への告知をしない、あるいはしたくないと考えることが、夫婦双方に(他人に相談できないという)心理的葛藤を生じ、その後の夫婦関係・親子関係に悪影響をおよぼすという考え方も存在する。しかし本邦より離婚率

がはるかに高率である合衆国でも、AIDを選択して児を得たカップルの離婚率(7.2%)はコントロール(12.9%)に比較して有意に低く³⁾、また子供への告知の有無はその後の親子関係や親の心理的トラウマの形成に対して悪影響をおよぼさないと報告されていることから⁴⁾、そのような影響は少ないであろうことが推察される。今回のアンケートからはこの面に関しての解析をする直接的なデータは得られていないが、AIDをして変わった人生観の中で「家族を持った喜び」と共に「家族への責任感」を示す回答が非常に多かったことから、本治療を行ったことで家庭や家族を否定的に考えるカップルは少ないことが推測される。AIDを選択したカップルは、第三者の配偶子を使用しなければ育児を希望できないという現実を受け入れており、これから自分たちが作り上げる家庭・家族というものを一般のカップルに比較して、より真摯かつ前向きに考えている事が示唆される。

実際に治療をうけたカップルにこの治療が真実幸福を与えているかどうか知ることは非常に困難であり、かつそのことは子供の成長や時間経過と共に変化していくことが考えられる。しかしあらかじめ連絡をして参加意志を確認したわけではない今回のアンケート調査に対して約8割という高い返信率が得られたこと、またその返信の大多数が児の出産後に親としての自覚と責任感を感じ、過半数が今後第2子をこの治療によりもうけてもよいと考えていることから、少なくとも出生児が学童期に達するまでの時点

では本治療が夫婦関係を損なったり、出生児との親子関係を特殊なものにしているという傾向は見られなかった。前述した秘密保持や、この治療につきまとう近親婚を防ぐための遺伝的情報の確保とそれに関係した告知の問題など、様々な問題は未だ解決されていない。しかし少なくともこの治療を選択した夫(婦)がこのような問題点を現実的に受け止め、また家族関係を損なうことなく健全に処理し、少なくとも一定の満足を得ていることが今回の調査結果において明らかになった。

文 献

- 1) 飯塚理八(1957) 人工授精. 日本医師会雑誌 38: 128-132
- 2) Klock SC and Maier D (1991) Psychological factors related to donor insemination [see comments] Fertil Steril 56:489-495. Comment in: Fertil Steril 1992 57:943-945
- 3) Amuzu B, Laxova R and Shapiro SS (1990) Pregnancy outcome, health of children, and family adjustment after donor insemination. Obstet Gynecol 75:899-905
- 4) Natchgall RD, Pitcher L, Tschann JM, et al. (1997) Stigma, disclosure, and family functioning among parents of children conceived through donor insemination. Fertil Steril 68:83-89

(受付: 2000年4月18日)

(受理: 2000年5月1日)

表1 アンケート内容

番号のあるものは選んで○をつけて下さい。()の中には自由にご記入下さい。 ◇あなたの現在の年齢は → ()歳 ◇奥さまの現在の年齢は → ()歳 ◇ご結婚なさってからの年数は → ()年 ◇お子さまの年令・性別 → ()歳、(男児・女児) ◇A I Dについてどのように知りましたか 今からだいたい()年()カ月前 1. 医師から聞いて 2. 本や雑誌を読んで 3. ()から聞いて 4. その他() ◇A I Dを知りどちらが先に施行を希望されましたか 1. 自分から望んだ 2. 妻から望んだ 3. その他() ◇A I Dの施行を決めた時のあなたのお気持ちを聞かせて下さい 1. 本当にしたいと思った 2. 本当はしたくなかった 3. 妻の希望が強いので賛成した 4. よくわからない ◇A I D施行にあたり、奥さま以外の方に相談されましたか 1) 相談しなかった 2) 相談した→相談された方はどなたですか(複数回答可) 1. 自分の両親 2. 奥さまの両親 3. 両親の両方 4. 自分の兄弟姉妹 5. 妻の兄弟姉妹 6. 友人 7. その他() ◇A I Dを望んだ理由について該当するものに○を(複数可)、もっとも強い動機に◎をつけてください。 1. 自分の強い希望 2. 奥さまの強い希望 3. 両親の希望 4. 家を残したいから 5. 老後が心配だから 6. 夫婦継続のため 7. 世間体のため 8. 子供が好きだから 9. 生活に張りや欲しいから -1-	10. 養子縁組みに抵抗があるから 11. 他に方法がなかったから 12. その他() ◇A I Dを望んだ時、また始めてからどんな不安を感じましたか。 1) 感じない 2) 感じた→どんな不安でしたか、該当するものに○を(複数可)、最も強いものに◎をつけてください。 1. 精子提供者の検査は確実か 2. 血液型のミスはないか 3. 精子提供者への秘密保持は確実か 4. 自分たちの秘密保持は確実か 5. 当院受診時に特別視されないか 6. 他院受診時に特別視されないか 7. すぐに妊娠できるか 8. 妊娠できるまで診てもらえるか 9. 健康な子供を保証してくれるか 10. 親と似ていないのではないか 11. 親としての愛情が持てるか 12. 夫婦の気持ちのずれは生じないか 13. その他() ◇あなた自身子供は好きですか 1. とても好き 2. まあまあ好き 3. どちらでもない 4. あまり好きではない 5. 嫌い ◇A I Dの1回の授精費用は高いと思われますか 1. とても高い 2. 高い 3. どちらでもない 4. 安い 5. とても安い ◇授精で妊娠が成立しなかった時どのようなお気持ちでしたか。 1) 体験がない 2) 体験した→該当するものに○を(複数可)、もっとも強い動機に◎をつけてください。 1. 何とも思わない 2. 二度としたくない 3. 悔しさ 4. あきらめ 5. 奥さまへの申し訳なさ 6. なにもできない虚しさ 7. 自分へのプレッシャー 8. 医療への怒り ◇妊娠の知らせを受けた時どんなお気持ちでしたか 1. とても嬉しい 2. 心配だが嬉しい 3. 嬉しさと不安が半々 4. 嬉しいが心配 5. とても不安 -2-
◇出産後に初めてお子さんを抱いた時どのようなお気持ちでしたか 1. とても嬉しい 2. 心配だが嬉しい 3. 嬉しさと不安が半々 4. 嬉しいが心配 5. とても不安 ◇子供ができてあなたの人生感はどう変わりましたか 1) 特に変化はない 2) 変わった→どのような変化ですか。 該当するものに○をつけてください(複数回答可) (プラス面) 1. 自分に自信が持てるようになった 2. 性格が明るくなった 3. 仕事に張りやがでた 4. 家庭をより大切に思うようになった 5. 気持ちが軽くなった 6. 周りの目を気にしなくなった 7. その他() (マイナス面) 1. 自分に自信がなくなった 2. 物事に対しより神経質になった 3. 自分個人への疎外感 4. 周りの目を気にするようになった 5. 子供への愛情への不安 6. 子供の成長への不安 7. その他() ◇子供の成長に伴い気持ちの変化はありますか (複数回答可) 1. こだわりはあったが、自分の子である実感を日々感じている。 2. 不安であったが愛情が増してきた 3. 自分に似ている点が出てきたと感じる 4. 顔や体型が自分と似ていないと感じる時がある 5. 性格が違い過ぎると思う時がある 6. 家族でいると周囲からどのように見られか不安になる 7. 初めに抱いていた不安は更に深くなった 8. 特に変化はない 9. その他() -3-	◇次のお子さんをこの治療で希望しますか 1. 強く希望する 2. 一応希望する 3. 機会があれば考える 4. あまり希望しない 5. 希望しない →どのような点で() ◇将来A I Dの施行についてお子さんにお話しされますか 1. 必ずする 2. できればしたい 3. まだ考えていない 4. できればしたくない 5. 絶対にしない →どのような点で() ◇実際にA I Dの治療を受けられていかがでしたか 1. 大変よかった 2. よかったと思う 3. 現在の状態ではまだわからない 4. しなかった方がよかった 5. わからない →どのような点で() ◇A I Dという医療技術があることをどう思いますか 1. あった方がよいと思う 2. どちらでもよい 3. ない方がよいと思う ◇A I Dについてお考えのことがありましたら自由にお書きください ご協力ありがとうございました。 -4-

Emotional Reaction of Male Partners to Donor-insemination Pregnancy

Naoaki Kuji, Masako Horii, Kaori Amemiya, Emi Takagaki, Hiroaki Tanaka,
Noriko Matsuda, Tomoe Fukuchi, Reiko Tanigaki, Shinichi Tsuchiya, Toshio Hamatani,
Nobuaki Ozawa, Kou Sueoka and Yasunori Yoshimura.

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

To examine the emotional reaction of the male partner to childbearing through donor insemination (DI) in Japan, the husbands of recipient mothers were questioned by mail through a multiple-choice, anonymous questionnaire. Out of 190 couples who underwent DI and raised children during 1993-1998, 146 husbands (77%) replied. Although the majority (78%) of the subjects did not tell anyone about the DI, the persons most frequently told were the husband's parents (17%). The most frequent motivation to start DI was the subject's desire for children; some subject confessed that the decision was necessary "to maintain their partnership" (14%) or because they were "reluctant to choose adoption" (19%). Many husbands (67%) had anxiety about their children's physical resemblance to themselves, but most of the husbands (80%) felt great sympathy with their new family and hoped to raise another children in the future. Almost all (145/146) husbands did not intend to tell their children about DI. In conclusion, DI seemed to have no adverse psychological effects on husbands and their families in Japan. However, most couples tended to keep DI confidential.

Key words: Donor insemination, secrecy, disclosure, pregnancy, infertility

(Jpn J Fertil Steril 45:219-225 2000)

不妊治療後に発症した子宮外妊娠に関連する因子の検討

The Analysis of Infertility Therapy-induced Ectopic Pregnancy

斉藤 正博

Masahiro SAITOH

林 直樹

Naoki HAYASHI

石原 理

Osamu ISHIHARA

田谷 順子

Junko Taya

五十嵐 健治

Kenji IGARASHI

堀 籠 邦子

Kuniko HORIGOME

竹田 省¹⁾

Satoru TAKEDA

木下 勝之

Katsuyuki KINOSHITA

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

¹⁾同周産期総合母子医療センター

Center for the Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

不妊治療後の妊娠においてはIVF-ET後を含め、子宮外妊娠の発生率が高い。そこで、治療後に妊娠が成立した症例を対象として子宮外妊娠の発生に関連する因子を検討した。1994年1月より1996年12月までに不妊外来を初診し妊娠した559例を対象とした。卵管因子のある例における子宮外妊娠の頻度は6.3%(11/175)と卵管因子のない例0.5%(2/384)と比較して有意に高値であった($p<0.01$)。また、子宮外妊娠例のうち、61.5%にクラミジア感染症が認められた。顕微授精を含めた体外受精の妊娠のうち4.5%(5/111)が子宮外妊娠となり、うち4例(80%)が卵管留水腫を有していた。体外受精胚移植例を含む不妊症スクリーニング検査後の妊娠例を対象とした調査においても、子宮外妊娠の発症要因として、卵管因子が重要であることが示唆された。

キーワード：子宮外妊娠、卵管留水腫、卵管周囲癒着、クラミジア感染症、生殖補助技術(ART)

(日不妊会誌 45:227-231 2000)

緒 言

自然妊娠症例における子宮外妊娠が発生するリスク因子には、卵管病変と腹腔鏡手術や卵管に対するマイクロサージェリーが知られている¹⁻⁵⁾。また、不妊治療にIVF-ET(体外受精-胚移植法)が導入され、胚を子宮内へ移植したにもかかわらず、胚は卵管内に移行し子宮外妊娠となる場合が少なくない^{2,4,5,7,9,10)}。しかし、これらの報告は、子宮外妊娠となった症例か

ら後方視的検討を行ったものが多い。すなわち、同等の検査治療を行って妊娠の成立した不妊婦人一般における卵管因子の評価は十分行われていない。そこで、不妊原因を精査あるいは治療した後に妊娠に成功し、結果的に子宮外妊娠となった症例の背景因子について、子宮内に妊娠した例と比較検討したところ、あらためて、子宮外妊娠の成立における卵管因子の重要性が示唆された。

対象および方法

1994年1月より1996年12月までに当科不妊外来を初診し、精査治療後に妊娠した559例を対象とした。このうち、体外受精胚移植または顕微授精による妊娠が111例、それ以外の不妊治療による妊娠が448例であった。各症例について病歴とHSG所見および腹腔鏡手術時所見と処置をビデオから詳細に検討した。腹腔鏡下手術あるいは開腹手術による直視的腹腔内所見は11.8% (66/559)に得られた。また、クラミジア感染症と子宮内膜症の有無につき検討した。なお、クラミジア感染症の有無はスクリーニング検査として、子宮頸管のクラミジア抗原検査(DNA)を行なった。しかし、HSGあるいは腹腔鏡検査にて卵管因子が示唆された症例に対しては、さらにクラミジア抗体価検査を行なった。また、子宮内膜症は、腹腔鏡を含めた開腹所見により直視下に診断したものと超音波断層法検査において卵巣に明らかな子宮内膜症性嚢腫を有するものとした。

統計学的解析は χ^2 検定を行い、 $p<0.05$ をもって有意とした。

結 果

対象とした559例の平均年齢は 30.6 ± 3.87 歳(mean $\pm$ SD)で、平均不妊期間 2.8 ± 2.2 年(mean $\pm$ SD)であった。また、原発性不妊症は326例(58.3%)、続発

性不妊症は233例(41.7%)であった。全症例のうち370例(66.2%)に対して排卵誘発が行なわれ、その内訳はhMG-hCG療法(GnRH agonist併用を含む)277例(49.6%)、クロミフェン療法93例(16.6%)であった。また、AIH(配偶者間人工受精)が排卵誘発周期のうち138例(24.7%)に併用された。体外受精法による妊娠は59例(10.6%)、顕微授精法(ICSI)による妊娠例は47例(8.4%)であった(表1)。

妊娠症例のうち、子宮外妊娠となった症例は13例/559例(1.8%)であった。

卵管因子の存在が確認された例における子宮外妊娠の発生率は6.3%であり、卵管因子のない群0.5%に比較して有意に高かった($p<0.01$) (表2)。なお、ここで示す卵管因子とは、HSGまたは腹腔鏡により卵管閉塞、卵管周囲癒着症、卵管采周囲癒着症あるいは卵管留水腫などが確認されたものとした。

また、子宮外妊娠例と子宮内妊娠例の頻度をその他の背景因子から比較すると、腹腔鏡下癒着剥離術後では前者38.5%(5例)、後者4.8%(26例)に比較して有意に高く($p<0.01$)、クラミジア感染症既往例では前者61.5%(8例)、後者6.6%(36例)に比較して有意に高かった($P<0.01$)。一方、子宮内膜症症例では両者に差はなく、それぞれ15.4%(2例)、13.0%(71例)であった(表3)。

体外受精および顕微授精による妊娠例のうち子宮外妊娠の頻度は4.5% (5/111)であり、これは通常の

表1 妊娠成立に至った周期の治療法(重複あり)

	子宮外妊娠 症例数	(n=13) %	子宮内妊娠 症例数	(n=546) %
排卵誘発法	10	76.9	360	65.9
クロミフェン	1	7.7	92	16.8
hMG療法 (体外受精/顕微授精を含む)	9	69.2	268	49.1
AIH	4	30.8	134	24.5
ART(生殖補助技術)	5	38.5	106	19.4
IVF	3	23.1	59	10.8
ICSI	2	15.4	47	8.6
全例	13		546	

表2 卵管因子の有無による子宮外妊娠の発症頻度

	HSGまたは腹腔鏡による卵管因子の有無 有	無	卵管因子の存在した比率 %
子宮外妊娠	11	2	84.6 (2/13)
子宮内妊娠	164	382	30.0 (164/546)
子宮外妊娠の発生率(%)	6.3*1 (11/175)	0.5*1 (2/384)	

*1: $p<0.01$

表3 妊娠症例にみられる背景因子の比較

	子宮外妊娠 (n=13)		子宮内妊娠 (n=546)		p
	症例数	%	症例数	%	
癒着剥離術	5	38.5	26	4.8	$p<0.01$
クラミジア感染症の既往	8	61.5	36	6.6	$p<0.01$
子宮内膜症	2	15.4	71	13.0	N.S

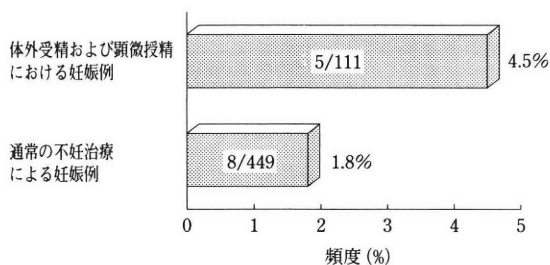


図1 子宮外妊娠の発症頻度

不妊治療による子宮外妊娠の頻度1.8%(8/453)より高かった(図1)。また、体外受精および顕微授精による子宮外妊娠5例のうち4例(80%)に卵管留水腫が認められた。一方、通常の不妊治療による子宮外妊娠8例では2例(25%)に卵管留水腫が認められた。

考 察

不妊治療後の妊娠症例の子宮外妊娠の頻度は排卵誘発等の不妊治療後では3.1%⁶⁾、保存的卵管手術後では20%^{5,6)}であり、自然妊娠の0.3~1.3%^{2,5,7,9)}に比し高い。

さらに、胚を子宮内に移植したにもかかわらず、体外受精胚移植法等の生殖補助技術(ART)を用いた場合は子宮外妊娠が2~11%^{2,4,5,7,9,10)}と高率に発症することが報告されている。その理由の一つとして、以前より胚移植の際の移植位置や培養液の量によって子宮外妊娠の発生との関連がしばしば論じられてきている^{5,7,10)}。当科では、今回の検討期間中、超音波ガイド下にETチューブを挿入しカテーテルの先端を子宮底から約1cm手前にあることを確認している。また、培養液の注入量は50 μ l以下としている。従って、今回対象とした症例において、ETの条件はいずれもほぼ均一であると考えられる。

今回の検討でも、不妊治療後の子宮外妊娠の発症頻度は1.8%であり、体外受精あるいは顕微授精では4.5%と、その他の不妊治療の1.8%と比較し、さらに頻度が高かった。すでに、卵管病変を有する症例に子宮外妊娠が多く発生することが知られている。ま

た、卵管外所見として腹腔鏡検査で卵管周囲あるいは子宮、付属器周囲に癒着を認める症例でも子宮外妊娠が多いことが報告^{6,11)}されている。今回の研究結果でも、卵管因子のある群では6.3%と高い頻度で子宮外妊娠が発生したが、卵管因子を認めない群では0.5%と子宮外妊娠の自然発生率^{5,9,12)}と同等であることが明らかとなった。また、体外受精あるいは顕微授精後に子宮外妊娠となった症例では、卵管異常、とくに、卵管留水腫例に発生しやすいことが多く報告^{2-5,7-9,11,12)}されている。また、卵管の通過性が一側卵管のみの症例、さらに、子宮外妊娠既往患者あるいは卵管再建術の既往患者において、子宮外妊娠の発生率が高い^{5,12)}。今回の検討でも体外受精または顕微授精胚移植例の子宮外妊娠率は4.7%(5/111)と高く、その5例中4例(80%)に卵管留水腫が認められた。

卵管水腫はまた、体外受精あるいは顕微授精の着床率および妊娠継続率を悪化させる因子との報告¹³⁻¹⁷⁾もあるが、関係はないとする成績¹⁸⁾もある。

一方、Zouves et al.等⁶⁾は卵管結紮あるいは両側卵管切除術後の症例では体外受精あるいは顕微授精後の子宮外妊娠の発生を認めなかったことから、保存的卵管形成術(卵管再建術)の不成功例に対しては、子宮外妊娠の発生を予防する目的で卵管結紮または切除術を考慮してもよいと述べている。従って、卵管留水腫あるいは明らかな卵管病変を認めた症例に対して、積極的に卵管切除術をすすめる報告が次第に増加している^{1,19,20)}。

これまで当科では、子宮卵管造影写真の所見から卵管異常が疑われた場合、腹腔鏡手術を行い、卵管周囲の強度の癒着あるいは卵管留水腫例に対して、卵管を温存し、体外受精を選択してきた。しかし、今回の調査結果から、子宮外妊娠の発生予防も考慮して、上記病変のある症例では卵管結紮や切除を行うことが望ましいと思われた。

クラミジアトラコマティスは、卵管炎をはじめとした骨盤内感染症を起こし癒着、卵管性不妊、子宮外妊娠等に関与^{7,11)}しており、卵管性不妊患者の70%以上にクラミジア感染症が認められる¹⁸⁾。今回の検

討でも、子宮外妊娠であった例の61.5%にクラミジア感染症が確認された。

不妊検査治療後の妊娠においても子宮外妊娠の発生に関係する因子を調査した結果、卵管病変の有無が子宮外妊娠の発生要因として最も重要であった。一方、卵管因子のない例における子宮外妊娠の発生は自然妊娠に発生する比率と差がなかった。従って、腹腔鏡検査で卵管周囲癒着や卵管留水腫がある場合は体外受精/顕微授精を行う場合でも、子宮外妊娠の発生の予防として、また、着床率あるいは妊娠継続率の改善を目的として、卵管結紮あるいは切除を行うことが重要である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Aboulghar MA, Mansour RT and Serour GI (1998) Controversies in the modern management of hydrosalpinx. Hum Reprod Update 4:882-890
- 2) Chang CC, Wu TH, Tsai HD, et al. (1998) Bilateral simultaneous tubal sextuplets: pregnancy after *in vitro* fertilization-embryo transfer following salpingectomy. Hum Reprod 13:762-765
- 3) Andersen AN, Yue Z, Jing F, et al. (1994) Low implantation rate after *in vitro* fertilization in patients with hydrosalpinges diagnosed by ultrasonography. Hum Reprod 9:1935-1938
- 4) Zouves C, Erenus M and Gomel V (1991) Tubal ectopic pregnancy after *in vitro* fertilization and embryo transfer: a role for proximal occlusion or salpingectomy after failed distal tubal surgery? Fertil Steril 56:691-695
- 5) 宮崎豊彦, 久慈直昭, 菅原正人 他(1991) 体外受精-胚移植における子宮外妊娠発症に関する因子の検討. 日産婦誌 43:1496-1500
- 6) Lavy G, Diamond MP and DeCherney AH (1987) Ectopic pregnancy: it's relationship to tubal reconstructive surgery. Fertil Steril 47:543-556
- 7) 伊藤理廣, 関 守利, 竹内 巧 他(1998) 体外受精胚移植後の子宮外妊娠. 産婦の実際 47:2241-2246
- 8) 軽部裕子, 児玉英也, 福田 淳 他(1995) 体外受精における卵管留水腫の影響. 日不妊会誌 40:181-184.
- 9) Verhulst G, Camus M, Bollen N, et al. (1993) Analysis of risk factors with regard to the occurrence of ectopic pregnancy after medically assisted procreation. Hum Reprod 8:1284-1287
- 10) Marccus SM and Brinsden PR (1995) Analysis of the incidence and risk factors associated with ectopic pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer. Hum Reprod 10:199-203
- 11) 関 守利(1998) 腹腔鏡下大量通水療法. 臨産婦 52:843-847
- 12) 柴原浩章, 塩谷朋弘, 長谷川昭子 他(1994) 体外受精-胚移植法による子宮外妊娠発生要因の検討. 産婦の進歩 46:722-727
- 13) NG EHY, Yeung WSB and Ho PC (1997) The presence of hydrosalpinx may not adversely affect the implantation and pregnancy rates *in vitro* fertilization treatment. J Assist Reprod Genet 14:508-512
- 14) Vandromme J, Chasse E, Lejeune B, et al. (1995) Hydrosalpinges *in vitro* fertilization: an unfavourable prognostic feature. Hum Reprod 10:576-579
- 15) Strandell A, Waldenstrom U, Nilsson L, et al. (1994) Hydrosalpinx reduces *in vitro* fertilization/embryo transfer pregnancy rates. Hum Reprod 9:861-863
- 16) Kassabji M, Slims JA, Butler L, et al. (1994) Reduced pregnancy outcome in patients with unilateral or bilateral hydrosalpinx after *in vitro* fertilization. Eur J Obstet Reprod Biol 56:129-132
- 17) Fleming C and Hull MGR (1996) Impaired implantation after *in vitro* fertilization treatment associated with hydrosalpinx. Brit J Obstet Gyne 103:268-272
- 18) Sharara FI, Scott RT, Marut EL, et al. (1996) *In vitro* fertilization outcome in women with hydrosalpinx. Hum Reprod 11:526-530
- 19) Andersen AN, Lindlard A, Loft A et al. (1996) The infertile patient with hydrosalpinges-IVF with or without salpingectomy? Hum. Reprod 11:2081-2084
- 20) Shelton KE, Butler L, Toner JP, et al. (1996) Salpingectomy improves the pregnancy rete in *in vitro* fertilization patients with hydrosalpinx. Hum Reprod 11:523-525

(受付: 2000年 2月15日)

(受理: 2000年 5月10日)

The Analysis of Infertility Therapy-Induced Ectopic Pregnancy

Mašahiro Saitoh, Osamu Ishihara, Kenji Igarashi, Naoki Hayashi,
Junko Taya, Kuniko Horigome, Satoru Takeda¹⁾ and Katsuyuki Kinishita

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

¹⁾Center for the Maternal-Fetal and Neonatal Medicine, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

The ectopic pregnancy has been known to increase in consequence of infertility therapy including in vitro fertilization and embryo transfer. We, therefor, analyzed possible factors regarding infertility therapy induced ectopic pregnancy. Between January 1994 and December 1996, we had 559 successful cases after infertility therapy in our out-patient clinic. For these cases, we investigated HSG films, laparoscopic findings as well as existence of chlamydial infection. The occurrence of ectopic pregnancy in the cases with tubal factor was 6.3% (11/175), in contrast to 0.5% (2/384) of the cases without tubal factor, whereas 61.5% of the cases of ectopic pregnancy had the history of chlamydial infection. There were five (4.5%) of 111 patients who had undergone IVF-ET or ICSI resulted in ectopic pregnancy, four (80%) of them had hydrosalpinx. It seems likely that tubal factor is still remaining the most noteworthy factor for infertility therapy induced-ectopic pregnancy including IVF-ET.

Key words: ectopic pregnancy, hydrosalpinx, peritubal adhesion, chlamydia infection, assisted reproductive technology.

(Jpn J Fertil Steril 45:227-231 2000)

The Use of Frozen-thawed Spermatozoa Obtained from Alloplastic Spermatocele for Intracytoplasmic Sperm Injection

Takeshi. KURAMOTO, Arief. BOEDIONO, Michiyo. SUGIOKA,
Tsuna. UMEBAYASHI, Kimiko. FUKUDA, Mutsuro. MOTOISHI,
Kiyoshi. KOMATSU¹⁾, Hirofumi. TAKIHARA²⁾ and Hidekazu. SAITO³⁾

Kuramoto Women's Clinic
Fukuoka 812-0012, Japan

¹⁾Department of Urology, Hara Sanshin Hospital
Fukuoka 812-0033, Japan

²⁾Department of Urology, Onoda City Hospital
Onoda 756-0088, Japan

³⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Yamagata University School of Medicine,
Yamagata 990-9585, Japan

Abstract: This present study investigated the effectiveness of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using cryopreserved spermatozoa aspirated from alloplastic spermatocele for the treatment of 2 couples that were infertile due to obstructive azoospermia (case 1) and the emissional disorder (case 2). In case 1, the azoospermic condition was caused by previous inguinal herniorrhaphy and in case 2, the emissional disorder was caused by previous retroperitoneal lymphnode dissection for the treatment of testicular tumors. The rates of fertilization and cleavage were 100% and 100%, respectively for case 1 and 42% and 21% for case 2, after ICSI with frozen-thawed alloplastic spermatocele spermatozoa. Healthy babies were born from both wives. This clinical investigation indicates that ICSI with frozen-thawed alloplastic spermatocele sperm is an alternative treatment for infertile couples with obstructive azoospermia or emissional disorder as male factors.

Key words: alloplastic spermatocele, sperm cryopreservation, ICSI, male factor infertility.

(Jpn J Fertil Steril 45:233-237 2000)

Introduction

A significant number of infertile men demonstrate conditions that prevent transport of spermatozoa from the somniferous tubules to the ejaculate, including congenital absence, atresia or dysplasia of the vas deferens, failed attempts at reconstruction of the vas deferens or epididymovasostomy, or ejaculation owing to retroperitoneal surgical dissection. Pamerol and Marina¹⁾ reported that 48 percent of cases of azoosper-

mia were caused by congenital anomalies of the genital tract. If both the congenital absence of ejaculatory ducts and/or an extensive segment of the vas deferentia and the acquired damages that make a reconstructive operation of the seminal pathway impossible are considered, there is a large number of patients in whom the possibility of recovering fecundity involves only the creation of a spermatocele for the retention of spermatozoa followed by intrauterine insemination (IUI). Hanley²⁾ first created a spermatocele by mak-

ing a cavity with amniotic tissue and, subsequently achieved a pregnancy after IUI. Most reports regarding alloplastic spermatocele (AS) followed by IUI in humans, however, have indicated low success rates. Recently, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is the newest and most successful micromanipulation technique for treating male factor infertility³⁾. The subsequent fertilization of human oocytes by ICSI confirmed its clinical application for the treatment of infertile couples in whom the male partner had severely compromised semen parameters. But some patients who have male factor infertility desire their baby without attempting ICSI. They want to try IUI in their first therapy.

We reported here, the success of using cryopreserved spermatozoa obtained by AS for ICSI in 2 infertile couples whose motile sperm concentration was not insufficient for IUI.

Case report

Both husbands had only a single testis since they previously underwent orchiectomy in 1 testis due to testicular trauma at 37 years of age in case 1 and testicular tumors at 39 years of age in case 2. Both their wives, 37 years of age in case 1 and 39 years of age in case 2, had normal reproductive cycles. In case 1, the azoospermic condition was caused by previous bilateral inguinal herniorrhaphy and in case 2, the emissional disorder was caused by previous retroperitoneal lymphnode dissection for the treatment of testicular tumors. Testicular biopsies confirmed normal spermatogenesis and motile spermatozoa in both husbands. Therefore, the construction of alloplastic spermatocele for IUI was performed.

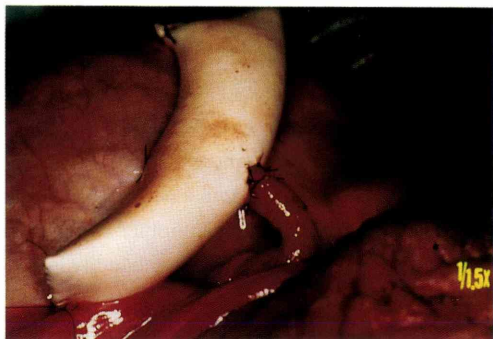


Fig. 1 Alloplastic spermatocele construction

AS was constructed in a closed tube fashion with the use of an 8 mm diameter expanded polytetrafluoroethylen (PTFE) graft. The 5 cm graft was sutured to the ends of the bilateral side with 6-0 nylon (Fig. 1). After surgical exploration of the right testis, the vas deferens was dissected and cut while keeping the blood supply at the distant side of the testis. Then, the vas deferens was microsurgically sutured to the side point of the AS with 8-0 nylon. The AS was then placed into the scrotal space with the testis and fixed under the lateral scrotal skin to allow easy access for fluid extraction. The AS was reconstructed twice in case 1 and once in case 2 due to insufficient motile sperm concentration. Percutaneous aspiration was performed until successful sperm extraction (Fig. 2). In case 1, sperm extraction was performed 36 times and in 6 trials, motile spermatozoa were present in the extraction (Table 1). In case 2, sperm extraction was performed 7 times and in 6 trials motile spermatozoa were present (Table 1). However in both cases, IUI was not performed due to insufficient motile sperm concentration and they were attempted ICSI procedure by using cryopreserved spermatozoa Table 2 shows the concentration of spermatozoa obtained from alloplastic spermatocele just after collection, after 80% Percoll treatment and after thawing. Although cryopreservation reduced sperm quality, there were still enough aggressively motile spermatozoa for ICSI.

Wives were down-regulated with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogue (Sprecure; Hoechst Marion Roussel, Tokyo, Japan) and ovarian superovulation was performed by administering human menopausal gonadotropin (hMG, Humegon; Organon, Holland) and pure follicle-stimulating hormone



Fig. 2 Sperm extraction from alloplastic spermatocele

Table 1. Results of spermatocele aspirations in 2 patients who had successful sperm extraction.

Grafting	Weeks after grafting	Case1		Case2	
		Sperm concentration*	Motility (%)	Sperm concentration*	Motility (%)
I	2	250	0	22	5
	3	420	0	21	3
	4	250	0	27	4
	5	146	0	—	—
	6	95	0	24	0
II	2	750	0	212	42
	3	—	—	110**	5
	4	166	5	64	9
	5	111	0.6	—	—
III	2	520	0	—	—
	3	231	3	—	—
	4	118	1	—	—
	5	38	3	—	—
	6	45**	9	—	—

* Sperm×10⁶/ml
** Initial aspiration used for ICSI

Table 2. Concentration of spermatozoa obtained from alloplastic spermatocele after collection, Percoll treatment and thawing (before ICSI was performed).

Treatment		Sperm concentration*	Motile sperm concentration*	Motility (%)
Case 1	Aspirated sperm	45.0	4.1	9.0
	80% Percoll	68.0	10.0	15.0
	Thawing	18.0	0.8	1.0
Case 2	Aspirated sperm	110.0	5.5	5.0
	80% Percoll	193.5	52.0	27.0
	Thawing	65.5	0.8	1.0

*Sperm×10⁶/ml

Table 3. Results after ICSI with frozen-thawed spermatozoa obtained from alloplastic spermatocele.

	Case 1	Case 2
No. of aspirated oocytes	7	21
No. of metaphase II oocytes injected	4	19
Intact oocytes (% of injected)	4 (100)	19 (100)
1 PN oocytes (% of injected)	0 (0)	1 (5)
2 PN oocytes (% of injected)	4 (100)	8 (42)
3 PN oocytes (% of injected)	0 (0)	1 (5)
Embryo cleaved (% of 2PN oocytes)	4 (100)	8 (100)
Transferable embryo	3	7
No. embryo transferred	3	3
No. embryo frozen	0	4

(FSH, Fertinorm P; Serono, Tokyo, Japan). Oocytes were collected with an 18 gauge single lumen needle (Hakko, Tokyo, Japan) guided by vaginal ultrasound 35 to 36 hours after hCG was administered. ICSI was performed with intact oocytes that had developed to the metaphase II stage which were identified by the presence of a single polar body. The rates of normal fertilization (with the presence of 2 pronuclei) after ICSI in cases 1 and 2 were 100% and 42%, respectively (Table 3). All fertilized oocytes cleaved and the best 3 were transferred to the mother 2 days after oocyte retrieval. Supernumerary embryos in the second couple were cryopreserved for the further use. Healthy babies were born with normal deliveries from both wives; a girl (3288g) was born to the first couple at 41 gestational weeks and a girl (3164g) was born to the second couple at 38 gestational weeks.

Conclusion

Over the last decade, a number of investigators have used a range of spermatocele designs constructed with saphenous silicon prosthesis⁴⁾, cup-shaped silicon-dacron prosthesis⁵⁾, woven polypropylene⁶⁾, and polytetrafluoroethylen (PTFE) vascular^{7, 8)}. Although several pregnancy have been reported insemination with the spermatozoa from the alloplastic spermatocele, the results were poor. These poor results may have been due to both the low number of spermatozoa and the low number of aggressively motile spermatozoa obtained from the alloplastic spermatocele. Poor sperm recovery may have resulted from occlusion of the epididymal ducts or vas deferens, occlusion of the spermatocele lumen, and/or low sperm output by the testis. Moreover, in cases in which all of the spermatozoa were immotile, IUI resulted in no pregnancies⁸⁾. In this study, we obtained spermatozoa from the alloplastic spermatocele with expanded PTFE graft material (Fig. 1). Marmar et al.⁸⁾ demonstrated that the PTFE graft prevented spermatozoa leakage and was able to withstand multiple needle punctures. Implanting the device into a dartos punch allowed easy access for aspiration. We have not encountered any problems with infections due to the grafts and to date we have not had to remove any implant. Therefore, spermatozoa collection from the alloplastic spermatocele is useful for ICSI and infertile couples who tried to IUI for their first therapy with obstructive azoospermia or ejaculatory dysfunction as male factors have more chances for ICSI.

Cryopreservation of human spermatozoa is a widely accepted technique in artificial insemination. How-

ever, it is well known that cryopreservation reduces sperm quality. Since the minimal spermatozoa require for obtaining fertilization and pregnancy after ICSI, cryopreserving poor-quality spermatozoa to perform ICSI after thawing is possible. This strategy is of great importance when we deal with valuable sperm samples, such as spermatozoa surgically retrieved from the epididymis, testicle or alloplastic spermatocele.

References

- 1) Pamerol JM and Marina S (1976) Congenital and postinflammatory obstruction of the male reproductive tract. In: Human semen and fertility regulation in men. Hafez ESE(Ed.). St Louis: CV Mosby Co. 398
- 2) Hanley H (1955) The surgery of male subfertility; Hunterian lecture. *Ann Roy Coll Surg Eng* 17:159
- 3) Palermo GD, Joris H, Devroy P, et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18
- 4) Kelami A, Rohloff D, Affeld K, et al. (1977) Alloplastic spermatocele, insemination from epididymis reservoir. *Urology* 10:317-319
- 5) Wagenknecht LV, Weitze KH, Hoppe LP, et al. (1980) New development in surgical andrology: alloplastic spermatocele. *Invest Urol* 17:432-434
- 6) Jimenez-Cruz JF (1980) Alloplastic spermatocele. *J Urol* 123:885-886
- 7) Turner T (1988) On the development and use of alloplastic spermatoceles. *Fertil Steril* 49:387-395
- 8) Marmar JI, DeBenedictis TJ and Praiss DE (1984) Clinical experience with an alloplastic spermatocele. *J Androl* 5:304-311

(Received February 24, 2000)

(Accepted May 16, 2000)

人工精液瘤より採取した凍結精子を用いた卵細胞質内精子注入法

蔵本武志, Arief Boediono, 杉岡美智代, 梅林ツナ, 福田貴美子,
元石睦郎, 小松 潔¹⁾, 瀧原博史²⁾, 斎藤英和³⁾

蔵本ウイメンズクリニック

¹⁾原三信病院泌尿器科

²⁾小野田市立病院泌尿器科

³⁾山形大学医学部産婦人科

人工精液瘤造設手術を行った2症例より回収した凍結・融解精子を使用して、顕微授精(卵細胞質内精子注入法: ICSI)ー胚移植を行った。症例1は、幼少時に鼠径ヘルニア手術による閉塞性無精子症であり、症例2は、精巣腫瘍根治術の腹膜リンパ節郭清手術により射精障害を起こし、2症例ともに人工精液瘤造設術が施行された。回収された精子の凍結・融解後における運動率が不良のためICSIを行った結果、受精率および分割率は、症例1で100%および100%、症例2で42%および21%であった。2症例ともに3個の分割胚を移植した結果、2症例ともに妊娠が認められ、健児の出生に至った。これらの結果より、閉塞性無精子症などでは、精巣上体精子の性状がはじめ不良なものでも人工精液瘤を造設し、反復して精子採取を行うことで、運動精子を回収できる可能性があり、これにICSIを併用することで妊娠および健児を出産できることが明らかとなった。

キーワード: 人工精液瘤造設, 精子凍結, 卵細胞質内精子注入法, 男性不妊

(日不妊会誌 45:233-237 2000)

Epididymal Micropuncture; Our Experience During the Past Seven Years

Hatsuki HIBI, Hidetoshi FUKATSU, Yoshimasa ASADA¹⁾ and Masanori YAMAMOTO²⁾

Department of Urology, Aichi Medical University,
Nagakute 480-1195, Japan

¹⁾Fertility Center, Nakajima Clinic,
Aichi 480-0202, Japan

²⁾Division of Urology, International University of Health and Welfare,
Tochigi 324-0011, Japan

Abstract: In December 1991, we developed a new sperm collection method involving an epididymal micropuncture technique to obtain as many uncontaminated spermatozoa as possible for use in microinsemination for patients with obstructive azoospermia^{1, 2)}. Epididymal sperm was collected by a combination of micropuncture and fixation of pipette on the micromanipulator. The epididymal tunic was carefully incised and the micropipette with a silastic tube was directly inserted into a dilated epididymal tubule. Epididymal spermatozoa were obtained from 77 patients by using this method during the past seven year. The volume of epididymal fluid obtained ranged from 1 to 900 μ l (mean 102 μ l). Sperm concentration ranged from 0.1 to 269million (mean 45million). The sperm motility ranged from 0.1-80% (mean 17%). When aspirated epididymal spermatozoa were supplied for *in vitro* fertilization (IVF)/partial zona dissection (PZD)/subzonal insemination (SUZI), the clinical pregnancy rate per cycle was only 12% (3/25), while spermatozoa were supplied for intracytoplasmic sperm injection (ICSI), the clinical pregnancy rate per cycle was 38.5% (20/52).

Key words: epididymal micropuncture, obstructive azoospermia, intracytoplasmic sperm injection (ICSI)
(Jpn J Fertil Steril 45:239-244 2000)

Introduction

Azoospermia caused by congenital absence of the vas deferens or failed reconstruction of seminal tract used to be a serious problem. Schlegel et al. reported that epididymal micropuncture using a glass capillary tube could be used successfully for epididymal sperm retrieval³⁾. During the advancement of assisted reproductive technology we developed a sperm collection technique to obtain as many uncontaminated motile spermatozoa as possible. In 1992, intracytoplasmic injection of single spermatozoon into a oocyte (ICSI) was reported as the ultimate treatment for women who have not become pregnant by *in vitro* fertilization (IVF) or subzonal insemination (SUZI) of oocytes⁴⁾.

Since a high pregnancy rate had been achieved by ICSI, the aspirated spermatozoa from the epididymal fluid were used for ICSI from 1994. We report the epididymal sperm collection system by using a micropuncture technique and pregnancy results after microinsemination procedure during the past seven years.

Patients and Methods

Patients

From December 1991 to March 1998, 115 azoospermic men were considered candidates for microinsemination using spermatozoa obtained from the epididymis. The age of patients ranged from 27 to 47 years (mean 34.1) and the partners from 25 to 40 years

Table 1: Clinical differences between MESA group and TESE group

	Testis size (ml)	LH (mIU/l)	FSH (mIU/l)
MESA group (n=52)	14.5±2.0	4.55±2.39	11.68±4.38
TESE group (n=38)	13.6±1.9	3.71±0.80	14.44±4.38
P value*	0.748	0.703	0.676

data were expressed as mean ± SEM

* Fisher's test

(mean 32.1). The causes of azoospermia were as follows: congenital absence of the vas deferens (n=56), epididymal obstruction of unknown cause (n=28), epididymal obstruction associated with chronic urinary tract infection due to spinal injury (n=4), vasal obstruction due to herniorrhaphy in childhood who did not desire to receive a seminal reconstruction (n=20), failed reconstruction of seminal tract (n=6) and vasectomy at the time of radical cystectomy for invasive bladder cancer (n=1).

Micropipette preparation

Preparation of micropipettes and the method of micropuncture were as follows: A micropipette for puncture was drawn on a horizontal puller (Narishige Scientific, model PN-3, Tokyo, Japan) from constant-bore flint glass tubing with an outside diameter of 1 mm. and inside diameter of 0.7mm. The pipette tips were sharpened on a rotating wet stone grinder (Narishige, model EG-6) to a diameter of about 75µm, and were washed in soap and rinsed with distilled water, coated with silicon and then allowed to dry completely. The pipettes were sterilized by ethylene oxide gas prior to use.

Surgical procedure for epididymal micropuncture

The procedure was performed under general or epidural anesthesia in the initial 81 cases, and that in the later 34 cases under local anesthesia with spermatic block by lidocaine. The testis and epididymis were exposed through a scrotal incision and immobilized in a testicular holder with the aid of 2% agar. The preparation of the micropipette and the micropuncture method have been previously reported¹⁾. The micropipettes were placed in a micromanipulator (Narishige, model MM-133) fixed on the metal plate and connected to a 10ml glass syringe with a silastic tube. The epididymal tunic was incised and the loop of epididymal tubules was exposed under an operat-

Table 2: Retrieved epididymal sperm characteristics (n=77)

Fluid volume (µl)	1-900 (mean 102)
Sperm concentration (×10 ⁶ /ml)	0.1-269 (mean 45)
Motility (%)	0.1-80 (mean 17)

ing microscope at X10-25 magnification. The epididymal tubule was punctured in an avascular area. The pipette tip was withdrawn gently 0.3-0.5mm. from the lumen and adjusted for maximum flow. A puncture site was carefully selected following the puncture method of Schlegel et al.³⁾ The first micropuncture site was always on the testicular side of the grossly dilate white tubules that were located mostly in the caput epididymis. Subsequent punctures were made at a more proximal site until an optimal sperm quality was obtained. When no further fluid could be obtained, the pipette was removed from the tubule and the fluid was transferred into modified human tubar fluid (m-HTF, Naka medical, Tokyo, Japan), and sent to a IVF laboratory. If spermatozoa were not presented in an aspirated sample after repeated puncture, a testicular sperm extraction (TESE) was performed. Closure of puncture site was not necessary. Since 1997, collected spermatozoa have been cryopreserved in ten patients for subsequent ICSI in an asynchronous IVF cycle.

Results

Operation

The operation time ranged from 38 to 100 (mean 63.5) minutes. Oral analgesics were administered for a few days in some cases.

Retrieved sperm characteristics

Epididymal spermatozoa were obtained by using a micropuncture technique in 77 patients. (MESA group) On the other hand, TESE was performed in 38 patients because of absence of spermatozoa in aspirated fluid from several epididymal micropuncture procedures. (TESE group) No significant differences

Table 3: Outcome of microinsemination

	MESA-IVF/PZD/SUZI	MESA-ICSI	TESE-ICSI
Clinical pregnancy	3/25 (12%)	20/52 (38.5%)	12/38 (31.5%)
Live delivery	3/25 (12%)	20/52 (38.5%) (included 2 twins)	12/38 (31.5%) (included 2 twins)
Abortion	Not observed	Not observed	3/12 (25%)

MESA= microscopic epididymal aspiration

IVF= *in vitro* fertilization

PZD= partial zona dissection

SUZI= subzonal insemination

ICSI= intracytoplasmic sperm injection

were observed between MESA group and TESE group in regard to testis size, LH and FSH value. (Table 1) The volume of epididymal fluid obtained ranged from 1 to 900 μ l (mean 102 μ l). Sperm concentration ranged from 0.1 to 269million/ml (mean 45million/ml). The sperm motility ranged from 0.1-80% (mean 17%). (Table 2) Cryopreservation of aspirated spermatozoa was performed to five patients in MESA group and to five in TESE group.

Outcome of microinsemination

The clinical pregnancy was confirmed by ultrasonography with detection of the gestational sac. The overall clinical pregnancy rate per cycle was 29.9% (23/77) in the MESA group, while 31.5% (12/38) in the TESE group. When aspirated epididymal spermatozoa were supplied for IVF/PZD/SUZI, the clinical pregnancy rate per cycle was 12% (3/25), while spermatozoa were supplied for ICSI, the clinical pregnancy rate per cycle was 38.5% (20/52). Three abortions were observed in the TESE group at eight weeks, eight weeks, and twenty-five weeks, respectively. Thirty-two live deliveries (included 4 twins) were achieved without any abnormalities. (Table 3) Of these, nine cesarean section (9/29, 31%) were performed. Birth weight and weeks of delivery were at average 2711g (1614-3626) and 38.2 weeks (33-41), respectively.

Discussion

Some cases of male infertility due to obstructive azoospermia are amenable to surgical reconstruction such as vasoepididymostomy or vasovasostomy. However, others associated with congenital absence of the vas deferens have been considered untreatable until the development of alloplastic reservoir. Although the collection of spermatozoa was possible from artificial

spermatocele as a reservoir for subsequent homologous insemination, the aspirated sperm quality and outcome of pregnancy has been reported to be very poor⁵.

Another interesting approach to the treatment of congenital absence of the vas deferens has been reported by Silber et al.⁶ who showed that microsurgical aspiration of spermatozoa from the proximal epididymis combined with IVF resulted in two pregnancies. They later reported a large series of human pregnancies achieved by IVF using spermatozoa aspirated directly from the epididymis in men with congenital absence of the vas deferens. They reported that clinical pregnancy was achieved in 10 of the 32 treatment cycles⁷.

The micropuncture technique is thought to be useful because it allows the collection of large volumes of epididymal fluid without contamination of blood cells and tissue fluid in the research laboratory to examine the transepithelial androgen movement in the epididymides of animals⁸. We have found micropuncture to be a very useful technique to aspirate epididymal spermatozoa from the men with obstructive azoospermia as reported by Schlegel et al.³ Our technique of epididymal sperm collection involves a combination of micropuncture and fixation of pipette on the micromanipulator^{1,2}. The epididymal tunic was carefully incised and meticulous hemostasis was made with bipolar cautery. Then a glass micropipette with a silastic tube was directly inserted into a dilated epididymal tubule. Therefore, any micromanipulation of the epididymis is best performed under the operating microscope, or at least high power optical loupe. The advantage of this technique is uncontaminated and relatively large volume of epididymal fluid (mean 102 μ l) could be retrieved. Initially, we used the col-

lected spermatozoa for IVF/PZD/SUZI. The clinical pregnancy rate was only 12%. The low clinical pregnancy rate in our initial series, compared to previous reports^{3,7)}, may have been attributed to the poor motility of epididymal sperm and immaturity of microinsemination technique. The epididymal sperm has been documented to have abnormal quality. The reason might be that there were dead and degenerating sperm mixed with maturing sperm in a shortened, obstructed epididymal tubule. SUZI and PZD treatment for epididymal sperm strongly supported the use of micromanipulation with epididymal sperm. However, application of PZD and SUZI instead of conventional IVF yielded only limited improvement in pregnancy⁹⁾.

In 1992, successful use of ICSI to achieve pregnancy was reported in four women who had not become pregnant by IVF or SUZI treatment⁴⁾. Tournaye et al.¹⁰⁾ used microsurgical epididymal aspiration combined with ICSI and obtained an overall pregnancy rate of 50%. Their successful pregnancies could be attained using microfertilization in addition to the sperm collection method. Furthermore, Schlegel et al. reported that the results with ICSI were better for all categories of results (fertilization, clinical pregnancy, on going pregnancy and deliveries) than the IVF/PZD/SUZI procedure¹¹⁾. Now ICSI has replaced conventional IVF as the most prominent method using sperm obtained by epididymal sperm aspiration.

To avoid an open surgical procedure, percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and testicular fine needle aspiration have been developed^{12, 13)}. This procedure has an advantage that it is easily performed and is more acceptable to patients, but this procedure may damage the tissue because of the blind puncturing. The original percutaneous epididymal sperm aspiration method has been modified slightly by making a small window on the scrotum. This modified percutaneous sperm aspiration technique has yielded successful results¹⁴⁾. Dohle et al. reported that epididymal and testicular retrieved spermatozoa were successfully used for ICSI to treat obstructive azoospermia, and resulted in an ongoing pregnancy in 10 of 24 couples (41.6%). Their epididymal spermatozoa were collected microsurgically in four cases and percutaneously in 18 cases¹⁵⁾. Meniru et al. also reported that

the outcome of PESA-ICSI treatment compared favourably with that of ICSI using ejaculated spermatozoa¹⁶⁾. Although PESA does not require microsurgical skill, the volume of epididymal fluid that can be obtained with PESA is quite small¹⁷⁾. On the other hand, testicular fine needle sperm aspiration reported that was less effective as compared to open sperm extraction¹⁸⁾.

Although epididymal physiology is of proven flexibility, the pregnancy obtained with testicular spermatozoa by using the ICSI technique even bypassed epididymal factor such as glycoproteins¹⁹⁾. When ICSI is performed with ejaculated, epididymal or testicular sperm, good fertilization and pregnancy rates are achieved without significant differences among the various sperm sources¹⁴⁾. In our series, there were no significant differences between MESA group and TESE group in regard to pregnancy rate, testis size, LH and FSH value. We have tried to aspirate sperm from epididymis even though in a case of slightly high FSH value.

Factors other than spermatozoa could be the major determinant of the success of assisted reproduction treatment in cases of male infertility. Silber et al. reported the effect of female age and ovarian reserve on the pregnancy rate²⁰⁾. Wives of azoospermic men who were in their 20s had a 46% live delivery rate per cycle, but wives over 40 years had only a 4% live delivery per cycle. They emphasized that the pregnancy rate and the live delivery rate were dependent strictly on the age of the wife, and on her ovarian reserve.

With the advancement of cryopreservation techniques, the use of frozen-thawed epididymal sperm has been reported and now widely used²¹⁾. Cha et al. reported that no difference was found in the rates of fertilization and pregnancy between the frozen-thawed epididymal sperm and the fresh epididymal sperm¹⁴⁾. Thus, surplus spermatozoa should be cryopreserved for future use. Since the Ethical Committee allowed the cryopreservation of spermatozoa from 1997 March at our institute, we attempted this procedure in ten patients. Of these, four pregnancies and live deliveries were attained.

In conclusion, we have performed epididymal micropuncture to men with congenital absence of the vas deferens or surgically irreparable vasal obstruc-

tion during the past seven years. The pregnancy rate per cycle of approximately 39% and live delivery rate of approximately 32% were achieved. This technique offers a larger quantity of uncontaminated spermatozoa that can be frozen and stored for future ICSI procedure.

Acknowledgments

These procedures were mostly performed at Nagoya University. We thank Professor Shinichi Oshima and Dr Satoshi Katsuno for kindly supporting this study.

References

- 1) Yamamoto M, Hibi H, Miyake K, et al. (1995) Successful pregnancy after microfertilization with epididymal sperm retrieved by micropuncture technique in the patient with congenital absence of the vas deferens. *Urol Int* 54:165-168
- 2) Yamamoto M, Hibi H, Miyake K, et al. (1995) Bulk sperm collection by epididymal micropuncture and stimulation of the spermatic nerve: a novel method for sperm retrieval for IVF for surgically irreparable vasal obstruction. *Int J Androl* 18:97-102
- 3) Schlegel PN, Berkely AS, Goldstein M, et al. (1994) Epididymal micropuncture with *in vitro* fertilization and oocyte micromanipulation for the treatment of unreconstructable obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 61:895-901
- 4) Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340:17-18
- 5) Turner TT (1988) On the development and use of alloplastic spermatoceles. *Fertil Steril* 49: 387-395
- 6) Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C, et al. (1988) Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: A new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 50:525-528
- 7) Silber SJ, Ord T, Balmaceda J, et al. (1990) Congenital absence of the vas deferens. The fertilizing capacity of human epididymal sperm. *New Engl J Med* 323:1788-1792
- 8) Yamamoto M, Nagai T and Miyake K (1991) Different mechanisms are involved in 3H-androgen uptake by the rat seminiferous and epididymal tubules in vivo. *Nagoya J Med Sci* 53:33-41
- 9) Fishel S, Timson J, Lisi F, et al. (1992) Evaluation of 225 patients undergoing subzonal insemination for the procurement of fertilization *in vitro*. *Fertil*

Steril 57:840-849

- 10) Tournaye H, Devroey P and Liu J (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
- 11) Schlegel P, Palermo G, Alikani M, et al. (1995) Micropuncture retrieval of epididymal sperm with *in vitro* fertilization: importance of *in vitro* micromanipulation technique. *Urology* 46:238-241
- 12) Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, et al. (1994) Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 9:2058-2061
- 13) Belker AM, Sherins RJ, Dennison-Lagos L, et al. (1998) Percutaneous testicular sperm aspiration: a convenient and effective office procedure to retrieve sperm for *in vitro* fertilization with intracytoplasmic sperm injection. *J Urol* 160:2058-2062
- 14) Cha KY, Oum KB and Kim HJ (1997) Approaches for obtaining sperm in patients with male factor infertility. *Fertil Steril* 67:985-995
- 15) Dohle GR, Ramos L, Pieters MH, et al. (1998) Surgical sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection as treatment of obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 13:620-623
- 16) Meniru GI, Gorgy A, Batha S, et al. (1998) Studies of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update* 4:57-71
- 17) Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S, et al. (1994) Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 9:2058-2061
- 18) Friedler S, Raziel A, Strassburger D, et al. (1997) Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 12:1488-1493
- 19) Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, et al. (1993) Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet* 342:1237
- 20) Silber SJ, Nagy Z, Devroey P, et al. (1997) The effect of female age and ovarian reserve on pregnancy rate in male infertility: treatment of azoospermia with sperm retrieval and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12:2693-2700
- 21) Nagy Z, Silber S, Liu J, et al. (1995) Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 63:808-815

(Received April 19, 2000)

(Accepted June 7, 2000)

精巣上体微小穿刺法；7年間の経験

日比初紀，深津英捷，浅田義正¹⁾，山本雅憲²⁾

愛知医科大学泌尿器科教室

¹⁾ナカジマクリニック

²⁾国際医療福祉大学泌尿器科

1991年より閉塞性無精子症に対し，精巣上体の微小穿刺法による精子採取術を行ってきた．マイクロピペットをマイクロマニピュレーターに接続し，精巣上体管に直接穿刺して精巣上体管内液を採取した．7年間に77例の閉塞性無精子症患者に施行した．採取された精巣上体管内液は1から900マイクロリットル，精子濃度は10万/mlから2億6900万/ml，運動率は0.1%から80%であった．採取された精子がIVF/PZD/SUZIに供された場合の妊娠率は12%であったが，ICSIに供された場合の妊娠率は38.5%であった．

キーワード：微小穿刺法，閉塞性無精子症，顕微授精

(日不妊会誌 45:239-244 2000)

PCOS 症例に対するゴナドトロピン製剤 初期投与量についての検討

The Comparison of the Initial Dose of Gonadotrophin in Ovulation Induction for the Patients with Polycystic Ovary Syndrome.

伊 東 宗 毅

Munetake ITOH

石 原 理

Osamu ISHIHARA

斉 藤 正 博

Masahiro SAITOH

林 直 樹

Naoki HAYASHI

木 下 勝 之

Katsuyuki KINOSHITA

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

Department of Obstetrics and Gynaecology, Saitama Medical Centre,
Saitama Medical School, Kawagoe 350-8550, Japan

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)における、より安全で有効な排卵誘発プロトコールを作成するために、PCOS症例12例に対して、初期投与量を75IU/日あるいは100IU/日に設定したFSH製剤投与量漸増法によるゴナドトロピン療法を試みた。その結果、対象とした全周期に排卵が得られ、両群とも各2周期に妊娠が成立した。多胎妊娠はなく、中等症以上の卵巣過剰刺激症候群も発生しなかった。同一症例に対して両法を試みた4例において比較すると、100IU/日群において、ゴナドトロピンの投与期間が短く総投与量が少ない傾向があった。ゴナドトロピン製剤の選択肢の拡大により、PCOSにおける排卵誘発を個別化することがより容易になった。

キーワード：PCOS, FSH, 排卵誘発, OHSS

(日不妊会誌 45:245-249 2000)

緒 言

多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)は、日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会の報告¹⁾によれば、月経異常、LHの基礎分泌高値とFSH正常範囲(LH>FSH)、超音波断層検査による卵巣所見で多数卵胞の嚢胞状変化を特徴とする症候群である。また、PCOSは通常、排卵障害をともなうため、不妊症を主訴とするカップルにおいて、しばしば不妊因子のひとつとして認められる。たとえば、当科不妊外来における1990～91年妊娠症例169例のうち、22例、約13%にPCOSが認められている²⁾。従って、PCOSを不妊因子として持つ婦人に対しては、不妊治療の目的で排卵誘発を行うことが必須となるが、この場

合、クロミフェンが有効である症例は限られ、また排卵が認められても妊娠が成立しないため、FSH製剤などゴナドトロピン療法を要することがしばしばある³⁾。

ところが、PCOS症例に対してゴナドトロピン療法を行うと、同時に多数の卵胞が発育することがしばしばあり、その結果、多胎妊娠や卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の発生するリスクが排卵を有する婦人と比較すると、極めて高くなることが問題である⁴⁾。そこで、これらを回避するため、ゴナドトロピン製剤として、LH含量の少ないFSH製剤を用いることや、少量のゴナドトロピンを長期間投与する方法、投与法の工夫、たとえば投与量を漸減(ステップダウン)あるいは漸増(ステップアップ)することが提案さ

れてきた^{5,6)}。

一方、最近FSH注射製剤において、1アンプル中に含まれるFSHが100IUである製剤が使用可能となったため、PCOSに対するゴナドトロピン療法の際に、FSH投与量の選択において幅が広がった。そこで、PCOS症例に対するゴナドトロピン療法において、従来の1アンプル75IUの製剤と比較して卵巣の反応性に異なる点があるかどうか、また、二種類の製剤を使い分けることにより多胎妊娠やOHSSをより回避しやすくなる可能性があるかどうかを検討した。

対象および方法

1999年1月から12月の間に埼玉医科大学総合医療センター産婦人科不妊外来に通院していた不妊症カップルのうち、日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会の提案するPCOSの診断基準を満たし、本研究に参加することの同意が得られた12例16周期を対象とした。対象の体型および内分泌的背景を表1に示す。多毛などアンドロゲン過剰を疑わせる所見を有する例はない。これら12症例の主訴は、原発性不妊症が8例、続発性不妊症が4例であり、PCOS以外の不妊因子は、1例が子宮内膜症を、1例が片側卵管の通過障害を、1例が軽度の乏精子症を有していた。また、今回の検討前に、対象症例全例においてクロミフェンによる排卵誘発を試み、5例においてクロミフェンは全く無効であり、7例は排卵についてある程度効果を認めたが、クロミフェンを3周期以上投与して治療したにもかかわらず妊娠が成立しなかったため、hMG-hCG療法の適応と判断した症例である。

排卵誘発に用いたゴナドトロピン製剤は、フェルティノームP(セローノジャパン)(75IU/A)(F周期)とヒュメゴン100(日本オルガノン)(100IU/A)(H周期)

である。いずれの場合も、月経周期3～5日から投与を開始し、初期投与量として1A/日(すなわちF周期では75IU、H周期では100IU)を用い、同量のまま1週間継続した。反応が不十分な場合2A/日(すなわち150IUまたは200IU)に増量し、さらに1週間継続することを原則とした。なお卵胞発育が不十分な場合、3A/日(すなわち225IUまたは300IU)に増量し、さらに1週間まで継続を可とした。経陰超音波断層法による観察で、首席卵胞径の長径が18mmに到達した時点で、hCG5000IU(持田製薬)を投与し、性交のタイミングを指示した。なお、5例8周期においてはhCG投与の翌日に配偶者間人工授精術(AIH)を施行した。

F周期とH周期の選択はランダムではないが、登録順に交互とし、F周期で妊娠しなかった場合次周期はH周期による治療を、H周期で妊娠しなかった場合の次周期はF周期とした。

また、排卵誘発中は、超音波断層法による観察を随時行い、卵胞発育と卵巣の腫大を観察し、少なくとも7日毎およびhCG投与時に、血中エストラジオールを測定した。排卵の確認は超音波断層法および基礎体温の上昇により確認し、OHSSの発症はWHOの定義によった。なお、統計的有意差の検討はt検定あるいは χ^2 検定によった。

成 績

排卵誘発を行なった全周期の平均をとると、表1に示すようにF周期(9例9周期)とH周期(7例7周期)の間に対象症例の背景に有意差を認めず、薬剤の総投与量や発育卵胞数など排卵誘発による卵巣の反応性も、ほぼ同等であった(表2)。

本研究は、12症例16周期を対象として行なったが、第一回目の治療周期(12例12周期)において、F

表1 フェルティノームP投与周期(F周期)とヒュメゴン100投与周期(H周期)の背景

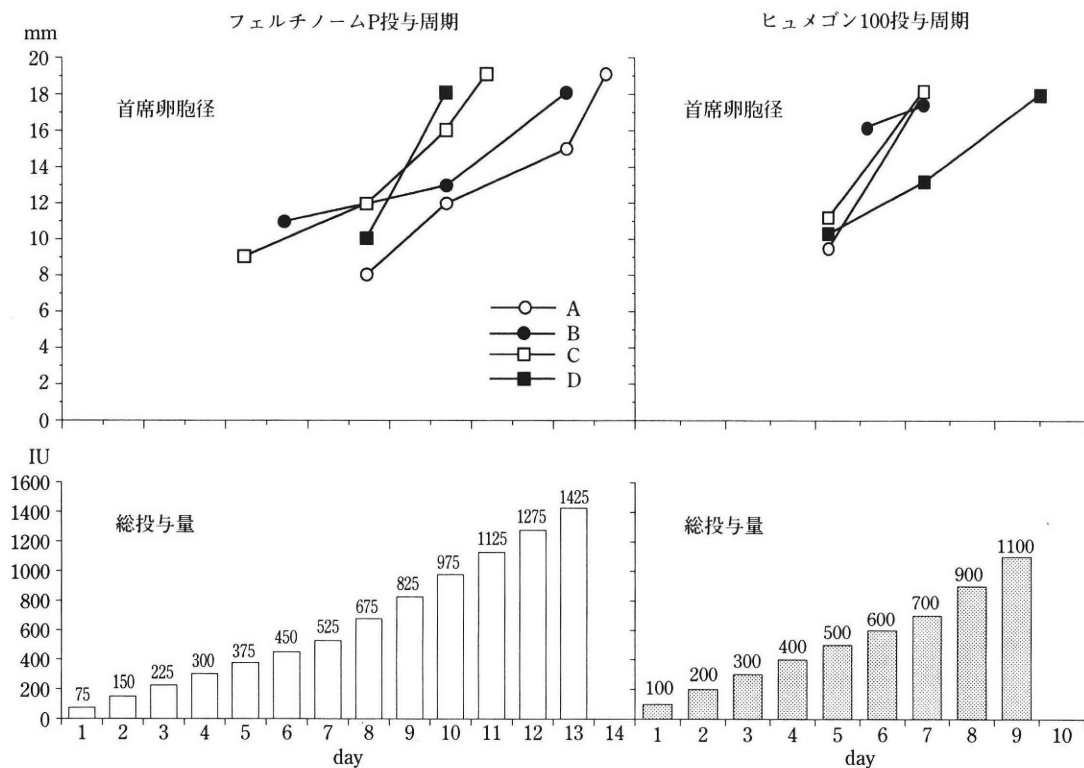
	年齢	体重(kg)	BMI	経産婦	LH(IU/l)	FSH(IU/l)	PRL(ng/ml)
F周期(n=9)	31.9±3.3	53.6±8.4	21.3±3.5	1/9	13.4±7.0	5.7±1.3	5.7±2.8
H周期(n=7)	31.5±3.3	55.8±10.6	22.0±4.3	1/8	11.0±3.2	5.6±1.3	7.4±4.3

(mean±S.D.:いずれの項目もt検定または χ^2 検定で有意差なし)

表2 フェルティノームP投与周期(F周期)とヒュメゴン100投与周期(H周期)の治療周期のまとめ

	総投与日数	総投与量(IU)	首席卵胞径(mm)	E ₂ (pg/ml)	15mm以上卵胞数	子宮内膜厚(mm)	妊娠例
F周期(n=9)	12.0±4.3	1325±742	19±1.2	1068±847	2.8±1.5	14.3±3.7	2
H周期(n=7)	11.3±4.9	1463±913	18±1.1	904±1334	2.0±1.4	13.1±2.4	2

(mean±S.D.:いずれの項目もt検定または χ^2 検定で有意差なし)



ABCD各症例のフェルチノームPおよびヒュメゴン100投与時の首席卵胞径の推移を示す。

図1 同一症例における二種類のゴナドトロピン製剤による卵胞発育の比較

表3 フェルティノームP投与周期(F周期)とヒュメゴン100投与周期(H周期)の両者を行った例の成績

	首席卵胞径10mmまでの投与量(IU) (投与日数)	hCGまでの投与量(IU) (投与日数)	hCG投与時E ₂ (pg/ml)	15mm以上の卵胞数
F周期(n=4)	694±215 (7.0±1.6)	1275±274 (10.5±2.4)	1238±189	3.8±1.7
H周期(n=4)	575±96 (4.8±0.96)	850±300 (6.8±1.5)	153±37	1
有意差(t検定)	なし	なし	p<0.01	(mean±SD)

(mean±SD)

周期, H周期全例に3週間以内に排卵が得られた。また、両群の各2例2周期に妊娠が成立した(妊娠率4/12=33.3%)。第二回目の治療周期(4例4周期)も全例に排卵が得られたが、妊娠した例はなかった(妊娠率0/4=0%)。各群とも2周期に軽度(WHO分類による1度)のOHSSを認めた(4/16=25%)が、とくに治療は要さなかった。OHSSを来した症例のうち、3例においては妊娠が成立しなかったが、H周期の1例において妊娠が成立した。なお、今回の検討の中で多胎妊娠はなかった。

F周期3例およびH周期1例において、第一周期の投

与期間が2週間以上の長期におよんだため、本人の申し出により第二周期の検討が断念され、本研究のプロトコールと異なる他の投与方法による排卵誘発へ切り替えとなった。従って、今回の検討について所期の目的を達成したのは、残り4例のみであった。すなわち4例において、F周期とH周期双方の検討が可能であった。しかし、これらの症例はいずれの治療によっても妊娠が成立しなかった。

F周期とH周期双方の検討をした4例における、卵胞発育とFSH製剤投与量の経過を図1に示す。これら4例に限ると、表3のように、首席卵胞径が10mmを

超えるまでの総投与量(投与日数)とhCG投与時点までの総投与量(投与日数)はF周期において多い(長い)傾向があったが有意差はなかった。一方、hCG投与時の血中エストロジオールは、F周期で $1238 \pm 189 \text{ pg/ml}$ 、H周期で $153 \pm 37 \text{ pg/ml}$ とF群で有意に高く($p < 0.01$)、 15 mm 以上の卵胞数は、F群で 3.8 ± 1.7 個あったのに対して、H群では4例とも1個であった。

考 察

PCOS症例に対するゴナドトロピン製剤による排卵誘発は、OHSSや多胎妊娠など、その副作用をいかにして最小限にするかが最大のポイントである。しかし、卵巣のゴナドトロピンに対する反応性には個人差が大きく、適正な投与量や投与方法を一律に決定することは困難である。従って、従来、投与可能な最少量の製剤であるフェルチノームP(75IU/A)1A/日を、原則として第一クールの初期投与量として我々は用いてきた。少量のFSH製剤たとえば37.5IU/日を長期間fixed doseで投与することによりPCOS症例においてもOHSSを回避可能である⁷⁾が、37.5IU/Aの製剤は本邦では市販されていない。また75IUを初期投与量にした場合でも、卵巣にほとんど反応の見られない例が相当数含まれる。すなわち、本研究でもF群において3例が第二周期の検討の中止を申し入れたことに示されるように、自己注射が許可されない現況では、コンプライアンスの観点から長期間にわたる連日通院を伴う注射治療を実際の臨床で行うことは困難である。

従って、今回、PCOSを有する症例において、初期投与量として100IU/日を用いることにより、75IU/日を用いた場合と比較して卵胞発育の遅延する症例を減少できる可能性を追求するために、本研究を計画した。しかし、実際には、第一回目の排卵誘発により妊娠する症例がかなりあったこと(今回の検討では33.3%)、また、反応の悪い症例では少量からのステップアップを繰り返すことは、前段に述べたように、コンプライアンスの面から困難であることが明らかとなり(第一周期で妊娠が成立しなかった8例中4例が本研究からドロップアウトした)、実際に両法を比較検討できた症例は4例にすぎなかった。同様のプロトコルを継続しても、症例数の増加は期待できず、従って、本研究はきわめて少数例の検討で終了せざるを得なかった。

しかし、両法を比較できた4例についてみると、100IU/日の初期投与量で開始した場合、投与期間が

短く、総投与量が少量であるだけでなく、成熟卵胞数が少ないことが明らかで、100IU/日が初期投与量として必要十分である例がPCOSのなかに存在することが示唆された。すなわち、ゴナドトロピンに対する卵巣の反応性について、症例により異なる閾値、すなわち75IUでは不十分であるが100IUであれば十分である症例が存在することが示唆された。

一方、FSH製剤に含まれるLH含量も、PCOS症例における排卵誘発の際に重要である。OHSSなどの副作用を最小限度にするためにはLH含量の少ない製剤が有利であると考えられ、本研究で用いたフェルティノームPおよびヒュメゴン100は、現在市販中の製剤の中では、いずれもLH成分が少ないとされるが、今回は、薬剤のロット間におけるLH含量の差など詳細は検討していない。

また、今回の検討から、ゴナドトロピンの初期投与量に反応しない症例に対して、本研究のプロトコルのように、機械的に倍量に増量するステップアップは、結果的に多数の卵胞を育てる可能性につながり、あまり好ましくないことが示唆された。すなわち、PCOSに対する安全な排卵誘発のためには、その個人の卵巣反応性をまず、かなり微妙なレベルで評価する必要がある。従って、現在37.5IU/AのFSH製剤が、本邦では入手できない以上、100IU/Aの製剤の存在価値が十分あると思われる。

しかし、一方、初期投与量として、75IU/日でも100IU/日でも、本プロトコルにより2週間以上の投与を有する反応の良くない例が、現在の定義ではPCOSに含まれることが明らかである。すなわち、このような卵巣の反応性の低い症例を含めてPCOSとして同一に取り扱うのではなく、PCOSをいくつかのサブグループに分け、治療を個別化する必要性がある⁸⁾。今回、各症例のLH基礎値やLH/FSH比、フリーテストステロン値、体重、BMIなどを子細に検討し、この可能性を追求したが、症例数が不十分であるため、症例毎に必要とするFSH初期投与量の決定に参考となるよい指標は得られなかった(データ省略)。言い換えれば、PCOSのサブグループを設定する場合も、これらとは異なる指標をあらたに導入する必要のあることが示唆された。また、今後、症例を追加してサブグループ化したうえで、腹腔鏡による卵巣表面のdrillingなど外科的治療の有効性や、GnRHパルスやクロミフェンなど薬物療法の有効性に差がないか検討する必要があると思われる。

以上をまとめると、現時点では、PCOSに対するゴナドトロピン療法において、多胎妊娠やOHSSの

リスクを最小限にするためには、FSHの初期投与量は、従来と同様に少量から、ある程度試行錯誤的に検討していくことが必要である。しかし、異なる量の製剤が利用可能となったことは、症例に応じて一日投与量の選択の幅を広げたことで、一定の意義があると考えられる。

文 献

- 1) 本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会(1993) 生殖・内分泌委員会報告(本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会検討結果報告) 日産婦誌 45:1359-1367
- 2) 斉藤正博, 石原 理, 飯野好明 他(1994) 不妊治療における妊娠例の不妊原因と診療法に関する検討 日不妊会誌 39:266-271
- 3) 本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する小委員会(1995) 生殖・内分泌委員会報告(本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の治療法に関する小委員会検討結果報告) 日産婦誌 47:1287-1291
- 4) 石原 理, 飯野好明, 斎藤正博 他(1994) 排卵を

有する不妊婦人に対するhMG療法の有用性に関する検討 日産婦誌 46:221-226

- 5) Andoh K, Mizunuma H, Liu X, et al. (1998) A comparative study of fixed-dose, step-down, and low-dose step-up regimens of human menopausal gonadotropin for patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 70:840-6
- 6) Hugues JN, Cedrin-Durnerin I, Avril C, et al. (1996) Sequential step-up and step-down dose regimen: an alternative method for ovulation induction with follicle-stimulating hormone in polycystic ovarian syndrome. *Hum Reprod* 11:2581-4
- 7) Messinis IE and Milingos SD (1997) Current and future status of ovulation induction in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod Update* 3:235-53
- 8) Hughes E, Collins J and Vandekerckhove P (2000) Ovulation induction with urinary follicle stimulating hormone versus human menopausal gonadotropin for clomiphene-resistant polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst* 2:CD000087

(受付: 2000年 5月 1日)

(受理: 2000年 6月 7日)

The Comparison of the Initial Dose of Gonadotrophin in Ovulation Induction for the Patients with Polycystic Ovary Syndrome.

Munetake Itoh, Osamu Ishihara, Masahiro Saitoh,
Naoki Hayashi and Katsuyuki Kinoshita

Department of Obstetrics and Gynaecology, Saitama Medical Centre,
Saitama Medical School, Kawagoe 350-8550, Japan

In order to establish safer and efficient ovulation induction protocol in polycystic ovary syndrome (PCOS), we set the initial dose of gonadotrophin as 75IU/day or 100IU/day in the gonadotrophin step-up regimen for the twelve patients with PCOS. The successful ovulation was achieved in all the cycles with both doses studied, and two patients of the both groups were eventually pregnant. There were neither cases with multiple pregnancy nor ovarian hyperstimulation syndrome occurred in this study. However, we were able to shorten the average length of injection days and to decrease the average total dose of gonadotrophin in the cases when we started with 100IU/day as an initial dose. Therefore, the 100IU seems to be a better choice in certain cases and might help individualize the ovulation induction protocol in the cases with PCOS.

Key words: PCOS, FSH, Ovulation induction, OHSS

(Jpn J Fertil Steril 45:245-249 2000)

Two Kinds of Galactosyltransferases in Fluids from Rat Rete Testis and Epididymis

Midori IIDA, Tadasu URASHIMA and Tokihiro MATSUZAWA¹⁾

Department of Bioresource Science, Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080-8555, Japan

¹⁾Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of
Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, 080-8555, Japan

Abstract: Two kinds of galactosyltransferase activities were detected in fluids from both the rete testis and the epididymis of rat. One enzyme (named GalTase A) transferred Gal from UDP-Gal to N-acetyllactosamine, whereas another one (named GalTase B) transferred Gal to GlcNAc. The GalTase A activity was stronger in the epididymal fluid than in the rete testicular fluid, whereas the GalTase B activity was higher in the testicular fluid than in the epididymal fluid. The GalTase B activity depended absolutely on the presence of Mn^{2+} , whereas the GalTase A activity was activated more by the presence of Mg^{2+} than Mn^{2+} . Both galactosyltransferases were shown to transfer Gal to sperm membrane fractions collected from sperms in the epididymis.

The GalTase A and GalTase B were suggested to be α 3galactosyltransferase and β 4galactosyltransferase, respectively, based on substrate specificities. Although α 3galactosyltransferase activity was stronger in the epididymal fluid than in the rete testicular fluid, the lectin staining with BSIB₄ showed that there were more α -Gal units in the glycoconjugates on the surface of sperm cells of the rete testis than those of the epididymis. It is possible that the non reducing Gal α 1-3 linkage in the glycoconjugates on the sperm surface is hydrolyzed by α -galactosidase activity during passage through the epididymis.

Key words: galactosyltransferase, rat, rete testis, epididymis, sperm

(Jpn J Fertil Steril 45:251-258 2000)

Introduction

Mammalian spermatozoa in the testis and caput epididymis are generally incapable of binding to the zona pellucida and fertilizing the egg. The mammalian epididymis is thought to provide the specific intraluminal environment for the morphological and biochemical modifications necessary to produce functionally mature spermatozoa. The sperm plasma membrane, vital to the early events in fertilization, undergoes extensive biochemical changes as spermatozoa pass from the caput to the cauda region of the epididymis. Although certain details of these biochemical modifi-

cations are still unclear, many data elucidate that sperm surface glycoconjugates are modified during passage through the epididymis¹⁻⁴⁾. Two groups of glycoprotein-modifying enzymes, glycosyltransferases and glycohydrolases, are reported to be present in the luminal fluid of epididymis^{3,5-14)}. The enzymes in the former modify the existing glycoproteins by adding sugar residues from the donor (sugar nucleotide) to the acceptor molecules, and the enzymes in the latter cleave the terminal sugar residues from the existing glycoconjugates.

The activities of some glycosyltransferases such as galactosyltransferase^{6,8)}, fucosyltransferase^{8,9)} and

sialyltransferase^{5,8)} as well as β 3N-acetylglucosaminyltransferase¹⁰⁾ have been detected in the rat rete testicular fluid or the epididymal fluid. These enzymes are assumed to modify the sugar moieties in sperm surface glycoconjugates during passage through the epididymis. Hamilton⁶⁾ has reported the activity of one galactosyltransferase, which transfers galactose (Gal) from UDP-Gal to N-acetylglucosamine (GlcNAc), in rat rete testicular and epididymal fluids. This galactosyltransferase was assumed to be β 4galactosyltransferase from the inhibition of the activity by α -lactalbumin. However, the activity of another type of galactosyltransferase, which transfers Gal from UDP-Gal to the Gal residue of N-acetylglucosamine (Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc), has not been detected in the testicular and epididymal fluids yet, even though it has been found in many mammalian tissues and fluids^{15, 16)}.

This study suggests that a galactosyltransferase, which transfers Gal from UDP-Gal to N-acetylglucosamine, is present in the rat epididymal and testicular fluids.

Materials and methods

1 Materials

N-Acetylglucosamine (Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc) was purchased from Seikagaku Co., Tokyo, Japan. Galactose (Gal), lactose and N-acetylglucosamine (GlcNAc) were obtained from Kanto Kagaku Co., Tokyo, Japan. UDP-Gal, Bandeiraea Simplicifolia BS-I isolectin B4 (BSI-B4) labeled with FITC and α -galactosidase from green coffee beans were from Sigma Co., St. Louis, USA. UDP-[³H]Gal was purchased from Daiichi Kagaku Co., Tokyo, Japan. Fucal β 1 $\rightarrow$ 2Gal β 1 $\rightarrow$ 4Glc (2'-fucosyllactose) was separated from a brown bear milk¹⁷⁾.

2 Preparation of testicular sperm and rete testicular fluid

Adult male rats of the Wistar strain (11 to 20 weeks old) were used throughout this experiment. Testicular sperm were collected from rete testis using a micro vinyl tube (id. 0.2 mm) by the method of Hamilton⁶⁾. The sperm with rete testicular fluid thus collected were centrifuged at 1500 X g for 5 min. The supernatant obtained was stored at -20°C as "rete testicular fluid". The fluid from several animals was pooled for

enzyme assay. The sperms isolated from the fluid were also employed as "testicular sperm" after washing with PBS 3 times.

3 Preparation of cauda epididymal sperm and fluid

The cauda epididymis with a small stump of vas deferens was dissected free of fat, and the tangled epididymal tube was unconvoluted carefully using tweezers under a dissecting microscope. Then cauda epididymal sperm with sticky fluid were gently forced out from the tube by retrograde flushing with a small amount of PBS, and collected by centrifugation at 3000 X g for 5 min. The supernatant thus obtained was used as "epididymal fluid". The sperms were washed with PBS 3 times and employed as cauda epididymal sperm.

4 Estimation of sperm number

Sperm diluted in PBS were enumerated with a hemacytometer.

5 Isolation of sperm plasma membrane

The suspension containing sperm plasma membrane was obtained by the method of Tulsiani et al.¹⁸⁾. The cauda epididymal spermatozoa were suspended with 1.0ml of 0.1% Triton X-100, and the suspension was centrifuged at 3000Xg for 5 min to obtain the supernatant.

6 Galactosyltransferase assay

Galactosyltransferase (GalTase) activities were assayed as described previously for N-acetylglucosaminyltransferase¹⁰⁾ with some modifications.

GalTase activity with N-acetylglucosamine as an acceptor was assayed as follows. The incubation mixture consisted of 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0), 20mM MgCl₂, 2mM ATP, 1.5mM UDP-[³H]Gal (10 kBq per 100 μ l incubation mixture), 40 mM N-acetylglucosamine and 40 μ l of rete testicular or epididymal fluid. The total volume was 100 μ l. Parallel incubations without acceptor were performed to correct for any hydrolysis of UDP-Gal. After incubation for 24 h at 37°C, the reaction mixture was cooled in ice to stop the reaction and passed immediately through Bio-Rad AG 1X8 ion exchange resin (Cl⁻ form, 200-400 mesh) contained in a Pasteur pipette to remove residual UDP-[³H]Gal. The incorporation of [³H]Gal into

N-acetyllactosamine was determined by liquid scintillation counting with a Packard Tri-Carbo scintillation counter.

The assay conditions for another GalTase activity with GlcNAc as an acceptor were as follows. The incubation mixture consisted of 50 mM sodium cacodylate buffer (pH 7.0), 20mM MnCl_2 , 2mM ATP, 1.5mM UDP-Gal containing UDP- ^3H Gal (10 kBq per 100 μl incubation mixture), 40mM GlcNAc and 40 μl of rete testicular or epididymal fluid. The total volume was also 100 μl . The incubation was performed at 37°C for 4 hr. The other steps for the assay were as described above. Protein concentration was measured by the micro method of Matsusawa et al.¹⁹⁾ using bovine serum albumin as the standard.

7 The transfer of [^3H]galactose to the sperm plasma membrane fraction

The transfer of [^3H]galactose to the sperm plasma membrane fraction was carried out as above except that the incubation was conducted in the absence of acceptor, N-acetyllactosamine or GlcNAc.

For the assay of GalTase, various amounts of the sperm plasma membrane fraction were added to the assay mixture (total 140 μl) containing 50mM cacodylate buffer (pH 7.0), 20mM MgCl_2 or MnCl_2 , 2mM ATP, 1.5mM UDP-Gal containing UDP- ^3H Gal (10 kBq per 100 μl) and 20 μl epididymal fluid with 20% α -lactalbumin for GalTase A or without α -lactalbumin for GalTase B. The incubation and determination of the incorporation of [^3H]galactose were carried as above. Parallel incubations without acceptors were performed.

8 Histochemical staining methods for sperm, testis and epididymis with FITC labeled lectin

Both testis and epididymis were frozen in liquid nitrogen, sectioned at 10 μ in a cryostat and dried on cover slips at room temperature. Testicular or epididymal sperm suspended in PBS were also spread out on coverslips to dry. These tissue sections or sperm on coverslips, after being fixed in 10% formalin for 3 min and washed with PBS, were incubated in PBS containing 1% FITC labeled BSI-B4 at 37°C for 30 min or 3 hrs. After the incubation they were washed with PBS and mounted in "crystallmount (Cosmo Bio Co., To-

kyo, Japan)" for examination under an Olympus fluorescence system (BX-60) within 4 hrs. For control, tissue sections or sperm were pre-incubated in a medium containing both BSA and labeled lectin. Tissue sections and sperm treated with α -galactosidase (2 units/ml in 0.1 M phosphate buffer, pH 6.0) at 37°C for 8 hrs were also employed for control.

Results

1 Characterization of two kinds of GalTases in fluids from rat rete testis and epididymis

Preliminary experiments showed that the fluid from both rat rete testis and epididymis had two kinds of GalTase activities which catalyzed the transfer of Gal from UDP-Gal to N-acetyllactosamine or GlcNAc. The galactosyltransferase activity, which transfers Gal to N-acetyllactosamine, named "GalTase A", was stronger in the epididymal fluid than in the testicular fluid, whereas another galactosyltransferase activity, which transfers Gal to GlcNAc, named "GalTase B", was stronger in the testicular fluid than in the epididymal fluids (Table 1). The activities for both GalTases in the rete testicular and epididymal fluids were optimal at pH 7.0 (Fig. 1).

Table 1 Activities of GalTase A and B in the both of testis and epididymis

	GalTase A	GalTase B
	MEAN $\pm$ S.D. (1×10^{-1})	MEAN $\pm$ S.D.
Testis	0.82 $\pm$ 0.04 (3)	1.51 $\pm$ 0.14 (2)
Cauda Epididymis	4.2 $\pm$ 0.98 (3)	0.14 $\pm$ 0.01 (2)

(n mol of UDP-Gal/min $\cdot$ mg-1 of protein)

Numbers in parentheses indicate times for experiments.

Table 2 Effects of various divalent metal ions on GalTase A and GalTase B activities of rat epididymal fluids

Metal ions	Relative activity	
	GalTase A ^{a)}	GalTase B ^{b)}
Mn ²⁺	25	100
Ca ²⁺	30	24
Mg ²⁺	100	19
Zn ²⁺	44	15
Co ²⁺	21	30
Cd ²⁺	14	11

The relative activities were calculated from mean value in triplicate experiments.

^{a)} These were expressed in the relative values that of Mg^{2+} as 100.

^{b)} These were expressed in the relative values that of Mn^{2+} as 100.

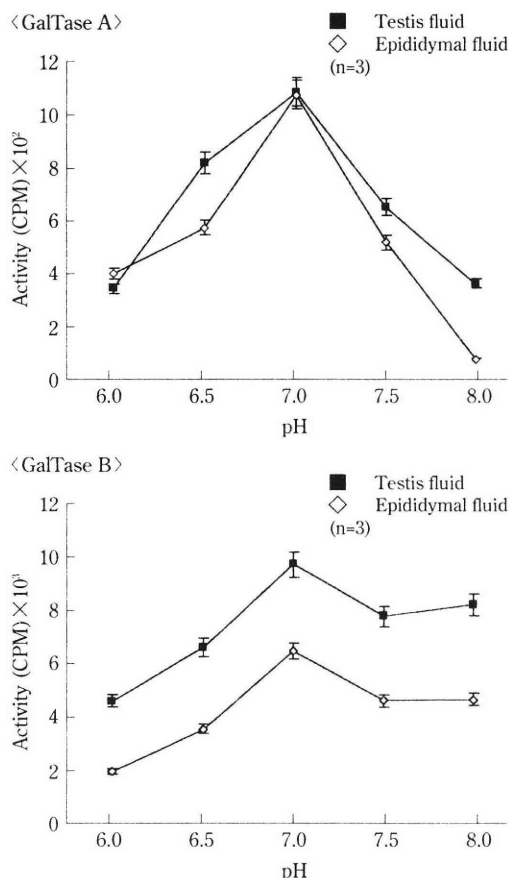


Fig. 1 Effect of pH on the activities of (1) GalTase A and (2) GalTase B in the rat rete testicular and the epididymal fluids. The buffers employed were sodium cacodylate (pH 6.0-8.0), all at 50mM. Numbers in parenthesis indicate the experimental times.

The effects of divalent metal ions on the GalTase activities were examined at the 20mM concentration with the epididymal fluids (Table 2). The "GalTase B" activity depended absolutely on the presence of Mn^{2+} , though other ions, including Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , and Cd^{2+} , were only partially effective. On the other hand, Mg^{2+} was more effective than Mn^{2+} for the "GalTase A" activity. The activities of "GalTase A" and "GalTase B" in the epididymal fluid in the presence of Mg^{2+} or Mn^{2+} were maximal at above 40mM, although the Mg^{2+} concentration had no effect on "GalTase B" activity in the epididymal fluid (Fig. 2). In both the epididymal and the testicular fluid, the "GalTase A" activity with Mg^{2+} and "GalTase B" activity with Mn^{2+} were completely inhibited by addition of 20mM EDTA (data not shown).

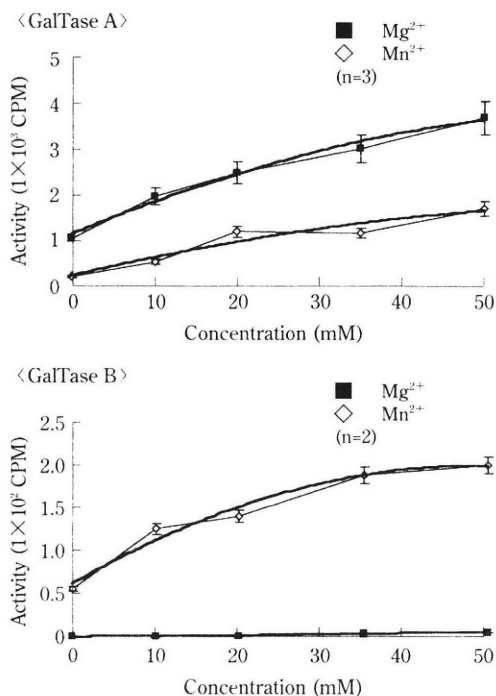


Fig. 2 Effects of concentration of Mg^{2+} and Mn^{2+} on (1) GalTase A and (2) GalTase B activities of rat epididymal fluids. Numbers in parenthesis indicate the experimental times.

The "GalTase B" activity in the epididymal fluid was completely inhibited by addition of 10% α -lactalbumin, whereas the "GalTase A" activity in the epididymal fluid was not (data not shown). The addition of 0.1% triton X-100 had no effect on the activities of either "GalTase A" or "GalTase B" in the epididymal fluid (data not shown).

2 Acceptor specificity for "GalTase A"

A few oligosaccharides or monosaccharide were examined as acceptors for "GalTase A" activity in the epididymal fluid at 40mM (Table 3). Lactose and ga-

Table 3 Acceptor specificities of the GalTase A activities of rat epididymal fluids

Acceptor (40mM)	Relative ^{a)} activity
Gal β 1 $\rightarrow$ 4GalNAc	100
Gal β 1 $\rightarrow$ 4Galc	78
Gal	31
Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal β 1 $\rightarrow$ 4GalNAc	0

The relative activities were calculated from mean value in triplicate experiments.

^{a)} These were expressed in the relative values that of Gal β 1 $\rightarrow$ 4GalNAc as 100.

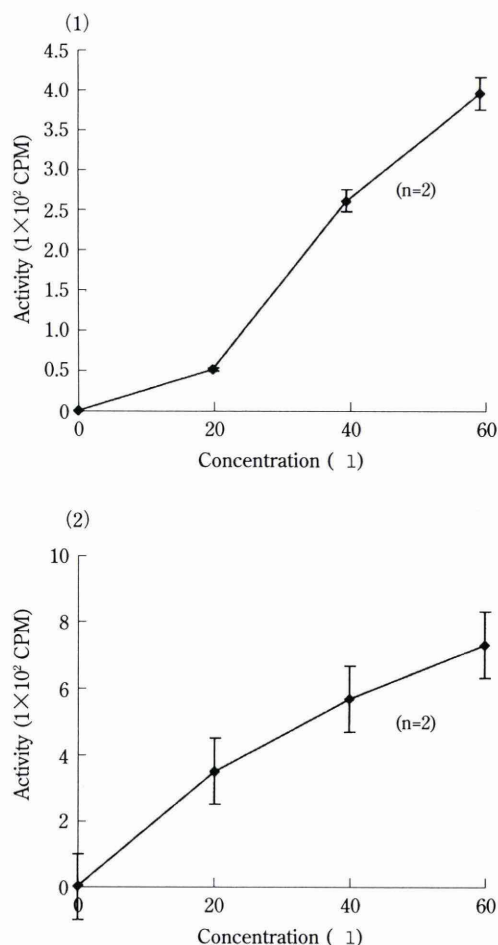


Fig. 3 Effects of the amounts of sperm plasma membrane fraction on (1) GalTase A and (2) GalTase B activities of rat epididymal fluids. The GalTase A and B activities were measured with 20% α -lactalbumin or without α -lactalbumin, respectively, in the reaction mixtures. Numbers in parenthesis indicate the experimental times.

lactose as well as N-acetyllactosamine showed acceptor specificities for the "GalTase A", whereas 2'-fucosyllactose did not.

3 "GalTase A" and "GalTase B" activities in the epididymal fluid for the sperm membrane fraction as acceptors

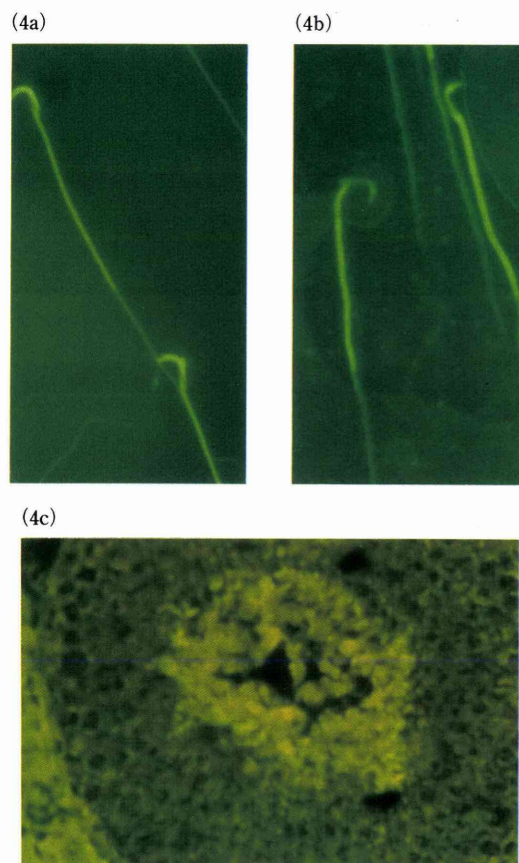
For "GalTase A" activity assay, the mixture contained 20mM $MgCl_2$ and 20% α -lactalbumin to suppress "GalTase B" activity, whereas it contained 20 mM $MnCl_2$ for "GalTase B" assay without α -lactalbumin. In the reaction without α -lactalbumin, the in-

corporation of [3H] Gal into sperm plasma membrane should be mostly due to the "GalTase B" activity of the fluids, because the activity of "GalTase B" was significantly higher than that of "GalTase A" (see Table 1).

It was shown that both GalTases had acceptor specificities for the sperm membrane fraction and the incorporation of [3H]Gal increased in accord with the amount of the membrane fraction added (Fig. 3).

4 Histochemical observation

As the galactosyltransferase activity, which transfers Gal from UDP-Gal to N-acetyllactosamine, was assumed to be due to α 3galactosyltransferase, the



(a) Rat testicular sperm. Their heads show a strong reaction with BSI-B4 labeled FITC. $\times 600$.
 (b) Rat epididymal sperm. Their heads show no staining reaction. $\times 600$.
 (c) Tissue section of rat testis. The heads and nuclei of spermatids on later stages show the reaction. No reaction was demonstrated in nuclei of other cells, spermatogonia and spermatocytes.

Fig. 4

surfaces of rete testicular sperms as well as epididymal sperm were investigated for staining by the lectin which recognized Gal α 1 $\rightarrow$ 3Gal units in glycoconjugates.

Testicular sperm head showed a positive staining reaction with labeled BSI-B4 which bound specially to α -Gal residue, while the head of epididymal sperm did not show a reaction (Figs. 4a and b). In testicular sections, the positive reaction was also observed in the head of sperm (Fig. 4c). This indicated that the positive reaction for labeled BSI-B4 in the head of free testicular sperm was not induced artificially by the preparation of sperm from rete testis. No control sperm which was digested by α -galactosidase showed the reaction.

Discussion

This study shows that two kinds of galactosyltransferase activities, which differ in both substrate specificity and the requirement of divalent metal ion, existed in rat rete testicular fluids and epididymal fluids. "GalTase B" was assumed to be β 4galactosyltransferase, which transfers Gal from UDP-Gal to non reducing GlcNAc of the glycoconjugates to produce Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-R, from its substrate specificity for GlcNAc and the inhibition by α -lactalbumin. The activities of β 4galactosyltransferase have been detected in the rete testicular fluids and sperm cell surfaces of the rat^{6, 8)}, mouse²⁰⁾ and human^{21, 22)}.

"GalTase A" was assumed to be α 3galactosyltransferase, which transfers Gal from UDP-Gal to non reducing Gal of the LacNAc unit in the glycoconjugates to produce Gal α 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-R, based on its substrate specificity. This GalTase has not been detected in rat epididymal fluids or rete testicular fluids.

The activity level of "GalTase A" was higher in rete testicular fluids than in epididymal fluids, whereas that of "GalTase B" was higher in epididymal fluids than in rete testicular fluids. "GalTase B" required Mn²⁺ for the expression of its activity, whereas "GalTase A" preferred Mg²⁺ to Mn²⁺. These results showed that modification of the glycoconjugates on rat sperm to produce LacNAc may occur in the rete testis rather than in the epididymis, whereas that to produce Gal α 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc-R may occur in the epididymis rather than the rete testis. The formations of LacNAc

or Gal α 1 $\rightarrow$ 3Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc in the epididymis or in the rete testis are assumed to be stimulated by different divalent metal ions, namely Mn²⁺ or Mg²⁺.

Activities of both "GalTase A" and "GalTase B" in the epididymal fluids were detected for sperm plasma membranes as acceptors. This suggests that the modifications of the glycoconjugates in sperm surfaces is induced by these two galactosyltransferases during passage through the epididymis.

The staining reaction with BSI-B4 lectin, which specially recognizes non reducing α 1 $\rightarrow$ 3Gal in the glycoconjugates, was strong in testicular sperm heads, while the sperms treated with α -galactosidase were not stained with the lectin. Thus, the testicular sperm heads had a non reducing α 1 $\rightarrow$ 3Gal unit in the surface glycoconjugates. On the other hand, the head of epididymal sperm did not show staining with the lectin. It was concluded that the number of non reducing α 1 $\rightarrow$ 3Gal units in the glycoconjugates on the sperm surface was reduced during passage through the epididymis. This is, however, not consistent with the result that the activity of α 3galactosyltransferase was stronger in the epididymal fluids than in the rete testicular fluids. α -Galactosidase activity has been reported in the rete testis²³⁾. It is possible that the non reducing Gal α 1 $\rightarrow$ 3 linkage in the glycoconjugates on the sperm surface is hydrolyzed by α -galactosidase activity during passage through the epididymis. The activity of α -galactosidase may be stronger than that of α 3galactosyltransferase in the epididymis.

In conclusion, the modification to the glycoconjugates on rat sperm surface, which occurs during the passage of the sperm through the epididymis, involves several glycosyltransferases such as β 4galactosyltransferase and α 3galactosyltransferase as well as glycosidases such as β -galactosidase and α -galactosidase.

References

- 1) Hammerstedt RH and Parks JE (1987) Changes in sperm surface associated with epididymal transit. *J Reprod Fertil Suppl* 34:133-149
- 2) Eddy EM (1988) The spermatozoon. In: Knobit E, Neill J (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd. 27-102
- 3) Orgebin-Crist M-C (1987) Post - testicular development of mammalian spermatozoa. In: *Morphological Basis of Human Reproduction Function*.

- New York: Plenum Press; Acta Med 115-174
- 4) Yanagimachi R (1988) Mammalian fertilization. In: Knobil E, Neill J (Eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press Ltd. 135-185
 - 5) Bernal A, Torres J, Reyes A, et al. (1980) Presence and regional distribution of sialyl transferase in the epididymis of the rat. *Biol Reprod* 23:290-293
 - 6) Hamilton DW (1980) UDP-Galactose: N-acetylglucosamine galactosyltransferase in fluids from rat testis and epididymis. *Biol Reprod* 23:377-385
 - 7) Tandolili B, Wilson J, Reddy PRK, et al. (1976) Characteristics and hormonal control of some glycoprotein glycosyltransferase reactions in male reproductive organs. *Adv Enzyme Regul* 7:291-323
 - 8) Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Holland MK, et al. (1993) Glycosylation of rat sperm plasma membrane during epididymal maturation *Biol Reprod* 48:417-428
 - 9) Samir SR and Clarke FM (1995) Glycosidic specificity of fucosyltransferase present in rat epididymal spermatozoa. *J Androl* 16(5):448-456
 - 10) Tsuji Y, Urashima T and Matsuzawa T (1996) The characterization of a UDP-N-acetylglucosamine: Gal β 1-4Glc (NAc) β 1-3N-acetylglucosaminyltransferase in fluids from rat rete testis. *Biochim Biophys Acta* 1289:115-121
 - 11) Skudlarek MD and Orgebin-Crist M-C (1986) Glycosidases in cultured rat epididymal cells: enzyme activity, synthesis, and secretion. *Biol Reprod* 35:167-178
 - 12) Skudlarek MD and Orgebin-Crist M-C (1988) Effects of swainsonine on rat epididymal glycosidases. *J Reprod Fertil* 84:611-617
 - 13) Skudlarek MD, Tulsiani DRP and Orgebin-Crist M-C (1992) Rat epididymal luminal fluid "acid" β -D-galactosidase optimally hydrolyses glycoprotein substrate at neutral pH. *Biochem J* 42:843-858
 - 14) Tulsiani DRP, Skudlarek MD, Araki Y, et al. (1995) Purification and characterization of two forms of β -D-galactosidase from rat epididymal luminal fluid: evidence for their role in the modification of sperm plasma membrane glycoprotein(s). *Biochem J* 305:41-50
 - 15) Hosomi DW and Takeya A (1989) Identification of a soluble UDP-Gal: Gal(β 1-4)Glc (or GlcNAc) (α 1-3)galactosyltransferase of bovine colostrum. *Jpn J Vet Med* 51:961-968
 - 16) Cummings RD and Mattox SA (1988) Retioid acid-induced differentiation of the mouse teratocarcinoma cell line F9 is accompanied by an increase in the activity of UDP-galactose: β -D-galactosyl α 1,3-galactosyltransferase. *J Biol Chem* 263:511-519
 - 17) Urashima T, Kusaka Y, Nakamura T, et al. (1997) Chemical characterization of milk oligosaccharides of brown bear, *Ursus arctos yesoensis*. *Biochim Biophys Acta* 1334:247-255
 - 18) Tulsiani DRP, Skudlarek MD and Orgebin-Crist M-C (1989) Novel α -D-mannosidase of rat sperm plasma membranes: characterization and potential role in sperm - egg interactions. *J Cell Biol* 109:1257-1267
 - 19) Matsuzawa T, Takekoshi M and Aikawa J (1998) A micromethod for protein assay using a light microscope. *Jpn J Vet Med* 60:1141-1143
 - 20) Cardullo RA and Wolf DE (1995) Distribution and dynamics of mouse sperm surface galactosyltransferase: implications for mammalian fertilization. *Biochemistry* 34:10027-10035
 - 21) Ross P, Vigneault N, Provencher S, et al. (1993) Partial characterization of galactosyltransferase in human seminal plasma and its distribution in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 98:129-137
 - 22) Huszar G, Sbracia M, Vigue L, et al. (1997) Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in man: Relationship among plasma membrane β 1,4galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod* 56:1020-1024
 - 23) Martinez-Garcia F, Regdera J and Cobo P (1995) The apical mitochondria - rich cells of the mammalian epididymis. *Andrologia* 27:195-206

(Received April 18, 2000)

(Accepted June 15, 2000)

ラット精巣網液および精巣上体液中の2種のガラクトシルトランスフェラーゼ活性

飯田美登里, 浦島 匡, 松澤時弘¹⁾

帯広畜産大学生物資源科学

¹⁾帯広畜産大学獣医

ラット精巣網液および精巣上体液中に、基質特異性の異なる2種のガラクトシルトランスフェラーゼ活性が検出された。一方はN-アセチルラクトサミンをアクセプターとし(GalTase Aと命名)、他の一方はN-アセチルグルコサミンをアクセプターとしていた(GalTase Bと命名)。GalTase A活性は精巣上体液よりも精巣網液で高かったが、GalTase B活性は精巣網液よりも精巣上体液で高かった。GalTase B活性は Mn^{2+} への絶対依存性を示したが、GalTase A活性は Mn^{2+} よりも Mg^{2+} の存在下でより高かった。両ガラクトシルトランスフェラーゼは、精巣上体精子から分画した細胞膜画分にもガラクトースを転移することが示された。

基質特異性に基づき、GalTase AおよびGalTase Bは各々、 $\alpha 3$ および $\beta 4$ ガラクトシルトランスフェラーゼと推定された。 $\alpha 3$ ガラクトシルトランスフェラーゼ活性は精巣網液よりも精巣上体液中で高かったが、BSIB₄を用いたレクチン染色から、精巣上体よりも精巣網での精子の表層に、 α -Galユニットが多く存在することが示された。この現象は、精巣上体通過中における精子表層への α -ガラクトシダーゼの作用によってもたらされるものと推定される。

キーワード：ガラクトシルトランスフェラーゼ, ラット, 精巣網, 精巣上体, 精子

(日不妊会誌 45:251-258 2000)

Effects of Gonadotropin Releasing Hormone Agonist on Uterine Volume in Patients with Adenomyosis, Leiomyomata or Both

Masao FUKUHARA, Tetsuko INAZU, Akiko MARUYAMA,
Yoshitsugu WATANABE, Masatoshi SANO and Gen-ichi NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamanomachi Hospital,
Fukuoka 810-8539, Japan

Abstract: An objective of this investigation is to clarify the reducing effect of gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) on uterine volume of adenomyosis. A retrospective chart review was conducted of 153 premenopausal women, 34 to 54 years of age, with adenomyosis and/or uterine leiomyomata at Hamanomachi Hospital. GnRH-a was administered for 42 to 294 days before hysterectomy. Uterine volume before and after GnRH-a treatment was measured by ultrasound imaging. Surgically removed uteri were histopathologically examined. A significant uterine volume reduction of 51.4% was achieved in cases of adenomyosis. There was no statistical difference among the reduction rates of the uterus for cases of adenomyosis, leiomyomata, or both lesions. Reduction rates in uterine volume obtained from cases of adenomyosis and leiomyomata following treatment with GnRH-a were nearly the same.

Key words: gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a), adenomyosis, leuprolide acetate, uterine volume, reduction effect

(Jpn J Fertil Steril 45:259-263 2000)

Introduction

We have reported on the reducing effect of gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a) on uterine volume in cases of leiomyomata as assessed by ultrasonography and on the uterine cavity area in leiomyomata as assessed by hysterosalpingography^{1, 2)}. There are many reports concerning the reducing effect of GnRH-a on leiomyomata size and whole uterine size in leiomyomata¹⁻⁹⁾. With the exception of a few case reports, however, it is difficult to find written evaluation of the reducing effect of GnRH-a on uterus involving adenomyosis, another condition of enlarged uterus commonly encountered in clinical practice. About 25% of all surgically removed uteri are histopathologically diagnosed as having adenomyosis^{10, 11)}, but it is very difficult to diagnose, preoperatively, whether the enlarged uterus is due to leiomyomata or adenomyosis.

Symptomatic enlarged uterus, such as hypermenorrhea and dysmenorrhea, is considered an indi-

cation for hysterectomy. Recently it is common practice to carry out vaginal hysterectomy as treatment for leiomyomas after a temporary reduction in uterine volume using GnRH-a for three or four months^{6, 8)}. It is important for the physician to know the reduction rate before administration of GnRH-a to patients with possible adenomyosis who are scheduled for vaginal hysterectomy.

We retrospectively analyzed cases with enlarged uterus who were administered GnRH-a preoperatively and who, histopathologically, were diagnosed postoperatively as having adenomyosis and/or leiomyomata. We present what is believed to be the first investigative report concerning the reducing effect of GnRH-a on uterine volume in patients with adenomyosis.

Materials and Methods

A total of 153 premenopausal women, 34 to 54 years of age, with symptomatic enlarged uterus who had undergone hysterectomy in the Department of Obstetrics and Gynecology at Hamanomachi Hospital were

Table 1. Demographic Data

	Group-A (n=28)	Group-L (n=94)	Group-AL (n=31)
Age (y)	44.7 ± 4.5	45.5 ± 3.4	46.8 ± 3.3
Weight (kg)	53.8 ± 7.1	54.6 ± 7.5	56.2 ± 9.4
Height (cm)	155.6 ± 5.3	156.5 ± 4.5	155.7 ± 5.7
Gravidity	3.3 ± 1.3	2.6 ± 1.4	3.1 ± 1.8
Parity	2.2 ± 0.7	1.9 ± 0.8	1.8 ± 0.9
Pretreatment uterine volume (cm ³)*	347.5 ± 189.0	568.8 ± 355.0	516.2 ± 350.3
Duration of GnRH-a treatment (days)	113.0 ± 58.1	117.3 ± 38.9	114.3 ± 41.0

Note: All values represent mean ± S.D.

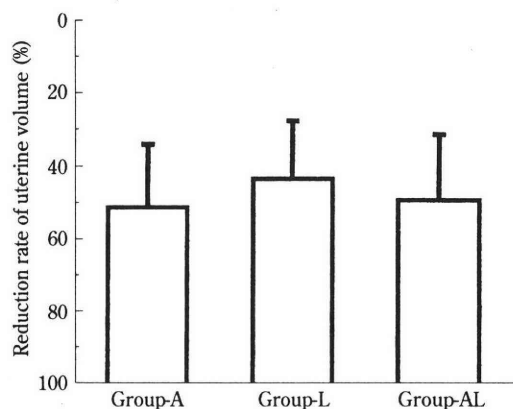
* Group-A versus Group-L, $p < 0.01$.

included in this study. Inclusion criteria included, (a) preoperative GnRH-a treatment, (b) ultrasound measurement of the three largest dimensions of the uterus, performed both before and after GnRH-a treatment, (c) hysterectomy performed immediately after GnRH-a treatment, and (d) an established postoperative histopathological diagnosis. Following the histopathological examination of surgically removed uteri, 28 patients were diagnosed with adenomyosis (Group-A), 94 patients had leiomyomata uteri (Group-L), and 31 patients had involvement of both lesion types (Group-AL). We administered GnRH-a to patients preoperatively for 42 to 294 days (116 ± 43 days, mean $\pm$ S.D.) for the purpose of treating anemia, facilitating surgical procedure (especially vaginal hysterectomy), and relieving symptoms prior to surgery. One hundred and fifty three patients received leuprolide acetate 1.88mg subcutaneous injection into the lateral abdominal wall every 4 weeks. All GnRH-a treatments were initiated within the first 5 days of the menstrual cycle for all patients. All patients had histories of regular menstrual cycles before the study and showed no signs of uterine neoplasia on cervical smear, endometrial smear or biopsy. The volume of the uterus was calculated using a prolate ellipse equation¹²⁾. All data are presented as mean $\pm$ S.D. Comparison of demographic data was performed by one-factor analysis of variance (ANOVA) and a multiple comparison test was made using Scheffé's multiple range test. A comparison of the mean uterine volume before and after GnRH-a treatment was made by the paired t-test. The difference between the groups was considered significant if p was < 0.05 .

Results

Demographic data for the three groups of patients were shown in Table 1. The three groups were very similar with respect to age, weight, height, gravidity, parity, and duration of GnRH-a treatment. The pretreatment uterine volume was shown to be statistically different between group-A and group-L.

The reduction rate of uterine volume for each group was shown in Figure 1. The mean uterine volume decreased in group-A from $348 \pm 189 \text{ cm}^3$ (147 cm^3 to 906 cm^3) to $157 \pm 77 \text{ cm}^3$ (57 cm^3 to 406 cm^3) after 113 ± 58 days (44 days to 294 days) of GnRH-a treatment, for an average decrease of 51.4%. In group-L, the mean pretreatment uterine volume was $569 \pm 355 \text{ cm}^3$ (128 cm^3 to $2,058 \text{ cm}^3$) compared with $311 \pm 191 \text{ cm}^3$ (72 cm^3 to $1,163 \text{ cm}^3$) after 117 ± 39 days (49 days to 235 days) of GnRH-a treatment, for an average decrease of 43.4%. In group-AL, the mean pretreatment



Percent reduction in uterine volume after GnRH-a treatment compared with that of pretreatment volume. Values represent mean $\pm$ S.D.

Figure 1

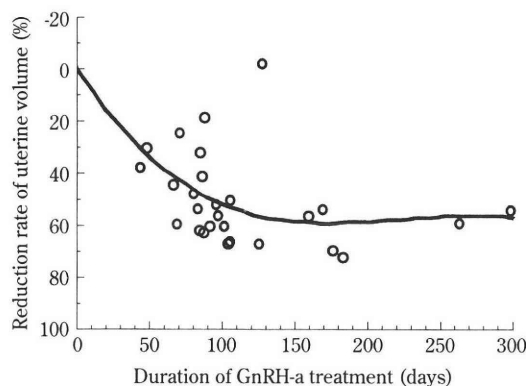
uterine volume was $516 \pm 350 \text{ cm}^3$ (195 cm^3 to $1,890 \text{ cm}^3$) compared with $240 \pm 139 \text{ cm}^3$ (69 cm^3 to 672 cm^3) after 114 ± 41 days (42 days to 225 days) of GnRH-a treatment, for an average decrease of 49.2%. There was no statistical difference among the reduction rates between the three groups. In each group, however, there was a statistical difference between the mean pretreatment uterine volume and mean uterine volume just prior to surgery ($p < 0.0001$).

Figure 2 illustrated the relationship between the duration of GnRH-a treatment and the reduction rate of uterine volume in group-A. From the regression curve of the means, the greatest reducing effect of GnRH-a treatment was found within the first 60 days, at more than 40% of pretreatment volume. After that, there was little volume reduction with continued GnRH-a treatment.

Figure 3 indicated the relationship between estimated pretreatment uterine volume and its consequent reduction rate in group-A. In 17 cases, the pretreatment uterine volume was more than 250 cm^3 . Fifteen of these cases had an overall uterine volume decrease of 40% or more. In 11 cases with pretreatment uterine volume less than 250 cm^3 , 7 cases demonstrated a volume reduction of more than 40% and 4 cases showed a reduction of less than 40%.

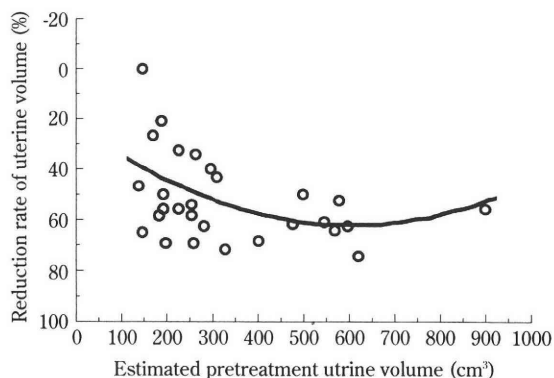
Discussion

Adenomyosis is characterized by a deep invasion



Relationship between duration of GnRH-a treatment and reduction rate of uterine volume in group-A. Third-order regression curve of the reduction rate on the duration of GnRH-a treatment is displayed. $Y = 100.0 - 0.897X + 0.004X^2 - 6.467 \times 10^{-6}X^3$, $R^2 = 0.906$, $P = 0.2397$.

Figure 2



Relationship between estimated pretreatment uterine volume of adenomyosis and its consequent reduction rate in group-A. Second-order regression curve of the reduction rate on the estimated pretreatment uterine volume is displayed. $Y = 78.205 - 0.134X + 1.1 \times 10^{-4}X^2$, $R^2 = 0.213$, $P = 0.1461$.

Figure 3

of endometrial glands and stroma within the myometrium. Clinical symptoms include enlarged uterus, dysmenorrhea, and hypermenorrhea. The severity of pain depends on the depth of the myometrial invasion. Hysterectomy is the only responsive action proven to be successful in the treatment of adenomyosis. Our literature search found only four case reports concerning GnRH-a treatment and adenomyosis¹³⁻¹⁶. Three articles reported on pregnancies following GnRH-a treatment for controlling adenomyosis¹⁴⁻¹⁶. Only one article provided a quantitative description of the changes in uterine volume during GnRH-a treatment¹³.

We and some other investigators have found that the reduction rate of uterine volume in cases of leiomyomata, when treated by GnRH-a, is between 34% and 55% of pretreatment uterine volume¹⁻⁹. In this study, we clarified that the mean uterine volume reduction of adenomyosis was 51.4%; the same value as that of leiomyomata. Most of the uterine size reduction in cases of adenomyosis occurred by the eight week of GnRH-a treatment. The duration of GnRH-a treatment for the reduction of adenomyosis is the same length as that of leiomyomata^{3,5,8,9}. Understanding the characteristics of uterine size reduction curve for adenomyosis is important for minimizing costs and maximizing the efficacy of treatment for adenomyosis uteri, especially when evaluating surgical intervention.

It was demonstrated that the reduction rate in uteri with adenomyosis of less than 250 cm^3 showed disper-

sion and reduction was less than that in uteri over 250cm³. However, so long as we use GnRH-a for the purpose of treating severe anemia and/or facilitating vaginal hysterectomy, the low reduction rate in uteri of less than 250cm³ is not an important consideration.

The temporary reduction in mean uterine volume by GnRH-a converted operative procedures that were previously performed by laparotomy into vaginal or laparoscopic hysterectomy^{8, 10}. When compared with abdominal hysterectomy, vaginal hysterectomy has been associated with a significantly lower complication rate, fewer hospitalization days, and a quicker recovery¹⁷. More recently, the feasibility and safety of outpatient vaginal or laparoscopic assisted vaginal hysterectomy has been reported^{18, 19}. As demonstrated in this study, almost the same reduction rate could be expected for uteri with adenomyosis as for leiomyomata, following GnRH-a treatment. As a result, we can use GnRH-a, preoperatively, for symptomatic enlarged uterus, for the purpose of volume reduction, facilitating vaginal hysterectomy without exact pretreatment differential diagnosis, irrespective of leiomyomata or adenomyosis. This provides a new choice of treatment for patients with adenomyosis.

References

- 1) Watanabe Y, Nakamura G, Matsuguchi H, et al. (1992) Efficacy of a low-dose leuprolide acetate depot in the treatment of uterine leiomyomata in Japanese women. *Fertil Steril* 58:66-71
- 2) Watanabe Y and Nakamura G (1995) Effects of two different doses of leuprolide acetate depot on uterine cavity area in patients with uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 63:487-490
- 3) Friedman AJ, Barbieri RL, Benacerraf BR, et al. (1987) Treatment of Leiomyomata with intranasal or subcutaneous leuprolide, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 48:560-564
- 4) Lumsden MA, West CP and Baird DT (1987) Goserelin therapy before surgery for uterine fibroids. *Lancet* 1:36-37
- 5) Friedman AJ, Harrison-Atlas D, Barbieri RL, et al. (1989) A randomized, placebo-controlled, double-blind study evaluating the efficacy of leuprolide acetate depot in the treatment of uterine leiomyomata. *Fertil Steril* 51:251-256
- 6) Stovall TG, Ling FW, Henry LC, et al. (1991) A randomized trial evaluating leuprolide acetate before hysterectomy as treatment for leiomyomas. *Am J Obstet Gynecol* 164:1420-1425
- 7) West GP, Lumsden MA, Lanson SL, et al. (1987) Shrinkage of uterine fibroids during therapy with goserelin (Zoladex): a luteinizing hormone releasing hormone agonist administered as a monthly subcutaneous depot. *Fertil Steril* 48:45-51
- 8) Schneider D, Golan A, Bukovsky I, et al. (1991) GnRH analogue-induced uterine shrinkage enabling a vaginal hysterectomy and repair in large leiomyomatous uteri. *Obstet Gynecol* 78:540-541
- 9) Kessel B, Liu J, Mortola J, et al. (1988) Treatment of uterine fibroids with agonist analogs of gonadotropin-releasing hormone. *Fertil Steril* 49:538-541
- 10) Owolabi TO and Strickler RC (1977) Adenomyosis. A neglected diagnosis. *Obstet Gynecol* 50:424-427
- 11) Molitor JJ (1971) Adenomyosis: a clinical and pathological appraisal. *Am J Obstet Gynecol* 110: 275-284
- 12) Shawker TH (1980) Monitoring response to therapy. In: Braascho DJ, Shawker TH, (eds). *Abdominal ultrasound in the cancer patient*. John Wiley and Sons, New York, pp113-134
- 13) Grow DR and Filter RB (1991) Treatment of adenomyosis with long-term GnRH analogues: A case report. *Obstet Gynecol* 78:538-539
- 14) Nelson JR and Corson SL (1993) Long-term management of adenomyosis with a gonadotropin-releasing hormone agonist: a case report. *Fertil Steril* 59:441-443
- 15) Hirata JD, Moghissi KS and Ginsburg KA (1993) Pregnancy after medical therapy of adenomyosis with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 59:444-445
- 16) Silva PD, Perkins HE and Schauburger CW (1994) Live birth after treatment of severe adenomyosis with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil Steril* 61:171-172
- 17) Dicker RC, Greenspan JR, Strauss LT, et al. (1982) Complications of abdominal and vaginal hysterectomy among women of reproductive age in the United States. *Am J Obstet Gynecol* 144:841-848
- 18) Reimer IJ (1988) Early discharge after vaginal hysterectomy. *Obstet Gynecol* 71:416-418
- 19) Summit RL Jr., Stovall TG, Lipscom BGH, et al. (1992) Randomized comparison of laparoscopy-assisted vaginal hysterectomy with standard vaginal hysterectomy in an outpatient setting. *Obstet Gynecol* 80:895-901

(Received May 2, 2000)
(Accepted June 15, 2000)

子宮腺筋症と子宮筋腫に対するGnRH agonist (GnRH-a)の縮小効果

福原正生, 稲津哲子, 丸山章子, 渡辺良嗣, 佐野正敏, 中村元一

浜の町病院 産婦人科

この研究の目的は, gonadotropin releasing hormone agonist (GnRH-a)の子宮腺筋症に対する縮小効果を明らかにすることである。浜の町病院で子宮腺筋症もしくは子宮筋腫に対して治療を行った34歳から54歳までの閉経前の患者153人について後方視的に検討した。GnRH-aを子宮摘出前に平均で116日間(42~294日間)投与した。GnRH-a治療前後の子宮の大きさを超音波断層法で計測し, 体積を算出し比較した。摘出子宮は病理組織学的検査を行い, その結果により子宮腺筋症群, 子宮筋腫群, 両者併存群に群別した。子宮腺筋症群ではGnRH-a治療により平均で51.4%の有意な縮小率が得られた。この縮小率は, 他の2群の縮小率とほぼ同程度のものではなかった。

キーワード: GnRH agonist (GnRH-a), 子宮腺筋症, 酢酸リュープロレリン, 子宮体積, 縮小効果

(日不妊会誌 45:259-263 2000)

胚盤胞移植：妊娠率向上のための Key Point

Blastocyst Transfer: The Key Point for Improving Pregnancy Rate

京 野 廣 一

Koichi KYONO

佐 藤 智 子

Tomoko SATO

福 永 憲 隆

Noritaka FUKUNAGA

拝 郷 浩 佑

Kousuke HAIGOU

千 葉 せつよ

Setsuyo CHIBA

松 尾 優 子

Yuko MATSUO

レディースクリニック京野 婦人科・泌尿器科

Department of Gynecology and Urology, Lady's Clinic Kyono,

Miyagi 989-6221, Japan

1) 反復ART不成功例に対し、D2/3胚移植(ET)、56例63周期、D5/6胚盤胞移植(BT)103例117周期を試み、着床率、妊娠率を比較、また不妊原因別、年齢別、採卵数、D1:2前核(PN)数、D3:8細胞期胚数、hCG投与時の子宮内膜の厚さ、パターンを調べ、D5/D6BTの有効な適応を検討した。その結果D2/3ETとD5/6BTでは着床率、妊娠率に差はなかった。BTの適応として不妊原因別にみても有効性の差はとくにみられなかった。

従って現状ではBTの適応は採卵数10個以上、D1:2PNが8個以上、D3:8細胞期胚が5個以上、hCG時子宮内膜8mm以上、leaf pattern、年齢40歳未満が良いと考えられる。

2) 市販の3種類のsequential medium (1)P1-Blastocyst medium (2)G1.2-G2.2 (3)K-SICM-K-SIBMを用い、また各々の培養液から3lotsを無作為に抽出しlot間の胚盤胞到達率を検討し、培養液の種類による違い、lotによる違いがあるか検討した。その結果、有意差はないものの培養液により胚盤胞到達率に違いがみられた。また各々の培養液のlot間にも差がみられており、厳密なquality control, quality assuranceが不可欠である。

3) ①5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂ ②6%CO₂, 5%O₂, 89%N₂ ③5%CO₂ in airの3種類のincubator環境下でのpH, PO₂, PCO₂を測定し、至適環境を検討した。PO₂は③では140mmHg以上と①、②に比べ有意に高く、①、②の方がin vivoの状態に近い。②の方が①に比べ、胚盤胞到達率が良い傾向がみられた。しかもPCO₂も②の状態ではどの培養液でもほぼ一定であった。pHは(1)の場合どの環境でも7.25-7.32とほぼ一定であった。

(3)では(1)に比し有意にpHが高かった。また②は①に比しpHがやや低い傾向がみられた。今後、培養液にあわせたより適な条件設定が妊娠率向上に貢献すると思われる。

キーワード：胚盤胞, sequential medium, PO₂, PCO₂, pH

(日不妊会誌 45:265-271 2000)

緒 言

胚盤胞はin vivoにおいて、子宮内膜のimplantation windowが開いている時期(排卵後5-7日目)に着床するといわれている。In vitroにおいても採卵後5-6日目の

胚移植は、卵巣刺激の影響やin vitroでの培養系で約12-18時間遅延することを考慮しても、胚の発育と子宮内膜の変化が同調しており、他の種の動物をみても、妥当である。最近、培養液が改善され、sequential mediumという卵管腔液、子宮腔液に似た組成の

培養液が入手可能となった。胚の要求に応じて2~3種類の組成の異なった培養液を使い分けることは胚にとって大変望ましいものと考えられる。近年、そのsequential mediumを使用することにより、viabilityの高い胚盤胞が作成でき、着床率、妊娠率が向上し、多胎防止にも有効との報告がなされている¹⁻⁷⁾。そこで今回、反復ART不成功例を対象としてD2/3・D5/6移植の成績を比較し有効性を検討するとともに、胚盤胞移植の適応、今後の展望について考察する。また現在、数種類の培養液が市販されているが、わかる範囲でも各々の組成に若干の違いがみられる。また、同じ培養液を使用しているのにもかかわらず成績に差があるため、代表的な3種類の培養液、そして各々3種類のlotについて胚盤胞到達率を検討した。また25mM bicarbonateを含む培養液では5%CO₂でpHが7.2~7.4に保たれるとの報告がある⁸⁾。一方で6%CO₂の方が胚の質の向上に望ましいとの報告もある(personal communication)。そこで、5%CO₂、5%O₂、90%N₂(5-5-90)と6%CO₂、5%O₂、89%N₂(6-5-89)の2種類の環境下での受精率、胚盤胞到達率、pH、PO₂、PCO₂を比較し、至適な培養系を検討した。

対象および方法

1998年9月より2000年2月までの1年6カ月間に2回以上採卵、胚移植しても不成功に終わった症例を対象とした。その後ARTを施行した症例をretrospectiveにD5/6胚移植103名117周期、D2/3胚移植56名63周期にわけて比較検討した。

卵巣刺激法は基本的にlong protocolを主体とし、poor responderや以前に採卵数が少ない症例にはshort protocolを施行した。

培養液はinsemination、ICSI(D0)から2PN(D1)までIVF20(Scandinavian IVF Science,Sweden)を使用し、2PNからD3までの2日間、D3からD5あるいはD6までの2-3日間は各々、P1-Blastocyst medium(Irvine,USA)、G1.2-G2.2(Scandinavian IVF Science,Sweden) K-SICM-K-SIBM(COOK, Australia)の3種類のsequential mediumを使用した。卵子、精子、胚は50μlのdropをoilで覆い、5-5-90と6-5-89の2種類のincubatorの環境下で培養した。D5では桑実胚も移植した。なお、pH、PO₂、PCO₂は培養液1mlをoilで覆いそれぞれのincubatorで一晩平衡して、IRMA blood analysis system series 2000(Diametrics Medical

表1 反復ART不成功例のD2/D3とD5/D6移植の比較

	D2 / D3 ET			D5 / D6 B ET		
	Total	ICSI	IVF	Total	ICSI	IVF
周期数	63	38	25	117	84	33
年齢(range)	36.2(28-42)	36.6(28-42)	35.6(29-42)	34.2(26-44)	34.7(26-43)	32.9(29-44)
平均既往ART回数	3.6	3.6	3.6	4.1	4.0	4.2
平均採卵数	6.0	5.3	7.1	8.0	8.5	6.6
受精率	61.3	59.0	63.5	74.5	75.7	71.7
分割率	95.2	95.0	95.3	97.3	97.8	96.1
胚盤胞到達率						
B/2PN				29.3	29.5	28.7
≥3BB/2PN				9.6	9.2	10.8
B/8cell				87.4	93.5	74.8
≥3BB/8cell				28.6	29.0	27.9
平均胚移植数	2.5	2.5	2.5	2.7	2.8	2.6
着床率	15.3 ^a	13.6	17.9	13.2 ^a	12.0	16.5
妊娠数	16	8	8	29	18	11
妊娠率	29.6 ^b	25.0	36.4	28.4 ^b	25.0	28.2
流産率	12.5 ^c	12.5	12.5	34.5 ^c	38.9	27.3
妊娠継続・分娩率	87.5	87.5	87.5	62.1 [*]	61.1	72.7
キャンセル率	14.3 ^d	15.8	12.0	12.3 ^d	14.3	9.1
多胎率	31.3 ^e	37.5	25.0	28.5 ^e	35.3	18.2
平均胚凍結率	1.2 ^f	0.7	2.0	0.8 ^f	0.9	0.6

同一符号間において有意差なし

* 1例 子宮外妊娠のため62.1%

表2 不妊原因別(1症例1原因)からみた胚盤胞移植の妊娠率

不妊原因	患者数	採卵周期数	移植周期数	妊娠数(%)
男性	47	55	48	15(31.3)
卵管	23	24	22	8(36.4)
卵巣	5	8	4	0(0.0)
子宮	5	6	5	1(20.0)
子宮内膜症	4	4	4	1(25.0)
原因不明	19	20	19	4(21.0)
合計	103	117	102	29(28.4)

※各群間に有意差なし

表3 D5/D6 BT適応の検討

	D2/D3 ET		D5/D6 ET	
	着床率	妊娠率	着床率	妊娠率
年齢(歳)				
≤29	0.0 (0/ 3)	0.0 (0/ 1)	25.0 (7/ 28)	66.7 (6/ 9) ^{ab}
30-34	15.2 (7/ 46)	43.8 (7/16)	18.4 (16/ 87)	37.5 (12/32)
35-39	21.3 (13/ 61)	33.3 (8/24)	9.1 (11/121)	20.5 (9/44) ^a
≥40	3.7 (1/ 27)	7.7 (1/13)	7.0 (3/ 43)	6.3 (2/32) ^b
採卵数(個)				
≤4	7.8 (4/ 5)	14.3 (4/28)	14.3 (6/ 42)	15.3 (5/33)
5-9	15.6 (7/ 45)	33.3 (5/15)	10.1 (12/119)	20.3 (9/44)
≥10	24.4 (10/ 41)	63.6 (7/11)	16.1 (19/118)	37.5 (15/40)
2PN数(個)				
≤4	12.5 (10/ 80)	23.7 (9/38)	11.7 (15/128)	17.4 (12/69)
5-7	22.7 (5/ 22)	42.9 (3/ 7)	8.5 (8/ 94)	21.9 (7/32)
≥8	2.9 (6/ 35)	44.4 (4/ 9)	24.6 (14/ 57)	62.5 (10/16)
8細胞期胚数(個)				
≤2	15.2 (16/105)	31.7 (13/41)	10.6 (20/189)	18.4 (16/87)
3-4	12.5 (1/ 8)	33.3 (1/ 3)	11.3 (6/ 54)	27.8 (5/18)
≥5	60.0 (3/ 5)	100.0 (1/ 1)	29.7 (11/ 37)	66.7 (8/12)
子宮内膜(hCG投与時)(n=24)				
厚さ(mm) <8				3
≥8				21
pattern homogenous				2
leaf				22
子宮内膜(胚移植時)(n=21)				
厚さ(mm) <8				1
10> ≥8				1
≥10				19
pattern homogenous				20
leaf				1

同一符号間において有意差有り (p<0.01)

incorporated)で測定した。また、統計処理は1~5)をχ²検定、6)に分散分析を用いた。今回は以下の事項を検討した。

- 1) 反復ART不成功例のD2/3とD5/6移植の比較
- 2) 不妊原因別からみた妊娠率の比較
- 3) D5/D6 BT適応の検討
- 4) 3種類のsequential medium とincubatorのガス環境の胚盤胞到達率への影響

- 5) 3種類のsequential mediumのlot間の比較
- 6) 3種類のsequential mediumと3種類の incubator ガス環境下のpH、PCO₂、PO₂の検討

結 果

- 1) 反復ART不成功例のD2/D3とD5/D6移植に着床率、妊娠率の差は認められなかった(表1)。
- 2) 不妊原因別にみると卵巣因子で妊娠率が低い傾向

表4 3種類のsequential mediumとincubatorのガス濃度における発生率

Medium	ガス濃度	胚盤胞到達率 ^{*1}	≥3BB到達率 ^{*2}
P1/Blastocyst	5-5-90	31.5 (33/104) ^a	13.5 (14/104)
	6-5-89	55.6 (15/ 27) ^a	11.1 (3/ 27)
G1.2/G2.2	5-5-90	26.7 (20/ 75)	12.0 (9/ 75)
	6-5-89	50.0 (1/ 2)	50.0 (1/ 2)
K-SICM/K-SIBM	5-5-90	41.5 (66/159)	16.4 (26/159)
	6-5-89	48.5 (24/ 50)	16.0 (8/ 50)

同一符号間において有意差有り (p<0.05)
^{*1} 胚盤胞数/day3の分割数
^{*2} 3BB以上数/day3の分割数

表5 3種類のsequential mediumのLot間の比較

Medium	胚盤胞到達率 ^{*1}	≥3BB到達率 ^{*2}
P1/Blastocyst		
lot.9929290958	40.0 (4/10)	20.0 (2/10)
lot.9929291061	17.6 (3/17)	5.9 (1/17)
lot.9929291162	35.5 (6/17)	17.6 (3/17)
G1.2/G2.2		
lot.8020fi121	28.0 (7/25)	8.0 (2/25)
lot.8020fi20-3	10.3 (3/29) ^a	6.9 (2/29)
lot.8020fi14-3	42.6 (6/13) ^a	15.4 (2/13)
K-SICM/K-SIBM		
lot.416767	30.4 (7/23)	21.7 (5/23)
lot.421608	45.5 (15/33)	18.2 (6/33)
lot.424432	57.1 (8/14)	21.4 (3/14)

同一符号間において有意差有り (p<0.01)
^{*1} 胚盤胞数/day3の分割数
^{*2} 3BB以上数/day3の分割数

を示した以外はとくに有意な差はみられなかった (表2)。

3) 妊娠率向上のための因子を検討した結果、D5/6BTで30歳未満は66.7%の妊娠率で加齢とともに低下した。とくに40歳以上では6.3%とD2/D3の7.7%と同様に低く、D5/D6移植の有効性はみられなかった。採卵数が10個以上の場合、40例中15例(37.5%)、2PNが8個以上の時、16例中10例(62.5%)、D3で8細胞以上に発達した胚が3個以上の時、30例中13例(43.3%)、5個以上の時、12例中8例(66.7%)が妊娠した。従って、採卵数10個以上、D1で2PNが8個以上、D3で8細胞期以上のものが5個以上の時に、D5/D6まで培養すると50%以上の妊娠が可能となる。

妊娠した症例の子宮内膜を調べてみると、hCG投与時、厚さ8mm以上が24例中21例、leaf patternが24例中22例であった。また胚移植時の子宮内膜の厚さは21例中19例が10mm以上、homogeneous patternが21例中20例であった。ただし、hCG投与

表6-1 D1～D3に用いる培養液のガス濃度の比較

Medium	ガス濃度	n	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)
IVF20	5-5-90 ^{*1}	8	7.498±0.050	30.3±3.6	77.6±5.2 ⁱ
	6-5-89 ^{*2}	8	7.423±0.044 ^d	36.1±3.8	76.0±6.8 ^u
P1	5-5-90	9	7.297±0.064 ^a	35.4±4.8	80.2±7.3 ^{uv}
	6-5-89	10	7.259±0.056 ^b	38.9±3.9 ^r	88.8±19.6 ^s
	5air ^{*3}	10	7.281±0.039 ^{ce}	38.4±4.4 ^s	146.4±4.3 ^{vwxyzv,z,t}
G1.2	5-5-90	6	7.499±0.060 ^{fj}	30.1±5.2	77.0±7.3 ^y
	6-5-89	6	7.447±0.047 ^g	35.2±4.0	81.1±4.7 ^z
K-SICM	5-5-90	9	7.518±0.088 ^h	29.0±4.4 ^{rs}	96.8±40.2 ⁿ
	6-5-89	8	7.424±0.088 ^{im}	36.3±7.2	87.4±29.3 ^j

同一符号間において有意差有り (p<0.01)
^{*1} 5-5-90: 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂
^{*2} 6-5-89: 6%CO₂, 5%O₂, 89%N₂
^{*3} 5air: 5%CO₂ in air
数値はmean±SD

表6-2 D3～D5に用いる培養液のガス濃度の比較

Medium	ガス濃度	n	pH	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)
Blastocyst	5-5-90* ¹	10	7.304±0.042 ^a	35.4±3.3 ^h	77.2±10.8 ^l
	6-5-89* ²	9	7.313±0.161 ^c	36.0±10.6 ⁱ	76.0±5.8 ^m
	5air* ³	10	7.278±0.042 ^e	37.3±3.5 ^j	142.5±16.9 ^{lmnopq}
G2.2	5-5-90	6	7.386±0.054	35.0±4.8	86.6±25.6 ⁿ
	6-5-89	6	7.347±0.051 ^k	38.8±5.0 ^k	95.4±37.9 ^o
K-SIBM	5-5-90	9	7.522±0.070 ^a	26.7±4.0 ^{hijk}	81.1±11.1 ^p
	6-5-89	9	7.453±0.082 ^b	31.8±5.6	78.0±1.8 ^q

同一符号間において有意差有り (p<0.01)

*¹ 5-5-90: 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂*² 6-5-89: 6%CO₂, 5%O₂, 89%N₂*³ 5air: 5%CO₂ in air

数値はmean±SD

時の子宮内膜が8mm未満で3例、胚移植時、8mm未満でも1例妊娠した(表3)。

- 4) 3種類のsequential mediumで胚盤胞到達率、3BB以上(Gardnerの分類6))到達率を比較すると、有意差はないものの良い方からK-SICM-K-SIBM, P1-Blastocyst medium, G1.2-G2.2の順であった。また5-5-90と6-5-89を比較すると、P1-Blastocyst mediumでは有意に6-5-89の方が良好であった(表4)。
- 5) 5-5-90の環境下で3種類のsequential mediumの3lotsで調べてみると、やはり違いがみられG1.2-G2.2のlot. 8020fj20-3とlot. 8020fi14-3で有意差がみられた(表5)。
- 6) 3種類のsequential mediumのpH, PO₂, PCO₂を調べてみた。P1-Blastocyst mediumではpHはともに5-5-90, 6-5-89, 5%CO₂ in air(5 air)のどちらでも7.25～7.32と安定していた。どの培養液においても5-5-90と6-5-89を比べると6-5-89でPHが低い傾向がみられた。G1-2, K-SICMはP-1より、K-SIBMはBlastocyst mediumよりpHが有意に高い値を示した。PO₂はP1-Blastocyst mediumを使用した場合、5-5-90, 6-5-89, 5 airで各々80.2±7.3, 88.8±19.5, 146.4±4.3mmHgと5 airで有意に高値を示した。PCO₂は同様の培養液では各々35.4±4.8, 38.9±3.9, 38.4±4.4mmHgと有意差は認めず、ほぼ一定であった(表6-1, 2)。

考 察

胚盤胞移植は着床率、妊娠率が高く、選択された胚盤胞を1～2個移植することにより、多胎防止に有効との報告が多い^{1,10)}。しかし、私達の成績ではD2/3とD5/6移植で、着床率、妊娠率、多胎率は変わらず、反復ART不成功例に対して全く有効性が認められなかった。ただし、D2/D3に良好胚を移植しても

妊娠しない反復ART不成功例に対し胚盤胞まで発達する能力があるのか(embryo genome activationにかかわる精子側因子⁹⁾と胚の染色体異常の検索の必要性)、あるいはD5/D6に良好な胚盤胞を移植しても妊娠しない場合、子宮側の着床因子の検索が必要となり、原因究明の1手段となる可能性が高い⁶⁾。胚盤胞まで発達したものは、8細胞期胚以前の胚と比較し、染色体異常が少なくなり、多胎防止のためにも良好胚選択の長所があるかもしれない。とくに米国ではJones H.Jr.¹⁰⁾が報告しているように多胎防止が主な目的で胚の選択をし、胚盤胞移植を施行している。不妊原因別にみた場合、とくに、子宮因子に有効との報告がある⁶⁾。しかし、当院のデータでは栗田等¹¹⁾と同様に有意差を認めなかった。但し子宮内膜が薄い症例(hCG投与時8mm未満に3名、胚移植時8mm未満1名)でも妊娠がみられており、症例を増やして検討していきたい。卵巣因子の場合、PCOSを除いて採卵数が1～3個と極端に少なく、また43歳の1症例が4回施行するなど片寄りもあり、妊娠例はなかった。

今回、胚盤胞移植(D5/D6)の妊娠率が低かった要因として、年齢、採卵数などの制限を全く設けず、40歳以上32周期(27.4%)、採卵数5個以下48周期(41.8%)を含む症例に実施したことによると考えられる。事実、採卵数10個以上、D1:2PN 8個以上、D3:8 cell以上が5個以上の症例に限定すれば、妊娠率50%以上となる。しかし、また採卵数5個未満でも3回以上ART不成功の症例で5例が初めてのD5/D6BTで妊娠している。培養液、培養環境の改善、胚、子宮内膜の双方から着床の解明がなされれば、少数の卵でもD5/D6BTにより、高率に妊娠が期待できるようになるであろう。また予想に反し、より選択されたD5/D6胚盤胞移植の方が流産率が高い傾向

を示したため今後、症例を増やし検討していきたい。また、prospectiveにみた場合、D3に8cellが3個以上ならD5/D6まで培養を続けて胚盤胞で移植する、8 cellが0~2個、あるいは胚の質がよくない場合は胚盤胞にこだわらず直ちに胚移植するのが現状では望ましいと考えられる¹²⁻¹⁴⁾。

sequential mediumは改善されたとは言え、まだ不十分な培養液であり、すべての症例に行うのではなく適応を決めて行うのがよいと考える。

Sequential mediaは主に、2PN-8 cellまでの卵管腔液に似た培養液と8cell-Blastocystまでは子宮腔液に似た組成の2種類の培養液で行われているが、とくに後半の*in vitro*の培養環境は*in vivo*の子宮環境とどちらが優れているのであろうか？当院での初めの4カ月間のデータでは50%の妊娠率で、胚盤胞移植は非常に有効との結果であったが³⁾、症例の増加にともない反復ART不成功例を対象としたD2/D3とD5/D6移植に着床率、妊娠率の差がなく、胚盤胞まで培養することの意義をみいだせないでいる。

そこで胚盤胞移植の妊娠率向上の重要な要因として培養液、incubatorのガス環境を検討してみた。前述の3種類の培養液、また各々の培養液のlot間、そして5%CO₂、5%O₂、90%N₂と6%CO₂、5%O₂、89%N₂のincubator環境下でも胚盤胞到達率、3BB以上の良好な胚盤胞到達率の差がみられた。市販の培養液を使用する場合は、きちんとしたquality control, quality assuranceが必須である。一つの防衛手段として、手間ひまはかかるが、常に3種類の培養液を使用することで培養液、lot間の悪影響を最小限に食い止め、大きな妊娠率低下は防止できる可能性がある。また桑実胚から胚盤胞にかけて酸素消費量が増大するが、incubatorのガス環境としてはどのような状態が最も至適なのだろうか？Dumoulin JC¹⁵⁾は胚盤胞到達率でみた場合酸素濃度が5%の方が20%より良好であったと報告している。我々のデータでも5%O₂では酸素分圧がどの培養液でも75~90mmHgなのに対し、20% O₂では142~146mmHgを示した。胚盤胞の酸素消費量が増大するとは言え、どのあたりが、至適なのだろうか？Gardner DK(personal communication)は20%O₂はtoxicで6~7%O₂が良いと述べている。

培養系に関してはBavister¹⁶⁾がいうように、stageにあったきめ細かい培養液が必要である。いずれにせよ今後、胚の要求に応じた至適な環境の究明が胚盤胞の着床率、妊娠率に大きく貢献すると思われる。現時点では卵管内環境がbestであり、少なくとも一方の卵管が正常であれば、ZIFTが有効であろ

う。事実、良好な胚盤胞移植をしても妊娠しない反復不成功例にZIFTを試み妊娠に成功している。

また良好な卵を得ることが基本であり、経口避妊薬を併用したGnRHaのLong protocolが推奨される¹⁷⁾。子宮内膜の形成や卵胞発育が不良な例には血流を改善する低容量アスピリンも有効である¹⁸⁾。また免疫抑制の意味で排卵期からコルチコステロイドの短期間投与も有効との報告がある¹⁸⁾。

胚盤胞の凍結に関してはcryoloopを用いたvitrificationの有効性が報告されている¹⁹⁾。また、胚盤胞の内細胞塊を分離してES細胞を開発することにより将来、臓器移植、遺伝子治療などに対し有力視されている。今後、胚盤胞移植は培養液、培養環境の改善とともに、ますます盛んになっていくものと思われる。現時点での胚盤胞移植の適応とは、年齢40歳未満、採卵数10個以上、2PN8個以上、8細胞期胚が5個以上あること、hCG投与時の子宮内膜が8mm以上、leaf patternを呈していること、D5に良好な胚盤胞が1個以上あることである。今後は1個の胚盤胞を移植し、妊娠率50%を超える治療が現実のものになることを期待するものである。

文 献

- 1) Gardner KD, Phil D, Vella P, et al. (1998) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduce the need for multiple embryo transfer. Fertil Steril 169:84-88
- 2) Jones GM, Trounson A, Lolatis N, et al. (1998) Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following *in vitro* fertilization and embryo transfer. Fertil Steril 70: 1022-1029
- 3) 京野廣一、佐藤智子、福永憲隆 他(1999) 胚盤胞移植の効果：2回以上の妊娠不成立例を対象として、第17回日本受精着床学会講演抄録集 123
- 4) 京野廣一(1999) 胚盤胞移植の効果；反復不成功例を対象として、第2回IVF研究会シンポジウム「Blastocyst ETは妊娠率向上に有効か？」抄録集 75-84
- 5) 福井淳史(1999) D4-6transferの治療成績と透明帯厚による着床ポテンシャルの評価、第2回IVF研究会シンポジウム「Blastocyst ETは妊娠率向上に有効か？」抄録集 91-94
- 6) 向田哲規、高橋克彦、岡 親弘 他(1999) 反復ART不成功例に対する胚盤胞移植の臨床成績。日産婦誌 51:1125-1133
- 7) 安部裕司、中野由起子、渋谷幸裕 他(2000) ヒト桑実胚/胎胚期移植の臨床的検討。日不妊会誌 45: 37-41

- 8) Barnett DK and Bavister BD (1996) What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their development competence? *Mol.Reprod.Devel.* 43:10-133
- 9) Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, et al. (2000) Sperm chromatin damage impairs human fertility. *Fertil Steril* 73:43-50
- 10) Jones HW Jr (2000) The impact of high order multiple pregnancies. *Serono symposia USA ;International symposium on ART and the human blastocyst.* 3
- 11) 栗田松一郎, 田中 温, 永吉 基 他 (2000) ニューテクノロジー当院における反復着床不成功例に対する胚盤胞移植の成績, 着床-妊娠率向上をめざして-*Modern Reproductive Medicine (鈴木秋悦)* 78-86
- 12) 東口篤司, 金沢朋扇, 林 巧 他 (1999) 体外受精における胚移植は媒製精後何日目にすべきか? 産婦実録 48:1983-1986
- 13) Milki AA, Hinckley MD, Fish JD, et al. (2000) Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 73:126-129
- 14) Racowsky C, Jackson KV, Cekleniak NA, et al. (2000) The number of eight-cell embryos is a key determinant for selecting day 3 or 5 transfer. *Fertil Steril* 73:558-564
- 15) Dumoulin JCM, Coonen E, Bras M, et al (2000) Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 15:402-409
- 16) Bavister BD (1999) Stage-specific culture media and reactions of embryos to them. *Towards reproductive certainty* Jansen R. and Mortimer D. (eds) The plenay proceedings of the 11th world congress on *in vitro* fertilization & human reproductive genetics. 367-377
- 17) Meldrum D (2000) Patient stimulation and effect on outcomes. *Serono symposia USA ;International symposium on ART and the human blastocyst.* 5
- 18) 正岡 薫, 稲葉憲之 (2000) ARTにおける着床率向上のコツ. ロング・プロトコールにおける卵胞刺激開始時期と着床, 着床-妊娠率向上をめざして-*Modern Reproductive Medicine (鈴木秋悦)* 128-132
- 19) Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK, et al. (1999) Vitrication of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 72:1973-1078

(受付: 2000年 5月18日)

(受理: 2000年 6月21日)

Blastocyst Transfer(BT): The Key Point for Improving Pregnancy Rate

Koichi Kyono, Noritaka Fukunaga, Setsuyo Chiba, Tomoko Sato, Kousuke Haigou and Yuko Matsuo

Department of Gynecology and Urology, Lady's Clinic Kyono

Miyagi 989-6221, Japan

To determine the effects of different factors of BT on the rate of pregnancy.

The study was performed on 63 cycles in 56 patients {D2/D3 embryo transfer[ET]} and 117 cycles in 103 patients {D5/6blastocyst transfer(BT)} who had failed to conceive more than 2 times after ART attempts. We used 3 kinds of sequential media

1) P1-Blastocyst medium, 2) G1.2-G2.2, 3) K-SICM-KSIBM} and examined the blastocyst formation rate, the difference of lots, pH, PO₂ and PCO₂ under ① 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂ ② 6%CO₂, 5%O₂, 89%N₂ ③ 5%CO₂ in air, respectively.

There is no significant difference in implantation rate(15.3% vs.13.2%) and pregnancy rate (29.6% vs. 28.4%) between D2/3 ET and D5/6BT. But the pregnancy rate of D5/6BT is more than 50% if the indication is more than eight 2PN(D1) and five 8 cells(D3). There is a significant difference between ① and ② in blastocyst formation rate using 1) and a significant difference between lots using 2). PO₂ is significantly higher under ③ than ① or ② using 1). PCO₂ is consistently stable under ② using 1) 2) 3). pH is 7.25-7.32 under ①, ② and ③ using 1), but 7.34-7.53 under ① and ② using 3). There is a significant difference in pH between 1) and 3). ② is slightly lower than ① in pH.

It is very important to always perform strict quality control and quality assurance of commercial sequential media. Our data suggest that 6%CO₂, 5%O₂, 89%N₂ may be better than 5% CO₂, 5%O₂, 90%N₂ for blastocyst formation rate. If we can get more than eight 2PN and five 8 cell embryos, and the patient's age is less than 40 y.o., it is better to attempt blastocyst transfer.

Key words: blastocyst, sequential medium, pH, PO₂, PCO₂

Controlled Ovarian Hyperstimulation における GnRH agonist 徐放製剤の有用性について

Efficacy of Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH agonist Depot

斉 藤 正 博

Masahiro SAITOH

石 原 理

Osamu ISHIHARA

林 直 樹

Naoki HAYASHI

田 谷 順 子

Junko TAYA

堀 籠 邦 子

Kuniko HORIGOME

竹 田 省¹⁾

Satoru TAKEDA

木 下 勝 之

Katsuyuki KINOSHITA

埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

¹⁾同周産期総合母子医療センター

Center for the maternal-fetal and neonatal medicine, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

Controlled ovarian hyperstimulationにおけるGnRH agonist (GnRHa)徐放製剤の有用性を評価するため、以下の検討を行なった。

1997年1月から1998年9月までにIVFあるいはICSI目的で卵巣刺激を施行した26例を対象とした。同一17症例において酢酸ブセレリン点鼻薬を用いた結果、hCG投与前に P_4 値が上昇し妊娠が不成功であった採卵周期17周期と、酢酸リユープロレリン徐放製剤を使用した19周期の臨床成績を比較した。また、IVFあるいはICSI予定の子宮内膜症を合併する症例に徐放製剤を併用した症例9例、12周期についても同様の調査を行なった。

その結果、①徐放製剤投与周期は点鼻薬投与周期に比べ大量のhMG製剤を要し、採卵数は少なく、コストは高い傾向があった。②hCG切替時の E_2 値は徐放製剤投与周期で低く、 P_4 値の上昇はなかった。③良好胚の得られる確率は差がなく、受精率も同等であった。④徐放製剤投与周期の妊娠率は良好で、流産例はなかった。従って、徐放製剤を併用した卵巣刺激は症例を選択して用いることによりART (assisted reproductive technology)時に有用である可能性が示唆された。

キーワード：COH(controlled ovarian hyperstimulation), GnRH agonist, 体外受精-胚移植法, 顕微授精
(日本不妊会誌 45:273-277 2000)

緒 言

体外受精(IVF)あるいは顕微授精(ICSI)-胚移植(ET)を目的とした標準的卵巣刺激法は、現在、GnRH agonist(GnRHa)の点鼻投与を併用したhMG-hCG療法である。

しかし、過卵巣刺激(Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH)の際のGnRHaの点鼻投与の問題は、その吸収に個人差があること、ゴナドトロピン抑制効果が不十分である場合にhCG投与前にプロゲステロン(P₄)が上昇する場合があることなどである。これらの点では点鼻投与法に比して、皮下注射法が優れている。

GnRHa注射製剤については、連日注射法の報告があるが、GnRHa徐放製剤を用いたCOHとこの方法を用いたIVF、ICSIの成績の報告は少ない。

そこで、GnRHa徐放製剤のCOHにおける有用性を評価する目的で以下の研究を行なった。

対象および方法

1 対象

1997年1月より1998年9月までに当科でIVFあるいはICSI目的でCOHを施行した症例のうち、26例/29周期を対象とした。これらの平均年齢は32.8±4.0歳(Mean±SD)、平均不妊期間5.2±2.9年である。

黄体中期から酢酸ブセレリン点鼻薬を用いたロングプロトコルによるCOHを行なった結果、hCG投与前の採血時にP₄値が1.5ng/ml以上に上昇した17症例、17周期を酢酸ブセレリン群(C群)とした。このC群の症例に対して、患者の同意を得た後、GnRHa徐放製剤(酢酸リュープロレリン)1.88mgを先行する黄体期に単回皮下注射し、再度、COHを行なった17例、19周期をA群とした。

さらに、子宮内膜症合併例に対して、GnRHa徐放製剤を1カ月に1回、3回以上皮下注射し、その後、ウルトラロングプロトコル法によりCOHを開始し、IVE-ETあるいはICSI-ETを行なった9例、12周期をB群とした。

2 方法

C群では、黄体中期より酢酸ブセレリン点鼻投与を開始し、月経開始3～5日目より、原則としてFSH(フェルティノームP)225IU/日の投与を開始し、その投与第4日目よりhMG(ヒュメゴン)150 IU/日に変更後、主席卵胞がφ18mmに達したところがでhCG 10,000IUを投与し34時間後に経腔超音波断層法下に

採卵した。A群においても、C群と同様に黄体中期に酢酸リュープロレリン1.88mgを皮下投与し、月経開始後、C群と同様に卵巣刺激を開始した。B群では、酢酸リュープロレリン1.88mgを皮下投与最終日から2ないし3週間後にC群と同様に卵巣刺激を開始した。また、A,B,C群ともに採卵後は黄体期補充療法として、プロゲステロン50mgを連日筋注投与した。これらの各群について、hCG切替時までに必要としたhMGの総投与量(単位)、hCG投与前の血中エストラジオール(E₂)値およびP₄値、採卵数、受精率、妊娠継続率、GnRHaを含む排卵誘発のコスト等を調査し比較検討した。

なお、統計学的検討は、 χ^2 検定を行ない、 $p<0.05$ をもって有意とした。

成 績

患者背景を表1に示す。子宮内膜症群(B群)はやや年齢が高い傾向を示すが、有意差は認められなかった。

hMG総投与量は、C群1742.6±379.2単位、A群2335.5±472.6単位で徐放製剤投与周期でより多量を要した($p<0.01$)。一方、B群では3197.7±938.1単位とさらに多量のhMG製剤が必要となった($p<0.01$) (表2)。

一方、採卵数は、C群10.6±5.4個、A群8.0±6.1個と徐放製剤投与周期において少なくなる傾向が認められた。また、B群では5.7±4.2個とさらに採卵数が少なかった(表2)。

このことはhCG切替時のE₂値(pg/ml)にも反映されC群、A群、B群の順にそれぞれ213.7±1173.8、1250.2±1209.7、707.3±394.9と低い値を示した(表2)。

表1 患者背景

	C群とA群		B群	
症例数	17		9	
年齢(歳)	31.8±4.2		34.1±4.7	
平均不妊期間(年)	5.4±3.0		5.0±2.9	
不妊原因*				
卵管因子	4	23.5%	2	16.7%
男性因子	7	41.2%	3	25.0%
子宮内膜症因子	6	35.3%	12	100%
原因不明	2	11.8%	0	0%

*重複例を含む

C群：酢酸ブセレリンを用いた群

A群：酢酸ブセレリンの代りに酢酸リュープロレリンを用いた群

B群：子宮内膜症のため酢酸リュープロレリンによるウルトラロングプロトコルを行った群

表2 各群における成績

	C群 酢酸ブセレリンを用いた群 (17周期)	A群 酢酸ブセレリンの代りに 酢酸リュープロレリンを 用いた群 (19周期)	B群 子宮内膜症のため酢酸 リュープロレリンによる ウルトラロングプロトコ ールを行った群 (12周期)	有意差
hMG製剤の総投与量 (IU)	1742.6±379.2 ^{*1}	2335.5±472.6 ^{*1, *2}	3197.7±938.1 ^{*2}	^{*1} : p<0.01 ^{*2} : p<0.01
採卵数 (個)	10.6±5.4	8.0±6.1	5.7±4.2	N.S.
hCG切替時の Estradiol値 (pg/ml)	2137.2±1173.8	1250.2±1209.7	707.3±394.9	N.S.
hCG切替時の Progesterone値 (ng/ml)	2.7±3.0	0.9±0.5	1.1±1.1	N.S.
hCG投与前までのコスト (¥)	2,268±24,531 ^{*1}	26,773±25,858 ^{*1, *2}	153,673±53,190 ^{*2}	^{*1} : p<0.01 ^{*2} : p<0.01
得られた胚における 良好胚(G1,G2)の割合 (%)	92.5	83.3	95.2	N.S.
受精率 (%)	62.4	71.1	68.3	N.S.
妊娠率 (%)	0.0	57.9	18.2	N.S.

一方、hCG切替時のP4値(ng/ml)はそれぞれ2.7±3.0, 0.9±0.5, 1.1±1.1と徐放製剤を投与した場合には上昇しなかった(表2)。

また、hCG投与前までのコストを比較すると、C群92,268±24,531円、A群126,773±25,858円、B群153,673±53,190円の順に高額なCOHとなった(表2)。

得られた胚における良好胚の占める割合は、C群92.5%、A群83.3%、B群95.2%であり各周期において差は認められなかった(表2)。

また、受精率は、各周期においてほぼ同等であったにもかかわらず、対周期当たりの妊娠率はC群0%、A群57.9%、B群18.2%であった(表2)。また、流産例はなかった、妊娠例のうち、多胎は6例(双胎5例、品胎1例)で、卵巣過剰刺激症候群を呈した例は認められなかった。

考 察

IVFあるいはICSI-ETプログラムにおける妊娠率を向上させるために、GnRHaを用いて下垂体を脱感作した状態で外因性ゴナドトロピンによるCOHを行ない、卵胞発育の同調性を高め、適切な数の成熟卵胞を発育させることが可能となった。しかし、GnRHaの点鼻薬を用いた場合、early luteinizationを来す例があり、このような周期におけるIVFあるいはICSIの成功率が低いと報告されている²⁾。

GnRHa徐放製剤(酢酸リュープロレリン)はその強

力なparadoxical effectにより、ゴナドトロピンの基礎値や血清E₂値の低下をもたらす。この結果、内因性ゴナドトロピンをより効果的に抑制し、そのため、子宮内膜症に対する臨床的効果は高いこと³⁻⁵⁾が知られている。子宮内膜症を有する婦人に対するIVF-ETの前処置にGnRHa療法が有用であったという報告^{5, 7, 8)}が多い。

一方、GnRHaは子宮内膜症の治療薬として開発された薬であり、半減期が長い、GnRHaが卵へ悪影響を及ぼす可能性⁹⁻¹¹⁾、顆粒膜細胞のアポトーシスを介して卵の質を低下させる可能性も指摘されているが¹⁰⁻¹²⁾、子宮内膜症の治療と平行して不妊治療を行う必要がある症例もいることから、適応のある症例にはGnRHaの長期使用は必要である。

今回、GnRHaの点鼻投与でearly luteinizationを認めた症例と子宮内膜症を合併した症例に対して、下垂体への強い抑制効果を期待して、GnRHa徐放製剤を用いた卵巣刺激法を試みた^{12, 14, 15)}。この方法では、GnRHa点鼻投与と比較してhCG切替時のP₄値の上昇は認められず、良好胚の獲得率や受精率、妊娠率および妊娠継続率は良好であった。しかし、内因性ゴナドトロピン分泌抑制効果が強いことから、ゴナドトロピン製剤の量は点鼻投与群(C群)より多量を必要とし、コストが高くなった。発育卵数が少ないため、血清中E₂値が低かった。従って、ゴナドトロピンへの反応性が低下している40歳以上の女性やpoor responder等の症例には適さない方法と思われる。

た。子宮内膜症合併例では採卵数の減少やコストが大きくなることは徐放製剤を長期に用いている影響と考えられる。

GnRHa徐放製剤の使用した場合に得られた胚の形態的評価は、点鼻薬の場合と差がなかった。このことは早期黄体化は胚に対して形態的には明らかな変化を示さないと考えられる。しかし、early luteinization例の臨床成績は不良であり、早期黄体化は着床環境への影響をおよぼす可能性が考えられる。

一方、ゴナドトロピンの抑制効果が遷延する可能性の高い徐放製剤投与周期群(A群、B群)では初期流産は1例も発生しなかったことは、児の心拍を確認するまで行う黄体ホルモン療法は有効であると思われる。言い換えれば、GnRHa徐放製剤は着床以後に悪影響をおよぼさないと考えられた。しかし、多胎妊娠率はGnRHa徐放製剤投与周期群(A群、B群)で46.2%(6/13)と高かった。これは、A群、B群が難治例であるため移植胚数を3個としたことに起因しているものと思われた。

今後、GnRHaアゴニストよりも強力なGnRHアンタゴニストの日常的な臨床応用が可能となる日まで、GnRHa徐放製剤はIVFやICSIにおけるCOHにおいて、適応がある場合には有力な選択肢の一つであることが示唆された。

以上のことより、IVFあるいはICSI-ETの際に、GnRHaとして酢酸リユプロレリンを併用したCOHは、採卵数やコストの面での問題はあものの、hCG投与前にプロゲステロンが上昇した症例や子宮内膜症を合併する症例、反復不成功例等に対して試みる価値ある方法と考えられた。

文 献

- 1) Steptoe PC, and Edwards RG (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo. (letter) *Lancet* 2:366
- 2) Hofmann GE, Thei J, Khoury J, et al. (1996) Premature luteinization during controlled ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization-embryo transfer has no impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril* 66:980-986
- 3) 星合 昊, 矢島 聡, 杉本 修 他(1993) 酢酸リユプロレリン徐放製剤(TAP-144-SR)の子宮内膜症に対する臨床効果. *産婦世界* 45:61-82
- 4) Dugi AM, Miller JD, Knittle J, et al. (1990) Lupron depot (leuprolide acetate for depot suspension) in the treatment of endometriosis: a randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Fertil Steril* 54:419-427
- 5) 詠田由美, 本庄 考, 窪田真知 他(1996) 2種類のGnRH agonist製剤, leuporelin acetate depotとbuserelin acetateを併用したIVF-ETのための卵巣刺激の試み. *日不妊会誌* 41:59-65
- 6) Pittaway DE, Ellington CP and Klimek M (1988) Preclinical abortions and endometriosis. *Fertil Steril* 49:221-223
- 7) Dikker D, Goldman GA, Ashkenazi J, et al. (1990) The value of pretreatment with gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue in IVF-ET therapy of severe endometriosis. *Hum Reprod* 5:418-420
- 8) Dikker D, Feldburg D, Goldman JA, et al. (1992) The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 57:597-600
- 9) Dekel N, Lewysohn O, Ayalon D, et al. (1988) Receptors for gonadotropin releasing hormone are present in rat oocytes. *Endocrinology* 123:1205-1207
- 10) Billig H, Furuta I and Hsueh AJ (1994) Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology* 134:245-252
- 11) 齊藤英和, 中原健次, 齊藤隆和 他(1998) 体外受精法におけるGnRHアゴニスト, アンタゴニスト, 産婦の実際 47:477-483
- 12) T Dada, O Salha, HS Basille, et al. (1999) A comparison of three gonadotropin-releasing hormone analogues in an in vitro fertilization programme: a prospective randomized study. *Hum Reprod* 14:288-293
- 13) Filicori M, Cognigni GE, Arrone R, et al. (1996) Role of different GnRH agonist regimens in pituitary suppression and the outcome of controlled ovarian hyperstimulation. *Hum Reprod* 11:123-132
- 14) Porcu E, Filicori M, Dal Prato L, et al. (1995) Comparison between depot leuporelin and daily buserelin in IVF. *J Assist. Reprod genet* 12:15-19
- 15) Dantas ZN, Asch RH, Balmaceda JB, et al. (1994) Comparison between nafarelin and leuprolide acetate for in vitro fertilization: preliminary clinical study. *Fertil Steril* 61:705-708

(受付: 2000年 5 月12日)

(受理: 2000年 6 月23日)

Efficacy of Controlled Ovarian Hyperstimulation Using GnRH agonist Depot

Masahiro Saitoh, Osamu Ishihara, Naoki Hayashi, Junko Taya,
Kuniko Horigome, Satoru Takeda¹⁾ and Katsuyuki Kinoshita

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

¹⁾Center for the maternal-fetal and neonatal medicine, Saitama Medical Center,
Saitama Medical School, Saitama 350-8550, Japan

To assess the efficacy of GnRH agonist depot preparation in controlled ovarian hyperstimulation (COH), we carried out the following investigation.

The study included 26 patients (29 cycles) who received COH between January 1997 and September 1998 in our out patient clinic for IVF-ET or ICSI. The first study employed 17 cases who had previously had early luteinization before hCG injection at the time of IVF or ICSI using buserelin acetate nasal spray. The following COH cycles for these patients were conducted using leuporelin acetate depot preparation. We compared several factors in both cycles as follows; total hMG dose, serum estradiol and progesterone levels at the time of hCG injection, the number of collected oocytes, fertilization rate and on-going pregnancy rate as well as the total expense of COH. We also investigated the same factors in the patients with endometriosis who had had COH under ultralong protocol with leuporelin depot.

The cycles with leuporelin depot required more amount of hMG dose and higher cost in comparison with the cycles with buserelin spray, although the number of collected oocytes was less. In addition, the estradiol levels at the time of hCG injection in depot cycles were lower than those of nasal spray cycles. There was no premature luteinization occurred in this protocol. Both the fertilization rate and quality of obtained embryo were similar in different COH methods and the pregnancy rate after depot cycle was acceptable. We had no miscarriage in depot cycle, as well.

Thus, this study suggests that GnRH agonist depot preparation is worth using in COH cycles for ART in selected patients' group.

Key words: COH(controlled ovarian hyperstimulation), GnRH agonist, IVF-ET, ICSI

(Jpn J Fertil Steril 45:273-277 2000)

Birth of a Healthy Baby Following the Intracytoplasmic Injection of Ejaculated Spermatozoa from a Non-Mosaic XYY Patient

Yasuhisa ARAKI, Michiko OHNO¹⁾, Mitsuhiro MOTOYAMA¹⁾ and Sigeo ARAKI²⁾

The Institute for Advanced Reproductive Medical Technology,
Gunma 371-0037, Japan

¹⁾The Institute of Advanced Medical Technology Central Clinic,
Tochigi 329-0431, Japan

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Jichi Medical University,
Tochigi 329-0431, Japan

Abstract: Sex chromosomes of X- or Y-bearing sperm (n=886) were analyzed using fluorescent in situ hybridization (FISH) in an XYY patient prior to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment. The results demonstrated an approximate 1: 1 ratio of X and Y sperm. Labeling with three different probes revealed the following distribution: 0.1% XX, 0.2% YY, 0.1% XY and 0.2% disomy 18. These rates are within the normal range.

Eleven mature oocytes were injected resulting in 6 fertilizations. Three embryos were then transferred into the uterine cavity. The result was a normal pregnancy and delivery of a healthy child. Genetic analysis of the neonate disclosed a normal 46, XY karyotype. This report should serve as further evidence that normal sperm with fertilization potential are produced in the ejaculated sperm of an XYY man. This report is the first report of a baby conceived by ICSI from an XYY patient.

Key words: 47, XYY, oligozoospermia, ICSI, karyotype, FISH

(Jpn J Fertil Steril 45:279-283 2000)

Introduction

It has been found that up to 15.2% of azoospermic and 4.4% of oligospermic patients carry a constitutional chromosomal abnormality^{1, 2)}. Virtually all cases of XYY are a result of paternal meiosis II non-disjunction. The frequency of XYY live-births (0.1%) coincides with the observed frequency of YY sperm in ejaculates of normal males (0.06-0.11%)^{3, 4)}. The XYY abnormality is a documented etiology of oligozoospermia. Before sperm from such men is used for clinical treatment, the cause of the condition and incidence of somatic and germ cell genetic/chromosome anomalies should be examined in light of the potential consequences for resulting offspring. It is essential that these issues be clearly discussed with the couple. Proper counseling in these matters is as important as

efficacious treatment. Potential parents must be educated as to the risks and benefits of pursuing treatment as it will impact on the future health of their child. Therefore, the incidence of sperm sex chromosome anomalies should be evaluated before treatment is offered to an XYY patient. Prenatal or postnatal karyotypic assessment of the baby is also important. Here, a case report of the treatment of an XYY patient using ICSI, resulting in a normal, healthy baby, is presented.

Case Report

A 35year old man and his 31year old spouse were referred to our *in vitro* fertilization (IVF) program in October [REDACTED]. Their previous treatment history included one attempt at gamete intrafolloplan transfer (GIFT), and two attempts each at IVF and ICSI. A physical examination revealed a normal appearance

(height 173cm, weight 69Kg), and normal hair distribution. Testicular volume was 10ml right testicle and 1 ml on the left. Blood analysis demonstrated an elevated concentration of follicle stimulating hormone (FSH) of 20.9mIU/ml, luteinizing hormone (LH) 15.6mIU/ml, low testosterone 4.7ng/ml and normal prolactin 8.2ng/ml. Semen samples were produced by masturbation, allowed to liquefy at 37°C for 30min, then an aliquot of 5 μ l was placed in a Makler chamber and analyzed using computer-aided sperm analysis (The CellSoft, Cryo Resources Ltd., New York, NY) according to standard procedures (World Health Organization 1992). The ejaculate had an average volume of 3.0ml and a sperm concentration of 5.2×10^6 /ml, motile 55%.

Peripheral blood chromosome analysis of 20 lymphocyte cells showed all to be 47, XYY karyotype.

Sex chromosome of X- or Y-bearing sperm was analyzed using fluorescent in situ hybridization (FISH). One ml of semen was mixed with PBS (pH 7.4) containing 6mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and centrifuged for 5 min. at 750g. The pellet was resuspended in 1ml of PBS containing 2mM dithiothreitol (DTT) and incubated at room temperature for 45min. with regular mixing to ensure homologous nuclear decondensation. It was then washed for 5min. at 750g, fixed with methanol: acetic acid (3: 1) and air-dried on slides. Fluorescence in situ hybridization (FISH) using fluorochrome labeled repeat sequence DNA probe (Vysis), which are specific for chromosome 18, X and Y, respectively, were used according to the manufacturer's protocol with minor modifications. The hybridization solution consisted of 50% formamide, 5% dextran sulfate, and DNA probe were denatured at 70°C for 10min. prior to hybridization. Sperm slide were also denatured by immersion in 70% formamide, 2XSSC at 70°C for 5min., then dehydrate in an ethanol series and air-dried. Hybridization were performed at 37°C during 4hours to overnight. Chromosome 18 was labeled with spectrum aqua, chromosome X was labeled with spectrum green and chromosome Y was labeled with spectrum red. Specimen slides were denatured in a 73°C denaturing solution for 5min. Pre-denatured probes (5 μ l) were transferred to the slides and 22-mm² cover glasses were placed over them. The slides were allowed to hybridize in a

moist, dark chamber at 37°C for at least 6hr. After hybridization, the slides were washed and mounted with 5 μ l of 4', 6-diamino-2-phenyl iodol (DAPI) counterstain in an anti-fade solution (Vysis) and observed under a fluorescent microscope equipped with a triple-band pass filter set for simultaneous observation of Spectrum Aqua, Spectrum Green and Spectrum Red.

A total of 886 sperm were assessed. The percentages for X- and Y-bearing sperm were 49.3% and 47.9%, respectively. Labeling with the three different probes identified sperm at the following frequencies; 0.1% XX, 0.2% YY, 0.1% XY and 0.2% disomy18. Fourteen sperm were unstainable X or Y sex chromosomes.

His wife had regular ovulatory cycles, and a normal hysterosalpingogram. Ovarian stimulation was achieved by the combination of the gonadotrophin releasing hormone (GnRH) agonist (Buserelin acetate, Hoechst) and human menopausal gonadotrophin (hMG, hMG-Nikken, Tokyo). 10,000 units of human chorionic gonadotrophin (hCG, Profasi, Serono), were administered when the leading follicle reached a mean diameter of 18-20mm.

Oocytes were retrieved at 33-35hr post hCG. Twelve oocytes were collected at metaphase II (MII), and each of the oocytes were injected. Six of these oocytes had been fertilized as demonstrated by the presence of two pronuclei (2PN). All six oocytes cleaved and another two oocytes (undetected 2PN) also cleaved 48hr after injection. The cleaving embryos were judged to be of grade III morphology (fragment 20-50%) from 2PN. Three embryos transferred to uterine cavity. The other cleaved embryos were of a worse grade. Luteal support was supplemented with progesterone (300mg/tablet) suppositories for the duration 28days after embryo transfer.

Pregnancy was achieved, and the first hCG concentration in urine was 50mIU/ml, 14days after the embryo transfer. A singleton pregnancy with visible heart pulsation could be seen in the sixth gestational week. The pregnancy was uneventful and in April 1999, the patient had a normal vaginal delivery at term (37weeks, one day) of a healthy boy weighting 2105g. Fetal cord blood was assessed for chromosome analysis using 20 lymphocyte cells, all showing a 46, XY karyotype.

Discussion

The frequency of the 47, XYY karyotype in the male neonatal population is approximately 0.1%⁵. 47, XYY are frequently found in cytogenetic surveys of infertile males⁶. The extra Y chromosome is believed to arise through nondisjunction at the second paternal meiotic division.

Evans et al.⁷ hypothesized that the loss of the extra Y chromosome from a primitive germ-cell or spermatogonium of a 47, XYY male is either a frequent but random event or that the 46, XY germ cell has a strong proliferative advantage over the 47, XYY germ cell. Burgoyne⁸, however, suggested that since spermatogonia are usually 47, XYY, in these men there might be a directed loss of the extra Y chromosome at a later stage of spermatogenesis. The recent finding of normal karyotypes in embryos from three couples in which the father had a 47, XYY somatic karyotype⁹ and 46, XY germ cell karyotype supports the hypothesis that abnormal X chromosome "dosage" in germ cells is modified during spermatogenesis with selective premature sperm cell death at the spermatocyte stage^{1, 10, 11}. Our result supports the suggestion that one Y chromosome is similarly eliminated during spermatogenesis. Recently, Colombero et al. reported suboptimal semen samples had a higher incidence of aneuploidy. In their study, the increased frequency of chromosomal abnormalities did not have a direct effect on the fertilization rate, pregnancy characteristics or neonatal outcome.

Only one small study of the chromosomal constitution of ejaculated sperm from an XYY male has been published by without FISH method thus far. Using the hamster zona-free oocyte assay, Benet & Martin¹² karyotyped 75 cells from the ejaculated semen of an XYY male and found a normal incidence of X- and Y-bearing sperm. The present study confirms these findings supporting the hypothesis that the extra Y chromosome in XYY men is eliminated during spermatogenesis. Up to now the disomy rates for almost all chromosomes have been established in fertile males by FISH. The frequencies determined by different groups have varied considerably. Thus, for example, for chromosome 1 disomy rates ranging from 0.06% to 0.8% have been reported^{13, 14}. The incidence of X

chromosome disomy has been reported to range from 0.02% to 0.6%^{15, 16}. Average diploidy rates established in fertile probands range from 0.03% to 0.3%^{17, 18}. In our study labeling with three different probes revealed the following distribution: 0.1% XX, 0.2% YY, 0.1% XY and 0.2% disomy 18. These rates are within the normal range.

Grass et al.¹⁹ reviewed reports of 57 live-born infants fathered by 31 XYY men. Of the 57 infants 13 (23%) were chromosomally abnormal. However, after removing cases of maternal non-disjunction and mosaicism, the frequency of abnormalities was 14%. This percentage is still high but probably reflects an ascertainment bias since these XYY men were selected through the birth of their chromosomally abnormal children. Conversely, most 47, XYY males are fertile and produce chromosomally normal 46, XY sons and 46, XX daughters¹⁹⁻²¹.

Our results suggest that XYY males do not have an increased risk of aneuploid progeny as a result of secondary non-disjunction or interchromosome effects, and support the hypothesis that one Y chromosome is eliminated in the germ cells of XYY males¹³. In light of these findings proper counseling becomes an issue of paramount importance. Fertility specialists must be aware of the most recent information and be prepared to offer patients all available options. In conclusion we offer what we feel to be an appropriate outline for such counseling. When presented with male-factor infertility and a chromosomal abnormality is discovered the patient should be advised to have his ejaculated semen tested with FISH. Based on the percentage of normal sperm discovered with FISH, the risks of proceeding with treatment should be clearly explained and discussed. If the decision to continue with treatment is made we advocate the use of pre-implantation diagnosis and amniocentesis. Finally after birth a blood test should also be used to assess the genetic health of the child.

Reference

- 1) Harari O, Bourne H, Baker G, et al. (1995) High fertilization rate with intracytoplasmic sperm injection in mosaic Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril* 63:182-184
- 2) Yoshida A, Miura K and Shirai M (1996) Chromo-

- some abnormalities and male infertility. *Assisted Reproduction Reviews* 6:93-98
- 3) Rothwell NV (1983) Sex chromosome anomalies in humans. In (eds), *Understanding genetics*. Oxford University Press, New York, pp.113-118
 - 4) Bischoff FZ, Nguyen DD, Burt KJ, et al. (1994) Estimates of aneuploidy using multicolor fluorescence in situ hybridization on human sperm. *Cytogenet. Cell Genet* 66:237-243
 - 5) Maeda T, Ohno M, Matsunobu A, et al. (1991) A cytogenetic survey of 14,835 consecutive liveborns. *Jpn J Hum Genet* 36:117-129
 - 6) Yoshida A, Miura K and Shirai M (1996) Cytogenetic survey of 1,007 infertile males. *Urol Int* 58: 166-176
 - 7) Evans EP, Ford CE, Changanti RSK et al. (1970) XY spermatocytes in an XYY male. *Lancet* I:719-720
 - 8) Burgoyne PS (1979) Evidence for an association between univalent Y chromosome and spermatocyte loss in XYY mice and men. *Cytogenet Cell Genet* 23:84-89
 - 9) Staessen C, Coonen E, Van Assche E, et al. (1996) Preimplantation diagnosis for X and Y normality in embryos from three Klinefelter patients. *Hum Reprod* 11:1650-1653
 - 10) Muller J, Skakkebaeck NE and Rotcliffe SG (1995) Quantified testicular histology in boys with sex chromosome abnormalities. *Int J Androl* 18:57-62
 - 11) Chevret E, Rousseaux S, Monteil M, et al. (1997) Meiotic behaviour of sex chromosomes investigated by three-colour FISH on 35142 sperm nuclei from two 47, XYY males. *Hum Genet* 99:407-412
 - 12) Benet J and Martin R (1989) Sperm chromosome complements in a 47, XYY. *Med Genet* 78:313-315
 - 13) Holmes JM and Martin RH (1993) Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. *Hum Genet* 91:20-24
 - 14) Pieter MHEC, Geraedts JPM, Meyer H, et al. (1990) Human gametes and zygotes studied by nonradioactive in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet* 53:15-19
 - 15) Griffin DK, Abruzzo MA, Millie EA, et al. (1995) Nondisjunction in human sperm: evidence for an effect of increasing paternal age. *Hum Mol Genet* 4:227-2232
 - 16) Jackson-Cook C and Haller VL (1991) Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome complements and chromosome specific probes. *Am J Hum Genet* 49 (Suppl. A):18
 - 17) Lu PY, Hammit DG, Zinsmeister AR, et al. (1994) Dual color fluorescence in situ hybridization to investigate aneuploidy in sperm from 33 normal males and a man with a t(2;4;8)(q23;q27;p21). *Fertil Steril* 62:394-399
 - 18) Williams BJ, Ballenger CA, Malter HE, et al. (1993) Non-disjunction in human sperm: results of fluorescence in situ hybridization studies using two and three probes. *Hum Mol Genet* 2:1929-1936
 - 19) Grass F, McCombs J, Scott CL, et al. (1984) Reproduction in XYY males: two new cases and implication for genetic counselling. *Am J Hum Genet* 19: 533-560
 - 20) Rouchy J and Turleau C (1984) *Clinical atlas of human chromosomes*, 2nd edn, Wiley, New York.
 - 21) Chandley, AC (1985) *Chromosomes*. In: Hargreave TB(ed) *Male infertility*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp144-159

(Received November 24, 1999)

(Accepted May 8, 2000)

Non-mosaic XYY患者の精子を用いたICSIによる正常児分娩例荒木康久, 大野道子¹⁾, 本山光博¹⁾, 荒木重雄²⁾

高度生殖医療技術研究所

¹⁾ 高度医療技術研究所・中央クリニック²⁾ 自治医科大学産婦人科

乏精子症や無精子症に染色体異常出現頻度の高いことが判明している。卵細胞質内精子注入法(ICSI)治療対象者で乏精子症かつXYY患者の射出精子性染色体異常出現をFISHで検討した(検査精子数, 886)。0.1%XX, 0.2%YY, 0.1%XYや0.2%18番染色体のdisomyが確認された。X:Y精子はほぼ1:1であり, XおよびY精子とも正常精子が大部分であった。この結果から治療により正常児の得られる率の高いことを患者に伝えICSIを実施した。

採卵された12個のうち, 成熟卵11個に精子を注入したところ6個に受精し分割した。GradeIII(フラグメント20~50%)の胚3個を移植した。他の胚は良好胚といえず使用しなかった。妊娠成立後, 37週1日目で2105g, 染色体正常(46, XY)な男児を出産した。XYY患者から射出される精子は性染色体の異常精子は少ないことが再確認された。XYY患者の射出精子を検査した上でのICSIによる分娩報告例は最初と思われる。

キーワード: XYY, 乏精子症, ICSI, 核型, FISH

(日不妊会誌 45:279-283 2000)

低用量ピル服用中に末梢血管拡張と浮腫で 投与中止に追い込まれた症例

Report of a Case Discontinued the Administration of Low Dose Oral Contraceptive Pills because of Generalized Vascular Teleangiectasia and Edema

吉 田 耕 治

Kohji YOSHIDA

石 明 寛

Meikan SEKI

倉 橋 敦 也

Atsuya KURAHASHI

柏 村 正 道

Masamichi KASHIMURA

産業医科大学産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Occupational
and Environmental Health, School of Medicine, Kitakyushu 807-8555, Japan

39歳の主婦が、1錠中に19-ノルエチステロン0.5mgと17-エチニルエストラジオール0.035mgを含有する低用量一相性経口避妊薬NSD-1の内服8周期目に、全身の掻痒、浮腫、末梢血管拡張の副作用を来した。これらの皮膚症状はNSD-1内服中止約1ヵ月後には軽快した。低用量経口避妊薬内服中のこのような皮膚症状は稀であるが、末梢血管拡張の病因について若干の考案を加えた。

キーワード：経口避妊薬、末梢血管拡張、エチニルエストラジオール

(日不妊誌 45:285-289 2000)

緒 言

末梢血管拡張は慢性の肝臓病や妊婦に見られることが多い。病因は今なお不明であるが、エストロゲン過剰との因果関係が指摘されてきた。すなわちエストロゲンは女性の子宮内膜の螺旋(らせん)動脈を腫大・肥大させるが、これと同様の变化を皮膚の小動脈で起こしたものが末梢血管拡張であるという考え方である。エストロゲン以外に、血管の拡張と血流の加速もvascular teleangiectasiaの一因と考えられている。

血流の加速(hyperdynamic circulation)に先だって起こる全身的な血管の拡張には種々の内因性の血管拡張物質も関係している。また肝硬変で門脈圧が亢進した患者に見られるhyperdynamic circulationにはnitric oxide(NO)も一部関与していると言われている(Pizcueta MP et al. 1992)¹⁾。

ところで経口避妊薬中にはエストロゲンが含まれており初期の性ステロイドの含量が多かった時代は末梢血管拡張の報告も散見されたが(Goodrich SM 1964)²⁾、近年の低用量ピルでの報告は稀である。今回、39歳の婦人が一相性低用量ピルNSD-1の治験内服中に末梢血管拡張と全身性の浮腫・掻痒の副作用を来したので報告する。

薬剤と投与方法

1 薬 剤

NSD-1は1錠中に19-ノルエチステロン(ノルエチンドロン)0.5mgと17-エチニルエストラジオール0.035mgを含有する淡青色の21錠と、不活性の橙色Placebo 7錠の計28錠で1シートとした製剤で(水口他, 1990)³⁾、月経開始後最初の日曜スタートの第1世代低用量ピルである。治験薬剤は第一製薬と日本シンテックス株式会社(1995年に解散消滅)より提供

を受けた。

2 投与方法

月経開始の直ぐの日曜日から毎日ほぼ同じ時刻に内服を開始し21日間継続、続いて、不活性のPlaceboを7日間内服させた。

3 臨床検査

下記の諸検査を行った。検査はすべて株式会社BML(東京)に依頼した。採血・採尿は最初、NSD-1内服前、2回目からは、Placebo内服中に行った。
血液学的検査：赤血球数、白血球数、白血球分画、血小板数、ヘモグロビン、ヘマトクリット
血清生化学的検査：総蛋白、A/G比、総ビリルビン、GOT、GPT、Al-P、LDH、LAP、BUN、血清クレアチニン、Na、K、Cl、Ca、P

尿検査：蛋白、糖、沈渣

特殊検査：T₃、T₄、TSH、LH、FSH、ACTH、コルチゾール、E₂、プロゲステロン、総コレステロール、HDLコレステロール、LDLコレステロール、トリグリセリド、総脂質、リン脂質、空腹時血糖、血清インシュリン、プロトロンビン時間、トロンボテスト、APTT、フィブリノーゲン、プラスミノーゲン、ブドウ糖負荷試験、心電図、婦人科内診(腔スミア、内膜検査)

症 例

症 例： 39歳の主婦。身長：148cm、体重：47kg。

主 訴：経口避妊薬NSD-1を約8周期服用中の末梢血管拡張と全身性の浮腫・掻痒。(写真1, 2)

妊娠・分娩歴：妊娠4回、帝王切開分娩2回、人工妊娠中絶2回。

体 質：ややアレルギー体質で、蕁麻疹が来やすく、また食中毒を起しやすかった。

現病歴：患者は11月13日に最初の血液と尿の検査を、産業医大の関連病院で受けた。これは一相性低用量ピル治験薬NSD-1の内服前の検査である。治験薬は直ぐの日曜の11月15日から内服開始した。経口避妊薬を飲むに至ったのは、直前に妊娠早期の人工妊娠中絶術を受け、今後の避妊法として婦人科医が薦めたこと、また夫がコンドームによる避妊を嫌悪するという事情もあった。以後ほぼ1カ月に一回採血と尿検査を受けた。内服3周期目の1月11日に診察してカンディダ腔炎が見つかり、パラベールクリームと同腔錠の投与を受けた。このころより消退

出血の量が極端に減少した。4月14日の来院時にすでに顔と全身の軽い掻痒感を訴えており、オイラックスH軟膏20gの処方を受けた。その後、8周期目の7月15日になってから全身の痒みと浮腫、末梢血管の拡張が顕著となりNSD-1の副作用と考えられたため服用を中止させた。

主要検査値の推移

NSD-1の内服でインシュリンとコルチゾールが一貫して上昇し、またリン脂質も上昇傾向がみられたが、内服中止の約1カ月後には、ほぼ正常値に戻った。末梢血管拡張や浮腫と関係が深いとされるE₂はNSD-1投与前が39.7pg/ml、NSD-1内服中は10.9から49pg/mlの間の値で、投与中止1カ月後は54.2pg/mlとむしろ内服中に低下していた(図1)。

NSD-1投与中止後の経過

NSD-1投与中止後、全身の痒みと浮腫、末梢血管の拡張は徐々に軽快していったが末梢血管拡張のみは1カ月後にもまだ認められた(写真1, 2)。その後月経は自然に発来し(8月14日から4日間、ついで9月7日から数日)経血量は多かった。約4カ月後の11月18日になって、避妊を中止していたため、9月7日からの月経を最終月経として再度妊娠していることが判明した。診断は子宮内妊娠6~7週。避妊の失敗なのでその妊娠も中絶された。

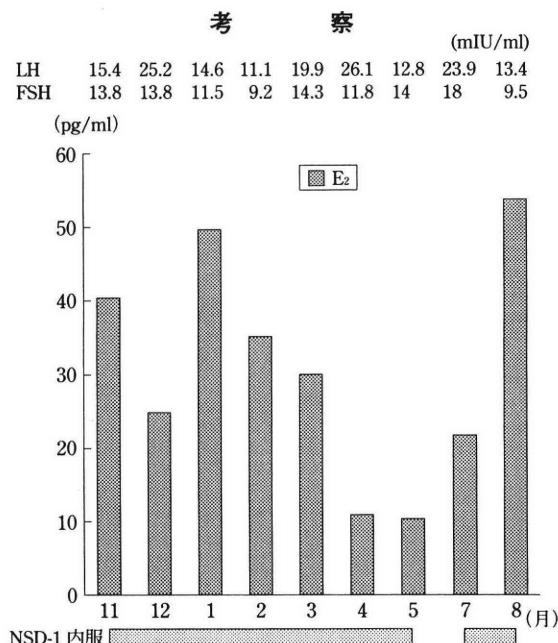
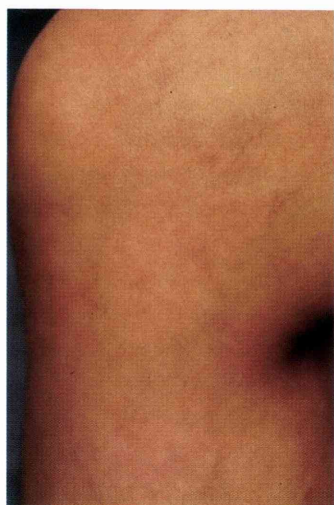


図1 低用量ピルNSD-1内服中のE₂、LH、FSHの値の変化



症状が重かった頃よりもやや臉の浮腫は軽減しているが、まだ全体に顔がむくんでいる。

写真1 低用量ピル中止後1カ月目の顔写真



最も症状が重かった時は、vascular spider様であった。

写真2 低用量ピル中止後1カ月目の右下肢の内側の皮膚表層血管の拡張所見

低用量ピルは、エストロゲンとプロゲステロゲンの2種の合成女性ホルモン剤である(矢沢, 1997)⁴⁾。低用量ピルの中でも本剤のように第1世代のプロゲステロゲンであるノルエチステロンを含有する製品がアメリカでの使用率は最も高い⁴⁾。一方、低用量ピルに用いられるエストロゲンはエチニルエストラディオール一種のみで、現在日本で認可され使用中の製品の含有量は30~40 μg でほとんど差はない。

NSD-1の1錠中の含有量も35 μg である。一方、古い中用量のピルであるドオルトン®ではエチニルエストラディオールが1錠中に50 μg と少し多く含まれている。

今回の患者のような末梢血管拡張の副作用は、低用量ピルではエストロゲン剤の含有量が低下したため減少している。現に、NSD-1の治験症例366例中の発生は本例1例(0.3%)のみで周期で言えば5,622周期中1(0.02%)の低率であった。そのほかでは、全身の搔痒感が本例を含む0.8%(0.07%)、顔面の痒みが本例のみで0.3%(2周期: 0.04%)浮腫が1.9%(0.5%)の割合であった³⁾。本患者がこのような皮膚症状を来した一因として、もともとアレルギー体質で蕁麻疹ができやすく、食中毒も起しやすかったということは関係がある可能性はある。しかし、この薬剤を中止して1カ月強で症状が消失したので薬疹であることは間違いないと思われる。中用量のピルであるドオルトン®でも過敏症として発疹、エストロゲン剤による電解質代謝の異常による浮腫の報告があるので、本患者の全身浮腫、末梢血管拡張、搔痒感もNSD-1の内服と因果関係があると考えの方が自然である。たまたま低用量ピル内服中に接触性皮膚炎が合併したと考えると、皮膚症状が顔面、両下肢、腹部とほぼ全身に出来ていた事とは矛盾すると思われる。また、前回の妊娠中、それから今回の低用量ピル内服中止後の妊娠中には、このような皮膚症状は見られていない。

経過中にインシュリンとコルチゾールが一貫して上昇し、またリン脂質も上昇していたが、これは、低用量ピル内服により糖尿病傾向、副腎皮質機能亢進傾向、脂肪肝傾向などが出来たためと思われるが、今回の末梢血管拡張や浮腫との相関は不明である。

後半でも述べるがコルチゾールの上昇はピルによりコルチゾール結合グロブリンが上昇したのが原因である。

これ以外の末梢血管拡張の発生機序について考案を加える。古くから末梢血管拡張が発生する病態や疾患として知られているのが妊娠と肝硬変である。Esteve, E(1994)ら⁵⁾は60人の正常妊婦で50人に血管性の変化を認め、内32人にvascular teleangiectasiaを認めたが、本患者のように脚部に認めた例は1例のみであった。Skudder PAとFarrington DT(1993)⁶⁾も正常妊婦に多数のteleangiectasiaを認めたことを報告している。妊娠中のエストロゲン過剰と末梢循環の異常などがこの発生に関与していると思われるが、通

常はこれら妊娠性の変化は分娩後には軽快する。しかしながら本患者の末梢血中 E_2 の値は、どちらかというとNSD-1内服中に逆に低下している(図1)単純に本患者でエストロゲン過剰作用があったかどうかについては別の考え方をする必要がある。

NSD-1の治験366症例中の服薬状況が「良」の症例315例中の1,149周期でも、血液中のエストラジオール値の最高値が100pg/ml以下の例が255例で全体の81%を占めていた³⁾。しかしこの値には内服したエチニルエストラジオールは反映されていない(エストラジオールのRIAキット⁷⁾のエチニルエストラジオールとの交叉は 8×10^8 以下)。

エチニルエストラジオールは皮下注射ではエストラジオールとほぼ同等の効果であるが内服では約12倍も効果が高まることが知られている⁸⁾。これは天然のエストロゲンは肝臓で急速に代謝されるのに対して、エチニルエストラジオールは肝で不活性化されにくいためである。従って末梢血中の内因性の E_2 がNSD-1内服で低下していたのはnegative feedbackのためで、やはりNSD-1内服中は内服前よりも低用量ピルによるエストロゲン活性は高まっていたと思われる。図1で内因性の E_2 が最も低下している4~5月頃にNSD-1によるnegative feedbackが最も強く作用していたと考え、本患者が4月頃から全身の皮膚の掻痒感を訴えていたことと符合する。従って内因性の E_2 が最低のときにNSD-1によるエストロゲン活性は最大だったと思われるが残念ながらその時の血中エチニルエストラジオールは測定されていない。図1をみるとNSD-1使用中かならずしもLH, FSHは低下していないが、これらLH, FSHの生物学的活性などにnegative feedbackがかかっていたものと思われる。(BMLのデータでは、LHの正常値は卵胞期 0.9~15.5, 排卵期 2.2~87.5, 黄体期 0.4~21.6, FSHはそれぞれ、3.1~23.9, 3.5~24.0, 1.0~17.2単位はすべてmIU/ml)採血は投与前の11月13日を除くとすべてPlacebo内服中の月経期のものなので、LH, FSHが若干高めなのはnegative feedbackからのreboundによるものであろう。

NSD-1中のプロゲステロンであるノルエチステロン自体も代謝されて極く微量の 17α エチニルエストラジオールに変化し⁹⁾、またノルエチステロンそのものも軽いエストロゲン作用を有している¹⁰⁾。

末梢血管拡張や蜘蛛状血管についてより深く研究されているのは肝硬変の患者である。Maruyama, Y (1991)¹¹⁾によれば、男性の肝硬変の患者では、女性化兆候とくに女性化乳房や手掌紅斑、末梢血管拡張

を示す患者では末梢血の E_2 /free T比が高かったという。free Tの割合に影響するSHBG (sex hormone-binding globulin) が女性化やvascular teleangiectasiaの発生に重要な役割を果たしていることも指摘している。Van Thiel (1975)¹²⁾からも慢性アルコール依存症の男性で女性化乳房や末梢血管拡張を合併している患者は、合併していない男性患者よりも血漿中のエストロンの値が有意に高かったと報告している。このような観察から拡張末梢血管にはエストロゲンやプロゲステロン・レセプターの量が多いと予想されるが、Sadick NSとNiedt GW (1990)¹³⁾の報告では生検した下肢の拡張末梢血管に、免疫細胞化学的な方法ではエストロゲンやプロゲステロン・レセプターは検出できなかった。今後ほかの細胞生化学的な方法でも研究が行われる必要があろう。Li CP (1999) ¹⁴⁾は、エストロゲンよりもsubstance Pと呼ばれる物質の上昇が、非アルコール性肝硬変患者の末梢血管拡張との関係が深いことを証明した。さらにWitte CL (1975) ¹⁵⁾は肝硬変患者の末梢血管拡張は、門脈圧亢進から派生する皮膚のhyperdynamic blood flowと関連すると述べている。しかしながら常識的には、ピル内服中の血管拡張や浮腫は、男性肝硬変のそれよりも、妊娠時の発生のほうに機序的には近いと考えられる。肝硬変患者でのこれらの研究がどの程度今回の患者の症状発生と関連するかは、 E_2 /free T比、SHBG、エストロン、エストロゲンやプロゲステロン・レセプター、substance P、皮膚のhyperdynamic blood flow等が今回の患者で計測されていないので不明である。今後の研究に待ちたい。検査値の経過で、コルチゾールの一過性上昇がみられたが、この現象は他のNSD-1の治験患者でも観察されておりコルチゾール結合グロブリンの増加のためと考えられている³⁾。また本患者でも見られたカンディダ腔炎もピル内服中に時にみられる合併症である。

日本で1999年9月から発売された低用量ピルでエチニルエストラジオールとノルエチステロンの合剤で一相性のものはヤンセン協和と持田製薬のオーソM-21であるがエチニルエストラジオールの量がNSD-1よりも多い。治験薬としては同時に治験したNSD-3が科研製薬のノリニールT28やツムラのシンフェーズT28であるが3相性で性ステロイドの総量はやはりNSD-1よりも多い。今回の副作用を起したNSD-1は最終的には日本では市販されなかった。(NSD-1内服治験中の本症例の皮膚症状については文献3)に既に記載されていて、当時の治験メーカーの日本シンテックスと第一製薬にとっては既知の事実

である.)

文 献

- 1) Pizcueta MP, Pique JM, Bosch J, et al. (1992) Effects of inhibiting nitric oxide biosynthesis on the systemic and splanchnic circulation of rats with portal hypertension. *Brit J Pharmacol* 105:184-190
- 2) Goodrich SM (1964) Peripheral venous distensibility and velocity of venous blood flow during pregnancy or during oral contraceptive therapy. *Am J Obstet Gynecol* 99(6):740
- 3) 水口弘司, 多賀理吉, 谷澤修 他(1990) 経口避妊薬NSD-1の避妊効果に対する臨床試験成績臨床医薬6(11):2409-2442
- 4) 矢沢桂二郎(1997) アメリカ経口避妊薬使用の現状 メディカル朝日26(11):26-31
- 5) Esteve E, Saudeau L, Pierre F, et al. (1994) Physiological cutaneous signs in normal pregnancy. *Ann Dermatol nnVenereol* 121(3):227-231
- 6) Skudder PA and Farrington DT (1993) Venous conditions associated with pregnancy. *Semin Dermatol* 12(2):72-77
- 7) Estradiol Direct Radioimmunoassay Kit説明書, 1987年12月改訂, 製造元 SORINBIOMEDICA(フランス原子力庁グループ), 輸入販売元 ミドリ十字株式会社
- 8) 17 β -ethynylestradiol (1984) 生化学辞典, 東京化学同人 p166
- 9) 岡田弘二(1976) Norethindrone, 産科婦人科学大系, '76A, 中山書店, 東京 p41
- 10) 岡田弘二(1982) 合成プロゲステロン剤の効果, ステロイド療法のありかた, 金芳堂, 東京 p23
- 11) Maruyama Y, Adachi Y, Aoki N, et al(1991) Mechanism of feminization in male patients with non-alcoholic liver cirrhosis: role of sex hormone-binding globulin. *Gastroenterol Jpn* 26(4):435-439
- 12) VanThiel DH, Gavalier JS, Lester R, et al. (1975) Plasma estrone, prolactin, and sex steroid-binding globulin in chronic alcoholic men. *Metabolism* 24(9):1015-1019
- 13) Sadick NS and Niedt GW, (1990) A study of estrogen and progesterone receptors in spider telangiectasia of the lower extremities. *J Dermatol Surg Oncol* 16(7):620-623
- 14) Li CP, Lee FY, Hwang SJ, et al. (1999) Role of substance P in the pathogenesis of spider angiomas in patients with nonalcoholic liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 94(2):502-507
- 15) Witte C L, Hicks T, Renert W, et al. (1975) Vascular spider: a cutaneous manifestation of hyperdynamic blood flow in hepatic cirrhosis. *South Med J* 68(2):246-248

(受付: 2000年 4月20日)

(受理: 2000年 6月14日)

Report of a Case Discontinued the Administration of Low Dose Oral Contraceptive Pills because of Generalized Vascular Teleangiectasia and Edema

Kohji Yoshida, Atsuya Kurahashi, Meikan Seki and Masamichi Kashimura

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Occupational and Environmental Health, School of Medicine, Kitakyushu 807-8555, Japan

A 39-year-old housewife was complaining of generalized itching, edema and vascular teleangiectasia at the 8th cycle of low dose oral contraceptive (OC) use. The OC prescribed was NSD-1, which was the monophasic pill containing 35 μ g of 17 β -ethynylestradiol and 500 μ g of 19-norethisterone (norethindrone) in one tablet. Those skin symptoms such as itching, vascular teleangiectasia and edema almost ceased around 1 month after the OC interruption. Skin lesions during low-dose OC use were very rare, however pathogeneses of vascular teleangiectasia were discussed.

Key words: oral contraceptive pill, peripheral teleangiectasia, ethynylestradiol

(Jpn J Fertil Steril 45:285-289 2000)

地 方 部 会 講 演 抄 録

第117回日本不妊学会関西支部集談会

日時：平成11年3月13日(土)午後1時30分～

場所：日本シェーリング株式会社 新館講堂(大阪市)

1. 牛黄体におけるLHレセプターmRNAのスプライシングバリエーションの発現

○川手憲俊, 玉田尋通, 稲葉俊夫,

澤田 勉

(大阪府立大農学獣医臨床繁殖)

牛の黄体における黄体形成ホルモン(LH)レセプターmRNAのスプライシングバリエーションの発現についてRT-PCR法により検討し、さらに準定量的RT-PCR法を用いて黄体発育過程におけるその量的変化について検討した。RT-PCRによって得られた増幅産物は明瞭な4本のバンドから構成されており、増幅予定領域内の一部の配列をプローブに用いたサザンブロット分析で4本のバンドに強いシグナルが見られた。またその塩基配列については最長のバンドは519bp(全長型, A form)で牛LHレセプターcDNAの当該領域の配列と同一であった。残りの3本のバンドは、438bp, 253bpおよび、172bpであり、それぞれ、exonXの全域の欠失、exonXIの5'側の一部の欠失、およびexonXの全域とexonXIの5'側の一部の欠失が見られた。これら3つのスプライシングバリエーションは、長いものからそれぞれ、綿羊で報告されたLHレセプターmRNAのF, BおよびG formに相当するものであった。また黄体発育過程におけるA, FおよびG formの量的変化についてはI期からII期前半にかけて有意に増加し、さらにII期前半から後半へ有意に増加するが、II期後半とIII期の黄体との間には有意差は認められなかった。またB formはI期からII期前半にかけては有意に増加するが、その後は有意な変化は認められなかった。以上の成績から、牛のLHレセプターmRNAのスプライシングバリエーションは少なくとも3種類存在し、それらは綿羊で報告されたものと同種のものであること、さらに4種のmRNA量は黄体発育過程においてほぼ同様に増加することが示唆された。

2. 着床期のマウス子宮内膜間質細胞におけるLy6A/Eの発現

○巽 啓司, 樋口壽宏, 藤原 浩,

中山貴弘, 藤田一之, 江川晴人,

藤井信吾

(京都大産婦)

着床期のマウス子宮内膜の変化の分子機構を明らかにする目的で、cDNAサブトラクション法を用いて、着床時の子宮内膜に特異的に発現する遺伝子を同定し、その発現と局在についてNorthern Blot法およびin situ hybridization法にて解析した。また免疫組織染色法で蛋白の発現を確認した。スクリーニングの結果、Ly6A/E遺伝子がクローニングされた。Ly6A/Eは血球系細胞の表面マーカーとして発見され、血管内皮や脾臓で発現することが知られているが、子宮での発現は報告されていない。Ly6A/Eは非妊娠マウスでは子宮内膜上皮に発現されているものの、妊娠3日目までに消失すること、また妊娠5日目以後になると着床した胚の周囲に位置する脱落膜化した子宮内膜間質細胞にその発現が誘導されることが明らかとなった。なお子宮筋や血管内皮では恒常的に発現していた。Ly6A/Eは着床前後で子宮内膜上皮から間質へと発現部位が変化する分子であり、着床期子宮内膜の変化に深く関与するのではないかと考えられた。

3. IVF-ETにおけるKruger's Strict Criteria, SMI値および受精率との関係

○島田知代, 半田雅文, 藤原マキ,

原田真木子, 浜井晴喜, 加藤浩志,

小林真一郎, 磯島晋三

(生長会府中病院不妊センター)

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、1996年よりSperm Quality Analyzer(SQA)を用いてSperm Motility Index(SMI)を測定し、精子のQualityを客観的に評価している。今回、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、受精率に関しては、SMI100以上で有意に高値を示す傾向にあった。しかしながら、SMIが100以上を示す症例でも、受精率が低い、あるいは受精しない場合があり、運動精子数やSMIを用いても、IVFにおける受精の予測は完

全ではなかった。そこで、精子の運動性以外に、精子の形態学的な問題も受精にかかわる要因と思われるので、今回、SMIとアクロゾームの比率も含めた正常形態精子14%以上で有意に受精率が向上するとされているKruger's strict criteria (KSC)を組み合わせて、IVF-ETの受精率を予測し得る可否を検討したので報告する。

4. ヒト精巣における肥満細胞のサブタイプと造精機能障害について

○山中邦人, 藤澤正人, 堅田明浩,
藤岡 一, 龍見 昇, 岡田 弘,
荒川創一, 守殿貞夫 (神戸大泌尿)
田中浩之 (神戸徳洲会泌尿)

【目的】ヒト精巣について特発性男性不妊症における肥満細胞の増加が報告されているが、それが果たす役割については不明な点が多い。ヒト肥満細胞はtryptaseとchymaseの2種の特異的プロテアーゼをマーカーとしてMCTs(mast cells containing only tryptase)とMCTCs(mast cells containing both tryptase and chymase)の2種のサブタイプが存在し、種々の病変においてその分布の違いが注目されている。今回我々は正常精巣組織と精索静脈瘤患者、閉塞性無精子症患者および特発性男性不妊症患者の精巣組織に免疫組織染色を行い、肥満細胞数の増減とサブタイプの分布について検討した。【方法】ホルマリン固定、パラフィン包埋した精巣組織の連続切片を作成し、一次抗体としてanti-tryptase, anti-cathepsinGを使用した免疫組織染色を行った。tryptase陽性の肥満細胞数を全肥満細胞数とし、tryptaseとcathepsinGの両者が陽性の肥満細胞数をMCTCs数、全肥満細胞数とMCTCs数の差をMCTs数とした。全肥満細胞数/精細管断面数、MCTs数/全肥満細胞数、MCTCs数/全肥満細胞数を算出し、正常群と造精機能障害群を比較検討した。【結果】造精機能障害が軽度のうちからMCTCsの比率が増加していた。また高度の造精機能障害を有する特発性無精子症患者では全肥満細胞数/精細管断面数が増加していた。【考察】精巣での肥満細胞の増加とサブタイプの変化が造精機能障害に関与している可能性が示唆された。

5. 閉塞性無精子症の診断における精漿 α -グルコシダーゼの有用性

○六車光英, 日浦儀仁, 藤田一郎,
檀野祥三, 松田公志 (関西医大泌尿)

【目的】 α -グルコシダーゼは精漿中に豊富に存在し、

主に精巣上体由来するとされ、精巣上体の生化学的マーカーとしての可能性が示唆されている。そこで我々は閉塞性無精子症の診断における精漿 α -グルコシダーゼの有用性について検討を行った。【対象および方法】対象は精管または精巣上体閉塞のために当科で精路再建術を行った26例である。精漿 α -グルコシダーゼ活性の測定は4-メチルウンベリフェロン- α -D-グルコシドを基質とし、遊離した4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度を測定した。【結果】精管閉塞例の精漿 α -グルコシダーゼ活性は $27.2 \pm 21.8 \text{ nmol/min/ejaculate}$ (mean $\pm$ S.D., $n=22$)で、精巣上体閉塞例($68.7 \pm 71.2 \text{ nmol/min/ejaculate}$, $n=7$)、Sertoli-cell-only($105.2 \pm 51.1 \text{ nmol/min/ejaculate}$, $n=8$)に比べ有意に低かった。また、これらの精管閉塞例に精管-精管吻合術を行ったところ、術後の精漿 α -グルコシダーゼ活性は術前に比べ有意に上昇した。【考察】閉塞性無精子症の診断における精漿 α -グルコシダーゼ活性の有用性が示唆され、今後さらに症例を重ね、検討を行う予定である。

6. 精巣上体精子吸引法(MESA)の臨床成績—体外受精の方法による検討—

○大久保和俊, 小倉啓司, 荒井陽一
(倉敷中央病院泌尿)
高橋 晃 (倉敷中央病院産婦)
武縄 淳 (洛和会音羽病院泌尿)
奥野 博, 小川 修
(京都大泌尿)
渡辺栄三 (醍醐渡辺病院産婦)

【目的】精巣上体精子吸引法(MESA)の有用性について、体外受精の方法による検討を行った。【対象と方法】平成3年9月より平成10年12月までに倉敷中央病院泌尿器科、洛和会音羽病院泌尿器科、京都大学医学部泌尿器科の3施設で閉塞性無精子症の診断のもとにMESAを行った14例を対象とした。内訳は鼠径部手術後4例、先天性両側精管欠損8例、Young症候群2例。ARTは平成3年9月より平成6年6月まではconventional IVF, SUZI, SUZI+ICSI(A群)を、平成6年6月より平成10年12月まではICSI(B群)を行った。B群の5例6回では凍結から解凍を経た精子を、その他は新鮮のままARTに供した。【結果】MESAは14例に18回行い、全例全回で運動精子が得られた。A群は5例に7回のMESAを行った。A群全体の受精率は $29/106=27.4\%$ 、3例に化学妊娠を、1例に拳児を得た。一方B群は10例に11回のMESAを行い、延12回媒精を行った。B群全体の受精率は $73/129=56.6\%$ 、8例

に化学妊娠を得た。うち4例は挙児を、2例は現在妊娠継続中である。MESAで得られた総運動精子数はA群45.5万に対しB群51.8万と差はなかった。また運動率にも大差はなかった。【考察】MESAによる受精率や生産率は、得られた精子の質よりも体外受精の方法のほうが重要な要因と考えられた。

7. 生殖医療に対する医学部学生の意識調査

○大橋一友, 河本明子, 木村 正,
徳川吉弘, 国重一郎, 緒方 功,
森山明宏, 東 千尋, 村田雄二
(大阪大産婦)

【目的】進歩の著しい生殖医療に対して、医学部学生がどのような意識を持っているか調査した。【対象】大阪大学医学部学生58名を対象とした。【方法】(1)「先進生殖医療の現状」と題した講義を1時間行った後に、アンケートに答える形式で調査を行った。(2)アンケートは「各配偶子操作ならびにその関連操作はヒト生殖医療の場において行われるべきものと考えますか?」という問いに「はい」、「いいえ」、「現時点では判断できない」で答える形式で行った。【結果】(1)AIH, IVF, SUZI, ICSIに対して、93%, 86%, 81%, 78%が「はい」と答えた。(2)AID(24%)にはIVFでのdonation(sperm; 22%, egg; 24%)と同じく低い賛同しか得られなかった。(3)減数手術、代理母に賛同した割合は14%, 22%と低値であったが、「現時点では判断できない」とした回答が33%, 40%と高率であった。(4)クローン操作には76%が「いいえ」と回答した。(5)男女間で「はい」に有意差があったのはSUZI, ICSI(男>女), AID(男<女)であった。

8. IVF-ETプログラムにおける採卵日固定法の試み

○後藤 栄, 高倉賢二, 竹林浩一,
増田善行, 中西桂子, 廣瀬雅哉,
木村俊雄, 秋山 稔, 布留川浩之,
野田洋一 (滋賀医大産婦)

当科では1998年4月にIVF-ETプログラムにおいて採卵日をあらかじめ設定する採卵日固定法を導入した。【目的・方法】同法は採卵日を月～水曜日に固定し、採卵から胚移植を金曜日までに終了させることにより、週末の採卵・胚移植を避け、患者ならびにARTに携わるスタッフの負担の軽減をはかることを目的とし、GnRHアゴニスト併用下(long protocol)に、予定した採卵日の11日前よりpure FSH 225IUを4日間、ついでhMG 150IUを5日間投与して卵胞刺激を行

う。【対象】15症例、16周期、平均年齢32.1歳、平均不妊期間4.6年であった。【結果】平均採卵数5.38個、受精率68.2%、臨床妊娠率33.3%と良好な成績が得られた。15症例中、mild OHSS 1例、多胎妊娠0例であった。キャンセル率は18.7%と比較的高率に認められた。13採卵周期中11周期(86.4%)は予定日に採卵で、予定日を1日すぎて採卵したものは2周期(13.6%)であった。【結語】同法は妊娠率、合併症発症率など従来の方法と比較して有意な差を認めない上、採卵日が予定できるため患者ならびにARTに携わるスタッフの負担を軽減でき、有用な卵巣刺激方法であると考えられた。

9. ART治療における移植胚の選別とその問題点について

○濱田ゆかり, 長谷川昭子, 脇本栄子,
田路秀明, 柴原浩章, 香山浩二,
(兵庫医大産婦)
善本哲郎, 島 博基 (兵庫医大泌尿)
繁田 実 (兵庫医大分娩新生児)

体外受精胚移植術(IVF-ET)において良好な妊娠率を得るために、複数個の胚を移植することが一般に行われている。しかしながら、このために多胎妊娠が高率に発生し、種々の臨床上的問題が発生している。今回、我々の治療成績を後方視的に分析し、妊娠率と多胎妊娠発生率から、IVF-ETにおける移植胚の選別ならびに移植胚数の決定について分析したので報告する。【対象および方法】1995年9月より1998年12月までに兵庫医科大学においてIVF-ET治療(顕微授精を含む)を行い、1個以上胚を移植した407周期に対して、移植胚数別の臨床妊娠率、継続妊娠率、多胎妊娠率に影響する因子を統計的に分析した。【結果】移植胚数当たりの臨床妊娠率、継続妊娠率、多胎妊娠率は移植胚数1個では15%(8/15), 7%(4/54), 0%, 2個では28%(29/105), 24%(25/105), 32%(8/25), 3個では30%(73/242), 26%(62/242), 35%(22/62)であった。臨床妊娠率、継続妊娠率、多胎妊娠率ともに、移植胚数1個に対して2個以上の場合は統計的に有意な増加が認められたが、2個と3個では差は認められなかった。一方、3胎妊娠の5例はすべて3個移植群であった。【結論】現在の我々のIVF-ETプログラムでは、移植胚数を2個にしても良好な妊娠率が得られ、かつ3胎妊娠を回避できると考えられる。

10. Blastocyst胚移植法の検討

○富山達大, 延澤みゆき, 近藤恵子

(大阪HARTクリニック)

胚をBlastocyst(胚盤胞)胚の状態まで培養し, 胚移植を行う事は, 自然妊娠により近づく理想的な胚移植法と考えられている。近年, 着床率の向上や多胎妊娠を減少させる目的でBlastocyst胚移植を行うという報告もあるが, その適応には, 未だ統一された見解はない。今回我々は, 過去3回以上胚移植を行ったが, 一度も妊娠しなかった132症例に, 161周期Blastocyst胚移植を試みた。98周期にBlastocyst胚まで培養し, 33周期に妊娠が認められた。現在, 10例が正常出産し17例がongoing中で, 5例が流産, 1例が子宮外妊娠だった。以上より, 複数回胚移植不成功例に対して, Blastocyst胚移植は, 有用な胚移植法であると考えられた。

11. 凍結保存精巢上体精子によるICSIの試み

○向林 学, 高瀬規久也, 三橋洋治,

星合 昊

(近畿大産婦)

児玉光正, 朴 英哲, 栗田 孝

(近畿大泌尿)

男性不妊患者に対する治療は, 94年10月より重度の乏精子症に対して卵細胞内精子注入法(ICSI)を行うことにより対応を行ってきたが, 無精子症を呈する男性不妊患者に対しては泌尿器科に検索, 加療を依頼するのみで院内での積極的な治療は行っていない。今回, 手術治療が困難と診断された閉塞性無精子症(右精管欠損, 左精管閉塞)の症例に対し, 初めて泌尿器科に精巢上体精子の採取を依頼し, 凍結保存した精子を用いてICSIを行い妊娠例を得る経験をした。症例は双胎妊娠であり現在も妊娠経過は良好である。

12. Klinefelter症候群に発生した精巢類表皮嚢胞の一例

○東田 章, 中村吉宏, 坪庭直樹,

山中幹基, 古賀 実, 三浦秀信,

西村憲二, 内田欣也, 北村雅哉,

松宮清美, 奥山明彦 (大阪大泌尿)

症例は33歳男性。不妊を主訴に他院を受診した。身長180cm, 体重65kg。触診で左精巢は硬く23mlに腫大, 右精巢は1mlと萎縮しており, 左精巢腫瘍の診断にて当科紹介となった。術前精液検査で高度の乏精子症を認め, 内分泌学的には血清LH, FSHの上

昇とテストステロン値の低下を認めた。染色体は47XXYであった。AFP, CEA, β -hCGは上昇を認めなかった。Klinefelter症候群に発生した精巢腫瘍の診断で根治的精巣摘除術を施行した。病理組織学的には精巢類表皮嚢胞であった。

13. 血液透析患者に施行した陰茎海綿体検査の経験

○田中智章, 河野 学, 安本亮二

(大阪市立十三市民病院泌尿)

武本佳昭, 土田健司, 甲野拓郎,

耕田周佳, 長沼俊秀, 田中義彦,

垣谷祐子, 岸本武利

(大阪市立大泌尿)

【目的】勃起不全を訴えた血液透析患者に対して, 血管作動性薬による陰茎海綿体注射を行い, 陰茎海綿体機能検査およびその有効性を検討した。【方法】勃起不全を主訴に受診した血液透析患者2名に対して, 血管作動性薬による陰茎海綿体検査を施行した。投与方法は, PGE_1 20 μg または塩酸ノパペリン40mgを陰茎海綿体に注射した。注射後の評価は, (1)陰茎肘動脈血圧係数(PBPI) (2)反応性(勃起持続時間, 硬度) (3)早期勃起の頻度で行った。【結果】PBPIでは2例とも動脈硬化性障害を認めた。1例で PGE_1 に対して良好な反応が得られたが, 1例は PGE_1 および塩酸ノパペリンに対して未反応であった。とくに未反応例に対して PGE_1 による陰茎海綿体トレーニングを施行したが, 海綿体機能に改善は認めなかった。また注射後に, 血圧の変動や皮下血腫等の副作用はいずれの症例でも認めなかった。【結論】勃起不全を訴えた血液透析患者に対して, 安全に血管作動性薬による陰茎海綿体検査を施行し得た。いずれも陰茎海綿体に動脈性障害を認め, vasoactive drugに未反応症例もあった。

14. 男性不妊患者における精索静脈瘤手術の意義: 自然妊娠・出産とARTの関与について

○奥野 博, 中村英二郎, 七里泰正,

寛 善行, 寺地敏郎, 小川 修

(京都大泌尿)

中山貴弘, 藤原 浩, 藤井信吾

(京都大婦産)

石見大輔, 渡辺浩彦, 森 崇英,

渡辺栄三

(醍醐渡辺病院)

【目的】近年, 体外受精・胚移植や顕微授精などの

ニューテクノロジー、いわゆるAssisted Reproductive Technology (ART)の進歩により、従来治療困難であった高度乏精子症や無精子症患者でも挙児を得ることが可能となってきた。そこでこのような変化のなかで男子不妊症患者における精索静脈瘤手術の意義・位置付けを再検討する目的で、精索静脈瘤手術後の自然妊娠・出産率ならびに自然妊娠に至らない患者に対するARTの関与・成績について調査した。

【対象】当院ならびに関連病院でICSIが導入された1993年以降の精索静脈瘤手術症例、148例を対象とした。手術は片側が107例、両側が39例であった。

【結果】術後の自然妊娠は37例(25.0%)で、うち出産は32例(21.6%)であった(うち5例：第2子以上出産)。自然妊娠に至らなかった111例中57例ではART(AIH, ICSI, TESE-ICSI)を併用し、妊娠は29例(20.0%)、出産は23例(15.5%)(うち2例：双子)で、計66例(44.6%)が妊娠し、55例(37.1%)が挙児を得た。なお妊娠継続中は7例、流産は5例(うち2例：ICSI)であった。【考察】ARTの併用によりたしかに妊娠・出産率は飛躍的に増加したが、なかでもICSIの場合、母体に対する影響や費用、多胎・低体重児の問題、さらに静脈瘤手術により第2子以上の挙児が不妊症の問題なく得られること、自然妊娠のほとんどの症例が1年以内の妊娠であること等を考慮すること、精索静脈瘤手術は現時点でもまず始めに行うべき治療と考えられた。また視診・触診では診断困難なsubclinicalの症例も正確に診断することが妊孕性に影響することが示唆されたので併せて報告する。

特別講演 I

勃起不全の診断における陰茎硬度周径の夜間連続測定法(RigiScan)

○金子茂男, 水永光博, 谷口成実,
八竹 直

(旭川医科大学泌尿器科学教室)

勃起障害の研究は近年急速に進歩し、その病態についての理解が進められるようになった。その成果は経口治療薬(sildenafil)の開発に結びつき、昨年は世界中で勃起障害についての関心が高まった。心因性、器質性を問わず勃起障害全般に適応を有する経口治療薬の登場は勃起障害の診断、治療体系にも少なからず影響を与えつつある。しかし本剤の安全かつ適正な使用、本剤の無効な患者の治療法の開発には勃起障害のさらなる病態解明が必要であり、正確

な診断の下で治療を行うという医療の原則が崩れるものではない。夜間陰茎勃起現象は健康な男性にみられる生理的現象であり、精神的影響を受けないことから心因性、器質性勃起障害の鑑別に重要な現象とされている。本講演では勃起障害の概略と、夜間陰茎勃起現象の記録法の一つであるRigiScanによる陰茎硬度周径連続測定法について述べる。

特別講演 II

着床前遺伝子診断とその倫理的側面

吉村泰典

(慶應義塾大学医学部産婦人科学教室)

現在、妊娠時に行われている出生診断は、絨毛サンプリングや羊水細胞から染色体のKaryotypeを検索することにある。しかし、これらの方法では診断の結果によっては出産か中絶かの選択を迫られたり、母体にとって精神的、肉体的苦痛を伴うことも多い。現在では急速に進歩した生殖技術と分子生物学的手法を結集して、妊娠成立以前に初期胚の遺伝子診断が可能となってきた。着床前遺伝子診断とは受精卵の一部を用いてDNA診断を行い、着床前に遺伝子疾患を診断しようというものである。胚生検による遺伝子性疾患の診断は先端生殖医療である体外受精・胚移植を基本にした手技と、これに顕微授精などで培われた顕微操作、分子生物学的手法により、極めて微量な試料からの遺伝性疾患の診断といったハイテクノロジーを駆使することによってのみ可能となったものといえる。遺伝的にハイリスクで妊娠のたびごとに胎児診断で異常の判定がなされ、妊娠中絶を繰り返すことにより、その恐怖心から妊娠することを躊躇し、挙児を断念している女性も少なくない。この着床前診断は、従来の出生前診断よりも細胞レベルで行われるため、結果的に母体にとって低侵襲であり、発生する胎児にとっても安全で低侵襲な方法であれば極めて有意義であると考えられる。本講演では着床前診断の方法論を概説

し、その倫理的側面についても言及する。

第118回 日本不妊学会関西支部集談会

日時：平成12年3月25日(土)午後1時30分～

場所：日本シエリング株式会社 新館講堂(大阪市)

1. ICSIで治療したnon-mosaic型クラインフェルター症候群症例の妊娠と胎児出生前診断結果について

○繁田 実, 香山浩二

(兵庫医大分娩新生児)

濱田ゆかり, 霞 弘之, 田路秀明,

小森慎二, 香山浩二 (兵庫医大産婦)

近藤宣幸, 善本哲郎, 島 博基

(兵庫医大泌尿)

繁田 実, 小森慎二, 澤井英明,

長谷川昭子, 香山浩二, 島 博基

(兵庫医大先端研発生生殖)

【目的】クラインフェルター症候群は過剰なX染色体を含む男性の染色体異常であり、non-mosaic症例ではそのほとんどが無精子症になり生児を得ることは困難であったが、最近のART技術のなかで精巣精子を用いた卵細胞質内精子注入法(ICSI)により出産例が報告されている。我々も同様の2症例で射精精液またはTESE中の精子を用いてICSIを施行し妊娠成立を得、さらに胎児の羊水採取にて染色体核型を確認したので報告する。【方法】一般不妊検査にて不妊原因を検索した後、高度の乏精子症を示す男性因子による不妊症でART治療の適応と診断した。施設内倫理委員会の治療承認を経て、遺伝外来における遺伝カウンセリングにて患者の同意を得た後ART治療を実施した。ICSIは定法にそって実施した。精子は射精精液またはTESE中に検出した精子をICSIに用いた。経腹的に羊水を採取し胎児の羊水細胞の染色体検査を実施した。【結果】不妊夫婦の末梢血による通常の染色体検査にて夫の染色体は47, XXYでnon-mosaic型のクラインフェルター症候群であることが確認された。射精精液で無精子症であった症例KSはTESE中の非運動精子を用い、症例HKは射精精液中の運動精子を用いてICSIを行った。射精精液の検査結果は液量1.1ml, 濃度 14×10^4 /ml, 運動率33%であった。症例KSはMetaphase II 卵8個にICSIを施行し4分割胚6個の内2個を2日目に子宮内に移植し、症例HKはMetaphase II 卵4個にICSIを施行し4分割胚3個の内2個を2日目に子宮内に移植し、いずれも単胎妊娠が成

立した。羊水検査による胎児の羊水細胞の染色体検査では正常核型であった。【結論】そのほとんどが無精子症になり生児を得ることは困難であるといわれるnon-mosaic型のクラインフェルター症候群において、射精精液またはTESE中の精子を用いたICSIで妊娠が成立した。さらに、胎児の羊水細胞の染色体検査で正常核型を確認した。

2. 体外受精における多胎(特に品胎)防止策の導入について

—ヒト受精卵を胚盤胞まで培養した経験から—

○小林真一郎, 半田雅文, 浜井晴喜

野尻恵子, 島田知代, 原田真木子

加藤浩志, 磯島晋三

(生長会府中病院不妊センター)

ARTを実施する我々の責任として、IVFあるいはICSIの妊娠率を向上させることは言うまでもないが、次にARTにより発生する多胎妊娠を極力減少させる必要がある。今回我々は、ヒト受精卵を胚盤胞まで培養することにより、移植する胚の個数を極力2個以内とし、品胎発生を予防する試みを行ったので報告する。1999年5月より採卵個数が6個以上であったIVF、ICSI施行120周期を対象として、受精卵を5日間培養し胚盤胞が1個でも得られれば、胚移植は2個に限定した。胚盤胞が2個移植できた周期は67周期あり、その場合の妊娠率は約55%(37/67)であった。また胚盤胞を少なくとも1個(1個あるいは2個)移植できた周期は88周期で、その場合の妊娠率は約48%(42/88)であった。以上のことから、胚盤胞が1個でも得られれば妊娠率は約50%近くが期待され、移植胚数は2個で十分であると考えられた。また対象症例中の双胎発生率は約13%となり、それまでの我々の施設での発生率を下回る結果になった。今後本法を確立してゆくことにより多胎発生率の減少、とくに品胎の発生予防は可能であると思われる。

3. BLASTOCYST移植法Ⅱ—その有用性と限界—

○富山達大, 和田滋子, 片岡希代子

(大阪HARTクリニック)

Blastocyst移植法は、様々な培養液の開発とともに方法は簡素化され、その有用性について海外より多くの報告がなされている。当院でも1997年よりBlastocyst移植法に取り組み、日本産婦人科学会雑誌(1999年12月号)に1998年までの成績を掲載し、反復ART不成功例に対するBlastocyst移植法の有用性について報告を行った。

今回、1999年度に反復ART不成功例に対して行ったBlastocyst移植163症例、204周期について、その成績に検討を加え、新しい知見を得たので報告する。

4. 当院における機能性無精子症患者に対するTESEの治療成績

○奥野 博, 中村英二郎, 筧 善行,
小川 修 (京都大泌尿)
井上卓也, 中山貴弘, 藤原 浩,
藤井信吾 (京都大婦産)

【対象と方法】当院では1997年2月から現在まで機能性無精子症患者に対し15例16回のTESE-ICSIを施行してきた。対象症例は特発性造精機能障害(①Sertoli cell only syndrome 6例, ②hypospermatogenesis 4例, ③maturation arrest 3例), ④後天性造精機能障害(mumps orchitis 1例, chemotherapy+RX 1例)であった。方法はmultiple biopsy 法15回, microdissection法1回にてcollector tissue sieve等を用いて精巣組織処理を行った。ICSIはすべてfresh spermを用いた。【結果】精子採取率はそれぞれ①17%②60%③100%④100%, 運動精子はhypospermatogenesis 1例, 後天性造精機能障害(mumps orchitis)1例で得られた。採卵あたりの受精率はそれぞれ精子が採取できたもので①43%②78%③44%④67%であった。妊娠はhypospermatogenesis 1例(chemical abortion), 後天性造精機能障害(mumps orchitis)1例(産児)の2例であった。【考察】妊娠にかかわる因子ではいかにviableな精子を採取できるかが重要であると考えられた。

5. 不妊を契機に発見された精巣類表皮嚢胞の一例

○梶田周佳, 田中智章, 西阪誠泰
安本亮二 (大阪市立十三市民病院泌尿)
河野 学 (大阪市立弘済院病院泌尿)
甲野拓郎, 長沼俊秀, 岸本武利
(大阪市立大泌尿)

患者は30才男性、不妊(結婚後3年)、oligozoospermiaを主訴として泌尿器科に紹介受診。初診時、左精巣に精索静脈瘤(grade I)と右精巣上部に腫瘤を認めた。精液所見はvolume 7.0ml, 精子数 4×10^6 /ml, 運動率は3%であった。精巣エコーでは、右精巣に周囲とは境界明瞭な内部不均一な腫瘤を認め、MRIにおいては、辺縁部がencapsulateされた境界明瞭な径

約1.8cmの円形の腫瘤を認め、左精巣上体周囲に精索静脈瘤と思われる管腔構造が認められた。腫瘍マーカーは正常であった。右精巣類表皮嚢胞、左精索静脈瘤の診断の元、左精索静脈瘤根治術、右精巣腫瘍核出術を施行した。腫瘍の病理診断は、Epidermal cyst with calcificationであった。術後、精子数は 8×10^6 /ml、40%と改善傾向を認めた。現在、AIH施行中である。今回、不妊と精巣類表皮嚢胞について文献的考察を加えて発表する。

6. 精索静脈瘤術前後における血中Inhibin B濃度について

○藤澤正人, 土橋正樹, 山崎隆文,
神崎正徳, 辻 功, 岡田 弘,
荒川創一, 守殿貞夫
(神戸大泌尿)

【目的】Inhibin BはFSH分泌の重要な生理学的調節因子である。今回、我々は、精索静脈瘤患者の精巣静脈低位結紮術前後における血中Inhibin B濃度を測定し、下垂体ホルモン(FSH, LH, testosterone, PRL, E_2)、臨床所見、ならびに精液所見との関連性について検討した。【対象】精巣静脈低位結紮術をうけた精索静脈瘤患者53例について術前に精巣容積、血中FSH, LH, testosterone, PRL, E_2 の測定を行った。また、術前と術後約6カ月後にInhibin B濃度の測定とLH-RH負荷検査を行った。精液検査は、術前および術後3カ月ごとに行い、精液所見改善の判定は当科の判定基準(Fujisawa, et al. Fertil Steril 61, 779, 1994)に従った。【結果】術前の血中Inhibin B濃度とFSHならびにLH-RH負荷検査でのFSHピーク値は負の相関を示した。また、術前の精子濃度は血中Inhibin B濃度と正の相関を示した。術前に乏精液症であった47例のうち22例(46.8%)で精液所見の改善がみられた。改善群の術前のInhibin B濃度は 123.1 ± 54.4 pg/mlで、非改善群に比べてやや高値を示した。改善群では術後Inhibin B濃度は 127.3 ± 48.9 pg/mlで術前に比べやや上昇していたが、有意な差は認められなかった。術後Inhibin B濃度が上昇したものは47例中25例であり、このうち15例(60%)の精液所見に改善が見られた。一方、Inhibin B濃度が不変あるいは低下した22例のうち精液所見が改善したものは5例(22.7%)のみであった。【考察】精巣静脈結紮術後の血中Inhibin B濃度の上昇は、精液所見の改善につながる可能性が示唆された。

7. 犬の子宮蓄膿症と脱落膜腫

○野村紘一 (大阪府立大獣医外科)

犬子宮蓄膿症は中～高齢犬の発情休止期に好発する疾患で、子宮が厚ぼったく肥厚しその中に膿を入れている。大部分の子宮は嚢胞状増殖を示し、胎盤形成時の子宮腺の増殖に似ている。子宮からは細菌が検出されることが多く、子宮蓄膿症の原因は細菌感染であろうと考えられてきたが、今までに、細菌接種による子宮蓄膿症の誘発には成功していない。また、大抵の症例で卵巣に黄体が存在し、黄体ホルモンの過剰分泌が疑われたが、血中黄体ホルモン値は必ずしも高くはなく、正常範囲内である。このように、犬子宮蓄膿症の原因に関しては未だ不明な点も多い。一方、犬は有脱落膜動物に属しているが、今までに脱落膜腫が作成されたとする報告は見られない。そこで、齧歯類と同様の方法で、犬に脱落膜腫を作成することを試みた。すなわちあらかじめ、左側卵管と左側子宮角基部を結紮しておいて、犬を交配させ、着床相当の時期に、左子宮角のみに絹糸の挿入や創傷等の人工刺激を加えた。右子宮角はそのまま妊娠させた。その結果、刺激を加えた左子宮角には子宮腺の嚢胞状増殖が見られ、これらの組織像は右子宮角の胎盤組織に類似していた。犬の正常妊娠時の脱落膜反応は齧歯類のような間質細胞増殖型ではなく、子宮腺増殖型であるところから、これらの人工刺激によって形成された子宮腺の嚢胞状増殖は犬の脱落膜腫に相当するものと考えられた。そこで、刺激源として、犬子宮蓄膿症から分離培養した大腸菌液を用いて脱落膜腫を誘起したところ、感染を伴った子宮腺の嚢胞状増殖が得られた。これらの組織像は自然発症例の犬子宮蓄膿症の組織像に一致していた。以上から、犬子宮蓄膿症は細菌感染を刺激源とした一種の脱落膜反応(犬脱落膜腫)である可能性が示唆された。

8. エストロジェン負荷による卵胞嚢腫牛の視床下部機能の評価

○川手憲俊, 辻 誠, 玉田尋通,
稲葉俊夫, 澤田 勉
(大阪府立大獣医臨床繁殖)

牛の卵胞嚢腫の発生機構については視床下部-下垂体系の異常が想定されているが、いまだ十分には明らかにされていない。今回我々は、GnRH投与により一時的に卵巣に黄体化が見られたが、その後正常な発情周期が回復せず卵胞嚢腫が再発した乳牛の

1症例に遭遇した。そこで、本嚢腫牛の視床下部のエストロジェンに対する感受性を調べる目的でエストラジオール-17 β (E₂)1mgを投与し、血中LH濃度を測定した。その結果、本嚢腫牛においてはE₂投与後のLHサージは検出できなかったが、一方、正常発情周期を示す雌牛3例においてはE₂投与後24時間目にLHサージのピークが見られた。本嚢腫牛ではGnRHに対する下垂体の反応性に著しい異常は認められないが、エストロジェン投与によるLHサージの惹起が欠如していることから、視床下部のエストロジェン感受性の低下が示唆された。

9. jsd/jsd mutantマウスに対するGnRH antagonist(Nal-Glu)による精子形成の誘導

○東田 章, 松宮清美, 岸川英史,
三浦秀信, 西村憲二, 北村雅哉,
奥山明彦 (大阪大泌尿)
Marvin L. Meistrich
(Department of Experimental Radiation
Oncology, The University of Texas,
MD Anderson Cancer Center)
堂前嘉代子 (武庫川女子大生活環境)
西宗義武 (大阪大微生物病研)

【目的】放射線及び薬剤性精巣障害に対して、GnRH antagonistまたはagonistにより精細胞の分化の回復が得られることが報告されている。男性不妊モデルマウスの一つであるjsd/jsd mutantマウス(jsdマウス)に対してもGnRH antagonist療法による精祖細胞の分化誘導が得られたので報告する。【対象と方法】jsdマウスはC57BL/6系統で微生物病研究所で継代しているものを用いた。8週齢のマウスに浸透圧ポンプを用いて、Nal-Gluを2500 μ g/kg/dayで4週間投与した後に屠殺し、体重、精巣、精囊重量、血清ホルモン値を測定した。一側精巣はブアン固定の後、HE染色を行い組織学的所見を検討した。他側は精巣内テストステロン(ITT)測定を行った。これとは別に4週間のNal-Glu投与の後Nal-Gluを中止して4週間後に精巣組織を検討した。【結果】Nal-Glu投与により精祖細胞から精母細胞までの分化を誘導し得た。ITTは無治療のjsdマウスでは高値を示し、Nal-Glu投与群では血清テストステロンとともに低下を認めた。またNal-Glu投与を中止することによって精子細胞までの分化を誘導できた。【考察】jsdマウスにおいて、GnRH antagonistによるテストステロン抑制により精祖細胞から精母細胞までの分化を誘導し得た。jsdマウスにおける精祖細胞分化の障害にはテストステロ

ンが関与していることが示唆された。また減数分裂には逆にテストステロンが必要であると考えられた。

10. 二次元電気泳動による前立腺特異抗原のペプチドマップ解析

○田中 努, 吉貴達寛, 岡田裕作
(滋賀医大泌尿)

磯野高敬

(滋賀医大実験実習機器センター)

近年、前立腺特異抗原(PSA)は血清中においてprotease inhibitorと結合した結合型PSA(complex PSA)を形成するとともに一部は非結合型PSA(free PSA)として存在しており、このcomplex PSAの比率が前立腺肥大症(BPH)より前立腺癌が高いことが明らかになってきている。しかし、このようなfreeおよびcomplex PSAが存在し、癌とBPHでその存在比率に差が生じる原因は現在のところ明らかではない。そこで今回我々は、PSAの分子形態の差を二次元電気泳動と飛行時間型質量分析法(TOF-MS)によるペプチドマップ解析の手法を用いて検討した。TOF-MSは、レーザー脱離法によって蛋白質分子をイオン化後、電場によって加速し電磁場の存在しない高真空のドリフト空間を自由飛行させ、その飛行時間を測定することで当該物質の質量を知る方法である。二次元電気泳動により分離できた各PSAの分子形態についての解析結果を報告する。

11. 男性機能温存を可能な限り追求した異時性両側性進行精巣腫瘍の一例

○大久保和俊, 寺田直樹, 松田陽介,
前川信也, 小倉啓司, 荒井陽一
(倉敷中央病院泌尿)

【緒言】精巣腫瘍は性的活動期に発症する事が多く、化学療法や手術などによる男性機能低下は患者にとり大きな問題となる。今回我々は、異時性両側性進行精巣腫瘍患者に対して治療前の精子凍結保存、精巣部分切除術、神経温存後腹膜リンパ節郭清(RPLND)を行い、可能な限り男性機能温存を追求したので報告する。【症例】27歳男性、91年2月(23歳時)左精巣腫瘍stage Iにて高位精巣摘除術を施行。病理組織は胎児性癌+成熟奇形腫。脈管浸潤あり、PVB療法2コース施行した。95年2月右精巣腫瘍(下極に径2cm大)および後腹膜リンパ節転移を認め、stage II Aと診断した。精液検査では精子数 $16.0 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率24%と乏精子症、精子無力症を認めた。患者は婚約して

おり、治療前に2回にわたり精子凍結保存を行った。テストステロン産生能温存のため精巣は部分切除とした。同時に残存精巣の6カ所生検で上皮内癌がないことを確認した。病理組織は胎児性癌であった。リンパ節転移に対し、3コースのEP療法の後、神経温存RPLNDを行った。摘除リンパ節は壊死組織のみであった。その後2000年2月現在に至るまで再発はない。治療後1年ではT.77.5ng/dlと低値であったが性欲や勃起機能は保たれている。順行性射精が可能であるが治療後2年でも無精子症であった。96年8月から凍結保存精子によるICSIを行い、2回目のICSIで99年4月健康な女兒を得た。

12. 糖尿病患者におけるアルドースリダクターゼと性機能障害の関係

○邵 仁哲, 河内明宏, 藤戸 章
三木恒治 (京都府立医大泌尿)
納谷佳男 (洛和会丸太町病院泌尿)
中村直登 (京都府立医大第一内科)
矢部千尋 (京都府立医大薬理)

【目的】アルドースリダクターゼ以下(AR)は、NADPHを補酵素として、グルコースをソルビトールという糖アルコール(ポリオール)に変換する。このポリオール経路の代謝亢進が糖尿病組織における種々の合併症をひき起こすと考えられている。今回私達は、赤血球AR値を測定することにより、糖尿病患者におけるアルドースリダクターゼと性機能障害の関係を検討した。【対象と方法】対象は、当院糖尿病外来に通院している20~60歳代の患者のうち、国際勃起機能スコア(IIEF)を含むアンケートとAR採血の承諾を得る事のできた30例。そのうち、勃起障害(+)16例(以下DM.ED(+))群、勃起障害(-)14例(以下DM.ED(-))群であった。なお、IIEFが15点以下のものを勃起障害(+)とした。【結果】年齢をマッチさせたコントロール群のAR値は 9.9 ± 0.1 、DM.ED(-)群 8.7 ± 1.1 、DM.ED(+))群 10.1 ± 1.0 で、コントロール群とDM.ED(-)群、DM.ED(-)群とDM.ED(+))群との間にそれぞれ有意差を認めた($p < 0.05$)。

13. 前立腺癌内分泌療法の造血機能に対する影響

○室田卓之, 六車光英, 川喜田睦司,
松田公志 (関西医大泌尿)

【方法】対象は1995年~98年に前立腺癌に対する内分泌療法(LH-RHアナログ)を行った63人(平均71.4歳、病期A 3人、B 16人、C 21人、D1 3人、D2 20人)。観察期間中に内分泌抵抗性癌となった症例は除外し

た。治療前、3カ月後、6カ月以降の末梢血(赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット)血清鉄、エリスロポエチン濃度を検討した。【結果】内分泌療法全ての病期において赤血球数RBC(406万/ μ l)平均11万/ μ l、ヘモグロビン濃度HGB(12.4g/dl)平均0.24g/dlの減少を認め($p<0.01$)正球性正色素性貧血を呈した。また、病期C以下症例RBC:治療前421.7万/ μ l→後411.7万/ μ l, HGB:12.9g/dl→12.56g/dl, 病期Dの症例RBC:治療前417万/ μ l→後406万/ μ l, HGB:前12.7g/dl→12.1g/dl。【考察】前立腺癌内分泌療法中の血清テストステロン低下が正球性正色素性貧血の原因である可能性が高いと思われる。

特別講演 I

環境ホルモンとコイの精巣異常

佐々木文彦(大阪府立大農学部獣医解剖学教室)

我々は、マウス下垂体の性差の存在(雄では成長ホルモン細胞が多く、雌ではプロラクチン細胞が多い)とその性分化の機構を解明してきた。すなわち、生後発育中の性ホルモンはマウス下垂体の性分化に関与している。

環境ホルモン(内分泌攪乱物質)は自然界に幅広く存在し、動物体内に取り込まれエストロゲン様作用により、胎生期や生後発育中に性腺を傷害すると考えられている。日本においても、巻貝のインボセックスやコイの精巣異常を招き、成人男性の精子数減少の一因ではないかと危惧されている。しかし、この様な野性動物の性腺に環境ホルモンが異常をもたらす機構については明らかになっていないのが現状である。

堺市を流れる石津川には下水処理場から環境ホルモン(ノニルフェノール、ベンゾフェノン、ビスフェノールA、エストラジオール17- β 等)が流入している。本講演では、本河川に生息するコイの精巣と下垂体を形態学的に検討する事によって、精巣と下垂体の黄体形成ホルモン(LH)細胞が一年を通じて環境ホルモンにより如何なる影響を受けているかを報告する。

特別講演 II

哺乳類精巣と低温ショック蛋白質

藤田 潤

(京都大学大学院医学研究科分子病診療学)

生物は一般に環境の温度変化に適応する能力をもっている。哺乳類細胞において、熱ショックに対する応答は研究されているが、低温ストレス応答についてはほとんど報告がない。しかし、細菌や植物では低温ストレスに応答して発現の亢進する低温ショック蛋白質群が報告されており、哺乳類にも類似の応答機構が存在する可能性がある。

哺乳類の精子形成細胞は、分化段階に応じて厳密な遺伝子発現のコントロールがなされている。さらに精子形成細胞は体温よりも低い温度(32℃)に保たれないと分化できずに死滅する特質をもっている。我々は、マウスの精巣で発現する遺伝子を解析中に、32℃で発現誘導される新しいRNA結合蛋白CIRP(Cold-Inducible RNA Binding Protein)を見いだした。この発現誘導は、意外なことに通常の低温(4℃や10℃)では認められなかった。ヒト細胞において、CIRPおよび構造の似たRNA結合蛋白RBM3の発現を調べたところ、これらも32℃で発現誘導を認めた。マウス正常精巣ではCIRPは精子形成細胞に、RBM3はセルトリ細胞に発現しており、停留精巣にすると両者の発現が低下した。これら哺乳類における初めての低温ショック蛋白質は、精子形成細胞の生存、分化に関係している可能性がある。なお最近、脳の障害を予防するために、低体温療法(32～33℃)が行われ良好な成績が報告されている。また、消化管や皮膚はこの程度の低温ストレスに常にさらされているであろう。今後、軽度低温での生物学が重要になる可能性がある。

参考文献: 1) J. Cell Biol., 137., 899-908, 1997. 2) BBRC, 236, 804-807, 1997. 3) Gene, 204, 115-120, 1997. 4) Am. J. Pathol., 152, 289-296, 1998. 5) BBRC, 245, 534-538, 1998. 6) J. Mol. Microbiol. Biotechnol., 1, 243-255, 1999. 7) Am. J. Pathol., in press.

第11回 日本不妊学会春季九州支部会

日時：平成12年4月16日(日)

午前8時30分～午後2時

会場：アクロス福岡 国際会議場(福岡市)

1. 長期培養(胚盤胞移植)における培養液の検討 (G₁₋₂ & G₂₋₂ Sequential Media Systems vs 10%非働化血清添加HTF)

○鍛田恵里, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 田中威づみ
竹本洋一, 高崎博幸, 井手紀子
岩本智子, 小田原瑞穂, 長野亜紀子
竹本佳世 (セントマザー産婦)
楠 比呂志 (神戸大農学附属農場)

【目的】Gardnerの方法に従って長期培養を行ってきたが、妊娠率の向上は著しくなかった。そこで今回我々は、長期培養(胚盤胞移植)における培養システムの検討(G₁₋₂, G₂₋₂ vs 10%非働化血清添加 HTF)を行ったので報告する。【方法】長期培養には、Coda InLine Filter(gen X)を装着した専用の3ガスインキュベーターを2台用いた。①ICSI後3日目までをG₁₋₂でその後2日間をG₂₋₂で培養する。②5日間同じ10%HTF内で培養する。③3日目に新しい10%HTFに入れかえるの3種類の方法を比較した。【結果】3種類の方法における培養5日後の胚盤胞への発生率と胚盤胞+桑実胚への発生率は、それぞれ14.0%(6/43)と67.4%(29/43), 34.6%(18/52)と61.5%(32/52)および、28.8%(15/52)と61.5%(32/52)であった。

2. Sequential medium G₁₋₂の有用性に関する基礎的検討

○田中威づみ, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 井手紀子
岩本智子, 長野亜紀子, 鍛田恵里
竹本佳世 (セントマザー産婦)
楠 比呂志 (神戸大農学附属農場)

【目的】今回我々は、初期発生の中で特に重要とされる前半部分の培養液G₁₋₂(Gardner)の成分をヒト卵管液と10%非働化母体血清添加HTFの成分とを比較検討したので、その結果について報告する。【方法】ヒト卵管液, G₁₋₂, 10%非働化血清添加HTFの各種成分を測定した。【結果】①組成内容が報告されているG₁に比較し, G₁₋₂ではNa-lactateがやや増量し, Non-essential アミノ酸がやや減量, HSAが増量していた。②10%HTFにはNon-essential, essentialアミノ

酸は全て確認できたが、その濃度はG₁₋₂の約1/10程度であった。③卵管液の成分は, G₁₋₂に比べNa, K, Mg, Ca, Taurineが高値であった。【結論】卵管液のサンプリングに問題は残るが、ヒト体外受精用メディウムと卵管液との間には成分組成上、大きな差異が推測された。

3. 注入式血液ガス分析装置を用いた培養液pH 分析ならびに培養器CO₂濃度に関する検討

○詠田由美 (詠田由美クリニック)

【目的】培養液pHと培養器CO₂濃度は胚培養の重要な条件であるが、pHの測定条件設定が困難であることより十分な検討はなされていない。今回、注入式血液ガス分析装置を用いて培養液pHの測定を行ったので報告する。【方法】同一ロットの市販HTF培養液に10%ヒト血清を加え、測定検体(HTF液)とした。HTF液1mlを器官培養皿に入れ、1mlのオイルでカバー後、2.5～6.0%の各種CO₂濃度に設定した培養器に、12～22時間置いた(n=31)。その後、気泡の混入を避け、針つきシリンジにHTF液を回収しゴム栓封入後、直ちにポータブル注入式血液ガス分析装置(IRMA2000)を用いてHTF液のpHを測定した。【成績】培養液CO₂濃度の上昇に伴い培養液pHは低下し、pH値はCO₂濃度2.5%では7.52±0.01、3.5%は7.39±0.01、4.0%は7.35±0.01、4.5%は7.31±0.01、5.0%は7.30±0.03、5.5%は7.25±0.01、6.0%は7.21±0.01であった。CO₂濃度を独立変数とした回帰分析ではR²=0.941の直線回帰を示し、回帰式より、HTF液のpHを7.40に設定する培養器至適CO₂濃度は3.6%となった。【結語】今後、ヒト胚培養の至適pHならびに培養器至適CO₂濃度について再検討を要すると考えられる。

4. ICSIにおける卵細胞膜穿刺方法と受精・分割 の検討

○野崎あすか, 隈本 巧, 松田佳子
渡邊英明, 河野由佳子, 田内悦子
西山和加子, 松本ゆみ, 野見山真理
小島加代子

(高邦会高木病院不妊センター)

【目的】一般に、良質なMetaphase IIの卵細胞膜は伸展性に富んでいる。そこで、ICSI施行時の卵細胞膜の破れ方によってその伸展性を分類し、ICSIの成績との関係を後方視的に検討した。【方法】138個の成熟卵にICSIを施行したところ、卵細胞膜の破れ方には次の5つがあった。Ⅰ：injection needleにて穿刺すると同時に破れる、Ⅱ：軽度の吸引にて破れる、Ⅲ：

Ⅱで破れず、方向を変えて再度穿刺すると同時に破れる、Ⅳ：Ⅲで破れず、軽度の吸引にて破れる、Ⅴ：Ⅳで破れず、強度の吸引にて破れる。ICSI施行後、5タイプ別に卵の生存率、受精率および分割状況を調べた。【結果】卵の生存率、受精率は伸展性の乏しいⅠで低く、適度な伸展性をもつⅢで高い傾向が見られた。分割率は、全てのタイプにおいて差は認められなかった。【結論】卵細胞膜の破れ方により卵の生存率、受精率に差が生じた。今後、さらに症例を増やし考察を深めたい。

5. Poor quality卵子における核置換の基礎的研究

○田中 温, 永吉 基, 栗田松一郎
馬渡善文, 田中威づみ, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 岩本智子
(セントマザー産婦)

【目的】卵子の成熟度は臨床上、核の成熟度、すなわち囲卵腔内の第一極体の放出の有無により判定されている。しかし、M-Ⅱ卵子のICSI後の胚発生の結果は一様ではない。これは、卵細胞質の成熟度に差がある為と考えられる。現在、poor qualityの卵子に対しGVの置換が研究されているが、その成績は十分ではないと思われる。今回我々は、核置換後の胚発生を高める目的でM-Ⅱ期における核置換の基礎的検討を行ったので、その結果について報告する。【方法】①ICSI周期に採取された未成熟卵子を患者の同意を得て使用した。②M-Ⅰ期、GV期卵子をWay-mouth培養液内で体外培養し、第一極体を放出した後、ピエゾマイクロマニピュレーターで第一極体と卵細胞質の染色体を吸引し、これを同様に除核された卵子の囲卵腔内に注入し電気融合を行った。融合後の卵子にICSIを行った。【結果】低率ではあるが正常な胚発生を観察できた。

6. IVF施行回数、年齢別にみた当院の成績

○平井香里, 長木美幸, 内藤多恵
広津留恵子, 宇都宮隆史
(セント・ルカ産婦)

【目的】今回我々は、IVF施行回数・年齢別に妊娠率を比較し、加齢による影響と何回までのIVFが妊娠への可能性があるかを検討した。【方法・結果】対象は1992年7月から1998年12月までに当院で採卵を施行し当該周期において胚移植を行った4061周期でIVF施行回数は1回から30回までにおよび、10回位迄は各々で10%近くの妊娠が得られていた。最高は24

回目(39歳)で児を得ていた。IVF施行5回までに全妊娠周期の83%が妊娠していた。また年齢別には20～24歳、以後5歳区切りの6群に分け、妊娠率は19%、20%、18%、12%、6%、0%となっていた。25～29歳では3回迄に80%以上が妊娠しているのに対し40～45歳では6回で80%以上となり幅があった。最高では41歳(10回目)で児を得ている。更に各年齢における妊娠後の行方は25歳から34歳にかけて平均61.1%が児を得ているのに対し、40歳以上は25%と低く、流産率も54.2%と半分以上を占める結果となった。

7. 5回以上のIVF-ETによる妊娠例の検討

○小野田 親, 本田律生, 永田康志
西村佳与子, 田中信幸, 松浦講平
岡村 均 (熊本大産婦)

【目的】今回、複数回IVF-ETを施行し妊娠に到った症例について検討を行った。【対象】過去8年間に当科で5回以上IVF-ETを施行したのは199周期で、妊娠は25周期(A群)、非妊娠は174周期(B群)であった。4回以下での妊娠は77周期(C群)であり、これら3群間を比較検討した。【結果】hMG使用量はA群1695±586IU、B群1558±608IU、C群1370±412IU($p<0.05$)。採卵数は10.8±7.2、B群8.8±6.7、C群9.2±6.2(N.S.)であった。適応は男性因子がA群24.0%、B群31%、C群20.8%($p<0.05$)で顕微授精の割合は32%、35.6%、14.3%($p<0.05$)であった。【考察】5回以上で妊娠に到った例ではhMG使用量の増加、採卵数の増加がみられ、男性因子の増加、一方では早期の顕微授精の併用が成績向上に重要と考えられた。

8. 体外受精-胚移植(IVF-ET)の成績と子宮内膜の厚み(EM)の関連性に対する移植胚のqualityの影響についての検討

○神山 茂, 宮城博子, 松田貴子
野原 理, 金澤浩二 (琉球大産婦)

【目的】IVFの成績は、hCG投与前のEMと関連があるとされている。この関連性に移植胚のqualityが影響するか否かを検討した。【方法】96.1～99.10の期間に施行した、354周期(EM $\geq$ 10mm:277周期、EM $<$ 10mm:77周期)を対象とした。【結果】①全体の妊娠率は、EM $\geq$ 10mmで28.9%(80/277)、EM $<$ 10mmで9.1%(7/77)であり、有意差があった($p<0.01$)。②良好胚をETできた周期(150周期)における妊娠率は、EM $\geq$ 10mmで45.5%(56/123)、EM $<$ 10mmで7.4%(2/27)であり、有意差があった($p<0.01$)。不良

胚をETした周期の妊娠率は、 $EM \geq 10mm$ で15.6% (24/154), $EM < 10mm$ で10.0% (5/50)であり、有意差が無かった。【結論】移植胚が不良の場合は、EMとIVFの成績の関連性は低いことが示唆された。

9. Prospective randomized tryによるDay3ETとDay5ETの臨床的比較検討

○池田千秋, 長木美幸, 佐藤真紀

広津留恵子, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦)

【目的】近年、妊娠率の向上や多胎妊娠防止の目的で5日間体外培養後の胚盤胞期胚移植の有用性が報告されている。今回我々はprospective randomizedにIVF後のDay3ETとDay5ETの妊娠率、キャンセル率を比較することによりその有用性を検討した。【方法】99年9月より当院にて体外受精を行なった150周期を対象とした。Day3ETの培養液には市販のHTFを、Day5までの培養には①HTF/Blastocyst Mediumと②G_{1.2}/G_{2.2}を使用し、その成績を比較した。【結果】Day3ET, Day5ETの妊娠率はそれぞれ18.1% (13/72), 12.3% (7/57) (①20.0%, ②3.7%)であり、キャンセル率は2.7% (2/72), 26.9% (21/78) (①21.1%, ②32.5%)だった。【結論】HTFを用いたDay3ETの妊娠率の方がBlastocyst stage culture mediumを用いたDay5ETの妊娠率よりも高かった。これより胚盤胞培養と5日目胚移植は理論上は合目的ではあるが、臨床的にはさらに検討すべきであると考えられた。

10. 胚盤胞移植における適応別胚発生の比較

○江頭昭義, 元石睦郎, 杉岡美智代

梅林ツナ, 福田貴美子, 東島利紀

蔵本武志 (蔵本ウイメンズクリニック)

【目的】胚盤胞移植において、適応理由の異なる反復不成功例と品胎防止例で胚発生の比較を行った。【方法】反復不成功44周期 (4日目移植: 4周期, 5日目移植: 40周期) と品胎防止39周期 (4日目移植: 10周期, 5日目移植: 29周期) の計83周期について、分割率, 3日目に5細胞以上の追加培養可能胚率, 4日目の桑実胚以上への発生率および5日目の初期胚盤胞以上への発生率を比較した。また、各周期ごとの追加培養可能胚に対する胚盤胞率で6群 (0, 1~19, 20~39, 40~59, 60~79および80~100%群) に分類し、周期数に対する各群の割合 (%) を算出した。さらに、追加培養可能胚に対する良好胚率を6群 (0, 1~19, 20~39, 40~59, 60~79および80~100%群) に分類し、周期数に対する各群の割合 (%) も算出し

た。【結果】分割率, 追加培養可能胚率および桑実胚率については、反復不成功例 (97%, 91%および59%) と品胎防止例 (95%, 94%, 60%) に差は認められなかったが、初期胚盤胞以上への発生率では、反復不成功例 (27%) に対し品胎防止例 (44%) が有意に高くなった。胚盤胞率で6群に分類した結果、胚盤胞0%群は、反復不成功例 (35%) が品胎防止例 (3%) より高く、胚盤胞の得られた群では、反復不成功例で胚盤胞率20~39%群 (35%) が最も高かったのに対し、品胎防止例では胚盤胞率60~79%群 (28%) が最も高くなった。良好胚率を比較した結果、良好胚0%群は反復不成功例 (77%) が品胎防止例 (38%) よりも高く、良好胚の得られた群では、いずれの場合も反復不成功例 (14, 7, 2, 0および0%) が品胎防止例 (26, 31, 3, 3および0%) よりも低くなった。以上の結果より、反復不成功例と品胎防止例では桑実胚までの胚発生に差は見られないものの、反復不成功例は胚盤胞への発生率, 追加培養可能胚に対する胚盤胞率および良好胚率において、品胎防止例よりも低くなることが明らかとなった。

11. 不妊治療中の夫婦の理解度調査

○渡辺利香, 後藤孝子, 倉橋千鶴美

指山実千代, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦)

【目的】患者さんへ必要な情報は伝わり理解されているのか日頃のかかわりを含めた評価【対象】対象A新患, B腹腔鏡検査後, C人工授精, D体外受精【方法】一部テスト形式の質問紙を配布【結果】定義の不妊期間を2年と答えられたのは夫婦共に対象Aが73.3%で最も多かった。次に、基礎体温では対象Aが73.3%対象C72.2%対象D70.6%が正しく答えていた。生殖器の解剖は対象A・Dともに全員正解でAIHとIVFの違いは対象C・Dともに全員正解であった。当院での不妊治療全般の説明を載せたパンフレットを、妻は全員利用していた。腹腔鏡後ビデオ説明を夫婦で受け38.9%が改めて夫婦の問題と感じ、50%が夫に現状を知ってもらいたいきっかけになったと答えた。【結論】基本的な事を理解していないままAIHやIVFを受けている患者さんが少数ではあるが存在した。また腹腔鏡後のビデオ説明は夫婦で治療に取り組むためにはとても効果的と感じた。

12. ART治療へ進む患者の生命倫理の捉えかた

○ 實崎美奈, 原井淳子, 倉橋千鶴美

指山実千代, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦)

【目的】ART治療へ進む患者は、生命倫理的な問題についてどう考えどう捉えているかを知る。【対象・方法】当院において初めてART治療周期に入る患者29名に対する個人面接による聞き取り調査。【結果】対象患者の平均年齢は34.9歳、平均不妊期間は3年6カ月であった。着床前診断、出生前診断、減胎手術の各項目についてはそれぞれ約半数が「希望する」と答えた。ドネーションについてはいずれかの方法を希望するものが10.3%であったのに対し、「希望しない」が75.9%を占め、その理由として「夫婦2人の子供がほしい」「そこまでしてほしくない」が挙げられた。【考察】対象患者の平均年齢の高さから染色体異常についての関心が高く慎重になっている様子が見られ、多胎妊娠は現実的な問題として考えられている。また、「不妊はあくまでも夫婦2人の問題である」と捉えられている様子が示唆された。

13. 不妊治療経験が母性理念に与える影響(普通妊娠者と比較して)

○ 柴田令子, 原井淳子, 斎高美穂

二宮 睦, 宿利佳子, 内藤多恵

宇都宮隆史 (セント・ルカ産婦)

【目的】不妊治療経験者の母性意識を理解する。【対象・方法】当院で不妊治療後妊娠に至った患者による質問形式の母性理念調査。又同様の調査を市内保育所に通う児を持つ母親に行う。【結果】「女は子供を産むことで自分が生きた証拠を残すことができる」「女は子供を持つことで人生の価値を知ることができる」の項目では、非常にそう思う、そう思うの肯定意見が両項目共にIVF群で37%と低く、コントロール群では、51.5%と半数を超えていた。更に、「母親が子供の成長を生き甲斐にするのは間違っている」の項目では、非常に違う、違うの否定意見がIVF群で26%で、コントロール群の方が40%と高かった。【考察】以上の結果より不妊治療経験者は、子供の存在だけに執着する人生や夫婦の関係ではなく、他に人生の価値を見出そうとしていると考えられる。これらの事より不妊治療を経験したことは、母性理念の形成に影響を与えているということが示唆される。

14. Diff Quik 染色によるヒト精子アクロソーム解析について

○ ポール・キハイレ, 広津留恵子

池田千秋, 宇都宮隆史

(セント・ルカ産婦)

三角順一

(大分医大)

Diff Quik染色を用いたヒト精子アクロソームとconventional IVFによる受精率の関係をprospectiveに検討した。Acrosome-intact精子が40%以上の17人の患者においては、Krugerらのstrict criteriaによる精子正常形態率(SNM)は $18.7 \pm 4.2\%$ 、平均受精率は $75.6 \pm 5.2\%$ だった。Acrosome-intact精子が40%以下の症例は6人だった。そのうち3人が受精率0% (SNM $7.7 \pm 5.2\%$)、残り3人が平均受精率 $31.7 \pm 3.2\%$ (SNM $9.2 \pm 1.5\%$)であった。これより、Acrosome-intact精子が40%以下の場合、たとえSNMが5%以上であってもICSI施行が望ましいことが示唆された。

15. 画像解析ソフトを用いた精子頭部形態の検討

○ 宮村泰豪, 蓮尾敦子, 北島道夫

藤下 晃, 石丸忠之 (長崎大産婦)

精子形態の客観的な評価は困難であり、各施設間でもばらつきが大きいとされる。今回我々は画像解析コンピュータソフトを用いて、精子頭部を測定し形態評価を行った。当科で体外受精・胚移植治療を行った13症例13周期を対象とした。媒精時の精子のスメアを作成し、パパンニコロー染色を施した。画像解析ソフト(Mac scope)を用いて各周期100合計1300の精子頭部の形態を観察した。頭部の長さは $4.59 \pm 0.64 \mu\text{m}$ 、幅は $2.94 \pm 0.44 \mu\text{m}$ および長さ幅比は 1.59 ± 0.32 であった。WHOのマニュアル4版のストリククライテリアに従って分類すると、3項目が全て正常(長さ $4.0 \sim 5.0 \mu\text{m}$ 、幅 $2.5 \sim 3.5 \mu\text{m}$ および長さ幅比 $1.5 \sim 1.75$)であった精子の割合は11~34%であり、ARTの際の受精率が低下するとされる15%未満であったのは13例中2例であった。

16. 不動精子における生存性の有無の識別の検討

○岩本智子, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 田中威づみ
竹本洋一, 高崎博幸, 井手紀子
小田原瑞穂, 長野亜紀子, 松島みどり
鎌田恵里, 竹本佳世
(セントマザー産婦)
楠 比呂志 (神戸大農学附属農場)

【目的】重症男性不妊症の治療の中で、全ての精子が動かない精子不動症の症例を経験することは少ないが、不動精子が生存している場合、その精子を用いたICSIの受精率は、運動精子とほとんど大差なく高率となる。一方、死滅した不動精子を用いた受精率は非常に低値となる。この両者の区別には、従来からHOST法が多用されてきたが、今回我々は、不動精子の生存性識別に関して、より詳細な検討を行い、臨床上有用な結果を得たので報告する。【方法】①HOST法において低張溶液中で尾部が変形した不動精子、②①で尾部の変形がみられたのに10% HTF内に移して変形が回復した不動精子、および③HEGLUT法：(Heparin・Glutathione法)において頭部の膨化しなかった不動精子を用いてICSIを行った。【結果】3種類の方法におけるICSI後の受精率は①8/17(47%)②24/39(61%)③2/17(11.7%)であった。

17. 射精精液中に認められる円形精子細胞と精子所見の関係について

○小田原瑞穂, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 田中威づみ
井手紀子, 高崎博幸
(セントマザー産婦)

【目的】Tesaricは、無精子症患者の射精精液中の円形精子細胞を用いて、新生児の出産を報告した。今回我々は、射出精液中の円形精子細胞と精子濃度との関係について検討し、有用な結果が得られたので報告する。【方法】無精子症患者、重症男性不妊症患者、良好精子患者の射出精液を10%不活化血清加HTFで洗浄し、沈渣を観察し、確認できた円形精子細胞の生存率をトリパンブルー染色で検出した。【結果】①無精子症患者の精液では、円形精子細胞は全く認められなかった。②重症男性不妊症患者の大半で円形精子細胞を認め、その生存率は約60%であった。③良好精子患者では円形精子細胞はほとんど認められなかった。【結論】重症乏精子症・精子無力症症例にのみ生存率の高い円形精子細胞が射出精液中

に出現する機序は不明であるが、セルトリ細胞と円形精子細胞との間の結合状態に変化が生じているものと推測された。

18. 円形精子細胞の染色体分析

○高崎博幸, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 田中威づみ
竹本洋一 (セントマザー産婦)

【目的】現在、邦国におけるROSIの臨床応用は凍結されている。その大きな理由として無精子症における円形精子細胞の染色体の正常性に関する検討が不十分であると考えられる。今回我々は、円形精子細胞の染色体について検討を行い、臨床上有用な結果を得たので報告する。【方法】過排卵処理後、採卵シリアルロニダーゼで裸化したマウス(B₆C₃F₁)卵子にヒト円形精子細胞を電気刺激(D.C 1500V/cm・99μsec)を行った後にピエゾマイクロマニピュレーターを用いて注入した。注入5~6時間後にビンプラスチン(0.1μg/ml)を含む10%血清加HTFに移行し、その7~8時間培養後に染色体検査を行った。【結果】染色体の分析が可能であった症例、PCCを生じた症例、分析不能であった症例の割合はそれぞれ約60%、30%、10%であった。【結論】現在のところ、円形精子細胞の染色体異常の発生率は低値であった。

19. 逆行性射精による乏精液症の検討

○小松 潔, 山口秋人
(原三信病院泌尿)
結城裕之 (同 産婦)

逆行性射精とは射精時の膀胱頸部にある内括約筋閉鎖不全により精液が膀胱へ逆流するために生じる無精液症または乏精液症である。乏精液症患者の射精直後の尿中に多数の精子を確認できた部分的逆行性射精症につき検討した。対象は94年3月より99年1月までの10例である。平均精液量は0.9mlで全例、射精直後の尿中に多数の精子を認めた。基礎疾患として糖尿病2例、脊髄損傷1例、直腸癌術後1例であったが、残りの6例は不明であった。8例に膀胱頸部の収縮を高める目的でイミプラミン60mg/日の投与を3ヵ月以上施行した。評価可能症例は4例で内3例に精液所見の改善が見られ1例がAIHにて妊娠を認めた。精液量2.0ml以下の乏精液症患者の射精後尿中精液検査は部分的逆行性射精を診断する上で重要である。

20. 当院における閉鎖性無精子症の臨床成績

○杉岡美智代, 元石睦郎, 江頭昭義
梅林ツナ, 福田貴美子, 東島利紀
蔵本武志 (蔵本ウイメンズクリニック)
小松 潔 (原三信病院泌尿)

【目的】閉塞性無精子症の重度男性不妊においても、卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の臨床応用が一般的となり、妊娠の可能性が十分期待できるようになった。今回は当院での閉塞性無精子症について、その臨床成績について報告する。【方法】testicular sperm extraction (TESE) あるいはmicrosurgical epididymal sperm aspiration (MESA) により回収された新鮮精子あるいは凍結・融解精子をICSIに使用し、その後の正常受精率、良好胚への発生率および妊娠率を調べた。また、新鮮精子と凍結・融解精子を使用した場合の受精率、良好胚への発生率および胚移植あたりの妊娠率を比較した。【結果】128周期1033個の成熟卵子にICSIを行った結果、生存卵子919個に対する正常受精率および良好胚への発生率は、それぞれ63%および41%であった。全胚凍結を行った13周期を除く103周期で胚移植が可能であり、胚移植あたりの妊娠率は41%、移植胚に良好胚を1個以上含む74周期の妊娠率は、47%であった。また、新鮮精子と凍結・融解精子を使用した場合を比較すると、受精率 (62% vs. 64%) および良好胚への発生率 (40% vs. 42%) に差は見られなかった。新鮮精子と凍結・融解精子を使用した場合の胚移植あたりの妊娠率は、全周期 (49% vs. 36%) および良好胚を含む周期 (54% vs. 48%) いずれの場合も新鮮精子を用いた場合が高い傾向にあるものの、有意な差は認められなかった。以上の結果より、閉塞性無精子症の症例においても、精子凍結の有無にかかわらず良好な受精率、良好胚への発生率および妊娠率が得られた。

21. Cystic fibrosis が疑われる、閉塞性無精子症を伴ったKartagener症候群の一例

○栗田松一郎, 田中 温, 永吉 基
馬渡善文, 田中威づみ
(セントマザー産婦)
松田貴雄
(九州大生体研附属病院遺伝外来)

Kartagener症候群は全内臓逆位、慢性副鼻腔炎、気管支拡張症を三主徴とし、別名immotilecilia syndromeともいわれ、精子不動症を合併している事が多い。透過電顕像では絨毛や精子尾部の微細構造に

異常が認められる。症例は、大学病院各科において、全内臓逆位、慢性副鼻腔炎、気管支拡張症、および無精子症と診断された32歳の男性で、精巣生検はJonsen score 7点であった。当院にて精巣上体より精子回収を試みたところ、精巣上体頭部のみに軽度の拡張があり、体部以降は萎縮傾向を認めた。頭部より得られた液中には20~40%の運動精子が確認された。Kartagener症候群と類似の呼吸器症状を示すcystic fibrosisを疑い、PCRによる遺伝子診断を試み、 $\Delta F508$ のpoint mutationを認めた。また透過電顕像では精子尾部における微細構造の異常は認めなかった。

22. 顕微授精および凍結融解胚移植にて妊娠、出産に成功した男性Kartagener症候群と女性弾力線維性仮性黄色腫の不孕夫婦

○西村佳与子, 田中信幸, 本田律生
新田 慎, 坂口 勲, 大場 隆
片刈秀隆, 松浦講平, 岡村 均
(熊本大産婦)

Kartagener症候群 (KS) の男性は、線毛の超微細構造に欠陥があり、精子運動障害のために不妊を呈する。一方、弾力線維性仮性黄色腫 (PXE) は皮膚、眼底、心血管系などの弾力線維が系統的に障害され、時に重篤な妊娠合併症を引き起こす稀な遺伝疾患である。今回我々は、KSの男性とPXEの女性の不孕夫婦において、初回顕微授精の後に施行した凍結融解胚移植により妊娠、出産に成功した症例を経験したので報告する。症例は28歳男性と27歳女性の夫婦で、挙児希望 (不妊期間4年) を主訴として当科を受診した。精液検査の結果、量1~2ml、濃度 $1 \sim 4 \times 10^4$ /ml、運動率5~20%で、85%の精子は形態学的に異常を認めなかった。人工授精を2回施行したが、妊娠が成立せず、同意を得て顕微授精を行った。GnRHa-hMG-hCGの排卵誘発により、18個の卵を回収し、ICSIにより10/18 (56%) が受精、3個を子宮内に移植したが、妊娠しなかった。次々周期にホルモン補充下13日目に凍結胚を融解し、3個移植したところ、妊娠成立、ホルモン補充は妊娠9週まで継続した。妊娠28週までの妊娠経過には特に異常を認めなかったが、34週の時点でIUGRを認め入院管理、36週に遅発性除脈のため帝王切開術を施行、1490gの健常女兒を得た。

23. チョコレート嚢胞に対する治療法が卵巣機能におよぼす影響

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

チョコレート嚢胞治療により, 卵巣機能低下を来すか否かは重要な問題である. 今回, チョコレート嚢胞に対する様々な治療法が, 卵巣機能におよぼす影響を検討した. 対象は過去1年間に当科で腹腔鏡あるいは開腹手術でチョコレート嚢胞と確認した症例である. Gn-RH analogue療法単独5例(G群), アルコール固定4例(A群), チョコレート嚢胞核出術片側3例(N1群)・両側3例(N2群)において治療前後の卵巣機能の変化を検討した. 検討項目は, day7での血中FSH, LH, estradiol(E₂)値, 排卵期の10mm以上の发育卵胞数, 黄体期中期でのE, progesterone(P)値である. hMG療法を行った例ではhMG総投与量, 排卵期の15mm以上の发育卵胞数などを検討した. 検討結果の詳細を文献的考察も加え報告する.

24. 当科における多嚢胞性卵巣症候群の臨床経過に関する検討

○山内和幸, 江上りか, 山本伸一
野崎雅裕, 中野仁雄 (九州大産婦)

多嚢胞性卵巣症候群は, 月経障害, 不妊, 肥満, 多毛など多彩な症状を認めるが, 画一的な治療法はなく, 個々の症状に対して治療がおこなわれている. 多嚢胞性卵巣症候群の臨床経過を検討し治療指針を再考した. 当科内分泌外来で管理した多嚢胞性卵巣症候群患者64症例を対象とし, 理学所見, LH, FSH等の内分泌学的検査所見, 超音波断層法で計測した卵巣長径および臨床経過について, 臨床的特徴を検討した. HAIR-AN症候群を2例認め, また日産婦学会の診断基準の参考項目をすべて満たす典型例は少なかった. LH/FSH比は平均1.58, 卵巣長径は平均35.4mm, 卵巣体積は平均10.3mlであった. また経過観察中に子宮体癌となった1例, 卵巣捻転を起こした1例があった. 近年, 挙児希望しない症例も増加しており, 長期管理における注意点について検討する必要があると考えられた.

25. 当科外来におけるPCOS患者の臨床的検討

○小山伸夫, 蓮田大二
(聖粒会慈恵病院)

【目的】月経異常を示すPCOSの病態は未だ不明であ

る. そこで日産婦の診断基準に基づいたPCOSを臨床的に検討した. 【方法】1998年1月から12月までの1年間に月経不順, 不妊症等にてLH-RHテストを施行した189例を対象とした. 【成績】全体の189例中LH-RHテストがPCOSパターンを示したのは57例(30.2%)であった. 解析可能な171例のうち月経不順の症例は112例(A群), 規則的月経周期を示す症例は59例(B群)であった. A群のうちテストがPCOSパターンを示したのは42例(37.5%)であり, 一方B群のうちそれは11例(18.6%)に過ぎなかった. PCOSを対象群と比較すると, LH/FSH, Δ LHの増加はもとより年齢の低下, 月経期間の延長が認められた. またLH/FSH, Δ LHは月経不順の程度と正の相関を示した. 【結論】1. PCOSは対照群より有意に年齢の低下, 月経期間の延長が認められた. 2. LH/FSH, Δ LHはPCOSの重症度の判定基準になる可能性が考えられた.

26. 高インスリン血症を呈する不妊患者に対するインスリン抵抗性改善薬の効果の検討

○浅野間和夫, 松田貴雄, 近藤晴彦
小川昌宣, 加藤秀則, 和氣徳夫
(九大生医研生殖)

近年, インスリン抵抗性症候群が注目され, 高アンドロゲン状態との関与が報告されている. 当科でもPCO患者のインスリンの状態を確認しているが, 高インスリン血症を伴うPCO 2症例に対して, インスリン抵抗性改善薬メトホルミンを使用し, その効果を検討した. 症例はいずれもクロミフェン, hMGの使用に抵抗性を示す排卵障害で当科へ紹介された患者である. テストステロン高値で, 遅発性 3β -HSD欠損症を疑わせるホルモン動態, 肥満, 多毛, 色素沈着を示し, 臨床的にPCOSの状態であった. インスリン抵抗性の改善目的でメトホルミン1500mg/日を3カ月間使用した. その結果, 高インスリン血症および高アンドロゲン状態の改善は認められたが, 自然排卵には至らなかった. PCO症例においてインスリン抵抗性の改善に伴い, 排卵誘発剤に対する感受性が増加する報告があるが, 単独でのメトホルミンの使用にはさらなる検討が必要と考えられた.

27. 体外受精における酢酸ナファレリンと酢酸ブセレリンによる排卵誘発成績の相違点

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

体外受精胚移植の排卵誘発に対するGn-RH analogue併用の有用性を報告する文献はあるが, Gn-RH analogueの種類による体外受精胚移植成績の相違点に関する報告は少ない。今回我々は酢酸ナファレリンと酢酸ブセレリンによる排卵誘発成績の相違点を検討し若干の知見を得たので報告する。対象は当科で体外受精胚移植を行った患者で, 酢酸ブセレリン投与群(1998年1月から7月)10例10周期(以下, B群とする), 酢酸ナファレリン投与群(1998年8月から12月)7例7周期(以下N群とする)である。内分泌動態, 排卵誘発成績について検討した。検討の結果, hMG投与量・排卵誘発成績に関して, 両者間に有意差はなく, 1日3回投与の酢酸ブセレリンに対し, 1日2回投与で同等の作用を発揮する酢酸ナファレリンはコンプライアンスの点から有用であると考えられた。

28. 抗CL β ₂-glycoprotein I 抗体が絨毛細胞におよぼす影響

○井上統夫, 石丸忠之 (長崎大産婦)
河野雅洋 (田中クリニック)

【目的】抗CL β ₂-glycoprotein I 抗体(aCL β ₂GP I 抗体)が絨毛細胞に対して直接的にどのような影響をおよぼすかについて検討した。【方法】aCL β ₂GP I 抗体陽性の抗リン脂質抗体症候群患者(APS群)および健康ボランティア(Control群)より血清を分離した。BeWo細胞を24時間前培養し各血清を添加した後, さらに72時間培養して細胞増殖能をWST-1assayを用いて調べた。次に細胞を48時間前培養した後同様に血清を添加後24時間培養し, 上清中のEstradiol (E₂), Progesterone(P), およびhCG濃度を測定した。同時に各ウエル中の蛋白量を定量した。【結果】細胞増殖能はAPS群でControl群と比較して有意に減少していた。E₂の産生はAPS群で有意に低下していたが, PおよびhCGに関しては両群間で差を認めなかった。また蛋白量は両群に差はなかった。【結論】aCL β ₂GP I 抗体が絨毛細胞の増殖を抑制し, E₂の生成を低下させることがAPSにおける流産の一因となっている可能性が示唆された。

29. FISH法において, より鮮明なシグナルを得るための工夫

○竹本洋一, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 馬渡善文, 田中威づみ
高崎博幸, 井手紀子, 岩本智子
(セントマザー産婦)

今回我々は, FISH法において, より正確に診断するために, 標本の種類に応じて, 固定法, 前処理, 変性条件および, 観察の際の注意点について検討した。患者の同意の下に得られた, リンパ球, 割球, 有核赤血球, 精細管内細胞を用いて, FISH法を行った。その結果, ①固定法については, 細胞の洗浄, 低張処理, カルノア固定, スライドガラスへの塗抹法を細胞に応じて使い分けた方が良かった。②標本の裸核状態によっては, 前処理を行った方が良かった。③変性条件によっては, 核が膨化しシグナルが不鮮明になることがあるので, 標本の種類に応じて, 変性温度, 時間を設定した方がより鮮明なシグナルが得られた。④観察においては, 1種類のフィルターでは, アーチファクトなどの判別が困難な場合があるので, 必ず, 数種類のフィルターを用いて, 各シグナルの色調を確認することで, より正確な診断が可能であると考えられた。

30. 胎児有核赤血球を用いたFISH法による出生前診断の試み

○馬渡善文, 田中 温, 永吉 基
栗田松一郎, 田中威づみ, 竹本洋一
高崎博幸, 井手紀子, 岩本智子
(セントマザー産婦)

現在, 母体血中の胎児有核赤血球を採取し, これを用いて出生前診断を行うことが試みられているが得られる細胞が極めて少ないのが難点である。今回, 胎囊の絨毛部分より直接有核赤血球を採取しFISH法により診断を行うことが可能かどうか検討を行った。患者の同意が得られた, 妊娠8週から12週の胎内死亡または稽留流産症例を対象として経腔的または経腹的に採卵針を用いて絨毛部分を穿刺吸引し, 1~3ml採血を行った。洗浄遠沈後, 細胞浮遊液を作成し鏡検した。400倍の視野中に1~数個の有核赤血球を認めた。カルノア固定後スライドに塗抹風乾し, トリプルカラー(X, Y, 18)のVysis社製DNAプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い蛍光顕微鏡にて観察した。その結果, 胎児有核赤血球のX, Y, 18番染色体の蛍光スポットを容易に確認で

きた。この方法は侵襲的方法ではあるが熟練すれば困難なく採血可能であり、結果も短時間に得られる。

31. Y由来marker染色体をもったTurner症候群の一例

○浜田一志, 京野和夫, 窪田真知
本庄 考, 澄井敬成, 井上善仁
瓦林達比古 (福岡大産婦)

Turner症候群は、性染色体異常を原因とし、性腺の分化発育の障害を有する。核型は45Xのmonosomy, 45X/46XXのmosaicismが大部分であるが、約6%にY染色体もしくはY由来のmarker染色体を持つ。今回我々は、Y由来marker染色体を持ったTurner症候群の一例を経験したので報告する。症例は22歳、原発性無月経を主訴に来院。理学所見では軽度の低身長を認め、乳房発育TannerⅡ、内診所見では陰毛発育TannerⅢ、子宮は超鳩卵大、両側付属器は触知しなかった。内分泌学的検査でLH 53mIU/ml, FSH 123mIU/ml, E₂ 12pg/mlとhypergonadotropic hypogonadismであり、またDEXA法にてBMDが0.723g/cm²と骨量減少症を認めた。染色体検査ではG-banding法で45X+marker/45Xのmosaicismであり、さらにmarker染色体の精査を行ったところ、Y染色体由来であることが判明した。Y染色体由来のmarker染色体を持つTurner症候群では約15~25%に性腺芽腫を発症する危険性があるため腹鏡下性腺摘除術を施行した。

32. 子宮内膜間質細胞のcytokine産生に対するinterferon- γ の作用

○奈須家栄, 河野康志, 植原久司
宮川勇生 (大分医大産婦)

【目的】子宮内膜間質細胞(ESC)はIL-6, IL-8, MCP-1, M-CSFなどのcytokineを産生する。また脱落膜内の絨毛細胞やT cellはTh1cytokineの1つであるinterferon- γ (IFN- γ)を産生する。我々はESCにおけるIL-6, IL-8, M-CSFおよびMCP-1産生に対するIFN- γ の作用について検討した。【方法】子宮筋腫の手術時に採取、分離したESCに種々の濃度(0.01-100U/ml)のIFN- γ を加えて24時間培養し、上清中のIL-6, IL-8, M-CSFおよびMCP-1濃度をELISA法を用いて測定した。【成績】無刺激では少量のIL-6, IL-8, M-CSFおよびMCP-1の分泌が認められた。IL-6, M-CSFおよびMCP-1の産生するはIFN- γ の濃度依存性に増加したが、IL-8の産生はIFN- γ の濃度依存

性に減少した。【結論】IFN- γ はESCのcytokine産生を調節することにより、脱落膜内の炎症細胞の機能や分布をコントロールすることにより妊娠の成立、維持に関与していると考えられる。

33. 当科における内視鏡下手術の現況

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

近年の内視鏡機器の開発は目覚ましく、従来開腹で行なわれてきた手術が内視鏡下で行われることが多くなった。当科でも腹腔鏡・子宮鏡・卵管鏡などの内視鏡手術を応用してきた。1995年まで総手術数に対する内視鏡下手術は、2~9%であったが、昨年から子宮鏡下手術も積極的に応用を開始し、1999年は20%を超える状態になった。腹腔鏡の適応も、腹腔内検査や癒着剥離のみでなく、卵巣腫瘍核出・子宮筋腫核出・単純子宮摘出術へと拡大し、子宮鏡下手術も無麻酔下のポリープ摘除から筋腫核出までおこなうようになった。手術適応の拡大に伴い、皮下気腫や腹壁からの出血・開腹への移行など合併症も当初みられたが、手術器具の変更・術式の工夫等により手術時間の短縮と合併症の軽減を行う腹腔鏡特有の合併症を最小限に止められるようになってきている。当科の内視鏡下手術の現況と合併症軽減のための対策について述べる。

34. 当科における子宮鏡下手術に関する検討

○辻 多恵, 藤下 晃
カレク・ネワズ・カーン, 濱崎哲史
北島道夫, 宮村泰豪, 石丸忠之
(長崎大産婦)

過去4年間に、当科で施行した子宮鏡下手術26例をretrospectiveに解析し、治療成績や合併症および不妊症例ではその後の妊娠率などを検討した。26例の内訳は子宮腔癒着症4例、不全中隔子宮10例および粘膜下筋腫12例である。平均の手術時間は125分であったが、子宮腔癒着症では平均109分と短く、粘膜下筋腫では140分であった。26例中子宮穿孔が4例(15%)にみられ、うち2例は腹腔鏡下に縫合修復したが、2例は開腹手術に切り換えた。不妊合併例では子宮腔癒着で50%(2/4例)、不全中隔子宮では30%(3/10例)に妊娠成立したが、粘膜下筋腫合併不妊の4例では、現在までのところ妊娠例を認めていない。なお、粘膜下筋腫例では、筋腫結節の径が30mmを超える例では、穿孔や再発の危険性が高くなる傾向

にあるが、子宮鏡下手術の適応として、筋腫の發育部位や突出度などをさらに検討する必要がある。

35. ラパロリフトによる腸管損傷の一例

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

気腹法特有の合併症を避ける意味で、当科では95年からラパロリフトによる吊り上げによる腹腔鏡を行ってきた。今回、我々はラパロリフトによる腸管損傷の一例を経験したので報告する。症例は22歳、主訴は月経痛である。20歳時に開腹による右チョコレート嚢胞核出術の既往があった。前回の術後月経痛が軽快したため、腹腔鏡手術を希望し来院した。ラパロリフトJrによる吊り上げ法による腹腔鏡下に左チョコレート嚢胞alcohol固定を施行した後、ラパロリフトを十分に吊り上げ腹腔内洗浄した。腹壁内に挿入していたラパロリフトJrの抜去は困難を極め、ようやく誘導できたバルーンとともに黒く変色した小腸を確認した。ラパロリフトJrを腹腔内に直ちに還納し開腹した。ラパロリフトJrの内輪部分に小腸がループ状に約20cm嵌頓しており、腸管損傷部位の確認と修復を行った。ラパロリフトには小腸嵌頓の合併症があることを銘記すべきである。

36. 重複子宮重複腔片側腔閉鎖の腔開口術後に大量出血をきたした一例

○今石裕人，駒井 幹，宮嶋 諭
友成廉平，牛嶋公生，堀 大蔵
杉山 徹，西田 敬，嘉村敏治
(久留米大産婦)

重複子宮重複腔片側腔閉鎖は胎生6週頃の発生異常により発生し、初発症状は、月経に一致する下腹部痛である。今回我々は、腔開口術後に、子宮内腔より大量の動脈性出血をきたした症例を経験したので、若干の考察を加えて報告する。症例は、11歳女児。9月26日近医外科にて虫垂切除時に腫大した子宮を認め、当科紹介となった。重複子宮重複腔片側腔閉鎖と診断と、12月23日に腔開口術を施行した。術後3日目に、突然の大量出血を認め、子宮動脈の選択的塞栓術を試みた。造影中に子宮内腔に急速に流出する造影剤を認め、動脈性出血が推測された。塞栓術により止血し、現在はカウフマン療法により月経調節を行っている。我々は、子宮腔留血腫の血腫排出後に起こった動脈性出血に対し、塞栓術が有効であった症例を経験した。子宮収縮剤の投与によっても、止血しなかったことより若年者における手術では十分な注意が必要であると思われた。

関連学会のお知らせ

第28回 日本マス・スクリーニング学会／第23回技術部会

記

会 期：平成12年9月1日(金)～2日(土)

会 場：こまばエミナース(東京都目黒区)

会 長：青木 継稔(東邦大学医学部長)

特別講演Ⅰ：「テクノロジーアセスメントとマス・スクリーニング」

演者 久繁 哲徳(徳島大学医学部衛生学教授)

特別講演Ⅱ：「現行マス・スクリーニングの問題点と今後の展開」

演者 黒田 泰弘(徳島大学医学部小児科教授)

招待講演：(1) “The Danish PKU-biobank. Legal practical and scientific aspect”

Bent Norgaard-Pedersen, MD., D. Sci (Denmark)

(2) 「ニューヨークにおけるHIVスクリーニングについて」(仮題)

Kenneth A Pass, Ph. D. (U.S.A)

(3) 「韓国における新生児マス・スクリーニングの現状と将来」

李 東煥, Dong Hwan Lee (Korea)

シンポジウムⅠ：テーマ「小児期の色々なマス・スクリーニング」

シンポジウムⅡ：テーマ「これからの新しいマス・スクリーニング」

演題募集：規定の用紙にてお申し込み下さい。用紙をお持ちでない方は下記事務所迄、ご請求下さい。

演題締切：平成12年6月2日(金) 必着

演題送付：〒153-8515 東京都目黒区大橋2-17-6

東邦大学医学部第2小児科学教室

清水 教一, 山口 之利

第23回日本マス・スクリーニング学会／第23回技術部会事務局

TEL 03(3468)1251(代) FAX 03(3468)2927(医局)

国際シンポジウム「子宮内膜の機能と病態の分子メカニズム」
International Symposium on Cell and Molecular Biology of
Endometrium in Health and Disease

会 期：平成12年10月3日～5日

会 場：St. Catherine's College (Kobe Institute)
〒657-0801 神戸市灘区五毛字丸山53-1
電話：078-881-2277

オーガナイザー：

Dr. Helen Mardon (Nuffield Department of Ob & Gyn, University of Oxford)
丸尾 猛 (神戸大学医学部産科婦人科)
Dr. Stephen Kennedy (Nuffield Department of Ob & Gyn, University of Oxford)
Prof. David Barlow (Nuffield Department of Ob & Gyn, University of Oxford)

招請講演者：

植木 實 教授	大阪医科大学産科婦人科
神崎 秀陽 教授	関西医科大学産科婦人科
武谷 雄二 教授	東京大学医学部産科婦人科
寺川 直樹 教授	鳥取大学医学部産科婦人科
中後 聡 助手	神戸大学医学部産科婦人科
藤井 信吾 教授	京都大学医学部産科婦人科
星合 昊 教授	近畿大学医学部産科婦人科
丸尾 猛 教授	神戸大学医学部産科婦人科
宮川 勇生 教授	大分医科大学産科婦人科
吉村 泰典 教授	慶応義塾大学医学部産科婦人科
Dr. John Alpin	University of Manchester, UK
Professor David Barlow	University of Oxford, UK
Dr. Simon Bennett	Oxagen, UK
Dr. Herjan J.T.C. Bennink	Organon, Belgium
Dr. Kristof Chwalisz	Jenapharm, Germany
Professor Ian Fraser	University of Sydney, Australia
Dr. Linda Giudice	Stanford University, USA
Dr. Holger Hess Stummpp	Schering, Germany
Dr. Stephen Kennedy	University of Oxford, UK
Dr. Susan Kimber	University of Manchester, UK
Professor Phillipe Koninckx	University of Leuven, Belgium
Dr. Bruce Lessey	University of North Carolina, USA
Dr. Helen Mardon	University of Oxford, UK
Dr. Margaret Rees	University of Oxford, UK
Dr. Lois Salamonsen	Monash University, Australia
Professor Stephan Smith	Cambridge University, UK
Professor Anna Starzinski-Powitz	University of Frankfurt, Germany
Dr. Colin Stewart	Institute of Cancer Research, USA

参 加 費： 大学研究者 30,000円
企業研究者 50,000円
大 学 院 生 無料

演題申し込み： 一般演題はポスターセッションのみ用意いたしております。
講演発表御希望の方は、application formをFAXにて事務担当者まで御請求ください。
Title, Author(s), Institution名と本文300words以内からなる抄録をe-mail(または郵送)にて、
application formをFAXにて、下記連絡先までお送りください。
平成12年8月15日(当日必着)です。

連 絡 先： 国際シンポジウム「子宮内膜の機能と病態の分子メカニズム」
日本側主催者 丸尾 猛(神戸大学医学部教授)
(事務担当 中後 聡)
〒650-0017 神戸市中央区楠町7丁目5-1
神戸大学医学部産科婦人科学教室
電話：078-382-6000 FAX：078-382-6019
E-mail：maruo@kobe-u.ac.jp

日本性感染症学会第13回学術大会 開催のご案内

日 時：平成12年 12月2日(土)午後1時30分～午後6時
12月3日(日)午前9時30分～午後5時30分

会 場：愛知芸術文化センター
〒461-8525 名古屋市東区東桜1丁目 (TEL：052-971-5511)

会 長：野口昌良

学会内容(予定)

1. 特別講演 「HSPとクラミジア・トラコモティス感染」
2. シンポジウム 「性感染症の母子感染・最近の対応」
3. スポンサーシップシンポジウム 「新しい抗ヘルペス剤開発の動向」
4. ランチョンセミナー 「性感染症の治療の進歩」
イブニングセミナー 「妊婦のクラミジア感染の診断と治療」
5. 一般演題
(演者の都合により変更することがあります)

演題募集：学会誌綴じ込みの申込用紙にてお申し込み下さい。
なお、申込用紙を必要の方は下記事務局までご請求下さい。

演題締切：平成12年9月30日(土)必着

参加費：8,000円

連絡先：日本性感染症学会第13回学術大会事務局
〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21
愛知医科大学産婦人科学教室
担当：中部 健、佐藤英子、藤田 将、青山紀子
TEL：0561-62-3311 内線2153 / FAX：0561-62-2991

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4000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。ただし編集委員会が校閲が必要と認めた場合は、その費用を著者負担とする。
8. 投稿原稿は表紙（題名、著者名、所属、住所、ランニングタイトルを和文ならびに英文で明記）、英文抄録、和文抄録、本文（緒言、対象/材料および方法、結果、考察、引用文献）の順に並べ、図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。ランニングタイトルは和文で25字以内、英文で40letters以内とする。
9. 記述は和文または英文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
10. 海外の人名、地名などは原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの関連学会用語集に従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
11. 文献は次の形式により、引用順に末尾に一括記載する。著者、編者名は3名までとし、以下は他（et al.）とする。

a) 雑誌の場合

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

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

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

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

b) 単行本の場合

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

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

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

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

(送付先) 〒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

梅雨入りしすっきりしない天候が続く中、第45巻3号の編集作業も終わり一息ついたところです。今号は皆様のお力添えもあり依頼原稿3編、原著・症例報告14編を収載することができました。ところで日本は今IN(情報技術)の時代といわれています。インターネットの機能も充実し電子メール、ネットバンキングなど様々なサービスが行われています。確かに筆無精の私も電子メールであれば相手を気にせず気楽に送ることができるため大変重宝しております。ある人に言わせると、そのうちに印刷物はインターネットデータにとって代わるとのことでした。そうなるとこの学会誌はどうなるのでしょうか?。時代を先読みし、本誌も今後投稿しやすい学会誌として努力しなければと思います編集後記とさせていただきます。

(編集委員 安部裕司)

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3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 6月25日印刷
2000年 7月 1日発行