

Japanese Journal of Fertility and Sterility
日本不妊学会雑誌

Vol.47 No.1 January 2002
第47巻 第1号 平成14年1月1日

第 47 回日本不妊学会総会および学術講演会 (第 2 回予告)

日本不妊学会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 14 年 10 月 2 日（水）幹事会，理事会

3 日（木）学術講演会，評議員会，総会，総懇親会

4 日（金）学術講演会

（尚，10 月 4 日，5 日に受精着床学会とジョイントしております）

II. 会 場：岐阜長良川国際会議場

〒502-0817 岐阜市長良福光 2695-2

III. 学術講演会予告：

メインテーマ

「不妊症—21 世紀の動向と EBM—」

会長講演

Rokitansky 症候群を考える

演者：玉舎 輝彦（岐阜大学医学部産婦人科教授）

座長：伊藤 晴夫（千葉大学医学部泌尿器科教授）

招請講演

1) 生殖医学とゲノムインプリンティング

演者：佐々木裕之（国立遺伝学研究所教授）

座長：森 崇英（日本不妊学会名誉会員）

2) ES 細胞の多能性を維持する分子機構

演者：丹羽 仁史（理化学研究所再生研チームリーダー）

座長：佐藤 和雄（日本不妊学会監事）

3) ES 細胞と生殖医学

演者：野瀬 俊明（三菱化学生命科学研究所主任研究員）

座長：飯塚 理八（日本不妊学会名誉会員）

シンポジウム

1. PCOS と不妊治療のデベイト

座長：武谷 雄二（東京大学医学部産婦人科教授）

宮川 勇生 (大分医科大学産婦人科教授)

演者:

1) オーバービュー

堂地 勉 (鹿児島大学医学部産婦人科助教授)

2) 未熟卵採集/*in-vitro* の成熟

吉田 仁秋 (吉田レディースクリニック院長)

3) PCOS 薬物療法の不応症の治療—インスリン抵抗性薬との併用

倉林 工 (新潟大学医学部周産母子センター助教授)

2. 倫理問題に関するデベイト

座長: 吉村 泰典 (慶応大学医学部産婦人科教授)

永田 行博 (鹿児島大学医学部産婦人科教授)

演者:

1) 生存しない胎児の妊娠中絶

新家 薫 (日本産婦人科医会副会長)

2) 胎児の臓器移植

福冨 教偉 (大阪大学医学部機能制御外科助手)

3) oocyte donation, 代理懐胎, 匿名性

吉村 泰典 (慶応大学医学部産婦人科教授)

3. ART における技術革新と限界 (動物からヒトへの提言)

座長: 今井 裕 (京都大学農学部教授)

岡村 均 (熊本大学医学部産婦人科教授)

演者:

1) 卵巣組織の凍結保存

杉本 実紀 (京都大学農学部応用生物生体機構)

2) 核移植 overgrowth syndrome

(遺伝子異変, 染色体異常, 刷込み遺伝子)

河野 友宏 (東京農業大学バイオ教授)

3) 体細胞クローン個体-胎芽 (仔) の生物学的リスクと限界

小倉 淳郎 (国立感染症研究所獣医科学部室長)

4. 精子受精能のコントロールバシー

座長: 香山 浩二 (兵庫医科大学医学部産婦人科教授)

並木 幹夫 (金沢大学医学部泌尿器科教授)

演者:

1) 抗精子抗体は ART の普及で意味を持つか

小森 慎二 (兵庫医科大学産婦人科講師)

2) Y 染色体微少欠失と顕微受精

高栄 哲 (金沢大学医学部泌尿器科講師)

3) ヒト円形精子細胞を用いた授精法へのコメント

田中 温 (セントマザー産婦人科医院々長)

5. ART の問題点

座長：中村 幸雄 (杏林大学医学部産婦人科教授)

守殿 貞夫 (神戸大学医学部泌尿器科教授)

演者：

1) 補助ハッチングと非ハッチングによる妊娠

矢野 浩史 (矢野産婦人科院長)

2) 原因不明不妊—ICSI か非 ICSI か

森本 義晴 (IVF 大阪クリニック院長)

3) 胚盤胞移植は自然な進展か

高橋 克彦 (広島 HART クリニック院長)

6. 不妊症と手術—可能性と限界

座長：野口 昌良 (愛知医科大学産婦人科教授)

久保 春海 (東邦大学医学部産婦人科教授)

演者：

1) 卵管通過障害で形成手術か ART か

末岡 浩 (慶応大学医学部産婦人科教授)

2) 不妊症診断に内視鏡が常に必要か

森田 峰人 (東邦大学医学部産婦人科講師)

3) 不妊症と子宮筋腫核出術

今井 篤志 (岐阜大学医学部産婦人科助教授)

7. 癌治療における妊孕性維持への工夫

座長：奥村 明彦 (大阪大学医学部泌尿器科教授)

井上 正樹 (金沢大学医学部産婦人科教授)

演者：

1) 子宮温存

丹羽 憲司 (岐阜大学医学部産婦人科講師)

2) 卵巣温存

清水 敬生 (癌研・産婦人科医長)

3) 精巣温存

松宮 清美 (大阪大学医学部泌尿器科講師)

8. 不妊治療における漢方—基礎と臨床

座長：野田 洋一 (滋賀医科大学産婦人科教授)

田中 俊誠 (秋田大学医学部産婦人科教授)

演者：

1) 視床下部・下垂体・卵巣系異常

後山 尚久 (大阪医科大学産婦人科助教授)

2) 不育症

太田 博孝（秋田大学医学部産婦人科助教授）

3) 乏精子症

古谷 雄三（富山医科薬科大学泌尿器科助教授）

9. 難治性不妊症の対策

座長：牧野 恒久（東海大学医学部産婦人科教授）

青野 敏博（徳島大学名誉教授）

演者：

1) ART の卵巣プアレスポonder

高崎 彰久（山口済生会下関総合病院産婦医長）

2) 原因不明の不妊症の漢方の有用性

假野 隆司（假野クリニック院長）

3) 抗リン脂質抗体（自己抗体）症候群の

不育症でアスピリン療法無効例

杉 俊隆（東海大学医学部産婦人科講師）

10. 内分泌攪乱物質と生殖生理

座長：石川 睦男（旭川医科大学産婦人科教授）

堤 治（東京大学医学部産婦人科教授）

演者：

1) 免疫系

伊藤 直樹（岐阜大学医学部産科婦人科講師）

2) 胚の発生、発育

高井 泰（東京大学医学部産婦人科）

3) アリル炭化水素レセプター系

田熊 直之（旭川医科大学産婦人科）

4) プレグナン X レセプター系

増山 寿（岡山大学医学部産婦人科）

Ⅳ. 一般演題募集要項

昨年度と同様、インターネットを利用したオンラインによる演題応募のみといたします。

1. 申込締切日および申込先

日本不妊学会ホームページよりお申し込み下さい。

練習期間：平成 14 年 3 月 19 日（火）正午～平成 13 年 5 月 15 日（水）正午

応募期間：平成 14 年 4 月 17 日（水）正午～平成 13 年 5 月 15 日（水）正午

（昨年より一カ月ほど早くなっております、ご注意ください。）

—日本不妊学会ホームページ URL—

<http://www.jsfs.or.jp>

申込者のコンピュータ環境が原因で演題の登録に不備をきたしても事務局では一切責任を負えません。練習期間をご利用になりできるだけ早めに確認されることをお奨めいたします。

2. 演題の申込上の注意

1) 演題内容申込時点の結論が明確であり、かつ未発表のものに限ります。倫理面について十分に考慮した研究を応募して下さい。倫理的な内容も採否の審査対象となります。

2) 演者、共同演者

演者、共同演者ともに申込の時点で本学会会員であることが必要です。連名で申込む場合に注意して下さい。会員以外の方は演題申込みと同時に、2002年度会費(8,000円)を納入の上会員になって下さい。なお、筆頭演者を発表演者とします。

3) 会員コード番号について

(1) 会員コード番号(5桁)は必須です。

(2) 申請中の場合、仮会員番号として99999と入力して下さい。

(3) 会員コード番号は日本不妊学会会員名簿を御参照下さい。

4) 所属機関名表示方法

インターネット画面の応募要項に従って下さい。

(1) 機関名(大学、病医院、診療所、センター、研究所など)は、可能な限り略式に表示し、機関ごとに表示法を統一して下さい。

(2) 固有の機関名は原則としてそのまま記しますが、略称が慣用化されている場合は略称を用いて下さい。ただし、機関名に含まれる都道府県名や都市名は短縮しないで正式名を用いて下さい。

(3) 財団法人、社会福祉法人、医療法人などの名称は、それを付記しなければ他の機関と区別し難い場合などのほかは省略して下さい。

5) 演題分類の選択

発表を希望する主題群(演題分類)を1つ選択して下さい。

演題分類はプログラム作成上の都合で希望項目から変更される場合があります。

演題発表形式は口演発表のみといたします。

6) 演題名

全角90文字(半角180文字)以内でタイトル(副題を含む)を付けて下さい。

7) 抄録本文について

(1) 抄録本文の欄には抄録本文のみを記入して下さい(演題名、所属機関名、演者名等はここに書かず所定の欄に記入して下さい)。

(2) 抄録本文の先頭行は1マスあけずに左詰めで記入して下さい。

(3) 本文は800字以内にまとめて下さい。800字を越えた場合は登録をすることができません。

(4) 漢字、ひらがな、カタカナは1文字として、数字、欧単語のアルファベット、記号、スペースなどは1/2文字として数えます。

(5) 本文中に図表、写真を入れないで下さい。

(6) 所属機関、演者名を伏せて選考しますので、演題あるいは本文中に具体的な機関名、演者名を記入したり、それらを明らかに想定できるような内容を記述してはなりません。

8) 応募方法

入力画面へのアクセス方法

日本不妊学会ホームページ <http://www.jsfs.or.jp> からリンクした第 47 回学術講演会の演題登録画面を選択し、入力画面に進んで下さい。なお、主な注意事項は以下の通りです。

- (1) 入力画面で申し込んでいただいた内容は送信ごとに登録確認画面を返送しますので、入力した内容をご確認下さい。この登録確認画面送付をもって受領のご連絡となります。
- (2) 登録時には演題受付番号が自動発行されます。またご自分で演題パスワードを設定していただきます。この演題受付番号とご自分で設定した演題パスワードにより応募期間内に限り登録した内容(抄録本文、未入会の場合の仮会員番号、いろいろなチェック欄等)の修正が何度でも可能です。
- (3) セキュリティーの関係から演題受付番号とご自分で設定した演題パスワードの問い合わせには応じられませんのでご注意下さい。
- (4) 登録時にお送りする登録確認画面には演題受付番号とご自分で設定した演題パスワードが掲載されていますので、プリントアウトし、紛失しないようにご注意下さい。
- (5) 事務局では一切原稿訂正の対応はできませんので充分にご確認ください。
- (6) 特殊文字を使用する際には、使用方法をよくご確認ください。

9) 演題採否と通知

- (1) 一般演題の採否は会長に御一任下さい。
- (2) 演題の採否結果は演題受付番号を、第 47 回学術講演会ホームページを通じて発表します。
- (3) 発表日時・会場は、抄録号、第 47 回学術講演会ホームページでご覧下さい。

10) 特殊文字について

- 上付き文字が必要なときは、文字の前後を〈SUP〉と〈/SUP〉で囲って下さい。

(例) $\text{Na}^{\langle\text{SUP}\rangle+}\langle\text{/SUP}\rangle$ は Na^+ となります。

$\text{A}^{12} \rightarrow \text{A}^{\langle\text{SUP}\rangle 12} \langle\text{/SUP}\rangle$

$\text{A}^{+-} \rightarrow \text{A}^{\langle\text{SUP}\rangle +-} \langle\text{/SUP}\rangle$

$\text{A}^{ab} \rightarrow \text{A}^{\langle\text{SUP}\rangle ab} \langle\text{/SUP}\rangle$

- 下付文字が必要なときは、文字の前後を〈SUB〉と〈/SUB〉で囲って下さい。

(例) $\text{H}^{\langle\text{SUB}\rangle 2} \langle\text{/SUB}\rangle \text{O}$ は H_2O となります。

$\text{A}^{\langle\text{SUB}\rangle 12} \langle\text{/SUB}\rangle \rightarrow \text{A}_{12}$

$\text{A}^{\langle\text{SUB}\rangle +-} \langle\text{/SUB}\rangle \rightarrow \text{A}_{+-}$

$\text{A}^{\langle\text{SUB}\rangle ab} \langle\text{/SUB}\rangle \rightarrow \text{A}_{ab}$

- イタリック文字が必要なときは、文字の前後を〈I〉と〈/I〉で囲って下さい。

(例) $\langle\text{I}\rangle c\text{-fos} \langle\text{/I}\rangle$ は *c-fos* となります。

- 太文字が必要なときは、文字の前後を〈B〉と〈/B〉で囲って下さい。

(例) $\langle\text{B}\rangle \text{太文字} \langle\text{/B}\rangle$ は **太文字** となります。

- アンダーラインが必要なときは、文字の前後を〈U〉と〈/U〉で囲って下さい。

(例) $\langle\text{U}\rangle \text{アンダーライン} \langle\text{/U}\rangle$ は アンダーライン となります。

V. 参加申込方法

学会当日会場にて受け付けます。

学会参加費：7,000 円

懇親会費：5,000 円

総懇親会は学術講演会初日の 10 月 3 日（木）に長良川国際会議場で行います。

是非御出席下さい。

VI. 宿泊案内・宿泊申込書は本号巻末に掲載してあります。

平成 14 年 1 月 1 日

第 47 回日本不妊学会

会長 玉舎 輝彦

連絡先：〒500-8705 岐阜市司町 40

岐阜大学医学部産婦人科教室第 47 回日本不妊学会事務局

担当：伊藤 直樹，古井 辰郎，御厩 留美

TEL：058-267-2631（直通）

FAX：058-265-9006（直通）

会 告

会 員 各 位

平成 14 年学会誌発刊に関するお知らせ

平成 14 年の学会誌発刊は、投稿論文数の減少および学術講演会開催期日などの要因により、下記の通り発刊回数および発刊月が変更となりますので、お知らせ申し上げます。

第 47 巻 1 号

平成 14 年 1 月

” 2 号・3 号合併号

5 月

” 4 号（抄録号）

9 月

英文誌『Reproductive Medicine and Biology』に関するお知らせ

第 46 巻 3 号にて会告いたしました『Reproductive Medicine and Biology』は、日本不妊学会、日本受精着床学会および日本アンドロロジー学会の 3 学会で共有化することが決定いたしましたのでお知らせ申し上げます。

現在 3 月発刊（Vol. 1 No. 1）に向け、準備を進めております。

会員各位からのご投稿およびご協力をお願い申し上げます。

なお、投稿規定および申込は日本不妊学会公式ホームページにてご覧ください。

（日本不妊学会ホームページ：<http://www.jsfs.or.jp>）

平成 13 年 11 月 30 日

社団法人 日本不妊学会

理 事 長 伊 藤 晴 夫

編集委員長 遠 藤 克

会 告

会 員 各 位

学術奨励賞選考規定に関するお知らせ

標記の件につきまして、下記の通り改定いたしましたのでお知らせ申し上げます。

1. 対象論文 ①前年度本学会誌（不妊学会誌または Reproductive Medicine and Biology）掲載原著論文

②前年度上記以外（国内外を問わず）に掲載された原著論文。但しその内容の大部分または全てが不妊学会において発表されたもので、その抄録を添付する。なお、学会発表と雑誌掲載の時期の前後は問わない。

2. 年 令 現状どおり年令 45 歳以下のもの

3. 推薦法 自薦または他薦

4. 審 査 専門分野に分ける

平成 13 年 11 月 30 日

社団法人 日本不妊学会
理 事 長 伊 藤 晴 夫
学術委員長 武 谷 雄 二

平成 14 年度日本不妊学会学術奨励賞について

前頁に記載の新規定に準ずる論文を対象に、平成 14 年度日本不妊学会学術奨励賞の推薦を受付けます。

推薦資格は、本学会理事、評議員、大学教授、学会誌レフリーに限ります。
推薦は、次頁の所定の書式をご利用下さい。

予備選考委員会および選考委員会で推薦された論文の中から 3 編の授賞論文を決定します。授賞論文の筆頭著者には賞状と副賞として日本オルガノンより奨励金 50 万円を各々に授与します。

ご不明な点は、学会事務局へお問い合わせください。

〔推薦書締切日〕 平成 14 年 4 月 30 日（火）

〔推薦書送付先および問い合わせ先〕

社団法人日本不妊学会事務局

〒102-0083 東京都千代田区麹町 5-2 K-WING3F

TEL: 03-3288-7266 FAX: 03-5275-1192

E-mail: info@jsfs.or.jp

日本不妊学会学術奨励賞推薦書

日本不妊学会理事長 殿

下記の論文を日本不妊学会学術奨励賞に推薦いたします。

(論文名)

日本不妊学会雑誌 第 46 巻 ____ 号 ____ ~ ____ 頁 (平成 13 年 ____ 月)

雑誌名 _____ 第 ____ 巻 ____ 号 ____ ~ ____ 頁 (平成 ____ 年 ____ 月)

(不妊学会以外の雑誌に掲載されている場合)

(筆頭著者名)

(筆頭著者生年月日)

____ 年 ____ 月 ____ 日

(推薦理由)

平成 ____ 年 ____ 月 ____ 日

推薦者所属・現職

氏名 _____ 印 _____

会 告

会 員 各 位

日本不妊学会公式ホームページ開設お知らせ

日本不妊学会公式ホームページを11月8日に開設いたしましたので、お知らせ申し上げます。

会員の方々に有効にご利用いただきたく存じます。

未だ不備なページがございますが、電子ジャーナルなど早急に整備させてまいります。

また、ご意見、ご希望がございましたら事務局宛にメールにてお送りくださいますようお願い申し上げます。

(日本不妊学会事務局 E-mail: info@jsfs.or.jp)

日本不妊学会公式ホームページ URL

<http://www.jsfs.or.jp>

平成13年11月30日

社団法人 日本不妊学会

理 事 長 伊 藤 晴 夫

広報委員長 中 村 幸 雄

日本不妊学会雑誌

第47巻 第1号

平成14年1月1日

—目 次—

原 著

- オカタ酸による Cdc2 キナーゼのチロシン 15 の脱リン酸化を伴わない活性化 (英文)
.....榎谷法生..... 1
- 男性不妊症患者におけるムンプス精巣炎の検討
.....今本 敬・鈴木啓悦・神谷直人・小宮 顕
清水亮行・戸辺豊総・市川智彦・伊藤晴夫..... 13
- 不妊治療におけるメンタルケアのためのグループアプローチの有用性
.....伊藤弥生・福田貴美子・蔵本武志..... 19
- 不妊診療における臨床データ管理・医学統計解析ソフト“Sarah Base”の有用性
.....内藤多恵・工藤由香・宇津宮隆史..... 25
- 年齢因子による ART の成績
.....間崎和夫・伊藤嘉奈子・波井幸裕・塩川素子
祖母井英・片桐由起子・雀部 豊・安部裕司・久保春海..... 33
- Bcl6 欠損マウスの腔開口および精巣分化における組織学的検討 (英文)
.....小島聡子・市川智彦・徳久剛史・伊藤晴夫..... 39
- ヒト射出精子に与える精漿中元素の影響
.....山田宏子・片寄治男・柳田 薫
篠原厚子・千葉百子・富永國比古・佐藤 章..... 47
- 当科における体外受精後多胎妊娠に関する後方視的検討
.....本田徹郎・梅岡弘一郎・中堀 隆
高橋 晃・磯崎八重子・高橋 司・馬岡 陽..... 55
- 地方部会講演抄録 61

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 47, No. 1, 2002)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Activation of Cdc2 Kinase Induced by Okadaic Acid without the
Dephosphorylation of Cdc2 on Tyrosine15
.....N. Masuya..... 1
- Clinical Investigation of Male Infertility in Patients with a Past History of Mumps Orchitis
.....T. Imamoto, H. Suzuki, N. Kamiya, A. Komiya,
A. Shimizu, T. Tobe, T. Ichikawa & H. Ito..... 13
- Efficacy of a Group Approach to Infertile Patients' Mental Care
.....Y. Ito, K. Fukuda & T. Kuramoto..... 19
- The Efficiency of the Computer Software "Sarah Base" for the Data Control
and Statistical Analysis of Infertility Treatment
.....T. Naito, Y. Kudo & T. Utsunomiya..... 25
- The Effect of Age on Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology
.....K. Masaki, K. Itoh, Y. Shibui, M. Shiokawa, E. Ubagai,
Y. Katagiri, Y. Sasabe, Y. Abe & H. Kubo..... 33
- Histological Analysis of Vaginal Opening and Spermatogenesis in BCL6-deficient Mice
.....S. Kojima, T. Ichikawa, T. Tokuhisa & H. Ito..... 39
- Influence of the Elements in Seminal Plasma on the Human Ejaculated Spermatozoa
.....H. Yamada, H. Katayose, K. Yanagida, A. Shinohara,
M. Chiba, K. Tominaga & A. Sato..... 47
- Retrospective Analysis of Multiple Pregnancies in *In Vitro* Fertilization
.....T. Honda, K. Umeoka, T. Nakahori, A. Takahashi,
Y. Isozaki, T. Takahashi & Y. Umaoka..... 55

Activation of Cdc2 Kinase Induced by Okadaic Acid without the Dephosphorylation of Cdc2 on Tyrosine15

Norio MASUYA

Department of Obstetrics and Gynecology, Sakura Hospital, Toho University School of Medicine,
564-1 Shimoshizu, Sakura-shi, Chiba 285-8741, Japan ; and Department of Biochemistry,
Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omori-Nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

Abstract : In the eukaryotic cell cycle, M phase is induced by the activation of Cdc2 kinase, composed of Cdc2 and cyclin B. During G₂ phase it is inhibited by the phosphorylation on Thr14 and Tyr15 of Cdc2. Dephosphorylation of those residues activates Cdc2 kinase and induces M phase. Okadaic acid, a potent inhibitor of phosphatases 1 and 2A, has been shown to activate Cdc2 kinase, but the molecular mechanism of the activation is not yet clear. In the present study, two Cdc2 kinase-containing fractions, high speed supernatant of metaphase egg extract (HSS) and ammonium sulfate-fractionated maturation-promoting factor (As-MPF) from *Xenopus* egg extract were prepared, and the action of okadaic acid upon these two fractions was examined *in vitro*. Although Cdc2 kinase activities of both HSS and As-MPF were increased by okadaic acid, the mechanism of activation was found to be different. The dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 accompanied the okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase in HSS, but not in As-MPF. The difference was mainly due to that of ATP concentration between these fractions. Thus, this study presents the evidence that okadaic acid can activate Cdc2 kinase by the mechanism independent of the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2.

Key words : Cdc2 kinase, cell cycle, okadaic acid, tyrosine 15 of Cdc2, *Xenopus laevis*

(Jpn J Fertil Steril 47 : 1-12 2002)

Introduction

In eukaryotic cells the onset of mitosis is induced by the activation of the maturation promoting factor (MPF)¹⁻³⁾, the master regulator of the entry into M-phase. It is now known that MPF, as a molecule, is equivalent to Cdc2 kinase. It is composed of a catalytic subunit, Cdc2, the level of which is constant throughout the cell cycle, and a regulatory subunit, cyclin B, which oscillates in abundance during the cell cycle⁴⁻¹⁰⁾. The activation of Cdc2 kinase at the onset of M phase is known to be controlled by the change in the phosphorylation state of Cdc2^{10,11)}. During G₂ phase Thr14 and Tyr15 of Cdc2 are phosphorylated maximally by Wee1 and Myt1 kinases, and the activation of Cdc2 kinase is thereby prevented¹²⁻¹⁹⁾. Cdc25 cata-

lyzes the abrupt dephosphorylation of Thr14 and Tyr 15 at the G₂/M transition, resulting in the rapid increase of the activity of Cdc2 kinase^{20,21)}.

Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2 A protein phosphatases, has been shown to induce M phase or M phase-like phenotypes in various types of cells as well as the increase of the activity of Cdc2 kinase. Microinjection of okadaic acid into oocytes of *Xenopus* induced mitotic maturation and MPF activation²²⁾. Microinjection of okadaic acid into oocytes of starfish induced the increase of histone H1 kinase activity²³⁾. Histone H1 kinase was activated by okadaic acid in a cell-free extract of *Xenopus* eggs²⁴⁾. In cultured BHK21 cells okadaic acid was shown to induce the activation of Cdc2 kinase and mitosis specific events²⁵⁾. Although many studies have shown that

Cdc2 kinase is activated by okadaic acid, the underlying molecular mechanism is not yet clear. A few models for Cdc2 activation by okadaic acid have been proposed²⁶⁻²⁸⁾. According to these models, okadaic acid induces the phosphorylation of Cdc25 by the inhibition of the phosphatase which dephosphorylates and inhibits Cdc25. Cdc25 is fully activated by the phosphorylation and activates Cdc2 kinase by dephosphorylating Thr14 and Tyr15 of Cdc2. To gain more knowledge on the action of okadaic acid leading to the activation of Cdc2, the present work was undertaken.

In the present study, I prepared two fractions containing Cdc2 kinase, high speed supernatant of metaphase egg extract (HSS) and ammonium sulfate-fractionated MPF (As-MPF), from *Xenopus* egg extract, and examined the action of okadaic acid upon these two fractions *in vitro*. I have found that the mechanism of activation of Cdc2 kinase is different between these fractions. I present the evidence that okadaic acid can activate Cdc2 kinase by the mechanism independent of the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2.

Materials and Methods

Preparation of HSS and As-MPF. The eggs of *Xenopus laevis* dejellied with 2% cysteine were washed with 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.0), suspended in cold extraction buffer (EB²⁹⁾ consisting of 80 mM sodium β -glycerophosphate, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol, leupeptin (3 μ g/ml), and 300 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, and transferred to 20-ml centrifuge tubes containing EB. After excess EB was withdrawn, the eggs were crushed by centrifugation at 10,000 g for 15 min at 4°C. The cytoplasmic fraction between the lipid caps and the pellet was collected and centrifuged again at 10,000 g for 15 min. The resultant cytoplasmic fraction was centrifuged at 250,000 g for 4 hr in the Beckman SW 55 rotor. The supernatant was used as HSS.

As-MPF was prepared as described by Yamashita and Maller³⁰⁾ without addition of ATP γ S. The 250,000 g supernatant was obtained as in the preparation of HSS except that the eggs were suspended in cold

modified extraction buffer (MEB³¹⁾ consisting of 80 mM sodium β -glycerophosphate, 50 mM NaF, 20 mM EGTA, 15 mM MgCl₂, 20 mM HEPES (pH 7.5), 1 mM dithiothreitol, leupeptin (3 μ g/ml), and 300 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, and transferred to 20-ml centrifuge tubes containing MEB with 20 mM α -naphthyl phosphate. A 0~35% (NH₄)₂SO₄ fraction from the supernatant was prepared by the addition of 0.65 vol of 3.8 M (NH₄)₂SO₄ dissolved in 80 mM sodium β -glycerophosphate, 15 mM MgCl₂, 20 mM EGTA, 20 mM HEPES (pH 7.5). The mixture was incubated on ice for 30 min, and the precipitate was collected by centrifugation. The precipitate was resuspended in dialysis buffer (DB; 100 mM sodium β -glycerophosphate, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 20 mM HEPES [pH 7.5], 300 μ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM dithiothreitol), whose volume was equal to one fifth of the total volume of the 250,000 g supernatant, dialyzed overnight against 1,000~5,000 vol of DB, and stored in aliquots at -80°C.

Cdc2 Kinase Assays. Samples were diluted 5-fold with DB. Four microliters of the diluted samples were mixed with 16 μ l of histone H1 kinase assay buffer (25 mM HEPES [pH 7.5], 12.5 mM MgCl₂, 37.5 mM β -mercaptoethanol, 0.125 mM ATP, 6.25 μ Ci [γ -³²P]-ATP, 0.625 mg/ml histone H1, 0.125 mg/ml bovine serum albumin) and incubated for 15 min at 30°C. Reactions were terminated by the addition of 10 μ l acetic acid, and the mixture was spotted on P81 phosphocellulose paper. The P81 phosphocellulose paper was washed once with 30% acetic acid for 15 min and twice with 15% acetic acid for 15 min each. The P81 paper was then dehydrated in 99.5% ethanol and dried. The radioactivity was quantified by counting Cerenkov radiation.

Western blotting. Protein samples were mixed with 3 volume of PI-sample buffer (60 mM Tris-HCl [pH 6.8], 2% SDS, 10% glycerol, 5 mM EDTA, 20 mM Na₃VO₄, 30 mM NaF, 5% β -mercaptoethanol, 3% BPB), and subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Twelve percents and 7.5% polyacrylamide gels were used for the detection of Cdc2 and of Cdc25 and Wee1, respectively. The sample volume applied to each lane was 5~20 μ l. After electro-

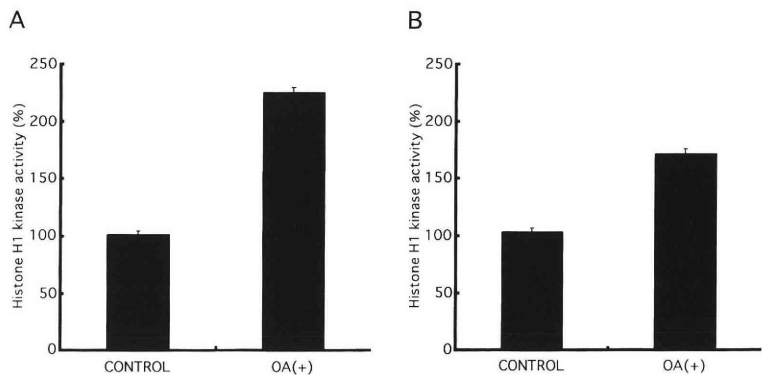


Fig. 1 Activation of Cdc2 kinase by okadaic acid. Either HSS (A) or As-MPF (B) was incubated with 2 μ M okadaic acid for 30 min at 27°C, and the activity of Cdc2 kinase was assayed using histone H1 as substrate. The activity after the treatment with okadaic acid (right) is compared with that of the control (left) without either addition of okadaic acid or incubation. Each column with bar shows the mean $\pm$ S.E. of seven samples. Activity is expressed as the percentage of the mean value of the activity in the control.

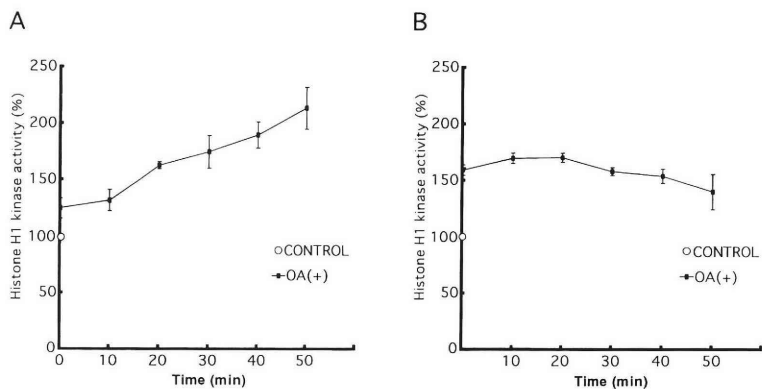


Fig. 2 Time course of activation of Cdc2 kinase. The histone H1 kinase activity was assayed every 10 min after the incubation of either HSS (A) or As-MPF (B) with 2 μ M okadaic acid at 27°C. In the control the addition of okadaic acid was omitted and the activity was assayed without incubation. The point at zero time represents the activity assayed immediately after the addition of okadaic acid. Each point with bar represents the mean $\pm$ S.E. of four separate assays. The values are expressed as the percentages of the activity in the control.

phoresis proteins were transferred to PVDF membrane. Cdc2, Cdc2 phosphorylated on Tyr15 (PY15-Cdc2), Cdc25 and Wee1 were detected with anti-Cdc2 (clone 5F6, MBL and monoclonal mouse anti-p34,

ZYMED), anti-phospho-Tyr15-Cdc2 (anti-PY15-Cdc2) (Phospho-cdc2[Tyr15] Antibody, Cell Signaling), anti-Cdc25 (prepared in this laboratory), and anti-Wee1 (Rabbit anti-Wee1, ZYMED) antibodies, respectively.

The proteins were visualized by use of the appropriate secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate and 4-nitro blue tetrazolium chloride.

Results

To confirm whether okadaic acid activates Cdc2 kinase in HSS and As-MPF, I measured the histone H1 kinase activity in these fractions after the incubation in the presence of okadaic acid. The kinase activities in HSS and As-MPF increased to about 180% and 160% of the control, respectively, after the incubation with 2 μ M okadaic acid for 30 min (Fig. 1, A and B). Then, the time course of the histone H1 kinase activity in HSS and As-MPF was examined after the incubation of these fractions with okadaic acid. As shown in Fig. 2, the histone H1 kinase activity in HSS increased immediately to about 125% of the control and rose gradually thereafter (Fig. 2A), whereas the activity in As-MPF immediately increased to about 160% and the high activity was maintained for 50 min at least (Fig. 2B).

Next, the molecular state of Cdc2 was analyzed by the western blotting. In electrophoresis Cdc2 of the *Xenopus* egg is known to migrate as four bands with different mobilities according to the difference in the molecular state. The band with the highest mobility is known to correspond to the fully active state of Cdc2 kinase. Cdc2 in untreated HSS was detected as two bands and during the incubation with okadaic acid two bands appeared in new positions (Fig. 3A). Each band of Cdc2 was denoted as band 1~4 according to its position from top to bottom. Cdc2 in the untreated HSS was detected as two bands, namely bands 1 and 3. On incubation of HSS with okadaic acid band 1 disappeared immediately and band 2 appeared simultaneously (Fig. 3A, upper panel). At 20 min after incubation band 2 became undetectable, whereas band 4 became detectable instead. The level of the Cdc2 phosphorylated on Tyr15 was observed to decrease at the same time, indicating that the dephosphorylation of the Tyr residue of Cdc2 had occurred. The electrophoretic pattern of Cdc2 did not undergo much change thereafter, at least until 50 min after incuba-

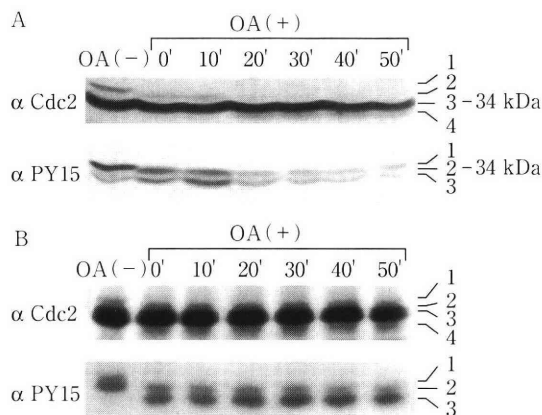


Fig. 3 Okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc2. HSS (A) or As-MPF (B) was incubated with 2 μ M okadaic acid at 27°C. At the indicated times after incubation the reactions were stopped by addition of PI-sample buffer. The incubated samples were analysed by SDS-PAGE with 12% SDS-polyacrylamide gel and western blotting. The membrane was probed with an anti-Cdc2 antibody (upper panel) or with an anti-PY15-Cdc2 antibody (lower panel). Sample without either addition of okadaic acid or incubation are shown as the controls (lanes denoted as "OA (-)"). The numbers on the right (1-4) denote the position of the corresponding bands of Cdc2 (band 1-4).

tion. In untreated As-MPF, Cdc2 was detected as three bands, namely bands 1~3, and band 4 was undetectable (Fig. 3B, upper panel, leftmost lane). Band 4, corresponding to the active form of Cdc2, appeared immediately after addition of okadaic acid to As-MPF (Fig. 3B, upper panel, second lane from the left). The Tyr15 residue of Cdc2, however, was not dephosphorylated (Fig. 3B, lower panel). Instead, the bands of Cdc2 detected with anti-PY15 antibody underwent a lower shift in electrophoretic pattern (Fig. 3B, lower panel). No change in the electrophoretic pattern of Cdc2 occurred thereafter. Increase of the concentration of okadaic acid up to 20 μ M did not change the results described above. However, when the concentration was 0.2 μ M or lower, no change in the electrophoretic pattern of Cdc2 was induced (data not shown).

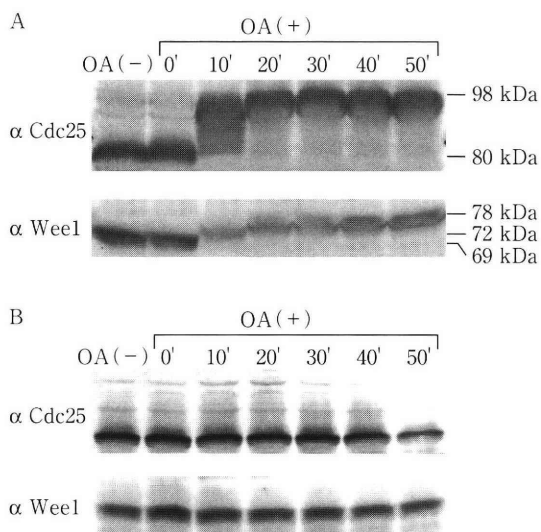


Fig. 4 Okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc25 and Wee1. HSS (A) or As-MPF (B) was treated exactly as in Fig. 3. The protein samples were analyzed by SDS-PAGE with 7.5% polyacrylamide gel and western blotting. The membrane was probed with an anti-Cdc25 antibody (upper panel) or with an anti-Wee1 antibody (lower panel).

In some preparations of As-MPF band 4 was detected before addition of okadaic acid. In such cases, the intensity of band 4 increased after addition of okadaic acid. In all the As-MPF preparations examined, at least one of anti-PY15 reactive band of Cdc2 was observed to undergo a lower shift although dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 was never detected. Since Cdc25 and Wee1 regulate the phosphorylation state of Tyr15 of Cdc2, the molecular states of these enzymes were also analyzed by western blotting (Fig. 4). In HSS, the decrease in the electrophoretic mobilities of both of Cdc25 and Wee1 was observed during the incubation with okadaic acid (Fig. 4A). These changes were initiated at about 10 min after the incubation with okadaic acid, and was completed by 20 min. The retarded bands in the electrophoresis are known to correspond to active form in Cdc25 and inactive form in Wee1. In As-MPF, the electrophoretic mobilities of both Cdc25 and Wee1 remained unchanged even after incubation with okadaic acid (Fig. 4B).

The results mentioned above demonstrated that the dephosphorylation of Tyr15 residue of Cdc2 accompanied the okadaic acid-induced increase of histone H1 kinase activity in HSS, but not in As-MPF. Since the dephosphorylation of Cdc2 is known to be catalysed by Cdc25, I examined the effects of sodium orthovanadate (Na_3VO_4), an inhibitor of Cdc25 and other tyrosine phosphatases. When HSS or As-MPF was incubated for 50 min with okadaic acid in the presence of 10 mM sodium orthovanadate, the increase of the activity of Cdc2 kinase was abolished in HSS (Fig. 5A), but unaffected in As-MPF (Fig. 5B). Consistent with these results, the okadaic acid-induced change in the electrophoretic pattern of Cdc2 was abolished in the presence of sodium orthovanadate in HSS, but unchanged in As-MPF (Fig. 6, A and B).

Since the effects of okadaic acid on the molecular state of Cdc2 in HSS and in As-MPF were different, I suspected that the difference might be caused by different concentration of ATP in these fractions. Because of the dilution during dialysis the concentration of ATP in As-MPF is expected to be much lower than that in HSS. To address this issue, I analyzed the molecular state of Cdc2 in As-MPF after 30-min incubation with okadaic acid in the presence of 1 mM ATP. As shown in Figure 7, Tyr15 residue of Cdc2 was dephosphorylated under this condition (Fig. 7, lower panel, right lane). The decrease of the mobilities of Cdc25 and Wee1 was also observed under the same condition (Fig. 8). Although okadaic acid did not cause the dephosphorylation of the Tyr15 residue of Cdc2 at 0.03 mM ATP, it induced the dephosphorylation incompletely at 0.1 mM ATP, and completely at 0.3 mM ATP (Fig. 9). The dephosphorylation of Tyr15 was inhibited by sodium orthovanadate (Fig. 9). The retardation in the electrophoretic mobilities of both of Cdc25 and Wee1 was induced by okadaic acid in the presence of ATP at 0.3 mM or higher concentration (Figs. 8 and 10). These changes in the mobilities of Cdc25 and Wee1 were not inhibited by sodium orthovanadate (Fig. 10).

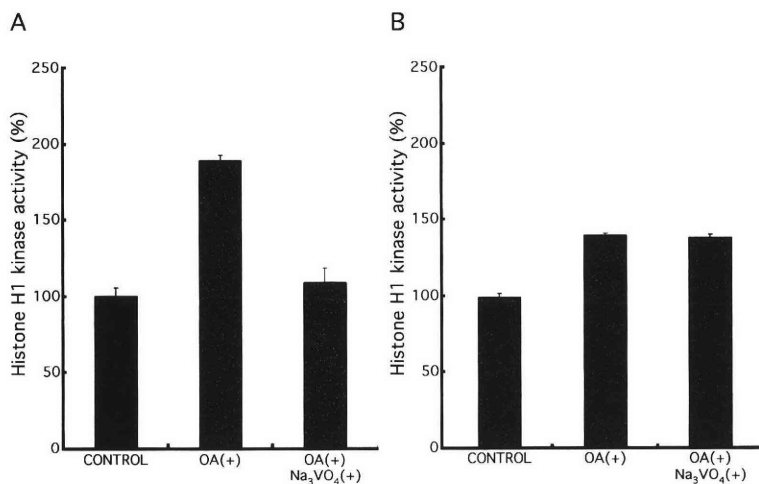


Fig. 5 Effect of sodium orthovanadate on the activation of Cdc2 kinase by okadaic acid. The histone H1 kinase activity was assayed after incubation of either HSS (A) or As-MPF (B) with 2 μ M okadaic acid for 30 min in the absence (middle, denoted as "OA (+)") or presence (right, denoted as "OA (+), Na₃VO₄ (+)") of 10 mM sodium orthovanadate. The activities of the samples with neither incubation nor addition of the inhibitors are taken as the controls (left, denoted as "CONTROL"). Each column with bar represents the mean $\pm$ S.E. of four separate assays. The values are expressed as the percentage of the mean value of the control.

Discussion

In the present study I have shown that histone H1 kinase activities of both HSS and As-MPF were increased by okadaic acid, and that the increase of the activity was accompanied by that of the fully active form of Cdc2. Since it is known that histone H1 kinase activity in metaphase *Xenopus* egg extract is mostly due to Cdc2 kinase^{24,31} and that okadaic acid activates Cdc2 kinase in *Xenopus* egg extract²⁴, the observed increase of histone H1 kinase activity is most likely to indicate that okadaic acid activated Cdc2 kinase both in HSS and in As-MPF. This is also supported by the concomitant increase of the active form of Cdc2 kinase as evidenced by the intensified band 4 on the western blot (Fig. 3).

Although the okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase was observed both in HSS and in As-MPF, several lines of evidence suggest that the mo-

lecular mechanism underlying the activation was different between the cases with the two fractions. In HSS, the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 accompanied the okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase (Fig. 3). Since the phosphorylation state of Cdc2 on Tyr15 is regulated by the balance between phosphorylating Wee1 and Myt1 kinases and dephosphorylating Cdc25 phosphatase^{16,19-21,32,33}, the dephosphorylation of Tyr15 can be attributed to either activation of Cdc25 or inactivation of Wee1 or Myt1 kinase. Cdc25 is known to be activated by phosphorylation on several Ser/Thr residues in the N-terminal region. The phosphorylation results in the decrease in the electrophoretic mobility^{26,27,34}. On the other hand Wee1 is inactivated by phosphorylation, which also causes the decrease in the electrophoretic mobility³⁵. Thus, the results described above suggest that okadaic acid induced the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 by both activation of Cdc25 and inactivation of Wee1. In

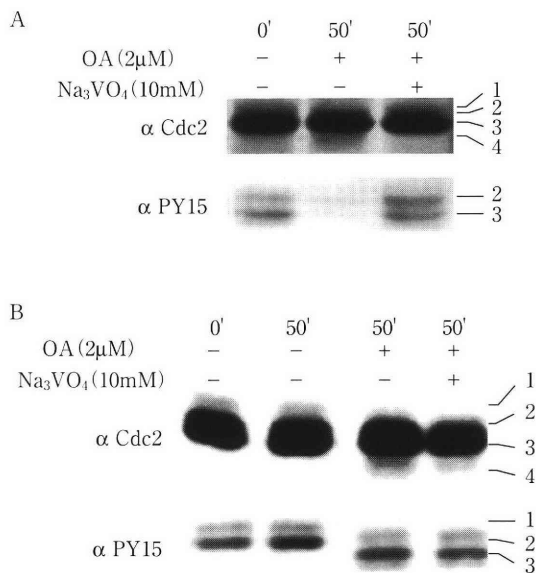


Fig. 6 Effect of sodium orthovanadate on okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc2. After incubation of either HSS (A) or As-MPF (B) for 50 min with 2 μ M okadaic acid in the absence (second lanes from the right) or presence (rightmost lanes) of sodium orthovanadate, western blotting was performed as in Fig. 3. Unincubated (leftmost lanes) and incubated (second lane from the left in B) controls, in which neither okadaic acid nor sodium orthovanadate was added, were also shown. The membrane was probed with an anti-Cdc2 antibody (upper panel) or with an anti-PY15-Cdc2 antibody (lower panel).

contrast, incubation of As-MPF with okadaic acid did not induce the dephosphorylation of Tyr15 residue of Cdc2 despite the increase of activity and amount of the active form of Cdc2 kinase (Figs. 1B and 3B). Consistently, it did not induce the changes in the electrophoretic pattern corresponding either to activation of Cdc25 or to inactivation of Wee1 (Fig. 4B). The above results indicate that the incubation of HSS with okadaic acid caused the dephosphorylation of Tyr15 residue of Cdc2 and the resultant activation of Cdc2 kinase, whereas incubation of As-MPF caused activation of Cdc2 kinase by the mechanism independent of the dephosphorylation of the Tyr residue.

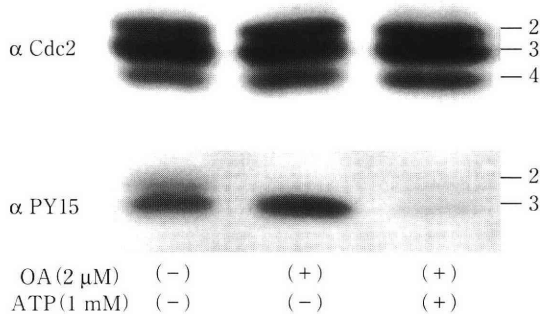


Fig. 7 Effect of ATP on okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc2 in As-MPF. Western blotting was performed as in Fig. 3 after incubation of As-MPF for 30 min with 2 μ M okadaic acid in the presence of 1 mM ATP. Left lane denoted as "OA (-) ATP (-)" represents sample without incubation or addition of either okadaic acid or ATP. Middle lane denoted as "OA (+) ATP (-)" represents sample with incubation of okadaic acid for 30 min at 27°C in the absence of ATP. Right lane denoted as "OA (+) ATP (+)" represents sample with incubation of both okadaic acid and ATP for 30 min at 27°C. The membrane was probed with an anti-Cdc2 antibody (upper panel) or with an anti-PY15-Cdc2 antibody (lower panel).

The difference in the dependence of the activation of Cdc2 kinase on the dephosphorylation of Tyr15 residue of Cdc2 is reflected in the results of the experiment with sodium orthovanadate (Figs. 5 and 6). The okadaic acid-induced changes in both activity and molecular state of Cdc2 kinase were almost completely abolished in the presence of 10 mM sodium orthovanadate in HSS, whereas they remained almost unchanged in As-MPF. Since vanadate inhibits the phosphatase activity of Cdc25 dephosphorylating Tyr15 of Cdc2, the results are consistent with the view that the dephosphorylation of Tyr15 is an essential step in the mechanism of okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase in HSS, but not in As-MPF.

What causes the difference between these mechanisms? Probably it is mainly caused by the difference in the concentration of ATP between HSS and As-MPF. On the basis of the reported value of ATP content per oocyte³⁶⁾, I estimate the concentration of

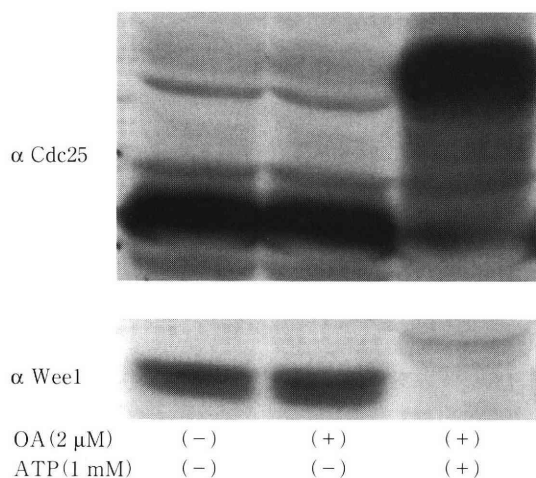


Fig. 8 Effect of ATP on okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc25 and Wee1 in As-MPF. Western blotting was performed as in Fig. 4 after incubation of As-MPF for 30 min with 2 μM okadaic acid in the presence of 1 mM ATP. The treatment of the samples and the denotation of the lanes are the same as in Fig. 7. The membrane was probed with an anti-Cdc25 antibody (upper panel) or with an anti-Wee1 antibody (lower panel).

ATP in HSS and in As-MPF to be about 2 mM and 1 μM, respectively. Okadaic acid induced the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 also in As-MPF when the concentration of ATP was raised to 0.3 mM or higher (Figs. 7 and 9). Considering the estimated ATP concentrations above, the result indicates that the dephosphorylation of Tyr15 requires relatively high concentration of ATP, which is readily attained in HSS, but not in As-MPF. Since the same range of ATP concentration is also required for okadaic acid-induced phosphorylation of Cdc25 and Wee1, as evidenced by the decrease in the electrophoretic mobilities (Fig. 10), it is reasonable to consider that the requirement of ATP concentration over 0.3 mM for the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2 is due to that for activation of Cdc25 or inactivation of Wee1 through phosphorylation of these enzymes. Okadaic acid-induced changes in the molecular states of Cdc2, Cdc 25 and Wee1 observed in As-MPF supplied with 0.3 mM or higher concentrations of ATP were similar to

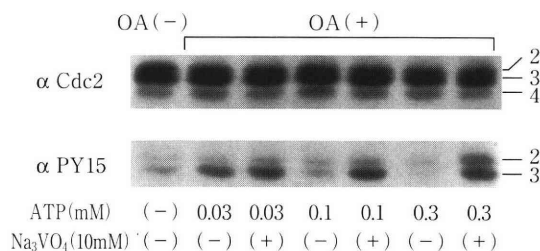


Fig. 9 Effect of ATP concentrations on okadaic acid-induced change in the molecular state of Cdc2. Western blotting was performed as in Fig. 3 after incubation of As-MPF for 30 min with 2 μM okadaic acid in the presence of 0.03, 0.1, or 0.3 mM ATP and in the absence (-) or presence (+) of 10 mM sodium orthovanadate. The membrane was probed with an anti-Cdc2 antibody (upper panel) or with an anti-PY15-Cdc2 antibody (lower panel).

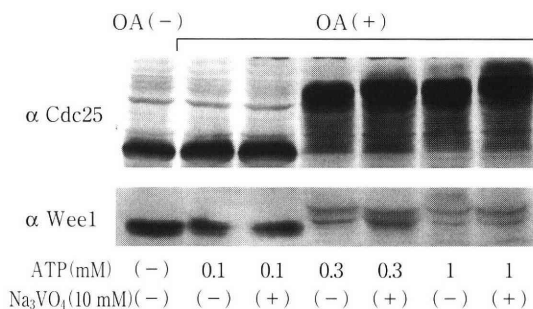


Fig. 10 Effect of ATP concentrations on the change in the molecular state of Cdc25 and Wee1 by okadaic acid. Western blotting was performed as in Fig. 4 after incubation of As-MPF for 30 min with 2 μM okadaic acid in the presence of 0.1, 0.3 or 1 mM ATP and in the absence (-) or presence (+) of 10 mM sodium orthovanadate. The membrane was blotted with an anti-Cdc25 antibody (upper panel) or with an anti-Wee1 antibody (lower panel).

those in HSS. Therefore, it is suggested that the mechanism of Cdc2 kinase activation under these two conditions are similar to each other.

Besides the increased dephosphorylation of Cdc2 on Tyr15, okadaic acid induced other changes in the mo-

lecular state of Cdc2 at the lower ATP concentrations in As-MPF. When 0.03 mM ATP was added to As-MPF, okadaic acid caused the increased phosphorylation of Cdc2 on Tyr15 (Fig. 9). It is likely to be due to the activation of Wee1 or Myt1. When 0.1 mM ATP was added to As-MPF, okadaic acid seemed to cause virtually no change in the phosphorylation state of Tyr15 of Cdc2. It is because the activation of Cdc25 was balanced by that of Wee1 and Myt1 kinases with the opposing activity. This view is supported by the observation that phosphorylation of Cdc2 on Tyr15 was strongly increased when the activity of Cdc25 was inhibited by sodium orthovanadate (Fig. 9).

Kumagai and Dunphy²⁶⁾ proposed a mechanism explaining how okadaic acid induces the activation of Cdc2 kinase. They showed that okadaic acid promotes phosphorylation of Cdc25 by inhibition of Cdc25-inhibitory phosphatase and proposed that okadaic acid-induced phosphorylation of Cdc25 activates this enzyme and leads to the activation of Cdc2 kinase. This mechanism readily explains okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase caused by the dephosphorylation of Tyr15 (Figs. 1A, 2A and 3A). As for the okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase without dephosphorylation of Tyr15 (Figs. 1B, 2B and 3B), however, some other mechanism(s) must be considered. Some possible explanations may be provided by the change in the phosphorylation state of the other site of Cdc2 than Tyr15.

Thr14 and Thr161 are known as the phosphorylation sites of Cdc2 besides Tyr15^{12,15,37,38)}. The phosphorylation of Thr161 by cdc2-activating kinase (CAK) is essential for the activity of Cdc2 kinase, whereas that of Thr14 or Tyr15 is inhibitory^{13,38)}. Thr161 is known to be phosphorylated by CAK and dephosphorylated by either kinase-associated phosphatase (KAP) or protein phosphatase 2A^{13,39-43)}. Therefore, okadaic acid is expected to shift the balance toward the phosphorylation of Thr161 by its inhibition of protein phosphatase 2A. Actually, okadaic acid was shown to inhibit the dephosphorylation of Thr161 of Cdc2, which normally occurs after the degradation of cyclin B at the onset of anaphase⁴⁴⁾. A similar mechanism may explain the okadaic acid-induced activation of Cdc2 kinase without

dephosphorylation of Tyr15, which was observed when okadaic acid activated Cdc2 kinase in As-MPF with no ATP added (Figs. 1B and 2B).

In the present study I have shown that okadaic acid can activate Cdc2 kinase by the mechanism independent of the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2. To my knowledge, it is the first demonstration of this fact. What is the significance of this observation? The physiological importance of the mechanism of Cdc2 kinase activation, independent of the dephosphorylation of Tyr15, has been shown in G₂-M transition of special types of the cell cycle. For example Tyr15 is not phosphorylated in goldfish oocyte maturation, and Cdc2 kinase is activated by the mechanism independent of the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2⁴⁵⁾. In *Xenopus* oocyte Cdc2 is not phosphorylated on Tyr15 during the MI-MII transition period⁴⁶⁻⁴⁸⁾. Since Cdc2 is activated during this period at the onset of MII, the activation is due to the mechanism independent of the dephosphorylation of Tyr15 of Cdc2. Moreover, the similar mechanism may be required for the activation of Cdc2 kinase even in more general cases where Cdc2 kinase is activated by the dephosphorylation of Tyr15. At the G₂-M transition of the cell cycle Cdc2 kinase must be activated very rapidly from the inactive state. The rapid activation is achieved by a positive feedback loop^{34,49)}. Once the slight activation of Cdc2 kinase occurs, the slightly activated Cdc2 phosphorylates and activates Cdc25, which dephosphorylates and activates additional Cdc2 kinase in turn. The initiation of the positive feedback loop between Cdc2 and Cdc25 may be induced by the mechanism of Cdc2 kinase activation, independent of the dephosphorylation of Tyr15. Therefore, the investigation of the Cdc2 kinase-activating mechanism I have shown in this study will contribute to the understanding of the physiological regulation of Cdc2 kinase.

The author wish to thank Prof. Shigeru Yamashita for critical reading of the manuscript and for helpful discussions. The author is also grateful to Dr. Yuichi Tsuchiya and Dr. Shin Murai for preparation of the antibody against Cdc25. The encouragement of Prof. Ito and members of Department of Obstetrics and Gy-

necology, Sakura Hospital, Toho University School of Medicine is gratefully acknowledged.

References

- 1) Masui Y, Markert CL (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J Exp Zool* 177 : 129-145
- 2) Wasserman WJ, Masui Y (1975) Effects of cyclohexamide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp Cell Res* 91 : 381-388
- 3) Gerhart J, Wu M, Kirschner M (1984) Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. *J Cell Biol* 98 : 1247-1255
- 4) Lohka MJ, Hayes MK, Maller JL (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 : 3009-3013
- 5) Dunphy WG, Brizuela L, Beach D, et al. (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* 54 : 423-431
- 6) Gautier J, Norbury C, Lohka M, et al. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* 54 : 433-439
- 7) Draetta G, Luca F, Westendorf J, et al. (1989) Cdc 2 protein kinase is complexed with both cyclin A and B : evidence for proteolytic inactivation of MPF. *Cell* 56 : 829-838
- 8) Meijer L, Arion D, Golsteyn R, et al. (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *Embo J* 8 : 2275-2282
- 9) Gautier J, Minshull J, Lohka M, et al. (1990) Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* 60 : 487-494
- 10) Morgan DO (1997) Cyclin-dependent kinases : engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13 : 261-291
- 11) Solomon MJ (1993) Activation of the various cyclin/cdc2 protein kinases. *Curr Opin Cell Biol* 5 : 180-186
- 12) Krek W, Nigg EA (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle : identification of major phosphorylation sites. *Embo J* 10 : 305-316
- 13) Lundgren K, Walworth N, Booher R, et al. (1991) Mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64 : 1111-1122
- 14) Igarashi M, Nagata A, Jinno S, et al. (1991) Wee1 (+)-like gene in human cells. *Nature* 353 : 80-83
- 15) Solomon MJ, Lee T, Kirschner MW (1992) Role of phosphorylation in p34cdc2 activation : identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* 3 : 13-27
- 16) Parker LL, Piwnicka-Worms H (1992) Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* 257 : 1955-1957
- 17) Kornbluth S, Sebastian B, Hunter T, et al. (1994) Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol Biol Cell* 5 : 273-282
- 18) Atherton-Fessler S, Liu F, Gabrielli B, et al. (1994) Cell cycle regulation of the p34cdc2 inhibitory kinases. *Mol Biol Cell* 5 : 989-1001
- 19) Mueller PR, Coleman TR, Kumagai A, et al. (1995) Myt1 : a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* 270 : 86-90
- 20) Kumagai A, Dunphy WG (1991) The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc2 protein in a cell-free system. *Cell* 64 : 903-914
- 21) Gautier J, Solomon MJ, Booher RN, et al. (1991) cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* 67 : 197-211
- 22) Goris J, Hermann J, Hendrix P, et al. (1989) Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. *FEBS Lett* 245 : 91-94
- 23) Picard A, Capony JP, Brautigan DL, et al. (1989) Involvement of protein phosphatases 1 and 2A in the control of M phase-promoting factor activity in starfish. *J Cell Biol* 109 : 3347-3354
- 24) Felix MA, Cohen P, Karsenti E (1990) Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the *Xenopus* early embryonic cell cycle : evidence from the effects of okadaic acid. *Embo J* 9 : 675-683.
- 25) Yamashita K, Yasuda H, Pines J, et al. (1990) Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates cdc2/H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells. *Embo J* 9 : 4331-4338.
- 26) Kumagai A, Dunphy WG (1992) Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts. *Cell* 70 : 139-151
- 27) Izumi T, Walker DH, Maller JL (1992) Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell* 3 : 927-939
- 28) Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, et al. (1993)

- Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase : specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* 4 : 397-411
- 29) Wu M, Gerhart JC (1980) Partial purification and characterization of the maturation-promoting factor from eggs of *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 79 : 465-477
- 30) Yamashita S, Maller JL (1990) Identification of an activator required for elevation of maturation-promoting factor (MPF) activity by gamma-S-ATP. *J Cell Biol* 110 : 1583-1588
- 31) Felix MA, Pines J, Hunt T, et al. (1989) A post-ribosomal supernatant from activated *Xenopus* eggs that displays post-translationally regulated oscillation of its cdc2+ mitotic kinase activity. *Embo J* 8 : 3059-3069
- 32) Parker LL, Atherton-Fessler S, Piwnicka-Worms H (1992) p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 : 2917-2921
- 33) Honda R, Ohba Y, Yasuda H (1992) The cell cycle regulator, human p50weel, is a tyrosine kinase and not a serine/tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 186 : 1333-1338
- 34) Izumi T, Maller JL (1993) Elimination of cdc2 phosphorylation sites in the cdc25 phosphatase blocks initiation of M-phase. *Mol Biol Cell* 4 : 1337-1350
- 35) Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG (1995) Cell cycle regulation of a *Xenopus* Wee1-like kinase. *Mol Biol Cell* 6 : 119-134
- 36) Maller J, Wu M, Gerhart JC (1977) Changes in protein phosphorylation accompanying maturation of *Xenopus laevis* oocytes. *Dev Biol* 58 : 295-312
- 37) Gould KL, Moreno S, Owen DJ, et al. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function. *Embo J* 10 : 3297-3309
- 38) Norbury C, Blow J, Nurse P (1991) Regulatory phosphorylation of the p34cdc2 protein kinase in vertebrates. *Embo J* 10 : 3321-3329
- 39) Fesquet D, Labbe JC, Derancourt J, et al. (1993) The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* 12 : 3111-3121
- 40) Poon RY, Yamashita K, Adamczewski JP, et al. (1993) The cdc2-related protein p40MO15 is the catalytic subunit of a protein kinase that can activate p33cdk2 and p34cdc2. *Embo J* 12 : 3123-3132
- 41) Solomon MJ, Harper JW, Shuttleworth J (1993) CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* 12 : 3133-3142
- 42) Lee TH, Turck C, Kirschner MW (1994) Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol Biol Cell* 5 : 323-338
- 43) Poon RY, Hunter T (1995) Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* 270 : 90-93
- 44) Lorca T, Labbe JC, Devault A, et al. (1992) Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J* 11 : 2381-2390
- 45) Yamashita M, Kajiura H, Tanaka T, et al. (1995) Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation. *Dev Biol* 168 : 62-75
- 46) Ferrell JE, Jr., Wu M, Gerhart JC, et al. (1991) Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34cdc2 and a microtubule-associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol Cell Biol* 11 : 1965-1971
- 47) Furuno N, Nishizawa M, Okazaki K, et al. (1994) Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *Embo J* 13 : 2399-2410
- 48) Ohsumi K, Sawada W, Kishimoto T (1994) Meiosis-specific cell cycle regulation in maturing *Xenopus* oocytes. *J Cell Sci* 107 : 3005-3013
- 49) Hoffmann I, Clarke PR, Marcote MJ, et al. (1993) Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2-cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* 12 : 53-63

(Received ; November 22, 2001)

(Accepted ; December 18, 2001)

オカダ酸による Cdc2 キナーゼのチロシン 15 の脱リン酸化を伴わない活性化

榎谷 法生

東邦大学医学部附属佐倉病院産科婦人科学教室
東邦大学医学部生化学教室

真核生物の細胞周期において、M 期の開始は Cdc2 キナーゼの活性化によって引き起こされる。Cdc2 キナーゼは、触媒サブユニットである Cdc2 と調節サブユニットであるサイクリン B からなる 2 量体であり、MPF の実体であることが知られている。G₂ 期においては Cdc2 キナーゼの活性は Cdc2 の Thr 14 と Tyr15 のリン酸化によって抑制されているが、それらが脱リン酸化されることによって Cdc2 キナーゼが活性化され、M 期を誘導する。プロテインホスファターゼ 1 および 2A の阻害剤であるオカダ酸は Cdc2 キナーゼを活性化することが知られているが、その機序は明らかにされていない。今回、カエル卵より Cdc2 キナーゼを含む 2 つの蛋白質画分、すなわち高速遠心上清 (HSS) と MPF 硫酸画分 (As-MPF) を調製し、これらの画分にオカダ酸を作用させ、*in vitro* でその作用機序を検討した。HSS、As-MPF のいずれの画分においても、オカダ酸の作用によって、Cdc2 キナーゼの活性が上昇したが、その活性化機序は両画分において異なることが判明した。オカダ酸による Cdc2 キナーゼの活性化は、HSS においては Tyr15 の脱リン酸化を伴ったが、As-MPF においては Tyr15 の脱リン酸化を伴わなかった。以上の結果より、オカダ酸によって Cdc2 キナーゼは Tyr15 の脱リン酸化によらずに活性化され得ることが明らかになった。

キーワード：Cdc2 キナーゼ、細胞周期、オカダ酸、チロシン 15、アフリカツメガエル

(日不妊会誌 47:1-12 2002)

男性不妊症患者におけるムンプス精巣炎の検討

Clinical Investigation of Male Infertility in Patients with a Past History of Mumps Orchitis

今 本 敬
Takashi IMAMOTO

鈴 木 啓 悦
Hiroyoshi SUZUKI

神 谷 直 人
Naoto KAMIYA

小 宮 顕
Akira KOMIYA

清 水 亮 行
Akiyuki SHIMIZU

戸 辺 豊 総
Toyofusa TOBE

市 川 智 彦
Tomohiko ICHIKAWA

伊 藤 晴 夫
Haruo ITO

千葉大学医学泌尿器科学教室

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

ムンプス精巣炎患者について、その造精機能に与える影響を中心に臨床的に検討した。1987年から1999年までの間に、男性不妊症を主訴に当科を受診し、ムンプス精巣炎の既往のあった16例（16～43歳、平均30.4歳）を対象とした。精巣炎発症年齢は14～29歳で平均21.3歳であった。併発症として聴力障害を1例に認めた。患側は、両側7例、片側7例、不明2例であった。両側罹患例では5例が無精子症、1例が乏精子症を呈し、1例のみが精子数、運動率ともに正常であった。片側例では1例に乏精子症を認め、5例は精子数正常であったがそのうち3例に運動率の低下を認めた。両側例のうち、罹患後2カ月で無精子症を呈した1例は、18カ月で精子数、運動率ともに正常化した。精巣生検を2例に施行したが、両側罹患例で16年を経過した無精子症例においてもJohnsen score 4.6と生殖細胞が認められ、このような症例ではTESE-ICSI等の補助生殖技術の応用により挙児を得られる可能性が示唆された。

キーワード：ムンプス、精巣炎、男性不妊症、補助生殖技術

（日不妊会誌 47:13-17 2002）

緒 言

男子におけるムンプス罹患は、成人においてはその約20%に精巣炎を併発し、ときには両側の精巣機能が廃絶して男性不妊症の原因となる。今回、ムンプス精巣炎患者について、その造精機能に与える影響を中心に臨床的に検討した。

対象および方法

1987年から1999年までの13年間に千葉大学医学部附属病院泌尿器科を、男性不妊症を主訴に受診したもののうち、ムンプス精巣炎の既往のあった16例（16

～43歳、平均30.4歳）を対象とした。

精巣容積の計測を15例に、内分泌学的検査を14例に、精液検査を15例に施行した。精巣容積は、12cc未満のものを萎縮とした。精子を全く認めないものを無精子症、精子数が2000万/ml未満を乏精子症、2000万/ml以上を正常とした。精子運動率は50%以上を正常とした。精巣生検を2例に施行した。

結 果

精巣炎発症年齢は14～29歳、平均21.3歳で、ピークは16～20歳代に認めた（図1）。患側は両側7例、片側7例、不明2例であり、併発症として聴力障害を1例

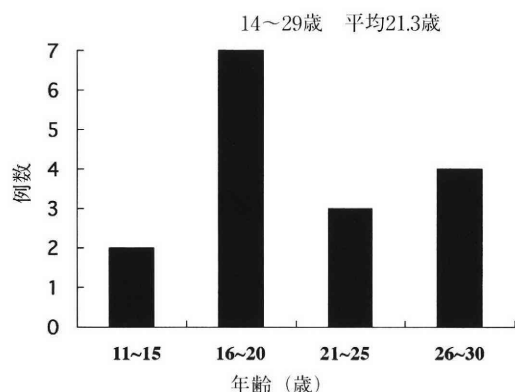


図1 精巣炎発症年齢の分布

表1 患側と精巣容積

精巣容積 \ 患側	患側	片側	両側	不明
両側 ≥ 12 cc		7 例	2 例	1 例
両側 < 12 cc			5 例	

表2 初診時精液検査所見

精子濃度 \ 患側	患側	片側	両側	不明
$\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$		5 例*1	1 例	1 例
$0 < 20 \times 10^6/\text{ml}$		1 例	1 例	1 例
0		0 例	5 例*2	0 例

*1 うち 3 例は運動率 $< 50\%$ *2 うち 1 例は罹患後 18 カ月で精子濃度 $\geq 20 \times 10^6/\text{ml}$, 運動率 $\geq 50\%$ に回復

(5.3%)にみとめた。また、16 例中、精巣炎発症から受診までの期間が 1 年以上のものが 12 例、6 年以上が 10 例であり、罹患後長期間経過したものが多かった。

患側と精巣容積との関係では、片側例と比較して両側例では精巣容積の小さいものが多く、特に 7 例中 5 例では両側とも 12 cc 未満の萎縮を認めた (表 1)。片側例では 7 例全例が精巣容積 12 cc 以上であった。また、両側罹患例でも無精子症を呈さないものでは、明らかな精巣萎縮を認めなかった。

初診時の精液検査所見 (表 2) と、そのうち 2 回以上精液検査を施行し得た 4 例の精子濃度の推移 (図 2) を示す。先に述べたように、初診時とはいえ罹患後長期間経過したものが多く含まれているが、片側例では 1

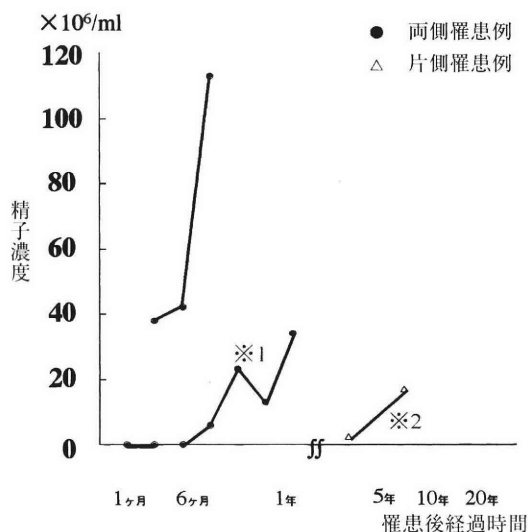


図2 精子濃度の推移

(2 回以上精液検査を施行した 4 例)

※1 特に不妊症に対する治療は行わなかったが罹患後 18 カ月で精子数、運動率ともに正常化

※2 ビタミン B₁₂ などの経口投与を行い精子濃度の改善をみた

例に乏精子症を認め、5 例は精子数正常であったがそのうち 3 例に運動率の低下を認めた。一方、両側罹患例では 5 例が無精子症、1 例が乏精子症を呈し、1 例のみが精子数、運動率ともに正常であった。ただし、両側例のうち罹患後 2 カ月で無精子症を呈した 1 例は、特に不妊症に対する治療は行わなかったが 18 カ月で精子数、運動率ともに正常化した (図 2 における※1)。また図 2 における※2 の症例は、ビタミン B₁₂ などの経口投与を行い精子濃度の改善をみたが挙児を得ず、AIH (artificial insemination with husband) の適応となった。

内分泌学的検査所見では、血清テストステロン (T) 値を測定し得た 14 例中 1 例のみが T 低値 (1.84 ng/ml) を示し、本例では両側精巣萎縮と無精子症をみた。血清 FSH 値は片側罹患例では 6 例中 1 例のみが高値を示したのに対して、両側例では 7 例中 6 例と高頻度に FSH 高値をみた (表 3)。

精巣生検を 2 例に施行したが、両側罹患後 16 年を経過した無精子例においても、Johnsen score 左側 4.6 と生殖細胞が認められた (右側 1.4)。もう 1 例の乏精子症を示した左側罹患例では Johnsen score 左側 2.4、右側 8.0 であった。

表 3 患側と血清 FSH 値

血清 FSH 値 \ 患側	片側	両側	不明
正常	5 例	1 例	1 例
高値	1 例	6 例	

考 察

ムンプスウイルスはパラミキソウイルスに属し¹⁾、主に飛沫感染で好発年齢は 3~5 歳である²⁾。ムンプス感染の 85% は 15 歳以下の小児にみられ、感染は自然に消退するが、本ウイルスは蛋白分解酵素に対して高感受性であるため耳下腺炎のみならず、肺炎、卵巣炎、精巣炎、心筋炎、関節炎、甲状腺炎、乳腺炎、腎炎などの合併症を来す^{1,3)}。また、神経親和性であるため脳髄膜炎、内耳感染が起こりうる。聴力障害は蝸牛前提神経障害によって引き起こされ予後不良であり³⁾、自験例でも併発症として聴力障害を 1 例 (5.3%) に認めた。

ムンプス精巣炎は耳下腺で増殖したムンプスウイルスが血行性に精巣に達して発病すると考えられ¹⁾、思春期以前では稀だが、思春期以降のムンプス罹患男性の 14~35% に発生し、罹患精巣の 30~50% に萎縮性変化を起こすとされる¹⁾。Werner はムンプスに感染した男性の 36% が精巣炎を発症し、片側、両側に関わらず、その 50% が両側の精巣萎縮を来すと報告している⁵⁾。年齢は 10 歳代後半より 40 歳までが多く²⁾、小児期男子でのムンプス精巣炎は稀とされる⁶⁾。自験例においても精巣炎発症年齢は 14~29 歳で平均 21.3 歳であった。ムンプス精巣炎は通常は耳下腺炎の 4~8 日後に発生し、ほとんどは片側例だが、17~30% は両側罹患と報告されている。成人は小児の 2 倍以上の危険度で両側罹患となるとされる¹⁾。今回の検討では患側の明らかな 14 例中、両側罹患が 7 例、片側が 7 例であった。診断は耳下腺腫脹が先行する場合は容易だが、ムンプス感染の 30~40% は不顕性であるため、精巣炎は先行する耳下腺炎を欠くことがあり、その診断を困難にする。精巣炎の明らかな原因がなく、クラミジア性あるいは細菌性としての適切な治療にもかかわらず、症状が持続する非典型例ではムンプス精巣炎を考慮すべきである¹⁾。

ムンプス精巣炎の治療としては他の原因による精巣炎と同じく保存的対症療法で、床上安静、陰囊の挙上、

冷却、広い抗菌スペクトルを持つ抗生物質、免疫グロブリン製剤の投与、解熱鎮痛剤の併用で³⁾、特に免疫グロブリン製剤の投与により発熱日数および精巣腫脹日数が短縮したことが報告されている⁷⁾。自験例では精巣炎を主訴に受診したものはなく、その効果を確認し得なかった。精巣炎の後遺症として男性不妊症が挙げられ、自験例では 16 例中、精巣炎発症から受診までの期間が 1 年以上のものが 12 例、6 年以上が 10 例であり、罹患後長期間経過したものが多かったが、両側罹患例では 5 例が無精子症、1 例が乏精子症を呈し、1 例のみが精子数、運動率ともに正常であった。片側例では 1 例に乏精子症を認め、5 例は精子数正常であったがそのうち 3 例に運動率の低下を認めた。Petersdorf はムンプス精巣炎患者の 22% に精巣萎縮または無精子症が起こると報告し⁸⁾、佐藤らは特発性男性不妊症に占めるムンプスの既往は 117 例中 17 例 (14.5%) で最も多かったとしている³⁾。また、片側例でも無精子症となりうるので両側罹患例と同様に経過観察を十分に行う必要があるとされ^{2,3)}、Shulman らも、片側罹患であっても対側精巣に徐々に変性性変化が生じ、高度乏精子症や無精子症になるとしている⁹⁾。一方、ムンプス精巣炎において妊孕性の障害は 7~13% の頻度で起こるが、不可逆性の不妊症は稀であるという報告があり¹⁾、自験例でも、両側例のうち罹患後 2 カ月で無精子症を呈した 1 例では、18 カ月後には精子数、運動率ともに正常化した。また、両側罹患例で 16 年を経過した無精子症例においても精巣生検にて生殖細胞が認められ、ムンプス精巣炎によると考えられる無精子症例においても、TESE-ICSI 等の補助生殖技術の応用により児を得られる可能性が示唆された。

男性不妊になる原因として、抗精子抗体の産生、精子凝集抗体の増加の頻度は比較的低いとされる⁹⁻¹²⁾。Manson らによれば、ムンプス精巣炎による炎症が高度になり浮腫の増強、精上皮、精細管への浸潤が起こると、精上皮の萎縮や精細管の硝子化、ひいては繊維化、癒着化をきたすという¹⁾。自験例において両側罹患例でも無精子症を呈さないものでは、明らかな精巣萎縮を認めなかった。このような精巣組織の変性、その結果としての男性不妊症に対する予防策は、できる限り早期にムンプスに対する治療を完全に行うこととされる⁹⁾。

また、ムンプス精巣炎は急性期に Leydig 細胞機能に障害を与え、その障害は長期間に及ぶとする報告¹³⁾や、アンドロゲン分泌が障害されれば、長期間経過後

に二次性徴欠落に伴う症状が出現してくるという報告もある⁹⁾。Aiman らはムンプス精巣炎により精巣萎縮を来した 3 例において 1~42 年後に女性化乳房が出現したと報告し、それらのテストステロン産生率は同年代の 50% であったとしている。彼等は Leydig 細胞機能の低下によるテストステロンの分泌低下と、エストロゲンとアンドロゲンの生成比の変化により女性化乳房が生じたと推測している¹³⁾。自験例のうち T 値を測定し得た 14 例中 1 例のみが T 低値であり、本例では両側精巣萎縮と無精子症をみた。

精巣炎、ひいてはムンプス予防のためにはワクチンの接種が最も有用と考えられている。本邦では MMR (Measles-Mumps-Rubella: 麻疹, ムンプス, 風疹) virus vaccines (3 種混合ワクチン) が使用され、副反応はほとんどが耳下腺腫脹のみ (0.16%) で既接種者からは 1 例も併発症は出現しておらず、またワクチン接種による抗体獲得率は約 85% で、それらにおいては終生免疫が得られるとされる³⁾。生後 15 カ月以降に MMR ワクチンとして投与されるムンプスワクチンは、感染に対して 97% の予防効果があるとされ¹⁾、ムンプス罹患がピークとなる 4~6 歳以前のワクチン接種が望ましいと考えられた¹⁾。

文 献

- 1) Manson AL (1990) Mumps orchitis. *Urology* 36: 355-358
- 2) 佐藤安男, 平野大作, 賀屋 仁, 他 (1987) 流行性耳下腺炎性睾丸炎 30 例の臨床的検討. *日不妊会誌* 32: 190-194
- 3) 佐藤安男, 池谷知格, 岡田清己 (1991) ムンプス精巣炎. *泌尿器外科* 4: 677-680
- 4) 高山直秀, 南谷幹夫 (1996) 小児期ムンプス睾丸炎患者の検討. *小児科臨床* 49: 1085-1088
- 5) Werner CA (1950) Mumps orchitis and testicular atrophy. I. occurrence. *Ann Intern Med* 32: 1066-1074
- 6) 本村四男 (1940) 睾丸炎ならびに出血性腎炎を併発せる小児流行性耳下腺炎の 1 例. *臨小誌* 14: 595-600
- 7) 南谷幹夫, 八森 啓, 増田剛太 他 (1986) 免疫グロブリン療法, ウイルス感染症に対する免疫グロブリン—特にムンプス睾丸炎に対する治療—. *化学療法の領域* 2: 891-897
- 8) Petersdorf RG, Bennett IL (1957) Treatment of mumps orchitis with adrenal hormones. *Ann Intern Med* 32: 222-228
- 9) Shulman A, Yavetz H, Shohat B, et al. (1992) Mumps orchitis among soldiers: frequency, effect on sperm quality, and sperm antibodies. *Fertil Steril* 57: 1344-1346
- 10) 古屋聖児, 熊本悦明, 伝法公磨, 他 (1980) Mumps orchitis の形態学的, 免疫学的研究. *日泌尿会誌* 71: 973-976
- 11) 熊本悦明, 古屋聖児 (1980) ムンプス睾丸炎と睾丸障害. *臨床とウイルス* 8: 271-273
- 12) Andrada JA (1977) Immunologic studies in patients with mumps orchitis. *Andrologia* 9: 207-211
- 13) Aiman J, Brenner PF, Macdonard PC (1980) Androgen and estrogen production in elderly men with gynecomastia and testicular atrophy after mumps orchitis. *J Clin Endocr Metab* 50: 380-386

(受付: 2001 年 5 月 15 日)

(受理: 2001 年 8 月 20 日)

Clinical Investigation of Male Infertility in Patients with a Past History of Mumps Orchitis

Takashi Imamoto, Hiroyoshi Suzuki, Naoto Kamiya, Akira Komiya,
Akiyuki Shimizu, Toyofusa Tobe, Tomohiko Ichikawa and Haruo Ito

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

To investigate seminal function in patients with mumps orchitis, 16 patients between the ages of 16 and 43 years (average, 30.4) were examined in this study between 1987 and 1999. Deafness was observed in one patient. Bilateral testes were involved in 7 cases, unilateral in 7, and laterality was unclear in 2. Among the 6 unilateral cases who underwent semen analysis, one had oligozoospermia and 5 showed a normal sperm count; 3 of those with normal sperm count had decreased sperm motility. Of the 7 patients with bilateral orchitis, 5 showed azoospermia, one had oligozoospermia, and one had normal sperm count and motility. In one azoospermia case, sperm count and motility normalized 18 months after onset of orchitis. Another azoospermia patient had a Johnsen score of 4.6 at testicular biopsy 16 years after the occurrence of bilateral orchitis. For such patients, application of assisted reproductive technology should be considered.

Key words : mumps, orchitis, male infertility, assisted reproductive technology

(Jpn J Fertil Steril 47 : 13-17 2002)

不妊治療におけるメンタルケアのための グループアプローチの有用性

Efficacy of a Group Approach to Infertile Patients' Mental Care

伊藤 弥生
Yayoi ITO

福田 貴美子
Kimiko FUKUDA

蔵本 武志
Takeshi KURAMOTO

蔵本ウイメンズクリニック

Kuramoto Women's Clinic, Fukuoka 812-0012, Japan

当院では体外受精コーディネータによるカウンセリングや治療教育の機会である「不妊教室」を実施していたが、この度メンタルケアのためのグループを導入した。本研究では、不妊治療におけるメンタルケアのためのグループアプローチの導入について報告し、その有用性について検討した。1997年5月から1998年4月までに参加した38名の患者にアンケート調査を実施し、21名(55.3%)より回答を得た。17名(81%)の患者がグループに参加して満足し、19名(90.5%)の患者がグループが役に立つと応え、メンタルケアのためのグループが、①仲間との出会いによる孤独感の解消、②十分な感情表出によるカタルシス、③体験的情報の交換による不安の緩和に対して有効に機能し、不妊患者の精神的安定に対する有効性が高いことが明らかとなった。今後、不妊治療を行う各施設においてメンタルケアのためのグループが広く展開されることを期待したい。

キーワード：不妊患者、メンタルケア、グループアプローチ

(日不妊会誌 47:19-24 2002)

緒 言

近年、生殖医療においては医療技術が急速に進歩する一方で、患者の精神面の支援は立ち遅れていたが、最近になり医師や看護婦による取り組みが見られるようになった^{1,2)}。当院でも、体外受精コーディネーターによるカウンセリングや治療教育の機会である「不妊教室」を実施していたが^{3,5)}、この度メンタルケアのためのグループを導入した^{6,8)}。本稿では不妊治療におけるメンタルケアのためのグループアプローチの有用性について検討する。

対 象

1997年5月より開始し1998年4月現在までに実施した12回のグループを対象とした。グループへの参加は、不妊に悩む患者主体の支え合いに関心を持つものを募集し、治療段階や年齢等による制限は設けなかつ

た。参加者は全員女性であり、平均参加者数7名(4名~12名)、平均年齢34歳(26歳~44歳)、延べ患者数89名であった。

グループの実施方法

グループ全体のコーディネーター役の心理士(以下Coo)と、治療に関する疑問に答えるための体外受精コーディネーター(以下IVFCoo)がスタッフとしてグループに関わり、1回2時間月1回ペースで行った。対話内容は患者がその時に話題にしたい事項を自由に話せるようフリートークとした(図1,表1)。

調査方法

第1回から第12回(1997年5月から1998年4月)までに参加した38名に、グループに参加した感想について、郵送による無記名回答で自由記述によるアンケート調査を行った(表2)。調査期間は1998年から

5月25日から6月12日までであった。

結 果

38名中21名より回答を得、回収率は55.3%であった。回収の得られた患者の年齢は26歳から39歳、平均年齢は32歳であった。不妊期間は2～8年、平均不妊期間4年であった。調査時の治療状況は、人工授精3名、体外受精3名、顕微授精14名、治療後妊娠1名であった。

グループへの参加動機は、(1) 同じ悩みを持つ友人が欲しい、(2) 不安や悩みを話したい、(3) ストレスを発散させたい、(4) 体験的情報を交換したいなどであった。

グループに対する満足度については17名(81%)の患者が満足したと答えていた(図2)。具体的な理由としては、(1) 同じ悩みを持つ人といえると気が楽になる、(2) 辛いのは自分だけではないという安心感がある、(3) 私も頑張っていこうという前向きな気持ちになる、(4) さまざまな情報や体験を聞けて勉強になるなどの理由が挙げられた。グループの有用性に対しても19名(90.5%)の患者が有用性を認め、役に立った事柄として(1) 励ましあえる仲間ができた、(2) 治療に対し明るい気持ちで望めるようになった、(3) 以前より病院に行くのが楽しくなったなどが挙げられていた(図3)。



図1 グループ開催時の様子

表1 グループの実施方法

スタッフ	グループ全体をコーディネートする心理士1名 治療上の疑問に答える体外受精コーディネーター1名
時間	1回2時間
頻度	月1回
対話内容	フリートーク

表2 アンケート調査の項目

1. 年齢
() 歳
2. 不妊期間
() 年
3. 治療段階
①タイミング法 ②人工授精 ③体外受精 ④顕微授精 ⑤その他 ()
4. グループへの参加動機
()
5. グループの満足感
(a) ①満足 ②ほぼ満足 ③普通 ④やや不満 ⑤不満
(b) 具体的な内容
()
6. グループが役に立てたこと
(a) ①ある ②ない
(b) 具体的な内容
()

注) 選択肢は当てはまるものを丸で囲み、() は自由記述をするよう求めた。

考 察

不妊患者は、治療や妊娠に対する不安をはじめ、経済的な負担や周囲の無理解など様々な悩みを抱えているが、結婚すれば子どもがいて当然という偏見が強い社会においては、不妊患者の多くは孤独に悩まざるをえない。孤独感はこれ自体が悩みとなるが、自分だけが苦しい思いをしているという思いが他の悩みを深刻化する。

メンタルケアのためのグループに参加した患者は、同じ悩みを持つ患者と出会うことで、「自分の問題が普遍的で他者と分かちあえるものであることに気づき大きな安堵感を体験」¹⁰⁾している。同じ悩みを持つもの同士の集まりであることにより話しやすい雰囲気が作られるが、日常の診療に直接的に携わる医療従事者がグ

ループをコーディネートすると患者は医療従事者に嫌われないよう話を制限してしまう怖れが強い。当院のグループでは、フリートークの時間には医療従事者は入らないようにしているため、遠慮なく話すことができている(表 3)。当院では、医療従事者ではなく心理士である Coo がスタッフとして関わっているが、Coo がプライバシーの尊重やグループ内の葛藤を防止し安全性を保障しているため、患者は気安いだけではなく安心して感情を表出することができ、カタルシスも得られている。

生殖医療については一般には依然として人工的なイメージが強く、患者は、医療従事者から医学的知識を提供されても、痛みの程度や施術後の過ごし方など実際に治療がどのように体験されるのか、自分の身における体験という観点からの不安は大きい。これから受

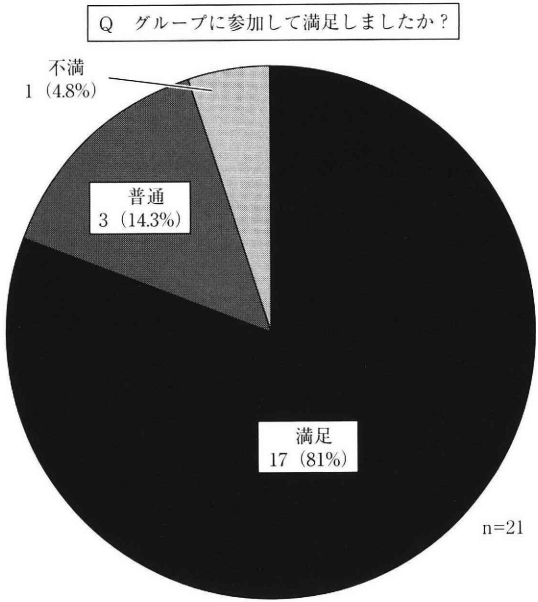


図 2 グループの満足度

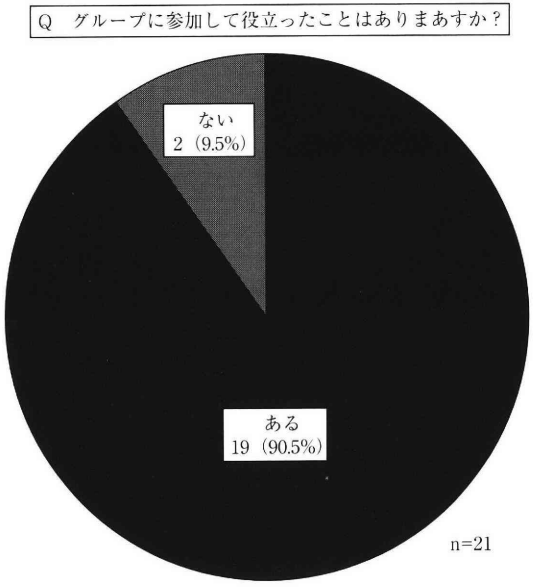


図 3 グループの有用性

表 3 グループの進め方

	参加者	内容	スタッフの役割
フリートーク 1.5 時間	患者 Coo	フリートーク	Coo はスムーズに進行するよう適宜フィードバックやサポートを実施
治療についての 質問コーナー 0.5 時間	患者 Coo IVFCoo	患者から出された 治療上の疑問に応答	ICFCoo は正確でわかりやすい医療情報を提供

ける治療への戸惑いやそれまで受けた治療に対する違和感を感じている患者は少なくないが、先輩患者や同じ治療を受けた患者と体験の情報を交換することで、今後の治療への戸惑いが消失し、違和感を抱いていた治療も納得して受け容れられるようになっていった。患者にとって体験の情報の持つ意味は大きいですが、これについて話しあう際は、不妊原因や年齢等の背景により当然起こってくる違いに注意がいきにくく、他の患者と同じように体験されない場合には不安を生じさせる可能性がある。Coo は患者相互の自由な対話を促進するだけではなく、治療教育が必要な事項については逐次チェックを行い、フリートーク後の「治療についての質問コーナー」の際に、患者からの自発的な質問に頼るだけではなく適宜質問を促し、IVFCoo による治療教育への橋渡しを行い不安を解消させている(表3)。

メンタルケアのためのグループに参加した患者は、参加時に様々な心理的支援を受けるだけではなく、グループを通して共に励ましあう仲間をえることで、以後の治療も前向きな姿勢で取り組めるようになっている。

このように不妊治療におけるメンタルケアのためのグループアプローチは、不妊患者の精神的安定に対する有効性が高いという結果を得た(図4)。

グループアプローチは、有用性が高い一方で患者の心理に直接触れるアプローチであるため、望ましい展

開には細心の配慮が欠かせない。メンタルケアのためのグループには、固定したメンバーで行うクローズド形式と、固定しないオープン形式(表4)がある。前者の場合には関係の深まりに連れ内容的深まりが期待される。しかし、グループの人間関係に濃密な心理力動関係が形成されるため、葛藤が起こりがちである。関係の深まりには必須の契機であるが、患者が傷ついたり、グループが破綻する危険性がある。さらに不妊治療の場合は妊娠した患者がグループから抜けていき最後の1人になる可能性がある。グループへの参加によってようやく孤独から解放された不妊患者にとって、孤独から解放してくれるはずの場で再び孤独な状



図4 不妊患者に対するメンタルケアのためのグループアプローチの有効性

表4 グループアプローチにおけるオープン形式とクローズド形式の特徴

	メリット	デメリット
オープン	・ 関係が深まりすぎず安全である ・ 常に新しい患者が参加するため、治療後妊娠した患者がグループから抜けても最後の1人になる心配がない	・ 関係が深まりにくく内容的深まりにかける
クローズド	・ 関係の深まりにつれ内容的深まりも期待される	・ 関係が深まり葛藤が発生しやすい ・ 最後の1人になる可能性がある

表5 グループの経過

導入期 第1回～第6回	仲間との出会いを通して前向きに励まし合う場の形成
	治療後妊娠した患者をめぐる葛藤の発生(第6回)
継続期 第7回～第12回	↓ 治療後妊娠した患者はグループから「卒業」(第7回)
	グループの質が高まり安定したグループ展開

況に追い込まれることは耐え難いストレスである。一方オープン形式は深まりはあまり期待できないが、その分安全である。また、仲間となった患者が治療後妊娠してグループから離れていっても常に新規に参加する患者がいるため、仲間に関われた状態を保持することができる。当院では安全性を重視しオープン形式を選んだ。このようなグループを起動する際における配慮に加え、グループ実施時も安全性への留意が必要である。集団では他者に刺激されハイテンションとなりいつもは話さないことも話してしまう傾向がある。特に精神的健康の増進に焦点が当てられる場合には、自己開示を行えば行こう程よいというムードが高まりやすいが、グループ参加時に気持ちよく話していても帰宅後に話しすぎたことを後悔し抑鬱状態に陥る危険性もあり、無理のない自己開示が行われるよう介入するなどの配慮が重要である。グループがうまく展開し軌道にのったようでも問題が生じてくることがある。当院では、グループに参加後治療による妊娠が判明した患者がいたが、しばらくはこの患者の参加に励まされる回が続いていた。そのため、不妊患者にとって治療後妊娠した者の参加は将来の自分の姿をイメージする機会となり有効であると思われていたが、その後、妊娠している患者の存在に傷ついてグループ内での葛藤が起こったりグループへの参加をやめるといった問題が生じてきた(表5)。この問題への対処が必要となったが、この際も患者の安全の保障を第一とし、治療後に妊娠した患者をグループの対象者から除外する場合も、排除されたという被害感を持たせないよう、また、他の患者にも排除したという罪悪感を抱かせないように注意し、治療後に妊娠した患者を祝って送り出す「卒業」という形をとるようにした。

今後各施設で不妊患者のためのグループアプローチを行っていく場合、医療従事者では日常の診療に多忙であり負担は少なくない。また患者も忙しそうな医療従事者のそぶりを見ると落ち着いて話せないというデ

メリットも生じる。心理士を活用するなどの工夫をしながら、今後生殖医療の現場で不妊患者への有用性が高いグループアプローチが広く実施されることを期待したい。

本論文の要旨は第 43 回日本不妊学会(1998 年)で報告した。

文 献

- 1) 中澤直子(2001)不妊とコンサルテーション—臨床医の立場から—。日不妊会誌 46:1-6
- 2) 有森直子, 森 明子(2001)不妊とコンサルテーション—看護の立場から—。日不妊会誌 46:7-10
- 3) 福田貴美子, 蔵本武志(1997)ARTにおける体外受精コーディネーターの必要性。日不妊会誌 42:221
- 4) 福田貴美子(2000)生殖医療を受ける患者に対するカウンセリング/サポート。ペリネイタルケア 19:25-29
- 5) 福田貴美子, 井上尚美, 松本典子, 他(2001)ART診療とコンサルテーションにおける IVF コーディネーターの必要性和役割に関する研究。日不妊会誌 46:1-18
- 6) 伊藤弥生, 福田貴美子, 蔵本武志(1998)不妊治療における継続的サポートグループの必要性—コーディネーターとしての心理士の関わりを通して—。日不妊会誌 43:445
- 7) 伊藤弥生, 福田貴美子, 蔵本武志(1998)不妊治療における継続的サポートグループの試み。日本人間性心理学学会第 17 回大会発表論文集。日本人間性心理学学会, pp94-95
- 8) 伊藤弥生(1999)不妊に悩む女性のためのグループアプローチ。現代のエスプリ第 385 号, 野島一彦編, 至文堂, 東京, pp126-135
- 9) 広瀬寛子, 一鉄時江(1997)がん患者のための外来サロンの試み。看護学雑誌 61:850-856
- 10) ヤーロム IV, ヴイノグラードフ S(1991)グループサイコセラピー。川村優訳, 金剛出版, 東京, p25
(受付:2001 年 2 月 7 日)
(受理:2001 年 10 月 22 日)

Efficacy of a Group Approach to Infertile Patients' Mental Care

Yayoi Ito, Kimiko Fukuda and Takeshi Kuramoto

Kuramoto Women's Clinic, Fukuoka 812-0012, Japan

Starting from 1997, We started a group for infertile patients' mental care. This study was conducted to investigate efficacy of a group approach to infertile patients' mental care. 38 patients who participated in the group from May 1997 to April 1998, were questioned by mail through an anonymous questionnaire. Results shows that 81% patients were satisfied with the group and 90.5% of them found it helpful. Participants of the group were released from loneliness, and got catharsis and freedom from anxiety for their experience of infertile treatment. We recommend that each infertility treatment institution use a group approach for infertile patients' mental care.

Key words : group approach, infertile patients, mental care

(Jpn J Fertil Steril 47 : 19-24 2002)

不妊診療における臨床データ管理・医学統計解析ソフト “Sarah Base”の有用性

The Efficiency of the Computer Software “Sarah Base” for the Data Control and Statistical Analysis of Infertility Treatment

内 藤 多 恵
Tae NAITO

工 藤 由 香
Yuka KUDO

宇津宮 隆 史
Takafumi UTSUNOMIYA

セント・ルカ産婦人科

St. Luke Clinic, 5 Tsumori-Tomioka, Oita City, Oita 870-0947, Japan

我々は、診療や検査によって発生するデータを精密かつ簡単に蓄積し、分析することを目的として、臨床データ管理・医学統計解析ソフト「Sarah Base」(セーラベース)を開発した。このソフトを使うことで学会でのプレゼンテーションや論文作成を精密に行い、さらに進んだ研究計画を立てることができる。なお、セーラベースにはいくつかの補助機能が使えるように設計されている。検査センターからの報告をフロッピーディスクでデータベースに取り込むことや、入力データの慣用句設定、新規項目の作成がユーザー側で容易に行うことができる。さらに、日本産科婦人科学会の「生殖医学の登録」の報告については、セーラベースに蓄積したデータを容易に集計・印刷できるオプションソフトを開発し、過去2回にわたって報告を行った。我々の医院では開院1992年6月以来、4,398人の挙児希望患者が来院し、その妊娠率は44.9%であった。生殖補助医療(ART)の妊娠率は不妊原因に左右される。そこで、1992年から2001年の間に当院にてARTを施行した4,826周期において、セーラベースを用い、それぞれの不妊因子ごとに妊娠率を検討した。治療周期あたりの妊娠率は抗精子抗体群で25.6%と最も高く、男性因子で16.7%と最も低かった。我々は、不妊診療において、精密かつ正確なデータ管理は必要不可欠であると考える。

キーワード：セーラベース、コンピュータソフト、統計解析、診療支援ソフト、生殖補助医療

(日不妊会誌 47:25-31 2002)

緒 言

産婦人科の中でも不妊症診療領域は、様々なデータを常に分析しながら治療方針を計画していくという分野であり、毎日のデータ処理にコンピュータは欠かせない。我々は臨床データ管理・医学統計解析ソフト「セーラベース」を開発し¹⁾、開院以来の患者情報を蓄積、一元管理をおこなった。セーラベースに蓄積したデータをもとに治療方針を計画し、さらに統計解析を行うことで論文・学会発表などの資料作成にも役立てている。セーラベースは日常臨床において日々発生

する膨大な量の臨床データをデータベースに保存し、必要な時にはデータベースからデータを抽出し、統計学的分析も可能なソフトウェアである。

セーラベースを開発してから2年余り経過した。この間、多くの改良を加え今の形に至った。今回、当院で使用しているセーラベースを用いて外来患者及び妊娠結果の内訳、ARTでの妊娠率を分析し、さらにこのようなデータベースでデータ管理することで得られる効果について報告する。

図1 Sarah Base 診療支援起動画面
(患者リストにおける氏名は実名ではありません。)

対象および方法

1) 対象

対象は1992年6月3日から2001年3月31日までに来院した当院の全患者である。分析方法はセーラベース（セント・ルカ産婦人科開発ソフトウェア）により、外来患者及び妊娠結果の内訳、ARTでの妊娠率を分析・集計した。

2) 方法

I. 基本構成

セーラベースは患者情報の登録及び既存患者情報の変更、患者ごとの検査データの入力・表示を行うデータベースのセーラベース診療支援プログラム、蓄積したデータから必要なデータを選択し、統計用ファイルに排出するセーラベースデータ排出プログラム、排出した統計用ファイルを対象に統計処理を行うセーラベース統計解析プログラム、項目の管理を行うセーラ

表1 SarahBase 診療支援での入力画面

現症状・既往歴	精液検査
結婚・月経歴	一般検査
妊娠歴	GTT
初診時診断	内分泌所見
腹腔鏡検査1	染色体検査
腹腔鏡検査2	入院手術
卵管造影	泌尿器所見
体外受精排卵誘発	妊娠サマリー
体外受精採卵・媒精	出産サマリー
体外受精 Culture	1歳時の状態サマリー
体外受精 Transfer	
体外受精凍結	

ベース項目管理作成ツールプログラム、入力画面の作成・編集・削除を行うセーラベース入力画面作成ツールプログラムから構成している。また、セーラベースにはオプションとしてレセコン頭書情報取込、レセコ

表 2 SarahBase 診療支援の機能

患者情報編集機能	患者情報の編集時に使用
患者検索機能	患者の検索に使用
患者データ全表示	検査結果の全データが表示される
患者データ画面別表示	検査結果を画面別に全表示する
重要表示 (赤字表示)	データの異常値を知らせる
検査結果最新表示	最新の検査結果が表示される
ノート機能	患者ごとのメモ書きができる
サマリー画面機能	各画面から必要な項目のみをまとめて表示できる

表 3 外来患者及び妊娠結果の内訳 (2000. 5. 31 現在)

1. 当院の患者数		
1) 開院 (1992. 6. 3) ～本年 (2000. 5. 31) までの外来患者数 8,847 人		
男性 2,529 人 (28.6%) (平均年齢 33.1 歳)		
正常 987 人 (39.0%) 異常 1,542 人 (61.0%)		
女性 6,318 人 (71.4%) (平均年齢 30.3 歳)		
・ 育児希望の女性 4,398 人 (69.6%) (平均年齢 30.4 ± 4.3 歳)		
・ 妊娠件数 2,245 件 (平均年齢 30.7 ± 4.0 歳)		
・ 妊娠に至らなかった女性 2,425 人		
2) 妊娠率 (患者あたり) 44.9% $\{ (4,398 - 2,425) / 4,398 \}$		
3) 治療途中で諦めた女性* 2,113 人 (48.0%)		
4) 実妊娠率 (患者あたり) 86.3% $\{ (4,398 - 2,425) / (4,398 - 2,113) \}$		
2. 妊娠の内訳		
他院へ紹介済	1,655 例	(73.7%)
流産	456 例	(20.3%)
子宮外妊娠	67 例	(3.0%)
胞状奇胎	9 例	(0.4%)
不明	54 例	(2.4%)
当院で経過観察中	4 例	(0.2%)
計	2,245 例	(100%)
3. 妊娠に至った主たる有効治療		
ART (生殖補助医療) 全体	706 例	(31.5%)
IVF-ET (体外受精)	374 例	(16.7%)
MF-ET (顕微授精)	206 例	(9.2%)
CRYO-ET (凍結胚移植)	84 例	(3.7%)
GIFT (胚偶子卵管内移植法)	37 例	(1.7%)
ZIFT (接合子卵管内移植法)	5 例	(0.2%)
AII (人工授精)	480 例	(21.4%)
HMG-HCG	261 例	(11.6%)
クロミフェン	250 例	(11.1%)
その他	548 例	(24.4%)
計	2,245 例	(100%)

*妊娠していないにもかかわらず半年以上来院していない女性

(1992/6/3～2001/3/31)

最多施行回数 34回

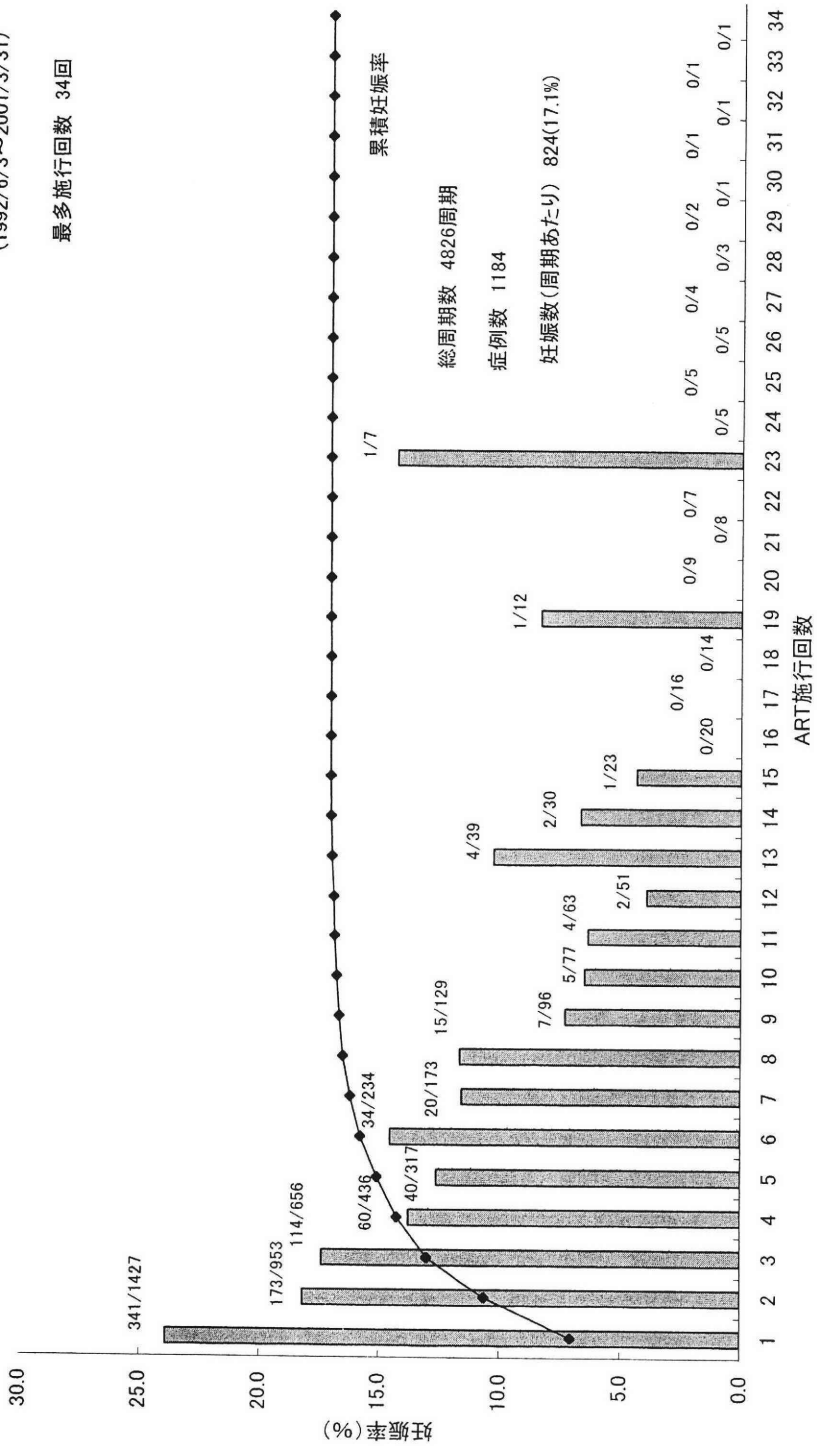


図2 ART 施行回数別妊娠率

ン診療情報取込, セーラベース検査結果報告取込, 生殖医学の登録集計・印刷があり, その動作環境は Windows 95/98/NT 4.0, CPU: Pentium 200 MHz 以上 (推奨 Pentium II 266 MHz 以上), メモリ: 64 MB 以上, ハードディスク: 空き容量 100 MB 以上, ディスプレイ解像度: 1,024×768, CD-ROM ドライブとした。

II. データ蓄積

患者データを蓄積しているセーラベース診療支援には起動時, 左部分に患者リストを表示した。中央には患者基本情報を, また右部分にはデータ入力画面の画面リストを表示した (図 1)。画面リストで画面を選択すると入力が可能である。

新患者の氏名・年齢等は, 受付にて医療事務用コンピュータ (レセプト用コンピュータ) に入力されたデータを専用の排出ソフトを利用し, 自動的に取りこみを行った。また薬や注射データ, 診療データ等も専用ソフトでレセプト用コンピュータから取りこみを行った。院外に依頼した検体検査の結果は検査センターからの報告をフロッピーディスクで受け, 取りこみを行った。自院での検査結果データはそのまま入力することによりサーバに蓄積した。診療データ等の文字データは慣用語句を設定することによりマウス選択入力を行った。慣用語句は入力時点でも追加可能とした。我々は基本的に, 病院で発生するデータはすべてセーラベース診療支援に蓄積しており, その入力項目を表 1 に示す。セーラベース診療支援のその他の機能については, 表 2 に示す。

III. データ集計・分析

セーラベースデータ排出では, セーラベース診療支援で蓄積したデータにおいて, 集計に必要とする項目のみをピンポイントで選択し, 過去 1 年, 過去 2 年などと期間を限定しての排出を可能とした。その結果, 作成された統計用ファイルを使用して統計解析を行った。セーラベース診療支援と連動したセーラベース統計解析は, 条件に従ってデータの抽出, 削除を行うことを可能とした。定性値や文字データのスコア変換や未入力セルを前後の値や平均値で補完することも可能とした。またデータ項目間の四則演算も可能とした。さらに 11 種類の統計解析手法により検定を行い, 解析データを CSV 形式でエクスポートすることも可能とした。解析データをエクスポートすることで, 市販の表計算ソフトでのグラフ化が容易になった。

結 果

1) 当院の不妊外来成績について

1992 年 6 月 3 日から 2000 年 5 月 31 日までに当院に来院した患者について, 外来患者及び妊娠結果の内訳を集計した (表 3)。挙児希望で来院した女性は, 4,398 人 (平均年齢 30.4 ± 4.3 歳) で, その妊娠率 (患者あたり) は 44.9% であった。

2) ART での妊娠率について

1992 年 6 月 3 日から 2001 年 3 月 31 日までに当院にて ART を施行した 1,184 症例, 4,826 周期の体外受精施行周期別の妊娠率について分析を行った (図 2)。また患者を卵管因子, 男性因子, 子宮内膜症因子, 抗精子抗体因子, 原因不明の 5 群で大別し, 各々の不妊因子における施行周期別妊娠率について検討を行った。1 症例に 2 つ以上の不妊因子が考えられる場合は, 両方の因子で重複して検討した。治療周期あたり妊娠率を因子別に比較すると, 男性因子群は 16.7% と最も低く, 抗精子抗体因子群は 25.6% と最も高かった。また男性因子群は施行回数を重ねた妊娠が目立ち, 抗精子抗体因子群は施行回数が少ない時期に妊娠する傾向が見られた²⁾。

考 察

市販の表計算ソフトでは扱えるデータ量や機能に限界があり, 一般的な統計分析ソフトウェアでは, データの手入力が必要で, いずれも多数の関数の中からデータに見合った統計手法を探し出さねばならない。その問題を解決するセーラベースはデータを蓄積し, 統計解析までを一貫して行うことができるようになった。是永³⁾は, 入力したデータがシステムの中で, 処理加工されプリンターに出力できれば, 状況の把握や省力化に役立つと述べている。我々は, セーラベースを利用することで, データ解析ごとにカルテを開いてデータをひろっていくわずらわしさから開放された。このことから治療方針の計画立案や, 論文・学会発表などの資料作成が容易になった。さらに患者への情報提供用資料作成や, 毎年の病院年報作成にもセーラベースはかかせなくなった。またセーラベースにはオプションとして, 日本産科婦人科学会の「生殖医学の登録」集計・印刷ソフトを備えている。報告ごとに 1 年以上前のデータを集計しなければならないが, セーラベース診療支援にデータ入力さえしていれば容易に集計, 印刷することが可能である。生殖医学の登録の

ためだけのデータ入力では手間がかかるし、その他への有効利用は望めない。我々は過去2回、このオプションソフトを使用して簡便に報告を行うことができた。

コンピュータを使うことによってデータ入力以降の解析作業が軽減されても、その反面、データ入力の手間がかかることを忘れてはならない。レセプト用コンピュータからのデータ取り込みや、検査センターからのフロッピーディスクによる検査結果取り込み、さらに入力用慣用句の準備をしているが、それでもデータ入力にわずらわしさを感じることもある。当院では、部署ごとにデータ入力担当を決めデータ入力を行っているが、誰がデータ入力をするのかということは、システム導入の際に大きな問題となる。同様に、是永¹⁾は診療システムの導入を考えるとときはその利点と欠点をよく理解した上で、その利点を重視する場合のみ導入を試みるのがよいと述べている。

またデータ入力確認の重要性についても考えなければならない。日々の仕事の片手間に、データが正確に入力されているかどうか確認を行うことは容易ではない。このことから当院では情報処理担当を2名配置し、データの管理を先導している。実際に当院では診療データ入力後、セーラベース診療支援一覧表示画面を使って、入力が正確におこなわれているか否か確認することにした。毎年おこなっている病院年報作成時、さらに日本産科婦人科学会による「生殖医学の登録」報告時にもデータ確認を行い、データが正確に蓄積されるよう管理した。

さらに当院では、各部署から2名の Information technology (IT) 担当者を選出し、セーラベースがさらに使いやすいソフトになるよう意見の交換をおこなった。その要望をプログラマーに伝え、機能のバージョンアップを行っていくためにも情報処理担当者は必要であると考えている。

また、セーラベース運用中にデータ項目の追加・削除が必要になることがある。データベースを導入しても、ユーザー側で簡単なカスタマイズが可能でなければ、導入費用以外のカスタマイズコストが必要である。そこで、セーラベースでは、データ項目の変更や入力

画面のレイアウトについては、情報処理担当者が設定できるようにした。項目のデータ型は、文字型、定性型、数値型、日付型、計算式の5種類の設定を可能とした。

最近ではIT担当者のミーティングにおいて、検査のたびに検査結果を保管用ノートに書きうつし、そのノートからさらに患者カルテ貼付用伝票に書き写しているという現状を改善するために、検査したその場でタッチパネルによってデータ入力が可能で、同時に患者カルテ貼付用伝票も必要枚数プリントアウトできるようなシステムの開発を検討している。これが実現すれば、何段階もの作業が削減され、人の手を介すことが少なくなるのでミスも減ると考えられる。

以上、データベースを使っのての当院のデータ管理とその効果について述べた。最後に、各施設とも、紙カルテ、データベース使用などいずれかの方法でデータ管理を行い、データを正確に保存しようと努力していると思われる。しかし、施設ごとのデータが正しくても、それが公開される時点での統一された基準が現在のところ皆無である。従って、不妊治療を行う施設間の臨床成績データを比較する場合、公開されたデータをそのまま鵜呑みにすることはできないという実情もある。施設間に統一されたソフトウェア、統一されたデータ比較の基準を早急に決めることが必要と思われる。

文 献

- 1) 後藤孝子(1999)臨床データ・医学統計解析ソフト Sarah Base. 医療とコンピュータ 10:77-82
- 2) 平井香里(2001)不妊因子別および加齢によるARTへの影響. 産婦人科の実際(印刷中)
- 3) 是永迪夫(1991)産婦人科診療のOA化をめぐるエンゼルクリニック実用化の紹介. 産婦人科の世界 43:515-520
- 4) 是永迪夫(1992)コンピュータと産婦人科診療 診療所におけるパソコンの利用. 産科と婦人科 59:1670-1676

(受付: 2001年6月25日)

(受理: 2001年11月19日)

The Efficiency of the Computer Software "Sarah Base" for the Data Control and Statistical Analysis of Infertility Treatment

Tae Naito, Yuka Kudo and Takafumi Utsunomiya

St. Luke Clinic, 5 Tsumori-Tomioka, Oita City, Oita, 870-0947, Japan

The software for the filing and analysis of medical data, "Sarah Base", was designed and constructed in our clinic. This software was designed with the aim of storing data accurately and simply. Using this software, statistical analysis is performed easily and correctly. In addition, presentations at medical meetings and papers are performed sophisticatedly and further studies are designed smartly. Furthermore, fine utilities were designed to run the system; simpler input of the data is available using a floppy disk of the results from examination centers and new additional headings are framed easily by users. The optional software for providing reports of assisted reproductive technology to the Association of Japan Obstetrics and Gynecology was also designed and we have already reported twice using this software. Since the opening of our clinic in June/1992, the number of patients who desired a baby was 4,398 and the pregnancy rate was 44.9%. The pregnancy rate of ART depends on the case of infertility. Using the "Sarah Base", We evaluated and analyzed the pregnancy rate in 4,826 cycles of ART from 1992 to 2001 in each group according to the infertility factors. The highest pregnancy rate per ART cycle was 25.6%. This was obtained in the patients with anti-sperm antibody factor. On the other hand, the lowest pregnancy rate of 16.7% was found in the patients with male factor.

We concluded that precise and accurate data control is essential for medical institutes, especially for clinics of reproductive medicine.

Key words : Sarah Base, computer soft, statistical analysis, medical examination soft, ART

(Jpn J Fertil Steril 47 : 25-31 2002)

年齢因子による ART の成績

The Effect of Age on Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology

間 崎 和 夫	伊 藤 嘉奈子	渋谷 幸 裕
Kazuo MASAKI	Kanako ITOH	Yukihiro SHIBUI
塩 川 素 子	祖母井 英	片桐 由起子
Motoko SHIOKAWA	Ei UBAGAI	Yukiko KATAGIRI
雀 部 豊	安 部 裕 司	久 保 春 海
Yutaka SASABE	Yuji ABE	Harumi KUBO

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, 6-11-1 Ohmorinishi,
Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

生殖補助医療技術 (Assisted reproductive technology; ART) においては加齢に伴う妊娠率の低下が大きな問題である。そこで当院の ART における年齢別妊娠率、流産率などを後方視的に検討した。対象は1997年1月より1999年12月までに当院で行った通常の体外受精 (*In vitro* fertilization; IVF) 127周期、卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) 342周期である。年齢を30歳未満、30歳～34歳、35歳～39歳、40歳以上に分け採卵数、受精卵数、妊娠率、着床率、流産率を検討した。年齢別の平均採卵数は30歳未満、30歳～34歳、35歳～39歳、40歳以上でそれぞれ13.3, 10.4, 8.0, 6.5と減少し、平均受精卵数もそれぞれ7.7, 6.4, 4.8, 4.0と減少した。IVFにおける受精率は年齢別にそれぞれ50.9%, 69.2%, 59.4%, 74.1%, 採卵当たりの妊娠率は年齢別に36.4%, 37.0%, 18.8%, 13.6%であった。着床率は年齢別にそれぞれ30.4%, 19.3%, 9.8%, 6.4%で、30歳未満と40歳以上で有意差を認めた。ICSIにおけるmetaphase II(MII)卵当たりの受精率は年齢別にそれぞれ75.9%, 81.8%, 79.3%, 72.1%であった。採卵当たりの妊娠率は年齢別に52.1%, 35.4%, 34.2%, 10.6%, 着床率は27.5%, 18.5%, 18.2%, 5.0%で、40歳以上の群とそれ以外の群でいずれも有意差を認めた。また全体の流産率は年齢別にそれぞれ24.1%, 22.6%, 36.0%, 62.5%であった。年齢が上昇するにつれ、採卵数、受精卵数は減少し、IVFにおける妊娠率は35歳以上で減少傾向を認め、ICSIにおける妊娠率は40歳以上で有意に減少した。

キーワード：体外受精・顕微授精、年齢因子、妊娠率

(日不妊会誌 47:33-37 2002)

緒 言

母子保健の主なる統計によると、日本人の出生数は1970年の193万人から1998年には120万人に減少している¹⁾。また30歳以上で分娩した母親の割合を1970年と1998年で比較すると23.2%から42.9%に、35歳以上で分娩した母親の割合は4.7%から10.6%に倍増しており、母親の出産年齢が上昇している。一

方、不妊治療においては加齢に伴う卵の染色体異常の発現や妊孕性の低下が大きな問題となっている。そこで当院の ART における年齢因子の影響を検討した。

方 法

1997年1月より1999年12月までに当院で行った通常のIVF96症例127周期、ICSI217症例342周期を対象とし、年齢を30歳未満、30歳～34歳、35歳～39

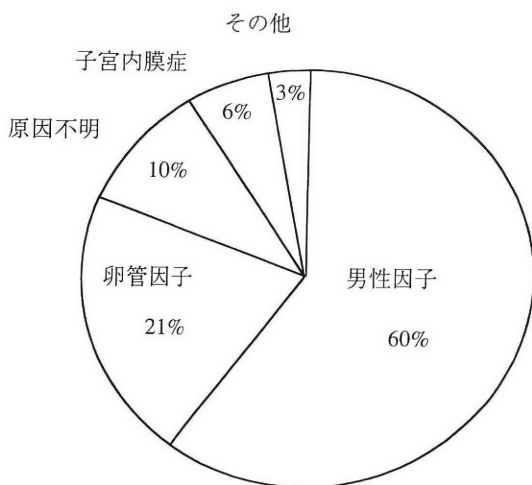


図1 当院における ART の適応 ('97~'99, 313 症例)

歳, 40 歳以上に分け, 採卵数, 受精率, 妊娠率, 着床率, 流産率などを後方視的に検討した. 体外受精の方法については既報²⁾のごとくであるが, 以下に簡単に述べる. 卵巣刺激は前周期の黄体中期より gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa; buserelin acetate, スプレキュア[®], ヘキスト・マリオン・ルセル) 900 µg/day を鼻腔噴霧し月経開始後, 固定日採卵法 (7-days schedule 法) に従って human menopausal gonadotropin (hMG, ヒュメゴン[®], 日本オルガノン) 300 IU/day を 7 日間連日筋注投与した. 採卵は human chorionic gonadotropin (hCG, ゴナドトロピン[®], 帝国臓器) 10,000 IU/day 筋注投与 36 時間後に経膈超音波ガイド下に行った. 採取された卵子は 10% synthetic serum substitute (SSS; Irvine scientific) 添加 human tubal fluid (HTF; Irvine scientific) を用い 5%CO₂ in air 気相下で 4~5 時間培養し, swim up 法によって得られた運動良好精子 10~20×10⁴/ml にて媒精した. また重症男性不妊症および原因不明の受精障害症例では ICSI を行い, 媒精または ICSI 後 18 時間で雌雄前核が確認できた受精卵を継続培養し, day 2 から day 5 で胚移植を行った.

統計学的検討には Student *t*-test と χ^2 test を用いた.

表1 当院の ART の臨床成績 ('97~'99)

	IVF	ICSI
症例	96	217
年齢	35.1 ± 4.2	34.5 ± 4.3
採卵周期	127	342
胚移植周期	116	321
胚移植率 (%)	91.3	93.9
採卵数	9.3 ± 6.6	9.3 ± 5.8
受精率 (%)		
対採卵	64.0	58.7
対 MII 卵		78.9
胚移植数	2.2 ± 0.8	2.2 ± 0.8
妊娠率 (%)		
対採卵	26.0	33.9
対胚移植	28.4	36.1
対症例	34.4**	53.5**
多胎妊娠率 (%)	18.2	12.1
着床率 (%)	14.8	17.1
流産率 (%)	24.2	31.0
子宮外妊娠率 (%)	15.1*	2.6*

**p < 0.01 *p < 0.05

結 果

当院における ART の適応は男性因子 60%, 卵管因子 21%, 原因不明 10%, 子宮内膜症 6%, その他 (抗精子抗体陽性など) 3% であった (図 1). IVF と ICSI の臨床成績を比較すると平均年齢はそれぞれ 35.1 ± 4.2 歳, 34.5 ± 4.3 歳, 採卵周期数は 127 周期と 342 周期, 胚移植率は 91.3% と 93.9% であった (表 1). 平均採卵数はそれぞれ 9.3 ± 6.6 個と 9.3 ± 5.8 個, 受精率は IVF 64.0%, ICSI では metaphase II 卵当たり 78.9% であった. 胚移植数は IVF, ICSI とも平均 2.2 ± 0.8 個, 妊娠率は採卵当たりでは IVF 26.0%, ICSI 33.9%, 胚移植当たりではそれぞれ 28.4%, 36.1%, 症例当たりでは 34.4% と 53.5% であり有意差 (p < 0.01) を認めた. 多胎妊娠率は IVF 18.2%, ICSI 12.1%, 着床率はそれぞれ 14.8% と 17.7%, 流産率は 24.2% と 31.0%, 子宮外妊娠率は 15.1% と 2.6% (p < 0.05) であった.

平均採卵数を年齢別に検討すると 30 歳未満では 13.3 個, 30 歳~34 歳 10.4 個, 35 歳~39 歳 8.0 個, 40 歳以上では 6.5 個と年齢が上昇するとともに有意に減少した (図 2). 受精卵数も同様にそれぞれ 7.7 個, 6.4 個, 4.8 個, 4 個と減少した. 次に IVF と ICSI に分けて年齢別に受精率, 妊娠率, 着床率を検討した. IVF

における受精率は 30 歳未満 50.9%, 30 歳～34 歳 69.2%, 35 歳～39 歳 59.4%, 40 歳以上 74.1%, 採卵当たり

の妊娠率は年齢別にそれぞれ 36.4%, 37.0%, 18.8%, 13.6%, 胚移植当たりの妊娠率はそれぞれ 44.4%, 39.5%, 20.9%, 14.3% であった(表 2). 妊娠率に有意差は認めなかったが, 35 歳前後でおよそ 40% から 20% に減少した. 着床率は年齢別にそれぞれ 30.4%, 19.3%, 9.8%, 6.4% で 30 歳未満と 40 歳以上で有意差を認めた($p < 0.05$). 同様に ICSI における年齢別 MII 卵当たりの受精率はそれぞれ 75.9%, 81.8%, 79.3%, 72.1%, 採卵当たりの妊娠率はそれぞれ 52.1%, 35.4%, 34.2%, 10.6%, 胚移植当たりの妊娠率は 55.6%, 38.1%, 35.3%, 11.9%, 着床率は 27.5%, 18.5%, 18.2%, 5.0% であり, 妊娠率と着床率において 40 歳未満と 40 歳以上で有意差を認めた($p < 0.01$)(表 3). また流産率は年齢別にそれぞれ 24.1%, 22.6%, 36.0%, 62.5% であり 40 歳以上で増加していた(図 3). 子宮外妊娠率は年齢別にそれぞれ 13.8%, 4.8%, 2.0%, 0% で年齢とともに減少した.

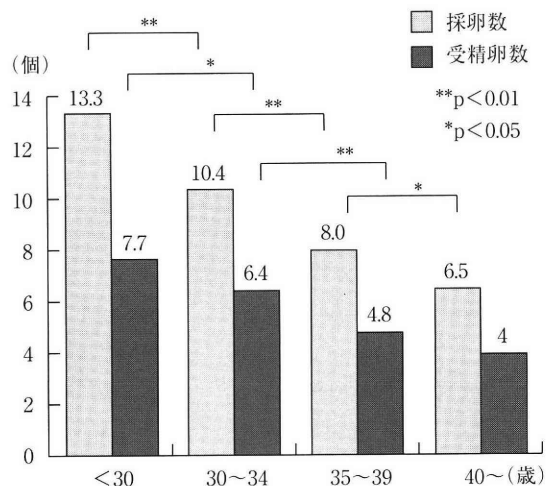


図 2 年齢別平均採卵数, 受精卵数

表 2 IVF における年齢別受精率, 妊娠率, 着床率

年齢	< 30	30 ~ 34	35 ~ 39	40 ~
採卵周期数	11	46	48	22
平均採卵数	14.6	11.2	8.2	5.3
平均受精卵数	7.5	7.7	4.9	3.9
受精率 (%)	50.9	69.2	59.4	74.1
総受精数 / 総採卵数	82/161	355/513	233/392	86/116
妊娠数	4	17	9	3
対採卵妊娠率 (%)	36.4	37.0	18.8	13.6
対胚移植妊娠率 (%)	44.4	39.5	20.9	14.3
着床率 (%)	30.4*	19.3	9.8	6.4*

* $p < 0.05$

表 3 ICSI における年齢別受精率, 妊娠率, 着床率

年齢	< 30	30 ~ 34	35 ~ 39	40 ~
採卵周期数	48	127	120	47
平均採卵数	13.0	10.1	7.9	7.1
平均受精卵数	7.7	5.9	4.7	4.0
受精率 (対 MII 卵) (%)	75.9	81.8	79.3	72.1
総受精数 / 総採卵数	371/489	744/910	572/721	186/258
妊娠数	25	45	41	5
対採卵妊娠率 (%)	52.1	35.4	34.2**	10.6**
対胚移植妊娠率 (%)	55.6	38.1	35.3	11.9
着床率 (%)	27.5	18.5	18.2	5.0

** $p < 0.01$

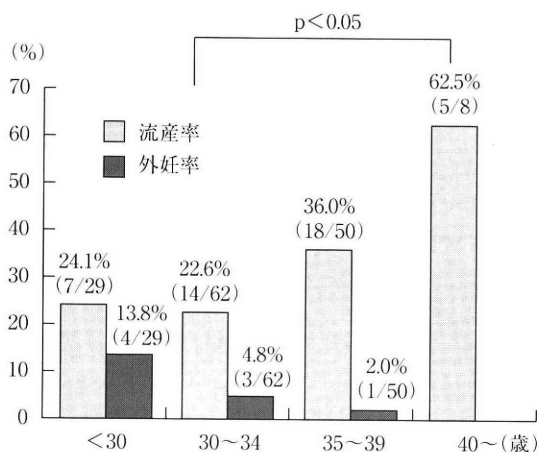


図3 年齢別流産率、子宮外妊率

考 察

我々の成績では採卵数、受精卵数、妊娠率、着床率は加齢により減少し、流産率には増加が認められた。この成績は諸家の報告^{3,4)}とほぼ一致していた。IVFにおける妊娠率は35歳前後で約40%から約20%に減少傾向を示し、ICSIにおいては40歳前後で約35%から約10%に有意に減少した。35歳前後におけるIVFの適応は、卵管因子が30歳~34歳では54.3% (25/46)、35歳~39歳では50% (24/48)と最も多く、卵管因子の妊娠率はそれぞれの年齢群で44.0% (11/25)から25.0% (6/24)に減少した。次にIVFの適応で多かったのは原因不明不妊で、その頻度は30歳~34歳で17.4% (8/46)、35歳~39歳で25.0% (12/48)、その妊娠率はそれぞれ12.5% (1/8)から8.3% (1/12)に減少した。またIVFの受精率は30歳~34歳の69.2%から35歳~39歳の59.4%に減少しており、この群で受精障害が疑われる症例はICSIを併用し受精率を改善するの一つの方法と思われた。しかし40歳を越えた症例の妊娠率はIVF、ICSIとも約10%と低く、一方流産率は高く、卵の質的異常が疑われる。

加齢による妊娠能の低下には卵の質的低下・染色体異常^{5,6)}、閉鎖卵胞の増加や子宮の胚受容能の低下⁷⁾などが考えられている。加齢による不妊症治療の一つの方法として米国ではドナー卵が使用されている。これは過排卵処理を受け採卵されたドナー卵と夫の精子を受精させ、エストロゲン、プロゲステロンによって調節した患者に移植する方法である⁷⁾。さらに米国では

加齢とともに増加する染色体異常の中で最も多いとされるX, Y, 18, 13, 21, 16の異常を、受精卵の割球の一部をbiopsyし、FISH (fluorescence in situ hybridization) 法によって調べ異数体の胚移植を避ける方法がとられている^{6,8)}。しかし日本においては現時点ではドナー卵の使用は認められておらず、また着床前診断の臨床応用も社会的にまだ難しい状況である。

細胞質のミトコンドリアはATPを産生する細胞代謝に重要な小器官である。加齢によって妊娠率が減少する原因のひとつにミトコンドリアのATP産生能力の減少が考えられている⁹⁾。ドナー卵の細胞質からミトコンドリアを多く含む部分を分離、レシピエントマウスの卵細胞質に移植し、ATP産生量が増加した報告や¹⁰⁾、反復する着床障害の患者卵の細胞質に、妊娠性のあるドナー卵の細胞質を移植し生児を得たという報告がある^{11,12)}。また40歳以上で妊娠率が極端に減少する原因の一つに加齢による異数体の増加があり^{5,6)}、これは減数分裂における紡錘糸の形成異常と関連していると考えられる。Zhangらは若いドナー卵の卵核胞を除核し、高齢者の卵核胞をドナー卵の開卵腔に移植し、電気融合によって減数分裂を開始することを報告した¹³⁾。これは細胞質-核相互作用を改善し卵の成熟、受精を改善しようとする試みである。一方細胞質移植によって産まれた児にはドナー卵のミトコンドリアDNAの遺伝が確認されている¹⁴⁾。これら細胞質移植や核移植ではドナー卵のミトコンドリアDNAやmRNA、蛋白質やその他の細胞成分の混入が考えられ、ドナーの遺伝疾患などに十分な注意が必要である。細胞質移植や核移植ははまだ研究段階の方法であり、手技の成功率、卵の体外成熟、妊娠率など技術的問題の解決や、安全性、適応などを十分に検討する必要がある。日本ではまずドナー卵の使用についての倫理的問題の解決、法的整備、社会的コンセンサスが得られなければこれらの臨床応用は困難である。また一方で卵子、精子、胚の基礎的研究やさらなる生殖補助医療技術の発展が望まれる。

文 献

- 1) 厚生省児童家庭局母子保健課(2000)母の年齢別、出生割合、母子保健の主なる統計—平成11年度刊行一。母子保健事業団、東京、p48
- 2) 安部裕司、池永秀幸、中野英之、他(1995)ARTプログラムにおける採卵日固定刺激法の効果について、日不妊会誌 40:211-215

- 3) Oehninger S, Veek L, Lanzendorf S, et al. (1995) Intracytoplasmic sperm injection: achievement of high pregnancy rates in couples with severe male factor infertility is dependent primarily upon female and not male factors. *Fertil Steril* 64: 977-981
- 4) Romeu A, Muasher S, Acosta A, et al. (1987) Results of *in vitro* fertilization attempts in women 40 years of age and older: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 47: 130-136
- 5) Munne S, Alikani M, Tomkin G, et al. (1995) Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* 64: 382-391
- 6) Benadiva CA, Kligman I, Munne S (1996) Aneuploidy 16 in human embryos increases significantly with maternal age. *Fertil Steril* 66: 248-255
- 7) Meldrum DR (1993) Female reproductive aging: ovarian and uterine factors. *Fertil Steril* 59: 1-5
- 8) Gianaroli L, Magli MC, Munne S, et al. (1997) Will preimplantation genetic diagnosis assist patients with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod* 12: 1762-1767
- 9) Barnett D, Bavister B (1996) What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev* 43: 105-133
- 10) Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P (1998) Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 13: 2857-2868
- 11) Cohen J, Scott R, Schimmel T, et al. (1997) Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 350: 186-187
- 12) Cohen J, Scott R, Alikani M, et al. (1998) Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol Hum Reprod* 4: 269-280
- 13) Zhang J, Wang CW, Krey L, et al. (1999) *In vitro* maturation of human preovulatory oocytes reconstructed by germinal vesicle transfer. *Fertil Steril* 71: 726-731
- 14) Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, et al. (2001) Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod* 16: 513-516

(受付: 2001 年 8 月 22 日)

(受理: 2001 年 11 月 21 日)

The Effect of Age on Pregnancy Rate in Assisted Reproductive Technology

Kazuo Masaki, Kanako Itoh, Yukihiro Shibui, Motoko Shiokawa, Ei Ubagai,
Yukiko Katagiri, Yutaka Sasabe, Yuji Abe and Harumi Kubo

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine,
6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

The aim of this study was to evaluate the effect of age on the rates of fertilization, pregnancy, implantation and abortion in three hundred thirteen women who had undergone a total of 469 cycles of conventional IVF or intracytoplasmic sperm injection (ICSI) between January 1997 and December 1999. The subjects were divided into four age groups (group 1: <30 years; group 2: between 30 and 34 years; group 3: between 35 and 39 years; group 4: ≥ 40 years). For IVF, fertilization rates were 50.9%, 69.2%, 59.4% and 74.1% in groups 1, 2, 3 and 4, respectively. Pregnancy rates were 36.4%, 37.0%, 18.8% and 13.6%, respectively, and implantation rates were 30.4%, 19.3%, 9.8% and 6.4%, respectively. For ICSI, fertilization rates were 75.9%, 81.8%, 79.3% and 72.1% in groups 1, 2, 3 and 4, respectively. Pregnancy rates were 52.1%, 35.4%, 34.2% and 10.6%, respectively, and implantation rates were 27.5%, 18.5%, 18.2% and 5.0%, respectively. For ICSI, the fertilization, pregnancy and implantation rates were all significantly lower in group 4, compared with other groups. The overall incidence of abortion was 24.1%, 22.6%, 36.0% and 62.5%, respectively. Among patients undergoing IVF, the pregnancy rate was lower in women over 35 years. With ICSI, the pregnancy rate was significantly lower in women over 40 years of age.

Key words: IVF/ICSI, female age, pregnancy rate

(Jpn J Fertil Steril 47: 33-37 2002)

Histological Analysis of Vaginal Opening and Spermatogenesis in BCL6-deficient Mice

Satoko KOJIMA^{1,2,3)}, Tomohiko ICHIKAWA²⁾, Takeshi TOKUHISA³⁾ and Haruo ITO²⁾

¹⁾Department of Urology, Funabashi Municipal Medical Center, kanasugi 1-21-1, funabashi 273-8588, Japan

²⁾Department of Urology and ³⁾Developmental Genetics, Graduate School of Medicine, Chiba University,
Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8670, Japan

Abstract : Female Bcl6-deficient (Bcl6^{-/-}) mice are infertile and males have reduced fertility. Although Bcl6 plays an important role in protecting spermatocytes from apoptosis in the adult mice testes, the role of Bcl6 in the development of reproductive organs of female mice has not been reported. In this study we found that the ovaries of adult Bcl6^{-/-} mice were histologically normal. However, their vaginas were permanently imperforate. Furthermore, a large number of spermatocytes with abnormal nuclei and spermatids with deformed acrosome were observed in the testes of adult Bcl6^{-/-} mice by electron microscopy, although they had normal serum testosterone levels. These results suggest that Bcl6 plays an important role in vaginal opening and in spermatogenesis.

Key words : Bcl6, spermatogenesis, vagina, mouse, infertility

(Jpn J Fertil Steril 47 : 39-45 2002)

Introduction

The *Bcl6* gene was first identified on the breakpoint of a chromosomal translocation involving 3q27 in human diffuse large B cell lymphomas^{1,2,3)}. The Bcl6 protein is localized in the nucleus and functions as a transcriptional repressor^{4,5)}. Bcl6 expression is ubiquitous, but is especially high in germinal center B cells^{6,7)}. Since Bcl6-deficient (Bcl6^{-/-}) mice are completely defective in germinal center formation, Bcl6 is thought to be essential for memory B cells to differentiate through germinal centers^{8,9,10)}. Bcl6^{-/-} female and male mice display infertility and very low fertility, respectively. The number of spermatozoa in the epididymis of adult Bcl6^{-/-} mice was less than that in Bcl6^{+/+} mice¹¹⁾. Since Bcl6 is expressed in testicular germ cells between pachytene-spermatocyte stage and round-spermatid stage of normal sperm and since a large number of apoptotic spermatocytes were detected in the testes of Bcl6^{-/-} mice¹¹⁾, Bcl6 plays an

important role in protecting spermatocytes from apoptosis in the adult testes. Furthermore, the *in vitro* fertilization rate of Bcl6^{-/-} sperm with normal oocytes was lower than that of normal sperm, suggesting abnormal functioning of Bcl6^{-/-} sperm. However, a role of Bcl6 in spermatogenesis is presently unclear, and the reproductive organs of female Bcl6^{-/-} mice have not been analyzed. In this study, we histologically examined the reproductive organs of females and spermatogenic cells in the testes of male Bcl6^{-/-} mice. We found imperforate vagina in the females, and many abnormal spermatogenic cells in the male Bcl6^{-/-} mice. We discuss the functions of Bcl6 in the vaginal opening in female mice and in spermatogenesis of male mice.

Materials and Methods

Animals

C57BL/6 mice were purchased from Japan SLC (Hamamatsu, Japan). Bcl6^{-/-} mice, which have been

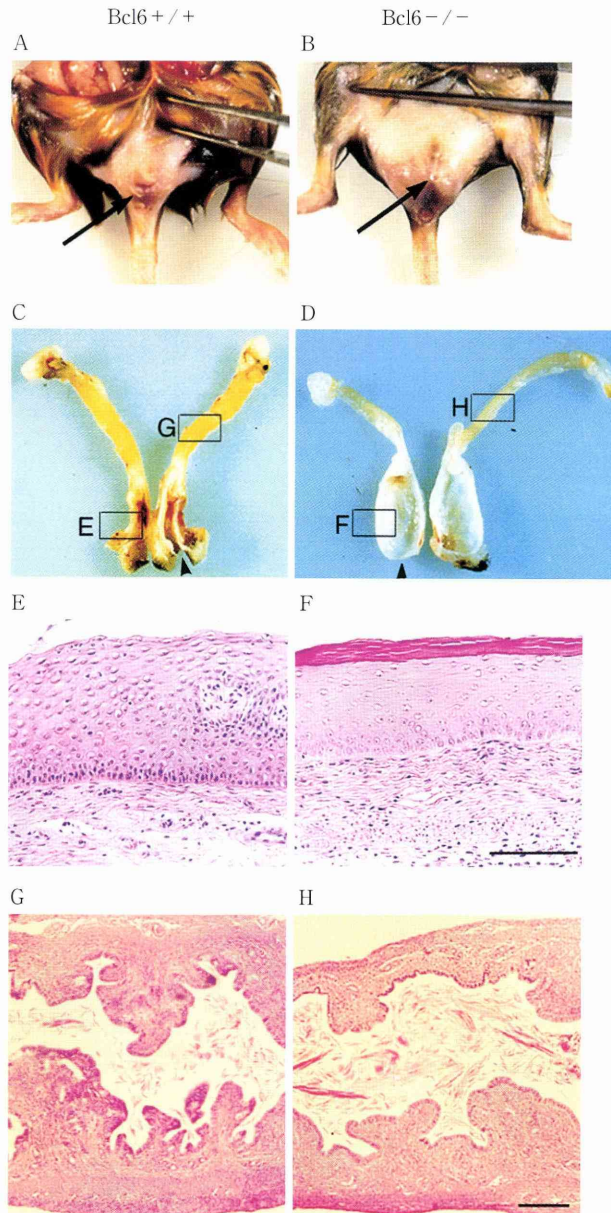


Fig. 1 Anomaly of the genital tract of female Bcl6^{-/-} mice.

The reproductive organs of female Bcl6^{-/-} mice were examined microscopically. Although Bcl6^{+/+} mice at 8 weeks of age showed vaginal canalization (A, arrow; C, arrowhead), the vagina of Bcl6^{-/-} mice at 8 weeks of age (B, arrow) was imperforate and the vaginal lumen was dilated with discharge (D, arrowhead). A part of the vaginal wall of Bcl6^{-/-} mice (F) was thin. Keratinization in the vaginal wall was detected in the Bcl6^{-/-} mice, but was not seen in any of the Bcl6^{+/+} mice (E). The uterus of the Bcl6^{-/-} mice (H) was histologically normal and was similar to that of the Bcl6^{+/+} mice (G). (Scale Bar, 100 μ m).

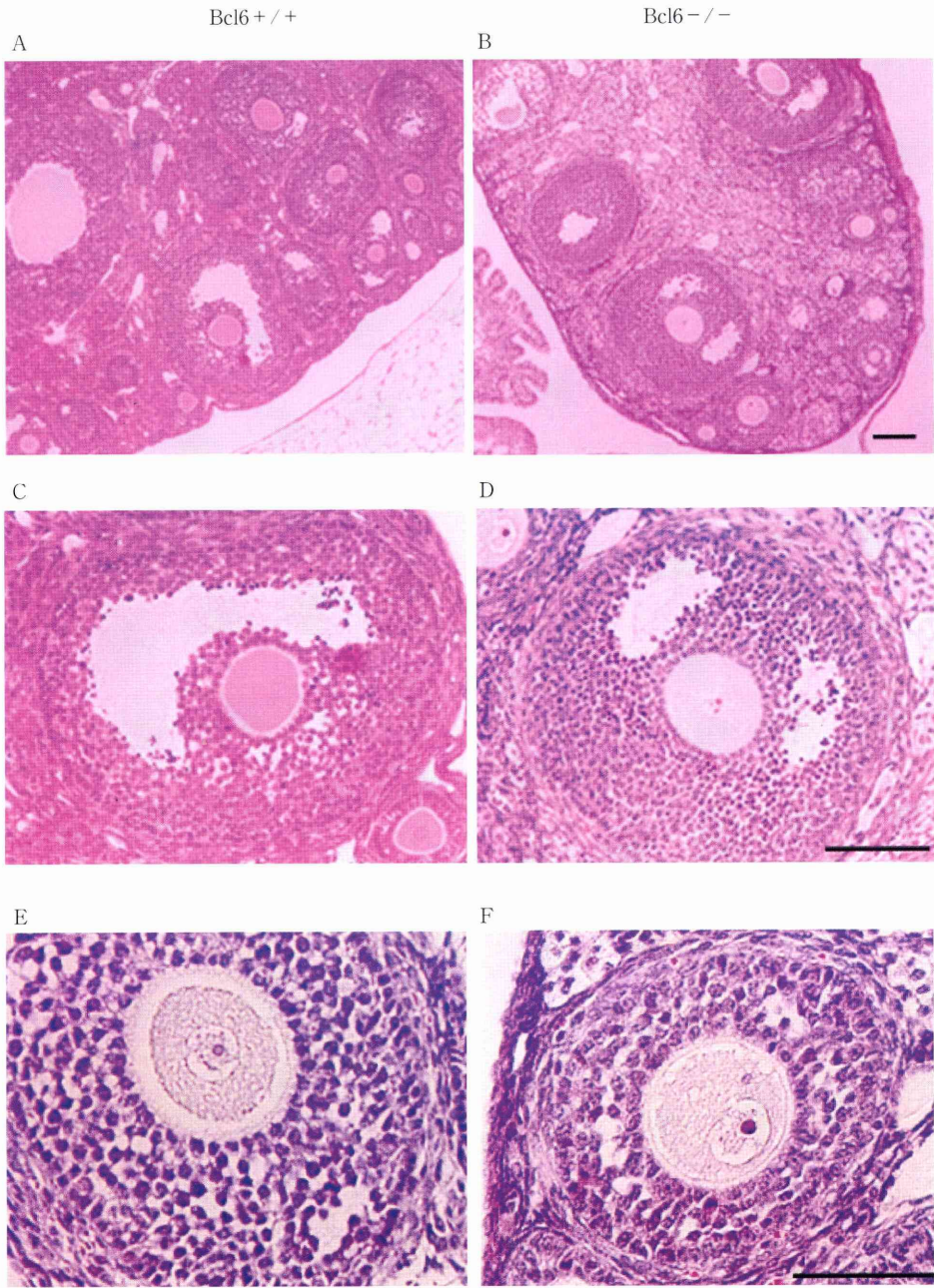


Fig. 2 Histologically normal ovaries in the female $Bcl6^{-/-}$ mice.

The ovaries of $Bcl6^{-/-}$ mice at 8 weeks of age contained mature follicles (B) that were similar to those in the $Bcl6^{+/+}$ mice (A). The Graafian follicles and secondary follicles in the $Bcl6^{-/-}$ mice (D, F) were similar to those in the $Bcl6^{+/+}$ mice (C and E, respectively). Scale Bar, 100 μ m).

described elsewhere¹²⁾, were maintained under specific pathogen-free conditions in the animal center of the Graduate School of Medicine, Chiba University.

Histological study

The uterus, ovaries and vagina of 8- to 12-week-old female mice were fixed with 4% paraformaldehyde by perfusion through the heart, removed, and embedded in paraffin. Sections (5 μ m thick) were deparaffinized in xylene and stained with hematoxylin and eosin (HE).

Electron microscopy

The testes of 12-week-old male mice were fixed by perfusion of 3% glutaraldehyde in HEPES buffer (10 mM, pH 7.4) through the heart for 20 minutes. Then, the testes were removed, cut into small blocks, and immersed in the fixative for an additional 12 hours. Fixed testes were post-fixed with 1% OsO₄, dehydrated, and embedded in Epon 812. Ultra-thin sections (80-nm thick) were stained with uranyl acetate followed by lead citrate and examined by electron microscopy (JEOL 1200 EX, Tokyo, Japan).

Hormone assay

Blood samples were collected from each animal by cardiac puncture. The plasma testosterone concentration was measured in duplicate by radioimmunoassay (RIA, S.R.L.). The minimum detection limit in the assay was 0.01 ng/ml. The intra- and interassay coefficients were 4% and 8%, respectively.

Results

Vagina of female Bcl6^{-/-} mice is imperforate

The reproductive organs of female Bcl6^{-/-} mice were examined microscopically. Although the vagina of Bcl6^{+/+} mice at 8 weeks of age was open (Fig. 1A, C), the vagina of Bcl6^{-/-} mice at 8 weeks of age was closed and the cavity was dilated and filled with discharge (Fig. 1B, D). Ninety percent (81/90) of the Bcl6^{-/-} female mice showed an imperforate vagina and the remaining female mice showed a pin-hole perforate vagina. None of the Bcl6^{-/-} mice (from 6 to 24 weeks of age) showed normal opening of the vagina. Histologically, the vaginal wall was thin. Keratinization was detected in the vaginal wall of the Bcl6^{-/-} mice (Fig. 1F), but it was not seen in the vaginal wall

of any of the Bcl6^{+/+} mice (Fig. 1E). The uterus of both Bcl6^{+/+} (Fig. 1G) and Bcl6^{-/-} mice (Fig. 1H) showed normal development.

Ovaries of adult female Bcl6^{-/-} mice are histologically normal

The ovaries of Bcl6^{-/-} mice at 8 weeks of age were subject to histological examination. The ovaries of Bcl6^{-/-} mice displayed normal follicle formation (Fig. 2B), and were histologically similar to those of the Bcl6^{+/+} mice (Fig. 2A). The Graffian follicles (Fig. 2D) and secondary follicles (Fig. 2F) of the Bcl6^{-/-} mice developed normally and were similar to those of the Bcl6^{+/+} mice (Figs. 2C, E).

Morphologically abnormal spermatogenic cells were observed in the testes of male Bcl6^{-/-} mice

The spermatogenic cells in the testes of Bcl6^{-/-} mice at 12 weeks of age were examined by electron microscopy. In Bcl6^{+/+} mice, a normal pachytene spermatocyte had round nuclei with regular contour (Fig. 3A). A spermatocyte in the Bcl6^{-/-} mice was degenerated with lobulation of the nucleus (Fig. 3B arrow). A normal step7 spermatid in the Bcl6^{+/+} mice showed an acrosome with a smooth surface spreading over the nucleus (Fig. 3C). However, a step7 spermatid of the Bcl6^{-/-} mice revealed mitochondria that were deformed in shape (Fig. 3D, arrow) and the acrosome membrane was undulated (Fig. 3D, arrowheads). As to the normal step 9 spermatid in the Bcl6^{+/+} mice, the acrosome had spread over the surface of the nucleus (Fig. 3E). However, a spermatid at the same stage in the Bcl6^{-/-} mice showed a distorted nucleus and acrosome with interruption, and the apex was abnormally protruded (Fig. 3F, arrowhead). The spermatogonia, Sertoli cells and Leydig cells in the testes of the Bcl6^{-/-} mice were normal in this study (data not shown).

Serum testosterone level of adult male Bcl6^{-/-} mice is normal

The serum testosterone level of adult male Bcl6^{+/+} and Bcl6^{-/-} mice was measured by RIA. The serum testosterone level of the Bcl6^{-/-} mice (127 $\pm$ 58 ng/ml, mean $\pm$ S. E.) did not significantly differ from that of the Bcl6^{+/+} mice (419 $\pm$ 130 ng/ml) (Fig. 4).

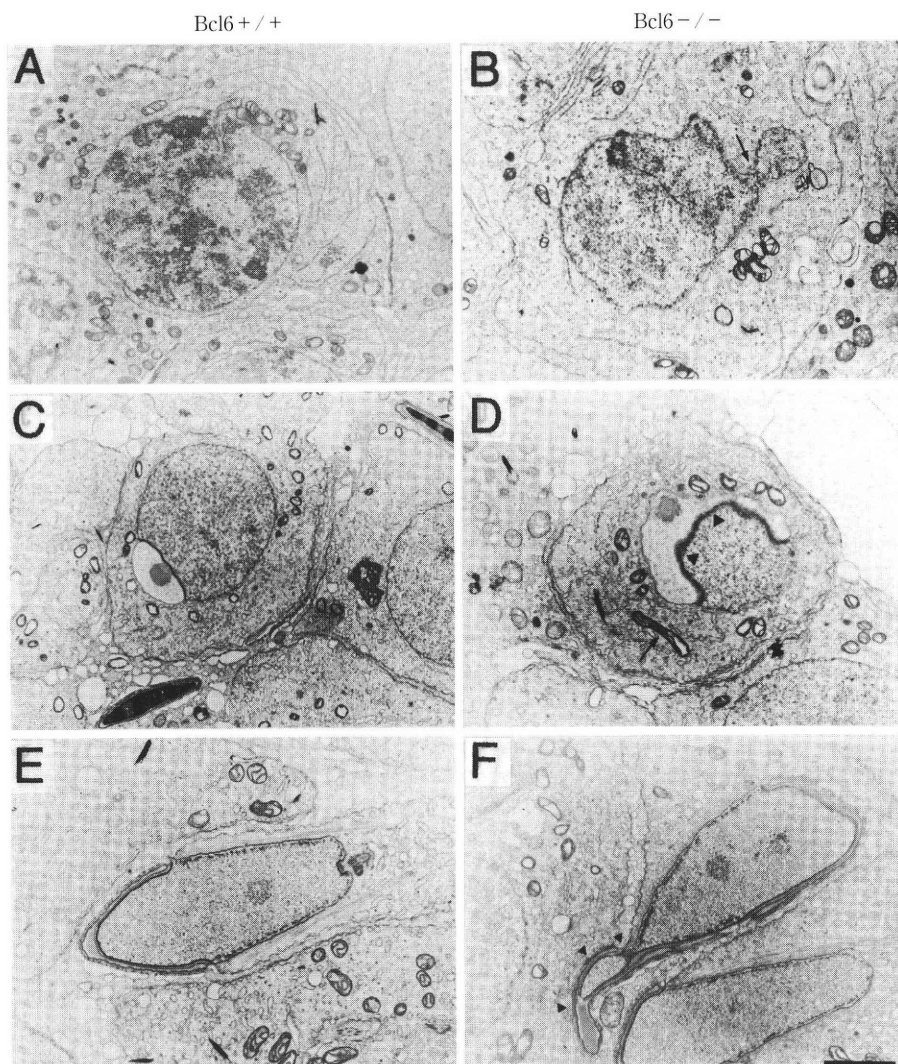


Fig. 3 Abnormal spermatogenic cells in the testes of male *Bcl6*^{-/-} mice as observed by electron microscopy

Ultra-thin sections of the seminiferous tubules of *Bcl6*^{+/+} (A, C, E) and *Bcl6*^{-/-} (B, D, F) mice at 12 weeks of age were examined by electron microscopy. Scale bar, (A), 4.2 μm; (B), 2.8 μm; (C), 4.8 μm; (D), 5.0 μm (E, F).

Discussion

Both female and male *Bcl6*^{-/-} mice display abnormal reproductive functions. The reason that *Bcl6*^{-/-} female mice are infertile is that the vagina of *Bcl6*^{-/-} mice is permanently closed (Fig. 1). Follicle-stimulating hormone receptor-deficient (FSHRKO) female

mice are infertile because of their imperforate vagina. The ovaries of FSHRKO mice are significantly reduced in size, and follicular development is arrested at the prenatal stage¹³. Since the ovaries of *Bcl6*^{-/-} mice were histologically normal (Fig. 2) and the appropriate number of eggs were observed after superovulation (data not shown), the hormonal condition may be

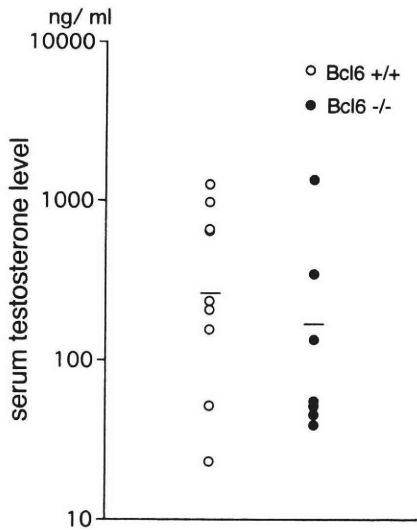


Fig. 4 Comparison of the serum testosterone levels of adult male Bcl6^{-/-} and Bcl6^{+/+} mice. The serum testosterone level of adult male mice was measured by RIA. The serum testosterone level of male Bcl6^{-/-} mice between 8 and 12 weeks of age (127 ± 58 ng/ml, mean $\pm$ S.E.) did not significantly differ from that of male Bcl6^{+/+} mice (419 ± 130 ng/ml, mean $\pm$ S.E.) ($p = 0.103$). Each circle indicates the level in a mouse. The horizontal bar indicates the mean serum testosterone level in that group.

normal in Bcl6^{-/-} female mice. P_{gk}-Bcl-2 transgenic mice, which express the human Bcl-2 protein in a variety of tissues, also show a closed vagina due to inhibition of hormone-triggered apoptosis of the vaginal mucosa¹⁴. Bcl6 is ubiquitously expressed, and is probably expressed in the vaginal mucosa during its development, suggesting that Bcl6 plays a role in hormone-triggered apoptosis of the vaginal mucosa. In humans, there is a category of the anomaly, vaginal atresia. Thus, Bcl6 may be associated with vaginal atresia in humans.

The reason for the low reproductive function of male Bcl6^{-/-} mice may be as follows. First, the number of spermatozoa in the epididymis of adult Bcl6^{-/-} mice was 20% of that of normal mice. Although the relationship between Bcl6 and apoptosis was controversial in previous papers^{15,16}, we have reported the

relationship between Bcl6 and germ cell apoptosis¹¹. Many apoptotic cells are observed in the seminiferous tubules of adult Bcl6^{-/-} mice and most of the apoptotic cells are in stage XII seminiferous tubules; 90% of the apoptotic cells are meiotic I stage spermatocytes¹¹. Thus, the reduced number of spermatozoa in the epididymis of adult Bcl6^{-/-} mice is due to higher frequency of apoptosis during spermatogenesis. Second, the mating ability (plug formation) of Bcl6^{-/-} male mice is lower than that of Bcl6^{+/+} male mice¹¹. Third, Bcl6^{-/-} sperm may have lower ability of fertilization since the *in vitro* fertilization rate of Bcl6^{-/-} sperm was lower than that of Bcl6^{+/+} sperm¹¹. Indeed, we showed that there are many abnormal spermatogenic cells in the testes of adult Bcl6^{-/-} mice by electron microscopy (Fig. 3). These abnormal sperm may be defective in capacitation.

Many spermatogenic cells in the testes of adult Bcl6^{-/-} mice were histologically deformed (Fig. 3). In many spermatids in the adult Bcl6^{-/-} mice, the acrosome was deformed and the nucleus was lobulated. The abnormality of spermatogenesis in the testes of adult Bcl6^{-/-} mice is not due to an abnormal serum testosterone level (Fig. 4). The Leydig cells, Sertoli cells and prostate were histologically normal in the Bcl6^{-/-} mice (data not shown). Although most of the apoptotic cells in the testes of Bcl6^{-/-} mice are meiosis I spermatocytes in stage XII seminiferous tubules¹¹, these deformed spermatogenic cells are spermatocytes and spermatids. The spermatogenic cells at these stages in the testes of normal mice express Bcl6¹¹. Thus, Bcl6 plays an important role in spermatogenesis, especially in acrosomal formation in spermatids.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. T. Fukuda, Dr. M. Hatano, Dr. S. Okada, Dr. Y. Toyama, and Dr. S. Yuasa for skillful technique and discussion.

References

- 1) Kerckaert JP, Deweindt C, Tilly H, et al. (1993) LAZ3 a novel zinc-finger encoding gene, is dis-

- rupted by recurring chromosome 3q27 translocations in human lymphomas. *Nature Genet* 5: 66-70
- 2) Miki T, Kawamata N, Hirose S, et al. (1994) Gene involved in the 3q27 translocation associated with B-cell lymphoma, Bcl5, encodes a Krüppel-like zinc-finger protein. *Blood* 83: 26-32
 - 3) Ye BH, Lista F, Lo Coco F, et al. (1993) Alterations of a zinc finger-encoding gene, BCL-6, in diffuse large-cell lymphoma. *Science* 262: 747-750
 - 4) Chang CC, Ye BH, Chaganti RS, et al. (1996) BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6947-6952
 - 5) Seyfert VL, Allman D, He Y, et al. (1996) Transcriptional repression by the proto-oncogene BCL-6. *Oncogene* 12: 2331-2342
 - 6) Cattoretti G, Chang CC, Cechova K, et al. (1995) BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86: 43-53
 - 7) Onizuka T, Moriyama M, Yamochi T, et al. (1995) BCL-6 gene product, a 92- to 98-kD nuclear phosphoprotein, is highly expressed in germinal center B cells and their neoplastic counterparts. *Blood* 86: 28-37
 - 8) Dent AL, Shaffer AL, Yu X, et al. (1997) Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276: 589-592
 - 9) Fukuda T, Yoshida T, Okada S, et al. (1997) Disruption of the Bcl6 gene results in an impaired germinal center formation. *J Exp Med* 186: 439-448
 - 10) Ye BH, Cattoretti G, Shen Q, et al. (1997) The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-center formation and Th2-type inflammation. *Nature Genet* 16: 161-170
 - 11) Kojima S, Hatano M, Okada S, et al. (2001) Disruption of the Bcl6 gene increases testicular germ cell apoptosis in mice. *Development* 128: 57-65
 - 12) Yoshida T, Fukuda T, Hatano M, et al. (1999) A role of Bcl6 in mature cardiac myocytes. *Cardiovasc Res* 42: 670-679
 - 13) Abel MH, Wootton AN, Wilkins V, et al. (2000) The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology* 141: 1795-1803
 - 14) Rodriguez I, Araki K, Martinou Jc, et al. (1997) Mouse vaginal opening is an apoptosis-dependent process which can be prevented by the overexpression of Bcl2. *Dev Biol* 184: 115-121
 - 15) Kumagai T, Miki T, Kikuchi M, et al. (1999) The proto-oncogene Bcl6 inhibits apoptotic cell death in differentiation-induced mouse myogenic cells. *Oncogene* 18: 467-475
 - 16) Yamochi T, Kaneita Y, Akiyama T, et al. (1999) Adenovirus-mediated high expression of BCL-6 in CV-1 cells induces apoptotic cell death accompanied by down-regulation of BCL-2 and BCL-XL. *Oncogene* 18: 487-494

(Received: August 20, 2001)

(Accepted: November 22, 2001)

Bcl6 欠損マウスの膣開口および精巣分化における組織学的検討

小島 聡子^{1,2,3)}, 市川 智彦²⁾, 徳久 剛史³⁾, 伊藤 晴夫²⁾

¹⁾船橋市立医療センター泌尿器科

²⁾千葉大学大学院医学研究院遺伝子機能病態学 (旧泌尿器科), ³⁾同 分化制御学

Bcl6 ノックアウトマウス (Bcl6^{-/-}) は雌雄ともに不妊症を呈する。Bcl6 はマウスの精巣において精母細胞のアポトーシスを抑制する役割を果たすのに重要であるが、雌マウスの生殖器における機能については報告がない。今回我々は Bcl6^{-/-} 雌マウスの卵巣は正常であるが膣の開口部に閉塞があることを示した。また、Bcl6^{-/-} 雄マウスの精巣を電子顕微鏡を用いて観察し、精母細胞の核の変形、精子細胞の核、アクロソームの変形などの形態学的異常を認めた。なお、Bcl6^{-/-} 雄マウスの血清中のテストステロン値は正常マウスと比較して統計的に有意差を認めなかった。これらの結果から、Bcl6 は膣の開口と精子形成において重要な役割を果たしていることが示唆された。

キーワード: Bcl6, 精子形成, 膣, マウス, 不妊症

(日不妊会誌 47: 39-45 2002)

ヒト射出精子に与える精漿中元素の影響

Influence of the Elements in Seminal Plasma on the Human Ejaculated Spermatozoa

山田 宏子	片 寄 治 男	柳 田 薫
Hiroko YAMADA	Haruo KATAYOSE	Kaoru Yanagida
篠 原 厚 子 ¹⁾	千 葉 百 子 ¹⁾	富 永 國比古 ²⁾
Atsuko SHINOHARA	Momoko CHIBA	Kunihiko TOMINAGA
	佐 藤 章	
	Akira SATO	

福島県立医科大学医学部産科婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Fukushima Medical University,
Fukushima 960-1295, Japan

¹⁾順天堂大学医学部衛生学教室

Department of Epidemiology and Environmental Health, Juntendo University School of Medicine,
Tokyo 113-8421, Japan

²⁾ロマリ ندا クリニック

Loma Linda Clinic, Fukushima 963-8004, Japan

金属元素と男性不妊との関係を調査するため、119例から回収された精液を対象に、精漿中元素濃度をフレイム原子吸光法、比色法、マイクロ波-プラズマ質量分析法で測定し、各元素濃度と精液パラメーターの関連を調査した。また、影響の確認された元素については添加実験を行い、*in vitro*における効果についても検討した。有意な精液所見の変化は亜鉛、銅およびカドミウムにおいて観察された。亜鉛濃度 300 µg/ml 以上群 (n=24) の精子運動率 ($32.4 \pm 27.4\%$, mean $\pm$ SD) は、他の 200 µg/ml 未満群 ($46.3 \pm 22.8\%$, n=58), 200 以上 300 µg/ml 未満群 ($49.1 \pm 29.8\%$, n=37) より有意に低下していた (p=0.0161)。銅濃度 0.20 µg/ml 以上群 (n=32) の精子運動率 ($32.7 \pm 27.7\%$) は、他の 0.15 µg/ml 未満群 ($48.7 \pm 23.8\%$, n=59), 0.15 以上 0.20 µg/ml 未満群 ($48.8 \pm 27.5\%$, n=28) より有意に低下していた (p=0.0179)。カドミウム濃度 0.001 µg/ml 未満群の総精子数 ($456.1 \pm 443.7 \times 10^6$, n=25) は他の 0.001 以上 0.010 µg/ml 未満群 ($302.9 \pm 340.8 \times 10^6$, n=80), 0.01 µg/ml 以上群 ($179.2 \pm 126.2 \times 10^6$, n=10) より有意に高値であった (p=0.0152)。*In vitro* における亜鉛 (ZnSO₄ · 7H₂O)、銅 (CuSO₄ · 5H₂O) 曝露では、300 µg/ml の亜鉛、50 µg/ml の銅曝露で精子運動の指標 (運動率, linearity, velocity, ALH) が経時的に低下した。精漿中の過剰な亜鉛および銅の存在は、ヒト射出精子の運動性を抑制することが、またカドミウムは精子形成能の抑制に関連があることが指摘された。

キーワード: ヒト射出精子, 精漿, 銅, 亜鉛, カドミウム

(日不妊会誌 47: 47-54 2002)

緒 言

近年、生殖機能に有害に作用する環境因子が問題と

なり、人体に対してもその有害性が示唆されてきた¹⁾。ダイオキシンを代表とする内分泌攪乱物質と呼ばれる化学物質は、生殖系および個体発生に重大な異常を生

ずることが実験動物において確認されている²⁻⁵⁾。

一方、男性生殖機能の低下も近年次々に報告された⁶⁻¹⁰⁾。その原因として後天的な内分泌攪乱物質や空気、水、土壌などの自然環境の中に放出された化学物質などの環境因子の影響が強く疑われている¹¹⁾。これらは、微量でも食物連鎖により蓄積され、最終的には人体に対して有害に作用する可能性を持ち、それが胎児期からの曝露であれば、生殖内分泌系への影響を無視できず、さらには次世代へも影響を及ぼす可能性が考えられる。

これらの環境汚染物質の中には多数の金属元素も含まれているが、その過剰蓄積がヒトの造精機能および精子機能に与える影響についての調査研究は少なく、知見に乏しい^{12,13)}。本研究では、男性生殖機能が受ける金属元素の影響を調査研究することを目的とし、精漿中の金属元素濃度と精液所見についての関係を検討した。さらに、本研究において精液所見に有意な影響を与えることが観察された亜鉛と銅について、*in vitro* における精子運動性を指標にその抑制効果を検討した。

材料および方法

1. 精漿中元素濃度測定

1996年1月から1997年6月までの間に、当科不妊外来に通院加療中の患者119例より採取された余剰精液を同意を得て対象とした。検体を用手法にてシャーレに採取し、37℃大気下で30分間液化処理後、computer assisted semen analyser (CASA, Cell Soft, Cryo Resources, Ltd., NY, USA)により測定後の精液を、300gで5分間遠心処理し、得られた精漿を測定まで-30℃で、金属汚染のないことを硝酸溶出試験により確認されたプラスチックチューブ (sampling tube, 1.5 ml, eppendorf-IATRON, Tokyo, Japan)を用い凍結保存した。

マクラー精子分析カウントチェンバー (Makler counting chamber, Sefi-Medical Instruments, Israel) を使用し位相差顕微鏡下に200倍で、精子濃度、精子運動性パラメーター (velocity: $\mu\text{m}/\text{sec}$, linearity, ALH (amplitude of lateral head displacement): μm) をCASAを使用し測定した。

測定に使用する器具には、中性洗剤およびアルカリ性洗剤で洗浄後、硝酸溶液 (HNO_3 : 脱イオン水=1:1) に1~2日浸漬し、脱イオン水でさらに洗浄して脱金属処理をおこなった。検体を室温で融解後、マイクロウェーブオーブンによる湿式灰化法により分解操作 (digestion) を行い無機化処理し、検体中の各種元素濃

度を以下の方法で測定した。

(1) Na, K, Ca, Zn, Mgの濃度は、フレイム原子吸光法 (FAAS: flame atomic absorption spectrometer) で測定した¹⁴⁾。アセチレン-空気フレイム中で試料中の元素を原子化し、原子固有の吸収度を測定することによりFAAS (Hitachi Z-8100 Hitachi Co., Tokyo, Japan) を使用し定量を行った。

(2) P濃度は、比色法 (Colorimetric method) で測定した¹⁵⁾。検体600 μl に2Mの硫酸200 μl と7.8 mMのモリブデン酸アンモニウムを混合し、5%のアスコルビン酸と2 mMの酒石酸の混合液160 μl を加え、さらに蒸留水840 μl を加えた。10分間放置後、880 nmの波長で standard calibration curve より濃度を測定した。

(3) 計44元素 (Li, Be, V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Y, Zr, Mo, Ag, Cd, In, Sn, Sb, Te, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Hg, Tl, Pb, Bi, Th, U) の測定は、マイクロ波-プラズマ質量分析法 (MIP-MS: Microwave induced plasma-mass spectrometry) によって行った¹⁶⁾。MIP-MSには、type P-7000 (Hitachi Co., Tokyo, Japan) を使用し、プラズマガスおよびキャリアガスとして高純度窒素ガス (99.999%) を用いての条件設定で測定を行った。

2. *In vitro* における金属元素曝露と精子運動性の検討

精漿中金属元素濃度と精液所見 (精子運動性) の検討で関連性が示唆された亜鉛と銅を選択し、それらの*in vitro* における精子運動性への影響を検討した。

当科で卵管性不妊症の診断により、体外受精-胚移植 (IVF-ET) で治療されている男性因子のない患者10例の余剰精液を同意を得て使用した。運動精子は精液を液化後 modified HTF (hepes-buffered human tubal fluid, Irvine Scientific, CA, USA) に混和して10 mlの精子浮遊液としたのち、300gで5分間遠心洗浄後、10%SSS (serum substitute supplement, Irvine Scientific, CA, USA) 添加 HTF を用いて1時間 swim-up 処理し回収した。

亜鉛は $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を、銅は $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を用い蒸留水を溶媒に500 mg/ml (Znとして113.9 mg/ml), 50 mg/ml (Cuとして12.8 mg/ml) の濃度でそれぞれの stock solution を作り、使用まで室温で保存した。精子浮遊液には、精子生存可能濃度及び浸透圧による予備実験から精子培養液中の濃度を $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ では

100 $\mu\text{g/ml}$ (Zn; 22.8 $\mu\text{g/ml}$), 300 $\mu\text{g/ml}$ (Zn; 68.3 $\mu\text{g/ml}$), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ では 25 $\mu\text{g/ml}$ (Cu; 6.4 $\mu\text{g/ml}$), 50 $\mu\text{g/ml}$ (Cu; 12.8 $\mu\text{g/ml}$) として調整し使用した。HTF は plastic culture dish (FALCON, 35-3037 center-well organ culture dish, Becton Dickinson, NJ, USA) に 1 ml の容量で入れ 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 , 95~98% 相対湿度条件下に運動精子を培養した。対照 HTF には培養液 1 ml に 2 μl の蒸留水を加えた。また、各実験毎に培養液の pH を pH メーター (TOA pH meter, HM-30S, TOA Electronics Ltd., Tokyo, Japan) で、浸透圧を氷点降下法により浸透圧メーター (Osmotic Pressure Auto & STAT OM-6030, OM-6030, 京都第一科学) で測定した。

運動精子を最終精子濃度 $20 \times 10^5/\text{ml}$ に調整し, culture dish に注入した (2~5 μl)。精子運動性を CASA を用いて培養開始 0, 1, 3, 5 および 24 時間後に測定した。

3. 統計検定

精漿中元素濃度と精液所見パラメーターの関係は, unpaired-*t* test (StatView 4.11, Macintosh) により検討した。亜鉛, 銅を用いた金属曝露と精子運動性の変化については paired-*t* test で検討した。

結 果

1. 精漿中元素濃度と精液所見の関係

測定された 50 元素の 119 例における精漿中濃度について, 全例で検出された元素は以下の 11 種類であった。Na (3088.094 ± 474.437 , mean $\pm$ SD $\mu\text{g/ml}$), Mg (147.280 ± 72.115), P (1053.094 ± 211.133), K (694.000 ± 409.877), Ca (365.878 ± 136.316), Fe (0.301 ± 0.293), Cu (0.164 ± 0.084), Zn (210.012 ± 101.347), Se (0.103 ± 0.031), Rb (1.138 ± 0.457), Sr (0.083 ± 0.043)。また, 精漿中元素濃度と精液量, 精子濃度, 精子運動率, total sperm number (TSN = 精液量 $\times$ 精子濃度) の 4 要素の検討を行い, 関連性が指摘された亜鉛, 銅, カドミウムについての結果を以下に示す。尚, その他 47 元素については明らかな統計的関係を認めるものはなかった。

精漿中亜鉛濃度と精子運動率との関係を図 1 に示す。亜鉛濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 未満群の運動率は $46.3 \pm 22.8\%$, 亜鉛濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上から 300 $\mu\text{g/ml}$ 未満群は $49.1 \pm 29.8\%$ であり, 亜鉛濃度 300 $\mu\text{g/ml}$ 以上の群ではじめて運動率が $32.4 \pm 27.7\%$ に有意に低下した ($p = 0.0161$)。

精漿中銅濃度と精子運動率の関係を図 2 に示す。銅

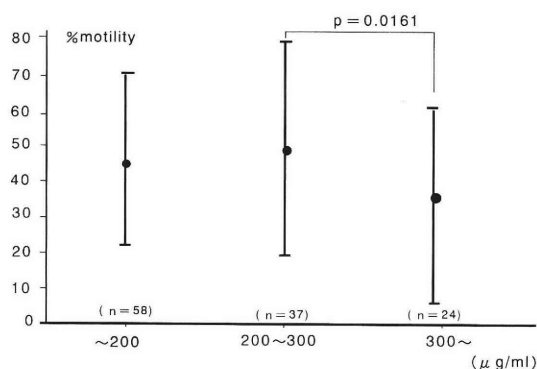


図 1 精漿中亜鉛濃度と射出精子運動率の関係

(~200: 精漿中亜鉛濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 未満群, 200~300: 精漿中亜鉛濃度 200 $\mu\text{g/ml}$ 以上 300 $\mu\text{g/ml}$ 未満群, 300~: 精漿中亜鉛濃度 300 $\mu\text{g/ml}$ 以上群), (mean $\pm$ SD)

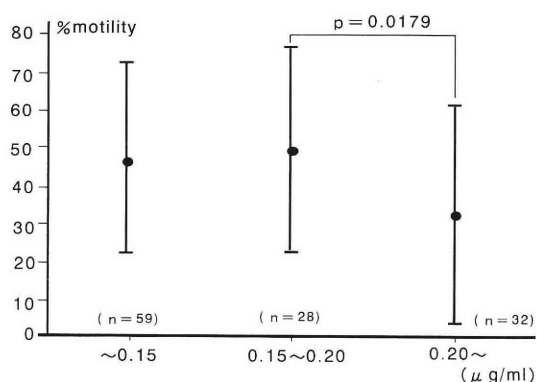


図 2 精漿中銅濃度と射出精子運動率の関係

(~0.15: 精漿中銅濃度 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 未満群, 0.15~0.20: 精漿中銅濃度 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 以上 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 未満群, 0.20~: 精漿中銅濃度 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以上群), (mean $\pm$ SD)

濃度 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 未満群の運動率 $48.7 \pm 23.8\%$, 銅濃度 0.15 $\mu\text{g/ml}$ 以上から 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 未満群は $48.8 \pm 27.5\%$ であり, 銅濃度 0.20 $\mu\text{g/ml}$ 以上群ではじめて運動率が $32.7 \pm 27.7\%$ に有意に低下した ($p = 0.0179$)。

精漿中カドミウム濃度では TSN で統計的関係を認めた。カドミウム濃度が 0.001 $\mu\text{g/ml}$ 未満群では TSN が $456.1 \pm 443.7 \times 10^6$ 個であり, 他の 2 群との間に有意差を認めた ($p = 0.0152$) (図 3)。

2. 亜鉛, 銅曝露と精子運動性の変化

亜鉛曝露時間と精子運動性の変化について図 4 に示

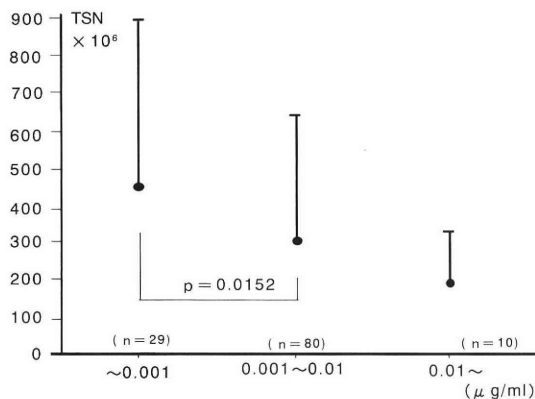


図3 精漿中カドミウム濃度と total sperm number (TSN) の関係

(~0.001: 精漿中カドミウム濃度 0.001 μg/ml 未満群, 0.001~0.01: 精漿中カドミウム濃度 0.001 μg/ml 以上 0.01 μg/ml 未満群, 0.01~: 精漿中カドミウム濃度 0.01 μg/ml 以上群), (mean ± SD)

す。精子運動率は 300 μg/ml 群 (Zn として 68.3 μg/ml) では曝露 1 時間後から対照と比較し有意に低下しはじめ、その後経時的に低下していった。100 μg/ml 群 (Zn として 22.8 μg/ml) では 24 時間後ではじめて対照と比較し有意に低下した。その他 linearity および velocity は 3 時間後から、ALH は 5 時間後から 300 μg/ml 群 (Zn として 68.3 μg/ml) で対照と比較し有意に低下しはじめた。100 μg/ml 群 (Zn として 22.8 μg/ml) では有意差は対照と比較し 24 時間後ですべてのパラメーターに認められるようになった。また、作成された亜鉛を含む精子培養液は 100 μg/ml (Zn として 22.8 μg/ml) では pH が精子の至適培養液 pH 7.2, 300 μg/ml (Zn として 68.3 μg/ml) では pH 7.0 であった。浸透圧は両群とも精子至適浸透圧 275~310 mOsm/kg. H₂O 以内であった。

銅曝露時間と精子運動性の関係について図 5 に示す。いずれの精子運動性パラメーターにおいても 25 μg/ml 群 (Cu として 6.4 μg/ml) では対照と比較し有意な変化は認められなかったが、50 μg/ml 群 (Cu として 12.8 μg/ml) では対照と比較して 3 時間後から velocity が、5 時間後から運動率が有意に低下しはじめ、linearity, ALH は 24 時間後ではじめて対照と比較し有意な低下を示した。また、作成された銅を含む精子培養液はすべての濃度で精子の至適培養液 pH 7.2~7.4 以内、

浸透圧も精子至適浸透圧以内であった。

考 察

近年、ダイオキシンを中心とした内分泌攪乱物質が注目されているが、大気、水質、土壌の工業化に伴う汚染の種類は多岐にわたる。そのような中でディーゼルなど化石燃料の燃焼に伴い発生する粉塵やガスの中には多量の重金属が含まれ、食物連鎖の頂点に立つヒトでは環境汚染により金属元素の過量の曝露を受ける可能性が高いことは容易に想像される。しかし、どの種類の重金属が男性生殖機能に対して如何に作用するのかについて詳細は不明であり、報告も少ない。

金属元素の一部は生体の恒常性維持には必要不可欠なものであるが、過剰あるいは欠乏はそれぞれ生体に中毒、欠乏症を発生することが知られている。一方、生殖内分泌系に対して多くの金属元素は有害に作用し、精巣内精細管上皮における精子形成に抑制的に作用する。例えば、鉛は血液-精巣関門 (blood-testis barrier) を通過するため、Winder の動物実験では血中濃度 35 μg/dl 以上の曝露で、精子形成の抑制が認められ、また精巣内ライディッヒ細胞のステロイドホルモン合成および活性を減弱させると報告している¹⁷⁾。また、Lancranjan らは、重度に鉛に曝露された労働者 (血中鉛濃度 40~50 μg/dl 以上) についての追跡調査で、奇形精子症、乏精子症が増加したと報告しており、他にも鉛と異常精液所見の相関を指摘するものが散見される^{18~20)}。

カドミウムにおいては、Parizek らの齧歯類を用いた動物研究によれば、1.1~1.2 mg/kg の投与で、選択的に精巣が傷害を受けることが報告されている²¹⁾。これは毛細血管内皮細胞への障害が精巣内精細胞の壊死をもたらすためと説明されている。北米とヨーロッパでは、食物、水、空気から 1 日あたり体に入るカドミウムは、10~40 μg/dl といわれ²²⁾、呼吸器系と比べ消化器系のカドミウム吸収は 5~10% 少ないと報告されている²³⁾。カドミウムの吸収経路のほとんどが呼吸器系であることを考慮すれば、発生源として喫煙 (タバコ 1 本あたり 1~2 μg のカドミウムが含まれている) は候補に挙げられる。喫煙習慣が生体に与える影響は多岐にわたるが、生殖内分泌系に与える影響として今までに喫煙が女性の妊孕性を低下させること、子宮外妊娠の頻度を高めること、流産の頻度を高めること^{24,25)}、体外受精 (IVF-ET) 後の胚の分割が遅延すること²⁶⁾、喫煙の影響を受けた胎児が出生後成人した際に妊孕性

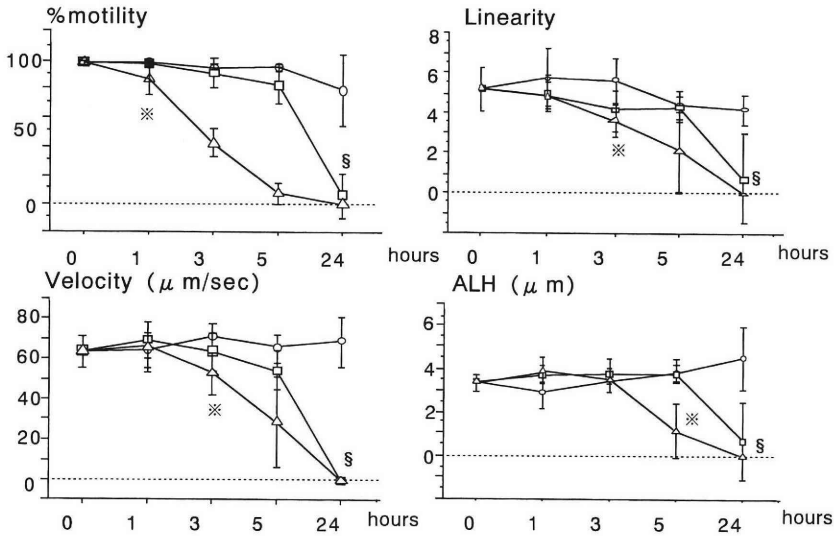


図4 亜鉛曝露後の精子運動パラメーターの経時的変化

□ ; 100 $\mu\text{g/ml}$, △ ; 300 $\mu\text{g/ml}$, ○ ; control, $n = 10$, mean $\pm$ SD
* $p < 0.01$, § $p < 0.01$

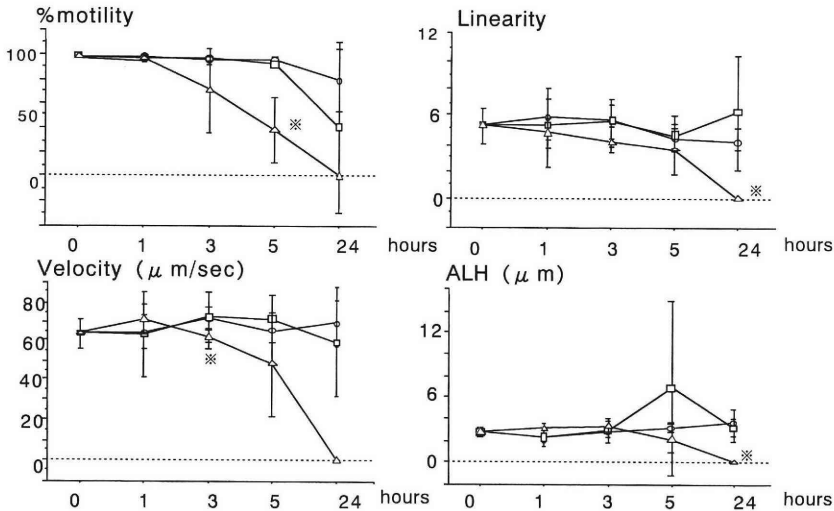


図5 銅曝露後の精子運動パラメーターの経時的変化

□ ; 25 $\mu\text{g/ml}$, △ ; 50 $\mu\text{g/ml}$, ○ ; control, $n = 10$, mean $\pm$ SD
* $p < 0.01$

が低下していること²⁷⁾などが報告されている。母体から男性胎児への作用も推測され、喫煙によるカドミウムの男性生殖機能への影響も無視できない。カドミウムの造精機能に対する抑制作用のために一回に射出さ

れる精液中の精子数(total sperm number, TSN)が喫煙の程度が増すにつれて減少することが予測されるが、Brinkmann 指数により検討した我々の予備研究では明らかな有意差を認めなかった(結果非記載)。しか

し、調査した群の喫煙習慣が延長した場合には、カドミウムの蓄積が進み、対象個人の TSC が今後さらに低下してくることが予想される。

一方、金属元素の中には精子形成、精子機能に必要な不可欠なものが存在する。中でも亜鉛は前立腺から分泌され、精液中では血液中より 200 から 300 倍の濃度で存在する重要な元素であり、Kvist らによれば、精子細胞膜および精子核の安定化に寄与するとされる^{28,29)}。Fawcett は受精の過程で雌性生殖器官内を通過する間に精子から遊離することで、精子の受精能獲得 (capacitation) が進行すると報告している³⁰⁾。しかし、精漿中高濃度亜鉛は射出精液中の精子運動性を抑制していることが本研究から明らかとなり、亜鉛の過剰状態は精子機能の低下に関連することが示唆された。運動精子を用いた *in vitro* における亜鉛添加実験では、精子運動性は濃度および曝露時間依存性に抑制されることが確認された。*In vitro* で検討した亜鉛濃度が精子運動性に影響があった精漿中亜鉛濃度より高いのは、精子培養液より精漿中の亜鉛結合蛋白が多いことに起因するものと考えられる。すなわち、蛋白非結合性の亜鉛濃度が精子運動性に直接影響すると考えられる。

精子機能における銅の役割については不明だが、精漿中高濃度銅は精子運動性の抑制と相関していた。Reblero らも *in vitro* での銅の精子運動性低下と受精能低下との相関について報告しており本研究と一致する³¹⁾。溶液中で銅イオンは一価と二価イオンの間で酸化還元反応を起こしているため、銅の過剰は精子細胞膜に対して過酸化反応を惹起、細胞膜の破壊につながり精子運動性を低下させる可能性が考えられる。また、今回行った *in vitro* の銅曝露による精子運動性の検討では、精漿と比較しより高濃度で有意な差を認めた。これは射出時に主に精子へ曝露される亜鉛と異なり、銅は *in vitro* よりも低濃度、長時間の曝露で精子運動性に影響を与えていることを示唆するものと考えられる。

生体が亜鉛、銅、カドミウムなどの金属元素の曝露を受け、体内にそれらの元素が過剰に存在すると、生体内ではメタロチオネインなどの金属結合性蛋白が主に肝臓で誘導されて増加することが知られている。メタロチオネインは 61 個のアミノ酸から成る蛋白で金属元素の過剰な曝露により誘導され、亜鉛、銅、カドミウム、水銀等と結合し、結合した金属元素を無毒化する^{32,33)}。精漿中にもメタロチオネインの存在が確認されており、他の重金属曝露により誘導された可能性

も考えられる。亜鉛はそのメタロチオネインに捕足されて測定されることから、精子運動性の障害は亜鉛ではなくメタロチオネインを誘導した他の金属元素であることも考えなければならない。以上のことを考慮すると、目的とする金属元素の精子機能、さらには男性生殖機能に対する影響の評価には多面的な評価が要求されることになる。

本研究では、ヒト精漿中元素濃度測定から精液所見に影響のある金属元素を調査し、統計的関係を認めた亜鉛、銅、カドミウムの 3 つの金属元素に絞り検討した。過剰の亜鉛、銅の存在は精子運動性を障害することで男性生殖機能を低下させることが示唆された。カドミウムは、長期的曝露により造精機能に作用し男性生殖機能を低下させることが推測された。これらのことから環境汚染やライフスタイルの変化に伴う金属元素の曝露は、微量ながらも精子機能に作用し男性不妊を増加させる可能性が指摘され、他の環境因子同様今後調査研究していく必要性が強調された。

文 献

- 1) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al. (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613
- 2) Gray LE, Ostby JS, Kelce WR (1997) A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 146: 11-20
- 3) Heimler I, Trewin AL, Chaffin CL, et al. (1998) Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod Toxicol* 12: 69-73
- 4) Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C (1994) The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102: 380-383
- 5) Gierthy JF, Spink BC, Figge HL, et al. (1996) Effect of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and 17 β -estradiol on estrogen receptor regulation in MCF-7 human breast cancer cells. *J Cell Biochem* 60: 173-184
- 6) Pajarinen J, Laippala P, Penttilä A, et al. (1997) Incidence of disorders of spermatogenesis in middle-aged Finnish men, 1981-1991: two necropsy series. *Br Med J* 314: 13-18
- 7) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al. (1995)

- Declining semen quality and increasing incidence of testicular cancer is there a common cause? *Environ Health Perspect* 103 (suppl 7) : 137-139
- 8) Ginsburg J, Hardiman P (1992) Decreasing quality of semen. *Br Med J* 305 : 1229
- 9) Irvine S, Cawood E, Richardson D, et al. (1996) Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Br Med J* 312 : 467-471
- 10) Joffe M (1996) Decreased fertility in Britain compared with Finland. *Lancet* 347 : 1519-1522
- 11) Sharpe RM, Skakkebeak NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 : 1392-1395
- 12) Xu B, Chia SE, Taskok M, et al. (1993) Trace elements in blood and seminal plasma and their relationship to sperm quality. *Reprod Toxicol* 7 : 613-618
- 13) Xuexhi J, Youxin L, Yilan W (1992) Studies of lead exposure on reproductive system: a review of work in China. *Biomed Environ Sci* 5 : 266-275
- 14) 千葉百子 (1996) 必須微量元素の血中濃度と測定法概論. *日本臨床* 54 : 179-185
- 15) 日本薬学会編 (1990) 衛生試験法注解. 金原出版, 東京, pp77-78
- 16) Shinohara A, Chiba M, Inaba Y (1994) Analysis of trace elements in biological materials by microwave induced plasma-mass spectrometry. *Jpn J Hyg* 49 : 924-934
- 17) Winder C (1989) Reproductive and chromosomal effects of occupational exposure to lead in the male. *Reprod Toxicol* 3 : 221-233
- 18) Lancranjan I, Popescu H, Gavenescu O, et al. (1975) Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Arch Environ Health* 30 : 396-401
- 19) Chowdhury AP, Chinoy NJ, Gautam AK, et al. (1986) Effect of lead on human semen. *Adv Contracept Deliv Syst* 2 : 208-210
- 20) Assennato G, Paci C, Baser M, et al. (1987) Sperm count suppression without endocrine dysfunction in lead exposed men. *Arch Environ Health* 42 : 124-127
- 21) Parizek J, Zahor Z (1956) Effects of cadmium salts on testicular tissue. *Nature* 177 : 1036-1038
- 22) Goy R (1991) Toxic effects of metals. In: Amuder MO, Dull J, Klaassen CD (eds.), 4th ed, Casarett and Doull's Toxicology. Pregum Press, New York, pp623-680
- 23) Friberg L, Elinder CG, Kjellstrom T, et al. (eds) (1986) Cadmium and health, volumes I and II: Boca Raton. CRC Press, Florida
- 24) Stillmann RJ (1989) Smoking and reproductive health. *Semin Reprod Endocrinol* 7 : 291-348
- 25) Baird DD, Wilcox AJ (1985) Cigarette smoking associated with delayed conception. *JAMA* 253 : 2979-2983
- 26) Hughes EG, YoungLai EV, Ward SM (1992) Cigarette smoking and outcomes of in-vitro fertilization and embryo transfer. a prospective cohort study. *Hum Reprod* 7 : 358-361
- 27) Weinberg CR, Wilcox AJ, Baird DD (1989) Reduced fecundability in women with prenatal exposure to cigarette smoking. *Am J Epidemiol* 129 : 1072-1080
- 28) Kvist U (1982) Spermatozoal thiol-disulphide interaction: a possible event underlying physiological sperm nuclear chromatin decondensation. *Acta Physiol Scand* 115 : 503-505
- 29) Huret JL (1986) Nuclear chromatin decondensation of human sperm: a review. *Arc Androl* 16 : 97-109
- 30) Fawcett DW (1958) The structure of the mammalian spermatozoon. *Int Rev Cytol* 7 : 195-234
- 31) Reblero L, Guadarrama A, Lopez T, et al. (1996) Effect of copper ion on the motility, viability, acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa *in vitro*. *Reprod Fertil Dev* 8 : 871-874
- 32) Suzuki T, Suzuki K, Nakajima K, et al. (1994) Metallothionein in human seminal plasma. *Int J Urol* 1 : 345-348
- 33) 小泉利明, 鈴木和男 (1996) 元素の生体内での役割. 健康と元素その基礎知識. 千葉百子, 鈴木和男編, 南山堂, 東京, pp 63-68

(受付: 2001 年 8 月 13 日)

(受理: 2001 年 11 月 26 日)

Influence of the Elements in Seminal Plasma on the Human Ejaculated Spermatozoa

Hiroko Yamada, Haruo Katayose, Kaoru Yanagida, Atsuko Shinohara¹⁾,
Momoko Chiba¹⁾, Kunihiro Tominaga²⁾ and Akira Sato

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Fukushima Medical University,
Fukushima 960-1295, Japan

¹⁾Department of Epidemiology and Environmental Health, Juntendo University School of
Medicine, Tokyo 113-8421, Japan

²⁾Loma Linda Clinic, Fukushima 963-8004, Japan

The aim of this study was to investigate the influence of some elements, especially metallic elements, on semen parameter. Density of 50 elements in the seminal plasmas which were collected from 119 patients were measured by using the flame atomic absorption spectrometry, colorimetric method or microwave induced plasma-mass spectrometry. Influences of zinc and copper that were determined to have some effects on the sperm motion was examined by exposing motile sperm in the metal containing medium *in vitro*. Sperm motility was significantly declined ($32.4 \pm 27.4\%$, mean $\pm$ SD, $p = 0.0161$) in the cases ($n = 24$) whose zinc density was over $300 \mu\text{g/ml}$ compared to the other groups ($46.3 \pm 22.8\%$; under $200 \mu\text{g/ml}$ ($n = 58$) $49.1 \pm 29.8\%$; 200 to $300 \mu\text{g/ml}$ ($n = 37$), respectively). Sperm motility was significantly declined ($32.7 \pm 27.7\%$, $p = 0.0179$) in the cases ($n = 32$) whose copper density was over $0.20 \mu\text{g/ml}$ compared to the other groups ($48.7 \pm 23.8\%$; under $0.15 \mu\text{g/ml}$ ($n = 59$), $48.8 \pm 27.5\%$; 0.15 to $0.20 \mu\text{g/ml}$ ($n = 28$), respectively). Total sperm number (TSN) was significantly higher ($456.1 \pm 443.7 \times 10^6$, $p = 0.0152$) in the cases ($n = 29$) whose cadmium density was under $0.001 \mu\text{g/ml}$, compared to the other groups ($302.9 \pm 340.8 \times 10^6$; 0.001 to $0.010 \mu\text{g/ml}$ ($n = 80$), $179.2 \pm 126.2 \times 10^6$; over $0.01 \mu\text{g/ml}$ ($n = 10$), respectively). In case of the $300 \mu\text{g/ml}$ zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) exposure *in vitro*, the significant decline of sperm motility, linearity, velocity and ALH were observed at the time of 1 hour, 3 hours, 3 hours and 5 hours after exposure, respectively, compared to control. In case of the $50 \mu\text{g/ml}$ copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) exposure *in vitro*, the significant decline of sperm motility, linearity, velocity and ALH were observed at the time of 5 hours, 24 hours, 3 hours and 24 hours after exposure, respectively, compared to control.

In conclusion, it was suggested that the excess amount of zinc and copper in seminal plasma was detrimental for male reproductive ability by reducing sperm motile activity, whereas it was possibly suggested that cadmium had toxic effect on the spermatogenesis.

Key words : human ejaculated sperm, seminal plasma, copper, zinc, cadmium

(Jpn J Fertil Steril 47: 47-54 2002)

当科における体外受精後多胎妊娠に関する後方視的検討

Retrospective Analysis of Multiple Pregnancies in *In Vitro* Fertilization

本田 徹 郎
Tetsuro HONDA

梅 岡 弘一郎
Kouichiro UMEOKA
高 橋 晃
Akira TAKAHASHI

中 堀 隆
Takashi NAKAHORI

倉敷中央病院産婦人科
Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Central Hospital,
1-1-1 Miwa, Kurashiki, Okayama, 710-8602, Japan

磯 崎 八重子
Yaeko ISOZAKI
高 橋 司
Tsukasa TAKAHASHI

倉敷中央病院臨床検査科
Department of Laboratory Medicine, Kurashiki Central Hospital,
1-1-1 Miwa, Kurashiki, Okayama, 710-8602, Japan

馬 岡 陽
Yo UMAOKA

小野レディースクリニック
Ono Ladies Clinic, 538-3 Nishihonmachi, Ono, Hyogo, 675-1375, Japan

当科では体外受精の発育良好胚移植数は最大3個で症例により2個にしている。この方針が多胎妊娠発生の面から妥当であるかを検討した。[研究方法] ①過去8年間の新鮮胚移植561周期の良好胚移植数と妊娠結果について解析した。良好胚は、day 2でG1-2の4 cell以上、day 3で、G1-2の8 cell以上、day 5で胚盤胞と定義した。②新鮮胚・凍結胚周期で妊娠し妊娠12週以降に分娩した症例について、分娩週数と経過を調査した。[結果] ①形態良好胚移植数が0, 1, 2, 3個と増えるにつれ、生産率(3.1%, 11.2%, 23.5%, 29.1%)は増加した($p < 0.001$)。さらに、(A)良好胚総数2個でその2個を移植した群、(B)良好胚総数が3個以上であったが多胎回避のために2個のみ移植した群、(C)良好胚が3個以上あり3個を移植した群、の3群を比較すると、生産率は(A) 22.2%, (B) 27.0%, (C) 29.1%と、 $A < B \approx C$ であった。また(B)と(C)の多胎妊娠率は、双胎(B) 10.0%, (C) 25.0%で、品胎(B) 0%, (C) 2.3%で、 $B < C$ であった。②単胎93例、双胎24例、品胎3例のうち胎児発育に異常のない妊娠6~7カ月の流産率は双胎3例、品胎1例とすべて多胎妊娠であった。双胎の1例で1児に無脳児があった。妊娠24週以降生産例の帝王切開率は、単胎17.8%、双胎60.9%、品胎100%で多胎において高かった($p < 0.001$)。[結論] 多胎妊娠は早産率が高く、双胎品胎ともに回避が望ましいと考えられた。良好胚が多い場合3個移植を2個移植にすることで生産率を下げずに多胎妊娠率を低下できる可能性が示された。しかし双胎発生をゼロに近づけるには将来的に1個移植に向かう努力が必要である。

キーワード：体外受精，多胎妊娠，移植胚数，早産，帝王切開率

緒 言

多胎妊娠は早産・低出生体重など児のリスクと切迫早産・妊娠中毒症・帝王切開分娩増加など母体のリスクとなり、またその医療費の個人および公的負担の問題をもちかかえている。先進国では過去 20 年間に不妊治療における排卵誘発剤投与と体外受精の普及、および妊婦の高齢化に伴い、多胎妊娠が増加している。例としてアメリカでは、双胎分娩が全分娩に占める割合は 1980 年の 1,000 あたり 18.9 から 1998 年の 28.1 に増加し、同様に品胎以上の多胎は 100,000 あたり 37.0 から 193.5 に増加している¹⁾。当院は NICU を有するため紹介患者も含めて多胎妊娠の分娩が多く、最近 1 年間では全分娩あたり双胎が 4.1%、品胎が 0.53% であった。当科でも多胎分娩率は年々増加している。

体外受精による生産のうちで多胎妊娠の頻度は、1995 年の世界統計で双胎が 24.7%、品胎が 4.1%、四胎が 0.2% である²⁾。また日本では、1998 年の統計で双胎と品胎がそれぞれ 21.2%、2.3% である³⁾。

体外受精における多胎妊娠を回避するためには 1 回の移植胚数を減らすことが肝要であるが、特にヨーロッパ諸国でこの問題に関心が高いようであり、移植胚数を 2 個に制限している施設があり、ベルギーでは 1998 年以降、2 胚移植周期数が 3 胚移植周期数を上回っており、さらに近年では 38 歳未満の症例に対しては 1 個に制限する提案がなされている⁴⁾。一方、アメリカや日本では多胎妊娠に関して比較的寛容なようであり、日本でも学会レベルで移植胚数を 2 個以下にする動きはなく、多胎妊娠を減らす努力は各医療施設に委ねられている。

妊娠率を可能なかぎり低下させずに移植胚数を減少させるには、より implantation potential の高い「良好」な胚を選択することが必要となる。良好胚の選択方法として、前核期、受精後 2~3 日目(以下 day 2-3)の分割期、day 5 の胚盤胞期、とそれぞれに良好胚の特徴が報告されているが、いまだどの方法が最もすぐれているかについては明確な結論は出ていない⁵⁾。

当科では基本的に day 2, day 3 もしくは day 5 に良好胚 3 個の移植を行っている。ただし若年齢で既往治療回数が少なく発育良好胚が多い場合など、多胎発生リスクが高いと考えられる症例では、患者本人と相談して移植胚数を 2 個にとどめている。しかし初回であろうとも 1 個移植は施行していない。この治療方針が妥当なものであるかどうかを、臨床妊娠率や多胎発生

率および妊娠経過と児の発育経過をもとに retrospective に検討した。

対象と研究方法

(1) 胚形態・移植個数と妊娠結果

当科で体外受精を開始した 1993 年から 2000 年 12 月までに体外受精を受けて胚移植にまで至ったのは、新鮮胚 561 周期と凍結胚 173 周期で合計 734 周期(220 症例)であった。このうち新鮮胚 561 周期について、治療時年齢、採卵回数、胚の形態と個数、妊娠結果について解析した。凍結融解胚は融解してその日に移植することが多く、発育良好か否かの評価が困難であると考えたので検討から除外した。移植日は、day 2 が 424 周期、day 3 が 116 周期、day 4 が 3 周期、day 5 が 18 周期であった。胚の形態については、day 2 では、Veeck 分類 Grade 1-2 で 4 cell 以上を、day 3 では、Grade 1-2 で 8 cell 以上を、day 4 では桑実胚以上を、day 5 では胚盤胞以上を発育良好とした。採卵回数は初回を 1 回目と数え、また他院での治療は数えなかった。

妊娠結果については、「生産」「死産」「流産」「妊娠なし」に分類した。超音波診断にて胎嚢が認められたが妊娠 11 週までに流産したもの、および子宮外妊娠を「流産」、化学妊娠および妊娠に至らなかったものを「妊娠なし」とした。生産、死産、流産を臨床妊娠とした。また、胎児数は生産および死産症例における分娩児数とした。したがって、妊娠 11 週以前に胎内死亡にいたった胎児は数えていない。

(2) 胎児数と分娩週数

新鮮胚周期および凍結胚周期で妊娠し、妊娠 12 週以降に分娩した単胎 93 例、双胎 24 例、品胎 3 例について、分娩週数、経過などを調査した。また特に超低出生体重児と極低出生体重児については可能なかぎりその発達を追跡した。当院は NICU を有し、当科で体外受精を受け早産に至った症例は全例当院小児科で follow を受けていたので小児科の協力のもと追跡調査を行った。

統計方法は、多因子解析には stepwise regression を、2 群間比較には unpaired *t*-test を、多群間比較には ANOVA を用いて、いずれも信頼度 95% 以上をもって有意とした。

結 果

(1) 胚形態・個数と妊娠結果

表 1 新鮮胚移植周期における妊娠周期と非妊娠周期の比較

	妊娠周期 (n = 141)	非妊娠周期 (n = 420)	P	F
年齢	32.0±4.3	34.4±4.8	0.0001	26.5
移植時の発育良好胚総数	3.57±2.86	2.14±2.14	0.0001	39.2
移植総数	2.95±0.64	2.64±1.03	0.0008	
発育良好胚の移植数	2.11±0.94	1.50±1.10	0.0001	19.4
採卵回数(初回は 1)	2.28±2.04	2.94±2.41	0.0039	

表 2 新鮮胚移植周期における、発育良好胚移植数と妊娠率、生産率および多胎妊娠率

発育良好胚移植数	臨床妊娠(率)	生産(率)	生産中双胎(率)	生産中品胎(率)
0 個(n = 97)	8(8.2%)	3(3.1%)	1(33.3%)	0(0%)
1 個(n = 169)	30(17.8%)	19(11.2%)	2(10.5%)	0(0%)
2 個(n = 136)	43(31.6%)	32(23.5%)	6(18.8%)	1(3.1%)
3 個(n = 151)	59(39.1%)	44(29.1%)	11(25.0%)	1(2.3%)
4 個(n = 8)	1(12.5%)	1(12.5%)	1(100%)	0(0%)
計 n = 561	141(25.1%)	99(17.6%)	21(21.2%)	2(2.0%)

表 3 発育良好胚 2 個移植症例において発育良好胚数の違いによる妊娠率、生産率および多胎妊娠率

発育良好胚数	臨床妊娠(率)	生産(率)	生産中双胎(率)	生産中品胎(率)
2 個のみ(n = 99)	27(27.3%)	22(22.2%)	5(22.7%)	1(4.5%)
3 個以上(n = 37)	16(43.2%)	10(27.0%)	1(10.0%)	0(0%)
計 n = 136	43(31.6%)	32(23.5%)	6(18.8%)	1(3.1%)

新鮮胚移植 561 周期の臨床妊娠は 141 周期(移植あたり 25.1%)、生産は 99 周期(移植あたり 17.6%)、であった。また生産 99 例のうち双胎は 21 例(21.2%)、品胎は 2 例(2.0%)であった。患者背景であるが、年齢 33.8 ± 4.8 歳(mean $\pm$ S.D., 以下同様)、移植日における発育良好胚数 2.5 ± 2.4 個、移植胚数 2.7 ± 1.0 個、うち発育良好胚の移植数 1.7 ± 1.1 個、採卵回数 2.8 ± 2.3 回目(他院での治療回数は含まない)、であった。

まず臨床妊娠率に影響を及ぼす因子について検討した。検討因子は、年齢、発育良好胚総数、移植総数、発育良好胚の移植数、採卵回数、の 5 因子である。表 1 に、この 5 項目について、妊娠周期と非妊娠周期における比較を示した。各因子について unpaired *t* test を行くと、5 因子すべてにおいて 2 群間に有意差が認められた。しかし、多因子解析を行うと、移植時の発育良好胚総数($F = 39.2$)、年齢($F = 26.5$)、発育良好胚

の移植数($F = 19.4$)、の 3 因子が妊娠率に影響していた。すなわち、移植胚数(良好胚と非良好胚の移植数合計)は今回の検討では妊娠率に影響していなかった。

そこで発育良好胚の移植数と妊娠率、生産率、多胎妊娠率の関係を検討した(表 2)。発育良好胚の移植数が増えるにつれて臨床妊娠率、生産率ともに増加する($p < 0.001$, ANOVA)が、良好胚 4 個移植群はいわゆる着床不全症例であり妊娠率は低い。多胎妊娠率については、妊娠症例数が少なく有意差は認められなかったが、発育良好胚の移植数が増えるにつれて多胎妊娠率が増加する傾向がみられた。

発育良好胚を 2 個移植した症例には、発育良好胚が 2 個しかなかった症例と、発育良好胚が 3 個以上あったが多胎妊娠を危惧して 2 個しか移植しなかった症例がある。その両群および良好胚 3 個移植群の妊娠結果を比較した(表 3)。すると、有意差はなかったものの、

表4 体外受精後の単胎・双胎・品胎の分娩週数の分布

分娩週数	単胎	双胎	品胎
12—15	2 ^a		
16—19			
20—23	1 ^b	1	1
24—27		2 ^c	
28—31			1
32—35	6	3 ^d	1
36—	84	18	
計	93	24	3

a 1 例が染色体異常、2 例とも胎内死亡、

b 染色体異常による人工妊娠中絶

c 表 5 に児の経過を示した、

d 1 例において 1 児が無脳児、

全良好胚 2 個群に比べて全良好胚 3 個以上移植 2 個群は妊娠率・生産率ともに高く、全良好胚 3 個以上の群では妊娠率 43.2%、生産率 27.0%、と良好胚 3 個移植群のそれ（それぞれ 39.1%、29.1%）に匹敵する結果であった。また全良好胚 3 個以上移植 2 個群の多胎妊娠率は生産あたり 10.0% であり、良好胚 3 個移植群のそれ（27.3%）に比べて多胎妊娠の発生率が低かった。

(2) 胎児数と分娩週数

新鮮胚周期および凍結胚周期で妊娠し、妊娠 12 週以降に分娩した単胎 93 例、双胎 24 例、品胎 3 例について、分娩週数を表 4 に示した。単胎 93 例中、3 例が死産しているが、2 例は染色体異常で 1 例は胎内死亡であった。他の 90 例は妊娠 32 週以降に生産し児の経過も良好である。双胎 24 例中、3 例が妊娠 6～7 カ月に早産（23 週死産、24 週生産、25 週生産）している。これら 3 例はいずれも胎児発育には異常がなく、いわば純粹な早産である。24 週に早産した双胎は生後 7 カ月半（修正 3 カ月半）の時点で発達遅延はないが、頭部 MRI にて第 1 児・第 2 児にそれぞれ右側・両側の cystic PVL が認められており、今後の発達に関して経過観察が必要である。25 週に早産した双胎は生後 11 カ月半（修正 8 カ月）の時点で発達遅延はなく、2 児ともに頭部 MRI にて異常なく、おそらく正常に発達することが期待できる。33 週に分娩した双胎の 1 例において 1 児が無脳児であったが 1 児は問題なく経過した。他の双胎 20 例は 32 週以降に生産し児の経過も良好である。品胎 3 例中、1 例が 21 週に死産しているが、胎児発育に異常はなかった。他 2 例はそれぞれ 30 週と 32 週に

生産し児の発達も良好である。このように、胎児に異常のない妊娠 6～8 カ月の流早産はすべて多胎であった。

分娩様式であるが、妊娠 24 週以降に生産した症例における帝切率は、単胎で 17.8% (16/90)、双胎で 60.9% (14/23)、品胎で 100% (2/2) で多胎において帝切率が高かった ($p < 0.001$, ANOVA)。

考 察

当科における新鮮胚移植周期の臨床妊娠率および生産率はそれぞれ 25.1%、17.6% であった。1998 年の日本産婦人科学会の集計³⁾によると、新鮮胚移植 15,284 周期の臨床妊娠率と生産率はそれぞれ 20.9% (3192 周期)、13.4% (2054 周期) であるから、当科の成績は日本の標準的な水準にあると考えられる。また生産あたりの多胎率は、当科では双胎が 21/99 (21.2%) 品胎が 2/99 (2.0%) であり、日本産婦人科学会の同報告ではそれぞれ 21.2%、2.3% であるから、多胎発生率についても日本の標準的な水準にあると思われる。

妊娠率に影響する因子の多因子解析から発育良好胚の総数、年齢、良好胚の移植数が大きな影響をもつ因子であることが示された。次に良好胚の移植数と妊娠率、生産率の関係を調べたところ、良好胚の移植数が 0, 1, 2, 3 個と増加するにつれて妊娠率、生産率ともに上昇した。しかし、(A) 良好胚総数 2 個でその 2 個を移植した群、(B) 良好胚総数が 3 個以上であったが多胎回避のために 2 個のみ移植した群、(C) 良好胚が 3 個以上あり 3 個を移植した群、の 3 群を比較すると、それぞれ妊娠率は (A) 27.3%、(B) 43.2%、(C) 39.1% で、生産率は (A) 22.2%、(B) 27.0%、(C) 29.1% で、いずれも $A < B \approx C$ という結果であった。また (B) と (C) の多胎妊娠率は、双胎 (B) 10.0%、(C) 25.0% で、品胎 (B) 0%、(C) 2.3% で、 $B < C$ という結果であった。今回の検討は無作為群間比較検討でなく、(B) 群の症例選択には、医師と患者の相談というバイアスがかかっているが、3 個以上の良好胚があったときに移植数を 2 個に制限しておく、妊娠・生産率を低下させずに多胎発生率を低下できる可能性が示唆された。

良好胚移植数を 3 個から 2 個に減少することによって多胎発生率を低下させる報告はいくつかあり、Templeton らはイギリスの 78,325 周期を retrospective に解析して 5 個以上の受精卵が得られた場合に 3 個移植と 2 個移植との比較では生産率に差がなく多胎発生率が後者で低いことを示した⁵⁾。また Milki らは胚盤胞

移植にて、平均 5.4 個の胚盤胞が得られた症例を 3 個移植群と 2 個移植群にわけて比較し、それぞれの妊娠率が 58%, 62%, 双胎率が 50%, 39%, 品胎率が 29%, 0% という成績を報告している⁶⁾。このように、implantation potential の高い良好胚が多数ある場合には、3 個移植のかわりに 2 個移植にしても妊娠率を下げずに多胎率を減少できると考えられる。

良好胚移植数が 3 個から 2 個になると品胎はほとんどなくなると思われるが、双胎は一定頻度で発生する。日々の診療において、日本では患者と家族らは双胎妊娠に対して一般に寛容であるように感じられる。体外受精を受けるまでに長い期間の不妊治療を受けてきた患者や家族にとっては、双胎妊娠は一度にふたりの子供にめぐまれ、不妊治療から解放される安堵感があるように思われる。われわれもこれまで体外受精における双胎妊娠は許容範囲であると考えていた。しかし、今回単胎・双胎・品胎の分娩週数を検討したところ、双胎 24 例中、3 例が妊娠 6~7 カ月に早産していた。また帝切率も単胎にくらべて双胎では高率であった。これらのことから、双胎妊娠もできるかぎり減少させる努力が必要であろうと考えられた。なお双胎妊娠 24 例中 1 例の 1 児に無脳児があった。体外受精では無脳児、二分脊椎、水頭症、食道閉鎖の頻度が自然妊娠に比べて高く、その多くが双胎であるという報告がある⁷⁾。

双胎妊娠も限りなくゼロに近づけるには、良好胚の 1 個移植という方法しかないと思われる。しかし、良好胚の 1 個移植にて高い妊娠率が得られたという報告もあるものの、まだ数は少ない^{8,9)}。当科では全く実績もないため、患者側に説得力のある説明を行うことは現在の段階ではむずかしいと思われる。今しばらくは、妊娠率の高い、すなわち高齢でなく、良好胚が多く、既往採卵回数が少ない症例を対象として、良好胚移植数を 2 個にとどめることが現実的な選択でないかと思われる。今後 implantation potential の高い胚を選択する技術を向上させ、やがては 1 個移植が可能となるよう努力していきたいと考えている。

謝 辞

今回の論文作成にご指導ご協力をいただきました、当院小児科 NICU センター長、亀山順治先生ほかの先生方に深謝いたします。

文 献

- 1) Ventura SJ, Martin JA, Vurtin SC, et al. (2000) Births' final data for 1998. Natl Vital Stat Rep 48: 1-100
- 2) De Mouzon J, Lancaster P (1997) World Collaborative Report on *in vitro* fertilization, preliminary data for 1995. J Assist Reprod Genet 14S: 251-265
- 3) 本庄英雄, 伊吹令人, 野田洋一, 他 (2001) 平成 11 年度生殖医学登録報告 (平成 10 年分の臨床実施成績—国際統計報告書). 日産婦誌 53: 665-682
- 4) Gerris J, Van Royen E (2000) Avoiding multiple pregnancies in ART; a plea for single embryo transfer. Hum Reprod 15: 1884-1888
- 5) Templeton A, Morris JK (1998) Reducing the risk of multiple births by transfer of two embryos after *in vitro* fertilization. N Engl J Med 339: 573-577
- 6) Milki AA, Fisch JD, Behr B (1999) Two-blastocyst transfer has similar pregnancy rates and a decreased multiple gestation rate compared with three-blastocyst transfer. Fertil Steril 72: 225-228
- 7) Hazekamp J, Bergh C, Wennerholm U, et al. (2000) Avoiding multiple pregnancies in ART; consideration of new strategies. Hum Reprod 15: 1217-1219
- 8) Vilska S, Tiitinen A, Hyden-Granskog C, et al. (1999) Elective transfer of one embryo results in an acceptable pregnancy rate and eliminates the risk of multiple birth. Hum Reprod 14: 2392-2395
- 9) Gerris J, De Neubourg D, Mangelschots K, et al. (1999) Prevention of twin pregnancy after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection based on strict embryo criteria: a prospective randomized clinical trial. Hum Reprod 14: 2581-2587

(受付: 2001 年 9 月 25 日)

(受理: 2001 年 12 月 13 日)

Retrospective Analysis of Multiple Pregnancies in *In Vitro* Fertilization

Tetsuro Honda, Kouichiro Umeoka, Takashi Nakahori and Akira Takahashi

Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Central Hospital,
1-1-1 Miwa, Kurashiki, Okayama, 710-8602, Japan

Yaeko Isozaki and Tsukasa Takahashi

Department of Laboratory Medicine, Kurashiki Central Hospital,
1-1-1 Miwa, Kurashiki, Okayama, 710-8602, Japan

Yo Umaoka

Ono Ladies Clinic, 538-3 Nishihonmachi, Ono, Hyogo, 675-1375, Japan

Multiple pregnancy in ART is of great concern. In our institute, a maximum of 3 good embryos are transferred at one time. The live birth rate per transfer (LBR), multiple pregnancy rate per live birth (MPR), and pregnancy outcomes were retrospectively studied. In fresh IVF/ICSI cycles, the transfer of 0, 1, 2, and 3 good embryos ($n=97, 169, 136, 151$) resulted in increasing LBR (3.1%, 11.2%, 23.5%, 29.1%), respectively ($p<0.001$). We compared the following three groups; (A) only two good embryos were available, and the two were transferred ($n=99$), (B) more than two good embryos were available, and only 2 were transferred upon the patients' request ($n=37$), (C) three good embryos were transferred ($n=151$). LBR were (A) 22.2%, (B) 27.0%, (C) 29.1% ($A<B\approx C$), respectively. In contrast, MPR were (B) 10.0% (twin 10.0%, triplet 0%) and (C) 27.3% (twin 25.0%, triplet 2.3%), respectively. In singleton, twin, and triplet ($n=93, 24, 3$) live - /still-births after fresh/frozen-thawed cycles, the preterm delivery without fetal abnormalities at 20~27 wks was 0%, 12.5%, and 33.3%, and the cesarean section rate (24-wks) was 17.8%, 60.9%, and 100%, respectively. From these findings, when more than 2 good embryos are available, transfer of 2 embryos, instead of 3, may reduce MPR without affecting LBR. However, because twin pregnancies have a higher risk of preterm delivery and cesarean section than singleton, further efforts to avoid twins should be taken.

Key words: *in vitro* fertilization, multiple pregnancy, preterm delivery, cesarean section

(Jpn J Fertil Steril 47: 55-60 2002)

地 方 部 会 講 演 抄 録

第 124 回 日本不妊学会関東地方部会

日時：平成 13 年 6 月 9 日(土)午後 1 時 00 分～6 時 00 分

場所：日本都市センター会館（東京都）

1. Transport ICSI により妊娠した逆行性射精の 1 例

○高梨安弘，安部裕司，佐々木由香
塩川素子，祖母井英，渋谷幸裕
伊藤嘉奈子，中野由起子，雀部 豊
池永秀幸，間崎和夫，久保春海

（東邦大第 1 産婦）

三浦一陽

（東邦大泌尿器第 1）

射精障害による男性不妊のひとつに逆行性射精がある。不妊治療として、薬物による順行性射精が期待できない場合、膀胱から回収された精子により AIH が行われてきた。最近では ART の進歩により、IVF さらには ICSI による治療も報告されてきている。今回我々は、サテライト施設（横須賀）で採卵し、ART センターで胚移植を行う One way Transport ICSI により妊娠分娩に成功した症例を経験したので報告する。症例は 29 歳，平成 10 年 10 月，原発性不妊のため来院した。月経周期は 28 日型，順調，ホルモン値，子宮内膜日付診に異常はなかったが，両側卵管膨大部閉塞，不完全逆行性射精と診断された。前医にて AIH, IVF-ET が行われ，受精障害を指摘された。平成 12 年 4 月に採卵，精子は Hotchkiss 法に準じて膀胱内より回収し，ICSI を施行した。48 時間後，4 細胞期胚，Veeck 分類 grade 1, 2 の 2 個を胚移植し単胎妊娠した。妊娠経過は順調で，平成 13 年 1 月 12 日，妊娠 39 週 0 日，3,030 g の女児を正常分娩した。

2. 腹腔鏡下子宮形成術・筋腫核出術後妊娠に至った双角子宮の 1 例

○岸 郁子，小野寺成実，春日美智子
秋葉靖雄，小西康博，中野眞佐男

（済生会神奈川県産婦）

（目的）腹腔鏡下子宮形成術・筋腫核出術後妊娠に至った双角子宮の 1 例について検討した。（症例）症例は 33 歳，挙児希望にて近医受診し，子宮筋腫を指摘され平成 11 年 4 月当科初診となった。HSG 上，左内腔及び左

卵管のみ描出が認められ，MRI 検査では径 8.5 cm 大の筋層内筋腫と共に子宮内腔の分離が認められた。子宮筋腫を合併した双角子宮と診断した。AIH 6 回施行したが妊娠せず，平成 12 年 7 月腹腔鏡下に子宮形成術（Jones & Jones 手術）・子宮筋腫核手術を施行した。術後 AIH 1 回目にて妊娠が成立し，妊娠経過は順調であった。（結論）子宮筋腫は，子宮内腔を圧排することにより不妊原因となっていた。双角子宮に対して子宮形成術を施行することも不妊治療の一つの方法であると考えられた。手術の低侵襲性及術後の腹腔内癒着の可能性を考慮した場合，腹腔鏡下子宮形成術及び筋腫核出術は極めて有用であると考えられた。

3. Holmium YAG laser を用いた多嚢胞性卵巣症候群の腹腔鏡下治療

○清水亜紀，浅田弘法，佐藤健二
丸山哲夫，久慈直昭，末岡 浩
吉村泰典

（慶應義塾大産婦）

多嚢胞性卵巣症候群は排卵障害を主訴に来院する多くの患者に認められる。これに対し，hMG-hCG による誘発で卵巣過剰刺激症候群や多胎妊娠を起こした症例や hMG 無効症例には，当院では Holmium YAG laser を用いて卵巣焼灼術を施行している。症例は 33 歳，当院にて，平成 12 年より，クエン酸クロミフェンによる排卵誘発を 3 周期，hMG-hCG 療法を 2 周期施行するも排卵を認めなかった。このため Holmium YAG laser にて腹腔鏡下卵巣焼灼術を施行した。本症例においては卵巣焼灼術後の性ホルモン値の改善は認めなかったが，一過性の自然排卵は認めた。また，術前無効であったクエン酸クロミフェンは卵巣焼灼後，有効になった。これらの結果，Holmium YAG laser 使用による腹腔鏡下卵巣焼灼術は hMG 使用に苦慮する多嚢胞性卵巣症候群に対し有効であることが示唆された。

4. 低ゴナドトロピン性性腺不全症で発見された下垂体腫瘍の 1 例

○山崎多佳子，今本 敬，清水亮行
鈴木啓悦，市川智彦，伊藤晴夫

（千葉大泌尿器）

鈴木規之，中津裕臣，村上信乃

（旭中央病院泌尿器）

32 歳, 独身男性。性器發育不全を主訴に旭中央病院泌尿器科外来を受診した。外性器所見はターナーの分類で G1, Ph1 であった。PRL, LH, FSH の低値を認め、LH-RH テストでは反応 (-), hCG テストではテストステロンの上昇を認めた。性染色体は 46XY, SRY, DAZ (+) であった。下垂体 MRI を施行したところ、トルコ鞍内に径 1.5 cm の腫瘍を認めた。下垂体腫瘍は経過観察とし、性腺不全症に対して hCG/hMG 療法を行った。外性器は治療後、良好に発達、射精可となり、精液検査も治療を重ねるうちに精液量、精子濃度の上昇がみられた。

5. 男性不妊外来における Klinefelter 症候群の検討

○工藤貴正, 永尾光一, 吉田 淳
野沢英雄, 西見大輔, 須山太助
石井延久, 三浦一陽

(東邦大第一泌尿器)

1992 年 1 月より 2000 年 12 月まで 9 年間に不妊を主訴に受診した男性患者 3,062 人を対象とした。非閉塞性無精子症 (NOA) 514 例, Klinefelter (KL) 症候群 72 例中モザイクは 13 例であった。NOA 群の 14.2 % は KL 症候群であった。内分泌検査所見では FSH, LH 高値であった。初診時の年齢で有意な所見を認めなかった。平均精巣容積は 3.4 ± 1.6 ml で殆どが 5 ml 未満であり既報と一致するものであった。NOA 群 46, XY 症例との比較により, KL 症候群は高度な造精機能障害を示す一方で, LH が代償性に上昇していた。FSH においても造精機能反映の観点では良好であった。本症では視床下部-下垂体-精巣軸機能が保たれている事が推測された。本症における性腺機能不全の原因は精巣に限局する事が示唆された。

6. 精巣生検 12 年後に対側の精巣腫瘍の発生をみた停留精巣固定術後の無精子症の 1 例

○鈴木康太郎, 澤田卓人, 渡辺岳志
石塚榮一, 岩崎 皓

(横浜赤十字病院泌尿器)

45 歳男性。16 歳時に右精巣固定術を施行。不妊を主訴に 34 歳時に当科初診。精液検査で無精子症を認めたため両側精巣生検を施行。右の精巣は Sertoli cell only。左の精巣は瘢痕化した精細管の中にほぼ正常の精細管も一部でみられ、段階的な萎縮像を呈していた。精巣生検より 12 年後の 2001 年、左陰嚢腫大にて受診。

左精巣腫瘍の診断にて左高位除精術施行。病理は pure seminoma, 病期は clinical stage I であった。術前 LDH の高値を認めたが、術後速やかに正常化したため、Watchful waiting の方針にて退院となった。Retrospective に精巣生検時の病理組織と精巣腫瘍発症時の病理標本で, intratubular germ cell neoplasia の有無を胎盤性アルカリフォスファターゼ染色を用い検討した。結果はいずれの標本でも intratubular germ cell neoplasia は認められなかった。

7. TESE を予定していた患者に発見された精巣腫瘍の 1 例

○宮野佐哲, 馬場克幸, 松下和彦
星野孝夫, 矢島通孝, 岩本晃明

(聖マリアンナ医大病院泌尿器)

西田智保 (聖マリアンナ医大東横病院)

山川克典 (相模原協同病院)

症例は 33 歳男性。主訴は 2 年間の不妊。現病歴：近医より無精子症にて紹介受診となる。現症：精巣サイズは右側 14 ml, 左側 16 ml, 触診にて異常は認めず。内分泌学的検査では全て正常であった。無精子症の診断にて、患者は TESE+ICSI を希望され、3 カ月後に入院した。入院時の精巣触診にて、左精巣下極に腫瘤を触れ精巣腫瘍を疑った。US, MRI にて精巣腫瘍の診断にて、左高位精巣摘出術を行い、同時に精巣生検も施行した。病理結果は seminoma pT1 であり精巣生検は両側ともに Sertoli-cell-only であった。術後、FSH が術前と比較し上昇が見られ、腫瘍発生が造精機能に何らかの影響を及ぼしたと考えられるが詳細は不明である。最後に、男性不妊治療において、精液所見の改善や精子が得られればそれで良いと考えがちであるが、重大な疾患を合併している可能性があり、基本である視触診をおろそかにせず、治療を行なう必要性を痛感させられた症例であった。

8. TESE-ICSI により妊娠に至った膀胱外反症の 1 例

○徳岡 晋, 神山 洋, 鈴木寛規
吉田マキ, 高橋暁子, 吉田 淳

(木場公園クリニック)

三浦一陽 (東邦大第一泌尿器)

膀胱外反症 (BE) の男性に TESE-ICSI を実施し、妊娠に至った 1 症例を経験した。BE は発生の 2~3 週に確認される排泄腔膜の発達異常による先天性の膀胱、

外性器、下腹部の筋骨格系の奇形で、頻度は 3 万の出生に 1 人で男女比は 2.6~5.0 対 1。症例は 31 歳、男性。生後より、尿道造設術等 4 回実施し、4 回目の術後より膀胱ろうにて排尿管理。平成 12 年 7 月 22 日、挙児希望にて当院初診。身長；161 cm 体重；51 kg 性欲、勃起すべて正常。精液検査の結果は無精子症。精巣容積は左右 8 ml づつと減少、ホルモンの値はすべて正常。妻は 32 歳、OGOP。TESE-ICSI により、ET 後 14 日目の尿中 hCG 50 単位 (+)、7W4D に FHB (+)。現在、妊娠 34 週で経過順調、超音波上奇形はなし。BE 患者の生命予後は大幅に改善しており、挙児希望が増大している。次世代以降の遺伝カウンセリングや、妊娠中の胎児の慎重な観察が必要である。

9. 非刺激周期の未熟卵を用いた ICSI (IVM-IVF) による妊娠例

○児島孝久 (アモルクリニック)

排卵誘発剤が不要な不妊治療法では、卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) や多胎の防止可能となる。PCO や High responder 症例に対し、hMG を使用しない IVM-IVF を計 10 例 10 周期に実施し、その結果 2 例が妊娠に至ったので報告する。IVM-IVF の実施方法は、月経周期の 9~15 日目に、卵胞径が 7 mm、内膜厚 8 mm 以上になった時点で採卵。採卵針は外套 18 G、内套針 20 G 針を用い、小卵胞を穿刺吸引。頻回に針の洗浄を実施。回収された卵は hCG、FSH 入りの培養液 (TCM 199 + FSH + hCG) で一晩培養し、翌日と翌々日に M-II 卵に ICSI 施行。得られた胚を採卵 4 日目に移植、Bio-AHA、黄体サポート (E + P) を併用した。通常の採卵と比較して、手技の困難さ、採卵時の疼痛が強かった。その結果、採卵個数平均 7.8 個に対し、M-II 卵は 3.0 個、受精卵は 1.8 個で、妊娠 2 例とも胎嚢出現後 (妊娠 5 週、6 週) に流産に至った。IVM-IVF では不良卵の割合が高く未熟卵の培養法に改善の余地が、及び流産防止対策が必要と思われた。

10. 当院における TESE-ICSI の成績

○吉田 淳、徳岡 晋、神山 洋

吉田マキ、鈴木寛規、高橋暁子

(木場公園クリニック)

三浦一陽

(東邦大第一泌尿器)

1999 年 1 月から 2001 年 4 月までに実施した精巣内精子回収法 (TESE)-卵細胞質内精子注入法 (ICSI) についてまとめたので報告する。対象は、閉塞性無精子

症 32 例、射精障害 3 例、精巣腫瘍手術後 1 例、非閉塞性無精子症 50 例 (46, XY39 例、クラインフェルター症候群 11 例)。TESE は、非閉塞性無精子症には 1999 年 1 月から 11 月までは Multiple Biopsy 法を行い、1999 年 12 月からは Microdissection 法を行った。閉塞性無精子症、射精障害、精巣腫瘍手術後には従来通りの精巣生検を行った。非閉塞性無精子症のカップルに実施した新鮮精巣精子による ICSI (20 周期) と凍結精巣精子による ICSI (9 周期) の間で受精率、分割率、着床率、妊娠率、流産率で有意差を認めなかった。また、閉塞性無精子症、射精障害、精巣腫瘍手術後に実施した新鮮精巣精子による ICSI (33 周期) と凍結精巣精子による ICSI (27 周期) の間で受精率、分割率、着床率、妊娠率、流産率で有意差を認めなかった。

11. 胚移植時期と着床率、妊娠率に関する検討

○渋谷幸裕、雀部 豊、伊藤嘉奈子

塩川素子、橋田 英、中野由紀子

前村俊満、間崎和夫、安部祐司

久保春海

(東邦大産婦第 1)

[目的] 前核期における良好胚を後方視的に検討し、その良好胚を移植した症例について、移植時期が臨床成績に及ぼす影響を検討した。[方法] 2000 年 9 月から 2001 年 5 月までに採卵を施行した 84 症例 84 周期 (ET キャンセル: 6 周期) のうち前核に形成した 450 個の胚に対し前核の評価を行い、そのうち移植した 152 個の胚を対象とした。前核は①前核の距離-a: 接着, b: 近接, c: 離れている②核小体の同期性-5: 同期性あり, 3: 中間群, 0: 同期性なし, の 2 項目にて評価した。[結果] I 移植胚中の妊娠症例に移植した胚の割合 (%) - a-5: 87, a-3: 83, a-0: 0, b-5: 73, b-3: 46, b-0: 4, c-0: 0 であり a-5, a-3, b-5 と他の群に有意差を認めた。II a-5, a-3, b-5 を移植胚に含む症例の移植日別妊娠率 (%) Day 2: 94 (15/16), Day 3: 100 (4/4), Day 4: 80 (4/5), Day 5: 43 (3/7), Day 6: 0 (0/1) であった。[まとめ] 前核期における良好胚は移植日に関わらず好成績であった。

12. 胚盤法培養環境の比較検討

○岡 親弘

(東京 HART クリニック)

平成 10 年より体外受精および顕微授精の難治性不妊の患者に対して胚盤胞移植を行ってきたが、東京 HART クリニック開業より胚の培養環境の改善を行ったので、比較検討を行った。対象: 平成 12 年 1 月

より平成 13 年 4 月までの体外受精および顕微授精の患者で、2 回以上通常の胚移植を行って妊娠しなかった患者である。方法：受精後に以前は O_2 5% CO_2 5% N_2 90% の Mix gas で培養液は G1・2, G2・2 の順次培養で行った。一方東京 HART クリニックでは O_2 5% CO_2 6% N_2 89% とし培養液は同様であるがシステムは大幅に改善した。結果：培養液の PO_2 は 123 mmHg から 73 mmHg へ大きく改善した。胚盤胞到達率はそれぞれ 23% と 43% であった。BT キャンセル率と妊娠率は、それぞれ 27% と 16%、36% と 65% であった。結論：培養環境の改善により臨床データでも大幅に改善を認めた。

13. Sydney IVF 培養液による発生胚の凍結解凍移植成績

○高見澤 聡, 柴原浩章, 種市明代
平野由紀, 鈴木達也, 山内有子
佐藤郁夫 (自治医大産婦)
角田啓道 (同 附属病院臨床検査部)

【目的】当院の ART は '99 年 6 月以降、培養液は HTF から Sydney IVF に替え、新鮮胚移植における有用性を報告してきた。今回、凍結解凍胚移植 (F-ET) における Sydney IVF の有用性を検討した。【方法】'01 年 4 月までに当院で施行した F-ET125 周期を対象とした。凍結前-解凍後の使用培養液 [HTF (H) または Sydney IVF (S)] より H-H 群 77 周期、H-S 群 18 周期、S-S 群 30 周期に分け、良好胚維持率、着床率、妊娠率を比較した。また、後者 2 群は解凍後 Sydney IVF 使用の H・S-S 群 48 周期として一括し、H-H 群と比較した。【結果】H-H、H-S、S-S、H・S-S 各群の良好胚維持率 (54.7, 65.0, 85.5, 78.0%), 着床率 (5.8, 14.6, 13.2, 13.7%), 妊娠率 (13.0, 22.2, 26.7, 25.0%) であり、妊娠率に有意差は認めなかったが、良好胚維持率、着床率は H-H 群と他群間に有意差を認めた。【結論】F-ET にて、Sydney IVF は胚の質の改善・維持と着床率の改善をもたらした。その有用性が示唆された。

14. マウスにおける PCB (polychlorinated biphenyls) 曝露精子の体外受精への影響

○平井邦彦, 栗林 靖, 石塚文平
(聖マリアンナ医大産婦)

<目的>PCB 曝露された精子が受精率に影響を与えるか、Catalase (CAT), Thioredoxin (TRX) 前処置が、受精率を回復させるかを検討。<方法>CD-1 雌マ

ウスを PMSG-hCG 法にて卵を回収し、精子は、Percoll 法にて最終濃度 1×10^6 /ml で媒精し、受精率を観察。CAT 使用群は、Control 群、CAT 添加群、PCB 添加群、CAT+PCB 添加群と比較。TRX 使用群も同様に行った。<結果>静止前培養液中への CAT, TRX 添加はその後の体外受精による受精率には、変化を与えなかった。運動率に影響を与えない濃度での静止前培養液中への PCB 曝露は受精率の低下が見れた。カタラーゼ添加により有意な、受精率の回復が見られた。<結論>PCB は、精子運動能に影響させない濃度でも高濃度では受精能に何らかの影響を与えられ、CAT は、精子受精能に防御的に働いていると考えられた。

15. ヒト卵胞液中にある精子活性化物質

○森沢正昭, 吉田 学, 田中裕之
(東京大学理学系研究科)
森沢幸子 (聖マリアンナ医大生物学)
吉池美紀, 馬場克幸, 岩本見明
(同 泌尿器)
栗林 靖, 石塚文平 (同 産婦)

これまでヒト、ラット、マウスで卵胞液には精子の凝集、hyperactivation 様運動、走化性を起こす要因が含まれていると言われていたが、その実体は明らかでない。本研究で卵胞液が健康な男性から採取した受精能獲得以前の精子の運動を活性化すること、すなわち自動精液解析装置 (Cell Soft) による測定で運動速度 (velocity)、頭部振幅 (ALH) が増加する事が明らかとなった。この卵胞液による活性化は不妊外来来訪男性から採取した精子にもみられた。また、その効果は精子を希釈して数分でみられること、卵胞液中での精子の運動が hyperactivation 様運動であること、分子量は 3,000 以下であることが分かった。更にその実態を探るべく、エタノール、クロロホルム抽出により部分精製を行った所、水層に抽出された画分に顕著な活性がみられた。

16. ヒト精子形態標準画像の確立

○兼子 智, 郡山 智, 赤星晃一
黒島正子, 宮越 敬, 佐久間雄一
富永英一郎, 田辺清男
(東京歯大市川総合病院産婦)
西田智保, 岩本見明
(聖マリアンナ医大泌尿器)
コンピューター画像解析装置 (CAIA) による正常形

態精子観察において reference として用いる標準精子画像を得ることを目的とし、形態良好精子を精製するとともに精子頭部最大断面画像が得られるフィルター法を開発した。攪拌密度勾配法により精子を濃縮、swim down, cell affinity chromatography による先体反応誘起精子を精製した。さらに 20~40% Nycodenz 直線密度勾配中で沈降平衡を行い、密度が最も重い分画を回収した。0.03% ローズベンガルで 45°C, 30 分間染色を行ない、精子懸濁液を孔径 2.0 μm のメンブランフィルター上に吸引した後、観察に供した。精液中の精子頭部形態は多様であったが、精製後の精子分画ではほとんど均一な楕円形頭部を有しており、密度および運動能を指標した分画法を正常形態精子の選別に有用であることが示された。フィルター法はスメア法に比して精子頭部の長短径比の分布幅が小さく、精子頭部最大断面画像が得られることが示された。加温ローズベンガル染色法、フィルター法は精子形態の定量的観察に有用であると考えられる。

17. グラディエントポンプを用いたピュアセプション連続密度勾配による精子分離効率

○吉井 毅, 久慈直昭, 田中宏明

浅田弘法, 小澤伸晃, 末岡 浩

吉村泰典

(慶応大産婦)

(目的)グラディエントポンプにより作成したピュアセプション連続密度勾配における至適精子分離法を確認する。(方法)47~90% の 3 ml のピュアセプション連続密度勾配に 1 ml の精液を重層し、300 g にて 5, 10, 20, 40 分間、また 1,600 g にて 10, 20 分間遠心し、精子回収率および運動率を測定した。(結果)1. 遠心時間の増加とともに、回収率は増加し、20 分で 10%, 40 分で 20% の精子を回収できた。2. 300 g の遠心では最下層の精子の運動率は 5 分および 10 分では 0% だが 20 分以上の遠心により運動精子を回収可能、また 1,600 g の遠心では 10 分の遠心で運動精子を回収可能であった。(結論)グラディエントポンプにより再現性のあるピュアセプション連続密度勾配が作成可能、また運動精子回収には 300 g では 20 分以上、1,600 g では 10 分以上の遠心時間を要する。

18. Hypergonadotropic hypogonadism に対する GnRH agonist 療法の治療効果

○舞床和洋, 広島牧子, 遠藤尚江

大浦訓章, 許山浩司, 田中忠夫

(東京慈恵会医大産婦)

小田原靖

(小田原ウイメンズクリニック)

高ゴナドトロピン性の卵巣機能不全は一般的に治療困難であり、その排卵誘発には苦慮することは多い。今回、様々なバックグラウンドの高ゴナドトロピン性卵巣機能不全症例 7 例に GnRH agonist を投与し、その効果を検討した。7 例のうち早発卵巣不全が 6 例、加齢によるものが 1 例で、早発卵巣不全のうち 1 症例の原因は医原性による後天的なものであった。7 症例のゴナドトロピンは高値を示しており、GnRH agonist の投与によりいずれも速やかに低下し、4 例においてその後排卵を認めた。卵胞発育、排卵したものとそうでないものとの間に下降度の差は認められなかった。妊娠に至ったものは 2 例あったが、早期卵巣不全 Friedman 分類の Gonadotropin Resistant Ovary Syndrome であった。

19. 習慣流産に対する不妊治療の効果

○児島孝久

(アモルクリニック)

不妊診療中に習慣流産症例に遭遇することはまれではない。2 回以上の流産症例に対して、通常の不妊治療が有効かを検討した。1999 年 1 月から 2000 年 12 月に治療後妊娠に至った 859 例中、2 回以上自然流産の既往のある 33 例を対象とした。基本的には次回の流産を避けるために避妊を指示、BBT や超音波上良好排卵と判断された場合のみ妊娠を許可した。リンパ球輸血や抗凝固療法は実施せず。既往流産は 2 回が 18 例、3 回 7 例、4 回 5 例、5 回 3 例で、今回妊娠に至った治療内容は自然周期が 12 例、hCG 4 例、クロミド 11 例、hMG 5 例、AIH 2 例、IVF 4 例、ICSI 0 例であった。今回も流産に至ったのは計 6 例で、治療内容は自然周期 1 例、hCG 3 例、クロミド 2 例であった。軽い不妊治療での妊娠例が再度流産に至り、IVF を含む hMG 誘発例では流産は 1 例もなかった。流産の 6 例中 4 例に絨毛染色体検査を実施、1 例が正常、3 例に異常がみられた。2 回以上自然流産歴を有する症例に積極的に排卵誘発を行うと、流産を防止する効果があると思われる。

20. ART 後に発生した子宮外妊娠症例の検討

○大野貴史, 柴原浩章, 和田智明

角田哲男, 藤原寛行, 小川修一

高見澤聡, 佐藤郁夫

(自治医大産婦)

ART 後の妊娠における子宮外妊娠、および内外同時

妊娠の高い発生が知られている。我々も 1995 年 5 月から ART を開始したが、これまでに子宮外妊娠を 4 例、また内外同時妊娠（子宮内+両側卵管）を 1 例経験した。今回これらの症例を検討した結果、特に子宮外妊娠発生リスクファクターを持つ患者においては、妊娠 5 週の段階で子宮内に GS が存在しなければ、子宮外妊娠の可能性を想定し厳重に管理する。また子宮内に GS が存在する場合でも、内外同時妊娠の可能性、pseudosac の可能性は完全に否定できるものでないことが痛感された。外科的処置を選択する場合、反対側卵管の予防的切除の意義については是非があるが、術前に正確な情報を提示しておく。その上で、現時点においては患者および家族の意向に沿った対応を行う方向で、最終的には術中所見を参考に決定すべきと考える。

21. 子宮筋腫核出術後の妊娠、再発の検討

○武井英理子, 川内博人, 石川雅一

藤田一博, 安藤広美, 西島正博

(北里大産婦)

目的：子宮筋腫は性成熟期女性の 20~40% に存在し、不妊症や不育症の原因となりうる他、術後の再発なども問題となる。今回我々は、当科における子宮筋腫核出術後の妊娠率、筋腫の再発率を検討した。方法：対象は 1991 年 1 月から 1999 年 4 月までに、当科家族計画外来通院中の開腹下子宮筋腫核出術を施行した 104 症例の内、1 年以上経過観察できた 68 症例で、妊娠率、再発率について検討を行った。結果：1. 既婚者の術後妊娠率は 67.9%、不妊症例では 58.3% で差は認められなかった。HSG 所見、年齢、核出筋腫と妊娠率について関連性は認められなかった。2. 再発率は 36.8% であった。多発群での術前 GnRHa 投与例で有意に高い再発率が認められた。結論：子宮筋腫を有し、不妊期間が一定期間以上あれば、年齢や筋腫の数に関わらず、筋腫核出術も考慮すべきである。また、多発例には術前 GnRHa 投与は慎重にすべきである。

22. 子宮奇形の分類と妊娠に関する検討

○宮本わか奈, 島貫洋人, 桜井明弘

佐藤雄一, 武内裕之, 木下勝之

(順天堂大産婦)

子宮奇形は、不妊症の原因となり、妊娠予後を不良にするリスクファクターのひとつといわれている。当科外来受診の患者の中で MRI により診断した子宮奇形 51 例（子宮形成術未施行）を AFS 分類にもとづき

単角子宮 8 例、重複子宮 20 例、双角子宮 7 例、中隔子宮 16 例に分類し、妊娠、流産、不妊、不育、周産期合併症について検討した。経妊患者は 21 例で総妊娠数は 36 回であった。不妊を主訴とする症例は 15/51 例 29% のみであった。各分類別の妊娠に占める流産の割合は 25~50% と比較的高い傾向にあるが、経妊患者 1 人あたりでは、平均 0.7 回で、3 回以上の反復流産例はなかった。21 人の経妊患者中に 13 人 (62%) に挙児が得られた。子宮奇形の種類別では流産率に有意差はなく、反復流産例もなかった。子宮形成術を施行しなくても、62% が挙児を得ている。子宮奇形に対して、直ちに子宮形成術を行う必要はなく、一定観察期間をおくことが望ましい。

23. 凍結胚移植後の血中 E_2 , P_4 及び子宮内膜厚の変化から妊娠成立を予測できるか？

○菊池信正, 伊藤理廣, 高間史子

関根敏弘, 上条隆典, 峯岸 敬

(群馬大産婦)

解凍胚移植を施行する前提として妊娠成立のためには、子宮内膜と胚の発生段階の同期化が必要であり、当院では、胚移植後にプロゲステロン補充療法を行っているがそれが生体内の妊娠維持機構にどのような影響をあたえているか諸説がありはっきりとした結論はでていない。この点から移植後の血中 E_2 , P_4 値ならびに子宮内膜厚の変化に注目しそこから着床ひいては妊娠に至ることが推定できるか否かを検討した。対象は 2000 年 1 月から 9 月までの 9 カ月に、不妊外来で In-Vitro Fertilization (IVF)-embryo transfer (ET) を施行後に受精卵を凍結していた 91 例を対象とした。今回の検討では、全 91 胚移植周期中 15 周期が妊娠にいたり、妊娠率は 16.5% の結果を得た。ホルモン値においては血中 E_2 , P_4 値ともに有意差は認めなかったものの P_4 については Clinical に妊娠が継続していったグループは流産したグループに比較して平均的に上まっている傾向がみられ、プロゲステロン補充が妊娠継続のかぎをにぎっている可能性が示唆された。また、胚移植後、5 日目、10 日目に妊娠が継続していった方が順調に内膜を肥厚させる傾向が強く、流産に至った方は 5 日目以降の段階で内膜の成長が悪い傾向が認められた。しかし、解凍胚移植後の血中 E_2 , P_4 値、子宮内膜厚の変化より妊娠しているか否かを判断することは、今回の検討では難しいという事実が指摘できたが妊娠した症例に限り、測定にはその妊娠の継続予測が

できる可能性が認められ外来での検診や follow-up などの点からも有用性が考えられた。

第 38 回 日本不妊学会北陸支部学術総会

日時：平成 13 年 6 月 9 日（土）13:30～

場所：金沢都ホテル（金沢市）

1. IVF 妊娠後、17 週で破水するも 27 週にて生児を得た 1 例

○本保喜康，大下陸郎（金沢聖霊総合病院）
深江 司（深江レディースクリニック）

症例は 32 歳の女性。4 回目の IVF にて妊娠に至った（平成 10 年 7 月）。しかし同年 9 月 28 日、17 週で急な腹痛と共に破水した。この時点で推定胎児体重は 166 g、妊娠の継続は殆ど不可能と思われた。しかし本人と夫は妊娠を続ける事を強く希望されたため、翌日プロムフェンスを装着し、人工羊水として、抗生物質を添加した生理的食塩水を、子宮内へ持続的に注入した。ここで子宮内羊水量を以下の方法で計算した。すなわち子宮内を左右に 2 分画、さらに上中下に 3 分画して計 6 個の子宮内分画を想定し、各分画内の羊水ポケットの 3 軸方向の最大長 (x, y, z) を超音波装置で計測した。さて、上下分画内のポケットの形状を半楕円体 (体積 = $0.523xyz$)、中分画内のその形状を楕円柱 (体積 = $0.785xyz$) で近似して各体積を計算し、これらの総和を推定羊水量 (eAFV) とした。この eAFV を用いる事の妥当性については本年 5 月の日産婦学会で口述発表した。さて 25 週までは、プロムフェンスの位置移動、入れ替え、シロッカー結紮の追加などにより、日内変動はあるものの、eAFV を 100～300 ml に保てることが出来た。しかし 25 週以降は、子宮頸管の脆弱化により子宮内羊水量の維持が困難となった。さらに 27 週になると漏孔形成により eAFV は 20～40 ml となった。そこで児心拍を更に厳重にモニターする事にした。27 週 4 日目に児心拍の Viability の低下を認めため NICU のある施設へ母体搬送した。直ちに帝切により 927 g の女児が出生した（アプガールスコア 3 点）。現在 2 歳 6 カ月、やや体重は少ないものの、ほぼ順調に发育している。（まとめ）17 週で破水したが eAFV を指標として、子宮内羊水を維持管理することで、27 週まで児を子宮内で发育させることができた。またこの eAFV は分娩時期を決定する上でも重要な指標となった。

2. 当院での IVF-ET における子宮内外同時妊娠症例について

○原 直範，橋爪淳子，山崎裕行

道倉康仁（永遠幸マタニティクリニック）

【目的】子宮内外同時妊娠は自然妊娠では稀であるが複数個の胚を移植する IVF-ET においてはその発生頻度は高いとされている。当院での IVF-ET 後の子宮内外同時妊娠症例について IVF-ET 後の子宮外妊娠の発生要因と合わせて検討した。【対象及び方法】1. 平成 5 年 1 月から平成 13 年 3 月までに、当院での IVF-ET の妊娠 1985 例中子宮内外同時妊娠は 5 例発症し（発生率 0.3% (5/1985)），それらについて診断時期、診断時超音波所見、治療方法、予後、OHSS の有無及び不妊原因としての卵管因子の有無を検討した。2. 平成 9 年 1 月から平成 13 年 3 月までの当院での IVF-ET 後の妊娠 1060 例中の子宮外妊娠 23 例について、子宮外妊娠の発生に関する因子を検討した。【結果】1. 子宮内外同時妊娠の診断時期は平均 7 週 1 日（5 週 0 日～9 週 2 日）、診断時超音波所見は卵管内 GS が 2 例、腹腔内出血が 3 例あり、全例に卵管切除術を行った。子宮内妊娠の継続は 3 例であった。3 例に OHSS 合併を認め、それらでは診断時期が遅れる傾向があった。不妊原因としての卵管因子は 2 例に認めた。2. IVF-ET 後の子宮外妊娠の発生率は 2.2% (23/1060) であった。子宮外妊娠の発生率は卵管因子を有する例においては 4.5% (9/201) と、卵管因子を有さない例 1.6% (14/859) と比較して有意に高値 ($P < 0.05$) であったが、移植胚数別には有意差を認めなかった。子宮外妊娠例では卵管因子を有する 9 例中 6 例に卵管水腫を認めた。【結論】IVF-ET 後の子宮外妊娠の発生要因として卵管因子が関与する事が示唆された。IVF-ET 後の子宮内外同時妊娠は比較的稀ではあるが、複数胚移植例の妊娠判明時、特に卵管因子を有する例では子宮内外同時妊娠の可能性を念頭に置く必要がある。またその場合 OHSS 合併では診断時期が遅れる傾向があることも留意しておくべきである。

3. ICSI における卵細胞膜穿刺方法についての考察

○鈴木康夫，鈴木雅夫

（鈴木レディースホスピタル）

【目的】1992 年に Palermo らによって ICSI（卵細胞内精子注入法）による妊娠例が報告されて以来、重度

の男性不妊あるいは通常の IVF で受精しない受精障害例に対し ICSI は汎用され技術的な面はある程度確立された感があるが、その穿刺時の極体の位置、並びに穿刺時の卵の破れ方について検討を行った。【方法】ICSI 目的にて採卵した 7 症例 (平均年齢 33.7 ± 2.5) で第 1 極体の明瞭な 75 個の卵につき 5° , 6° , 7° , 11° , 12° , 1° の 6 方向に第 1 極体をおいて 3° より穿刺を行い、その穿刺時に同時に膜が破れる場合、吸引をして破れる場合と受精率、良好胚発生率を比較検討した。なお他の $2^\circ \sim 4^\circ$, $8^\circ \sim 10^\circ$ は紡錘糸への損傷の懸念から対象外とした。【結果】(1) 受精 (2PN 形成) には第 1 極体の位置 ($5^\circ \sim 7^\circ$, $11^\circ \sim 1^\circ$) によってあまり差がなかった。(2) 良好胚発生は第 1 極体が 7° , 11° の方が従来基本とされた 6° , 12° より高率であった。(3) 受精 (2PN 形成)、良好胚発生ともに穿刺後直ちに細胞膜が破れた卵より、穿刺後吸引によって破れた卵の方が高率であった ($P < 0.05$)。【結論】穿刺後直ちに破れず、吸引の後に破れるような弾力に富む卵に対し紡錘糸に損傷を与えずなおかつ紡錘糸により近接した部位に精子を注入する目的で第 1 極体が 7° , 11° の位置で刺入する方法でより高率に良好胚が得られる可能性が示唆された。ただし最近では紡錘糸が培養時間の経過と共に移動し第 1 極体直下に必ずしも存在しないことが報告されており、また live oocyte の紡錘糸観察が可能となってきたことから更なる検討が必要であると思われる。

4. 脱落膜リンパ球の Th2 ケモカインレセプター (CRTH2) の発現および局在に関する検討—着床部と非着床部での比較—

○道又敏彦, 津田 博, 種部恭子

宮崎聡美, 斎藤 滋 (富山医薬大産婦)

【目的】妊娠維持には Th2, Tc2 細胞が重要であることが報告されているが、脱落膜中のこれらの細胞の局在については不明である。今回 Th2, Tc2 細胞に特異的に発現する CRTH2 に対する抗体を用いて、脱落膜中における CRTH2 陽性細胞の発現および局在を着床部と非着床部で比較した。【方法】医学的適応で妊娠初期に人工妊娠中絶を施行した 15 名を対象とし、日産婦倫理規定を遵守し採取した脱落膜よりパラフィンブロックを作製した。1 次抗体として抗 LCA (白血球), CD3 (T 細胞) および CD8 (細胞障害性 T 細胞) 抗体ならびに抗 cytokeratin (上皮細胞マーカー) 抗体を用い ABC 法による免疫組織染色をおこなった。cy-

tokertatin 陽性 trophoblast 近傍を着床部、それ以外の箇所を非着床部と規定した。次に、共焦点顕微鏡を用いて CD3 と CRTH2 および CD8 と CRTH2 の二重蛍光抗体染色を行い、強拡大 5 視野で陽性細胞数を計測した。【成績】1) 着床部と非着床部では、白血球数には差がなかったが、 $CD3^+T$ 細胞数、 $CD8^+T$ 細胞数は着床部で (135.20 ± 64.44 vs. 90.87 ± 60.92 ; $p = 0.031$, 72.40 ± 40.05 vs. 47.60 ± 36.71 ; $p = 0.043$) と非着床部の値に比し有意に高値となった。2) 着床部の $CD3^+CRTH2^+$ (Th2 と Tc2) 細胞数 (4.11 ± 1.69 vs. 1.14 ± 0.37 ; $p < 0.00001$)、細胞率 (22.05 ± 9.84 vs. 16.23 ± 7.44 ; $p = 0.0389$)、 $CD8^+CRTH2^+$ (Tc2) 細胞数 (2.23 ± 0.79 vs. 0.71 ± 0.29 ; $p < 0.00001$)、細胞率 (20.31 ± 7.76 vs. 15.53 ± 5.71 ; $p = 0.0323$) は、非着床部に比し有意に高値を示した。【結論】着床部脱落膜に T 細胞とりわけ Th2, Tc2 細胞が集集することが初めて明らかとなった。

5. Sertoli-cell-only tybule を呈した 45, X/46, idic(Y) (q11.2) の 1 例

○太田昌一郎, 明石拓也, 布施秀樹

(富山医薬大泌尿器)

【はじめに】比較的に稀な Y 染色体構造異常の 1 例を経験したので報告する。【症例】症例は 31 歳男性。主訴は不妊。現病歴は 2 年前に結婚以来、特に避妊はしていないが、挙児に恵まれないため近医を受診し、当科での精査を勧められ受診した。家族歴および既往歴に特記すべきことなし。現症は身長 165 cm 体重 70 kg 精巣両側とも 6 ml で、尿道、陰茎、前立腺、精巣上体および精管は触診および視診上正常であった。精液検査は 2 回とも無精子症であった。内分泌学的検査は (正常範囲) LH 12.5 mIU/ml ($1.8 \sim 9.1$) FSH 30.8 mIU/ml ($1.6 \sim 10.6$) テストステロン 7.7 ng/ml ($2.7 \sim 10.7$) であった。染色体検査を行ったところ 45, X/46, idic(Y) (q11.2) 11 細胞/89 細胞のモザイクであった。そこで患者に十分な説明をし、承諾を得た上で、末梢血より DNA を抽質し、PCR 法で SRY 遺伝子の存在を調べたところ陽性で、AZF の STS を PCR 法で検索したところ大部分が欠失していた。精巣生検の結果は Sertoli-cell-only tybule であった。【まとめ】本症例では AZF の大部分の欠損と精巣組織所見との関係が予測された。

6. 当院における IVF-ET の治療成績の検討

○重田優子, 瀬川智也, 生水真紀夫

村上弘一, 可西直之, 井上正樹

(金沢大学産婦)

【目的】当科で IVF-ET を施行した症例を, 着床, 非着床群に分けて検討し, 結果に影響したと思われる因子について調べた. 【対象】平成 11 年 9 月から平成 13 年 5 月までに当科で IVF-ET を施行した 46 症例 (26 名). 【成績】採卵可能例 44/46, 受精例 35/44, ET 施行例 33/35, 着床例 11/33 (単胎 5 例, 双胎 1 例, 子宮外妊娠 1 例, 稽留流産 3 例, 科学的流産 1 例). 【結果】平均年齢, 平均不妊歴, 平均 IVF-ET 回数の比較で, 非着床群では平均年齢が有意に高かった. 不妊原因 (卵巣, 卵管, 子宮, 男性因子) に有意差はなかった. hCG 切り替え時の卵胞数 3~6 個, 採卵数 2~5 個で着床が多く見られた. 採卵時の血中 LH は非着床群で有意に高値であった. また E_2 , P_4 の高値は受精との関係が示唆された. 排卵誘発法では hMG 総量 1000~1500 単位, 投与日数 7~11 日が適量と考えられた. GnRHa 投与は long protocol で着床率が高く, 4 分割以上の卵が多く見られた. 【結論】受精に影響した因子として, 平均 hMG 投与量, $E_2 \cdot P_4$ 値が考えられた. 着床に影響した因子として, 年齢, LH 値が考えられた. GnRHa の short protocol では採卵前の LH 抑制が不十分であることが推測された.

7. Y 染色体上に微小欠失を認めなかった特発性不妊患者において, AZFa 領域に発現する遺伝子の欠失をみた 1 例

○鈴木ひろみ, 前田雄司, 高 栄哲

並木幹夫 (金沢大泌尿)

吉田 淳 (木場公園クリニック)

【患者】35 歳男性 主訴: 育児希望 精巣容量 右: 5ml 左: 7ml. 精巣生検 Johnsen score 2. 【方法】患者ゲノム DNA を用いて, STS 法によって微小欠失を検討し, さらに, 精巣に発現する Y 染色体の上既知遺伝子がゲノム上に存在するかを検討した. さらに, cDNA を用いて RT-PCR 法によって各遺伝子の発現を検討した. 【結果】Y 染色体上に微小欠失および Y 染色体上既知遺伝子ゲノムの欠失は認めなかった. 患者精巣生検から得た cDNA より AZFa 領域に一致する精巣発現既知遺伝子 DFFRY (*Drosophila fat facets related Y*), DBY (*DEAD Box Y*), UTY (*Ubiquitous transcribed Y*) の発現が欠失していた. 【考察】AZFa 領域の欠失は Sertoli only の表現型を呈することが知られている. 本症例において, AZFa 領域の遺伝子がゲ

ノム上に欠失がないにもかかわらず, 発現していないことから転写系の異常が示唆される. 一方, DBY, DFFRY, UTY は ubiquitous に発現しており, X 染色体から X ホモログ (DBX, DFFRX, UTX) が発現している. この Y ホモログと X ホモログの量の不均衡が精子形成異常を惹起させている可能性が考えられている. また, X ホモログにない Y ホモログ特異な精子形成機能がある可能性も考えられる.

8. 直径 250 μ m 以下の微小卵胞を含めた乳牛の卵胞, 卵子の相対的成長について

○榊田星史, 泉 徳和

(石川県農短大家畜繁殖)

宮本 元

(京都大大学院農学研究科動物機能開発)

本間ら (1959), Miyamoto ら (1980) が, 牛の卵胞, 卵子の相対的成長について報告しているが, 新鮮な卵胞, 卵子の関係を示していない. また Izumi ら (1997) は, 新鮮な卵胞, 卵子を扱っていたが, 250 μ m 以下の微小卵胞は含めていない. Roy ら (1993) は, ヒトの前胞状卵胞を培養し, 胞状卵胞にまで成長させていた. 本研究では, 優良な遺伝形質をもった雄牛を最大限活用できるよう, 微小卵胞を含めた新鮮な卵胞, 卵子の相対的成長像を明らかにした. 微小卵胞の採取は, Itoh ら (2000) の「おろし金」による方法を採用した. 卵子の性状評価後, 卵胞, 卵子の直径を各々, x 軸, y 軸とし, 回帰分析した. 決定係数が最大値の回帰式を微分し, 成長率曲線式を得, この式から卵子が最大径に達する卵胞の大きさを推定した. 卵胞, 卵子対の最適回帰式は, いずれも決定係数, 999 の双曲線となり, 全体で $y = 162x / (x + 0.246)$, $y = 131x / (x + 0.191)$ (各々, 透明帯含の対, 透明帯不含の対), 正常対で $y = 162x / (x + 0.253)$, $y = 131x / (x + 0.199)$ となった. 成長率曲線式は, 全体で $y' = 39.9 / (x + 0.246)^2$, $y' = 25.0 / (x + 0.191)^2$, 正常対で $y' = 41.0 / (x + 0.253)^2$, $y' = 26.1 / (x + 0.199)^2$ となった. この式から, 卵子が最大径に達したと見なせる卵胞の直径は, 4.00 mm 以上となった. これらの値を超えた卵胞, 卵子対を一回帰分析したところ, いずれも真の勾配 (β) の 95% 信頼区間内に 0 が含まれ, 卵子の成長が止まっていることが示唆された.

9. 不育症に対する低分子ヘパリン療法の有用性について

○折坂 誠, 佐々木博正, 折坂早苗
八木原亮, 斉藤里奈, 品川明子
高橋 仁, 服部克成, 西川有紀子
黒川哲司, 打波郁子, 宿南憲一
河原和美, 吉田好雄, 経沢 弥
細川久美子, 後藤健次, 小辻文和

(福井医大産婦)

【目的】不育症は、反復流産や習慣流産など、妊娠は成立するが流産を繰り返し、生児を得られない病態の総称である。不育症についてはいまだ不明な点も多く、治療方針も確立されていないが、近年、抗リン脂質抗体症候群に伴う不育症に対して、血液凝固学的・免疫学的機序によるヘパリン療法の有用性が報告されている。今回は、原因不明の不育症症例に対し、低分子ヘパリンと低用量アスピリン療法を行い、その有用性を検討した。【方法】原因不明の不育症 4 症例に対し、妊娠初期より低分子ヘパリン (75 IU/kg/day 持続点滴静注) およびアスピリン (81 mg/day 内服) による管理を行った。なお治療に際しては、十分なインフォームド・コンセントを得た上で行っている。【成績】現在、1 例が生児を獲得し、3 例は妊娠継続中であり、胎児発育には異常を認めていない。治療経過中、3 例に歯肉出血、1 例に血小板減少を認めたが、いずれも軽度であり自然軽快した。【結論】原因不明の不育症症例に対しても、低分子ヘパリンと低用量アスピリン療法は有用であると考えられた。また、化学流産や枯死卵を繰り返す症例でも有効であったことから、ヘパリンとアスピリンが、妊娠初期の脱落膜の微小循環を改善することにより、妊娠予後を改善する可能性が示唆された。今後は、その適応や投与方法、安全性について、さらに検討をすすめていきたい。

10. 採卵時未成熟卵子の体外培養についての検討

○西 美佐, 豊北美穂, 原 直範
山崎裕行, 道倉康仁
(永遠幸マタニティクリニック)
桑山正成, 加藤 修
(加藤レディースクリニック)

【目的】体外受精を目的とした過排卵処理の採卵後では、しばしば未成熟卵子を混在するが、このような

未成熟卵子がどれほどの、成熟、受精、発生能力を持つのかを、卵丘細胞の有無にて比較検討を行った。【対象と方法】当院における卵巣刺激周期において、ICSI 実施予定者のうち、本研究のインフォームド・コンセントの得られた患者由来未成熟卵子 151 個を対象とした。得られた未成熟卵子を a 区：卵丘細胞裸化 GV 期、b 区：卵丘細胞非裸化 GV 期、c 区：卵丘細胞裸化 MI 期に分け、成熟培養を行った。培養液は 10% 患者本人成熟卵胞液、0.5 mM Pyruvate 添加 TCM199 を用い、24 時間から 48 時間行った。第一極体の確認された卵子に ICSI を行い、さらに二核形成された卵子は、P1 Medium と、G2.2 Medium にて胚盤胞培養を行った。【結果】成熟率はそれぞれ、a: 63.2% (36/57), b: 79.3% (23/29) および、c: 86.2% (56/65) であった。ICSI 後の受精率は、a: 91.2% (31/34), b: 85.0% (17/20), c: 88.2% (45/51) であった。また分割率はそれぞれ、a: 70.6% (24/34), b: 75.0% (15/20), c: 80.4% (41/51) となった。さらに、胚盤胞発生率はそれぞれ、a: 0% (0/34), b: 10.0% (2/20), c: 11.8% (6/51) となり、卵丘細胞の付着による培養により、胚盤胞発生が可能となった。【結論】体外受精治療では利用されない、GnRHa + hMG 周期での、正常に hCG に反応しない卵胞由来の未成熟卵子でも、卵丘細胞卵子複合体の状態であれば、体外成熟、体外受精、体外培養により、胚盤胞へ発生することが明らかとなり、不妊治療への利用の可能性が示唆された。また、成熟培養時の卵丘細胞の存在が、胚盤胞発生に何らかの関与を示している可能性も考えられた。

11. CHALLENGE TO IMPOSSIBILITIES IN A.R.T.

○加藤 修 (加藤レディースクリニック)

近年、体細胞クローンに象徴される生殖工学分野の急速な進展に伴い、生殖補助医療分野においても IVF/ICSI あるいは胚の体外培養/凍結保存など、新しい ART が次々と実用化され、その適応が飛躍的に拡大した。しかしながら、依然、現時点での不妊医療における IMPOSSIBILITIES として、Male Factor では無精子症が、そして Female Factor としては、特に高齢女性において卵子品質の反復不良が問題となっている。これらの不可能を可能とすべく、両 Factor に対する NEW ART の確立を試みた。

For Male Factor: Maturation Arrest 患者の治療法としてこれまで、精子細胞 (RS) を卵子に顕微注入す

る ROSI (Tesarik, 1995) や、体細胞との共培養により精子完成後 ICSI を行う手法 (Cremades, 1999) などが世界的規模で試みられてきたが、胚移植後の妊娠率は極めて低く、絶望的な結果に終わっている。我々は既存の発想を転換し、自然な受精現象の利用、すなわち正常な精子に ROSI を assist させる Assisted Induced Activation (AIA) 法の確立を試みた。まず患者卵子へ健康な提供精子を注入、卵子活発化を誘起後、患者 RS を注入し、前核期に提供精子由来の雄性前核を除去する手法である。通常の ROSI では受精率は 30~40% で胚盤胞への発生は得られないが、AIA 法により 87% が受精し、26% が培養後、胚盤胞へと発生した。FISH および DNA 診断 (Gene Print Multiples STR system) による安全性の評価試験でも AIA 由来胚が患者本人の正常な遺伝子 (染色体) を有した胚であることが証明された。

For Female Factor: 40 歳を越えた高齢患者を含む難治不妊患者の多くは、子宮機能が正常にも関わらず IVF/ICSI により得られた分割胚を反復移植しても妊娠が成立せず、卵子品質に不妊原因があると考えられている。我々はマウスおよびウシを用いた基礎実験をもとに、患者核を正常な提供卵子へ移植することにより細胞質を最大限に置換できる核移植法を利用した、卵子品質改善法の開発を行っている。インフォームド・コンセントの得られた患者由来廃棄卵子を用いて、前核期および前核胞期 (GV 期) でそれぞれ患者由来の核 (GV あるいは前核) を、除核したドナー卵子細胞内へ移植を行い、卵子の *in vitro* での発生能改善効果を比較した。その結果、前核期で核置換した卵子の発生率は十分に改善されず、受精後の卵子品質改善は困難であることが示唆されたが、GV 期で患者核を移植後、卵子を体外成熟 (IVM) させ、患者精子を用いて ICSI することにより、患者夫婦間の遺伝子を持つ胚を作出、培養したところ、胚盤胞への発生に成功した。今後、例数を重ねて本技術の安全評価を反復検討し、また倫理問題にも十分配慮しながら、本技術を、40 歳以上の高齢女性の不妊治療法としてだけでなく、ミトコンドリア症など、細胞質に障害を有する全ての卵子の救済法としても有効な NEW ART として、開発、完成させて行きたい。

平成 13 年度日本不妊学会中部支部学術集会

日時：平成 13 年 6 月 9 日 (土)

場所：興和紡績 (株) 本社ビル (名古屋市)

1. 当科における選択的卵管疎通術の成績

○佐藤英子, 浅井光興, 中部 健

野口昌良

(愛知医大産婦)

子宮卵管造影法 (HSG) など卵管閉塞と診断された症例の中にも、腹腔鏡施行時に卵管の疎通性を認める症例がある。特に卵管間質部における閉塞は、器質的なものでないことが多いことも報告されている。当科では HSG で卵管近位部閉塞と診断された症例に対し子宮鏡下選択的卵管造影を行っており、当科における本法の成績について検討した。

対象は片側または両側の卵管閉塞を診断され、その後選択的卵管造影施行が可能であった 49 症例 72 卵管で、そのうち 67 卵管、右側 30 卵管 (間質部; 21, 峡部; 9), 左側 37 卵管 (間質部; 28, 峡部; 9) に対し、処置用ヒステロファイバースコープ (HYF-1T) により子宮内を観察しながら卵管口にカテーテル (PR-19A) を挿入し造影剤を注入する方法で選択的卵管造影を行った。

間質部閉塞を診断された 49 卵管中 31 卵管 (63.3%), 峡部閉塞 18 卵管中 8 卵管 (44.4%) が疎通に成功した。そのうち術後卵管疎通性を調べることでできた 21 卵管中、峡部閉塞の 1 卵管のみが再閉塞し、疎通性のある卵管を有しなかった 33 例中 24 例 (72.3%) が少なくとも片側の卵管の疎通性が得られた。卵管開通における左右差は、峡部では左右差を認めなかったが、間質部では右側の疎通率は 21 卵管中 11 卵管 (52.4%), 左側は 28 卵管中 20 卵管 (71.4%) と左側の方が成功率が高かった。49 例中 14 例 (28.6%) に妊娠が成立し、うち 10 例は 6 カ月以内であった。

子宮鏡下選択的卵管造影法は簡便な方法であり、HSG で卵管近位部閉塞と診断された症例に対し非常に有用であることが示された。したがって、これらの症例にはまず本法を施行し、成功した場合は 6 カ月程度経過観察し、妊娠に到らない場合には腹腔鏡などを施行していくべきであろう。

2. 腹腔鏡下卵巣チョコレート嚢胞処置と不妊治療成績

○可世木 博, 可世木成明, 新横峰子

可世木辰夫

(可世木病院)

中村あずみ

(藤田保健衛生大産婦)

チョコレート嚢胞を有する不妊症患者をどう扱えば、より良い不妊治療成績が上げられるのか、腹腔鏡を適応した症例をもとに検討した。当院で平成 10 年 1 月から 12 年 12 月までの 3 年間に 470 例の腹腔鏡手術を行ったが、その内、術前にチョコレート嚢胞 (1 cm 以上) の診断が下され、その不妊治療として腹腔鏡を施行し、そして術後 6 カ月以上経過した症例は 62 例であった。チョコレート嚢胞に対する腹腔鏡の基本術式は嚢胞摘出で、62 例中 48 例は完全摘出した。また術後治療は原則的にそのまま不妊治療を再開しており、GnRHa を用いた症例は 6 例のみであった。術後 1 年以内に再び嚢胞を認めたものは 12 例で、進行期を考えると高い再発率とは言えない。

以上のようにして、腹腔鏡を適応したチョコレート嚢胞患者 62 例につき、その妊娠成績を検討した。待機療法といい、不妊治療は再開するが IVF は適応していない症例での妊娠率は 21 例、34% であった。そして、その内 16 例は半年以内での妊娠であり、20 例は 10 カ月以内での妊娠であった。術後 1 年を経過すれば順次 IVF を適応していくが、IVF 妊娠も 16 例に及ぶ。この両者を合計すると、60% の人が妊娠を達成したことになる。この成績より、術後 GnRHa で半年以上にわたって妊娠を遠避けたり、IVF を術後 6 カ月以内で急ぐのは考えものだと思われる。

以上の結果より、当院では不妊症患者でチョコレート嚢胞を確認した場合には、なるべく早く腹腔鏡を行い、嚢胞の完全摘出をめざしている。そしてこの場合、術 1 年以内での妊娠が多いので一般不妊治療を進め、待機している。一年以上経てから GnRHa や IVF を検討すれば良いと考えられる。

3. 当教室における腹腔鏡下子宮外妊娠手術の現況

○塚田和彦, 廣田 穰, 大原 聡

大橋由政, 加藤利奈, 中村あずみ

吉田麻里子, 長谷川清志, 多田 伸

宇田川康博 (藤田保健衛生大産婦)

【目的】腹腔鏡下子宮外妊娠手術症例の手術成績を検討し、腹腔鏡による子宮外妊娠手術の術式選択とその問題点について考察した。【対象と方法】1994 年～2001 年 3 月までに子宮外妊娠手術を行った 135 例のうち腹腔鏡下手術を実施した 54 例を対象とした。54

例の術式の内訳は、卵管切除術 24 例、卵管線状切開術 21 例、胎嚢圧手術 (血腫除去術) 8 例、卵巣部分切除術 1 例であった。腹腔鏡下卵管保存手術の適応は、1. 挙児希望があること、2. 未破裂卵管であること、3. 卵管周囲に強固な癒着を認めないこと、4. 卵管采を含み 4cm 以上の健常卵管を温存可能であること、5. 術前の超音波断層検査で胎児心拍動を認めないこととした。

【成績】腹腔鏡下子宮外妊娠手術症例の患者背景は、平均年齢 28.9 ± 4.5 歳、手術時妊娠週数; 7.6 ± 1.3 週、術前の尿中 hCG 値; 6333.1 ± 10190.6 mIU/ml、腹腔内出血量; 150.4 ± 225.2 ml であった。また、54 例のうち未産婦が 32 例 (59.3%) と高率であり卵管保存手術の重要性が示された。術後成績は、卵管保存例の術後の HSG による卵管疎通性率は 57.1% であり、術後の子宮内妊娠率は卵管切除例で 64.3%、卵管保存例で 73.3% であった。卵管保存例における同側反復子宮外妊娠は 1 例 (14.3%) に認められ、persistent ectopic pregnancy (PEP) は全例を通じて 1 例も経験していない。【考察】当教室での腹腔鏡下子宮外妊娠手術の術後成績は諸家の報告と同等ないしはそれ以上であり、PEP は皆無であった。この結果は、当教室での腹腔鏡下子宮外妊娠手術の適応基準設定と術式選択の妥当性を示唆するものと思われた。また、卵管保存術後の同側反復子宮外妊娠症例はいずれも卵管采に癒着を認めた症例であり、このような症例に対しては卵管切除術を選択すべきと考えられた。

4. クエン酸クロミフェン Day 1 投与の検討

○青山和史, 佐藤 剛, 松原寛和

生田克夫, 鈴森 薫 (名古屋市立大産婦)

【目的】クエン酸クロミフェン (CC) は無月経患者や原因不明の不妊症患者に最も頻用される排卵誘発剤である。CC は、月経周期の 5 日目から投与されることが一般的で、排卵誘発率は 90% と良好であるが、妊娠率は期待されうるより低い。それは CC の抗エストロゲン作用による子宮内膜厚や頸管粘液の低下、子宮内膜の成熟遅延、子宮動脈血流の変化などの原因が報告されている。そこで、それらの副作用を軽減する目的で当科にて CC を月経周期の 1 日目から投与した症例と従来通りに 5 日目から投与した症例の臨床的効果を比較検討した。【方法】対象は排卵障害のない不妊症患者 12 例 59 周期で、Day 1 投与 33 周期、Day 5 投与 26 周期である。Day 1 投与群と Day 5 投与群でそれぞれ発育卵胞数 (15 mm 以上)、子宮内膜厚 (mm)、排卵日

までの日数を比較した。【成績】Day 1 投与群の全体では発育卵胞数は 2.0 ± 1.5 , 子宮内膜厚は 9.2 ± 2.6 , 排卵日は 14.9 ± 2.0 で, Day 5 投与群の全体では, それぞれ 2.5 ± 2.6 , 8.2 ± 3.0 , 15.0 ± 2.2 で有意差を認めなかった。CC 内服量別に検討した場合, CC 50 mg 内服では, Day 1 投与群は 1.8 ± 0.8 , 9.6 ± 2.7 , 14.4 ± 2.1 , Day 5 投与群は 1.7 ± 0.7 , 7.3 ± 2.3 , 15.3 ± 2.3 で, 内膜厚が有意に増加した ($p < 0.05$)。また, CC 100 mg 内服では Day 1 投与群は 2.3 ± 2.2 , 8.7 ± 2.5 , 14.8 ± 1.4 , Day 5 投与群は 3.2 ± 3.6 , 8.9 ± 3.6 , 14.6 ± 2.2 で結果に有意差は見られなかった。【結論】CC の Day 1 投与は Day 5 投与と比較して内膜厚が改善される傾向にはあったが, 卵胞数, 排卵日までの日数と共に統計的に有意な差は認められなかった。

5. 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase 欠損症による続発性排卵障害の 1 例

○高田佳世子, 北村公也, 後藤淳子
 金山尚裕 (浜松医大産婦)
 菅沼信彦 (豊橋市民病院不妊センター)
 松山 薫 (榛名総合病院)

血中プロゲステロン (P) 値の持続的高値を認め, 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase 欠損症と考えられた続発性排卵障害症例を経験したので報告する。

症例は 32 歳時に続発性無月経を主訴として受診した。14 歳で初経初来するも, 以降不順で, 20 歳から無月経となった。P 剤投与による消退出血は認められず, 精査のため当院受診となった。身長 157 cm, 体重 51 kg, 血圧 100/68 mmHg, 体型は正常女性型であったが, 経陰超音波断層法では両側卵巣は描出されず, 子宮は発育不全を示した。エストロゲン/プロゲステロン補充療法施行により, 消退出血を惹起させることができた。月経 7 日目に, 血中エストラジオール (E_2) 値は 10 pg/ml であるにもかかわらず, P 値は 4.7 ng/ml と高値を示した。

デキサメサゾン (DEX) による抑制試験では, 前値として ACTH, コルチゾール, アルドステロンは正常であったが, P (4.7), 17 α -OH-P (3.57 ng/ml), DOC (0.36 ng/ml) は高値を示し, E_2 ($10 >$), テストステロン (5.0 ng/ml), アンドロステンジオン (0.2 ng/nl), DHEA (0.5 ng/nl) は低値を示した。DEXA 服用後は, コルチゾールは, $10 \text{ } \mu\text{g/dl}$ まで抑制され, 同時に P (0.5), 17 α -OH-P (2.5), DOC (0.1) も低下した。

以上の結果より, 持続的に高値を示した P 分泌は副

腎由来と考えられ, この病態から 17 α -hydroxylase/17, 20-lyase 欠損症が疑われた。現在, 当遺伝子の解析を行い, その変異を検討中であり, 臨床的には妊娠できるよう治療を行っていく予定である。

6. 妊娠例からみた当院不妊症例の検討

○伊藤則雄, 村田泰隆, 伊藤充彰
 勝股克成, 岩瀬 明, 岡本早苗
 野村昌男, 塚原洋次郎, 塚原慎一郎
 安藤寿夫, 正橋鉄夫, 水谷榮彦
 (名古屋大産婦)

当院産婦人科不妊外来において, 平成 12 年 1 月より, 平成 13 年 4 月までに, 妊娠が判明した 65 症例を対象として, 患者の背景や治療経過などについて検討した。妊娠判明時の年齢は, 25 歳から 41 歳までで, 平均年齢は 32.4 歳, 平均不妊期間は 3.4 年, 当院での治療開始より妊娠判明までの平均期間は 1.5 年であった。47 例が原発性不妊で, 18 例が続発性不妊であった。28 例において当院受診以前に他院での治療歴が存在した。治療法は 65 症例中 16 例が IVF による妊娠で, うち 4 例が ICSI によるものであった。クロミフェン, hMG による排卵誘発と, AIH を併用したものが 8 例, 排卵誘発のみでの妊娠が 16 例, AIH のみが 2 例で, その他の 23 例については原疾患の治療を行うと同時にタイミング指導が行われていた。不妊期間が 2 年以上の症例は 44 例で全体の 68% であり, 5 年以上の症例が 17 例で 26% を占めていた。65 例中 47 例 (72%) が, 当院での治療開始後 2 年以内に妊娠しており, 多くの症例が治療初期に妊娠していることがわかった。また, 子宮内膜症症例において, 平均年齢は 31 歳と低いものの治療期間は平均 2.2 年と長く, 治療に 2 年以上必要とした症例の割合も 63% と高い傾向があった。子宮筋腫症例では, 平均年齢が 35 歳と高いものの平均治療期間は 1.5 年と平均的であった。子宮筋腫を伴う 12 症例のうち 10 例において筋腫核手術が施行されていたが, そのうち 7 例が術後 2 年以内に妊娠していた。この結果は, 我々が, 第 53 回日本産科婦人科学会において『子宮筋腫核手術施行例の妊娠予後に関する検討』と題して発表した内容とともに, 核手術の有用性を示唆しているものと考えられる。

7. 子宮内膜症合併難治性不妊の 1 例

○石川くにみ, 張簡珮怡, 内藤恵美
 根本泰子, 齋藤 優, 服部政博

古川雄一

(静岡赤十字病院産婦)

【目的】近年、子宮内膜症を合併する不妊症患者は増加しているが、その発生病因や、妊娠能低下を引き起こす機序は明らかではなく、統一された治療法も定められていない。今回我々は、18回のAIHにより妊娠成立し得た子宮内膜症合併難治性不妊の1例を経験したので報告する。【症例】33歳、0経妊0経産。月経痛と不妊を主訴に、平成4年11月当院受診した。内診上、両側卵巣腫瘍を認め、CA125は49 U/mlとやや高値を示し、経膈超音波および骨盤CT写真で右卵巣に4.0 cm、左卵巣に3.0 cmの内膜症性チョコレート嚢胞を認めた。平成5年6月より6カ月間スプレキア治療開始し、CA125は28 U/mlに低下したが、両側卵巣腫瘍は縮小しなかった。患者の挙児希望も強く、平成6年3月に両側卵巣腫瘍摘出術、卵管癒着剥離術、腹腔内洗浄施行した。術後スプレキア治療施行し、子宮卵管造影にて卵管疎通性を確認した。その後、待期療法で経過観察したが妊娠成立せず、平成8年1月より平成9年4月まで15回AIHを施行した。平成9年5月より再び月経痛が増強し、CA125が46 U/mlと上昇を認めた為、6カ月間スプレキア治療施行した。平成10年1月よりAIHを再開したところ、平成10年9月に18回目AIHで妊娠成立し、平成11年8月に帝王切開術で正常児娩出した。【結論】子宮内膜症不妊の治療法選択は統一された基準がなく、治療法をどのように考え、何を選択すべきかは今だ議論が多い。不妊症治療におけるIVF-ETの位置付けは、子宮内膜症の精査、加療をした上で、最終手段として選択すべきであると考え。子宮内膜症合併難治性不妊で、術後もGnRH療法に並行してAIHを繰り返して行い妊娠成立し得た経験を今後も生かしていきたい。

8. 肥満細胞遮断薬による高度乏精子症の治療

○日比初紀、瀧 知弘、山田芳彰

本多靖明、深津英捷 (愛知医科大泌尿器)

浅田義正

(ナカジマクリニック不妊センター)

山本雅憲

(水野病院泌尿器)

【目的】特発性男性不妊症に対する薬物療法として有効なものは未だ見いだされていない。特発性男子不妊症において組織化学的実験からマスト細胞が有意に増加していることが報告され、以前我々は前向き調査を行いその臨床的有効性を報告した。今回我々の施設で精子濃度が1000万/ml以下の高度乏精子症患者に肥

満細胞遮断薬である tranilast を投与し、その有用性を検討したので報告する。【対象及び方法】1999年4月より2000年4月までに当院泌尿器科不妊外来を受診した初診患者58名の内、精子濃度が1000万/ml以下の特発性高度乏精子症患者16名を対象とした。精巣のサイズ、内分泌検査、精液検査を施行した後 tranilast を一日300 mg 経口投与し、その他の薬剤の使用を禁じた。投与期間は最低12週とし、副作用がなく効果が認められた場合は妊娠成立をゴールとして投与を継続した。【結果】患者の年齢は平均34.2歳(27~40)、妻は平均30.4歳(24~36)、不妊期間は平均3.1年(0.7~10)であった。精巣容積は平均右14.1 ml(6~22 ml)、左14.6 ml(6~22)。内分泌学的検査はLH 3.1 mIU/ml(1.6~9.7)、FSH 7.6 mIU/ml(4~30.1)、テストステロン 433 ng/dl(330~607)であった。精液所見は初診から2ないし3回の平均で、精子濃度408万/ml(10~910)、運動率41%(0~67%)であった。12週後17例中7例、41.1%に精子濃度が著明に上昇したが運動率は変わらなかった。(精子濃度629万/ml→3914万/ml、運動率32%→36%)自然妊娠は3例に得られ、各々投与開始3、5、10カ月後であった。また tranilast 投与前後で精巣のサイズ、LH、FSH、テストステロンは変化がなかった。(14.6/14.4 ml, 3.2 mIU/ml, 8.3 mIU/ml, 447 ng/dl)なお副作用は1例に軽度の眠気を訴えた以外認められず、全例内服可能であった。【結語】今回の検討は症例数が少なく、かつ後ろ向き調査であったが、tranilast は特発性高度乏精子症に対して有用な薬剤と考えられた。今後は多施設での共同研究が必要と思われた。

9. 精巣における Notch 遺伝子の発現

○森紳太郎、星野清孝

(藤田保健衛生大泌尿器)

角川裕造、丸野内楳

(藤田保健衛生大総合医科学研究所応用細胞)

【目的】幹細胞の増殖と分化の調節に Notch と呼ばれる膜貫通型の受容体分子の関与が知られている。Notch は二つに切断された後、約180 kD のN末端と約120 kD のC末端からなるヘテロ二量体を形成し、C末側を細胞内に向けた形で細胞表面に存在している。隣接する細胞からリガンド刺激を受けると切断を受け、その細胞内領域は核に移行してRBP-J κ と複合体を形成し標的遺伝子の転写を活性化する。今回我々は Notch 情報伝達系が精子形成過程に働いているのではないかと考え、精巣に於ける Notch の発現様式をマウ

スを用いて検索した。【方法】マウスは ICR を用いた。免疫組織学では、Notch 1, 2, 3, 4 の各々 C 末端, N 末端に対する抗体を用いて蛍光抗体法により精巣における Notch の発現を調べた。また電子顕微鏡下にその詳細を観察した。Western blotting 法では精巣細胞を細胞質分画, 核分画に分け、発現を確認した。精巣の再生過程に於ける Notch 発現については busulfan をマウス腹腔内に 40 mg/kg 投与し、再生過程における発現状態を調べた。【結果と考察】今回の検討の結果、Notch 1, 2, 3, 4 全てにおいて発現パターンは異なるものの精巣への関与が示唆された。Notch 3 は精祖幹細胞でシグナルが活性化しており、精母細胞では発現していないこと、薬剤投与後の幹細胞の増殖過程で Notch 3 の発現が観察されたことから、幹細胞の維持および増殖に働いていると考えられた。一方 Notch 1, 4 では精母細胞でシグナルが活性化していると考えられ、精母細胞の増殖、分化に関与していると考えられた。また Western blot ではすべての抗体について細胞質もしくは核成分で発現が確認できたことから免疫組織化学で染色がみられなかったものについても精子形成に関与している可能性も示唆された。

10. 不妊症患者における子宮内膜と USTG 画像

○古井辰郎, 伊藤美穂, 田上慶子
青木生美, 今井篤志, 玉舎輝彦

(岐阜大産婦)

【目的】不妊症領域における超音波検査の果たす役割は極めて大きい。ところが、一般不妊症診療において、月経周期特に基礎体温に対して子宮内膜超音波像が一致しない患者がしばしば認められる。このような症例は、PCO 症例により多く認められる傾向がある。そこでこのような症例について、そのホルモン異常などの病態を解明するため、正常な超音波所見を示す症例と比較し、各種血中ホルモン値との相関関係を検討した。【方法】平成 11 年および 12 年に当科を不妊または月経異常を主訴に受診した患者のうち、経陰超音波上 PCO 様の卵巣を示した患者 51 例について、その基礎体温、子宮内膜超音波検査および LH, FSH, テストステロン, E_2 等の各種ホルモン検査を施行した患者 51 症例についてその画像診断とホルモンレベルとの相関を検討した。【結果】51 例中 19 例で基礎体温では低温層を示したにもかかわらず超音波上分泌期様内膜所見を認め、その病理所見は間質の著明な浮腫を伴う増殖期内膜であった。残りの 32 症例では月経周期と子宮内

膜の超音波所見とに異常は認めなかった。年齢, Body Mass Index, 血中プロラクチン値で両者に有意な差は認めなかった。一方、血中テストステロン値, LH/FSH 比, E_2 値では前者が有意に高値を示した。【考察】PCO 様の卵巣の超音波像を示す症例の中に増殖期にも関わらず子宮内膜が超音波上分泌期様の高輝度を呈する症例を認めた。その原因として、テストステロンにより子宮内膜の間質が浮腫化したことが示唆された。さらに、このような症例でもわずかながら妊娠、出産例を認めたことより、このような子宮内膜が妊娠に関して不利な状況ではあるが適切な排卵誘発により妊娠・出産も可能であると思われる。

11. Premature Ovarian Failure の 2 症例

○東口敦司, 細川知俊, 馬島秀泰

(慶應義塾伊勢原病院産婦)

X 染色体異常が原因と考えられる Premature Ovarian Failure (以下 POF) の 2 症例を経験したので報告する。【症例 1】25 歳, 0 経妊 0 経産【主訴】原発性無月経【検査所見】LH 46 mIU/ml, FSH 140 mIU/ml, PRL 6.5 ng/ml, $E_1 < 10$ pg/ml, E_2 10.3 pg/ml, $E_3 < 5$ ng/ml, LHRH テストは卵巣性無月経パターン, 染色体分析で 46X, add(X)(q22.3). 腹腔鏡下卵巣生検で卵胞形成を認めず。【症例 2】38 歳, 1 経妊 0 経産【主訴】続発性無月経【検査所見】LH 32 mIU/ml, FSH 120 mIU/ml, PRL 4.7 ng/ml, $E_1 < 10$ pg/ml, $E_2 < 10$ pg/ml, $E_3 < 5$ ng/ml, LHRH テストは卵巣性無月経パターン, 染色体分析で 46X, del(X)(q21). 腹腔鏡下卵巣生検で両卵巣に白体と閉鎖卵胞を認めた。【まとめ】本 2 症例の様な場合、カウフマン療法を施行し、挙児希望があれば GnRHa-hMG-hCG 療法が行われる。妊娠・月経歴に拘わらず POF 症例では染色体分析が必要と思われる。

12. メラトニンの迅速な Gn-RH ニューロン刺激作用

○中沢和美

(藤田保健衛生大学坂文種報徳曾病院産婦)

【目的】メラトニンは主に松果体で合成、分泌され、血中濃度は夜間に高く、昼間に低い日内リズムを示す。このメラトニンの分泌動態がヒト女性の生殖機能の調節機構に深く関わっていることを示唆する報告は多数ある。例えば習慣性に激しい運動を続ける女性および第二度無月経の女性の血中メラトニン濃度は有意に高値を示すと言われている。今回、生殖機能調節機構の

中枢である Gn-RH ニューロンへのメラトニンの作用について検討を行なった。【方法】(a) 9 週例の SD 系雄ラットを去勢し 3 週間後に腹腔内にメラトニン 20 μg を投与し、1 時間後に Gn-RH ニューロンの神経終末が局在する正中隆起部を摘出、高濃度 K^+ 添加培養液中で培養後、培養液中および組織中の Gn-RH 濃度を RIA 法にて測定した。血液も同時採取しメラトニン濃度を RIA 法にて測定した。(b) 9 週齢の SD 系雄ラットを去勢し 3 週間後に正中隆起部を摘出し、メラトニン 10^{-5}M 添加培養液中で 1 時間培養し培養液中および組織中の Gn-RH 濃度を測定した。【結果】メラトニン投与 1 時間後の血中濃度は有意に増加した。メラトニンの腹腔内投与は Gn-RH の分泌能力を有意に増加させた。また正中隆起部内濃度も有意に増加した。培養液中に添加されたメラトニンは培養液中および組織中の Gn-RH 濃度に影響を与えなかった。【考察】季節性繁殖動物を明期暗期の長さの調節により生殖行動を開始させるには週の単位が必要と考えられているが、今回メラトニンは 1 時間で Gn-RH ニューロンを活性化することが初めて明らかとなった。さらにメラトニンが性腺ステロイドホルモンが無くても効果をおよぼすことが明らかとなった。培養液中のメラトニンは作用しないことから、正中隆起部以外の組織が必要と考える。【結論】メラトニンは短時間で中枢性生殖調節機構を賦活する。

13. 緩速凍結法による胚盤胞凍結保存とホルモン補充周期下の融解胚移植で妊娠に至った 1 例

○森脇崇之、小口秀紀、田村圭造

岸上靖幸、鈴木正樹、三輪忠人

(トヨタ記念病院産婦)

早川美奈、日比博子、中村 哲

(同 臨床検査)

体外受精において、分割胚に比較して困難とされる胚盤胞の凍結・融解移植で妊娠に成功した 1 例を報告する。

症例は 30 歳、女性。両側卵管閉塞による不妊のため体外受精の適応となった。体外受精・胚移植周期と凍結・融解胚移植周期で 4 回の胚移植を施行したが妊娠に至らず、胞胚期の拡張期胚盤胞 1 個と桑実胚 1 個を、凍結保護剤として 1,2-propanediol と sucrose を使用した緩速凍結法で凍結保存した。経皮エストロゲン剤と経口プロゲステロン剤およびプロゲステロン坐剤に

よるホルモン補充周期に凍結胚を融解しその生存を確認した。4 時間の追加培養の後に胚盤胞と桑実胚を移植し単胎妊娠が成立した。妊娠 9 週でエストロゲン、11 週でプロゲステロンの補充を終了し、現在順調に妊娠継続中である。

14. 胚移植困難例の体外受精成績について

○岡田喜親、杉本利幸、弘島大輔

大石晃良、山口万紀子、鈴木留美

望月 修 (聖隷三方原病院不妊センター)

【目的】体外受精における一連の操作のうち、最終段階である胚移植は通常簡単な操作であるため、あまり重要視されない傾向にある。しかし、時に移植カテーテルの子宮内挿入が困難な症例に遭遇することがあり、思わぬアクシデントに苦慮することがある。このような挿入困難例に当センターでは、これまで wallace カテーテルとスタイレットの併用を実施しており、その成績については昨年当学会で発表した。今回は胚移植困難例にスタイレットに変えてシドニーカテーテルを用い、その胚移植操作が体外受精成績に及ぼす影響について検討を行った。【方法】平成 12 年 4 月から 12 月の体外受精・胚移植で、胚移植困難例にシドニーカテーテルを用いた群と wallace カテーテルでスムーズな移植を行った群を対象とした。対象症例は 61 例、106 周期 (顕微授精 50 周期を含む) で、胚移植内容により wallace (スムーズ) 群 93 周期、シドニー (困難) 群 13 周期に分け、年齢、不妊期間、採卵数、子宮内膜の厚さ、胚移植数、臨床妊娠率、着床率および出血の有無について検討を行った。【成績】2 群の年齢 (平均) と不妊期間はそれぞれ 35.2 歳 vs 32.3 歳、78 カ月 vs 57 カ月といずれもシドニー群で若い傾向にあったが、採卵数、子宮内膜の厚さ、胚移植数は 2 群間に差を認めなかった。一方、胚移植当たりの臨床妊娠率は 34.4% vs 30.8% で、困難例に使用したシドニー群の成績も良好であった。またカテーテルへの血液付着が各々 7.5% vs 46% の頻度でみられ、スムーズ群の付着例では妊娠が皆無であったが、シドニー群では 3 例に妊娠が認められた。着床率は 17.4% vs 16.1% と両群で有意差は見られなかった。【結論】胚移植困難例にシドニーカテーテルを用い、比較的良好な妊娠率を得ることができた。また本カテーテルでは血液付着の程度がごく微量なため、これら血液付着例の中にも妊娠例が存在したものと推定された。

15. 精巣内精子による顕微授精の臨床成績

○平 浩之, 村田朋子, 佐藤真知子
伊藤知華子, 若原文世, 都築知代
上條浩子, 浅井正子, 成田 収
(成田病院産婦)
早川隆啓, 早瀬喜正, 小島宗門
(名古屋泌尿器科病院)

【目的】無精子症患者に対して, 主として非閉塞性無精子症の場合, 精巣精子回収法 (TESE) により得た精子を用いて, 卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を行う治療法が, 現在定着してきている. 当院にて施行してきた TESE/ICSI の成績について検討した. 【方法】最近 2 年間に, 無精子症の診断を得た 73 例のうち, 精巣生検を行った 40 例を対象とし, 精子回収可否のパラメータを検討した. また, TESE/ICSI が可能であった 19 症例 (24 周期) について, 同時期の射出精子による ICSI (1134 周期) と比較して, その成績を調べた. 【結果】精子回収可否のパラメータとして, FSH (可能例: 平均 10.1 mIU/ml, 不能例: 24.1 mIU/ml), Johnsen's Score (可能例: 7.1, 不能例: 2.3) に有意差が認められたが, Testosterone, LH には有意差はなかった.

TESE/ICSI の結果は同時期の射出精子による ICSI と比較して, 周期あたりの妊娠率は有意に高く (54.2%/29.9%) になっているが, 受精率, 流産率には差異はなかった. TESE/ICSI のうち, 運動精子と不動精子の比較では, 受精率に有意差を認めた (74.4%/35.6%) が, 胚の質, 妊娠率には差異はなかった. 新鮮精子と凍結精子では, 受精率 (54.3%/94.6%) に有意差を認め, 胚の質, 妊娠率には差異はなかった. 【結論】1) TESE/ICSI による妊娠率は, 射出精子による ICSI より, 有意に高い. 2) TESE による精子回収の予測には, FSH, Johnsen' Score が有用. 3) 不動精子より運動精子, 新鮮精子より凍結精子の方が受精率は高くなるが, 胚の質, 妊娠率に差異はない.

第 38 回 日本不妊学会中国四国支部学術講演会

日時: 平成 13 年 8 月 25 日 (土) 13:00~18:35

場所: 徳島プリンスホテル (徳島市)

1. ヒト卵巣顆粒膜・莖膜細胞における HGF と SCF のパラクリン作用

○出浦伊万里, 伊藤雅之, 永野裕美子

坂本靖子, 山内延広, 藤井亜希子
大島順恵, 谷口文紀, 吉田壮一
岩部富夫, 原田 省, 寺川直樹

(鳥取大産婦)

【目的】ウシ卵巣において, 莖膜細胞由来の HGF (hepatocyte growth factor) と顆粒膜細胞由来の SCF (stem cell factor) は性ホルモン産生と細胞増殖を促進する. 本研究ではヒト卵巣における HGF ならびに SCF およびそれぞれの受容体の遺伝子発現を検索するとともに, HGF と SCF の作用を検討した. 【方法】患者の同意のもと, 体外受精時に卵胞液と顆粒膜細胞を, 手術時に莖膜細胞と卵巣間質細胞を採取した. それぞれの遺伝子発現を RT-PCR 法にて検索した. 卵胞液中の HGF および SCF 濃度は ELISA 法で測定した. 顆粒膜細胞に HGF を, 莖膜細胞に SCF を添加したのち細胞増殖能を MTT assay にて評価し, 培養液中の性ホルモン濃度を EIA 法で測定した. 【成績】莖膜および卵巣間質細胞において HGF と c-kit の遺伝子発現を, 顆粒膜細胞において SCF と c-met の遺伝子発現を認めた. HGF (50 ng/ml) の添加は顆粒膜細胞の SCF 遺伝子発現を, SCF (50 ng/ml) の添加は莖膜細胞の HGF 遺伝子発現を増強した. 卵胞液中 HGF と SCF 濃度の間には正の相関 ($r=0.547$, $p<0.01$) がみられた. SCF の添加は莖膜細胞の増殖を促進した. HGF の添加は顆粒膜細胞の増殖に影響を及ぼさなかったが, P 産生を有意に増加した. 【結論】ヒト卵巣における HGF ならびに SCF およびそれぞれの受容体の遺伝子発現を明らかにした. 顆粒膜細胞に発現する SCF と莖膜細胞に発現する HGF はパラクリン因子として positive feedback loop を形成し, 細胞増殖と分化に関与することが示唆された.

2. 摂食促進物質オレキシンの LH パルス状分泌抑制作用

○尾形理江, 田中 優, 三浦尚子
清川麻知子, 田村貴央, 桑原 章
井川 洋, 齊藤誠一郎, 松崎利也
安井敏之, 苛原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】我々は摂食促進物質オレキシン (Ox) が下垂体からの LH パルス状分泌を抑制することを明らかにし, 内因性オピオイドの関与について検討した. 【方法】卵巣摘出後の雌ラットを用い脳室内に OxA (A 群), OxB (B 群) を 3 nmol, 生理食塩水 (C 群) を単独投

与, およびオピオイド拮抗物質であるナロキソン (0.5 mg/kg/h, N 群) を併用, 脳室内投与後 2 時間の LH パルス状分泌の変化を検討した。【成績】OxA では平均 LH 値 (A 群: $4.81 \pm 0.56 \mu\text{g/l}$, A+N 群: $7.47 \pm 0.71 \mu\text{g/l}$, C 群: $8.45 \pm 0.75 \mu\text{g/l}$) とパルス頻度 (A 群: 2.71 ± 0.42 回/2h, A+N 群: 3.71 ± 0.18 回/2h, C 群: 5.29 ± 0.36 回/2h) が OxA の投与により有意 ($p < 0.01$) に減少し, N 併用により有意 ($p < 0.01, 0.05$) に回復した。OxB では平均 LH 値 (B 群: $6.75 \pm 0.44 \mu\text{g/l}$, B+N 群: $6.71 \pm 0.29 \mu\text{g/l}$, C 群: $8.45 \pm 0.75 \mu\text{g/l}$) とパルス頻度 (B 群: 3.75 ± 0.56 回/2h, B+N 群: 4.00 ± 0.33 回/2h, C 群: 5.29 ± 0.36 回/2h) は OxB の投与により有意 ($p < 0.05$) に減少し, N 併用にて回復しなかった。【結論】Ox による LH パルス状分泌の抑制には, OxA では内因性オピオイドが関与し, OxB では関与が少ないことが示唆された。

3. TRH 刺激による MAP キナーゼ活性化とプロラクチン, 成長ホルモンの遺伝子発現の変化について

○金崎春彦, 米原利栄, 高橋健太郎
宮崎康二 (島根医大産婦)
山本秀幸, 福永浩司, 宮本英七
(熊本大第一薬理)

プロラクチン (PRL), 成長ホルモン (GH) の両ホルモンを産生・分泌するラット下垂体 GH3 細胞において, ホルモン分泌促進因子である Thyrotropin-releasing hormone (TRH) による Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) の活性化反応が, 両ホルモンの遺伝子発現にどの様に関与するかを検討した。TRH 刺激で PRL, GH 両ホルモンの分泌反応は促進したが, PRLmRNA の増加, GHmRNA は有意に減少した。MAP キナーゼ阻害剤 PD098059 で TRH 刺激による PRLmRNA の増加及び GHmRNA の減少はそれぞれ抑制された。MAP キナーゼキナーゼキナーゼ (MEKK) の恒常活性化型発現ベクターを細胞に強制発現すると TRH 刺激と同様に PRLmRNA の増加, GHmRNA の減少が生じた。また TRH 刺激で PRL プロモーター活性 ($-609 \sim +12$) は著明に亢進したがこの変化は PD098059 で抑制され, 一方 GH プロモーター ($-563 \sim +30$) 活性は TRH 刺激により変化を認めなかった。これらの結果は TRH が MAP キナーゼ活性化を介して PRL 遺伝子発現を促進していること, また TRH 刺激による GHmRNA の減少は MAP キ

ナーゼの GH プロモーターへの直接的な作用では無いことが示唆された。

4. ラット下垂体 GH3 細胞における cAMP によるプロラクチン合成への MAP キナーゼの関与について

○米原利栄, 金崎春彦, 高橋健太郎
宮崎康二 (島根医大産婦)
山本秀幸, 福永浩司, 宮本英七
(熊本大第一薬理)

我々はこれまでにラット下垂体 GH3 細胞を用い, ホルモン分泌促進因子である Thyrotropin-releasing hormone (TRH) は Mitogen-activated protein kinase (MAP キナーゼ) を介してプロラクチン (PRL) 及び成長ホルモン (GH) の発現を抑制していることを報告してきた。今回我々は cAMP による MAP キナーゼの活性化反応とホルモンの遺伝子発現について検討を行った。cAMP アナログ CPT-cAMP は MAP キナーゼの活性化を有意に増加させた。また CPT-cAMP 刺激で PRL は増加, 逆に GH は減少した。恒常活性化型 cAMP キナーゼ (A キナーゼ) を GH3 細胞に強制発現すると MAP キナーゼ活性は増加し, CPT-cAMP 刺激と同様のホルモン変化が生じた。細胞内 cAMP を上昇させる PACAP27 は, GH3 細胞において MAP キナーゼを活性化させ, この活性化は A キナーゼ阻害剤 H89 及び MAP キナーゼ阻害剤 PD098059 にて完全に抑制された。CPT-cAMP 及び PACAP27 による PRL プロモーター活性の増加は H89 及び PD098059 の同時投与で著明に抑制された。これらの結果は cAMP による MAP キナーゼの活性化反応はプロラクチン合成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

5. 40 歳以上の高齢症例に対する ART の成績

○矢野浩史, 久保敏子, 大橋いく子
矢野知恵子, 古谷公一
(矢野産婦人科 IVF センター)

【目的】加齢により妊娠能は低下し, ART を用いても高齢者の不妊患者の妊娠率は不良である。当院での 40 歳以上の ART (IVF, ICSI および FET) による治療成績について検討した。【方法・成績】対象は 1996 年 1 月より 2001 年 3 月までに採卵を施行した 40 歳以上の不妊患者 57 症例 133 周期について検討した。そのうち 54 症例 119 周期で採卵できたが, 胚移植まで到達したのは 46 症例 85 周期で, 胚移植到達率は症例あたり

80.7% (46/57), 採卵周期あたり 63.9% (85/133) であった。IVF は 21 症例 27 周期, ICSI は 41 症例 89 周期に行われた。ART 症例 (IVF, ICSI および FET) の平均年齢は 41.6 ± 1.7 歳 (max 46 歳), 平均採卵数 3.5 ± 3.2 個, 受精率 69.2%, 平均移植胚数 2.4 個, 良好胚の割合 76.2%, 移植周期妊娠率は 10.6% (9/85), 症例妊娠率は 17.4% (8/46) であった。妊娠が成立した 8 症例 9 周期のうち 6 症例 6 周期が出産し, 2 症例 3 周期が流産 (33.3%) となった。出生児の染色体はすべて正常であり, 奇形もなかった。出産最高齢は 45 歳 11 カ月であった。妊娠群 8 症例と非妊娠群 38 症例を比較した。平均年齢は 41.4 ± 1.5 歳と 41.3 ± 1.5 歳, 平均採卵数は 6.8 ± 5.2 個と 4.9 ± 3.3 個, 受精率は 71.1% と 76.6%, 平均移植胚数は 3.1 個と 2.3 個, 良好胚の割合は 76.0% と 78.4% であった。【結論】40 歳以上の症例における ART の妊娠率は低かったが, 採卵数や移植胚数が多い群では妊娠に成功する症例も存在した。従来 40 歳以上の高年齢の不妊患者に対する ART は消極的であったが, 症例を選択すれば挙児可能と思われた。

6. 新しく開発された Quinn's Advantage medium による IVF および ICSI の成績

○久保敏子, 矢野浩史, 大橋いく子
矢野知恵子, 古谷公一

(矢野産婦人科 IVF センター)

【目的】HTF medium (HTF) は多くの施設で用いられているが単純培養液であるため, 胚を发育させるための栄養素が不足しており, また发育を抑制する glucose および Pi を比較的高濃度に含んでいる。Quinn's Advantage medium (QA) の Cleavage type には glucose および Pi が全く含まれてなく, また发育を促進するために pyruvate, アミノ酸, タウリンなどの栄養素が含まれている。今回 HTF と QA を使用した成績を比較して, QA の有効性について検討した。【方法】対象は, 1999 年 1 月から 2000 年 6 月までの期間に HTF を使用した IVF 47 周期および ICSI 37 周期の計 84 周期 (HTF 群) と, 2000 年 9 月から 2001 年 4 月までの期間に QA を使用した IVF 36 周期および ICSI 27 周期の計 63 周期 (QA 群) である。QA (Sage Bio-Pharma 社) はナカメディカルより提供を受け, HTF は IRVINE SCIENTIFIC 社のものを使用した。QA 群は媒精に glucose, Pi を含んでいる QA (Fertilization) を使用し, その後 QA (Cleavage) にて授精卵の培養を行った。【成績】HTF 群は, 受精率 79.2% (469

/592), 分割率 89.6% (420/469), 妊娠率 35.7% (30/84) であった。QA 群は, 受精率 76.5% (372/486), 分割率 94.9% (353/372), 妊娠率 44.4% (28/63) であった。治療法別では, IVF 周期における結果は, HTF 群と QA 群でそれぞれ, 受精率 87.0% (289/332) と 81.0% (234/289), 分割率 90.0% (260/289) と 94.9% (222/234), 妊娠率 44.7% (21/47) と 44.4% (16/36) であった。ICSI 周期における結果は, HTF 群と QA 群でそれぞれ, 受精率 69.2% (180/260) と 70.1% (138/197), 分割率 88.8% (160/180) と 94.9% (131/138), 妊娠率 24.3% (9/37) と 44.4% (12/27) であった。【結論】Day 2, Day3 移植において QA medium は, HTF medium と同様の成績が得られた。QA medium には初期胚の发育のために重要な栄養素が添加されており, 培養環境をさらに改善すれば成績の向上が期待できると思われた。

7. 当科における体外受精による多胎妊娠の検討

○本田徹郎, 梅岡弘一郎, 中堀 隆

高橋 晃 (倉敷中央病院産婦)

高橋 司, 磯崎八重子 (同 臨床検査科)

馬岡 陽 (小野レディースクリニック)

【緒言】多胎妊娠は早産・低出生体重・妊娠中毒症・帝王切開分娩など母児のリスクとなる。これまで当科では採卵後 2 ないし 3 日目に 3 個の胚を移植することを治療の first line にしてきた。ただし初回治療で年齢が若い場合など, 多胎発生リスクが高いと考えられる場合には本人と相談して移植数を 2 個にとどめている。この治療方針が妥当なものであるかどうかを, 臨床妊娠率や多胎発生率をもとに検討した。【対象】当科で 1993~2000 年に体外受精を受けて胚移植まで至った全 734 周期 (新鮮胚周期 561 周期および凍結胚周期 173 周期) について, 年齢, 既往採卵回数, 胚の形態と個数, 妊娠結果について解析した。发育良好胚の定義は, day 2 で Veeck grade 1~2, 4 cell 以上とし, 同様に day 3 で G1~2, 8 cell 以上, また day 5 で blastocyst 以上のものとした。【結果】良好胚移植数が 0, 1, 2, 3 個と増えるにつれ, 移植あたりの臨床妊娠率 (それぞれ 5.3%, 19.3%, 30.9%, 38.6%), 生産率 (それぞれ 2.1%, 12.8%, 22.2%, 29.1%) は増加した。多胎妊娠になりやすい因子を検討したところ, 发育良好胚の移植数が多いことが最大の因子であり, ほかには採卵回数の少ないこと, 年齢が若いことなどが関与していた。妊娠経過であるが, 双胎の 12.5% (3/24) と品胎の 66.7

% (2/3) が胎児側の異常なしに妊娠 32 週未満に死産もしくは早産していた。一方、単胎 93 例には胎児側の異常による 3 例の死産以外には 32 週未満の死産・早産はなかった。【考察】多胎妊娠になりやすい最大の因子は良好胚を多く移植することであった。多胎妊娠は早産のリスクになることが当科の症例でもあてはまっていた。今後良好胚の移植数を症例によって減少することを考慮する必要があると考えられた。

8. ART に GnRH-antagonist を用いた 10 症例の検討

○堤ゆかり, 森出直子, 檜尾健二

中川浩次, 山野修司, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】GnRH-antagonist の併用が、早発排卵、早期黄体化、及び ART の成績へ及ぼす影響を検討した。【対象】卵胞期初期 FSH 値 10 IU/ml 以上、または hMG に低反応を示す症例を除外し、文書による同意を得られた夫婦 10 組を対象とした。上記条件を満たし、同時期に採卵日固定法で ART を実施した 9 例をコントロールとした。【方法】月経開始 3 日目よりパーゴナル 150 IU を連日投与し、パーゴナル投与開始 6 日目から hCG 投与日まで GnRH-antagonist (NS75A, 0.25 mg) を連日投与した (antagonist 使用群) 最大卵胞径が 18 mm を越えた時点で hCG 10,000 単位投与し、35 時間後に採卵を行った。【結果】hCG 投与日血清 LH の上昇や血清プロゲステロン値の上昇は認めなかった。FSH の投与量は平均 16.6 アンブル、GnRH-antagonist の投与日数は平均 4.7 日で、全例で採卵が可能だった。antagonist 使用群およびコントロール群の受精率は 79.7%, 86.0%, 分割率は 84.3%, 83.8%, 妊娠率は 22.2%, 25.0% で両者間に有意差はなかった。【まとめ】GnRH-antagonist を用いることで、1. 10 症例すべてで、早発排卵、早期黄体化を抑制することができた。2. GnRH-agonist を用いた方法と ART の成績に差を認めなかった。

9. 最近 3 年間の多胎妊娠発生に関する全国調査成績

○田中 優, 尾形理江, 三浦尚子

清川麻知子, 山田正代, 上村浩一

桑原 章, 井川 洋, 齊藤誠一郎

安井敏之, 苛原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】本邦での不妊治療による多胎妊娠発生の現状を把握する目的で、1997~1999 年の 3 年間の発生状況に関する全国調査を実施し、前回 (1994~1996 年) と比較し、最近の動向を検討した。【方法】全国の主な不妊治療施設にアンケート調査を行い、1997 年 1 月~1999 年 12 月の 3 年間に成立した 3 胎以上妊娠例を対象に、症例の背景、妊娠に至った治療法、胎数、妊娠転帰などを調査した。【結果】1) 3 胎以上妊娠は 682 例で前回に比して若干増加している可能性があった。2) 3 胎以上妊娠の発生原因はその 98.7% が不妊治療によるもので、とくに 3/4 が体外受精胚移植法で発生し、割合も著明に増加していた。3) 3 胎以上妊娠に占める 4 胎以上の割合は一般排卵誘発では前回と大差ないのに対し、体外受精では減少していた。4) 3 胎以上妊娠に対する減数手術施行率は増加傾向にあり、主に 2 胎を目指して行われていることがわかった。【考察】不妊治療での 3 胎以上妊娠は若干増加傾向にあり、一般排卵誘発、体外受精胚移植ともにさらなる多胎予防の努力が必要と考えられた。また、減数手術は現実的に施行されている現状が明らかとなった。

10. 副作用軽減を目的としたゴナドトロピン療法の投与方法の検討

○三浦尚子, 田中 優, 尾形理江

清川麻知子, 上村浩一, 桑原 章

井川 洋, 齊藤誠一郎, 松崎利也

安井敏之, 苛原 稔, 青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】ゴナドトロピン療法の副作用である多胎妊娠や OHSS を軽減する治療法を開発する目的で、FSH 低用量持続療法 (低用量療法) と FSH-GnRH パルス療法 (パルス療法) の有用性を、通常法と比較検討した。【方法】視床下部性排卵障害 (60 症例) または PCOS (46 症例) をそれぞれ FSH 通常法、低用量療法、パルス療法の 3 群に分けて、排卵障害に対する治療効果と副作用の発生率を比較検討した。【成績】低用量療法とパルス療法の排卵率と妊娠率は通常法と比較して差は認められなかった。通常法の視床下部性排卵障害および PCOS 症例における多胎妊娠率は、それぞれ 12.5%, 30.3% であったのに対し、低用量療法とパルス療法では多胎妊娠が認められなかった。また通常法の OHSS 発生率は視床下部性排卵障害で 40.9%, PCOS で 43.2% であるのに対し、低用量療法ではそれぞれ 12.0%, 25.0%, パルス療法ではそれぞれ 0%, 13.4% と有意に

低く、その発生率はパルス療法で特に低かった。【結論】低用量療法およびパルス療法は通常法による排卵率、妊娠率を保ったまま多胎妊娠や OHSS の発生を予防でき、特に PCOS などの OHSS のハイリスク患者に対しては FSH-GnRH パルス療法が有用であることが示唆された。

11. 卵巣過刺激症候群 (OHSS) の発症中に認められた卵巣内出血の 1 症例

○栗岡裕子, 高橋健太郎, 尾崎智哉

金崎春彦, 宮崎康二 (鳥根医大産婦)

今回、OHSS に卵巣内出血を合併し、その後保存的に経過観察した症例を経験したので報告する。症例は 33 歳、主婦。多嚢胞性卵巣症候群で平成 11 年 6 月より controlled ovarian hyper-stimulation を開始。Day 5 から 7 まで hMG (ヒュメゴン) 150 IU/day 投与し、Day 8 から 9 まで hMG (日研 HMG) 75 IU/day を投与。Day 11 に hCG 5000 IU 投与し排卵誘起を行った。hCG 投与後両側卵巣径の増加を認めたため、luteal support を hCG から黄体ホルモンに変更した。Day 22 に突然の左下腹痛を認め同日入院。その後疼痛は増悪せず、同日の WBC 13200 / μ l, Hb 11.1 g/dl, Ht 33.1 %, albumin 4.0 g/dl で 37°C 代の発熱以外 vital sign も安定していた。Day 25 に WBC 7400 / μ l, Hb 5.5 g/dl, Ht 16.7%, albumin 3.8 g/dl と貧血を認めたため卵巣内出血を疑い、手術適応も考慮しつつ、鉄剤、アルブミン製剤投与を追加し保存的に治療した。Day 27 の Hb 5.0 g/dl を nadir に以後貧血も改善したが妊娠には至らなかった。MRI で左卵巣は 12×7 cm に腫大し卵巣内に出血を認め、OHSS に卵巣内出血を合併した症例と診断した。左卵巣は月経が生じて縮小しないため EP 療法を継続し、平成 12 年 3 月に 4×4 cm まで縮小したが患者の転居のため他院へ転科となった。本症例のように OHSS に出血を合併すると、濃縮した血液学的所見に伴い、臨床像が複雑になり注意を要する。

12. 子宮内膜症表在性病変と妊娠能

○谷口文紀, 永野裕美子, 坂本靖子

山内延広, 藤井亜希子, 伊藤雅之

大島順恵, 吉田壮一, 岩部富夫

原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

【目的】子宮内膜症には表在性、深在性および癒着病変が存在するが、これら病変と不妊との関連については明らかでない。内膜症患者の腹腔内貯留は増加してお

り、その中には高濃度のサイトカインが存在することが明らかとなった。一方、内膜症病変自体がサイトカインを産生し、妊娠能を低下させる可能性が示唆されている。本研究では、子宮内膜症表在性病変と不妊との関連を知ることを目的とした。【方法】1989 年から 1997 年の間に当科で不妊原因精査を目的として腹腔鏡検査を行い、子宮内膜症と診断された症例のうち、卵管因子や男性因子を有する症例を除いた 162 例を検討対象とした。腹腔鏡下に腹水吸引、表在性病変の焼灼および付属器の癒着剥離を行い、妊娠能があると判断された場合は待機療法を行った。待機療法期間内に妊娠に至らない場合は内膜症治療薬剤による薬物療法を行った。【成績】腹腔鏡下操作後の待機療法あるいはその後に行われた薬物療法によって 69 例 (43%) に自然妊娠が成立した。R-AFS による内膜症進行期と妊娠率の間に関連はみられなかった。表在性病変あるいは癒着病変の存在と妊娠成立について検討すると、表在性病変が除去された症例の妊娠率は 49% であり、表在性病変の存在しなかった症例の 28% に比して有意に高かった。【結論】子宮内膜症合併不妊患者の表在性病変を消失させることにより高い妊娠率が得られたことから、表在性病変の存在が妊娠能低下に関与している可能性が示唆された。

13. PCO 患者に対する FSH 製剤投与開始量の検討

○中村康彦, 杉野法広, 滝口修司

高山尚子, 原田綾子, 加藤 紘

(山口大生殖・発達・感染医科学)

高崎彰久, 田村博史, 石松正也

森岡 均 (済生会下関総合病院産婦)

【目的】PCO 患者はクロミッド療法に抵抗性でゴナドトロピン療法の対象となることが多い。しかし本患者はゴナドトロピン療法にて OHSS になりやすく、その排卵誘発にあたっては注意が必要である。本研究では、FSH 製剤の投与開始量を変えて、その臨床成績を比較した。【方法】日産婦の診断基準で PCO と判定された 15 名に対して、原則として月経開始 7 日目より 1 周期目フェルティノーム P 150 IU/day, 2 周期目ヒュメゴン 100 IU/day, 3 周期目フェルティノーム P 75 IU/day で投与開始とした。投与 1 週間後で卵胞発育を認めなければ投与量を増加し、妊娠に至らなければ 1→2→3 周期の順に投与開始量を変えた。この各治療周期における発育卵胞数、hCG 切り換え時の血中 E₂ 値、

FSH 総投与量および投与日数, OHSS 発症率, 妊娠率について検討した。【結果】1 周期目における OHSS 発症率は, 13 例中 7 例と最も多く, 発育卵胞数 (3.8 ± 1.1 個), 血中 E_2 値 (1722 ± 387 pg/ml) も 2 周期目, 3 周期目に比して高値であった。FSH 総投与量および投与日数は, 投与開始量に反比例していた。なお, 妊娠例は 1 週目 2 例, 2 週目 2 例, 3 週目 3 例であった。【結論】PCO 症例に FSH 製剤の投与を行う場合, 投与開始量としては 100 IU あるいは 75 IU 製剤で開始することが望ましい。

14. 不育症症例の黄体期中期の子宮血流の検討

○笈本朱理, 羽原俊宏, 中塚幹也
野口聡一, 小西秀樹, 工藤尚文

(岡山大産婦)

私達は, 不育症例では妊娠初期において子宮動脈血管抵抗が高値を示していることを報告してきた。今回, 不育症症例の非妊娠時黄体期中期の子宮血流について検討した。【対象・方法】当科不妊・不育症外来を受診した 2 回以上の流・死産の既往を持つ不育症群 ($n=59$) および男性因子による不妊または生児を持つ続発不妊である control 群 ($n=72$) の 131 症例を対象とした。黄体期中期に, 左右の子宮動脈の pulsatility index (PI) 値を計測し平均値を算出した。【結果】control 群の子宮動脈 PI 値は 2.23 ± 0.41 (mean $\pm$ S.D.) であったが, 不育症群では 2.64 ± 0.49 と有意に高値であった ($p < 0.001$)。不育症群のうち抗核抗体陽性例では子宮動脈 PI 値は 2.83 ± 0.50 で, 抗核抗体陰性例の 2.44 ± 0.41 に比較して有意に高値であった ($p < 0.03$)。不育症群のうち Lupus anticoagulant (LAC) 陽性または抗リン脂質抗体陽性例 ($n=10$) の子宮動脈 PI 値は 3.12 ± 0.44 で, 両者とも陰性の症例の 2.54 ± 0.45 に比較して有意に高値であった ($p < 0.002$)。【考察】習慣性流産・不育症症例の中に, 血流抵抗が高く子宮循環の不良である一群があり, この機序には自己免疫的な血管障害が関与している可能性がある。

15. 心因性 ED としての未完成婚の 1 例

○紙谷章弘, 永井 敦, 井口裕樹
公文裕巳

(岡山大泌尿器)

症例は, 31 歳, 男性, 平成 11 年 4 月に結婚後, 性交を試みるも陰茎勃起は得られるが陰内への挿入ができず, 挙児を希望し近医産婦人科を受診。妻の陰その他の形態に異常はないため, 平成 11 年 10 月 25 日, 当科

紹介受診。身体所見, 血液生化学所見に特に異常なく, 早朝勃起も正常であった。問診では, 性交時勃起は良好であるが, 挿入が困難で, そのうち勃起が減弱するとのことであった。以上より, 勃起機能は正常であるが挿入ができないための焦りによる勃起の減弱を伴う性交不能と診断した。クエン酸シルデナフィルを処方し, さらに性交時に潤滑ゼリーを陰口と陰茎に十分塗布して挿入するよう指導した。シルデナフィルにより良好な勃起は得られたが, やはり挿入は不可能であった。そこで, 平成 12 年 7 月 17 日, 妻の内診を夫と共にに行った。まず, 医師による内診を夫に見せて指導し, 次に夫による内診を行い, 夫の指が楽に挿入できることを夫自身により確認した。帰宅後性交を試み, 指は楽に挿入できるようになったが, シルデナフィルにても勃起が不完全で, 挿入に至らなかった。そこで, 平成 12 年 12 月 25 日, プロスタグランディン E1 を陰茎海綿体内に注射し, 直後に性交を試みた (ホテル直行法)。今回は十分な勃起が得られ, 挿入, 及び陰内射精まで可能であった。現在, 挙児希望にて排卵日にホテル直行療法を施行しているが妊娠には至っていない。

16. 精巣間質の fibrosis の程度が vasectomy reversal の成績を規定する

○白石晃司, 瀧原博史

(小野田市立病院泌尿器)

内藤克輔

(山口大泌尿器)

【目的】vasectomy reversal の成績を予測する因子として閉塞期間が唯一の有用なパラメーターである。vasectomy に伴い組織学的にも様々な変化が認められる。vasectomy に伴う間質病変の関与を検討するために精細管内病変と同時に間質の fibrosis の程度を定量的に解析し, 術後成績との関連を調べてみた。【対象と方法】1984 年 1 月から 2000 年 12 月の間に山口大学および小野田市立病院泌尿器科において施行された顕微鏡下精管-精管吻合症例 (22 症例, 43 精巣, 30~54 歳, 平均 40.5 ± 5.5 歳) を対象とした。精巣組織のパラフィン切片を用いて以下の解析を行った。1) H.E. 染色による johnsen's score の算出, 2) proliferative nuclear cell antigen (PCNA) 染色による PCNA-labelling index (PCNA-LI) の算出, 3) TUNEL 法による apoptotic cell の検出, 4) Masson-Trichrome 染色を行い collagen fiber の面積を NIH-Image により定量的に解析 (percent of fibrosis)。各パラメーターと閉塞期間との相関および術後成績との関連について解析した。【結

果】PCNA-L.I. および percent of fibrosis が閉塞期間と有意に負の相関を示した (各, $r=0.626$, $p<0.0001$, $r=0.405$, $p<0.001$). 開存群, 非開存群の間では閉塞期間と percent of fibrosis に有意差を認め (8.1 vs 13.4 years, 33.4 vs 47.5%, $p<0.05$). 妊娠群, 非妊娠群の間では percent of fibrosis のみに有意差を認めた (32.3 vs 39.0%, $p<0.05$). 【考察】 vasectomy 後の閉塞期間が進むにつれ精細胞の DNA 合成能, 間質病変のすべてが障害されたが, vasovasostomy 後の成績を規定するものは精細管内病変ではなく, 間質の fibrosis の程度であった. 間質の fibrosis が精路閉塞による障害を不可逆的にすると考えられた.

17. Kallmann 症候群兄弟例に対する FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION, COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION, MULTICOLOR SPECTRAL KARYOTYPING による染色体解析

○小林達也, 常 義政, 森岡政明

田中啓幹 (川崎医大泌尿器)

【目的】我々は Kallmann 症候群兄弟例を経験した. 今回, 臨床的診断に加え, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Comparative genomic hybridization (CGH), Multicolor spectral karyotyping (M-FISH) の染色体解析を行ったので報告する. 【対象】患者は兄 16 歳 (case 1), 弟 15 歳 (case 2) の兄弟例. 兄 2 歳, 弟 1 歳時に両側停留精巣で近医診断. 兄 8 歳, 弟 7 歳時に近医で両側停留精巣に対して, 両側精巣固定術施行. この時点で G-band 染色体検査を行い, 正常であった. その後, 2 次性徴発現せず, 当院紹介受診となる. 身体所見は両症例とも Tanner 分類; 1 度, Genital stage; stage 1, PH stage; stage 1 であった. また, 嗅覚試験でも嗅覚の異常を認めた. 内分泌検査所見では, LH, FSH の低下 (日内変動消失), LH-RH 負荷試験, LH-RH 連続負荷試験の反応低下を認めた. HCG 負荷試験については, 両症例とも反応を認めた. 【方法】両症例本人および, 両親より同意・承諾を得た上で, 患者リンパ球を抽出, 3 日間培養. 培養後, DNA 抽出および, 染色体標本の作成を行った. FISH; 作成した各症例の染色体標本上で Spectra-Green で標識した X centromere probe (Xp11.1-q11.1) と Spectra-red で標識した KAL gene probe (Xp22.3) を同時に Hybridization. 18 hr 後, 蛍光顕微鏡で観察し, Quips 社製解析装置で画像解析を行った. CGH; 正常男性染色体標本

上で Spectra-Green で標識した患者 DNA と Spectra-red で標識した正常 DNA を同時に Hybridization. 72 hr 後, 蛍光顕微鏡で観察し, Quips 社製解析装置で症例染色体の loss, gain について解析した. M-FISH; 作成した各症例の染色体標本上で Spectra-Vysion probe を用い Hybridization. 18 hr 後, 蛍光顕微鏡で観察し, Quips 社製解析装置で転座について解析を行った. 【結果】FISH では, 両症例とも KAL gene の存在を認めた. CGH では, KAL gene の相同染色体である.

18. 不妊を主訴とした勃起障害 (ED)・射精障害症例の検討

○奈路田拓史, 神田光則, 西谷真明

金山博臣, 香川 征 (徳島大泌尿器)

【目的】男性不妊症の原因は精液所見の異常ばかりでなく, 勃起障害 (ED) や射精障害もその原因となりえる. 今回, 当科の不妊・ED 外来を初診した患者で, 不妊を主訴とした ED および射精障害の症例につき検討した. 【対象】2000 年 1 月から 2001 年 6 月までの 18 カ月間に当科不妊・ED 外来を初診した患者は 101 例であった. そのうち ED 症例が 42 例 (42%), 射精障害症例が 5 例 (5%) であり, この 47 例を対象とした. 【結果】ED 42 例中, 不妊を主訴とするものは 11 例 (26%) であり, 4 例 (36.4%) は未完成婚, 全例離婚協議中であった. Sildenafil を処方した症例が 2 例 (18.2%), AIH を勧めた症例, VCD を使用した症例がそれぞれ 1 例 (9.1%), 残りの 3 例 (27.3%) は初診後, 受診しなかった. 射精障害 5 例中, 不妊を主訴とするものは 3 例 (60%) であり, 1 例は居住環境による心因性射精障害と考えられ AIH を勧めた. 1 例は primary emission loss であり, TESE を検討中, 1 例は高度の遅漏で, 離婚問題に発展した. 経過観察中・治療中に妊娠に至った症例はなかった. 【結語】ED 症例の 1/4, 射精障害症例の 3/5 は挙児希望であったが, これら症例においては, 挙児の獲得が困難であることが示唆された.

19. 精子不動化抗体の受精障害機序の解明—精子細胞膜の流動性の検討—

○中川浩次, 山野修司, 堤ゆかり

森出直子, 檜尾健二, 鎌田正晴

青野敏博

(徳島大産婦)

【目的】精子不動化抗体が精子の細胞膜の流動性に及ぼす影響を検討した. 【方法】実験 1. 精子不動化抗体陽性患者血清から精製した IgG (精子不動化抗体群) ま

たはヒト IgG (対照群) 2.25 mg/ml を含む HTF 中で、精子を 5%CO₂ in air で 2 時間培養した。0.05 nmol/ml の [3H]lysoPAF を加え、培養 20 分後および 60 分後の [3H]lysoPAF の膜内移行率を BSA 抽出法で検討した。実験 2. 精子不動化抗体を含む培養液中で精子を 2 時間培養後、引き続き抗体陽性培養液中で 2 時間培養する $++$ 群とヒト IgG を添加した培養液中で培養する $+-$ 群とに分け、膜内移行率を検討した。ヒト IgG 7.5% を含む培養液中で培養したものを対照とした。【結果】1. 精子不動化抗体群および対照群の膜内移行率 (平均値 $\pm$ SE) は培養 60 分後に 9.0 ± 1.3 , 13.4 ± 1.3 であり、精子不動化抗体群が有意に低値を示した ($p < 0.05$)。2. 60 分後の膜内移行率は $++$ 群, $+-$ 群, 対照群でそれぞれ 7.4 ± 0.9 , 13.4 ± 1.5 , 15.5 ± 2.4 であり、 $+-$ 群は $++$ 群より有意に高値を示し ($p < 0.05$)、対照群と同等であった。【結論】精子不動化抗体は、精子の細胞膜の流動性を低下させるが、抑制は可逆性であることが判明した。

20. 骨粗鬆症による多発性胸腰椎圧迫骨折を契機に診断された低ゴナドトロピン性低アンドロゲン症の 1 例

○安本博見, 松原昭郎, 井上省吾

牟田口和昭, 碓井 亞 (広島大泌尿器)

新田泰章 (済生会広島病院整形外科)

骨粗鬆症は閉経後の女性や高齢者に好発する疾患であり、壮年期以前の男性では稀である。しかし骨代謝におけるアンドロゲンの重要性は以前から知られており、低アンドロゲン症では若年男性に骨粗鬆症を生じテストステロン補充療法が有効とされている。今回、我々は壮年期に骨粗鬆症による多発性胸腰椎圧迫骨折を契機に診断された低ゴナドトロピン性低アンドロゲン症の 1 例を経験したので報告する。【症例】50 歳男性。【主訴】腰痛。【現病歴】1999 年 8 月、転倒し右脛腓骨を骨折。保存的治療で骨癒合せず、手術療法でも治療が遷延した。同年 11 月腰痛が出現。多発性胸腰椎圧迫骨折を認めた。コルセット固定とエチドロン酸二ナトリウム内服を開始。骨密度の低下があり原因検査中に低アンドロゲン症を認め精査目的に紹介となった。【家族歴】未婚。【既往歴】思春期に 2 次性徴を認めず。【現症】類宦官様体で体毛は少なく、陰茎、精巣とも小さく、性発育度は Tanner 2 度と判定した。嗅覚試験は正常。【検査所見】血清テストステロン 0.1 ng/ml, LH 1.3 mIU/ml, FSH 2.7 mIU/ml, HCG 負荷試験ではテス

トステロン 0.1 $\rightarrow$ 負荷後 1.0 ng/ml と反応を認めた。核型は 46XY であった。以上より低ゴナドトロピン性低アンドロゲン症と診断しエナント酸テストステロンの筋注、アルファカルシドール内服による治療を行っている。

21. 酸化ストレスによる精子運動能障害に対するメラトニンの効果

○木元正和, 森岡信之, 松岡志保

泉谷知明, 深谷孝夫 (高知医大産婦)

【目的】近年精漿中に存在する Cu, Fe などの微量元素により喚起される酸化ストレスが精子運動能を障害する可能性が示唆されている。我々は、強力な抗酸化能を有するメラトニンが精漿中に高濃度に存在し、精子の脂質過酸化を抑制する可能性を明らかにした。今回、*in vitro* 培養系を用い、酸化ストレスに伴う精子運動能障害に及ぼす M 添加の影響について検討した。【方法】精液検査及び IVF-ET 時に同意の得られた残余精液を検体とした。単層攪拌密度勾配法により運動精子を回収、10%SSS 添加 HTF で調整した。1) 活性酸素種生成のため精子浮遊液に Cu ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0~40 nM/ml を添加し、37°C $\cdot$ 5%CO₂ 下で 20 時間培養した。培養前後に運動精子数を目視法で測定し運動精子残存率を算定した。2) Cu 40 nM/ml に加え M 0~10 ng/ml を添加し 20 時間培養後運動精子残存率を測定した。3) 培養後、精子中脂質過酸化物 (LPO) 濃度を LPO-586kit で測定した。【成績】1. Cu 添加により運動精子残存率は用量依存的に有意に低下した。2. Cu に加え M を添加した際の運動精子残存率は用量依存的に有意に上昇した。3. 精子中 LPO 濃度は Cu 添加により増大したが、M 添加により有意に低下した。【結論】Cu 添加による精子脂質過酸化の亢進に伴う精子運動能障害は、M の添加により防御されることが明らかとなった。

22. 左精管腫瘍・精管近位部欠損、右精管完全欠損による閉塞性無精子症の 1 例

○奈路田拓史, 大西智一郎, 黒川泰史

金山博臣, 香川 征 (徳島大泌尿器)

症例は 30 歳、男性。挙児えられず、精査希望にて受診。精液検査は無精子症であった。触診にて右精管は触知できず、左は陰嚢中央部に 1.5 cm 大の弾性硬、辺縁明瞭な腫瘍を触知し、その遠位部は精巣上体から連続する精管に触れ、腫瘍の近位部では精管を触知しな

かった。精巣容量は左右とも 20 ml, LH, FSH, testosterone は正常範囲内であった。左精管腫瘍に対して、手術を施行した。遠位部では、精巣上体から連続する精管が認められ、その精管は近位部で腫瘍に連続し、終末していた。腫瘍のさらに近位部では、精管様構造物が存在せず、腫瘍で盲端に終わっていた。腫瘍を遠

位部精管とともに一塊で摘除した。精管の近位部が欠損しているため、精路の再建は不可能であった。また右側は、精管が完全に欠損していた。手術は、TESEを追加して終了した。摘出腫瘍は組織学的に精管筋層の過形成であり、精巣における精子形成は JSC 9 点であった。挙児希望に関しては、今後 ICSI の予定である。

関連学会のお知らせ

日本哺乳動物卵子学会 生殖補助医療胚培養士資格審査および講習会のお知らせ

日本哺乳動物卵子学会では、このたび生殖補助医療に携わる胚培養士の水準を向上させ、胚培養士としての資格を与えることを目的として、生殖補助医療胚培養士資格認定制度を策定いたしました。つきましては生殖補助医療胚培養士資格審査および講習会を下記の要領にて実施いたします。

記

期 日：講習会 平成 14 年 4 月 27 日（土）
資格審査 平成 14 年 4 月 28 日（日）

開催場所：都市センターホテル
東京都千代田区平河町 2-4-1 TEL: 03-3265-8211

資格審査要項および申込み用紙請求について：
学会事務局宛に請求して下さい。（270 円切手を同封のこと）

申込み宛先：〒252-8510
藤沢市亀井野 1866 日本大学生物資源科学部内
日本哺乳動物卵子学会 宛
「生殖補助医療胚培養士資格審査 申込み」と表記して下さい。

申込み締め切り日：平成 14 年 3 月 15 日（当日消印有効）

定員：申込み順に約 100 名とします。

平成 13 年 10 月
日本哺乳動物卵子学会
理事長 石島芳郎

第 43 回 日本哺乳動物卵子学会開催のご案内

下記の要領で第 43 回日本哺乳動物卵子学会および総会を開催致します。多数の会員の参加をお願い致します。

第 43 回 日本哺乳動物卵子学会

大会長 平尾 幸久

記

期 日：2002 年 5 月 31 日（金）・6 月 1 日（土）

会 場：和歌山ビッグ愛

〒640-8319 和歌山市手平二丁目 1-2（代表 TEL）073-435-5200

連絡先：和歌山県立医科大学 教養部生物学教室内 第 43 回日本哺乳動物卵子学会事務局

〒641-8509 和歌山市紀三井寺 811-1 TEL & FAX 073-441-0771

大会幹事：矢本 希夫（産科婦人科学 TEL 073-441-0633）

南 佐和子（産科婦人科学 TEL 073-441-0633）

山崎 尚（生物学 TEL 073-447-2300（内 5816））

細井 美彦（近大・生物理工学部 TEL 0736-77-3888）

学会参加申込：学会当日会場にて受け付けます。参加費は次のとおりです。

・学会参加費 7,000 円 ・懇親会参加費 7,000 円

1. 学術集会：5 月 31 日（金）・6 月 1 日（土）の両日、特別講演、シンポジウムと一般講演等を行います。

・特別講演Ⅰ：「発生工学の進歩（仮題）」

浅島 誠 教授（東京大学・院・総合・生命）

・特別講演Ⅱ：「生殖医療の進歩とバイオエシックス（仮題）」

吉村泰典 教授（慶應義塾大学医学部・産婦）

・シンポジウム：「生物工学の新展開」, 「胚盤胞移植—最近の進歩—」

・一般講演：講演の形式は口演とポスターです。

・その他教育講演等を予定しています。

[演題申込]

演題の申込は、本誌 18 巻 3 号綴じ込みの原稿用紙にタイプまたはワープロで印字した講演要旨、およびそのコピー 2 部を、申込用紙、通知用はがきと共に上記連絡先宛書留郵便にてお送り下さい。原稿はそのまま写真印刷して、本誌 19 巻 2 号に講演要旨として掲載されます。なお会員 1 人 1 題とさせて頂く場合がありますのでご了承下さい。

・本大会発表に研究奨励賞を設けています。大会 2 日目の総会時に授賞式を行います。

・申し込み締切日：2002 年 2 月 11 日（必着）

[発表要領]

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

2. 理事会・評議員会・編集委員会・懇親会：次の通り開催する予定です。

・理 事 会：5 月 31 日（金）12:00 より

・評 議 員 会：6 月 1 日（土）12:00 より

・編集委員会：6 月 1 日（土）8:30 より

・総 会：6 月 1 日（土）12:45 より

・懇 親 会：5 月 31 日（金）18:30 より アバローム紀の国（和歌山市）

日本医学会だより

JAMS News

2001年10月 No. 26

日本医学会

〒113-8621 東京都文京区本駒込2-28-16

日本医師会館内 TEL 03-3946-2121(代)

第26回日本医学会総会

第26回日本医学会総会(杉岡洋一会頭)は、2003年4月4日(金)～6日(日)、福岡での開催に向けて準備を進めており、総会登録を2002年1月から開始の予定である。

この度、総会展示の会期が4月2日(水)～4月8日(火)に変更決定した。展示会場は福岡ドームで、その内容としては「すこやかメッセ2003—社会が育てる医学と医療」をメインテーマとする市民向けの公開展示ならびに専門家向けの学術展示による2部構成を企画している。

公開展示は、「みんなで創る健康社会」を目標として、人間を科学する、支え合う暮らし、共生の未来へ、と題する3つのゾーンから構成される。

学術展示は、「テクノロジーの医学応用の可能性と選択」をテーマに、画像医療システム展示、医科機器展示・医療情報システム展示、医書展示の三者が企画されている。

第3回日本医学会特別シンポジウム

2001年9月6日～7日、札幌プリンスホテルにおいて「医とゲノム」が開催された。組織委員は、廣重 力(北海道医療大学学長)、大石道夫(かずさDNA研究所所長)、中村睦男(北海道大学総長)、崎山幸雄(北海道大学大学院医学研究科客員教授)、本間研一(北海道大学大学院医学研究科教授)の各氏であった。

プログラムは、基調講演：ヒトゲノム科学の現在と未来、I. ヒトゲノム解析の最前線(1)、II. ヒトゲノム解析の最前線(2)、III. ヒトゲノム解明と価値観の変容をもって構成された。

シンポジウムの詳細は、記録集として2002年2月頃に刊行される予定である。希望者は、日本医学会宛、郵便はがきで申し込まれた(無料)。

第120回日本医学会シンポジウム

2001年12月13日(木)10:00～17:00、日本医師会館において「血管新生の基礎と臨床」をテーマに第120回シンポジウムが開催される。組織委員は、永井良三、須田年生、澁谷正史の各氏。参加希望者は、日本医学会に郵便はがきで申し込まれた。参加費無料。

プログラムの概要は下記のとおり。

I. 血管新生の分子制御機構

1. 血管リモデリングの細胞生物学/西川伸一(京大・分子遺伝学)
2. 動静脈形成の制御機構/須田年生(熊本大発生研センター)
3. 血管新生の転写調節/佐藤靖史(東北大加齢研・腫瘍循環)
4. 造血と血管新生の相互作用/高倉伸幸(金沢大がん研・細胞分化)

II. 血管新生と腫瘍

1. VEGF(血管内皮増殖因子)と腫瘍の進展/澁谷正史(東大医科研・癌細胞増殖)
2. 血管新生とマトリックスメタロプロテアーゼ/杉田憲治(塩野義製薬(株)診断薬部)
3. 内因性血管新生抑制因子としてのコンドロモジュリン—I/開 祐司(京大再生医研・生体分子設計)
4. 浸潤・転移・血管新生阻害因子NK4に

による制ガン/中村敏一(阪大・分子組織再生学)

III. 血管新生の臨床応用

1. 薬物による血管新生療法/佐田政隆(東大・循環器内科)
2. 遺伝子を用いた血管新生療法/森下竜一(阪大・遺伝子治療)
3. 細胞移植による血管新生療法/室原豊明(久留米大・循環器病研)

医学賞・医学研究助成費の決定

医学賞・医学研究助成費選考委員会が去る9月14日に開催され、平成13年度の受賞者が決定した。授与式は11月1日の第54回日本医師会設立記念医学大会に際してとり行われる。

本選考は、日本医学会が日本医師会から委任されているもので、今年度の応募件数は医学賞21件、医学研究助成費89件であった。表彰される方々は下記のとおりである。

〈日本医師会医学賞〉

- ・糖鎖と糖鎖遺伝子の新しい機能の発見/谷口直之(阪大院・分子生物学)
- ・動脈硬化性心血管病の病態解明/竹下 彰(九大院心臓血管研・内科)
- ・輸血後移植片対宿主病(輸血後GVHD)に関する研究/十字猛夫(日赤血液センター・輸血学)

〈日本医師会医学研究助成費〉

- ・全身性エリテマトーデスの発症に関わる遺伝素因の解明/広瀬幸子(順天堂大・病理学)
- ・転写因子遺伝子を用いた幹細胞のインスリン産生細胞分化/倭 英司(阪大院・分子防御医学)
- ・インスリン抵抗性に関わる新規な脂肪組織特異的遺伝子の同定とその機能解析/小川 渉(神戸大・内科学)
- ・チミジンホスホリラーゼの血管新生、浸潤、転移への関与とその阻害方法の開発/秋山伸一(鹿児島大腫瘍研・がん化学療法)
- ・アジア巨大都市化の影響下にある日本の新た

な社会医学課題の系統的解析手法の開発/高野健人(東医歯大院・健康推進医学)

- ・造血器腫瘍に対する新たな免疫遺伝子治療の開発/安川正貴(愛媛大・内科学)
- ・心不全の再生治療/小室一成(千葉大院・内科学)
- ・インスリンおよび運動による糖代謝促進の分子メカニズムと糖尿病における異常の解明/浅野知一郎(東大・内科学)
- ・転写統合装置を用いたリウマチ滑膜細胞の包括的理解/中島利博(聖マ医大難研センター・内科学)
- ・Desert Hedgehog (DHH) 遺伝子変異による新しい遺伝性末梢神経障害の病態解明/梅原藤雄(鹿児島大・内科学)
- ・難治性疼痛(求心路遮断痛)に対する大脳運動野刺激療法のメカニズム解析/齋藤洋一(阪大院・脳神経外科学)
- ・家族性乳癌の遺伝子診断とその臨床応用/野口眞三郎(阪大バイオ研・腫瘍外科学)
- ・骨髄由来細胞による肝再生の機序とその制御に関する研究/長谷川 潔(東大・外科学)
- ・尿失禁の症状尺度と疾患特異的なQOL尺度の開発/本間之夫(東大・泌尿器科学)
- ・卵巣機能不全の病因・病態の解明と予防に関する研究/森田 豊(東大・産科婦人科学)

認定医制についての三者懇談会

第25回認定医制についての三者懇談会が9月10日に開催された。そこでは機構改革後の専門医認定協議会としてはじめての三者承認(10月1日付)のための「承認通知書」、「三者承認シール」が検討された。

また、専門医認定協議会から「専門医認定制に関する基本方針」が提出され、専門医認定協議会の役割、活動が説明された。また平成5年11月の「認定医の公認に関する三者懇談会の見解」は、その後変化に伴う名称訂正などを加えたのち、その基本精神は遵守することが確認された。

投稿規定

(2001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（臨床材料を含む）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、その他の編集に関する事項については、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. 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. 投稿論文は、ワードプロセッサまたはコンピュータソフトを用いて作成する。原稿は、A4版用紙に和文では35字×25行の横書きとし、現代仮名づかいと常用漢字を用いる。英文論文では、12ポイントの字体でダブルスペースで印字する。1ページ当たり25行とする。なお、専門家に校閲を受けておくこと。ただし、編集委員会で校閲が必要と認めた場合にはその費用を著者負担とする。原稿は、原本1部と査読用コピー2部を添え、写真は原稿を含めて3部とする。
論文は、審査終了後に最終原稿1部と原稿を記録したフロッピーディスク（FD）を送付する。FDのラベルには、機種、ソフト等を記入する。
7. 原著、総説、論説、臨床報告などには、必ず600字以内の和文ならびに、200words以内の抄録（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。
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。なお、投稿原稿、図表、写真は返却しない。
9. 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。
10. 文献は次の形式により、引用順に末尾一括記載する。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-頁とする。
和文誌名は該当誌の規定または慣用に略名に従い、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-頁とする。(英文の場合は編者名, 書名, 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

11. 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。
12. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
13. 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。
14. 特別掲載を希望する論文は、受付順によらず、速やかに審査掲載される。なお、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。
15. 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。
16. 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
17. 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5-3 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

英文

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： 個

図： 個

写真： 枚

[カラー印刷：白黒印刷] 希望

ランニングタイトル：

(和文 25 字以内，英文 40 letters 以内)

キーワード： 和文

(各 5 語以内) 英文

別刷希望数： 部 50 部単位とし，希望部数を記入(別刷は有料です)。

フロッピーの添付→機種名：

ソフト名：

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

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

投稿者の資格：本誌への投稿は，会員に限定されていますので，非会員の方は，共著者共に本会事務局宛入会手続きを取ってください。

連絡先：代表者名：

連絡先住所(郵便番号)：

TEL：

FAX：

E-mail

編集後記

病院の窓からも冠雪した富士山が眺められ冬の自然の美しさに感激しています。しかし、世紀の変わった昨年、米国史に残る同時多発テロ事件が発生し、今もって戦闘が続いております。また、わが国においても殺伐とした事件も多く続発しましたが、おおむね平和に2002年を迎えることができました。

さて、今年から日本不妊学会が英文雑誌発行ということで和文雑誌への投稿が激減するのではないかと懸念しておりましたが、47巻1号には8編の原著論文が掲載され、編集委員の一人として、ほんとしております。

我々の出生した頃は年間250万人以上でしたが、昨年はなんと117万人まで激減し、2007年頃には死亡者数が出生数を上回り、日本の人口が減少してくると言われております。その反面、不妊で悩む多数の夫婦がおり、今後の生殖医学の発達により子供さんが授かるように、また日本の少子化に少しでも歯止めがかかるよう生殖医学の研究の成果を期待しております。それが本学会・本誌の発展につながると信じております。

(編集委員 三浦一陽)

編集委員

遠藤 克 (委員長)

安部 裕司
石塚 文平
田原 隆三
新村 末雄

安藤 索
押尾 茂
中村 幸雄
三浦 一陽

石川 博通
末岡 浩
永尾 光一

Editorial Board

Tuyoshi ENDO (Editor-in-Chief)

Yuji ABE

Bunpei ISHIZUKA

Ryuzo TAHARA

Sueo NIIMURA

Motomu ANDO

Shigeru OSHIO

Yukio NAKAMURA

Kazukiyo MIURA

Hiromichi ISHIKAWA

Kou SUEOKA

Koichi NAGAO

日本不妊学会雑誌 第47巻第1号

編集発行所 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

E-mail: funin-g@vinet.or.jp

郵便振替 00170-3-93207

印刷・製本

株式会社 杏林舎

〒114-0024

東京都北区西ヶ原 3-46-10

TEL: 03-3910-4311

FAX: 03-3949-0230

E-mail: info@kyorin.co.jp

2001年12月25日印刷

2002年1月1日発行

第 4 7 回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・交通のお申し込みのご案内

平成 1 4 年 1 0 月 2 日 (水) ~ 1 0 月 5 日 (土)、岐阜・長良川国際会議場におきまして

「第 4 7 回日本不妊学会」と「第 2 0 回日本受精着床学会」がジョイントで盛大に開催されます。

ご参加の皆様のご便宜を図るため宿泊等のお世話を (株) 日本旅行岐阜支店 がさせていただきますことになりました。

この学会が、皆様に意義あるものとなりますよう十分な配慮を致す所存でございます。

多数の皆様のご利用をお待ち申し上げております。

1	ご 宿 泊 の ご 案 内
---	---------------

料 金：お一人様当たり (1 泊朝食付・サービス料・税金込)

ホテル記号	ホ テ ル 名	お部屋タイプ	宿泊料金	申込記号	会場までの所要時間
A	岐阜ルネッサンスホテル	ツインシングルユース	14,700	A-1	徒歩約 3 分
		ツイン	10,500	A-2	
B	岐阜グランドホテル	ツインシングルユース	17,000	B-1	車で 約 5 分
		ツイン	12,000	B-2	
C	ホテル 3 3 0 グランデ岐阜 (又は同等クラス)	シングル	10,000	C-1	車で約 15 分
		ツイン	9,500	C-2	
D	岐阜グランパレホテル (又は同等クラス)	シングル	8,500	D-1	車で約 15 分
		ツイン	8,000	D-2	
E	ホテルスポーツパルコ (又は同等クラス)	シングル	7,500	E-1	車で約 1 0 分
		ツイン	7,000	E-2	
F	岐阜第一ホテル (又は同等クラス)	シングル	7,000	F-1	車で約 15 分
		ツイン	6,500	F-2	

※ご予約は、お申し込み順とさせていただきますので、ご希望施設が満室が満室の場合は、ご変更をお願い

する場合がございます。予めご了承下さい。(申込書に申込記号記号にて、必ず第 2 希望までご記入下さい)

※ツインをご希望の方は、必ず同室者を明記してお申し込み下さい。

※C~F のホテルでお部屋タイプがシングル希望の場合、シングル部屋が満室の場合はツイン部屋をお一人様
利用の場合がございます。その場合、料金がシングル料金から 2, 0 0 0 ~ 4, 0 0 0 円の追加となります。

予めご了承下さい。料金はクーポン送付時の請求書にてご確認ください。

2 交通のご案内

航空券及びＪＲ切符等、名古屋空港～岐阜市内まで路線バス等の手配をご希望の方は、別途承りますのでご用命ください。

3 観光のご案内

A. 下呂温泉と高山散策 1泊2日コース

旅行代金 お一人様 ￥28,000【旅行期間10月4日（金）～5日（土）】

旅行代金 お一人様 ￥32,000【旅行期間10月5日（土）～6日（日）】

日次	行	程
①	岐阜	岐阜各務原 I C 八幡 I C 下呂温泉（泊） 16:00頃 東海北陸自動車道 18:30頃
②	ホテル	高山市内自由散策（屋台会館、高山陣屋、古い街並 等） 08:30 10:00
	高山	八幡 I C 一宮木曽川 I C 名古屋空港 JR名古屋駅 13:00 東海北陸自動車道 16:00頃 16:40頃

予定ご宿泊ホテル：下呂望川館

B. 世界文化遺産：白川郷合掌集落&高山朝市見学 1泊2日コース

旅行代金 お一人様 ￥28,000【旅行期間10月4日（金）～5日（土）】

旅行代金 お一人様 ￥32,000【旅行期間10月5日（土）～6日（日）】

日次	行	程
①	岐阜	岐阜各務原 I C 清見 I C 高山（泊） 16:00頃 東海北陸自動車道 18:40頃
②	ホテル	高山朝市見学 白川郷荻原町合掌集落（昼食） 07:50 08:00 09:00 11:00 12:30
		八幡 I C 一宮木曽川 I C 名古屋空港 JR名古屋駅

予定ご宿泊ホテル：高山グリーンホテル

C. 紅葉の新穂高ロープウェイと高山朝市見学 1泊2日コース

旅行代金 お一人様 ￥31,000【旅行期間10月4日（金）～5日（土）】

旅行代金 お一人様 ￥35,000【旅行期間10月5日（土）～6日（日）】

日次	行	程
①	岐阜	岐阜各務原 I C 八幡 I C 高山（泊） 16:00頃 東海北陸自動車道 18:40頃
②	*ご出発まで高山朝市にご案内 ホテル 新穂高ロープウェイ（3,000メートル級の山々を見学） 平湯（昼食） 08:30 10:30 12:30 13:00 13:40	
	清見 I C	一宮木曽川 I C 名古屋空港 JR名古屋駅 17:00頃 17:30頃

予定ご宿泊ホテル：高山グリーンホテル

D. 長良川鵜飼 (予定時間 18:15~20:00)

旅行代金 お一人様 ¥10,000 (船賃・鮎料理・飲物含む)

実施予定日は10月2、3、4日の3日間となります。必ずお申込書にご希望日をご記入下さい。

(注) 最少催行人員 2名。

現地係員がご案内。

※旅行条件 (A. B. Cコース添乗員同行)

- ・ A. B. Cコースはそれぞれ、旅行期間が10月4日 (金) ~10月5日 (土) と10月5日 (土) ~6日 (日) の2回設定がございます。必ずお申込書にご希望の出発日をご記入下さい。
- ・ A. B. Cコース最少催行人員 25名様とさせていただきます。
- ・ ホテルのお部屋は4~5名様で1部屋利用 (相部屋) となります。
3名様1室をご希望の場合お一人様2,000円、2名様1室をご希望の場合はお一人様5,000円の追加料金となります。
(個室ご希望の方は、申込書備考欄へご記入の上、お申込下さい)

4 お申込方法

- ① 別紙申込用紙に必要事項をご記入の上、㈱日本旅行岐阜支店までFAXにて平成14年 8月16日(金) 18:30までにお申込み下さい。
恐れ入りますが、宿泊・観光につきましては、お電話でのお申込はご遠慮願います。
- ② 申し込みおよび問い合わせ先
(株)日本旅行岐阜支店 第47回日本不妊学会総会および学術講演会デスク
担 当：東・小野・田中
〒500-8833 岐阜市神田町7-3-2
TEL:058-265-7504 FAX:058-265-7503
- ③ クーポン送付及び精算
9月6日(金)迄に宿泊等のクーポン類及び請求書、振込み用紙を送付させていただきますので
請求書到着後、7日以内に㈱日本旅行口座にお振込み下さい。
ご請求の際、お一人様につき600円の通信手数料を申し受けますので、予めご了承下さい

5 変更・取消について

- ・お申し込み後に、変更・取消が生じた場合は、必ずFAXにてご連絡ください。
- ・取消料として1件につき下記の取消料を申し受けます。料金には、各機関規定取消料と弊社取消手数料が加算されております。なお、通信手数料の返金はございません。

21日前まで	20～10日前	9～2日前	予約日の前日	当日及び無断取消
無料	20%	50%	80%	100%

- ① 変更のみの場合は、14日前より変更手数料として1件につき525円(税込み)を申し受けます。
- ② 取消日が土・日曜日にあたる場合は、次の平日の取消として扱わせていただきますのでご注意ください。
- ③ ご返金は学会終了後に行いますが、手続きの都合上、若干の日数がかかると思われます。あしからず、ご了承ください。ご返金時の振込手数料はお客様ご負担となります。
- ④ 変更・取消におけるご返金は、上記取消料及び振込手数料を差し引いた金額を大会終了後1ヶ月以内にさせていただきます。



岐阜市内 ガイドマップ



- 宿泊施設
- ① 岐阜ルネッサンスホテル
 - ② 岐阜グランドホテル
 - ③ ホテル330グランド岐阜
 - ④ 岐阜キャッスルホテル
 - ⑤ 岐阜ワシントンホテルプラザ
 - ⑥ ホテルサンルート岐阜
 - ⑦ 岐阜パリスホテル
 - ⑧ 岐阜グランパレホテル
 - ⑨ ホテルスポーツパルコ
 - ⑩ ホテル第二スポーツパルコ
 - ⑪ ニュー岐阜ホテルプラザ
 - ⑫ 岐阜第一ホテル
 - ⑬ パルセス・イン岐阜
 - ⑭ 岐阜観光ホテル十八楼別館

整理番号：

第47回日本不妊学会総会および学術講演会 宿泊・観光お申込書

《お申込締め切り日 平成14年8月16日(金)》

フリガナ		TEL・FAX
お申込 代表者名		TEL：－ FAX：－

送付宛先名	
郵送物送付先	〒 ○を付けてください (勤務先・自宅)

No.	フリガナ		性別	ご宿泊 第一希望			ご宿泊 第二希望	ツイン利用 同室者名	観光コース		
	氏	名		10/2(水)	10/3(木)	10/4(金)			コース番号	希望日	人数
例	ギフ	タロウ	男	Aー1	Aー1	Aー1	Bー1	ギフ ハナコ	A	10月5日出発	2
	岐阜	太郎	女					岐阜 花子			
1			男								
			女								
2			男								
			女								
3			男								
			女								
4			男								
			女								
5			男								
			女								

備考・通信欄：

ご返金の際の お振込先	銀行	支店	普通・当座：
	口座名義：		

- ※ ご記入の際は、楷書にてハッキリとご記入願います。
- ※ ご宿泊は、必ず第二希望までご記入下さい。
- ※ 5名様以上でお申し込みの際は、お手数ですがコピーを取ってご使用ください。
- ※ ツインルームをご希望の方は、必ず同室者氏名をご記入ください。
- ※ この申込書を基にご請求させていただきます。

送信先：(株)日本旅行岐阜支店 FAX：058－265－7503