

淡路 英雄, 井上 正人, 小林 善宗
 本田 育子, 金子みつ恵, 藤井 明和

目的：体外受精 IVF-ET において、予後を左右する最大の因子は卵子の質である。したがって IVF-ET の成績を改善していくためには、卵子及び受精卵の正常性に対する検索が不可欠である。このような観点から、今回われわれは IVF で受精しなかつた卵子を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察し、その表面構造について検討した。

方法：男性側に異常のない卵管性不妊患者32例に計58回の IVF-ET を行つた。Clomiphene-HCG または Clomiphene-HMG-HCG にて排卵誘発を行い、HCG 注射後34～36時間で腹腔鏡 (45回) あるいはエコーガイド (13回) により採卵した。卵子は約5時間前培養後、洗滌精子を加えて12～16時間培養し、受精の有無は雌雄前核の存在により判定した。32例の受精率は $93.2 \pm 2.6\%$ (Mean $\pm$ S.E.) で、114個の成熟卵子中101個 (88.6%) が受精した。非受精卵は2% glutaraldehyde で固定後、上昇アセトン系列にて脱水し、臨界点乾燥、全蒸着を行い、日本電子 JSM-35型 SEM を用いて観察した。

成績：非受精卵の透明帯表面は多孔性のスポンジ様構造を示し、受精卵のそれとほとんど同じであつた。また一部には表面がより平滑な卵子も観察された。透明帯上には先体反応を完了した精子が結合し、侵入開始直後の精子から頭部を完全に埋没した精子まで、さまざまな侵入過程が観察された。このような卵子では精子の囲卵腔への侵入は認められず、受精障害はその大部分が透明帯の表層下で起こることが示唆された。

独創点：IVF における非受精卵を SEM にて観察し、①透明帯の表面構造には差のないこと、②受精障害は透明帯の表層下で起こること、を明らかにした。

質問 (京都大) 津久井伸一

1. 非受精卵の透明帯表面構造は、受精卵のそれとほとんど同じであつたということだが、受精卵の電顕による検討もされたのか。

2. 透明帯上には先体反応を完了した精子が結合していたとのことだが、透明帯上の精子はすべて生体反応を完了していたのか。

回答 (東海大) 淡路 英雄

受精卵の不妊症の腹腔鏡検査時に採取した卵子について検査した。今回は写真を出さなかつたが、非受精卵とはほぼ同じ表面構造を示した。

我々の受精システムでは写真を見ていただければ分

るように、比較的少数の精子しか透明帯表面に付着していない。透明帯表面に同定された精子はすべて先体反応を完了している。

質問 (徳島大) 山野 修司

受精障害は透明帯の表層下で起こるとの結論だが、透明帯は全体として均質な物質のように理解している。透明帯の表層とは具体的に何をさすのか？

回答 (東海大) 淡路 英雄

透明帯は電顕的に見ると二層から成っております。受精障害はこの二層目の所で起こるのではないかと思っている。

質問 (京都大) 森 崇英

走査電顕像で接着と結合を区別できるか否か教えてください。

回答 (東海大) 淡路 英雄

Sperm attachment と sperm binding をヒト卵子で正確に判定するのは困難ですが、卵子を固定する前に、micropipette では付着精子を出来るだけ除去するようにしている。透明帯上の精子はそのほとんどが侵入の初期段階にあり、走査電顕で見る精子は一応結合した精子と考えている。

20. Controlled Ovarian Stimulation 法と Sperm Capacitated AIH 法の併用による妊孕性向上について

(浜松医大)

林 賛育, 安藤 勝秋, 比嘉 弘美
 渡辺 憲生, 稲本 裕, 寺尾 俊彦
 川島 吉良

目的：長期間の不妊治療にもかかわらず妊娠し得なかつた不妊症に対し、積極的に妊孕性を高める目的で Controlled Ovarian Stimulation (COS) 法を施行した後、受精能力を高めるため In vitro Capacitation (IVC) で処理した精子を用いて AIH を行い、その有用性を検討した。

方法：難治性機能性不妊症、中枢性無排卵性 (Clomid 無効例) に対して hMG-hCG 療法 (hCG の注射時間を一定としない従来法) を行つても妊娠しなかつた症例に、新たに COS 法 (月経2日目より hMG 150～225IU/day を7～9回注射し、最後の hMG より24～50時間後に AIH または IVC-AIH) を行つた。男性不妊症 (精子の数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下, motility 60% 以下) に対しても、IVC 及び COS 法を行つた。卵胞成熟度は RIA 法による血中 E_2 値及び超音波検査にて、主卵胞の大きさを指標にした。IVC には培養液 Ham-F10 を

用いて、遠心、培養後、AIH を行つた。IVC 前後の精子を透過型電子顕微鏡で検討した。

成績：① hMG-hCG (従来法) における妊娠率は 22.2% (n=27 case), これで妊娠しなかつた症例に COS-AIH または COS-IVC-AIH を行つた。COS-AIH の妊娠率は 8.3% (n=24 case), COS-IVC-AIH は 18.8% (n=32 case) であり、後者が有意に高かつた。② COS 法について、hCG 投与 2 日前の血中 E_2 値は妊娠群で 1,600pg/ml, その後 hCG 注射までの E_2 上昇率は 20% であり、非妊娠群は E_2 値 590pg/ml, 上昇率 8% であつた。血中 E_2 値及び上昇率は妊娠成功に関する重要因子であることが明らかになつた。③ 本法による IVC は電顕学的に Plasma membrane の膨大を認めるが先体膜の形態的变化は認めなかつた。

独創点：① 従来の hMG-hCG 療法にて無効であつた症例を選択し、COS-IVC-AIH を行い、妊娠率を向上させ得た。② COS 法により妊娠に必要な血中 E_2 値、及び E_2 の上昇傾向を明らかにした。③ IVC 法は精液中の Decapacitation Factor を除去することにより、精子の受精能力を高めると考えられる。

質問 (兵庫医大) 石田 雄三

sperm capacitated AIH により妊娠率が上昇したとの報告だが、washed AIH, Swim up AIH 単独との妊娠率の比較はどうですか。capacitation するのに sperm incubation 30分～60分は、短い様に思うが。

回答 (浜松医大) 林 賛育

Swim up 法単独や濃縮法単独という方法は用いていないので、我々の In Vitro Capacitation 法のうち、どの過程が妊娠率を向上させるのかは検討していない。今後、検討して行きたい。また、incubation time について我々はこの様な時間で、妊娠率を向上させるのに必要な capacitation を起こさせることができると考えている。

質問 (東海大) 井上 正人

Capacitated sperm の特徴として示される plasma membrane の膨化は artifact ではないのか。

回答 (浜松医大) 林 賛育

精子の Capacitation 後 plasma membrane の膨大化について、これは精子 In vitro で遠心、培養の操作及び Decapacitation factors の除去により起こつた形態的变化と思われる。

21. 家兎排卵時コラーゲン合成系におよぼすステロイドホルモンとプロスタグランディンの影響

(京都大) 姫野 憲雄, 川村 直行

岡村 均, 森 崇英
(同・病理) 福本 学

目的：hCG により誘起された家兎の排卵現象と卵巣中 collagen 合成活性の間に密接な関連があり、さらに本活性に prostaglandin (PG) が関与していることを明らかにしてきた。一方 LH surge 後急増する sex steroids の排卵機構における意義は明らかでない。今回さらに、排卵時の collagen 合成活性調節機序について検討を加える目的で、種々の PGs および steroids を用いて、それらの collagen 合成活性におよぼす影響を検討した。

方法：雌性成熟家兎を用い、1. hCG 100iu 投与による排卵誘発群、2. PG 単独投与群、3. hCG と PG を投与した排卵群、4. hCG と同時に PG 合成阻害剤である indomethacin (INDO) を投与した排卵抑制群、5. 本系にさらに PG を投与し排卵を回復した群、6. steroid 単独投与群、7. hCG と種々の steroid を投与した群の 7 群の実験系を作製した。PG は PGE_1 0.1 mg/kg, PGE_2 0.7mg/kg, $PGF_{2\alpha}$ 1.5mg/kg を投与し steroid は estrogen (E) 10mg/kg, progesterone (P) 40mg/kg, testosterone (T) 40mg/kg, dexamethasone (D) 10mg/kg を投与した。各群より摘出した卵巣より卵胞を核出し、collagen 合成に関わる酵素である prolyl hydroxylase (PH) 活性と lysyl oxidase (LO) 活性と collagen 量として hydroxyproline (Hyp) 量を測定した。

成績：第 4 群にみられた PH 活性抑制は、第 5 群における PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ 投与で第 1 群の peak 値の約 2/3 まで回復したが PGE_1 投与では変化がみられなかつた。LO 活性は第 1 群に比べ第 4 群では低下したが有意ではなかつた。第 6 群では testosterone が vehicle に比べ有意に活性を亢進させた。また第 1 群に比し第 7 群では D, P の負荷により PH 活性上昇はむしろ抑制され、T の負荷により増加の傾向を示した。

独創点：卵巣の排卵時の collagen 合成活性、特に PH 活性調節には PGE_2 , $PGF_{2\alpha}$ が関与すること、さらに D, P により PH 活性の抑制がみられ T によりやや増加する傾向がみられたことから、これらの steroid も本酵素活性に深く関与している可能性が強い。

22. 新しい排卵誘発法—HMG 律動的皮下投与法 (慶応大)

中村 幸雄, 樋口 泰彦, 白石 悟
原 澄子, 玉崗 有告, 木戸 進
強口 芳明, 飯塚 理八