

主論文

(1)

Ethane dimethane sulphonate (EDS) 投与によるラット 造精機能障害およびその防御的薬剤の検討

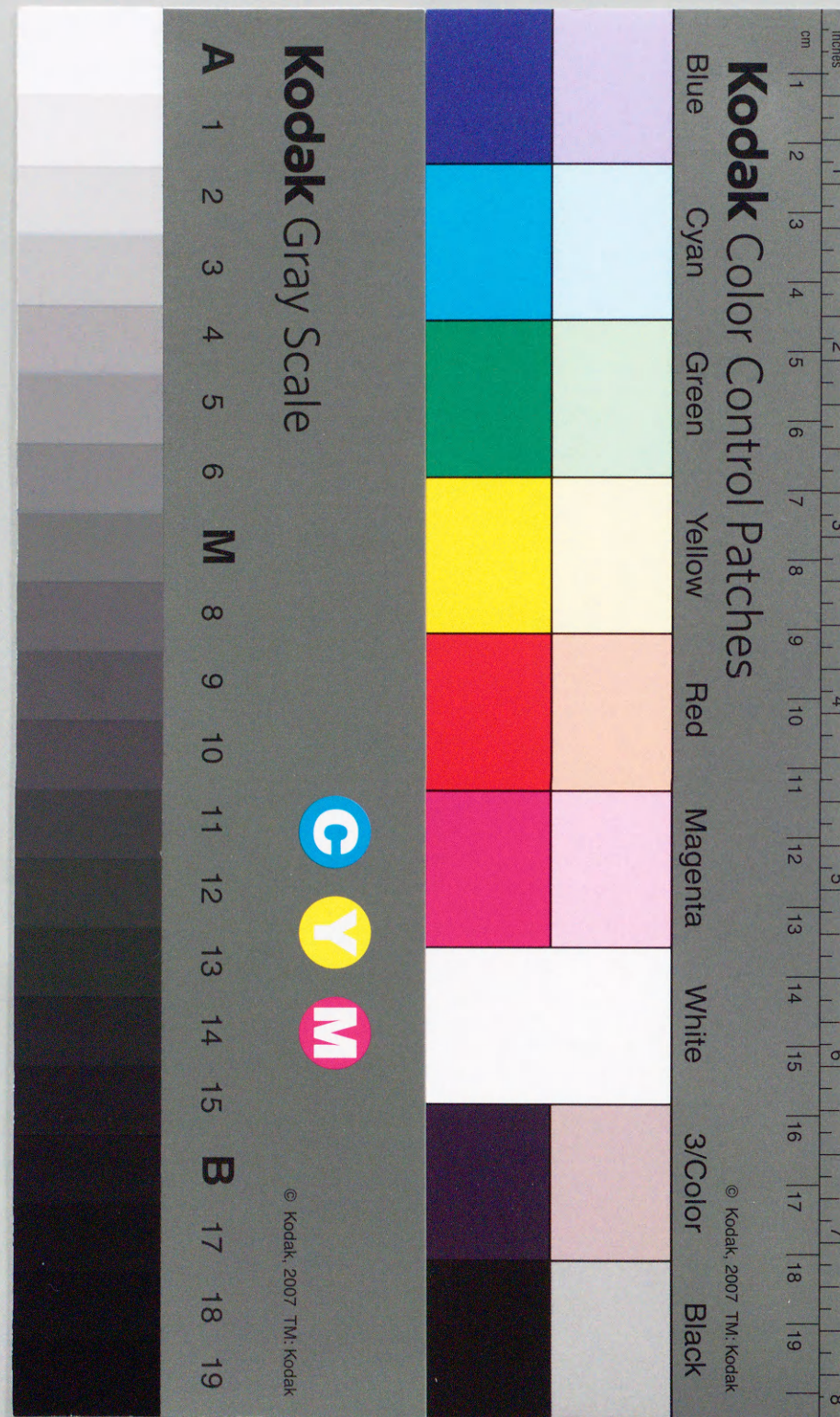
岡山大学医学部泌尿器科学教室（主任：大森弘之教授）

永 井 敦

STUDY ON ETHANE DIMETHANE SULPHONATE (EDS)-INDUCED SPERMATOGENIC
DAMAGE AND PROTECTIVE DRUGS AGAINST THIS DAMAGE IN THE RAT

Atsushi Nagai

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)



Ethane dimethane sulphonate (EDS) 投与によるラット 造精機能障害およびその防御的薬剤の検討

岡山大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 大森弘之教授)

永 井 敦

STUDY ON ETHANE DIMETHANE SULPHONATE (EDS)-INDUCED SPERMATOGENIC DAMAGE AND PROTECTIVE DRUGS AGAINST THIS DAMAGE IN THE RAT

Atsushi Nagai

Department of Urology, Okayama University Medical School, Okayama Japan
(Director: Prof. H. Ohmori)

The effects of a single administration of ethane dimethane sulphonate (EDS), which has a direct cytotoxic effect on Leydig cells, was assessed for its spermatogenic damage and intratubular androgen level in SD male adult rats. The protective effect of human chorionic gonadotropins (hCG) (s.c.), testosterone propionate (TP) (s.c.) and intratesticular administration of testosterone microcrystal suspension (Tmcs) against the spermatogenic damage in rats EDS given was also evaluated.

EDS caused a decrease of the seminiferous tubular diameter and impaired spermatogenesis remarkably; moreover, it also caused significant decreases in intratubular androgen levels.

These results suggest that EDS-treated SD male adult rats may be suitable as a model for hormone dependent infertility. The administration of hCG and intratesticular Tmcs prevented tubular damage and increased the intratubular T level. On the other hand, the administration of TP prevented tubular damage while remarkably decreasing intratubular androgen level.

In this connection, it was inferred that priming of rats with TP caused an increase in intratubular androgen binding protein, which would stimulate spermatogenesis.

The fact that a single injection of Tmcs caused no tubular damage suggests that intratubular T level is one of the factors playing an important role in spermatogenesis and that an intratesticular injection of Tmcs may be useful for the treatment of some cases of idiopathic male infertility.

Key words: ethane dimethane sulphonate (EDS), spermatogenic damage of rats, intratesticular testosterone microcrystal suspension (Tmcs) injection therapy

要旨: SD 系雄性ラットに Leydig 細胞を直接障害する ethane dimethane sulphonate (EDS) を投与し, EDS による精巣障害ならびに精細管内 androgen 濃度に対する基礎的検討を行った. さらに EDS 投与による精巣障害を防御する役割を果たすと考えられる testosterone propionate (TP), hCG の皮下注射および T microcrystal suspension (Tmcs) 精巣内注入を行い, この 3 群における防御的効果を検討した.

EDS 投与による精巣障害の基礎的検討では, 精細管直径は有意に縮小し精子形成障害をきたした. 精細管内 androgen 濃度も有意に低下した. このことより, EDS 投与ラットはホルモン依存性不妊ラットモデルに適していることが判明した.

hCG および Tmcs 精巣内注入により精細管内 T 濃度の増加を認め, 精細管直径は保たれ, EDS 投与ラットの精細管障害を防御することが可能であった. TP 投与は精細管内 androgen 濃度を著明に低下させたが, EDS 投与による精細管障害を防御することが判明した. これはラットにおいては TP によるプライミングにより精細管内 androgen binding protein (ABP) が増加し, この ABP が精子形成を惹起することが推察された.

精細管内では T は精子形成に重要な役割を果たす因子であることが示唆され, 精巣内 Tmcs 注入療法は一部の特発性男性不妊症に対して有用な治療法であると考えられた.

キーワード: ethane dimethane sulphonate (EDS), ラット造精機能障害, 精巣内テストステロン微小結晶浮遊液注入療法

緒 言

Ethane dimethane sulphonate (EDS) はラット精巣における Leydig 細胞を選択的に障害する alkylating agent である¹⁾²⁾. 今回, EDS 投与ラットにおける精巣障害の状態を観察し, さらに男性不妊症に対して有用な治療薬と言われている human chorionic gonadotropin (hCG) および testosterone 製剤の精巣障害に対する防御的効果を組織学的, 内分泌学的に検討した.

また精細管内における androgen とくに testosterone (T) の役割について検討する目的で EDS 投与ラット精巣内に Testosterone microcrystal suspension (Tmcs) を注入し, その防御的効果を検討したので報告する.

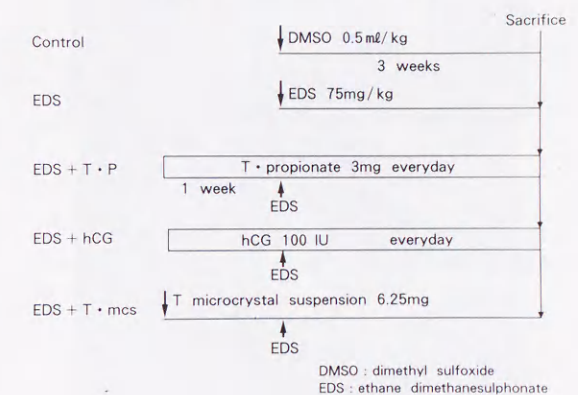
対象並びに方法

I. 対象および実験方法

実験には14週齢, 体重 430 ± 20 g の Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用し, これを5群に分け実験に供した. Control 群には dimethyl sulfoxide (DMSO) を用い, (DMSO: 生食/1:3) 0.5ml/kg, EDS 群には EDS 75mg/kg を腹腔内に投与し, 3週後に屠殺した. EDS は Jackson ら³⁾の報告に従い作成した. さらに, testosterone propionate (TP) 群, および hCG 群は実験開始日よりそれぞれ TP 3mg, hCG 100IU を連日4週間皮下注射を施行した. 実験開始より1週目に EDS を腹腔内投与し, 3週後(最終皮下注射12時間後)に屠殺した. Tmcs 群は実験開始日にエーテル麻酔下に陰囊皮膚に小切開を加え, 両側精巣白膜内に21G注射針を用いて Tmcs 6.25mg/生食0.25ml を注入した. そして, TP, hCG 群と同様に1週目に EDS を腹腔内投与し, 3週後に屠殺した. Tmcs の作成は以下の通り行った. testosterone 原末300mg をアセトン1ml に溶解加温したものを冷水中でマイクロクリスタル化する. 更にグラスフィルターで濾過した後, 界面活性剤である Tween 添加生食水に入れ, 再懸濁し滅菌した. 使用したラット数は, hCG 群5匹, その他が各群4匹である. 屠殺時に精巣, 副性器を摘出し, 下大静脈より採血を行った. Fig. 1 に Treatment schedule を示す.

II. 測定方法

Fig. 1 Treatment schedule



1. 精細管内 androgen 濃度測定

精細管は穂坂ら⁴⁾により報告された方法に従い, コラゲナーゼと No. 100メッシュを用いる two step incubation system にて分離した.

精細管内 T および 5α -dihydrotestosterone (DHT) 濃度はわれわれが既に報告した Sephadex LH-20 microcolumn chromatography による分画抽出法を用いた RIA 法にて測定した⁵⁾.

2. ラット血清 T, LH, FSH 濃度測定

血清 T は二抗体法による RIA キットにて測定し, LH, FSH に関しては, National Institute of Arthritis, Diabetes & Digestive & Kidney Diseases (NIADDK) より提供を受けた rat LH, FSH 測定用 RIA キットにより, RP-2スタンダードを用いて測定した.

3. 精細管直径測定

精細管直径はオリンパス社製デジタル測微接眼装置 (×400) を用いて測定し, 精細管に対する影響を観察した.

成 績

I. 精巣, 副性器重量

摘出した精巣重量を Fig. 2 に示す. 精巣重量は control 群が 1.77 ± 0.14 (mean $\pm$ S.D.), EDS 群が 1.10 ± 0.22 g であり, EDS 群で有意に精巣重量の低下を認めた. TP 群, hCG 群, Tmcs 群はそれぞれ 1.78 ± 0.11 , 1.60 ± 0.20 , 1.40 ± 0.25 g であり, EDS 群と比べ精巣

Fig. 2 Comparison of testicular weight in 5 groups

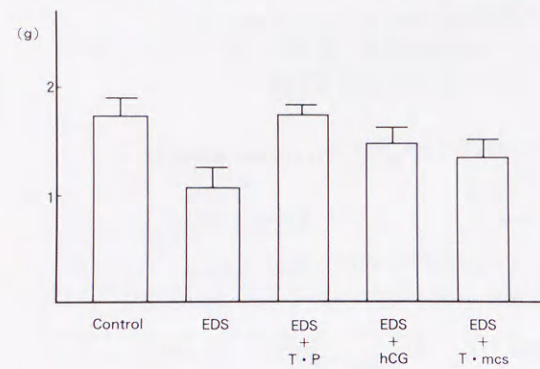
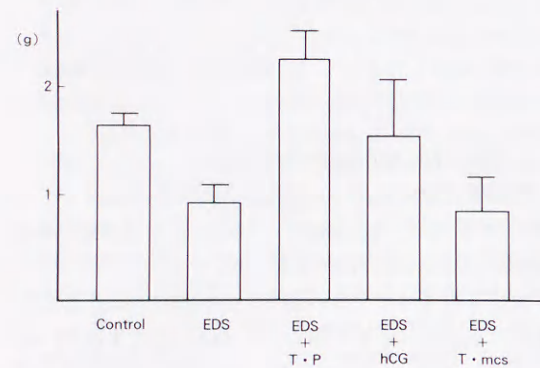


Fig. 3 Comparison of seminal vesicular weight in 5 groups



重量は有意に保たれていた。

精嚢重量に関してはcontrol群 1.62 ± 0.09 , EDS群 0.92 ± 0.15 , TP群 2.26 ± 0.27 , hCG群 1.50 ± 0.55 , Tmcs群 0.85 ± 0.31 gであり, control群およびTP群はEDS群に比し有意に精嚢重量は保たれていた, hCG群およびTmcs群はEDS群と有意差は認めなかった (Fig. 3).

II. 血中ホルモン濃度

血中T, LH, FSH濃度をそれぞれFig. 4, 5, 6に示す。T濃度はcontrol群 5.2 ± 1.3 , EDS群 0.8 ± 0.6 , TP群 12.2 ± 1.4 , hCG群 4.6 ± 1.3 , Tmcs群 1.5 ± 1.3 ng/mlであり, EDS群, Tmcs群において有意の低下を認めた, TP群ではcontrol群に比し有意に上昇を認めた。

LH濃度はcontrol群 0.49 ± 0.14 , EDS群 2.67 ± 1.00 , TP群 0.24 ± 0.10 , hCG群 0.77 ± 0.12 , Tmcs群 2.48 ± 0.28 mIU/mlであり, control群に比しEDS

Fig. 4 Comparison of plasma T levels in 5 groups

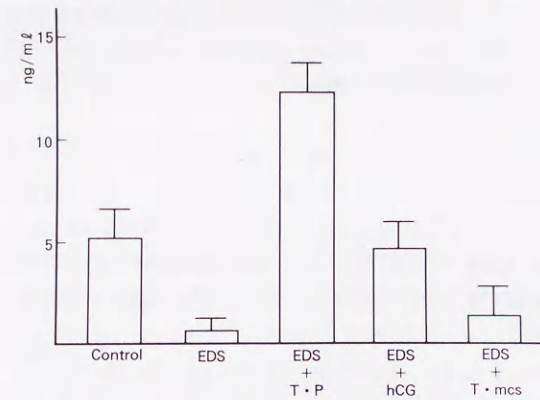


Fig. 5 Comparison of plasma LH levels in 5 groups

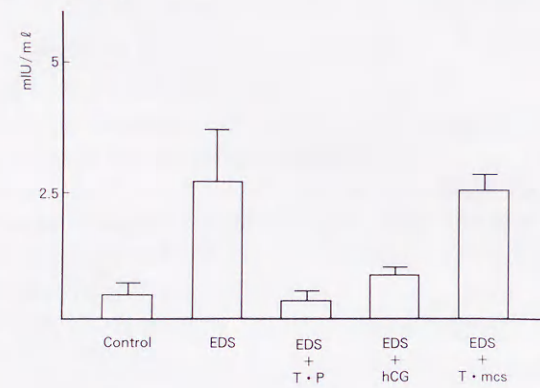
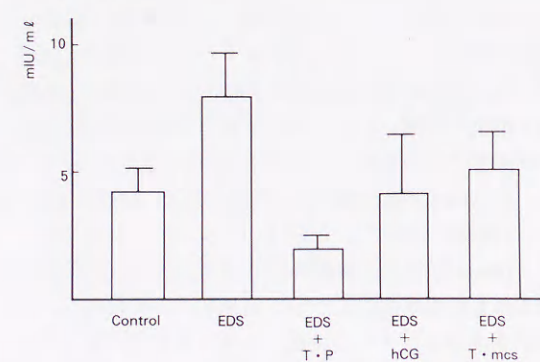


Fig. 6 Comparison of plasma FSH levels in 5 groups



群, Tmcs群で有意の上昇を認め, hCG群でも上昇を認めた。FSH濃度はcontrol群 4.16 ± 0.87 , EDS群 7.86 ± 1.72 , TP群 1.85 ± 0.40 , hCG群 4.10 ± 2.25 , Tmcs群 4.98 ± 1.50 mIU/mlであり, EDS群において

Fig. 7 Comparison of seminiferous tubular diameter in 5 groups

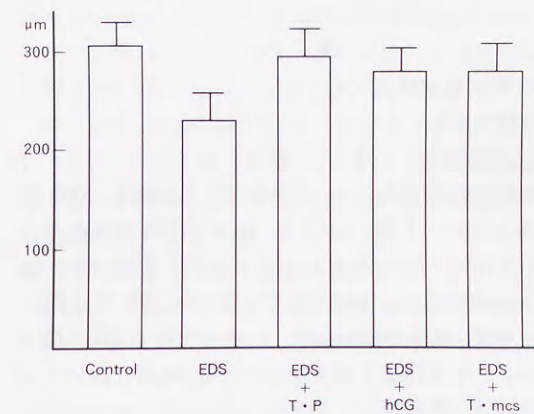
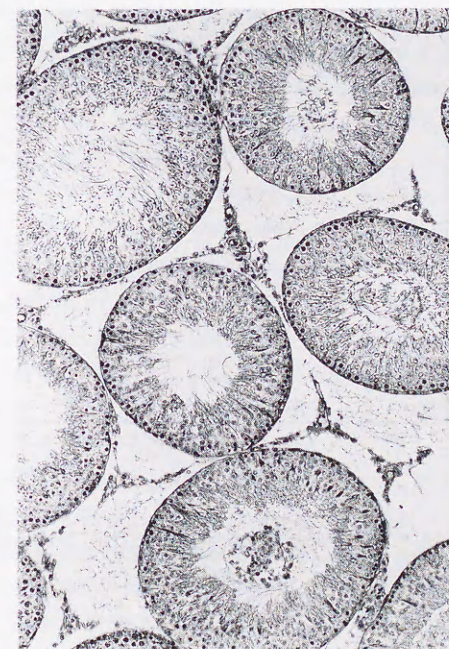


Fig. 8 Histological findings of rat testis treated with dimethyl sulphoxide (control group)



有意の上昇を認めた。

III. 組織学的効果

精巣障害の程度を見る指標として, 精細管直径を測定した⁶⁾。Control群 304.4 ± 24.7 , EDS群 232.3 ± 28.8 , TP群 294.1 ± 26.8 , hCG群 278.7 ± 26.3 , Tmcs群 $279.9 \pm 31.1 \mu\text{m}$ であり, EDS群では他の4群と比べ有意に精細管直径の縮小を認めた (Fig. 7).

Fig. 9 Histological findings of rat testis treated with ethane dimethane sulphonate (EDS group)

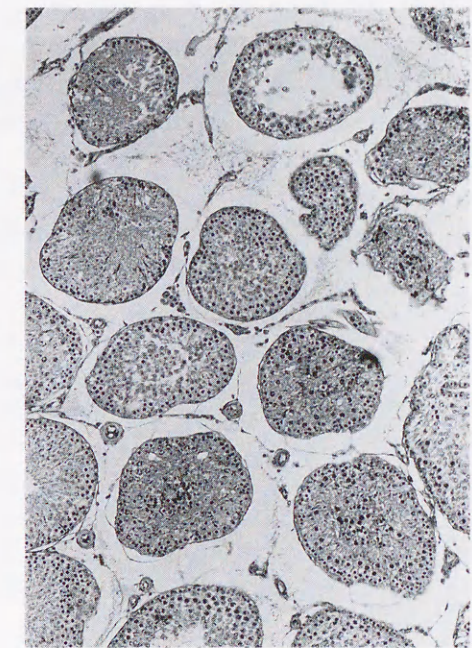


Fig. 10 Histological findings of EDS-given rat testis pretreated with testosterone propionate (TP group)

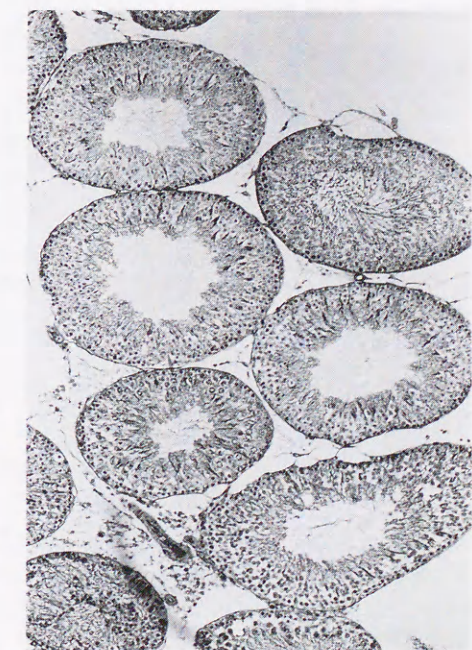


Fig. 11 Histological findings of EDS-given rat testis pretreated with human chorionic gonadotropin (hCG group)

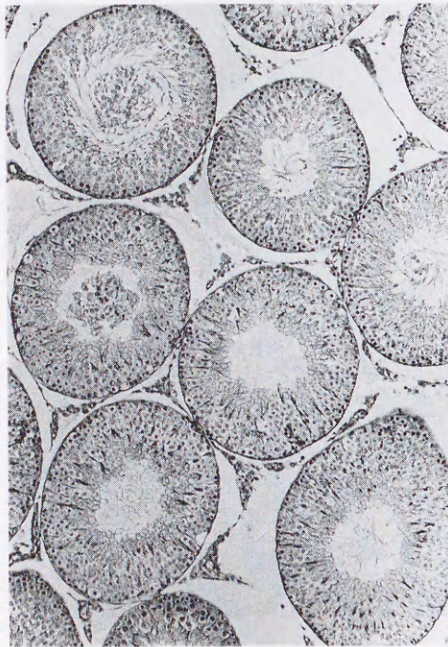


Fig. 12 Histological findings of EDS-given rat testis pretreated with testosterone microcrystal suspension (Tmcs group)

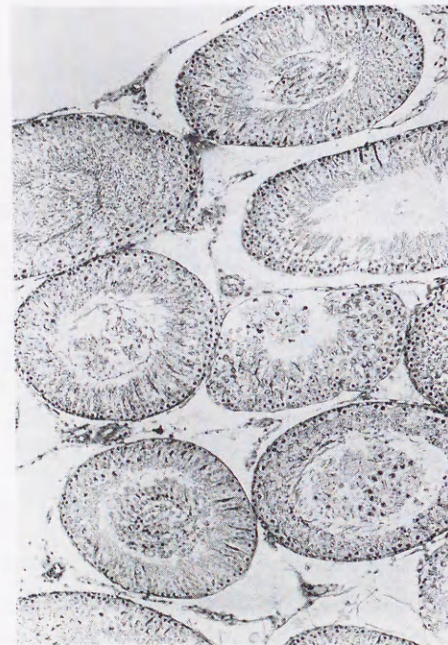


Fig. 8~12に精巣所見を示す。EDS 群では著明な精細管の萎縮が認められ、間質細胞もまばらであるが、TP 群では精細管直径は正常に保たれ、spermatozoa も認められた。また、hCG 群、Tmcs 群についても、EDS 群と比べ精子形成は保たれており、明らかに精細管直径は保たれていた。

IV. 精細管内 androgen 濃度

精細管内 T 濃度は control 群 273.8 ± 92.8 , EDS 群 19.5 ± 7.3 , TP 群 2.1 ± 1.3 , hCG 群 278.7 ± 26.3 , Tmcs 群 70.7 ± 34.9 ng/g.t.w. であり、EDS 群では control 群に比し、著明な低下を認めた。TP 群で EDS 群と同様に低下を認めたが、hCG 群では control 群と同程度の精細管内 T 濃度を示し、Tmcs 群においてもある程度、精細管内 T 濃度の上昇が認められた (Fig. 13)。

精細管内 DHT 濃度は、control 群 27.3 ± 19.1 , EDS 群 4.4 ± 2.8 , TP 群 1.6 ± 1.1 , hCG 群 27.9 ± 10.9 ,

Fig. 13 Comparison of intratubular T levels in 5 groups

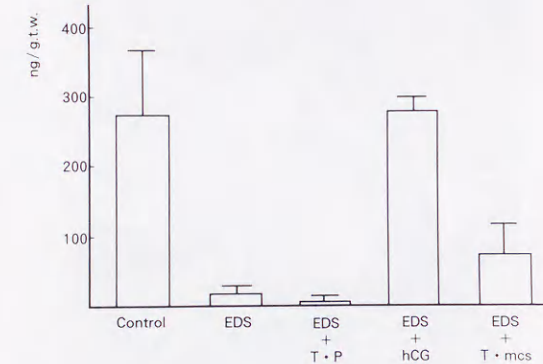
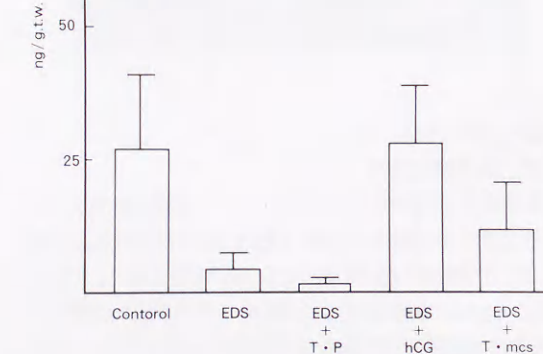


Fig. 14 Comparison of intratubular DHT levels in 5 groups



Tmcs 群 10.7 ± 9.5 ng/g.t.w. であり、hCG 群で著明に上昇し、Tmcs 群についても上昇傾向を認めた (Fig. 14)。

考 察

I. EDS 投与によるラット精巣への影響について

精巣重量は EDS 群で著明に低下し、control 群に比して EDS は精巣障害を強く惹起することが判明した。これは O'leary ら⁷⁾の報告による EDS 投与21日目の精巣重量とはほぼ一致した。精巣に対する EDS の組織学的効果では精細管直径の測定を行い比較検討した。これは Pesce⁸⁾の報告に基づき標本の精細管の短軸を測定するものであるが、精細管障害の程度と良く相関する。EDS は精細管直径を著明に減少させており、その精細管障害の程度が強いことがわかる。顕像でも示したが、EDS 投与群では間質細胞もまばらであり精細管萎縮が認められる。Kerr ら⁹⁾は EDS の single injection により約3日から7日で精巣間質の Leydig 細胞の消失をきたし、14日目より新しい Leydig 細胞の出現を認めると報告している。さらにその形態学的検討により、EDS 投与によって Leydig 細胞の消失する理由として、EDS は Leydig 細胞に近接するマクロファージに対して貪食能を活性化させるが、その貪食能を活性化させるような抗原性を有しているのではないかと推定している。Rommerts ら⁹⁾は in vitro の実験で EDS は mature rat の Leydig 細胞に障害を与え、immature rat の Leydig 細胞には障害を与えないと報告しているが、それによると EDS は Leydig 細胞の蛋白をアルキル化し、その結果細胞の機能が失われ細胞の「死」につながり、マクロファージの貪食が始まると述べている。

血中 testosterone (T) 濃度の測定では EDS 群で著明な低下を認めている。血中 T の推移を調査した報告では21日目には T は control level の1/2からほぼ control level にまで復している⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾。それらの報告によれば血中 T 濃度は EDS 投与後3日目で最低となり、14日から21日で正常レベルに復帰している。著者の実験では21日目でもなお 0.8 ± 0.6 ng/ml と低い値であった。LH, FSH に関しては EDS 群で LH, FSH とも高値を示した。これは他の報告とはほぼ一致した⁷⁾¹⁰⁾¹¹⁾。

精細管内 androgen 濃度に関しては control 群の精細管内 T 濃度は 273.8 ± 92.8 ng/g.t.w. に対し、EDS 群で 19.5 ± 7.3 ng/g.t.w. と EDS 群で有意に低下を認めた。以上より、EDS 腹腔内単回投与によりラット精巣

においては精細管内 T 濃度の著明な低下を認め、さらに精子形成障害を惹起することが判明した。

以前に著者らが報告した adriamycin (ADR) 投与ラットにおける検討では、ADR は精祖細胞および精母細胞の分裂時における DNA 合成を障害するが、精細管内 androgen 濃度には影響を与えないことが判明し、ホルモン依存性の不妊モデルには不适当であった¹²⁾。これに対し、今回の EDS 腹腔内単回投与による精細管内 T 濃度の低下および精子形成障害は、ホルモン依存性不妊ラットモデルとして適していると考えられる。

すなわち、特発性男性不妊症の中には精細管内 androgen 濃度が低値のため精子形成が十分に発現しない症例が存在していることが判明している⁵⁾。これに対する治療法の基礎的な検討に対しては精細管内 T 濃度の低い不妊ラットモデルが必要であり、EDS 投与ラットはこれに最適であると考えられる。

II. EDS 投与ラットにおける精巣障害に対する防御的薬剤の効果について

今回の基礎的検討により EDS 腹腔内単回投与により著明な精子形成障害および精細管内 T 濃度の低下を認め、ホルモン依存性不妊ラットモデルに適していると判明した。しかし、EDS の精巣に対する障害は投与後2~3週間がピークであり、その後は自然回復を認める⁷⁾。したがって、EDS 投与前より TP, hCG および Tmcs を投与し、その防御効果を見ることとした。

まず hCG 投与群についての検討であるが、本群では最も精細管内 T 濃度の上昇が認められ、control 群とほぼ同じレベルに保たれていた。精巣所見においても精細管直径も保たれ、spermatogenesis も維持されていた。hCG 投与によりラット Leydig 細胞の増加が認められることは既に報告されている¹³⁾¹⁴⁾。今回の実験結果より、hCG は EDS による Leydig 細胞の障害を予防し、その結果として精細管内 T 濃度を保ち、spermatogenesis を維持したと考えられる。

Jackson ら³⁾も、EDS 投与ラットにおける hCG 投与にて精細管上皮の防御が完全に成立しており、これは間質細胞の破壊が起こらなかったことを意味すると報告している。

次に TP 群での検討では、当然のことながら副性器重量および末梢血中 T 濃度の著明な増加を認めた。さらに精細管直径においても EDS 群より有意に増加し、顕像レベルでも精細管障害防御能のあることが判明した。TP 投与にて精細管障害防御能があることは

Jackson ら³⁾も報告しているが、その機序については述べられていない。今回の実験では精細管内 androgen 濃度を測定したが、TP 群では EDS 群と比較してもさらに低値を示している。これは hCG と相反する結果であり、TP 投与で精細管内 T 濃度が低値を示すことにもかわらず精細管障害が予防されている。これに関してはさらに詳細な検討が必要であるが、Anthony ら¹⁵⁾がラットにおいては pregnenolone により androgen binding protein (ABP) が産生され、精子形成を惹起すると報告していることより、この場合、TP 体外投与というプライミングにおいて ABP が産生され精子形成障害を防御するものと推察されるが、詳細な検討が望まれる。

最後に Tmcs 群での検討であるが、EDS 群に比し精細管直径は保たれ、さらに spermatogenesis も認め精細管障害を予防する効果は明らかであった。精細管内 T 濃度は EDS 群 $19.5 \pm 7.3 \text{ ng/g.t.w.}$ に対し Tmcs 群は $70.7 \pm 34.9 \text{ ng/g.t.w.}$ であり、control 群、hCG 群に比較して有意に少ないながら、ある程度 T 濃度は保たれていた。しかし、血中 T 濃度においては Tmcs 群は control 群より有意に低いレベルであり、EDS 群とほぼ同等、さらに LH 濃度に関しても EDS 群とほぼ同じレベルであった。また、精嚢重量に関しても EDS 群と同じレベルであった。

すなわち、Tmcs 群は精嚢重量、末梢血中 T 濃度および LH 濃度に関して EDS 群と差がなく、精細管内 T 濃度のみ上昇させることが判明した。このことより、精細管内では T は精子形成に重要な役割を果たす因子の一つであることが示唆された。ただ精細管内 T 濃度が control 群より有意に低値である事より、精子形成に関しては、精細管内 T 濃度はある程度存在すれば良いと考える。このことをより明確にするには hCG および Tmcs の投与量、期間を変えた詳細な検討による精細管内 T 濃度の測定が必要である。しかし、いずれにせよ精細管内 T は精子形成に必要であると考えられ、さらに精巢内 Tmcs 注入療法は、大島ら¹⁶⁾が報告した男性ホルモンペレット移植療法よりも組織障害および精巢内分布に関し優れており、一部の特発性男性不妊症に対して有用な治療法である事が示唆された。

結 語

SD 系雄性ラットに Leydig 細胞を直接障害する ethane dimethane sulphonate (EDS) を投与し、ラット精巢障害の基礎的検討を行い、さらにその防御的役

割を果たすと考えられる薬剤を使用、精巢障害に対する防御的効果を検討し、以下のごとき結果を得た。

1. EDS 投与により精細管内 T および DHT 濃度は有意に低下し、さらに著明な精子形成障害をきたし、EDS 投与ラットはホルモン依存性不妊ラットモデルとして適している事が判明した。

2. hCG 投与および T microcrystal suspension (Tmcs) 精巢内注入により、EDS 投与ラットの精細管障害を防御することが可能であり、精細管内 T 濃度も増加を認めた。

3. testosterone propionate (TP) 投与は精細管内 T, DHT 濃度を著明に低下させるにもかかわらず、EDS 投与ラットの精細管障害を防御することが判明した。その理由として、ラットにおいては TP によるプライミングにより精細管内 androgen binding protein (ABP) が増加し、この ABP が精子形成を惹起することが推察された。

4. 精細管内では T は精子形成に重要な役割を果たす因子の一つであることが示唆された。さらに精巢内 Tmcs 注入療法、すなわち男性ホルモンペレット移植療法は、一部の特発性男性不妊症に対して有用な治療法であると考えられた。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った恩師、大森弘之教授に深謝いたします。また、研究にあたり、直接の御指導を頂いた大橋輝久講師(現岡山赤十字病院泌尿器科)に感謝いたします。さらに貴重な御助言および御協力を頂いた帝京大学産婦人科学教室神戸川明助教授並びに測定にあたり御協力を頂いた湯川厚巳技官に感謝いたします。

本論文の要旨は第34回日本不妊学会総会および第78回日本泌尿器科学会総会において報告した。

文 献

- 1) Jackson, H.: The effects of alkylating agents on fertility. Brit. Med. Bull., 20, 107—114, 1964.
- 2) Cooper, E.R.A. and Jackson, H.: Comparative effects of methylene, ethylene and propylene dimethanesulphonates on the male rat reproductive system. J. Reprod. Fert., 23, 103—108, 1970.
- 3) Jackson, C.M. and Jackson, H.: Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatic action of ethane dimethanesulphonate. J. Reprod. Fert., 71, 393—401, 1984.
- 4) 穂坂正彦, 西村隆一, 高井修道, 原田昌興: ヒト分離精細管における testosterone の代謝. 日不妊会

誌, 28, 143—150, 1983.

- 5) 入江 伸, 大橋輝久, 大橋洋三, 古川雅人, 永井敦, 山下良孝, 大森弘之: 精細管内 Androgen 濃度の研究. 第1報. 日不妊会誌, 33, 236—243, 1988.
- 6) Pesce, C.M.: The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. Sem. Diag. Pathol., 4, 264—274, 1987.
- 7) O'leary, P.C., Jackson, A.E., Irby, D.C. and De Kretser, D.M.: Effects of ethane dimethane sulphonate (EDS) on seminiferous tubule function in rats. Inter. J. Andrology, 10, 625—634, 1987.
- 8) Kerr, J.B., Donachie, K. and Rommerts, F.F.G.: Selective destruction and regeneration of rat Leydig cells in vivo. Cell Tissue. Res., 242, 145—156, 1985.
- 9) Rommerts, F.F.G. and Hoogerbrugge, J.W.: In vitro effects of ethylene dimethane sulfonate (EDS) on isolated Leydig cells. in Cell Biology of the Testis and Epididymis, p. 401, The New York Academy of Sciences, New York, 1987.
- 10) Kerr, J.B., Bartlett, J.M.S., Donachie, K. and Sharpe, R.M.: Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat. Cell Tissue. Res., 249, 367—377, 1987.
- 11) Jackson, A.E., O'leary, P.C., Ayers, M.M. and de Kretser, D.M.: The effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat Leydig cells: Evidence to support a connective tissue origin of Leydig cells. Biol. Reprod., 35, 425—437, 1986.
- 12) 永井 敦, 大橋輝久, 大橋洋三, 山下良孝, 小浜吉照, 大枝忠史, 山根 享, 吉田光宏, 大森弘之: Adriamycin 投与ラットにおける造精機能障害に関する内分泌学的, 組織学的検討. 日不妊会誌, 35, 573—577, 1990.
- 13) Christensen, A.K. and Peacock, K.C.: Increase in Leydig cell number in testes of adult rats treated chronically with an excess of human chorionic gonadotropin. Biol. Reprod., 22, 383—391, 1980.
- 14) Chemes, H.E., Rivarola, M.A. and Bergadá, C.: Effect of HCG on the interstitial cells and androgen production in the immature rat testis. J. Reprod. Fert., 46, 279—282, 1976.
- 15) Anthony, C.T., Danzo, B.J. and Orgebinchrist, M.: Investigation on the relationship between sperm fertilizing ability and androgen-binding protein in the hypophysectomized, pregnenolone-injected rat. Endocrinology, 114, 1419—1425, 1984.
- 16) Oshima, H., Negishi, T., Takagi, K., Yokokawa, M. and Ochiai, K.: Clinical evaluation of testosterone pellet implantation in the testis as a treatment of male infertility. in The Testis in Normal and Infertile Men, Troen, P. and Nankin, H.R., 1st. ed., p. 561, Raven Press, New York, 1977.

(1992年2月13日受理)

