

精巣内精子採取：精子保存の進歩と課題

大阪大学医学部泌尿器科学教室（主任：奥山明彦教授）

北村 雅哉*, 西村 憲二, 三浦 秀信
松宮 清美, 奥山 明彦

大阪警察病院泌尿器科（部長：藤岡秀樹）

小森 和彦, 藤岡 秀樹

健康保険組合連合会大阪中央病院泌尿器科（部長：竹山政美）

古賀 実, 竹山 政美

RETRIEVAL AND CRYOPRESERVATION OF TESTICULAR SPERM

Masaya KITAMURA, Kenzi NISHIMURA, Hidenobu MIURA,
Kiyomi MATSUMIYA and Akihiko OKUYAMA*From the Department of Urology, Osaka University Medical School*

Kazuhiko KOMORI and Hideki FUJIOKA

From the Department of Urology, Osaka Police Hospital

Minoru KOGA and Masami TEKEYAMA

From the Department of Urology, Osaka Central Hospital

We reviewed 44 cases of non-obstructive azoospermia treated by testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) from July, 1997 to September 1999 at our institutes. Testicular sperm were retrieved from 32 patients (72.7%). ICSI was performed on 29 patients and the partners of 15 patients (46.9%) became pregnant. Out of 10 patients with histology of Sertoli-cell-only, we could retrieve sperm from 3 patients (30%). Testicular volume, Johnsen's score count (JSC), and FSH were significant parameters to predict the recovery of testicular sperm from the patients, but if only the patients with JSC less than 8, are analyzed, none of them was significant parameter. Chromosomal abnormality was not a significant parameter. The partner's age, motility of recovered sperm and testicular volume correlated with the fertilization rate. Chromosomal abnormality or the usage of cryopreserved sperm was not a significant parameter to predict fertilization.

(Acta Urol. Jpn. 46: 587-590, 2000)

Key words: Azoospermia, Male infertility, TESE, ICSI

緒 言

卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) は妊娠成立に必要な精子数を劇的に減少させ、男性不妊治療に革命をもたらしてきた¹⁾ 治療の対象は高度乏精子症から精巣内精子を使用することにより、無精子症にまで広がりつつある。精巣内精子抽出術 (Testicular sperm extraction; TESE) はまず、1993年に閉塞性無精子症においてその有用性が報告され²⁾、ついで1994年には精子形成そのものに障害のある非閉塞性無精子症の治療にも有効であることが報告された³⁾ これは射出精液中に精子がまったく見られない場合でも、精巣のごく一部に少数の精子が

形成されている場合があり、これを回収し ICSI に供することにより妊孕性が期待できるためである。しかも、FSH、精巣容量、精巣生検の結果など、従来の妊孕性を考えるパラメーターがその成績の絶対的指標とならないことが報告され⁴⁾、また従来治療不能と考えられてきたクラインフェルター症候群においても本法を用いて妊娠、出産例が出るに及び⁵⁾、TESE-ICSIを試みずしては絶対不妊の診断はできない状況になりつつある。一方、本法では精子が回収できなかった場合、排卵誘発など、妻側の ICSI の準備が無駄になってしまう場合がある。しかし、非閉塞性無精子症の精巣精子は非常に少数である上に状態が不良で、凍結は困難なことも多い。本稿では1997年7月から1999年9月までの2年間に大阪大学およびその関連施設で行われた計44例の TESE-ICSI、および凍結精

* 現：国立大阪病院泌尿器科

巢精子を用いた Cryo TESE-ICSI の結果について報告し、その結果の予測因子について検討する。

対象と方法

1) 対象患者

1997年7月から1999年9月まで当科および関連施設にて行った TESE のうち、先天性精管欠損、ヘルニア術後、パイプカット術後など明らかな閉塞性無精子症を除いた計44例。年齢は 34 ± 5 歳、妻の年齢は 32 ± 5 歳。精巣容量は 9.7 ± 4.6 ml、ホルモン値は LH 6.2 ± 4.5 mIU/ml, FSH 18.2 ± 16 mIU/ml, testosterone 3.8 ± 1.4 ng/ml, E2 24 ± 9 pg/ml, Prolactin 11 ± 8.4 ng/ml, 精巣組織の組織学的検査も施行された26例については Johnsen's score count (JSC) 5.3 ± 3.3 であった。

2) 方法

無精子症症例は遠心などにより完全な無精子症であることを十分に確認後、原則として、まず両側精管精嚢腺造影、両側精巣の1箇所づつから組織学的検査と精子の抽出を試みた。抽出不能例にかぎり精巣機能に対する長短期的影響などを十分に説明し、承諾の得られた症例にのみあらためて multiple TESE を施行した。TESE は局所麻酔あるいは腰椎麻酔下に少なくとも片側5~6箇所から通常法あるいはバイオプティガン™を用いた方法^{6,7)}を改変して行った。すなわち、通常法に準じ1箇所を白膜を切開した後同部より14Gのガン挿入、深度、方向をかえ精巣組織を採取した。

精巣組織の一部は直ちにスライドグラスで挫滅、検鏡し、精子が認められた場合には残りの組織に modified HTF media (Irvine Scientific, California, USA) を加え細切、検鏡、マイクロマニピュレーターにて精子を吸引、ICSI に供した。少数精子の凍結はミネラルオイル中に精子凍結用培養液 (Sperm Freeze™, Ferti Pro, Aalter, Belgium) の小滴を作り、そのなかに1個の精子を入れプログラムフリーザー (5°C まで毎分 -7°C にて冷却, 1分間保持の後さらに毎分 -10°C で -80°C まで冷却, 5分間保持) にて凍結した後液体窒素で保存する方法で行った (Fig. 1)。術後陰嚢内血腫などの副作用はなく、1999年12月現在、血中テストステロン値の低下などを認める症例はなかった。

結果

集計した44例のうち32例 (72.7%) で精子の回収が可能であった。そのうち運動精子は23例 (52.3%) に認められた。精子回収が可能であった32例のうち29例で ICSI が施行され、28例 (87.5%) で受精が確認され、15例 (46.9%) で妊娠が成立した。1999年12月現

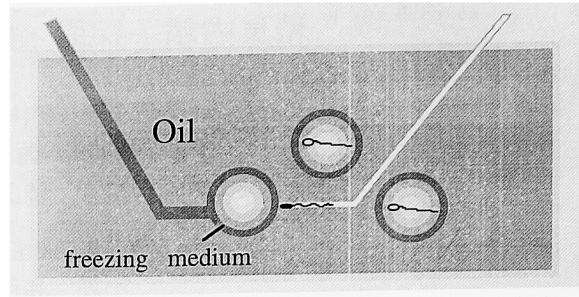


Fig. 1. Microdroplet 法による少数精子の凍結 mineral oil 中に作った freezing medium の小滴の中に精子を入れる。

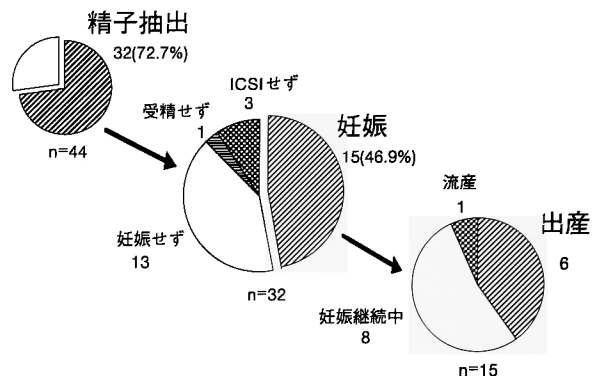


Fig. 2. 大阪大学医学部泌尿器科およびその関連施設で施行された非閉塞性無精子症に対する TESE-ICSI の治療成績 (7/97~9/99)。

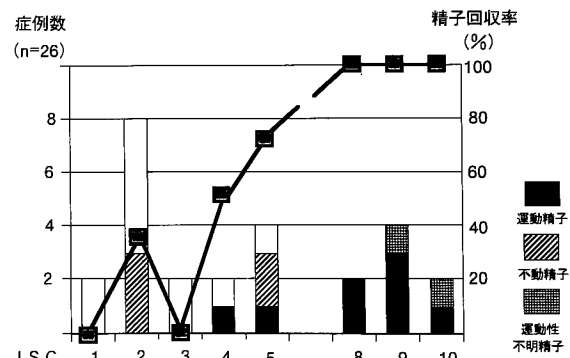


Fig. 3. 精巣の組織像 (Johnsen's score count) と精子回収。棒グラフは回収症例数、折れ線グラフは回収率を示す。運動性不明精子は運動性についての記載の無かったもの。

在、6例が出産、1例が流産に終わっている (Fig. 2)。

組織学的検査が施行された26例についてその JSC ごとの精子回収率をみた (Fig. 3)。JSC 8 以上の症例では回収率は100%であり、また、JSC 2 以下の Sertoli cell only のような症例においても10例中3例、30%で不動精子ではあるが、精子の回収が可能であった。

精子回収の可否を予測する因子を検討したところ、精巣容量、JSC、FSH において有意差がみられた

Table 1. 受精の可否を予測するパラメーター

	妻の年齢		Motility		平均精巣容量 (ml)	
	<35	≥35	(+)	(-)	≥10	<10
有意差あり:						
受精 (+)	126	39	118	30	104	48
受精 (-)	48	49	58	43	26	42
	p<0.0001		p=0.0001		p<0.0001 (カイ二乗検定)	
有意差なし: 年齢, LH, FSH, T, PRL, JSC, 染色体異常の有無, 凍結精子の使用 (カイ二乗検定)						

数字は卵の数を示す。

Table 2. 凍結精子の使用による ICSI の成績

	凍結精子	新鮮精子	凍結精子	新鮮精子
受精 (+)	112	56	妊娠 (+)	10
受精 (-)	101	42	妊娠 (-)	12

受精に関しては卵の数, 妊娠に関しては症例数を示す。

($p=0.0037, 0.0002, 0.0012$: t 検定). 男性の年齢, LH, testosterone, E2, prolactin (t 検定), 男性側の染色体異常の有無 (カイ二乗検定) においては回収群, 非回収群の間で有意差は認められなかった。

次に, 回収精子の妊孕能を検定するため卵ごとの受精の有無を集計したところ, 妻の年齢, 精子運動性の有無, 平均精巣容量で受精群と非受精群間に有意差がみられた (Table 1, カイ二乗検定). 男性の年齢, LH, FSH, testosterone, E2, prolactin, JSC, 男性側の染色体異常の有無, 凍結精子の使用の有無では有意差が認められなかった (カイ二乗検定). 凍結精子の使用については新鮮精子を用いた場合とその受精率, 妊娠率ともに有意差を認めなかった. (カイ二乗検定) (Table 2).

考 察

TESE-ICSI は従来絶対不妊と考えられてきた多くの非閉塞性無精子症患者に大きな福音となってきているが, 問題点も多い. 1つは精巣に対する侵襲であり, 1つはその回収の不確実性である. 今回われわれの症例では認められなかったが, TESE, 特に multiple TESE は大量の精巣組織が摘出される上に術後の血行障害から長期的には男性ホルモン産生も含めた精巣機能の障害を生じる可能性がある⁸⁾ また, 新鮮精子を用いた ICSI が試みられる場合, 精子が回収できなければ無用な排卵誘発, 採卵をパートナーに強いる結果となりがねず, 回収の可否を術前に予測するパラメーターの確立が求められてきた. 当初, Tournaye ら⁴⁾ はこのようなパラメーターはない, と報告したが, 近年, 精巣容量や FSH と精子回収の可否に相関あり, との報告も見られる⁹⁾. われわれの集計では JSC, 精巣容量, FSH で相関あり, との結果であっ

たが, JSC8 以上の症例は厳密には精路の閉塞が関与している可能性があり, これらの症例を除外すると相関あるパラメーター ($p<0.01$) はなくなった. また, 今回十分なインフォームド Consent のもと, クラインフェルター症候群 2 例を含む 7 例の染色体異常症例に TESE を施行したが, うち 6 例で精子の回収に成功しており, 染色体異常の有無は精子回収の可否と相関がみられず, 精子回収の有無を予測する絶対的指標は見出せなかった. そこで, パートナーへの侵襲を避けるため, まず TESE を行い得られた精子を凍結し, あらためて ICSI を行うこと (Cryo TESE-ICSI) が考えられるが, 非常に少数の精巣精子を凍結することは技術的に困難なことが多い. ハムスターの透明帯を使う方法などが報告されているが¹⁰⁾, 今回われわれはミネラルオイルの中に培養液の microdroplet を作り凍結する方法を用い, 新鮮精子と有意差のない授精能を得ることができた. これは最近の報告とも一致するが¹¹⁾, 精子 DNA の損傷から生産率に差が生じるという報告¹²⁾ もあり, 今後は受精率のみならず生産率までの検討が必要であろう. 今回は出産あるいは流産まで至った症例が少なく, 今後さらに検討を加えていきたい.

また, 回収精子の授精能について今回精子の運動性との相関が認められたが, これは不動精子には死滅精子が含まれているためと考えられる. JSC が精子の授精能と相関があるとの説もあるが¹³⁾, 本検討でも JSC が低いと不動精子が増える傾向があり, 同様の理由が予想される. ICSI において妻の年齢が受精率と相関することは精巣精子に限らず広く知られており¹⁴⁾, 妥当な結果であろう. 精巣容量が相関を示した理由は不明である. 最後に, 本法によって次世代に無精子症の責任遺伝子が伝わる可能性も指摘されてお

り¹⁵⁾, 十分な術前の説明のもと, 慎重な適応の選択が必要であろう。

結 語

1) 非閉塞性無精子症で精子の回収を予測するパラメーターを検討した。JSC, 精巣容量, FSH で相関あり, との結果であったが, JSC 8以上の症例を除外するとこれらの相関はなくなり, 絶対的パラメーターとはなり得なかった。受精に関しては妻の年齢, 精子運動性の有無, 精巣容量が有意なパラメーターとなった。

2) Microdroplet 法を用いた Cryo TESE-ICSI は新鮮精子を用いた TESE-ICSI と同等の受精率が得られ, 無用なパートナーへの侵襲を避けるのに有用と思われた。

本研究にあたり ICSI を施行していただきました辻 敏徳, 岡本吉夫 (岡本クリニック), 大久保香苗, 脇本 博 (脇本産婦人科), 渡部正子, 宮崎和典 (宮崎クリニック), また集計に協力頂きました渡辺由美子の諸氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Palermo G, Joris H, Devroey P, et al.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**: 17-18, 1992
- 2) Schoysman R, Vanderwalmen P, Nijs M, et al.: Pregnancy after fertilization of human testicular sperm. *Lancet* **342**: 1237, 1993
- 3) Hauser R, Temple-Smith PD, Southwick GJ, et al.: Fertility in cases of hypergonadotropic azoospermia. *Fertil Steril* **63**: 631-636, 1994
- 4) Tournaye H, Camus M, Goossens A, et al.: Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* **10**: 115-119, 1995
- 5) Palermo GD, Schlegel PN, Sills ES, et al.: Births after intracytoplasmic injection of sperm obtained by testicular extraction from men with nonmosaic Klinefelter's syndrome. *N Engl J Med* **338**: 588-590, 1998
- 6) Rajfer J and Binder S: Use of Biopsy gun for transcutaneous testicular biopsies. *J Urol* **142**: 1021-1022, 1989
- 7) Tuuri T, Moilanen J, Kaukoranta S, et al.: Testicular biopsy gun needle biopsy in collecting spermatozoa for intracytoplasmic injection, cryopreservation and histology. *Hum Reprod* **14**: 1274-1278, 1999
- 8) Ron-El R, Strauss S, Friedler S, et al.: Serial sonography and colour flow Doppler imaging following testicular and epididymal sperm extraction. *Hum Reprod* **13**: 3390-3393, 1998
- 9) Ezeh UIO, Moore HDM and Cooke ID: Correlation of testicular sperm extraction with morphological, biophysical and endocrine profiles in men with azoospermia due to primary gonadal failure. *Hum Reprod* **13**: 3066-3074, 1998
- 10) Walmsley R, Cohen J, Ferrara-Congedo T, et al.: The first and ongoing pregnancies associated with sperm cryopreservation within evacuated egg zonae. *Hum Reprod* **13**(Suppl 4): 61-70, 1998
- 11) Ben-Yosef D, Yogev L, Hauser R, et al.: Testicular sperm retrieval and cryopreservation prior to initiating ovarian stimulation as the first line approach in patients with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* **14**: 1794-1801, 1999
- 12) Steele EK, Lewis SEM and McCulure N: Science versus clinical adventurism in treatment of azoospermia. *Lancet* **353**: 516-517, 1999
- 13) Tournaye H, Liu J, Nagy PZ, et al.: Correlation between testicular histology and outcome after intracytoplasmic sperm injection using testicular spermatozoa. *Hum Reprod* **11**: 127-132, 1996
- 14) Oehninger S, Veeck L, Lanzendorf S, et al.: 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, 1995
- 15) Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, et al.: Three-generation evaluation of Y-chromosome microdeletion. *J Androl* **20**: 394-398, 1999

(Received on January 24, 2000)
(Accepted on January 25, 2000)