

## 新鮮精巣精子と凍結保存精巣精子の治療成績の比較検討

公平 直樹<sup>1</sup>, 市岡健太郎<sup>1\*</sup>, 大久保和俊<sup>1\*\*</sup>, 植月 祐次<sup>1</sup>  
 斎藤 亮一<sup>1</sup>, 青山 輝義<sup>1</sup>, 井上 幸治<sup>1</sup>, 寺井 章人<sup>1</sup>  
 中堀 隆<sup>2</sup>, 本田 徹郎<sup>2</sup>, 高橋 晃<sup>2</sup>, 古手川直子<sup>3</sup>  
 高橋 司<sup>3</sup>

<sup>1</sup>倉敷中央病院泌尿器科, <sup>2</sup>倉敷中央病院産婦人科, <sup>3</sup>倉敷中央病院不妊症センター

### A COMPARISON OF INTRACYTOPLASTIC SPERM INJECTION OUTCOMES WITH FRESH AND FROZEN-THAWED TESTICULAR SPERM

Naoki KOHEI<sup>1</sup>, Kentaro ICHIOKA<sup>1</sup>, Kazutoshi OKUBO<sup>1</sup>, Hirotsugu UETSUKI<sup>1</sup>,  
 Ryoichi SAITO<sup>1</sup>, Teruyoshi AOYAMA<sup>1</sup>, Koji INOUE<sup>1</sup>, Akito TERAI<sup>1</sup>,  
 Takashi NAKAHORI<sup>2</sup>, Tetsuro HONDA<sup>2</sup>, Akira TAKAHASHI<sup>2</sup>, Naoko KOTEGAWA<sup>3</sup>  
 and Tsukasa TAKAHASHI<sup>3</sup>

<sup>1</sup>The Department of Urology, Kurashiki Central Hospital

<sup>2</sup>The Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Central Hospital

<sup>3</sup>The Department of Infertility Center, Kurashiki Central Hospital

Testicular sperm can be obtained from patients with non-obstructive azoospermia. However, there is not enough evidence concerning whether fresh or frozen-thawed sperm is better for successful pregnancy. We retrospectively compared initial treatment results of intracytoplasmic sperm injection using fresh and frozen-thawed testicular sperm in our institution. From August 1997 to May 2006, a total of 27 cases including 18 cases using fresh sperm (269 oocytes) and 9 cases using frozen sperm (97 oocytes) were evaluated. In the fresh and frozen sperm groups 33.4 and 32.9%, respectively, developed good quality embryo. There was no significant difference between the two groups in successful pregnancy and birth rates.

(Hinyokika Kiyō 54 : 471-474, 2008)

**Key words :** Testicular sperm extraction, Frozen-thawed testicular sperm

### 緒 言

近年、無精子症患者でも精巣精子を用いた卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) によって挙児を得ることが可能になった。また、顕微鏡下精巣精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction; MD-TESE) の開発、普及により、非閉塞性無精子症であっても高い精子採取率が得られるようになってきた<sup>1-3)</sup>。

現在のところ、精巣精子の存在を予想する有効な方法はないとされている。また ICSI に際して、女性側の排卵誘発、採卵は身体的にも経済的にも大きな負担となっている。そのため、多くの施設では前もって精巣精子採取術 (testicular sperm extraction; TESE) を行い、精巣精子の存在が確認された場合にはまず凍結保存を行い、その後女性側の準備を開始し、凍結精

子を用いた ICSI を行うのが一般的のようである。

しかしながら、非閉塞性無精子症のように造精機能の低下している環境から採取された少数の精子を凍結融解すると、精子の質を悪化させてしまう懸念がある。精子採取技術が向上した現在、採取された精子をそのまま新鮮精子として ICSI に供する方が妊娠の可能性を高められるのではないかと期待する意見も出てきている。

倉敷中央病院では、非閉塞性無精子症に対する治療方針としては、新鮮精子を用いた ICSI を第一選択としてきた。すなわち、まず診断的 MD-TESE を行い、精巣精子が確認できた場合には一旦凍結保存しておく、後日女性側の採卵の日にあわせて 2 回目の MD-TESE を行い、そこで得られた新鮮精子を用いて初回の ICSI を行っていた。この方法だと男性が 2 回手術を受ける欠点はあるものの、妊娠については最もよい条件を提供することができる。

今回、われわれは初回 ICSI 施行時に凍結精子を用いた場合と新鮮精子を用いた場合の受精胚の状態を比

\* 現 : 京都大学医学部泌尿器科学教室

\*\* 現 : 神戸市立医療センター中央市民病院泌尿器科

較し, TESE 施行時の精子凍結の ICSI の成績への影響について後方視的に検討したので報告する.

### 対象および方法

1997年8月から2006年5月までに倉敷中央病院にて施行した TESE 症例を対象とした. 両側の精巣発育が不良であり, 病理所見において平均 Johnsen's score 8.0未満の症例は造精機能障害があるものとして NOA (non-obstructive azoospermia: 非閉塞性無精子症) と診断した. 上記以外の症例では初回 MD-TESE 時に精巣全体に均一な太い精細管構造が確認され, そこから容易に精子が確認でき, これらの症例は造精機能障害がないものとして, 射精障害や両側精管欠損症などを含めて非 NOA と診断した. NOA に対する初回治療は, 診断的 MD-TESE にて精巣内精子が確認できた症例にのみ採卵の日にあわせた2回目の MD-TESE を行い, そこで得られた新鮮精子を用いて ICSI を行うことを原則とした.

非 NOA に対しては新鮮精子と凍結精子のいずれを使用するかは患者の希望に沿って決定した. 対象症例は初回 ICSI の際に使用した精子により「新鮮精子群」, 「凍結精子群」の二群に分類し, 受精率, 分割率, 良好胚率, 妊娠率, 出産率を比較検討した. ただし, 採卵をした周期が胚移植 (embryo transfer: ET) に不適切と判断された場合は全胚保存としているため, 妊娠・出産の割合はこれらを除いた症例で検討した. 胚の形態学的評価は Vecck の分類を使用した<sup>4)</sup>. すなわち day 2 を評価日として grade 1 と grade 2 を良好胚とした.

使用する精子の形態・運動性については良好なものを優先して使用しているが, 本解析では詳細が不明であるため評価項目としていない. 凍結融解精子を使用する場合で, 選別が困難なときは80%パーコール液を使用した選別法を利用している. 統計学的検討には Chi-square test を使用した.

### 結 果

患者背景を Table 1 に示した. 新鮮精子群18例と凍結精子群9例中の NOA はそれぞれ11例 (61.1%), 4例 (44.4%) であった. 非 NOA はそれぞれ7例 (38.9%), 5例 (55.6%) であった. 新鮮精子群と凍結精子群における受精率, 分割胚率, 良好胚率, 妊娠率, 出産率を Table 2 に示した. 受精率・分割率・良好胚率, 妊娠率, 出産率に群間差は認められなかった.

さらに NOA と非 NOA に亜分類して, 受精率, 分割胚率, 良好胚率, 妊娠率, 出産率を比較した (Table 3a, b). NOA 15例中の新鮮精子群は11例 (73.3%), 凍結精子群は4例 (26.7%) であった. 受精率・分割率・良好胚率について両群間に有意差を認めなかったが, 凍結精子群には妊娠例を認めなかった.

非 NOA 12例中の新鮮精子群は7例 (58.3%), 凍結精子群は5例 (41.7%) であった. 新鮮精子群と凍結精子群では受精率・分割率・良好胚率については有意差を認めなかった.

**Table 1.** Characteristics of patients with fresh and frozen testicular spermatozoa undergoing assisted conception of treatment

	NOA/非 NOA	妻 年齢 (平均)	夫 年齢 (平均)	臨床診断内訳	JS (平均)
新鮮精子群	NOA 11人	26-40 (30.6)	27-43 (32.7)	特発性 6人, Klinefelter 症候群 3人, 両側停留精巣術後 1人, 脊損後造精機能障害 1人	0.9-6.5 (3.7)
	非 NOA 7人	26-37 (30.0)	30-44 (36.0)	特発性 3人, 両側精管欠損症 2人, ヤング症候群 1人, 射精障害 1人	8.2-9.9 (9.0)
凍結精子群	NOA 4人	30-42 (36.3)	26-43 (36.0)	Klinefelter 症候群 2人, 特発性 1人, 脊損後造精機能障害 1人	0.4-4.5 (2.7)
	非 NOA 5人	27-38 (31.8)	28-40 (34.4)	特発性 5人	8.2-9.1 (8.5)

NOA: non-obstructive azoospermia.

**Table 2.** The ICSI results of each group with fresh and frozen-thawed testicular sperm

	全症例数	全胚保存	妊娠 (出産)	ICSI した卵数	受精胚数	分割胚数	良好胚数*
新鮮精子群	18	3	5 (4)	269	211 78.4%	202 75.1%	90 33.4%
凍結精子群	9	2	1 (1)	97	79 81.4%	76 79.2%	32 32.9%
					p=0.359	p=0.322	p=0.680

\* Day 2 で判定した胚

**Table 3a.** The ICSI results of each group with fresh and frozen-thawed testicular sperm in non-obstructive azoospermia

	全症例数	全胚保存	妊娠 (出産)	ICSI した卵数	受精していた胚数	分割胚数	良好胚数*
新鮮精子群	11	1	4 (3)	141	105 74.5%	98 69.5%	54 38.3%
凍結精子群	4	1	0	28	21 75.0%	20 71.4%	10 35.7%
					p=0.716	p=0.634	p=0.906

**Table 3b.** The ICSI results of each group with fresh and frozen-thawed testicular sperm in except for non-obstructive azoospermia

	全症例数	全胚保存	妊娠 (出産)	ICSI した卵数	受精していた胚数	分割胚数	良好胚数*
新鮮精子群	7	2	1 (1)	128	106 82.8%	104 81.3%	36 28.1%
凍結精子群	5	1	1 (1)	69	58 84.1%	56 81.2%	22 31.9%
					p=0.823	p=0.988	p=0.733

\* Day 2 で判定した胚

## 考 察

顕微鏡下精巣内精子採取術 (MD-TESE) が広く行われるようになり, NOA においても高い精子回収率がよく報告されるようになった. Tournaye ら<sup>2)</sup>は50%, Tsujimura ら<sup>3)</sup>は42.9%と報告している. 倉敷中央病院では NOA に対する MD-TESE の精子採取率は43.2%, 37症例中16例である (1997年8月~2006年5月).

しかしながら, 高い精子回収率をもってしても, その後の妊娠率, 出産率は意外に低いのが現状であり, 文献的には Vermaeve ら<sup>5)</sup>が, 着床率は8.6%だったと報告している. これは ICSI に供する精巣精子の状態が悪いことが原因と推測されるため, 高い妊娠率, 出産率を目指すためにはできるだけ状態のよい精子を ICSI に使用しなければならない.

現在のところ, 精巣精子の存在を術前に予想する有効な方法はないとされており, また女性側の排卵誘発, 採卵は身体的にも経済的にも大きな負担となるため, 精巣内精子の存在が確認された場合にのみ, 女性側の準備を開始し, 凍結精子を用いた ICSI を行うのが一般的となっている. そのため, NOA における ICSI では凍結精子を使用する施設が多い. また, 文献的にも新鮮精巣精子と凍結精巣精子の比較で, 凍結による悪影響がないとする報告が後ろ向き検討でいくつか散見される<sup>6-9)</sup>. しかしながら, NOA のように造精機能の低下している環境から採取された少数の精子を凍結融解すると, 精子の質を悪化させてしまう懸念がある. 精子採取技術が向上した現在, 採取された精子をそのまま新鮮精子として ICSI に供する方が妊

娠の可能性を高められるのではないかと期待する意見も出てきている.

倉敷中央病院では, NOA に対する治療方針としては, 新鮮精子を用いた ICSI を第一選択としてきた. すなわち, まず診断的 MD-TESE を行い, 精巣内精子が確認できた場合には一旦凍結保存しておき, 後日女性側の採卵の日にあわせて2回目の MD-TESE を行い, そこで得られた新鮮精子を用いて初回 ICSI を行っていた. この方法だと男性が2回手術を受ける欠点はあるものの, 妊娠については最もよい条件を提供することができると考えたからである.

今回, われわれの施設では初回の治療成績だけを検討したが, ICSI 後の day 2 までの胚の発育状態については, 新鮮精巣精子群と凍結精巣精子群の間に有意差を認めなかった. また, NOA と非 NOA に分類した検討においても, day 2 までの胚の発育状態では新鮮精巣精子群と凍結精巣精子群の間に有意差を認めなかった. しかし, 妊娠率, 出産率についての検討では, 症例数が少ないため十分な検討が出来なかったものの, NOA の妊娠症例はすべて新鮮精子群であった. 今回の検討では, 症例数が限られていたこともあり, 新鮮精子群と凍結精子群の間に胚の発育状態, 妊娠率・出産率において有意な差はなかったが, NOA に対する ICSI に際しては新鮮精子を使用する方が適しているという可能性については, 今後さらに検討を続ける必要があると考えられた.

## 結 語

倉敷中央病院における新鮮精子群と凍結精子群の間に胚の発育状態, 妊娠率・出産率について検討した.

今回の検討では、症例数が限られていたこともあり有意な差はなかったが、今後さらに検討を続ける必要があると考えられた。

本論文の趣旨の一部は第51回日本生殖医学会総会にて発表した。

## 文 献

- 1) Schlegel PN: Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* **14**: 131-135, 1999
- 2) Toumaye H, Camus M, Vandervorst M, et al.: Surgical sperm retrieval for intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl* **20**: 69-73, 1997
- 3) Tsujimura A, Matsumiya K, Miyagawa Y, et al.: Conventional multiple or microdissection testicular sperm extraction: a comparative study. *Hum Reprod* **17**: 2924-2929, 2002
- 4) Veeck LL: Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus, vol 2. Williams and Wilkins Co, Baltimore, 1991
- 5) Vernaev V, Toumaye H, Osmanagaoglu K, et al.: Intracytoplasmic sperm injection with testicular

spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril* **79**: 529-533, 2003

- 6) Wu B, Wong D, Gelety TJ, et al.: Optimal use of fresh and frozen-thawed testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in azoospermic patients. *J Assist Reprod Genet* **22**: 389-394, 2005
- 7) Hauser R, Yogev L, Ben-Yosef D, et al.: Severe hypospermatogenesis in cases of nonobstructive azoospermia: should we use fresh or frozen testicular spermatozoa? *J Androl* **26**: 772-778, 2005
- 8) Wald M, Ross LS, Niederberger CS, et al.: Analysis of outcomes of cryopreserved surgically retrieved sperm for IVF/ICSI. *J Androl* **27**: 60-65, 2006
- 9) Huang FJ, Chang SY, Lu YJ, et al.: Clinical implications of intracytoplasmic sperm injection using cryopreserved testicular spermatozoa from men with azoospermia. *J Reprod Med* **45**: 310-316, 2000

(Received on March 26, 2007)  
(Accepted on February 18, 2008)

## Editorial Comment

非閉塞性無精子症における TESE-ICSI の問題点の 1 つに、ICSI に供する精子の質がある。精子が極少数のみ採取できた場合において、凍結保存の影響についてはまだ不明である。本研究はこの問題に対して、単一施設における ICSI の成績を、使用した精子（凍結保存精子が新鮮精子か）と無精子症の原因（非閉塞性か否か）で分けて解析しており、症例数が少ないが意義のある仕事と考えられる。本研究の問題点の 1 つに、著者らは非閉塞性無精子症（NOA）を「両側の精巣発育が不良で顕微鏡下に精子が採取できた症例」と定義し、上記以外の症例は精巣全体に精細管構造が確認され、造精機能障害がないものとして非 NOA と定義している。しかし、本論文にて使用している分類は決して一般的な方法ではなく、精巣容積や血清 FSH 値、閉塞機転の有無、精巣生検の病理結果などを用い

るべきと考える<sup>1)</sup>。しかし、精巣生検による診断は、生検の採取部位によって組織所見が異なることも珍しくなく<sup>2)</sup>、その結果として中には臨床所見と組織所見が一致しない場合も見受けられる。また、外診上閉塞機転が明らかでない閉塞性無精子症も存在するのも事実である。今後、無精子症の分類方法を画一化し、非閉塞性無精子症における精子凍結保存の影響を明らかにしていく必要があると考える。

- 1) Jarow JP, Espeland MA and Lipshultz LI: Evaluation of the azoospermic patient. *J Urol* **142**: 62-65, 1989
- 2) McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoesli-Hansen CE, et al.: Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: mini review. *Hum Reprod* **22**: 2-16, 2007

京都大学 宗 田 武