

## Flow cytometry による睾丸内精子形成能の評価判定

## 第2報：男子不妊症患者の精子形成能の評価

山口大学医学部泌尿器科学教室（主任：酒徳治三郎教授）

川 井 修 一

DNA FLOW CYTOMETRIC EVALUATION  
OF SPERMATOGENESIS

## PART 2: STUDIES ON MALE INFERTILITY

Shuichi KAWAI

*From the Department of Urology, School of Medicine, Yamaguchi University**(Director: Prof. J. Sakatoku)*

Flow cytometric DNA analysis was performed on the testicular biopsy tissue obtained from 17 oligospermic men, 25 azoospermic men and 5 normal men.

DNA histograms were made after viewing a small piece of biopsy tissue for a short time. The DNA histograms were classified by eye into four types (Type A: Aspermatogenesis without haploid cell, Type B: Maturation arrest at primary spermatocyte, Type C: Hypospermatogenesis, Type D: Normal spermatogenesis).

Analysis of the DNA histograms accurately revealed the proportion of haploid, diploid and tetraploid cells. The DNA distributions for 5 normal men were  $58.9 \pm 3.6\%$  haploid cells,  $24.3 \pm 3.8\%$  diploid cells and  $16.8 \pm 0.8\%$  tetraploid cells. Significant correlation was found between the proportion of haploid cells (%haploid) and the testicular volume.

The results of the investigation of the correlation between the DNA distributions and histological evaluations show that testicular degeneration increase proportionally to the decrease in haploid cells. Therefore, the %haploid appears to be an effective index for the quantitative evaluation of spermatogenesis.

**Key words:** Flow cytometry, DNA, Testicular biopsy, Spermatogenesis, Male infertility

## 緒 言

睾丸内精子形成能を知ることは、男子不妊症の診断・予後判定および治療法の決定上、非常に重要なことである。現在睾丸内精子形成能の評価は主として睾丸生検の組織学的検索によっている。すでにその評価法として Nelson ら<sup>1)</sup>, Tjioe ら<sup>2)</sup>, Steinberger ら<sup>3)</sup>, Johnsen<sup>4)</sup>, Skakkebek ら<sup>5)</sup>, de Krester ら<sup>6)</sup>, 本邦では酒徳<sup>7)</sup>, 市川<sup>8)</sup>, 美川<sup>9)</sup>, 寺田<sup>10)</sup>など多数の報告があるが、いまだに評価法が確立されるまでにはいたってなく、判定者により評価が異なることもある。

精子形成は精細管の中で精細胞が spermatogonia → primary spermatocyte → secondary spermatocyte → spermatid → sperm の成熟過程を通っておこなわれており、それにともなって核 DNA 量も  $2C \rightarrow 4C \rightarrow 2C \rightarrow 1C$  と変化する。このことより睾丸組織内の haploid cell (1C), diploid cell (2C), tetraploid cell (4C) の各成熟段階の細胞がどの程度の割合で存在するかという DNA 量分布を知ることが睾丸内精子形成能の評価となりうると考えられる。

今日までヒト睾丸組織内 DNA 量分布を flow cytometry を用いて測定した報告は少なく<sup>11-14)</sup>, な

かでも男子不妊症患者の睪丸組織内 DNA 量分布を測定したものは needle biopsy による Clausen ら<sup>15)</sup>の報告のみである。著者は、第1報<sup>16)</sup>で報告した処理法を用いて、男子不妊症患者の睪丸組織内 DNA 量分布を flow cytometry で測定し、組織学的評価法との関係を検討した。同時に睪丸容量および精子濃度との関係も合わせて検討をおこなった。

### 対象ならびに方法

不妊を主訴として1981年10月より1984年2月までの2年4ヵ月間に山口大学医学部附属病院泌尿器科を受診し、睪丸生検を施行された男子患者42例を対象とした。うちわけは、乏精子症17例、無精子症25例であった。また正常群として精管結紮術の際、患者の協力で得られた睪丸生検組織5例も対象とした。

#### 1. 精子濃度の算定

用手法にて採取後30分経た精液をロック希釈液を用いて白血球メランジュールで10倍希釈し、改良型ノイバイエルン算定板にのせた後、検鏡算定した。

#### 2. 睪丸容量の測定

測定には、山口大学泌尿器科学教室にて作製された打ち抜き式の Orchidometer<sup>17)</sup>を使用した。

#### 3. 睪丸組織検索方法

睪丸生検は Charny<sup>18)</sup>の方法に従っておこなった。睪丸容量に左右差を認めない場合は一側の睪丸生検を施行、左右差を認める場合はより大きい睪丸の生検を施行した。

##### a) 固定および染色

生検組織は直ちに Bouin 固定をし paraffin 包埋してから Hematoxylin-Eosin 染色をおこなった。

##### b) 組織学的評価

Johnsen<sup>4)</sup>の score count 法 (Table 1) および市川・熊本<sup>8)</sup>の分類 (Table 2) にて組織学的評価をおこなった。

##### c) Flow cytometry による睪丸組織内 DNA 量分布測定

睪丸生検組織の一部を第1報<sup>16)</sup>にてすでに報告した検体処理法に従って処理した。すなわち、生検組織を collagenase 処理で遊離細胞とし、70% ethanol 固定後、ribonuclease, pepsin 処理、propidium iodide で核 DNA を蛍光染色、flow cytometry (Becton-Dickinson 社 FACS III) で各検体  $3 \times 10^4$  個の細胞の DNA 量を測定しヒストグラムを得た。得られたヒストグラムの各 peak の面積を計算し、haploid, diploid, tetraploid の細胞比率を算出した。測定に際しては、ヒト末梢血中リンパ球を 2C の

Table 1. Johnsen's score count

10. 精細胞の層が厚く正しい配列、多数の精子をともなう完全な精子形成能
9. 多数の精子を認めるが、細胞配列に乱れ
8. 精細管腔内に精子が5~10
7. 精子を認めず、精子細胞が多数
6. 精子を認めず、精子細胞も5~10
5. 精子、精子細胞を認めず、精母細胞は多数
4. 精子、精子細胞を認めず、精母細胞も数個
3. 精細胞は精祖細胞のみ
2. 精細胞は欠如、Sertoli細胞のみ
1. 精細管内に細胞成分を認めず

Table 2. 市川・熊本分類

- 0 : 未分化型
- I : 精子変性型 (線維化型)
- II : Sertoli tubule型 (精細胞の欠如)
- IIIa : 高度精子形成不全型 (精母細胞まで)
- IIIb : 中等度精子形成不全型 (精子細胞わずかに消失)
- IIIc : 軽度精子形成不全型 (精細胞が少なく、精子細胞も少ない)
- IV : 正常

#### Testicular biopsy tissue

Incubation in 0.05 % collagenase  
for 60 min. at 37°C

Centrifuge for 5 min. at 400 g

Fixation in 70 % ethanol for 24 hrs. at 4°C

Treatment with 0.1 % RNase for 30 min. at 37°C

Treatment with 0.5 % pepsin for 15 min. at 37°C

Staining with propidium iodide

Flow cytometry

Fig. 1. Method

標準サンプルとし 60 channel になるよう flow cytometry を調整した (Fig. 1).

### 結 果

各症例とも一般の睪丸生検と同様の少量の組織片にて良好な DNA ヒストグラムを得ることが可能であった。大部分の症例では3つの peak が認められ、左から haploid, diploid, tetraploid の細胞を示すと考えられた。組織学的に正常あるいは正常に近い像を示す症例では、15 channel 付近に小さい peak が認められるが、これは第1報でも報告したように sperm

を示すと考えられ, flow cytometry の scattering threshold のわずかな調整によりこの peak の大きさが異なり, 今回の細胞比率の算出からは除外した. また diploid と tetraploid の peak の間にある S 期の細胞はわずかであり, これを除いた haploid, diploid, tetraploid cell の総数を 100 として各細胞比率を算出した (Table 3~5).

#### 1. DNA ヒストグラムの分類

男子不妊症患者42例および正常群5例より得られた DNA ヒストグラムを haploid cell の peak の有無, haploid cell の占める割合 (以下 %haploid と略す), および tetraploid cell の peak の大きさより4つの type に分類することが可能であった (Fig. 2).

Type A: Aspermatogenesis without haploid cell  
Haploid cell の peak を認めず, diploid cell が

90%以上を占める2峰性のヒストグラムである. Haploid cell を認めないことより精細胞の成熟は spermatid まで進んでいないと考えられ, また tetraploid cell の割合もわずかであり primary spermatocyte も存在しないと考えられる症例である. この type のヒストグラムを示すものとして, 組織学的には市川・熊本分類によると, I 硝子変性型, II Sertoli tubules 型と IIIa の高度精子形成不全型のなかで spermatogonia までの分化にとどまる型が含まれる.

Type B: Maturation arrest at primary spermatocyte

Haploid cell の peak は Type A と同様に認めず, 2峰性のヒストグラムであるが, tetraploid cell の peak が著明に大きく, tetraploid で精細胞の成熟が止まっていると考えられる症例である. 組織学的にも tetraploid の大部分を占める primary sper-

Table 3. DNA distributions obtained from azoospermic men

| No. | Age | Testicular<br>volume(ml)<br>(rt.-lt.) | DNA distributions<br>(%) |      |      | Johnsen<br>score | Histological<br>classification |
|-----|-----|---------------------------------------|--------------------------|------|------|------------------|--------------------------------|
|     |     |                                       | 1 C                      | 2 C  | 4 C  |                  |                                |
| 1   | 31  | 6 6                                   | 0                        | 95.0 | 5.0  | 2.0              | II                             |
| 2   | 31  | 4 - 4                                 | 0                        | 93.4 | 6.6  | 1.6              | II                             |
| 3   | 28  | 19 22                                 | 23.6                     | 47.3 | 29.1 | 5.9              | IIIb                           |
| 4   | 27  | 6 - 6                                 | 0                        | 97.3 | 2.7  | 2.0              | II                             |
| 5   | 36  | 12 - 12                               | 0                        | 94.6 | 5.4  | 2.0              | II                             |
| 6   | 30  | 16 - 16                               | 40.1                     | 44.9 | 15.0 | 5.3              | IIIb                           |
| 7   | 33  | 10 14                                 | 0                        | 96.5 | 3.5  | 2.0              | II                             |
| 8   | 30  | 5 4                                   | 0                        | 94.0 | 6.0  | 2.0              | II                             |
| 9   | 31  | 10 - 10                               | 0                        | 93.6 | 6.4  | 2.2              | II                             |
| 10  | 32  | 5 - 6                                 | 0                        | 98.1 | 1.9  | 2.0              | II                             |
| 11  | 34  | 10 - 10                               | 0                        | 96.0 | 4.0  | 2.0              | II                             |
| 12  | 27  | 9 9                                   | 7.9                      | 85.8 | 6.3  | 3.8              | IIIa                           |
| 13  | 31  | 26 -                                  | 60.9                     | 18.6 | 20.5 | 8.6              | IIIc                           |
| 14  | 33  | 8 - 8                                 | 0                        | 67.3 | 32.7 | 4.5              | IIIa                           |
| 15  | 30  | 19 - 19                               | 50.0                     | 28.5 | 21.5 | 8.5              | IIIc                           |
| 16  | 28  | 26 19                                 | 42.2                     | 30.7 | 27.7 | 8.8              | IIIc                           |
| 17  | 30  | 12 - 12                               | 0                        | 96.1 | 3.9  | 2.0              | II                             |
| 18  | 36  | 22 19                                 | 62.7                     | 19.4 | 17.9 | 8.7              | IIIc                           |
| 19  | 35  | 12 12                                 | 0                        | 95.1 | 4.9  | 2.0              | II                             |
| 20  | 31  | 12 - 12                               | 4.3                      | 87.4 | 8.3  | 2.3              | IIIa                           |
| 21  | 28  | 26 - -                                | 52.9                     | 24.0 | 23.1 | 8.8              | IV                             |
| 22  | 35  | 22 - 20                               | 55.2                     | 27.1 | 17.7 | 8.4              | IIIc                           |
| 23  | 29  | 8 - 8                                 | 0                        | 96.1 | 3.9  | 1.0              | I                              |
| 24  | 32  | 5 - 4                                 | 0                        | 95.0 | 5.0  | 2.0              | II                             |
| 25  | 28  | 12 - 10                               | 0                        | 70.1 | 29.9 | 4.9              | IIIa                           |

Table 4. DNA distributions obtained from oligospermic men

| No. | Age | Sperm count<br>(10 <sup>6</sup> /ml) | Testicular volume(ml)<br>(rt.-lt.) | DNA distributions |              |      | Johnsen score | Histological classification |
|-----|-----|--------------------------------------|------------------------------------|-------------------|--------------|------|---------------|-----------------------------|
|     |     |                                      |                                    | 1 C               | ( % )<br>2 C | 4 C  |               |                             |
| 1   | 31  | 0.1                                  | 6 - 6                              | 21.0              | 68.2         | 10.8 | 3.9           | IIIb                        |
| 2   | 29  | 2.0                                  | 19 - 16                            | 36.5              | 44.3         | 19.2 | 8.1           | IIIc                        |
| 3   | 32  | 8.2                                  | 16 - 16                            | 45.8              | 30.9         | 23.3 | 7.6           | IIIc                        |
| 4   | 32  | 2.5                                  | 10 - 10                            | 28.7              | 55.6         | 15.7 | 6.7           | IIIb                        |
| 5   | 31  | 0.1                                  | 12 - 12                            | 29.8              | 53.9         | 16.3 | 5.3           | IIIb                        |
| 6   | 29  | 0.1                                  | 14 - 14                            | 18.0              | 63.1         | 18.9 | 3.8           | IIIa                        |
| 7   | 29  | 0.1                                  | 14 - 16                            | 35.5              | 44.0         | 20.5 | 6.5           | IIIb                        |
| 8   | 32  | 3.2                                  | 12 - 14                            | 54.7              | 30.1         | 15.2 | 7.2           | IIIc                        |
| 9   | 24  | 0.1                                  | 12 - 14                            | 5.7               | 84.0         | 10.3 | 2.7           | IIIa                        |
| 10  | 32  | 32.2                                 | 22 - 19                            | 60.9              | 21.6         | 17.5 | 8.9           | IV                          |
| 11  | 40  | 1.2                                  | 16 - 14                            | 45.4              | 25.3         | 29.3 | 4.4           | IIIb                        |
| 12  | 28  | 0.1                                  | 10 - 10                            | 14.0              | 75.3         | 10.7 | 4.7           | IIIa                        |
| 13  | 31  | 25.1                                 | 22 - 22                            | 56.3              | 23.1         | 20.6 | 8.8           | IV                          |
| 14  | 36  | 3.2                                  | 14 - 10                            | 41.3              | 44.2         | 14.5 | 8.8           | IIIc                        |
| 15  | 30  | 0.1                                  | 12 - 12                            | 16.2              | 60.0         | 23.8 | 5.1           | IIIa                        |
| 16  | 34  | 0.7                                  | 19 - 16                            | 40.7              | 38.9         | 20.4 | 7.2           | IIIc                        |
| 17  | 30  | 0.5                                  | 20 - 20                            | 28.3              | 51.8         | 19.9 | 6.5           | IIIb                        |

Table 5. DNA distributions obtained from normal men

| No.                   | Age | Testicular volume(ml)<br>(rt.-lt.) | DNA distributions    |                      |                      | Johnsen score       | Histological classification |
|-----------------------|-----|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-----------------------------|
|                       |     |                                    | 1 C                  | ( % )<br>2 C         | 4 C                  |                     |                             |
| 1                     | 35  | 22 - 22                            | 54.2                 | 29.6                 | 16.2                 | 9.5                 | IV                          |
| 2                     | 40  | 19 - 19                            | 63.4                 | 19.2                 | 17.4                 | 9.3                 | IV                          |
| 3                     | 38  | 16 - 19                            | 57.1                 | 25.3                 | 17.6                 | 9.7                 | IV                          |
| 4                     | 20  | 22 - 22                            | 61.4                 | 22.8                 | 15.8                 | 9.2                 | IV                          |
| 5                     | 31  | 19 - 19                            | 58.8                 | 24.6                 | 16.6                 | 9.5                 | IV                          |
| mean<br>( $\pm$ S.D.) |     |                                    | 58.9<br>( $\pm$ 3.6) | 24.3<br>( $\pm$ 3.8) | 16.8<br>( $\pm$ 0.8) | 9.4<br>( $\pm$ 0.2) |                             |

matocyte で maturation arrest をきたし, IIIa 群に含まれる. Table 3 の症例14, 25がこの type に含まれ, tetraploid の割合は25%以上である.

#### Type C: Hypospermatogenesis

ヒストグラムは3峰性であり, haploid cell は認められるが, %haploid が正常群より少なく, haploid cell の peak が相対的に小さい type である. ときに haploid cell の peak の左方に sperm の小さい peak を認め4峰性を示すこともある. 組織学的には IIIb, IIIc の中等度から軽度精子形成不全型が含まれ

る.

#### Type D: Normal spermatogenesis

ヒストグラムは4峰性であり, haploid cell の peak が著明に大きく, その左方には sperm と考えられる小さい peak が認められる. 組織学的にはIV群の正常を示すもので, 対照とした精管結紮時の正常群5例と, 無精子症の精路閉塞例の一部が含まれる. haploid, diploid, tetraploid cell の割合は, 正常群で58.9 $\pm$ 3.6%, 24.3 $\pm$ 3.8%, 16.8 $\pm$ 0.8%であった. 正常範囲を mean $\pm$ 2SD とすると %haploid は51.7

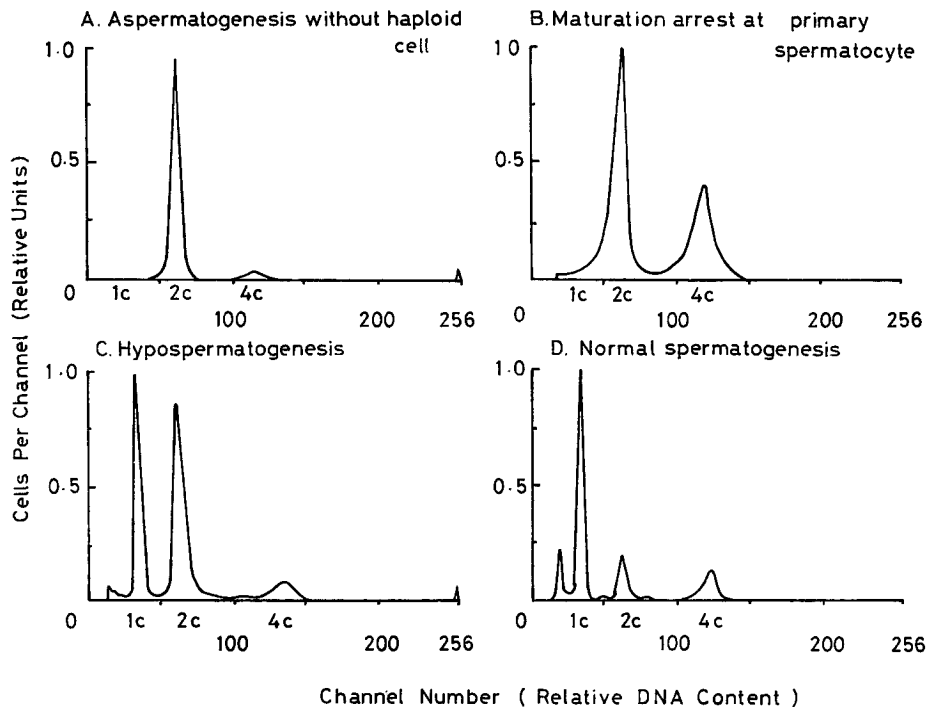


Fig. 2. Classification of DNA histograms

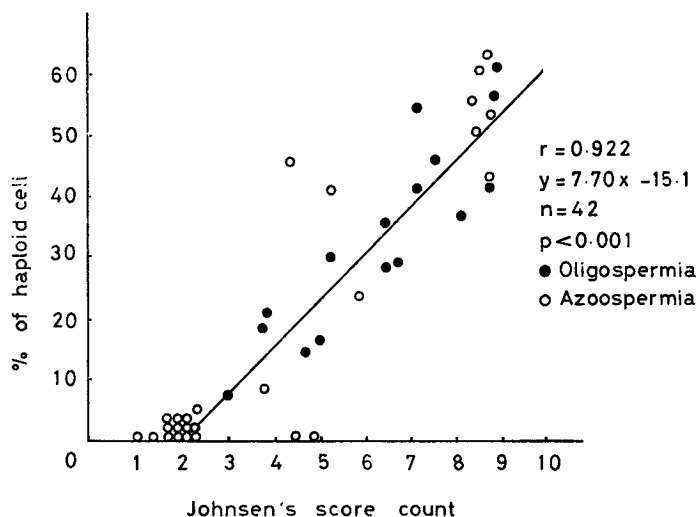


Fig. 3. Johnsen's score と % haploid

%から66.1%となる。

## 2. 組織学的評価と %haploid の関係

Haploid cell は精細胞が減数分裂した後の細胞で spermatid をあらわしており、%haploid は diploid や tetraploid cell の細胞比率より精細胞の成熟の程度をもっとも示していると考えられる。以下 %haploid とほかの組織学的評価法との比較をおこ

なった。

### (1) Johnsen's score と %haploid

Johnsen's score と %haploid との関係をみたのが Fig. 3 である。その結果、相関係数 0.922 ( $P < 0.001$ ) と有意な相関関係が認められた。Score が 2 以下の 12 症例は全例 %haploid は 0%であった。また score が 4 以上で %haploid が 0%を示す 2 例は

いずれも primary spermatocyte での maturation arrest の症例であった。Score が5以上の症例はいずれも haploid cell が存在し、score が大きくなるにつれて、%haploid も大きくなる傾向が認められた。%haploid が40%以上あり azoospermia を呈するもの (Table 3 症例13, 15, 16, 18, 21, 22) は、いずれも精路造影施行時に精路の通過障害が確認された症例である。

## (2) 市川・熊本分類と %haploid の関係

精細胞の成熟がどの過程まで進んでいるかという精細管所見より分類をおこなった市川・熊本分類と %haploid の関係をみたのが Fig. 4 である。その結果 I, II では全例 %haploid は0%であった。IIIa では  $8.3 \pm 7.1\%$ , IIIb  $31.6 \pm 8.3\%$ , IIIc  $49.0 \pm 9.1\%$ , IV  $56.7 \pm 4.1\%$  と各群に有意な差が認められた ( $P <$

0.001)。このように組織学上精細胞の成熟分化が進むにしたがって %haploid が大きくなる傾向が認められた。

## 3. %haploid と精子濃度の関係

今回おこなった睾丸生検は、azoospermia および精子濃度  $1 \times 10^6/\text{ml}$  以下の高度な oligospermia の症例が80%を占めており、%haploid と精子濃度になんらかの関係を認めることはできなかった。しかし %haploid が0%の症例はすべて azoospermia であり、oligospermia の症例では全例 haploid cell が存在した。

## 4. %haploid と睾丸容量の関係

%haploid と睾丸容量の関係を Fig. 5 に示した。相関係数  $0.806$  ( $P < 0.001$ ) と有意な相関関係が認められた。しかし睾丸容量  $10 \sim 16 \text{ ml}$  では %haploid

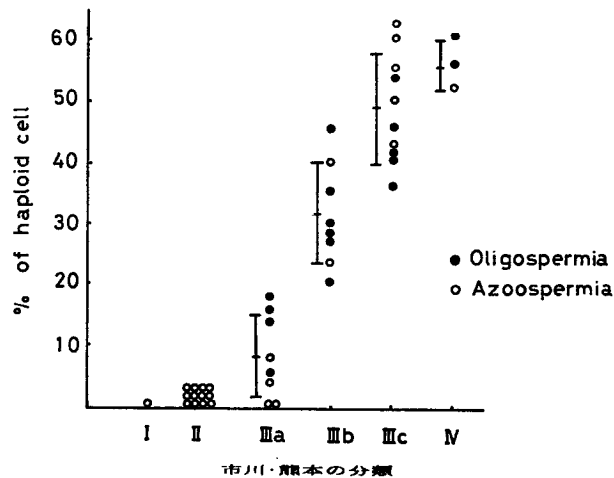


Fig. 4. 市川・熊本分類と % haploid

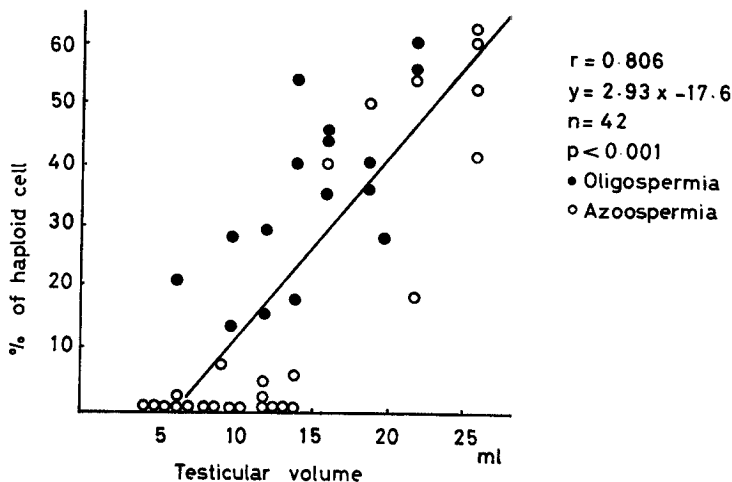


Fig. 5. 睾丸容量と % haploid

が0%から54.7%とかなりのばらつきが認められた。

## 考 察

ヒト睾丸の生検が Charny<sup>18)</sup>によって報告されて以来、男子不妊症の診断・予後判定、治療法の決定のため睾丸生検の組織学的検索が広くおこなわれている。今日まで、その組織学的評価法として多数の報告があるが、大別して以下の3つの系統にわけられる。

(1) 組織像を精細管の病理学的所見を中心として大きく分類した Nelson<sup>1)</sup>、酒徳<sup>7)</sup>の評価法。

(2) 精子形成上、精細胞がどの過程まで成熟しているかで精細管所見を段階的評価、あるいは段階的評価を点数化し数十個の精細管の平均値で精子形成能を評価しようとする Johnsen<sup>4)</sup>、de Krester<sup>6)</sup>、市川<sup>8)</sup>、美川<sup>9)</sup>の評価法。

(3) 精細管内細胞を spermatogonia, primary spermatocyte (さらに細かく leptotene, pachytene に分類), secondary spermatocyte, spermatid および sertoli cell に分類、各細胞数を測定し、どの成熟過程の細胞がどの程度存在するかによって精子形成能を評価した Tjioe<sup>2)</sup>、Steinberger ら<sup>3)</sup>、寺田<sup>10)</sup>の評価法。

以上の評価法の中で(1)の評価法は、日常臨床上簡便で有用であるが、分類が大きすぎて定量的に精子形成能を評価するのは困難であり、多数の精細管の大部分を占める所見で表現するため判定者の主観が入ることが多い。そのため定量的に精子形成能の評価をおこなうためには(2)、(3)の評価法を用いる必要があり、なかでも(3)の評価法がより正確に精細管を評価していると考えられる。しかしこの(3)の評価法は、精細胞の各成熟段階の細胞の分類判定がおこなえる熟練した判定者が必要であり、また多数の精細管を観察するため多大の時間と労力が必要である。

Flow cytometry で測定した細胞比率による精子形成能の評価は(3)と同じ系統の評価法と考えられるが検体処理にとくに複雑な過程はなく、flow cytometry での測定所要時間は各検体平均5分間と短く、客観的で正確な結果が得られ前述の短所は解消されている。

すでに Clausen ら<sup>15)</sup>は20例の男子不妊症患者の睾丸組織内 DNA 量分布を needle biopsy の標本を用いて flow cytometry で測定し、障害された睾丸では DNA 量分布が正常例と大きく異なることを報告しているが、組織学的所見との関連性については言及していない。著者は、睾丸切開生検標本を用いて flow cytometry で DNA 量分布を測定するととも

に、同部位の組織標本を作製し、従来の組織学的評価をおこない、両者の関係を詳細に検討した。その結果、flow cytometry による精子形成能の評価の有用性が以下のごとく認められた。

### 1. DNA ヒストグラムの有用性

30 channel 付近の peak の有無により haploid cell の有無、すなわち精細胞の成熟が spermatid まで進んでいるかいなかの判定が可能である。Haploid cell の peak が存在する場合、その peak と diploid cell の peak の高さを比較することで精子形成能がどの程度障害されているか判定される。正常群では、haploid cell の peak は diploid cell の peak の約4倍の高さがあるが、oligospermia の患者で精子形成が障害されていると考えられる症例では、2つの peak がほぼ同じ高さか、haploid cell の peak の方が小さくなっている。

そのほか、tetraploid cell の peak の高さを見ることにより primary spermatocyte での maturation arrest を知ることが可能であり、15 channel 付近の peak の有無で sperm が存在するかいなかの判定も可能であった。

このようにヒストグラムは一見して以下の4つの type に精子形成能を分類することが可能である。

Type A: Aspermatogenesis without haploid cell

Type B: Maturation arrest at primary spermatocyte

Type C: Hypospermatogenesis

Type D: Normal spermatogenesis

各 type 別の頻度は、azoospermia の症例では A: 52%, B 8%, C 24%, D 16% で、oligospermia では A, B は0%で C: 82%, D: 18%と酒徳<sup>7)</sup>市川<sup>8)</sup>の報告と大差は認められなかった。

また組織学的に障害の進んでいる症例では、各3つの peak の coefficient of variation (CV) が大きくなり peak の幅が広がる傾向が認められ、とくにこの傾向は、haploid cell の peak で著明であった。この現象は、障害された睾丸には de Krester<sup>6)</sup>が報告した abnormal germ cell が多数存在しその核の不同性によるものと考えられ、abnormal cell が spermatid に多く存在することとも一致している。

### 2. %haploid の有用性

%haploid と Johnsen's score には相関係数0.922と相関関係が認められ、Johnsen's score の3~9のいわゆる hypospermatogenesis の症例で score が大きくなるにしたがって %haploid が大きくなる傾

向が強く認められた。また %haploid と市川・熊本分類の関係を見ても、Ⅲa～c の精子形成不全型で、形成不全が軽度になるにしたがって %haploid が大きくなっていった。このように %haploid によって hypospermatogenesis の定量的評価が可能と考えられる。

今回の測定では、正常群の %haploid は  $58.9 \pm 3.6\%$  となり、Clausen ら<sup>18)</sup> の報告の  $46.7 \pm 10.0\%$  との報告よりかなり大きくなっていった。これは、手技、装置が異なることによると考えられる。

そのほか、臨床的所見である睪丸容量と %haploid に相関関係が認められたが、精子濃度と %haploid には、今回の症例の大部分が azoospermia および精子濃度  $1 \times 10^6/\text{ml}$  以下の高度 oligospermia であったため相関関係を見出せなかった。

以上のように DNA ヒストグラムおよび %haploid は精子形成能の指標として非常に有用であると考えられる。しかしながら、Sertoli tubules 型の症例と spermatogonia での maturation arrest の症例は DNA ヒストグラムが同じ Type A になり鑑別が不能であり、また精細管の径の大小、精細管あたりの精細胞数、基底膜の肥厚の有無は、flow cytometry による DNA 量分布測定からは判別困難である。したがって、臨床では DNA 量分布測定とあわせて、さらに組織学的観察をおこなうことにより、精子形成能をより正確に、定量的に評価することが可能であると考えられる。

## 結 語

男子不妊症患者42例、精管結紮時の正常者5例の睪丸生検組織の DNA 量分布を flow cytometry を用いて測定し、組織学的評価法との関係を検討、以下の結果を得た。

1. 各症例とも従来の睪丸生検と同様の少量の組織片にて、短時間で良好な DNA ヒストグラムが得られた。

2. ヒストグラムの各 peak の面積を計算することにより haploid, diploid, tetraploid cell の細胞比率が正確に算出された。

3. 正常群の haploid, diploid, tetraploid cell の細胞比率は  $58.9 \pm 3.6\%$ ,  $24.3 \pm 3.8\%$ ,  $16.8 \pm 0.8\%$  であった。

4. ヒストグラムを haploid cell の peak の有無および haploid, tetraploid cell の peak の大きさより、Type A: Aspermatogenesis without haploid cell, Type B: Maturation arrest at primary sper-

matocyte, Type C: Hypospermatogenesis, Type D: Normal spermatogenesis の4つの type に分類が可能であった。

5. 睪丸容量が小さくなるにしたがって、haploid cell の占める割合(%haploid)も小さくなり、両者の間に有意な相関関係が認められた。

6. %haploid と Johnsen's score および市川・熊本分類との関係を検討すると、%haploid は精子形成が障害されるにしたがって小さくなり、精子形成能の定量的な指標になりうると考えられる。

稿を終えるにあたり、御懇意なる御指導、御校閲を賜った酒徳治三郎教授に深甚なる謝意を表します。また御指導、御助言をいただきました山口大学医学部第2病理学教室の高橋学教授に感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第27回日本不妊学会総会(東京・1982)、第1回 FCM・Cell Biology 研究会(東京・1983)において発表した。

## 文 献

- 1) Nelson WO: Interpretation of testicular biopsy. JAMA 151: 449~454, 1953
- 2) Tjioe DY, Steinberger E and Paulsen CA: A simple method for quantitative analysis of seminiferous epithelium in human testicular biopsies. J Albert Einstein Med Center 15: 56~62, 1967
- 3) Steinberger E and Tjioe DY: A method for quantitative analysis of human seminiferous epithelium. Fertil Steril 19: 960~970, 1968
- 4) Johnsen SG: Testicular biopsy score count — A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1: 2~25, 1970
- 5) Skakkebek NE and Heller CG: Quantification of human seminiferous epithelium. J Reprod Fert 32: 379~389, 1973
- 6) de Krester DM and Holstein AF: Testicular biopsy and abnormal germ cells. In human semen and fertility regulation in men, pp 332~343, Mosby Co., Saint Louis, 1976
- 7) 酒徳治三郎: 男子性機能障害症の睪丸生検像について 第2編 男子不妊症の睪丸生検像. 泌尿紀要 24: 610~622, 1958
- 8) 市川篤二・熊本悦明・小野田廉雄: 無精子症の研究. 最新医学 15: 1549~1560, 1960

- 9) 美川 郁夫 : 男子不妊症の睾丸組織像 および尿中 17-KS 分画像に関する研究. 日泌尿会誌 58 : 637~659, 1967
- 10) 寺田雅生 : 睾丸機能の研究 第3報 精子発生不全睾丸の精細管内細胞数の研究. 日泌尿会誌 64 : 930~948, 1973
- 11) Zimmermann A and Truss F Die DNS-Bestimmung bei der Diagnostik von Hodenerkrankungen. Verh Dtsch Ges Urol 31 : 362~363, 1980
- 12) Zimmermann A and Truss F The prognostic power of flow-through cytophotometric DNA determinations for testicular disease. Analytical and Quantitative Cytology 2 : 247~251, 1980
- 13) Pfitzer P, Gilbert P, Rolz G and Vyska K: Flow cytometry of human testicular tissue. Cytometry 3: 116~122, 1982
- 14) Evenson DP and Melamed MR : Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. J Histochem Cytochem 31: 248~253, 1983
- 15) Clausen OPF and Abyholm T Deoxyribonucleic acid flow cytometry of germ cells in the investigation of male infertility. Fertil Steril 34: 369~374, 1980
- 16) 川井修一 : Flow cytometry による睾丸内精子形成能の評価判定 第1報 ヒト睾丸組織内 DNA 量分布測定の基礎的研究. 泌尿紀要 30 : 1021~1027, 1984
- 17) 那須誉人・瀧原博史・平山 嗣・越戸克和・酒徳治三郎 : 新しい睾丸測定器 (Orchidometer) について. 日不妊会誌 24 : 12~15, 1979
- 18) Charny CW: Testicular biopsy, its value in male sterility. JAMA 115 : 1429~1433, 1940  
(1984年6月19日受付)