

II. 受精障害例の取り扱いの検討

受精障害は受精率が 0% の場合であるが、これに低受精率の場合を含めるか否かの議論は少ない。低受精率とは受精率が 20 以下⁸⁾、あるいは 25% 以下とするとの報告がある⁹⁾。今回の調査では、受精率が 10% 以下を示す症例ではその受精率はすべて 0% であった。ただし、受精率が 10% とは 10 個の卵を媒精しなければならず、現在の各施設での平均採卵数が 5~8 個であることを考え合わせると、受精障害を受精率 0% と規定して問題ないと思われた。

IVF-ET において受精障害という病態が存在して受精が成立しなかったのであれば、次回の IVF-ET にもその病態が存在している可能性が高く、受精不成立が繰り返されることが推測される。初回の IVF-ET あるいは初回に限らず受精不成立の結果が得られた場合では、それぞれ 33.3% と 13.9% で受精不成立が繰り返され、この 2 回目の ART 実施の際に、エンブリオロジストの IVF-ET では受精が不成立との予測下に ICSI が実施され、その結果受精が成立していた例を含めると、それぞれ 75.0% と 53.3% となり、受精率が 0% の IVF-ET に続く IVF-ET の治療周期は受精障害のリスクが極めて高いものと考えられた。排卵誘発剤の投与、採卵という侵襲的手技の副作用のリスクを患者婦人が負っていることを考慮すると、受精障害が 1 度認められたら、「受精障害例」と判断し、ART として ICSI を選択してよいと思われた。

III. 無精子症例の取り扱いの検討

MESA, TESE が実施されるまでの診療の流れに関する考察を順序に従って以下に述べる。また、図 23 にフローチャートを示した。

1. 閉塞性か非閉塞性かの診断

まず、はじめに閉塞性か非閉塞性かの診断が泌尿器科によって行われるべきである。

2. 閉塞性の場合

精路再建手術の適応の有無を検討する。

1) 精路再建手術の適応がある場合

患者に情報を提供し、実施を勧める。精路再建手術を受ける意志がある場合には、実施を計画す

る。他施設で実施する場合には他施設を紹介する。実施が可能な他施設が遠方で、治療を受ける夫婦が他施設での治療を望まない場合には MESA を考慮する。手術を受け、術後精液中に良好な精子を認めない場合には MESA を考慮する。MESA において良好精子が回収できない場合には TESE を考慮する。ART 実施の要件は生理的な妊娠が不可能な場合と考えられ、閉塞性無精子症の精路再建術後の妊娠率は精管精管吻合術、精巢上体精管吻合術などで 30% 以上に期待できることから、まず、生理的な妊娠を精路再建術により図るべきと考えられる¹⁰⁾¹¹⁾。精路再建術の効果が得られない場合に ART を選択する。精路再建手術が実施可能な施設の所在には地域的偏りが存在し、遠方で治療を受けることを望まない夫婦に、遠方の施設での治療を強制することはできない。よって、このような場合には ART (MESA) の適応と考えてよいと思われる。最近、閉塞性無精子症において、精巢上体精子は精巢精子と比べて精子の持つ DNA に損傷 (フラグメンテーション) がより多く認められ、配偶子としての資質は精巢精子が優れているとの報告があった¹²⁾¹³⁾。しかし、まだ広くコンセンサスが得られていることではなく、また、TESE は MESA よりも身体が受けるストレスが多いので、ART の適応と考えられた場合には、まず MESA を行うべきと考えられる。

2) 精路再建手術の適応がない場合

MESA を考慮する。MESA で良好精子が回収できない場合には TESE を考慮する。

3. 非閉塞性の場合

1) TESE 適応の有無の検討

生殖補助医療に携わる泌尿器科医が、TESE によって精子が回収できる可能性の有無を評価する。検査所見により、精子が採取される見込みがない場合には、TESE の適応がないと判断しうる。ただし、検査を目的とした精巢生検が行われる場合には、検査と治療の意味を兼ねて夫婦の同意の上で TESE を実施する事が出来る。検査所見により、精子が採取される見込みがある場合には、TESE の適応とする。ただし、検査を目的とした精巢生検が行われる場合には、検査と治療の意味を兼ねて夫

婦の同意の上で TESE を実施する。

施術前に無精子症患者の精巣組織から精子が回収できる可能性の評価を行うことは重要である。この判断は生殖医療に関係する泌尿器科医が原則として行うべきである。現在までに精巣容量、病理組織学的所見(病理組織診断, Johnsen's score), 血中ホルモン値(FSH, テストステロン)などを指標とした検討がなされてきたが, 臨床上有益と思われる指標となっていない。

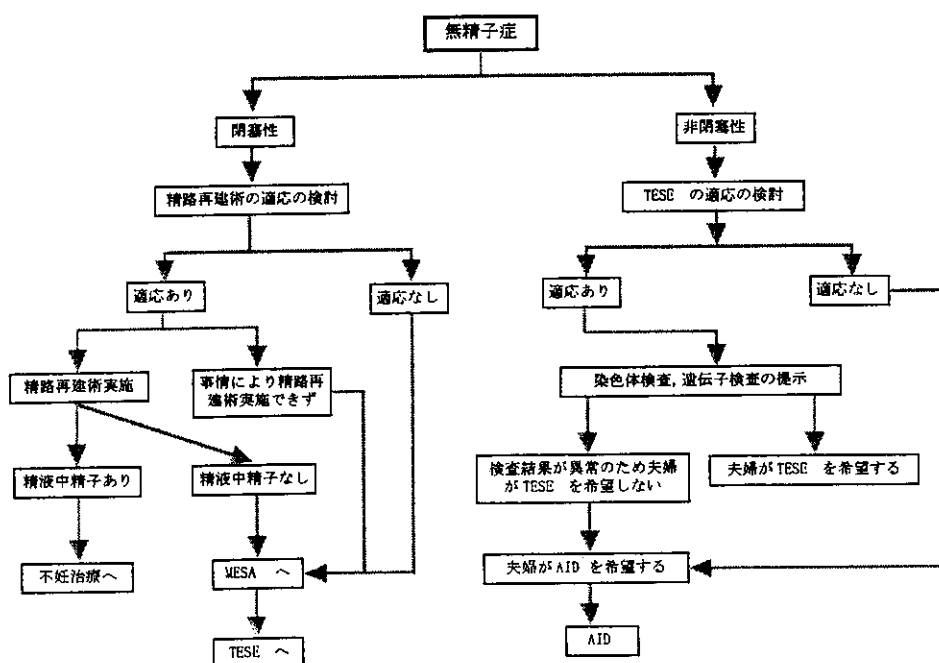
当施設で 1994 年から 1997 年までに実施した 39 症例, 75 治療周期の TESE 症例の検討の結果, 精子回収が可能だったのは 75 周期中 48 周期 (64%), 39 症例中 24 症例 (62%) であった⁵⁾。また精巣病理組織診断と精子の回収成績の関連では, 全症例ではその 62%に精子が回収できたが, Sertoli cell only Syndrome では精子回収成功率が低値(17%)であった⁵⁾。精子回収成績と血中 FSH 値では関連性を見いだせなかった。Johnsen's score と精巣容量については精子回収が常に可能であった群と常に不可であった群間にそれぞれ有意差を認めた⁵⁾。Johnsen's score が 8 以上, または精巣容量が 16ml 以上でそれぞれ 94%, 89%の症例で精子回収が可能であった。また, Johnsen's score では精子回収不

可能であった例のスコアは 3.5(平均値)であったが, score 3.5 以下の 11 例中 3 例(27%)に精子回収が可能であり, 常に精子が回収可能であった例の平均値は 7.3 であったが, 全症例中 7.3 以上を示した 18 例中 1 例(6%)に精子回収が常に不可能であった。精巣容量について, 常に回収できなかった例での平均値は 10.1ml であったが, 10.1 以下を示した 11 例中 4 例(36%)に精子が回収可能であり, 容量が 1ml の症例からも精子が採取可能であった⁵⁾。また, 精子が常に回収できた例の平均値は 15.7ml であったが, それ以上を示す例でも 9 例中 1 例(11%)に精子回収が不可能であった。このように, 両パラメーターともに特異性が低いことが示された⁵⁾。以上のことから, 施術前に無精子症患者の精巣組織から精子が回収できる可能性を判断することが困難であるので, 精巣の病理組織検査を行う目的と治療の目的を兼ねて, 夫婦の同意の上で TESE を実施することは合理的と考えられた。

2) TESE の実施に関して

TESE を受ける夫婦には染色体と造精機能関連遺伝子の検査の意義を説明し, 同意を得たら検査を実施する。無精子症例に TESE を行う場合には, TESE を行った後に, 妻から採卵を行うべきである。

図23 無精子症例の取り扱いに関するフローチャート



また、TESE 実施後に余剰となった精巣組織(精巣精子浮遊液)は凍結保存することが望ましいと考えられる。無精子症例から TESE により精子が回収可能な確率は約 60%であり⁵⁾、妻から採卵が可能な確率は 90%以上である。また、採卵後の未受精卵の凍結保存法は確立されているとはいえないのが現状である。これらのことから、無精子症例に TESE を行う場合には、TESE を行った後に、妻から採卵を行うべきであると思われる。また、TESE 実施後に余剰となった精巣組織(精巣精子浮遊液)は、夫の精巣に与える障害を軽減、防止するために凍結保存し、次の施術に備えることが望ましいと思われる。

3. AID の適応を考える条件についての考察

AID は「精子の提供を受けなければ妊娠できない夫婦のみ」に限定されるべきで、無精子症例においては「TESE によって精子が採取できなかったか、または採取される見込みがないと考えられる」場合が、AID を実施する要件と思われる。無精子症の症例の約 60%で精巣より精子が回収可能で、精子が採取された場合には通常の(無精子症以外の適応で ICSI を実施した症例)ICSI 症例と同等の妊娠率が得られている。したがって、TESE の適応となる夫婦は、当面 AID の適応にならないと考えられる。ただし、染色体検査、造精機能関連遺伝子の検査により、異常所見があり、夫婦が夫の精子による TESE を望まない場合には AID の適応としてよいと思われる。また、「TESE によって精子が採取される見込みがないと考えられる」とは、原則として生殖補助医療に関係する泌尿器科医によって判断されるべきである。

E. 結論

妊娠を期待できる実施回数を検討したところ、AIH では 7 回、IVF-ET では 4 回、ICSI では 5 回と考えられた。IVF-ET で受精障害(受精率が 0%)が 1 度でも認められた場合には ICSI の適応としてよいと思われた。無精子症例では精路再建手術の適応や TESE の適応を泌尿器科医の診断のもとに

判断し、また AID は原則として TESE が不可能な場合にのみ選択されるべきであると考えられた。

【参考文献】

- 1) 吉松宣弘, 星和彦, 柳田薫, 会田都美子, 佐藤章: 体外受精および人工授精における精子回収法の検討. 日本不妊学会雑誌, 32:412-418, 1987.
- 2) Reference values of semen variables, In WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction fourth edition, Cambridge University Press, UK, pp60-61, 2000.
- 3) 星和彦, 佐藤章, 柳田薫: 体外受精, 胚移植の実際. 産婦人科治療, 53: 272-277, 1986.
- 4) Yanagida, K., Katayose, K., Yazawa, H., Kimura, Y., Konnai, K., Sato, A.: The usefulness of the piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in human. Hum. Reprod., 4: 448-453, 1998.
- 5) 柳田薫, 片寄治男, 矢澤浩之, 木村康之, 林章太郎, 佐藤章, 鈴木孝之, 荻原雅彦, 柳田知彦, 山口脩: 男性不妊症における医療連携. 日本不妊学会雑誌. 45: 47-51, 2000.
- 6) Meldrum, D.R., Silverberg, K.M., Bustillo, M., Stokes, L.: Success rate with repeated cycles of in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil Steril 69: 1005-1009, 1998.
- 7) Hull, M.G.R., Fleming, C.F., Hughes, A.O., McDermott, A.: The age-related decline in female fecundity; a quantitative controlled study of implanting capacity and survival of individual embryos after in vitro fertilization. Fertil Steril ; 65, 783-789, 1996.
- 8) Roest, J., Van Heusden, A. M., Zeilmaker, G. H., Verhoeff, A.: Treatment policy after poor fertilization in the first IVF cycle. J. assist. Repro. Genet., 15:18-21, 1998.
- 9) Tomas, C., Orava, M., Tuomivaara, L., Martikainen, H.: Low pregnancy rate is achieved in patients treated with intracytoplasmic sperm

injection due to previous low or failed fertilization in in-vitro fertilization. Hum. Reprod., 13: 65-70, 1998.

10) Matsuda, T., Muguruma, K., Komatz, Y., Yoshida, O. : Microsurgical epididymovasostomy for obstructive azoospermia: factors affecting postoperative fertility. Eur.Urol., 26: 322-326, 1994.

11) Belker, A.M., Thomas, A., J., Jr., Fuchs, E., F., Konnak, J., W., Sharlip, I., D. : Results of 1469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. J.Urol., 145: 505-511, 1991.

12) Lopes, S., Jurisicova, A., Casper, R.F. : Gamete-specific DNA fragmentation in unfertilized human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 13: 703-708, 1998.

13) Steele, E.K., McClure, N., Maxwell, R.J., Lewis, E.M. : A comparison of DNA damage in testicular and proximal epididymal spermatozoa in obstructive azoospermia. Mol. Hum. Reprod., 9: 831-835, 1999.

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）

研究報告書

生殖補助医療の適応及びそのあり方に関する研究

－生殖補助医療の適応に関する研究－

子宮内膜症への生殖補助医療(ART)の適応に関する研究

研究者 吉村泰典 慶応義塾大学医学部産婦人科学教室教授

研究要旨 従来の子宮内膜症の治療指針としては、①腹腔鏡検査による診断、ステージの確定について、②薬物療法がおこなわれ、③要すれば開腹手術が実施されるのが一般的であった。最終的には生殖補助医療(ART)が実施されていた。腹腔鏡下手術の応用により子宮内膜症の各種病変に対しても診断と同時に手術治療がおこなわれるようになった。これは開腹を回避し患者に対する侵襲が少ないのみならず、術後の癒着形成も最小限であると期待され、不妊治療においては特に有用であると考えられる。子宮内膜症治療法のパラダイムが変化しつつあるともいえる。ただし、腹腔鏡所見により卵管機能障害の顕著な症例では手術ないし薬物療法による妊娠成績は不良であり、早期の ART 適応が望まれる。

研究協力者 堤 治
東京大学附属病院分院教授

A. 研究目的

不妊症の原因として子宮内膜症が挙げられる。不妊症の原因としては排卵因子、卵管因子、男性因子の3つが主なものとされるが、それとならぶものとして子宮内膜症が捉えられ始めた。実際、不妊症の原因検索において、腹腔鏡検査が実施されるがその際に子宮内膜症が発見されることは多い。また子宮内膜症の診断確定や進行期

評価のために腹腔鏡が実施される。従来の子宮内膜症の治療指針としては、①腹腔鏡検査による診断、ステージの確定について、②GnRH アナログないしダナゾールによる薬物療法がおこなわれ、③要すれば開腹手術が実施されるのが一般的であった。最終的には生殖補助医療(ART)ART が実施される。その診療指針に対して最近の生殖医療においても有効性が認識されつつある、腹腔鏡下手術の応用がどのように組み込まれるかが本研究の主な目的である。また子宮内膜症への ART の適応に関連して子宮

内膜症における不妊の原因究明や腹腔鏡下手術を含む治療の有効性の評価もおこなおうとした。

B. 研究方法

研究方法としては文献的ないし実態調査として以下の方法をとる。(1) 子宮内膜症への ART の適応の実態を文献的に明らかにし、その成績も調査する。(2) 腹腔鏡下手術の子宮内膜症における有用性を評価し、その適用方法を検討する。(3) 子宮内膜症に対する腹腔鏡下手術の標準的術式を比較検討する。これらにより子宮内膜症性の不妊治療に対する ART の適応基準を策定する。

子宮内膜症への生殖補助医療(ART)を適応し成果をえる為には子宮内膜症の成因や病態にせまる必要もある。特に各種サイトカイン濃度を含めた腹腔内環境の変化を定量する。これは腹腔鏡下手術の有効性の基盤を形成するものである。

C. 研究結果

不妊症の原因検索において、腹腔鏡検査が実施されるがその際に子宮内膜症が発見されることは多いとされていた。今回の調査では不妊患者の 30-50% に子宮内膜症が発見されることが明らかになった。

一般的には子宮内膜症の診断確定や進行期評価のために腹腔鏡が実施されるが、従来の子宮内膜症の治療指針としては、①腹腔鏡検査による診断、ステージの確定に

ついで、②GnRH ないしダナゾールによる薬物療法がおこなわれ、③要すれば開腹手術が実施されるのが一般的であった。最終的には ART が実施される。

子宮内膜症を有する不妊症患者に ART 特に体外受精を実施した場合、その成績は他の適応と同等ないし良好であることが明らかになった。

腹腔鏡下手術の応用により子宮内膜症の各種病変に対しても診断と同時に手術治療をおこなう施設も増加しつつある。腹腔鏡下手術は開腹を回避し患者に対する侵襲が少ないのみならず、術後の癒着形成も最小限であると期待され、不妊治療においては特に有用であると考えられる。

腹腔鏡所見により卵管機能障害の顕著な症例では手術ないし薬物療法による妊娠成績は不良であり、早期の ART 適応が望まれることも明らかになった。

子宮内膜症に対する腹腔鏡下手術の要点は、腹腔鏡で子宮内膜症を発見、診断した場合、病巣を可及的かつ一期的に病巣を除去する。ブルーベリースポット等の腹膜病変に対してはレーザーないし電気メスで焼灼する。この場合腹腔鏡下手術の利点を生かし、微小な病変までくまなく探し出し適切な処置をおこなうことができる。癒着剥離は卵巣や卵管周囲の癒着病変の処置が中心となる。付属器と広間膜間あるいはダグラス窩を開放するため子宮と直腸間等の剥離もおこなう。不妊症例では予め通色素検査をおこない卵管の疎通性を確

認する。卵管機能に問題があるときには卵管周囲癒着の剥離は適応とならない。また月経困難症の強い症例には仙骨子宮靱帯の切断を加えることもある。子宮内膜症のチョコレート嚢腫に対しては内溶液の吸引洗浄、嚢腫のアルコール固定法等が腹腔鏡下に実施されることもある。しかしアルコール固定の場合、嚢腫の組織型を確認できない、卵巣に対する毒性、再発の可能性等の問題点がありチョコレート嚢腫に対しても他の卵巣嚢腫同様核出手術が原則となる。

D. 考察

不妊症の原因検索において、腹腔鏡検査が実施されるがその際に子宮内膜症が発見されることは多く、施設にもよるが30-50%にのぼる。また子宮内膜症の診断確定や進行期評価のために腹腔鏡が実施される。従来の子宮内膜症の治療指針としては、①腹腔鏡検査による診断、ステージの確定について、②GnRH アナログないしダナゾールによる薬物療法がおこなわれ、③要すれば開腹手術が実施されるのが一般的であった。最終的にはARTが実施され、その成績は他の適応と同等ないし良好であることが明らかになっている。腹腔鏡下手術の応用により子宮内膜症の各種病変に対しても診断と同時に手術治療がおこなわれるようになった。これは開腹を回避し患者に対する侵襲が少ないのみならず、術後の癒着形成も最小限であると期待さ

れ、不妊治療においては特に有用であると考えられる。子宮内膜症治療法のパラダイムが変化しつつあるともいえる。ただし、腹腔鏡所見により卵管機能障害の顕著な症例では手術ないし薬物療法による妊娠成績は不良であり、早期のART適応が望まれる。

不妊患者に腹腔鏡下手術を行うと30-50%の患者に子宮内膜症が見い出されることを述べたが、明らかに卵の輸送の障害となるような癒着病変がない場合でも不妊の原因となりうる。またそれら患者に腹腔鏡（腹腔内洗浄）を行うと妊娠率が向上することから内膜症患者の腹腔内環境には何らかの妊孕能障害因子が存在するのではないかと考えられてきた。

子宮内膜症患者の腹腔内貯留液中で上昇しているサイトカイン・成長因子としてHGF、SCF、sTNFR、IL-1、IL-6、IL-8、TGF- β 、VEGFなど数多くの物質が報告されている。IL-1 β は胚発育を抑制し、精子の卵貫通能を阻害し、TNF α も胚への毒性を有し、精子の運動能を阻害するなど、各サイトカイン・成長因子の妊孕能への影響も報告されている。以上のような腹腔内の各因子の正常からの逸脱は、妊孕能低下をもたらす一因ともなっていると考えられる。これらの不妊症との関連も視野にいれてARTの適応を考慮すべきと考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

Tsutsumi O, Momoeda M, Taketani Y; Breast

fed infants, possibly exposed to dioxins, unexpectedly have decreased incidence of endometriosis in the later life. International Journal of Gynecology and Obstetrics. 2000 Feb; 68(2):151-153

Maruyama M, Osuga Y, Momoeda M, Yano T, Tsutsumi O, Taketani Y: Pregnancy rates after laparoscopic treatment. Differences related to tubal status and presence of endometriosis. Journal of Reproductive Medicine 2000 Feb; 45(2):89-93.

Morita Y, Nishii O, Kido M, Tsutsumi O: Parvovirus infection after laparoscopic hysterectomy utilizing fibrin glue hemostasis. Obstetrics and Gynecology 2000 Jun 1; 95(6 Suppl 1):1026

Saito H, Tsutsumi O, Noda Y, Ibuki Y, Hiroi M: Do assisted reproductive technologies have effects on the demography of monozygotic twinning? Fertil Steril. 2000 Jul;74(1):178-179.

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Momoeda M, Suenaga A, Kugu K, Fujiwara T, Takai Y, Yano T, Taketani Y: Evidence for the presence of angiogenin in human follicular fluid and the upregulation of its production by human chorionic gonadotropin and hypoxia. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2000 85(9):3352-3355.

Osuga Y, Koga K, Tsutsumi O, Igarashi T, Okagaki R, Takai Y, Matsumi H, Hiroi H, Fujiwara T, Momoeda M, Tetsu Yano T, Taketani Y: Stem Cell Factor (SCF)

concentrations in peritoneal fluid of women with or without endometriosis. American Journal of Reproductive Immunology 2000 Oct;44(4):231-235

Koga K, Osuga Y, Tsutsumi O, Okagaki R, Momoeda M, Yano T, Fujiwara T, Takai Y, Kugu K, Morita Y, Taketani Y: Increased soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFR) I and sTNFR II levels in peritoneal fluid in women with endometriosis. Molecular Human Reproduction 2000 Oct;6(10):929-933.

堤 治: 母子保健と子宮内膜症 母子保健 489: 7, 2000

堤 治: 産婦人科における内視鏡下手術の展望 21世紀の内視鏡下手術の展望 日本内視鏡外科学会雑誌 5(1):57-60, 2000

堤 治: 生殖医療—assisted reproductive technology の現況と将来 医学のあゆみ 特集 21世紀に期待される医学・医療 195 巻 13号 2000

堤 治: 内視鏡の手術の基本手技 腹腔鏡新女性医学大系 6 産婦人科手術の基礎 320-332, 2000

西井修、堤 治: 子宮内膜症の診断と腹腔鏡下手術 救急医学 24(1): 83-86, 2000 ヘルス出版

岡垣竜吾、丸山正統、大須賀穰、百枝幹雄、堤 治、武谷雄二: 内視鏡下手術の術中所見と術後妊娠 臨床婦人科産科 54(4): 590-595, 2000 医学書院

西井 修、堤 治：ラパロスコピー（腹腔鏡検査）特集症状・症候からみた産婦人科外来診療ガイド 産婦人科治療 Vol.80 増刊, 2000 永井書店

高井 泰、堤 治：産婦人科領域の腹部救急疾患 特集 腹部救急疾患の画像診断-特異所見による確診 消化器外科 23:1985-1993, 2000

堤 治：子宮内膜症の増加と環境因子 臨床と薬物治療 Vol 20:8-11, 2001

堤 治：子宮内膜症と環境因子 日本臨床 Vol 59:230-235, 2001

2.学会発表

堤 治：子宮内膜症の最近の話題—病因論から最新の治療法まで— 世界産科婦人科学会議シンポジウム 平成 12 年 9 月 6 日ワシントン DC

堤 治：特別講演「産婦人科における内視鏡手術の現況と将来」千葉内視鏡フォーラム 平成 12 年 10 月 6 日 千葉

堤 治：特別講演「婦人科領域の腹腔鏡下手術の現況と将来」第 6 回四国婦人科内視鏡懇話会 平成 12 年 10 月 7 日

堤 治：ランチョンセミナー「子宮内膜症の最近の話題」日本産科婦人科学会関東連合地方部会 平成 12 年 10 月 22 日 大宮

堤 治：最小侵襲手術の婦人科領域における応用とその教育・トレーニング 第 6 回日本最小侵襲整形外科研究会 平成 12 年 12 月 10 日 東京

堤 治：女性性器の解剖と術野の展開 第 3 回日本内視鏡学会 12 月 14 日 大阪

堤 治：環境ホルモンと子宮内膜症 荒川区医師会講演会 平成 12 年 12 月 15 日 東京

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
研究報告書

生殖補助医療の適応及びそのあり方に関する研究
－生殖補助医療の適応に関する研究－
男性不妊症における精子形成関連遺伝子の意義

研究者 吉村泰典 慶応義塾大学医学部産婦人科学教室教授

研究要旨

研究目的

無精子症および重症乏精子症を原因とする男性不妊症患者における Y 染色体長腕上での微小欠失の有無に関してその頻度および特徴を分析すると共に、生殖補助技術を微小欠失がある男性不妊症患者に適応した場合の微小欠失の遺伝状況について分析することを目的とした。

研究方法

インフォームドコンセントを得た上で患者の末梢血、臍帯血及び精子を採取して DNA を分離して PCR を用いて Y 染色体長腕の AZFc 領域の遺伝子を中心に増幅を行い、その領域での欠失の有無を検討した。

結果と考察

1) 無精子症及び重症乏精子症患者 197 名の末梢血 DNA を解析した結果、15 名 (7.6%) に AZFc 領域に欠失を同定した。患者を精子濃度にて分類して検討したところ欠失を認めた患者全員は、精子濃度が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下であることを示した。一方、正常男性（精子濃度 $20 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上）30 名を検討した結果、全く欠失は認めなかった。2) 末梢血の DNA に微小欠失の認められた男性の精子における微小欠失の有無を検討した結果、Y 染色体のある精子において同様の欠失が存在することが判明した。3) 微小欠失を認めた不妊症男性において顕微授精を施行し男児を出産した 3 例について微小欠失の有無を検討した。それらの男児の臍帯血及び末梢血を検討した結果、3 名すべてに欠失を認めた。さらに、その内 1 例は父親よりも広い範囲の欠失を認めた。以上より精子濃度が $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下の重症乏精子症の患者においては AZFc 領域の微小欠失を検討する必要があることが示唆された。さらに、顕微授精を適応する際には微小欠失が児に遺伝することを十分に説明することが必要であると考えられた。

結論

重症の造精機能障害（精子濃度 $1 \times 10^6 / \text{ml}$ 以下）の男性においては、7.6% に Y 染色体の AZFc 領域に微小欠失が認められた。さらに、顕微授精により男子が出産した場合にはその微小欠失は児に遺伝することが明らかになった。

研究協力者
香山浩二
兵庫医科大学産科婦人科学教室
教授
小森慎二
兵庫医科大学産科婦人科学教室
講師

A. 研究目的

一般に健常の夫婦においては、不妊症になる確率は、10—15%であると考えられている。その原因は大きく分けると排卵障害、卵管障害などの女性側要因、乏精子症に代表される造精機能障害などの男性側要因、そして原因不明の3つに分けることができる。この不妊症の原因における男性側要因は、全体の25—30%を占めている。この男性側要因を頻度別に分析すると、一番目が精索静脈瘤、二番目は特発性、三番目が閉塞性となっている。このように原因が明らかでない特発性要因の占める割合は非常に大きい。一方、男性を遺伝的に規定しているY染色体は、性の決定や造精機能に関与していることは以前より指摘されてきた。すでに、ヒトにおいて性決定遺伝子の一つと考えられるSRY遺伝子が、Y染色体の短腕に存在することも明らかになっている¹⁾。また、造精機能に関与する遺伝子が、Y染色体に存在することも指摘されてきた。それに加えて近年の分子生物学的手法の進歩は、以前では分からなかった染色体の構造を塩基配列のレベルまで解析することを可能としてきた。そして、ヒト染色体の全塩基配列を決定するとしている世界的ゲノムプロジェ

クトが進められ、ほとんど全塩基配列が決定されるようとしている。このような状況において、Y染色体の長腕のいくつかの領域が、造精機能に関与していることが明らかになり、無精子症および重症乏精子症の患者の中にY染色体長腕に微小欠失が存在することが指摘されてきた。本研究では、無精子症および重症乏精子症を原因とする男性不妊症患者におけるY染色体長腕上での微小欠失の有無に関してその頻度および特徴を分析すると共に、生殖補助技術を微小欠失がある男性不妊症患者に適用した場合に、微小欠失が遺伝するかどうかについて検討することを目的とした。

B. 研究方法

1) 無精子症及び乏精子症における微小欠失の検討

インフォームドコンセントを十分に行った上で、無精子症および乏精子症患者197名を対象として微小欠失の有無についての研究を行った。研究に際しては、対象となる患者を精子濃度により、非閉塞性無精子症 28例、閉塞性無精子症 20例、 $1 \times 10^5 / \text{ml}$ 未満 49例、 $1 \times 10^5 / \text{ml} - 1 \times 10^6 / \text{ml}$ 未満 50例、 $1 \times 10^6 / \text{ml} - 1.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 未満 50例の5つの群に分類した。また、対照群として児のある正常男性（精子濃度 $2.0 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上）30名を用いた。研究対象の末梢血よりDNAを抽出し、AZFc領域(図1)を中心に設定した16種類のprimer set (表1)を用いてPCR法を行った²⁾。増幅されたDNA断片は電気泳動にて、その断片の有無を確認した。この方法は、Y染

染色体の特定の領域に特異的な primer set を設定して PCR 法を行い、その領域のゲノム遺伝子の増幅をするという方法である。実際に、その領域がゲノム上に存在すれば、PCR 法により特定の大きさの DNA 断片が増幅され、電気泳動にて確認することができる。しかし、もし微小欠失のために、ゲノム上にその領域が存在しなければ、DNA の断片が増幅されない。このようにしてそれぞれの領域での DNA 断片の増幅の有無を検討して微小欠失の有無を判定した。さらに、微小欠失が認められた症例については、サザンブロット法を行い欠失の有無を確認した。

2) 単一精子での微小欠失の検討

通常の PCR 法を用いた微小欠失の検討は、末梢血より抽出した DNA を用いて行う。というのは、欠失の有無の検討はゲノム遺伝子についての検討であるので、末梢血より分離した DNA と生殖細胞（精巣）より分離した DNA は同じであるということを前提としている。しかし、末梢血と生殖細胞とは発生原基の由来が異なるので、必ずしも同じであるといえない。そこで、我々は、微小欠失を認めた患者の精子について同様の欠失が存在するかを直接検討した。この場合、精子には性染色体は X か Y のどちらかしか含まれていないので、先ず Y 染色体が含まれるかどうかを Y 染色体短腕に存在する SRY 遺伝子の存在の有無で確認した。対象の精子は、正常男性の精子 50 個及び微小欠失のある男性の精子 30 個をマイクロマニピュレーターを用いて 1 個ずつ単離した。次いで、単一精子より DNA を抽出した。微小欠失の有無は、DAZ

領域に含まれている sY254 の primer set を用いて検討した。DNA が微量であるため、予め random primer を用いて PEP 法を行い、DNA の量を増やした後に、sY254 の primer set を用いた PCR 法を行った。

3) 次世代への微小欠失の移行（遺伝）に関する検討

微小欠失を認めた男性不妊症患者の治療には、顕微授精が行われた。実際に、顕微授精を施行した 157 例（その内、微小欠失のあった症例 12 例）における妊娠率を検討したところ、微小欠失が認められた 12 症例においては、5 例（41.7%）が妊娠に成功した。一方、微小欠失のない 145 例では、51 例（35.2%）が妊娠に成功した。両群で妊娠率で有意差は認めなかった。この微小欠失があった症例で、妊娠に成功した 5 例の内、3 例が男児を出産した。そこで、父親において認められた微小欠失が、男児に認められるかどうかについて検討した。臍帯血あるいは末梢血より DNA を単離して、上記と同様の PCR 法にて微小欠失の有無を検討した。

倫理面での配慮

本研究は、患者よりの血液及び精子を用いて検討した。そのため、研究に際して患者に一人一人に研究の目的に関して十分にインフォームドコンセントを行い、承諾の得られた場合にのみ研究対象とした。また、その結果に関しても患者が希望する場合は、説明をおこなった。また、顕微授精にて男児を出産した症例においても、両親に造精機能障害と Y 染色体の微小欠失との関連についての説明を行い、了

解の得られた症例について研究を実施した。また、その結果は両親の希望する場合に説明を行った。

C. 研究結果

1) 無精子症及び乏精子症における微小欠失の検討

無精子症および乏精子症患者 197 名を対象として末梢血より DNA を抽出し、16 種類の primer set を用いて PCR 法を行い、AZFc 領域を中心に微小欠失の有無を検討したその結果、非閉塞性無精子症群に 1 例、閉塞性無精子症例群に 1 例、 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 未満の群に 6 例、 $1 \times 10^5/\text{ml} - 1 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群に 6 例、 $1 \times 10^6/\text{ml} - 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群に 1 例とそれぞれの群に微小欠失を認めた。全体として、15 症例 (7.6%) に微小欠失を同定した。さらに、 $1 \times 10^6/\text{ml} - 1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の群における 1 例の精子濃度は $1 \times 10^6/\text{ml}$ であった。一方、対照群では微小欠失は認められなかった。(図 2)³⁾

2) 単一精子での微小欠失の検討

微小欠失のある男性より単離した 30 個の精子の内、12 例に SRY 遺伝子を同定し Y 染色体の存在を確認した。これら 12 個の精子について、sY254 の遺伝子は増幅されなかった。一方、正常男性の精子 50 個の内、SRY 遺伝子は 15 例に増幅された。この 15 個の精子のうち 13 例に、sY254 の遺伝子が増幅された。その結果、微小欠失のある男性の精子においても、末梢血

DNA において認めた微小欠失が同様に存在していることが確認された⁴⁾。

3) 次世代への微小欠失の移行に関する検討

顕微授精で男児が出産した 3 症例とも、父親と同様に Y 染色体に微小欠失が存在することが明らかになった (図 3)。このうち 1 症例においては、父親よりもより広い範囲に微小欠失が認められた。

D. 考察

無精子症および重症乏精子症の症例の 7.6% に AZFc 領域に微小欠失があることが明らかになった。これは、以前より報告されている発生率と同様の結果となった (表 3)⁵⁻¹⁴⁾。さらに、乏精子症の程度では、我々の検討では、微小欠失が存在した全例が、精子濃度が $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であった。このことより、精子濃度が $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の症例では微小欠失の有無は検討すべきであると考えられた。

一般に微小欠失の検討は、末梢血より抽出した DNA を用いて行うが、生殖細胞である精子とは発生原基が異なるため、精子より DNA を抽出して検討したところ、同様に欠失が存在することが確認された。そのため、末梢血を用いての検討でも十分であると考えられた。また、健常の男性の精子で Y 染色体があった 15 例の内 2 例において欠失が存在したという結果に対しては、実際に de novo で欠失が発生したのか、あるいは技術的なことでおこったものなのかは現在のところ明らかではない。

近年の生殖医療の進歩で、従来であれば、妊娠が不可能であった不妊夫婦で

も妊娠することが可能となってきた。男性不妊症例においても同様である。そこで、注目されているのは、今回指摘してきた Y 染色体の微小欠失が、その子孫に移行（遺伝）するという問題である。一般に、Y 染色体の微小欠失は、造精段階で発生すると考えられており、その微小欠失を持って生まれた男性は不妊となり、子孫にその微小欠失は遺伝しないと考えられていた。一方で、Y 染色体の微小欠失と造精機能障害の程度は必ずしも一致しないこと指摘されている。そのため、実際に親子で Y 染色体の欠失が存在した症例も報告はされている^{5-7, 9, 15, 16)}。しかし、これはあくまで稀な症例であると考えられていた。ところが、今日の生殖医療の進歩は、これら通常では妊娠しないと考えられた症例でも児を得ることが可能となってきた。その場合、微小欠失が子孫に受け継がれる可能性が指摘されてきた。本研究での検討の結果、父親と同様の欠失が存在することを明らかにした。このことにより、顕微授精により妊娠した場合は、明らかに欠失は遺伝することが判明した。しかし、それら男子において、将来父親と同様の造精機能障害が発生するかは今後の検討を待たなくてはいいけない。

Y 染色体の長腕の AZF 領域における微小欠失の意義については多くの点で明らかではない。一般に、この欠失があることにより、造精機能障害が発生するが、そのために致死的になったりその他の病気を誘発したりするものではなく、不妊症以外は健康に生活することができると考えられている。このことより AZF 領域に造精機能のみに関連する特異的かつ重要な

遺伝子が存在はすることが推定される。しかし、現在までにいくつかの遺伝子は同定されているが、未だに造精機能に深く関与する遺伝子は発見されていない。また、どのような機序で微小欠失が発生するか、あるいはどうして特定の領域（AZF）での発生がおこるのかも明らかでない。このように、Y 染色体の長腕の微小欠失と造精機能障害との間には多くの不明な点が存在している。現在、ヒトゲノムプロジェクトが進められているが、Y 染色体は、他の染色体と比べて、構造や遺伝子配列での多型が多く、ヒトゲノムプロジェクトでも一番遅れている領域である。そのため、造精機能に関与する特定の機能をもった遺伝子を同定することには、まだ時間を要するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 小森慎二, 中田祐子, 阪田和子, 香山浩二, 加藤浩志, 小林真一郎, 磯島晋三 (2000) Y 染色体に微小欠失を認めた乏精子症患者における顕微授精後により妊娠した胎児臍帯血での微小欠失の検討. 産婦人科治療, 81 (1), 109.

2. Komori, S., Nakata, Y., Sakata, K., Kato H., Koyama K., Analysis for microdeletions of Y chromosome in a single sperm from a severe oligozoospermic man. J. Hum. Genet. (in press)

3. Kato H., Komori, S., Nakata, Y., Sakata, K., Kanazawa, R., Handa, M., Kobayashi, S., Koyama K., Isojima S., Screening for deletions of the D16-23 of the Y chromosome in Japanese azoospermic and oligozoospermic men. *J. Hum. Genet.* (in press)

2. 研究発表

1. Koyama, K. and Sawai, H. (2000) Molecular analysis of AZFc region of Y chromosome in Japanese infertile males with spermatogenic defects. (invited speaker) International Congress on Fertilization, Embryo Development and Implantation, 11.6-9, New Delhi, India.

2. 小森慎二 (2000) 造精機能障害と ART への応用. (シンポジウム—病態からみた不妊治療の適応と限界—) 第 45 回日本不妊学会, 11.23-24, 神戸.

3. 加藤浩志, 半田雅文, 小林真一郎, 磯島晋三, 阪田和子, 中田祐子, 小森慎二, 香山浩二 (2000) Y 染色体長腕上 AZFc 領域近傍の微小欠失が男児へ移行した症例についての検討. 第 52 回日本産科婦人科学会学術講演会, 4.1-4, 徳島. (日本産科婦人科学会誌, 52 (2), 305, 2000.)

4. Komori, K., Nakata, Y., Kato, H., Sakata, K., Sawai, H. and Koyama, K. (2000) Genomic screening for spermatogenic factor in the AZFc region of the Y chromosome. 20th Annual

Meeting of American Society for Reproductive Immunology, 6.10-13, Jacksonville, U.S.A. (*Am. J. Reprod. Immunol.* 43 (6), 320, 2000)

5. Takenobu, T., Komori, S., Nakata, Y., Kato, H., Sakata, K., Sawai, H. and Koyama, K. (2000) Genetic analysis for Y chromosome microdeletions in Japanese infertile males. 20th Annual Meeting of American Society for Reproductive Immunology, 6.10-13, Jacksonville, U.S.A. (*Am. J. Reprod. Immunol.* 43 (6), 320, 2000)

6. 小森慎二, 澤井英明, 香山浩二, 加藤浩志, 磯島晋三 (2000) Y 染色体の AZFc 領域におけるゲノム遺伝子の解析. 第 18 回日本受精着床学会, 7.6-7, 岡崎. (講演抄録集, 154, 2000)

7. 小森慎二, 香山浩二 (2000) Y 染色体長腕上の造精関連遺伝子の解析. 白樺湖カンファレンス, 9.30-10, 白樺湖.

8. Sakata, K., Komori, S., Nakata, Y., Kato, H., Sawai, H. and Koyama, K. (2000) Genetic analysis for Y chromosome microdeletions in Japanese infertile males. 2nd International Conference on Experimental and Clinical Reproductive Immunology, 11.15-18, Amsterdam.

9. 澤井英明, 小森慎二, 加藤浩志, 香山浩二 (2000) Y 染色体の微小欠失と造精機能について. 第 15 回日本生殖免疫学会,

12.15-16, 東京.

参考文献

1. Sinclair AH, Berta. P, Palmer MS et al (1990) A gene from human sex determining region encodes a protein with homology to a conservative DNA binding motif. *Nature* 346, 240-244
2. Vollrath D, Foote S, Hilton A et al (1992) The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 258, 52-58
3. Kato H, Komori S, Nakata Y et al (2000) Screening for deletions of interval 6 of the Y chromosome in Japanese azoospermic and oligozoospermic men. *J. Hum. Genet.* (in press)
4. Komori S, Kato H, Nakata Y et al (2001) Analysis for microdeletions of Y chromosome in a single sperm from a severe oligozoospermia. *J. Hum. Genet.* (in press)
5. Nakahori Y, Kyroki Y, Komaki R et al (1996) The Y chromosome region essential for spermatogenesis. *Hormone Res.* 46, 20-23
6. Qureshi SJ, Ross AR, Salo P et al (1996) Polymerase chain reaction screening for Y chromosome microdeletions: a first step towards the diagnosis of genetically-determined spermatogenic failure in men. *Mol. Hum. Reprod.* 2, 775-779
7. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S et al (1996) Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions inYq11. *Hum. Mol. Genet.* 5, 933-943
8. Brown LG, Alagappan R, Sawai-Kawaguchi T et al. (1997) Deletions of DAZ gene cluster in infertile patients with azoospermia and oligozoospermia. *Abstract Cytogenet. Cell Genet.* 79, 1-20
9. Giraidi SK, Mielnik A and Schlegel PN(1997) Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men *Hum. Reprod.* 12 1635-1641
10. Kremer JAM, Tuerlings JHMA, Meuleman EJM et al (1997) Microdeletions of the Y chromosome and intracytoplasmic sperm injection: from gene to clinic. *Hum. Reprod.* 12, 687-6919.
11. McElreavey K, Barbaux S, Bourgeron et al (1997) Mutation screening of the long arm of the human Y chromosome, including the Y-linked DAZ gene family, and the autosomal gene DAZLA in infertile men. *Abstract, Cytogenet. Cell. Genet.* 79, 1-20

12. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak J et al (1997) Screening for deletions of Y chromosome involving the DAZ (Deleted in AZoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. Fertil. Steril. 67 542-547
13. van der Ven K, Montag M, Peshka B et al (1997) Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. Mol. Hum. Reprod. 3, 55-59
14. Vogt PH, Affara N, Davey P et al (1997) Report of the international workshop on Y chromosome mapping 1997. Cytogenet. Cell Genet. 79, 1-20
15. Chang PL, Sauer MV, and Brown S (1999) Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. Hum. Reprod. 14, 2689-2694
16. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R et al (1999) Three generation evaluation of Y-chromosome microdeletion. J. Androl. 20, 394-398

図 1 Y染色体のAZF領域を含めた模式図

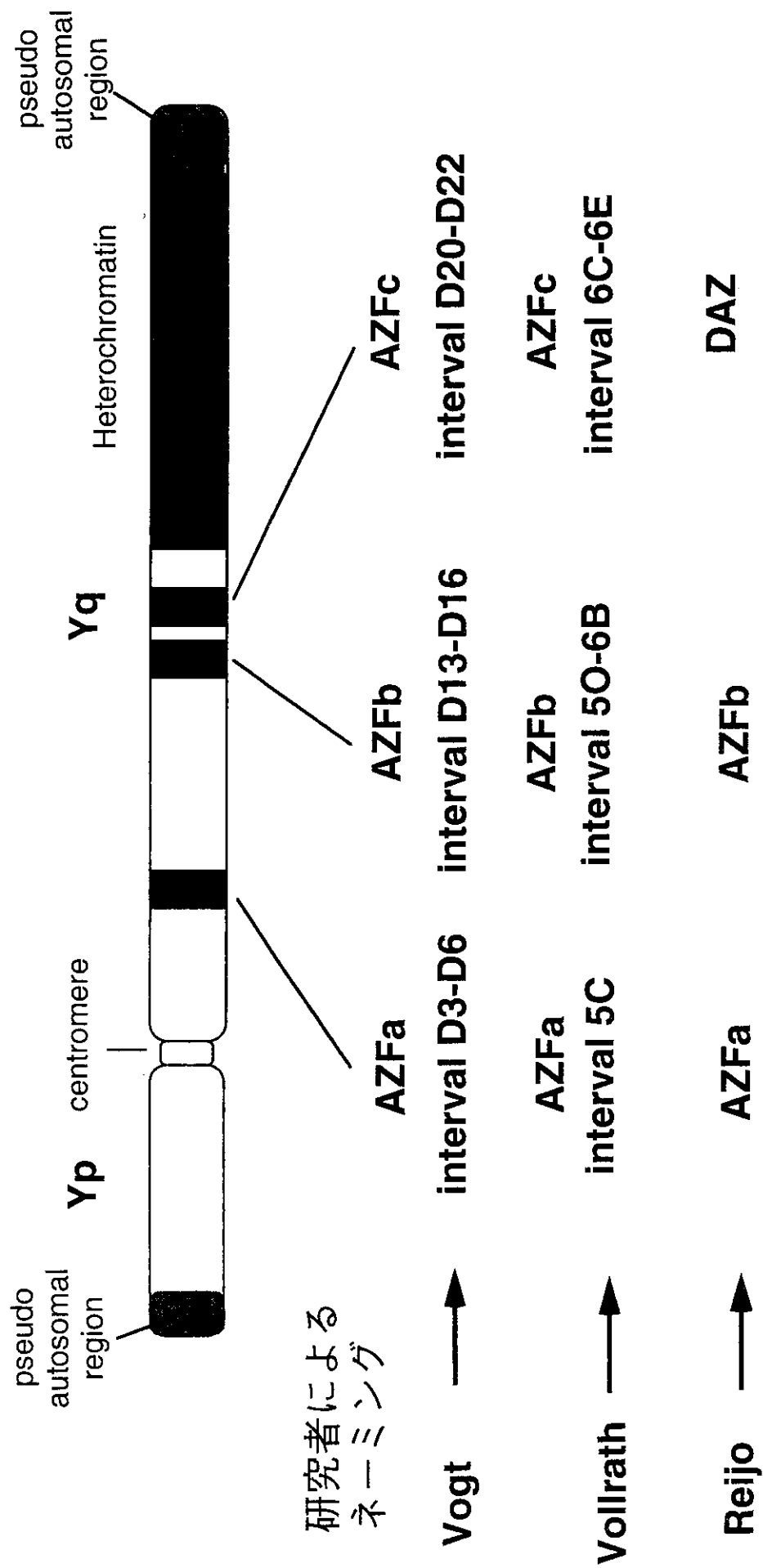


表 1 微小欠失の検討に使用したプライマーの一覧

primer	forward	reverse	size (bp)
sY138	CACATGAAGCACTGGAAC TG	AGGGCCTGAGTCTCCAGG	170
sY233	AGTTAGTAAGCCCCAGTTATCCTCC	TTTGGAAGGACACCTTATTAGCCA	115
sY240	TCAAATAGCAGCAATTTAATAT	GCACCTGAAGAGCTGCTTG	247
sY245	TTACTTCCTTAAGTCAAAGCGG	CTGAGACAGCAAGACCAATCC	101
sY277	GGGTTTGGCCTGCATACGTAATTA	CCTAAAAGCAATTCTAAACCTCCAG	275
sY254	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA	GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	107
sY283	CAGTGATACACTCGGACTTGTGTA	GTTATTTGAAAAGCTACACGGG	375
sY255	GTTACAGGATTCGGCGTGAT	CTCGTCAITGTCAGCCAC	126
sY236	CCCCATCGGTAAACCAAATCA	CCCATTTGAAGTTTCAAGGTGTCA	94
sY267	GAATGTGTATTCAAGGACTTCTCG	TACTTCCTTCGGGGCCTCT	102
sY272	GGTGAGTCAAATTAGTCAATGTCC	CCTTACCACAGGACAGAGGG	93
sY269	CTCTGGGACAAGTGTTCCTTG	CATTGGCATGAATGTGTATTCA	94
sY273	GGTCTTTAAAAGGTGAGTCAAATT	AGACAGAGGGAACTTCAAGACC	95
sY158	CTCAGAAGTCCTCCTAATAGTTCC	ACAGTGGTTTGTAGCGGGTA	231
sY159	TACATGTTATGTGCTATGCC	CACATTATATAATATGTATGTTGTC	550
sY160	TACGGGTCTCGAATGGAATA	TCATTGCATTCTTTCCATT	236

図2 各症例での微小欠失領域のまとめ

