

Kuramochi-Miyagawa et al.

positions to which the small RNA mapped, and when multiple repeat names were retrieved, the class (e.g., LTR/MaLR and rRNA), and subclass (e.g., IAP), where applicable, were determined by the repeat with the greatest number of positions (Supplemental Table S2). When the top two repeats had the same number of positions, we did not determine the class or subclass. To identify small RNAs that corresponded to tRNAs, rRNAs, snRNAs, snoRNAs, scRNAs, miRNAs, piRNAs (known species from adult testes), and mRNAs based on sequence similarity, we extracted the sequences of the RNAs from GenBank (flat files, <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) and downloaded the remaining sequences from the following databases: for tRNAs, Genomic tRNA database (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/Mmusc>); for rRNAs, European ribosomal RNA database (<http://www.psb.ugent.be/rRNA/index.html>); for snoRNAs, snoRNA database (<http://www.snoRNA.biotoul.fr>) and RNA database (<http://ism-research.imb.uq.edu.au/rnadbl>); for piRNAs, RNA database (<http://ism-research.imb.uq.edu.au/rnadbl>); for miRNAs, miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>); and for mRNAs, Refseq Genes (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>) and Ensemble Genes (<http://www.ensembl.org/index.html>). A BLAST search (<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) was subsequently performed using our small RNA sequences as queries and our downloaded sequences as a database. Since sequence alignments using the BLAST program are local, a gap can hamper the alignment of short homologous sequences flanking the gap. Therefore, we extracted the sequences of the aligned regions from the data set with an extra 5 nt at both ends and realigned them with the small RNA sequences, using a global alignment program developed in-house that uses plural gap penalty parameter sets. We then classified the small RNAs using a 90% sequence identity threshold. Finally, the repeat annotations based on genomic position and the annotations based on sequence similarity were combined. For small RNAs with more than one annotation, we used the following order of priority: rRNA, tRNA, snoRNA, sc/srpRNA, miRNA, rasiRNA, piRNA, and mRNA. The unannotated sequences were classified as unknown.

#### Distribution and frequency of piRNAs corresponding to IAP and Line-1

The sequences of IAP1 (M17551) and L1\_Mda [nucleotides 588–7713 of M13002] were retrieved from the flat files of GenBank. All of the small RNA sequences cloned were BLAST-searched against the IAP1 and L1\_Mda sequences, using a cutoff *E*-value of 0.0001. The number of hits was determined every 100 nt.

#### Cluster analysis of small RNAs

We performed a cluster analysis of the male fetal gonadal small RNAs, with the following conditions: (1) The cluster should contain at least 11 types of small RNAs, and (2) the relative abundance of small RNAs between 24 and 28 nt in length should be greater than that of small RNAs between 19 and 23 nt in length.

#### Immunoprecipitation of the MIL1 ribonucleoprotein complex, and the isolation, labeling, and detection of small RNAs

E16.5 testes were homogenized in lysis buffer (20 mM HEPES at pH 7.5, 150 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Nonidet P-40, 1 mM DTT) that contained protease inhibitors. Protein-RNA complexes were immunoprecipitated using anti-MIL1-N2 and anti-MIW12-N1 antibodies or normal rabbit serum as a control with Protein G Sepharose beads, and the RNAs were purified

using ISOGEN-LS (Nippon Gene). The RNAs were labeled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP using T4 polynucleotide kinase for 15 min at 37°C and then separated by 15% denaturing PAGE.

#### Microarray analysis

Total RNA from E16.5–E17.5 testes was purified using Sepasol-RNA I Super. For the rasiRNA probes, those sequences that were cloned more than six times and were >22 nt in length were selected from among the small RNAs that were annotated as repeats. In those cases where the small RNAs overlapped by 23 nt at their 5'-ends, a representative sequence was selected according to the number of clones. For the miRNA probes, we chose sequences that were cloned more than five times and were <23 nt in length from among the small RNAs that were annotated as miRNAs. In those cases where the small RNAs overlapped by 17 nt at their 5'-ends, a representative sequence was selected according to the number of clones. The target sequences for the microarray are listed in Supplemental Table S5. Microarray analysis was performed by a service provider (LC Sciences).

#### Small RNA Northern blotting

Northern blots were used to detect small RNAs, as described previously (Aravin et al. 2006), with 10  $\mu$ g of total RNA loaded per well. The sequences of the probes used to detect the small RNAs are described in Supplemental Table S6. Hybridization was performed at 42°C in the same buffer used for regular Northern blotting. The membrane was washed twice with a 2x SSC/0.1% SDS solution at 42°C.

#### Acknowledgments

We thank Dr. Y. Matsui for providing the Oct-4/GFP mice, Dr. S. Tajima for providing the anti-Dnmt antibodies, and Ms. A. Kawai and Mr. K. Yoshinaga for assistance. We also thank Dr. K. Horie and Dr. Y. Kato for helpful discussions, and Ms. A. Mizokami for secretarial work. This work was supported in part by grants from the Japan Society for the Promotion of Science, the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, the 21st Century COE Program "CICET," and the Uehara Memorial Foundation, Japan.

#### References

- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M.J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., et al. 2006. A novel class of small RNAs bind to MIL1 protein in mouse testes. *Nature* 442: 203–207.
- Aravin, A.A., Sachidanandam, R., Girard, A., Fejes-Toth, K., and Hannon, G.J. 2007. Developmentally regulated piRNA clusters implicate MIL1 in transposon control. *Science* 316: 744–747.
- Bellve, A.R., Cavicchia, J.C., Millette, C.F., O'Brien, D.A., Bhatnagar, Y.M., and Dym, M. 1977. Spermatogenic cells of the prepubertal mouse. Isolation and morphological characterization. *J. Cell Biol.* 74: 68–85.
- Bourc'his, D. and Bestor, T.H. 2004. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* 431: 96–99.
- Brennecke, J., Aravin, A.A., Stark, A., Dus, M., Kellis, M., Sachidanandam, R., and Hannon, G.J. 2007. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 128: 1089–1103.
- Carmell, M.A., Girard, A., van de Kant, H.J., Bourc'his, D., Bestor, T.H., de Rooij, D.G., and Hannon, G.J. 2007. MIWI2 is

- essential for spermatogenesis and repression of transposons in the mouse male germline. *Dev. Cell* 12: 503-514.
- Cox, D.N., Chao, A., Baker, J., Chang, L., Qiao, D., and Lin, H. 1998. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes & Dev.* 12: 3715-3727.
- Girard, A., Sachidanandam, R., Hannon, G.J., and Carmell, M.A. 2006. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 442: 199-202.
- Grivna, S.T., Beyret, E., Wang, Z., and Lin, H. 2006. A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes & Dev.* 20: 1709-1714.
- Gunawardane, L.S., Saito, K., Nishida, K.M., Miyoshi, K., Kawamura, Y., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. 2007. A slicer-mediated mechanism for repeat-associated siRNA 5' end formation in *Drosophila*. *Science* 315: 1587-1590.
- Hata, K., Kusumi, M., Yokomine, T., Li, E., and Sasaki, H. 2006. Meiotic and epigenetic aberrations in Dnmt3L-deficient male germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 73: 116-122.
- Houwing, S., Kamminga, L.M., Berezikov, E., Cronenbold, D., Girard, A., van den Elst, H., Filipov, D.V., Blaser, H., Raz, E., Moens, C.B., et al. 2007. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in zebrafish. *Cell* 129: 69-82.
- Ishihara, H., Tanaka, I., Wan, H., Nojima, K., and Yoshida, K. 2004. Retrotransposition of limited deletion type of intracisternal A-particle elements in the myeloid leukemia C11s of C3H/He mice. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 45: 25-32.
- Kalmykova, A.I., Klenov, M.S., and Gvozdev, V.A. 2005. Argonaute protein PIWI controls mobilization of retrotransposons in the *Drosophila* male germline. *Nucleic Acids Res.* 33: 2052-2059.
- Kato, Y., Kaneda, M., Hata, K., Kumaki, K., Hisano, M., Kohara, Y., Okano, M., Li, E., Nozaki, M., and Sasaki, H. 2007. Role of the Dnmt3 family in de novo methylation of imprinted and repetitive sequences during male germ cell development in the mouse. *Hum. Mol. Genet.* 16: 2272-2280.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Yomogida, K., Kuroiwa, A., Tadokoro, Y., Fujita, Y., Sato, M., Matsuda, Y., and Nakano, T. 2001. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech. Dev.* 108: 121-133.
- Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., et al. 2004. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development* 131: 839-849.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Lane, N., Dean, W., Erhardt, S., Hajkova, P., Surani, A., Walter, J., and Reik, W. 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35: 88-93.
- Lau, N.C., Seto, A.G., Kim, J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Bartel, D.P., and Kingston, R.E. 2006. Characterization of the piRNA complex from rat testes. *Science* 313: 363-367.
- Meistrich, M.L. 1993. *Cell and molecular biology of the testis*. Oxford University Press, New York.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G., and Laux, T. 1998. Role of the ZWILLE gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *EMBO J.* 17: 1799-1809.
- Nolan, T., Braccini, L., Azzalin, G., De Toni, A., Macino, G., and Cogoni, C. 2005. The post-transcriptional gene silencing machinery functions independently of DNA methylation to repress a LINE1-like retrotransposon in *Neurospora crassa*. *Nucleic Acids Res.* 33: 1564-1573.
- Peters, L. and Meister, G. 2007. Argonaute proteins: Mediators of RNA silencing. *Mol. Cell* 26: 611-623.
- Reddien, P.W., Oviedo, N.J., Jennings, J.R., Jenkin, J.C., and Sanchez Alvarado, A. 2005. SMEDWI-2 is a PIWI-like protein that regulates planarian stem cells. *Science* 310: 1327-1330.
- Saito, K., Nishida, K.M., Mori, T., Kawamura, Y., Miyoshi, K., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. 2006. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes & Dev.* 20: 2214-2222.
- Sakai, Y., Suetake, I., Shinozaki, F., Yamashina, S., and Tajima, S. 2004. Co-expression of de novo DNA methyltransferases Dnmt3a2 and Dnmt3L in gonocytes of mouse embryos. *Brain Res. Gene Expr. Patterns* 5: 231-237.
- Sarot, E., Payen-Groschene, G., Bucheton, A., and Pelisson, A. 2004. Evidence for a piwi-dependent RNA silencing of the gypsy endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster* flamenco gene. *Genetics* 166: 1313-1321.
- Shi, H., Ullu, E., and Tschudi, C. 2004. Function of the Trypanosome Argonaute 1 protein in RNA interference requires the N-terminal RGG domain and arginine 735 in the Piwi domain. *J. Biol. Chem.* 279: 49889-49893.
- Tanaka, S.S., Toyooka, Y., Akasu, R., Katoh-Fukui, Y., Nakahara, Y., Suzuki, R., Yokoyama, M., and Noce, T. 2000. The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes & Dev.* 14: 841-853.
- Walsh, C.P., Chaillet, J.R., and Bestor, T.H. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat. Genet.* 20: 116-117.
- Watanabe, T., Takeda, A., Tsukiyama, T., Misc, K., Okuno, T., Sasaki, H., Minami, N., and Imai, H. 2006. Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: Retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes & Dev.* 20: 1732-1743.
- Webster, K.E., O'Bryan, M.K., Fletcher, S., Crewther, P.E., Aapola, U., Craig, J., Harrison, D.K., Aung, H., Phutikanit, N., Lyle, R., et al. 2005. Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 4068-4073.
- Yoshimizu, T., Sugiyama, N., De Felice, M., Yeom, Y.I., Ohbo, K., Masuko, K., Obinata, M., Abe, K., Scholer, H.R., and Matsui, Y. 1999. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein [GFP] transgene in mice. *Dev. Growth Differ.* 41: 675-684.
- Zaratiegui, M., Irvine, D.V., and Martienssen, R.A. 2007. Non-coding RNAs and gene silencing. *Cell* 128: 763-776.



## Sperm-Egg Fusion Assay in Mammals

Naokazu Inoue and Masaru Okabe

### Summary

As representatives of the 60 trillion cells that make a human body, a sperm and an egg meet, recognize each other, and fuse to create a new generation. Thus, gamete fusion is an extremely important process that must transpire without error to launch life activity. This may drive the fusion mechanism to evolve into an unflinching and steady process. At the same time, fusion must be restricted to occur only between two gametes of the same species. However, the molecular bases of the fusion event in fertilization have not yet been clarified. In this chapter, we describe the methods to evaluate fusion by staining the swollen sperm nuclei after fertilization.

**Key Words:** Sperm; egg; fusion; fertilization; Izumo.

### 1. Introduction

Fertilization is well known as one of the most typical cell-cell fusion processes *in vivo*. Among the many ejaculated sperm journeying into the uterus, and subsequently to the ampulla of the oviduct, only a few bump into eggs. At the final stage of the long journey, a selected sperm penetrates into the zona pellucida (ZP) that surrounds the eggs and fuses with the egg plasma membrane. Until recently, the molecular basis for fertilization was poorly understood, especially the final sperm-egg fusion process.

To identify factors involved in sperm-egg fusion, we utilized an antimouse sperm monoclonal antibody OBF13 that specifically inhibits the fusion process, and we succeeded in finding a novel fusion factor that we named *Izumo* after the Japanese shrine dedicated to marriage (*I*). On the egg plasma membrane, the fusion-related protein CD9 was discovered rather serendipitously by three groups (*2-4*). In those studies, the assessment of fusion was performed by either the Hoechst prestain or poststain method described below. At present, *Izumo* and CD9 are the only factors that have been proved to be indispensable

From: *Methods in Molecular Biology*, vol. 475: *Cell Fusion: Overviews and Methods*  
Edited by: E. H. Chen © Humana Press, Totowa, NJ

through gene-manipulated animals. Elucidation of the real central factor of the fusion machinery is yet to come.

## 2. Materials

### 2.1. Preparation of Oocytes

1. Female mouse 8 weeks old (or older) of an appropriate strain (10 weeks old or older female if hamster).
2. Hypodermic needle, 30 gauge, 1/2 inch syringe, 1 mL sterile disposable.
3. Pregnant mare's serum gonadotropin (PMSG; Sigma, St. Louis, MO, catalog number G-4877), human chorionic gonadotropin (hCG; Sigma, catalog number C-1063) for superovulation.
4. Hyaluronidase type IV-S (Sigma, catalog number H-4272).
5. 30- or 60-mm no surface coated plastic dish for bacteria (Iwaki, Holliston, MA, numbers 1000-035, 1010-060).
6. Watchmaker's forceps (Fontax 5C).
7. Egg-handling pipette (finely drawn capillary tube (Funakoshi 1-40-7500) with mouth pipette (Sigma, catalog number A5177).
8. Stereoscopic microscope (Olympus SZX12).
9. CO<sub>2</sub> incubator (37°C, 5%CO<sub>2</sub>, Asahi 4020).
10. Modified kSOM medium (for culture of mouse eggs; **Table 1**).
11. FHM medium (for collection of mouse eggs; *see* **Table 1**).
12. BWB medium (for culture of hamster eggs; *see* **Table 1**), modified BWB medium (containing 3 mg/mL of human serum albumin [HAS; Sigma catalog number A-1653]).
13. Mineral oil (Sigma, catalog number M-8410).

### 2.2. Removal of the Zona Pellucida

1. Piezo-manipulator PMAS-CT150 (Prime Tech LTD, Japan).
2. Stereoscopic microscope.
3. Egg-handling pipette.
4. Acidic Tyrode's solution (Sigma, catalog number T-1788).
5. Borosilicate glass tube (Sutter Instrument Co., Novato, CA, B100-75-10).
6. Sutter P97 puller to make a 10- $\mu$ m diameter capillary.
7. 12.5% PVP in Hepes-CZB (*see* **Table 1**).
8. Mineral oil.

### 2.3. Collection of Sperm

1. 10-week-old (or older) appropriate strain male mouse.
2. Human sperm from healthy male donors.
3. TYH medium (for capacitation of mouse sperm; *see* **Table 1**).
4. Modified BWB medium (for capacitation of human sperm; *see* **Table 1**).
5. Watchmaker's forceps (Fontax 5C).

Table 1  
Composition of Media

Reagent	Source	Modified					Hepes- CZB
		kSOM	FHM	TYH	BWW		
NaCl	Sigma S-5886	2.775 g	2.775 g	3.488 g	2.455 g	2.38 g	
KCl	Sigma P-5405	0.093 g	0.093 g	0.178 g	0.178 g	0.18 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma P-5655	0.0238 g	0.0238 g	0.081 g	0.081 g	0.08 g	
MgSO <sub>4</sub>	Sigma M-2643	0.012 g	0.012 g	0.072 g	0.072 g	0.071 g	
Sodium lactate (60% [w/v])	Sigma L-7900	1.18 mL	1.18 mL	—	1.54 mL	1.85 mL	
Sodium pyruvate	Sigma P-4562	0.011 g	0.011 g	0.028 g	0.014 g	0.0176 g	
Glucose	Sigma G-6152	0.018 g	0.018 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	
Glutamine (200 mM stock)	Sigma G-7513	2.5 mL	2.5 mL	—	—	2.5 mL	
Bovine serum albumin	Sigma A-3311	0.5 g	0.5 g	2.0 g	—	1.5 g	
EDTA 0.2 Na	Sigma E-6635	—	—	—	—	0.0205 g	
EDTA 0.4 Na (10 mM)	Dai-ichi 1.3 mL × 10	0.5 mL	0.5 mL	—	—	—	
NaHCO <sub>3</sub>	Sigma S-5761	1.05 g	0.168 g	1.053 g	1.5 g	0.21 g	
Hepes	Sigma H-6147	—	2.38 g	—	—	2.6 g	
CaCl <sub>2</sub> /2H <sub>2</sub> O	Sigma C-7902	0.126 g	0.126 g	0.126 g	0.126 g	0.125 g	
Essential amino acid	GibcoBRL 11130-051	10 mL	10 mL	—	—	—	
Nonessential amino acid	GibcoBRL 11140-050	5 mL	5 mL	—	—	—	
Penicillin-streptomycin	GibcoBRL 15140-148	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	
Phenol Red 0.5%	Dai-ichi 1.3 mL × 10	1.0 mL	1.0 mL	0.5 mL	0.5 mL	1.0 mL	
1.0 N NaOH	Nacalai tesque 315-11	—	Adjust to pH 7.4	—	—	Adjust to pH 7.4	
Water	GibcoBRL 15230-162	Adjust to 500 mL	Adjust to 500 mL	Adjust to 500 mL	Adjust to 500 mL	Adjust to 500 mL	

These medium were filtrated with 0.2 μm filter, divided into 10 mL, and stored at -20°C until used.



6. Straight-blade Vannas scissors (Natume MB54-1).
7. Stereoscopic microscope.
8. CO<sub>2</sub> incubator.
9. 30- or 60-mm nontreated plastic dish.
10. Mineral oil.

#### **2.4. Staining of Fused Sperm**

1. Hoechst 33342 (Invitrogen H-3570).
2. CO<sub>2</sub> incubator.
3. 0.25% glutaraldehyde for fixation.
4. Stereoscopic microscope.
5. Ix-70 fluorescent microscope (Olympus).
6. Egg-handling pipette.
7. Mineral oil.
8. Mixture of solid paraffin and Vaseline (mixing ratio is 1:9).

### **3. Methods**

#### **3.1. Preparation of Oocytes**

This procedure is described in more detail by Nagy et al. (5).

1. Intraperitoneal injections of 5 IU PMSG and 5 IU hCG at a 48-h interval to 8-week-old (or older) female mice (injection 30 IU PMSG and 30 IU hCG at 72-h interval to 10-week-old or older female hamster).
2. Sacrifice the mice at 13–15h after hCG injection (sacrifice the hamster at 17h after hCG).
3. Dissect the oviducts.
4. Transfer the oviduct to a mineral oil-covered 30- or 60- mm plastic dish.
5. Newly ovulated oocytes, surrounded by cumulus cells, are found in the ampulla of oviduct.
6. Place one oviduct beside a mineral oil-covered 100- $\mu$ L drop of FHM medium prepared on 60-mm plastic dish.
7. Use watchmaker's forceps to grasp the oviduct and supplementary forceps to tear the oviduct close to where the oocytes are located.
8. Release the clutch of cumulus cells into a 100  $\mu$ L drop of FHM medium.
9. Allow eggs to incubate in 35 IU/mL hyaluronidase solution until the cumulus cells are completely removed (it may take approximately 5 min).
10. Wash eggs by pipetting in and out and subsequently transferring eggs into fresh drops of FHM medium (repeat at least three times).
11. Place up to 50 eggs in a 50- $\mu$ L drop of modified kSOM at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> in air until removal of the zona pellucida is performed.

#### **3.2. Removal of the Zona Pellucida**

Two different methods for the preparation of zona pellucida-free eggs are described. Acidic Tyrode's method is a quick and easy method to remove zona

pellucida and is often used by researchers. However, a drawback of this method is that a part of the dissolved zona pellucida was found to be reabsorbed on the egg plasma membrane (6). In natural conditions, the acrosome intact sperm do not bind to egg plasma membrane, but with acidic Tyrode's method we cannot eliminate a massive adhesion between acrosome intact sperm and eggs with reabsorbed zona pellucida on their plasma membrane. Because this "false binding" can be eliminated by mechanical zona pellucida removal methods as shown in **Figures 1 and 2** (6), we always use this method to perform sperm-egg fusion assay. The other available mechanical removal method is reported by another group (7).

### 3.2.1. Acidic Tyrode's Method

1. Prepare eggs and remove cumulus cells as described in **Subheading 3.1**.
2. Transfer cumulus-free eggs into a 50- $\mu$ L drop of mineral oil-covered acidic Tyrode's solution prepared on a plastic dish.
3. To remove remnant medium, transfer eggs into a second 50  $\mu$ L of acidic Tyrode's solution.
4. Repeatedly pipette the eggs in and out until the zona pellucida are dissolved under the stereoscopic microscope (it may be finished within 30 s).
5. Wash zona pellucida-free eggs at least three times by transferring eggs into fresh new drops of TYH medium to remove remnant acidic Tyrode's solution. (For human sperm, modified BWW medium is required instead of TYH medium.)

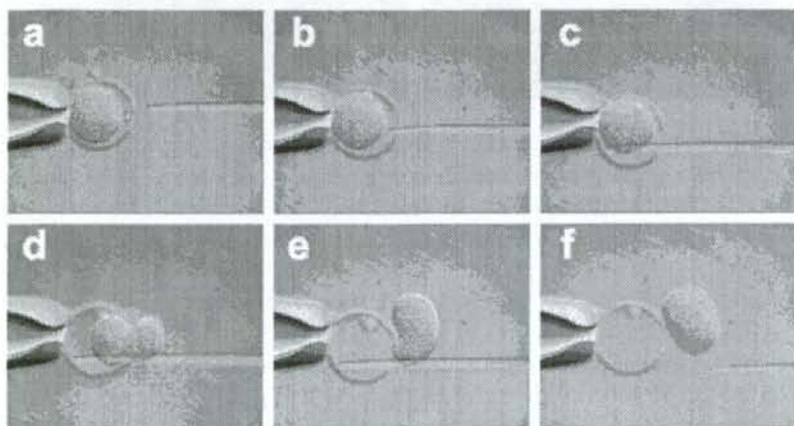


Fig. 1. Preparation of zona pellucida-free eggs using a piezo-micromanipulator. Eggs were freed from the cumulus cells and placed in a drop of FHM. A pipette, attached to a piezo-driven micromanipulator, was used to form a slit in the zona pellucida (**A,B**). The egg then was flushed out through the slit by rapidly introducing medium into the perivitelline space from behind the eggs (**C-F**).

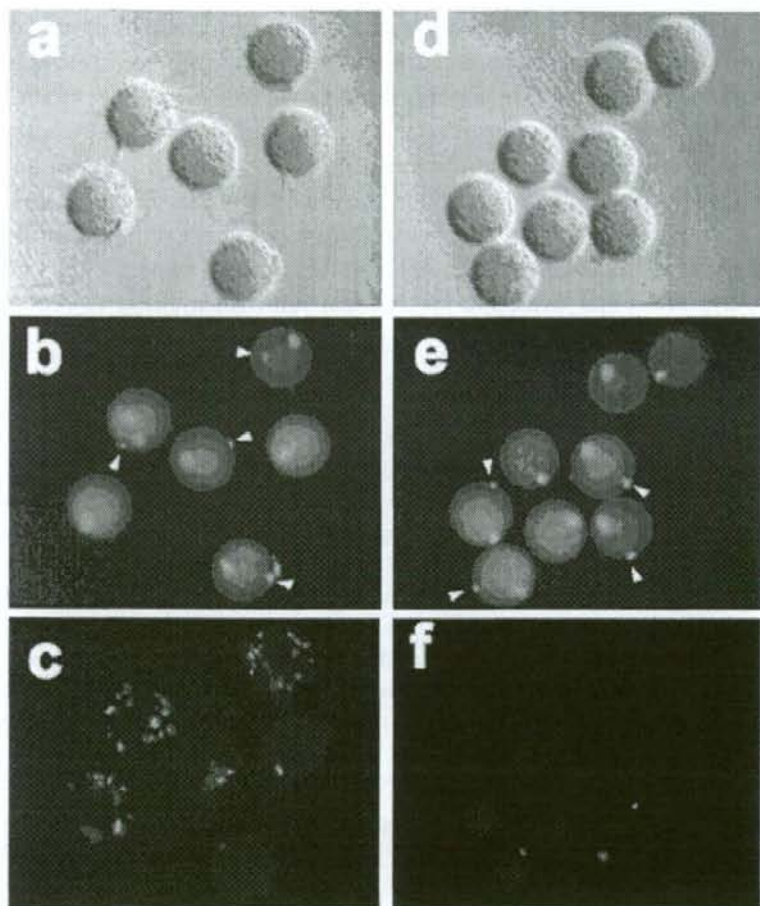


Fig. 2. An example of the Hoechst "preloading" method: comparison of sperm binding and fusing abilities to denuded egg plasma membrane (PM) by acidic Tyrode's (acid PM) or manipulator (piezo PM). "Green sperm" from *Acr-EGFP* transgenic mice (8) were capacitated for 2 h and then mixed with eggs preloaded with Hoechst 33342 that were prepared with acidic Tyrode's solution (in A-C) and a piezo-manipulator (in D-F). After 30 min of incubation, eggs were fixed and visualized by fluorescence microscopy to assay sperm PM binding and fusion. (A,D) Bound sperm (Hoffman modulation contrast optics). Considerably more sperm were present on the acid PM than on the piezo PM. (B,E) Fused sperm are stained with Hoechst (arrowheads) because of the dye transfer from the egg. Similar numbers of fused sperm were seen with both types of egg preparation. The larger egg nucleus was also stained. (C,F) Acrosome intact sperm had "green fluorescent" acrosomes. The majority of sperm bound to eggs prepared with the acidic Tyrode's solution were acrosome intact, while few sperm prepared by the piezo-micromanipulator that bound to eggs were acrosome intact.



6. Incubate in TYH medium for more than 1 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air to allow surface proteins to recover.

### 3.2.2. Mechanical Method Using a Piezo-Manipulator

1. Prepare eggs and remove cumulus cells as described in **Subheading 3.1** (see **Fig. 1**; **ref. 6**).
2. Prepare the drilling pipette from a borosilicate glass tube by pulling using a Sutter P97 puller to a diameter of 10 μm according to an appropriate textbook (5).
3. Add a few microliters of mercury to the tip of the pipette to enhance the drilling efficiency.
4. Prepare several 6-μL drops of mineral oil-covered 12.5% PVP in Hepes-CZB and FHM media prepared on the top of a 60-mm plastic dish.
5. Equip the pipette to the piezo-driven micromanipulator and first soak the pipette wall with 12.5% PVP in Hepes-CZB.
6. Make an approximately 30-μm slit in the zona pellucida by applying a piezo-pulse (see **Fig. 1**).
7. Flush out the oocyte from the slit by rapidly introducing medium into the perivitelline space from behind the eggs (see **Fig. 1**).
8. Place up to 50 zona pellucida-free eggs into a 50 μL drop of TYH medium and incubate at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air until use.

## 3.3. Collection of Sperm

### 3.3.1. Human Sperm

1. Collect sperm from healthy male donors by masturbation.
2. Liquefy for 30–60 min at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air and divide into 0.5-mL aliquots.
3. Place 0.5-mL aliquots to the bottom of 2 mL of modified BWB medium.
4. Incline the tubes to an angle of 30 ° and incubate at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air for 1 hr.
5. Take out approximately 1.0 mL of the upper part of the medium containing motile sperm into another 1.5-mL tube.
6. Centrifuge for 5 min at 500 g at room temperature.
7. Discard supernatant and resuspend the sperm in 1 mL of modified BWB medium.
8. Repeat **steps 6** and **7** twice more. Eventually resuspend in a mineral oil-covered 400-μL drop of modified BWB medium prepared on 60-mm plastic dish at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air until use.

### 3.3.2. Mouse Sperm

1. Dissect the cauda epididymis from 12-week-old (or older) mice according to textbook (5).
2. Place the epididymis beside a 100-μL drop of TYH medium covered by mineral oil in a 30- or 60-mm plastic dish.

3. Use watchmaker's forceps to grasp the cauda epididymis and make a cut at the proximal cauda epididymis (mature sperm are stored) with straight-blade Vannas scissors.
4. After squeezing the sperm out from the cut area, hold the swarm of sperm by sticking them to the tip of supplementary forceps.
5. Introduce the swarm of sperm into a 200- $\mu$ L drop of TYH medium.
6. At 1 h after incubation, check the sperm motility by observing well-dispersed sperm.
7. Cultivate sperm for an additional 1 h in TYH medium at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air to induce capacitation and spontaneous acrosome reaction before insemination.

### 3.4. Staining of Fused Sperm

Fusion assessment can be performed in two different ways.

#### 3.4.1. Hoechst "Preloading" Method

1. Prepare the zona pellucida-free eggs as described in **Subheading 3.2**.
2. Introduce eggs into a 50- $\mu$ L drop of Hoechst 33342 (1  $\mu$ g/mL) in TYH medium (up to 50 eggs per spot), and allow to stand for 10 min at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air.
3. Transfer the eggs into another fresh 50- $\mu$ L drop of TYH medium covered with mineral oil.
4. Incubate dye-loaded eggs for 15 min at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air to discharge excess dye.
5. Repeat **steps 3** and **4** three more times, and subject to fusion assay.
6. Cultivate sperm as described in **Subheading 3.3**, to induce capacitation.
7. Transfer the eggs into a 50- $\mu$ L drop of FHM medium containing 0.25% glutaraldehyde for fixation after 30 min of incubation with  $2 \times 10^5$  mouse sperm.
8. Allow to stand for 5 min at room temperature.
9. Wash the sperm-bound eggs by transferring eggs into fresh drops of FHM medium several times
10. Observe under a fluorescence microscope (ultraviolet excitation light). With this method, only nuclei of fused sperm are stained by the dye transferred into sperm after membrane fusion (see **Fig. 2** and **3**; **Note 1**).

#### 3.4.2. Hoechst "Poststaining" Method: Observation of Swollen Sperm

1. Prepare the zona pellucida-free eggs as described in **Subheading 3.2**.
2. Cultivate sperm as described in **Subheading 3.3**, to induce capacitation.
3. Prepare a 100- $\mu$ L drop of TYH medium covered by mineral oil prepared on 60-mm plastic dish.
4. Introduce zona pellucida-free eggs into a drop of TYH medium.
5. Incubate zona pellucida-free eggs with  $2 \times 10^5$  (for mouse) or  $1 \times 10^6$  (for human) sperm for 6 h in TYH or modified BWB medium at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in air,

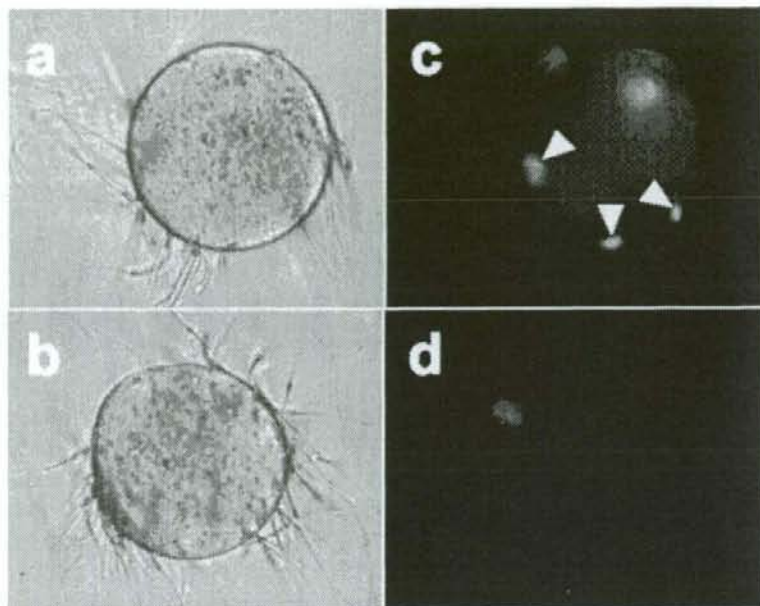


Fig. 3. An example of the Hoechst "preload" method: fusion assay of Izumo knockout sperm. Fused sperm were stained by the egg that was preloaded with Hoechst 33342. The arrowheads show the fused sperm. In comparison with a few *Izumo*  $+/-$  sperm, which successfully fused with eggs (A,C), *Izumo*  $-/-$  sperm never fused with eggs (B,D). This defect was limited to the fusion process, because pups from *Izumo*  $-/-$  sperm could be obtained by intracytoplasmic sperm injection. (Reprinted from ref. 1 with permission of Nature Publishing Group.)

respectively. Fused sperm heads launch to swell during this incubation period; some enlarged sperm heads can be seen under a phase contrast microscope.

6. Wash the sperm bound eggs by pipetting and transferring into fresh new drops to remove weakly bound sperm.
7. Incubate the eggs with 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of Hoechst 33342 for 10 min at 37°C under 5%  $\text{CO}_2$  to stain swollen sperm nucleus.
8. Wash the eggs several times by transferring them into fresh TYH medium.
9. To observe sperm-fused eggs, apply four small dabs of Vaseline mix (vaseline: solid paraffin = 9:1) on a slide glass by injecting out from a syringe without needle.
10. Place a few eggs into a 1- $\mu\text{L}$  drop of FHM medium, and cover the eggs with a cover glass.
11. Gently press the eggs with the cover glass to flatten the eggs under the stereoscopic microscope to make the observation easier (see Note 2).
12. Observe under a fluorescence microscope (ultraviolet excitation light).



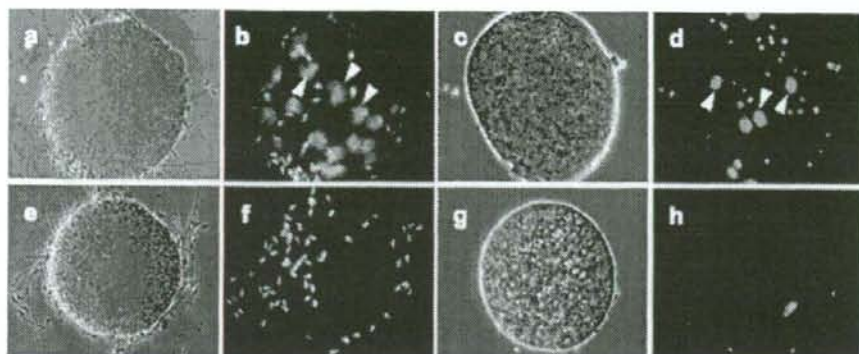


Fig. 4. Exemplification of Hoechst "poststain" method: involvement of Izumo in the xeno-species fusion system. Six hours after the insemination of zona-pellucida-free hamster eggs with *Izumo* +/- (A,B) and -/- (E,F) mouse sperm, sperm heads were stained by adding Hoechst 33342 to the medium (B,F). The sperm-egg binding was strong enough to resist the repeated pipetting. Human sperm were also added with 25 µg/mL of antihuman Izumo (G,H) or control IgG (C,D) to zona-pellucida-free hamster eggs. No fusion was observed in the presence of anti-Izumo antibody. The arrowheads indicate the swelling sperm head after staining with Hoechst 33342 (B,D). (Reprinted from ref. 1 with permission of Nature Publishing Group.)

Fused sperm (enlarged heads) will be stained with the dye as in **Figure 4**. (For human sperm, the use of modified BWW medium is required instead of TYH medium; see **Note 3**.)

#### 4. Notes

1. The Hoechst "preloading" method is not applicable when hamster eggs are used. They seem to pump out the Hoechst dye from the cytosol. As a result, hamster eggs are not able to accumulate enough dye for fusion assay (see **Subheading 3.4.1**).
2. For the observation of swollen sperm, the cover glass is pressed down to squeeze the eggs such that the sperm become more visible, but this has to be done carefully. The eggs burst easily with excess amount of pressurization (see **Subheading 3.4.2**).
3. The mixing of gametes of xeno species is ethically restricted in many ways. Please follow the ethical laws in the countries where the experiments are pursued (see **Subheading 3.4.2**).

#### References

1. Inoue, N., Ikawa, M., Isotani, A., and Okabe M. (2005) The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. *Nature* **434**, 234–238.
2. Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M., and Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science* **287**, 329–331.

3. Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., Suzuki, K., Kosai, K., Inoue, K., Ogura, A., Okabe, M., and Mekada, E. (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science* **287**, 321–324.
4. Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, T., Sakagami, J., Tada, N., Miyazaki, S., and Kudo, A. (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat. Genet.* **24**, 279–282.
5. Nagy, A., Gertsenstein, M., Vintersten, K., and Behringer, R. (2002) *Manipulating the Mouse Embryo*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
6. Yamagata, K., Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamaguchi, R., Moss, S. B., and Okabe, M. (2002) Sperm from the calmodulin-deficient mouse have normal abilities for binding and fusion to the egg plasma membrane. *Dev. Biol.* **250**, 348–357.
7. Ziyyat, A., Rubinstein, E., Monier-Gavelle, F., Barraud, V., Kulski, O., Prenant, M., Boucheix, C., Bomsel, M., and Wolf, J. P. (2006) CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J. Cell Sci.* **119**, 416–424.
8. Nakanishi, T., Ikawa, M., Yamada, S., Parvinen, M., Baba, T., Nishimune, Y., and Okabe, M. (1999) Real-time observation of acrosomal dispersal from mouse sperm using GFP as a marker protein. *FEBS Lett.* **449**, 277–283.

## 特集 月経困難症に対する治療戦略

## 子宮腺筋症の疼痛対策

浅田 弘法\*<sup>1</sup> 羽田 智則\*<sup>1</sup> 梶谷 宇\*<sup>1</sup>  
 内田 浩\*<sup>1</sup> 浜谷 敏生\*<sup>1</sup> 丸山 哲夫\*<sup>1</sup>  
 吉村 泰典\*<sup>1</sup> 岸 郁子\*<sup>2</sup> 木挽 貢慈\*<sup>3</sup>

## はじめに

子宮腺筋症は、子宮筋層に子宮内膜症病巣が侵入、あるいは発生したものである。子宮腺筋症の発症率は報告によって大きく異なり、数%というものから40~70%という報告まである<sup>1,2)</sup>。このような発症率の違いは、診断基準や、摘出子宮の検索方法の相違によって生じると考えられる。また、これらの摘出子宮による評価ではもともと検索した子宮が疾患を伴った子宮であるため、検討した集団に偏りがあり、いわゆる発症率・有病率は明確にはなっていないのが現状である。

一方、臨床的には病理学的な診断とは別に臨床症状と画像診断により子宮腺筋症を診断している。画像診断として、経陰超音波およびMRIが普及してきたため、診断率は向上してきた。特にMRIによる診断は強磁場のMRIが普及してき

たこともあり、きわめて重要な情報を提供してくれる。子宮腺筋症の臨床症状としては月経困難症と過多月経が主たる症状であるが、過多月経の症状は40~50%に、月経困難症の症状は約15~30%の子宮腺筋症患者に認められると報告されている<sup>1)</sup>。超音波診断およびMRIで診断した場合、子宮腺筋症診断のsensitivityおよびspecificityは約80~90%と報告されている<sup>3)</sup>。

従来は画像診断による子宮腺筋症の診断が困難であったため、子宮腺筋症と妊孕能、子宮腺筋症と切迫流産および子宮破裂などの妊娠合併症、子宮腺筋症と子宮体癌などの関連性についてはprospectiveに評価することはできなかった。そのため、現状では診療のよりどころになるようなデータはない。一方、子宮内膜症と月経困難症との関連性は多数の報告が存在している。子宮腺筋症は、深部子宮内膜症の一亜型であると考えられることができるので、ダグラス窩子宮内膜症、直腸子宮内膜症などのいわゆる深部内膜症と称される、硬結を伴う子宮内膜症に対する治療法と同様の治療方法が子宮腺筋症に対しても有効であると推測される。硬結を伴う深部子宮内膜症病変の治療は、薬剤の効果が少ないことから、切除が基本的な治療である。子宮腺筋症によって発症する疼

Asada Hironori

\*<sup>1</sup> 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室  
 (〒160-8582 東京都新宿区信濃町35番地)

\*<sup>2</sup> 東京歯科大学市川総合病院産婦人科

\*<sup>3</sup> 川崎市立川崎病院産婦人科



表1 子宮内膜症治療の目的

1. 疼痛（月経困難症・性交時痛・慢性骨盤痛など）をできる限り減弱する。
2. 子宮内膜症の再発をできる限り少なくする。
3. 妊娠の可能性をより向上させる。

痛には根治的な切除が有効であると考えられている<sup>4)</sup>。妊孕能の改善という点では軽度の子宮内膜症病巣切除に効果があるという報告もあり、また、直腸子宮内膜症などの深部内膜症病巣切除が妊孕能を高めるという報告がある<sup>5)</sup>ものの、深部内膜症病巣切除が妊孕能に対してどのような影響を与えるかについては、まだ明確な結論は出していない。

本稿では、子宮腺筋症の疼痛対策について、薬物療法と外科的治療に分けて論じてみたい。

## 1. 子宮腺筋症の病型

子宮腺筋症は子宮筋層内に浸潤、あるいは発生した子宮内膜症組織がその主体である。子宮腺筋症の病型分類はCullenらの分類<sup>6)</sup>（粘膜下、筋層内、漿膜から靭帯内）は現在も病型理解に応用できる。臨床的に子宮腺筋症の症例を詳細に観察していると、子宮腺筋症が単独で存在している症例と、子宮後壁から浸潤しているように病変が広がっていて、卵巣およびダグラス窩に子宮内膜症病巣を著明に認める症例とに分類することができる。単独病変を子宮体部に認める症例は、発生の段階から子宮体部に腺筋症病巣が存在していた症例、あるいは、分娩や流産をきっかけとして子宮内膜が子宮体部に迷入した症例と推測される。また、ダグラス窩から子宮体部まで広汎に子宮内膜症病巣を認める症例は、病巣部位の広がりが広く、腹腔内に存在していた子宮腺筋症が子宮筋層に浸潤していった症例と解釈される。すなわち、偶発的に子宮筋層に進展しただけの子宮腺筋症

と、卵巣病変および腹膜病変なども含めた病変があり、子宮内膜症の発症が多臓器にわたっている中で子宮腺筋症が存在する症例では、原因となる子宮内膜症の病態が異なる可能性があると考えている。我々の経験した症例においても、子宮腺筋症単独で存在している症例は、病巣切除で臨床症状が改善する傾向があり、骨盤内に広く広がっている子宮内膜症患者の治療は病巣切除も完全切除が困難であること、および内膜症病巣の再発も起こりやすいことから、症状の再発が起こりやすい傾向がある。

## 2. 子宮腺筋症の治療目的

子宮内膜症の治療目的は、1) 月経困難症などの疼痛緩和、2) 妊孕能の改善（不妊症治療）、および3) 子宮内膜症再発の抑制である（表1）。子宮腺筋症においても同様の治療効果を目的とした治療が行われているが、子宮腺筋症だけを単独に解析した報告が稀であるため、治療方針の決定に際しての明確な基準が今のところない。

子宮腺筋症患者においては月経困難症が強度なことが多く、特に疼痛に関しては、子宮体部のみならずダグラス窩に著明圧痛点を認める場合が多い。子宮腺筋症が単独で発症している症例では子宮体部に限局した圧痛を特徴とするが、骨盤に広く広がった子宮内膜症を伴う子宮腺筋症はダグラス窩周囲の深部病変を伴い、ダグラス窩から直腸周囲にも病変が存在する。このような症例では、日常生活を障害するほどの月経困難症と慢性骨盤痛を生じる症例があり、臨床的には疼痛緩和が治療としては優先される。一方、子宮腺筋症と妊孕能に関しては議論がある。子宮腺筋症により精子の輸送が障害される可能性や、着床が障害される可能性は指摘されてはいるが、子宮腺筋症自体が不妊症と関連があるかどうかは現状では明確なevidenceはない。

表2 子宮腺筋症の治療法

1. 妊孕能温存の必要がない場合  
子宮全摘術+子宮内膜症病巣切除 (症例により卵巣摘出を行う)
2. 妊孕能の温存が必要な場合  
保存的治療：
  - ・ NSAIDs などの消炎鎮痛剤の使用
  - ・ GnRH 製剤, danazol などの子宮内膜症治療薬剤の使用
  - ・ IUD (プロゲステロン, danazol などの含まれているもの)
 外科的治療：
  - ・ endomyometrial ablation (子宮内よりの焼灼・温熱療法)
  - ・ electrocoagulation (腹腔鏡による電気焼灼)
  - ・ 子宮腺筋症切除術+子宮内膜症病巣切除術
 その他の治療法：
  - ・ 子宮動脈塞栓術
  - ・ aromatase inhibitor
  - ・ 抗エストロゲン剤 (SERMs), 抗プロゲステロン製剤 (SPEMs)

### 3. 子宮腺筋症の治療方法

子宮腺筋症の治療方法については表2にまとめられた。妊孕能温存の必要がない場合はもちろん子宮全摘術+子宮内膜症病巣切除術である。しかし、妊孕能の温存、すなわち、子宮および卵巣の温存が必要な場合は保存的な治療が優先される。

#### 1 薬剤による治療法

- ・ 一般的な薬剤 (NSAIDs, GnRH, danazol, ピル)

保存的な治療では、まず NSAIDs を使用するが、これでも疼痛がコントロールできない場合、現在の挙児希望の有無、年齢などを考慮して、GnRH 製剤の投与や danazol の投与を考慮する。これらの薬剤による治療方法 (GnRH, ピル, danazol) は、いずれも排卵を抑制して、エストロゲンの分泌を抑制することが治療の主体である。薬剤投与中に妊娠することはできないという欠点がある。また、いずれの治療も疼痛に対する治療効果としては大きな差はないとされているが、副作用の発現が異なり、対象となる患者の状

態により薬剤を選択することになる。NSAIDs による消化管潰瘍、danazol による肝機能障害と変声、GnRH による鬱症状の増悪などは注意が必要であり、既往歴や職業なども考慮して薬剤選択にあたる必要がある。また、ピルの投与は、月経量の減少、月経困難症の改善について、子宮内膜症患者や機能性月経困難症の患者に対して効果があることが報告されている。しかし、子宮腺筋症の患者においては、一時的に月経困難症が増悪することが多く、また、子宮腺筋症組織の腫大による子宮腫大が起こることもある。子宮腺筋症が主体の患者に対しては、ピルの投与が卵巣子宮内膜症や腹膜子宮内膜症を主体とする患者と異なった影響を及ぼす可能性があるため、注意が必要である。

#### ・ 薬剤塗布 IUD

ボンゾールの投与は肝機能障害などの副作用もあり、現在子宮内膜症に使用されることは少なくなってきたが、danazol を塗布した IUD やプロゲステロン類似薬剤が投与されている IUD の使用により子宮腺筋症による月経困難症が改善したとの報告もあり<sup>7)</sup>、局所投与については今後の多数例の検討を待ちたい。プロゲステロン製剤が塗布されている IUD (LNG-IUD) の使用報告



は限られているが、深部子宮内膜症の慢性骨盤痛が改善したという報告や、子宮腺筋症症例の子宮内膜切除後 (TCR) に LNG-IUD を使用した群では 90% の症例で月経困難症が改善し、LNG-IUD を使用していない群では 20% の症例しか疼痛改善をみなかったとの報告もされている。

#### ・その他の薬剤 (aromatase inhibitor など)

その他、現在候補とされている治療薬には、aromatase inhibitor がある。aromatase はチトクローム P450 に属する酵素であり、顆粒膜細胞、ライディッヒ細胞などに主として存在し、アンドロゲンを変換するステロイド代謝酵素である。存在場所は、胎盤、脂肪、乳腺、骨、脳、卵巣で発現している以外に、子宮内膜症や子宮筋腫を持つ患者の子宮内膜にも発現していることが確認されている。正所性子宮内膜に比して異所性子宮内膜において aromatase が発現し、局所のプロスタグランジン E<sub>2</sub> などにより誘導されて、局所のエストロゲン産生と子宮内膜症病変の維持に関与している可能性が示されている。今のところ、子宮内膜症および子宮腺筋症に対する aromatase inhibitor の大規模な study はないが、エストロゲン感受性のある乳癌に対する知見や、閉経後の難治性子宮内膜症病変に対する症例報告などから、aromatase inhibitor は子宮内膜症の治療薬として、今後が期待される薬剤である。

以上、子宮腺筋症を中心とした子宮内膜症に対する薬物療法について概観した。しかし、子宮内膜症患者に対する薬物療法は、すべての子宮内膜症患者をまとめて評価している報告が多く、今後、子宮腺筋症が主な病型である患者に対する薬剤治療も、他の病型の子宮内膜症患者と分離して再度検討する必要があると考えている。

## 2 外科的治療法

子宮腺筋症に対する根治術は子宮全摘術である。しかし、近年挙児希望の年長が上昇していることもあり、妊孕能の温存を考慮しながら子宮腺

筋症の治療にあたる必要な症例が増加してきている。子宮腺筋症に対する外科的治療および外科的治療に準じた治療で報告があるのは、子宮鏡による子宮内膜の焼灼術、子宮腺筋症切除術、および子宮動脈塞栓術 (UAE) である。子宮腺筋症の診断基準に子宮内膜の junctional zone の肥厚を取り入れている報告例も多数あり、子宮内膜側からの焼灼によって、疼痛および過多月経といった子宮腺筋症の臨床症状を緩和することをねらった治療方法が子宮鏡による焼灼術である。この方法によっても疼痛緩和と月経量の減少はあるようであるが、長期的な予後は明確でなく、また報告例も少ないのが現状である。

その他に、一般的ではないが、子宮腺筋症切除術も施行が試みられている (表 3)。子宮腺筋症切除術は、深部子宮内膜症に対する治療と同様な考え方に基づいて行われる治療方法である。子宮腺筋症切除術も長期予後は明確ではないが、術後の月経困難症の改善は認められ、特に、より完全に近く切除することができる症例においては疼痛の再発率も低い。また、妊孕能に関しては、より根治的な子宮内膜症病変切除を行うことで改善があるとの報告もあり<sup>9)</sup>、子宮腺筋症についても切除術により、疼痛および妊娠率が改善する可能性も指摘されている。一方、子宮腺筋症切除後の妊娠において子宮破裂の可能性が示唆され、妊娠中期の子宮破裂報告例もあり注意が必要である。子宮腺筋症切除術を行う際には、妊娠した際に妊娠中期における子宮破裂のリスクに関して考慮する必要がある。

以上に述べてきたような背景をもとに、我々は表 4 に示すような症例に対して子宮腺筋症切除術を施行している。まず、子宮温存の希望がある症例が原則である。疼痛に関しては、強度の月経困難症、性交時痛、慢性骨盤痛などがあり、NSAIDs などの消炎鎮痛剤を投与しても日常生活を障害するような症例である。また、難治性の不妊症症例で強度の月経困難症を伴う子宮腺筋症を持つ症例に対しては、十分なインフォームドコ



表3 子宮腺筋症切除術 (術式による特徴)

- ・開腹手術  
触診による病巣部位が確認しやすい。  
縫合が確実にできる。
- ・腹腔鏡下手術  
ダグラス窩の視野が良いため、併発した子宮内膜症病巣の治療が行いやすい。  
縫合・結紮に技術を要する。  
触覚による確認がしにくい。
- ・腹腔鏡補助下 (小開腹)  
開腹手術と腹腔鏡下手術の両者のメリットを生かすことができる。  
触診による確認と、確実な縫合結紮ができる。  
手術時間が延長する。

表4 子宮腺筋症切除術の適応

1. 子宮温存の希望がある。
2. 保存的治療 (NSAIDs, GnRH など) を行っても、激しい疼痛 (月経困難症・性交時痛・慢性骨盤痛) が改善しない場合。
3. 通常の不妊症治療、および体外受精を数回施行しても妊娠に至らない症例で、超音波検査、MRI、および臨床所見から子宮腺筋症と診断された場合 (難治性不妊症)。

ンセントを行った上で子宮腺筋症切除術を試みる  
ことがある。しかし、月経困難症を伴わない挙児  
希望症例に対しては、子宮腺筋症切除術が子宮破  
裂のリスクを抱えることとなるため、現状では積  
極的な施行は勧められない。

腺筋症切除が可能かどうかの判断においては、  
MRI による診断がもっとも重要である。MRI の  
画像によって子宮腺筋症の範囲を診断し、比較的  
限局している症例にのみ子宮腺筋症切除術を施行  
している。

#### 4. 子宮腺筋症切除術の術式 (腹腔鏡補助下, 腹腔鏡下)

子宮腺筋症切除術には、従来の開腹手術、小開  
腹を伴った腹腔鏡補助下の手術、および腹腔鏡下  
手術に分けられる。我々の施設では、以上のどの  
術式も施行しているが、ここでは腹腔鏡補助下子  
宮腺筋症切除術および腹腔鏡下子宮腺筋症切除術

について述べる。

##### 1 腹腔鏡補助下子宮腺筋症切除術

この術式はいわゆる腹腔鏡補助下子宮筋腫核出  
術と同様な術式である。腹腔鏡下に骨盤腔内を観  
察し、特にダグラス窩および両側卵巢周囲の病巣  
切除を行う。次に子宮腺筋症の病巣切除を腹腔鏡  
下あるいは小切開の創部から行い、触診による病  
巣部位の確認を行い、十分に病巣部位が摘出され  
ていることを確認した上で縫合を行う。手術時間  
が延長するが、腹腔鏡によるダグラス窩の視野の  
良さと、開腹手術による触覚による確認、縫合結  
紮のやりやすさなどの利点がある。子宮腺筋症の  
病巣部位が5~8 cm 以上の症例や、MRI 上腺筋  
症の範囲が限定しにくい症例の場合にこの術式を  
施行している。

##### 2 腹腔鏡下子宮腺筋症切除術

この術式は腹腔鏡下子宮筋腫核出術と同様な  
術式であり、術式に関していくつかの報告があ  
る<sup>9,10)</sup>。しかし、子宮筋腫と異なり、病巣部位と  
正常筋層が認識しにくいのが子宮腺筋症切除術を

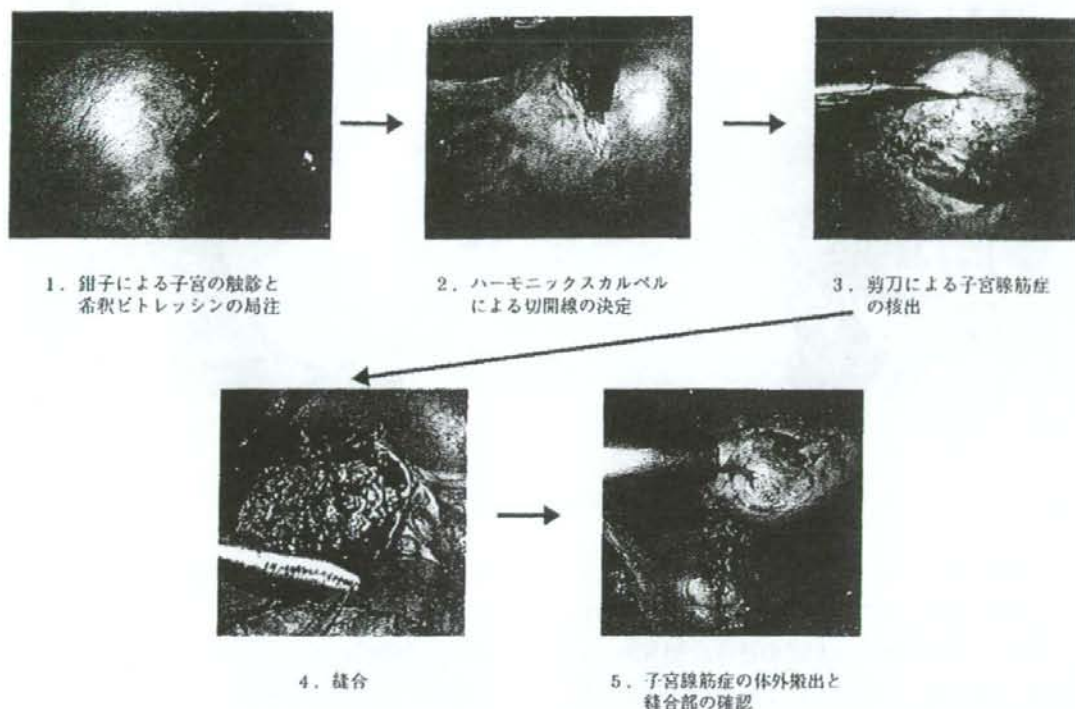


図1 腹腔鏡下子宮腺筋症核出術

困難なものにしている。腺筋症の病巣と正常筋層が明確な症例においては比較的容易に核出することができる。子宮の漿膜面を詳細に観察し、漿膜面まで内膜症病巣が明らかにある場合は楔状切除を行い、また、漿膜面が正常所見である時は漿膜を残すようにして、いわゆる子宮筋腫核出術と同様な術式で行っている。子宮腺筋症の病巣が5~8cm程度以下であり、またMRIにおいて、子宮腺筋症と正常筋層の境界部分が比較的わかりやすい症例に施行している。図1に術式を示した。また、図2は同一症例の術前・術後のMRI画像である。この症例では比較的子宮腺筋症と正常子宮筋層の境界が明確であり、腹腔鏡下に切除術を施行している。術中の切除範囲決定には、MRI画像による病巣部位の確認と鉗子による子宮体部の触診を行うことが必要である。触覚に関して腹腔鏡補助下および開腹手術に劣るが、習熟により鉗子による触覚と、筋層の所見から病巣部位と正常筋層の境界部位を見極めることは可能である。

しかし、縫合操作に習熟することが必須であり、また、実際に手術を施行している時に病巣部位と正常筋層の境界がわかりにくい時には、病巣をなるべく残存させないために、腹腔鏡補助下子宮腺筋症切除術に移行することも考慮すべきであると考えている。

## 5. 子宮腺筋症切除術の予後

図2に示した症例においては、術前に認められた子宮後壁の子宮腺筋症病巣はほぼ消失し、VASによる疼痛評価において、術前90から術後25までに減少した。術後2年間で月経時の疼痛は術後から変化はない症例である。子宮腺筋症の病巣切除術を行った12症例では、いずれも術後1年間はVASによる評価では疼痛の改善が認められている。しかし、病巣部位が卵巣動脈に近い



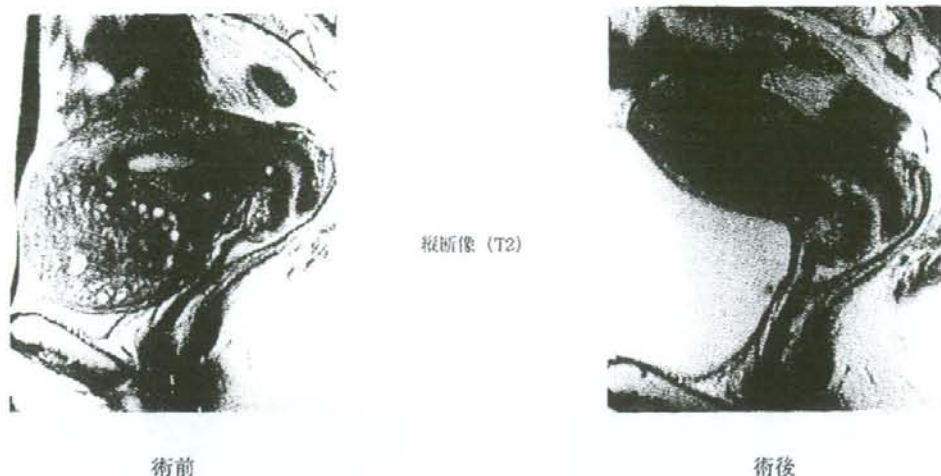


図2 子宮腺筋症切除術前後のMRI所見

などの理由から完全切除となっていないと考えられる症例は疼痛の再発が1年以内で生じた。症例によっては術後疼痛や違和感の残る症例もあり、このような症例においては、子宮腺筋症病巣の残存や、子宮腺筋症以外の原因による骨盤痛が発症している可能性も考えられた。また、子宮腺筋症が子宮全体に及ぶような症例もあり、この症例に対しては、子宮表面をバイポーラーで焼灼することのみを行ったが、これだけの治療においても約1年間は疼痛緩和が得られた。

子宮腺筋症切除術の術後妊孕性に関しては評価が困難であるが、長期の不妊症で、かつ子宮腺筋症を持つ患者にも腹腔鏡下および腹腔鏡補助下子宮腺筋症切除術を施行し、その術後の不妊症治療で妊娠した3症例がある。これらの症例は予定帝王切開で分娩となった。2症例においては、妊娠期間および帝王切開においても異常は認められなかったが、1症例において妊娠28週での子宮破裂となっている。疼痛治療を目的として子宮温存を図る場合は、今後の症例検討が必要であるが、子宮腺筋症切除術の術後における子宮破裂のリスクについて説明しておく必要があると考えている。他施設の子宮腺筋症術後の症例報告や、文献的報告による子宮筋腫核出術の術後妊娠においても子宮破裂症例も報告されているので、妊娠期間

は注意して経過観察を行う必要がある。過去の報告でも子宮腺筋症の切除により疼痛緩和が約50%以上の患者に認められたとされている<sup>10)</sup>ものもあるが、報告例はわずかである。また、子宮腺筋症の切除術後の子宮形成方法に関してはいくつかの報告があるが、長田および武内らの報告にあるように、漿膜面を残して折り重ねるような方法<sup>11)12)</sup>により、残存子宮の強度を維持できる可能性があり、疼痛緩和のみならず、妊娠予後・妊娠期間の合併症については今後の検討が必要である。

## ま と め

子宮腺筋症は子宮内膜症の一つの病型であるというばかりでなく、臨床的には強度の月経困難症を伴う場合が多い。挙児希望があるため子宮の温存を希望される症例に対しては、子宮内膜症に対する治療に準じて治療を行うものの、治療法の選択にいわゆる evidence のないものが含まれてくるため、治療法の決定に際して悩まされることが多い。MRIが画像診断として普及する以前は、子宮腺筋症であると確実に診断することが困難で