

2) 精巣上体・精巣内精子回収法

新潟大学医学部産婦人科学教室 山本 泰明・長谷川 功
 鈴木 美奈・村川 晴生
 本多 晃・八幡 哲郎
 倉林 工・田中 憲一

Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration and Testicular Sperm Extraction

Yasuaki YAMAMOTO, Isao HASEGAWA, Mina SUZUKI
 Haruo MURAKAWA, Akira HONDA, Tetsuro YAHATA
 Takumi KURABAYASHI and Kenichi TANAKA

*Department of Obstetrics and Gynecology
 Niigata University School of Medicine*

Azoospermia is common in the infertile male population. In Niigata University, department of obstetrics and gynecology, 28 couples suffering from infertility because of azoospermia from 1995. 5 - 1997. 5. Azoospermia is caused either by spermatogenic arrest or by obstruction of the genital tract. Microsurgical epididymal sperm aspiration, testicular sperm extraction were performed in the husbands, followed by intracytoplasmic sperm injection of oocytes recovered from wives. Cleaving embryos were transferred to the uterine cavity 48 hours after the intracytoplasmic sperm injection procedure. A sperm retrieval rate was 71.4 %, a fertilization rate of 50.9 % was achieved after intracytoplasmic sperm injection. On 19 occasions, embryos were transferred and five patients became pregnant, an overall pregnancy rate of 25.0 % per transfer. This study shows the combined microsurgical sperm extraction-intracytoplasmic sperm injection procedure to be highly efficient in achieving fertilization in vitro, even after recovery of grossly impaired epididymal and testicular sperm.

Key words: Infertility, Azoospermia, Intracytoplasmic sperm injection, epididymal sperm, testicular sperm
 不妊症, 無精子症, 卵細胞質内精子注入法, 精巣上体精子, 精巣精子

Reprint requests to: Yasuaki Yamamoto, M.D. 別刷請求先: 〒951-8520 新潟市旭町通1-757
 Department of Obstetrics and Gynecology, 新潟大学医学部産科婦人科学教室 山本 泰明
 Niigata University School of Medicine,
 1-757, Asahimachi-dori, Niigata City,
 Niigata 951-8520, Japan.

はじめに

1978年、Edward & Steptoe が体外受精・胚移植 (IVF・ET: In vitro fertilization-Embryo transfer) による世界で最初の出産例を報告して以来、IVF・ET を中心とした ART (Assisted reproductive technology) が不妊症治療の主役となってきた。こうしたなか重症乏精子症など通常の IVF で受精卵が得られない症例が難治例として蓄積されてきた。これに対する治療として、顕微鏡下配偶子操作により受精させる顕微授精法 (microfertilization) が臨床応用され、1992年、Palermo らがヒトで卵細胞質内精子注入法 (ICSI: Intracytoplasmic sperm injection) による出産例を報告¹⁾し、重症男性不妊症患者に対する治療成績が向上してきた。新潟大学産科婦人科でも1995年5月に新潟大学医学部倫理委員会にて ICSI の臨床応用が許可されてから、重症男性不妊症症例に対し ICSI を行い妊娠・分娩例を報告してきた。さらに射出精液中に全く精子を認めない無精子症の患者に対し、婦人科で精巣上体あるいは精巣内から精子を回収し ICSI を行い妊娠例が得られた。当科で行っている精巣上体穿刺による精子回収法 (MESA: Microsurgical epididymal sperm aspiration)、精巣精細管からの精子回収法 (TESE: testicular sperm extraction) について述べ、その有用性と問題点について検討した。

対 象

1995年5月より1997年5月の間に挙児希望で新潟大学医学部附属病院産科婦人科を受診した夫婦のうち、複数回の精液検査で無精子症と診断された男性28例を対象とした。無精子症は大きく閉塞性無精子症と非閉塞性無精子症に分けられるが、閉塞性無精子症では精路の閉塞もしくは先天欠損により射出精子が得られないと診断され精巣上体もしくは精巣内から精子回収できる可能性が高いと考えられるが、非閉塞性無精子症は造精機能障害が主であり精子回収は困難な例が多い。症例の内訳を表1に示した。現在、当科では精子回収は婦人科医が行っており、MESA/TESE の実施日に合わせ、妻に対しても過排卵誘発を行い夫の手術同日に IVF・ET の採卵を行い、精子回収可能例には ICSI を施行した。ICSI の終了した卵子は18時間で培養後、前核の有無で受精を判定、48時間後に経子宮頸管法で胚移植し、採卵後18日目に妊娠判定を行った。

方 法

(1) 精子回収用ガラス製マイクロピペットの作製
マイクロピペット用ガラス管を超純水で10回洗浄し乾燥滅菌した後、プラーで加熱伸展させ先端を細く鋭利に牽引する。マイクロピペット先端外径 50 μ m のところで切断、先端角30度になるように鋭利に研磨し、硫酸、25%フッ化水素、超純水、100%アルコールで洗浄しておく。

(2) 精巣上体精子回収法: MESA

全身麻酔下、陰嚢に正中切開を加え精巣上体を露出、直視下に怒張した精巣上体を作成したガラス製マイクロピペットで穿刺、精子の回収を行った。

回収した精子は10%血清添加 modified HTF 内で培養し運動精子を確認する。回収できた場合には精子採取同日に ICSI を行い、余剰精子は凍結保存した。

(3) 精巣精子回収法: TESE

MESA で運動精子が回収できなかった場合は精巣白膜に4箇所、約5mmの小切開を加え実質が膨隆突出してきたところを切り取り、一部は組織標本とし、多くは実体顕微鏡下に 27G 注射針を用い精細管を伸展させ組織を細切、さらに2枚のスライドグラスですりつぶした後、培養し運動精子を回収した。運動精子が回収できない場合には不動精子を用いて ICSI を行った。

(4) 卵細胞質内精子注入法: ICSI

卵子は採卵し4~8時間の前培養を行った後、0.1%ヒアルロニダーゼ処理を1分間行い、マイクロピペットによる吸引で卵丘細胞を除去し裸化卵子とし、10%患者血清 HTF 培養液で洗浄、培養しておく。卵子は10%患者血清添加 HTF 培養液 30 μ l のマイクロドロップレット中に、精子は7.5% PVP30 μ l のドロップレット中に置き、全体をミネラルオイルで覆っておく。卵子は極体が12時もしくは6時になるように左側からホールディング・ピペットで吸引・保持した後、インジェクション・ピペット内に精子を一個吸引、ゆっくりインジェクション・ピペットを卵細胞質内に刺入、細胞質吸引により活性化を計ってから緩徐に精子のみを注入した。

(5) 体外受精・胚移植

ICSI 処理の終了した卵子は10%患者血清 HTF 内に移し37 $^{\circ}$ C、O₂ 5%、CO₂ 5%の環境で培養した。受精の確認は通常の体外受精・胚移植と同様に採卵後約18時間で判定、胚移植は48時間後に胚の grading を行ったあと経子宮頸管法で ET カテーテルを用い最大3個移植した。その後は黄体支持をプロゲステロン 100mg

表1 無精子症例原因別内訳

鼠径ヘルニア術後	5例
先天性精管欠損	2例
精巣上体発育不全	1例
精巣上体炎後閉塞	1例
原因不明閉塞	6例
停留精巣術後	1例
原因不明造精能障害	12例
無精子症男性	28例

連日で行い、採卵後18日目に尿中HCG定性検査、さらに胎嚢が確認されたものを妊娠と判定した。

結 果

無精子症と診断された28例中20例(71.4%)で精子回収が可能であり、閉塞性16例中14例(87.5%)、造精機能低下と考えられた非閉塞性12例中6例(50.0%)で運動精子回収が可能だった(表2)。

無精子症例の精巣組織診断は normal spermatogenesis 28%, hypospermatogenesis 40%, spermatogenic arrest 11%, aspermatogenesis 21%だった。精巣組織所見と精子回収の関係では normal spermatogenesis 症例では全例で精子回収でき、hypospermatogenesis で73%, arrest で33.3%, aspermatogenesis でも50%で精子回収が可能だった。

術前のFSH27.4と高値を示し、精巣容量5ml、生検でsertoli cell only syndromeと診断され高度造精機能障害と考えられた症例で、TESEの病理組織がSertoli cell only syndromeと再び診断されたが精子回収の可能だった症例を経験した。

精子回収可能群ではLH 5.0±3.0 mlU/ml, FSH 7.5±3.5 mlU/ml, テストステロン 390±74.2, 回収不能群ではLH 7.7±5.4 mlU/ml, FSH 18.6±9.9 mlU/ml, テストステロン 378±136であり、回収不能群で有意にFSHが高い結果だった(P<0.01)(表3)。

FSH値と精巣容量はほぼ逆相関しFSHが上昇するほど造精障害があり精子回収不良と考えられた(図1)。

運動精子が得られた全例で新鮮精子を用い受精卵が得られ受精率は50.9%であり、凍結精子でも全例に受精卵が得られたが受精率41.7%とやや低率だった。ICSIを施行した20例中5例(25.0%)に臨床的妊娠が見られた。

表2 術前診断と精子回収率

術前診断	症例数	精子回収(回収率)
閉塞性	16例	14例(87.5%)
非閉塞性	12例	6例(50.0%)
計	28例	20例(71.4%)

表3 精子回収とホルモン値・精巣容量

	精子回収可能(N=20)	回収不能(N=8)	P
FSH	7.47±3.45	18.6±9.96	<0.01
LH	5.00±3.01	7.71±5.35	N.S
Test	399±74.2	378±136	N.S
容量	17.2±4.66	10.1±4.08	<0.01

考 察

ICSIは1992年にPalermoら¹⁾によって初の成功例が報告され本邦でも1994年1月に分娩例が報告²⁾された。治療法としてICSIが確立されたことにより、理論的には1個の精子が存在すれば受精卵を得られ妊娠のチャンスがあることになった。精液中に精子が存在しない場合でも、このMESA/TESEにより精子が得られる可能性がありMESA/TESEは無精子症治療に有効な方法³⁾⁴⁾と考えられる。精巣生検で高度造精機能障害と考えられた症例やFSHの上昇の見られる症例でも精子回収できる場合があり、精巣精子の存在も難しいと術前予想される症例でもMESA/TESEを試みてみる価値が十分あると考えられる。

一方、MESA/TESEを行っても精子を1個も得ることができない場合があり、現在のところ日本産婦人科学会、日本不妊学会のガイドラインに従えば非配偶者間人工授精(Artificial Insemination with Donor)によってしか生児を得ることはできない。しかし、理論的には精子以前の未熟精子細胞(円形精子細胞: round spermtid)を用いて生児を得ることが可能であり、海外ではspermtidを用いて健児を得た報告⁵⁾もされている。現在日本では倫理面、ヒトでの安全性の確立がなされていないことから時期尚早とし臨床応用は認められていない。今後、安全に臨床応用が可能か判断できるよう基礎的な検討を重ねていく必要があると思われる。顕微授精についても卵子の活性化の問題、質に関する問題など課題も多いと思われる。

体外受精・胚移植、顕微授精、ICSIと不妊症の治療

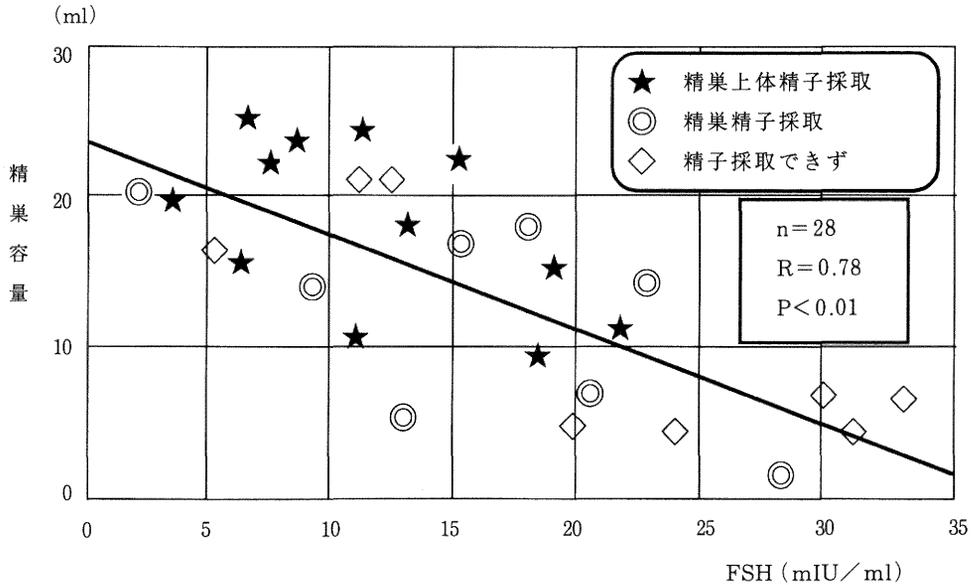


図1 FSH-精巣容量と精子回収

方法は拡大しているが様々な問題を含んでおり未だ最適な方法とは言えず、医療費の問題や、周産期医療に関しても多胎・早産・未熟児出生といった問題を抱えており、不妊患者の希望だからと言って単に妊娠を目指して治療をどんどん進めていくことは慎重にしなければならないと思われる。

参考文献

- 1) Palermo, G., et al: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.*, **340**: 17, 1992.
- 2) 柳田 薫, 他: ヒト卵細胞質内精子注入法による顕微授精の成績 *日産婦誌*, **46**: 605~606, 1994.
- 3) Schoysman, R., et al: Pregnancy obtained with human testicular spermatozoa in an in vitro fertilization program. *Lancet.*, **342**: 1237, 1993.
- 4) Silber, S.J., et al: High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testis biopsy. *Human reproduction*, **10**: 148~152, 1995.
- 5) Tesarik, J., et al: spermatid injection into human oocytes, clinical application in the treatment of infertility due to nonobstructive azoospermia. *Hum Rep.*, **11**: 780~783, 1996.

司会 ありがとうございます。質問ございますでしょうか。受精卵は何個ぐらい戻しておられるのですか。

山本 当科では最大で3個にしていますし、卵細胞質内精子注入法でも通常の媒精による体外受精・胚移植でも3個に限っております。