

Title	Restoration of Spermatogenesis and Fertility in Azoospermic Mutant Mice by Suppression and Re-elevation of Testosterone Followed by Intracytoplasmic Sperm Injection
Author(s)	東田, 章
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43201">https://hdl.handle.net/11094/43201</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	とう だ ち 東 田 章
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 6 6 5 0 号
学位授与年月日	平成 14 年 1 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	Restoration of Spermatogenesis and Fertility in Azoospermic Mutant Mice by Suppression and Re-elevation of Testosterone Followed by Intracytoplasmic Sperm Injection (無精子症を呈する変異マウスにおけるテストステロン抑制、再上昇および卵細胞質内精子注入による精子形成、妊孕性の回復)
論文審査委員	(主査) 教授 奥山 明彦  (副査) 教授 西宗 義武 教授 村田 雄二

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

補助生殖技術の進歩に伴い多くの男性不妊患者において産子が得られるようになり、近年では精巣内精子を用いた顕微授精により射出精子の得られない無精子症患者においても産子が得られている。しかし、現状では臨床的にこれらの補助生殖技術を応用するには少なくとも精巣内に精子細胞以上の分化細胞が必要であり、精子細胞までの分化が得られない症例に対しての治療法は確立されていない。我々は精細胞分化が精祖細胞で停止し、精巣内テストステロン濃度 (ITT) が上昇している juvenile spermatogonial depletion (*jsd*) mouse (以下 *jsd* マウス) に対し GnRH アンタゴニスト投与してテストステロンを抑制することにより精母細胞までの分化を誘導し得ることを以前に報告したが、GnRH アンタゴニストの投与のみでは精子細胞は得られなかった。一方、正常のマウスにおいても GnRH アンタゴニストの投与により精子細胞のアポトーシスが生じ精細管内から精子細胞、精子が消失することが知られている。本研究では *jsd* マウスに対し GnRH アンタゴニストを投与した後に投与を中止することにより、精母細胞から精子細胞までの分化を誘導し、得られた精子細胞を用いた顕微授精を行い妊孕性を回復させることを目的とした。また、GnRH アンタゴニスト中止による精母細胞から精子細胞への分化がテストステロンの再上昇によるものであることを確認することを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

##### 1. GnRH アンタゴニスト中止による変化の検討

生後 8 週齢のオス *jsd* マウスに対し、GnRH アンタゴニストの Nal-Glu を浸透圧ポンプを用いて 2500  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の割合で 4 週間投与した後に Nal-Glu の投与を中止し、中止後 2、4、8 週で各群 5 匹ずつ血清 LH、FSH、テストステロンおよび精巣内テストステロン濃度を RIA により測定した。組織学的評価としては、精巣をブアン固定、パラフィン包埋し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。各切片について精細管数を調べ、そのうち 2 つ以上の精母細胞、精子細胞を含む精細管の割合を百分率で評価し、各群の平均、標準誤差を算出した。Nal-Glu 投与を継続した *jsd* マウスおよび無治療の *jsd* マウスを対照とし、各 time point で ANOVA、Fisher の PLSD test を用い統計学的に検討した。

結果としては、血清 LH、FSH、テストステロンおよび ITT 濃度は Nal-Glu 投与中止により速やかに上昇した。Nal-Glu 中止 2 週後には精細管内には精母細胞と精子細胞が見られ、精母細胞は、その後急速に減少した。精子細胞

は Nal-Glu 中止 4 週後に最も多くなり、中でも elongated spermatid の割合が増加した。8 週目には、精母細胞、精子細胞ともにほぼ消失した。

## 2. テストステロン補充による減数分裂の誘導

Nal-Glu 中止による減数分裂の誘導が、テストステロンの再上昇によるものであることを確認するために、実験 1 と同様に生後 8 週齢の *jsd* マウスに対し Nal-Glu を 4 週間投与した後、Nal-Glu は継続しつつ同時にテストステロンペレット (15mg/60days) を皮下に投与した。2 週間後に内分泌学的、組織学的に検討した。

結果としてテストステロン補充により、血清テストステロン、ITT は上昇し、組織学的にも、精子細胞を認めた。

## 3. テストステロン抑制、再上昇で誘導された精子細胞を用いた顕微授精

次に、生後 8 週齢の *jsd* マウスに対し Nal-Glu を 4 週間投与した後、Nal-Glu を中止し、4 週間後に精巣を摘出し、顕微鏡下に精巣より精子細胞を抽出した。一方、ヒト絨毛ゴナドトロピンおよび妊馬血清ゴナドトロピンを投与したメス B6D2F1 マウスから卵細胞を抽出した。ピエゾインジェクターを用いて顕微鏡下に 94 の精子細胞を卵細胞内に注入し、KSOM メディウムで 24 時間培養した後、2-cell stage まで至った卵細胞を偽妊娠メス ICR マウスの卵管に移植した。その結果、表現型正常の 8 匹の産仔を得た。

### 【総括】

精細胞分化が精祖細胞で停止する男性不妊ミュータントである *jsd* マウスにおいて GnRH アンタゴニストを投与した後に投与を中止することにより、精子細胞までの分化を誘導しえた。また、GnRH アンタゴニストを投与後にテストステロンを補充することによっても同様の効果が得られ、精祖細胞から精子細胞へはテストステロン値が低くても分化が起こるが、精母細胞から精子細胞への分化にはテストステロンが必要であることが確認された。さらに、テストステロン抑制、再上昇により誘導された精子細胞を用い顕微授精を行うことにより産仔を得た。テストステロン抑制療法が、男性不妊症の治療の一つの選択肢となりうる可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

男性不妊症に対する治療として顕微授精などの補助生殖技術が行われているが、そのためには、少なくとも精子細胞以上に分化した精細胞が存在することが必要であり、それ以前の段階で精細胞分化が停止している症例に対しては現時点では有効な治療法がない。東田らの研究では、精細胞分化が未分化な精祖細胞で停止している不妊モデルマウスの *jsd* マウスに対し、GnRH antagonist を投与し、テストステロンを抑制することで精母細胞までの分化を誘導した上で、GnRH antagonist を中断し、テストステロンの再上昇を図ることにより精子細胞 (elongated spermatid) までの分化を誘導した。さらに、このようにして得られた精子細胞を精巣より抽出し、顕微授精を行うことにより産仔を得ることに成功した。遺伝的要因による男性不妊モデルにおいてこのような方法で産仔を得た報告は他に類がなく、将来的には、ヒト不妊症の治療に対する臨床応用も期待される。また、この研究は精子形成の過程において、その分化の段階によりテストステロンの意義が異なることを示唆している。

以上、この研究は学位の授与に値すると考えられる。