

学位論文の要旨

Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on
embryo development after intracytoplasmic sperm injection

(顕微授精後の胚発育における精液中活性酸素の早期および後期父性効果)

February, 2021

(2021 年 2 月)

Shinnosuke Kuroda

黒田 晋之介

Departement of Urology

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学大学院医学研究科 泌尿器科学

(Research Supervisor: Yasushi Yumura, Associate Professor)

横浜市立大学附属市民総合医療センター生殖医療センター

(研究指導教員：湯村 寧 准教授)

(Doctoral Supervisor: Masahiro Yao, Professor)

指導教員：矢尾 正祐 教授

学位論文の要旨

Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on embryo development after intracytoplasmic sperm injection

(顕微授精後の胚発育における精液中活性酸素の早期および後期父性効果)

<https://doi.org/10.1080/19396368.2020.1720865>

1. 序論

平成 27 年度の厚生労働省調査研究（湯村, 2016）によれば, 現在我が国の生殖可能年齢カップルの 6 組に 1 組が不妊症であり, そのカップルの約半数に男性不妊症が認められる. その最多の原因が造精機能障害(82.4%)であるが, その約 50%が特発性つまり原因不明である. そのような中で, 酸化ストレスと男性不妊症の関連が近年注目されており, 病態としてのエビデンスが蓄積されつつある. 活性酸素(Reactive oxygen species: ROS)は H_2O_2 やフリーラジカルなどの総称であるが, 精液中 ROS は 1987 年 Aitken らによって化学発光量測定法を用いて同定された (Aitken et al., 1987). 低濃度の ROS は精子のアクロソーム反応, 超活性化, capacitation, 卵との融合といった受精過程に必須であることが知られているが, 高濃度の ROS は酸化ストレスを生じさせ, 精子細胞膜の脂質過酸化などを引き起こし精子の運動率や受精率を低下させると考えられている (Agarwal et al., 2003). 竹島らは精液中のパラメータと精液中 ROS の間に有意な負の相関を認めたことを報告している (Takeshima et al., 2017). また湯村らの報告では (Yumura et al., 2009), 不妊症カップルにおいて自然妊娠群と非妊娠群で精液中 ROS を比較すると非妊娠群の男性で有意に精液中 ROS が高いということが示された. 一方で高濃度の精液中 ROS は精子 DNA 断片化にも関与し, 生殖補助医療技術(Assisted reproductive technology: ART)においても受精率や妊娠率に悪影響を与えることが報告されている (Sukcharoen et al., 1996; Zorn et al., 2003). しかし胚発育に関連したデータは乏しく, とくに詳細な胚発育ステージにおける精液中 ROS の影響は報告されていない. そこで今回我々は顕微授精(Intracytoplasmic injection: ICSI)における受精および胚発育と, 精液中 ROS との関係性を実証すべく検討を行った.

2. 対象と方法

2013 年 3 月～2016 年 12 月に横浜市大附属市民総合医療センター生殖医療センターにて ICSI を行い同意が得られたカップルのうち, 女性が 43 歳未満, MII 卵が 1 個以上獲得できた 77 組, 161 サイクルより採取された卵 887 個を対象とした. ROS 値測定には採卵以前に採取された精液の中で直近のものをを用いた. 測定器は monolight 3010™を使用し, 0.5 μ L の

原精液に 100mM ルミノール 40 μ L を添加して 200 秒間化学発光を測定し積分したものを ROS 総量とした。対象の卵において, 1)受精群と非受精群での ROS 値の比較, 2)受精した胚のうち, Day3 における良好胚到達群と非到達群での ROS 値の比較, 3)受精した胚のうち初期胚移植を行った ICSI サイクル由来の胚を除き, Day5 における良好胚盤胞到達群と非到達群での ROS 値の比較を行った。また Receiver operating characteristic 曲線より Day3 の良好胚到達, Day5 の良好胚盤胞到達を予測する ROS 値を検討した。

3. 結果

受精率は 65.4%であり, 受精群と非受精群で ROS 値に有意な差は認められなかった(54204 ± 7454 Relative Light Units: RLU vs 52018 ± 9052 RLU, $P=0.858$)。Day3 における非良好胚到達群において ROS 値は有意に良好胚到達群よりも高く (35645 ± 6934 RLU vs 81451 ± 45234 RLU, $P=0.0026$) , Day5 における非良好胚盤胞到達群において有意に良好胚盤胞到達群よりも高かった (27916 ± 16336 RLU vs 81780 ± 14498 RLU, $P=0.015$)。良好胚到達, 良好胚盤胞到達予測の ROS カットオフ値はそれぞれ 6601 RLU, 4926 RLU であった。カットオフ値を用いた高 ROS 群と低 ROS 群と比較すると, 有意に良好胚到達率, 良好胚盤胞到達率は低 ROS 群で高かった (51.5% vs 63.8% , $P=0.004$; 11.2% vs 24.8% , $P=0.001$)。

4. 考察

結果より, 受精・非受精群間には精液ROS値に有意な差はなく, Day3初期胚およびDay5胚盤胞においてはそれぞれ良好到達群よりも非到達群で有意に精液中のROS値が高かった。このことから胚発育の初期および後期において精液ROSは悪影響を与えていると考えられた。胚発育において, 精子DNAの損傷のような精子由来, すなわち父性効果の影響は初期胚から胚盤胞形成といった後期過程に影響を及ぼすと考えられていた(Tesarik et al., 2004)。しかし近年ではDNA 損傷は胚発育前期にも同様に影響する可能性が報告されている(Simon et al., 2014)。精液中ROSの胚発育における詳細なステージへの影響についての既存の報告は我々が調べたかぎりみられないが, 高濃度ROSは精子DNAの損傷を誘導することから, 結果的に早期および後期の胚発育に悪影響を与えていると考えられた。また良好初期胚到達と胚盤胞到達では予測ROS値が異なり, カットオフ値は良好初期胚到達の方が高かった。このことから初期胚から良好胚盤胞まで到達するためには, より精液ROSが低い条件であることが必要と考えられた。

本研究結果から高い精液中 ROS は ICSI における胚発育の初期および後期において悪影響を与えていると考えられた。また得られた所見から ICSI の胚発育予測因子として ROS 値が有用である可能性が示唆された。

引用文献

Agarwal, A., Saleh, R.A., and Bedaiwy, M.A. (2003), Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79(4), 829–843.

Aitken, R.J., and Clarkson, J.S. (1987), Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*, 81(2), 459–469.

Simon, L., Murphy, K., Shamsi, M.B., Liu, L., Emery, B., Aston, K.I., Hotaling, J., and Carrell D.T.(2014), Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. *Hum Reprod*, 29(11), 2402–12.

Sukcharoen, N., Keith, J., Irvine, D.S., and Aitken R.J. (1996), Prediction of the in-vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of the delay between testing and IVF. *Hum Reprod*, 11(5), 1030–1034.

Takeshima, T., Yumura, Y., Yasuda, K., Sanjo, H., Kuroda, S., Yamanaka, H., and Iwasaki, A. (2017), Inverse correlation between reactive oxygen species in unwashed semen and sperm motion parameters as measured by a computer-assisted semen analyzer. *Asian J Androl*, 19(3), 350–354.

Tesarik, J., Greco, E., Mendoza, C. (2004), Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, 19(3), 611–5.

湯村 寧(2016). 厚生労働省子ども・子育て支援推進調査研究事業 我が国における男性不妊に対する 検査・治療に関する調査研究 平成 27 年度総括・分担研究報告書, available at: <http://www.j-andrology.org/news/web2017118.pdf>

Yumura, Y., Iwasaki, A., Saito, K., Ogawa, T., and Hirokawa, M. (2009), Effect of reactive oxygen species in semen on the pregnancy of infertile couples. *Int J Urol*, 16(2), 202–207.

Zorn, B., Vidmar, G., and Meden-Vrtovec, H. (2003), Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Int J Androl*, 26 (5), 279–285.

論文目録

I 主論文

Early and late paternal effects of reactive oxygen species in semen on embryo development after intracytoplasmic sperm injection

Kuroda S., Takeshima T., Takeshima K., Usui K., Yasuda K., Sanjo H., Kawahara T., Uemura H., Murase M., Yumura Y.:

雑誌名 : Systems Biology in Reproductive Medicine Vol.66, No.2, Page 122-128. 発行年 2020 年

II 副論文

Negative correlation between presence of reactive oxygen species and Sperm Motility Index in whole semen samples of infertile males

Kuroda S., Yumura Y., Mori K., Yasuda K., Takeshima T., Kawahara T., Miyoshi Y., Uemura H., Iwasaki A., Takashima K., Ikeda M., Kondo Y.:

雑誌名 : Revista Internacional de Andrologia Vol.15, No.3, Page 84-89. 発行年 2018 年

III 参考論文

(英文、自著および共著)

1. Cancer Chemotherapy and Chemiluminescence Detection of Reactive Oxygen Species in Human Semen.

Takeshima T., Kuroda S., Yumura Y.:

Antioxidants (Basel). Vol.8, No.10, pii: E449. 発行年 2019 年

2. Oxidative stress marker 8-hydroxyguanosine is more highly expressed in prostate cancer than in benign prostatic hyperplasia.

Ohtake S., Kawahara T., Ishiguro Y., Takeshima T., Kuroda S., Izumi K., Miyamoto H., Uemura H.:

Mol Clin Oncol. Vol.9, No.3, Page 302-304. 発行年 2018 年

3. Effect of density gradient centrifugation on reactive oxygen species in human semen.

Takeshima T., Yumura Y., Kuroda S., Kawahara T., Uemura H., Iwasaki A.:

Syst Biol Reprod Med. Vol.63, No.3, Page 192-198. 発行年 2017 年

4. Reactive oxygen species measured in the unprocessed semen samples of 715 infertile patients.

Yumura Y., Takeshima T., Kawahara T., Sanjo H., Kuroda S., Asai T., Mori K., Kondou T., Uemura H., Iwasaki A.:

Reprod Med Biol. Vol.16, No.4, Page 354-363. 発行年 2017 年

5. An infertile patient with Y chromosome b1/b3 deletion presenting with congenital bilateral absence of the vas deferens with normal spermatogenesis.

Kuroda S., Usui K., Mori K., Yasuda K., Asai T., Sanjo H., Yakanaka H., Takeshima T., Kawahara T., Hamanoue H., Kato Y., Miyoshi Y., Uemura H., Iwasaki A., Yumura Y.:

Clin Exp Reprod Med. Vol.45, No.1, Page 48-51. 発行年 2018 年

6. Successful onco-testicular sperm extraction from a testicular cancer patient with a single testis and azoospermia.

Kuroda S., Kondo T., Mori K., Yasuda K., Asai T., Sanjo H., Yakanaka H., Takeshima T., Kawahara T., Kato Y., Miyoshi Y., Uemura H., Iwasaki A., Yumura Y.:

Clin Exp Reprod Med. Vol.45 No.1 Page 44-47. 発行年 2018 年

7. A case of a rare variant of Klinefelter syndrome,47,XY,i(X)(q10).

Kondo T., Kuroda S., Usui K., Mori K., Asai T., Takeshima T., Kawahara T., Hamanoue H., Uemura H., Yumura Y.:

Andrologia. Vol.50, No.7, e13024. 発行年 2018 年

8. Editorial Comment from Dr Kuroda to Male infertility in Sertoli cell-only syndrome: An investigation of autosomal gene defects.

Kuroda S.:

Int J Urol. Vol.26, No.2, Page 298-299. 発行年 2019 年

9. Editorial Comment from Dr Kuroda to Differences in semen characteristics between patients with testicular cancer and other malignancies using various cut-off values.

Kuroda S.:

(和文・自著)

10. 当院における低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症の検討
黒田 晋之介, 白井 公紹, 森 亘平, 保田 賢吾, 浅井 拓雄, 三條 博之, 山中 弘行, 竹島 徹平, 加藤 喜健, 湯村 寧:
泌尿器外科 第 32 巻第 9(号)1177 頁～1181 頁 発行年 2019 年
 11. 人口知能 (AI) 補助による精子選別支援システムの開発
黒田 晋之介, 竹島 徹平, 山本 みずき, 湯村 寧, 佐々木 勇人, 濱上 知樹:
産婦人科の実際 第 68 巻第 6(号)637 頁～644 頁 発行年 2019 年
 12. 他科疾患と不妊
黒田 晋之介, 竹島 徹平, 湯村 寧:
Modern Physician 生殖医療のいま 第 38 巻第 7(号)746 頁～749 頁 発行年 2018 年
 13. リングY染色体と考えられた染色体異常を有する無精子症患者の1例
黒田 晋之介, 湯村 寧, 浜之上 はるか, 保田 賢吾, 山中 弘行, 三條 博之, 竹島 徹平, 小林 将貴, 加藤 喜健, 岩崎 皓, 野口 和美:
泌尿器科紀要 第60巻第11(号)583頁～586頁 発行年2014年
 14. 男性不妊を主訴とした染色体異常患者の検討
黒田 晋之介, 湯村 寧, 保田 賢吾, 山中 弘行, 竹島 徹平, 小林 将貴, 加藤 喜健, 岩崎 皓, 野口 和美:
泌尿器科紀要 第 60 巻第 7(号)309 頁～313 頁 発行年 2014 年
 15. 横浜市立大学附属市民総合医療センターにおける精巣胚細胞腫瘍症例の臨床的検討
黒田 晋之介, 湯村 寧, 渡邊 真波, 古屋 一裕, 中村 昌史, 寺西 淳一, 三好 康秀, 近藤 慶一, 野口 和美:
泌尿器外科 第 26 巻第 3(号)351 頁～355 頁 発行年 2013 年
 16. 精巣類上皮嚢胞 (Epidermoid cyst) の 2 例
黒田 晋之介, 湯村 寧, 渡邊 真波, 古屋 一裕, 中村 昌史, 寺西 淳一, 三好 康秀, 近藤 慶一, 野口 和美:
泌尿器外科 第 25 巻第 2(号) 257 頁～259 頁 発行年 2012 年
 17. MD-TESE により精子を回収し得た Klinefelter 症候群の 1 例
黒田 晋之介, 湯村 寧, 渡邊 真波, 古屋 一裕, 中村 昌史, 寺西 淳一, 三好 康秀, 近藤 慶一, 野口 和美:
泌尿器外科 第 24 巻第 12(号)2007 頁～2010 頁 発行年 2011 年
- (和文・共著)
18. 不妊を契機に発見された多精巣症の 1 例
岩本 源太, 竹島 徹平, 黒田 晋之介, 湯村 寧, 上村 博司:
泌尿器科紀要 第 65 巻第 10(号)425 頁～427 頁 発行年 2019 年

19. 【リプロダクションの現在-いま精子力を考える】精子力改善プロジェクト 感染症・生活習慣・食生活が造精機能に及ぼす影響
湯村 寧, 竹島 徹平, 黒田 晋之介 :
臨床泌尿器科 第 73 巻第 13(号)986 頁～991 頁 発行年 2019 年
20. 【男性不妊アップデート-ART をする前に知っておきたい基礎知識】手術療法 精索静脈瘤(臨床・手術)の適応と限界
湯村 寧, 竹島 徹平, 黒田 晋之介 :
臨床婦人科産科 第 72 巻第 11(号)1106 頁～1112 頁 発行年 2018 年
21. 【不妊と不育の新たな課題】ART 治療成績向上のための男性不妊治療の役割
竹島 徹平, 黒田 晋之介, 湯村 寧 :
産婦人科の実際 第 66 巻第 13(号)1839 頁～1844 頁 発行年 2017 年
22. 男性不妊症を契機に見えられたロバートソン転座の 2 例
保田 賢吾, 湯村 寧, 近藤 拓也, 森 亘平, 白井 公紹, 浅井 拓雄, 黒田 晋之介, 三條 博之, 山中 弘行, 竹島 徹平 :
泌尿器外科 第 30 巻第 12(号)1789 頁～1793 頁 発行年 2017 年
23. 男性不妊症に対する当センターにおける顕微鏡下精索静脈瘤低位結紮術の初期治療成績
白井 公紹, 竹島 徹平, 近藤 拓也, 森 亘平, 浅井 拓雄, 保田 賢吾, 黒田 晋之介, 湯村 寧 :
泌尿器外科 第 30 巻第 11(号)1643 頁～1646 頁 発行年 2017 年
24. 男性不妊症に対する薬物療法の効果
森 亘平, 竹島 徹平, 近藤 拓也, 白井 公紹, 浅井 拓雄, 保田 賢吾, 山中 弘之, 三條 博之, 黒田 晋之介, 湯村 寧 :
泌尿器外科 第 30 巻第 6(号)999 頁～1002 頁 発行年 2017 年
25. Male hypogonadotropic hypogonadism(MHH)による男性不妊の精査中に下垂体 Rathke 嚢胞と診断し治療した 1 例
浅井 拓雄, 近藤 拓也, 森 亘平, 保田 賢吾, 三條 博之, 黒田 晋之介, 山中 弘行, 竹島 徹平, 湯村 寧 :
泌尿器外科 第 30 巻第 5(号)607 頁～609 頁 発行年 2017 年
26. 女性不妊治療施設における男性不妊患者の調査
湯村 寧, 小川 毅彦, 加藤 喜健, 竹島 徹平, 山中 弘行, 黒田 晋之介, 三條 博之, 保

田 賢吾, 野口 和美

泌尿器外科 第 29 巻第 4(号) 419 頁～422 頁 発行年 2016 年

27. 精液中活性酸素(reactive oxygen species;ROS)と精液検査パラメータの相関に関する検討 当院における精液 1,329 検体の解析

竹島 徹平, 保田 賢吾, 三條 博之, 黒田 晋之介, 山中 弘行, 湯村 寧, 岩崎 皓, 野口 和美, 高島 邦僚, 池田 万里郎, 近藤 芳仁

産婦人科の実際 第 63 巻第 8(号) 1157 頁～1163 頁 発行年 2014 年

28. 顕微鏡下精巣内精子回収術(Microdissection testicular sperm extraction:MD-TESE)により精子を回収し得た Y 染色体常染色体転座の 1 例

湯村 寧, 村瀬 真理子, 片山 佳代, 千木野 みわ, 相澤 佳乃, 黒田 晋之介, 野口 和美
泌尿器科紀要 第 58 巻第 6(号)307 頁～310 頁 発行年 2012 年

29. 不妊を主訴とした特発性低ゴナドトロピン性男子性腺機能低下症の 1 例

湯村 寧, 小林 将貴, 竹島 徹平, 北川 雅一, 千木野 みわ, 相澤 佳乃, 黒田 晋之介, 野口 和美

泌尿器外科 第 25 巻第 11(号)2213 頁～2216 頁 発行年 2012 年