

## 非閉塞性無精子症に対する内分泌療法のメカニズムとその検証

山口大学大学院医学系研究科 泌尿器科学分野 講師 白石 晃司

### 1. はじめに

非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia: NOA) に対し顕微鏡下精巣内精子採取術 (microdissection testicular sperm extraction: Micro-TESE) および顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) により挙児可能となったが、Micro-TESE による精子採取率は 40~50%程度であり、十分な成績であるとは言いがたい。特に精巣組織像が Sertoli cell only (SCO) や early maturation arrest (MA) の症例において採取率は低下し、根本的な治療法がないのが現状である。男性低ゴナドトロピン性性腺機能低下症 (male hypogonadotropic hypogonadism: MHH) とは異なり、NOA 症例においては一般的には高ゴナドトロピンを呈し、hCG やリコンビナントヒト FSH(rhFSH) 製剤を用いた治療は無効であると考えられていた。我々は Micro-TESE にて精子採取不可能であった NOA 症例を対象に高容量の hCG および rhFSH を用いることで 2 回目の Micro-TESE にて精子採取を試み、20%の症例において精子採取が可能であった (サルベージ内分泌療法)<sup>1)</sup>。NOA に対する内分泌療法の現状と本治療法の作用機序についての解析結果とその後の臨床試験の成績について概説する。

### 2. NOA に対する従来の内分泌療法

#### クロミフェン塩酸塩

クロミフェン塩酸塩 (以下、クロミフェン) はエストロゲンによる視床下部-下垂体へのネガティブフィードバックを抑制することで、ゴナドトロピンの分泌を促す。以前より主に乏精子症の症例に対して empirical に使用される多いが<sup>2)</sup>、ゴナドトロピン低値の症例が多いほどその有用性が高くなるため、その結果については報告者によりまちまちである。当然のことながら一般的に高ゴナドトロピンを呈する NOA 症例における有効率は低いが、Chua らのメタアナリシスにおいては NOA 症例におけるクロミフェンの有用性について報告している<sup>3)</sup>。

Hussein らは精巣生検にて主に maturation arrest や hypospermatogenesis の症例を含む NOA 症例において Micro-TESE 前にクロミフェン療法を施行し、無治療群では精子採取率が 33.6%であったが、治療群においては 60%であったことを報告している<sup>4)</sup>。

### アロマターゼインヒビター

アナストロゾールやレトロゾールなどが含まれる。米国においてはNOAに対する内分泌療法の主流となりつつあるが、本邦での適応が閉経後乳癌のみであり抗がん剤としての位置づけであることから、自費診療で行うにも非常に使用しにくい現状である。投与により全身のアロマターゼを阻害することによりテストステロンからエストラジオール（E2）への変換を阻害するが、精巣内にもアロマターゼはSertoli cellに多く発現していると言われ、精巣内テストステロン（intratesticular testosterone: ITT）濃度の上昇をもたらし、精子形成を促進すると考えられている。またクロミフェンと同様に視床下部一下垂体へのE2によるネガティブフィードバックを抑制するため、内因性のゴナドトロピンの上昇も来し、精子形成を促進する。アロマターゼ阻害剤が有効な症例は末梢血でのテストステロン/E2比が10未満の症例が適していると報告されている<sup>5)</sup>。しかしアロマターゼ阻害剤を用いたTESE前の内分泌療法については有効性を示す報告<sup>6)</sup>と逆の報告<sup>7)</sup>も存在し、その症例選択や投与方法については未だ研究の余地は多分にある。

### ゴナドトロピン療法

一般的にNOA症例においてゴナドトロピン療法は無効と考えられているが、いくつかのトライアルではその有用性を示している。SelmanらはhCG（6000単位/週）とrhFSH（225～450単位/週）の併用により射出精子の出現やTESEでの精子採取率の向上について報告している<sup>8)</sup>。Efesoyらはmaturation arrestと診断されたNOA症例においてrhFSHの使用により11人中2人に射出精子の出現を認めたと報告している<sup>9)</sup>。RamasamyらもhCG単独、rhFSH単独またはそれらの併用によりMicro-TESEの成績全体が改善したことを報告しているが<sup>7)</sup>、その適応や治療レジメンについて前向きに検討した報告は存在しない。

### 3. 高ゴナドトロピン状態に対する高容量hCG投与とサルベージ内分泌療法

Micro-TESE前の内分泌療法について造精機能がむしろ悪化するということも完全には否定できない。Micro-TESE導入前の時代ではあるが我々はNOA症例に対しテストステロンリバウンド療法を施行した時期があった（図1）。高容量のテストステロンを投与することにより視床下部一下垂体系を抑制し、Sertoli細胞の機能を一時休止させることである（“resetting of the FSH receptor”）。実際にGnRHを用いてゴナドトロピンを抑制した後にインヒビン分泌能で評価したSertoli細胞の機能が改善すると報告されている<sup>10)</sup>。テストステロン投与を中止した際に内因性のゴナドトロピンが上昇するに伴い、ITTが上昇し、精子形成が刺激されるであろうとの仮説に基づいた治療である。乏精子症においては精液所

見の改善を認める症例が20%程度に認められたが、NOA症例においては精子形成が生じたとしても理論的には一過性であり、実際にどのタイミングで精子採取（当時はconventional TESE）を行うべきかの判定は非常に難しく、conventional TESEにて精子採取が可能であった症例は30例中1例（3%）であった。またlate MAや減数分裂後の段階で精子形成が止まっている症例においては、このステップが非常にテストステロン依存性であるため、テストステロン投与によるITTの低下により反対に精子形成に抑制的に作用する可能性がある。ITT濃度を保ちつつ、FSHレセプターのresettingが可能な内分泌療法のプロトコールについて検討した。

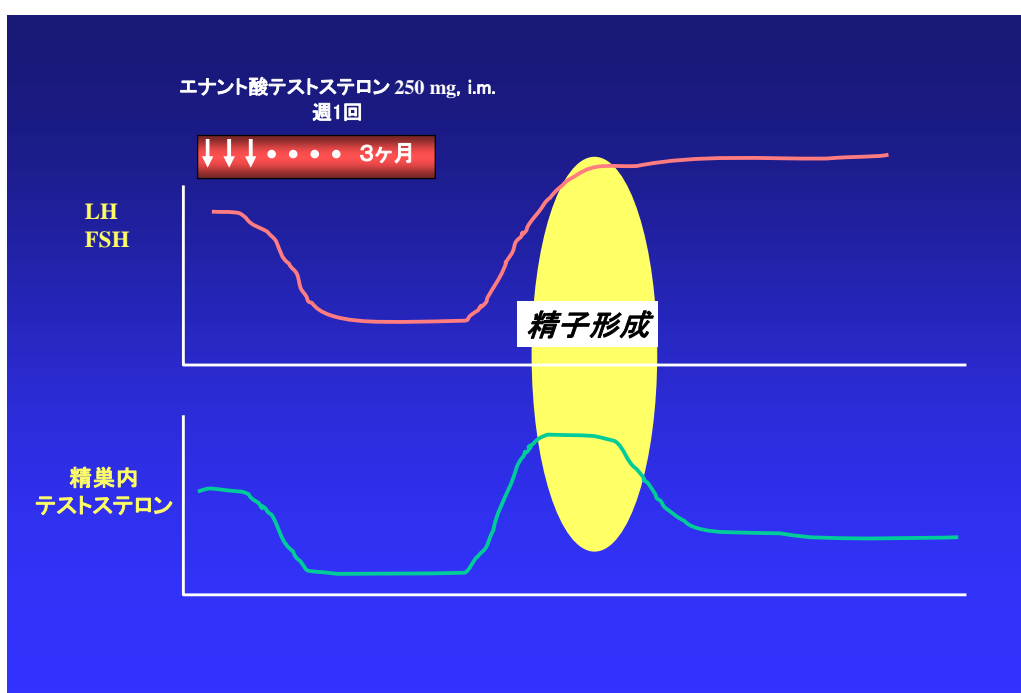


図1. テストステロンリバウンド療法の原理と内分泌動態

我々はMA-10 Leydig cell やラット Leydig cell 初代培養系にて高容量のhCGによる培養下であっても、hCG刺激に伴いテストステロン分泌（MA-10においてはプロゲステロン分泌）が亢進することを確認した（unpublished data）。

Micro-TESEにて精子採取が不可能であった症例を対象に、hCGおよびrhFSHを用いた内分泌療法（サルベージ内分泌療法）について検討した（図2）。高容量のhCG（5000単位x週3回）の投与に伴い、明らかな血清テストステロン濃度の上昇を認め、視床下部-下垂体にネガティブフィードバックがかかることが判明した<sup>1)</sup>。この場合ITT濃度は保ちつつ、FSH分泌低下によりresetting of the FSH receptorが同時に生じるという独特な精巣内内分泌環境が形成される（図2）。

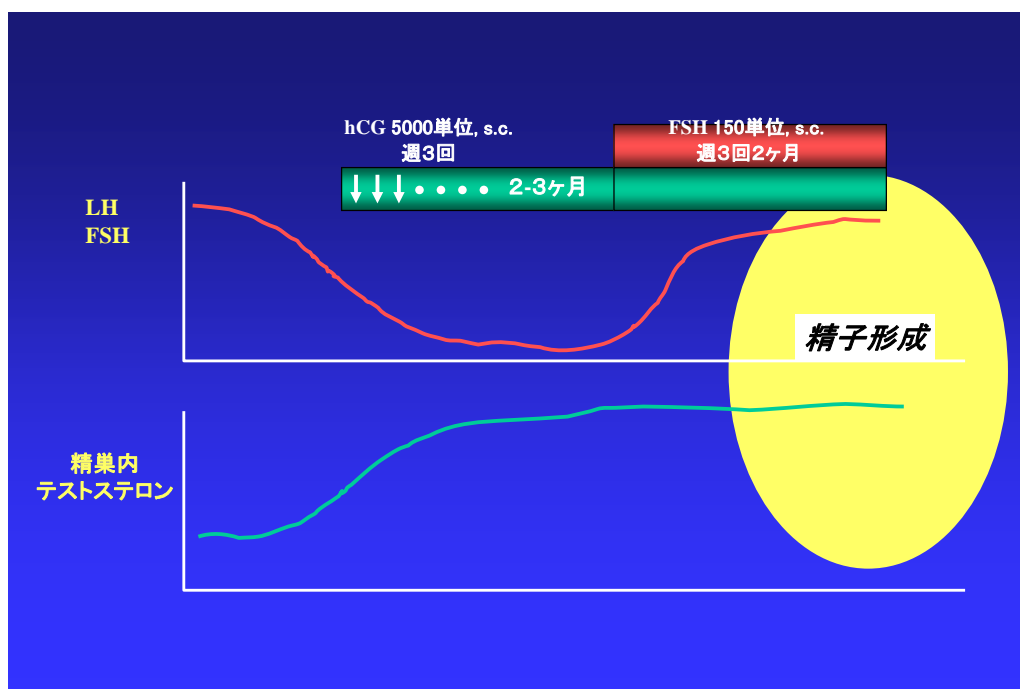


図2. サルベージ内分泌療法の原理と内分泌動態

Micro-TESEにて精子採取不可能であった48名(23~47歳、平均33.8歳)を対象とした。20名は内分泌療法に同意されず、2回目のMicro-TESE(second Micro-TESE)を希望され、28名については初回のMicro-TESEより最低6ヶ月経過した後に内分泌療法を施行し、second Micro-TESEを施行した。hCG投与によりゴナドトロピン低下を認めた症例はrhFSHを併用し(15例)、低下しなかった症例(13例)については引き続きhCGの投与を行った(図2)。各群におけるsecond Micro-TESEの精子採取率および精子採取可能群および不可能群におけるパラメーターについて解析を行った。内分泌療法施行群:28名および未施行群:20名の間で年齢、妻の年齢、初回Micro-TESE前のLH、FSH、血清テストステロン、精巣容積および低テストステロン(300 ng/dl未満)を認めた症例については有意差は認められなかった。内分泌療法施行群においてはsecond Micro-TESEにて6例(21.4%)に精子採取が可能であり、未施行群においては全例精子回収は不可能であった( $p<0.05$ )<sup>1)</sup>。内分泌療法施行28例において、second Micro-TESEにて精子採取可能群(6例)と不可能群(22例)の患者背景を検討した。年齢、初回のMicro-TESE時の精巣容積、LH、FSHおよび血清テストステロン値に有意差は認めなかったが、精子採取可能群においては初回のMicro-TESEにて円形精子細胞を認めた症例が4例(66.7%)であり、不可能群の3例(13.6%)に比べ有意にその頻度が高かった( $p<0.05$ )。つまりサルベージ内分泌療法が有効な

症例は精巣の病理組織像が late MA や hypospermatogenesis などの減数分裂後の精子形成を促進し、SCO や精祖細胞や精母細胞での early MA の症例には無効であった。減数分裂後の精子形成は spermiogenesis とも言われ、非常にテストステロン濃度依存性のステップであり、hCG による ITT の増加が精子形成に促進的に作用したのではないかと考えられる。

#### 4. サルベージ内分泌療法の検証と精巣内での変化

我々の報告したNOAに対するMicro-TESE後のサルベージ内分泌療法については多くの施設で検証され、精子採取率が10%から87%と報告されている（日本生殖医学会総会および日本泌尿器科学会総会での発表）。傾向としてMicro-TESEの経験数の多い施設からの報告は精子採取率が低くなる傾向がある。その理由として我々の結果では精子採取可能であった6例中4例はhypospermatogenesisの症例であり、Micro-TESEの経験数の増加により初回のMicro-TESEにて精子採取が可能なケースが多いためである。実際にサルベージ内分泌療法を行った症例の大部分は自身のMicro-TESEの初期60例に含まれ、その時期の精子採取率32%でそれ以降の成績に比べ劣っていた<sup>11)</sup>。治療効果の検証の目的で、Micro-TESEに慣れた施設による全国多施設共同研究を行った。その結果23例中2例（9%）で精子採取可能であり、初回の病理組織学的所見は2例ともlate MAであった。現在までにサルベージ内分泌療法を自施設にて55例に対して行ったが、late MAやhypospermatogenesisまたは初回の病理組織は不明であるが円形精子細胞や後期精子細胞の採取が可能であった症例のみについて検討すると、18例中10例（56%）で射出精子を認めるか2回目のMicro-TESEにて精子採取が可能であった。

#### 5. サルベージ内分泌療法による造精機能亢進の機序

先述したように内分泌療法が有効であった症例は初回のMicro-TESEの時点で円形精子細胞を認める頻度が高かったこと、また精巣内fluidを用いたテストステロン濃度の検討にて精巣内テストステロンは高濃度になっていることより<sup>12)</sup>、高濃度の精巣内テストステロンが必要とされるspermiogenesisのステップでの分化が阻害されている症例において内分泌療法が有効であったと考えられた。また、hCG刺激によりLeydig細胞よりテストステロンのみならずepidermal growth factorスーパーファミリーに属する強力な増殖因子の分泌がMA-10 Leydig細胞<sup>13)</sup>およびラットLeydig細胞初代培養<sup>14)</sup>にて示されている。実際にヒト精巣サンプルにおいてもNOA症例において精子形成を認める部分においてもそれらのgrowth factorの発現が高かった<sup>15)</sup>。一方でearly maturation arrestの症例においてもサルベージ内分泌療法は全く無効なわけでもなく、劇的に精子形成の促進を認めた症例も存在した<sup>1)</sup>。サルベージ内分泌療法により精祖細胞でのDNA合成能

(proliferating cell nuclear antigen の発現にて判定) が、特に rhFSH 製剤を用いた症例において顕著であり<sup>12)</sup>、Sertoli 細胞におけるアンドロゲンレセプターの発現も亢進した<sup>16)</sup>。MHH においては rhFSH 製剤の早期使用により精子形成がより促進されるという報告も存在する<sup>17)</sup>。NOA 症例においても rhFSH 製剤投与の工夫を行い、減数分裂後の細胞のみならずより未分化な細胞においても有効な内分泌療法の確立を目指している。

## 6. おわりに

Micro-TESE は NOA 症例に対して画期的な治療法であったが、存在する精子を探すのみであり、実際に精子形成の促進といった点からはなんらかの治療は行えていない。精子形成促進を目指し今後さらに内分泌療法を発展させていく必要がある。術前の内分泌療法については血清テストステロン値が 300 ng/dl 未満の症例においては我々もクロミフェンを中心に治療 (Hussein) を行っているが、Micro-TESE にて精子採取が不可能であった症例については初回の病理組織結果に基づいて表に示すようなオプションにて治療を行っている (表)。

Hypospermatogenesis や late MA 症例においてはかなり期待ができる状態であると考えられる。また MHH も含め無精子症の治療を研究することで、複雑な精子形成のメカニズムについての多くの情報が得られ、今後基礎的および臨床的視点からの情報の共有により NOA 治療の新たな戦略を見出すことができると考えられる。

表. 初回の TESE の病理組織所見に基づいた現在の治療方針

1 回目の TESE での病理組織	治療のオプション
Hypospermatogenesis	1) 2 回目の Micro-TESE 2) 2 回目の Micro-TESE 前にクロミフェンまたはサルベージ内分泌療法
Late maturation arrest	1) 2 回目の Micro-TESE 前にサルベージ内分泌療法
Early maturation arrest	1) 治療は勧めない 2) 採取率が極めて低いことに同意いただいた上でサルベージ内分泌療法後に 2 回目の Micro-TESE
Sertoli cell only	1) 治療は勧めない 2) 採取率が極めて低いことに同意いただいた上で 2 回目の Micro-TESE

Micro-TESE: microdissection testicular sperm extraction, SSR: sperm retrieval rate

## 【引用文献】

- 1) Shiraishi K, Ohmi C, Shimabukuro T, Matsuyama H. Human chorionic gonadotrophin treatment prior to microdissection testicular sperm extraction in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 2012;27:331-339.
- 2) Sigman M, Vance ML. Medical treatment of idiopathic infertility. *Urol Clin North Am* 1987;14:459-469.
- 3) Chua ME, Escusa KG, Luna S, Tapia LC, Dofitas B, Morales M. Revisiting oestrogen antagonists (clomiphene or tamoxifen) as medical empiric therapy for idiopathic male infertility: a meta analysis. *Andrology* 2013;1:749-757.
- 4) Hussein A, Ozgok Y, Ross L, Rao P, Niederberger C. Optimization of spermatogenesis-regulating hormones in patients with non-obstructive azoospermia and its impact on sperm retrieval: a multicentre study. *BJU Int* 2013;111:110-114.
- 5) Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol* 2001;165: 837-841.
- 6) Schiff JD, Palermo GD, Veeck LL, Goldstein M, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Success of testicular sperm extraction [corrected] and intracytoplasmic sperm injection in men with Klinefelter syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:6263-6267.
- 7) Ramasamy R, Ricci JA, Palermo GD, Gosden LV, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *J Urol* 2009;182:1108-1113.
- 8) Selman HA, Cipollone G, Stuppia L, De Santo M, Sterzik K, El-Danasouri I. Gonadotropin treatment of an azoospermic patient with a Y chromosome microdeletion. *Fertil Steril* 2004;82:218-219.
- 9) Efesoy O, Cayan S, Akbay E. The efficacy of recombinant human follicle stimulating hormone in the treatment of various types of male-factor infertility at a single university hospital. *J Androl* 2009;30:679-684.
- 10) Foresta C, Bettella A, Spolaore D, Merico M, Rossato M, Ferlin A. Suppression of the high endogenous levels of plasma FSH in infertile men are associated with improved Sertoli cell function as reflected by elevated levels of plasma inhibin B. *Hum Reprod* 2004;19:1431-1437.

- 11) 白石晃司、西島 淳、松山豪泰. 顕微鏡下精巣内精子採取術初期 250 例の経験. 西日本泌尿器科 2013;75:345-351.
- 12) Shinjo E, Shiraishi K, Matsuyama H. The effect of human chorionic gonadotropin-based hormonal therapy on intratesticular testosterone levels and spermatogonial DNA synthesis in men with non-obstructive azoospermia. *Andrology* 2013;1:929-935.
- 13) Shiraishi K, Ascoli M. A co-culture system reveals the involvement of intercellular pathways as mediators of the luteinizing hormone receptor (LHR)-stimulated ERK1/2 phosphorylation in Leydig cells. *Exp Cell Res* 2008;314:25-37.
- 14) Shiraishi K, Ascoli M. Luteinizing hormone/choriogonadotropin stimulate the proliferation of primary cultures of rat Leydig cells through a pathway that involves activation of the extracellularly regulated kinase 1/2 cascade. *Endocrinology* 2007;148:3214-3225.
- 15) Shiraishi K, Matsuyama H. Local expression of epidermal growth factor-like growth factors in human testis and its role in spermatogenesis. *J Androl* 2012;33:66-73.
- 16) Kato Y, Shiraishi K, Matsuyama H. Expression of testicular androgen receptor in non-obstructive azoospermia and its change after hormonal therapy. *Andrology* 2014;2:734-740.
- 17) Dwyer AA, Sykiotis GP, Hayes FJ, Boepple PA, Lee H, Loughlin KR, Dym M, Sluss PM, Crowley WF Jr, Pitteloud N. Trial of recombinant follicle-stimulating hormone pretreatment for GnRH-induced fertility in patients with congenital hypogonadotropic hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:1790-1795.