様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 23 年 2 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2006～2009
課題番号：18591796
研究課題名（和文）　精子受精能と細胞内情報伝達系についての研究

研究課題名（英文）　Relationship between sperm fertilizing ability and intracellular signal transduction.

研究代表者
久保田　俊郎（KUBOTA TOSHIRO）
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50126223

研究成果の概要（和文）：
ドナー群と不妊患者群で hyperactivation、細胞内カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]i$）の変化を比較した。ドナー 群では hyperactivated sperm の比率は上昇し、不妊患者群より高かった。ドナー群では$[Ca^{2+}]i$ の増加率は hyperactivated sperm の比率、精子運動性パラメーター（VAP、VSL、ALH、BCF、LIN）と相関を認めた。一方、不妊患者群では相関を認めたのは ALH のみであった。ドナー群では、$[Ca^{2+}]i$ の増加率は、形態異常精子では形態正常精子と比較し低かった。ドナー群の精子では、中片部または尾部に形態異常のある精子の $[Ca^{2+}]i$ の上昇率は、ともに形態正常精子より低かった。不妊患者群の形態正常精子の $[Ca^{2+}]i$ の上昇率はドナー群の形態正常精子より低かった

研究成果の概要（英文）：
The baseline and peak fluorescence of the spermatozoa with abnormal morphology was lower when compared with normal spermatozoa. Follicular fluid-induced $[Ca^{2+}]i$ increase of morphologically normal spermatozoa from infertile couples was lower than that of morphologically normal spermatozoa from healthy donors.This study shows that spermatozoa with abnormal morphology have disorders of signal transduction in healthy donors, and normal shaped sperm from infertile patients have disorders of signal transduction comparing that from healthy donors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総　計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：医師薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学･産婦人科学
キーワード：生殖医学

１．研究開始当初の背景

哺乳動物の精子は受精にいたるまでに capacitation と先体反応の２つの変化を起こす事が必要である。男性不妊症患者の精子ではこの受精能獲得に至る２つの変化を起こす能力に障害がある場合が多いといわれており、精子の受精能獲得現象のメカニズムを解明することは不妊症の治療に非常に重要である。精子の先体反応発現には細胞内へのカルシウムイオンの流入が必要であることが明らかになっている。

２．研究の目的

子宮頚部、子宮腔内を通過した精子は、卵管狭部で卵管上皮に頭部を付着させ、排卵まで待機しており、排卵がおこると精子は卵管膨大部まで移動し、卵巣から排卵された卵－顆粒膜細胞複合体と出会い、受精がおこるといわれている。この時、精子は、hyperactivation と呼ばれる特有の運動をするが、その原因物質やその情報伝達経路は同定されていない。私達は卵胞液や精漿が、精子の受精能を促進し、精子細胞内カルシウムを上昇させることを報告してきたが、そのうちどのような因子が直接作用しているのかはわかっていないのでその因子を解明したい。また、ヒト精子が、いかにして卵の所在を認識し卵に到達し得るかも解明されていない。不妊症の症例の中には、これらの過程に障害があり受精に至らない可能性がある。本研究では、卵もしくは卵－顆粒膜細胞複合体の分泌物よりヒト精子の卵への走化性誘引物質を同定し、精子内の情報伝達経路を解明したい。

３．研究の方法

1)男性不妊患者および妊孕能を有するドナー精子の間に hyperactivation や細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]i$）の変化の差があるかを検討した。男性不妊患者および妊孕能を有するドナーより同意を得て提供された精液を対象とした。.精子を精子自動運動解析装置により解析し、同時にプロゲステロン添加後の$[Ca^{2+}]i$ の変化を cell suspension 法で測定した。卵胞液添加後の、単一精子レベルの$[Ca^{2+}]i$ を測定し、形態正常精子と形態異常精子の間で比較した。

2)体外受精時に採取された精液中の運動精子数が 10×10^6/ml 以上得られ、conventional IVF により体外受精を行った症例を対象とし、各症例を 1) 受精率 50%以上の群 2) 受精率 50%未満の群 3)受精卵の得られなかった群の 3 群に分け、精子自動精子分析装置（CASA・SQA）の各パラメーターとの関連を検討した。

3) 採精から人工授精（AIH）実施までの経過時間および禁欲日数と AIH の臨床成績の関連について検討を行った。 AIH を施行した患者（449 名・1054 周期）を対象とした。平均年齢は夫 37.1±4.7 歳（24~51 歳)、妻 35.4±4.0 歳(22~46 歳)であった。密度勾配遠心法による精子の処理後、AIH を施行した患者を後方視的に検討した。また、採精から AIH までの経過時間および禁欲日数別にそれぞれ妊娠率、精液所見を比較検討した。

４．研究成果

１)overnight incubation によりドナー 群の hyperactivated sperm の比率は上昇し、患者群より高かった。ドナー群では$[Ca^{2+}]i$ の増加率は hyperactivated sperm の比率、

精子運動性パラメーター（VAP、VSL、ALH、BCF、LIN）と相関を認めた。一方、患者群では相関を認めたのは ALH のみであった。ドナー群では、$[Ca^{2+}]i$ の増加率は、形態異常精子では形態正常精子と比較し低かった。ドナー群の精子では、中片部または尾部に形態異常のある精子の $[Ca^{2+}]i$ の上昇率は、ともに形態正常精子より低かった。患者群の形態正常精子の $[Ca^{2+}]i$ の上昇率はドナー群の形態正常精子より低かった。

2）SQA 自動精子分析装置においては、TFSC・TSC・SMI の各パラメーターにおいて受精率 50%以上の群で他の 2 群と比べ、有意に高い値を示した。一方で、CASA 精子自動精子分析装置（CASA）の結果では、精子の Progressive percent は受精率 50%以上の群で他の 2 群と比べ有意に高い値を示した。ただ CASA による movement characteristic の各パラメーターでは、受精率 50%以上の群で他の 2 群と比べ、高い値を示す傾向を示したものの有意な差とはならなかった。今回の結果より精子自動精子分析装置を用いることにより、conventional IVF を行う際に受精能の高い精子をより精度よく判別することが可能になると考えられた。

3）①採精から AIH 実施までの経過時間が長いほど、精液所見（運動率、総運動精子数）は有意に低下した。②今回の検討内における妊娠率には有意差が認められなかった。禁欲日数が長くなると精液量、濃度、精子数、運動精子数は有意に増加した。③運動率には差が認められなかった。④禁欲 0~2 日の群と比較し、3~7 日と 8 日以上の群は有意に妊娠率が高かった。⑤禁欲 3~7 日と 8 日以上の間に有意差は認められなかった。採精から AIH 実施までの経過時間については、7 時間の範囲内において臨床成績に差が認められなかった。禁欲日数については、禁欲期間を 2 日（48 時間）以上持つことを指導する事が望ましい。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

1. Kawai M, Araragi K, Shimizu Y, Hara Y: Identification of placental leucine aminopeptidase and triton-slowed aminopeptidase N in serum of pregnant women.
Clin Chim Acta 2009;400:37-41

2. 石川智則、原田竜也、清水康史、久保田俊郎：常位胎盤早期剥離に至った子宮腺筋症合併不妊症例. 日本受精着床学会雑誌 26(1):252-254, 2009

3. 岩田未菜、清水康史、吉木尚之、原田竜也、石川智則、宮坂尚幸、尾林聡、久保田俊郎：当院における配偶者間人工授精(intrauterine insemination:IUI)の治療成績. 日本受精着床学会雑誌26(1):118-122, 2009

4. 清水康史、久保田俊郎：月経異常. 症候別患者さんを上手に診るコツ JUNIOR 480:35-42, 2009

5. Wanajo A, Sasaki A, Nagasaki H, Shimada S, Otsubo T, Owaki S, Shimizu Y, Eishi Y, Kojima K, Nakajima Y, Kawano T Yuasa Y, and Akiyama Y：Methylation of the Calcium Channel-Related Gene, CACNA2D3, Is Frequent and a Poor Prognostic Factor in Gastric Cancer, Gastroenterology, 135;580-590,2008

6. Shimizu Y, Minaguchi R, Ishikawa T,

Harada T, Yoshiki N and Kubota T：Increase in the concentration of cytosolic-free calcium induced by human follicular fluid was decreased in single human spermatozoon with abnormal morphology, Reproductive Medicine and Biology, 7;143-149,2008

7．石川智則、久保田俊郎：特集生殖補助医療をめぐる諸問題・１不妊治療におけるARTの適応．診断と治療社、1207-1212,2008.10

8．清水康史、久保田俊郎：体外受精、ICSIの適応．よくわかる臨床不妊症学．P118-124．中外医学社．東京．2007

9．堀出由里、清水康史、原田竜也、己斐秀樹、尾林聰 、坂本秀一、久保田俊郎、麻生武志、多田雅人：不妊症例における腹腔鏡後の妊娠に関する検討。産婦人科の実際、55(7):1175－1178,2006.

〔学会発表〕（計 12　件）

1.清水康史、大原基弘、許山浩司、依光毅、河村寿宏： 抗精子不動化抗体陽性女性の妊娠転帰．第 28 回日本受精着床学会．2010.7.横浜

2.清水康史、村松裕崇、有地あかね、河村真紀子、依光毅、許山浩司、大原基弘、河村寿宏：抗精子不動化抗体陽性女性の体外受精成績について．第 55 回日本生殖医学会．2010.10.徳島

3. 石川智則、原田竜也、久保田俊郎：卵巣チョコレート嚢胞合併例の ART 嚢胞摘出をART に先行すべきか．第27 回日本受精着床学会総会・学術講演会、京都、2009.8

4. 石川智則、大川智実、原田竜也、吉木尚之、久保田俊郎：当科における腹腔鏡手術の現況．第49 回日本産科婦人科内視鏡学会学術講演会、高知、2009.9

5. 原田竜也、清水康史、岩田未菜、田島麻記子、石川智則、久保田俊郎：体外受精における精子自動精子分析装置（CASA・SQA）の意義についての検討．第60回日本産科婦6人科学会学術講演会、横浜、2008.4

6. 原田竜也、清水康史、岩田未菜、石川智則、久保田俊郎：子宮内膜症症例の体外受精における精子自動精子分析装置（CASA・SQA）の意義．第53回日本生殖医学会総会・学術講演会、神戸、2008.10

7．Iwata M, Shimizu Y, Harada T, Ishikawa T, Miyasaka N, Obayashi S, Kubota T: Analysis of Factors Influencing Pregnancy Rates of Intrauterine Insemination (IUI), 第20回アジア・オセアニア産婦人科学会、東京、 2007.9

8．岩田未菜、清水康史、原田竜也、石川智則、宮坂尚幸、尾林 聡、久保田俊郎：当院における配偶者間人工授精（AIH）の治療成績。第59回日本産科婦人科学会学術講演会、京都、2007.4

9．岩田未菜、清水康史、原田竜也、石川智則、宮坂尚幸、尾林聰、久保田俊郎：当院における配偶者間人工授精（ＡＩＨ）の治療成績。第25回日本受精着床学会総会・学術講演会、仙台、2007.8

10．石川智則、田島麻記子、原田竜也、吉木尚之、清水康史、久保田俊郎： 子宮腺筋症と不妊症の関連についての検討 第11回産婦人科臨床フォーラム、東京 2007.12

11. Shimizu Y, Horide Y, Kubota T, Aso T：Outcome of pregnancy of endometriosis patients after laparoscopy. 62nd annual meeting of American Society of Reproductive Medicine, New Orleans. USA, 2006.10

12．清水康史、田島麻記子、久保田俊郎、麻生武志：重度の子宮腺筋症合併妊娠で生児を得た一例。第 58 回日本産科婦人科学会学術講演会、横浜、2006.4

〔図書〕（計 0 件）
〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
久保田　俊郎（KUBOTA TOSHIRO）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50126223
(2)研究分担者
原田　竜也（HARADA TATSUYA）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：80376748
石川　智則（ISIKAWA TOMONORI）
東京医科歯科大学・医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50447489
(3)連携研究者
清水康史（SHIMIZU YASUFUMI）2006-2008
研究代表者
田園都市レディースクリニック・不妊センター長
研究者番号：80242197