

# 【 1 】

氏 名	おお さか あき よし 大 坂 晃 由
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第797号
学位授与の日付	令和3年10月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (先端外科学)
学位論文題目	Evaluation of the sperm DNA fragmentation index in infertile Japanese men by in-house flow cytometric analysis (自家製フローサイトメトリー解析による日本人男性不妊患者の精子DNA断片化指数：DFIに関する評価)
論文審査委員	(主査) 教授 釜 井 隆 男 (副査) 教授 麻 生 好 正 教授 高 倉 聡

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【背 景】

生殖補助医療（人工授精、体外受精、顕微授精）が進歩した現代においては、精子が少ない状態（乏精子症、高度乏精子症）でも挙児を得る事が可能になった。これらの患者にとって妊娠へつながる精子を選別するためには従来の精液検査のみでは不十分である。生殖補助医療の方法および技術は進展している一方で、依然として残っている最大の課題として良質な精子の選別が挙げられる。しかし、これらの汎用される質の良い精子を選別する指標が未だ存在しない。そのため、最近になって良質な精子を検索する方法として、DNAを損傷した精子の割合（DNA断片化指数、DNA fragmentation index：DFI）が用いられるようになってきた。これまで、諸外国（アメリカ、中国、台湾、イタリア）の男性不妊患者の大規模なDFIと妊孕性の関連性の報告がされている。しかしながら、本邦におけるDFIと妊孕性に関する研究がほとんどされていない。そこで、今回我々は当院におけるDFIと精液検査パラメータおよび妊娠との関連性を評価した。

### 【目 的】

日本人男性不妊患者におけるDFIと妊孕性の指標（精液検査パラメータと妊娠）との関連性を評価することを目的とした。

### 【対象と方法】

2017年から2019年の間に獨協医科大学埼玉医療センターおよび梅ヶ丘産婦人科、つばきウイメンズクリニックを受診した743名の男性不妊患者と20名の妊孕性のある（6か月以内に自然妊娠した夫婦）

男性を対象とした。患者選択基準として、基礎疾患（慢性疾患、悪性疾患、勃起障害、射精障害）、精液濃度30万/ml、禁欲期間（1日以下、6日以上）、配偶者（40歳以上、婦人科疾患）、DFI測定の際に新鮮精液（射出してすぐの評価）を用いた症例を除外した。精液検査はWHO（2010）マニュアルに基づいて評価した。また、DFI測定は精子クロマチン構造測定法（Sperm Chromatin structure assay：SCSA, Evenson et al 1980）を参考に、最近の進歩したフローサイトメトリーを用いて当院で評価を行った。まずは、当院のDFI測定の再現性を確かめるために同時（同一検体を10回評価）、日差再現性（3検体を10日に分けて評価）を検討した。次に、精液検査パラメータ（精液量、濃度、運動率、総精子数、総運動精子数、正常形態率）とDFIの関連性はSpearman's rho testで評価した。743名の男性不妊患者の内、観察期間内に6か月以上に渡ってタイミング法および人工授精を行っており、妊娠成立の可否が追跡可能であった130名の不妊患者を対象として、妊娠成立とDFIのcut-off値を評価した。獨協医科大学埼玉医療センター生命倫理委員会の承認を得て、各患者よりインフォームドコンセントによる同意を取得している（承認番号：2075）。

### 【結 果】

DFI測定の同時および日差共に再現性は良好であった（変動係数：4%未満）。妊孕性のある患者（20名）と比較して不妊患者（743名）のDFIは高かった（中央値：7.70%，19.37%）。6か月以上のタイミング法および人工授精を行った130名の妊娠成立、不成立を区別するDFIのROC曲線におけるCut-off値は23.95%であった（AUC：0.842，感度：81.6%，特異度：72.8%）。DFIと精液量は統計学的に関連性を認めなかったが、精液濃度、運動率、総運動精子数、正常形態率は有意に負の相関を認めた（ $p<0.05$ ）。

### 【考 察】

当院のDFI測定は再現性が高いものであった。精液検査（濃度、運動率、総運動精子数、正常形態率）とDFIは、過去の報告と同様に、負の相関関係を示した。妊娠成立（タイミング法および人工授精における）を示すDFIのCut-Off値：24.0%は、過去の大規模な報告[Evenson et al (2015)]であるCut-Off値：25.0%と同様の結果であった。また、妊孕性のある男性のDFI値：7.7%は妊娠成立を区別するDFIのCut-Off値：23.95%より低い結果であった。

### 【結 論】

日本人男性不妊患者における大規模なDFIと妊孕性の関連性を評価した。生殖補助医療のステップアップを検討する際に、新たな妊孕性の評価指標として有用な可能性が示唆された。今後、不妊カップルにおいてDFIの値がタイミング法、人工授精、体外受精および顕微授精を選択する基準として用いられるかもしれない。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

背景として、生殖補助医療が進歩した現代においては、精子が少ない状態だとしても1個の精子があれば、拳児を得る事が可能になった。そのため更なる妊娠率の向上には、良質な精子を検索する方

法が必要となり、最近になってDNAが損傷した精子の割合（DNA fragmentation index：DFI）が用いられるようになった。しかしながら、本邦における大規模なDFIと妊孕性に関する研究がない。そのため、今回我々はDFIと精液検査パラメータおよび妊娠との関連性を評価した。

対象と方法として、2017年から2019年の間に当院を受診された803名の男性不妊患者、それらの内で130名のタイミング法および人工授精によって6か月以上追跡可能な患者および20名の妊孕性のある患者（6か月以内に妻が出産歴あり）を対象とした。精液検査はWHOラボマニュアル「-ヒト精液検査と手技-（5版）」、DFIは精子クロマチン構造測定法（Sperm chromatin structure assay：SCSA）で評価した。精液検査パラメータ（精液量、濃度、運動率、総精子数、総運動精子数、正常形態率）とDFIの関連性はSperman's rho testで評価した。さらに、タイミング法および人工授精を行い、6か月以上追跡可能であった患者を対象とするROC解析によって妊娠とDFIのCut-off値を評価した。

結果は、不妊患者のDFIは妊孕性のある患者と比較して高かった。（19.4% vs 7.7%）DFIは精液量を除いて、精液濃度、運動率、総運動精子数、正常形態率は有意に負の相関を認めた。（ $p<0.05$ ）タイミング法および人工授精による妊娠成立とDFIのROC曲線におけるCut-off値は24.0%であった。

以上から、女性側に不妊因子を認めない場合は、DFI値によって治療法提示の目安になるかもしれない。

#### **【研究方法の妥当性】**

SCSAのprotocolに基づいて、DFIを評価した。当院の研究員、複数名における検査の精密性（測定内、測定間精度評価）を検証した後に、すべての精液検体の評価を行った。本研究は倫理委員会の承認を得た上で、十分なインフォームドコンセントを取得し研究を行っており、また、後方視的な非侵襲性の研究であり、倫理的にも問題はない。なお、精液検査各種パラメータおよび妊娠成立、不成立とDFIの関連性を適切に統計学的に解析されている。以上より、本研究方法は、質の高い後方視的研究であり、妥当なものである。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

本研究は日本人男性不妊患者における初めての大規模な精液検査および妊娠（タイミング法および人工授精）を予測するDFI値の検討である。さらに、妊孕性のある男性20名のDFIの検討も行っている。これによって、DFI値から自然妊娠、人工授精、体外受精および顕微授精の選択を提案できる可能性が示唆された。今後の日本人男性不妊患者における診療の指標となりうる研究である。これらの点で本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### **【結論の妥当性】**

申請論文では、既存の妊孕性を評価する指標である精液検査パラメータとDFIは負の相関関係があることを示した。さらに、妊孕性のある男性は不妊患者と比較してDFIの値は有意に低く、不妊患者におけるタイミング法および人工授精による妊娠成立とDFIのCut-Off値を提示した。過去の研究において、精液検査パラメータとDFIの相関性や人工授精からstep upする基準となる可能性が報告されている。これらの結論は、理論的に矛盾するものではなく、泌尿器科学、内分泌学、アンドロロ

ジーなど関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

各国において既存の精液検査パラメータとDFIの関連性を示唆する報告はあるが、日本人における大規模な比較やタイミング法および人工授精による6か月以上の追跡による妊娠成立DFIの関連性、および妊孕性のある男性のDFIを検討した報告は少ない。本研究は妊孕性のある男性のDFIは不妊男性と比較して有意に低く、人工授精、タイミング療法における妊娠成立を予測するDFIのCut-Off値は24.0%と高値であることを示した。人工授精、体外受精へのstep upを示す指標の一つとして、DFIが有用な可能性を示した。この点で本研究は臨床的に大変意義深いと評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、泌尿器科学、内分泌学、アンドロロジーの理論を学び、研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌に掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

#### **(主論文公表誌)**

Asian Journal of Andrology

(24 : 40-44, 2022)