男子不妊症の治療学的検討

—Clomiphene Citrate 投与による精漿 transferrin 上昇度と

Sperm Count 改善度との関連性—

札幌医科大学泌尿器科学教室（主任：熊本悦明教授）

高木 良雄 熊本 悦明 伊藤 直樹 南部 明民
立木 仁 三熊 直人 赤樫 圭吾 丸田 浩

THERAPUTIC EVALUATION OF MALE INFERTILITY

—The Increase of Seminal Transferin Level and the Improvement in Sperm Concentration Following Administration of Clomiphene Citerate—

Yoshio Takagi, Yoshiaki Kumamoto, Naoki Itoh, Akihito Nanbu, Hitoshi Tachiki,
Naoto Mikuma, Keigo Akagashi and Hiroshi Maruta

Department of Urology, Sapporo Medical College
(Director: Prof. Y. Kumamoto)

This study was designed to evaluate the functional changes of Sertoli cells following the administration of clomiphene citrate for male infertility.

Sperm count and seminal transferrin level were measured before and after the treatment in 22 cases of oligozoospermia (sperm count: less than $20 \times 10^6/\text{ml}$) and 14 cases of subnormal sperm count group (sperm count: $20 \sim 30 \times 10^6/\text{ml}$). Clomiphene citrate was administered per os for more than 3 months consecutively in a dose of 25 mg/day. Seminal transferrin concentration increased more than 1.5 times compared with pre-treatment level in 6 cases (16.7%). Among these patients, sperm count markedly increased ($20 \times 10^6/\text{ml}$ or more than the pre-treatment level) in 3 cases (50%) and slightly increased ($10 \times 10^6/\text{ml}$ or more than pre-treatment) in 1 case (16.7%). In 30 cases, in which seminal transferrin level did not increase, sperm count markdly increased in 6 cases (20%) and slightly increased in 6 cases (20%). Thus, sperm count was improved more frequently in the cases in which seminal transferrin level remained elevated than the cases with no elevation of serum transferrin level.

Serum FSH level of patients whose seminal transferrin level remained elevated after the treatment was significantly higher than that of patients with no elevation of serum transferrin level (mean $\pm$ SD= 32.8 ± 18.0 mIU/ml v.s. 14.4 ± 11.7 mIU/ml, respectively).

These data suggested that the activation of Sertoli cells may contribute to the increase of sperm count following the administration of clomiphene citrate and the elevated seminal trasferrin secretion may be related to the increase of serum FSH level following this treatment.

Key words: male infertility, seminal transferrin, clomiphene citrate

要旨：男子不妊症のクエン酸クロミフェン投与による Sertoli 細胞機能の変化について検討するため、この薬剤で治療した乏精子症（精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満）22例、subnormal 症例（精子数 $20 \sim 39 \times 10^6/\text{ml}$ ）14例について精子数および精漿中 transferrin の変化について検討した。クエン酸クロミフェンは1日25 mg を3ヵ月以上連日経口投与した。治療後に精漿中 transferrin が1.5倍以上上昇した症例では6例中4例（66.7%）で精子数の改善（精子数 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の増加）が認められた。精漿中 transferrin が1.5倍未満の上昇しか認められない症例では30例中12例（40%）で精子数の改善が認められた。また治療後に精漿中 transferrin が1.5倍以上上昇した症例では上昇の認められない症例と比較して治療後の血清 FSH が高値を示す傾向が認められた。以上よりクエン酸クロミフェン投与により精子数が改善する症例では FSH の上昇によって Sertoli 細胞機能が刺激され賦活化することが示唆された。

キーワード：男子不妊症，精漿中トランスフェリン，クエン酸クロミフェン

I. 緒 言

精漿中 transferrin は Sertoli 細胞機能を反映するマーカーとして、精子発生能障害例において低下していることが知られている。著者らも¹⁾既に男子不妊症症例において精漿中 transferrin が低値であり、睾丸の精細管の組織障害が強度のものほど精漿中 transferrin が低下していることを報告している。ところでその男子不妊症の成因はいまだ不明な点が多く、そのため治療法も理論的に整理されていない。ただ上述の如く男子不妊症と Sertoli 細胞機能低下とがかなり関連性があるとするならば各種治療法による Sertoli 細胞機能改善度と spermatogenesis 改善度は関連性をもつものと推定される。しかしながら男子不妊症の治療過程における Sertoli 細胞機能の変化についてはほとんど検討されていない。そこで著者らはホルモン療法剤であるクエン酸クロミフェンを男子不妊症症例に投与し、Sertoli 細胞機能の改善度の指標として精漿中 transferrin の変動を調べ、Sertoli 細胞機能の変化と精子数改善に関する治療効果との関係について検討したので報告する。

II. 対象および方法

1. 対象症例

男子不妊症症例のうち可能な限り2回以上の精液検査を行ない、精子数がいずれも $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満で、精子数の平均値が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の乏精子症例22例、 $20 \sim 39 \times 10^6/\text{ml}$ の subnormal 群14例を対象とした。対象症例に対しては3カ月以上クエン酸クロミフェンを投与し治療経過をみた。クエン酸クロミフェンは1回25mgを1日1回連日投与した。なお精路通過障害のある症例は除外した。また2回以上精液を採取しクエン酸クロミフェン投与を行なわなかった16例については精漿中 transferrin の治療前の変動を調べる対象に加えた。

2. 精液の採取

4～5日以上以上の禁欲期間をおいた後、用手法で射精させ精液を採取した。精液は液化後精液量、精子数などを測定した。その後精液は $2,000 \times g$ 30分間遠沈を行ない、上清を採取して精漿とし測定まで凍結保存した。

3. 精漿中 transferrin の測定

精漿中 transferrin の測定は既に報告したように RIA 2 抗体で行なった¹⁾。標準品としては human transferrin (Sigma) を使用した。radio-isotope 標識 transferrin は¹²⁵I transferrin (Amersham) を使用し、抗体は抗ヒト-transferrin sheep 血清 (Amersham)、

抗 sheep IgG donkey 血清 (Amersham) を使用した。

4. 血清 FSH, LH, testosterone の測定

不妊症症例の血清 FSH, LH, testosterone の測定は、各々 FSH キット「第一」(第一ラジオアイソトープ), LH キット「第一」(第一ラジオアイソトープ), Testosterone test set (Wien) を用いて測定した。

5. クエン酸クロミフェンによる精子数改善度の評価

クエン酸クロミフェンによる治療効果は、熊本ら²⁾の判定法に準じて、精子数の改善に重点をおき、①著明改善—精子数が治療前値より $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上増加したもの、②改善—精子数が治療前値より $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上改善したもの、③不変—精子数が治療前値と比較して $\pm 10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の変動か $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上減少したものの3段階に分類した。なお治療前の精子数は、可能な限り2回以上の精液検査を行ない、最高値の精子数を治療前値とした。

III. 結 果

1. 精液検査ごとの精漿中 transferrin の変動に関する検討

精漿中 transferrin が治療を行っていない場合どの程度の変動を示すかを目的に、2回の精液検査を行なった乏精子症18例、subnormal 群19例について、精漿中 transferrin がどの程度変動するか検討した。図1にこの結果を示したが、精漿中 transferrin は精液検査

図1 治療前の精漿中 transferrin の変動

ごとに変動を認めるが、低い値と高い値の比が1.5以上を示した症例は乏精子症で18例中4例(22.2%)、*subnormal*群で19例中2例(10.5%)であった。また2回の差の絶対値が $15\mu\text{g/ml}$ 以上あった症例は乏精子症では1例もなく、*subnormal*群では19例中3例(15.8%)であった。以上のように精液中 transferrin は

検査毎に変動を示すものの、その比が1.5を超えて変動する場合は少ないため、治療後の精漿中 transferrin が治療前より1.5倍以上上昇した場合精漿中 transferrin 上昇例とした。

2. 治療前後の精子数の変化と精漿中 transferrin の上昇との関連性についての検討

図2に治療前後の精子数の変化を示した。同時に各症例の transferrin の上昇の有無も分るようにしてある。これを乏精子症と *subnormal* 群にわけて精子改善度別に精漿中 transferrin の上昇の有無をまとめたのが図3である。治療後精漿中 transferrin が1.5倍以上上昇したものは全体で36例中6例(16.7%)に認められた。内訳をみると精子数著明改善群9例中乏精子症で1例、*subnormal*群で2例、精子数改善群7例中乏精子症で1例(14.3%)、精子数不変群20例中乏精子症で2例(10%)で治療後精漿中 transferrin の上昇が認められた。

図4には治療後の精漿中 transferrin が1.5倍以上上昇した6例と1.5倍未満の上昇しか示さないか低下した30例の2群に分けて精子数改善度との関係を示した。精漿中 transferrin 上昇群では乏精子症4例中1例、*subnormal*群2例全例で精子数の著明な改善を認めた。また乏精子症の1例でも精子数の改善が認められた。従って精漿中 transferrin 上昇群では精子数著明改善50%、精子数改善16.7%で精子数が改善以上を示したものは66.7%であった。一方精漿中 transferrin 不変群30例では乏精子症18例中2例、*subnormal*群12例

図3 精子数改善度別の精漿中 transferrin 上昇の有無

図4 精漿中 transferrin 上昇の有無別の精子数改善度

中 4 例で精子数の著明な改善を認めた。また乏精子症の 5 例, subnormal 群 1 例で精子数の改善を認めた。従って精漿中 transferrin 不変群では精子数著明改善 20%, 精子数改善 20% で精子数が改善以上を示したものは 40% であり, 精漿中 transferrin 上昇群のほうが精子数著明改善例が多く認められた。

つづいて個々の症例の治療経過中の精漿中 transferrin の推移について検討した。図 5 に精漿中 transferrin 上昇群 6 例の治療経過中の精漿中 transferrin の推移を示した。治療前精漿中 transferrin が $20\mu\text{g/ml}$ 以上の 3 例では治療中の精漿中 transferrin はいずれも $60\mu\text{g/ml}$ を示した。一方治療前の精漿中 transferrin が $20\mu\text{g/ml}$ 未満の 3 例では治療中に精漿中 transferrin の上昇は認められるもののその上昇は軽度であった。図 6 に精子数は著明改善あるいは改善したものの精漿中 transferrin の上昇が認められなかった 11 例の治療経過中の精漿中 transferrin の推移を示した。これら症例では精漿中 transferrin が比較的大きく変動している症例が多く認められた。図 7 に精子数の改善および精漿中 transferrin の上昇の両者とも認められなかった症例の治療経過中の精漿中 transferrin の推移を示した。治療経過中の精漿中 transferrin の変動は比較的少ないが治療経過中に精漿中 transferrin がむしろ下降している症例も認められた。

3. 精漿中 transferrin の上昇の有無と治療前後の各種血中ホルモンの変化との関係

これまでの検討では、クエン酸クロミフェン投与に

図5 クエン酸クロミフェン投与による精漿中 transferrin の変化—精漿中 transferrin 上昇群—

より精漿中 transferrin が上昇した症例で精子数改善度も良好であるという結果であった。そこで次に精漿中 transferrin 上昇群と不変群の間に内分泌学的な差異がないか検討を行なった。

図6 クエン酸クロミフェン投与による精漿中 transferrin の変化—精漿中 transferrin 不変群 その1—(精子数著明改善・改善群)

図7 クエン酸クロミフェン投与による精漿中 transferrin の変化—精漿中 transferrin 不変群 その2—(精子数不変群)

① 精漿中 transferrin の上昇度と治療前後の血清 FSH の変化との関係

図8に精漿中 transferrin 上昇群と不変群の2群に分けて治療前後の血清 FSH の値を示した。治療前の血清 FSH は、精漿中 transferrin の上昇群では $10.1 \pm 6.3 \text{ mIU/ml}$ (mean $\pm$ S.D.), 不変群では $8.2 \pm 4.7 \text{ mIU/ml}$ であり、両群間に差は認められなかった。しかし治療後の血清 FSH では精漿中 transferrin 上昇群で $32.8 \pm 18.0 \text{ mIU/ml}$, 不変群で $14.4 \pm 11.7 \text{ mIU/ml}$ となり、上昇群のほうが有意に血清 FSH が高値であった。FSH に Sertoli 細胞機能賦活作用があるとされていることから興味深い所見と考えている。

② 精漿中 transferrin 上昇の有無と治療前後の血清 LH の変化との関係

治療前後の血清 LH の値も同様に精漿中 transferrin 上昇群と不変群に分けて検討し、図9に示した。治療前の血清 LH は精漿中 transferrin の上昇群では平均 $12.5 \pm 4.9 \text{ mIU/ml}$, 不変群では $10.9 \pm 4.8 \text{ mIU/ml}$ と、FSH と同様に両者の間に差は認められなかった。しかし治療後の血清 LH は上昇群で $40.2 \pm 17.6 \text{ mIU/}$

ml, 不変群で $20.4 \pm 13.2 \text{ mIU/ml}$ となり、血清 FSH と同様に精漿中 transferrin の上昇群で血清 LH は有意に高値を示した。

③ 精漿中 transferrin 上昇の有無と治療前後の血清 testosterone の変化との関係

そこでその LH に反応して上昇すべき血清 testosterone についても、精漿中 transferrin 上昇群と不変群の間で治療後上昇に差があるかどうかについて検討してみた。しかし図10に示す如く治療前の血清 testosterone は精漿中 transferrin の上昇群で $4.51 \pm 0.91 \text{ ng/ml}$, 不変群で $4.91 \pm 1.78 \text{ ng/ml}$ で両群間に差は認められず、しかもまた治療後血清 testosterone 値も精漿中 transferrin 上昇群で $7.96 \pm 2.74 \text{ ng/ml}$, 不変群で $7.96 \pm 2.10 \text{ ng/ml}$ であり、これも両群間に差は認められなかった。LH に差があるのに testosterone に差が認められなかったという所見の解釈は難しいが、いずれにせよ Leydig 細胞性 testosterone は FSH 程 transferrin 上昇に強く関与していないと考えられる。

IV. 考 察

Transferrin は鉄結合性蛋白質であるが、増殖の盛んな精細胞に鉄を運搬することにより精子発生過程に

図8 精漿中 transferrin 上昇の有無と治療前後の血清 FSH

図9 精漿中 transferrin 上昇の有無と治療前後の血清 LH

関与している。その transferrin が Sertoli 細胞から分泌されていることは既に明らかにされている³⁾。その分泌能を臨床的に検討した報告も少なからず認められるが^{4)~7)}、Sertoli 細胞の解剖学的な立地条件から精漿中に分泌された transferrin を調べる以外に方法はない。

しかし精液は睪丸以外の部位からの分泌液の混入もある訳で、我々が¹⁾検討したところでは精漿中 transferrin の約70%のみが精巣由来であり、残りは他よりの混入である。しかし睪丸性 transferrin が大部分を占めていること、精巣の精細管組織障害度が高度症例ほど精漿中 transferrin が低値を示すことが明らかであることから、精漿中 transferrin は Sertoli 細胞機能を反映する一応のマーカーと考えている。

ところで精子発生不全例の個々の障害原因を分析することが難しく、そのため治療の決め手がない現状では各種の薬剤による治療が試行錯誤により試みられている。クエン酸クロミフェンは1961年に Greenblatt らにより排卵誘発剤として開発された薬剤であるが、視床下部レベルで estradiol と拮抗して LH-RH の分泌を高め内因性 gonadotropin の分泌を亢進させる作用

をもつ⁸⁾。この薬剤を投与することにより血中 FSH の上昇および血中 LH の上昇による血中 testosterone の分泌亢進がおり、それにより男子不妊症例の精子発生成に亢進的作用が現れる訳である⁹⁾。従って本薬剤のホルモンの作用は当然 Sertoli 細胞機能の亢進を介してのものと推定される。そこでこの薬剤によって治療した症例の治療による Sertoli 細胞機能の改善度をみる一つの指標として精漿中 transferrin の測定を行なった。

精子数は一般に検査のたびに大きなバラツキがあることが知られている²⁾。また精漿中 transferrin は正常者においても23.1~55.9 (平均39.5) $\mu\text{g/ml}$ とひろい範囲に分布しており精漿中 transferrin が低値を示す症例も認められる¹⁾。そこでまず治療前の症例で2回以上精液検査を行なった症例について、精漿中 transferrin の変動を調べ、治療経過を検討するに足り得るか検討した。この検討の結果では精漿中 transferrin にはやはり変動が認められたが、その変動はさほど大きくなく治療経過の検討が可能であると考えられた。

精漿中 transferrin の上昇の有無と精子数改善度と

図10 精漿中 transferrin 上昇の有無と治療前後の血清 testosterone

の関係については、精漿中 transferrin 上昇群 6 例中 4 例と多くの症例で精子数の改善が認められ、Sertoli 細胞の賦活化が精子数改善に大きく関与していると考えられた。また今回の結果では精漿中 transferrin 上昇群と不変群の間に治療前の血清 FSH に差は認められなかったが、治療後の血清 FSH をみると上昇群では不変群と比較して有意に高値を示した。また治療後の血清 LH も FSH と同様に精漿中 transferrin 上昇群で高値を示した。しかし LH に刺激されて分泌される血清 testosterone ではいずれの群でも上昇が認められ、特に差が認められなかった。これらのことから考えると、クエン酸クロミフェン投与による FSH の分泌亢進が精漿中 transferrin の上昇に大きく貢献していると考えられる。

現状では男子不妊症の成因は未だ不明な点が多いが、今回の検討から Sertoli 細胞の賦活化が精子数の改善に重要な役割を演じている何等かの原因による Sertoli 細胞機能低下が精子発生不全発症に結びついていることが示唆された。そのような意味で男子不妊症の治療についてはさらに Sertoli 細胞を直接刺激する薬剤について検討することが重要である。その Ser-

tolis 細胞からの transferrin の分泌は各種の薬剤で刺激亢進されることが知られている。例えば Skinner ら¹⁰⁾は培養した Sertoli 細胞の培養液中に FSH の他 testosterone, さらに retinol などを加えると各々の薬剤の単独添加よりも複数の添加のほうが Sertoli 細胞からの transferrin の分泌を亢進させると報告している。また Huggenvik ら¹¹⁾も培養 Sertoli 細胞に FSH, insulin, retinol, testosterone を与えると Sertoli 細胞内の transferrin mRNA が増加すると報告している。このように Sertoli 細胞からの transferrin の分泌はある単独の薬剤の投与よりも複数の薬剤投与でその分泌はさらに亢進する可能性があり、今後臨床的に使用可能な Sertoli 細胞を賦活化する各種薬剤の開発が不妊症の治療を進展させる上で重要であると考えられる。

文 献

- 1) 高木良雄, 熊本悦明, 渡辺勇一: 男子不妊症例の Sertoli 細胞機能に関する研究—精漿中 transferrin および精漿中 inhibin 活性に関する検討—. 日不妊会誌, 34, 214—224, 1989.
- 2) 熊本悦明, 丸田 浩他: oligozoospermia に対する Mecobalamin の臨床効果. 泌尿紀要, 34, 1109—1132, 1989.
- 3) Skinner, M.K. and Griswold, M.D.: Secreted proteins from rat Sertoli cells. Exp. Cell Res., 123, 127—135, 1980.
- 4) Holmes, S.D., Lipshutz, L.I. and Smith, R.G.: Transferrin and gonadal dysfunction in man. Fert. Steril., 38, 600—603, 1982.
- 5) Calдини, A.L., Orlando, C., Barni, T., Messeri, G., Pazzagli, M., Baldi, E. and Serio, M.: Measurement of transferrin in human seminal plasma by a chemiluminescent method. Clin. Chem., 32, 153—156, 1986.
- 6) Liu, D.Y., Cooper, E.J. and Baker H.W.G.: Seminal transferrin, an index of Sertoli cell function: Is it of clinical value? Clinical Reproduction and Fertility, 4, 191—197, 1986.
- 7) 吉田謙一郎: ヒト精漿中の transferrin 濃度についての検討. 日泌尿会誌, 80, 216—223, 1989.
- 8) Kato, J., Kobayashi, T. and Villee, L.M.: Effect of Clomiphene in the uptake of estradiol by the active hypothalamus and hypophysis. Endocrinology, 82: 1049, 1968.
- 9) Sigman, M. and Vance, M.L.: Medical treatment of idiopathic infertility. Urologic Clinics of North America, 14 (3): 459—469, 1987.
- 10) Skinner, M.K. and Griswold, M.D.: Secretion of testicular transferrin by cultured Sertoli cells

is regulated by hormones and retinoids. *Biology of Reproduction*, 27 : 211—221, 1982.

- 11) Huggenvik, J., Sylvester, S.R. and Griswold, M. D.: Control of transferrin mRNA synthesis in

Sertoli cells. *Annals New York Acad. Sci.*, 438 : 1—7, 1984.

(1990年3月14日受理)