

**MW-8-6** 臍帯血管内皮細胞において、エストロゲンによりミトコンドリア一酸化窒素合成酵素を介し、ニトロシル化されたミトコンドリア蛋白のプロテオーム解析

札幌医大<sup>1</sup>, カリフォルニア大アーバイン校<sup>2</sup>

郷久晴朗<sup>1</sup>, Hong-Hai Zhang<sup>2</sup>, 秋元太志<sup>1</sup>, 寺本瑞絵<sup>1</sup>, 田中綾一<sup>1</sup>, 岩崎雅宏<sup>1</sup>, Dong-Bao Chen<sup>2</sup>, 斎藤 豪<sup>1</sup>

**【目的】**ミトコンドリアは多くの細胞で一酸化窒素(NO)作用の中心の場であると考えられている。われわれは最近、エストロゲンが血管内皮細胞蛋白のニトロシル化(SNO)を促進することを示した。しかしながらエストロゲンがミトコンドリア蛋白をSNOするかは不明である。そこでミトコンドリアを単離し、もしSNOされていればどのような蛋白か、またミトコンドリア局在の血管内皮型NO合成酵素(eNOS)を介しているか検討した。**【方法】**倫理委員会の承認を得て正常産の臍帯からヒト臍帯血管内皮細胞(HUVEC)を培養し、E2, ニトロソグルタチオン(GSNO)で20分間処理した。SNO蛋白をビオチンスイッチ法でラベルし、ミトコンドリア, 小胞体, ゴルジ体マーカーを用い免疫染色法にて解析した。磁気ビーズを用いてミトコンドリアを単離し、SNOレベルをWB法にて分析した。ビオチンでラベルしたミトコンドリアSNO蛋白をトリプシン処理し、アビジンビーズを用いて回収し質量分析を行った。ミトコンドリア, 細胞膜, ゴルジ体に局在するeNOSをHUVECに過剰発現させ、E2によるSNOへの影響を調べた。**【成績】**E2とGSNOはミトコンドリア蛋白SNOを促進した。プロテオーム解析によってcontrol, E2, GSNO付加HUVECからそれぞれ、12, 33, 57のミトコンドリアSNO蛋白を同定し、それらは機能分析により、アポトーシスやエネルギー代謝など様々な機能に関わっていた。E2は細胞膜ではなく、ミトコンドリア・ゴルジ体局在のeNOSを介してSNOを促進した。**【結論】**E2はミトコンドリア局在eNOSを介して速やかに血管内皮ミトコンドリア蛋白のSNOを促進した。つまりミトコンドリア蛋白のSNOはエストロゲンの血管拡張作用に重要であると考えられた。

**MW-9-1** 精子力は35歳から低下する

獨協医大越谷病院泌尿器科

岡田 弘, 林 雅敏

**【目的】**挙児開始年齢の高齢化に伴って、妊娠率の低下が問題になっている。この原因が、卵のagingによることが問題にされているが、男性因子のagingとの関連を検討した報告は少ない。精子の卵活性化能に対するagingの影響をマウス卵を用いた異種間授精実験で検討した。**【方法】**排卵処理したマウス卵管から採取した卵に、児のある妊孕性の確かめられた健常男子25人と男性不妊外来患者で精液所見に大きな異常の無い特発性不妊患者65人から採取した精子を、ピエゾマイクロマニピュレーターで顕微授精し、7時間後、15時間後に第二極体の放出と雄性・雌性前核形成の有無により、卵活性化率を評価した(mouse oocyte activation test: MOAT)。当該研究は、施設の倫理委員会の許可を受けて行なった。**【成績】**妊孕性の確かめられた健常男性精子では、MOATから見た20歳から50歳までは卵活性化能は85%-68%の間で大きな低下は認められなかった。特発性男性不妊患者精子では35歳以降で急速な卵活性化能の低下(35-40; 62%, 40-45; 52, 45-50; 39%)を認めた。**【結論】**35歳以上の女性の妊娠率の低下の原因は、卵のagingのみによるのではなく、多くの場合女性よりも高齢の男性パートナーの精子機能のagingによる影響を受けている不妊カップルも多数存在すると考えられた。男性因子を評価する方法のさらなる発展が期待される。

**MW-9-2** 微小流体チップ(Microfluidic Sperm Sorter; MFSS)で回収した精子のDNA損傷率(DNA fragmentation index)に関する検討

福岡大<sup>1</sup>, アイブイエフ詠田クリニック<sup>2</sup>

城田京子<sup>1</sup>, 伊東裕子<sup>1</sup>, 小濱大嗣<sup>1</sup>, 南 星旭<sup>1</sup>, 伊東智宏<sup>1</sup>, 河邊麗美<sup>1</sup>, 日高直美<sup>2</sup>, 宮本新吾<sup>1</sup>

**【目的】**近年、精子のDNA損傷率(DFI)が流産に影響することが示唆されている。今回MFSS法により回収した精子のDFI低減効果を検討した。**【方法】**一般男性37名の精液所見(精液量・総精子数・運動率)と、密度勾配遠心+swim up(S)またはMFSS(M)処理後のDFIを測定した。精液所見のいずれかが低い症例についてSまたはM法で処理後のDFIを比較した。S法では90%アイソレート(Irvine Scientific)を、M法ではQUALIS(メニコンライフサイエンス)を使用した。DFIはDNAクロマチン構造解析で測定した。精液検査はWHOラボマニュアル第5版に準拠した。なお、本研究は当院倫理委員会の承認を受けた。**【成績】**対象の平均年齢は31.8±8.3歳、精液量は2.3±1.6 ml, 総精子数は123.7×10<sup>6</sup>, 運動率は47.2±16.3%であった。S:M後の精子濃度, 運動率, DFIの平均はそれぞれ、49.4±46.4:3.6±4.0, 60.3±19.4:95.6±2.8, 10.1±8.5:0.8±1.9であった。S法では一般男性でもDFIが平均10%を示した。M法ではICSIに十分な量の精子を回収できた。処理前の精液量, 総精子数, 運動率が低い各11, 11, 6例についてS:M後のDFIは6.4±1.7:1.3±0.9, 16.6±11.8:1.3±2.8, 11.9±9.3:0.2±0.8といずれもM法のDFIが有意に低く、回収精子のDFIは平均1%程度であった。**【結論】**MFSS法は精子のDNA損傷率を抑制させ、体外受精の生児獲得率改善が期待される。