

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

改進重覆睪丸取精(TESE)進行卵細胞質內精蟲注射(ICSI)的多重考量—臨床和動物實驗的評估

Modification of the techniques for better testicular sperm retrieval in repeated Testicular Sperm Extraction (TESE) and following Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) – Evaluation of Clinical Trial and Animal experiment

計畫編號：NSC 87-2314-B-038-046

執行期限：86 年 8 月 1 日至 87 年 7 月 31 日

主持人：江漢聲 台北醫學院 泌尿科

一、中文摘要

在本年度研究計畫中，我們針對必須重覆取精來進行卵細胞質內精蟲注射的不孕症男人，如何保存睪丸組織和精蟲做較先進的評估。我們從動物實驗模式瞭解以切開後用細針多方向吸取精原小管可以做最無傷害、最多資訊的篩檢，在非阻塞性無精蟲症病人，我們就以這微量組織做 FISH，觀測是否有單套染色體，進而是否要做睪丸精蟲萃取來進行卵細胞質內精蟲注射。在睪丸精蟲萃取的方法上，目前我們開始做顯微精原小管切取術，以精原小管為單位，取多處的精原小管來做精蟲萃取。在精蟲的冷凍保存方面，我們的結果顯示 Yolk buffer 解凍後精蟲品質最好。從我們累積的經驗結論，多重考量來充分利用睪丸的精蟲將在今後使睪丸起因無精蟲的病人更有機會成功受孕，同時也能保持睪丸的完整。

關鍵詞：卵細胞質內精蟲注射、重覆取精、睪丸取精、精原小管

Abstract

In this project, we focus to evaluate the update technique for testicular sperm extraction and preservation for the infertile male who are needed for repeated sperm retrieval in the cycle of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI). Through the result of the rabbit experiment, we found that open, fine needle, multi-direction aspiration to get seminiferous tubule is minimal invasive and the most informative

screening biopsy method. Clinically, the specimen of seminiferous tubules from the non-obstructive azoospermia patients can be screened with Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). If there existed a haploid chromosome showed in FISH, that means meiosis did have been happened in the seminiferous tubule, then further testicular sperm extraction (TESE) for the ICSI will be performed. Recently, we do microdissection of seminiferous tubules in the procedure of TESE. Under microscope, we can differentiate the healthy seminiferous tubule from fibrotic one, and dissected for TESE. In the experience of sperm frozen, our result revealed that Yolk Buffer is the best medium to reserve sperm motility after defrozen. Based on our experience, modification of the technique for better testicular sperm retrieval will provide more opportunities in the future for ICSI and less injury to the testicular of the patients with testicular azoospermia.

Keywords: Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), Testicular Sperm Extraction (TESE), Repeated Sperm Retrieval, Seminiferous tubule.

二、緣由與目的

卵細胞質內精蟲注射(Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)在近年來改寫了男性不孕症的治療⁽¹⁾，無論是阻塞性無精蟲⁽²⁾，睪丸組織無精蟲⁽³⁾都有相當程度的突破。祇要能找到有活性的精蟲或成熟的精細胞，就有受孕的機會，在我們以往的經驗中，在男性不孕的各種治療，包括顯微精

道手術⁽⁴⁾、電激取精⁽⁵⁾、副睪丸取精⁽⁶⁾都有相當的成績；最近以不同精蟲做 ICSI 來治療男性不孕的成功率，授孕率達 59.74%，懷孕率達 42.11%⁽⁷⁾，我們近來更在國科會的支助下進行副睪丸取精的動物實驗和臨床研究，發現如何對外科技巧的改良，增加取精的成功率⁽⁸⁾；而原來計劃對臨床上較困難的重覆取精做進一步的實驗和研究。

在我們進行本年度研究計劃時，MESA 或 TESE 取精來進行 ICSI 的研究在世界各地都已普遍，各項研究也有飛躍的突破，所以本計劃原先的一些構想，在我們的先前的研究結果和其他有些大型研究中以證實不是那麼實際。包括：

- (1) 精蟲外觀品質並非 ICSI 成功率的因素⁽⁹⁾。
- (2) 睪丸精蟲、副睪丸精蟲的 ICSI 成功率相近⁽⁹⁾。
- (3) 副睪丸精蟲的情況無論在首次開刀或重覆手術都相當難預測；對於副睪丸精蟲不良的病人來說，睪丸取精是較現實的⁽⁸⁾。
- (4) 睪丸精蟲的冷凍技巧已有突破；冷凍精蟲 ICSI 的成功率也提昇到一個境界，所以睪丸取精將更普遍⁽¹⁰⁾。

所以本研究因應這些生殖科技的發展，在本年度所做的研究包括四個目標：

- (1) 比較不侵襲的手術(細針吸取)作反覆的睪丸切片，希望對睪丸造成更小的傷害，得到更多的訊息⁽¹¹⁾。
- (2) 在 TESE + ICSI 的外科手術中，我們針對睪丸組織的保存和顯微精蟲的取得，發展睪丸顯微取精手術 (Microdissection)⁽¹²⁾。
- (3) 在微細睪丸組織中分辨是否有製精功能，我們採用 FISH (螢光原位雜交法) 來偵測是否有減數分裂的發生，可以

預知是否有精蟲存在的可能。
本研究中也探討睪丸精蟲冷凍的技巧。
三、結果與討論

I. 睪丸“篩檢切片”的技巧探討

A. 細針穿刺的動物實驗：

我們以不同的方法做不同的兔子睪丸穿刺和切片，發現在(1)經皮穿刺 (2)切開穿刺 (3)切開做組織切片，三種方法中以切開穿刺最為精確，對睪丸傷害性最小。經皮穿刺的缺點是較小的睪丸無法精確做穿刺，有時引起附近的血腫。切開做組織切片的傷較大，炎性反應相當厲害；如果祇是一個小傷口切開，以細針 (20 號針頭)，連接含 HTF 的小管和 10cc 空針筒，對睪丸做各種方向的穿刺吸取，可知有下列的好處：

- ① 穿刺準確，可以向各種方向取樣本。
- ② 穿刺傷口極小，一般不用縫合，有時壓迫止血即可。
- ③ 取出樣本為精原小管組織，在顯微鏡下即可做精蟲的觀察。
- ④ 即使精蟲很少的睪丸 (萎縮或壞死的睪丸) 也可以取得精原小管。

B. 人體的睪丸組織以 FISH 來判定是否有製精跡象：

對於無精蟲的病人，在做睪丸精蟲萃取以前，可先以 FISH (Fluorescent In Situ Hybridization; 螢光原位雜交染色法) 觀察少量的睪丸組織，判定有無單套染色體存在。

本研究中共作了 10 名睪丸起因無精蟲病人，包括 Klinefelter's syndrome 病人 3 名、Y 染色體異常病人 1 名，發現 3 名病人有單套的 spermatid 存在。

這種技巧的確能分辨無精蟲病人的睪丸組織到底有無細胞染色體的減數分裂，是否值得做進一步的睪丸精蟲萃取進行卵細胞質內精蟲注射。

II. 睪丸顯微萃取精蟲做卵細胞質內精蟲注

射的技巧探討：

傳統的睪丸切片術不僅對睪丸造成傷害，取的組織多，而且不見得找得到精蟲，對於睪丸起因的無精蟲病人，特別是睪丸非常小的情況下是相當大的挑戰。在我們最近的臨床經驗中有底下的結果：

a. 以精原小管為單位，分辨精蟲的有無來取樣本。

b. 可以在顯微鏡中精細的含精蟲的精原小管切取。

III. 睪丸精蟲冰凍的研究探討

在冷凍精蟲的實驗中我們用四種不同的冷媒，包括 Yolk buffer、8% Glycerol、10% Glycerol 和 15% Glycerol，在八組病人的試驗中，精蟲數在 $21-75 \times 10^6$ ，活動力在 4%-69%，解凍後四種冷媒所得到的立即平均精蟲活動力是 5.75%、2%、0%、0%，過了三十分鐘後平均精蟲活動力是 11.25%、3.75%、0%、0%，所以無論是何種精蟲，還是以 Yolk buffer 冷媒的解凍結果最好。我們將繼續這個研究，對睪丸精蟲的研究，希望能得到比 Yolk buffer 更完美的配方。

IV. 討論與結論：為保證睪丸組織免於在重覆取精時受到太大的傷害，臨床上三種考慮是有實際的需要。(1) 如何精確篩檢哪些睪丸會有精蟲；以免重覆取精傷害睪丸組織。(2) 如何在很小的睪丸中最精確找到精蟲；以及(3) 如何保存很有限的睪丸精蟲，這也是本研究的三大方向。就切片篩檢技巧來說，本研究先以動物實驗的模式來評估何種篩檢切片方法最精確，傷害最小，發現以切開多方向細針穿刺吸取精原小管的方式是最合理的篩檢切片方法，我們也應用於臨床，發現在局部麻醉下，以放大鏡 3.5 倍的開刀就可以做相當精確的“迷你傷口穿刺切片”。取出的精原小管，如果有精蟲，在阻塞性無精蟲病人可能就可以直接做 ICSI，非阻塞性無精蟲病人則要擇一個 Cycle 做更精確的精原小管顯微切取，找到有限的精蟲做 ICSI；如果篩檢的精蟲吸取為無精蟲，那麼以這些組

織做 FISH，將給我們一個很好的依據，要不要做顯微切取精原小管(Microdissection)(表一)，當然，睪丸精蟲若能冰凍，在整個流程上也是相當重要的角色。

四、計劃成果自評

I. 與原計劃內容相符程度：

本研究由於是現行尖端生殖科技，國際上發展相當快速，故原計劃中的構想在一年內已不實際。所以實際這一年所做研究內容除了冰凍技巧的探討之外，無論是動物實驗和臨床運用均和原計劃內容不符。

II. 達成預期目標：

然而本年度的實驗結果所達到的目標也如預期，包括(1) 重覆取精的標準判定；如果副睪丸精蟲不良可朝向睪丸取精，篩檢和多方向吸取來判定睪丸精蟲的有無；(2) 阻塞性無精蟲病人實際上取少許精原小管即可做 ICSI，睪丸起因無精蟲病人則以顯微探索(Microdissection)來精確取精；(3) 冰凍技巧方面我們將持續發展解凍良好的 Yolk buffer 冷媒的冷凍精蟲。

III. 研究成果的學術和應用價值：

本研究在今年內有重大的突破，包括：(1) 迷你傷口的多方向睪丸精蟲吸取篩檢，侵害性小，臨床運用價值高；(2) 顯微取精(Microdissection)將運用在睪丸精蟲非常少的病例；(3) 以 FISH 做睪丸有無製精的判斷，在學術上還是首見，我們也開使用於臨床。

IV. 發表於期刊的可能：

本研究的成果已在寫成論文，預計今年內會寄出一至二篇於國外期刊，也將發表於明年三月的男性醫學會和外科醫學會。

五、參考文獻

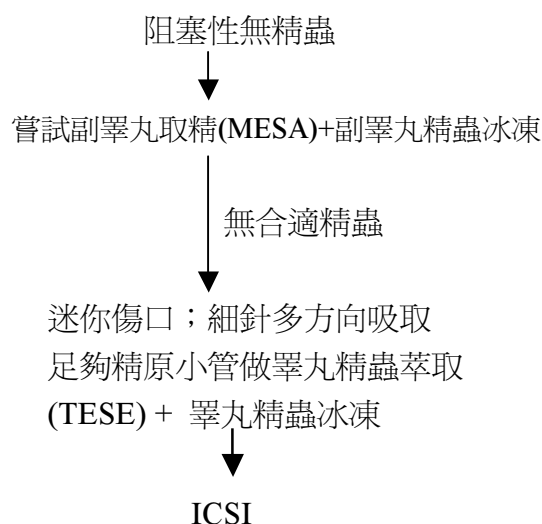
- [1] Palermo, G., Joris, H., Devroey, P.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single

- spermatozoa into an oocyte. Lancet, 340:17-18,1992.
- [2] Tournaye, H., Devroey, P., Liu, J. : Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection : a now effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of vas deferens. Fertil. Steril.,61:1045-1051,1994.
- [3] Silber, S. J., Van Steirteghem, A. C., Liu, J. : High fertilization and pregnancy rate after sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. Hum. Reprod.,10:148-152,1995.
- [4] Chiang, H. S. : Clinical study of vasectomy reversal :results of 60 single-surgeon cases in Taiwan. J. Formos. Med. Assoc.,95(11):866-869,1996.
- [5] Wang, Y.H., Chiang, H. S., Wu, C. C., and Lien, Y. N. : Electroejaculation in spinal cord injured males. J. Formosan. Med. Assoc.,91(4):413-418,1992.
- [6] Chiang, H. S., Wu, C. C., Chen, K. C., Wand, D., Chen, H. M., and Tzeng, C. C. : Functional characteristics of sperm obtained by microsurgical epididymal aspiration. Mol Androl 6:5-14,1994.
- [7] Chiang, H. S., Liu, C. H.: Intracytoplasmic sperm injection in male infertility.J Urol. ROC. 8(4):1-7,1997.
- [8] Chiang, H. S., Liu, C. H., and Fang C. L. : Surgical and pathological observation of epididymal tubule in the microscopic epididymal sperm aspiration (MESA) for intracytoplasmic sperm injection (ICSI).J Formosan Med. Assoc.97(12),1998(in press)
- [9] Madgar, I., Hourvitz, A., Levron, J., Seidman, D.S., Shulman, A., Raviv, G.G., Levran, D., and Bider, D. : Outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic injection of epididymal and testicular sperm extracted from patients with obstructive and nonobstructive azoospermia. Fertility & Sterility. 69(6):1080-4,1998.
- [10] Friedler, S., Raziel, A., Soffer, Y., Strassburger, D., Komarovsky, D. and Ron-el, R. : Intracytoplasmic injection of fresh and cryopreserved testicular spermatozoa in patients with nonobstructive azoospermia - a comparative study. Fertility & Sterility. 68(5):892-7,1997.
- [11] Mulhall, J.P., Burgess, C.M., Cunningham, D., Carson, R., Harris, D. and Oates, R.D. : Presence of mature sperm in testicular parenchyma of men with nonobstructive azoospermia: prevalence and predictive factors. Urology. 49(1):91-5; discussion 95-6,1997.
- [12] Schlegel, P.N., Palermo, G.D., Goldstein, M., Menendez, S., Zaninovic, N. and Veeck, L.L. Rosenwaks, Z. : Testicular sperm extraction with intracytoplasmic sperm injection for

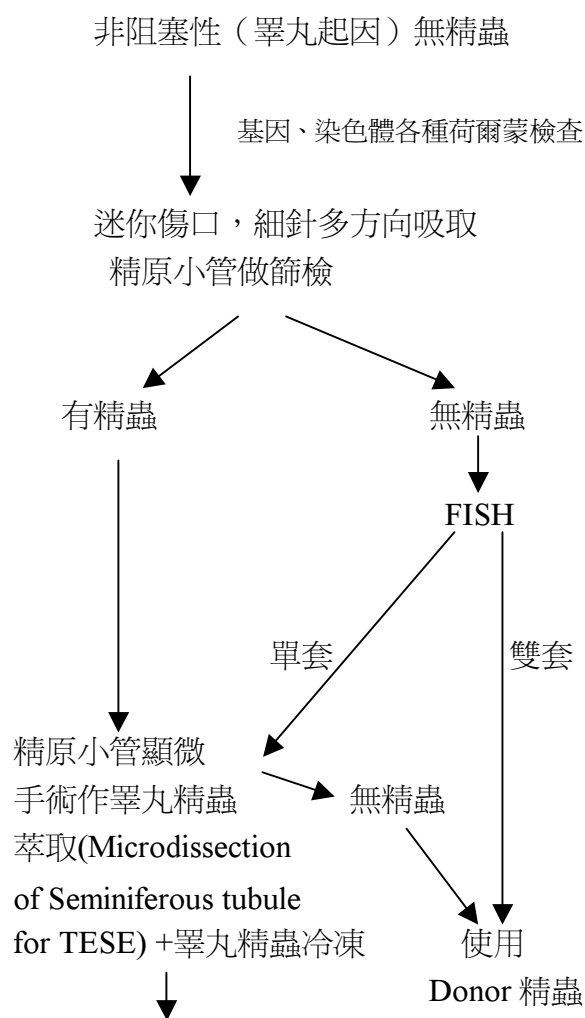
nonobstructive azoospermia. Urology. 49(3):435-40,1997.

表一、無精蟲病人重覆取精的探索手術建議流程

A.



B.



ICSI