

疫学調査における精液所見検査法の標準化

分担研究者 兼子 智 東京歯科大学（市川総合病院）講師

研究要旨 疫学調査を目的とした精液所見測定においては、方法の標準化ならびに測定値の精度管理が不可欠である。そのためには精子濃度、運動率、奇形率等の各項目について標準品の設定、それらを用いた検量線の確立が必須である。さらに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定も必要となる。将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化が望まれ、コンピューター支援画像解析装置による測定の標準化、自動化が重要である。

A. 研究目的

ヒトの精子濃度が50年前に比して半減している、若年者の精液所見悪化などが報告され、その原因としていわゆる環境ホルモンの影響が指摘され、ヒト精液所見に関する疫学的調査が企画された。これまでヒト精液所見は主として不妊治療における造精機能診断の一助とされ、精子濃度、運動率、奇形率などが測定されてきたが、測定項目、方法は施設毎に多様である。疫学調査に際しては、特に施設間のデータ比較を必要とする場合には、標本のサンプリング、調査項目の選定、調査法の標準化、測定値の精度管理が不可欠である。

今回の疫学調査の目的には、環境因子のヒト生殖能力への影響評価がある。現行では精子濃度の増減が注目されているが、分析項目の選択にあたって精液所見の何が精子妊孕性を反映するのか、量的、質的に多面的な調査が必要となる。またどの程度の差異を検出するのか、有意差を得るためにはどのくらいの標本数を必要とするかを考慮して分析法を選択する必要がある。定量のための標準品をどのように設定するのが重要となる。

本研究は疫学調査に適合した精液検査法の標準化を図る一端として、精子濃度、運動率、運動速度標準品の策定、それらの検量線を確立するとともに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定を試みた。

さらに将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化を試みた。測定方法の選択にあたっては、情報のデジタル化、自動化が可能であるなど大規模な疫学調査に適した画像解析装置を用いる方法の標準化を中心に検討を行った。

B. 研究方法

1) 血球計算盤を用いた精子濃度測定法の標準化

精液検査を行う技師の教育訓練と測定値の精度管理のために、精液所見に影響する種々の因子について詳細に検討し、それに基づいて精液検査標準法マニュアルを作成した。

2) 精液検査の自動化

精子画像解析装置による精子濃度の測定：熟練した技師が血球計算盤を用いて $123 \times 10^6/\text{ml}$ と測定した精子標本の2倍希釈系列をコンピューター画像解析装置（精子自動分析器）により測定し、精子濃度検量線を作成した。精子濃度検量線で直線性の得られる濃度に中性ホルマリン液で希釈した精子懸濁液を画像解析装置を用いて測定した。適正な精子懸濁液の濃度、懸濁液を透入するチャンバーの厚さを検討した。

精子運動標準品を用いた精子運動率検量線の作成：射精精液を攪拌密度勾配法で濃縮後、swim upまたはswim down法により運

動精子を選択的に分離した。この精子懸濁液を鏡検して全ての精子が運動していることを確認し、これを100%運動精子とした。ついで同懸濁液の半量を50℃で約5分間加熱して非動化し、これを0%運動精子とした。両者を任意の割合で混合した0-100%運動率標品の運動率を画像解析装置を用いて測定し、検量線を求めた。

C. 研究結果および考察

1) 血球計算盤を用いた精子濃度測定法の標準化

本研究班で実施している疫学調査（妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男性の生殖機能に関する調査）では、血球算定盤を用いて精子濃度を測定している。この方法は高精度であり、得られた数値を直接絶対値として使用できるが、検査技師の熟練を要する。そこで技師の教育訓練と測定値の精度管理のために、精液所見に影響する種々の因子について検討し、精液検査標準法マニュアルを作成した（奥山分担研究者の報告書および付録参照）。精液所見に影響を及ぼす因子として、精液採取に関してはマスターベーションの慣れ、採取環境、禁欲期間、経時的变化など、検査手技については精液の均一化操作、希釈などが重要であることを確認した。

2) 精液検査の自動化

精子濃度： 画像解析装置を用いる自動化法は精液中の他細胞との識別能の向上とともに標準精子を用いたキャリブレーションが求められるが、大規模な疫学調査には自動化が有利である。画像解析装置において精子濃度検量線は 4×10^6 /ml以下で直線性が得られることが明かとなり、それ以上の精子濃度では定量的な測定は困難であることが示唆された（図1）。さらにCCDカメラ画像をデジタル処理するコンピューター画像解析装置は、精子濃度、運動率を同時測定するために無希釈の精液を間隙10-20 μ mのチャンバーに透入して測定を行う場合が多いが、CCDカメラは焦点面の精子画像のみを認識するためチャンバー間隙の変化を追従できず、現行の方法では精子濃度にバラツキがでることが明かとなった。以上の予備的検討をもとに以下に示す精子濃度測定法を考案した。

中性ホルマリン液で 4×10^6 /ml以下となるように希釈した精子懸濁液を検鏡プレート（セキスイ、間隙70 μ m）に透入した。約10分間静置すると精子はチャンバー底面に沈降して1層となる。単一焦点面に収束した精子像を画像解析装置を用いて測定した。ビュルケルチュルク血球算定盤（間隙：100 μ m）画像、検鏡プレート画像ともに0- 10^8 /ml希釈前濃度の範囲で直線性が得られ、画像解析装置を用いて高精度に精子濃度を測定することが可能であることが示された（図2）。

精子運動率、運動速度： 精子運動能は主観的な顕微鏡観察ではおおまかなgradingのみが可能であり、定量値を得るには画像解析装置を用いる必要がある。現行では精子運動標準品ならびにそれらを用いて作成した検量線が存在せず、コンピューターが算出した数値をそのまま利用している。以上の観点から精子運動標準品を用いた検量線の作成を試みた。射精精液を攪拌密度勾配法で濃縮後、swim upまたはswim down法により選択的に分離100%運動精子と、50℃で約5分間加熱して非動化した0%運動精子を任意の割合で混合して調製した精子運動標準品を画像解析装置を用いて測定した結果、rが0.9以上の直線性を有する検量線を得ることができた（図3）。本検討は精製精子、すなわち精子のみが存在する画像の解析結果であり、今後、無精子症精液に上述した精子運動標準品を再添加して作成した模擬精液を用いた検討が必要である。さらに本法では精子運動の質的な変化を再現できないので、この点に関しては更なる検討を要する。精子運動速度に関しては、対物マイクロメーターを用いたキャリブレーションが有用であった。

精子奇形率： WHOの分類に従う。標本作成法、染色法の標準化が求められる。典型的な奇形精子画像配布して観察の基準とする。染色過程における細胞の変形等を考慮して標準的な方法の確立が必要である。顕微鏡画像をデジタルカメラで撮影してコンピューター上で評価する方法を検討している。

D. 結論

疫学調査に適合した精液検査法の標準化を

図る一端として、精子濃度、運動率、運動速度の各項目について標準品を策定し、それらの検量線を確立するとともに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定を試みた。さらに将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化を試みた。測定方法の選択にあたっては、情報のデジタル化、自動化が可能であるなど大規模な疫学調査に適した画像解析装置を用いる方法の標準化を中心に検討を行った。

E. 研究発表

1. 論文発表

Kaneko, S., Nozawa, A., Kuroda, Y., Oda, T., Takeuchi, K., Yoshimura, Y., Nozawa, S. Simultaneous determination of human sperm adenylyl purine nucleotides and nucleoside by means of high performance liquid chromatography-prelabel fluorescent detection system. *Advances in Reproduction* 1, 29-39, 1998.

Katayama, M., Taniguchi, H., Matsuda Y.,

Akihama, S., Kaneko, S., Ishikawa, H., Aikawa, A. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Anal. Letters* 31, 621-629, 1998.

Katayama, M., Nakane, R., Mastuda, Y., Kaneko, S., Hara, I., Sato, H. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Analyst* 123, 2339-2342, 1998.

兼子智：ヒト精子の凍結保存，日本アンドロロジー学会総会記事 17, 48-50, 1998.

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

コンピューター画像解析装置の精子濃度追従性

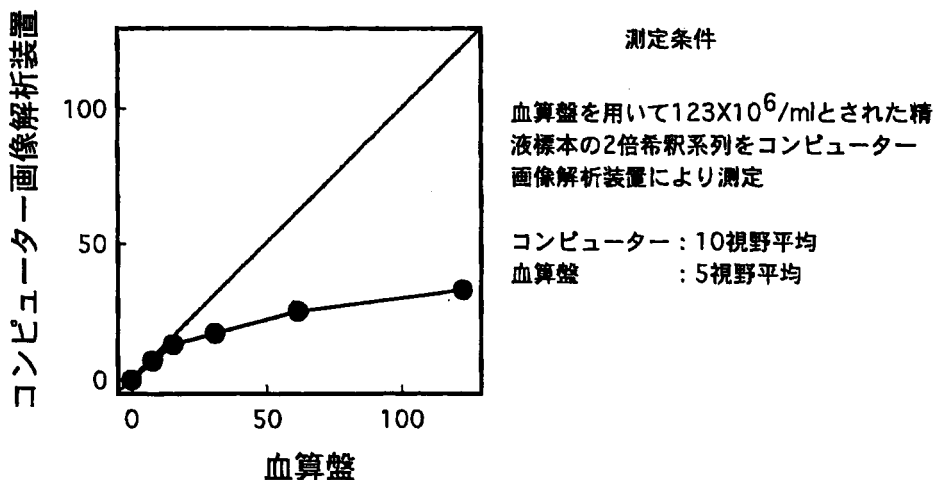


図1. 画像解析装置における精子濃度検量線

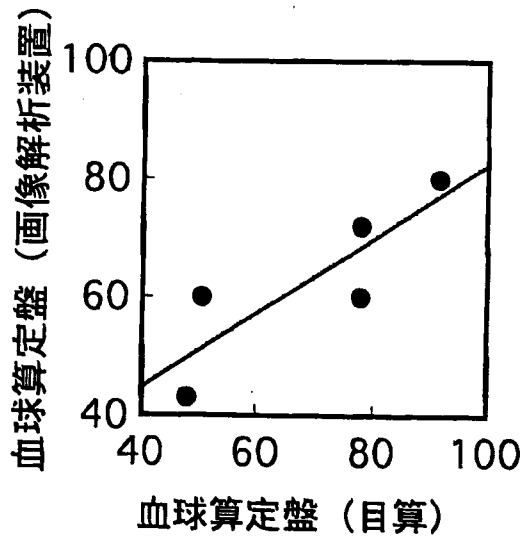


図2. 血球算定盤を用いた精子算定 (目算と画像解析装置の比較)

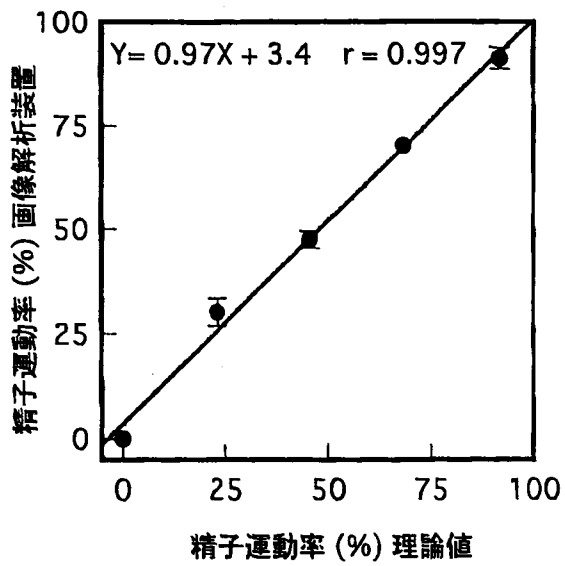


図3. 精製運動精子を用いた精子運動率検量線