

厚生省生活安全総合事業
内分泌かく乱物質等の生活環境中の化学物質による健康影響
—日本人正常男性の生殖機能に関する総合的研究

技術講習会

精液所見観察法 標準プロトコール

1998年10月27日

はじめに

これまで造精機能の指標として精液所見の検査が行われてきた。一般精液所見として精液量、精子濃度、運動率、奇形率などが検査される。

これらの値は不妊症治療において、男性側の妊孕能の指標として診断と一助とされた。このため、個々の施設において測定法は必ずしも一定でなかった。

今回、妊娠婦人の夫の精液所見に関する国際共同研究を行うに当たり、方法の標準化を行うこととなり、定められた標準仕様書に従って方法を解説した。

観察の手順

精液の受付

データシートに記入（患者個人記録）

精子奇形率測定用サンプルの分別

精子運動の観察

液化、均一化、精液量の測定

精子濃度の測定

データシートに記入（精液記録）

精漿の遠心分離、凍結保存

1. 精液の採取

1-1. 精液の用手的採取

精液採取時の記載項目に関しては別紙を参照されたい。

一般に精液採取は用手的に行われるため、マスターベーションの慣れに留意する。すなわち、初回の採取では不慣れなために精液量が少なく、精液所見が不良である場合がある。特に病院のトイレなどで採取する場合は、不慣れなために精液所見が低くなる可能性があるため留意する。精液は少なくとも 48 時間以上禁欲した後、採取する。

また自宅採取の場合は、採取後 1 時間以内に検査を施行するよう留意する。運搬に際しては、温度に留意する。標準では、20-37℃で保管、運搬する。すなわち、冬季において精液が低温に暴露されると、精子運動の不可逆的低下を来す。また患者が温度保持を目的として、使い捨てカイロなどで保温すると過度の温度上昇により精子が死滅する（一般的に 45-50℃で 5 分間以内に不動化する）。

また夏季には、精液を室温で長時間保存すると、精液中の細菌による糖代謝により乳酸

が蓄積し、pH 変動をきたして精子生存性が低下する。

精液の採取は院内または自宅等で用手的に行う。精液は採取後、30-60 分間程度室温放置して液化を行う。

精液は、射精時に精子を含む精巣上体液と副性腺液（前立腺、精囊腺等）が混合され、射出する。従って、射精直後の精液は不均一であり、均一化操作を必要とする。精液の液化の確認、および液量の測定には 5 ml のディスポシリンジを用いる。採取に際しては、十分な射精感を確認して広口の滅菌容器に全量を採取する。その際、不十分な射精（精液量が 0.5 ml 以下）のものは再検とする。

1-2. 精液の均一化および精液量の測定

広口容器に採取した精液は約 30 分間室温放置後、液化の確認および精液量の測定をおこなう。図 1 にまとめたように精液容器を斜めに保持し、5 ml のディスポシリンジを用いて、吸入、排出を繰り返す。その際、精液の泡立ちを防止するため、シリンジで精液を吸いきらず、吐ききらずに均一化を行う。液化完了はシリンジを数 cm の高さに保持して、精液を排出すると、独立した液滴となって流下するのを目安とする。もし、液化不良な場合は、連続した糸状に流下するので、さらに吸入、排出を繰り返す。最終的に上記の状態を確認して精液全量をシリンジに吸入し、精液量を測定する。値はシリンジの目盛りを読み、少数 1 桁 (0.0 ml) と記載する。さらに一滴をスライドグラスに滴下し、カバーグラスで封入して 400 倍で検鏡し、おおまかな精子濃度、運動率を観察する。これにより、後述する精液の希釈倍率決定の目安とする。

標準仕様書には下記の方法が指示されているが、本研究では精液量は容量法により測定する。

空の精液容器を用意し、数個の重量を計って偏差が小さいことを確認しておく。上皿秤を用意し、空容器重量を風袋として差し引いておく。

精液の入った容器を載せて重量を測定し、比重 1 として $1.0 \text{ g} = 1.0 \text{ ml}$ として精液量を測定する。

均一化操作後の肉眼所見で、血精液症（精液が微赤色で、顕微鏡観察により赤血球の混在を認める）、膿精液症（顕微鏡観察により白血球を認める）場合は記録してデータシートに記載する。

2. 精子運動の評価

混和、均一化した精液 10 μ l を自動ピペット（精液または希釈した精液は粘度が高い場合があり、長鎖 DNA 操作の先端の口径が大きいものを使用する）に取り、洗浄済スライドグラスに載せ、22 X 22mm カバーガラスをかける。これを 3 つ作成する。位相差顕微鏡下に 400 倍で観察し、下記に示す基準に従い、4 分類する。観察に際しては、顕微鏡ステージ保温盤（37°C）の使用が推奨される。

A：速度の速い直進運動精子

B：速度が遅く運動の直線性が不良な精子

C：尾部の振戦を認めるが、前進運動していない精子

D：非運動精子

少なくとも 200 以上の精子を観察するが、全てを同一視野で観察せず、4-6 視野を観察する。精子数が少ないときは顕微鏡の全視野を使用するが、精子濃度が濃い場合は視野の半分、さらには 1/4 を用いる。または接眼マイクロメーターを使用する。これは接眼レンズに 10 X10 の格子が切っており、この 1 ないし数区画内の精子を観察する。前進運動する A、B 型の精子をまず観察し、後に C、D 型の精子を観察する。

精子運動の観察は 3 回行い、最初に測定した A-D の検査値の差が全て $\pm 10\%$ 以下ならば、平均値を測定値とする。もし 10% 以上ならば、もう 1 回の値を加えた平均値を測定値とする。各項目（A-D）の百分率を%で記録する。

3. 精子濃度の評価

3-1. 精液希釈法

精子濃度の測定には血球算定盤を用いる。精子の検鏡には位相差顕微鏡を使用する。本研究では Burkert-Turk 型を使用する。血球の場合は、濃度が一定の範囲内であるので、一律メランジュールを用いて希釈するが、精子の場合は濃度の変動範囲が大きいので、何段階かの希釈系列を使用する。

精子の不動態ならびに希釈は固定液を使用する。方法の標準化を図るため希釈は以下に示す方法で行う。

希釈液は 200 μ l、1.0 ml の自動ピペットまたはメスピペットを用いて、あらかじめスピッツ等に 0.4 ml、1.0 ml または 2.0 ml づつ希釈液を分注しておく（固定液は室温保存可）。自動ピペットのチップは、水溶液に用いる場合は通常のものを用いるが、精液または希釈した精液は粘度が高い場合があり、先端の口径が大きいものを使用する（自動ピペ

ットのチップは希薄な水溶液を吸入するように作成されており、精液のように粘度の高い懸濁液を取り扱う際には、チップ先端をメス等で切断し、口径を少し大きくしておく、または長鎖 DNA 取り扱い用のチップの先の口径が大きい市販品を用いる)。取り扱いに際しては、必ずしも無菌的に行う必要はない。

精子濃度が特に薄いもの

希釈液 0.4 ml に均一化した精液 200 μ l を添加、攪拌する (3 倍希釈)

希釈液 1.0 ml に均一化した精液 200 μ l を添加、攪拌する (6 倍希釈)

通常の希釈

希釈液 2.0 ml に液化、均一化した精液 200 μ l を添加、攪拌する (11 倍希釈)

特に濃い精液

11 倍希釈した精液 1.0 ml を希釈液 2.0 ml に添加、攪拌 (33 倍希釈)

固定液の調製

炭酸水素 Na	50 g
ホルムアルデヒド(40% V/V)	10 ml
蒸留水	1

固定液は室温保存でパラホルムアルデヒドを生成し、白濁することがあるので、1 週間以内の使用が望ましい。

簡便な調製法として、メイロン等のアシドーシス補正用の 5%(V/V)炭酸水素 Na 溶液アンプルを購入し、ここに市販の特級ホルマリンを 1%(V/V)となるように添加して混和、使用する。10-20 ml の小容量のアンプルを用いて、頻繁に廃棄する。

3-2. 計算盤の洗浄

中性洗剤で洗浄後、蒸留水等で濯ぐ。乾燥する。直ちに使用するときにはアルコールに浸し、ドライヤー（冷風）で乾燥させる。洗浄が不十分であると、精子懸濁液が計算室内で

不均等分布する原因となる。

計算盤を清拭し（ティッシュペーパーは繊維が付着して後述する Newton 輪作成の障害となるので、キムワイプなどを用いる）、カバーガラスを載せ、クレンメで押さえて Newton 輪を作る。クレンメのない者は計算室の測堤をわずかに湿しておきカバーガラスの一端を測堤上に渡し、両示指で強く押さえながら滑り込ませて Newton 輪を作る。

希釈した精液を計算室の一侧に落とし、毛細管現象で自然に内部に広がるようにする。このとき、液は計算室の全面に広がらなくてはならない。側溝にあふれ出でも良い。精子が十分沈むまで、数分間静置してから検鏡する。この間、乾燥を防ぐため、湿潤箱（シャーレ、タッパウェアなどに水を含ませた綿などを入れたものを用意する）に入れる。

まず弱拡大で分画線を見つけ、ついで中拡大（200倍）とし、Turk分画（図00）の1, 2, 3, 4, 5の5カ所を選び、図11に示すように各16の小区画中の総数を一度に数え、重複計算しないために右辺、下辺線上のものは数え込み、上辺、左辺のものは数えないよう定めておく。5カ所を合計すると80小区画の総数が得られる。この総数をEとするとき、

1 μ l中の総数xは

$$x = E \times 400/80(\text{全区画}) \times 0.1(\text{計算室の深さ}) \times \text{希釈倍率}$$

従って、1.0 ml中の精子濃度は $x \times 1000$ となる

4. 精漿の調製と凍結保存（この項に関しては、最終プロトコール確定後に連絡します）。

精漿は精液を 10,000 rpm 以上で約 15 分間遠心分離した上清（精漿）を別容器に分取して密栓して凍結保存する。凍結に際してはプラスチック可塑剤等の溶出を最小限とするため、セラムチューブ（住友ベークライト）を使用する。

また遠心に際して、通常のポリスチレン製プラスチックチューブを使用すると、可塑剤の溶出が考えられるので、ガラス製の試験管等を使用する。さらにガラス表面に残留する有機物は、超純水で洗浄後、300-400℃で1-2時間加熱して揮発させる。

6. 精子濃度算定用標準品の配布

精子濃度算定の練習用に精液標本を配布します。

精液を固定液で希釈し、予め精子濃度を精密に測定した標本（既知検体）を作成し、これを用いて血球算定盤による精子濃度測定の練習を行う。

また4半期に一度程度、未知検体を配布しますので、マニュアルに従い、測定を行い検

査値を返送していただきます。

7. 合成標準精液による運動率測定の練習

後述する方法により運動率がほぼ 100%精子精子懸濁液を作成し、これを 2 分して一方を加熱により不動化して運動率 0%の精子懸濁液を調製する。両者を任意の割合で混合して、これを azoospermia の精液に添加した合成精液を作成する。これをビデオ撮影したものを配布するので、精子運動観察のトレーニングに使用する。

8. データの記録

データは記録用紙への記入とともに、コンピューターに入力してください。ソフトはエクセルを使用する予定です。Windows または Mac を使用できるようにする予定です。

付 録

精子運動検量線の作成

Percoll 調製法

1. 85%Percoll 液処方表

溶液 I		溶液 I I	
H e p e s	4. 7 g	M g C l 2	0. 0 5 g
N a C l	8. 0 g	C a C l 2	0. 1 4 g
K C l	0. 4 g	M g S O 4	0. 0 5 g
N a 2 H P O 4	0. 0 5 g		
K H 2 P O 4	0. 0 6 g	蒸留水	5 0 m l
に溶解			
G l u c o s e	1. 0 g		
N a H C O 3	0. 4 g		

試薬は無水換算になっています

蒸留水 90ml に NaHCO₃ 以外を溶解し、1N NaOH で約 pH7.0 にあわせる。NaHCO₃ を加えて溶かし、100ml とする。これにさらに NaOH を滴下して pH7.2 とする（溶液

I - I)。 約 70ml を別の容器に取り分ける。 残りにさらに NaOH を滴下して pH7.4 とする (溶液 I - II)。

上記の方法は Percoll 自身が弱アルカリ性のため Percoll 調製用の溶液 I - I と Hanks 液調製用の溶液 I - II を別に使い、両者の pH をきっちり 7.4 とするための処方である。 実際、臨床的には精子の生存性は pH7.2~7.8 くらいの範囲で影響を受けないので、pH7.4 の溶液 I - II のみを作って、Percoll の希釈、Hanks 液の調製の両方に使って差し支えない。

Percoll	85 ml
溶液 I - I	10 ml
溶液 I I	5 ml
アルブミン	1 ml 注1
抗生物質	10 mg 注2

85%等張化 Percoll 液 約 100 ml

蒸留水	85 ml
溶液 I - I I	10 ml
溶液 I I	5 ml

Hanks 液 100 ml

注1： アルブミンは 25%アルブミンバイアルを 1ml ずつ分注して凍結しておくとう便利

注2： 抗生物質はスペクトルを考慮して適当なものを選択してください。添加する量は適当でかまいません。

調製した Percoll 液は 0.45 m のミリポアフィルター濾過してスピッツに分注してフタをして冷蔵庫 (4 °C) 保存する。

攪拌密度勾配の操作法

1. 精液の受け付け
2. 患者氏名の確認
3. 蓋を開け、5 ml ディスポシリンジに吸引して精液量の測定
4. スライドグラスに滴下 (精子数、運動率の観察)
5. 液化状態、ゲルの混在の観察 (もし曳糸性を示すようならばほぼ同量の Hanks 液

生食を加え、吸入、排出を繰り返し、粘度低下を図る、もしゼラチン状の塊を認める時は同様にして希釈してスピッツに入れて約 5 分間静置して沈澱させ、上清を用いる（研究用にはこれがポイントである）

6. Percoll 液に層積
7. L型攪拌棒で攪拌 ——精液/Percoll 界面の両側 2cm の範囲を
8. 遠心分離（3000 回転、20～30 分間）
9. Percoll 層を吸引、除去
10. 沈澱約 0.3 ml 程度を残す

Swim down 法

精子を攪拌密度勾配法により濃縮し、沈殿精子を Hanks 液で希釈して 0.5ml 程度とする。80%Percoll 液約 10ml に層積して 37℃で数時間培養する。ここでもキャピラールを使用して swim down した精子を回収する。

Swim down に用いる Percoll 濃度を高くすると精子選別能は向上するが、精子回収率は若干低下する。60%Percoll 程度を用いると回収率は高い。一般的には 80%Percoll が使い易い。

Swim down した精子を回収、Hanks 液で 2 倍程度に希釈し、底部に 80%Percoll を 0.1ml 程度導入して（クッション法）で精子を再濃縮する。

精子を検鏡し、運動率がほぼ 100%であることを確認する（100%運動精子）。この懸濁液の半量を分取し、約 50℃の温湯中に浸漬して、精子を不動化する（0%運動精子）。

この両者を一定比率で混合し、これを無精子症精液に懸濁し、合成精液を調製する。

例： 1 : 1 の混合で 50%運動率の精液となる。

東京歯科大学市川総合病院 産婦人科 兼子 智

付録

精子形態の評価

今回のガイドラインでは、精子形態の評価のため、精液のスミア標本作製することとなっています。作製したスミア標本は評価の統一化を図るため、国際調査本部に送り、Shorr の変法にて染色され、パリとコペンハーゲンで2度にわたり形態の評価を行います。

<精液スミア標本の作製法>

1. スライドガラスの右端に 10 μ l の液状化した精液をのせる
(気泡が入らないように留意する)
2. カバーガラスでスミアに引く
3. 風乾する
4. エタノール:アセトン=3:1 の固定液中で1時間固定する
5. 風乾する

Date : 98. _____

ID番号 : Fe10 _____

検者 : _____

氏名 : _____

大学・西部・浅川・堀

精液採取時間(前回) : _____

ビデオ : ' ~ ' _____

精液採取時間(今回) : _____

禁欲期間 (hr) : _____

smear作製

検査開始時間 : _____

報告書作成

検査までの時間 (min) : _____

Volume (ml) : _____

Motility

	1	%	2	%	3	%	mean
A							
B							
C							
D							
total							

Density

×

count 1 _____

count 1' _____

count 2 _____

count 2' _____

mean _____

density (×10⁶/ml) _____

参 考 资 料

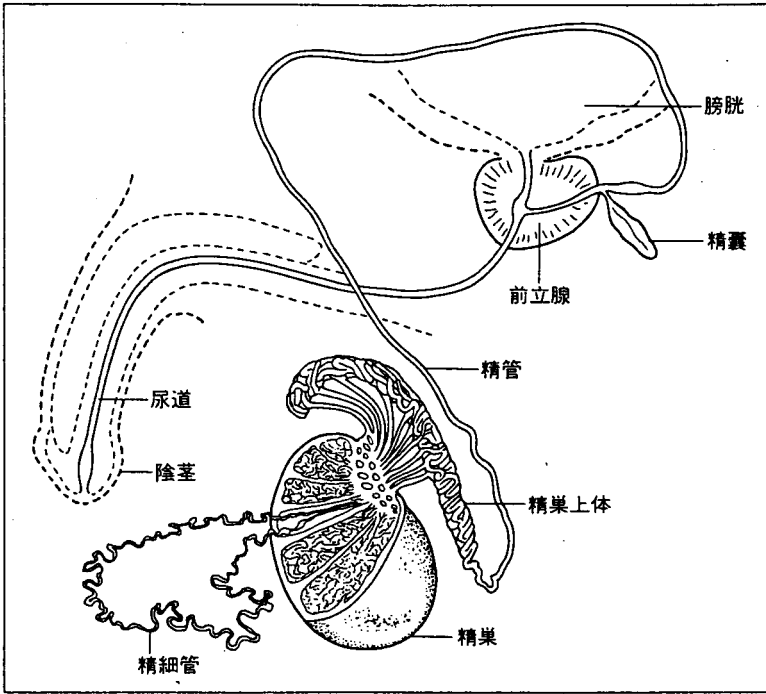


図1. 男性生殖路経の概略¹⁾

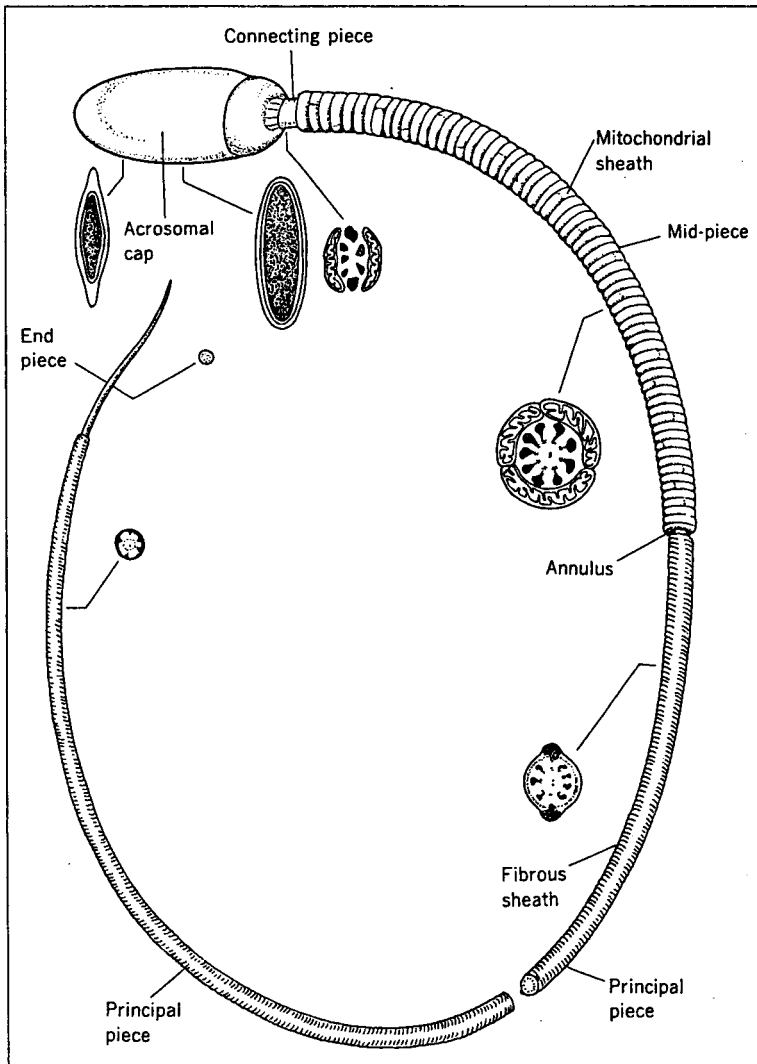


図2. 哺乳類精子の構造²⁾

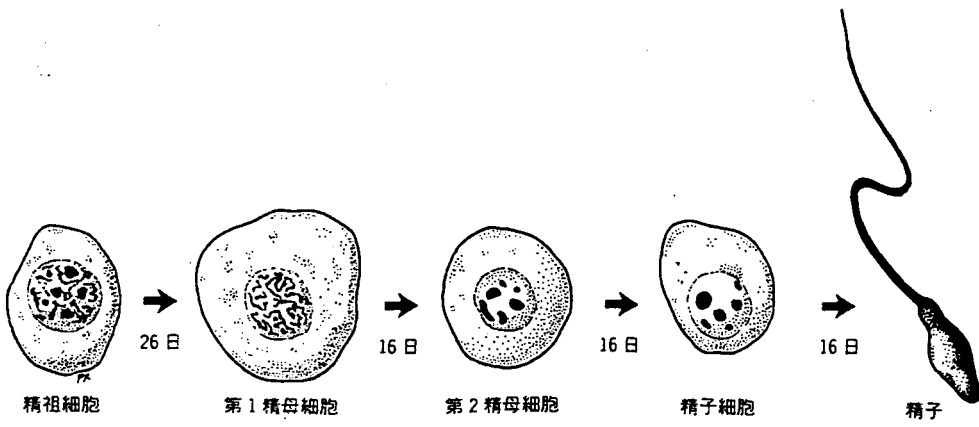


図3. ヒトの造精過程 (約74日を要す)³⁾

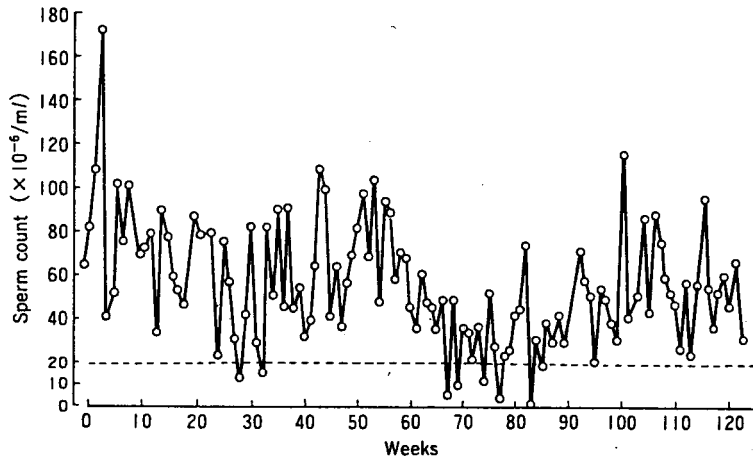


図4. 精子濃度の変動 (1個人が120週にわたって各週に測定した値)⁴⁾

表1. 二分画射精時の精液一般性状⁵⁾

	第一分画	第二分画
精液量 (ml)	1.43 (29.8%)	3.36 (70.2%)
全精子数 ($\times 10^6$)	156.2 (55.4%)	125.9 (44.6%)
精子濃度 ($\times 10^6/ml$)	108.0	35.9
精子運動率 (%)	67.4	59.3
正常精子率 (%)	89.4	88.4

*健康男子14名(26標本)の平均値。

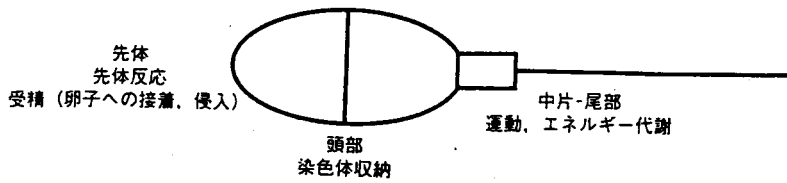


図 5. 精子機能の分類

表 2. 精液所見の正常値⁴⁾

Standard tests	
Volume	2.0 ml or more
pH	7.2-8.0
Sperm concentration	20×10^6 spermatozoa/ml or more
Total sperm count	40×10^6 spermatozoa per ejaculate or more
Motility	50% or more with forward progression (categories 'a' and 'b') or 25% or more with rapid progression (category 'a') within 60 minutes of ejaculation
Morphology	30% or more with normal forms ^a
Vitality	75% or more live, i.e., excluding dye
White blood cells	Fewer than 1×10^6 /ml
Immunobead test	Fewer than 20% spermatozoa with adherent particles
MAR test	Fewer than 10% spermatozoa with adherent particles
Optional tests	
α -Glucosidase (neutral)	20 mU or more per ejaculate (see Appendix XVII for the definition of U).
Zinc (total)	$2.4 \mu\text{mol}$ or more per ejaculate
Citric acid (total)	$52 \mu\text{mol}$ or more per ejaculate
Acid phosphatase (total)	200 U or more per ejaculate (see Appendix XV for the definition of U)
Fructose (total)	$13 \mu\text{mol}$ or more per ejaculate

表 3. 精液所見の分類⁴⁾

Normozoospermia	Normal ejaculate as defined in IA
Oligozoospermia	Sperm concentration fewer than 20×10^6 /ml
Asthenozoospermia	Fewer than 50% spermatozoa with forward progression (categories 'a' and 'b') or fewer than 25% spermatozoa with category 'a' movement (see Section 2.4.2)
Teratozoospermia	Fewer than 30% spermatozoa with normal morphology
Oligoasthenoteratozoospermia	Signifies disturbance of all three variables (combinations of only two prefixes may also be used)
Azoospermia	No spermatozoa in the ejaculate
Aspermia	No ejaculate

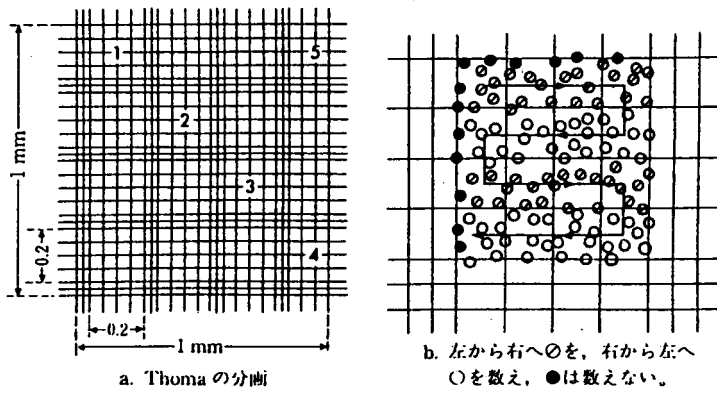


図 6. Thoma 分画の数え方

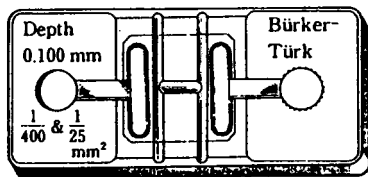


図 7. Bürker Türk 型血球計算盤

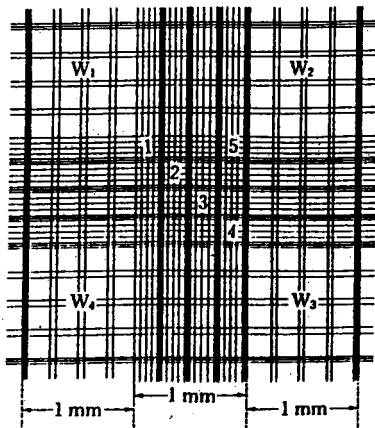


図 8. Türk の分画

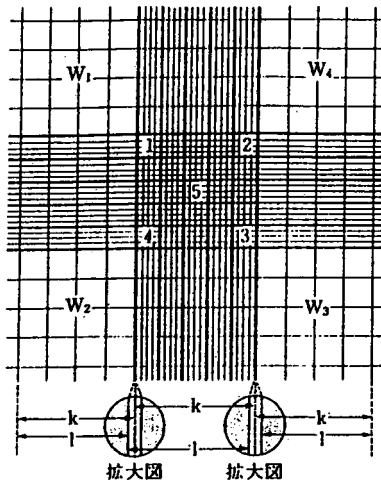


図 9. 改良型 Neubauer 分画

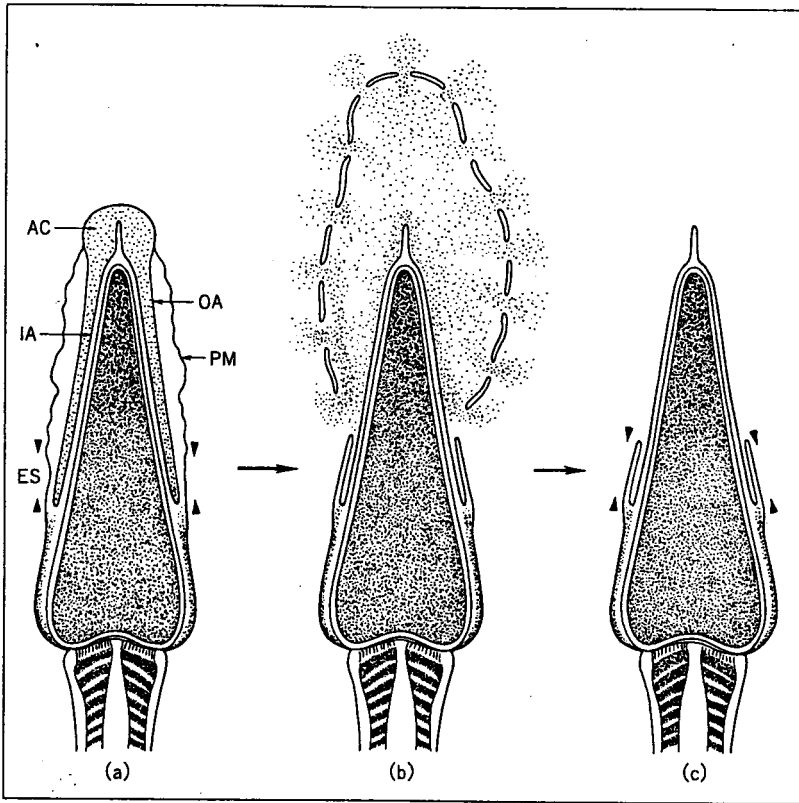


図 10. 哺乳類精子の先体反応⁶⁾

出典

- 1) Moran DT and Rowley JC: Visual Histology, Lea & Febiger, Philadelphia, p.201, 1988.
- 2) Fawcett DW: The mammalian spermatozoon. Dev Biol 44: 394. 1975.
- 3) Heller CG, Clermont Y: Kinetics of the germinal epithelium in man. Rec Prog Horm Res 20: 545, 1954
- 4) WHO: WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction 3rd ed, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1992.
- 5) 小林俊文 : 二分画射精に関する研究. 日本不妊会誌 15:7, 1970.
- 6) Bedford JM and Cooper GW: Membrane Fusion, In "Cell Surface Reviews", (Poste G and Nicolson GL ed), Elsevier/North-Holland Biommmedical Press, Amsterdam, 5:66, 1978.