

精子運動性に関する生理学的研究

分担研究者 石島 純夫 東京工業大学生命理工学部 助手

研究要旨 内分泌攪乱物質の生殖機能への影響を評価するための指標として、精子の形態と運動性を正確に調べるための観察法と解析法を比較検討した。さらに、これらを簡便にかつ効率よく行うための装置についても検討した。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質の生殖機能への影響を評価するための指標として精子数が用いられ、現在国際的な規模での調査が行われているが、生殖機能や受精現象により密接に関係する精子の形態や運動性を調べることは、解析方法がまだ確立していないなどの問題はあつたものの、より重要な課題である。これまでに、精子の運動性及びその機構をほぼ解明したので、形態や運動性を正確に解析する方法を確立し、さらに、臨床や畜産などの分野でも使うことのできる簡便な解析装置の開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

a. 精子形態の解析法

高解像度のデジタルカメラをノマルスキ一微分干渉顕微鏡に装着し、生きたままの精子の像をデジタルカメラで撮影し、コンピュータのハードディスクに取り込んだ。この画像をもとに、画像解析ソフトを用いて頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。

b. 精子運動の解析法

簡便にかつ精度の高い精子運動の解析法を確立するために、精子の運動特性を明らかにし、その特性に基づいた観察法と解析法を明らかにした。

C. 研究結果及び考察

a. 精子形態の解析法

最近のデジタルカメラの高解像度化によって、従来のフィルムに劣らない画像が得られ、ハードディスクのメモリーに直接書き込み、コンピュータソフトによって処理できた。これまで広く使われてきたビデオテープに記録する方法と異なり、デジタル画像処理では、画質の劣化や走査線による画像の不均一さなどもなくなった。さらに、デジタル画像をそのままインターネットで全世界に瞬時に転送できるなど、一カ所で集中的にデータの処理や比較が可能になり、データ処理の効率化と高精度化が容易になった。従来、世界規模での調査の大きな妨げとなっていたビデオレコーダの違いによるデータの互換性の問題もデジタル画像で

は問題にならず、世界規模での調査・研究の最も大きな障害が取り除かれた。

b. 精子の運動解析法

カバーガラスやスライドガラスなど、その運動を妨げるもののない溶液中では、精子は螺旋を描きながら螺旋軸上を比較的まっすぐに進む。通常の顕微鏡観察のように、比較的浅い容器を用いて精子の運動を観察すると、精子が自由に動ける間は螺旋を描いて移動するが、カバーガラスやスライドガラスに衝突し、精子の長軸方向の回転が妨げられようになると、精子はカバーガラス直下やスライドガラス上で円運動をするようになる。したがって、プレパラート作成後、しばらくすると、ほとんどの精子はカバーガラスやスライドガラス近くに集まることになる。ヒト精子では鞭毛がかなり大きな三次元運動をするため、頭と尾を結ぶ軸の回りを毎秒11回ほどで回転をしながら前進する。前進の推進力である鞭毛運動は、毎秒12回ほどの頻度で、振幅11マイクロメートルの比較的対称な屈曲波である。回転しない時の前進速度は、毎秒40マイクロメートルほどであった。回転の頻度は鞭毛運動の頻度と関係するので、平面的な鞭毛運動の観察によって、精子の運動の全てをほぼ予測することができる。そこで、精子の観察のための容器は、精子の回転を妨げるために、精子浮遊液の厚さを10マイクロメートル以下にする必要がある、顕微鏡などで確かめる。体外授精のためにはより多くの良い精子を選別する必要があるが、精子の質の評価のためには、できるだけ試料そのままを観察することが

望ましく、希釈などもあまり行わないことが望ましい。また観察容器内での精子の入れ替わりも防ぐ必要がある。容器内での精子の入れ替わりを防ぐためには、精子浮遊液は一定の厚さであることが重要である。

37度で長時間観察する必要がある場合には、水分の蒸発を防ぐために、カバーガラスの回りをミネラルオイルなどで封印する必要がある。鞭毛運動の頻度の正確な測定のためには、少なくとも毎秒60枚以上の画像を撮影できる記録装置か、ストロボ装置などを使用する必要がある。毎秒30枚しか記録できない家庭用ビデオテープレコーダでは、高い頻度で運動する精子を正確に記録することはできない。この目的のために、ストロボ装置は非常に有用で、短時間に測定が行えるだけでなく、通常の光源に比べて非常に短い時間の露光のために、試料の損傷が少ないと思われる。

コンピュータ画像解析ソフトでは、精子の像を2値化し、精子の頭のみを追尾するものがほとんどである。顕微鏡の対物レンズによって作られた像を正確に2値化できるよう、2値化のレベルを変えられる必要がある、読み落としのないよう画像解析ソフトのパラメータの取り込み範囲を適切に設定する必要がある。このためには、顕微鏡により鮮明な像が得られることがきわめて重要であり、暗視野顕微鏡はこの目的には向かない。位相差顕微鏡のネガティブとポジティブの二つの方法ではわずかに差があり、画像解析ソフトによってはこの違いを補正することができず、大きな違いを生じることがある。

D. 研究発表

1. 学会発表

Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., and Suarez, S. S. Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reactivated goldenhamster spermatozoa. *Zool. Sci.*, 16, Suppl., 107, 1999.

G. 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