

ヒト精液検査の標準化に向けて

分担研究者 兼子 智東京歯科大市川総合病院産婦人科

研究要旨 精液所見測定法を再検討し、標準化を試みた。画像解析装置による精液所見定量に不可欠な、精子濃度標準品、運動率標準画像の設定を行った。測定標準化には測定に使用する画像解析装置のキャリブレーションが重要であることが示された。さらに精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した新たな形態標準品の確立を試みた。

A. 目的

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た。精子濃度、運動率、奇形率などの測定法は施設毎に多様であり、必ずしも標準化されていなかった。若年者の精液所見悪化が報告され、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た。ヒト精液所見に関する疫学的調査に際しては、標本のサンプリング、調査法の標準化、測定値の精度管理が不可欠であり、疫学調査に適合した検査法の標準化が急務である。本研究は精子濃度、精子運動率、精子運動速度、奇形率等の各項目において、標準品の設定、検量線の策定、それらの精度管理について検討した。

体液中の細胞数定量の代表例として、血液中の血球算定が挙げられる。これを精液所見測定と比較すると、前者では濃度変化の範囲が小さく、採血（不随意）により一定の条件下に標本採取が可能であり、固定

標本の搬送により central labo における測定が可能である。また測定自動化に不可欠な標準血球が策定されている。一方、精液中の精子濃度は 0-数億/ml と変動幅が大きい。精子運動は経時変化しやすく、採取した施設での測定が必要となる。

精液検査の標準化に関する検討項目

精液の用手的採取： 一般に精液採取は用手的に行われるため、種々の因子が射精に影響し、ひいては精液所見が変動する。マスターベーションの慣れ、精液採取環境（トイレと専用採精室など）、禁欲期間、経時変化などを標準化する必要がある。

精子濃度、精子運動観察用チャンバー： 現行ではマクラー盤、血球算定盤など種々の精子観察用チャンバーを用いて精子濃度、運動の同時測定が行われている場合が多い。測定精度向上のためには、精子濃度、運動率測定用に最適化されたチャンバーを各々標準化する必要がある。

精子濃度： 血球算定盤を用いた精子濃度測定法は、高精度であるが検査技師の熟練を要する。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。

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。またキャリブレーションに用いる精子運動標準品が求められる。

精子奇形率： 従来基準とされた WHO の分類では精子形態と機能の相関に関しては言及されていなかった。本研究では、成熟した運動精子を精製し、これを培養することにより先体反応を誘起する。すなわち、先体反応を誘起能を有する成熟した運動精子を選択的に分離する。その形態を計測することにより優良精子標準品を作成する。さらに標本作成法、染色法の標準化も行う。

B. 方法

標準品の策定

精子濃度標準品： 標準血球を用いて血球算定盤の検定を行い、同一算定盤を用いて精液標本の精子濃度を観察し、測定値の変動係数を考慮して統計的に精子濃度を求め、精子濃度既知の仮標準品を策定する。これまで画像解析装置を用いた精液所見解析は、精子濃度、精子運動率、運動速度などのパラメーターを同時測定するため間隙 10-20 μm のチャンバーに無希釈の精液を浸透させ、測定を行う。本研究では、各パラメ-

ーターの測定精度を向上させるため、精子濃度と精子運動を個別に測定した。精子濃度測定用チャンバーには間隙 70 μm のセキスイ検鏡プレートを用いた。上述した精子濃度仮標準品をホルマリナーハンクス液で固定し、希釈系列を作成した。測定に際しては運動率表示が 0%であることを確認することにより、液の流れによる測定誤差を排除した。

精子運動率標準品： 精子濃縮後、swim down 法を用いて運動精子を分離し、顕微鏡下に得られた標本中の全精子が運動していることを確認後、半量を加熱等により不動化し、0%運動精子分画とする。両者を混合して種々の運動率を有する精子懸濁液を作成する。本品では、精子運動を質的には再現できず、今後検討を必要とする。

精子運動速度のキャリブレーション： 画像解析装置を用いて対物マイクロメーター画像を入力し、ピクセル数を距離に換算する。

精子形態： 精子形態の観察には顕微鏡が用いられる。顕微鏡観察により得られる画像は 3 次元構造物を平面に投影したものとなる。これまで精子標本の作成にはスメア一法が用いられてきた。ヒト精子頭部は球形というよりむしろテニスラケットのような円板状の形をしている。すなわちスメア一法では精子頭部が任意の方向でスライドグラスに接着し、これを 2 次元画像として解析すると精子頭部形態は大きくばらつくことになる。

本研究では、精子頭部形態標準品を得るた

め、フィルター法による精子標本作成を行った。精液または洗浄精子は 106 個となるようフィルター(孔径 2.0 μm)に吸引し、0.5%等張ホルマリン、pH7.4 で固定した。これを染色して頭部形態の観察に供した。

倫理面への配慮

研究に供した精液標本の提供者からインフォームドコンセントを得た。

C. 結果と考察

精子濃度標準品の策定

分析学において、定量分析を行うためには標準品の設定ならびにそれを用いた検量線の作成が最も重要である。精子濃度は変動幅が広いので、検量線の直線部分をどの濃度におくかが問題となる。

精液を中性ホルマリンで固定、希釈して血球算定盤で測定した。精液を 3 から 10 倍に希釈し、200 匹程度をカウントした。本法では、血球算定盤自体が標準機器であり、検量線を必要とないという利点がある反面、検査技師の習熟によりバラツキがでる。同一検体を精子測定に十分な経験を有する検査技師が測定した結果、標準誤差は数%以内であった。

コンピューター画像解析装置を用いた精液所見測定は、CCD カメラ画像をデジタル処理しますが、コンピューターは焦点面にはっきりと結像した精子のみを認識するため、チャンパー厚の変化を追従できないという欠点を有している。このため間隙が薄い特殊なチャンパーが用いられてきたが、精液は粘度が高くチャンパーへの浸透させる過程でバラツキが生じることが明かとな

った。

我々は精子濃度、精子運動の同時測定は誤差を生む要因と考え、まず、精子濃度に関しては、中性ホルマリンで $4 \times 10^4/\text{ml}$ 程度に希釈、不動化した精液を間隙が 70 μm のチャンパーに浸透させ、底面に一層になるように精子を沈降させた後に観察する方法を採用した。

コンピューターを用いることによりただちに高精度なデータがえられるように思われるが、電気信号に変換された値をアナログデータにするためには標準品を用いた検量線が不可欠である。いろいろな濃度の精液を無希釈で測定する従来法を再現するため、血球算定盤により $123 \times 10^4/\text{ml}$ と算定された精液を中性ホルマリンで 2 倍希釈系列を作成し、コンピューター画像解析装置で測定した。低濃度では直線性が得られるが、高濃度では精子数が低く算出された。画像解析装置を用いて精子濃度を正確に測定するためには、装置の測定感度に適応し、検量線の直線部分に内挿できるように精液を希釈する必要があることが示された。本研究では、精子濃度が約 $4 \times 10^4/\text{ml}$ 程度に希釈して観察を行うこととした。

精子運動率標準品

精液から運動精子を選択的に分離し、運動率 97%程度の精子懸濁液を調製した。この半量を 50°C に加熱して不動化した。両者を混合して、約 0、25、50、75、100%となるように精子懸濁液(精子濃度 $4 \times 10^4/\text{ml}$)を調製した。画像解析装置を用いて 3 回測定を行った。r=0.9 以上の直線検量線が得られた。

精子形態測定標準化

本研究では、機能的に正常な精子を 1. 直線運動性を有する、2. 成熟精子である、3. *in vitro* で先体反応誘起能を有する精子と定義した。精液から、攪拌密度勾配法を用いて精子濃縮を行い、これを 99% 等張化 Percoll (密度 1.13g/ml) に層積して 37°C、2 時間 swim down を行った。この間に先体反応を誘発した精子を cell affinity chromatography 法により精製した。

これをフィルカップ法によりフィルター上に吸引、固定した。これをギムザ染色法により染色し、顕微鏡観察に供した。スメア一法と異なり、フィルター法では精子が同一方向にフィルター上に固定され形態観察に適することが明かとなった。

現在、画像解析装置を用いた形態計測を確立するため、精子固定法、染色法、ならびに長短径比、重心点、面積、偏心率等の測定パラメーターの検討を行っている。次年度には、上述した精製法で調製した精子の形態を観察し、標準精子形態を確立したい。

D. 結論

これまで精液所見の疫学調査においても主として不妊治療における観察法が用いられてきたが、測定手法ならびに精度に不備があることが明かとなった。本研究は精液所

見測定法を再検討し、標準化を試みた。精子濃度、運動率、運動速度測定に際しては、標準品、検量線の設定が不可欠であることが示された。さらに精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した形態標準品の確立が重要である。

E. 研究発表

学会発表

兼子智、田辺清男、岩本晃明、ヒト精液検査の標準化・国際比較に向けて、

第 18 回日本アンドロロジー学会総会記事、86、1999

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀、野澤資重利、岩本晃明、兼子智、日本人正常男性の生殖機能の現状、日本不妊学会雑誌、44 :

546、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