

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告要旨

非配偶者間人工授精ドナー精子の精液所見に関する研究

分担研究者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部講師

研究要旨 慶應義塾大学病院における非配偶者間人工授精のためのドナー精液所見から、1970年から1998年に及ぶ28年間の精子数変化を現在なお解析中であるが、その一部を報告する。精子提供者は20～25歳の健康男性で、精液量2.0ml以上、精子濃度 50×10^6 /ml以上、精子運動率50%以上の良好群をドナー登録者としている。精子濃度は1970～1989年群でも、1990～1998年群に於いても共に総検体データについての検討で現在までに調査した範囲では減少傾向を示した。精子運動率については1970～1989年群で軽度の減少傾向を示したが、1990年以降では減少傾向を示さなかった。バイアスの検討ならびにデータの集積・解析を継続する必要がある。

A. 研究目的

1992年デンマークのSkakkebaekらによって過去50年間の男性の精液所見が変化してきたことが報告された。これは文献的に世界各地の男性について調査したものであったが、精子濃度、精液量の明らかな減少の事実が報告された。この事実は不妊診療に関わる男性不妊の事象のみならず、人類が抱えている問題である点を指摘したこの報告の後、次々とこれに追従する報告がなされた。これらの報告は同一の国からも精液性状の低下が、肯定的：否定的の両面からの報告であり、肯定的な場合でも精子濃度、精子運動率、精液量の3つのパラメーターのうち、精子運動率や精液量に関するコメントについては必ずしも低下を示していないものもある。

これらの統計学的考察には種々のバイアスに関する考慮が必要であることは明らかである。年齢、禁欲期間、地理的条件、季節変動などデータをサンプリングする上での選別条件も重要な要素となるばかりでなく、測定基準や測定した人物の能力などを含め、測定方法の統一化がされていないことが指摘され、データの信頼性ないしは統計的に有意であるかについての疑問が投げかけられていることも事実である。

また、精子に関する国際的疫学的調査の

中で、本邦の精子に関わる情報は触れられていない。外因性内分泌かく乱物質など環境汚染によって影響されることを仮定すれば、先進工業国であり、Dioxin類以外にも殺虫剤、農薬、界面活性剤、塩化ビニールなどの塩素化合物など、多種多様な毒性物質の被曝因子が他国より多く存在し、また魚類を多く摂取する食習慣からも食物連鎖による環境有機物の生殖能への影響が色濃く示唆される。また、条件を限定させた母集団のデータはさらに貴重な意義を有する。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院では、本邦において1948年から非配偶者間人工授精を開始し、年齢の条件や測定方法が同一である健康男性の長年に亘るデータが蓄積されてきた。これらのデータは国際的にも、またわが国の生殖能力の変遷を知る上で極めて貴重であり、かつまた莫大なものである。1970年から1998年に及ぶ28年間の精子数変化を現在なお解析中であるが、その一部を報告する。精子提供者は20～25歳の健康男性で登録時に感染症検査及び精液検査を施行して、精液量2.0ml以上、精子濃度 50×10^6 /ml以上、精子運動率50%以上の良好群をドナー登録者としている。

C. 研究結果・考察

慶應義塾大学病院における1970年から1989年までの精子データは提供者別解析の出来る結果の集積ではなく、人工授精に用いられた精液所見からの調査であり、1990年以降のデータは提供者によって提出された精液所見の集積であるため、双方の結果を同一条件のものとして対応させるためにはバイアスの考察がなお必要である。

精子濃度は1970～1989年群でも、1990～1998年群に於いても共に総検体データについての検討で現在までに調査した範囲では減少傾向を示した。減少程度は前述したバイアスの検討の上で考察すべきであるが、1970～1989年に比較し、1990年以降でより強い減少傾向を示した。精子運動率については1970～1989年群で軽度の減少傾向を示したが、1990年以降では減少傾向を示さなかった。この条件を選択した上での母集団から得た本邦の経時的変化は、環境汚染による外因性内分泌かく乱物質の影響や生活習慣の変化など多様な原因が考えられている生殖能の低下に対応する貴重な情報源となり得る。抽出した母集団の年齢が20～25歳であることから、胎内で成長する精巣形成過程での影響と仮定すると、20～25年前、すなわち、1970～1998年は少なくとも1940年代後半から1978年頃までの間にヒトの生殖能に及ぼされた影響と考えることが出来る。

Skakkebaekらの報告は61論文から14,947名の男性について検索したものであり、1940年に比較し1990年には平均精子濃度は $113 \times 10^6/\text{ml}$ から $66 \times 10^6/\text{ml}$ へ、精液量は3.40から2.75mlへと減少を示していた。この減少は単純計算すると50年間で精子濃度は約25%、精液量は約20%の減少を示し、年平均で精子濃度は $0.94 \times 10^6/\text{ml}$ 、精液量は0.013ml減少したことになり、射出精子総数は 1.22×10^4 ずつ減少したことになり得る。また、国別の分布として欧州（デンマーク、スウェーデン、フィンランド、ノルウェー、ドイツ、フランス、ギリシャ）、北米（米国）、南米（ペルー、ブラジル）、アフリカ（ナイジェリア、タンザニア）、中近東（イスラエル、リビア、クウェート）、アジア（インド、タイ、ホンコン）、オセア

ニア（オーストラリア）の広範囲にまたがっている。すなわち、特定の地域による減少と考えるよりも地球規模での減少と考えるべき報告であった。これらの変化に比較すると明らかに慶應義塾大学病院のドナー精子の減少は緩徐である。

年齢や健康状態などの特定した母集団を選定し、測定方法に関しても同一条件で検討を行った報告は例を見ない。フランスのJouannet P.らの報告によれば、1973年から1992年までの精子バンクで存在した精子についての分析が従来の疫学的統計報告より一層厳密なデータと言えらる。精液は第一射精精子、年齢と禁欲期間を補正したものであった。精子濃度の減少率は2.6%/年で、精子運動率と正常形態率から算出した正常精子数の減少は0.3～0.7%/年であった。今回の慶應義塾大学病院の統計はこれに比較しても、さらに緩徐な減少である可能性が強い。

今後は更にバイアスの検討ならびにデータの集積・解析を継続する必要があるが、慶應義塾大学病院におけるこのデータの延長線上には、現在のヒトの生殖能へ及ぼす影響因子の作用状況は20～25年後の結果として帰納することになるのだが、今後の持続的なデータ集積が、その対応策を練る上で極めて重要な情報源となるであろう。

D. 結論

慶應義塾大学病院における非配偶者間人工授精のためのドナー精液所見から、28年間（1970年～1998年）における精子数変化の一部を解析した。精子濃度は1970～1989年群でも、1990～1998年群に於いても共に総検体データについての検討で現在までに調査した範囲では減少傾向を示した。精子運動率については1970～1989年群で軽度の減少傾向を示したが、1990年以降では減少傾向を示さなかった。

E. 研究発表

1. 論文発表

末岡 浩：精子減少と環境有機物。産婦人科の世界 51, 103-109, 1999.

2. 学会発表

篠原雅美, 末岡 浩, 土屋慎一, 小林紀子, 松田紀子, 吉村泰典: 本邦における健常男性の精液所見—28年の変化. 日本受精着床学会. 平成10年7月11日.

末岡 浩: 本邦における精子数減少と環境有機物の影響. (招請講演) ART FORUM '98". 平成10年11月13日. 鹿児島.

末岡 浩: 日本人の精子・精液の状態について (招請講演) 内分泌攪乱化学物質学会

第2回環境ホルモン学会講演会. 平成11年2月15日. 東京.

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

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱物質による精巣内ホルモン環境, 精子形成能, 受精能に関する研究

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 教授

研究協力者 田中 政巳 聖マリアンナ医科大学 講師

研究協力者 栗林 靖 聖マリアンナ医科大学 講師

研究協力者 野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学 助手

研究要旨 ビスフェノールA母体経路暴露による周産期および成熟雄のステロイド代謝酵素やゴナドトロピン受容体等への影響について検討した。ラットとマウスに、ビスフェノールA 0.2および20 μg/ml を妊娠1日より出生後21日まで母体に飲水投与した。ラットビスフェノールA 20 μg/ml群の妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。またマウスビスフェノールA 0.2および20 μg/ml群の出生10週における血清中テストステロン濃度と精巣, 前立腺, 貯精嚢および凝固腺重量は対照と有意な差はなく, ビスフェノールA 20 μg/ml群の出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素, LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。また, ビスフェノールAを投与した雌から生まれた雄マウスの産仔を性成熟期まで生育させ, その精子濃度, 精子運動率を検査したところ, 0.2および20 μg/ml群ともに対照群との間に有意差を認めなかった。

A. 研究目的

I. 精巣内ホルモン環境, 精子形成能への影響

精子形成にはホルモンの存在が必須でありゴナドトロピン (FSH, LH) およびテストステロンが独立にあるいは協調して作用する。セルトリ細胞でつくられるアンドロゲン結合蛋白はライディヒ細胞で産生・分泌されたテストステロンを精路において高濃度に保つのに作用し, 精子の成熟に働くテストステロンの作用を高めている。正常な精子形成がおこなわれるためには性成熟期においてテストステロンとゴナドトロピンおよびその受容体が正常に発現することが必要である。

脳や生殖器の性分化は胎児精巣由来のテストステロンに依存している。ヒトでは胎齢8週頃, ラットでは胎齢15日頃から胎児精巣に形成されるライディヒ細胞から分泌されるテストステロンへの暴露

によって雄型に誘導され, 暴露されなければ雌型へ誘導される。またラット血清テストステロン濃度は出生直後に, LH受容体mRNAの発現は出生直前にピークを示し, これらは脳の性分化や生殖器の発達・分化に関わると考えられている。従って胎児期や新生仔期におけるホルモン環境, ことにテストステロン作用の乱れは性分化の異常を誘導し, 成熟後の生殖器に不可逆的な変化を引き起こすと考えられる。近年不安視されている精子の量的・質的低下も母体経路で暴露された内分泌かく乱物質による胎児期や新生仔期の精巣ホルモン環境のかく乱が原因となる可能性が考えられ, 本研究では内分泌かく乱物質の母体経路暴露による胎児期および新生仔期精巣のテストステロン産生とその関連調節因子への影響を検討する。10年度は内分泌かく乱物質としてビスフェノールAをラットおよびマウス

に投与し、周産期および成熟後のステロイド代謝酵素やゴナドトロピン受容体への影響について予備的検討をおこなった。

II. 受精能への影響

内分泌かく乱物質の母体経路暴露における雄性生殖機能への影響を検討することを目的とする。10年度はビスフェノールAを投与した母マウスから生まれた雄マウスの精子濃度、精子運動率を検査するとともに、体外受精や顕微鏡受精による受精率と発生率を求めるための予備的検討を行った。

B. 研究方法

I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

SD系ラットとICR/MCH系マウスを用い、ビスフェノールA 0.2および20 µg/mlを妊娠1日（膈プラグ確認日）より出生後21日まで母体に飲水投与した。現在、ラット妊娠19、21日胎児雄と出生1、3日とマウス出生10週雄の血液と精巣をサンプリング中である。血清中テストステロン濃度と精巣のステロイド代謝酵素、FSH受容体、LH受容体、アンドロゲン結合蛋白およびインヒビンのmRNAの発現をRT-PCR法により調べている。

II. 受精能への影響

上記の条件でビスフェノールAを投与したICR/MCH系マウスを用いた。10週齢以降の雄マウスの精巣上体より回収した精子を37°C、5%CO₂ in air中で30分巻培養した後、その精子濃度と運動率を血球計算盤にて二検者により3回ずつ測定した。また、マウスの顕微受精のための装置の設定を行い、顕微受精技術の基礎的検討として、未受精卵への精子の注入とその後の胚発生を確認した。

C. 研究結果

I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

【ラット】

ビスフェノールA20 µg/ml群において妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素（P450scc, 3β-HSD, P450c17, 17β-HSD）とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。出生1日精巣における

17β-HSDとLH受容体のmRNAの発現も対照と差はなかった。

【マウス】

ビスフェノールA 0.2および20 µg/ml群において出生10週における血清中テストステロン濃度(図1)と精巣、前立腺、貯精囊および凝固腺重量(表1)は対照と有意な差はなかった。またビスフェノールA 20 µg/ml群において出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素（P450scc, 3β-HSD, P450c17）, LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。

以上の結果は、胎児期から授乳期におけるビスフェノールA 20 µg/ml以下の母体経路の暴露は妊娠19日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現には影響しないことを示唆している。しかし今回よりも低濃度のビスフェノールAの母体経路暴露によって成熟後のラットの精子産生が抑制されることが報告されており、今回調べた因子以外の変動を介して精子産生が抑制される可能性も考えられる。また周産期のテストステロン濃度やLH受容体mRNAの発現は著しく変動することから、周産期の他の時期におけるステロイド代謝酵素やLH受容体のmRNAの発現等への影響を明らかにする必要がある。

II. 受精能への影響

ビスフェノールA 20 µg/ml群(A) 4匹, 0.2 µg/ml群(B) 4匹, 対照群(C) 5匹について体重、左右精巣重量、精子濃度、精子運動率を検査した。体重はA群37 ± 1.4g (平均値 ± SD, 以下同様), B群39 ± 4.2g, C群33.5 ± 2.3g, 左右精巣重量は、A群101.5 ± 12.33mg, 105.2 ± 11.43mg, B群95.2 ± 7.34mg, 98.5 ± 9.01mg, C群90.2 ± 15.65mg, 94.7 ± 16.14mg, 精子濃度は、A群28.8 ± 19.73 × 10⁵/ml, B群30.1 ± 19.37 × 10⁵/ml, C群25.6 ± 9.14 × 10⁵/ml, 精子運動率は、A群53.8 ± 6.97%, B群46.8 ± 20.72%, C群48.5 ± 14.69%であった。各群間における各parameterにおける有意差は認めなかった。

顕微受精の準備状況については、採卵数やそのquality, セッティングした

injection pipetteの状況により差が出るものの、その後の胚発生を確認するまでにいたっている。

D. 考察

10年度の研究から胎児期から授乳期におけるビスフェノールA 20 µg/ml以下の母体経由の暴露は妊娠19日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体、アンドロゲン結合蛋白およびインヒビリンmRNAの発現には影響しないことが示唆されたが、周産期を通じてのステロイド代謝酵素やLH受容体mRNAの発現等への影響を確認することが必要であり現在サンプリング中である。特に周産期の血清中テストステロン濃度は出生2時間後に急峻なピークを示して性分化に重要な役割を担い、また精巣のテストステロン産生を刺激するLHの受容体mRNAの発現は出生前日にピークを示すことが知られており、内分泌かく乱物質暴露による周産期のテストステロン産生やLH受容体への影響を明らかにするために、周産期をさらに細分しての検討も今後行う計画である。また今回調べていない因子（アンドロゲンレセプター、5α-レダクターゼ等）、組織（精巣上部、下垂体等）および内分泌かく乱物質（スチレン、ノニルフェノール等）の検討も実施する。

受精能に関する検討においては、引き続き顕微受精による検討を進めるとともに、体外受精により発生した胚を胚移植し産仔を得る系を確立する予定である。

また、蛍光プレラベル化剤を用いた液体高速クロマトグラフによる高感度測定法を応用して、母体に投与したビスフェノールAの胎児、新生仔への移行を検討する。

E. 結論

ラットとマウスに、ビスフェノールA 0.2 および 20 µg/ml を妊娠1日より出生後21日まで母体に飲水投与した。ラットビスフェノールA 20 µg/ml群の妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。またマウスビスフェノールA

0.2 および 20 µg/ml群の出生10週における血清中テストステロン濃度と精巣、前立腺、貯精囊および凝固腺重量は対照と有意な差はなく、ビスフェノールA 20 µg/ml群の出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびインヒビリンのmRNAの発現は対照と差はなかった。また、ビスフェノールAを投与した雌から生まれた雄マウスの産仔を性成熟期まで生育させ、その精子濃度、精子運動率を検査したところ、0.2 および 20 µg/ml群ともに対照群との間に有意差を認めなかった。

F. 研究発表

なし

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

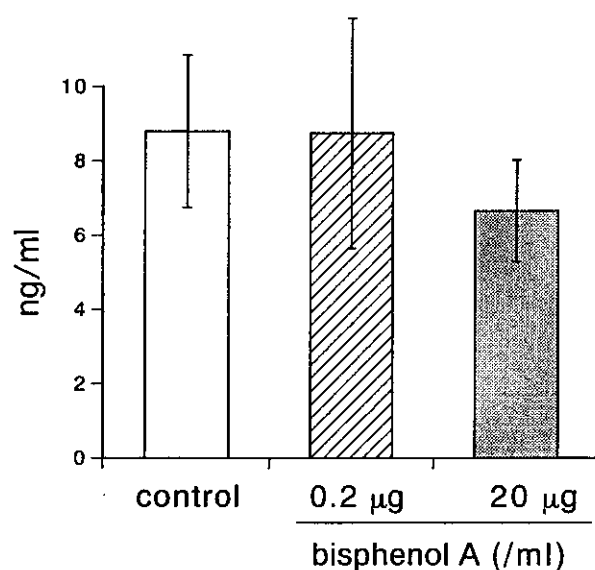


図1. ビスフェノールA投与群マウス(10週)における血清中テストステロン濃度

表1. ビスフェノール投与群マウス(10週)の体重および臓器重量

bisphenol A ($\mu\text{g/ml}$)	body (g)	testis	prostate	coagulating g.	seminal v.
		(mg/20g BW)			
control	37.1 ± 0.6	134.1 ± 3.4	6.2 ± 0.3	13.6 ± 0.5	43.1 ± 2.3
0.2	36.0 ± 0.3	128.0 ± 5.5	6.9 ± 0.5	12.1 ± 0.4	41.1 ± 2.0
20	36.4 ± 0.2	126.7 ± 3.6	5.3 ± 0.4	14.2 ± 1.1	44.7 ± 2.4

付録1 精液所見観察法標準プロトコール

付録2 国際調査コーディネーターマニュアル

付録3 内分泌かく乱物質の男性生殖機能への影響(総説)

付録4 環境ホルモンはヒト男性の内分泌・生殖系の健康障害
を起こしているか(総説)

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、精嚢腺等）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 操作用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℃）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 Burkner-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。

精子の不動化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 ず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実習

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	
Hepes	4.7 g	MgCl ₂	0.05 g
NaCl	8.0 g	CaCl ₂	0.14 g
KCl	0.4 g	MgSO ₄	0.05 g
Na ₂ HPO ₄	0.05 g		
KH ₂ PO ₄	0.06 g	蒸留水	50 ml
に溶解			
Glucose	1.0 g		
NaHCO 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 II	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 - II	10 ml
溶液 II	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、沈澱精子を 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、精液のスミア標本を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) : _____

smear作製

禁欲期間 (hr) : _____

報告書作成

検査開始時間 : _____

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