

表 1. 精漿中の元素濃度

(単位: $\mu\text{g}/\text{m l}$)

Elements	Mean	SD	Min.	Median	Max.
Na	2946	424	1151	2945	6235
K	1141	302	677	1065	2322
Mg	120.2	50.2	23.2	114.6	354
Ca	328	96	123	319	586
P	1161	267	542	1127	2563
Fe	0.461	0.868	ND	0.297	7.563
Cu	0.099	0.085	0.009	0.078	0.622
Zn	188.022	88.967	28.801	166.028	463.848
Se	0.139	0.07	0.031	0.125	0.422
Rb	1.515	0.471	0.695	1.413	3.623
Sr	0.068	0.030	0.005	0.070	0.149

表 2. 血清中の元素濃度

(単位: $\mu\text{g}/\text{m l}$)

Elements	Mean	SD	Min.	Median	Max.
Na	3032	111	2523	3033	3261
K	163	19	134	159	222
Mg	18.9	1.3	16.1	18.8	22.5
Ca	97	5	87	96	107
P	116	12	89	117	146
Fe	1.159	0.380	0.374	1.127	2.146
Cu	0.834	0.167	0.504	0.810	1.437
Zn	0.852	0.169	0.551	0.808	1.334
Se	0.155	0.032	0.083	0.154	0.291
Rb	0.208	0.038	0.137	0.200	0.350
Sr	0.042	0.026	0.014	0.033	0.154

表 3. 精漿中および血清中の元素濃度の比較

Elements	Mean value ($\mu\text{g/ml}$)		Ratio*
	Serum	Seminal plasma	
Na	3032	2946	0.97
K	163	1141	7
Mg	18.9	120.2	6.4
Ca	97	328	3.4
P	116	1161	10.0
Fe	1.159	0.461	0.4
Cu	0.834	0.099	0.1
Zn	0.852	188.022	220.7
Se	0.155	0.139	0.9
Rb	0.208	1.515	7.3
Sr	0.042	0.068	1.6

※血漿中の元素濃度／血清中の元素濃度

表 4. 精漿中の元素濃度間の相関および精子パラメータとの相関

	Na										
K		K									
Mg	0.497***	0.725***	Mg								
Ca	0.264*	0.745***	0.843***	Ca							
P	0.352***				P						
Fe						Fe					
Cu		0.260*	0.265*	0.257*		0.536***	Cu				
Zn	0.346***	0.725***	0.898***	0.810***			0.276**	Zn			
Se	0.303**	0.372***	0.391***	0.354***	0.433***		0.210*	0.395***	Se		
Rb		0.855***	0.566***	0.602***			0.279**	0.613***	0.401***	Rb	
Sr		0.421***	0.444***	0.549***				0.422***		0.411***	Sr
Age	-0.233*					-0.297**		-0.217*		-0.277**	
Abst			0.222*					0.357***			
Interval											
Vol		-0.236*									-0.226*
Motility											
Sperm conc		0.245*	0.307**		0.321**			0.295**	0.428***		
Total count			0.241*		0.218*			0.256*	0.363***		
Total mot count			0.247*		0.247*			0.239*	0.344***		

数値は相関係数 ($p < 0.05$)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$
 太字：相関係数の絶対値 0.4 以上、青太字：相関係数の絶対値 0.7 以上

表 5. 血清中の元素濃度間の相関および精子パラメータとの相関

	Na									
K		K								
Mg		0.272**	Mg							
Ca				Ca						
P			0.271**		P					
Fe				0.222*		Fe				
Cu							Cu			
Zn				0.295**		0.357***	0.363***	Zn		
Se								0.496***	Se	
Rb		0.685***	0.252*							Rb
Sr						0.213*	0.388***			0.286**
Age	0.303**									
Abst										
Interval							0.207*			
Vol										
Motility										
Sperm conc										
Total count										
Total mot count										

数値は相関係数 ($p < 0.05$)、 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$
 太字：相関係数の絶対値 0.4 以上、青太字：相関係数の絶対値 0.7 以上

若年男性（男子大学生）の生殖機能調査

—理学的検査における医師間差・施設間差に関する事前検討—

主任研究者	岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学	教授
研究協力者	塚本 泰司	札幌医科大学	教授
研究協力者	奥山 明彦	大阪大学医学部	教授
研究協力者	並木 幹夫	金沢大学医学部	教授
研究協力者	金武 洋	長崎大学医学部	教授

研究要旨 男性生殖機能に関する国際共同研究の一環として我々は 1999 年 5 月から 2000 年 5 月まで川崎地区で実施した若年男性(大学生)を対象とした男性生殖機能調査を行ったが、その 2 回目の調査を 2002 年より川崎地区で実施することとなった。さらに、札幌、金沢、大阪、長崎の 4 地区においても若年男性の生殖機能調査を実施することを決定した。今年度は調査の事前検討として理学的検査における医師（診察者）間差ならびに施設（調査実施場所）間差の検討を行った。調査に参加する予定の 5 施設から 2 名ずつの泌尿器科医が 12 名の男子大学生ボランティアに対して 2 日間にわたって理学的検査を行い、精巣サイズの測定値と精巣静脈瘤の診断結果を比較検討したところ、どちらの結果も医師間差・施設間差ともに予想外に大きかったことが判明した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質等の環境因子の影響で精子数の減少をはじめとする男性生殖機能の低下が心配されている。本研究は健康な日本人男性の生殖機能の疫学調査から日本人正常男性の生殖機能パラメータをデー

タベース化し、日本人男性の生殖機能の標準値を把握するための資料とするとともに、疫学調査を継続的に実施することによって各パラメータの変動の有無を確認することを目的とする。今年度は平成 14 年度に開始予定の若年男性（大学生）の調査の準備を行っ

た。本調査は川崎地区においては2年間おいての2度目の実施であり、また地域差を検討する全国規模の調査としては札幌、金沢、大阪、長崎の4地区において初めて実施するものである。地域差の検討は環境因子の地域差ならびにその地域の男性集団の環境因子に対する感受性の差異を検討するうえで重要な情報となる。しかしながら、異なる施設で実施した検査の結果を比較するには方法の標準化と検査技術の精度管理がなされている必要がある。精液検査に関しては当初から国際共同研究本部(コペンハーゲン大学病院発達生殖部門)および国内の調査本部(聖マリアンナ医科大学泌尿器科)を中心とした精度管理プログラムが施行されているが、理学的検査に関しては共通のプロトコールに従うという条件のみで実地での精度管理はなされていなかった。今回、川崎、札幌、金沢、大阪、長崎の5施設において疫学調査を実施し比較検討を行うにあたり、理学的検査結果の精度管理ならびに誤差の検討も重要であると考え、実際に調査に参加して理学的検査を担当する医師が集まって男子学生ボランティアに対して診察を行い、その結果の比較検討を試みた。

B. 研究方法

5施設から2名ずつ計10名の医師(経験年数は5~22年)が参加した。ボランティアは12名の大学生で、第1回目の若年男性の調査に参加した中から精巣サイズの大小と精索

静脈瘤の有無を考慮して選んだ。精巣サイズはPraderのOrchidometerを使用し、単位を容量(ml)で示した。参考値として1人の技師による超音波診断での精巣容量も求めた。静脈瘤診断では、静脈瘤なし、第1度(Valsalva負荷にて診断)、第2度(Valsalva負荷せずに触診にて診断可能)、第3度(視診のみで診断可能)に分類した。診察は2日間にわたって行った。1日目、2日目ともに同じ手順で10名の医師が12名のボランティア全員を1回ずつ診察した。

C. 研究結果

精巣サイズの測定: 精巣容量(ml)の平均値+SD(最低-最高)は、1日目の右側が 20.7 ± 4.9 (12-30)、左側が 19.0 ± 5.4 (8-38)、2日目の右側が 20.8 ± 4.9 (10-30)、左側が 19.3 ± 5.3 (8-30)であった。ボランティア12名の左右の精巣サイズを10名の医師が測定した時の測定値の分布幅は、小さくても5ml、大きいもので10ml以上あった。個々の医師で2日間の測定値が一致した割合は最高67%、最低4%であった(表1)。同一施設の2医師間での測定値の差を見るために48回(12人の左右の精巣を2回測定)の測定値の平均を比較すると、2施設で有意差を認めた。(表2)。超音波診断との比較では触診の方が高めに測定される傾向にあった。

精索静脈瘤の診断: 表3に医師ごとの診断結果を示す。12名の医師が10名の左右

の精巣を 2 日間にわたって診断した延べ 48(12×10×2)回の判定において精索静脈瘤なしという評価は最低で 16 件、最高で 36 件であった。また最も顕著な第 3 度の診断は最低 2 件、最高 11 件であった。ボランティアごとに診断結果を見てみると、10 名の医師全員が一致した判定はわずか 4 件(なし:3 件、第 3 度:1 件)だった。同一施設の 2 名の医師間で判定が一致した割合(一致率)は、63%(15 件)が 1 施設、54%(13 件)が 3 施設、17%(4 件)が 1 施設であった。同一医師による 2 日間の一致率は 73%であった。

D. 考察

精巣サイズの測定結果では医師間・施設間・施設内すべてにおいて差異が認められた。また同じ医師の測定日による差も認められた。精索静脈瘤の診察結果においても、医師間・施設間・施設内すべてにおいて差異が認められた。視診で判定可能とされる第 3 度の診断も、医師によって大きな相違が見られた。また同一の医師が同じボランティアに対して 2 日間で異なる診断をする例も見られた。

以上の結果より、疫学調査を行う前には医師間で検査結果の差を減じるためのト

レーニングを行う必要があること、および、他施設と理学的所見の比較を行う場合にはこのような差が生じる可能性があることを念頭に入れるべきであることを確認した。

E. 結論

調査に参加する 5 施設から 2 名ずつの泌尿器科医が 12 名の男子大学生ボランティアに対して 2 日間にわたって理学的検査を行い、精巣容量の測定値と精巣静脈瘤の診断結果を比較検討したところ、どちらの結果も医師間差・施設間差ともに予想外に大きかったことが判明した。この結果を各施設の各医師にフィードバックし、同一施設内での医師のトレーニングを行ったうえで疫学的調査を開始することとした。

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

表 1. 各医師における 2 回の測定的一致率

Dr. No	一致精巣数	一致率 (%)
1	1	4
2	12	50
3	6	25
4	9	38
5	2	8
6	14	58
7	6	25
8	5	21
9	16	67
10	12	50

表 2. 同一施設における測定値の医師間差

医師	精索静脈瘤診断数			
	なし	第1度	第2度	第3度
D-1	28	5	6	9
D-2	34	9	3	2
D-3	16	9	12	11
D-4	35	4	7	2
D-5	29	6	7	6
D-6	25	10	10	3
D-7	36	4	5	3
D-8	30	9	6	3
D-9	19	11	16	2
D-10	33	6	3	6

表 3. 各医師の精索静脈瘤診断結果

医師	精索静脈瘤診断数			
	なし	第1度	第2度	第3度
D-1	28	5	6	9
D-2	34	9	3	2
D-3	16	9	12	11
D-4	35	4	7	2
D-5	29	6	7	6
D-6	25	10	10	3
D-7	36	4	5	3
D-8	30	9	6	3
D-9	19	11	16	2
D-10	33	6	3	6

表 4. 各医師の精索静脈瘤診断結果

施設	診断一致数	一致率(%)
A	15	63
B	13	54
C	13	54
D	4	17
E	13	54

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書研究要旨

若年男性集団における精子 DNA 断片化と精子パラメータとの関連

分担研究者 兼子 智 東京歯科大市川総合病院 講師

分担研究者 野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学 助手

研究協力者 西田 智保 聖マリアンナ医科大学 大学院生

研究要旨 若年男性のボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度(TUNEL 陽性率) と他の精子パラメータとの関連を統計的に解析した。若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の平均 TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度 20×10^6 または 40×10^6 を基準にした場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差を認めず、前進性運動率 50% または高速前進性運動率 25% を基準に分類した場合では、運動率の低い群で TUNEL 陽性率が有意に高くなることが示された ($P = 0.0295$)。標準的な精子濃度範囲では精子濃度と精子核 DNA 断片化との間に相関関係はなく、運動性に関しては前進性運動率と高速前進性運動に負の、非運動率に正のいずれも弱い相関 ($|R| < 0.4$) が認められた。本研究では、各種パラメータの検索から男性生殖機能の現状を把握するのに役立つ基礎データを集積することを目的に、その一環として正常男性の精子 DNA 断片化分析を行い、他の精子パラメータとの関連を比較検討した。

A. 研究目的

ヒトの精子の質は不均一で、一回の射精で得られた精液には質的に様々なレベルの精子が混在している。それらの状態は通常、WHO 基準の検査法を用いて主として精子の濃度、運動性、形態によって評価するが、そこから得られる情報には限界がある

ため、男性の生殖能力を評価できるより信頼性の高い技術が求められている。精液検査で検出できない精子の異常のひとつに精子核 DNA の損傷がある。この問題は近年の補助生殖医療技術の発達に伴って、ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) に供するための正常な精子をどのように

選別するかの問題と関連して注目を集めるようになった。ICSI における妊娠率は精子の質と無関係であるという報告があるが、一方では自然状態では卵子が受け入れることのない異常な精子でも機械的に導入してしまう結果、受精に失敗したり、胎児に異常が生じる可能性があることが指摘されている。そのため、ICSI の普及に伴い、精子核 DNA の健全性の評価に関する研究の重要性が増している。

精子核の DNA 損傷は TUNEL 法によって、DNA 断片化現象として検出することができる。DNA 断片化の程度は、一般の健康な男性や妊娠能を有する男性集団に比べて不妊症の男性集団で高く、精製処理により運動性の良好な精子のみを集めた検体では、精製前より低くなることが知られている。また、精子 DNA 断片化の百分率は精子運動率、精子正常形態率と負の相関を示すとされ、精子濃度については、負の相関を示すという報告と、相関関係を認めないとする報告がある。本研究では、男性生殖機能の新規評価法の確立をめざす研究の一環として、精子 DNA 断片化分析に注目し、若年男性ボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度と他の精子パラメータとの関連を統計的に解析した。これまでに報告されている対象者の多くは大学病院等の不妊外来を受診した男性で、その内訳は

男性側因子による不妊患者、精液所見の正常でかつ原因不明の不妊患者、妊娠能の確認された精管結紮手術前の男性などである。健康な男性について検討した例は対照群としての少数例があるだけで、多数例の一般正常男性について精子核の DNA 断片化分析を行ったのは本研究が最初である。

B. 研究方法

精液検体：川崎市の大学に通う男子大学生のボランティア 79 名 (18-24 歳) から精液検体を集めた。精液は、48 時間以上の禁欲期間の後、マスターベーションによって採取した。採取後 1 時間以内に WHO ガイドラインに基づく血球計算盤を用いた目視法により精液検査を行い、精液量、精子濃度および精子運動率を測定した。TUNEL：精子 DNA の断片化は TUNEL 法を用いて検出した。本法では精液を従来のスライドグラス上に塗末する代わりに、直径 2.0 μm のメンブランフィルター上に捕捉して用いた。精子はフィルターごと 4% paraformaldehyde 4°C で 30 分間固定した後、0.05% SDS, 1.0% DTT and Proteinase K (0.4 unit/ml) で 37°C 10 分間の前処理を経て、TdT と biotin-dUTP からなる TUNEL 混合液で 60 分間反応させた。更に FITC-avidin を 37°C で 30 分間反応させた。TUNEL と FITC-avidin のラベルには MEBSTAIN Apoptosis kit II を使用した。精子核の後染色には Propidium iodide を

用いた。観察は、膜フィルターをスライドガラスにのせ、epi-fluorescent 顕微鏡を用いて精子頭部を 1000 倍で観察した。FITC-avidin により黄色または緑色に染色されたものは DNA 断片化の検出された (TUNEL 陽性) 精子とし、PI 染色により赤のみに染まるものは DNA 断片化の検出されない (TUNEL 陰性) 精子とみなした。陰性対照には TdT を除いた TUNEL 混合液で反応させた精子を、陽性対照には DNase I (4.0 mg/ml) で室温で 15 分処理した後に TUNEL 反応を行った精子をそれぞれ用いた。

C. 研究結果

1. 精液所見

若年男性ボランティアの精液各精子パラメータの平均値±SD は、精液量 3.1±1.2 ml、精子濃度 76.6±63.1 ×10⁶/ml、総精子数 239.9±213.4×10⁶、精子運動率 (a+b) 60.5±14.1%、総運動精子数 138.9±116.4×10⁶であった。79名の精液の質は、60名(76%)が精子数と運動率について正常 (精子濃度 20×10⁶/ml 以上、運動率 50%以上)、5名(6.3%)が乏精子症 (精子濃度 20×10⁶/ml 未満)、14名(17.7%)が精子無力症 (運動率 50%未満) と分類され、乏精子症と精子無力症を併せ持つ症例はみられなかった(表 1)。

2. 精子核 DNA 断片化の検出

若年男性ボランティアの TUNEL 陽性率(%)の分布は、5%未満が 18名 (23%)、

5%以上 10%未満が 26名(33%)、10%以上 15%未満が 21名(27%)、15%以上 20%未満が 10名 (13%) 20%以上 25%未満が 2名 (2%)、25%以上 30%未満が 2名 (2%) となった。全体の 96%が 20%未満に分布し、30%以上は認められなかった。79例の TUNEL 陽性率の平均値±標準偏差は 10.1±6.0%、中央値は 9.4%、最小値は 0.9%、最大値は 28.3%であった(図 1)。

精子核における DNA 断片化の程度と精液の質との関連を検討するために、若年男性集団を精液の質で 2つに分類してそれぞれの TUNEL 陽性率を比較した (図 2)。WHO 基準で定義されている精子濃度の正常限界値 20×10⁶/ml で 2つの集団に分けて比較した場合、両者の TUNEL 陽性率の平均値に有意な差は認められなかった (図 2-A、*P*=0.6439)。また妊孕能に関連したもう一つの基準として報告されている精子濃度 40×10⁶/ml を限界値として分類して比較した場合も両者の TUNEL 陽性率の平均値に有意差は認められなかった。精子運動性に関しては、WHO 基準にしたがって運動率 a+b では限界値を 50%に、運動率 a では限界値を 25%として、それぞれ TUNEL 陽性率の平均値を比較したが、両者とも運動率が限界値に満たない集団で TUNEL 陽性率が有意に高かった(図 2-C、*P*=0.0295 ; Figure 3-D、*P*=0.0015)。

図 3 は、縦軸に TUNEL 陽性率、横軸に

精子の運動性に関連したパラメータの数値をとった相関図である。運動性に関しては前進性運動率 (a+b) と高速前進性運動率 (a) に負の、非運動率(d)に正のいずれも弱い相関 ($|R| < 0.4$) が認められた。また運動率 a+b と a のグラフでは、運動率の高い領域にプロットされた多くの点が TUNEL 陽性率 15%以下のレベルにあったが、運動率の低い領域においては TUNEL 陽性率のレベルは 5%以下から 30%近くまで広範囲に分布していた (図 3-A および 3-B)。また、非運動精子の比率 (d) を横軸にとったグラフでは、TUNEL 陽性率は非運動率の高い領域で低く、非運動率低い領域で広範囲に分布する傾向を示した(図 3-E)。

D. 考察

若年男性ボランティアの精子核における TUNEL 陽性率の範囲は 0.9%から 28.3%の間に分布し、平均値と中央値はそれぞれ 10.1%と 9.4%だった。結果では示していないが、我々が不妊患者の精子検体を用いて行った DNA 断片化分析の予備的検討では、TUNEL 陽性率の平均値、最大値ともに今回の若年ボランティアより有意に高い(平均値 21.6%、 $P < 0.001$)ことが示されている。

若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度を基準にした

場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差は認められなかったが、運動性を基準に分類した場合には、運動率の低い群の TUNEL 陽性率が有意に高かった (図 2)。また TUNEL 陽性率と運動性精子の比率との間に弱い負の相関 (非運動性精子の比率との間には弱い正の相関) が示され、精子の運動性と DNA 断片化との間に負の相関があるとするこれまでの報告と矛盾しない結果となった (表 1)。TUNEL 陽性率に対して弱い負の相関を示した運動率 a+b と運動率 a の相関図をみると、運動率の高い領域では多くの点が TUNEL 陽性率 15%以下のレベルにあったが、運動率の低い領域においては TUNEL 陽性率のレベルは 5%以下から 30%近くまで広範囲に分布していた (図 3-A および 3-B)。非運動性精子の割合を示す運動率 d は運動率 a+b と強い逆相関 ($R^2 > 0.9$) を示すパラメータであるが、TUNEL 陽性率との相関においても正反対の傾向を示した (図 5-D)。このことから我々は、対象とした若年男性集団では精子の運動性と精子核 DNA 断片化との間に弱い負の相関があると結論した。しかしながら、2 次元に展開された相関図のパターンを観察すると、示された相関が有意ではあるがごく弱いという点と考え合わせて、運動性が低い領域においては TUNEL 陽性率の高い集団と低い集団の両方が存在しているという解釈も可能

である。若年男性集団における結果は、傾向としては過去の主として男子不妊症例での報告と矛盾しないものの、運動性と TUNEL 陽性率との間の逆相関が非常に弱い点、運動率の高い群と低い群では TUNEL 陽性率の分布に違いが見られた点などが異なっていた。これらのことから病的に精子の質が低下している男性の集団と正常な男性集団とでは TUNEL 法で検出される精子核 DNA 断片化のパターンに差異がある可能性も考えられる。

今回用いた TUNEL 法による精子核 DNA の断片化分析は、個々の男性における精子の質や生殖機能を評価できるほど精度が高くない。不妊症の正確な診断や、ICSI をはじめとする補助生殖技術の適応を判定する手段とするにはさらに詳細な検討がなされなければならない。次の段階としては、TUNEL 法の精度を高めるための方法の改善に加え、TUNEL 法とは異なるメカニズムに基づいて DNA の障害を検出する Annexin V 法や Comet 法などを組み合わせて精子核 DNA の変化を多面的に分析する必要がある。

E. 結論

若年男性ボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度 (TUNEL 陽性率) と他の精子パラメータと

の関連を統計的に解析した。若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の平均 TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度 20×10^6 または 40×10^6 を基準にした場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差を認めず、前進性運動率 50% または高速前進性運動率 25% を基準に分類した場合には、運動率の低い群で TUNEL 陽性率が有意に高かった。また TUNEL 陽性率に対して前進性運動率と高速前進性運動に負の、非運動率に正のいずれも弱い相関が認められた。

F. 研究発表

論文発表

西田智保、兼子智、野澤資亜利、岩本晃明：
若年男性集団における DNA 断片化と精子パラメータとの関連。聖マリアンナ医科大学雑誌 29, 541-548, 2002.

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

表 1. 精液所見

Semen parameters	Mean \pm SD	Median	Range
Semen volume (ml)	3.1 \pm 1.2	2.9	1.3–7.0
Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	76.6 \pm 63.1	64.0	9.3–447
Total sperm count ($\times 10^6$)	239.9 \pm 213.4	179.4	21.4–98
Motility a+b ^s (%)	60.5 \pm 14.1	61	17–89
Motility a ^s (%)	45.0 \pm 18.3	48	6–79
Motility b ^s (%)	15.5 \pm 11.7	11	2–48
Motility c ^s (%)	7.6 \pm 2.4	7	3–15
Motility d ^s (%)	31.9 \pm 13.6	31	6–79
Total motile sperm count ($\times 10^6$)	138.9 \pm 116.4	109.5	11.6–63

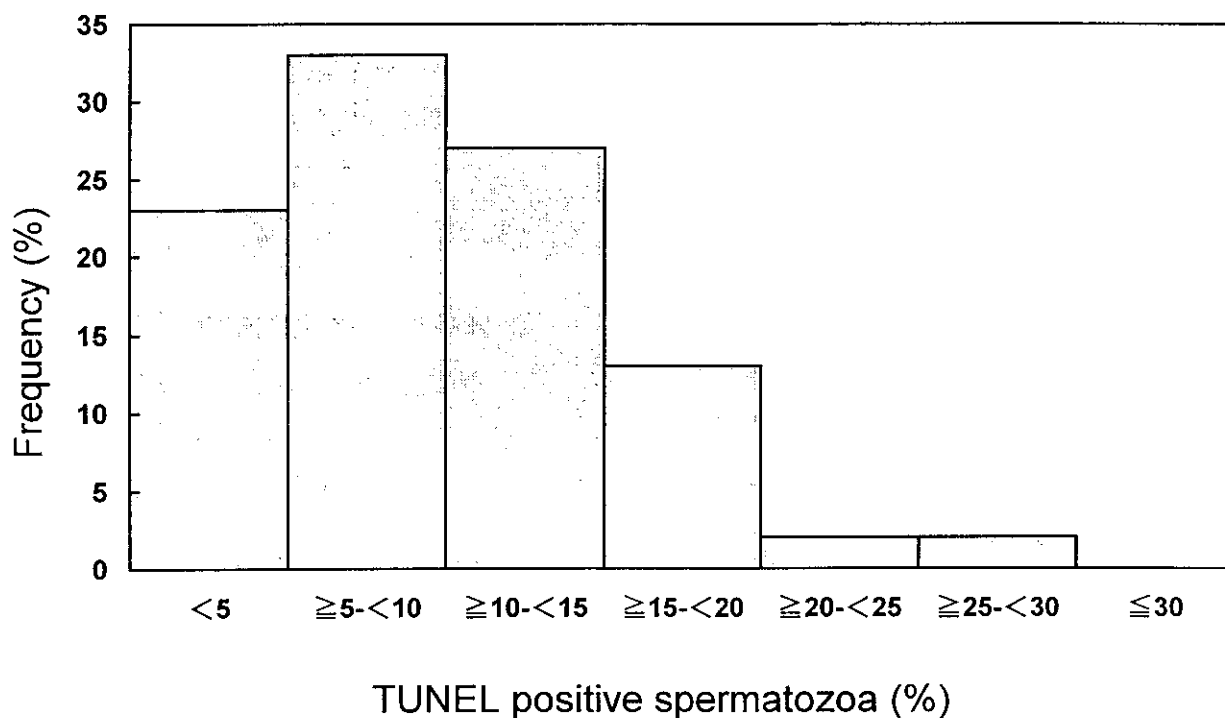


図 1. TUNEL 陽性率の分布

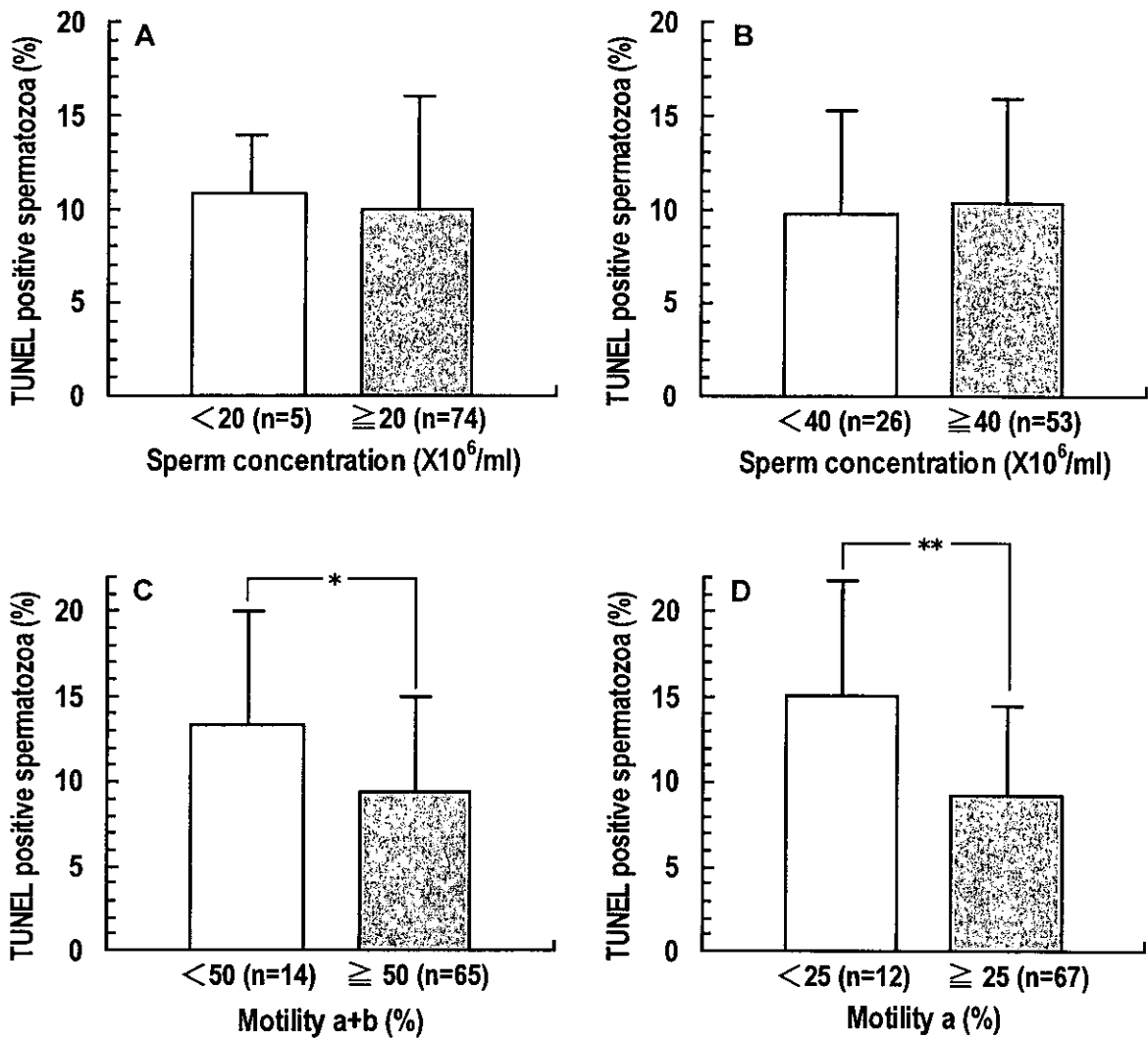


図2. 精液の質による TUNEL 陽性率の比較

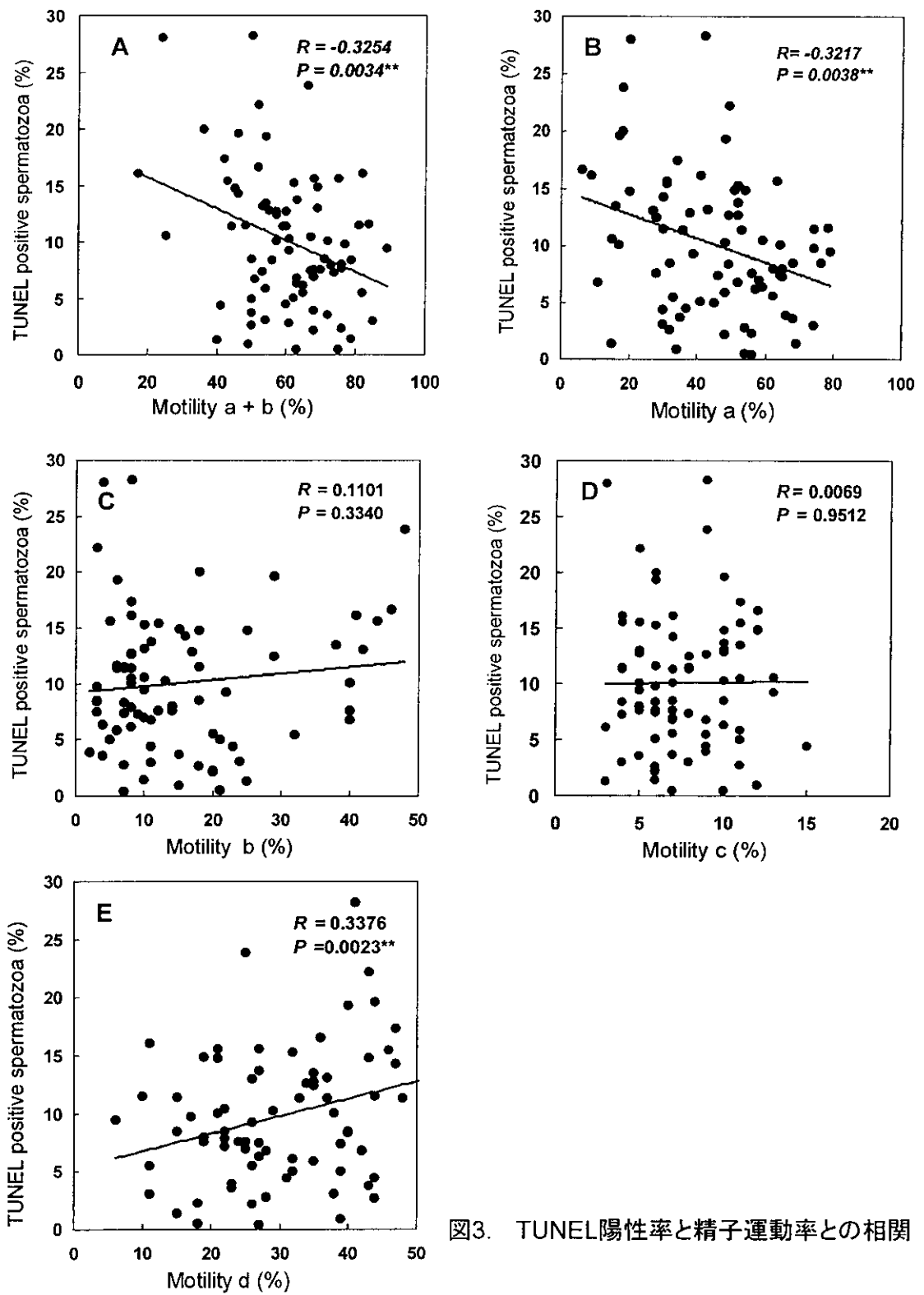


図3. TUNEL陽性率と精子運動率との相関

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書研究要旨

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。平成 13 年度は、コンピュータ画像解析装置(CAIA)において reference として用いる標準精子画像を得るため、1) 形態良好精子の精製、2) 精子頭部最大断面画像が得られるフィルター法の開発、3) 固定、風乾による形態変形を避けるための等張培養液中で CAIA に適した精子染色法の検討を行った。Percoll 密度勾配遠心分離法により濃縮した精子を swim down 後、運動率はほぼ 100%となった。ローズベンガル染色により CAIA に適した階調差の少ない均一な染色像が得られた。精液中の精子頭部形態は多様であったが、精製後の精子分画ではほとんどが均一な楕円形頭部を有しており、密度および運動能を指標とした分画法が正常形態精子の選別に有用あることが示された。フィルター法はスメアー法に比して精子頭部の長短径比の分布幅が小さく、精子頭部最大断面画像が得られることが示された。

A. 研究目的

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する。

2001 年度は精子形態観察法の半自動化を試みた。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、精子頭部最大断面画像が得られるフィルター法ならびに固定、風乾による形態変形を避け、等張培養液中でCAIAに適した精子染色法(ローズベンガル法)を開発した。

標準品として用いる精子は、形態を指標として精製操作を行った。

B. 研究方法

1. 精子の精製

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。細胞密度1.13g/ml以上の運動精子分画をさらに20-40%Nycodenz直線密度勾配中で沈降平衡を行った。密度が最も重い分画を回収し、形態観察に供した。

2. 精子染色法、標本作成法

0.3%ローズベンガル、0.05% Triton X-100を含む等張培養液(ハックス液)に懸

濁し、室温、30分間染色を行った。精子懸濁液を孔径2.0 μ mのメンブランフィルター上に吸引した後、固定、風乾することなく観察に供した。

3. 画像解析法

CAIAには油浸下に1000倍で顕微鏡観察を行い、CCDカメラで画像を記録した。画像処理にはSimple PCIを用いた。解析項目として、精子頭部面積、周囲長、長径、短径、真円率、縦横比を検討した。

(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. 研究結果と考察

射精精液中の精子頭部は多様な形態を示したが、精製操作を行うことにより、いわゆるWHO基準で正常形態精子とされる楕円形頭部を有する精子比率が増大し、最終的に沈降平衡した精子分画ではほとんどが楕円形頭部を有する精子であった。

室温下では生存精子はローズベンガルに被染色性を示さなかったが、Trion X-100を添加して除膜することにより、CAIAに適した階調差の少ない赤色染色像が得られた。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。顕微鏡観察を行い、フィルター法とスメア一法を比較した結果、後者では主として短径にばらつきが見られたが、前者では最大径面で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。図1にフィルカップ法を示した。計測項目を図示した。表1に8症例、6887匹の精子を画像解析した結果をまとめた。図2は計測パラメータ毎の分布をまとめた。各項目とも正規分布し、今後の計測項目として面積、短径、長径を選定した。図3は選定した3項目における標準偏差分布を示している。3項目とも平均±1SDに過半数の精子が分布していた。従って、実際の測定においては平均±1SDの範囲に分布した精子を正常形態精子として解析を行う予定である。

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。精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した形態標準品画像を設定した。

今後、検査技師が観察した正常形態率（主観法）との相関を検討し、本法の実用性を検証したい。

E. 研究発表

学会発表

兼子智、郡山智、赤星晃一、黒島正子、佐久間雄一、富永英一郎、前田太郎、岩本晃明、田辺清男、ヒト精子形態標準画像の確立、日本不妊学会、東京、2001年10月

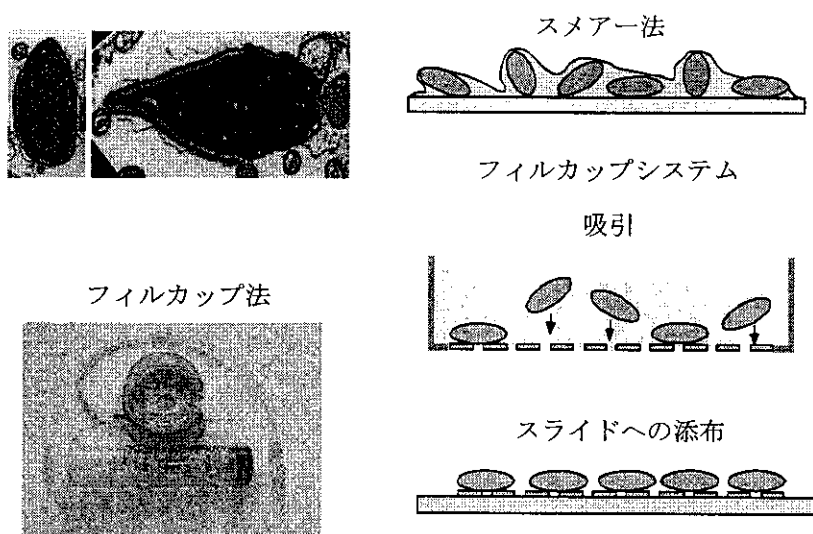


図1. フィルカップ法による精子顕微鏡標本作製法

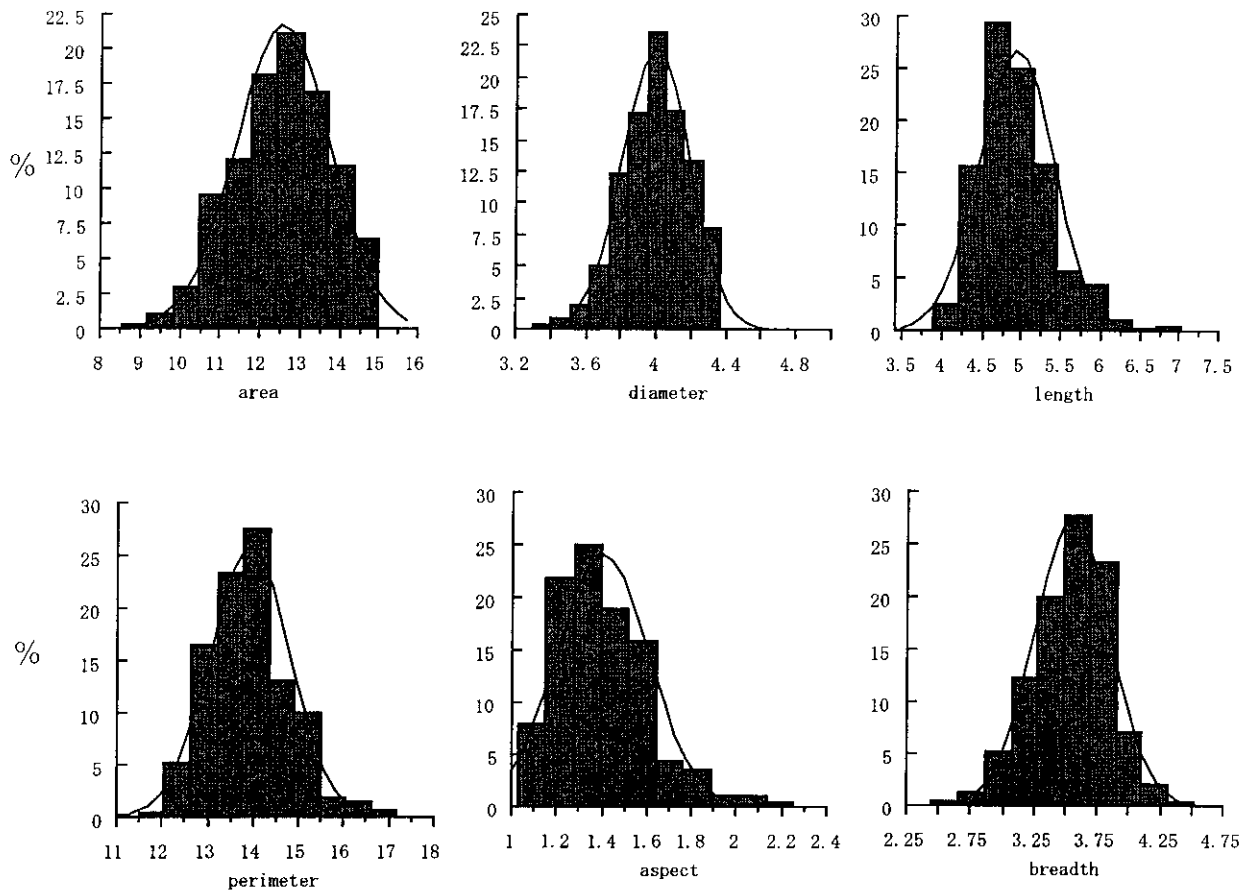


図2. 精子画像の計測パラメータ分布

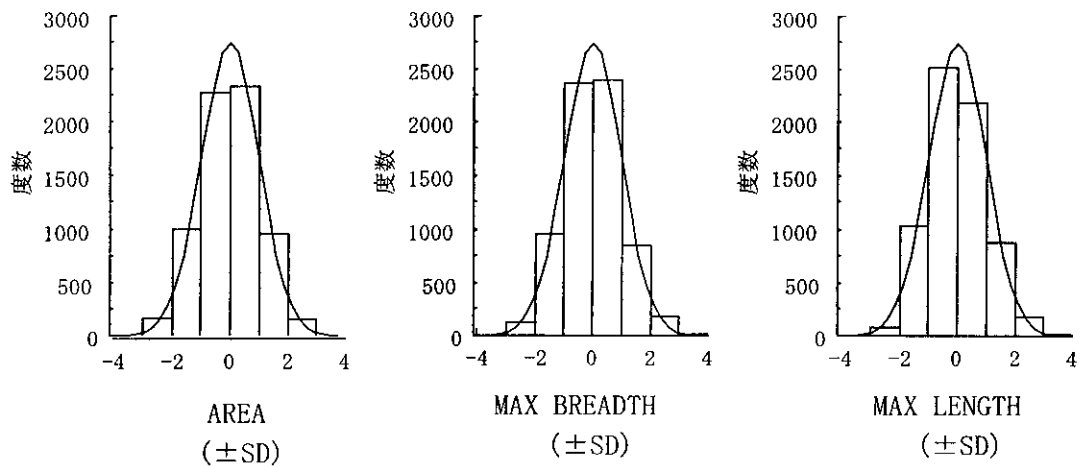


図3. 精子頭部の面積、短径、長径における標準偏差分布