

1 日本の各地域別 Y 染色体ハプロタイプ頻度

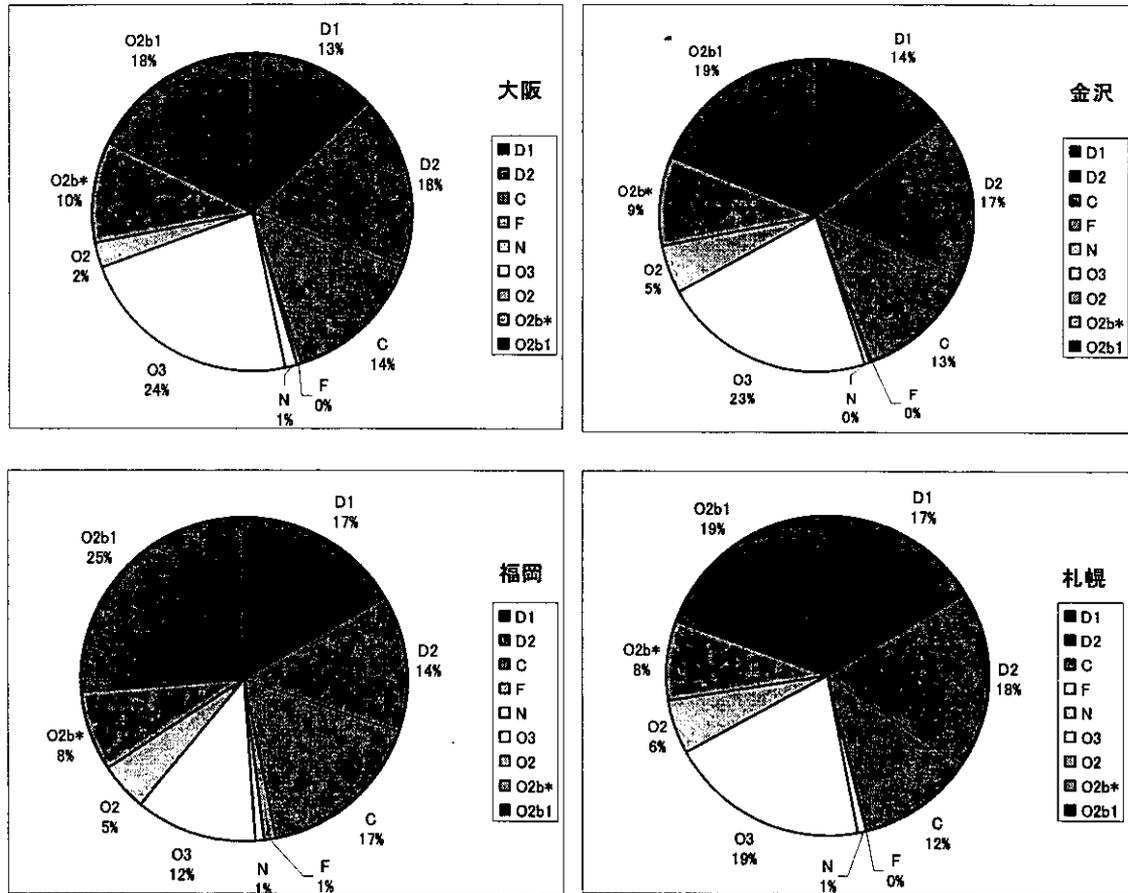


表1 Y染色体上のマイクロサテライトDNA マーカー-DYS19のタイプと前立腺がんとの関連

DYS19 alleles	Prostate cancer patient	Normal controls	Odds Ratio
A allele (186bp)	3	7	N.S
B allele (190bp)	6	3	N.S
C allele (194bp)	60*	49	2.04 (0.75-2.42)
D allele (198bp)	7**	24	0.26 (0.65-3.71)
E allele (202bp)	14	16	N.S
total	90	99	

* P=0.02、P=0.02

別添 6

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
篠原厚子、千葉百子、馬場克幸、野澤資亜利、稲葉 裕、岩本晃明	妊孕能を有する日本人男性の精漿および血清中の微量元素	Biomedical Research on Trace Elements	13	214-215	2002
岩本晃明、野澤資亜利、馬場克幸	男性生殖への影響— Testicular Dysgenesis Syndrome について— (特集 内分泌攪乱物質の基礎と臨床)	最新医学	57	74-81	2002
Ewis AA, Lee JW, Shinka T, <u>Nakahori Y</u>	Two Y-chromosome-specific polymorphisms 12f2 and DFFRY in the Japanese population and their relations to other Y-polymorphisms	J Med Invest	49	44-50	2002
Ewis AA, Lee JW, Naroda T, Sasahara K, Sano T, Kagawa S, Iwamoto T, <u>Nakahori Y</u>	Linkage between prostate cancer incidence and different alleles of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19	J Med Invest	49	56-60	2002
Ewis AA, Lee JW, Shinka T, <u>Nakahori Y</u>	Microdeletions of a Y-specific marker, Yfml, and implications for a role in spermatogenesis	J Hum Genet	47	257-261	2002
Ewis AA, Lee JW, Kuroki Y, Shinka T, <u>Nakahori Y</u>	Yfml, a multi-copy marker, specific for the Y chromosome and beneficial for forensic, population genetic and spermatogenesis-related studies	J Hum Genet	47	523-528	2002

20020965

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.41の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。

資 料

精液検査標準化ガイドライン

精液検査標準化ガイドライン作成ワーキンググループ

大阪大学泌尿器科 奥山 明彦、 松宮 清美
金沢大学泌尿器科 並木 幹夫 高 栄哲
京都大学泌尿器科 小川 修 奥野 博
神戸大学泌尿器科 守殿 貞夫 岡田 弘
札幌医大泌尿器科 塚本 泰司 伊藤 直樹
聖マリアンナ医大泌尿器科 岩本晃明 馬場 克幸
東京歯科大市川病院産婦人科 兼子 智
千葉大学泌尿器科 伊藤 晴夫 市川 智彦

事務局 聖マリアンナ医科大学泌尿器科 野澤資亜利

1992年デンマークの Skakkebeak グループ¹⁾ が1983年から1991年までの過去50年間の論文を解析し、この間、精子濃度が年次的に減少し50年前の42%になっていることを報告した。さらに精子減少と精巣腫瘍、尿道下裂、停留精巣等の発生率の増加がこの50年の間に起こってきたことから何らかの環境要因としてエストロゲン様物質の影響(のちの内分泌かく乱物質)ではとの仮説が立てられた。この論文によって精子問題が大きくクローズアップされ、それに刺激された多数の研究・医療施設が過去の精液検査データ retrospective に解析してヒト精子の減少傾向の検証を試みた。しかし、その結果は、精子数が減少しているという報告と減少傾向は認められないとする報告に別れ、減少傾向の有無についてはいまだに結論がでていない。しかし精子濃度に地域差が認められるようである。この問題でしばしば指摘されることは、精子数の測定法が標準化されていないために、異なる時代、あるいは異なる施設間で測定された精子数のデータを単純に比較できないこと、すなわち精液検査上のバイアスが存在することである。

この指摘を踏まえてコペンハーゲン大学の Skakkebaek らは、地球規模での精子数減少問題について統一プロトコルの基に男性生殖機能の国際調査が1996年より開始された。わが国も1998年よりこの国際疫学調査に参加し、各国とのデータの比較には精液検査法の精度管理 (quality control ; QC) が必須であることを認識した。さらに本邦における男性生殖機能の疫学的調査で全国5地域を設定し、精液検査について技術者間のQCを行ったところ、数値がばらつくことが判明した。このことは、男子不妊症の治療や研究に力を注いでいる施設間でもデータを単純に比較することが困難であることを意味している。

従来、臨床家は精液検査のQCについて無関心であり、他の施設との比較を何ら疑問も持たずに行なってきた。この分野もEBM (Evidence Based Medicine) にもとづいた医療を行うべきで男性生殖機能の評価・診断および男子不妊症の各種の治療方法の成績を他施設と比較するためにも精液検査の標準化ガイドラインを作成する必要がある。本邦では多くの施設でWHOガイドライン²⁾ に則って実施しているが、WHOガイドラインは精液検査の大枠を示すものである。本書は精液検査の標準化を目的とし、WHOガイドラインに準拠して検査手技を具体的に示す手引書を目指した。

本ガイドラインの骨子を下記に列記する。

1. WHOマニュアル1999年版²⁾ に可能な限り準拠した。
2. 精液量の測定を重量法とした。計量器の購入が必要となるが正確で、容易である。

3. 精子濃度と精子運動率の測定を分けて検査すべきである。 Makler chamber は原液で精子濃度と精子運動率を同時に測定され簡便であることから、多くの施設で日常診療に用いられている。しかし、正確性にかけることで WHO は推奨していないので、精液検査標準化として用いるべきではない。
4. 精子濃度の測定には精子を不動化して血球計算盤にて行う。
5. 精子運動率の測定には液化、混和した精液をスライドグラスに載せカバーグラスで覆って400倍の顕微鏡下に行う。その時に接眼レンズに格子を入れる方法、また顕微鏡像をテレビに映し出し、テレビ画面上に格子を作成しておく、運動精子の評価が容易になり、また精子濃度が少ない場合には同じ精子を数えてしまう欠点も除かれる。
6. 精子正常形態率の測定はスライドグラスに液化、混和した精液の塗沫標本を作製し簡便な Diff-Quik[®]にて染色したのち strict criteria の形態分類に準拠し分類し、正常形態率で表す。
7. 精子濃度および運動率の測定について内部および外部QCのために添付した CD-ROM中に10検体のサンプル画像がはいっており、検査担当者はこれを用いてワーキンググループの出した数値に入るようトレーニングをして頂きたい。
8. 精液検査所見を学会および論文発表する時には検査方法は「精液検査標準化ガイドライン」に準拠した旨、記載する。
10. 追補には実際の検査時に必要なノウハウを記したので参考にさせていただきたい。さらにガイドラインでは推奨しないが、各施設で使用されている Makler の計算盤、あるいは精子自動分析器の測定上の注意事項を記載した。また保険請求できない検査あるいは臨床的有用性がまだ充分確立されていない検査であるが一部の男子不妊症検査に必要と考えられる検査を記載し、文献も付記した。

以上、精液検査標準化のガイドラインの骨子をまとめた。本ガイドラインは本邦ではじめてのガイドラインとなる。従ってまだまだ不備な点、お気づきの点、が多々あるかと思われるが、添付したCD-ROMを大いに活用していただき、そして定期的にご利用していただくことによってより精度を高め、各施設のデータが安心して比較できるように願っている。今後、皆様に問題点をお寄せいただき、より良いガイドラインにしていく所存である。

目次

I 精液採取法

1. 精液採取・運搬に関する説明
2. 禁欲期間
3. 採取回数
4. 採取場所
5. 採取容器
6. 採取方法
7. 搬送法
8. 記録法 データシート

II 精液検査法

1. 精液液状化
2. 肉眼的所見
3. 精液量の測定法
4. pHの測定法
5. 精子運動率の測定法
6. 精子濃度の測定法
 - 1) 測定の準備
 - 2) 測定法
 - (ア) 血球計算盤の準備
 - (イ) カバーガラスの設置
 - (ウ) 計測法 i) Burkel-Turk 血球計算盤による測定法
 - ii) 改良 Neubauer 血球計算盤による測定法
 - 3) 無精子症の診断法
7. 精子の正常形態率の測定法
 - 1) 塗沫標本の作成
 - 2) 染色法
 - (ア) パパニコロー染色法
 - (イ) Diff-Quik[®]法
 - (ウ) 観察法
 - (エ) WHOによる精子正常形態の定義
 - (オ) 分類
 - (カ) 精子正常形態率算定法
8. 精液中の白血球の検出法
9. 精子生存率の測定法

Ⅲ 精液検査の基準値

Ⅳ 精液所見の表記法

Ⅴ 精度管理(quality control, QC)

Ⅵ 補遺

1. Makler 計算盤について
 - 1) 問題点
 - 2) 使用する場合の注意
 2. 精子運動自動分析装置
 - 1) 精子濃度の測定について
 - 2) 精子運動率の測定について
 3. ガイドライン本文に関して、実際の手技に関する追補
 - 1) 精液の採取
 - (ア) 精液の用手的採取
 - (イ) 精液の均一化および精液量の測定
 - 2) 精子運動の評価
 - 3) 精子濃度測定に際しての注意点
 - (ア) 血球計算盤について
 - (イ) 希釈について
- i) 精子濃度が特に低い場合の希釈
 - ii) 通常の希釈
 - iii) 精子濃度が特に高い場合の希釈
 - iv) 希釈液の調製
 - 4) 計算盤の洗浄
 - 5) 精液中白血球数の測定上の注意点
4. 精子調製時における精子所見の測定
5. MAR test
6. 電子顕微鏡による精子構造の評価
 7. 染色法の手技
 - 1) パパニコロー染色法
 - 2) ペルオキシダーゼ染色法
 - 3) エオジン Y 溶液作成法

I. 精液採取法

1. 精液採取・運搬に関する説明：精液採取・搬送に関する説明を事前に行う（書面

あるいは口頭)。

説明内容は下記に示す内容を網羅し施設内の採取室、搬送方法、提出場所を図説することが望ましい。³⁾ 参考資料1 (精液検査を受けられる患者様へ)

2. 禁欲期間: 2日 (48時間) 以上7日以内とする。

記録紙に禁欲期間を記載する。

3. 採取回数: 3ヶ月以内に少なくとも2回行う。二回の結果に大きな相違 (各検査項目参照) がある場合はさらに検査を行う。2回の場合はその平均値、3回以上の場合は中央値を採用する。

4. 採取場所: 1時間以内に持参可能なところで採取する。1時間以内に持参できない場合は施設内で採取する。プライバシーを遵守し、精液採取室の整備とその環境条件を整えることが望ましい。³⁾

5. 採取容器: 清潔で口径の広いガラスあるいはプラスチック容器を用いる (図 1. 容器の写真)。

採取容器の条件 (下記のうち、より多くの条件を満たすものが望ましい)

- a 清潔 (不純物の混入がない・滅菌)
- b 口径が広い (容器外への喪失を防ぐ)
- c 携帯性に優れている。
- d 蓋がしっかり閉まる。
- e 安定して自立する。
- f 透明
- g 容器自体の精子への影響がない。

6. 採取方法: マスターベーションによる採取を原則とし、全量を採取する。

*コンドームによる採取はコンドーム自身が精子の運動率に影響を及ぼす可能性があるために使用しない。また性交中断射精による採取は、パートナーの協力・時間的制限が必要なことや、全量採取できない可能性が高いため、(特に初期射精は精子濃度、運動率ともに高いため、前半をこぼすと検査値が低くなる) 行ってはならない。

7. 搬送法

採取した検体は室温から37℃に保温した状態で搬送する

8. 記録法

採取した検体容器に氏名等を記載する。

例:

採取記録を付記 (タックシール等を用いる)

患者自身に記入してもらうのが望ましい。

- a 患者氏名

- b 患者 ID
- c 採取日時
- d 採取方法
- e 採取場所
- f 採取状態（全量採取の有無、採取できなかった場合は射精の前半あるいは後半のどの程度を採取できなかったかを明記する。例：3/4, 1/2, 1/4）
- g 禁欲期間

II. 精液検査法

1. 精液液化

液化の確認：広口容器に採取した精液は室温または 37°C にて約 15 - 60 分間静置する。5ml のディスポシリンジ等を用いて空気の混入がないように精液の吸入・排出を繰り返して均一化を行う。液化の確認は、3～4 cm の高さから精液を滴下し、液滴となって落下するのを目安とする（CD-ROM 映像 1）。

注意点；液化が不十分な場合はシリンジで吸入、排出を繰り返すことにより、ほとんどの場合、液化する。

最終的に CD-ROM のような映像が得られない場合には測定結果は参考値とする。

2. 肉眼的所見

精液液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（精液が混濁して顕微鏡観察により白血球を認める—II.8 参照）場合は記録してデータシートに記載する。

3. 精液量の測定法

精液量は重量法により測定する。秤量単位 0.1g まで測定できる計量器を用いる。

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する。比重 1 として 1.0 g = 1.0 ml として精液量を換算する。

* 従来の容量法は誤差が大きいため、本ガイドラインでは重量法を採用する。
注意点；精液容器のロットが異なった場合、すなわち新しく入荷した場合にはかならずゼロ点補正をしなければならない。（0.5g から 1.0g 異なることがある。）

4. pH の測定法

射精後 1 時間以内に測定する。放置することにより、pH が高くなるので注意を要する。測定は pH 試験紙を用い、精液一滴を試験紙に落とし、30 秒後に測定する。無精子症では、pH7.0 未満と判定した場合には射精管閉塞症や先天性精管欠損症などの閉塞性無精子症を疑う。

5. 精子運動率の測定法

スライドガラスはアルコール洗浄後、乾燥する。または洗浄済みスライドガラスを使用する。混和、均一化した精液 10 μ l をスライドガラスにのせ、気泡が入らないように 22 × 22 mm カバーガラスで覆う。

100 倍で検鏡して粘液糸、精子凝集の有無、精子の分散状態を確認する。接眼マイクロメーター（格子状）または格子をつけたテレビモニター上で観察すると運動精子の測定が容易になる（図 2、CD-ROM 映像 2）。

顕微鏡下に 400 倍で観察し、精子の運動性は以下の 4 つに分類する（WHO マニュアル準拠）。観察には位相差顕微鏡および顕微鏡ステージ保温盤（37°C）の使用を推奨する。

A：運動速度が速く、直進する精子

B：速度が遅い、あるいは直進性が不良な精子

C：頭部あるいは尾部の動きを認めるが、前進運動していない精子

D：非運動精子

5 か所以上の視野で 200 個以上の精子を分類する⁴⁾。原則として精子運動の分類は 3 回行い、平均値を測定値とする。

運動率は A+B の割合（%）で示す（小数点以下を四捨五入する）。

6. 精子濃度の測定法

1) 測定の準備

a. 運動率測定に使用した標本を用いて 1 視野（400 倍）に見える精子の数によって希釈倍率を決定する。精子を認めない場合は精液全量を遠沈し、検鏡にて精子の有無を確認する。詳細は 6. 3) を参照。

希釈倍率

① 15 精子以下→5 倍希釈

② 15-40 精子→10 倍希釈

③ 40-200 精子→20 倍希釈

④ 200 精子以上→50 倍希釈

希釈する精液は 100 μ l とし、希釈率に合わせて希釈液を添加する。希釈後十分に混和する。

b. 希釈溶液の組成

① 0.1% TritonX-100（TritonX-100 1ml を生理食塩水 1L に溶解）

② 1.0%ホルマリン（炭酸水素ナトリウム 50g と 35%ホルマリン 10ml を蒸留水 1L に溶解）

③ 位相差顕微鏡を用いない場合は上記組成にトリパンブルー 0.25 g / L あるいはゲンチアナバイオレット 5 ml / L を加える。

2) 測定法

Burker-Turk または Neubauer 血球計算盤を用いる。

(ア) 血球計算盤の準備:

血球計算盤洗浄法

検査終了時、血球計算盤は中性洗剤を用いて洗浄後、1. 水、2. エタノール、3. エタノール-エーテル等量混液で3度洗浄し、風乾する。短時間に反復使用する時は血球計算盤計算室に洗浄ビン等で蒸留水を吹き付けて洗浄後、アルコール綿でふき取り、風乾する。

(イ) カバーガラスの設置と計算室への希釈精液の注入

ニュートンリングを確認する (図 3?、CD-ROM 映像 3)。

希釈して不動化した精液 10 μ l をそれぞれの計算室に毛細管現象を利用して注入する。

精子が沈降するまで、乾燥防止のための湿潤箱中で5分間静置する。

(ウ) 計測法

200 あるいは 400 倍で計測する (位相差顕微鏡が望ましい)。頭部尾部を持つ精子のみを計測する。

i) Burker-Turk 血球算定盤 (図 4) による測定法

計算室 (図 5) は H 型の渠により 2 つに分離され、各々に Turk の分画が刻まれている。カバーガラスを固定した後、測定室は深さ 0.1mm となる。Turk の分画は 3mm の方形であり 9 個の大区画 (1 辺 1mm²) から構成される。それぞれの大区画 (1mm²) は 16 個の中区画よりなりさらに 1 つの中区画は 16 個の小区画よりなっている。その中央の 1mm² は 16 中区画ある。精子濃度測定に際しては、中央の 16 個の中区画内の精子をすべて測定する。各辺の線上にある精子を重複計算しないように任意の 2 辺の線上の精子を測定する。この計測精子総数を n とすると

$$1 \text{ ml 中の総精子数 } X \text{ は } X (\text{/ml}) = n \times \frac{25}{16} \times \text{希釈倍率} \times 10^4$$

2 回計測し、その差が図 6 に示す範囲内であれば二つの計測値の平均を測定値として採用する⁵⁾。

計算例 1 ; 算定盤 16 中区画をカウントした時の精子数が 250 と 198 であった時、総和は 448 となり、2 値の差は 52 となる。この値は図 6 に示した 95%信頼限界曲線を越えているので計測結果を棄却し、再度計測操作を行う。

計算例 2 ; 算定盤 16 中区画をカウントした時の精子数が 247 と 213 であった時、総和は 460 となり、2 値の差は 34 となる。この値は図 6 に示した 95%信頼限界曲線の範囲内であるので計測結果を採用し、値は平均をと

って $460/2=230$ となる。

図6の差以上であれば、希釈時の間違い、計測違い、精液中の精子分布の違いなどが考えられることから最初から再測定する。

ii) 改良 Neubauer 血球算定盤による測定法 (図7)

中央の大区画は25の中区画に分かれ、各々が16小区画に分割されている。25の中区画をすべて測定する(n)。1(中)(小)区画は $1/400 \text{ mm}^2$ となる。⁶⁾

1 ml 中の総精子数 X は

$$X \text{ (/ml)} = n \times 25/25 \times \text{希釈率} \times 10^4$$

3) 無精子症の診断法

無精子症が疑われる場合には精液全量を500xg(半径15cmでは約1800rpm、半径10cmでは約2100rpm)、15分遠沈する⁷⁾。沈澱を検鏡して精子を認めなければ、無精子症と判定する。

7. 精子の正常形態率の測定法

1) 塗沫標本の作成

スライドガラス洗浄法

均一な塗沫を行うために、スライドガラスの洗浄、脱脂を行う。スライドガラスは中性洗剤で洗浄した後、アルコール、エーテル等量混合物に浸漬して脱脂し、風乾する。または市販の洗浄済スライドガラスを使用する。塗沫手技⁸⁾を図7およびCD-ROM映像4に示した。引きガラスは通常のカバーガラスまたは血球算定盤用カバーガラスを使用する。スライドガラス上に均一化した精液を $5-20 \mu\text{l}$ 程度取り、塗抹する。スライドガラスと引きガラスの角度が鋭角であると薄い標本ができ、鈍角であると厚い標本となる。また引く速度が遅いと薄くなり、速いと厚くなる。塗沫面の両側縁はスライドガラスの辺縁より離れてなくてはならない。塗沫後は速やかに乾燥させる。固定法は、使用する染色法に応じて行う。

2) 染色法

(ア) パパニコロー染色法

永久標本はパパニコロー染色法による⁹⁾ (図8)。

(イ) Diff-Quik[®]法

簡便法として、血液染色用のDiff-Quik[®] (国際試薬、神戸) も使用される。ただし永久標本にはならない。Diff-Quik[®]はライト染色、ギムザ染色と同様な染色像が得られる血液鑑別用迅速染色法である。血液染色に準じて、精子染色を行う(図9)。

手順

1. 精液塗沫標本（前述の方法に従って調製）は風乾後、スライドガラスを Diff-Quik[®] 固定液中に 5-10 秒間浸す。余分の液は振り切る
2. スライドガラスを Diff-Quik[®] 染色液 I 中に 5-10 秒間浸す。余分の液は振り切る。
3. スライドガラスを Diff-Quik[®] 染色液 II 中に 5-10 秒間浸す。余分の液は振り切る。
4. 精製水でスライドガラスを洗浄、風乾する。

(ウ) 観察法

油浸 100 倍の対物レンズを用い、1000 倍明視野で染色標本を観察する。分類方法は図 10 に示す (図 10)。200 以上の精子を観察し、形態分類する。Diff-Quik 染色法は写真撮影もしくはデジタル画像として保存する。

(エ) WHO による精子正常形態の定義¹⁰⁾

頭部は卵円形で、長径 4.0-5.0 μm 、短径 2.5-3.5 μm 、縦横比 1.50-1.75 である (パパニコロー染色による 95%信頼限界)。先体が頭部の 40-70%を占め、中片は幅 1.0 μm 以下と細く、頭部長径からその 1/2 の長さであり、頭部に軸状に接続している。中片部細胞小滴は頭部の半分以下である。尾部は細く直線状であり、約 45 μm である。これ以外の精子を異常と定義する。

(オ) 分類

頭部形態の分類には Kruger ら¹¹⁾ の strict criteria が推奨される。

- i. 頭部異常: Large, small, tapered, pyriform, round, amorphous vacuolated (頭部の 20%以上に非染色性の空胞を認める)
- ii. 頸部、体部異常: neck and midpiece 異常
- iii. 尾部異常: short, multiple, hairpin, broken tail, bent tail, irregular width, coiled tail, およびそれらの組み合わせ
- iv. 細胞小滴異常: 中片部の細胞小滴が頭部の 1/3 以上を占める。

(カ) 精子正常形態率算定法

本ガイドラインでは精子奇形率ではなく、精子正常形態率を採用する。

従って、Kruger による正常精子と異常精子を 200 以上観察し、その精子正常形態率を算定する。

8. 精液中の白血球の検出法

1X10⁶/ml 以上の白血球数を有する場合を膿精液症と定義している。¹²⁾

白血球と未熟な精細胞との鑑別が困難なため染色して白血球数を測定する。方法

としてペルオキシダーゼ染色と抗 - 汎白血球モノクローナル抗体を用いた免疫染色がある。このうちで、ガイドラインとして手技が簡便なペルオキシダーゼ染色を行う（図11）。

同時に血球計算盤で顆粒球の1mlあたりの数を算出し、 1×10^6 /ml以上であれば沈渣・尿培養・前立腺圧出液鏡検等で、尿路・性器感染症の精査を行う。

手順

1. 精液 100 μ l を反応液 900 μ l（追補参照）と混合する。
2. 2分間震盪する。
3. 20-30分間室温で放置する。
4. 再度震盪する。
5. 500xg（半径15cmでは約1800rpm、半径10cmでは約2100rpm）、5分遠沈する。遠心後、アスピレーターで上清を除去し、沈殿を攪拌して200倍で検鏡する。
6. 血球計算盤で精子以外の円形状細胞を200個以上観察し、茶染したペルオキシダーゼ陽性細胞（顆粒球）および陰性細胞（精細胞、特に円形精子細胞）の比率を算定する。

9. 精子生存率の測定法

不動精子が50%以上の場合は、原則としてエオジン染色法（図10、およびCD-ROM影像）により精子生存率を測定する¹³⁾。

測定方法

等量（1滴づつ）の精液とエオジンY溶液をスライドガラス上で混和し、カバーガラスで覆い、30秒後に400倍で顕鏡する。無染（無色）のものを生存精子、赤染のものを死滅精子と判定し、精子生存率（%）を算定する。

III. 精液検査の基準値

表1

IV. 精液所見の表記法

表2

V. 精度管理（quality control, QC）

精液検査におけるQCは信頼性、再現性を維持するために重要であり、一定の頻度で行われるべきである。施設内でのinternal quality control（IQC）、同一サンプルを用いて多施設間で結果を比較するexternal quality control（EQC）がある。使用する血球算定盤、ピペット等の精度管理も定期的に行う。IQCおよびEQCは、付属のCD-ROMに収録されている画像を使用し、測定誤差が大きくなるように定期的に行う。

VI 補 遺

1. Makler 計算盤について

1) 問題点

原液で精子濃度と精子運動率を同時に測定され簡便であることから、多くの施設で日常診療に用いられている。しかし、正確性に欠けることで WHO は推奨していないので、精液検査標準化として用いるべきではない。

- i. $100 \times 10^6/\text{ml}$ 以上では測定が困難で稀釈の必要がある。
- ii. ゴミなど $10 \mu\text{m}$ 以上のものが混入した場合、Makler 計算盤の間隙が $10 \mu\text{m}$ 以上になる可能性があり、測定が不正確になる。
- iii. 長期の使用によりガラスの平面性の喪失を来し、測定が不正確になる。

2) 使用する場合の注意

本ガイドラインは上記の問題点から推奨しない。ただし Makler 計算盤で測定した場合には記録用紙に記載する。ガイドラインに準じて血球計算盤で出されたデータとの比較は出来ないので注意されたい。

日常臨床においておおよそのデータを知りたい場合にはその限りではない

使用上のポイント

- i. カバーガラスと基盤ガラスの表面の汚れ、ほこりを完全に除去する。繰り返し使用するためにクリーニングが重要である。
- ii. ステージ周囲の4個のピンにニュートンリングが生じることを確認する。
- iii. ステージ上に精液を稀釈せずに、原液を Makler 計算盤に $5 \mu\text{l}$ 載せる。 $5 \mu\text{l}$ 以上の精液をのせた場合には、著明な測定誤差を生じる。
- iv. 気泡が入らないように注意する
- v. 200倍で検鏡、10方形の精子数を最低2箇所別々に計測する。10精子未満の場合には100方形を計測する
- vi. 頭部尾部を備えた完全な形態の精子のみを計測する。精子数のみの計測であれば、精液を $45 - 50^\circ\text{C}$ 、5分間加温して不動化する
- vii. 位相差顕微鏡を用いることが望ましい

2. 精子運動自動分析 (computer-aided sperm analysis, CASA)

精子数に関しては測定可能範囲が比較的狭く、また高価であり、普及していないことから精液検査標準化には適切ではない。

ヒト精液所見 (精子濃度、精子運動率) 測定における定量性向上ならびに標準化に

CASAは有用と考えられるが、測定法の標準化、精度管理には以下に示す条件整備が不可欠である。

1) 精子濃度の測定について

CCDカメラによる画像をデジタル処理するCASAは、精子濃度、運動率を同時測定するために無希釈の精液を間隙 10-20 μm のチャンバーに注入して測定を行う場合が多い。

①現行のCASA測定法の問題点として

①-1. 精液中の精子濃度は0-数億/mlと変動幅が大きく、すべての濃度範囲において直線検量線を得ることは困難である。

①-2. CCDカメラは焦点面の精子画像のみを認識するためチャンバー間隙の変化を追従できない、

①-3. 間隙 10-20 μm のチャンバーに精子を注入する際、濃度分布が不均一となる。

①-4. 解析に際し、精液中の精子とそれ以外の粒子の識別能の向上が求められ、精子濃度が過少、過剰であると誤差が大きくなる。

CASAにおける測定精度向上のためには、

1. 精子濃度、各々に最適化された方法で個別に測定する必要がある、
2. 射出精液は固定後、画像解析装置に最適な濃度範囲に希釈あるいは濃縮して測定を行う必要がある、
3. チャンバーの最適化が必要である、
4. 定量化のためには、精子濃度標準品の整備が必要となる（既知濃度精子またはその画像を用いてキャリブレーションすることにより、異なる機種 of 画像解析装置または同一機種でも各施設間における誤差を補正することが可能となる）。

血球算定盤を用いた精子濃度測定法は熟練を要するが高精度であり、特別な機器を要しない。

2) 精子運動率の測定について

精子運動能は主観的な顕微鏡観察では grading のみが可能であり、定量値（運動率）を得るには CASA を用いる必要がある。現行ではコンピューターが算出した数値をそのまま利用しているが、定量化のためには精子運動標準品ならびにそれらを用いて作成した検量線が不可欠である。

以上の観点から、精液検査標準化ガイドライン作成にあたっては WHO マニュアルに可及的に準拠し、CASA は採用せず、将来的な課題とした。

3. ガイドライン本文に関して、実際の手技に関する追補

1.) 精液の採取

(ア) 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、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。運搬の際には、温度に留意する。標準では、20-37°C 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、精子運動が不可逆的に低下する。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°C 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、程度室温放置して液化を行う。

(イ) 精液の均一化および精液量の測定

精液は、射精時に精子を含む精巣上体液と前立腺液、精囊液等が混合され、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。精液の液化の確認を行う。その際、精液量の少ない（0.5 ml 以下）場合は再検とする。

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 3-4 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。さらにスライドグラスに滴下し、カバーグラスで覆って 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。

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 カバーグラスをかける。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。

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、5 箇所以上の視野を観察する。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。

市販のカバーグラスには種々のサイズがあり、液厚を約 20 μ m とするため、カバーグラスサイズと添加液量を表に示した。

カバーグラス	20 μ m 厚とするための液量
18X18mm	6.48 μ l
22X22mm	9.68 μ l
24X24mm	11.52 μ l
24X32mm	15.36 μ l

3) 精子濃度測定に際しての注意点

(ア) 血球計算盤について

精液または希釈精液の計算室への注入：被検液を計算室の一側に落とし、毛細管現象で自然に内部に広がるようにする。このとき、液は全面に広がらなくてはならない。一部は側溝に広がってもよいが、溝を満たしてはいけない。また空胞が入ってはいけない。

精子が十分沈降するまで水平に静置し、まず弱拡大で鏡検して血球計算盤の分画線を見だし、ついで 200 ないし 400 倍で分画中の精子を観察する。重複計測しないため、精子頭部が下辺および右辺線上のものは計測し、上辺および左辺線上のものは除外する。