

弱拡大で観察時に計算室内に精子が均等に分布することを確認する。測定の誤差要因として、希釈が不正確である、カバーガラスの不良またはカバーガラスが算定盤に十分密着していないことによる深さの不正確、他細胞を精子と誤認する、被検液が側溝からこぼれるか計算室内に泡が入ったときなどが挙げられる。

(イ) 希釈について

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、または先端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。

希釈する際は希釈液をボルテックスミキサーで攪拌しながら精液を加える。攪拌せずに加えると精漿中の蛋白質等が凝集し精子を巻き込んだ塊になってしまうので注意する。

i) 精子濃度が特に低い場合の希釈

均一化した精液 100 μ l に希釈液 100 μ l を添加、攪拌する（2倍希釈）

均一化した精液 100 μ l に希釈液 200 μ l を添加、攪拌する（3倍希釈）

ii) 通常の希釈

均一化した精液 100 μ l に希釈液 400 μ l を添加、攪拌する（5倍希釈）

均一化した精液 100 μ l に希釈液 900 μ l を添加、攪拌する（10倍希釈）

10倍希釈した精液 100 μ l に希釈液 100 μ l を添加、攪拌する（20倍希釈）

iii) 精子濃度が特に高い場合の希釈

10倍希釈した精液 100 μ l に希釈液 400 μ l を添加、攪拌する（50倍希釈）

iv) 希釈液の調製（本文参照）

希釈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。

1.0%ホルマリンの簡便な調製法：5%(V/V)炭酸水素ナトリウム溶液アンプル（メロン等アシドーシス補正用）に市販の特級ホルマリンを15%(V/V)となるように添加し混和して使用する。10-20 mlの小容量のアンプルを用いて頻りに廃棄する。

4) 計算盤の洗浄

中性洗剤で洗浄後、蒸留水等で洗剤を除去し乾燥する。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ニュートンリング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、ニュートンリングを作る。ニュートンリングの作成には、計算室の測堤を呼気等で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ると容易である。

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。

5) 精液中白血球数の測定上の注意点

精液中の白血球は精子機能に悪影響を与えることを示した報告が多数発表されている。しかし、精液所見の悪い症例では、精液中に未熟な精細胞が多く認められる事から、これらと白血球を区別することは大切である。

ペルオキシダーゼ染色はその細胞質にペルオキシダーゼを持つ細胞である顆粒球を検出する方法であり、白血球内のリンパ球を検出することは出来ない。このため、白血球共通抗原を認識する抗 - 汎白血球モノクローナル抗体を用いた、免疫染色の方が白血球全体を検出できるため、理想的な方法といえる。しかし、精子を傷害するのは reactive oxygen species (ROS) の供給源である顆粒球であり臨床ペルオキシダーゼ染色で問題はない。また、免疫染色は約4時間かかるのに比して、ペルオキシダーゼ染色は予製液さえ準備してあれば、約45分間で実施可能であり、日常診療上有用な方法である。

4. 精子調製時における精子所見の測定

本マニュアルは射出精液の精液量、精子濃度、運動率、精子形態測定の方法を記したものである。近年の assisted reproductive technology の進歩に伴い、精子洗浄濃縮等の精子調製が行われるようになった。遠心分離（精子濃縮）、swim up 等により分別された精子懸濁液の精子所見についても、原則的には本マニュアルに準拠する。

精子濃縮により液量が少ない場合には、重量法による液量測定は不適であり、容量

法を用いる。精子濃度測定に際しては、適当な希釈倍率を用いる。運動率測定に使用する精子懸濁液も適宜希釈して観察を容易にする。一方、swim up 等により精子濃度が低い場合には希釈が困難であるので、45-50℃、5分間の加熱により不動化するなど改変が必要となる。このため、値は参考値となる。

5. MAR test

精子運動率が低い場合、精子凝集が認められる場合には抗精子抗体を検索することが必要である。その代表的検査法としての、MAR test¹⁴⁾には、精子表面に抗精子抗体の付着があるか否かを検討する Direct SpermMar test¹⁵⁾および子宮頸管粘液中に、抗精子抗体が存在するか否かを検討する Indirect SpermMar test¹⁵⁾がある。

6. 電子顕微鏡による精子構造の評価

精子運動率、精子生存率、精子奇形率に極端な異常を認める場合には、電子顕微鏡を用いた精子頭部の空胞変性、ミトコンドリアの配列異常、精子尾部の微細構造異常などの検索が有用である。

7. 染色法の手技

1) パパニコロー染色法¹⁰⁾

固定したスミアは以下の手順で染色する

80%エタノールに10回浸漬 (1回の浸漬は1秒)

70%エタノールに10回浸漬

50%エタノールに10回浸漬

蒸留水に10回浸漬

ハリスまたはマイヤーのヘマトキシリン 正確に3分

流水による洗浄 3~5分

1%HCL・70%エタノールに2回浸漬

流水による洗浄 3~5分

蒸留水に1回浸漬

50%エタノールに10回浸漬

70%エタノールに10回浸漬

80%エタノールに10回浸漬

90%エタノールに10回浸漬

オレンジ G6 2分

95%エタノールに10回浸漬

95%エタノールに10回浸漬

EA-50 5分

95%エタノールに5回浸漬

95%エタノールに5回浸漬

95%エタノールに2回浸漬

99.5%エタノール 2分

キシロール 1分

2) ペルオキシダーゼ染色法

(ア) 準備する試薬

NH_4Cl (塩化アンモニウム)

Na_2EDTA (エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム):

Ortho-toluidine (オルトトルイジン)

30% H_2O_2 (過酸化水素水)

(イ) 予製液の作成

A液 飽和 NH_4Cl 溶液 (250 g/L)

NH_4Cl 2.5 g を超純水に溶かして 10 ml とする。

B液 Na_2EDTA 50 g/L Dulbecco's PBS (pH 6.0)

Na_2EDTA 0.5 g を Dulbecco's PBS (pH 6.0) に溶かし 10 ml とする。

C液 Ortho-toluidine 溶液 (0.25 mg/ml)

Ortho-toluidine 2.5 mg を DMSO または 95%エタノール に溶解して 1ml とし、次に超純水で 10 ml とする。

(ウ) 反応液作成

A液 : B液 : C液 : 30% H_2O_2 = 1 ml : 1 ml : 9 ml : 1 滴 の割合で混合する。

反応液は作成後、24 時間以内に使用する。

3) エオジンY溶液作成法

塩化ナトリウム水溶液 (9g/L) にエオジンY (カラーインデックス : C. I. 45380) 5g を溶解する。市販品の利用が簡便である。

文献

- 1 Carlsen E, Giwercman A, Skakkebaek NE, et al : Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 1992; 305; 609-613
- 2 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, 1999.
- 3 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, 4-6, 1999
- 4 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p9-10, 1999.
- 5 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p16, 1999.
- 6 臨床検査法提要 金井泉原著、金井正光編著 改定第31版,p266, 平成10年
- 7 World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, 1999.
- 8 臨床検査法提要 金井泉原著、金井正光編著 改定第31版,p287, 平成10年
9. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p17-18, p71, 1999.
10. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p19-27, 1999.
11. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, et al.: Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 49(1):112-7, 1988.
12. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p10-11, 1999.
13. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th edn. New York: Cambridge university Press, p14,68, 1999.
14. Stedronska J and Hendry WF. The value of the mixed antiglobulin reaction

(MAR-test) as an addition to routine seminal analysis in the evaluation of the subfertile couple. *Am. J. Reprod. Immunol.* 3: 89-91, 1983

15. Comhaire FH, Hinting A, Vermeulen L, Schoonjans F., Goethals I. Evaluation of the direct and indirect mixed antiglobulin reaction with latex particles for the diagnosis of immunological infertility. *Int. J. Androl.* 11: 37-44, 1987

表 1 精液検査の基準値

精液量	Volume	2.0ml 以上	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
pH	pH	7.2 以上	
精子濃度	sperm concentration	20x10 ⁶ /ml 以上	
総精子数	total sperm number	40x10 ⁶ 以上	
精子運動率	Motility	50%以上	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 運動率は A+B の割合 (%) で示す
精子正常形態率	Morphology	15%以上	Kruger らの strict criteria に準じる
精子生存率	Vitality	75%以上	
白血球数	White blood cells	1x10 ⁶ /ml 未満	

表 2 精液所見の表記法

正常精液	normozoospermia	表 1 の基準を満たすもの
乏精子症	oligozoospermia	精子濃度 20x10 ⁶ /ml 未満
精子無力症	asthenozoospermia	運動率 50%未満
奇形精子症	teratozoospermia	形態正常精子 15%未満
乏精子—精子無力—奇形精子症	Oligoasthenoteratozoospermia	精子濃度、運動率、奇形率のすべてが異常
無精子症	azoospermia	精液中に精子が存在しない (遠心分離で確認)
無精液症	aspermia	精液が射出されない

精液検査を受けられる患者様へ

1. 禁欲期間は2日（48時間）以上7日以内としてください。
2. 精液検査は1ヶ月以内に少なくとも2回行います。2回の結果に大きな相違がある場合はさらに検査を行います。
3. 1時間以内に持参できるところで採取してください。1時間以内に持参できない場合は院内の精液採取室で採取していただきます。
4. 精液はマスターベーションによって全量を採取してください。
5. コンドームは精子の運動率に影響を及ぼしますので使用しないでください。
6. 採取した検体の温度が下がらないよう持参してください。特に冬季はご注意ください。

切り取り線

精液検査を受けられる患者様へ

1. 禁欲期間は2日（48時間）以上7日以内としてください。
2. 精液検査は1ヶ月以内に少なくとも2回行います。2回の結果に大きな相違がある場合はさらに検査を行います。
3. 1時間以内に持参できるところで採取してください。1時間以内に持参できない場合は院内の精液採取室で採取していただきます。
4. 精液はマスターベーションによって全量を採取してください。
5. コンドームは精子の運動率に影響を及ぼしますので使用しないでください。
6. 採取した検体の温度が下がらないよう持参してください。特に冬季はご注意ください。

切り取り線

精液検査を受けられる患者様へ

1. 禁欲期間は2日（48時間）以上7日以内としてください。
2. 精液検査は1ヶ月以内に少なくとも2回行います。2回の結果に大きな相違がある場合はさらに検査を行います。
3. 1時間以内に持参できる場所で採取してください。1時間以内に持参できない場合は院内の精液採取室で採取していただきます。
4. 精液はマスターベーションによって全量を採取してください。
5. コンドームは精子の運動率に影響を及ぼしますので使用しないでください。
6. 採取した検体の温度が下がらないよう持参してください。特に冬季はご注意ください。