

精子受精能の評価とその改善法

秋田大学医学部
産科婦人科教授
田中 俊誠

同・助手
児玉 英也

はじめに

精子の受精能力に低下が認められる男性不妊例に対する治療は、体外受精を初めとする生殖補助技術を用いても奏功率が著しく低い。しかし近年、精子の受精能力に関する生理学的・病理学的知見が集積されるとともに、in vitroでの精子の受精能力を改善する試みがなされ、評価を得るに至った改善法も散見される。それに加えて、精子の細胞質内注入に代表される顕微授精技術の開発により、男性不妊の治療の可能性が広がってきた。そのような状況から、不妊治療を開始する初期の段階で、できるだけ早期に精子の機能を正しく評価することが、以前にも増して重要となってきた。本稿では、精子の受精能力の正しい評価法、およびin vitroでの精子の受精能力の改善法について解説したい。なお、免疫学的な問題については、紙数の制限があるので今回は省略した。

精子受精能の評価法

〔I. 精液検査〕

精液検査は、精子機能を評価するうえで最も簡便でかつ基本的なステップである。ただし、精液所見が必ずしも精子の受精能力を正しく反映しない場合も少なくないことを理解しておく必要がある。

1. 精液検査施行時の注意事項

精液検査施行時の注意事項としては、(1)検査前に2~7日間の禁欲期間をおく、(2)射出後少なくとも1時間以内で、精液が十分液化した状態で検査を行う、(3)精液所見には経日的変動が大きいことから異常が疑われた場合は2週間以上の間隔を開けて再検査を行う、などがある。精子濃度および運動率の算定は、通常の血球算定板でも可能であるが、マクラーの精子算定板を使用するのが便利である。精子奇形率の算定には、Papanicolaou染色等の固定標本を用いるのが望ましい。

(表1) 精液所見の正常値 (WHO, 1987)

精液量	2.0ml以上
pH	7.2~7.8
精子濃度	20×10 ⁶ /ml以上
総精子数	40×10 ⁶ /ml個
精子運動率	前進する精子が50%以上または 高速に直進する精子が25%以上 (採取後60分以内)
精子奇形率	50%未満
精子生存率	50%以上

2. 精液検査の評価法

精液所見の評価には、WHO から提唱された診断基準が一般に用いられている (表1)。精液検査のパラメーターとして精子濃度、運動率、奇形率の3因子が重要であり、多くの男性不妊例ではこれら因子の異常が複合して認められる。一般的に、精子に存在する異常因子の数が増加すれば、それだけ重篤な受精能力の障害があると考えられる。3因子の中では、奇形率が体外受精の受精率と最も高い相関を示す。

〔Ⅱ. 精子受精能力の特殊検査〕

精子の受精能力を正しく評価する目的で、多くの検査が考案されている。しかし現在の所、単一の検査手技をもって精子の受精能力を正確に評価することは困難である。これは、個々の検査が受精に必要な精子機能の一部しか評価できないこと、男性不妊の精子の受精障害の原因となる機能異常が多彩で、その障害の程度もさまざまであること、に起因している。したがって、各施設で特殊検査を導入する場合は、その検査の目的と限界を正しく認識して施行することが重要である。

1. 受精に必要な精子の機能

精子は精巣内で形成された後精巣上体に移行して最終的な成熟を遂げるが、その過程で精子核のクロマチンは強く凝縮される。射出された精子は女性の性器内または培養液中で何等かの生化学的変化を受けた結果、受精能力を獲得する (capacitation)。受精能力を獲得した精子は、活発な運動性を示し (hyperactivation)、卵子透明帯に結合して先体反応 (acrosome reaction) をおこしてアクロシン等の先体酵素を放出、透明帯を貫通して卵卵腔に達する。精子はその後卵細胞膜を貫通して卵細胞質内に侵入し、精子頭部は膨化して雄性前核を形成する。このように、精子は精巣で形成されてから、形態学的ならびに生化学的成熟を遂げながら種々の機能が与えられて、受精に与る。

2. 代表的な精子受精能力の評価法

A. 精子核の成熟度の評価

精液中の成熟精子の割合を算定する目的で、sodium dodecyl sulfate 溶液中で核の膨化がおこることを利用した精子核脱凝縮試験、一本鎖 DNA を識別する acridine orange 染色、成熟核クロマチン (プロタミン) を識別する acidic aniline blue 染色、が用いられている。

B. 精子運動機能のコンピューター画像解析

精子運動の軌跡をコンピューター解析し、精子速度、直進性、精子頭部の振幅等のパラメーターを評価する。この中では、精子の直進性が受精率と良好な相関を示すと報告されている。

C. 先体反応誘起試験

受精能を獲得した精子は、適切な刺激が与えられると先体反応が誘起される。このことを利用して、Ca ionophore や卵胞液等の刺激により先体反応が誘起される精子の割合を算定し、受精能を獲得した精子の指標とする。先体反応をおこした精子の識別には、FITC 標識 pisum sativum agglutinin を用いた蛍光染色や triple stain 法、また特殊なモノクローナル抗体を用いた方法が用いられている。

D. 精子・透明帯結合試験

高塩濃度溶液中または凍結により保存されたヒト透明帯を用い、被検精子が透明帯に結合する能力を *in vitro* で検討する。この検査の結果は用いた透明帯の性状に大きく影響されるため、一つの透明帯を半切して一方をコントロールとして用いるヘミソナ・アッセイが考案されている。

E. ハムスター試験 (Hamster test)

透明帯を除去したハムスター卵子には、受精能力を獲得し先体反応が完了した精子のみが侵入可能であることを利用して、ヒト精子の受精能力を間接的に証明する方法。

F. 低浸透圧精子膨化試験 (hypoosmotic swelling test)

細胞膜機能の正常な精子は、低浸透圧負荷により精子尾部が膨化するので、そのような精子の出現頻度を算定する。

G. アクロシン活性の測定

精子の主要な先体酵素であるアクロシンの活性を測定する方法で、比色法やゼラチン・プレートを用いた方法が実用化されている。

以上述べた検査法が、多彩な精子機能のどの部分を評価するものかを想定し、表2に示してある。

(表2) 代表的な精子受精能検査が反映する精子機能

精子機能	精子核の成熟度	精子運動能	受精能獲得現象	透明帯結合能	卵細胞膜結合能	前核形成能	*体外受精の相対率との関係
精子核の成熟度の評価	◎	—	—	—	—	△	弱
精子運動の画像解析	—	◎	△	—	—	—	弱～中
先体反応誘起試験	—	—	◎	○	△	—	強
精子・透明帯結合試験	—	○	○	◎	—	—	強
ハムスター試験	—	○	○	—	○	△	中～強
低浸透圧精子膨化試験	—	—	○	△	△	—	弱
アクロシン活性の測定	—	—	—	○	—	—	弱

*文献1による

- ◎：検査結果に直接反映される精子機能
- ：検査結果に間接的に反映される精子機能
- △：検査結果に関連がある可能性のある精子機能
- ：検査結果にほとんど無関係の精子機能

精子受精能の改善法

細胞質内精子注入の良好な成績が報告されているが、この技術は多くの施設においてまだ完成されたとはいえず、また手技そのものの安全性も完全に確立されていない。したがって、通常の体外受精手技の延長線上で、受精率の向上ならびに安全性の確立に、努力することは重要である。下記に述べるような、現時点で評価の得られている精子受精能の改善方法をできるだけ試みたうえで、受精不能な症例に顕微授精を行うべきである。

〔I. 精子の調整法〕

体外受精を含めた生殖補助技術に用いる精子の調整過程で、従来行われてきた遠心洗浄法では、遠心の機械的損傷により精子の活性酸素の産生が増加して、精子の受精能力が損なわれる可能性が指摘されている。精子の機械的損傷を減少する目的で、パーコール密度勾配やナイコデンツ (イソピスト®) を用いた遠心洗浄が推奨されている。しかし、パーコールに関しては、製造会社より日本産科婦人科学会へ、製剤そのものの安全性が確認されていないことから臨床応用を規制してほしいとする要望がなされており、使用しないのが望ましい。

〔Ⅱ．媒精濃度の増加〕

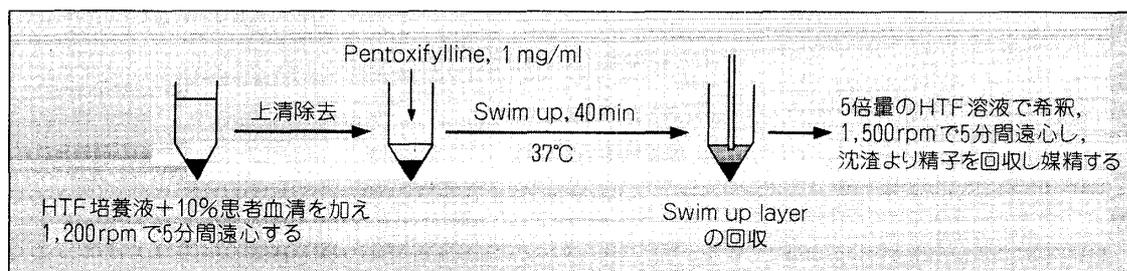
受精能力が低下した精子でも、その障害が軽度であれば、卵子との接触のチャンスを増加させるとにより受精の可能性が上昇する。したがって、そのような精子の媒精においては、媒精濃度を通常の運動精子濃度（ $5 \sim 10 \times 10^4$ 個/ml）から、その5～10倍の濃度にまで上げてやる必要がある。また、媒精可能な精子の絶対量が少ない場合は、極少量の培養液の小滴や微細なチューブ内で受精を試みることも、有効と報告されている。

〔Ⅲ．薬剤による刺激〕

一部の精子の受精能力の障害が、特殊な薬物の刺激や前処置によって改善されることが知られている。以下、代表的な薬剤の臨床応用について述べる。

1. Pentoxifylline

Phosphodiesterase inhibitorで細胞内cyclic AMPの蓄積作用のあるpentoxifyllineの報告は多い。使用にあたっては、精漿成分を取り除いた後、精子を1 mg/mlのpentoxifyllineで約40分間インキュベートした後、薬剤を洗浄してただちに媒精する（図1）。この薬剤には、精子の運動能や先体反応誘起能に対する促進効果があると考えられている。



（図1）Pentoxifyllineの使用方法

2. TEST-yolk buffer

TEST-yolk bufferは、新鮮な鶏卵の卵黄成分を20%含むbufferで、精子の長期保存に使用される。その場合、精漿成分を取り除いた精子懸濁液に等量のbufferを加えて冷蔵庫中に保存するが、その保存にともなって精子の受精能力の改善が認められることが報告されている。

《参考文献》

- 1)Liu DY, Baker HWG. Test of human sperm function and fertilization in vitro. Fertil Steril 1992; 58: 465—483
- 2)Cummins JM, Jequier AM. Treating male infertility needs more clinical andrology, not less. Hum Reprod 1994; 9: 1214—1219