

## 凍結保存精子の受精機能に関する研究

東北大学医学部産科学婦人科学教室 (主任: 矢嶋 聡教授)

吉 田 仁 秋

## Fertilizing Capacity of Fresh and Frozen Spermatozoa

Hiroaki YOSHIDA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai**(Director: Prof. Akira Yajima)*

**概要** 精子の凍結保存は既に臨床応用されているが、融解後の受精機能に関しては十分な評価が成されていない。今回、凍結融解前後の精子機能を受精現象と結び付けて評価し、凍結保存による受精能を検討した。

対象は、正常及び不妊症患者の計214例とし、採取された精液は一般精液検査後、1) Bovine cervical Mucus Penetration test (BMP test), 2) Hamster test (ZSPT), 3) Triple stain 法 (AR test), 4) Hypoosmotic Swelling test (HOS test), 5) 精子自動解析装置, にて精子機能を評価した。凍結保存は、KS-II液を使用し、Program freezerにより凍結後、液体窒素中に保存した。すべての精液は融解後蘇生率を算出し、凍結前と同様に精子機能を評価した。なお、対象は精子濃度により、A,  $20 \times 10^6/\text{ml}$  未満, B,  $20 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ , C,  $40 \times 10^6/\text{ml}$  以上の3群に分類した。

1) 融解後の平均蘇生率は、A, B群がC群より低い傾向を認めた。2) 融解後のBMP test検査における最高到達距離は、A群において有意に低下していた。3) Hamster testによる侵入率では、B, C群は凍結前後に差はなかつた。しかし、融解後のA群は、有意に低い結果を得た。4) HOS testでは、凍結前後の各群でG-type膨化率、総膨化率に有意な差は認められなかつた。5) Triple stain法では、凍結後のAcrosoma Reaction (AR)率はやや高い傾向を示すが、凍結前後に有意な差はなかつた。6) 精子自動解析装置では、LHD以外のパラメーターは凍結後低下していたが、受精能は保持されていることが推測された。

以上の結果より、A群では凍結により機能面での脆弱性が増し、受精能が低下することが判明した。したがって乏精子症では、凍結融解の臨床応用が困難であることが示唆された。正常者では、凍結融解により臨床応用が充分可能であることが本研究により明らかとなつた。

**Synopsis** Although frozen semen is now being used clinically, the fertilizing function of thawed semen has not yet been evaluated adequately. The changes in frozen sperm functions were evaluated and the changes in regard to the fertilization phenomenon were also investigated. The collected semen was evaluated by the following function tests, 1) Bovine cervical Mucus Penetration test (BMP test), 2) Zona-free hamster egg Sperm Penetration Test (ZSPT), 3) Hypoosmotic Swelling test (HOS test), 4) Triple stain technique (AR test), 5) Semen Auto Analyzer. The freezing medium was KS-II solution with a program freezer (CRYO-10). The results were as follows: 1) In the BMP test, the frozen normospermic group maintained fertilizing capacity. 2) There was no significant difference between fresh and frozen semen in the penetration rate of ZSPT except in the oligospermic group. 3) In the HOS test, there was no difference between fresh and frozen specimens in the number of swollen sperms which endured freezing and maintained the sperm membrane integrity. 4) There was a tendency to compare to that of fresh semen the increase in AR in frozen semen, but it was not significant. 5) There were low values after thawing except for LHD, but there still remained fertilizability after freezing. In conclusion, there was no reduction in fertilizing capacity following freezing through out the sperm function tests.

**Key words:** Semen cryopreservation • Fertilizability

## 緒 言

従来より、精液検査項目として精子濃度・運動率・奇形率等が測定され、男性不妊症の重要な評

価方法として位置づけられている。しかし、これらの検査方法だけでは受精機能の評価としては充分ではなく、かつ直接妊孕能を反映しているとは

いい難い。最近、受精能をより正確に評価するため、種々の検査法が開発されている。一方、精子の凍結保存方法はほぼ確立されつつあり、AIH・AID・IVF<sup>1)8)</sup>、などで、その簡便さにより広く臨床応用されている。しかし凍結保存精液を用いたAIHでの妊娠率は、新鮮な精液の妊娠率と比較すると低下している<sup>2)3)</sup>。凍結融解により精子受精機能の低下がその原因と推測されるが、充分には解明されていない。今回の研究においては、凍結融解後の精子機能を受精現象と結び付けて評価し、凍結保存による受精能変化の検討を目的とした。

更に、臨床的に治療が困難である乏精子症患者の精子の凍結保存の可能性について検討し、乏精子症での妊娠率低下を来す要因をも考察した。受精現象を精子側から判断すると、頸管粘液、子宮腔内及び卵管内を上行する運動精子がCapacitationを経てAcrosome Reaction (AR)とともに透明帯を通過して卵実質内に侵入し、受精に至る。その受精機能を判断するうえで下記のような5種類の検査が必要になる。よつて受精機能の評価として、以下の方法を用いた。1) ウシ頸管粘液を用いた精子運動能試験 (Bovine cervical Mucus Penetration test, 以下BMP test) : 精子の運動機能を頸管粘液にて判定, 2) ハムスターによる精子受精能試験 (Zona-free hamster egg Sperm Penetration Test, 以下ZSPT) : CapacitationとARを起こした精子の受精能を判定, 3) Hypoosmotic Swelling test (以下HOS test) : 精子の受精機能を尾部の膜構造によつて判定, 4) Triple stain法によるAcrosome Reactionの検索 (以下AR test), 5) 精子自動解析によるパラメーターの評価 (Semen Auto Analyzer)。

### 研究方法

研究対象は、正常及び不妊症の患者214例とした。精液採取は用手的に行い、37°C 30分、液化静置後、半量は一般精液検査を施行し、受精機能検査後、残量は凍結保存用とした。凍結前の精子濃度により、A.  $20 \times 10^6$ /ml未満, B.  $20 \sim 40 \times 10^6$ /ml, C.  $40 \times 10^6$ /ml以上の3群に分類し、各群での凍結融解後の精子機能を検討した。

#### 1. 精子の凍結方法

精子の凍結保存方法は、基礎実験により得られた最良の凍結保存液及び凍結速度を採用した。すなわち保存液にはKS-II液を使用し、凍結方法はProgram freezerにて段階的に行つた。採取された精液は、KS-II液と1:1に滴下混合の後、ストロー管に封入した。凍結はProgram freezerを用い、凍結速度は室温 $\sim -5^\circ\text{C}$  ( $-0.5^\circ\text{C}/\text{min}$ )、10分間hold $-5^\circ\text{C} \sim -80^\circ\text{C}$  ( $-10^\circ\text{C}/\text{min}$ )、5分間holdにて段階的に行つた後、液体窒素中に保存した。検体は2~8週間凍結保存し、融解は37°Cの微温湯により急速融解させ、受精機能試験を施行した。

#### 2. BMP test

BMP testは、Alexander<sup>2)</sup>の方法に準じて行い、新鮮あるいは融解後の検体について本試験を施行した(図1)。カップ内に0.2mlの液化精液を注入し、あらかじめ室温にて解凍しておいたウシ頸管粘液充填ずみのガラス毛细管2本をカップ内に立て、室温に放置した。30, 60, 90分後にガラス管をスケールの入ったスライドガラス上に置き、100倍あるいは200倍にて鏡検し、最高到達距離を測定した。凍結保存した粘液は急速融解した後、無処理のままカップに0.2ml注入し、新鮮精液と同様な方法を用い、測定を行つた。

#### 3. Hamster test (ZSPT)

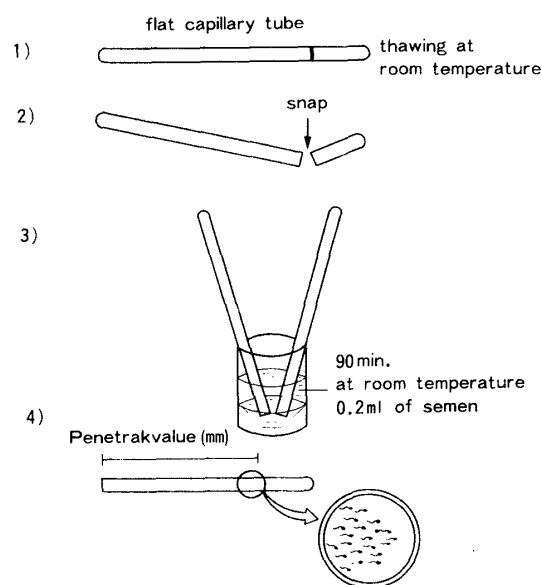


図1 BMP testの概要

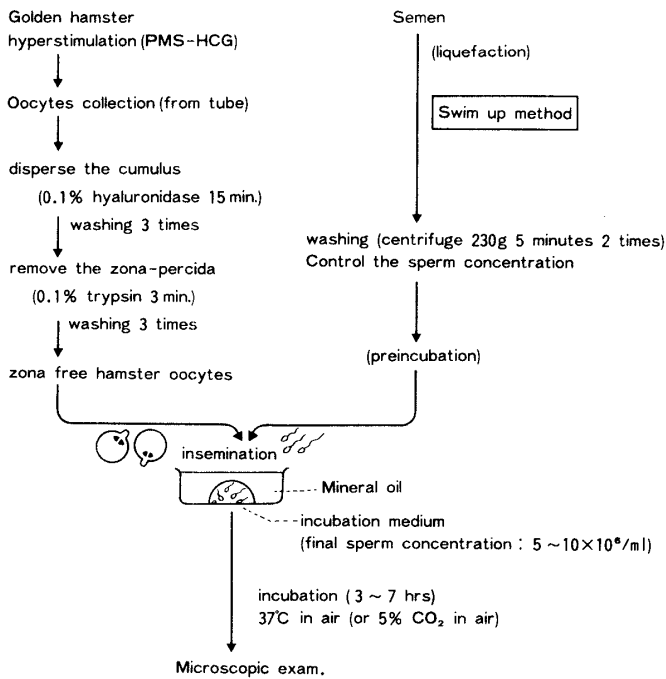


図2 Hamster test の概要

1) 卵の採取

図2は、Hamster test<sup>16)</sup>の概要を示したものである。卵の採取は、6週以降の成熟 Golden hamster に、PMS 30IU, hCG 30IU 投与にて過排卵処理を施し、卵管より採取した。0.1%Hyaluronidase にて卵丘細胞を取り除き、0.1%Trypsin にて透明帯を除去し、あらかじめ精子数を調整しておいた精子のドロップ内に、20~30個の卵を移し媒精した。

2) 精子の処理

採取された精液は Swim up を30~60分間施行

し、2回洗浄後 $5\sim 10\times 10^6/\text{ml}$ となるように調整した。凍結保存精液は急速融解した後、mBWW の培養液を加え、遠心操作にて凍結保存液を洗浄し、更に60分間の Swim up を施行した後、2回洗浄後に精子数を調整した。

3) 媒精及び判定

精子は3~4時間の前培養の後、媒精に供した。培養条件は、37°C下の5%CO<sub>2</sub> in air 下で4~6時間とした。精子侵入の判定は、卵細胞内の精子頭部の膨化所見及び雄性前核の確認によつて行つた。更に媒精に用いた卵全体と、侵入した卵との比によつて侵入率を算定した。

4. Hypoosmotic Swelling test (HOS test)

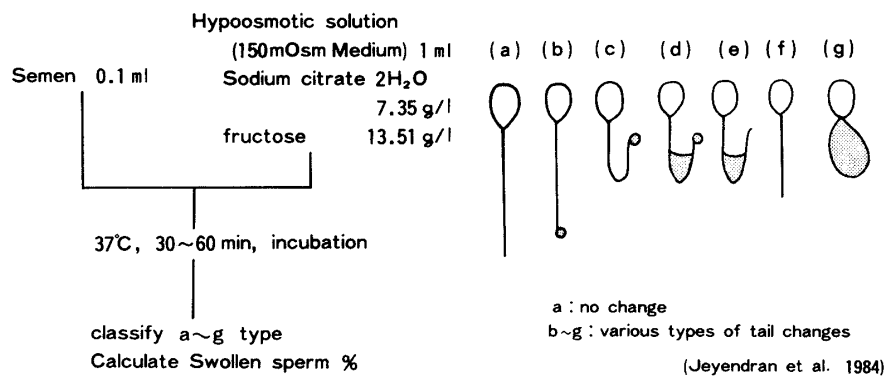
HOS test は、Jeyendran et al.<sup>6)</sup>の方法に準じた。本試験では fructose 液とクエン酸ナトリウム液を1:1に混合させた低浸透圧溶液(150 mOsm)を用いた。この低浸透圧溶液1mlと精液0.1mlとを混合させ、37°C・5%CO<sub>2</sub> in air 下で、30~60分間培養を行つた後、400倍にて鏡検した。低浸透圧溶液の作用で変化を来した精子尾部により a~g type に分類した<sup>6)</sup>(図3)。最低100以上の精子を数え、G-type 膨化率及び総膨化率の割合を算出した。凍結精液も融解後、上述の方法にて膨化率を算出した。

5. Triple stain 法による AR の観察

新鮮及び凍結精液の AR は、Talbot et al.<sup>13)</sup>が報告した Triple stain 法を用いて行つた。

1) 第1段階の染色

新鮮精液及び凍結保存精液は、洗浄処理後37°C



HOS test の概要

膨化精子の分類

図 3

表1 凍結前後の運動率の比較

( $\times 10^6/\text{ml}$ )	凍 結 前		凍 結 後		蘇 生 率 Rate	n
	Count ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Motility (%)	Count ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	Motility (%)		
(A) 0~20	11.6 $\pm$ 5.70	41.9 $\pm$ 14.3	11.2 $\pm$ 9.9	21.7 $\pm$ 21.5	46.6 $\pm$ 45.3	46
(B) 20~40	35.3 $\pm$ 34.7	48.6 $\pm$ 14.5	14.7 $\pm$ 19.4	27.8 $\pm$ 24.5	51.1 $\pm$ 43.4	52
(C) 40~	87.6 $\pm$ 37.5	61.2 $\pm$ 17.2	39.4 $\pm$ 30.0	40.9 $\pm$ 21.7	63.5 $\pm$ 29.4	116
Total	68.2 $\pm$ 45.7	56.5 $\pm$ 18.1	30.5 $\pm$ 28.6	35.4 $\pm$ 23.2	59.3 $\pm$ 35.4	214

で15分間2%trypan blue 染色液で染色した。余剰の trypan blue 液を洗浄後、3%glutaraldehyde で固定し、蒸留水で水洗し自然乾燥させた。

## 2) 第2段階の染色

0.4%Bismark brown Y (pH 1.8) 液で40°C 5分間染色後、蒸留水にて洗浄後乾燥させた。

## 3) 第3段階の染色

続いて0.8%Rose Bengal (pH 5.3) 液で25°C 20分間染色を行い、水洗後乾燥させた。検体を1,000倍にて鏡検し、100~400の精子を観察し、AR 率を求めた。

## 6. 精子自動解析装置による凍結前後の比較

凍結前及び凍結融解後の精液178例に対し、精子自動解析装置 (Computerized Semen Auto Analyzer HTM-2030)にて精子濃度、運動率を算出し、更に現在受精機能と関係していると推測されている以下の5項目について、凍結前後で比較検討した。: 1) mean velocity (mic/sec), 2) mean LHD (Lateral Head Displacement, mic), 3) mean lineality (%), 4) progressive motility (%), 5) mean frequency (Hz)

### 研究成績

#### 1. 凍結後の精子蘇生率

表1に凍結前、融解後のA, B, C各群での精子濃度、運動率、及び蘇生率を示した。A, B群の乏精子症では、融解後の蘇生率が低い傾向を認めた。

#### 2. 凍結前後のBMP testの比較

凍結前のBMP testの平均値は41.1 $\pm$ 17.2mmであり、凍結後では14.0 $\pm$ 11.2mmであった。凍結後のBMP testでは、いずれの群においても有意に低下していた。よって凍結後のBMP testの

表2 BMP test 90分値の凍結前後の比較

( $\times 10^6/\text{ml}$ )	凍 結 前	凍 結 後 (+KS-II)	凍 結 後 (洗 浄)
(A) 0~20	24.0 $\pm$ 16.8	3.0 $\pm$ 5.2*	10.0 $\pm$ 6.4
(B) 20~40	33.5 $\pm$ 18.2	3.0 $\pm$ 1.8*	12.2 $\pm$ 10.4
(C) 40~	47.0 $\pm$ 13.4	17.5 $\pm$ 10.6*	26.4 $\pm$ 10.6
Total	41.1 $\pm$ 17.2 (n=82)	14.0 $\pm$ 11.2 (n=37)	19.5 $\pm$ 12.3 (n=42)

mean $\pm$ SD (\*: p<0.01)

表3 Hamster test による侵入率の凍結前後の比較

( $\times 10^6/\text{ml}$ )	凍 結 前	凍 結 後
(A) 0~20	5.33 $\pm$ 8.11	0.56 $\pm$ 1.67*
(B) 20~40	8.06 $\pm$ 8.53	7.14 $\pm$ 9.16
(C) 40~	41.5 $\pm$ 39.2	36.5 $\pm$ 35.6
Total	36.5 $\pm$ 38.3	21.7 $\pm$ 25.2

(\*: p<0.01)

低下に凍結保存液が影響を及ぼすか否かを検討するため、凍結融解後に保存液を洗浄かつSwim upを行い、再度BMP testを施行した。その結果は表2のごとく、洗浄後においていずれの群でも有意に上昇していた。

#### 3. 凍結前後のZSPTの侵入率

A, B, C各群のZSPTの侵入率を凍結前後において比較すると、B, C群では凍結前後の侵入率に、有意差が認められなかった。しかし凍結後のA群の侵入率は有意に低下していた(表3)。

#### 4. 凍結前後のHOS testの比較

表4 凍結融解前後のHOS testの比較

( $\times 10^6$ /ml)	G-type		Total	
	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後
(A) 0~20	5.7 $\pm$ 5.0	6.2 $\pm$ 5.9	57.6 $\pm$ 8.1	51.4 $\pm$ 13.8
(B) 20~40	15.9 $\pm$ 10.8	10.4 $\pm$ 4.5	72.5 $\pm$ 7.6	71.8 $\pm$ 17.0
(C) 40~	25.7 $\pm$ 9.2	22.4 $\pm$ 5.1	75.1 $\pm$ 8.3*	63.6 $\pm$ 13.2
Total	18.0 $\pm$ 12.7* (n=57)	10.3 $\pm$ 6.0 (n=40)	69.8 $\pm$ 11.8 (n=57)	62.2 $\pm$ 16.3 (n=40)

(\*: p&lt;0.01)

表5 凍結融解前後のAcrosome Reactionの比較

( $\times 10^6$ /ml)	UR		R	
	Fresh	Post thaw	Fresh	Post thaw
(A) 0~20	28.04 $\pm$ 14.08	21.56 $\pm$ 8.54	16.46 $\pm$ 13.30	19.67 $\pm$ 18.86
(B) 20~40	25.30 $\pm$ 12.41	21.17 $\pm$ 8.89	24.70 $\pm$ 14.26	28.78 $\pm$ 21.11
(C) 40~	24.32 $\pm$ 17.80	21.79 $\pm$ 10.26	24.76 $\pm$ 19.29	25.29 $\pm$ 24.59
Total	25.65 $\pm$ 15.59 (n=82)	21.48 $\pm$ 8.98 (n=50)	22.32 $\pm$ 16.80 (n=82)	24.52 $\pm$ 21.30 (n=50)

UR: ARを起こさなかつた群

R: ARを起こした群

表6 Semen Auto Analyzerによる凍結前後の比較

( $\times 10^6$ /ml)	mean velocity (mic/sec)		mean LHD (mic)		mean lineality (%)		prog. motility (%)		mean frequency (Hz)	
	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後	凍結前	凍結後
(A) 0~20	35.93 $\pm$ 5.68	28.85 $\pm$ 12.43	2.42 $\pm$ 0.85	2.82 $\pm$ 2.15	61.73 $\pm$ 14.21	50.46 $\pm$ 18.56	29.33** $\pm$ 19.81	15.69 $\pm$ 12.59	5.55* $\pm$ 1.55	3.77 $\pm$ 1.77
(B) 20~40	34.70** $\pm$ 8.95	23.63 $\pm$ 11.25	3.03 $\pm$ 0.99	2.89 $\pm$ 1.53	64.20 $\pm$ 7.24	49.13 $\pm$ 22.05	28.10 $\pm$ 21.18	15.75 $\pm$ 13.34	11.37 $\pm$ 20.63	3.16 $\pm$ 1.78
(C) 40~	36.93 $\pm$ 8.32	32.63 $\pm$ 15.21	3.55 $\pm$ 1.21	3.08 $\pm$ 1.64	58.14 $\pm$ 7.16	49.75 $\pm$ 18.18	53.25* $\pm$ 21.40	22.75 $\pm$ 12.99	4.86* $\pm$ 0.83	3.19 $\pm$ 1.78
Total	36.15* $\pm$ 7.62 (n=105)	28.87 $\pm$ 13.34 (n=73)	3.16 $\pm$ 1.20 (n=105)	3.01 $\pm$ 1.75 (n=73)	60.29* $\pm$ 9.63 (n=105)	50.36 $\pm$ 18.29 (n=73)	42.27* $\pm$ 23.83 (n=105)	18.13 $\pm$ 12.60 (n=73)	6.22** $\pm$ 8.83 (n=105)	3.29 $\pm$ 1.64 (n=73)

(\*: p&lt;0.01)(\*\* : p&lt;0.05)

表4は、HOS testにおける総膨化率及びG-type膨化率を凍結前後で比較したものである。凍結前のG-type平均膨化率は、18.0 $\pm$ 12.7%で、凍結融解後では10.3 $\pm$ 6.0%であり、前者に比して有意に低下していた。しかしA、B、Cの各群では、凍結前後に有意差は認めなかつた。更に、凍結前

の総膨化率の平均は69.8 $\pm$ 11.8%、凍結融解後では62.2 $\pm$ 16.3%であり、凍結前後において各群とも有意の差は認められず、凍結融解後においても平均60%以上の総膨化率を示していた。

#### 5. 凍結前後のARの比較

凍結前の平均AR率は22.3 $\pm$ 16.8%、凍結融解

後では $24.5 \pm 21.3\%$ であつた(表5)。A, B, C各群とも凍結前後において、凍結後に上昇する傾向を示すが有意の差は認められなかつた。

#### 6. 精子自動解析装置による凍結前後の比較

受精機能と関連していると推測されているパラメーターの凍結前後の値は、それぞれ表6のごとく、1) mean velocity:  $36.15 \pm 7.62$ ,  $28.87 \pm 13.34$  (mic/sec), 2) mean LHD:  $3.16 \pm 1.20$ ,  $3.01 \pm 1.75$  (mic), 3) mean lineality:  $60.29 \pm 9.63$ ,  $50.36 \pm 18.29$  (%), 4) prog. motility:  $42.27 \pm 23.83$ ,  $18.13 \pm 12.60$  (%), 5) mean frequency:  $6.22 \pm 8.83$ ,  $3.29 \pm 1.64$  (Hz)であつた。velocity, lineality, prog. motility, frequencyの凍結融解後の値は、凍結前の値に比して有意に低下していた。しかしA, B, Cの各群の比較では、どのパラメーターでも有意差を認めず、乏精子症に特徴的な所見は得られなかつた。

#### 考 案

従来の一般的な精液検査は、男性の妊孕力、特に直接受精機能を反映するものとはいひ難い。よつて受精機能を客観的に評価するため、さまざまな検査が開発され、臨床応用され始めている。これらの受精機能検査は、新鮮精子においては多数の報告があるが、凍結保存精子に関してはいまだ充分とはいひ難い。

ヒト精子凍結保存の応用は1954年に Sherman et al.が人工授精妊娠を初めて報告した。その後、凍結保護剤・凍結速度・凍結保存法等にさまざまな改良が加えられ、広く臨床応用されるようになった。最も改良された点はグリセリンと卵黄緩衝液を用いた保護剤の開発と Program freezerを応用した凍結法の改良である。凍結保護剤は、精子に対する温度変化の衝撃を防御するためさまざまな配慮が成されている。今回使用したKS-IIあるいはHSPMでは、温度衝撃に対しリン酸緩衝液、また15%-Glycerineを使用して耐凍能を与え、氷晶形成の予防に工夫がなされている。

更にpHの変動を防御するため、緩衝剤としてKS-IIではTris-Glycineを、HSPMではHepes-Glycineを添加している。この二つの凍結保護剤の大きな違いは、第1にKS-IIにおける卵黄の使

用である。この卵黄緩衝液中のリピッドとレシチンが精子の温度衝撃を緩和し、保存に効果があるとされている。第2には精子の代謝基質として、KS-IIではショ糖を、HSPMではglucoseを使用している点である。この両方で蘇生率に差が認められたのは、卵黄緩衝液が原形質膜に対してより強い保護作用を持つためと推測された。

凍結方法に関しては、室温より5℃までの温度衝撃域をできる限り緩徐に凍結すべきである。5℃/min以上の割合で冷却すると温度衝撃により精子機能と形態が損なわれると報告されている。氷晶形成域や再氷晶化域(-5℃~-80℃)はできる限り速やかに通過する必要があるが、冷却速度が速すぎても Program freezerと実測値の間にgapが生じ蘇生率に影響を及ぼすと推測された。

BMP testにおいては凍結融解後のSwim up精子は、どの群でもその到達距離がSwim up前と比し有意に上昇し、凍結保存液が精子の運動能に影響を及ぼしていた。この結果よりGlycerineなどの凍結保護剤の洗浄が、機能検査時に必要であり、更に人工授精を臨床応用する際にも必要であることが推測された。

妊孕性のある男性と不妊男性とのBMP test値を比較したUrry et al.<sup>14)</sup>の報告では、妊孕性群において有意に高いとしている。Takemoto et al.<sup>12)</sup>は、妊孕性のある群でのBMP test値はすべて20mm以上を示したとしている。これらの事実よりBMP testが、受精能の検査として重要な位置を占める可能性が推測される。

IVF時受精率の検討によると、BMP testが20mm以上であれば受精能を有すると報告<sup>7)</sup>されている。今回の結果で、凍結後の正常精子群のBMP test平均値は26.4mmであり、したがつて今回の成績を考慮すると正常群においては、凍結融解後も充分受精能が保持されていると考えられる。しかしながら、A群の乏精子症群では凍結洗浄後においてもこの基準値に到達できず、凍結の臨床応用が困難であることが示唆された。

ZSPTの判定基準としてPolansky et al.<sup>10)</sup>は、IVF時の受精率とZSPTとの対比から10%を

cut off 値と定め、Urry et al.<sup>14)</sup>は、凍結融解後精子で妊娠を認めた群の検討により20%以上、更にKyouno<sup>7)</sup>は30%を cut off 値としている。しかし1987年の WHO 臨床検査マニュアルにおいて、ZSPT の判定基準が記載されていない。これは精子の前培養時間が異なることや、培養液、媒精時間、精子と卵の培養時間などが、各施設においてさまざまなため、一定の基準を設定できないためと推察される。しかしながら今回の凍結後の結果では正常者では平均36.5%を示し、cut off 値を30%としても、妊孕力は充分保たれていると考えられる。一方、A 群の乏精子症では極端に低値を示し、環境変化に対して機能的な脆弱性を有し、侵入率低下の一因であることが推測された。

低浸透圧溶液における精子尾部の膨化能は原形質膜機能が正常か否かを現わし、精子の受精能力の指標とされている。Van der Ven et al.<sup>15)</sup>は IVF 時に HOS test を施行し、受精した卵はすべて60%以上の総膨化率を示したと報告している。この結果より判断すると、今回の実験では凍結後精子の膜機能に変化はなく、受精能力が充分保たれていることが推測される。これは膜輸送ばかりではなく、代謝や尾部線維の活動機能が凍結後でも変化が少ないことを示唆している。

AR test の結果で、AR 率が凍結融解後にわずかに上昇することから、原形質は正常な構造を保ち Capacitation が出現するものと考えられる。De Jonge et al.<sup>4)</sup>は IVF program で受精卵と未受精卵の AR 率に差はなかつたとし、Pilikian et al.<sup>9)</sup>も凍結後で AR 率がやや上昇するという今回の成績とほぼ一致する報告をしている。

精子自動解析装置は最近多くの施設において用いられているが、どのパラメーターが受精機能と関連しているのかいまだ明確ではない。Sandler et al.<sup>11)</sup>の報告では、IVF 時の卵の受精率と対比させた結果、Autoanalyzer で受精率に差が認められたものは、motility・lineality・LHD などの項目であつたとしている。更に LHD が2.8mic 以上で90%が受精していた事実により、LHD が最も受精と関係が深いとしている。同様に Holt et al.<sup>5)</sup>の報告では、IVF 時には velocity が25~30

mic/sec 以上で受精率が高くなり、更に30mic/sec 以上では ZSPT の侵入率も上昇すると報告している。今回の凍結前後の結果では LHD, velocity 以外は凍結後有意に低下するが、mean LHD は2.8mic 以上、velocity も30mic/sec 以上であるという結果を得、この事実より受精能力は凍結後でも充分保持されていることを示唆している。

以上の研究成績により精液検査正常者では精子の受精機能面から判断するならば、その運動能、膜構造、侵入率、運動機能等は凍結融解後でも充分維持されていることが判明した。したがって凍結によつてその妊孕力を低下することはないものと推察される。一方、乏精子症患者では、温度変化に対し機能面での脆弱性が増し、蘇生率や生化学的変化ばかりではなく、受精能も低下することが本研究により明らかとなつた。

凍結精子は今後ますます広く臨床応用されると考えられるが、その適用にあつては精子の受精機能を充分検討する必要がある。

#### 文 献

1. Aiman, J.: Factors affecting the succes of donor insemination. *Fertil. Steril.*, 37: 94, 1892.
2. Alexander, N.J.: Evaluation of male fertility with an in vitro cervical mucus penetration test. *Fertil. Steril.*, 36: 201, 1981.
3. Ansbacher, R.: Artificial insemination with frozen spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 29: 375, 1978.
4. De Jonge, C.J., Rawlins, R.G. and Zaneveld, L. J.D.: Induction of the human sperm acrosome reaction by human oocytes. *Fertil. Steril.*, 50: 949, 1988.
5. Holt, W.V., Moore, H.D.M. and Hillier, S.G.: Computerassisted measurement of results with in vitro fertilization assays. *Fertil. Steril.*, 44: 112, 1985.
6. Jeyendran, R.S., Van der Ven, H.H., Perez-Palaez, M., Crabo, B.G. and Zaneveld, L.J.D.: Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.*, 70: 219, 1984.
7. Kyouno, K.: A study of the fertilizing capacity of human spermatozoa: The hamster test. *Tohoku J. Exp. Med.*, 151: 345, 1987.
8. Mihandanan, M.M., Trounson, A.O. and

- Leeton, J.F.* : Successful use of human semen cryobanking for in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 40 : 340, 1983.
9. *Pilikian, S. and Guerin, J.F.* : Acrosome reacting capacity of frozen-thawed semen: Relation to hamster ova penetration. *J. Androl.*, 16 : 209, 1986.
10. *Polansky, F.F. and Lamb, E.J.* : Analysis of three laboratory tests used in the evaluation of male fertility. *Fertil. Steril.*, 51 : 215, 1989.
11. *Sandler, B., et al.* : The amplitude of lateral head displacement correlation with human in vitro fertilization. '88 Abstract of Annual Meeting American Fertility Society, 95 : 75, 1988.
12. *Tekemoto, F.S., Rogers, B.J., Wiltbank, M.C., Soderdahl, D.W., Vaughn, W.K. and Hale, R. W.* : Comparison of the penetration ability of human spermatozoa into bovine cervical mucus and zona free hamster eggs. *J. Androl.*, 6 : 162, 1985.
13. *Talbot, P. and Chacon, R.S.* : A triple stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm. *J. Exp. Zool.*, 215 : 201, 1981.
14. *Urry, R.L., Carrel, D.Y., Hull, D.B., Middleto, R.G. and Wiltbank, M.C.* : Penetration of zona free hamster ova and bovine cervical mucus by fresh and frozen human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 39 : 690, 1983.
15. *Van der Ven, H.H., Jeyendran, R.S., Al-Hasai, S., Perez-Pelaez, M., Diedrich, K. and Zaneveld, L.J.* : Correlation between human sperm swelling in hypoosmotic medium (Hypoosmotic Swelling Test) and in vitro fertilization. *J. Androl.*, 7 : 190, 1986.
16. *Yanagimachi, R.* : The use of zona free animal ova as a test system for the assessment of fertilization capacity human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15 : 471, 1976.

(No. 6998 平3・5・11受付)