

「ヒト精液検査と手技」

WHO・ラボマニュアル5版 翻訳



出版：高度生殖医療技術研究所

WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen

FIFTH EDITION

は世界保健機構によって 2010 年に刊行されたものである。

世界保健機構事務局は日本語で出版するための翻訳と出版の許可を高度生殖医療技術研究所に与えた。研究所は日本語の全責任を負うものとする。

WHO ラボマニュアル-ヒト精液検査と手技-5 版。

本著書は前版の WHO ラボマニュアル-ヒト精液の検査と精子—頸管の相互作用とタイトルを異にしている。

1. 精液と化学 2. 精液とラボマニュアル 3. 精子とラボマニュアル 4. 精子検査 5. 精子と卵子の相互作用 6. ラボ手技と標準化 7. 品質管理

著作権利

本翻訳著書の著作権利は高度生殖医療技術研究所（〒371-0105 群馬県前橋市富士見町石井909-21）が所有している。

本著書の複写の申請は、販売目的、または、非販売目的に関わらず上記の住所に申し出なければならない（Fax: 027-230-5412 e-mail: yaaraki@nifty.com）。

本著書に含まれる情報の正当性について研究所が詳細に検討したものではなく、内容はいかなる保証も得ないまま多方面に普及されているものも含まれている。それゆえ、本著書内容の解釈とその活用についての責任はすべて読者にあるものとする。つまり本著書内容の使用から生じた事故について研究所は一切責任を負わない。

印刷は岡英社で行った。

編集者

荒木康久 沖津 摂 佐藤和文 福田愛作

翻訳者（翻訳担当箇所順）

角田啓道（自治医科大学附属病院 臨床検査部 主任臨床検査技師）
 藤井好孝（倉敷成人病センター・倉敷成人病クリニック 体外受精センター技師長）
 遠藤雄史（倉敷成人病センター・倉敷成人病クリニック 体外受精センター 胚培養士）
 中原裕子（医療法人愛生会 扇町レディースクリニック・シニア 胚培養士）
 藤田智久（医療法人社団啓樹会 西村ウイメンズクリニック ART 培養室長）
 村松正子（医療法人社団啓樹会 西村ウイメンズクリニック ART 培養室）
 青野展也（吉田レディースクリニック 培養室長）
 八尾竜馬（扶桑薬品工業株式会社研究開発センター 研究員）
 野々口耕介（醍醐渡辺クリニック 培養室主任）
 清水敏夫（JA 長野厚生連篠ノ井総合病院 臨床検査科 前総技師長）
 杉本利幸（静岡レディースクリニック 検査・培養部長）
 山本太陽（静岡レディースクリニック 検査）
 花村浩美（静岡レディースクリニック 検査）
 熊谷晶子（スギモトレディースクリニック 培養室長）
 中條友紀子（京野アートクリニック 培養部主任）
 大庭美和子（大川レディースクリニック 培養室長）
 森本 誠（済生会松阪総合病院 ART センター 係長）
 平岡謙一郎（虹クリニック 培養室長）
 大津英子（セント・ルカ産婦人科研究室 室長）
 清水勇聡（芝公園かみやまクリニック 培養室 主任）
 渡邊英明（神奈川レディースクリニック IVF 室 部長）
 立花郁雄（スズキ記念病院 技師長）
 野田隆弘（スズキ記念病院 産婦人科医師）
 沖津 摂（三宅医院 生殖医療部 部長）
 福田愛作（IVF 大阪クリニック 院長）
 大石美穂（済生会横浜市東部病院 リプロダクションセンター 係長）
 佐藤和文（一般社団法人日本臨床エンブリオロジスト学会理事長）
 猪鼻達仁（医療法人財団 順和会 山王病院 不妊技術室 主任）
 西原卓志（医療法人三慧会 I V F なんばクリニック 培養環境部門 課長）
 江頭昭義（蔵本ウイメンズクリニック 培養室室長）
 古川 博（藤田保健衛生大学病院臨床検査部 係長）
 足達まり恵（藤田保健衛生大学病院臨床検査部）

WHO / 翻訳契約：高度生殖医療技術研究所

目次

謝辞	XiV
本マニュアルで用いられる頭字語と略語	XVii

Chapter 1	背景	1
1.1	序章	1
1.2	第5版	1
1.3	マニュアルの応用範囲	3

PART I. 精液検査

Chapter 2	標準手順	4
2.1	序章	4
2.2	サンプル採取	8
2.2.1	準備	8
2.2.2	診断あるいは研究目的のための精液採取	8
2.2.3	生殖補助医療のための精液の無菌的な採取	9
2.2.4	細菌検査のための精液の無菌回収	9
2.2.5	自宅での精液採取	9
2.2.6	コンドームを用いた精液採取	10
2.2.7	検体の安全な取り扱い	11
2.3	最初の肉眼的検査	11
2.3.1	液化	11
2.3.2	精液の粘性	12
2.3.3	精液の様子	13
2.3.4	精液量	13
2.3.5	精液の pH	14
2.4	最初の顕微鏡的検査	15
2.4.1	混合精液からの標本抽出	16
2.4.2	標本の作製	16
2.4.3	精子集合	17
2.4.4	精子凝集	18
2.4.5	精子以外の細胞成分	20
2.5	精子運動性	20
2.5.1	精子運動性の分類について	21
2.5.2	精子運動性の評価のためのサンプルの準備	21
2.5.3	実例	26
2.5.4	標準値の下限	26
2.6	精子活性	26

2.6.1	Eosin-nigrosin を使用した活性試験.....	27
2.6.2	Eosin 単独生存性試験.....	30
2.6.3	低浸透圧膨化法による生存試験	32
2.7	精子数.....	35
2.7.1	計算盤の種類	36
2.7.2	改良型 Neubauer 血球計算盤	36
2.7.3	血球計算盤格子の使用法	37
2.7.4	計算盤の手入れ法	38
2.7.5	精液の希釈固定法	39
2.7.6	十分な数の精子について測定することの重要性	39
2.8	通常の数値手順	41
2.8.1	必要な希釈倍率の決定	41
2.8.2	希釈の準備と血球計算盤への注入.....	43
2.8.3	計算室内の精子数の計測	44
2.8.4	精液の精子濃度の計算	47
2.8.5	実施例	47
2.8.6	精子濃度の最低基準限度値.....	48
2.8.7	射精精液中の総精子数の計算	48
2.8.8	総精子数の最低基準限度値.....	48
2.9	低精子数 : cryptozoospermia と無精子症の疑い	49
2.10	低精子数の正確な評価が必要でない場合.....	49
2.10.1	追加措置を必要としない	49
2.10.2	精子確認のために遠心した標本を検査する	49
2.10.3	精液検体を遠心しないで運動精子を確認する方法	51
2.11	少ない精子数でも正確な評価が必要な時.....	52
2.11.1	改良型 Neubauer 血球計算盤の全区画での少ない精子数の評価（位相差顕微鏡）	53
2.11.2	大容量の使い捨てスライドでの低い精子濃度での評価（蛍光顕微鏡）	57
2.12	精子以外の細胞の測定.....	61
2.12.1	精液中の円形細胞の濃度計算	61
2.12.2	この方法の感度	61
2.12.3	計算例	62
2.13	精子の形態.....	62
2.13.1	正常精子の概念	63
2.13.2	精液塗抹標本の準備.....	64
2.14	染色法.....	68
2.14.1	伝統的な固定法と続いての染色法	68
2.14.2	精子形態学のためのパパニコロー染色法	69
2.14.3	精子形態学のためのショール染色方法.....	72
2.14.4	形態学的精子観察のための迅速染色方法	74

2.15	染色した標本の観察	75
2.15.1	正常形態精子の分類	75
2.15.2	異常形態精子の分類	76
2.16	形態図版 1-14	78
2.17	塗抹標本による精子形態評価の分析	118
2.17.1	正常精子の形態評価	118
2.17.2	計算例	119
2.17.3	基準下限値	119
2.17.4	異常精子の形態評価	119
2.17.5	計算例	120
2.17.6	特殊な精子欠損の評価	120
2.18	精液中の白血球の評価	121
2.18.1	オルト-トルイジンを用いたペルオキシダーゼ細胞染色	121
2.19	精液中の未熟生殖細胞の評価	127
2.20	精子の被覆抗体試験	128
2.20.1	混合抗グロブリン反応試験	129
2.20.2	直接イムノビーズテスト	131
2.20.3	間接イムノビーズテスト	134
Chapter 3	選択的な手技	136
3.1	複数の精子欠損の指標	136
3.1.1	複数の形態的な欠損指標の計算	136
3.1.2	実施例	138
3.2	汎白血球抗原 (CD45) 免疫細胞化学的染色	139
3.2.1	原理	139
3.2.2	試薬	139
3.2.3	手順	140
3.3	精子と子宮頸管粘液の相互作用	143
3.3.1	生体内 (性交後) テスト	143
3.3.2	試験管内検査	146
3.3.3	試験管内単純化スライドテスト	148
3.3.4	毛細管テスト	149
3.4	付属生殖器機能のための生化学分析評価	152
3.4.1	精漿中の亜鉛測定	153
3.4.2	精漿中のフルクトース測定	155
3.4.3	精漿中の中性 α -グルコシダーゼ測定	157
3.5	コンピューターによる精子解析	160
3.5.1	緒言	160
3.5.2	CASA を用いた精子運動性の評価	161

3.5.3	CASA を使った精子濃度の測定.....	164
3.5.4	コンピューターを用いた精子の形態の評価	164
Chapter 4	研究のための手順	166
4.1	活性酸素	166
4.1.1	緒言	166
4.1.2	精子浮遊液の活性酸素の測定	167
4.2	ヒト精子と卵子の相互作用テスト	171
4.3	ヒト透明帯結合テスト	171
4.4	先体反応の評価	172
4.4.1	先体状態の蛍光評価法の手順	172
4.4.2	誘導先体反応の評価.....	176
4.5	透明帯除去ハムスター卵子通過テスト	178
4.5.1	手順.....	178
4.6	精子クロマチンの評価.....	184
PART II. 精子処理		
Chapter 5	精子調整法	186
5.1	序	186
5.1.1	いかなる場合、精子を精漿から分離する必要があるのか？	186
5.1.2	調整方法の選択	186
5.1.3	精子を精漿や感染性物質から分離する効果	187
5.2	基礎知識	187
5.3	簡易洗浄	188
5.3.1	試薬.....	188
5.3.2	手順.....	188
5.4	直接 swim-up 法.....	189
5.4.1	試薬.....	189
5.4.2	手順.....	189
5.5	不連続密度勾配法	190
5.5.1	試薬.....	190
5.5.2	手順.....	191
5.6	HIV に感染した精液の調整.....	192
5.7	精巣精子、精巣上体精子の調整	192
5.7.1	酵素処理法	192
5.7.2	機械的処理法	193
5.7.3	ICSI のための精子懸濁液.....	193
5.8	逆行性射精の検体	193
5.9	射精に介助を必要とした精液の調整	194

Chapter 6	精子凍結保存	195
6.1	はじめに	195
6.2	精液凍結保存プロトコル	198
6.2.1	標準操作法	198
6.2.2	乏精子症の検体や外科的に採取された精子のための修正プロトコル	201
6.2.3	ストローのラベリングと記録	202
PART III. 品質保証		
Chapter 7	品質保証と品質管理	204
7.1	男性泌尿器科学検査室における品質管理	204
7.2	精液検査における誤差の特性	204
7.3	統計的な標本抽出時のエラーの最小限化	205
7.4	品質保証計画	208
7.5	検査室における作業手順書	208
7.6	組織内部における品質管理	208
7.6.1	QC のための標本の購入	209
7.6.2	検査室内で作製される QC 標本	209
7.6.3	保存標本について（購入標本、検査室内で作製された標本）	210
7.6.4	新鮮な QC 標本（検査室内での作製）	211
7.7	同一検査者における、また異なる検査者間における体系的な誤差の解析と報告のための統計的手順	211
7.7.1	$\bar{X}$ 管理図	212
7.7.2	S 管理図	216
7.8	百分率における品質管理	217
7.9	$\bar{X}$ と Schart の検定	218
7.9.1	異常値発見法	218
7.9.2	基準値外を測定した原因	219
7.9.3	基準外値が得られた場合の対応	220
7.10	技師間の変動を解析し報告するための統計操作法	220
7.10.1	2人以上の技師による測定値の比較	220
7.10.2	月間平均値のモニタリング	223
7.11	外部組織による品質管理（EQC）と品質保証（EQA）	223
7.11.1	EQC 結果の評価	225
7.11.2	基準外結果が得られた場合の対処法	226
7.12	精度管理（QC）の頻度と優先順位	227
7.13	トレーニング	228
7.13.1	精子濃度測定に問題がある場合の実用的注意事項	228
7.13.2	精子形態評価の難しさを経験するときの実際的なヒント	230

7.13.3	精子運動性評価の難しさを経験するときの実践的なヒント	231
7.13.4	精子生存性評価の難しさを経験するときの実践的なヒント	232
参考文献		234

付録

付録 1 基準値と精液命名法.....260

A1.1	基準値	260
A1.2	学術用語	262

付録 2 設備と安全性.....264

A2.1	アンドロロジーラボの必需品	264
A2.2	アンドロロジー・ラボ内の潜在的バイオハザード	268
A2.3	ラボ職員の安全処置	268
A2.4	ラボ装置の安全処置	271
A2.5	液体窒素取扱い時の安全予防処置	272

付録 3 顕微鏡.....274

A3.1	サンプルの設置	274
A3.2	接眼レンズの調整	276
A3.3	像の集束（焦点調整）	276
A3.4	接眼レンズの集束（焦点調整）	277
A3.5	光コンデンサーの集束（焦点調整）	277
A3.6	コンデンサーを中央にする	277
A3.7	位相リングの調整	278
A3.8	蛍光顕微鏡.....	278

付録 4 保存液.....279

A4.1	Biggers, Whitten, Whittingham.....	279
A4.2	Dulbecco's (ダルベッコ) リン酸緩衝液 (PBS)	279
A4.3	Earle's 培養液	280
A4.4	Ham's F-10 培養液	280
A4.5	Hank's (ハンクス) 平衡塩類液	281
A4.6	ヒト卵管液.....	281
A4.7	Krebs-Ringer (クレブスリンガー) 液.....	282
A4.8	トリス緩衝塩 (Tris-buffered saline)	282

A4.9	タイロード液.....	283
A4.10	パパニコロー染色	283

付録 5 子宮頸管粘液..... 288

A5.1	はじめに	288
A5.2	子宮頸管粘液の採取と保存	289
A5.3	子宮頸管粘液の評価	290

付録 6 液及び頸管粘液検査のための記録用紙..... 294

A6.1	精液検査記録用紙のテンプレート	294
A6.2	頸管粘液記録用紙のテンプレート	297

付録 7 サンプル誤差とクオリティーコントロール..... 298

A7.1	精子濃度測定時の誤差	298
A7.2	標本誤差の理解の重要性.....	301
A7.3	パーセントの測定による誤差	302
A7.4	品質管理（QC）のための精液標本の作製	306
A7.5	精子運動性解析に対する施設内部品質監査を目的とした録画ビデオの制作手順.....	307
A7.6	精子濃度決定における施設内部品質管理のための希釈精液の調整	313
A7.7	内部精度管理のための精子形態学的評価スライド	316
A7.8	備品の標準化.....	318

付録 8 精液検査における多国の外部精度管理プログラム..... 321

図

図 2.1	1 年半にわたる精子総数と精子濃度の変化.....	6
図 2.2	精液中の精子の非特異的集合.....	18
図 2.3	精子凝集の異なる程度の模式図.....	19
図 2.4	精子運動性評価のための補助.....	24
図 2.5	明視野で観察した eosin-nigrosin 染色のスミア像.....	29
図 2.6	ヒト精子の低浸透圧による代表的な形態変化の概略図.....	34
図 2.7	改良型 Neubauer 血球計算盤.....	37
図 2.8	正方形区分格子での精子計測法.....	38
図 2.9	運動精子を見つけるためのカバーガラス全領域の走査.....	52
図 2.10	形態学的に正常な精子.....	64
図 2.11	精子形態のための精液塗抹方法.....	65
図 2.12	正常精液塗抹標本の準備.....	66
図 2.13	ヒト精子の異常形態図.....	78
図 2.14	ヒト精液中のペルオキシダーゼ陽性と陰性細胞.....	124
図 3.1	精液中の白血球.....	142
図 3.2	クレーマー精子進入測定器.....	150
図 3.3	CASA により測定される変数の専門用語.....	163
図 4.1	オプソニンを作用させたザイモサン処理に反応して発生した化学ルミネセンス.....	170
図 4.2	白血球と精子の発生活性酸素種による寄与分析.....	171
図 4.3	ヒト精子のエンドウマメ凝集素 (PSA) 蛍光染色.....	175
図 4.4	透明帯除去ハムスター卵子に進入したヒト精子の位相差顕微鏡写真.....	184
図 7.1	精子濃度における X_{bar} 管理図.....	215
図 7.2	精子濃度における S 管理図.....	217
図 7.3	Bland-Altman マニュアル図表とそこに示された CASA による精子前進性運動率の推定値.....	221
図 7.4	精子濃度による Youden プロット図表.....	222
図 A2.1	ローター半径と回転速度から相対的遠心力 (RCF) を決定する計算図表.....	270
図 A5.1	スライドガラスの上で空気乾燥された頸管粘液のシダ状結晶形成の例.....	289
図 A7.1	総精子数評価における 2 回測定による数値の違いの許容範囲.....	299
図 A7.2	真のパーセントの機能としての 2 回の反復検査と全精子数評価の違いに関する許容.....	304
図 A7.3	精子の運動性を測定するための参考.....	311
図 A7.4	顕微鏡を覗いた時の接眼レンズ内の格子目盛り (レチクル) の見え方 (赤色目盛り) .	312
図 A7.5	ビデオテープに録画され、モニター上に表示された測微計の画像とその画像上への補足図描写 ; 説明文参照.....	313

BOXES

Box 2.1 精液採取容器の適合性の確認	9
Box 2.2 プロメラインの調製	12
Box 2.3 精液混合	16
Box 2.4 湿標本の深さ	17
Box 2.5 割合の計算における誤差	24
Box 2.6 反復割合の比較	25
Box 2.7 推定数の誤差	39
Box 2.8 改良型 Neubauer 血球計算盤の中央 3 つの区画を利用して反復測定 of 1 回あたり 200 個の精子を測定するためには	41
Box 2.9 深さ 20 μ m の湿標本における強拡大 1 視野あたりの容量	42
Box 2.10 反復測定の比較	46
Box 2.11 改良型 Neubauer 血球計算盤での全 9 区画で標本ごとに精子数 200 個の到達	53
Box 2.12 100 μ m の標本厚さがある大容量の使い捨て chamber で標本ごとに 200 個の精子数の検査	57
Box 2.13 強拡大下で観察した、100 μ m の標本厚さをもつ大容量の使い捨て chamber の容積 ...	59
Box 2.14 封入剤	69
Box 3.1 ワックス・ワセリンの準備	144
Box 3.2 深さ 100 μ m 中の強拡大あたりの粘液量観察のための準備	145
Box 4.1 ハムスターの排卵誘発	180
Box 4.2 ガラスピペットの準備	182
Box 6.1 精子の凍結保存の目的	196
Box 6.2 ヒト精子の凍結保存のリスクアセスメント	197
Box 7.1 品質保証と品質管理における専門用語	206
Box 7.2 $\bar{X}$ 管理図における傾向分布の警告限界値、動作限界値の決定方法	214
Box 7.3 集積された標準偏差値からの $\bar{X}$ 傾向分布限界値の代替計算方法	214
Box 7.4 S 管理図における傾向分布の警告限界値と動作限界値の計算方法	216
Box 7.5 QC 記録の基本的チェック項目	219
Box 7.6 技師間の系統的誤差検証のための演習	224
Box 7.7 IQC 過程の要点	225
Box 7.8 精度管理のタイムスケジュール	227
Box 7.9 QC テストのまとめ	227
Box A2.1 遠心力の計算法	268
Box 3.1 対物レンズ	275
Box A5.1 採取された粘液の容積を決定する方法	290
Box 5.2 量は HPF により視野当たり 100 μ m の深さの粘液で観察される	292

表

表 2.1	200 個の精子を繰り返し計算し得られた割合の許容誤差範囲（全体の 400 計算）	25
表 2.2	計測した総精子数に対するおおよその標本誤差（%）	40
表 2.3	必用な精液の希釈倍数、調製法、使用するチャンバーと観察有効領域.....	42
表 2.4	総和に対する 2 つの繰り返し計測数の許容差	46
表 2.5	2 つの数値の間の合計での許容差：低い濃度	55
表 2.6	図版 1-14 使用されている解説の説明	79
表 2.7	イムノビーズテストに必要な精液（精子）の量.....	132
表 3.1	複数の精子欠陥指標の計算	137
表 3.2.	子供をもつ夫婦と子供に恵まれない夫婦の精子欠陥指標	138
表 3.3	精子進入濃度ランク	151
表 3.4	毛細管試験結果の分類.....	152
表 7.1	X_{bar} 管理図と S_{bar} 管理図における傾向分布の限界値を平均値と標準偏差値に基づいて決定するための係数一覧.....	213
表 7.2	精子濃度算定上起こりえる問題点と対策.....	229
表 7.3	精子形態評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案.....	230
表 7.4	精子運動性評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案	232
表 7.5	精子生存性評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案	233
表 A1.1	精液所見に対しての下限限界値（5 パーセンタイルと 95%の信頼範囲の）	261
表 A1.2	避妊用具を使用しないで 12 カ月以内に妊娠したパートナーの男性精液パラメーターの分布範囲	262
表 A1.3	精液性状に関連する学術用語	263
表 A7.1	2 回の反復測定値の総数の違いの許容範囲	300
表 A7.2	100 個の精子（全体として 200 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲	305
表 A7.3	200 個の精子（全体として 400 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲	305
表 A7.4	400 個の精子（全体として 800 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲	306

謝辞

本書は国連開発計画（UNDP） / 国連人口基金（UNFPA） / 世界銀行特別研究計画、ヒト生殖発生・研究機関（HRP）, WHO 生育研究部門（RHR）により刊行された。
このマニュアルの準備と編集へ参加された方々に深く感謝する。

Editor-in-chief

Dr Trevor G Cooper

Centre of Reproductive Medicine and
Andrology of the University,
Münster, Germany
(WHO Collaborating Centre
for Research in Male Reproduction)

Editorial team

Dr John Aitken

Biological Sciences
School of Life and Environmental Sciences
University Drive
Callaghan, New South Wales,
Australia

Dr Jacques Auger

Service de Biologie de la Réproduction
Pavillon Cassini Hôpital Cochin
Paris, France

Dr HW Gordon Baker

University of Melbourne
Department of Obstetrics and
Gynaecology
Royal Women's Hospital
Carlton, Victoria, Australia

Dr Chris LR Barratt

Division of Maternal and
Child Health Sciences
The Medical School
Ninewells Hospital
Dundee, Scotland

Dr Hermann M Behre

Centre for Reproductive
Medicine and Andrology
Martin-Luther-University

Dr Lars Björndahl

Andrology Centre,
Karolinska University Hospital
and Institute,
Stockholm, Sweden

Ms Charlene Brazil

Center for Health and
the Environment
University of California
Davis, CA, USA

Dr ChristopHer De Jonge

University of Minnesota
Reproductive Medicine Center
Minneapolis, MN, USA

Dr Gustavo F Doncel

CONRAD
Department of Obstetrics and
Gynecology Eastern Virginia
Medical School
Norfolk, VA, USA

Dr Daniel Franken

Department of Obstetrics and
Gynaecology
Tygerberg Hospital
Tygerberg, South Africa

Dr Trine B Haugen

Faculty of Health Sciences
Oslo University College
Oslo, Norway

Dr Aucky Hinting

Andrology Unit,
Department of Biomedicine
School of Medicine
Airlangga University,
Surabaya, Indonesia

Halle, Germany

Mr Godwin E Imade

Department of Obstetrics and Gynaecology
Faculty of Medical Sciences University of Jos
Jos, Nigeria

Dr Thinus F Kruger

Reproductive Biology Unit
Stellenbosch University
Tygerberg, South Africa

Dr Hesbon O Odongo

Department of Zoology
University of Nairobi
Nairobi, Kenya

Ms Elizabeth Noonan

Fred Hutchinson Cancer Research Center
Statistical Center for HIV / AIDS Research and
Prevention
Seattle, WA, USA

Dr Steven M Schrader

National Institute for Occupational
Safety and Health
Centers for Disease Control and Prevention
Cincinnati, OH, USA

Dr Christina CL Wang

Harbor-UCLA Medical Center
Torrance, CA, USA

Dr William Shu-Biu Yeung

Department of Obstetrics and Gynaecology
University of Hong Kong
Hong Kong SAR, China

**WHO Secretariat,
Department of Reproductive Health
and Research**

Dr Kirsten M Vogelsong

Scientist
Research Area Manager

Dr Sigrid von Eckardstein

Former Acting Research Area Manager

Dr Michael T Mbizvo

Director *ad interim*

Ms Maud Keizer

Secretary

さらに、形態学顕微鏡写真を作製し資料をチェック頂いた Ms Cathy Treece, Ms Charlene Tollner and Professor Jim Overstreet (University of California, Davis, CA, USA)、非精子細胞の識別に援助いただいた Dr Rune Eliasson (SopHiahemmet Hospital, Stockholm, Sweden)、品質管理に関する項をチェック頂いた Dr Timothy Farley (World Health Organization, Geneva, Switzerland)、マニュアル編集に追加情報を提供された Dr Gary N Clarke (The Royal Women's Hospital, Carlton, Australia)、Dr Roelof Menkveld (Tygerberg Academic Hospital and University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa)、and Pieter Wranz 教授 (University of Stellenbosch, Tygerberg, South Africa) に感謝する。

国際アンドロロジー学会の財政的支援に深く感謝する。

本マニュアルの編集は、男性の妊孕性の標準化について WHO 特別調査委員リーダーであった故 Geoffrey Waites (1928--2005) への思いであり、第 2 版、3 版、4 版の共同編集者に捧げるものである。編集委員会の任務に対する情熱は、恵まれない人々に対する Geoffrey の誠実、公平、気遣いにより推進された。

このマニュアルで使用される頭字語と省略形

Ab	antibody: 抗体
AI	artificial insemination: 人工授精
AID	artificial insemination with donor semen: 非配偶者間人工授精
AIH	artificial insemination with husband's semen: 配偶者間人工授精
ALH	amplitude of lateral head displacement: 精子頭部の平均振幅
ANOVA	analysis of variance: 分散分析
APAAP	alkaline phosphatase–anti-alkaline phosphatase complex: アルカリホスファターゼ-抗アルカリホスファターゼ複合体
AR	acrosome-reacted: 先体反応
ART	assisted reproductive technology: 生殖補助技術
ASA	anti-sperm antibody: 抗精子抗体
BAEE	N-benzoyl-L-arginine ethyl ester: N-ベンゾイル-L-アルギニンエチル塩酸塩
BCF	beat-cross frequency (Hz): 精子頭部が1秒間に振る回数 (Hz)
BSA	bovine serum albumin: ウシ血清アルブミン
BWW	Biggers, Whitten and Whittingham: ビッグーズ ホイッテンウィッティンガム培地
CASA	computer-aided sperm analysis: コンピューターを用いた自動精子解析
CASMA	computer-aided sperm morphometric assessment: コンピューターを用いた自動精子形態評価
CBAVD	congenital bilateral absence of the vas deferens: 先天性両側輸精管欠損
CD	compact disk: コンパクトディスク
CD	cytoplasmic droplet: 細胞質小滴
CD45	cluster of determination 45 (pan-leukocyte marker): 分子クラスター45 (pan-白血球抗原マーカー)
CD46	cluster of determination 46 (acrosomal antigen): 分子クラスター46 (先体抗原)
CI	confidence interval: 信頼区間
CL	confidence limit: 信頼限界
CO ₂	carbon dioxide: 二酸化炭素
DMSO	dimethyl sulfoxide: ジメチルスルホキシド
DNA	deoxyribonucleic acid: デオキシリボ核酸
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline: ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液
DVD	digital versatile disc: デジタルバーサタイルディスク
EDTA	ethylenediamine tetra-acetic acid: エチレンジアミン四酢酸
EQA	external quality assurance: 外部品質保証
EQC	external quality control: 外部品質管理
ERC	excess residual cytoplasm: 余剰細胞質
FITC	fluorescein isothiocyanate: フルオレセインイソチオシアネート
FMLP	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: ホルミルメチオニルロイシルフェニルアラニン

GIFT	gamete intrafallopian transfer: 配偶子卵管内移植
GPC	glycerophosphocholine: グリセロホスホコリン
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide: 過酸化水素
HBSS	Hanks' balanced salt solution: ハンクス平衡塩溶液
HBV	hepatitis B virus: B型肝炎ウイルス
hCG	human chorionic gonadotrophin: ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
HCV	hepatitis C virus: C型肝炎ウイルス
HIV	human immunodeficiency virus: ヒト免疫不全ウイルス
HOP	hamster oocyte penetration: ハムスター卵子進入
HOS	hypo-osmotic swelling: 低浸透圧膨化
HPF	high-power field: 高倍率視野
HRP	Horseradish peroxidase: 西洋わさびペルオキシダーゼ
HSA	human serum albumin: ヒト血清アルブミン
HTF	human tubal fluid: ヒト卵管液
IB	immunobead: イムノビーズ
IBT	immunobead test: イムノビーズ試験
ICSI	intracytoplasmic sperm injection: 卵細胞質内精子注入法
Ig	immunoglobulin: 免疫グロブリン
IM	immotility: 不動性
IQC	internal quality control: 内部品質管理
IU	international unit: 国際単位
IUI	intrauterine insemination: 子宮内人工授精
IVF	in-vitro fertilization: 体外受精
KRM	Krebs–Ringer Medium: クレブスリンガー培養液
LIN	linearity: 精子の直線性
LLQ	lower limit of quantification: 最低定量限度
LPF	low-power field: 低倍率視野
MAD	mean angular displacement: 平均角変位
MAI	multiple anomalies index: 多発奇形指数
MAR	mixed antiglobulin reaction: 混合抗グロブリン反応
NA	numerical aperture: 開口数
NP	non-progressive (motility): 非前進性 (運動性)
PBS	phosphate-buffered saline: リン酸緩衝生理食塩水
PDCA	plan, do, check, act: 計画、実行、評価、改善
PMA	phorbol 12-myristate 13-acetate: ホルボールミリステートアセテート
PMSG	pregnant mare serum gonadotrophin: 妊馬血清性性腺刺激ホルモン
PNPG	p-nitrophenol glucopyranoside: p-ニトロフェニルグルコピラノシド
PR	progressive (motility): 前進性 (運動性)
PSA	<i>Pisum sativum</i> agglutinin: エンドウマメ凝集素
QA	quality assurance: 品質保証
QC	quality control: 品質管理

RCF	relative centrifugal force: 相対遠心力
RI	refractive index: 屈折率
RNA	ribonucleic acid: リボ核酸
ROS	reactive oxygen species: 活性酸素種
r.p.m.	revolutions per minute: 毎分回転数
SD	standard deviation: 標準偏差
SDI	sperm deformity index: 精子奇形指数
SDS	sodium dodecyl sulfate: ドデシル硫酸ナトリウム
SE	standard error: 標準誤差
SOP	standard operating procedure: 標準作業手順書
STR	straightness (VSL / VAP) : 直進性
TBS	Tris-buffered saline: トリス緩衝生理食塩水
TGG	Tyrode's glucose glycerol: タイロードブドウ糖グリセロール
TZI	teratozoospermia index: 奇形精子症指数
VAP	average path velocity: 精子進行方向性速度の平均値
VCL	curvilinear velocity: 精子曲線地点移動速度の平均値
VSL	straight-line (rectilinear) velocity: 精子直線地点移動速度の平均値
WHO	World Health Organization: 世界保健機構
WOB	wobble (VAP / VCL) : 揺れ (VAP / VCL)

Chapter 1 背景

1.1 序章

ヒト精液検査の操作方法標準化に対する必要性の高まりに応え、ヒト精液と精子-頸管粘液相互作用を検査するための WHO ラボラトリーマニュアルは最初 1980 年に発行された。それ以来 3 回更新され、数多くの言語に翻訳されてきた。過去 30 年間にわたり、そのマニュアルは世界的標準を示すものとして認識され、世界中の基礎的ならびに臨床的ラボラトリーで広く使用されてきた。

この成功にもかかわらず、以前の版で推奨されていた事項も新たな証拠に照らし改訂が必要になった。また、いくつかの概念は更なる説明や裏づけとなる証拠を必要とすることが明白となってきた。これらの考慮すべき事柄に促され、WHO はそのマニュアルに記述された方法を確認、変更、あるいは更新することを目的とし、全ての方法を再調査するための編集委員会を設立した。そのマニュアルに記述された方法を用いて得られたデータが不十分なため、多くの場合においてこれが困難なことであるということが判明した。いくつかのケースでは、大変信頼のおける個々のラボラトリーにおいて一貫した結果が得られたが、それらは他の施設では再現されなかった。これらの状況を鑑み、編集委員会は関係書類を評価したのち改訂することにいった。

その他の推奨事項は、技術者と科学者から受けたもので、特に記述された多くの方法についてより詳細の必要性に関してである。以前の版では詳細な点が欠如しており、そのためいくつかのラボラトリーで WHO マニュアルに従った精液検査を行いたいと思っていても他の施設で記述された方法を好んで選択したり、あるいは彼ら独自の方法を作成していた、というものであった。全世界的規模での比較をよりいっそう簡単にするため、今回のマニュアル版ではいっそう詳細な部分、ならびに代わりの分析方法が示されている場合はその理論的根拠の解説も含むようにした。あるラボラトリーで論文結果を報告する場合、このマニュアルを参考にしていたなら、どの特定の方法を用いたかを明示することが推奨される。

1.2 第 5 版

- 第 5 版は 3 部から構成される：精液検査（第 2-4 章）、精子調整（第 5 章と第 6 章）ならびに品質保証（7 章）。第 1 部は精液検査に関する部分であり、前の版と似ているが三つの章に分割された：標準的な方法、これは精液の質を測定するため積極的に毎日定期的に行われる操作手順：オプションのテスト、これは特定の状況で用いられるか、もしくはラボラトリーによって選択されて用いられている。研究目的のテスト：これは通常、毎日定期的に行われる仕事とはみなされない。精液の培養はアンドロロジー検査室では普通行われないため、これについては精液の滅菌的採取法の項でふれることにする。精子調整法の項では射精精液のみならず精巣と精巣上体から得られた精子も含む。方法論の項目のところに、注意（方法についての説明）、コメント（結果の解釈）ならびに Box（その他の補足説明を含む）が挿入

されてある。

この第5版の要点を以下に略述する。

- 精液検査の章はマニュアルの他の部分との前後参照を最小限にし、それぞれの方法論全てが基本的に完璧になるように、全ての実際に用いる溶液、手順、計算式、ならびに説明についての詳細を含めた。
- 精子調整の項は拡張され、精子凍結保存の章が追加された。頸管粘液検査に関する方法は粘液の特徴により、オプションの章と付録とに分けた。
- 以前の版に比べ付録は少なくし、特別な領域に情報を限定した。
- *精子数の評価*。精液の希釈法ならびに精液サンプル中の精子数の評価に用いられる計数盤の範囲が、計数の反復ごとに 200 個の精子が数えられるように変更した。サンプル回収における過ちの重要性、ならびに得られた数値の結果の信頼性が強調されている。編集委員会は射精精液あたりの全精子数は精子濃度よりもより正確な精巢機能の評価を提供すると考えるが、これを行うためには精液容積が正確に測定されなければならない。
- *乏精子症の評価*。一見単純そうだが、乏精子症の診断は、とても少ない精子の計数にあたっての大きな誤差、検査のための顕微鏡視野の多さ、そして細胞残渣を伴った精子のペレットを調べる困難さなどの多くの因子によって混乱させられる。推奨される変更点は固定された、遠心分離されていないサンプルを検査すること、ならびに実施された計数方法の感度を明示することを含む。しかしながら、治療するのに十分な数の精子を集めるために必要とされる遠心分離方法、ならびに精管切除術後の精液評価のため、未固定サンプル中の運動精子を見つけ出す方法も含めた。
- *精子運動性の評価*。以前の版からの主な変更点は精子運動性をカテゴリー別に分けたことである。現在では、精子は活発に前進する、活発には前進しない、運動しない精子に分類されることを推奨する（グレード a、b、c、d の代わりに）。
- *精子形態の評価*。いくつかのラボラトリーは正常形態だけを検査するが、他の施設では異常のタイプ、部位そして程度の方がより重要であると考えている。これらの検査あるいは特異的な検査、半定量的な検査のどれが精液検査の価値を高めるかについては論争として残っている。正常形態のパーセント（厳密な分類化あるいはコンピューターによる形態検査で決められた）と体内での受精率の関係を支持する証拠は、精液中における精子の形態的に特徴的な亜集団を見出そうとするための正当な理由となっている。この版では、なぜ各精子がそれに分類されたかといった説明文とともに、正常ならびに境界に属すると思われる精子のよりいっそう高画質の顕微鏡写真が加えられている。これは技術者が精子を一貫して分類するためのトレーニングに役立たせるためである。最近の妊孕性のある集団からのデータを形態的に

正常な形のパーセントについての参考値として示した。

- **品質管理。**この章は完全に書き換えられた。精液検査のための厳密な品質保証はどうしても分析方法が必要である。品質管理の結果が不成功に終わった場合、ラボラトリー的能力をいかにすれば改善できるかといったヒントと助言も加えた。
- **基準範囲と基準限界値。**本マニュアルではパートナーが 12 ヶ月以内に妊娠したことを判断基準として男性の精液所見が正常であると定義し、その結果を元にして標準範囲を制定した。3 大陸の 8 ヶ国に属する、つい最近父親となった男性より約 400 から 1900 の精液サンプルを得、それらの生データを用いて、精液所見の基準範囲を制定した。ごく一般的な統計手法によって両側基準範囲からの 2.5 パーセンタイルのデータを異なる母集団から得られたと定めて、除外した。しかしながら、どの精液性状パラメーターにおいても、測定値の高い側の数値は妊孕性に対して問題ないと考えられるため、精液に関して片側基準範囲がより適していると考えられた。5 パーセンタイルが下限値として与えられ、精液に関するそれぞれのパラメーターの全分布については付録 1 に掲載した。

1.3 マニュアルの応用範囲

- ここで説明した方法は精液検査の品質や比較結果を向上させるガイドラインとなることを目的とした。地方の、国の、あるいは国際的なラボラトリー認定機関でも、それらは義務的なものと考えする必要はない。精液検査は、臨床の医療現場において、また基礎研究の分野においても有用であろう。つまり男性側が避妊中であってもそうでないとしても造精能力をモニターするため、または男性の妊孕能を調査するために有用であると考ええる。

Chapter 2 標準手順

2.1 序章

射精時、精液は両側の精巣上体に貯留された精子濃縮懸濁液が副生殖腺液と混ざり、そして希釈された後に産生される。それはいくらかの塊として射精される。精管切除術の前後で精液量を比較すると、精液量の約 90% が主に前立腺と精囊から、次いで球尿道（カウパー）腺と精巣上体からの副生殖器分泌液で成り立っていることが明らかとなっている（Weiske, 1994）。

精液は主として 2 つの数値化可能な特質を有する：

- 精子総数：これは精巣での精子産生と精巣以降の管内の開放に影響される。
- 様々な副生殖腺が関与する総液量：これは生殖腺の分泌活性に影響される。

精子の性質（生存性、運動性ならびに形態）と精漿液の構成物も精子機能には重要である。

性交時、射精精液中の、最初の、精子に富む前立腺分泌液の一部は膣にまで伸展した子宮頸管粘液に接触するであろう（Sobrero & MacLeod, 1962）、そして残りの液は蓄えとして膣に残される。それに対して、ラボラトリーでは、射精精液全量が容器内に回収され、精囊腺由来タンパクから発達した凝固物に閉じ込められている。この凝固物はその後前立腺タンパク分解酵素の作用により液化され、その間浸透圧は上昇する（Bjorndahl & Kvist, 2003; Cooper et al., 2005）。

どのようにして射精が行われたかによって精子の質は変化するといういくつかの証拠がある。ラボラトリー近くの部屋でマスターベーションにより容器内に採取された精液は、自宅で性交して採取された殺精子剤なしのコンドーム中に回収された精液と比べ質が低い（Zavos & Goodpasture, 1989）。この違いは性興奮様態の違いを反映しているのかもしれない、というのは、マスターベーションによってサンプルを作り出すために費やされる時間は、射精前の精液放出の程度を反映しており、精液の質にも影響するためである（Pound et al., 2002）。

- 採取時の状態によって、精液の質は通常、修正できない因子に左右される。つまり、精巣での精子産生、副生殖器官での分泌物、ならびに最近患った病気（特に発熱）や禁欲時間などであり、結果の解釈を考慮し記録されるべきである。

精液の質についてのラボラトリーでの測定結果は以下に述べる事に依存する：

全量が回収されたかどうか。射精の際、最初に排出された精液分画は主に精子に富む前立腺分泌液で、その後の分画は主として精囊液である（Björndahl & Kvist, 2003）。それゆえ、射精精液の最初の（精子に富む）部分を失うことは最後の部分を失うことより精液分析の結果に影響する。

副生殖腺の活動度、その分泌液は射精の際に濃縮状態の精巣上体精子を希釈する（Eliasson, 2003）。しかしながら、精子濃度は他の生殖腺機能に影響されるため、精子濃度は精巣精子の生産量の直接的な測定ではない。しかし、射精精子総数（精子濃度×精液量）は直接的な測定である。たとえば、若者と老人の精子濃度が同じであっても総精子数は違うだろう。それは精液量と総精子生産量は年齢とともに減少するからである（Ng et al., 2004）。

- 最後の性生活からの時間が経過し、射精が行われないと、精巣上体の蓄積精子は尿道へとあふれ出し、尿中に洗い流される（Cooper et al., 1993; De Jonge et al., 2004）。精子生存率とクロマチンは精巣上体機能が障害されない限り（Correa-Perez et al., 2004）、禁欲期間が長くなっても影響を受けない（Tyler et al., 1982b; De Jonge et al., 2004）。

最後から 2 番目の禁欲期間。精巣上体は一回の射精では完全には空にはならないので（Cooper et al., 1993）、いくらかの精子は前回の射精の時から残存する。これは年齢の幅と射精精子における精子の質に影響する（Tyler et al., 1982a）。この影響の程度は確かめるのが難しくほとんど考慮されていない。

精巣サイズは射精あたりの精子総数に影響する（Handelsman et al., 1984; WHO, 1987; Behre et al., 2000; Andersen et al., 2000）。精巣のサイズは精子形成活性レベルを反映し、精子形態にも影響する（Holstein et al., 2003）。

Comment: 精液の質における大きな生物学的変化（Castilla et al., 2006）は上記のたくさんの要素を反映しており、すべての精液測定は正確であることが要求される。

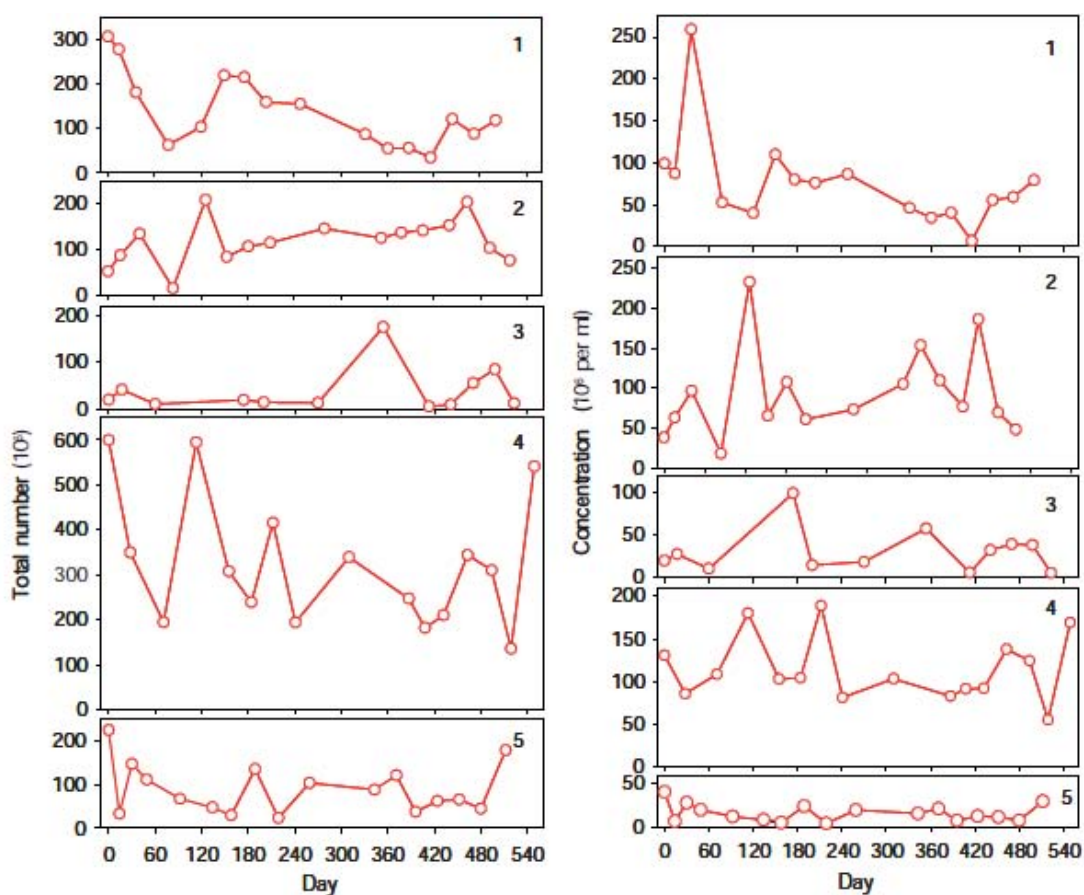
これらの変化に富み、ほとんど制御できない要素は、よく知られている精液構成物における個体間でのバリエーションを示している（Baker & Kovacs, 1985; Alvarez et al., 2003）。図. 2.1 は男性ホルモンによる避妊研究の偽薬群に参加した若い 5 人の健常なボランティアの、WHO によって推奨された方法で分析された、精液構成物の経時的変化を表す。このような多様性があるということは精液検査の結果の解釈に重要な意味を持つ。

- 一回の射精精液サンプルでは男性精液の質の評価は不可能である。
- ベースラインとなるデータを得る為には 2 つか 3 つのサンプルを分析することが有用である（Poland et al., 1985; Berman et al., 1996; Carlsen et al., 2004;

Castilla et al., 2006; Keel, 2006)。

射精精液全体に対して行われた検査では、受精部位に到達する極一部のわずかな精子集団の受精能を決定することはできないが、それでも精液検査は個々の患者の臨床的な状態について本質的な情報を提供してくれる。もし結果が有効で、役立つ情報を提供してくれるようにしたいなら、精子回収と検査のすべての局面は適切に標準化された手順によって行われなければならない。この章に記載されたテストは、精液評価を行う不可欠な段階的な手順である。

図 2.1 1 年半にわたる精子総数と精子濃度の変化



Schering Plough と Bayer Schering Pharma AG 提供

精液検査は下記の段階を含む（詳細は後の項で述べる）。

初めの 5 分

- 液化のため、精液サンプルの入った容器をベンチの上かインキュベーター (37 °C) 内におく。

30 分から 60 分間：

- 液化と精液外見所見の検査。
- 精液量を測定する。
- 精液の pH を測定する（液化した場合）。
- 顕微鏡による外見観察ならびに精子運動性の検査用には湿潤な検体を準備し、精子数検査用には希釈した検体を準備する。
- 精子生存性を検査する（運動率が低い場合）。
- 精子形態検査のための精液塗末標本を作成する。
- 精子濃度検査のための精液希釈を行う。
- 精子数の検査をする。
- 混合抗グロブリン反応テスト (MAR) を実施する（液化した場合）。
- ペロキシダーゼ陽性細胞の検査を行う（丸い細胞を認めた場合）。
- イムノビーズテストの為に精子を準備する（液化した場合）。
- 精液を遠心処理する（バイオケミカルマーカの分析が必要な場合）。

3 時間以内：

- 微生物学のラボラトリーにサンプルを送る（必要時）。

4 時間以後：

- 精子形態のための塗末標本を固定し、染色し、検査する。

当日のその後の遅い時間（あるいはサンプルを凍結保存した場合は後日）：

- 副生殖器管腺マーカを分析する（必要時）。

- 間接イムノビーズテストを実施する（液化した場合）。

2.2 サンプル採取

2.2.1 準備

- サンプルはラボラトリー近くのプライベートルームにて採取されるべきである。それは精液の気温変動への暴露を制限し、また採取から検査までの時間を管理するためである（例外については項 2.2.5 と項 2.2.6 を参照）。
- サンプルは最低 2 日間以上で最高 7 日間以内の禁欲期間後、採取すべきである。もし再検が必要なら、禁欲日数は可能な限り一定にして来院するようにすべきである。
- 男性患者は精液採取に関して明確に書かれた説明書を提示され、そして説明されるべきである。これらの説明では、精液サンプルは全量必要で、どの分画についてもそのわずか一部を失った場合でも報告しなければならないことを強調すべきである。
- 次に述べる情報は報告書に記録されるべきである（付録 6、項 A6.1 参照）：男性患者の名前、誕生日と個人識別番号、禁欲期間、採取日と時間、精液の全量か否か、精液採取時の問題点、採取から精液検査開始までの時間。

2.2.2 診断あるいは研究目的のための精液採取

- 精液サンプルはマスターベーションによって、清潔なガラスもしくはプラスチック製広口容器中に採取されるべきである。その容器は精子に無害であることが証明された一生産工程分からのものでなくてはならない（Box 2.1 参照）。
- 精液が入った容器は 20°C から 37°C の気温に保たれ、精子への大きな温度変化をさけるべきである。容器には男性患者の名前、ID、日付と採取時間が記載されたラベルを貼らなければならない。
- 精液が入った容器は精液が液化するよう、ベンチ上かインキュベーター内 (37°C) に置く。
- もし精液が不完全回収であった場合、特に最初の精子に富む分画を取り損ねた場合、報告書に記載する。もし精液が不完全な場合、2 回目の精液は 2-7 日間の禁欲期間の後採取されるべきである。

Box 2.1 精液採取容器の適合性の確認

高精子濃度かつ運動性良好な精液サンプルを選ぶこと。精子に無害な容器に半分の精液を入れ（control）、容器内の残りの半分を検査に用いること。精子の運動性を室温か37°C下で1時間ごとに4時間まで検査すること（2.5参照）。もしそれらが対照と検査評価で各タイムポイントにおいて差がなければ（両側t検定で $P>0.05$ と判定された場合）、検査に用いた容器は精子に無害であると考えられ、精液採取容器としての必要条件を満たしたと考えられる。

2.2.3 生殖補助医療のための精液の無菌的な採取

- これは診断を目的として採取されるが（2.2.2 参照）、精子回収容器、ピペットチップ、混和用のピペットは無菌でなければならない。

2.2.4 細菌検査のための精液の無菌回収

この状況下では、精液ではないもの（例えば、皮膚からの共生微生物）由来の微生物汚染はさけるべきである。精液採取容器、ピペットチップならびにピペットは無菌でなければならない。

男性患者は下記のごとくしなければならない：

- 排尿をすませておくこと。
- 精液への皮膚からの共生微生物の汚染リスクを減らすため、手とペニスを石鹼で洗うこと。
- 石鹼を洗い流すこと。
- 新鮮な使い捨てタオルで手と性器を乾かすこと。
- 無菌容器内に精液を射精すること。

Note: 精液サンプル採取から微生物学ラボラトリーでの検査開始までの時間は3時間を超えるべきではない。

2.2.5 自宅での精液採取

- 精液の自宅採取はクリニック内でマスターベーションによって精液採取ができないか、または検査室付近に適切な施設がないことが証明された場合など、例外的な

状況において実施する。

- 男性患者には精液の採取や輸送に関して、明確に口頭または文書で指示する必要がある。精液サンプルは完全すなわち精子に富んだ最初の分画を含む、精液全量を採取することを強調して説明する必要がある。男性患者はサンプルのどの部分をどれだけ損失したかを報告する必要がある。サンプルが不完全である場合は報告書に記載しておく。
- 男性患者には氏名と識別番号をラベルし、あらかじめ質量を測ってある容器を渡すこと。
- 男性患者は精液採取時間を記録し、採取から 1 時間以内に検査室へサンプルを運ぶこと。
- 検査室への輸送中は、サンプルを 20°C から 37°C に保つこと。
- 報告書にはサンプルが自宅または検査室以外の他施設で採取されたことを記載すること。

2.2.6 コンドームを用いた精液採取

- コンドームを用いた精液採取はマスターベーションによる採取ができないと証明された場合など、例外的な状況において実施する。
- 精液採取用の特別な無毒のコンドームのみ使用すること。市販で入手可能である。
- 男性患者には製造元によるコンドームの使用方法、閉じ方そして検査室への届け方または輸送方法などの情報を説明する必要がある。
- 男性患者は精液採取時間を記録し、採取から 1 時間以内に検査室へサンプルを運ぶこと。
- 検査室への輸送中は、サンプルを 20°C から 37°C に保つこと。
- 報告書には、自宅または検査室以外の他施設で性交渉中に特別なコンドームを用いて採取されたサンプルであることを記載する。

Note: 通常、ラテックスコンドームは精子運動性に干渉する薬剤が含まれているため、精液採取に使用してはならない (Jones et al., 1986)。

Comment 1: 膣外射精は、多数の精子を含む精液の最初の部分を損失するため、信頼

できない精液採取方法である。さらに、サンプルの細胞や細菌による汚染や低 pH の腔液が逆に精子運動性に影響を及ぼす。

Comment 2: 精液の採取ができない場合は、性交後テスト（3.3.1 参照）によって精子に関する情報を得ることができる。

2.2.7 検体の安全な取り扱い

精液サンプルには危険な感染病原体（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、肝炎ウイルス、単純ヘルペスウイルス）が含まれている可能性があるため、バイオハザード（生物災害）として取り扱う必要がある。精液サンプルを生物検定、子宮内精子注入法（IUI）、体外受精（IVF）または卵細胞質内精子注入法（ICSI）（5.1 参照）に用いる場合、または精液を培養する（2.2.4 参照）場合は、無菌材料と適した手技を使用しなくてはならない。付録 2 に概説されている安全指針は忠実に守られるべきである。すなわち良い検査室業務には検査の安全性が必要である（WHO, 2004）。

2.3 最初の肉眼的検査

精液検査は脱水や温度による変化で精液の質に影響するのを防ぐため、なるべく採取して 30 分から 1 時間以内に、液化後すぐに単純検査から始める。

2.3.1 液化

通常、射精直後に容器に採取された精液は半流動性の凝固した塊である。室温に数分置くと精液は大抵液化し始め（より薄くなる）、塊の不均一な混合液は液体にみえてくる。液化が進むにつれて、精液はより均一でほとんど液体となり、最終的にごく小さい塊が残る。通常室温放置で 60 分以上かかることはめったにないが、15 分以内にサンプルの液化が完了する。60 分以内に液化が完了しない場合は、記録しておく必要がある。自宅またはコンドームによって採取した精液サンプルは、通常、検査室に到着するまでに液化している。

正常に液化している精液サンプルは、液化しないゼリー様顆粒（ゼリー体）を含んでいることがあるが、これらには臨床上的意義はない。しかし、粘液糸があるため精液検査に干渉することがある。

Note 1: 液化は上述のように可視的に、そして顕微鏡的に確認することができる。精液の液化によって不動精子は運動性を獲得する。顕微鏡で不動精子が観察された場合は、より多くの時間をかけて液化を完了させなくてはならない。

Note 2: 液化中は、室温か 37°C にセットしたインキュベーター内で、連続した穏やか

な混合または2次元振盪機でサンプル容器を回転させることでサンプルが均一になる。

Note 3: 精液が30分以内に液化しない場合は、精液検査を進めずにさらに30分待つ。60分以内に液化が起こらない場合は、項2.3.1.1のように続行すること。

2.3.1.1. 液化の遅延

時々、サンプルが液化せず精液の評価が難しくなることがある。このような場合は、追加の処理として、機械的な攪拌か酵素消化が必要になる。

1. あるサンプルでは、等量の生理的培養液（たとえばダルベッコリン酸緩衝食塩水；付録 4、A4.2 参照）を加え、ピペティングを繰り返すことで液化を起こせる。
2. 平らに削った 18G 針（内径 0.84 mm）または 19G 針（内径 0.69 mm）にシリンジをつけ、ゆっくり攪拌を繰り返す（6-10 回）と均一になる。
3. 広い特異性を持ったタンパク質分解酵素であるブロメライン（EC 3.4.22.32）による消化は、液化を促進する（Box 2.2 参照）。

Box 2.2 ブロメラインの調製

ダルベッコリン酸緩衝食塩水（付録4、A4.2参照）にブロメライン10IU / mL添加する。攪拌によって溶解するのは難しいが、たいていは15-20分以内で溶解する。精液1に対して10IU / mLブロメラインを等量入れて希釈し（1+1（1：2）、最終量を2にする）、ピペットチップで攪拌し、37°Cで10分間インキュベートする。検査を進める前にサンプルをよく懸濁する。

Comment: これらの処理は精漿の生化学、精子運動性や精子形態に影響を及ぼすため、使用したことを記録しておかなくてはならない。精子濃度を算出するときに、精液のブロメラインによる 1+1（1：2）希釈を計算する必要がある。

2.3.2 精液の粘性

液化後、精液を広口径（内径約 1.5 mm）のプラスチックディスポーサブルピペットで穏やかに吸引し、重力による精液の滴下や糸を引く長さを観察することで、サンプルの粘性を評価できる。正常なサンプルは小さな液滴がピペットから滴下する。粘性が異常である場合は、液滴は 2cm 以上の糸を引く。

あるいは、サンプルにガラス棒を入れ、取り出すときにできる糸の長さを観察することで、粘性を評価できる。糸が 2cm を超える場合は、粘性が異常として記録しておくこと。

部分的に液化していないサンプルと対照的に、粘稠な精液検体は均一な粘性を示し、その粘度は時間によって変化しない。高い粘性は、サンプルをピペッティングした際にピペットに強く付着しているため、サンプルの弾力性により認識できる。この粘性を除去する方法は、遅延性の液化（2.3.1.1 参照）と同じである。

Comment: 高い粘性は、精子運動性の測定、精子濃度、抗体がコーティングされた精子の検出や生化学マーカーの測定に影響する。

2.3.3 精液の様子

正常に液化した精液サンプルは不透明で乳白色である。精子濃度が非常に低い場合は透明に見えるが、色は異なっており、例えば赤血球が存在（血精液症）している場合は赤褐色を呈し、黄疸がある男性やビタミン剤や薬を内服している場合には黄色調を呈している。

2.3.4 精液量

精液量は主に精囊と前立腺、少量の尿道球腺と精巣上体の分泌物によって生産される。液量を正確に測定することは、精液中の総精子数や精子以外の細胞を算出する場合のように、精液評価に必要不可欠である。

液量は採取された容器内のサンプルの重量を測定することが最も良い方法である。

- サンプルはあらかじめ重量を測定した無菌で、ディスポーサブルな容器に採取すること。
- 精液が入っている容器の重量を量ること。
- 容器の重量を減算する。
- 精液の密度を $1\text{g} / \text{mL}$ と仮定して、サンプルの重量から液量を計算する（Auger et al., 1995）。（精液密度は $1.043 \sim 1.102\text{g} / \text{mL}$ で変化する（Huggins et al., 1942; Brazil et al., 2004a; Cooper et al., 2007））。

Note: 空のサンプル容器は重量が異なっているため、どの容器も個々にあらかじめ測定しておく必要がある。重量は採取者に渡す前に、容器に記載しておく。油性マジックペンで容器またはラベルに記載する。ラベルに重量を記載する場合は、空の容器を測定する前に貼り付けること。

あるいは、直接液量を測定することもできる。

- サンプルを広口の目盛り付きガラスシリンダーに直接入れて測定する。これは一般に販売されている。
- 目盛りから直接液量を読む（0.1mL の精度で）。

Note: 精液をピペットやシリンジにサンプル容器から吸引するか、直接シリンダーに容器を傾けて移す方法による量の測定は、全てのサンプルを回収できず、過小評価する恐れがあるため推奨しない。液量は 0.3～0.9mL 回収できていない（Brazil et al., 2004a; Iwamoto et al., 2006; Cooper et al., 2007）。

Comment 1: 精液量が少ない場合は、射精管の閉塞か先天性両側精管欠損症（CBAVD）の特徴であり（de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000; Weiske et al., 2000）、精囊の発育が乏しい状態である。

Comment 2: 精液量が少ない場合は、採取の問題（精液の取りこぼし）、部分的な逆行性射精またはアンドロゲン欠乏症などがあげられる。

Comment 3: 精液量が多い場合は、付属生殖器の炎症による活発な滲出を示している。

2.3.4.1. 最低基準値

精液量の最低基準値は 1.5mL である（全体での下位 5%の値、95%信頼区間（CI）1.4－1.7）。

2.3.5 精液の pH

精液の pH は異なる付属腺の分泌物、主にアルカリ性の精囊分泌物と酸性の前立腺分泌物の pH 値のバランスを示している。この pH は液化後に一定の時間内、できれば 30 分後が良いが、射精後に生じる CO₂ の低下によって影響を受けるため、いかなる場合も射精の 1 時間以内に測定する必要がある。

正常なサンプルには、6.0～10.0 の範囲の pH 試験紙を用いるべきである。

- 精液サンプルをよく混合する（Box 2.3 参照）。
- pH 試験紙上に均等に少量の精液を広げる。
- 浸透させた領域の色が一定になるまで待つ（30 秒未満）。

- 較正片と色を比較して pH 値を測定する。

Note: pH試験紙の精度は既知の標準と照合しておく必要がある。

粘稠なサンプルは、粘着液の測定のために設計された pH メーターを用いることで、少量の精液の pH を測定することができる (Haugen & Grotmol, 1988)。

2.3.5.1. 基準値

現在、健常男性の精液の pH による基準値はほとんどない。未決定のより多くのデータから、このマニュアルはより低い閾値として 7.2 を一定値としている。

Comment 1: 精液量や精子濃度が少ない精液サンプルの pH が 7.0 より低い場合は、射精管の閉塞か先天性両側精管欠損症 (CBAVD) であり (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000; Weiske et al., 2000)、精囊の発育が乏しい状態である。

Comment 2: 精液の pH は自然の緩衝作用が低下し、時間が経つにつれて上昇するため、pH 値が高い場合はほとんど臨床的に役に立たない情報である。

2.4 最初の顕微鏡的検査

位相差顕微鏡は新鮮精液の未染色標本の全ての検査に推奨される (付録 3 の顕微鏡のセットアップ方法を参照)。サンプルの最初の顕微鏡的検査は総合した拡大率の 100 倍 (たとえば、10 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズを組み合わせる) で標本を精査することが必要である。

サンプルの概要を明らかにするには

- 粘液糸の形成。
- 精子集合や凝集。
- 精子以外の細胞たとえば、上皮細胞、“円形細胞” (白血球と未成熟精細胞) や分離した精子の頭部や尾部の存在。

標本は 200 倍や 400 倍の倍率 (たとえば、20 倍または 40 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズの組み合わせ) で観察する必要がある。この目的は、

- 精子運動率の評価 (2.5 参照)。

- 精子濃度の正確な評価に必要とされる希釈の決定（2.8 参照）。

2.4.1 混合精液からの標本抽出

液化した精液の性質から、検査のために精液の代表標本をとることには問題がある。よく混合されていないサンプルでは、2つの別の部分標本の検査を行うと、精子の運動率、生存率、濃度や形態に差が出る場合がある。再現性のあるデーターを得るために、検査用に一定量をとる前にサンプルを良くに混合（Box 2.3 参照）すると、反復して検査した結果は、検査値が検査用の値と一致する。反復間の一致はポアソン分布による精子数（Box 2.5 と 2.6、表 2.1 参照）と二項分布によるパーセンテージ Box 2.5 と 2.6、表 2.1 参照）によって決定できる。

Box 2.3 精液混合

評価のために精液を一定量とる前に、容器内でサンプルをよく混合する必要があるが、泡立つため勢いよく混ぜてはいけない。広口（内径約1.5mm）のディスポーサブルプラスチックピペット（必要な場合は無菌）でサンプルを10回吸引すれば混合することができる。精子にダメージがあるため、高速度のボルテックスで混合してはならない。

2.4.2 標本の作製

- 精液サンプルをよく混合する（Box 2.3 参照）。
- 精子が懸濁液から沈殿するため、混合後すぐに精液の一定量を取り出す。
- 再度一定量取り出す場合は、もう一度混合すること。

精液の量とカバーガラスの大きさは、精子が自由に泳げるように約 20 μ m（Box 2.4 参照）の固定された深さの標本を用いて検査が行われるように、標準化しなければならない。

- 標準量の精液、例えば 10 μ L、をきれいなスライドガラスの上に置く。
- その上にカバーガラス、例えば 10 μ L に 22mm×22mm、をのせて深さ約 20 μ m（Box 2.4 参照）のチャンバーを作成する。カバーガラスの重量でサンプルを広げる。
- カバーガラスとスライドガラスの間に空気の泡が生じたり、入ったりしないように気をつけること。
- サンプルが流れなくなったらすぐに新鮮な湿標本を検査すること。

Box 2.4 湿標本の深さ

標本の深さ ($D_1 \mu\text{m}$) は、サンプルが広がるエリア ($A_1 \text{mm}^2$) でサンプル量 ($V_1 \mu\text{L} = \text{mm}^3$) を割ることで得られる。すなわち $D = V/A$ となる。したがって、 $10 \mu\text{L}$ の量の精液をきれいなスライドガラスの上に置き、 $22\text{mm} \times 22\text{mm}$ のカバーガラス (エリアは 484mm^2) をかけて、深さ $20.7 \mu\text{m}$ のチャンバーを作製する。 $6.5 \mu\text{L}$ のサンプルでは $18\text{mm} \times 18\text{mm}$ のカバーガラス (エリアは 324mm^2) をかけて深さ $20.1 \mu\text{m}$ のものを作製する。 $11 \mu\text{L}$ のサンプルでは $21\text{mm} \times 26\text{mm}$ のカバーガラス (エリアは 546mm^2) をかけて深さ $20.1 \mu\text{m}$ を作成する。たまにより深いチャンバーを用いる場合は $40 \mu\text{L}$ のサンプルに $24\text{mm} \times 50\text{mm}$ のカバーガラス (エリアは 1200mm^2) をかけて深さ $33.3 \mu\text{m}$ を作製する。

Note 1: 深さが $20 \mu\text{m}$ 未満のチャンバーは精子の回転運動を制限する (Le Lannou et al., 1992 ; Kraemer et al., 1998)。

Note 2: チャンバーが深すぎる場合は、精子が焦点の中やその焦点から移動するため検査が難しくなる。

Note 3: 視野当たりの精子数がかかなり変動する場合は、サンプルが均一ではない。このような場合は、サンプルを再度徹底的に混合する必要がある (Box 2.3 参照)、また上記の新しいスライドを準備する。

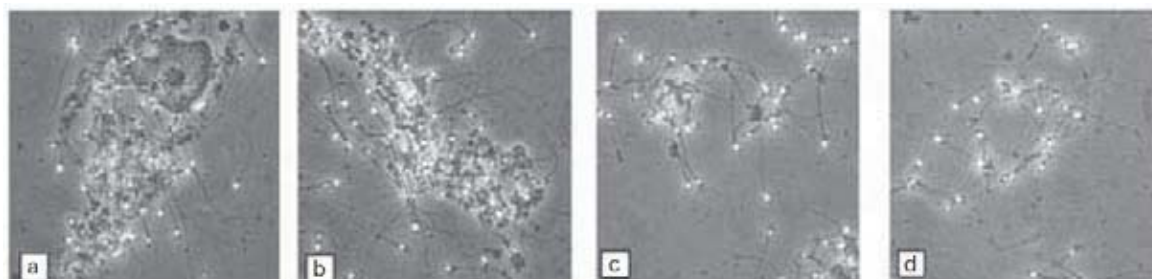
Note 4: 異常な稠度、異常な液化 (2.3.1 参照)、精子集合 (2.4.3 参照) または精子凝集 (2.4.4 参照) の結果によっても均一性に欠けることになる。

2.4.3 精子集合

不動精子同士の接着あるいは運動精子の粘液糸、精子以外の細胞または残片との接着は、非特異的であると考えられる (図 2.2 参照)。またこのような場合は記録しておく必要がある。

図 2.2 精液中の精子の非特異的集合

精子と上皮細胞 (a)、精子と残片 (b)、精子同士との凝集 (c,d)。



C Brazil 提供

2.4.4 精子凝集

精子凝集は特に運動精子が互いに頭部と頭部、尾部と尾部または混合に起因して接着している事をいう。精子運動性は多くの場合、すさまじい振動運動で活発だが、ときどき精子は非常に凝集するため、それらの運動は制限される。運動精子が頭部、尾部または中片部が互いに接着している場合は記録する必要がある。

主要な凝集の形の程度（グレード 1-4）と接着部位（グレード A-E）は記録しておくこと（Rose et al., 1976）（図 2.3 参照）。

- グレード 1：単独 凝集あたりの精子が<10、多くの自由な精子がいる。
- グレード 2：中等度 凝集あたりの精子が 10-50、自由な精子がいる。
- グレード 3：多数 50 以上の精子が凝集し、まだ自由な精子もいる。
- グレード 4：全体 全ての精子が凝集し互いに結合している。

Note: 細胞や残片と接着している運動精子または互いに接着している不動精子（集合）は凝集として評価してはいけない。

図 2.3 精子凝集の異なる程度の模式図

接着部位	凝集の程度			
	1. 単独 (<10 精子 / 凝集、多くの自由な精子がいる)	2. 中等度 (10-50 精子 / 凝集、自由な精子がいる)	3. 多数 (50 以上の精子が凝集し、まだ自由な精子もいる)	4. 全体 (全ての精子が凝集し互いに結合している)

A. 頭部と頭部



B. 尾部と尾部 (頭部は自由で凝集がない。)



C. 尾部の先端と尾部の先端



D. 混合 (頭部と頭部また尾部と尾部が接着している。)



E. もつれ (頭部と尾部が絡まっている。尾部と尾部が凝集しているため、頭部の凝集はないわけではない。)



Rose et al.,(1976) 提供

Comment 1: 凝集の存在は不妊の免疫学的な原因であるという十分な根拠にはならないが、抗精子抗体の存在を示唆している。さらに検査が必要である（2.20 参照）。

Comment 2: 強い凝集精子は運動率と濃度の評価に影響する。

2.4.5 精子以外の細胞成分

精液は精子以外の細胞を含み、臨床的に関連するものもある。これらは泌尿生殖器由来の上皮細胞、白血球や未成熟精細胞（後者の 2 つをまとめて“円形細胞”とよばれる（Johanisson et al., 2000））を含んでいる。これらは染色したスメアを 1000 倍率で検査することで確認できる（項 2.12、図版 13 と 14、項 2.19 参照）。これらの細胞はペルオキシダーゼ活性（2.18 参照）または CD45 抗原（3.2 参照）の検出によって、より正確に同定と定量できる。濃度は湿標本（2.18.1.5 参照）または、染色されたスメア上の精子数や精子濃度に対するこれらの細胞の比率（2.12.1 参照）から、精子と同様に測定できる。

2.5 精子運動性

前進運動精子の程度（2.5.1 参照）は、妊娠率と関連している（Jouannet et al., 1988; Larsen et al., 2000; Zinaman et al., 2000）。コンピューターを使った精子分析（CASA）による運動性評価の方法は、項 3.5.2 に述べてある。

精液中の精子運動性は、乾燥、pH、または温度変化など精子運動への悪影響を避けるため、射精精液の液化後 30 分後、いずれの場合でも 1 時間以内に評価すべきである。

- 精液サンプルをよく混ぜること（Box 2.3 参照）。
- 精液を混和後、直ちに一部標本を採取すること。それは懸濁液中の組成に偏りが生じないように配慮するためである。
- 一部標本を採取し直す前には、精液を混和すること。
- 反復測定毎に、20µm の深さになっている乾燥していない標本作製し直さなくてはならない（2.4.2 参照）。
- サンプルの流れが止まるまで待つこと（60 秒以内）。
- 200 倍または 400 位の位相差顕微鏡にて観察すること。

- 運動性能別に幾つかの部類に分ける場合、反復測定毎に約 200 個の精子を評価すること。
- 反復測定値が近似しているかどうか確認すること。もし、近似していれば計算を続行し、範囲外であれば、新しくサンプルを準備して反復測定し直すこと。

Note 1: 手順は、室温か37°Cに温めた顕微鏡ステージで行うが、各施設でどちらかに統一すること。もし、精子運動性を、37°Cで評価することになっているならば、精液サンプルとスライドガラス、カバーガラスも予め温めておくこと。

Note 2: 接眼マイクロメーターを使用（図 2.4a参照）すると、検鏡範囲を限定でき、観察が容易になる。まず、速度が速く直進する精子を評価して、次いで、直進性が不良な精子、不運動精子に分類し評価する（2.5.1参照）。検鏡範囲を限定し精子を評価しているので、運動性を求めるには、数視野を測定するのが良い。

2.5.1 精子運動性の分類について

運動性を評価するための簡単な分類方法として、不動精子から区別して前進運動精子あるいは非前進運動精子とすることが推奨されている。各精子の運動性は次の通り分類できる。

- 前進運動精子（PR）：速度に関わりなく、非常に活発に、直線的にあるいは大きな円を描くように動いている精子。
- 非前進運動精子（NP）：前進性を欠いた様々な運動性を有する精子。例えば小さな円を描くように動く、精子頭部の位置をほとんど動かすこともできない程度の尾部の運動性、鞭毛運動だけが観察される精子。
- 不動精子（IM）：動きが見られない精子。

Comment 1: 旧版のマニュアルでは、37°Cで $>25\mu\text{m} / \text{sec}$ のスピードをもつ精子を“グレード a”と定義し、前進運動精子が速いか遅いかを分類するように推奨した。しかし、その判定は検体の運動性が極めて極端な場合でない限り、検査技師にとって正確に分類することは難しいことである（Cooper & Yeung, 2006）。

Comment 2: 精子運動性を議論する時に、総運動精子（PR+NP）で評価するのか、または前進運動精子（PR）のみで評価するのかを決めておくことが重要である。

2.5.2 精子運動性の評価のためのサンプルの準備

- 運動性の評価を 37°Cで行うことになっているのであれば、温度を安定させるため、予め 10 分間程度ステージを温めておくこと。
- 乾燥していない 20 μ m の深さの新鮮な標本を準備する (2.4.2 参照)。
- 位相差顕微鏡を使用し、200 倍または 400 倍の倍率下でスライドを観察する。
- 精液サンプルの流動が静止するまで待つ。
- 乾燥による運動性への悪影響を防止するためにカバーガラスの縁から少なくとも 5mm 内側の精子を観察すること (図 2.4b 参照)。
- 繰り返し同じ領域を観察しないように、規則正しくスライドグラスを観察する。そして、たびたび観察領域を変更して観察する。運動精子の存在する視野だけ観察することを避ける (観察領域の選択は、ランダムに行う)。
- ランダムに選択した観察領域を決定後は直ちに評価を開始する。精子が、顕微鏡の視野内や格子内に泳いでくるのを待った上で検査を開始してはならない。
- 観察領域内のすべての運動精子を評価する。これは、接眼マイクロメーターを使用すれば、最も容易に実施できる (図 2.4a 参照)。精子濃度を見て測定する領域やグリッドの位置を選択する。もし精子濃度が高ければグリッドの一番上の列だけを評価し、もし精子濃度が低ければグリッド全体を評価する。
- 運動精子数を重複測定するのを避けるために、迅速にカウントする。目的は領域内のすべての運動精子をカウントするためである。すなわち、カウントしている間に領域に他から進入してきた運動精子をカウントしないためである。運動精子を多くカウントする結果になってしまう。
- 最初、PR (2.5.1 参照)) をカウントする。次に、同じ領域の中で NP をカウントし、最後に IM をカウントする。経験を積み、1 度に 3 種類の精子を評価でき、グリッドの広範囲内を評価できる。
- その施設内の測定器を用いて各運動評価の精子数を一致させる。
- 測定誤差を許容範囲内にまで低下させるために各々の反復測定において最低 5 視野以上で合計 200 個以上の精子を評価すること (Box2.5 参照)。
- 反復測定後、各運動性評価 (PR、NP or IM) の頻度について平均パーセントと 2 群間のパーセントの誤差を計算する。

- 表 2.1 または図 A7.2、付録 7 を参照し、許容誤差を決める。(これらは、サンプリングエラーにより、サンプルの 95% が期待される 2 つの割合の最大誤差を表している)。
- その割合の差が許容誤差範囲内なら、それぞれの運動精子評価 (PR, NP と IM) の平均値を報告する。差が大きければ、もう一度精液サンプルから 2 回分の標本を採取してそれぞれ標本を作成し、それぞれのサンプルから反復評価をし直す (図 2.6 参照)。
- 各々の精子運動評価分類において、測定したほぼすべての精子に対する平均の割合として報告する。

Note 1: 完全な精子 (頭部と尾部を有するものと定義する。項 2.7.3 参照) だけを評価する。つまり、精子濃度の算出に当たっては完全な形態の精子だけを数える。運動性を有していたとしてもピンヘッドの運動精子は数えない。

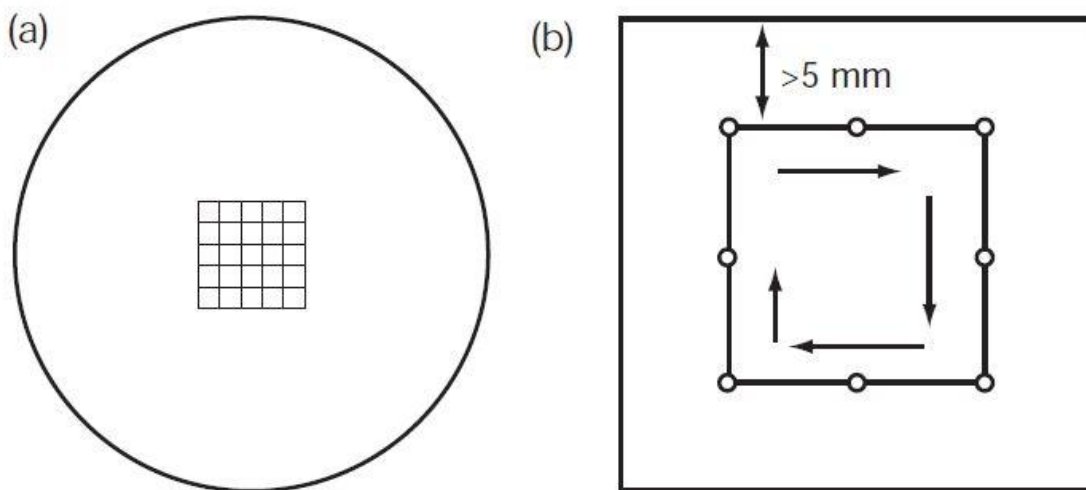
Note 2: もし精子を 2 段階に分けて (例えば、最初に PR を評価し、次いで NP+IM) 評価して 200 個の精子を数える場合、200 個カウントする前に全ての評価が加わらなければ、カウントは 200 個を越して全ての評価が加わるまで続けなければならない。最初に数えた運動精子評価への割合の偏りを回避するためである。

Note 3: 一般的に精子の運動性は実際よりも過大に見積もられる傾向が強いが、この傾向はマイクロメーターを用い、さらに数える順番を反対にして (NP と IM を最初に評価する)、なおかつ測定に偏りが生じないように可能な限り注意して測定を行うことで回避することができる。

Note 4: 極稀な例であるが、攪拌しても均一化できないような精液サンプルの場合には、3 回計数し直しても受け入れ不可能な差が見られる場合がある。この場合は、すべて測定した平均値を計算し、レポートに記載する。

図 2.4 精子運動性評価のための補助

(a) 接眼マイクロメーターは、運動精子、不動精子をカウントすることをより容易にする。(b) 精子運動性を評価する領域の体系的な選択は、カバーガラスの縁からの少なくとも 5mm 離れた場所を鏡検する。



Box 2.5 割合の計算における誤差

パーセントの評価がどの程度正確であるかという点は数える精子の数 (N) だけでなく、未知の割合 (p) (二項分布) に依存する。近似の標準誤差 (SE) は20%から80%の間で $\sqrt{(p(100-p))/N}$ となる。この範囲外で、適切に使用する方法は $1/(2\sqrt{N})$ ラジアン標準偏差を有するangular transformation (arc sin square root), $z = \sin^{-1}\sqrt{(p/100)}$ であり、カウントされた精子の数だけに依存する。真のパーセントではない。

表 2.1 200 個の精子を繰り返し計算し得られた割合の許容誤差範囲（全体の 400 計算）。

平均 (%)	許容誤差*	平均 (%)	許容誤差*
0	1	66-76	9
1	2	77-83	8
2	3	84-88	7
3-4	4	89-92	6
5-7	5	93-95	5
8-11	6	96-97	4
12-16	7	98	3
17-23	8	99	2
24-34	9	100	1
35-65	10		

* 95%信頼区間

Box 2.6 反復割合の比較

百分率値は最も近い整数に補正されなくてはならない。通常は、0.5%を最も近い偶数に補正する。例えば32.5%は32%へ、3.5%は4%へという具合である。補正後の百分率値は合計で100%にならないこともある点に注意する。

平均値を算出する上で、各反復測定における百分率値の間の相違が表2.1で示された数より小さいかまたは等しければ算出結果を受け入れ、その平均値は結果として認められる。

許容範囲外の大きな差は数え間違いやピペッティングエラー、精子がよく混和されていなかったこと、あるいはチャンバーやスライドグラス上の精子の不均一などに起因する。

百分率値の差が許容範囲外の場合、最初の2つの値を除いて再評価する。

（3回目のサンプルを数えて3つの値の平均値にしたり、最も近い2つの値の平均をとらないことである）。

精子運動や生存評価のために、eosinや低浸透圧膨化試験（HOST）がある。新鮮精液を2分して検体を準備する。eosin-nigurosin塗抹標本から精子生存と精子形態を評価するためには、スライド標本を重複して検査する。

これらの95%のCIカットオフ値によって、重複検査値の約5%は1回測定の範囲外になるであろう（付録7、A7.3参照）。正確な二項式の信頼限界は現在コンピューターで計算することができ、これらは、重複検査の一致を評価して本マニュアル中の図や表に用いられている。

2.5.3 実例

例 1. 200 個の精子の 2 回カウントにおける運動精子の評価は、以下の通りである。前進精子の割合が 30%と 50%、非前進精子の割合が 5%および 15%、不動精子の割合が 65%と 35%であった。最も多数を占めるカテゴリーは不動精子で平均 50%、差は 30%である。表 2.1 から見ると、平均 50%では、最高 10%までの違いが起こることが予想されている。この限界値を超えたので、結果は棄却し、新たに 2 つのスライドグラスを用意し、精子運動性を再カウントする。

例 2. 200 個の精子の 2 回カウントにおける運動精子の評価は、以下の通りである。前進運動精子は、37%、および 28%、非前進精子は、3%、および 6%、不動精子は、60%と 66%であった。最も多数を占めるカテゴリーは不動精子で平均 63%であり、2 つの差は 6%である。表 2.1 から、平均 63%は、最高 10%までの違いが起こることが予想されている。違いを見ると、これを超えないため、結果は受け入れて、平均値：PR 32%、NP4%、IM63%を報告する。

2.5.4 標準値の下限

全体の運動性 (PR+NP) の標準値の下限は 40% (5 パーセンタイル、95%信頼区間 38-42) である。

前運動精子 (PR) の標準値の下限は 32% (5%パーセンタイル、95%信頼区間 31-34) である。

Comment: 射精精液中の総前進運動精子数は生物学的な意味がある。このことは射精精液中の精子総数 (2.8.7 参照) に前進運動精子数のパーセントを乗じて求められる。

2.6 精子活性

精子活性は、精子細胞膜の構造的完全性を評価することで推定される。全サンプルをルーチン検査として決めているかもしれないが、すべての精液サンプルについて行う必要はなく、前進運動精子の割合が 40%未満の精液について特に重要となる。死滅精子の割合が不動精子の割合を越える (サンプリング誤差内) べきではない。生存精子の割合は通常、運動精子数より多い。

生存精子の割合は、色素排除試験や低浸透圧膨化試験によって、細胞膜が無傷の精子を識別することによって評価される。色素排除試験は、死滅精子に見られるように破損した細胞質膜が不透過性の色素を取り込むという原理に基づく。低浸透圧膨化試験は、無

傷の細胞質膜（生きた細胞）を有する生存精子のみが低張液中において膨張する。各試験の例は以下で説明される。

精子活性は、乾燥または温度変化などの悪影響を受けた精液での観察を避けるために、液化 30 分後の精液で評価することが望ましく、必ず射精 1 時間以内にできるだけ早く評価する必要がある。

Comment 1: 不動精子が生存または死滅しているかの判断は、臨床的に重要である。活性結果は、同じ精液サンプルからの運動性の結果と関連して評価する必要がある。

Comment 2: 生存精子が多数存在していても、不動精子は、精子の鞭毛中の構造欠陥が存在している可能性がある（Chemes & Rawe, 2003）。高頻度に不動精子や非活力精子（死滅精子症）が存在している場合、精巣上体の病理学的徴候を示唆している（Wilton et al., 1988; Correa-Perez et al., 2004）。

2.6.1 Eosin nigurosin を使用した活性試験

この染色法は、nigurosin を使用することで背景と精子頭部とのコントラストをはっきり解りやすくすることができる。また、スライドガラスの保存も可能なため、再評価や品質管理ができる（Bjorndahl et al., 2003）。

2.6.1.1. 試薬の準備

1. EosinY : 0.67g の eosinY（カラーインデックス 45380）と 0.9g の塩化ナトリウム（NaCl）を、蒸留水 100mL 中に軽く温めながら溶解する。
2. Eosin-nigurosin: 10g の nigurosin（カラーインデックス 50420）を 100mL の eosinY 溶液に追加溶解する。
3. その溶液を煮沸し、そして、室温になるまで冷やす。
4. ろ紙（例えば、90g/m²）で粗いゼラチン状の沈澱物をろ過して取り除き、暗色のガラスボトルに入れ、密栓後、保存する。

2.6.1.2. 手順

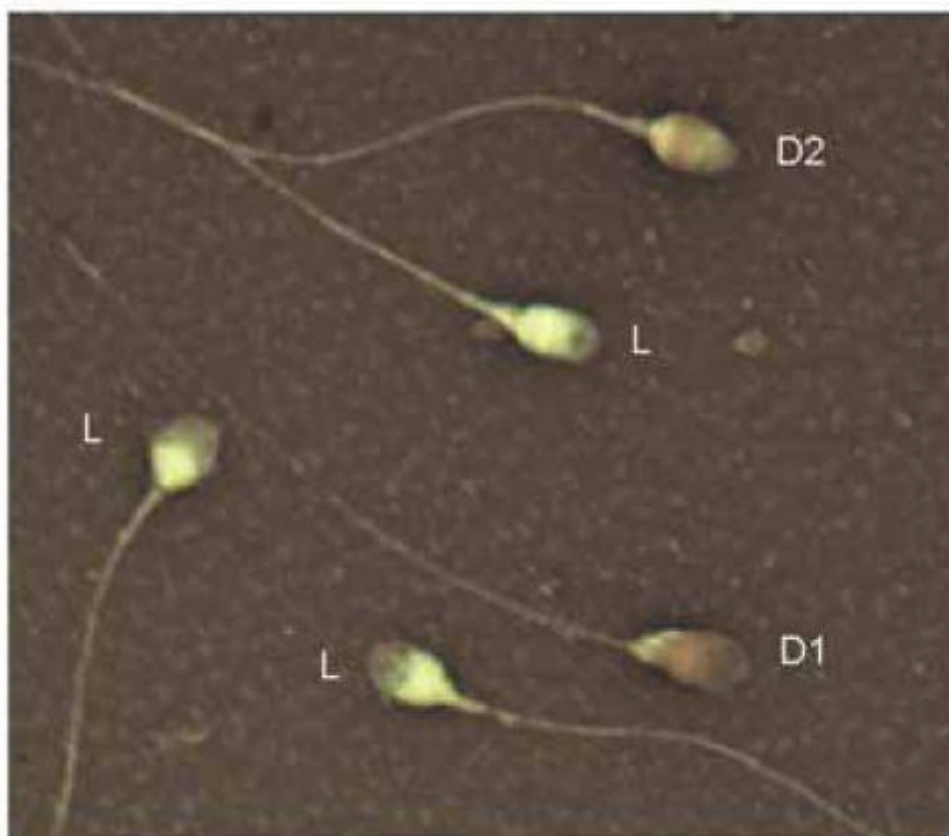
1. 精液サンプルを、よく混ぜる（Box2.3 参照）。
2. 50μL の精液と同量の eosin-nigurosin 溶液を混和し、例えば、磁気性の滴板や試験管内で 30 秒間待つ。

3. 再度、半量にして移動する前に、eosin-nigurosin 溶液を混和し上述した 2 のように行う。
4. 汚れを除去したスライドガラスの上にその混和した溶液を載せ、スメアを作製後、空气中で乾燥させる (2.13.2 参照)。
5. 乾燥後、直ちに検鏡するか、疎水性の封鎖剤で封入後、検鏡する (2.14.2.5 参照)。
6. 明視野で、 各々のスライドガラスを光学顕微鏡で油浸 1000 倍にて検鏡する。
7. 染色された精子 (死滅精子) と無染色の精子 (生存精子) の数を、カウンターなどを使用して数える。
8. それぞれのスライドガラスについて 200 個の精子を評価する。サンプリング誤差をできるだけ小さくするためである (Box 2.5 参照)。
9. 2 枚のスライドガラスについて、生存精子の割合の差と平均値を計算する。
10. 表 2.1 または図 A7.2、付録 7 を参照し、許容誤差を決める。(これらは、サンプリングエラーにより、サンプルの 95% が期待される範囲においての 2 つの割合の最大誤差を表している)。
11. その割合の差が許容誤差範囲内なら、生存精子の平均値を報告する。もし、差が大きければ、もう一度、新鮮精液サンプルを 2 分して再評価する (Box 2.6 参照)。
12. 最も近い全体の数に対し生存精子の平均値を報告する。

図 2.5 明視野で観察した eosin・nigurosin 染色のスメア像

赤 (D1)、暗いピンク色 (D2) の頭を持つ精子は、死滅精子 (細胞膜が破損している) と考えられる。

白 (L)、薄いピンク色 (L) の頭を持つ精子は、生存精子 (細胞膜が無傷である) と考えられる。



TG Cooper提供

2.6.1.3. スコアリング

1. **Nigrosin** により染色された精子は、暗い背景下で観察を行うと識別がより容易になる。
2. 頭部が白色の像を示す精子は生存と判定され、死滅精子は赤色もしくは濃いピンクに頭部が染色される（図 2.5 参照）。頭部が薄いピンクの精子は生存と判定される。
3. 頸部の一部領域のみが染色され、残りの頭部領域が染色されていない状態を示す「leaky neck membrane」の場合は、細胞死や完全膜崩壊の徴候ではないと考えられる。これらの細胞は生存と判断されなければならない。

2.6.1.4. Lower reference limit

正常と判断される生存率（膜の正常な精子）の下限值は、58%である（5th centile, 95% CI 55–63）。

Comment: 精液中における原形質膜が損なわれていない生存精子の総数は生物学的にみて大変重要である。射精精子中の総生存精子数は、原形質膜が損なわれていない生存精子の比率と射精精子の総数を乗算することによって得られる（2.8.7 参照）。

2.6.2 Eosin 単独生存性試験

この方法はシンプルかつ素早く施行できるが、湿式法のためクオリティーコントロール目的としての保存が出来ない。

2.6.2.1. 試薬準備

1. **NaCl, 0.9% (w/v)** : 0.9g の NaCl を 100mL の純水に溶かす。
2. **Eosin Y, 0.5% (w/v)** : 100mL の 0.9%の NaCl に、0.5g の Eosin Y (colour index 45380) を溶かす。

Note: 市販のEosin溶液の中には、低浸透圧であるために精子にストレスを与え偽陽性の結果となる場合がある（Björndahl et al., 2004）。そのような溶液を使用する場合、浸透圧を上げるため0.9gのNaClを100mLの溶液に加える。

2.6.2.2. 処理方法

1. 精液サンプルをよく混和する（Box2.3 参照）。
2. 精液 5 μ L と Eosin 溶液 5 μ L をスライドグラス上に乗せる。スライドグラス上で検体をピペットにより円を描くように混ぜ合わせる。
3. 22mm $\times$ 22mm のカバーグラスで覆い、30 秒放置する。
4. もう一枚スライドを作製するため、再び精液サンプルをよく混和し、精液サンプルと Eosin 溶液を混和し、上記のステップ 2 と 3 と同様に処理を行う。
5. それぞれのスライドは、ネガティブ位相差コントラストで観察するのが望ましく（ポジティブ位相差コントラストでは薄いピンクを識別するのが困難である）、200 倍もしくは 400 倍に拡大し観察を行う。
6. 染まった（死滅）細胞と染まらない（生存）細胞数をカウンターを用い計測する。
7. サンプルングエラーを低下させるために、それぞれのスライドから 200 の精子を計測し評価する（Box 2.5 参照）。
8. 2 枚のスライドから得られた生存率の平均値と差を計算する。
9. 表 2.1 または図 A7.2（付録 7）より、差の許容範囲を決定する。（それぞれは、単独のサンプルングエラーによって 95%のサンプルで起こる可能性がある 2 つの割合の最大差を示す。）
10. 割合の差が許容範囲であれば、平均生存率で報告する。もし、差があまりにも大きい場合は、新たに精液から 2 つのサンプルを作製し測定を繰り返して評価する。
11. 平均精子生存率は最も近い数の整数で報告する。

2.6.2.3. スコアリング

1. 生存精子は頭部が白色または薄いピンクに染色され、死滅精子は頭部が赤白または濃いピンクに染まる。
2. 頸部の一部領域のみが染色され、残りの頭部領域が染色されて無い状態を示す「leaky neck membrane（頸部のみが部分的に染色されている）」場合は、細胞死や完全膜崩壊の徴候ではないと考えられる。これらの細胞は生存と判断されなければならない。

3. 薄いピンクの識別が困難な場合は、**nigrosin** を使用し背景のコントラストを増加させて観察する（2.6.1 参照）。

2.6.2.4. 標準下限値

正常と判断される生存率（膜の正常な精子）の下限値は、**58%**である（5th centile, 95% CI 55–63）。

Comment: 精液中における原形質膜が損なわれていない生存精子の総数は生物学的にみて大変重要である。射精精液中の総生存精子数は、原形質膜が損なわれていない生存精子の比率と射精精子の総数を乗算することによって得られる（2.8.7 参照）。

2.6.3 低浸透圧膨化法による生存試験

生存性試験において染色法に代わるものとして、**hypo-osmotic swelling (HOS) test** が評価に用いられる（Jeyendran et al., 1984）。この方法は、例えば ICSI 時の精子の選別など、染色を避けなければならない場合に有用である。膜の正常な精子は低浸透圧溶液下で 5 分以内に膨化し、全ての尾部形状は 30 分間処理で安定する（Hossain et al., 1998）。

以下のように使用する：

- 通常の診断では 30 分間インキュベートする;しかし、
- 治療で精子を用いる場合は 5 分間インキュベートする。

2.6.3.1. 試薬準備

1. 診断目的の膨化溶液: 0.735g のクエン酸ナトリウム二水和物と 1.351g の D-フルクトースを 100mL の純水に溶かす。この溶液を 1mL ずつ -20°C で凍結する。
2. 治療目的の場合: 培養液 1 に対し滅菌純水 1 の割合で希釈する。

2.6.3.2. 処理方法

1. 凍結した膨化溶液を融解し使用する前に良く混和する。
2. 膨化溶液 1mL もしくは等量希釈された培養液 1mL の入った微量遠心管を 37°C、5 分間加温する。

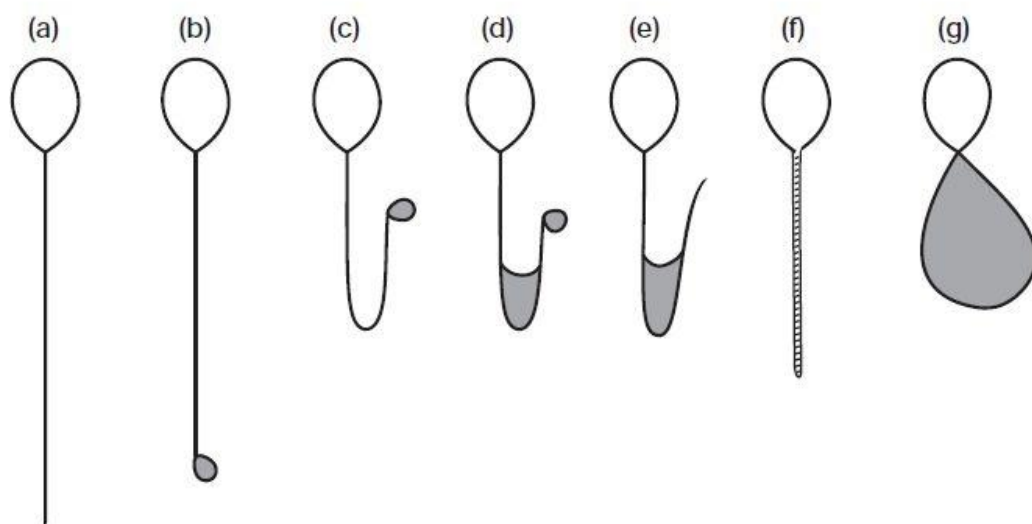
3. 精液検体を良く混和する（Box 2.3 参照）。
4. 精液 100 μ L を膨化溶液に加え、ピペットで吸い出してゆっくりと混ぜ合わせる。
5. 37°C下で正確に 5 分間もしくは 30 分間（上記参照）インキュベートし、そこから 10 μ L を清潔なスライドガラス上に取り出し、22mm×22mm のカバーガラスで覆う。
6. もう一枚スライドガラスを作製するため、再び精液サンプルをよく混和し、膨化溶液と混ぜ合わせてインキュベートし、スライド検体を作製する。
7. それぞれのスライドは、位相差顕微鏡で 200 倍もしくは 400 倍に拡大し観察を行う。
8. 膨化していない（死滅）細胞と膨化している（生存）細胞の数をカウンターを用い計測する。
9. サンプルングエラーを低下させるために、それぞれのスライドガラスから 200 の精子を計測し評価する（Box 2.5 参照）。
10. 2 枚のスライドから得られた生存率の平均値と差を計算する。
11. 表 2.1 または図 A7.2（付録 7）より、差の許容範囲を決定する。（それぞれは、単独のサンプルングエラーによって 95%のサンプルで起こる可能性がある 2 つの率の最大間差を示す。）
12. 差が許容範囲であれば、平均生存率で報告する。もし、差があまりにも高い場合は、新たに精液から 2 つのサンプルを作製し測定を繰り返して評価する。
13. 平均精子生存率は全体の数に最も近い平均数を報告する（Box 2.6 参照）。

2.6.3.3. スコアリング

1. 尾部が丸くなるような形態が変化した細胞は、膨化精子として同定する（図 2.6）。
2. 生存細胞は精子尾部の膨化の確認によって識別される。従って、下記に示す様々な種類の膨化の形態を呈する精子は全て生存精子として判定する。

図 2.6 ヒト精子の低浸透圧による代表的な形態変化の概略図

(a) 変化なし。(b) – (g) 尾部変化の様々な型。尾部の膨化箇所はグレー色の領域で示した。



Jeyendran RS. et al., (1984) 提供

2.6.3.4. 標準下限値

低浸透圧膨化試験によって得られる数値は eosin によって得られる数値とほぼ同等である (Carreras et al., 1992)。

正常と判断される生存率（膜の正常な精子）の下限値は、58%である（5th centile, 95% CI 55–63）。

Comment: 精液中における原形質膜が損なわれていない生存精子の総数は生物学的にみて大変重要である。射精精液中の総生存精子数は、原形質膜が損なわれていない

生存精子の比率と射精精子の総数を乗算することによって得られる（2.8.7 参照）。

2.7 精子数

射精精液の総精子数と精子濃度はいずれも妊娠までの期間（Slama et al., 2002）と妊娠率（WHO, 1996; Zinaman et al., 2000）の両方に関係し、妊孕性を予測する因子となる（Bonde et al., 1998; Larsen et al., 2000）。多数の報告で、総精子数と生殖能力が関連していることが証明されている。

射精精液中の精子数は、精液検査の際に測定される精子濃度から算出される。輸送路障害が無く、禁欲期間が短い正常な射精の場合、射精精液中の総精子数は精巣容量に関連しており（Handelsman et al., 1984; WHO, 1987; Andersen et al., 2000; Behre et al., 2000）、精巣での造精機能（MacLeod & Wang, 1979）と輸送路通過性が評価される。精液中の精子濃度は、受精や妊娠率に関連しており、精囊と前立腺からの分泌液の量によって影響を受け（Eliasson, 1975）るので精巣機能を特異性に評価しているものではない。

Comment 1: 「総精子数」と「精子濃度」という用語は、同義語ではない。精子濃度は、精液量あたりの精子数を示し、放たれた精子数とそれらを希釈している体液量についての機能を示す。総精子数は、全ての射精された精子総数であり、精子濃度に精液量を乗算することにより得られる。

Comment 2: 一般的に、総精子数は精巣での精子産生能を反映するが、アンドロゲン欠乏を伴う脊髄損傷患者からの電気刺激的射精や、長期にわたる禁欲または部分的な逆行性射精で採取された検体の場合では反映していない可能性がある。

Comment 3: 精子濃度（単位ボリュームあたりの数）という意味を表現する際に、「精子密度」（単位ボリュームあたりの量）と言う用語は使われるべきではない。

精子数の測定は、以下のステップから成る（以降、項ごとに詳述）。

- 適切な希釈倍率と適切な計算盤（2.8.1 参照）を決めるために、希釈していない液化した精液を良く混和し、スライドグラスに乗せカバーグラスで覆い試験する。通常は運動性の評価を行うため、湿式（2.4.2 参照）にて行う。
- 精液と固定希釈液を混和する。
- 血球計算盤に規定量の精子を注入し、湿潤箱で静置する。
- 検体を 10～15 分以内に評価する（それ以降では、蒸発により計算盤内の精子位置

が顕著に影響する)。

- 1 検体あたり少なくとも 200 精子を計測する。
- 許容範囲を確認するため、もう 1 検体を計測し比較する。許容範囲であれば計測を続け、そうでなければ新たに希釈し直す。
- 1mL あたりの精子濃度を計算する。
- 射精精液中の総精子数を計算する。

2.7.1 計算盤の種類

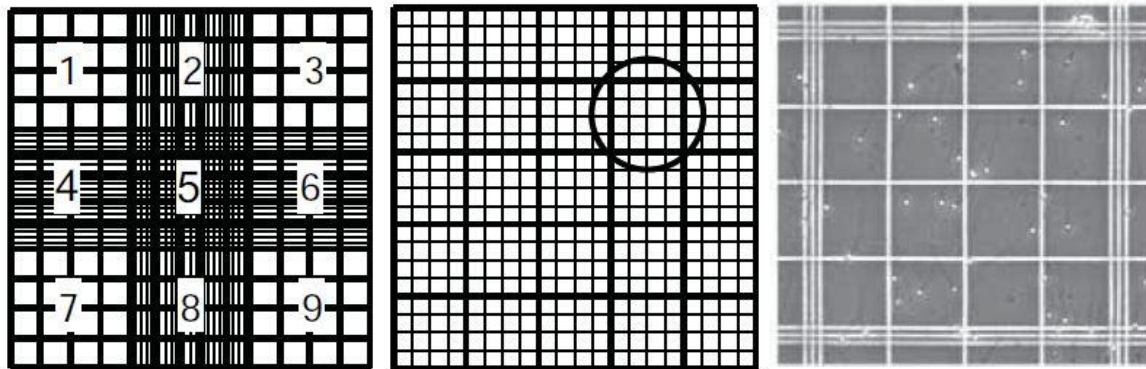
100 μ m の深さの血球計算盤の使用を推奨する。ここでは改良型 Neubauer 血球計算盤の希釈比率について述べる。他の深さの血球計算盤が使われる可能性があるが、それらは異なる体積と格子パターンを有しており、計算するには異なるファクターが必要である。使い捨ての計算盤を用いて精子濃度の測定を行うことが出来るが (Seaman et al., 1996; Mahmoud et al., 1997; Brazil et al., 2004b)、改良型 Neubauer 血球計算盤と異なる結果が出る可能性がある。毛細管現象により満たされる浅い計算盤は、流動により精子の配置が均一にならない可能性がある (Douglas-Hamilton et al., 2005a, 2005b)。それを修正することが出来る可能性があるが (Douglas-Hamilton et al., 2005a)、それは推奨できない (Björndahl & Barratt, 2005)。代わりの計算盤の有効性は、計算盤の特徴 (付録 7, A7.8 参照)を確認し、改良型 Neubauer 血球計算盤と結果の比較を行い、外部の品質管理プログラムで満足な成績が得られることによって、その有効性を確立しなければならない。低い精子濃度を正確に評価するためには、大容量の計算盤が必要であるかもしれない (2.11.2 参照)。

2.7.2 改良型 Neubauer 血球計算盤

改良型 Neubauer 血球計算盤は、分かれた 2 つの計算盤を備えており、それぞれ 3mm×3mm の格子ラインがガラス表面に刻まれている。そして特殊な厚いカバーガラス (thickness number 4, 0.44 mm) が使われ、そしてそれが底面より 0.1mm 上にガラス柱で支えられ、格子の上に位置している。それぞれの計測領域は、9 区画の 1mm×1mm の格子で構成されている。これらの格子は図 2.7 に示してある。

図 2.7 改良型 Neubauer 血球計算盤

格子領域の図を以下に示す：血球計算盤の 1 つの計測エリアの全 9 区画格子（左のパネル）；25 の大きな正方形区分（中央のパネル）の中心格子（No.5）；そして検体の満たされた計算盤の一部の顕微鏡像（右のパネル）で、中心格子の 25 の正方形区分のうちの 1 つで（中央のパネルの円で囲まれた部位）、3 本の線で囲まれている 16 の小さな正方形区分を示す。



C Brazil.提供

100 μ m の深さで、それぞれの格子は 100nL を保持する。4 個の格子（No.1,3,7,9）は 4 個の正方形に 4 本の列を含み、それぞれ 6.25nL を保持する；2 個の格子（No.2,8）は 5 個の正方形区分に 4 本の列を含み、それぞれ 5nL を保持する；2 個の格子（No.4,6）は 4 個の正方形区分に 5 本の列を含み、それぞれ 5nL を保持する；そして中央の格子（No.5）は 5 個の正方形区分に 5 本の列を含み、それぞれ 4nL を保持する（図 2.7, 中央のパネル）。中央格子の 25 個の正方形区分（No.5）のそれぞれは、16 個のより小さな正方形区分に細分化されている（図 2.7, 右のパネル）。このように、格子 1,2,3,7,8,9 はそれぞれ 1 列につき 25nL を保持する 4 本の列を持ち、格子 4,5,6 はそれぞれ 1 列につき 20nL を保持する 5 本の列を持つ。

希釈比率と計測精子数に応じて、計算盤の異なる領域を用い精子濃度測定に使用される。20 倍希釈と 5 倍希釈では、格子番号 5 の列で評価され、必要に応じて格子番号 4 と 6 から計算する（2.8 参照）。2 倍希釈では、200 の精子を計測するために、必要に応じて全 9 個の格子で評価される（2.11.1 参照）。

2.7.3 血球計算盤格子の使用法

- ・完全な形態を有する精子（頭部と尾部を伴う）のみを計測する。
- ・精子を計測するかどうかは、その頭部の位置により決められる；尾部の位置は重要ではない。正方形区分の境界線は、3 本の中央の線で示される；このように、もし頭部の大半が 2 本の内側の線上にかかっている場合は計測するが、頭部の大半が外側の 2 本の線上にかかっている場合は計測しない（図 2.8, 左のパネル）。

- 隣接する2つの正方形の境界線上にかかっている同じ精子を重複しないように回避し1つだけ計測しなければならない。例えば、精子頭部の大半が、左または下の境界線上のL字形を呈する線上（図2.8, 中央パネル参照）にかかっている場合は計測し、上または右の境界線上にかかっている場合（図2.8, 右パネル）は計測しない。

Note: 頭部の無い（ピン状頭部）精子尾部または尾部の無い精子頭部が多く存在する場合は、それらを記録し報告しなければならない。もし必要とみなされる場合は、それらは精子由来として同様に濃度を評価することができる（2.8参照）、もしくは精子と反応する染色を行いその率で測定することが出来る（2.17.6参照）。

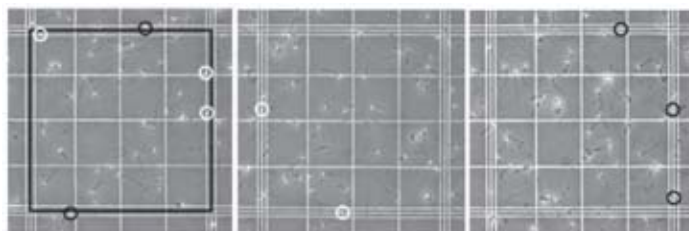
2.7.4 計算盤の手入れ法

血球計算盤は特殊な厚さのカバーガラスを使用しなければならない（thickness number 4, 0.44 mm）。

- 乾燥した残留物はローディングの妨げになるので、使用後の血球計算盤とカバーガラスは水洗後に乾いたティッシュで拭き取り清掃する。格子表面を拭き、前の検体の精子残留物を取り除く。
- 精液中からの感染の可能性のある患者からのコンタミネーションを避けるために、計算盤とカバーガラスを消毒液に一晩浸ける（付録2, A2.4 参照）。

図 2.8 正方形区分格子での精子計測法

正方形区分の境界の3本線の中央線を境界線と定義する（黒線、左のパネル）。中央正方形区分にある精子は全て計測する。頭部が2本の内側の線上にかかっている場合（白丸）は計測し、頭部が外側の2本の線上にかかっている場合（黒丸）は計測しない。精子頭部の大半が、左または下の境界線上（白丸、中央パネル参照）にかかっている場合は計測し、上または右の境界線上にかかっている場合（黒丸、右パネル）は計測しない。



C Brazil.提供

2.7.5 精液の希釈固定法

1. 50gの重炭酸ナトリウム(NaHCO_3)と10mLの35%(v/v)のホルマリンを1000mLの純水に溶かす。
2. 精子頭部を染めて強調したい場合は、0.25gのtrypan blue (colour index 23859) または5mLの飽和(>4 mg / mL) gentian violet (colour index 42555) を加える。
3. 4°Cで保存する。結晶が生じた場合は、使用前に0.45 μm のフィルターを通す。

2.7.6 十分な数の精子について測定することの重要性

標本誤差を減らすため、適正数の精子を数えなければならない（少なくとも合計で400個、また各反復測定においては約200個を調べることが望ましい）（Box 2.7 と表 2.2 参照）。

Box 2.7 推定数の誤差

精子数推定値の精度は、実際に測定した精子の数に依存する。ポアソン分布において、計測数(N)の標準誤差(standard error, SE)はNの平方根($\sqrt{N}$)、精液容量あたりの精子数の95%信頼区間(confidence interval, CI)は約 $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ （もしくは $N \pm 2 \times \sqrt{N}$ ）である。

もし100個の精子を計測すると、SEは10 ($\sqrt{100}$)、95%CIは80-120 (100 ± 20) となる。もし200個の精子を計測すると、SEは14 ($\sqrt{200}$)、95%CIは172-228 (200 ± 28) となる。もし400個の精子を計測すると、SEは20 ($\sqrt{400}$)、95%CIは360-440 (400 ± 40) となる。

標本誤差は、便宜的に計測数の百分率として表示される ($100 \times (\sqrt{N}/N)$)。これらの値は、表2.2に示す。

Note: これらの値はあくまでも近似値である。信頼区間は推定値付近で常に対称性があるとは限らないからである。ポアソン分布の特性に基づいた正確な95%信頼区間は、400個の計測数に対して361-441、100個の計測数に対して81.4-121、10個の計測数に対して4.80-18.4、1個の計測数に対して0.03-5.57、0個の計測数に対して0.00-3.70である。

表 2.2 計測した総精子数に対するおおよその標本誤差 (%)

総精子数	標本誤差	総精子数	標本誤差	総精子数	標本誤差
1	100.0	25	20.0	85	10.8
2	70.7	30	18.3	90	10.5
3	57.7	35	16.9	95	10.3
4	50.0	40	15.8	100	10.0
5	44.7	45	14.9	150	8.2
6	40.8	50	14.1	200	7.1
7	37.8	55	13.5	250	6.3
8	35.4	60	12.9	300	5.8
9	33.3	65	12.4	350	5.3
10	31.6	70	12.0	400	5.0
15	25.8	75	11.5	450	4.7
20	22.4	80	11.2	500	4.5

Comment 1: あまりにも少数の精子計測は、不確かな結果を生じ（付録 7、A7.1 参照）、診断や治療に影響を及ぼす可能性がある（付録 7、A7.2 参照）。この事は、精子が治療目的に採取され、精子数が少ない場合は避けがたいことである（5.1 参照）。

Comment 2: 精液量が少なく推奨以下の精子しか数えることが出来ない場合、得られた値の精度は大幅に低下するだろう。繰り返し計測して 200 個より少なければ、表 2.2 に示された標本誤差を報告する。

2.8 通常の計数手順

血球計算盤の区画番号 4、5、6 のひとつもしくは全てにおいて精子数を約 200 個とするためには、1 + 4 (1:5) 希釈と 1 + 19 (1:20) 希釈が精子濃度範囲として適切である (表 2.3 と Box 2.8 参照)。

Box 2.8 改良型Neubauer血球計算盤の中央3つの区画を利用して反復測定の間あたり200個の精子を測定するためには

もし、最初の湿標本で強拡大視野 (High-power field, HPF) 4nL (Box 2.9参照) あたり100個の精子が認められれば、理論的には25個 / nL (25,000個 / μ L, 25,000,000 個 / mL) となる。改良型Neubauer血球計算盤の中央区画 (区画番号5) の容量は100nL なので、そのなかには2,500個の精子が存在する。この標本を1 + 4 (1:5) で希釈するとバックグラウンドは低下し、区画あたりの精子数は約500個となる。これは、標本誤差が小さく十分許容できる精子数である。

もし、湿標本でHPFあたり10個の精子が認められれば、2.5個 / nL、250個 / 中央区画となる。この標本を1+1 (1:2) で希釈するとバックグラウンドは低下し、区画あたりの精子数は約125個となる；区画番号4, 5, 6の3つでは375個となり、標本誤差が小さく十分許容できる精子数である。

Note: ここで計算した濃度は、大まかな推定値でしかない。それは、ごく少量の精子しか計数しておらず容量も正確とはいえないからである。希釈していない標本から推定された濃度は、希釈した標本を用いて計算盤で算出した濃度の30~130%の値となる。

2.8.1 必要な希釈倍率の決定

精子数を正確に測定するために必要な精液の希釈倍率は、未希釈の精液標本から評価される。これは通常、運動率評価のために用いられた湿標本 (2.4.2 参照) を指す。

- 項 2.4.2 の記載に従い作製された湿標本のひとつを HPF (200 倍もしくは 400 倍) あたりの精子数を推定するために検査する。
- ひとつの HPF は約 16nL (200 倍) もしくは 4nL (400 倍) に相当する (Box 2.9 参照)。
- もし精子が観察されれば計測して表 2.3 から必要な希釈倍数を決定し、項 2.8.2 に進む。

- もし精子が観察されなければ、残りの湿標本を観察する。残りの標本にも精子が観察されなければ項 2.9 に進む。

Box 2.9 深さ20 μm の湿標本における強拡大1視野あたりの容量

顕微鏡の各視野で観察される精液の容量は、視野の面積（ πr^2 、 π は約3.142、 r は顕微鏡視野の半径である）と深度（湿標本では20.7 μm ）に依存する。顕微鏡視野の直径は、ステージマイクロメーターを用いて測定するか、接眼レンズ開口の直径を対物レンズの倍率で割ることにより推測できる。

×40の対物レンズと20mm開口の×10の接眼レンズを用いた場合、顕微鏡視野の直径は、約500 μm （20mm / 40）である。この場合、 $r = 250\mu\text{m}$ 、 $r^2 = 62,500\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 196,375\mu\text{m}^2$ 、容量は、4,064,962 μm^3 もしくは約4nLとなる。

×20の対物レンズと20mm開口の×10の接眼レンズを用いた場合、顕微鏡視野の直径は、約1,000 μm （20mm / 20）である。この場合、 $r = 500\mu\text{m}$ 、 $r^2 = 250,000\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 785,500\mu\text{m}^2$ 、容量は、16,259,850 μm^3 もしくは約16nLとなる。

表 2.3 必要な精液の希釈倍数、調製法、使用するチャンバーと観察有効領域

×400 視野 あたりの 精子数	×200 視野 あたりの 精子数	必要な希釈 倍数	精液 (μL)	固定液 (μL)	チャンバー	観察領域
> 101	> 404	1:20 (1+19)	50	950	改良 Neubauer	区画 5、4、6
16-100	64-400	1:5 (1+4)	50	200	改良 Neubauer	区画 5、4、6
2-15	8-60	1:2 (1+1)	50	50	改良 Neubauer	区画 5、4、6
< 2	< 8	1:2 (1+1)	50	50	改良 Neubauer もしくは 大容量	9つの区画 もしくは スライド全体

Note 1: エアーディスプレイスメント方式の白血球用ピペットや自動ピペットは、粘性のある精液を容積測定により希釈するには正確性に欠ける；ポジティブディスプレイスメント方式のピペットを用いる。

Note 2: 診断目的のための分析用の精液標本は、小容量を扱う時のピペッティング誤差を避けるため50 μL 以下にならないようにする。

Note 3: 推奨希釈倍率で視野あたりの精子数があまりにも少ない場合は、もう一度希釈倍率を下げて準備する。推奨希釈倍率で視野あたりの精子数があまりにも多く精子が重なる場合は、もう一度希釈倍率を上げて準備する。

Note 4: もしも **1+19 (1:20)** が不適切であれば、**1+49 (1:50)** にする。

Comment 1: 最初の湿標本において精子数が少ない場合 (**400 倍の HPF あたり <4 個 : 約 $1 \times 10^6 / \text{mL}$**)、正確な精子数は必要とされないことがある (**2.10 参照**)。

Comment 2: 低濃度の精子 (**400 倍の HPF あたり <2 個 : 約 $0.5 \times 10^6 / \text{mL}$**) を正確に測定するために、改良型 **Neubauer** 血球計算盤の **9 つの区画 (2.11.1 参照)** を全て使用する、もしくは大容量の使い捨てチャンバーを用いて蛍光検出する方法 (**2.11.2 参照**) が推奨される。

2.8.2 希釈の準備と血球計算盤への注入

- 息を吹きかけ血球計算盤の表面をわずかに湿らす。
- 計算盤の柱にしっかりとカバーグラスを押しつけて固定する。2 つのガラス表面の間の虹色 (複数のニュートンリング) によりカバーグラスが正しく配置されたことを確認する。多くの虹線があるほどよく適合している; 1 つか 2 つの虹線だけだと、チャンバーの深度にばらつく問題が生じる可能性がある。
- ポジティブディスプレイスメント方式のピペットを使用し、2 つの希釈用バイアルに適量の固定液 (表 2.3 参照) を分注する。
- 精液標本をよく混ぜる (Box 2.3 参照)。
- 精子が沈降しないように攪拌後すぐに適量の精液を吸引する (表 2.3 参照)。
- チップの開口部に触れないよう注意し、ピペットチップの外部に付いた精液を拭き取る。
- 精液を固定液に加え、固定液の吸排出によりピペットチップをリンスする。
- 精液標本を再びよく混ぜ、上記に従って反復測定用の希釈精液を準備する。
- 最初の希釈精液をボルテックスにより最大速度で 10 秒間攪拌する。精子の沈降を避けるため、懸濁した固定済み精液からすぐに約 10 μL を採取する。

- チャンバー片側の V 字の溝に合わせて注意深くピペットチップを接触させる。
- ピペットのプランジャーをゆっくりと押し、毛細管現象によりチャンバーを満たす。カバーガラスは、満たしている最中に動かないようにする。また、チャンバーはあふれないよう（カバーガラスが動くように見えることがある）、不十分にならないよう（空気がチャンバー内部のいくつかの箇所を満たしている）にする。
- 2 番目の希釈精液を上記のように攪拌し、懸濁した希釈済み精液からすぐに 10 μ L を採取する。上記のステップに続き血球計算盤の 2 番目のチャンバーに注入する。
- 血球計算盤は、乾燥を防ぐため湿潤箱（例えば、ペトリ皿内の水で飽和させたろ紙のうえなど）で少なくとも 4 分間室温で水平にして保存する。この間、固定された細胞は区画上に沈降する。

Note 1: いくつかのチャンバーは、円形のガラス柱によって構成されている；それらを用いた場合は、ニュートンリングが現れない。カバーガラスを固定するため、約 1.5 μ L の水をそれぞれの円形ガラス柱に加える（Brazil et al., 2004a）。この際、水が計測エリアに入らないように注意する。

Note 2: カバーガラス固定のために血球計算盤用の留め金を使用すると、一定の深度を保てる（Christensen et al., 2005）。

Note 3: 粘性の高い標本において、攪拌が 5-10 秒遅れると精液は希釈液中で凝集する可能性がある。この場合、精液を固定液に加えてからすぐに 10 秒間攪拌する。

2.8.3 計算室内の精子数の計測

精子数は、血球計算盤の 2 つの計算室で計測されるべきである。もし両方の計数値が十分に一致すれば、その部分標本は標本全体を反映していると見なすことができる（2.4.1 参照）。

- 血球計算盤を位相差顕微鏡の 200 倍もしくは 400 倍で観察する。
- 標本誤差を許容できる程度まで小さくするために、それぞれの標本で精子を少なくとも 200 個ずつ数える（Box 2.7 と Table 2.2 参照）。

- 最初に改良型 **Neubauer** 血球計算盤の片方の計算室内の中央区画（Fig 2.7 の区画番号 5）を行毎に計測する。
- 少なくとも 200 個の精子が観察され、行（5 つの大きな四角）全ての計測が終わるまで継続する。計測は行毎におこなわなければならない；行の途中で止めない。もし中央区画を全て観察し精子数が 200 未満の場合、近接した 2 つの区画（Fig. 2.7 の 4 番と 6 番）の行（4 つの大きな四角）を計測する。
- 200 個の精子を計測するのに要した行の数を記録しておく。血球計算盤のもう一方の計算室を計測する場合も同じ数の行を計測する。
- 試験室の計数器を用いて精子数と行を記録する。
- 血球計算盤の 2 番目の計算室に切り替え、最初の繰り返し試験用標本と同じ行（同じ容量）を再び計測する。たとえ、精子が 200 個未満でもおこなう。
- 2 つの計算室の総和と 2 値の差を計算する。
- 表 2.4 もしくは付録 7. の図 A7.1 から許容差を決定する（各々の値は、標本誤差単独で標本の 95% で起こり得る計数値間の最大差を示す）。
- もし差が許容差以内であれば、濃度を計算する（2.8.4 参照）。もし差が許容差以上であれば、項 2.8.2 に記述されているように新たに 2 つの希釈済み精液を準備し、計数を繰り返す（Box 2.10 参照）。
- 平均精子濃度は有効数字 2 桁で報告する。
- 射精あたりの総精子数を計算する（2.8.7 参照）。

Note 1: もし区画 4, 5, 6 の精子数が 200 個未満であれば区画 1, 2, 3, 7, 8, 9 の容量は区画 4, 5, 6 とは異なるため計測を続けない（2.7.2 参照）。この場合、希釈倍率を下げた希釈済み精液を 2 つ準備し計測する。もしも、1+1（1:2）の希釈が必要ならば項 2.11 へ進む。

Note 2: 同じ計算室を 2 回、もしくは 1 つの希釈済み精液を満たした 2 つの計算室を計測するのは、本当の繰り返し試験とはいえない。これでは、サンプリング、攪拌、希釈の誤差を検出できない。

表 2.4 総和に対する2つの繰り返し計測数の許容差

総和	許容差*	総和	許容差*
144-156	24	329-346	36
157-169	25	347-366	37
170-182	26	367-385	38
183-196	27	386-406	39
197-211	28	407-426	40
212-226	29	427-448	41
227-242	30	449-470	42
243-258	31	471-492	43
259-274	32	493-515	44
275-292	33	516-538	45
293-309	34	539-562	46
310-328	35	563-587	47

*およそ95%信頼区間に基づく

Box 2.10 反復測定と比較

個々の計測数間の差は0と期待される。標準誤差は2つの計測数の総和の平方根に等しい。そのため、信頼限界が95%だとすると繰り返し計測数の差の偏りが偶然に起きるものとするには、 $(N1-N2) / (\sqrt{N1+N2})$ は <1.96 となる。

もし、計測値の差が表2.4もしくは表2.5の該当欄に与えられた数値よりも少ないもしくは等しい値の場合、計数値は許容されそれらの平均から濃度が計算される。大きな差は、計測ミス、ピペッティングエラー、細胞の混和不足などにより計算室上に精子が均一に分布していなかったためだと示唆される。

計測値の差が許容値以上の場合、最初の2値は採用せずに、新たに2つの新鮮な希釈済み精液を作製し数える（3つめの標本を計測し、3つの値の平均値をとる、もしくは2つの近似した値の平均値をとることはしてはならない）。

これは、精子の計数やペルオキシダーゼ陽性細胞の計数に適応される（2.18参照）。

CD45陽性細胞（3.2参照）や未成熟生殖細胞（2.19参照）を計測する際は、染色標本を再計測するべきである。

95%信頼区間のカットオフ値により、約5%の繰り返し試験は偶然起きる偏りの限度外となる。

Note: 不均一な検体でまれに起こることだが、繰り返し試験を3セットしても許容できない差が生じる場合がある。この場合、全ての繰り返し試験を平均し、そのことを報告書に記載する。

2.8.4 精液の精子濃度の計算

精液中の精子濃度を計算し報告することが推奨される。濃度は、精巣機能の特異的な指標ではないが、受精率や妊娠率と関連している。

精液中の精子濃度は、精子の数 (N) をそれらが見いだされた容量、すなわち、繰り返し試験で測定した行の総数 (n) の容量 (区画 4, 5, 6 それぞれ 20nL) で割り、希釈倍率を掛ける。濃度は $C = (N/n) \times (1/20) \times \text{希釈倍数}$ となる。

1+4 (1:5) 希釈で、区画 4, 5, 6 を使用した場合、その濃度は、 $C = (N/n) \times (1/20) \times 5$ 精子 / nL = $(N/n) \times (1/4)$ 精子 / nL (もしくは 10^6 / mL 精液)。

1+19 (1:20) 希釈で、区画 4, 5, 6 を使用した場合、その濃度は、 $C = (N/n) \times (1/20) \times 20$ 精子 / nL = (N/n) 精子 / nL (もしくは 10^6 / mL 精液)。

1+49 (1:50) 希釈で、区画 4, 5, 6 を使用した場合、その濃度は、 $C = (N/n) \times (1/20) \times 50$ 精子 / nL = $(N/n) \times 2.5$ 精子 / nL (もしくは 10^6 / mL 精液)。

2.8.5 実施例

例 1. 1+19 (1:20) 希釈で、繰り返し試験 1 では 7 桁に 201 個の精子を含んでおり、繰り返し試験 2 では 7 桁に 245 個の精子を含んでいる。それらの総和 (201+245) は 14 桁に 446 個、2 値の差 (245-201) は 44 である。表 2.4 から 2 値の差が許容差 (41) 以上のため、新たな繰り返し試験用の希釈済み精液を作製する。

例 2. 1+19 (1:20) 希釈で、繰り返し試験 1 では 4 桁に 220 個の精子を含んでおり、繰り返し試験 2 では 4 桁に 218 個の精子を含んでいる。それらの総和 (220+218) は 8 桁に 438 個、2 値の差 (220-218) は 2 である。表 2.4 から 2 値の差が許容差 (41) 以下のため、計測値を採用する。

1+19 (1:20) 希釈したこの精液の濃度は $C = (N/n) \times 1.0$ 精子 / nL、すなわち、 $(438/8) \times 1.0 = 54.75$ 精子 / nL、もしくは 55×10^6 精子 / mL である (有効数字 2 桁)。

Note: 1+19 (1:20) 希釈で区画 4, 5, 6 を用いると、その濃度は計算しやすい。計測した総精子数を測定した行数で割ることで、 10^6 / mL 中の精子濃度が算出できる。例えば、上記の例だと計算は、 $(220+218) / (4+4) = 438 / 8 = 55 \times 10^6$ 精子 / mL となる。

例 3. 1+19 (1:20) 希釈で、繰り返し試験 1 では 15 桁 (区画 5, 4, 6) に 98 個の精子

を含んでおり、繰り返し試験 2 では 15 桁 (区画 5, 4, 6) に 114 個の精子を含んでいる。それらの総和 (98+114) は、30 桁に 212 個、2 値の差 (114-98) は 16 である。表 2.4 から 2 値の差が許容差 (29) 以下のため、計測値を採用する。
 1+19 (1:20) したこの精液の濃度は $C = (N/n) \times 1.0$ 精子 / nL、すなわち、 $(212/30) \times 1.0 = 7.07$ 精子 / nL、もしくは 7.1×10^6 精子 / mL である (有効数字 2 桁)。400 個の精子より計測数が少ないため、表 2.2 に示された 212 個の精子の標本誤差を報告する (約 7%)。

Note: この例では、区画 5, 4, 6 で観察された精子数が 200 を下回っているため標本の希釈倍数が大き過ぎたといえる ; 1+4 (1:5) 希釈がより適している。

例 4. 1+4 (1:5) 希釈で、繰り返し試験 1 では 4 桁に 224 個の精子を含んでおり、繰り返し試験 2 では 4 桁に 268 個の精子を含んでいる。それらの総和 (224+268) は 8 桁に 492 個、2 値の差 (268-224) は 44 である。表 2.4 から 2 値の差が許容差 (43) 以上のため、新たな繰り返し試験用の希釈済み精液を作製する。

例 5. 1+4 (1:5) 希釈で、繰り返し試験 1 では 8 桁に 224 個の精子を含んでおり、繰り返し試験 2 では 8 桁に 213 個の精子を含んでいる。それらの総和 (224+213) は 16 桁に 437 個、2 値の差 (224-213) は 11 である。表 2.4 から 2 値の差が許容差 (41) 以下のため、計測値を採用する。

1+4 (1:5) 希釈したこの精液の濃度は $C = (N/n) \times (1/4)$ 精子 / nL、すなわち、 $(437/16) / 4 = 6.825$ 精子 / nL、もしくは 6.8×10^6 精子 / mL である (有効数字 2 桁)。

Note: 1+4 (1:5) 希釈も簡単に計算できる。計測した総精子数を測定した桁数で割り、さらに 4 で割れば良い。例えば、上記の例だと計算は、 $((224+213) / (8+8)) / 4 = (437 / 16) / 4 = 27.3 / 4 = 6.8 \times 10^6$ 精子 / mL となる。

2.8.6 精子数の最低基準限度値

精子濃度の最低基準限度値は 15×10^6 精子 / mL である (5 パーセンタイル、95% 信頼区間 $12-16 \times 10^6$)。

2.8.7 射精精液中の総精子数の計算

射精精液あたりの総精子数を計算し報告することが推奨される。このパラメーターは、精巣が精子を生産する能力や雄性生殖道の開通性の指標となる。これは、全体の射精精液の容量を精子濃度に掛けることで算出する。

2.8.8 総精子数の最低基準限度値

総精子数の最低基準限度値は、 39×10^6 精子 / 射精精子である (5 パーセンタイル、95%

信頼区間 $33-46 \times 10^6$)。

2.9 低精子数：cryptozoospermia と無精子症の疑い

もし湿標本の作製を繰り返して精子が観察されなかった場合、無精子症の疑いがある。その定義は変更することが提唱されているが (Sharif, 2000; Ezech & Moore, 2001)、無精子症は、その原因や診断・治療の根拠を提示するよりも、むしろ射精精子の記述として残されている。一般的に無精子症という言葉は、遠心後の標本の沈降物に精子が認められない場合にのみ使用することが受け入れられている (Eliasson, 1981)。

しかし、それは以下のことを念頭に置いておくべきである：

- 沈降物に精子が見つかるかどうかは、遠心時間や遠心速度 (Lindsay et al., 1995; Jaffe et al., 1998)、沈降物の観察量に依存する。
- 15 分間 3000g の遠心では、標本中の全ての精子は沈降しない (Corea et al., 2005)。
- 遠心後、運動性は失われ (Mortimer, 1994a)、濃度は低く見積もられる (Cooper et al., 2006)。

これらの標本が処理される方法は、精子の存在や精子運動性に関する主観的なデータが十分かどうか (2.10 参照)、正確な精子数が要求されるかどうかに依存する (2.11 参照)。

2.10 低精子数の正確な評価が必要ではない場合

もし最初の湿標本において HPF あたりの精子数が少ないとき (400 倍の HPF あたり 0-4 もしくは 200 倍の HPF あたり 0-16)、いくつかのオプションが利用できる。

2.10.1 追加措置を必要としない

もし 400 倍の HPF あたり精子数が <4 存在する場合 (すなわち $<約 1 \times 10^6 / \text{mL}$)、大抵の臨床目的には精子濃度を $<2 \times 10^6 / \text{mL}$ として (低精子数に関連する高い標本誤差として説明するため)、運動精子が認められたかどうかとともに報告すれば十分である。

2.10.2 精子確認のために遠心した標本を検査する

いずれの湿標本でも精子が観察されない場合、多量の標本中に精子が少しでもいるかどうか決定するために遠心することができる。

- 精液標本を良く混ぜる（Box 2.3 参照）。もし標本が粘性の高い場合、項 2.3.1.1. の記述に従って粘性を低下させる。
- 精液から 1mL の部分標本をとり、15 分間 3000g で遠心する。
- 大部分の上清を傾捨し、残り約 50μL の精漿中で精子沈降物を再懸濁する。
- 沈降物の部分標本 10μL を 2 つのスライドにそれぞれ採取し、22mm×22mm のカバーガラスで覆う。これで、およそ 20μm の深度を有する（Box 2.4 参照）2 つの湿標本ができる。
- 200 倍もしくは 250 位の位相差顕微鏡でそれらのスライドを観察する。
- 視野毎に順序よくカバーガラスを完全に観察する。ひとつの角から開始し、x 方向に反対側に向かって観察する。次に y 方向に沿って 1 視野動かし、端から端まで x 方向に向かって観察する。このようにジグザグの方法を続け順序よく完全に部分標本を観察する（図 2.9）。視野を変更する間もスライドグラスを観察し続ける。
- 20 倍対物レンズと 20mm 開口の 10 倍接眼レンズを用いた場合、顕微鏡の視野は直径が約 1000μm となる（Box 2.9 参照）。それゆえ、22mm×22mm のカバーガラスの観察は、約 484 視野（22×22）となる。
- いずれかの繰り返し試験で精子が認められた場合、cryptozoospermia とする。
- 両方の繰り返し試験に精子が存在していなかった場合、無精子症とする。

Note 1: 15mL チューブが入る多くの卓上型遠心機は、3000g に達しない：1.5-2.0mL チューブが入る、高速遠心機を使用する。精液は部分標本を採取する前によく混ざっていることを確認する。

Note 2: スライドグラスの観察は、標本のバックグラウンドが高くなるので 10 分以内におこなう。

Note 3: 生殖補助医療のために標本を遠心する場合、全体の精液標本と沈降物の大部分（例えば沈降物の 10μL 程度の 4 つの部分標本）は、生存精子を見つけるための分析に必要であろう。

Comment 1: 検査に用いた部分標本から運動精子が含まれていないことは、必ずしも残りの標本にも運動精子が含まれていないことを意味しない。

Comment 2: 遠心は全ての精子を沈降させないので、この方法は総精子数を決定するために使えない。定量のためには、項 2.11.1 もしくは 2.11.2 を参照にする。

2.10.3 精液検体を遠心しないで運動精子を確認する方法

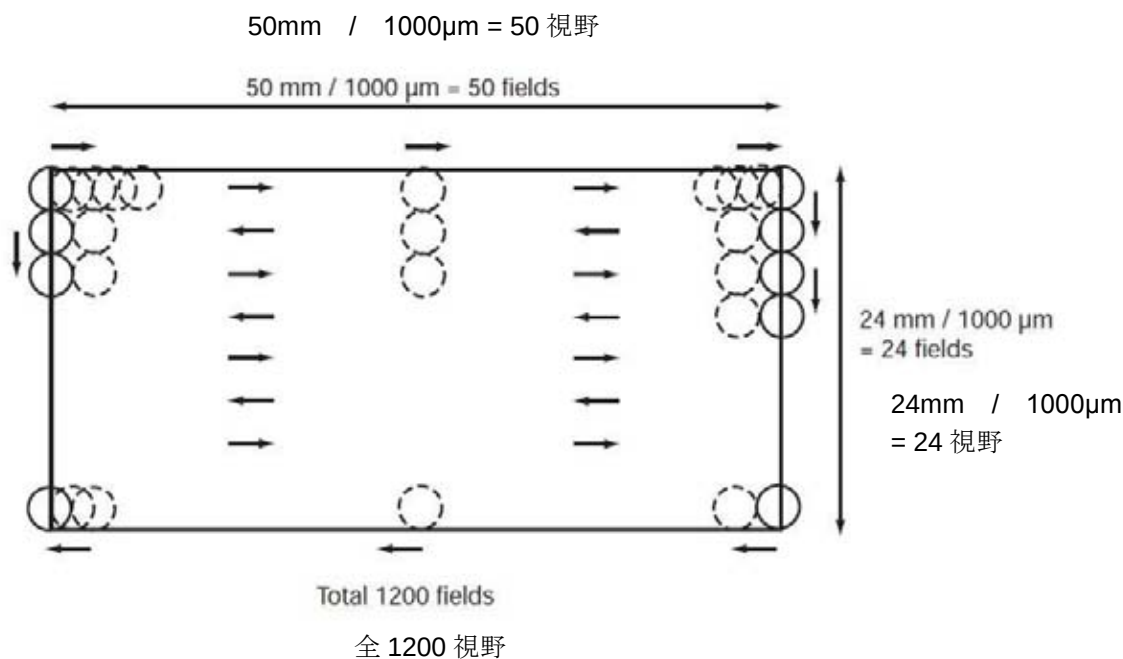
運動精子を探すとき（例えば、精管切除後の検体など）、検体を固定液で希釈したり、高い回転数で遠心したりするのは避けなければならない時がある。この場合、検体の一部を希釈しないで評価しなくてはならない。

- ・ 精液検体をよく混ぜて均一化する（Box 2.3 参照）。
- ・ 精液検体より一部、40 μ L を取って 24mm×50mm のカバーグラスをかける。これで検体の厚さは 33 μ m になる。
- ・ 位相差顕微鏡で 200 倍か 250 倍ぐらいで検査する。
- ・ カバーグラスの全領域を視野毎に効率よく走査する。カバーグラスのひとつの角から始めて、X 軸方向に沿って、反対側に向かって走査する。反対側できたら一視野分、Y 軸方向に移動し、また戻って走査する。このジグザグ法を行うことで完全に効率よく全標本に目を通すことができる（図 2.9 参照）。
- 視野を移動している間も目を離してはいけない。
- ・ 20 倍の対物レンズと 10 倍の接眼レンズで 20mm のレンズ口径であれば、顕微鏡の視野の直径はおおよそ 1000 μ m になる（Box 2.9 参照）。従って、24mm×50mm のカバーグラスではおおよそ 1200 視野（24x50）を調べることになる。

Note: この手技は10分以内におこなわないと、検体のバックグラウンドが高くなる恐れがある。

図 2.9 運動精子を見つけるためのカバーグラス全領域の走査

200 倍で検鏡すれば 24mm×50mm のカバーグラスでは約 1200 強拡大視野、22mm×22mm のカバーグラスなら約 484 強拡大視野を調べることになる。



Comment: 検体一部の観察で運動精子がないからといって、残りの精液検体にも運動精子がないということではない。

2.11 少ない精子数でも正確な評価が必要な時

この項では遠心処理をしないで少ない精子濃度を検査する方法について記述する。精子をペレットにしないで、精子を低希釈したり大量精液を検査する。

定量下限 (LLQ) を論じるとき、20%の精度は許容し得る値と考えられる。(Shah et al, 2000)。

1+1 (1:2) で希釈した精液を用いて、改良型 Neubauer 血球計算盤の中央の区画 (図 2.7 の 5 番) すべてを検査すると理論的には、標本誤差 20%で 250000 個 / mL の精子濃度が確認できる。9 区画すべてを検査すると、27800 個 / mL の少ない精子濃度が概算できる。25μL 保持できる大容量の使い捨て chamber では、同じ標本誤差で 1000 個 / mL の精子濃度が測定できるようになる (Cooper et al, 2006)。

ここで推奨しているように、精液を 1+1 (1:2) で希釈すると、上記の値は希釈しない

精液での 500000 個 / mL、55600 個 / mL と 2000 個 / mL に相当する。しかしながら精液検体をわずかでも希釈すれば大量のバックグランドが出現する。大容量 chamber の走査は、10 分から 20 分ほどかかる。しかし精子をすばやく確認するなら蛍光色素を使うことで容易になる (2.11.2 参照)。

2.11.1 改良型 Neubauer 血球計算盤の全区画での少ない精子数の評価 (位相差顕微鏡)

標本誤差を少なくするためには、必要な精子数 (できれば一つの chamber で約 200 個の精子を、両方の chamber では少なくとも全部で 400 個) を測定しなくてはならない。(Box2.7 と表 2.2 参照)

- 精液をよく混ぜ均一化する (Box2.3 参照)。

精液の一部をとり固定液で 1+1 (1:2) に希釈する (2.7.5 参照)。項 2.8.2 に注意する。

- 最初の標本 (表 2.3 参照) において強拡大下で 2 個より少ない精子数の検体を 1+1 (1:2) で希釈すると血球計算盤で精子が約 200 個 (Box2.11 参照) になるまで測定するのが精子濃度の限界として適当である。必要であれば 1 から 9 までの区画を評価する。

Box 2.11 改良型 Neubauer 血球計算盤での全 9 区画で標本ごとに精子数 200 個の到達

もしも初めの標本で強拡大下 4nL に 2 個の精子がいた場合、理論的には 0.5 個 / nL になる。(500 個 / μ L あるいは 500000 個 / mL)

改良型 Neubauer 血球計算盤の全 9 区画で 900nL の検体量であれば、そこには 450 個の精子がいるだろう。検体を 1+1 (1:2) で希釈すれば、バックグランドを減らすことになり、chamber あたり 225 個の精子数になり十分、標本誤差を低く抑えられる。

Note: この値はおおまかな概算になる。なぜなら少ない精子を測定し量も不正確かもしれないからである。

2.11.1.1. 手順

1. 上述のように、精液検体の一部をとり固定液で、1+1 (1:2) で希釈する。これを 2 つつくる。
2. 希釈した標本を血球計算盤の各 chamber に、一つの標本を一つの chamber に入れる。
3. 血球計算盤を水平に置き室温で乾かないように湿潤箱 (例えばペトリ皿に水で湿ら

せたる紙をひいたもの)の中で、少なくとも 4 分間おいておく。この間に不動化した細胞は区画底面に沈んでいく。

4. 血球計算盤を位相差顕微鏡で 200 倍か 400 倍で検鏡する。
5. 各々の標本で少なくとも 200 個の精子を測定する。これは標本誤差を少なくし許容できる数値にするためである (Box2.7 と表 2.2 参照)。
6. 一つの chamber で区画ごとに検査し、少なくとも 200 個の精子が観察されるまで続ける。そして一つの区画はすべて検査する。検査が完了したとしても区画の途中で検査を止めてはいけない。
7. 少なくとも 200 個の精子に到達した区画の数を記録する。同じ数の区画を血球計算盤のもう一方の chamber で測定するからである。
8. 計算機器を使った精子の数と区画数を照合する。
9. 血球計算盤のもう一方の chamber に移って、仮に 200 個の精子数より少ないとしても、最初の標本と同じ数の区画 (同じ量) を測定する。
10. 2 つの数値の合計と差を計算する。
11. 表 2.5 (表 2.4 を少ない精子数に広げた) から許容できうる差を決める。あるいは図 A7.1 付録 7 (2 つの数値の最大の差を示して標本誤差だけで検体の 95% に起こると予期される数値)。
12. もし差が許容されるなら濃度を計算する (2.11.1.2 参照)。もし差があまりにも大きいなら、新しく標本を上記と同様に 2 つ作り直して再測定する (Box2.10 参照)。
13. 精子の平均濃度を有効数字 2 桁で記録する。
14. 射精ごとの総精子数を計算する (2.11.1.5 参照)。

表 2.5 2つの数値の間の合計での許容差：低い濃度

合計	許容差*	総和	許容差*	総和	許容差*
35–40	12	144–156	24	329–346	36
41–47	13	157–169	25	347–366	37
48–54	14	170–182	26	367–385	38
55–62	15	183–196	27	386–406	39
63–70	16	197–211	28	407–426	40
71–79	17	212–226	29	427–448	41
80–89	18	227–242	30	449–470	42
90–98	19	243–258	31	471–492	43
99–109	20	259–274	32	493–515	44
110–120	21	275–292	33	516–538	45
121–131	22	293–309	34	539–562	46
132–143	23	310–328	35	563–587	47

*信頼区間 95%に基づく

2.11.1.2. 精液での低い精子濃度の計算

精液での精子濃度はその数 (N) を精子がいた容積、すなわち標本を検査した区画（一区画の容積は 100nL）の総数 (n) の容積で割る。そして希釈倍率を掛ける。それは、 $C = (N / n) \times (1 / 100) \times \text{希釈倍率}$ 。

1+1 (1:2) で希釈すると、濃度 $C = (N / n) \times (1 / 100) \times 2 \text{ 個 / nL} = (N / n) \times (1 / 50) \text{ 個 / nL}$ 。

血球計算盤の各 chamber で 9 区画全てを評価したとき、精子の総数は、両方の chamber の総容積 (1.8μL) で割り、希釈倍率 (2) を掛けると 1μL あたり (精液 1 mL あたり 1000 個) の精子濃度が得られる。

2.11.1.3. この方法の感度

もしも各 chamber で 200 個よりも精子が少ない場合は標本誤差が 5% を超えるだろう。両方の chamber で 400 個よりも少ない場合は、測定した細胞の数と標本誤差を記録する (表 2.2 参照)。

もし各 chamber で 25 個よりも少ない精子数ならば、濃度は 1 mL あたり 56000 個より少なくなる。改良型 Neubauer 血球計算盤の全 9 区画を 1+1 (1:2) で希釈し、評価したとき、これは 20% の定量下限にあたる (Cooper et al, 2006)。観察された精子数と「正

確な濃度を求めるには精子が少なすぎる（56000 個 / mL 以下）」と注釈を記録する。

Comment: 検体一部の観察で運動精子がないからといって、残りの精液検体にも運動精子がないということではない。

2.11.1.4. 計算例

例 1. 1+1 (1:2) で希釈し、標本 1 では 2 つの区画で 200 個の精子が確認された。一方、標本 2 では 2 つの区画で 250 個の精子が確認された。各数値の合計は (200+250) になり 4 区画で 450 個そして差は (250-200) で 50 になる。表 2.5 から偶然におこる差 (42) を超えている。それゆえ、この結果は破棄して新しい標本をつくり直す。

例 2. 1+1 (1:2) で希釈し、標本 1 では 3 つの区画で 210 個の精子が確認された。一方、標本 2 では 3 つの区画で 200 個の精子が確認された。各数値の合計は (210+200) になり 6 区画で 410 個そして差は (210-200) で 10 になる。表 2.5 から偶然におこる差 (40) より少ない。それゆえ、この数値は許容される。

1+1 (1:2) で希釈した検体の精子濃度は $C = (N / n) \times (1 / 50)$ 個 / nL、または $(410 / 6) / 50 = 1.37$ 個 / nL、か 1.4×10^6 個 / mL (有効数字 2 桁)。

例 3. 1+1 (1:2) で希釈し、標本 1 では全 9 区画で 120 個の精子が確認された。一方、標本 2 では全 9 区画で 140 個の精子が確認された。各数値の合計は (120+140) になり 18 区画で 260 個そして差は (140-120) で 20 になる。表 2.5 から偶然におこる差 (32) より少ない。ゆえに、この数値は許容される。

各 chamber (総容積 1.8μL) の全 9 区画を評価するとき、1+1 (1:2) で希釈した検体の精子濃度は $C = (N / 1.8) \times 2$ 個 / μL = $(260 / 1.8) \times 2 = 288.8$ 個 / μL あるいは 290×10^3 個 / mL (有効数字 2 桁)。精子が 400 個よりも少なければ、表 2.2 より 260 個の精子での標本誤差 (約 6%) を記録する。

例 4. 1+1 (1:2) で希釈し、標本 1 では全 9 区画で 10 個の精子が確認された。一方、標本 2 では全 9 区画で 8 個の精子が確認された。25 個よりも少ない精子数では濃度は 56000 個 / mL 以下になる。「標本には 18 個の精子が確認された。正確な濃度を求めるにはあまりにも少ない (56000 個 / mL 以下)」と記録する。

例 5. 1+1 (1:2) で希釈し、両方の標本で精子が確認できなかった。

25 個よりも少ない精子数では濃度は 56000 個 / mL 以下になる。「標本には精子が確認できなかった。正確な濃度を求めるにはあまりにも少ない (56000 個 / mL 以下)」と記録する。

2.11.1.5. 射精での総精子数の計算

射精ごとの総精子数の計算と記録が推奨されるのは、そのパラメーターが精子をつくりだす精巣能力と精管の通過性の測定を備えているからである。
これは精子濃度に全射精量を掛けることで得られる。

2.11.2 大容量の使い捨てスライドでの低い精子濃度での評価（蛍光顕微鏡）

大容量の 100 μ m の標本厚さの chamber を使って濃度評価の感度を増加することができる（Cooper et al, 2006）。

大容量のスライドは、100 μ m の標本厚さの chamber が 2 カ所あり、各 25 μ L を保持できる。標本誤差を減らすため十分な数の精子（約 200 個を測定し、2 カ所の chamber で少なくとも総数で 400 個）を測定しなくてはならない（Box 2.7 と表 2.2 参照）。

- 精液検体をよく混ぜ均一化する（Box 2.3 参照）。
- 精液検体から一部をとり Hoechst33342 を含む（1mg / l）固定液で 1+1（1:2）で希釈する（2.7.5 参照）。項 2.8.2 にも注意する。

1+1（1:2）で希釈した最初の標本（表 2.3）で 2 個よりも精子が少ない時は全 chamber で精子数が約 200 個になるまで測定をするのが精子濃度の限界として適当である（Box2.12 参照）。

Box 2.12 100 μ mの標本厚さがある大容量の使い捨てchamberで標本ごとに200個の精子数の検査

もし最初の標本で強拡大下、4nLにわずか1個しか精子がない場合、理論的には0.25個/nL（250/ μ Lあるいは250000/mL）になる。

25 μ Lが保持できる大容量のchamberでは、6250個の精子がいることになる。検体を1+1（1:2）で希釈すればバックグラウンドを減らすことになる。chamberあたり3125個の精子数であれば、低い標本誤差を許容するのに十分である。

Note: この値はおおまかな概算になる。なぜなら少ない精子を測定し量も不正確かもしれないからである。

2.11.2.1. 手順

1. 上述のように、精液検体の一部をとり固定液で、1+1（1:2）で希釈したものを 2 つ作る。

2. スライドの各 chamber に希釈した 1 つの標本を 1 つの chamber に 25 μ L 入れる。
3. スライドを水平に置き 10 から 15 分室温で遮光し乾かないように湿潤箱（例えばペトリ皿に水で湿らせたろ紙をひいたもの）で静置する。色素は精子頭部に結合し不動化した細胞はこの間に chamber の底面に沈む。
4. 適切なダイロニックミラーとバリアーフィルターを使って蛍光顕微鏡にて 250 倍で検査する。
5. 各標本で少なくとも 200 個精子を測定する。標本誤差を低くして許容できる数値にするためである（Box 2.7 と表 2.2）。
6. ひとつの chamber を視野毎に効率よく検査する。カバーガラスのひとつの角から初めて、X 軸方向に沿って、反対側に向かって走査する。反対側まできたら一視野分、Y 軸方向に移動し、また戻って走査する。このジグザグ法を続けていく（図 2.9 参照）。視野を移動している間も目を離してはいけない。
7. 少なくとも 200 個に精子数が到達した視野の数を記録する。もう一方の chamber で同じ視野数を測定するためである。
8. 計算機器を使って精子の数と区画数を照合する。
9. もう一方の chamber に移って、仮に 200 個の精子数より少ないとしても、最初の標本と同じ数の視野（同じ量）を測定する。
10. 2 つの数値の合計と差を計算する。
11. 表 2.5（表 2.4 を少ない精子数に広げた）から許容できうる差を決める。あるいは図 A7.1 付録 7。（2 つの数値の最大の差を示して標本誤差だけで検体の 95% に起こると予期される数値）。
12. もし差が許容されるなら濃度を計算する（2.11.2.2 参照）。もし差があまりにも大きいなら、新しく標本を上記と同様に 2 つ作り直して再測定する（Box 2.10 参照）。
13. 精子の平均濃度を有効数字 2 桁で記録する。
14. 射精ごとの総精子数を計算する（2.11.1.5 参照）。

Note 1: 精子は、より広がった蛍光（大きな核）を持つ白血球や非精子細胞と違って明るい蛍光点（凝縮した核）で現れる（Zinaman et al, 1996）。

Note 2: 不確かな蛍光シグナルについては、位相差に切り替えて精子尾部を確認する。

2.11.2.2. 精液中の低い精子濃度の計算

精液中の精子濃度は、精子数（ N ）と精子数を検査した顕微鏡の視野数（1 視野の容積を v として Box 2.13 を参考に計算する）の容積（ n ）で割り、希釈倍率を掛けたものである。

$$C = (N / n) \times (1 / v) \times \text{希釈倍率}$$

250 倍であれば、視野の容積は 80 nL（Box 2.13 参照）そして 1+1（1:2）で希釈すると、濃度 $C = (N / n) \times (1 / 80) \times 2 \text{ 個 / nL} = (N / n) \times (1 / 40) \text{ 個 / nL}$ （精液 1mL あたり 10^6 個）。

400 倍であれば、視野の容積は 20nL（Box 2.13 参照）そして 1+1（1:2）で希釈すると、濃度 $C = (N / n) \times (1 / 20) \times 2 \text{ 個 / nL} = (N / n) \times (1 / 10) \text{ 個 / nL}$ （精液 1mL あたり 10^6 個）。

両方の chamber の全領域を評価したとき、精子の総数は両方の chamber の総容積（50 μ L）で割り、希釈倍率を掛けると 1 μ L あたりの精子濃度（精液 1mL あたり 1000 個）が得られる。

Box 2.13 強拡大下で観察した、100 μ mの標本厚さをもつ大容量の使い捨てchamberの容積

顕微鏡下の各視野の精液の量は、視野の領域と chamber の深さ（ここでは 100 μ m）による。（ πr^2 、 π は約 3.142 そして r は顕微鏡視野の半径である）

顕微鏡視野の直径は、ステージマイクロメーターあるいは接眼レンズのレンズ口径の直径を対物レンズの倍率で割ることで概算できる。

40 倍の対物レンズとレンズ口径 20mm の 10 倍の接眼レンズで顕微鏡視野は約 500 μ m（20mm / 40）の直径になる。この場合 $r=250\mu\text{m}$ 、 $r^2=62500\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 196375\mu\text{m}^2$ となり容積は $19637500\mu\text{m}^3$ あるいは約 20nL である。

25 倍の対物レンズとレンズ口径 25mm の 10 倍の接眼レンズで、顕微鏡視野は約 1000 μ m（25mm / 25）の直径になる。この場合 $r=500\mu\text{m}$ 、 $r^2=250000\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 785000\mu\text{m}^2$ となり容積は $78500000\mu\text{m}^3$ あるいは約 80nL である。

2.11.2.3. この方法の感度

もし各 chamber に精子が 200 個より少なければ、標本誤差は 5%を超えるだろう。両

方の検体標本に精子が 400 個より少なければ、算定した細胞数と標本誤差を記録する（表 2.2 参照）。

もし各 chamber で精子が 25 個よりも少なければ濃度は 1mL あたり 2000 個以下になる。全 chamber（25 μ L）を評価し、1+1（1:2）で希釈したときの標本誤差 20%の定量下限にあたる。観察された精子の数と「正確な濃度を測定するにはあまりにも精子の数が少ない（2000 個以下）」と注釈も記録する。

Comment: 検体一部の観察で運動精子がないからといって、残りの精液検体にも運動精子がないということではない。

2.11.2.4. 計算例

例 1. 1+1（1:2）で希釈し、標本 1 では 300 視野で 210 個の精子が確認された。一方、標本 2 では 300 視野で 300 個の精子が確認された。各数値の合計は（210+300）になり 600 視野で 510 個そして差は（300-210）で 90 になる。表 2.5 から偶然におこる差（44）を超えている。それゆえ、この結果は破棄して新しい標本をつくり直す。

例 2. 1+1（1:2）で希釈し、標本 1 では 400 視野で 200 個の精子が確認された。一方、標本 2 では 400 視野で 230 個の精子が確認された。各数値の合計は（200+230）になり 800 視野で 430 個そして差は（230-200）で 30 になる。表 2.5 から偶然におこる差（41）より少ない。それゆえ、この数値は許容される。

1+1（1:2）で希釈すれば、検体の精子濃度 $C = (N / n) \times (2 / v)$ 個 / nL になる。もし $v=20\text{nL}$ （400 倍で検鏡下、Box 2.13 参照）なら $C = (430 / 800) \times (2 / 20) = 0.0538$ 個 / nL、あるいは 54000 個 / mL（有効数字 2 桁）になる。

例 3. 1+1（1:2）で希釈し、標本 1 では全 chamber で 50 個の精子が確認された。一方、標本 2 では全 chamber で 70 個の精子が確認された。各数値の合計は（50+70）になり両方の chamber で 120 個になり、そして差は（70-50）で 20 になる。表 2.5 から偶然におこる差（21）より少ない。それゆえ、この数値は許容される。

両方の chamber の全領域（50 μ L）を評価したとき、1+1（1:2）で希釈した、検体の精子濃度 $C = (N / 50) \times 2$ 個 / μ L = $(120 / 50) \times 2 = 4.8$ 個 / μ L あるいは 4800 個 / mL（有効数字 2 桁）になる。

測定した精子が 400 個より少なければ表 2.2 より 120 個の精子の標準誤差（約 10%）を記録する。

例 4. 1+1（1:2）で希釈し、標本 1 では全 chamber で 20 個の精子が確認された。一方、標本 2 では全 chamber で 18 個の精子が確認された。25 個よりも少ない精子数で

は濃度は 2000 個 / mL 以下になる。「標本には 38 個の精子が確認された。正確な濃度を決めるにはあまりにも少ない (2000 個 / mL 以下)」と記録する。

例 5. 1+1 (1:2) で希釈し、両方の標本で精子が確認できなかった。

25 個よりも少ない精子数では濃度は 2000 個 / mL 以下になる。「標本には精子が確認できなかった。正確な濃度を決めるにはあまりにも少ない (2000 個 / mL 以下)」と記録する。

2.11.2.5. 射精での総精子数の計算

射精ごとの総精子数の計算と記録が推奨されるのは、そのパラメーターが精子をつくりだす精巣能力と精管の通過性の測定を備えているからである。

これは精子濃度に全射精量を掛けることで得られる。

2.12 精子以外の細胞の測定

精液中での非精子細胞の存在は、精巣障害 (未熟な精細胞)、精巣輸出管の病理学的障害 (繊毛房) あるいは副精腺 (白血球) の感染などを示している。精液中の非精子細胞 (上皮細胞、円形細胞 (精細胞や白血球) あるいは分離してしまった精子頭部と尾部) の数は、精子の場合 (2.8.3 参照) と同じ方法で血球計算盤を使って、固定した標本で概算することが出来る。しかしながら、精子を測定するために希釈された精液は、通常では非精子細胞を正確に評価するには、よほど高い濃度でない限り希釈されすぎている。精子と比較して、円形細胞が多いときはスライドグラス (2.12.1 参照) で評価する。もしくはペルオキシターゼ陽性細胞の算定中 (1.18.1.5 参照) に、それらの濃度を評価することができる。

2.12.1 精液中の円形細胞の濃度計算

円形細胞の濃度は、精子濃度と関連させながら、原精液を固定し染色したスメアーを評価して算定する (2.13.2 参照)。

N は円形細胞の数で、同じ視野数に 400 個の精子がいる。そして S は精子の濃度 ($\times 10^6$ / mL) である。そして円形細胞の濃度 ($\times 10^6$ / mL) である C は次の式で算定される

$$C = S \times (N / 400)。$$

2.12.2 この方法の感度

もし検体で円形細胞が精子よりも少ない場合 (例えば 400 個以下)、標本誤差は 5% を超えるだろう。この場合、算定した細胞数と標本誤差 (表 2.2 参照) を記録する。もし円形細胞が 25 個より少ない場合は、円形細胞の数と共に「あまりにも少なくて正確な濃度は測定できない。」と注釈をそえる。

2.12.3 計算例

例 1. ある検体の標本に、200 個の精子につき 21 個の円形細胞があった。もう一方の標本には 200 個の精子につき 39 個の円形細胞があった。数値の (21+39) の合計は 60、そして差は (39-21) で 18。表 2.5 から偶然に起こりうる差 (15) を超えている。それゆえ、その結果は廃棄して、新しい標本をつくりなおす。

例 2. ある検体の標本に、200 個の精子につき 24 個の円形細胞があった。もう一方の標本には 200 個の精子につき 36 個の円形細胞があった。数値の (24+36) の合計は 60、そして差は (36-24) で 12。表 2.5 から偶然に起こりうる差 (15) よりも少ない。それゆえ、この数値は許容できる。

400 個の精子につき 60 個の円形細胞だと、精子濃度は 1mL あたり 70×10^6 個になり円形細胞の濃度は $C = S \times (N / 400)$ 個 / mL から $70 \times 10^6 \times (60 / 400) = 10.5 \times 10^6$ 個 / mL あるいは、 10×10^6 個 / mL (有効数字 2 桁) になる。400 個より少なければ標本誤差は表 2.2 より 60 個 (約 13%) になる。

Comment 1: もし円形細胞の濃度が 1mL あたり 1×10^6 個を超えるととき原精液にはペルオキシターゼ活性 (2.18 参照) あるいは白血球マーカー (3.2 参照) を評価すべきである。それゆえ、濃度は正確に測定する。可能なら未熟な精細胞を染色標本で同定する (2.19 参照)。

Comment 2: 射精液中の円形細胞の総数は、炎症や精子形成の重度さを反映している。これは円形細胞の濃度と全射精液量を掛けることで得られる。

2.13 精子の形態

精子形態の決定は次の行程 (次の項目で示されている) で構成される。

- スライドグラスに精液塗抹標本を用意する (2.13.2 を参照)。
- スライドグラスを空気乾燥、固定、染色を行う (2.14 を参照)。
- 標本を長期間保存するならば、カバーグラスでスライドを封入する (2.14.2.4 と 2.14.2.5 を参照)。
- スライドグラスは油浸、明視野、1000 倍で観察する (2.15 と 2.16 を参照)。
- 正常形状 (2.15.1 を参照) か正常形状と異常形状の百分率を求めるために、繰り返しておおよそ 200 の精子細胞を評価する (2.15.2 を参照)。

- 繰り返した値が許容範囲に近似しているか比較する。もし、それらが近似であるならば、計算を続ける。そうでなければスライドガラスの再検査をする。

2.13.1 正常精子の概念

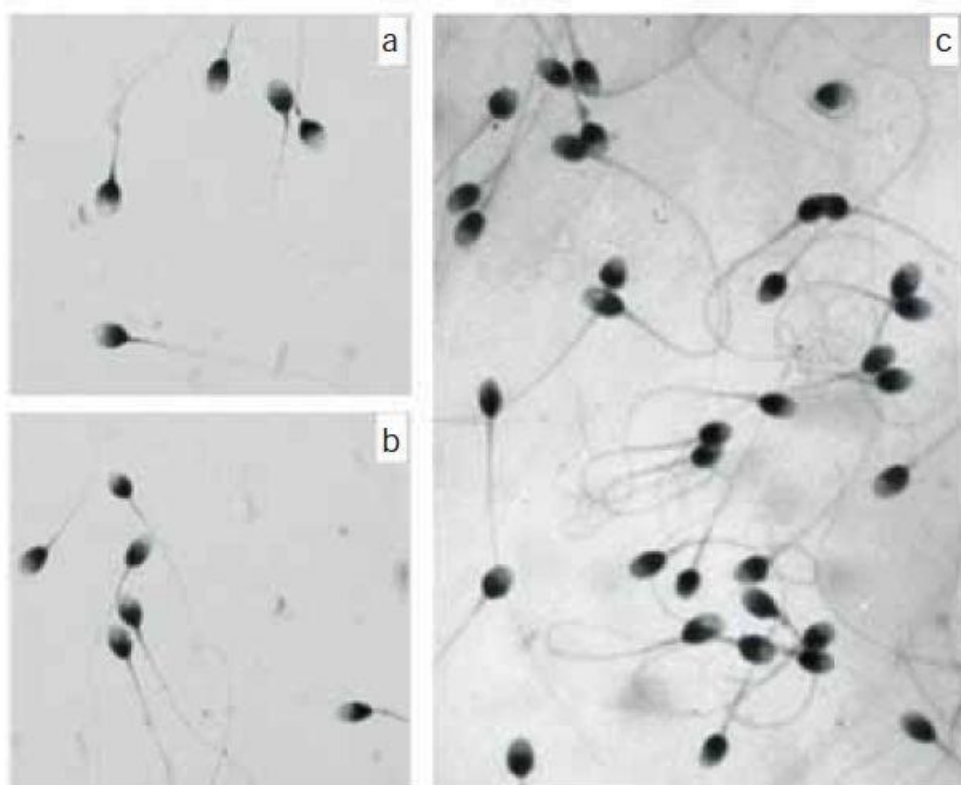
ヒト精子の変わり易い形態を評価するのは難しい。しかし、女性生殖器から回収された精子の観察、特に性交後の子宮頸管粘液中 (Fredricsson & Bjoerk,1997;Menkveld et al.,1990) と、透明帯の表面から回収した精子 (Menkveld et al.,1991; Liu & Baker, 1992a) (図 2.10 参照) の観察は、受精能を有する (形態学的に正常な) 精子の外観を決める上で役立つ。精子形態の信頼できる基準の適用により、正常形状率と諸々の妊娠に関する事項 (妊娠までの時間 (TTP)、生体内と体外での妊娠率) の関係は確立されており (Eggert-Kruse et al.,1996; Jouannet et al.,1988; Toner et al.,1995; Coetzee et al.,1998; Menkveld et al.,2001; Van Waart et al.,2001; Garrett et al.,2003; Liu,2003)、妊娠の予測に役立つであろう。

ここに示す分類体系の基本的な方針は、子宮頸内膜粘液中にみられる受精能を有する精子細胞群の何を識別して正常とするかは限界がある。これらのガイドラインを使うと、数検体は 25%の正常精子を越えるが (Menkveld et al.,2001)、妊娠と不妊男性両方との正常範囲は概ね 0~30%である。この低い値は必然的に低い基準となる。確かに、基準範囲と 3~5%の正常形状の基準は、体外受精 (Coetzee et al.,1998)、人工授精 (Van Waart,2001)、体内受精 (Van der Merwe et al.,2005) の研究にみられる。

ヒト透明帯は、また形態学的に似た精子群を選別している。しかし、そのような透明帯で選んだ精子は広い範囲の形状を示す (Liu et al.,1990; Garrett et al.,1997)。透明帯で選ぶ形態を示す父親からの精液中の運動精子率はやはり低い (8-25%) (Liu et al.,2003)。

図 2.10 形態学的に正常な精子

(a,b) 体外の透明帯から回収され、ショール染色された精子。(c) 性交後に子宮頸管粘液から回収され、パパニコロー染色された精子。精子頭部、中片部、主部に非常にわずかな傷を認める。尾部は曲がっているが、鋭い角張りはない。



(a,b) Liu et al., (2003) 提供 (c) Menkveld & Kruger (1990) 提供

2.13.2 精液塗抹標本の準備

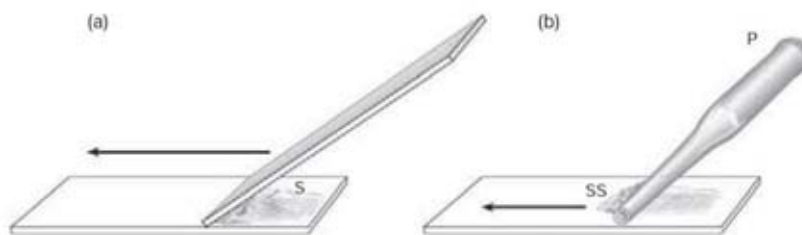
精液に固定剤を急激に加えることは、精子蛋白の変性により精子細胞が不明瞭になり、十分な観察ができなくなる。形態学的な分析には、固定と染色の前に空気乾燥した精液塗抹標本を準備するのが通例である。しかしながら、それらの行程は形態学的人工産物が生じるので、精液塗抹標本の空気乾燥は次と関連づけられている。

- 精子の大きさの変化：乾燥、固定、染色された精子は精液に見られる生きた精子より小さい。
- 未成熟精子頭部の拡大 (Soler et al., 2000)：そして浸透圧に感受性のある細胞質小滴の消失 (Abraham-Peskir et al., 2002; Cooper et al., 2004)。しかし、過度に残った細胞質の大量はそのままである。

- 染色または 1 枚のスライドガラスが破損した問題のあるケースでは、新鮮精液検体から、2 またはそれ以上の塗抹標本が作られるべきである。精子形態はスライドガラス間で明らかに違いがあるであろうから、評価はなるべく 2 枚のスライドガラスのそれぞれについて繰り返しで行なう。
- 精液検体容器を混和する（Box 2.3 を参照）。
- 半分を直ちに移す。懸濁液を沈めないように、時間をかけない。
- 繰り返し一部を移す前に精液検体を再度混和する。
- 違う状態では、違う塗抹方法を用いた方が良いかもしれない（図 2.11）。

図 2.11 精子形態のための精液塗抹方法

- (a) 希釈しない精液の羽毛法。精液滴（S）を角度を付けたスライドガラスの背部エッジに沿って広げ、スライドガラス上を前方に引き塗抹する。(b) 洗浄検体のピペット法。精子懸濁液（SS）の 1 滴を水平にしたピペット（P）を押すことにより、スライドガラスの表面に広げる。



2.13.2.1. 正常精液検体

この方法では、精液の一部は羽毛法でスライドガラスの全表面に塗抹される（図 2.11a, 2.12 参照）。

1. 糸くずのないティシュペーパーで強くこすることにより、つや消したスライドガラスの両方の表面をきれいにする。
2. 中硬度（HB か No.2）の鉛筆を用いて、つや消した部分に識別情報（例えば、識別番号、日付）を記入する。
3. 精子濃度により 5-10 μ L の精液一部をスライドガラスの端に置く。2 番目のスライドガラスを用いて、スライドガラスの表面に沿って精液滴を引く（図 2.11a, 2.12）。

引いたスライドガラスがつや消しでなければ、スライドガラスの両端を用いて 4 つの違った塗抹標本が作れる。

4. スライドガラスは 2.14 で示すように空気乾燥と染色をする。

Note 1: 鉛筆は固定や染色で消えない。ところが、インクや永久的なマーカーは消える。

Note 2: 塗抹する前に2秒以上、スライドガラスの端に精液滴を置いてはならない。

Note 3: 必ず精液滴の前方へ精液がスライドガラスを横切るようにスライドガラスを引く。背後から精液を押してはならない。

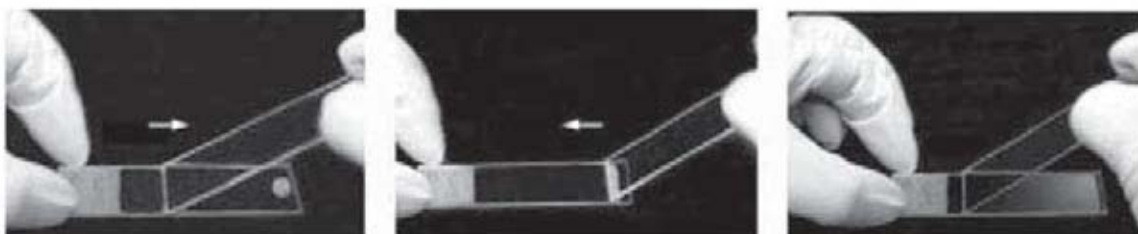
塗抹標本の良否（精子の最小限の重なり）は次による。

- 精液量と精子濃度：精子が少なければ、お互いの重なりあいは少ない。
- 引くスライドガラスの角度 (Hotchkiss 1945)：角度が小さければ塗抹は薄くなる。
- 塗抹のスピード (Eliasson 1971)：早くなるほど塗抹は厚くなる。

10 μ L の量、45°の角度、約 1 秒間の塗抹から始めてみる。スライドガラスの精子の重なりを減らすため、必要に応じてそれらのパラメーターを変える (Menkveld et al.,1990)。精液の粘性が低い場合は羽毛法が良いが、しばしば極端に粘性の精液では不適當となる (図 2.12 と 2.13.2.3 を参照)。

図 2.12 正常精液塗抹標本の準備

動作の感覚をつかむため、引くスライドガラスを 45°に置き、精液の半分に接するまで動かす（左写真）。スライドガラスの端に沿って走らせる（中央写真）。引くスライドガラスを静かに（概ね 1 秒以上）戻す（右写真）。



C Brazil 提供

低い精子濃度 ($<2 \times 10^6$ / mL)、粘性か残骸物の多い検体、または自動形態解析 (computer-assisted morphHology) が行われている場合 (3.5.4 を参照) は、他の方法が必要となる。

2.13.2.2. 低い精子濃度の検体

精子濃度が低い (例えば $<2 \times 10^6$ / mL) 場合は、検体を濃縮する。

1. 検体を 600g で 10 分、遠心分離する。
2. 上澄みのほとんどを除去する。
3. 緩やかなピペット操作で、沈殿物を残った上澄みで再懸濁する。
4. 可能な限り高い精子濃度が得られる。ほぼ 50×10^6 / mL 以上の濃度にはしない。
5. 正常検体として扱う (2.13.2.1 を参照)

Note: 遠心分離は精子形態に影響を及ぼす可能性があり、記載しておく。

2.13.2.3. 粘性の精液検体

時々、良好な塗抹ができないことがある。それは精液性状の粘性が高く、均等な厚さにならないからである。粘性の検体は、液化の乏しい検体と同様の方法 (2.3.1.1 参照) か、洗浄 (2.13.2.4 参照) により処理することができる。

Note: これらの方法は精子形態に影響を及ぼす可能性があり、記載しておく。

2.13.2.4. 残渣が多いか粘性の精液検体の洗浄と、自動精子形態解析で背景を減ずるための洗浄。

残渣や大量の微粒子成分 (粘性検体にみられるような) は、スライドガラスの端に精子の頭部が集まる原因となり分類を難しくさせる。これらの検体は次のように洗う。

1. 室温にて、精液の半量 (精子濃度により 0.2-0.5mL) を 10mL の生理食塩水 (純水 100mL に NaCl 0.9g) で希釈する。
2. 800g で 10 分間遠心分離をする。
3. 上清のほとんどを捨てる。

4. 緩やかなピペティングで、残っている上清 (概略 20-40 μ L) に沈渣を再懸濁する。
5. パスツールピペットで、5-10 μ L の懸濁液をスライドグラスに置き、塗抹を作成する (図 2.11b を参照)。
6. 塗抹標本が均等に広がっていることを確認し、位相差顕微鏡の 400 倍で観察する。
7. 400 倍の視野で、かたまり、重なりあっている精子細胞が少なくとも 40 個はあることをチェックする。
8. スライドグラスを空気乾燥し、2.14 で示すように染色する。

Note 1: 多くの精子が重なりあっていれば、より少ない精液により他の塗抹を作成する。

Note 2: 精子が少ない場合は、より多くの精液で他の塗抹を作成する。

Note 3: 検体の洗浄は精子形態に影響を及ぼすので、記載をしておく。

Comment: 塗抹を作成する前に、30 分以上の液化をした精液では、背景の染色が減ずるかもしれない。

2.14 染色法

精液塗抹標本は空気乾燥し、精子の詳細な観察のために固定と染色がされる。パパニコロー、ショールか Diff-Quik 染色が推奨される。

明視野顕微鏡にて、これらの 3 つの染色法で、頭部の先体域は淡い青に染まり、先体後部域は、暗い青に染まる。中片部は、少し赤く染まり、尾部は青か赤みを帯びて染まる。たいてい頭部と中片部周囲に位置する過度の残存細胞質はピンクか赤 (パパニコロー染色) か赤みを帯びた橙色 (ショール染色) に染まる。

Comment: 迅速染色法、つまり精液の 1 滴をスライドグラスで固定と染色するもので、市販品が入手可能である。塗抹手技により均等な精子分布でない場合は勧められない。ここに示す形態学的な分類のための必要な細部の観察には不向きであり、迅速法は推奨されない。

2.14.1 伝統的な固定法と続いての染色法

本マニュアルでは、次の方法によりエタノール非溶性封入剤で封入されたスライドグラスからの像を示した。

2.14.2.1. 試薬

1. パパニコロー染色：商品を使用するか、付録 4 と A4.10 を参照する。
2. 酸性エタノール：1.0mL の濃塩酸を 70% (V/V) エタノールの 200mL に加える。
3. キシレン：エタノール 1+1 (1:2)：100%エタノールとキシレンを等量混ぜる。

Note 1: キシレンは健康を害する危険性があるので、ドラフトのなかで扱うべきである。

Note 2: 塗抹標本は少なくとも4時間は空気乾燥をし、固定や染色の前には1週間までの保存である。

2.14.2.2. 空気乾燥した精液塗抹標本の固定

1. 少なくとも 15 分間は 95% (V/V) エタノールにスライドグラスを浸す。

2.14.2.3. 固定した精液塗抹標本の染色

連続的にスライドグラスを次の通り浸す。

- | | | |
|----|-----------------|-------|
| 1. | 80% (V/V) エタノール | 30 秒 |
| 2. | 50% (V/V) エタノール | 30 秒 |
| 3. | 純水 | 30 秒 |
| 4. | ハリスのヘマトキシリン | 4 分 |
| 5. | 純水 | 30 秒 |
| 6. | 酸性エタノール | 4-8 回 |
| 7. | 冷流水 | 5 分 |
| 8. | 50% (V/V) エタノール | 0 秒 |

- | | |
|---------------------|------------|
| 9. 80% (V/V) エタノール | 30 秒 |
| 10. 95% (V/V) エタノール | 少なくとも 15 分 |
| 11. Orange G-6 染色 | 1 分 |
| 12. 95%エタノール | 30 秒 |
| 13. 95%エタノール | 30 秒 |
| 14. 95%エタノール | 30 秒 |
| 15. EA-50 染色 | 1 分 |
| 16. 95%エタノール | 30 秒 |
| 17. 95%エタノール | 30 秒 |
| 18. 100%エタノール | 15 秒 |
| 19. 100%エタノール | 15 秒 |

*1 回はだいたい 1 秒浸すことに相当

Note 1: エタノール固定は細胞の脱水を起こす。従って、塗抹標本は直接95%エタノールの固定から染色は80%エタノールにわずか10秒で良い。一方、固定後空気乾燥した標本は50%エタノールにより長く（2-3分）入れなければいけない。

Note 2: 上記6で、4回から始めて、満足な結果になるまで続ける。このステップは重要で、最終的な染色の鮮明度を劇的に変える脱色期間となる。もし、このステップを省略すれば、精子や背景は暗くなり、回数を増やせば精子や背景ははっきりしなくなる。

Note 3: スライドガラスは封入しないか封入して観ることができる。

2.14.2.4. 封入前の染色した精液塗抹標本の扱い。

標本の封入液として 2 種類がある。: エタノール溶性・非溶性封入剤

- エタノール溶性の封入剤は、標本がまだエタノールで湿った状態で直接に使う。
- エタノール非溶性の封入剤は、上記 19 のステップから直接に次のステップに進む（ドラフト内で扱う）。

1. キシレン：エタノール、1+1（1:2） 1分

2. 100%キシレン 1分

一回ごと 1 枚のスライドグラスをキシレン染色容器から移し、封入の際にスライドグラスが完全にキシレンで湿った状態で 1-2 秒液を切る。

2.14.2.5. 染色した精液塗抹標本の封入

1. スライドグラスに 2-3 滴の封入剤を滴下する。
2. 直接塗抹標本上にカバーグラス（24mm×50mm か 24mm×60mm が最も使いやすい）を置く。
3. 気泡が入らないように、スライドグラスの長い側から封入剤と接する。
4. 必要であれば、気泡がスライドグラス端から抜けるように静かにスライドグラスの上を押さえる。
5. スライドグラスの裏面から過剰なキシレン（使った場合）を拭き取る。
6. 封入した塗抹標本をスライド乾燥ラックに水平に入れるか、ドラフト内で 24 時間吸収紙の上で乾燥させる。

2.14.3 精子形態学のためのショール染色方法

ショール染色は、パパニコロー染色とほぼ同じ正常形状率を示す（Meschede et al.,1993）。

2.14.3.1. 試薬

1. ハリス ヘマトキシリン：パパニコローNo.1
2. ショール液：できあいを買うか、次のように用意する。温めた 50%（V / V）エタノール 220mL にショールの粉末を 4g 溶かす。次に冷やし、氷酢酸の 2.0mL を加

え（ドラフト内）、濾過する。

3. 酢酸エタノール：95%（V/V）エタノールの 75mL に氷酢酸 25mL を加える。
4. アンモニア・エタノール：75%（V/V）エタノールの 95mL に 25%（V/V）水酸化アンモニウムの 5mL を加える。

2.14.3.2. 空気乾燥精液塗抹標本の固定

スライドガラスを酢酸エタノールか 75%（V/V）エタノールに 1 時間浸ける。

2.14.3.3. 固定標本の染色

スライドガラスを連続的に次に浸す。

- | | |
|-------------------|----------|
| 1. 流水 | 12-15 回* |
| 2. ヘマトキシリン | 1-2 分 |
| 3. 流水 | 12-15 回* |
| 4. アンモニア・エタノール | 10 回* |
| 5. 流水 | 12-15 回* |
| 6. 50%（V/V）エタノール | 5 分 |
| 7. ショール染色 | 3-5 分 |
| 8. 50%（V/V）エタノール | 5 分 |
| 9. 75%（V/V）エタノール | 5 分 |
| 10. 95%（V/V）エタノール | 5 分 |

*1 回は約 1 秒間浸すのに相当

Note: スライドは未封入か封入で観ることができる。

2.14.3.4. 染色標本の封入

2.14.2.4 と 2.14.2.5 を参照。

2.14.4 形態学的精子観察のための迅速染色方法

迅速染色法は、特に分析結果を 1 日で出す必要がある病院のラボで役立つ。いくつかの分色法は有用である (Kruger et al., 1987)。塗末標本を迅速染色法で染色すると、濃く背景が染まり、パパニコロー染色法より標本の質が劣る場合がある。

2.14.4.1. 試薬

1. Diff-Quik 迅速染色キットの構成 :
 - a) 固定液 (トリアリルメタン色素溶解エタノール)
 - b) 染色液 1 (eosin 好性キサnten)
 - c) 染色液 2 (好塩基性チアジン)
2. 固定液 : トリアリルメタン 1.8mg を 95% (v/v) メタノール 1000mL に溶解
3. 固定液 : 95% (v/v) メタノール

2.14.4.2. 精液塗末標本の乾燥固定法

スライドグラスをトリアリルメタン固定液 (Diff-Quik キットまたは調整したもの) に 15 秒間、または 95%メタノールに 1 時間浸漬する。スライドグラスを濾紙等の上に垂直に置き、余剰な液を除去する。

2.14.4.3. 固定した精液塗末標本の染色

連続的にスライドグラスを浸漬する :

- | | |
|------------|------------------|
| 1. 迅速染色液 1 | 10 秒 |
| 2. 迅速染色液 2 | 5 秒 |
| 3. 水道水にて洗浄 | 10~15 回、過度な染色を除去 |

ステップごとにスライドを濾紙等に垂直に置き、余剰な液を除去する。

Note 1: スライドグラスはマウントの有無に関わらず観察することが可能である。

Note 2: 背景が濃染の場合、精液サンプルを洗浄すべきであり（2.13.2.4参照）、新たにスライドガラスを作成、染色を行う。洗浄は精子の形態に影響を及ぼす可能性があるため、洗浄を行った際には記録をする必要がある。

2.14.4.4. 染色した精液塗末標本の封入

2.14.2.4 項、2.14.2.5 項参照。

2.15 染色した標本の観察

染色した標本の観察には、少なくとも 100 倍の油浸レンズに 10 倍の接眼レンズの使用が望ましい。封入されていない組織またはカバーガラスとレンズの間に、細胞とガラスの屈折率（約 1.5 と 1.50～1.58）と同等の屈折率の液体を満たすことで、より鮮明な像が得ることができる。これには通常油浸レンズ用オイル（屈折率 1.52）が用いられる。封入剤はこれらと同様の屈折率である（1.50～1.55、Box 2.14 参照）。

2.15.1 正常形態精子の分類

精子の形態学的評価は、外部機関の評価基準における解釈の多様性や客観性の欠如により多くの障害が付随している（7.13.2 参照）。ここでの推奨する方法はシンプルな正常、異常の分類、異常精子の異常個所分類の方法である。これは精子の形態学的評価の際の評価基準に適応されるべきである（Kruger et al., 1986; Menkveld et al., 1990; Coetzee et al., 1998）。正常下限値（2.17.3 参照）は以下に記述された方法を用いた時だけ有効である。

精子は頭部、頸部、中片部、尾部および終部から成る。終部は光学顕微鏡では観察が困難であり、頭部（および頸部）と尾部（中片部と尾部）で構成されているように観察される。正常と考えられる精子は頭部と尾部いずれも正常でなければならない。わずかでも正常との判断に迷う場合、異常と判別する。

- 正常な精子の頭部は輪郭が滑らかで卵円形である。また、頭部の 40～70%に先体部が構成されていることが詳細に明らかになっている（Menkveld et al., 2001）。先体部には大きな空胞や2個以上の小さな空胞を含まず、これらが精子の頭部の 20%以上を占めてはならない。また、頭部の先体部以外も空胞を含んではならない。
- 常に精子の中片部は細長く、通常頭部と同程度の長さである。また、頭部と中片部の主軸が整列していなければならない。中片部に精子頭部の 3 分の 1 以上の大きさの細胞質の残留があるものは、異常の 1 つと考えられる（Mortimer & Menkveld,

2001)。

- 常に精子の尾部は一定の太さで中片部よりも細く、約 $45\mu\text{m}$ (頭部の 10 倍程度の長さ) である。尾部の後部は輪状になっていることが多く (図. 2.10c 参照)、輪郭が鮮明でないものは鞭毛 (尾部) が破壊されていることを示している。

Comment 1: この判断方法では、他の部分が著しい異常でない限り、頭部が最も重要である。

Comment 2: 接眼マイクロメーターは、精子頭部の大きさによる正常、異常の判別に便利である。

Comment 3: P77 のパパニコロー染色された精子の頭部の寸法 (2.14.2 の方法にて染色、正常として評価された) は、コンピューターシステム (反復測定の変動係数 2~7%) で計測したところ、全長 $4.1\mu\text{m}$ 、95%CI 3.7-4.7 ; 幅 $2.8\mu\text{m}$ 、95%CI 2.5-3.2 ; 全長-幅比 1.5、95%CI 1.3-1.8 であった。

Comment 4: P74 のパパニコロー染色された精子の中片部 (2.14.2 の方法にて染色、正常として評価された) は、同様のコンピューターシステムで測定したところ全長 $4.0\mu\text{m}$ 、95%CI 3.3-5.2 ; 幅 $0.6\mu\text{m}$ 、95% CI 0.5-0.7 であった。

Comment 5: コイル状の尾部 ($>360^\circ$ 、図 2.13 参照) は精巣上体機能不全を示している可能性がある (Pelfrey et al., 1982)。

この精子の形態学的評価は、精子の形態の僅かな差異の識別や判断を学習する場合に応用でき、有用である (正常な精子の頭部と尾部の境界は項 2.16 の図版 1-12 と解説を参照)。

2.15.2 異常形態精子の分類

ヒトの精液サンプルには、様々な異常精子が含まれている。不完全な精子形成やいくつかの精巣上体の病態は、異常形態精子の割合を増加させる。形態学的異常は複合的であることが多い。異常精子は、異常の種類にもよるが一般的に受精能が低く、これはおそらく異常な DNA を持つことに由来している。形態学的異常は、DNA の断片化の増加 (Gandini et al., 2000)、構造的な染色体異常 (Lee et al., 1996)、未成熟染色体 (Dadoune et al., 1988) や異数体 (Devillard et al. 2002; Martin et al., 2003) の発生率増加と関係している。形態学的に頭部の形に重点を置くが、しかしながら尾部 (中片部と尾部) の形も考慮される。

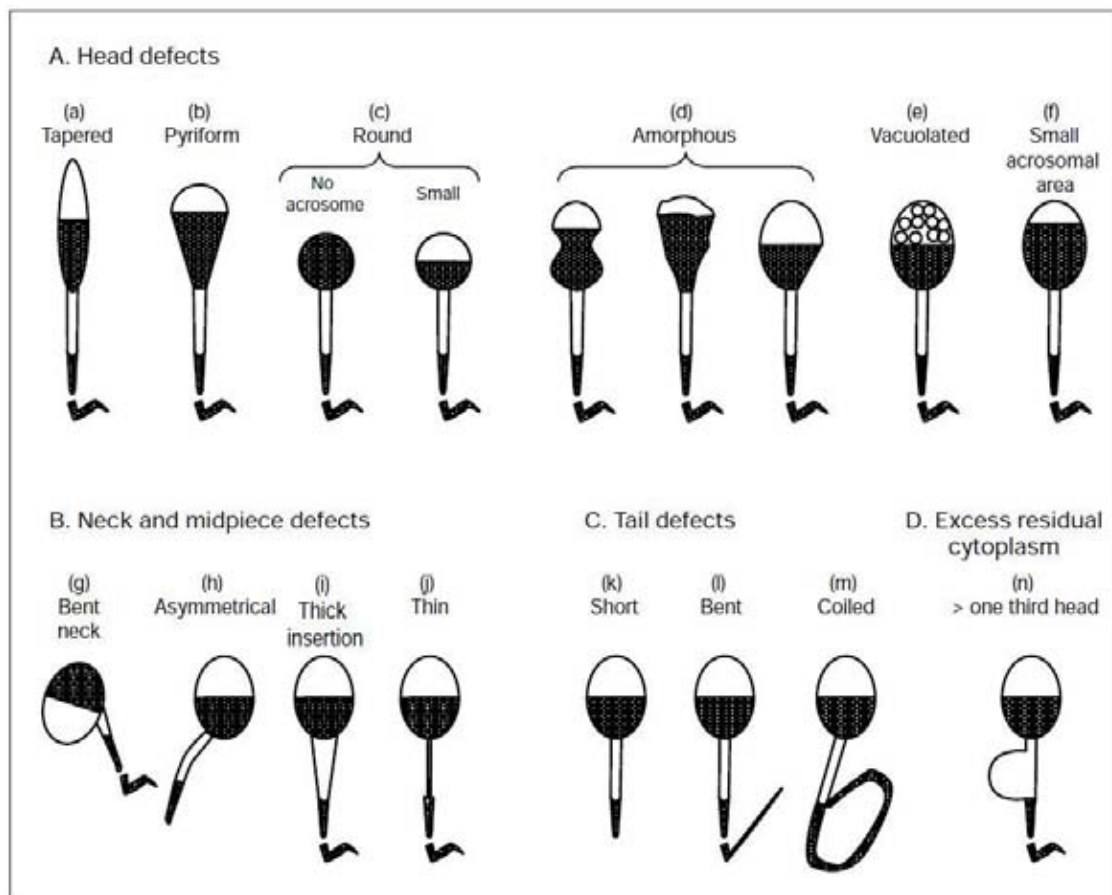
以下の項には注意が必要である (図 2.13 参照)。

- 頭部異常：大きいものや小さいもの、細型、洋梨型、円形、無定形、空胞化したもの（空胞が2個以上、または、無染色の空胞が頭部の20%以上を占める）、先体部より後方に空胞をもつもの、先体部が小さい、または大きい（40%以下、または70%以上）、双頭、またはこれらの複合。
- 頸部および中片部異常：頭部から中片部が非対称に続いている、厚いまたは不規則である、急な屈曲がある、異常に薄い、またはこれらの複合。
- 尾部異常：短い、複数の尾部がある、壊れている、滑らかにヘアピン状に曲がっている、急に蹄状に曲がっている。幅が不規則である、コイル状である、またはこれらの複合。
- 余剰な残留細胞質（ERC）：これは精子形成過程で生じる異常である。頭部の大きさの3分の1、またはそれ以上の細胞質が染色された場合、それはしばしば中片部の異常と関係した（Mortimer & Menkveld., 2001）異常である。この細胞質の余剰による異常は、細胞質滴としてはならない（Cooper, 2005）。

Comment 1: 細胞質滴（膜-結合型小胞が中片部、または頭部頸部結合部上にある）は、ヒト精子の生理学的機能上は正常である。精液や頸管粘液、培養液中では、細胞質滴が中片部まで伸びるように肥大している場合、細胞質滴は位相差顕微鏡や微分干渉顕微鏡、X線顕微鏡を用いて観察される（Abraham-peskir., 2002、Feticv et al., 2005）。

Comment 2: 細胞質滴は浸透圧に敏感であり、通常の空気乾燥を行うのはあまり適切ではない（Chantler & Abraham-Peskir., 2004、Cooper et al., 2004）。また、中片部に小さな膨満があるものは鮮明に染色されない。細胞質滴は、固定、染色されたスライドガラス上で頭部の3分の1未満の大きさのものであれば（Mortimer & Menkveld., 2001）、異常とは考えない。

図 2.13 ヒト精子の異常形態図



Kruger et al.,1993提供

2.16 形態図版 1-14

図版 1-14 の全ての顕微鏡像を以前にあった厳密な形態学的評価基準に応用し、測定した。この精子形態学的分析は主観的であり特に標準化が難しい。このような理由から、多数の特徴的な精子頭部および尾部の基準を基にして正常と異常の境の設定を試みた。図版はこの分野の専門家である **Thinus Kruger** 博士によって評価されたものである。この評価は、異常の表示に一貫性を持たせるために補足を付けた。

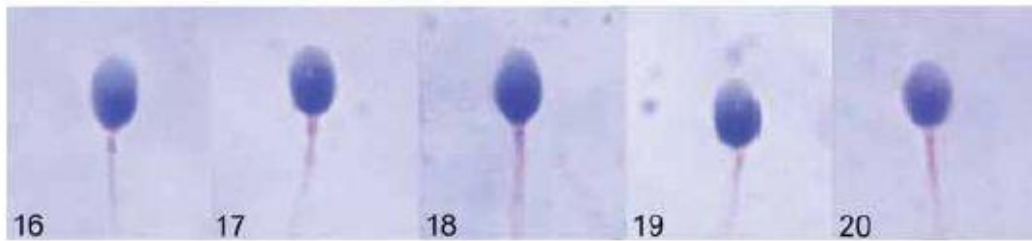
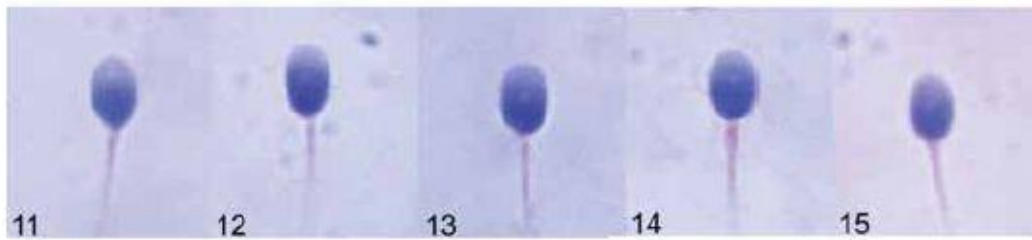
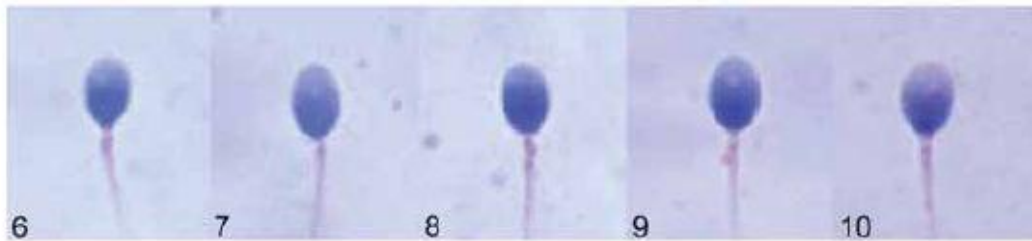
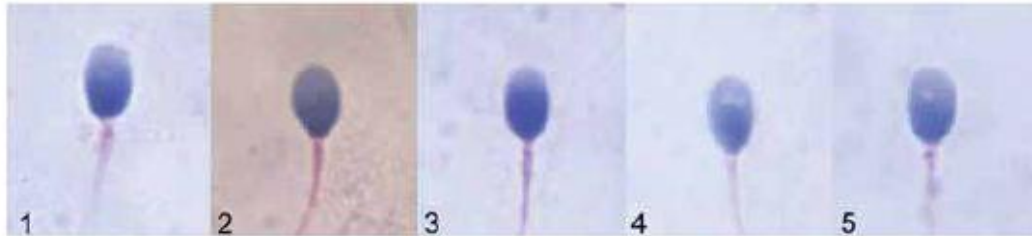
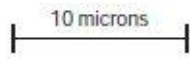
色が逆になっている表は、それぞれの精子の顕微鏡像の形態学的評価を表している。この表は、精子の頭部の形が正常か異常か、形以外での異常の詳細、中片部および尾部の形状、さらに精子を全体的に見た場合正常かどうかを示している。その他の関連性のある所見は **Comment** 欄の下に記した。更に詳しい **Comment** は表 2.6 で説明してある。

表 2.6 図版 1-14 使用されている解説の説明

<40% arc	精子頭部に占める先体の割合が 40%以下
>70% arc	精子頭部に占める先体の割合が 70%以上
>one third	細胞質異常（頭部に占める割合が 3 分の 1 以上）（ERC）
<one third	細胞質正常（頭部に占める割合が 3 分の 1 以下）（CD）
abnormal	異常（画像参照）
amorphous	頭部形状（図 2.13d 参照）
bacilli	バクテリア
bent	不自然なくの字湾曲（図 2.13g、j 参照）
coiled	異常（画像参照）
CD	細胞質滴
cytoplasm	細胞質、または細胞質滴の余剰
degenerating	異常（退化白血球、画像参照）
degenerating	異常（退化精子細胞、画像参照）
degect	異常（欠失、画像参照）
double	異常（重複、画像参照）
epithelial cell	男性の精管上皮細胞
ERC	余剰細胞質残留（図 2.13 参照）
flat	頭部形状が楕円形でない
focus	焦点外（評価不可）
if PP OK	画像内に尾部全域が収まっていない（画像の範囲内が正常な場合、精子
insert	頭部と尾部の結合部の軸が一方に寄っている
irreg	輪郭が不規則
looped	尾部が湾曲し、尾部自体の上に重なっている
macrophage	食作用系の白血球（マクロファージ）
monocyte	顆粒性の白血球（単球）
spermatide	精細胞
no acro	先体欠損
normal	頸管粘液中の精子に類似
not assessd	重なり、または焦点不合により観察不可
overlapping	尾部の重なりにより頭部不鮮明
PA vac	先体部より後部に空胞有り
pinhead	精子ではない（染色体が存在しない）
polymorph	多核白血球

pyriform	頭部形状（図 2.13b 参照）
round	頭部形状（図 2.13c 参照）
side view	輪郭が見られる
samLI	頭部の大きさ
spermatide	未成熟生殖細胞
spermatocyte	未成熟生殖細胞
tapered	頭部形状（図 2.13a 参照）
thick	異常（画像参照）
too long	異常（画像参照）
>2 vac	空胞が 2 つ以上

Plate 1

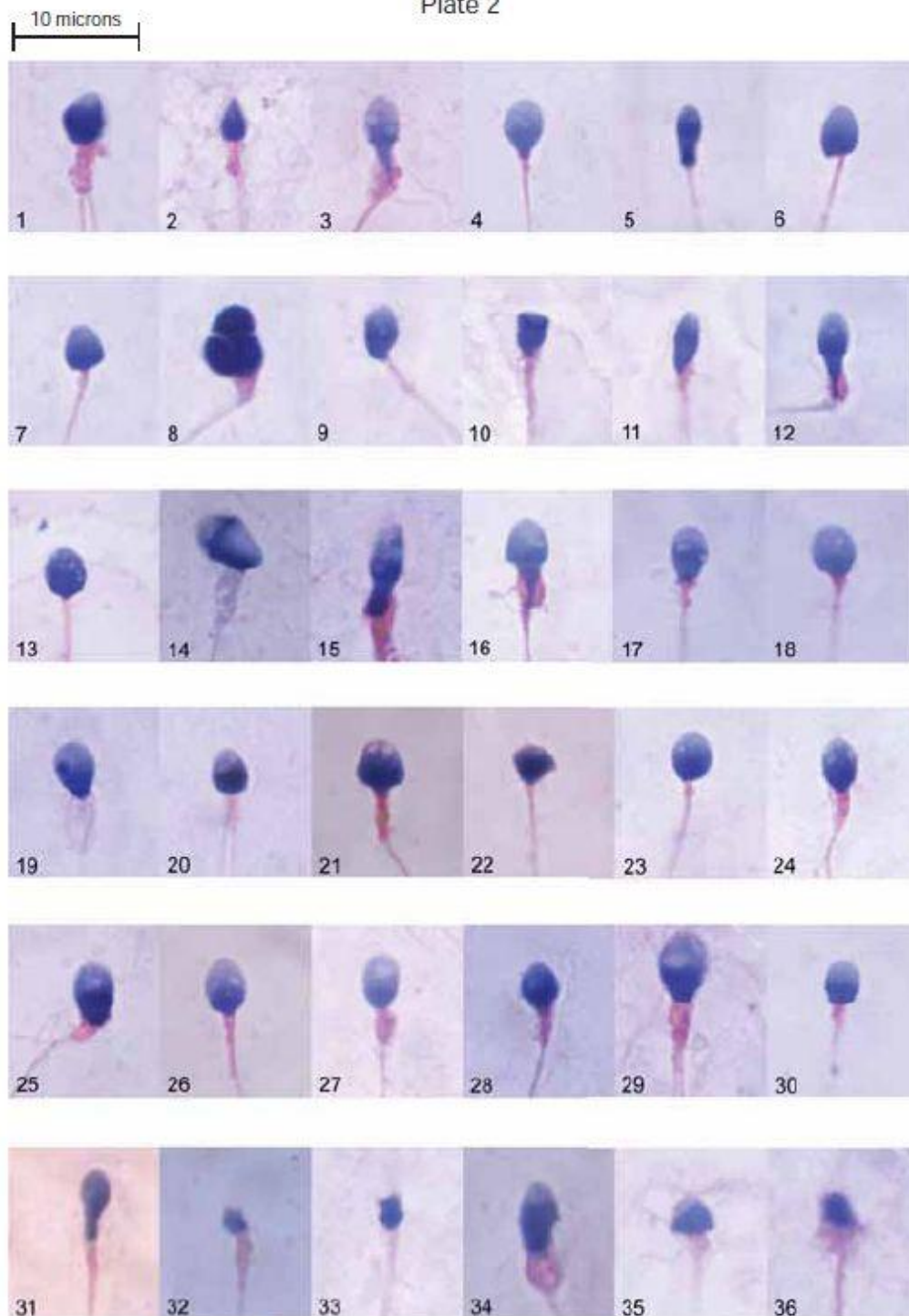


Micrographs courtesy of C Brazil.

図版1における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常		正常		正常	
2	正常		正常		正常	
3	正常		正常		正常	
4	正常		正常		正常	
5	正常		正常		正常	
6	正常		正常		正常	
7	正常		正常		正常	
8	正常		正常		正常	
9	正常		正常		正常	
10	正常		正常		正常	
11	正常		正常		正常	
12	正常		正常		正常	
13	正常		正常		正常	
14	正常		正常		正常	
15	正常		正常		正常	
16	正常		正常		正常	
17	正常		正常		正常	
18	正常		正常		正常	
19	正常		正常		正常	
20	正常		正常		正常	

Plate 2

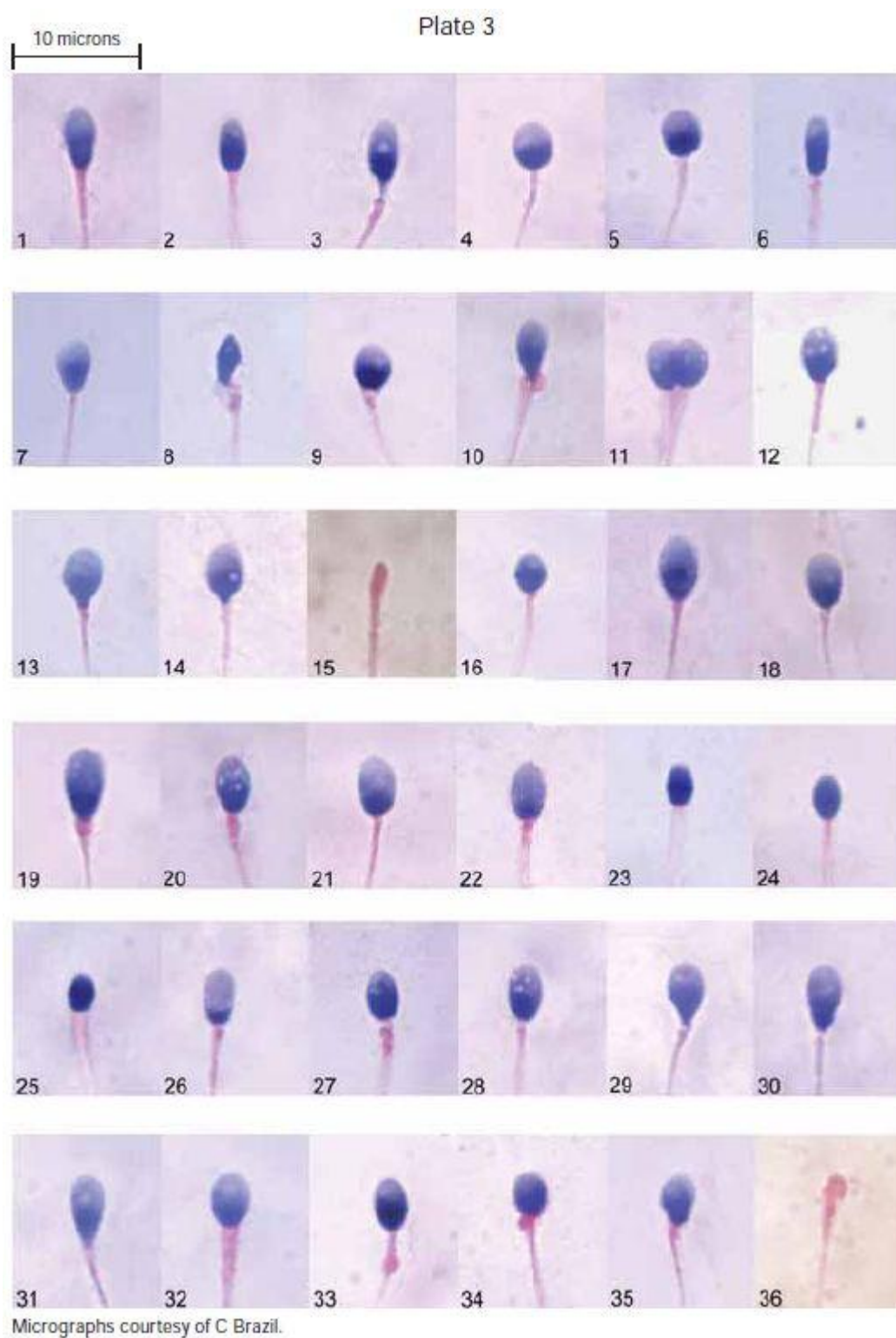


Micrographs courtesy of C. Brazil.

図版2における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常		厚い	2本	異常	
2	異常		いびつ		異常	輪郭明瞭
3	異常	洋ナシ型	湾曲、いびつ、 細胞質残留		異常	異常1/3以上
4	異常				異常	
5	異常	洋ナシ型			異常	
6	異常				異常	
7	異常				異常	
8	異常		厚い		異常	
9	異常		偏り		異常	
10	異常				異常	
11	異常				異常	
12	異常	洋ナシ型		湾曲	異常	
13	異常	空胞2個超 先体後部空胞			異常	
14	異常		厚い		異常	
15	異常	洋ナシ型	厚い、 細胞質残留		異常	異常1/3以上
16	異常	洋ナシ型	細胞質残留		異常	異常1/3以上
17	正常	先体後部空胞			異常	
18	異常		厚い、偏り		異常	
19	異常		異常		異常	
20	異常		厚い		異常	
21	異常		厚い		異常	
22	異常				異常	
23	異常				異常	
24	正常	空胞2個超	厚い		異常	
25	異常		厚い、湾曲		異常	
26	異常		厚い		異常	

27	異常	先体70%超	厚い		異常	
28	異常		厚い		異常	
29	異常		厚い		異常	
30	異常		厚い		異常	
31	異常	洋ナシ型	厚い		異常	
32	異常	小型	厚い		異常	
33	異常	小型	厚い		異常	
34	異常		細胞質残留		異常	異常1/3以上
35	異常		厚い		異常	
36			厚い		異常	



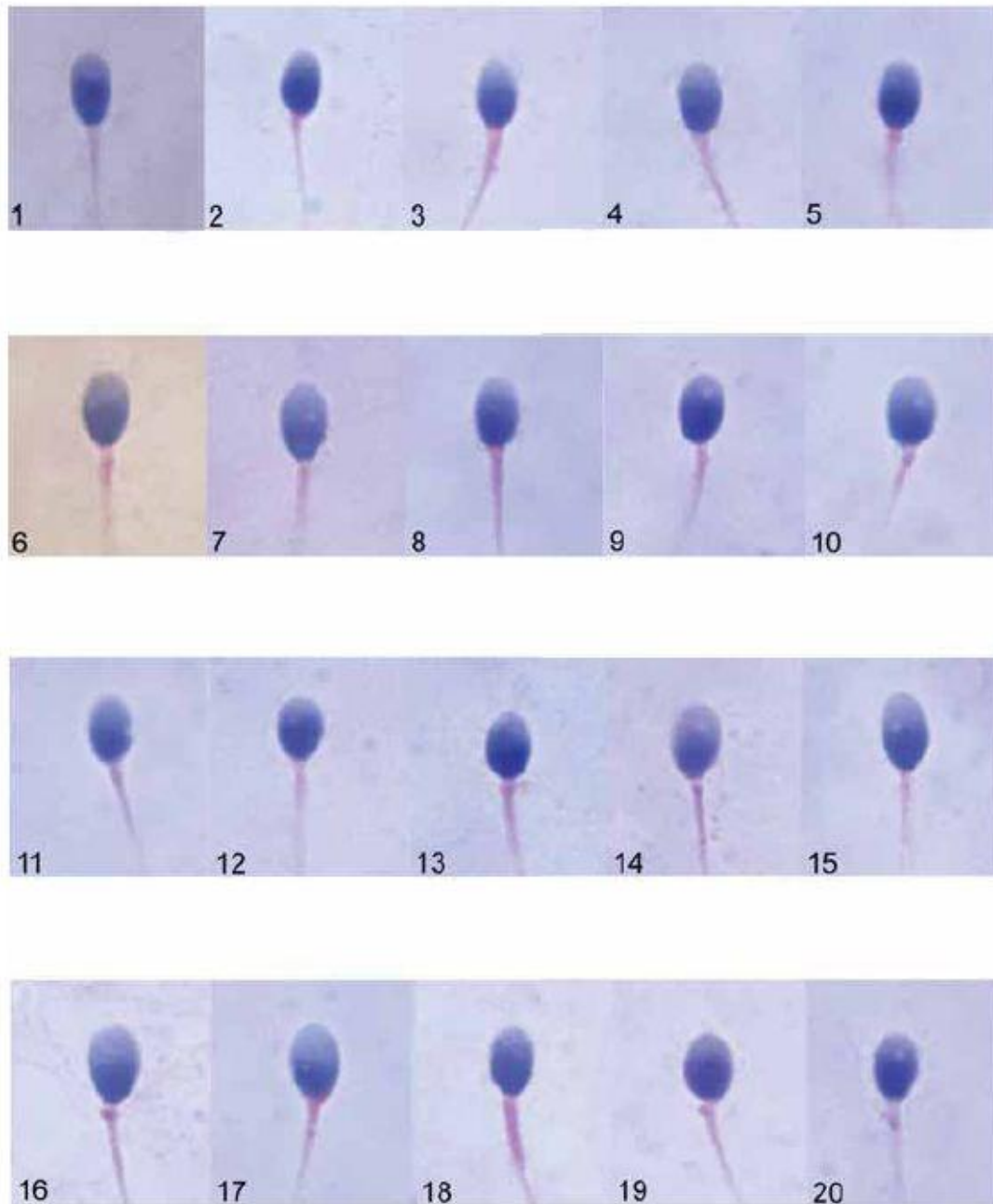
図版3における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常	先細	厚い		異常	
2	異常				異常	
3	異常		いびつ		異常	
4	異常	円形			異常	
5	異常	円形			異常	
6	異常	先細小型			異常	
7	異常	先細小型			異常	
8	異常	無定形	厚い		異常	
9	異常	円形	厚い		異常	
10	異常	先細	いびつ、厚い		異常	
11	—				—	頭2個
12	異常	空胞2個超 先体後部空胞			異常	
13	異常				異常	
14	正常	先体後部空胞			異常	
15	—				—	頭部無し
16	異常	小型			異常	
17	正常	長型			異常	
18	正常		厚い		異常	
19	異常		厚い		異常	
20	異常	空胞2個超	偏り		異常	
21	正常	先体70%超			異常	
22	異常	先体70%超			異常	
23	異常	先体40%未満、 小型			異常	
24	異常	先体40%未満、 小型			異常	
25	異常	先体40%未満、 小型			異常	
26	異常	先体70%超			異常	

27	異常	先体40%未満、 空胞2個超	いびつ		異常	
28	正常	空胞2個超			異常	
29	異常	先細			異常	
30	異常	先細			異常	
31	異常	先細			異常	
32	正常		厚い		異常	
33	正常		厚い		異常	
34	異常	先体40%未満	厚い		異常	
35	異常		厚い、湾曲		異常	
36	—				—	頭部無し

Plate 4

10 microns



Micrographs courtesy of C. Brazil.

図版4における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常	扁平	厚い		異常	
2	正常		厚い、湾曲		異常	
3	正常		厚い		異常	
4	正常		厚い、湾曲		異常	
5	正常		厚い		異常	
6	正常		厚い		異常	
7	異常	いびつ			異常	
8	正常		厚い		異常	
9	正常		陥没、湾曲		異常	
10	正常		厚い、湾曲		異常	
11	異常	先体後部空胞			異常	
12	異常				異常	
13	異常	先体40%未満、 空胞2個超	厚い		異常	
14	正常		いびつ		異常	
15	正常		陥没		異常	
16	正常		厚い		異常	
17	正常		陥没、湾曲		異常	
18	正常		厚い、 長すぎる		異常	
19	正常	先体40%未満	挿入		異常	
20	正常	先体40%未満	いびつ		異常	

10 microns

Plate 5



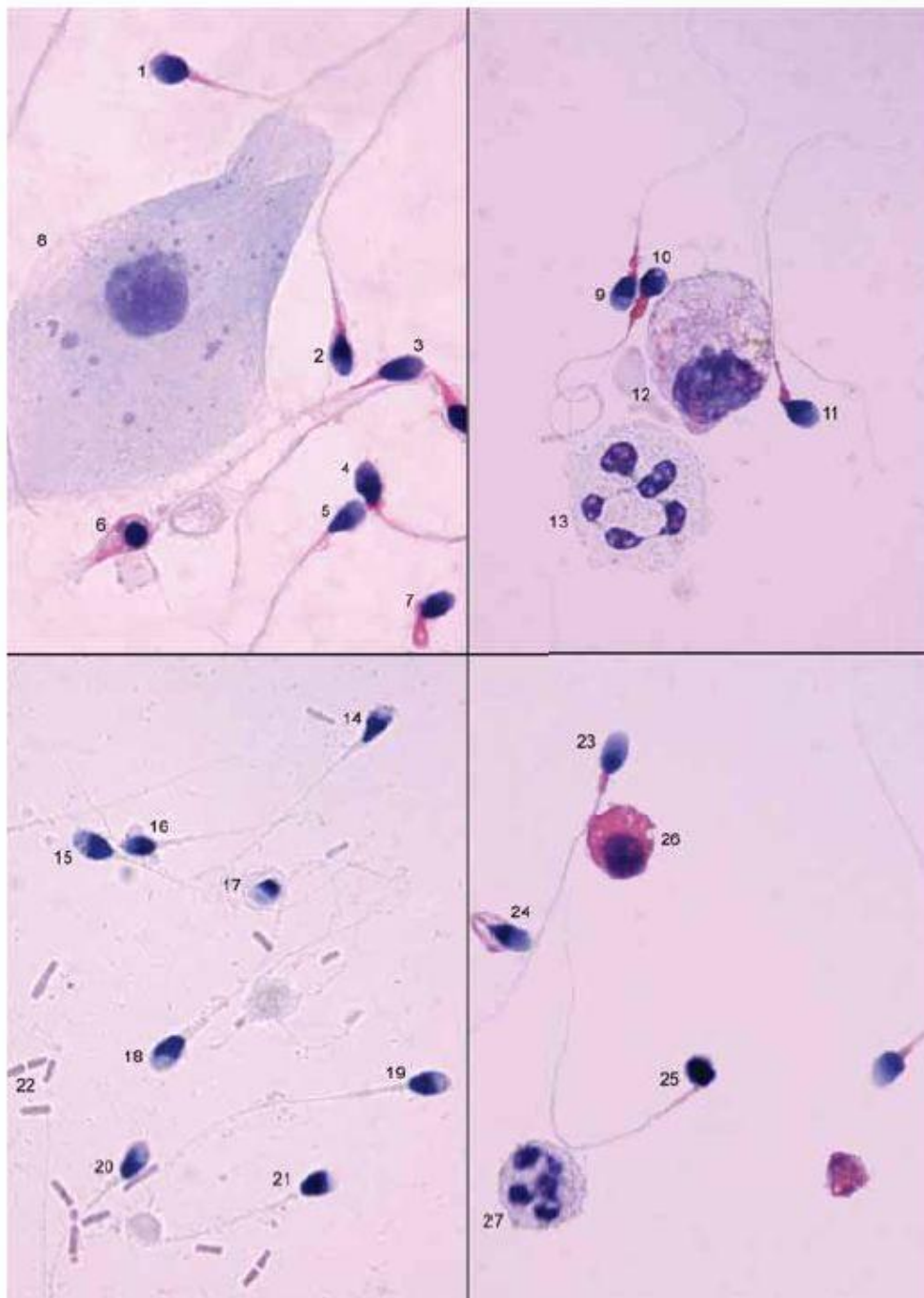
Micrographs courtesy of C Brazil.

図版5における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常		残余細胞質過剰		異常	1/3以上
2	正常		湾曲	正常	異常	
3	異常	先体70%超		輪状	異常	
4	正常		湾曲	正常	異常	
5	正常		厚い	輪状	異常	
6	異常	先体後部に 空胞		渦巻き状	異常	
7	正常				正常	
8	正常			2本ある	異常	
9	異常			渦巻き状	異常	
10	異常		湾曲、陥没	渦巻き状	異常	
11	正常		厚い	湾曲	異常	
12	正常		湾曲	正常	異常	

10 microns

Plate 6



Micrographs courtesy of C. Brazil.

図版6における精子形態評価

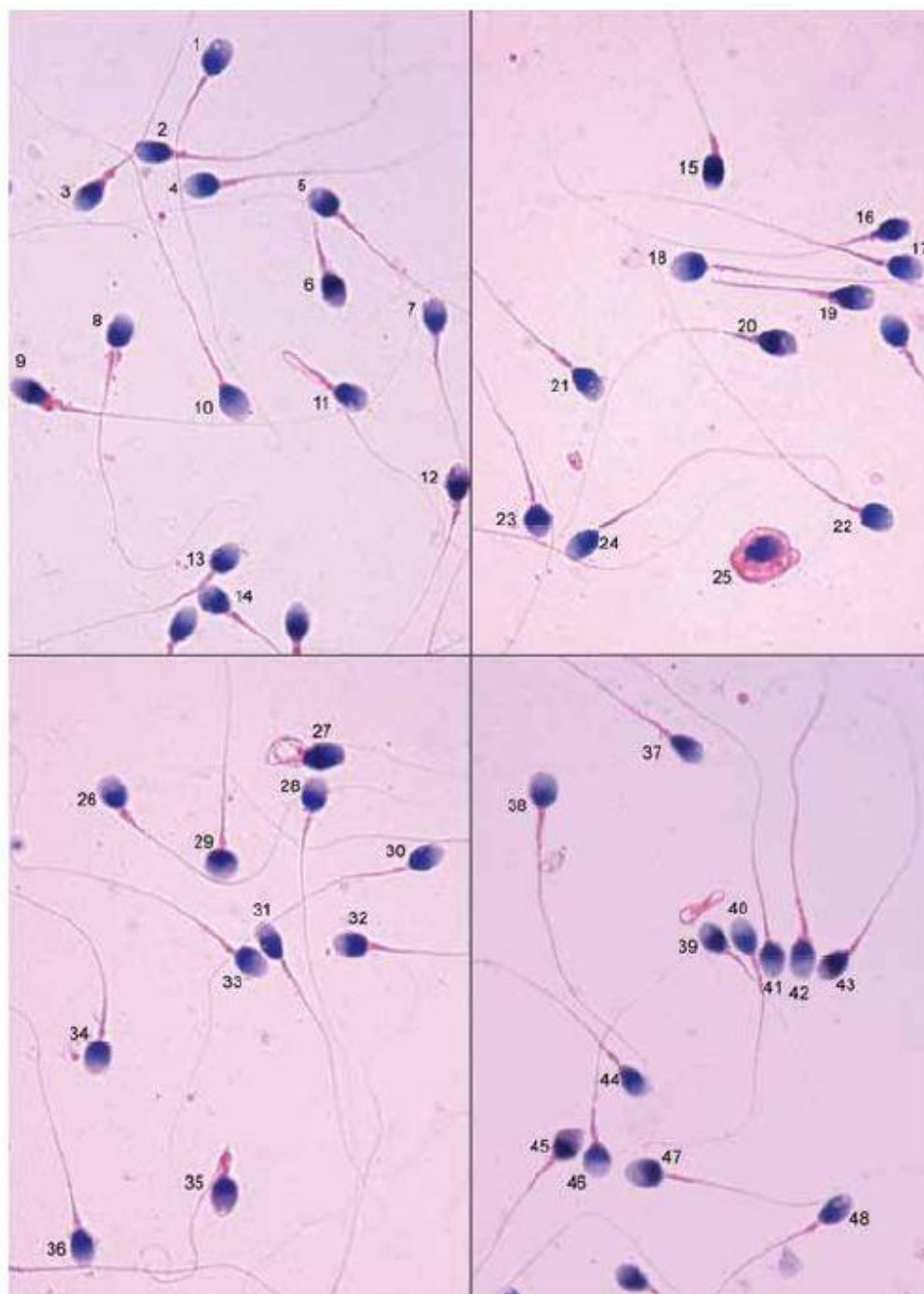
精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常	先体40%未満	厚い	正常	異常	
2	正常		厚い		異常	
3	正常				正常	
4	異常		厚い		異常	
5	異常	先細小型			異常	
6					分類不能	異常精子
7	異常		厚い	渦巻き状	異常	
8						上皮細胞
9	正常		厚い、陥没		異常	
10	異常	先体40%未満	厚い		異常	
11	正常		厚い		異常	
12						変性マクロファージ？
13						多形核白血球
14	異常	洋なし型			異常	
15	正常				正常	
16	異常	先体40%未満			異常	
17	異常	円形		認められず	異常	頭部が離れている？
18	異常		厚い		異常	
19	正常				正常	
20	正常				正常	主部が正常の場合
21	異常	扁平			異常	
22						桿菌
23	正常		厚い		異常	
24	正常		厚い	渦巻き状	異常	
25	異常	無定形			異常	
26						精子細胞

27						多形核 白血球
----	--	--	--	--	--	------------

10 microns



Plate 7



Micrographs courtesy of C Brazil.

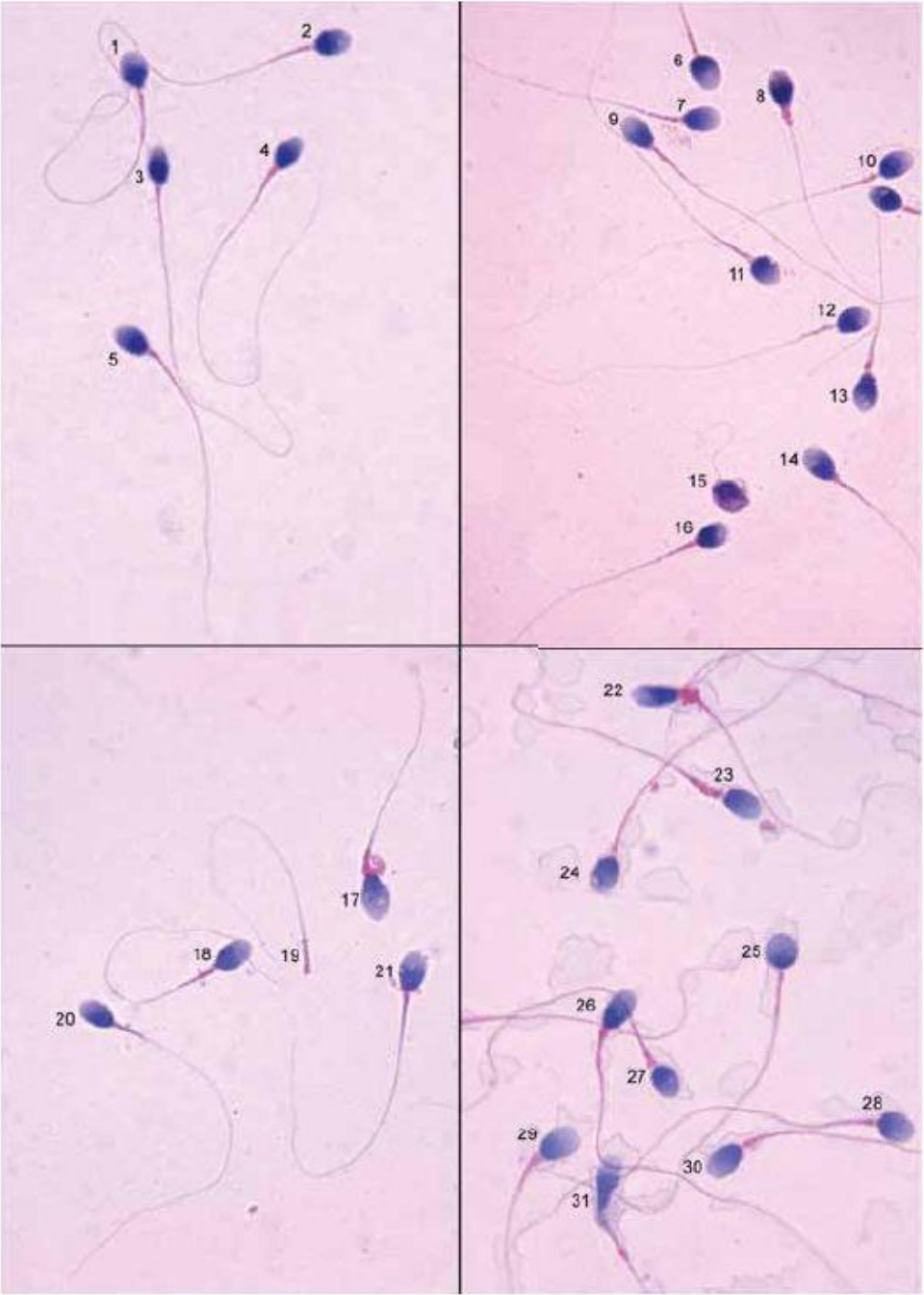
図版7における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に 関する 他のコメント	中片部に 関する コメント	主部に 関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常	空胞2個			正常	
2	正常				正常	
3	正常		厚い		異常	
4	正常				正常	
5	正常				正常	主部が見えないが正常
6	正常		厚い		異常	
7	正常	表面に空胞			正常	
8	正常		細胞質小滴		正常	1/3未満
9	異常		厚い、残余細胞質過剰		異常	1/3以上
10	正常				正常	
11	正常	先体後部に空胞		輪状	異常	
12	正常				正常	主部が見えないが正常
13	正常	先体後部に空胞			異常	
14	正常	先体後部に空胞			異常	
15	異常	先体40%未満	厚い		異常	
16	異常	先体40%未満			異常	
17	正常				正常	
18	正常				正常	主部が見えないが正常
19	正常		厚い	短い	異常	
20	異常		厚い		異常	
21	正常	空胞2個超			異常	
22	異常	円形			異常	
23	異常	円形			異常	
24	正常				正常	

25						細胞質内の精子頭部？
26	正常				正常	
27	正常	先体なし		渦巻き状	異常	
28	正常				正常	
29	異常	円形			異常	
30	正常	先体後部に空胞			異常	
31	異常	先細小型、先体後部に空胞			異常	
32	正常				正常	主部が見えないが正常
33	正常				正常	
34	正常				正常	主部が見えないが正常
35	異常		厚い	湾曲	異常	
36	正常				正常	主部が見えないが正常
37	正常				正常	主部が見えないが正常
38	異常	円形			異常	
39	正常				正常	
40	正常				正常	
41	正常				正常	
42	正常		厚い		異常	
43	正常	先体40%未満			異常	
44		焦点外				評価せず
45	異常	円形			異常	
46	異常	円形			異常	
47	正常				正常	
48	正常				正常	主部が見えないが正常

10 microns

Plate 8



Micrographs courtesy of C. Brazil.

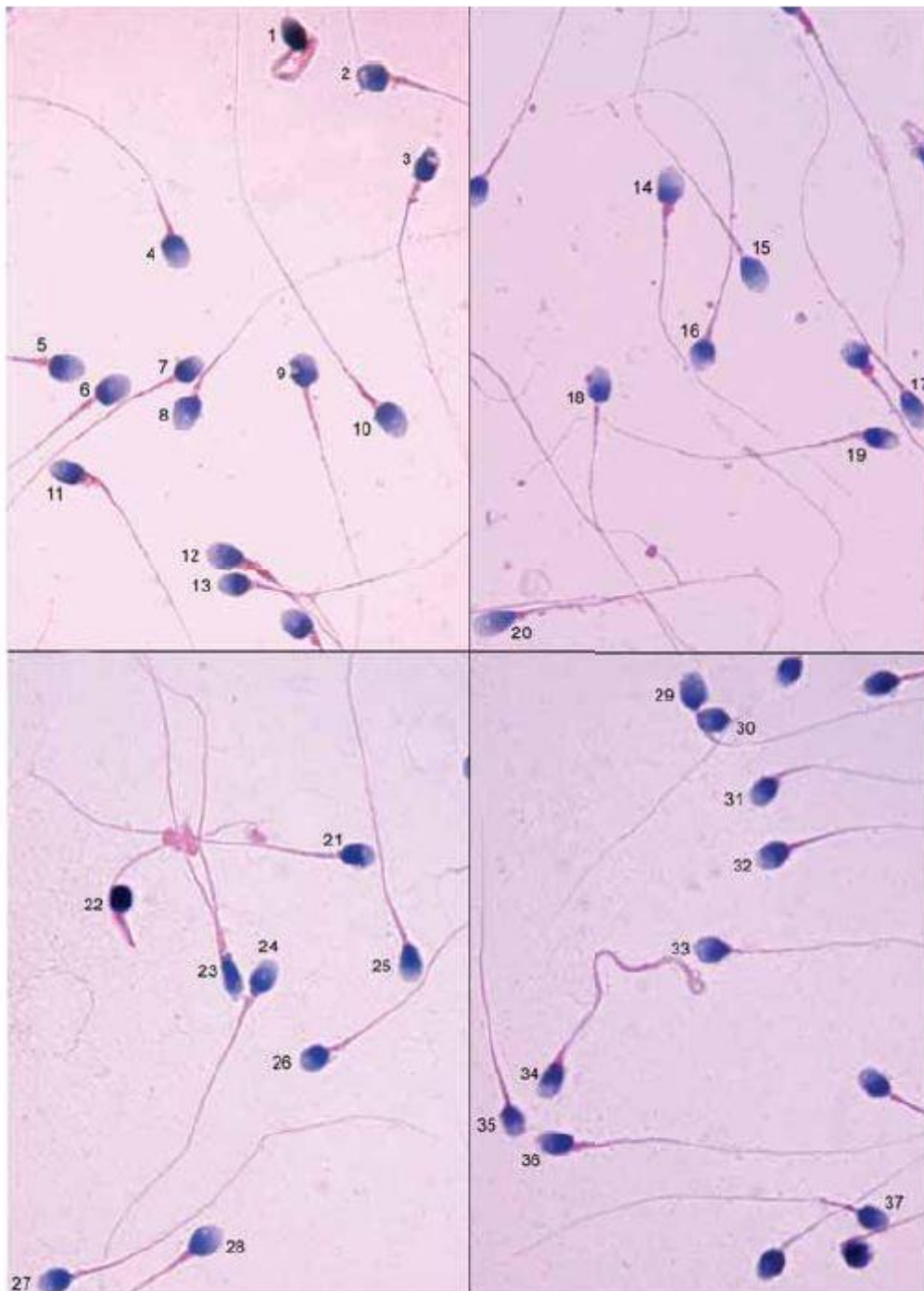
図版8における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常			正常	正常	
2	正常	空胞2個超		正常	異常	
3	異常	先細小型			異常	
4	正常			正常	正常	
5	正常				正常	
6	正常				正常	主部が見えないが正常
7	正常				正常	主部が見えないが正常
8	正常		厚い		異常	
9	正常				正常	
10	正常				正常	
11	正常	先体後部に 空胞			異常	
12	正常				正常	
13	異常				異常	
14	正常				正常	主部が見えないが正常
15	異常	無定形		欠損	異常	
16	正常				正常	主部が見えないが正常
17	異常	先体70%超	厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
18	正常				正常	
19						ピンヘッド
20	正常				正常	
21	正常	先体後部に 空胞			異常	
22	異常	先細小型	厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
23	異常	扁平	厚い		異常	

24	正常	空胞2個超			異常	
25	異常	円形			異常	
26	正常		厚い		異常	
27	正常		厚い		異常	
28	正常	空胞2個超、 先体70%超			異常	
29	異常				異常	
30	正常	先体70%超			異常	
31	異常	洋なし型			異常	

10 microns
|-----|

Plate 9



Micrographs courtesy of C Brazil.

図版9における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に 関する 他のコメント	中片部に 関する コメント	主部に 関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常			渦巻き状	異常	
2		重なっている				評価せず
3	異常	先体40%未満			異常	
4	正常				正常	主部が見えないが正常
5	正常				正常	主部が見えないが正常
6	正常	先体70%超	陥入		異常	
7	正常		陥入		異常	
8	正常	先体70%超	陥入		異常	
9	異常	先体後部に 空胞			異常	
10	正常	空胞2個超	厚い		異常	
11	異常		厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
12	異常		厚い、挿入、残 余細胞質過剰		異常	1/3以上
13	正常				正常	主部が見えないが正常
14	異常		厚い		異常	
15	正常			正常	正常	
16	異常				異常	
17	異常	先細小型、 空胞3個、先体後 部に空胞			異常	
18	正常				正常	
19	異常	空胞20%超			異常	
20	異常	先細小型			異常	
21	正常	先体後部に 空胞			異常	
22	異常	無定形		湾曲	異常	
23	異常	先細小型		2本ある	異常	
24	異常	先体後部			異常	

		空胞				
25	正常	空胞2個超			異常	
26	正常				正常	主部が見えないが正常
27	正常				正常	
28	正常				正常	主部が見えないが正常
29		重なっている				評価せず
30		重なっている				評価せず
31	正常				正常	主部が見えないが正常
32	正常				正常	主部が見えないが正常
33	正常				正常	主部が見えないが正常
34	正常		厚い	厚い、渦巻き状	異常	
35	異常	片側が卵形でない			異常	
36	正常	先体40%未満			異常	
37		重なっている				評価せず

10 microns

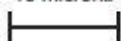
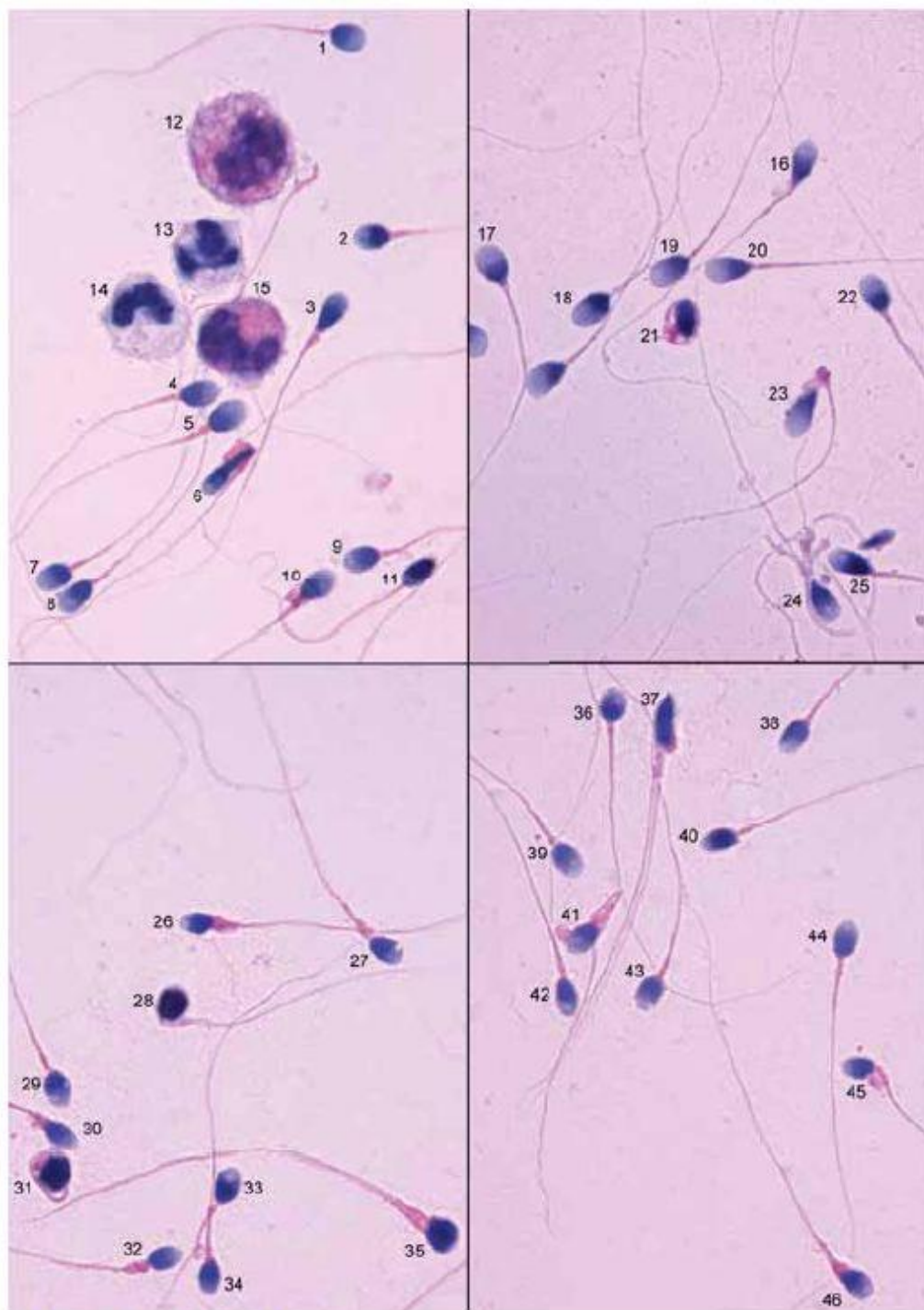


Plate 10



Micrographs courtesy of C Brazil.

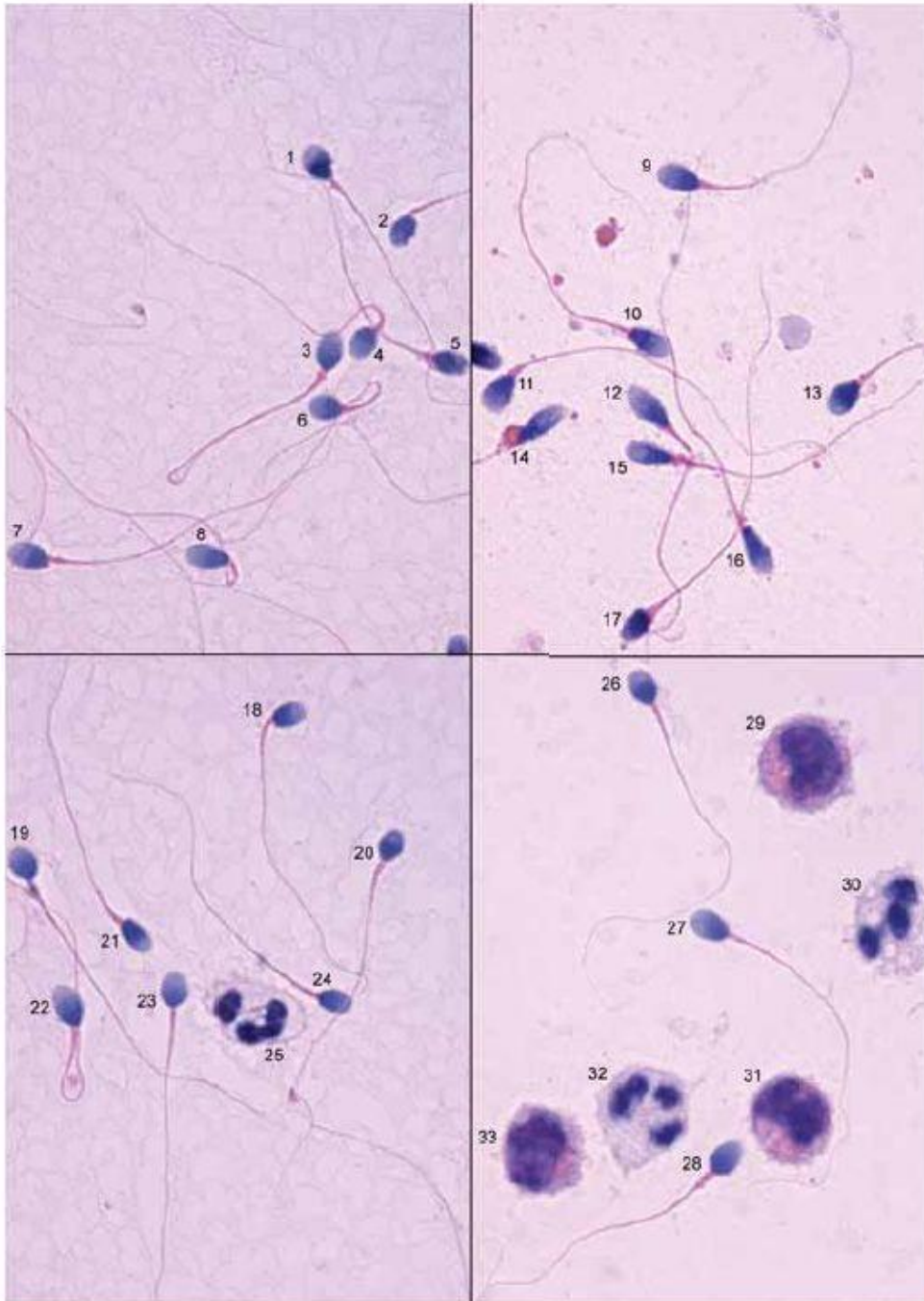
図版10における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に 関する 他のコメント	中片部に 関する コメント	主部に 関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常		挿入		異常	
2	正常				正常	主部が見えないが正常
3	異常	洋なし型			異常	
4	正常				正常	
5	正常		厚い		異常	
6	異常	洋なし型	残余細胞質過剰	湾曲	異常	1/3以上
7	正常				正常	
8	正常				正常	
9	正常	空胞3個			異常	
10	異常	先細小型	厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
11	異常	先細小型、先体 40%未満		湾曲	異常	
12						単球
13						多形核 白血球
14						多形核 白血球
15						単球
16	異常	先細小型			異常	
17	正常				正常	主部が見えないが正常
18	正常				正常	
19	正常				正常	
20	正常				正常	主部が見えないが正常
21	異常	無定形			異常	
22	正常				正常	主部が見えないが正常
23	異常	先細小型	厚い	湾曲	異常	

24		重なっている				評価せず
25	異常	先細小型			異常	
26	異常	無定形	厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
27	正常		厚い		異常	
28	異常	無定形	厚い		異常	
29	異常	先体後部に 空胞			異常	
30	異常		厚い		異常	
31	異常		厚い	渦巻き状	異常	
32	正常		厚い		異常	
33		重なっている				評価せず
34		重なっている				評価せず
35	異常	無定形、 先体なし	厚い		異常	
36	正常	先体40%未満			異常	
37	異常	洋なし型	厚い	2本ある	異常	
38	正常				正常	主部が正常 の場合
39	正常		厚い		異常	
40	異常	先体40%未満			異常	
41	異常		厚い	湾曲	異常	
42	正常				正常	主部が見え ないが正常
43	正常	空胞2個、 先体40%未満			異常	
44	正常				正常	
45	異常		厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
46	異常		厚い		異常	

10 microns
|-----|

Plate 11



Micrographs courtesy of C Brazil.

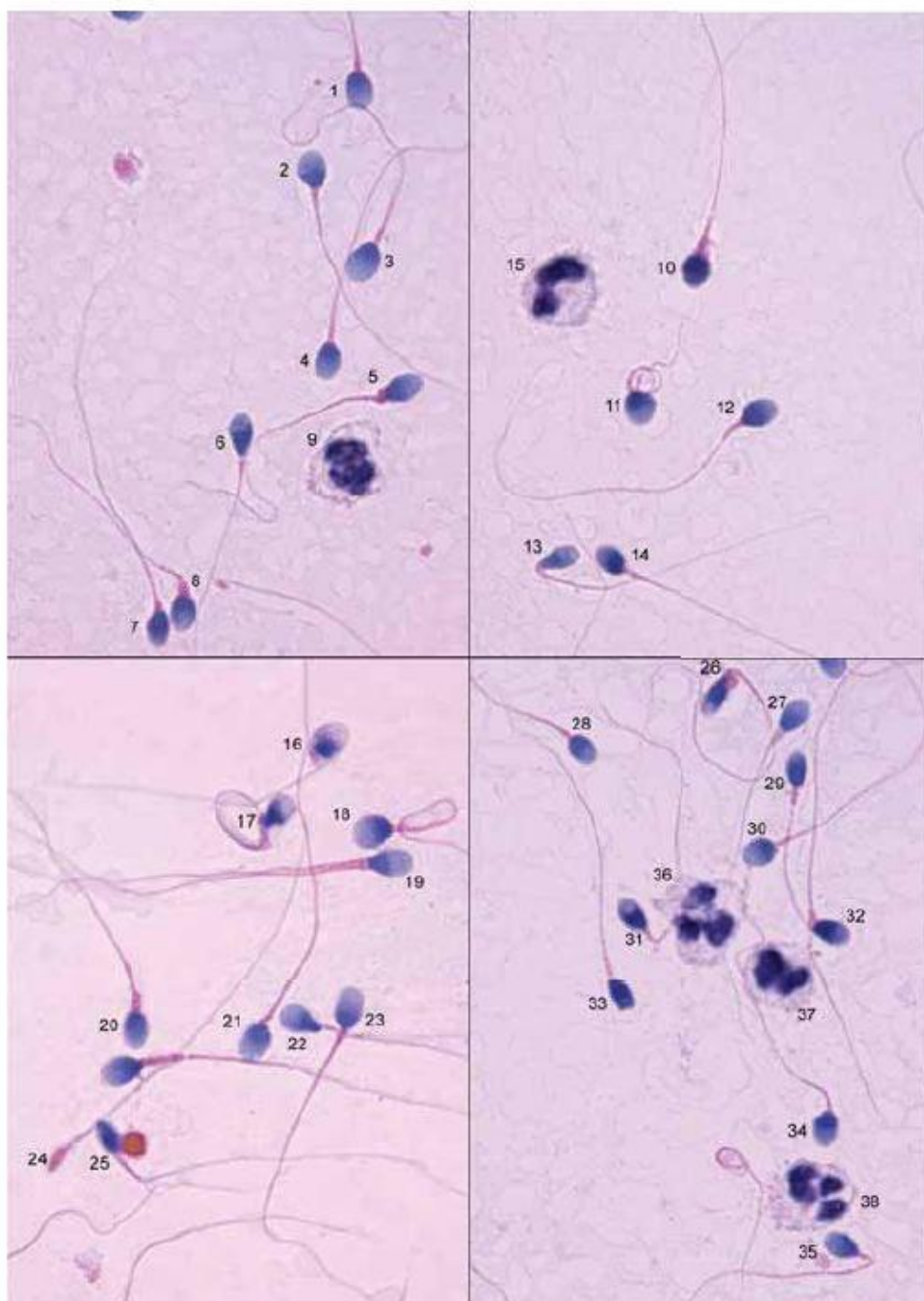
図版11における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に 関する 他のコメント	中片部に 関する コメント	主部に 関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	異常		挿入		異常	
2	異常		挿入		異常	
3	正常		厚い	輪状	異常	
4	正常				正常	
5	異常	空胞2個超、 先体40%未満	厚い		異常	
6	正常			輪状	異常	
7	異常		挿入		異常	
8	正常			輪状	異常	
9	異常	先体70%超、 先細小型			異常	
10	異常	先細小型			異常	
11	正常		厚い		異常	
12	異常	先細小型			異常	
13	正常	先体40%未満	厚い		異常	
14	異常	先細小型	厚い、残余細胞 質過剰		異常	1/3以上
15	異常	先細小型	厚い		異常	
16	異常	先細小型			異常	
17	異常	無定形	厚い		異常	
18	正常				正常	
19	正常				異常	
20	異常				異常	
21	異常				異常	
22	正常	先体70%超		輪状	異常	
23	正常				正常	
24	正常				正常	
25						多形核 白血球
26	正常				正常	
27	正常				正常	

28	正常	先体70%超			異常	
29						单球
30						多形核 白血球
31						单球
32						多形核 白血球
33						单球

10 microns
|-----|

Plate 12



Micrographs courtesy of C. Brazil.

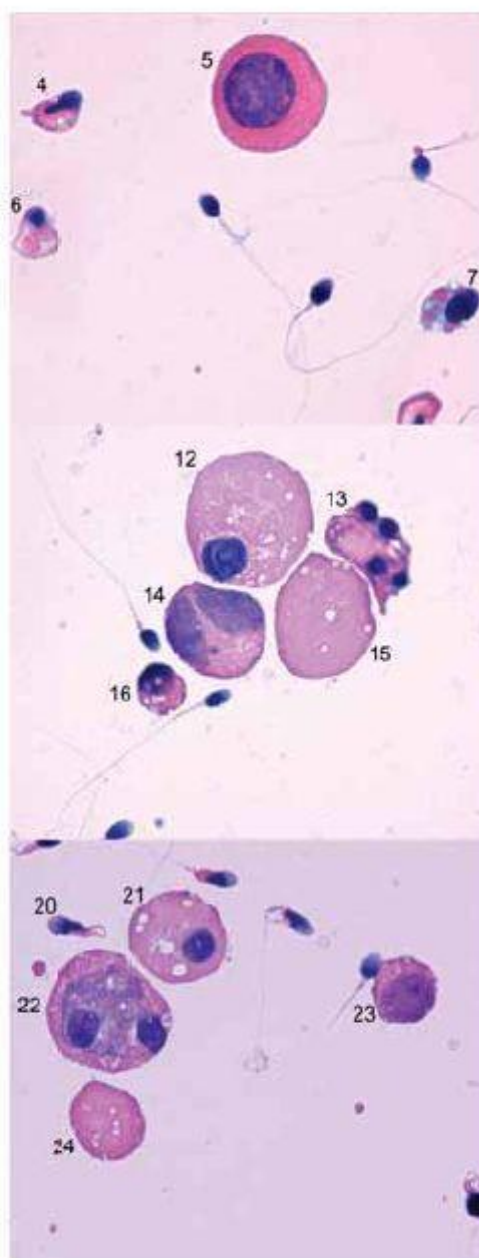
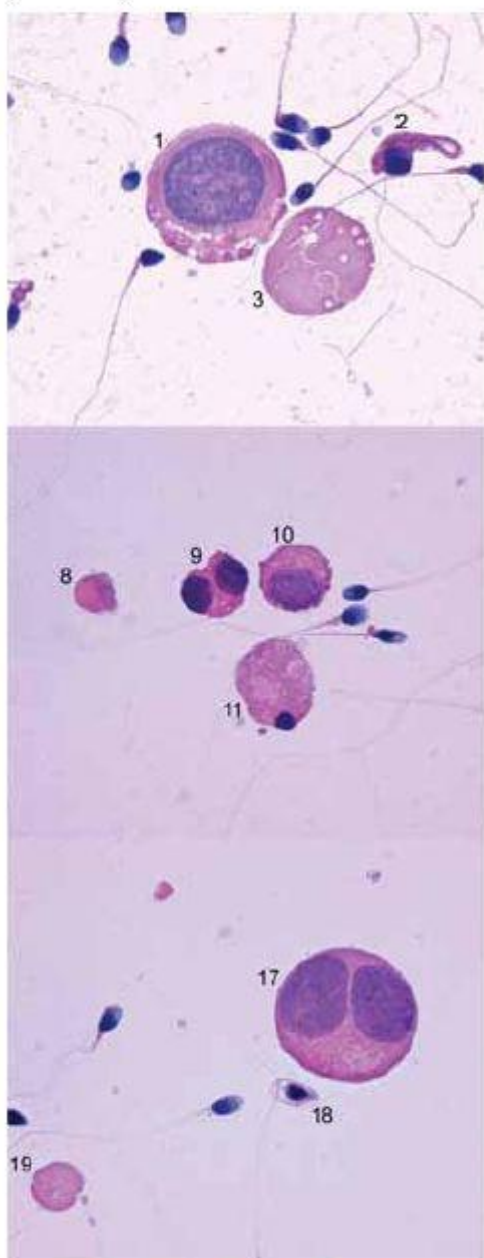
図版12における精子形態評価

精子	頭部の形状	頭部に関する 他のコメント	中片部に関する コメント	主部に関する コメント	精子の 総合的な分類	コメント
1	正常	先体70%超			異常	
2	異常				異常	
3	異常	先体70%超			異常	
4	正常				正常	主部が見えないが正常
5	異常		厚い		異常	
6	異常	先細小型			異常	
7		焦点外	厚い			評価せず
8	異常		厚い、湾曲		異常	
9						変性白血球
10	異常		厚い		異常	
11	異常	円形		渦巻き状	異常	
12	正常				正常	
13	異常	先細小型	湾曲		異常	
14	異常		陥入		異常	
15						多形核 白血球
16	異常	無定形			異常	
17	異常			渦巻き状	異常	
18	異常		厚い	渦巻き状	異常	
19	正常			2本ある	異常	
20	異常		厚い		異常	
21		重なっている				評価せず
22	異常	洋なし型			異常	
23	正常				正常	
24	異常				異常	ピンヘッド
25	異常	無定形		湾曲	異常	
26	異常	無定形	厚い、湾曲		異常	
27	正常		厚い		異常	
28	正常				正常	主部が見えないが正常

29	異常	先細小型			異常	
30	異常	円形			異常	
31	正常		湾曲	重なっている		評価せず
32	正常		厚い、湾曲		異常	
33	異常				異常	
34	異常				異常	
35	正常		湾曲		異常	
36						多形核 白血球
37						多形核 白血球
38						多形核 白血球

Plate 13

15 microns



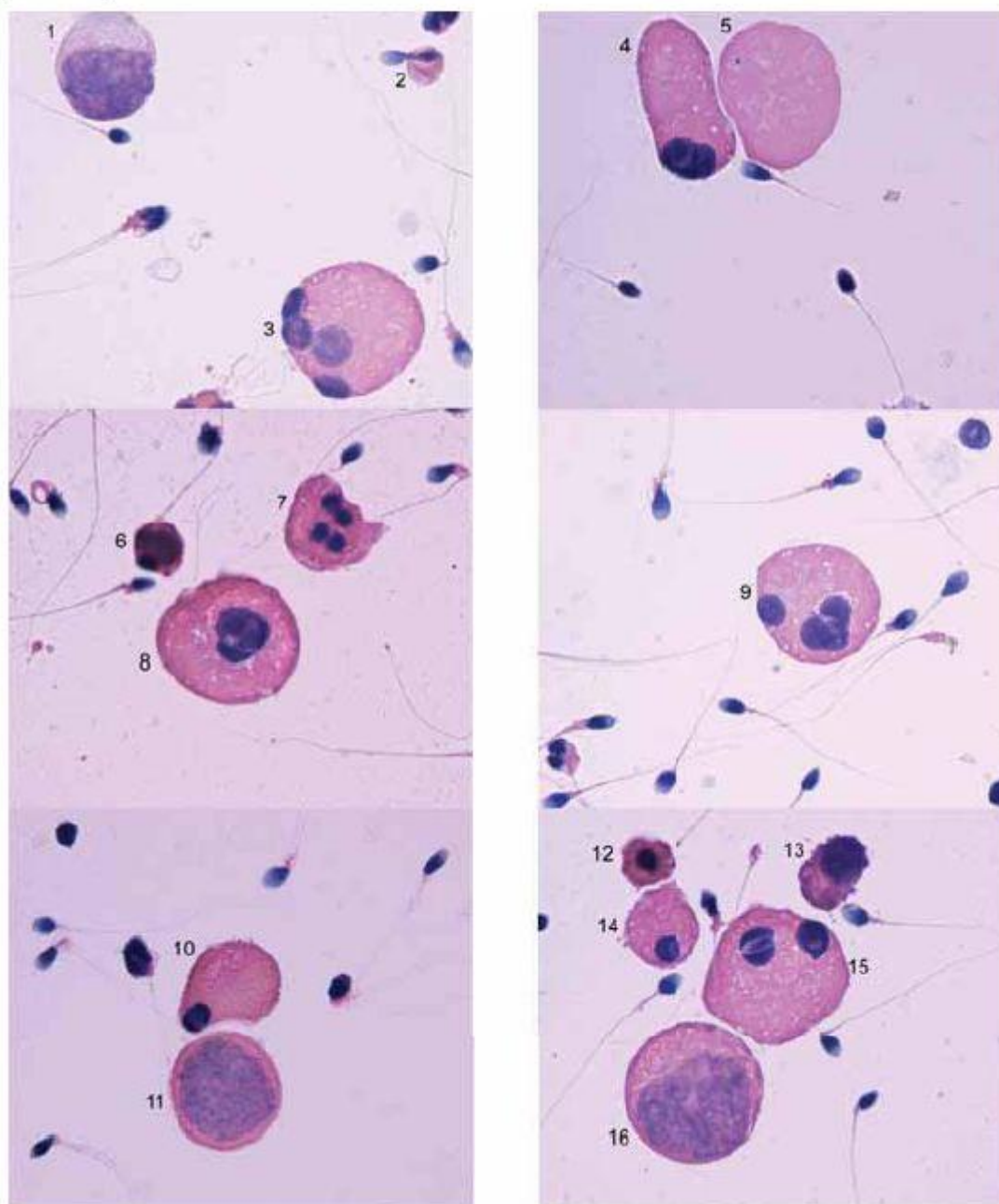
Micrographs courtesy of C Brazil.

図版13における細胞評価

細胞	細胞タイプ
1	マクロファージ
2	異常精子
3	細胞質
4	異常精子
5	精母細胞
6	異常精子
7	異常精子？細胞質上に遊離した頭部がある？
8	細胞質
9	分裂している精子細胞
10	精母細胞
11	変性している精子細胞
12	精子細胞
13	変性している精子細胞
14	分裂している精母細胞
15	細胞質
16	変性している精子細胞
17	分裂している精母細胞
18	異常精子
19	細胞質
20	異常精子
21	精子細胞
22	捕食中のマクロファージ
23	精母細胞
24	細胞質

15 microns

Plate 14



Micrographs courtesy of C Brazil.

図版14における細胞評価

細胞	細胞タイプ
1	マクロファージ
2	異常精子
3	(分裂している) 精子細胞
4	(分裂している) 精子細胞
5	細胞質
6	分類不能
7	変性している精子細胞
8	変性している精子細胞？
9	変性している精子細胞
10	変性している精子細胞
11	マクロファージ
12	変性している精子細胞
13	変性している精子細胞
14	変性している精子細胞
15	変性している精子細胞
16	マクロファージ

2.17 塗抹標本による精子形態評価の分析

2.17.1 正常精子の形態評価

正常精子の比率を明らかにすれば十分である。この形態評価の範例により、精子の機能部位が考えられる。頭部の大きさや形状の変異、または中片部および主部にみられる種々の欠損について、すべてを識別する必要はない。

形態学的評価は、特定の精子を偏って選択することを防ぐために、スライド上の数ヵ所の領域を系統的に選択し、その領域において、評価可能な精子すべてを検査すべきである。

- 明視野顕微鏡を用いたスライドの評価は油浸で倍率 1000 倍にて検査する。
- 各視野のすべての精子評価は、顕微鏡視野から別の視野に動かしながら行う。
- 各々、繰り返し少なくとも 200 個の精子を評価する。それは、サンプリング誤差を許容可能なレベルに低減するためである（Box 2.5 参照）。
- 正常精子および異常精子の数を、検査用カウンターにより集計する。
- 少なくとも 200 個の精子を評価する。なるべく複数のスライド検査するのが良いが、同じスライドでもよい。
- 2 回の評価を行い、その正常形態率を比較する。
- 繰り返し行った評価から、2 つの正常形態率の平均値および差を計算する。
- 差の許容範囲の決定は、表 2.1、図 A7.2 または付録 7 から判定する（いずれも、2 つのパーセントの最大差がサンプル誤差によるとして、検体の 95%で起こりえる期待値である）。
- そのパーセントの差の異なりが許容できる場合は、平均正常形態率を報告する。差が大きすぎる場合は、その同じスライドについて評価を繰り返す（Box 2.6 参照）。
- 正常形態率の平均値は全体に最も近い数にして報告する。

Note 1: 頭部および尾部を有している（2.7.3 参照）完全な精子のみを評価する。完全な精子のみをカウントするためである。未熟な生殖細胞（円形細胞）はカウントしない。

Note 2: 重なっている精子および頭部が縁にある精子は評価しない。このような精子は、適切な分析が不可能である。このような精子は、良好な塗抹標本では存在していない（2.13.2.1 参照）が、破片および大量の粒子状物質が存在する場合に生じることがある（精液が粘稠な場合など：2.13.2.3 参照）。このような検体は、染色前に洗浄し（2.13.2.4 参照）、スライドガラスを検査すること。

2.17.2 計算例

例 1. 精子 200 個を繰り返しカウントしたところ、正常形態率は 18 および 9 である。平均値の概数は 14% であり、差は 9% である。表 2.1 から、平均値が 14% の場合、偶然のみで生じる差は最大 7% と予想される。これを上回る差が認められるため、結果を破棄し、繰り返しスライドの再評価を行う。

例 2. 精子 200 個を繰り返しカウントしたところ、正常形態率は 10 および 14 である。平均値の概数は 12% であり、差は 4% である。表 2.1 から、平均値が 12% の場合、偶然のみで生じる差は最大 7% と予想される。認められた差はこれより小さいため、結果は許容され、平均値すなわち 12% が正常形態であると報告する。

2.17.3 基準下限値

正常形態率の基準下限値は 4% である（5 パーセンタイル、95%CI : 3.0~4.0）。

Comment: 射精液中の形態学的に正常な精子の総数には、生物学的意義がある。この数は、射精液中の精子の総数（2.8.7 参照）に正常形態率を掛けると得られる。

2.17.4 異常精子の形態評価

精子のすべて異常形態を類別することは、診断および研究上、役立つ可能性がある。必要に応じて、欠損の特徴について、頭部（%H）、中片部（%M）、または主部（%P）に欠損をもつ精子の割合ならびに残余細胞質過剰な精子の割合（%C）を調べる。

マルチキーカウンターを使用して、正常精子を 1 つのキーで、異常精子を 1 つのキーで、4 つに類別した異常精子（H、M、P、C）をそれぞれ 1 つのキーでカウントすることができる。このようなカウンターを用いれば、それぞれの精子を 1 回だけカウントし、それぞれの異常を個別にスコア化することが可能となる。

- 精子 400 個の最終評価から、正常精子および異常精子の割合（この 2 つの形状は 100% まで測定すべきである）。同様に各タイプの異常の割合、すなわ

ち%H、%M、%P、および%C（これらの数値の合計は 100%にはならない）を得ることができる。

- 異常について上記のとおり分類した場合、その精子の割合は、特定の欠損をもつ異常精子の総数を正常精子および異常精子の総数で割り、100 倍すると得られる。これらの数値は、複数の異常に関する指数を計算する際にも利用できる（3.1 参照）。

2.17.5 計算例

例 繰り返し 1 回目の評価で、キーが 6 個のカウンターを用いて、精子 200 個をスコア化したのち、42 個の精子が正常、158 個が異常とされる。異常精子 158 個のうち、140 個が頭部、102 個が中片部、30 個が主部に欠損をもち、44 個が残余細胞質過剰である。2 回目の評価の結果は、正常精子 36 個、異常精子 164 個である。異常精子のうち、122 個が頭部、108 個が中片部、22 個が主部の欠損をもち、36 個が残余細胞質過剰である。

正常カテゴリーのみ、繰り返しの許容性を比較する。1 回目の評価では正常精子は 21% であり、2 回目の評価では 18% である。これらの値の平均は 19.5% であり（切り上げて 20%）、差は 3% である。表 2.1 から、平均値が 20% の場合、偶然のみで生じる差は最大 8% までと予想される。認められた差はこれより小さいため、結果は許容され、平均値が報告される。すなわち、正常形態が $(42+36) / 400 = 20\%$ 、頭部の異常が $(140+122) / 400 = 66\%$ 、中片部の異常が $(102+108) / 400 = 53\%$ 、主部の異常が $(30+22) / 400 = 13\%$ 、残余細胞質過剰な精子の割合が $(44+36) / 400 = 20\%$ である。

Note: これらのカテゴリーは、それぞれの異常が別々に集計されており、一部の精子には複数の欠損がみられるため 100% にならない。

Comment: 異常精子のさらなる詳細な分析は、異常精子 1 個について各部位における異常の数を組み合わせた種々の指数を用いる。この分析について 3.1.1 に示した。

2.17.6 特殊な精子欠損の評価

時に、多くの精子は特有の構造欠損を有している。例えば、先体発達が障害されると“小円形頭部欠損”や“頭部円形精子症”をもたらす。

もし、基盤が精子核に対し先体の反対側に伴っていないとしたら、遊離する際、頭部が吸収されて、尾部だけ（頭部が小さい異常）が精液中にみつかる。

Note 1: 小さい頭部（尾部のみ）は頭部異常としてカウントしない。それらは、基盤より先のクロマチンや頭部構造を持たないからである。

Note 2: 尾部無し（小さい頭部）や頭部無し（小さい頭部）のものは、精子としてカウントしない（頭部と尾部を遊離として定義されている。参照2.7.3）ので、それらは精子異常と考えられていない。

通常、全ての精子がこれらの異常のいずれかに該当するような男性は通常不妊である。そのような症例はまれであるが、同定され正しく報告されることが重要である。例えば、頭部無しの精子、小さい頭部（尾部無し）や頭部の先体欠損である。

そのような異常が数多くみられるような場合は、全精子に対する異常の割合を算出することが望ましい。総観察精子数が 400 となるまで評価した視野当たりの異常を認めた細胞数を N とし、精子濃度 ($10^6 / \text{mL}$) を S とした場合、欠損精子濃度 ($10^6 / \text{mL}$) は、公式 $C = S \times (N / 400)$ で計算できる。

2.18 精液中の白血球の評価

白血球、（大部分は多形核白血球（PMN、好中球））はほとんどのヒトの精液中に存在している（Tomlinson et al., 1993; Johanisson et al., 2000）。白血球はパパニコロー染色による精液の塗抹標本作製して観察することで、精子細胞や精母細胞などと区別できる（2.14.2 参照）。区別は、染色配色、核のサイズの違いと形に基づく（Johanisson et al., 2000）（図版 6, 10, 11, 12, 13 と 14 参照）。多分、多形核白血球は、形態学的に多核精子細胞と区別がつかないが、精子細胞のよりピンクがかった色に対して、青みがかった色で染色される（Johanisson et al., 2000）。核のサイズは、識別の判断材料になるかもしれない。リンパ球はおよそ $7\mu\text{m}$ 、大食細胞（macrophage）は $15\mu\text{m}$ 以上と、単核球はサイズにおいて広い特徴を示す。退化と分裂が核の大きさに影響することから、核の大きさが唯一の指針である。

精液中の白血球数を定量化する数種類の別の技術がある。ペルオキシダーゼ陽性の顆粒細胞が白血球精液中の大部分で、ペルオキシダーゼ活性の日常的な測定は、最初のスクリーニング技術として有効である（Wolff, 1995; Johanisson et al., 2000）（2.18.1 参照）。

白血球は、普通の白血球と精子抗原に対して、より時間のかかる、高価な免疫化学分析法でさらに区別することができる（Homyk et al., 1990; Eggert-Kruse et al., 1992）（3.2 参照）。

2.18.1 オルト-トルイジンを用いたペルオキシダーゼ細胞染色

このテストは、迅速で安価な顆粒細胞の最初のスクリーニングに役立つ。

2.18.1.1. 原理

伝統的に、ヒト精液中の白血球は、ペルオキシダーゼ酵素で顆粒細胞を特定する組織化学的法で数えている（図 2.14）。この手技は実行するのが比較的簡単という長所があるものの、以下の細胞は検出されない。

- ・顆粒を放出した活性多核球。
- ・リンパ球、大食細胞や単核球のようなペルオキシダーゼを含まない種類の白血球。

このテストは、多形核白血球とペルオキシダーゼのない多核精子細胞を区別することに役立つ（Johanisson et al., 2000）。下記の分析評価は、Nahoum と Cardozo（1980）に基づいている。本キットは商業的に入手可能である。

2.18.1.2. 試薬

1. リン酸塩緩衝液（67mmol / l、pH6.0）：1000mL の蒸留水に 9.47g のリン酸水素二ナトリウム無塩（ Na_2HPO_4 ）を、また 1000mL の蒸留水に 9.08g のリン酸二水素カリウム塩（ KH_2PO_4 ）を溶解する。pH6.0 になるまでひとつの溶液にもう一方の溶液を加える（おおよそ 12mL の Na_2HPO_4 溶液と 88mL KH_2PO_4 溶液）。
2. 飽和塩化アンモニウム（ NH_4Cl ）溶液：1000mL の蒸留水に 250g の NH_4Cl を加える。
3. エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩（ Na_2EDTA ）148mmol / l：Step 1 で準備したリン酸塩緩衝液（pH6.0）で 50g / l を溶解する。
4. 基質：2.5mg の o-トルイジンを 10mL の 0.9%（9g / l）食塩水に溶かす。
5. 30%（v / v）過酸化水素（ H_2O_2 ）：購入したもの。
6. 作業溶液：9mL の o-トルイジン Substrate に、1mL の飽和塩化アンモニウム（ NH_4Cl ）溶液、1mL の 148mmol / l エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム塩（ Na_2EDTA ）、10 μL の 30%（v / v）過酸化水素（ H_2O_2 ）を加え、よく混和する。この溶液は、準備後 24 時間まで使用可能である。

Note: 国際癌研究機関（IARC, 1982）は、オルトルイジンがヒトへの発癌性の危険性を指摘しているため、取り扱いには注意すべきである。適当な予防措置をとらなければならない（付録2 参照）。

2.18.1.3. 手順

1. 精液をよく混和する（Box 2.3 参照）。
2. 精液 0.1mL をとり、0.9mL の作業溶液と混合する（1+9（1:10）希釈）。
3. 精子懸濁液を穏やかに 10 秒間 Vortex にかき、20～30 分間室温にて培養する。あるいは、チューブ密閉方式にて連続的に揺り動かす。
4. 前述の作業溶液と混ぜた 2 倍希釈精液を取り出す前に、精液サンプルを再混和する。

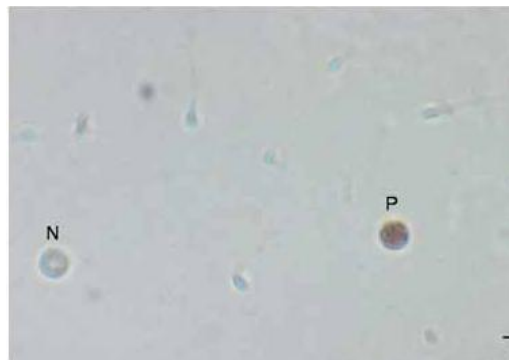
2.18.1.4. 血球計算盤によるペルオキシダーゼ陽性細胞数の算定

1. 20～30 分後に、もう一度精子懸濁液を混ぜ、血球計算盤の両側を複数準備したサンプルのうちの 1 つで満たす。
2. 血球計算盤の乾燥を防ぎ、細胞を沈殿させるために、室温で加湿器（例えば、覆われたペトリディッシュ内の湿らせた紙の上など）にすくなくとも 4 分間保存する。
3. 200 倍もしくは 400 位の位相差顕微鏡で計算盤を観察する。
4. 容認可能な低いサンプリングエラーを得るために、それぞれの希釈したサンプル内の、ペルオキシダーゼ陽性細胞を少なくとも 200 個カウントする（Box2.7 と表 2.2 参照）。ペルオキシダーゼ陽性細胞は茶色に染色され、ペルオキシダーゼ陰性細胞は染色されない（図 2.14 参照）。
5. 少なくとも 200 個のペルオキシダーゼ陽性細胞がカウントされるまで、ひとつの計算盤、格子から格子、の観察を続ける。カウントは格子の途中で止めないで完全に格子から格子まで観察すべきである。
6. 少なくとも 200 個のペルオキシダーゼ陽性細胞に達するまで算定した格子数を記録する。他の血球計算盤もその格子と同じ数をカウントする。
7. ラボのカウンター器具を用いて、ペルオキシダーゼ陽性細胞と格子の数を計算する。
8. ペルオキシダーゼ陽性細胞が 200 個に足りなかったとしても、2 番目の計算盤に変えて、最初の複製標本と同じ数の格子のカウントを行う。

9. 2つの計算盤のペルオキシダーゼ陽性細胞の合計と違いを計算する。
10. 表 2.5 または図 A7.1 (付録 7) との違いの許容性を決定する (単独のサンプリングエラーのため、サンプルの 95% に生じる 2 つのカウントの最大差を各々示している)。
11. 許容範囲であれば、濃度を算出する (2.18.1.5 参照)。違いがあまりにも高ければ、2 つの新しい希釈液を用意して、複製標本のカウント評価を繰り返す (Box 2.10 参照)。
12. ペルオキシダーゼ陽性細胞の平均濃度を、2 つの別々の表から計算して報告する。
13. 射精精液あたり総ペルオキシダーゼ陽性細胞数を計算する (2.18.1.8 の後の Comment 参照)。

図 2.14 ヒト精液中のペルオキシダーゼ陽性と陰性細胞。

ペルオキシダーゼ陽性顆粒細胞 (P) (茶色) とペルオキシダーゼ陰性円形細胞 (N)。スケールバー 10 μ m。



TG Cooper提供

2.18.1.5. 精液中のペルオキシダーゼ陽性細胞の濃度算出

精液中のペルオキシダーゼ陽性細胞の濃度は、希釈試料（格子内の容量が 100nL のところ）で細胞の数（N）を格子の総数（n）で割り、希釈倍数を掛ける。

1+9（1:10）の希釈のため、濃度は 1nL あたり $C = (N/n) \times (1/100) \times 10 \text{ 細胞 / nL} = (N/n) \times (1/10) \text{ 細胞 / nL}$ 。このように（N/n）は、1nL（ 10^6 細胞 / mL）あたりのペルオキシダーゼ陽性細胞の濃度を得るために 10 で割る。

それぞれの血球計算盤の 9 つの格子を評価するとき、総ペルオキシダーゼ陽性細胞数は、両方の計算盤の総容量（1.8μL）で割り、希釈倍数（10）を乗算し、1mL あたりの細胞濃度を得ることができる（mL あたり 1000 細胞）。

Note: この方法は、カウントできる円形細胞総数（ペルオキシダーゼ陽性、陰性）が、計算上Nとして用いるときに、円形細胞濃度を計算するために用いることができる。

2.18.1.6. 方法の感度

計算盤のペルオキシダーゼ陽性細胞が 200 に満たない場合、サンプリングエラーは 5% を超える。両方の計算盤の全ての格子のペルオキシダーゼ陽性細胞が 400 に満たない場合、細胞数カウントによるサンプリングエラーを報告する（表 2.2 参照）。

それぞれの計算盤で 25 個に満たないペルオキシダーゼ陽性細胞がカウントされた場合、濃度は $<277000 \text{ 細胞 / mL} : 1 + 9 \text{ (1:10)}$ 希釈を用い、改良 Neubauer 計算盤の全て 9 つの格子が評価されるとき、20%のサンプリングエラーのため定量化の下限である（Cooper et al., 2006）。ペルオキシダーゼ陽性細胞数は、“濃度算定のためにはあまりにも少ない細胞数（ $<277\,000 \text{ / mL}$ ）”のコメントとともに報告すること。

Comment: 検査したサンプルにペルオキシダーゼ陽性細胞が存在しないことは、残りのサンプルにも存在しないことを必ずしも意味するものではない。

2.18.1.7. 例

例 1 : 1 + 9（1:10）の希釈において、複製標本の一方が 9 つの格子内に 60 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数で、複製標本の他方が 9 つの格子内に 90 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数だった場合、合計細胞数（60+90）は、18 の格子内に 150 個、そして、違い（90-60）は 30 である。表 2.5 より、これは単独で偶然に予想される違い（24）を上回るなので、この結果は放棄され、新しい複製サンプル標本を作製する。

例 2 : 1 + 9 (1:10) の希釈において、複製標本の一方が 5 つの格子内に 204 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数で、複製標本の他方が 5 つの格子内に 198 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数だった場合、合計細胞数 (204+198) は、10 の格子内に 402 個、そして、違い (204-198) は 6 である。表 2.5 より、これは単独で偶然に予想される違い (39) を下回るので、この結果は採択される。

このサンプルのペルオキシダーゼ陽性細胞濃度は、1 + 9 (1:10) 希釈で、nL あたり $C = (N/n) \times (1/10)$ 、あるいは $(402/10) / 10 = 4.02$ 細胞 / nL、あるいは 4.0×10^6 細胞 / mL (2 つの主要な計算方法)。

例 3 : 1 + 9 (1:10) の希釈において、複製標本の一方が 9 つの格子内に 144 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数で、反復測定他方が 9 つの格子内に 162 個のペルオキシダーゼ陽性細胞数だった。合計細胞数 (144+162) は、18 の格子内に 306 個、そして、違い (162-144) は 18 である。表 2.5 より、これは単独で偶然に予想される違い (34) を下回るので、この結果は採択される。

それぞれの計算盤において 9 つの格子を評価したとき、このサンプルのペルオキシダーゼ陽性細胞濃度は、1 + 9 (1:10) 希釈で、nL あたり $C = (N/1.8) \times 10$ 細胞 = 1μL あたり $(306/1.8) \times 10 = 1700$ 、あるいは 1.7×10^6 細胞 / mL (2 つの主要な計算方法)。400 細胞に満たないため、表 2.2 で与えられる 306 細胞のサンプリングエラーを報告する (おおよそ 6%)。

例 4 : 1 + 9 (1:10) の希釈において、ペルオキシダーゼ陽性細胞がどちらのサンプル標本にも 9 個すべての格子内において 25 個に満たなかった。濃度は $<277\,000$ / mL。「ペルオキシダーゼ陽性細胞はこのサンプル内には見当たらず。濃度算定のためにはあまりにも少ない細胞数 ($<277\,000$ / mL)」と報告する。

2.18.1.8. 基準値

現在、妊孕性を有する男性の精液に存在するペルオキシダーゼ陽性細胞の基準範囲はない。追加検証は保留のままであり、このマニュアルではペルオキシダーゼ陽性細胞の基準値は 1.0×10^6 / mL としておく。

Comment 1: 射精精液中の総ペルオキシダーゼ陽性細胞数は、炎症性の状態の重症度を反映するかもしれない (Wolff, 1995)。この数値はペルオキシダーゼ陽性細胞の濃度を前精液の液量と乗ずることによって求めることができる。

Comment 2: 不妊男性のペルオキシダーゼ陽性細胞の cut-off 値の報告は、多形核白血球 (PMN) 0.5×10^6 から 1.0×10^6 / mL、または総白血球 1×10^6 から 2×10^6 / mL の間で変動している (Wolff, 1995)。このマニュアルの前版では、白血球濃度が 1×10^6 / mL 以上の場合を“leukocytospermia”としていた。この設定値があまりにも低いと考える者もいれば (Wolff, 1995) 一方で、高すぎると主張する者もいた。

最終的な試験結果（精子の質、体外受精の結果、細菌の存在、活性酸素種に対する精子の反応など）を見た上で総合的に判断されることとした（Sharma et al., 2001; Punab et al., 2003）。

Comment 3: 射精精液中に大量の白血球が含まれる場合（leukocytospermia、膿精液症）は、感染や精子の質の悪さと関係しているかもしれない。

Comment 4: 白血球の存在によって精子が受ける損傷の程度は、射精精液中の総白血球数、および精子数に対する白血球数に依存している。

Comment 5: 白血球は、酸化攻撃によって精子の運動性と DNA の完全性を損なわせる（4.1 参照）。しかし、観察された白血球浸潤の程度次第で損害を与えるかどうか、例えば、浸潤の部位や時期、関係している白血球が自然のものなのか否か、それらが活性化状態でいるかどうか、精液検体から推察することは不可能である。（Tomlinson et al., 1993; Aitken & Baker, 1995; Rossi & Aitken, 1997）。

2.19 精液中の未熟生殖細胞の評価

生殖細胞は、円形精子細胞と精母細胞、まれに精原細胞を含む。それらは、染色した精子塗抹標本で判別することができるが、細胞が退化しているとき、炎症性の細胞と区別することは難しいかもしれない。

精子細胞と精母細胞は、通常、パパニコロー染色（Johanisson et al., 2000）による精子塗抹標本染色で白血球と区別することができる（2.14.2 参照）。染色配色、核の大きさや形（図版 6, 10, 11, 12, 13 と 14）、細胞内ペルオキシダーゼの欠如や白血球特異抗原の欠乏（3.2 参照）に基づいて識別することができる。多核精子細胞は、形態学的に多形核白血球と混同しやすいが、より青みがかった多形核白血球と比較して、ピンクがかかった色に染色することができる（Johanisson et al., 2000）。円形精子細胞は形成過程で先体（Couture et al., 1976）、レクチン（4.4.1 参照）、もしくは特異的な抗体（Homyk et al., 1990; Ezeh et al., 1998）などに対する特異的な染色により区別できると思われる。

核の大きさは識別に役立つであろう。精原細胞（精液中にはめったに見られない）はおおよそ $8\mu\text{m}$ の核があり、精母細胞はおおよそ $10\mu\text{m}$ の核である。精子細胞は $5\mu\text{m}$ の核がある。それらの大きさは、退化と分裂が核の大きさに影響を及ぼすことから、指針になるにすぎない。

2.20 精子の被覆抗体試験

精子が凝集した場合（運動精子が頭部と頭部、尾部と尾部、またはそれらが混在した状態でお互にくっついた場合）（2.4.4 参照）、精子抗体の存在が原因であるかもしれない。

Comment 1: 精子抗体は、精子凝集なしで存在することがあり得る。同様に凝集は、精子抗体以外の要因に起因することもあり得る。

Comment 2: 単なる精子抗体の存在は、精子自己免疫の判断には不十分である。抗体が精子機能を著しく妨害することの証明が必要である。通常、精子粘液進入テスト（3.3 参照）によって行われる。抗体は透明帯結合や先体反応を阻止する。

精液中の抗精子抗体（ASAs）は、完全に IgA と IgG の 2 つの免疫グロブリン分類に属する。IgM 抗体は、それらよりも大きいため、精液中では見つからない。IgA 抗体は、IgG 抗体より大きな臨床的意義があるかもしれない（Kremer & Jager, 1980）。両方の分類は、関連したスクリーニングテストで精子細胞上や体液中に検出される。

- 精子上の抗体に対する試験（直接試験）。混合抗グロブリン反応（MAR）テスト（Bronson et al., 1984）とイムノビーズ（IB）テスト（Bronson et al., 1982; Clarke et al., 1982, 1985）の 2 つの直接試験を記述する。MAR テストは新鮮精液を用いて実施されるのに対し、IB テストでは洗浄精子が用いられる。この 2 つのテストの結果は、必ずしも一致するわけではない（MacMillan & Baker, 1987; Scarselli et al., 1987; Meinertz & Bronson, 1988; Hellstrom et al., 1989）。しかし、IB テストの結果は血清中の抗体を検出する運動抑制テストの結果とよく相関する。IB テストと MAR テストの試験方法は異なるが、いずれの方法においても精子 / ビーズ製剤は顕微鏡によって検査される。ビーズは精子表面に抗体を有する運動精子と不動精子に付着する。結合したビーズの運動精子の割合を記録する。
- 精子の存在しない液体（すなわち精漿、血清や液化させた頸管粘液など）に対する抗精子抗体検査（間接法）。これらのテストでは、抗精子抗体の存在が疑われる液体を希釈後に、非働化处理した上で、精漿を除去された抗体を有しないドナー精子を添加して培養を行う。検体中の抗精子抗体はドナーの精子に特異的に結合し、上記のように直接テストの場合と同じ方法で評価される。信頼度の高い結果を得るため、精子と抗体の相互作用のために十分に時間をかけることが重要であるが、精子の運動性が時間とともに低下することを心にとめておかなければならない。テストは運動精子の状態に依存する。

Note 1: ここで記述される2つの抗精子抗体テストキットは市販されている。両方とも運動精子の状態に依存する。運動精子が不十分であれば、精漿や血清中の間接的な試験が可能である。

Note 2: 全ての精子を殺したり、精子の運動性を妨げたりする細胞毒性を有する抗体は、これらの分析で見つけることはできない。

2.20.1 混合抗グロブリン反応試験

混合抗グロブリン反応（MAR）テストは安価で、迅速で、感度が高いスクリーニングテストである（Rajah et al., 1992）が、直接イムノビーズテスト（2.20.2 参照）より得られる情報は少ない。

MAR テストでは、抗体に覆われたビーズと洗浄していない精子表面と結合させるために「橋渡し」抗体（抗 IgG または抗 IgA）が用いられる。直接的な IgG と IgA MAR テストは、新鮮で、未処理の精液とラテックス粒子（ビーズ）を混ぜ合わせることによって実施されるか、ヒト IgG または IgA で被覆された赤血球を用いる。懸濁液には単一特異的な抗ヒト IgG か抗ヒト IgA を加える。粒子と運動精子の間の混合した凝集の形成は、精子上に IgG もしくは IgA 抗体が存在することを示す（ビーズ間の凝集は、抗原-抗体の評価のために陽性コントロールとして用いられる）。

2.20.1.1. 手順

1. 精液検体をよく混ぜる（Box 2.3 参照）。
2. 精液 3.5μL をとり、顕微鏡用スライドにおく。
3. それぞれの直接テストのコントロールとして、3.5μL の抗精子抗体陽性精液と 3.5μL の同じく抗精子抗体陰性精液を別々のスライドにのせる。その精液は、前述の直接 MAR 試験が示すように、それぞれ抗精子抗体の有する男性と有さない男性からのものでなければならない。あるいは、陽性の精子は抗体を有することが既知である血清との共培養によって作出することもできる（2.20.3 参照）。
4. IgG で被覆したラテックス粒子（ビーズ）を 3.5μL ずつ、それぞれテストとコントロールの血清のドロップに加え、ピペットチップにて攪拌し混ぜる。
5. 各々の精液とビーズとの混和物に、ヒト IgG に対する抗血清 3.5μL を加え、ピペットチップにて攪拌し混ぜる。

6. およそ 20 μ m の深さとなるように、懸濁液をカバーガラス (22mm×22mm) で覆る (Box2.4 参照)。
7. スライドを水平に、室温の加湿器 (例えば、覆われたペトリディッシュ内の湿らせた紙の上など) に 3 分間保存する。
8. 3 分後と 10 分後に 200 倍もしくは 400 倍の倍率の位相差顕微鏡でプレパラートを観察する。
9. IgG で被覆したビーズの代わりに IgA を、抗 IgG 抗体の代わりに抗 IgA 抗体を用いた手順を繰り返す。

2.20.1.2. 判定

精子が表面に抗体を持っているならば、ラテックスビーズは精子に付着する。まず、運動精子が付着した粒子のいくつか、もしくは集団とともに動きまわっているのが見られる。結局、凝集は精子の動きを制限するように大きな塊となり、被覆抗体を持っていない精子は、粒子の間で自由に動いているのが観察される。

評価の目的は、ビーズが付着した運動精子の割合を決める。一般的な問題は、ビーズの近くにあるが付着していない非前進性精子により生じる。ビーズが付着しているかどうかは、小さなピペットチップでカバーガラスを軽く叩くことによって確かめることができる。活性化した精子の動きに同調してビーズも同じように動いている場合には、結合陽性と判定する。

1. 運動精子のみを記録し、2 つ以上のラテックス粒子と結合した運動精子の割合を測定し、尾部先端への結合は無視する。
2. サンプリングエラーを許容範囲内に収めるために、それぞれの反復測定において少なくとも 200 個の運動精子について測定する (Box2.5 参照)。
3. 粒子が付着した運動精子の割合を計算する。
4. ラテックス粒子の結合した精子の部位 (頭部、中片部、主部) と種類 (IgG もしくは IgA) を記録する。尾部先端への結合は無視する。

Note 1: 100%の運動精子が3分でビーズ結合している場合、その時点で試験の結果とする。10分で再判断はしないこと。

Note 2: 3分経過時点で全ての運動精子がビーズに結合していなかった場合、10分経過時点で再判断する。

Note 3: 精子が10分で不動の場合、結果として3分経過した時点での評価を用いる。

2.20.1.3 参考値

現在のところ、妊孕性を有する男性の精液の MAR テストで、抗体に結合した精子の参考値はない。まだ実証されていないが、このマニュアルでは粒子と付着した運動精子が 50%の割合であることを基準値としている。

Comment: 子宮頸管粘液への精子進入と生体内受精は 50%以上の運動精子に抗体が結合している時、有意に障害される (Abshagen et al., 1998)。尾部先端のみ限定して粒子が付着している場合は、受精への機能の低下とは関係なく、不妊ではない男性にも存在することがあり得る (Chiu & ChamLey, 2004)。

2.20.2 直接イムノビーズテスト

この分析法は MAR テストより時間はかかるが、精漿中の多くの未知成分の中から取り除かれた精子表面上の抗体についての情報を得ることができる。

直接イムノビーズ (IB) テストでは IgG または IgA に対して共有結合したウサギ抗ヒト免疫グロブリンで被覆されているビーズを、洗浄した精子と混ぜ合わせる。運動精子に抗ヒト IgG または IgA を一緒にしたビーズが結合することは、精子の表面に IgG または IgA 抗体が存在することを示す。

2.20.2.1. 試薬

1. ウシ血清アルブミン (BSA) 添加 Dulbecco のグルコースリン酸緩衝液 (PBS) あるいは BSA 添加 Tyrode 液 : 付録 4、項 A4.2 と A4.9 参照。
2. 緩衝液 I : 0.3g の Cohn Fraction V BSA を 100mL のダルベッコの PBS または Tyrode の培養液に加える。
3. 緩衝液 II : 5g の Cohn Fraction V BSA を 100mL のダルベッコの PBS または Tyrode の培養液に加える。
4. すべての溶液を 0.45 μ m のフィルターでろ過し、使用の前に 25~35°C に保温する。

2.20.2.2. イムノビーズの準備

1. それぞれのイムノビーズの種類 (IgG、IgA) ごとに、別々の遠心分離管で 0.2mL

のストックビーズ懸濁液を 10mL の緩衝液 I に加える。

2. 500g～600g で 5～10 分遠心分離する。
3. 洗浄したイムノビーズから上清を捨てる。
4. 0.2mL の緩衝液 II 中でビーズを静かに再懸濁する。

2.20.2.3. 精子の準備

表 2.7 に示すように、これらの分析のために必要な精液の量は精子濃度と精子運動率から決定される。

表 2.7 イムノビーズテストに必要な精液（精子）の量

精子濃度 ($\times 10^6$ / mL)	精子運動率 (PR) (%)	精液量 (mL)
>50	-	0.2
21-50	>40	0.4
21-50	<40>10	0.8
10-20	>40	1.0
10-20	<40>10	2.0
<10>5	>10	>2.0

1. サンプルをよく混ぜる (Box 2.3 参照)。
2. 精液必要量を遠心管に移し、緩衝液 I を 10mL まで加える。
3. 500g で 5～10 分、遠心する。
4. 精子洗浄後、上清を捨てる。
5. 精子の沈渣を新しい緩衝液 I 10mL で静かに懸濁する。
6. 500g で 5～10 分、遠心する。
7. 上清を捨てる。
8. 精子の沈渣を緩衝液 II 0.2mL で静かに懸濁する。

Note 1: 1.0mL以上のサンプルであれば、3回の洗浄が必要である。

Note 2: 精子運動量の低いサンプル（10%か、それ以下）は明確な結果が得られないかもしれない。この場合には間接イムノビーズテストを考える（2.20.3参照）。

2.20.2.4. 手順

抗精子抗体-陽性精子と抗精子抗体-陰性精子のそれぞれの検査には、コントロールを置くべきである。精液は、抗精子抗体の有無にかかわらず、それぞれに、先のイムノビーズテストを実施すべきである。

1. 検査のために洗浄した精子懸濁液 5 μ L を顕微鏡スライドに置く。
2. 抗精子抗体-陽性精子と抗精子抗体-陰性精子 5 μ L ずつを別々のスライドに準備する。
3. それぞれの精子ドロップのそばに抗-IgG イムノビーズ懸濁液 5 μ L 置く。
4. ピペットチップで精子ドロップと抗-IgG イムノビーズをかき混ぜる。
5. 深さ約 20 μ m のドロップに 22mm $\times$ 22mm カバーグラスを置く（Box 2.4 参照）。
6. スライドを水平に、3~10 分間、湿った容器（例えば、湿ったろ紙でペトリ皿を覆う）に置く。培養の間にイムノビーズ結合がかなり減少するため、スライドを評価する前は 10 分以上待たないこと（Gould et al., 1994）。
7. 倍率 $\times$ 200 または $\times$ 400 の位相差顕微鏡でスライドを観察する。
8. 頭部一尾部の結合した精子は無視し、また、ビーズに 1 つか、それ以上結合した運動精子のみをカウントする（項 2.20.1.3）。
9. 項 2.20.1.3 で説明されたようにテストを解釈する。
10. 抗 IgA イムノビーズ懸濁液を使って手順を繰り返す。

Note: 全ての結合が10分以内に順序正しく確実に評価されるためには、スライドの準備を最優先させる。

2.20.2.5. 基準値

今のところ、妊孕男性精液におけるイムノビーズテストでの抗体結合精子の基準値はない。このマニュアルでは精子結合ビーズが 50%を基準値にするか否か結論が得られていない。

Comment: 運動精子（前進しているものと前進していないもの）の 50%、もしくは、それ以上がビーズ結合の場合、免疫学的不妊症と診断される（Barratt et al., 1992）。尾部の先端にビーズが結合しているものは、不妊と関連づけられず、妊孕男性にも存在している（Chiu & ChamLey, 2004）。

2.20.3 間接イムノビーズテスト

間接イムノビーズテストは、熱で不活性化された精子を含まない液（血清、精巣内液精漿、プロメリン処理融解による頸管粘液）の抗精子抗体を検出するのに使用される。抗体を有しないドナー精子に抗精子抗体を検査しようとする検体を混ぜて評価する方法が間接イムノビーズテストである。

2.20.3.1. 試薬

項 2.20.1 参照（直接イムノビーズテスト試薬）。

頸管粘液検査には、10IU / mL プロメライン、広域特異性のある蛋白分解酵素（EC 3.4.22.32）（Box 2.2 参照）を準備する。

2.20.3.2. イムノビーズの準備

項 2.20.2.2.参照。

2.20.3.3. ドナー精子の準備

項 2.20.2.3.参照。

2.20.3.4. 検査材料の準備

1. 頸管粘液試験では、10IU / mL プロメラインで 1+1（1 : 2）に希釈し、ピペットチップでかき混ぜ、37°Cで 10 分培養する。完全に液化したら 2000g で 10 分遠心する。上清は直ちに検査するか、-70°Cで凍結する。
2. 頸管粘液、血清、精漿、精巣内液を 56°Cで 30～40 分温め、補体を不活化する。

3. 緩衝液Ⅱで熱不活化サンプルを 1+4 (1 : 5) に希釈する (例えば、10 μ L のサンプルに 40 μ L の緩衝液Ⅱを加える)。
4. 既知の陽性精子、陰性精子を準備する。例えば、イムノビーズテストで検出された男性の血清の抗精子抗体の有無にかかわらず、それぞれの間接テストには、コントロールを置くべきである。輸精管切除男性で、もし、精子が尾部や先端との結合をのぞき、50%<の結合が認められる運動精子を有するのであれば、その男性の血清はコントロールとして用いられる。

2.20.3.5. ドナー精子と検査サンプルとの培養

1. 洗浄したドナー精子懸濁液 50 μ L と 1 : 5 に希釈された試験液 50 μ L を混ぜる。
2. 37°C で 1 時間培養する。
3. 500g で 5~10 分遠心する。
4. 上清を捨てる。
5. 精子の沈渣を新しい緩衝液Ⅰ 10mL に入れて静かに懸濁する。
6. 500g で 5~10 分遠心する。
7. 上清を捨てる。
8. 上記 5・6・7 の洗浄を繰り返す。
9. 精子の沈渣を緩衝液Ⅱ 0.2mL で静かに懸濁する。

2.20.3.6. イムノビーズテスト

1. 項 2.20.2.4 で説明したように、検査液で培養されたドナー精子のイムノビーズテストを行う。
2. 項 2.2.1.2. と 2.20.1.3. で説明したテストで評価を解釈する。

Chapter 3 選択的な手技

この章で説明するテストは、通常 of 精液検査に必要ではないが、ある特定の状況では、診断や研究目的の役に立つかもしれない。

3.1 複数の精子欠損の指標

形態学的異常精子は、複数の欠陥（頭部の中央部や主部、または、それらの組合せ）を抱えている。特にヒトの精子の損傷の度合いの研究では、形態学的異常の発生率についての詳細な評価は、形態学的に正常な精子の割合についての簡単な評価よりも役に立つであろう（Jouanet et al., 1988 ; Auger et al., 2001）。形態学的に正常な精子を記録することは、同様に頭部、中央部や主部に異常がある精子を累積全体評価の中で、精子当たりの平均異常数を与えられる。

累積的に全体評価の頭部の中央部や主部の詳細な異常に関する記録から、3 つの指標を得ることができる。

- 累積異常指標（MAI）（Jouannet et al., 1988）；
- 奇形精子症指標（TZI）（Menkveld & Kyuger, 1996 ; Menkveld et al., 2001）；
- 精子奇形指標（SDI）（Aziz et al., 1996, 2004）。

これらの指標は生体内受精と関連がある（MAI and TZI）（Jouannet et al., 1988; Menkveld et al., 2001; Slama et al., 2002）、また試験管内（SDI）（Aziz et al., 1996）での受精率が関連して、正確な病理学的状態の評価に役に立つと思われる（Auger et al., 2001; Aziz et al., 2004）。

3.1.1 複数の形態的な欠損指標の計算

各、異常精子は、頭部の中央や主部の欠陥および余分な残りの細胞質（精子頭部サイズの 1/3 以上の大きさ）をスコア化する。

指標のタイプごとに、検査室の細胞カウンターを使用することができる。

もしカウンターが使用できない場合は、簡単な評価表が使用できる。

- 累積異常指標（MAI）は、異常精子あたりの奇形の平均値である。頭部の中央や主部の奇形のすべてが計算に含まれている。この検査に使用される形態学評価基準は、David et al. (1975) から Auger & Eustache (2000) によって修正され、このマニュアル (2.15.1 と 2.15.2 参照) に提示されたものと異なっている。

- 奇形精子症指標（TZI）は累積異常指標（MAI）と同様だが、1 異常精子あたり最大 4 つの欠陥が数えられる：頭部・中央部・主部、そして、余分な残りの細胞質、1 異常精子あたりの奇形実数なら何でも含まれる。このマニュアルで与えられた形態学的な評価基準は使用できる。
- 精子奇形指標（SDI）は精子（異常精子だけではない）の総数で割った奇形値である。頭部異常のいくつかは組み込むが、それぞれ中央部、主部欠陥あたり 1 つだけを組み込む。このマニュアルで与えられた形態学的な評価基準は使用できる。

表 3.1 複数の精子欠陥指標の計算

	MAI	TZI*	SDI
最大値		4.00	.033
分母	異常精子	異常精子	全精子
(A) 計測精子数	200	200	200
正常精子 (N)	46	46	46
正常精子 (%)	23	23	23
(B) 異常精子数 (200-46)	154	154	154
(1) 頭部異常数 (MAI, SDI) もしくは、1 ヲ所以上の頭部異常を持つ精子数 (TZI)	284	154	154
(2) 中片部異常数 (MAI) もしくは、1 ヲ所以上の中片部異常を持つ精子数 (TZI, SDI)	54	52	52
(3) 主要部異常数 (MAI) もしくは、1 ヲ所以上の主要部異常を持つ精子数 (TZI, SDI)	54	46	46
(4) 残存細胞質を持つ精子数	14	14	14
(C) 異常合計 MAI: (1) + (2) + (3) = (C)	392		
(D) 異常合計 TZI, SDI: (1) + (2) + (3) + (4) = (D)		266	324
指標計算式	C/B	D/B	D/A
指標数	2.55	1.72	1.62

*奇形精子症指標（TZI）の記述は、原著論文（Menkveld et al., 2001）、the manual of the European Society of Human Reproduction、Embryology (ESHSE) and the Nordic Association for Andrology (NAFA) (ESHRE / NAFA, 2002) に従い、範囲を 1～4 までとしている。これは、このマニュアル（WHO, 1999）の前の版の記述（TZI の範囲を 1～3 とし、余分な残りの細胞質を中央部欠陥であるとみなした）と異なっている。

3.1.2 実施例

例：6 段式カウンターで精子 200 を評価したうち、一度目は、正常 42、異常 158。異常精子 158 では、頭部欠陥 140、中央部欠陥 102、主部欠陥 30、余分な残りの細胞質 44。二度目の結果は、正常 36、異常 164。そのうち、頭部欠陥 122、中央部欠陥 108、主部欠陥 22、余分な残りの細胞質 36。TZI の決定には、欠陥総数（140+102+30+44+122+108+22+36=604 異常）を異常精子（158+164=322）で割る。 $TZI=604 / 322=1.88$ である。

表 3.2 では、不妊クリニックに通う男性と子供の父となった男性の、ここ 3 年以内の MAI と TZI を提示する。

表 3.2. 子供をもつ夫婦と子供に恵まれない夫婦の精子欠陥指標

	子供に恵まれない夫婦		子供を持つ夫婦	
	MAI ¹	TZI ²	MAI ³	TZI ²
平均値	1.94	1.81	1.58	1.51
標準偏差	0.37	0.3	0.2	0.2
最小値	1.12	1.26	1.04	1.17
最大値	3.9	2.64	2.38	2.07
パーセンテージ				
5	1.44		1.27	
10	1.51	1.74	1.34	1.33
25	1.67		1.44	
50	1.88	1.81	1.58	1.54
75	2.14		1.72	
90	2.44		1.86	
95	2.65		1.94	
N	4930	103	994	107

¹ Unpublished data from J Auger, Paris, using David morphological classification (David et al., 1975, modified by Auger & Eustache, 2000) .

² Menkveld et al., 2001.

³ Jørgensen et al., 2001, using

3.2 汎白血球抗原（CD45） 免疫細胞化学的染色

過酸化酵素を含まないリンパ球、大食細胞、単核細胞など他種の白血球の顆粒を放出した多核白血球は、細胞性ペルオキシダーゼ（2.18.1 参照）のオートルイジン・テストでは検出できなかったが、免疫化学手法で検出することができる。免疫化学染色法は、顆粒細胞ペルオキシダーゼ活性の評価よりも高価で手間はかかるが、白血球と生殖細胞を見分けることに役立っている。

3.2.1 原理

すべてのクラスのヒト白血球は、特定の抗体（CD45）を現し、適切な単一抗体で検出できる。元の抗体の性質を変えることによって、大食細胞、単核細胞、好中球、B-細胞またはT-細胞のような違うタイプの白血球であっても、この基本方法に適応することができ、関心の的である。

3.2.2 試薬

1. ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液（DPBS）：付録 4 と項 A4.2 を参照。
2. トリス酸緩衝生理食塩液（TBS），pH8.2；付録 4 と項 A4.8 を参照。
3. テラミゾール-塩酸（レバミゾール） 1.0 mol/l：レバミゾール 2.4g を精製水 10mL で溶かす。
4. 基質：TBS（pH8.2） 9.7mL に、ナフトール AS-MX phosphate 2mg、ジメチルホルムアミド 0.2mL、0.1mol/l レバミゾール 0.1mL を加え、使用直前に Fast Red TR salt 10mg を加えフィルター（0.45μm）を通す。
5. 固定液：アセトンのみ、または、アセトン / メタノール / ホルムアルデヒド：アセトン 95mL に、無水メタノール 95mL と 37%（v/v）ホルムアルデヒド 10mL を加える。
6. 一次抗体：コード化された CD45、一般的な白血球抗原に対する単一抗体。
7. 二次抗体：マウス代替、ウサギ免疫グロブリン。使用希釈液は、抗体価と原料由来に依存する。
8. アルカリ性ホスファターゼと抗アルカリ性ホスファターゼの複合体（APAAP）。
9. ハリス ヘマトキシリン染色合剤（後染色として）：付録 4 と項 A4.10 参照。

3.2.3 手順

3.2.3.1. 精液の準備

1. 精液サンプルをよく混ぜる (Box 2.3 参照)。
2. 5 倍量の DPBS の約 0.5mL でサンプルの一部と混和する。
3. 500g で 5 分間遠心後、上清を取り除き 5 倍量の DPBS で沈渣を懸濁する。
4. 500g で 5 分間遠心。
5. この操作をもう一度繰り返し、沈渣を DPBS で懸濁し、精子を約 50×10^6 / mL に調整する。

3.2.3.2. 精子標本の準備

1. 清潔なスライドグラス (2.13.2 参照) に懸濁液 5 μ L をのせ 2 枚塗抹標本作製し空気乾燥させる。
2. 空気乾燥させた細胞を、無水アセトンで 10 分、または、アセトン / エタノール / ホルムアルデヒドで 90 秒固定する。
3. TBS で 2 回洗浄、洗い流す。
4. スライドは、直ちに染色するか、後で分析する場合はアルミホイルで包み、 -70°C で保管する。

3.2.3.3. 抗体と培養

1. 各スライドの細胞固定範囲をグリースペン (範囲を決めるペン) でマークし (直径約 1cm 円形)、その範囲を一次単一抗体 10 μ L でカバーする。
2. スライドを水平に、30 分湿った容器 (例えば、湿ったろ紙でペトリ皿を覆う) に置き、乾燥を防ぐ。
3. TBS で 2 回洗浄、洗い流す。
4. 標本の同じ範囲を二次抗体で覆い、培養器で 30 分培養する。
5. TBS で 2 回洗浄、洗い流す。

6. 同じ範囲に、10 μ L 抗アルカリ性ホスファターゼの複合体を加える。
7. 培養器で 1 時間培養する。
8. TBS で 2 回洗浄、洗い流す。
9. ナフトールリン酸物 10 μ L と共に 20 分培養器で培養する。

Note: 反応を強めるためには、各試薬15分を限度に、二次抗体、抗アルカリ性ホスファターゼの複合体は繰り返し染色することができる。

3.2.3.4. 後染色と封入

1. スライドグラスがいったん赤みがかったら、TBS で洗う。
2. 数秒間、ヘマトキシリンで後染色する；水道水で洗い、封入剤で封入する（2.14.2.4 と 2.14.2.5 参照）。

3.2.3.5. CD-45 陽性細胞数の評価

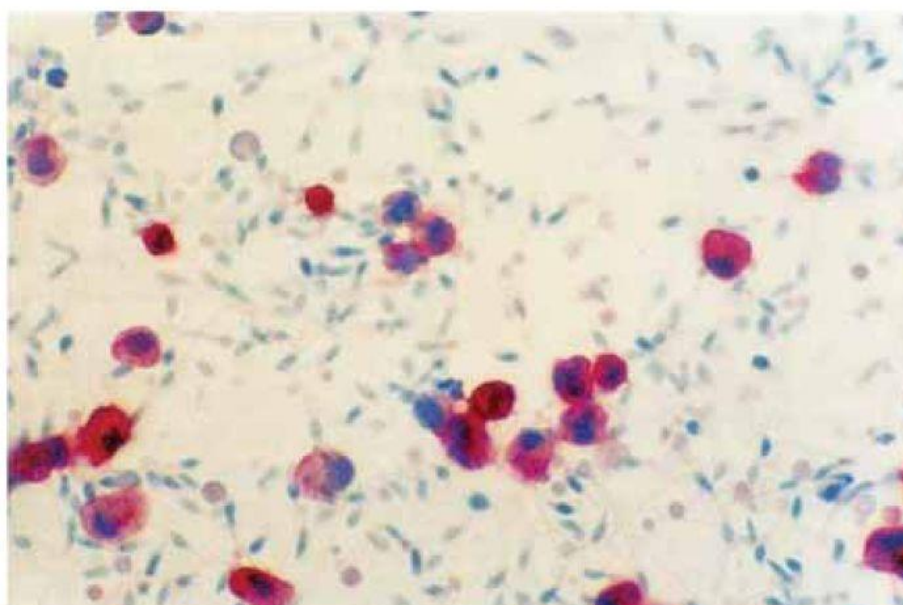
1. 光学顕微鏡×200 または×400 の倍率で、スライドの染色範囲全体を見る。CD45 陽性細胞（白血球）は赤く染まる（図.3.1 参照）。
2. サンプル不十分による誤差をなくすために、CD45 陽性細胞と精子は別々に 200、それぞれ繰り返し測定する。
3. 検査室カウンター器で CD45 陽性細胞と精子数を数える。
4. 2 番目の標本も同様に評価する（精子は 200 まで数える）。
5. CD45 陽性細胞の 2 つの数の合計と差を計算する。
6. 表 2.5、図.A7.1; 付録 7 から違いの許容性を決定する（サンプリング誤差のために、2 つのカウント間での誤差は、サンプルの 95%に起こると予想される）。
7. もし誤差が許容されるなら、濃度を計算する（3.2.3.6 参照）。もし誤差が大きすぎるなら、繰り返しスライドを再評価する。
8. CD45 陽性細胞の 2 つの有効数値の平均濃度を報告する。
9. 一射精あたりの CD45 陽性細胞の総数を計算する（3.2.3.9 参照）。

3.2.3.6. 精液 CD45 陽性細胞濃度の計算

CD45 陽性細胞濃度は、スライド上の精子に比例して計算される。もし、N が 400 精子と同じ領域で数えられた CD45 陽性細胞であれば、S は精子濃度 ($10^6 / \text{mL}$)、CD45 陽性細胞 ($10^6 / \text{mL}$) 濃度 (C) は公式 $C=S \times (N / 400)$ から計算することができる。

図 3.1 精液中の白血球

CD45 有する細胞（白血球）は赤く染色される。



RJ Aitken.提供

3.2.3.7. 方法の感度

もし、サンプル（例えば、<400）中、CD45 陽性細胞が精子より少なければ、サンプリング誤差は 5%を超えるであろう。この場合の細胞数のサンプリング誤差を報告する（表 2.2 参照）。

CD45 陽性細胞が 25 未満では、「濃度を確定するには正確性が低すぎる」と報告する。

3.2.3.8. 使用例

例 1. 標本 1 で 200 精子あたりの CD45 陽性細胞を 20、さらに、2 枚目の標本で 200 精子あたり CD45 陽性細胞を 40 で有った時、値の合計 (20+40) は 60、差 (40-20) は 20 である。表 2.5 から、この誤差は予想許容値 (15) 以上であるため、この結果は採用せず、新しい評価をする。

例 2. 標本 1 で 200 精子あたりの CD45 陽性細胞を 25、さらに、2 枚目の標本で 200 精子あたり CD45 陽性細胞を 35 で有った時、値の合計 (25+35) は 60、差 (35-25) は 10 である。表 2.5 から、誤差が予想許容値 (15) より少ないため、この値は受け入れられる。

400 精子あたりの CD45 陽性細胞 60、 70×10^6 cells / mL 精子濃度での CD45 陽性細胞濃度は、 $C = S \times (N / 400)$ cells / mL = $70 \times 10^6 \times (60 / 400) = 10.5 \times 10^6$ cells / mL、あるいは 10×10^6 cells / mL (2 つとも有効)。細胞 400 未満では、表 2.2 (約 13%) で与えられている、60 細胞に対するサンプリング誤差を報告する。

3.2.3.9. 基準値

今のところ、妊娠男性精液中の CD45 陽性細胞の基準値はない。 1.0×10^6 / mL ペルオキシダーゼ陽性細胞であれば、その値は総白血球中に高濃度であるという意味だが、すべての白血球がペルオキシダーゼ陽性顆粒細胞というわけではない。

Comment: 総白血球数 (射精精液の総白血球数) は、炎症状態の重症度を反映している可能性がある (Wolff, 1995)。射精精液総量に CD45 陽性細胞濃度を掛けることによって、射精精液の CD45 陽性細胞総数が得られる。

3.3 精子と子宮頸管粘液の相互作用

月経周期の限られた期間は、エストロゲンに影響され、粘液は精子の進入を支持している。女性の中でも精子が頸管粘液に進入できる期間はかなり違い、同じ個人においても、一周期ごとに異なる可能性がある。

Note: 頸管粘液の特性の評価、保存、詳細な回収法は、付録5を参照のこと。

Comment: 男性が精液サンプルを採取できない時には、性交後テスト (3.3.1 参照) から何らかの情報を得ることができる。

3.3.1 生体内 (性交後) テスト

3.3.1.1. 目的

性交後テストの目的は、頸管粘液中の運動精子数、生存精子の評価 (Sobrero & MacLeod, 1962)、性交数時間後の精子状態 (粘液の蓄積の役目) (Moghissi, 1976) を測定することである。この情報は、パートナーの男性または女性の陽性精子抗体の重要性を評価するのに用いられる。

3.3.1.2. タイミング

性交後テストは、できるだけ、臨床診断（例えば、通常期間の周期、基礎体温、頸管粘液の変化、膣の細胞診断、血中または尿中の黄体ホルモン・エストロゲン測定、卵巣の超音波検査）によって確定された排卵直前に行うべきである。粘液は、標準時（性交後9～14時間）に検査室で評価されることが重要である。

3.3.1.3. カップルへの説明

性交後テストの準備のために、テスト最適日、注意事項を説明する：

1. テストの2日前から、性交、マスタベーション（男性）を控える；
2. テスト日の前夜、膣での性交；
3. 性交中、膣には何も塗らず、性交後の女性は膣を洗浄しない（シャワーは浴びてもよいが浴槽には入らない）；
4. 女性は、翌朝、テストのためにクリニックに来院し状況を伝えなければならない。

3.3.1.4. 手順

1. 潤滑油を用いていない膣鏡を膣に挿入する。
2. 針なしのツベルクリン注射器、ピペットまたはポリエチレンチューブで後膣円蓋部に溜まった精液をできるだけ吸引する。
3. 別の注射器またはカテーテルで、子宮頸管からできるだけ多くの粘液を吸引する。
4. 粘液サンプルをスライドグラスに置いて、カバーグラス（22mm ×22mm）をかけて、平らにする。これはシリコン油または直径 100 μ mのガラスビーズ（Drobnis et al.,1988）を含んだワックスワセリン（Box3.1）を用いたカバーグラスを用いることで、厚みを一定にできる。
5. 400 倍の光学位相差顕微鏡で調べる。

Note: 信頼できる結果のために、粘液サンプルは高品質で血液汚染がないことが重要である。

Box 3.1 ワックス・ワセリンの準備

事前にワックス・ワセリンを混ぜたものを準備する。使用の準備ができるまで、室温に保存する。ビーカーでワックス（48—66°C 融点）を溶かし、ワセリン（およそ 2 倍量のワセリンへおよそ 1 倍量のワックス）をガラスの筒に入れて混ぜる。まだ温かい間に、3mL か 5mL の注射器（針なしで）に吸引する。一旦混合物が固まれば、注射器に先の鈍い 18-ゲージの針を付けて詰め込む。

3.3.1.5. 膣内貯留精液サンプル

精子は通常 2 時間以内に膣で死滅する。精液が膣内に溜まっていたことを確認するため、膣内貯留サンプル（2.4.2 参照）を湿った状態で準備し、検査する。

3.3.1.6. 子宮頸管サンプル

子宮頸管の下部の精子数は、性交からの時間に依存する。
性交 2—3 時間後に、子宮頸管の下部に精子が多く蓄積する。

子宮頸部粘液中の精子数の推定は、伝統的に、強拡大の顕微鏡視野あたりの数に基づいている（Box3.2 参照）。粘液中の精子濃度は、 μL あたりの精子数として表されなければならない。

Box 3.2 深さ 100 μm 中の強拡大あたりの粘液量観察のための準備

各々の顕微鏡視野の粘液量は、視野の範囲（ πr^2 、 π は約 3.142、 r は顕微鏡視野の半径）とチャンバーの深さ（ここでは 100 μm ）に依存する。顕微鏡視野の直径は、ステージマイクロメーターで測定するか、接眼レンズの開口の直径を対物レンズの倍率で割ることによって推測できる。

対物レンズ $\times 40$ と接眼レンズ $\times 10$ の開口径 20mm の時、顕微鏡視野は、直径約 500 μm （20mm / 40）。この場合、 $r = 250\mu\text{m}$ 、 $r^2 = 62500\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 196375\mu\text{m}^2$ 、容量は 19637500 μm^3 または 20nL。

このように、100 μm の深さで $\times 400$ 強拡大視野での精子 10 カウントは、粘液 20nL あたり約 10 精子のカウントまたは μL あたり 500 精子に等しい。しかし、数えられた細胞の総数は少なく、サンプリングエラーは高い。

表 2.2 に 10 細胞のサンプリングエラーが報告されている（約 32%）。

子宮頸部粘液の精子運動性は、次のように分類する：

- PR = 前進運動精子；
- NP = 非前進運動精子；
- IM = 不運動精子。

通常、子宮頸部の機能で最も重要な指標は、前進運動精子の存在です。

3.3.1.7. 解釈

- 精子が粘液で見つからなければ、テストは陰性。
- 性交後 9–14 時間後、子宮頸管粘液に前進運動精子が存在すれば、頸管因子や不妊を引き起こす可能性のある男、女の精子自己免疫に対して有意に議論できる (Oei et al., 1995) .
- 振動現象を示している非前進精子が見られるとき、粘液または、精子上に抗精子抗体の存在する可能性がある。

Note: 最初の結果が陰性か異常であれば、性交後テストは繰り返すべきである。

Comment 1: 精子が腔内貯留サンプルで見つからなければ、カップルに腔内射精をしたか確認すべきである。

Comment 2: 陰性検査結果は、誤ったタイミングによるためかもしれない。月経周期のあまりに早く、または、あまりに遅く行われると、妊娠可能女性で陰性になる可能性がある。一部の女性において、検査は全ての月経周期の間、わずか 1 または 2 日が陽性かもしれない。排卵を正確に予測することができないとき、周期の間に数回、性交後検査を繰り返すか、試験管内で何度か検査を行う必要がある。

Comment 3: 最適なタイミング周期において何度も性交後検査が陰性の時、子宮頸部の不妊原因を調べる必要がある。

3.3.2 試験管内検査

精子と子宮頸管粘液相互作用の詳細な評価は、試験管内の進入テストを実施するのが良い。これらのテストは通常、性交後検査陰性の後、実施され、対照として提供精液と提供子宮頸管粘液を使ってクロスオーバーテストで実施されるとき、最も信頼できる情報が得られる。この検査は、男性または女性パートナーが抗精子抗体陽性の意義を評価するためにも用いられる。

- 精子子宮頸管粘液相互作用テストの目的が様々な子宮頸部の粘液標本の質を比較するとき、正常精子検体を使用すべきである。
- 様々な精液検体の質を評価する目的の時、質の良い同じ検体で性周期中間の子宮頸管粘液を使用すべきである。

Note: 子宮頸管粘液の収集、貯蔵と評価の特徴の詳細については付録5を参照のこと。

Comment 1: 提供子宮頸管粘液は、人工授精または体外受精の採卵予定の女性の性周期の中間期に採取できる。子宮頸管粘液は、自然周期または、性腺刺激ホルモンで排卵が誘発された周期の精子注入前に採取すべきである。

Comment 2: 女性は、検査のためにエストロゲン化した粘液を産生するために、7ー10日間エチニルエストラジオールを投与される（付録 5, A5.2.1 参照）。

Comment 3: 排卵誘発をクロミフェン投与されている婦人からの子宮頸管粘液は用いるべきでない。クロミフェンが頸部に抗エストロゲン作用の影響をしているからである。

- 性周期の中間期の頸管粘液を使用すべきである。
- 試験管内テストは精液採取 1 時間内にすべきで、脱水または精液の質に影響する温度変化を防ぐためである。
- 子宮頸管内膜の子宮頸管粘液の pH は、pH 試験紙（範囲 6.0—10.0）を用いて、その部位または、採取後すぐに測定すべきである。もし、pH をその部位で測定するならば、外子宮頸管粘液の pH は子宮内頸管粘液の pH より常に低いので注意して測定すべきである。注意することは、膣内の pH は低いゆえ膣分泌物のコンタミを避けなければならない。
- 精子は、子宮頸管粘液の pH の変化に影響されやすい。酸性粘液は精子を不動化するが、アルカリ性の粘液は運動性を増す可能性がある。子宮頸管粘液の過度のアルカリ性（pH8.5）は、精子の生存能力に悪影響を与える可能性がある。
- 子宮頸管粘液内の精子運動性と生存性の至適 pH は 7.0～8.5 で、これは性周期中期の子宮頸管粘液の正常 pH 範囲である。一方、pH6.0 から 7.0 の間が精子進入性に適合し、運動性は pH 6.5 より下でしばしば弱まる。もし、粘液の pH が 7.0 未満である時、精子子宮頸管粘液テストはしばしば中止される。

Note: 代理ゲル、例えばウシ子宮頸管粘液または合成ゲルは、精子—頸管粘液相互作用の試験管内テストのために、ヒト子宮頸管粘液と等しいと考えることはできない。しかし、これらの材料の使用は、粘着性媒体の精子運動性に関する情報を提供してくれる（Neuwinger et al., 1991; Ivic et al., 2002）。

3.3.3 試験管内単純化スライドテスト

3.3.3.1 手順

1. 1 滴の子宮頸管粘液をスライドグラスに置いて、カバーグラス (22mm×22mm) を掛けて平らにする。この試料の深さは、直径 100- μm のガラスビーズを含んだシリコン油またはワックスセリン (Box3.1 参照) を混ぜたものでカバーグラスを支持することによって標準化することができる (Drobnis et al., 1988)。
2. カバーグラスの両側の端に接触するように 1 滴の精液を置くと、精液が毛細管現象によってカバーグラスの下を移動する。この方法で子宮頸管粘液と精液との間で明確な接触面が得られる。
3. スライドグラスを水平に 30 分、37°C 乾燥を防ぐため 湿潤箱に置く (例えば、覆ったペトリ皿の中の濾紙の上で)。
4. 光学位相差顕微鏡 400 倍で接触面を調べる。

3.3.3.2 観察

以下の特徴が存在するかどうか注意して見る：

1. 3 分以内に、精液の指 (指骨) のような像が伸びて粘液の中に進入する。これは流体の生体的な特性で、無精子症の検体でさえ起る (Perloff & Steinberger, 1963; Moghissi et al., 1964)。
2. 大部分の精子は、粘液に入る前に、指骨状の部分に進入する。多くの場合、一個の精子は、精子の列を粘液に導くように見える。
3. 一度、子宮頸管粘液の中に進入すると、精子は扇形に広がって、無作為に動くように見える。いくらかの精子は精漿の方に引き返すものもあるが、ほとんどは細胞の破片や白血球の抵抗に会うまで子宮頸管粘液の中に深く移動する。
4. 精子は、精液・粘液接触面から 500 μm (すなわち、およそ 10 精子の長さ) かそれ以上粘液に進入する。
5. 精子は、運動性を有していること (おおよその精子運動率と、それらが前進運動をしているかどうか記載しておく)。

3.3.3.3 解釈

簡易化スライドテストの解釈は主観的である。理由は平板スライドグラスにおいて、精液

粘液接触面のサイズと形を標準化することが不可能であることによる。従って、それは精子粘液相互作用の質的な評価だけのものである。それでも、多くの役に立つ観察をすることができる。

1. 正常な結果：精子は粘液層に進入し、そして、**90%以上**が確実な進行性運動型である。この時、精子子宮頸管粘液相互作用に関して問題がないことを示唆する。
2. やや異常な結果：精子は粘液層に深く進入しているものの、ほとんどは精液—粘液相互層から **500 μ m** (すなわち、約 **10** 個の精子の長さ) より内部へは進んでいない。これは、精子子宮頸管粘液相互作用に関して問題があることを示唆する。
3. 異常結果：(1) 精子は粘液層に深く入りこむが、急速に不動になるか、「振動」運動を示す。または (2) 精子は、精液粘液層を進入できない。指骨状の密集を形成ができない。しかし、精子は相互層の精液側に沿って集まる。これは、粘液または、精子表面に抗精子抗体が存在することを示唆する。

Comment: 異常な結果が夫婦の精液と粘液の検体を使って得られるとき、提供精液と提供子宮頸管粘液を使ったクロスオーバーテストは、精液か子宮頸管粘液に問題があるかどうか確認することができる。

3.3.4 毛細管テスト

毛細管テストは **Kremer (1965)** によってはじめて報告され、いろいろ修正法が提案されてきた。このテストは、毛細管の中の粘液に精子進入する能力を測るものである。ここで推薦する手順は、最初のテストを基にしている。

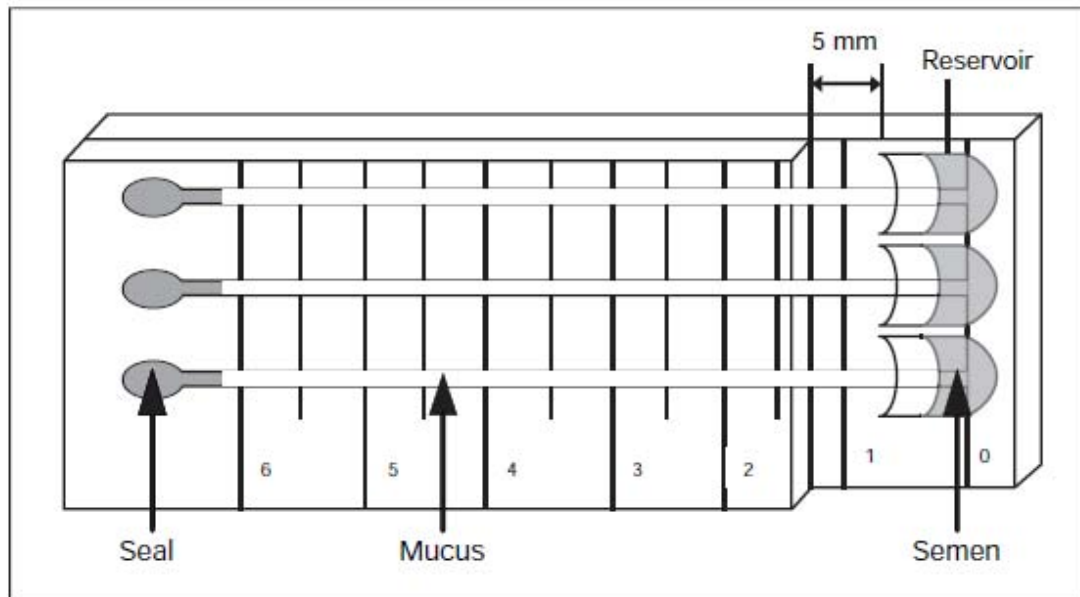
3.3.4.1. 装置

いろいろな種類の毛細管が使われた、しかし、平らな毛細管で **5cm** の長さ、観察する部分は内部の直径 **0.3mm** が推奨される。

クレマー精子進入測定器 (図 3.2) は、次のように検査室で造ることができる。

1. プラスチック試験管 (半径約 **3.5mm**) から切った **3** つの小貯留容器をガラススライドの上に接着する。
2. 最初のガラススライド上に **2** 枚目のガラススライドを貼る。**2** 枚目のスライドは **1.5cm** 短くすべきで、貯留容器から **5mm** 離れたところに置かれなければならない。この構築は、毛細管とガラススライドの間の精液の漏れを防ぐ。
3. **1** センチメートルのスケールをスライドに付ける。

図 3.2 クレーマー精子進入測定器



3.3.4.2. 手順

1. 液化した精液（射精後 1 時間以内）の約 100 μ L を精液貯留容器に各々入れる。
2. 必ず気泡が入らないようにして、各々の毛細管に子宮頸管粘液を吸引する。
3. 毛細管密封剤、粘土または類似した材料で各々のチューブの一端に封をする。
チューブの開いた端からわずかに粘液が突き出るように、十分な密封剤を塗らなければならない。
4. 毛細管の開いた端は精液サンプルを含んだ貯留容器へ約 0.5cm 入るようスライド上に置く。
5. 精液と粘液の乾燥を防ぐために、湿った箱に 37°C で 2 時間水平に装置を置く（例えば水で湿らした濾紙でおおわれたペトリ皿の中）。
6. 100 倍光学位相差顕微鏡で毛細管を調べる。概説は項 3.3.4.3 にある。
7. 装置を 37°C インキュベーターに戻して、もう一度前進精子の存在を 24 時間後に毛細管を調べる。

3.3.4.3. 観察

2 時間後に、前進運動性精子の移動距離、進入密度、移動減少を評価する。

1. 移動距離: 精液貯留容器の毛細管の端からチューブの中の最も遠い精子までの距離を記録する。
2. 進入密度: 精液貯留容器の毛細管の端から 1cm と 4.5cm で測定する。各々の点で、弱拡大 (×100) 1 視野あたりの精子の平均数を記録する。平均精子数は隣接した 5 つの弱拡大から得られる。進入密度ランクは表 3.3. のように表す。検査の分類のために、1cm または 4.5cm のどちらかの、最も高い精子進入密度ランクを記録する。

表 3.3 精子進入濃度ランク

弱拡大あたりの精子平均数	ランク順位
0	1
0-5	2
6-10	3
11-20	4
21-50	5
51-100	6
>100	7

3. 移動減少: 1cm と比較して 4.5cm の進入密度の減少として計算する。これは、異なったランク順位として表わす。

例 1. 1cm の進入密度は、弱拡大で 51-100、4.5cm では 6-10 である。

移動減少値は、3 (ランク 6 からランク 3) (表 3.3)。

例 2. 1cm の進入密度は、弱拡大で 21-50、4.5cm では 51-100 である。

移動減少値は 0、理由は進入密度が実際には高まっている (ランク 5 からランク 6) (表 3.3)。

4. 前進運動精子: 2 時間と 24 時間に子宮頸管粘液内の前進運動精子の存在を測定する。

3.3.4.4. 解釈

結果は、表 3.4 に従って陰性、乏しい、良いに分類される。

3.4 付属生殖器機能のための生化学分析評価

表 3.4 毛細管試験結果の分類

移動距離 (cm)		高進入密度 (1または 4.5cmでの弱拡大当 りの精子数		1cmから 4.5cmの移 動減少（ラ ンク順位を 引く）		粘液内の前 進性持続時 間（時間）	分 類
1		0		—		—	陰性
<3	or	<10	or	>3	or	2	乏しい
4.5	and	>50	and	<3	and	>24	良
検査結果の他のすべての組み合わせ							普通

質の悪い精液は、精巣で異常な精子が産生されている可能性がある。あるいは精巣後の精巣上体の異常、あるいは異常副生殖腺分泌物からの射精による障害から生じている可能性もある。副生殖腺からの分泌物は、腺機能を評価するために測定することができる。例えば前立腺からのクエン酸、亜鉛、 γ -グルタミルペプチド転移酵素と酸性ホスファターゼ；精囊のためのフルクトースとプロスタグランジン；精巣上体のためのフリーL-カルニチン、グリセロフォスフォコリン（GPC）と中性の α -グルコシダーゼである。

感染症は時々これらのマーカーの分泌の減少を引き起こす。しかし、マーカーの総量は正常範囲内にとどまっている。感染症は分泌上皮に不可逆の損害を引き起こすこともありえる。そのため、治療の後さえ、分泌は低いままのことがある（Cooper et al., 1990 a、von derKammer et al., 1991）。

- 前立腺の分泌能力。精液の中の亜鉛、クエン酸（Möllerling & Gruber, 1966）または酸性ホスファターゼ（Heite & Wetterauer 1979）の量は前立腺分泌をよく反映し、これらのマーカー間で良い相関関係がある。亜鉛の分光光度法の検査は、3.4.1 で記述されている。
- 精囊の分泌能力。精液中のフルクトースは、精囊の分泌機能を反映する。その評価のための分光光度法の方法は、3.4.2 で記述されている。
- 精巣上体の分泌能力。L-カルニチン、GPC と中性 α -グルコシダーゼは、精巣上体マーカーで臨床的に使われる。中性 α -グルコシダーゼは、精巣上体障害のために、L-カルニチン、GPC より特異的で、鋭敏であることが示されている（Cooper et al., 1990 a）。
- α -グルコシダーゼの 2 つのアイソフォームが、精漿中に存在している：メジャ形は中性形で精巣上体から、単独に生じ、マイナー型は酸性形で前立腺から生じる。中

性 α -グルコシダーゼの単純な分光光度法の検査法は、3.4.3 で記述されている。

Comment: 射精した付属腺分泌物の総内容物はその腺の全体的な分泌機能を反映する (Eliasson1975)。これは、全射精量を用いて付属腺マーカーの濃度を乗じて求められる。

3.4.1 精漿中の亜鉛測定

3.4.1.1. 背景

分光測光法による血清亜鉛測定キットは、市販で精液に適応できる。以下に記す方法は Johnsen & Eliasson (1987) の方法に基づき、感度 $4\mu\text{mol/l}$ で 96 穴プレートリーダーを用いた修正法 (Cooper et al.,1991) である。精液と試薬の量は、3mL または 1mL のキュベットを使う分光光度計のために、比例して調節することができる。適切な補正は、結果を計算する際にしなければならない。

3.4.1.2. 原理

合成 2- (5-ブロモ-2-pyridylazo) -5- (N-プロピル-N-sulfopropylamino) -フェノール (5-Br-PAPS) は亜鉛と結合して、色の変化をもたらす。

$5\text{-Br-PAPS} + \text{Zn}^{2+} \rightarrow 5\text{-Br-PAPS}-\text{Zn}$ 複合体を 560nm の波長の光で吸収する。

3.4.1.3. 試薬

1. 血清中の亜鉛の評価のためのキットは、市販品購入できる。色素試薬 A (60mL ビンが 2 本) と色素試薬 B (30mL ビンが 1 本) だけを使用する。
2. 亜鉛標準液 ($100\mu\text{mol/l}$) : 0.144g の硫酸亜鉛 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) を 50mL の純水に溶かして、1mL~99mL の純水を加えることによって、100 倍にこれを希釈する。
- 20°C で凍結保存する。
3. 標準曲線 : ステップ 2 で準備した $100\mu\text{mol/l}$ の亜鉛標準液に純水で希釈して 80、60、40、20、 $10\mu\text{mol/l}$ の標準液を作製する。
4. 色試薬 : 色素試薬 A の 4 等量と色素試薬 B (1 枚の 96 穴プレートのために約 25mL 必要) の 1 等量を混ぜ合わせる。このクロモゲン溶液は、室温で 2 日間、4°C で 1 週間安定である。
5. 凍結内部品質管理精漿プール (3.4.1.4 のステップ 1 参照) する。

3.4.1.4. 手順

1. 精液検査の後、残っている精液サンプルを、**1000g** で **10 分間**遠心分離する。上清を取り、無精子の精漿を測定まで **- 20°C** で保存する。無精子の精漿は、将来の分析において内部品質管理の標準として保存することができる。
2. 無精子の精漿を解凍して、ボルテックスミキサーでよく混ざる。また、内部品質管理のための保存した精漿を解凍し **1 等量**と混ぜる。
3. 精漿の各々の試料の二重希釈準備：2 本の **1.5mL** チューブの各々に純水 **300μL** を取り、**5μL** の精漿（正置換ピペットで）を加え、**5 秒間**ボルテックスミキサーで混ぜる。
4. **96 穴プレート**にステップ 3 の希釈した精漿サンプル **40μL** を 2 穴に加える。ブランク（純水 **40μL**）を 2 穴に入れる、そして、各々の標準液 **40μL** を 2 穴に入れる。
5. それぞれの穴に色素試薬 **200μL** を加え、**96 穴プレートシェーカー**の上で **5 分間**混ぜる。
6. **560nm** の波長でプレートを読む。その際、水をブランクにしてゼロ補正する。

3.4.1.5. 計算

1. サンプル中の亜鉛濃度を標準曲線（**mmol / l**）から、吸光度を比較することによって読みとる。
2. 一番上の標準より上にある結果を棄却する、そしてより大きな希釈倍数（純水を使って希釈）でこれらのサンプルを再測定する。
3. 未希釈の精漿中の亜鉛（**mmol / l**）の濃度を得るために、**61**（**5μL** 精漿を **300μL** の水で希釈）の希釈指数をかけて、結果を得る。
4. 二重測定は、**10%以内**に入らなければならない（すなわち評価値 / 平均評価値） $\times 100 \leq 10\%$ ）。もしそうならない時は、新しい精漿を用いて二重再測定する。
5. 射精中の総亜鉛量（**μmol**）を求めるために、総精液量（**mL**）を亜鉛濃度にかけて求める。

3.4.1.6. 低値基準限界

射精あたり **2.4μmol** が亜鉛の低値参照限界値である（Cooper et al., 1991 and TG

Cooper unpublished data)。

3.4.2 精漿中のフルクトース測定

3.4.2.1. 背景

以下に記す方法は、Karvonen & Malm (1955) の方法に基づき、74 $\mu\text{mol/l}$ の感度を持った 96 穴プレートリーダーを用いた修正法 (Cooper et al., 1990a) である。精液と試薬の量は、3mL または 1mL のキュベットを用いた分光光度計のために、比例して調節することができる。適切な補正は、結果を計算する際にしなければならない。

3.4.2.2. 原理

熱と低い pH の影響下で、フルクトースはインドールと色素複合体を形成する。

熱+酸

フルクトース+インドール $\rightarrow$ 複合体、470nm の波長の光を吸収する。

3.4.2.3. 試薬

精漿中のフルクトースの評価のためのキットは、市販購入できる。あるいは、以下の試薬を準備する。

1. 除タンパク薬 1 ($63\mu\text{mol/l ZnSO}_4$) : 1.8g の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 100mL の純水に溶かす。
2. 除タンパク薬 2 (1 モル / l NaOH) : 0.4g の NaOH を 100mL の純水に溶かす。
3. 色素試薬 (インドール $2\mu\text{mol/l}$ を含む $16\mu\text{mol/l}$ の安息香酸保存剤) : 200mg の安息香酸を 90mL 純水に溶かして 60°C の水浴中で振って溶解する。この溶液に 25 mg のインドールを入れ溶解し、純水で 100mL にする。フィルター ($0.45\mu\text{m}$ 孔サイズ) でろ過して、 4°C で保存。
4. フルクトース標準液 (2.24mmol/l) : 40mg の D-フルクトースを 100mL の純水に溶解する。 4°C で保存するか、一部は凍結する。
5. 標準曲線 : 2.24mmol/l の標準液を純水で希釈して、1.12、0.56、0.28 と 0.14mmol/l の 4 つの標準液を作る。
6. 凍結精漿内部精度管理検体 (3.4.2.4 ステップ 1 参照)。

3.4.2.4. 手順

1. 精液検査後、残った精液を 1000g で 10 分、遠心分離する。上清を取り、精子を含まない精漿を測定まで -20°C で保存。精子を含まない精漿は、今後の分析において内部精度管理標準品として他の検体とともに保存する。
2. 精子を含まない精漿を解凍し、ボルテックスミキサーでよく混ぜる。また、保存した内部精度管理精漿も一部を溶解し攪拌する。
3. 各々の精漿検体を二重測定で希釈準備する：各々 2 本の 1.5mL チューブに 50 μL の純水を入れ、5 μL の精漿を入れて（正置換ピペットで）攪拌する。
4. 除タンパク：希釈した検体 55 μL に、63 $\mu\text{mol / l}$ ZnSO_4 12.5 μL と 0.1 モル / l の NaOH 12.5 μL を加え混合する。室温で 15 分放置し、その後 8000g 5 分間遠心分離する。
5. 各々のサンプルから試験管へ上清 50 μL を移す。ブランク 2 検体（水 50 μL ）、各々の標準液 50 μL をそれぞれ 2 検体ずつ含む。
6. 各々のチューブにインドール試薬 50 μL を加えて、混ぜる。
7. 各々のサンプルに 32% (v/v) 塩酸 (HCl) 0.5mL を加えて、ドラフトの中で自己密封式のパラフィルムでカバーし注意して混和する。
8. 水浴 50°C で 20 分間加熱する。混和し、15 分間氷水の中で冷却する。
9. ドラフトの中で注意して、96 穴プレートに正置換ピペットで 250 μL を移す。
10. 透明な粘着性の検査フィルムで 96 穴プレートを密閉する。分光光度計を酸から保護するためである。
11. ゼロ点校正するために、水を使用して、470nm の波長でプレートを読む。

3.4.2.5. 計算

1. 吸光度を比較することによって、標準曲線 (mmol / l) から、サンプルのフルクトースの濃度を読む。
2. 結果が一番上の標準を越えれば棄却し、そしてより大きな希釈倍数で再分析する（純水を使って希釈）。

3. 未希釈精漿中のフルクトース濃度 (mmol/l) を得るために、希釈倍数 16 (5 μ L の精漿は水と除タンパク試薬 75 μ L で希釈、) を、各々のサンプルにかけて結果を得る。
4. 二重測定は、10%以内に入らなければならない (すなわち評価値 / 平均評価値) $\times 100 \leq 10\%$)。もしそうならない時は、新しい精漿を用いて二重再測定する。
5. 射精中の総フルクトース量 (μ mol) を求めるために、総精液量 (mL) をフルクトース濃度にかけて求める。

3.4.2.6. 3.4.2.6 低値基準限界

射精あたり 13 μ mol がフルクトースの低値基準限界である (Cooper et al., 1991 and TG Cooper, unpublished data)。

Comment: 精液中の低フルクトースは、射精管閉塞、先天性両側性輸精管欠損 (de la Taille et al., 1998; Daudin et al., 2000; von Eckardstein et al., 2000)、部分的な逆行性射精とアンドロゲン欠乏に特有。

3.4.3 精漿中の中性 α -グルコシダーゼ測定

3.4.3.1. 背景

精漿は精巣上体内由来の中性イソ酵素 α -グルコシダーゼと、前立腺由来の酸性イソ酵素を含んでいる。後者 (前立腺由来の酸性イソ酵素) をドデシル硫酸ナトリウム (SDS) (Paquin et al., 1984) により選択的に抑制することで、精巣上体の機能の指標となる中性 α -グルコシダーゼの測定が可能となる。カスタノスペルミン抑制剤 (阻害剤) を用いて、非グルコシダーゼ関連基質分解を調べることで、この分析の精度を更に上げることが可能となる。

以下に示す方法は 1.9 mU / mL の感度を持つ 96 ウェルのプレートリーダーを用いたものである (Cooper et al., 1990b)。精液と試薬の量は、使用する分光光度計の 3-mL キュベットあるいは 1-mL キュベットの比率に合わせて変えればよい。正確な結果を得るためには適切な補正が必要不可欠である。

3.4.3.2. 原理

グルコシダーゼは合成グルコピラノシド (ピラノイド環を含む配糖体) 基質 (酵素の作用をうけて化学反応を起こす物質) を炭酸ナトリウムの添加により黄色くなるパラニトロフェノール (広義ではニトロ基の置換したフェノール類で、狭義ではモノニトロフェノール $C_6H_4(OH)(NO_2)$ をいい、pH 5.0 では無色、pH 7.0 では黄色を呈する指示

4 種類の標準液を作製する。

9. 品質管理用の精漿内のサンプルを凍結保存する（3.4.3.4, ステップ 1 参照）。

3.4.3.4. 手順

1. 分析後の残りの精液サンプルを 1000g で 10 分間遠心する。沈殿を取り除いた上澄み（精子を取り除いた精漿）を分析まで -20°C で凍結保存する。精子を取り除いた精漿は、今後の分析に使用する品質管理用のサンプルとして、他の検体と混ぜても良い。
2. 精子を取り除いた精漿を融解して、ボルテックス・ミキサーで良く混ぜる。同様に他の検体と混ぜた精漿を融解して良く混ぜる。
3. オートピペットを使って、15 μL の精漿をそれぞれ 2 本の 1.5-mL のチューブに入れる。コントロール用に 15 μL の水を入れたもの、品質管理用に 15- μL の精液内のサンプルを入れたもの（4 サンプル）も含む。
4. 2 つの品質管理用のサンプルに 8 μL の 1 mmol / l のカスタノスペルミンを加えて精漿のコントロールを準備する。
5. それぞれのチューブに 100 μL の PNPG 基質溶液（ 37°C ）を加える。
6. それぞれのチューブをボルテックスにかけ、 37°C で 2 時間培養する（厳密な温度管理と時間管理が必要）。
7. 2 時間後に呈色試薬 1 を加えて、かき混ぜて培養を止める。
8. 250 μL のサンプルと標準液を 96 ウェルのプレートに移す。
9. 60 分以内に 405 nm の波長で、コントロール用の水で 0 点調整したものを基準に、96 ウェルのプレートリーダーを読み取る。

3.4.3.5. 計算

1. 吸光度を比較することで、標準曲線（ $\mu\text{mol} / \text{l}$ ）により算出した PNP の濃度を読み取る。
2. 標準最高値を超えたサンプルは外して、これらのサンプルに関しては希釈して（希釈には緩衝液 1 を使用）再度分析する。

3. 修正係数（0.6194；下記の注釈参照）を掛けて、希釈していない精漿内の中性グルコシダーゼの活性度（IU / l）を算出する。
4. それぞれのサンプルから得られた、コントロール用の精漿カスタノスペルミン活性度（IU / l）を引いて修正した（グルコシダーゼ関連）活性度を算出する。
5. 分析で得られた値の許容範囲は 10%以内である。すなわち（得られた値の差÷得られた値の平均）× 100 が 10%以内でなければならない。得られた値の許容範囲が 10%を超える場合、新たに精漿を 2 検体分、再度分析する。
6. 修正したグルコシダーゼ活性度に全精液量（mL）を掛けて、射精精液当たりのグルコシダーゼ活性（mU）を算出する。

Note: 1国際単位（IU）のグルコシダーゼ活性は、37 °Cで1分当たりのPNPの生産量が1 μmolと定義されている。この分析では、120分の間に全量1.115 μLのうち15 μLの精漿が活性度として得られるので、修正係数は（1115 / 15） / 120 = 0.6194となる。

3.4.3.6. 検出限界

中性 α-グルコシダーゼ検出下限は射精精液当たり 20 mU である（Cooper et al., 1991 and unpublished TG Cooper）。

3.5 コンピューターによる精子解析

3.5.1 緒言

精子細胞と微粒子細胞片の区別が困難なことから、最近まで、コンピューターによる精子解析装置（computer aided sperm analysis; CASA）を用いて精子濃度の測定を行うことが出来なかった（ESHRE, 1998）。しかし、DNA の蛍光染色、精子尾部のアルゴリズムの解析といった技術の進歩により、精子濃度（今後は前進運動精子濃度も）の測定が可能になりつつある（Zinaman et al., 1996; Garrett et al., 2003）。

検体と装置の取り扱いに十分気を付ければ、ルーチンで行う診断の何項目かに CASA を利用することができる。高い水準での装置の取り扱いを確立・維持していくためには、品質管理を行うための手順が必要不可欠である（7 章を参照）。

いくつかの会社が CASA システムを販売している。CASA を用いることで精子の運動性、運動学、更には精子濃度の測定をすることが出来る。半自動式で形態を評価出来るものまである。CASA（運動性、濃度、形態を測定・評価出来る機能を持つ）は手動で行う方法（従来の目視で行う方法）と比べて精度が高い、精子の運動学的（前進運動、ハイパーアクチベーション化した運動、受精能を獲得した精子の特性）なパラメーターのデーターを数値化出来る、といった利点を持つ。

CASA により評価した前進運動精子の濃度及び運動性は、*in vitro* 及び *in vivo* での受精率、あるいは、妊娠するまでの期間と強い相関があることが報告されている (Liu et al., 1991a; Barratt et al., 1993; Irvine et al., 1994; Krause, 1995; Donnelly et al., 1998; Larsen et al., 2000; Garrett et al., 2003; Shibahara et al., 2004)。CASA による精子の運動性及び濃度の測定については項 3.5.2 及び項 3.5.3 を、また、コンピューターによる形態の解析の現状については項 3.5.4 をそれぞれ参照して頂きたい。

3.5.2 CASA を用いた精子運動性の評価

CASA 装置は、運動細胞を検出出来る機能を持つ為、精子の運動学の解析に最も力を発揮する。CASA により算出された運動率はあまり当てにならない。なぜならば、運動率は不動精子の数から算出する為、細胞片を不動精子として認識する可能性があるからである。

検体の取り扱い、フレームの比率、精子濃度、精子濃度計算盤の深さ (Davis & Katz, 1992; Mortimer, 1994a, b; Kraemer et al., 1998) といった様々な要因が CASA 装置の精度に影響をおよぼす。とは言え、適切な手順に従って測定を行えば、正確で再現性の高い結果が得られる (Davis & Katz, 1992)。CASA を使用するのであれば、報告されているガイドライン (Mortimer et al., 1995; ESHRE, 1998) にしっかりと目を通す必要がある。

CASA を使って運動性に関するパラメーターを調べたいのであれば、射精精液当たり、少なくとも 200 の運動精子を解析する必要がある。これは、もっと多くの精子を解析しなければならないことを意味している。もし精子の解析をする際、運動のタイプ別に分類する、あるいは他の色々な解析をしたいのであれば、少なくとも 200、出来れば 400 の運動精子の解析が必要である。精子の解析を行う時に、必要とするサンプル数を決めると良い。

CASA 装置は、データーをまとめて統計処理が出来るソフトへ接続すると良い。多くの運動性に関するパラメーターはガウス分布ではないので、それぞれの変数の中心傾向を調べる時には平均値ではなく、中央値を用いる方が良い。一個の精子の測定値を数学的に変換してから統計処理を行うのが望ましい。

3.5.2.1 手順

いずれの CASA 装置に於いても、最大限の性能を引き出すためには、予め装置を正確にセットアップする必要がある。メーカーは適切な設定方法を示しているが、装置の再現性及び精度はユーザーの設定次第であることを良く認識しなければならない。適切な品質管理用の機材 (例えばビデオレコーダー) の使用は必要不可欠である (付録 7, A7.5 参照)。一般的な CASA の設定方法を考察した論文が何報もある (Davis & Katz, 1992;

Mortimer, 1994b; ESHRE, 1998)。

3.5.2.2. 検体の取り扱い

CASA で使用する精液検体の採取と取り扱いは第 2 章の概略に従って行う。

精子の運動性は温度の影響を大きく受けるので、CASA 装置で検体を取り扱う時は 37 °C に維持する。運動特性及び精子濃度を解析する場合、希釈していない（そのままの）検体を用いる。精子の運動性を解析する場合、精子濃度は $2 \times 10^6 / \text{mL}$ ～ $50 \times 10^6 / \text{mL}$ の間で行う（Garrett et al., 2003）。

精子濃度が濃いサンプル ($> 50 \times 10^6 / \text{mL}$) では、高い頻度で衝突が起きて、正しい結果が得られなくなる。そのようなサンプルの場合は、検体を採取した同一の男性の精漿で希釈する。

1. 精子検体を 16,000g で 6 分間遠心して、精子を取り除いた精漿を準備する。
2. 精子を取り除いた精漿で、精子濃度が $< 50 \times 10^6 / \text{mL}$ となるように希釈する。

使い捨ての 20 μm の深さの計算盤を使うと精度の高い結果が得られる。ここに示しているのは二枚のチャンバーを用いるシステムであり、二枚両方のチャンバーを共に使用して解析を行う。チャンバー内の数視野を調べる。トータルで 12 視野あるチャンバーであれば、6 視野を調べれば精度の高い結果が得られる。1 チャンバーにつき、少なくとも 200 個の精子を解析する。品質管理の原理と運動性評価の基準の設定は同様な考え方である（2.5.2 参照）。検体は直接チャンバーにのせたもの、あるいは、それをビデオに記録したもの、どちらでも解析可能である。解析にビデオレコーダー（ビデオテープ、CD-ROM、DVD）を用いると、より精度の高い標準化、質の維持が可能となる（付録 7、A7.5 参照）。それぞれのメーカーが推奨する記録装置、精子頭部と背景を最大限に区別出来るコントラストが得られる照度を示している。

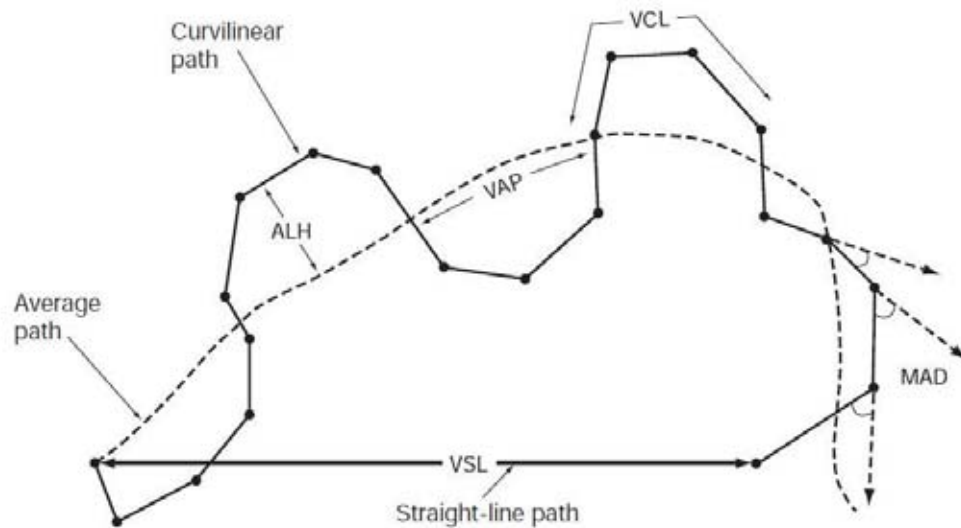
正確な結果を得るために必要とされる精子の解析時間は、反対意見もあるが、基本的な CASA による分析では最低 1 秒である（Mortimer, 1994b）。

3.5.2.3. CASA で用いられる専門用語について

CASA により測定可能な値は図 3.3 に示した専門用語で区別される。

1. VCL、曲線速度 ($\mu\text{m} / \text{s}$) 顕微鏡下で見た二次元での精子頭部の実際の曲線進路に沿った平均速度、細胞活力の測定。
2. VSL、直線運動（直進する）速度 ($\mu\text{m} / \text{s}$) 真っすぐに引いた直線に沿って精子頭部が始めに通過した点と最後に通過した点の間の平均速度。

図 3.3 CASA により測定される変数の専門用語



3. VAP、精子進行方向性速度の平均値 ($\mu\text{m/s}$)。精子頭部の平均進路に沿った平均速度ここで言う平均進路とは精子頭部のジグザグな曲線軌道を、CASA 装置のアルゴリズムにより滑らかな曲線軌道に修正した経路を示している。
4. ALH、精子頭部の平均振幅 (μm)。精子頭部の平均進路に対する横方向へのずれの大きさ。この大きさは、ずれの最大値あるいは平均値で表わされる。それぞれの CASA 装置で、異なるアルゴリズムを使って修正しているので、この値に関しては他の装置との間で比較は出来ない。
5. LIN、直進性。曲線進路の直進性、 VSL / VCL 。
6. WOB、振れ幅。平均進路に対する実際の動きの比、 VAP / VCL 。
7. STR、直進性。平均進路の直進性（平滑化経路の直線からの逸脱）、 VSL / VAP 。
8. BCF、振れ幅の交差頻度 (Hz)。曲線進路が平均進路を交差する割合の平均。
9. MAD、振れ幅のずれの平均角度 (度)。精子頭部が向きを変えた瞬間の、曲線軌道に対する角度の変化の平均時間。

Note: それぞれのCASA装置が、異なるアルゴリズムを使って上に示した様な動きに

関する多くの変数を算出している。全てのCASA装置間で測定値を単純に比較することができるのか不明である。

3.5.3 CASA を使った精子濃度の測定

DNA 染色と CASA を併用することで運動精子濃度及び運動率を正確に調べる事が出来るものの、操作を行う上で細心の注意が必要である (Garrett et al., 2003)。例えば、もし使い捨てのチャンバーを用いる場合、チャンバー上の精子の分布は均一ではなくムラがあるので、色々な場所を何箇所か調べる必要がある (Douglas-Hamilton et al., 2005b)。血球計算盤に対しても同様に確認する必要がある。

精子濃度は 2×10^6 per mL から 50×10^6 per mL の間の濃度のみが測定可能となる (Garrett et al., 2003)。したがって、精子濃度が 50×10^6 per mL 以上ある場合、希釈する必要がある (3.5.2.2 参照)。

Comment: CASA 装置は染色された精子頭部を感知してカウントする。顕微鏡下で評価を行わない限り、正常な精子を判別することは出来ない (すなわち頭部と尾部がしっかりとくっついている精子)。

3.5.4 コンピューターを用いた精子の形態の評価

解析に映像を用いると、精子の形態評価を数値化することが出来る、客観的に再現性を持って行える、という大きな強みを持つ。市販の装置は精子頭部、中心部、また、場合によっては先端部の形態評価を数値化するのに有効である。それだけではなく、運動性に影響を及ぼす尾部の異常を、CASA を使って運動性及び動きを調べることで、より正確に評価し得る。CASA 装置は一般的に、精子頭部及び中心部を正常あるいは異常に分類し、精子頭部と中心部の大きさ、頭部の精円率及び均一性、そして、染色により先体反応が起きた範囲の平均値、標準偏差あるいは中間値を算出する。

自動化された方法を用いると、手動で行う方法に比べて、遥かに客観的に正確に再現性のある測定が可能となる (Menkveld et al., 1990)。自動化された方法による評価の正確性及び再現性の誤差は 7%以内であり (Garrett & Baker, 1995)、経験を積んだ技師の手動による評価と比べてはるかに低い。しかしながら、手技的な不一致 (例えば焦点、照度、検体の準備と染色) (Lacquet et al., 1996; Menkveld et al., 1997) 及び技術的に困難を伴う精子頭部と細胞片の区別 (特に精子濃度が低いとき等) (Garrett & Baker, 1995; Menkveld et al., 1997; Coetzee et al., 1999a, b) といったことで、コンピューターによる精子形態評価の測定値 (CASMA) の再現性及び正確性は疑わしくなる。自動化された評価が意味することは、検体準備の不備、そして装置の不備といったことに対して埋め合わせが出来ないという現実があるということである。したがって、細胞染色に関するちょっとした違いが誤った分類、あるいは、精子細胞として認識出来ないといったことになりかねず、当然の結果として結果値のバイアスとなり得る。

手動で形態評価を行う際、確実に比較可能な結果を得る為には、手順及び器具を標準化し、品質管理を維持して行わなければならない。CASMA（精子形態評価の測定値）を記録するためには、背景による影響を無くすために、精子の取り扱いが項 2.13.2.4 で述べたように行う必要がある。精子濃度が低い ($<2 \times 10^6$ per mL) 場合、項 2.13.2.2 に述べたように、検体を遠心により濃縮する必要がある。

Note: 遠心は精子の形態に影響をおよぼす可能性があり、遠心したことを記録に残さなければならない。

CASMA（精子形態評価の測定値）の結果と妊孕性の間には強い相関があることを報告した論文が 2 報ある。Coetzee et al. (1999c) は自動で測定した精子形態評価の測定値が *in vitro* での受精率と妊娠率を予測する指標となることを報告している。Garrett et al. (2003) は透明帯に接着した精液内の精子 (“zona-preferred”, %Z) の頭部の形態的特徴の割合が、精液内の精子の直進速度 (VSL) と共に有意にかつ独立して、多くの不妊カップルを含むグループの自然妊娠率と相関があることを報告している。それらの透明帯に接着した精液内の精子 (“zona-preferred”, %Z) と VSL (精液内の精子の直進速度) の妊孕性との関係は一定のように見えて、どの点で妊娠率が上がらなくなるのかの域値は同定されていない。精子形態を評価・測定するための CASA の適応を明確にするために、大きな母集団に対する妊孕性との関連を調べた研究が更に必要である。

自動化されたシステムは品質管理用システムを提供するのに大きな役割を持つものであるが、不妊治療施設に対する自動化されたシステムの利点を明らかにする研究が更に必要である。

Chapter 4 研究のための手順

精子機能を評価するためのテストを行う場合、精子以外の細胞が精子に与えるダメージを押さえるために、射精後 1 時間以内に、精子と精漿を分離することが必要不可欠である。精子機能を調節する分子レベルのメカニズムが多く解明されつつあることから、新しい診断的テストの進歩が目覚ましい。例えば、DNA 核の凝集と完全な状態がヒト精子の機能を決定する上で重要な意味を持つことを示したデータが最近示されている。精子と妊孕性に対して、DNA の状態とクロマチンの構成との間の関連が明らかにされつつある (Sakkas et al., 1998; Aitken & Krausz, 2001; Virro et al., 2004)。

同様に、精子機能を調節する形質導入のシグナルに関する理解が深まることで、男性不妊患者の精子の異常が発生する正確なプロセスを明らかにする診断的テストが行えるようになりつつある。より男性不妊の生物学上の原理を見抜くため、妊娠に必須のプロセス（透明帯への接着、先体の開口分泌、卵子の卵細胞膜との融合）を満たすヒト精子の能力を評価するテストの一連が進展し続けている。

4.1 活性酸素

4.1.1 緒言

過剰な活性酸素 (ROS) の産出と細胞質酵素の高い活性（例えばクレアチンホスホキナーゼなど）は精子中間部における過剰残余細胞質を伴う異常に影響している可能性がある (Rao et al., 1989; Gomez et al., 1996; Aitken et al., 2004)。

活性酸素は酸素の代謝産物であり、また、超酸化物、過酸化水素、ヒドロキシル基、ヒドロペロキシル基及び酸化窒素でもある。これらの物質が過剰に存在すると、細胞脂質、タンパク質及び DNA に対して酸化によるダメージを与えることで病的変化を引き起こす (Griveau & Le Lannou, 1997; Aitken et al., 2003; Henkel et al., 2004)。大部分の細胞は抗酸化酵素系（超酸化物不均化酵素、グルタチオンペルオキシダーゼ及びグルタチオンカタラーゼ）と非抗酸化酵素系（尿酸、アスコルビン酸及び α -トコフェロール）の両方を備えているが、これらの防御が崩れると精子機能が落ちてしまう (Agarwal et al., 2004)。

ヒト射精精液において、活性酸素は精子及び白血球の両方から産出される (Aitken & West, 1990)。精漿内には遊離基スカベンジャー及び抗酸化酵素があり、これらが不足している男性がいる (Jones et al., 1979; Smith et al., 1996)。したがって、不妊治療のための精子調整（第 5 章参照）において精漿を取り除くと、精子細胞が酸化による攻撃を受けやすい状態になり得る。ROS の産出が高いのは、過酸化によるダメージと精子機能の低下が原因であると同時に、核及びミトコンドリアゲノム両方の DNA のダメージが原因によるものである。精子のサバイバルテストはよくヒト精子の質の評価に使

われる。精子のサバイバルテストの結果は、精子の過酸化脂質の状態と非常に強い相関がある (Gomez et al., 1998)。

ルミノールあるいはルシゲニンを用いる化学ルミネセンスを行うことで、ヒト精子の ROS の産出及び酸化還元活性を測定することが出来る。

4.1.2 精子浮遊液の活性酸素の測定

4.1.2.1. 原理

この工程では、ルミノールの様な化学ルミネセンスプローブの存在下で、ヒト精子が発する極少量の光を、感光性のルミノメーターを使って測定する。ここに示すのは、過酸化水素の発生を高い感度で測定出来るルミノールとセイヨウワサビのペルオキシダーゼを混合する方法を用いている。他のプローブ (例えばルシゲニン) を用いても、洗浄したヒト射精精液の ROS の産出をモニターすることが出来る (Aitken et al., 1992; McKinney et al., 1996)。

formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP) プローブに反応して産出されるシグナルは、ヒト精子の表面には FMLP レセプターがないことから、白血球の粒子に対して特異的である (Krausz et al., 1992)。多形核 (白血) 球の数が分かっている浮遊液を使うと、反応を校正することが出来る (図 4.1 参照)。

Comment 1: これらのプローブを使って測定した活性の精度は必ずしも正確なものではないかも知れないが (Aitken et al., 2004)、得られたデータは精子の機能を反映することが報告されている (Zorn et al., 2003; Said et al., 2004)。

Comment 2: 1 個の白血球は、1 個の精子細胞に比べて、少なくとも 100 倍以上の ROS を産出する。したがって少量の白血球のコンタミが、精子浮遊液から発生した化学ルミネセンスのシグナルに大きな影響をおよぼす。

4.1.2.2. 試薬類

1. フェノールレッドの入っていない塩類平衡ハanks液 (HBSS) : 付録 4, 項 A4.5 参照。
2. フェノールレッドの入っていないクレブズーリンガー溶液 (KRM) : 付録 4, 項 A4.7 参照。
3. ルミノール、25 mmol / l : 29 mg のルミノール (5-amino-2,3-dehydro-1,4-pHthalazinedione) を 10 mL の DMSO に溶解。

4. セイヨウワサビのペルオキシダーゼ (HRP) (type VI, 310 IU / mg protein) : 5 mg (1550 IU) を 1 mL の KRM に溶解。
5. FMLP (白血球特異プローブ、10 mmol / l) : 44 mg の FMLP を 10 mL の DMSO に溶解。
6. ホルボール 12-ミリスチン酸塩 13-酢酸塩 (PMA) : 1 mmol / l ストック溶液 : 6.2 mg の PMA を 10 mL の DMSO に溶解。1 mmol / l PMA を DMSO で 100 倍希釈して 10 μ mol / l の作業用溶液を調整。
7. ザイモサン。
8. ゼラチン : 0.1% (1 g / l) を HBSS に溶解。

4.1.2.3. ザイモサンのオプソニン作用

1. 500 mg のザイモサンを 10 mL の HBSS に懸濁する。
2. 勢い良くボルテックスをかける。
3. 蒸発しないように蓋をして、ビーカーの中で 20 分間沸騰させる。
4. 500g で 5 分間遠心。
5. ペレットを 10 mL の HBSS で洗浄。
6. 洗浄を繰り返す。
7. ペレットを 5 mL の新鮮なヒト血清の中で丁寧にピペッティングしながら再懸濁。
8. 20 分間培養。
9. 500g で 5 分間遠心。
10. ペレットを 10 mL の HBSS で洗浄。
11. 洗浄を繰り返す。
12. ペレットを 50 mg / mL の濃度で 0.1% (1 g / l) のゼラチンを加えた 10 mL の HBSS の中で丁寧にピペッティングしながら再懸濁。

13. 使用するまで -20°C で冷凍保存。

4.1.2.4. 自然に発生した ROS の検出

1. 精液サンプルを良く攪拌し（Box 2.3 参照）、ROS 測定用に精子濃度が少なくとも 10×10^6 となるように除去。
2. 精子を KRM で洗浄し（5.3 参照）、精子濃度が $10 \times 10^6 / \text{mL}$ となるように調整。
3. フェノールレッドの入っていない KRM に懸濁していた洗浄精子浮遊液 400 μL を使い捨てのルミノメーター容器へ入れる。泡立でない様に気を付ける。
4. 25 mmol / l のルミノール 4 μL を加える。
5. セイヨウワサビのペルオキシダーゼ溶液（1550 IU / mL）8 μL を加える。
6. 化学ルミネセンスのシグナルをルミノメーターの中で 37°C に安定するまで約 5 分間モニターする。精液の白血球から発生した ROS は FMLP、ザイモサンあるいは PMA の添加により刺激されるが、PMA は精子から発生した ROS も同様に刺激する。

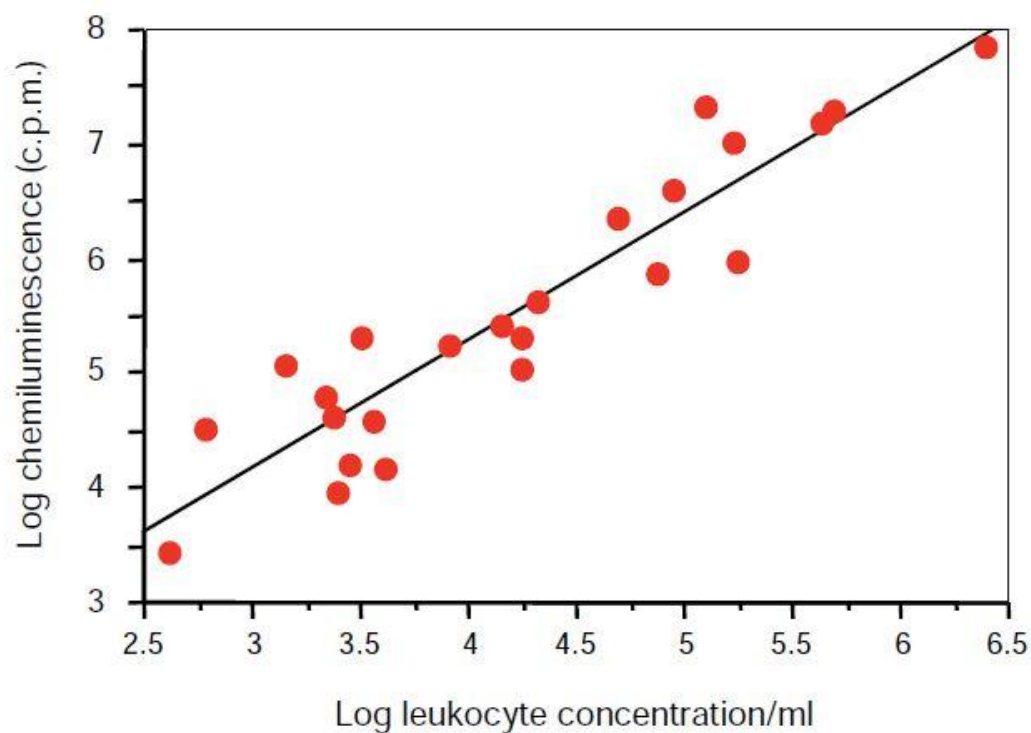
4.1.2.5. 白血球から発生した ROS の FMLP 誘発

10 mmol / l の FMLP2 μL を上記のサンプルへ添加し、精子浮遊液内に存在する全白血球からの化学ルミネセンスのシグナルを刺激する（図 4.2 参照）。

4.1.2.6. 白血球から発生した ROS のザイモサン誘発

オプソニンを作作用させたザイモサン物質 20 μL を上記のサンプルへ添加し、精子浮遊液内に存在する全白血球からの化学ルミネセンスのシグナルを刺激する。
シグナルの大きさは白血球のコンタミした濃度に直接比例する（図 4.1 参照）。

図. 4.1 オプソニンを作用させたザイモサン処理に反応して発生した化学ルミネセンス
白血球濃度と化学ルミネセンスとの間に直線的な相関が認められた。

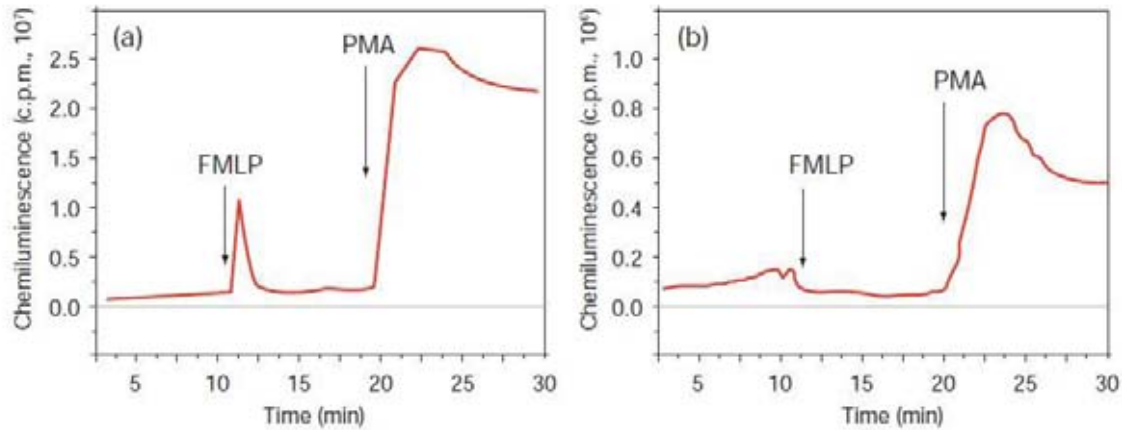


RJ Aitken 提供

4.1.2.7. 白血球と精子による発生活性酸素種の PMP 誘発

1. PMA 保存溶液を DMSO で 100 倍に希釈し、 $10\mu\text{mol/l}$ に調製する。
2. FMLP もしくはオプソニン化ザイモサンシグナルが安定するまで待つ。
3. 精子懸濁液に $10\mu\text{mol/l}$ の PMA を $4\mu\text{L}$ 加え（終濃度 100nmol/l ）、精子の化学発光シグナルを刺激する（図 4.2）。

図 4.2 白血球と精子の発生活性酸素種による寄与分析



(a) 白血球のコンタミネーションがある場合、発生活性酸素種のバーストが白血球特異的プローブの FMLP に続いて観察される。PMA の添加後に精子と白血球の両方からの持続的な強い化学発光シグナルが観察される。

(b) 白血球のコンタミネーションがない場合、FMLP の反応は無くなり PMA 誘導の間、精子からの明確なシグナルが観察される。

4.1.2.8. 結果

白血球コンタミネーションの影響を調べるために、刺激後のグラフィック出力を調べる。

4.2 ヒト精子と卵子の相互作用テスト

精子と透明帯の結合は、精子が先体内容物を放出し露出する先体反応から始まり、活性化された尾部の運動性により透明帯への透過を許す。この結合能力を評価するために、剖検や摘出卵巣もしくは不成功に終わった IVF により得られた、ヒトの非受精卵や非継続卵を使用する。この方法は、凍結卵でも行うことができるが、利用できるヒト卵子の不足により限界がある (Yanagimachi et al., 1979; Kruger et al., 1991; Liu & Baker, 1992b; Liu et al., 2004)。

4.3 ヒト透明帯結合テスト

透明帯結合テストの一つである半透明帯テスト (Burkman et al., 1988) は、同濃度のテスト対象の精子とコントロール精子を、半分に切断した透明帯各々に曝露させるものである。他の結合テストの方法として、テスト対象の精子を蛍光染色 (フルオレセイン等) しコントロール精子を他の蛍光染色 (ローダミン等) でラベルする方法もある。(Liu et al., 1988, 1989)。透明帯に結合した精子数を各々カウントし、その比率を出す。どちらのテストとも、受精率と相関があると報告されている (Liu & Baker, 2003)。

結合精子数を評価することは、IVF において低い受精率を示す症例や、突発性不妊、奇形精子症などの症例において、臨床的に役立つであろう (Franken et al., 1989; Liu & Baker, 1992a, 2004)。透明帯との結合精子が少ない若しくは全く認められない場合は、精子の機能欠陥が通常考えられる。

4.4 先体反応の評価

生理的な先体反応は、精子が透明帯に接着した後に起こる。透明帯によって誘発された先体反応は、透明帯の表面から回収した精子や、分解したヒト透明帯タンパク質に曝露させた精子で評価することができる (Liu & Baker, 1994, 1996; Franken et al., 2000)。奇形精子症や乏精子症の症例において、他の精液形状には異常が認められないが、透明帯から誘起される先体反応が欠損している場合もある。その他に、透明帯への結合は正常であるが先体反応が乏しい場合もあるかもしれない (Liu et al., 2004)。これらのテストは、ヒト透明帯の入手が困難ため限界がある。他の霊長類の透明帯は、種特異的な結合性のため、ヒト精子の結合は阻害され、ヒト透明帯の代わりとして使用することはできない (Bedford, 1977; Liu et al., 1991b; Oehninger et al., 1993)。例えば、カルシウムイオノフォアなどの他の刺激も先体反応を誘起する。しかし、透明帯により誘起された先体反応の結果とは関連しない (Liu & Baker, 1996)。先体反応の誘起された後の先体の状態は、顕微鏡下もしくはエンドウ豆 (エンドウアグルチニン) (4.4.1 参照) やピーナツ (ピーナツレクチン) などの蛍光標識レクチンや先体抗原 CD46 に対するモノクローナル抗体 (Cross, 1995) を使用したフローサイトメトリーにより評価することができる (Fenichel et al., 1989; Henley et al., 1994; Cooper & Yeung, 1998)。

4.4.1 先体状態の蛍光評価法の手順

この方法は、最初に Cross ら (1986) により開発され Liu と Baker (1988) により改変されている。この改変された方法は、より単純で再現性があり鮮明な像を得ることができる (図 4.3)。使用する精子は、白血球や生殖細胞、死滅精子を除く処理を行った運動精子が好ましい。そのためサンプル精子は状態に応じて、洗浄 (5.3 参照) もしくはスイムアップ (5.4 参照)、濃度勾配分離 (5.5 参照) などの処理を行わなければならない。

4.4.1.1. 試薬

1. FITC で標識したエンドウアグルチニン (Pisum sativum agglutinin : PSA) (PSA-FITC)。
2. リン酸バッファー (PBS) pH 7.4。
3. 0.9% (9 g/l) 生理食塩水: 精製水 100mL に NaCl 0.9g を溶解。

4. 95% (v / v) エタノール。
5. PSA 貯蔵液: PBS4mL に 2mg の PSA-FITC を溶解。0.5mL に分注し- 20°Cで保存。
6. PSA 希釈標準溶液: PSA 貯蔵液 0.5 mL を 10 mL の PBS で希釈 (4°C保存で 4 週間使用可能) 。

4.4.1.2. 精子の簡易洗浄

1. 精液をよく混和後 (Box 2.3 参照)、約 0.2mL ずつに分ける。
2. 0.9% (9 g / l) 生理食塩水 で 10mL に希釈。
3. 800g で 10 分遠心。
4. 20–40 μ L 残し上清みを除去。
5. 残った沈殿物を穏やかに懸濁。
6. 再度洗浄する。

4.4.1.3. 洗浄精子の調製

1. スイムアップ (5.4 参照) もしくは 1 回洗浄された密度勾配分離 (5.5 参照) 精子を生理食塩水で 10mL に希釈。
2. 800g で 10 分遠心。
3. 20–40 μ L 残し上清みを除去。
4. 残った沈殿物を穏やかに懸濁。

4.4.1.4. 塗抹標本

1. 約 5 μ L の精子懸濁液をおおよそ 1cm の長さに塗抹する。
2. 湿塗抹標本を位相差顕微鏡 (400 倍) にて観察する。
3. 精子が凝集せず均一に分散していることを確認する。
4. 風乾。

5. 95% (v/v) エタノール 30 分にて固定。
6. 風乾。

4.4.1.5. PSA-FITC 染色

1. PSA 希釈標準溶液 10mL を縦型染色瓶に注ぐ。
2. 固定乾燥されたスライドを PSA-FITC 染色液に浸漬する。
3. 1 時間以上 4°C で染色する。
4. 各々のスライドを精製水で洗浄し、エタノール溶液 (2.14.2.4 2.14.2.5 参照) で封入。 .

Note: 染色時間を長くしても (18 時間以上)、PSA の結果に影響はない。短くすると (1 時間以内) スライドの評価が困難になる。

4.4.1.6. 評価

蛍光顕微鏡下 (450–490 nm 励起) にて 400 倍の油浸で観察し、以下のように分類をする。

1. 完全な先体 Acrosome-intact (AI) : 精子頭部の半分以上が明るく均一に蛍光している (図 4.3) 。
2. 反応先体 Acrosome-reacted (AR) : 精子赤道部のみ蛍光バンドが認められ、先体領域には蛍光染色は認められない (図 4.3) 。
3. 異常先体 Abnormal acrosomes: その他の精子全てである。

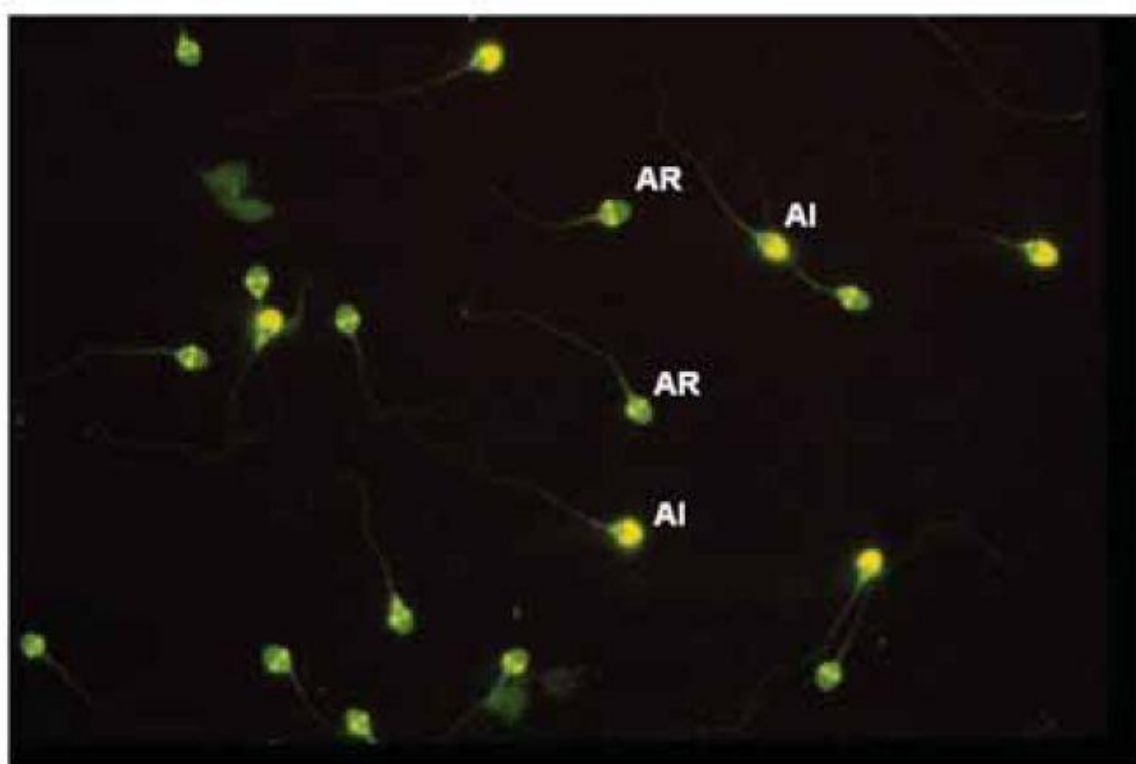
4.4.1.7. 先体反応精子の集計

1. カウンターを用いて、AI と AR の数をそれぞれカウントする。
2. 測定数が少ないために起こるサンプリング誤差を予防するために、各々のスライドにおいて 200 個をカウントする (Box 2.5 参照) 。
3. 複製された 2 枚のスライドから先体反応の起こった精子の割合の平均と、差を計算する。

4. 差が許容範囲であるかを、表 2.1 もしくは図 A7.2 により確認する。
5. 割合の差が許容範囲であれば、先体反応の起こった精子の割合として報告する。差が大きい場合、2 枚のスライドを再度カウントする（Box 2.6 参照）。
6. 先体反応の起こった精子の割合を整数で報告する。

図 4.3 ヒト精子のエンドウマメ凝集素（PSA）蛍光染色

頭部周辺（先体）が染色された AI 精子と、赤道バンドもしくは先体領域周辺部が染色された AR 精子を示す。



HWG Baker 提供

4.4.2 誘導先体反応の評価

先体反応は、精子が透明帯に接着した後、卵子透明帯を通過し卵子と融合する前に必ず起こる細胞外への分泌である。カルシウムの流入は、通常先体反応の最初の事象であると考えられている。カルシウムイオノフォアを用いて誘起されたカルシウム流入は、先体反応を経た精子の能力を試す 1 つの方法である (Aitken et al., 1993)。この方法は、この評価方法の基礎であり、イオノフォア誘起後先体反応テスト (acrosome reaction after ionophore challenge :ARIC) とよばれている。しかし、先体状態のテストが臨床での分析評価とされるには、さらなる評価が必要である。

4.4.2.1. 試薬

1. 3.5% (35 g/l) ヒト血清アルブミン (HSA) 含有の Ham's F-10 (付録 4, A4.4 参照)。
2. BWW 貯蔵液 (付録 4, A4.1 参照)。
3. ジメチルスルフォキシド (DMSO)。
4. 1 mmol/l イオノフォア A23187 貯蔵液 : DMSO 10 mL に 5.23 mg の A23187 を溶解。
5. 3% (v/v) グルタルアルデヒド、もしくは 70% (v/v) エタノール。

4.4.2.2. 手順

1. 精液を完全に液化するために 30~60 分放置する。
2. HSA 添加 Ham's F-10 受精能獲得誘導培養液を分析ごとに調製する。
3. 培養液を使用前に、37°C に加温する。CO₂ インキュベーター内で加温することが望ましい。
4. HSA 添加 Ham's F-10 培養液を用いた、密度勾配遠心分離法 (5.5 章参照) により、白血球や死滅精子生殖細胞のような不要物を除き、高濃度の運動精子を調整する。
5. 運動精子濃度が約 1×10^6 / mL のチューブを、コントロールと検体精子用に 2 本準備する。
6. 受精能獲得を誘起するために、精子懸濁液を 37°C 5% (v/v) 、に 3 時間加温放置 (ガス交換のために、チューブのふたを緩くしておく)。もし CO₂ インキュベ

ーターが利用できない場合、Hepes 緩衝液（付録 4、4.1 章、Note 1. 参照）を使用し、キャップをしっかりと締めて 37°C にて加温放置する。

7. 検体チューブには、最終濃度が 10 μ mmol/l になるように、イオノフォア A23187 貯蔵液（1 mmol/l）を 10 μ L 添加する。
8. コントロールチューブには DMSO を 10 μ L 添加する。
9. 37°C で 15 分加温放置。
10. 運動率を測定するために、各々のチューブから少量採取する。
11. 3%（v/v）グルタルアルデヒド、もしくは 70%（v/v）エタノールを 100 μ L 添加し、固定する。
12. 固定した精子をスライドに移し、風乾する。
13. 蛍光標識を使用して精子を染色する（4.4.1.5 章参照）。
14. 蛍光顕微鏡下（450–490 nm 励起）にて 400 倍の油浸で観察。
15. 検体サンプル（検体 AR 割合）とコントロール（コントロール AR 割合）の先体反応精子の割合を算出する。

4.4.2.3. 評価

1. イオノフォア誘起後先体反応テスト検体の AR 割合から、コントロールの AR 割合を引く。
2. 通常、その差は約 15% である。
3. 10% 以下の場合、異常と判断される。
4. 10~15% の間の場合、精子機能の異常が示唆される。
5. コントロールの値が 15% 以上であった場合、自然での早期先反応が示唆される。

4.4.2.4. クオリティーコントロール

1. このテストを行う度に、陽性コントロール（以前の結果で 15% 以上の AR 率を示したイオノフォア反応の良好であった男性の精液）を行わなければならない。

2. 染色液のバッチが新しく変更されるごとに、染色が確実に行われるかを確かめるために、陽性コントロールを用いて古い染色液とクロスオーバーテストを行う。

4.5 透明帯除去ハムスター卵子通過テスト

ハムスター卵子へのヒト精子の融合は、細胞膜が、ヒト精子の先体反応した赤道部分を覆う最初の段階から、ヒト卵子細胞膜への精子の融合と機能的に同じである。ハムスター卵子通過テストや製紙通過能評価は透明帯が無いという点で生理的状況とは異なる。標準的なテストの手順を以下に示す。

Comment: 従来のハムスター卵子テストは、長い体外培養期間による自然先体反応の発生に左右される。この手順が、生物学的プロセスより非効率的であり、異なるメカニズムを含む可能性もあり、偽陰性結果（ハムスター卵子通過テストには不合格であっても、体外や体内での受精が可能な男性）が、頻繁に確認されている（WHO, 1986）。このように、結果の確実性に限界があるものの、このテストは、精子頭部膜の融合能力に関する情報が得られる。精子と、透明帯相互作用の後で先体反応を始める 2 つの重要な細胞内シグナルが、カルシウムの流入と細胞質のアルカリ化である。双方とも、2 価陽イオンイオノフォア（Aitken et al., 1993）により人工的に発生させることができ、精子をイオノフォアを用いて刺激した方法が報告されている。

4.5.1 手順

4.5.1.1. 試薬

1. BWW 貯蔵液（付録 4, A4.1 参照）。
2. ヒアルロニダーゼ（300–500 IU / mg）。
3. トリプシン タイプ I（10 000 BAEE U / mg）。
4. ワックス（融点 48–66 °C）。
5. ワセリン。
6. ミネラルオイル。
7. 透明帯除去ハムスター卵子: 商業的に購入もしくはハムスターの過排卵により得られる（Box 4.1 参照）。
8. ジメチルスルフォキシド（DMSO）。

9. イオノフォア（代替手順用）1 mmol/l 貯蔵液：2 価陽イオンイオノフォア A23187 5.23 mg を 10mL の DMSO に溶解。

4.5.1.2. イオノフォアを使用しない一般的な手順

1. 試料精子をよく懸濁する（Box 2 参照）。
2. 密度勾配遠心分離法（5.5 章参照）もしくはスィムアップ法（5.4 章参照）により精液を調製する。
3. できるだけ上精みを取り除く。
4. 穏やかにピペッティングし、濃縮精子を調製する（2.7、2.8 章参照）。
5. 濃縮精子を 0.5mL 培養液中に約 10×10^6 / mL に希釈する。
6. チューブを 45° に傾け表面積を増やす。
7. 精子懸濁液を 37°C、5%CO₂ で 18 時間～24 時間加温放置し、受精能獲得を促す（ガス交換のためにキャップを緩くしめる）。CO₂ インキュベーターが使用できない場合、Hepes バッファーを使用し、チューブのキャップをしっかり締めて 37°C で加温放置する（付録 4 A4.1 Note 1. 参照）。
8. 20 分間チューブを垂直に戻し、不動精子を沈殿させる。
9. 死滅精子を採取しないように、上澄みの上部 1 / 3 を慎重に採取し、新しいチューブに移す。
10. 運動精子濃度が 3.5×10^6 個 / mL に調製する。
11. 定量型ピペットを用いて、50～150μL の既知の量の精子懸濁液を小ディッシュにやさしく移す。使い捨てプラスチックチューブを使用して、注意深く精子のドロップを十分なミネラルオイルで覆う。

4.5.1.3. カルシウム（Ca²⁺）イオノフォアを使用した代替手順

1. 項 5.5 に記述しているように、密度勾配遠心分離により高運動精子を調製する。
2. 80%密度勾配の下層のペレットを採取し、8mL の BWW 中に移す。

3. 5分500gで遠心する。
4. 上澄みをできるだけ取り除く。やさしくペレットを回収する。
5. ペレット中の精子数をカウントし(2.7、2.8 参照)、おおよそ運動精子濃度を 5×10^6 個 / mL に調製する。
6. 精子懸濁液を 1mL ずつ 2 本用意し、最終濃度 1.25 と $2.5 \mu\text{mol} / \text{l}$ になるように、1 mmol / l の A23187 貯蔵液を 1.25 μL と 2.5 μL それぞれに添加する。
7. 37°C 3 時間加温放置する。
8. 5分500gで遠心する。
9. 上澄みをできるだけ取り除く。やさしくペレットを回収する。
10. 運動精子率を測定する。
11. 新しい BWW を用いて運動精子数を 3.5×10^6 個 / mL に希釈する。有効な結果をえることができるのは、精子濃度が 1×10^6 個 / mL 程度までである。
12. 項 4.5.1.2 ステップ 11 に記述してあるように、ミネラルオイル下に精子を分散させる。

Note: イオノフォアによる用量反応曲線は、個人によりばらつきが認められるため、2種類のイオノフォア濃度にてテストを行うことが推奨される。

Box 4.1 ハムスターの排卵誘発

まず、動物に対する注射の法律条件がすべて満たされていることを確認することが必要である。妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG)とヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)の適量を小さな容器に調製し、使用まで -20°C で保存する。幼若ハムスターもしくは成熟ハムスターの発情周期Day1に、30IUのPMSGを腹腔内に注射する。48-72時間後に40IUのhCGを投与する。対象動物の背中をつかみ、一方の手で腹部の皮膚をぴっちり伸ばし、もう一方の手で、21ゲージ針と1mL シリンジを使用してホルモン剤を腹腔(股関節の上)に注射する。動物の不快感を最小限にし、スムーズな注入のために、動物ごとに針を交換する。

4.5.1.4. 卵巣の回収

1. 動物保護等の関連組織により承認された方法により、**hCG** を注射し、**18 時間以内** に卵子を回収する。
2. ハムスターの背を持ち、腹部の毛を **95% (v/v)** エタノールで湿らせる。
3. 鋸歯鉗子で皮膚をつかみ、子宮と卵巣を露出させるために、ハサミで皮膚と筋肉を切り開く。
4. **95% (v/v)** エタノールで鉗子とはさみを拭き、毛皮を取り除く。
5. 腹腔から腸を押し、子宮角を露出させる。
6. 鉗子で一方の子宮角をつかみ、腹腔から持ち上げ、卵管、卵巣、卵巣靱帯を露出させる。
7. 鉗子で子宮角の最末端部分をもち、ちょうど鉗子の下の子宮の末端部分を切る。卵巣を切除し、小さなディッシュに温めた (**37°C**) **BWW** を入れた中に置く。
8. 同様にもう一つの卵巣を回収する。

4.5.1.5. 卵丘細胞塊の回収

1. 卵巣を解剖顕微鏡上で投光し、卵子が含まれた卵丘細胞塊を見つけるために、卵管の膨大部を確認する。
2. 鉗子で卵管を持ち、**21** ゲージ針で膨大部に穴をあけると、.穿刺孔から卵丘細胞塊が吐出する。
3. 卵丘細胞塊を針で引き出す。全ての卵丘細胞塊を回収するために卵管を鉗子で圧搾する。

4.5.1.6. 卵子の回収と処理

1. 鉗子と針を使用して卵丘細胞塊を集め、時計皿やスポットプレート等の浅い容器内で、加温し **CO₂** 平衡化した **0.1% (1 g/l)** のヒアルロニダーゼ (**300–500 IU / mL**) **BWW** 中に置く。
2. 細胞を光から保護するために、容器をアルミホイルで遮光し、**10 分間**室温にて加温放置する。解剖顕微鏡で卵丘細胞の分離を観察する。

3. 炎により引き延ばしたガラスピペット（Box 4.2 参照）を用いて、裸化した卵子をヒアルロニダーゼから新しい平衡化加温 BWW に移す。
4. マルチウエルディッシュカスポットプレートの新しい平衡化加温 BWW のドロップに、各々の卵子を移すことによって 2 度ずつ洗浄する。
5. 透明帯を除去するために、0.1%（1 g / l）トリプシン（10 000 IU / mL）に室温でおよそ 1 分浸漬する。解剖顕微鏡下で、透明帯が溶解したのを確認したらすぐに卵子を移す。
6. 卵子を BWW で 3 回洗浄する。
7. 単離した卵子を 37°C に加温し、媒精する。もしくは、使用まで 4°C にて 24 時間以内であれば保存できる。

Box 4.2 ガラスピペットの準備

ガラス毛细管もしくはパストゥールピペットの両端を持ち、ブンゼンバーナーの炎の上で回転させ十分に熱する。ガラスが溶けてきたらすぐに、両手を引きガラスを引き延ばす。ピペットの開口部を、望むサイズ（およそ 1mm）のところで、折り取る。1mL シリンジを引き延ばしていない方に装着する。

4.5.1.7. 配偶子の共培養

1. 透明帯を除去したハムスター卵子を、1 つのドロップに 5 個ずつになるように、いくつかのドロップに分ける（例えば準備した精子サンプルに対し、20 個の卵がある場合は、4 つのドロップに 5 個ずつ卵に分ける）。
2. ガラスピペットに精子懸濁液を希釈し過ぎないように、少量の培養液とともに、5 個くらいの卵をまとめて吸い込む。
3. ピペットの先端を中央にある精子懸濁液のドロップに直接入れ、ゆっくり卵子を分けていく。ピペットには陽圧を与え続け、ミネラルオイルのピペット内への流入を防ぎ、精子懸濁液に気泡が入らないように気をつける。
4. 精子懸濁液からピペットの先端を抜いた後、付着している余分なオイルを除去する。
5. 全ての卵子を精子懸濁液に移すまで、3. を繰り返す。
6. 卵子を移動させた後は、精子間のコンタミネーションを防ぐため、BWW でピペッ

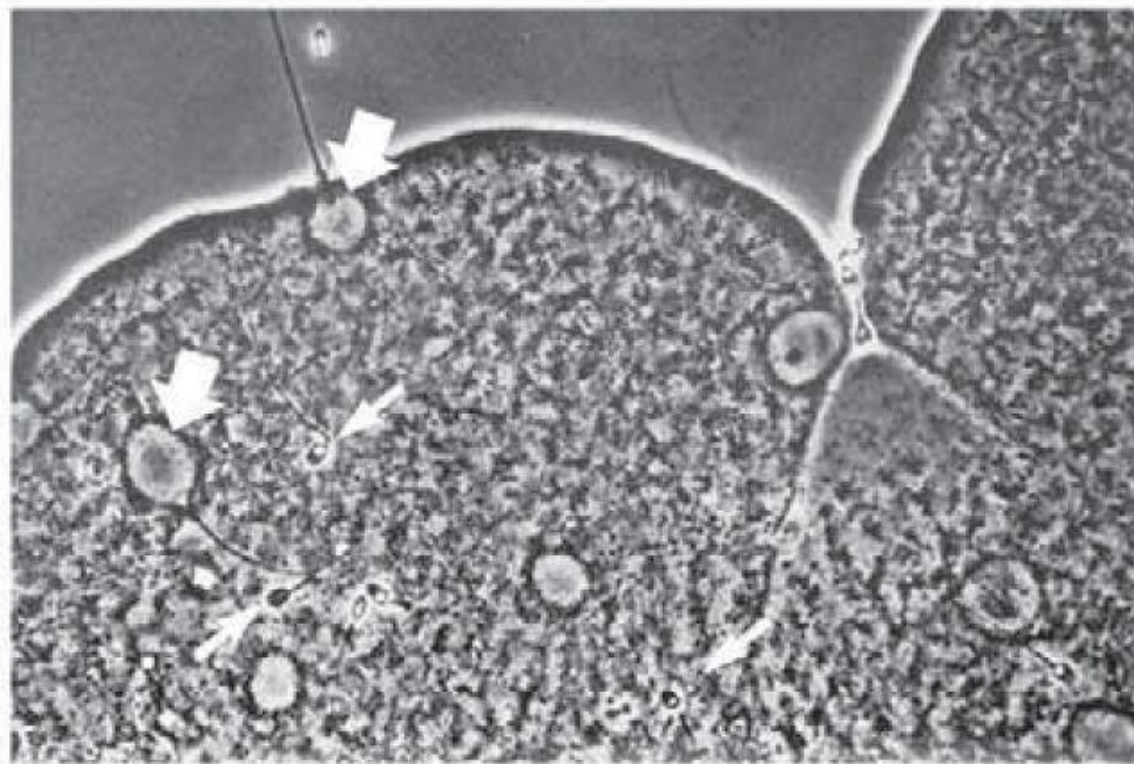
トを完全にすすぐ。

7. 37°C、5% CO₂ (v/v) in air で 3 時間培養する。
8. オイルカバーされたドロップから卵子を取り出す。BWW に移す前に、ピペットの先端に付着したオイルを注意深く落とす。
9. 火炎伸展したピペットを使い、BWW で卵子に付着した精子を簡単に洗い落とす。

4.5.1.8. 卵子の分析

1. スライドグラス (22m×22m, thickness number 1.5, 0.17mm) を補助するために、長方形になるように 4 角にワックス・ワセリン混合物 (Box 3.1 参照) を柱状に置く。
2. その中央に卵子の入った少量の BWW ドロップを置く。
3. カバーグラスをワックス・ワセリン混合物の上へのせ、上からゆっくり押し下げると、徐々に卵子は平らになっていく。脱凝集した精子頭部を観察するには、卵子をしっかりと平らにする必要がある。
4. もし必要なら卵子が潰れてしまうのを防ぐために、スライドグラスに BWW を加える。
5. 200 倍位相差顕微鏡で検鏡する。
6. 頭部が脱凝集し、尾部が頭部に付着している、もしくは頭部の近くにある精子の数をカウントする (図 4.4 参照)。
7. 少なくとも 1 個の精子が進入している卵子の割合と、1 つの卵子にいくつの精子が進入しているかを記録する。
8. 卵子の洗浄後にも、卵の表面に接着して残っている精子の数を記録することで、アクロソームリアクション (先体反応) が起こっている精子の割合を求めることができると考えられている。

図 4.4 透明帯除去ハムスター卵子に進入したヒト精子の位相差顕微鏡写真



広い矢印が、卵細胞質内で脱凝集を起こした精子。

細い矢印が、細胞質内に進入しておらず卵の表面に接着している精子。

Aitaken et al, (1983) 提供

4.5.1.9. クオリティコントロール

評価を行う際は、卵細胞質内への進入が 50%以上の精子サンプルで行う必要がある。

4.6 精子クロマチンの評価

精子のクロマチンと DNA の正常度をみるために、様々な方法が行われてきた。それらの多くはヒストンに結合 (アニリンブルー) したり、核酸に結合 (アクリジンオレンジ、クロモマイシン) する染料が使われていて、組織学的もしくはフローサイトメーターによって評価されている。DNA 塩基の破損を評価する事を基本とした terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP)-nick-end labelling (TUNEL) 法(in situ end-labelling;ISEL と短く呼ばれてもいる法)、コメットアッセイ、精子クロマチン分散 (SCD) 法などの新しい方法もある。テ

ストの結果はそれぞれに関連があり (Chohan et al., 2006)、精子の形態、運動性、生存力とも相関がある。これらのテストを行うことで、**C-IVF** の受精率に関して追加的な情報を得ることが可能であり、場合によっては妊娠率を予測することもできるかもしれない。精子クロマチン構造評価 (SCSA) は、生体内外において受精の正否を予測できる可能性がある (Evenson & Wixon, 2006)。しかしながら、テストの結果と流産、または他の妊娠結果との間に相関があるかどうかは、未だ明らかではない。

Chapter 5 精子調整法

5.1 序

精子は機能診断テストのため、もしくは人工授精や ART の治療のためなど様々な目的から精漿から分離される必要がある。精子機能テストを行う場合、精漿に含まれる精子以外の細胞が生成する物質から受けるダメージを制限するために、射精から 1 時間以内に精漿と精子を分離することが重要となる。

Comment 1: カウントした精子が少なすぎたときは、不確かな結果が得られてしまうことがあり（付録 7, A7.1.1 参照）、診断や治療に影響を及ぼす場合がある（付録 7, A7.2 参照）。このようなことは精子が治療目的に必要な時、避けられなかったり、利用出来ないことがある。

Comment 2: 精液の量が少ない、または推奨されているよりもカウントした精子数が少なかった場合、得られた値の精度は有意に減少する。もしカウントした精子の数が 400 に満たなかった場合、数えた精子数に対するサンプリングエラーの値を報告する（表 2.2 参照）。

5.1.1 いかなる場合、精子を精漿から分離する必要があるのか？

精漿は、精子が頸管粘液を通過する助けをする（Overstreet et al., 1980）が、精漿のいくつかの構成成分（プロスタグランジン、亜鉛など）は、精子子宮内注入や IVF など自然のバリアをバイパスしている ART においては、妊娠の成立を邪魔してしまう。精漿から精子を分離することは、治療においてゴミや生殖細胞以外の細胞、死んだ精子を除去し、形態的に正常で運動性の高い精子を最終調整で得るために非常に重要である。精液を培養液で希釈し遠心する方法は、精子子宮内注入で正常な精子を得るために現在も用いられている（Boomsma et al., 2004）。しかしながら、精液パラメーターに 1 つもしくは複数の異常があった場合は、一般的に密度勾配遠心法や直接 swim-up 法が優先される（Morshedi et al., 2003）。ガラス繊維管を使った方法は、あまり所見の良くない精液で精子を分離する場合は、密度勾配遠心法と同じくらい効果があると報告されている（Rhemrev et al., 1989; Johnson et al., 1996）。

5.1.2 調整方法の選択

精子調整法の選択は、精液サンプルの状態によって大きく影響を受ける（Canale et al., 1994）。例えば、直接 swim-up 法は、精液サンプルが正常であるケースで選択されるが、超乏精子症や精子奇形症、精子無力症の場合、多くの運動精子の回収が可能であるため密度勾配遠心法が使われる。密度勾配遠心法は、それぞれのサンプルの特徴によって、遠心するサンプルの全体量を減らし、精子の遊走距離を制限することで運動精子を最大

限回収することを可能にし、粘性の強い精液では遠心時間を増やすことができるなど、応用が可能な方法である。

それぞれのラボで扱いやすい精子ペレットを得るための回転数、遠心時間を定める必要がある。精子数が非常に少ない場合、回転数や遠心時間を変更し最大数の精子を回収するチャンスを増やすべきである。回転数や遠心時間を変更する場合は、実際の治療を行う前にしっかりと試しておく必要がある。精子調整に最も適した方法を定める場合、透明帯除去ハムスター卵子進入テスト（4.5 参照）などで調整された精子の機能的な能力の評価が重要な指標となる。

5.1.3 精子を精漿や感染性物質から分離する効果

精子選別法の効果は、回収される精子の総数、総運動精子数、正常形態運動精子数などに表れてくる。一般的に運動精子の回収は swim-up 法が密度勾配遠心法（>20%）よりも低いと言われている（<20%）（Ng et al., 1992）。swim-up 法と密度勾配遠心法では、精子調整の最終段階で精漿の構成物質から受けるコンタミネーションの水準が異なる。Björndahl et al. (2005) は前立腺から分泌される亜鉛を、精漿構成成分の溶解性マーカーとして用いた。彼らは時間経過による亜鉛の swim-up 培養液への拡散を測定した。その結果、最終的な亜鉛濃度は swim-up 法の方が密度勾配遠心法よりも高い結果になった。

精液サンプルは有害な伝染性の物質を含んでいる場合があるので、精液を取り扱うときは感染する危険性を考え、細心の注意を払う必要がある。精子調整法では 100% 全ての有害物質を取り除くことは不可能である（5.6 参照）。安全に関するガイドラインについてはその概略を付録 2 に記載している通りであるが、しっかり見ておく必要がある。ラボにおける良き慣習は、ラボの根本的な安全性へと繋がるものである（WHO, 2004）。

5.2 基礎知識

3 つの簡単な精子調整法を以下の項で述べる。全ての方法で使用される培養液は、平衡化された塩溶液にタンパク質と、精子を処理する環境に調節するための緩衝剤が含まれているものが使われている。顕微授精（ICSI）、体外受精（IVF）、人工授精（AI）、配偶子卵管内移植（GIFT）などの ART では、ウィルスやバクテリア、プリオンによる汚染を避け、高度に精製されたヒト血清アルブミンが必須である。アルブミンはこれらの方法で使用できるように商品として入手が可能である。インキュベーターが大気と 37°C で設定されている場合、培養液は Hepes もしくは同様の培養液を使い、チューブのキャップはきつく閉めておく必要がある。インキュベーターが 5% CO₂、37°C の場合は、重炭酸 Na 緩衝系培養液もしくは同様の培養液を使い、ガス交換が可能のように、チューブのキャップはゆるめておく必要がある。これは、培養液の pH が精子の生存に重要な関係があるといわれているためである。精子調整に用いる培養液は、最終的にど

の緩衝剤が使われている培養液が最もふさわしいかによって決定される必要がある。例えば、精子機能検査では精子のキャパシテーション（受精能獲得）を補助する培養液が必要だとされていて、一般的には重炭酸 Na が含まれている（25mmol / l）。

精液は滅菌された状況で採取されるべきである（2.2.3 参照）。滅菌の技術と器具は、治療で行う精子調整法に不可欠なものである。

5.3 簡易洗浄

簡易洗浄は精子の回収率が最も高く、精液の質が良ければ適した方法である。この方法は、精子子宮内注入のための精子調整にしばしば用いられる。

5.3.1 試薬

1. できれば下記に示すようなヒト血清アルブミン（HSA）もしくは血清を添加した BWW、Earl's、Ham'sF-10、HTF（市販、あるいは付録 4、A4.1、A4.3、A4.4、A4.6 参照）。
2. 精製され、ウイルス、細菌、プリオン、エンドトキシンを含まない HSA。
3. HSA の添加： 50mL の培養液に、300mg の HSA、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v / v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。
4. 血清の添加： 46mL の培養液に、4mL の非動化（56°C、20 分間）した患者血清、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v / v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。

5.3.2 手順

1. 精液をよく混和する（Box2.3 参照）。
2. 精漿をできるだけ除去するため、精液量の 2 倍量の血清等を添加した培養液で希釈する。
3. 希釈した精液をできれば 3mL 以下になるよう複数のチューブに分注する。
4. 300-500g、5-10 分間遠心分離する。
5. 慎重に上清を吸引、除去する。

6. 精子のペレットを 1mL の血清等を添加した培養液で静かに懸濁する。
7. 300-500g、5-10 分間遠心する。
8. 慎重に上清を吸引、除去する。
9. 精子のペレットを目的に合った（媒精など）濃度、運動性にする（2.5、2.7 参照）ために適切な容量の血清等を添加した培養液で懸濁する。

Note: 精漿を除去するための洗浄の回数は、より少ないチューブの使用と各々のチューブの容量を増やすことによって、減らす事ができる。このようにするには、確実に精子のペレットを得るために遠心力と遠心分離の時間を増やすべきである、例えば 500-600g、8-10分間。

5.4 直接 swim-up 法

精子は、精漿から泳ぎ出て培養液中に進む能力によって選ばれる。これは、「swim-up」として知られている。精液は、精子細胞膜の過酸化のダメージを生じさせるため、swim-up 前には希釈や遠心分離をするべきではない（Aitken & Clarkson, 1988）。このように精液からの直接 swim-up は、運動精子を分離させるには適した方法である（例えば、Mortimer, 1994a, b）。直接 swim-up は、液化された精液の上に培養液を重層化することによって、もしくは、培養液の下に液化された精液を注入することによって行う。やがて、運動精子は培養液中に泳いでくる。この方法は、洗浄法より精子回収率は低い、精子の運動性で選別されるので、精子の運動率が低い精液で有用な方法である（例えば、IVF や ICSI のために）。

5.4.1 試薬

1. できれば下記に示すような HSA もしくは血清を添加した BWW、Earl's、Ham'sF-10、HTF（付録 4、A4.1、A4.3、A4.4、A4.6 参照）。
2. 精製され、ウイルス、細菌、プリオン、エンドトキシンを含まない HSA。
3. HSA の添加：50mL の培養液に、300mg の HSA、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v/v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。
4. 血清の添加：46mL の培養液に、4mL の非動化（56°C、20 分間）した患者血清、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v/v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。

5.4.2 手順

1. 精液をよく混和する（Box2.3 参照）。

2. 滅菌した 15mL コニカルチューブに 1mL の精液を入れ、その上に 1.2mL の血清等を添加した培養液を静かに重層する。あるいは、血清等を添加した培養液の下にピペットを用いて精液を注入する。
3. 精液と培養液の接地表面積を広くするため、チューブを 45 度傾けて、37°C、1 時間保温する。
4. 静かにチューブを直立した状態に戻し、培養液の上から 1mL を回収する。ここには、運動性の高い精子が含まれている。
5. これを 1.5-2.0mL の血清等を添加した培養液で希釈する。
6. 300-500g、5 分間遠心分離し、上清を除く。
7. 精子濃度、運動性、高速運動性の評価をするために 0.5mL の血清等が添加された培養液で静かに懸濁する。
8. その検体が直接治療や研究に使用される。

5.5 不連続密度勾配法

不連続密度勾配法は、良好精子の選別の最良な方法であり、他の細胞や組織片からの分離が可能である。また、swim-up 法より標準化が簡単であり、結果は終始一貫している。この方法は、IVF と ICSI の際に精子の回復と調整のために用いられる。この方法は、シランコートされたコロイド状シリカから成る密度勾配を通して精漿を遠心分離する。それは、細胞の密度によって分離される。加えて、運動精子はチューブの底で柔らかいペレットを形成するために勾配液中を活発に泳ぐ。一般的に 40% (v/v) の密度表層と 80% (v/v) の密度下層の簡単な 2 段階の不連続密度勾配法が、最も広く使用されている。通常、密度勾配法を用いて調整した精子は、非常に運動性が高く、白血球、非生殖細胞、変性した生殖細胞を含まない。密度勾配法による精液処理のための製品が、数多く販売されている。これらの製品は、メーカーの推奨する方法で使用しなければならない。推奨する手順と異なる方法に変えるのであれば証拠に基づくものでなければならない。ほとんどの密度勾配溶液は、本質的に低い浸透圧を持つ高分子量の成分を含むので、通常女性生殖器系と同等の浸透圧の培養液で調整する。

5.5.1 試薬

1. できれば下記に示すような HSA もしくは血清を添加した BWW、Earl's、Ham'sF-10、もしくは HTF (付録 4、A4.1、A4.3、A4.4、A4.6 参照)。

2. 精製され、ウイルス、細菌、プリオン、エンドトキシンを含まない HSA。
3. HSA の添加：50mL の培養液に、300mg の HSA、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v/v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。
4. 血清の添加：46mL の培養液に、4mL の非動化（56°C、20 分間）した患者血清、1.5mg のピルビン酸ナトリウム、0.18mL の乳酸ナトリウム（60%（v/v）のシロップ）と 100mg の重炭酸ナトリウムを加える。
5. 等張密度勾配溶液：10mL の 10 倍濃縮の培養液に 90mL の密度勾配溶液、300mg の HSA、3mg のピルビン酸ナトリウム、0.37mL の乳酸ナトリウム（60%（v/v）のシロップ）、200mg の重炭酸ナトリウムを加える。
6. 80%（v/v）密度勾配溶液：40mL の等張密度勾配溶液に 10mL の血清等を添加した培養液を加える。
7. 40%（v/v）密度勾配溶液：20mL の等張密度勾配溶液に 30mL の血清等を添加した培養液を加える。

Note: これらの等張密度勾配溶液は、よく 100%、80%、40%（v/v）呼ばれるが、本当は 90%、72%、36%（v/v）である。

5.5.2 手順

1. 1mL の 80%（v/v）の密度勾配溶液に 1mL の 40%（v/v）の密度勾配溶液を重層することによって、チューブに密度勾配を作る。
2. 精液をよく混和する（Box2.3 参照）。
3. 密度勾配溶液の上に 1mL の精液を重層し、300-400g で 15-30 分間遠心分離する。精液の状態により複数のチューブを用いることもある。
4. 精子ペレットからほとんどの上清を除去する。
5. （密度勾配溶液の除去のため）5mL の血清等を添加した培養液で静かに懸濁し、200g、4-10 分間遠心する。
6. 洗浄の手順を繰り返す（上記ステップ 4,5）。

7. 精子濃度、運動性、高速運動性の評価をするために 0.5mL の血清等が添加された培養液で静かに懸濁する（2.5、2.7 参照）。

5.6 HIV に感染した精液の調整

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）が精液に存在しているなら、精漿中と非精子細胞の中でウイルスの RNA とプロウイルスの DNA を比較的容易に確認することができる。HIV レセプター（CD4、CCR5、CXCR4）は、非精子細胞のみに発現することから、密度勾配法の後に swim-up 法を行う方法は、HIV に感染していない女性のパートナーの感染を予防する方法として提唱されている（Gilling-Smith et al., 2006; Savasi et al., 2007）。これらの方法は、HIV ウイルス感染していない精子から感染している非精子細胞と精漿（密度勾配法の上清）を分離し、更に（密度勾配のペレットから）swim-up で運動精子を分離させるために開発された。調整した検体は、使用する前に逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）にてテストし、HIV の感染がなかったもののみ ART 使用されるべきである。今まで結果から推奨されるものの、精子の調整を通して HIV の感染のリスクが完全に除去できている十分な証拠はない。

Note: これらの方法は、HIV に感染していない検体との相互感染のリスクを最小限にするため、安全な施設でのみ行われるべきである。

5.7 精巣精子、精巣上体精子の調整

精巣組織と精巣上体から採取された精子の調整には、特別な方法を必要とする。精巣上体精子の吸引の典型的な適応は、造精機能障害よりむしろ閉塞性無精子症である。従って、治療のために比較的多くの精子を回収することができる。精巣上体精子の吸引は、赤血球と非生殖細胞のコンタミネーションを最小限にでき、精巣上体運動精子の分離と選別を比較的容易にする。多数の精巣上体精子が得られた場合は、密度勾配法がその後のための調整としては有用である（5.5 参照）。精子数が少ない場合には、洗浄濃縮法を行う（5.3 参照）。

精巣精子は、切開による生検（顕微鏡解剖の有無に関わらず）、または、経皮的な針生検によって回収できる。精巣検体は、常に非生殖細胞と多数の赤血球が混在しているので、精子のきちんとした分離には追加の処置が必要である。精細管と結合している伸張した精子細胞を遊離させるのには、酵素処理もしくは、機械的な方法を必要とする。精子の数が少なく、運動性も低い故に、精巣精子は ICSI ために準備される。

5.7.1 酵素処理法

1. 精巣組織をコラゲナーゼ（例えば、1mL の培養液に微生物コラゲナーゼ、Type 1A 0.8mg の割合で）と共に 30 分ごとにボルテックスしながら 1.5-2 時間、37°C で保

温する。

2. 100g、10 分間遠心し、ペレットを調べる。

5.7.2 機械的処理法

1. 精巣組織を培養液中で、潰して懸濁液をつくるまで、カバーグラスで挟んで組織を湿させておく。
2. あるいは、培養ディッシュの底に平行に曲げられる使い勝手の良い針（ディスポのツベルクリンシリンジに付けられる）で、細胞を精細管から剥ぎ取る。

5.7.3 ICSI のための精子懸濁液

1. 1.5mL の培養液で検体を洗浄する。
2. 300g、8-10 分間遠心する。
3. 上清を除去し、0.5mL の新しい培養液で再懸濁する。
4. ペレットで精子の運動性と数を推測します。（精子数の少ない検体は、より少ない量の培養液で再懸濁する必要があるかもしれない。）
5. 培養ディッシュに 5-10 μ L のドロップを作る。
6. ミネラルオイル（あらかじめ CO₂ で平衡化したもの）でカバーする。
7. 5-10 μ L の精子懸濁液を培養液に入れる。
8. 慎重に ICSI 用ピペットで培養液とオイルの境界面から運動精子を吸引する。
9. 吸引した精子を粘稠性のある液体、例えば PVP（7-10%（100g / l））に移す。

5.8 逆行性射精の検体

一部の男性において、精液が膀胱に射精され結果的に無精液症や射精が見られない方がいる。この確認は、射精後の尿に精子が存在するかどうか調べることで確認できる。薬理的な処置が不可能か、もしくは効果がなければ、尿からの精子の回収は可能性がある。重炭酸ナトリウムの摂取による尿のアルカリ化は、尿中の精子の運動性保持の可能性を上げる（Mahadevan et al., 1981）。

ラボでは、男性に説明をする必要がある。

- 膀胱を空にしない程度に排尿する。
- マスターベーションによって検体容器に射精する。
- もう一度、培養液が入った異なる検体容器に排尿する。
(尿がよりアルカリ化されるように)

両射精された検体、とりわけ尿サンプルも検査する。かなりの尿量があるかもしれないので、検体を濃縮させるためしばしば遠心（500g、8 分間）が必要になる。もし、濃縮された逆行性の検体と射精された検体とがあれば、最も効率である密度勾配法で処理することができる（5.5 参照）。

5.9 射精に介助を必要とした精液の調整

射精障害もしくは、射精することができない男性からの精液は、陰茎への直接的な振動刺激か、直腸への電氣的な刺激で回収できるかもしれない。脊髄損傷男性からの精液は、高い精子濃度と低い運動率、赤血球、白血球のコンタミネーションが頻繁に認められる。電氣的射精による検体は、密度勾配法によって最も効果的に処理することができる（5.5 参照）。調整の方法に関わらず、このタイプの精液には、非運動性を高率に含む。

Chapter 6 精子凍結保存

6.1 はじめに

精子を取り扱う臨床検査部の業務において、精子の凍結保存は重要な位置を占める。ヒト精子の低温生物学の歴史は 1940 年代後半にさかのぼる。凍結による細胞障害から精子を保護する作用がグリセロールにある事の発見が、ドライアイスによる -79°C でのヒト精子の凍結保存の成功につながった (Polge et al., 1949; Bunge & Sherman, 1953; Bunge et al., 1954)。現在では精子の凍結保存には液体窒素が汎用されている。精子の凍結保存技術は世界中に広く普及しており、精子の凍結保存に携わる商業的精子バンクや公的機関が多数設立されるに至った (Perloff et al., 1964; David et al., 1980; Clarke et al., 1997; Leibo et al., 2002)。

数多くの精子凍結のプロトコールが存在し、様々な凍結保護剤と凍結手技が用いられる。凍結保存の際、細胞の生存のために重要なのは凍結-融解の過程で細胞内結晶の形成を最小限に抑えることである。適切な凍結保護剤が選択され、冷却と加熱を適切な時間経過で行うことが、細胞内の水分の氷結晶形成を最小限にするために必要である (Sherman, 1990; Keel & Webster, 1993; Watson, 1995)。細胞の水分がガラス化する臨界点は -130°C であるが、この臨界点を越える時間が長すぎると細胞内水分が再結晶化して細胞に障害を引き起こすことになる。とくに凍結精子融解の過程で重要である。ヒト精子が耐えられる冷却-加温の速度にはある程度の許容域がある。急速冷却（コールドショック）に対してヒト精子は比較的良く耐える。これは不飽和脂肪酸の二層構造からなる細胞膜の液性が高いことが理由と考えられる (Clarke et al., 2003)。またヒト精子は他の細胞に比べて凍結保存による細胞障害にも強い。細胞内の水分比率が約 50%と低いことがその理由である。しかしながら、凍結-融解後にも運動能力を保ち続ける運動精子は平均で 50%にすぎず、精子の機能の点では凍結-融解による悪影響は避けられない (Keel & Webster, 1993)。それゆえに、凍結保存の手技を至適化する事は凍結-融解操作の精子への悪影響を最小限に留め、ひいては妊娠率の向上に寄与する (Woods et al., 2004)。

凍結精子による人工授精の妊娠率は融解後の精子の質や人工授精のタイミングと関連するが、女性の年齢、過去の妊娠歴、排卵の状態や子宮、卵管の異常などの、精子を受け入れる女性側のファクターも少なからず影響する (Le Lannou & Lansac, 1993)。適切な凍結保存手技で保存された検体ならば凍結保存の時間経過による精子の質の低下は顕著なものでは無い。28 年前に凍結保存された精子によって受胎した児の出生例も報告されている (Feldschuh et al., 2005; Clarke et al., 2006)。

精子凍結保存の目的は様々である (Box6.1 参照)。そのなかでも、特殊な場合には目的に応じて、凍結保存の手技を修正する必要がある (6.2.2 参照)。

Box 6.1 精子の凍結保存の目的

精子提供

妊孕性が確認されている、あるいは妊孕性を有するとみなされる男性の精液がドナーとして保存される。提供された精子は、人工授精、体外受精、顕微授精などに利用される。通常はクリニックや精子バンクが募集し、集められた精子を匿名で提供する。あるいは、既知の提供者の精子を提供されるケースもある。

- 顕微授精に適した生存精子や正常形態の精子が得られない。または顕微授精でも妊娠に至らないか、顕微授精を行うだけの経済的余裕が無い。
- 遺伝的疾患が子に伝わることを回避する。
- 血液型不適合による胎児の溶血性貧血の予防。
- 反復流産（精子提供が有効であると判断された場合。）
- 男性パートナー無しで妊娠を望む女性。
- 遺伝性疾患や感染症をスクリーニングするために地域や国で定めた規制には、必ず従うべきである。

妊孕能の保持

妊孕性が損なわれる手術操作や薬品や環境への曝露を受けるに先立って、精子をあらかじめ保存しておく。

- 精管切除術（再び挙児希望が出た場合、将来の婚姻状況の変化に備えて）。
- 恒久的に精子形成を損なう薬剤治療、または放射線治療（Meseguer et al., 2006; Schmidt et al., 2004）。
- 生命の危険を伴う仕事（例えば、夫死亡後の精子による妊娠、出産が認められている国での軍務など）。

不妊治療

- 人工授精、体外受精、顕微授精における夫精子の利用。
- 重症の乏精子症、運動精子が毎回の射精で得られない症例（顕微授精のバックアップとして）（Bourne et al., 1995）
- 生殖管閉塞の手術や視床下部下垂体機能不全のゴナドトロピン療法など、精子獲得に関する治療の効果が期間的に限定されている症例。
- 精子の採取に特別な手技が必要な症例。例えば脊椎損傷患者の電気刺激による射精。逆行性射精に対する尿中からの採取。外科的な精子採取など。
- ART 当日に夫が来院できないため、新鮮精子が使えない症例。

感染症の垂直感染の防止

抗レトロウイルス剤でコントロールされている HIV キャリアーの男性の精子で、ウイルスが同定されないものを保存して、人工授精、体外受精、顕微授精などに利用する。女性側への HIV 感染のリスクを低下させる事が目的である。

Note 1: 不妊治療や妊孕性保持を目的として妊娠を確実にするためには、10回以上の媒精を行うに十分な量の精子を保存する必要がある。異常がある精液を幾度かに分けて採取し精子をプールしてAIHに用いる試みは、有効性がまだ示されていない。

Note 2: 顕微授精を行うのに必要なのはただ1つの精子である。したがって生存が明らかな運動精子ならば凍結してみる価値はある。

Note 3: 生殖能力が損なわれる医療行為を受ける前に精液を保存することは、将来父親になる希望を残すことになり、精神的な面でも有益である。アルキル化剤や放射線治療を受ける際には、精子の突然変異のリスクを避けるために、治療が始まる前に精子保存がなされなければならない。思春期男性も含め、抗ガン剤治療や放射線治療を受ける全ての生殖年齢の男性に対して（Kamischke et al., 2004）、精子凍結保存の選択肢が示されるべきである。

ヒト精子の凍結とその後の長期保存は非常に複雑な手技であり、これに携わるスタッフには特殊な責任と決定権とを与えられなければならない。また、業務を遂行する上でリスクアセスメントを行うことが推奨される（Box6.2 参照）。

Box 6.2 ヒト精子の凍結保存のリスクアセスメント

ヒト精子の凍結保存のリスクアセスメントにおいて考慮されるべき事項

物品、資材

- 窃盗や火災による遺失、あるいは冷凍凍結ストローやアンプル、容器、液体窒素の供給停止などのリスクに備えた容器、検体、保管室の安全性。
- 目的に沿った器材の使用法。
- 窒素の充填と除去のシステム。

スタッフの安全性と防護

- 個人を防護する設備。
- 液体窒素の不足と大気中の酸素濃度の低下を感知するシステム。

サンプル間の相互汚染のリスク

- 保管中の検体の相互感染のリスクを低減する。
- 凍結容器のタイプ：バイアルかストロー、ストローのシーリング方法（熱あるいはポリマー）。
- 冷却媒体：液体窒素、窒素蒸気。
- ウイルスの混入が確実、または疑いのあるハイリスクのサンプルの保管法と取り扱いプロトコル。

凍結されたサンプルの安全性

- 全損のリスクを避けるために、サンプルを分割して、異なる場所で保管する。
- 各ステップでサンプルのダブルチェックを行う。
- ラベルや標識コードとして丈夫なものを使用する。
- 保管されている資材とサンプルを定期的にチェックする。

Sources: Tedder, 1995; Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; TomLinson, 2005

Note 1: 液体窒素と比べて、窒素蒸気相での保管は相互汚染のリスクが低い。注意すべき点としては、資料容器の形状とサンプルの充填状態によって、容器内の温度の著しい不均衡が生じる事がある。極端な例では -100°C にさえ至らないことがある (TomLinson, 2005)。したがって、窒素蒸気相での保管の際は資料の温度が、ガラス質への転換温度である -130°C を上回らないように注意して、保管容器内の温度の不均衡が精子の損傷を防ぐ必要がある (see Clarke, 1999)。

Note 2: 熱シール可能なイオノマー樹脂製のストローは液体窒素での保管に安全に使用できる。熱シールによって内容が流失することが無く、ウイルスや細菌混入を防ぎ、 -196°C まで冷却可能である (Mortimer, 2004; Gilling-Smith et al., 2005; TomLinson, 2005)。

6.2 精液凍結保存プロトコール

精子凍結と精子バンクのプロトコールが公開されている (Mortimer, 2004; Wolf, 1995)。購買可能な凍結保護剤もある。よく使用される凍結保護剤グリセロール卵黄クエン酸塩 (GEYC)、機械的な操作による精子凍結の手技、そして急速凍結の詳細を以下に示す。

6.2.1 標準操作法

6.2.1.1. GEYC 調整

1. 65mL の滅菌蒸留水に、1.5 g のブドウ糖と 1.3 g のクエン酸ナトリウム 3 塩基 2 水和物を加える。
2. 15mL のグリセロールを加えて完全に混和する。
3. 1.3 g のグリシンを加える。溶解したら、溶液を $0.45\text{-}\mu\text{m}$ 孔フィルターで濾過する。
4. 20mL の卵黄を加える (病原性のない卵が望ましい) : 卵を洗浄して殻を除去する。卵黄を包む膜を穿刺しシリンジに卵黄を吸引する。(卵 1 コからおおよそ 10mL の卵黄が得られる)
5. 混合液を 56°C のウォーターバスに 40 分間入れ、時々揺り動かす。

6. 溶液の pH を確認する。もし、pH6.8-7.2 の範囲外なら、組成が誤っていると考えられるので破棄して新しく作り直す。
7. 無菌検査のための細菌培養をこの段階で行う。
8. 精子への毒性試験もこの段階で行う。
9. 無菌操作で 2mL ずつ分注して-70°Cで保存する。
10. 3 ヶ月以内に使用する。

6.2.1.2. 精液への凍結保護剤の添加

1. 凍結保護剤を解凍して室温まで温め、混和する。最初に 37°Cまで加温することが有効である。
2. 高濃度のグリセロールは精子に有害である。そのため精子へ凍結保護剤を添加して混和する際には細心の注意が必要である。
3. 渦巻き状の滴下、静かな上下のピペッティング、あるいは 5 回に分けた添加などの方法で、1 容量の GEYC を 2 容量の精液に加えて室温で 10 分以上かけて慎重に混和する。
4. GEYC を加えた後、30-35°Cで 5 分間インキュベートする。

6.2.1.3. ストローへの充填

1. 0.5mL のプラスチックストローは熱伝導性が高く、保管が容易な為広く普及している。より大きな容量が必要な場合はプラスチックバイアルが用いられる。
2. 0.5mL のプラスチックストローに精液と GEYC の混和液を吸引する。または凍結用バイアルに注入する。ストローに充填する際には、吸引器やストローの端に適合するアダプターを用いる。

6.2.1.4. ストローの密封

2 つの綿繊維で挟まれた乾燥ポリビニルアルコール粉末の栓のついたストローは精液と粉末が接触することで自動的に封入される。そのため特別な封入操作が不要である。

1. コンテナ側にくるストローの端を、軽く叩いて 1 cm 程の空気の隙間を作る。
2. 空気の隙間を作った側を無菌のポリビニルアルコール粉末に差し込み、1 cm の深さの水に入れて封入する。
3. 粉末シール法は感染源を通す可能性があるので、熱シール法はより望ましいといえる。
4. プラスチックのバイアルやアンプルに保存する場合、その容量は 90%より少なく充填しなければならない。
5. 容器の外側を拭いて乾燥させ、70%アルコールなどで滅菌処置を行う。

6.2.1.5. プログラムフリーザーでの精液の冷却と凍結

液体窒素の蒸気をフリージングチャンバーに注入し、その速度を制御する事がプログラムフリーザーの原理である。

1. ストローまたは冷凍用バイアルをプログラムフリーザーにセットする。プログラムの実行は説明書に従う。
2. 一般的なプログラムとして、20°Cから-6°Cまでは毎分-1.5°C。その後-100°Cまでは毎分-6°Cでストローを冷却する。所要時間は約 40 分である。ストローを液体窒素中に移すまでの時間が必要なので-100°Cが 30 分間維持される。
3. 施設毎の経験から、より複雑な方法がとられることもある (Perez-Sanchez et al., 1994)。

6.2.1.6. マニュアルでの精液の冷却と凍結

マニュアルでの凍結操作も、プログラムフリーザーに劣らない成績を上げている。マニュアル法には多くの変法がある。

1. ストローを 20 分間-20°Cの冷凍庫に入れる。引き続いて-79°Cのドライアイスの上に置き、その後、-196°Cの液体窒素に入れる。
2. ストローを-20°Cの冷凍庫に入れる。引き続いて-70°Cの冷凍庫に移す。あるいは、バスケットか容器に入れて、空気と液体窒素蒸気との混合物の入った小さな液体窒素の容器内に置き、-80°Cから-100°Cで 10-15 分冷却する。そして最終的に-196°Cの液体窒素に入れる。大きな容器に入れた液体窒素の液面から 10-20 cm 上にストローを 1 時間静置し、液体窒素上の温度勾配を利用する方法もある。

6.2.1.7. 凍結精液の保存

1. 凍結したストローをプラスチックの保存用チューブ（ミニ容器）の中に入れ、これらを、より大きな保管用容器に挿入する。
2. クライオバイアルは、金属ケーンのクリップに装着するか貯蔵ボックスに置いて貯蔵タンクで保存する。クライオバイアルの蓋は完全に密封されているわけではないので、蒸気相での保管が望ましい。
3. ストローの入った容器は液体窒素の入った真空ビンないしタンクに入れて保管する。

6.2.1.8. 凍結精液の輸送

凍結精子は運送業者を介して輸送することができる。運送業者は液体窒素のタンクを使用する。時間経過によってタンク内の液体窒素は蒸発するので、低温輸送に必要な低温を保てる期間は業者によって異なり、数日から数週間の幅がある。

Note: 地域や国、国際的に定められた、液体窒素とヒト生体試料輸送に関する規制に抵触しないよう従う。

6.2.1.9. 凍結精液の融解

1. 液体窒素または蒸気タンクから必要なだけのストローを取り出し、ティッシュペーパーあるいはラックに置き、約 6 分かけて室温に戻す。クライオバイアルを室温に戻す場合、やや長くなり約 10-20 分で室温に戻す。
2. 10 分以内にストローの端を滅菌されたハサミで切り落とし、不妊治療の際には媒精に供するための容器に移す。また、運動能を検証して凍結のプロセスをチェックする事もある。
3. 急速凍結のサンプルは、解凍にも時間をかけない方が良い結果につながる (Verheyen et al., 1993)。
4. 過剰な浸透圧ストレスから精子を守るため少量の検体を繰り返し希釈して凍結保護剤を除去する操作は、解凍された精子の状態を良好にし (Gao et al., 1995)、妊娠率の向上につながる。

6.2.2 乏精子症の検体や外科的に採取された精子のための修正プロトコール

- ごく限られた運動精子しかない精液や、生殖器官から外科的に採取された少数の精子懸濁液は将来の顕微授精の為に保存することができる。

- 精液は、必要に応じて、1500 g 10 分間で遠心分離し、約 0.4mL の容量に濃縮して、GEYC を加え上に述べたプロセスをすすめる。
- 精巣上体液、精巣抽出液、その他の方法で得られた精子懸濁液は、スィムアップ法や密度勾配遠心法で処理され、Hepes バッファーと 4mg / mLHSA を含む精子調整メEDIUMに調整される。これらは、タイロード・グルコース・グリセロール凍結保護剤ないし、HSA を含む市販の凍結保護剤で凍結保存できる。

6.2.2.1. 修正凍結保護剤 (TGG)

1. 無菌タイロード液 (付録 4、A4.9 参照) 40mL に無菌 HSA (100mg / mL) 5mL、グルコース 0.9g、グリセロール 5mL を加え、0.45µm ポアフィルターで濾過する。
2. 2mL ずつに分注し-70°Cで保管する。

6.2.2.2. 手技

1. 運動精子がごく僅かで検体量が 2.0mL 以上あれば、室温で 1500g 5 分遠心分離する。
2. 上清を取り除いて残った 1mL を再懸濁する。精子の運動率を計量する。もし精子数が少ない時は、カバーガラスの範囲内にある数で計量する。
3. 2mL に分注した TGG1 本を解凍する。
4. 最終調整精子懸濁液 1 容に対して、TGG1 容を静かに加え、混ぜる。
5. 前述の方法でストローないしはクライオバイアル内に封入後、凍結する。もしストローが完全に充填されないならば、ストローが液体窒素の液面に浮き上がることを防ぐ為に、ミニ容器のキャップをつける。

6.2.3 ストローのラベリングと記録

ストローやバイアルにラベルをつけて、コード化して管理をする事は必須事項である。提供者の匿名性を守る為に、全てのデータシートとコンピューターデータベースにコードを使用する。ドナーの特定につながるコードには機密保持が必要で、安全を重視し個別にとりあつかう。優れたコーディングシステムは数多くあるが、最も重要な事はドナーや保管依頼主に個別のコードが割り振られることである。以下に述べるコーディングシステムは十分に機能しているシステムの一例である。

- 新規の匿名のドナー個別に二文字のコードが割り当てられる (AA, AB, AC... BA... など、ZZ で最終、その後新しい方法が必要となる)。

- 患者と、匿名でないドナーには 3 文字のコードが割り当てられる: AAA、AAB、など。
- 一人のドナーから複数の検体が出た場合、パーソナルコードの後の数字で表す。例えば、ドナーBT によって提供される 8 番目の検体は BT-8 と表現する。
- 文字コードと検体番号は黒の消えないマーカーでストローやバイアル個々に記入する。あるいは液体窒素保管用のラベルを使用する。
- ストローが入ったミニ容器には、コードと検体番号が記入された標識スティックを入れる。
- 一目で分かるように、容器、ミニ容器、ストロー、封入パウダーを色分けすることも有効である。
- 保管された精子が使用される毎に、データベース上のストローやバイアル数も、これに応じて変更していく。

Note: ドナーや患者から検体を確認することが必要な際には、必ず2名でダブルチェックし、チェックした証拠を検査室で記録しておく。サンプルの受け取り、調整とストローのラベリング、タンク内への保管や使用ないし破棄のための解凍などが該当する。技術者が一度に取り扱う精液検体は、一つに限られることが理想である。

Chapter 7 品質保証と品質管理

7.1 男性泌尿器科学検査室における品質管理

男性泌尿器科学検査室には適切な診断と患者の健康上の留意点を決定するための信頼性の高い検査結果を出すことが望まれる。精液検査は工程が非常に複雑であり作業手順を標準化することが困難なので、手順上の間違いを検出したり検査結果の誤差を補正したりする上では品質管理（QC）の導入が不可欠である。同一症例においても異なる施設の検査室間で精子濃度や精子の形態評価の結果に大きな食い違いが生じていること（Neuwinger *et al.*, 1990; Matson, 1995; Cooper *et al.*, 1999, 2002）からも、品質管理の改善と算定方法の標準化が必要である。

検査室の規模にかかわらず各検査室は検査結果が常に正しい方法で算定され、高精度であることを保証するために標準化のための手法にのっとりた品質保証（QA）の工程を履行すべきである（De Jonge, 2000; Mortimer & Mortimer, 2005）。現実に QA 工程の履行が法律によって定められている国もあり、あるいは施設認定を行ったり健康保険制度を導入したりしている国もある。状況によってはここに掲げた QA 工程を完璧に履行する上で必要な人的、材的資源が揃っていない場合もあるかもしれない。例えばそのような状況下にあっても、ごく基礎的な要素である精子の形態評価や精子濃度、運動性の測定に関しては、品質管理に関しての内部監査や、もし可能であれば外部監査によって常に監視される体制を構築しておくべきである。

一般的な品質管理に関する書籍（例：Wheeler & Chambers, 1992; Wheeler, 1993）やさらに検査室に特化して品質管理について詳しく記載された書籍（例：Cembrowski & Carey, 1989; Carey & Lloyd, 1995; Westgard, 2002）があるので参考にされたい。各々の検査室内部で実施される品質管理活動は一般に内部監査（IQC）（第 7 章 項 6 参照）と呼ばれる。他方、外部監査（EQC）とは同一の検体を用いていくつかの異なる施設において算出された結果から評価されるものをいう（第 7 章 項 11 参照）。

7.2 精液検査における誤差の特性

品質管理（QC）手順の運用においては測定誤差の原因とその重要度合いの把握が必要である。いかなる測定においても必ずある程度の測定誤差が生じるが、その誤差の大きさは上方、および下方の信頼区間によって表わされる。いくら正確な測定であってもその精度には限界がある。つまり、ある一つの結果は真の値に近似しているときに正確であると判断される。測定における誤差には無作為に生じるものと、体系上の問題で生じるものの二つに分類することができる。主として検査精度に影響を及ぼす無作為な誤差は目盛りの読み違いや標本抽出時の操作上の誤りから生じるので、このような範疇の誤差は同一検査者によって、かつ同一の機材を用いていても反復測定することで検知できる。体系的な誤差（場合によっては偏差とも呼ばれる）は比較的潜行性が強いといえる。なぜならばこのような範疇に該当する誤差はある一つの検査だけに対して生じ、しかも直接的に結果を歪曲してしまういくつかの要因から発現し、そしてそれゆえに反復測定によって検出することができないからである。

たとえ抽出標本の精液が十分に混和されて、精液中あるいは固定液や培養液中で精子が均一に拡散した状態にあったとしても精液検査結果の正確性の甚大なる欠損の原因となる。精子の濃度、運動性、生存性や形態の検査では当然ながら実際に数える精子の数は限られているので、これらの検査結果の数値は検体全体を代表した一部標本から算出される推測値といえる。ある一定の精液量を選択抽出するとき（精子濃度の計算時）やある一定数の精子に対して調査するとき（運動性や形態、生存性の検査時）に生ずる一部標本抽出における偏差は無作為な誤差であり、一般的には統計的な、あるいは標本抽出における誤差と呼ばれる。この領域においてよく使われる専門用語を **Box 7.1** に記載した。抽出標本を混和するときやまたは一旦標本が廃棄された後などには、ある誤差が生じた上でさらに別の誤差が生じることもある。しかしこのような誤差は検査手技を改善することによって発生頻度を最小限にとどめることができる（7.13 参照）。

日常業務としての精液検査における品質管理の目的は、無作為に生ずる誤差と体系的な誤差の程度を監視し、可能な限り最小化させることである。信頼度が高く、臨床医や研究者にとってより有益な結果を得るためにこれら全ての誤差は最小限にとどめなくてはならない。

7.3 統計的な標本抽出時のエラーの最小限化

部分標本を用いた検査における誤差の度合いは、より多数の精子を検査することによって減少させることができるが（表 2.2、Box 2.5 と 2.7 参照）、統計学的な正確性の上昇とそれを獲得するために検査に要する時間、そしてその遂行の結果生じる検査者の疲労が元になる検査精度の低下とのバランスを考慮に入れなくてはならない。反復測定結果の平均値の受容性を審査するために 95%信頼領域を用いた場合、約 5%の抽出標本において数的な偏差単独の結果として 1.96 倍以上の標準誤差が生じその結果、不必要に測定を反復しなくてはならなくなる。しかしこの程度の追加業務は受理さるに値する。しかし、この追加業務量をもっと削減したければ、より広範な限界値（2.6 倍あるいは 3 倍程度の標準誤差）を採用してもよい（それぞれ、おおよそ 1%または 0.2%程度において限界値以上の誤差が生じることになる）。

Box 7.1 品質保証と品質管理における専門用語

精度	真の値に対する試験結果として受理するに値する近似値。
概数値	真の値の概算で、幾つかの検査室から得られた結果の平均値から導かれる（目標値、合意値、一般真値などともいう）。
偏差	概数値からの試験結果のばらつき。発生しうる不正確性のことで、いつも同一傾向にある（体系的な誤差）。
二項分布	理論上の分布のことで結果が二つに分類されるような型の事象に対して用いられる。例）運動 / 不動、生存 / 死滅、など。
Bland-Altman の図	一連の一对の観察間での各々の平均値による差異の図表表示。
共通原因偏差	一般的な偏差の原因であり、調査・研究によって確立された方法において全ての個々の値に影響を及ぼす。
95% 信頼領域	反復測定結果のうち全体のばらつきの 95% の領域内にある値。 (測定値に対し、 $\text{mean} \pm 1.96 \times \text{SE}$ あるいは $N \pm 1.96 \times \sqrt{N}$)
合意値	概数値の欄参照。
通常の実値	概数値の欄参照。
傾向分布の模式図	測定回数毎の結果を示す図表で、各々の測定値を中心値線と傾向分布の限界値と一緒に表示している。
Control limits	傾向分布の限界値。
drift（偏流）	少しずつ連続的に起こる測定値の微細な変動で、測定回数と共に測定精度に変化を及ぼす。
外部組織による品質管理	外部組織による品質監査で、様々な検査手順に対して異なる検査室間で比較すること。体系的な偏差の検出や検査精度調査を目的として実施される。
推奨される検査室での訓練（GLP）	調査が行われる検査室における検査の計画、実施、監視、結果記録、報告書作成などの遂行に関する骨子となる原理一式。
in control	全ての測定値が期待通りの傾向分布の限界値内にあるときに、その工程は管理範囲内にあるとする。
施設内における品質管理	検査室内での操作工程において偏差を測定する品質管理試験で、日々の作業の精度を査定する。無作為な偏差（精度）を精査するのに有効である。
ISO	国際標準化機構。その主たる役割は検査室の品質管理を含む国際的な基準を制定することである。
製造された品質管理標本	商品として購入可能な品質管理のための標本。手順書に従って制作、精度解析が行われている。
out of control	測定値が期待された傾向分布の限界値の範囲から外れてい

	るとき、または管理範囲内にあっても測定値に大きな偏りが生じているとき、作業工程が管理範囲外にあるとする。管理範囲外にある作業工程は必ず精査されなければならない。
PDCA	計画→実行→調査→改善策の遂行という一連の流れ。 (シューハート周期)
ポアソン分布	抜き取り検査に用いられる論理的な分布。
精度	反復測定で得られた結果を元にした近似値。
精度上の誤差	“抽出標本の誤差”参照。
無作為に生じる誤差	“抽出標本の誤差”参照。
S 管理図	回数毎における測定値の標準偏差値の傾向分布図。これは各作業工程の均一性や測定値の精度を監視するために用いられる。
標本抽出時のエラー	限られた数の精子を調べるような検査において発生する誤差であり、その値は調べた精子数の平方根に反比例する。標本抽出時の誤差（%SE）は調査精子数の標準誤差（ $\sqrt{N}$ ）であり、調査精子数に対する割合として表現される（ $100 \times (\sqrt{N}/N)$ ）（無作為誤差、精度誤差、統計的な標本抽出時エラーなど）。
シューハート周期	PDCA の欄参照。
特殊な原因による差異	非常に大きく、または断続的に発生したり予測不能であったりする差異の原因で、調査された作業工程における個々の値にのみ影響を及ぼすもの（無作為に生じる誤差）。
標準的な操作手順書	作業工程とその詳細な方法をどのように実行すればよいのか表記した手順書一式。
統計的な標本抽出時エラー	標本抽出時のエラー参照。
体系的な誤差	“偏差”参照。
目標値	“概数値”参照。
偏差	同一工程における個々の検査結果間の差異。偏差（誤差）の原因がいつも同じこともあれば、時々において特殊な場合もある。
$\bar{X}$ 管理図	測定毎の実測平均値を表わしている傾向分布の模式図。
Youden 図	測定毎に得られた数値を表示した図。

7.4 品質保証計画

信頼に値する検査結果を出し続けるための最良の方法は品質保証計画を継続的に発展させ続け、そして実行し続けることである。原則として、品質保証計画は検査室から提供される検査結果の質と妥当性、そしてその他検査室で行われる業務を監視し、評価するものである。

管理業務、経営、統計解析、危険性への予防策がとられた正しい業務手順などが品質保証計画の核心を形成している。継続的な監視作業は検査室内から生じ得る問題を検出し、それらを補正するだけでなく、そのような問題が発生することを未然に防ぐことにも役立つ。品質保証計画は検査室内で実施されるそれぞれの作業工程や検査方法毎に標準的な作業手順（SOPs）と、より詳細な説明文を含む品質マニュアル（QM）を作成すべきである。これらの手順書には、各作業に対する注解や検査室における作業票、検査依頼主や検査を指示した臨床医に向けての情報提供資料など、幾つかのひな型や関連資料などが付随されている。品質マニュアルは検査室の組織構造について記載されており、そこには具体的に検査室員に対してそれぞれの役職（業務資格）ごとに望まれる技能（訓練）の他、検査を実施した検査員と検査室長などの管理・監督者との会議予定、継続的な検査員の育成、成長、訓練などについてより詳細に列記されている。

7.5 検査室における作業手順書

全ての検査室員は記載された標準的な作業手順書（SOPs）に従わなくてはならない。この手順書は技師の訓練のために有用であり、また非日常的な業務の遂行や信用し難い検査結果が生じた検査工程への対応策を施す際に非常に参考になる。

これらの手順には注解、患者の治療経過情報、患者の受診予定日、検査法の性能、解析結果の報告方法、新入検査室員に対する訓練方法、備品検査機器の試験・監視方法、傾向分布模式図（Control chart）を用い、検査結果が異常値を示しているとき（傾向分布の限界値の範囲から外れているとき）にそれに従う方法などが含まれている。標準的な作業手順書（SOPs）は検査室内の全ての検査機器が通常通り適切に稼働する状態にあるかを点検するための手順が完全に盛り込まれていなくてはならない。そこには日常の機器点検方法、点検スケジュール、機器類の校正記録、科学的備品（顕微鏡、遠心分離機、ピペット類、天秤類、凍結保存器、保冷库や緊急時の備品；点眼薬やシャワーなど）の保守点検に関する書類などが含まれる。基本的な手段として、それぞれの検査機器に対して行った調整や校正などについて記録した保守点検履歴を記録し続けることである。これらの記録は、検査室における作業手順が傾向分布の限界値の範囲外の結果を出し始めたときに役立つ。

7.6 組織内部における品質管理

組織内部における品質管理（IQC）とは特に検査精度を監視することであり、検査結果が規定限界から逸脱したとき、つまり結果が疑わしいときには見逃すことなくそれを指

適しなくてはならない。活用される品質管理の手順は管理されるための評価に依存している。なぜならばエラーの種類によって品質管理のための適切な評価法が異なってくるからである。精液の希釈やピペティングの手技、精液検査盤の再利用手順などの評価には定期的な検査が必要である。その一方で固定された検体標本やビデオテープなどを用いた評価はそれほど頻繁に行う必要はないかもしれない。なぜならばこれらの方法による評価ではエラーが発生しうる検査ステップの多くが省略されているため現実的にあまり意味を成さないと思われるからである。

IQC の実践的な履行方法は検査室の日常業務遂行で用いられる全ての材料を考慮に入れた評価であり、また品質管理表を用いての検査室材料に対する適性結果も監視することである。このように、**IQC** は検査室における日常業務の一部であり各地域、地方における基準に従って遂行されるべきものである。**QC** のための標本の解析は日常検査室業務の一部として行われるべきであり、標本の解析であることを前提とした作業を対象とすべきではない。なぜならばその方法では通常業務における作業手順と比較してより正確な手順の元、より高精度な検査結果が導かれてしまうからである。同一検査者における、あるいは各検査者間での検査結果のバラツキを監視するために用いられる **IQC** のための標本は既製品を外部から購入することもできるし、また検査室内から調達することもできる。いずれの方法を採用してもそれぞれに利点と欠点がある。

7.6.1 **QC** のための標本の購入

IQC のための標本としては既に平均値と偏差の程度が調べられているものが商品として入手可能である。これら商業ベースの標本の利点としては、検査精度をより正確に評価できることである。検査室における精液検査結果の偏差は認証を受けた筋による同一標本に対する検査結果の偏差と比較、照合することができる。このような標本を用いることによって検査室は検査精度を自己評価するための施設独自の管理表を確立し、そして検査結果の精度を評価するための標本製造者による検査結果偏差の推奨範囲を活用すべきである (Westgard, 2002)。**QC** のための標本購入の欠点としてはその購入コストが高額であることと、商業ベースの標本が世界中のどこにおいても利用可能な体制になっていないことが挙げられる。どのようにして標本製造業者によって定められた目標値が得られたのかという点については特に注意を払っておく必要がある (反復測定、**CASA** の使用、多数の検査者の結果を元にした集計結果、外れ値の削除などの測定値補正法などが考えられる)。

7.6.2 検査室内で作成される **QC** 標本

個々の検査室内で **QC** 標本を作成することの利点はコストを削減できることと、検査室ごとの様々な事情を考慮に入れた上で都合のよい特殊な標本を作成できることである。非常に幅広い様々な所見の標本作製が可能であり、長期間にわたって保存が可能である。一方、欠点としては目標値が不明確という点である。定期的に比較対照用標本を用いて標本の平均域値 (例; 精子濃度 $=50 \times 10^6 / \text{mL}$ など) や臨界域値 (例; 精子濃度 $<15 \times 10^6$

/mL など)などを評価することを推奨する。

7.6.3 保存標本について（購入標本、検査室内で作成された標本）

保存標本は精子濃度、運動率、形態や精子生存性の評価のための IQC のプログラムに利用することができる。このような保存標本利用の利点としては目標値が既知であったり（購入標本において）、外部施設から供給されることであったり（EQC プログラムによって）、あるいは複数の算定方法（検査室に装備されている機材を用いて）によって見積もることができる点であり、それゆえに反復測定法によって体系的な誤差を検出できる。

7.6.3.1. 精子濃度

精子濃度に大きくばらつきのある精液標本は希釈後に保存するとよい。様々な所見を有する複数の別検体を混和して目的とする精子濃度になるように調合したり、大容量標本作製したりしてもよいが、混和によって精子の凝集反応が生じることがある。

付録 7 の項 A7.6、“精子濃度測定における IQC のための非凝集精子懸濁液の作成と保存に関する手引き”参照。

7.6.3.2. 精子の形態と生存性

精子の形態観察においては、風乾・固定された精液塗抹標本（2.13.2.1 参照）または固定後に染色された精液塗抹標本（2.14 参照）が用いられる。そして、精子の生存性検査においては eosin-nigrosin 染色された塗抹標本（2.6.1 参照）が用いられる。塗抹用の検体は検査室において日常業務として行われる精液標本の中から患者認証番号を伏せた状態で抽出すべきである。標本は良好所見、中間所見、不良所見の検体からそれぞれ作成したほうがよい。スライドガラスは再利用することができる。しかし、一旦品質が劣化し始めたときには新たなスライドガラスを利用すべきである。各々のスライドの使用時期を一定に定めることによって検査技師が特定のスライドへ執着をもってしまって、それが原因で生じ得る検査結果の解析の偏りを回避するので得策である。

付録 7 の項 A7.7、“精子形態評価における品質管理のためのスライド標本作製法”参照。スライド標本が適切な方法で作成後に保存されていれば、数か月、ないし数年間は劣化することなく品質を保持することができる。QC の評価の度に作成されたスライド標本一式は、位置評価分ずつスライドの向きを互い違いにさせたり、あるいは互いに一部分が重なり合うように重ねたりして保管しておくといよい。

7.6.3.3. 精子運動率

一般診療所、EQC 普及委員会あるいはその他の組織などによって特別に制作されたビ

デオテープ、CD、あるいはDVDなどに録画された精液標本の動画がQCのために利用可能である。ビデオ制作に当たっては、実際の精液検査の際と同じ倍率下で録画が行われなくてはならない。全ての日常検査業務において、通常検査と同倍率下でかつほぼ同様のコントラストで録画される場合には特にテレビカメラやスクリーン利用の有効性が増加する。

付録7のA7.5項、“精子運動性測定におけるQCのためのビデオ録画の方法”参照。

7.6.4 新鮮なQC標本（検査室内での作製）

簡便な内部監査の方法としては同一技師、あるいは複数の異なる技師による、同一検体から別々に作成した独立抽出標本を用いた反復測定法がある。反復測定による評価は日常の精液検査業務と同様の手順で行われなくてはならない。このQCの方法は精子濃度検査、運動率検査、形態検査と生存性検査に適応できる。精子凝集検査や集合体形成検査における主観的な特徴、混和による抗グロブリン反応テストにおける変異性(Bohring & Krause, 1999)などは生存している接合子や陽性コントロール検体の必要性などと共に、これらの検査のためのQCを困難なものにする要因である。

新鮮精液における精子運動性測定の施設内品質管理には特有な問題が存在する。すなわち、精子運動性は時間の経過とともに減少していくので、複数の技師によって同一検体の検査を実施する場合には最初に検査を行った技師となるべく時間を問わずして他の技師も検査を行う必要がある。精子運動性検査に用いられるスライドグラスにカバーグラスを被せた検査標本では、精子運動性はほんの数分間しか安定して保たれない。従って、スライドグラスとカバーグラスとの隙間が一定に保たれる精子計算盤を用いれば、精子の運動性は約30分程度保たれる。架橋顕微鏡、あるいはテレビモニターに接続されたカメラを装着した顕微鏡を利用することで同時に複数の技師が同一検体の同一視野内の精子の評価を行うことができるようになる。接眼レンズに埋め込まれている格子目の代替として、酢酸エステル製の格子目をモニター上に被せることで実況下での運動性解析を行うことができる（付録7、A7.5参照）。

CASA（コンピュータによる精子運動性解析装置）を用いている検査室では品質管理の実施に当たって、製造者の指示通りの手順に従わなくてはならない。場合によっては品質管理実施の手段としてハードディスク内に保存された、ある一定の速度で運動していることが記録されている精子の動画の再生なども含まれる。

7.7 同一検査者における、また異なる検査者間における体系的な誤差の解析と報告のための統計的手順

管理図表の作成や解釈は検査室での品質保証において欠くことのできない必須要素である。いずれのQCシステムが適用されるかは、検査室における問題の本質と利用可能

な機材がどのようなものであるかということに依存する。

7.7.1 $\bar{X}$ 管理図

$\bar{X}$ 管理図は当初、目標値から大きくかけ離れた結果や全般的な偏差の増大を検知するために創り上げられた。体系上に問題のある誤差は同一検体を連続して反復測定することによって検知することができる。反復測定は同一抽出検体に対して行われ、平均値は検査回数毎に図表上に表示される。保存された標本はその製造販売元（購入した標本の場合）、外部監査（EQC）プログラム、あるいは見積もり（標本材料に対する異なるいくつかの検査方法からの）などから得られる真の値、あるいは目標値を得るための手順に用いられることがある。

Comment: $\bar{X}$ 管理図は、検査を行う技師間において結果上に大きな偏差が生じているかどうかを検知することにおいては S 管理図と比較して感度が低い（7.7.2 参照）。検査結果の偏差を検知するためには $\bar{X}$ 管理図の場合と同様にそれぞれの QC 抽出標本ごとに数値の範囲を S 管理図によって監視し適宜、警告限界値と動作限界値を定めるべきである。

7.7.1.1. $\bar{X}$ 管理図における傾向分布の限界値の算出

同一組織内部から調達される QC 抽出標本一式は、連続的に測定される。最初の 10 検体の解析が完了後、それぞれの検査技師別に傾向分布の限界値が算出される。これらの計算によって同一標本に対する反復測定の結果得られた数値と同一検査者によって行われた作業工程別の数値の分布が表現される。10 検体の解析毎に検査結果の平均値と標準偏差値を計算しなおし、新たな $\bar{X}$ 値と S 値を用いて傾向分布の限界値を更新していくことで、検査室内における品質管理上健全な状況を維持し続けることができる。QC 抽出標本の在庫を使い切る前に、新たな標本を準備するように心がけ、そして新たに入手した新ロットの標本を最初に使用する際には旧ロットの標本と一緒に使用し、新たに傾向分布の限界値を構築すべきである。傾向分布の限界値を算出するために用いられる係数について表 7.1 に表示し、また実際の算出方法の例については Box 7.2 と Box 7.3 に示した。

表 7.1 $\bar{X}$ 管理図と $\bar{S}$ 管理図における傾向分布の限界値を平均値と標準偏差値に基づいて決定するための係数一覧

測定実施 技師数 (n)	SD値 (C_n)	$\bar{X}$ 傾向分布の 限界値		$\bar{S}$ 傾向分布の 限界値			
		警告 限界値 (A_2)	動作 限界値 (A_3)	下方動 作 限界値 ($S_{0.999}$)	下方警 告限界 値 ($S_{0.975}$)	上方警 告限界 値 ($S_{0.025}$)	上方動 作限界 値 ($S_{0.001}$)
2	1.253	1.772	2.659	0.002	0.039	2.809	4.124
3	1.128	1.303	1.954	0.036	0.180	2.167	2.966
4	1.085	1.085	1.628	0.098	0.291	1.916	2.527
5	1.064	0.952	1.427	0.160	0.370	1.776	2.286
6	1.051	0.858	1.287	0.215	0.428	1.684	2.129
7	1.042	0.788	1.182	0.263	0.473	1.618	2.017
8	1.036	0.733	1.099	0.303	0.509	1.567	1.932
9	1.032	0.688	1.032	0.338	0.539	1.527	1.864
10	1.028	0.650	0.975	0.368	0.563	1.495	1.809

Box 7.2 X_{bar} 管理図における傾向分布の警告限界値、動作限界値の決定方法

下図は同一のIQCにより準備された10検体のQC抽出見本に対する4名の検査技師による精子濃度の測定値、平均値および標準偏差値を示している。

抽出標本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
技師A	38	35	40	34	38	36	44	43	39	43
技師B	42	36	42	40	40	40	43	43	46	40
技師C	38	43	40	51	38	33	39	45	35	39
技師D	34	36	36	37	36	39	42	43	46	34

平均 38.0 37.5 39.5 40.5 38.0 37.0 42.0 43.5 41.5 39.0
 標準偏差 3.27 3.70 2.52 7.42 1.63 3.16 2.16 1.00 5.45 3.74

これら 10 件のQC 抽出標本においてmeans (X_{bar})、平均値は以下の計算式によって求められる。 $(38.0 + 37.5 + \dots + 39.0) / 10 = 39.7$, また、SDs (S_{bar}) の平均値は同様に以下のとおりである。 $(3.27 + 3.70 + \dots + 3.74) / 10 = 3.40$.

技師数 (n) が4の場合、 $A_{2,n}$ と $A_{3,n}$ (表7.1参照) における係数はそれぞれ1.085 と1.628である。従って傾向分布における警告限界値 (平均値から求める2つの標準誤差) は以下の計算式によって求められる。

$X_{\text{bar}} \pm A_{2,n} \times S_{\text{bar}} = 39.7 \pm (1.085 \times 3.40) = 39.7 \pm 3.7$, あるいは 36.0 と 43.3×10^6 per mL

同様に動作限界値 (平均値から求める3つの標準誤差) は以下の計算式によって求められる。

$X_{\text{bar}} \pm A_{3,n} \times S_{\text{bar}} = 39.7 \pm (1.628 \times 3.40) = 39.7 \pm 5.5$, あるいは 34.2 と 45.2×10^6 per mL

Box 7.3 集積された標準偏差値からの X_{bar} 傾向分布限界値の代替計算方法

検査技師間における検査結果の標準偏差値の見積もりは以下の計算式によって得ることができる。

$S_{\text{bar}} \times c_n$ (= 1.085 抽出標本数が4の場合 (表7.1)) = 3.69.

この数値は集積した標準偏差値を元に直接的に算出して求めた値である3.84に近似する数値である。

$s = \sqrt{(s_1^2 + s_2^2 + \dots + s_{10}^2) / 10} = 3.84$ ここで、 s_i はQC抽出標本における標準偏差値である。この結果は片方平均での2,3の標準誤差 ($s/\sqrt{n}$) において傾向分布における警告限界値、動作限界値を直接的に算定する際に活用することができる。この例では、警告限界値は35.8 および 43.5×10^6 per mL、また動作限界値は33.9 および 45.5×10^6 per mLであり、これらの値は S_{bar} , $A_{2,n}$ および $A_{3,n}$ を用いて求めた値と極めて酷似した結果である。

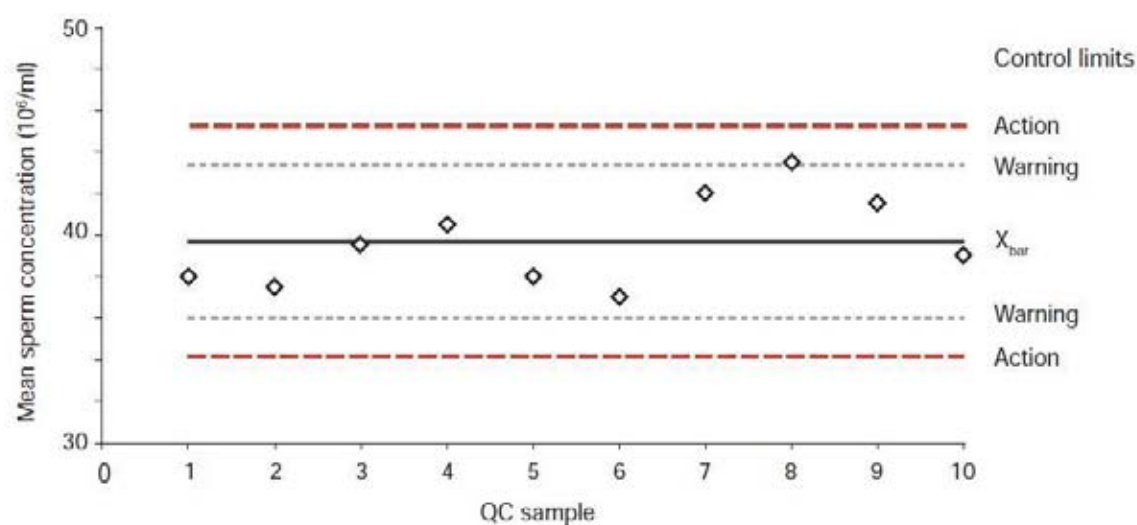
7.7.1.2. $\bar{X}$ 管理図の表示

検査室に所属するすべての検査員が IQC 標本の検査を実施し、IQC における傾向分布の模式図構築に関与しなくてはならない。もし試験手順の偏差が正常範囲内に落ち着いていれば、IQC 標本の解析は日常業務として実施し、得られた結果を既に確立された値と比較していればよい。比較のための実際の作業としては IQC 標本の測定結果の平均値を検査毎に傾向分布の模式図上に表示し、得られた数値が検査室における各検査方法別に定められた偏差（誤差）の範囲外にないことを確認していけばよい。例として、図 7.1 参照。

精子運動性検査、形態評価、生存性検査を実施する上で $\bar{X}$ 管理図を制作し、警告限界値と動作限界値を設定しなくてはならない。そのうえで、精子濃度を例にして概要を示すが、検査して得られた運動率との相違を評価しなくてはならない（7.8 参照）。

図 7.1 精子濃度における $\bar{X}$ 管理図

連続測定における平均値（◇）を前回測定した際の目標値（ $\bar{X}_{bar}$ ）と警告限界値、動作限界値を示す図中に表示した。



X 軸（QC sample）：抽出標本

Y 軸（Mean sperm concentration（10⁶/mL））：平均精子濃度

Control limits：傾向分布の限界値

7.7.2 S 管理図

この管理図は検査技師が偏差の大きい検査結果を生み出しているかどうかを検知することができる。この導入においては、反復測定が実施され、測定毎に平均偏差値が図表上に表示される。QC 標本は全て同一ロット由来なので標本間の差異は考えにくく、それゆえに測定を行った検査技師間の有意な検査結果の差異は一検査技師、あるいは数名の検査技師の検査において体系的な傾向の偏りが存在することを示唆していることになる。

7.7.2.1. S 管理図における傾向分布の限界値の算出

傾向分布の限界値は $\bar{X}$ 管理図作成の時と同じ要領で S 管理図上に追加表示される。しかしながら、もしも標準偏差値の分布が対称的になっていない場合、警告限界値と動作限界値は以下の要領によって採択される。つまり、もしも検査の精度・正確性が変わらないのであれば、新たな検査結果が傾向分布の限界値の範囲外に該当する確率は $\bar{X}$ 管理図の場合とほぼ同程度である。従って、警告限界値と動作限界値はそれ以降の標本によって無作為偏差単独の結果、それぞれ 5%と 0.2%の確率で超えられる。これらの限界値は χ^2 分布から決定され、 $S_{\bar{bar}}$ の標準偏差の平均値を乗ずる際に用いられる係数 $S_{a,n}$ は表 7.1 へ表示のとおり与えられる。実例を Box 7.4 に示す。S 管理図において検査結果が下方限界値を下回った場合、予測に反して結果のばらつきが小さいことを示唆しており、これは検査技師間での検査手順への理解度や、手技の均一性が真に改善されたことを意味する。

Box 7.4 S管理図における傾向分布の警告限界値と動作限界値の計算方法

Box 7.2 での計算結果より、抽出標本における標準偏差の平均値 $S_{\bar{bar}}$ は 3.40×10^6 per mL である。

表 7.1 より技師数 (n) が 4 における $s_{a,n}$ の値は、

下方動作限界値が $S_{\bar{bar}} \times s_{0.999,4} = 3.40 \times 0.098 = 0.33 \times 10^6$ per mL、

下方警告限界値が $S_{\bar{bar}} \times s_{0.975,4} = 3.40 \times 0.291 = 0.99 \times 10^6$ per mL、

上方警告限界値が $S_{\bar{bar}} \times s_{0.025,4} = 3.40 \times 1.916 = 6.51 \times 10^6$ per mL、

上方動作限界値が $S_{\bar{bar}} \times s_{0.001,4} = 3.40 \times 2.527 = 8.59 \times 10^6$ per mL である。

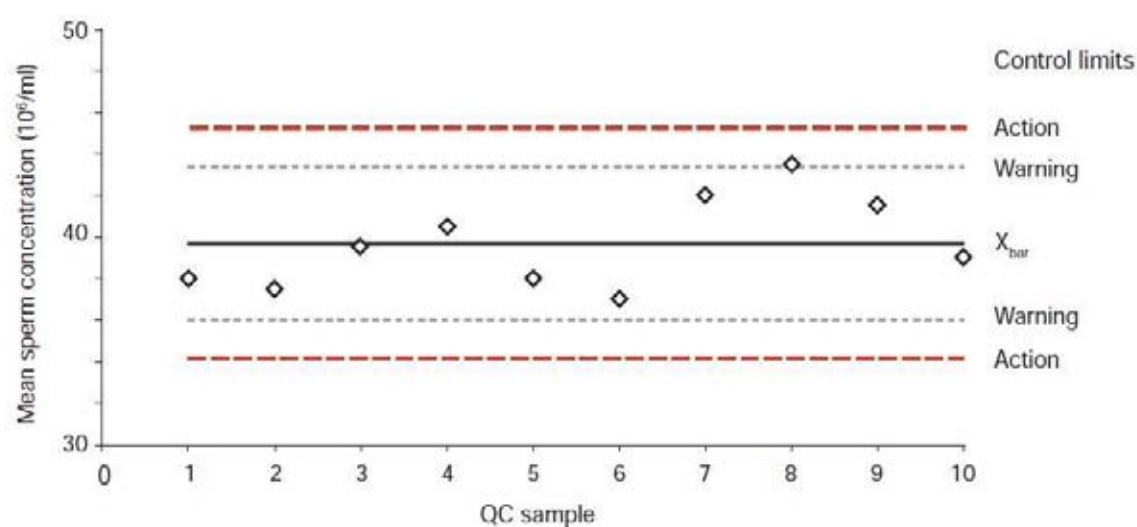
7.7.2.2. S 管理図の制作

標準偏差値を求めるための次の検査結果値は、その数値が検査室内で行われる検査手法ごとに定められた偏差（誤差）の許容範囲外に該当するかどうかを決定するために傾向分布の模式図上に表示される。例として、図 7.2 参照。

精子運動性検査、形態評価、生存性検査を実施する上で S 管理図を制作し、警告限界値と動作限界値を設定しなくてはならない。そのうえで、精子濃度を例にして概要を示すが、検査して得られた運動率との相違を評価しなくてはならない（7.8 参照）。

図 7.2 精子濃度における S 管理図

連続測定における標準偏差値（◇）を前回測定した際の目標値（ S_{bar} ）と警告限界値、動作限界値を示す図中に表示した。



X 軸 (QC sample) : 抽出標本

Y 軸 (SD sperm concentration ($10^6 / \text{mL}$)) : 精子濃度の標準偏差値

Control limits : 傾向分布の限界

7.8 百分率における品質管理

精子を 2 群以上に分類する場合（形態学的な正常と異常、前進運動精子と非前進運動精子、生存精子と死滅精子など）、各々の群内にける該当算出百分率の標準誤差は、正確ではあるが具体的には表面上表わされることの無い実精子計測数（ N ）に依存する。ある事象の比率における一般的な標準誤差の概算見積もり 'P' はその比率が 20% から 80% の間に該当する場合、 $\sqrt{p(100-p)/N}$ となる。比率がこの範囲外の場合、より適切な方法として度数変換（アークサイン平方根）、つまり $z = \sin^{-1}\sqrt{p/100}$ を活用すべきである。この場合、標準偏差は $1/(2\sqrt{N})$ radians となり、すなわち算出された百分率の数値ではなく、実精子計測数のみに依存することがわかる（Kuster et al., 2004）。各々の検査結果における標準偏差はこれらの値に近似するはずなので、平均標準偏差（ S_{bar} ）は 2.5% を超えることになる。なぜならばさらに検査者間による実精子計測数の

ばらつきが存在するからである。この場合、目標は S_{bar} を減ずることによって得られる。

精液所見結果として、正常形態か異常か、前進運動性か非前進性か、生細胞か死細胞か、など2つか3つの分類に判定が下される場合、個々の分類における推定値の標準誤差は、精子濃度と同様に真の値（原典不祥）に基づいている。一般的な比率の標準誤差の推定値は $P=\sqrt{P(100-P)/N}$ の式で表され 20%～80%の間となる。この範囲を超える標準誤差が発生する場合は、角変換式（arc sin 平方根） $z=\sin^{-1}\sqrt{P/100}$ が適用となる。この数式では標準偏差は $1/(2\sqrt{N})$ ラジアンで表される。精子の場合を例にとれば、この数値は精子数によるものでありその比率によって変動するものではない

本来個々の計測値の標準偏差はその真の値に近似すべきであるが、技師間の測定個人差という因子が加わるため、平均的な標準偏差（ S_{bar} ）は 2.5%を超えることが多い。この場合 S_{bar} 値を小さくすることが重要となる。

7.9 $\bar{X}_{\text{bar}}$ と Schart の検定

ラボの技師と上司はこの結果と一緒に検討すべきである。もし基準値が大幅に変動していれば、全測定過程の系統的な評価をおこない、大幅な変動の要因を突き止めるべきである。

7.9.1 異常値発見法

測定操作に対する QC 管理の基本的なガイドラインは設定されている。QC 記録の審査がこのガイドラインに則って行われなければならない、そして必要があれば同様に対策が取られるべきである。異常値と判定するには、以下のようなさまざまな基準が設定されている。

- 一つの測定値が 3SD（標準偏差）の枠外に存在する。これが最も基本の基準であり一般的に採用されている。この判定法により測定値の評価が一変することがあり得る。
- 連続 3 測定値の内の 2 つが測定基準外にある。
- 連続 5 測定値の内の 4 つが測定基境界区域にある。
- 連続 3 測定値の内の 2 つが測定基準上限、もしくは下限境界またはあ区域外にある。
- 連続 8 測定値が基準基準値の上方もしくは下方に偏っている。この基準は非常に有用である。何故なら、非常に簡潔でまた一番目の基準で見逃されやすい測定が一方に偏移する傾向を敏感に捕らえることができる。

実務的には、最初と最後の基準が一般的に多く採用されている。

QC 検体が基準外と判定されれば、さまざまなタイプの問題点に対して、それが測定系統全体であれ部分的なものであれ、その程度に応じて原因説明の手掛かりとなるよう警告が発せられるような仕組みが設定されるべきである。培養室の責任者は定期的に QC 結果をチェックする必要がある。

Box 7.5 QC記録の基本的チェック項目

チェック項目

原因

一つの検体が測定基準外の値を示した。

部分的問題

3測定値の2つが基準外を示した。

系統的問題

5測定値の4つが基準境界値を示した。

系統的問題

連続2測定値が基準値の上下限外もしくは境界領域であった。

系統的問題

連続2測定値のいずれか一方が基準値の上下境界領域であった。

部分的問題

連続8測定値が基準値のすべてが上下限外であった。

系統的問題

7.9.2 基準値外を測定した原因

QC 過程でのさまざまなサインは慎重に検討しどんな些細な問題点をも見つけ出さなければならない。可能性のある問題点を以下に列挙する。

- 検体の攪拌が不十分なもの。粘性の強いものや凝固している検体に多い。
- 技師の単純ミス。検体取り違いや記録間違い。
- 技術的ミス。標本作成時や検体希釈中などに起こる不注意によるミス。
- 不十分な事前教育。精子の濃度、形態、生存、精子尾部の異常、運動精子の定義などラボ内において基準がバラバラ。また精子濃度の算定ミスに由来する間違いなど。
- 測定機器に由来する測定値変動。自動検体吸入ピペットの摩耗や不良品によるサンプリング量や希釈率の誤差は測定値の再現性を損なう。顕微鏡の光軸調整の不備によりクリアな画像が得られない場合に、精子の生存性や形態の正確な判定が得られない不正確な自動天秤やメスシリンダーも同様の問題を起こす。
- QC 用検体の劣化。
- 器具の変更。特にピペットや計算盤を交換した場合。
- 測定操作法の変更やラボ内の環境の変化など。

7.9.3 基準外値が得られた場合の対応

測定結果が基準外であった場合、推定される原因やその時とられた対策は記録しなければならない。もし原因がはっきりしない場合は QC 検体をもう一度測定し、最初に得られた結果自体に何か問題点を含んでいなかったかの検証が必要となる。ただ QC 検体の測定値がやはり基準値外を示すようであれば、それ以降の検体測定前に問題点を見つけ、その後に正確な測定値が得られるよう修復すべきである。

以上の操作を実施するためには以下の諸点に注意を払う必要がある。

- 全操作過程の流れを順序立てて分かりやすく表したマニュアルの作成。項 7.2-7.5 の SOP と表を参考にされたい。
- 操作過程マニュアルを見れば、どの過程で異変が起こり易いか一目瞭然となるようにし、異変の原因診断が可能となり、異変発生を減少につなげる対策が取れるようにしておく。
- さらにデーターを集め、新しいマニュアルを作成し、その方法による測定値の変動が許容範囲内であるかどうか検討する必要がある。問題点を明確にし、何が問題を起こしているかの仮説を立てて検証し、そして問題となっている操作を見直すという一連の過程が Shewhart や PDCA (plan, do, check, act) サイクルとして知られる方法である。

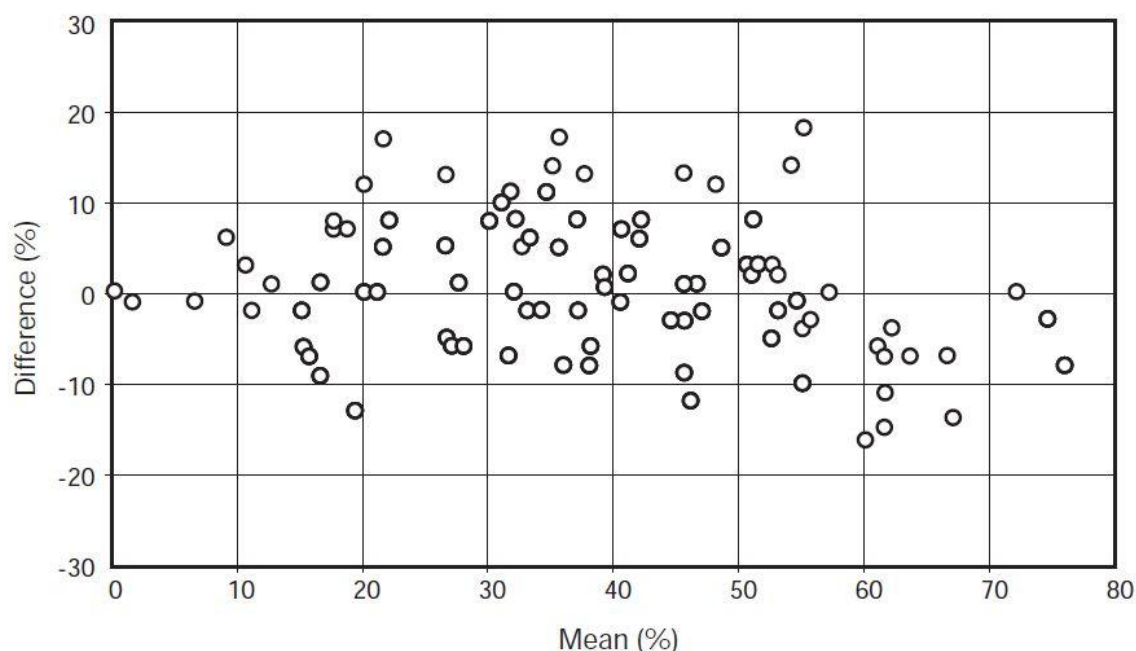
7.10 技師間の変動を解析し報告するための統計操作法

新鮮精液検体の検査法に基づいた QC 操作は凍結検体にも当てはまり、これを用いて技師間変動を検討することが可能となる。しかし、この場合は真の値は明らかではないので、X 軸は使えず、また定誤差（技師による偏り）も推定できない。そこで、主な QC 操作はそれぞれ 5 から 10 の QC 検体を用いて、技師間変動は S チャートを用いて、技師による測定系の相違は双方向分散分析（ANOVA）を用いる。

7.10.1 2 人以上の技師による測定値の比較

2 人以上の技師による測定値を以下の列挙したいくつかの方法で比較することが可能である。

図 7.3 Bland-Altman マニュアル図表とそこに示された CASA による精子前進性運動率の推定値。 この表は手動と CASA における測定平均値と測定結果をプロットで表したものである。

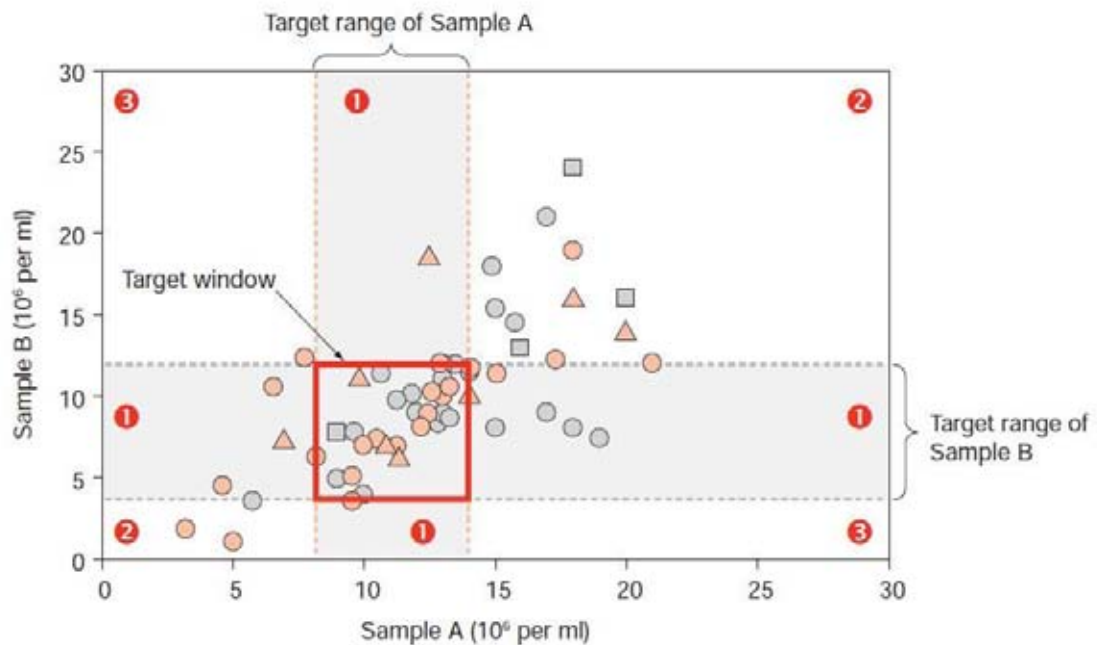


HWG Backer 提供

- 表に平均値に対する 2 つの測定値を書き込む。2 人の技師による同一検体における精子濃度の測定値の比較は、図-7.3 に示されている技師と CASA による精子運動率の比較と同様の傾向が見られるはずである。
- 平均値と標準偏差を算定する（一対比較法）。同一検体が 2 人の技師で測定されているので、その測定平均値には差がないはずである。もしその間に何がしかの差があれば、それを一対 T 検定で行うことにより、この 2 人の技師の技術的な偏りを明らかにできる。図-7.4 Youden 図表。精子濃度の測定値が記入されている。

この表には数人の技師による 2 検体（検体 A と B）の測定値がそれぞれプロットされている。個々の技師による測定値が分かるように違った色や記号でプロットされている。**②**の領域の測定値は系統的異常値であるのに対して、**①**や**③**に現れる異常値はたまたま起こった異常測定値と言える。

図 7.4 精子濃度による Youden プロット図表



- 2 検体についてそれぞれの測定値をプロットしてみよう (Youden 図表)。数人の技師が異なる 2 検体を測定した場合、図-7.4 に見られるような測定値の分布が起こるはずである。それぞれの技師や施設の測定値を図のように相対してプロットをおこなう。そうすると技術の優れた技師や模範施設の測定では縦軸と横軸点線で囲まれた領域の測定値が信頼度 95%の値となる。この領域に測定値が収まることを目標とする。2つの内 1 検体が正確であり、もう一方がそうでない、すなわち①領域にかかる場合は、たまたま起こった誤測定であるが、両方の測定値が②の領域に入った場合、すなわち高すぎるか低すぎる場合は系統的誤測定と言える。たまたま起こった誤測定は 1 検体を過少に測定し、もう一つの検体を過大に測定したことに起因して起こることが多い。
- 双方向分散分析 (ANOVA)。この方法は多くの統計学教科書やコンピュータプログラムとして購入も可能であるが、技師間の測定誤差を統計的に解析できる。上記のような一対の比較では、すべての技師間に測定値に差の無いことが前提となっている。そこで、それぞれの技師について個々の検体の平均測定値を算出し、個々の技師における誤差の平均と標準偏差を算出する。そこで誤差が標準偏差の 3 倍以上ある場合に、その技師の測定値に有意な偏りがあると判定される。

技師間の技術的な相違をあらわす正式な統計学的解析は、ほとんどの統計コンピュータプログラムで購入可能な双方向分散分析 (ANOVA) の中の F テストでおこなわれる。

誤差の平均平方根は残差もしくは誤差の平方根、すなわち分散表の解析から得られる平均平方根である。平均誤差が 2.5 標準偏差より大きい場合は偶然の変動のみ (<1.2%) によるものとは考え難い。技師間変異が有意であろうとなかろうと、技師の測定値平均や平均誤差が想定範囲内であることを確認する必要がある。すべてのコンピュータプログラムに技師間の標準偏差値が備えられているとは限らない。それだけを独自に算出しなければならないこともある。技師間に相当な誤差があれば、いかにして安定した測定が得られるかを構築するためにすべての過程が検証されなければならない。実際の例が項 7.6 に示されている。精子濃度における技師間標準誤差の算出法、そしてそれが偶然の変動のみに起因するものであるかどうかの検証法が書かれている。観察から直接算出する場合には丸め誤差が生じないように十分な小数点以下の桁を空けておく必要がある。

7.10.2 月間平均値のモニタリング

主たる施設内 OC (IQC) 過程は技師間および測定間誤差の検定に基づいているが精液検査結果の傾向を監視することにより更なる情報が得られることも想定される。

特定の期間 (例えば月単位) に得られた、すべての患者について検索された違いの平均は、平均の上下標準誤差の 2 から 3 倍の処置限界で警告とともに X 軸にプロットすることができる。標準誤差は最初の測定値の標準偏差を各期間の精液検査の検体数の平方根で分割するか、直接平均値の分布を観察することで類推が可能である。対照限界は少なくとも 6 ヶ月間の監視データで同定され定期的に更新する必要がある。ひとつの平均値を出すには最低 20 の測定値が必要である。小さな施設では一カ月以上のデータを蓄積する必要があるだろう。更に精度を向上するには正常精子検体を数カ月測定しその累積データを観察することにより測定値の誤差を素早く発見できる。

期待される測定値からの偏移は検体の個体差 (検体採取男性の時間的な変化、同一男性からの検体採取回数の違い、どのような不妊原因またはどの科からの紹介かの違い) や技術的要因 (測定技師の違い、ラボの機器や試薬の違い、季節による室温の変化の影響など) によると思われる。

7.11 外部組織による品質管理 (EQC) と品質保証 (EQA)

外部組織による QC (EQC) は測定結果を監視するための QC にとって必要不可欠である。しかし一方で外部組織による QA (EQA) は、ラボの操作過程がきちりとした管理下に行われていることを確認するために検体の集め方や検査値の報告方法などの個々の操作を監視するものである。EQC は測定値を他のラボのものと比較することもある。EQC をおこなうことで単一のラボではできないような方法で測定したり、他の尺度で比較検討したりすることを可能としてくれる。

EQC と IQC は相補的なものである。もし QC 検体自体が厳選されたものでなかったり

匿名性が保たれていなかったりするような場合 IQC では十分に役割を果たしているとは言えず、EQC であれば問題点を明らかにしてくれるであろう。EQC には測定方法の正確さと安定性を維持してくれる利点がある。しかし EQC の場合、QC 検体は外部から持ち込まれるので、その取り扱いは特別とならざるを得ない。そこですべての過程が通常の測定と同様におこなわれたかどうか警戒して監視する必要がある。

Box 7.6 技師間の系統的誤差検証のための演習

下表は QC5 検体の精子濃度を 3 人の技師で検査したときの測定結果である。精子濃度の単位は $\times 10^6 / \text{mL}$ である。

検体番号	1	2	3	4	5
技師 A	108	45	100	50	92
技師 B	103	47	102	50	96
技師 C	104	46	89	41	88
平均値	105	46	97	47	92

各技師の測定値から検体平均値を差し引いた値 (d_{ij}) を下表に示した。

検体番号	1	2	3	4	5
技師 A	3.0	-1.0	3.0	3.0	0.0
技師 B	-2.0	1.0	5.0	3.0	4.0
技師 C	-1.0	0.0	-8.0	-6.0	-4.0

平均 $m_j = \sum_i d_{ij} / n$ で表され標準偏差 $S_j = \sqrt{(\sum_i d_{ij}^2 / (n-1))}$ と表される。Nは検体数を表している。これらの差は個々の技師に対して算出されたものである。

検体番号	平均 (m_j)	標準偏差 (S_j)	平均/ s 標準誤差 ($m_j / \text{se} (m_j)$)
技師 A	1.600	1.949	1.836
技師 B	2.200	2.775	1.773
技師 C	-3.800	3.347	-2.539

技師 C に関しては、同一検体における平均誤差は $-3.8 \times 10^6 / \text{mL}$ または他の 2 人の技師の平均値より 5.7 ($-3.8 - (1.6 + 2.2) / 2$) $\times 10^6 / \text{mL}$ すくなく算定されたこととなる。この測定値が低く算定されたことが偶然に生じた誤差であるのかを検討するには、誤差の平均平方根 (σ) は技師数を t とすると技師の測定値の差の平均偏差より $\sigma = \sqrt{(\sum_j S_j^2 / (t-1))}$ で表される。この例では $\sigma = 3.369 \times 10^6 / \text{mL}$ となる。それぞれの技師の平均値の差の標準誤差は $\text{se} (m_j) = \sigma \sqrt{((1-1/t) / n)}$ または $1.230 \times 10^6 / \text{mL}$ となる。技師 C の平均誤差の絶対値 ($-3.8 \times 10^6 / \text{mL}$) は 3 標準誤差より大きく、技師の能力が同様であるという前提の下、期待値の 0 との間に有意の差があると言える。技師間の測定値に差があると正式に判定するには、技師と QC 検体の双方向 ANVA による F テストによる検定が必要である。この精子濃度分析をおこなうための分散係数を以下に示した。

検体	二乗の	自由度	二乗の	F 比	P 値
----	-----	-----	-----	-----	-----

	総和		平均		
QC 検体	9807.6	4	2451.90	216.03	<0.001
技師	109.2	2	54.6	4.81	0.042
誤差	90.8	8	11.35		
合計	10007.6	14			

誤差の平均平方根は $\sqrt{11.35}=3.369 \times 10^6/\text{mL}$ となり上の表から得られる。予想されるようにQC検体間の誤差は非常に大きい ($P<0.001$)、なぜなら異なった新鮮精液が用いられているからである。技師間の差のFテスト値 ($F=4.18$, $P=0.042$, 自由度2と8で) はP値0.05レベルで有意差が存在する。この差は偶然に発生する誤差より大きいことを示唆している。

Box 7.7 IQC過程の要点

操作	標的問題点	QC検体	技師数
X 軸図表	偏位、全体の変動制、正確性	凍結検体	個人 複数
S 図表	偏位 / 精度	凍結 / 新鮮	複数
一対 ANOVA	偏位 / 精度	凍結 / 新鮮	複数
Bland-Altman 表	偏位 / 精度	凍結 / 新鮮	2人
対試験	偏位 / 精度	凍結 / 新鮮	2人
Youden表	偏位 / 精度	凍結 / 新鮮	複数

EQC では同じ検体が参加施設に送付され測定されるので、測定値の比較のみならずプログラムの精度管理試験まで達成することができる。各ラボは測定値を管理センターに送り、そこで EQC に合格しているかの審査が行われる。管理センターはそれ以外に、参加施設での測定値の平均値と標準偏差を算出し今回の試験の概要を明確にする。米国内の精液検査に関する EQC プログラムを巻末に掲載している。

7.11.1 EQC 結果の評価

EQC 案はラボに自分達の測定値と他の参加施設の結果について情報を提供してくれる。特定の目標とする測定値が正確に測定されていたかどうか、複数の血球計算盤による精子濃度は正確であったか、CASA による精子運動率は正確に測定されていたかなどが確認されるべきである。結果はしばしば図表で示させることが多い。もし同じ EQC 検体が何度も使用される場合は、この検体についてはラボの測定値について先入観が入っていたりや変動の可能性のあることが書き添えられる。

2 検体が分析に使用される場合は Youden 図表が使用され、それぞれの検体の結果が X と Y 軸に図-7.4 で示したようにプロットされる。この表を見ればプロットの分散や分布からどの施設がどの程度変異しているかが明らかとなる。更に他の方法（違った計算盤

や染色法、また分類法など) や別の施設を追加しても、プロットの色やシンボルを変えることで新たな情報が得られる。

2 つ以上の検体が使用された場合はさまざまな先入観 (予想される値からの変異) が発生する。これには以下のようなものが存在する。

- 偏り指標 (BIS: bias index score) : 偏りを変異の特定係数×100 で除したもので、陽性または陰性で表現される。
- 分散指標係数 (VIS: variance index score) : BIS とよく似た指標であるが、こちらは常にプラスの数字で表わされる。
- 平均実情 BIS (MRBIS) または VIS (MRVIS) 係数 : どのような傾向にあるかを確認するのに役立つ。
- MRBIS や MIVIS が低値の場合は測定結果が目指す値に近いことを示している。MRBIS が低値で MRVIS が高い場合は突発的な誤差が出やすく、逆に MRBIS、MRVIS がともに高値の場合は系統的誤差の可能性を示している。ラボとして“問題なし”や“問題あり”またはランキングの評価報告はラボの監査や登録に際して有用である。

ラボの測定操作がきっちりおこなわれているかどうかの監視の簡単な方法は、Y 軸に測定結果をプロットし X 軸には目標値をプロットすることである。この表を見ればラボの実情がつまびらかになる。もうひとつの方法として図 7 の Blandon-Altman 図表に示されるよう、目標値からの変異を見ることも可能である。

7.11.2 基準外結果が得られた場合の対処法

EQC 報告のもっとも重要な情報はラボの測定値や測定方法についての異常に関するものである。ラボにとって望ましい結果は測定方法の精度の向上や維持に役立つことである。EQC の基準値の平均値や規定値より常に上下に変異している場合は測定方法を再評価する必要がある。EQE 結果に大きなばらつきが見られる時には、通常 IQE にも同様のことがみられる。このことは検体ごとに計測値が一定しないということを意味している。測定の技術的操作をもう一度見直しマニュアルに沿った注意深い再調整が必要である。

項 7.9.3 で IQC について述べたような技師の再トレーニングや機器の再テストなどの適切な対処が必要である。表 7.2-5 には精子検査における測定値変異の原因となる可能性のある事項とその解決法が示されている。他のラボからの技術者の応援や、他の EQC 成績良好ラボでの研修がラボの精度改善におおいに役立つ。EQC 良好ラボからコンサルタントを迎えることは測定法の欠点を改善し精度の向上維持のために有益である。

7.12 精度管理（QC）の頻度と優先順位

QC 標本の測定は定期的に行われなければならない。その頻度は地方や中央政府の法令や認可団体の規則などで決められている。時には精液検査のある日には毎回 QC 検体測定を義務付けている。それができない場合は、検査検体の 1%や 5%を QC 検体として測定すべきとされている。

QC 検体は以下の目的で使用されるべきである：

- 新入職員や現職員の技術チェックのため；
- 新しい機器、消耗品、操作法や IQC 用検体が初めて使用される時。

Box7.8 内に QC 実施スケジュールのガイドラインが示されている。現実的にはソノスケジュールは技師の労働環境で調整すべきである。Box7.9 に各 QC 過程での優先順位が示されているが、いくつかの項目は必要があればまたは経済的に可能であれば実施すればよいと考えられる。

Box 7.8 精度管理のタイムスケジュール

毎日	同一検体での検査結果の監視と相関検査
毎週 / 毎月	複数の技師による同一検体の再検査の検定
毎月 / 年 4 回	検査値平均値の分析
年 4 回 / 6 カ月毎	外部QC（EQC）への参加
6 か月毎 / 年 1 回	消耗品や機器の校正

Box 7.9 QCテストのまとめ

指標	検体	目標値	精度 / 変異	正確性	優先順位
濃度	IQC 新鮮	なし		Sチャート, 一対 ANOVA	1
	IQC 凍結	あり	X 軸チャート	Sチャート	3
	EQC	あり	X 軸チャート	Sチャート	2
形態	IQC 新鮮	なし		Sチャート, 一対 ANOVA	1
	IQC 凍結	あり	X 軸チャート	Sチャート	3
	EQC	あり	X 軸チャート	Sチャート	2
運動率	IQC 新鮮	なし		Sチャート, 一対 ANOVA	1
	IQC 凍結	あり	X 軸チャート	Sチャート	3

生存性	EQC	あり	X 軸チャート	Sチャート	2
	IQC 新鮮	なし		Sチャート, 一対	1
				ANOVA	
	IQC 凍結	あり	X 軸チャート	Sチャート	3
	EQC	あり	X 軸チャート	Sチャート	2

7.13 トレーニング

新人技師をトレーニングする場合や新しい検査法の導入や検査方法の修正などに際しては QC と同様の取り組みが可能である。技師のトレーニングは以下に示した取り組みに注意を払いおこなわれるべきである。

7.13.1 精子濃度測定に問題がある場合の実用的注意事項

- 精液の混和法や希釈法、計算盤の取り扱い、計算法などのトレーニング。
- 検体に蒸発による影響が表れるまでの検体設定後 10-15 分以内に検査をおこなう。
- 二人の技師が同時に検査をおこなう。その際、教育用顕微鏡やビデオ撮影可能な顕微鏡、またはモニターに顕微鏡画面を映しながら、さまざまな検査手技をおこない両者を比較してトレーニングする。
- 教育用顕微鏡を用い、精子算定時に計算盤の線上の精子を数えるかどうかなどの細かい指導をおこなう。
- 表 7.2 参照のこと。

表 7.2 精子濃度算定上起こりえる問題点と対策

操作	予防	対策
希釈前の不十分な精液の攪拌。	トレーニング、SOP	攪拌の繰り返し
希釈間違い（1:20 希釈を 1:20 に間違えるなど。）	トレーニング、SOP	IQC
校正不良ピペット（100 μ であるべきところが実際には 95 μ や 110 μ と誤差がある）。	機器の保守管理、SOP	攪拌 / 希釈の繰り返し、IQC,EQC
不適切なピペットの使用（ピペット内の液体中に空気の混入など）。	トレーニング、SOP	希釈の繰り返し、IQC,EQC
希釈時に検体を規定量採取していなかった。	トレーニング、SOP	希釈の繰り返し、IQC,EQC
精子希釈時にピペット外側に付着している精液を十分に拭き取っていない。	トレーニング、SOP	IQC
計算盤の洗浄と乾燥が不十分。	トレーニング、SOP	点検の繰り返し
計算盤の不適切な使用や検体の充填（計算盤の間に異物の混入など）。	トレーニング、SOP	点検の繰り返し
精液の攪拌から算定用の希釈までの時間が長過ぎる（精液中で精子がすぐに沈殿する）。	トレーニング、SOP	希釈操作と点検の繰り返し
精液の希釈から計算盤に充填するまでの時間が長すぎる（希釈精液中で精子がすぐに沈殿する）。	トレーニング、SOP	希釈操作と点検の繰り返し
顕微鏡の不清潔や光軸調整不良、不適切倍率。	トレーニング、SOP、機器の保守点検	IQC,EQC
計算盤に重点後から検査までの期間が短過ぎる（精子が均等に分布するまでの時間が必要）。	トレーニング、SOP	点検の繰り返し、IQC,EQC
測定前に計算盤が水平になっていない、または計算盤が十分な湿度のある環境に置かれていない。	トレーニング、SOP	点検の繰り返し、IQC,EQC
精子の識別不十分（細胞片を精子と数えたり、精子を他の細胞と間違えたりする）。	トレーニング、SOP	IQC,EQC
算定するグリッドが多すぎたり少なすぎたりする（不正確な算定となる）。	トレーニング、SOP	IQC,EQC
カウントする精子があまりに少なく、高いサンプリング誤差を導くこと。	トレーニング、SOP	IQC,EQC
ライン上の精子カウントが一定しない（カウント法によっては過剰や過少に評価してしまう）。	トレーニング、SOP	IQC,EQC
マルチキーカウンターの不調。	器具のメンテナンス	IQC,EQC
計算上のミスや希釈倍率の計算違い。	トレーニング、SOP	IQC,EQC
ヘマトクリット管を用いる場合には均等に精子が分布していない可能性がある。	トレーニング、SOP	IQC,EQC

7.13.2 精子形態評価の難しさを経験するときの実践的なヒント

- このマニュアル中のガイドラインを厳守する。各精子の顕微鏡写真図や関連した解説を研究する。
- ボーダーラインの形態の精子に対して特に注意を払う。これらは異常として分類されなければならない。
- スコア評価およびビデオカメラとテレビ画面を装備するブリッジ顕微鏡または顕微鏡を使用する研修会を行う。
- 表 7.3 参照のこと。

表 7.3 精子形態評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案

操作	予防	対策
顕微鏡が適切に清掃、調節されていない。不適当な拡大。	トレーニング, SOP, 器具のメンテナンス	IQC, EQC
分析を行う前の不十分なトレーニング。	トレーニング	IQC, EQC
明確なガイドラインのない主観的な技術。	トレーニング, SOP	IQC, EQC
分類方法（分析の間に変更を引き起こすかもしれない）に対する仲間の微妙な影響。	トレーニング	IQC（管理表）
塗抹標本作製時の精液の不十分な混和。	トレーニング, SOP	IQC
劣った塗抹標本（すなわち厚すぎる、あるいは薄すぎる）。	トレーニング, SOP	IQC
劣った染色技術（すなわち明るい、暗い、あるいは背景が染まり過ぎている）。	トレーニング, SOP	IQC
スライドの端で精子を評価すること。	トレーニング, SOP	IQC
平らでないか、あるいは他の精子と重なっている精子を記録しようとする。	トレーニング, SOP	IQC
区画のすべての精子を記録するのではなく、評価のために精子を選ぶこと。	トレーニング, SOP	IQC
時間とともに染色の色があせること（保存された IQC サンプルのために）。	トレーニング, SOP	IQC（管理表）
100 より多くカウントされない場合、割合の計算における誤差。	トレーニング, SOP	IQC, EQC
マルチキーカウンターの不調。	器具のメンテナンス	IQC, EQC

7.13.3 精子運動性評価の難しさを経験するときの実際的なヒント

- 評価を行う直前に標本を作る。全体的な運動性における先入観を減らすために、漂っている流れが止まったあとでのみ読む。
- ランダムに領域を選ぶ。そして故意に運動精子の高いまたは低い数を備えた領域を選ばない。こうする 1 つの方法は、領域が選ばれるまで、接眼レンズを通してみることを避けることである。
- 計測開始前に格子内に精子が入ってくるのを待っていてはいけない。
- 早く分析する；精子濃度によって、一度に格子の小さな部分だけを分析する。
- 計測の途中にその該当区画に後から入ってきた精子を数えないようにするために、格子の 1 つの区画をより少ない時間で検査する。
- 2 段階で前進、非前進および非運動の精子をカウントする。技術に関する問題があるならば、分析の順序を逆にする。
- 表 7.4 参照のこと。

表 7.4 精子運動性評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案

操作	予防	対策
一部採取する前の検体の不適当な混合。	トレーニング, SOP	再採取と再評価、IQC
スライドが分析の前に準備された後、あまりに長く待つこと（精子は、急速に活力を失う）。	トレーニング, SOP	再採取と再評価、IQC
ステージウォーマーの不適当な温度（例えば、あまりに高い温度は精子を殺してしまう。）	トレーニング, SOP, 器具のメン テナンス	IQC
顕微鏡が適切に清掃、調節されていない。不適当な拡大。	トレーニング, SOP, 器具のメン テナンス	IQC, EQC
ガイドンスのための接眼レンズの格子の欠如。	備品	IQC（管理表）
カバーガラスの端のまわりで分析すること（精子は死ぬか、あるいはカバーガラスの外側 5mm のまわりで動きが鈍くなる。）	トレーニング, SOP	再評価、IQC
ゆっくり評価をしすぎること（評価中に定義された区画へ他の精子が泳いでくる）。	トレーニング, SOP	IQC
マルチキーカウンターの不調。	器具のメンテナン ス	IQC, EQC
100 より多くカウントされない場合、割合の計算における誤差。	トレーニング, SOP	IQC, EQC
主観的な偏り（すなわち、一貫して高すぎる運動率あるいは低すぎる運動率）。	トレーニング, SOP	IQC, EQC
運動性を下げる準備の手順（例えば、温度変化、強力な混和、毒素による汚染）。	SOP	IQC
分析のための領域を作為的に選択。分析の遅れ（例えば、分析を開始するために、運動精子が領域または格子に泳ぐまで待つこと）。	トレーニング, SOP	IQC, EQC

7.13.4 精子生存性評価の難しさを経験するときの実践的なヒント

- 赤（死滅）とピンク（生存）の精子頭部の識別に特に注意を払う（弱いピンクに頭部が染色されている精子は、生存として評価される）。もし、染色が頸部領域の一部に限られていて、頭部領域の残りが染色されていない場合には、これは、細胞死や全細胞膜崩壊の現われではなく、「漏出性の頸部細胞膜」と考えられる。
- Eosin-nigrosin 法を使用することを考慮する（2.6.1 参照）。
- 表 7.5 参照。

表 7.5 精子生存性評価における変動（誤差）の原因と解決策の提案

操作	予防	対策
顕微鏡が適切に清掃、調節されていない。不適当な拡大。	トレーニング, SOP, 器具のメン テナンス	IQC, EQC
不適当な染色：いくつかの方法は、精子を殺す低浸透圧状況を与える。	トレーニング, SOP	運動性との比較
あまりに染色に長く待つこと。	トレーニング, SOP	運動性との比較
直接封入されないならば、乾いた塗抹標本の再水和作用は、染色がすべての精子へ漏れることを可能にする。	トレーニング, SOP	運動性との比較
死滅精子の過大評価（例えば、わずかにピンクに染まった頭部をもつ精子を死滅精子とすること）。	トレーニング, SOP	IQC, EQC
頸部に限ってピンクに染色された精子を死滅と評価すること。	トレーニング, SOP	IQC, EQC

参考文献

- Abraham-Peskir JV et al. (2002) . Response of midpiece vesicles on human sperm to osmotic stress. *Human Reproduction*, 17:375-382.
- Abshagen K et al. (1998) . Influence of sperm surface antibodies on spontaneous pregnancy rates. *Fertility and Sterility*, 70:355-356.
- Agarwal A et al. (2004) . Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive Biomedicine Online*, 8:616-627.
- Aitken RJ, Baker HW (1995) . Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good Samaritans? *Human Reproduction*, 10:1736-1739.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1987) . Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 81:459-469.
- Aitken RJ, Clarkson JS (1988) . Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *Journal of Andrology*, 9:367-376.
- Aitken RJ, Elton RA (1986) . Application of a Poisson-gamma model to study the influence of gamete concentration on sperm–oocyte fusion in the zona-free hamster egg penetration test. *Journal of Reproduction and Fertility*, 78:733-739.
- Aitken RJ, Krausz CG (2001) . Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, 122:497-506.
- Aitken RJ, West KM (1990) . Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *International Journal of Andrology*, 13:433-451.
- Aitken RJ et al. (1983) . Methods for assessing the functional capacity of human spermatozoa; their role in the selection of patients for in-vitro fertilization. In: Beier H, Lindner H, eds, *Fertilization of the human egg in vitro: Biological basis and clinical application*. Berlin, Springer: 147-168.

- Aitken RJ et al. (1992) . Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *Journal of Cellular Physiology*, 151:466-477.
- Aitken RJ et al. (1993) . Analysis of the response of human spermatozoa to A23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction. *Journal of Andrology*, 14:132-141.
- Aitken RJ et al. (2003) . Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:65-70.
- Aitken RJ et al. (2004) . Shedding light on chemiluminescence: the application of chemiluminescence in diagnostic andrology. *Journal of Andrology*, 25:455-465.
- Alvarez C et al. (2003) . Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Human Reproduction*, 18:2082-2088.
- Alvarez JG et al. (1987) . Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology*, 8:338-348.
- Andersen AG et al. (2000) . High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young men. *Human Reproduction*, 15:366-372.
- Armitage P et al. (2002) . *Statistical methods in medical research*. Oxford, Blackwell Science.
- Auger J, Eustache F (2000) . Standardisation de la classification morphologique des spermatozoïdes humains selon la méthode de David modifiée. *Andrologia*, 10:358-373.
- Auger J et al. (1995) . Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine*, 332:281-285.
- Auger J et al. (2001) . Sperm morphological defects related to environment, lifestyle and medical history of 1001 male partners of pregnant women from four European cities. *Human Reproduction*, 16:2710-2717.
- Aziz N et al. (1996) . The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of

- oocyte fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 66:1000-1008.
- Aziz N et al. (2004) . Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and Sterility*, 81:349-354.
- Baker HW, Kovacs GT (1985) . Spontaneous improvement in semen quality: regression towards the mean. *International Journal of Andrology*, 8:421-426.
- Barnett RN (1979) . *Clinical laboratory statistics*, 2nd ed. Boston, Little, Brown.
- Barratt CLR et al. (1992) . The poor prognostic value of low to moderate levels of sperm surface-bound antibodies. *Human Reproduction*, 7:95-98.
- Barratt CLR et al. (1993) . Prognostic significance of computerized motility analysis for in-vivo fertility. *Fertility and Sterility*, 60:520-525.
- Bedford JM (1977) . Sperm / egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anatomical Record*, 188:477-487.
- Behre HM et al. (2000) . Diagnosis of male infertility and hypogonadism. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology, male reproductive health and dysfunction*. Berlin, Springer: 92.
- Berman NG et al. (1996) . Methodological issues in the analysis of human sperm concentration data. *Journal of Andrology*, 17:68-73.
- Biggers JD et al. (1971) . The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Björndahl L, Barratt CL (2005) . Semen analysis: setting standards for the measurement of sperm numbers. *Journal of Andrology*, 26:11.
- Björndahl L, Kvist U (2003) . Sequence of ejaculation affects the spermatozoon as a carrier and its message. *Reproductive Biomedicine Online*, 7:440-448.
- Björndahl L et al. (2003) . Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. *Human Reproduction*, 18:813-816.
- Björndahl L et al. (2004) . Why the WHO recommendations for eosin–nigrosin staining techniques for human sperm vitality assessment must change. *Journal of*

Andrology, 25:671-678.

Björndahl L et al. (2005) . Contamination by seminal plasma factors during sperm selection. *Journal of Andrology*, 26:170-173.

Bland JM, Altman DG (1986) . Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*, 1:307-310.

Bohring C, Krause W (1999) . The intra- and inter-assay variation of the indirect mixed antiglobulin reaction test: is a quality control suitable? *Human Reproduction*, 14:1802-1805.

Bonde JP et al. (1998) . Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*, 352:1172-1177.

Boomsma CM et al. (2004) . Semen preparation techniques for intrauterine insemination. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, CD004507.

Bourne H et al. (1995) . Sperm preparation for intracytoplasmic injection: methods and relationship to fertilization results. *Reproduction, Fertility, Development*, 7:177-183.

Brazil C et al. (2004a) . Standardized methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:635-644.

Brazil C et al. (2004b) . Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:645-656.

Bronson RA et al. (1982) . Detection of sperm specific antibodies on the spermatozoa surface by immunobead binding. *Archives of Andrology*, 9:61.

Bronson RA et al. (1984) . Sperm antibodies: their role in infertility. *Fertility and Sterility*, 42:171-183.

Bunge RGT, Sherman JK (1953) . Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 172:767-768.

Bunge RG et al. (1954) . Clinical use of frozen semen: report of four cases. *Fertility and Sterility*, 5:520-529.

- Burkman LJ et al. (1988) . The hemizona assay (HZA) : development of a diagnostic test for the binding of human spermatozoa to human hemizona pellucida to predict fertilization potential. *Fertility and Sterility*, 49:688-697.
- Canale D et al. (1994) . Inter- and intra-individual variability of sperm morphology after selection with three different techniques: layering, swimup from pellet and Percoll. *Journal of Endocrinological Investigation*, 17:729-732.
- Carey RG, Lloyd RC (1995) . *Measuring quality improvement in healthcare: a guide to statistical process control applications*. New York, Quality Resources.
- Carlsen E et al. (2004) . Effects of ejaculatory frequency and season on variations in semen quality. *Fertility and Sterility*, 82:358-366.
- Carreras A et al. (1992) . Sperm plasma membrane integrity measurement: a combined method. *Andrologia*, 24:335-340.
- Castilla JA et al. (2006) . Influence of analytical and biological variation on the clinical interpretation of seminal parameters. *Human Reproduction*, 21:847-851.
- Cekan SZ et al. (1995) . *Principles of external quality assessment: a laboratory manual*. Geneva, World Health Organization.
- Cembrowski GS, Carey RN (1989) . *Laboratory quality management*. Chicago, ASCP Press.
- Chantler E, Abraham-Peskir JV (2004) . Significance of midpiece vesicles and functional integrity of the membranes of human spermatozoa after osmotic stress. *Andrologia*, 36:87-93.
- Chemes HE, Rawe YV (2003) . Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*, 9:405-428.
- Chiu WW, Chamley LW (2004) . Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 82:529-535.
- Chohan KR et al. (2006) . Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. *Journal of Andrology*, 27:53-59.

- Christensen P et al. (2005) . Discrepancies in the determination of sperm concentration using Bürker-Türk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology*, 63:992-1003.
- Clarke GN (1999) . Sperm cryopreservation: is there a significant risk of crosscontamination? *Human Reproduction* 14:2941-2943.
- Clarke GN et al. (1982) . Immunoglobulin class of sperm-bound antibodies in semen. In: Bratanov K, ed. *Immunology of reproduction*. Sofia, Bulgarian Academy of Sciences Press: 482-485.
- Clarke GN et al. (1985) . Detection of sperm antibodies in semen using the Immunobead test: a survey of 813 consecutive patients. *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 7:118-123.
- Clarke GN et al. (1997) . Artificial insemination and in-vitro fertilization using donor spermatozoa: a report on 15 years of experience. *Human Reproduction*, 12:722-726.
- Clarke GN et al. (2003) . Improved sperm cryopreservation using cold cryoprotectant. *Reproduction, Fertility, Development*, 15:377-381.
- Clarke GN et al. (2006) . Recovery of human sperm motility and ability to interact with the human zona pellucida after more than 28 years of storage in liquid nitrogen. *Fertility and Sterility*, 86:721-722.
- Coetzee K et al. (1998) . Predictive value of normal sperm morphology: a structured literature review. *Human Reproduction Update*, 4:73-82.
- Coetzee K et al. (1999a) . Repeatability and variance analysis on multiple computer-assisted (IVOS) sperm morphology readings. *Andrologia*, 31:163-168.
- Coetzee K et al. (1999b) . Assessment of interlaboratory and intralaboratory sperm morphology readings with the use of a Hamilton Thorne Research integrated visual optical system semen analyzer. *Fertility and Sterility*, 71:80-84.
- Coetzee K et al. (1999c) . Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS) . *Fertility and Sterility*, 71:222-225.

- Cooper TG (2005) . Cytoplasmic droplets: the good, the bad or just confusing? *Human Reproduction*, 20:9-11.
- Cooper TG, Yeung CH (1998) . A flow cytometric technique using peanut agglutinin for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 19:542-550.
- Cooper TG, Yeung CH (2006) . Computer-aided evaluation of assessment of “grade a” spermatozoa by experienced technicians. *Fertility and Sterility*, 85:220-224.
- Cooper TG et al. (1990a) . The influence of inflammation of the human male genital tract on secretion of the seminal markers α -glucosidase, glycerophosphocholine, carnitine, fructose and citric acid. *International Journal of Andrology*, 13:329-335.
- Cooper TG et al. (1990b) . Improvement in the assessment of human epididymal function by the use of inhibitors in the assay of α -glucosidase in seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 13:297-305.
- Cooper TG et al. (1991) . Variations in semen parameters from fathers. *Human Reproduction*, 6:859-866.
- Cooper TG et al. (1993) . Effects of multiple ejaculations after extended periods of sexual abstinence on total, motile and normal sperm numbers, as well as accessory gland secretions, from healthy normal and oligozoospermic men. *Human Reproduction*, 8:1251-1258.
- Cooper TG et al. (1999) . Experience with external quality control in spermatology. *Human Reproduction*, 14:765-769.
- Cooper TG et al. (2002) . Semen analysis and external quality control schemes for semen analysis need global standardization. *International Journal of Andrology*, 25:306-311.
- Cooper TG et al. (2004) . Cytoplasmic droplets are normal structures of human spermatozoa but are not well preserved by routine procedures for assessing sperm morphology. *Human Reproduction*, 19:2283-2288.
- Cooper TG et al. (2005) . Changes in osmolality during liquefaction of human semen. *International Journal of Andrology*, 28:58-60.

- Cooper TG et al. (2006) . Azoospermia: virtual reality or possible to quantify? *Journal of Andrology*, 27:483-490.
- Cooper TG et al. (2007) . Ejaculate volume is seriously underestimated when semen is pipetted or decanted into cylinders from the collection vessel. *Journal of Andrology*, 28:1-4.
- Cooper TG et al. (2010) . World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16:231-245.
- Corea M et al. (2005) . The diagnosis of azoospermia depends on the force of centrifugation. *Fertility and Sterility*, 83:920-922.
- Correa-Perez JR et al. (2004) . Clinical management of men producing ejaculates characterized by high levels of dead sperm and altered seminal plasma factors consistent with epididymal necrostermia. *Fertility and Sterility*, 81:1148-1150.
- Couture M et al. (1976) . Improved staining method for differentiating immature germ cells from white blood cells in human seminal fluid. *Andrologia*, 8:61-66.
- Cross NL (1995) . Methods for evaluating the acrosomal status of human sperm. In: Fenichel P, Parinaud J, eds. *Human sperm acrosome reaction*. Paris, John Libbey Eurotext (Colloques INSERM) : 277-285.
- Cross NL et al. (1986) . Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm. *Gamete Research*, 15:213-226.
- Dadoune JP et al. (1988) . Correlation between defects in chromatin condensation of human spermatozoa stained by aniline blue and semen characteristics. *Andrologia*, 20:211-217.
- Daudin M et al. (2000) . Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertility and Sterility*, 74:1164-1174.
- David G et al. (1975) . Anomalies morphologiques du spermatozoïde humain. I. Propositions pour un système de classification. *Journal de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction*, 4 (Suppl. 1) :17-36.

- David G et al. (1980) . The success of A.I.D. and semen characteristics: study of 1489 cycles and 192 ejaculates. *International Journal of Andrology*, 3:613-619.
- Davis RO, Katz DF (1992) . Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, 13:81-86.
- De Jonge C (2000) . Commentary: forging a partnership between total quality management and the andrology laboratory. *Journal of Andrology*, 21:203-205.
- De Jonge C et al. (2004) . Influence of the abstinence period on human sperm quality. *Fertility and Sterility*, 82:57-65.
- de la Taille A et al. (1998) . Correlation of genitourinary abnormalities, spermogram and *CFTR* genotype in patients with bilateral agenesis of the vas deferens. *Progress in Urology*, 8:370-376.
- Devillard F et al. (2002) . Polyploidy in large-headed sperm: FISH study of three cases. *Human Reproduction*, 17:1292-1298.
- Donnelly ET et al. (1998) . In-vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertility and Sterility*, 70:305-314.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005a) . Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *Journal of Andrology*, 26:107-114.
- Douglas-Hamilton DH et al. (2005b) . Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, 26:115-122.
- Drobnis EZ et al. (1988) . Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications. *Developmental Biology*, 130:311-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1989) . Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51:317-323.
- Eggert-Kruse W et al. (1992) . Differentiation of round cells in semen by means of monoclonal antibodies and relationship with male fertility. *Fertility and Sterility*, 58:1046-1055.

- Eggert-Kruse W et al. (1993) . The pH as an important determinant of sperm-mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59:617-628.
- Eggert-Kruse W et al. (1996) . Sperm morphology assessment using strict criteria and male fertility under in-vivo conditions of conception. *Human Reproduction*, 11:139-146.
- Eliasson R (1971) . Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3:49-64.
- Eliasson R (1975) . Analysis of semen. In: Behrman SJ, Kistner RW, eds. *Progress in Infertility*, 2nd ed. New York, Little, Brown: 691-713.
- Eliasson R (1981) . Analysis of semen. In: Burger H, de Kretser D, eds. *The testis*. New York, Raven Press: 381-399.
- Eliasson R (2003) . Basic semen analysis. In: Matson P, ed. *Current topics in andrology*. Perth, Ladybrook Publishing: 35-89.
- Eliasson R et al. (1970) . Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologie. *Andrologia*, 2:1257.
- ESHRE (1998) . Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, 13:142-145.
- ESHRE / NAFA (2002) . Manual on basic semen analysis (ESHRE Monographs #2) . Oxford, Oxford University Press.
- Evenson DP, Wixon R (2006) . Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*, 65:979-991.
- Ezeh UI, Moore HM (2001) . Redefining azoospermia and its implications. *Fertility and Sterility*, 75:213-214.
- Ezeh UI et al. (1998) . Correlation of testicular pathology and sperm extraction in azoospermic men with ejaculated spermatids detected by immunofluorescent localization. *Human Reproduction*, 13:3061-3065.
- Feldschuh J et al. (2005) . Successful sperm storage for 28 years. *Fertility and Sterility*, 84:1017.

- Fenichel P et al. (1989) . Evaluation of the human sperm acrosome reaction using a monoclonal antibody, GB24, and fluorescence-activated cell sorter. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87:699-706.
- Fetic S et al. (2006) . Relationship of cytoplasmic droplets to motility, migration in mucus, and volume regulation of human spermatozoa. *Journal of Andrology*, 27:294-301.
- Franken DR et al. (1989) . The hemizona assay (HZA) : a predictor of human sperm fertilizing potential in in-vitro fertilization (IVF) treatment. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 6:44-50.
- Franken DR et al. (2000) . PHysiological induction of the acrosome reaction in human sperm: validation of a microassay using minimal volumes of solubilized, homologous zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 17:374-378.
- Fredricsson B, Björk G (1977) . Morphology of postcoital spermatozoa in the cervical secretion and its clinical significance. *Fertility and Sterility*, 28:841-845.
- Gandini L et al. (2000) . Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15:830-839.
- Gao DY et al. (1995) . Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Human Reproduction*, 10:1109-1122.
- Garrett C, Baker HWG (1995) . A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, 63:1306-1317.
- Garrett C et al. (1997) . Selectivity of the human sperm–zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, 67:362-371.
- Garrett C et al. (2003) . Automated semen analysis: “zona pellucida preferred” sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Human Reproduction*, 18:1643-1649.
- Gilling-Smith C et al. (2005) . Laboratory safety during assisted reproduction in patients with blood-borne viruses. *Human Reproduction*, 20:1433-1438.
- Gilling-Smith C et al. (2006) . HIV and reproductive care—a review of current practice. *British Journal of Gynaecology*, 113:869-878.

- Gomez E et al. (1996) . Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of Andrology*, 17:276-287.
- Gomez E et al. (1998) . Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *International Journal of Andrology*, 21:81-94.
- Gould JE et al. (1994) . Sperm-immunobead binding decreases with in-vitro incubation. *Fertility and Sterility*, 62:167-171.
- Grimes DA, Lopez LM (2007) . "Oligozoospermia," "azoospermia," and other semen-analysis terminology: the need for better science. *Fertility and Sterility*, 88:1491-1494.
- Griveau JF, Le Lannou D (1997) . Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International Journal of Andrology*, 20:61-69.
- Handelsman DJ et al. (1984) . Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *International Journal of Andrology*, 7:369-382.
- Haugen TB, Grotmol T (1998) . pH of human semen. *International Journal of Andrology*, 21:105-108.
- Heite H-J, Wetterauer W (1979) . Acid phosphatase in seminal fluid: method of estimation and diagnostic significance. *Andrologia*, 11:113-122.
- Hellstrom WJG et al. (1989) . A comparison of the usefulness of SpermMar and Immunobead tests for the detection of antisperm antibodies. *Fertility and Sterility*, 52:1027-1031.
- Henkel R et al. (2004) . Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy. *Fertility and Sterility*, 81:965-972.
- Henley N et al. (1994) . Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain. *International Journal of Andrology*, 17:78-84.

- Holstein AF et al. (2003) . Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1:107.
- Homyk M et al. (1990) . Differential diagnosis of immature germ cells in semen utilizing monoclonal antibody MHS-10 to the intra-acrosomal antigen SP-10. *Fertility and Sterility*, 53:323-330.
- Hossain AM et al. (1998) . Time course of hypo-osmotic swellings of human spermatozoa: evidence of ordered transition between swelling subtypes. *Human Reproduction*, 13:1578-1583.
- Hotchkiss RS (1945) . *Fertility in men*. London, William Heineman Medical Books.
- Huggins C et al. (1942) . Chemical composition of human semen and of the secretions of the prostate and seminal vesicles. *American Journal of Physiology*, 136:467-473.
- IARC (1982) . *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans*. Lyon, International Agency for Research on Cancer (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Suppl. 4) : 169-170.
- Insler V et al. (1972) . The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10:223-228.
- Irvine DS et al. (1994) . A prospective clinical study of the relationship between the computer-assisted assessment of human semen quality and the achievement of pregnancy in vivo. *Human Reproduction*, 9:2324-2334.
- Ivic A et al. (2002) . Critical evaluation of methylcellulose as an alternative medium in sperm migration tests. *Human Reproduction*, 17:143-149.
- Iwamoto T et al. (2006) . Semen quality of 324 fertile Japanese men. *Human Reproduction*, 21:760-765.
- Iwasaki A, Gagnon C (1992) . Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility*, 57:409-416.
- Jaffe TM et al. (1998) . Sperm pellet analysis: a technique to detect the presence of sperm in men considered to have azoospermia by routine semen analysis.

Journal of Urology, 159:1548-1550.

Jeyendran RS et al. (1984) . Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to the other semen characteristics. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70:219-228.

Johanisson E et al. (2000) . Evaluation of “round cells” in semen analysis: a comparative study. *Human Reproduction Update*, 6:404-412.

Johnsen O, Eliasson R (1987) . Evaluation of a commercially available kit for the colorimetric determination of zinc in human seminal plasma. *International Journal of Andrology*, 10:435-440.

Johnson DE et al. (1996) . Glass wool column filtration versus mini-Percoll gradient for processing poor quality semen samples. *Fertility and Sterility*, 66:459-462.

Jones DM et al. (1986) . Immobilization of sperm by condoms and their components. *Clinical Reproduction and Fertility*, 4:367-372.

Jones R et al. (1979) . Peroxidative breakdown of phospholipids by human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31:531-537.

Jørgensen N et al. (2001) . Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16:1012-1019.

Jouannet P et al. (1988) . Male factors and the likelihood of pregnancy in infertile couples. I. Study of sperm characteristics. *International Journal of Andrology*, 11:379-394.

Kamischke A et al. (2004) . Cryopreservation of sperm from adolescents and adults with malignancies. *Journal of Andrology*, 25:586-592.

Karvonen MJ, Malm M (1955) . Colorimetric determination of fructose with indol. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratory Investigation*, 7:305-307.

Katz DF et al. (1986) . Morphometric analysis of spermatozoa in the assessment of human male fertility. *Journal of Andrology*, 7:203-210.

Keel BA (2006) . Within- and between-subject variation in semen parameters in infertile men and normal semen donors. *Fertility and Sterility*, 85:128-134.

- Keel BA, Webster BW (1993) . Semen cryopreservation methodology and results. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 71-96.
- Kraemer M et al. (1998) . Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction*, 13:611-619.
- Krause W (1995) . Computer-assisted sperm analysis system: comparison with routine evaluation and prognostic value in male fertility and assisted reproduction. *Human Reproduction*, 10 (Suppl. 1) : 60-66.
- Krausz C et al. (1992) . Development of a technique for monitoring the contamination of human semen samples with leucocytes. *Fertility and Sterility*, 57:1317-1325.
- Kremer J (1965) . A simple sperm penetration test. *International Journal of Fertility*, 10:209-215.
- Kremer J, Jager S (1980) . Characteristics of anti-spermatozoal antibodies responsible for the shaking phenomenon, with special regard to immunoglobulin class and antigenreactive sites. *International Journal of Andrology*, 3:143-152.
- Kruger TF et al. (1986) . Sperm morphologic features as a prognostic factor in in-vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 46:1118-1123.
- Kruger TF et al. (1987) . A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of Andrology*, 18:275-277.
- Kruger TF et al. (1991) . Hemizona assay: use of fresh versus salt-stored human oocytes to evaluate sperm binding potential to the zona pellucida. *Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*, 8:154-156.
- Kruger TF et al. (1993) . *The self teaching programme for strict sperm morphology*. Bellville, South Africa, MQ Medical. Kuster CE et al. (2004) . Determining sample size for the morphological assessment of sperm. *Theriogenology*, 61:691-703.
- Lacquet FA et al. (1996) . Slide preparation and staining procedures for reliable results using computerized morphology. *Archives of Andrology*, 36:133-138.

- Larsen L et al. (2000) . Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human Reproduction*, 15:1562-1567.
- Le Lannou D, Lansac J (1993) . Artificial procreation with frozen donor semen: the French experience of CECOS. In: Barratt CLR, Cooke ID, eds. *Donor insemination*. Cambridge, Cambridge University Press: 152-169.
- Le Lannou D et al. (1992) . Effects of chamber depth on the motion pattern of human spermatozoa in semen or in capacitating medium. *Human Reproduction*, 7:1417-1421.
- Lee JD et al. (1996) . Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Human Reproduction*, 11:1942-1946.
- Leibo SP et al. (2002) . Cryopreservation of human spermatozoa. In: Vayena E et al., eds. *Current practices and controversies in assisted reproduction*. Geneva, World Health Organization: 152-165.
- Lentner C (1981) . *Geigy scientific tables. Vol. 1:Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition*. Basle, Ciba-Geigy: 50.
- Lindsay KS et al. (1995) . Classification of azoospermic samples. *Lancet*, 345:1642.
- Liu DY, Baker HWG (1988) . The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 50:288-293.
- Liu DY, Baker HWG (1992a) . Morphology of spermatozoa bound to the zona pellucida of human oocytes that failed to fertilize in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94:71-84.
- Liu DY, Baker HW (1992b) . Tests of human sperm function and fertilization in vitro. *Fertility and Sterility*, 58:465-483.
- Liu DY, Baker HWG (1994) . Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with

reduced sperm–zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Human Reproduction*, 9:1694-1700.

Liu DY, Baker HWG (1996) . Relationship between the zonae pellucida (ZP) and ionophore A23187-induced acrosome reaction with the ability of sperm to penetrate the ZP in men with normal sperm-ZP binding. *Fertility and Sterility*, 66:312-315.

Liu DY, Baker HWG (2003) . Disordered zona pellucida induced acrosome reaction and failure of in-vitro fertilization in patients with unexplained infertility. *Fertility and Sterility*, 79:74-80.

Liu DY, Baker HW (2004) . High frequency of defective sperm–zona pellucida interaction in oligozoospermic infertile men. *Human Reproduction*, 19:228-233.

Liu DY et al. (1988) . A human sperm–zona pellucida binding test using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Fertility and Sterility*, 50:782-788.

Liu DY et al. (1989) . A sperm–zona pellucida binding test and *in vitro* fertilization. *Fertility and Sterility*, 52:281-287.

Liu DY et al. (1990) . Use of oocytes that failed to be fertilized in vitro to study human sperm–oocyte interactions: comparison of sperm–oolemma and sperm–zona pellucida binding, and relationship with results of IVF. *Reproduction, Fertility, Development*, 2:641-650.

Liu DY et al. (1991a) . Relationship between sperm motility assessed with the Hamilton Thorn motility analyzer and fertilization rates in vitro. *Journal of Andrology*, 12:231-239.

Liu DY et al. (1991b) . Horse and marmoset sperm bind to the zona pellucida of salt stored human oocytes. *Fertility and Sterility*, 56:764-767.

Liu DY et al. (2003) . Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, 18:2382-2389.

Liu DY et al. (2004) . Clinical application of sperm–oocyte interaction tests in in-vitro fertilization—embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertility and Sterility*, 82:1251-1263.

- MacLeod J, Wang Y (1979) . Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertility and Sterility*, 31:103-116.
- MacMillan RA, Baker HW (1987) . Comparison of latex and polyacrylamide beads for detecting sperm antibodies. *Clinical Reproduction and Fertility*, 5:203-209.
- Mahadevan M et al. (1981) . Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation. *Fertility and Sterility*, 36:243-247.
- Mahmoud AM et al. (1997) . The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertility and Sterility*, 68:340-345.
- Martin RH et al. (2003) . A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. *Biology of Reproduction*, 69:535-539.
- Matson PL (1995) . External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Human Reproduction*, 10:620-625.
- McKinney KA et al. (1996) . Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probe. *Archives of Andrology*, 36:119-125.
- Meinertz H, Bronson R (1988) . Detection of antisperm antibodies on the surface of motile spermatozoa. Comparison of the immunobead binding technique (IBT) and the mixed antiglobulin reaction (MAR) . *American Journal of Reproductive Immunology and Microbiology*, 18:120-123.
- Menkveld R, Kruger TF (1990) . Basic semen analysis. In: Acosta AA et al., eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*. Baltimore, Williams & Wilkins: 68-84.
- Menkveld R, Kruger TF (1996) . Evaluation of sperm morphology by light microscopy. In: Acosta AA, Kruger TF, eds. *Human spermatozoa in assisted reproduction*, 2nd ed. London, Parthenon Publishing: 89-107.
- Menkveld R et al. (1990) . The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Human Reproduction*, 5:586-592.

- Menkveld R et al. (1991) . Sperm selection capacity of the human zona pellucida. *Molecular Reproduction and Development*, 30:346-352.
- Menkveld R et al. (1997) . Effects of different staining and washing procedures on the results of human sperm morphology by manual and computerized methods. *Andrologia*, 29:1-7.
- Menkveld R et al. (2001) . Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Human Reproduction*, 16:1165-1171.
- Meschede D et al. (1993) . Influence of three different preparation techniques on the results of human sperm morphology analysis. *International Journal of Andrology*, 16:362-369.
- Meseguer M et al. (2006) . Sperm cryopreservation in oncological patients: a 14-year followup study. *Fertility and Sterility*, 85:640-645.
- Moghissi KS (1976) . Post-coital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27:117-129.
- Moghissi KS et al. (1964) . Mechanism of sperm migration. *Fertility and Sterility*, 15:15-23.
- Möllerling H, Gruber W (1966) . Determination of citrate with citrate lyase. *Analytical Biochemistry*, 17:369-376.
- Morshedi M et al. (2003) . Efficacy and pregnancy outcome of two methods of semen preparation for intrauterine insemination: a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 79 (Suppl. 3) : 1625-1632.
- Mortimer D (1994a) . *Practical laboratory andrology*. Oxford, Oxford University Press.
- Mortimer D (1994b) . Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, 3:97-111.
- Mortimer D (2004) . Current and future concepts and practices in human sperm cryobanking. *Reproductive Biomedicine Online*, 9:134-151.
- Mortimer D, Menkveld R (2001) . Sperm morphology assessment—historical perspectives and current opinions. *Journal of Andrology*, 22:192-205.

- Mortimer D, Mortimer S (2005) . *Quality and risk management in the IVF laboratory*. Cambridge, Cambridge University Press.
- Mortimer D et al. (1995) . Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development*, 7:951-959.
- Nahoum CRD, Cardozo D (1980) . Staining for volumetric count of leukocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertility and Sterility*, 34:68-69.
- Neuwinger J et al. (1990) . External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertility and Sterility*, 54:308-314.
- Neuwinger J et al. (1991) . Hyaluronic acid as a medium for human sperm migration tests. *Human Reproduction*, 6:396-400.
- Ng FL et al. (1992) . Comparison of Percoll, mini-Percoll and swim-up methods for sperm preparation from abnormal semen samples. *Human Reproduction*, 7:261-266.
- Ng KK et al. (2004) . Sperm output of older men. *Human Reproduction*, 19:1811-1815.
- Oehninger S et al. (1993) . The specificity of human spermatozoa / zona pellucida interaction under hemi-zona assay conditions. *Molecular Reproduction and Development*, 35:57-61.
- Oei SG et al. (1995) . When is the post-coital test normal? A critical appraisal. *Human Reproduction*, 10:1711-1714.
- Overstreet JW et al. (1980) . In-vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 34:604-606.
- Paquin R et al. (1984) . Similar biochemical properties of human seminal plasma and epididymal 1,4-glucosidase. *Journal of Andrology*, 5:277-282.
- Pelfrey RJ et al., (1982) . Abnormalities of sperm morphology in cases of persistent infertility after vasectomy reversal. *Fertility and Sterility*, 38:112-114.
- Pérez-Sánchez F et al. (1994) . Improvement in quality of cryopreserved human spermatozoa by swim-up before freezing. *International Journal of Andrology*, 17:115-120.

- Perloff WH, Steinberger E (1963) . In-vitro penetration of cervical mucus by spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 14:231-236.
- Perloff WH et al. (1964) . Conception with human spermatozoa frozen by nitrogen vapor technique. *Fertility and Sterility*, 15:501-504.
- Plaut DA, Westgard JOW (2002) . QC external quality assessment. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing: 125-163.
- Poland ML et al. (1985) . Variation of semen measures within normal men. *Fertility and Sterility*, 44:396-400.
- Polge C et al. (1949) . Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164:626-627.
- Pound N et al. (2002) . Duration of sexual arousal predicts semen parameters for masturbatory ejaculates. *PHysiology and Behavior*, 76:685-689.
- Punab M et al. (2003) . The limit of leucocytospermia from the microbiological viewpoint. *Andrologia*, 35:271-278.
- Quinn P et al. (1985) . Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Sterility*, 44:493-498.
- Rajah SV et al. (1992) . Comparison of mixed antiglobulin reaction and direct immunobead test for detection of sperm-bound antibodies in subfertile males. *Fertility and Sterility*, 57:1300-1303.
- Rao B et al. (1989) . Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. *Gamete Research*, 24:127-134.
- Rhemrev J et al. (1989) . Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertility and Sterility*, 51:685-690.
- Rose NR et al. (1976) . Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa. *Clinical and Experimental Immunology*, 23:175-199.

- Rossi AG, Aitken RJ (1997) . Interactions between leukocytes and the male reproductive system. The unanswered questions. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 424:245-252.
- Said TM et al. (2004) . Human sperm superoxide anion generation and correlation with semen quality in patients with male infertility. *Fertility and Sterility*, 2:871-877.
- Sakkas D et al. (1998) . Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Human Reproduction*, 13 (Suppl. 4) :11-19.
- Savasi V et al. (2007) . Safety of sperm washing and ART outcome in 741 HIV-1-serodiscordant couples. *Human Reproduction*, 22:772-777.
- Sawyer DE et al. (2003) . Quantitative analysis of gene-specific DNA damage in human spermatozoa. *Mutation Research*, 529:21-34.
- Scarselli G et al. (1987) . Approach to immunological male infertility: a comparison between MAR test and direct immunobead test. *Acta Europea Fertilitatis*, 18:55-57.
- Schmidt KL et al. (2004) . Assisted reproduction in male cancer survivors: fertility treatment and outcome in 67 couples. *Human Reproduction*, 19:2806-2810.
- Seaman EK et al. (1996) . Accuracy of semen counting chambers as determined by the use of latex beads. *Fertility and Sterility*, 66:662-665.
- Shah VP et al. (2000) . Bioanalytical method validation—a revisit with a decade of progress. *PHarmacological Research*, 17:1551-1557.
- Sharif K (2000) . Reclassification of azoospermia: the time has come? *Human Reproduction*, 15:237-238.
- Sharma RK et al. (2001) . Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *Journal of Andrology*, 22:575-583.
- Sherman JK (1990) . Cryopreservation of human semen. In: Keel BA, Webster BW, eds. *CRC handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility*. Boca Raton, CRC Press: 229-259.

- Shibahara H et al. (2004) . Prediction of pregnancy by intrauterine insemination using CASA estimates and strict criteria in patients with male factor infertility. *International Journal of Andrology*, 27:63-68.
- Slama R et al. (2002) . Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Human Reproduction*, 17:503-515.
- Smith R et al. (1996) . Total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Human Reproduction*, 11:1655-1660.
- Sobrero AJ, MacLeod J (1962) . The immediate postcoital test. *Fertility and Sterility*, 13:184-189.
- Soler C et al. (2000) . Objective evaluation of the morphology of human epididymal sperm heads. *International Journal of Andrology*, 23:77-84.
- Tedder RS (1995) . Hepatitis B transmission from contaminated cryopreservation tank. *Lancet*, 346:137-140.
- Tomlinson M (2005) . Managing risk associated with cryopreservation. *Human Reproduction*, 20:1751-1756.
- Tomlinson MJ et al. (1993) . Prospective study of leukocytes and leukocyte subpopulations in semen suggests they are not a cause of male infertility. *Fertility and Sterility*, 60:1069-1075.
- Toner JP et al. (1995) . Value of sperm morphology assessed by strict criteria for prediction of the outcome of artificial (intrauterine) insemination. *Andrologia*, 27:143-148.
- Tyler JP et al. (1982a) . Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation.
I. Clinical characteristics. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1:273-285.
- Tyler JP et al. (1982b) . Studies of human seminal parameters with frequent ejaculation
II. Spermatozoal vitality and storage. *Clinical Reproduction and Fertility*, 1:287-293.
- Van der Merwe FH et al. (2005) . The use of semen parameters to identify the subfertile male in the general population. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 59:86-91.

- Van Waart J et al. (2001) . Predictive value of normal sperm morphology in intrauterine insemination (IUI) : a structured literature review. *Human Reproduction Update*, 7:495-500.
- Verheyen G et al. (1993) . Effect of freezing method, thawing temperature and post-thaw dilution / washing on motility (CASA) and morphology characteristics of high-quality human sperm. *Human Reproduction*, 8:1678-1684.
- Virro MR et al. (2004) . Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertility and Sterility*, 81:1289-1295.
- von der Kammer H et al. (1991) . The evaluation of markers of prostatic function. *Urological Research*, 19:343-347.
- von Eckardstein S et al. (2000) . Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, 73:1226-1231.
- Watson PF (1995) . Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction Fertility and Development*, 7:871-891.
- Weiske WH (1994) . Minimal invasive Vasektomie mittels Fulgurationstechnik. Erfahrungen bei 1000 Patienten in 12 Jahren. *Urologe*, B34:448-452.
- Weiske WH et al. (2000) . Clinical findings in congenital absence of the vasa deferentia. *Andrologia*, 32:13-18.
- Westgard JO (2002) . Foreword to the second edition. In: Westgard JO, ed. *Basic QC practices: training in statistical quality control for healthcare laboratories*. Madison, WI, QC Publishing.
- Wheeler DJ (1993) . *Understanding variation: the key to managing chaos*. Knoxville, TN, SPC Press.
- Wheeler DJ, Chambers DS (1992) . *Understanding statistical process control*, 2nd ed. Knoxville, TN, SPC Press.

- WHO (1986) . Consultation on the zona-free hamster oocyte penetration test and the diagnosis of male fertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 6) .
- WHO (1987) . (prepared by Comhaire F et al.) Towards more objectivity in diagnosis and management of male infertility. *International Journal of Andrology*, (Suppl. 7) : 22-24.
- WHO (1996) . Task Force for the Regulation of Male Fertility. Contraceptive efficacy of testosterone-induced azoospermia and oligozoospermia in normal men. *Fertility and Sterility*, 65:821-829.
- WHO (1999) . *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical mucus interaction*, 4th ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- WHO (2004) . *Laboratory biosafety manual*, 3rd ed. Geneva, World Health Organization (<http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf>, last accessed 25 February 2010) .
- Wilton LJ et al. (1988) . Human male infertility caused by degeneration and death of sperms in the epididymis. *Fertility and Sterility*, 49:1051-1058.
- Wolf DP (1995) . Semen cryopreservation. In: Keye WR et al., eds. *Infertility evaluation and treatment*. Philadelphia, WB Saunders: 686-695.
- Wolff H (1995) . The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertility and Sterility*, 63:1143-1157.
- Woods EJ et al. (2004) . Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. *Cryobiology*, 48:146-156.
- Yanagimachi R et al. (1979) . Retention of biologic characteristics of zona pellucida in highly concentrated salt solution: the use of salt stored eggs for assessing the fertilizing capacity of spermatozoa. *Fertility and Sterility*, 31:562-574.
- Zavos PM, Goodpasture JC (1989) . Clinical improvements of specific seminal deficiencies via intercourse with a seminal collection device versus masturbation. *Fertility and Sterility*, 51:190-193.
- Zinaman MJ et al. (1996) . Evaluation of computer-assisted semen analysis (CASA) with IDENT stain to determine sperm concentration. *Journal of Andrology*,

17:288-292.

Zinaman MJ et al. (2000) . Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, 21:145-153.

Zorn B et al. (2003) . Seminal reactive oxygen species as predictors of fertilization, embryo quality and pregnancy rates after conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *International Journal of Andrology*, 26:279-285.

付録 1 基準値と精液命名法

A1.1 基準値

精液検体に対する測定結果の数値は、項目毎に設けられた基準値と比較する必要がある。その比較の結果から、臨床における試みや精査のための各患者の管理や初期対応方法の決定がなされる。ここでの基準値は、精液の質と受精能との相互関係についてのいくつかの前方視的研究の結果から算出されたものである。さらにこの基準値は、避妊をやめた後 12 か月以内にそのパートナーが妊娠に至った男性を“妊孕性を有する男性”と定義した上で、そのような男性を直接、後方視的に選択することによって得た (Cooper et al., 2010)。

- 完全な精液サンプル、つまり、一人一検体（数回検査の最初の検査）で禁欲 2~7 日後に採取したものが本解析には用いられた。
- 精液量はこの調査の時点において WHO によって推奨されている方法、すなわち重量測定、あるいはメスピペットまたは目盛り付容器へ検体全量を移し入れることによって測定した。総精子数は、固定後に希釈したサンプルの精子濃度を血球計算盤で測定し、その精子濃度の数値を元に算出した。総運動精子 (PR+NP) は前進運動精子 (PR)、非前進運動精子 (NP) と不動精子 (IM) を室温または 37°C で測定した。正常形態精子のデータは厳格な分類 (Tygerberg) (約 35% が正常形態) の予想最大範囲を上回っていないラボからだけを採用した。精子の生存性は生存性判定試薬である eosin 染色によって精子頭部が染色されないことによって判定した。
- 統計方式は異なる集団由来と考えられる下方境界値として両側基準範囲から 2.5 パーセンタイルを採用した。しかしながら精液所見を表わす指標においては片側基準範囲の方がよりふさわしいと思われる。なぜならば、精液において高すぎる数値が必ずしも妊孕能に悪影響を及ぼしているとは考えにくいからである。表 A1.1 に 5 パーセンタイル下方基準限界値を、また表 A1.2 には完全度数分布を表示した。

Comment 1: 表 A1.2 の基準分布は避妊中止後 12 か月以内にパートナーが妊娠した最近の父親の精液特徴を表している。

Comment 2: 男性は各々の集団から構成されており、彼らの精液所見は健康男性一般集団とは異なるかも知れない。

Comment 3: 精液の特徴は男性間でも、個人でも大きく変動しており、カップルの生殖能を間違いなく判断できるものでない。それゆえ、変動範囲はヒトの妊孕性の状態を示すものにすぎない。

Comment 4: 95%の基準範囲内にある精液所見でも生殖能を保証していない。

Comment 5: 男性の精液所見で、ここでいう下限基準値以下でも必ずしも生殖能が無いわけではない。つまり、それらの精液所見は最近の男性精液所見以下である。この値は受精能を有する男性の 5%が基準範囲から算出されたデータで決められている。

Comment 6: 男性の精液所見は臨床情報と共に解釈される必要がある。

Comment 7: 精液品質の中には地域の違いやラボの違いによる可能性がある。ラボは、このマニュアルに記述された技術を用いて自分達の基準値を考えるべきである。

Comment 8: 妊娠の時期は女性パートナーの生殖能状態に影響される。

表 A1.1 精液所見に対しての下限基準値（5 パーセントイルと 95%の信頼範囲）

パラメーター	下限基準値
精液量 (mL)	1.5 (1.4—1.7)
総精子数 (百万/射精量)	39 (33—46)
精子濃度 (百万/mL)	15 (12—16)
総運動率 (PR+NP,%)	40 (38—42)
前進運動率 (PR,%)	32 (31—34)
生存率 (生存精子,%)	58 (55—63)
精子形態 (正常形態,%)	4 (3.0—4.0)
他の基準値	
pH	≥ 7.2
ペルオキシダーゼ陽性白血球 (百万/mL)	< 1.0
MAR テスト (粒子と結合した運動精子,%)	< 50
イムノビーズテスト (ビーズと結合した運動精子,%)	< 50
精液中亜鉛 (マイクロモル/射精量)	≥ 2.4
精液中果糖 (マイクロモル/射精量)	≥ 13
精液中中性グルコシダーゼ (ミリ単位/射精量)	≥ 20

表 A1.2 避妊器具を使用しないで 12 カ月以内に妊娠したパートナーの男性精液パラメーターの分布範囲

パラメーター (単位)	数	パーセンタイル								
		2.5	5	10	25	50	75	90	95	97.5
精液量 (mL)	1941	1.2	1.5	2.0	2.7	3.7	4.8	6.0	6.8	7.6
総精子数 (百万/射精量)	1859	23	39	69	142	255	422	647	802	928
精子濃度 (百万/mL)	1859	9	15	22	41	73	116	169	213	259
総運動率 (PR+NP, %)	1781	34	40	45	53	61	69	75	78	81
前進運動率 (PR, %)	1780	28	32	39	47	55	62	69	72	75
非前進運動率 (NP, %)	1778	1	1	2	3	5	9	15	18	22
不動精子 (IM, %)	1863	19	22	25	31	39	46	54	59	65
生存率 (%)	428	53	58	64	72	79	84	88	91	92
正常形態 (%)	1851	3	4	5.5	9	15	24.5	36	44	48

Cooper et al., 2010 提供

A1.2 学術用語

正常範囲から逸脱した所見を示すために専門的な用語の使用を廃止してはどうかという議論も行われたが (Grimes & Lopez, 2007)、本マニュアルにおいてはあえて数値よりもむしろ言語を用いることとし、精液性状の基準値から大きく偏っている状態について専門用語を用いて表現する方法をそのまま残した (表 A1.3 参照)。学術用語は単に精液の品質を分類しているだけで、生物学的因果関係 (Eliasson et al., 1970) を示しているわけではない。これらの用語は、ある精液標本において、ある項目における数値が基準値の範囲外にあることを示すために用いられる。それゆえ、異なる集団に起因している可能性がある。精液の学術用語の多くは一つのパラメーターに関連づけられている。しかし、正常精液は 3 つの精子パラメーター、すなわち数、運動率、形態学を基準にしている。それぞれのパラメーターの基準値の変動は個々に示すことができる。

References

- Cooper TG et al. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16:231-245.
- Grimes DA, Lopez LM (2007) "Oligozoospermia", and other semen-analysis terminology;

the need for better science. Fertility and Sterility, 88:1491-1494

Eliasson R et al. (1970) Empfehlungen zur Nomenklatur in der Andrologia.2:-1257.

表 A1.3 精液性状に関連する学術用語

無精液症	精液無し（無し又は逆行性射精）
無力精子症	前進運動（PR）精子が基準の下限以下
無力奇形精子症	前進運動（PR）と形態正常精子が基準の下限以下
無精子症	射精液中に精子が無い（評価法を使用して定量限界）
不定型無精子症	新鮮精液注に精子はみえないが、遠心分離したペレットで観察される
血精液症	射精液中に赤血球が含まれる
白血球精液症（膿精液症）	射精液中に基準値以上の白血球がある
死滅精子症	射精液中に精子生存率低く、不動精子率が高い
正常精液	総精子数（又は報告結果により濃度）＊と前進運動率、形態学的に正常精子が基準内か下限より上である
乏無力精子症	総精子数（又は報告結果により濃度）と前進運動率が基準の下限以下
乏無力奇形精子症	総精子数（又は報告結果により濃度）、および前進運動率と正常形態精子率の両方が基準の下限以下
乏奇形精子症	総精子数（又は報告結果により濃度）と正常形態精子が基準の下限以下
乏精子症	総精子数（又は報告結果により濃度）が基準の下限以下
奇形精子症	形態正常精子率が基準の下限以下

＊ 基準値は常に総精子数を示すべきで、濃度より優先される。

Note: 接尾語「spermia」は射精液に対して、また、「zoospermia」は精子に対して用いられる。従って以下のような言い回しは用いるべきではない。
例) asthenospermia, asthenoteratospermia, cryptospermia, oligoasthenospermia, oligoteratospermia, oligospermia, teratospermia.

付録 2 設備と安全性

A2.1 アンドロロジーラボの必需品

以下は、このマニュアルで記載された基本的検査を実施する為のアンドロロジーラボの必需品と器具のリストである。

以下の必需品の由来が知りたい時は、このマニュアルのどこかに引用された引用文献を参照のこと。

A2.1.1 ラボは以下の一般的な機器と必需品を備えておかなければならない

- 天秤。
- 浸み込まない表面構造の実験台。
- 容器。
- 使い捨て鋭利な対象物。
- 有害廃棄物処分。
- ラボ用生物学的安全性マニュアルのコピー（WHO, 2004）。
- ディープフリーザー。
- 殺菌剤又は次亜塩素酸ソーダ、純水に 0.1% (v/v) と 1% (v/v) を溶解。
- 殺菌石鹸又は皮膚殺菌力のある洗剤。
- ディスポーザブル手袋。
- 目のすすぎ用液。
- 応急手当用品。
- 有害試薬、化学薬品又は染色液など作製したり、保管の為のドラフト。
- 冷蔵庫。

- シャワー。

A2.1.2 以下の必需品と器材は精液検査に必要である

- 毛細管とシール（頸管粘液進入テストのため）。
- CASA 装置（オプション）。
- 遠心機。
 - －300～500g（日常的な精子取り扱いと尿の為に）、1000g（精液分画用）、2000g（粘液サンプル用）。
 - －3000g に達する高速遠心機（無精子を疑うサンプル用） 又は 16000g 小型遠心機（精子を含まない精漿分離の為）（Box A2.1 参照）。
- 凍結装置（オプション）。
- コンドーム：殺精子剤無し、毒素含まない（オプション）。
- 希釈液バイアル。
- 解剖用顕微鏡（オプション；ハムスター卵採取用）。
- 濾紙、90g / m²（染色液濾過用）。
- 蛍光顕微鏡とレンズ（オプション；先体反応テストと高感度精子濃度計測用）。
- 血球計算盤：改良 Neubauer 又は代替品、深さ 100µm、厚いカバーグラス（厚さ No. 4, 0.44mm）。
- インキュベーター（37°C）、なるべくなら CO₂5%（v/v）（オプション）。
- ラボラトリーフィルム：自己密封できるもの、定型のもの。
- ラボ用マルチキーカウンター：（6 または 9 個のキー）。
- 大容量カウントチャンバー：（オプション；精子低濃度測定用）。
- 光度計：（オプション；ROS 分析用）。
- 顕微鏡用スライド：
 - －台座ガラス又は表面に区画付きカバーグラス（厚さ No. 1.5、0.16-0.19mm）。

—無地のスライドに精液 1 滴置き、他のスライドを重ねて塗抹標本を作製する。

- ペン / 鉛筆。
 - スライドガラス記入用；軟かく書ける HB 鉛筆（アメリカ レート No.2）が適当。
 - ワックス / 油性鉛筆（輪郭を書くペン—オプション；スライド上で抗体溶液区域を制限する為のペン）。
 - 永久の目印ペン。
- pH（ISFET）電極（オプション・粘性精液測定用）。
- pH 試験紙（測定範囲 6—10）。
- 位相差顕微鏡（精子濃度、運動性、形態評価用）少なくとも 50 ワット光源と下記の付属品（付録 3 参照）。
 - 対物レンズ 10 倍、20（又は 25）倍、40（又は 63）倍陽性相目的、100 倍油浸レンズ。
 - 対物レンズ 40 倍陰性相目的（オプション；eosin の生存テスト）。
 - 広視野接眼レンズ 10（又は 12.5）倍、目印の区画線入り（接眼用）。
 - ステージ用マイクロメーター（精子形態測定用）。
 - イギリスファインダー（区画付きスライドガラス—オプション；QC 評価用）。
 - 加温ステージ（オプション；精子速度測定用）。
 - ピペットとピペットチップ。
 - ラテックス滴下用パスツールピペット又はプラスチック製使い捨てピペット又は精液混和用自動ピペット。
 - 空気置換ピペット。
 - 10～100 μ L を測れるピペット。
- 精液と粘液分析記録（付録 6 参照）。
- サンプルミキサー。
 - 精液混和用の回転車輪又は 2 次元シェーカー（オプション）。
 - 精液希釈用ボルテックスミキサー。
- 96 穴プレート用密封テープ（オプション；フラクトース分析用）。
- 精液採取容器。
 - 蓋つき使い捨ての広口容器。
 - オートクレーブ可能ガラス製収集シリンダー。

- 使い捨てスライドチャンバー（オプション：サンプル運動性QC用）。
- 分光光度計（オプション：精液の生化学分析用）。
- スポットプレート、磁器又はホウケイ酸ガラス（eosin・nigurosin テスト用）。
- 時計（オプション；サンプルのQC用）。
- ティッシュペーパー：糸くずの出ないもの。
- 加温盤：ベンチ上で使える（オプション；運動性評価用のスライド加温）もの。

A2.1.3 以下の化学製品は備えた方が望ましい

- 抗体（白血球用 CD45）。
- 消泡剤（オプション；サンプル QC 用）。
- 細胞性ペルオキシダーゼキット（オプション）。
- 凍害防止培養液（オプション）。
- 密度勾配培養液（精子用）。
- フラクトース分析キット（オプション）。
- グルタルアルデヒド（オプション；HOP テスト用）。
- ミネラルオイル（オプション；HOP テスト用）。
- 中性 α グルコシダーゼ分析キット（オプション）。
- パパニコロー染色液。
- ワセリン（オプション；HOP テスト用）。
- 迅速染色キット（オプション；精子形態用）。
- ワックス（融点 48–66°C）（オプション；HOP テスト用）。

- 亜鉛分析キット（オプション）。

Box A2.1 遠心力の計算法

精子への遠心分離（相対的遠心力RCF）力は、回転速度（N、1分当たりの回転数r.p.m.）とローター中心からポイントの距離まで測定する（通常は遠沈管の底）（半径、R, cm）に依存する。RCFは公式： $1.118 \times 10^{-5} \times R \times N^2$ から計算される。例えば、ローター半径8.6cmで5000r.p.m.の遠心分離は2404gの力を発生する。13.5cmのローター半径で3900rpmの遠心分離は2296gを生じる。図A2.1はローター半径と回転速度からRCFを決定用する計算図表である。

A2.2 アンドロロジー・ラボ内の潜在的バイオハザード

ヒトの体液、例えば、精液は潜在的感染があるものとして扱い特殊に注意して処理しなければならない。アンドロロジーラボにおいて精液中から検出されうる最も重要な感染性微生物は、HIV、B型、C型肝炎ウイルス（HBV と HCV）である。ラボ職員はすべての生物由来サンプルに対して潜在的感染源として取扱い、取扱い中は、適切な注意をしなければならない。

A2.3 ラボ職員の安全処置

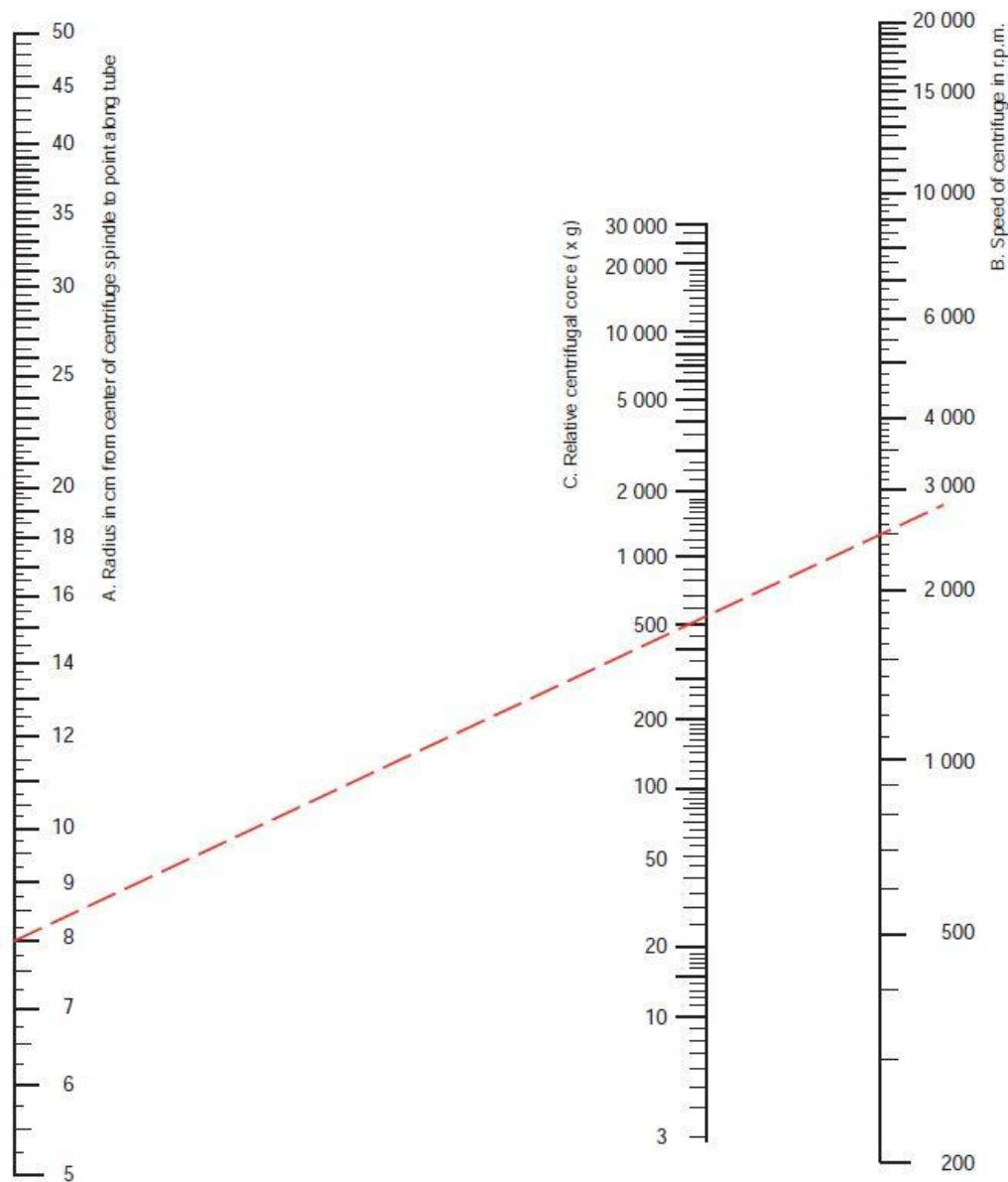
- ヒトのサンプルを取り扱っているすべてのラボ職員は、B型肝炎の予防注射を受けなければならない。
- 何者も、アンドロロジー・ラボ内においては飲食、喫煙、化粧や食物保管は行ってはならない。
- ロでのピペット操作は許されない。機械式のピペット装置は液体操作用に常に使用されなければならない。
- すべてのラボスタッフは、ラボ用着または使い捨てガウンを着て、外出時にそれを脱がなければならない。ラボ職員は、使い捨て手袋をつける。特に新鮮な精液や凍結精液または精漿や他の生物由来サンプルが触れた容器に接触するときはディスポ手袋（ゴム、ラテックスまたはビニール、粉の有無は関係ない）を使用しなければならない。スタッフがラボを出るとか電話やコンピューターを使う時、手袋は脱ぎ捨てなければならない。それらは再利用してはいけない。
- 職員は定期的に手を洗うべきである。特にラボから出る時や検体取扱い後やガウンと手袋を脱いだ後はいつも手洗いをしなければならない。

- スタッフは、精液で汚れた鋭利な器具での傷を防ぐ注意をしなければならない。素手で精液と触たり、傷、擦り傷や病変が精液に触れないように配慮すること。

図 A2.1 ローター半径と回転速度から相対的遠心力（RCF）を決定する計算図表

ローター半径（cm、左の軸）と回転速度（r.p.m.、右の軸）を結んでいる直線が RCF の中央軸と交差する。例えば、半径 8cm と回転速度 2500r.p.m.では約 550g の RCF となる。

（計算された値は 559g、(Box A2.1 参照)）



- 測定は、尿や血液や精液サンプルの流失を防ぐ処置をしなければならない。
- すべての鋭利な物（針、刃等）の使用後は、表記された容器に入れなければならない。この容器は満杯になる前に蓋をして、他の危険物取扱と同様に処分されなければならない。
- すべての潜在的に危険な用具（手袋、精液容器）は、集められて適切に処分されなければならない。
- 顔マスクまたは外科的マスクは、潜在的に噴霧や水滴を取り扱う、つまり、開放されたミキサーや遠心機を取り扱うスタッフ全員が身につけなければならない。精液サンプルの最後の残りをピペットから強く噴き出してはいけない、霧や水滴の原因となるからである。
- スタッフは耐熱手袋と上部を閉じた靴、保護安全ゴーグルを着けなければならない。例えば、液体窒素の取り扱いの時である。

A2.4 ラボ装置の安全処置

作業台とディスプレイで無い容器が精液や他の生物由来サンプルと接触したのであれば、滅菌または消毒すべきである。以下の手順で実施する。

日々、検査完了毎の実施：

- 消毒液による作業区域の洗浄。例えば、0.1% (1g / l) 次亜塩素酸ナトリウムまたは類似消毒剤で拭き、少なくとも 1 時間（または一晩）放置後、水で消毒剤をすすぎ落とす。
- 計算盤とカバーガラスは 1% (1g / l) 次亜塩素酸ナトリウムまたは類似消毒剤に一晩浸し、その後水で消毒剤をすすぎ落とす。

流出後の処置：

- 万が一、容器の外部に精液がこぼれ落ちて汚染が起こった場合には、消毒剤で拭く。例えば、0.1% (1g / l) 次亜塩素酸ナトリウムまたは類似消毒剤で拭き、その後、水ですすぐ。
- どんな流出物でも発生直後に消毒剤で作業台の上を洗う。例えば、1.0% (10g / l) 次亜塩素酸ナトリウムまたは、類似消毒剤で拭き、少なくとも 4 時間放置後、水で消毒剤をすすぎ落とす。

必要に応じて精液採取容器の HIV 加熱不活化を以下の方法で行う：

- 少なくとも 2 時間、170°C (340 °F) 乾熱滅菌でおこなう。加熱前にホイルで被い、扱うまで冷やしたままにしておく。
- 蒸気滅菌（オートクレーブ）で滅菌する。少なくとも 121°C (250 °F) 20 分間 101 キロパスカル（15 ポンドまたは 1 気圧）で行う。
- 煮沸滅菌、20-30 分間続ける。

A2.5 液体窒素取扱い時の安全予防処置

- 液体窒素は危険です。常に取り扱いは注意深くして、承認された保存庫だけを使い、蓋は密閉にしない。液体窒素中に検体を浸漬するときは道具を使う。
- 目を保護するために顔シールドまたは安全ゴーグルを着用すること。手は乾燥レザ一または絶縁手袋を着用して保護すること。上部を閉じた靴を履いて足を保護すること。
- 液体窒素がこぼれると広がりやすく、従って広範囲が冷却される。室温下では柔らかく、しなやかな素材の物質でも液体窒素に接触すると硬くてもろくなる。
- 極度の低温で重傷になることがある。皮膚にかかると火傷に似た症状を呈することもある。液体窒素のガスは極度に冷たい。目のような組織は繊細で、顔や手の皮膚では影響されないようなガスが当たっただけでも障害される可能性がある。
- 液体窒素が沸騰しているとき、周辺に飛び散っているとき、または冷却されたガスが噴出しているようなときにはそのまま何もせずに様子を見ておくこと。液体窒素の沸騰や周辺への飛散は、暖かい容器に液体窒素を注いだときなどにしばしば起こる。常にこれらの行為は、沸騰や跳ね返りを最小にするためにゆっくりと実施すること。
- 絶縁管には触れない。液体窒素容器やパイプに決して無防備な体で触れない。液体窒素によって極端に冷却された金属棒は皮膚に触れると直ちに接着してしまい、引き離そうとすると皮膚組織が引き千切られてしまう。
- 良く換気された区域で作業することである。少量の液体窒素から大量のガス（室温で、液体窒素の体積の 9 倍となる）が発生する。もし、液体から窒素ガスが閉鎖空間に蒸発したら、空中の酸素濃度は低下し、仮死状態になる危険性がある。液体窒素保存室では酸素探知機（酸素濃度が 17% (v/v) 以下に落ちるとアラームが作動する）を用いるべきである。

- チューブとかストローは特別に作られた液体窒素凍結用のものを用いる。それらが暖かくなると爆発することがあるので常に注意しなければならない。

Reference

WHO (2004) . Laboratory biosafety manual, 3rd ed. Geneva, World Health Organization ([http: / / whqlibdoc.who.int / publications / 2004 / 9241546506.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546506.pdf),last accessed 25 February 2010)

付録 3 顕微鏡

顕微鏡の特徴に関する最良の情報源は全ての部品の明確な図表が記載された製品マニュアルである。もしマニュアルが入手できないようであればインターネット検索から顕微鏡の仕組み、使用法に関する情報が得られる。

本マニュアルに記載されている精液評価には位相差顕微鏡が推奨される。顕微鏡は少なくとも 50 ワット以上の光源、なるべく位相差コンデンサーの双眼鏡（2 つの対物レンズ）で 10 倍、20 倍（もしくは 25 倍）、40 倍（もしくは 63 倍）の対物レンズ、明視野 100 倍油浸対物レンズ（形態および生存性の評価用）を装備したものが望ましい（一般的な評価、運動性、生存性、精子と精子細胞以外の計測用）。暗視野レンズは生存性の測定や CASA（精子運動解析装置）に必要となる。そして蛍光レンズは蛍光顕微鏡に必要となる。

- 対物レンズの品質と価格はかなり多様である（Box A3.1 参照）。より高価な対物レンズではきれいな像が見えるが、低品質の対物レンズでも十分である。
- 接眼レチクル（レチクル、グラチクル、接眼マイクロメーター）は一般的には 5mm もしくは 10mm もしくは様々な形態のグリットが刻まれた既知の目盛が刻まれたガラス製レンズである。もともと刻まれている接眼レンズもあれば、内部にレチクルを入れるために取り外すことができるものもある。レチクルは異なった直径のものを使用できるが、接眼レンズの直径に正確に適合させる必要があり、精子形態を決める対物マイクロメーターで校正できる。またレチクルを使用することで精子の運動性を評価する視野の範囲を限定することもできる。図.2.4（a）と図.7.4（a）に示したのは 20 倍と 40 倍で運動性を評価するのに適した大きさの 5mm×5mm のグリットである。濃度測定や形態評価に 10mm×10mm のグリットを好む技術者もいる（図.A7.5 参照）。
- 対物マイクロメーターは一般的に 1mm を 10 μ m の区画に分割した目盛を表面に刻み加工したスライドガラスである。これは接眼マイクロメーターやレチクルのグリットを校正したり、例えば運動性の計測時に範囲の測定に利用することができる（図.A7.5 参照）。

下記の手順は顕微鏡からの最良の像をもたらしてくれる。もし光路が適切な位置と調整がなされているなら、像は明瞭ではっきりとし目が疲れないであろう。以下の手順は新しい顕微鏡を使用する時やいつも像が不明瞭な時に行う必要がある。

A3.1 サンプルの設置

- スライドガラスの上に 10 μ L（その他の量は Box 2.4 参照）の精液をスライドガラスに滴下し、22mm×22mm（厚み番号 1.5、0.17mm）（他の形態は Box 2.4 参照）

のカバーガラスを被せてステージに置く。顕微鏡調整を行うために精液を滴下したスライドガラスの代わりに対物マイクロメーターを使用することもできる。

- 電源をつけて目に快適な最大限のコントラストをもたらすように明暗を調節する。
- 10 倍明視野対物レンズを選択し、コンデンサーホイールを選択した対物レンズの倍率に合わせるために回転させる。

Note: もし顕微鏡が三眼鏡なら（例えば写真もしくはビデオ録画用のカメラを装着できる3つ目の接眼レンズを備えている）、光路切換えつまみが一般的には接眼レンズの右側にある。このつまみには3つの設定があり、1つ目は全ての光を接眼レンズに入れる、2つ目は全ての光をカメラに入れる、3つ目は接眼レンズとカメラに光を半分屈折させる。

Box 3.1 対物レンズ

それぞれの顕微鏡用レンズにはこの様な情報が記載されている。

UPlanFI	PlanApo	Plan Neofluor	plan	SFluor
20× / 0.80 imm corr	40× / 0.75 PH2	100× / 1.35 oil Iris	100× / 1.25 oil Ph3	20× / 0.75
160 / 0.17	∞ / 0.17	∞ / —	∞ / 0.17 WD 1.0	

様々な記号の説明を以下に記す。

Plan : 平面レンズ。平面視野にある全てのものに焦点を合せられる。

Apo : 色収差を高度に補正するアポクロマトレンズ（色収差レンズ）。

F, FI, FL, Neofluor, Fluo, Fluotar, UV, ,S-Fluor: 紫外線光を透過し、蛍光顕微鏡に使用されるレンズ。

100×、×63、40×、etc, : レンズの倍率

0.30、0.50、0.80、1.30、1.40、etc.: レンズの開口数。これはレンズの光集積能を表している。使用する光の波長 (λ , ラムダ) とともに、開口数は解像度（個別として識別できる 2 つの対象物間の最小距離）を決める。 NA （開口数） $=n \times \sin \alpha$ 、 n （エータ）は媒質の屈折率で、 α は照明光がつくる円錐の側線と垂直線との角度である。 $\sin \alpha$ の最大値は 1.00、開口数の最大値は理論的には n と同じであるが、実際には最大値は 1.4 である。最大の解像度を得るために最高値の開口数を選択する。

PH, PH1, PH2, PH3, NP, N: 位相リングを備えたレンズを示している。PH は同位相リングコンデンサーを、NP もしくは N は逆相リングを示している。PH1、PH2、PH3 はコンデンサーの位相リングがそれぞれ必要となる。正相コントラストレンズは内部構造を見ることができる（湿性標本や運動性計測に使用できる）。一方、位相コントラストレンズは背景が黒く像を白くする（湿性プレパラートでの生存性、CASA に使用できる）。

Imm, Immersion, Oil, W: 対象とレンズの間に主にオイル、水 (W) もしくはグリ

セロールなどの液体と一緒に使用することで鮮明な像を見られるように設計されたレンズを示している（このような表示がなければ、ドライレンズなので液体とは使用しないようにする）。

Iris : ギザギザしたリングで調整できるアイリスのついたレンズを示している。

Corr : 異なった屈折率の浸漬溶液を使用することができる、ギザギザした補正環のついたレンズを示している。

160、 ∞ : 鏡筒の長さ、もしくは接眼レンズと対象物との距離を示している。通常は 160mm であるが最近のレンズは無限にできる。

0.17、- : 対物レンズに必要なカバーガラスの厚さ。カバーガラス番号 1.5 は（厚さ 0.16-0.19mm）ほとんどの用途に使用できる。血球計算盤はカバーガラス番号 4（厚さ 0.44mm）が必要となる。“-”はカバーガラスの厚さは重要ではない、もしくは浸漬液をスライドガラスに直接滴下できることを示している。

WD : 作動距離; 試料にはっきりと焦点が合う時の対物レンズ前部とスライドガラス表面との距離。作動距離は倍率や開口数が増加するにつれ狭くなり、normal (NWD, 5mm まで)、long (LWD, 5.25–9.75mm)、extra-long (ELWD, 10-14)、super-long (SLWD, 15-30mm) とレンズの作動距離が長くなる。改良 Neubauer 血球計算盤を使用する際に LWD を必要とする顕微鏡もある。

屈折率 : 液体を通過した時の光の位相範囲。屈折率 (RI, n , eta) は真空では 1.0000、空気中では約 1.0 (1.0008)、水では 1.33、グリセロールでは 1.47、ほとんどの浸漬オイルでは 1.515 である。乾燥後の固定液 (1.488–1.55) はスライドガラス (1.50-1.58) とほぼ同じ屈折率となる。

A3.2 接眼レンズの調整

- 接眼レンズを引き離す、もしくは引き寄せて接眼レンズと目の幅を調整する。

A3.3 像の集束（焦点調整）

- 20 倍、もしくは 40 倍対物レンズをできるだけステージに近づけて粗動焦点調整を回す。対物レンズとスライドガラスの破損を避けるため、接眼レンズを覗きながらではなく、前方もしくは側方から対物レンズとステージを見る。スライドガラスを対物レンズにほぼ接触させるように、ステージの高さを調整するため粗動焦点調整を使用する。対物レンズからステージを下げるように、粗動焦点調整を回転する方向に注意しながら回す。
- 両方の接眼レンズを覗きながら、試料におおよそ焦点が合うまで、徐々に対物レンズをステージから遠ざかるよう動かすため、粗動焦点調整をゆっくりと回転させる。

Note : 焦点を合わせづらい場合は、正しい焦点面に近づけるためにスライドガラスの擦りガラスの端に焦点を合わせてみる。

A3.4 接眼レンズの集束（焦点調整）

- 2つの接眼レンズが別々に焦点調整できる顕微鏡もあれば、一方の接眼レンズが固定されていて、もう一方は調整できる顕微鏡もある。
- 調整可能な接眼レンズは“+ / 0 / -”といった目盛が一般的には記されている。この工程を始める前に接眼レンズを“0”に合わせる。
- もし一方の接眼レンズが固定されているなら、固定された接眼レンズだけを通して観察する（もう一方の目は閉じておくか覆っておく）。
- 微調整を使用して試料にピントを合わせる。これは死滅精子やごみの粒子もしくは対物マイクロメーターのグリットなどの動かない試料にピントを合わせるのに役立つ。
- 調整可能な接眼レンズを覗きながら焦点を合わせ、固定された接眼レンズ上の目は閉じるか覆っておく。おおよそ焦点が合うまで、接眼レンズの根元にあるギザギザしたリングを“+”もしくは“-”方向に回転させる。

A3.5 光コンデンサーの集束（焦点調整）

- 視野絞りを閉じる（顕微鏡本体の光源の真上にある）。
- 絞りの端が出来るだけ鮮明な焦点になるまでコンデンサーの左もしくは右についている小さなつまみを使用してコンデンサーを上下すると光の輪が小さく鮮明になる。その場所は一般的にはコンデンサーが一番高所にある時になる。光の像の端はコンデンサーの焦点が合うにつれ青から赤へと変化し、コンデンサーの端はわずかに不鮮明なままなら、光は中心を外れているかもしれない。

Note: 視野開口部が虹彩絞りを備えていないなら、光源の上に置かれた尖った対象（例えば鉛筆の先端）に焦点が合う。

A3.6 コンデンサーを中央にする

- コンデンサーセンタリングつまみで視野絞りを中央にする。つまみは一般的に（通常ギザギザしている）コンデンサーの前面もしくは側面から斜めに2つ突出している。
- 光の像を中央にした後、光が視野に行き渡るように視野絞りを開放する。このポイントを省略して視野絞りを開放しないこと。

- ぎらついた光が消えるまでコンデンサー開口を絞る。

Note: 右側のコンデンサーセンタリングつまみのすぐ後方にコンデンサーの位置を固定する小さなネジがあるかもしれない。このネジを緩めると、顕微鏡からコンデンサー本体が外れてしまうので、コンデンサーを中央にする際に、回さないように注意する。

A3.7 位相リングの調整

- これは顕微鏡メーカーから入手できる芯出し望遠鏡を使用して行う。
- 使用している対物レンズに適したコンデンサーの適切な位相リングを視野の中に入れる。
- 片側の接眼レンズを外し、芯出し望遠鏡と置き換える。芯出し望遠鏡の本体を片側の手で保持し、覗きながらもう一方の手で上部を回転させ、芯出し望遠鏡のリングに焦点を合わせる。2つのリングに焦点が合うまで回転させる。一方のリングは暗く（位相リング）、もう一方は明るい（光のリング）。
- 位相コンデンサーにある位相調整つまみを回して同軸を有するために、リングを一列に配置する。つまみは通常コンデンサーの後方にある。
- 芯出し望遠鏡と顕微鏡の接眼レンズを置き換える。

A3.8 蛍光顕微鏡

蛍光顕微鏡はヘキスト 33342 染色（2.11.2 参照）を使用した高感度の測定行程における精子核とレクチンで標識した FITC を使用した先体反応の検出に使用される。（4.4.1 参照）。ヘキスト 33342 染色と FITC の励起の最大波長は 346nm と 494nm で、それぞれに対応する発光極大値は 460nm と 520nm である。蛍光レンズが必要になる（Box A3.1 参照）。顕微鏡の各機種は、購入時の追加装備として、染色した試料を観察するためにダイクロイックミラーと保護フィルターの必需品セットがある。

付録 4 保存液

全ての溶液には精製水（蒸留水、蒸留水を蒸留した水、イオン交換水）が必要となる。

A4.1 Biggers, Whitten, Whittingham

BWW 保存液 (Biggers et al.1971)

1. 精製水 1000mL に 5.54g 塩化ナトリウム (NaCl)、0.356g 塩化カリウム (KCl)、0.294g 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.250g 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、0.162g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4) を加える。
2. 1mol / l 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
3. 1000mL 当たり 1.0mL フェノールレッド (0.04%、0.4g / l) を添加する。

Note: この保存液は4°Cで数週間保存することができる。

BWW 使用液

使用日：

1. 100mL 保存液に 210mg 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、100mg D-グルコース、0.37mL 60% (v / v) 乳酸ナトリウム溶液、3mg ビルビン酸ナトリウム、350mg ウシ血清アルブミン Flaction V、10.000 単位 ペニシリン、10mg 硫酸ストレプトマイシンを添加する。
2. 5% (v / v) 二酸化炭素、95% (v / v) 空気の気相下で使用前に 37°Cに保温する。

Note 1: 空気中で培養する場合：20mmol / l Hepes (ナトリウム塩：5.21g / l) を加え、0.366g / l NaHCO_3 を減らす。

Note 2: 濃度勾配の場合 (5.5.1 参照)：フェノールレッドを除き、試薬の規定量の 10 倍を用いて 10 倍濃度の保存液を準備する。準備した後、上記を 100mL に調整する。

A4.2 Dulbecco's (ダルベッコ) リン酸緩衝液 (PBS)

Dulbecco's グルコース-PBS：750mL 精製水に 0.2g 塩化カリウム (KCl)、0.2g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、0.1g 塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、8.0g 塩化ナトリウム (NaCl)、2.16g リン酸ナトリウム七水和物

($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、1.00g D-グルコースを添加する。

1. 10mL の精製水に 0.132g 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を溶解し、攪拌しながら上記の溶液にゆっくりと加える。
2. 1mol / l 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。

Note 1: 析出させないために、塩化カルシウム (CaCl_2) を単独で、ゆっくりと、混和しながら加える。

Note 2: 必要なら、使用前に100mLあたり0.3g ウシ血清アルブミン (BSA) (必須脂肪酸不含) を加える。

A4.3 Earle's 培養液

1. 750mL 精製水に 6.8g 塩化ナトリウム (NaCl)、2.2g 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、0.14g リン酸ナトリウム一水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)、0.4g 塩化カリウム (KCl)、0.20g 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、1.0g D-グルコースを添加する。
2. 上記の溶液に 0.20g の塩化カルシウム (CaCl_2) をゆっくりと混和しながら溶解する。
3. 1mol / l 塩酸 (HCl) もしくは 1mol / l 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
4. 精製水で 1000mL に調整する。

Note 1: 空気中で培養する場合 : 20mmol / l Hepes (ナトリウム塩 : 5.21g / l) を加え、0.366g / l NaHCO_3 を減らす。

Note 2: 濃度勾配の場合 (5.5.1参照) : 重炭酸塩を除き、試薬の規定量の10倍を用いて10倍濃度の保存液を準備する。準備した後、100mLに0.22g NaHCO_3 を添加する。

A4.4 Ham's F-10 培養液

1. 750mL 蒸留水に 7.4g 塩化ナトリウム (NaCl)、1.2g 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、0.285g 塩化カリウム (KCl)、0.154g リン酸ナトリウム (Na_2HPO_4)、0.153g 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.083g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、

0.044g 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、1.1g D-グルコースを添加する。

2. 1mol / l 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。

Note 1: 空気中で培養する場合 : 20mmol / l Hepes (ナトリウム塩 : 5.21g / l) を加え、0.366g / l 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3) を減らす。

Note 2: 濃度勾配の場合 (5.5.1 参照) : 重炭酸塩を除き、試薬の規定量の 10 倍を用いて 10 倍濃度の保存液を準備する。準備した後、100mL に 0.12g NaHCO_3 を添加する。

A4.5 Hank's (ハンクス) 平衡塩類液

1. 750mL 精製水に 8.0g 塩化ナトリウム (NaCl)、0.4g 塩化カリウム (KCl)、0.35g 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、0.185g 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、0.1g 塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、0.1g 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.06g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、0.048g リン酸ナトリウム (NaH_2PO_4)、1.0g D-グルコースを添加する。
2. 1mol / l 水酸化ナトリウム水溶液 (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。

A4.6 ヒト卵管液

原書の作成法 (Quinn et al., 1985)

1. 750mL 精製水に 5.931g 塩化ナトリウム (NaCl)、0.35g 塩化カリウム (KCl)、0.05g 硫酸マグネシウム七水和物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、0.05g リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、2.1g 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、0.5g D-グルコース、0.036g ピルビン酸ナトリウム、0.3g 塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、4.0g、DL-乳酸ナトリウム (60% (v / v) 溶液) を添加する。
2. 上記の培養液 1mL に 10 μg フェノールレッド、100 単位 ペニシリン、50 μg 硫酸ストレプトマイシンを添加する。
3. 1mol / l 塩酸 (HCl) で pH を 7.4 に調整する。
4. 精製水で 1000mL に調整する。

Note 1: 空气中で培養する場合：20mmol/l Hepes（ナトリウム塩：5.21g/l）を加え、0.366g/l 重炭酸ナトリウム（ NaHCO_3 ）を減らす。

Note 2: 濃度勾配の場合（5.5.1 参照）：重炭酸塩、ピルビン酸、乳酸を除き、試薬の規定量の 10 倍を用いて 10 倍濃度の保存液を準備する。準備した後、100mL に 0.21g NaHCO_3 、0.0036g ピルビン酸ナトリウム、0.4g 乳酸ナトリウムを添加する。

A4.7 Krebs-Ringer（クレブスリンガー）液

フェノールレッド不含 Krebs-Ringer 液（KRM）

1. 750mL 精製水に 6.9g 塩化ナトリウム（ NaCl ）、2.1g 重炭酸ナトリウム（ NaHCO_3 ）、0.35g 塩化カリウム（ KCl ）、0.32g 塩化カルシウム二水和物（ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）、0.18g リン酸ナトリウム二水和物（ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）、0.1g 塩化マグネシウム六水和物（ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ）、0.9g D-グルコースを添加する。
2. 1mol/l 水酸化ナトリウム水溶液（ NaOH ）で pH を 7.4 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。

A4.8 トリス緩衝塩（Tris-buffered saline）

1. 750mL 精製水に 6.055g トリス、8.52g 塩化ナトリウム（ NaCl ）を添加する。
2. 1mol/l 塩酸で pH を 8.2 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。

Note: 10 倍濃度の保存液は試薬の規定量の 10 倍を用いて作成できる。使用の際は 10 倍量の精製水で希釈し、1mol/l 塩酸で pH を調整する。

A4.9 タイロード液

1. 750mL 精製水に 0.2g 無水塩化カルシウム (CaCl_2)、0.2g 塩化カリウム (KCl)、0.05g リン酸水素ナトリウム (Na_2HPO_4)、0.2g 塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、8.0g 塩化ナトリウム (NaCl)、1.0g 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3)、1.0g D-グルコースを添加する。
2. 1mol/l 塩酸 (HCl) もしくは 1mol/l 水酸化ナトリウム (NaOH) で pH を 7.4 に調整する。
3. 精製水で 1000mL に調整する。
4. 必要ならば使用前に 100mL あたり 0.3g BSA (必須脂肪酸不含) を添加する。

A4.10 パパニコロー染色

既成品の染色液で通常は十分であるがラボ内で調整することもできる。

Note: 異なった濃度のエタノールを調整する前に精製水の酸性度を調べる。そして pH を 7.0 にする。

EA-36 (EA-50 と同等)

組成

- | | |
|------------------------------------|--------|
| 1. Eosin Y (カラーインデックス 45380) | 10g |
| 2. ビスマルクブラウン Y (カラーインデックス 21000) | 10g |
| 3. ライトグリーン SF、黄色 (カラーインデックス 42095) | 10g |
| 4. 精製水 | 300mL |
| 5. 95% (v/v) エタノール | 2000mL |
| 6. リンタングステン酸 | 4g |
| 7. 炭酸リチウム飽和水溶液 (>1.3g / 100mL) | 0.5mL |

保存液

下記に従って、それぞれ 10% (100g / l) 染色液を別々に調整する。

1. 100mL 精製水に 10g eosin Y を溶解する。
2. 100mL 精製水に 10g ビスマルクブラウン Y を溶解する。
3. 100mL 精製水に 10g ライトグリーン SF を溶解する。

調整

1. 2l の染色液を調整するために、50mL eosin Y 保存液 に 10mL ビスマルクブラウン Y 保存液を混和し、12.5mL ライトグリーン SF 保存液を添加する。
2. 95% (v / v) エタノールで 2000mL に調整する。
3. 4g リンタングステン酸を添加する。
4. 0.5mL 炭酸リチウム飽和水溶液を添加する。
5. 十分に混和し、茶褐色の瓶の中に入れきつく蓋を締めて室温で保存する。

Note 1: 保存液は2-3ヶ月間、安定している。

Note 2: 使用前に0.45μmのフィルターを通す。

オレンジ G6

組成

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| 1. オレンジ G クリスタル (カラーインデックス 16230) | 10 g |
| 2. 精製水 | 100mL |
| 3. 95% (v / v) エタノール | 1000mL |
| 4. リンタングステン酸 | 0.15g |

保存液 No1 (オレンジ G6、10% (100g / l) 溶液)

1. 100mL 精製水に 10g オレンジG クリスタルを溶解する。
2. 十分に混和し、使用前一週間、室温で茶褐色もしくはアルミホイルで覆った栓瓶内に保管しておく。

保存液 No2 (オレンジ G6、0.5%溶液)

1. 50mL 保存液 No1 に 950mL 95% (v / v) エタノールを添加する。
2. 0.15g リンタングステン酸を添加する。
3. 十分に混和し、室温で茶褐色もしくはアルミホイルで覆った栓瓶内に保存する。

Note 1: 使用の前に濾過する。

Note 2: 溶液は2.3ヵ月間、安定である。

ハリスのヘマトキシリン (酢酸非含有)

構成成分

1. ヘマトキシリン (暗色の結晶;カラーインデックス 75290)
2. 95% (v / v) エタノール
3. アルミニウム硫酸アンモニウム十二水化物 ($\text{Al}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
4. 酸化第二水銀 (HgO)

準備

1. 加熱で 160g のアルミニウム硫酸アンモニウム十二水化物を 1600mL の純水に溶かす。
2. 8g のヘマトキシリンの結晶を 80mL の 95% (v / v) のエタノールで溶かす。
3. ヘマトキシリン水溶液をアルミニウム硫酸アンモニウム水溶液に加える。

4. 混合物を 95°Cまで加熱する。
5. 混合物を加熱状態から取り出し、ゆっくりと 6g の酸化第二水銀を攪拌しながら加える。

Note : 水溶液の色は黒紫色になる。

1. 容器を冷たいウォーターバスに即座に浸す。
2. 水溶液が冷めた後に、濾過する。
3. 室温で暗褐色またはアルミニウム箔でおおわれたボトルに保管する。
4. 使う前に 48 時間置く。
5. 必要とする量と同量の純水で希釈する。
6. 再度、濾過する。

スコットの水道水代替溶液

Note : スコットの水溶液は、通常の水道水では核を青色に変化させるに不十分の時間だけに使用される。例えば、20～25枚のスライドをすすいだ後など、溶液はしばしば取り替えなければならない。

構成成分

1. 重炭酸ナトリウム (NaHCO_3) 3.5g 。
2. 硫酸マグネシウム七水化物 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 20.0g 。
3. チモールの結晶 (防腐剤として必要であるならば)。
4. 精製水 1000mL。

酸性のエタノール溶液。

構成成分

1. エタノール 99.5% (v / v) 300mL。

2. 濃塩酸 (HCl) 2.0mL 。
3. 精製水 100mL。

References

- Biggers JD et al. (1971) . The culture of mouse embryos in vitro. In: Daniel JC, ed. *Methods in mammalian embryology*. San Francisco, WH Freeman: 86-116.
- Quinn P et al. (1985) . Improved pregnancy rate in human in-vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fl uid. *Fertility and Sterility*, 44:493-498.

付録 5 子宮頸管粘液

A5.1 はじめに

子宮頸管粘液中の精子は、液状の中で浮遊している。女性生殖器官系の分泌物と精子との相互作用は、精子の生存や機能の上で極めて重要である。現在、ヒトの子宮や卵管液との精子作用を評価する実用的な方法はない。しかし、子宮頸管粘液は容易に採取できて研究に利用できる。

ヒトの頸部上皮は異なる種類の分泌細胞から成り、それらの性質や豊富な分泌顆粒は頸部のそれぞれの部分で異なっている。これらの細胞からの分泌物は、頸管粘液に関与している。卵巣ホルモンが、頸管粘液の分泌を調節している。すなわち、 17β -エストラジオールは多量の水様性粘液の産生を刺激し、黄体ホルモンは上皮性細胞の分泌活性を抑制している。分泌される頸管粘液量は、周期的な変化を示す。通常の月経周期を有する生殖年齢の女性において、毎日の粘液産生量は月経中期で $500\mu\text{L}$ から、その他の時期で $100\mu\text{L}$ 未満と変化する。少量の子宮内膜、卵管、おそらく卵胞液も子宮頸管粘液の貯蔵に関与していると思われる。そのうえ、子宮や頸部上皮から白血球や細胞残屑も存在している。

頸管粘液は、90%以上の水を含んでいる種々異なる成分の分泌物で、いくつかの流動学的な特性を示す：

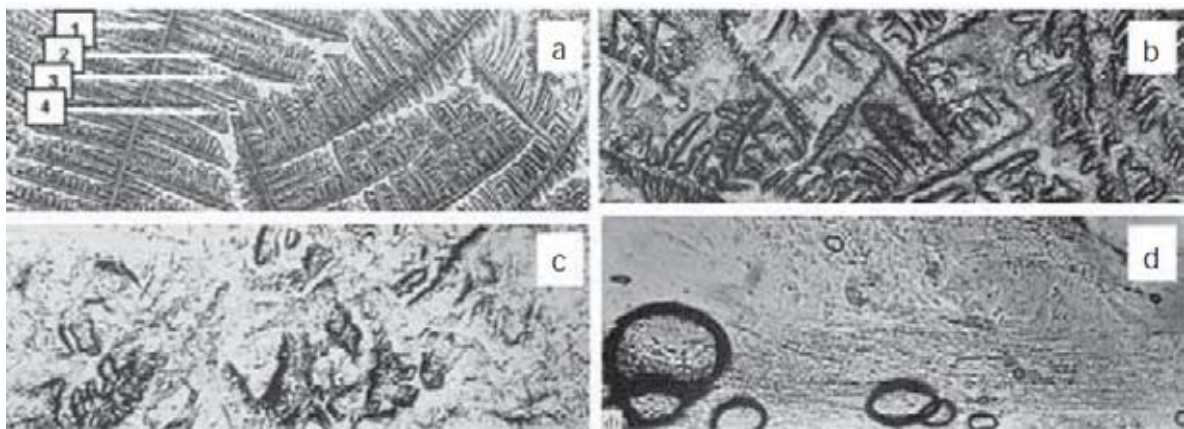
- 粘性は分子配列によって、またタンパク質と頸管粘液のイオン濃度によって影響される。粘液量は月経周期の時期で変化している。排卵直前の月経中期では水様性への変化している。月経の直前は非常に粘稠性（しばしば細胞状の）の高いものに变化している。排卵が完了される頃には、粘液の粘性はすでに再び増大し始めている。
- 牽糸性は、線維化を記述するのに用いられる用語で、“糸能力”または頸管粘液の弾性特性のことである。
- シダ状結晶形成は頸管粘液をガラス表面上で乾燥させた時に観察できる。
(図 A5.1 参照)

頸管粘液は、高低の粘性構成から成るヒドロゲル組成と電解質、有機化合物と可溶タンパク質から成り立っている。高い粘性成分はムチンの高分子ネットワークで、粘液の流動学的な特性に影響を与えている。頸管ムチンは、ペプチド核とオリゴ糖側鎖でできているサブユニットからなる原繊維組織である。頸管粘液の構成素の周期的な変化が、精子の進入と生存に影響を与えている。精子は、ほぼ通常の 28 日型周期の 9 日目から、ヒト子宮頸管粘液に進入することができる。進入能力は徐々に高まり排卵の直前にピークに達する。精子の進入は粘液特性の大きな変化前に減少し始める。それぞれの変化は時期により異なり、精子進入能力の程度は普通にみられる。運動精子は、子宮頸部の腺

窩に頸管粘液の繊維によって導かれるかもしれない。そして、そこで精子は保持され、子宮と卵管にゆっくり放出されるであろう。

図 A5.1 スライドガラスの上で空気乾燥された頸管粘液のシダ状結晶形成の例

(a) シダ状結晶形成：1、一次幹；2、二次幹；3、三次幹；4、四次幹（スコア 3）；(b) 主として一次幹・二次幹（スコア 2）であるが、若干の三次幹も現れている；(c) 非定形的なシダ結晶化（スコア 1）；(d) 結晶化なし（スコア 0）。丸い構造は、気泡である。スコアリングの説明については、項 A5.3.3 を参照のこと。



Comment: 不妊に対し大切な診断の一部として精子-子宮頸管粘液相互の作用を評価することは重要である。異常な精子-子宮頸管粘液相互作用の観察は、人工授精や生殖補助医療のために必要なことである。

A5.2 子宮頸管粘液の採取と保存

A5.2.1 採取手順

膣鏡で頸部を露出させて、綿棒で頸管外口をやさしくふきとり、膣の汚染物質を外に取り除く。消毒綿か、または、鉗子で頸管粘液を取り除く。次いで頸管粘液を頸管内から粘液採取用注射器、ツベルクリン注射器（針なし）、ピペットまたはポリエチレン・チューブで吸引して頸管粘液を採取する。吸引圧は採取装置により標準化されるべきだと考えられる。吸引する前に、子宮頸管口におよそ 1cm 装置の先端を入れて、それから、装置で吸引を継続する。装置が子宮頸管口のから完全に粘液を吸引する直前に、吸引圧を止める。装置を子宮頸管口から取り外す。採取した粘液内に気泡や膣内容物が混じらないようにカテーテルを締め合わせるのが得策である。可能な限り、粘液の品質は採取直後に評価すべきである。もし、採取直後の検査が不可能であれば、それがテストされるまで、粘液は保存すべきである（A5.2.2 参照）。

頸管粘液が月経中期以外の時期で集められることになっているとき、その粘液量は採取前、7-10日間、毎日20-80 μ gのエチニルエストラジオールの投与によって増大させることができる。この方法は水量を増すことで、より粘稠性を低めた粘液分泌物を生じさせられる(Eggert-Kruse et al., 1989)。この方法は生体外で精子-粘液相互作用を評価することに役立つかもしれないが、ホルモンが投与されない時の夫婦の体内状況を必ずしも反映するというわけではない。

A5.2.2 保管と保存

粘液は、本来の採取容器であれ、小試験管であれ脱水を避けるために栓とかシールして密封保管することができる。注意は、貯蔵容器で空域を最小限にとどめることである。サンプルは、冷蔵庫(4°C)で保存し最高5日間までである。できれば、粘液サンプルは2日以内に使用すべきである。つまり、採取と使用までの期間は、常に注意されなければならない。流動学的試験や精子進入試験には、凍結・融解した粘液サンプルを用いるべきではない。

A5.3 子宮頸管粘液の評価

頸管粘液の特性の評価は、牽糸性、シダ状結晶形成(結晶化)、粘性とpHの評価を含んでいる。附録6は、スコアリングやサンプル書式が掲載されている。頸管粘液特性評価はInsler et al., (1972)の提案に基づきMoghissi (1976)によって考案された。スコアは、採取された粘液量(A5.3.1 参照)と4項目の変化(A5.3.2~A5.3.5 参照)を基にしている。粘液のpHは総頸管粘液スコアに含まれていないが、精子粘液相互作用の重要な決定因子として測られなければならない(Eggert-Kruse et al., 1993)。最大のスコアは15である。得点10を超えるスコアは、通常精子進入を支持している良い頸管粘液を示している;10未満のスコアは、頸管粘液が精子進入にとって好ましくない状態を意味している。

A5.3.1 量

粘液の粘稠度が正確な測定値を難しくしている。直径の分かっているカテーテル管内の粘液の長さから推定される(Box A5.1 参照)。

Box A5.1 採取された粘液の容積を決定する方法

準備された粘液(V、 μ L = mm^3)の容積は、粘液を含んでいる長さ(L、mm)と管(A、 mm^2)の断面積を乗ずることによって得られる： $V = A \times L$ 。断面積 $A = \pi r^2$ 、 π がほぼ3.142、またrは管の半径である。しかるに、2mmの直径管($= 3.142 \times 1 \times 1 = 3.142$ の mm^2)の粘液の10cm(100mm)の長さの場合、 $A \times L = 3.142 \times 100 = 314 \text{ mm}^3 = 314 \mu\text{L}$ または0.31mLの容積となる。

量は、以下の通りにスコアされる：

0 = 0mL

1 = 0.01-0.10 mL またはおよそ 0.1mL

2 = 0.11-0.29 mL またはおよそ 0.2mL

3 = >0.3mL またはおよそ 0.3mL 以上

A5.3.2 粘性（濃度）

頸管粘液の粘性は、精子進入に影響を与えている最も重要な要因である。精子移動に対する抵抗が月経中期の頸管粘液ではほとんどないものの、黄体期に観察される粘稠性粘液は驚くべきバリアをつくる。

粘性は、以下の通りにスコアされる：

0 =濃い、非常に粘着性、月経前粘液

1 =中間程度の粘性粘液

2 =少し粘着性粘液

3 =水様性、最小の粘稠性、月経中期（排卵前）粘液

A5.3.3 シダ状結晶形成

シダ状結晶形成（図 A5.1 参照）は、スライドガラス上で空気乾燥された頸管粘液の検査によってスコア化される。標本上ではいろいろな結晶化したシダ状のパターンが見られる。粘液の構成に従い、「シダ」は一次幹だけに止まらせるかもしれないし、あるいは、幹は一度、二度、三度と分岐し、二次幹、三次幹、四次幹を作り出している。資料標本は周囲数か所を観察されなければならない。試料に特有であるシダ状結晶形成は最も高い程度のスコアで表される。シダ状結晶形成は標本の厚みと存在する細胞の数に応じて非常に変化することがありうる。標本にはシダ状結晶形成の複数のステージが出現したり、時々、すべてのステージが 1 つの標本上で見つかることもある。

シダ状結晶形成は、以下の通りにスコアされる：

0 =結晶化なし

1 =型にはまらないシダ構造

2 =一次と二次幹シダ状結晶形成

3 =三次で四次幹シダ状結晶形成

A5.3.4 牽糸性

1 滴の子宮頸管粘液を顕微鏡スライドに置いて、カバーガラスでそれに接触させるか、もしくは、第 2 のスライドガラスを斜め方向にあてて、穏やかに、カバーガラスまたは第 2 のスライドガラスを持ち上げる。頸管粘液糸が 2 つの表面の間で伸びた長さを評価する。

牽糸性は、以下の通りにスコアされる：

0 = <1cm

1 = 1.4cm

2 = 5.8cm

3 = 9cm か、それ以上

A5.3.5 細胞充実性

すべての細胞数が細胞数 / μL で表現されるということが推奨されている。頸管粘液の白血球と他の細胞を評価することは、伝統的に強力な顕微鏡（HPF）の視野当たりカウントされることに基づいている（Box A5.2 参照）。

Box 5.2 量はHPF により視野当たり100 μm の深さの粘液で観察される

粘液の容積は各々の HPF で観察されるは視野（ πr^2 、 π がほぼ 3.142。r は管の半径）とチャンバーの深さ（100 μm ）に依存する。顕微鏡の視野の直径はステージマイクロメーターで計ることができる。もしくは、対物レンズの倍率と接眼レンズの開口の目盛から計算することができる。

x 40 対物レンズと x10 接眼レンズで開口 20mm の場合、顕微鏡の視野はおよそ 500 の μm （20mm / 40）の直径を持つ。この場合、 $r = 250\mu\text{m}$ 、 $r^2 = 62,500\mu\text{m}^2$ 、 $\pi r^2 = 196,375\mu\text{m}^2$ で容積は $19,637,500\mu\text{m}^3$ またはおよそ 20nL である。

しかるに、視野当たり 10 の細胞数のカウントは 20nL 当たり 10 の細胞、または μL 当たり 500 の細胞数にほぼ等しい。数えられる細胞の数が低い場合は、サンプリングエラーは高くなる;10 の細胞を反復カウントはサンプリングエラー22%である（表 2.2 参照）。それゆえ、その量は μL 当たり 280~720 の細胞数になる。

細胞のためのスコア範囲は、以下の通りである：

0 = >20 細胞 / 1 視野、または >1000 細胞 / $1\mu\text{L}$

1 = 11-20 細胞 / 1 視野、または 501-1000 細胞 / $1\mu\text{L}$

2 = 1-10 細胞 / 1 視野、または 1-500 細胞 / $1\mu\text{L}$

3 = 0 細胞

A5.3.6 pH

子宮頸管内からの粘液 pH は pH 紙、範囲 6.0-10.0、を用いて採取後直ぐに粘液の一部を測定すべきである。もし一部を測定するとき、注意点は頸管外にある粘液と接触を避けなければならない。なぜなら頸管外の粘液の pH は頸管内のものより低い（より酸性の）ためである。また、膣の分泌物も pH が低いため避けなければならない。精子は、頸管粘液の pH の変化に影響されやすい。酸性の粘液は精子を不動にさせ、一方、アルカリ性の粘液は運動性を高める可能性がある。

頸管粘液の過度のアルカリ度（pH 8.5 を超える）は、精子の生存能力に悪影響を与えるかもしれない。頸管粘液の精子移動と生存のための最適 pH 値は 7.0 と 8.5 の間にある。それは月経中期頸管粘液の通常 pH 範囲で、6.0 と 7.0 の間の pH 値が精子進入と適合性を持つかもしれないが、運動性は pH 6.5 以下でしばしば弱まる。粘液の pH が 7.0 以下にあるならば、精子-頸管粘液相互作用試験はほとんど実施されない。

場合によっては、頸管粘液がかなりより酸性になっていることがあるかもしれない。これは、異常な分泌物、細菌感染症の存在または膣液の混入より起こることがある。

References

- Eggert-Kruse W et al. (1989) . Prognostic value of in-vitro sperm penetration into hormonally standardized human cervical mucus. *Fertility and Sterility*, 51:317–323.
- Eggert-Kruse W et al. (1993) . The pH as an important determinant of sperm–mucus interaction. *Fertility and Sterility*, 59:617–628.
- Insler V et al. (1972) . The cervical score. A simple semiquantitative method for monitoring of the menstrual cycle. *International Journal of Gynaecology and Obstetrics*, 10:223–228.
- Moghissi KS (1976) Postcoital test: physiological basis, technique and interpretation. *Fertility and Sterility*, 27:117–129.

付録 6 液及び頸管粘液検査のための記録用紙

A6.1 精液検査記録用紙のテンプレート

モデルとしてこのサンプル記録フォームを提示する。

このマニュアルに記載してある方法を用いた精液検査時に観察結果の記録ができる。初回の検査結果（例えば、1回の射精精液あたりのペルオキシダーゼ陽性細胞総数）と組み合わせることにより、導関変数のデーターを得ることが可能となる。研究目的として使用した場合、検体記録用紙からのデーターはコンピューターのデーターベースに入力することができ、さまざまな導関変数を計算できる

記録用紙は、異なる日時に実施した結果を記録できるように複数のコラムがある。これは連続して精液サンプルの結果を表示できる便利な方法である。記録フォームの一部の余白には、追加コメントや観察情報が記録できるため便利である。基準値とその他のコンセンサスな閾値は、四角のカッコ内で表わされる（付録 1, 表 1.1 と注釈を参照）。

名前
Code
日付 (日 / 月 / 年)
採取 (1、ラボラトリー、2、自宅)
採取時間 (時 分)
検体提出時間 (時 分)
検査開始時間 (時 分)
患者
禁欲期間 (日)
薬物療法 (投薬)
採取の困難性
精液
処置法 (例えば、プロメライン)
完全回収? (1. 全量、2. 不完全)
外観 (1. 正常、2. 異常)
粘性 (1. 正常、2. 異常)
液化 (1. 正常、2. 異常) (分)
接着 (凝集性) (1-4, A-E)
pH (≥ 7.2)
精液量 (mL)
精子
全精子数 (10^6 / 採精) (≥ 39)
精子濃度 (10^6 / mL) (≥ 15)
奇形 (%) 400 精子数カウントできない場合
生存 (%) 生存精子 (≥ 58)
全運動精子 前進運動精子+非前進精子 (%) (≥ 40)
前進運動精子 (%) (≥ 32)
非前進精子 (%)
不動精子 (%)
正常形態 (%) (≥ 4)
頭部異常 (%)
頸部異常 (%)
複数異常 (%)
細胞質残塊 (%)
免疫グロブリン G 抗精子抗体テスト (3 or 10 分) (< 50)
免疫グロブリン A 抗精子抗体テスト (3 or 10 分) (< 50)
免疫グロブリン G イムノビーズテスト (% with beads) (< 50)
免疫グロブリン A イムノビーズテスト (% with beads) (< 50)
精子以外の細胞

ペルオキシダーゼ陽性細胞数 ($10^6 / \text{mL}$) (<1.0)

副生殖腺機能

亜鉛 ($\mu\text{mol} / \text{射精精子}$) (≥ 2.4)

フラクトース (果糖) ($\mu\text{mol} / \text{射精精子}$) (≥ 13)

α -グルコシラーゼ ($\text{mU} / \text{射精精子}$) (≥ 20)

検査担当者サイン

A6.2 頸管粘液記録用紙のテンプレート

氏名

Code

最終月経からの初診日（日 / 月 / 年）

頸管粘液スコアー

日付（日 / 月 / 年）

周期

粘液量（0, 1, 2, 3）

粘性（0, 1, 2, 3）

羊歯状結晶形成（0, 1, 2, 3）

牽糸性（0, 1, 2, 3）

細胞型（0, 1, 2, 3）

合計スコアー（max 15）

pH

性交後検査（フーナーテスト）

日付（日 / 月 / 年）

性交後の時間

Vaginal pool

Endocervical
pool精子濃度（精子/ μ l）

精子運動性

前進運動精子（%）

非前進精子（%）

不動精子（%）

検査担当者サイン

付録 7 サンプル誤差とクオリティーコントロール

A7.1 精子濃度測定時の誤差

A7.1.1 カウント評価での誤差

精子濃度を測定する場合、ある一定の倍率で希釈された精子は計算盤を用いて測定する。しかしながら、一回の測定では正確性に欠ける。この正確性は信頼区間と定義され、信頼区間とは正確な値を含む特定の確率（信頼度係数）で示す。最も一般的に使用されているのが **0.95** である。その値を、**95%信頼水準（信頼係数）** と呼ばれ、この値の信頼限界は **95%** である（Armitage et al., 2002）。

精子を任意に計算盤に分配して測定した場合、特定の量における精子数は測定した数と等しい分散であるポアソン分布に従う。総数（**N**）の標準誤差（**SE**）は、総数（**N**）の平方根（ $\sqrt{N}$ ）であり、標本誤差（**%SE**）は $100 \times (\sqrt{N}/N)$ と **95%信頼区間（CI）** で、概算 $N \pm 1.96 \times SE$ （もしくは $N \pm \text{約 } 2 \times SE$ ）で示される。

Note: これらの値は近似値であり、測定に関する信頼限界値は常に対称ではない。ポアソン分布の特性に基づく **95%の正確な95%信頼区間は400のカウントの場合 361.76~441.21、100カウントの場合81.36~121.66、10のカウントの場合4.80~18.39、カウント1の場合0.025~5.572、および0の場合0.0~3.7である。**

A7.1.2 反復計測間での一致

精液を混合したとしても両方に均一に精子が分配されるため、精液サンプルを別々の希釈で測定した反復計測が推奨される（2.4.1 参照）。1回希釈した精液を同じチャンバーで2回計測するのと、2枚のチャンバーを準備してそれぞれを測定するのでは、正確には同じ反復計測にはならない。これは、検体準備や測定するための混合や希釈での誤差を考慮していないからである。

独立した計測における測定値の違いは **0** であることが期待されますが、標準誤差は2回の測定値の合計の平方根と同じである。それゆえ、 $z = (N1 - N2) / \sqrt{(N1 + N2)}$ が **1.96** 未満であるべきであり、**1.96** 未満の場合測定値は正確である。もし **1.96** より大きい場合は、再度測定を行う。図. A7.1 に $N1 - N2$ の許容範囲を示している。

例えば、異なる2回の測定における **200** 精子（合計 **400**）の平均値が **39** よりも大きい場合、2つの測定値は1回あたり **180.5** ($200 - 19.5$) と **219.5** ($200 + 19.5$) である。

図. A7.1 の要約が表 A7.1 に示してある。反復測定値の許容範囲の評価に役立つ（2.8.3 と 2.11 参照）。

通常の精子測定において、少なくとも反復して 200 個以上の精子を測定することを推奨する。そして全体で 400 個以上の精子を測定することにより、標本誤差は 5%未満になる（表 2.2 参照）。精子数が少ない場合には、標本誤差が大きくなることは避けられない（2.11 と 2.11.2 参照）、このような症例の場合には、測定した精子数（表 2.2 参照）における標本誤差を記載しておくべきである。

図 A7.1 総精子数評価における 2 回測定による数値の差の許容範囲

実線は chance alone による、反復測定間での測定値の最大相違値を示している

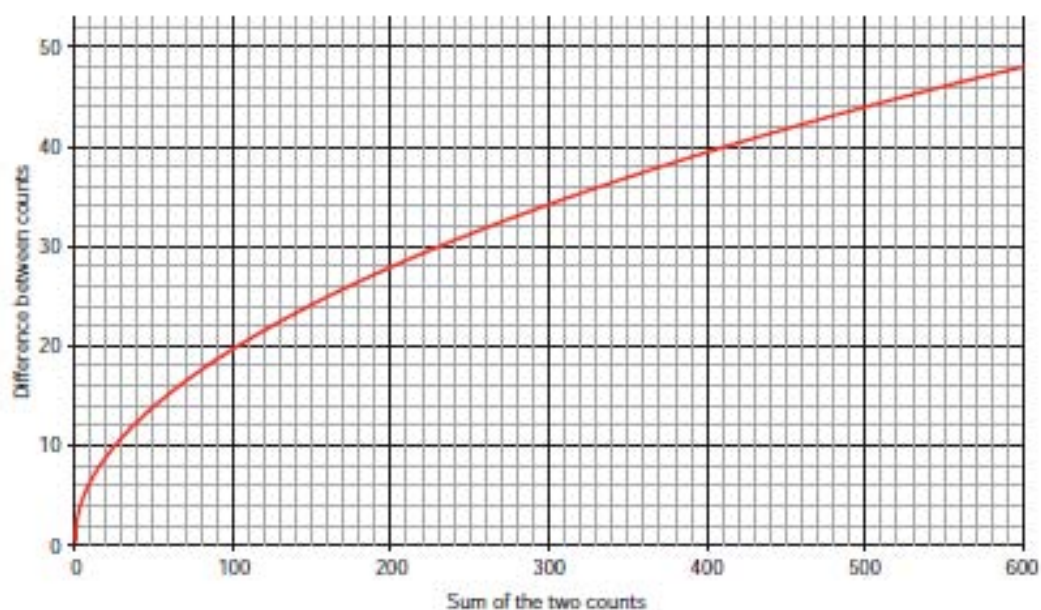


表 A7.1 2 回の反復測定値の総数の違いの許容範囲

合計	許容差*	総和	許容差*	総和	許容差*
35-40	12	144-156	24	329-346	36
41-47	13	157-169	25	347-366	37
48-54	14	170-182	26	367-385	38
55-62	15	183-196	27	386-406	39
63-70	16	197-211	28	407-426	40
71-79	17	212-226	29	427-448	41
80-89	18	227-242	30	449-470	42
90-98	19	243-258	31	471-492	43
99-109	20	259-274	32	493-515	44
110-120	21	275-292	33	516-538	45
121-131	22	293-309	34	539-562	46
132-143	23	310-328	35	563-587	47

*信頼区間 95%に基づく

A7.2 標本誤差の理解の重要性

このマニュアルでは十分な精子数の測定と反復した評価により正確な範囲内の数値が得られることを強調したい。これらの過程は、精子濃度や総精子数の測定値をより正確な値（正確には不明確である）を得るためには必要であるからである。ごく少量の精子を測定した場合には、精子濃度は不正確な値として算出される。少なくとも 400 個以上の精子数を測定できなかった場合には、記録用紙にその状況と誤差も含んでいることを記載しておくべきである（表 2.2 参照）。

精度は、一度に多くの精子を乗せることができるグリッドがある深い計算盤を用いて測定する方が、少ない精子しか乗せることができないグリッドがある浅い計算盤で測定するよりも高い。測定を容易にするには、非運動精子と重ならないように検体を十分に希釈してから測定することである。

以下の例は精子数が少ない検体を扱った際に正確な測定値を得るための計算盤の違いについて表記する。

1mm×1mm のグリッドがある小さいチャンバー内を希釈していない精子で満たした場合：

- 1mL あたり 1×10^6 個の精子濃度の場合、1μL あたり 1,000 個の精子、1nL あたり 1 個の精子数となる。
- 1mm×1mm のグリッドで 10μm の深さがある場合、10nL あたり 10 個の精子数となる。
- 10 個の精子を測定した場合の誤差は 32%であり、95%信頼区間では $10 \pm 1.96 \times \sqrt{N}$ ($=10 \pm 6.2$)（表 2.2 参照）。
- 全量 10nL では、この大きな信頼区間では精子数 4 個（10 個-6 個）から精子数 16 個（10+6）の範囲が正常な数値の範囲となる。
- これを精液 1mL に計算すると 40 万から 160 万の精子数の評価となる。
- 実際には、50μL あたり 2 万から 8 万個の精子を含んでいる計算となる。
- 20nL のボリュームで 2 回の反復測定を行い、20 個の精子を観察した場合の換算値をもとめると、22%の標本誤差があり信頼区間は 20 ± 8.8 、実際の測定値は 11 個（20 個-9 個）もしくは 29 個（20 個+9 個）となる。1mL に換算すると 55 万から 145 万個の精子数となる。これを 50μL に約分すると 2 万 7,500 個から 7 万 2,500 個になる。

9 個の 1mm×1mm のグリッドがある大きい計算盤内を 1:1 に希釈した精子で満たした場合：

- 1mL あたり 1×10^6 個の精子がいる検体の場合、1:1 の希釈精液を作成（2.8 参照）した場合、1mL あたりの精子数は 50 万個、1 μ L あたりでは 500 個、1nL あたりでは 0.5 個となる。
- いくつかの 1mm×1mm のグリッドがあり、深さが 100 μ m の計算盤（1 グリッドあたり 100nL）を用いた場合、4 グリッド（400nL）に 200 個、2 回繰り返すことにより 400 個（800nL）の精子が存在する。
- 400 個の精子を測定した場合の標本誤差は 5% で 95% 信頼区間では $400 \pm 1.96\sqrt{N}$ ($=400 \pm 39$) となる（表 2.2 参照）。
- この信頼区間は、1:1 に希釈した精液の 800nL の全量で 360 個（400 個-40 個）から 440 個（400 個+40 個）となる。
- それゆえ、希釈していない精液に計算すると、1mL あたり 90 万から 110 万個の精子数となる。
- 実際には、これは 50 μ L 中に 4 万 5,000 個から 5 万 5,000 個の精子が存在することになる。

A7.3 パーセントの測定による誤差

A7.3.1 パーセントを算定することによる誤差

精子を 2 種類に分類する（正常形態と異常形態、運動精子と不動精子、生存精子と死滅精子、先体反応陽性と先体反応陰性、透明帯除去ハムスター卵子への接着能陽性と陰性など）場合、パーセントは 2 項分布に従う。この分布では、評価されたパーセント（P）の標準誤差は精子数（N）と同様に各分類精子数の正確性に依存する。標準誤差は $\sqrt{p(100-p)/N}$ で表わされ、信頼区間は正規分布で近似値される。これは、20～80% の範囲で良好な近似値となる。

- 100 個の精子を測定し、正常形態の割合が 20% の場合、正常値としての正常形態の標準誤差は、 $\sqrt{20(100-20)/100} = \sqrt{(20 \times 80)/100} = \sqrt{1600/100} = 4\%$ となる。この 95% 信頼区間では、 $\pm 1.96 \times 4\%$ もしくは $\pm 7.8\%$ であり、対応する信頼区間は 12.2-27.8% である。
- 200 個の精子を測定した場合には、標準誤差は $\sqrt{20(100-20)/200} = \sqrt{(20 \times 80)/200} = \sqrt{1600/200} = 2.8\%$ となる。95% の信頼区間では $\pm 1.96 \times 2.8\%$ もしくは $\pm 5.5\%$ である。

あり、対応する信頼区間は 14.5-25.5%である。

- 400 個の精子を測定した場合には、標準誤差は $\sqrt{20(100-20)/400} = \sqrt{(20 \times 80)/400} = \sqrt{(1600/400)} = 2.0\%$ となる。95%での信頼区間では $\pm 1.96 \times 2.0\%$ もしくは $\pm 3.9\%$ であり、対応する信頼区間は 16.1-23.9%である。

20-80%の範囲外では、より適切な方法として、角変換 (arc sin square root) $z = \sin^{-1} \sqrt{p/100}$ を用いる。これは $z = 1/(2\sqrt{N})$ で表わす標準偏差を特性に持ち精子数に依存する。真のパーセントではない。代替の手段は、数個の広く利用可能な統計ソフトウェアパッケージの 1 つを使用することで正確な二項式の信頼限界を計算される。

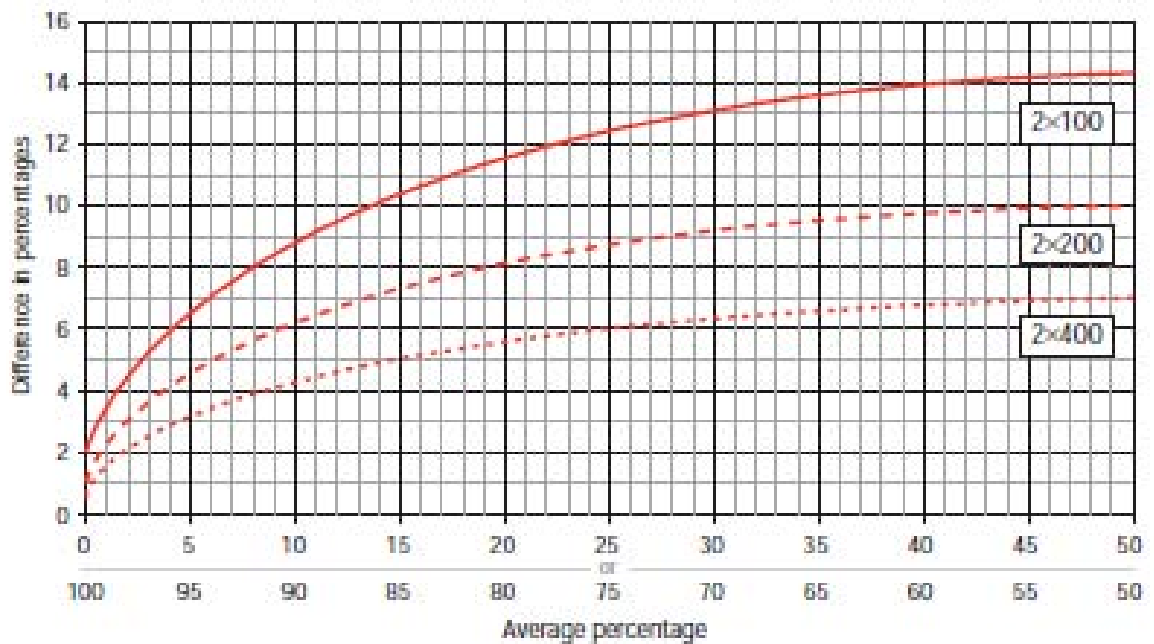
A7.3.2 重複測定間のパーセントの一致

すべてのサンプルで反復したパーセントの算出 (P_1 と P_2) を行い比較することが良い。予測相違値 d ($d = |P_1 - P_2|$) は $1.96 (\sqrt{2p(100-p)/N})$ $P = (P_1 + P_2)/2$ で表わす。独立した評価の相違は、パーセント評価に従属した標準誤差と測定した精子数の合計を用いると 0 と予測される。

図 7.2 に 200 個以下の精子数で反復して統計的誤差の評価を示した。これは 100 個、200 個、400 個 (全体として 200 個、400 個、800 個) を反復して測定したパーセントの 95%信頼範囲を示している。誤差は約 50%が対称であり、最大誤差が 50%、最小誤差が 0%と 100%である。

図 A7.2 2 回の反復測定によって得た百分率値間における許容誤差と測定した全精子数との関連性。

下図中の線は、それぞれ各測定において 100 個（2 回測定の合計で 200 個;実線表示）、200 個（2 回測定の合計で 400 個;真ん中の点線表示）、あるいは 400 個（2 回測定の合計で 800 個;最も下の点線表示）ずつの精子を計測した時に得られるパーセントにおける 95%信頼区間において起こると予測される誤差を示している。



反復測定間での許容範囲の誤差はこのグラフから読み取れる。全体で 200 個の精子（1 回あたり 100 個測定）した場合、5%（あるいは 95%）の水準で誤差が生じるとした場合、95%信頼区間では 6.6%の誤差が生じる。平均すると、同一検体を反復して測定した場合、20 回のうち 19 回は 2.42%から 9.00%内に存在する。20 回のうち 1 回は、この範囲に入らない数値となる。全体で 800 個の精子（1 回あたり 400 個）で考えてみると、5%（あるいは 95%）の水準で誤差が生じるとした場合、95%信頼区間以上であれば 3.1%で誤差が生じ、95%信頼区間では 3.1%から 7.6%存在する。同様に 400 個の精子（1 回あたり 200 個を繰り返した）の場合、20%（あるいは 80%）の真の 95%信頼限界値は 8.1%であり、上限が 24.3%で下限が 16.2%である。

表 A7.2, A7.3 と A7.4 はカウントした精子数が異なる場合に反復して測定した際に、算出したパーセントを得た場合の数値の許容範囲の誤差を示してある。

これは形態的正常性、運動性、生存性、先体反応誘起率などを反復計測により算出する際の評価として図 7.2 よりもより使いやすい。

表 A7.2 100 個の精子（全体として 200 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲

平均 (%)	相差*
0	2
1	3
2	4
3	5
4	6
5-6	7
7-9	8
10-12	9
13-15	10
16-19	11
20-25	12
26-33	13
34-66	14

平均 (%)	相差*
67-74	13
75-80	12
81-84	11
85-87	10
88-90	9
91-93	8
94-95	7
96	6
97	5
98	4
99	3
100	2

*信頼区間 95%に基づく

表 A7.3 200 個の精子（全体として 400 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲

平均 (%)	相差*
0	
1	
2	
3-4	
5-7	
8-11	
12-16	
17-23	
24-34	
35-65	

平均 (%)	相差*
66-76	
77-83	
84-88	
89-92	
93-95	
96-97	
98	
99	
100	

*信頼区間 95%に基づく

表 A7.4 400 個の精子（全体として 800 個）を反復して測定した場合に得られた平均によるパーセントの違いの許容範囲

平均 (%)	相差*	平均 (%)	相差*
0	0	70-81	6
1-3	2	82-88	5
4-6	3	89-93	4
7-11	4	94-96	3
12-18	5	97-99	2
19-30	6	100	0
31-69	7		

*信頼区間 95%に基づく

A7.4 品質管理（QC）のための精液標本の作製

品質管理用の標本の所見は、理想をいえば検査室内で実際に行われる精液検査でのごく一般的な結果とほぼ同じ範囲内にあることが望ましい。特に QC のために非常に少数の標本しか利用できない場合には、QC 標本の所見は検査室での典型的な所見を有していなくてはならない。例えば不妊治療施設の検査室の場合、臨床上重要となる範囲つまり精子濃度が $15 \sim 50 \times 10^6 / \text{mL}$ 、前進運動率が 30～50%、そして正常形態率が 5%未満程度の標本を選抜すべきである。

- いったんひとまとめにした上で分注した各標本は保護剤を添加した上で凍結あるいは冷蔵保存することができる。そして定期的に精子濃度測定用として利用することができる。
- 標本精液を凍結融解後に精子が十分に生存していなかったために、運動性や抗精子抗体検査を対象として施設内部、あるいは外部審査のための材料としては不適切な場合があるかもしれない。
- 精子運動性検査を目的とした QC には精子の動画を録画したビデオテープや CD、DVD などを利用することができる。
- 同様に精子の形態評価を目的とした QC には精子の画像を記録した写真やビデオテープ、CD や DVD などを利用することができる。
- 特にビデオ録画は精子の運動率や形態評価を行う訓練目的としては有益ではあるが、その利用はあくまでも補足的であるべきで、実際の精液標本の検査目的に代替利用されるべきではない。

- 染色された精液のスライド標本は精子の形態評価の品質管理に用いることができる。固定塗抹標本もある期間保存可能であり、染色品質の評価に利用できる。染色されたスライド標本は時間の経過に伴って徐々にその品質が劣化していくが、その劣化の進行は標本の固定や染色作業工程の精度に依存する。しかしながら、本マニュアルに記載してあるパパニコロー法で染色した上で、かつ室温下の暗所で保存された標本であれば数ヶ月か、場合によっては数年間保存可能である。
- 抗精子抗体陽性患者の血清はイムノビーズテスト間接法の品質管理試験に利用することができる。しかし、イムノビーズ直接法の品質管理試験への利用には適さない。

A7.5 精子運動性解析に対する施設内部品質監査を目的とした録画ビデオの制作手順

本手順書には技師が手作業で行う通常の精子運動性解析に対する品質監査を目的としたビデオ録画画像の製作方法について記載する。

- 動画の録画に際して、通常の運動率測定で複数視野を検査することを模して、最低 5 視野から多くて 10 視野分、かつ最低でも 400 個の精子を測定できる動画を録画する必要がある。
- 録画されたビデオには検査室における日常の検査でよく見受けられる様々な所見の検体をほぼ網羅した、あらゆる所見を有する複数検体分の精子動画が記録されていないといけない。
- 上記のとおり、ビデオテープには通常の場合、ただ単に幾つかの異なる所見の精液標本それぞれにおいて 5 視野分の精子の運動動画が記録されてさえいればよいわけだが、特殊な状況の場合、例えば異なる検査室間での品質の標準化や複数施設における研究を実施する場合などにはさらに複雑な精子運動の録画が必要となることもある。このような場合ではより多くの精液標本を用い、さらに録画されたテープ全般にわたって精子運動の動画が反復して録画されていないといけない。同一標本の精子動画の反復再生によって異なる検査技師間における検査精度を評価することができる。

A7.5.1 付加的な設備

検査室には日常の精子運動性検査に必要な備品に加え、検査精度の品質管理を行うための録画装置の整備が必要である：

- ビデオ録画装置、あるいは CD-RW または DVD-RW ドライブを備えたコンピューター；
- 録画した動画を識別するための認識記号を記すための機材。表面に数字が刻印されたスライド（イギリス式ファインダー）やタイムコードジェネレータなど。

A7.5.2 操作手順

- もしも複数の精液検体が利用可能な場合、途中で区切ることなく必要分の精子の運動動画を一括して録画することができる。それが不可能な場合には各々の精液検体について、利用可能になる度毎に録画していてもよい。
- もし通常の精液検査が室温下で実施されているのであれば、動画の録画も同じく室温下で行わなくてはならない。同様に、もしも精子の運動性検査が通常、**37°C**の条件下で実施されているのであれば、精子運動の動画録画も同じく **37°C**の条件下で行われなくてはならない。

Note: もしも録画を**37°C**の条件下で実施する場合、顕微鏡ステージの加温盤は録画開始の少なくとも**10分**以上前に電源を入れて温度が**37°C**付近で安定していることを確認しなくてはならない。

- あらかじめ異なるそれぞれの精液検体において合計 **400** 個の精子を測定するために必要な視野分の動画を録画しなくてはならない。
- 精子濃度の低い精液検体では、十分な数の精子に対して評価を行うために **10** 視野分以上の動画を録画する必要がある。**10** 視野分の動画を録画するためには数分の時間を要する。
- 動画の録画は精子運動性測定に一般的なスライドグラスとカバーグラスを用いた場合か、あるいは深さが **20μm** に固定された専用計算盤を用いた場合に実施することができる。

Note 1: もしも使い捨てタイプの精子計算盤を用いると、一般的なスライドグラスとカバーグラスを用いた場合と比較して精子の運動性はより長時間安定的に保たれる。この専用計算盤を用いれば、同一標本において**10**視野、あるいはそれ以上の視野分の動画を録画可能となる。

Note 2: 一般的なスライドグラスとカバーグラスを用いるならば、動画録画中の径時的な運動性の著しい衰退を避けるために複数枚の標本を使用する必要がある。

- 大体どの精液検体でも、運動率測定結果にいくらかはばらつきがあることを心得ておかなければならない。
- ビデオ録画に当たって、各々の精液検体には独自の認識記号をあてはめなくてはならない。認識記号の付し方はただ単にそれぞれの検体単位で行う方法よりも、それぞれの検体別に、かつ顕微鏡下の別々の視野毎に付して管理する方法の方がより望ましい。例えば、最初に述べた単純な検体別の認識記号の付し方では、ある検体に対して検査開始の冒頭に一つ認識記号を付けると、次に全く別の精液検体が登場するまでその記号が変わることはない。一方、より詳細な認識記号の付し方では同一検体においても測定視野毎に別の認識記号がつけられる。例えば、最初の検体の測定における最初の視野動画に対して **01-01**、その検体の測定における 2 番目の視野動画に対しては **01-02** などといったように記号を付すのが望ましい。このように、より具体的な認識記号つけによって各技師がどの検体のどの視野を測定しているのか追跡できるようになる。

Note 1: ビデオ録画にあたり、視野が変わる毎に、または検査検体が変わる毎に短時間の無録画領域を確保すると便利である。それによって検査を行っている技師が新たな視野、または検体の動画再生が始まることを認識できるからである。

Note 2: 録画の際に節目毎に無録画領域を確保するための非常に単純な方法として顕微鏡の光源を何かで覆って、光を遮断してやればよい。

Note 3: 記録を遮断する方法はビデオ録画を一時停止する際にも活用できる。また、録画を一時的に停止する際、ビデオデッキの“停止”ボタンではなく“一時停止”ボタンを押すべきである。それというのも“停止”ボタンを押すとノイズなど録画映像の乱れの発生原因になりうるからである。

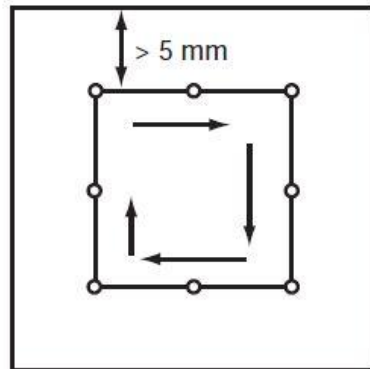
- 検査検体の画像を録画するに当たって、それと同一の倍率下で約 10 秒間、顕微鏡ステージ用測微計の画像を録画する。倍率を一致させることで通常の顕微鏡を用いた測定を忠実に反映する画像をテレビモニター上に映しだすことができる。測微計の画像を利用することで一定の倍率の下で常に変わらず安定した録画が可能となる。また、この測微計の録画画像はテレビモニター上に重ねて使う酢酸アセテート製の自家製格子目盛りや **CASA** の精度校正に利用できる。
- 最初の検体の認識記号を約 5～7 秒間録画する。予定時間経過時点で、目印代わりとして一旦顕微鏡の光源を遮断して約 3 秒間黒い無画像状態を録画し、そこで録画を一時停止する。
- 録画を開始する精液検体が最初に録画されるべき正しい検体であることを確認する。十分に攪拌された精液から **10 μ L** 採取してスライドグラス上に載せ、**22mm** 四方のカバーグラスを被せる。または深さが一定している専用検査盤を用いる場合に

はその隙間に 7 μ L の精液を流し込む。検体の受動的な流れが止まり、動きが落ち着くまで数秒間（必要に応じて 37°C の温度下にて）静置しておく。図 A7.3 に示す方法に従って 10 視野（あるいはそれ以上）分の動画を録画する。CASA に対する品質管理を実施する場合には、検体の精子濃度が 50×10^6 / mL を超えてはならない。もしもそれ以上に精子濃度が濃い場合には同一精液検体由来の精漿を用いて希釈しなくてはならない（3.5.2 項参照）。

- スライド標本または計算盤の左上付近で、かつ辺縁から 5mm 以上内側あたりから最初の視野を決める。その視野を顕微鏡のステージを静止させ、なるべく同じ状態を持続させながら 15 秒間録画する。15 秒経過後、3 秒間の無画像時間を置いた後に録画を一時停止する。もし各検体において視野別に認識記号で識別する場合、この時点で認識記号を変え、その認識記号のみの映像を約 5～7 秒間撮影する。
- 図 A7.3 に示す方式に従ってカバースライドまたは計算盤上に 2 番目の視野を定め、その視野を 15 秒間録画する。そこで再び、3 秒間の無画像時間を置いて一旦録画を一時停止し、もし必要であれば 3 番目の視野用に認識記号を変える。このようなやり方で合計 400 個の精子分（精子濃度によって 10 視野程度、あるいはそれ以上に及ぶこともある）の動画を録画する。最終の視野の録画を終えたのち、最後に 3 秒間の無画像時間を設けて録画を終える。
- 2 件目の検体を準備する。つぎに、その 2 番目の検査検体の認識記号を 5 ないし 7 秒間程度録画し、引き続き約 3 秒間の無画像時間を確保すること。
- 前述した要領で、2 件目の検体について 1 視野あたり 15 秒ずつで 10 視野分以上の動画を、視野が変わる毎に空白の間隔をはさみながら録画し、最終視野の録画終了後に、再び空白の無画像時間を設けておく。
- この録画作業工程を必要な検査検体分を確保できるまで反復して繰り返す。

図 A7.3 精子の運動性を測定するための参考

最低でもカバーガラスの辺縁から 5mm 以上内側部位における精子運動性を録画したビデオ動画視野における体系的な検鏡法



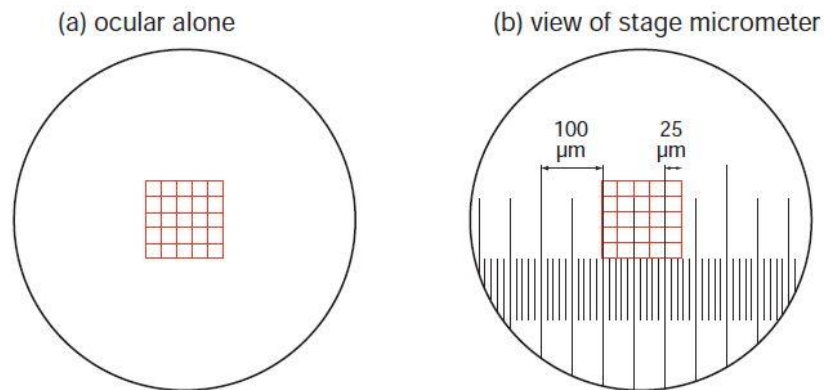
Note: より複雑な施設内品質管理のための精子動画が必要になった場合、2台目の録画用ビデオデッキか、特殊なビデオ編集用ソフトがインストールされたコンピューターが必要となる。この場合、後になって各視野の動画の識別ができるよう工夫しながら、各検体の動画を別々に録画する。この際、録画に際して検体の反復撮影によって変更されてしまうので、検体の認識記号は録画してはいけない。もしもビデオ編集用ソフトがインストールされたコンピューターが使用可能な場合、各検査検体の動画画像をデジタル化し、いくつかの動画を組み合わせてDVDを作製することができる。

A7.5.3 ビデオ録画された動画による精液検査

- 下記に示す要領にて、酢酸エステル製シートに格子目盛りを書き写し、それをテレビモニター上に貼り付けて録画した精子動画を元に検査を実施する。この方法によって、通常の検査時に用いられる接眼レンズに内蔵された格子目盛りを用いた測定法を模倣することができる（図 A7.4a 参照）。

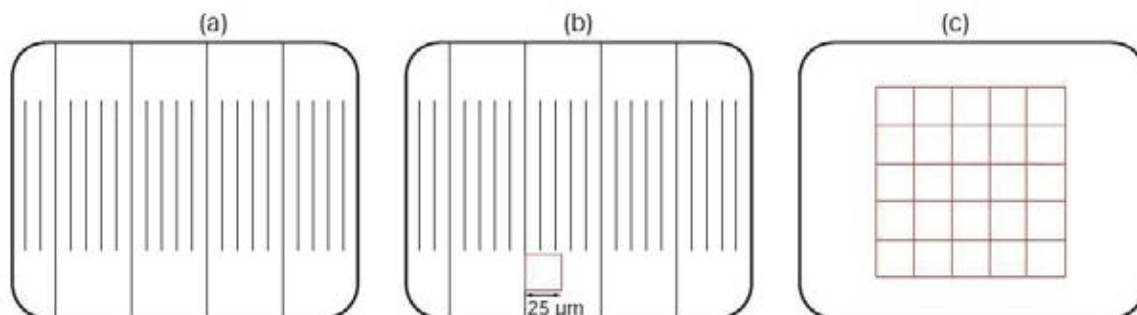
図 A7.4 顕微鏡を覗いた時の接眼レンズ内の格子目盛り（赤色目盛り）の見え方

(a) 格子目盛りのみ、(b) 測微計と格子目盛り



- 測微計を通常、精子運動率を測定するときと同じ倍率に設定した顕微鏡のステージ上に置く。格子目盛りを備えた接眼レンズを通して覗くと（図 A7.4 参照）、測微計を利用して格子目盛りの各部位の長さを測定できる。ここに示す例では、接眼レンズの格子目盛りは一边が $125\mu\text{m}$ 四方で、格子を構成する小四角形の一边が $25\mu\text{m}$ 四方である（図 A7.4b 参照）。これらの測定は慎重に行うこと。
- 録画した画像をテレビモニター上で再生し、測微計の画像が映し出された時点でビデオを一時停止する（図 A7.5a 参照）。
- 酢酸エステル製のシートをテレビモニター上に貼り付け、上に示した要領で接眼レンズ内の格子目盛りの一四方の大きさをそのシート上に書き写す（図 A7.5b）。
- 同じ要領で接眼レンズ内の格子目盛り全体（25 四方）分の画像を書き写す（図 A7.5c）。
- ビデオ録画した精子の動画を解析するに当たって、格子目盛りを写し取った酢酸エステル製シートをしっかりとテレビモニター上に貼り付けること。運動率測定は貼り付けられた格子目盛りのうち、もっとも一般的に利用される部分で実施すること。例えば、上部 2 列目部分での計測、あるいは上下両端を除いて中心 3 列分での計測などである。
- 録画されている各分割動画あたり 200 個分の精子の測定を繰り返しながら、その結果を記録していく。

図 A7.5 ビデオテープに録画され、モニター上に表示された測微計の画像とその画像上への補足図描写；説明文参照



A7.6 精子濃度決定における施設内部品質管理のための希釈精液の調整

A7.6.1 一般的に考慮すべき事項

- 精液中の精子濃度検査における各手順の精度は、検査室で希釈後に保管された精液標本を用いて監視できる。
- IQC サンプルは、通常、検査室での精液検査において正常範囲とみなされている所見の検体であることが望ましい。
- 保護剤で精液を希釈し、保存用小瓶に均等に分注する。これらの標本は冷蔵保存が可能であり、時間を置いた後にでも精子数算定に用いることができる。
- 同一検体から作成された各分注瓶の中の精子濃度が確実に均一になるよう、精子懸濁液を作成する際には検体を十分に混和するよう留意しなくてはならない。このように高精度の IQC サンプルを作成することで、そのサンプルを用いての精子濃度算定における結果のばらつきが各人の算定の手順における問題によるものであると明確に断言することができる。
- 血球計算盤を使用して精子濃度を評価する前に、もう一度保存された IQC サンプルを希釈する。検査室での日常業務として検査に用いられた検体の中で最も新しい希釈精液を用いること。それによって精液検体中に見られる残渣や精子以外の細胞の状態を日常の精液検査の時とほぼ同様に再現することができる。例えば、もし、精液があらかじめ保護剤で等倍希釈されている場合、培養液で 1:10 に 10 倍希釈した場合には、実際には 20 倍希釈されたことになる。
- 低濃度の精子を有する保存サンプルを作成したい場合、高濃度の精子を有する精液検体を希釈して作成するのではなく、元々精子濃度の低い検体を用いて作成を試み

る方が望ましい。なぜならば、検査において検体中に見られる残渣などの混入物の状況を日常の検査業務の時とほぼ同じ状態にすることができるからである。

- **Swim-up** 調整精子は、通常検査でみられる残骸や、遊離した頭部、細胞断片数は少ない。従ってそのようなサンプルは、同じく調整された精子上清の算定における IQC サンプルとして用いることが最良である。
- 一度の IQC において準備される精子懸濁液の数は技師の人数と検査回数に依存する。
- 冷蔵庫内で保存された希釈精液は少なくとも 4 カ月間安定している。

A7.6.2 試薬

以下の 3 つの保存剤のいずれかが使用される：

- ホルマリン: 10% (v/v) ホルムアルデヒド。 27mL の純水に、37% (v/v) ホルムアルデヒドを 10mL 加える。
- Azide (Jørgensen et al., 2001) : 3mol / l のアジ化ナトリウム (NaN_3)。 19.5g の NaN_3 を純水 100mL に入れて溶かす。
- 凝集保護溶液 (APSiS) (Brazil et al., 2004) 。 100mL の純水に、1.0g のウシ血清アルブミン (BSA)、2.0g のポリビニールピロリドン (PVP)、0.90g の塩化ナトリウム (NaCl)、0.1mL の洗剤トリトン X-100、0.004mL のシリコン消泡剤と 0.10g のアジ化ナトリウムを加える。完全に混和後、0.45 μm のフィルターで不純物を除去し 4°C で保存する。

Note: 殺菌剤であるアジ化ナトリウムは、無毒化溶液を作製するために APSiS から省くことができる。しかし、その溶液がもし汚染されたなら破棄すべきである。

A7.6.3 追加準備事項

精子濃度測定のために必要とされる日常的な備品以外に、QC サンプルの作成には以下に掲げるものが必要である：

- 凍結用小瓶あるいは小型チューブ。保存のためにぴったり蓋が閉まるもの。
- 耐久性マーカー。チューブにラベルするため。

A7.6.4 手順

1. 利用する精液検体が概ね、必要とする精子濃度の条件を満たしていることをあらかじめ確認しておくこと。必要とされる保存精液の量は検査室の必要度によって異なる。従って状況に応じて、利用できる精液の全量を使うか、あるいは、各々の濃度になるよう希釈した精液 4mL を準備すること。
2. 精液を回収したら、できるだけすばやく保護剤で希釈する。もし APSIS が希釈と保存に使用されるとすれば、希釈の前の時間が長ければ長いほど、結晶形成がより多くなる。これらの結晶は、チャンバー内に精子を流し入れたり、カウントするときに影響する。
3. 精液全量を移すには、15mL の遠心分離管が必要である。精液 mL 当たり 10% (v/v) ホルマリン 100 μ L と 3mol/l アジ化合物 10 μ L を加えるか、1mL APSIS を加える。
4. 全ての小瓶のラベルは準備された材料の識別情報と日付をつけてサンプルの保存に用いられる。蓋と先端は外して、小瓶をラックに立て、すばやく詰め込むべきである。
5. 希釈された保存精液は配分工程を経て完全に混和されたか確認する。類似の精液濃度が全てのバイアルであるか保証することも確認する。混合後、少々遅れであっても、分注する精子が動かなくなったり、変化する前であれば大丈夫である。混和の均一性を確実にする 1 つの方法は、希釈精液の遠心分離チューブをラックに置き、片手でプラスチックの転送ピペットにより連続的に混ぜながら、もう一方の手でピペットを用いて分注する。
6. 検査室の仕様に依拠して、各小瓶は 0.5 から 1.0mL にすべきである。0.5mL 以上の検体の保存は、各々の小瓶ごとに数回測定する。
7. 一度、保存された懸濁精液はすべての小瓶に分注され、しっかり蓋がしてなければならない。使用される小瓶の種類によるが、自家製フィルムを使用し封をする。もし、凍結小瓶であれば必要はない。
8. 残っている精液サンプルに関しても全過程を繰り返す。
9. 保存は小瓶を 4°Cで行う。

Note: IQC溶液の濃度は希釈された後に決めるべきである。原液の精液濃度から推定すべきではない。一度、精液の懸濁液を準備した小瓶から必要なだけ取り算定する (2.7と2.8参照)。結果は項7.7に述べられている手順に従い図表にする。すべてのカ

ウントは検査室で一般的に使われている方法で行う。項の下段で血球計算盤を使用した手順が述べられている。

A7.6.5 保存された IQC 検体の使用法

- 保存された溶液は精子算定の前にさらに希釈すべきである。希釈は防腐剤の使用に依存する。
- ホルマリンやアジ化物添加された精液の最初の希釈はすくなく、カウントする必要はない。ARSIS にて保存された精液は、最初に 2 倍希釈（すなわち 1+1 (1:2)）し、これを最終的濃度として数える必要がある。
- 原精液 25×10^6 / mL 以上の濃度をもつ APSIS 中の希釈懸濁液のカウントは、さらに 10 倍希釈して使用すると最もよくカウントできる。50 μ L の保存精液を純水 450 μ L 加えて得る。これは最終的に 20 倍に希釈された精液になる。APISIS を希釈剤として使用できない。理由は血球計算盤上の精子沈降の妨げとなるからである。
- 次のステップのために、すべてのピペットを適切な量にセットしておき、混和後、直ちに分取できるようきれいなチップを詰めておく。
- 希釈液の小瓶に適量の水を用意しておく（上記の例では、10 倍希釈するなら 450 μ L）。小瓶の中身はボルテックスミキサーの最大スピードで約 30 秒間よく混和する。50 μ L の一部を水の入った希釈小瓶に移す。そして、この溶液小瓶を最大スピードで約 20 秒間攪拌する。血球計算盤に 10 μ L の懸濁液を入れ、項 2.8.2 と 2.8.3 で述べてある方法で精子を数える。
- 精子数が少ないため原精液が使用されるときは、算定用希釈は適当に調整する必要がある。例えば、 $4 \sim 25 \times 10^6$ / mL の範囲の精子の場合は、最終的に 5 倍希釈になるようにする。ARSIS にて保存された精液の場合 2.5 倍 (2+3:精液がすでに ARSIS で 1+1 (1:2) に希釈する。これは、50 μ L の保存精液を 75 μ L の精製水に加えて作製する。
- 冷蔵庫に保存された精液懸濁液は、少なくとも 4 カ月間は安定しているが、新しい時期には溶液を準備しなければならない。移行期間には古いものと新しい希釈検体を重複してチェックすることが望ましい。

A7.7 内部精度管理のための精子形態学的評価スライド

A7.7.1 一般的考慮すべき事項

- 塗抹は形態学における染色と分析の内部精度管理ために検査室で準備できる。
- 複数の塗抹標本は異なった精液検体、つまり、検査室で形態分類しているものから準備できる。
- 塗抹は固定と保存が可能で、後で染色と分析ができる。
- 塗抹染色標本は、形態分析方法の QC ために個々でも重複でも用いることができる。
- 重複の QC を使用することは技術者自身の精度を認める。これらの QC スライドは、同じ検査室内の技師間の比較、および検査室間の分析を比較するのに役立つ。
- パパニコロー染色で封入された塗抹標本は、暗室内で数カ月間から数年間安定している。
- 精液は塗抹標本作製するすべての工程を通して、よく攪拌されなければならない。特定の精液からのものでも均一標本になる保証のためである。分析中見つかる大部分の変化は検査中の工程（つまり、形態観察手技）の結果であると仮定できる。スライド塗抹中の精液不適当な混合では起こらない。

A7.7.2 手順

1. 検体容器から精液を **15mL** の遠心管試験管へ移す。これはスライド標本作製する過程でより簡単にさらに完全に混和できる。
2. スリガラスのスライド表面を綿の入っていないティッシュペーパーで強くこすって綺麗にする。
3. スリガラスに **HB** の鉛筆 (**No. 2**) で **ID**、日時を記載する。鉛筆の文字は、固定やパパニコロー染色しても安定である。ペンやマーカーインクは安定でない。
4. ピペットにきれいなチップを付け **10 μ L** 積載する（または形態標本を検査室で作製する同量）。
5. 精液はすべてのプロセスで完全に混和する。それはすべての標本が可能な限り同一であると保証するためである。混和後、検体を移動する時間が短かくスライドに置く精子数の変化がなければ、許される。
6. サンプルは、遠心試験管のなかで大きな口径（直径約 **1.5mm**）のピペットを使って、**10** 回吸引して良く攪拌する。室温に等しくするためである。この作業は、十分に混ざるように強行うが、泡立たせてはいけない。

7. 混和後、直ちに懸濁液から精子を分取し、きれいなスライドの端に 10 μ L 載せる。スライド上の小滴を塗抹するまで数秒以上置かないことが重要である。
8. スライドの表面に精液の一部を置いて羽毛法で塗抹する (2.13.2 参照)。このやり方は、2 枚目のスライドの縁でスライドの表面に沿って 1 滴の精液を引きのばす。スライドを使用して、精液を「引く」ようにスライドを使用し、精液を後から「押す」ようにしないことである。塗抹が厚くなったり、重なったり、凝集して背景を濃染色させないように注意することである。スライド上の精子の分散は精液量、精子濃度およびスライドの引く角度 (小さい角度は薄い塗抹になる) (Hotchkiss, 1945) と塗抹を引くスピード (速く動かすと厚い塗抹になる) (Fliasson, 1971) に左右される。
9. 複数枚のスライド作製にはステップ 6-8 を繰り返す。1 滴取る前に精子が沈殿しないことを保証するため、その都度、良く攪拌して作る。
10. 一度、技術が確立すると標本作製はスムーズになり、攪拌ごとに 2~3 枚のスライドが作製できる。1 敵の分注は手早く、2~3 枚の塗抹は数秒間に作製すべきである。

A7.8 備品の標準化

- ピペット、カウンティングチャンバーや他の備品は半年か 1 年に 1 回標準測定すべきである。

A7.8.1 天秤

- 天秤は内部の標準測定器で定期的にチェックし、同時に検査室の維持管理も外部のキャリブレーションによりチェックを受けるべきである。
- 天秤は外部の標準重りで測定する (例えば、精液重量の範囲をカバーできる 1, 2, 5 および 10g)。
- 10 回連続測定し、その平均値、SD 及び変動係数 (CV) ($=100 \times \text{SD} / \text{値の計算}$ ($\text{CV}=100 \times \text{SD} / \text{平均}$)) を求める。
- 精度をチェックする (規定重量は測定平均値の 2SD 以内に入る)。

A7.8.2 ピペット

- ピペット検定は、純水を目盛りマークしたところまで吸引し、容器に分注し行う。

- ピペット内の水の比重を $1\text{g} / \text{mL}$ と仮定して、予想量を測定する。

Note: 温度の比重は温度により低下する (Lentner, 1981)。

20°C で $0.9982\text{g} / \text{mL}$ 、 30°C で $0.9956\text{g} / \text{mL}$ 、 40°C で $0.992\text{g} / \text{mL}$ である。しかし、較正の目的のために $1.0\text{g} / \text{mL}$ の仮定した量は適当とみなす。

- 10 回測定を繰り返す。平均値、SD および CV ($=100 \times \text{SD} / \text{平均}$)。
- 精度をチェックする (規定重量は測定平均値の 2SD 以内に入る)。

A7.8.3 チャンバー深度

- 計算盤の深さの測定は、顕微鏡の焦点上で Vernier スケールを用いて行う。最初にチャンバグリッドに焦点を当て、次いでカバーガラスの裏面のインク目印に焦点を当てる。2 ポイントの間の目盛線の数を測定する。
- 10 回測定を繰り返し、平均値、SD および CV ($=100 \times \text{SD} / \text{平均}$) を計算する。
- 精度をチェックする (規定重量は測定平均値の 2SD 以内に入る)。

A7.8.4 インキュベーター

- インキュベーターの温度と保温版は、定期的に較正された温度計でチェックすべきである。
- CO_2 ガス混合は、毎日インキュベーター本体表示をチェックする、あるいは、他のガス分析システムを用いて週、月単位でチェックすべきである。また、ガス供給時にはサンプリングしてチェックすべきである。

A7.8.5 pH 試験紙

- 既知の pH 規格に対してチェックすべきである。

A7.8.6 他の設備

- 他の実験設備と試薬、たとえば、pH メーターのようなものは標準規定に対して 3 カ月から 6 カ月の間隔でチェックすべきである。

Reference

Armitage P et al. (2002). Statistical methods in medical research. Oxford, Blackwell Science.

- Brazil C et al. (2004) . Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *Journal of Andrology*, 25:645-656.
- Eliasson R (1971) . Standards for investigation of human semen. *Andrologia*, 3:49-64.
- Hotchkiss RS (1945) . *Fertility in man*. London, William Heineman Medical Books.
- Jørgensen N et al. (2001) . Regional differences in semen quality in Europe. *Human Reproduction*, 16:1012-1019.
- Lentner C (1981) . *Geigy scientific tables*. Vol. 1: Units of measurement, body fluids, composition of the body, nutrition. Basel, Ciba-Geigy.

付録 8 精液検査における多国の外部精度管理プログラム

Australia: Fertility Society of Australia, External Quality Assurance Schemes for Reproductive Medicine, PO Box 1101, West Leederville, Western Australia 6901, Australia

Denmark: Dansk Institut for Ekstern Kvalitetssikring for Laboratorier, Sundhedssektoren, DEKS 54MI, Herlev Universitets sygehus, Herlev Ringvej 75, 2730 Herlev, Denmark

Germany: QuaDeGA, Centrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Universitätsklinikum, Domagkstrasse 11, D-48129 Münster, Germany

Italy: Valutazione Esterna di Qualità, Gruppo Controllo Qualità Analitico Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Policlinico Sant'Orsola-Malpighi, Bologna, Italy

Scandinavia: NAFA (Nordic Association for Andrology), Andrology Unit, Reproductive Medicine Centre, Karolinska Hospital, PO Box 140, SE-171 76 Stockholm, Sweden

Spain: Centro de Estudio e Investigación de la Fertilidad (CEIFER), Granada, Spain

United Kingdom: UKNEQAS Schemes for Andrology, Department of Reproductive

本著書で記載されている手技は臨床現場やラボで従事するエンブリオロジスト、研究する研究者、医師、看護師、管理者、その他のために必要なものとして提供されている。最新版である 5 版は事実に基づき、日常業務に役立つ詳細な手順、特殊研究検査の最新が提供されている。その理由は、最終的に精液分析の高品質な標準化と異なるラボの結果を比較向上させるためである。

最新版の特徴

- ・簡単に使用できる説明書：各手技を詳細に説明した。
- ・手技を説明するため追加された資料と結果解釈の手引を加えた。
- ・多数の詳細顕微鏡写真によって様々な精子異常形態を示した。
- ・精子の準備と凍結の項を増やした。
- ・事実に基づき精液性状の正常、限界域を示した。
- ・品質管理、品質保証の章を加えた。