

3) 精液検査

(1) 男性不妊症の現状

男性因子の頻度は不妊カップルの40～50%を占める¹⁾。精液検査では精液量・pH・精子濃度・精子運動率・精子正常形態率・抗精子抗体等を測定する。国際的な検査法・判定法を示すWHOの基準値(表C-1-1)²⁾以下の場合は再検査を1～2回行い、一度でも全項目に合格すれば男性因子なしと判定する。異常所見を認める場合は泌尿器科学的に精査する。表C-1-2に診断名を記した。なお本邦でも最近「精液検査標準化ガイドライン」³⁾が発行されたが、その内容はWHOマニュアルに沿う。

男性不妊症の原因には造精機能障害、精路通過障害、副性器障害、性機能障害、免疫性不妊症等がある。

治療法としては、造精機能回復の目的で薬物療法あるいは手術療法が、また生殖補助医療として人工授精、体外受精、顕微授精等が行われる。

(2) 一般精液検査の方法

(表 C-1-1) 精液所見の基準値²⁾

精液量	2.0ml 以上
pH	7.2 以上
精子濃度	$20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上
総精子数	40×10^6 以上
運動率(射精後 60 分以内)*	運動精子 (a + b) 50%以上 前進運動精子 (a) 25%以上
形態	**
生存性	75%以上生存
白血球数	$1 \times 10^6/\text{ml}$ 未満
抗精子抗体	
イムノビーズテスト	ビーズ付着運動精子が 50%未満
MAR テスト	ラテックス粒子付着運動精子が 50%未満

*精子運動性のグレード

a: 高速前進運動 (37℃ で $25 \mu\text{m}/\text{秒}$ 以上, 20℃ で $20 \mu\text{m}/\text{秒}$ 以上。なお $25 \mu\text{m}$ とはおおよそ頭部の長さの 5 倍, または尾部の長さの 1/2 に相当)

b: ゆっくり, または不活発な直進運動

c: 非前進運動 ($5 \mu\text{m}/\text{秒}$ 未満)

d: 不動

** WHO マニュアルの方法により多施設で検討中

(表 C-1-2) 精液所見による診断

診断名	英語表記	基準
正常精液	normozoospermia	全検査項目の基準値を満たす。
乏精子症	oligozoospermia	精子濃度が $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満。
精子無力症	asthenozoospermia	前進運動精子が 50% 未満。 もしくは高速直進精子が 25% 未満。
奇形精子症	teratozoospermia	正常形態精子が 15% 未満。
無精子症	azoospermia	精液中に精子が存在しない。
無精液症	aspermia	精液が射出されない。

精液検査を行う場合には、禁欲期間(2日以上7日以内)・採取法(マスターベーション)・採取場所(施設内、または1時間以内に持参可能)・採取容器(清潔で口径の広いガラスあるいはプラスチック容器)等に細心の注意を払い、取り違えのないよう留意する。しかしながら精液検査結果の再現性には問題点が指摘されている。たとえば妊孕性のある男性から精液を反復採取した場合でも、同一の測定値を示すことなくさまざまな程度の変動を認め、異常値を認める際には是非再検査が望まれる理由である。

【一般精液検査の手順】

①液化能、粘度、精液 pH、精液量を評価・測定。肉眼的に血精液症や膿精液症がないかも観察する。

②精子運動率の測定

液化した精液10 μ l をスライドグラスに載せカバーグラスで覆い、400倍の顕微鏡下に行う。保温盤の使用が望ましい。精子の運動性を以下の4項目に分類する。

A：速度が速く、直進する精子

B：速度が遅い、あるいは直進性が不良な精子

C：頭部あるいは尾部の動きを認めるが、前進運動していない精子

D：非運動精子

精子運動率はA+Bの占める割合(%)で算出するが、5カ所以上の視野で200個以上の精子を分類し、これを原則3回繰り返した平均値で示す。

ところで運動する細胞である精子測定をより客観的に評価するため、computer-aided sperm analysis(CASA)を用いる方法がある。高価である点から普及率は低い。精子運動率のほか精子運動に関連するパラメーター、および精子濃度を測定できる。

③精子濃度の測定

精子を不動化し適切な倍率に希釈して血球計算盤で測定する。精子を認めない場合は精液全量を500 $\times$ g、15分遠沈し、沈殿を検鏡して精子を認めなければ無精子症と判定する。

④精子の形態分類

精子形態の評価はKruger et al. (1986)による strict criteria を用いる。精液スメアをDiff-Quik 染色し、図 C-1-4 に示す a タイプ、すなわち頭部は卵型(長さは5~6 μ m で幅は2.5~3.5 μ m)でなめらかな外形を示し、先体はその40~70%を占め、頸部・中片部・尾部の欠損を認めない、という基準を満たす場合を正常形態精子とし、その比率(正常形態率)を求める。正常形態率15%以上を normal 群、5~14%を good prognosis 群、4%以下を poor prognosis 群と判定する。normal 群では精子受精能に問題はなく、poor prognosis 群はICSIの対象となる患者に多い。

(3) 特殊検査の方法

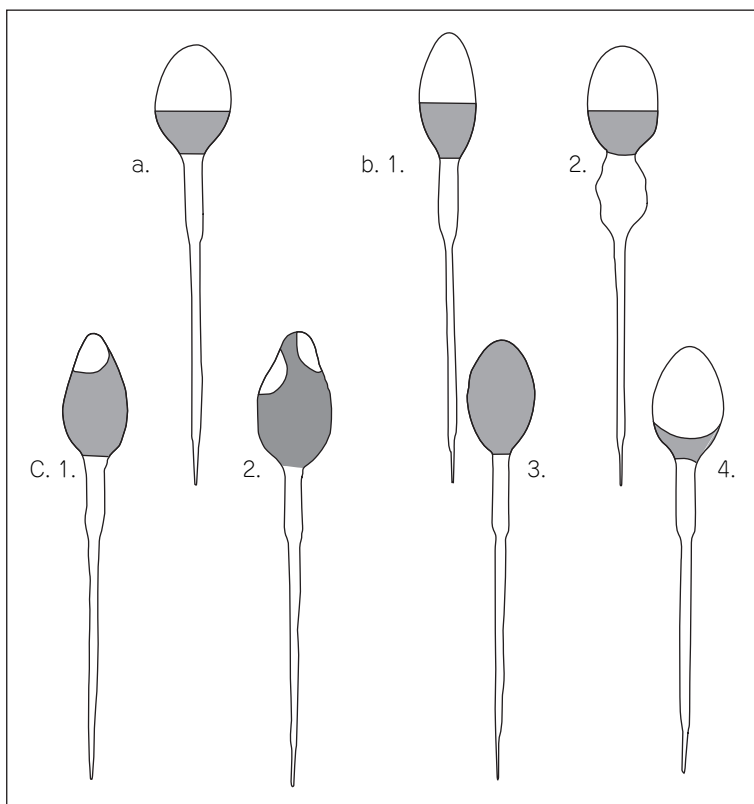
抗精子抗体および精子受精機能の検査法について述べる。

①抗精子抗体の検出

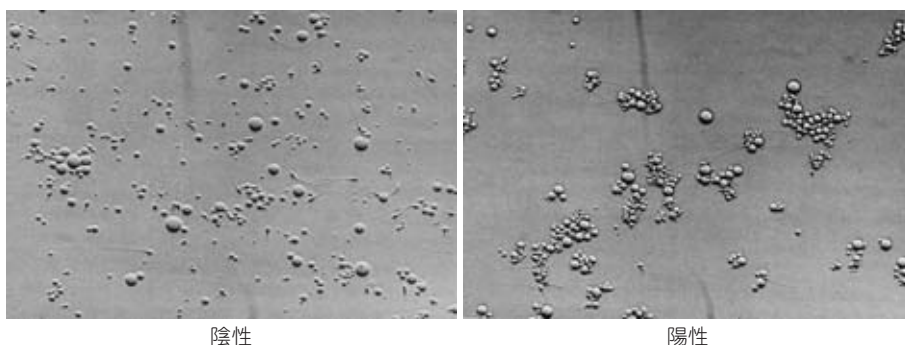
精子細胞膜に結合する抗精子抗体検出法としてBronson et al. (1981)による直接イムノビーズテスト(direct-immunobead test; D-IBT)を行う。

方法は約5 $\times$ 10⁶個の運動精子を含む精液を、0.3%BSA(=bovine serum albumin)添加Tyrodes液5mlで混和して遠心(500 $\times$ g、5分間、2回)後、上清を除去する。ウサギ抗ヒトIg抗体を結合させたポリアクリルアミドビーズ(=イムノビーズ[IB])0.1mlを、0.3%BSA添加Tyrodes液5mlと混和して遠心(500 $\times$ g、5分間、1回)の後、上清を除去する。調整したIBに5%BSA添加Tyrodes液0.1mlを加え全量を0.2mlとし混和する。

精子浮遊液とIB調整液を各々5 μ lずつスライドグラス上に滴下して混和し、カバーグラスを載せる。乾燥を避け室温で10分間静置後、顕微鏡下($\times$ 400)に運動精子200個を観察し、IB結合の有無とその部位を記録する。



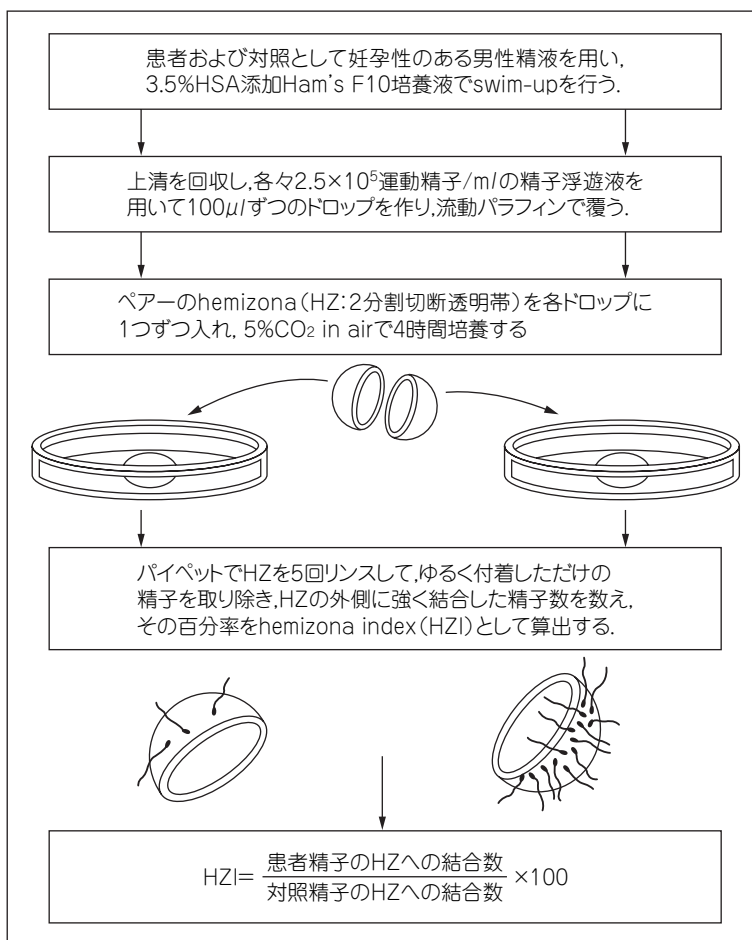
(図 C-1-4) Kruger による strict criteria を用いる精子形態評価法



(図 C-1-5) Bronson によるイムノビーズテストを用いる抗精子抗体検出法

図 C-1-5 に陰性および陽性結果を示すが、原法によると IB を 1 個でも結合する精子が全体の 20% 以上存在すれば、抗精子抗体陽性と判定する。最近の WHO マニュアル²⁾では、cut-off 値が 50% に修正されたが、その根拠は明確でない。

射出精子に抗精子抗体が結合する男性の治療方針決定のため、抗精子抗体が不妊症発生と関連するか、精子通過能は post-coital test, 受精能は後述する hemizona assay (HZA)



(図 C-1-6) Burkman によるヘミゾナアッセイを用いる受精機能検査法

で判定できる。

②精子受精機能判定法

一般精液所見が正常にもかかわらず, 精子受精機能障害のある男性が存在する。あらかじめ初回の体外受精施行前にいずれかの精子受精機能検査を実施し, 媒精法として IVF か ICSI のどちらが適当か検討しておく必要がある。WHO マニュアル²⁾では精液検査の optional test として, Jeyendran et al. (1984)による hypo-osmotic swelling(HOS) test(精子尾部膨化試験), Yanagimachi et al. (1976)による zona-free hamster oocyte test(ハムスターテスト), および Burkman et al. (1988)による HZA を紹介している。

HOS test とは射出精子に150mOsmol の低浸透圧負荷をかけ, 精子尾部細胞膜の形態学的変化を観察し, 間接的に精子細胞膜の機能面を判定する簡便な方法である。得られた精子がすべて不動精子の場合, その中から生存する精子を選別して ICSI に供する目的にも, HOS test は応用されている。

ハムスターテストの特徴は, ヒト精子の受精機能を評価するため直接卵子(ハムスター)を用いる点にある。先体反応を終了した精子だけがあらかじめ透明帯を除去したハムス

ター卵子に侵入でき、一般精液所見からでは予測困難なヒト精子の受精能力を推定できる。一方 HZA の利点は、ハムスターテストと同様、直接卵子を用いて精子受精機能を評価する点にある。しかも同種のヒト卵子を用いる点でより信頼度が高い。HZA の手技を図 C-1-6 に示す。

《参考文献》

1. 柴原浩章. 産婦人科における男性不妊の診断. 産婦人科診療指針. 鈴木光明, 編, 松原茂樹, 柴原浩章, 編集協力 東京: 中外医学社, 2005; 424—428
2. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, 1999
3. 精液検査標準化ガイドライン. 日本泌尿器科学会監修, 精液検査標準化ガイドライン作成ワーキンググループ編 東京: 金原出版, 2003

4) 精子—頸管粘液適合試験

性交後試験(postcoital test; PCT)に代表される精子—頸管粘液適合試験は、Sims が 1868 年に提唱し、Huhner が 1913 年に実用化した不妊検査法で、Huhner test あるいは Sims-Huhner test と呼ぶ。歴史的な手法であるがために、検査法・判定法の標準化の難しさが指摘され、また臨床的意義に対する否定的な見解が存在する。

このいわば in vivo の assay とは異なり、精子の頸管粘液への進入を in vitro で評価する方法があり、Miller-Kurzrok test と呼ぶ。

本稿では国際的な検査法・判定法を示す WHO ラボマニュアル第 4 版¹⁾に記載される sperm-cervical mucus interaction に準じて解説するとともに、本邦でよく行われる PCT の現状を、最近の文献から紹介する。

【精子—頸管粘液適合試験】

頸管粘液は月経周期の一定時期、すなわちエストロゲン優位を示す排卵前に精子を通過させるが、この現象には個人差ばかりか、同一の女性においても周期差がある。中には全月経周期のうちわずかに 1～2 日の期間だけ PCT 陽性、すなわち精子の頸管粘液通過性良好となる女性が存在する。In vivo test である PCT 陰性、すなわち精子の頸管粘液内通過性不良の場合、再検査は必須であるが、反復して陰性の場合には in vitro test を考慮する。

(1) In vivo test(PCT)(図 C-1-7)

検査時期: 基礎体温・頸管粘液の性状変化・卵胞径・可能ならエストロゲン測定等の結果を参考に、排卵前あるいは排卵日に行う。性交後 9～24 時間後に採取した頸管粘液を観察する。

カップルへの説明: 検査前は少なくとも 2 日間禁欲する。検査前夜にいつも通りの性交を行い、正確な時間を申告する。潤滑剤は使用しない。シャワーは可だが入浴は不可。

PCT の方法: 潤滑剤を使用せず腔鏡を腔内に挿入し、後腔円蓋の貯留液をツベルクリン用注射器(針なし)等で採取する。次に異なる注射器で子宮頸管から頸管粘液を採取する。各々をスライドガラスに載せ、カバースライドで被い検鏡する。

腔円蓋貯留液採取: 精子は腔内では通常 2 時間以内に死滅する。この検査は精液が腔内に放出されたかの確認を目的とする。

頸管粘液採取: 子宮頸管下方の精子数は性交後の時間経過とともに変動し、2～3 時間後に最も多い。頸管粘液中の精子濃度は精子数/mm³で表現し、精子運動率は次のように分類する。すなわち高速直進精子、低度あるいは直進不良精子、前進運動しない精子、非