

精子形態の臨床的研究 Testsimplets® slide の使用経験

藤沢市民病院泌尿器科（部長：広川 信）

岩 本 晃 明

広 川 信

岩 崎 皓

藤沢市民病院中検病理（部長：松下和彦）

松 下 和 彦

朝倉泌尿器科医院（院長：朝倉茂夫）

朝 倉 茂 夫

APPLICATION OF TESTSIMPLETS® FOR
CLASSIFICATION OF SPERM MORPHOLOGY

Teruaki IWAMOTO, Makoto HIROKAWA and Akira IWASAKI

*From the Department of Urology, Fujisawa City Hospital**(Chief: Dr. M. Hirokawa)*

Kazuhiko MATSUSHITA

*From the Department of Pathology, Fujisawa City Hospital**(Chief: Dr. K. Matsushita)*

Sigeo ASAKURA

*From Private Practice of Urology, Asakura**(Chief: Dr. S. Asakura)*

Testsimplets® is a pre-stained, ready-to-use slides for differential blood cell counts.

We have been using this Testsimplets® slide to classify sperm morphology since 1978. Its characteristics is that it is very easy to prepare specimens quickly and we can see sperm morphology clearly for the classification of the sperm. We regard this Testsimplets® slide as a supravital staining. The disadvantage is that we can not preserve specimens for more than 24 hrs.

Extensive use of the Testsimplets® slide is a useful method for the classification of sperm morphology in the infertility clinic.

Key words: Testsimplets®, Sperm morphology, Supravital staining, Classification of sperm

緒 言

臨床検査で精子形態を知るには、通常、固定標本の Papanicolaou® 染色あるいは Haematoxylin-Eosin 染色が行なわれている。

著者¹⁾は1978年より西ドイツでヘモグラムの検査に使用されている Testsimplets® slide を精子形態の検

索に応用している。その結果、有用性を認めたので紹介する。

Testsimplets® slide と使用方法

この Testsimplets® slide は既に染色液 (N-methylene blue と cresyl violet acetate) がスライドガラスの表面に塗布されている。スライドガラス

Table 1. Author's classification for sperm morphology

oval form	$4.2\mu < \text{length} < 6.3\mu$ $1.8\mu < \text{width} < 2.7\mu$ oval shape
distorted form	between oval form and tapering form, oval form and amorphous form and oval form and round form
tapering form	
large form	length $> 6.3\mu$, width $> 4.2\mu$
small form	length $< 2.7\mu$, width $< 1.8\mu$
round form	
amorphous form	
immature cell	
other	

Table 2. Semen analysis of present cases

semen analysis	cases		fertile men		oligospermia		varicocele	
	1	2	3	4	5	6		
volume (mℓ)	2.3	2.0	4.3	2.5	4.0	5.5		
density ($\times 10^6/\text{mℓ}$)	51	150.6	24.8	20.4	3.3	22		
motility (%)	67	50	22	48	50	35		
oval form (%)	51.9	86.4	48.1	74.7	66.2	36.0		
distorted form	31.2	10.3	37.5	18	29.7	39.6		
tapering form	9.9		0.7		0.3	11.6		
large form	0.1		0.2	0.2				
small form	0.1	0.3	0.2	0.2		0.3		
round form	0.5		1.0	0.7	2.0	0.3		
amorphous form	4.4	2.7	9.8	5.3	1.6	9.6		
immature cell	1.0	0.3	0.7			1.4		
other	0.8		2	1.0	0.3	1.2		

の中央に精液を一滴たらし、カバーグラスをかけ、精液の層をなるべく薄く均一にさせるためカバーグラスの上からペン先で軽く押しつけ精液をのばす。室温で30分から120分おくと標本が作製できる。なお、精子濃度が $15 \times 10^6/\text{ml}$ 以下と低い場合には、精液を2,000回転、10分間の遠沈を行ないその沈澱物で標本を作製する。

観察方法は油浸下1,000倍で顕鏡し、写真をとりキャピネ版に引伸して精子形態の分類を行なっている。分類方法は著者の試案した分類基準²⁾による (Table 1)。

実際例の検討

Fertile men 2例、原発性乏精子症2例、精索静脈瘤2例の実際例を紹介する。精液所見及び Testsimpls® slidesにより観察された精子形態の分類を Table 2に一覧する。

Fertile men

症例1: 37歳、3児を得ているため不妊手術を希望して来院している。

症例2 33歳、1972年3月結婚し1976年3月長女、1977年長男が生れる。

原発性乏精子症

症例3: 24歳、不妊期間1年5ヵ月を経て来院している。原発性乏精子症と診断し、薬物療法を行ない第1子を得ている。

症例4: 31歳、不妊期間2年4ヵ月を経て来院している。妻が一度自然流産を経験している。

精索静脈瘤

症例5: 33歳、不妊期間3年4ヵ月を経て来院している。左精索静脈瘤第3度を認める。精索血管高位結紮術を施行し、約1年後に妊娠、児を得た。

症例6: 20歳、左陰囊痛を訴えて来院している。左精索静脈瘤第2度を認める。精液所見が不良なため手術を行なった。

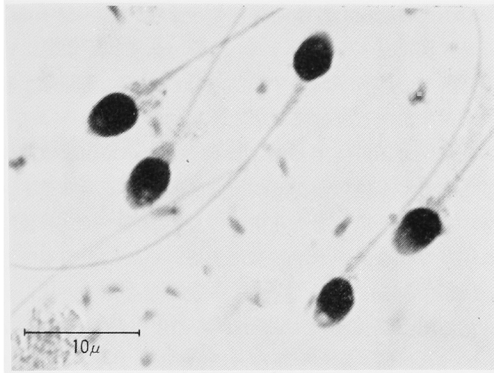


Fig. 1. Oval form

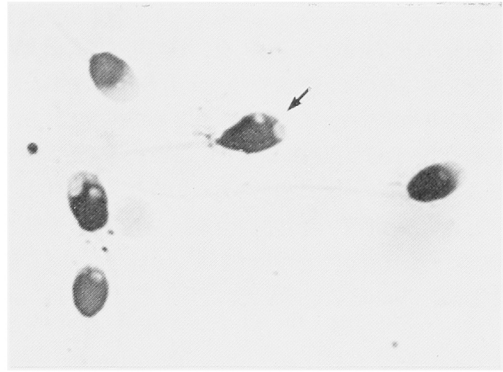


Fig. 2. Distorted form (arrow)

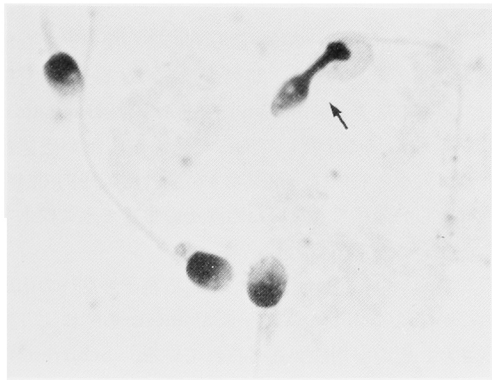


Fig. 3. Amorphous form (arrow)

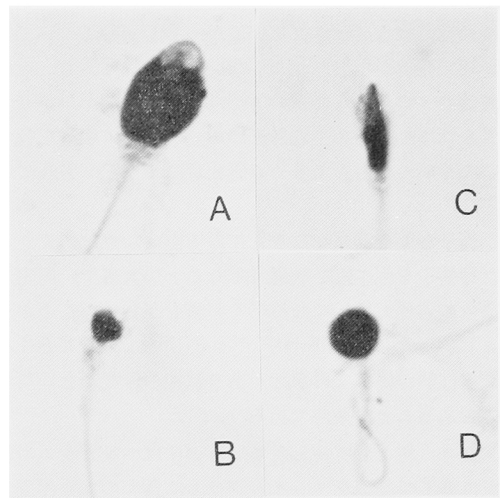


Fig. 4. A. Large form, B. Small form, C. Tapering form, D. round form

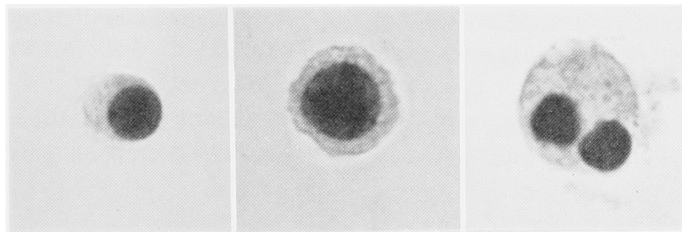


Fig. 5. Immature cell

Fig. に示した写真は前述したように油浸下1,000倍で写真撮影し、キャビネ版に引き伸したものである。Fig. 1 に見られる5つの精子は頭部がきれいな oval の形をしており正常型精子 (oval form) とした。中片部、尾部も明瞭に染色されている。Fig. 2 の中央、矢印にみられる精子は頭部が尾部に向ってやや細くなって、辺縁がゆがんでおり、他の4個の oval form

とは異なっていることから著者は変形精子 (distorted form) と分類した。Fig. 3 の矢印の精子は明らかに異常を示していることがわかり病的精子 (amorphous form) とした。他にも種々の精子がみられ Fig. 4 に示した。Aの精子は頭部の長さ 8.1μ、幅 5μ の大きな精子で大型精子 (large form) である。Bの精子は小型精子 (small form) である。Cの精

子は頭部が細く薄くなっていることから先細小型精子 (tapering form) と分類した。Dの精子は真に丸い形をしているので円型精子 (round form) とした。尾部が8の字になって屈曲しているのが観察される。Fig. 5に示した細胞は精液中に出現する幼若細胞で核及び細胞質が明瞭に染色されている。

このようにして、1症例200個以上の精子及び幼若細胞について分類を行なっている。6症例の形態分類の結果をTable 2に示した。

考 察

妊孕能を評価するうえで精子濃度、運動率、精子形態の観察は重要なパラメーターである。前者については通常、検査がなされているが、精子形態については詳細な分析が行なわれていないのが現状である。その理由の一つとして従来の方法は煩雑で手間がかかりすぎるために日常の不妊外来において簡単に検査を行なうににくい。その点で多くの研究者により工夫されている。

精子形態を観察するうえで最も重要な点は、できるだけ精子を生に近い状態でみることが大事で、固定・染色の過程で精子になるべく影響を与えないことが望ましい。そしてAlfordら²⁾が、述べているごとく、標本作製が簡単で再現性があり試薬の保存がきいて安価であることが条件であろう。

従来、主として使われている方法はヘモグラムの作製に準じて精液をスライドグラスに薄くのばし半固定し、Papanicolaou染色、あるいはHaematoxylin-Eosin染色を行ない観察されている。Hellings⁴⁾によれば、両染色法とも精子形態の観察に適していることが述べられている。しかし先程も述べたように標本の作製に時間がかかり煩雑であるので日常の不妊外来で簡単に標本を作りにくい欠点がある。Emilsonら⁵⁾は精子の生死の有無と形態が同時に観察ができ、しかも標本の作製にも手間がかからないEosin-nigrosin染色法を紹介している。この方法の特徴は今まで死精子も含めて観察していたものが、生精子だけの形態を分析できる点であろう。しかし欠点としては種々の幼若細胞と白血球との鑑別が若干つきにくいことであると述べている。この幼若細胞と白血球あるいは精液中に混入する他の細胞との鑑別が問題となる。Tejadaら⁶⁾は新しい試みとしてMetachromatic fluorescent stain法を用いると白血球やマクロファージとの鑑別が困難な精母細胞の同定にも有用であると紹介している。彼らは迅速な方法と述べているが過程がやや複雑で手間がかかると思われる。

Arfordらは尿の沈渣の染色に使われているSedi-Stain (Clag-Adams Corporation)を精子形態に応用し標本の作製が簡単で細胞成分の分類にも極めて有用な試薬であると勧めている。

今回、著者の使用したTestsimplets® slideは前述したごとく、染色液が既に塗布されているスライドグラスに一滴の精液をたらすだけで約30分～120分後には観察できる簡便さが特徴である。更に精子を生に近い状態でみることができて、一種の超生体染色法ともいえる。この点ではAlfordらの用いたSedi-Stainも同様の性質といえよう。その他にTestsimplets® slideによる標本が見やすいことも特徴である。従来の方法では精液で血液のような薄い標本を作ることが非常に難しい。そのため標本が厚くなり精子が重なったり精漿がじゃまになったりして十分な観察ができない。Testsimplets® slideは写真のようなきれいな精子をみることが出来る。またFig. 5のような幼若細胞の観察にもPapanicolaou法あるいはHaematoxylin-Eosin法に比較して決して見劣りしないと思われる。欠点としては、室温で4時間、冷蔵庫内で24時間程度しか保存できないため、そのまま永久標本とならないことである。

このTestsimplets® slideによる精子形態への応用についてはSchirrenら⁷⁾、Calameraら⁸⁾により報告され、その有用性が述べられている。SchirrenらによればPapanicolaou法と比較して精子形態の分類に有意の差を認めていない。著者も従来のPapanicolaou法との比較検討を行ない既に報告している²⁾。著者は精子頭部の大きさが、Testsimplets® slideに比べてPapanicolaou法が縮小すること、一部の症例で精子形態の分類分布が両染色法で異なる事実を観察した。今後、多数例の検討を要するが、精子を生に近い状態で観察しえて、標本の作製が極めて簡単、迅速に行なえるTestsimplets® slideの使用は日常の不妊外来での精子形態の分類に大いに役立つものと考えられる。

結 語

精子形態の検索にヘモグラムに使用されているTestsimplets® slideを応用した。その特徴は標本の作製が極めて簡単で迅速にできかつ見やすいこと、そして精子を生に近い状態で観察できることである。このTestsimplets® slideの有用性について述べた。

文 献

- 1) 岩本晃明・広川 信・松下和彦・高井修道・

- Testsimplets® slides による精子および精細胞の形態学的検索. 第379回日泌東京地方会にて講演, 1978
- 2) 岩本晃明：精子形態の臨床的研究. その1：精子形態の分類と fertilemen について, その2：精索静脈瘤について. 日不妊会誌 **26**:330~354, 1981
 - 3) Alford LM and Rivard DJ: A simple stain for differentiating semen constituents. *J Urol* **126**: 609~610, 1981
 - 4) Hellinga G : *Clinical Andrology*. p. 24, William Heinemann Medical Book, London, 1976
 - 5) Emilson LBV, Dougherty KA, Cockett ATK and Urry RL : Simultaneous determination of human sperm morphology and viability. Simple office technique. *Urology* **11**: 488~491, 1978
 - 6) Tejada RI, Marik JJ, Winer JH and Friedman S: A new metachromatic fluorescent stain for rapid morphologic evaluation of human sperm. *Fertil steril* **36** 535~537, 1981
 - 7) Schirren C, Eckhard U, Jachczik R and Carstensen CA: Morphologic differentiation of human spermatozoa with Testsimplets® slides. *Andrologia* **9**: 191~192, 1977
 - 8) Calamera JC and Vilar O : Comparative study of sperm morphology with three different staining procedures. *Andrologia* **11**: 255~258, 1979

(1985年10月4日受付)