

男性不妊における精子授精能に関する研究

—透明帯除去ハムスター卵精子侵入試験とヒト精子授精能—

神戸大学医学部泌尿器科学教室（主任：守殿貞夫教授）

浜	口	毅	樹
松	本		修
守	殿	貞	夫

STUDY OF SPERM FERTILIZING ABILITY ON MALE
INFERTILITY: USING ZONA FREE HAMSTER
EGGS PENETRATION ASSAY

Takeki HAMAGUCHI, Osamu MATSUMOTO and Sadao KAMIDONO

*From the Department of Urology, Kobe University**(Director: Prof. S. Kamidono)*

Zona free hamster egg-sperm penetration assay (SPA) was performed on 50 normal fertile men and 58 infertile men. The median penetrating rate was 68% (13%~100%) for the fertile men and 11% (0%~100%) for the infertile men. There existed no clear relationship between SPA and any other sperm parameters. SPA showed the best diagnostic rate (72.4%) for male infertility, which was evaluated by the 95% specificity threshold values of normal males. Therefore, SPA is best correlated with male impregnating ability. On the contrary, the infertile diagnostic rate of sperm density was relatively low (36.8%). SPA was also carried out on male partners of unexplained infertility couples, and 8 out of 36 (22%) showed decreased sperm penetration rate (less than 10%). In these couples, the deterioration of fertilizing ability was thought to be one of the causative factors of infertility.

Key words: Male infertility, Infertile diagnostic rate, Sperm penetration assay, Unexplained infertility couples

緒言および目的

男性の妊孕能は従来一般的な精液所見すなわち精液量、精子濃度、精子運動率および精子奇形率などで評価されている。しかし、男性不妊の診療にたずさわっているとこれらの精液所見のみでは妊孕能を正確に評価できないことを実感する。たとえば薬物治療などで精液所見が著明に改善し、明らかに正常と考えられる域に達してもなお長期間妊娠にいたらなかったり、逆に精液所見が不良と考えられても妊娠にいたる症例も多く経験される。これには配偶者の受精能などの関与も考慮すべきであるが、精子の質（quality）ともい

うべき精子授精能の低下が原因と考えられる男性不妊の存在が推察される。すなわち従来男性の妊孕能のパラメータとして最も多用されていたのは精子の量的因子（quantity）としての精子濃度などであるが、むしろ男性の妊孕性評価には精子の質が重要ではないかと考えられる。そこで精子授精能を評価しようとされている、Yanagimachi ら¹⁾により確立された、透明帯除去ハムスター卵を使用した精子侵入試験 sperm penetration assay（以下 SPA と略す）に注目し、正常男性、不妊男性および従来の精液検査では正常と考えられる「いわゆる原因不明不妊夫婦の夫」を対象として、SPA が従来の精子パラメータよりも男性妊孕能に、より関連するかどうかを検討した。わが国での男子授精能に関するこれら対象についての体系的な

研究報告はなされていない。今回これらに関して興味ある結果を得たので報告する。

研究 方 法

(1) SPA と従来の精子パラメータ

正常対照男性は不妊エピソードがなく、原則として配偶者が妊娠中、あるいは児を得てから1年以内の男性57名で、その年齢分布は23歳から37歳である（正常群）。男性不妊患者は、神戸大学医学部附属病院泌尿器科男性不妊外来を受診した、不妊期間が2年以上で配偶者に産婦人科学的異常を認めない、無精子症を除く67名を対象とした（男性不妊群）。その年齢分布は26歳から46歳である。対象のなかで2回以上にわたり精液が得られた場合、それらを1検体とした。したがって正常群では72検体、不妊群では87検体について後記の各種パラメータが算定・測定された。

(2) 検査項目および方法

精液は4日間の禁欲の後、用手法にて滅菌シャーレに採取されたものを使用した。精子パラメータとしての精子濃度、精子運動率、精子運動速度は当科で開発した BPP system²⁾ (bilevel picture processing system) — 2値画像処理方式の自動精液検査装置 — によって測定された。精液量から総精子数および総運動精子数が算定された。その他の精子パラメータとして、奇形率はパバニコロー染色、アクロシン活性をBAEE/ADH 法³⁾ によって、精子侵入率は後記のSPA で測定された。精漿については量のほか、pHをpHメータにより、ZnおよびMg濃度を原子吸光法⁴⁾ にて測定した。なお、精漿は2,000g×30分間で遠心分離された。

(3) 精子侵入試験の方法 (Fig. 1 に略記)

(a) 精子の準備

十分液化した精液をよく混和し、その約0.5 mlを滅菌 pasteur pipette を用いて16×125 mmの滅菌試験管 (Falcon) にとる。その後この試験管に3.5% human serum albumin (Sigma: fraction V) を加えた modified Biggers Whitten and Whittingham (以下 mBWW と略す) の培養液 (Table 1) を精子洗浄の目的で10 ml 注入かくはんの後、室温にて遠沈 (250g×5分) し、上澄みを水流ポンプで吸引廃棄した。同様に mBWW により計3回の精子洗浄操作を行ない、精漿を除去し最終的に mBWW 培養液により、運動精子濃度が $5 \times 10^6/\text{ml}$ の精子浮遊液を作成した。この精子浮遊液0.5 ml を別の滅菌試験管に分注し、液面を少量の滅菌流動パラフィンでシールし、37℃、5% CO₂ 含有大気中で2時間の精

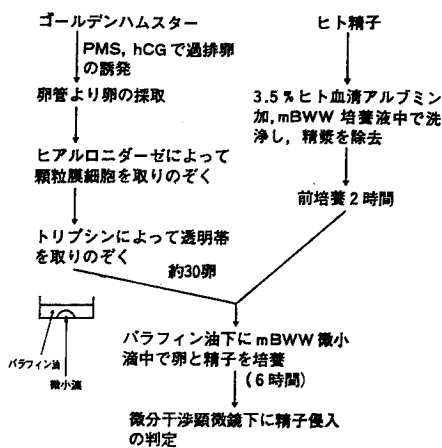


Fig. 1. 精子侵入試験

Table 1. Modified-B.W.W. 培養溶液

NaCl	4.91 (g/l)	84.0 (mMol)
NaHCO ₃	3.00	35.7
KCl	0.36	4.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	1.2
CaCl ₂	0.19	1.7
KH ₂ PO ₄	0.16	1.2
Na-pyruvate	0.03	0.3
Na-lactate	2.50	2.2
Glucose	1.00	5.6
H.S.A.*	35.00	
Streptomycin	50 mg/l	
Penicillin-G	100,000 iu/l	

* : purified human serum albumin: fraction V (Sigma Chem., St. Louis, MO)

子前培養を行なった。

(b) 卵子の準備

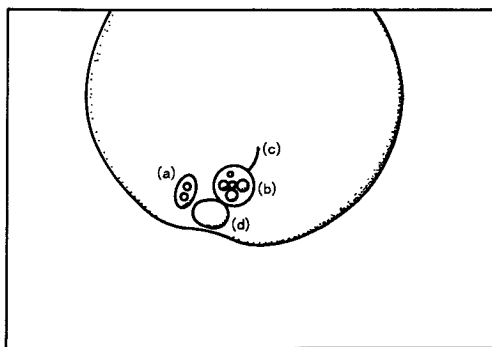
SPA 施行3日前に、発情後期で4週齢から12週齢の雌ゴールデンハムスターに PMS (pregnant mare's serum) 20単位を腹腔内注射し、その約50時間後に、hCG (human chorionic gonadotropin) 10単位を腹腔内注射し過排卵処置を行なった。この hCG 注射後15~18時間めに屠殺後開腹して卵管を採取し、乾燥を防ぐ目的で流動パラフィンの入ったシャーレ (直径 30 mm) 中に静置した。実体顕微鏡下に卵管膨大部から顆粒膜細胞層に包まれた卵を採取し、流動パラフィン中の mBWW 微小滴中に静置した。ハムスター1匹あたり約40個の卵の採取が可能であった。0.1% ヒアルロニダーゼ含有 mBWW 微小滴中へ、先端

を 200μ 程度に細めたマイクロピペットを用いて、顆粒膜細胞層に包まれた卵を移し、約15分間静置して顆粒膜細胞を分散させた。続いて mBWW 微小滴中で卵を3度洗浄し顆粒膜細胞を完全に除去した。つぎに0.1%トリプシン含有 mBWW 微小滴中へ卵を移し2～3分間静置し、透明帯を溶解させた。このようにして得られた透明帯除去卵を mBWW 微小滴中で3度洗浄し、卵の準備が完了した。これら卵と被検精子は直ちに混和培養されることが要求されるため、精子および過排卵処理からはじまる卵の準備については綿密な計画が必要であった。

(c) 培養および判定

精子侵入試験は1検体あたり約30個の卵を使用し、前述の前培養された精子浮遊液約 0.3 ml をパラフィン油下におき微小滴とし、その中へ卵を注入し混和する。37℃、5% CO_2 含有大気中で6日間培養し精子侵入の有無を判定した。

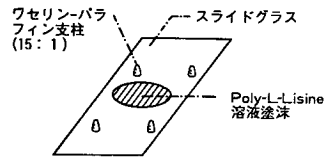
精子侵入の判定は、混和培養終了後、mBWW 微小滴中で卵を一度洗浄し、圧平標本にしてからノマルスキー型微分干涉顕微鏡下 ($\times 400$ 倍) で行なった。膨化した精子頭部または雄性前核が認められ、かつ精子尾部を伴うものを精子侵入ありと判定した (Fig. 2)



a : 雌性前核 b : 雄性前核
c : 精子尾部 d : 極体

Fig. 2. ハムスター卵へのヒト精子侵入像

A. スライドガラスの作成



B. マイクロピペットによる卵の挿入

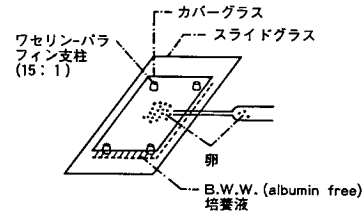


Fig. 3. 圧平標本作成方法

約30個のそれぞれの卵について精子侵入の有無を判定し、試験に使用した卵の何%に精子侵入がみられたかをもって精子侵入率とした。すなわち、たとえば30個の卵のうち6個の卵に精子侵入がみられれば精子侵入率は20%である。

卵圧平標本の作成には、スライドガラス上に予めカバーガラスの大きさに合わせた、4本のワセリン-パラフィン混合 (15:1) 支柱をおく。次いで卵をスライドガラスに付着させる目的で、その内部に1～2滴のホリエルリジン溶液を塗抹乾燥後、albumin free の mBWW 培養液を約10滴のせ、その支柱の上にカバーガラスを静置させておく。マイクロピペットを用い培養液に浮遊した卵をカバーガラスとスライドガラスの間に注入後、約15分間静置し、実体顕微鏡下に過剰な培養液をろ紙にて吸引し、圧平標本が作成された (Fig. 3)。

(d) 結果

正常群と男性不妊群の各種精子パラメータの最大値、最小値と第1四分位、第3四分位、および中央値と平均値を Table 2 に示した。四分位数とは正規分布における標準偏差と同じ意味あいを持ち、第1四分位とは小さい方から数えて全症例実測値を1/3に分割する数値を、第3四分位は3/3に分割する数値である。測定値などが正規分布をとらない場合には平均値よりこの表記法のほうが、それらの代表的な測定値を表示するものとしてより適しているとされている。

正常群と男性不妊群の比較を Wilcoxon 順位と検定で行なうと、アクロシン活性を除く他のすべてのパラメータに有意差 ($P < 0.05$) が認められた。しかし、

Table 2. 精子パラメーター —正常群, 不妊群—

		最小値	第1四分位	中央値	第3四分位	最大値	平均値±S.D.	検体数
精 子 濃 度	正常群	18.0	62.0	80.0	104	319	91.9±66.7	72
	($\times 10^6/\text{ml}$) 不妊群	0.1	17.7	32.9	57.7	159.8	42.4±36.2	87
精 子 運 動 率	正常群	26.9	48.0	57.9	66.2	88.4	57.5±16.5	72
	(%) 不妊群	2.0	16.2	24.6	41.6	75.3	30.5±21.0	87
平均精子運動速度	正常群	20.5	26.0	30.6	35.8	47.8	31.5±8.5	65
	($\mu\text{m}/\text{sec}$) 不妊群	11.3	17.9	25.0	29.1	41.7	24.5±7.9	84
総 精 子 数	正常群	54	159	234	328	649	261±169	72
	($\times 10^6$) 不妊群	0.1	53.5	91	190	618	144±148	87
総 運 動 精 子 数	正常群	22	83	125	196	547	152±119	72
	($\times 10^6$) 不妊群	0.1	12.6	30.3	49.5	432	47.3±68.3	87
精子正常形態率	正常群	40.7	69.4	77.4	86.0	98.3	76.6±15.0	71
	(%) 不妊群	0.1	52.7	67.8	78.6	95.2	36.3±22.5	85
ア ク ロ シ ン 活 性	正常群	0.2	2.0	3.1	3.6	13.1	3.7±2.8	46
	($\text{mU}/10^7$) 不妊群	0.4	1.1	1.8	4.2	9.0	2.9±2.4	45
精 子 侵 入 率	正常群	13	46	68	86	100	66±35	50
	(%) 不妊群	0	0	11	28	100	21±35	58

Table 3. 精漿パラメーター —正常群, 不妊群—

		最小値	第1四分位	中央値	第3四分位	最大値	平均値±S.D.	検体数
精 液 量	正常群	1.0	2.2	3.0	3.5	6.0	3.0±1.1	72
	(ml) 不妊群	0.5	2.5	3.1	4.8	8.9	3.7±1.9	87
pH	正常群	6.6	7.8	7.9	8.1	8.4	7.9±0.3	56
	不妊群	6.8	7.7	7.9	8.1	8.6	7.9±0.3	68
精 漿 中 亜 鉛	正常群	40	87	124	167	547	154±71	50
	($\mu\text{g}/\text{ml}$) 不妊群	43	82	137	175	446	151±87	53
精漿中マグネシウム	正常群	43	86	102	136	218	113±41	43
	($\mu\text{g}/\text{ml}$) 不妊群	41	77	109	143	341	131±70	49

有意差が認められるとはいえ測定値は正常群, 男性不妊群ともにきわめて広範囲に分布, 交錯している. 例えば精子濃度についてみると, 正常群での最小値は $18.0 \times 10^6/\text{ml}$ であるのに対し, 男性不妊群の最大値は, $159.8 \times 10^6/\text{ml}$ であった. 他のパラメータについても同様のことがいえる.

一方, 精液, 精漿パラメータ (Table 3) は正常群と男性不妊群間に有意差は認められなかった.

前述したごとくアクロシン活性を除く各種精子パラメータについては, 正常群, 男性不妊群間に有意差が認められたが, 次にこのうちのどのパラメータが正常との比較という観点からみて, 男性不妊について診断的価値の高いかを検討した. すなわち各種パラメータの不妊診断率を求め比較した.

不妊診断率の算定には各パラメータの正常値における95%特異性を使用した. 95%特異性について精子侵入率を例にとって説明する (Fig. 4). 今回正常群50例について精子侵入率を測定し, その測定値の最小値は13%であるので, 正常群のすべてが正常と診断され

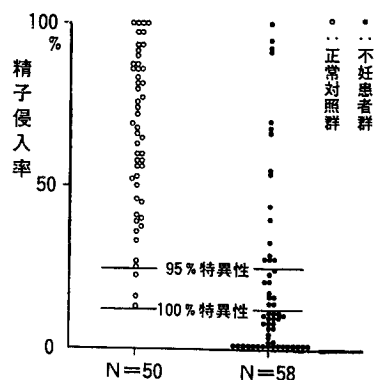


Fig. 4. 精子侵入率の95%および100%特異性

るための閾値すなわち12%が100% specificity (特異性) 閾値である. これに対し, 95%特異性とは正常人の95%, この例では47例が正常と判断されるための閾値であり, 47例目の実測値は25%であるので24%が95%特異性閾値となる. 100%特異性よりも95%特異性を採用する方がより現実的であるため95%特異性を採

Table 4. 精子および精漿パラメータの95%および100%特異性

項 目		特 異 性	
		95 %	100 %
1	精 液 量 (mℓ)	1.1	0.9
2	精 子 濃 度 ($\times 10^6/\text{mℓ}$)	24.9	17.9
3	精子運動率 (%)	34.9	26.8
4	精子平均運動速度 ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	21.5	20.4
5	精液中総精子数 ($\times 10^6$ 匹)	72.9	53.9
6	精液中総運動精子数 ($\times 10^6$ 匹)	24.9	21.9
7	精子正常形態率 (%)	55.0	40.6
8	精子侵入率 (%)	24	12
9	アクロシン活性 ($\text{mU}/10^7$ 匹)	0.9	0.1
10	精液pH低値	7.5	6.5
11	精液pH高値	8.5	8.5
12	精漿中亜鉛濃度 ($\mu\text{g}/\text{mℓ}$)	57	39
13	精漿中マグネシウム濃度 ($\mu\text{g}/\text{mℓ}$)	58	42

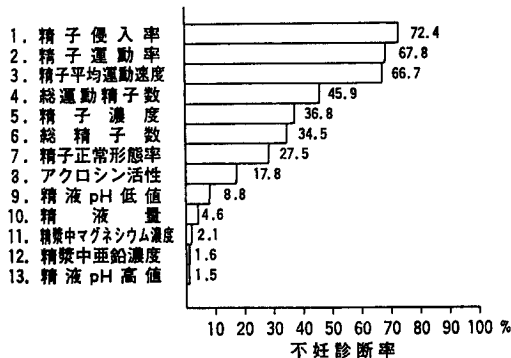


Fig. 5. 精子および精漿パラメータの不妊診断率—95%特異性による診断—

用し、この閾値から不妊診断率を算定する。すなわち精子侵入率24%以下の症例は不妊群では58例中24例(72.4%)であるため95%特異性における不妊診断率は72.4%ということになる。同様にしてもとめた各種パラメータの100%特異性および95%特異性閾値をTable 4に、95%特異性における不妊診断率をFig. 5に示した。

不妊診断率が最も高かったのは精子侵入率で、これについて精子運動率の67.8%が良好であり、以下精子平均運動速度、総運動精子数の順であった(Fig. 5)。一方、従来、不妊診断のうえで重視されていた精子濃度の診断率は36.8%と低値であった。この不妊診断率は、妊娠能のあることが証明された正常群のパラメータを基準として決められていることから、診断率の高いパラメータほど授精能に強く関与していることを示しており、精子侵入率は授精能に最も関与するパラメータと考えられた。

次に男性不妊群を対象として精子侵入率と精子濃度、運動率、総運動精子数および他の精子パラメータ

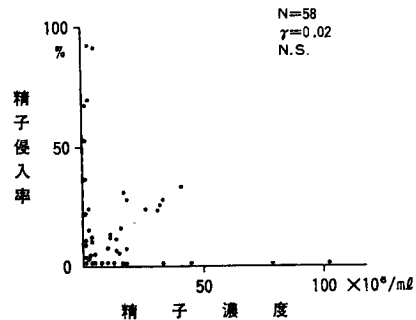


Fig. 6. 精子侵入率と精子濃度—男性不妊群—

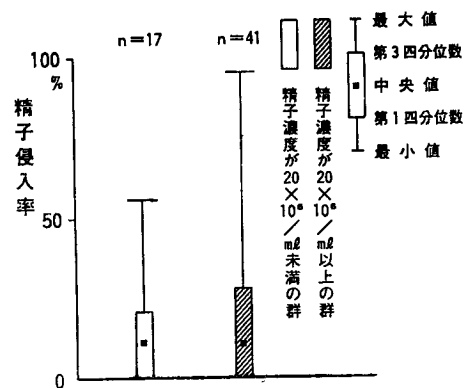


Fig. 7. 精子濃度別精子侵入率—男性不妊群—

との相関関係が検討された。精子侵入率と精子濃度の関係をみると精子濃度が低値の症例でも高い精子侵入率を示す症例が多くみられ、逆に精子濃度が高くても精子侵入率の低い症例も多く、両者は相関しないことがわかる(Fig. 6, $r=0.02$, N.S.).

精子濃度を $20 \times 10^6/\text{ml}$ を境として精子の濃度が高い群と低い群の、2群に分割して精子侵入率を比較検

討したところ、両群の精子侵入率に有意差は認められなかった (Fig. 7).

男性不妊群の精子侵入率と精子運動率の関係を検討したところ (Fig. 8), 両パラメータ間に有意な相関は認められなかった.

しかし、運動率が40%未満および40%以上の2群に分割し、さらに10%以下の群についても検討したところ (Fig. 9), 40%以上の群と他の2群との間の精子

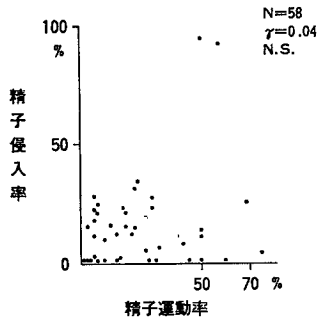


Fig. 8. 精子侵入率と精子運動率 —男性不妊群—

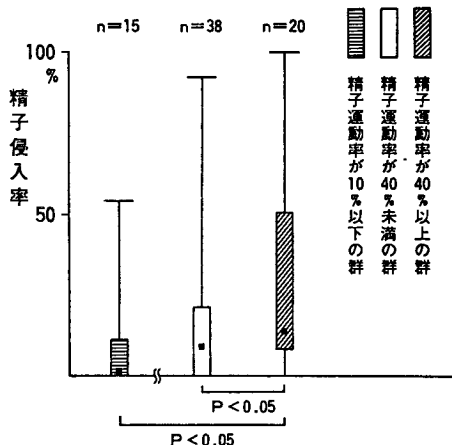


Fig. 9. 精子運動率別精子侵入率 —男性不妊群—

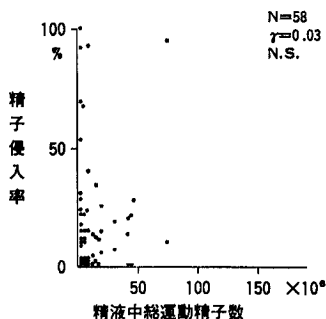


Fig. 10. 精液中総運動精子数と精子侵入率 —男性不妊群—

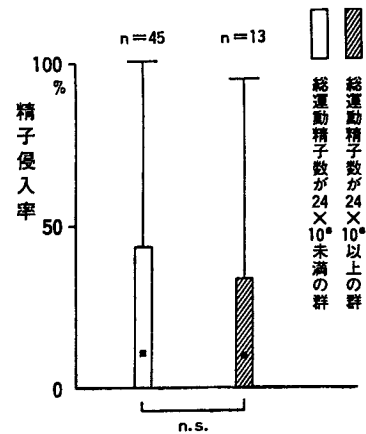


Fig. 11. 総運動精子数別精子侵入率 —男性不妊患者—

侵入率にそれぞれ有意差が認められた.

総運動精子数と精子侵入率の関連を同様に検討した (Fig. 10) が両者に相関はみられず、また男性不妊患者で総運動精子数が 24×10^6 以上の群と未満の群との間の精子侵入率に差は認められなかった (Fig. 11). 同様の検討を男性不妊群で精子平均運動速度、奇形率、総精子数について行なったが、いずれも精子侵入率との間に有意な相関を認めなかった. なお、正常群についても同様に精子侵入率と他の精子パラメータとの相関について検討したが、精子侵入率と相関するパラメータは認められなかった (Fig. 12~14).

(4) 原因不明不妊夫婦の夫における SPA の検討

(a) 対象

いわゆる原因不明不妊夫婦とは「通常の精液検査などで夫に異常を認めず、かつ通常の産婦人科的検査などで妻側に不妊の原因が認められない夫婦」である. 今回は各精子パラメータの95%特異性の結果を参考として、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、精子運動率40%以上、総運動精子数 24×10^6 以上、精子平均運動速度 $21.6 \mu\text{m}/\text{sec}$ 以上、精子正常形態率50%以上のすべての条件を満足させ、不妊期間2年以上のものとした. 以上に加え夫婦の血清中抗精子抗体がともに陰性という条件を加えた. これは原因不明不妊夫婦の中に精子授精能の低下が原因となっているものが、どの程度存在しているかを検討する本研究の性質上、いわゆる原因不明不妊夫婦の不妊原因の一つとして解明されつつある免疫学的不妊を除外するためである. なお抗精子抗体は精子不動化試験および Tray-agglutination test⁵⁾ により検索し、後者による凝集抗体は抗体価32以下を陰性とした.

この条件を満たした原因不明不妊夫婦の夫36例につ

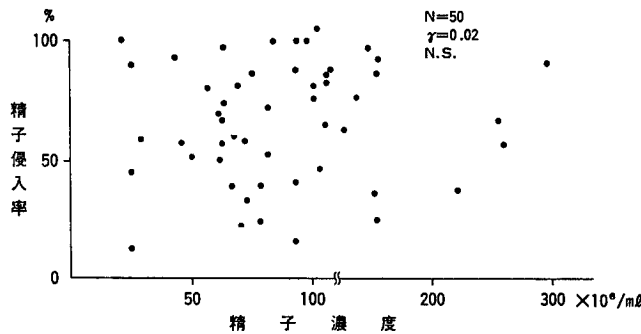


Fig. 12. 精子侵入率と精子濃度 —正常群—

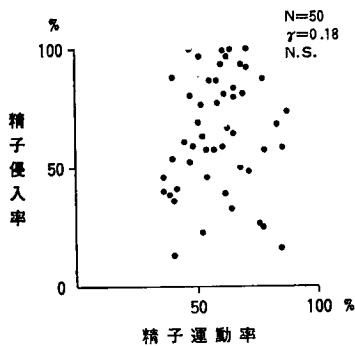


Fig. 13. 精子侵入率と精子運動率 —正常群—

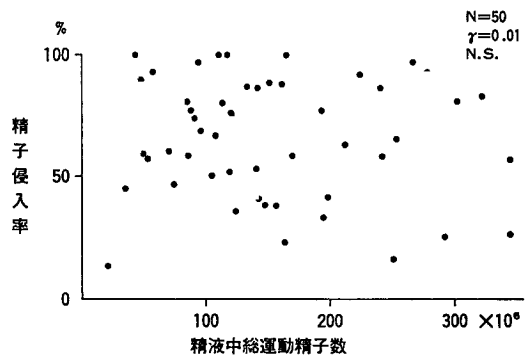


Fig. 14. 精子侵入率と精液中総運動精子数 —正常群—

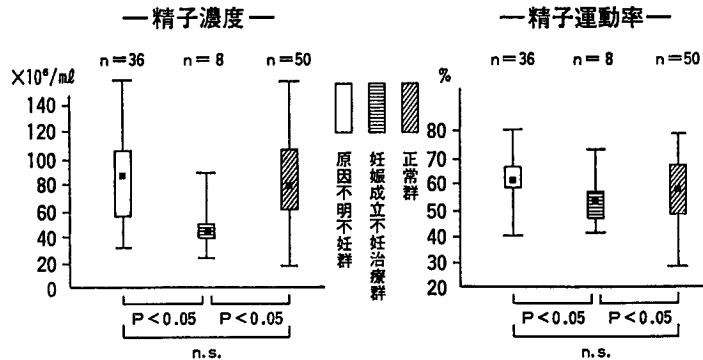


Fig. 15. 群別精子濃度・精子運動率

いて、SPA を行なった。その年齢分布は23歳から36歳で平均31.3歳、不妊期間は2.1年～8.0年で平均3.4年であった（原因不明不妊群）。

当科男性不妊外来を受診している男性不妊患者のうちで治療中に配偶者に妊娠の成立がみられた8例（妊娠成立不妊治療群）についても妊娠成立が判明した時点で、SPA を行ない比較した。これら妊娠成立不妊治療群の年齢分布は27歳から33歳で平均30.1歳、不妊期間は1.2年～3.8年平均2.9年であり、平均治療期間は1.2年であった。上記の両群と正常群について精子

侵入率を比較した。

(b) 結果

妊娠成立不妊治療群では原因不明不妊群および正常群に比し、精子濃度・運動率ともに推計学的に有意に（ $P<0.05$ ）低く、妊娠成立不妊治療群の精液所見は他の2群に比べて不良であった。一方、原因不明不妊群と正常群の比較では、前者の方が精子濃度・運動率ともにやや良好な傾向であるが、有意差は認められない（Fig. 15）。各群の精子侵入率をみると（Fig. 16）、正常群では最小値13%最大値100%で中央値は68%と

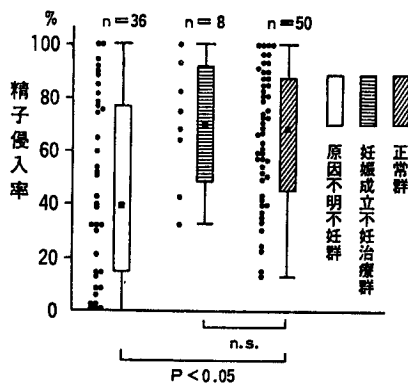


Fig. 16. 群別精子侵入試験

全体に高い侵入率を示している。これに対し、原因不明不妊群では最小値 0%，最大値 100% で中央値は 11% と全体的に正常群に比し低値で有意差 ($P < 0.05$) が認められた。正常群の 95% 特異性閾値 24% 以下の症例が対象の 36 例中 12 例 (33%) に、また 100% 特異性閾値 12% 以下の症例が 8 例 (22%) に認められた。妊娠成立不妊治療群では最小値 33%，最大値 100%，中央値 70% と良好で正常群との間に有意差はなかった。

以上の結果より、原因不明不妊群の精子侵入率は他の 2 群より低下していた。このうち明らかな低下といえる、侵入率 10% 未満のものは原因不明不妊群であり、これら症例では精子授精能の低下が不妊原因と考えられた。

考 察

男子の授精能は最終的に妊娠成立の有無に帰結することは議論の余地がない。受精には精子の授精能の獲得 (capacitation) が必要であり、その最終過程として精子の先体反応 (acrosome reaction) も必要である。capacitation の本態は完全に明らかにされていないが、精子が雌生殖器官中を通過する間に精子に付着している decapacitation factor などの精漿成分が除去されることが第一段階と考えられている。さらに、顆粒膜細胞層を通過するまでに、先体反応を完成させ、透明帯を通過するのに必要なアクロシンを放出する準備が完了する。先体反応は透明帯を通過するのに必要なだけでなく、卵に侵入するためにも不可欠とされている。男子の授精能について検討する場合、ヒト精子と新鮮なヒト卵子を用い、前述の過程の異常の有無を検索するのが理想的であるが、実際には困難である。1972 年柳町⁶⁾は透明帯を除去したハムスター卵子に capacitation および先体反応を起こしたモルモット精子が侵入できることを報告し、ついで

1976 年 capacitation, 先体反応を終了したヒト精子も透明帯除去ハムスター卵子に侵入する⁷⁾ことを示した。この事実から透明帯除去ハムスター卵子を利用した精子侵入試験 (SPA) が精子授精能の検査法として応用されるようになった。

臨床的には、1978 年 Barros ら⁷⁾は男性不妊群と正常群の精子について SPA を行ない、男性不妊群では正常群に比較して侵入成績が悪かったことを報告し、SPA の不妊診断法としての有用性を示唆した。その後も多数の本試験に関する報告がなされてきたが、実施法について未だ一定した方式は確立されていない。本試験の実施にあたっては、培養液、精子前培養時間、精子卵混和後培養時間、培養精子濃度の条件の設定が重要である。現在われわれは crystalline bovine albumin のかわりに human serum albumin を 3.5% の濃度となるように加えた mBWW 培養液を用いている。斎藤ら⁸⁾は bovine serum albumin 使用時には、侵入率の成績が低下する傾向があると述べており、一般的には human serum albumin が用いられている。albumin はヒト精子の capacitation のために重要で、albumin free では acrosome reaction は起こらず、また、その lot により acrosome reaction に差の生じる可能性もあることから、同一 lot の albumin が用いられるべきである。

精子前培養は、精子の capacitation を起こすために必要な操作であるが、その最適条件は報告者によって多少の違いがある。例えば Barros ら⁷⁾は 1 時間で十分とし、Rogers ら⁹⁾は 18~20 時間としている。あまり短時間では個人により acrosome reaction に時間差があるので偽陰性のである可能性があり、反対に長時間では前培養中に精子運動率の急激な低下をきたす症例があることから未だ統一した見解をみていない。Zausner ら¹⁰⁾は短時間培養 (2~3 時間) と長時間培養 (17~24 時間) による SPA の成績を比較し、短時間培養の方が良い結果を得られたと報告している。われわれも Zausner らの方針をとり、培養中の精子運動率の低下も無視できる 2 時間前培養が適当と考えている。精子と卵子の混和後の培養時間も一定の見解はないが短時間では偽陰性の危険が、また長時間すぎると卵の変性ならびに尾部の吸収により侵入判定が困難になる。われわれは前培養時間との関連および岡田¹¹⁾の *in vitro* mBWW 培養液中で培養した洗浄精子の acrosome reaction 完了率の経時的変化曲線が 6~8 時間で平衡化することから考えて、6 時間 (前培養からの合計 8 時間) が適当と考えている。

卵精子混和培養の精子濃度では、Binor ら¹²⁾は運

Table 5. 平均精子侵入率（正常対照）

年度	報告者	平均精子侵入率 (最小値～最大値)
1979	Barros ⁽⁷⁾	29%
1979	Rogers ⁽⁹⁾	56% (14～100)
1979	Kanwar ⁽¹³⁾	88%
1981	Aitkin ⁽¹⁴⁾	56% (11～100)
1981	Hall ⁽¹⁵⁾	66% (20～100)
1981	Zqausner ⁽¹⁰⁾	81% (15～100)
1981	Cohen ⁽¹⁶⁾	83% (29～100)
1982	Templeton ⁽¹⁷⁾	38% (0～92)
1983	Bolans ⁽¹⁸⁾	61% (40～100)
1984	自 験 例	66% (13～100)

動精子濃度 $0.6 \times 10^6/\text{ml}$ 以下なら精子侵入は起こらなかったとしている。培養精子濃度の違いにより精子侵入率に差があるので、比較検討するためには濃度を一定にする必要があるとされており、基礎的検討より運動精子濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ が適当と考えた。

正常対照の SPA (Table 5) は、諸家によりかなりの差が認められる。1979年 Rogers ら⁹⁾は、男性不妊精子の侵入率は 0～10%、正常対照 14～100%であったので、正常値を10%前後ではないかとしている。その後も多くの諸家により正常値を10%以上とした報告^{14,17,19)} がみられる一方、Hall ら¹⁵⁾のように20%以上を正常値とした報告もある。また井上ら²⁰⁾は Ca ionophore A23187 を用いて acrosome reaction を高率にかつ短時間で起こさせる方法を用いた SPA を 1,083 例に施行しその正常値を侵入率 70%以上とし異常値を30%以下としている。しかし、前記したごとく本試験の一定した実施条件が定まっていない現状での正常値は各施設において、妊孕力を有する正常者の値を参考に決定すべき性質のものと考えられる。本報では正常群の精子侵入率の最低値が13%であり、諸家の報告を参考にして検討した結果、10%までを正常とした。なお正常値内での高低（たとえば100%と30%）がもつ臨床的意義については未検討であり今後の課題と考えられる。いずれにしろ、SPA が精子授精能を評価するうえで信頼性の高い検査であることは、最近の体外受精 (IVF) における受精率との一致から証明されてきている。すなわち Margalioth ら²¹⁾は SPA が異常であった場合には IVF で受精したものではなく、SPA が正常のものでは77%に IVF で受精が成立したと報告しており、井上らも前述の SPA の結果と IVF の相関を報告している²⁰⁾。このように SPA で異常を示した場合にはヒト卵に対する授精能の低下が考えられる。

今回正常群と男性不妊群との精子侵入率をはじめとする精子パラメータを比較したところ、アクション活

性を除き両群間の他のすべての精子パラメータに有意差が認められた。しかし、集団としてみれば有意差のみられる各パラメータも、個々の症例では男性不妊群と正常群ではかなりの交錯が認められ、ただちに診断価値の高さにはつながらなかった。不妊診断率では精子の侵入率が95%特異性閾値72.4%を示し、すべてのパラメータの中で最高値であった。この診断率は妊孕能を有する正常群のパラメータを基準として決められていることから、診断率の高いパラメータほど授精能に強く関与していることを示しており、SPA は授精能の評価に最も有用と考えられた。

Albertsen ら²²⁾は客観的な精液検査法である MEP 法 (multiple exposure photography method) を用いて各種精子パラメータを測定し、かつ同時に SPA を行ない、本報と同様に正常者の特異性閾値を基準とした各パラメータの不妊診断率を検討している。これによると SPA の診断率が66%と良好であり、続いて精子平均運動速度の診断率54%、精子奇形率27%とし、精子濃度のそれは16%、運動率に関しては診断率4%と不良であったと報告している。今回の成績では SPA の診断率72.4%とその有用性については同じ成績を得たものの、著者の運動率は67.8%と良好で Albertsen らと相反する結果であった。これらの不一致については、他にこれらに関する報告がみられないので、現時点で結論づけることは困難でありさらに症例を重ねて検討する考えである。従来精液検査の中心的存在であった精子濃度の不妊診断率は著者および Albertsen らともに低値で一致している。

わが国における妊孕可能限界の精液所見は一般的に精子濃度 $45 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率60%、精子奇形率20～30%とされている。そして、精子濃度 $40 \sim 40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満のものが乏精子症とされてきた。しかし今回の検討では正常者の中にも $40 \times 10^6/\text{ml}$ 未満のものが存在することが明らかとなった。近年、欧米では乏精子症を $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満とすることが一般的となりつつあり、Eliasson²³⁾ は妻が妊娠3カ月目の夫精液を対象とした検討から、正常精液所見を精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、総精子数 80×10^6 以上、運動率50%以上、運動速度が良好で、精子奇形率60%未満としている。今回の検討で正常群の95%特異性における各種パラメータの閾値をみると、精子運動率を除きほぼ Eliasson の成績と同様である。運動率については、Eliasson は実際よりも高く評価される直接観察法により運動率を測定しているため、今回の BPP 法による客観的測定とくらべ高値となるのは当然のことである。以上のような成績から、従来重視されてきた精子濃度などの量

的因子 (quantity) の見直しが必要と考えている。この現実からわが国での精液所見の妊孕可能限界値は、精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 、総精子数 $60 \times 10^6/1$ 回射精、精子運動率40~50% (肉眼による直接観察法では60%) と考えている。

SPA と精子濃度、運動率など他のパラメータとの関連をみると、正常群、男性不妊群ともに相関が認められなかった。今までの報告もこれに一致するものが多い。しかし Zausner ら¹⁰⁾のように、survial index すなわち、培養後の運動率と精子前進性から算出された係数と SPA はよく相関したとする報告や岡田²⁴⁾のように、sperm motile efficiency index すなわち一定の line 上を単位時間あたりに通過する精子数と精子侵入率とは相関するとの報告も見受けられる。今回の成績で精子運動率が10%未満の症例での精子侵入率が低い傾向にあったこと、また運動率40%以上で精子侵入率が高かったことは精子運動性とのある程度の関連を示唆しているものと考えられるので、今後さらに詳細な検討が必要と考えられる。

岡田¹¹⁾は Talbot ら²⁵⁾が提唱した triple stain technique による精子 acrosome reaction の検討を行ない、不妊患者精子のうちで乏精子症患者や運動率20%以下の精子は fertile male に比して acrosome reaction をおこさせることが困難であったとしている。SPA において侵入する精子は capacitation の最終段階としての acrosome reaction を終了していることが不可欠であるが、今回の成績では精子侵入率は精子濃度などと相関せず、岡田の成績とは一致しなかった。前述のように SPA は臨床的に男性の妊孕力に最も関与していることから、SPA は単に acrosome reaction の確認だけではなく、精子運動能を含む総合的な判定をしている可能性を示唆するもので、不妊診断に極めて有用と考えられた。SPA はあくまで、卵との受精の場での反応を *in vitro* でみる検査であり、受精の場である卵管膨大部に精子が達するためには、従来の考えほどの精子濃度、運動率が必要ではないにしろ、ある程度良好な精液所見であることが必要と考えられ、従来の精液検査の意義を全く否定するものではない。

いわゆる原因不明不妊夫婦の夫における SPA の検討において、精子侵入率の正常値を10%以上として判定した結果22% (36例中8例) に精子侵入率の低下がみられた。これらの夫婦では夫の精子授精能の低下が不妊原因と考えられ、原因不明不妊夫婦の原因検索に SPA が重要であることを示唆している。

妊娠成立不妊治療群では、その精子濃度、運動率は

正常群、原因不明不妊群と比し有意に低値であるにもかかわらず正常精子侵入率を示したことは上記の結論強く支持するものと考えられる。かつ従来の精液所見のみからの妊孕性の判定の限界を示唆していると考えられる。同様の報告では、原因不明不妊夫婦の精子侵入率は1981年に Hall ら¹⁵⁾が、その32%に侵入率低下をみたしたのを始め、他にも同様の報告¹⁷⁾が散見される。

アクロシン活性の95%特異性による診断率は低かった。これは死滅精子や acrosome reaction 未完了の精子のアクロシン活性を一括して測定していることが一因と考えられる。

SPA は精子の顆粒膜細胞層や透明帯通過能は評価できないこと^{26,27)} また、不妊診断率が最も良好であったが100%ではなかったことから今後アクロシン活性やさらには今までにない新しい評価法の確立が望まれる。

以上、今回の研究成績によって男性不妊の授精能の評価において SPA の有用性が示唆された。しかし、SPA は決して簡単に施行可能な検査ではないことから臨床的には SPA と相関する簡便な検査の開発が望まれる。

結 語

正常男性50名と不妊男性58名に透明帯除去ハムスター卵を使用した精子侵入試験 (SPA) を施行したところ精子侵入率 (中央値) はそれぞれ68% (13%~100%)、11% (0%~100%) で不妊男性では低値であった。

正常男性および不妊男性ともに精子侵入率と従来の精子パラメータとの間に相関は認められなかった。SPA の不妊診断率は72.4%と他のパラメータに比べて高率であり、男性妊孕能に最も関連する可能性が示唆された。これに対し従来重視されてきた精子濃度の不妊診断率は36.8%と低かった。

従来の精液検査では正常と評価される「いわゆる原因不明不妊夫婦の夫」に SPA を施行し、精子侵入率10%未満の症例が36例中8例 (22%) に認められ、精子授精能の低下が不妊原因となっている可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、終始御指導ならびに御校閲を賜りました恩師石神義次名誉教授に深く感謝の意を表します。

また、本研究に際し御助言をいただいた教室の諸先生方に感謝いたします。本論文の要旨は第72回日本泌尿器科学会総会 (1984年) にて報告した。

文 献

- 1) Yanagimachi R, Yanagimachi H and Rogers BJ: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15: 471~476, 1976
- 2) Hazama M, Okada H, Matsumoto O, Kamidono S and Ishigami J: Automatic analysis of sperm characters by means of a microcomputer system. The XIth World Congress on Fertility and Sterility, June 1983, Dublin
- 3) Schill WB: Acrosin activity in human spermatozoa. Methodological investigation. *Arch Derm Forsch* 248: 257~273, 1973
- 4) 荒木 峻・鈴木繁喬：フレイム分光光度法と原子吸光分析法：分析化学 第2版, 278~284, 東京化学同人, 東京, 1971
- 5) 石神襄次・松本 修：免疫学的男性不妊。免疫と疾患 8: 197~202, 1983
- 6) Yanagimachi R: Penetration of guinea pig spermatozoa into hamster egg *in vitro*. *J Reprod Fert* 28: 477~480, 1972
- 7) Barros C, Gonzalez J, Herrea E and Bustos-Obregon E: Human sperm penetration into zona free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilization ability: *Andrologia* 11: 197~210, 1979
- 8) 斎藤 晃・星 和彦・鈴木雅洲・柳町隆造・林 恵子：ハムスター卵子を使用したヒト精子の受精力検討—方法と利用の現状—。産と婦 49: 1855~1862, 1982
- 9) Rogers BJ, Campen HV, Ueno M, Lambert H, Bronson R and Hole R: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil & Steril* 32: 664~670, 1979
- 10) Zausner GB, Blascol L and Wolf DP: Zona free hamster eggs and human sperm penetration capacity: a comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil & Steril* 36: 771~777, 1981
- 11) 岡田 弘：男性不妊に関する研究—in vitro におけるヒト精子 acrosome reaction—。泌尿紀要 31: 429~440, 1985
- 12) Binor Z and Sokoloski JE: Penetration of the zona free hamster egg by human sperm. *Fertil & Steril* 33: 321~327, 1980
- 13) Kanwar KC, Yanagimachi R and Lopata A: Effects of human seminal plasma on fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil & Steril* 31: 321~327, 1979
- 14) Aitken RJ, Rudak EA, Richardson DW, Djahanbakhch O and Templeton A: The influence of anti-zona and anti-sperm antibodies on sperm-egg interactions. *J Reprod Fert* 62: 597~606, 1981
- 15) Hall JL: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil & Steril* 35: 457~468, 1981
- 16) Cohen J, Felten P and Zeilmaker GH: *In vitro* capacitation of fresh and cryopreserved human spermatozoa: a comparative study of freezing and thawing procedures. *Fertil & Steril* 36: 356~362, 1981
- 17) Templeton A, Aitken J, Mortimer D and Best F: Sperm function in patients with unexplained infertility. *Br J Obstet Gynecol* 89: 550~554, 1982
- 18) Bolans JR, Overstreet JW and Katz DF: Human sperm penetration of zona free hamster eggs after storage of the semen for 48 hours at 2°C to 5°C: *Fertil & Steril* 39: 536~541, 1983
- 19) Karp LE, Williamson RA, Moore DE, Shy KK, Plymate SR and Smith WD: Sperm penetration assay: useful test in evaluation of male fertility. *Obstet Gynecol* 57: 620~623, 1981
- 20) 井上正人・小林善宗・本田育子・内村道隆・村上 優・松浦俊一・藤井明和：Zona-free hamster egg sperm penetration test による精子受精能力の判定—不妊患者 1,083例の分析。第5回 日本アンドロロジー学会抄録集 p. 118
- 21) Margalioth EJ, Navot D, Laufer N, Yosef SM, Rabinowitz R, Yarkoni S and Schenker JG: Zona free hamster ovum penetration assay as a screening procedure for *in vitro* fertilization. *Fertil & Steril* 40: 386~388, 1983

- 22) Albertsen PC, Chang TSK, Vindivich D, Robinson JC and Smyth JW : A critical method of evaluating tests for male infertility. *J Urol* **130**: 467~475, 1983
- 23) Eliasson R : Comprehensive endocrinology, The Testis, p 381, Raven Press, New York, 1981
- 24) 岡田詔子 : 受精能と運動能の相関. 第5回日本アンドロロジー学会抄録集 p. 16
- 25) Talbot P and Chacon RS : A triple stain technique for evaluating normal acrosomal reactions of human sperm. *J Exp Zool* **215**: 201~208, 1981
- 26) Overstreet JW, Yanagimachi R and Katz D F Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the free hamster egg : a study of fertile donor and infertile patients. *Fertil & Steril* **33** : 534~542, 1980
- 27) John EG, Overstreet JW, Yanagimachi H, Yanagimachi R and Katz DF: What function of the sperm cell are measured by *in vitro* fertilizing of the hamster eggs. *Fertil & Steril* **40**: 344~352, 1983

(1986年8月4日迅速掲載受付)