

— 総説 —

特集：生殖補助医療における精子処理の基礎と実際

生殖補助医療における精液処理の工夫と実際 Tips and actual operation of sperm preparation for ART

湯本 啓太郎

Keitaro Yumoto

医療法人社団 ミオ・ファティリティ・クリニック 〒683-0008 米子市

Medical Corporation Group Mio Fertility Clinic, Reproductive Centre, 2-1-1 kuzumo-minami, Yonago, Tottori 683-0008, Japan

要旨：生殖補助医療（ART）においては、当然のことながら、受精可能な成熟卵子の獲得とともに、必要十分な健常精子の回収が最重要因子である。そして、可能な限り配偶子の質的劣化を防ぐ目的により体外培養環境は体内環境に近づける努力がなされてきた。そのため、ART治療の際、精子は室温環境のクリーンベンチ内で処理後、37.0度に設定された加湿型培養器内にて、媒精もしくは顕微授精まで保管されてきた。しかしながら、近年、卵子のみならず、精子保管条件や精液処理に関する検討が多く行われているため、実施手順の再考の必要性により、近年当院で変更した点などについて解説する。

キーワード：ヒト精液，一般不妊治療，ART，保存温度，保存時間

はじめに

一般的に男性因子による不妊患者に対する一般不妊治療からARTでは、原精液所見により子宮内精子注入法（IUI）、体外受精（c-IVF）、顕微授精（ICSI）などが行われる。これらの手法を用いる際には、できるだけ多くの健常精子を回収することは必須であり、現在では、そのために種々の改良・工夫が施された精子回収法が考案されている^{1,2)}。しかしながら、我々は、当初より密度勾配遠心法（パーコール処理）を実施している。原精液中で最も重量があるのは運動精子であるため、沈渣を回収することで、運動精子を多く集めることができるかとされている。調整法としては、市販されているパーコール原液（Cytiva, Sweden）を、 $\text{pH}7.40 \pm 0.2$ 、浸透圧 $280 \pm 2 \text{ mOsm/kg}$ に合わせ、HEPES含有HTF mediumにより希釈し、3種類（40%、70%、90%）の濃度のパーコール液を作成している。実際の精液処理方法は、射出精液を約30分間液化後、コニカルチューブ（Corning, USA）に3層パーコール（40%、70%、90%）を層積し、その層を崩さないように液化精液を壁づたいにゆっくり入れ、遠心分離（30分間）にてコニカルチューブ底沈渣から運動精子を回収する。

また、本処理にて、精液中の殆どの不純物、細菌、ウイルスは除去できるとされている。また、我々の過去の検討から、2層パーコール処理よりも3層パーコール処理を実施した場合に、より精液中の不純物を除去できるが、精液中のすべての菌、ウイルスを除去できる訳ではなく、検討したサンプルの数%では、少数の細菌叢が検出されている。そのため、我々は、原精液所見の厳しい場合（ $< 1.0 \times 10^6/\text{mL}$ ）であったとしても、可能な限り細菌、ウイルスの除去を目的に3層パーコール処理を堅持している。また、使用する培養液には抗生物質が添加されており、精液中の菌の混入にも付加的効果が期待できると考えている。しかし、過去の苦い事例で、採卵翌日に、媒精を行った受精用培養液（Fertilization Medium, COOK, Australia）から緑膿菌が検出され、これが、精液由来であることが後日判明した。したがって、原精液中の一般細菌培養において感染源となりうる細菌が確認された際には、予防的薬療法が必須であり、また、IUI実施前に、女性側への化学療法も一考に値する。

近年、精液処理後から精子頭部に含まれるDNAは酸化ストレスの影響で、DNAフラグメンテーション率が時間経過と共に増加することが報告されている³⁾。そのため、精液処理法や保存温度の検討⁴⁾、精液処理から媒精までの経過時間と培養結果^{5,6)}などに関する論文が多く見られる。いずれにしても、精液処理終了から実際に治療に用いるまでの時間には正の相関があり、経過時間が延長すると、精子の質と機能が低下すると報告されている。また、精子処理後の保存温

（受付 2021年7月30日／受理 2021年9月4日）

別刷請求先：〒683-0008 鳥取県米子市車尾南2-1-1

医療法人社団 ミオ・ファティリティ・クリニック

e-mail: yumotok@mfc.or.jp

度は37.0度に比して、室温保存で良好な傾向が認められている。本稿では、これらの精液所見や精子処理とその後の治療成績について解析結果も提示したい。

精液所見と治療法選択

当院でのIUI実施症例における精液処理前後の精液所見と妊娠結果を表1に示す。原精液の精子濃度が、 $10.0 \times 10^6/\text{mL}$ 以上であれば妊娠率10%以上が期待されるが、 $10.0 \times 10^6/\text{mL}$ 未満では、妊娠率は低下し、精子濃度 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 未満では、妊娠率は明らかに低下($P < 0.01$)する。また、表1に処理後として、IUI用にパーコール処理にて運動精子回収した濃度別妊娠率を示す。最終濃度が低値であるほど、運動率が良好であったとしても妊娠率は低率となった。そのため、原精液、処理後の精子濃度が $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ 未満では、挙児希望夫婦の第一選択がIUIである場合、事前に十分な情報提供

が必要で、医療者側としての第一選択が必ずしもIUIでなく、ARTの推奨が必要と考えている。次に、当院でのc-IVF症例における精液処理後の運動精子濃度別の正常受精率を表2に示す。当院では、媒精に供する精子浮遊液は最終運動精子濃度 $5.0 \times 10^6/\text{mL}$ とし、卵子あたり $5.0 \times 10^4/\text{mL}$ で媒精しているが、最終運動精子濃度 $2.4 \times 10^6/\text{mL}$ 以下において、必要精子数を媒精しても正常受精率は低下することが確認され、現在では、最終精子濃度 $2.4 \times 10^6/\text{mL}$ 以下の場合はICSI適応としている。

精子調整時のポイント

我々は前述の通りART用精液処理法として、3層パーコール密度勾配法(40%, 70%, 90%)を用いているが、加えて、より運動性の優れた精子回収のためにswim up法を追加実施している。その後、6% CO₂下にてpHが 7.35 ± 0.05 とな

表1 IUIにおける精液処理前後の精液所見と妊娠率

	原精液 ($\times 10^6$)			運動率 (%)	処理後 ($\times 10^6$)		
	IUI数	妊娠数	妊娠率 (%)		IUI数	妊娠数	妊娠率 (%)
< 5.0	280	11	3.9 ^a	≥ 95	419	17	4.1 ^c
5.0~9.9	337	25	7.4	≥ 95	360	24	6.7
10.0~14.9	425	49	11.5 ^b	≥ 95	366	29	7.9 ^d
15.0~19.9	434	52	12.0 ^b	≥ 95	382	38	9.9 ^e
20.0~24.9	536	55	10.3 ^b	≥ 95	434	52	12.0 ^e
25.0~29.9	529	70	13.2 ^b	≥ 95	415	48	11.6 ^e
30.0~34.9	571	82	14.4 ^b	≥ 95	449	72	16.0 ^e
35.0~39.9	568	65	11.4 ^b	≥ 95	410	56	13.7 ^e
40.0~44.9	507	68	13.4 ^b	≥ 95	403	54	13.4 ^e
45.0~49.9	416	52	12.5 ^b	≥ 95	359	48	13.4 ^e
50.0~54.9	338	50	14.8 ^b	≥ 95	319	51	16.0 ^e
55.0~59.9	313	52	16.6 ^b	≥ 95	291	47	16.2 ^e
60.0~64.9	266	36	13.5 ^b	≥ 95	260	35	13.5 ^e
65.0~69.9	229	36	15.7 ^b	≥ 95	258	38	14.7 ^e
≥ 70.0	1161	177	15.2 ^b	≥ 95	1785	271	15.2 ^e
計	6910	880	12.7		6910	880	12.7

^a vs. ^b, ^c vs. ^e $P < 0.01$ カイ二乗検定により行った。 ^c vs. ^d $P < 0.05$ カイ二乗検定により行った。

表2 精液処理後所見とc-IVFにおける正常受精率

最終濃度 ($\times 10^6/\text{mL}$)	成熟卵子数	正常受精数	正常受精率 (%)
0.4~1.9	25	12	48.0 ^a
2.0~2.4	183	106	57.9 ^b
2.5~2.9	268	172	64.2 ^a
3.0~3.4	735	484	65.9 ^b
3.5~3.9	1080	696	64.4 ^b
4.0~4.4	2170	1409	64.9 ^b
4.5~4.9	4165	2854	68.5 ^b
≥ 5.0	24943	17731	71.1 ^c
計	33569	23464	69.90%

^a vs. ^c $P < 0.05$ カイ二乗検定により行った。 ^b vs. ^c $P < 0.01$ カイ二乗検定により行った。

受精用培養液を用い濃縮した精子浮遊液を作成するが、その保管については、精巣内温度が、体温よりも2～3度低い⁷⁾ことから、33.0度に常時設定したウォータージャケットタイプの6% CO₂インキュベーター内で保管している。近年の論文において、処理後に24時間室温保管した場合、37.0度保管した場合に比して、精子のDNA損傷率の上昇が緩やかになる⁸⁾という報告もあるが、短時間であればほとんど差はない⁹⁾とも言われている。したがって、我々は、精巣内温度と室温は異なると考え、より自然に近い状態で保管するために、室温ではなく、精巣内温度に近い33.0度での短期保管を心がけている。

媒精までの保存時間

当院では、原則、採卵から4時間前後で媒精を実施している。我々の過去の検討から、採卵から媒精までの前培養時間が6時間以上だと正常受精率が低下 ($P < 0.01$) した (表3)。これまでに、精液処理から媒精までの時間は短時間の方が良いとの報告⁷⁾があるが、精液処理からの時間は検討に入っていない。そのため、当院における採卵から4時間前後での媒精を原則とし、精液処理から媒精までの経過時間とc-IVF時の正常受精率の追試検討結果を表4に示す。精液処理から1時間未満での媒精と、精液処理から6時間以上経過後の媒精の場合に、正常受精率の低下 ($P < 0.01$) が認められた。6

時間以上経過した際に正常受精率が低下した理由としては、これまでの様々な報告からも、精子の質の劣化によると想像されるが、1時間未満の場合に正常受精率が低下した理由は不明である。しかし、本来、膣に射精した精子は、卵管内でcapacitationを完了し、卵子との結合能を獲得する¹⁰⁾が、ヒト精子におけるcapacitationにどのくらいの時間が必要なのかは、未だ詳細な解析はなされていない。したがって、精液処理後1時間では、capacitationが不十分な症例が存在する可能性が考えられた。

以上のことから、我々は、精液処理後から少なくとも1時間以上経過後に媒精することが望ましいことが示唆された。そのため媒精予定時間から逆算して、精液処理開始時間を設定することで、精子のDNAフラグメンテーション率の軽減にも繋がると考えている。

結 論

今回、当院のARTデータベースの後方視的解析結果より、タイミング療法、次にIUI、その後c-IVF、ICSIといったステップアップ治療ではなく、原精液中の精子濃度を基本とし、各症例の背景と拳児への意向を最優先に、精液所見を考慮した個々の夫婦に対するテラーメイド治療が何より重要と考える。

表3 前培養時間と受精結果

前培養時間	成熟卵子数	正常受精数	異常受精数	正常受精率(%)	異常受精率(%)
4時間未満	1341	938	115	69.9	8.6
4～5時間未満	18936	13368	1414	70.6 ^a	7.5
5～6時間未満	13632	9552	1015	70.1 ^a	7.4
6～7時間未満	3634	2455	293	67.6 ^b	8.1
7～8時間未満	1322	883	83	66.8 ^b	6.3
8時間以上	112	76	7	67.9 ^b	6.3
計	38977	27272	2927	70	7.5

^a vs. ^b $P < 0.01$ カイ二乗検定により行った。

表4 精液処理から媒精までの経過時間とc-IVFにおける正常受精率

媒精までの時間	成熟卵子数	正常受精数	正常受精率(%)
1時間未満	1119	700	62.6 ^a
1～2時間未満	4700	3271	69.6 ^b
2～3時間未満	8841	6270	70.9 ^{b,c}
3～4時間未満	11874	8432	71.0 ^{b,c}
4～5時間未満	6971	4954	71.1 ^{b,c}
5～6時間未満	1600	1138	71.1 ^{b,c}
6時間以上	174	109	62.6 ^d
計	35279	24874	70.5

採卵から媒精までの前培養時間は原則4時間前後で行った。^a vs ^b $P < 0.01$ カイ二乗検定により行った。^c vs ^d $P < 0.05$ カイ二乗検定により行った。

文 献

- 1) Zhang, X., Khimji, I., Gurkan, U.A., Safaee, H., Catalano, P.N., Keles, H.O., Kayaalp, E. and Demirci, U. (2011): Lensless imaging for simultaneous microfluidic sperm monitoring and sorting. *Lab Chip.*, 11, 2535–2540.
- 2) Parrella, A., Keating, D., Cheung, S., Xie, P., Stewart, J.D., Rosenwaks, Z. and Palermo, G.D. (2019): A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity. and recurrent ART failure. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 36, 2057–2066.
- 3) Jackson, R.E., Bormann, C.L., Hassun, P.A., Pocha, A.M., Motta, E.L., Serafini, P.C. and Smith, G.D. (2010): Effects of semen storage and separation techniques on sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.*, 94, 2626–2930.
- 4) Thijssen, A., Klerkx, E., Huyser, C., Bosmans, E., Campo, R. and Ombelet, W. (2014): Influence of temperature and sperm preparation on the quality of spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online.*, 28, 436–442.
- 5) Çok, T., Çağlar Aytaç, P., Şimşek, E., Haydardedeoğlu, B., Kalaycı, H., Özdemir, H. and Bulgan, K.H. (2015): The effect of preserving prepared sperm samples at room temperature or at 37°C before intrauterine insemination (IUI) on clinical pregnancy rate. *Turk. J. Obstet. Gynecol.*, 12, 6–10.
- 6) Ahmed, I., Abdelateef, S., Laqqan, M., Amor, H., Abdel-Lah, M.A. and Hammadeh, M.E. (2018) Influence of extended incubation time on Human sperm chromatin condensation, sperm DNA strand breaks and their effect on fertilisation rate. *Andrologia*, 14, 10.1111/and.12960.
- 7) Elder, K. and Dale, B. (2011): *In vitro fertilization*. third ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- 8) Aboulmaouahib, S., Madkour, A., Kaarouch, I., Saadani, B., Sefrioui, O., Louanjli, N., Copin, H., Cadi, R. and Benkhalifa, M. (2016): Effect of semen preparation technique and its incubation on sperm quality in the Moroccan population. *Andrologia.*, 49, 10.1111/and.12688.
- 9) Karimi, Zarchi, M., Maleki, B., Dehghani, Ashkezari, M., Motamed, Zadeh, L. and Agha-Rahimi, A. (2020): The effects of in vitro incubation of asthenoteratozoospermic semen after density gradient centrifugation at room temperature and 37°C on sperm parameters, chromatin quality and DNA fragmentation in a short time period. *J. Reprod. Infertil.*, 21, 275–282.
- 10) Lynn, R. Fraser. (1998): Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum. Reprod.*, 13, 9–19.