

—総説—

特集：生殖補助医療における精子処理の基礎と実際

## 当院における精液処理法の工夫と実際

### Innovations and practices in semen processing at our hospital

秋葉 陽子<sup>1,2</sup>

Yoko Akiba<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ウイメンズ・クリニック大泉学園 〒178-0063 練馬区

<sup>2</sup>株式会社ダンテ 〒105-0004 港区

<sup>1</sup>Women's clinic Oizumigakuen, 1-27-19 Higashioizumi, Nerima-ku, Tokyo 178-0063, Japan

<sup>2</sup>Dante Inc., 4-6-15 Shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-0004, Japan

**要旨：** 精液中の細菌混入は精漿成分の変性をさせ、細菌の内毒素により精子運動性が低下する。また、加温等の環境にて精子先体が損傷し受精能力が虚弱化することから、精子の前処理と処理中の温度管理に着目した。ヒト精液中には細菌性内毒素が高濃度に含まれる症例がある。密度勾配遠心法を用いて精漿を分離すると、細菌性内毒素の経時的上昇を認めず、精子DNA断片化率も有意に低くなることから、精液中の負の影響を抑制し精子の正常性を保つ有効な手段である。また、精子処理から媒精まで血清添加培養液での37℃の加温は、精子が自発的な先体反応を起こして先体が損傷し、受精能力を虚弱化させる可能性がある。治療に用いる精子は密度勾配遠心法後、室温にて保存し、媒精直前に血清添加培養液で加温してswim-up法を行うことが望ましい。培養室での精子処理は、運動精子回収のみではなく、精子の正常性を可能か限り保つことに留意する必要があると考える。

**キーワード：**TLR2/TLR4, 密度勾配遠心法, 精子室温保存

#### はじめに

精液中の細菌混入は、精漿成分の変性を引き起こし精子機能が低下することが報告されている<sup>1)</sup>。細菌混入による精子運動性の低下は、白血球からのサイトカインの分泌による自然免疫応答によって誘起されていると考えられてきた。しかし、我々は、精子にも免疫細胞関連遺伝子TLR2とTLR4が発現しており、細菌が放出する内毒素の影響によって精子運動性が低下することを報告した。

また、体外受精に用いる精液検体は処理から媒精までインキュベーター内で加温して保存することが一般的である。しかし、本来受精過程で誘起される先体反応が37℃、6% CO<sub>2</sub>下の血清添加培養液中では自発的に起こることが知られており、加温により精子先体が損傷し、精子の受精能力が脆弱化している可能性が危惧される。

これらのことから、本稿では、精液の前処理と処理中の温

度管理に着目し、精子生存性を損なわない最適な処理法について当院の処理法を含めて紹介する。

#### ヒト精液中の細菌、内毒素混入と精子への影響について

ヒトの精液中には細菌の混入が約3割の症例に認められ、そのほとんどがグラム陽性菌である。また、グラム陽性菌の細胞膜成分であるペプチドグリカンは、溶菌時に放出される毒素として作用し、グラム陰性菌の内毒素であるlipopolysaccharide (以下LPS) は、グラム陽性菌においても放出するものがある。精漿中の内毒素濃度の測定を行うと、血清中よりも高濃度に含まれる症例を多く認める<sup>2)</sup>。このようにヒト精液中には細菌だけではなく、内毒素も高濃度に存在しており、ペプチドグリカンの受容体であるTLR2とLPSの受容体であるTLR4はヒト精子においてタンパク質レベルでの発現と先体部位に局在していることを確認した<sup>2)</sup>。マウス精子においても同様に、TLR2とTLR4がタンパク質レベルで発現と先体で局在している。そこで、野生型マウス、TLR4ノックアウト(以下KO)マウス、TLR2/TLR4KOマウスの精子に対してPam3cysとLPSの添加試験を行った。野生型マウス精子はPam3cys添加とLPS添加のどちらでも精子運動率が低下しDNA断片化率が上昇した。

(受付 2021年7月26日/受理 2021年9月17日)

別刷請求先：〒178-0063 東京都練馬区東大泉1-27-19

アラウダ大泉ビル

ウイメンズ・クリニック大泉学園

e-mail: akiba.yoko@hc-sys.jp

さらにTLR4KOマウス精子ではLPS添加のみで精子への負の影響を認め、TLR2/TLR4KOマウスでは内毒素による精子への負の影響を認めなかった。体外受精の受精率においても、LPS添加において野生型マウス精子では受精率が低下するがTLR4KOマウス精子での受精率低下は認めず、TLR2/TLR4KOマウスではPam3cys添加、LPS添加のどちらの区においても受精率低下は認めなかった。これらのことから、精子ではそれぞれのリガンドをTLR2およびTLR4が特異的に認識することにより、精子運動性と受精能が低下することを明らかとした<sup>2)</sup>。

### 精漿成分に着目した精液処理法について

精液中の細菌、内毒素混入により精子機能が低下することから、治療に用いる精液の前処理はこの影響を軽減する必要がある。LPSに対してはPolymyxinB (以下PMB) という中和剤が存在するがヒト精液中に高頻度に存在するグラム陽性菌から放出されるペプチドグリカンに対しての中和剤は現時点では存在しない。このことから、精子を内毒素などが含まれる精漿から速やかに分離し、かつ精漿中の細菌や内毒素を除去する必要がある。その方法として密度勾配遠心法が有効であると考えられ、当院での体外受精用の精液処理法は密度勾配遠心法/swim-up法で行っている。具体的には(図1)に示す。射出精液検体を受け取り、液化を確認した後、CASA(精子運動解析システムCASA;ハミルトン・ソース社)にて精子数、運動率の測定を行う。精液所見がWHOの基準値以上の場合には、速やかに90%/50%2層

Isorate液(Irvine Scientific)上に検体を重層し、400回転、15分で遠心分離を行う。その際に、細菌からの内毒素の溶菌につながる可能性があるため、精液の液化が十分な場合には培養液での攪拌は行わない。精液の液化が不十分な場合にはのみ、少量の5% HSA添加HFFmedium(扶桑薬品)にて攪拌した後、Isolate液に重層する。遠心分離後、回収した精子のペレットは5% HSA添加HFFmedium中の底部に静置し、15分間37°C、6% CO<sub>2</sub>下でインキュベートしたのち、運動精子を回収する。回収した運動精子を再びCASAにて精子数、運動率を測定、Diff-Quick染色によるstrict- criteriaで精子正常形態率を測定し、通常体外受精もしくは顕微授精に用いる。

当院において、遠心処理法のみで精液処理を行った場合、精液中のペプチドグリカン濃度は経時的に上昇するが、密度勾配遠心法を行うことにより、経時的なペプチドグリカン上昇を認めなかった(図2)。また、ヒト精子にPam3cysもしくはLPSを添加すると、精子運動率が有意に低下し、精子のDNA断片化率が有意に上昇することを認めた。さらに、密度勾配遠心法/swim-up法で処理を行った精子を用いて顕微授精を行った症例では、swim-up法のみでの症例と比較して、心拍確認以降の妊娠継続率が有意に上昇することを確認した。これは、密度勾配遠心法/swim-up法で処理した精子を用いて顕微授精を行う際にDNAが断片化した精子を用いる割合が低くなったためと推測される。密度勾配遠心法は従来、良好精子選別のための手段であるが、精液から精子を回収することによって精液中の細菌性内毒素の増加によ

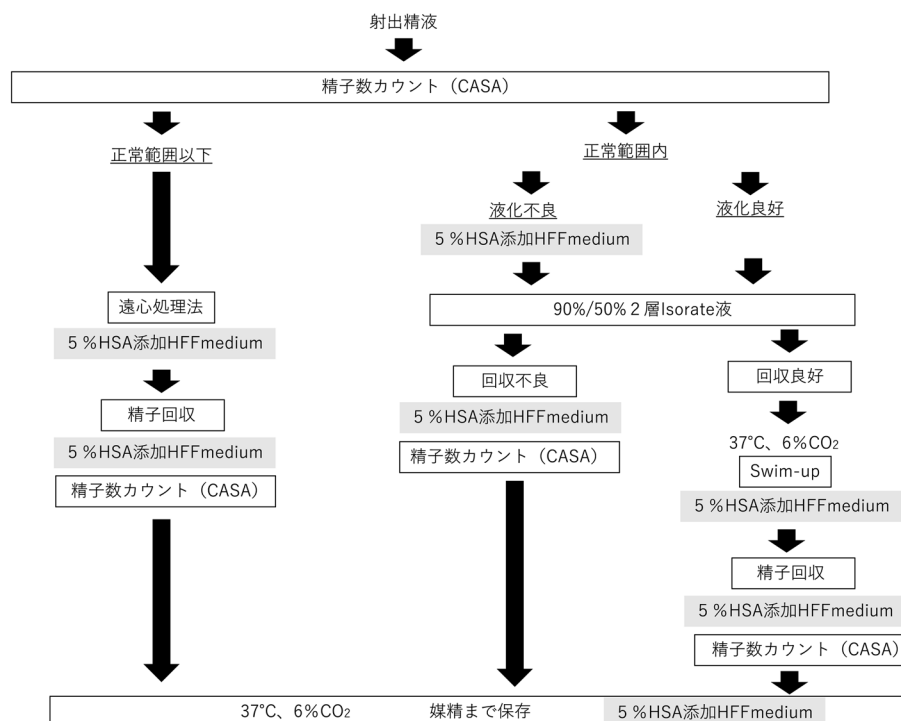
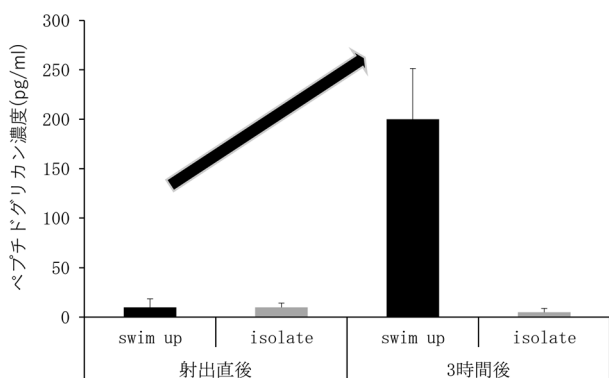


図1 精液処理法の流れ



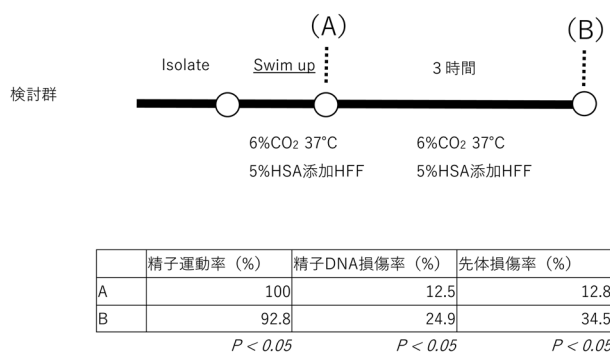
密度勾配遠心法を行うことにより、内毒素濃度の上昇を認めない

図2 精液処理法別，経時的細菌性内毒素（ペプチドグリカン）濃度変化

る負の影響を抑制し，精子の正常性を保つ手段としても有効であるといえる。

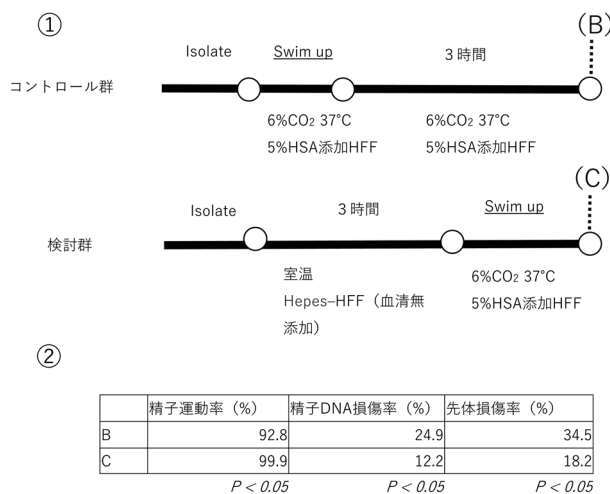
### 自発的先体反応誘起に着目した精子調整時の温度管理について

精子は37°Cの血清添加培養液中で長時間培養すると，自発的先体反応を誘起することが知られている。私たちは，密度勾配遠心法/swim-up法で処理し運動精子を回収した後，媒精に用いるまでの2-3時間をインキュベーターにて加温培養する過程で，精子が自発的に先体反応を誘起して先体が損傷するため，受精能力が脆弱化している可能性があると考えた。実際，私たちの検討において，密度勾配遠心法/swim-up法で回収した直後 (A) と回収後37°C，6% CO<sub>2</sub>下の血清添加培養液中で3時間培養した後の精子 (B) を比べると，精子運動率は回収直後の100%から培養後は92.8%へと有意に低下し ( $P < 0.05$ )，精子DNA損傷率は12.5%から24.9%へ ( $P < 0.05$ )，先体損傷率は12.8%から34.5%へ有意に上昇していた ( $P < 0.05$ ) (図3)。そこで，私たちは密度勾配遠心法で精子を回収した後，血清無添加の培養液にて室 (26°C) で3時間保存し，媒精の直前に加温してswim-up法で精子を回収する方法を考案した。具体的には，精液の液化を確認後，90%/50%2層 Isorate液に検体を重層し，400回転15分で遠心分離した後，血清無添加 HEPES - HFFmedium中で室温にて3時間保存した。その後37°Cで加温して精子のペレットを5%HSA添加HFF medium中の底部に静置し，37°C，6% CO<sub>2</sub>下で15分間インキュベートした後，運動精子を回収した。回収した運動精子はCASAによって運動率を測定し，TUNEL染色による精子DNA断片化率とFITC-PNA染色法による先体損傷率を評価した。コントロール群としてはこれまでと同様に，90%/50%2層 Isorate液で精子を回収した後，37°C，6% CO<sub>2</sub>下の5%HSA添加HFFmedium培養液中でswim-up法で精子を回収し，回収後も5%HSA添加HFFmedium培養液中にて37°C，6%



37°C，6% CO<sub>2</sub>下の血清添加培養液中で3時間培養後は精子機能が低下した

図3 密度勾配遠心法回収直後と3時間培養後の精子の比較



室温，無血清培養液で保存することにより精子正常性が維持された

図4 室温保存との比較

CO<sub>2</sub>下3時間保存した精子とした (図4①)。

この検討での結果を図4②に示す。運動率は検討群において99.9%であり，コントロール群の92.8%と比較して有意に高い値となった ( $P < 0.05$ )。精子DNA断片化率，先体損傷率はそれぞれ，検討群は12.2%，18.2%であり，コントロール群の24.9%，34.5%と比較して，検討群で有意に低い値となった。これらのことから，精子を密度勾配遠心法で回収した後，無血清培養液にて室温で保存することによって，精子の運動性が高く，かつ，自発的な先体反応を抑制し先体の正常性を維持したまま保存できることが示唆された。また，検討群ではこの後疑似的媒精環境として6% CO<sub>2</sub>，5% O<sub>2</sub>下で受精用培養液 (fertilization medium; オリジオ) にて3時間培養した後でも運動率が維持され，先体反応が誘起されていることを確認しており，少なくとも3時間の室温での保存は，精子の受精能を十分保持した状態保管することが確

認された。血清添加培養液では血清中のアルブミンが受精能獲得を引き起こすため精子の先体が損傷すると考えられるため、精子回収時以外には無血清培養液を使用することが望ましいと考えられる。さらに、治療の際に精子調整から媒精までに時間を要する場合には、密度勾配遠心法実施後、室温にて血清無添加培養液中で精子を保存し、媒精直前に37°Cまで加温してSwim-up法を実施することにより、運動率性および先体を維持した精子を媒精に用いることができると考えられた。

### おわりに

ヒト精液中には細菌や内毒素など、精子に負の影響を与える因子が存在し、それらの影響を除外するためには、採精後、密度勾配遠心法を用いて速やかに精子を分離する必要がある。さらに、媒精までに時間を要する場合には、血清無添加培養液と室温にて保存することにより、自発的先体反

応を抑制し、精子の正常性を維持したまま媒精に用いることが可能である。精子の正常性の低下は、受精した後の胚の後期の発生や、妊娠後の流産率に影響を与えることから、培養室での精液処理は、運動精子を回収することのみでなく、精子の正常性を可能な限り維持できる留意して行う必要があると考えている。

### 文献

- 1) Ochsendorf, F.R. (2008): Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia*, 40, 72–75.
- 2) Fujita, Y., Mihara, T., Okazaki, T., Shitanaka, M., Kushino, R., Ikeda, C., Negishi, H., Liu, Z., Richards, J.S. and Shimada, M. (2011): Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Hum. Reprod.*, 26, 2799–2806.