

精子の曲性に関するCASAを用いた検討

Examination of Sperm Curvature using CASA

磯部 哲也 松浦 大創

TETSUYA ISOBE, DAIZO MATSUURA

Reproductive Medical Center, Suzuka Kaisei Hospital, 112-1 Koucho, Suzuka, Mie 513-0836, Japan

要旨: 精子運動の曲性に関する法則は未知である。理論的に直進性LIN (Linearity) と曲線速度VCL (Curvilinear Velocity) の関係式を導き49症例から得られた新鮮射精精液175サンプルに対して精子運動解析装置CASA (Computer-Aided Sperm Analysis) を用いてその式の正当性を証明した。測定は1サンプルにつき視野を変えて精子の総カウント数が300以上になるように複数回行った。k₀を定数として直進性Lと曲線速度(前進速度)Vの間に関係式L²<1-k₀V²が成り立つことがわかった。3症例に対しては90%単層パーコール法を用いた精液処理を行いその前後および時間経過を追って各種精子運動パラメーターの測定を行なった。L²<1-k₀V²はk₀<(1-L²)/V²と変形できることより理論から(1-L²)/V²の値がサンプル中の精子の曲がりくねる度合いを表わすことがわかった。各サンプルについて(1-L²)/V²の平均値×10⁴を求めこれをSKI (Suzuka Kaisei Index) とした。SKIはパーコール処理によって減少し時間経過に伴って増加した。また全175サンプルについて調べた結果、運動率や平均曲線速度が減少するにつれてSKIは増加する傾向が認められた。これらの結果よりSKIが精子運動能を評価する指数の一つになりうる可能性が示唆された。さらに精子バネ理論を組み合わせることによってhyperactivationは高エネルギー状態を反映しているにすぎない可能性が示唆された。

キーワード: CASA, Linearity, 精子, 精子運動能評価指数, 精子運動法則

ABSTRACT: The principles relating to the directionality of sperm movement are unknown. The authors theoretically derived a formula for the relation between linearity (LIN) and curvilinear velocity (VCL), and demonstrated the validity of that formula using computer-aided sperm analysis (CASA) on 175 samples of freshly ejaculated semen obtained from 49 patients. Semen from 3 patients was treated using a 90% single-layer Percoll preparation, and various parameters were measured before and after the treatment as well as over the course of time. Measurements were made multiple times for each sample, changing the visual field so that the total sperm count was above 300. It was found that, taking k₀ as a constant, the following relation held between linearity (L) and curvilinear velocity (V): L² < 1 - k₀V². Since L² < 1 - k₀V² can be rearranged as k₀ < (1 - L²)/V², it was found theoretically that the value of (1 - L²)/V² indicates the degrees of winding forward of the sperm in a sample, the mean values of (1 - L²)/V² × 10⁴ were determined and used as the Suzuka Kaisei Index (SKI). SKI decreased with the Percoll treatment, and then increased with time. All 175 samples were examined, and a tendency was seen for the percent motility and mean curvilinear velocity to decrease with increases in SKI. These results suggest that SKI is a potential index of sperm motility. Moreover, it was found by using Sperm Spring Theory that hyperactivation may be merely the high energy state.

Key words: sperm, CASA, linearity, sperm motility index, law of sperm motion

緒言

精子運動解析装置 (CASA: Computer-Aided Sperm Analysis) を用いることによって精子の前進速度(曲線速度) VCL (Curvilinear velocity), 精子頭部首振り運動の振幅ALH (Amplitude of lateral head displacement) や振動数BCF (Beat-cross frequency), 直進性LIN (Linearity) など精

受付日: 2007年8月13日/受理日: 2007年9月28日
 鈴鹿回生病院 生殖医療センター: 〒513-0836 三重県鈴鹿市国府町112-1
 TEL: 059-375-1212 FAX: 059-375-1717
 e-mail: iso12-7@blue.ocn.ne.jp

子の運動能を評価するための様々なパラメーターを得ることができる。

卵透明帯への侵入直前の精子集団のなかに運動性が極めて活性化されるhyperactivationとよばれる現象をおこす精子の存在が発見され、この現象はVCLとALHの増加およびLINの減少を伴うことが報告された。

精子の前進速度VCL, 精子頭部首振り運動の振幅ALHや振動数BCFの間に成り立つ法則は近年発見されたりが、精子運動の曲性LINに関する法則は未知である。Hyperactivationの解明にはLINとその他の運動パラメーターの関係が不可欠である。今回、Hyperactivationが数理的に解明できる現象であると考え、数学的手法を用いてLINが満たすべき関係式を導き、CASAを用いた実験によりその正当性の証明を試みた。

対象と方法

以下に詳述するように理論的に直進性LIN (Linearity) と曲線速度VCL (Curvilinear Velocity) の間に成り立つ関係式を導き仮説とした。49症例から得た新鮮射精精液175サンプルに対して精子運動解析装置CASAを使って仮説の正当性を調べた。測定は1サンプルにつき視野を変えて精子の総カウント数が300以上になるように複数回行った。3症例に対しては90%単層パーコール法を用いた精液処理を行い、その前後および時間経過を追って測定を行なった。今回の実験ではSMAS (Sperm Motility Analysis System) (KAGA ELECTRONICS Co., Ltd, Tokyo, Japan) と呼ばれるCASAを使用した。SMASでは射精精液を1滴(5~10 μl)のせたMaklerチャンバーを位相差顕微鏡にセットして光量を調節し精子頭部に焦点を合わせるだけでCCDカメラが経時的に撮影した画像をコンピューター処理して個々の精子について直線速度VSL (Straight-line velocity) μm/s・曲線速度VCL (Curvilinear velocity) μm/s・頭部首振り運動の振幅ALH (Amplitude of lateral head displacement) μmや振動数BCF (Beat-cross frequency) Hz・直進性LIN (Linearity) などのパラメーターを測定することができ、個々の精子の生データをEXCEL (Microsoft, USA) 上で加工することができる。精子の前進速度は曲線速度(精子が移動した軌跡の長さ/測定に要した時間)で表わすことができる。直進性LINは[撮影の始点と終点を結んだ直線距離] ÷ [始点から終点までの移動距離], すなわち直線速度 ÷ 曲線速度で定義される。

実験に際してその目的や方法をデータ提供者に説明し同意を得るとともに個人情報匿名化され施設内で厳重に管理されることを明示した。

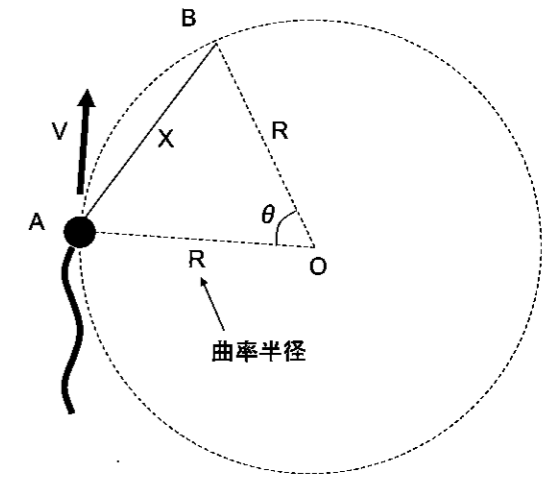


図1 同じ曲率で前進運動をする精子の曲率半径と曲線速度・直進性の関係
 直進性の定義よりLIN = (弧ABの長さ) / (直線ABの長さ) となる。

仮説(精子曲率理論)

測定時間中同じ曲率で前進運動をしている精子を考える。図1のように精子の前進速度(曲線速度)をV, 前進運動の曲率半径をR₀, 始点と終点を結ぶ直線の長さをX, Xに対応する角度をθラジアンとすれば、直進性Lはその定義よりL = X/V (1.1)が成り立つ。

二等辺三角形ABOにおいて次のように余弦定理が成り立つ。

$$X^2 = R_0^2 + R_0^2 - 2R_0^2 \cos \theta \text{ すなわち } X = R_0 \sqrt{2(1 - \cos \theta)} \quad (1.2)$$

扇形ABOにおいてラジアン定義よりV = R₀θ (1.3)が成り立つ。

式(1.2), (1.3)を式(1.1)に代入すると次の式が成り立つ。

$$L = \frac{\sqrt{2} \times \sqrt{1 - \cos \theta}}{\theta} = \frac{\sqrt{2} \times \sqrt{1 - \cos \left(\frac{V}{R_0} \right)}}{\left(\frac{V}{R_0} \right)} \quad (2.1)$$

テーラー展開 cos(V/R₀) ≅ 1 - 1/2 (V/R₀)² + 1/24 (V/R₀)⁴ を用いれば、式(2.1)は近似的に次のようになる。

$$L^2 = 1 - \left(\frac{1}{12R_0^2} \right) V^2 \quad (2.2)$$

式(2.2)はR₀ = 1 / (√12 √(1 - L²)) (2.3)に変形できるので、測

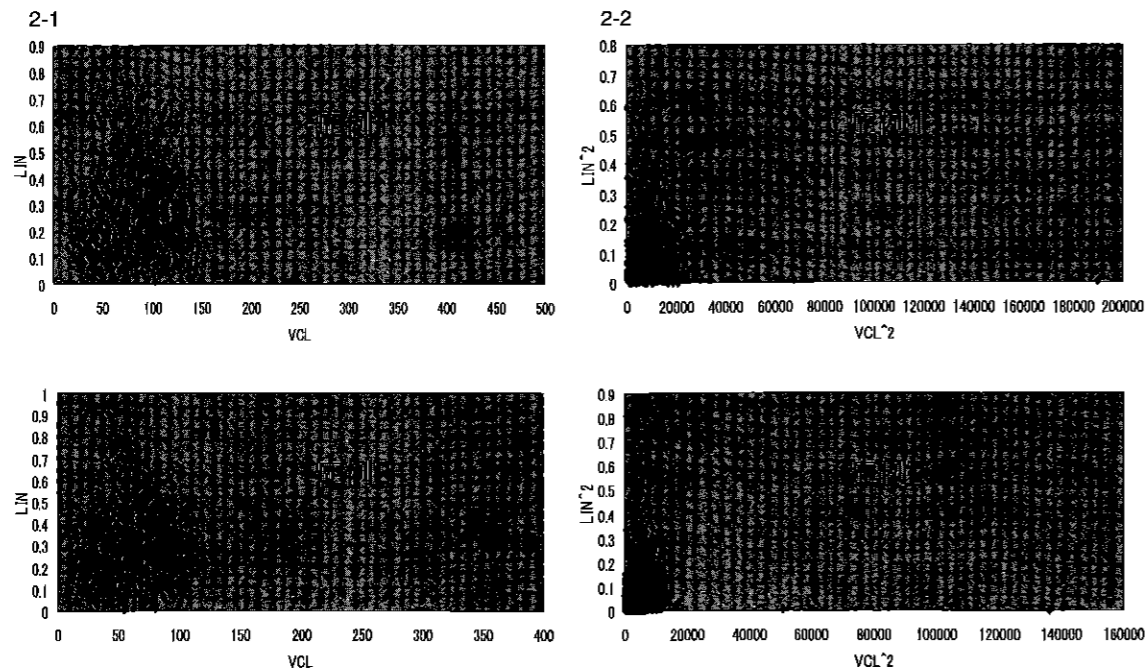


図2 新鮮射出精液の代表サンプルにおける含有運動精子の散布図

図2-1は縦軸に直進性Lを横軸に曲線速度Vをプロットしたものである。L²+k₀V²<1で表される楕円内部に分布することがわかる。
 図2-2は縦軸に直進性の二乗L²を横軸に曲線速度の二乗V²をプロットしたものである。(L²)<1-k₀(V²)で表される直線下部に分布することがわかる。

定開始時から終了時まで同じ曲率で前進する精子の場合には式(2.3)を満たす曲率半径R₀で旋回するが、精液中に同じ曲率で運動をする精子は非常に少ないと考えられ、ほとんどの精子は曲率半径を変えながら進むと思われる。曲率を変えながら動く精子の場合、1秒間に動いた軌跡の長さ(=曲線速度)Vと始点と終点を結ぶ直線距離(=直線速度)を軌跡の長さで割った値である直進性Lを図1の円に当てはめて算出した仮定の曲率半径Rは式(2.3)より $\frac{1}{\sqrt{12}} \frac{V}{\sqrt{1-L^2}}$ となるがこの値はサンプル中で最小の一定曲率で旋回する精子の曲率半径R₀₀よりも常に小さい。したがってそのサンプル中の精子は次式を満たすことになる。

$$\frac{1}{\sqrt{12}} \frac{V}{\sqrt{1-L^2}} \leq R_{00} \text{ すなわち } L^2 \leq 1 - \left(\frac{1}{12R_{00}^2} \right) V^2 \quad (2.4)$$

式(2.4)は次のように書き換えることができる。

$$L^2 \leq 1 - k_0 V^2 \quad (2.5)$$

式(2.5)はV-L座標系において径を1, R₀₀√12とする楕円内部を表す。

結果

図2に新鮮射出精液の代表2サンプルに対して含有運動精子の散布図を示した。図2-1は縦軸に直進性Lを横軸に曲線速度Vをプロットしたものである。L²+k₀V²<1で表される楕円内部に分布することがわかった。図2-2は縦軸に直進性の二乗L²を横軸に曲線速度の二乗V²をプロットしたものである。(L²)<1-k₀(V²)で表される直線下部に分布することがわかった。

図3は図2と同様の2サンプルにおいて縦軸に(1-L²)/V²×10⁴を横軸に精子カウント番号をとった散布図である。2症例ともにk₀×10⁴<(1-L²)/V²×10⁴を満たしている。k₀×10⁴<(1-L²)/V²×10⁴はL²<1-k₀V²と同等である。k₀の値は症例1で1×10⁻⁴、症例2で0.4×10⁻⁴でありサンプルによって異なることがわかった。式(2.4)(2.5)よりサンプル中に曲がりくねって進む精子の割合が多いほど(1-L²)/V²の平均値は大きくなると考えられるので、(1-L²)/V²の平均値×10⁴をSKI(Suzuka Kaisei Index)と定義した。

表1にパーコール処理を行なった代表症例におけるSKIの値を処理前、処理直後、処理12時間後、24時間後、48

時間後について示した。平均直進性・運動率・平均曲線速度・SESE(Standard Error with Sperm Equation)の値も併記した。SESEは縦軸に1/VCL(曲線速度)を横軸に1/ALH(頭部首振り運動の振幅)をとった散布図における回帰直線(Sperm Equation)からの1/VCLの標準誤差×10³と定義される。パーコール処理直後において運動率と平均VCLは増加しSKIとSESEは減少した。パーコール処理後時間経過とともに運動率と平均VCLは減少したがSKIとSESEは増加した。平均直進性においてはパーコール処理および時間経過による平均VCL・運動率と相関する変動は認め

めなかった。
 図4に全175サンプルについてSKIと運動率・平均VCLの関係をそれぞれ示した。SKIと平均VCL・運動率の間にも負の相関性を認めた。相関係数Rはそれぞれ0.638, 0.463であった。

図5に全175サンプルについてSESEと運動率・平均VCLの関係をそれぞれ示した。SESEと平均VCL・運動率の間にも負の相関性を認めた。相関係数Rはそれぞれ0.548, 0.191であった。

図6に全175サンプルについてSKIとSESEの関係を示した。SKIとSESEの間に強い正の相関性を認めた。相関係数Rは0.823であった。

考察

L²<1-k₀V²はk₀<(1-L²)/V²と変形できることより図2・図3から仮説の式(2.5)の正当性は証明される。図3よりk₀の値はサンプルによって異なることがわかる。

サンプル中に曲がりくねって進む精子の割合が多いほど(1-L²)/V²の平均値は大きくなると考えられるので、(1-L²)/V²の平均値×10⁴をSKI(Suzuka Kaisei Index)と定義した。表1よりパーコール処理によって平均VCLや運動率が上昇すればSKIは低下し、時間経過によって平均VCLや運動率が低下すればSKIは上昇している。平均LINはパーコール処理前後や時間経過によっても平均VCL・運動率と相関する変動は認めなかった。また、図4より射出精液のサンプル集団においてSKIは平均VCLや運動率と負の相関を示した。直線運動をする精子の割合が多いほど受精率は高くなることが知られている。潜在的受精能を評価するSperm penetration assayにおいて運動率とVCLが受精率と正の相関性を持つことが報告されている²⁻⁴⁾ので、SKIを用いて受精率を評価できる可能性があると考えられる。

精子方程式からの標準誤差×10³で定義されるSESE(Standard Error with Sperm Equation)が精子運動能評価指

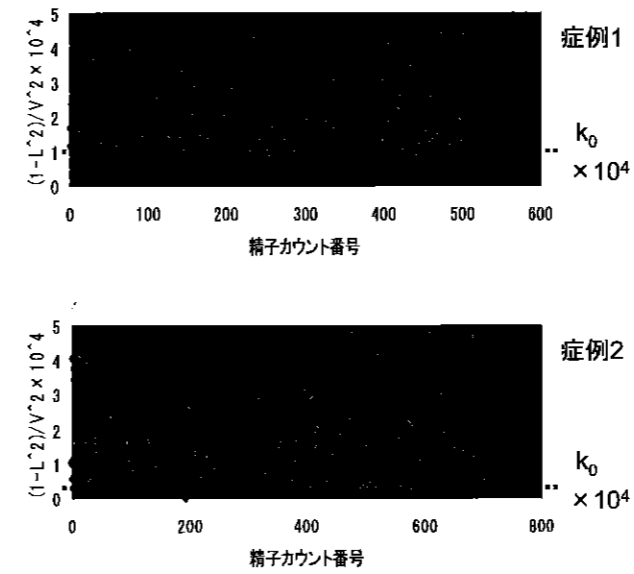


図3 縦軸に(1-L²)/V²×10⁴を横軸に精子カウント番号をとった散布図

2症例ともにk₀×10⁴<(1-L²)/V²×10⁴を満たしている。k₀×10⁴<(1-L²)/V²×10⁴はL²<1-k₀V²と同等である。k₀の値は症例1で1×10⁻⁴、症例2で0.4×10⁻⁴でありサンプルによって異なることがわかる。サンプル中に曲がりくねって進む精子の割合が多いほど(1-L²)/V²の平均値は大きくなると考えられるので(1-L²)/V²の平均値×10⁴をSKI(Suzuka Kaisei Index)と定義した。

表1 パーコール処理および時間経過ともなう精子運動パラメーターの推移

	精子濃度	運動率	平均VCL	平均LIN	SESE	SKI
処理前	88.8	87.1	76.39	0.3	4.8	3.741
直後	269.78	98.23	103.04	0.28	2.76	1.274
12時間後	162.03	91.33	41.12	0.29	9.24	9.241
24時間後	132.86	74.29	35.62	0.27	15.68	15.319
48時間後	94.5	32.21	28.31	0.26	17.28	21.244
72時間後	82.88	11.65	20.24	0.26	16.97	29.905

SESEは縦軸に1/VCL(曲線速度)を横軸に1/ALH(頭部首振り運動の振幅)をとった散布図における回帰直線(Sperm Equation)からの1/VCLの標準誤差×10³と定義される。

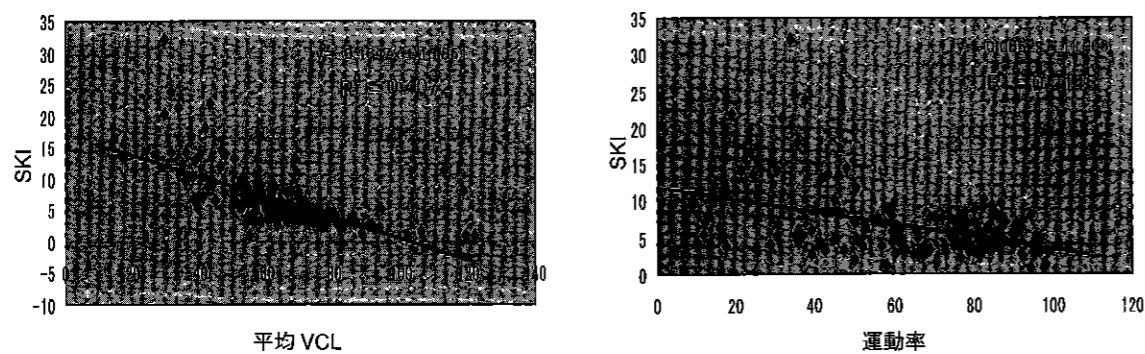


図4 全サンプルにおけるSKIと平均VCL・運動率の関係

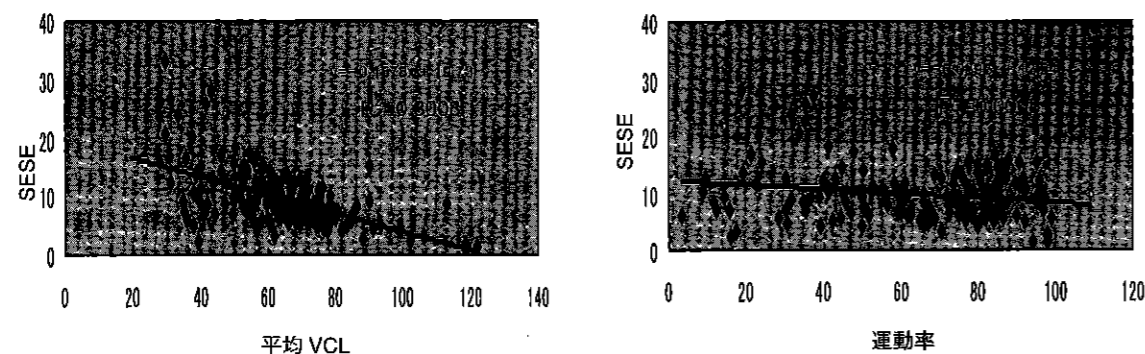


図5 全サンプルにおけるSESEと平均VCL・運動率の関係

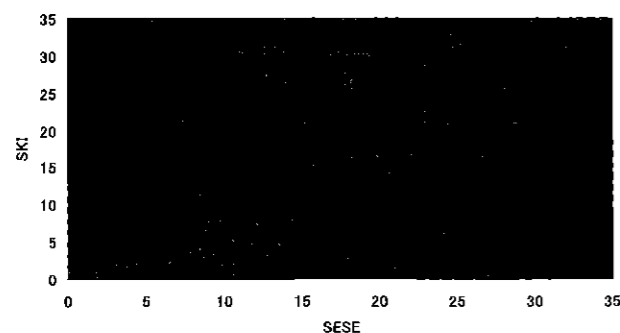


図6 全サンプルにおけるSKIとSESEの関係

数になりえる可能性があるという報告¹⁾は表1, 図5より支持される。精子方程式からのずれ(標準誤差)が生じる原因として奇形精子などの構造異常もありえるが, 正常形態の場合においては尾部が生み出す推進力と頭部が受ける抵抗力以外に何らかの外力の影響が最も考えやすい。図6にみられるSKIとSESEの正の相関性は精子が受ける外力と曲がりくねる度合いが正相関することを意味する。図4にみられる平均VCLとSKIの負の相関性は前進

速度が遅いほど曲がりくねることを意味する。これらより前進速度VCLが小さい精子は重力を受けて沈降しMakler chamberの壁にトラップされて曲がりくねり, 壁から摩擦力を受けることで精子方程式に従わなくなるのではないかと考えられる。

精子の曲線速度VCLと頭部首振り運動の振動数BCF・振幅ALHの関係式はすでに精子バネ理論によって解明されており¹⁾, 個々の精子の運動は次の3法則により規定されることになる。

$$\begin{aligned} 1/V &= a(1/A) + b \\ f &= f_0 \\ L^2 &< 1 - k_0 V^2 \end{aligned}$$

ここで, Vは精子の前進速度, Aは精子頭部の首振り振幅, fは精子頭部の首振り振動数, Lは直進性である。a, b, f₀, k₀はそれぞれ定数である。上記3法則を上から順に第1, 第2, 第3法則と名づけることにすれば, 1回の射出精液中に含まれる精子集団につき第1法則をプロットした散布図における回帰直線が精子方程式(Sperm Equation)である。透明帯進入直前の精子のなかには運動活性が極めて増大するものが存在して²⁾ hyperactivationと

呼ばれている。Progesterone・Pentoxifylline⁶⁾やGABA⁷⁾などによっても誘起されることが報告され, hyperactivationではVCLとALHの上昇とLINの下降が必要条件とされ⁸⁾, CASAを用いた定義も提唱されている⁹⁾。またパーコール法やswim-up法を用いた精液調整によって集められた精子はVCL・ALHが高くLINが低いと報告されている¹⁰⁾。これらの現象は上記の精子運動法則から説明することができる。①精子にエネルギーが供給されればALHが増加する。②ALHが増加すれば第1法則によって自動的にVCLが増加する。③VCLが増加すれば第3法則によって自動的にLINが減少する傾向を生じる。すなわちhyperactivationは単に高いエネルギーを得た状態にすぎず, 精液調整によって得られた精子は単に高いエネルギーを持っているにすぎないと考えられるかもしれない。高エネルギーがhyperactivationを引き起こす必要条件であることは確かであろうが, hyperactivationという現象が果して単純なる高エネルギー状態にすぎないのか, 卵から何らかの化学物質が分泌されて起こる特殊な現象なのかは今後のさらなる研究が必要である。第3法則は不等式なのでLINはVCLの増加に伴って必ずしも減少するとは限らないことがわかる。ALHの増加に伴うVCLの増加分は第1法則より決定されるが上述のように測定チャンバーの壁から受ける摩擦力のためVCLの増加分に誤差を生じる。精子バネ理論¹⁾によれば精子内部で発生したエネルギーは頸部バネに蓄えられその屈曲によって前進する。したがってhyperactivationの定義で最も重要なパラメーターはALHであると考えられることができる。

SESE・SKIともに平均VCLや運動率と相関性を持つことから精子の運動能を評価する指数となりえる可能性はあるが, 運動率との相関においてSESEよりもSKIのほうが優れていると思われる。SKIを用いたIVFにおける受精率やAIHにおける妊娠率の評価を実用化させるためには, 今後臨床データを蓄積し, 検証していくことが必要である。

文献

- 1) 磯部哲也: 精子運動の数学的解析. 受精床誌, 24 (1): 6-15, 2007.
- 2) Fetterolf, P.M., Rogers, B.J.: Prediction of human sperm penetrating ability using computerized motion parameters. Mol. Reprod. Dev., 27 (4): 326-331, 1990.
- 3) King, L.M., Holsberger, D.R., Donoghue, A.M.: Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in turkeys. J. Androl., 21 (1): 65-71, 2000.
- 4) Kathiravan, P., Kalatharan, J., John, E.M., Veerapandian, C.: Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. Anim. Reprod. Sci., 104: 9-17, 2008.
- 5) Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fertil., 23: 193-196, 1970.
- 6) Jayaprakash, D., Kumar, K.S., Shivaji, S., Seshagiri, P.B.: Pentoxifylline induces hyperactivation and acrosome reaction in spermatozoa of golden hamsters: changes in motility kinematics. Hum. Reprod., 12(10): 2192-2199, 1997.
- 7) Calogero, A.E., Hall, J., Fishel, S., Green, S., Hunter, A., D'Agata, R.: Effects of gamma-aminobutyric acid on human sperm motility and hyperactivation. Mol. Hum. Reprod., 2(10): 733-738, 1996.
- 8) Cancel, A.M., Lobdell, D., Mendola, P., Perreault, S.D.: Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. Hum. Reprod., 15 (6): 1322-1328, 2000.
- 9) Schmidt, H., Kamp, G.: Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. Reproduction, 128 (2): 171-179, 2004.
- 10) Moohan, J.M., Lindsay, K.S.: Spermatozoa selected by a discontinuous Percoll density gradient exhibit better motion characteristics, more hyperactivation, and longer survival than direct swim-up. Fertil. Steril., 64 (1): 160-165, 1995.