

CASA を用いた妊孕能評価法

Method of Assessment of Fertility using the CASA System

磯部 哲也 松浦 大創 高西 昭宏 林 奈穂子

TETSUYA ISOBE, DAIZO MATSUURA, AKIHIRO TAKANISHI, NAOKO HAYASHI

Reproductive Medical Center, Suzuka Kaisei Hospital, 112-1 Koucho, Suzuka Mie 513-8505, Japan

要旨：精子エネルギー理論によって、振幅 A で首振り運動する精子が持つ力学的エネルギーが $KA^2 \times$ 比例定数で表されることがわかっている。K (精子エネルギー係数) は次の式から求められる係数であり精液サンプルごとに決まる定数である。

$$\left(\frac{\lambda}{t_{\max}}\right)^2 = e^{\frac{1}{Kt_{\max}}}$$

ここで、 λ は A^2 の平均値、 e は自然対数の底、 t_{\max} は精子力学的エネルギー分布曲線 (縦軸に精子の存在確率密度を横軸に A^2 をそれぞれとって描いたグラフ) において精子の存在確率密度が極大になる時の A^2 の値である。この計算は CASA (Computer-assisted sperm analysis) を用いた測定で得られるパラメーターをもとに EXCEL で行なうことができる。 KA^2 をエネルギー指数として ω 以上のエネルギー指数を持つ精子の濃度を ω -CAS (Concentration of Activated Sperm) と定義すれば、この値は次式に示されるように精子力学的エネルギー分布関数において A^2 を ω/K から無限大まで積分することによって求めることができる。

$$\omega\text{-CAS} = \text{精子濃度} \times \int_{\frac{\omega}{K}}^{\infty} P dt \quad \text{ただし} \quad P = \frac{C}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t}\right)^{Kt} \quad \frac{1}{C} = \int_0^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t}\right)^{Kt} dt$$

不妊症と診断されたカップルのうちスクリーニング検査で女性側に異常所見を認めなかった 47 症例の射精精液 163 サンプルと、すでに自然妊娠で挙児を得ている男性 45 症例の射精精液 162 サンプルにおいて MAKLER チャンバーを用いて CAS を調べた結果、 $6\text{-CAS} > 1.0$ の場合には自然妊娠を十分に期待できることがわかった。

キーワード：CASA, 精子, エネルギー, 妊孕能, 超活性化現象

ABSTRACT: It is established by the sperm energy theory that the mechanical energy of a sperm moving with amplitude of lateral head displacement A is given by $KA^2 \times$ a constant. K, the sperm energy coefficient, is determined for each semen sample by following equation:

$$\left(\frac{\lambda}{t_{\max}}\right)^2 = e^{\frac{1}{Kt_{\max}}}$$

Where, λ is the mean value of A^2 , e is the base of the natural logarithm, and t_{\max} is the peak value of A^2 in the sperm existing probability density in the distribution curve of the sperm mechanical energy (sperm existing probability density on the vertical axis, A^2 on the horizontal axis). This calculation can be performed using EXCEL with parameters obtained by measurement using CASA (computer-assisted sperm analysis). With KA^2 defined as the energy index, if the concentration of sperm with an energy index of more than ω is defined as ω -CAS (concentration of activated sperm), ω -CAS can be obtained by integrating the sperm mechanical energy distribution function by A^2 from ω/K to infinity by the following formula:

$$\omega\text{-CAS} = \text{concentration of the sperm} \times \int_{\frac{\omega}{K}}^{\infty} P dt \quad P = \frac{C}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t}\right)^{Kt} \quad \frac{1}{C} = \int_0^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t}\right)^{Kt} dt$$

The CAS of 163 samples of ejaculated semen from 47 men in couples diagnosed with infertility, in which no abnormal findings were present in screening tests of the female partners, and 162 samples of ejaculated semen from 45 men who had already fathered children in natural pregnancies, was investigated using a MAKLER chamber. It was found that natural pregnancy can be reasonably expected in cases of $6\text{-CAS} > 1$.

Key words: CASA, sperm, energy, fertility, hyperactivation

受付日：2008年11月27日／受理日：2009年1月19日

鈴鹿回生病院 生殖医療センター：〒513-8505 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

緒言

精子を評価する指数として一般的に運動率と精子濃度が用いられ正常値としてWHOの基準が使われているが、この基準で妊孕能を評価することは困難であるため妊娠の可否を直接に評価できる指数の考案が望まれている。

精子エネルギー理論¹⁾によれば精子の力学的エネルギー分布が次の式 (Sperm Distribution Law) に従うことがわかっており、振幅Aで首振り運動する精子のもつ力学的エネルギーは KA^2 ×比例定数で表される。

$$P = \frac{C}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} \quad \frac{1}{C} = \int_0^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} dt$$

ここで、Pは精子の存在確率密度、tは精子頭部の首振り振幅Aの二乗、 λ はtの平均値、eは自然対数の底、K(精子エネルギー係数)は各精液サンプルにおいて固有に定まる定数である。精子の存在確率密度分布曲線において確率密度が極大になるときのtの値を t_{max} とすればKの値はSperm Distribution Lawの式をtで微分して得られる次式を用いて求めることができる。

$$\left(\frac{\lambda}{t_{max}} \right)^2 = e^{\frac{1}{Kt_{max}}} \quad (\text{Isobe's formula})$$

これらの計算はCASA (Computer-assisted sperm analysis) を用いた測定で得られたパラメーターをもとにEXCELで行なうことができる。

精子が卵の透明帯を破って進入するためには、その精子がある一定以上の力学的エネルギーを持つ必要があると予想される。

対象と方法

不妊症と診断されたカップルのうちスクリーニング検査で女性側に異常所見を認めなかった47症例の射精精液163サンプル(以下、不妊群とする)と、すでに自然妊娠で挙児を得ている50歳以下の男性45症例の射精精液162サンプル(以下、自然妊娠群とする)に対して精子運動解析装置CASAを用いて精子運動パラメーターを測定した。測定はMAKLERチャンバー²⁾を用いておこなった。測定は1症例につき視野を変えて3~5回行なった。ここで述べるカウント精子数とは測定開始から終了まで終始追尾できた実測運動精子数のことである。女性に対するスクリーニング検査の内容は月経周期5~7日目におけるホルモン基礎値(FSH, LH, E2, P, PRL)測定、子宮卵管造影、黄体期中期におけるホルモン値(E2, P)測定、子宮および付属器の超音波断層診断である。実質不妊期間が2年以上の場合を不妊症とした。

精子頭部の首振り振幅Aの二乗をtとすればKtは精

子1匹の力学的エネルギーを反映するため、Ktを精子1匹のエネルギー指数とする。 ω 以上のエネルギー指数をもつ精子の濃度を ω -CAS (Concentration of Activated Sperm) と定義すると ω -CASは $\omega = Kt$ を用いて次式で求めることができる。

$$\omega\text{-CAS} = \text{精子濃度} \times \int_{\omega}^{\infty} P dt$$

$$\text{ただし } P = \frac{C}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} \quad \frac{1}{C} = \int_0^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} dt$$

全サンプルに対してCASAで得たデータをもとにK値を精子エネルギー理論に記述された方法に準じて以下のルール①~⑥に従って求めて ω -CASを算出し ω を変動させて自然妊娠群と不妊群での違いを調べた。

- ① 実測の頭部首振り振幅ALHの二乗の平均値を1視野全カウント精子について求め λ 値とする。
- ② 横軸にALHの二乗値(=t値)をとり縦軸に精子の存在する割合(実測存在精子数/視野全カウント精子数)をとって分布図を作成する。横軸を自然数のみで定義し、たとえばt値が3以上4未満となった精子の数を横軸値4の座標にプロットする。横軸における自然数の定義域は連続して精子数が0となるところまでとする。連続せず単回で精子数が0となった場合は対数計算の便宜上精子数を1とする。
- ③ ②の分布図において極大点をとる自然数tの値-0.5を仮り t_{max} として次式 (Isobe's Formula) に代入してKを求め λ 値とする。-0.5とするのは、連続分布で極大点をとるt値は次式から λ 値よりも小さい有理数とならなければならない、②でt値3以上4未満の精子数を横軸値4の座標にプロットしていることから離散分布で極大点をとるt値が4になった場合の実際の連続分布におけるt値は3と4の間に存在するからである。

$$\left(\frac{\lambda}{t_{max}} \right)^2 = e^{\frac{1}{Kt_{max}}} \quad (\text{Isobe's Formula})$$

- ④ 求めた仮りK値を次式に代入して横軸にt値を連続数としてプロットして理論的存在確率密度分布曲線を描く。

$$P = \frac{C}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} \quad \frac{1}{C} = \int_0^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{e\lambda}{t} \right)^{Kt} dt$$

- ⑤ ④の分布曲線において極大値をとるtの値を修正 t_{max} とし、仮り t_{max} と修正 t_{max} の平均値を真の t_{max} と考えて実効 t_{max} とする。
- ⑥ 実効 t_{max} 値を再度Isobe's Formulaに代入してK値を求める。

②の分布図において明らかな極大をもたず漸減する場合には仮り t_{max} を0.5とする($\lambda < 1$ の場合には λ 値/2を仮り t_{max} とする)。極大点が変わりにくい場合には複数の候補点で上記①から⑥の計算を試み、K値と λ 値を次

式(④の確率密度分布式を変形した離散分布式であり④と同等である)に代入して横軸にtを②と同様にプロットして次式の左辺を縦軸にプロットして散布図を描き平均二乗法を用いて回帰直線とその相関係数Rを求め、Rがより1に近くなるものを採用する。

$$\log \left[\frac{(P_t \sqrt{t})^{\frac{1}{K}} \times t!}{\sqrt{t}} \right] = t \times \log \lambda + \frac{\log D}{K} \quad \frac{1}{D} = \sum_{t=1}^{\infty} \frac{1}{\sqrt{t}} \left(\frac{\lambda^t \sqrt{t}}{t!} \right)^K$$

P_t は②で用いた実測の存在精子の割合である。

カウント精子数nが50未満の場合には実測 λ 値の誤差が大きくなるので(0.018×n+1.89)より得られた値を λ 値とする。 $\lambda = 0.018 \times n + 1.89$ はnと λ に正の相関がみられたことから全サンプルで平均二乗法を用いて求めた回帰直線方程式である。さらにカウント精子数が10未満の場合には分布が描けないため λ の補正をするともに漸減する分布パターンをとるとして実効 t_{max} を0.5とする。

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。実験にはMAKLERチャンバーを用いた。SMASでは射精精液を1滴(約5 μ l)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1秒間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) μ m/s・曲線速度VCL (Curvilinear velocity) μ m/s・頭部首振り運動の振幅ALH (Amplitude of lateral head displacement) μ mや振動数BCF (Beat-cross frequency) Hz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 (Co. 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。

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。

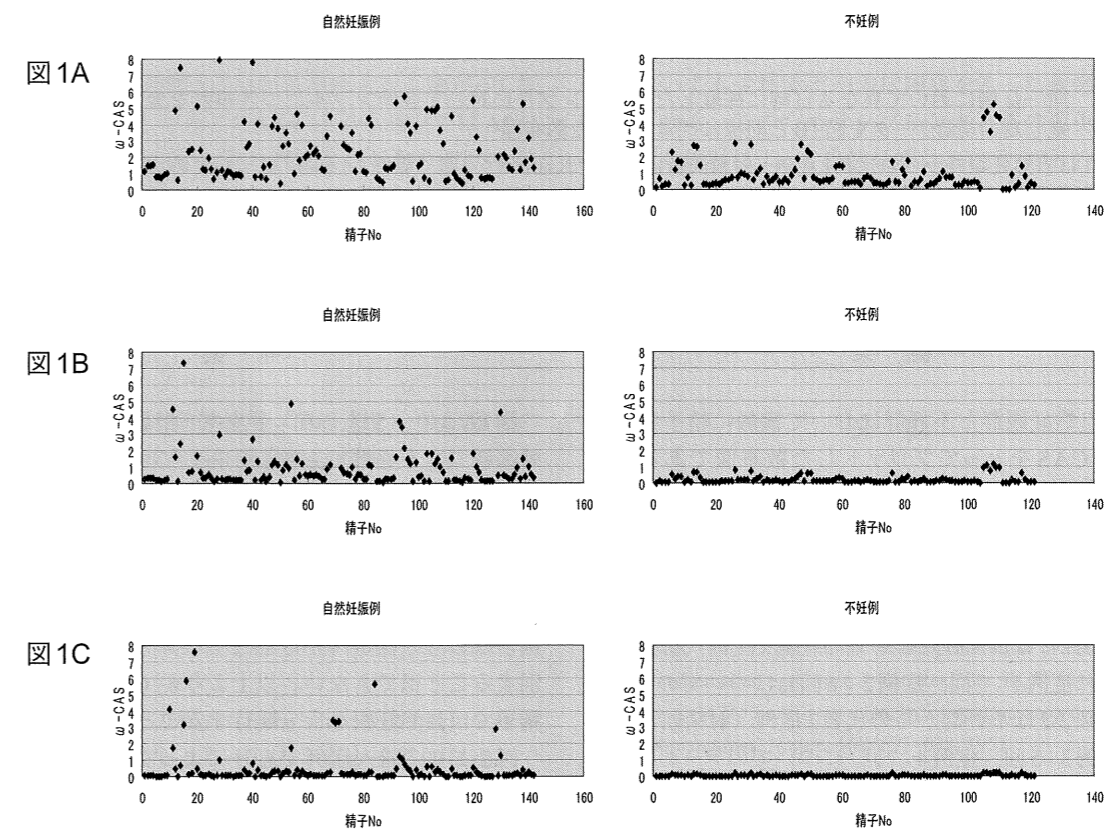


図1 自然妊娠群と不妊群において横軸に精子番号を、縦軸に ω -CASをとってプロットした散布図

図1A, 図1B, 図1Cはそれぞれ $\omega = 5, 6, 7$ の場合である。図1Aより、5以上のエネルギー指数を持つ精子は自然妊娠群でも不妊群でも多く存在しており両群を区別することはできない。図1Bより、6以上のエネルギー指数を持つ精子の濃度は不妊群ではすべての精子で 1×10^6 /ml未満であるが自然妊娠群では 1×10^6 /ml以上の精子も多数存在する。図1Cより、7以上のエネルギー指数を持つ精子は自然妊娠群・不妊群ともに非常に少なく両群を区別することはできない。以上より $6\text{-CAS} > 1.0$ を満たす精子では自然妊娠を十分期待することができる。

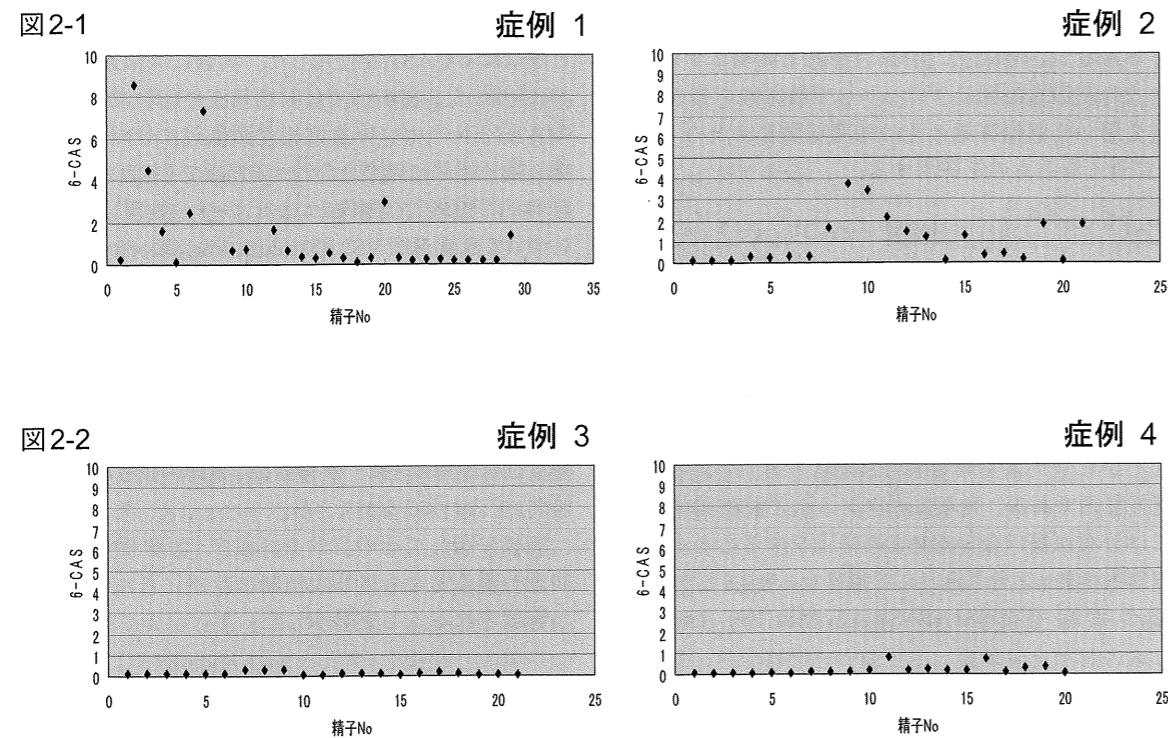


図2 同一症例において異なる日時に採取した精液サンプルに対して各サンプルにつき視野を変えて3~4回測定した全視野データを図1Bと同様にプロットした散布図

図2-1は自然妊娠群からの代表2症例(射精回数それぞれ症例1:7回, 症例2:6回)についてのデータを示す。図2-2は不妊群からの代表2症例(射精回数それぞれ症例3:5回, 症例4:7回)についてのデータを示す。同一症例でも日によって精液所見にばらつきがみられるが不妊群では6-CAS > 1.0になることはない。

結果

図1は自然妊娠群と不妊群において横軸に精子番号を、縦軸に ω -CASをとってプロットした散布図である。図1A, 図1B, 図1Cはそれぞれ $\omega = 5, 6, 7$ の場合である。

図2は同一症例において異なる日時に採取した精液サンプルに対して各サンプルにつき視野を変えて3~4回測定した全視野データを図1Bと同様にプロットした散布図である。図2-1は自然妊娠群からの代表2症例(射精回数はそれぞれ症例1:7回, 症例2:6回)についてのデータを示す。図2-2は不妊群からの代表2症例(射精回数はそれぞれ症例3:5回, 症例4:7回)についてのデータを示す。

図3は自然妊娠群において、6以上のエネルギー指数をもつ精子(activated sperm)の理論的濃度である6-CASを横軸にとり、6以上のエネルギー指数をもつ精子の数を実測のALHの二乗値から拾い上げて求めた濃度を縦軸にとって描いた散布図である。6-CASと実測activated sperm濃度は6-CASが大きいところでは正比例するが、小さいところでは正比例直線から外れてくる。

図1Aより、5以上のエネルギー指数を持つ精子は自然妊娠群でも不妊群でも多く存在しており両群を区別することはできない。図1Bより、6以上のエネルギー指数を持つ精子の濃度は不妊群ではすべての精子で $1 \times 10^6/\text{ml}$ 未満であるが自然妊娠群では $1 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の精子も多数存在する。図1Cより、7以上のエネルギー指数を持つ精子は自然妊娠群・不妊群ともに非常に少なく両群を区別することはできない。以上より6-CAS > 1.0を満たす精子では自然妊娠を十分期待することができる。

図2より、同一症例でも日によって精液所見にばらつきがみられるが不妊群では6-CAS > 1.0になることはない。これらの結果より、受精をするための十分条件として精液1 mlあたりに6以上のエネルギー指数を持った精子が 1×10^6 匹以上存在すればよいことになる。射精精液に限らず受精時においても卵周囲に局在する精子群においてある一定値以上のエネルギーをもつ精子がある一定値以上の濃度で存在することが受精をするための必要

考察

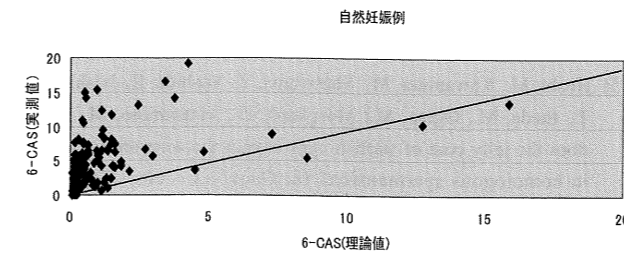


図3 自然妊娠群において、6以上のエネルギー指数をもつ精子(activated sperm)の理論的濃度である6-CASを横軸にとり、6以上のエネルギー指数をもつ精子の数を実測のALHの二乗値から拾い上げて求めた濃度を縦軸にとって描いた散布図
6-CASと実測activated sperm濃度は6-CASが大きいところでは正比例するが、小さいところでは正比例直線から外れてくる。

条件であることが推測される。

Capacitation^{3, 4)}と呼ばれる受精能獲得を済ませた精子は先体反応⁵⁾を起こし受精の直前にhyperactivation^{6, 7)}と呼ばれる飛び跳ねるような激しい運動をするようになる。Hyperactivationの特徴^{8, 9)}は中片部が大きく曲がって振幅が大きくなることでありCASAによる測定ではALHとVCLが高くLINが低い¹⁰⁾と報告されておりCASAによる定義¹¹⁾も考案されている。

精子バネ理論¹²⁾によれば精子の運動は次の式(Isobe's Law)に従う。

$$\left(\frac{1}{V}\right) = a\left(\frac{1}{A}\right) + b$$

$$f = c$$

ここで、Vは精子の前進速度(曲線速度)、Aは頭部の首振り振幅、fは頭部首振り運動の振動数、a, b, cは各精液サンプルにおける固有の定数である。

精子曲率理論¹³⁾によれば前進速度と直進性の間には次の関係式が成り立つ。

$$L^2 \leq 1 - kV^2$$

ここで、Vは精子の前進速度(曲線速度)、Lは直進性である。

この不等式と精子方程式(Isobe's lawの第1式)を用いればALH上昇→VCL上昇→LIN下降が必然的な現象であることがわかる。精子の力学的エネルギーはALHの二乗に比例することからhyperactivationを一種の高エネルギー状態として説明することができる。Hyperactivationは自由運動する精子とは異なり透明帯に存在する精子活性化ペプチド(SAP)¹⁴⁾や先体反応誘起物質(ARIS)¹⁵⁻¹⁷⁾や卵から放出される走化性誘引物質¹⁸⁾によって鞭毛内の化学反応が非正常状態となり精子方程式を満たさない運

動になっている可能性がある。Hyperactivationという高エネルギー状態が定常的であるにせよ非定常的であるにせよ、射出精液において6-CAS > 1.0の条件を満たすことは射出精液中に6以上のエネルギー指数をもつ精子(activated sperm)が1 mlあたりに 1×10^6 匹以上存在することなので、この条件が受精時において卵を取り巻く局在領域中にhyperactivationをおこした精子(hyperactivated sperm)の濃度が臨界値以上に達することにつながるものと考えられる。

図3より、6-CASが大きいところでは実測activated sperm濃度を6-CASの代用とすることが可能であるが、小さいところでは実測値が正比例直線から外れてくるため代用は不可能である。正比例直線から外れてくる原因としてカウント精子数が小さい場合に生じる偶然誤差が考えられる。

今回のサンプリングでは自然妊娠経験例の精子を健常精子とし、スクリーニングで女性因子を否定できた症例の精子を異常精子として取り扱ったが、自然妊娠例のなかには非常に低い確率をクリアして妊娠した症例も存在すると考えられスクリーニングで女性因子を否定できた例においても受精障害や着床障害をもつ症例の存在が考えられる。このためサンプリング方法の変更や今後の大規模な検討によって自然妊娠におけるCASのcut-off値が是正される可能性がある。6-CASを用いて妊娠能を評価する方法をIMTH(Isobe-Matsuura-Takanishi-Hayashi) Methodと命名すれば、IVF(in-vitro fertilization)において培精液にIMTH Methodを用いることによって受精能の評価が可能になるものと思われる。

文献

- 1) Isobe, T.: Mathematical analysis of sperm energy distribution. Jpn. J. Fertil. Implant., 25: 12-18, 2008.
- 2) Makler, A.: The improved ten-micrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. Fertil. Steril., 33: 337-338, 1980.
- 3) Austin, C.R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. Aust. J. Sci. Res., Ser. B., 4: 581-596, 1951.
- 4) Chang, M.C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into fallopian tubes. Nature, 168: 697-698, 1951.
- 5) Dan, J.C.: Studies on the acrosome reaction to egg water and other stimuli. Biol. Bull., 103: 54-66, 1952.
- 6) Yanagimachi, R.: The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. J. Reprod. Fertil., 23: 193-196, 1970.
- 7) Burkman, L.J.: Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. Arch. Androl., 13: 153-165, 1984.

- 8) Ishijima, S., Baba, A., Mohri, H., Suarez, S.S.: Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.*, 61: 376–384, 2002.
- 9) Hoshi, K., Yanagida, K., Aita, T., Yoshimatsu, N., Sato, A.: Changes in the motility pattern of human spermatozoa during in vitro incubation. *Tohoku J. Exp. Med.*, 154: 47–56, 1988.
- 10) 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: 1322–1328, 2000.
- 11) Schmidt, H., Kamp, G.: Induced hyperactivity in boar spermatozoa and its evaluation by computer-assisted sperm analysis. *Reproduction*, 128: 171–179, 2004.
- 12) Isobe, T.: Mathematical analysis of sperm motility. *Jpn. J. Fertil. Implant.*, 24: 6–15, 2007.
- 13) Isobe, T., Matsuura, D.: Examination of sperm curvature using CASA. *Jpn. J. Fertil. Implant.*, 25: 6–11, 2008.
- 14) Suzuki, N.: Structure, function and biosynthesis of sperm-activating peptides and fucose sulfate glycoconjugate in the extracellular coat of sea urchin eggs. *Zool. Sci.*, 12: 13–27, 1995.
- 15) Hoshi, M., Kawamura, M., Maruyama, Y., Yoshida, E., Nishigaki, T., Ikeda, M., Ogiso, M., Moriyama, H., Matsumoto, M.: How does the jelly coat of starfish eggs trigger the acrosome reaction in homologous spermatozoa? In: Gagnon, C., eds. *The male gamete: from basic science to clinical applications*, pp. 119–125, Cache River Press, Vienna, 1999.
- 16) SeGall, G.K., Lennarz, W.J.: Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Dev. Biol.*, 71: 33–48, 1979.
- 17) Meizel, S., Pillai, M.C., Diaz-Perez, E., Thomas, P.: Initiation of the human sperm acrosome reaction by components of human follicular fluid and cumulus secretions including steroids, In: Bavister, B.D., Cummins, J., Roldan, E.R.S., eds. *Fertilization in mammals*, pp. 205–222, Serono Symposia, USA, Norwell, 1990.
- 18) Ward, G.E., Brokaw, C.J., Garbers, D.L., Vacquier, V.D.: Chemotaxis of *Arbacia punctulata* spermatozoa to resact, peptide from the egg jelly layer. *J. Cell Biol.*, 101: 2324–2329, 1985.