

良好精子選別のための様々な処理方法まとめ

ARTにおいて、良好精子を選別回収する技術は欠かせないものであります。今までいろいろな手法が考案されてきていて、一部はルーチンで活用されています。現状の精子選別回収方法についてまとめられた文献がありましたので簡単にご紹介します。

Jeyendran, R.S. et al., Selecting the most competent sperm for assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility*, 111(5), pp.851–863. 2019.

【人工授精やIVFのための通常の精子選別】

- 運動性による選別
スイムアップに代表される、培養液内を泳がせる精子の運動性を利用した回収方法。
- 運動性と精子サイズによる選別
Percoll等を使用した密度勾配遠心法による、精子の分離方法。良好形態や運動率を高く回収可能。
- 非付着性を利用した選別
死滅精子は棒状に固くなっていることを利用し、グラスウールフィルターを通して生存精子を回収する手法。
- テストヨークバッファ処理を利用した選別
テストヨークバッファに混和した精子を冷却することで、コレステロールとリン脂質の割合を改善し、受精率が改善する。(らしい)
- 性染色体による選別
X染色体 Y染色体の違いを利用して、比重や蛍光度によって選別しようとする技術。

手法	メリット	デメリット
Swim-up (SU) procedure スイムアップ法	<ul style="list-style-type: none"> ● より粘性の高い培養液に移動する運動性の精子を集められる。(?) ● 非動的因子を取りのぞける。 ● 正常運動精子からダブルスタンダード DNA ダメージ精子を分離できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 集められた運動精子は受精能力が保証されるわけではない。 ◆ 受精率や妊娠率を減少させる活性酸素種を除去できるわけではない。 ◆ 白血球や細胞片や未熟精子から有能な精子を分離できるわけではない。
Continuous or discontinuous density-gradient (DG) procedure 連続/不連続密度勾配(遠心)法	<ul style="list-style-type: none"> ● 非運動精子と運動精子を効果的に分離できる。 ● 運動精子を高濃度で得られる。 ● ARTでの精子選別の業界標準となっている。 ● 活性酸素が低く、酸化ストレスを低減できる。 ● 白血球を分離除去できる。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 精子数が少ない、高い粘稠精液、多量の細胞片のサンプルには使用できない。

	<ul style="list-style-type: none"> ● 成熟精子がペレットに集まる。 ● ダブルおよびシングルスタンダード DNA のダメージ精子を分離できる。 	
Glass wool filtration procedure グラスウールフィルタリング法	<ul style="list-style-type: none"> ● スイムアップや密度勾配法よりも高濃度の精子を得られる。 ● 棒状の死滅精子はグラスウールカラムに貼り付くので、機能的な正常精子が結果的に通り抜ける。 ● 高粘稠性のサンプルに有効。 ● 精子無力症や乏精子症に有効。 ● 正常アクロソームの濃度が高い。 ● クロマチン正常性が高い。 ● ハムスターテスト(透明帯除去ハムスター卵子にヒト精子を媒精する試験)の結果が良好。 ● スイムアップと比較して体外受精の受精率が高い。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ グラスウール片に由来する物質がサンプルに混入するが、これらは有害な結果をもたらしてはいない。 ◆ ART ではあまり行われていない方法。
TEST yolk buffer treatment テストヨークバッファ処理	<ul style="list-style-type: none"> ● 受精率が10%以下と低い、原因不明のカップルに有効。 ● 精子のキャパシテーションを誘導。 ● 受精率、先体反応、IVFの結果を上昇させる。 ● 明らかに有害な効果は見当たらない。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 不明確なメカニズムによる温度処理が必要: 冷却は細胞膜のコレステロール-リン脂質の比率を改善しているように思われる。
Sex-specific chromosome 性特異的染色体	<ul style="list-style-type: none"> ● Y 染色体精子を選別する能力がある。 ● フローサイトメトリーによる X 精子 Y 精子のソーティングが良好。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ エラー率が高い傾向にある。(常に欲しい性が得られるわけではない。) ◆ 成功率が低い。 ◆ 受精率が減少。 ◆ 回収精子数が少ない。 ◆ FDA の承認が得られていないので、アメリカでは実施できない。

【新しい高度な精子選別】

◇ Pentoxifylline 処理による選別

精子無力症や TESE で回収された非運動精子に処理すると、生存精子は運動を再開するので生存を判断することが可能。

◇ 精子高拡大観察による選別

いわゆる IMSI で、100 倍の対物レンズを使用して、通常よりも詳細に精子を観察して選別する手法。

◇ 微小流体技術を応用した選別

マイクロ流体力学を応用したデバイスを用いた精子選別方法、特別な試薬や遠心処理の必要がない。

◇ 表面荷電による選別

精子細胞膜表面の荷電を利用した選別手法で、ここではゼータポテンシャル法と呼ばれている。電気泳動を用いる。

◇ アポトーシスによる選別

磁石を用いたソーティング（MACS）を使用して、アポトーシス細胞を除去する選別方法。

◇ 精子細胞膜の成熟を利用した選別

成熟した精子がヒアルロン酸レセプターを持つことを利用して、ヒアルロン酸コートされた部位に付着した精子を回収する方法。PICSI と呼ばれている。

◇ 精子細胞膜の正常性を用いた選別

ここでは HOS-test のことを指している。低浸透圧液に精子を入れると、細胞膜が正常な精子尾部は膨化するの、生存を確認することができる。

手法	メリット	デメリット
Pentoxifylline treatment ペントキシフィリン処理	<ul style="list-style-type: none"> ● 精子の運動性を活性化する(精子無力症、精巣上体や精巣の非運動精子、抗精子抗体に対して良好な処理)。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 精子洗浄後の試薬の残留が懸念されている。しかし、直接浸漬するわけではないので、卵子や胚への影響は特に認められていない。 ◆ 報告例が少ない。
Motile sperm organelle morphology examination (MSOME) 運動精子細胞小器官形態検査	<ul style="list-style-type: none"> ● ICSI 不成功例の患者に有効。 ● 妊娠率を改善する（60% vs 30%）。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 技術が難しい ◆ コストがかかる ◆ 特別な装置とトレーニングが必要 ◆ 9つの無作為試験のメタアナリシスは、この手法を支持していない。 ◆ 研究サンプルが少ない。
Microfluidic sorting 微小流体ソーティング	<ul style="list-style-type: none"> ● 運動性と形態の両方で精子を選別。 ● 遠心分離不要（受動的な方法）。 ● スイムアップや密度勾配に比べてDNAのダメージが少ない。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 微小流体チャンバーが必要。 ◆ ICSIの受精率、妊娠率、生産率がスイムアップと比較して改善されるわけではない(後方視検討)。 ◆ 結果のデータ不十分。
Zeta-potential method ゼータ電位法	<ul style="list-style-type: none"> ● チャージが少ない精子や細胞片を洗って、高いチャージの精子を固定する。 ● 密度勾配法と比較して正常なDNAやプロタミンを有した成熟精子を高率に選別できる。 ● 密度勾配法よりも受精率が高い。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 精子回収率が低い（8.6%）。 ◆ 精子濃度の低いサンプルには適さない。 ◆ 電気泳動装置が必要。 ◆ 精子DNAの正常性、形態、運動性に関して、密度勾配法より優れているわけではない。 ◆ この方法で回収した精子を用い

		た ICSI の結果（受精、分割、ハイグレード等）の改良された結果報告がない。
Magnetic-activated cell sorting (MACS) 磁気活性化セルソーティング	<ul style="list-style-type: none"> ● 細胞死の精子を除外できる。 ● より低い割合の DNA 損傷を想定できる。 ● 精子の形態を改善する。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 運動性を下げる。 ◆ スイムアップや密度勾配法と比較して ICSI の結果は改善されない。 ◆ 着床率や流産率に違いは無い。 ◆ ドナー卵子を使った場合でも結果に違いは無い。 ◆ 研究報告が少ない。
Membrane maturity procedures (PICS: plastic culture dish with microdots of hyaluronic acid (HA) on its inner surface; ©, a viscous medium containing HA) 細胞膜成熟性手法 (PICS: ヒアルロン酸コートディッシュを用いる。 Sperm Slow method ヒアルロン酸含有メEDIUMを用いる。)	<ul style="list-style-type: none"> ● ヒアルロン酸レセプターを有する精子は成熟していて形態良好、DNA フラグメンテーション率が低く、染色体数的異常率が低い。 ● ヒアルロン酸接着精子を用いた ICSI は胚のクオリティー良好。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 受精率や妊娠率は改善されない。 ◆ タイムラプス研究での胚発生結果に違いはない。
Hypo-osmotic swelling (HOS) test 低浸透圧液膨化テスト	<ul style="list-style-type: none"> ● 精子尾部の細胞膜が正常であれば、間接的に頭部細胞膜も正常であることが分かる。 ● 精子にダメージを与えずに、精子細胞膜の正常性を調査できる。 ● ART に使用できる運動していない生存している精子を区別できる。 ● 通常の精液検査よりも妊娠を予想できる。 ● IVF の結果を予想できる。 ● HOS テストの異常は、低受精率、高い DNA フラグメント、正常核型患者の異数性の低い率と関係している。 ● 精子生存性に影響を与えない。 ● 低コスト。 ● 特別な装置は必要なし。 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ 染色体再構成や正常な核や細胞膜の精子を選択するために、更なる研究が必要。

メリットやデメリットについて、？マークがつく内容も多々ありましたが、あまり知られていない方法も紹介されていて興味深かったです。運動性や形態、さらには機能面でも良好な精子を選択できる手法の開発、特に DNA や染色体の正常性を担保できるような技術が進めばよいなと思いました。

