

低精子数 及び無精子症 の測定に関するマニュアル

MANUAL FOR THE ASSESSMENT OF
LOW SPERM COUNTS AND AZOOSPERMIA

Leja®[®] 100 ミクロン 2 チェンバー スライド
Leja®[®] 20 ミクロン 2 チェンバー スライド

Leja





Leja® Standard Counting Chamberのご案内

製造元：

Leja® Products B.V.
Luzernestraat 10, 2153 GN Nieuw Vennepe, The Netherlands

web: www.Leja®.nl

Leja® は ISO 9001:2000 の認定を受けております。

Leja®スライドは、専門家専用のインビトロ診療器具です。

Leja®スライドは、血中細胞や精子など浮遊している細胞を専門家が顕微鏡下で数値化し鑑定するためのもので、セルフテスト用ではありません。Leja®スライドをお取扱いの際は、資格をもつ専門家の方のみとさせていただきます。

Leja®スライドは日光のあたらない密閉した箱に室温で保存して下さい。Leja®スライドは長年保管してあってもお使い頂けます。チャンバーから霞のようなものが出ることがありますが、チャンバー中を満たせばとれますしチャンバーの機能には影響はありません。

体液は感染危険物質です。スライドを取扱う際は、外側の左右の縁のみに触れるようにし、注入口には触れないで下さい。体液がこぼれないようにして下さい。

Leja®スライドはガラス製です。割れると鋭い角ができますので、ご注意ください。

使用済みのLeja®スライドは感染性廃棄物として扱い、地区の医療廃棄物処理法に従って廃棄して下さい。

総説

Leja®スライドは、血中細胞や精子など浮遊している細胞を専門家が顕微鏡下で数値化し鑑定するためのものです。測定の際は、顕微鏡が必要です。顕微鏡を、精液分析によく用いられる Computer Assisted Semen Analysis (CASA) システムに装着することも可能です。運動性の高い精子の分析には、10x あるいは 20x の対物レンズを使って 12 ミクロンまたは 20 ミクロンの高さのチャンバー付き Leja®スライドをご使用下さい。高さ 100 ミクロンの Leja®スライドは、少ない細胞数 (0 ~ 8,000 /ml および 8,000 ~ 1×10^6 /ml) の分析の際にご使用下さい。(詳しくは、Leja スライド 20 ミクロン & 100 ミクロン用のマニュアルをご覧ください。)

Leja®スライドは、フロートガラス製で、顕微鏡用スライドの標準規格サイズ (75x25x1 mm) です。切って割るのではなく挽いて適切なサイズにカットしてありますので切断面が鋭くなく、取扱いの際のユーザーへの安全性に配慮されています。Leja®チャンバーの上には、カバースリップがあります。Leja® 4 チャンバータイプのスライドのカバースリップのサイズは、32 x 21 x 0.7 mm です。ガラスのスライドもカバースリップも洗浄済みでコーティング処置を施してあります。洗浄済みのガラスの表面は、非常に反応しやすくなっていますが、コーティング加工で、検体注入の際ガラスの表面に細胞が張り付いてしまうのを防止し、また、注入の際空気の泡が出来てしまうのを防ぎます。ですが、精液サンプルの中に微小物質がある場合、空気泡が発生しやすくなりますのでご注意ください。

Leja®スライドの仕様はスライド本体の左右の側面にプリントされています。

Leja®スライドには、様々なチャンバーの数や高さのタイプがあり、チャンバーの数は 3 種類 (2、4、8)、高さは 3 種類 (12、20、100 ミクロン) あります。各チャンバーの最小容量は 1 μ l、最大は 25 μ l で、スライドにプリントされています。分析の際有効な表面積は、8 チャンバーのスライドの場合で 20 mm²、4 チャンバーの場合で 66 mm²、高さ 100 ミクロンの 2 チャンバーの場合 250 mm² です。

Leja®スライドの 2 層のガラス板の距離は厳密に決められており、対物サイドに樹脂が塗ってあります。この



樹脂中に、精密な決まった直径のスペーサーが入っています。カバースリップはプリント済みのパターンの上に置かれ、二つのガラス板が並行になるように押しつけられます。この時、スペーサーの直径によりガラス板の間の距離が決まり、樹脂を固めます。製造中チャンバー内にホコリやチリが入り込むのを防ぐため、Leja®スライドの製造はクリーンルームで行われております。

製造工程とチャンバーのデザインは、特許により守られています。

チャンバーの高さ

チャンバーの高さの許容率は最大5%です。100ミクロンのチャンバーの場合、実際の高さは100 ±5ミクロンです。実際の製造されたスライドの高さの最大値と最小値および95%信頼区間は、製造バッチごとにウェブサイトにてご提供しております。

Segre-Silberberg 効果のための補正

原則として Segre-Silberberg 効果は全ての毛細管の側面にあてはまるため、チャンバーにサンプルを注入する際の細胞の動きにも影響します。そのため、分析チャンバー中央部での測定濃度が、実際より低い数値に出ます。この Segre-Silberberg 効果の補正の必要性は、ポアズイコ流の発生、チャンバーの高さ、カウンティングチャンバー表面の特質、表面張力、サンプルの流入速度や粘性など、多くのファクターによります。水分の多い液体中の精子の場合、補正係数は1.30、粘性の高いサンプルの場合は1.00に近い数値を用います。他のファクターは全て定数値なので、Segre-Silberberg 効果に関連する変数はサンプルの粘性のみです。流入時間と粘性度は高い関連性がありますので、21mmの毛細管を使って Leja®®チャンバーにサンプルを充填する時間を計ることで特定のサンプル用の補正係数を計算できます。

チャンバーの高さが100ミクロンの場合、Segre-Silberberg 効果はほとんどありませんので、補正係数を使用する必要はありません。

品質管理

1. チャンバーの高さ

製造後、全てのスライドに品質管理テストを行います。印刷の質と樹脂の接着面は視認で確認されます。チャンバーの高さに関しては、1) 単色光で干渉パターンをチェックする、2) 1箱25枚のスライドのうち3枚を、Leja®®特製の測定機器でミクロン単位で高さを計測する2つの方法で検査されます。この Leja®®特製機器は、視認できる光の全波長の干渉原理を利用した測定機器です。製造ロットそれぞれの測定結果は Leja®®のウェブサイトでご覧頂けます。

2. 毒性

それぞれの製造ロットは、人間の精子よりも毒性に敏感なイノシシの精子を薄めた液で毒性テストを受けます。チャンバー中央部（樹脂の縁から最低0.8mm内側の部分）にある精子の運動性もテストします。毒性テストには6分かかりますが、その間精子の運動性は最大10%減少します。毒性テストの結果は、Leja®®のウェブサイトでご覧頂けます。10xあるいは20xの対物レンズを用いた場合の視覚は、100ミクロンより大幅に低いいため、100ミクロンのスライドは毒性テストの対象外となります。

3. 空気泡の発生

それぞれの製造ロットに、標本注入時の空気泡発生テストがあります。日々無作為に選ばれたスライドに水を入れ、空気泡が発生しない場合のみ品質テストにパスしたことになります。

4. 廃棄処理

ご使用前の Leja®®スライドは、家庭の一般廃棄物として廃棄して頂けます。人間の体液を充填した後の Leja®®スライドは感染の危険がありますので、使用後の Leja®®スライドの破棄に関しては地方自治体の指示に従って下さい。



低精子数及び無精子症の査定

人間精液および精液・子宮頸管粘液の採取や精液の取扱いに関しては、WHO の定めた実験室用マニュアル *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction* (参考文献リスト参照) に従って下さい。
人間の精液は感染の危険がありますので、常に感染性廃棄物としてお取り扱い下さい。

この手順の目的

このチャプターでは、Leja® 100 ミクロン・2 チャンバー・スライドを使って無精子症 (0 ~ 8,000 /ml) の精液の濃度を測定する場合、または Leja® 20 ミクロン・2 チャンバー・スライドを使って低濃度 (8,000 ~ 1×10^6 /ml) の精液の濃度を測定する場合の手順を解説します。

必要な設備

- 位相差顕微鏡 : 10x または 20x の対物レンズ
- テストチャンバー: 高さ 20 ミクロンの 2 チャンバー・スライド
- テストチャンバー: 高さ 100 ミクロンの 2 チャンバー・スライド
- ホットプレート : 60° C または、ホルムアルデヒド (36%溶液)
- 注入容量 : 10 μ l と 25 μ l
- ストップウォッチ
- 細胞カウンター
- 保湿ボックス

変数と数式

R_{adius} = 直径 / 2

π = パイ; 3.14

μ = ミクロン

VM_x = 顕微鏡下での 1 フィールドの容積

VM_{10} = 10x 対物レンズを使用している場合の顕微鏡下での 1 フィールドの容積 (単位 = nl);

$$VM_{10} = radius^2 \times \text{チャンバーの高さ} \times \pi$$

VM_{20} = 20x 対物レンズを使用している場合の顕微鏡下での 1 フィールドの容積 (単位 = nl);

$$VM_{20} = radius^2 \times \text{チャンバーの高さ} \times \pi$$

FT_1 = チャンバー #1 の充填時間

FT_2 = チャンバー #2 の充填時間

TC_1 = チャンバー #1 での測定数の合計

TC_2 = チャンバー #2 での測定数の合計

AF_1 = チャンバー #1 でカウンティングに使用したフィールドの数

AF_2 = チャンバー #2 でカウンティングに使用したフィールドの数

VL_1 = チャンバー #1 の推定容積; $VL_1 = AF_1 \times VM$

VL_2 = チャンバー #2 の推定容積; $VL_2 = AF_2 \times VM$

C_{i1} = チャンバー #1 の濃度; $C_{i1} = TC_1 / VL_1$ (10^6 / ml)

C_{i2} = チャンバー #2 の濃度; $C_{i2} = TC_2 / VL_2$ (10^6 / ml)

S_{x1} = チャンバー #1 の Segre Silberberg 効果の補正係数 (Appendix 2 を参照)

S_{x2} = チャンバー #2 の Segre Silberberg 効果の補正係数 (Appendix 2 を参照)

C_{t1} = チャンバー #1 の正確な濃度 (Segre Silberberg 効果を補正した数値); $CT_1 = C_{i1} \times S_{x1}$ 。

C_{t2} = チャンバー #2 の正確な濃度 (Segre Silberberg 効果を補正した数値); $CT_2 = C_{i2} \times S_{x2}$ 。

C_f = 最終的な正しい濃度; $C_f = (C_{t1} + C_{t2}) / 2$



顕微鏡の調整

- 対物マイクロメーターで顕微鏡のフィールドの直径を計測して下さい。半径 (*radius*) は直径の 1/2 です。中間レンズのレンズのないタイプの顕微鏡では、直径は大体 2,000 μ 、半径は 1,000 μ です。(10x 対物レンズの場合)。対物レンズが 20x の場合、直径は 950 μ 、半径は 475 μ です。
- フィールド当たりの容積を計算します。まず、半径をミクロンの単位に直します。チャンバーの高さは、20 ミクロンなので、フィールドの容積は、 $radius^2 \times 20 \times \pi$ (小数点以下 8 桁の数字がでます)。1 nl は $10^6 \mu^3$ ですので、さらに 10^6 で割って、容積を算出します (単位 = nl)。
- VM_{10} は 10x 対物レンズを使用している場合の顕微鏡下での 1 フィールドの容積です (単位 = nl)。 VM_{20} は 20x 対物レンズを使用している場合の顕微鏡下での 1 フィールドの容積です (単位 = nl)。
- 10x 対物レンズで高さ 20 ミクロンの Leja® スライドをご使用の場合、顕微鏡下の 1 フィールドの容積は、 $62.7 \text{nl} = 1,000^2 \times 20 \times 3.14 / 10^6$ (半径が 1,000 ミクロンの場合)。
- もしフィールドごとの精子数の平均が 5 であったなら、精子濃度は $5/62.8 = 0.080$ /nl、別の表現では 0.0801×10^6 /ml (つまり、1 ml ごとに平均 80,000 の精子細胞)、となります。
- 20x 対物レンズの場合、顕微鏡下の 1 フィールドは 14.2 nl (半径が 475 ミクロンの場合)。
- もしフィールドごとの精子数の平均が 7 であったなら、精子濃度は $7/14.2 = 0.49$ /nl、別の表現では 0.49×10^6 /ml (つまり、1 ml ごとに平均 490,000 の精子細胞)、となります。

手 順

1. 精液が液化するのを待ちます。
2. サンプルを、泡がでないよう注意して攪拌します。
3. Leja® スライド (2 チャンバー、高さ 20 ミクロン) を用意します。
4. よく混ぜた精液サンプルを 10 μ l ピペットに取ります。
5. ストップウォッチの準備をします。
6. 片方のチャンバーの注入口にピペットの先をあてます。
7. ストップウォッチのスタートボタンを押すと同時に、注入を開始します。
8. 注入口の縁に達したらすぐにストップウォッチを止めて下さい。
9. 余分な液を拭きます。
10. 充填時間 (FT_1) を記録します。
充填時間を正しく測定するために、ピペットにはチャンバーの容量以上のサンプルを注入しておいて下さい。
11. Leja® スライドを顕微鏡にセットします。
12. 顕微鏡下でサンプルを観察して下さい。



13. まず、10 フィールド内の細胞を数えて下さい。
10x の対物レンズをご使用で、合計が 5 またはそれ以下の場合、濃度は 8,000 精子/ml 以下ということになります。

$$\frac{5}{10 \times 62.8} = 0.008 \times \frac{\text{精子数}}{nl} \quad (\text{1 フィールドの容積が } 62.8 \text{ nl の場合})$$

この簡易測定法で計算した濃度が、 1×10^6 細胞/ml 以上の場合、サンプル濃度の測定は標準の方法で行います。このまま次のステップへお進みください。または、20 ミクロン・チャンバーを使った標準測定方法のマニュアル（別紙）をご参照下さい。

簡易測定濃度が 1×10^6 細胞/ml より少ない場合、100 ミクロン・スライドを使ってサンプル濃度の測定を行って頂く必要があります。（次のチャプター、または、100 ミクロン・スライドを使った測定方法のマニュアル（別紙）をご参照下さい。

手順（簡易測定濃度が 8,000 ~ 1×10^6 細胞/ml 以上の場合）

14. 上記の簡単な測定方法で推定濃度が 8,000 ~ 1×10^6 細胞/ml とでた場合、ランダムに 5 つ（またはそれ以上）のフィールドを選び、フィールド内の成体精子数を数えて下さい。できれば、合計で 200 以上の細胞を数えるまで続けて下さい。
15. 合計数 (TC_1) と、使用したフィールドの数 (AF_1) を記録します。
16. 使用したフィールドの推定容積を計算します； $VL_1 = AF_1 \times VM$
17. このチャンバーの濃度を計算します； $C_{ii} = TC_1 / VL_1$ (10^6 / ml)
18. Segre Silberberg 効果を補正します。Appendix 2 を参照し、Leja® の 20 ミクロン・2 チャンバー・スライドの充填時間 (FT_1) に対応する補正係数 (S_{x1}) を見つけて下さい。
19. チャンバー #1 の正しい濃度を計算します； $CT_1 = C_{ii} \times S_{x1}$
20. 以上のステップを、チャンバー #2 に行います。充填時間 (FT_2)、合計細胞数 (TC_2)、使用フィールド数 (AF_2)、濃度 (C_{i2})、Segre Silberberg 効果を補正した正しい濃度 (C_{t2}) を測定・算出します。
21. 次に、チャンバー #1 と #2 の補正後の濃度の平方根に 2 を掛けます； $2 \times \sqrt{TC_1 + TC_2}$
また、チャンバー #1 と #2 の補正後の濃度の差異の絶対値を計算します； $|TC_1 - TC_2|$
22. $|TC_1 - TC_2| \leq [2 \times \sqrt{(TC_1 + TC_2)}]$ の場合、2 つのチャンバーの測定結果は 95% の信頼区間内です。測定結果を採用します。
23. $|TC_1 - TC_2| \geq [2 \times \sqrt{(TC_1 + TC_2)}]$ の場合、2 つのチャンバーの測定結果には誤差があります。最初からやり直して下さい。
24. 2 つのチャンバーから得た数値が正確だと思われる場合（ステップ-22 で結果が採用された場合）、2 つのチャンバーから得た濃度の平均値、 C_f ）を計算してこのサンプルの正しい精子濃度を算出します。
 $C_f = (C_{i1} + C_{i2}) / 2$



低精子数及び無精子症の査定 (Leja® 100 ミクロン・2 チャンバーを使用する場合)

Leja® 100 ミクロン・2 チャンバーのスライドは、運動性のある精子のサンプルにはお使い頂けませんので、精子の動きを弱める必要があります。ホルムアルデヒド（36%溶液、5 μ l）をサンプルに加えてからスライドに注入するか、充填したスライドを30秒ほどホットプレート（60° C）に載せてから測定を始めて下さい。

手 順

1. ホルムアルデヒド処理した精液 25 μ l を、Leja® 2 チャンバー・スライドのチャンバーAに注入して下さい。または、未処理の精液を注入したスライドを、ホットプレートで処置して下さい。
2. 10x、あるいは20xの対物レンズのどちらでも、100 ミクロンの高さは焦点を合わせるには厚すぎます。まずは、5分から10分置いて細胞が底に落ち着くのを待ちます。乾燥を防ぐため、保湿ボックスに入れて置いて下さい。
3. Leja®スライドを、位相差顕微鏡にセットします。
4. チャンバー内の精子細胞、全てを数えて下さい（X）。 位相差顕微鏡では十分可能です。
5. 数えた細胞数（X）を Appendix 2 を参照して、濃度、および95%（または99%）の信頼区間を見つけ出します。
6. チャンバーBで、以上の手順を繰り返します。
7. チャンバーAと、チャンバーBの95%の信頼区間が重複する場合、2つのチャンバーの測定結果は信頼できます。サンプルの濃度として、2つの濃度の平均値を計算して下さい。

1つのチャンバー内に200以上の細胞がある場合、その時点で作業を中止して、Leja® 20 ミクロン・スライドをご使用下さい。

例 1：

細心の注意を払って細胞を数えた結果、100 ミクロン・スライドのチャンバー1つの細胞数が0だった場合。
濃度 = $0.000000 \times 10^6 / \text{ml}$

(CI 95%: $0.000000 \times 10^6 \sim 0.000120 \times 10^6 / \text{ml}$; CI 99%: $0.000000 \times 10^6 \sim 0.000184 \times 10^6 / \text{ml}$)

例 2：

100 ミクロン・スライドのチャンバー1つの細胞数が5だった場合。
濃度 = $0.000200 \times 10^6 / \text{ml}$

(CI 95%: $0.000065 \times 10^6 \sim 0.000467 \times 10^6 / \text{ml}$; CI 99%: $0.000043 \times 10^6 \sim 0.000566 \times 10^6 / \text{ml}$)



【参考文献】

- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers. *J Androl.* 2005 Jan-Feb; 26(1): 107-14.
- Douglas-Hamilton DH, Smith NG, Kuster CE, Vermeiden JP, Althouse GC. Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration. *J Androl.* 2005 Jan-Feb; 26(1):115-22.
- WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. (4th ed.) Cambridge University Press, 1999. ISBN 0 521 64599 9

Appendix 1

充填時間 (FT) 秒	S_x	充填時間 (FT) 秒	S_x
2.0	1.32	9.0	1.09
2.1	1.31	10.0	1.08
2.2	1.30	11.0	1.08
2.3	1.29	12.0	1.07
2.4	1.28	13.0	1.06
2.5	1.27	14.0	1.06
2.6	1.26	15.0	1.06
2.8	1.25	16.0	1.05
2.9	1.24	17.0	1.05
3.2	1.23	18.0	1.05
3.4	1.22	19.0	1.04
3.6	1.21	20.0	1.04
3.8	1.20	21.0	1.04
4.0	1.19	22.0	1.04
4.2	1.18	23.0	1.04
4.5	1.17	24.0	1.04
5.0	1.16	25.0	1.03
5.3	1.15	30.0	1.03
5.5	1.14	60.0	1.01
6.0	1.13	120.0	1.01
7.0	1.11	180.0	1.00
8.0	1.10	240.0	1.00

この表は充填時間と Segre Silberberg 効果を修正するための補正係数 (S_x) の関係を示しています。これらの数値が適用となるのは、精液や血漿など水を含む液体を、長さ21mm・高さ20ミクロンのLeja®チャンバーに使用する場合のみです。充填時間が2.2秒かかる場合、水を注入するのと等しいこととなります(粘性 = 1 cP)。

Leja® 100ミクロン・スライドのチャンバーでは、成体精子の頭部の直径とチャンバーの高さ(深さ)の比率のため Segre Silberberg 効果は現れません。



Appendix 2

X = 細胞数
濃度 = 10^6 細胞 /ml
CI = 信頼区間 (10^6 /ml)

X	濃度 10^6 /ml	CI 95% 下限	CI 95% 上限	CI 99% 下限	CI 99% 上限
0	0.000000	0.000000	0.000120	0.000000	0.000184
1	0.000040	0.000001	0.000223	0.000000	0.000240
2	0.000080	0.000010	0.000289	0.000000	0.000371
3	0.000120	0.000025	0.000351	0.000014	0.000439
4	0.000160	0.000044	0.000410	0.000027	0.000504
5	0.000200	0.000065	0.000467	0.000043	0.000566
6	0.000240	0.000088	0.000522	0.000062	0.000626
7	0.000280	0.000112	0.000577	0.000082	0.000685
8	0.000320	0.000138	0.000630	0.000103	0.000743
9	0.000360	0.000165	0.000683	0.000125	0.000800
10	0.000400	0.000192	0.000736	0.000149	0.000856
11	0.000440	0.000220	0.000787	0.000173	0.000911
12	0.000480	0.000248	0.000838	0.000198	0.000966
13	0.000520	0.000277	0.000889	0.000223	0.001020
14	0.000560	0.000306	0.000940	0.000249	0.001074
15	0.000600	0.000336	0.000990	0.000276	0.001126
16	0.000640	0.000366	0.001039	0.000303	0.001179
17	0.000680	0.000396	0.001089	0.000330	0.001232
18	0.000720	0.000427	0.001138	0.000358	0.001284
19	0.000760	0.000458	0.001187	0.000386	0.001335
20	0.000800	0.000489	0.001236	0.000414	0.001387
21	0.000840	0.000520	0.001284	0.000443	0.001438
22	0.000880	0.000552	0.001332	0.000472	0.001489
23	0.000920	0.000583	0.001380	0.000501	0.001539
24	0.000960	0.000615	0.001428	0.000530	0.001590
25	0.001000	0.000647	0.001476	0.000560	0.001640
26	0.001040	0.000679	0.001524	0.000590	0.001690
27	0.001080	0.000712	0.001571	0.000620	0.001740
28	0.001120	0.000744	0.001619	0.000650	0.001790
29	0.001160	0.000777	0.001666	0.000680	0.001839
30	0.001200	0.000810	0.001713	0.000711	0.001888
31	0.001240	0.000842	0.001760	0.000741	0.001938
32	0.001280	0.000876	0.001807	0.000772	0.001987
33	0.001320	0.000909	0.001854	0.000803	0.002036
34	0.001360	0.000942	0.001900	0.000834	0.002084
35	0.001400	0.000975	0.001947	0.000866	0.002133
36	0.001440	0.001008	0.001994	0.000897	0.002182
37	0.001480	0.001042	0.002040	0.000928	0.002230
38	0.001520	0.001076	0.002086	0.000960	0.002278
39	0.001560	0.001109	0.002132	0.000992	0.002326
40	0.001600	0.001143	0.002179	0.001024	0.002374
41	0.001640	0.001177	0.002225	0.001055	0.002422
42	0.001680	0.001211	0.002271	0.001087	0.002467
43	0.001720	0.001245	0.002317	0.001120	0.002518
44	0.001760	0.001279	0.002363	0.001152	0.002566
45	0.001800	0.001313	0.002408	0.001184	0.002614
46	0.001840	0.001347	0.002454	0.001216	0.002661
47	0.001880	0.001381	0.002500	0.001249	0.002709
48	0.001920	0.001416	0.002546	0.001281	0.002756
49	0.001960	0.001450	0.002591	0.001314	0.002803
50	0.002000	0.001484	0.002637	0.001346	0.002851
51	0.002040	0.001519	0.002682	0.001379	0.002898
52	0.002080	0.001554	0.002728	0.001412	0.002945
53	0.002120	0.001588	0.002773	0.001445	0.002992
54	0.002160	0.001623	0.002818	0.001478	0.003039
55	0.002200	0.001657	0.002864	0.001511	0.003086
56	0.002240	0.001692	0.002909	0.001544	0.003133
57	0.002280	0.001727	0.002954	0.001577	0.003180
58	0.002320	0.001762	0.002999	0.001610	0.003226
59	0.002360	0.001796	0.003044	0.001644	0.003273
60	0.002400	0.001832	0.003089	0.001677	0.003320
61	0.002440	0.001866	0.003134	0.001710	0.003366



X	濃度 10 ⁶ /ml	CI 95% 下限	CI 95% 上限	CI 99% 下限	CI 99% 上限
62	0.002480	0.001901	0.003179	0.001744	0.003413
63	0.002520	0.001936	0.003224	0.001777	0.003459
64	0.002560	0.001972	0.003269	0.001811	0.003506
65	0.002600	0.002007	0.003314	0.001844	0.003552
66	0.002640	0.002042	0.003359	0.001878	0.003598
67	0.002680	0.002077	0.003404	0.001912	0.003644
68	0.002720	0.002112	0.003448	0.001946	0.003691
69	0.002760	0.002148	0.003492	0.001979	0.003737
70	0.002800	0.002183	0.003538	0.002013	0.003783
71	0.002840	0.002218	0.003582	0.002047	0.003829
72	0.002880	0.002254	0.003627	0.002081	0.003875
73	0.002920	0.002289	0.003672	0.002115	0.003921
74	0.002960	0.002324	0.003716	0.002149	0.003967
75	0.003000	0.002360	0.003760	0.002183	0.004013
76	0.003040	0.002395	0.003805	0.002217	0.004059
77	0.003080	0.002431	0.003850	0.002251	0.004105
78	0.003120	0.002466	0.003894	0.002285	0.004151
79	0.003160	0.002502	0.003938	0.002319	0.004196
80	0.003200	0.002537	0.003983	0.002354	0.004242
81	0.003240	0.002573	0.004027	0.002388	0.004288
82	0.003280	0.002609	0.004071	0.002422	0.004334
83	0.003320	0.002644	0.004116	0.002456	0.004379
84	0.003360	0.002680	0.004160	0.002491	0.004425
85	0.003400	0.002716	0.004204	0.002525	0.004470
86	0.003440	0.002750	0.004248	0.002560	0.004516
87	0.003480	0.002787	0.004292	0.002594	0.004562
88	0.003520	0.002823	0.004337	0.002629	0.004607
89	0.003560	0.002859	0.004381	0.002663	0.004652
90	0.003600	0.002895	0.004425	0.002698	0.004698
91	0.003640	0.002931	0.004469	0.002732	0.004743
92	0.003680	0.002967	0.004513	0.002767	0.004788
93	0.003720	0.003002	0.004557	0.002802	0.004834
94	0.003760	0.003038	0.004601	0.002836	0.004879
95	0.003800	0.003074	0.004645	0.002871	0.004924
96	0.003840	0.003110	0.004689	0.002906	0.004970
97	0.003880	0.003146	0.004733	0.002940	0.005015
98	0.003920	0.003182	0.004777	0.002975	0.005052
99	0.003960	0.003218	0.004821	0.003010	0.005105
100	0.004000	0.003254	0.004865	0.003045	0.005150
101	0.004040	0.003291	0.004909	0.003080	0.005196
102	0.004080	0.003327	0.004953	0.003114	0.005241
103	0.004120	0.003363	0.004997	0.003150	0.005286
104	0.004160	0.003399	0.005040	0.003184	0.005331
105	0.004200	0.003435	0.005084	0.003219	0.005376
106	0.004240	0.003471	0.005128	0.003254	0.005421
107	0.004280	0.003508	0.005172	0.003289	0.005466
108	0.004320	0.003544	0.005216	0.003324	0.005511
109	0.004360	0.003580	0.005260	0.003360	0.005556
110	0.004400	0.003616	0.005303	0.003394	0.005600
111	0.004440	0.003652	0.005347	0.003430	0.005645
112	0.004480	0.003689	0.005390	0.003465	0.005690
113	0.004520	0.003725	0.005434	0.003500	0.005735
114	0.004560	0.003762	0.005478	0.003535	0.005780
115	0.004600	0.003798	0.005522	0.003570	0.005825
116	0.004640	0.003834	0.005565	0.003606	0.005870
117	0.004680	0.003870	0.005609	0.003641	0.005914
118	0.004720	0.003907	0.005652	0.003676	0.005959
119	0.004760	0.003943	0.005696	0.003711	0.006004
120	0.004800	0.003980	0.005740	0.003746	0.006048
121	0.004840	0.004016	0.005783	0.003782	0.006093
122	0.004880	0.004052	0.005827	0.003817	0.006138
123	0.004920	0.004089	0.005870	0.003852	0.006182
124	0.004960	0.004126	0.005914	0.003888	0.006227
125	0.005000	0.004162	0.005957	0.003923	0.006272
126	0.005040	0.004198	0.006001	0.003959	0.006316
127	0.005080	0.004235	0.006044	0.003994	0.006361
128	0.005120	0.004272	0.006088	0.004030	0.006405
129	0.005160	0.004308	0.006131	0.004065	0.006450
130	0.005200	0.004344	0.006174	0.004100	0.006494
131	0.005240	0.004381	0.006218	0.004136	0.006539



X	濃度 10 ⁶ /ml	CI 95% 下限	CI 95% 上限	CI 99% 下限	CI 99% 上限
132	0.005280	0.004418	0.006262	0.004171	0.006583
133	0.005320	0.004454	0.006305	0.004207	0.006628
134	0.005360	0.004491	0.006348	0.004242	0.006672
135	0.005400	0.004528	0.006392	0.004278	0.006716
136	0.005440	0.004564	0.006435	0.004314	0.006761
137	0.005480	0.004601	0.006478	0.004349	0.006805
138	0.005520	0.004638	0.006522	0.004385	0.006850
139	0.005560	0.004674	0.006565	0.004420	0.006894
140	0.005600	0.004711	0.006608	0.004456	0.006938
141	0.005640	0.004748	0.006652	0.004492	0.006983
142	0.005680	0.004784	0.006695	0.004527	0.007027
143	0.005720	0.004821	0.006738	0.004563	0.007071
144	0.005760	0.004858	0.006781	0.004599	0.007116
145	0.005800	0.004894	0.006825	0.004634	0.007160
146	0.005840	0.004931	0.006868	0.004670	0.007204
147	0.005880	0.004968	0.006911	0.004706	0.007248
148	0.005920	0.005005	0.006954	0.004742	0.007293
149	0.005960	0.005042	0.006998	0.004778	0.007337
150	0.006000	0.005078	0.007041	0.004813	0.007381
151	0.006040	0.005115	0.007084	0.004849	0.007425
152	0.006080	0.005152	0.007127	0.004885	0.007470
153	0.006120	0.005189	0.007170	0.004921	0.007514
154	0.006160	0.005226	0.007213	0.004956	0.007558
155	0.006200	0.005262	0.007256	0.004992	0.007602
156	0.006240	0.005299	0.007300	0.005028	0.007646
157	0.006280	0.005336	0.007343	0.005064	0.007690
158	0.006320	0.005373	0.007386	0.005100	0.007734
159	0.006360	0.005410	0.007429	0.005136	0.007778
160	0.006400	0.005447	0.007472	0.005172	0.007822
161	0.006440	0.005484	0.007515	0.005208	0.007866
162	0.006480	0.005520	0.007558	0.005244	0.007910
163	0.006520	0.005558	0.007601	0.005280	0.007954
164	0.006560	0.005594	0.007644	0.005316	0.007998
165	0.006600	0.005631	0.007688	0.005352	0.008042
166	0.006640	0.005668	0.007730	0.005388	0.008086
167	0.006680	0.005705	0.007774	0.005424	0.008130
168	0.006720	0.005742	0.007816	0.005460	0.008174
169	0.006760	0.005779	0.007860	0.005496	0.008218
170	0.006800	0.005816	0.007902	0.005532	0.008262
171	0.006840	0.005853	0.007946	0.005568	0.008306
172	0.006880	0.005890	0.007988	0.005604	0.008350
173	0.006920	0.005927	0.008032	0.005640	0.008394
174	0.006960	0.005964	0.008074	0.005676	0.008438
175	0.007000	0.006001	0.008118	0.005712	0.008482
176	0.007040	0.006038	0.008160	0.005748	0.008526
177	0.007080	0.006075	0.008203	0.005784	0.008570
178	0.007120	0.006112	0.008246	0.005820	0.008614
179	0.007160	0.006150	0.008289	0.005857	0.008657
180	0.007200	0.006186	0.008332	0.005893	0.008701
181	0.007240	0.006224	0.008375	0.005929	0.008745
182	0.007280	0.006261	0.008418	0.005965	0.008789
183	0.007320	0.006298	0.008461	0.006001	0.008833
184	0.007360	0.006335	0.008504	0.006038	0.008876
185	0.007400	0.006372	0.008546	0.006074	0.008920
186	0.007440	0.006409	0.008590	0.006110	0.008964
187	0.007480	0.006446	0.008632	0.006146	0.009008
188	0.007520	0.006484	0.008675	0.006182	0.009052
189	0.007560	0.006520	0.008718	0.006219	0.009095
190	0.007600	0.006558	0.008761	0.006255	0.009139
191	0.007640	0.006595	0.008804	0.006291	0.009183
192	0.007680	0.006632	0.008846	0.006328	0.009226
193	0.007720	0.006669	0.008889	0.006364	0.009270
194	0.007760	0.006706	0.008932	0.006400	0.009314
195	0.007800	0.006758	0.008975	0.006436	0.009358
196	0.007840	0.006781	0.009018	0.006473	0.009401
197	0.007880	0.006818	0.009060	0.006509	0.009445
198	0.007920	0.006855	0.009103	0.006545	0.009488
199	0.007960	0.006892	0.009146	0.006582	0.009532
200	0.008000	0.006930	0.009189	0.006618	0.009576

Leja

Leja 社日本総代理店

<http://www.neuro-s.co.jp>

 **NEUROSCIENCE, INC.**[®]

株式会社 ニューロサイエンス

本 社 ■ 〒110-0016 東京都台東区台東 4-5-1 sales@neuro-s.co.jp
TEL. 03-5688-1061 FAX. 03-5688-1065

大阪営業所 ■ 〒532-0002 大阪府大阪市淀川区東三国5-13-9 米澤ビル東三国 4F
TEL. 06-6391-8841 FAX. 06-6391-8859

販売代理店

--