

厚生科学研究費補助金(生活安全総合研究事業)

平成 10 年度研究報告書

内分泌かく乱物質等の生活環境中の化学物質による健康影響  
—日本人正常男性の生殖機能に関する総合的研究—  
(H10-生活-017)

平成 11 年 3 月

主任研究者 岩 本 晃 明

(聖マリアンナ医科大学)

内分泌かく乱物質等の生活環境中の化学物質による健康影響  
—日本人正常男性の生殖機能に関する総合的研究—

主任研究者 岩本 晃明 聖マリアンナ医科大学 教授

**研究要旨** 主任研究者のグループにおいてヨーロッパで実施している“妊娠女性のパートナーを対象とした正常男性生殖機能の国際調査”に参加し、聖マリアンナ医科大学を拠点に川崎・横浜地区での調査を実施する一方、分担研究として、上記調査の全国4地域における実施に向けての予備的検討、生殖機能調査における疫学的検討とデータ解析、精液検査の標準化と精度管理、コンピュータ画像解析による精子形態および運動性の解析、非配偶者間人工授精ドナー（AID）における過去28年間の精液所見の解析、ビスフェノールAによる精巣内ホルモン環境、精子形成能、受精能に関する研究の基礎的検討を行った。

**分担研究者**

奥山明彦（大阪大学医学部教授）  
伊津野孝（東邦大学医学部講師）  
兼子 智（東京歯科大学市川総合病院講師）  
石島純夫（東京工業大学生命理工学部助手）  
末岡 浩（慶應義塾大学医学部講師）  
小林真一（聖マリアンナ医科大学教授）

**A. 研究目的**

本研究は妊孕能を有する男性を対象とした生殖機能調査に基づき、健康な日本人男性の生殖機能について詳細に解析するとともに、内分泌かく乱物質との関連において日本人男性の生殖機能の健康状態を明らかにするための標準的な調査法、検査法ならびに解析方法を確立することを目的とする。

**B. 研究方法**

聖マリアンナ医科大学本院と関連病院ならびに協力病院の産婦人科において妊娠が判明した女性のパートナー（配偶者）の男性に協力を求め、精液検査、男性生殖器の診察を行うとともに、質問票により、カップルと男性の母親のライフスタイルや健康に関する情報を得た。調査にあたっては倫理上の配慮として、同意を得ること、秘密厳守、結果の告知をすることが確認等が義務づけられ、本調査は聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認のもとに行われた。

同様の調査を平成11年度から全国複数箇所で行うにあたり、各分担研究者の協力の下に、調査地域の選定、調査方法の検討、各地域のデータ比較を可能にするための精液検査技術の標準化と精度管理を実施した。また疫学調査に適した精液検査技術の自動化を目指して、血球計算盤を用いた目視法との比較において、再現性のある精度の高い方法の開発を行った。さらに二重焦点ビデオ顕微鏡による精子運動性の詳細な解析、精子画像解析自動分析装置の精度評価を行った。

慶應義塾大学病院に記録されている非配偶者間人工授精ドナー精液所見の1970年から1998年までのデータについて解析した。

妊娠中のマウスにビスフェノールAを0.2および20 $\mu$ g/mlで飲水投与し、その子孫（雄）への影響（ステロイド代謝酵素、ゴナドトロピン受容体等へ影響、精子濃度、精子運動率など）を調べた。

**C. 研究結果**

1. 聖マリアンナ医科大学を拠点とした川崎・横浜地区での調査が終了し、一般精液所見および理学所見のデータの一部を解析した。
2. 地域差を検討する全国調査を実施するため、札幌医大、大阪大学医学部、金沢大学医学部、原三信病院（福岡）の各

泌尿器科を拠点とすることが決定し、倫理委員会への申請、調査組織の結成、調査スタッフ（検査技師、疫学調査コーディネーター）の教育研修などの準備を行った。

3. 地域差を検討する全国調査を実施刷るに当たり、調査地点の選出方法、対象者の募集方法について疫学的観点から検討した。さらに、先行の川崎・横浜地区における調査の生活様式に関するアンケートの結果を一部解析した。
4. 精液検査法の標準プロトコールを作成し、プロトコールに従った精度管理プログラムにより全国 4 拠点施設における技術者の教育訓練を実施した。また、精液検査の画像解析装置による自動化に向けて、精子濃度、運動率、奇形率の各項目について標準品を設定するとともに、それらを用いて検量線を作成した。
5. 疫学調査に適したコンピュータ画像解析による精子形態の解析法を確立した。また二重焦点ビデオ顕微鏡を用いて精子運動の詳細な解析を行った。また精子自動解析装置の精度評価に関する基礎的検討を行った。
6. 慶應大学医学部家族計画相談所に登録された AID ドナーの過去 28 年間(1970 年から 1998 年)の記録に基づき、本邦の健常者精液の精子濃度と運動率をならびに精子濃度・運動率について一部を解析し、1970～1989 年群と、1990～1998 年群での比較を行った。
7. 妊娠および授乳中のマウスに 0.2 および 20  $\mu$ g/ml で飲水投与したビスフェノール A の、子孫(雄)のステロイド代謝酵素、ゴナドトロピン受容体等ならびに精子濃度、精子運動率への影響は認められなかった。

#### D. 考察

男性生殖機能の指標として精液所見を用いるためには、精液量、精子濃度、総精子数、運動率、奇形率などのパラメータが正常な状態においてどのような範囲の数値を示し、病的な状態ではどのように変化するかが明らかになっていなければならない。また精子数や濃度は個体内ならびに個体間、季節や地域差等の生理的変動が大きいので、

その変動の幅や、変動をもたらす要因についても詳しい検討を要する。今回の調査ならびに研究により、妊孕能を有する日本人男性の生殖機能に関する標準値が示されるとともに、それらの詳細な解析ならびに関連の基礎研究により、今後重要性の増すと考えられる男性生殖機能の疫学調査に用いる標準法の確立が期待できる。さらに、生殖機能の指標としての精液所見がより正確に捉えられるようになれば、男性不妊症の詳細な鑑別・診断につながる。

平成 10 年度に完了した妊娠女性のパートナーを対象とした正常男性生殖機能の調査結果は日本人男性の生殖機能の、現時点で示し得るのひとつの標準値であるとともに、11 年度より開始する全国 4 地域での調査結果、および国際調査の参加各国のデータとの比較が可能になるという意味でも貴重な情報といえる。本調査はまた、生殖機能の疫学調査に関する問題を具体的に考える非常に良いケーススタディとなった。生殖機能調査においては精子濃度の分布が極めて広い範囲にわたること、特に WHO 基準を大幅に下回る所見においても挙児を得ていることなどは、一定の条件のもとに実施された大規模な調査の結果を解析することによって始めて明らかになったことである。また、ヒト精子の問題がなぜ混乱を招くのかを、さまざまなケースを通じて実感することが出来たことも大きな成果だった。この経験に基づいて問題点を整理し、基礎研究の結果と合わせて次年度以降の研究計画に生かすことにより、内分泌かく乱化学物質との関連において男性生殖機能を評価できる方法の確立を目指したい。

#### E. 結論

“妊娠女性のパートナーを対象とした正常男性生殖機能の国際調査”に参加し、聖マリアンナ医科大学を拠点に川崎・横浜地区での調査を実施する一方、全国 4 地域における調査の実施に向けた予備的検討、生殖機能調査の疫学的検討とデータ解析、精液検査の標準化と精度管理、コンピュータ画像解析による精子形態および運動性の解析、非配偶者間人工授精ドナー (AID) の精液所見の解析、実験動物へのビスフェノール A 投与による精巣内ホルモン環境、精子形成能、受精能に関する研究の基礎的検討を行った。これにより現

時点における日本人正常男性の標準値を知ろうえでの有用な情報が得られるとともに、生殖機能の評価に関する問題点がかなり整理され、疫学調査に適した方法論の確立に役立つ具体的な技術的改良がなされた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

岩本晃明, 星野孝夫, 野澤資亜利, 馬場克幸, 松下智彦, 西田智保: 環境ホルモンはヒト男性の内分泌・生殖系の健康障害を起しているか. 日本医師会雑誌 121(5), 67-68, 1999.

野澤資亜利, 岩本晃明: (総説) 内分泌かく乱化学物質の男性生殖機能への影響—ヒト精子は減少しているのか—. 聖マリアンナ医科大学雑誌 26, 223-231, 1998.

Kaneko, S., Nozawa, A., Kuroda, Y., Oda, T., Takeuchi, K., Yoshimura, Y., Nozawa, S. Simultaneous determination of human sperm adenyl purine nucleotides and nucleoside by means of high performance liquid chromatography-prelabel fluorescent detection system. *Advances in Reproduction* 1, 29-39, 1998.

Katayama, M., Taniguchi, H., Matsuda Y., Akihama, S., Kaneko, S., Ishikawa, H., Aikawa, A. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Anal. Letters* 31, 621-629, 1998.

Katayama, M., Nakane, R., Mastuda, Y., Kaneko, S., Hara, I., Sato, H. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Analyst* 123, 2339-2342, 1998.

兼子智: ヒト精子の凍結保存, 日本アンドロロジー学会総会記事 17, 48-50, 1998.

兼子智: ヒト精液検査の標準化-国際比較に向けて. 日本アンドロロジー学会総会記事 18, 86-88, 1999.

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B.

A. Movement of *Turritella* spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. *Cell Motil. Cytoskeleton* In press.

Ishijima, S., Hara, M., and Okiyama, M. Comparative studies on the spermatozoan motility of Japanese fishes. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, 33, 139-152, 1998

石島純夫: 鞭毛、鞭毛運動、フラジェリン. 生化学辞典 第3版、東京化学同人、1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement of spermatozoa: conversion of sliding into bending. *J. Reprod. Develop.* 44, Suppl., 41, 1998

Ishijima, S., Hamaguchi, Y., and Iwamoto, T. Characteristics of motor apparatus of human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Comp. Physiol. Biochem.* 15, 265, 1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement underlying chirality and propagation direction of bending waves. Abstracts of 8th International Symposium on Spermatology, 37, 1998

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B. A. Movement of *Turritella* Spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. Abstracts of 8th International Symposium on Spermatology, 81, 1998.

末岡 浩: 精子減少と環境有機物. 産婦人科の世界 51, 103-109, 1999.

### 2. 学会発表

馬場克幸, 岩本晃明, 星野孝夫, 松下智彦, 石塚文平, 大塚博光, 星野真也子: 日本における正常男性の生殖機能について (予報) 一妊娠した女性のパートナーの調査一. 日本アンドロロジー学会台7回学術大会. 平成10年7月19・20日、神戸市.

馬場克幸, 西田智保, 松下智彦, 星野孝夫, 岩本晃明: 本邦における妊婦のパートナー

の生殖機能について。日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会。平成10年12月11・12日、京都市。

岩本 晃明：日本人の精子・精液の状態について。第2回環境ホルモン学会講演会。平成11年2月15日、東京。

篠原雅美，末岡 浩，土屋慎一，小林紀子，松田紀子，吉村泰典：本邦における健常男性の精液所見—28年の変化。日本受精着床学会。平成10年7月11日。

末岡 浩：本邦における精子数減少と環境有機物の影響。（招請講演）ART FORUM '98”。

平成10年11月13日。鹿児島。

末岡 浩：日本人の精子・精液の状態について（招請講演）内分泌攪乱化学物質学会第2回環境ホルモン学会講演会。平成11年2月15日。東京。

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男性の生殖機能に関する調査研究  
—川崎・横浜地区における調査—

主任研究者 岩本 晃明 聖マリアンナ医科大学 教授

**研究要旨** 日本人正常男性の生殖機能について詳細に解析し、データベース化する目的で、自然妊娠した女性のパートナーすなわち妊孕能を有する男性を対象とした生殖機能の国際調査に参加し、川崎・横浜地区での調査を実施した。調査は350数例をもって終了したが、そのうち解析の済んでいる255例について精液検査、生殖器の診察等の結果を報告する。

#### A. 研究目的

ヒト精子に関するこれまでの研究の主流は、欧米諸国の精子銀行におけるAID(非配偶者間人工授精ドナー)の記録や精管結紮術前の調査、定義が定かでない健康男性の調査、不妊外来を訪れた患者から得たデータなどの疫学調査に基づくもので、対象者の条件設定や精液検査に際しての禁欲期間、測定方法ならびに解析の方法が調査機関によって少しずつ異なっていた。従って同一施設内でのデータの比較は問題ないが、他施設とのデータを単純に比較するわけには行かない。ヒト精子数の減少について論争が起きているが、この問題で重要なのは他施設との絶対値の比較を行う必要があることである。こうした問題解決の糸口を求めてコペンハーゲン大学のSkakkebaekらの提唱により、妊孕能を有する男性を対象とした生殖機能調査の国際共同研究の実施が決定し、1996年10月、調査のためのプロトコール、指針ならびに細則が公表された。そして、その年、デンマーク、フィンランド、フランス、スコットランドなどで調査が始まり、日本では本プロジェクトに聖マリアンナ医科大学が参加し川崎・横浜地区での調査を1997年11月より開始した。本研究の目的は、国際共同研究による男性生殖機能調査に基づき、自然妊娠した女性のパートナー、すなわち妊孕能が確認されている正常男性の生殖機能について、生殖器の診察、精液検査、血液検査、およびカップルのライフスタイルや健康について

の情報を分析し、現在の正常男性の生殖機能に関するデータベースを作成することにある。さらにヨーロッパ、米国との同一プロトコールによる調査結果とあわせて国際比較を行い、地球規模の環境汚染との関係を解明することを目指す。

#### B. 研究方法

聖マリアンナ医科大学本院と関連病院ならびに協力病院の産婦人科において妊娠が判明した女性のパートナー(配偶者)の男性に協力を求め、承諾の得られた255名より精液を採取し、精液量、精子濃度、精子運動率などのパラメーターを測定した。同時に男性生殖器の診察を行い、不妊の原因の一つとされる精索静脈瘤などの異常の有無を調べた。また質問票により、カップルと男性の母親のライフスタイルや健康に関する情報を得た。調査にあたっては国際調査のプロトコールの示す通り、ボランティアに対する倫理上の配慮として、同意を得ること、秘密厳守、結果の告知をするかどうかの確認等が義務づけられており、本調査は聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認のもとに行われた。調査参加者の募集にあたっては、コーディネーターが妊婦に本調査の内容を説明しボランティアとしての参加を要請した。

#### C. 研究結果

255例の年齢分布は20代83名、30代158名、40代14名である。年代別の精液所見は20代、

30代、40代の順にそれぞれ、平均精液量が3.3, 3.2, 3.7 ml、全例の平均は3.2mlであった。平均精子濃度は114.2, 106.7, 83.7×10<sup>6</sup>/ml、全例の平均は107.9×10<sup>6</sup>/ml(最低0.5×10<sup>6</sup>/ml、最低818.05×10<sup>6</sup>/ml)で、中央値(メジアン)は82.3×10<sup>6</sup>/mlであった。平均運動率は58.8, 56.7, 46.2%で、全例の平均は56.8%である(表1)。精子濃度のWHO正常基準下限値20×10<sup>6</sup>/mlを下回る例が255名中26名(10%)、精子濃度、運動率ともにWHO基準を満たさない例が13名(5%)含まれていた。男子不妊症の一原因となる精索静脈瘤はValsalva法にて診断される第1度の精索静脈瘤は46例、触診にて診断可能な第2度精索静脈瘤は12例、視診にて容易に診断可能な第3度精索静脈瘤は6例に認めた(表2)。なお精巣腫瘍、停留精巣、尿道下裂等の生殖器系の異常は認めていない。

#### D. 考察

精子濃度は1mlあたり0.5×10<sup>6</sup>/mlから818.05×10<sup>6</sup>/mlまで極めて広範囲に分布していた。WHO基準を満たさない例が精子濃度については10%、精子濃度、運動率の両方とも基準値以下が5%あったが、それらが全て挙子を得ている事実は貴重な情報といえる。全体の平均精子濃度は107.9×10<sup>6</sup>/mlであるが、中央値(メジアン)は82.3×10<sup>6</sup>/mlで、中央値の方が精子濃度分布のピークに近い値を示していた。今後、平均値で表すのが良いのか中央値の方が良いのか、あるいは幾何学平均値を用いるべきかなどについて検討すべきである。

なお精漿、血液は微量の内分泌かく乱化学物質の測定が可能になった時に備えて凍結保存されている。

#### E. 結論

自然妊娠した女性のパートナー(妊孕能を有する男性)を対象とした生殖機能の国際調査に参加し、川崎・横浜地区での調査を実施した。350数例で調査を終了したが、そのう

ち255例について精液検査、生殖器の診察等の結果を解析した。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

岩本晃明, 星野孝夫, 野澤資亜利, 馬場克幸, 松下智彦, 西田智保: 環境ホルモンはヒト男性の内分泌・生殖系の健康障害を起こしているか. 日本医師会雑誌121(5), 675-680, 1999.

野澤資亜利, 岩本晃明: (総説) 内分泌かく乱化学物質の男性生殖機能への影響—ヒト精子は減少しているのか—. 聖マリアンナ医科大学雑誌 26, 223-231, 1998.

##### 2. 学会発表

馬場克幸, 岩本晃明, 星野孝夫, 松下智彦, 石塚文平, 大塚博光, 星野真也子: 日本における正常男性の生殖機能について(予報)—妊娠した女性のパートナーの調査—. 日本アンドロロジー学会第7回学術大会. 平成10年7月19・20日、神戸市.

馬場克幸, 西田智保, 松下智彦, 星野孝夫, 岩本晃明: 本邦における妊婦のパートナーの生殖機能について. 日本内分泌攪乱化学物質学会第1回研究発表会. 平成10年12月11・12日、京都市.

岩本 晃明: 日本人の精子・精液の状態について. 第2回環境ホルモン学会講演会. 平成11年2月15日、東京.

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

表1. 妊孕能を有する日本人男性 255 人の精液所見

精子パラメーター	20代 (n=83)	30代 (n=158)	40代 (n=14)	全体 (n=255)	正常基準 限界値(WHO)
精液量 (ml)	3.3 ± 1.5	3.2 ± 1.5	3.7 ± 2.1	3.2 ± 1.5	2.0ml
精子濃度 (×10 <sup>6</sup> /ml)					
平均値	114.2 ± 120.8	106.7 ± 85.0	83.7 ± 71.4	107.9 ± 97.4	20×10 <sup>6</sup> /ml
中央値	81.0	89.5	60.9	82.3	
運動率 "a+b" (%)	58.8 ± 13.7	56.7 ± 14.5	46.2 ± 18.2	56.8 ± 14.7	50%
総精子数 (×10 <sup>6</sup> )	336.4 ± 306.0	320.0 ± 277.6	269.2 ± 215.2	322.6 ± 283.6	40×10 <sup>6</sup>
総運動精子数 (×10 <sup>6</sup> )	198.6 ± 165.9	187.3 ± 171.3	138.6 ± 118.5	188.3 ± 167.1	

(平均値 ± 標準偏差)

表2. 精索静脈瘤の頻度

グレード	例数 (%)	
	左	右
精索静脈瘤なし	191 (74.9)	0
1度 (Valsalva 法にて診断)	46 (18.0)	0
2度 (触診にて診断可能)	12 (4.7)	0
3度 (視診にて診断可能)	6 (2.3)	0



厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

妊婦のパートナーを対象とした正常男性生殖機能調査  
—全国4地域における調査—

分担研究者 奥山 明彦 大阪大学医学部 教授

研究協力者 塚本 泰司 札幌医科大学 教授

研究協力者 並木 幹夫 金沢大学医学部 教授

研究協力者 小松 潔 原三信病院 診療部長

**研究要旨** 全国4地域における妊婦のパートナーを対象とした正常男性生殖機能調査の準備として、拠点となる施設の組織作り、調査プロトコルの整備、方法の標準化ならびに統一化、技術者の教育訓練等の準備を実施した。

**A. 研究目的**

主任研究者の岩本らは1997年より妊孕能を有する男性を対象とした生殖機能調査を川崎・横浜地区において実施している。この調査は平成10年度本研究事業の一部であると同時にコペンハーゲン大学のSkakkebaekらの提唱により実施されているヨーロッパにおける男性生殖機能に関する国際共同研究「妊婦のパートナーを対象とした男性生殖機能調査」一環のとして進められている。調査が開始してまもなく研究グループ内で、川崎・横浜地区という限定された地域での調査結果を日本からのデータとして国際共同研究の場に提出できるのかどうかという議論が起こり、全国規模での調査の必要性が検討された。結局、近年問題になっているヒト精子の減少傾向に関する各国からの報告から、地域差の問題は無視できないという結論になり、より総合的な評価をめざして全国複数箇所での調査を行うことを決定した。調査は先行の川崎・横浜地区での調査と同様の条件で、各地域300例を目標に1年余りの期間で実施される計画であるが、地域間でデータを比較できるように調査は可能な限り一定の条件下で実施されなければならない。調査方法の基準になるものとして国際共同研究のプロトコルがあり、参加各国が必ず自国語に翻訳して使用する事

になっているが、複数箇所からの調査結果を比較検討する目的においては、それだけでは不十分である。我々は、条件が異なることによって生じるバイアスを最小限にしようとするなら、詳細な手順を示したマニュアルの作成とそれに従って調査が実施されるようなシステムの整備が必須であると考えた。今年度は調査の方法（調査プロトコルに示されている方法、特に精液検査法と調査参加者の募集方法）を可能な限り標準化し統一化することを目的に準備を進めた。

**B. 研究方法**

**調査拠点の選択：** はじめに日本列島を5地域に分割した。次に、既に調査が実施されている川崎・横浜地区を含む地域を除いた4地域について、それぞれ主要な大学病院および総合病院を抽出し、その中から調査を遂行しうる条件を満たした施設を選出した。  
**調査チームの組織化：** 各拠点病院の泌尿器科に調査事務局を設置し、医師、検査技師、コーディネーターからなる調査チームを組織した。また拠点病院および関連病院の産婦人科に協力を要請し、調査協力者の募集窓口となる産科外来数ヶ所を決めた。各施設の倫理委員会に調査実施の承認申請を行った。

精液検査法の標準化と精度管理：国際調査プロトコールに示された方法による、精液検査の標準マニュアルを作成した(付録1)。さらに、標準マニュアルに基づいて各施設の精液検査担当者の教育訓練を行った。最初、聖マリアンナ医科大学泌尿器科(調査本部)における講習会で兼子分担研究者による講義と聖マリアンナ医科大学泌尿器科技師による実技指導(精子濃度と精子運動率の測定)が行われ、その後、調査本部から同一の固定検体を各施設に発送し、その測定結果を本部に返送するという方式での訓練を3回実施した。最後に、再び調査本部に集まって精液検査技術の習熟度を確認した。

調査参加者募集方法の統一化：調査参加者の募集にあたっては、各施設の調査コーディネーターが対象者に接触して統一化された手順で勧誘する方法を採った。参加者募集から調査までの手順を示したマニュアルを作成し(付録2)、それを用いた講習会を開催して各施設のコーディネーターの教育訓練を実施した。講習会では伊津野分担研究者が参加者募集に関する疫学的な観点からの基本的な考え方を講義し、聖マリアンナ医科大学泌尿器科の調査コーディネーターが実際の手順について説明した。

### C. 研究結果および考察

調査拠点として札幌医大(札幌)、大阪大学医学部(大阪)、金沢大学医学部(金沢)、原三信会病院(福岡)の4ヶ所が決定した。各施設の泌尿器科に調査チームが組織され、倫理委員会への申請、関連病院産婦人科への調査協力要請等の手続きが開始した。

各施設の精液検査担当者を対象とした実技訓練では測定回数を重ねるにしたがって測定値が安定した。精液検査においては精液の液化や希釈などの操作が測定値のばらつきに大きく影響するが、それらを適正に行うことによって検査精度が上がる事が確認された。精子濃度の算定における標準値(調査本部技師による測定値)に対する各施設担当者の平均偏差は、第1回の講習会直後では1.9~4.7であったのが、教育訓練の最後の測定では0.5~1.5と小さくなった(図1)。調査開始後も調査本部から各施設に定期的に固定検体が発送する方法で検査

技術の精度管理が行われることになっている。

調査に参加する妊孕能を有する男性は、妊娠中の女性のパートナー(配偶者)を対象に募集することが国際調査のプロトコールに示されている。川崎・横浜地区での調査では聖マリアンナ医科大学の大学病院および関連病院の産婦人科外来で診療を受けている妊婦を通じてそのパートナーの参加を呼びかけた。今回の4施設における調査においても同様の条件で対象者が選ばれるように、国際調査プロトコールの遵守とコーディネーターの重要性を確認したうえで、各施設ごとに調査の準備を開始した。しかしながら、調査本部が各施設の準備状況の中間報告を受けた段階で、そのやり方では調査方法の統一化をはかるには不十分であることが明らかになった。すなわち、実際には各施設の状況がそれぞれ大きく異なるため川崎・横浜地区で行ったと全く同じ方法をとることが容易でないこと、プロトコールに示されている事項についての解釈が各施設の担当者によって必ずしも一定していないこと、また、例数を多く集めるために各施設でさまざまな工夫が凝らされる結果、対象の選択基準や選択方法が一定でなくなる危険性が生じたことなどが問題として挙げられ、調査本部は疫学の専門家である伊津野分担研究者と相談の結果、このままでは偏った基準で対象者を選択するリスクを避けることができないと判断した。そこで、一度すべての作業を中断して、現状の見直しと対策を講じることとなった。

その結果、調査参加者募集に関する詳細なマニュアルと関係書類一式からなるコーディネーター用のファイルを作成し、それを用いて、調査内容を完全に理解したコーディネーターが、常に一定の手順で対象者に接触する方法をとることが決まった。コーディネーター用ファイルには、協力を要請する産科外来向けの説明資料から、調査対象者を勧誘するチラシ、参加希望者に調査内容を説明するための資料一式とシナリオ等が含まれている。コーディネーターは、調査本部での講習会に参加し、調査内容の詳しい説明と、疫学調査における注意事項について教育訓練を受けた。特に本調査において必ず遵守すべき点と各施設の状況に合わせて変更可能な点などを十分に確

認し、各施設に戻ってマニュアル通り調査が実施できるよう、各施設の責任者（平成11年度より研究分担者）と相談しながら最終的な準備を進めることとなった。

**D. 結論**

全国4地域における妊婦のパートナーを対象とした正常男性生殖機能調査実施に向けて、拠点となる施設の組織作り、調査プロトコルの整備、方法の標準化ならびに統一化、技術者の教育訓練等を行った。

**E. 研究発表**

なし

**F. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

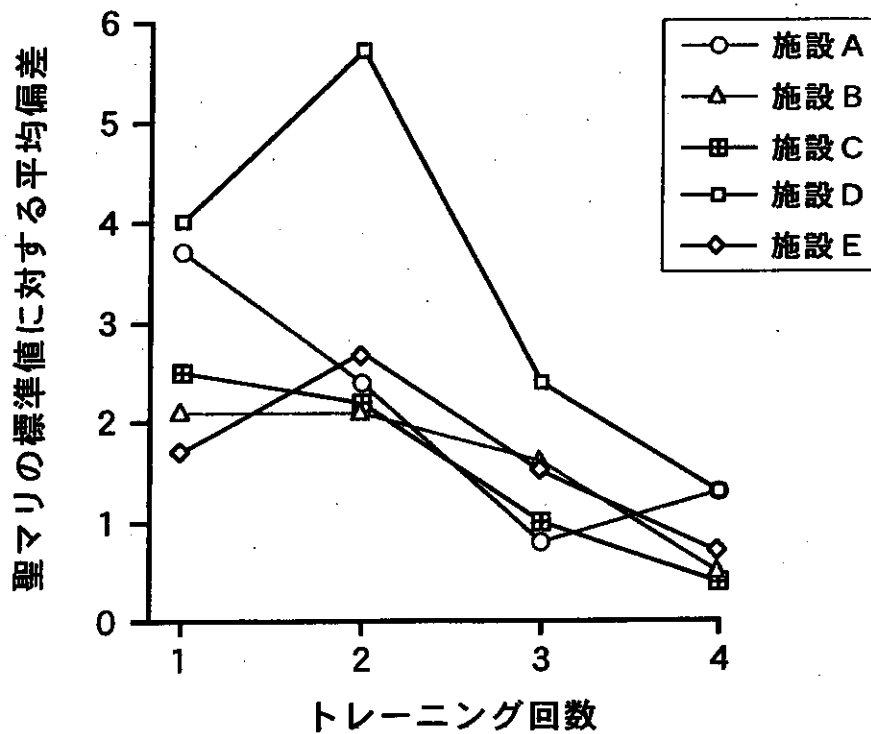


図1. 各施設の精子濃度測定値における平均偏差の推移

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

精液調査における疫学的検討とデータ解析

分担研究者 伊津野 孝 東邦大学医学部 講師

**研究要旨** 妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男子の生殖機能の全国調査を実施するにあたり、調査地点の選出方法、対象者の募集方法を検討した。また、先行調査としての聖マリアンナ医大で実施した川崎・横浜地区でのアンケート調査の結果を解析した。

**A. 研究目的**

日本人正常男子の生殖機能に関する総合的研究における、日本人の精子濃度の全国調査で、調査地点の選出方法、対象者の募集方法の検討、及び先行調査としての聖マリアンナ医大でのアンケート調査の結果を明らかにする事を目的とする。

**B. 研究方法**

全国調査における調査地点の選出方法、対象者の募集方法の決定手段を再検討し、先行調査している川崎・横浜地区の調査結果を解析する。

**C. 研究結果および考察**

1) 調査地点の選出

先行調査は関東地方（聖マリアンナ医大：神奈川県）で行われており、日本の代表値を求めたり、日本国内の地域差を検討するには、関東の他に少なくとも、北海道、関西、北陸、九州の4地区から調査地点を選出することが考えられた。各調査地点から、実際の調査拠点病院を選出するには、今回の調査が、1) 多数の産科外来患者数を必要とする、2) 男性生殖機能調査は泌尿器科医が行う、3) 精子検査は、精子測定に熟練した検査技師が行う、4) アンケート調査の実施、回収、データ入力など、事務処理のマンパワーが求められる、などの理由から、無作為に病院を選出し、調査を依頼することは不可能と判断し、4地区の拠点となる、大学病

院・総合病院に調査を依頼した(図1)。

2) 対象者の募集方法

デンマークをはじめ、他国の募集方法は産科医師が直接、妊婦に本研究の目的を説明し、参加の同意をとる方法をとっているが、本邦における、診察時間の制限の中では、この方法は現実的ではないと判断し、コーディネーターを間に介し、このコーディネーターが最初に妊婦に接触して、本研究の趣旨を説明し、参加を募る方式とした。

3) 先行調査の結果

参加率は呼びかけた1600人中359人の22.4%であった。年齢は $31.8 \pm 4.7$  (M $\pm$ SD) 歳、精子濃度  $120.9 \pm 103.9$  (M $\pm$ SD, Min0.5, Max818, Median 93.3)  $\times 10^6$ /mlであった。喫煙率は精子濃度低群（以下低群）の喫煙率50.0%に対し、精子濃度高群（以下高群）の54.8%であった。喫煙期間は低群の10年以上67.8%に対し、高群67.2%であった。喫煙本数は低群の20本以上59.6%に対し、高群の68.0%と高群の本数が多かった。有機野菜の摂取は低群の39.8%に対し、高群の27.1%と低群の方が摂取頻度は高かった。教育水準は低群の大学進学率59.8%に対し、高群の57.6%であった。パートナーの母親の出産時における喫煙率は低群の5.6%に対し、高群の6.7%と高群で高かった。母親の仕事は低群で29.4%が仕事をしていたのに対し、高群では16.2%が仕事をしており、低群の方が仕事をしていた割合は高かった(表1)。

**D. 結論**

妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男子の生殖機能の全国調査のための調査地点の選定、対象者の募集の方法を決定し、調査を実施できる態勢を整えた。また、先行の川崎・横浜地区での調査結果を一部解析した。

**E. 研究発表**

なし

**F. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

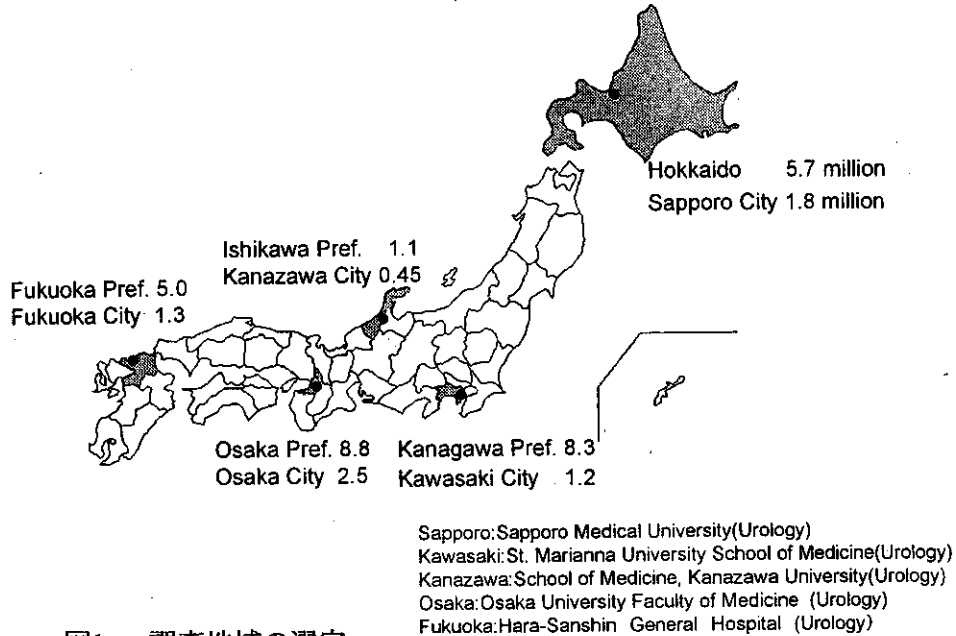


図1. 調査地域の選定

表1. 妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男性の生殖機能調査 (川崎・横浜地区) 生活様式に関するアンケート調査結果の解析

項目	精子濃度低群	精子濃度高群
例数 (N)	180	179
年齢	31.3 ± 4.7歳	32.2 ± 4.5歳
喫煙率	88 (50%)	98 (54.8%)
10年以上喫煙	80 (67.8%)	86 (67.2%)
20本以上喫煙	53 (59.6%)	66 (68.0%)
有機野菜摂取	70 (39.8%) *	48 (27.1%)
大学進学率	107 (59.8%)	102 (57.6%)
母親喫煙率	10 (5.6%)	12 (6.7%)
母親仕事有	53 (29.4%) **	29 (16.2%)

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

疫学調査における精液所見検査法の標準化

分担研究者 兼子 智 東京歯科大学（市川総合病院）講師

**研究要旨** 疫学調査を目的とした精液所見測定においては、方法の標準化ならびに測定値の精度管理が不可欠である。そのためには精子濃度、運動率、奇形率等の各項目について標準品の設定、それらを用いた検量線の確立が必須である。さらに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定も必要となる。将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化が望まれ、コンピューター支援画像解析装置による測定の標準化、自動化が重要である。

**A. 研究目的**

ヒトの精子濃度が50年前に比して半減している、若年者の精液所見悪化などが報告され、その原因としていわゆる環境ホルモンの影響が指摘され、ヒト精液所見に関する疫学的調査が企画された。これまでヒト精液所見は主として不妊治療における造精機能診断の一助とされ、精子濃度、運動率、奇形率などが測定されてきたが、測定項目、方法は施設毎に多様である。疫学調査に際しては、特に施設間のデータ比較を必要とする場合には、標本のサンプリング、調査項目の選定、調査法の標準化、測定値の精度管理が不可欠である。

今回の疫学調査の目的には、環境因子のヒト生殖能力への影響評価がある。現行では精子濃度の増減が注目されているが、分析項目の選択にあたって精液所見の何が精子妊孕性を反映するのか、量的、質的に多面的な調査が必要となる。またどの程度の差異を検出するのか、有意差を得るためにはどのくらいの標本数を必要とするかを考慮して分析法を選択する必要がある。定量のための標準品をどのように設定するのが重要となる。

本研究は疫学調査に適合した精液検査法の標準化を図る一端として、精子濃度、運動率、運動速度標準品の策定、それらの検量線を確立するとともに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定を試みた。

さらに将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化を試みた。測定方法の選択にあたっては、情報のデジタル化、自動化が可能であるなど大規模な疫学調査に適した画像解析装置を用いる方法の標準化を中心に検討を行った。

**B. 研究方法**

1) 血球計算盤を用いた精子濃度測定法の標準化

精液検査を行う技師の教育訓練と測定値の精度管理のために、精液所見に影響する種々の因子について詳細に検討し、それに基づいて精液検査標準法マニュアルを作成した。

2) 精液検査の自動化

精子画像解析装置による精子濃度の測定：熟練した技師が血球計算盤を用いて $123 \times 10^6/\text{ml}$ と測定した精子標本の2倍希釈系列をコンピューター画像解析装置（精子自動分析器）により測定し、精子濃度検量線を作成した。精子濃度検量線で直線性の得られる濃度に中性ホルマリン液で希釈した精子懸濁液を画像解析装置を用いて測定した。適正な精子懸濁液の濃度、懸濁液を透入するチャンバーの厚さを検討した。

精子運動標準品を用いた精子運動率検量線の作成：射精精液を攪拌密度勾配法で濃縮後、swim upまたはswim down法により運

動精子を選択的に分離した。この精子懸濁液を鏡検して全ての精子が運動していることを確認し、これを100%運動精子とした。ついで同懸濁液の半量を50℃で約5分間加熱して非動化し、これを0%運動精子とした。両者を任意の割合で混合した0-100%運動率標品の運動率を画像解析装置を用いて測定し、検量線を求めた。

### C. 研究結果および考察

#### 1) 血球計算盤を用いた精子濃度測定法の標準化

本研究班で実施している疫学調査（妊婦のパートナーを対象とした日本人正常男性の生殖機能に関する調査）では、血球算定盤を用いて精子濃度を測定している。この方法は高精度であり、得られた数値を直接絶対値として使用できるが、検査技師の熟練を要する。そこで技師の教育訓練と測定値の精度管理のために、精液所見に影響する種々の因子について検討し、精液検査標準法マニュアルを作成した（奥山分担研究者の報告書および付録参照）。精液所見に影響を及ぼす因子として、精液採取に関してはマスターベーションの慣れ、採取環境、禁欲期間、経時的変化など、検査手技については精液の均一化操作、希釈などが重要であることを確認した。

#### 2) 精液検査の自動化

**精子濃度：** 画像解析装置を用いる自動化法は精液中の他細胞との識別能の向上とともに標準精子を用いたキャリブレーションが求められるが、大規模な疫学調査には自動化が有利である。画像解析装置において精子濃度検量線は $4 \times 10^6$ /ml以下で直線性が得られることが明かとなり、それ以上の精子濃度では定量的な測定は困難であることが示唆された（図1）。さらにCCDカメラ画像をデジタル処理するコンピューター画像解析装置は、精子濃度、運動率を同時測定するために無希釈の精液を間隙 $10-20 \mu\text{m}$ のチャンバーに透入して測定を行う場合が多いが、CCDカメラは焦点面の精子画像のみを認識するためチャンバー間隙の変化を追従できず、現行の方法では精子濃度にバラツキがでることが明かとなった。以上の予備的検討をもとに以下に示す精子濃度測定法を考案した。

中性ホルマリン液で $4 \times 10^6$ /ml以下となるように希釈した精子懸濁液を検鏡プレート（セキスイ、間隙 $70 \mu\text{m}$ ）に透入した。約10分間静置すると精子はチャンバー底面に沈降して1層となる。単一焦点面に収束した精子像を画像解析装置を用いて測定した。ピュルケルチュルク血球算定盤（間隙： $100 \mu\text{m}$ ）画像、検鏡プレート画像ともに $0-10^8$ /ml希釈前濃度の範囲で直線性が得られ、画像解析装置を用いて高精度に精子濃度を測定することが可能であることが示された（図2）。

**精子運動率、運動速度：** 精子運動能は主観的な顕微鏡観察ではおおまかなgradingのみが可能であり、定量値を得るには画像解析装置を用いる必要がある。現行では精子運動標準品ならびにそれらを用いて作成した検量線が存在せず、コンピューターが算出した数値をそのまま利用している。以上の観点から精子運動標準品を用いた検量線の作成を試みた。射精精液を攪拌密度勾配法で濃縮後、swim upまたはswim down法により選択的に分離100%運動精子と、50℃で約5分間加熱して非動化した0%運動精子を任意の割合で混合して調製した精子運動標準品を画像解析装置を用いて測定した結果、 $r$ が0.9以上の直線性を有する検量線を得ることができた（図3）。本検討は精製精子、すなわち精子のみが存在する画像の解析結果であり、今後、無精子症精液に上述した精子運動標準品を再添加して作成した模擬精液を用いた検討が必要である。さらに本法では精子運動の質的な変化を再現できないので、この点に関しては更なる検討を要する。精子運動速度に関しては、対物マイクロメーターを用いたキャリブレーションが有用であった。

**精子奇形率：** WHOの分類に従う。標本作成法、染色法の標準化が求められる。典型的な奇形精子画像配布して観察の基準とする。染色過程における細胞の変形等を考慮して標準的な方法の確立が必要である。顕微鏡画像をデジタルカメラで撮影してコンピューター上で評価する方法を検討している。

### D. 結論

疫学調査に適合した精液検査法の標準化を

図る一端として、精子濃度、運動率、運動速度の各項目について標準品を策定し、それらの検量線を確認するとともに精子奇形率測定に用いる奇形精子標準画像の設定を試みた。さらに将来的には標準品のインターネット配信を可能とするため、データのデジタル化を試みた。測定方法の選択にあたっては、情報のデジタル化、自動化が可能であるなど大規模な疫学調査に適した画像解析装置を用いる方法の標準化を中心に検討を行った。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

Kaneko, S., Nozawa, A., Kuroda, Y., Oda, T., Takeuchi, K., Yoshimura, Y., Nozawa, S. Simultaneous determination of human sperm adenyl purine nucleotides and nucleoside by means of high performance liquid chromatography-prelabel fluorescent detection system. *Advances in Reproduction* 1, 29-39, 1998.

Katayama, M., Taniguchi, H., Matsuda Y.,

Akihama, S., Kaneko, S., Ishikawa, H., Aikawa, A. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Anal. Letters* 31, 621-629, 1998.

Katayama, M., Nakane, R., Mastuda, Y., Kaneko, S., Hara, I., Sato, H. Determination of cyclosporine A by high-performance liquid chromatography with aryl ozalate chemiluminescence detection. *Analyst* 123, 2339-2342, 1998.

兼子智：ヒト精子の凍結保存，日本アンドロロジー学会総会記事 17, 48-50, 1998.

### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

### コンピューター画像解析装置の精子濃度追従性

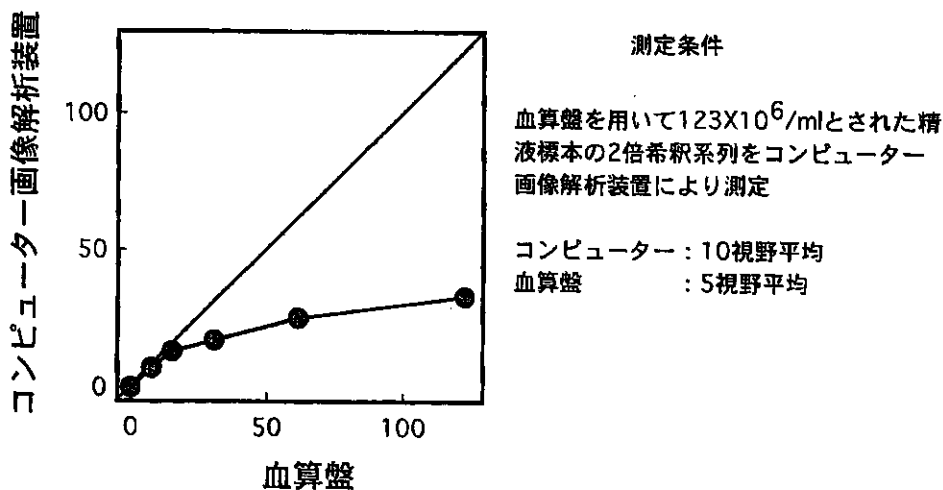


図1. 画像解析装置における精子濃度検量線



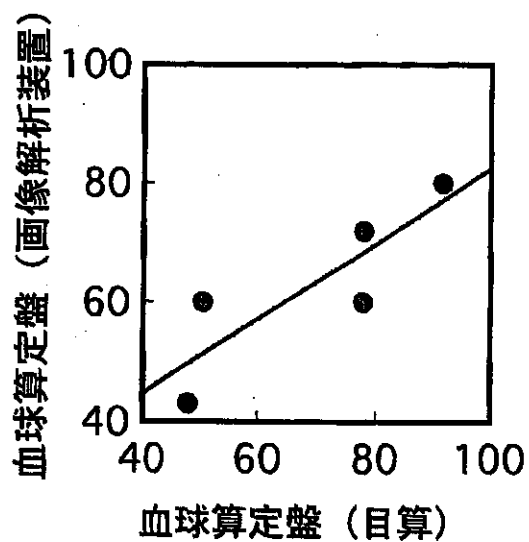


図2. 血球算定盤を用いた精子算定 (目算と画像解析装置の比較)

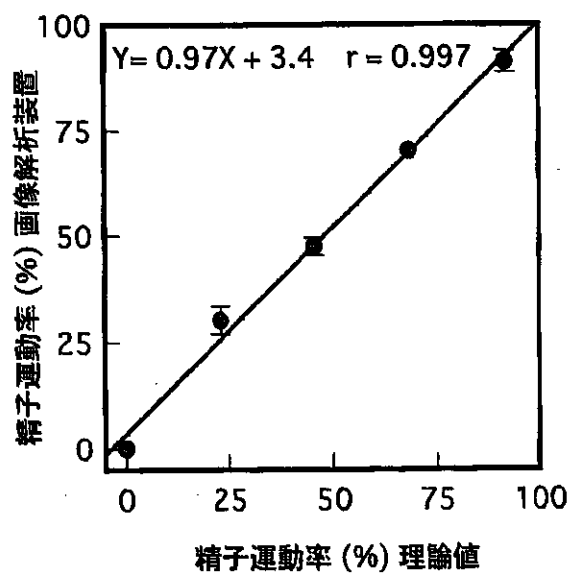


図3. 精製運動精子を用いた精子運動率検量線

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）  
分担研究報告書

精子運動性に関する運動生理学的研究

分担研究者 石島 純夫 東京工業大学生命理工学部助手

**研究要旨** 生殖機能のよりよい指標として、精子の形態や運動性を用いるために、精子の運動性のメカニズムを明らかにするとともに、形態や運動性を解析する方法の確立、さらに簡便な解析装置の開発を行った。

**A. 研究目的**

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響を評価するための指標として精子数が用いられ、現在国際的な規模での調査が行われているが、生殖機能や受精現象により密接に関係する精子の形態や運動性を調べることは、解析方法がまだ確立していないなどの困難はあるものの、より重要な課題であると考えられる。そこで、まず精子の運動性及びその機構を明らかにし、次に、形態や運動性を正確に解析する方法を確立し、さらに、臨床や畜産などの分野でも使うことのできる簡便な解析装置の開発を行うことを目的とする。

**B. 研究方法**

a. 精子の形態解析

高解像度のデジタルカメラをノマルスキー微分干渉顕微鏡に装着し、記録した像をデジタルカメラからコンピュータに転送し、画像解析ソフトを用いて頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。

b. 精子の運動解析

双眼の2つある接眼レンズの片方をずらすことにより機械的筒長を変え、それぞれの接眼レンズにビデオカメラを装着し、異なった焦点面の映像を1つのモニター上に表示し、ビデオテープレコーダで記録した。詳しい解析のために、1コマ毎の精子やその鞭毛運動を解析した(図1)。さらに、三次元的な精子の運動を明らかにするために、精子運動の原動力である鞭毛の運動を調べた。位相差顕微鏡に毎秒200コマ撮影で

きる高速度ビデオカメラを取り付け、精子の頭部を持つガラスの極微小ピペットを顕微操作器（マイクロマニピュレータ）を使って動かすことにより、鞭毛の屈曲運動を様々な方向から観察した。

精子の運動装置である軸糸の特性を調べるために、精子の細胞膜を界面活性剤（Triton X-100）で除去し、適当なイオン条件の下で、薬物やイオンなどを溶液中に加え、それらの精子運動に対する効果を調べた。

**C. 研究結果及び考察**

a. 精子の形態解析

最近のデジタル画像処理技術の進歩により、市販のデジタルカメラやコンピュータを用いて、精子の形態解析が比較的容易に行えるようになった。

b. 精子の運動解析

カバーガラスやスライドガラスなど、その運動を妨げるものがない溶液中では、精子は螺旋を描きながら螺旋軸上を比較的まっすぐに進む。この際、精子の鞭毛運動の振動面は、螺旋面、すなわち螺旋階段のステップに相当する部分に一致する。この精子の螺旋運動は、長軸の周りの回転と鞭毛の振動面での回転運動とによって説明することができる。通常の顕微鏡観察のように、比較的浅い容器を用いて精子の運動を観察すると、精子が自由に動ける間は螺旋を描いて移動するが、カバーガラスやスライドガラスに衝突し長軸方向の回転が妨げられようになると、カバーガラス直下やス

ライドガラス上で円運動をするようになる。したがって、プレパレート作成後、しばらくすると、ほとんどの精子はカバーガラスやスライドガラス上に集まることになる。螺旋の向きは精子によって異なる（以下参照）。

精子の運動は、尾部鞭毛が作る屈曲の運動による。運動中のヒトやウシ精子鞭毛の形は、断面が楕円のメガホンのような形の表面に巻き付く三次元螺旋である。鞭毛の三次元螺旋が左巻きか、あるいは右巻きかを調べるために、頭部の先端をカバーガラスに付けて、カバーガラスの面に垂直な軸の周りに回転している精子の回転方向を調べた。回転方向がわかれば、風車の形とその回転方向の関係のように、鞭毛の巻き方が分かる。調べたすべての動物で、精子は時計回りにも反時計回りにも回転した。ただし、種によって、時計回りと反時計回りとの比率が異なり、海産動物の精子では時計回りに回転する精子の割合が高く、哺乳類とメダカの精子では反時計回りに回転する精子の割合が高かった。精子の回転数は鞭毛の三次元性の大小に関係しており、回転数の大きなヒトやウシの精子の鞭毛運動が顕著な三次元成分を持つのに対して、ウニやヒトデやゴールデンハムスターの精子の鞭毛運動はかなり平面的であった。

時計回りと反時計回りとの比率は異なるものの、すべての動物種で精子は両方向に回転した。さらに、海産動物のウニやヒトデの精子と、哺乳類とメダカの精子とで、回転方向について逆の傾向を示した。回転方向を決める細胞内因子を同定するために、ウニ精子の細胞膜を界面活性剤で除去した後、適当なイオン条件下で ATP を含む溶液中で鞭毛運動を起こさせ、精子の回転運動の方向に対する様々な薬物やイオンの効果を調べたところ、カルシウムイオン濃度によって回転の方向が変わった。ウニ除膜精子では、カルシウムイオン濃度の高い溶液中では時計回りに回転する傾向が強く、カルシウムイオン濃度が低くなると、反時計回りに回転するようになった。回転の方向の変化は、鞭毛の屈曲の三次元成分が逆転（対掌性の変化）することによると考えられるので、カルシウムイオン濃度の違いに

よって、鞭毛の三次元螺旋の対掌性が変わったと考えられる。

精子の鞭毛運動は本来三次元運動であるといっても、ウニやヒトデやゴールデンハムスターの精子はかなり平面的な運動をする。この問題を明らかにするために、カブトガニの精子の運動を調べた。生きている化石と呼ばれるカブトガニは、現在北アメリカに1種類とアジアに3種類の合計4種類が生息している。アメリカ産カブトガニ精子鞭毛には真ん中に2本の中心対小管と呼ばれる微小管があるのに対して、アジア産のものにはこれがない。それぞれの運動を高速度ビデオ撮影装置を用いて調べた結果、アメリカ産のカブトガニ精子鞭毛が平面運動をしたのに対して、アジア産のものは三次元螺旋であった。平面的な運動形成に、2本の中心対小管が関係している。事実、ウナギの精子鞭毛も中心対小管を持たず、その運動は三次元螺旋であった。

精子の運動は、種によりかなり異なるため、それぞれの精子の運動に適したパラメータを決める必要がある。

すでにアメリカでは、精子の形態や運動性を生殖機能を知る指標として採用し、国家的な調査を開始し、さらにはヨーロッパへ参加を呼びかけている。現段階では、精子運動の理解不足や精子運動のどのパラメータを計測すべきかなど、まだ十分議論すべき問題が残されてはいるものの、同一基準のもとに行われる国際的な調査によって重要な知見が得られることは、これまでの精子数についての国際共同調査からも明らかである。日本においても精子の形態と運動性についての同様な調査を開始するためには、簡便な精子運動自動解析装置の開発が必要である。これまで効果的な臨床や畜産業を目指して、幾度か試みられて来たが、まだ実用化には至っていない。そこで、上述した精子の運動性の知見を踏まえ、アメリカやイギリスなど市販されている装置の欠点を改良した装置を開発・製作し、正確な精子の形態と運動性の調査を効率よく行うための方法を確認し、全国的な調査と臨床や畜産業での応用に活用したいと考えている。

#### D. 結論

生殖機能のよりよい指標として、精子の形態や運動性を用いるために、精子の運動性のメカニズムを明らかにするとともに、形態や運動性を解析する方法の確立し、以下の簡便な解析装置の開発を行った。①精子形態：高解像度のデジタルカメラをノルスキー微分干渉顕微鏡に装着し、記録した像をデジタルカメラからコンピュータに転送し、画像解析ソフトを用いて頭部の形態や鞭毛の長さなどを解析した。②精子運動：双眼の2つある接眼レンズの片方をずらすことにより機械的筒長を変え、それぞれの接眼レンズにビデオカメラを装着し、異なった焦点面の映像を1つのモニター上に表示し、ビデオテープレコーダで記録した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B. A. Movement of *Turritella* spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. *Cell Motil. Cytoskeleton* In press.

Ishijima, S., Hara, M., and Okiyama, M. Comparative studies on the spermatozoan motility of Japanese fishes. *Bull. Ocean Res. Inst., Univ. Tokyo*, 33, 139-152, 1998

石島純夫：鞭毛、鞭毛運動、フラジェリン。生化学辞典 第3版、東京化学同人、1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement of spermatozoa: conversion of sliding into bending. *J. Reprod. Develop.* 44, Suppl., 41, 1998

Ishijima, S., Hamaguchi, Y., and Iwamoto, T. Characteristics of motor apparatus of human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Comp. Physiol. Biochem.* 15, 265, 1998

Ishijima, S. Mechanisms of flagellar movement underlying chirality and propagation direction of bending waves. Abstracts of 8th

International Symposium on Spermatology, 37, 1998

Ishijima, S., Ishijima, S. A., and Afzelius, B. A. Movement of *Turritella* Spermatozoa: direction of propagation and chirality of flagellar bends. Abstracts of 8th International Symposium on Spermatology, 81, 1998.

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

#### Double-focal videomicroscopy

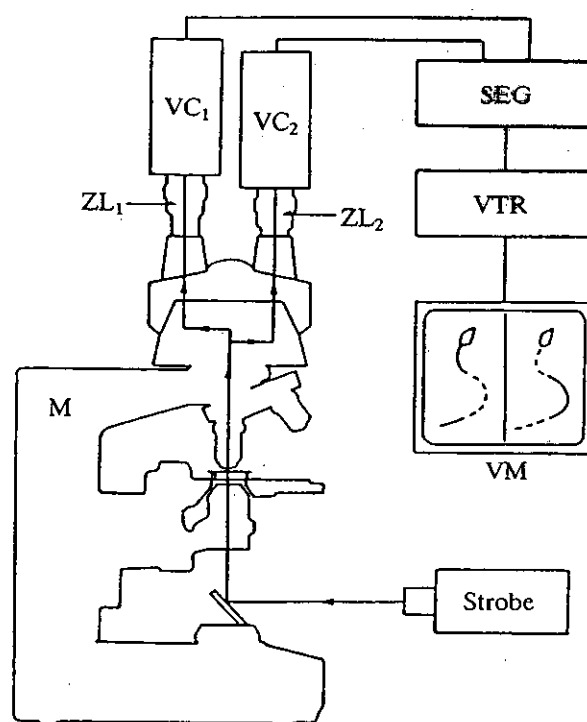


図1. 二重焦点ビデオ顕微鏡