

までの禁欲時間:182.7±181.4 時間、検査までの時間 (分) :25.5±17.1 分、運動率の平均:A ; 23.4±13.5%、B ; 19.7±9.2%、C ; 9.9±5.7%、D ; 46.4±14.8% 精液量:3.2 ±1.5ml、精子濃度 (125.5±87)×10⁶個/ml、精子総数(398.8±350.1) ×10⁶ 個であった。

D. 考察

調査の統計的信頼性を確保するために、同一プロトコール、検査の標準化は必須である。しかしながら、派遣病院に対して画一的なお願いは非現実的であり、逆に協力関係に大きな支障をきたすことがある。現在、派遣病院での協力も積極的になりつつあり、コーディネーターと派遣病院との連携をさらに充実させ、参加者の増加を図る必要がある。

精液パラメーター値に関しては、他地区との比較を待ちたい。

E. 結論

コーディネーターと派遣病院との連携を充実させ、参加者の増加を図る必要がある。

F. 研究発表

なし

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

厚生省科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

日本人正常男性の生殖機能に関する総合的研究
—妊婦のパートナーを対象とした全国調査(札幌地区)—

分担研究者 塚本泰司 札幌医科大学泌尿器科教授
研究協力者 伊藤直樹 札幌医科大学泌尿器科講師

研究要旨 現在までに、健康教室に参加している妊婦約 200 名に本研究の目的および意義を説明し研究協力を呼びかける文書を配布した。このうち、現在までに 21 名より研究協力の申し出があった。これら 21 例に対しては夫の最終的な同意が得られ次第、精液検査などの必要な諸検査を行う予定である。

A. 研究目的

環境中のエストロゲン様物質が、男子の生殖機能に影響を及ぼしているのではないかと、という推測があり、また先進国では男性の精子数が減少しているのではないかと、という懸念もある。しかし、後者に関しては、この懸念を支持する報告とこれに反する報告とがあり、実際に精子数が減少しているかどうかは不明である。われわれは、札幌において 20 年前と現在との一般男子における精液の性状（精子数、精液量など）を比較検討したが、この 20 年間の差は明らかではなかった。しかし、この比較には対象の選択方法、精液の検査方法などの 2 つの検討で差があり厳密な意味での比較には多少困難な点があった。

そこで、今回は全国規模での調査の一環として、日本人男性の精液性状の検討を行うこととした。

B. 研究方法

1) 対象

妊娠のため産婦人科病院を定期検診のため受診した妊婦の夫を精液検査のボランティアとして、検査の対象とした。妊娠中の健康教室に参加する妊婦に本研究の目的および意義を説明し、その夫の検査への参加を呼びかけた。参加に同意の得られた男性を以下の検査の対象とした。

2) 精液検査および泌尿器科的診察

本研究に参加お同意が得られた男性に対して、一定期間の禁欲の後にマスターベーションにより精液の提供を依頼した。得られた精液は本研究の統一した検査方法により必要な検査を行うこととした。同時に、標準的な方法により泌尿器科的診察を行い、特に精巣の大きさ、陰茎あるいは陰毛の発育状態をチェックすることとした。

C. 結果

年間 1500 件の分娩数のある産婦人科病院を研究協力病院として設定した。この病

院では週 3 回、妊婦のための健康教室が開かれており、1 回の参加者は約 30 名である。現在までに、約 200 名の妊婦に本研究の目的および意義を説明する機会があり、研究協力を呼びかける文書が配布された。このうち、現在までに 21 名より研究協力の申し出があった。これら 21 例に対しては夫の最終的な同意が得られ次第、既述の方法に乗っ取って精液検査、泌尿器科的診察、アンケート用紙の回収を行うことにしている。

D. 考案

本年度は本研究に協力得られた産婦人科病院での研究開始が、主に分担研究者側の理由により、大幅に遅延してしまった。しかし、ようやく研究態勢が整い研究を開始することが可能となった。研究が開始されてからの期間は今だ短いが、これまでの妊婦健康教室での本研究についての協力依頼の説明を行った際の妊婦側の反応は良好ではないかとの印象を抱かせるのもであった。

今後、多数例での検討を強力に押し進め日本人男性での精液性状の研究結果をあきらかにすると同時に、われわれが札幌市における 20 年間の健康男性における精子数の調査結果との比較検討も行う予定である。

E. 結論

本研究を開始し、約 200 名の妊婦に本研究

の目的および意義を説明し研究協力を呼びかける文書を配布した。このうち、現在までに 21 名より研究協力の申し出があった。これら 21 例に対しては夫の最終的な同意が得られ次第精液検査などの必要な諸検査を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

伊藤直樹、高木誠次、塚本泰司、他. 日本男子の精子異常と環境ホルモン. 内分泌・糖尿病科、8(5): 512-518, 1999.

2. 学会発表

伊藤直樹、塚本泰司、他健康成人男子の精子数は変化していない—札幌市における 20 年の検討. 「パネルディスカッション—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、東京、1999 年 2 月.

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

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 東邦大学助教授

研究要旨 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、対象者の募集方法を検討した。また、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、先行調査している聖マリアンナ医大の調査結果を解析する。

C. 研究結果及び考察

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、地区の拠点となる、大学病院に調査を依頼した。

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 ± 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の喫煙率は低群の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。

D. 今後の展望

11年度は調査を実施できる態勢を整え、調査を始めた。また、先行調査の結果を一部解析した。今後はデータの収集が始まるとともに、先行調査の解析も進むことが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀、野沢資亜利、岩本晃明、兼子智:日本人正常男性の生殖機能の現状-生活様式との関連-日本不妊学会雑誌 44:468,1999

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、西田智久、野沢資亜利、岩本晃明、兼子智:日本内分泌攪乱化学物質学会第二回研究発表会要旨集 p205,1999

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

厚生省科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

ヒト精液検査の標準化に向けて

分担研究者 兼子 智東京歯科大市川総合病院産婦人科

研究要旨 精液所見測定法を再検討し、標準化を試みた。画像解析装置による精液所見定量に不可欠な、精子濃度標準品、運動率標準画像の設定を行った。測定の標準化には測定に使用する画像解析装置のキャリブレーションが重要であることが示された。さらに精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した新たな形態標準品の確立を試みた。

A. 目的

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た。精子濃度、運動率、奇形率などの測定法は施設毎に多様であり、必ずしも標準化されていなかった。若年者の精液所見悪化が報告され、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た。ヒト精液所見に関する疫学的調査に際しては、標本のサンプリング、調査法の標準化、測定値の精度管理が不可欠であり、疫学調査に適合した検査法の標準化が急務である。本研究は精子濃度、精子運動率、精子運動速度、奇形率等の各項目において、標準品の設定、検量線の策定、それらの精度管理について検討した。

体液中の細胞数定量の代表例として、血液中の血球算定が挙げられる。これを精液所見測定と比較すると、前者では濃度変化の範囲が小さく、採血（不随意）により一定の条件下に標本採取が可能であり、固定

標本の搬送により central labo における測定が可能である。また測定の自動化に不可欠な標準血球が策定されている。一方、精液中の精子濃度は 0-数億/ml と変動幅が大きい。精子運動は経時変化しやすく、採取した施設での測定が必要となる。

精液検査の標準化に関する検討項目

精液の用手的採取： 一般に精液採取は用手的に行われるため、種々の因子が射精に影響し、ひいては精液所見が変動する。マスターベーションの慣れ、精液採取環境（トイレと専用採精室など）、禁欲期間、経時的変化などを標準化する必要がある。

精子濃度、精子運動観察用チャンバー： 現行ではマクラー盤、血球算定盤など種々の精子観察用チャンバーを用いて精子濃度、運動の同時測定が行われている場合が多い。測定精度向上のためには、精子濃度、運動率測定用に最適化されたチャンバーを各々標準化する必要がある。

精子濃度： 血球算定盤を用いた精子濃度測定法は、高精度であるが検査技師の熟練を要する。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。

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。またキャリブレーションに用いる精子運動標準品が求められる。

精子奇形率：従来基準とされた WHO の分類では精子形態と機能の相関に関しては言及されていなかった。本研究では、成熟した運動精子を精製し、これを培養することにより先体反応を誘起する。すなわち、先体反応を誘起能を有する成熟した運動精子を選択的に分離する。その形態を計測することにより優良精子標準品を作成する。さらに標本作成法、染色法の標準化も行う。

B. 方法

標準品の策定

精子濃度標準品： 標準血球を用いて血球算定盤の検定を行い、同一算定盤を用いて精液標本の精子濃度を観察し、測定値の変動係数を考慮して統計的に精子濃度を求め、精子濃度既知の仮標準品を策定する。これまで画像解析装置を用いた精液所見解析は、精子濃度、精子運動率、運動速度などのパラメーターを同時測定するため間隙 10-20 μm のチャンバーに無希釈の精液を浸透させ、測定を行う。本研究では、各パラメーター

の測定精度を向上させるため、精子濃度と精子運動を個別に測定した。精子濃度測定用チャンバーには間隙 70 μm のセクスイ検鏡プレートを用いた。上述した精子濃度仮標準品をホルマリン-ハンクス液で固定し、希釈系列を作成した。測定に際しては運動率表示が 0%であることを確認することにより、液の流れによる測定誤差を排除した。

精子運動率標準品： 精子濃縮後、swim down 法を用いて運動精子を分離し、顕微鏡下に得られた標本中の全精子が運動していることを確認後、半量を加熱等により不動化し、0%運動精子分画とする。両者を混合して種々の運動率を有する精子懸濁液を作成する。本品では、精子運動を質的には再現できず、今後検討を必要とする。

精子運動速度のキャリブレーション： 画像解析装置を用いて対物マイクロメーター画像を入力し、ピクセル数を距離に換算する。

精子形態： 精子形態の観察には顕微鏡が用いられる。顕微鏡観察により得られる画像は 3 次元構造物を平面に投影したものとなる。これまで精子標本の作成にはスメア一法が用いられてきた。ヒト精子頭部は球形というよりむしろテニスラケットのような円板状の形をしている。すなわちスメア一法では精子頭部が任意の方向でスライドグラスに接着し、これを 2 次元画像として解析すると精子頭部形態は大きくばらつくことになる。

本研究では、精子頭部形態標準品を得るた

め、フィルター法による精子標本作成を行った。精液または洗浄精子は 106 個となるようフィルター(孔径 $2.0\mu\text{m}$)に吸引し、0.5%等張ホルマリン、pH7.4 で固定した。これを染色して頭部形態の観察に供した。

倫理面への配慮

研究に供した精液標本の提供者からインフォームドコンセントを得た。

C. 結果と考察

精子濃度標準品の策定

分析学において、定量分析を行うためには標準品の設定ならびにそれを用いた検量線の作成が最も重要である。精子濃度は変動幅が広いので、検量線の直線部分をどの濃度におくかが問題となる。

精液を中性ホルマリンで固定、希釈して血球算定盤で測定した。精液を 3 から 10 倍に希釈し、200 匹程度をカウントした。本法では、血球算定盤自体が標準機器であり、検量線を必要とないという利点がある反面、検査技師の習熟によりバラツキがでる。同一検体を精子測定に十分な経験を有する検査技師が測定した結果、標準誤差は数%以内であった。

コンピューター画像解析装置を用いた精液所見測定は、CCD カメラ画像をデジタル処理しますが、コンピューターは焦点面にはっきりと結像した精子のみを認識するため、チャンバー厚の変化を追従できないという欠点を有している。このため間隙が薄い特殊なチャンバーが用いられてきたが、精液は粘度が高くチャンバーへの浸透させる過程でバラツキが生じることが明かとな

った。

我々は精子濃度、精子運動の同時測定は誤差を生む要因と考え、まず、精子濃度に関しては、中性ホルマリンで $4\times 10^4/\text{ml}$ 程度に希釈、不動化した精液を間隙が $70\mu\text{m}$ のチャンバーに浸透させ、底面に一層になるように精子を沈降させた後に観察する方法を採用した。

コンピューターを用いることによりただちに高精度なデータがえられるように思われるが、電気信号に変換された値をアナログデータにするためには標準品を用いた検量線が不可欠である。いろいろな濃度の精液を無希釈で測定する従来法を再現するため、血球算定盤により $123\times 10^4/\text{ml}$ と算定された精液を中性ホルマリンで 2 倍希釈系列を作成し、コンピューター画像解析装置で測定した。低濃度では直線性が得られるが、高濃度では精子数が低く算出された。画像解析装置を用いて精子濃度を正確に測定するためには、装置の測定感度に適応し、検量線の直線部分に内挿できるように精液を希釈する必要があることが示された。本研究では、精子濃度が約 $4\times 10^4/\text{ml}$ 程度に希釈して観察を行うこととした。

精子運動率標準品

精液から運動精子を選択的に分離し、運動率 97%程度の精子懸濁液を調製した。この半量を 50°C に加熱して不動化した。両者を混合して、約 0、25、50、75、100%となるように精子懸濁液(精子濃度 $4\times 10^4/\text{ml}$)を調製した。画像解析装置を用いて 3 回測定を行った。 $r=0.9$ 以上の直線検量線が得られた。

精子形態測定標準化

本研究では、機能的に正常な精子を 1. 直線運動性を有する、2. 成熟精子である、3. in vitro で先体反応誘起能を有する精子と定義した。精液から、攪拌密度勾配法を用いて精子濃縮を行い、これを 99% 等張化 Percoll (密度 1.13g/ml) に層積して 37°C、2 時間 swim down を行った。この間に先体反応を誘発した精子を cell affinity chromatography 法により精製した。

これをフィルカップ法によりフィルター上に吸引、固定した。これをギムザ染色法により染色し、顕微鏡観察に供した。スメア一法と異なり、フィルター法では精子が同一方向にフィルター上に固定され形態観察に適することが明かとなった。

現在、画像解析装置を用いた形態計測を確立するため、精子固定法、染色法、ならびに長短径比、重心点、面積、偏心率等の測定パラメーターの検討を行っている。次年度には、上述した精製法で調製した精子の形態を観察し、標準精子形態を確立したい。

D. 結論

これまで精液所見の疫学調査においても主として不妊治療における観察法が用いられてきたが、測定手法ならびに精度に不備があることが明かとなった。本研究は精液所

見測定法を再検討し、標準化を試みた。精子濃度、運動率、運動速度測定に際しては、標準品、検量線の設定が不可欠であることが示された。さらに精子形態の観察に際しては、精子機能を考慮した形態標準品の確立が重要である。

E. 研究発表

学会発表

兼子智、田辺清男、岩本晃明、ヒト精液検査の標準化- 国際比較に向けて、第 18 回日本アンドロロジー学会総会記事、86、1999

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明、兼子智、日本人正常男性の生殖機能の現状、日本不妊学会雑誌、44 : 546、1999

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

精子運動性に関する生理学的研究

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 内分泌攪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、精子の形態と運動性を正確に調べるための観察法と解析法を比較検討した。さらに、これらを簡便にかつ効率よく行うための装置についても検討した。

A. 研究目的

内分泌攪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問題はあるものの、より重要な課題である。これまでに、精子の運動性及びその機構をほぼ解明したので、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. 精子形態の解析法

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、生きたままの精子の像をデジタルカメラで撮影し、コンピュータのハードディスクに取り込んだ。この画像をもとに、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. 精子運動の解析法

簡便でかつ精度の高い精子運動の解析法を確立するために、精子の運動特性を明らかにし、その特性に基づいた観察法と解析法を明らかにした。

C. 研究結果及び考察

a. 精子形態の解析法

最近のデジタルカメラの高解像度化によって、従来のフィルムに劣らない画像が得られ、ハードディスクのメモリーに直接書き込み、コンピュータソフトによって処理できた。これまで広く使われてきたビデオテープに記録する方法と異なり、デジタル画像処理では、画質の劣化や走査線による画像の不均一さなどもなくなった。さらに、デジタル画像をそのままインターネットで全世界に瞬時に転送できるなど、一カ所で集中的にデータの処理や比較が可能になり、データ処理の効率化と高精度化が容易になった。従来、世界規模での調査の大きな妨げとなっていたビデオレコーダの違いによるデータの互換性の問題もデジタル画像で

は問題にならず、世界規模での調査・研究の最も大きな障害が取り除かれた。

b. 精子の運動解析法

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。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、精子の長軸方向の回転が妨げられようになると、精子は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、プレパラート作成後、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近くに集まることになる。ヒト精子では鞭毛がかなり大きな三次元運動をするため、頭と尾を結ぶ軸の回りを毎秒11回ほどで回転をしながら前進する。前進の推進力である鞭毛運動は、毎秒12回ほどの頻度で、振幅11マイクロメートルの比較的対称な屈曲波である。回転しない時の前進速度は、毎秒40マイクロメートルほどであった。回転の頻度は鞭毛運動の頻度と関係するので、平面的な鞭毛運動の観察によって、精子の運動の全てをほぼ予測することができる。そこで、精子の観察のための容器は、精子の回転を妨げるために、精子浮遊液の厚さを10マイクロメートル以下にする必要がある、顕微鏡などで確かめる。体外授精のためにはより多くの良い精子を選別する必要があるが、精子の質の評価のためには、できるだけ試料そのままを観察することが

望ましく、希釈などもあまり行わないことが望ましい。また観察容器内での精子の入れ替わりも防ぐ必要がある。容器内での精子の入れ替わりを防ぐためには、精子浮遊液は一定の厚さであることが重要である。

37度で長時間観察する必要がある場合には、水分の蒸発を防ぐために、カバーガラスの回りをミネラルオイルなどで封印する必要がある。鞭毛運動の頻度の正確な測定のためには、少なくとも毎秒60枚以上の画像を撮影できる記録装置か、ストロボ装置などを使用する必要がある。毎秒30枚しか記録できない家庭用ビデオテープレコーダでは、高い頻度で運動する精子を正確に記録することはできない。この目的のために、ストロボ装置は非常に有用で、短時間に測定が行えるだけでなく、通常の光源に比べて非常に短い時間の露光のために、試料の損傷が少ないと思われる。

コンピュータ画像解析ソフトでは、精子の像を2値化し、精子の頭のみを追尾するものがほとんどである。顕微鏡の対物レンズによって作られた像を正確に2値化できるよう、2値化のレベルを変えられる必要がある、読み落としのないよう画像解析ソフトのパラメータの取り込み範囲を適切に設定する必要がある。このためには、顕微鏡により鮮明な像が得られることがきわめて重要であり、暗視野顕微鏡はこの目的には向かない。位相差顕微鏡のネガティブとポジティブの二つの方法ではわずかに差があり、画像解析ソフトによってはこの違いを補正することができず、大きな違いを生じることがある。

D. 研究発表

1. 学会発表

Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., and Suarez, S. S. Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reactivated goldenhamster spermatozoa. Zool. Sci., 16, Suppl., 107, 1999.

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

正常精液所見を有する日本人ドナー精子の変化

分担研究者 末岡 浩 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室専任講師

研究要旨 本邦における正常精液所見の経時的推移を検討することを目的に非配偶者間人工授精ドナーの健康男性の精液所見について検討を行った。精子提供者は 20～25 歳の健康男性で登録時に感染症検査及び精液検査を施行して、精液量 2.0ml 以上、精子濃度 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、精子運動率 50%以上の良好群をドナー登録者とした。精子濃度は 1970～1989 年群でも、1990 年以降群においても、ともに総検体データについて調査した範囲では減少傾向を示した。1970～1989 年に比較し、1990 年以降でより強い減少傾向を示した。精子運動率については 1970～1989 年群で軽度の減少傾向を示したが、1990 年以降では減少傾向を示さなかった。

A. 研究目的

1992 年、Skakkebaek の報告以来過去数年間の男性の精液所見が減少傾向にあることが報告されてきた。これは、何れも文献的に世界各地の男性について調査したものであったが、精子濃度または精液量の減少の事実が報告された。この事実によって不妊診療に関わる男性不妊の事象のみならず、人類が抱える重大な問題である点が指摘された。この報告の後、次々に追従する報告がなされたが、これらの報告は何れも、精液性状の低下の事実が肯定的ないしは否定的の両面からの報告が混在し、肯定的な場合でも、精子濃度、精子運動率、精液量の 3つのパラメーターのうち精子濃度の低下は共通しているが、精子運動率や精液量に関するコメントについては必ずしも低下を

示していないものもある。

疫学的検討による精子関連報告の統計学的考察に関しては種々のバイアスに関する考慮が必要であることが指摘されている。しかし、年齢や健康状態などの特定した母集団を選定し、測定方法に関しても同一条件で検討を行った完全ともいべき条件設定での報告は例をみない。

本邦における正常精液所見の経時的推移を検討することを本研究の目的とした。

B. 研究方法

慶應義塾大学病院では、本邦において初めて 1948 年から非配偶者間人工授精を開始し、年齢や精液所見等の均一の条件の母集団から抽出した。ドナーの健康男性の長年に亘るデータが蓄積されてきた。また、

精液所見の検査法は過去30年間同一の方法により、2名の同一人物によって鏡検法で計測されてきた。

精子提供者は20～25歳の健康男性で登録時に感染症検査及び精液検査を施行して、精液量2.0ml以上、精子濃度 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、精子運動率50%以上の良好群をドナー登録者としている。ただし、1970～1989年までの精子データは提供者別の精子数変動を解析できる結果の集積ではなく、人工授精に用いられた精液所見からの調査であり、1990年以降のデータは提供者によって提出された精液所見の集積である。調査は1999年の末までに拡大して集計した。

C. 結果

精子濃度は1970～1989年群でも、1990年以降群においても、ともに総検体データについての検討で現在までに調査した範囲では減少傾向を示した。減少程度は前述したバイアスの検討の上で考察すべきであるが、1970～1989年に比較し、1990年以降でより強い減少傾向を示した。精子運動率については1970～1989年群で軽度の減少傾向を示したが、1990年以降では減少傾向を示さなかった。

D. 考察

精子に関する国際的疫学的調査の中で、本邦の精子に関わる情報は触れられていない。Skakkebaekらの報告でも、調査論文の地域は5大陸に及ぶが、アジアは実にインド・タイ・ホンコンのみである。

わが国における調査報告は長期的なretrospectiveなデータの解析は重要な意義

を有する。すなわち、一定の母集団から、一定の方法で得られた情報は、これまでの生殖能の変化を見極める上での対照としても意義は大きい。

この条件を選択した上での母集団から得た本邦の経時的変化は、環境汚染による外因性内分泌攪乱物質の影響や生活習慣の変化など多様な原因が考えられている生殖能の低下に対応する貴重な情報源となり得る。抽出した母集団の年齢が20～25歳に限定されていることから、対象男性の精巣形成過程は母親の在胎時期の約20～25年前にあり、この期間からの影響を検討する必要が指摘される。胎内で成長する精巣形成過程で受けた影響が大きいことが指摘されていることから、母体への環境汚染状況との関わりは高い可能性があり、すなわち、1970～1998年の値の低下は少なくとも1940年代後半から1978年頃までの間に、及ぼされた影響と考えることができる。

E. 結論

生殖能の低下の一端として健康な若年男性の精子数低下傾向は否定できない。今後の持続的なデータ集積が、その対応策を練る上で極めて重要な情報源となるであろう。

F. 研究発表

1. 論文発表

末岡 浩，吉村泰典：精子減少と環境有機物．産婦人科の世界51(1):103-109, 1999

2. 学会発表

末岡 浩：精子核の膨化機構（ミシボジウム）．第92回日本繁殖生物学会大

会.仙台国際センター（仙台）（1999.9.27-
29)

2. 実用新案登録
なし

3. その他

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

内分泌かく乱物質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

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 教授
研究協力者 田中 政巳 聖マリアンナ医科大学 講師

研究要旨 ビスフェノールA母体經由暴露による周産期および成熟雄の血清テストステロン濃度, ステロイド代謝酵素, ゴナドトロピン受容体等への影響について検討した。ラットあるいはマウスに, ビスフェノールA 0.2, 2. 20 および200 µg/ml を妊娠1日より出生後21日(離乳時)まで母体に, さらに離乳後の仔に飲水投与した。ビスフェノールA 2 µg/ml 投与母体の妊娠19日における血清ビスフェノールA濃度は30 ng/mlであった。ビスフェノールA 20 µg/ml 投与ラットの妊娠19日胎仔精巣におけるステロイド代謝酵素とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。またビスフェノールA 0.2 および20 µg/ml を離乳時まで投与したマウスの出生10週における血清中テストステロン濃度と精巣, 前立腺, 貯精嚢および凝固腺重量は対照と有意な差はなく,

20 µg/ml 群の出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素, LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。一方200 µg/ml 投与ラット出生日の血清テストステロン濃度が低下したことから高用量のビスフェノールAは性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。

A. 研究目的

I. 精巣内ホルモン環境, 精子形成能への影響

精子形成にはホルモンの存在が必須でありゴナドトロピン (FSH, LH) およびテストステロンが独立にあるいは協調して作用する。セルトリ細胞でつくられるアンドロゲン結合蛋白はライディヒ細胞で産生・分泌されたテストステロンを精路において高

濃度に保つのに作用し, 精子の成熟に働くテストステロンの作用を高めている。正常な精子形成がおこなわれるためには性成熟期においてテストステロンとゴナドトロピンおよびその受容体が正常に発現することが必要である。

脳や生殖器の性分化は胎仔精巣由来のテストステロンに依存している。ヒトでは胎齢8週頃, ラットでは胎齢15日頃から胎

仔精巣に形成されるライディヒ細胞から分泌されるテストステロンへの暴露によって雄型に誘導され、暴露されなければ雌型へ誘導される。またラット血清テストステロン濃度は出生直後に、LH 受容体 mRNA の発現は出生直前にピークを示し、これらは脳の性分化や生殖器の発達・分化に関わると考えられている。従って胎仔期や新生仔期におけるホルモン環境、ことにテストステロン作用の乱れは性分化の異常を誘導し、成熟後の生殖器に不可逆的な変化を引き起こすと考えられる。近年不安視されている精子の量的・質的低下も母体経路で暴露された内分泌かく乱物質による胎仔期や新生仔期の精巣ホルモン環境のかく乱が原因となる可能性が考えられ、本研究では内分泌かく乱物質の母体経路暴露による精巣のテストステロン産生とその関連調節因子への影響を検討する。11年度はビスフェノールAの母体経路暴露による周産期および成熟後のテストステロン濃度とその関連調節因子への影響を検討した。

II. 受精能への影響

内分泌かく乱物質の母体経路暴露における雄性生殖機能への影響を検討することを目的とする。11年度はビスフェノールAを投与した母マウスより生まれた雄マウスの精液濃度、精子運動率を検査するとともに、ビスフェノールA暴露精子の受精能を評価するため体外受精および顕微受精を行い、その受精率と発生率を検討した。

III. ビスフェノールAの経胎盤による移行 ビスフェノールAの経胎盤による移行に

ついては、現在データは少ない。とくに低濃度母体暴露の移行については明らかではなく、蛍光プレラベル化剤を用いた液体高速クロマトグラフによる高感度測定法により母体に投与した各濃度ビスフェノールAの母体および胎仔、新生仔への移行を検討した。

B. 研究方法

I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

SD系ラットとICR/MCH系マウスを用い、ビスフェノールA 0.2, 2.20および200 µg/ml を妊娠1日より出生後21日（離乳時）まで母体に、さらに離乳後の仔に継続して飲水投与した。現在、ラット妊娠19, 22日胎仔と出生2時間後（出生日）、4日と離乳時まで母体に投与したマウスの出生10週雄の血液と精巣をサンプリング中である。また離乳後の仔にビスフェノールAの飲水投与を現在継続中である。現在血清中テストステロン濃度と精巣のステロイド代謝酵素、FSH受容体、LH受容体、アンドロゲン結合蛋白およびインヒビンのmRNAの発現をRT-PCR法により調べている。

II. 受精能への影響

上記の条件でビスフェノールAを投与したICR/MCH系マウスを用いた。10週齢以降の雄マウス精巣上体より回収した精子を37°C、5% CO₂ in air 中で30分間培養した後、その精子濃度と精子運動率を血球算定盤にて二検者により3回ずつ測定した。また、同精子を体外受精と顕微受精に供し、

受精率と胚発育を調べた。

Ⅲ. ビスフェノール A の経胎盤による移行
蛍光プレラベル化剤を用いた液体高速クロマトグラフによる高感度測定法により母体に投与した各濃度ビスフェノール A の母体および胎仔、新生仔への移行を検討中である。

C. 研究結果及び考察

I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

【ラット】

ビスフェノール A 200 μ g/ml 投与群で出生 2 時間後の血清テストステロン濃度が有意に低下した。ビスフェノール A 20 μ g/ml 群において妊娠 19 日胎仔精巣におけるステロイド代謝酵素 (P450scc, 3 β -HSD, P450c17, 17 α -HSD) と LH 受容体の mRNA の発現は対照と差はなかった。出生 1 日精巣における 17 β -HSD と LH 受容体の mRNA の発現も対照と差はなかった。

【マウス】

ビスフェノール A 0.2 および 20 μ g/ml 群において出生 10 週における血清中テストステロン濃度と精巣、前立腺、貯精囊および凝固腺重量は対照と有意な差はなかった。またビスフェノール A 20 μ g/ml 群において出生 10 週の精巣におけるステロイド代謝酵素 (P450scc, 3 β -HSD, P450c17), LH 受容体およびインヒビンの mRNA の発現は対照と差はなかった。

以上の結果は、胎仔期から授乳期におけるビスフェノール A 20 μ g/ml 以下の母体経路の暴露は妊娠 19 日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素, LH 受容体

およびインヒビンの mRNA の発現には影響しないことを示唆している。しかし今回よりも低濃度のビスフェノール A の母体経路による暴露によって成熟後のラットの精子産生が抑制されることが報告されており、今回調べた因子以外の変動を介して精子産生が抑制される可能性も考えられる。一方 200 μ g/ml 投与ラット出生日の血清テストステロン濃度が低下したことから高用量のビスフェノール A は性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。

II. 受精能への影響

ビスフェノール A 20 μ g/ml 群(A)8 匹、ビスフェノール A 0.2 μ g/ml 群(B)8 匹、対照群(C)10 匹について体重、左右精巣重量、精子濃度、精子運動率を検査した。体重は A 群 38 \pm 1.8g (平均値 \pm SD、以下同様)、B 群 35 \pm 4.8g、C 群 34 \pm 3.8g、左右精巣重量は、A 群 104.2 \pm 13.6mg、106.4 \pm 10.4mg、B 群 100.2 \pm 10.2mg、99.4 \pm 16.4mg、C 群 95.9 \pm 9.4mg、96.4 \pm 12.3mg、精子濃度は、A 群 32.2 \pm 18.3 \times 10⁵/ml、B 群 35.5 \pm 18.3 \times 10⁵/ml、C 群 29.3 \pm 8.3 \times 10⁵/ml、精子運動率は、A 群 52.3 \pm 4.9%、B 群 47.8 \pm 18.8%、C 群 49.1 \pm 12.2%であった。各群間における各 parameter に有意差は認めなかった。体外受精における受精率は、A 群 73.3 \pm 12.2%、B 群 69.4 \pm 14.9%、C 群 70.3 \pm 17.2%と各群間に有意差は認めなかった。また、顕微受精における受精率も、A 群 50.4 \pm 22.3%、B 群 57.6 \pm 19.2%、C 群 54.3 \pm 15.9%と各群間に有意差は認めなかった。

Ⅲ. ビスフェノール A の経胎盤による移行
ビスフェノール A 2 µg/ml 投与マウス母体の妊娠 19 日における血清ビスフェノール A 濃度は 30 ng/ml であった。

D. 今後の展望

11 年度の研究から胎仔期から授乳期におけるビスフェノール A 20 µg/ml 以下の母体経由の暴露は妊娠 19 日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素, LH 受容体, アンドロゲン結合蛋白およびインヒビリン mRNA の発現には影響しないことが示唆されたが, 周産期を通じてのステロイド代謝酵素や LH 受容体 mRNA の発現等への影響を確認することが必要である。特に周産期の血清中テストステロン濃度は出生 2 時間後に急峻なピークを示して性分化に重要な役割を担うと考えられているが, 本年度の研究において 200 µg/ml 投与ラット出生 2 時間後の血清テストステロン濃度が低下したことから高用量のビスフェノール A は性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。

また精巣のテストステロン産生を刺激する LH の受容体 mRNA の発現は出生前日にピークを示すことが知られており, 内分泌か

く乱物質暴露による周産期の LH 受容体への影響を明らかにする必要がある。また周産期をさらに細分しての検討も必要であり, 現在ビスフェノール A 各濃度投与の妊娠 22 日胎仔と出生 1 (出生日), 4 日の血清テストステロン濃度を測定中である。また今回調べていない因子 (アンドロゲンレセプター, 5 α -レダクターゼ等), 組織 (精巣上体, 下垂体等) および内分泌かく乱物質 (スチレン, ノニルフェノール等) の検討も実施する。

また, 母体に投与した各濃度ビスフェノール A の胎仔, 新生仔への移行を測定中である

E. 研究発表

なし

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

遺伝的素因による環境影響に対する反応性の差違に関する研究

分担研究者 中堀 豊 徳島大学・医学部・教授

研究要旨 日本人男性をY染色体の多型にしたがって、4つのタイプに分類した。子どものあるボランティア成人の精子数を調べたところ、Y染色体のタイプにより精子数が異なることが分かった。この事実は、①男性の精子形成能力が遺伝的に異なっている、または②男性のグループ間で内分泌かく乱物質等に対する反応性が違っているという可能性を示唆している。

A. 研究目的

近年、内分泌かく乱物質によるヒトの精子数への影響が議論されている。しかしながら、内分泌かく乱物質が精子数に影響を及ぼすという確固たる証拠は存在しない。一方、ヒトY染色体上には精子形成に関与すると考えられる遺伝子がいくつか存在すると考えられている。実際、Y染色体長腕の特定領域の欠失がヒトの無精子症と関連している。本研究では日本人男性をY染色体上の多型を用いて4種類のタイプに分類し、それぞれのタイプの男性において精子数に違いがあるか、また、無精子症になりやすい傾向をもつか否かを調べることを目的とした。

B. 研究方法

正常男性における精子数を検索するために、神奈川県内の3つの病院において少なくとも1名の子どものいる198名の健康なボランティア男性より、精子及び血液検体を得

た。また、合計106名の無精子症患者の検体は神奈川県及び大阪府の病院でインフォームドコンセントのもとで採取された。血液よりゲノムDNAを抽出後、3種類のY染色体上の多型マーカーの組み合わせからY染色体のタイプを決定し、精子数との関連、無精子症との関連について統計学的な考察を行った。

C. 研究結果

1. それぞれのタイプの男性の精子数を調べると、タイプにより精子数が異なっていた。
2. 無精子症の起こり易さは特定のY染色体のタイプと関連していることが示された。

D. 考察

得られた結果より、①男性の精子形成能力が遺伝的に異なっている、または②男性のグループ間で内分泌かく乱物質等に対する反応性が違っている可能性が考えられた。Y染色体には、現在のところ、精子形成に