

20010805

別添2

## 厚生科学研究費補助金

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疫学的調査研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者	岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学
分担研究者	野澤 資亜利	聖マリアンナ医科大学
	兼子 智	東京歯科大学市川総合病院
	石島 純夫	東京工業大学
	中堀 豊	徳島大学

平成14（2002）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

日本人正常男性の生殖機能に関する疫学的調査研究……………1  
主任研究者 岩本晃明

II. 分担研究報告書

妊孕能を有する男性の生殖機能調査  
一川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡からの報告……………11  
主任研究者 岩本晃明  
研究協力者 塚本泰司、奥山明彦、並木幹夫、小松潔

妊孕能を有する男性の精漿および血清中の元素濃度の測定……………16  
分担研究者 野澤資亜利  
研究協力者 千葉百子、篠原厚子

若年男性(男子大学生)の生殖機能調査  
一理学的検査における医師間差・施設間差に関する事前検討……………22  
主任研究者 岩本晃明  
研究協力者 塚本泰司、奥山明彦、並木幹夫、金武洋

若年男性集団における精子 DNA 断片化と精子パラメータとの関連……………27  
分担研究者 兼子 智、野澤資亜利  
研究協力者 西田智保

ヒト精液検査の標準化に向けて……………35  
分担研究者 兼子 智

精子運動性に関する運動生理学的研究……………40  
分担研究者 石島純夫

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……………43  
分担研究者 中堀 豊  
研究協力者 新家利一

III. 研究成果の刊行に関する一覧表……………48

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

総括研究報告書

## 日本人正常男性の生殖機能に関する疫学的調査研究

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** 内分泌かく乱物質の男性生殖機能への影響を検証するための基礎資料として日本人正常男性の生殖機能パラメータをデータベース化する目的で疫学調査を実施した。妊孕能を有する男性の調査では、今年度までに、地域差を検討する目的で実施された全国4地域（札幌、大阪、金沢、福岡）での調査が終了したので、先行の川崎・横浜地区での調査とあわせて精液検査の結果を解析した。妊孕能を有する男性の一部については精漿および血清中の微量元素の濃度を測定し、微量元素の濃度と精子パラメータとの関連を統計学的に解析した。男性生殖機能の地域差の検討は若年男性の調査においても計画され、来年度の開始に向けて、調査に参加する4施設（札幌、大阪、金沢、長崎）に川崎の本部を加えた5施設で、理学的検査における医師（診察者）間差ならびに施設（調査実施場所）間差の検討を行った。また疫学調査で得られた若年男性の精子の一部を用いて、TUNEL法による精子DNA断片化解析を行った。生殖機能調査において重要な意味を持つ精液検査法標準化の一環で、精液検査自動化のための基礎的検討として、コンピュータ画像解析装置のreferenceとなる標準精子画像を得るための形態良好精子の精製、固定、形態変形の少ない精子染色法の検討等を行った。同じく精液検査自動化に向けて、精子運動装置の生化学的特性を明らかにするために、精子内のカルシウムイオンやcAMP、pHの精子運動に対する効果を調べた。さらに、内分泌かく乱化学物質の男性生殖機能への影響を個人の遺伝的背景の違いから検討する目的で、疫学調査で得られた血液を用いてY染色体上の5つのbiallelic DNAマーカーにより日本人集団のY染色体を6種類に分類して精子数との関連を検索した。

## 分担研究者

野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学・助手

兼子 智 東京歯科大学市川総合病院・講師

石島純夫 東京工業大学総合理工学研究科・助手

中堀 豊 徳島大学大学院医学部・教授

## A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質が男性生殖機能に深刻な健康影響をもたらすという仮説は、化学物質の職業性暴露の例や野生生物に観察された事例、動物実験の結果等を根拠としている。しかしこうした影響がヒトの通常の生活環境下において実際にあるのかどうか、あるとしたらどの程度なのかについて、まだ確実な証拠は得られていない。ヒト精子の低下傾向が問題になっているが、それが地球規模で本当に減り続けているのかどうかについても明らかになっていない。この問題を検証するには、標準化された方法による疫学調査から信頼性の高いデータを継続的に収集することが必要である。本研究は、男性生殖機能に関する国際共同研究の一環として正常男性を対象とした疫学調査を実施し、その結果から日本人男性の生殖機能の現状を把握するとともに、生殖機能に関連した各種パラメータを記録し、今後の男性生殖機能に関する動向を知る上での基礎データとすることを目的とする。そのために、実際に疫学調査を実施しながら、得られたヒト試料を用いて、男性生殖機能を評価するため

の新しい方法の開発を目指す。

## A. 研究方法

1. 聖マリアンナ医科大学(川崎・横浜)、札幌医科大学(札幌)、大阪大学医学部(大阪)、金沢大学医学部(金沢)の附属病院および原三信病院(福岡)の泌尿器科が各地域における疫学調査の拠点となり、拠点病院、関連病院ならびに協力病院の産婦人科で妊娠が確認された女性を介して男性パートナー(配偶者)の参加を募った。男性に対して精液検査、理学的検査を含む診察、採血(血液中の各種内分泌ホルモン値の測定等)を行い、さらに男性と妊婦の双方に対して生活習慣等の質問票による調査を行った。精液検査はWHO基準に準拠した国際共同研究のプロトコールにしたがった。

2. 1997年11月から1998年12月にかけて川崎・横浜地域で実施した妊婦のパートナーを対象とした男性生殖機能調査において承諾を得て入手保存されていた血清ならびに精漿359例のうち91例を試料として用いた。男性の平均年齢は31.5歳(20~44歳)であった。精子パラメータ(精液量、精子濃度、運動率ほか)の数値は、調査結果の精液所見データベースより対象者91例のデータを抽出して用いた。血清ならびに精漿中の元素濃度は順天堂大学医学部衛生学教室の協力により同教室において測定された。前処理として精漿200~400 $\mu$

1. 血清200  $\mu$ lを脱金属処理済みテフロン製バイアルにとり、硝酸と過酸化水素水を加えてマイクロウェーブ分解し、超純水で一定量にした。11種類の元素 (Na、K、Mg、Ca、Zn、P、Cu、Fe、Rb、Se、Sr) について試料中の濃度を測定した。測定法は、フレイム原子吸光法 (Na、K、Mg、Ca、Zn)、マイクロ波誘導プラズマ-質量分析法 (Cu、Fe、Rb、Se、Sr) または比色法 (P) によった。

3. 若年男性の疫学調査に参加する5施設から2名ずつ計10名の泌尿器科医が、12名の大学生ボランティアに対し2日間にわたって理学的検査を行った。精巣のサイズはPraderのOrchidometerで測定した。精索静脈瘤の診断では、静脈瘤なし、第1度、第2度、第3度に分類した。

4. 川崎市の大学に通う男子大学生のボランティア79名の精液検体を用いてTUNEL法による精子DNAの断片化分析を行った。精子は固定後0.05% SDS, 1.0% DTT and Proteinase K (0.4 unit/ml)で37°C10分間の前処理を経て、TUNEL反応を行い、蛍光顕微鏡を用いて精子頭部を1000倍で観察した。FITC-avidinにより黄色または緑色に染色されたものはDNA断片化の検出された (TUNEL陽性) 精子とし、PI染色により赤のみに染まるものはDNA断片化の検出されない (TUNEL陰性) 精子とみなした。

陰性対照にはTdTを除いたTUNEL混合液で反応させた精子を、陽性対照にはDNase I (4.0 mg/ml) で15分処理した後にTUNEL反応を行った精子をそれぞれ用いた。

5. 検体より機能的に正常な精子を集める目的で以下の操作を行った。精液から攪拌密度勾配法を用いて精子濃縮を行い、Percollによるswim down、Nycodenz直線密度勾配中での沈降平衡を経て回収した最も重い精子分画を、0.3%ローズベンガル、0.05% Triton X-100を含む等張培養液で染色し、メンブランフィルター上に捕捉して顕微鏡観察した。CCDカメラで画像を記録し、Simple PCIにて画像処理を行った。解析項目として、精子頭部面積、周囲長、長径、短径、真円率、縦横比を検討した。

6. 精子無力症患者の精子と、生殖能力を有する男性、および若年男性の精子を試料とし、以下の解析を行った。1)精子形態の解析：精子を光学顕微鏡で観察し、頭部や尾部の形態を調べ比較した。また、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、コンピュータで解析した。精子の超微形態を調べるために、電子顕微鏡を用いて調べた。2)精子運動の解析：精子の運動を高速度ビデオカメラを用いて記録し、この画像をコンピュータのハードディスクに保存し、画像

解析ソフトを用いて精子の運動率、前進速度、鞭毛打頻度などの運動特性を明らかにした。さらに、顕微鏡視野内の多数の精子を短時間に自動で追尾し、その座標を読みとる精子運動自動解析装置を用いて、精液の特性評価を行った。精子運動装置の生化学的特性を明らかにするために、精子膜を除去した精子にATPを加えて運動を再活性化し、さらに溶液中のイオンや薬物を変えらることにより、精子の運動の変化を調べた。

7. 従来の SRY、DXYS5Y、YAP に加えて、AZFa 領域の 12f2 多型および UTY イントロン 4b 多型をそれぞれ PCR 反応および DHPLC 法によって解析した。また AZFc 領域についてはマイクロサテライト DNA マーカー Yfm1 の蛍光標識プライマーで増幅の後、蛍光自動シーケンサーによるリピート数解析を行った。

### C. 研究結果と考察

1. 川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡の男性における精液パラメータの平均値±SD は、精液量：3.3±1.5/3.2±1.6/2.8±1.4/3.5±3.2/2.8±1.4ml、精子濃度：120.9±103.9/110.4±84.9/96.8±78.4/104.9±83.6/124.9±179.5×10<sup>6</sup>/ml、運動率 A+B：55.8±14.7/55.6±18.2/77.3±18.5/46.8±13.7/55.3±15.2%、禁欲期間：211.3±254.9/214.4±348.6/156.8±214.9/226.8±131.0/

167.3±293.2 時間であった。また精液所見が WHO 基準を下回る割合は、川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡の順に、精液量(2 ml 未満)：20.4/23.2/10.3/25.2%、精子濃度 (20×10<sup>6</sup>/ml 未満)：4.4/9.6/6.4/4.9.4%、運動率 A+B：34.0/7.6/58.4/32.0%となった。5 地域とも精子濃度が精液 1ml あたり 1 億前後という値で、この数値をみる限りにおいては、心配されている精子数の低下が示唆されるような結果ではなかった。今後は各地域から得られた精子濃度のデータに関して QC(Quality control: 精度管理)データに基づいた補正を行い、国内 5 地域間のおよびヨーロッパ 4 都市との比較を試みるとともに、血清中の各種内分泌ホルモン値等のデータとも対応させて総合的に判断したい。

2. 元素濃度を測定した妊婦配偶者 91 名における精液所見の平均値±SD は、精液量 (ml)：5.1±1.2、精子濃度(×10<sup>6</sup> /ml)：93.7±67.5、運動率(%)：57.5±14.7 であった。精漿および血清中の各元素濃度を高い順に並べると、精漿では Na>P>Ka>Ca>Zn>Mg>Rb>Fe>Se >Cu>Sr、血清では Na>Ka>P>Ca>Mg>Fe>Zn>Cu>Rb>Se>Sr、であった。微量元素の濃度は精漿中と血清中では大きく異なっていた。精漿中と血清中特に精漿中の Zn は血清中に比較して 220 倍もの高濃度で存在していた。精漿中の幾つかの元素間に強い正の相関

が認められ ( $p < 0.0001$ )、そのうち相関係数が 0.7 以上の組み合わせは K と Mg、K と Ca、K と Zn、K と Rb、Mg と Ca、Mg と Zn、Ca と Zn であった。K と Rb は血清中でも有意な相関が認められた ( $r = 0.685$ 、 $p < 0.0001$ )。精漿中の Mg、P、Zn、および Se の濃度と精子濃度との間にそれぞれ弱い相関が認められた ( $r < 0.5$ 、 $p < 0.01$ ) が、運動率との間には相関が見られなかった。血清中の元素については他のパラメータとの間に有意な関連は認められなかった。

3. 測定された精巣サイズ最高値と最低値の差は小さくとも 5ml、大きいもので 10ml 以上あった。個々の医師で 2 日間の測定値が一致した割合は最高 67%、最低 4% であった。同一施設の 2 医師間での測定値の差を見るために 48 回 (12 人の左右の精巣を 2 回測定) の測定値の平均を比較すると、2 施設で有意差を認めた。精索静脈瘤について 12 名の各医師がボランティア 10 名の左右の精巣を 2 日間にわたって診断した延べ 48 (12 × 10 × 2) 回の判定において精索静脈瘤なしという評価は最低で 16 件、最高で 36 件であった。また最も顕著な第 3 度の診断は最低 2 件、最高 11 件であった。同一ボランティアに対して 10 名の医師全員が一致した判定はわずか 4 件 (なし: 3 件、第 3 度: 1 件) だった。同一施設の 2 名の医師間で判定が一致した割合 (一致率) は、63% (15 件) が 1 施設、54% (13 件) が 3 施

設、17% (4 件) が 1 施設であった。精巣サイズの測定結果でも精索静脈瘤の診察結果においても医師間・施設間・施設内すべてにおいて差異が認められた。また同じ医師の測定日による差も認められた。医師間・施設間・施設内すべてにおいて差異が認められた。また同一の医師が同じボランティアに対して 2 日間で異なる診断をする例も見られた。以上の結果より、疫学調査を行う前には医師間で検査結果の差を減じるためのトレーニングを行う必要があること、および、他施設と理学的所見の比較を行う場合にはこのような差が生じる可能性があることを念頭に入れるべきであることを確認した。

4. 若年男性ボランティア 91 名の TUNEL 陽性率 (%) の分布は、5% 未満が 18 名 (23%)、5% 以上 10% 未満が 26 名 (33%)、10% 以上 15% 未満が 21 名 (27%)、15% 以上 20% 未満が 10 名 (13%)、20% 以上 25% 未満が 2 名 (2%)、25% 以上 30% 未満が 2 名 (2%) であった。全体の 96% が 20% 未満に分布し、30% 以上は認められなかった。79 例の TUNEL 陽性率の平均値 ± 標準偏差は  $10.1 \pm 6.0\%$ 、中央値は 9.4%、最小値は 0.9%、最大値は 28.3% だった。精子核における DNA 断片化の程度と精液の質との関連を検討するために、若年男性集団を精液の質で 2 つに分類してそれぞれの TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度を正常限界値 20

×10<sup>6</sup>/ml で 2 つの集団に分けて比較した場合、両者の TUNEL 陽性率の平均値に有意な差は認められなかった ( $P=0.6439$ )。また精子濃度 40×10<sup>6</sup>/ml を限界値として分類して比較した場合も両者の TUNEL 陽性率の平均値に有意差は認められなかった。精子運動性に関しては、WHO 基準にしたがって運動率 a+b では限界値を 50%に、運動率 a では限界値を 25%として、それぞれ TUNEL 陽性率の平均値を比較したが、両者とも運動率が限界値に満たない集団で TUNEL 陽性率が有意に高かった ( $P=0.0295$ 、 $P=0.0015$ )。

運動性に関しては前進性運動率 (a+b) と高速前進性運動率 (a) に負の、非運動率 (d) に正のいずれも弱い相関 ( $|R|<0.4$ ) が認められた。今後は TUNEL 法の精度を高めるための方法の改善に加え、TUNEL 法とは異なるメカニズムに基づいて DNA の障害を検出する Annexin V 法や Comet 法などを組み合わせて精子核 DNA の変化を多面的に分析する必要がある。

5. 射精精液中の精子頭部は多様な形態を示したが、精製操作を行うことにより WHO 基準で正常形態精子とされる楕円形頭部を有する精子比率が増大し、最終的に沈降平衡した精子分画ではほとんどが楕円形頭部を有する精子となった。室温下では生存精子はローズベンガルに被染色性を示さなかったが、Trion X-100 を添加して除

膜することにより、CAIA に適した階調差の少ない赤色染色像が得られた。これをフィルカップ法によりフィルター上に吸引・定着させて顕微鏡観察を行った結果、精子頭部が最大径面でフィルター上に固定され形態観察に適することが明らかになった。この方法で 8 例、6887 個の精子を画像解析し計測パラメータ毎の分布をまとめたところ各項目とも正規分布し、今後の計測項目として面積、短径、長径を選定した。選定した 3 項目における標準偏差分布はいずれも平均±1SD に過半数の精子が分布していた。従って、実際の測定においては平均±1SD の範囲に分布した精子を正常形態精子として解析を行う予定である。

6. 精子形態の解析：精子無力症患者の精子はほとんど運動せず、頭部や尾部についても形態異常が観察された。妊婦配偶者の精子では、異常率は頭部・尾部とも低下するが、精子無力症患者の精子で見られた構造異常のほとんどが光学顕微鏡による観察だけでなく、電子顕微鏡による超微形態でも確認された。若年男性の精子では、個人差が大きく、異常率の高いものからほとんど含まないものまでさまざまであった。電子顕微鏡を用いた観察から、運動性の欠損は運動装置である鞭毛の形成不全が重要であることが明らかになった。一方、これまで明らかにされなかった頭部の異常として、核内の膜構造の存在や核質の空胞



化なども確認された。光学顕微鏡によって観察される構造異常と、電子顕微鏡による超微形態異常の間には、異常の発生率や、発生箇所などについて相関は見られなかった。

精子運動の解析：精子無力症患者の精子では活発な運動を示すものはほとんどなく、特に精子の長軸のまわりを回転しながら前進する精子は皆無だった。妊婦配偶者の精子では、運動率が平均で約 50% と比較的良好で、前進速度の分布についても比較的正規分布に近いパターンを示した。一方、若年男性では、運動率や前進速度について個人差が大きく、さらに前進速度の分布についても正規分布を示すものだけでなく、各速度ともほとんど同じ割合を示す異常なパターンも観察された。鞭毛打頻度については個人間のばらつきが大きく、鞭毛打頻度が細胞内の ATP の濃度に関係していることを考えると、細胞内の生化学的条件による違いが運動の違いとして現れている可能性が高い。そこで細胞膜を除去した精子を組成の明らかな溶液中で運動を再開させ、イオンや薬物の精子運動に対する効果を調べたところ、cAMP については、濃度が高くなるにつれて、運動率だけでなく鞭毛打頻度も高くなり、その結果前進速度も速くなった。pH については、7 から 9 の範囲であまり差のない運動を示したが、この範囲外では精子は運動しなかった。運

動装置としての鞭毛は比較的単純で、運動を制御する膜の役割がかなり複雑ながら、重要であることが明らかになった。

7. Y染色体ハプロタイプ分類と精子数：従来ハプロタイプ II として我々が分類してきた Y 染色体は 12f2 多型の有無によって II $\alpha$  と II $\beta$  の二つに分類できた。またハプロタイプ I は UTY 遺伝子のイントロンに存在する多型 (UTYintron4b) によって I $\alpha$  と I $\beta$  に分類することができた。これによって Y 染色体を大きく 6 種類 (I $\alpha$ 、I $\beta$ 、II $\alpha$ 、II $\beta$ 、III、IV) に分類した。

Yfm1 の多型性と 4 種類の Y 染色体ハプロタイプとの関連：Yfm1 は A、A\*、B、C の 4 種類に分類できることが明らかとなった。タイプ B は Y 染色体ハプロタイプ IV と完全に連鎖していた。またハプロタイプ II は A または A\* と連鎖していた。DAZ 遺伝子を含む AZFc 領域の欠失をもつ無精子症と乏精子症では Yfm1 は完全に欠失していたが健常人では欠失は見いだせなかった。

Y 染色体の遺伝的背景の違いによって精子形成能が異なることは、オランダ人の集団においても報告されている (Krausz ら、Hum Mol Genet, 10:1873-7 2001)。人種を越えて同様の結論が得られたことから、Y 染色体の遺伝的背景の違いが精子形成能に影響を及ぼすことは確からしいと考えられる。我々はさらに AZFc 領域のゲノム

解析によって DAZ 遺伝子の構造に多型性がある可能性を示す知見を得ている。Yfm1 は DAZ 遺伝子の近傍に位置するため、そのコピー数の違いは DAZ 遺伝子における何らかの構造の違いを反映している可能性もある。最近、複数ある DAZ 遺伝子の部分欠失により乏精子症になっていると思われる例が少数ながら報告されている。このような症例の検索に Yfm1 は有効であるかもしれない。現時点では Y 染色体がどのようなメカニズムによって精子数に影響を与えているか不明であるが、Y 染色体のゲノム構造の多様性と精子数の関連を詳細に検討することにより、このメカニズムに迫ることができると考えている。さらに（精子数に影響を与えたとしたら）Y 染色体ハプロタイプの違いが内分泌かく乱物質に対する反応性の違いを生み出すメカニズムを知ることができると考えている。

#### D. 結論

全国 4 地域（札幌、大阪、金沢、福岡）で行われていた妊孕能を有する男性の生殖機能調査が終了した。先行の川崎・横浜地区での調査とあわせて精液検査の結果を解析した結果、平均精子濃度が 1 ml あたり 1 億前後と、良好な値であった。妊孕能を有する男性の一部については精漿および血清中の微量元素の濃度を測定し、微量元素の濃度と精子パラメータとの関連を統

計学的に解析した。来年度から全国各地で開始予定の若年男性の調査に向けて、調査に参加する 4 施設（札幌、大阪、金沢、長崎）に川崎の本部を加えた 5 施設で、理学的検査における医師（診察者）間差ならびに施設（調査実施場所）間差の検討を行い、医師間（内）でその結果にかなりの差が認められることを確認した。精液の質の評価に関する検討としては、TUNEL 法による精子 DNA 断片化解析を行うとともに、精液検査自動化のための基礎的検討として、コンピュータ画像解析に用いる標準精子画像を得るための精液調製法の改良を行い、形態的に正常な精子標本を得ることができた。精子運動性の異常の原因として、精子の形態異常の他に精子内の生化学的な条件による異常があると考え、カルシウムイオンや cAMP、pH の精子運動に対する効果を調べた。高濃度のカルシウムイオンや低い pH では、運動装置に構造的な異常がない場合でも精子は運動しないことが分かった。疫学調査で得られた血液を用いて Y 染色体上の 5 つの biallelic DNA マーカーにより日本人集団の Y 染色体を 6 種類に分類して精子数との関連を検索した。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

Lee, J.W., Kotliarova, S.E., Ewis, A.A., Hida, A., Shinka, T, Kuroki, Y., Tokunaga, K., Nakahori, Y.: Y-chromosome

compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266, and DXYS241. *J. Hum. Genet.* 46:80-84, 2001.

Y染色体多型による男性分類と増精機能：笹原賢司，中堀豊：産婦人科世界 53:7-12, 2001

Y染色体の多様性と男性表現型の関連：ゲノムサイエンスの新たな挑戦：中堀豊，李周遠，Ewis, A.A., 新家利一：蛋白質核酸酵素 46, 2346-2350, 2001

馬場克幸、岩本晃明：精液検査の実際と問題点。検査と技術 29, 1017-1019, 2001

西田智保、兼子智、野澤資亜利、岩本晃明：若年男性集団におけるDNA断片化と精子パラメータとの関連。聖マリアンナ医科大学雑誌 29, 541-548, 2002.

Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., and Suarez, S. S. Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Mol. Reprod. Develop.* 61, 376-384, 2002.

岩本晃明、野澤資亜利、馬場克幸：男性生殖への影響—Testicular Dysgenesis Syndrome について (特集 内分泌攪乱物質の基礎と臨床)。最新医学 57, 250-257, 2002

岩本晃明、野澤資亜利、馬場克幸：内分泌攪乱化学物質による男性性器系障害 (集中講座 内分泌攪乱物質最前線—ヒト健康影響はどこまで明らかになったか—) 日本医師会雑誌 127, 188-192, 2002

## 2. 学会発表

野澤資亜利、岩本晃明、矢島通孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀：日本人若年男性の生殖機能調査—精液所見の季節変動について—。日本不妊学会雑誌、46：415, 2001

兼子智、郡山智、赤星晃一、黒島正子、佐久間雄一、富永英一郎、前田太郎、岩本晃明、田辺清男：ヒト精子形態標準画像の確立。日本不妊学会雑誌、46：346, 2001

西田智保、篠原厚子、千葉百子、星野孝夫、馬場克幸、松下智彦、宮野佐哲、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明：日本人正常男性の生殖機能調査—血清および精漿中の微量元素の測定。環境ホルモン学会。第4回研究発表会、つくば市、2001年12月。

Ishijima, S. and Hara, M. Effects of waveform on swimming speed of a spermatozoon. *Zool. Sci.*, 18, Suppl., 32, 2001.

Irie, M., Ishijima, S., Noda, T., Irie, M.,

and Mohri, H. Study of the centriole  
adjunct of stag beetle spermatozoa.  
Zool. Sci., 18, Suppl., 85, 2001.

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他  なし

F. 知的所有権の取得状況

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

妊孕能を有する男性の生殖機能調査

—川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡からの報告—

主任研究者	岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学	教授
研究協力者	塚本 泰司	札幌医科大学	教授
研究協力者	奥山 明彦	大阪大学医学部	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** 内分泌かく乱物質の男性生殖機能への影響を検証するための基礎データを得ることを目的に、国際共同研究の一環として日本人正常男性の生殖機能調査を実施した。始めに1997年11月から1998年12月まで川崎・横浜地区において妊婦の配偶者（妊孕能を有する男性）の調査を実施した。1999年からは同じプロトコールによる調査を札幌、大阪、金沢、福岡でも開始し、平成13年度内に4地域全ての調査が終了した。本研究では合わせて本邦5地域における調査結果から主として精液所見について比較し、さらに国際共同研究において既に結果を報告しているヨーロッパ5都市（コペンハーゲン、パリ、エジンバラ、ツルク）の結果との比較も試みた。

A. 研究目的

1992年に発表された Carlsen らの論文は、過去50年間でヒトの精子が半減したという衝撃的な内容と、原因としてエストロゲン作用を有する環境中の化学物質の影響を示唆した点で大きな反響を呼んだ。しかし内分泌かく乱化学物質の男性

生殖機能への影響は、化学物質の職業性暴露の例や野生生物に観察された事例、動物実験の結果等を根拠としているが、こうした影響がヒトの通常的生活環境下において実際にあるのかどうか、あるとしたらどの程度なのかについてはまだ評価が定まっていない。ヒトの精子の動向についても

地球規模で本当に減り続けているのかどうかについて十分な答はまだ得られていない。そこでこの問題の検証に向けて1996年、デンマークのSkakkebaekの提唱により国際共同研究「正常男性の生殖機能」が発足した。この調査では妊孕能を有する男性の代表として妊婦の配偶者を対象にその生殖機能に関するデータを収集することを目的に、男性生殖器の診察と精液検査および血清中の性ホルモン検査、生活環境や習慣についてのアンケート調査を実施し、そこから得られるデータをデータベース化することとなった。当初ヨーロッパ各都市間のデータ比較を目的に始まったこの国際共同研究は、その後ヨーロッパ以外の都市の参加も得て規模を拡大しつつあるが、現在までにデンマーク、フィンランド、スコットランド、フランス、日本などで調査が終了し、米国での調査が続行中である。

日本では1997年11月から98年12月まで川崎・横浜地区で調査を実施し、1999年からは札幌、大阪、金沢、福岡でも調査が行われた。これらの調査は各国間、地域間のデータ比較のために、国際共同研究の共通プロトコールに準じて厳密な精度管理のもとに実施されている。本研究は、これらの調査結果から日本人正常男性の生殖機能に関する各種パラメータを記録し、今後の男性生殖機能に関する動向を知る上

での基礎基礎データとすることを目的とする。

#### A. 研究方法

聖マリアンナ医科大学(川崎・横浜)、札幌医科大学(札幌)、大阪大学医学部(大阪)、金沢大学医学部(金沢)の附属病院および原三信病院(福岡)の泌尿器科が各地域における疫学調査の拠点となった。対象者の募集においては、調査コーディネーターが拠点病院、関連病院ならびに協力病院の産婦人科に出向き、そこで妊娠が確認された女性を介して調査の趣旨を説明し、パートナー(配偶者)の男性の参加を募った。男性に対しては精液検査、理学的検査を含む診察、採血(血液中の各種内分泌ホルモン値の測定等)を行い、さらに男性と妊婦の双方に対して生活習慣等の質問票による調査を行った。各施設の調査期間は、川崎・横浜が1997(H9)年11月から1998(H10)年12月、札幌が2000(H12)年6月から2002(H14)年1月、大阪が1999(H11)年7月から2002(H14)年2月、金沢1999(H11)年1月から2001(H13)年10月、福岡が1999(H11)年10月から2001(H13)年3月であった。理学的検査は拠点病院の泌尿器科医が担当した。精液検査はWHO基準に準拠した国際共同研究のプロトコールにしたがった。採取された血液は血清の状態で凍結保存され、各種内分泌ホルモン値測定のためにコペンハーゲン大学病院発達生殖

部門に送られた（調査終了後すべての血清サンプルが揃った時点で一括しての測定される）。

### C. 研究結果

各地域における調査結果の一部を川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡の順に以下に示す。調査に参加した男性の数と平均年齢は、359/206/250/233/103 例および 31.8/30.6/32.3/30.1/32.1 歳であった。同じく精液パラメータの平均値±SD は、精液量：3.3±1.5/3.2±1.6/2.8±1.4/3.5±3.2/2.8±1.4ml、精子濃度：120.9±103.9/110.4±84.9/96.8±78.4/104.9±83.6/124.9±179.5×10<sup>6</sup>/ml、運動率 A+B：55.8±14.7/55.6±18.2/77.3±18.5/46.8±13.7/55.3±15.2%、禁欲期間：211.3±254.9/214.4±348.6/156.8±214.9/226.8±131.0/167.3±293.2時間であった。また精液所見が WHO 基準を下回る割合は、川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡の順に、精液量(2 ml 未満)：20.4/23.2/10.3/25.2%、精子濃度(20×10<sup>6</sup>/ml 未満)：4.4/9.6/6.4/4.9.4%、運動率 A+B：34.0/7.6/58.4/32.0%となった。

### D. 考察

本研究による疫学調査から、川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡における精液検査の結果が得られた。5 地域とも精子濃度が

精液 1ml あたり 1 億前後という値で、この数値をみる限りにおいては、心配されている精子数の低下が示唆されるような結果ではなかった。しかし、これらの数値はあくまでも生データなので、厳密に比較するには、QC(Quality control: 精度管理)データに基づいた補正<sup>(\*)</sup>が必要となる。図 1 は、現段階で日本の川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡の 5 都市の生データとヨーロッパ 4 都市(補正済み)のデータの比較を試みたものである。ヨーロッパ 4 都市における調査では、コペンハーゲンの値がツルクとエジンバラの値に比べて有意に低く、ツルクの値がコペンハーゲンの他に対して有意に高いことが報告されており、ヨーロッパではデンマークの精子濃度がフィンランドより低いという、それ以前の報告と一致した。今回の国内 5 都市の精子濃度はいずれもコペンハーゲンより高かった。国内 5 都市間の比較およびヨーロッパ 4 都市との比較については、今後 QC データと対応させた解析を行った上で検討するとともに、血清中の各種内分泌ホルモン値等のデータとも対応させて総合的に判断したい。

[\*本研究での精液検査法は国際共同研究の共通なプロトコール(WHO ガイドライン準拠)に従って行われている。また、精子濃度の測定に関しては、コペンハーゲンの

国際共同研究本部から定期的に送られてくる精液サンプル（QC サンプル：予め同じ濃度に調製されたものが各施設に送られる）を各施設の技師が測定してその結果（QC データ）を送り返すという、QC プログラムが平行して進められている。各施設の QC データは本部で解析され、コペンハーゲンの QC データを基準に、その傾向を調べる。もし、ある施設の測定結果が、基準値より高めになる、あるいは低めになるというような傾向が示された時には、調査終了後、各施設の精子濃度の値を、QC データに基づいて求められた補正式によって補正する。この方法によるデータの確認が終了したのち、施設間のデータ比較と検定を行う。]

#### E. 結論

妊婦配偶者の生殖機能に関する疫学調査疫学調査から、川崎・横浜、札幌、大阪、金沢、福岡における精液検査の結果が得られた。精子濃度は 5 地域とも精液 1ml あたり

1 億前後という値で、この数値をみる限りにおいては、心配されている精子数の低下が示唆されるような結果ではなかった。

#### F. 研究発表

学会発表

野澤資重利、岩本晃明、矢島通孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀：日本人若年男性の生殖機能調査—精液所見の季節変動について—、日本不妊学会雑誌、46：415，2001

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



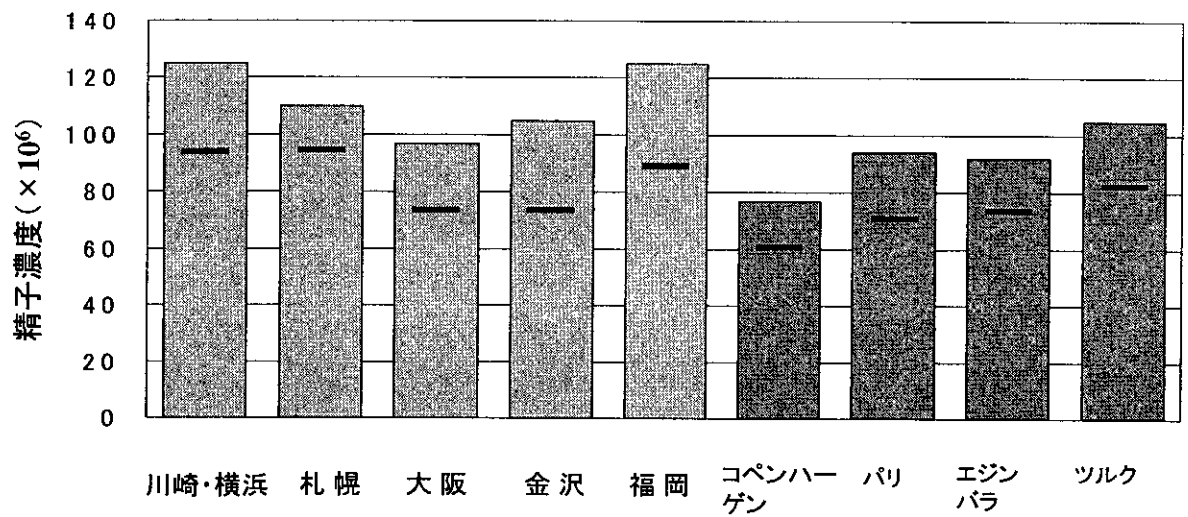


図1. 日本の5都市ならびにヨーロッパ4都市における精子濃度平均値の比較。ただし日本の5都市の精子濃度は生データを示した（最終的な比較には精度管理データに基づく補正が必要）。棒グラフ内の実線は中央値を表す。

妊孕能を有する男性の精漿および血清中の元素濃度の測定

分担研究者	野澤資亜利	聖マリアンナ医科大学	助手
研究協力者	千葉 百子	順天堂大学医学部	助教授
研究協力者	篠原 厚子	順天堂大学医学部	講師

**研究要旨** 1997年11月から1998年12月にかけて川崎・横浜地域で実施した妊婦の配偶者を対象とした男性生殖機能調査に参加した妊孕能を有する日本人男性359例のうち91例について、精漿および血清中の微量元素の濃度を測定し、微量元素の濃度と精子パラメータ（精子濃度、運動性ほか）との関連を統計学的に解析した。Na、K、Mg、P、Zn、Seなど11種類の常量・微量元素をフレイム原子吸光法、比色法、またはマイクロ波プラズマ質量分析法によって測定した結果、精漿中のMg、P、Zn、およびSeの濃度と精子濃度との間にそれぞれ弱い相関が認められた( $r < 0.5$ 、 $p < 0.01$ )。

A. 研究目的

必須微量元素は生体機能の維持や調節に重要な役割を果たしている。微量元素の欠乏はそれらが関与している機能の障害を引き起こし、また外的な因子による障害は微量元素の動態の変化として捉えられる可能性がある。近年、男性生殖機能に健康障害をもたらす内分泌かく乱化学物質等の環境因子が問題となり、その因果関係の検証が求められているが、それらの環境

因子の中には多数の金属元素類も含まれる。生殖機能に関しては亜鉛(Zn)他いくつかの元素の関与が知られているが、元素類の体内蓄積が造精機能にどう影響するかについての知見は乏しい。特に健康な男性集団を対象とした調査研究は少なく、各元素濃度の標準値の分布などに関しても情報が不足している。我々は1997年11月から1998年12月にかけて川崎・横浜地域において、妊婦の配偶者を対象とした男性生

殖機能調査を実施し、妊孕能を有する日本人男性 359 例に対し診察、精液検査、血液中の性ホルモン値の測定、および生活習慣等に関するアンケート調査を行った。得られた検体は生殖機能と関連したマーカー物質や内分泌かく乱物質等の測定に備えて保存されているが、今回、そのうちの 91 例について精漿ならびに血清中の常量および微量元素の濃度を測定し、元素濃度と精子パラメータ（精子濃度、運動性ほか）との関連を統計学的に解析した。

## B. 研究方法

1997年11月から1998年12月にかけて聖マリアンナ医科大学泌尿器科で実施した川崎・横浜地域の妊婦の配偶者を対象とした男性生殖機能調査において、承諾を得て入手保存されていた精漿および血清359例分のうち91例を試料として用いた。91例の選択は無作為ではなく、測定に必要な十分量の精漿を得るために、精漿検体が比較的多く保存されているものから選んだ。対象となった男性の平均年齢は 31.5歳（20～44歳）であった。精子パラメータ（精液量、精子濃度、運動率ほか）の数値は、調査結果の精液所見データベースより対象者91例のデータを抽出して用いた。それらの精子パラメータWHO基準に基づいた精液検査法によって求められたものである。血清ならびに精漿中の元素濃度は順天堂大学医学部衛生学教室において測定された。前

処理として精漿200～400  $\mu$ l、血清200  $\mu$ l を脱金属処理済みテフロン製バイアルにとり、硝酸と過酸化水素水（Tama Pure AA 100）を加えてマイクロウェーブ分解し、超純水で一定量にした。11種類の元素（Na、K、Mg、Ca、Zn、P、Cu、Fe、Rb、Se、Sr）について試料中の濃度を測定した。測定法は、フレイム原子吸光法（Na、K、Mg、Ca、Zn）、マイクロ波誘導プラズマ-質量分析法（Cu、Fe、Rb、Se、Sr）または比色法（P）によった。

## C. 研究結果と考察

精液所見の平均値 $\pm$ SDは、精液量(ml)：5.1 $\pm$ 1.2、精子濃度( $\times 10^6$  /ml)：93.7 $\pm$ 67.5、運動率(%)：57.5 $\pm$ 14.7であった。精漿サンプルの多い例を選んだため精液量が調査集団全体の平均3.3mlを大きく上回った。精漿および血清中の各元素濃度の標準値を表1および表2に示す。各元素濃度を高い順に並べると、精漿ではNa>P>Ka>Ca>Zn>Mg>Rb>Fe>Se>Cu>Sr、血清ではNa>Ka>P>Ca>Mg>Fe>Zn>Cu>Rb>Se>Sr、であった。精漿中および血清中の元素濃度の比較を表3に示す。微量元素の濃度は精漿中と血清中では大きく異なっていた。精漿中と血清中特に精漿中のZnは血清中に比較して220倍もの高濃度で存在していた。

精漿中の幾つかの元素間に強い正の相関が認められ ( $p < 0.0001$ )、そのうち相関

係数が 0.7 以上の組み合わせは K と Mg、K と Ca、K と Zn、K と Rb、Mg と Ca、Mg と Zn、Ca と Zn であった(表 4)。K と Rb は血清中でも有意な相関が認められた(表 5;  $r=0.685$ 、 $p<0.0001$ )。

精漿中の Mg、P、Zn、および Se の濃度と精子濃度との間にそれぞれ弱い相関が認められた( $r<0.5$ 、 $p<0.01$ )が、運動率との間には相関が見られなかった(表 4)。血清中の元素については他のパラメータとの間に有意な関連は認められなかった(表 5)。

#### D. 結論

Na、K、Mg、P、Zn、Se など 11 種類の常量・微量元素をフレイム原子吸光法、比色法、またはマイクロ波プラズマ質量分析法によって測定した結果、各元素の濃度は精漿中と血清中では大きく異なっていた。精漿および血清中の幾つかの元素間に強い正の相関が認められた。また、精漿中の Mg、P、Zn、および Se の濃度と精子濃度と

の間にそれぞれ弱い相関が認められた( $r<0.5$ 、 $p<0.01$ )。血清中の元素については精子パラメータとの間に有意な関連は認められなかった。

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

西田智保、篠原厚子、千葉百子、星野孝夫、馬場克幸、松下智彦、宮野佐哲、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明：日本人正常男性の生殖機能調査—血清および精漿中の微量元素の測定。環境ホルモン学会。第 4 回研究発表会、つくば市、2001 年 12 月。

#### 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