

表 1. ヒト精子頭部形態統計値

	平均	標準偏差	中央値	最小値	最大値	変動係数
面積 (μm^2)	12.6	1.19	12.60	8.54	15.0	0.094
周囲長 (μm)	13.9	0.879	13.93	11.5	17.2	0.063
長径 (μm)	4.93	0.446	4.86	3.90	7.02	0.095
短径 (μm)	3.55	0.300	3.55	2.45	4.52	0.085
真円率	0.816	0.047	0.826	0.558	0.984	0.058
縦横比	1.40	0.204	1.36	1.03	2.26	0.145

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研究科 助手

研究要旨 精子運動性の異常の原因として、精子形成時に生ずる形態的な異常の他に、精子内の生化学的な条件が原因の異常が考えられる。精子運動装置の生化学的特性を明らかにするために、カルシウムイオンや cAMP、さらには 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かった。

A. 研究目的

妊婦配偶者精子の形態調査の結果、妊婦配偶者精子は精子無力症患者の精子に比べて正常精子の割合は高いものの、異常のタイプには違いが見られないことが明らかになった。精子運動性の異常の原因として、精子形成時に生ずる形態的な異常の他に、構造的には完全でありながら、精子内の生化学的な条件が原因の異常が考えられる。この生化的異常の原因を明らかにするために、これまでの形態学的調査に加えて、精子内の生化学的条件を調べた。

B. 研究方法

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。

a. 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。さらに、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。

b. 精子運動の解析

精子の運動を毎秒 200 コマで撮影できる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。構造観察からでは明らかにされない、精子運動装置の生化学的特性を明らかにするために、精子膜を界面活性剤の Triton X-100 で除去し、エネルギーである ATP を加えて精子の運動を再活性化し、さらに溶液中のイオンや薬物を変えることにより、精子の運動の変化を調べた。

C. 研究結果及び考察

a. 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。

b. 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。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。一般に、細胞膜を除去した精子では、適当な条件下では、細胞膜を除去する前と比べて精子の運動率が高くなる傾向がある。膜の異常が取り除かれるために、運動率が高くなると考えられる。一方、精子の鞭毛運動はカルシウムイオンや cAMP、さらには pH によって鞭毛運動のパターンが変わるため、通常観察される鞭毛運動の条件を知るためには生きた精子を用いて測定する必要がある。一般的にはカルシウムイオンが低い方が対称的な波形を形成し、精子は

比較的真っ直ぐに前進する。一方、カルシウムイオン濃度が高くなると、非対称な鞭毛運動に変わるため、真っ直ぐに進まない。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。

D. 結論

妊婦配偶者の精子でも、精子無力症患者の精子で観察されたタイプの異常精子が見られたが、割合としては低かった。若年男性については、正常精子から異常精子まで、さまざまな割合で存在し、個人差が大きかった。精子の異常の原因を明らかにするために、光学顕微鏡や電子顕微鏡を用いた構造的な解析だけでなく、精子内の生化学的特性も調べるのが重要で、できれば精子 1 匹 1 匹での測定が望ましい。

E. 研究発表

1. 論文発表

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.

2. 学会発表

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.

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

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

研究協力者 新家利一 徳島大学医学部・助教授

研究要旨 我々の従来の研究によって、Y染色体のタイプの違いが精子形成能に影響を及ぼすことが示唆されている。今回、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。また無精子症候補領域に存在するDNA多型マーカーYfm1を用いて健常人と男性不妊症患者のゲノム解析を行った。

A. 研究目的

我々は従来の研究において、日本人のY染色体が3カ所のDNA多型により4つに分類され、それぞれの遺伝子構造や精子形成関連遺伝子の能力が異なることを示した。元々の遺伝的背景の違いによって精子数が影響を受けるのならば、内分泌かく乱化学物質によるヒトの精子形成への影響を考える場合、個人の遺伝的背景の違いを考慮する必要がある。

以上の点を踏まえて、我々はY染色体研究の立場から、ヒト精子形成の遺伝学的多様性、また、（影響があるとした場合の）内分泌かく乱化学物質に対する感受性の個体差について検討を行っている。

Y染色体は、偽常染色体領域と呼ばれる

領域を除いて、その大部分の領域が父親から息子にそのまま受け継がれていくという遺伝的な特性がある。このことはY染色体上に生じたDNAレベルで変化は父から息子へと伝えられ、特定のDNA多型はある特定の男性の男性子孫にしか受け継がれないことを意味する。

ヒト進化の上で生じたY染色体上のDNAの違いが男性系統毎の形質の違いとして表れている可能性がある。

Y染色体上には精巣特異的な遺伝子や精子形成に関与すると考えられる遺伝子が複数存在することが知られている。特に、無精子症患者のゲノム解析からY染色体上には少なくともAZFaとAZFb、およびAFZFcの3つの精子形成に重要な遺伝子

を含む領域が存在することが知られている。また、これらの領域には複数コピーを成して存在する遺伝子が存在し、多型が存在する可能性がある。

今年度の研究においては、AZFa 領域と AZFc 領域における DNA 多型に着目して、Y 染色体のハプロタイプ分類と精子数との関連解析を中心に行った。とくに AZFc 領域に存在する Yfm1 は複数コピーがこの領域に集ぞくして存在していると考えられ、AZFc 領域の欠失が無精子症患者の 10% 程度で認められることと併せて考えると、大変興味ある多型性であると考えて解析を行った。

B. 研究方法

精子数の情報が利用可能な DNA サンプルに関しては従来の SRY、DXYS5Y、YAP に加えて、AZFa 領域の 12f2 多型および UTY イントロン 4b 多型を解析した。また AZFc 領域については我々の共同研究者である福井医大法医学教室の松木らが見出したマイクロサテライト DNA マーカーである Yfm1 について検討した。

1) AZFa 領域の体型解析

12f2 多型解析では PCR 反応によって Y 染色体上の特定領域の欠失による多型の有無を検索した。また UTY 遺伝子のイントロンに存在する多型 (UTYintron4b) については DHPLC (denaturing high

performance liquid chromatography) 法による多型の検索を行った。

2) AZFc 領域の多型解析

DNA サンプルを 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

1) Y 染色体の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 α と II β 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 α と I β 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 α 、I β 、II α 、II β 、III、IV) に分類した。表 1 に精子数の情報が得られたサンプルについてハプロタイプと精子数の関連について示す。現時点で精子数に関するデータが未着のものがあり、完全な解析結果ではない。

2) Yfm1 の多型性と 4 種類の Y 染色体ハプロタイプとの関連 (表 2)

Yfm1 は A、A*、B、C (A から B 以外のタイプ) 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(deleted in azoospermia)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。健常人では欠失は見いだせなかった。ゲノムデータベースの検索を行ったところ、Yfm1 は DAZ 遺伝子の近傍 25Kb から 30Kb 程度に位置していることが判明した。

D. 考察

我々が 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を報告した後、Krausz らがオランダ人の集団においても、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を報告している (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。

日本人集団は我々の Y 染色体の分子遺伝学的検討から見ると、様々な集団が混じり合って構成されている様に見える。従って日本国内における地域ごとの Y 染色体ハプロタイプと精子数との関連の解析は重要であると考えられる。現在、国内の地域ごとに新しい 6 種類のハプロタイプ分類を用いて Y 染色体ハプロタイプと精子数との検討を行っている。

今回の Y 染色体ハプロタイプと精子数の解析はあくまでも途中解析である。現時

点で精子数の情報がまだ到着していない検体もあるため、正確な解析は今後継続していく。

我々は 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かもしれないとの知見を得ている。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。

近年のヒトゲノムプロジェクトの進展により、Y 染色体は従来考えられていた以上に様々な遺伝子が存在し、かつ複雑な構造を持っていることが明らかにされつつある。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。

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.

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

中堀豊, 李周遠, Ewis, A.A, 新家利一:
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る挑戦: 蛋白質核
酸酵素 46, 2346-2350, 2001

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

表1 Y染色体ハプロタイプと精子数の関連

Haplotype	n	Sperm concentration mean \pm SD	(log transformed)
I α	50 (13.7)	112.09 \pm 74.92	(1.96 \pm 0.28)
I β	102 (28)	99.75 \pm 75.11	(1.87 \pm 0.38)
II α	51 (14)	110.47 \pm 82.32	(1.91 \pm 0.37)
II β	65 (17.8)	87.96 \pm 65.41	(1.82 \pm 0.34)
III	31 (8.5)	119.62 \pm 118.76	(1.88 \pm 0.42)
IV	66 (18)	98.91 \pm 85.30	(1.84 \pm 0.40)
total	365 (100)	102.37 \pm 81.59	(1.87 \pm 0.37)

表2 Yfm1 の多型のタイプと無精子症・乏精子症の関連性について

Haplotypes	I				II		III	IV	Total examined	Total delete d Yf ml
	A	A* Del.	B	C	A	A* Del.	B Del.	B Del.		
Normal fertile males	5	8 -	2	36	39	7 -	15 -	38 -	150	-
Azoospermic males	4	3 7	1	12	16 7	- 7	7 -	8 3	68	17
Oligospermic males	11	8 3	-	26	17 5	3	6 -	9 1	89	9

別添6

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Lee, J.W., Kotliarova, S.E., Ewis, A.A., Hida, A., Shinka, T, Kuroki, Y., Tokunaga, K., <u>Nakahori, Y</u>	Y-chromosome compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266, and DXYS241	J. Hum. Genet	46	80-84	2001
笹原賢司, <u>中堀豊</u>	Y染色体多型による男 性分類と増精機能	産婦人科世界	53	7-12	2001
<u>中堀豊</u> , 李周遠, Ewis, A.A., 新家 利一	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	蛋白質核酸酵素	46	2346-2350	2001
馬場克幸、 <u>岩本晃明</u>	精液検査の実際と問題 点	検査と技術	29	1017-1019	2001
西田智保、 <u>兼子智</u> 、 <u>野澤資亜利</u> 、 <u>岩本晃明</u>	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
<u>Ishijima, S.</u> , 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
<u>岩本晃明</u> 、 <u>野澤資亜利</u> 、 <u>馬場克幸</u>	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
<u>岩本晃明</u> 、 <u>野澤資亜利</u> 、 <u>馬場克幸</u>	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