

別添2

厚生労働科学研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

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14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	塚本 泰司	札幌医科大学
	奥山 明彦	大阪大学
	並木 幹夫	金沢大学
	金武 洋	長崎大学
	兼子 智	東京歯科大学
	中堀 豊	徳島大学

平成15 (2003) 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	
若年男性の生殖機能調査	
—川崎地区における若年男性の調査第2回目—……………9	
主任研究者 岩本晃明 研究協力者 野澤資重利	
若年男性の生殖機能調査—札幌地区における調査—……………13	
分担研究者 塚本泰司 研究協力者 伊藤直樹	
若年男性の生殖機能調査—大阪地区における調査—……………17	
分担研究者 奥山明彦 研究協力者 松宮清美	
若年男性の生殖機能調査—金沢(北陸)地区における調査—……………20	
分担研究者 並木幹夫 研究協力者 高 栄哲	
若年男性の生殖機能調査—長崎地区における調査—……………23	
分担研究者 金武 洋 研究協力者 江口二郎	
造精機能に関連したバイオマーカーの検索……………26	
主任研究者 岩本晃明 研究協力者 吉田 薫	
ヒト精液検査の標準化に向けて……………29	
分担研究者 兼子 智	
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……………34	
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……………41	
IV. 研究成果の刊行物・別刷……………43	
V. 資料	

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
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。平成 14 年度は、川崎地区において若年男性（男子大学生）の生殖機能調査の第 2 回目を実施し、平成 14 年 4 月から 15 年 3 月までに参加した 279 名の理学的所見および精液所見の集計結果を示した。また地域差の検討を目的として全国 4 地域（札幌、大阪、金沢、長崎）において若年男性の生殖機能調査が始まり、その途中経過を報告した。

造精機能に関連したバイオマーカーの候補として DJ-1 タンパク質を取りあげ、その性状と精巣および精子における局在を調べた。DJ-1 タンパク質は精巣および精子に存在し、精子濃度との間に弱い正の相関が見られること、および精液中 DJ-1 タンパク質量平均値は妊婦配偶者と比較して不妊外来患者で有意に低く、新規の造精機能マーカーとしての可能性が示唆された。

精液所見測定法の標準化を目的に、コンピュータ画像解析装置に用いる標準精子画像を得るため、形態良好精子の精製を試み、Percoll 密度勾配を用いる沈降速度差遠心分離法、Optidenz を用いる沈降平衡法により正常形態精子比率が向上することを認めた。さらに本法で精製した精子は先体反応誘起率が高く、精子形態を指標とした精子調製が妊孕性の高い精子の分離に有効である可能性が示唆された。精液検査標準化ガイドラインの原稿が完成した。

精子形成能と Y 染色体ハプロタイプとの関連を解析するための基礎データとして、各 Y 染色体ハプロタイプ頻度の日本国内における地域差を検索した。その結果、各 Y 染色体ハプロタイプ頻度には地域差が存在することが明らかとなった。また男性の泌尿器・生殖器系の重要な疾患の一つである前立腺がんについて、Y 染色体 DNA 多型との関連を解析し、前立腺がん発症と Y 染色体タイプが関連している可能性が示唆された。

分担研究者

塚本泰司 札幌医科大学・教授

奥山明彦 大阪大学大学院医学系研究科・教授

並木幹夫 金沢大学大学院医学研究科・教授

金武 洋 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・教授

兼子 智 東京歯科大学市川総合病院・講師

中堀 豊 徳島大学大学院医学研究科・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。さらに、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泌尿器科を拠点として、川崎地区の大学生を対象とした一般若年男性の生殖機能調査を国際共同研究のプロトコールに従って実施した。川崎市の3か所の大学からの参加者に対して質問票の記入(既往歴、出生時の状況、生活環境等)、精液検査(48時間以上の禁欲期間の後にマスターベーションにより精液を採取。統一化された検査方法により精液量、精子濃度、精子運動率を測定)、生殖器の診察を含む理学的検査および各種内分泌ホルモン測定のための採血を実施した。さらに、精液所見および内分泌ホルモン値などの変動(個人差、個人内変動、季節変動)を検討する目的で、上記調査の参加者から再募集した48名に対して毎月(12回/年)精液検査とホルモン検査のための採血、採尿を実施する調査を開始した。

2. 地域差の検討のため、札幌医科大学、大阪大学、金沢大学、長崎大学の医学部泌尿器科を拠点として、各地域における大学生を対象とした一般若年男性の生殖機能調査を国際共同研究のプロトコールに従って実施した。各地域の協力大学より、年

年齢 18~24 歳の大学生、本人とその母親が日本で生まれていることを条件に調査参加者を募集した。参加者に対し、質問票(既往歴、出生時の状況、生活環境等)の記入、精液検査(48 時間以上の禁欲期間の後にマスターベーションにより精液を採取。統一化された検査方法により精液量、精子濃度、精子運動率を測定)、理学的検査(陰毛発育の程度、精巣容積、精索静脈瘤の有無、その他の異常等の診断)、採血(各種内分泌ホルモン値の測定のため 40ml 採血)を実施した。

3. 材料: 妊婦配偶者および若年男性、同意を得て凍結保存されている不妊患者の精漿および精子を用いた。方法: 1) 抗 DJ-1 抗体(monoclonal:3E8)を用いてヒト精漿、精子・精巣抽出物の Western blotting を行った。抗 DJ-1 抗体を用いた免疫組織化学によりヒト精巣および精子の DJ-1 の分布を検討した。抗 DJ-1 抗体を固相化した ELISA を用いて精漿中の ras 関連遺伝子産物 DJ-1 タンパク質濃度を測定した。

4. 精液を 20 μ m ナイロンメッシュフィルター濾過して異物を除去し、80%等張化 Percoll にて沈降速度差遠心分離を行った。沈澱から回収された精子懸濁液を 33%Optidenz に層積して沈降平衡遠心分離し、各分画から得られた精子の形態を光学顕微鏡および電子顕微鏡で観察した。また

精子懸濁液を 10 μ g FITC コンカナバリン A、1.0 μ g PI、20mMHepes 緩衝化生食、pH7.4 中で 20 分間染色し、先体部に緑色の FITC 蛍光を認め、頭部後半部に赤色の PI 蛍光を認める精子を先体反応誘起精子と判定した。

5. 1) 染色体ハプロタイプ頻度の解析: 疫学調査によって得られた血液由来の DNA サンプルに関して Y 染色体上に存在する、11 種類の DNA マーカー (YAP, 12f2, M213, M9, M217, LLY22g, M122, SRY, M95, 47z, M134) を用いて 775 人の健常人男性の Y 染色体ハプロタイピングを行った。また 367 人の不妊男性についても 3 種類の Y 染色体 DNA 多型 (SRY, YAP, を用いたハプロタイピングを行った。2) 前立腺がん Y 染色体 DNA 多型との関連性解析: 90 名の前立腺がん患者および 99 名の正常コントロールについてそれぞれ、がん組織及び末梢血リンパ球より DNA を抽出した。Y 染色体上の DYS19 遺伝子座について抽出した DNA を鋳型として、蛍光色素標識プライマーを用いて PCR 反応をおこなった。得られた PCR 産物について自動蛍光シーケンサーを用いて、DYS19 遺伝子座のタイプを決定し、前立腺がん発症との関連を解析した。

C. 研究結果と考察

1. 本調査は 1999 年 5 月 - 2000 年 5 月に川崎市でおこなわれた同じ調査の第 2 回目にあたる。平成 15 年 3 月 31 日までに、279 名の

男子大学生が調査に参加した(参加率 15.1%)。参加者の年齢(平均±SD)は20.3±1.5歳であった。精巣容量は左が21.0±4.3ml、右が21.6±4.3ml、平均の禁欲期間は79.2±33.4時間であった。各精液パラメータの平均値±SDは、精液量: 2.7±1.3 ml、精子濃度: 67.5±59.9×10⁶/ml、総精子数: 137.4±213.0×10⁶、精子運動率(A+B): 60.3±14.1%であった。精液所見がWHO基準を下回る例は、精液量(<2ml)で24.5%、精子濃度(<20×10⁶/ml)で16.3%、精子運動率(<50%)で12.6%含まれていた。無精子症と精子無力症の症例は認められなかった。精索静脈瘤の頻度はGrade1が左16.5%、右1.7%、Grade2が左8.6%、右0.4%、Grade3が3.2%、右0%であった。本調査は平成15年5月に終了予定である。1年間に12回検査を行う調査では、事前に説明会を開き、調査の趣旨を説明し、趣旨に賛同した48名を対象に平成15年1月から検査を開始した。平成15年3月までに48名がそれぞれ3回の検査を受けた。平成14年度中に全国4地域(札幌、大阪、金沢、長崎)で若年男性の調査が開始したので、それらの終了後に川崎のデータも含めては日本国内における若年男性の生殖機能の、地域差の検討を行う予定である。

2. 1) 札幌地区:平成15年2~3月の期間に38名が調査に参加した。参加者の年齢は18~24歳、平均21.2歳であった。精子数は9.2~262.5×10⁶/ml、平均94.5±60.5×10⁶/mlであった。無精子症は認めず、

精子数20×10⁶/ml未満の乏精子症は3例(7.9%)に認められた。精子運動率は3~83%、平均55±20.5%であった。運動率50%未満の精子無力症は9例(26.3%)に認められた。今回の結果と過去3回札幌市で行った研究とを比較すると、平均精子数は18~36歳の一般成人男性よりは若干高く、妊孕能を有する妊婦パートナーよりは若干低い結果であった。また、乏精子症の割合は他の2研究とほぼ同様であった。

2) 大阪地区:平成14年9月から15年3月までにパンフレット配布枚数は1400枚、調査参加者140例の調査を完了した(参加率は10%)。結果は、平均年齢21.2±1.44(Mean±SD)歳、精巣容積は左21.9±4.6ml、右22.3±4.6ml、精液量3.04±1.50ml、精子濃度80.5±62.8×10⁶/ml、精子運動率(A+B)58.8±10.4%であった。平成14年度の前半に精度管理と対象者の公募方法の策定に十分な準備を行い、共通のプロトコルを用いて参加者を募った。パンフレット配布枚数に対する参加率は約10%であり、参加者募集については機能しているものと考えられた。また精度管理については、主任研究者施設の指導のもとに定期的に施行されており問題なく調査を進行してきた。

3) 金沢(北陸)地区:平成14年7月1日から平成15年3月末日までにパンフレット1,052部を配布し、235名(22.3%)が参加した。対象者は、年齢21.5±1.5歳(平均±SD、以下同様)、身長172.7±6.0cm、

体重 64.1 ± 7.9 kg、精巣容量左 21.2 ± 4.5 ml、右 21.7 ± 4.2 ml であった。精索静脈瘤の頻度は、左 20.8%、右 3.8% であった。精液所見は、精液容量 3.3 ± 1.5 ml、精子濃度 72.1 ± 55.3 (中央値 60.8) $\times 10^6$ /ml、総精子数 230 ± 12.4 (中央値 187) $\times 10^6$ 、運動率(A+B) 55.5 ± 14.9 (中央値 57)% であった。本研究の標本は、比較的サンプルの収集し易い大学生を対象としているが、一般男子成人の精液所見を反映していると考えられる。理学的所見において精索静脈瘤の頻度が比較的高いことが特徴であった。

4) 長崎地区：平成 14 年度に参加者 208 名で得られた研究結果として、平均年齢 21.0 ± 1.6 歳、平均身長 171.5 ± 5.1 cm 平均体重 63.2 ± 9.2 kg であった。精巣容積は、左精巣平均 19.5 ± 4.2 ml、右精巣平均 20.3 ± 4.2 ml、精索静脈瘤は、左 25.0%、右 1.0% に認められた。精液所見では、精液量平均 3.1 ± 1.4 ml、精子濃度平均 $78.8 \pm 55.3 \times 10^6$ /ml、運動率平均 65.1 ± 14.4 % であった。本研究の妊婦パートナーを対象とした九州-福岡地区の結果と比較して、年齢で 11.1 歳若く、精子濃度で約 46×10^6 /ml 低く、運動率で約 9% 高かった。まだ途中経過であるが、最終的な他地区との比較、その原因として遺伝子の変異解析の結果や将来測定されるであろう環境ホルモンとの関連に興味をもたれるところである。

3. 1) 抗 DJ-1 抗体を用いてヒト精漿、精子・精巣抽出物を Western blotting にて検討したところ分子量 24kDa の単一バンドが検出された。2次元電気泳動でも Western blotting により、精漿、精子・精巣抽出物全てから分子量 24kDa で pI5.5~6.7 の4つのスポットをそれぞれから同様に検出することができた。

2) 抗DJ-1抗体を用いた免疫組織化学により、ヒトDJ-1は精巣ではライディヒ細胞と精細管内のセルトリ細胞、精粗細胞、精母細胞、精子細胞に存在すること、および精巣上体においては上皮細胞と、管内の精子に存在することが確認できた。射出精子でのDJ-1の局在については間接蛍光抗体法により精子頭部後半と中片前半に局在していることが示された。

3) 抗 DJ-1 抗体を固相化したプレートを用いることで精漿中 DJ-1 を測定できることが明らかになった。この ELISA で妊婦パートナー精漿について 356 例、不妊外来患者 98 例について測定し、運動率、精子数について比較検討、精子濃度については弱い正の相関が見られた。精漿中 DJ-1 タンパク質量平均値は妊婦パートナー (83.9ng/ml) と比較して不妊外来患者 (61.3ng/ml) で有意に ($p < 0.0001$) 低かった。現在のところ精巣機能を評価するのに良いパラメータとされている Inhibin B が精

子濃度に対して相関係数0.238 ($p < 0.0001$)であったのに比べ、DJ-1は相関係数0.298 ($p < 0.0001$)でこの集団に関しては Inhibin B に遜色無いマーカーであることが明らかになった。

4. 透過型電子顕微鏡を用いてヒト精子形態を詳細に観察しそのパターンを分類した。種々の精液所見を有する精液 27 標本について形態観察を行った結果、正常形態精子比率は、 $11.1 \pm 4.2\%$ であったが、Percoll 沈降速度差遠心分離後には、 $32.1 \pm 8.2\%$ に向上した。さらに同分画を 33%Optidenz(密度 1.183g/ml) に層積して沈降平衡遠心分離した結果、精子懸濁液/33%Optidenz 界面に回収された精子の正常形態精子比率 $49.3 \pm 9.6\%$ に達した。一方、Optidenz 沈澱分画に回収された精子のほとんどが奇形精子であった。11 精液標本について調製過程における先体反応誘起率を観察した。精漿が除去された Percoll 沈澱分画における値は $39.0 \pm 21.3\%$ であったが、33%Optidenz 界面分画に回収された精子では $73.2 \pm 24.7\%$ と、 2.48 ± 1.66 倍に向上した。先体反応を誘起している精子の形態はほとんどが正常形態を示した。

精液検査標準化ガイドラインの原稿が完成した。日本アンドロロジー学会、日本受精着床学会、日本赴任学会、日本臨床衛生検査技師会の各理事長・会長から推薦を受けることが決定した。

5. 1) 正常男性における Y 染色体ハプロタイプ頻度の解析：現時点までに 775 人の健常人男性の Y 染色体ハプロタイプを決定し、地域ごとにハプロタイプ頻度を算出した。その結果、日本人集団では 9 種類 (D1, D2, C, F, N, O3, O2, O2b*, O2b1) の Y 染色体ハプロタイプが観察され、各 Y 染色体ハプロタイプの頻度に地域差があることが明らかとなった。特に福岡地区は他地域のハプロタイプ頻度と異なるパターンを示していた。

2) 不妊男性における Y 染色体ハプロタイプ頻度の解析：泌尿器科外来を受診した不妊男性の Y 染色体について 4 種類のタイプに分類した。その結果 I136 人、II139 名、III26 名、IV66 名であった。

3) 前立腺がん Y 染色体 DNA 多型との関連性解析：Y 染色体上のマイクロサテライト DNA マーカーである DYS19 に関して、C タイプを持つ人はそれ以外のタイプを持つ人より、2.04 倍前立腺がんが多く認められた。 ($P=0.02$, 95% CI: 0.75-2.42)。また D タイプを持つ人の前立腺がんの頻度は他のタイプを持つ人の 1/4 (0.26 倍) であった ($P=0.002$, 95% CI: 0.65-3.71)。

D. 結論

川崎地区、および全国 4 地域 (札幌、大阪、金沢、長崎) で行われている若年男性の生殖機能調査の途中経過を報告した。いずれに地域においても、既に終了した妊孕

能を有する男性（妊婦のパートナー）に比較して、精子濃度が 20-30% 低く、精索静脈瘤の頻度が高い傾向が認められた。若年男性は妊孕能を有する男性と年齢、禁欲期間、募集条件（妊孕能に関する条件）等が異なるので、今後は可能な限り交絡因子を調整したうえでの解析が必要である。

ヒト DJ-1 はヒト精巣、精巣上体内および射出精子で発現しており、造精機能に関与している事が示唆された。精子に存在する DJ-1 についてはラットで受精に関与しているという報告があるので、ヒトでも先体反応等に関与する可能性が考えられる。男性生殖機能を評価するパラメータとしては Inhibin B と同程度のマーカーであることが示されしかも Inhibin B や他のホルモン系とは独立した新規のマーカーであることが本研究で示された。DJ-1 は造精機能評価しかも内分泌かく乱による影響を含んだ評価マーカーとして有用であると考えられる。

ヒト精子形態観察に reference として用いる正常形態精子を得るため、精液から形態を指標として精子精製を行った。密度勾配担体として Percoll および Optidenz を用い、各々沈降速度、浮遊密度による細胞分離を行った。その結果、両法を組み合わせることにより正常形態精子比率の上昇を認めた。さらに生理的機能の指標として先体反応誘起能を観察した結果、先体反応誘起精子はほとんどが正常形態を示し、形態を指標とした精子妊孕能評価の有用性

が示唆された。

各 Y 染色体ハプロタイプ頻度には地域差が存在することが明らかとなった。本研究で得られた結果は、今後遺伝疫学的手法によって Y 染色体ハプロタイプと精子形成能との関連を解析する際の基礎データとなる。また男性の泌尿器・生殖器系の重要な疾患の一つである前立腺がんについて、Y 染色体 DNA 多型との関連を解析し、前立腺がん発症と特定の Y 染色体タイプが関連している可能性が示唆された。

E. 健康危険情報 なし

F. 研究発表

1. 論文発表

篠原厚子、千葉百子、馬場克幸、野澤資亜利、稲葉 裕、岩本晃明：妊孕能を有する日本人男性の精漿および血清中の微量元素 . Biomedical Research on Trace Elements 13, 214-215, 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, 74-81, 2002.

Ishijima S, Iwamoto T, Nozawa S, Matsusita K: Motor apparatus in human spermatozoa that lack central pair microtubules. Mol Reprod Develop 63, 459-463, 2002.

Ewis AA, Lee JW, Shinka T, Nakahori Y: Two Y-chromosome-specific polymorphisms 12f2 and DFFRY in the Japanese population and their relations

to other Y- polymorphisms. J Med Invest 49, 44-50, 2002.

Ewis AA, Lee JW, Naroda T, Sasahara K, Sano T, Kagawa S, Iwamoto T, Nakahori Y: Linkage between prostate cancer incidence and different alleles of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS19. J Med Invest 49: 56-60, 2002

Ewis AA, Lee JW, Shinka T, Nakahori Y: Microdeletions of a Y-specific marker, Yfml, and implications for a role in spermatogenesis. J Hum Genet 47: 257-261, 2002.

Ewis AA, Lee JW, Kuroki Y, Shinka T, Nakahori Y: Yfml, a multi-copy marker, specific for the Y chromosome and beneficial for forensic, population genetic and spermatogenesis-related studies. J Hum Genet 47:523-528, 2002.

2. 学会発表

Yoshida K, Sato Y, Yoshiike M, Nozawa S, Tamai K, Ariga H, Iwamoto T: Distribution of DJ-1 in human male reproductive system. 9th International Symposium on Spermatology, Capetown October 6-11, 2002

伊藤直樹、笹尾拓己、塚本泰司、岩本晃明: 札幌市における妊婦パートナーを対象とした生殖機能の研究: 一般対象との比較検討. 第47回日本不妊学会学術講演会、2002年、岐阜

中堀豊: 多因子遺伝について: 遺伝率など. 第24回日本生物学的精神医学会(シンポジウム), 2002年4月10日, 埼玉

陳剛, 木下桂午, 新家利一, 中堀豊: The effects of estrogen on activity of the human Mullerian duct inhibitory

substance (MIS) promoter. 第225回徳島医学会学術集会, 2002年年8月7日, 徳島

新家利一, 陳剛, 木下桂午, 中堀豊: 精巢決定因子 SRY が自身の発現に及ぼす影響についての検討, 第47回大会日本人類遺伝学会, 2002年11月13-15日, 名古屋

黒木陽子, 新家利一, 中堀豊, 藤山秋佐夫, 榊佳之: Y染色体無精子症候群領域のゲノム構造解析, 第47回大会日本人類遺伝学会, 2002年11月13-15日, 名古屋

木下桂午, 新家利一, 陳剛, 中堀豊: PCDH22Y 遺伝子発現制御領域に存在するマイクロサテライトDNAマーカーの遺伝的多様性についての解析, 第226回徳島医学会, 2003年2月2日, 徳島

梅野真由美, 藤澤朋子, 新家利一, 中堀豊, 馬場嘉信, 岩本晃明: Multiplex PCR法を用いたY染色体欠失解析法の検討 Y chromosome deletion analysis with multiplex PCR method. 第13回日本臨床化学会四国支部会・総会, 2003年3月2日, 高知

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

厚生科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

若年男性の生殖機能調査

—川崎地区における若年男性の調査第2回目—

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 野澤資丞利 聖マリアンナ医科大学 助手

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、日本人若年男性（男子大学生）の生殖機能調査を実施した。本調査は1999年5月～2000年5月に川崎市でおこなわれた同じ若年男性の調査の第2回目にあたる。平成14年4月から調査を開始し、平成15年3月までに279名の男子大学生が参加した。これまでの参加者の平均年齢は20.3歳、各精液パラメータの平均値は、精液量：2.7ml、精子濃度：67.5×10⁶/ml、総精子数173.4×10⁶、運動率：60.4%であった。また、精液所見、内分泌ホルモン値などの変動（個人差、個人内変動、季節変動）を検討する目的で、上記調査の参加者から毎月（12回/年）精液検査とホルモン検査のための採血および採尿をを実施するグループを募集し、趣旨に賛同した48名を対象に平成15年1月から検査を開始した。

A. 研究目的

国際共同研究の一環として若年男性を対象とした男性生殖機能に関する疫学調査を実施し、男性生殖機能の現状ならびに内分泌かく乱化学物質との関連を検討する。本調査は1999年5月～2000年5月に川崎市でおこなわれた同じ若年男性の調査の第2回目にあたり、継続的に調査

を実施することによって、懸念されている精子数の減少に代表される男性生殖機能の低下の有無について検証することを目的とする。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。

B. 研究方法

聖マリアンナ医科大学泌尿器科を拠点として、川崎地区の大学生を対象とした一般若年男性の生殖機能調査を国際共同研究のプロトコールに従って実施した。川崎市の3か所の大学に調査参加者募集のポスターを掲示し、さらにパンフレットを配布した。調査の趣旨に同意して参加した男性に対しては生活習慣等に関する質問票の記入、精液検査、生殖器の診察を含む理学的検査および各種内分泌ホルモン測定のための採血が実施された。さらに、精液所見および内分泌ホルモン値などの変動（個人差、個人内変動、季節変動）を検討する目的で、上記調査の参加者から毎月（1年間で12回）精液検査とホルモン検査のための採血および採尿をを実施するグループを募集し、平成15年1月より検査を開始した。

C. 研究結果

平成15年3月31日までに、パンフレット配布数1850件に対して279名の男子大学生が調査に参加した（参加率15.1%）。参加者の年齢（平均±SD）は20.3±1.5歳であった。現時点での理学的所見と精液所見

の集計結果を表1と表2にそれぞれ示す。精巣容量は左が21.0±4.3ml、右が21.6±4.3ml、平均の禁欲期間は79.2±33.4時間であった。各精液パラメータの平均値±SDは、精液量: 2.7±1.3 ml、精子濃度: 67.5±59.9×10⁶/ml、総精子数: 137.4±213.0×10⁶、精子運動率(A+B): 60.3±14.1%であった。精液所見がWHO基準を下回る例は、精液量(<2ml)で24.5%、精子濃度(<20×10⁶/ml)で16.3%、精子運動率(<50%)で12.6%含まれていた。無精子症と精子無力症の症例は認められなかった。精索静脈瘤の頻度はGrade1が左16.5%、右1.7%、Grade2が左8.6%、右0.4%、Grade3が3.2%、右0%であった。本調査は平成15年5月に終了予定である。1年間に12回検査を行う調査では、事前に説明会を開き、調査の趣旨を説明し、趣旨に賛同した48名を対象に平成15年1月から検査を開始した。平成15年3月までに48名がそれぞれ3回の検査を受けた。

D. 考察

本研究はデンマークとフィンランドで実施されている国際共同研究「若年男性の生殖機能調査」の一環として実施された。デンマークおよびフィンランドでは一般

若年男性集団として、徴兵前の健康診断を受診する男性から参加者を募集しているが、日本では同様の集団を得ることができないので、調査同様に川崎市の大学に通

う大学生を対象に募集した。対象となった川崎市の3つの大学は前回の調査の時と変わっていない。平成11-12年に実施した第1回の若年男性(平均年齢20.3歳)における精液所見は、精液量: 2.8 ± 1.3 ml、精子濃度: $72.0 \pm 62.0 \times 10^6$ /ml、総精子数: $194.5 \pm 181.8 \times 10^6$ 、精子運動率(A+B): 58.4 ± 14.6 %で、現時点においては大きく変化しているようには見えない。調査終了を待って、2回の調査におけるデータの比較を行う計画である。また、今年度中に全国4地域(札幌、大阪、金沢、長崎)で若年男性の調査が始まっているが、それらの終了後には日本国内における若年男性の生殖機能の、地域差の検討を行う予定である。

血清中の各種内分泌ホルモンの測定については現在、コペンハーゲン大学において進行中である。その結果を待って、今後は精液所見の変動とホルモン値との関連等を検討する予定である。

E. 結論

川崎地区の大学生を対象とした男性生殖機能調査のデータ279例の途中経過として、調査に参加した男性の理学的所見、精液所見(精液量、精子濃度、総精子数、精子運動率

等)のデータを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

篠原厚子、千葉百子、馬場克幸、野澤資亜利、稲葉 裕、岩本晃明：妊孕能を有する日本人男性の精漿および血清中の微量元素. *Biomedical Research on Trace Elements* 13, 214-215, 2002.

野澤資亜利、馬場克幸、岩本晃明：内分泌かく乱化学物質と男性生殖機能。「環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発」pp.39-43, シーエムシー出版, 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, 74-81, 2002.

Ishijima S, Iwamoto T, Nozawa S, Matsusita K: Motor apparatus in human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Mol Reprod Develop* 63, 459-463, 2002.

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

表 1. 理学的所見

	Mean	SD	Median	Min	Max
身長(cm)	173	5.4	173	160	188
体重(kg)	65	9.2	64	48	120
右精巢(ml)	20.9	4.3	21	12	30
左精巢(ml)	21.6	4.3	22	12	30

表 2. 精液所見

	Mean	SD	Median	Min	Max
禁欲期間 (h)	79.2	33.4	66	37	351
精液量(ml)	2.7	1.3	2.5	0.3	8.2
精子濃度(x10 ⁶ /ml)	67.5	59.9	54.4	1.5	536.0
総精子数(x10 ⁶)	173.4	213.0	133.3	1.3	2786.9
運動率(%)	60.4	14.1	62	10	88

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

若年男性の生殖機能調査

—札幌地区における調査—

分担研究者 塚本泰司 札幌医科大学医学部 教授

研究協力者 伊藤直樹 札幌医科大学医学部 助教授

研究要旨 内分泌攪乱化学物質への暴露による男性生殖機能の低下が懸念されている。本研究では札幌市内の大学生を対象とし、男性生殖機能に関する検査を行い、全国4施設と比較検討することを目的とした。今年度は札幌市内の男子大学生38名を対象に、健康にや生活習慣等に関する質問票、理学的検査（外性器診察）、血液検査、精液検査を行った。参加者の年齢は18～24歳、平均21.2歳であった。精子数は $9.2\sim 262.5\times 10^6/\text{ml}$ 、平均 $94.5\pm 60.5\times 10^6/\text{ml}$ であった。無精子症は認めず、精子数 $20\times 10^6/\text{ml}$ 未満の乏精子症は3例（7.9%）に認められた。精子運動率は3～83%、平均 $55\pm 20.5\%$ であった。運動率50%未満の精子無力症は9例（26.3%）に認められた。今回の結果と過去3回札幌市で行った研究とを比較すると、平均精子数は18～36歳の一般成人男性よりは若干高く、妊孕能を有する妊婦パートナーよりは若干低い結果であった。また、乏精子症の割合は他の2研究とほぼ同様であった。以上の結果から、札幌市において大学生年代男性の明らかな生殖機能低下の徴候は認められなかった。しかし、十分な統計学的分析を行うには検討症例数が38例と少なく、平成15年度も研究を継続する必要があると考えられた。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質は生体内に取り込まれると内分泌器官受容体と結合し、刺激あるいは抑制的に作用するものである。その中でも女性ホルモン作用を有するものがあり、魚介類のメス化などが現実になっている。ヒトでも停留精巣・尿道下裂。

精巣腫瘍・不妊症が増加しているとする報告、それらと内分泌攪乱化学物質との関連性を示唆する報告があり社会的問題となっている。

男性生殖機能の指標としての精子数に関して、1990年代初めより世界各地において精子数減少が報告され始めたが、一方

で精子数不変という報告もあり、一定の結論は出ていない。本来 population-based study, community-based study などの疫学的調査が行われるべきであるが、精液検査という特殊な検査を必要とするために難しく、報告により検討対象や方法が様々で比較が難しい問題がある。

我々は札幌市において平成 10 年に成人男子 500 名弱のボランティアに対して大規模な精液検査を行い、約 20 年前の研究結果と比較検討し、精子数に変動は認められないという結論を得た。しかし、国内での地域差はないのかという疑問は解決されていない。

そこで妊婦パートナーという一定集団を対象にし、精液検査法も統一した全国規模の研究が組織され、札幌市においても行った結果、全国 5 ヶ所の精子数の違いは認められなかった。今回は、対象を大学生とし、同様の研究を全国 5 ヶ所（札幌、川崎、金沢、大阪、長崎）で行った。その札幌市での結果を報告する。

B. 研究方法

1. 対象

札幌市内の 2 大学（北海道大学、札幌医科大学）に本研究の参加を呼びかけるパンフレットを置き研究参加者を募集した。参加資格は 18～24 歳の大学生、本人とその母親が日本で生まれていることである。

（倫理面への配慮）

参加希望者には研究目的、研究方法、プライバシーの保持等に関し文書による説

明を行い、文書による同意を取得した後検査を行った。なお、本研究は札幌医科大学倫理委員会の承認を得た上で行なわれた。

2. 質問票

参加者に生活環境・労働環境・既往歴等に関する質問紙の記入をお願いした。

3. 採血

血清各種ホルモン値、内分泌攪乱化学物質等の測定を目的として 40ml の採血を行った。

4. 理学的所見

外性器発育の程度を評価するため、陰毛発育の程度、精巣容積とその位置、精巣腫瘍の有無、精管の有無、精索静脈瘤の有無などを視・触診にて診察した。

5. 精液検査

48 時間以上の禁欲期間の後にマスターベーションにより精液を採取した。本研究での統一した検査方法に従い、精液量、精子濃度、精子運動率を測定した。精液検査は毎回 2 名により検査し、定期的に未知のサンプルを用いた精度管理を行った。

C. 研究結果

平成 15 年 2～3 月に 38 名に対して検査を行った。参加者の年齢は 18～24 歳、平均 21.2 歳であった。

1. 精液検査所見

表 1 に精液検査所見を示した。精液量は 0.5～5.1ml、平均 2.7 ± 0.9 ml、精子数は $9.2 \sim 263 \times 10^6$ /ml、平均 $94.5 \pm 60.5 \times 10^6$ /ml、精子運動率は 3～83%、平均 $55 \pm$

20.5%であった。なお、無精子症は1例も認めず、精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満の乏精子症は3例(7.9%)に認められた。精子運動率が50%未満の精子無力症は9例(26.3%)に認められた。

表1 精液所見

	Mean	SD	Min	Max
精液量(ml)	2.7	0.9	0.5	5.1
精子数 ($\times 10^6/\text{ml}$)	94.5	60.5	9.2	263
運動率(%)	55	20.5	3	83

2. 理学的所見

身長、体重、両側精巣容積を表2に示した。最小精巣容積は両側13mlであり、本例の精子数は $62.3 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は67%と正常であった。一方、乏精子症3例の精巣容積は22-24ml、19-19ml、24-24ml(左-右)といずれも正常であった。精索静脈瘤は1例(2.6%)で左側にgrade 1を認め、本例の精巣容積は22-22ml、精子数は $246.1 \times 10^6/\text{ml}$ と正常であった。

表2 理学所見

	Mean	SD	Min	Max
身長(cm)	174	5.4	162	184
体重(kg)	66	7.7	52	85
右精巣(ml)	19.9	3.1	13	26
左精巣(ml)	20.0	3.0	13	26

D. 考察

Carlsenらの過去50年間に精子数は半減したとする衝撃的な報告以来、各国で精子数の変化に関する多くの報告がなされた。その結果、精子数が減少しているのか不変であるのか一定の結論は得られていない

のが現状である。と同時に、精子数研究における多くの問題点が明らかとされてきた。対象サンプルの selection bias の問題、精子数検査の方法と精度管理の問題は重大であり、同地域での年次変化、地域間差の比較を行うためには多くの条件を統一した prospective study が必要であることが明らかとなってきた。本研究は検討対象を大学生に統一し、募集方法から検査方法全てにわたり全国5施設で同じマニュアルに従ったものである。さらに欧米を中心にした研究方法にも準じているため国際比較も可能となっている。現在38例の検討結果しか得られていないため、他地域との比較は難しいが、現在も順調に検査は継続されており、最終的には300例に検査を施行する予定である。

札幌市においては過去に何度か大規模な精液検査研究が行われている。1回目は1975~1980年にかけて自衛官254名を対象に行われたもの、2回目は1998年に一般成人男性457名を対象に行われたものである。この2回の研究は我々の施設が単独で行ったものである。対象症例は1回目が自衛官、2回目が一般成人ボランティアであり、対象集団は一致していないこと、精子数のカウント方法は基本的には同じであるが、精度管理などは行われていないことなどの問題点はあるものの、これら2回の研究結果の比較で平均精子数の差は認められず、20年間の精子数変化は観測し得なかったと結論した。

前述したように精子数研究には解決し

にくい多くの問題が内在するわけであるが、可能な限り条件を統一し、横断的かつ縦断的研究に耐えうる研究を行う目的で妊婦のパートナーを対象とした研究が行われた。これは全国5施設が参加し、対象を統一した上で、決められたプロトコルに従い検査を行うもので、精子数計測に関する精度管理も行われた。本研究は対象を大学生とし、妊婦パートナー研究とほぼ同様のプロトコルに従い行われたものである。

表3は精子数に関して過去3回の我々の施設で行われた研究結果と今回の結果を比較したものである。もちろん対象集団の違い、研究方法の違いから単純に比較することは危険ではあるが、妊孕能を有する集団である妊婦パートナー群が平均精子数は最も高く、次いで今回の大学生が高い結果であった。

表3 各研究での精子数 ($\times 10^6/\text{ml}$)

	検討数	Mean	SD
1975-1980年	254	70.9	47.3
1998年	457	79.6	49.3
妊婦パートナー	206	110.0	47.3
大学生	38	94.5	60.5

今回の大学生の結果は過去2回の妊孕性を考慮しない研究での結果より精子数が高い可能性があるが、検討症例数が少なく、結論を出すのは難しい。平成15年度も研究を継続し、300例に対する検査を施行し、最終報告としたいが、少なくとも現

代の若者の生殖能力が低下している可能性は低いことが推測された。

E. 結論

全国5施設で行っている大学生を対象とした男性生殖機能調査の札幌市における結果を集計分析し報告した。その結果、平均精子数は $94.5 \pm 60.5 \times 10^6/\text{ml}$ と過去に札幌市で行った研究結果と比較して減少している傾向は認められなかった。しかし、検討対象数が38例と少なく最終的な結論を出すのは難しく、平成15年度も引き続き研究を継続し、最終的に300例を対象とした検討を行い報告する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

伊藤直樹、笹尾拓己、塚本泰司、岩本晃明：札幌市における妊婦パートナーを対象とした生殖機能の研究：一般対象との比較検討。第47回日本不妊学会学術講演会、2002年、岐阜

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）

分担研究報告書

若年男性の生殖機能調査

—大阪地区における調査—

分担研究者 奥山 明彦 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究協力者 松宮 清美 大阪大学大学院医学系研究科講師

研究要旨 内分泌かく乱物質が男性生殖機能に影響するとされているが、ヒトに関しては結論を得ていない。しかしながら、その解析のために必要な一般的な日本人若年男性の生殖機能は今までほとんど報告がなく、本研究で明らかにしようとするものである。一般的な日本人若年男性の生殖機能について詳細に解析しその健康状態を明らかにする目的で、国際調査の一環として共通のプロトコールで日本人若年男性として男子大学生を対象とした生殖機能調査を施行した。

A. 研究目的

本研究では一般的な日本人若年男性として、男子大学生の生殖機能について精液所見、理学的所見、血中ホルモン濃度、ライフスタイルや健康にかかわる情報を分析し、現在における一般的な日本人若年男性の生殖機能のデータベースを作成することである。さらに、すでに同様の調査が行われているデンマーク、スコットランド、フランス、フィンランドなどのヨーロッパ諸国のデータと比較して相違が存在するか、その原因は何かを明らかにしたい。

B. 研究方法

コーディネーターと検査担当技師を川崎本部に派遣し、統一マニュアルについて

訓練を施行した。調査の対象は大学生であり、募集目標は300例であることから、対象者を大阪大学内で募集することとした。参加者の募集方法は、大学本部の承認の下で大阪大学学内にポスターを掲示、事務局で予約管理を行った。条件としては、1. 男性パートナーが18-24歳、2. 大学生であること、3. 対象者とその母親が日本で出生したことである。対象者は質問表のほかに、泌尿器科診察、精液検査、採血を行う。精液検査は共通した手順にて当施設で行い、質問表、精液、血液サンプルはフランスとデンマークで一括解析を行う。また、主任研究者施設の指導のもとに定期的に精液検査の精度管理を施行した。

（倫理面への配慮）

実際の調査に先立って、大阪大学倫理委員会に本調査についての審査を申請し、承認を得た。

被験者のプライバシー確保に関する対策

アンケート原本と検体には個人名を記載せず通し番号で識別する。同意書には住所氏名のみを記載し個人を同定できるが、これだけをSD)歳、精巣容積は左 21.9±4.6ml、右 22.3ml、精液量 3.04±1.50ml、精子濃度が 80.5±62.8x10⁶/ml、精子運動率(A+B) 58.8%であった。

データベースにアクセスするためにはキー

ワードを設定し、分担研究者以外は閲覧できない。

ようにする。

研究結果の被験者への告知について

個人的情報のうち精液検査所見については、結果の解析に当たって決定的に重要で希望される場合のみ本人に郵送で結果を知らせることは明らかである。平成 14 年度の調査結果については参加者全員に前半に精度管理と対象者の公募方法の策知らせることは困難であり、厚生労働省の研究定に十分な準備を行い、共通のプロトコル班報告書あるいは発表予定学会等の案内を行って参加者を募った。パンフレット配

布枚数に対する参加率は約 10%であり、参加者募集については機能しているものとして

(保管、廃棄方法、目的外使用を行う場合はその任研究者施設の指導のもとに定期的に施

の範囲) 行されており問題なく調査を進行してき

生体材料は血清・尿・精漿は調査終了まで大阪大学医学部泌尿器科学教室に凍結保存する。

調査終了後にデンマークに送り、内分泌かく乱

物質とホルモン値を一括測定した後、余剰は廃棄する。目的外使用は行わない。

C. 研究結果

大阪地区において日本人若年男性の生殖機能疫学的調査を開始し、本年度中に

140例の調査を終了した。調査は水曜2例、土曜5例の週7例を目標とし、平成14年9月28日より調査を開始した。平成15年3月末日までにパンフレット配布枚数は

140例の調査を終了した。調査は水曜2例、土曜5例の週7例を目標とし、平成14年9月28日より調査を開始した。平成15年3月末日までにパンフレット配布枚数は

140例の調査を終了した。調査は水曜2例、土曜5例の週7例を目標とし、平成14年9月28日より調査を開始した。平成15年3月末日までにパンフレット配布枚数は

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

このような調査に当たっては、1. 対象者の選び方、2. 精液検査結果の精度管理

F. 健康危険情報

認めない。