

G. 研究発表

1) 論文発表

なし

2) 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

—金沢(北陸)地区における調査—

分担研究者 並木幹夫 金沢大学医学部泌尿器科教授

研究協力者 高 栄哲 金沢大学医学部泌尿器科講師

研究要旨 北陸地区の3大学の大学生を対象に精液採取を行う。その精液パラメータおよび生活歴・生殖機能調査表を分析することによって、環境における内分泌かく乱物質に対する影響について検証する。

A. 研究目的

近年ヒト精子の減少や質の低下を指摘する報告が話題となり、環境中の内分泌かく乱物質等の影響が原因として懸念されている。この問題の解決へ向け、本研究では一般成人男性（本研究では大学生）を対象とした生殖機能調査を実施し、健康な日本人男性の精液所見ならびに精液に関与する様々な因子について詳細に解析し、現在の日本人男性の生殖機能について総合的に検討する。分担研究者らは主に北陸地区における大学生を対象に、標準的な方法による精液検査および調査表による生活歴・生殖機能調査を行った。

B. 研究方法

北陸地区の3大学(金沢大学、北陸大学、星陵大学)に研究の主旨を説明し協力を得

た。各施設に参加呼びかけのポスターおよび番号付けした参加依頼のパンフレットを設置した。主任研究者施設の指導を受けたコーディネーターにより、ほぼ同一のプロトコルに準じた疫学的サンプルを収集した。さらに、精液検査も主任研究者施設と全く同一のプロトコルで行い、精液測定の一均化を図った。

精液測定は参加者の同意を文章で得た後、本学内において採取した。精子の運動率および濃度は標準化した方法によりただちに測定した。精液検査のほかに、生活歴・生殖機能質問表、泌尿器科的診察および採血も同時に行った。なお、質問表は全施設同一のものを用いた。

本研究に対して、本学医学部等医の倫理委員会（平成14年4月5日開催）で審査され承認された。（平成14年受付番号208）

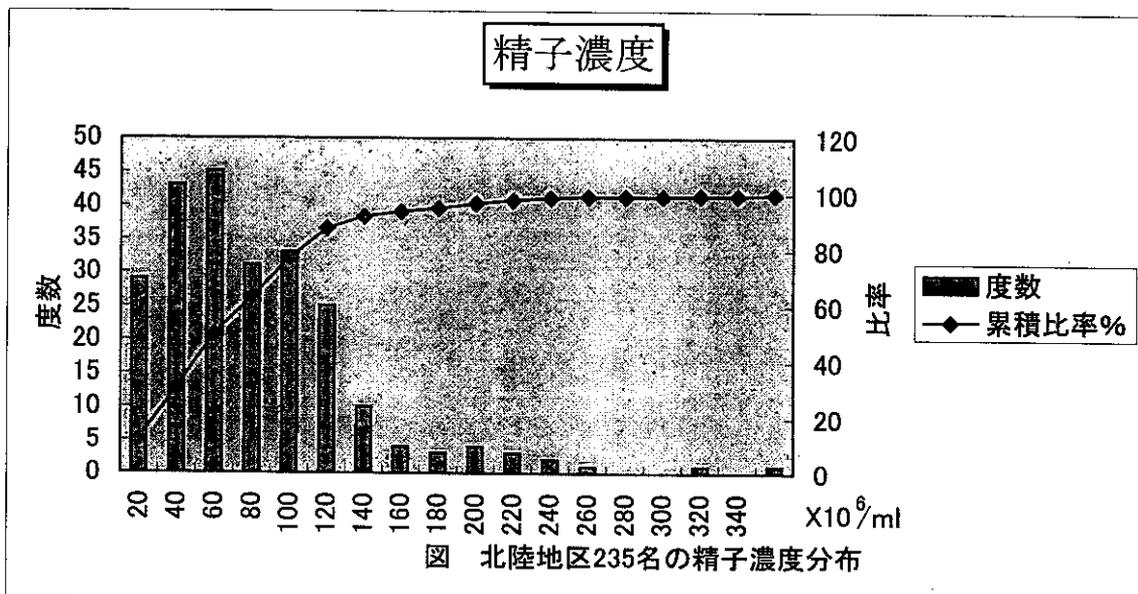
C. 研究結果

本研究の中間報告を行う。平成 14 年 7 月 1 日から平成 15 年 3 月末日までの結果を示す。研究参加呼びかけパンフレット 2,400 部を 3 大学に設置した。この内 1,052 部が参加候補者の手に渡ったと考えられる。実際に参加されたのは 235 名 (22.3%) であった。

参加者の理学的所見を示す。対象者 235 名 年齢 18~24 歳 (21.5 ± 1.5 歳), 身長 154 ~188 cm (172.7 ± 6.0 cm), 体重 45 ~98 kg (64.1 ± 7.9 kg) 精巣容量 左 10 ~31 ml (21.2 ± 4.5 ml), 右 11 ~30 ml (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。Grade 1 は左 7.6%, 右 1.7%, Grade 2 は左 9.4%, 右 2.1%, Grade 3 は左 3.8%, 右 0% であった。また、陰嚢水腫は左 0.9%, 右 0% で

あった。なお、精巣腫瘍や精管欠損などは認めなかった。

精液所見を示す。精子濃度のヒストグラムを図に示した。射出精液容量(ml)は 0.4 ~ 7.4 ml (3.3 ± 1.5 ml)、精子濃度は 0~420.9 $\times 10^6$ /ml (72.1 ± 55.3 中央値 60.8 /ml) であった。図で示したように、精子濃度 20×10^6 /ml 以下は 29 人、12.3% と比較的高い頻度を示した。無精子症 1 例を含め、一般に用いられている高度乏精子症の定義である 5×10^6 /ml 以下は 3 症例 (1.3%)、 5×10^6 /ml ~ 10×10^6 /ml は 6 症例 (2.6%) 認めた。さらに、総精子数は 0~1252 $\times 10^6$ ($230 \pm 12.4 \times 10^6$ 中央値 187×10^6) であり、 40×10^6 以下の症例は 21 (8.9%) 認めた。また、運動率(A+B) (%) は 0 ~91 % (55.5 ± 14.9 % 中央値 57 %) であった。



D. 考察

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。特に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。さらに、精液検査において妊孕性に関与する総精子数 40×10^6 以下の症例が 8.9%を認めた。これらの所見が北陸地区の特徴か否かは、他地区との比較や調査票の分析を要する。

E. 結論

北陸地区における、精液所見は妊孕性に関与する総精子数 4 千万以下は 8.9%であった。他地域との比較検討を要する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

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

—長崎地区における調査—

分担研究者 金武 洋 長崎大学大学院大学医歯薬学総合研究科 教授

研究協力者 江口二郎 長崎大学大学院大学医歯薬学総合研究科 助手

研究要旨 最近の研究から過去 50 年間に精液の質（精子数、運動率など）が低下していると言われており、その原因として環境ホルモン（内分泌かく乱化学物質）の影響が考えられている。本邦でも環境ホルモンが生殖機能や健康などに悪影響を及ぼすのではないかとの国民の危機感が高まり、厚生労働省や環境省なども本格的な調査にのり出している。そこで健康な若年男性の生殖機能について精液所見、生殖器所見、血中ホルモン濃度、ライフスタイルや健康に関わる情報を分析しデータベースを作る。本調査はすでにデンマークで行われていて、諸外国、国内の他大学でも行われる共同研究であり、国々で、地域で、(参加時期で被験者を分けて)季節で相違が存在するのかを解析する。さらに国内大学においては、徳島大学公衆衛生学教室で血液から抽出された DNA により Y 染色体ハプロタイプの解析（多型マーカーとして YAP, 47Z, SRY）を行い、双方のデータの関連解析を行う。

A. 研究目的

本研究は、健康な若年男性の集団として 18～24 才の大学生を対象とし、生殖機能について調査・解析しデータベースを作る。そこでみられる個体差の原因として、さらに候補遺伝子の変異解析を行い、その原因

遺伝子を特定することを目的とする。

B. 研究方法

この調査に参加する男性は、ライフスタイルや健康に関わる質問票に回答する他、長崎大学医学部附属病院泌尿器科外来に

て採尿、精液採取、生殖器の診察および約 40 ml の採血を行われる。

1) 質問票

コペンハーゲン大学に送り解析を行う。

2) 精液検査

精液量、精子濃度、運動率についての評価を行う。精子形態はスメア標本を作製し、フィンランドのツルク大学へ送り評価される。

3) 生殖器の診察

精巣容積、精索静脈瘤の有無などを診察の診察を行う。

4) 血液・精漿

①血清 4ml をコペンハーゲン大学へ送り、FSH, LH, inhibin-B, Testosterone, estradiol, sex- hormone-binding-globulin (SHBG) の血中濃度を測定する。

②5ml の血液を DNA 抽出用として徳島大学公衆衛生学教室へ送り、生殖機能に関連する遺伝子の解析に用いる。

③残りの血清・尿・精漿は、現在測定できない生殖機能に関わる因子や内分泌か
く乱化学物質を将来測定するために凍結

保存し、本学倫理委員会の承認後に使用する。

(倫理面への配慮)

個人情報はずべて厳重な秘密扱いとする。個人名はずべてコード番号で表記する

(匿名化) ので名前が特定されることはない。

本試験開始前に試験担当者は試験の目的、方法、被験者の人権保護など必要な事項について被験者に十分説明し、被験者の自由意思による同意を文書で得る。

C. 研究結果

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。

D. 考察

一般若年男性の生殖機能のデータベースができつつある。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。

E. 結論

平成 14 年度九州-長崎地区の若年男性の生殖機能として精液所見、生殖器所見の調査結果を得た。ライフスタイルや健康に関する情報、血中ホルモン濃度、遺伝子の変異解析を行うためのサンプルが得られた。平成 14 年度に 208 名の参加が得られ、最終的に 300 名の参加を予定している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

造精機能に関連したバイオマーカーの検索

分担研究者 岩本 晃明 聖マリアンナ医科大学 教授

研究協力者 吉田 薫 聖マリアンナ医科大学 研究員

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。また、DJ-1 が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、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免疫組織化学的に確認した。さらに、抗 DJ-1 抗体を固相化した ELISA にて妊婦配偶者と不妊外来患者の精漿について DJ-1 濃度を測定し、精子濃度との間に弱い正の相関が見られること、および精漿中 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 ($p < 0.0001$) 低かったことを示した。DJ-1 は、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 に遜色無いマーカーであると考えられる。

A. 研究目的

Ornidazole などの内分泌攪乱物質を経口投与したラット（精子数の減少と不妊）等で発現が減少することが知られている ras 関連癌遺伝子産物 DJ-1 タンパク質について内分泌攪乱物質による精子形成異常に関与するのではないかと考え、造精機能マーカーとしての導入を目的としてヒト精子、精巣及び精漿におけるこのタンパク質の動態と性質を明らかにする。

B. 研究方法

材料：疫学調査で得られて凍結保存されている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。2) ブラン固定または 10%ホルマリン固定した精巣生検材料で、抗 DJ-1 抗体を用いた免疫組織化学によりヒト精巣内での DJ-1 の分布を検討した。また、4%パラホルムアルデヒド固定または冷メタノール固定した精子を用いて同様の検討

を行った。3) 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。

C. 研究結果と考察

1) 抗 DJ-1 抗体(monoclonal:3E8)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。精子からの抽出では 0.1% Triton X-100 でほとんどが可溶化されることがわかった。また、イモビライズドライストリップを用いた 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) ヒト精巣内での分布についてはブアン固定と 10%ホルマリン固定で比較した結果、ブアン固定での染色像は抗原性が変化している疑いを示したので 10%ホルマリン固定で検討することにした。その結果、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、精子細胞に存在した。また、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 の局在について間接蛍光抗体法により検討した。4%パラホルムアルデヒド固定で DJ-1 は精子頭部後半と中片前半に局在しており、冷メタノール固定では尾部にも存在していることが示された。

3) MBL 玉井博士らの協力により、予め抗 DJ-1 抗体を固相化したプレートを用いることで組み換え DJ-1 を測定できるようになった。これを精漿に適用したところ精漿中 DJ-1 を測定できることが明らかになった。精漿は 100 倍希釈で測定可能であり、サンプルは極少量で測定できるため非常に感度の良い系と言える。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したが現在のところこれらに顕著な相関は確認されていないが、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。また、妊婦パートナーについては血漿中の各種ホルモン値を測定し、これらとの相関も検討したが顕著な相関は見られなかった。しかし、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。

D. 結論

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。今後はその作用機序解明が期待される。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。現在のところ精子濃度の測定精度が低く、相関係数が低くなる原因となっていると考えられる。従って、さらに検討が必要ではあるが 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。

1. 論文発表

なし

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

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

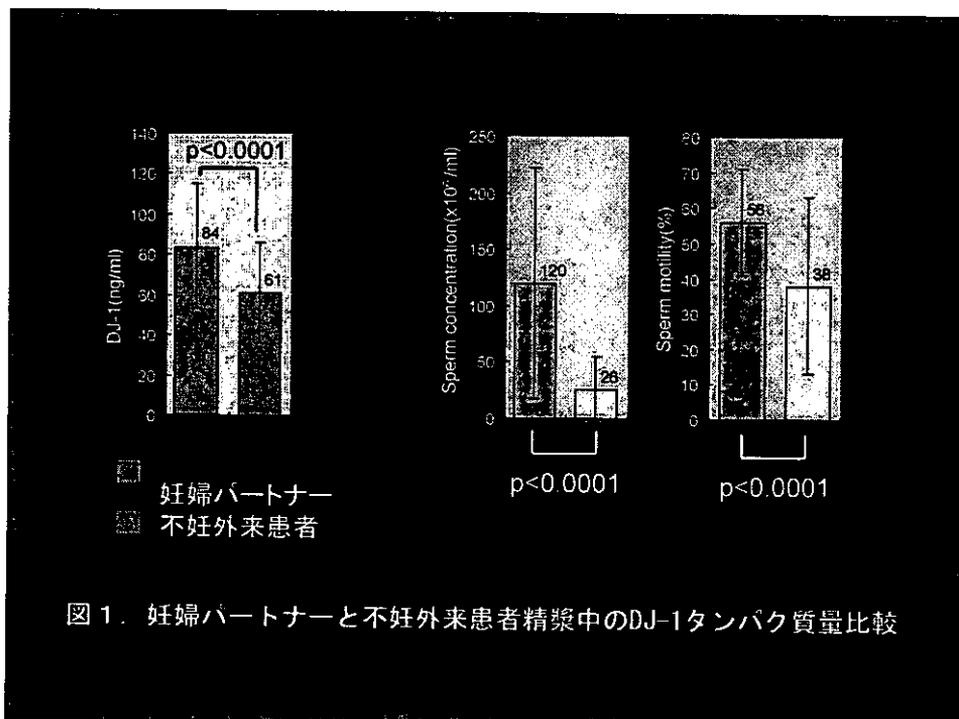
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

E. 研究発表



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 東京歯科大学(市川総合病院) 講師

研究要旨 精液所見測定法を再検討し、標準化を試みた。平成 14 年度は、コンピュータ画像解析装置(CAIA)において reference として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。なお本研究「ヒト精液検査の標準化に向けて」の一環として精液検査標準化ガイドラインの作成が進められ、ワーキンググループによってその原稿がほぼ完成した。

A. 研究目的

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

検討する。

これまで精子形態観察の標準化を試みてきた。前年度は reference として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た。この過程で種々の精子調製法を組み合わせることにより WHO 基準に準拠した楕円形頭部を有する正常形態精子を分離できることが示された。本年度はさらに精製条件を検討し、正常形態精子の分離効率を向上させた。

B. 研究方法

1. 精子の精製

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。精液は 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、さらから、80%等張化 Percoll (密度 1.10g/ml) 5.0ml に層積して 400xg、30 分間沈降速度差遠心分離を行った。さらに沈澱から回収された精子懸濁液を 33%Optidenz (密度 1.183g/ml) 0.5ml に層積して 2500Xg、7 分間沈降平衡遠心分離した。精子懸濁液、33%Optidenz 界面に回収された精子は Hnaks 液で洗浄した。精液、Percoll 沈澱分画、精子懸濁液・33%Optidenz 界面から得られた精子の形態を比較した。

2. 精子染色法

常法に従い、スライドグラスにスメアした後、Diff-Quik 染色法を行い、油浸下 1000 倍で鏡検し、Kruger らの判定基準に従い、楕円形頭部を有し、中片部に細胞小滴を有せず、尾部が伸張したものを正常形態精子と判定した。

3. 先体反応誘起精子の観察

精子懸濁液を孔径 0.2 μ m のフィルターに吸引固定し、10 μ g FITC コンカナバリン A、1.0 μ g PI、20mM HEPES 緩衝化生食、pH7.4 中で 20 分間染色した。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。

(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. 研究結果と考察

射精精液中の精子頭部は多様な形態を示した。透過型電子顕微鏡を用いて観察したヒト精子形態を図 1 にまとめた。種々の所見を有する精液 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。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。原精液に比して Percoll 沈澱分画、精子懸濁液/33%Optidenz 界面分画に回収された精子の正常形態精子比率は各々 3.10 ± 0.66 、 4.90 ± 1.27 倍に向上していた。個々の標本における値の変化を図 2 にまとめた。図 3 は原精液、33%Optidenz 界面分画、同沈澱に回収された精子の透過型電子顕微鏡像を示している。33%Optidenz 界面分画では頭部、尾部とも形態学的に均一性が高かった。一方、同沈澱分画では不均一であり、また頭部空胞変性を有する精子を認めた。

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

±21.3%であったが、33%Optidenz 界面分面に回収された精子では 73.2±24.7%と、2.48±1.66 倍に向上した。図 4 に先体反応誘起および未誘起精子の蛍光染色像を示した。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。

D. 結論

本研究は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観察した全て

の標本において正常形態精子比率の上昇を認めた。この結果は、正常形態精子と奇形精子には流体力学的性状および密度に差異が存在する可能性が示された。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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

＝精液検査標準化ガイドラインワーキンググループ＝

異なる施設間における精液所見データの比較、男性生殖機能の評価・診断および男子不妊症治療成績の比較等に寄与することを目的に、日本泌尿器科学会の承認のもとにワーキンググループを結成し「精液検査標準化ガイドライン」の作成を進めた。平成 14 年度は、ワーキンググループ各委員の執筆によりガイドラインの原稿が完成した（巻末に「資料：精液検査標準化ガイドライン」を掲載した）。平成 15 年 7 月の発刊に向けて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、日本臨床衛星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。

頭部異常

正常頭部

未凝集核

膜様構造

先体崩壊

核質異常



中片異常
尾部異常

ミトコンドリア異常

細胞小滴

細胞膜崩



図1. 透過型電子顕微鏡を用いて観察したヒト精子形態の分類

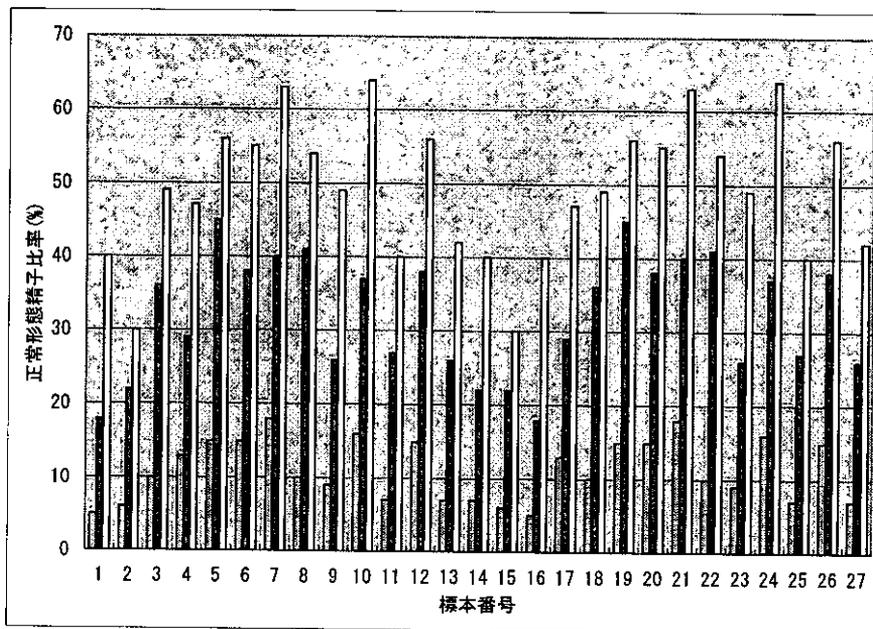


図2. 精子調製による精子正常形態比率の変化
各標本における棒グラフは左から原精液、Percoll 沈澱、33%Optidenz 界面における値を示している。

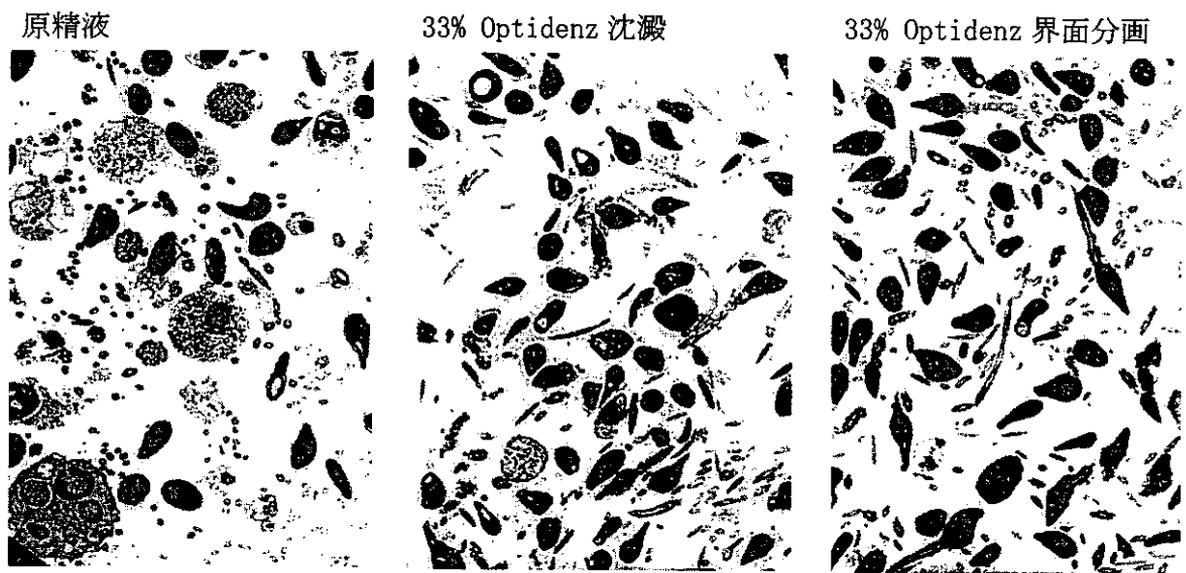


図 3. 原精液、33%Optidenz 界面分画、同沈澱に回収された精子の透過型電子顕微鏡像

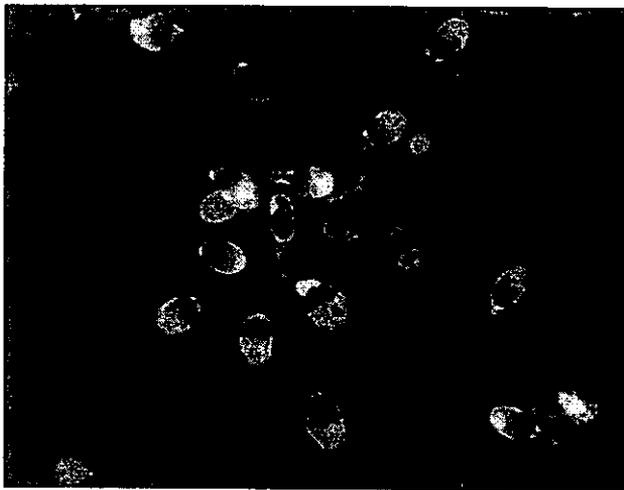


図 4. 先体反応誘起および未誘起精子の蛍光染色像
写真は 33%optidenz 界面から回収された精子を示す

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

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・医学研究科・教授
研究協力者 新家利一 徳島大学・医学研究科・教授

研究要旨 我々の従来の研究によって、Y染色体ハプロ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。本研究では、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。

A. 研究目的

我々は以前の研究において、Y染色体のハプロタイプによって精子形成能が異なる可能性を示した。このことは精子形成能それ自身が遺伝的に異なる、あるいは内分泌攪乱物質等に対する感受性が遺伝的に多様であるために、精子形成能が結果として異なることを示唆していると考えられる。

いずれにしても従来我々の研究より、内分泌攪乱物質が精子形成能に影響を及ぼすならば、個々人のもつY染色体の遺伝的背景を踏まえて評価する必要があると考えられる。

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特性がある。このためヒト進化上で生じたY染色体上のDNAの違いが男性系統ごとの形質の違いとして表れている可能性がある。

このY染色体に関連した形質には精子形成能のみならず、がんやその他の疾患も含まれる可能性がある。

遺伝疫学的な手法による各種疾患や各種表現型との関連解析では、対象とする集団の地域特性の把握が重要である。このため、本研究においても、正確な解析

のためには Y 染色体ハプロタイプ頻度の地域差を念頭に置く必要がある。

今年度の研究においては、疫学的調査によって得られた血液に由来する DNA サンプルを用いて、日本の各地域における各 Y 染色体ハプロタイプ頻度を明らかにし、Y 染色体と精子形成能との関連解析のための基礎データとすることを目的とした。

また Y 染色体の多様性と精子形成能以外の男性泌尿器・生殖器系疾患との関連性を検討する目的で、前立腺がんの発症と Y 染色体上の DNA 多型との関連解析を行った。

B. 研究方法

1) 地域ごとの各 Y 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。近年、国際的な組織である、Y 染色体コンソーシアムが世界的な Y 染色体ハプロタイプ分類を提唱している。国際的な場での発表のためには、この分類と我々が研究している Y 染色体ハプロタイプの整合性を意識して研究を行う必要がある、本研究ではこの国際分類に沿って

解析を行った。

また 367 人の聖マリアンナ医科大学泌尿器科外来を受診した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 (従来のハプロタイプ I, II, III, IV)。

2) 前立腺がんと 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。

なお、本研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 13 年 3 月 29 日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守して行っている。

C. 研究結果

1) 地域ごとの各 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(図1)。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

大学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) 前立腺がんとY染色体DNA多型との関連性解析について

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。 $(P=0.02, 95\% \text{ CI: } 0.75-2.42)$ 。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 $(P=0.002, 95\% \text{ CI: } 0.65-3.71)$ 。

D. 考察

Y染色体は男性にのみ存在するため、

そのハプロタイプ頻度には、集団の社会制度や移動などの歴史的な事情が深く関わっていることが予想される。日本人集団は埴原の提唱している二重構造モデルに沿って考えるなら、少なくとも2種類の異なる集団(いわゆる縄文系と弥生系)が混じり合って成立していると考えられる。またその程度は地域によって異なることが予想される。我々の今回の結果でもY染色体のハプロタイプ頻度は地域によって異なっており、特に福岡地区ではこの傾向が顕著であった。

Y染色体の多様性と精子形成能との関係を解析する上で、地域別のY染色体ハプロタイプ頻度は最も基礎的な情報となる。現

段階で精子濃度の疫学データの確認作業が終了していないため、確認終了後、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予定である。

Y染色体上には細胞増殖あるいはその抑制に関連していると考えられる遺伝子がいくつか存在している。これらが、がんなどの発症に直接関連しているかどうかは明らかでない。今回の我々の研究は前立腺がんとY染色体の多様性との関連を示唆するものであり、ハプロタイプ特異的なsingle nucleotide polymorphisms(SNPs)やゲノム構造の違いが前立腺がん発症に関与しているのかもしれない。

前立腺がん と Y 染色体の関連性についての報告は従来なく、我々の報告が最初である。

ヒトゲノムプロジェクトは塩基配列の決定に関しては一応目標が達成したが、Y 染色体に関しては反復配列が多く、ゲノム構造が複雑であるために、未だ不完全な情報しか得られていない。

今後も Y 染色体の多様性の視点から精子形成能の違いや男性泌尿器・生殖器系疾患との関連性を解析していく。

E. 結論

1. 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。

2. 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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, A. A. Lee, J. W., 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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし