

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業研究事業

日本人男性の生殖機能に関する疫学的調査研究に関する研究

平成13年度～15年度 総括・総合研究報告書

研究代表者 岩本 晃明

平成16（2004）年 5月

目 次

総括・総合研究報告

日本人男性の生殖機能に関する疫学的調査研究に関する研究-----	3
岩本 晃明 (分担研究報告)	
妊孕能を有する男性の生殖機能調査-----	5
岩本 晃明	
若年男性（男子大学生）の生殖機能調査-----	9
岩本 晃明	
造精機能に関連したバイオマーカーの検索-----	14
岩本 晃明	
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-----	17
野澤資亜利	
精子形成マーカーとしての血清中インヒビンBの有用性について-----	23
岩本 晃明	
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-----	28
兼子 智	
大学生を対象とした男性生殖機能調査-----	36
塚本泰司	
内分泌かく乱物質等の生活環境中の化学物質による健康影響-----	41
並木幹夫	
内分泌かく乱物質等の生活環境中の化学物質による健康影響-----	44
奥山 明彦	

平成 13-15 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括・総合研究報告書

日本人男性の生殖機能に関する疫学的調査研究 -若年男性を対象として-

主任研究者 岩本晃明 聖マリアンナ医科大学泌尿器科 教授

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 の採血が行われる。

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。

②5 ml 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7月から平成15年7月までに参加者300名で得られた研究結果として、平均年齢 20.8 ± 1.7 歳、平均身長 171.5 ± 5.2 cm、平均体重 63.5 ± 8.8 kg であった。精巣容積は、左精巣平均 19.3 ± 4.3 ml、右精巣平均 20.0 ± 4.3 ml、精索静脈瘤は、左 22.3%、右 0.7%に認められた。精液所見では、精液量平均 2.9 ± 1.4 ml、精子濃度平均 $76.2 \pm 54.0 \times 10^6$ /ml、運動率平均 65.1 ± 13.8 %であった。また被験者を参加時期で分けて春(3, 4, 5月)、夏(6, 7, 8月)、秋(9, 10, 11月)、冬(12, 1, 2月)の精子濃度平均は各々 76.6 、 80.1 、 75.3 、 73.5×10^6 /ml であり統計学的有意差はなかった。運動率平均は各々 66.8 、 65.4 、 69.7 、 60.1 %であり冬が他のどの季節よりも有意に低かった。

D. 考察

平成14年から15年度における一般若年男性九州-長崎地区の精液所見、生殖器所見のデータベースを作ることができた。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11.3歳若く、精子濃度で約 48.8×10^6 /ml 低く、運動率で約9.1%高かった。

他地区若年男性との比較、その相違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年から15年度における九州-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わる情報、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、さらに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の血清・尿・精漿のサンプルが得られた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他

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
分担研究者	塚本 泰司	札幌医科大学	教授
分担研究者	奥山 明彦	大阪大学医学部	教授
分担研究者	並木 幹夫	金沢大学医学部	教授
分担研究者	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動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、その後に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±179.5×10⁶/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 (20×10⁶/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^(*)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パリに対しても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

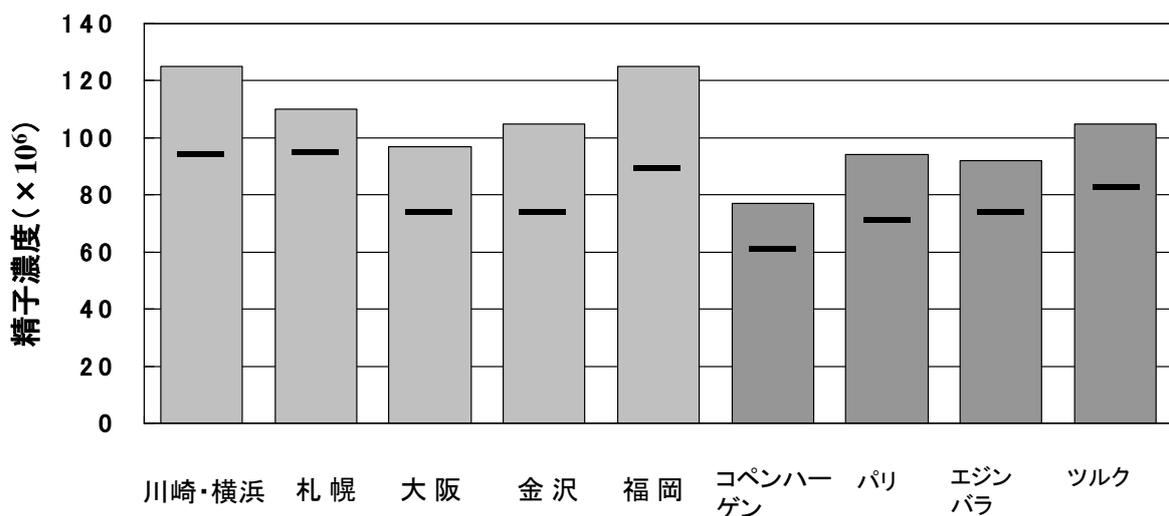


図1. 日本の5都市ならびにヨーロッパ4都市における精子濃度平均値の比較。ただし日本の5都市の精子濃度は生データを示した（最終的な比較には精度管理データに基づく補正が必要）。棒グラフ内の実線は中央値を表す。

平成 13-15 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

若年男性(男子大学生)の生殖機能調査

—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—

主任研究者	岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学	教授
分担研究者	塚本 泰司	札幌医科大学	教授
分担研究者	奥山 明彦	大阪大学医学部	教授
分担研究者	並木 幹夫	金沢大学医学部	教授
分担研究者	金武 洋	長崎大学医学部	教授

研究要旨 男性生殖機能に関する国際共同研究の一環として我々は 1999 年 5 月から 2000 年 5 月まで川崎地区で実施した若年男性(大学生)を対象とした男性生殖機能調査を行ったが、その 2 回目の調査を 2002 年より川崎地区で実施することとなった。さらに、札幌、金沢、大阪、長崎の 4 地区においても若年男性の生殖機能調査を実施することを決定した。今年度は調査の事前検討として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。調査に参加する予定の 5 施設から 2 名ずつの泌尿器科医が 12 名の男子大学生ボランティアに対して 2 日間にわたって理学的検査を行い、精巣サイズの測定値と精巣静脈瘤の診断結果を比較検討したところ、どちらの結果も医師間差・施設間差ともに予想外に大きかったことが判明した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質等の環境因子の影響で精子数の減少をはじめとする男性生殖機能の低下が心配されている。本研究は健康な日本人男性の生殖機能の疫学調査から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し、日本人男性の生殖機能の標準値を把握するための資料とするとともに、疫学調査を継続的に実施することによって各パラメータ

の変動の有無を確認することを目的とする。

今年度は平成 14 年度に開始予定の若年男性(大学生)の調査の準備を行った。本調査は川崎地区においては 2 年間おいての 2 度目の実施であり、また地域差を検討する全国規模の調査としては札幌、金沢、大阪、長崎の 4 地区において初めて実施するものである。地域差の検討は環境因子の地域差ならびにその地域の男性集団の環境因子に対する感受性の

差異を検討するうえで重要な情報となる。しかしながら、異なる施設で実施した検査の結果を比較するには方法の標準化と検査技術の精度管理がなされている必要がある。精液検査に関しては当初から国際共同研究本部（コペンハーゲン大学病院発達生殖部門）および国内の調査本部（聖マリアンナ医科大学泌尿器科）を中心とした精度管理プログラムが施行されているが、理学的検査に関しては共通のプロトコールに従うという条件のみで実地での精度管理はなされていなかった。今回、川崎、札幌、金沢、大阪、長崎の 5 施設において疫学調査を実施し比較検討を行うにあたり、理学的検査結果の精度管理ならびに誤差の検討も重要であると考え、実際に調査に参加して理学的検査を担当する医師が集まって男子学生ボランティアに対して診察を行い、その結果の比較検討を試みた。

B. 研究方法

5 施設から 2 名ずつ計 10 名の医師（経験年数は 5～22 年）が参加した。ボランティアは 12 名の大学生で、第 1 回目の若年男性の調査に参加した中から精巣サイズの大小と精索静脈瘤の有無を考慮して選んだ。精巣サイズは Prader の Orchidometer を使用し、単位を容量 (ml) で示した。参考値として 1 人の技師による超音波診断での精巣容量も求めた。静脈瘤診断では、静脈瘤なし、第 1 度 (Valsalva 負荷にて診断)、第 2 度 (Valsalva 負荷せずに触診にて診断可能)、第 3 度 (視診のみで診断可能) に分類した。診察は 2 日間にわた

って行った。1 日目、2 日目ともに同じ手順で 10 名の医師が 12 名のボランティア全員を 1 回ずつ診察した。

C. 研究結果

精巣サイズの測定：精巣容量 (ml) の平均値 +SD (最低-最高) は、1 日目の右側が 20.7 ± 4.9 (12-30)、左側が 19.0 ± 5.4 (8-38)、2 日目の右側が 20.8 ± 4.9 (10-30)、左側が 19.3 ± 5.3 (8-30) であった。ボランティア 12 名の左右の精巣サイズを 10 名の医師が測定した時の測定値の分布幅は、小さくても 5ml、大きいもので 10ml 以上であった。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 (表 1)。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。(表 2)。超音波診断との比較では触診の方が高めに測定される傾向にあった。

精索静脈瘤の診断：表 3 に医師ごとの診断結果を示す。12 名の医師が 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。ボランティアごとに診断結果を見てみると、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。同一医師による 2 日間の一貫率は 73%であった。

D. 考察

精巣サイズの測定結果では医師間・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。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。視診で判定可能とされる第 3 度の診断も、医師によって大きな相違が見られた。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。

E. 結論

調査に参加する 5 施設から 2 名ずつの泌尿器科医が 12 名の男子大学生ボランティアに対して 2 日間にわたって理学的検査を行い、精巣容量の測定値と精巣静脈瘤の診断結果を比較検討したところ、どちらの結果も医師間差・施設間差ともに予想外に大きかったことが判明した。この結果を各施設の各医師にフィードバックし、同一施設内での医師のトレーニングを行ったうえで疫学的調査を開始することとした。

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

表 1. 各医師における 2 回の測定の一貫率

Dr. No	一致精巣数	一致率 (%)
1	1	4
2	12	50
3	6	25
4	9	38
5	2	8
6	14	58
7	6	25
8	5	21
9	16	67
10	12	50

表 2. 同一施設における測定値の医師間差

医師	精索静脈瘤診断数			
	なし	第1度	第2度	第3度
D-1	28	5	6	9
D-2	34	9	3	2
D-3	16	9	12	11
D-4	35	4	7	2
D-5	29	6	7	6
D-6	25	10	10	3
D-7	36	4	5	3
D-8	30	9	6	3
D-9	19	11	16	2
D-10	33	6	3	6

表 3. 各医師の精索静脈瘤診断結果

医師	精索静脈瘤診断数			
	なし	第1度	第2度	第3度
D-1	28	5	6	9
D-2	34	9	3	2
D-3	16	9	12	11
D-4	35	4	7	2
D-5	29	6	7	6
D-6	25	10	10	3
D-7	36	4	5	3
D-8	30	9	6	3
D-9	19	11	16	2
D-10	33	6	3	6

表 4. 各医師の精索静脈瘤診断結果

施設	診断一致数	一致率(%)
A	15	63
B	13	54
C	13	54
D	4	17
E	13	54

造精機能に関連したバイオマーカーの検索

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 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) ブアン固定または 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。

E. 研究発表

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

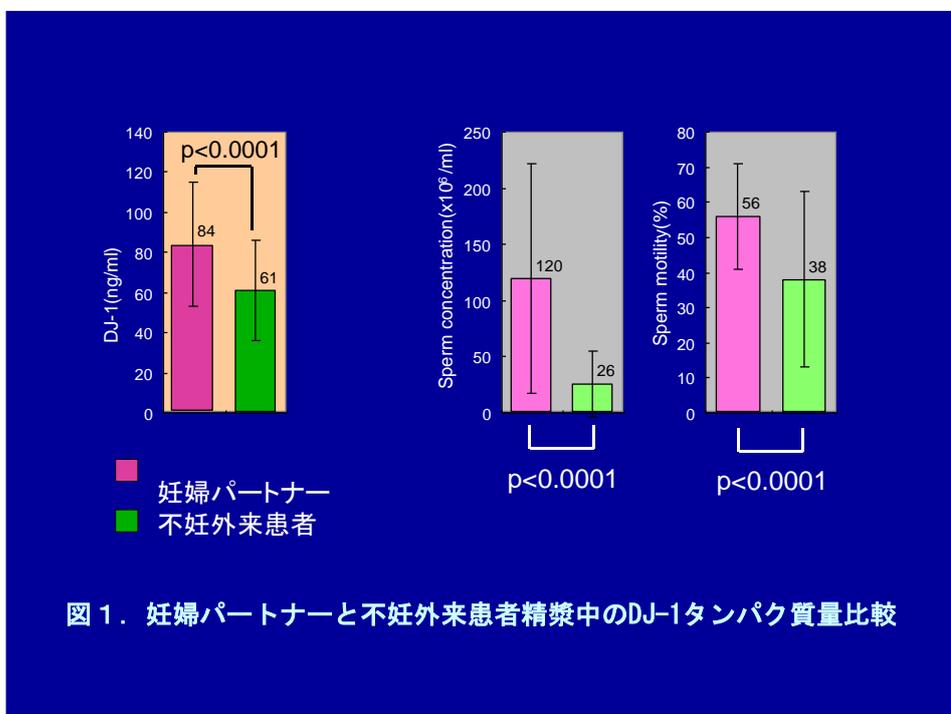


図1. 妊婦パートナーと不妊外来患者精漿中のDJ-1タンパク質量比較

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 μ l、血清200 μ 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>K>Ca>Zn>Mg>Rb>Fe>Se>Cu>Sr、血清ではNa>K>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

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

他

なし

な関連は認められなかった(表5)。

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、野澤資重利、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

表 1. 精漿中の元素濃度

(単位: $\mu\text{g}/\text{m l}$)

Elements	Mean	SD	Min.	Median	Max.
Na	2946	424	1151	2945	6235
K	1141	302	677	1065	2322
Mg	120.2	50.2	23.2	114.6	354
Ca	328	96	123	319	586
P	1161	267	542	1127	2563
Fe	0.461	0.868	ND	0.297	7.563
Cu	0.099	0.085	0.009	0.078	0.622
Zn	188.022	88.967	28.801	166.028	463.848
Se	0.139	0.07	0.031	0.125	0.422
Rb	1.515	0.471	0.695	1.413	3.623
Sr	0.068	0.030	0.005	0.070	0.149

表 2. 血清中の元素濃度

(単位: $\mu\text{g}/\text{m l}$)

Elements	Mean	SD	Min.	Median	Max.
Na	3032	111	2523	3033	3261
K	163	19	134	159	222
Mg	18.9	1.3	16.1	18.8	22.5
Ca	97	5	87	96	107
P	116	12	89	117	146
Fe	1.159	0.380	0.374	1.127	2.146
Cu	0.834	0.167	0.504	0.810	1.437
Zn	0.852	0.169	0.551	0.808	1.334
Se	0.155	0.032	0.083	0.154	0.291
Rb	0.208	0.038	0.137	0.200	0.350
Sr	0.042	0.026	0.014	0.033	0.154