

表 3. 精漿中および血清中の元素濃度の比較

Elements	Mean value (μg/ml)		Ratio※
	Serum	Seminal plasma	
Na	3032	2946	0.97
K	163	1141	7
Mg	18.9	120.2	6.4
Ca	97	328	3.4
P	116	1161	10.0
Fe	1.159	0.461	0.4
Cu	0.834	0.099	0.1
Zn	0.852	188.022	220.7
Se	0.155	0.139	0.9
Rb	0.208	1.515	7.3
Sr	0.042	0.068	1.6

※血漿中の元素濃度／血清中の元素濃度

表 4. 精漿中の元素濃度間の相関および精子パラメータとの相関

	Na									
K		K								
Mg	0.497***	0.725***	Mg							
Ca	0.264*	0.745***	0.843***	Ca						
P	0.352***				P					
Fe						Fe				
Cu		0.260*	0.265*	0.257*		0.536***	Cu			
Zn	0.346***	0.725***	0.898***	0.810***			0.276**	Zn		
Se	0.303**	0.372***	0.391***	0.354***	0.433***		0.210*	0.395***	Se	
Rb		0.855***	0.566***	0.602***			0.279**	0.613***	0.401***	Rb
Sr		0.421***	0.444***	0.549***				0.422***		0.411***
Age	-0.233*				-0.297**		-0.217*		-0.277**	
Abst			0.222*					0.357***		
Interval										
Vol		-0.236*								-0.226*
Motility										
Sperm conc		0.245*	0.307**		0.321**			0.295**	0.428***	
Total count			0.241*		0.218*			0.256*	0.363***	
Total mot count			0.247*		0.247*			0.239*	0.344 ***	

表 5. 血清中の元素濃度間の相関および精子パラメータとの相関

	Na										
K		K									
Mg		0.272**	Mg								
Ca				Ca							
P			0.271**		P						
Fe				0.222*		Fe					
Cu							Cu				
Zn				0.295**		0.357***	0.363***	Zn			
Se								0.496***	Se		
Rb		0.685***	0.252*							Rb	
Sr						0.213*	0.388***			0.286**	Sr
Age	0.303**										
Abst											
Interval							0.207*				
Vol											
Motility											
Sperm conc											
Total count											
Total mot count											

数値は相関係数 ($p < 0.05$)、* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$

太字：相関係数の絶対値 0.4 以上、青太字：相関係数の絶対値 0.7 以上

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

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 野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学 助手

研究要旨 妊孕能の確認された正常男性（妊婦の配偶者：平均 32.3 歳） 324 名と不妊外来を受診した男性患者(平均 34.0 ± 5.0 歳)211 名について、血清中のインヒビン B の濃度と、その他の内分泌ホルモン値ならびに精液所見との関連を解析した。血清中インヒビン B 濃度の平均値は、正常男性の 235.7pg/ml に対して、不妊患者では 108.8pg/ml であった。不妊患者のインヒビン B 濃度を診断別に見ると、クラインフェルター症候群(n=8) : 19.0 ± 34.5 pg/ml、非閉塞性無精子症(n=38) : 36.9 ± 45.8 pg/ml、閉塞性無精子症(n=7) : $136.9 \pm 82.7.8$ pg/ml、乏精子症(n=25) : 99.6 ± 63.7 pg/ml、精索静脈瘤(n=68) : 130.9 ± 62.5 pg/ml となり、精子形成の障害が重度であるほど低い傾向がみられた。両集団ともにインヒビン B 濃度は、精子濃度との間に正の相関が、FSH 濃度との間に負の相関がそれぞれ認められた ($P < 0.001$)。インヒビン B が低下し FSH が上昇している症例は無精子症または高度乏精子症をきたしていた。血清中のインヒビン B 濃度は精巣の精子形成機能と関連したマーカーでとして、男性生殖機能の評価に有用であることが示唆された。

A. 研究目的

精巣の Sertoli cell で産生されるインヒビン B は FSH の主たる調節因子で、それ自身が FSH の調節を受けて負のフィードバックループを形成している。インヒビン B はまた精巣サイズや精子濃度と正の相関を示すことから、精子数よりもより安定で信頼度の高い精子形成マーカーとして期待されている。本研究では、妊孕能の確認された正常男性と不

妊外来を受診した男性患者の 2 つの集団について、血清中のインヒビン B の濃度と、その他の内分泌ホルモン値ならびに精液所見との関連を解析した。

B. 研究方法

正常男性として妊婦の配偶者（1997 年から 1998 年に川崎で実施した妊孕能を有する男性を対象とした生殖機能調査の参加者、平

均 32.3 歳) 324 名、男性不妊患者 (不妊を主として聖マリアンナ医科大学泌尿器科外来を受診した男性、平均 34.0 ± 5.0 歳) 211 名を対象とした。対象者に対しては、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を行った。血清中の FSH、LH 濃度は化学発光免疫測定法で、インヒビン B 濃度はサンドイッチ ELISA 法でそれぞれ測定した。研究の実施にあたっては倫理委員会の承認ならびに対象者の文書による同意を得た。

C. 研究結果

血清中のインヒビン B 濃度の分布を図 1 に示した。正常男性(妊婦配偶者)のインヒビン B 濃度範囲はおよそ 100 pg/ml から 500 pg/ml までで、250pg/ml あたりにピークのある正規分布を示した。一方、不妊症男性は、全体が妊婦配偶者より低い濃度範囲にシフトしており、2 つのピーク (最初が 25-50pg/ml、2 番目が 150pg/ml あたり) のあるパターンを示した。

図 2 は、横軸に精子濃度、縦軸にインヒビン B 濃度を取った散布図で、全対象者のデータがグラフ上に示されている。散布図から、図 1 のヒストグラムで観察された不妊症男性の 2 つのピークのうち、インヒビン B 濃度の低い方のピークが、無精子症と乏精子症の男性で占められていることが分かる。2 番目のピークでは、無精子症と乏精子症以外に、精子濃度が正常範囲にある男性も多く含まれていた。

正常男性と不妊患者の血清中インヒビン B 濃度の平均値 (mean \pm SD) は、それぞれ 235.7 ± 76.6 pg/ml と 108.8 ± 75.1 pg/ml で、後者は前者に対して有意に低かった (表 1)。不妊患者のインヒビン B 濃度を診断別に見ると、クラインフェルター症候群 (n=8) : 19.0 ± 34.5 pg/ml、非閉塞性無精子症 (n=38) : 36.9 ± 45.8 pg/ml、閉塞性無精子症 (n=7) : $136.9 \pm 82.7.8$ pg/ml、乏精子症 (n=25) : 99.6 ± 63.7 pg/ml、精索静脈瘤 (n=68) : 130.9 ± 62.5 pg/ml で、精子形成の障害の度合いが高いほどインヒビン B 濃度が低い傾向がみられた (表 1)。

インヒビン B 濃度は、両集団ともに、精子濃度との間に正の相関が、FSH 濃度との間に負の相関が認められた (図 3、 $P < 0.001$)。FSH 濃度については、不妊患者では精子濃度との間に負の相関が認められたが、正常男性では有意な相関は認められなかった (図 3)。インヒビン B が低下し FSH が上昇している症例は無精子症または高度乏精子症をきたしていた。

D. 考察

血清中のインヒビン B 濃度は、両集団ともに精子濃度との間に有意な相関のあるパラメータであることが示された。特に不妊患者においては精子形成の障害の度合いが高いほど低い傾向がみられた。従来 FSH は精子形成の指標として用いられてきたが、健康な男性集団では、精子濃度との間に相関が認められなかった。一方、インヒビン B は、正常男性においても精子濃度との間に相関が認め

られたことから、内分泌かく乱化学物質などの環境因子の影響をみるための生殖機能マーカーとして有用性が期待できる。

E. 結論

血清中のインヒビンB濃度は精巣の精子形成機能と強く関連したマーカーである。特にFSH濃度と組み合わせて評価することにより、

精子形成不全のより確実な診断が可能になると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G. 知的所有権の取得状況

なし

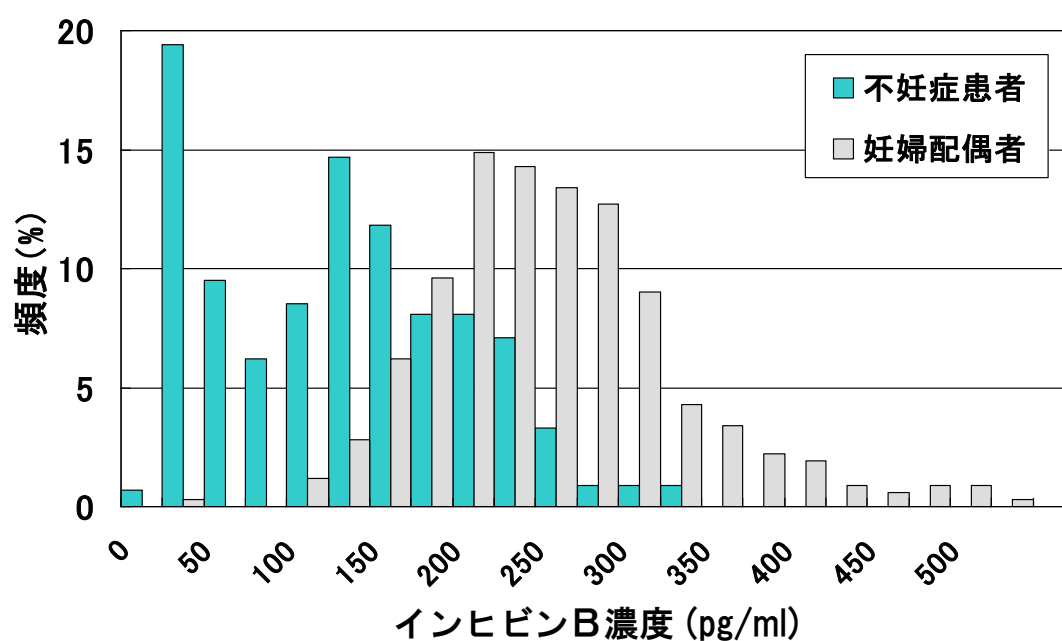


図1. 血清中のインヒビンB濃度分布

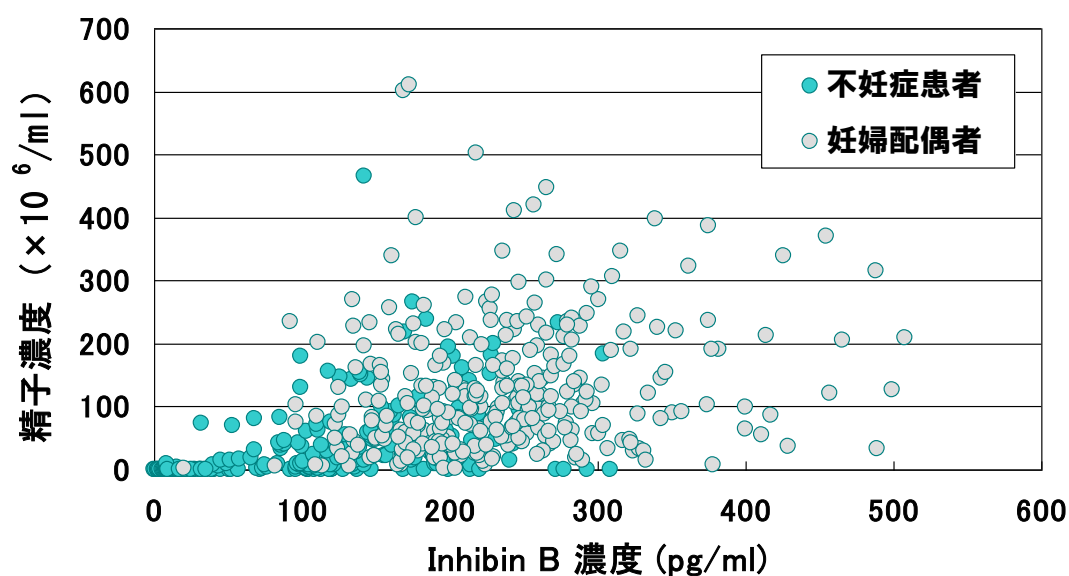


図2．精子濃度とインヒビンB濃度の散布図

表1．正常男性と不妊患者の血清中インヒビンB濃度

男性集団の分類	n	インヒビンB濃度 (mean±SD, 単位:pg/ml)
妊婦の配偶者	324	235.7±76.6
不妊症患者全体	211	108.8±75.1
クラインフェルター症候群	7	7.0± 6.2
非閉塞性無精子症	38	36.9±45.8
閉塞性無精子症	13	178.2±89.7
乏精子症(精子濃度 20×10^6 /ml未 満)	25	99.6±63.7
精索静脈瘤	68	130.9±62.5
精子無力症(運動率50%未満)	15	137.8±41.4

図 3. 相関係数

パラメータ	精子濃度	不妊患者		
Inhibin B	0.586 ***	Inhibin B		
FSH	-0.656 ***	-0.807 ***	FSH	
LH	-0.452 ***	-0.739 ***	0.715 ***	LH
T	0.114	0.172 *	-0.127	-0.071

パラメータ	精子濃度	妊婦配偶者		
Inhibin B	0.301 ***	Inhibin B		
FSH	-0.060	-0.339 ***	FSH	
LH	-0.214 **	-0.159 *	0.057	LH
T	0.051	0.021	-0.127	-0.079

*** $P < 0.001$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$

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

若年男性集団における精子 DNA 断片化と精子パラメータとの関連

分担研究者 兼子 智 東京歯科総合病院 講師

研究協力者 野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学 助手

研究協力者 西田 智保 聖マリアンナ医科大学 大学院生

研究要旨 若年男性のボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度(TUNEL 陽性率)と他の精子パラメータとの関連を統計的に解析した。若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の平均 TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度 20×10^6 または 40×10^6 を基準にした場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差を認めず、前進性運動率 50% または高速前進性運動率 25% を基準に分類した場合では、運動率の低い群で TUNEL 陽性率が有意に高くなることが示された($P=0.0295$)。標準的な精子濃度範囲では精子濃度と精子核 DNA 断片化との間に相関関係はなく、運動性に関しては前進性運動率と高速前進性運動に負の、非運動率に正のいずれも弱い相関 ($|R| < 0.4$) が認められた。本研究では、各種パラメータの検索から男性生殖機能の現状を把握するのに役立つ基礎データを集積することを目的に、その一環として正常男性の精子 DNA 断片化分析を行い、他の精子パラメータとの関連を比較検討した。

A. 研究目的

ヒトの精子の質は不均一で、一回の射精で得られた精液には質的に様々なレベルの精子が混在している。それらの状態は通常、WHO 基準の検査法を用いて主として精子の濃度、運動性、形態によって評価するが、そこから得られる情報には限界があるため、男性の生殖能力を評価できるより信頼性の高い技術が求められている。精液検査で検出できない精子の異常のひとつに精子核 DNA の損傷

がある。この問題は近年の補助生殖医療技術の発達に伴って、ICSI (Intracytoplasmic sperm injection) に供するための正常な精子をどのように選別するかの問題と関連して注目を集めるようになった。ICSI における妊娠率は精子の質と無関係であるという報告があるが、一方では自然状態では卵子が受け入れることのない異常な精子でも機械的に導入してしまう結果、受精に失敗したり、胎児に異常が生じる可能性があることが指

摘されている。そのため、ICSI の普及に伴い、精子核 DNA の健全性の評価に関する研究の重要性が増している。

精子核の DNA 損傷は TUNEL 法によって、DNA 断片化現象として検出することができる。DNA 断片化の程度は、一般の健康な男性や妊孕能を有する男性集団に比べて不妊症の男性集団で高く、精製処理により運動性の良好な精子のみを集めた検体では、精製前より低くなることが知られている。また、精子 DNA 断片化の百分率は精子運動率、精子正常形態率と負の相関を示すとされ、精子濃度については、負の相関を示すという報告と、相関関係を認めないとする報告がある。本研究では、男性生殖機能の新規評価法の確立をめざす研究の一環として、精子 DNA 断片化分析に注目し、若年男性ボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度と他の精子パラメータとの関連を統計的に解析した。これまでに報告されている対象者の多くは大学病院等の不妊外来を受診した男性で、その内訳は男性側因子による不妊患者、精液所見の正常でかつ原因不明の不妊患者、妊孕能の確認された精管結紮手術前の男性などである。健康な男性について検討した例は対照群としての少数例があるだけで、多数例の一般正常男性について精子核の DNA 断片化分析を行ったのは本研究が最初である。

B.研究方法

精液検体：川崎市の大学に通う男子大学生

のボランティア 79 名 (18–24 歳) から精液検体を集めた。精液は、48 時間以上の禁欲期間の後、マスターベーションによって採取した。採取後 1 時間以内に WHO ガイドラインに基づく血球計算盤を用いた目視法により精液検査を行い、精液量、精子濃度および精子運動率を測定した。TUNEL：精子 DNA の断片化は TUNEL 法を用いて検出した。本法では精液を従来のスライドガラス上に塗末する替わりに、直径 $2.0\mu\text{m}$ のメンブランフィルター上に捕捉して用いた。精子はフィルターごと 4% paraformaldehyde 4°C で 30 分間固定した後、0.05% SDS, 1.0% DTT and Proteinase K (0.4 unit/ml) で 37°C 10 分間の前処理を経て、TdT と biotin-dUTP からなる TUNEL 混合液で 60 分間反応させた。更に FITC-avidin を 37°C で 30 分間反応させた。TUNEL と FITC-avidin のラベルには MEBSTAIN Apoptosis kit II を使用した。精子核の後染色には Propidium iodide を用いた。観察は、膜フィルターをスライドガラスにのせ、epi-fluorescent 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) で室温で 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。

C. 研究結果

1. 精液所見

若年男性ボランティアの精液各精子パラメータの平均値±SD は、精液量 3.1 ± 1.2 ml、精子濃度 $76.6 \pm 63.1 \times 10^6/\text{ml}$ 、総精子数 $239.9 \pm 213.4 \times 10^6$ 、精子運動率(a+b) $60.5 \pm 14.1\%$ 、総運動精子数 $138.9 \pm 116.4 \times 10^6$ であった。79 名の精液の質は、60 名(76%)が精子数と運動率について正常（精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、運動率 50%以上）、5 名(6.3%)が乏精子症（精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満）、14 名(17.7%)が精子無力症（運動率 50% 未満）と分類され、乏精子症と精子無力症を併せ持つ症例はみられなかった(表 1)。

2. 精子核 DNA 断片化の検出

若年男性ボランティアの 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%) となった。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% であった(図 1)。

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 陽性率を比較した (図 2)。WHO 基準で定義されている精子濃度の正常限界値 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 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 (図 2-A)。また妊孕能に関連したもう一つの基準として報告されている精子濃度 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 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 (図 2-B)。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(図 2-C、 $P=0.0295$; 2-D、 $P=0.0015$)。

図 3 は、縦軸に TUNEL 陽性率、横軸に精子の運動性に関連したパラメータの数値をとった相関図である。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。また運動率 a+b と a のグラフでは、運動率の高い領域にプロットされた多くの点が TUNEL 陽性率 15%以下のレベルにあったが、運動率の低い領域においては TUNEL 陽性率のレベルは 5%以下から 30%近くまで広範囲に分布していた (図 3-A および 3-B)。また、非運動精子の比率 (d) を横軸にとったグラフでは、TUNEL 陽性率は非運動率の高い領域で低く、非運動率低い領域で広範囲に分布する傾向を示した(図 3-E)。

D. 考察

若年男性ボランティアの精子核における TUNEL 陽性率の範囲は 0.9%から 28.3%の間に分布し、平均値と中央値はそれぞれ 10.1%と 9.4%だった。結果では示していないが、我々が不妊患者の精子検体を用いて行った DNA 断片化分析の予備的検討では、TUNEL 陽性率の平均値、最大値ともに今回の若年ボランティアより有意に高い(平均値 21.6%、 $P<0.001$)ことが示されている。

若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度を基準にした場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差は認められなかったが、運動性を基準に分類した場合では、運動率の低い群の TUNEL 陽性率が有意に高かった (図 2)。また TUNEL 陽性率と運動性精子の比率との間に弱い負の相関 (非運動性精子の比率との間には弱い正の相関) が示され、精子の運動性と DNA 断片化との間に負の相関があるとするこれまでの報告と矛盾しない結果となった (表 1)。TUNEL 陽性率に対して弱い負の相関を示した運動率 $a+b$ と運動率 a の相関図をみると、運動率の高い領域では多くの点が TUNEL 陽性率 15%以下のレベルにあったが、運動率の低い領域においては TUNEL 陽性率のレベルは 5%以下から 30%近くまで広範囲に分布していた (図 3-A および 3-B)。非運動性精子の割合を示す運動率 d は運動率 $a+b$ と強い逆相関 ($R^2>0.9$) を示すパラメータであるが、TUNEL 陽性率との相関においても正反対の傾向を示した (図 5-D)。

このことから我々は、対象とした若年男性集団では精子の運動性と精子核 DNA 断片化との間に弱い負の相関があると結論した。しかしながら、2 次元に展開された相関図のパターンを観察すると、示された相関が有意ではあるがごく弱いという点と考え合わせて、運動性が低い領域においては TUNEL 陽性率の高い集団と低い集団の両方が存在しているという解釈も可能である。若年男性集団における結果は、傾向としては過去の主として男子不妊症例での報告と矛盾しないものの、運動性と TUNEL 陽性率との間の逆相関が非常に弱い点、運動率の高い群と低い群では TUNEL 陽性率の分布に違いが見られた点などが異なっていた。これらのことから病的に精子の質が低下している男性の集団と正常な男性集団とでは TUNEL 法で検出される精子核 DNA 断片化のパターンに差異がある可能性も考えられる。

今回用いた TUNEL 法による精子核 DNA の断片化分析は、個々の男性における精子の質や生殖機能を評価できるほど精度が高くない。不妊症の正確な診断や、ICSI をはじめとする補助生殖技術の適応を判定する手段とするにはさらに詳細な検討がなされなければならない。次の段階としては、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。

E. 結論

若年男性ボランティア 79 名より集めた精液を用いて TUNEL 法による精子 DNA 断片化分析を行い、DNA 断片化の程度 (TUNEL 陽性率) と他の精子パラメータとの関連を統計的に解析した。若年男性集団を精液の質によって 2 群に分類してそれぞれの精子核の平均 TUNEL 陽性率を比較すると、精子濃度 20×10^6 または 40×10^6 を基準にした場合には 2 群間で TUNEL 陽性率に有意差を認めず、前進性運動率 50% または高速前進性運動率 25% を基準に分類した場合では、運動率の低い群で TUNEL 陽性率が有意に高かった。また TUNEL 陽性率に対して前進性運動率と高速前進性運動に負の、非運動率に正のいずれも弱い相関が認められた。

F. 研究発表

論文発表

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.

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. 精液所見

Semen parameters	Mean \pm SD	Median	Range
Semen volume (ml)	3.1 \pm 1.2	2.9	1.3–7.0
Sperm concentration ($\times 10^6$ /ml)	76.6 \pm 63.1	64.0	9.3–447
Total sperm count ($\times 10^6$)	239.9 \pm 213.4	179.4	21.4–98
Motility a+b $\%$ (%)	60.5 \pm 14.1	61	17–89
Motility a $\%$ (%)	45.0 \pm 18.3	48	6–79
Motility b $\%$ (%)	15.5 \pm 11.7	11	2–48
Motility c $\%$ (%)	7.6 \pm 2.4	7	3–15
Motility d $\%$ (%)	31.9 \pm 13.6	31	6–79
Total motile sperm count ($\times 10^6$)	138.9 \pm 116.4	109.5	11.6–63

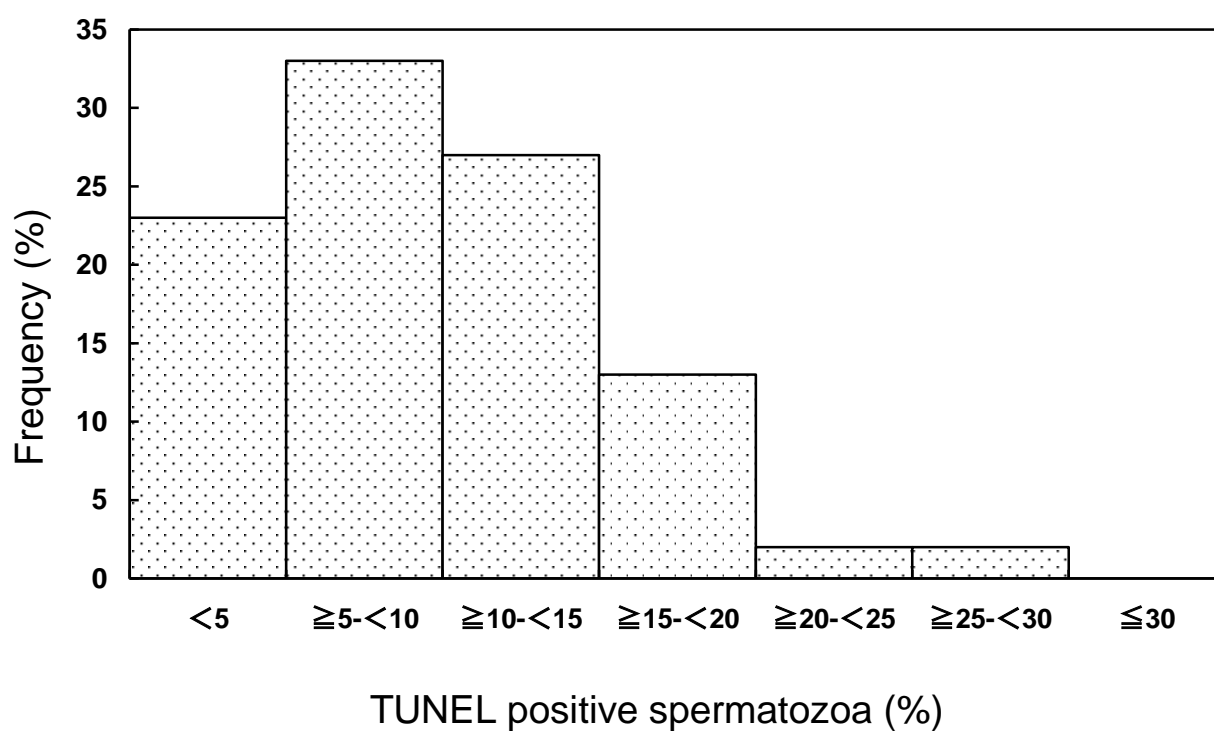


図 1. TUNEL 陽性率の分布

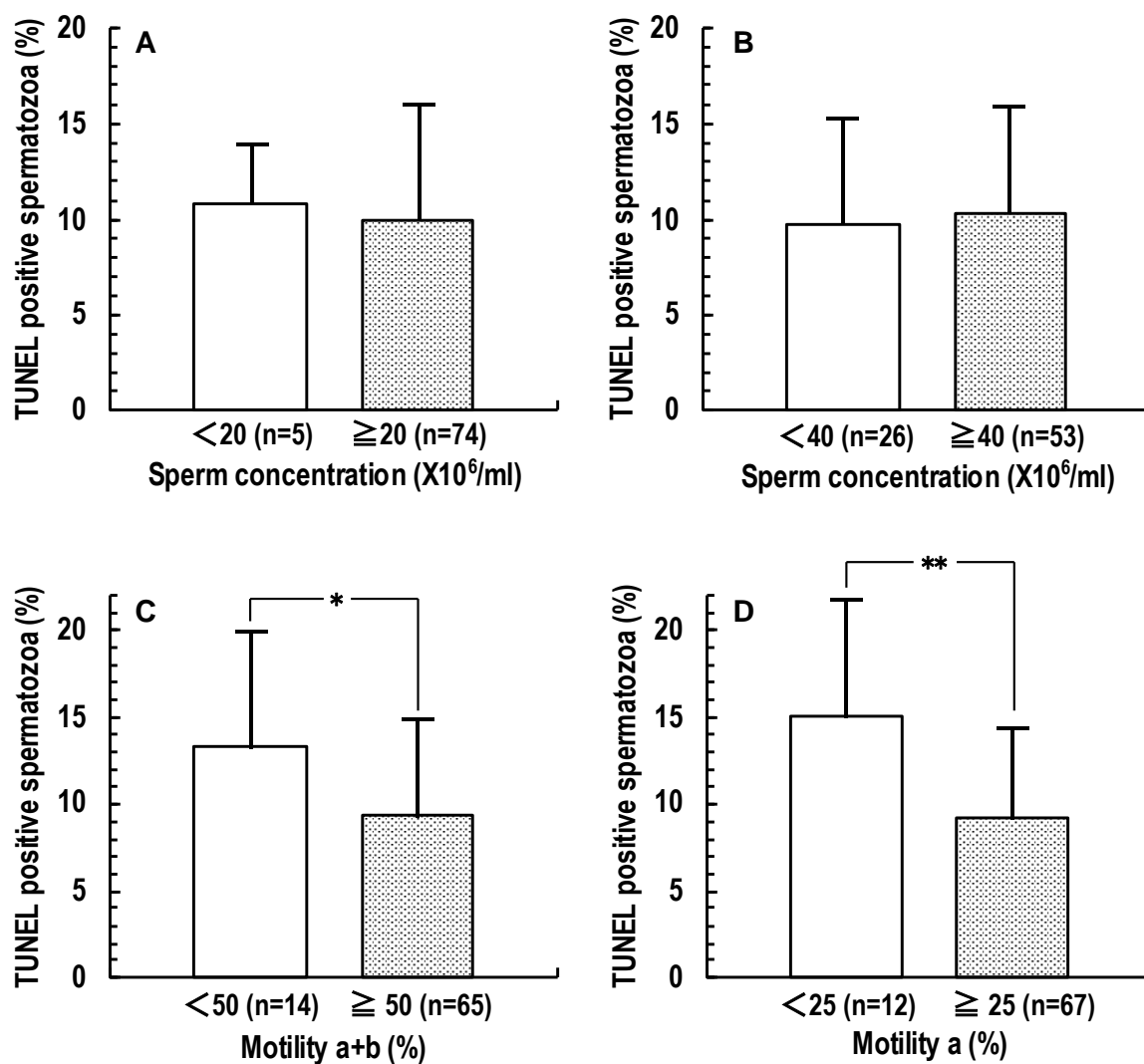


図 2. 精液の質による TUNEL 陽性率の比較

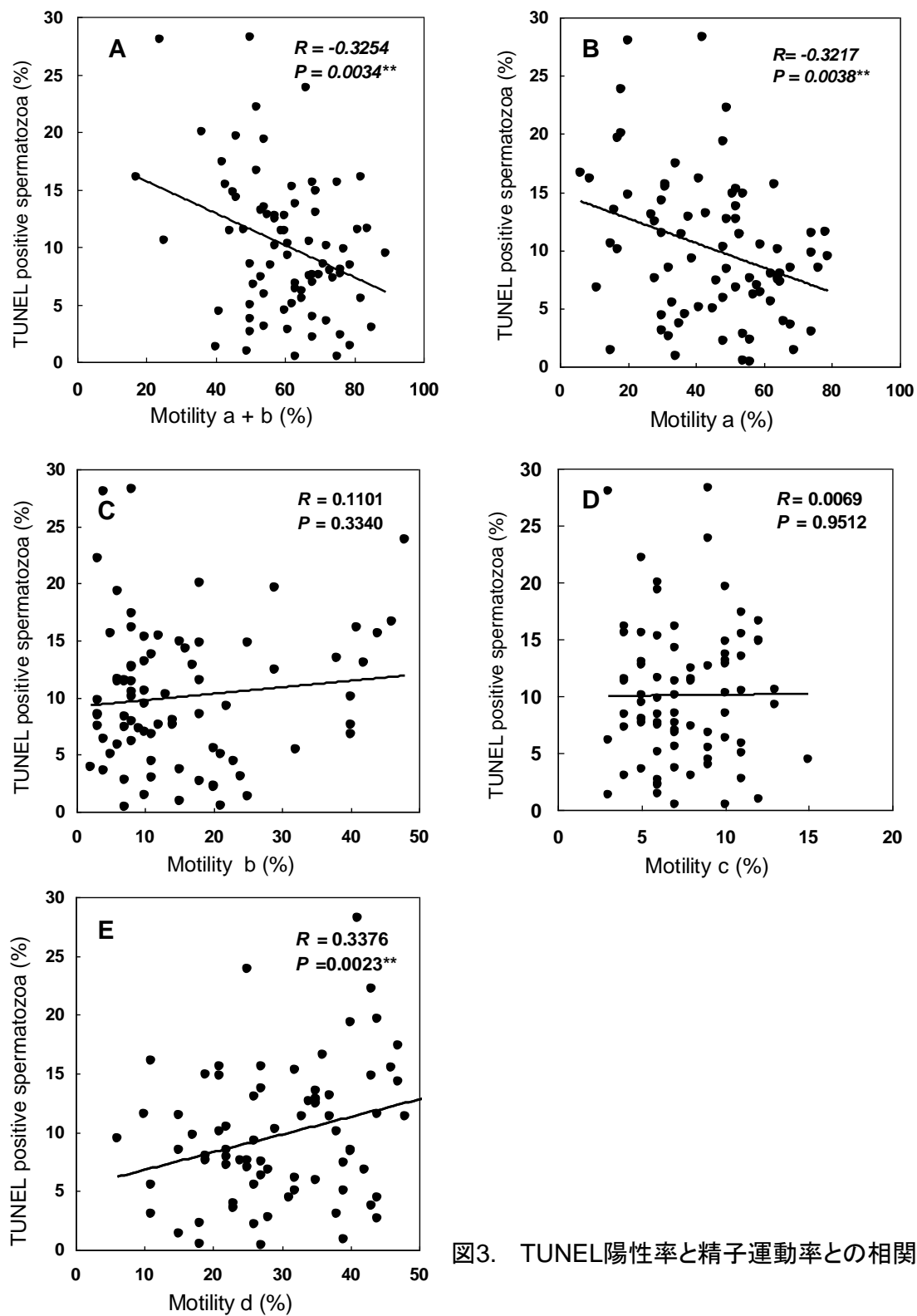


図3. TUNEL陽性率と精子運動率との相関

研究報告書

大学生を対象とした男性生殖機能調査

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 【目的】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。本研究は大学生を対象とし、検査方法を統一化することで、国内・海外での比較を行うことを目的としている。札幌市内の大学生を対象とした研究結果を報告する。

【対象と方法】札幌市内男子大学生 302 名を対象とした。健康に関する質問紙、外性器診察、血液検査、精液検査を行った。本研究は札幌医科大学倫理委員会の承認を得、文書による同意を取得した上で行なわれた。【結果】研究参加者の年齢は 18～24 歳、平均 20.8 歳であった。精子数は数十匹（遠心後沈渣中）～ $447.7 \times 10^6/\text{ml}$ 、平均 $87.6 \pm 60.6 \times 10^6/\text{ml}$ 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 19 例(6.3%)に認められた。精子運動率 (WHO 分類 A+B) は 3～87%、平均 $55.1 \pm 16.8\%$ であった。運動率 50%未満の精子無力症は 92 例(30.8%)に認められた。精索静脈瘤は 71 名(23.6%)に認め、grade I が 45 名と半数以上であった。【考案】今回の結果と前回行われた妊孕能を有する妊婦パートナーを対象とした結果を比較すると、精子数は有意に低下していたが、対象の違いが大きく関与している。過去 2 回札幌市で行われた 18～36 歳の一般成人男を対象とした研究と比較すると、平均精子数はほぼ同等であった。また、乏精子症の割合もほぼ同様であった。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いものと推測された。しかし、内分泌攪乱化学物質の影響は世代を超えて出現する懸念もあり、今回の結果をベースとして今後定期的なサーベイランスを行う必要があると考えられた。

A. 研究目的

わが国における少子高齢化は深刻な問題となっている。その背景には社会的・経済的などの多くの要因が存在するが、生殖機能の低下の有無も無視できない問題と考えられる。特に内分泌攪乱化学物質の影響による生物全体の生殖機能が懸念され始めてから、男性生殖機能の低下が世界的に注目され始めてきた。

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。

そこで、対象とその募集方法、精液採取・検査方法などを可能な限り統一し、地域差や各国間での差を比較する試みが行われ始めた。すでに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行われ、我々も札幌市における調査を施行した。その結果、全国5ヵ所の精子数の違いは認められなかった。本研究は対象を大学生とし、全国5ヵ所（札幌、川崎、金沢、大阪、長崎）で行ない、精子数・運動率等の違いを調査する目的で行われた。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. 質問紙

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. 外性器診察

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。

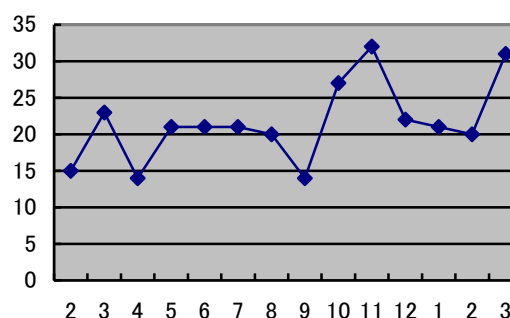
5 精液検査

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月～平成16年3月に計302名に対して検査を行った。参加者の年齢は18～24歳、平均20.8歳であった。月別の参加者数を図1に示す。月14～32名、平均21.6名／月、若干変動の大きい月もあったが概ね一定の参加者であった。

図1 月別参加者数の変化
—2003年2月から2004年3月—
（縦軸：参加者数、横軸：月）



1. 精液検査所見

表1に精液検査所見を示した。302例中2例で精液量が少なく精子運動率測定はできなかった。1例は精子数が極端に少なく運動率測定は困難で

あった。すなわち、精子運動率は 299 例に対して施行した。精液量は 0.2～7.0ml、平均 2.7 ± 1.2 ml、精子数は数十匹（遠心沈渣中）～ 447.7×10^6 /ml、平均 $87.6 \pm 60.6 \times 10^6$ /ml（遠心後に精子を確認した症例は除外）、精子運動率は 3～87%、平均 55.1 ± 16.8 % であった。なお、無精子症は 1 例も認めず、精子数 20×10^6 /ml 未満の乏精子症は 19 例（6.3%）に認められた。乏精子症例における精索静脈瘤の頻度は 7 例（36.8%）であり、後で示す全体での頻度（23.6%）に比して高かったが、grade 3 は認めず、grade 2 が 3 例、grade 1 が 4 例であった。精子運動率が 50% 未満の精子無力症は 92 例（30.8%）に認められた。

表 1 精液所見

	Mean	SD	Min	Max
精液量(ml)	2.7	1.2	0.2	7.0
精子数 ($\times 10^6$ /ml)	87.6	60.6	数十*	447.7
運動率(%)	55.1	16.8	3	87

*：遠心後沈渣中の所見、なお精子数平均値算出には除外

2. 理学的所見

身長、体重、両側精巣容積を表 2 に示した。

表 2 理学所見

	Mean	SD	Min	Max
身長(cm)	173.0	5.8	156	188
体重(kg)	65.4	8.0	50	98
右精巣(ml)	20.7	3.6	11	28
左精巣(ml)	20.6	3.5	11	30

最小精巣容積は 11ml であり、本例の精子数は 62.3×10^6 /ml、運動率は 67% と正常であった。一方、

乏精子症 19 例の精巣容積は 12-24ml、平均値は右 19.2ml、左 18.1ml と全体の平均よりも若干低下していた。

精索静脈瘤は計 71 例（23.6%）に認めた。内訳は grade 1：45 例、grade 2：15 例、grade 3：11 例である。4 例が両側に、2 例が右側のみに認め、65 例は左側のみに認められた。Grade 別の平均精子数、精子運動率、精巣容積を表 3 に示す。Grade 2, 3 症例では精子数が有意に低下していたが、前述したように grade 3 症例に乏精子症例は認められず、grade 2 症例でも 15 例中 3 例のみが乏精子症であった。

表 3 精索静脈瘤 grade 別の精液所見

Grade	精子数 ($\times 10^6$ /ml)	運動率	精巣容積
1	100.0		
2	64.1	48.5%	
3	67.1	52.9%	

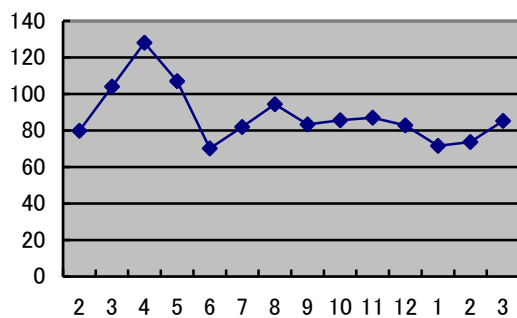
3. 月毎の精子数変化

図 2 に月毎の精子数の変化を示す。2003 年 3 月から 5 月の春にかけて精子数が高い傾向が認められた。しかし、2004 年 3 月ではその兆候は認められなかった。

図 2 月別の精子数変化グラフ

—2003 年 2 月から 2004 年 3 月—

（縦軸：精子数 ($\times 10^6$ /ml)、横軸：月)



D. 考察

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起こっている。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。

この懸念は 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によりますます高まり、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。

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ー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ールに従い行われたものである。

表 4 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 4 各研究での精子数 (×10⁶/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	302	87.6	60.6

E. 結論

今回の結果から、大学生という比較的若年健康男性における男性生殖機能の明らかな低下は認められなかった。しかし、内分泌攪乱化学物質のしたことで、今後のデータを同一レベルで比較検討可能となる、いわゆる基本データとなる点で極めて有用であると考えられた。

F. 研究発表

3. 論文発表

なし

4. 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

影響は長期的、数世代にわたり出現する可能性が示唆されていることから、長期的なサーベイランスが必要である。本研究は特に検査方法を確立

G. 知的財産権の出願・登録状況

4. 特許取得

なし

5. 実用新案登録

なし

6. その他

なし