

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

—日本人正常男性の生殖機能に関する総合的研究—

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、男性生殖機能に関する国際共同研究（疫学調査）に参加した。既に終了した妊婦のパートナー（妊孕能を有する男性）を対象とした川崎・横浜地区での調査 359 例の結果、ならびに大学生（非選択的若年男性）を対象とした川崎・横浜地区での調査 227 例の途中経過を示す。また分担研究として行われた、妊婦のパートナーを対象とした調査の全国 4 地域における実施、生活習慣と男性生殖機能における疫学的検討とデータ解析、精液検査の標準化と自動化、コンピュータ画像解析による精子形態および運動性の解析、非配偶者間人工授精ドナーにおける過去 30 年間の精液所見の解析、ビスフェノール A による精巣内ホルモン環境、受精能に関する研究、Y染色体多型による男性の分類と精子濃度との関連に関する検討について報告する。

分担研究者

奥山明彦（大阪大学医学部教授）
小松 潔（原三信会病院診療部長）
塚本泰司（札幌医科大学教授）
並木幹夫（金沢大学医学部教授）
伊津野孝（東邦大学医学部助教授）
兼子 智（東京歯科大学市川総合病院講師）
石島純夫（東京工業大学生命理工学部助手）
末岡 浩（慶應義塾大学医学部助教授）
小林真一（聖マリアンナ医科大学教授）
中堀 豊（徳島大学医学部教授）

A. 研究目的

本研究は男性生殖機能に関する疫学調査の結果に基づき、健康な日本人男性の生殖機能について詳細に解析するとともに、内分泌かく乱物質との関連において日本人男性の生殖機能の健康状態を明らかにするための標準的な調査法、検査法ならびに解析方法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1. 聖マリアンナ医科大学本院と関連病院ならびに協力病院の産婦人科において妊娠が判明した女性のパートナーの協力を得

て、妊孕能を有する男性の生殖機能に関する疫学調査を実施した。平成 11 年度は川崎・横浜地区より調査に参加した 359 例の全データ（男性の精液所見、理学所見、血液中の各種内分泌ホルモン値、および男性と妊婦双方への質問票）の解析を行った。

2. 男性生殖機能の地域差を検討する目的で妊婦のパートナーの調査を全国規模で実施するため、大阪大学医学部、原三信病院（福岡）、金沢大学医学部、札幌医科大学の各泌尿器科を拠点として、先行の川崎・横浜地区での方法に準じて調査態勢の整備を行った。
3. 新たな疫学調査として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非選択的若年男性の生殖機能調査を実施した。方法は妊婦のパートナーの調査に準じた。
4. 疫学調査に適した再現性のある精度の高い精液検査方法を開発する目的で、従来法を再検討し方法の標準化を試みた。画像解析装置による測定のための精子濃度標準品、精子運動標準画像、ならびに精子形態観察のための新たな形態標準品の設定を行った。
5. 簡便でかつ精度の高い精子形態の解析法として、高解像度デジタルカメラと微分干渉顕微鏡を用いて生きたままの精子像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトで解析する方法を検討した。さらに、高速度カメラによる精子運動性の詳細な解析を試みた。
6. 慶応義塾大学病院における非配偶者間人工受精ドナー精液所見から、1970 年から 1999 年までのデータについて解析した。

7. ビスフェノール A 母体経由曝露によるラット周産期の血清テストステロン濃度、ステロイド代謝酵素、ゴナドトロピン受容体等への影響について検討した。ラットにビスフェノール A 0.2, 2.20 および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を妊娠日（妊娠第 1 日）から出産日（妊娠第 23 日）まで母体に飲水投与し、妊娠第 22 日胎仔の血液と出産約 2 時間後の仔の血液と精巣を採取した。またビスフェノール A を投与した母マウスから生まれた雄マウスの精子について、精子濃度、運動率を検査するとともに、体外受精および顕微受精における受精率を検討した。
8. 日本人男性を Y 染色体上ハプロタイプで 4 種類のタイプに分類し、それぞれのタイプと精子数に違いがあるか否かを解析した。

C. 研究結果

1. 川崎・横浜地区での妊婦のパートナーを対象とした男性生殖機能調査の全データ 359 例を解析した。調査に参加した妊孕能を有する男性（平均年齢 31.8 歳）における各精液パラメータの平均値（ \pm SD）は、精液量:3.3(\pm 1.5)ml、精子濃度:120.9(\pm 103.9) $\times 10^6/\text{ml}$ 、精子運動率 (A+B):55.8(\pm 14.7)%で、WHO 基準を下回る例が精液量で 18.0%、精子濃度で 11.4%、精子運動率で 29.5%含まれていた。また精索静脈瘤の頻度は stage1(軽度)のもの 16.2%、stage1 および 2 が 7.8%であった。各種内分泌ホルモンの平均値（ \pm 標準偏差）は、エストラジオール:81.6 (\pm 20.7) pmol/ml、FSH:4.3 (\pm 1.9) IU/l、LH:3.1 (\pm 1.2) IU/l、テストステロン:23.0

(± 5.7) nmol/l、SHBG : 31.7 (± 12.1) nmol/l およびインヒビン B : 230.6 (± 77.2) pg/ml であった。精液所見とホルモン値の間、あるいはホルモン値間での相関を見たところ、インヒビン B と精子濃度の間に正の相関が ($r=0.291$, $P<0.001$)、インヒビン B と FSH の間に負の相関 ($r=0.554$, $P<0.001$) が認められ、インヒビン B が精子形成能のバイオマーカーとして役立つ可能性が示された。また、生活習慣と生殖機能との関連として、喫煙本数と飲酒量との相関関係を解析したが、精子濃度とそれらとの間に明らかな関係は認められなかった。

2. 大阪、福岡、金沢、札幌の4地域で妊婦のパートナーを対象とした男性生殖機能調査を実施するにあたり、協力病院の確保、調査に必要な人員・設備・検査技術等の整備を進め、態勢の整った地域より、調査本部（聖マリアンナ医科大学泌尿器科）の検査技術精度管理の下に順次調査を開始した。
3. 平成11年度中に川崎地区の大学生(18-24歳)227名が非選択的（妊孕能が確認されていない）若年男性の生殖機能調査に参加した。この段階での各精液パラメータの平均値(\pm SD)は、精液量:2.8(± 1.4)ml、精子濃度:68.3(± 56.1) $\times 10^6$ /ml、精子運動率(A+B): 58.6(± 14.0)%であった。
4. 一般精液所見(精子濃度、運動率、速度、奇形率等)測定における精度向上と標準化のために、精子濃度、運動率、運動速度標準品の策定および標準品を用いた検量線の作成、測定用チャンバーの設定を行った。本研究では機能良好精子を 1. 前進運動能、2.成熟性、3.先体反応誘起能を

有し、4.染色体構造異常を認めないものと定義し、射精精液から条件に該当する精子を精製した。精製精子のはほとんどが楕円形頭部を有していた。これを精子形態標準品とする定量的形態計測法の確立を図った。

5. 精子形態の解析法として、高解像度のデジタルカメラを用いて、微分干渉顕微鏡による生きたままの精子の像を拡大し、コンピュータに取り込み、画像解析ソフトで解析した。精子とその鞭毛運動の解析のために、高速度カメラを用いて、通常のビデオカメラを用いた場合の運動特性と比較した。活発なヒト精子は長軸の回りを回転しながら前進する傾向があった。通常のビデオカメラでは、鞭毛運動による頭の横振れの正確な記載は不可能で、毎秒200コマを撮影できる高速度カメラでも十分ではなかった。精子の頭のみを追尾するこれまでの精子運動自動解析装置ではこのような傾向を持つ運動から、精子の鞭毛運動の影響を明らかにすることは難しい。鞭毛の波形が変化したときの前進速度に対する影響を調べる必要がある。
6. 慶応義塾大学病院における非配偶者間人工受精ドナー精液所見から精子濃度は1970~1989年群でも、1990~1998年群に於いても共に総検体データについての検討で現在までに調査した範囲では減少傾向を示した。精子運動率については1970~1989年群で軽度の減少傾向を示したが、1990年以降では減少傾向を示さなかった。また、平成5~9年に行った非配偶者間人工授精患者1645名へのアンケート調査を行い妊娠・出産についての

検討を行ったが回答のあった妊娠例は447名、出産の回答のあった146名のうち、男女比は男児出産55% (80/146)、女児出産45% (66/146)であった。

7. 蛍光プレラベル化剤を用いた液体高速クロマトグラフにより測定した妊娠第22日胎児の血清ビスフェノールA濃度は、コントロール、0.2, 2, 20および200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与においてそれぞれ検出限界以下、8.7, 33.3, 1, 45.1, 56.3 ng/mlであった。出産約2時間後の児の血清テストステロン濃度はビスフェノールA200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 投与においてコントロールに比べ約30%有意に ($P < 0.001$) 低値を示し、高用量のビスフェノールAは脳の性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。RT-PCR法により調べた出産約2時間後の仔の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびFSH受容体のmRNAの発現はいずれの濃度のビスフェノールA投与もコントロールと差はなかった。
8. また、少数例ではあるが、マウスの体外受精および顕微受精における受精率については、投与群とコントロールとの間に有意差は認められなかった。
9. 妊孕能を有する(妊婦のパートナー)男性の4種類のY染色体ハプロタイプと精子数の関係を調べた結果、タイプにより精子濃度の分布が異なっており、我々の分類でタイプIIにあたる男性では平均精子数が少なかった。ついで、無精子症患者のタイプ分けを行った。その結果、無精子症の患者ではコントロール集団に比べてタイプIIの人が多かった。

D. 考察

妊婦のパートナーを対象とした正常男性

生殖機能に関する、川崎・横浜地区での調査を359例をもって終了し、その結果を示した。これらの結果は全てのデータの単純な統計処理の結果で、それぞれのデータを変動させる因子の関与については検討していない。平成12年度は年齢、禁欲期間、精液採取から検査までの時間などの因子について補正ならびに標準化した値での比較を試みる予定である。

その他、精液検査の標準化、コンピュータ画像解析による精子形態および運動性の解析、非配偶者間人工授精ドナーの精液所見の解析、実験動物へのビスフェノールA投与による精巣内ホルモン環境および受精能に関する研究、およびY染色体多型による男性の分類と精子濃度との関連に関する検討がなされた。

E. 結論

妊婦のパートナーを対象とした正常男性生殖機能に関する、川崎・横浜地区での調査359例の精液所見、理学所見、血液中の各種内分泌ホルモン値、および質問票の回答をデータベース化し、それらの解析結果を示した。また、全国4地域(大阪、福岡、金沢、札幌)における妊婦のパートナーの調査が開始した。さらに新たな疫学調査として川崎地区において妊孕能の確認されていない男性集団(非選択的若年男性集団)として大学生を対象とした男性生殖機能調査が始まり、経過報告として227例の精液所見の結果を示した。

その他、疫学調査に適した方法論の確立ならびに男性生殖機能の新たな評価法の開発および基礎的検討の一環として、精液検査の標準化、コンピュータ画像解析による精子形態および運動性の解析、非配偶者間人工授精ドナー(AID)の精液所見の解析、実験動物へ

のビスフェノールA投与による精巣内ホルモン環境、精子形成能、受精能に関する研究、およびY染色体多型による男性の分類と精子濃度との関連に関する検討がなされた。

F. 今後の展望

疫学調査によって得られた結果からは、精液所見、理学所見、血液中の各種内分泌ホルモン値、質問票の回答からなる妊孕能を有する男性の男性生殖機能に関するデータベースが構築される。妊婦のパートナーの調査の全データは、国際共同研究本部のコペンハーゲン大学病院発達生殖部門のデンマークデータベースにも入力されて参加各国のデータとの比較が可能になり、平成12年度にはその結果を報告できる。今後は全国4地域（大阪、福岡、金沢、札幌）でのデータ、および妊孕能の確認されていない男性集団（非選択的若年男性集団）におけるデータも含めて、男性生殖機能に関する大規模なデータベースを構築し、それらの統計解析、データ比較、ならびに基礎研究から得られた結果との総合的検討から内分泌かく乱物質との関連における男性生殖機能の評価に役立つ意向である。

G. 研究発表

1. 論文発表

馬場克幸、野澤資亜利、岩本晃明：内分泌攪乱化学物質と精子への影響。周産期医学 29, 405-408, 1999

Shinka, T., Nakahori, Y. et al.: Genetic variations on the Y chromosome in the Japanese population and implications for modern human Y chromosome lineage. *J. Hum. Genet.* 44: 240-245, 1999.

Kuroki, Y., Iwamoto, T., Nakahori Y. et al.: Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. *J. Hum. Genet.* 44: 289-292, 1999.

岩本晃明、馬場克幸：環境ホルモンと精子数の動向。医学のあゆみ 190, 739-742, 1999

馬場克幸、岩本晃明、西田智保、野澤資亜利：内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）のヒトへの影響—男性生殖機能を中心として—。総合臨床 48, 2505-2509, 1999

岩本晃明、野澤資亜利、馬場克幸、西田智保：精子数の及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響について。ホルモンと臨床 47, 43-51, 1999

伊藤直樹、高木誠次、塚本泰司、他。日本男子の精子異常と環境ホルモン。内分泌・糖尿病科、8(5): 512-518, 1999.

末岡 浩、吉村泰典：精子減少と環境有機物。産婦人科の世界 51(1):103-109, 1999

Ishijima, S., Baba, S. A., Mohri, H., and Suarez, S. S. Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reactivated goldenhamster spermatozoa. *Zool. Sci.*, 16, Suppl., 107, 1999.

2. 学会発表

馬場克幸、岩本晃明：ヒト精子性状とアンドロロジー—妊婦のパートナーについて—。第18回日本アンドロロジー学会学術大会、東京、1999年7月

兼子 智、田辺清男、岩本晃明、ヒト精液検査の標準化—国際比較に向けて—、第 18 回日本アンドロロジー学会学術大会、東京、1999 年 7 月

末岡 浩：精子核の膨化機構（ミニシンポジウム）、第 92 回日本繁殖生物学会大会、仙台、1999 年 9 月

岩本晃明、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀、野澤資亜利、兼子 智、伊津野孝：日本人正常男性の生殖機能の現状—妊婦のパートナーの国際共同研究に参加して—（シンポジウム）、日本不妊学会学術講演会、東京、1999 年 11 月

吉池美紀、西田智保、馬場克幸、野澤資亜利、岩本晃明、兼子 智、田辺清男、伊津野孝：日本人正常男性の生殖機能の現状—精子濃度測定法の統一化と自動解析装置を用いた解析法の検討—、日本不妊学会学術講演会、東京、1999 年 11 月

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、松下知彦、山川克典、西田智保、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明、兼子智：日本人正常男性の生殖機能の現状—生活様式との関連—、日本不妊学会学術講演会、東京、1999 年 11 月

中堀 豊、黒木陽子、新家利一他：ヒト精子数と遺伝的素因の関連—日本人 Y 染色体のタイプ別精子数—、第 44 回日本人類遺伝学会、1999 年 11 月、仙台

田中政巳、中谷祥子、野澤資亜利、片山昌勅、栗林 靖、馬場克幸、岩本晃明、小林真一：Bisphenol-A の胎児期および授乳期曝露によるラット、マウス雄性生殖機能への影響、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会、神戸、1999 年 12 月

伊津野孝、星野孝夫、馬場克幸、西田智久、野澤資亜利、岩本晃明、兼子智：日本人妊婦のパートナーの精子数の解析—喫煙・飲酒との関係—、日本内分泌攪乱化学物質学会第 2 回研究発表会、神戸、1999 年 12 月

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