

聖マリアンナ医科大学・教授

岩 本 晃 明

内分泌かく乱物質の
ヒト生殖機能への影響に関する総合的研究

研究期間：平成11年11月1日～平成16年10月31日

1. 研究実施の概要

造精機能が障害を受けるときのヒトに特徴的な変化をとらえることにより、精子形成のメカニズムの解明と、内分泌かく乱物質等の造精機能への影響を評価する実験系の開発を目指した。造精機能障害を示すヒト精巣では、①特異的な精細管基底膜の肥厚が、造精機能障害に先立つ現象である可能性があること、②精細管基底膜の肥厚に関与する糖タンパク質は、progesterone をトラップすることができ精細胞に存在するものとは異なること、③progesterone 代謝を促す酵素活性の変化は Leydig cell の過形成と Sertoli cell 機能変化によると考えられること、④代謝実験の結果 $\Delta 4$ 経路の一部の代謝物が正常より多く作られ、さらに異なる代謝物が作られている可能性があることを示した。In vitro でのヒト精子形成維持実験系作製を試み、免疫不全動物体内に成熟したマウス及びヒト精巣移植片を生着させ、従来の培養系より長期に維持させることが可能になった。また、成熟マウス精巣由来の多機能な支持細胞株のクローニングを行い、さらに、ヒト精巣における HSFY (heat shock-like factor encoded on the human Y chromosome) タンパク質の挙動を明らかにした。

男性生殖機能評価評価マーカーに関する研究として、①内分泌かく乱物質による不妊に関連するras関連癌遺伝子産物DJ-1タンパク質について精子形成異常への関与を考え、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した。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、造精機能および受精に関与していることが示唆された。さらに妊婦配偶者精漿中DJ-1濃度は弱いながらも精子濃度と正の相関を示した。従って、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ことが示された。なお本研究は北海道大学有賀教授との「内分泌かく乱物質」プロジェクト間の共同研究である。②内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価する方法を探索する一環として、プロテオミクスの導入を検討した。妊婦配偶者精漿のSDS-PAGEバンドからのLC/MS/MSとMASCOT searchによる網羅的解析を行い、正常のヒト精漿に存在するタンパク質をできるだけ多く同定することを試みた。妊婦配偶者それぞれの精漿中に平均約130のタンパク質を同定することができた。さらにこのリストの機能的グループ化を行なった。また、精漿タンパク質二次元電気泳動ゲルパターンの妊婦配偶者と無精子症の比較を行い無精子症に関連するタンパク質の検索を行った。

内分泌かく乱物質曝露による有害作用の多くが遺伝子発現への影響に起因すると考えられることから、本研究では内分泌かく乱による精巣機能への影響を遺伝子発

現の変化を指標としてヒトおよびマウスを対象として検討した。また、これら遺伝子が内分泌かく乱物質曝露のバイオマーカーとなるかを検討した。内分泌かく乱物質であるbisphenol A(BPA)およびdiethylstilbestrol(DES)の胎児期、新生児期、授乳期曝露や精巣障害(停留精巣)モデルマウスの精巣において発現が低下する遺伝子としてcofilin-2とtestican-3の2つを見出した。また、これらの発現は内分泌かく乱物質を曝露されたマウスおよび精液所見が不良のヒトの白血球中でも低下していることを見出した。また、cofilin-2とtestican-3遺伝子の発現は脳においても内分泌かく乱物質曝露により低下することを見出した。本研究ではさらに低用量DES(1 μ g/kg/day)母体経由曝露の精巣への影響を遺伝子発現の変化を指標としてディフアレンシャルディスプレイ法により検討し、meiosis-specific of the maintenance of chromosomal family に属するSMC1 β とDNAのメチル化に關与する β -globin遺伝子の発現が低用量DES曝露で増加することを見出した。

RecQヘリカーゼは、DNAの複製、組換え、修復等の過程でゲノムの安定化に重要な働きをになっている。外的刺激によるRecQヘリカーゼの発現の変動は、ゲノムの不安定化状態を反映すると考えられる。したがって、内分泌かく乱物質がRecQヘリカーゼの発現に及ぼす影響を調べることによって、内分泌かく乱物質のゲノム維持機構への影響を推察することができる。本プロジェクトにおける課題は、内分泌かく乱物質がゲノム維持ヘリカーゼに及ぼす影響を測定するシステムを構築し、ゲノム維持機構への影響を調べることである。化合物のDNAに対する傷害性は、個々の細胞レベルでDNAの損傷を高感度に検出するコメットアッセイを用いた。RecQヘリカーゼの発現変化は、mRNAレベル及びタンパク質レベルで解析し、各種抗体を用いた免疫染色によって、タンパク質の核内での分布を調べた。さらにタンパク質の発現を調節する遺伝子のプロモーター領域の活性を調べるために、ホタルルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイ系を構築した。これら、DNA傷害と修復系の検知プロトコールにより、内分泌かく乱物質がヒトゲノム修復機構に与える影響を調べることが可能となった。

実際に、これらの実験系を用いて内分泌かく乱物質によるゲノムの安定化への影響を調べたところ、①17 β -エストラジオール(E2)及びプラスチック製品の原料に広く用いられているBPAは、ゲノムDNAに傷害を与え不安定化するが、②ブルームヘリカーゼ(BLM)は、DNA傷害部位の修復に關与し、ゲノム不安定化回避に働いていることを示唆する知見を得た。

Y染色体の遺伝的多様性と男性表現型との関係について遺伝疫学的な手法によって解析を行った。解析した検体の総数は3,120検体、このうち細かなhaplogroupまで決定

したものは 2,260 検体であった。この内、遺伝疫学的解析は主として、①Y 染色体 haplogroup 分類、②アンケート、および③精液所見の 3 種類のデータが得られた札幌、金沢、大阪および福岡地区の妊婦配偶者検体を用いて行った。その結果、Y 染色体を DNA 多型によって縄文系（縄文人に由来すると考えられる Y 染色体）および弥生系（弥生人に由来すると考えられる Y 染色体）に大別すると、これら 2 つの系統の Y 染色体の頻度は、解析サンプルを入手した 4 つのいずれの都市においても、弥生系の方がやや高い傾向を示した。また主要な縄文系、弥生系の Y 染色体の系統において、平均精子濃度の季節変動があり、その変化（下がった後の立ち上がりの時期）はそれぞれが多く生まれる季節と対応する傾向が認められた。

また Y 染色体に最近マップされた HSFY 遺伝子について、無精子症患者における遺伝子解析並びに、遺伝子産物の発現解析および機能解析を行った。その結果 HSFY が実際の無精子症患者で認められる Y 染色体欠失領域に含まれる場合があること、HSFY が精巣組織において Sertoli cell と精子形成発現細胞に発現することなどが明らかとなった。これらのことから HSFY 遺伝子はヒト精子形成に重要な役割を担っている可能性があると考えられた。

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響を明らかにするために、ヒト精子の形態と運動性を指標とする調査の可能性を調べた。ヒト精子性状の基準値を明らかにするために、妊婦配偶者精子の形態と構造を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、精子の運動性については高速度カメラで撮影した画像一枚一枚を自作のコンピュータソフトを用いて解析した。これらのより効率的な測定を可能にするために、精子運動を自動で解析する装置を開発し、精度の高い測定を短時間で行えるようにした。さらに、精子の運動性を制御する細胞内因子を明らかにすることができたので、精子運動の変化から精子内の生化学的な条件を推測することができるようになった。また、精子が卵に進入する際に必須な精子鞭毛運動の変化とその原因を明らかにすることにより、精子の異常のため受精に至らない場合についても調査をすることが可能になった。このように、ヒト正常精子の形態や構造、さらに運動性とその制御因子を明らかにすることができたので、精子を指標として内分泌かく乱物質の影響を明らかにすることができると考える。

内分泌かく乱物質の生殖影響として、精子濃度の低下が指摘され、詳細な疫学調査が行われている。造精機能の指標として、一般精液所見（精子濃度、運動率、精子形態等）が調査の対象とされている。精子は精巣において 2 回の減数分裂を経て形成されるが、減数分裂前期以降の精母細胞死によりかなりの精細胞が消滅していることが知られており、その過程にはアポトーシスが関与すると考えられている。内分泌かく乱物質の精子

形成に及ぼす毒性に関して、精液所見を指標とした量的解析とともに精子の質に着目した研究も不可欠である。射出に至った精子についてもアポトーシスによる染色体損傷が存在する可能性が考えられ、個々の精子についてDNA構造異常の観察法を確立した。さらにDNA損傷を指標として精子の選別を行い、DNA損傷精子の排除を試みた。精子の妊孕性に深く関与する精子形態は、顕微鏡観察による主観的評価が行われているが、コンピュータ画像解析装置を用いた客観的手法の確立が望まれ、上記の精製精子を用いて、正常形態精子標準品を作製した。さらに内分泌かく乱物質の精子形成に及ぼす毒性を探る一端として、ヒト精漿中のBPA、nonylphenol (NP)の定量法を開発した。

2. 研究構想

内分泌かく乱化学物質による男性生殖機能への影響が危惧される中で、研究代表者は、男子不妊症原因究明の基礎的臨床的研究の実績と正常男性生殖機能の疫学調査研究の経験を活かして、内分泌かく乱化学物質のヒト生殖機能への影響に対する包括的な戦略を立て平成11年度CRESTに採択された。これまでの経験で実感したことは、この問題における方法論の欠如、すなわち、何をどう調べれば内分泌かく乱物質のヒトへの健康影響が把握できるのか、その手段のいかに不足しているかであった。ヒト精子問題が現時点であくまでも仮説として扱われるのは、それを証明する確かな方法が無いためである。実際に外因性の内分泌かく乱化学物質が男性生殖機能に重大な影響を及ぼしているのかどうか、ヒトの精子が本当に減り続けているのかどうか、精子が減っているとしてそれが何の原因によるのか、精子数の減少が実際に人類の生殖機能の低下につながるのかどうか、これらの質問に対する明快な解答は現在のところ得られていない。内分泌かく乱物質が原因と考えられる男性生殖機能への障害は世界各地の野生動物において観察され、動物実験によってもある程度確認されているが、人体への影響となると、実態を調査することも、因果関係を証明することも方法論的に非常に難しい。確かな評価系がないことは内分泌かく乱物質の生体への影響を捉える上で共通した問題点となっている。この問題を未解決のまま研究を重ねても現在の混乱状態をさらに助長することになりかねない。研究代表者は泌尿器科医という臨床医の立場から、本プロジェクトは基本的には、ヒト男性生殖機能への影響に重点を置いたものになるべきと考えている。ヒトの健康状態を直接眼にすることの出来る立場やヒト試料が得られることは本研究を遂行する上できわめて恵まれた状況といえる。

本プロジェクトの最大の特徴はヒトを対象とし、ヒトより得られた血液、DNA、精漿、精子、尿およびヒト細胞等を試料として内分泌かく乱物質のヒトへの影響を評価することである。具体的には、妊孕能を有する健常者と造精機能障害を有する不妊症症例との

相違を形態学的・生化学的・分子生物学的手法により明らかにすること、男性生殖機能を評価することのできるマーカー物質を検索すること、評価のための装置・方法を開発すること、および男性生殖機能あるいは造精機能の評価を様々なレベル(精子、精子形成、Y染色体、遺伝子)で可能にするための基礎的検討を、各領域の専門家の協力を得て実施した。さらに男性不妊をはじめとするさまざまな生殖機能異常の原因を明らかにし、将来的には臨床の場にフィードバックし治療法の開発を目指す戦略を立てた。

3. 研究実施内容

3. 1 ヒト精子形成のメカニズムに関する研究 (岩本グループ)

(1) 研究内容及び成果

1) 精子形成と精細管基底膜の肥厚について

【目的】精子形成過程には生殖幹細胞である精原細胞の精母細胞への分化を起点とする精細胞系列の様々な段階が存在し、これらの分化が正常に進行するために、時期特異的な精細胞での遺伝子発現や精細胞と支持細胞との細胞間相互作用、ホルモンなどの液性因子による精巣内環境が重要であると考えられているが、その詳細については不明である。精細管を構成する基底膜は造精機能障害のある精索静脈瘤や停留精巣の患者精巣において肥厚していることが知られている。しかし、このような基底膜の肥厚と造精機能障害の因果関係については未だ不明である。

今回、我々はヒトの精子形成過程における精細管基底膜の役割について明らかにするための第一歩として、精細管基底膜の肥厚と造精機能障害のどちらが先におこる現象であるかを詳細に検討した。さらに、基底膜の構成成分の肥厚に伴う変化についても検討した。

【方法】様々な造精機能段階を含む精巣組織サンプルとして、精巣腫瘍摘出精巣の肉眼的正常部位 (24 検体)、閉塞性無精子症患者の精巣組織 (15 検体)、精索静脈瘤患者の精巣組織 (30 検体)、無精子症患者の精巣組織 (37 検体)、剖検材料の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色標本 (9 検体、Copenhagen University Hospital の Dr.Meyts からの提供による) を使用した。検体の使用については、聖マリアンナ医科大学生命倫理委員会の承認および患者の方々の文書による同意を得た。ブアン固定したサンプルのパラフィン切片に HE 染色を行い各サンプルごとに、切片上における全ての精細管について、基底膜の厚さを測定し、それぞれの精細管内の造精機能段階を Johnsen's score count (JS 値) によって評価した。基底膜の厚さは1精細管につき3ヶ所測定した平均値で表した。精細管基底膜は精索静脈瘤患者の精巣を基底膜の厚さによって分類した Santamaria ら

(1992)の方法を基に、形態による指標を加え、厚い方から QT (quite thick)、T (thick)、LT (light thick)、ST (slight thick)、N (normal)の5段階に分類した。

さらに、ヒトの精細管基底膜の構成成分として知られている collagen IV、desmin などの抗体および精細胞を特異的に染めるマーカーである PNA lectin および Sertoli-Leydig cell tumor のマーカーである progesterone 抗体を用いて、組織化学染色と間接蛍光抗体法による免疫組織化学染色を行い、それぞれの成分の分布が精細管基底膜の肥厚に伴って変化するかどうかについても検討した。

【結果と考察】どの症例の精巣においても、サンプル内の精細管基底膜の厚さは均一ではなく、様々な厚さを持つことがわかった。JS 値によって、第一減数分裂前に障害を持つ Low JS group と、それ以降に障害を持つ high JS group に分けて両者の精細管を基底膜の厚さの分布により比較した。両者とも様々な厚さの基底膜を持つ精細管があること、Low JS group では厚い基底膜を持つ精細管が、high JS group では薄い基底膜を持つ精細管が多いことから、基底膜の厚さと造精機能障害には因果関係があることが示唆された。

次に、各精細管を造精機能段階を示す JS 値で評価し、精細管の厚さによる JS 値の分布を求めた。その結果、基底膜の最も薄い N における評価は、正常な造精機能状態を示すとする JS 値 9, 10 のみであった。T から ST までの基底膜の内部では、JS 値 9, 10 を含む様々な造精機能段階が見られた。精細胞が全くないことを示す JS 値 1, 2 の評価は、基底膜の厚い精細管ほど多く見られるようになった。また剖検試料 (JS 値>9.0)では、薄い基底膜を持つ精細管しか存在しなかった。さらに、比較的正常な精子形成を示すヒトの精巣組織片を器官培養すると精子形成不全となるが (正常に精子形成が維持される器官培養系がまだ確立されていないため)、それに伴って精細管基底膜の肥厚が進行していくことが観察された。以上、肥厚が進行性的な変化であり、肥厚した基底膜をもつ精細管内では造精機能障害を示す組織像から正常な精子形成を示す組織像まで様々な段階が見られるのに対し、最も薄い N の基底膜の精細管内部では必ず正常な精子形成のみが観察されることから、精細管の基底膜の肥厚は、造精機能障害に先立って起こる変化であることが示唆された。肥厚によって形態的にもっとも変化のある基底膜の inner layer では、基底膜の細胞外基質として知られている collagen IV や laminin に変化はなく、PNA-lectin で認識される糖タンパク質や、progesterone の量が増加することが明らかとなった。

2) ヒト特異的な精細管基底膜の肥厚に関与する糖タンパク質の解析

【目的】精子形成が異常なヒト精巣では、特徴的な基底膜の肥厚を持つ精細管が見られ

る。精子形成と基底膜の状態には因果関係があり、精子形成過程に異常がある時、肥厚した基底膜 inner layer に、PNA-lectin に対して特異的な結合を示す糖タンパク質が存在することを我々は1)で示した。この糖タンパク質は、ヒトに特異的な造精機能障害を示すマーカーになることが期待され、また、その造精機能障害への関与を検討する上で非常に重要であると考えられたので、詳しい解析を行った。さらに、肥厚した基底膜の inner layer は、抗 progesterone 抗体に対して陽性であったことから、この糖タンパク質と progesterone の相互関係についても検討した。

【方法】様々な造精機能段階を含む精巣組織サンプルとして、精巣腫瘍摘出精巣の肉眼的正常部位（4検体）、停留精巣の摘出精巣（3検体）、精索静脈瘤患者の精巣組織（1検体）、無精子症患者の精巣組織（5検体）、閉塞性無精子症患者の精巣組織（4検体）を使用した。精細管基底膜の分類と造精機能段階の評価は、各サンプルごとに、固定標本を作成し、切片上における全ての精細管基底膜の厚さを測定し、それぞれの精細管内の造精機能段階を JS 値によって評価した。第一減数分裂前に障害を持つ Low JS group とそれ以降に障害を持つ high JS group に分け、両 group 間での比較を行った。①Low JS group の精巣と high JS group の精巣からサンプルを調整し、肥厚に伴って基底膜で増減する糖タンパク質のスポットを2次元電気泳動で分離し、lectin affinity blotting、western blotting を用いて確定し、これらの糖タンパク質のスポットを質量分析により解析した。②精細管外部からの progesterone の取り込みの有無を見るために、Low JS group の精巣と High JS group の精巣からそれぞれ切り出した精細管の両端をポリアミド合成縫合糸で結び、FITC-progesterone-BSA または、FITC-BSA を含む外液中で incubation した後、洗浄し、物質の取込み状況を画像解析した。③Low JS group の精巣の未固定凍結切片を用いて、FITC-progesterone-BSA の結合性を確認した後、過剰な progesterone を含む溶液中、または progesterone を含まない溶液で pre-incubation し、洗浄後、肥厚した基底膜 inner layer への PNA-lectin の結合性を比較した。④Low JS group の精巣と High JS group の精巣において、精巣の基底膜以外の構造または細胞の糖タンパク質に対する PNA-lectin の結合性が、progesterone, BSA によって阻害されるか、細胞によってその性質が異なるかを検討した。

【結果と考察】①解析したスポットの一つは分子量約 43kDa, pI5-6 の糖タンパク質であり、質量分析の結果、ペプチドの一部がヒトアルブミンと一致した。しかし、免疫組織化学でも、western blotting でも抗ヒトアルブミン抗体とは交差しなかったことから、アルブミン様の新規タンパク質の可能性が示唆された。現在、さらなる differential

screening を行い、基底膜肥厚に関与する PNA-lectin で認識される他の糖タンパク質を探索中である。②Low JS group の精巣における肥厚した基底膜は、FITC-BSA を取り込まず、FITC-progesterone-BSA を取り込んだ。一方、High JS group の精巣の基底膜は、両者とも取り込まなかった。この結果より、肥厚した基底膜は、少なくとも精細管の外（間質）から progesterone を取り込み、トラップできることが明らかとなった。③Low JS group の精巣の未固定凍結切片において FITC-progesterone-BSA は、生の精細管同様、肥厚した基底膜に対して結合能を示した。肥厚した基底膜には PNA-lectin により認識される糖タンパク質が多く存在するが、progesterone を過剰に結合させた基底膜では、PNA-lectin の染色性が阻害されることが明らかとなった。以上の結果は、肥厚した基底膜に存在する糖タンパク質に progesterone が結合している可能性を示唆している。④PNA-lectin は、生殖細胞に結合するが、その結合は、progesterone や、BSA によって阻害されず、肥厚した基底膜への結合のみ阻害された。このことから、同じ PNA-lectin により認識される糖タンパク質でも、生殖細胞に存在するものと、肥厚した基底膜に存在するものでは、性質が異なることが示唆された。

3) ヒト精子形成過程の異常と $\Delta 4$ - C_{21} ステロイドホルモンについて

【目的】精巣内で精子形成に必要なandrogenを生成するのに、マウスやラットなどのげっ歯類では $\Delta 4$ pathwayを使用してpregnenoloneをandrogenに代謝するが、ヒトの場合は主に $\Delta 5$ pathwayを用いて代謝することが知られている。今回、通常の代謝過程ではほとんど生成されない $\Delta 4$ - C_{21} ステロイドホルモンが、造精機能障害のヒト精巣において認められたので報告する。

【方法】様々な造精機能段階を示す精巣組織サンプルとして、精巣腫瘍摘出精巣の肉眼的正常部位(9 検体)、停留精巣の摘出精巣 (2 検体)、精索静脈瘤患者の精巣組織 (5 検体)、無精子症患者の精巣組織 (10 検体)、血清サンプルとして、妊娠女性の配偶者である男性ボランティア (n=30)及び上記精巣組織を採取した症例の中から造精機能の不良な例(n=14)を使用した。精細管基底膜の分類と造精機能段階の評価は、各サンプルごとにHE染色したパラフィン切片上における全ての精細管基底膜の厚さを測定し、それぞれの精細管内の造精機能段階をJS値により評価した。造精機能の良好なサンプル群をHigh JS group (JS値>7.8)、不良なサンプル群をLow JS group (JS値<4.6)とし、この両サンプル間での比較を行った。①High JS group とLow JS groupの精巣組織を用いて、抗progesterone抗体、抗progesterone receptor (PgR) 抗体、抗androgen receptor (AR) 抗体、抗human serum albumin (HSA) 抗体を用いて免疫組織学的染色を試み、染色性

の比較を行った。また検体の一部からRNAを抽出し、それぞれのreceptorのプライマーを用いてRT-PCRを行い、receptorの発現量を比較した。②妊婦配偶者ボランティアとLow JS groupの患者から得られた血清で、 $\Delta 4$ -C₂₁steroid であるprogesteroneおよび17 α -hydroxy progesterone (17 α -OHP) 濃度、testosterone (T) 濃度をradio immuno assay (RIA)、enzyme immuno assay (EIA)にて測定した。また、High JS group とLow JS groupの精巣組織中ホルモン濃度を測定し比較した。③High JS group とLow JS groupの精巣組織について、抗 β -hydroxy steroid dehydrogenase (β -HSD)抗体を用いて免疫染色を試み画像解析を行った。また検体の一部からRNAを抽出し、各種代謝酵素のプライマーを用いてRT-PCRを行い、酵素群の発現量を比較した。④High JS group とLow JS groupの精巣組織を用いて、¹⁴C-pregnenoloneまたは¹⁴C-progesteroneを基質として代謝実験を行った。代謝産物は、各種溶媒系の組み合わせによりそれぞれ数段階の薄層クロマトグラフィーにて分離し、標品の移動度から代謝物の推定を行った後、それぞれ、酸化、アセチル化、再結晶法を用いて同定した。さらに、薄層クロマトグラフのオートラジオグラムから放射活性のあるスポットをプレートから剥離し、抽出後、一部を用いて放射活性の測定し、各々の代謝物への転換率を求めた。

【結果と考察】①造精機能障害を示す精巣では、肥厚した基底膜が progesterone 抗体に対する強い染色性を示したが、抗 PgR 抗体、抗 AR 抗体、抗 HSA 抗体に対しては陰性であった。つまり、肥厚した基底膜において progesterone は、PgR または AR に結合した状態、あるいは HSA に非特異的に結合した状態で存在しているのではないことが示唆された。また、造精機能障害を示す精巣では、抗体陽性を示す Sertoli cell が増加していたが、PgR と AR の mRNA レベルの変化がなく、それぞれの抗体陽性の Sertoli cell の数も変化していなかったことから、Sertoli cell における抗 progesterone 抗体陽性は、PgR や AR に progesterone が結合した結果ではないと推測された。

②妊婦配偶者であるボランティアと、Low JS group の血清中の progesterone、17 α -OHP、T 濃度に差はなかったが、Low JS group 精巣中の 17 α -OHP 濃度は High JS group の精巣中よりも有意に高かった。この結果は、造精機能が不良な精巣では androgen 代謝経路において17 α -OHPが中間代謝物として多く見られることを示している。

③High JS groupの精巣と比較して、Low JS groupの精巣は 3 β -HSD mRNAの発現量は増加し、17 α -hydroxylaseと C₁₇-C₂₀lyase活性の律速段階を決定するP450_{17 α ,lyase}の mRNA発現量は変化していないことが明らかとなった。また、17 β -HSDのmRNAの発現量は、期待されていたサイズの増幅物とそれとは異なるサイズの増幅物の2つが見られ、

それぞれの増幅物は、Low JS groupの精巣とHigh JS groupの精巣で発現レベルが異なることが明らかとなった。17 β -HSDについては様々なisoformが報告されており、今回得られた2つの増幅物についてさらなる解析を進める予定である。さらに抗 β -HSD抗体を用いた免疫組織染色では、mRNAの発現レベルの変化を支持する結果を得た。以上の結果は、造精機能不良な精巣ではandrogen代謝に必要ないくつかの酵素活性に変化が起きており、 $\Delta 4$ 経路の代謝物が生成されやすい状態であることを示唆している。抗体染色の結果から、精巣の間質における β -HSD生成は、High JS groupよりLow JS groupの方が多いたことがわかった。Low JS groupではLeydig cellの過形成が見られ、個々のLeydig cellの酵素生成能力に差がなかったことから、造精機能不良な精巣において β -HSDが多く生成される原因の一つは、Leydig cellの過形成にあることが示唆された。一方、精細管内にあるSertoli cellについては、 β HSD抗体陽性の細胞数は、High JS groupよりLow JS groupの精巣において多かった。Sertoli cellの数は、生後一定であるという報告があること、また、progesterone抗体陽性のSertoli cellでも同様の傾向を示したことから、造精機能障害を示す精巣で β -HSDが多く作られる原因の一つはSertoli cellの機能の変化であることが示唆された。

④代謝実験の結果、Low JS groupの精巣はHigh JS groupの精巣と比較して、 $\Delta 4$ 経路の代謝物であるprogesteroneおよび17 α -OHPが代謝物として多く作られることを示した。しかし、progesteroneは $\Delta 4$ 経路経由で生成直後にandrogenの代謝経路にない別の代謝物に転換されている可能性が実験から示唆され、現在、その代謝物の同定を試みているところである。さらに、Low JS groupの精巣において、 $\Delta 5$ 経路経由で転換されていると考えられる未同定の代謝産物が、High JS groupの精巣と比較して多く作られていることが示唆され、代謝実験において作られた残り総ての代謝物とともに同定を試みている。

以上の結果は、造精機能不良な精巣において、 $\Delta 4$ 経路の代謝物が生成されること、造精機能が良好な精巣と異なる代謝物が作られていることを示唆している。

4) 免疫不全動物を用いたヒト精子形成維持系開発の試み

【目的】今まで、ヒトは他のほ乳類と精子形成機構に対して同じ仕組みを持つことが期待され動物実験が代替手段として行われてきたが、必ずしも同じ仕組みがヒトにあてはまるとは限らない。我々は、ヒト生殖機能における内分泌かく乱物質の影響を探る上において、他の動物との共通の精子形成の仕組みだけではなく、今まで手薄となってきたヒト特有の精子形成の仕組みの両面を探る必要があると考える。しかし、ヒトを材料とした造精機能障害のメカニズムを探る実験はいままで、対象がヒトであること、体外に

において精子形成を維持できるヒト精巣組織の培養系、または精巣由来の細胞の培養系がないことから実験的な取り組みがほとんどなされてこなかった。*In vitro*でのヒト精子形成機構に関する研究は、円形精子細胞を精子細胞まで成熟させた報告があるのみであり、精子形成全体を網羅する実験系は未だ存在しない。昨今、様々な動物の精原細胞を免疫不全のマウスに移植することによって、精子形成を促す試みがなされているが、種の近いげっ歯類間においてのみ可能であることが報告されている。それに対して、様々な動物の未成熟な精巣組織の免疫不全のマウスへの移植は、種間を超え、正常な精子形成を促すことが確認されている。しかし、成熟した精巣組織の免疫不全のマウスへの移植は、同種のマウス組織の移植で短期間維持された報告があるのみである。我々は、免疫不全動物へヒトの精巣断片移植により、体外に取り出したヒト精巣の精子形成を免疫不全動物体内で促すこと、維持することができるのではないかと考え、精子形成維持系の開発を試みたので報告する。

【方法】①精巣を摘出した3種の免疫不全マウス、Aly/Nsc Jcl-aly/aly (Aly)、BALB/cA Jcl-nu (Nude)、C.B17/Icr-scid Jcl (Scid)をhostとして、その背中皮下に、幼若マウス(6-8日齢)C57Bl/6J Jclの未成熟な精巣を移植した。移植片を2ヶ月間マウス体内で保持した後、hostマウスを殺処分し、ホルモンの測定、移植片の組織学的検討を行い、最適なhostマウス系統を選択した。②同種動物の未成熟精巣、成熟精巣、造精機能障害を示す停留精巣、およびヒト成熟精巣を移植片として免疫不全マウスに移植し、移植片を2ヶ月動物体内で保持した後、動物を処分し、移植片の組織学的検討、hostの精巣重量測定、EIAによる各種血中ホルモンの測定を行った。移植片としてのヒト成熟精巣は、精巣腫瘍患者より摘出された精巣の肉眼的正常部位で精子形成の良好な部分を用いた。検体の使用に際しては、聖マリアンナ医科大学倫理委員会の承認の下、患者・ボランティアの方々より文書による同意を得た。

【結果と考察】①移植片の生着率及び精子形成はNudeならびにScidが良好な結果を示したので両者を以降の実験に使用した。②マウス成熟精巣を移植した結果、移植片生着率はNude 58.3%、Scid 77.8%を示し、精子形成はNudeは精原細胞まで、Scidは一部の移植片で精母細胞や残存精子やが見られた。マウス停留精巣を移植した結果、移植片生着率はNude 96.8%、Scid 91.7%を示し、精子形成はNudeは精原細胞まで、Scidは一部が精母細胞まで分化した。精巣腫瘍患者の摘出精巣の正常部位をNudeに移植した結果88.9%が生着し、精細管構造を維持すること、Leydig cell、myoid cell、Sertoli cellと精原細胞を維持し、一部で精母細胞を維持できることを確認した。生着移植片は基底膜の肥厚などのヒトの高度造精機能障害を示す精巣に特異的な特徴も示した。host血中

ホルモン濃度を EIA で測定した結果、移植片の精子形成が不良な例は良好な例と比較し、T が低く(停留精巣は高く)、LH、FSH が高かった。

以上の結果より、成熟したマウス及びヒトの精巣移植片は免疫不全マウスに精細管構造を保ったまま生着し、Sertoli cell と精原細胞及び、一部の精母細胞を今従来の培養系と比べ長期に維持できること、さらにマウス停留精巣移植片では精子形成能力を一部回復できることが明らかとなった。特にヒトの精巣移植片の精子形成維持については今までに例のない期待のできる結果となった。今後、正常な精子形成維持を可能にするため、内分泌環境の調整も含め host の状態の改善を検討する予定である。

5) マウス精巣由来培養細胞株の確立

【目的】近年、マウスより精原細胞由来の細胞株がクローニングされ、マウスでは精原細胞から精子までの精子形成過程を *in vitro* で再現することが可能になった。しかし、本来の精子形成過程は、精巣内で、様々な細胞との相互関係の上で進んでいると考えられる。精子形成過程を *in vitro* で精巣内に近い条件下で再現するためには、精巣における各種細胞の純粋な細胞集団を単離し、相互関係を調べることが重要である。しかしながら初代培養細胞では、細胞の性質が変化しやすいため実験に適していない。また、精巣内の総ての構成細胞に対して細胞株が樹立されているわけではない。また、既存の確立された細胞株では、精巣内のオリジナルな同種の細胞に比べ、その機能は一部に限られている。そこで我々は、本来の機能をなるべく多く維持した細胞株を総ての細胞種に対して作成することを試みており、今回、Sertoli cell 様の機能を持つ細胞株を成熟マウス 精巣よりクローニングしたので報告する。

【方法】6 週齢 C57BL/6J のマウス精巣由来の初代培養 Sertoli cell 株を単離し、飢餓状態にさらした後、細胞増殖の良好な接着性細胞集団を選択した。2 段階のサブクローニング後、細胞や核の形態が正常で、貪食能を有し、柵状構造を形成し、増殖能が高く、AR と PgR を共に発現し、その発現部位が正常であるという条件を満たす細胞クローンを選別し、さらに、AR と PgR の発現量が多いことを指標に細胞集団を絞り込んで最終クローニングを行った。

【結果と考察】成熟マウス精巣から Sertoli cell の性質を多数持つ細胞を 12 株クローニングした。クローン細胞株は、マウスの house keeping gene である cyclophilin を発現しており、Sertoli cell 以外の細胞に発現している c-kit (精原細胞)、LH-R, 3 β -HSD (Leydig cell)の発現は見られなかったが、本来 Sertoli cell で発現している、精細胞の分化や維持に重要だと考えられている stem cell factor、leukemia inhibitory factor、

basic fibroblast growth factor、transforming growth factor beta、 α -inhibin、AR、sulfated glycoprotein-2 の発現が確認された。一方、未成熟な Sertoli cell で発現し生殖巣の分化に必要とされる steroidogenic factor-1 や、Sertoli cell に存在する転写因子であるが、最近 KO mouse の研究から精子形成には不必要であることが明らかとなった GATA-1 の発現は見られなかった。これらのクローンは未成熟なマウスの精巣からクローニングされた既存の細胞株と比べ、様々な機能をあわせ持つことが確認できた。これらの細胞株は今後、精子形成過程を *in vitro* で再現するにあたり、重要なツールになると考えられる。

6) Y 染色体に存在する熱ショック転写因子、HSFY のヒト精巣における局在と、精子形成、精子成熟への役割について

【目的】HSFY はヒト Y 染色体上に存在する新規熱ショック転写因子(HSF)で、ヒト精巣特異的に発現する。しかし HSFY のヒト精巣における局在や、機能、役割については未だ不明である。本研究では、新家らとの共同研究で、ヒト精巣内でまず個々の細胞について HSFY の発現を詳細に観察し、精原細胞の分化、減数分裂、精子成熟の過程に関連した発現制御の有無について検討した。また、造精機能障害を示す精巣と成熟精子形成を示す精巣において、HSFY の発現を比較検討し、HSFY の発現の抑制と精子形成及び成熟に与える影響について推察した。

【対象と方法】比較的正常な精子形成を示す精巣断片 (JS 値>7.4)、無精子症または乏精子症の精巣生検の検体(JS 値<4.25)を材料とした。検体の一部をブアン固定し、パラフィン切片を作成、抗原の賦活化を行った後、抗 HSFY 抗体を用いて免疫染色を試みた。また検体の残りの部分からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE 後、抗 HSFY 抗体を用いて western blotting を行った。陰性対照として、抗原吸収を行った抗 HSFY 抗体を用いた。

【結果と考察】比較的正常な精子形成を示す精巣の場合、HSFY の局在は時期及び細胞特異的に見られた (3. 5(1) 2) 図3)。まず Dark A 精原細胞では核内でのみ発現が見られ、Pale A 精原細胞では核周辺部位にのみ発現が見られた。Type A 精原細胞での発現は一部の細胞に限られた。分化した Type B 精原細胞から第一減数分裂前期のレプトテン精母細胞までは発現が見られなかった。サイゴテン精母細胞になると、核内の染色体上で強い発現が見られるようになり、パキテン精母細胞では、その発現はまず核内の対合複合体に強く広がり、その後核周辺部位に強く見られ、パキテン期終期には発現が消失した。次に第一減数分裂後に 2 次精母細胞が形成されると、HSFY の発現は核か

ら細胞質へと一時的に見られ、第二減数分裂後、核と細胞質に見られた HSFY の発現は核の周辺部位に移行した。精子成熟期には HSFY は初め伸長精子細胞の核に見られ、その後発現は核から細胞質へと移行し消失した。Leydig cell や myoid 細胞、基底膜において HSFY の発現は見られなかった。しかし約半数の Sertoli cell では、細胞質において HSFY の発現が見られた。次に造精機能障害を示す精巣について HSFY の局在を検討したところ、対合複合体を形成するザイゴテン精母細胞や、第二次精母細胞で HSFY の発現に異常が見られた。さらに、精細管によっては片寄った HSFY の発現や、HSFY を発現している Sertoli cell の数に変化が見られた。また、western blotting の結果から精巣においても、HSFY のタンパク量は精子形成が正常なものと比較すると変化していた。これらのことは、造精機能障害の精巣において、時期特異的、また、細胞特異的に HSFY の発現に変化が起きていることを示している。

HSFY の時期ならびに細胞特異的な発現の解析より、精原細胞の分化、減数分裂、精子成熟の過程に平行した発現制御の存在が示唆された。さらに、造精機能障害を示す精巣において、減数分裂期の発現異常や、Sertoli cell における発現異常が認められたことから、時期ならびに細胞特異的な HSFY の発現は、HSFY が転写因子であることを考えあわせると、精子形成、成熟過程、特に減数分裂の機構に対し、重要な役割をになっている可能性が示された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価するための基礎的な研究としてヒト精子形成のメカニズムと内分泌かく乱物質等の造精機能への影響を評価する実験系の開発をめざして研究を行ってきた。本研究では、造精機能障害のある精巣に特徴的な物質として、基底膜 inner layer の糖タンパク質および通常とは異なるステロイド代謝物の存在が確認されたが、解析が進んでそれらの実体が明らかになれば、造精機能障害の特異的マーカーになる可能性がある。これらのマーカー物質は、内分泌かく乱物質等の精巣への影響を評価する有効なツールとなるとともに、造精機能障害の機序を明らかにする手がかりになると考えられる。

免疫不全動物の体内におけるヒト精子形成維持系ができれば、いままで不可能であったヒト精巣における実験を実際に検証することが可能になり、内分泌かく乱物質など環境因子の男性生殖機能への影響を直接評価することができるようになると思われる。

ヒト試料を用いた実験は、その試料の収集に制限があることと、動物実験では当たり前に得られるコントロールを、背景が多種多様なヒト試料の場合にはどのように定義し、得られた結果をどのように解釈するかという難しさがあつた。実際にヒ

ト精子形成のメカニズムを明らかにし、内分泌かく乱物質等の造精機能への影響の評価系を確立するには、まだまだ時間がかかると思われるが、この研究期間に得られたことを土台にさらに研究を発展させていきたいと考えている。

3. 2 男性生殖機能の評価に関する研究（岩本グループ）

(1) 研究内容及び成果

1) 造精機能マーカーとしての DJ-1 タンパク質に関する研究

Ornidazole などの内分泌かく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かく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した。なお、本研究は北海道大学有賀教授との「内分泌かく乱物質」プロジェクト間の共同研究である。

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 から 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 Lydig cell と精細管内の Sertoli cell、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。

③MBL 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 ELISA 法で 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 で妊婦配偶者精漿 356 例、不妊外来患者 98 例の精漿を測定し、精子濃度と運動率についての関連を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配偶者(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、妊婦配偶者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ーとされている 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。

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。

2) ヒト精漿・精子および精巣についてのプロテオーム解析

内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価する方法を探索する一環として、プロテオミクスの導入を検討した。

①網羅的解析を行い、正常のヒト精漿に存在するタンパク質をできるだけ多く同定することを試みた。精漿タンパク質を SDS-PAGE により分離し、各ゲル片に含まれる複数のタンパク質をトリプシン処理し、断片化する。LC/MS/MS によりこれらペプチドの質量を測定し、各ゲル片に含まれていた複数のタンパク質を MASCOT search を用いて同定する。この方法により、妊婦配偶者精漿 (10 名分) を解析した。各個人の精漿中に平均約 130 のタンパク質を同定することができた。このリストの機能的グループ化を行った結果、大多数が細胞外分泌タンパク質であったが、それ以外の精巣由来タンパク質も含まれることが明らかになった。これは徳島大学分子酵素学研究センター酵素分子生理学部門の谷口寿章教授との共同研究である。

②疾患との関連として当研究グループが保持している各種男性生殖機能障害の精漿サンプルについて二次元電気泳動を用いたタンパク質スポットの解析を行い、男性生殖機能障害マーカーとなり得るタンパク質を検索した。妊婦配偶者精漿 10 名分のゲルイメージ解析の結果、正常標準タンパク質のスポットマップが示された。このうちすべてのサ

サンプルに存在したのは 63 スポットであった。無精子症患者精漿のタンパク質のスポットマップを同様に作製し、正常標準タンパク質のスポットマップとの比較を行った。その結果、無精子症患者で消失するスポットが見いだされた。存在量の多いスポットについて LC/MS/MS および MASCOT search により同定した。

本研究により、ヒト男性生殖機能への影響を評価する方法として、特に体液として非侵襲的に得ることができる精漿タンパク質のプロテオミクスが有用であることが示された。

(2) 研究成果の今後期待される効果

内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価する方法を開発することを目標として男性生殖機能評価マーカーの検索を試みた。DJ-1 はここ 5 年間で急に注目されるようになったタンパク質で、ヒト DJ-1 は有賀グループにより遺伝子クローニングされた。有賀グループではその後 DJ-1 が androgen receptor の正の制御因子であることを明らかにし、その分子機構について引き続き研究を行っている。最近では家族性パーキンソン病の原因遺伝子の一つとされ活性酸素の消去およびプロテアーゼとしての役割もあることが判明している。また、DJ-1 のラットホモログである CAP-1/SP22 についても同時期、ドイツ及びアメリカ合衆国でそれぞれ同定され精巣毒性薬物との関連で不妊に関連する分子として注目されている。精巣毒性を示す薬物には内分泌かく乱物質も含まれることから DJ-1 が内分泌かく乱物質の一つのターゲットである可能性が示されている。

精漿タンパク質のプロテオミクスについてはこれまでにいくつかの報告がなされているが、いずれも代表的な構成タンパク質を評価するにとどまっている。今回我々の網羅的な解析により得られたタンパク質リストには、これまでの研究では精漿での報告がないタンパク質も含まれることがわかってきた。これらから不妊等の疾患に関連する因子を見いだすことができると考えている。また、これらの情報を用いて将来的には抗体ライブラリーを作成し、DJ-1 も含めたプロテインチップに応用する事が期待できる。

実用に耐える特定のマーカーを同定するにはいたらなかったが、DJ-1 タンパク質が実際にヒト男性生殖機能に関与していること、および方法論としてプロテオミクスが有用であることが証明された。精漿は非侵襲的に収集できる検体でありその構成タンパク質中に内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響を評価するマーカーを見いだすことができればヒトにおける暴露状況を広く調査することができると考えている。本研究ではその基礎を確立することができた。今後は精漿タンパク質中不妊および内分泌かく乱物質に関与する因子の同定にさらに取り組み、DJ-1 を含めた評価マーカーセットを用いたプロテインチップの開発が望まれる。

3. 3 内分泌かく乱により発現が変動する遺伝子の解析（岩本グループ）

（1）研究内容及び成果

1) 内分泌かく乱物質の精巣内ホルモン環境への影響と応答遺伝子に関する研究

【目的】 内分泌かく乱物質への曝露は生殖器官の発達を変化させて性機能の障害を引き起こすのではないかという指摘がなされている。本研究は近年増加が見られる精巣腫瘍、停留精巣、尿道下裂および懸念される精子数の減少など雄性生殖機能の低下が、飲水、食物あるいは環境中に存在する内分泌かく乱物質への曝露によるものであるとする仮説を検討するものであり、また内分泌かく乱物質の生体影響のバイオマーカーとなる遺伝子の検索を主として血液（白血球）において試みた。内分泌かく乱化学物質の多くは転写因子であるエストロゲンレセプターに結合して作用することから内分泌かく乱物質曝露による有害作用の多くが遺伝子発現への影響に起因すると考えられる。本研究では内分泌かく乱による精巣機能への影響を遺伝子発現の変化を指標としてヒトおよびマウスを対象として検討した。

【対象と方法】 大豆を含む食品および植物エストロゲンの含有量が多いとされる食品の摂取を2週間避け、極力植物由来エストロゲンのwash outをおこなった。Wash out 後大豆由来食品を2週間摂取した。摂取量はイソフラボン量に換算しておよそ500mg/dayであった。Wash out 後と大豆由来食品摂取後に採血した。血液（白血球）中のRNAを調製しディファレンシャルディスプレイ法を用いて大豆由来食品（植物エストロゲン）摂取によって変動する白血球遺伝子を検索した。その結果、大豆由来食品摂取によって変動するヒト白血球遺伝子としてcofilin-2と testican-3が得られた。これら遺伝子についてヒト白血球とマウス白血球、精巣および一部脳における発現をリアルタイムPCR法で検討した。

ヒトにおいては323人の健常若年成人ボランティアのうち精子濃度が $156.3 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ運動率が50%以上の7人（High-quality-group）と精子濃度が $22.4 \times 10^6/\text{ml}$ 以下かつ運動率が50%以下の11人（Low-quality-group）についてtestican-3とcofilin-2 mRNAの発現を検討した。

動物実験には2～3ヵ月齢のC3H/He系とC57BL/6系マウスを用いた。飼料は植物由来エストロゲンを極力含まないように製造した飼料（オリエンタル酵母社製、試験飼料No.2）を使用した。妊娠マウスは朝に膣プラグを確認した日を妊娠第1日（GD1）とした。Bisphenol-A（BPA） $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ をGD1からPND10（出

生日をPND1とした)まで母体に飲水投与し、PND120仔の精巣、血液および脳を採取した。対照には溶媒の0.05%エタノール溶液を投与した。Diethylstilbestrol (DES) 3 μ g/rat/dayをPND1からPND5までの5日間、仔の皮下に投与し、PND120で精巣、血液および脳を採取した。対照には溶媒のオリーブ油を投与した。また2ヶ月齢マウスで実験的精巣障害モデルとして両側に停留精巣を施術し、施術60日後に精巣と血液を採取した。対照には偽手術を施行した。これら処置を行ったマウスの血液(白血球)、精巣、血液および一部脳についてtotal RNAを調製し、testican-3とcofilin-2の2つの遺伝子についてそのmRNAの発現をリアルタイムPCR法で検討した。

【結果】①Low-quality-group ではHigh-quality-groupに比べ白血球のcofilin-2 mRNAの発現が22%、testican-3 mRNAの発現が52%ともに有意に低下し、精子数と精子運動率がともに大きく低下している症例では白血球のcofilin-2とtestican-3、特にtestican-3の遺伝子発現が低下していることが示された。②BPA 200 μ g/mlを胎児期と授乳期に母体経由で曝露されたマウスでは対照に比べcofilin-2 mRNAの発現とtestican-3 mRNAの発現が有意に低下した。DESを出生直後の5日間投与されたマウスでは対照に比べ白血球のcofilin-2 mRNAの発現が有意に低下、testican-3 mRNAの発現は低下傾向を示した。精巣においてはBPAを胎児期と授乳期に曝露されたマウスでは対照に比べcofilin-2 mRNAの発現が有意に低下、testican-3 mRNAの発現が低下傾向を示し、BPAの胎児期と授乳期に曝露により白血球と同様に精巣においてもcofilin-2とtestican-3の遺伝子発現が低下することが示された。DESを出生直後の5日間投与されたマウスでは対照に比べ精巣のcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現が有意に低下、DESの新生児期投与により白血球と同様に精巣においてもcofilin-2とtestican-3の遺伝子発現が低下することが示された。さらに脳においてもBPAの胎児期と授乳期曝露およびDESの新生児期投与により白血球と精巣と同様にcofilin-2とtestican-3の遺伝子発現が低下することが見出された。③停留精巣を施術されたマウスの精巣におけるcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現はともに有意に低下し、機能障害をおこした精巣においてこれら遺伝子の発現が低下していることが示された。一方停留精巣マウスでは白血球におけるこれら遺伝子の発現には変化はなかった。

【考察】本研究において内分泌かく乱物質曝露や機能障害をおこしている精巣においてcofilin-2とtestican-3の遺伝子発現が低下することを見出した。また内分泌かく乱物質曝露は白血球においてもこれら遺伝子の発現を低下させ、精巣における内分泌かく乱物質曝露の影響を白血球における変化が反映している可能性が示された。

Cofilinはアクチン脱重合活性と切断活性をもつアクチン結合性タンパク質である。Cofilinはリン酸化されることによりアクチン結合活性、脱重合活性、切断活性を失う。Cofilinのリン酸化に作用するLIM-キナーゼ（LIMK）はアクチン骨格制御因子として働く。生殖細胞ではLIMKのイソフォームであるLIMK2が減数分裂のプロセスに重要な役割をもち精子形成に関与することが示唆されている。またcofilinの細胞質から核への移動や核内での蓄積が精子細胞の発達に影響することが示唆されている。Testicanは精巣で見出されたプロテオグリカンの構成に関わるペプチドでtestican-1、testican-2、testican-3のイソフォームが存在する。Testicanの生理機能は現在明らかでないが、脳に多く分布するほか、下垂体、精巣、前立腺などにも比較的多く分布していることから、雄性生殖機能への関与が推定される。また本研究においてtestican-3の遺伝子発現が内分泌かく乱物質曝露により脳において変動していたことから、testican-3の脳における生理的役割についても興味もたれる。

BPAの新生児期や胎児期曝露は精巣重量減少、精子数減少、前立腺重量増加、性成熟期における血清T濃度低下等を生じることが報告されており、本研究でのBPAによる精巣および白血球のcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現低下がこれら雄性生殖機能の低下と関連している可能性がある。BPAは弱いエストロゲン活性を有する内分泌かく乱化学物質であり、BPAによるcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現低下も少なくとも一部はエストロゲン作用によるものと推定される。また、強いエストロゲン活性をもつDESの曝露においても同様の傾向が見られた。これらの結果は、白血球の変化が精巣における変化を反映していることを示唆しており、cofilin-2とtestican-3 mRNAの白血球における発現がエストロゲン様内分泌かく乱物質の曝露による精巣機能への影響のバイオマーカーになる可能性を示唆している。

一方、停留精巣を施術されたマウスではcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現の変化は精巣のみで認められ、白血球においては見られなかった。このことは白血球のcofilin-2とtestican-3遺伝子の発現はBPAやDESなど外来性に曝露されたエストロゲン様内分泌かく乱物質の影響をより強く反映することを示唆している。

今後さらに内分泌かく乱物質曝露における精巣のcofilin-2およびtestican-3遺伝子の発現低下の意義を明らかにしていくためには、これら遺伝子と精巣機能とくに精子形成との関係をまず明らかにする必要がある。このために現在男子不妊症患者の血液およびヒト精巣組織におけるcofilin-2とtestican-3 mRNAの発現について検討を進めている。

2) 低用量内分泌かく乱物質曝露の精巣遺伝子発現への影響に関する研究

我々はまた低用量DES母体経由曝露の精巣への影響を遺伝子発現の変化を指標とし

て検討した。内分泌かく乱物質は標準的な毒性試験における無作用量や無毒性量でホルモン様作用を示す可能性が指摘されている。本研究ではDES 1 μ g/kg/day 母体曝露の胎児および仔の精巣遺伝子発現への影響をディファレンシャルディスプレイ法により検討した。得られた15、000個以上のバンド(mRNA)の解析から meiosis-specific of the Struvtural Maintenance of Chromosomal family に属するSMC1 β とDNAのメチル化に関与する β -globin遺伝子の発現が低用量DES曝露で増加することを見出した。SMC1 β mRNAは妊娠17日の胎児から出生3日の仔で、 β -globin mRNAは妊娠13日の胎児から出生1日の仔で発現が増加していた。これら2つの遺伝子を含め成熟マウスでの変動は認められなかった。低用量DES曝露の精巣遺伝子発現への影響は変動が見られた遺伝子数からは僅かといえるが、DNAのメチル化は遺伝子の転写調節に重要であり低用量DES曝露により胎児期から新生児期に発現が増加した β -globin遺伝子の精巣機能への影響について今後検討していきたい。

3) BPAの胎児期曝露によるラット雄性生殖機能への影響

【目的】げっ歯類では胎児および新生児精巣由来のテストステロン(T)とこのTが脳内でアロマトーゼにより芳香化されて生成されるエストラジオールが生殖器官や脳の性分化、発達に重要な役割を持つことが知られている。Rhodaらはラット雄では血中T濃度が出生2時間後に鋭いピークを示し、同時に視床下部のエストラジオール濃度もピークを示すことを報告し、これが性分化に重要であることを示唆している。本研究ではBPAの胎児期母体経由曝露が性分化に重要とされる周産期T濃度への影響についてラットを用いて検討した。

【対象と方法】2~3ヵ月齢のSprague-Dawley系ラットを用いた。飼料は植物由来エストロゲンを極力含まないように製造した飼料（オリエンタル酵母社製、試験飼料No.2）を使用した。BPAは0.2, 2, 20, 200 μ g/mlとなるように0.05%エタノール溶液を用いて調製した。BPAはGD1（妊娠日）から出生日（PND1とした。GD23にあたる。）まで母体に飲水投与した。対照動物には0.05%エタノール溶液を投与した。GD22の胎児および出生2時間後（PND1-2hとする）の仔の血液およびPND1-2hの仔の精巣を採取した。

【結果と考察】GD22における胎児の血清BPA濃度は母体に投与したBPAの用量に関連して増加した。BPA曝露量の差に比べて胎児血中BPA濃度の差は小さかった。これはBPAの肝における、おそらく母体肝における代謝が速いためと考えられる。BPAの耐用1日摂取量は最大無毒性量（NOEL）50mg/kg/dayに安全係数1/1000を乗じた50 μ

g/kg/dayと定められている。今回の曝露に用いたBPAの用量0.2, 2, 20, 200 μ g/mlはおおよそ10 μ g/kg/dayから10mg/kg/dayの投与量に相当する。現在までにBPAのマウスおよびラットに対する胎児期母体経由曝露により、雌仔において100 μ g/kg/dayで雌仔の膈開口延長と発情期延長(SDラット)、雄仔において300mg/kg/dayで精巣上体・精囊重量減少(CD-1マウス)、100~400 μ g/kg/dayで精巣重量減少(Wistarラット)、20 μ g/kg/dayで1日精子生産量減少(CF-1マウス)、2 μ g/kg/dayで前立腺重量増加が示されている。

本研究において対照ラットPND1-2h仔の血中T濃度はGD22胎児の約2.5倍であった。これはRhodaらの報告と一致しており、本実験におけるラットPND1-2h仔の血中T濃度は出生直後の血中T濃度ピーク時のものであることを確認した。BPAの母体経由胎児への曝露は用量に相関してPND1-2h仔の血中T濃度を有意に低下させた。これはBPAのラット胎児期曝露がPND1-2hにおけるTの一過性分泌に対して影響することを示している。PND1-2h仔の血中T濃度を有意に低下させた200 μ g/ml BPAの曝露は成熟精巣の形態には光学顕微鏡下では影響しなかった。出生直後の血中T濃度ピークの抑制が精巣機能におよぼす影響は現在のところ不明である。Rhodaらはラット雄で見られる血中T濃度の出生2時間後のピークと同時に視床下部のエストラジオール濃度もピークを示すことを報告し、これが性分化に重要であることを示唆している。またBPA低用量の母体経由曝露による脳内性的二型核や攻撃性への影響が報告されている。これらのことからBPA胎児期曝露による出生2時間後の血中T量低下は精巣機能に対するよりも中枢の性分化への影響する可能性も考えられ、中枢への影響についても今後検討する必要があると思われる。今回PND1-2h仔の血中T濃度を有意に低下させた200 μ g/ml BPAは高用量であるが、同様の作用を有する複数の内分泌かく乱物質への複合曝露、種差や系統差による内分泌かく乱物質に対する感受性の相違等も考え合わせるとBPA胎児期曝露による血中T濃度出生直後のピークの抑制が生殖機能や中枢機能などの生体へ及ぼす影響の解明は重要と考えられる。

4) 植物エストロゲンの2元的作用

内分泌かく乱物質は受容体を介する他に、ステロイドホルモンの生合成経路に干渉することによってもホルモン作用をかく乱すると考えられている。androgenをエストロゲンに転換するアロマターゼは性分化や生殖機能の分化・発達・維持のみならず広範囲にわたって生体機能に関与する重要な因子である。内分泌かく乱物質の一つと考えられる植物エストロゲンのアロマターゼ活性に対する効果についてMCF7細胞を用いて検

討した。まずMCF7細胞を用い、pS2遺伝子の発現を指標としてエストロゲン活性を測定する系にTを添加することによりアロマターゼ活性を同時に測定する系を確立した。調べた植物エストロゲンのうちのゲニステインを除く数種類で1 μ M以下の低濃度ではアロマターゼ阻害作用を、1 μ M異常の高濃度ではエストロゲン作用を現し、U字型の用量反応曲線を示した。植物エストロゲンの摂取には乳癌発症のリスクを下げる効果があるとの報告があるが、本研究で示された低用量でのアロマターゼ阻害作用がこれに関与している可能性がある。

5) その他得られた知見

出生後の特定の時期にマウス精巣において発現がアップレギュレートされる遺伝子としてLANCL1(LanC-like protein 1)を見出した。LANCL1は脳と精巣に発現し、これら血液組織関門の背後に位置する組織において免疫監視機構として働くと考えられている。本研究からLANCL1 mRNAは16日齢までは発現は低いその後徐々に増加し、22-24日齢でプラトーに達することが示された。マウス血液精巣関門は10-16日齢に完成されるとの報告とあわせ、LANCL1 mRNA発現のアップレギュレートは血液精巣関門の形成と関連することが示唆される。

(2) 研究成果の今後期待される効果

内分泌かく乱物質曝露によって変動する遺伝子の探索はディファレンシャルディスプレイ法やマイクロアレイ法により多く実施され、内分泌かく乱物質曝露によって多くの遺伝子の発現が変動することが示されているものの、内分泌かく乱物質曝露のバイオマーカーとして有用な遺伝子は見出されていない。本研究で見出したcofilin-2とtestican-3遺伝子の内分泌かく乱物質曝露のバイオマーカーとしての有用性を今後明らかにしていきたい。そのためにはまずこれら遺伝子の生殖機能における生理的役割を解明していくことが必要であり、これに対する内分泌かく乱物質の影響を明らかにしなければならない。さらに本研究では、cofilin-2とtestican-3の遺伝子発現は脳においても内分泌かく乱物質により低下することを見出した。これら遺伝子の脳における生理的役割を解明するとともに、内分泌かく乱物質曝露が脳に及ぼす影響との関わりを明らかにしていくことも今後の研究課題である。また非侵襲的に採取可能な白血球におけるこれら遺伝子の内分泌かく乱物質曝露による変動は精巣および脳と同じであった。このことはヒトの白血球での発現を調べることで内分泌かく乱物質への曝露を推定できるバイオマーカーとしての応用を期待させるものである。今後精液所見の相違や精巣の種々病態におけるヒト精巣組織におけるこれら遺伝子の発現とヒト白血球における発現との相関、さらに

ヒト血液中内分泌かく乱物質濃度とヒト組織や白血球における発現との相関を明らかにしていきたい。

3.4. 内分泌かく乱物質のゲノム維持ヘリカーゼへの影響（古市グループ）

(1) 研究内容及び成果

1) BPAによるDNA損傷

コメットアッセイは、DNA2本鎖切断を個々の細胞レベルで検出できる高感度DNA損傷検出法である。17 β -エストラジオール及びその代謝物であるカテコールエストロゲンは、DNAへの損傷作用があり、損傷の過程にはエストロゲンレセプター（ER）の関与が知られている。内分泌かく乱作用が懸念される化合物の多くは、ERに対しE2と拮抗的に作用するため、これら化合物のDNAへの作用、すなわちDNA維持機構への影響は、非常に興味があるところである。我々は、ERに結合することが報告されているBPAをヒト乳ガン細胞でありERを発現しているMCF-7細胞の培養系に添加した後、コメットアッセイでDNAへの損傷能を評価した（Fig.1）。その結果 10^{-8} ~ 10^{-4} MのBPAの添加でコメットの形成が観察され、DNAの損傷により生じるDNA断片の蓄積と移動距離はBPAの濃度に依存して増加する傾向が見られた（Fig.2）。E2のDNAへの損傷作用は、BPAの約1/1000の濃度で認められた。BPAの傷害濃度は、比較的高く（ μ Mレベル）、血中、尿中で検出されるBPAの濃度はnMレベルであることを考えると、BPAに暴露されることによって生じるDNA損傷のリスクは低いと考えられた。

2) RecQヘリカーゼの発現変化

ゲノム維持に働くRecQヘリカーゼ群のひとつであるブルームヘリカーゼ（BLM）の抗体及びDNA損傷のマーカーのひとつであるリン酸化ヒストンH2AXの抗体でE2やBPA処理後の細胞を免疫染色すると、DNAの修復に関わるBLMは、DNAの損傷部位に集積し、発現が誘導されていることが観察された（Fig.3）。BLMmRNAを定量的PCR、そしてBLMタンパクをイムノブロッティングで検出したところ、培養系に添加したE2及びBPA濃度に依存してBLMの発現は遺伝子レベル及びタンパクレベルで上昇していることが確認できた（Fig.4）。これらの発現上昇の経時的な測定結果や、発現の上昇がシクロヘキシミドで阻害される事象から、BLMの遺伝子発現上昇は、E2による直接的な誘導ではなく、何らかのタンパク合成がされた後に起こる2次的な現象であることが示唆された。E2によるこの現象は、ERのアンタゴニストICI182,780によって、阻害されることから、E2のレセプターを介したものであることが示唆された。

3) プロモーター活性への影響

BLM遺伝子の発現は、遺伝子上流のプロモーター領域で制御されており、そのプロモーター領域の活性測定には、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたプロモーターアッセイが、適している。そこで、BLM上流のプロモーター領域（約300bp）をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したプラスミドを構築し、プロモーターアッセイによって、E2及びBPAのBLMプロモーター活性に対する影響を調べた。その結果、E2及びBPAは、濃度依存的にBLMのプロモーター領域を活性化することを見出した（Fig.5）。このシステムを用いることにより、ブルームヘリカーゼタンパクの発現に影響を与える化合物を感度良く簡便に調べることが可能となった

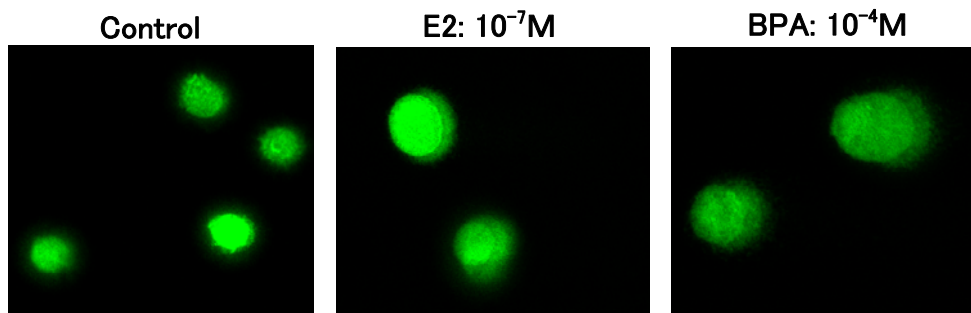


Fig.1 Photomicrographs of damaged DNA observed after 24h treatment in Comet assay

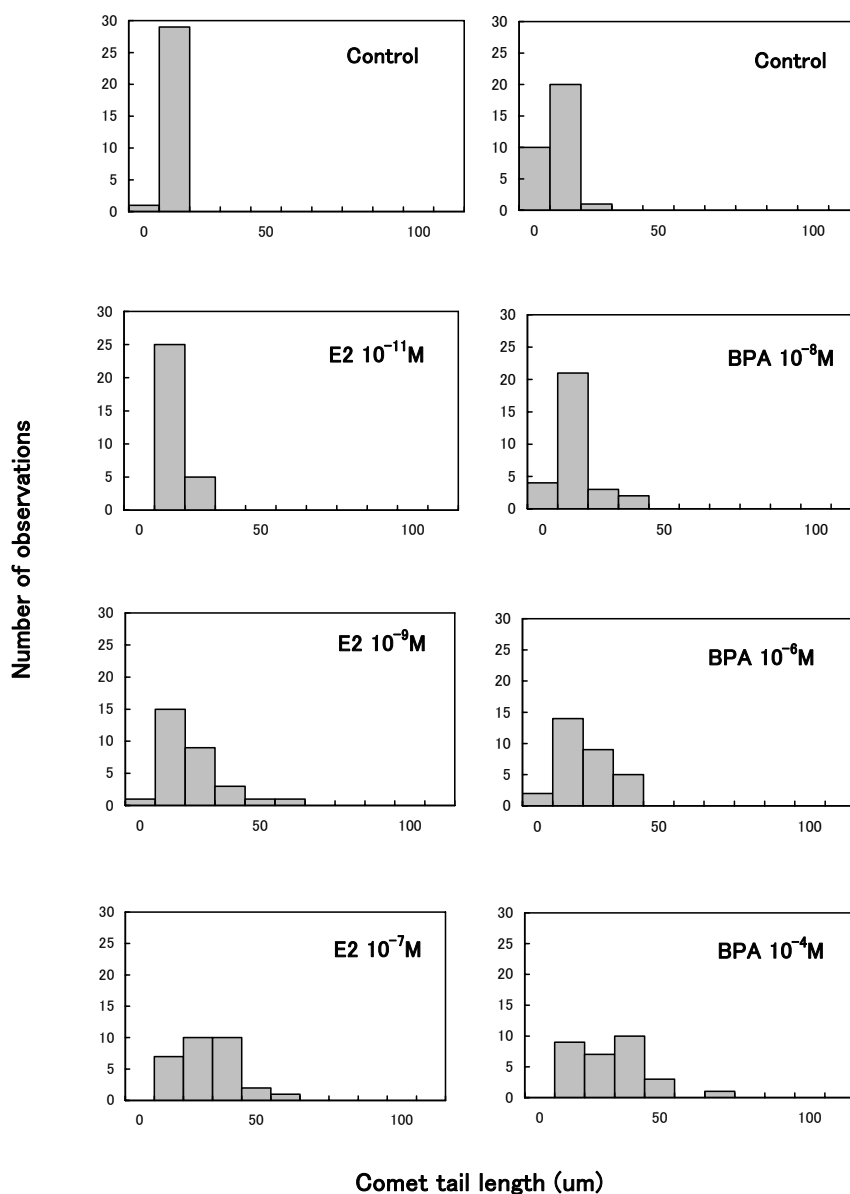


Fig.2 E2 and BPA induce DNA damage in MCF-7. Cells were treated with E2 (10^{-11} , 10^{-9} and 10^{-7} M) or BPA (10^{-8} , 10^{-6} and 10^{-4} M). Following a 3h treatment, cells were disaggregated with trypsin and examined by the comet assay as described in Materials and methods. Comet tail length (CTL) was measured in 30 cells each test. Data shown a typical result obtained from three identical examinations.

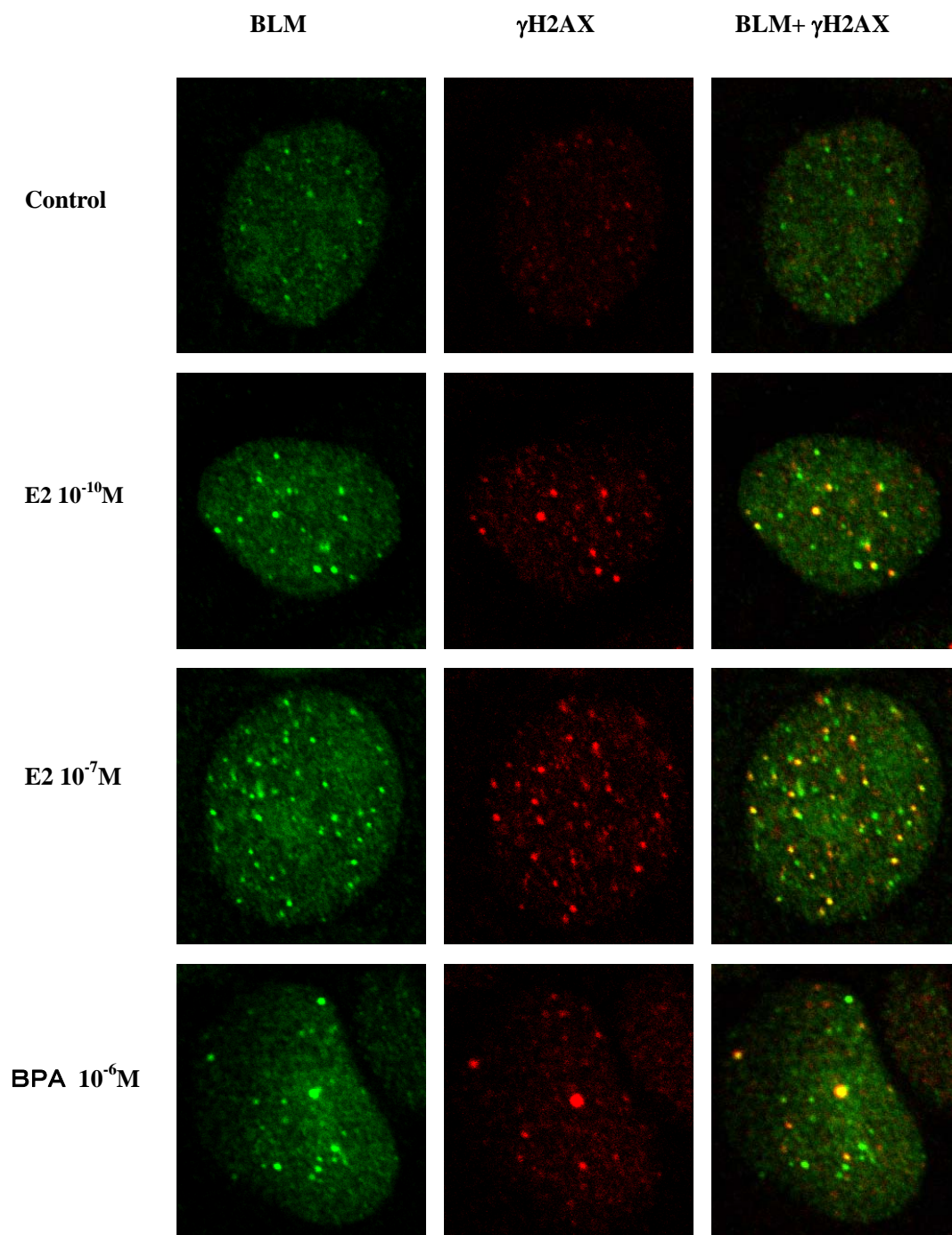


Fig. 3 BLM colocalizes with γ H2AX after DNA damage induced by E2 and BPA. After MCF-7 was treated with 10^{-10} and 10^{-7} M E2 or 10^{-6} M BPA for 3 h, coimmunostained with anti-BLM and anti- γ H2AX antibodies. BLM was stained green, γ H2AX was in red. Colocalization was indicated in yellow.

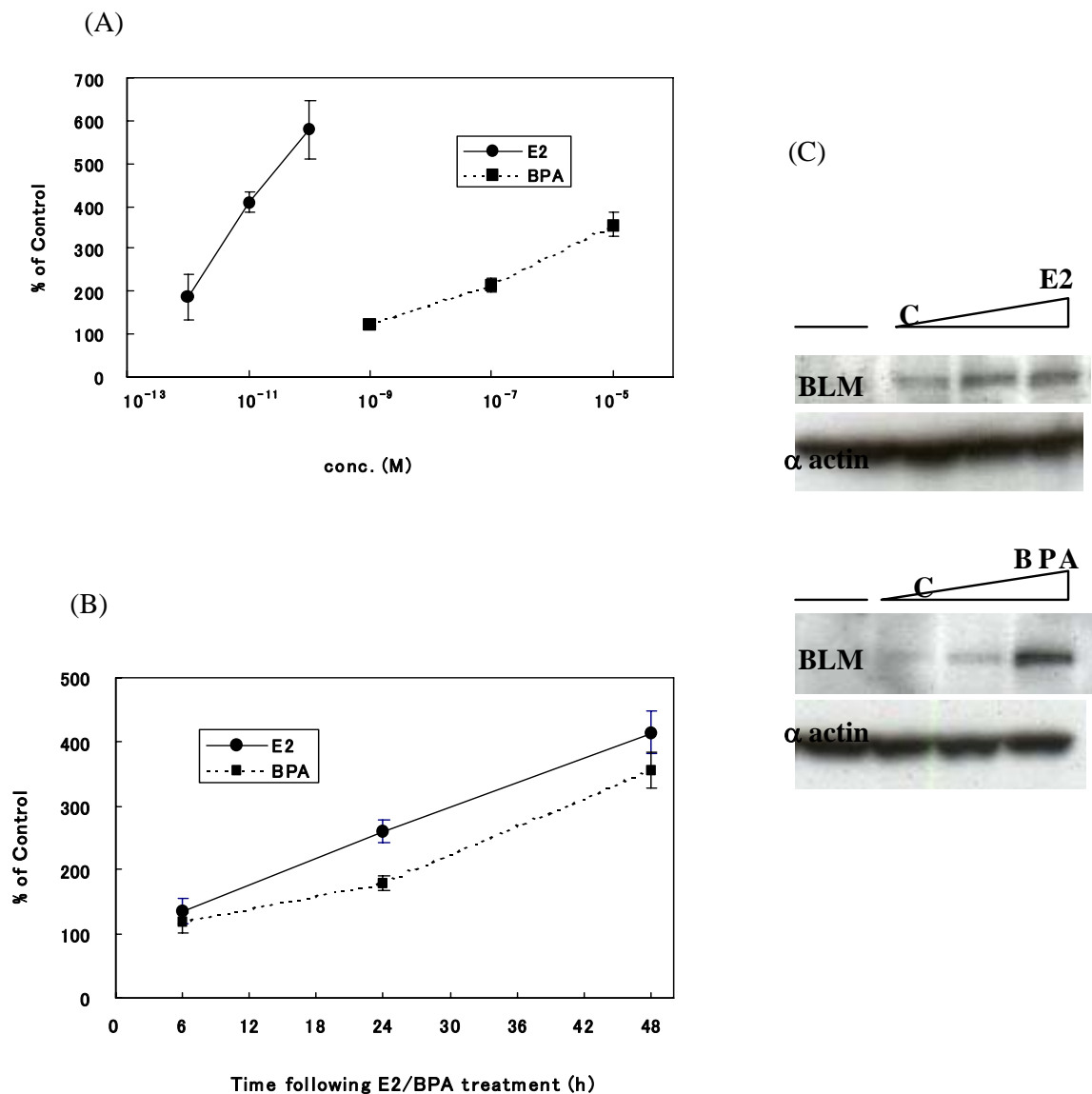


Fig.4 Induction of BLM expression by E2 and BPA.

Expression level of BLM was determined by the TaqMan RT-PCR analysis.

Data represent mean \pm standard deviation from sample analysis in triplicate.

(A) MCF-7 was grown in the presence of E2 (10^{-12} - 10^{-9} M) or BPA (10^{-9} - 10^{-5} M) for 48 hrs. (B) Time course analysis of BLM expression.

E2 and BPA induced BLM protein in MCF-7 cells.

(C) Immunoblot analysis was performed after treatment with E2 (10^{-12} , 10^{-10} and 10^{-12} M) or BPA (10^{-9} , 10^{-17} and 10^{-5} M) for 72 hrs.

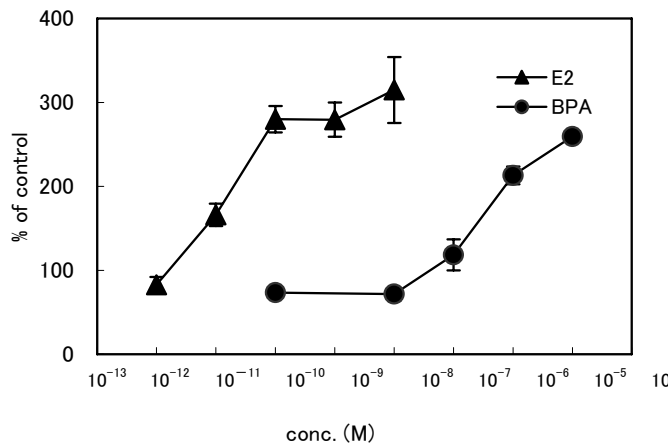


Fig.5 BLM promoter activity induced by E2 and BPA

MCF-7 cells were transfected with reporter plasmid pGL3-BLM and cultured in the presence of E2 or BPA at the indicated concentrations. After 48h cell extracts were measured for Luciferase activity. Data represent mean \pm standard deviation from sample analysis in quadruplet.

(2) 研究成果の今後期待される効果

生体が持つゲノム維持の機能、並びにこれに関与する細胞内の DNA ヘリカーゼは、加齢に伴い減衰することが我々の研究から判っている。ゲノム修復機能は、本来、放射線や紫外線などの自然界から与えられる外的要因と種々のストレスに由来する内在性酸素ラジカルによって起こる DNA 傷害に対して用意されたものであり、人工的化学物质よりなる様々な内分泌かく乱物質に由来する DNA 傷害に対しては無防備である可能性が高い。本研究で開発した DNA 傷害と修復系の検知プロトコールは、低濃度の内分泌かく乱物質がヒトゲノム修復機構に与える影響を調べる上で、全く新しい指標を示すものである。この実験系を用いて、内分泌かく乱物質として良く知られる BPA を添加した場合、ゲノムに対する損傷能を示すことが判った。用いた濃度 (μ M レベル) が生体内で検出される濃度 (nM レベル) に比較して高く、また損傷を受けたゲノムは、ブルームヘリカーゼをはじめと

する生体が持つゲノム維持の機能により修復されることが推察されたことから、内分泌かく乱物質が生体のゲノム不安定化を引き起こす可能性は低いと考えられた。しかしながら、生体が持つゲノム維持の機能、特にこれに関与する細胞内の DNA ヘリカーゼは、加齢に伴い減衰することが我々の研究から判っているため、ゲノム維持機能が低下している場合には内分泌かく乱物質に由来する DNA 傷害に対しては無防備である可能性が高く、内分泌かく乱物質のゲノム維持機構への影響は否定できない。これら検知プロトコールによって、ヒトゲノム修復機構に影響を与える内分泌かく乱物質を調べることに役立つものとする。

3. 5 Y 染色体の遺伝的多様性と男性表現系に関する研究（中堀グループ）

(1) 研究内容及び成果

1) 日本人男性集団における Y 染色体の遺伝的多様性と精子形成能についての検討

【背景】我々は、過去に YAP 多型をもつ男性集団（我々の以前の分類では haplotype II で現在の分類では、haplogroup D とよばれる）は、他の男性に比して精子濃度が有意に低いことを示した（J.Hum.Genet. 1999 : Kuroki.et.al）。ところで、近年、Y 染色体の遺伝的多様性に基づく人種間あるいは民族間の遺伝的な関連性に関する研究が世界的に注目されるようになってきている。現代日本の成り立ちは埴原が提唱しているように、原日本人と推測される‘縄文人’が住んでいた日本列島に、いわゆる弥生時代以降に大陸から新たに流入した‘弥生人’が流入することで形成されたと考えられている。Y 染色体の遺伝的な多様性から見地からみると YAP 多型をもつ Y 染色体は、Hammer や宝来らによって指摘されているように、原日本人である縄文人に由来すると考えられる。

本研究では現代日本人の Y 染色体を遺伝的多様性の視点から‘縄文系’と‘弥生系’と捉える中で、それぞれの系統に由来する Y 染色体を持つ男性間の精子数などを含む様々な男性表現型の違いを明らかにすることを目的とした。

【方法及び結果】本研究では、各地域の「妊婦配偶者」と「若年男性（大学生）」について、①Y 染色体 haplogroup 分類と②アンケートおよび③精液所見についてのデータを得た上で、精子所見と Y 染色体 haplogroup やその他の因子との統計的解析を行うことを計画した。現時点で、3 項目のデータが得られている札幌、金沢、大阪、福岡の妊婦配偶者の男性について、これらを用いて解析を行った。

1) 日本各地域における Y 染色体 haplogroup 頻度

先ず日本列島各地における両者の割合を知るため、札幌、神奈川、金沢、大阪、徳島、福岡、長崎における、Y 染色体の頻度を解析した。岩本リーダーとの共同で解析した検

体の総数は 3,120 検体、このうち細かな haplogroup まで決定したものは 2,260 検体であり、その一部を図 1 に示す (図 1、表 1)。日本列島の都市部においては、縄文系と弥生系の頻度は半々よりやや弥生系が多いことが共通しており、顕著な地域差はない。細かく観察すると、それぞれに特徴が見られるが、それでも、弥生主流派はどこにおいても haplogroup O2b1 であり、縄文系も haplogroup D が常に主流を占めている。haplogroup O2b1 は、中国人の大部分を占める Han の O1 のグループと近縁であるが、その先祖型である O2b*とともに、ほとんど日本と韓国、台湾にしか見られないタイプである。韓国においては先祖型 O2b*が多いのに、日本においては検体が得られた全ての地域で、O2b*は O2b1 の半分程度とシェアを減らして主流の座を滑り落ちている。まとめると、弥生系・縄文系のどちらともつかないものもあるが、haplogroup C を縄文系と考えると、どの都市においても縄文系と弥生系の比は半々より、少し弥生系のほうが多い。

2)精子数と Y 染色体 haplogroup

縄文系の生まれ月は春が多く、弥生系の生まれ月は秋が多い。主要な縄文系、弥生系の Y 染色体の系統において、平均精子濃度の季節変動があり、その変化 (下がった後の立ち上がりの時期) はそれぞれが多く生まれる季節と対応しているようにみえる。具体的なデータの提示は論文投稿準備中のため差し控えるが、検体収集の時期ごとに精子数と Y 染色体 haplogroup との関連性を検索すると、弥生系 Y 染色体の主要な haplogroup である O2b1 を持つ男性の精子数の変動は縄文系 Y 染色体を持つ男性のそれと好対照をなしていることが明らかになった。

我々は初期の研究で縄文系 Y 染色体をもつ男性が弥生系 Y 染色体をもつ男性に比べて精子数が多いとの知見を得ていた。多数検体を集めた今でも同様の傾向があるが、年間平均すると有意差は認められなかった。しかしながら、Y 染色体 haplogroup 間での平均精子数の季節変動を考慮すると、その理由は検体の収集時期にあると推測される。以前論文 (J.Hum.Genet. 1999 : Kuroki.et.al) で解析した検体は、1997 年 11 月から 1998 年 8 月初旬までに集中して集められた妊婦配偶者の検体であり、この時期は、haplogroup D の平均精子濃度が低い時期にあたる。

【考察】中堀は「Y 染色体上の遺伝子は何らかの形でヒトの性淘汰に関わっている」という作業仮説の下で、異なる系統の Y 染色体をもつ現代日本人男性の表現型の違いについて探索的に研究を行ってきた。今回の研究の結果、タイプ間の季節的な棲み分けが存在することが、日本各地において Y 染色体 haplogroup 頻度が類似している一つの大きな要因であろうと結論した。ヒトには季節繁殖性はないと考えられてきたが、縄文系の全

ての系統は、春に子を産むという北方系生物の戦略をとっているように見え、それを男性側の要因で調節しているように見える。例えば、日本に住むもう一つの霊長類であり、北限のサルであるニホンザルはあきらかな季節繁殖性である。これに対して、熱帯に住む高等な（真猿類以降の）霊長類にはほとんど季節繁殖性は見られない。日本は四季がはっきりしており、日本の動物の多くは春に生子、夏、秋と育てて冬を越すパターンである。同じ特性を縄文系の人ももっている。O2b1の男性の平均精子濃度の季節変動は、原日本人の濃度と好対照となっている。このことは先住者がいる場所での後発組としての繁殖に有利であったと推測され、これが日本列島でO2b1が主流となった一つの理由と考える。

今後は、今回の研究で得られたY染色体haplogroupと男性表現型との関連性についてより詳しい解析を行うために、①日本人男性のhaplogroupごとに、精子形成に年（またはそれに近い）周期が存在するかの確認、②個人の精子濃度の縦断的解析、③生まれ月とhaplogroupの関連の有無を他の日本人集団でも確認、④親子間での誕生季節関連の有無などの検索が必要となってくる。さらに、具体的にY染色体上のどの遺伝子が（あるいは構造そのものが）Y染色体の系統の違いによる表現型の差を生み出しているかを特定していく必要がある。

2) ヒトY染色体無精子症候補領域AZFbに存在する新規無精子症候補遺伝子HSFY (heat shock transcription factor like Y) 遺伝子の機能に関する研究

【背景】ヒトY染色体上には3つの無精子症候補領域(AZFa, b, c)が存在する。HSFYはヒトY染色体上に最近マップされたが、その機能は明らかとなっていない。そこでHSFYとヒト無精子症との関連、およびHSFYの機能を明らかにする目的で研究を行った。

【方法及び結果】無精子症患者57名についてHSFYの欠失を検索した。その結果、無精子症患者2名でHSFYを含むY染色体の欠失を見出した(図2-a)。次にHSFYの発現を正常組織を用いたノーザンブロット解析で検索した。その結果、この遺伝子は精巣で特異的に発現していることが判明した(図2-b)。またHSFYのマウスにおける相同遺伝子についてもRT-PCRによって発現を検索したところ、やはり精巣特異的な発現を認めた。さらに無精子症患者の精巣組織においてHSFYの発現をRT-PCR法によって検討したところ、健常コントロールに比べてHSFYの発現が著明に低下していた。またHSFYに対するポリクローナル抗体を作成し、タンパク質レベルでの発現を検討したところHSFYは精巣でタンパク質として発現していることが確認された(図2-c)。またHSFYの細胞内局在を知るために、Myc-HSFYをNT2/D1細胞に過剰発現させて、共焦

点レーザー顕微鏡による解析を行った。その結果 Myc-HSFY は NT2/D1 細胞においては細胞質に局在することが明らかとなった。

さらに共同研究者の佐藤らとの共同研究でヒトの精巣組織において HSFY の局在を検索したところ、HSFY は精子形成細胞と Sertoli cell に発現していることが判明した (図 3)。特に精子形成細胞系列においては時期特異的に細胞質と核の間で HSFY はその局在を変化させることが明らかになった。

HSFY の機能を知るために HSFY と相互作用するタンパク質分子を酵母ツーハイブリッド法によって同定した。同定された分子には focal adhesion に関与した分子が含まれ、この分子 (仮に A とする) も細胞質と核の間を往復するタンパク質であった。またアポトーシスに関与する分子 (仮に B とする) も HSFY 相互作用配偶者として同定された。

【考察】 HSFY はいわゆる他の古典的な HSF ファミリーのメンバーとその構造が大きく異なる。HSFY は AZFb 領域に存在すること、およびその分子生物学的な特徴から考えてヒトの精子形成に何らかの役割を担っていることが示唆された。最近では HSFY と類似した遺伝子が chicken でも同定されており、この遺伝子が脊椎動物で広く保存されている可能性が出てきている。HSFY とその相互作用配偶者との相互作用についての解析が HSFY 機能を明らかにするために重要であると考えており、この方面の研究を今後進める。

3) ミュラー管抑制因子(MIS)の転写活性に及ぼすエストロゲンの影響について

【背景】 近年内分泌かく乱物質がヒトの性分化や生殖機能に影響を与えるのではないかと懸念されている。しかしながら、未だヒト性分化の過程には分子レベルで不明な点が多く、ヒト性分化に内分泌かく乱物質の影響があるか否かは未だ明らかでない点が多い。そこで、エストラジオール(E2)がヒト性分化で重要な役割を担っている MIS の発現にどのような影響を及ぼすかをプロモーターレベルで検討した。

【方法及び結果】 ヒト MIS 遺伝子の翻訳開始コドンの直上より上流 273bp を含む遺伝子断片をホタルルシフェラーゼの上流に結合したプラスミドを構築した (pGL3-MIS273)。この MIS プロモーター領域には性分化に重要な転写因子である SOX9 や SF-1 の結合部位が存在する。このプラスミドとエストロゲン受容体 (ER) α または ER β 過剰発現プラスミドを NT2/D1 細胞に導入し、様々な E2 濃度下でエストロゲンが MIS プロモーターに及ぼす影響を検討した。

その結果、低濃度の E2 では ER α を導入した場合に、コントロールに比べ 7 倍程度 MIS プロモーター活性の増加が見られた。さらに E2 濃度を増加させると MIS プロモ-

ター活性は抑制された。

しかしながら、ER β では ER α で認められた MIS プロモーター活性への E2 の影響は認められなかった。さらに pGL3-MIS273 と SF-1 及び ER α 過剰発現プラスミドを同時に NT2/D1 細胞に導入したところ、低濃度 E2 存在下での MIS プロモーター活性は SF-1 のみを導入した場合と同程度となった。さらに E2 濃度を増加させると MIS プロモーター活性が抑制される傾向が認められた (図 4)。

【考察】本解析で、我々はヒト MIS プロモーター活性に対する影響は ER α と ER β とで異なることを初めて明らかにした。内分泌かく乱物質が MIS プロモーター活性に及ぼす影響を明らかにするためには、MIS プロモーター活性を調節する ER α の作用点について更なる分子生物学的解析が必要であると考えられる。

4) ヒト性分化における精巣決定因子 SRY 遺伝子の機能的下流に関する研究

【背景】SRY 遺伝子は Y 染色体上の精巣決定因子である。SRY 遺伝子は Sertoli cell 核内に局在し、*in vitro* で DNA 結合能を持つので、転写因子 (転写促進因子あるいは転写抑制因子) として機能することが推測されている。しかし現在までのところ SRY の直接の標的遺伝子は同定されていない。最近、Sertoli cell 間の tight junction の構成要素の一つである claudin11 の発現がマウスの胎児性腺において、Sry 発現直後に増加することが報告された。そこで我々は claudin11 の発現が SRY の発現によって影響されるか否かをヒト培養細胞系で検索した。

【方法及び結果】ヒト SRY 過剰発現プラスミドを NT2/D1 細胞に導入し、薬剤選択によって、SRY を過剰発現する NT2/D1 細胞株をクローン化した。RT-PCR 解析の結果、この SRY 過剰発現細胞株において SOX9 と claudin11 の発現量の増加が認められた。またレポーター遺伝子を用いた解析の結果、NT2/D1 細胞で Wild-type SRY の過剰発現は claudin11 のプロモーター活性および SOX9 のプロモーター活性をそれぞれ 2.5 倍と 3.2 倍増加させた。しかし、XY 女性に認められた遺伝子変異 T107X をもつ SRY の過剰発現は、Claudin11 と SOX9 のプロモーター活性の増加が認められなかった。さらに SRY が属する SOX ファミリーのメンバーの一つである SOX 9 についても、その過剰発現が claudin11 のプロモーター活性に影響を及ぼすか否かを検討した。その結果 1.7 倍のプロモーター活性の増加が認められた。

【考察】SRY は SOX9 と Claudin11 の発現を調節していることが推察された。

表1 日本の4つの都市における Y染色体 haplogroup の頻度

Haplogroup	Cities in Japan			
	Osaka	Kanazawa	Fukuoka	Sapporo
DE(xD2)	31(12.4)	33(14.1)	17(16.5)	33(16)
D2	43(17.2)	39(16.7)	14(13.6)	36(17.4)
C	35(14)	29(12.4)	17(16.5)	23(11.1)
F	66(26.4)	64(27.4)	19(18.4)	54(26.2)
O2b*	25(10)	21(9)	8(7.7)	16(7.8)
O2b1	43(17.2)	43(18.4)	27(26.2)	39(19)
n..d	7(2.8)	4(1.7)	1(1)	5(2.4)
total	250(100)	233(100)	103(100)	206(100)

n.d: not determined () 内は%を示す。

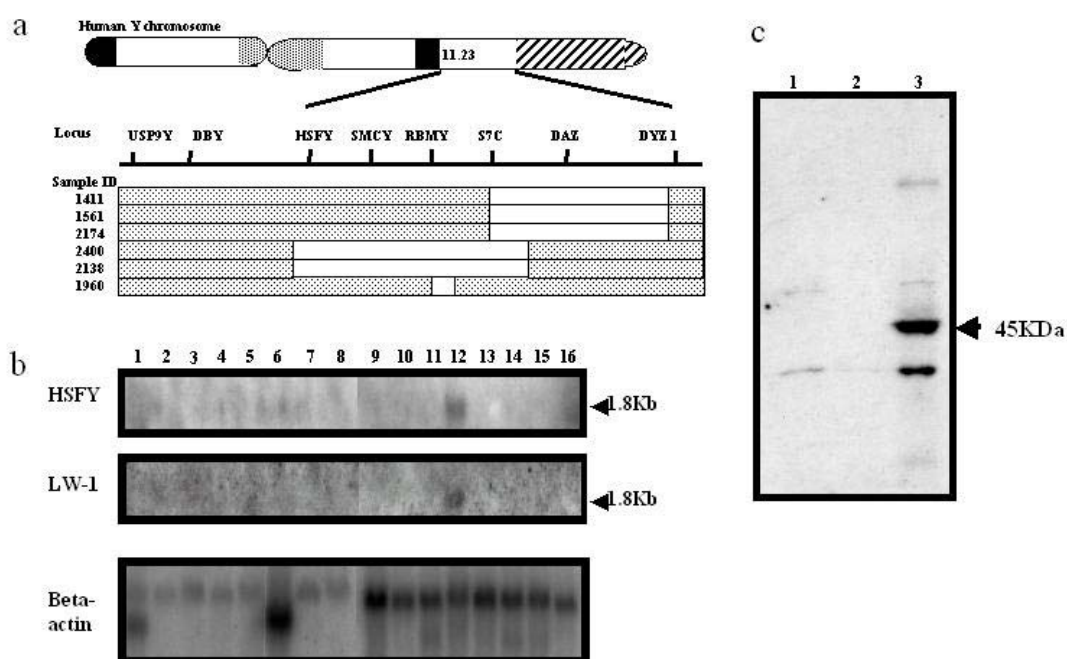


図2 無精子症患者における HSFY 遺伝子の欠失と正常組織における HSFY 発現

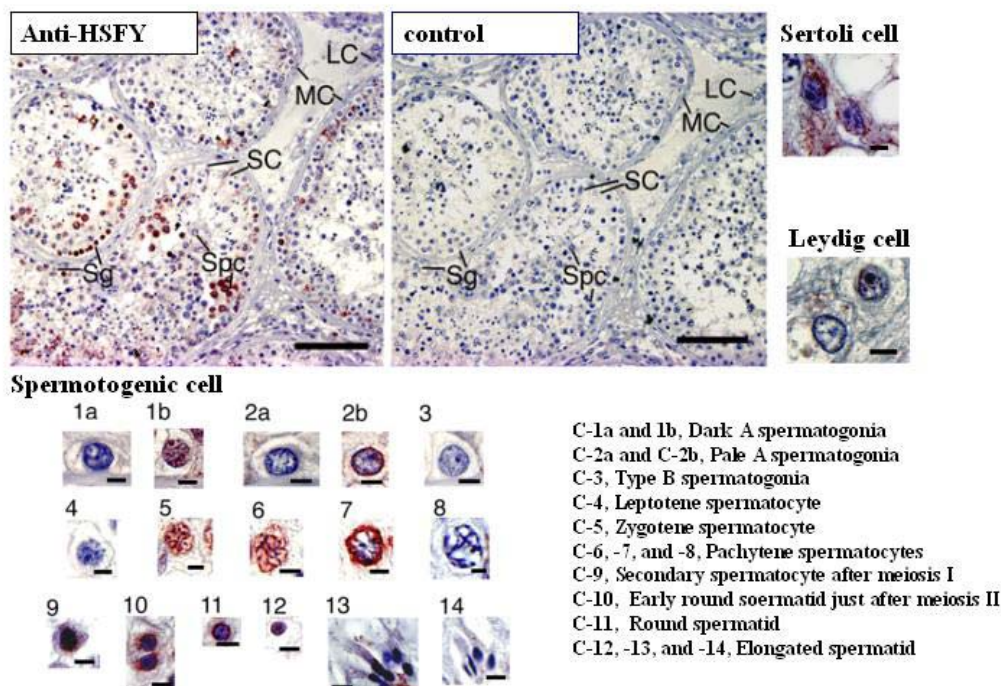


図3 正常精巣におけるHSFYタンパク質の分布と細胞内局在

(2) 研究成果の今後期待される効果

我々は世界に先駆けてY染色体の遺伝的多様性と精子数の関連解析の結果を報告し、その後、世界のいくつかのグループがこの分野に関心を持ち論文を発表している。内分泌かく乱物質のヒト精子形成への影響を評価する場合、研究対象がヒトであるため遺伝疫学的手法は不可欠なものである。Y染色体上には無精子症患者で比較的高頻度に欠失の認められる領域が存在することから、Y染色体上の遺伝子が精子形成に何らかの形で重要な役割を担っていることが予想される。本研究を通じて、以前から我々が提唱していた「Y染色体の遺伝的多様性が男性表現型と関連している」との仮説を遺伝疫学的に検証するための機会を得ることが出来た。現在も研究のまとめを継続中であるが、現在までに明らかになっている結果よりY染色体が関与すると予想される表現型は精子数に限らないと考えている。健常人でもY染色体がヒト精子数に影響を与えるかどうかは、重要な問題である。今後更にY染色体の遺伝的多様性と精子形成能についての詳しい解析を継続する必要があるが、これまでの本研究の成果から、内分泌かく乱物質の精子形成能への影響を評価する場合には、Y染色体の遺伝的な違いをあらかじめ明らかにしておく必要があると考える。

この研究プロジェクト期間中にヒトゲノム塩基配列の解析終了が報告された。今後は

haplogroup間(特に日本人の場合は縄文系と弥生系)でY染色体のDNAレベルでの違いを明らかにすることが必要である。更にこれに基づいて、ヒトY染色体の遺伝的背景の違いと男性表現型(生殖機能を含む)がどのように関連しているかについて解析を進めることが重要だと考える。

3. 6 妊婦配偶者精子の形態と運動性の解析(石島純夫グループ)

(1) 研究内容及び成果

これまで、精子形態については光学顕微鏡を用いた研究が主であったが、電子顕微鏡を用いた精子構造の観察によって、さらに重要な知見を得ることができると考えられた。しかし、不妊症などの患者精子の観察についてはこれまで数多くの報告がなされているものの、正常精子についての研究はほとんど行われて来なかった。そこで、妊婦配偶者精子を用いて、精子の形態と構造を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、精子形態と超微形態との関係や異常性の特徴を調べ、さらに男子不妊症患者精子の形態や構造との比較を行った。

精子の運動性についても妊婦配偶者精子を用いて解析し、正常精子の基準値を得るとともに、運動率や運動の速さのような運動量の中で、どのような運動量が不妊症患者の精子と比べて異なるのかなどを明らかにしようとした。また、精液量や精子数など他の精液特性との関係も調べた。これら精子の運動解析のためには詳細な解析が必要なため精子の運動を毎秒200コマで撮影できる高速度カメラを用いて撮影し、撮影画像一コマ一コマについて自作したコンピュータソフトを用いて解析を行った。

精子形態解析

精液を光学顕微鏡で観察し、世界保健機関(WHO)の分類を参考に、尾部については正常精子と3種類の異常精子(渦巻き、短い、折れ曲がり)、中片部については正常精子と2種類の異常精子(細胞質小滴保持、細い)、頭部については正常精子と6種類の異常精子(小さい、不定形、大きい、先細り、梨形、双頭)に分類した。

妊婦配偶者の精子のうち、正常な尾を持つものは、59.8 から 97.1%であり、平均は85.6%であった(表1)。

表1 妊婦配偶者と患者の形態特性

特徴	妊婦配偶者 (%)	患者 (%)	患者/妊婦配偶者
尾部			
正常	85.6±11.0	48.2±23.6	
異常			
渦巻き	7.0±6.8	23.0±17.1	3.3
短い	6.1±4.5	25.1±23.7	4.1
折れ曲がり	1.3±2.0	3.7±3.8	2.8
中片部			
正常	73.4±16.7	35.4±20.6	
異常			
細胞質小滴保持	15.1±9.7	23.8±14.0	1.6
細い	11.5±10.2	40.8±24.3	3.5
頭部			
正常	56.5±12.5	22.8±12.1	
異常			
小さい	18.5±5.5	33.8±14.5	1.8
不定形	11.3±5.5	16.1±6.2	1.4
大きい	7.0±4.3	10.7±5.4	1.5
先細り	4.0±3.9	7.8±4.7	2.0
梨形	2.4±1.9	7.0±4.3	2.9
双頭	0.3±0.4	1.8±1.6	6.0
平均±標準偏差			

尾部異常の精子のうち渦巻き精子と短い精子の比率はほぼ同じだったが、折れ曲がり精子の率はかなり低い。尾部の正常な精子と渦巻き精子の比率の間には強い相関があった（相関係数=0.93）が、それ以外に分類された精子の百分率の間には強い相関は見られなかった。中片部が正常な精子は、26.5 から 95.0%であり、平均は 73.4%であった。この値は、尾部が正常な精子の率に比べてかなり低い。中片部の3つの精子分類には強い相関は見出せなかった。正常な頭部を持つ精子の比率は、尾部や中片部の正常な精子よりさらに低く、36.3 から 80.2%であり、平均でも 56.5%にとどまった。頭部の7つの精子分類には強い相関は見られなかった。さらに尾部、中片部、頭部の正常な精子の率についても、強い相関はなかった。尾部、中片部、頭部の正常な精子の百分率から、これら全ての正常な精子の割合は 35.5%であると計算できる。妊婦配偶者の精子といえども、患者精子に比べ比率に違いはあるもののほぼ全ての異常を含んでいることが明らかになった。

精子無力症と精索静脈瘤の患者の精子で、正常な尾部を持つものは 4.8 から 83.3%で、平均は 48.2%と、妊婦配偶者の値の約半分であった。尾部異常の精子のうち、渦巻き精子と短い精子の比率はほぼ同じだったが、折れ曲がり精子の率はかなり低い。この傾向は、妊婦配偶者と同様であった。正常な中片部を持つ精子の割合は、5.4 から 66.0%にわたり、平均は 35.4%と妊婦配偶者精子の値の半分以下だった。正常な頭部を持つ患者精子の割合は、1.9 から 41.0%で、平均は 22.8%となり、妊婦配偶者精子に比べて著しく低い値になった。これらの値から期待される正常精子の割合は、22.8%と計算され、妊婦配偶者の場合の約半分になった。正常な中片部を持つ精子と正常な頭部を持つ精子の割合に強い相関があった（相関係数=0.88）が、その他の正常精子については相関は見られなかった。また、異常精子の間ではどの項目についての割合についても、強い相関は見られなかった。妊婦配偶者の精子に見られたような異常精子が、患者の精子でも高い割合で見られた。

渦巻き精子や短い精子、細い中片部、双頭精子などは、妊婦配偶者精子に比べて、患者の精子中で比較的多く見られた。患者が精索静脈瘤、あるいは精子無力症であることを考えると、運動装置に関する異常性が多いことは当然である。

妊婦配偶者精子や精子無力症あるいは精索静脈瘤の患者の精子を光学顕微鏡で解析した結果、患者の精液に比べて割合は低いものの、妊婦配偶者精子にも同じような異常精子があることが分かった。光学顕微鏡で観察した限りでは、妊婦配偶者の精子といえども、異常のない精子の割合は 36%程度であることが分かった。この値は、他の研究者の報告と一致しており、世界保健機関の 1992 年度マニュアルの値とも一致している。患者精子で見られた異常の種類のひとつが、妊婦配偶者精子でも見られたという光学顕微鏡の結果は、電子顕微鏡を使った超微形態の解析によっても証明された。

精子超微形態解析

ネガティブ染色をした精子の全体像から、光学顕微鏡で明らかになった精子の異常性をより詳しく確認することができた。さらに、それぞれの精子の断面像を観察することにより、さまざまな超微形態異常を観察することができた。鞭毛主部の断面観察では、周辺微小管が足りないものや、軸糸が二本あるもの、繊維鞘の外側に余分な周辺微小管があるものや、逆に中心微小管が足りないもの（図 1）などが観察できた。さらに、これらの構造はあるものの、繊維鞘の配置がおかしなものなども観察できた。中片部の断面観察からは、ミトコンドリアは完全でも、周辺束繊維の何本かが欠けているものなどが観察できた。尾部異常では、光学顕微鏡でも明らかになった折れ曲がり精子の詳細が明らかになった。すなわち、中片部の終わりの部分で、鞭毛が曲がっていた。頭部の異

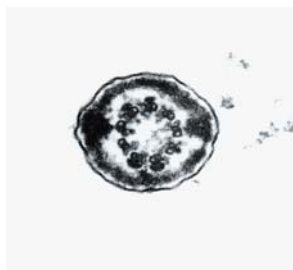


図1 妊婦配偶者精子の尾部異常。中心微小管構造がない。

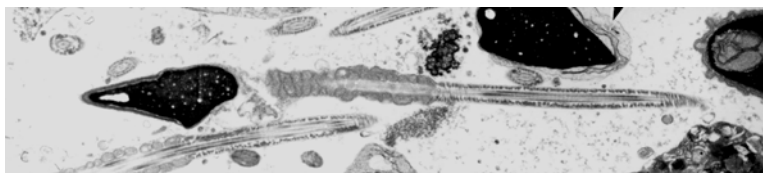


図2 妊婦配偶者精子の頭部異常。頭部先体の部分に空胞形成が見られる。一般に、ヒト精子の頭部には他の動物では見られないいくつかの空胞があるが、通常はあまり大きくないものが多い。この精子の空胞はかなり大きく、異常なものと考えられる。

常についてはさまざまで、光学顕微鏡でははっきりしなかった外部形態の異常性が、より詳しく観察することができた。先体の膜が波を打っていたり、切れていたりした。頭部の中に空胞が見られることがある（図2）が、数が多い場合と、大きな空胞が見られることがあった。これらは、光学顕微鏡では決して発見することのできない異常である。このように、妊婦配偶者精子においても、外部形態の異常だけでなく、内部の超微形態異常についてもさまざまな種類を見いだすことができた。精子無力症と精索静脈瘤の患者精子の電子顕微鏡による観察から、さまざまな種類の異常精子を確認することができた。異常のほとんどは、妊婦配偶者精子においても観察できたが、患者の精子においては、それぞれの割合が高かった。

電子顕微鏡による精子内部形態の観察から、光学顕微鏡では観察することのできない異常がかなり存在することが明らかになった。このことは、光学顕微鏡レベルの異常性と、電子顕微鏡で観察できるレベルの異常性の間に相関がないことを示唆している。この結果は、精液の評価のために、光学顕微鏡による検査法が主に用いられてきたこれまでの精液検査法を見直す必要があることを示している。最近盛んに用いられ、これまでの精子形態評価法より優れているとされる「厳密な基準」(strict criteria)が、これまでの形態検査に、子宮頸管通過という運動性を加味したもので、尾部の内部形態の正常性に運動性を加味することにより保証したものと考えられる。

妊婦配偶者精子のうち、86%は尾部が正常であり、頭部が正常なものは57%にとどまった。妊孕能と精子の形態とに強い相関があることを考えると、尾部の高い正常性が妊孕能の原因かもしれない。

光学顕微鏡による外部形態の観察から明らかになったように、尾部正常精子の割合と頭部が正常な精子の割合の間に強い相関は見られなかった。すなわち、頭部異常と尾部の異常とは同じような原因で起きる可能性が低いと考えられる。このことを精子の内部形態の点からも確かめるために、活発に運動している精子を swim-up 法により選別し、

電子顕微鏡で調べた。このような精子の鞭毛の内部形態は完全であった。患者の精子で、異常な軸糸の割合は 54.9%であったが、swim-up 法により選別した精子の異常精子の割合は、2.8%に減っていた。しかしこのような精子でも頭部異常は観察され、大きな空胞を持つものや、頭部の小さな異常は数多く観察された。

精液中の異常精子の種類と割合は試料によってさまざまで、精子異常性の間に強い相関は見いだせなかった。このことは、swim up 法で選別した活発に運動する精子の中片部や尾部にはほとんど異常が発見できなかったが、頭部には空胞異常や小さな頭部を持つなどの異常があったことから支持される。すなわち、精子異常の原因に関連はなく、たとえば頭部の異常と、尾部の異常は別の原因で起きていることを示している。従って、尾部や中片部の異常のために正常な受精が難しい精子を使っての細胞質内精子注入法による治療の可能性を保証する。しかし、患者精子では妊婦配偶者精子に比べて常に異常精子の割合が高かったので、頭部異常を持たない精子を選別する方法が重要になる。

精子運動解析

少しでも運動した精子を運動精子と数えた場合、妊婦配偶者 22 人の精液の運動率は、32.6 から 81.6%で、平均は 54.2%であった。精子数から求めた総運動精子数は、1300 万から 3 億 7700 万であった。運動に関する量と、精液量などとの関係を調べたところ、ほとんどの場合相関はなかったが、運動精子数と総精子数との間に非常に強い相関があった(相関係数=0.94)。精子数が多ければ、運動する精子の数も多いことを示している。少なくとも、妊婦配偶者精子のような正常精液の場合、精子数計測も重要で無意味ではないことを示唆している。運動精子数が総精子数に運動率を乗じたものであることを考えると、この結果は、運動率が妊婦配偶者によらずほぼ一定であることを示している。

精子の前進速度については、平均で 39.3 $\mu\text{m/s}$ となった。鞭毛運動についての鞭毛の波形についての量では、振動数が平均で 8.5Hz、波長は 34.0 μm 、振幅は 12.9 μm となった。良質のヒト精子の運動が比較的左右対称な運動であることが分かった。

妊婦配偶者精子に共通に見られた特徴は、精子運動率が比較的一定であった。その他の量の間に共通に見られた特徴はなかったので、運動率によって妊孕能を予測できる可能性が示唆される。今回得られたデータは、妊婦配偶者から得られたもので、さらに、精度の高い解析方法により得られたものなので、今後ヒト精子の運動を比較する場合の基準値として使用できると考える。

精子数計測が妊婦配偶者精子では意味のないものでないことが示唆された。患者の精子の場合にも総精子数と運動精子数の間に強い相関があるのかどうか興味がある。

(2) 研究成果の今後期待される効果

妊婦配偶者精子のサンプル数が少なかったことがいくぶん気がかりとはいえ、妊婦配偶者の精子の形態と運動性を解析することができ、念願だったヒト精子性状の基準値を得ることができた。精子バンクなどの施設が利用できない現在の日本では、今後もこのような解析が行われる可能性が低く、今後のヒト精子研究の重要な基礎的データとして利用されると確信している。

3. 7 自動ヒト精子運動解析装置の開発 (石島グループ)

(1) 研究内容及び成果

ヒト精子の運動は精子形態とともに妊娠するかどうかを予測する上で最も重要な性質のひとつであるとする報告があるが、現在広く行われている方法では、精子の運動を正確に調べることは難しい。世界保健機関が推奨し、現在一般的に行われている方法は、測定者が顕微鏡を覗きながら運動する精子を速く前進する精子と遅いが前進する精子と、さらに、尾の動きはあるものの前進しない精子の3種類に分類し、これに運動しない精子を加えて4つに分類する方法(目視法)である。この方法はさまざまな問題を含んでいるが、最大の問題点は測定者によって運動の基準が変わることである。実際、精子運動の目視法は、顕微鏡をのぞきながら精子の運動を瞬時に判断しなければならない作業で、かなり難しい作業であることが分かる。精子の運動は、せいぜい毎秒 50 マイクロメーター程度の速さなので、それほど速い運動ではないが、顕微鏡で観察する場合には、この運動を 200 倍や 400 倍に拡大したものを観察するので、かなり速い運動と感じられ、しかも視野の中を動き回るたくさんの精子を瞬時に判断しなければならない。その結果、それぞれの測定者でも測定値がかなりばらつくだけでなく、測定者が違えば測定値のさらなるばらつきが生じる。これが現状の精子運動測定値が信頼できない理由である。

このような測定法の問題点を改めるために、コンピュータを用いた自動解析が利用され始めている。しかし、欧米などに比べて日本では充分活用されていないのが実状である。これまで市販されてきた機器が外国製で、日本での販売価格がかなり高額なことや、器械の測定原理や使用法の理解不足、さらに、精子の運動を評価する測定値の意味やそれらの正確さなどについての理解が十分でなかったことなどが原因だと考えられる。精子運動のどのような性質がどの程度なら妊娠するのかといったより実りある議論をするためには、正確な測定を行うことが何よりも重要である。このような考えから、ヒト精子の運動をできるだけ正確に、効率よく測定する装置の開発を目指して独自のコンピュータを用いた精子運動解析装置、SMAS (Sperm Motility Analysis System) を開発した。

今回開発した自動ヒト精子運動解析装置を図3に示す。今回の開発で特に注意した点は、装置の測定結果をいつでも確かめることのできる装置の開発であった。これまで利用されてきた装置では、得られた測定値が正しいものであるかどうかを確認することが難しかった。この点がこれまでの装置に対する利用者の不安を払拭できなかった原因であった。そこで、測定毎に図4のようなレポートを作成し保存し、測定結果の精度を確かめたい場合には、画像を実際に測定することにより、いつでも確認できるようにした。この種の装置が、精子頭部の画像の大きさをもとに精子かどうかを判断している関係上、精子数の正確な測定は原理上難しい。そこで、装置が精子と正しく判断しているかどうかを確認する必要がある。

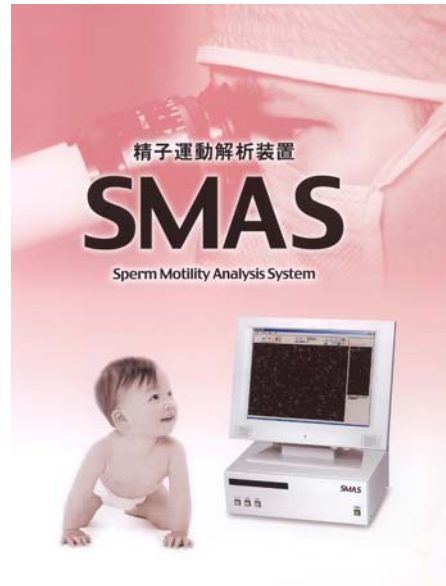


図3 独自に開発したコンピュータを用いた自動精子運動解析装置。

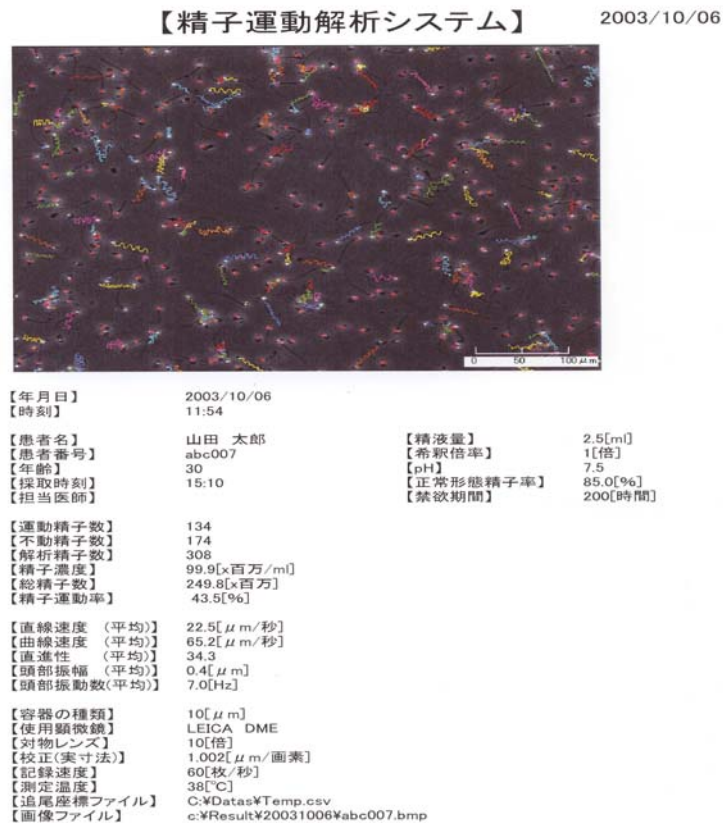


図4 検査ごとに作成・保存されるレポート。顕微鏡像と運動解析結果が保存されるので、この画像から精子数や精子運動を直接解析することができるため、装置の較正を行うことができる。

代表的な測定結果については、図5に示すようにグラフ表示が可能で、必要な場合には世界保健機関の目視法との対応も可能である。その他の性能については、SMASはこれまで利用されてきた装置とほとんど同じような性能を持つ。

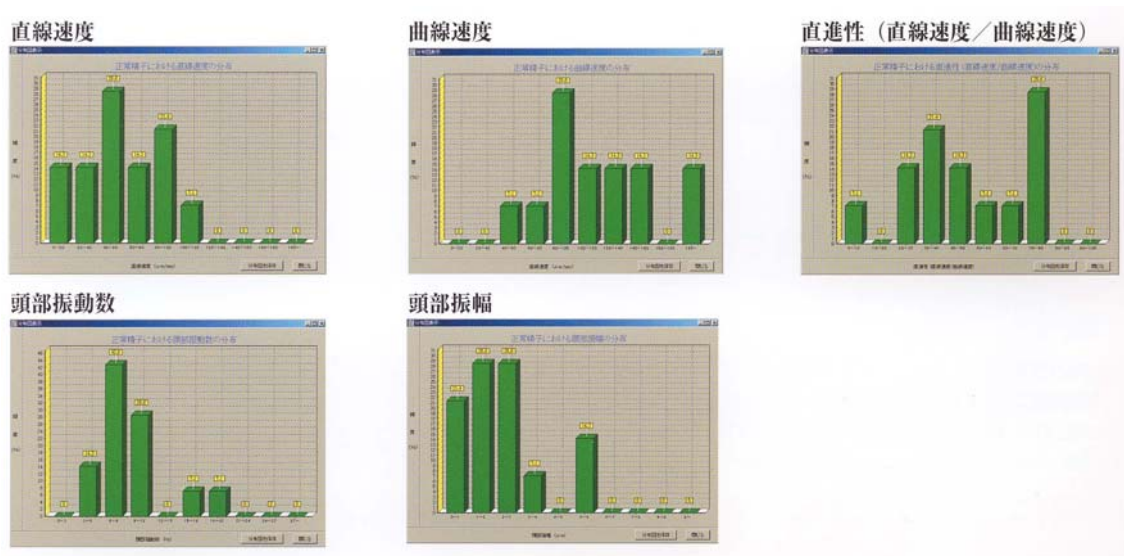


図5 代表的な運動量についての分布の様子。

(2) 研究成果の今後期待される効果

かなり安価な測定装置と呼べるコンピュータによる精子運動解析装置を開発することができた。しかし、やり残した問題も残っている。最も重要な問題は二つ。一つは高速化で、もう一つは顕微鏡と一体化した装置の開発である。ヒト精子は運動の特徴としてウシ精子と同じように、運動する際長軸の回りに回転しながら進む。鞭毛運動が三次元的であることが原因であるが、このため、鞭毛運動の頻度を正しく測定するのが難しい。ヒトやウシ以外の精子では、鞭毛運動が比較的平面に近い運動をするため、従来の方で測定された頭部振動数と呼ばれる量が、鞭毛の振動数に対応し、この振動数がすなわち鞭毛運動の振動数と考えても原理的な間違いではなかったが、ヒトやウシの精子の場合には、この関係は使えない。この問題の根本的な解決はかなり難しいが、最も簡単な解決は、精子長軸の回りの回転頻度を求める方法である。回転頻度が分かれば、計算によって鞭毛の頻度を求めることができる。そこで、この回転頻度を求めるために、通常のビデオの撮影速度より速い、毎秒200コマ以上の撮影が可能な装置を開発し、製品化したいと考えている。顕微鏡装置とコンピュータの一体化は本質的ではないが、装置の使い勝手を考えると重要である。コンピュータの画像解析ソフトを用いて、精子頭部の像を追尾する場合、頭部の像の大きさを指標に追尾することになるが、顕微鏡の調整が正しくない場合には、コンピュータソフトでは精子と認識しない場合が生ずる。このような理由から顕微鏡の正確な調整が、特に精子数の測定の場合には重要になるが、顕微

鏡の使用法に熟知していない利用者の場合には、現状の顕微鏡とコンピュータが別々の装置では、十分な精度が得られないことがある。そこで、これらを一体化し、精子画像の取り込みの際に、利用者の技能が関与しないような装置を開発することが重要であると考えている。

精子性状の正確な検査のためには、現状では時間と手間暇のかかる操作を必要とする。このために、大学や研究機関でさえも、精子性状について確かなデータを持たないのが現状である。この問題の解決に向けて、独自の自動精子解析装置を開発した。これまでの装置ではほとんど不可能だった測定装置の較正がいつでも比較的手軽にできるようにしたため、精度の高い測定を行う測定装置として安心して利用できると考える。このような装置を利用した研究が行われ、データが蓄積すれば、内分泌かく乱物質の生殖機能への影響や、より確かな不妊治療法の開発などが期待できる。

3. 8 精子運動の制御機構（石島グループ）

(1) 研究内容及び成果

これまでウニ精子の運動の研究から、精子鞭毛運動の振動数と運動中の鞭毛の形は別々に制御されていると考えられていた。すなわち、精子膜を除去して得られた除膜精子モデルを用いた実験から、振動数は $MgATP^{2+}$ 濃度によって制御されており、鞭毛の曲がりの程度には依らないと考えられてきた。また、鞭毛の曲がりの程度は精子内のカルシウムイオンなどにより変化し、この際鞭毛の振動数はほとんど変化しないと考えられた。一方、ほ乳動物の除膜モデルを用いて研究から、 $cAMP$ が鞭毛の曲がりを調節する可能性を報告した。

これらの問題をより明らかにするために、受精能を獲得し卵に進入することが可能になったほ乳類精子を用いて、振動数や鞭毛の曲がりを制御する精子内の要因を明らかにした。ゴールデンハムスターやヒツジやサルを除膜精子モデルを用いた研究から、ほ乳類精子では、振動数と鞭毛の曲がりは独立に制御されるものではないことが確かめられた。 $MgATP^{2+}$ によって振動数が変化するのは鞭毛の曲がりが比較的小さい場合に限られた。また、鞭毛の曲がりはカルシウムイオンによって変化するが、より対称な大きな曲がりは $cAMP$ によって作られることが明らかになった。これらは、精子全体の運動に対応し、比較的まっすぐ進む精子は精子内のカルシウムイオン濃度が低いことが示された。この鞭毛運動の解析をもとに、超活性化精子の鞭毛運動を調べ、ほ乳動物精子の超活性化とは、振動数の減少と中片部の著しい屈曲が原因であることが明らかになった。そこで、超活性化精子鞭毛運動のさまざまなパラメータの詳細な解析により、超活性化運動を明らかにし、超活性化精子をコンピュータによる自動精子運動解析装置による自

動解析の可能性を調べた。

中片部の曲率を培養時間とともに測定すると、最大曲率は $0.036\mu\text{m}^{-1}$ 、 $0.070\mu\text{m}^{-1}$ 、 $0.090\mu\text{m}^{-1}$ と培養時間とともに増大することが明らかになった。一方振動数は、培養初期の振動数 14.2Hz から 0.4Hz へと減少した。この結果は、著者らのこれまでの報告を確認することに成った。

次に、鞭毛運動の振動数と鞭毛の波形との関係を調べるために、振動数や波の伝播速度、微小管の滑り速度、波長、振動数などの運動量と、中片部の最大曲率との関係を調べた。振動数と中片部の最大曲率の関係では、双曲線的な関係が得られた。すなわち、振動数が大きく変化する間は、中片部の最大曲率は余り変化しないが、一方、中片部の最大曲率が大きく変化する場合には、振動数は余り変化しなかった。超活性化精子の運動特性を調べると、この後者に該当しており、前者の場合は、活性化精子の運動に対応することが分かった。すなわち、ハムスター精子の運動には、2つのかなり異なった運動状態が有り、活性化精子では振動数はかなり自由に変わるものの波形はほとんど変わらない。一方、超活性化に代表される運動では、振動数はかなり低い値で一定の値になるが、波形はかなり変化する。微小管の滑り速度と中片部の最大曲率の関係についてもほぼ同様の関係が得られた。このような運動状態の違いは、中片部の最大曲率が $0.036\mu\text{m}^{-1}$ 近辺で起こる。

超活性化が振動数の減少と中片部の振動数の増加によることは、すでに明らかになっていたが、この運動がどのような運動に対応するものかについてはこれまで明らかにならなかった。今回の実験により、活性化精子と超活性化精子の運動が、振動数は変化するが波形はほとんど変化しない運動と、逆に波形は変化するが振動数はほとんど変化しないという異なった運動に分類できたことにより、超活性化精子の特徴がより鮮明になった。さらに、この運動が、中片部の最大曲率 $0.036\mu\text{m}^{-1}$ で分類できることが明らかになったので、コンピュータでの自動精子運動解析で超活性化を分類する際に、振動数の減少の他に、中片部の最大曲率の変化を用いて、より正確な分類が可能になると期待できる。また、細胞内の MgATP^{2-} やカルシウムイオン濃度、さらには cAMP 濃度の変化によって、精子の運動の様子が推測できるようになったので、内分泌かく乱物質のような細胞外因子によって引き起こされる精子運動の変化と精子内の生化学的条件との関係を推測できるようになった。

(2) 研究成果の今後期待される効果

これまでほとんど注目されてこなかった、精子内の生化学的条件の違いによる精子の運動性異常については、十分な検証を行う時間がなかったが、精子が卵に進入するため

の必須条件である超活性化の精子運動変化の解析と、精子内の生化学的変化をほぼ明らかにすることができた。この結果、男性生殖機能検査としての精子利用の他に、受精可能かどうかを明らかにするための指標として精子が利用できるようになった。今回まとまった資金が利用できたために、これまで長い間の念願であった正常精子の正常検査や、精子性状の検査機器の開発などが可能になった。しかし、世界保健機関や多くの研究者の研究データが示すまでもなく、正常精子の性状は変化しており、継続的な調査が望まれる。これらの問題の解決法として、諸外国のような信頼するに足る精子銀行の設立や、今回のような調査の継続などが重要であると考えられる。

3. 9 ヒト精子DNA損傷観察法の開発およびそれに基づくDNA損傷精子の排除法の確立（兼子グループ）

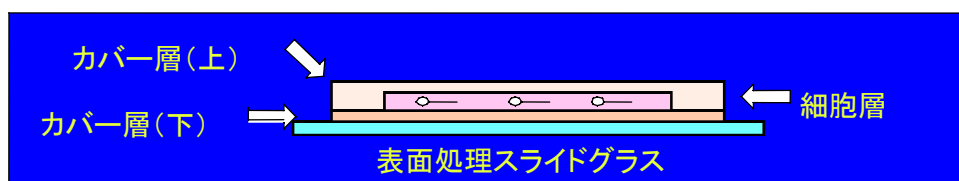
(1) 研究内容および成果

1) 精子DNA2重鎖切断の観察

すでに射出精子の一部には染色体傷害が存在し、そのほとんどが染色体の欠失であることが報告されている。電気泳動法を用いる断片化DNAの観察法であるコメット電気泳動法の定量性向上を図り、より詳細なDNA断片化情報を得るため、double strand break(DSB)の観察を行った。その結果、泳動像は極めて多様であることを認めたので、断片化様式の分類を試みるとともにアポトーシスの関与を検討した。

【方法】精製リンパ球をDNA損傷陰性対照として用いた。精子は98%Percoll密度勾配遠心分離法、swim up法により運動精子を精製した。リンパ球や精子は0.7%アガロース、0.7%シーナゲル混合物に懸濁して表面処理スライドグラス上に薄膜を形成し、さらに上下に保護層を作成した（図1）。ゲルは最初に2.0M NaClを加えた融解液（0.2%ラウリルザルコシルNa、0.2%Triton X-100、5.0mM EDTA、20mM Vitamin C-Na、10mM DTT、0.1M Tris-HCl、pH8.0）、次いで60 μ g/ml 精製トリプシンを加えた融解液中で処理した。

図1 修正COMET電気泳動法



泳動担体 0.7%アガロース、0.7% Syner Gel混合物

細胞融解 1

2.0 M NaCl
 0.2% ラウリルザルコシルNa
 0.2% Triton X-100
 5.0mM EDTA, 20mM
 Vitamin C-Na
 10mM DTT

細胞融解 2

60μg/ml 精製トリプシン
 0.2% ラウリルザルコシルNa
 0.2% Triton X-100
 5.0mM EDTA, 20mM
 Vitamin C-Na
 10mM DTT

成熟精子核タンパク質であるプロタミンは、そのアミノ酸組成の70%をアルギニンが占め、その分解にはトリプシンが適している。しかし、市販トリプシンにはDNA分解酵素が混在するため、リマビートリプシンインヒビターを固定した担体を用るアフィニティクロマトグラフィーで精製して、活性トリプシンを得た。得られた標品にDNase活性が存在しないことは、電気泳動法により確認した（図2）。

図2 ウシ膵トリプシンの精製

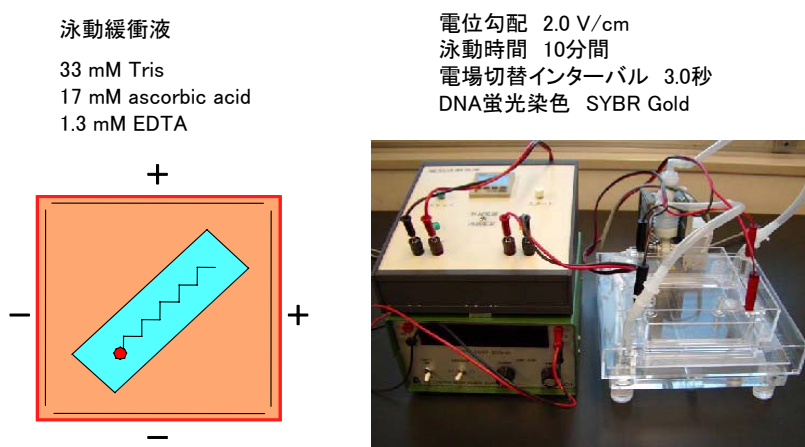
1. 市販2回結晶トリプシン
2. 2.0% 酢酸に溶解
3. 0.1M Tris-HCl, pH8.0で中和
4. LBTI固定Sepharoseアフィニティクロマトグラフィー (0.05M Tris-HCl, pH8.0, 0.2M NaCl)
5. 非結合物の除去 (0.05M Tris-HCl, pH8.0, 0.2M NaCl)
6. 活性型トリプシンの溶出 (2.0%酢酸)

DNase活性除去の確認

DNAマーカーと精製標品をincubateし、DNA泳動態度に変化がないことを確認

本研究では、DNA fiberと断片化DNAを同時観察するため、single cell pulse field gel electrophoresis (SCPFGE)を開発した。すなわち直交する2組の電極に3秒間づつ交互に2.0V/cm電位勾配で、10分間通電した。DNAは鍵状に泳動し、DNA fiberの超伸展が可能となった。泳動緩衝液は、新たに開発したTris-アスコルビン酸-EDTA緩衝液を用いた。泳動後、Syber GoldでDNA染色してDSBによるDNA断片化像を蛍光観察した(図3)。

図3 Single cell pulse field electrophoresis



【結果】図4は、精液および精製精子の電気泳動像を示している。写真右、精製精子はほとんどが原点から連続したファイバー状DNAが伸展する泳動像のみを示した。写真左は、精液における典型例を示したもので、正常精液と精液所見不良例では泳動像が大きく異なっていた。さらに観察されるDNA断片化パターンは極めて多様であった。そこで、精液中の精子に見られるDNA断片化パターンの分類を試みた(図5)。①連続したファイバー状DNAのみを認めるもの、②断片化が最も軽度なものでは、原点から伸展する連続したファイバー状DNAの先に数本の分離した長いDNAファイバーを認めるもの、③ファイバー状DNAの先に1ないし2群の粒子状の短鎖DNA、3.原点から短鎖DNAが長く伸びたもの、④最も断片化が進行したものでは原点部分が消失し、泳動度が速い断片のみ、などに分類された。

精子DNA断片化へのアポトーシスの関与を検討するため、2.0 μ g/mlアクチノマイシンD存在下にリンパ球を24時間培養し、化学的にアポトーシスを誘導した。その泳動像は原点から短鎖DNAが長く伸びたものが大部分であり、精液に見られる多様な泳動像とは一致しなかった(図6)。

図4 射精精液、精製精子の電気泳動像

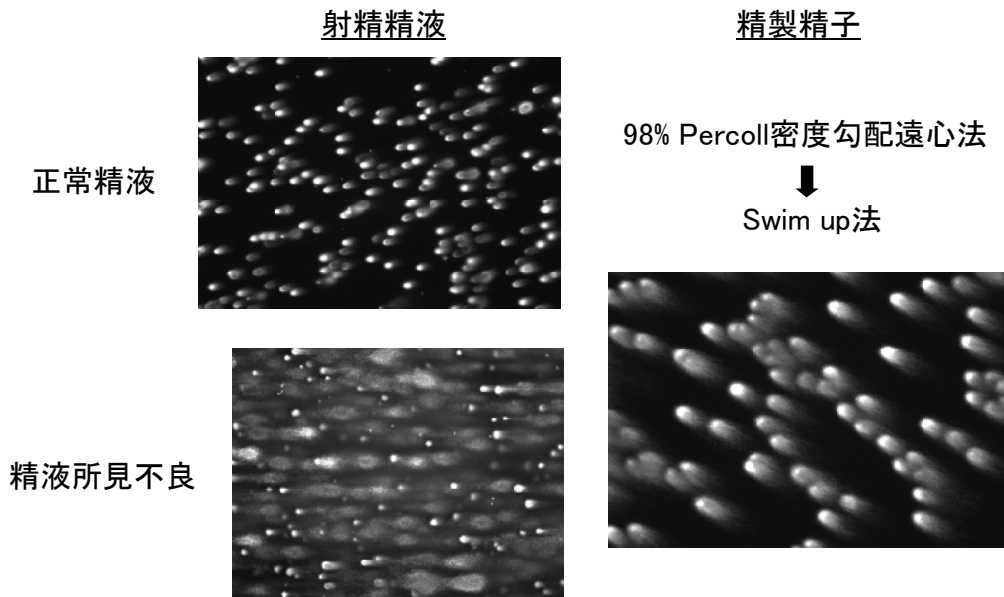


図5 DNA断片化像の多様性

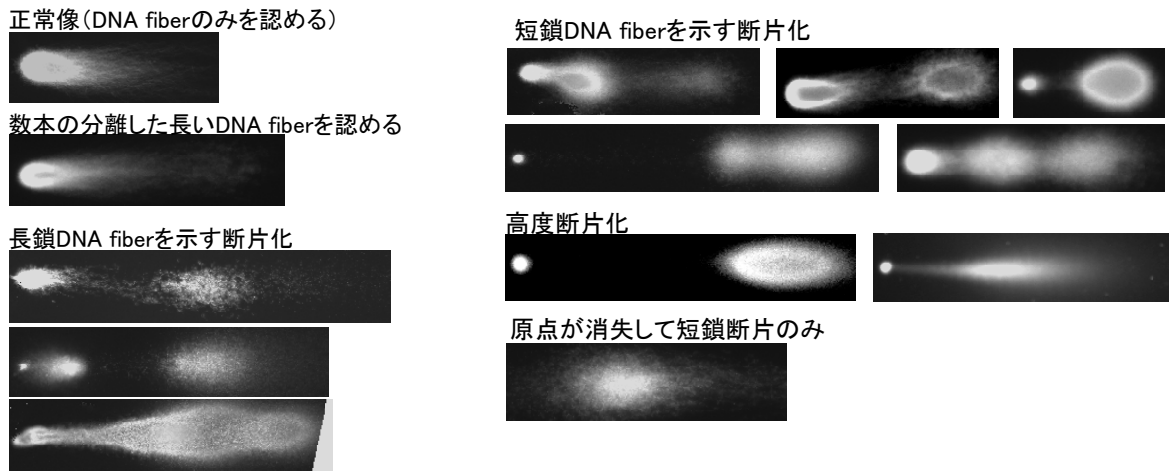
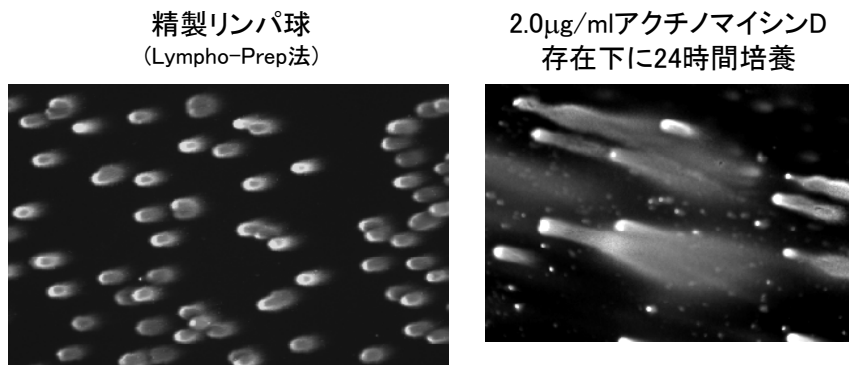


図6 アポトーシスの誘導



【考察】すでにcomet電気泳動法による細胞核DNAの断片化観察を目的としたキットが発売され、これを利用したヒト精子核断片化に関する報告がある。本研究において本キットを用いた予備実験を行った結果、少なくとも精子核DNAの観察においては、本キットの使用は不適であるとの結論を得た。1. 細胞をアガロース中で溶解し、DNAを裸化して泳動をするため界面活性剤、カオトロピックイオン、タンパク分解酵素の最適条件を検討した。その結果、0.2% ラウリルサルコシルNa、0.2%Triton X-100、10.0mM EDTA、20mM Vitamin C、20mM DTT にトリプシンを添加し、ゲルを37°C、1時間処理する条件を確立した。キットで用いる0.2% ラウリルサルコシルNa、2.0M NaClではタンパク分解が不完全であり、偽陰性となることを認めた。2. 細胞電気泳動に際しては、泳動槽の電極間距離、電位勾配、泳動緩衝液のイオン強度等が変化すると、同一検体でも泳動像が変化することを認めた。本研究では、解像力の改善を目的としてSCPFEを開発した。この方法により、連続したDNA fiberとともにDNA断片を同一視野上で観察が可能となり、定量的な解析が可能となった。

ヒト精子DNAにおけるDSBをSCPFEで観察した結果、個々の精子における断片化の程度は多様であった。すでに精子核断片化へのアポトーシスの関与が報告されているが、化学誘導アポトーシスの泳動像と必ずしも一致せず、さらに詳細な検討を要すると考えられる。

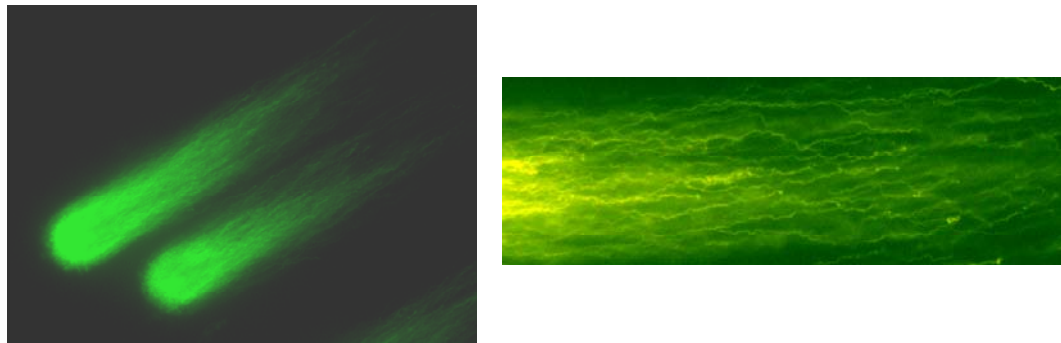
2) 精製によるDNA損傷精子の排除

1) で確立した精子DNA2重鎖切断の観察法を指標として、ヒト射精精液を分画して精製によるDNA損傷精子の排除を試み、分画標品の運動能、先体反応誘起能(AR)、DNA構造、頭部形態を指標とした精子精製法を検討した。

【方法】射精精液は90%Percoll沈降速度差遠心分離法(P法)により分画し、沈澱を20-40%Nycodenz密度勾配に層積し、沈降平衡分離した(N法)。精子は中間層と沈澱に2分されるので、中間層を回収、濃縮し、swim upを行った。精子濃度、運動率測定にはCASAを用いた。ARはFITC-conA-PI 2重蛍光染色法、DNA構造正常性は修正comet電気泳動法により観察した。DNA2重鎖切断の判定は、SCPFEにより超伸展したDNA fiber像が原点から伸展する連続するfiberのみを示すものを陰性、その先に長鎖または短鎖DNAを認めるものを陽性とした(図1)。頭部形態はWHO基準により判定した。

図1 DNA断片化陰性精子の判定

泳動原点から伸展する連続したDNA fiberのみを認め、
その先に短鎖の断片が観察されない

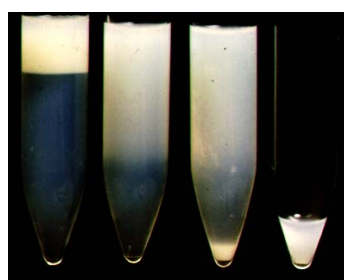


【結果】

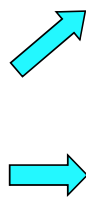
図2に分画の実際を示した。インフォームドコンセントを得た精液9標本(精子濃度 $62 \pm 48 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 $26.8 \pm 16.0\%$)はP法後、AR精子比率は $38.9 \pm 21.3\%$ 、N法中間層、沈澱では $73.2 \pm 24.6\%$ 、10%以下であった(図4)。P法後、comet像陰性、陽性精子の混合像を認めたが、N法中間層ではほとんどの精子がcomet陰性、逆に同沈澱層ではほとんどがcomet陽性像を呈した(図3)。原精液、P法沈澱、N法中間層の正常形態精子比率は、 $11.0 \pm 4.2\%$ 、 $32.1 \pm 8.2\%$ 、 $49.3 \pm 9.6\%$ であり、精製により約4.8倍上昇した(表1)。N法中間層をswim upした結果、運動率 $95 \pm 1.9\%$ の精子分画を得ることができた。

図3 Nycodenz沈降平衡法によるDNA損傷精子の排除

図2 精子分画法の実際



Percoll 沈降速度差遠心法



Nycodenz沈降平衡法



修正コメット電気泳動像

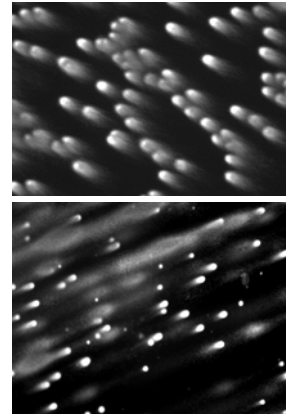


図4 Nycodenz分画における頭部形態、先体反応誘起能

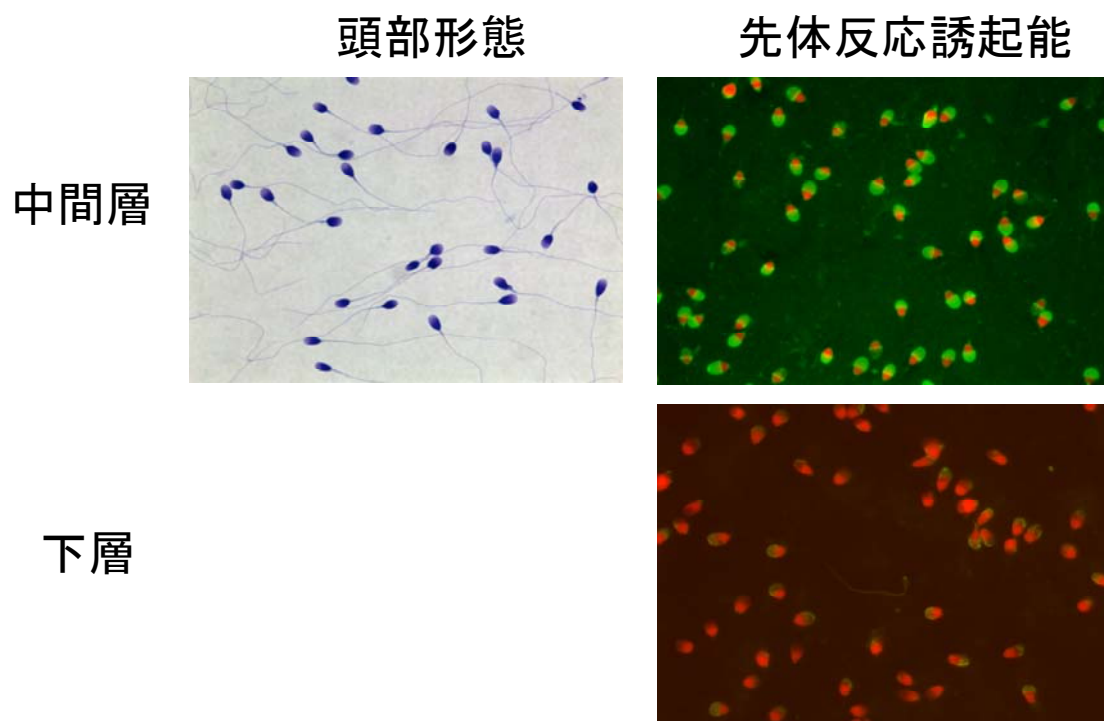


表1 Percoll沈降速度差遠心法、Nycodenz沈降平衡法 Swim up法を組み合わせた精子精製

		運動率	先体反応	頭部形態
原精液		26.8±16.0	-	11.0±4.2
Percoll	沈澱	64.8±14.2	38.9±21.3	32.1±8.2
Nycodenz	中間層	88.6±12.2	73.2±24.6	49.3±9.6
	下層	<10	<10	2.3±1.6
Swim up		95±1.9	-	56.8±6.7

N=9

【考察】P法、N法、swim upを組み合わせた精子精製法により、運動能、先体反応誘起能を有し、DNA構造、頭部形態が正常な精子を分画し得る可能性が示唆された。

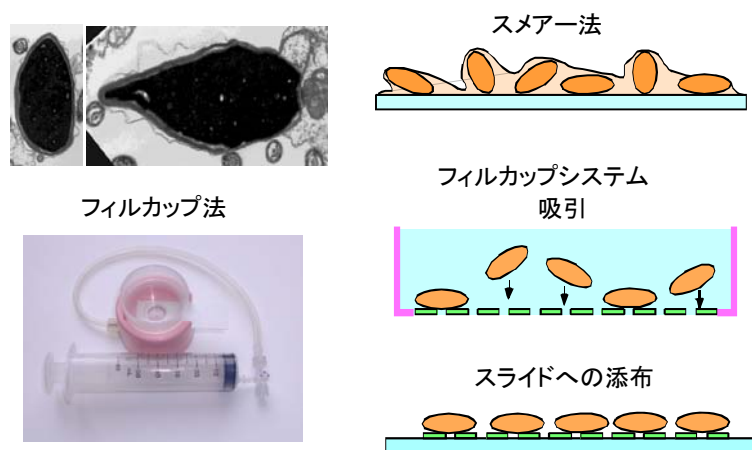
本研究の結果は、DNA損傷、非損傷精子間に物理化学的性状に差異が存在することが明らかになった。今後、さらに精製効率の改善を行いたい。

3) 精子機能を指標とした精子の分画と精子形態標準品の確立

精子形態に関するWHOの分類では、頭部形態についてoval shape with regular outline、すなわち楕円形の頭部を有する精子を正常精子と定義してきた。しかし精子形態と機能の相関に関しては言及されていなかった。本研究では種々の精子機能を指標として精子を分画、精製し、その形態を観察する。さらにコンピューター画像解析装置(CAIA)を用いる形態計測(morphometry)に供する画像標準品を得るため、CCD画像の解析に適した精子染色法を開発する。画像解析項目として、長短径比、重心点、面積、偏心率等の測定パラメーターの検討を行なった。

【方法と結果】精子を濃縮後、99%等張化Percoll(密度1.13g/ml)に層積してswim downを行った。染色操作(固定、風乾)による形態変形を避けるため、0.3%ローズベンガル、0.05%Triton-X100を含む等張培養液に懸濁し、染色した。均一な精子頭部最大断面像を得るため、染色精子懸濁液を孔径 $2.0\mu\text{m}$ のメンブランフィルター上に吸引、観察に供した(図1)。形態は、CCDカメラ画像をsimple PCI用いて計測した。swim down後、運動率はほぼ100%となり、先体反応誘起率は約87%であったローズベンガル染色によりCAIAに適した階調差の少ない均一な染色像が得られた。精液中の精子頭部形態は多様であったが、精製後の精子分画ではほとんどが均一な楕円形頭部を有していた(図2)。

図1 フィルカップ法による精子形態観察



6687匹の精製精子頭部を計測した結果、長径： $4.9 \pm 0.47 \mu\text{m}$ 、短径： $3.5 \pm 0.30 \mu\text{m}$ 、長短径比： 1.4 ± 0.20 、面積： $12.6 \pm 1.20 \mu\text{m}^2$ (SUP)、周囲長： $13.9 \pm 0.88 \mu\text{m}$ (平均 \pm SD)であった。表1に個々の標本における値を、図3に各パラメーターの分布をまとめた。得られた値はWHOマニュアルに記載された精子頭部長径、短径値のほぼ上限に位置し、本法では固定、染色による細胞収縮の影響がないためと推察された。

図2 フィルター上にトラップされた精製精子

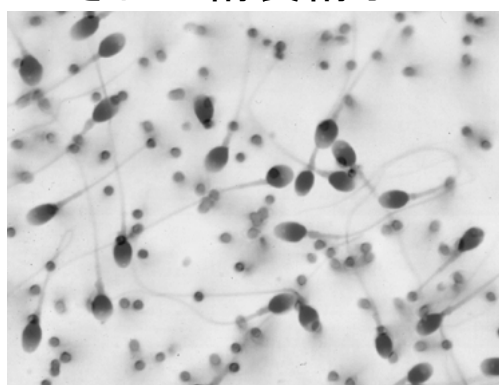


表1 ヒト精子形態パラメーター

平均 \pm SD

Case	Sperm count	Area (μm^2)	Perimeter (μm)	Max Length (μm)	Max Breadth (μm)	Roundness	Aspect Ratio
1	781	12.9 ± 1.48	15.2 ± 1.15	5.10 ± 0.414	3.53 ± 0.352	0.705 ± 0.061	1.46 ± 0.166
2	1370	12.1 ± 1.44	14.6 ± 1.07	5.01 ± 0.383	3.36 ± 0.282	0.719 ± 0.057	1.49 ± 0.131
3	160	12.6 ± 1.42	14.9 ± 1.08	5.16 ± 0.393	3.41 ± 0.266	0.714 ± 0.055	1.52 ± 0.121
4	540	12.5 ± 1.26	14.7 ± 0.980	5.02 ± 0.351	3.43 ± 0.260	0.730 ± 0.056	1.47 ± 0.126
5	411	12.3 ± 1.35	14.7 ± 1.03	5.09 ± 0.366	3.37 ± 0.262	0.713 ± 0.056	1.51 ± 0.124
6	1516	12.3 ± 1.34	14.8 ± 1.12	5.05 ± 0.406	3.45 ± 0.278	0.709 ± 0.061	1.47 ± 0.134
7	633	13.1 ± 1.35	15.6 ± 1.20	5.27 ± 0.412	3.55 ± 0.278	0.694 ± 0.063	1.49 ± 0.135
8	1422	12.6 ± 1.19	13.9 ± 0.879	4.96 ± 0.466	3.55 ± 0.300	0.716 ± 0.047	1.44 ± 0.204
Total	6887	12.5 ± 1.37	14.7 ± 1.16	5.05 ± 0.423	3.46 ± 0.301	0.730 ± 0.073	1.47 ± 0.160

【考察】WHOの基準ではスメアーした精子を染色後顕微鏡観察し、形態を主観的に判定する方法が採られている。疫学的調査においてはコンピューター画像解析装置等を用いた客観的測定法が、精度管理の点からも好ましい。本研究は、画像解析において判定の基準となる標準品を確立しようとするものである。密度および運動能を指標とした分画法は正常形態精子の選別に有用であり、さらに同標本は機能良好精子であることも明らかとなった。フィルター法は精子頭部長短径比の分布幅が小さく、精子頭部最大断面画像が得られることが示された。本研究では、密度勾配遠心分離、swim downにより調製した標品の解析を行った。項目2で得られたDNA損傷を有しない運動精子標品を用いて、再度検討をおこなう予定である。

4) 高速液体クロマトグラフィ、キャピラリー電気泳動法によるヒト精漿中のbisphenol A、nonylphenolの定量

ヒトへの環境ホルモン暴露の影響を検討する一端として、ヒト精漿中のbisphenol A(BPA)、nonylphenol (NP)を定量した。測定には高速液体クロマトグラフィ、キャピラリー電気泳動法を用いた。標準BPA、NPを用いた分析の結果、検出限界は各々1.7pg/mlであった。体外受精・胚移植を施行例のうちインフォームドコンセントが得られた57例から精液を得た。精漿はプロテイナーゼKによる消化後、疎水カラムを用いてBPA、NPを粗抽出後、分析に供した。検討した全ての検体において、BPA、NPは検出限界以下であった。両者のヒト精漿への移行は極めて少ないと考えられ、ヒト精子DNA損傷への影響因子である可能性は不明である。

(2) 研究成果の今後期待される効果

従来のDNA研究は、数百万個の細胞からDNAを抽出して解析を行う。本研究で新たに開発したSCPFGEは1個の細胞の染色体 (DNA) を超伸展し、intactなDNA fiberとDNA断片の同時観察が可能とする。DNA構造、FISHを用いた遺伝子解析など、個々の細胞を対象とするDNA研究を行う為の基礎技術となる。医薬品の開発に際して従来の催奇形性に加えてDNA傷害毒性が評価項目に追加される予定であり、本申請は、トキシコジェネティクス研究における新規解析法を提供する。

精子DNA損傷はアポトーシスを始めとする細胞の生理的、病理的変化の帰結と考えられる。DNA損傷、非損傷精子間に物理化学的性状に差異が存在し、この差を利用して両者を分画できることが明らかとなった。DNA損傷精子の排除は基礎研究に留まらず、不妊症領域において、体外受精、顕微授精の安全性向上に寄与する。

顕微鏡観察による主観的な精子形態の観察に対し、コンピューター画像解析装置等を

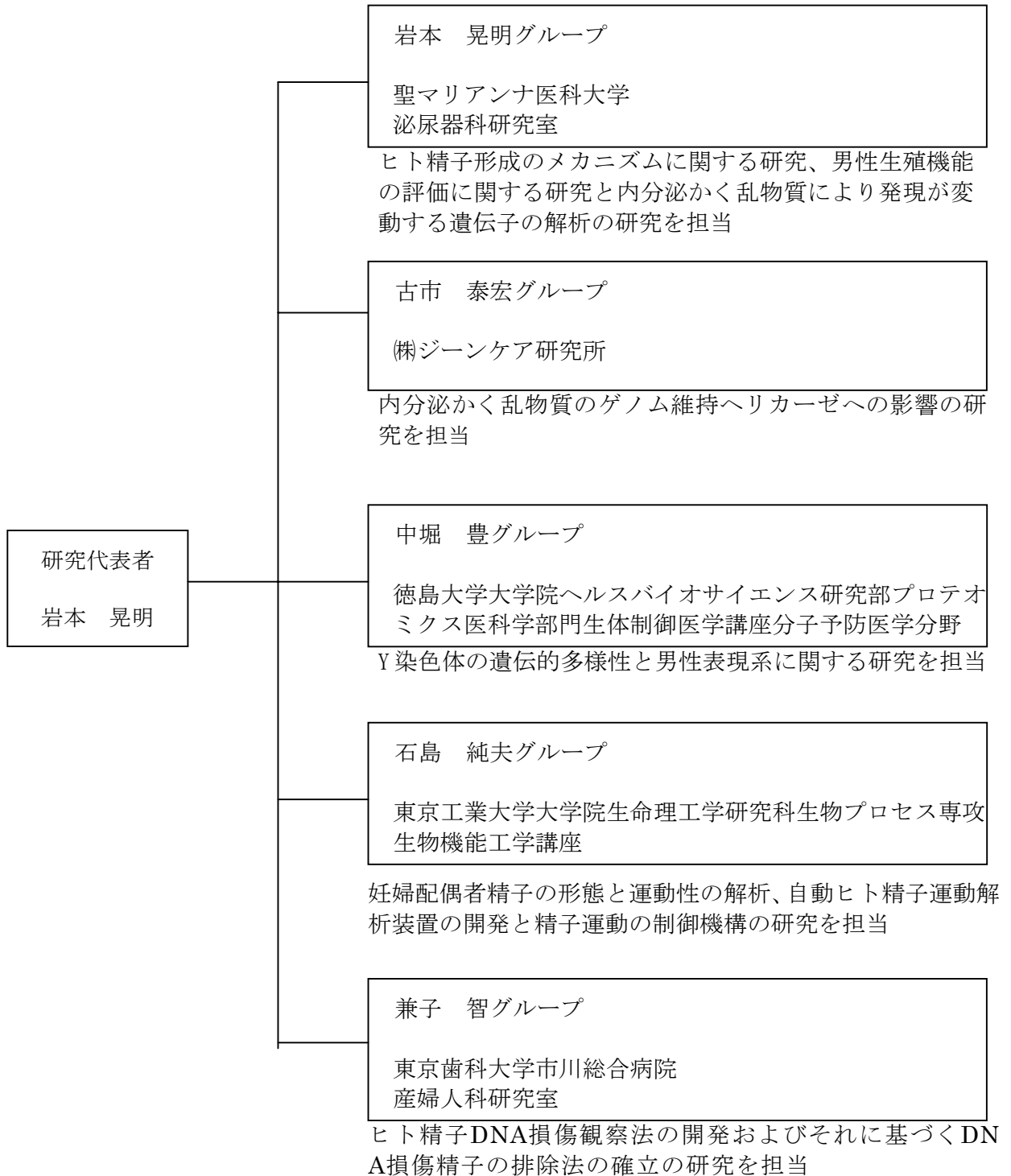
用いる客観的測定法は精度が高い。本研究は画像解析において判定の基準となる標準品を確立しようとするものである。本研究の進展により、精子頭部形態の簡易かつ高精度な評価が可能となることが期待される。

高速液体クロマトグラフィ、キャピラリー電気泳動法はガスクロマトグラフィに比して燃焼機器等を必要とせず、簡易かつ高感度である。内分泌かく乱物質の検出に広く応用されることが期待される。

内分泌かく乱物質の生殖影響としてヒト精子濃度の低下が指摘され、一般精液所見(精子濃度、運動率、精子形態等)を対象とする詳細な疫学調査が行われた。我々は、主として精子の質に着目して研究を行ってきた。精子の最も基本的な機能は染色体の運搬体であり、DNA損傷の定量的評価法を確立した。さらにDNA損傷を指標として精子精製を行った結果、DNA損傷を有しない精子は形態、先体反応誘起能等も良好であることが示された。顕微鏡レベルの観察においては、精製形態が有力な指標となると考え、コンピュータ画像解析法に関する基礎的検討を行い、精製した機能良好精子を用いた精子頭部画像標準品の策定を行った。

4. 研究実施体制

(1) 体制



(2)メンバー表

①岩本 晃明グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
岩本 晃明	聖マリアンナ医科大学 泌尿器科研究室	教授	EDs のヒト生殖機能への影響	平成 11 年 11 月～
馬場 克幸	同上	講師	同上	平成 11 年 11 月～
野澤資亜利	同上	助手	同上	平成 11 年 11 月～
中目真理子	同上	技術員	同上	平成 16 年 4 月～
吉池 美紀	同上	同上	同上	平成 11 年 11 月～
西田 智保	同上	助手	同上	平成 11 年 11 月～
佐藤 陽子	同上	CREST 研究員	EDs の精子形成における影響	平成 12 年 7 月～
吉田 薫	同上	同上	同上	平成 14 年 3 月～ 平成 16 年 5 月
加藤由美子	同上	CREST 研究補助員	研究データの収集・解析	平成 12 年 4 月～
荒井 路子	同上	同上	研究データの収集・解析および実験補助	平成 14 年 8 月～ 平成 16 年 8 日
高倉かほる	同上	同上	研究データの収集・解析および実験補助	平成 16 年 2 月～
兼森 理絵	同上	同上	研究チームでの研究事務処理	平成 14 年 1 月～
佐藤 裕子	同上	同上	研究機器の操作、実験測定	平成 12 年 4 月～ 平成 14 年 3 月
菊地 純子	同上	同上	研究チームでの研究事務処理	平成 12 年 1 月～ 平成 13 年 12 月
栗林 靖	同大学産婦人科	講師	EDs のヒト生殖機能への影響	平成 11 年 11 月～ 平成 13 年 3 月
田中 政巳	同大学 薬理学教室	同上	EDs の精巣機能への影響	平成 11 年 11 月～
西川 裕之	同上	CREST 研究補助員	研究データの収集・解析および実験補助	平成 13 年 8 月～ 平成 15 年 3 月
野口 勝枝	同上	同上	同上	平成 14 年 5 月～ 平成 16 年 5 月
村松 由佳	同上	同上	同上	平成 13 年 11 月～ 平成 13 年 12 月
N.E. Skakkebaek	コペンハーゲン大学 病院	教授	EDs の精巣機能への影響	平成 12 年 1 月～
H.Leffers	同上	研究員	同上	平成 12 年 1 月～
宮本 力	(株)イニシウム	研究開発 マネージャー	環境ホルモン物質のアッセイ系の開発	平成 14 年 4 月～ 平成 15 年 3 月

谷口 寿章	徳島大学分子酵素研究センター	教授	精子・精漿のプロテオーム解析	平成14年10月～
-------	----------------	----	----------------	-----------

②古市 泰宏グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
古市 泰宏	(株)ジーンケア研究所	所長	EDsの影響としてのDNA損傷・タンパク動態の解析	平成11年11月～
渡辺 公英	同上	主任 研究員	内分泌かく乱物質のヒト生殖関連遺伝子の発現に及ぼす影響測定	平成14年4月～ 平成16年3月
磯 貴子	同上	CREST 研究員	同上	平成13年10月～ 平成16年10月
佐藤 三佐子	同上	研究員	同上	平成11年11月～ 平成13年3月
北尾 沙織	同上	CREST 研究員	同上	平成12年4月～ 平成13年3月

③中堀 豊グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
中堀 豊	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部プロテオミクス医科学部門生体制御医学講座分子予防医学分野	教授	遺伝的素因による環境影響に対する反応の差異に関する研究	平成11年11月～
新家 利一	同上	助教授	同上	平成11年11月～
佐藤 陽一	同上	助手	同上	平成11年11月～
木下 桂午	同上	大学院生	統計解析による疫学的研究	平成11年11月～ 平成16年3月
閻 洪涛	同上	同上	新しいY染色体多型の解析	平成15年4月～
坂本 梢	同上	同上	同上	平成16年4月～
楊 新軍	同上	CREST 研究補助員	研究データの収集・解析および実験補助	平成16年3月～ 平成16年10月
陳 剛	同上	同上	新しい Y 染色体多型の解析	平成13年4月～ 平成16年10月
采見有紀子	同上	同上	PCR法によるDNA多型解析を中心とする研究補助業務	平成12年4月～ 平成15年11月
辻 恵子	同上	同上	DNA多型解析用のためのDNA抽出を中心とした研究補助業務	平成12年6月～ 平成16年3月
遠藤 朱美	同上	同上	同上	平成13年6月～ 平成15年8月

黒木 陽子	同上	CREST 研究員	Y染色体構造の多様性と精子形成の関連についての研究	平成12年4月～ 平成13年3月
笹原 賢司	同上	助手	新しいY染色体多型の解析	平成13年4月～ 平成14年3月
Ashraf Ewis	同上	大学院生	同上	平成13年4月～ 平成14年3月
李 周遠	同上	同上	遺伝的要因に係る情報収集とDNA実験	平成13年4月～ 平成14年3月
斎藤 公紹	同上	医 員	内分泌かく乱物質による培養細胞の反応	平成14年4月～ 平成15年3月
奈路田 拓史	同大学院医学研究科医学専攻器 官病態修復医学 講座泌尿器科学 分野	助 手	泌尿器科学的情報の提供、DNA解析	平成13年4月～ 平成16年3月

④石島 純夫グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
石島 純夫	東京工業大学 大学院生命理工 学研究科生物プロ セス専攻	助 手	精子形態・運動性に関する研究	平成11年11月～
浜口 幸久	同上	教 授	高速度多重焦点ビデオ顕微鏡の作製	平成11年11月～
B.A. Afzelius	ストックホルム大学	同上	精子形態の解析	平成11年12月～
馬場 昭次	お茶の水女子大 学理学部生物学 教室	教 授	自動精子運動解析装置の開発	平成11年11月～
奥野 誠	東京大学総合文 化研究科	助教授	精子超微細構造に関する研究	平成12年4月～
大室 純子	東京工業大学大 学院生命理工学 研究科生物プロセ ス専攻	CREST 研究員	精子運動の解析と画像解析装置の開発	平成13年7月～ 平成15年6月

⑤兼子 智グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
兼子 智	東京歯科大学 市川総合病院 産婦人科	講 師	精巣機能の新規評価法の開発	平成11年11月～
入江 美代子	同上	CREST 研究補助員	精子形態・運動性に関する研究	平成12年4月～ 平成16年3月
岡崎 雅子	同上	同上	研究データの収集・解析、実験動物の飼育・管理	平成12年2月～ 平成14年3月
小室 浩	同上	同上	研究データの収集・解析	平成13年4月～ 平成14年3月

片山 昌勅	明治薬科大学薬学部生体機能分析学研究室	講師	EDs分析法の開発	平成11年11月～平成13年3月
佐々木 正大	同上	CREST技術員	同上	平成11年11月～平成13年3月

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成13年 2月9日	第一回チーム内研究成果報告会	新横浜フジビューホテル	12名	研究の現状把握。研究進捗状況の発表、討論。今後の研究計画の確認。
平成14年 3月16日	第二回チーム内研究成果報告会	新横浜国際ホテル	15名	中間発表に向けての研究進捗状況の確認、発表、討論、意見交換。
平成15年 2月15日	第三回チーム内研究成果報告会	聖マリアンナ医科大学医科大学明石会館	17名	今後2年間の各グループの研究計画の打ち合わせ。研究進捗状況の発表、討論。
平成15年 6月21日	第四回チーム内研究成果報告会	聖マリアンナ医科大学医科大学明石会館	12名	研究進捗状況の発表、討論。最終年度に向けての研究計画の確認。

(2) 招聘した研究者等

なし

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 1件、海外 23件)

1. Iwamoto T, Nozawa S and Sato Y: Male reproductive health and effects of endocrine disruptors. *Env. Sci.*, 10, suppl, 1-12, 2003
2. Sato Y, Nishida T, Miyano S, Matsushita T, Baba K, Nakano M, Sato Y, Nozawa S and Iwamoto T: Spermatogenesis and the thickness of lamina propria in human seminiferous tubules. *Biol. Reprod.*, 66, suppl, 298-299, 2002
3. Yoshida K, Sato Y, Yoshiike M, Nozawa S, Ariga H and Iwamoto T: Immunocytochemical localization of DJ-1 in human male reproductive tissue. *Mol Reprod Dev*;66(4): 391-7, 2003 PMID: 14579415
4. Yoshida K, Yoshiike Y, Nozawa S, Tamai K, Ariga H, and Iwamoto T: Measurement of DJ-1 Protein in Human Seminal Plasma. *Environmental Sciences Vol. 9-2&3*, 2002
5. Almstrup K, Fernández MF, Petersen JH, Olea N, Skakkebaek NE and Leffers H: Dual Effects of Pytoestrogens Result in U-Shaped Dose-Response Curves. *Environmental Health Perspectives* 110: 743-748, 2002
6. Nielsen JE, Hansen MA, Jorgensen M, Tanaka M, Almstrup K, Skakkebaek NE, Leffers H: Germ cell differentiation-dependent and stage-specific expression of

- LANCL1 in rodent testis. *European Journal of Histochemistry* 47: 215-222, 2003
7. Almstrup K, Nielsen JE, Hansen MA, Tanaka M, Skakkebaek NE and Leffers H: Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biology of reproduction* 70: 1751-1761, 2004
 8. Lee JW, Kotliarova SE, Ewis AA, Hida A, Shinka T, Kuroki Y, Tokunaga K and Nakahori Y: Y-chromosome compound haplotypes with the microsatellite markers DXYS265, DXYS266, and DXYS241. *J Hum Genet* 46: 80-84, 2001
 9. Shinka T, Naroda T, Tamura T, Sasahara K, Nakahori Y: A rapid and simple method for sex identification by heteroduplex analysis using denaturing high-performance liquid chromatography(DHPLC). *J Hum Genet* 46: 263-266, 2001
 10. Ewis A A, Lee JW, Shinka T, Nakahori Y: Microdeletions of a Y-specific marker, Yfm1, and implications for a role in spermatogenesis. *J Hum Genet* 47:257-261, 2002
 11. Jabasini M, Xu F, Dang F, Shinka T, Nakahori Y, Baba Y: Range of separation of potential tool for bioseparation, Microchip electrophoresis system, for DNA polymorphisms on the Y chromosome. *Analytical Sciences* 19: 175-6, 2003
 12. Kyoung J, Kwak D, Hammer MF, Nakahori Y, Shinka T, Lee JW, Jin F, Jia X, Smith CT, Kim W: Y-chromosomal DNA haplogroups and their implications for the dual origins of the Koreans. *Hum Genet.*114: 27-35, 2003
 13. Yang XJ, Yan HT, Nakahori Y: Evaluation of the effectiveness of laser in situ keratomileusis and photorefractive keratectomy for myopia: A meta-analysis. *J Med Invest* 50: 180-187, 2003
 14. Chen G, Shinka T, Kinoshita K, Yan HT, Iwamoto T, and Nakahori Y: Roles of estrogen receptor α (ER α) in the regulation of the human Mullerian inhibitory substance (MIS) promoter. *J Med Invest* 50: 192-198, 2003
 15. Shinka T, Sato Y, Chen G, Naroda T , Kinoshita K, Unemi Y, Tsuji K, Toida K, Iwamoto T, Nakahori Y: Molecular Characterization of Heat Shock-like Factor Encoded on the Human Y Chromosome and Implications for Male Infertility. *Biol Reprod* 71: 297-306, 2004
 16. Ishijima S, Mohri H and Suarez SS: Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa. *Int J Urol* 7, Suppl, S73, 2000
 17. Ishijima S, Vines CA, Griffin FJ and Cherr GN: Flagellar movements of herring spermatozoa. *Zoological Science* 17, Suppl, 34, 2000
 18. Kubo-Irie M, Ishijima S, Noda T, Irie M and Mohri H: Study of the centrioleadjunct of stag beetle spermatozoa. *Zoological Science* 18, 85, 2001
 19. Ishijima S, Baba S, Mohri H, and Suarez SS: Quantitative analysis of flagellar movement in hyperactivated and acrosome-reactivated golden hamster spermatozoa. *Mol. Reprod. Develop* 61, 376-384, 2002.
 20. Ishijima S, Iwamoto T, Nozawa S, and Matsushita K: Motor apparatus in human spermatozoa that lack central pair microtubules. *Mol Reprod Develop* 63, 459-463, 2002.
 21. Kubo-Irie M, Matsumiya K, Iwamoto T, Kaneko S and Ishijima S: Morphological abnormalities in the spermatozoa of fertile and infertile men. *Mol. Reprod. Develop.*, In press.
 22. 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精子DNA断片化の解

析、聖マリアンナ医学雑誌 29, 541-549, 2001

23. Katayama M, Matsuda Y, Sasaki T, Shimokawa K, Kaneko S, Iwamoto T: Determination of bisphenol A and 10 alkylphenols in semen using SDS micelle capillary electrophoresis with β -cyclodextrin. *Biomedical chromatography*, 15 : 437-442, 2001
24. Katayama M, Matsuda Y, Shimokawa K, Ishikawa H, Kaneko S: Preliminary monitoring of bisphenol A and nonylphenol in human semen by sensitive high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis after Proteinase K digestion. *Anal Letters* 36, 2659-2667, 2003

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 20件、海外 5件)

1. 岩本晃明^{1,3)}, 石島純夫^{2, 3)} 1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科 2) 東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻 3) CREST、精液検査の標準化はどこまで可能か—精子運動能測定と精子形態測定の自動化へ向けて、第 45 回日本不妊学会学術講演会、神戸、2000 年 11 月 24 日
2. Teruaki Iwamoto (Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine), Current Status of Semen Quality in Japan. 2003 Toxicology and Risk Assessment Conference, Dayton, OH, U.S.A., 2003. 4. 30
3. 佐藤陽子, 岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科, CREST)、造精機能障害時にヒト精巣内でおこっていることについて、日本動物学会第 73 回大会、第 4 回“精子学談話会”、金沢、2002 年 9 月 25 日
4. 佐藤陽子, 野澤資重利, 岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科, CREST)、ヒト精子形成障害時に精巣内でおこっていることについて、日本アンドロロジー学会第 23 回大会、甲府市、2004 年 7 月 17 日
5. 佐藤陽子 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科, CREST) ほ乳類の精子形成維持系について、第一回生殖研究若手の会、三浦、2004 年 7 月 28 日
6. Kaoru Yoshida^{1,4)}, Yoko Sato^{1,4)}, Miki Yoshiike^{1,4)}, Shiari Nozawa^{1,4)}, Katsuyuki Tamai²⁾, Hiroyoshi Ariga^{3,4)}, Teruaki Iwamoto^{1,4)}, 1) Dept of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 2) Medical & Biological Laboratories Co., Ltd., 3) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University 4) CREST, Distribution of DJ-1 in Human Male Reproductive System. 9th International Symposium on Spermatology, Capetown, 2002. 10. 10
7. 吉田薫^{1,4)}、吉池美紀^{1,4)}、野澤資重利^{1,4)}、玉井克之³⁾、有賀寛芳^{2,4)}、岩本晃明^{1, 4)}、聖マリアンナ医科大学泌尿器科、2) 北海道大学大学院薬学研究科分子生物、3) 医学生物学研究所(MBL)、4) CREST、ヒト精漿中不妊関連タンパク質DJ-1 の測定、環境ホルモン学会第 4 回研究発表会、筑波、2001 年 12 月 15 日
8. 松下知彦¹⁾、吉田薫^{1,3)}、佐藤陽子^{1,3)}、吉池美紀^{1,3)}、野澤資重利^{1,3)}、有賀 寛芳^{2,3)}、岩本晃明^{1,3)}、1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科、2) 北海道大学大学院薬学研究科分子生物、3) CREST、ras関連癌遺伝子産物DJ-1 のヒト精子及び精巣中での分布、第 90 回日本泌尿器科学会総会、東京、2002 年 4 月 19 日
9. Henrik Leffers^{1,2)}, Thuri S.A. Kledal¹⁾, John Erik Nielsen²⁾, Masami Tanaka^{2,3)}, Karin Damm Joergensen¹⁾, Ewa Rajpert De-Meyts¹⁾, Niels E. Skakkebaek^{1,2)}, Teruaki Iwamoto^{2,4)}, 1) Dept. of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, 2) CREST, 3) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School

of Medicine, 4) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, Lose-Doss DES in Utero Exposure: Possible Delay in Germ Cell Development But No Effects in Adult Animals. 環境ホルモン学会第5回研究発表会、広島、2002年11月25日

10. 中堀豊 (徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, CREST)、日本人の成り立ち「Y染色体分類からみた日本人男性の表現型と適応度」(シンポジウム)、日本人類遺伝学会第48回大会、長崎、2003年10月22日
11. 梅野真由美^{1,3)}, 新家利一^{1,3)}, 中堀豊^{1,3)}, 許峰¹⁾, 馬場嘉信¹⁾, 荒井昭博¹⁾, 中村伸¹⁾, 岩本晃明^{2,3)}, 1) 徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) CREST、マルチプレックスPCR電気泳動法を用いたY染色体欠失解析システムの開発、日本人類遺伝学会第48回大会、長崎、2003年10月21日
12. 新家利一^{1,3)}, 奈路田拓史^{1,3)}, 陳剛^{1,3)}, 木下桂午^{1,3)}, 閻洪水^{1,3)}, 采見由紀子^{1,3)}, 辻恵子¹⁾³⁾, 岩本晃明²⁾³⁾, 中堀豊¹⁾³⁾ 1) 徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) CREST、ヒトY染色体上の無精子症候補領域に存在するHSFYの分子遺伝学的解析、日本人類遺伝学会第48回大会、長崎、2003年10月21日
13. 陳剛, 新家利一, 木下桂午, 閻洪涛, 中堀豊 (徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, CREST)、エストロゲンがヒトミューラー管抑制因子(MIS)のプロモーター活性に及ぼす影響についての検討、日本人類遺伝学会第48回大会、長崎、2003年10月21日
14. 梅野真由美^{1,3)}, 新家利一^{1,3)}, 中堀豊^{1,3)}, 朱永梅¹⁾, 馬場嘉信¹⁾, 荒井昭博¹⁾, 中村伸¹⁾, 岩本晃明^{2,3)}, 1) 徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) CREST、Y染色体欠失解析における迅速診断法の研究、第50回日本臨床検査医学会総会、広島、2003年10月29日
15. 岡本愛¹⁾, 梅野真由美^{1,3)}, 新家利一^{1,3)}, 中堀豊^{1,3)}, 岩本晃明^{2,3)}, 1) 徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) CREST、Y染色体欠失解析システムの開発および市販キットとの比較検討、第28回徳島県医学検査会、徳島、2003年12月7日
16. 馬場克幸^{1,3)}, 星野孝夫¹⁾, 西田智保¹⁾, 松下知彦¹⁾, 野澤資亜利^{1,3)}, 吉池美紀^{1,3)}, 岩本晃明^{1,3)}, 新家利一^{2,3)}, 中堀豊^{2,3)}, 梅野真由美^{2,3)} 1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 2) 徳島大学大学院医科学教育部分子予防医学分野, 3) CREST、Y染色体微小欠失を伴った不妊症患者の臨床的検討、第49回日本不妊学会学術講演会、旭川、2004年9月2日
17. Sumio Ishijima (Dept. of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, CREST)、Hydrodynamic aspects of fish sperm motility, 1st International Symposium on Aqua Bio-Mechanisms, Honolulu, 2000. 8. 27
18. 石島純夫 (東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻, CREST)、精子運動測定の自動化、第5回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒素研究会、宮崎、2000年9月29日
19. 石島純夫¹⁾, Vines, C. A. ²⁾, Griffin, F. J. ²⁾, Cherr G. N²⁾. 1)東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻, CREST 2) カリフォルニア大学デービス校ボデガ海洋研究所、ニシン精子の鞭毛運動、日本動物学会第71回大会、東京、2000年10月21日
20. 石島純夫^{1,4)}, 入江美代子⁴⁾, 岩本晃明^{2,4)}, 松宮清美³⁾ 1) 東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) 大阪大学医学研究院臓器制御医学, 4) CREST、妊孕能を持つ男性の精子における形態異常、日本動物学会第73回大会、金沢、2000年9月23日
21. Sumio Ishijima¹⁾, Hideo Mohri²⁾, James W Overstreet³⁾, Ashley I Yudin³⁾, 1) Dept. of

Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, CREST, 2) Okazaki National Research Institute, 3) University of California, Davis, Hyperactivation of monkey spermatozoa is triggered by Ca^{2+} and completed by cyclic AMP. 36th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Cincinnati, Ohio, 2003. 7. 21

22. 兼子智 (東京歯科大学市川総合病院産婦人科, CREST)、精液検査の標準化はどこまで可能か. ヒト精液検査の標準化に向けての展望、第45回日本不妊学会学術講演会、神戸、2000年11月24日
23. 西田智保^{1,3)}、兼子智^{2,3)}、吉池美紀^{1,3)}、田辺清男²⁾、岩本晃明^{1,3)} 1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 2) 東京歯科大学市川総合病院産婦人科, 3) CREST、TUNEL法によるヒト精子染色体断片化度の組織化学的観察、第18回日本受精着床学会学術講演会、岡崎、2000年7月6日
24. 兼子智^{1,3)}、西田智保^{2,3)}、郡山智¹⁾、赤星晃一¹⁾、黒島正子¹⁾、宮越敬¹⁾、佐久間雄一¹⁾、岩本晃明^{2,3)}、田辺清男¹⁾、1) 東京歯科大学市川総合病院産婦人科, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) CREST、ヒト精子頭部形態測定法の標準化に向けて一形態良好精子の精製および観察法について一、第18回日本受精着床学会学術講演会、岡崎、2000年7月6日
25. 佐々木正大¹⁾、片山昌勅^{1,2)}、下川健一²⁾、松田兆史²⁾、兼子智^{1,3)}、岩本晃明^{1,4)}、1) CREST, 2) 明治薬科大学薬学部生体機能分析, 3) 東京歯科大学市川総合病院産婦人科, 4) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科、 γ -cyclodextrinを用いた SDS micelle capillary electrokinetic chromatographyによる血清中の bisphenol A ならびに 10 種類の alkylphenol の検出、日本薬学会 121 年会、札幌、2001 年 3 月 28 日

②ポスター発表 (国内 13 件、海外 12 件)

1. Yoko Sato^{1,2)}、Takayasu Nishida^{1,2)}、Satetsu Miyano¹⁾、Tomohiko Matsushita¹⁾、Katsuyuki Baba^{1,2)}、Masaru Nakano³⁾、Yuko Sato^{1,2)}、Shiari Nozawa^{1,2)} and Teruaki Iwamoto^{1,2)}、1) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 2) CREST, 3) Ofuna Chuo hospital, Spermatogenesis and the thickness of lamina propria in human seminiferous tubules. The 35th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Baltimore, Maryland, 2002. 7. 28
2. Yoko Sato, Kaoru Yoshida, Shiari Nozawa, Katsuyuki Baba, Takayasu Nishida and Teruaki Iwamoto. (Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, CREST), Glycoprotein appeared in the thickened lamina propria of human seminiferous tubules with abnormal spermatogenesis. The 9th International Symposium on Spermatology, Cape Town, 2002. 10. 11
3. 佐藤陽子^{1,2)}、野澤資亜利^{1,2)}、馬場克幸^{1,2)}、宮野佐哲¹⁾、西田智保¹⁾、松下知彦¹⁾、岩本晃明^{1,2)}、1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 2) CREST)、spermatogenesisと細管基底膜の肥厚について、第20回日本アンドロロジー学会、宇都宮、2001
4. 佐藤陽子、野澤資亜利、岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科、CREST)、精子形成過程の異常とC₂₁ステロイドホルモンについて、日本発生生物学会第35回大会、横浜、2002年5月21日
5. 佐藤陽子、岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科、CREST)、造精機能障害時にヒト精巣内でおこっていることについて、日本動物学会第73回大会、第4回“精子学談話会”金沢、2002年9月25日
6. 佐藤陽子、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明 (聖マリアンナ医科大学泌尿器科、CREST)、精子形成過程の異常とC₂₁ステロイドホルモンについてpartII、日本発生生物学会36回大会、札幌、2003年6月11日

7. 佐藤陽子、吉池美紀、野澤資亜利、岩本晃明(聖マリアンナ医科大学泌尿器科, CREST)、精子形成過程の異常とC₂₁ステロイドホルモンについて、内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム、神奈川県葉山町、2003年6月13日
8. 佐藤陽子^{1,2)}、吉田薫^{1,2)}、野澤資亜利^{1,2)}、荒井路子^{1,2)}、中堀豊^{1,3)}、新家利一^{1,3)}、岩本晃明^{1,2)}、1) CREST, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) 徳島大学大学院医学系研究生体制御医学、Y染色体に存在する熱ショック転写因子HSFYのヒト精巣における局在と精子形成・精子成熟への役割、第22回日本アンドロロジー学会、広島、2003年7月20日
9. 松下知彦¹⁾、佐藤陽子^{1,3)}、入江美代子²⁾、吉田薫^{1,3)}、馬場克幸^{1,3)}、西田智保^{1,3)}、石島純夫^{1,2)}、岩本晃明^{1,3)}、1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 2) 東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻, 3) CREST、精子無力症の原因究明—spermiogenesisの異常によると思われる一症例の解析、第22回日本アンドロロジー学会、広島、2003年7月20日
10. 吉田薫^{1,3)}、山川克典¹⁾、星野孝夫¹⁾、馬場克幸^{1,3)}、松下知彦¹⁾、日吉峰麗²⁾、谷口寿章²⁾、岩本晃明^{1,3)}、1) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 2) 徳島大学分子酵素学研究センター酵素分子生理学部門, 3) CREST、ヒト精漿タンパク質のプロテオーム解析、環境ホルモン学会第6回研究発表会、仙台、2003年12月3日
11. 田中政巳^{1,5)}、中谷祥子¹⁾、野澤資亜利^{2,5)}、片山昌勅³⁾、栗林靖⁴⁾、馬場克幸^{2,5)}、岩本晃明^{2,5)}、小林真一¹⁾、1) 聖マリアンナ医科大学薬理学, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) 明治薬科大学薬学部生体機能分析, 4) 聖マリアンナ医科大学産婦人科, 5) CREST、Bisphenol-Aの胎児期暴露によるラット雄性生殖機能への影響、環境ホルモン学会第3回研究発表会、横浜、2000. 12. 15
12. John Nielsen^{1,3)}、Kristian Almstrup¹⁾、Masami Tanaka^{2,3)}、Niels E. Skakkebaek^{1,3)} and Henrik Leffers^{1,3)}、1) Dept. of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, 2) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine, 3) CREST, Timing of X-inactivation during spermatogenesis in the rodent testis. 12th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Doorwerth, Netherlands, 2002. 4. 6
13. Henrik Leffers^{1,3)}、Masami Tanaka^{2,3)}、Kristian Almstrup¹⁾、John Nielsen¹⁾、Thuri Kledal¹⁾、Lone F. Larsen¹⁾、Jorma Toppari¹⁾ and Niels E. Skakkebaek^{1,3)}、1) Dept. of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, 2) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine, 3) CREST, Understanding Gene Expression in the Testis. 12th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, Doorwerth, Netherlands, 2002. 4. 6
14. 田中政巳^{1,5)}、中谷祥子¹⁾、野口勝枝^{1,5)}、西川裕之⁵⁾、片山昌勅³⁾、野澤資亜利^{2,5)}、Henrik Leffers^{4,5)}、岩本晃明^{2,5)}、小林真一¹⁾、1) 聖マリアンナ医科大学薬理学, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) 明治薬科大学薬学部生体機能分析, 4) コペンハーゲン大学生殖発達部門, 5) CREST、Bisphenol-Aの母体経路暴露による精巣および脳の遺伝子発現への影響、環境ホルモン学会第5回研究発表会、広島、2002. 11. 25
15. Thuri S.A. Kledal¹⁾、John Erik Nielsen¹⁾、Masami Tanaka^{2,4)}、Karin Damm Joergensen¹⁾、Ewa Rajpert De-Meyts¹⁾、Niels E. Skakkebaek^{1,4)}、Teruaki Iwamoto^{3,4)}、and Henrik Leffers^{1,4)}、1) Dept. of Growth and Reproduction, Rigshospitalet, Copenhagen, 2) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine, 3) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 4) CREST、Low-Dose DES. In Utero Exposure: Possible Delay in Germ Cell Development But No Effects in Adult Animals、環境ホルモン学会第5回研究発表会、広島、2002. 11. 25
16. Masami Tanaka^{1,3)}、Katsue Noguchi^{1,3)}、Hiroyuki Nishikawa³⁾、Minoru Takase¹⁾、Katsuyuki Baba^{2,3)}、Takayasu Nishida^{2,3)}、Shiari Nozawa^{2,3)}、Teruaki Iwamoto^{2,3)}、Shinichi¹⁾、1) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine, 2)

Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 3) CREST, Analysis of relationship between endocrine disruption and gene expression in male humans and mice. 環境ホルモン学会第6回研究発表会、仙台、2003. 12. 2

17. Masami Tanaka^{1,3)}, Katsue Noguchi^{1,3)}, Hiroyuki Nishikawa³⁾, Minoru Takase¹⁾, Katsuyuki Baba^{2,3)}, Takayasu Nishida^{2,3)}, Shiari Nozawa^{2,3)}, Teruaki Iwamoto^{2,3)} Shinichi¹⁾, 1) Dept. of Pharmacology, St. Marianna University School of Medicine, 2) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 3) CREST, Analysis of the gene expression concerned with the endocrine disruption in male mice and humans. 10th International Congress of Toxicology, Tampere, Finland, 2004. 7. 11
18. 磯貴子^{1,2)}, 嶋本顕²⁾, 渡辺公英²⁾, 古市泰宏^{1,2)} 1) CREST, 2) (株) ジーンケア研究所、内分泌かく乱物質のゲノム維持機構への影響、環境ホルモン学会第5回研究発表会、広島、2002年11月25日
19. 磯貴子^{1,2)}, 嶋本顕²⁾, 渡辺公英²⁾, 古市泰宏^{1,2)} 1) CREST、2) (株) ジーンケア研究所、17 β -エストラジオール及びビスフェノールAのRecQヘリカーゼ群の発現への影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、仙台、2003年12月2日
20. Ishijima, S¹⁾., Mohri, H²⁾. Suarez, S. S³⁾. 1) Department of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, CREST, 2) National Institute for Basic Biology, 3) Department of Anatomy, Biomedical Sciences, Cornell University, Flagellar movements of hyperactivated and acrosome-reacted golden hamster spermatozoa, The third Asian and Oceanic Congress of Andrology, Chiba, 2000. 5. 26
21. Kubo-Irie. M^{1,2,3)}, Ishijima. S^{2,3)}, Noda, T.⁴⁾, Irie, M.⁴⁾, Mohri, H.⁵⁾ 1) University of the Air, 2) Department of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 3) CREST, 4) Waseda University, 5) Okazaki National Research Institutes, Study of the centriole adjunct of stag beetle spermatozoa. 日本動物学会第72回大会、福岡、2001年10月8日
22. Kubo-Irie, M^{1,2)}, Ishijima, S^{1,2)}, Matumiya, K³⁾., 1) Department of Bioengineering, Graduate School of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology, 2) CREST, 3) Dept. of Urology, Osaka University, Ultrastructural analysis of sperm abnormalities in fertile men. 環境ホルモン学会第4回研究発表会、筑波、2001年12月14日
23. 大室純子¹⁾, 岩本晃明^{1,2)}, 石島純夫^{1,3)}, 1) CREST, 2) 聖マリアンナ医科大学泌尿器科, 3) 東京工業大学生命理工学研究科生物プロセス専攻、超活性化精子の鞭毛運動と周辺微小管の滑りの調節、日本動物学会第74回大会、函館、2003年9月17日
24. Nishida T.^{1,3)}, Kaneko S.^{2,3)}, Yoshiike M.^{1,3)}, Nozawa S.^{1,3)}, Tanabe K.²⁾, Iwamoto T.^{1,3)}, 1) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 2) Dept. of Obstetrics and Gynecology and Urology, Ichikawa General Hospital, Tokyo dental College, 3) CREST, A new procedure for detecting DNA fragmentation in human spermatozoa using the Tunel method. 7th International Congress of Andrology, Montreal, Canada, 2001. 6. 19
25. Kaneko S.^{1,3)}, Ishikawa, H.¹⁾, Miyaji, K.¹⁾, Iwamoto, T.^{2,3)}, Tanabe K.¹⁾, 1) Dept. of Obstetrics and Gynecology and Urology, Ichikawa General Hospital, Tokyo dental College, 2) Dept. of Urology, St. Marianna University School of Medicine, 3) CREST, Preparation of morphometric standard of human sperm. VII International Congress of Andrology, Montreal, Canada, 2001. 6. 19

(3)特許出願（国内 1件、海外 0件）

① 国内

名称 : マルチプレックス PCR 用プライマーパネル、それを用いるマルチプレックス PCR 法、及び遺伝子解析方法

出願日 : 平成 15 年 7 月 31 日

出願番号 : 特願 2003—330646

発明者 : 中堀 豊、新家 利一、梅野 真由美、馬場 嘉信、許 峰、中村 伸、
荒井 昭博

(4)新聞報道等

① 新聞報道

- ・ 読売新聞（2004. 9. 25版夕刊18面）

「縄文系は秋 弥生系は春に濃い？—日本人の精子 2 タイプ—」中堀豊、岩本晃明

②受賞

- ・ 第 20 回日本アンドロロジー学会賞

佐藤陽子、野澤資亜利、馬場克幸、宮野佐哲、西田智保、松下知彦、岩本晃明（2001）
spermatogenesis と細管基底膜の肥厚について

- ・ 第 22 回日本アンドロロジー学会賞

佐藤陽子、吉田薫、野澤資亜利、荒井路子、中堀豊、新家利一、岩本晃明（2003）Y 染色体に存在する熱ショック転写因子 HSFY のヒト精巣における局在と精子形成、精子成熟への役割

③その他

1. 佐藤陽子、馬場克幸、岩本晃明、II 生殖生理検査 11. 男性不妊検査—精巣組織検査、婦人科検査マニュアル—データの読み方から評価まで、医学書院、159-162, 2002 年 4 月
2. 岩本晃明、野澤資亜利：男性生殖機能の疫学調査における国際比較の問題点．精子数に影響を及ぼす交絡因子—禁欲期間について—（研究最前線）Endocrine Disrupter News Letter 6 (3), 4, 2003
3. 野澤資亜利、馬場克幸、岩本晃明：精巣機能の国際比較—地域差の検討— 産婦人科の実際 52, 2257-2265, 2003
4. 石島純夫、石島早苗：「よい精子の条件」プレアデス出版 2004 年 4 月
5. 中堀豊、新家利一：男も女も元は一緒 —性分化の仕組みとその障害—、小児疾患のとらえかた pp.295-307、文光堂、平成 15 年
6. 中堀豊：Y 染色体研究の新しい展開、科学（岩波書店）73：1081-1085, 平成 15 年
7. 新家利一、中堀豊：性の分化と性染色体、日本臨床 62：247-254、2004 年
8. 新家利一、中堀豊：性分化・発達の異常、Annual review 内分泌、代謝、283-287、2004 年

7. 結び

内分泌かく乱物質のヒト男性生殖機能への影響についてヒト試料およびヒト細胞を用いて5年間の研究を行い、以上のような成果を上げることが出来た。中間評価では内分泌かく乱物質との関連が何もなされていないのではないかとの批判も受けたこともあった。岩本班の基本方針として臨床材料から正常に近い精巣と造精機能障害を有する精巣とで何が、何処でどの様に異なるのかをまず明らかにしようと形態学的、生化学的、分子生物学的手法を用いて探ることとした。まだ解明がなされていない74日を要する精子形成過程について佐藤らの新たな知見が見出された。そして従来造精機能に影響すると言われている運動精子、精子形態について妊よう能を有する精子についての初めての詳細な検証が出来た。また精子の質の問題で顕微授精に際しての DNA 損傷精子の排除に関する新たな知見も得られた。Y 染色体多型の遺伝疫学調査の検討からは世界に先駆けて Y 染色体の遺伝的多様性と精子数の関連解析が出来て環境因子、遺伝的因子の基礎的データとなった。ヒト細胞を用いて内分泌かく乱物質の新たな評価法として DNA 傷害と修復系の検知プロトコールは、低濃度の内分泌かく乱物質がヒトゲノム修復機構に与える影響を調べる上で、全く新しい指標となりえるものと思われた。また研究期間終了間近で大豆由来食品など植物エストロゲン摂取によって発現の変動するヒト白血球中遺伝子として *cofilin-2* と *testican-3* をコードする遺伝子の2つ遺伝子が見出され、内分泌かく乱物質の影響評価の指標となり得るのか更なる研究を続けたい。しかしながら内分泌かく乱物質の曝露評価を検討するするには、少量の生体試料で測定し得る物質は限られており、具体例としては最近になってようやく 10ml 程度の生体試料でダイオキシン(PCDD+PCDF 分画)濃度が測定可能になったというのが現状である。本研究でも、疫学調査で得られた若年男性の血液の一部を用いたダイオキシン濃度の測定や、妊婦配偶者および若年男性の血清を用いてのイソフラボン濃度の測定に着手し、日本人男性におけるこれらの物質の曝露状況を調査し始めているが、これまでの研究成果と対応させて内分泌かく乱物質のヒトへの影響について検討するのはこれからの課題となろう。生体試料を利用し種々の内分泌かく乱物質の測定が可能になれば、我々が凍結保存している約 3000 名分のヒト試料を用いて、本チームの研究成果で得られた評価法と併せて臨床データとの比較検討から内分泌かく乱物質の男性生殖機能への影響が明らかにされて来るものと期待している。研究期間終了後も、我々が保存しているヒト生体試料が有効に利用されることを願う次第である。内分泌かく乱物質とヒト生殖機能との関連については多くの未解決な問題が残されており、臨床医の立場から長期的な視野に立ってモニタリングシステムを構築し、疫学調査や不妊症症例からの生体試料を保存し、さまざまな観点から解析することが最善の策ではないかと考える。CREST 岩本チームの解散後も今までに得られた知見をもとに引き続き各研究者がそれぞれの残された課題を明ら

かにすべく努力をして参る所存である。

最後に、貴重なヒト試料をご提供下さった男性ボランティアならびに患者の皆様のご協力なくしてこの研究の遂行はありえなかったことを銘記し、ここに厚く御礼申し上げます

本研究は以下の研究グループによって行われた。

岩本グループ(岩本晃明:聖マリアンナ医科大学泌尿器科・研究代表者)

古市グループ(古市泰宏:ジーンケア研究所)

石島グループ(石島純夫:東京工業大学大学院生命理工学研究科)

兼子グループ(兼子 智:東京歯科大学市川総合病院産婦人科)

中堀グループ(中堀 豊:徳島大学大学院医学研究科)

