

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名 「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」

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者 岩本 晃明（聖マリアンナ医科大学 泌尿器科 教授）

主たる研究参加者

古市 泰弘（(株)ジーンケア研究所 所長）

中堀 豊（徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授）

石島 純夫（東京工業大学 大学院生命理工学研究科 助手）

兼子 智（東京歯科大学 市川総合病院 産婦人科 講師）

馬場 昭次（御茶ノ水女子大学 理学部 教授）

N. E. Skakkebaek（コペンハーゲン大学 教授（平成12年1月～））

奥野 誠（東京大学 大学院総合文化研究科 助教授（平成12年4月～））

片山 昌勅（明治薬科大学 薬学部 講師（～平成13年3月））

3. 研究内容及び成果：

内分泌かく乱物質が原因と考えられる雄性生殖機能障害は、世界各地の種々の野生生物で観察され、動物実験でもある程度確認されている。このことから、ヒト生殖機能への影響が危惧され、精子数減少、精液の質の劣化等の有無が大きな問題となっている。社会的に大きな関心を集めた精子数減少問題に関しては、その解析結果の正否、解析手法の適否が科学的論争的となった。男性生殖機能への影響を正確に評価する為には、ヒト試料を用いた解析が必須であるが、何をどう調べれば良いのか、その手段・手法が決定的に不足しているのが現状である。適切な評価系の未確立が、内分泌かく乱物質のヒトへの影響を解析・理解する上での、最大の問題点となっている。

これらの背景から、本研究では 妊孕能を有する健常者精子と造精機能障害を示す不妊症患者精子間の相異を、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、男性生殖機能評価用分子マーカーを開発する、男性生殖機能評価用装置・方法を開発する、男性生殖機能評価、造精機能評価を様々なレベル（精子、精子形成、Y染色体、遺伝子）で可能とするための基礎的検討を行う、男性生殖機能異常の原因を解明し、治療法の開発を目指す、事を目標とした。

本研究の成果概要は以下の通りである。

(1) ヒト精子形成機構、男性生殖機能評価に関する研究(岩本グループ)

1) ヒト精子形成機構に関する研究

精細管を構成する基底膜は、造精機能障害を示す精索静脈瘤や停留精巣患者では肥厚している。基底膜肥厚と造精機能障害に因果関係がある事、精細管基底膜肥厚は造精機能障害に先行する事、肥厚した基底膜ではPNA-lectin で認識される糖蛋白質の性質、含量が変化する事、を明らかにした。精子形成に必須のアンドロゲン合成には 5経路が利用されている。造精機能不良精巣では 4経路代謝物が生成される事、機能良好精巣とは異なる代謝物が作られている事、を明らかにした。ヒト特有の精子形成機構を解明する為には、in vitro 実験系が必要である。ヒト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、セルトリ細胞、精原細胞、一部の精母細胞を長期に維持出来る事、マウス停留精巣移植片では精子形成能を一部回復出来る事、を明らかにした。

2) 男性生殖機能の評価に関する研究(有賀チームとの共同研究)

DJ-1 はヒト精巣、精巣上体、射出精子で発現している事を明らかにした。男性不妊症患者精漿中 DJ-1 量は、妊婦配偶者に比べ有意に低く、精子濃度と弱い正の相関を示す事を明らかにした。現在精巣機能評価パラメーターとして利用されている Inhibin B に比べ遜色が無く、男性生殖機能評価パラメーターへの応用の可能性が示唆された。

3) 内分泌かく乱物質により発現が変動する遺伝子の解析

内分泌かく乱物質曝露、機能障害により、精巣の cofilin-2、testican-3 発現が低下する事を明らかにした。両遺伝子とも雄性生殖機能への関与が推定されており、発現低下と雄性生殖機能低下との関連性、内分泌かく乱物質評価用バイオマーカーへの応用の可能性が示唆された。MCF7細胞 / pS2 遺伝子発現を指標としたエストロゲン活性測定系で、植物エストロゲンは、1 μ M 以下ではアロマターゼ阻害作用を、1 μ M 以上ではエストロゲン作用を示し、U字型の用量反応曲線を示す事を明らかにした。植物エストロゲン摂取による乳癌発症リスク低下に、低用量でのアロマターゼ阻害作用が関与している可能性が示唆された。

(2) 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)

エストロゲンとその代謝産物カテコールエストロゲンはDNA損傷作用を示し、女性ホルモン受容体が関与している事が知られている。ビスフェノールA(BPA)もDNA損傷作用を示す事を明らかにした。ゲノム維持 ReqQ ヘリカーゼ群の一つであるブルームヘリカーゼ(BLM)への影響を解析し、濃度依存的に BLM プロモーターを活性化する事を明らかにした。ゲノム修復機能は、放射線、紫外線等の外的要因やストレス等による内在性酸素ラジカルに起因するDNA損傷に対して用意されたものであり、人工物質によるDNA障害に対しては無防備である可能性がある。また、加齢により減衰する事が知られている。DNA損傷を示すBPA濃度は生体内で検出される濃度(nMレベル)に比較して高く(μ Mレベル)、損傷は修復されるため、ゲノム不安定化の可能性は低いと考えられる。しかし、加齢等による、ゲノム維持機構低下時の影響の解析が必要である。

(3) Y染色体の遺伝的多様性と男性表現型に関する研究(中堀グループ)

日本人男性集団のY染色体多型と精子濃度間に相関が認められる事を明らかにした。日本人男性の精子数は、Y染色体ハプロタイプにより異なる事、其々のハプロタイプで精子数季節間変動が異なる事、を明らかにした。ヒトY染色体には3つの無精子症候補領域(AZF_a, b, c)が存在する。HSFファミリーの一員であるHSFYは、AZF_b領域に存在する事や分子生物学的特徴から、精子形成に関与する事が示唆されている。HSFYは精巣で特異的に発現し、無精子症患者では発現が顕著に低下する事、無精子症患者の一部ではHSFYを含むY染色体欠失が認められる事、を明らかにした。SRY遺伝子はY染色体上の精巣決定因子であり、セルトリ細胞核内に局在し、転写因子として機能する事が推測されている。標的遺伝子がSOX9、Claudin 11である事が示唆された。エストロゲンは、ミュー管抑制因子(MIS)転写活性を低濃度では増強するが高濃度では抑制する事、この作用はERを介しERを介さない事、を明らかにした。

(4) 精子の形態、運動性の解析及び自動ヒト精子運動解析装置の開発(石島グループ)

正常精子の研究は殆ど行われていない。その比率に相異はあるが、妊婦配偶者精子中にも男性不妊症患者精子に含まれるほぼ全ての形態異常が認められる事、正常精子は36%程度である事、を明らかにした。電子顕微鏡による精子内部形態観察から、光学顕微鏡では観察不能な異常が相当存在する事を明らかにした。この事は、光学顕微鏡観察主体の精液評価法の見直しが必要である事を示している。総精子数と運動精子数間に強い相関が認められる事を明らかにした。精子数が多ければ運動精子数も多い事を示しており、精子数計測に一定の意味がある事を示している。妊婦配偶者は比較的一定な精子運動率を示す事を明らかにした。精子運動率で妊孕能予測が可能である事が示唆された。

精子運動率は形態と共に妊孕能を予測する上で最も重要な性質の一つであるが、現在汎用されている

顕微鏡による目視法の測定結果は、測定者間、測定者内でのバラツキが大きく、信頼性に欠ける。精子運動を正確に効率的に測定するため、独自のコンピュータシステムを用いた、精子運動解析装置、SMAS(Sperm Motility Analysis System)を開発した。安価で高精度であり、必要に応じ目視法との対応も可能である。

(5) ヒト精子DNA損傷解析法及び損傷精子排除法の開発(兼子グループ)

射出精子の一部には DNA 損傷が存在し、その殆どが染色体の欠失である事が知られている。個々の精子の DNA 断片化の程度は多様であり、化学誘導アポトーシスとは必ずしも一致していない事を明らかにした。

WHO は「楕円形の頭部を有する物」を正常精子と定義しているが、機能との相関に付いては何ら言及していない。運動能、DNA 構造、頭部形態等を指標とした精子精製法を開発した。90% Percoll 沈降速度及び運動能を指標とした分画法は、正常形態精子選別に有効であり、同時に機能良好精子選別も可能である事を明らかにした。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

「環境汚染物質が本当に男性生殖機能に悪影響を及ぼしているのか？」と言う重大な問い掛けに対する解答を得る上で極めて重要な研究課題である。世界的にも殆ど実施されておらず、人類生態学的にも意義深い研究である事から、本課題へのチャレンジ自体が評価されるべきものかも知れない。しかし、インパクトの高い成果或いは何らかの明確な回答が得られたとは言い難く、未開拓の研究分野である事に伴う困難さ、ヒト試料を用いる困難さを考慮してもなお、残念な結果に終わってしまったと言わざるを得ない。

個別の成果としては、ヒト精子形態・運動解析用機器及び評価法の開発、Y染色体多型と精子数との関連性、等々の特筆に値するものも見受けられる。これらの成果が国際的に評価・採用され、大きな国際的疫学研究プロジェクトに発展し、当初の疑念への明確な回答が出される事を期待したい。

研究成果は論文(国際誌23報、国内誌1報)、学会(国際学会17件、国内33件)発表されている。研究成果を論文数等の単なる数量で評価すべきではないと思われるが、明確な結果が得られなかったため論文に成り難かった点を考慮してもなお、質・量共に不満足な結果と言わざるを得ない。JST以外からの出願ではあるが、遺伝子解析法に関する日本特許が1件出願されている。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

本研究チームに対する最大の期待は、Skakkebeckらの報告した精子数減少の正否、内分泌かく乱物質関与の有無、への回答の提示に有った。動物実験ではホルモン様物質投与により精子の質・量両面での劣化が観察されるため、Skakkebeck仮説を日本人集団で検証する事、国際共同研究の基で人種・生活環境に依る差異等を明らかにする事、が求められていた。残念ながら、未だ納得の行く結論は提示されていない。人種や食習慣の差異による変動等が問題にされ、精子数減少の有無及び内分泌かく乱物質関与の有無は余り明確では無いのが現状と思われるが、この問題に対する正確な現状報告を行う事が求められており、それに応える必要がある。基礎的研究が少なく方法論も未確立な状況での苦闘、国際的同一基準による世界的規模の疫学研究の一環として実施された事に伴う困難さを理解するとしても、中途半端に終わってしまった感を免れ得ない。この本来の研究目標達成に向けて、各研究グループが有機的に機能したとも、研究成果が効果的に反映されたとも思えず、残念である。

精子形成機構解明等々の基礎研究に関しても、個々の研究の位置付け、成果の新規性等が不明瞭であり、質の高い学術誌を通してその事を明らかにしていない事と相まって、正確な評価を困難にしている。また、有賀チームとの共同研究であるDJ-1の不妊症診断への応用の可能性も、期待していた程の相関性では無かったにしても、中途半端に終わっており、もう少しきめ細かい研究が必要であったと思われる。

一方、精子運動自動解析装置の開発、精子機能検査法の開発等々の重要な成果も挙げられているので、これらの成果を基に国際的疫学研究に取組み、当初の課題に明確な回答を出した上で、精子形成機構解明等の基礎研究に取組む事を期待したい。男性生殖機能評価系の確立は、化学物質の影響評価ばかりでなく、医薬品開発等にも応用可能であり、極めて重要と思われる。早期の確立を期待したい。また、約3千名に及ぶヒト試料も収集しており、貴重な研究資産として、各種の研究に有効利用されよう。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

佐藤陽子、岩本晃明両氏は、第20回日本アンドロロジー学会賞(2001年)及び第22回日本アンドロロジー学会賞(2003年)を受賞した。