

課題名 C-1008 エピゲノム変異に着目した環境由来化学物質の  
男性精子への影響に関する症例対照研究

課題代表者名 有馬 隆博（東北大学大学院医学系研究科）

研究実施期間 平成22～24年度

累計予算額 54,698千円（うち24年度16,673千円）  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキー  
ワード（5～10  
個以下程度） ヒト精子、乏精子症、環境化学物質、PCB、エピジェネティクス、  
DNAメチル化、ゲノムインプリンティング

#### 研究体制

- (1) 症例対照試験の実施・患者登録に関する研究（東北大学大学院 医学系研究科、セント・ルカ生殖医療研究所）
- (2) エピゲノム解析（精子）に関する研究（東北大学大学院 医学系研究科）
- (3) 環境化学物質の測定（末梢血および精漿）・網羅的TOF-MS解析に関する研究（東北大学大学院 医学系研究科、(株)いであ・環境創造研究所）
- (4) 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究（東北大学大学院 医学系研究科）

#### 研究協力機関

(株)G&Gサイエンス

#### 研究概要

##### 1. はじめに(研究背景等)

最近、我が国の晩婚化、少子化の社会情勢と、医療技術の進歩により、既婚者の15-20%が不妊治療を受けている。その40%は男性不妊（精子異常）で、漸増傾向にある。以前より、エストロゲン様作用を有する環境由来化学物質がヒトの性腺（生殖細胞）に影響を及ぼし、オスのメス化、精子数減少に影響を与え、種の存続に関わる事が社会的話題となったが、その関連性については、十分な科学的根拠がないため、未だ明らかにされていない。最近、この化学物質は、遺伝子のプロモーター等の後成的（エピジェネティックな）修飾による遺伝子発現に影響を及ぼすという仮説が検証されようとしている。エピジェネティクス（エピゲノム情報）とは、DNAの塩基配列の変化を伴わない、遺伝子発現制御に関わる後付けの修飾である。主たる現象として、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化やメチル化が知られている。このエピジェネティックな修飾は、生殖細胞形成過程では、『細胞の記憶』として遺伝子刷り込み機構（ゲノムインプリンティング）として知られている。このインプリンティングとは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象で、哺乳類の正常な発生、分化に必須な現象である。また、この機構の破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常、成人疾患にも影響を与える。

最近、生体試料中の化学物質の高感度分析法が進歩し、いくつかの化合物に関しては血液内組織濃度の測定が可能となった。少子化社会である我が国では、年間2万人ものART（生殖補助医療技術）出生児が誕生し、今後もART出生児が増加することが予想されるため、化学物質の生殖細胞、とりわけ男性精子の数・量の異常やエピジェネティックな修飾異常に起因するインプリント異常との関連は、次世代社会の最も重要な要件の一つとして、早急な対応が求められている。

##### 2. 研究開発目的

低用量の環境由来化学物質（以降、化学物質）の長期曝露は、ヒトの生態（生殖細胞）系および性腺に対して深刻な影響を及ぼす危険性をはらんでおり、ヒトへの影響を明らかにすることは環境保全上の重要課題であり、早急な対応が求められている。中でも環境残留性と人体への強い有害性

が問題となっている PCB や DDT には内分泌かく乱作用があり、性比や精子数の減少に影響を与えることが議論を呼んでいる。また、臭素化物系の難燃剤も曝露レベルの増加が懸念されている。このような化学物質のヒト健康影響を評価するためには、動物やヒト細胞などを用いた実験の知見に加えて、ヒトそのものを対象とする疫学研究による証拠が不可欠である。しかしながら、現状では父親への曝露や、ヒト精子への影響に関する疫学的研究は世界的にも極めて少ない。ダイオキシン類や PCB ではいくつかの報告も散見するが、多様な化学物質を対象とした網羅的な研究はなく、また低用量域における長期間曝露について一般集団を対象に検討した研究は報告されていない。

本研究では、成人男性末梢血内の化学物質濃度とヒト精子形成への影響について、形態と機能の両面から解析を行い、交絡要因を十分考慮しながら関連性を評価することを目的とした。具体的には、以下の 4 つのサブテーマに分けられる。

- (1) 症例対照試験の実施・患者登録に関する研究
- (2) エピゲノム解析（精子）に関する研究
- (3) 環境化学物質の測定（末梢血および精漿）・網羅的 TOF-MS 解析に関する研究
- (4) 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究

### 3. 研究開発の方法

#### (1) 症例・対照試験の実施・患者登録に関する研究

不妊症男性精子のうち顕微鏡による精液検査（精子数、運動率、奇形率）を行い、乏精子症患者精子（目標 100 例）をランダムに抽出する。この症例群に対して、年齢、居住地、生活習慣などをマッチさせた正常精子群（目標 200 例）を対照とした。

#### (2) エピゲノム解析（精子）に関する研究

新規開発のメチル化解析法を用い、インプリント遺伝子を標的としたエピゲノム（DNA メチル化）解析について、精子サンプルを用いて行い、異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子を明確にする。解析するインプリント遺伝子領域は 8 領域から 22 領域に拡大した。

#### (3) 環境化学物質の測定（末梢血および精漿）・網羅的 TOF-MS 解析に関する研究

症例・対照研究手法を用い、化学物質曝露との関連性を解析するため、症例と対照群の間で濃度差が見られる化学物質を明らかにした。さらに、差が明らかとなった化学物質は、多数の検体で再度個別に測定した。試料として、末梢血を用いた。化学物質としては脂溶性化学物質をターゲットとし、飛行時間型質量分析計（TOF-MS）に高分解能ガスクロマトグラフ（HRGC）あるいは包括的二次元ガスクロマトグラフ（Comprehensive GC:GCxGC）を組み合わせ網羅的な解析を行った。HRGC/TOF-MS あるいは GCxGC/TOF-MS は、多くの化合物の同時測定が可能であり、また、未知の化合物が検出されれば、測定後にその物質を同定可能である。

#### (4) 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究

化学物質濃度のヒト精子への影響についての評価は、多変量（共分散分析）解析を行い、算出した。その際、生活習慣などの交絡要因について補正を行い、より確実に検証した。

## 4. 結果及び考察

### (1) 症例対照試験の実施・患者登録に関する研究

対象：セント・ルカ産婦人科にて初診時、採血・精液検査をおこなった。

患者のうち同意を得られた患者

試料：血液（特定の採血管 2 本に採血）

精液（精液検査後、臨床には使用しない検体）

方法：以下の手順でおこなう。

- 1 採血（環境由来化学物質測定用 8ml×2 本、ホルモン測定用）  
測定したホルモンは LH、FSH、プロラクチン、テストステロン（表 1）
- 2 健康と日常生活に関するアンケート  
アンケート内容……年齢、身長、体重、生活環境（居住地）、職業、習慣、  
飲酒、喫煙、食事摂取頻度 など

成果：登録患者数……266 名

乏精子症患者……78 名（中等度：44 名、重症型：34 名）

正常精子の患者……188 名

平均年齢 全体……35.5（25-53）

乏精子症患者……36.2±5.5（27-52）（中等度：36.1±4.2、重症型：36.4±6.9）

正常精子の患者……35.2±5.6（25-53）

表 1 症例・対照群のホルモン検査の比較 (平均値)

	全体 (n= 266)	正常精子 (n= 188)	乏精子症患者 (n= 78)
LH (mIU/ml)	3.5	3.1	4.2
FSH (mIU/ml)	7.8	5.9	11
プロラクチン (ng/ml)	9.3	8.9	10.1
テストステロン (ng/dl)	475	451	460

### (2) エピゲノム解析(精子)に関する研究

1) 精子提供：精液検査を受けた患者の精子 266 例を登録した。症例群（乏精子症）は 78 例、対照群は 188 例であった。年齢、既往歴、生活歴、常用薬等の患者基本情報を登録した。精子は体細胞の混入がないように、swim-up 法にて精子細胞のみを回収し、DNA を抽出した。

2) 新たに得られた知見：

精子におけるメチル化解析：

DNA メチル化の解析は、22 領域のヒトインプリント遺伝子（H19、GTL2、ZDBF2、DIRAS3、NAP1L5、FAM50B、ZAC（PLAGL1）、GRB10、PEG10、PEG1（MEST）、INPP5F-v2、LIT1（KCNQ1OT1）、RB1、SNRPN、ZNF597、ZNF331、PEG3、PSIMCT-1、NNAT、L3MBTL、NESPAS、GNAS1A）の DMR について、DNA メチル化の解析をおこなった。197 検体中、50 検体（25.4%）でメチル化に異常が確認された。遺伝子別にみると、精子型メチル化の異常は 18%が卵子型メチル化遺伝子に異常を持っていた。症例別でみると重症乏精子症で 27 例中 20 例（74.1%）、中等度乏精子症 38 例中 8 例（21.1%）、正常精子 132 例中 22 例（16.7%）となった（図 1）。その中で、精子型、卵子型の両方に異常を持っているのは 50 例中 19 例（38.0%）であった。また、精子濃度との関係を調べてみたところ、重症乏精子症群で 66.7%、中等度乏精子症群で 11.1%、正常精子群で 22.2%が、3 種以上の遺伝子に異常を持つことが確認された。

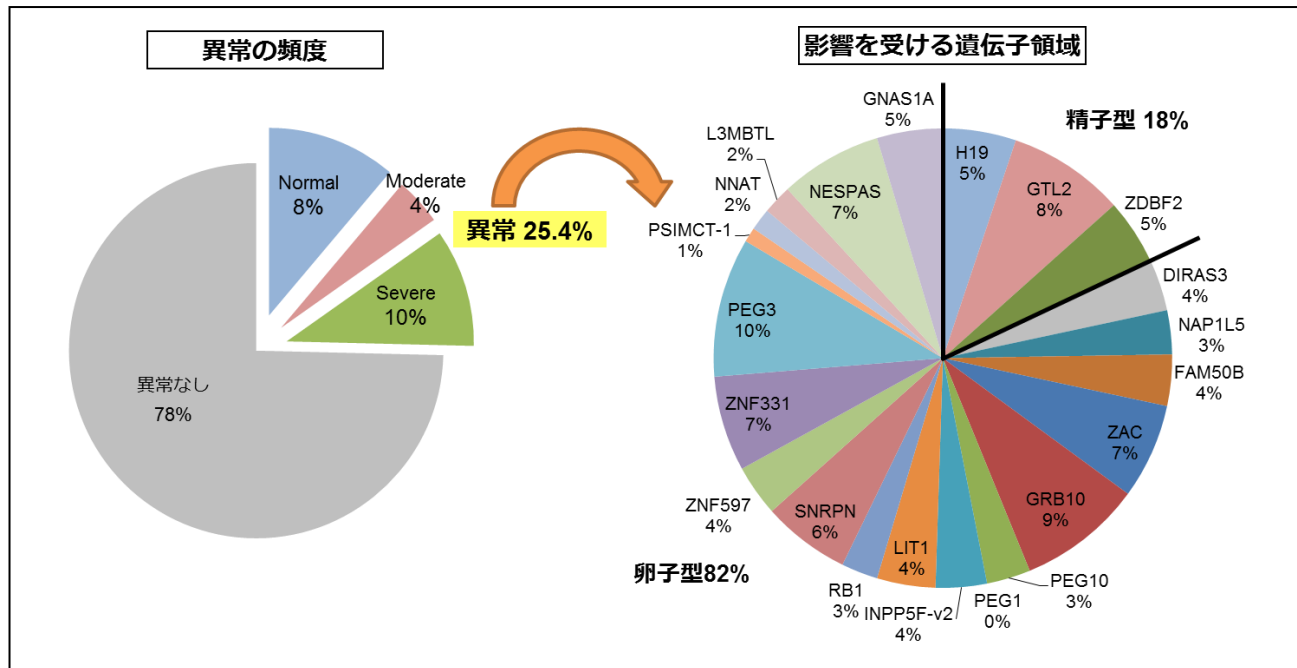


図1 不妊症男性精子におけるインプリント遺伝子のメチル化異常

メチル化異常と精子性状（精液所見）との関連性：

メチル化異常を示す精子と精液所見（濃度、運動率、奇形率）を比較検討した。図2に示すように、メチル化インプリント異常は精子濃度、運動率と負の相関を示し、奇形率とは正の相関を認め、メチル化異常の頻度は、精子所見と相関することが判明した。また、メチル化異常の程度についても重症型の乏精子症で最も高く、メチル化異常の頻度、程度伴に精液所見と相関することが示された。

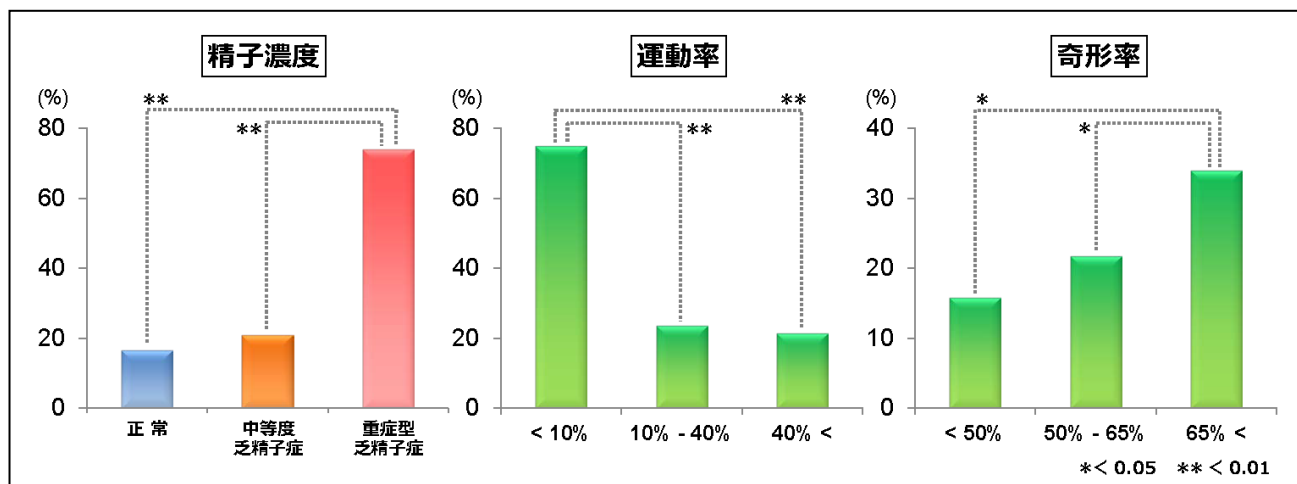


図2 インプリントメチル化の異常と精子所見との関係

メチル化異常の頻度は、精子濃度、奇形率、運動率の間で相関を認めた。

**(3) 環境化学物質の測定(末梢血および精漿)・網羅的TOF-MS解析に関する研究**

末梢血中の化学物質として、脂溶性化学物質をターゲットとし、飛行時間型質量分析計 (TOF-MS) に高分解能ガスクロマトグラフ (HRGC) あるいは包括的二次元ガスクロマトグラフ (Comprehensive GC:GCxGC) を組み合わせ網羅的な解析を行った。HRGC/TOF-MS あるいは GCxGC/TOF-MS は多くの化合物の同時測定が可能であり、また、未知の化合物が検出されれば、測定後にその物質を同定可能な場合も多い。症例と対照群の間で濃度差が見られる化学物質を明らかにした。その結果、多数の化学物質の同時検出に成功し、血液中で初めて検出された化合物も多かった。

現在確認された有機物を以下に示す。

3～10 塩素化ビフェニル、ヘキサクロロベンゼン、ヘキサクロロシクロヘキサン、DDE、DDD、DDT、ヘプタクロル、クロルデン、オキシクロルデン、ノナクロルトキサフェン (parlar26、32、50)、Mirex、TeBDE、PeBDE、HxBDE など (図 3)、2 群間で有意な差を認めた PCB (分画) についてさらに分析を進めた (図 4)。

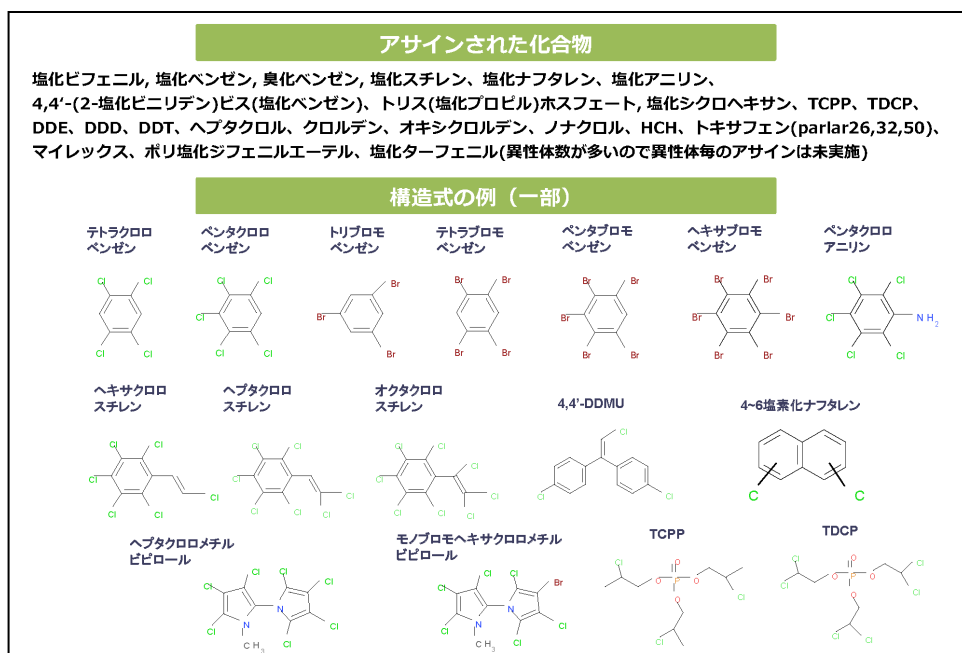


図3 GCxGC-TOFMSにより同定された化学物質の一部

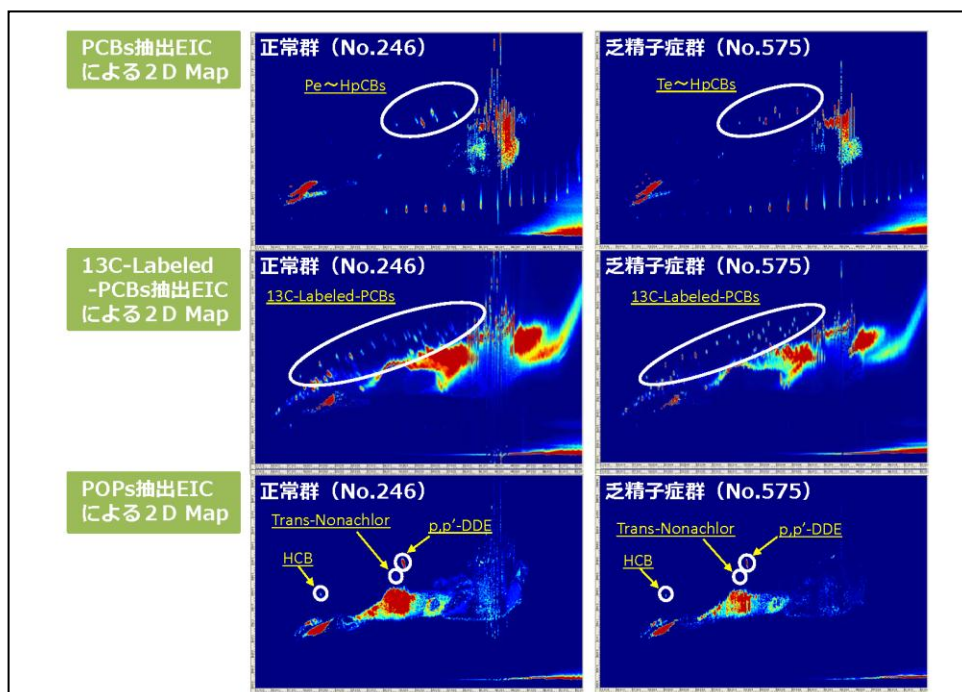


図4 GCxGC-TOFMSによる正常群血液と乏精子症群血液の比較

#### (4) 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究

GC-TOFMS による解析より、PCB に着目した。PCB の測定値は正規分布をしないことも知られていることから、統計学的な解析ではノンパラメトリックの手法を用いるか、または PCB 濃度から 3 群に分割し解析を行った。なお、表 2 で「PCB 検出率」とはいずれかの PCB 異性体で検

出下限値よりも大きなデータが得られた場合の割合を示した。乏精子群では 53 件中 52 件で検出されたのに比較して、精子正常群では 37 件中 26 件であり、統計学的にも有意な差が認められた ( $p=0.0001$ )、また、仮に検出下限値以下に下限値の半値を代入して計算しても同様に乏精子群で高い値が観察された (表 2)。

表2 血中PCBとその他の属性との関連性

	精子正常群	乏精子群	
人数	37	53	p
年齢 (year)	36.1±5.5	37.1±5.6	0.42
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.8±3.7	24.1±3.1	0.37
喫煙習慣あり*	18.8%	40.9%	0.048
教育歴 (大学卒業以上)	46.0%	41.5%	0.68
精子数 (単位)	111.7±77.3	25.4±22.5	< 0.0001
運動率 (%)	57.1±13.9	36.1±18.4	< 0.0001
精子数×運動率 (単位)	62.5±43.9	7.9±6.0	< 0.0001
奇形率	54.5±9.2	64.5±10.8	< 0.0001
インプリント異常数	1.8±3.2	3.4±5.0	0.090
PCB (ng/g-fat)	35.5±46.5	72.7±43.2	0.0002
PCB検出率	70.3%	98.1%	0.0001

平均±SD。n=90、喫煙データについてはn=76。

PCB分析で、検出下限値 (=0.1) 以下はその半値 (=0.05) を代入して計算した。

PCB検出率は、検出下限値以上となるデータが得られた検体数の割合を示した。

統計解析はt-testまたは $\chi^2$ 検定による。

以上の解析から血中 PCB と乏精子症との間に関連性が認められたことから、PCB 異性体と精子数 × 運動率との関連性を検討した (表 3)。精子数 × 運動率との間に高い関連性が示されたのは PCB#118、#182+187、#180、#170 であったものの、PCB#74 を除きその他の異性体でも有意な関連性が示された。PCB 異性体同士の間でも高い関連性があり (データ示さず)、今回の解析結果から原因となる異性体を推定することは困難と考えられた。

表3 PCB異性体と精子数×運動率との関連性 (Spearmanの順位相関係数) (n=90)

	相関係数	p
PCB#74	-0.120	0.26
PCB#66,80	-0.251	0.017
PCB#99	-0.397	0.0001
PCB#118	-0.461	< 0.0001
PCB#153	-0.392	0.0001
PCB#163,164	-0.284	0.007
PCB#138	-0.287	0.006
PCB#182,187	-0.524	< 0.0001
PCB#180	-0.420	< 0.0001
PCB#170	-0.486	< 0.0001
Total	-0.426	< 0.0001

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

本研究の結果から、血中 PCB 濃度が増加すると精子数 × 運動率などの指標が減少し、乏精子症の発生が増えることが示唆された。年齢、喫煙習慣などを調整しても関連性は一貫したものであり、男性不妊において PCB ばく露の重要性が示唆された（図 5）。

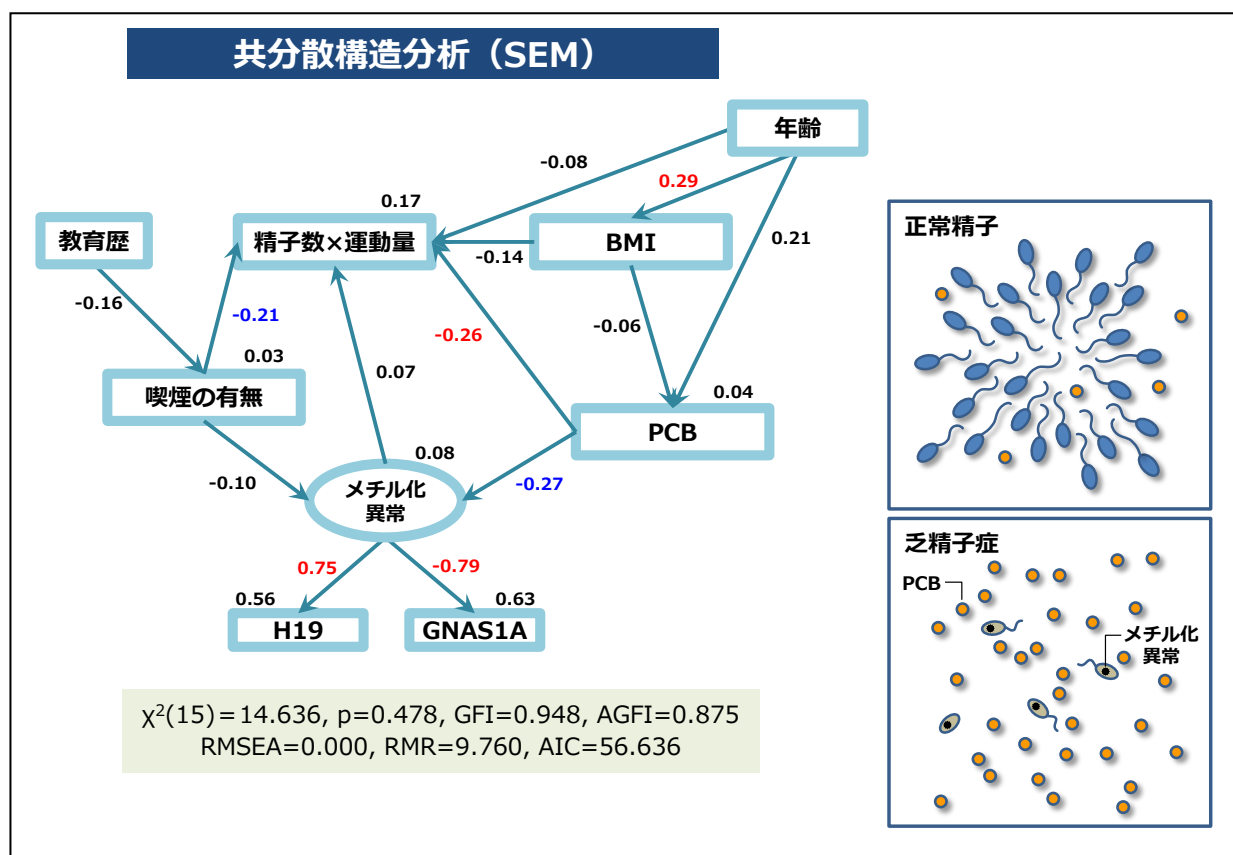


図5 共分散構造分析 (SEM)

本資料は、曝露回避に必要な行政的な基礎資料として、国民に提示することができ、また、少子化対策、不妊症治療の技術向上と医療行政に貢献できると考えられる。

### (2) 環境政策への貢献

過去に環境中に放出された化学物質は、長期間に渡り環境中に残留し、生物濃縮を経てヒトに取り込まれる。従って、化学物質のヒト生殖細胞への影響は、少子化問題を抱える我が国においては、重要な課題である。PCB が、精子の数、質に影響を及ぼすことが明らかになり、回避する方法を考案し、リスクコミュニケーションとして、市民に伝える事が、求められている。特に強調したい点は、リスクの存在だけでなく、どのようにすればリスクを回避できるのか、そしてその効果はどのくらいあるのかを、実証的なデータを併せて提示することにあると考える。本研究結果は、そのリスクコミュニケーションに必須の実証的なデータを、食を含めた生活習慣の安全性と有効性を含め、準備した。

#### <行政が既に活用した成果>

現在のところ行政が活用した成果はない。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

我が国における化学物質暴露、特にPCB類のヒト男性精子への直接作用について、科学的根拠を基に世界で初めて明らかにした。今後本研究は、化学物質について暴露回避に重要な行政資料となると考えられる。また不妊症に関するリスクとして、そのリスク情報を公開することに有用である。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) Hiura H, Okae H, Kobayashi H, Miyauchi N, Sato F, Sato A, Suzuki F, Nagase S, Sugawara J, Nakai K, Yaegashi N. and Arima T: BMC Medical Genomics, 5, 8-17 (2012)  
"High-throughput detection of aberrant imprint methylation in the ovarian cancer by the bisulphite PCR-Luminex method"

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可)

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 有馬隆博：第9回統合産婦人科研究合同セミナー（2011）  
「エコチルについて」
- 2) 有馬隆博：第6回日本生殖再生医学会（2011）  
「ARTにおけるエピジェネティック機構」
- 3) 有馬隆博：第28回日本医学会総会（2011）  
「生殖補助医療とインプリンティング異常」
- 4) 有馬隆博：第96回東北医学会総会（2011）  
「ゲノムインプリンティングとヒト疾患」
- 5) 有馬隆博、岡江寛明：第4回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク会（2011）  
「胎盤特異的インプリント遺伝子の役割」
- 6) 卵巣に関する国際カンファレンス 2012 "The International Ovarian Cancer 2012" 「ART and Epigenetic Errors - Abnormal DNA methylation in imprinting disorders after ART」 有馬隆博 2012.3.17 東京
- 7) 日本生殖再生医学会・第7回学術集会 「ARTにおけるエピジェネティック機構」 有馬隆博 2012.3.25 東京
- 8) Planet xMAP Japan 2012 「男性不妊症精子のインプリント遺伝子を標的としたDNAメチル化解析」 有馬隆博 2012.5.16 東京
- 9) 2012 セント・ルカセミナー「胎盤形成とゲノムインプリンティング」 有馬隆博 2012.6.3 大分
- 10) 第11回学術集会日本不妊カウンセリング学会 「生殖医療とエピジェネティクス」 有馬隆博 2012.6.8 東京
- 11) 第5回生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク「Non-random loss of imprinting in cloned mice」 有馬隆博 2012.11.20-21 京都
- 12) 第22回環境化学討論会「GCxGC-TOF/MSを用いたヒト血液中の有機化学物質測定」 有馬隆博 2013.7.31-8.2 東京

## 7. 研究者略歴

課題代表者：有馬 隆博

九州大学医学系研究科産婦人科学専攻修了、医学博士、  
現在、東北大学大学院医学系研究科教授

研究参画者

(1): 八重樫 伸生

東北大学医学部卒業、医学博士、現在、東北大学大学院医学系研究科教授

(2): 有馬 隆博 (同上)

(3): 松村 徹

東海大学海洋学研究科海洋科学専攻修了、理学博士、  
現在、(株)いであ・環境創造研究所副所長

(4): 仲井 邦彦

北海道大学環境科学研究科社会環境学専攻修了、学術博士、  
現在、東北大学大学院医学系研究科教授



## C-1008 エピゲノム変異に着目した環境由来化学物質の男性精子への影響に関する症例対照研究

### (1) 症例対照試験の実施・患者登録に関する研究

東北大学大学院 医学系研究科 有馬隆博・八重樫伸生

研究協力者

セント・ルカ生殖医療研究所 宇津宮隆史・佐藤晶子

平成 22～24 年度累計予算額：2,451 千円

(うち、平成 24 年度予算額：807 千円)

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

ヒト精子濃度や運動率およびエピゲノムに影響を及ぼす環境由来化学物質を同定し、科学的成果を得ることを本研究の目的としている。本サブテーマでは、症例・対照の患者精子および血液のサンプルの収集と患者基本情報、質問票による調査研究を行った。研究を実施する前に東北大学医学部および研究協力機関で倫理委員会に本研究内容に関する資料を提出し、承認を得て研究を開始した。

産婦人科外来を受診された男性患者のうち、採血および精液検査を実施した患者に、本研究内容について説明し、同意を得られた方を対象とした（内分泌異常を示す 2 例は除外した）。精液検査において精子数が少ない（ $<20 \times 10^6$  未満/ml）乏精子症群の患者を症例群として、78 名（重症型 34 例）登録、対照（正常精子）は 188 例、総計 266 例を 3 年間（H22.4～H25.3）で登録した。平均年齢はそれぞれ  $36.2 \pm 5.5$  (27-52)、 $35.2 \pm 5.6$  (25-53) で、2 群間に有意差は認められなかった。さらに年齢、身長、体重の基本属性と、生活環境（居住地）、職業、習慣、飲酒、喫煙、食事摂取頻度など 30 項目のアンケート調査を行い、精子減少との関連性について評価した。その結果、喫煙率が高い場合と職業で染料を扱う場合に乏精子症の頻度が高いことが示された。また、炭酸飲料摂取頻度が高いと精子濃度が低い傾向がみられた。

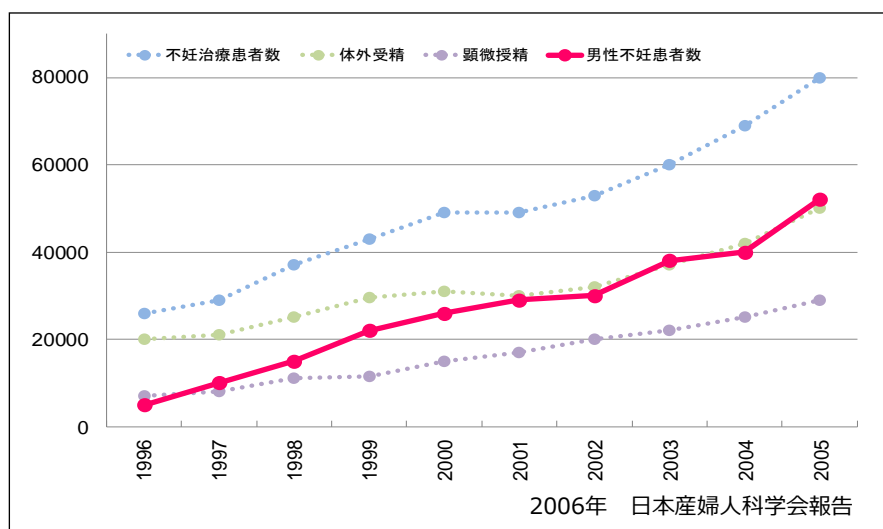
#### [キーワード]

ヒト精子、乏精子症、症例・対照研究、生活環境調査

### 1. はじめに

最近、我が国の晩婚化、少子化の社会情勢と、医療技術の進歩により、既婚者の 15-20%が不妊治療を受けている。その 40%は男性不妊(精子異常)で、漸増傾向にある(図(1)-1, 表(1)-1)。以前より、エストロゲン様作用を有する環境由来化学物質がヒトの性腺(生殖細胞)に影響を及ぼし、オスのメス化、精子数減少に影響を与え、種の存続に関わるものが社会的話題となっ

たが、その関連性については、十分な科学的根拠がないため、未だ明らかにされていない（表(1)-2）。最近、この化学物質は、遺伝子のプロモーター等の後成的（エピジェネティックな）修飾による遺伝子発現に影響を及ぼすという仮説が検証されようとしている<sup>1)</sup>。エピジェネティクス（エピゲノム情報）とは、DNAの塩基配列の変化を伴わない、遺伝子発現制御に関わる後付けの修飾である。主たる現象として、DNAのメチル化、ヒストンのアセチル化やメチル化が知られている。このエピジェネティックな修飾は、生殖細胞形成過程では、『細胞の記憶』として遺伝子刷り込み機構（ゲノムインプリンティング）として知られている<sup>2)</sup>。このインプリンティングとは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象で、哺乳類の正常な発生、分化に必須な現象である<sup>3)</sup>。また、この機構の破綻は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動、性格異常、成人疾患にも影響を与える。



図(1)-1 不妊症治療患者数の年次推移

表(1)-1 不妊症の原因

1	男性因子	40－50%
2	内分泌因子（排卵因子）	20－25%
3	卵管因子	30－40%
4	子宮因子	15－20%
5	頸管因子	10－15%
6	子宮内膜症	
7	免疫学的因	
8	原因不明	

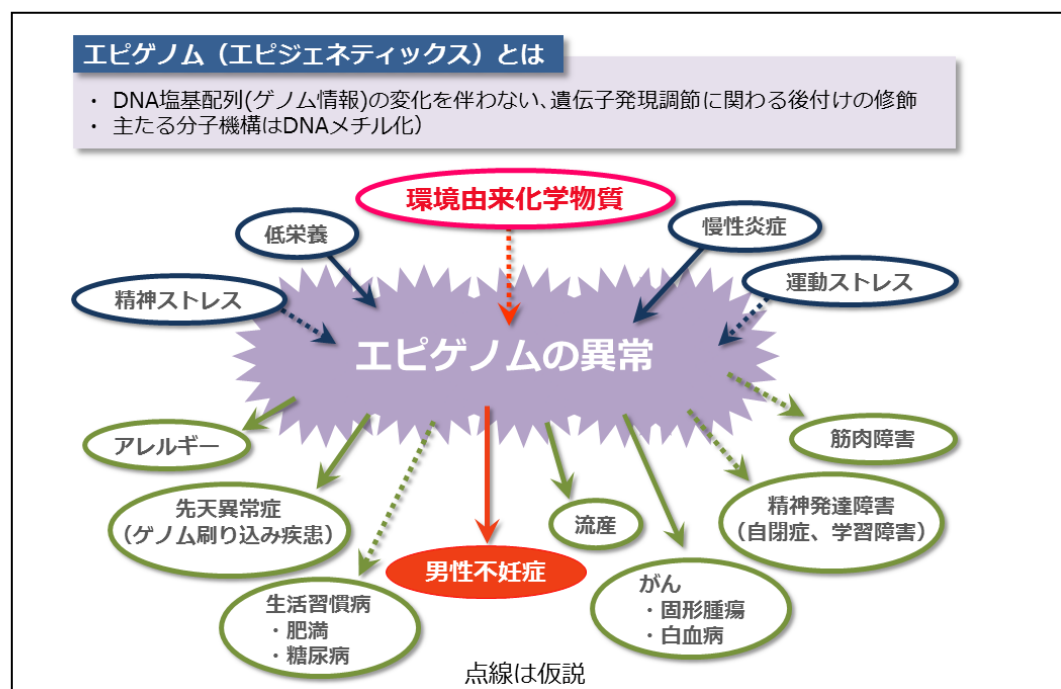
表(1)-2 環境由来化学物質の生息細胞への影響に関する報告例

化学物質	用途	生殖細胞への影響	生物種
トリブチルスズ トリフェニルスズ	塗料	雌の雄化	巻貝類
ノニルフェノール	界面活性剤の分解物	雌雄同体	コイ
DDT デコホル	農薬	生殖器矮小化 精巣機能不全	ワニ
ダイオキシン DES	農薬 流産防止剤	精子数の減少 精巣機能低下	ヒト

( (社)日本化学工業協会、(社)日本化学物質安全・情報センター)

最近、生体試料中の化学物質の高感度分析法が進歩し、いくつかの化合物に関しては精漿内組織濃度の測定が可能となった。少子化社会である我が国では、年間2万人ものART（生殖補助医療技術）出生児が誕生し、今後もART出生児が増加することが予想されるため、化学物質の生殖細胞、とりわけ精子数・量の異常やエピジェネティックな修飾異常に起因するインプリント異常との関連は、次世代社会の最も重要な用件の一つとして、早急な対応が求められている。本研究では環境由来化学物質がヒト精子のエピゲノム異常に関与し、男性不妊症に影響するのではないかという仮説のもとに研究を実施する（図(1)-2）。

本サブテーマでは、症例・対照の患者精子および血液のサンプルの収集することを目的としている。同時に質問票による調査も行った。参考資料(1)-1に質問票と結果を示す。

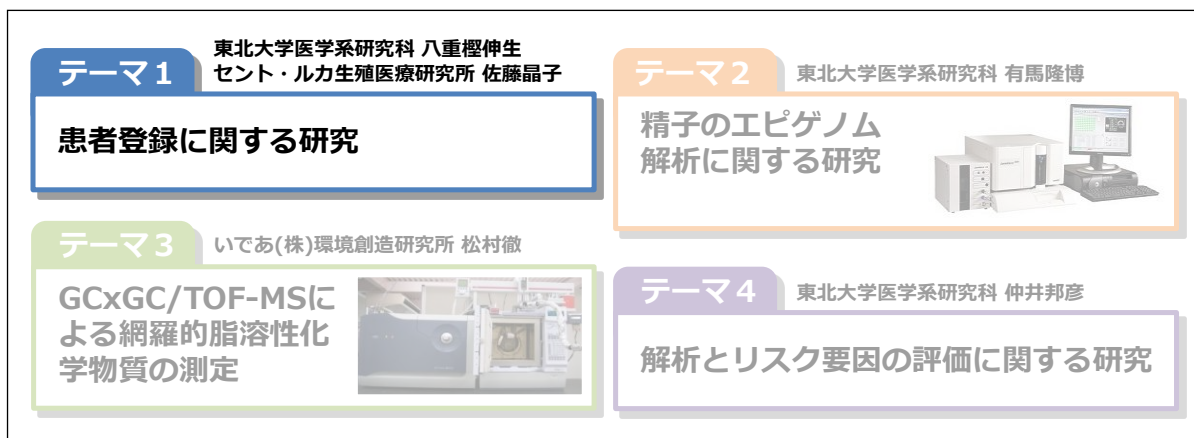


図(1)-2 研究仮説

## 2. 研究開発目的

低用量の環境由来化学物質（以降、化学物質）の長期曝露は、ヒトの生態（生殖細胞）系および性腺に対して深刻な影響を及ぼす危険性をはらんでおり、ヒトへの影響を明らかにすることは環境保全上の重要課題であり、早急な対応が求められている。中でも環境残留性と人体への強い有害性が問題となっている PCB や DDT には内分泌かく乱作用があり、性比や精子数の減少に影響を与えることが議論を呼んでいる。また、臭素化物系の難燃剤も曝露レベルの増加が懸念されている。このような化学物質のヒト健康影響を評価するためには、動物やヒト細胞などを用いた実験の知見に加えて、ヒトそのものを対象とする疫学研究による証拠が不可欠である。しかしながら、現状では父親への曝露や、ヒト精子への影響に関する疫学的研究は世界的にも極めて少ない。ダイオキシン類や PCB ではいくつかの報告も散見するが、多様な化学物質を対象とした網羅的な研究はなく、また低用量域における長期間曝露について一般集団を対象に検討した研究は報告されていない。

本研究では、成人男性末梢血内の化学物質濃度とヒト精子形成への影響について、形態と機能の両面から解析を行い、交絡要因を十分考慮しながら関連性を評価することを目的とした。サブテーマ1では、症例・対照試験の実施、患者登録をすることを目的とした。同意に、生活習慣などのアンケート調査を行った。研究体制を図(1)-3に示す。



図(1)-3 研究体制

## 3. 研究開発方法

不妊症男性精子のうち顕微鏡による精液検査（精子数、運動率、奇形率）を行い、乏精子症患者精子（目標 100 例）をランダムに抽出する。この症例群に対して、年齢、居住地、生活習慣などをマッチさせた正常精子群（目標 200 例）を対照とした。同時に以下の項目についても検討した。精液所見による分類を表(1)-3に示す。

対象：産婦人科外来受診時、採血・精液検査を行った患者のうち、本研究の説明を行い、同意を得られた患者。患者基本情報はカルテより転記。

ただし、内分泌疾患などは除外した。

試料：血液（特定の採血管 2 本に採血）

精液（精液検査後、臨床には使用しない検体）

方法：以下の手順で行う。

- 1) 採血（環境由来化学物質測定用 8ml×2 本、ホルモン測定用）  
測定したホルモンは LH、FSH、プロラクチン、テストステロン
- 2) 健康と日常生活に関するアンケート  
アンケート内容…年齢、身長、体重、生活環境（居住地）、職業、習慣、  
飲酒、喫煙、食事摂取頻度 など

表(1)-3 精液所見による分類

(1)	正常精液	基準値を満たすもの
	乏精子症	精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 未満
	精子無力症	運動率 50% 未満
	奇形精子症	形態正常精子 15% 未満
(2)	乏精子症	
	中等度乏精子症	精子濃度 $5 - 20 \times 10^6/\text{ml}$
	重症型乏精子症	精子濃度 $5 \times 10^6/\text{ml}$ 未満

#### 4. 結果及び考察

東北大学ではセント・ルカ産婦人科から回収した試料を匿名化し、記号にて保管管理を行った。個人情報の保護に関して厳密に行った。

##### (1) 患者基本情報の比較

対象：セント・ルカ産婦人科にて初診時、採血・精液検査をおこなった。

患者のうち同意を得られた患者

試料：血液（特定の採血管 2 本に採血）

精液（精液検査後、臨床には使用しない検体）

方法：以下の手順でおこなう。

- 1 採血（環境由来化学物質測定用 8ml×2 本、ホルモン測定用）  
測定したホルモンは LH、FSH、プロラクチン、テストステロン（表(1)-4）
- 2 健康と日常生活に関するアンケート  
アンケート内容 年齢、身長、体重、生活環境（居住地）、職業、習慣、飲酒、喫煙、食  
事摂取頻度 など

成果：登録患者数 266 名

乏精子症患者 78 名（中等度：44 名、重症型：34 名）

正常精子の患者 188 名

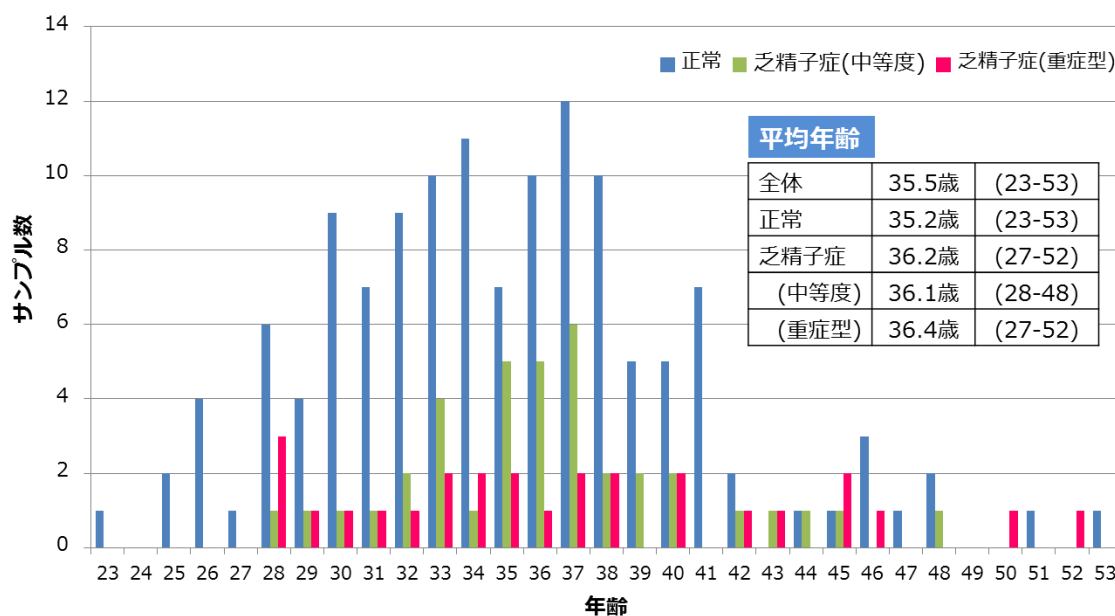
平均年齢 全体 35.5 (25-53)  
 乏精子症患者 36.2±5.5 (27-52) (中等度：36.1±4.2、重症型：36.4±6.9)  
 正常精子症患者 35.2±5.6 (25-53)

年齢および BMI (ボディマス指数) に関しては、2 群 (3 群) 間で統計学的に有意な違いは認められなかった (図(1)-4、図(1)-5、図(1)-6)。しかし、加齢とともに乏精子症の頻度が高くなる傾向を示した。症例・対照群のホルモン検査の比較を表(1)-4 に示す。

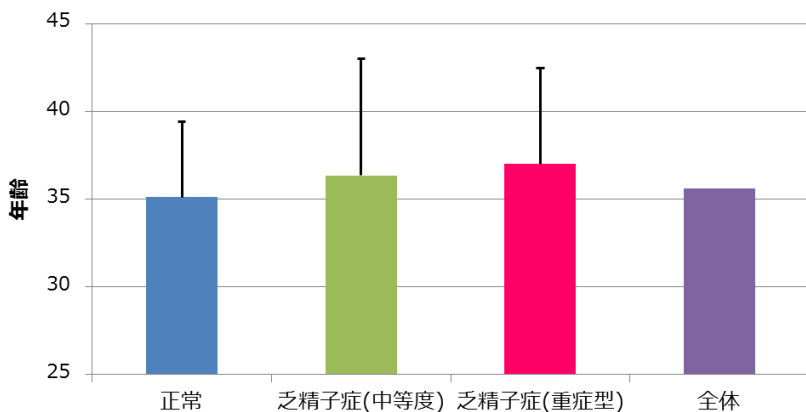
表(1)-4 症例・対照群のホルモン検査の比較

	全体 (n= 266)	正常精子 (n= 188)	乏精子症患者 (n= 78)
LH (mIU/ml)	3.5	3.1	4.2
FSH (mIU/ml)	7.8	5.9	11
プロラクチン (ng/ml)	9.3	8.9	10.1
テストステロン (ng/dl)	460	451	475

(平均値)

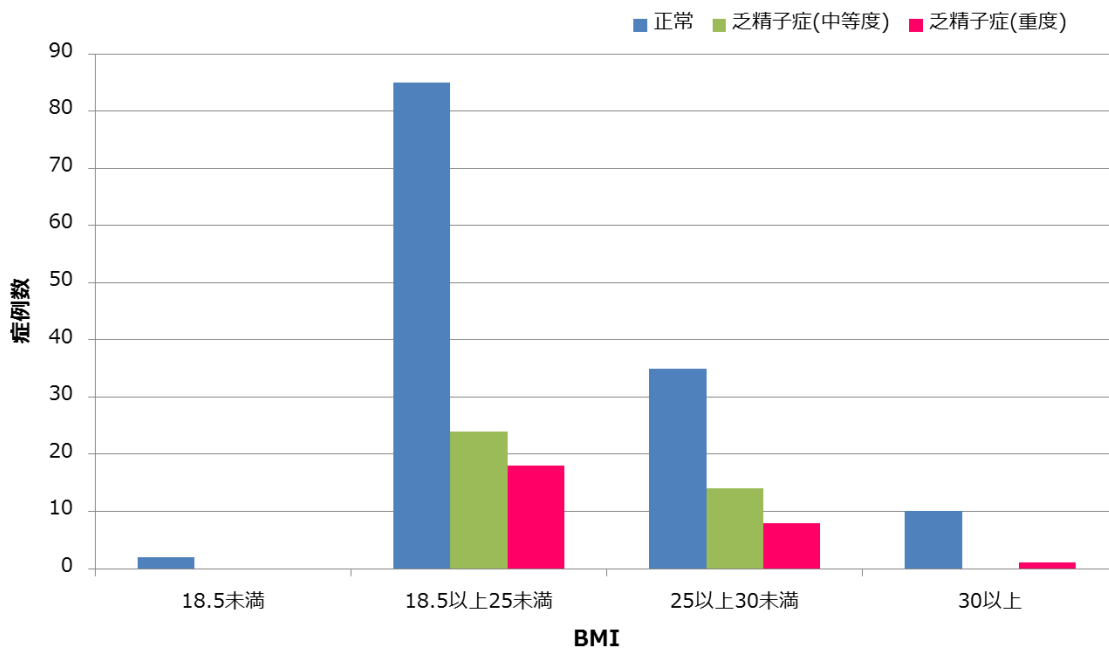


図(1)-4 年齢の分布



年齢	正常 n=132	乏精子症 (中等度) n=38	乏精子症 (重度) n=27	全体
平均	35.2	36.1	36.1	35.5
標準偏差	5.6	4.2	6.9	5.2

図(1)-5 年齢と精子所見の関連



図(1)-6 BMI の分布

## (2) 生活習慣からみた乏精子症

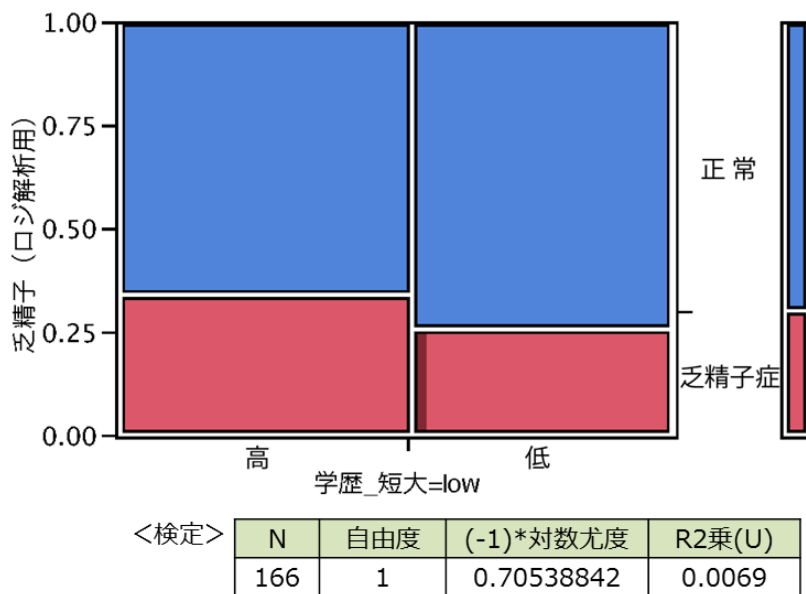
表(1)-5 生活習慣と乏精子症に関する疫学調査

項 目		正 常 n=188	乏精子症 (中等度) n=44	乏精子症 (重度) n=34
平均年齢 (標準偏差)		35.2 (5.6)	36.1 (4.2)	36.4 (6.9)
身長 (cm)	<= 165	16.3	22.7	14.7
	165 - 175	60.9	47.7	52.9
	>= 175	16.3	22.7	14.7
体重 (kg)	<= 65	37.8	34.1	29.4
	65 - 75	26.5	34.1	44.1
	>= 75	35.7	31.8	26.5
BMI	< 25	64.7	61.4	70.6
	>= 25	35.3	38.6	29.4
最終学歴	大学、大学院	43.2	60.0	51.9
	高校、その他	56.8	40.0	48.1
年収(万円)	< 420	57.8	45.7	56.0
	>= 420	42.2	54.3	44.0
平均睡眠(時間)	< 7	37.8	38.9	55.6
	>= 7	62.2	61.1	44.4
運動	する	50.0	57.1	40.7
	しない	50.0	42.9	59.3
タバコ	吸う	25.5	27.8	42.9
	吸わない	40.1	44.4	35.7
	やめた	34.4	27.8	21.4

生活習慣に関するアンケートの結果と精子所見との関連を表(1)-5に示す。

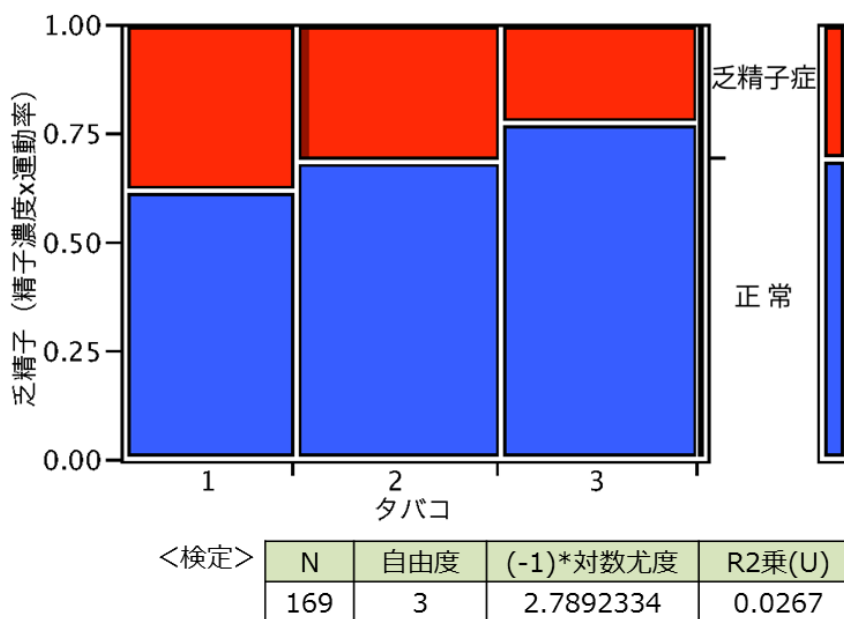


学歴では、高いほど乏精子症の頻度が高い傾向にあるが、受診する患者の傾向を反映しているのかもしれない。つまり、高学歴の人ほど受診するのかもしれない。あるいは、社会のストレスが多い場合に精子減少と関連するのかもしれない（表(1)-5、図(1)-7）。



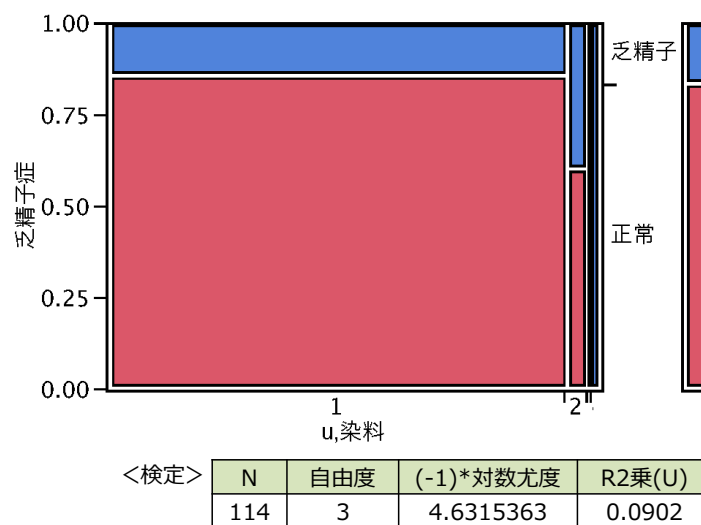
図(1)-7 学歴\_短大=low と乏精子（ロジ解析用）の分割表に対する分析

喫煙の有無に関しては、精子濃度との関連が示された（図(1)-8）



図(1)-8 タバコと乏精子（精子濃度 x 運動率）の分割表に対する分析

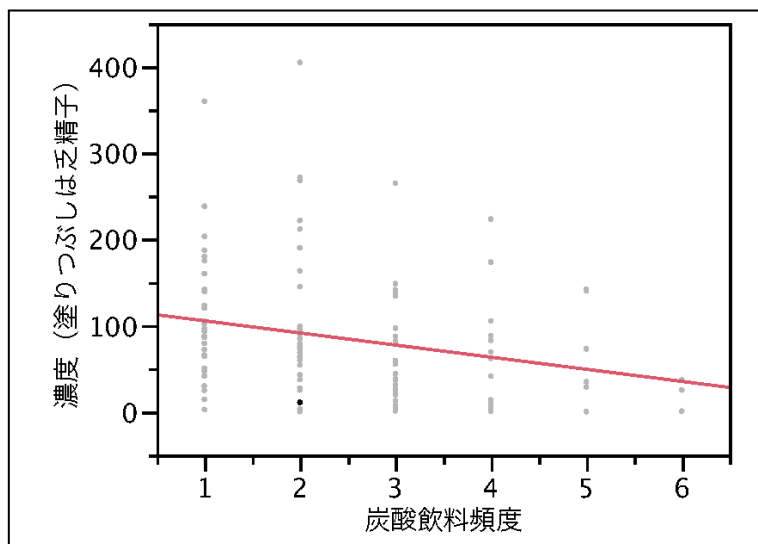
職業では、染料を扱う人に乏精子症の頻度が高い傾向はあるが、対象者数が少ないため、統計学的有意なものではない（表(1)-5、図(1)-9）



図(1)-9 染料と乏精子症の分割表に対する分析

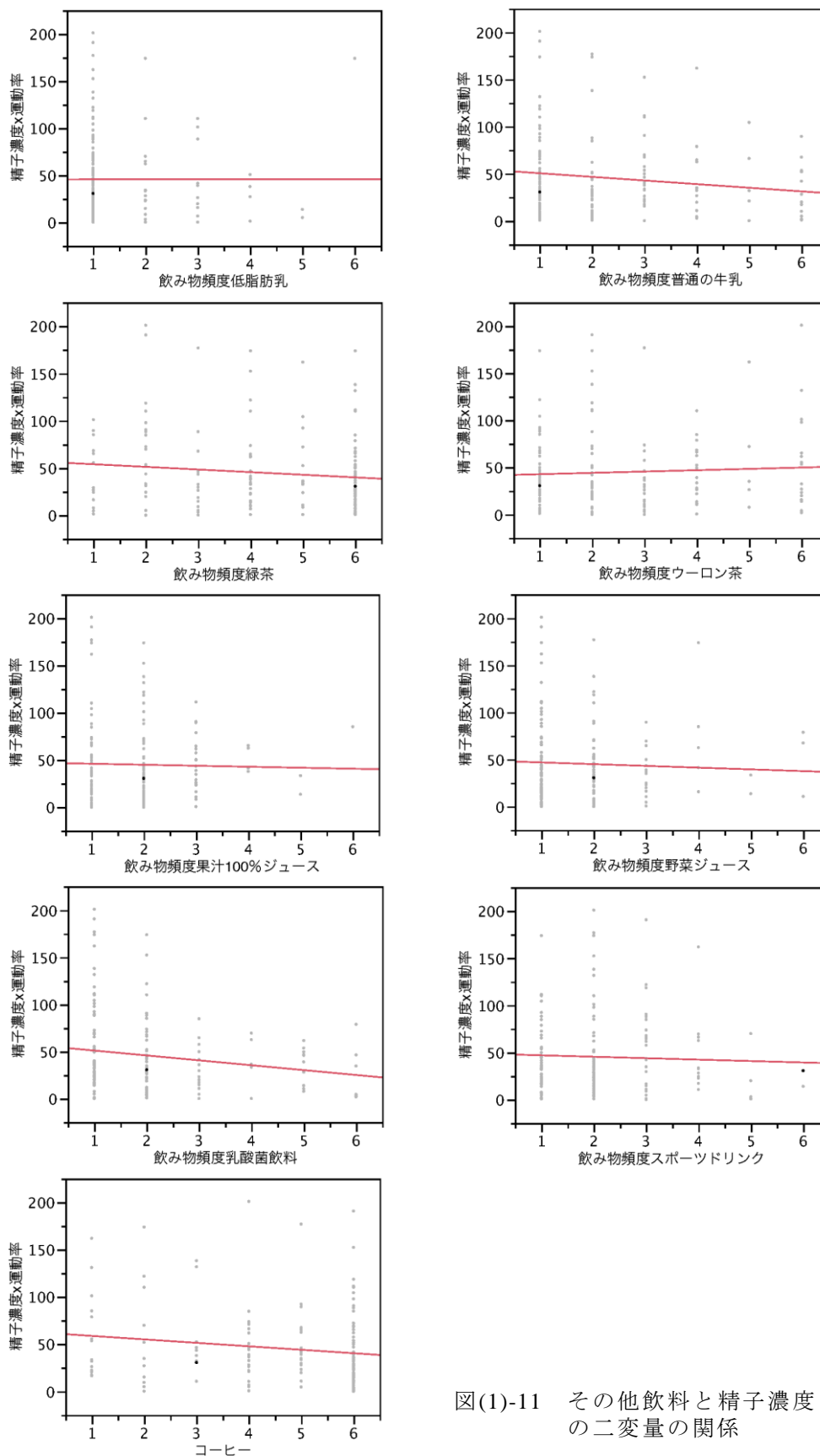
### (3) 食物摂取からみた乏精子症

乏精子症との関連がみられたものは、炭酸飲料摂取頻度であった。炭酸飲料頻度が高いほど精子濃度が低くなる傾向がみられた（負の相関）（表(1)-5、図(1)-10）。



図(1)-10 炭酸飲料と精子濃度 x 運動率の二変量の関係

その他の飲料やコーヒーなどで有意な差は認められなかった（図(1)-11）



図(1)-11 その他飲料と精子濃度 x 運動率  
の二変量の関係

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

乏精子症と関連する生活習慣および食物摂取について検討した。症例群が十分ではないが、これまでに、喫煙率が高い場合と職業で染料を扱う場合に乏精子症の頻度が高いことが示された。また、炭酸飲料摂取頻度が高いと精子濃度が低い傾向がみられた。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

過去に環境中に放出された化学物質は、長期間に渡り環境中に残留し、生物濃縮を経てヒトに取り込まれる。従って、化学物質のヒト生殖細胞への影響は、少子化問題を抱える我が国においては、重要な課題である。いかなる化学物質が、精子の数、質に影響を及ぼすのか、明らかにし、回避する方法を考案し、リスクコミュニケーションとして、市民に伝えることが、求められている。特に強調したい点は、リスクの存在だけでなく、どのようにすればリスクを回避できるのか、そしてその効果はどのくらいあるのかを、実証的なデータを併せて提示することにあると考える。本研究では、そのリスクコミュニケーションに必須の実証的なデータを、食を含めた生活習慣の安全性と有効性を含め、準備できる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

特に記載すべき事項はない

#### <査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)

特に記載すべき事項はない

#### <その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子、宮内尚子、阿部千鶴、林千賀：産婦人科の実際、金原出版株式会社, 741-750 (2011)  
「ARTにおけるエピジェティクス異常」
- 2) 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子、宮内尚子：卵子学, 京都大学学術出版会, 122-131 (2011)  
「ヒト卵子・精子・胚のエピジェティクス」
- 3) 有馬隆博、樋浦仁、岡江寛明、佐藤晶子、宮内尚子：助産雑誌, 医学書院, 62, 11 (2011)

「母子の健康と環境影響」

## (2) 口頭発表 (学会等)

- 1) 佐藤晶子、城戸京子、大津英子、有馬隆博、宇津宮隆史：第 17 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会 (2010)  
「流産後の胎盤絨毛におけるインプリント遺伝子の解析と精液性状・患者背景との関係」
- 2) 佐藤晶子：第 69 回日本生殖医学会九州支部会 (2010)  
「ART 後の流産における絨毛染色体検査結果が正常の絨毛と対応精子のメチル化解析」
- 3) 佐藤晶子、大津英子、長木美幸、熊迫陽子、後藤香里、城戸京子、小池恵、金子奈央、有馬隆博、宇津宮隆史：第 53 回日本哺乳動物卵子学会総会学術講演会 (2012)  
「ART 後の流産における絨毛染色体検査結果が正常核型の絨毛と対応精子のメチル化解析」
- 4) 佐藤晶子：第 30 回日本受精着床学会総会学術講演会 (2012)  
「ART 後の流産の絨毛染色体検査結果が正常核型の絨毛と対応精子のメチル化解析」

## (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

## (4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない

## (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

## (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

- 1) Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK: Science, 308(5727), 1466-9 (2005)  
“Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility”
- 2) Sasaki H, Matsui Y: Nat Rev Genet, 9(2), 129-40 (2008)  
“Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond”
- 3) McGrath J, Solter D: Cell, 37(1), 179-83 (1984)  
“Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes”

## (2) エピゲノム解析（精子）に関する研究

東北大学大学院 医学系研究科 有馬隆博

研究協力者

東北大学大学院 医学系研究科 樋浦仁・岡江寛明・千葉初音  
 (株) G&G サイエンス 阿部由紀子

平成 22～24 年度累計予算額：39,771 千円

(うち、平成 24 年度予算額：12,934 千円)

予算額は、間接経費を含む。

### [要旨]

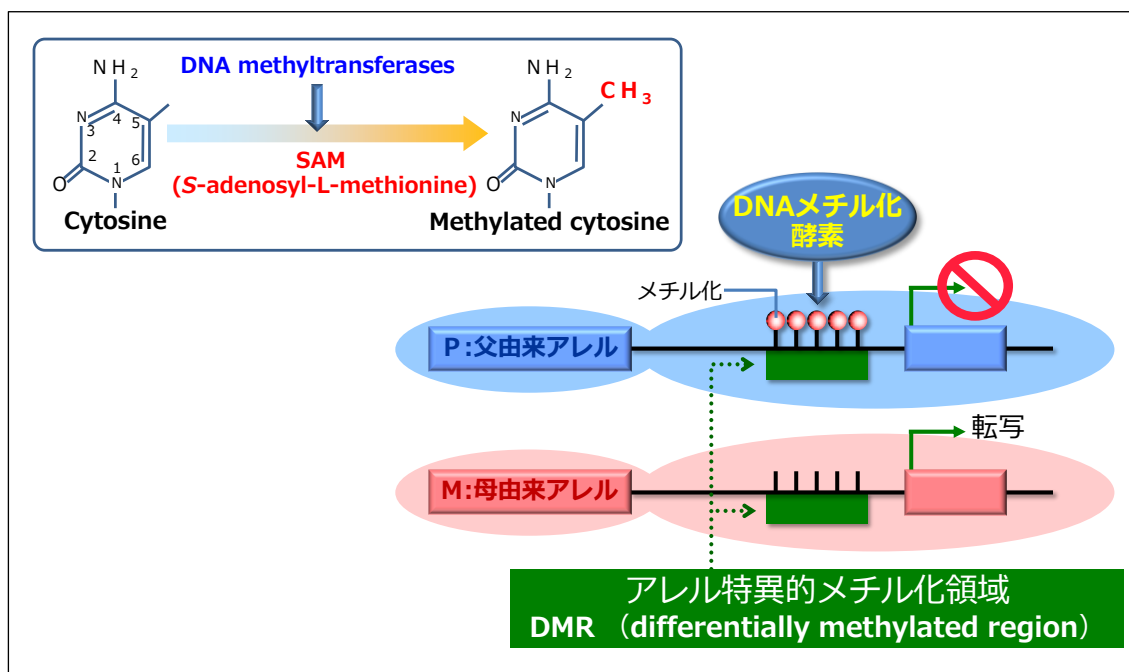
インプリント遺伝子の DNA メチル化は、エピジェネティックな修飾として、外的な変化（環境由来化学物質）に影響を受けやすい特徴がある。本サブテーマでは、新規メチル化解析法（PCR-Luminex 法）を改良し、インプリント遺伝子を標的としたエピゲノム（DNA メチル化）解析を行うことおよび、精子サンプルを用い、メチル化異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子について明らかにした。197 例の精子 DNA を用いた解析では、25.4%（50/197）に異常を認めた。その内訳は、精子型インプリント異常 18%、卵子型インプリント異常 82%であった。また、重症型乏精子症患者精子では 74.1%（20/27）にメチル化異常がみられた。このメチル化異常の頻度、程度は、精子数、精子運動率と負の相関を示し、精子奇形率とは正の相関を示した。メチル化異常と精液所見には強い関連は、精子形成がメチル化の獲得に重要であることを意味していると示唆された。

[キーワード] エピジェネティクス、DNA メチル化、インプリンティング、PCR-Luminex 法

### 1. はじめに

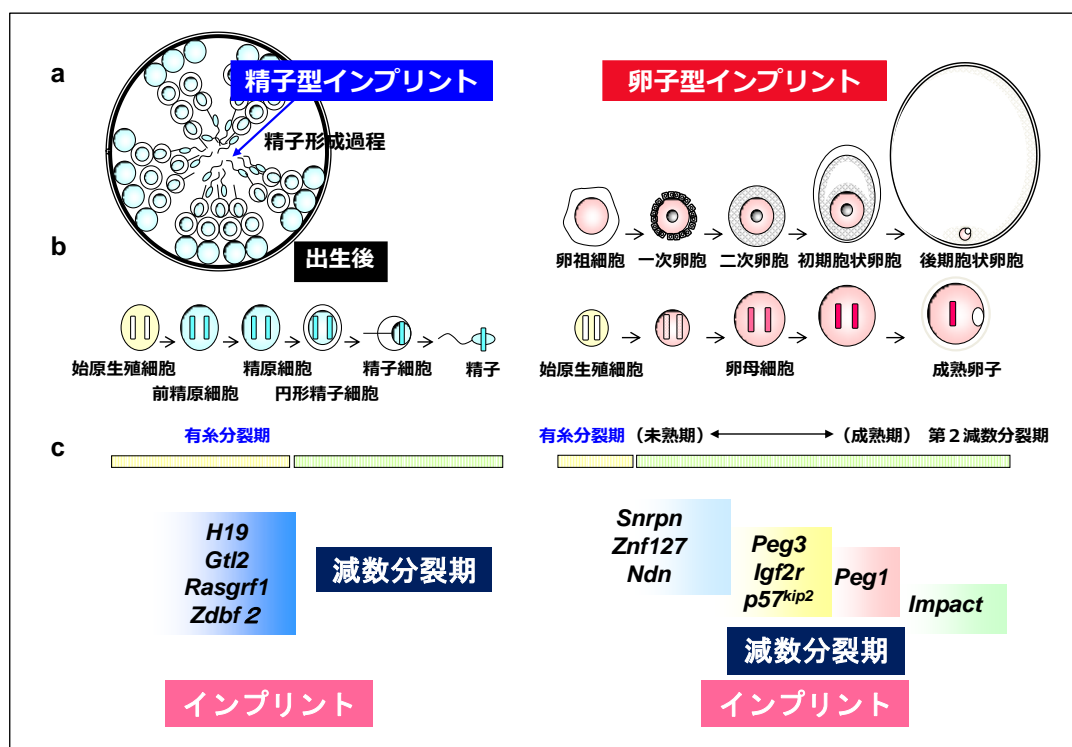
ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、一方の親から継承した遺伝子が選択的に機能し、他方の遺伝子は機能しないユニークな遺伝子発現様式を示す現象で、哺乳類の胎児の正常な発生、胎盤機能あるいは神経の発達等に重要な役割を果たす<sup>1, 2)</sup>。このゲノムインプリントを受ける遺伝子（インプリント遺伝子）は、2 本ある対立遺伝子（アレル）がそれぞれ母由来か、または父由来かを識別し、特定の親由来のアレルの発現（片親性発現）を示す（図(2)-1）。この遺伝子発現調節には、アレル特異的な DNA メチル化が必須であることが、マウスを使ったこれまでの研究で明らかとなっている<sup>3, 4)</sup>。このような領域は、アレル特異的メチル化領域（DMR、Differentially methylated regions）と呼ばれている。この DMR のメチル化は、始生殖細胞（Primordial germ cells: PGC, 精子、卵子の元になる細胞）で消去され、配偶子形成過程では、精子型または卵子型のインプリント（メチル化インプリント）が確立する（精子では精子型インプリント、卵子では卵子型インプリント）。卵子型インプリントは未熟卵から

成熟卵にかけて確立し、遺伝子ごとに原始卵胞期から胞状卵胞期の間に、メチル化獲得の時期が異なっている（図(2)-2 右）。一方、精子形成過程でメチル化を獲得するマウスインプリント遺伝子（精子型インプリント）は、これまでに 4 つの DMR（H19、Gtl2、Rasgrf1、Zdbf2）が報告されている（図(2)-2 左）<sup>5-8</sup>。また、ヒトでは Rasgrf1 を除く 3 種類のインプリント遺伝子が報告されている。マウス雄の生殖細胞の詳細な解析により、4 つの遺伝子の DMR は、いずれも有糸分裂期にある前精原細胞でメチル化が確立することが示されている。また、確立したメチル化インプリントは、受精後の着床初期にみられるリプログラミング（ゲノム全体の脱メチル化）の影響を受けることなく、安定に維持される<sup>9</sup>。また、これらのインプリント遺伝子のメチル化の異常は、様々な疾患や児の発育、発達異常、悪性腫瘍とも関連することも数多くの報告がある<sup>10</sup>。



図(2)-1 インプリント遺伝子のDNAメチル化による発現調節

インプリント遺伝子には、父由来、母由来のアレルを区別するアレル特異的メチル化領域（DMR）が存在する。この DMR のメチル化は、精子あるいは卵子形成過程で受精前に確立する。



図(2)-2 生殖細胞成長過程における DNA メチル化の獲得

左図) 精子形成と精子型インプリントの確立

- a: 精細管断面の模式図。b: 精子形成過程。c: 精子型インプリントの確立。有糸分裂期である前精原細胞（胎生 14.5 日目から出生時）でメチル化が確立する。

右図) 卵子形成と卵子型インプリントの確立

- a: 卵胞形成過程。b: 卵子形成過程。c: 卵子型インプリントの確立。第一減数分裂の複糸期で、分裂がいったん停止して卵子が成熟している間に、段階的に遺伝子毎にメチル化が確立する。

配偶子および初期胚は、DNA メチル化などのエピジェネティックな修飾が、ダイナミックに変動する時期である<sup>11, 12)</sup>。環境化学物質は、この時期に非常に脆弱な配偶子のエピジェネティクスに影響を及ぼす可能性が十分ある。不妊症の原因のおよそ半数は男性因子（精子に原因がある）であり、近年増加傾向にあることが報告されている（平成 20 年 日本産婦人科学会 不妊登録）。また、精子数が少ない乏精子症では、環境やストレスなどが原因となることも報告されており<sup>13-16)</sup>、乏精子症の精子では、エピジェネティックな異常を有することが予想される。

ヒト精子のメチル化インプリントについては、これまでに報告が少ない。正常なヒト精子では、減数分裂に入る以前に SNRPN（卵子型インプリント）のメチル化が消去され<sup>17)</sup>、H19（精子型インプリント）のメチル化が獲得されると報告されている<sup>18, 19)</sup>。Marques らは、乏精子症の患者と少数であるが正常形態を示す精子にも、インプリント遺伝子 H19 にメチル化異常があることを報告している<sup>16)</sup>。一方で、不妊症男性の精子では、インプリント遺伝子のメチル化が全て正



常であったとの報告もある<sup>20)</sup>。いずれにしても、これらの報告は限られたインプリント遺伝子の解析にすぎず、ヒト精子のゲノムインプリンティングに関する詳細な研究は、まだ十分ではない。

そこで、本研究では、多数例の男性精子のインプリント遺伝子の DNA メチル化について解析するため、簡便な DNA メチル化診断法として PCR-Luminex 法を改良すること、および PCR-Luminex 法を用い精子のメチル化、異常の頻度、程度、影響を受けやすい領域について明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究開発目的

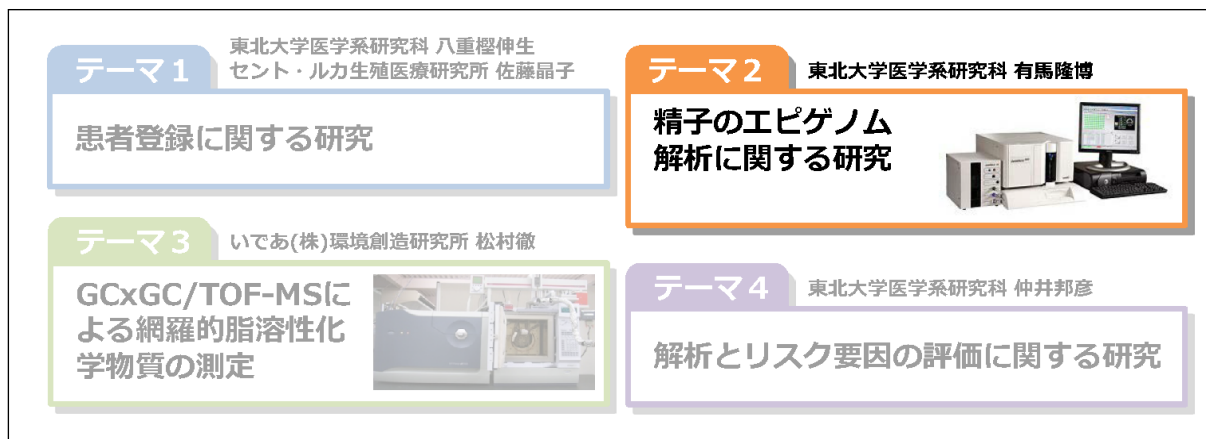
本研究は、ヒト精子への影響を及ぼしうる環境由来化学物質を同定し、科学的成果を得ることを目標としている。そのため本研究の、サブテーマは、以下の 2 項目である。研究体制を図(2)-3 に示す。

### (1) 新規DNAメチル化診断法の改良

PCR-Luminex 法を応用し、インプリント領域の異常を判定する診断システムを構築、精子検査法として、従来法との比較検討を行い、測定系を確立させる。

### (2) ヒト男性精子におけるメチル化インプリント異常の解析

PCR-Luminex法を用い、多数例の男性精子におけるインプリント異常の頻度・程度・影響を受けやすい遺伝子について解析する。また、精子のインプリント異常を示す症例の特徴についても検討する。



図(2)-3 研究体制

## 3. 研究開発方法

### (1) 新規DNAメチル化診断法の改良

PCR-Luminex 法による、メチル化の測定系を確立させるため、以下の工程について検討を加えた。

#### 1) 精子 DNA のバイサルファイト処理

《目標》

バイサルファイト処理工程の安定化と供試検体中の必要 DNA 量および供試精子量を決定する。

使用キット：

- ①EpiTect Bisulfite Kit (QIAGEN 社)
- ②EZ DNA Methylation Kit (ZYMORESEARCH 社)
- ③EZ DNA Methylation-Gold Kit (ZYMORESEARCH 社)

健康人検体を 500ng 準備し、各キットのプロトコールにしたがってバイサルファイト処理を行った。

各キットを用いた場合、処理に要する時間は、下記の通りである。

- ①EpiTect Bisulfite Kit : 6 時間程度
- ②EZ DNA Methylation Kit : 13~17 時間
- ③EZ DNA Methylation-Gold Kit : 3 時間程度

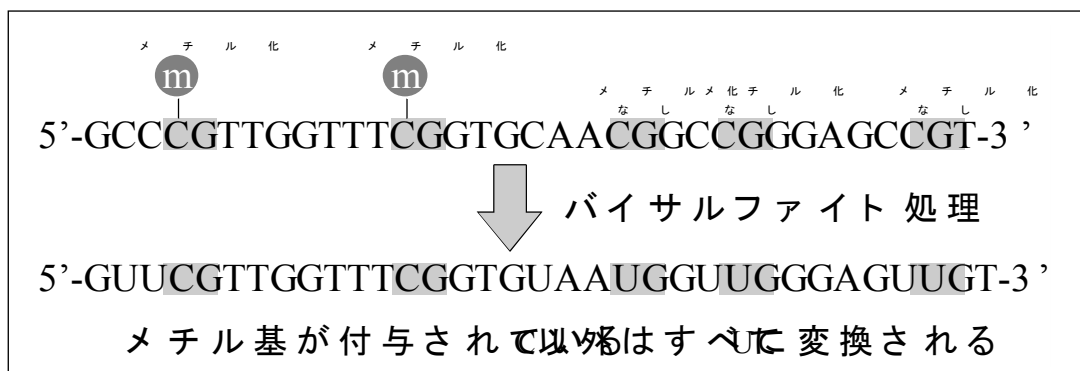
各キットにて処理を行ったバイサルファイト DNA (以下、BS-DNA) は、(1)バイサルファイト処理後の DNA 量、精製度の測定、(2)回収率の算出、(3)PCR 増幅反応を行い、バイサルファイトの効率を評価した。

#### 《検討内容》

##### ①バイサルファイト処理工程の検討

市販キットの性能、試薬構成および文献等の情報をもとに、検査に十分な質と量の DNA を安価、簡便に得るためのバイサルファイト処理方法を検討した。バイサルファイトの原理を図(2)-4 に示す。

- ①市販キットの性能確認
- ②バイサルファイト工程の検討



図(2)-4 バイサルファイトの原理

##### ②供試検体中の必要 DNA 量および供試精子量の決定

バイサルファイト処理を施した DNA を PCR にて増幅し、得られた結果より測定に必要な DNA 量を決定した。

## 2) ビオチン化プライマーによる Multiplex PCR 検討

### 《目標》

Multiplex PCR による増幅で、対象遺伝子領域が同等の増幅量を示し、かつ非特異的増幅がない増幅を示す条件設定を行う。

### 《検討内容》

#### ①プライマー設計

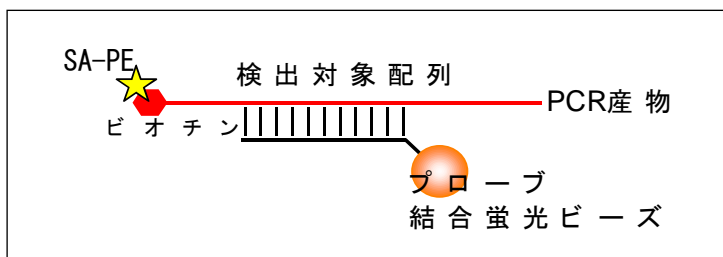
バイサルファイト後の DNA を鋳型とし、複数領域を同時に増幅可能なプライマーの配列、 $T_m$  値、GC 含量について検討を行った (図(2)-5)。

#### ②反応液組成

反応に使用する DNA 合成酵素を決定し、これに最適化した試薬組成を検討した。

#### ③反応温度、反応時間および増幅サイクル数

プライマーの  $T_m$  値、試薬組成をもとにアニーリング温度、PCR の各工程の反応時間および反応サイクル数を検討した。



図(2)-5 ビオチン化プライマーの検討

## 3) ハイブリダイゼーション検討

### 《目標》

メチル化配列に対応したプローブ、非メチル化配列に対応したプローブを作製し、増幅産物のメチル化の有無およびメチル化率測定に適したハイブリダイゼーション反応、SA-PE 反応の条件を選定する。

### 《検討内容》

#### ①検出プローブの設計

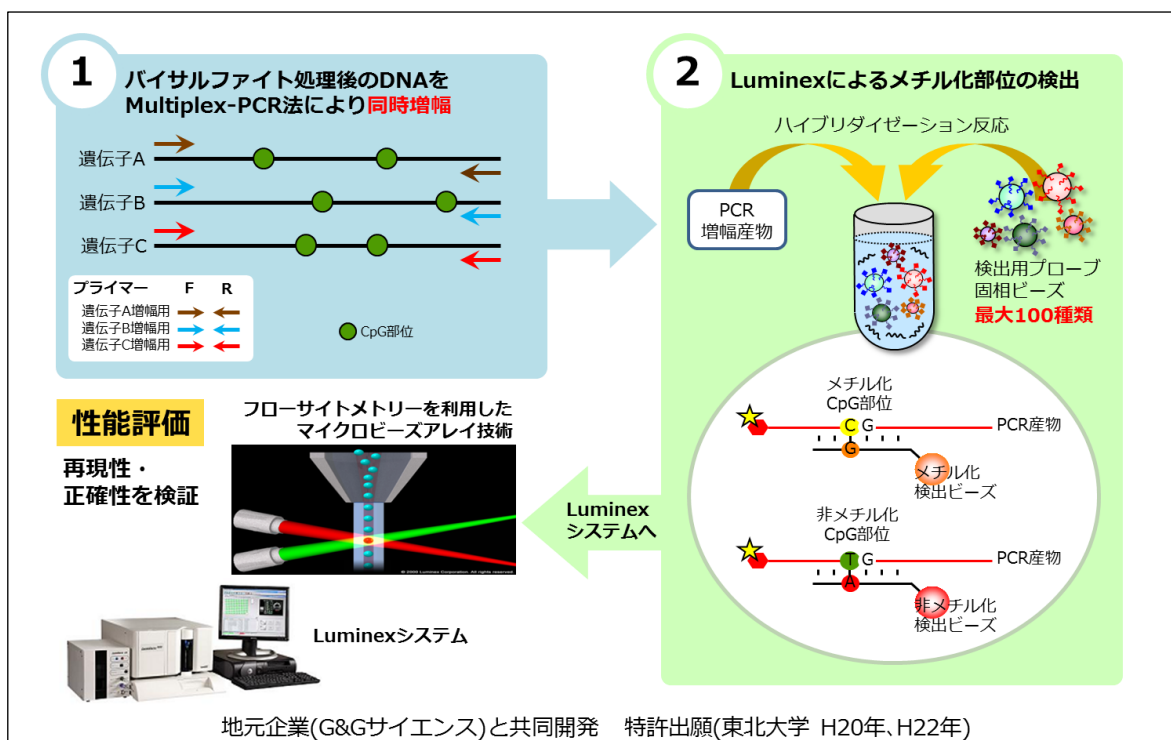
対象 8 遺伝子について、各 1~3 箇所、計 14 箇所のメチル化領域にプローブを設計し、検討を行った。

#### ②反応溶液検討

これまでハイブリダイゼーションに用いてきた溶液の組成をもとに検討を行った。

#### ③反応条件の検討

プローブの  $T_m$  値 (2 本鎖 DNA が熱変性して 1 本鎖になる温度) に加え、増幅の状況も考慮し、反応に用いる増幅産物量の検討、ハイブリダイゼーションおよびプローブとの反応に SA-PE (Streptavidin phycoerythrin) 反応温度の検討を行った。



図(2)-6 PCR-Luminex 法を用いた簡便、迅速なハイスループット DNA メチル化診断システムの改良

## (2) ヒト男性精子におけるメチル化インプリント異常の解析

### 1) 精子サンプルの採取

形態学的な精液検査（量、精子濃度、運動率、奇形率）を受けた不妊症検査のため（およそ半数は男性不妊症ではない）男性に、本研究内容の説明を行い、同意が得られた男性 197 名を対象にした。精子は、精液検査後の、本来廃棄される精子細胞を用い、本研究に使用した。収集した精子は、スイムアップ法<sup>21)</sup>により、リンパ球、上皮細胞を除去した。精液検査では、197 例のうち、132 例は「正常精子」を示した。残りの 65 例の患者は、「乏精子症」（「中等度乏精子症」は 38 例、「重症型乏精子症」は 27 例であった。精子細胞は PBS 液で繰り返し洗浄し、0.1mM 2-メルカプトエタノール<sup>22)</sup>を用いた標準的抽出方法により DNA を抽出した。ヒト正常白血球 DNA を、体細胞のコントロールとして使用した。

### 2) DNAメチル化の解析

DNA メチル化の解析は、22 領域のヒトインプリント遺伝子 (H19、GTL2、ZDBF2、DIRAS3、NAP1L5、FAM50B、ZAC (PLAGL1)、GRB10、PEG10、PEG1 (MEST)、INPP5F-v2、LIT1 (KCNQ10T1)、RB1、SNRPN、ZNF597、ZNF331、PEG3、PSIMCT-1、NNAT、L3MBTL、NESPAS、GNAS1A) の DMR について、DNA メチル化の解析をおこなった。まず、精子 DNA は、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research) を用い、バイサルファイト処理をおこなった。バイサルファイト処理により、メチル化していないシトシンは、ウラシルへ変換するのに対し、メチル化したシトシンは、メチルシトシンのまま残る。バイサルファイト処理後、22 領

域のインプリント DMR を、以下の条件で PCR (Polymerase chain reaction) にて増幅した。PCR 反応液は、各 0.5  $\mu$ M プライマー、200  $\mu$ M dNTPs、1x PCR Buffer、1.25 U の EX Taq Hot Start DNA Polymerase (TaKaRa Bio)、20  $\mu$ l スケールに調整した。各遺伝子 DMR の遺伝子マップとプライマー情報は、参考資料(2)-1 に記した。また、その他の遺伝子情報を参考資料(2)-2 にまとめた。

### (3) PCR-Luminex法を用いたメチル化の解析

#### 1) 人工プラスミドの作成

メチル化の検出には、最適なプライマー、プローブ、ハイブリダイゼーション、反応温度、反応時間などの条件を設定する必要がある。まず、PCR を用いて非メチル化人工プラスミドを作成した。メチル化プラスミドは、メチル化酵素を用いて作成した (SssI methylase, New England Biolabs)。

#### 2) オリゴプローブによるハイブリダイゼーション

オリゴプローブは、5'端をビオチンでラベルし、100 oligobeads/ $\mu$ l 濃度に調整した。メチル化および非メチル化を認識するオリゴプローブの塩基配列を参考資料(2)-3 に示した。ハイブリダイゼーションは、96 穴のプレートで 50  $\mu$ l のスケールでおこなった (オリゴプローブ 5  $\mu$ l、PCR 反応液 5  $\mu$ l、40  $\mu$ l の反応液 (3.75 M TMAC、62.5 mM TB (pH 8.0)、0.5 mM EDTA、0.125% N-lauroylsacosine))。ハイブリダイゼーション反応は、95°C 2 分、48°C 30 分でおこなった。その後、PBS-Tween を 100  $\mu$ l 加えて、3,300 rpm で 1 分間遠心し、上清を除去し、ペレットを PBS-Tween で洗浄した。測定は、Luminex 100 flow cytometer 装置でおこない、測定値は定量化した。PCR-Luminex 法を用いた簡便、迅速なハイスループット DNA メチル化診断システムを図(2)-6 に示す。

### (4) 統計学的解析

測定した 2 群間の比率データの有意差検定には、STATISTICA を用いた。COBRA 法と PCR-Luminex 法を用いたメチル化値の 2 群間の比較には、Spearman と Pearson の相関係数式を用いた。

### (5) 倫理審査

東北大学医学系研究科倫理委員会に本研究計画を提出し、承認を得て研究を開始した (受付番号 2009-145)。その後、研究の継続と一部内容の変更を追加した申請をおこない、研究の承認を得た (受付番号 2010-120)。また、協力医療機関においても、院内倫理委員会にて、承認を得て研究を実施した。

## 4. 結果及び考察

### (1) 新規 DNA メチル化診断法の改良

新規開発のメチル化解析法の性能評価を行った。3つのプロセスから評価と多数例のヒト精子検体を用いて、従来法と比較検討した。

#### 1) 精子 DNA のバイサルファイト処理

バイサルファイト処理工程の安定化と供試検体中の必要 DNA 量および供試精子量を決定した。

(結果)

#### ①バイサルファイト処理後の精製度

BS-DNA の吸光 (260nm、280nm) を測定し、回収量および精製度 (260nm/280nm の値) を算出した。結果を表(2)-1 に示す。

表(2)-1 バィサルファイトキットの精製度

	検体1		検体2		検体3		検体4	
	回収量	精製度	回収量	精製度	回収量	精製度	回収量	精製度
①EpiTect Bisulfite	2.12μg	3.150	1.99μg	3.169	2.20μg	3.246	2.11μg	3.050
②Methylation	325ng	1.694	315ng	1.658	390ng	1.770	413ng	1.800
③Methylation-Gold	336ng	1.843	328ng	1.630	455ng	1.805	399ng	1.714

\*精製度

通常の DNA 検体の場合、精製度 (吸光値 260nm/280nm) の値が 1.6~1.8 であれば良好な状態である。

これらの結果より、回収量は①EpiTect Bisulfite Kit が最も多いが、バイサルファイト処理前の DNA 量が 500ng であること、精製度が 3.0 前後であることから、本キットの性能には疑問が残るため、②EZ DNA Methylation Kit、③EZ DNA Methylation-Gold Kit が妥当な状態であると推察する。

#### ②回収率

各検体の DNA 回収率をバイサルファイト処理前の DNA との比較により算出した。結果を表(2)-2 に示す。

表(2)-2バイサルファイトキットの回収率

	検体1	検体2	検体3	検体4
①EpiTect Bisulfite	424.0%	398.0%	440.0%	422.0%
②Methylation	65.0%	63.0%	78.0%	82.6%
③Methylation-Gold	67.2%	65.6%	91.0%	79.8%

①では回収率が異常に高い。DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光を持つ物質の存在が疑われる。測定の際、これらの影響が懸念される。

## ③PCR 増幅反応

作製したバイサルファイト処理済み DNA（以下、BS-DNA）を鋳型とし、リアルタイム PCR 反応を行い、増幅状況を確認した。

下記に PCR 条件を示す。

・ BS-DNA 使用量：5ng,10ng,50ng

・ 増幅に使用したプライマー：H19 増幅用プライマー

F プライマー 5'- TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTT -3'

R プライマー 5'- ATAAATATCCTATTCCCAAATAACCCC -3'

・ 増幅プログラム

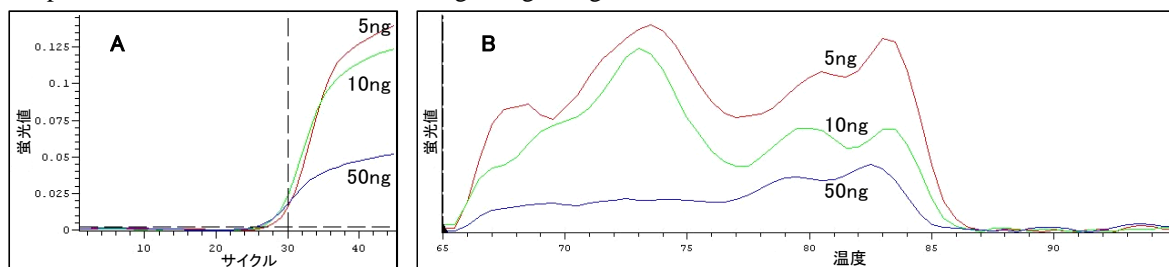
95℃, 2分 → (95℃, 20秒 → 60℃, 30秒 → 72℃, 30秒) ×50 サイクル

・ 融解曲線分析

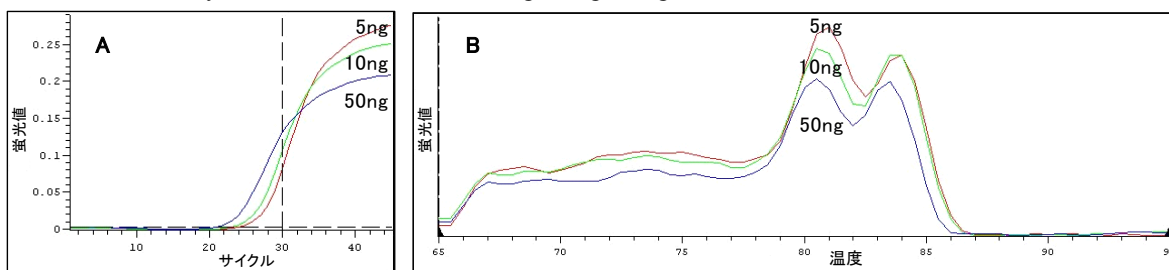
PCR 増幅産物の融解温度によって、非特異的増幅産物やプライマーダイマーと分別するため、増幅反応終了後 72℃から 100℃まで温度を上げ、2 本差 DNA の解離温度を特定した。

反応を行った結果、各 BS-DNA にてほぼ良好に増幅が確認された。(A) 増幅曲線および (B) 融解曲線分析を図(2)-7 に示す。

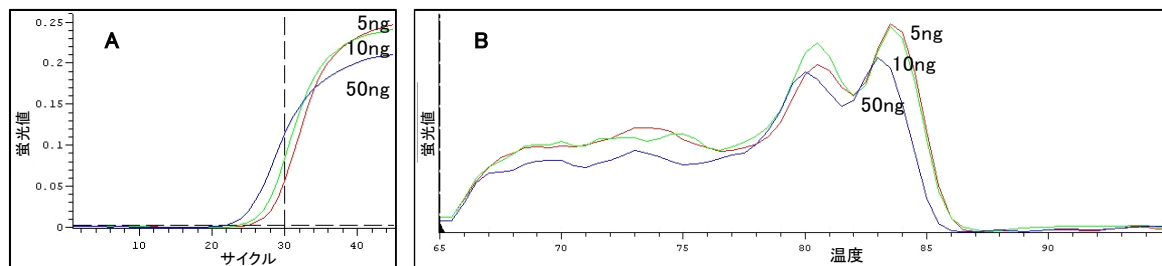
## ①EpiTect Bisulfite Kit：検体 2 5ng,10ng,50ng



## ②EZ DNA Methylation Kit：検体 2 5ng,10ng,50ng



## ③EZ DNA Methylation-Gold Kit : 検体 2 5ng,10ng,50ng



図(2)-7 各キットにより作成した BS-DNA の増幅状況 (上記①、②、③)

5～50ng の BS-DNA 量で測定した結果、どの濃度でも増幅が確認され、この範囲で増幅が可能であった。

## (考察)

A の増幅曲線より、増幅の開始 (曲線立ち上がり点) が①EpiTect Bisulfite Kit が 24 サイクルと、他の 2 キットが 21 サイクル程度であるのに比べ、やや遅れていることが確認された。

また B の融解曲線分析より、増幅産物の 2 本鎖が解離する温度を確認した結果、②、③はメチル化された配列を持つ産物と非メチル化の配列の 2 種類の増幅産物を示す 2 つのピークが確認されたが、①はこれらの 2 ピークが判別しにくいことに加え、低温度域にもう一つのピークが確認された。これはプライマー同士が結合して生成されるプライマーダイマーのピークであると考えられる。

①EpiTect Bisulfite Kit の回収率が異常に高い。本キットでバイサルファイト処理を行った DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光をもつ物質が含まれている可能性が否定できず、測定の際、これらの影響が懸念される。また、5～50ng の BS-DNA で良好な増幅が可能であったが、感度についてはさらにデータを取得する必要がある。また、EpiTect Bisulfite Kit にて処理を行った検体については、他のキットに比べ、増幅しにくい状態であることが判明したため、市販のキットを用いて処理を行う際には EZ DNA Methylation Kit または EZ DNA Methylation-Gold Kit を推奨する。

## 2) ビオチン化プライマーの設計

反応液組成、反応温度、反応時間および増幅サイクル数の観点から検討を行なった。

## (結果)

## ①プライマー設計

Multiplex 増幅のためのプライマーは、各領域フォワード、リバースプライマーを各々 2 から 5 本ずつ設計した。これらは長さ 20～28 塩基、Tm 値 60～72°C に設定し、検討を行った。GC 含量については、バイサルファイト処理により「C」が「T」に変換されているため、各プライマーの値をそろえることは難しく、18～58%となっている。



## ②反応液組成

DNA 合成酵素として、FastStart DNA Polymerase および AptaTaq DNA Polymerase（いずれも Roch 社）を検討した。これらの酵素にあわせ、溶液組成も検討し、下記 2 種類にてデータを取得した。

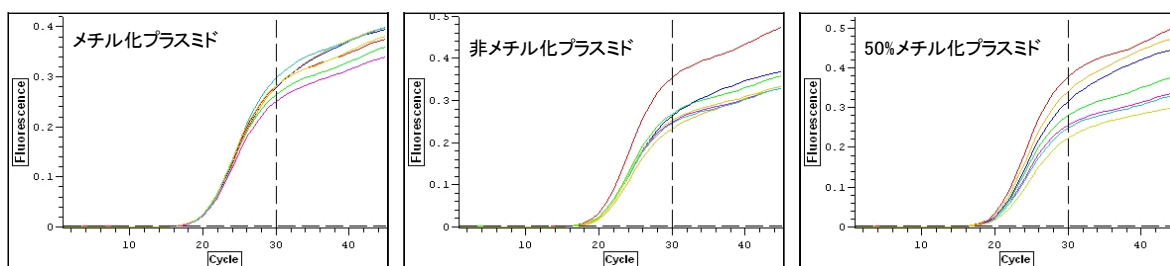
## ③反応温度、反応時間および増幅サイクル数

プライマーの  $T_m$  値、長さをもとに下記プログラムを設定し検討した。

95°C, 2min.

95°C, 20sec. → 58°C または 60°C, 30sec. → 72°C, 30sec. × 45 または 50 サイクル

72°C, 7min.



図(2)-8 プラスミドを用いた Multiplex PCR 増幅産物

全 7 遺伝子 (H19、GTL2、ZAC、PEG1、PEG3、LIT1、SNRPN) のメチル化プラスミド、非メチル化プラスミド、50%メチル化プラスミドすべてにおいて増幅開始(曲線立ち上がり点)は同じであり、良好な増幅が確認された。

## (考察)

上記 1,2,3 の検討の結果、現時点では、溶液 1、アニーリング温度 58°C、サイクル数 45 サイクルにて良好な結果が得られている。ただし、対象領域によっては、Multiplex にて検出が難しいものもあり、引き続きプライマーの  $T_m$  値などを調整し、設計する必要がある。

## 3) ハイブリダイゼーション検討

対象遺伝子領域のメチル化識別、メチル化率の測定を Luminex 法により実施するため、検出プローブ設計、反応液組成、反応条件の検討を行い、適正化を図った。

## (結果)

プローブの  $T_m$  値に加え、増幅の状況も考慮し、反応に用いる増幅産物量の検討、ハイブリダイゼーションおよび SA-PE 反応温度の検討を行った。プローブの  $T_m$  値より、ハイブリダイゼーションおよび SA-PE 反応を 48°C、52°C に設定し検討した。また、反応に用いる増幅産物を原液、2 倍希釈液、5 倍希釈液、10 倍希釈液にて検討し非特異的な検出がなく良好に検出される増幅産物の量を特定した。図(2)-8 に示す。

対象遺伝子 メチル化領域 プローブ カットオフ値	HT9				GTL2				ZAC		PEG1				
	領域1		領域2		領域1		領域2		領域1	領域2	領域1		領域2		
	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	メチル化 対応プ ローブ	非メチル 化対応プ ローブ	
	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	100	
メチル化プラスミド	H19	1229	62	689	129	61	89	105	83	97	64	79	74	87	46
非メチル化プラスミド	H19	37	560	54	512	30	74	99	75	71	59	81	75	61	39
50%メチル化プラスミド	H19	1063	325	529	309	62	94	137	104	111	82	138	103	119	73
メチル化プラスミド	GTL2	22	58	44	72	1598	131	986	247	77	45	70	60	66	46
非メチル化プラスミド	GTL2	47	69	61	100	61	1121	173	1285	77	60	89	78	86	59
50%メチル化プラスミド	GTL2	33	74	85	130	1263	607	822	767	83	56	90	79	82	50
メチル化プラスミド	ZAC	12	55	51	91	41	65	95	71	1752	55	69	50	49	34
非メチル化プラスミド	ZAC	21	62	63	97	42	77	85	92	75	802	71	76	60	38
50%メチル化プラスミド	ZAC	30	74	75	116	54	66	114	99	1139	442	119	93	105	53
メチル化プラスミド	PEG1	19	40	56	74	39	54	56	56	62	42	1135	71	4054	53
非メチル化プラスミド	PEG1	6	25	41	68	27	48	63	58	63	32	83	1946	238	346
50%メチル化プラスミド	PEG1	49	75	94	125	65	89	95	85	87	55	940	1348	4221	215
メチル化プラスミド	PEG3	14	45	52	48	51	73	76	81	69	35	76	55	38	32
非メチル化プラスミド	PEG3	41	43	41	97	35	52	91	73	60	55	84	70	60	62
50%メチル化プラスミド	PEG3	72	84	107	141	83	102	134	95	114	81	140	89	130	71
メチル化プラスミド	LIT1	14	49	48	98	38	75	96	63	62	47	90	75	74	43
非メチル化プラスミド	LIT1	49	64	95	148	63	70	127	87	85	71	116	84	112	45
50%メチル化プラスミド	LIT1	30	78	80	166	54	85	122	88	77	67	112	85	117	67
メチル化プラスミド	SNRPN	33	48	58	66	39	71	87	67	80	39	74	61	65	50
非メチル化プラスミド	SNRPN	36	58	48	101	50	67	83	68	70	51	65	103	66	52
50%メチル化プラスミド	SNRPN	31	67	68	105	59	82	108	71	64	61	78	85	109	36
陰性コントロール		30	39	56	76	34	71	92	71	66	37	67	72	66	38

図(2)-9 メチル化および非メチル化プローブによる定量解析

## (考察)

上記 1,2,3 の検討の結果、現時点では、反応溶液を変更する必要はなく、ハイブリダイゼーション、SA-PE 反応温度を 48℃で行うことで、良好な結果が得られている(図(2)-9)。ただし、対象領域によっては、蛍光値が低く、実際の検体を用いた場合に陽性、陰性の判別が困難になる可能性が高いため、引き続きプローブの Tm 値などを調整し、設計する必要がある。

## 4) Luminex システムによる蛍光値測定検討

蛍光強度により、メチル化の有無および率の測定が可能な測定系を検討した。

## ①開発した測定系の蛍光値の妥当性確認

## ②別法との比較検証

別法(バイサルファイトシーケンス法/COBRA 法)のデータを比較検証し、結果に乖離がないことを確認

## ③ヒト精子検体を用いた検証:

対象: 精液(精液検査後の検体)・血液

登録:

・不妊症男性(337名)

・顕微鏡検査: 数、運動率、奇形率の測定

症例: ・乏精子症と診断された患者(精子数×運動率 $< 5 \times 10^6/\text{mL}$ ) 61例・中間群

( $20-5 \times 10^6/\text{mL}$ ) 67例・正常精子を有する男性( $> 20 \times 10^6/\text{mL}$ ) 209例

## (結果)

従来法(COBRA)と比較し、COBRA が 90%以上の場合、Luminex が 90%以上の割合 95.5%で比較的安定な値が得られた。また、乏精子症患者に異常を認める割合が多い傾向

が見られた。成果は論文発表した。

(まとめ)

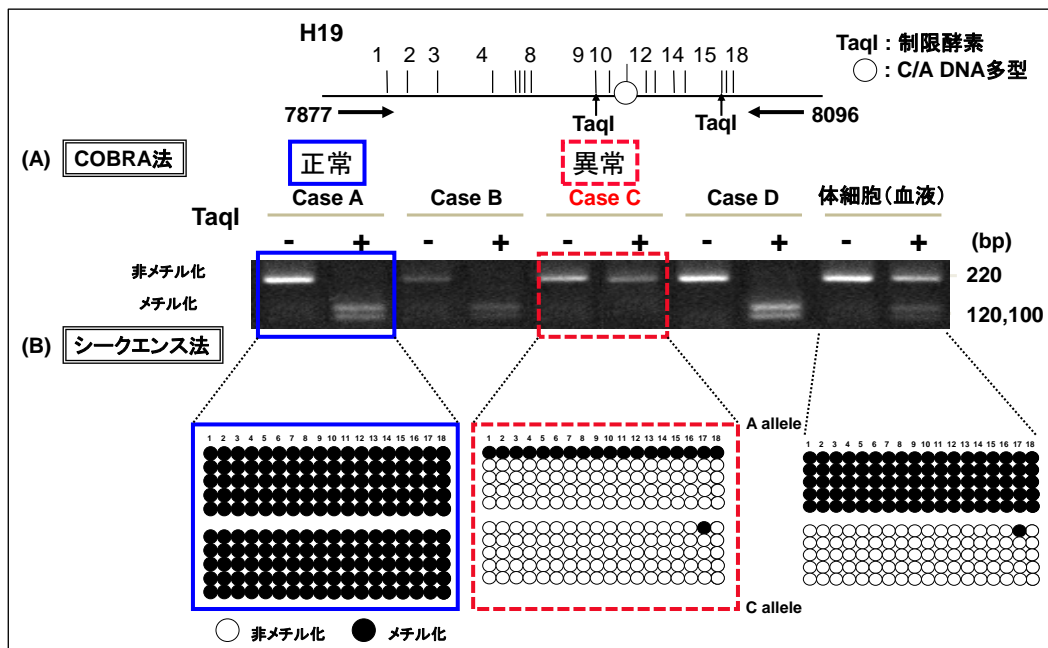
精子 DNA のバイサルファイト処理においては、EpiTect Bisulfite Kit の回収率が異常に高い。本キットでバイサルファイト処理を行った DNA 溶液には、DNA 以外に 260nm の吸光をもつ物質が含まれている可能性が否定できず、測定の際、これらの影響が懸念される。また、5~50ng の BS-DNA で良好な増幅が可能であったが、感度についてはさらにデータを取得する必要がある。また、EpiTect Bisulfite Kit にて処理を行った検体については、他のキットに比べ、増幅しにくい状態であることが判明したため、市販のキットを用いて処理を行う際には EZ DNA Methylation Kit または EZ DNA Methylation-Gold Kit を推奨する。

## (2) ヒト男性精子におけるメチル化インプリント異常の解析

### 1) 精子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

ヒト精子型インプリント遺伝子 DMR は 3 領域で、H19 領域は 220-bp (18 の CpG 部位)、GTL2 領域は 259-bp (15 の CpG 部位)、ZDBF2 領域は 220-bp (18 の CpG 部位) のメチル化について解析した (参考資料(2)-1)。

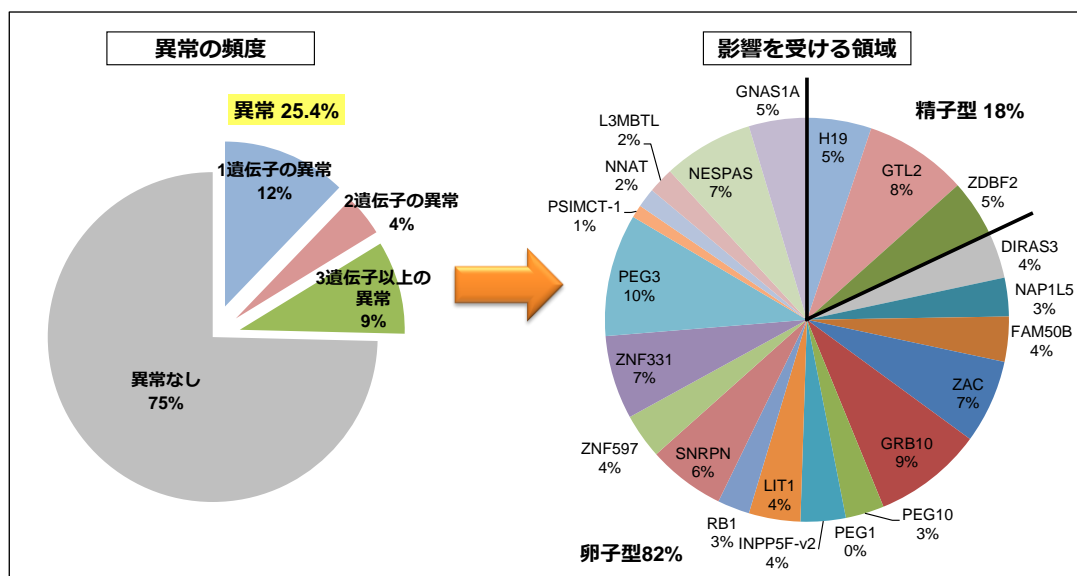
DMR のメチル化の解析には、制限酵素を用いる COBRA 法と、シーケンス法を併用した。バイサルファイト処理後の精子 DNA を、各 DMR に特異的なプライマーで PCR 増幅し、H19 は制限酵素 TaqI あるいは MluI を、GTL2 は TaqI あるいは NruI、ZDBF2 は TaqI を用いて消化した。メチル化された PCR 産物は制限酵素で切断され、メチル化されない PCR 産物は切断されない。体細胞 DNA では、およそ半分の PCR 産物がメチル化され、残り半分はメチル化されなかった。このことより、PCR によるバイアスがないことを確認した (図(2)-10; 血液)。さらに PCR-Luminex 法を用いた大多数の精子検体では、メチル化されたパターンを示した。しかし 10 例は、メチル化パターンに加え、非メチル化バンドも認めた。これらの PCR 産物は、更に、シーケンス法で、各 CpG 部位のメチル化状態について解析した。その結果、COBRA 法と同等のメチル化比率を示した (図(2)-10; Case C)<sup>22)</sup>。メチル化異常を示した 10 例のうち、7 例は重症型乏精子症患者であった。次に、GTL2 および ZDBF2 のメチル化の解析を行った。GTL2 では 16 例、ZDBF2 では 9 例に、異常な非メチル化精子を認めた (参考資料(2)-4)。これらの検体についてもシーケンス法で解析をおこなった。メチル化異常のうち乏精子症は、GTL2 で 8 例、ZDBF2 で 4 例であった。



図(2)-10 遺伝子 DMR のメチル化インプリントの解析

2) 卵子型インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

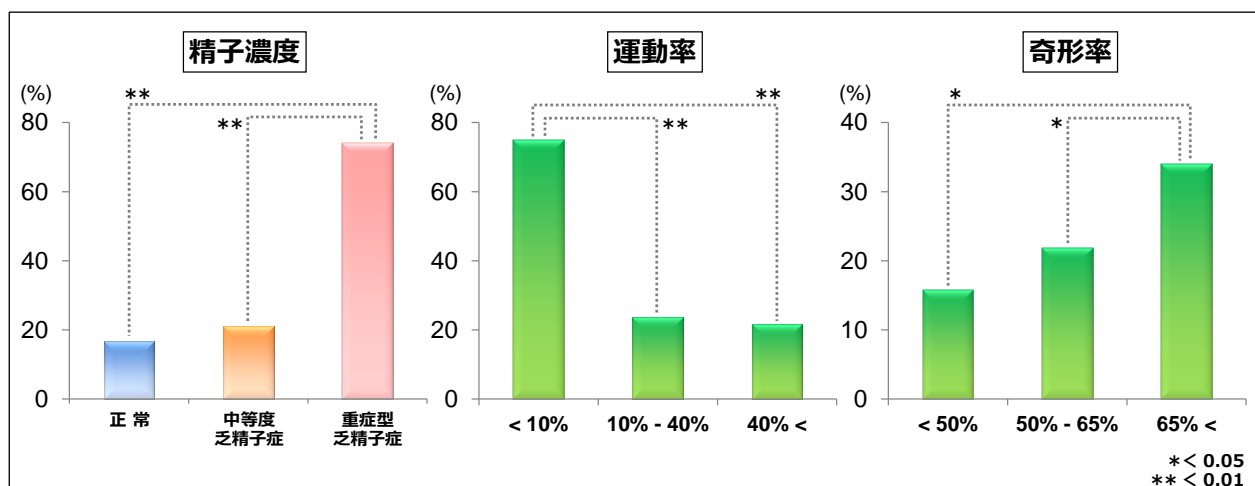
次に、卵子型インプリント遺伝子の 19 領域 (DIRAS3, NAP1L5, FAM50B, ZAC (PLAGL1), GRB10, PEG10, PEG1 (MEST), INPP5F-v2, LIT1 (KCNQ1OT1), RB1, SNRPN, ZNF597, ZNF331, PEG3, PSIMCT-1, NNAT, L3MBTL, NESPAS, GNAS1A) について、DNA メチル化の解析をおこなった。全体でメチル化異常は 197 例中 43 例で 21.8%であった。その内訳は、図(2)-11 右 にまとめた。もっとも異常の頻度が高い領域は、PEG3 (9.8%)、ついで GRB10 (8.8%)、NESPAS (7.2%) であった (図(2)-11 右)。また、異常なメチル化パターンを示す 43 例中 20 例は、複数のインプリント領域の異常であった。また、19 例は、精子型インプリントと卵子型インプリントの両方の異常がみられた。



図(2)-11 精子のメチル化異常の頻度

### 3) 非インプリント遺伝子の DNA メチル化の解析

精子の DNA メチル化異常が、インプリント遺伝子に特異的であるのか、あるいはゲノム全体のメチル化の異常であるのか検討した。インプリントを受けない反復配列 (LINE1 と Alu) について、DNA メチル化の解析をおこなった。これまでと同様に、COBRA 法とシーケンス法を用い、LINE1 (413-bp、28 の CpG 部位) と Alu (152-bp、12 の CpG 部位) のメチル化について解析した。その結果、全ての症例で、これら反復配列領域のメチル化に有意な差は認められず、メチル化の異常はインプリント遺伝子に特有な現象と考えられた。

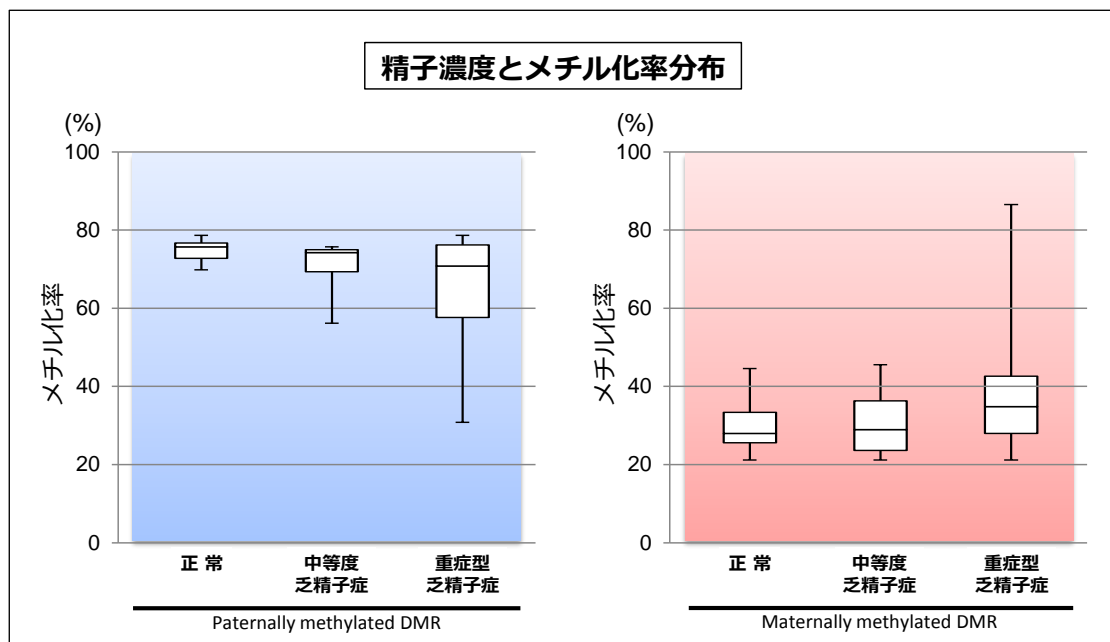


図(2)-12 メチル化異常と精子性状

### 4) メチル化インプリント異常の特徴

197 例の精子検体のうち、50 例 (25.4%) で、1 遺伝子以上の DMR にメチル化異常が確認された (図(2)-11 左)。精子型インプリントの異常は 18%、卵子型は 82%であった (図(2)-11 右)。3 領域以上の DMR でメチル化異常を示す症例は 50 例中 18 例で、このうち乏精子症の症例は 14 例 (77.8%) であった。

次に、メチル化異常と精液所見による精子性状との関連性について検討した。メチル化異常の頻度は、「重症型乏精子症」では 74.0% (20/27)、「中等度乏精子症」では 21.0% (8/38)、「正常精子」では 16.7% (22/132) で、メチル化異常と精子濃度に負の相関が認められた (図(2)-12)。同様に、運動率を 10% 以下、10-40%、40% 以上の 3 群に分類した場合、運動率とメチル化異常との間に負の相関を認めた。さらに奇形率を 50% 以下、50-65%、65% 以上の 3 群に分類した場合、奇形率とメチル化異常の頻度の間に、正の相関を認めた。メチル化異常の有無と年齢および BMI に相関は認めなかった。メチル化異常の程度について、「重症型乏精子症」、「中等度乏精子症」、「正常精子」について比較検討した。図(2)-13 に示すように、精子所見はメチル化異常の程度にも相関することが示された。



図(2)-13 精子濃度とメチル化率分布

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

ゲノムインプリンティング（遺伝子刷り込み）とは、特定の親由来の遺伝子が選択的に発現する現象である。哺乳類の場合、父親と母親から由来する一对のゲノムを持ち、通常は両者がともに発現する。ただし、いくつかの遺伝子では、父母のどちらか一方から受け継いだゲノムのみが発現し、機能的な差異を与えることが知られている。この遺伝子を「インプリント遺伝子」という。多くのインプリント遺伝子は胎児、胎盤の発育や神経の発達、行動に影響を及ぼすことが報告されている。

精子形成過程で獲得される精子型インプリント（父由来の遺伝子にメチル化がおこる）と卵子形成過程で獲得される卵子型インプリント（母由来の遺伝子にメチル化がおこる）の確立には、DNAの塩基配列に変化を与えることなく、世代ごとに新たにプログラムされるエピジェネティックな修飾が働き、配偶子の雄雌差を規定している。ほとんどのインプリント遺伝子には、対立遺伝子間でメチル化状態の異なる領域が存在し、ゲノムインプリント機構の重要な役割を担うと考えられている。従って、インプリント遺伝子におけるメチル化の異常は妊娠や出生にも重大な影響を及ぼす。

ART（体外受精などの生殖補助医療）出生児に、DNAのメチル化異常が原因と考えられる先天性疾患の発症頻度増が報告されている。ゲノムインプリントに関わる領域は精子型、卵子型あわせ22あり、我々は精子型インプリント2領域、卵子型インプリント5領域のメチル化異常を指摘し、先天性疾患との関係を報告した。また、ARTを希望する男性の精子の特定遺伝子メチル化異常とART出生児先天性疾患の相関も示唆している。一方、ARTを希望する男性の増加と先天性疾患出生児の増加により、安全なARTの実施が期待されており、

臨床現場での精子メチル化異常の確認のため、簡便かつ低価格な検査法開発が待望されている。精子のメチル化状態は生活環境や食物摂取に依存し変化することがあり、不妊症男性の精子のメチル化異常状態も変動があり、メチル化異常が顕著でなく通常男性の精子に近い時期もある。ARTを希望する男性に対し、この様なメチル化異常の少ない時期を選定し、ARTを行うことで、障害の無い出生児誕生の期待は高くなる。従来メチル化解析はバイサルファイトシーケンス法とCOBRA法が併用された。しかしこれらは煩雑な操作に加えて長時間を要し、結果解析に特殊技能を要求され、臨床診断レベルでの利用に適さない。従って、より簡便で低価格な方法が望まれている。そのため、新規メチル化解析法PCR-Luminex法は、科学的に有益で、臨床現場に即した技術となる。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

### <行政が活用することが見込まれる成果>

近年、ART技術の進歩は著しく、我が国においても、不妊症のために子供を持つことができない人々が子供を持てる可能性が広がってきており、ARTは着実に広まっている。

患者の病態に応じた多様なART技術の開発が進み、従来から行われていた人工授精に加え、昭和58年には体外受精・胚移植による初めての出生例が、平成4年には顕微受精による初の出生例が、それぞれ報告されている。日本産科婦人科学会は、昭和61年から一定のARTについて実施機関の登録および実施例の報告制度を設け、報告の収集・分析結果を公表している。それによると、体外受精、顕微授精等による出生児数は年間2万人に達したとされており、少子化問題を抱える我が国においては、重要な人的資源を提供している。

一方で、ARTを適正に実施するための制度が十分であるとは言えず、ARTをめぐる発生する倫理上、健康上の様々な問題に対して適切な対応ができていないのが現状である。さらに、ARTの多くは、医療保険が適用されていない自由診療であり、受診者は多額の費用を負担しなければならない。治療にかかる費用や期間に関しては、医療機関によって様々だが、体外受精の場合、1回の治療にかかる費用は20万円から40万円程度であり、これを5回から10回行うという流れが一般的である。したがって、経済的理由により、途中で治療を諦めざるを得ないケースも多い。また、経済上の問題をクリアしてARTに臨んだとしても、人工授精や体外受精の実施に伴う薬物療法による副作用や、出生した児の健康に問題があるなどのリスクは避けることはできない。

このような現状を打開し、不妊に悩む人々に対し、身体的、経済的負担の少ない、良質かつ適切なARTを実施するためには、医療保険の適用や公的な補助の対象として検討することはもちろん、現在のARTにおける技術的な問題をできるだけ排除し、短期間で成功率の高い、より安全な治療システムの構築が重要となる。本研究開発は、ARTにより出生した児のBeckwith-Wiedemann syndromeやAngelman syndromeなど、本来稀なインプリンティング異常症の発症率が高い原因の一つとして報告されている、不妊精子のインプリンティング異常を調べるためのスクリーニング検査システムを構築することである。このスクリーニング検査

を実施することにより、ARTにおける遺伝的安全性は飛躍的に高まり、今後増加するART受診者に対し、より適切な処置を行うことが可能となる。加えて、精子の質を評価することが、人工授精や体外受精、顕微授精に踏み切るべきか否かの判断材料となり、先の見えない治療を長く続けるような身体的、精神的負担を軽減するための一助となる。また、この方法は、新生児のインプリンティング異常症のスクリーニングや次世代型の妊婦検診（母体血から胎児血を分離）、将来的には、成人における癌、精神病、アレルギー疾患など、広く検診に応用することも可能である。現在、ダウン症候群などの新生児の染色体異常を判定するための検査が実施されているものの、この確定診断には、乳児の染色体を検査する必要がある、両親は精神的な、児は採血による身体的な苦痛を伴う。これに対し、本検査は、不妊症検査のルーチンで行う精液検査（顕微鏡による数、運動、形態検査）後の本来破棄される精子を用いるため、受診者の肉体的負担は軽く、受け入れやすいものといえる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) H. Hiura, H. Okae, H. Kobayash, N. Miyauchi, F. Sato, A. Sato, F. Suzuki, S. Nagase, J. Sugawara, K. Nakai, N. Yaegashi, and T. Arima: BMC Med Genomics, 5, 8 (2012)  
"High-Throughput Detection of Aberrant Imprint Methylation in the Ovarian Cancer by the Bisulphite Pcr-Luminex Method"

<査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

### (2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない



## (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

## (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

- 1) M. A. Surani: Cell, 93, 309-312 (1998)  
"Imprinting and the Initiation of Gene Silencing in the Germ Line"
- 2) S. M. Tilghman: Cell, 96, 185-193 (1999)  
"The Sins of the Fathers and Mothers: Genomic Imprinting in Mammalian Development"
- 3) D. Lucifero, M. R. Mann, M. S. Bartolomei, and J. M. Trasler: Hum Mol Genet, 13, 839-849 (2004)  
"Gene-Specific Timing and Epigenetic Memory in Oocyte Imprinting"
- 4) Y. Obata, and T. Kono: J Biol Chem, 277, 5285-5289 (2002)  
"Maternal Primary Imprinting Is Established at a Specific Time for Each Gene Throughout Oocyte Growth"
- 5) T. L. Davis, J. M. Trasler, S. B. Moss, G. J. Yang, and M. S. Bartolomei: Genomics, 58, 18-28 (1999)  
"Acquisition of the H19 Methylation Imprint Occurs Differentially on the Parental Alleles During Spermatogenesis"
- 6) T. L. Davis, G. J. Yang, J. R. McCarrey, and M. S. Bartolomei: Hum Mol Genet, 9, 2885-2894 (2000)  
"The H19 Methylation Imprint Is Erased and Re-Established Differentially on the Parental Alleles During Male Germ Cell Development"
- 7) T. Ueda, K. Abe, A. Miura, M. Yuzuriha, M. Zubair, M. Noguchi, K. Niwa, Y. Kawase, T. Kono, Y. Matsuda, H. Fujimoto, H. Shibata, Y. Hayashizaki, and H. Sasaki: Genes Cells, 5, 649-659 (2000)  
"The Paternal Methylation Imprint of the Mouse H19 Locus Is Acquired in the Gonocyte Stage During Foetal Testis Development"
- 8) J. Y. Li, D. J. Lees-Murdock, G. L. Xu, and C. P. Walsh: Genomics, 84, 952-960 (2004)  
"Timing of Establishment of Paternal Methylation Imprints in the Mouse"
- 9) H. D. Morgan, F. Santos, K. Green, W. Dean, and W. Reik: Hum Mol Genet, 14 Spec No 1, R47-58 (2005)  
"Epigenetic Reprogramming in Mammals"
- 10) M. Paulsen, and A. C. Ferguson-Smith: J Pathol, 195, 97-110 (2001)  
"DNA Methylation in Genomic Imprinting, Development, and Disease"
- 11) M. R. DeBaun, E. L. Niemitz, and A. P. Feinberg: Am J Hum Genet, 72, 156-160 (2003)  
"Association of in Vitro Fertilization with Beckwith-Wiedemann Syndrome and Epigenetic Alterations of Lit1 and H19"
- 12) E. R. Maher, L. A. Brueton, S. C. Bowdin, A. Luharia, W. Cooper, T. R. Cole, F. Macdonald, J. R. Sampson, C. L. Barratt, W. Reik, and M. M. Hawkins: J Med Genet, 40, 62-64 (2003)  
"Beckwith-Wiedemann Syndrome and Assisted Reproduction Technology (Art)"

- 13) G. R. Dohle, D. J. Halley, J. O. Van Hemel, A. M. van den Ouwel, M. H. Pieters, R. F. Weber, and L. C. Govaerts: *Hum Reprod*, 17, 13-16 (2002)  
"Genetic Risk Factors in Infertile Men with Severe Oligozoospermia and Azoospermia"
- 14) S. Fernandes, K. Huellen, J. Goncalves, H. Dukal, J. Zeisler, E. Rajpert De Meyts, N. E. Skakkebaek, B. Habermann, W. Krause, M. Sousa, A. Barros, and P. H. Vogt: *Mol Hum Reprod*, 8, 286-298 (2002)  
"High Frequency of Daz1/Daz2 Gene Deletions in Patients with Severe Oligozoospermia"
- 15) J. Gianotten, F. van der Veen, M. Alders, N. J. Leschot, M. W. Tanck, J. A. Land, J. A. Kremer, L. H. Hoefsloot, M. M. Mannens, M. P. Lombardi, and M. J. Hoffer: *Mol Hum Reprod*, 9, 587-592 (2003)  
"Chromosomal Region 11p15 Is Associated with Male Factor Subfertility"
- 16) J. Qiu: *Nature*, 441, 143-145 (2006)  
"Epigenetics: Unfinished Symphony"
- 17) M. Manning, W. Lissens, W. Weidner, and I. Liebaers: *Urol Int*, 67, 151-155 (2001)  
"DNA Methylation Analysis in Immature Testicular Sperm Cells at Different Developmental Stages"
- 18) A. Kerjean, J. M. Dupont, C. Vasseur, D. Le Tessier, L. Cuisset, A. Paldi, P. Jouannet, and M. Jeanpierre: *Hum Mol Genet*, 9, 2183-2187 (2000)  
"Establishment of the Paternal Methylation Imprint of the Human H19 and Mest/Peg1 Genes During Spermatogenesis"
- 19) C. J. Marques, F. Carvalho, M. Sousa, and A. Barros: *Lancet*, 363, 1700-1702 (2004)  
"Genomic Imprinting in Disruptive Spermatogenesis"
- 20) S. Hartmann, M. Bergmann, R. M. Bohle, W. Weidner, and K. Steger: *Mol Hum Reprod*, 12, 407-411 (2006)  
"Genetic Imprinting During Impaired Spermatogenesis"
- 21) C. Ushijima, Y. Kumasako, P. E. Kihale, K. Hirotsuru, and T. Utsunomiya: *Hum Reprod*, 15, 1107-1111 (2000)  
"Analysis of Chromosomal Abnormalities in Human Spermatozoa Using Multi-Colour Fluorescence in-Situ Hybridization"
- 22) B. R. Bahnak, Q. Y. Wu, L. Coulombel, L. Drouet, D. Kerbiriou-Nabias, and D. Meyer: *Nucleic Acids Res*, 16, 1208 (1988)  
"A Simple and Efficient Method for Isolating High Molecular Weight DNA from Mammalian Sperm"

### (3) 環境化学物質の測定（末梢血および精漿）・網羅的 TOF-MS 解析に関する研究

（株）いであ・環境創造研究所 松村 徹

平成 22～24 年度累計予算額：12,053 千円

（うち、平成 24 年度予算額：2,727 千円）

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

特定の化学物質をターゲットとしてあらかじめ選択し測定分析する方法では、（１）測定対象とする物質の存在量を精確に得ることが可能である、（２）測定対象として設定した化合物以外の存在量に関する情報は通常得られない、（３）測定対象とした化合物と調査したい事象の関係は（関係なしも含めて）わかるが、ターゲットとした化合物が原因かどうかは別問題である、（４）ターゲットの種類やその数によっては膨大な調査分析費用が必要である（例：30 万円／検体 x 2,000 人 = 6 億円）、といった特徴が見られる。今回、特定の罹患等に関するグループを作成し、可能な限り多種の化学物質を測定分析するため、ガスクロマトグラフ (GC)（あるいは包括的ガスクロマトグラフ (GCxGC)）-飛行時間型質量分析法 (TOFMS) による血液中の化学物質分析手法の開発を行った。TOFMS は二重収束型質量分析に比較し、検出感度に劣るが、ターゲットとなる化学物質を決定可能であること、得られる情報量（質量数情報）が多い（約 4GB／検体）である利点を有する。さらに、この TOF-MS 法を用い、乏精子症患者と正常精子の血液の、脂溶性化学物質濃度の差を網羅的に解析し、有意な差の見られた PCB（ポリ塩化ビフェニル）については、個別に分析した。また、PCB 異性体についても分析した。その結果、血中 PCB と乏精子症との間に関連性が認められ、PCB 異性体との間に高い関連性が示された。

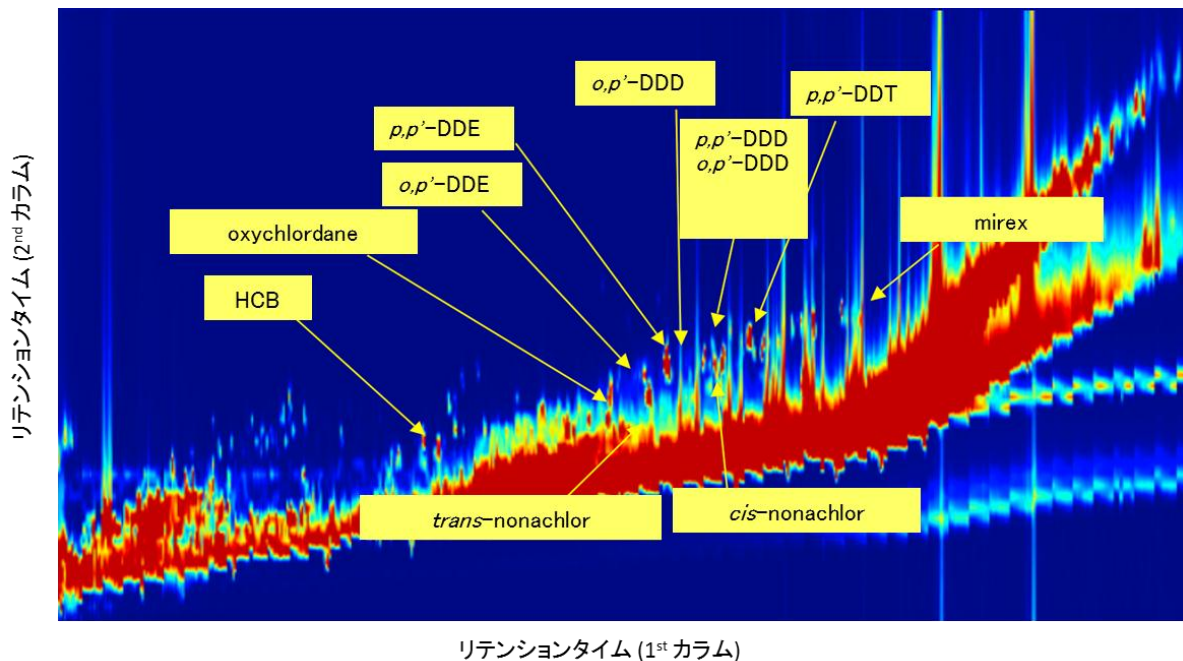
#### [キーワード]

脂溶性化学物質、網羅的解析、2次元 TOF-MS 法（GC/GCxGC-EI/CI-TOFMS）、PCB、PCB 異性体

#### 1. はじめに

近年、生体試料中の化学物質の高感度分析法が進歩し、いくつかの化合物に関しては組織内濃度の測定が可能となった。そこで、本サブテーマでは、化学物質測定系としては脂溶性化学物質をターゲットに、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) に高分解能ガスクロマトグラフ (HRGC) あるいは包括的ガスクロマトグラフを組み合わせて網羅的な解析を行う。包括的ガスクロマトグラフとは、Comprehensive GC、GC x GC とも呼ばれる多次元 GC の一種である。1次元 GC で分離不可能な化合物を 2つ目のカラムに導入することによって GC 分離能を高める手法である。MS との組み合わせによって物質分離能を非常に高くすることが可能である。質量分解能の観点からは、二重収束型質量分析計 (MS 分解能：10%谷で約 10000) との組合せも考えられるが、

本研究では質量走査速度を速く設定可能な TOFMS と組み合わせることとした（MS 分解能：半値幅で約 5000）。GCxGC は 2 つのカラムを連結する 2 次元構成とし、一定時間間隔にて低温モジュレーションすることにより GC 分離能を高める方法について検討した。図(3)-1 に GCxGC/TOFMS による網羅的脂溶性化学物質の測定の例を示す。また本方法を用いて、乏精子症患者と正常精子の血液の、脂溶性化学物質濃度の違いを網羅的に解析した。



図(3)-1 GCxGC/TOF-MS による網羅的脂溶性化学物質の測定法（血液）

- 1) 位置情報が判明している特定の脂溶性の有機化学物質（PCB、DDT、DDE、DDD、HCB 等）について、一度に解析できる。
- 2) 同時に非特定化学物質についても、質量スペクトルライブラリーや標準品を用いて同定することが可能である。
- 3) 比較対象群（試料）間において濃度差の検出された化合物を同定し、数値化する研究に適する。

## 2. 研究開発目的

症例対照研究手法を用い、化学物質曝露との関連性を解析する。試料として、末梢血を用いた。化学物質としては脂溶性化学物質をターゲットとし、飛行時間型質量分析計（TOF-MS）に高分解能ガスクロマトグラフ（HRGC）あるいは GCxGC を組み合わせ網羅的な解析を行う。HRGC/TOFMS あるいは GCxGC/TOF-MS は多くの化合物の同時測定が可能であり、また、未知の化合物が検出されれば、測定後にその物質を同定可能な場合も多い。本研究では以下の項目について検討することを目的とした。研究体制を図(3)-2 に示す。

- ①網羅的化学物質濃度測定系を確立すること

- ②乏精子症と正常精子患者の化学物質濃度を比較し、濃度差がみられる化学物質を明らかにすること



図(3)-2 研究体制

### 3. 研究開発方法

#### (1) 網羅的化学物質濃度測定系の確立

- ①GC-TOF-MS の各種設定条件を検討した。
- ②キャピラリーGC カラムを選定した。  
(GCxGC においては、1st および 2nd カラムの組み合わせ)
- ③GC 分離条件を検討した。電子衝撃イオン化法 (EI; Electron Ionization) 及び負イオン化学イオン化法 (NCI; Negative Chemical Ionization) の条件の検討も行った。
- ④存在が予期される化学物質の出現位置を確認した。
- ⑤実際の血液試料を測定 (被験者検体ではない) した。

#### (2) 乏精子症と正常精子患者の化学物質濃度の比較

乏精子症患者と正常精子の患者の血液を用い、網羅的に化学物質濃度について比較した。その結果、いくつかの化学物質に差が認められたが、PCB には特に有意な濃度差を認めたため、その異性体についても全例濃度分析を行った。

### 4. 結果及び考察

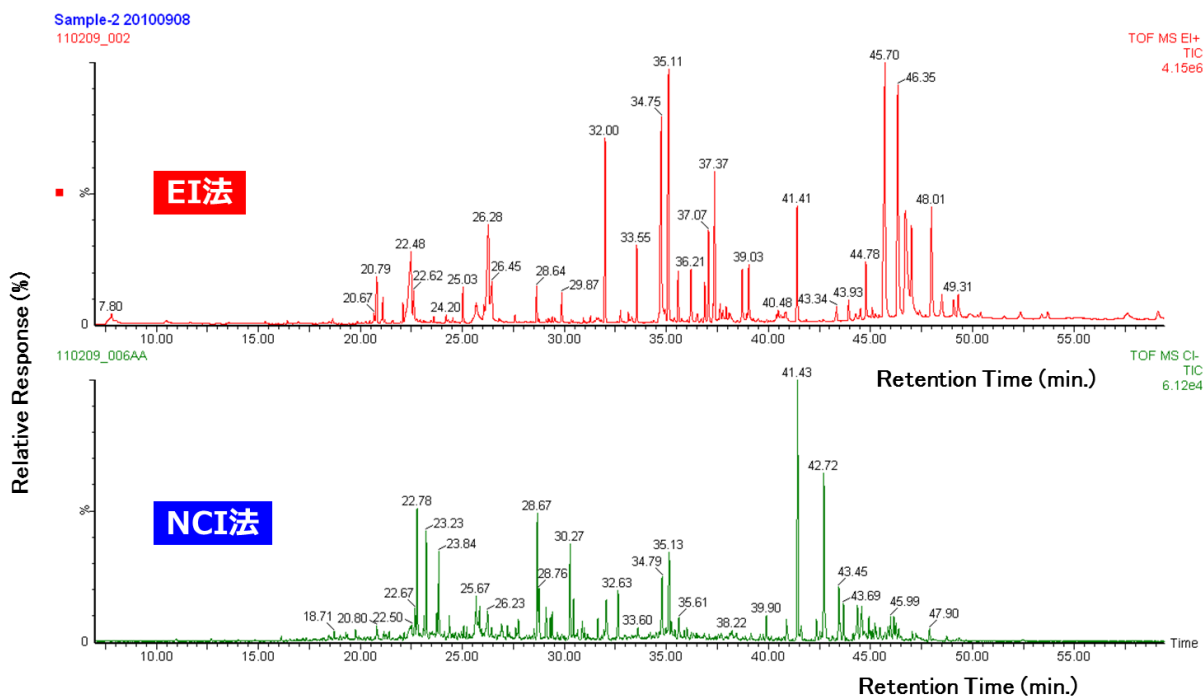
#### (1) 網羅的化学物質濃度測定系の確立

- ①GC-EI-TOF-MS、GC-CI-TOF-MS、GCxGC-EI-TOF-MS、GCxGC-EI-TOF-MS の装置条件検討を行い、最適条件を得た。
- ②化学物質 (主に PCB、多環芳香族、農薬、残留性有機汚染物質(POPs)) に関して①の手法における溶出位置アサインを行った。
- ④何種類かの GC カラム (GCxGC については 1st および 2nd カラムの組み合わせ) につい

て①および②の検討を行った。

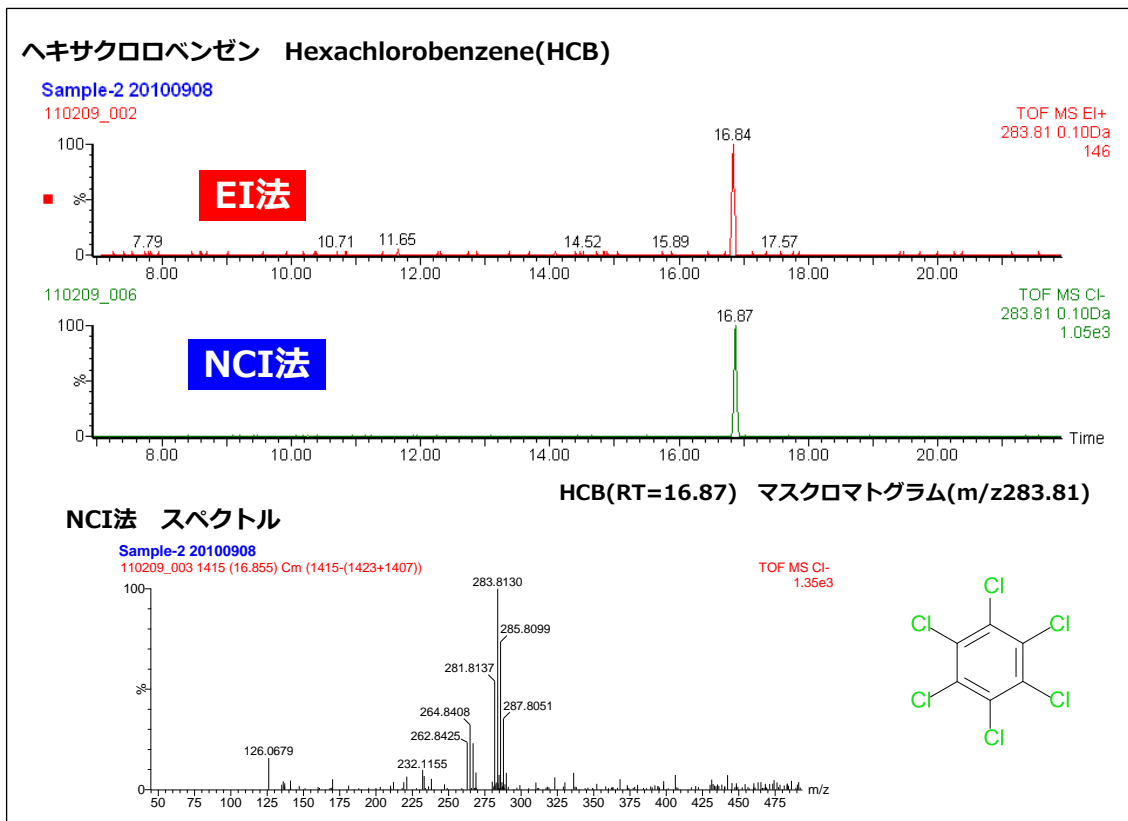
- ④プールされていた血液 試料及び本研究における被験者試料を用い、上記検討結果から設計した方法を適用し測定分析を行った。その結果いくつかの化学物質が検出された（図(3)-3-図(3)-7 EI（Electron Ionization）法, NCI（Negative Chemical Ionization）法）。特に PCT（ポリ塩化ターフェニル）は PCB より高濃度で検出され、新知見を得た。
- ⑤ブランク試験ではほとんどの化合物は検出されず、試料採取から前処理における外部汚染は問題ないことを確認した（図(3)-8）。
- ⑥血液中の化学物質濃度は低く、データ取得が困難である。そのため、前処理工程を追加するか検討する（ただし、前処理を追加すれば測定溶液中に回収できる化合物種類は減少する）。特に NCI 法で検出可能なターゲットに絞るか検討が必要である。（PCB は把握しつつ、PCB 以外の化合物を多く定量したい）。
- ⑦未同定化合物の定量の精確さ向上をいかに行うか？

測定前に対象化合物が決まっていないので、同位体を事前に添加することができない。また、被験者間濃度レベルの差に対して必要な分析の精度（ばらつき）を把握しなければならない。

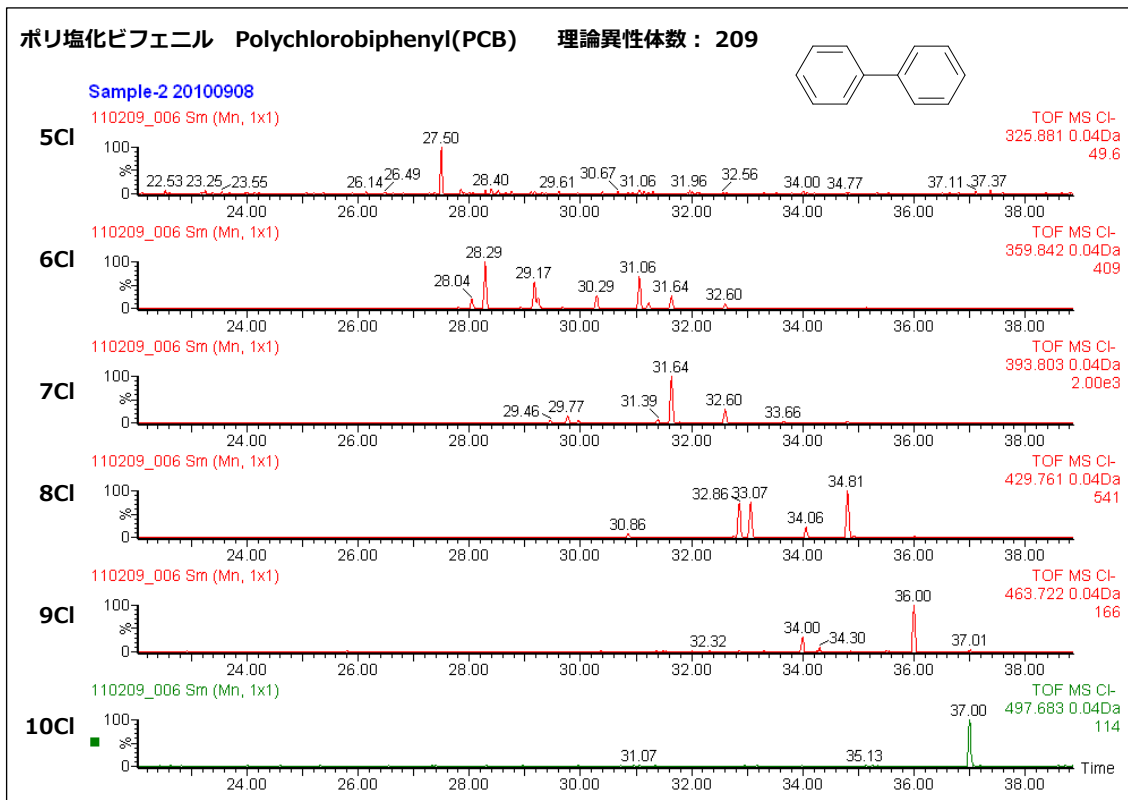


図(3)-3 血液試料 トータルイオンクロマトグラム の例

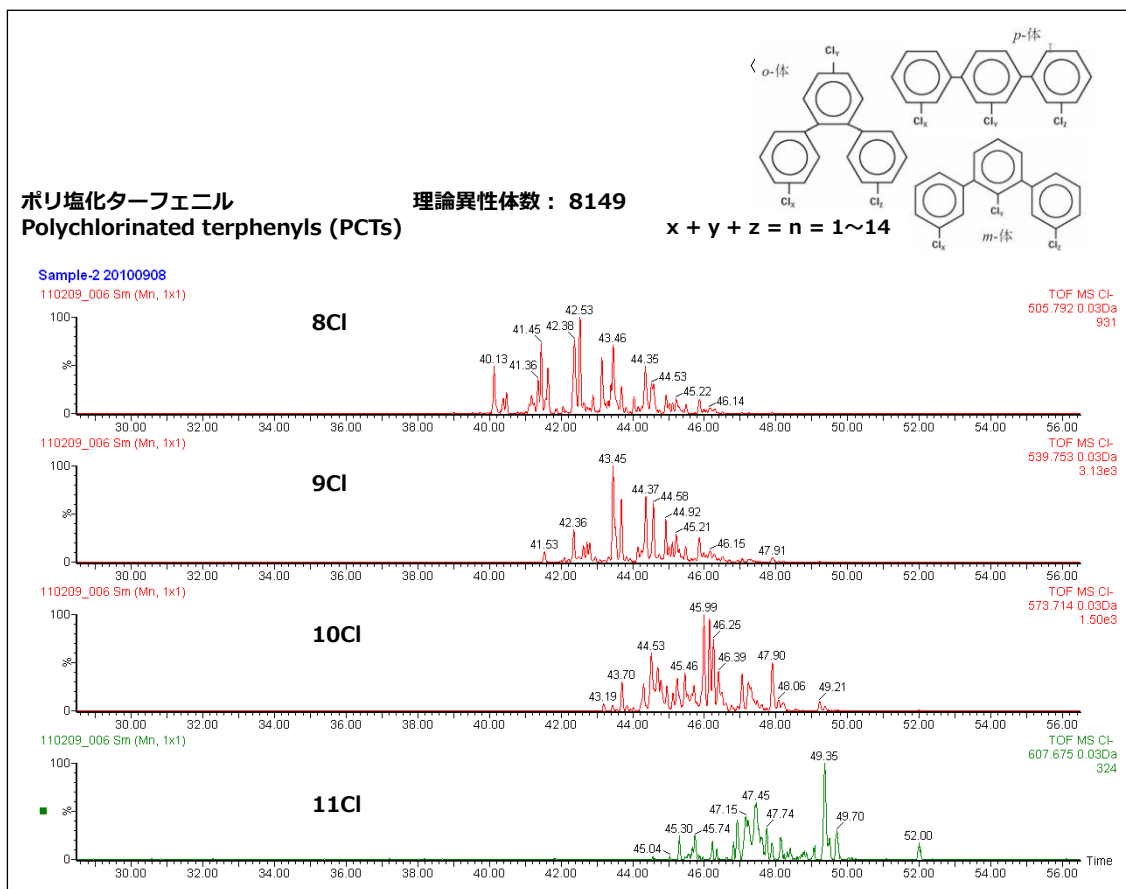
EI 法において検出されたほとんどの化合物は未同定（まだ報告されていない化合物であるという意味になる）横軸はリテンションタイム、縦軸は相対強度



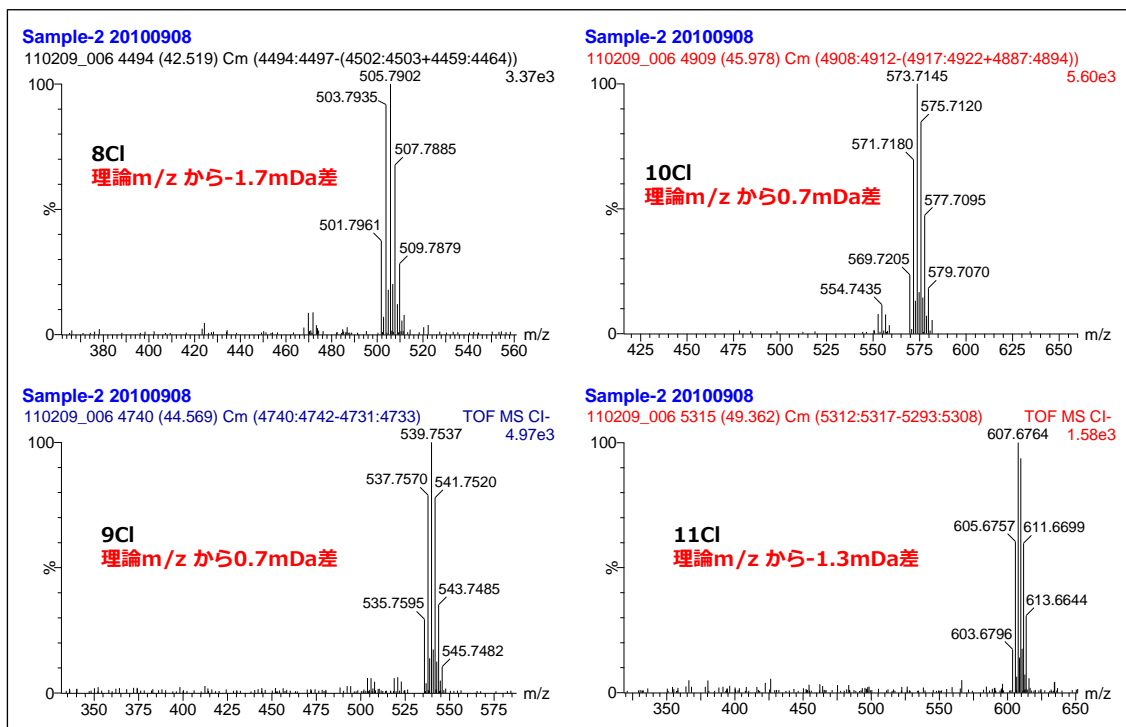
図(3)-4 血液試料の測定分析例 (HCB)



図(3)-5 血液試料の測定分析例 (PCB)

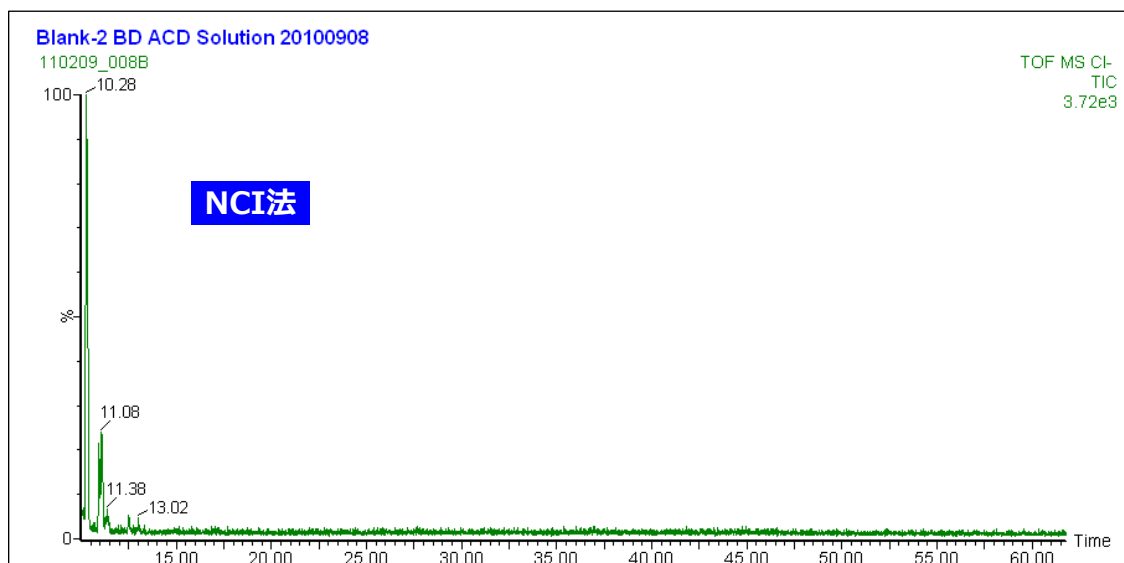


図(3)-6 血液試料の測定分析例 (PCT)



図(3)-7 血液中のポリ塩素化ターフェニル (PCT) 成分のスペクトル  
標準物質での同定はまだであるが、スペクトル解析の結果から考えてほぼ間違いない。





図(3)-8 ブランク試験におけるトータルイオンクロマトグラム

## (2) 乏精子症と正常精子患者血液を用いた網羅的化学品濃度の比較

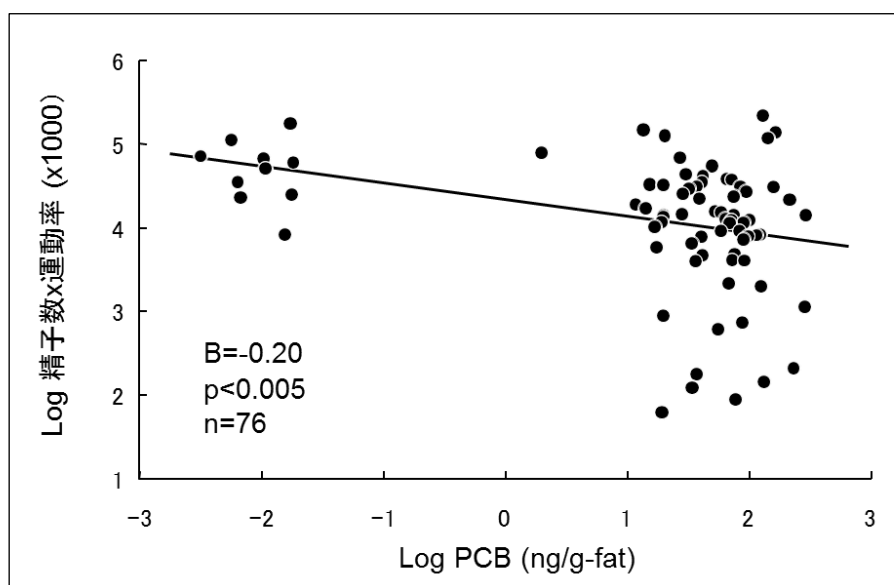
末梢血中の化学物質として、脂溶性化学物質をターゲットとし、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) に高分解能ガスクロマトグラフ (HRGC) あるいは包括的 2 次元ガスクロマトグラフ (Comprehensive GC:GCxGC) を組み合わせ網羅的な解析を行った。HRGC/TOFMS あるいは GCxGC/TOFMS は多くの化合物の同時測定が可能であり、また、未知の化合物が検出されれば、測定後にその物質を同定可能な場合も多い。症例と対照群の間で濃度差が見られる化学物質を明らかにした。その結果、多数の化学物質の同時検出に成功し、血液中ですべて初めて検出された化合物も多かった (図(3)-1、図(3)-3-図(3)-6)。

現在確認された有機物を以下に示す。

ポリ塩化ビフェニル (PCB: polychlorinated biphenyl の内 3~10 塩化物)、HCB (hexachlorobenzene;ヘキサクロロベンゼン)、HCH (hexachlorocyclohexane;ヘキサクロロシクロヘキサン)、DDE (dichloro-diphenyl-dichloroethylene;ジクロロジフェニルジクロロエチレン)、DDD (dichloro-diphenyl-dichloroethane;ジクロロジフェニルジクロロエタン)、DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethane;ジクロロジフェニルトリクロロエタン、dichloro-diphenyl-trichloroethane)、ヘプタクロル (heptachlor)、クロルデン (Chlordane)、オキシクロルデン (oxychlordane)、ノナクロル (nonachlor)、トキサフェン (toxaphene)、マイレックス (mirex)、ポリ臭化ジフェニルエーテル (PBDE: polybrominated diphenyl ether の内 4~6 塩化物)、ポリ塩素化ターフェニル (PCT: polychlorinated terphenyl の内 8~11 塩化物)

これらの化合物の中から、比較的濃度が高い PCB を選択し、GC-EI-TOFMS にて測定を行った。PCB の測定値は正規分布をしないことも知られていることから、統計学的な解析では母集団の分布などに正規分布などのある特定の分布を仮定しない手法 (ノンパラメトリックな方法) を用いるか、または PCB 濃度から 3 群に分割し解析を行った。以上の解析から血中 PCB と乏精子症との間に関連性が予想された (詳細は後述) ことから、PCB 異性体と精子数 x 運動率と

の関連性を検討した（図(3)-9）。運動精子数（精子数 x 運動率）との間に高い関連性が示されたのは PCB#118、#182+187、#180、#170 であったものの、PCB#74 を除きその他の異性体でも有意な関連性が示された。PCB 異性体同士の間でも高い関連性があり（データ示さず）、今回の解析結果から原因となる異性体を推定することは困難と考えられた。以上の結果から、血中 PCB 濃度が増加すると精子数 x 運動率などの指標が減少し、乏精子症の発生が増えることが示唆された。さらに、年齢、喫煙習慣などを調整して、次のサブテーマ 4 で検討した。



図(3)-9 血中 PCB と精子数 x 運動率の関連性

### (3) GC(GC<sub>x</sub>GC)-TOFMSによる取得データの例

生体試料にGC(GC<sub>x</sub>GC)-TOFMSを適用した報告例は極めて少ない。そこで、測定結果のアウトプットの例を図化していくつか示す。

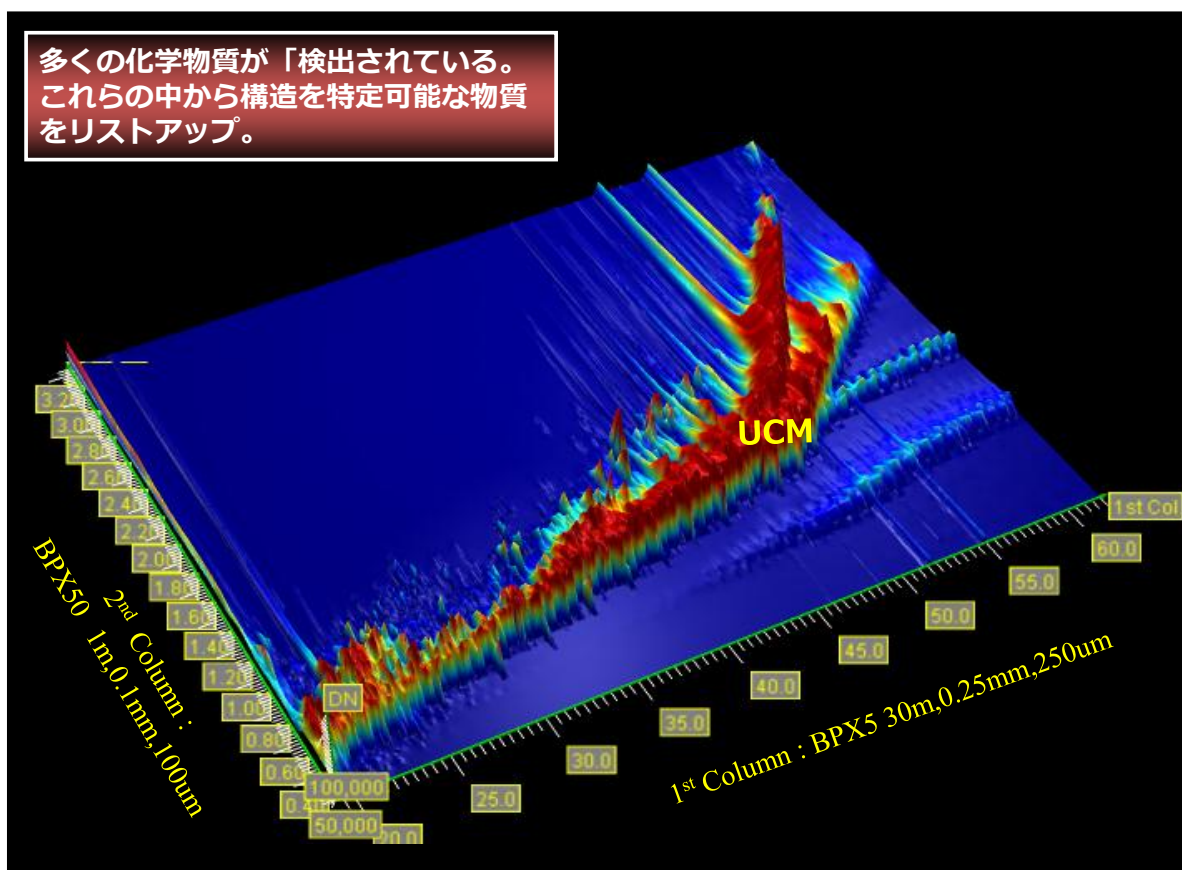
図(3)-10は、GC<sub>x</sub>GC-EI-TOFMSによるトータルイオンクロマトグラム（TIC）で、1stカラム及び2ndカラムの軸は、それぞれのカラムにおけるリテンションタイム（溶出時間）を示す。高さ方向は各クロマトグラムピークのレスポンス（絶対量）を示す（レスポンスは、青→水色→黄色→赤の順に大きい）。従来のGCではカラム1本での測定となるので、本図において1stカラム軸側から水平に見た時の分離状況が従来のGC分離能となる。本測定結果から、高い分離能で多くの化学物質が検出されていることがわかる。本クロマトグラムは、トータルイオンクロマトグラム（TIC）であるので、1stカラム及び2ndカラムの個々の座標について質量数情報が存在する（データ量が多くなる理由）。個々のクロマトグラムピークの帰属を知るためには、標準品等を用いた同定作業が必要である。ほとんどのピークは未同定であることもあり、UCM（Unresolved complex mixture）と表現されることがある。

図(3)-11は、PCBの標準物質を用いて、クロマトグラム出現位置を確認した結果である（2次元表示）。トータルイオンクロマトグラム（TIC）上にアサインした化合物（PCB）を表示してある。また、図(3)-12はPOPs系化合物の標準物質を用いて、クロマトグラム出現位置を確認した結果である（2次元表示）。図(3)-12では、化合物以外の質量数の結果は、フィルタリングにより除いてある。

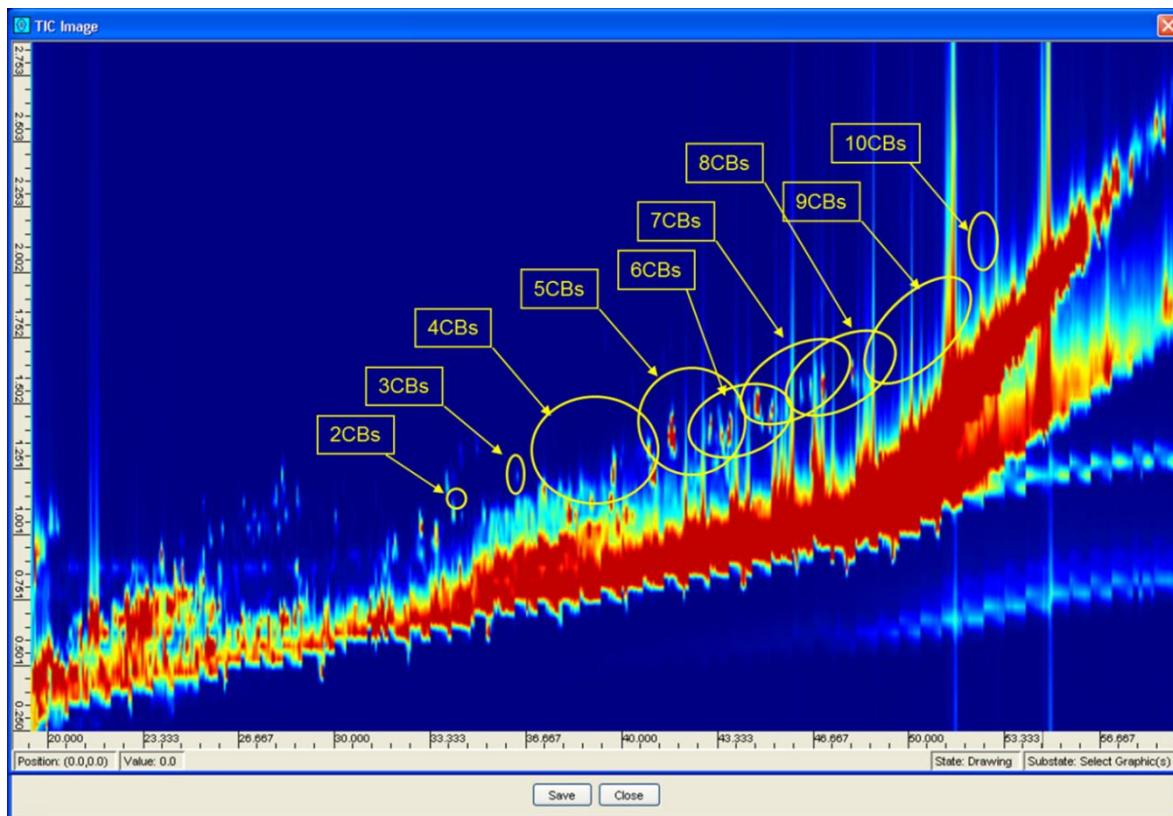
図(3)-13は標準物質による確認は終了してはいるが、マスペクトルパターン解析によって構造決定された化合物の例を示す。本研究において、2種類のリン系難燃剤、TCPP (Tris (2-Chloroisopropyl) Phosphate) 及びTDCP Tris (1,3-dichloro-2-propyl) Phosphateが検出された。

図(3)-14はイオン化法の違いによる結果の比較を示す。GCxGCでは多くの化合物が気化されイオン化室に導入されるが、複数のイオン化法によって測定することにより、単独のイオン化法に比べて多くの化合物を測定することができる。図(3)-14は同じ試料をEI及びNCIによって測定した結果である。NCIにおいては多くのUCMがイオン化されていないことがわかる。PCB及びPCT等の塩素化合物においては、塩素数の増加に伴い、NCIによる感度がEIによる感度より良い傾向が見られた（低塩素側ではEIの方が感度は良かった）。

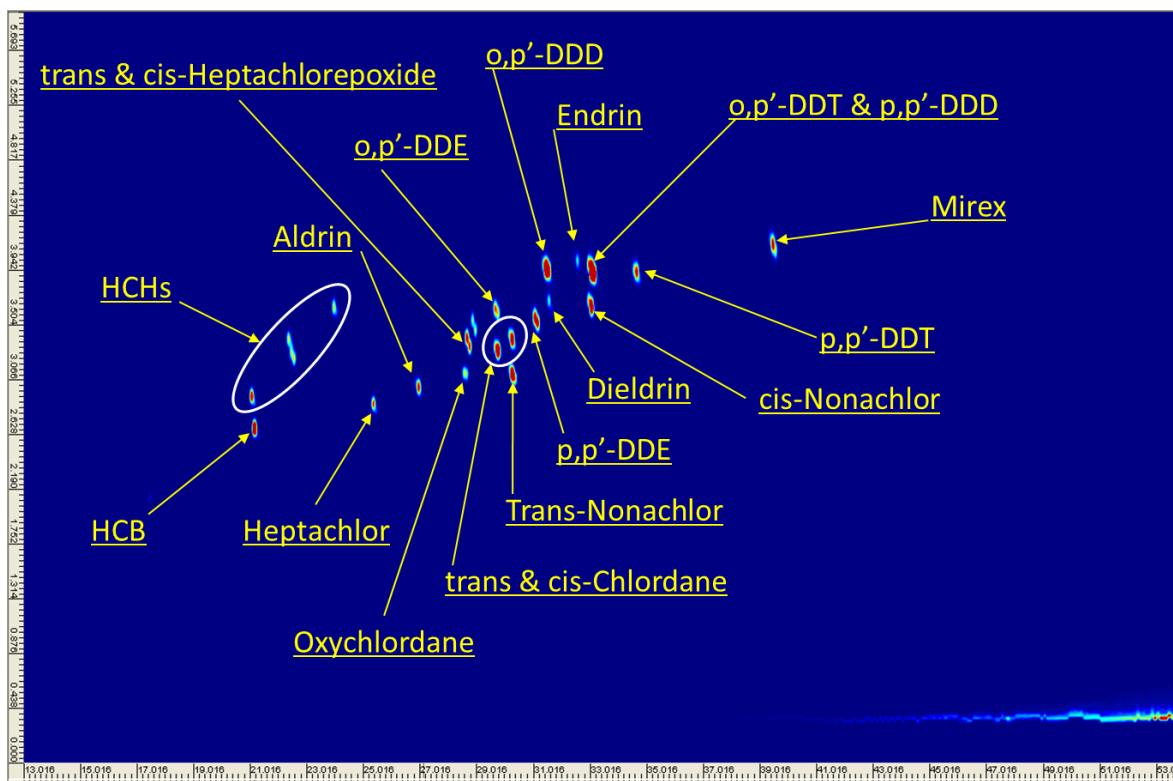
図(3)-15及び図(3)-16は、それぞれ正常精子群及び乏精子症群の被験者の血液を測定したクロマトグラムの一例である。POPs系化合物では、HCB、Trans-nonachlor及びp,p'-DDEが検出された。参考資料(4)-1-参考資料(4)-9に血液GCxGC測定結果を記載する。



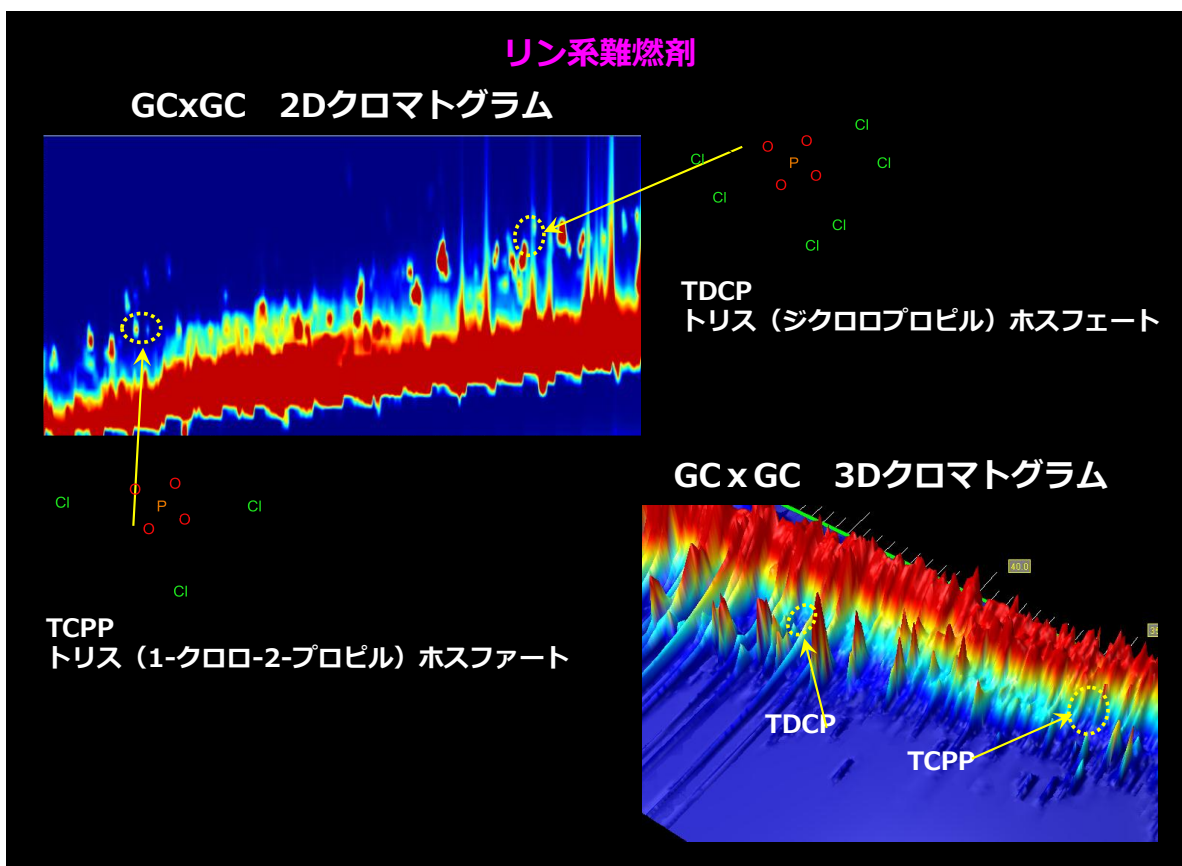
図(3)-10 GCxGC-EI-TOFMS による血液試料中の化学物質測定トータルイオンクロマトグラム(TIC)



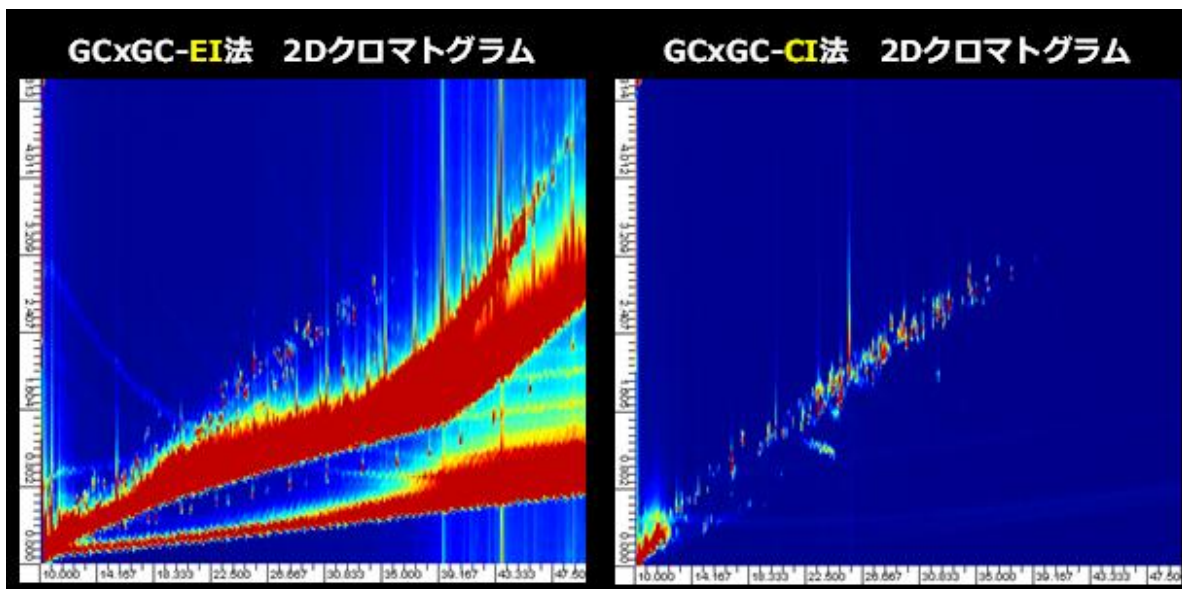
図(3)-11 GCxGC-EI-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定3次元クロマトグラム(PCB)



図(3)-12 GCxGC-EI-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定3次元クロマトグラム(POPs系化合物)

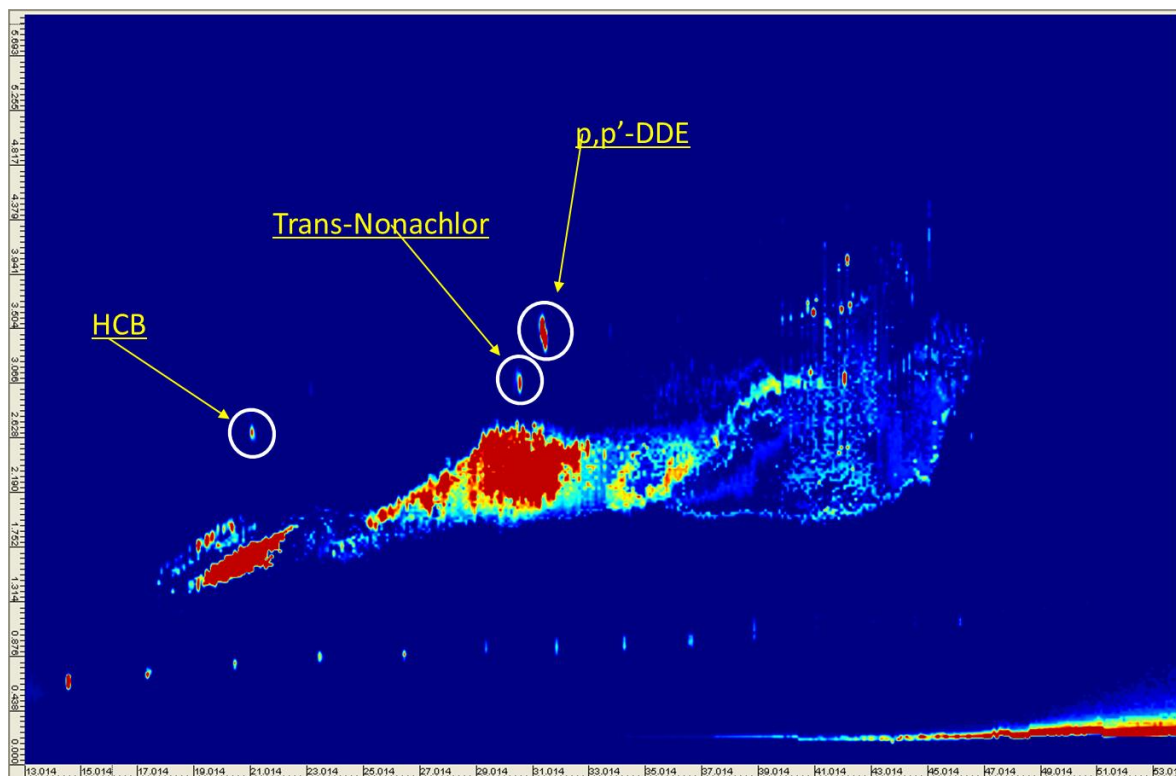


図(3)-13 GCxGC-TOFMS による血液試料中の化学物質測定 2 および 3 次元クロマトグラムの例

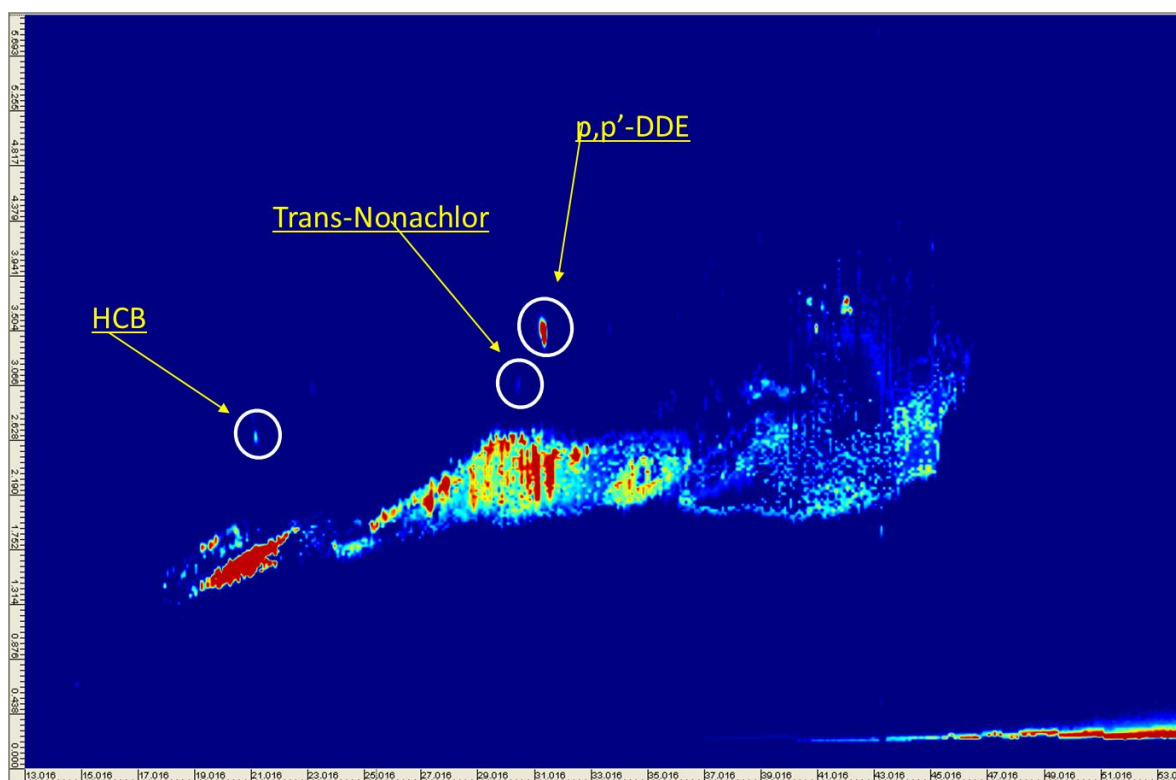


図(3)-14 GCxGC-TOFMS による血液試料中の化学物質測定 ーイオン化方法の違いによるー





図(3)-15 GCxGC-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定 Sample-No.244 (正常精子群)



図(3)-16 GCxGC-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定 Sample-No.573 (乏精子症群)

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

本研究では、化学物質測定系としては脂溶性化学物質をターゲットに、飛行時間型質量分析計 (TOFMS) に高分解能ガスクロマトグラフ (HRGC) あるいは包括的 2 次元ガスクロマトグラフ (Comprehensive GC:GCxGC) を組み合わせ網羅的な解析を行うことである。本法の開発は、不妊、特に男性不妊に関連する環境由来化学物質の関与について実証的なデータを提出することができる。不妊に関連する化学物質が明らかになった場合、そのリスク情報を提出する。また、包括的 2 次元 TOFMS 法による網羅的な化学物質の測定法は、他の生体試料にも適応が拡大できる。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

特定の化学物質の同定は、曝露回避に必要な行政的な基礎資料として、国民に提示することができ、このことにより、行政はリスク管理が可能となる。また、少子化対策、不妊症治療の技術向上と医療行政に貢献できる。また、化学物質曝露回避のための食行動について、実証的なデータを添えて国民に提示可能となる。不妊症および、成人男性への食育に有用な情報を提供できる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文 (査読あり) >

特に記載すべき事項はない

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

#### <その他誌上発表 (査読なし) >

特に記載すべき事項はない

### (2) 口頭発表 (学会等)

1) 松村 徹：第 22 回環境化学討論会 (2013)

「GCxGC-TOF/MS を用いたヒト血液中の有機化学物質測定」

**(3) 出願特許**

特に記載すべき事項はない

**(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）**

特に記載すべき事項はない

**(5) マスコミ等への公表・報道等**

特に記載すべき事項はない

**(6) その他**

特に記載すべき事項はない

**8. 引用文献**

特に記載すべき事項はない



#### (4) 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究

東北大学大学院 医学系研究科 有馬隆博・仲井邦彦

平成 22～24 年度累計予算額：423 千円  
(うち、平成 24 年度予算額：205 千円)

予算額は、間接経費を含む。

##### [要旨]

本研究では、乏精子症の症例群と対照群の化学物質ばく露量と精子性状（精子形態学およびエピゲノムによる質的評価）について、その関連性を多変量解析法で行った。その際、年齢、喫煙、BMI、教育歴、栄養素、食物摂取頻度、生活習慣といった交絡要因について補正を行った。化学物質ばく露の評価は網羅的解析手法を応用したが、そのうちポリ塩化ビフェニル (PCB) に着目して解析を行った。

その結果、精子正常群と乏精子群では、乏精子群では喫煙するものが多く、年齢、BMI、教育歴に統計学的有意な差は認められなかった。インプリント異常数は乏精子群でやや高い傾向が観察されたものの、統計学的に有意ではなかった。「インプリント異常」をインプリント異常が 2 つ以上観察された場合と定義した場合、精子正常群と乏精子群の分類との間に、有意ではないものの関連性 ( $p=0.0667$ ) が観察された。血中 PCB 濃度は、年齢、奇形率と正に関連し、精子数、運動率、精子数 x 運動率との間に負の関連性が示された。共変量として年齢と喫煙習慣 (Model2)、年齢、喫煙習慣、教育歴 (Model3)、年齢、喫煙習慣、教育歴およびインプリント異常の別 (Model4) でも同様な傾向が認められた。PCB と精子性状との間には負の関連性が観察されることは先行研究で一致した見解であるが、本研究での解析からも、血中 PCB と乏精子症との間に関連性があることがあらためて確認された。また PCB 異性体同士の間には高い関連性が認められ、今回の解析結果から原因となる異性体を推定することは困難と推測された。

[キーワード] 症例・対照試験、リスク評価、精子減少、環境化学物質、PCB

##### 1. はじめに

低用量の環境由来化学物質（以降、化学物質）の長期ばく露は、ヒトの生態（生殖細胞）系および性腺に対して深刻な影響を及ぼす危険性をはらんでおり、ヒトへの影響を明らかにすることは環境保全上の重要な課題であり、早急な対応が求められている。中でも環境残留性とヒトへの強い有害性が問題となっている PCB や DDT には内分泌かく乱作用があり、性比や精子数の減少に影響を与えることが議論を呼んでいる。また、臭素化物系の難燃剤もばく露レベルの増加が懸念されている。このような化学物質のヒト健康影響を評価するためには、動物やヒト細胞などを用いた実験の知見に加えて、ヒトそのものを対象とする疫学研究による検証が不可欠と考えられる。

PCB と精子性状の関連性については、多くの先行研究が報告されており、PCB ばく露に伴い、

精子数の現象、運動率の低下等多くの報告がある<sup>1-7)</sup>。ただし、これらは PCB などの単一の化学物質に着目した報告であり、多様な化学物質を対象とした網羅的な研究はない。また低用量域におけるばく露影響に関する報告は胎児期や新生児期を対象としたものが多い。その理由として胎児期および新生児期は中枢神経系が発達する時期であり、化学物質ばく露に対して感受性が高いことが挙げられる。また、妊娠女性や妊娠を予定している女性についての研究はあるが、男性や父親を対象に検討した研究は報告数も少ない。そのため、父親へのばく露やヒト精子への影響に関してはまだ明確ではない部分が多く、それらを明らかにするために男性やヒト精子を対象とした疫学的研究が求められている。

## 2. 研究開発目的

本研究では、成人男性末梢血内の化学物質濃度とヒト精子形成への影響について、形態と機能の両面から解析を行い、交絡要因を十分考慮しながら関連性を評価することを目的とする。

本サブテーマでは、(1)症例対照試験の実施・患者登録に関する研究、(2)エピゲノム解析(精子)に関する研究、(3)環境化学物質の測定・網羅的 TOF-MS 解析の結果をもとに(4)症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究を行った。研究体制を図(4)-1に示す。



図(4)-1 研究体制

## 3. 研究開発方法

PCB の測定値は正規分布をしないことが知られていることから、統計学的な解析ではノンパラメトリックの手法を用いるか、または PCB 濃度から 3 群に分割し解析を行った。血中 PCB 濃度と乏精子との関連性については、名義ロジスティック回帰分析により解析を実施した。パラメトリックな解析を行う場合は、対数変換を行って解析に使用した。血中 PCB 濃度とヒト精子(連続変数)との関連性については、共分散分析、重回帰分析ならびに共分散構造分析等の手法を用いて解析した。共分散構造分析では、単回帰分析や重回帰分析で得られた結果を参考にモデルを作成し、血中 PCB がヒト精子に及ぼす影響を調べた。以上の多変量解析に際しては、年齢、教育歴、BMI、喫煙や生活習慣などの交絡要因について補正を行った。統計学的な有意差は 5%危険率を採用した。

#### 4. 結果及び考察

精子正常群と乏精子群について、血中 PCB の分析を実施した 90 名分について、基本属性を表(4)-1 に示した。乏精子群では喫煙するものが多く、一方で年齢、BMI、教育歴には両群間に統計学的に有意な差は認められなかった。インプリント異常数は乏精子群でやや高い傾向が観察されたものの、統計学的に有意ではなかった。

GC-TOFMS による PCB 分析は半定量的な分析と考えられる。表(4)-2 で「PCB 検出率」とはいずれかの PCB 異性体で検出下限値よりも大きなデータが得られた場合の割合を示した。乏精子群では 53 件中 52 件で検出されたのに比較して、精子正常群では 37 件中 26 件であり、PCB の値について統計学的にも有意な差が認められた ( $p=0.0001$ )。また、仮に検出下限値以下について下限値の半値を代入して計算しても同様に乏精子群で高い値が観察された (表(4)-1)。

表(4)-1 血中 PCB とその他の属性との関連性

	精子正常群	乏精子群	
人数	37	53	p
年齢 (year)	36.1±5.5	37.1±5.6	0.42
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24.8±3.7	24.1±3.1	0.37
喫煙習慣あり*	18.8%	40.9%	0.048
教育歴 (大学卒業以上)	46.0%	41.5%	0.68
精子数 (単位)	111.7±77.3	25.4±22.5	< 0.0001
運動率 (%)	57.1±13.9	36.1±18.4	< 0.0001
精子数 x 運動率 (単位)	62.5±43.9	7.9±6.0	< 0.0001
奇形率	54.5±9.2	64.5±10.8	< 0.0001
インプリント異常数	1.8±3.2	3.4±5.0	0.090
PCB (ng/g-fat)	35.5±46.5	72.7±43.2	0.0002
PCB 検出率	70.3%	98.1%	0.0001

平均±SD。n=90、喫煙データについては n=76。

PCB 分析で、検出下限値 (=0.1) 以下はその半値 (=0.05) を代入して計算した。

PCB 検出率は、検出下限値以上となるデータが得られた検体数の割合を示した。

統計解析は t-test または  $\chi^2$  検定による。

なお、インプリント異常群をインプリント異常数から定義したが、インプリント異常が 1 つでも観察された場合を「インプリント異常」と定義した場合、インプリント異常群は 90 名中 54 名であり、精子正常群と乏精子群の分類との間 ( $2 \times 2$  の  $\chi^2$  検定) に有意な関連性は認められなかった。一方、「インプリント異常」をインプリント異常が 2 つ以上観察された場合と定義した場合、インプリント異常群は 37 名であった。精子正常群と乏精子群の分類との間に、有意ではないものの関連性 ( $p=0.0667$ ) が観察された。以後、インプリント異常群は「インプリント異常が 2 つ以上観察された場合」とした。

血中 PCB 濃度とその他の属性との関連性について、まずパラメトリックな解析を実施し、概要を表(4)-2 にまとめた。PCB は、年齢、奇形率と正に関連し、精子数、運動率、精子数 x 運動率との間に負の関連性が示された。喫煙については、喫煙歴から Brinkman index を計算し検討してみたが、PCB との間には関連性は見られなかった。インプリント異常数についても関連性は認められなかったが、インプリント異常数と精子数または精子数 x 運動率との間には高

い相関が観察された（データ示さず）。

表(4)-2 血中 PCB 濃度とその他の属性との関連性（Spearman の順位相関係数）

	相関係数	p
年齢（year）	0.35	0.0008
BMI（kg/m <sup>2</sup> ）	0.11	0.32
Brinkman index	0.041	0.73
精子数（単位）	-0.35	0.0007
運動率（％）	-0.42	< 0.0001
精子数 x 運動率（単位）	-0.43	< 0.0001
奇形率	0.24	0.03
インプリント異常数	0.029	0.79

Brinkman index は、喫煙期間（年）と一日当たりの喫煙本数から算出した。過去に喫煙していて、検査時は喫煙していなかった場合は、喫煙期間で計算した。

調査協力者を PCB 濃度から 3 群に分割し、正常精子群・乏精子症群との関連性について解析を行った。なお、喫煙習慣の変数を共変量として用いた場合に、質問票データの欠損から解析に用いるサンプル数が減少した。このため解析モデルごとに結果を示した。まず表(4)-3 上段に示すように、共変量として年齢のみを投入した場合（Model1）、血中 PCB 濃度が増加すると乏精子症の発生が増加した。さらに、共変量として年齢および喫煙習慣（Model2）、年齢、喫煙習慣および教育歴（Model3）、年齢、喫煙習慣、教育歴およびインプリント異常の別（Model4）を加えて解析を行っても、同様な傾向が認められた。

次に、インプリント異常の有無を目的変数とし、血中 PCB 濃度との関連性を検討したが、喫煙習慣を共変量として投入すると、PCB とインプリント異常との関連性は認めることができなかった。

表(4)-3 血中 PCB 濃度と乏精子群との関連性（名義ロジスティック回帰分析）

	血中 PCB			P-trend
	低値群	中等度群	高濃度群	
人数	30	30	30	
乏精子者数	8	19	26	
Model1	1.00 (reference)	4.81 (1.65-15.2)	22.4 (5.78-111.5)	< 0.001

	血中 PCB			P-trend
	低値群	中等度群	高濃度群	
人数	25	25	26	
乏精子者数	7	15	22	
Model2	1.00 (reference)	3.78 (1.15-13.5)	16.1 (3.91-82.4)	< 0.001
Model3	1.00 (reference)	4.10 (1.20-15.1)	17.5 (4.13-95.1)	< 0.001
Model4	1.00 (reference)	3.22 (0.89-12.5)	17.3 (3.95-98.7)	< 0.001

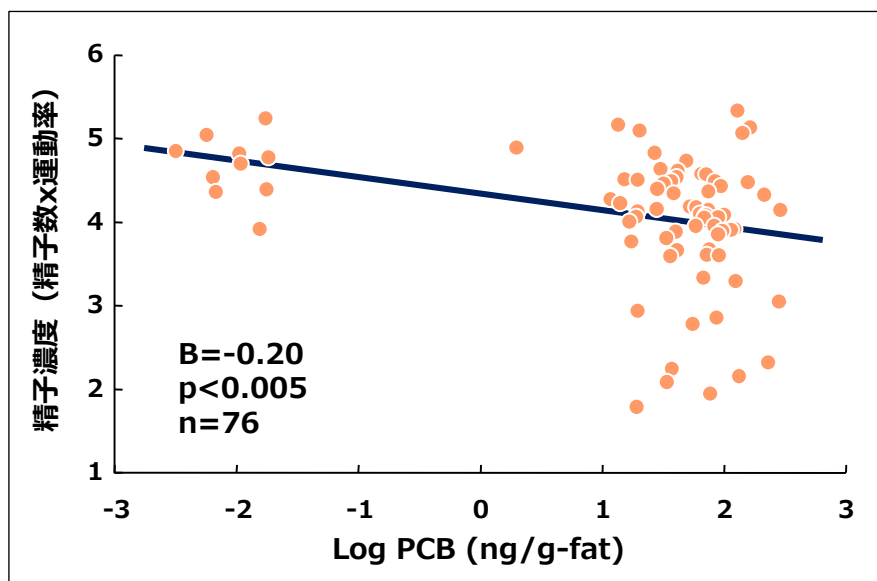
Model1：年齢による補正

Model2：年齢、喫煙習慣による補正

Model3：年齢、BMI、喫煙習慣、教育歴による補正。

Model4：年齢、BMI、喫煙習慣、教育歴、インプリント異常による補正

次に、パラメトリックな解析を実施した。PCB 濃度について、検出下限値以下の場合を検出下限値 (=0.1  $\mu\text{g/g}$ ) の半値を代入して、重回帰分析を行った結果を参考までに図(4)-2 に示した。目的変数は精子数 x 運動率、説明変数は血中 PCB とし、いずれも対数変換して用いた。共変量として、年齢、BMI、喫煙習慣を投入した。PCB と精子数 x 運動率の間には負の関連性が認められ ( $B=-0.19$ 、調整  $\beta=-0.327$ 、 $p=0.005$ )、PCB 濃度が増加すると、精子数が減少した。図には示さないが、喫煙習慣の有無でも精子数 x 運動率の間に差が認められ ( $B=0.23$ 、調整  $\beta=0.264$ 、 $p=0.026$ )、PCB (血中濃度が 10 倍となる影響) と喫煙習慣 (非喫煙と喫煙の 2 群間) の影響の大きさを比較すると、PCB ばく露の影響の方が大きいことが示唆された。



図(4)-2 血中 PCB と精子数 x 運動率の関連性

共変量として年齢、BMI、喫煙習慣 (喫煙/非喫煙)、学歴 (大学卒以上) として重回帰分析を行った。

以上のように血中 PCB と乏精子症との間に関連性が認められたことから、精子の性状と最も密接に関連する PCB 異性体を検討する目的で、PCB 各異性体と精子数 x 運動率との関連性を検討した (表(4)-4)。解析は、Spearman の順位相関係数によった。精子数 x 運動率との間に高い関連性が示されたのは PCB#118、#182+187、#180、#170 であったものの、PCB#74 を除きその他の異性体でも有意な関連性が示された。PCB 異性体同士の間でも高い関連性があり (データ示さず)、統計学的な共線性も指摘された。いずれかの PCB 異性体が原因物質であると推測されるものの、生体中では PCB の物性から多くの異性体が類似した体内動態を示すと考えられ、今回の結果から原因となる異性体を推定することは困難と考えられた。

表(4)-4 PCB 異性体と精子数 x 運動率との関連性 (Spearman の順位相関係数) (n=90)

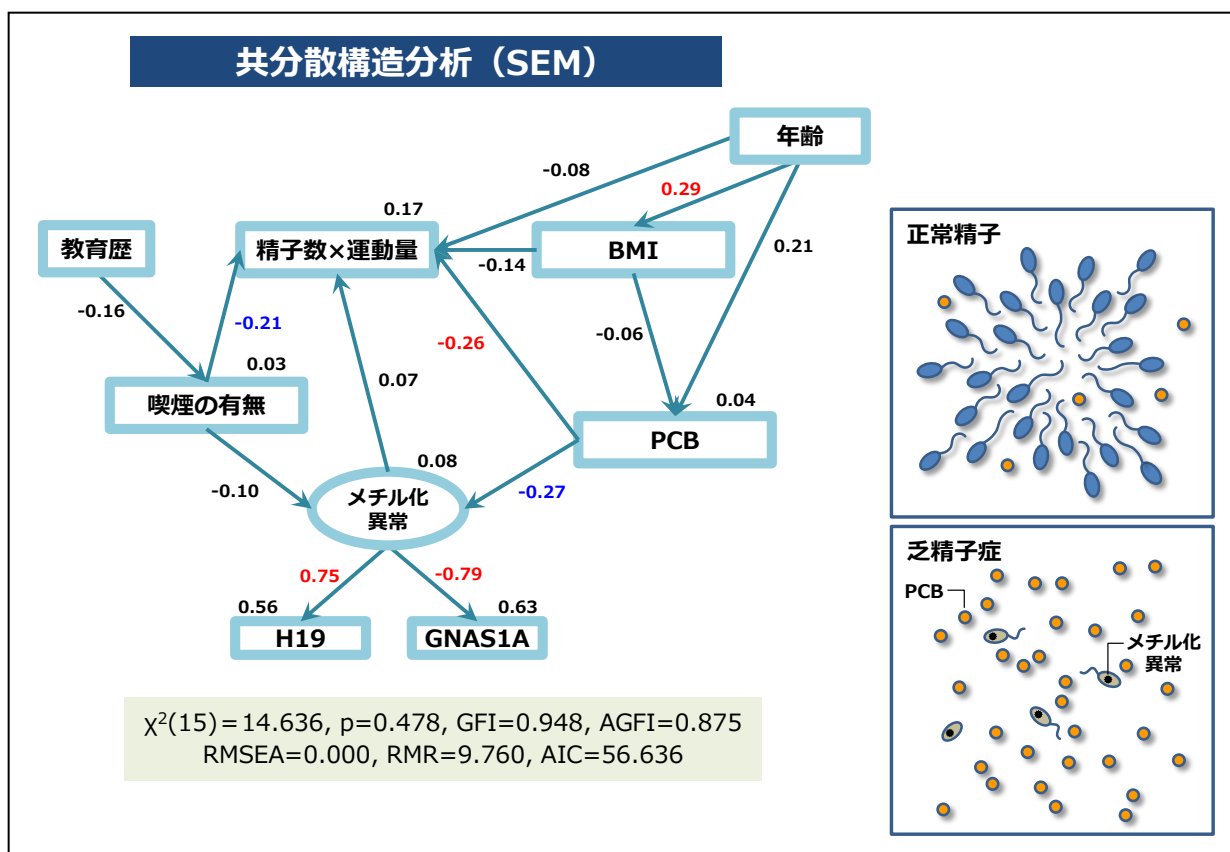
	相関係数	p
PCB#74	-0.120	0.26
PCB#66,80	-0.251	0.017
PCB#99	-0.397	0.0001
PCB#118	-0.461	< 0.0001
PCB#153	-0.392	0.0001
PCB#163,164	-0.284	0.007
PCB#138	-0.287	0.006
PCB#182,187	-0.524	< 0.0001
PCB#180	-0.420	< 0.0001
PCB#170	-0.486	< 0.0001
Total	-0.426	< 0.0001

以上の結果から、血中 PCB 濃度が増加すると精子数 x 運動率などの指標が減少し、乏精子症の発生が増えることが示唆された。年齢、喫煙習慣などを調整しても関連性は一貫したものであり、男性不妊において PCB ばく露の重要性が示唆された。また、この知見は、PCB と精子性状に関する先行研究の結果ともよく一致するものと考えられた。

なお、精子数 x 運動率は他の分担研究報告書で触れられているように、メチル化異常とも密接と推測される。PCB とメチル化異常との関連性について検討が必要である。さらに、年齢について、加齢そのものが精子の性状を低下させる要因と考えられる一方で、PCB は脂溶性化学物質であることから、PCB も年齢とともに体内蓄積量は増加することが知られている。このように共線性が想定されることから、共分散構造分析による総括的な検討を試みた (図(4)-3)。

血中 PCB 濃度が精子数 x 運動量に及ぼす影響を検証するために、いくつかのモデルを構成し、共分散構造分析を行った。単回帰分析や重回帰分析の結果から、仮説的なモデルを幾通りか想定し分析を行った。図(4)-3 のモデルは、メチル化異常という構成概念 (潜在変数) が外生変数としてあり、血中 PCB 濃度、精子数 x 運動量、喫煙等の潜在変数から構成される。これまでに血中 PCB が精子数 x 運動量に、喫煙が精子数 x 運動量に、年齢および BMI が PCB に、教育歴が喫煙の有無にそれぞれ影響することがわかっている。そこで、先行研究の結果も踏まえ図(4)-3 のようなモデルを作成した。これらの潜在変数はそれでは説明しきれない残差からなるとするモデルである (図中では残差については削除した)。まず、モデルの適合度についてみると、 $\chi^2$  二乗値は 14.636 で確率は 0.478 であり、仮説となるモデルを棄却しないとする値が得られた。また、GFI (goodness-of-fit、飽和モデルでの全分散が推定モデルでの分散でどれだけ説明できたか) および AGFI (Adjusted Goodness of Fit Index、自由度調整済み決定係数) は基準となる 0.85 以上の数値が得られた。また、AGFI よりも GFI の方で数値が 1 に近かった。RMSEA (Root Mean Square Error of Approximation) も基準となる 0.05 よりも小さい値が得られた。RMR (残差平方平均平方根) は 0 に近いほど良いとされるが、十分に小さい値であった。赤池情報量規準 (AIC) は他の仮定されたモデルと比較することが多いが、図(4)-3 が最も小さな値であった。以上より、仮説として立てたモデル (図(4)-3) は適合していると判断できる数値を示した。次に、変数間の関連性についてみると、血中 PCB 濃度は精子数 x 運動量との間

に負の関連性が再確認され、PCB 濃度が上昇すると精子数 x 運動率が減少することが確認された。血中 PCB 濃度が高い場合にメチル化異常が増えると予想したものの、実際には負の関連性が認められた。化学物質ばく露とメチル化制御の間に密接な関係があることが示唆されたものの、メチル化異常と精子数 x 運動率の間には有意な関連性は認められなかった。年齢が上がると精子数 x 運動量が減少すると考えられたが、本研究の結果によると、年齢が上がると血中 PCB 濃度が高くなり、そのために精子数 x 運動量が減少すると解釈され、年齢が直接的に精子数 x 運動量に影響を与えるというよりは PCB を介した場合に影響力が大きいことがわかり、間接的な影響を示唆した。喫煙に着目すると、教育歴が高い場合に喫煙している人の割合は少なく、喫煙をしている場合に精子数 x 運動量が減少することが示された。ところが、喫煙の有無はメチル化異常には影響をおよぼさない可能性が示された。図(4)-3 ではメチル化異常を説明する変数として H19 および GNAS1A が選択された。ただし、重相関係数の平方 (R<sup>2</sup>) が 0.08 と小さい値であることから説明はほぼ出来ていないことがわかる。そのため、メチル化異常を説明するために他の変数を投入したモデルも作成したが、モデルの適合度が適合しなかった。今後、サンプル数を増やして、再度解析を行う必要があると考える。それにより、メチル化異常と精子数 x 運動量の関係や PCB や喫煙がメチル化異常に及ぼす影響をさらに明確に説明することが可能となると期待される。



図(4)-3 共分散構造分析 (SEM)

本研究を解析する上で、以下の点は今後の課題と考えられる。PCB 分析を実施できたのはまだ 90 件にとどまっており、統計学的な解析を行う上でサンプル数をさらに増やすことが必要と考えられた。喫煙習慣に関するデータが一部欠落しており、サンプル数が減少した。また、不妊と診断されたのちに生体試料の採取を行った。もし調査協力者が受胎のため夫婦で食生活などの変更を行い、魚摂取量などを増加させていた場合には血中 PCB 濃度が増加する可能性があり、因果の逆転などを考慮すべきとも考えられる。横断調査で検証する上での大きな制約の一つと考えられた。PCB 濃度が増加すると、メチル化異常も増加するものと推測されたが、結果は逆転した。このメカニズムについては明らかではない。

今回の統計学的な解析では、GC-TOFMS にて化学物質の測定を実施したが、ピークを同定でき、また測定値として比較的高い値が得られた PCB のみを用いて解析を実施した。今後、未同定のピークまたは PCB 以外についても同様な解析を行うことが必要と推測された。ただ、やはりサンプル数が大きな制限であると考えられた。

## (1) 科学的意義

### 1) 精子所見とエピゲノム解析と化学物質の測定の関連

不妊、特に男性不妊に関連する環境由来化学物質の関与について、まだ PCB に関するものであるが、実証的なデータを提出することができた。我が国では PCB と男性不妊に関する知見はまだ多くはない。PCB ばく露が不妊に関連することをあらためて示す結果と考えられた。PCB については、小児への影響がクローズアップされているが、成人でもリスク管理が必要となるものと推測された。

### 2) (食)生活習慣との関連性

今回の調査では、喫煙や加齢の影響を明示することはできなかった。特に、加齢は PCB 濃度の増加を介して精子性状に影響するという結果が示唆された。PCB は主に魚介類の摂取を介して体内に取り込まれる化学物質である。化学物質ばく露回避のための食行動について、特に、成人男性への食育に資する情報がさらに必要になるものと考えられた。

## (2) 環境政策への貢献

### <行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない

### <行政が活用することが見込まれる成果>

特定の化学物質の同定は、曝露回避に必要な行政的な基礎資料として、国民に提示することができ、このことにより、行政はリスク管理が可能となる。また、少子化対策、不妊症治療の技術向上と医療行政に貢献できる。また、化学物質曝露回避のための食行動について、実証的なデータを添えて国民に提示可能となる。不妊症および、成人男性への食育に有用な情報を提供できる。



## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文（査読あり）>

特に記載すべき事項はない

#### <査読付論文に準ずる成果発表>

特に記載すべき事項はない

#### <その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

### (2) 口頭発表（学会等）

特に記載すべき事項はない

### (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

### (4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない

### (5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

### (6) その他

特に記載すべき事項はない

## 8. 引用文献

1) Hauser R. Semin Reprod Med, 24, 156-67 (2006)

“The environment and male fertility: recent research on emerging chemicals and semen quality”

2) Jurewicz J, Hanke W, Radwan M, and Bonde JP: Int J Occup Med Environ Health, 22, 305-29 (2009)

“Environmental factors and semen quality”

3) Hauser R, Chen ZY, Pothier L, Ryan L. and Altshul L: Environ Health Perspect, 111, 1505-11 (2003)

“The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p’ -DDE”

- 4) Pant N, Mathur N, Banerjee AK, Srivastava SP. And Saxena DK: *Reprod Toxicol*, 19, 209–214 (2004)  
“Correlation of chlorinated pesticides concentration in semen with seminal vesicle and prostatic markers”
- 5) Pant N, Kumar R, Mathur N, Srivastava SP, Saxena DK. and Gujrati VR: *Environ Toxicol Pharmacol*, 23, 135–139 (2007)  
“Chlorinated pesticide concentration in semen of fertile and infertile men and correlation with sperm quality”
- 6) Meeker JD and Hauser R: *Syst Biol Reprod Med*, 56, 122-31 (2010)  
“Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Male Reproduction”
- 7) McAuliffe ME, Williams PL, Korrick SA. And Altshul LM: *Environ Health Perspect*, 120, 535-40 (2012)  
“Perry MJ, Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE and sperm sex-chromosome disomy”

## Case-control Study on Epigenetic Alteration of Human Sperm of Environmental Chemical Disrupters

Principal Investigator: Takahiro ARIMA

Institution: Department of Informative Genetics, Environment and Genome  
Research Center, Tohoku University, Graduate School of  
Medicine  
2-1 Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai-City 980-8575, JAPAN  
Tel: 022-717-7844 / Fax: 022-717-7063  
E-mail: tarima@med.tohoku.ac.jp

Cooperated by: St, Luke Clinic, IDEA Consultants, Inc.

[Abstract]

Key Words: Human sperm, Epigenetics, DNA methylation, Environmental chemical disrupters, Genomic imprinting

Male factors are associated with infertility in about 40% frequency. Epigenetic modification, especially during germ cell is vulnerable and influenced by the environment and chemical disrupters. Genomic imprinting is regulated with epigenetic DNA methylation and the allele-specific expression of certain genes accounts for the requirement for both maternal and paternal genomes in normal development. This DNA methylation, the aberrant expression of several imprinted genes has been linked to a number of diseases, developmental abnormalities, malignant tumors, the life-style disease, mental diseases and the male sterility in humans. Recent studies have identified a small amount of chemical substance(s) by the methods of combination of TOF-MS and the Comprehensive GCxGC method. With these methods, we identified some chemical substances in the patients of infertile male. We found PCB (poly chlorinated biphenyl) and PCB isoforms.

DNA methylation analyses have largely been superseded by the methods involving the sodium bisulphite treatment of genomic DNA which converts unmethylated cytosine to uracil leaving the methylated cytosines unconverted. Recently, we have developed as a high-throughput, high-resolution PCR-Luminex method to be applied to the measurement of DNA methylation ratio. We found abnormal methylation in the sperms in severe oligospermia, 74.1% (20/27) showed the methylation imprint errors.

In this research, we aim to clarify the effects of chemical substance(s) exposure on

genomic imprinting in human sperm by the new technologies, a combination of TOF-MS and the Comprehensive GCxGC method to analyze chemical substance(s) and new PCR-Luminex methylation analyses method. We confirmed these technologies and analyzed the blood and sperm in the infertile men. We found the patient of oligospermia is associated with the higher concentration of PCB and PCB isoforms than that of normal sperm. This tendency does not have effect on the age, the history of smoking and education etc.

The result is expected to contribute to the prevention and the development of the new treatment methods of many diseases in adults (cancers, mental diseases, male infertility and life-style diseases) in the future.

## 参考資料(1)-1

健康と日常生活についてのアンケート

記入日 年 月 日

居住地 県 (市・町・村)

あなた自身の一般的な事柄についてお聞きします。以下の質問に順番に答えてください。  
 答えは当てはまるものに○をつけるか、必要なところは数字を記入してください。

身長は？

( ) cm

体重は？

( ) kg

年齢は？

( ) 歳

一日の平均睡眠時間は？

( ) 時間

最終学歴は？

( )

職業は？(仕事は？) (詳細に…仕事内容がわかるように書いてください。)

( )

年収は？(だいたい良いです。)

( )

趣味は？ 1.ある ( ( ) 内に記入してください。 ) 2.なし

( )

習慣は？ 1.ある ( ( ) 内に記入してください。 ) 2.なし

( )

軽く汗をかく運動をしますか？

1.はい 2.いいえ

1.はい と答えた方、週に運動量はどのくらいですか？

週 ( ) 回、( ) 分程度

疲れやすいですか？

1.はい 2.いいえ 3.わからない

農薬(殺虫剤を含む)を扱う職業に携わったことがありますか？

1.はい 2.いいえ 3.わからない

ポリ塩化ビフェニルなどダイオキシンを扱う職業に携わったことがありますか？

1.はい 2.いいえ 3.わからない

放射線を扱う職業に携わったことがありますか？

1.はい 2.いいえ 3.わからない

これまで一番長く住んだことのある場所は？

1.工場街 2.商店街 3.住宅街 4.農漁村 5.その他 ( )

乳児期の栄養摂取は？

1.母乳 2.人工乳 3.混合乳 4.不明

現在、たばこを吸っていますか？

1.はい 2.いいえ 3.やめた

1.はい と答えた方、何歳の時から吸っていますか？ ( ) 歳

一日何本吸いますか？ ( ) 本

3.やめた と答えた方、何歳の時やめましたか？ ( ) 歳

何歳から吸っていましたか？ ( ) 歳

一日何本吸っていましたか？ ( ) 本

毎月1回以上、次のもの (a.～u.) をご自分で扱いましたか？半日以上かけて扱った回数を教えてください。例にしたがって、あてはまる番号1つに○をつけてください。

	1 いいえ	2 月1回～月2、 3回程度	3 週に1回以上	4 毎日
例) 灯油・石油・ベンジン・ガソリン	1	2	3	4
a. 灯油・石油・ベンジン・ガソリン	1	2	3	4
b. 塩素系漂白剤・殺菌剤 (「混ぜるな危険」の表示のあるもの)	1	2	3	4
c. 医療用消毒殺菌剤	1	2	3	4
d. 油性マジック	1	2	3	4
e. 水性ペイント・インクジェットプリンタ	1	2	3	4
f. 有機溶剤 (シンナー、試験・分析・抽出用溶剤、ドライクリーニング用洗浄剤、染み抜き溶剤、ペイント塗料、除光液 (リムーバー) など)	1	2	3	4
g. コピー機、レーザープリンタ	1	2	3	4
h. エンジンオイル	1	2	3	4
i. ホルマリン・ホルムアルデヒド	1	2	3	4
j. 抗がん剤 (自分の治療薬は除く)	1	2	3	4
k. 病院で手術や検査に用いる全身麻酔薬	1	2	3	4
l. 殺虫剤	1	2	3	4
m. 除草剤	1	2	3	4
n. 上記以外の、または種類がわからない農薬 *名前がわかれば教えてください (→ )	1	2	3	4
o. 放射線・放射性物質・アイソトープ	1	2	3	4
p. 微生物	1	2	3	4
q. はんだなど鉛を含む製品	1	2	3	4
r. 無鉛はんだ (鉛フリーはんだ)	1	2	3	4

s. クロム、ヒ素、カドミウム	1	2	3	4
t. 水銀	1	2	3	4
u. 染料 (毛髪染め)	1	2	3	4
v. そのほか化学物質などの名前がわかれば教えてください。(→ )	1	2	3	4

これからあなたの食生活についておたずねします。

食事は一日何回摂りますか? ( ) 回

朝、昼、晩規則正しく摂りますか? 1. はい 2. いいえ

ご飯についておたずねします。

どのくらいの茶碗で食べますか?

1. 小さな茶碗 2. ふつうの茶碗 3. どんぶり 4. 食べない

( ) 均一日におよそ何杯食べますか?

1. 1杯未満 2. 2~3杯 3. 4~5杯 4. 6杯以上

みそ汁についておたずねします。

どのくらいの頻度で飲みますか?

1. 飲まない 2. 月に1~3日 3. 週に1~2日 4. 週に3~4日  
5. 週に5~6日 6. 毎日飲む

飲む方は、平均一日におよそ何杯飲みますか?

1. 1杯未満 2. 2~3杯 3. 4~5杯 4. 6杯以上

どのような味付けですか?

1. うすめ 2. ふつう 3. 濃いめ

みそ汁の具で一番食べたものを1つだけ選んでください。

1. とうふ、油揚げ 2. 海藻 (わかめなど) 3. 野菜 4. いも  
5. 卵 6. 魚や貝 7. その他 ( )

酒についておたずねします

お酒は飲みますか?

1. はい 2. いいえ

1. はい と答えた方、一回に飲む量と種類は?

ビール 大瓶 (633ml) で

1. 飲まない 2. 1本未満 3. 2~3本 4. 4~5本 5. 6本以上

\*中瓶または500ml 缶は0.8本、小瓶または350ml 缶は0.6本と換算してください。

日本酒 1合 (180ml) で

1. 飲まない 2. 1合未満 3. 2~3合 4. 4~5合 5. 6合以上

焼酎 1合 (180ml) で

1. 飲まない 2. 1合未満 3. 2~3合 4. 4~5合 5. 6合以上

ウイスキー シングル (30ml) で

1. 飲まない 2. 1杯未満 3. 2~3杯 4. 4~5杯 5. 6杯以上

ワイン グラス (60ml) で

1. 飲まない 2. 1杯未満 3. 2~3杯 4. 4~5杯 5. 6杯以上

その他 ( ) を コップ ( ) 杯程度

以下の食べ物はどのくらいの頻度で食べていますか？○で囲ってください。

食品名	ほとんど 食べない	月に 1~3回	週に 1~2回	週に 3~4回	週に 5~6回	毎日
お菓子	1	2	3	4	5	6
肉	1	2	3	4	5	6
魚	1	2	3	4	5	6
野菜	1	2	3	4	5	6
くだもの	1	2	3	4	5	6
揚げ物	1	2	3	4	5	6
外食 買ったおにぎりや弁当含	1	2	3	4	5	6
インスタント食品 (カップ麺、カレー)	1	2	3	4	5	6
大豆製品 (豆腐、納豆、豆乳など)	1	2	3	4	5	6

焼き肉や焼き魚などを食べたとき焦げた部分は食べますか？

1. ほとんど食べない
2. 3分の1くらい食べる
3. 半分くらい食べる
4. 3分の2くらい食べる
5. ほとんど全部食べる

料理に塩やしょうゆをかけることがありますか？

1. ほとんどない
2. ときどきある
3. しょっちゅうある

ラーメン、そば、うどんなどの汁はどれくらい飲みますか？

1. ほとんど飲まない
2. 3分の1くらい飲む
3. 半分くらい飲む
4. 3分の2くらい飲む
5. ほとんど全部飲む

週に1回以上飲んでいるビタミン剤はありますか？

1. はい
2. いいえ

1. はい と答えた方は商品名と飲んでいる頻度、期間を書いてください。

商品名 ( ) を 週 / 日 に ( ) 錠 ( ) 年

以下の飲み物はどれくらいの頻度で飲んでいますか？○で囲ってください。

飲料名	ほとんど 飲まない	月に 1~3回	週に 1~2回	週に 3~4回	週に 5~6回	毎日
低脂肪乳	1	2	3	4	5	6
ふつうの牛乳	1	2	3	4	5	6
緑茶	1	2	3	4	5	6
ウーロン茶	1	2	3	4	5	6
果汁100%ジュース	1	2	3	4	5	6
野菜ジュース	1	2	3	4	5	6
乳酸菌飲料 (ヤクルトなど)	1	2	3	4	5	6



スポーツ飲料 (ポカリスエットなど)	1	2	3	4	5	6
コーヒー (缶コーヒー含む)	1	2	3	4	5	6
炭酸飲料	1	2	3	4	5	6

飲むものがある方は一回の飲む量はどれくらいですか？○で囲ってください。

飲料名	コップ1杯	コップ 2~3杯	コップ 4~6杯	コップ 7~9杯	コップ 10杯以上
低脂肪乳	1	2	3	4	5
ふつうの牛乳	1	2	3	4	5
緑茶	1	2	3	4	5
ウーロン茶	1	2	3	4	5
果汁100%ジュース	1	2	3	4	5
野菜ジュース	1	2	3	4	5
乳酸菌飲料 (ヤクルトなど)	1	2	3	4	5
スポーツ飲料 (ポカリスエットなど)	1	2	3	4	5
コーヒー (缶コーヒー含む)	1	2	3	4	5
炭酸飲料	1	2	3	4	5

ご協力ありがとうございました

精子番号	濃度	運動率 (%)	奇形率 (%)	成熟期間 (日)	身長	体重	BMI	年齢	平均睡眠時間	おひ(1)	おひ(2)	趣味		おひ(1)	おひ(2)	習慣		する(1)	する(2)	運動		疲れやすい	農薬	PCBor ダイオキシン	放射線	一週間の 通勤 場所	卵巣の 大きさ	卵巣の 位置	卵巣の 形状		
												ある場合何か?	ある場合何か?			回数	何分			回数	何分										
1	18.7	63	57	5	175	70	22.9	37	8	1	1	ゴルフ		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	1		
2	3.3	17	83	5	174	67	22.1	30	6	1	1	テレビ、スポーツ観戦		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	4	3		
3	15.3	37	68	2	158	60	24.0	40	6	1	1	ドライブ		1	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
4	5.5	45	44	3	181	87	26.6	38	5	1	1	読書、ゴルフ		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
5	0.1	17	75	4	182	68.5	20.7	34	7	1	1	ゴルフ		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
6	6.3	62	35	4	161	55	21.2	36	6.5	1	1	読書		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
7	2.3	25	75	10	174	78	25.8	48	6	1	1	サッカー		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
8	0.1			6	166	75	26.6	33																							
9	88.4	66	58	4	178	80	18.9	30	7	2	2			2	2			2	2	1	2	2	2	2	3	3	4	3			
10	32.3	39	48	5	178	76	24.0	38	7	2	2			1	2			1	2	1	2	2	2	2	3	3	3	3			
11	10.1	24	83	7	175	71	23.2	44	7	1	1	ゴルフ、木工		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	4	4	1	1		
12	2.9	34	71	10	173	85	28.4	28	6	1	1	読書		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	2		
13	16.2	40	56	4	147	57	26.4	42	6.5	1	1	読書		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	4	3		
14	0.2	6	81	3	173	64	21.4	38	6	1	1	ゴルフ		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	2	3		
15	5.0	13	81	5	168	73	25.9	40	5	1	1	スポーツ観戦		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
16	0.2	67	67	6	183	77	23.0	33	5	1	1	スポーツ観戦		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
17	46.4	54	47	5	165	55	20.2	36	7	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2			
18	0.8	29	71	1	165	88	25.0	29	6	1	1	ビデオ		2	2			2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	1		
19	7.0	29	54	4	163	65	24.5	33																							
20	11.4	51	45	5	182	93	34.2	41	6	1	1	ネットゲーム、家庭菜園		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2		
21	3.7	79	52	2	165	93	34.2	35																							
22	4.4	27	67	3	167	67	24.0	45																							
23	12.8	70	50	2	171	73	25.0	32	7	1	1	ゴルフカート		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	4	4	1	
24	110.2	58	42	5	170	61	21.1	34	7	2	2			2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	4	2		
25	0.6	17	83	5	170	70	24.2	36	7	1	1	テレビ		1	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
26	19.8	33	47	3	180	94	29.0	28	6	1	1	読書		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	2		
27	52.5	52	40	3	168	62	22.0	28	8	1	1	スポーツ観戦、バドミントン		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	4	3	
28	4.7	37	71	4	164	60	22.3	35	6	2	2			2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	3	1		
29	7.8	57	58	2	171	65	22.2	28	6	1	1	スポーツ観戦、漫画、ゲーム		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	4	3	
30	41.4	63	61	5	177	68	21.7	34	6	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
31	0.1			2	174	66	21.8	28	6	1	1	カラオケ、絵、料理		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	1	
32	0.1			7	170	85	29.4	38	7	1	1	読書、ビデオ		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	4	2	
33	0.0	0.1	58	7	165	73	26.8	29	9	1	1	読書		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	4	4	4	1		
34	34.2	18	55	7	174	78	25.8	51	8	1	1	ゴルフ、テニス		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	2	4	4	2	3	
35	39.0	54	48	8	170	70	24.2	34	7	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
36	30.6	44	59	4	173	65	21.7	35	7	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	3	1		
37	3.6	55	53	4	173	69	23.1	37																							
38	1.5	38	53	4	172	82	27.7	35																							
39	36.1	57	74	4	168	73	25.9	41	8	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
40	6.7	63	75	4	178	82	25.9	36	7	1	1	音楽		2	2			2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
41	22.4	85	61	3	166	90	29.0	34	5	1	1	スキー		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
42	33.1	63	42	4	177	80	25.5	38	6	1	1	サッカー		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3		
43	72.3	51	53	10	173	67	22.4	29	8	2	2			2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	2		
44	84.9	38	54	4	182	75	22.6	39	5	1	1	ハイキング		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	4	4	1	2		
45	78.9	45	56	7	166	85	30.1	37	8	1	1	読書		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2		
46	88.0	62	58	5	163	64	24.1	33	8	1	1	サッカー、読書、旅行		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	2	2		
47	3.2	40	55	3	175	76	24.8	33	5	1	1	楽器演奏		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2		
48	0.4	1	67	5	185	74	21.6	37	6	2	2			2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	4	4	1	1		
49	8.4	32	65	4	180	70	21.6	33	6.5	1	1	音楽鑑賞		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	3		
50	62.1	38	54	5	170	67	23.2	35	9.5	1	1	読書		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	3		
51	22.7	52	59	14	170	75	26.0	34	7	1	1	ドライブ		2	2			2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
52	190.8	72	57	7	174	67	22.1	34	8	1	1	野球		2	2			1	2	1	2	2	2	2	2	3	3	1	3		
53	78.3	29	49	30	173	73	24.4	42						1	2			1	2	2	2	2	2	2	2	4	4	1	3		
54	28.2	47	77	4	172	75	25.4	32	7	1	1	野球		1	2			1	2	2	2	2	2	2	2	4	4	1	3		



種子番号	二班		味噌汁			酒			類度										ピタミツ精									
	3食規 則正し いか?	どのくら いの茶 湯か?	1日平 均何杯	頻度 均何杯	1日平 味付け	具 (1)数 (2)	ビール	日本酒	焼酎	ウイスキー	ワイン	その他	お菓子	肉	魚	野菜	果物	揚げ物	外食	インス タン食 品	大豆製 品	魚・肉 の煮け たこ ち食べ るか	料理監 やしょう ゆかけ の汁 飲むか	ラーメン の汁 飲むか	飲んで るか	商品名		
1	1	2	2	4	1	2	2	1	3	1			2	5	3	4	1	4	5	3	3	1	3	2	1	マルチビタミ		
2	1	2	2	5	2	3	3	2	2	3		4	4	3	5	3	4	1	1	1	4	3	3	3	2			
3	1	2	2	2	2	3	1	3	2	2		3	3	3	6	4	2	2	3	2	3	2	1	3	2			
4	2	2	2	26	2	2	1	3	1	6	1	1	4	4	5	1	4	5	1	3	5	3	5	5	2			
5	2	2	1	4	1	2	1	1	2	2	1	5	4	2	4	2	3	2	2	2	4	4	2	3	5	2		
6	2	2	1	2	1	3	2	1	3	1	1	3	6	3	6	1	6	1	6	5	2	2	5	3	5	2		
7	1	2	3	6	1	1	1	1	1	3	1	4	5	5	5	6	6	4	2	2	6	6	5	2	4	2		
8																												
9	1	2	1	4	1	2	1	2	2	1	1	2	5	3	4	2	3	4	3	2	4	4	2	3	5	2		
10	1	2	2	4	1	1	2	1	1	1	1	2	6	3	3	6	4	4	4	2	4	4	1	1	3	2		
11	1	2	1	2	1	3	1	2	2	2	3	3	2	3	3	6	2	3	2	3	2	3	2	4	2			
12	2	2	2	3	2	3	1	3	1	3	1	3	4	4	4	6	3	4	1	3	4	5	3	3	5	2		
13	1	2	2	6	2	2	1	1	3	1	1	1	3	3	6	6	3	3	2	2	6	2	2	2	4	2		
14	1	2	1	4	1	2	2	1	2	1	2	2	4	4	4	4	2	2	3	4	3	3	2	2	4	1	ピタミツメーカー	
15	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	3	4	3	3	5	5	3	2	2	4	3	2	2	2	2		
16	1	2	2	6	1	1	1	3	2	3	2	1	5	3	5	2	5	2	5	3	2	3	5	1	1	1	リネビタミ	
17	1	2	2	5	1	2	1	2	1	2	1	2	4	4	6	3	3	3	3	1	3	1	1	1	1	2		
18	1	2	2	1								3	3	3	2	6	2	2	3	3	5	5	1	1	4	2		
19																												
20	1	2	2	5	2	3	2					4	4	4	3	6	3	5	3	2	3	5	5	1	4	2		
21	1	2	2	4	2	1	1	1	1	1	1	4	4	4	3	6	3	5	2	2	3	5	5	1	4	2		
22	1	2	2	4	2	1	1	2	2	1	1	4	4	4	3	6	2	2	2	2	2	5	2	5	2	2		
23	1	2	1									5	3	3	3	4	4	3	2	2	2	4	2	2	3	2		
24	2	2	3	4	2	1	1	1	1	1	1	4	4	4	3	6	2	3	2	2	2	5	2	5	2	2		
25	1	2	2	6	2	2	2	2	2	1	2	5	3	3	4	4	2	3	1	2	2	2	3	3	2	2		
26	1	2	2	6	2	2	1	2	2	1	1	3	3	3	4	4	3	3	2	3	3	4	2	2	2	2		
27	1	2	1	5	1	2	1	1	2	1	1	4	4	4	4	3	1	2	3	3	3	5	5	2	5	2		
28	1	2	2	2	4	1	2	4	1	4	1	3	4	4	4	4	2	4	3	3	5	3	5	2	2	2		
29	2	2	2	5	1	2	2	1	2	3	2	3	5	2	4	4	4	2	3	3	5	3	3	2	1	2		
30	2	2	1	3	1	1	1	2	2	1	1	3	3	3	3	4	1	3	2	3	3	1	3	4	2	2		
31	1	2	3	6	1	2	3	1	2	3	1	4	4	3	6	2	2	2	2	2	5	5	1	3	2	2		
32	1	3	3	6	2	3	1	2	3	1	2	5	4	5	5	3	4	4	2	3	3	5	5	3	3	2		
33	1	3	1	4	1	3	1	2	3	1	1	2	4	4	5	3	5	4	3	3	4	4	5	2	2	2		
34	1	2	3	6	2	1	1	2	3	2	1	4	3	3	4	4	4	4	4	3	3	2	2	3	2	2		
35	2	2	1	5	1	2	1	1	2	1	1	5	4	5	4	6	3	4	4	3	4	3	2	3	2	2		
36	2	2	2	6	2	2	5	1	2	2	1	3	4	4	3	2	1	4	4	3	4	4	3	2	3	2		
37												3	4	3	3	2	1	4	3	4	3	5	5	3	3	5	2	
38																												
39	1	1	2	3	1	2	6	1	3	1	3	3	4	4	3	3	1	5	1	1	3	3	3	5	5	2		
40	1	2	2	4	1	2	1	2	2	2	2	4	4	4	4	4	5	2	2	2	3	3	3	2	4	2		
41	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1	4	4	4	2	4	2	4	2	1	3	5	2	2	5	2		
42	1	2	2	2	2	3	1	2	1	2	2	4	3	3	3	5	3	3	2	3	5	5	5	3	5	1	1	ビューゼラス
43	2	2	1	3	1	2	2	3	1	2	1	4	4	4	6	2	4	3	4	4	2	5	1	2	1	1		
44	2	2	2	6	2	3	1	1	2	1	3	2	4	4	4	5	2	4	3	4	3	4	3	2	3	2		
45	1	2	2	3	1	3	1	3	1	3	1	3	3	3	1	3	3	3	4	4	5	1	1	2	3	2		
46	1	2	2	4	1	2	1	1	2	1	1	4	4	4	5	4	4	4	3	4	5	1	1	2	3	2		
47	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	4	4	3	5	3	3	4	3	4	1	1	2	5	2		
48	2	2	2	3	2	2	1	2	2	3	2	4	4	2	5	3	3	4	6	2	2	4	1	1	3	2		
49	2	2	2	5	2	2	1	2	2	1	2	3	4	5	6	6	3	3	2	1	4	3	2	2	5	2		
50	1	2	1	6	1	2	1	3	1	1	1	3	3	3	3	3	3	3	2	2	4	4	5	2	3	2		
51	1	2	3	6	2	1	1	2	1	1	1	4	4	4	4	4	4	4	3	3	6	1	1	1	3	2		
52	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	1	3	6	2	5	1	1	4	2	2	3	6	1	2	2	2		
53																												
54	1	2	2	6	2	2	3	3	3	3	4	1	3	3	4	6	3	3	2	1	6	1	1	4	1	2	プロボリス	



精子番号	濃度	運動率 (%)	奇形率 (%)	禁欲期間 (日)	身長	体重	BMI	年齢	平均睡眠時間	趣味		習得		運動		疲れやすい	農作業	PCBやダイオキシン類	一週間の野菜の摂取量	喫煙の有無			
										あり(1)なし(2)	ある場合何か?	あり(1)なし(2)	ある場合何か?	する(1)しない(2)	週何分								
55	177.1	56	43	4	179	78	24.3	39	6	6	1木工	1散歩	2	2	2	2	2	2	3	3	2		
56	22.8	62	63	5	172	75	25.4	31	6	6	1バレーボール	2	2	1	2	2	2	2	2	4	4	3	
57	41.6	66	51	1	172	55	18.6	28	8	1	1釣り、ゴルフ	1	2	10	1	1	1	2	4	4	3		
58	20.7	56	76	4	180	80	24.7	29	8	1	1スポーツ	2	2	0.5	30	3	2	2	3	4	1		
59	20.1	71	74	5	167	57	20.4	37	7	7	1旅行、園芸	1	2	2	90	2	2	2	3	3	2		
60	26.4	41	65	4	168	105	37.2	40	7	7	1旅行、園芸	1	2	2	90	2	2	2	3	3	1		
61	34.9	36	48	1	172	66	22.3	44	7	7	1ジョギング	2	2	1	4	30	2	2	2	3	1	2	
62	10.8	48	46	4	164	71	26.4	38	6	6	1ゴルフ	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	
63	50.6	66	52	4	176	76	24.5	32	6	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	2	
64	38.0	69	44	5	164	75	22.2	46	7.5	7.5	1ゴルフ	2	2	2	2	2	2	2	3	4	3	3	
65	9.5	75	54	3	160	89	27.5	36	7	7	1サッカー	2	2	2	2	2	2	2	3	1	3	3	
66	22.2	46	54	7	170	79	27.3	33	33														
67	117.4	80	44	2	171	72	24.6	33			1種												
68	15.6	43	57	5	165	80	22.0	34	6	6	1ウエイトトレーニング、ゴルフ	1	2	1	3	60	2	2	2	1	3	1	
69	73.8	82	53	4	174	78	25.8	31	7	7		1	2	1	4	60	2	2	2	1	5	1	
70	1.3	52	60	4	186	75	21.7	34	7	7	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	1	
71	64.8	79	44	4	169	77	27.0	32	7	7	1ゴルフ、野球	2	2	1	1	30	2	2	2	3	1	2	
72	36.4	53	57	3	172	63	21.3	31	7	7	1映画鑑賞	2	2	1	1	30	2	2	2	3	1	2	
73	45.5	73	63	4	177	70	22.3	35	7	7		2	2	2	2	2	2	2	3	4	2	2	
74	131.1	87	40	1	172	70	23.7	33	7	7	1野球	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3	2	
75	25.1	39	54	3	169	74	25.9	40															
76	138.2	68	54	15	172	59	19.9	30	6	6	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	2	
77	43.6	55	55	19	169	70	24.5	45	7	7	1ボウリング	2	2	1	2	90	2	2	2	2	3	3	3
78	67.8	48	64	6	169	54	18.9	38	8	8	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	
79	36.6	23	55	30	168	89	31.5	42	7	7	1ソフトボール、野球	2	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	
80	46.8	25	64	4	164	57	21.2	39	7.5	7.5	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	1	1	
81	14.1	22	69	2	173	60	20.0	45	7	7	1ゴルフ	2	2	1	2	30	1	2	2	3	4	3	
82	3.3	41	74	3	175	63	20.6	46															
83	57.6	66	39	4	170	62	21.5	29	7	7	1サッカー	2	2	1	1	120	2	2	2	3	4	3	
84	201.1	74	44	7	166	66	24.0	40	7	7	2	2	2	2	2	2	2	2	1	3	4	1	
85	53.5	61	47	5	156	51	21.2	35	7	7	1ソフトボール	2	2	2	2	2	2	2	3	4	2	2	
86	127.6	66	67	5	163	60	22.6	26	7	7	1サッカー	2	2	1	3	120	1	2	3	3	4	1	
87	84.8	53	67	3	163	65	24.5	42	7	7	1読書、釣り	2	2	2	2	2	2	2	3	4	1	3	
88	41.7	53	57	2	174	67	22.1	32			1映画鑑賞、ゴルフ	1	2	2	2	2	2	2	3	3	1	1	
89	0.0			5	166	65	23.6	37															
90	23.2	48	58	4	168	88	31.2	35															
92	32.6	31	76	7	168	63	22.3	29	7	7	1バドミントン、バスケ	1	2	1	6	120	2	2	2	3	3	3	
93	46.0	73	68	5	167	65	23.3	43	8	8	1映画鑑賞	1	2	1	4	60	2	2	2	3	1	2	
94	24.0	49	72	7	175	81	26.4	40	6	6	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	
95	14.0	56	56	60	170	75	26.0	43	5	5	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	
96	31.7	65	43	4	174	65	21.5	35															
97	111.4	80	34	4	175	70	22.9	38	6	6	1ゴルフ	2	2	2	2	2	2	2	3	3	4	3	
98	34.8	36	60	2	173	77	25.7	32	8	8	1読書、インターネット	2	2	2	2	2	2	2	3	4	3	3	
99	36.4	50	41	5	170	73	25.3	29	6	6	1テニス	1	2	1	3	120	2	2	2	3	1	1	
100	48.3	65	48	6	167	69	24.7	37															
101	174.0	73	46	3	177	80	25.5	36	7	7	1ランニング、散歩	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	
102	17.2	63	59	2	174	75	24.8	37	8	8	1野球、ギター	1	2	1	2	60	1	2	2	1	3	4	2
103	42.1	78	56	5	168	79	28.0	26	8	8	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	1	1	
104	132.0	87	53	4	181	63	19.2	32															
105	49.8	63	62	2	173	62	20.7	37	7	7	1ゴルフ、ウオーキング	1	2	1	5	50	1	2	2	3	3	3	
106	110.2	76	66	10	178	74	23.4	39	5	5	1ウオーキング	2	2	1	7	180	2	2	2	3	4	1	
107	6.7	27	57	5	176	60	19.4	39	7	7	2	2	2	2	2	2	2	2	3	4	1	1	
108	92.4	77	57	3	166	60	21.8	34	8	8	1釣り	2	2	2	2	2	2	2	3	4	2	2	
109	52.0	51	57	3	171	62	21.2	37	6	6	1釣り、ソフトボール	2	2	1	1	120	1	2	2	3	4	3	



精子番号	二糖		味増子				酒						調味										商品名				
	3食規 則正し いか?	どのくら いの茶 均何杯 強か	頻度 均何杯	1日平 味付け	臭 (1)、酸 ま(2)	ビール	日本酒 焼酎	ウイ スキー	ワイン	その他	お菓子	肉	魚	野菜	果物	揚げ物	外皮	イース ト大 豆製 品	魚・肉 たこ ちぎ るか	料理産 物お ゆかけ の汁 飲むか	ソー ス飲 んで るか						
55	1	2	2	4	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	2	3	3	6	3	2	2	2	2	2	2	
56	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	3	3	1	1	4	5	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2	
57	1	2	1	2	1	1	1	3	2	2	3	2	2	1	2	4	4	1	3	6	5	3	3	2	2	2	
58	2	2	2	5	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	5	5	4	3	2	5	1	2	3	2	2	2	
59																											
60	1	1	3	5	2	3	2	1	2	2	1	2	1	1	2	5	4	6	2	2	4	4	2	3	3	5	2
61	1	2	1	6	1	2	3	1	2	2	2	2	1	1	4	4	3	3	4	3	3	3	4	3	3	5	2
62	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	3	3	2	1	2	4	3	2	4	3	2	1	3	2	3	1	2
63	1	2	1	5	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	3	4	3	3	5	3	4	4	3	3	1	2	2
64	1	2	2	3	1	3	4	1	3	1	3	1	1	1	4	3	3	2	4	4	4	4	3	2	2	4	2
65	1	2	2	2	1	2	6	1	3	1	3	1	1	1	1	2	1	2	3	5	4	2	4	2	4	2	2
66																											
67	2	3	2	3	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	6	3	3	3	3	5	3	3	3	3	3	5	2
68	1	2	1	6	1	2	2	2	2	2	4	5	3	3	6	1	2	2	6	4	2	2	4	2	4	2	2
69	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	3	5	4	4	1	4	2	3	3	3	3	3	3	3	4	2	2
70	1	2	2	3	2	2	2	2	2	2	4	4	3	3	4	3	2	2	3	3	3	2	2	2	2	2	2
71	2	2	1	4	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	4	4	5	4	3	2	2	2	4	2	4	2	2
72	1	2	1	2	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	3	2	2	2	3	5	1	4	4	4	2	2
73	1	2	2	4	1	2	3	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	5	1	4	4	4	4	2	2
74	1	2	2	4	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1	3	4	3	3	3	3	3	2	2	5	5	2	2
75																											
76	1	2	2	4	2	2	3	2	2	2	1	2	1	1	3	4	2	3	3	3	2	3	3	3	2	2	2
77	2	2	2	3	2	2	1	1	1	1	3	1	1	1	2	2	3	3	5	2	2	2	2	3	2	2	2
78	2	2	2	3	1	2	1	2	1	2	4	3	3	1	3	4	1	3	1	3	3	2	4	2	4	2	2
79	1	2	1	3	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3	6	3	2	3	3	2	2	2	2
80	2	2	1	3	1	2	3	1	3	1	1	2	1	1	4	4	6	1	5	3	1	1	5	2	1	2	2
81	1	2	1	3	1	2	1	1	2	1	2	1	1	1	5	4	4	2	4	5	1	1	5	2	1	2	2
82	1	2	2	5	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	4	4	4	3	3	1	2	2	4	2	1	2	2
83	1	3	1	3	1	2	2	1	2	1	3	3	1	1	3	6	1	3	2	1	3	2	1	3	5	2	2
84	1	3	1	3	1	2	2	1	2	1	2	1	1	1	4	3	3	3	2	1	3	2	1	3	5	2	2
85	1	2	1	2	1	1	1	2	1	2	2	4	2	2	4	5	2	2	3	5	1	1	1	1	1	2	2
86	1	2	1	6	1	1	3	1	1	2	3	4	3	3	6	5	3	1	2	5	3	3	5	3	3	5	2
87	1	2	1	5	1	2	1	1	3	1	4	5	5	5	6	3	3	2	4	5	3	3	5	3	5	2	2
88	1	2	2	5	1	2	1	1	3	1	4	5	5	6	3	3	2	2	4	5	3	3	5	3	5	2	2
89																											
90																											
92	2	3	1	5	2	2	2	1	3	1	1	1	1	1	4	3	3	2	3	3	2	2	3	2	2	2	2
93	1	2	1	3	1	1	2	1	2	1	3	3	3	4	2	3	2	2	2	4	1	2	4	1	2	2	2
94	1	2	2	5	1	2	1	1	3	1	3	3	3	4	5	3	3	2	6	3	1	4	3	1	4	2	2
95																											
96																											
97	1	2	1	5	1	2	3	2	2	1	3	3	2	2	5	2	5	3	2	2	1	3	4	4	1	2	2
98	1	2	2	4	1	2	1	1	3	2	2	4	3	3	3	2	3	3	6	1	1	1	1	1	1	2	2
99	1	2	2	4	1	2	2	1	4	2	2	5	5	5	3	4	5	3	2	5	2	4	4	2	2	2	2
100																											
101	1	2	1	6	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1	4	4	6	6	4	1	1	1	1	1	1	2	2
102	1	2	2	4	1	2	2	1	2	1	2	1	3	3	4	4	3	3	1	3	1	3	1	2	2	2	2
103	1	2	2	4	1	2	3	1	2	1	4	3	3	3	5	2	2	1	4	1	3	2	2	2	2	2	2
104																											
105	1	2	1	6	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	4	4	5	5	4	1	2	2	2	2	2	2	2
106	2	3	2	4	1	3	2	2	3	3	3	4	3	4	2	4	2	4	3	3	5	3	5	3	5	2	2
107	2	2	2	6	1	3	2	1	2	1	3	4	4	1	2	4	1	5	5	2	5	3	5	3	5	2	2
108	2	2	1	5	1	2	1	1	2	1	1	5	3	5	3	3	2	1	5	5	1	4	4	4	4	2	2
109	2	2	1	3	1	2	2	1	3	1	2	6	6	5	2	4	2	2	3	2	2	4	4	4	4	2	2













精子番号	濃度	運動率 (%)	奇形率 (%)	禁欲期間 (日)	身長	体重	BMI	年齢	平均睡眠時間	興味		習得		運動		疲れやすい	農薬	PCBやダイオキシン類	一歳長の乳母期の栄養摂取	吸う(1)吸わない(2)やめた(3)	
										あり(1)なし(2)	ある(1)ない(2)	する(1)しない(2)	何分	回数							
154	18.7	51	60	3																	
155	32.7	46	61	3	175	75	24.5	37	7	2					2						3
156	22.1	67	64	3	170	60	20.8	30	6	1	1	2	2		1	3	120			3	
167	15.8	47	62	3	167	59	21.2	33	8	2					1	6	80			3	
168	14.8	27	65	3	178	72	22.7	33	7	1	1	1	1	1	5	70				4	
169	90.7	76	52	3	169	62	21.7	38	7	1	1	1	1	1	1	120				2	
171	70.0	41	59	3	175	76	24.8	31	7	1	1	1	1	1	6	30				2	
171	28.2	48	60	5	163	73	27.5	36	6	1	1	1	1	1	2	120				3	
172	0.7	26	52	1	169	63	22.1	33	7	1	1	1	1	1	4	120				2	
173	10.9	33	73	3	180	79	24.4	35	6	1	1	1	1	1	2	120				2	
174	15.3	37	61	4	171	55	18.8	31	6	1	1	1	1	1	4	170				4	
175	65.5	78	52	4	167	62	22.2	27	6	1	1	1	1	1	2	120				2	
176	66.3	51	42	3	172	50	16.9	28	5	1	1	1	1	1	2	120				2	
177	40.3	65	50	4	179	82	25.6	28	6	2					1	4				2	
178	33.5	42	65	5	167	61	21.9	36	6	1	1	1	1	1	2	60				2	
179	0.1	8	69	3	177	80	23.5	42	7	1	1	1	1	1	2					1	
180	85.2	71	54	5	165	61	22.4	44	7	1	1	1	1	1	1	20				1	
181	62.7	71	46	5	175	70	22.9	30													
182	53.8	37	63	7	165	53	19.5	35													
183	27.1	44	57	3	170	80	27.7	32	6	1	1	1	1	1	4	80				4	
184	26.4	64	51	5	182	105	31.7	37	7	2					1	1	90			4	
185	131.8	67	51	14	173	85	28.4	37	7	2					1	2	60			4	
186	41.8	55	49	4	170	83	28.7	23	6	1	1	1	1	1	2	60				2	
187	61.7	52	57	6	170	66	22.8	30	6	1	1	1	1	1	2					3	
188	26.7	44	66	14	163	81	30.5	39	7	1	1	1	1	1	30					4	
189	25.1	78	64	4	172	86	29.1	34	7	1	1	1	1	1	1	120				4	
190	10.6	37	62	2	165	64	23.5	29	6	1	1	1	1	1	1	30				2	
191	20.0	40	68	4	171	76	26.0	29	7	1	1	1	1	1	1	30				2	
192	62.8	41	48	2	164	56	20.8	30	7	1	1	1	1	1	7	10				4	
193	7.8	23	62	3	178	74	23.4	35	7	1	1	1	1	1	2	60				4	
194	174.0	73	55	5	175	62	20.2	36	6	1	1	1	1	1	2					3	
195	4.3	32	60	2	166	74	26.9	36	6	2					1					3	
196	9.0	63	45	7	180	70	21.6	39	7	1	1	1	1	1	3	60				4	
197	24.4	53	74	4	173	58	19.4	28	6	2					1	1	120			4	
198	44.3	41	65	4	168	58	20.5	30	6	1	1	1	1	1	2					1	
199	17.4	95	55	5	172	83	28.1	38	7	1	1	1	1	1	2					4	
200	7.7	31	81	5		67		27													2
201	49.4	39	62	7	170	96	33.2	35	7	1	1	1	1	1	2					3	
202	43.5	61	62	4	172	76	26.4	37	7	1	1	1	1	1	4	2				4	
203	43.6	30	77	5	179	71	22.2	34	7	2					1	4	120			4	
204	0.1			2	165	60	22.0	45	8	2					2					4	
205	88.0	44	48	6	165	60	22.0	45													1
206	13.8	16	77?		170	75	26.0	42	7	1	1	1	1	1	7	30				3	
207	110.2	29	82	7	166	65	23.9	46	7	2					1	1	120			3	
208	97.9	66	57	5	167	60	21.5	26	7	1	1	1	1	1	2					4	
209	72.7	69	51	1	175	85	27.8	33	7	1	1	1	1	1	2					4	
210	67.6	39	75	14	170	70	24.2	53	7	1	1	1	1	1	2					1	
211	1.9	16	73	6	178	100	31.6	50	7	1	1	1	1	1	2					2	
212	4.5	20	76	2	166	65	23.6	35	6	1	1	1	1	1	5	600				2	
213	22.8	67	53	3	174	58	19.2	25	7	1	1	1	1	1	1					3	
214	29.2	54	65	5	177	88	28.1	24	6	1	1	1	1	1	2					3	
215	13.7	58	59	2	163	60	22.6	32													1
216	39.6	53	47	5	175	60	19.6	34													
217	69.6	47	53	4	173	75	25.1	34	7	1	1	1	1	1	2					3	



精子番号 3食糧 いのか?	二葉		味噌汁				酒						野菜								商品名					
	どのくらい 1日平均 均何杯	頻度	1日平均 均何杯	味付け	具 (1)・餃 ま(2)	ビール	日本酒	焼酎	ウイスキー	ワイン	その他	お菓子	肉	魚	野菜	果物	揚げ物	外皮	インス タン食品	大豆製 品		魚・肉 の煮け たこ ゆか るか	料理 油 ゆか るか	ソー ス ゆか るか		
154																										
155	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	3	3	1	1	4	3	3	3	3	3	3	3	3	4	2	
156	2	3	2	3	1	1	3	2	3	1	3	5	3	3	6	3	4	5	2	3	1	2	2	1	OPコーポラル・ピクエント	
157	1	2	2	6	1	1	3	1	3	1	3	1	3	3	5	1	2	2	2	4	3	2	5	1	ピクエント	
158	1	1	1	3	1	1	2	1	2	1	2	2	4	3	6	3	4	3	2	4	2	2	5	2		
159	1	2	2	4	1	1	3	2	3	1	3	4	4	3	6	4	3	2	3	3	2	1	1	1	フルチピタミン	
170	1	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	4	3	3	6	3	3	2	2	5	1	1	1	フルチピタミン		
171	1	2	2	2	1	1	2	1	3	1	1	3	6	2	1	3	4	3	3	2	3	1	3	フルチピタミン		
172	1	2	2	3	1	1	2	1	3	1	1	2	3	3	5	3	2	2	1	3	1	1	5	2		
173	1	2	2	3	1	1	3	1	1	1	1	3	3	3	6	4	3	2	2	3	1	2	2	2		
174																										
175	2	3	2	5	1	1	2	2	2	1	3	4	1	1	6	2	3	1	1	4	2	2	5	2		
176	2	2	2	5	2	1	2	1	1	1	1	4	4	4	6	6	4	2	2	6	1	3	4	2		
177	2	2	2	2	1	1	3	1	1	1	1	2	4	4	4	1	3	5	3	3	3	2	4	2		
178	2	2	2	1	3	1	1	1	3	1	1	3	1	1	5	2	4	2	2	3	1	2	3	2		
179	2	2	1	2	1	1	3	1	1	1	3	4	6	4	3	1	6	6	2	2	1	3	5	2		
180	1	2	2	5	2	1	2	2	2	1	2	4	4	3	5	5	1	1	1	5	1	3	1	2		
181																										
182																										
183	2	2	1	6	1	2	2	1	2	2	3	3	3	3	4	1	2	2	2	4	3	2	3	2		
184	1	2	2	6	2	2	2	1	1	2	2	2	3	3	5	4	3	2	2	2	5	2	5	2		
185	1	2	2	5	2	2	2	2	2	1	3	3	4	3	4	2	3	2	2	3	5	2	2	2		
186																										
187	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	6	4	4	3	3	4	4	2	3	2	1	3	1	ネイチャーメイド	
188	1	2	1	4	1	2	1	1	1	1	1	6	4	4	4	2	4	4	3	3	5	3	4	2		
189	2	2	3	5	1	2	1	2	1	1	2	3	4	3	6	2	3	2	3	4	3	2	4	2		
190	2	2	2	4	1	2	3	2	2	2	2	5	5	3	5	3	4	3	3	3	1	3	5	2		
191	2	2	2	3	2	1	2	1	1	1	2	4	6	6	4	6	6	6	6	6	2	2	5	2		
192	1	2	1	5	1	2	2	1	2	1	1	4	4	4	6	6	4	5	1	4	2	1	1	2		
193	1	2	2	5	2	2	2	1	2	1	2	4	5	3	6	3	4	3	3	3	1	2	1	2		
194	1	2	2	2	1	1	3	2	2	2	2	3	2	2	4	4	3	2	3	2	2	3	2	2		
195	2	2	2	4	1	2	1	2	1	2	3	4	4	4	6	1	5	4	3	3	2	2	3	2		
196	1	2	2	4	1	2	1	1	2	1	2	4	5	2	6	2	5	2	2	4	3	2	3	2		
197	2	3	2	5	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	6	3	2	2	3	5	1	3	2	2		
198	2	2	2	4	1	2	3	3	3	3	3	3	2	2	6	3	2	2	1	4	5	1	4	2		
199	1	2	2	2	1	2	5	1	1	3	1	4	4	3	6	6	3	3	2	3	5	1	3	2		
200																										
201	2	2	2	4	2	2	2	1	2	2	4	5	3	4	1	4	5	1	3	1	1	3	2			
202	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	3	2	2	3	6	1	2	2	2	3	5	3	5	2		
203	1	2	3	5	2	2	1	1	1	2	3	6	5	4	5	3	5	3	2	4	4	3	2	2		
204	1	2	1	6	2	1	1	4	3	3	1	4	4	4	6	3	4	2	3	6	4	2	5	2		
205																										
206	1	3	2	6	2	2	2	1	1	2	3	4	4	4	6	3	4	3	3	4	1	3	3	2		
207	1	2	1	3	3	2	2	1	1	3	1	1	3	3	4	2	3	2	2	4	5	3	5	2		
208	1	2	2	3	1	2	2	1	2	2	6	5	4	4	2	3	3	3	4	3	2	3	2	2		
209	1	3	3	4	2	2	3	1	1	3	3	4	4	4	5	2	4	2	3	3	5	2	5	2		
210	1	2	2	6	1	2	2	1	2	1	5	4	4	4	6	5	3	3	2	5	4	4	4	2		
211	2	2	3	3	1	2	2	1	2	1	3	5	3	3	6	5	3	2	2	3	4	3	3	2		
212	2	3	4	3	1	2	2	1	1	5	3	2	3	4	6	5	2	4	5	3	1	2	5	2		
213	2	2	2	4	1	2	1	1	2	1	4	4	4	4	6	6	3	2	2	5	2	3	3	2		
214	2	2	2	2	1	3	1	1	2																	
215																										
216																										
217	2	2	2	4	1	3	2	2	2	1	2	4	3	2	1	4	6	3	3	1	5	2	3	2		





選手番号	身長	体重	BMI	年齢	平均 種差 時間	趣味		習慣		運動		疲れや すい	農業 キーン	PO3or タイオ 放射線	一番長 く任ん だ場所 採取	吸う! 吸わな い! やめた (3)				
						あり! なし! (2)	ある場合何か?	あり! なし! (2)	ある場合何か?	する! しない (2)	週 何回						何分			
218	167.9	74	51	5	172	67	22.6	30	7	1	スケーボード	1	散歩	1	1	1				
219	35.6	66	50	3	170	62	21.5	36	7	1	音楽鑑賞、卓球、登山、	1	卓球	1	120	1				
220	80.2	69	44	4	166	62	21.3	37	9	1	ゲーム	2	1	1	20	2				
221	80.4	38	64	4	168	61	21.6	30	5	1	PC、登山、ランニング、ボウフラゲーム、トランプ、ダンス	1	ランニング、登山	1	30	2				
222	39.8	39	61	6	170	85	29.4	36	7	1	1車	2	1車	1	5	3				
223	10.6	54	56	4	169	68	23.8	32	6	1	1車	2	1	1	5	60	2			
225	112.3	63	56	4	169	58	20.3	33	5	1	ギヤングル	2	2	2	3	3	4			
226	91.8	82	54	14	170	64	22.1	34	6	2	2	2	2	2	2	3	4			
227	74.9	83	58	2	170	80	27.7	37	5	1	ネット	2	2	2	2	3	3			
228	33.5	66	53	2	167	75	26.9	39	8	1	スホーツ	2	2	2	2	5	1			
229	10.5	33	66	4	177	65	20.7	37	8	1	スホーツ	2	2	2	2	190	2			
230	104.3	85	34	6	180	78	24.1	30	6	2	2	2	2	2	3	3	3			
231	40.4	47	58	4	174	66	21.8	41	7	1	旅行・写真	2	2	2	2	60	3			
232	37.6	53	49	4	171	63	21.5	25	7	2	2	2	2	2	1	2	2			
233	24.3	39	51	2	171	79	27.0	35	7	1	釣り	2	1	ランニング	1	5	60	2		
234	29.6	34	57	3	170	57	19.7	32	7	2	2	2	2	2	1	1	1	2		
235	146.0	58	52	5	164	65	24.2	32	6	2	2	2	1	空手	1	4	120	1		
236	40.1	53	59	8	175	70	22.6	26	6	1	読書	2	2	2	3	3	3	2		
237	46.4	35	60	14	172	65	22.0	42	6	2	2	2	2	2	1	2	2	1		
238	9.0	21	89	4	171	72	24.6	37	7	1	ゴルフ	2	2	2	120	3	3	3		
239	188.2	84	61	5	177	70	22.3	39	6	1	温泉	2	2	2	10	3	3	3		
240	19.1	58	73	7	175	82	26.8	41	8	1	温泉	2	2	2	2	2	3	4		
241	24.6	80	49	7	171	89	30.4	37	7	2	2	2	2	2	120	2	4	2		
242	78.7	66	44	4	178	86	27.1	33	7	1	PC、読書	2	2	2	2	4	4	2		
243	43.2	40	57	4	169	63	22.1	36	7	1	1車	2	2	2	1	5	3	4		
244	33.9	64	66	7	174	72	23.8	36	6	1	2	2	2	2	2	2	3	4		
245	36.8	78	46	4	171	69	23.6	43	7	2	1	読書	2	3	3	3	1	3		
246	112.1	82	59	5	165	60	22.0	36	7	2	1	1	4	20	2	3	4	2		
247	4.8	29	78	2	174	73	24.1	27	6	2	2	2	2	30	3	2	1	4	2	
248	29.7	50	54	7	172	74	25.0	41	7	1	サイクリング、フットサル	2	2	2	2	120	2	3	1	2
249	22.9	44	48	3	157	56	22.7	31	7	2	2	2	2	1	2	2	3	4	2	
564	36.0	75	63	6	166	74	26.9	38	6	1	魚釣り	2	2	2	2	2	3	4	2	
565	125.4	76	52	3	164	73	27.1	28	6	1	音楽、映画	2	2	2	1	15	1	3	1	1
566	31.4	60	52	4	173	90	30.1	48	7	1	音楽演奏	2	2	2	1	2	3	4	2	
567	87.5	92	48	7	179	75	23.4	47	6	1	サッカー観戦、読書	2	2	2	1	1	4	2	2	
568	29.8	53	57	8	179	75	23.4	47	6	1	1車、写真	2	2	2	1	1	3	1	2	
569	257.8	81	41	1	168	57	20.2	30	8	1	1	1	2	45	2	3	1	2	3	
570	4.3	39	89	6	174	69	22.8	44	7	1	ゴルフ	2	1	2	2	2	3	2	3	
571	97.5	71	42	4	165	62	22.8	31	6	1	絵画、トランプ	2	2	2	50	3	3	1	2	
572	17.3	44	59	5	165	71	26.1	38	9	2	2	2	2	1	2	2	3	3	2	
573	0.4	40	70	1	178	70	22.1	33	3	1	体を動かす	1	果物、納豆を食べる	1	120	2	3	1	3	
574	115.9	88	42	8	174	76	25.1	45	7	1	ダンス	2	1	1	1	2	4	1	3	
575	17.9	56	63	3	174	67	22.1	29	7	1	読書	2	2	2	2	2	3	3	3	
576	30.3	70	58	2	169	80	28.0	36	7	1	スホーツ観戦	2	2	2	1	2	2	4	2	
577	23.0	59	67	1	174	79	26.1	39	5	1	PC	2	2	3	3	4	4	3	3	
578	29.4	51	62	7	172	57	19.3	27	8	1	スホーツ観戦、フットサル	2	2	2	120	2	4	4	3	3
579	43.0	58	51	5	170	72	24.9	29	6	1	1	1	1	2	3	3	1	3	3	
580	9.0	25	64	1	162	57	21.7	32	7	2	1	1	1	60	1	1	2	2	1	3
581	30.0	72	53	4	166	69	25.0	38	8	2	2	2	2	60	2	2	4	4	3	1

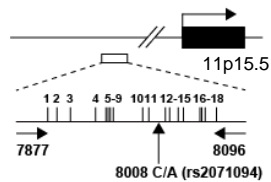
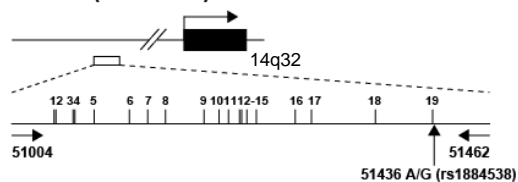
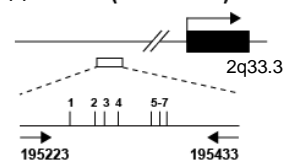


精子番号 1から 100まで 100まで	二糖		味増汁			酒						惣菜						惣菜						トッピング	
	3食規 則正し いか?	どのへら 1日平 均何杯	頻度 1日平 均何杯	味付け	具 類 (1)飲 まない (2)	数酒 ビール 日本酒	焼酎	ウイスキー	ワイン	その他	お菓子	肉	魚	野菜	果物	揚げ物	外食 メニュー	大豆製 品	魚肉 の揚げ たこ 巻か	料理塩 はしよ かけ の汁 飲むか	ソー ス 飲んで るか	商品名			
218	1	2	5	2	1	3	1	2	3	3	3	2	4	4	5	2	3	1	3	1	2	3	2		
219	1	1	3	1	1	3	1	2	1	1	1	4	4	6	4	3	1	4	5	1	2	2	2		
220	2	2	6	1	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4	5	1	2	2	2		
221	1	2	6	1	1	1	3	2	4	1	2	4	4	6	2	3	6	1	5	1	1	1	2		
222	1	2	1	4	2	2	1	1	2	3	3	3	4	4	2	3	3	1	5	5	1	1	2		
223	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	4	4	2	3	6	1	2	2	4	4	2		
224	1	2	4	1	2	2	1	1	1	1	1	3	4	4	2	2	2	2	3	1	1	1	2		
225	2	2	3	1	2	2	2	2	5	4	3	3	5	3	3	4	5	3	4	4	1	1	2		
226	2	2	2	1	2	1	1	2	1	1	1	6	6	2	4	3	3	3	4	2	2	3	2		
227	2	2	3	2	2	1	2	2	5	5	4	4	4	4	2	4	4	3	3	3	2	2	2		
228	1	2	6	1	2	3	1	1	1	1	3	3	6	3	3	3	3	5	2	3	5	2	2		
229	1	2	4	1	2	1	2	1	1	1	4	4	4	4	3	3	3	5	2	3	5	2	2		
230	1	2	4	1	2	1	2	1	1	1	5	5	5	5	3	5	3	1	3	1	3	2	2		
231	2	2	3	1	2	3	1	2	1	2	3	4	4	4	2	2	2	3	5	2	2	2	2		
232	2	3	4	2	2	3	2	2	5	4	4	4	4	4	2	2	2	2	4	3	5	2	2		
233	1	2	4	2	1	1	2	2	4	3	4	4	4	2	3	4	3	4	3	2	2	4	2		
234	1	2	2	4	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	3	3	3	2	2	4	2	2		
235	1	2	6	2	1	2	1	3	2	1	4	5	5	6	4	5	3	1	6	5	1	5	2		
236	1	3	3	2	2	1	1	1	3	3	4	3	4	2	3	3	3	3	1	2	2	4	2		
237	1	2	1	3	1	2	2	1	1	1	6	6	5	6	3	2	1	1	5	2	4	2	2		
238	1	2	5	1	2	1	1	2	1	1	3	4	3	4	4	4	2	6	2	3	3	2	2		
239	1	2	2	2	2	2	1	2	2	3	3	3	5	2	4	2	5	2	4	1	5	2	2		
240	1	1	6	2	2	3	1	2	2	2	6	6	6	6	3	3	1	3	3	1	1	1	2		
241	1	2	2	2	2	3	2	2	2	2	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2		
242	1	2	4	2	2	1	1	1	1	1	1	3	4	4	4	4	4	4	3	2	2	5	2		
243	1	2	1	5	1	2	2	1	3	1	3	4	4	1	3	3	3	2	3	2	5	2	2		
244	2	2	2	2	1	2	3	1	1	1	3	4	4	4	2	4	3	5	2	2	5	2	2		
245	1	1	6	1	2	1	1	1	1	2	4	4	4	4	3	2	2	6	4	3	4	2	2		
246	1	2	1	6	1	2	2	2	4	3	4	4	4	2	4	2	4	4	5	2	1	2	2		
247	2	2	5	1	2	5	1	2	1	1	6	5	6	2	5	5	2	4	5	2	3	2	2		
248	1	2	4	1	2	1	1	1	1	1	4	4	3	6	5	3	4	2	2	3	5	2	2		
249	1	2	2	2	2	1	1	2	1	1	1	4	4	4	3	3	3	3	2	2	3	2	2		
564	1	2	3	1	2	1	3	1	3	1	4	4	4	4	3	4	4	5	4	5	1	1	2		
565	2	3	3	1	2	2	2	1	2	2	3	3	3	6	2	4	3	3	5	1	1	1	2		
566																									
567	1	1	3	1	2	3	1	1	3	1	1	2	2	5	3	4	4	2	2	2	2	1	エスプレッソ		
568	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	3	4	6	3	4	4	2	5	5	2	2	5	2		
569	2	2	3	2	2	2	1	2	1	2	3	3	5	3	3	3	2	3	1	2	2	1	1		
570	1	2	2	3	1	1	1	3	3	1	6	6	5	6	6	3	1	5	3	1	3	2	2		
571	2	2	2	3	1	2	1	1	3	3	4	3	6	5	2	2	1	4	4	2	1	1	2		
572	1	2	1	6	1	2	1	2	1	1	3	4	4	2	4	2	2	4	1	1	1	1	2		
573	1	2	1	5	1	2	6	1	1	2	1	4	4	5	6	1	2	1	6	1	1	1	2		
574	1	2	2	6	2	3	3	1	1	1	3	5	5	6	4	3	2	5	2	3	5	1	1		
575	1	2	5	1	2	1	1	2	1	1	1	4	4	6	3	3	2	6	5	3	4	2	2		
576	1	2	6	2	2	3	1	1	2	1	2	4	4	6	4	5	1	5	5	2	5	2	2		
577	1	2	1	4	2	2	1	1	1	1	1	5	4	6	2	5	3	2	5	4	3	4	2		
578	2	2	1	4	1	2	2	1	1	1	1	3	4	1	4	3	2	2	2	2	1	1	2		
579	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	3	3	3	3	2	2	4	4	3	3	5	2		
580	2	2	1																				1		
581	2	2	4	2	2	1	3	3	1	1	4	4	6	4	6	4	4	5	5	2	2	1	1		

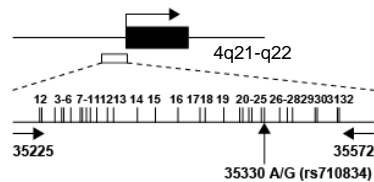
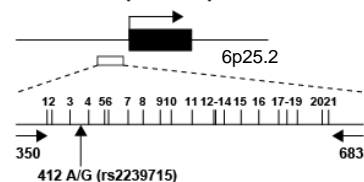
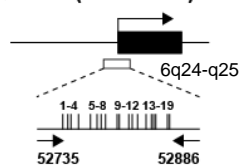
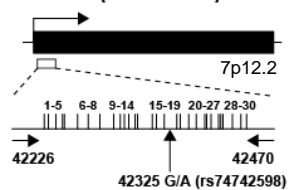
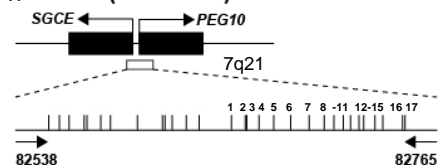
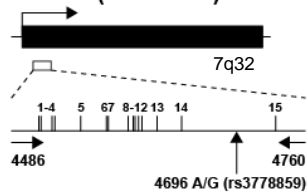
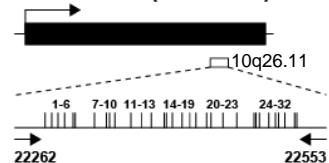
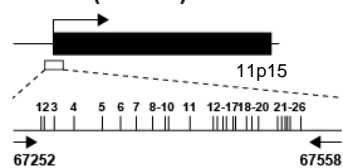
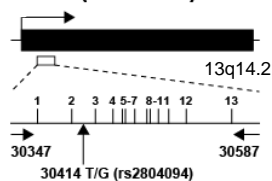
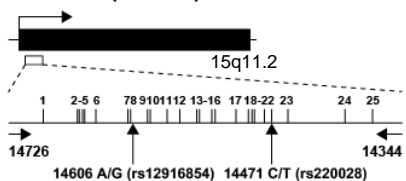
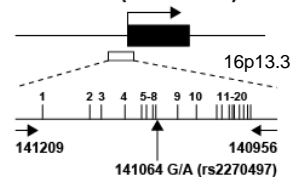


## 参考資料(2)-1 ヒトインプリント遺伝子のマップ

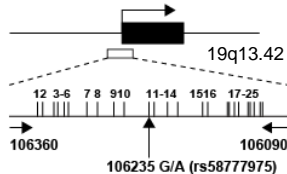
## (A) Paternal DMRs

(a) *H19* (AF125183)(b) *GTL2* (AL117190)(c) *ZDF2* (AC007383)

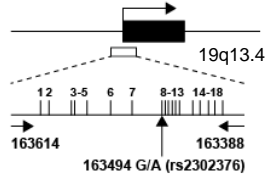
## (B) Maternal DMRs

(d) *DIRAS3* (AF202543)(e) *NAP1L5* (AC108065)(f) *FAM50B* (Y18504)(g) *ZAC* (AL109755)(h) *GRB10* (AC004920)(i) *PEG10* (AC069292)(j) *PEG1* (AB045582)(k) *INPP5F v2* (AL133461)(l) *LIT1* (U90095)(m) *RB1* (AL392048)(n) *SNRPN* (U41384)(o) *ZNF597* (AC025283)

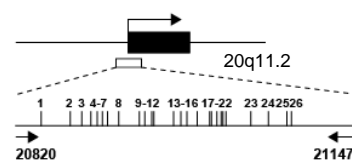
(p) *ZNF331* (AC011487)



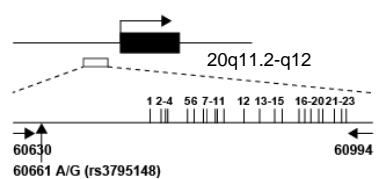
(q) *PEG3* (AC006115)



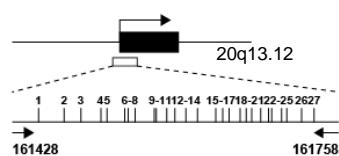
(r) *PSIMCT-1* (AL110115)



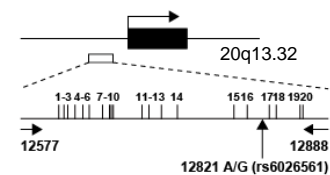
(s) *NNAT* (AL109614)



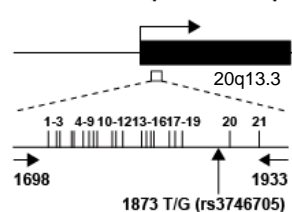
(t) *L3MBTL* (AL031681)



(u) *NESPAS* (AJ251760)

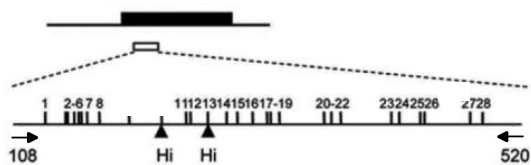


(v) *GNAS1A* (AF246983)

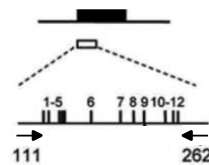


(C) Non-imprinted regions

(w) *LINE-1* (X58075)



(x) *Alu* (U14568)



## 参考資料(2)-2 Bisulphite PCR解析で用いたプライマー配列

Gene	Target	Primer sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	Annealing	Restriction Enzyme	Accession No.	chromosomal location	
H19	BS	H19 F2 H19 R1	TATATGGGTATTTTTGGAGGTTTTT ATAAATATCCTATTCCAAATAACCCC	220	57	Taq1 Mu1	AF125183	11p15.5
	SNP	hH19DMR sF1 hH19DMR sR1	AGGTTGGGGAGATGGGAGGAGATAC GTGGATAATGCCCGACCTGAAGATC	395	68			
	BS	GTL2 BSF1 GTL2 BSR1	GGGTTGGGTTTTGTTAGTTGTTTGT ACAATTTAACAAACACTTTCTCCCAAA	459	57			
ZDBF2	BS	ZDBF2 BSF1 ZDBF2 BSR1	GTTTTGTTAGTTAGATTGAAAAATA AAAAATAAATTAACCTAAAAATAAAAA	210	57	Taq1	AC007383	2q33.3
DIRAS3	BS	DIRAS3 BSF1 DIRAS3 BSR1	TGTTGTTTTGTTGATATTTGTTGTT CCTTAAACTCTAAACTAACCCCTC	349	57		AF202543	1p31
	SNP	DIRAS3 SF1 DIRAS3 SR1	ACTTACCTTTCTCGGAGGCACG AACAGTTCTCCCAACCTGTAAC	321	65			
	BS	NAP1L5 BS2F1 NAP1L5 BS2R1	TGATAGTGGGAAGTTAGTTAAGTGT AAAAATCTAAACTCTCAACCATC	348	57			
SNP	NAP1L5 SF1 NAP1L5 SR1	GCTGTCACAGTCTCCACCCTGC CCGCATCCGCAAGATCTCTCTG	202	66				
BS	FAM50B cBSF1 FAM50B cBSR1	GGTTTTGAGGAGAGTGTAGGTTTT AAAACTCTCTAAATAACCAACAACCTTAC	334	57	Y18504	6p25.2		
SNP	FAM50B SF1 FAM50B SR1	CAGGTAATGTTACGAGACGCCACAG GGGGCTCCTGTTTTACGCTGTG	218	67				
BS	ZAC F ZAC R	GGGGTAGTYGTCTTATAGTTTAGTA CRAACACCCAAACCTACCTA	152	57			Taq1	AL109755
GRB10	BS	GRB10 BSF2 GRB10 BSR2	GTTAGGGTTTTGYYGTAGAAAAAT CCAATCCCTCRAAAACTAA	245	55		AC004920	7p12.2
	SNP	GRB10 SF1 GRB10 SR1	GAACGGCTAGCACGAAAAGC CAGTCCCTCGGAGGCTGAGTATTG	185	69			
	BS	PEG10 BSF1 PEG10 BSR1	TTTAGTTGGTTAGTTAGTATTAGTATT AAAAATAAATCCACACCTAAAC	395	55			
PEG1	BS	hPEG1 BSF1 hPEG1 BSR1	AATTTAATTTATTTGATGAGTTATGAG ATATTTTTCAAATTTCAATAACAAC	275	57	Taq1	AB045582	7q32
	SNP	PEG1DMR sF2 PEG1DMR sR2	GTATCACGGTGGCGGAGTC ATGAGCGGAGACAATAAGCAAAC	315	61			
	BS	INPP5Fv2 BS4F1 INPP5Fv2 BS4R2	TAGGAATTTAATTAATAAGTTTTGTAA AATACAAACAACCTATTTAAACCTC	203	55			
LIT1	BS	LIT1 F LIT1 R	TTTTGGTAGGATTTTTGTTGAGGAGT CCTCACACCCAACCAATACCTC	307	57	Taq1	U90095	11p15
RB1	BS	RB1 BSF2 RB1 BSR1	GTGAAAGTGGTTTTGGGTAGTTTTG CTTAAACATTTCCAAAACCTACCCTACC	241	59		AL392048	13q14.2
	SNP	RB1 SF1 RB1 SR1	CGGCCGCCTCTACGTTTCTTTTTG CCTAGACGCTGACCATTCGCCACAAG	480	68			
	BS	hSNRPN BSF1 hSNRPN BSR1	AGGAGGTTATGGTAGTGGAATTAGG CACCACAATAAACAACCAATAAC	383	59			
SNP	SNRPN-DMR sF3 SNRPN-DMR sR3	ACCGAGCGGAGGAGGCTATG GACTGTGCTACTGCCCTTCTG	335	68				
BS	ZNF597 BSF1 ZNF597 BSR1	GTTTTTTGATAGGAGTTGTAGAAAG CAACTACCCAATAACTACAAATCCTC	254	57	AC025283	16p13.3		
SNP	ZNF597 SF1 ZNF597 SR1	CGGGTGGGAATGCCCTTCTCAAG GAGAACTCTGACCAATCAAAGGCGAGG	409	67				
BS	ZNF331 BSF2 ZNF331 BSR1	GTGCGTTTTGTTGTTTGTATAT ATCCCRCCACCCCTAAAAACCAAC	270	57			AC011487	19q13.42
SNP	ZNF331 SF2 ZNF331 SR2	CGTGTCAAGTGTCCGCGGTGCA GGCTGCTCACTGGTGCACAAACG	456	69				
BS	PEG3 BS2F3 PEG3 BS2R0	GGTTGTTGATTGGTTAGTATAGAAGTT CTCACCTCACCTCAATACTACRCAAC	227	55	Taq1	AC006115		
SNP	PEG3-DMR sF1 PEG3-DMR sR1	CTGTGCCCACTCTCGGACTG CACCTCGGTGCAGAAGTCTGG	342	66				
BS	PSIMCT-1 BSF1 PSIMCT-1 BSR1	GGATGTAGTTGGATATATTTTTTTTT ACTTATCAAACCTACTATTTCAAC	328	55			AL110115	20q11.2
NNAT	BS	NNAT BS2F1 NNAT BS2R1	TTTTAGTTAGTGGGTTTTTTGTATT CATTACACCTCCATCTACTACTAACCTAT	365	55		AL109614	20q11.2-q12
	SNP	NNAT S2F1 NNAT S2R1	TCAAACAGCCAGCGTCACTTTG ACCTCTTTCCAGCAAGCTGCCTG	237	61			
	BS	L3MBTL BSF0 L3MBTL BSR2	GTGTAGTTGGAGTGAGGTTTTTTG AAACCAACTCAAAACCTAAAAAC	331	55			
NESPAS	BS	NESPAS BSF1 NESPAS BSR1	AGTAAAGTTTTTTAGGAGTAGTTG AACAAACTATAATAAACTAAAAAACTAA	312	55		AJ251760	20q13.32
	SNP	NESPAS SF1 NESPAS SR1	CATGGTATTATCTGTGGGTTTCAG GCAGGGTCTCTCTGTTTATG	287	62			
	BS	GNAS1A BSF1 GNAS1A BSR1	GTGTGAGTGTATTTTATATATGTAAGT AACAAAAATCTATTTACCTCAAC	236	55			
SNP	GNAS1A SF1 GNAS1A SR1	GCTGCCCTGCGTGTGAGTGC CGGATGGCAGGAGTCTGTTTACC	251	67				
BS	LINE-1 BSF LINE-1 BSR	TTGAGTTGTGGTGGTTTTATTAG TCATCTCACTAAAAATACCAACA	413	50	X58075			
Alu	BS	Alu BSF Alu BSR	GATCTTTTTTATAAAAATATAAAAATTAGT GATCCCAACTAAAAATACAATAA	152	43	Mbo1	U14568	



## 参考資料(2)-3 PCR-Luminex法で用いたオリゴプローブの塩基配列

Target genes			Sequence (5'-3')
H19	probe (CpG 9)	Me	TTATAGTTCGAGTTCGTTT
		Un	ATTATAGTTTGAGTTTGTTT
	probe (CpG 16)	Me	AGTTACGCGTCGTAGG
		Un	AGTTATGTGTTGTAGGG
GTL2	probe (CpG 4)	Me	CCTAATAAATCGCGAACAA
		Un	CCTAATAAATCACAAACAA
	probe (CpG 8)	Me	GTTGTTGAGGTTTATAG
		Un	CTATAAACCTCAAACAACT
ZDBF2	probe (CpG 1)	Me	ATTCAAAACCGCAATAAACT
		Un	ATTCAAAACCACAATAAACTA
	probe (CpG 4)	Me	CAACTACTCGAATAACTAAA
		Un	CAACTACTCAAATAACTAAA
PEG1	probe (CpG 15)	Me	TTATGGTGCCTCGAGAT
		Un	GGTTATGGTGTGTTGAGAT
LIT1	probe (CpG 5)	Me	GTTATTGGTCGAAAGAGTT
		Un	GTTATTGGTTGAAAGAGTT
	probe (CpG 17)	Me	TGTTTTCGTCTTGTTCGAT
		Un	TTGTTTTGTTGTTGTTGAT
	probe (CpG 19)	Me	TGCGGTAGCGTTTCGAT
		Un	ATTGTGGTAGTGTTTTGATT
ZAC	probe (CpG 8)	Me	GGTACGTTTCGAGCGGT
		Un	GGTATGTTTGAGTGTTT
SNRPN	probe (CpG 16)	Me	AGGTTGGCGCGTATGTT
		Un	AGGTTGGCGCGTATGTT
	probe (CpG 19)	Me	AGGTTGGCGCGTATGTT
		Un	AGGTTGGCGCGTATGTT
PEG3	probe (CpG 20)	Me	GCGGTCTGAAGGCGTATTTA
		Un	GTGGTTGAAGGTGTATTTA

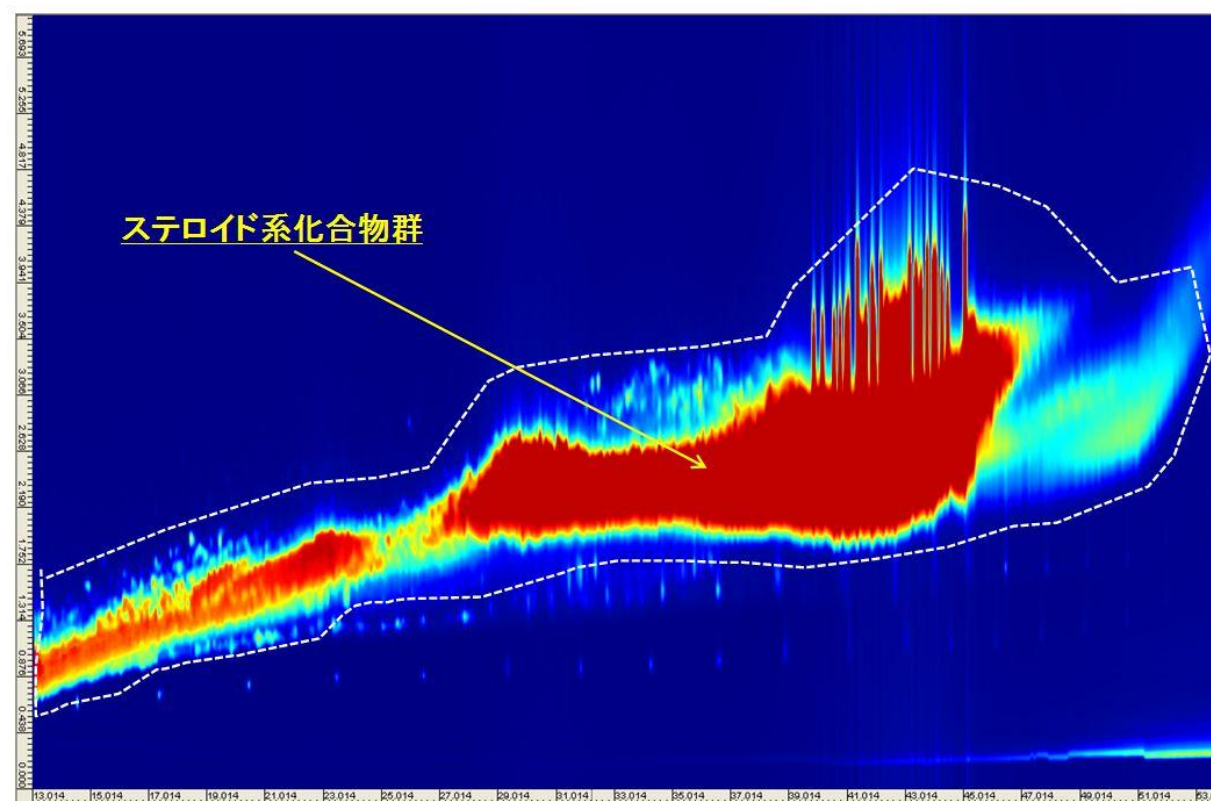


## 参考資料(4) 血液 GCxGC 測定結果

ここでは、本研究における被験者血液試料のGCxGC-TOF-MSの測定結果であるクロマトグラムを、いくつか示す。全ての図において、横軸はGCxGCにおける1st カラムのリテンションタイム、縦軸は2ndカラムのリテンションタイムで、対応するリテンションタイムにおける応答（レスポンス）を色で表現してある（青：応答小→赤：応答大）。

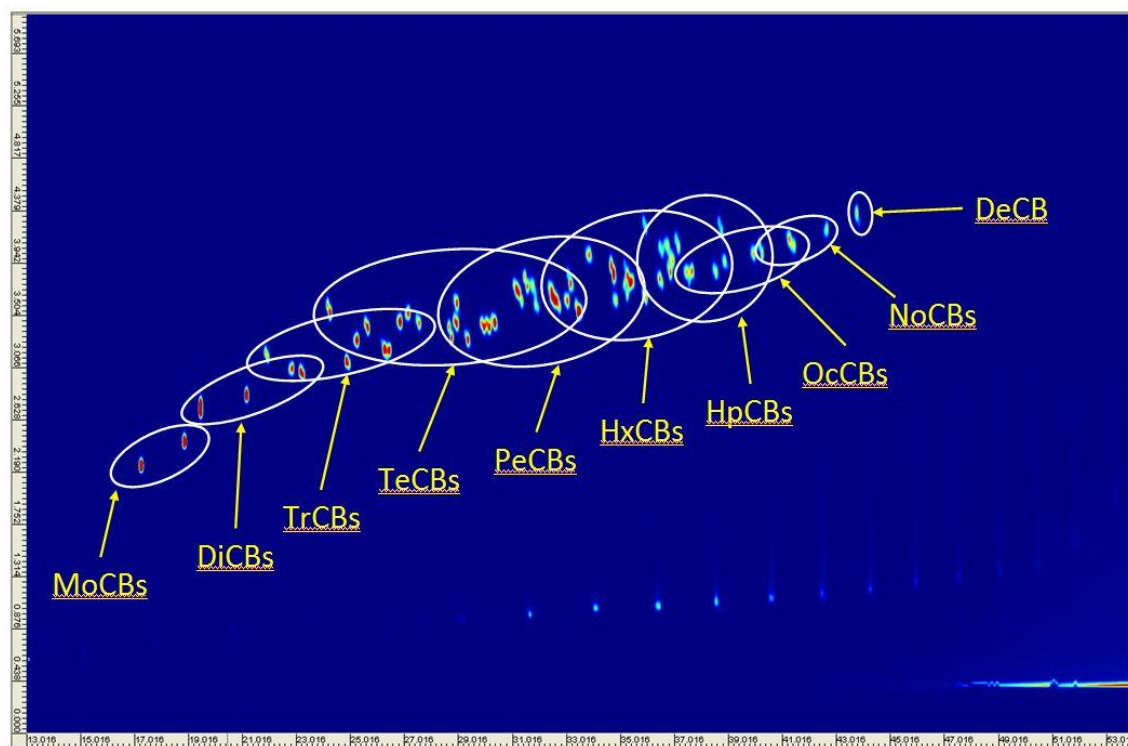
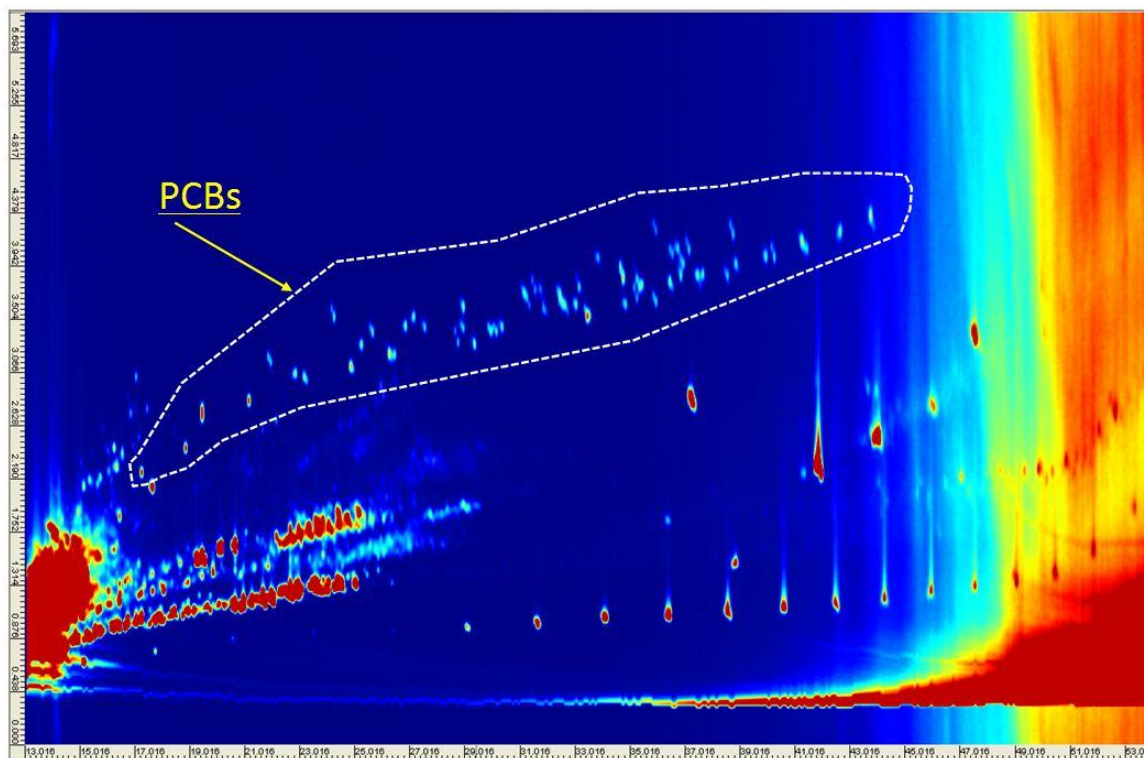
## 参考資料(4)-1

GCxGC-TOF-MSにおけるトータルイオンクロマトグラムである。全測定質量数を積算して応答を表示してある。非常に多くの化合物が検出されていることがわかる。使用した2種類のGCカラム（1st及び2nd）及び装置設定条件において、標準物質で出現位置を確認できていない物質はUSM（unresolved complex mixtures）と表現されることがあるが、ほとんどの化合物はUCMである。中央付近に出現している化合物は、ステロイド系化合物であると考えられる。



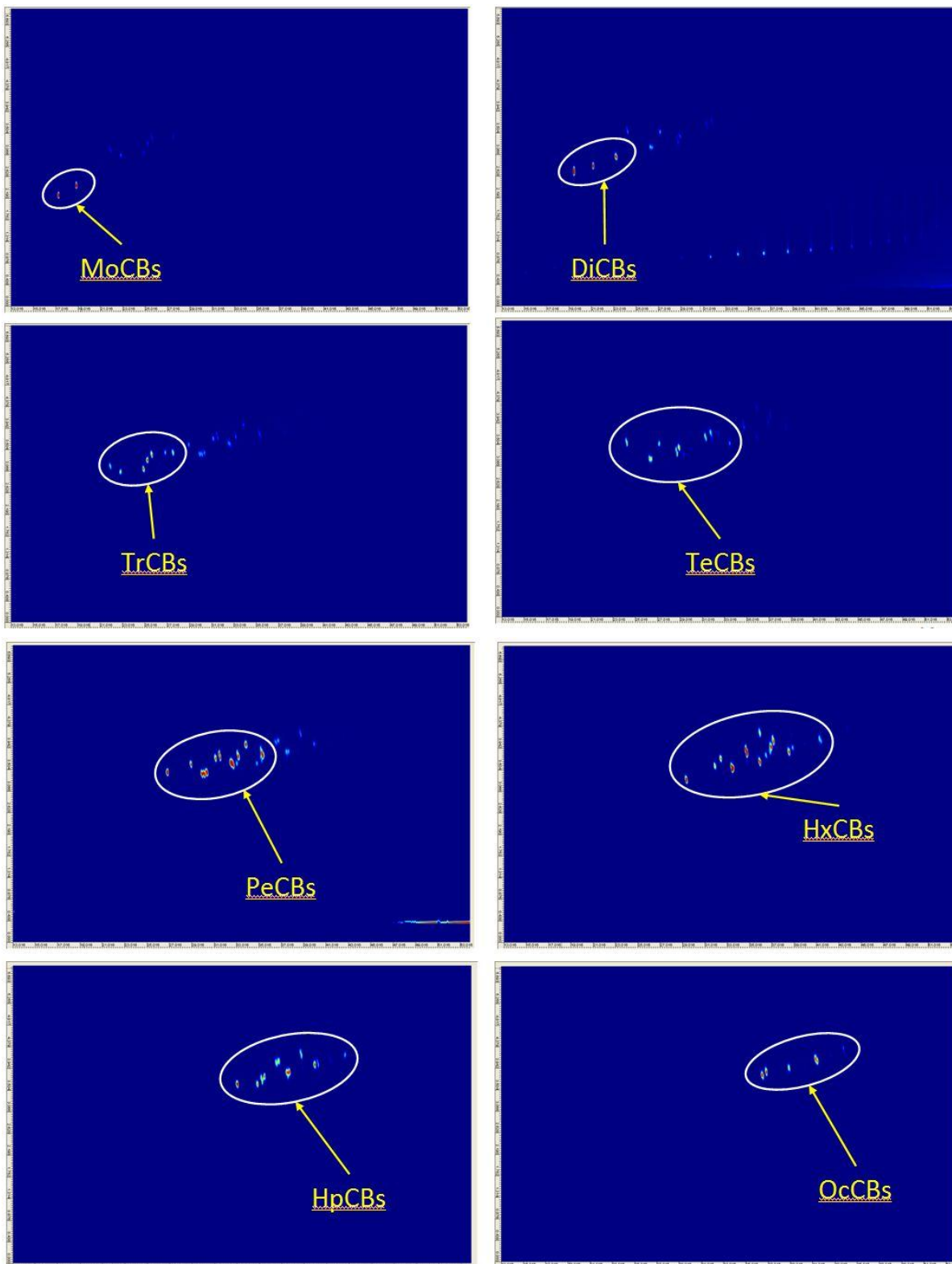
## 参考資料(4)-2

試料測定と同一の装置設定条件においてPCBの標準物質を測定したクロマトグラムを示す。Mono～deca CBが高分離能で検出されていることがわかる。この情報及び質量数並びにフラグメントの情報により、PCBsを同定定量可能となった。上図はトータルイオンクロマトグラム、下図はPCBの各同族体に該当する質量数にてフィルタリングを行ったクロマトグラムである。



## 参考資料(4)-3

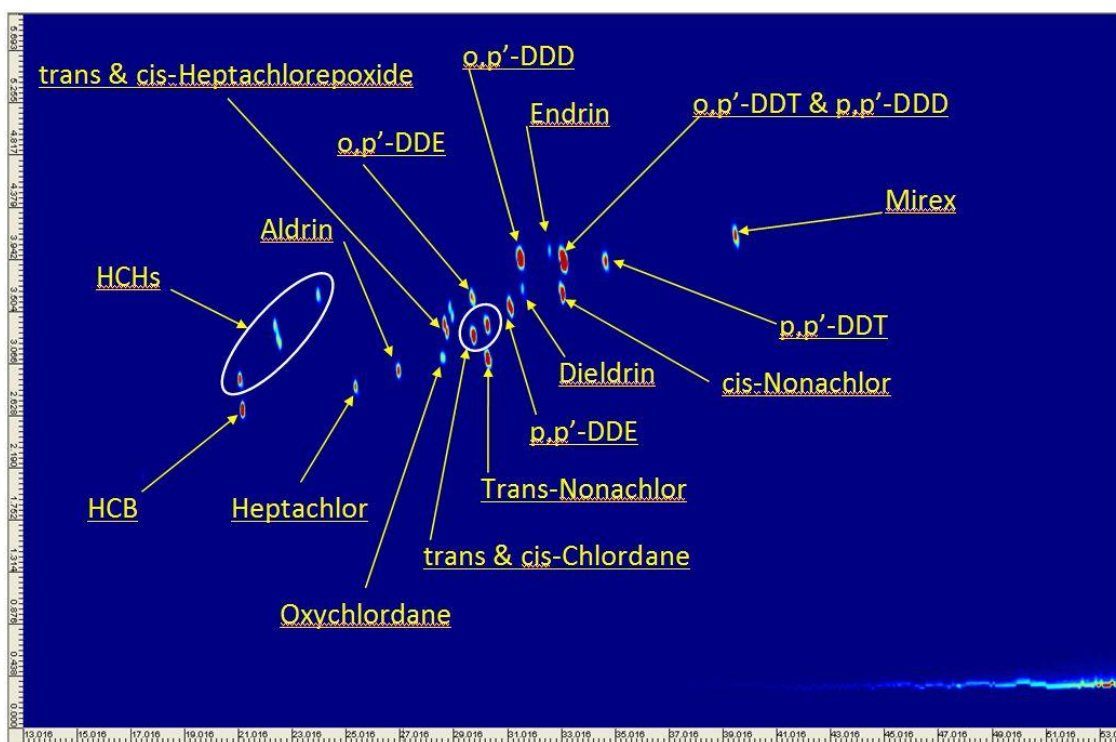
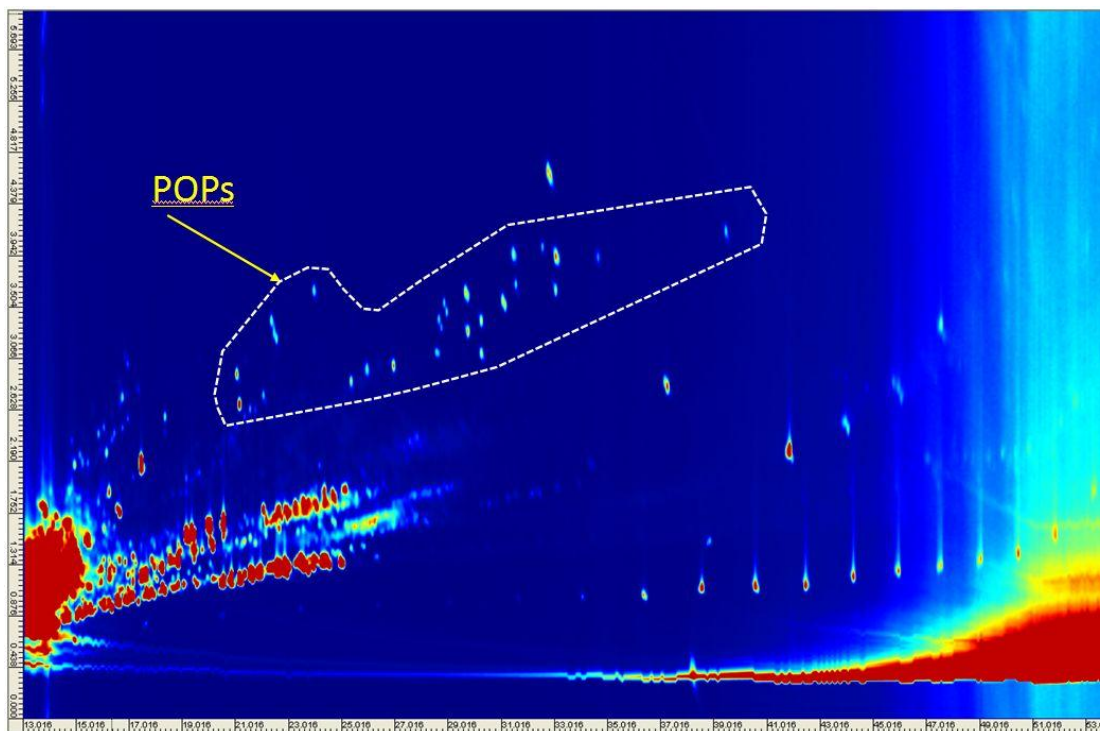
PCB各同族体 (mono~octa) に含まれる各異性体に対するクロマトグラムを示す (参考資料(4)-3 下図の拡大図に相当)。通常の一次元GCでは分離不可能である異性体 (横軸の値が同じである物質) の一部が分離していることがわかる。





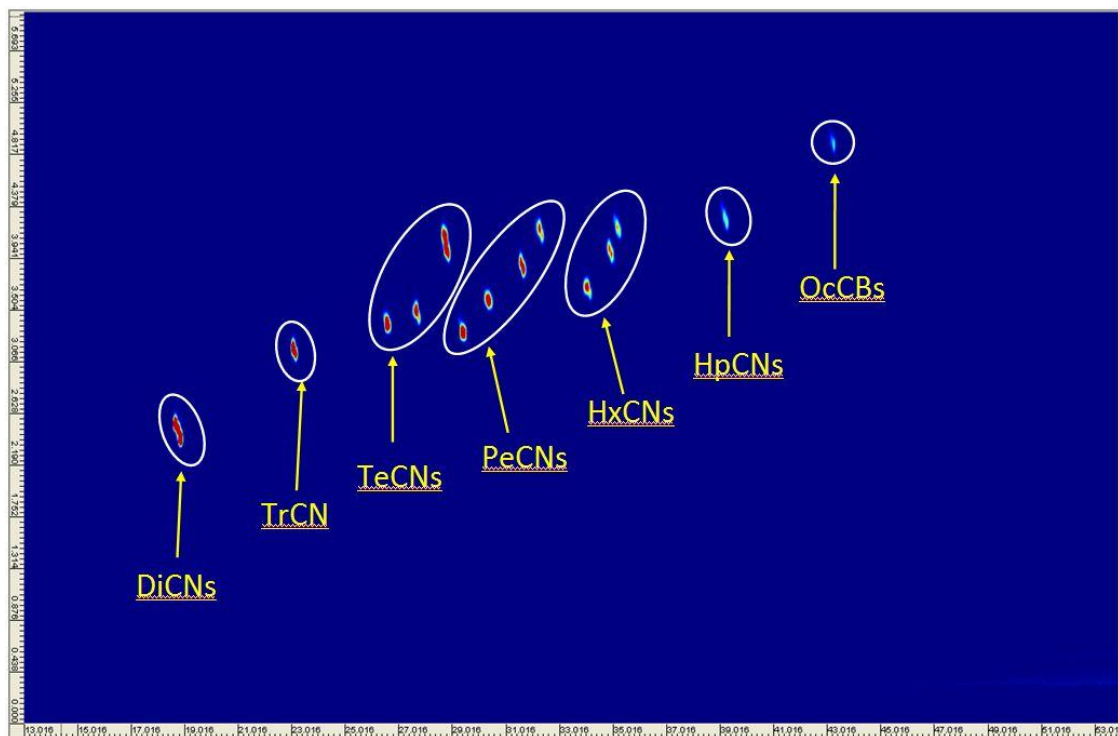
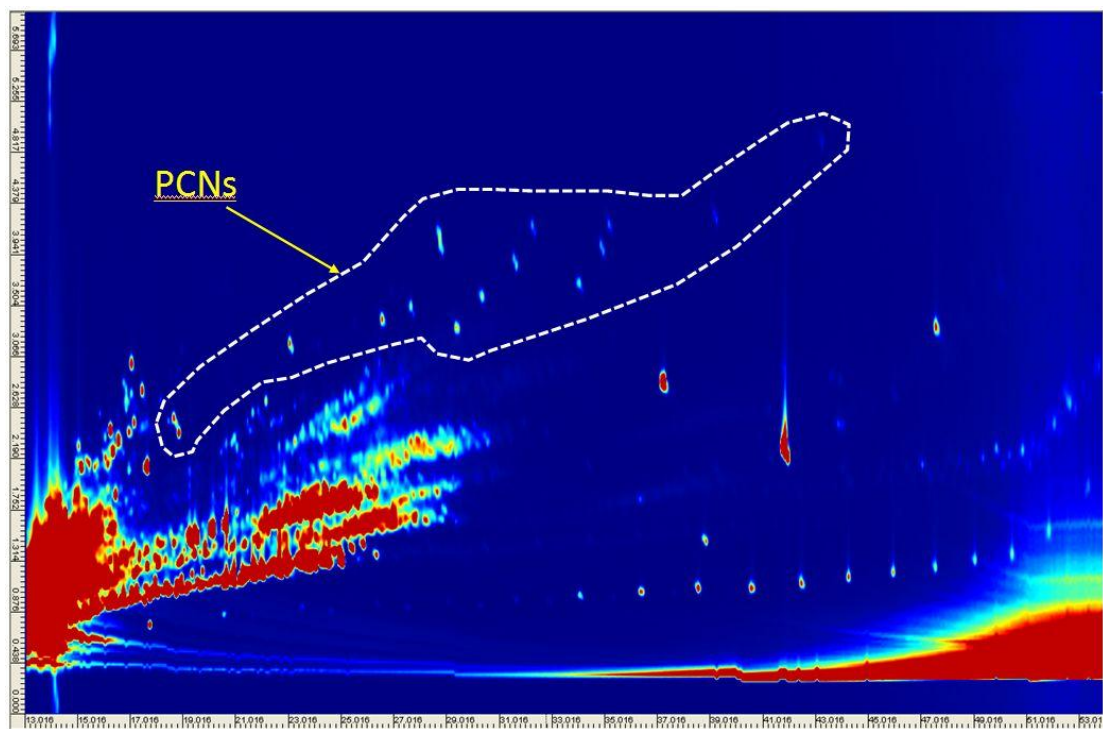
## 参考資料(4)-4

試料測定と同一の装置設定条件においてPOP<sub>s</sub>の標準物質を測定したクロマトグラムを示す。POP<sub>s</sub>化合物が高分離能で検出されていることがわかる。この情報及び質量数並びにフラグメントの情報により、POP<sub>s</sub>を同定定量可能となった。上図はトータルイオンクロマトグラム、下図はPOP<sub>s</sub>の各同族体に該当する質量数にてフィルタリングを行ったクロマトグラムである。



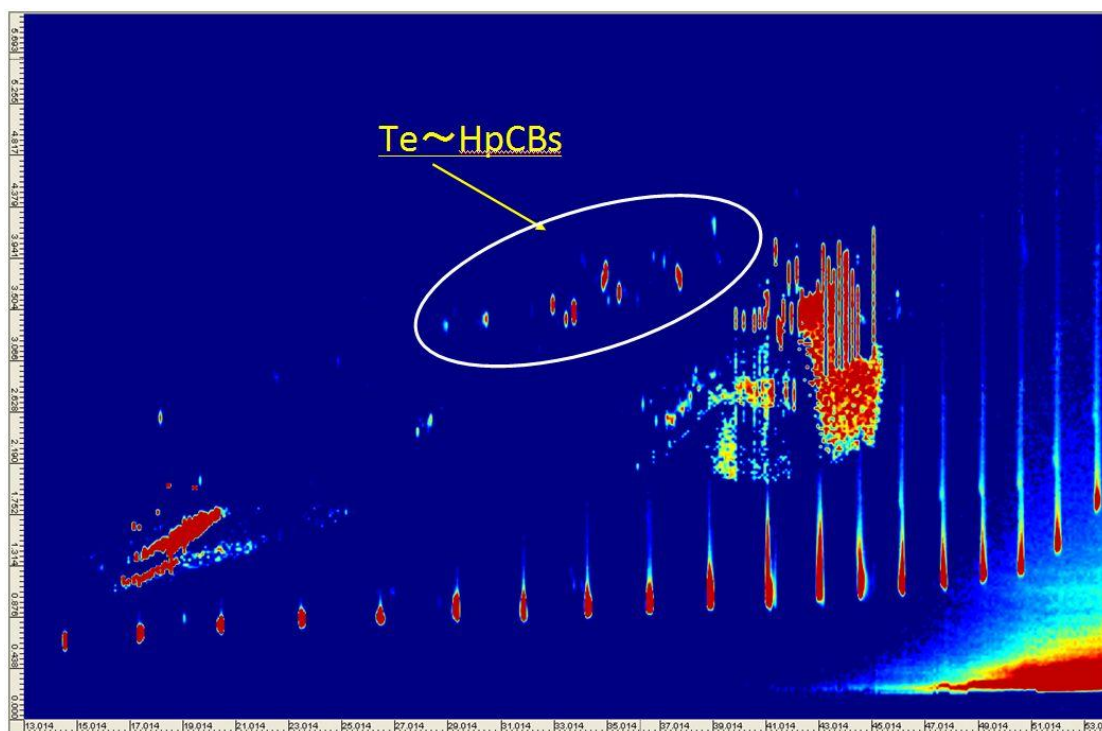
## 参考資料(4)-5

試料測定と同一の装置設定条件においてPCNsの標準物質を測定したクロマトグラムを示す。PCNs化合物が高分離能で検出されていることがわかる。この情報及び質量数並びにフラグメントの情報により、PCNsを同定定量可能となった。上図はトータルイオンクロマトグラム、下図はPCNsの各同族体に該当する質量数にてフィルタリングを行ったクロマトグラムである。



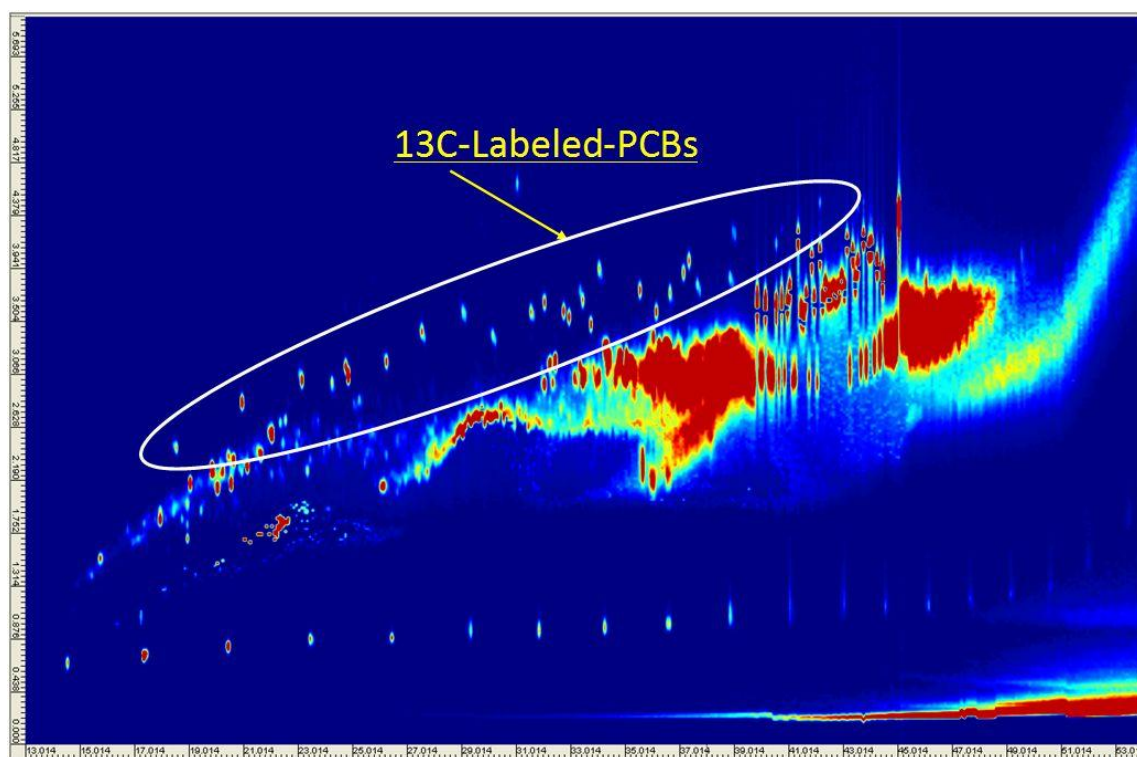
## 参考資料(4)-6

被験者のクロマトグラム一例である。Te~HpCBsが検出可能であった。



## 参考資料(4)-7

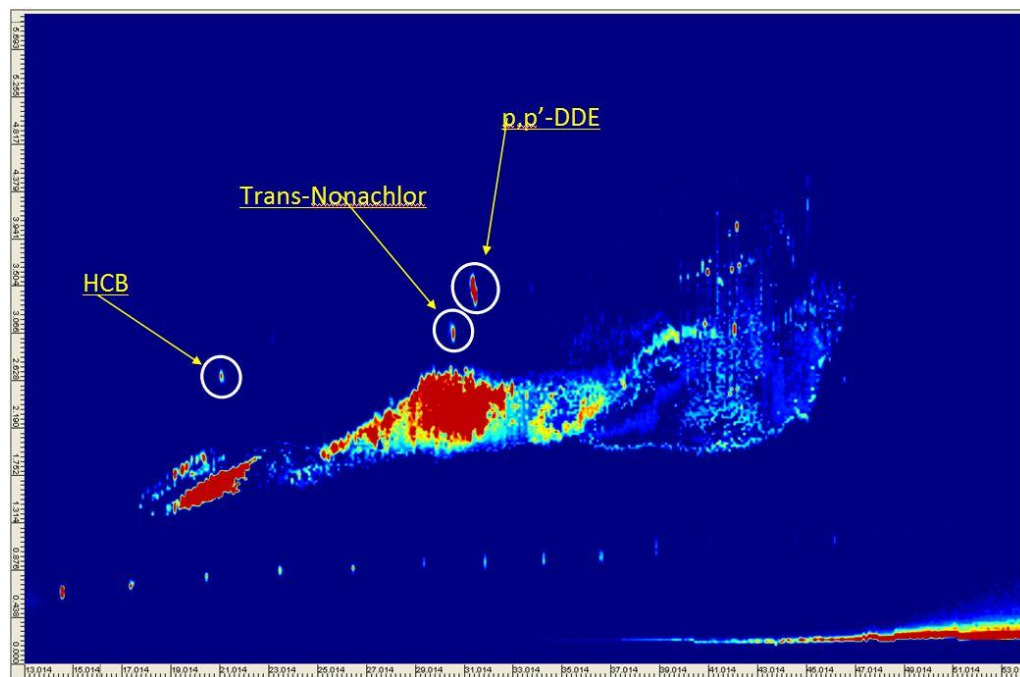
被験者のクロマトグラム一例である。PCBsに関しては同位体希釈法を用いた。内標準として添加した<sup>13</sup>C-Labeled-PCBsは問題なく検出可能であった。





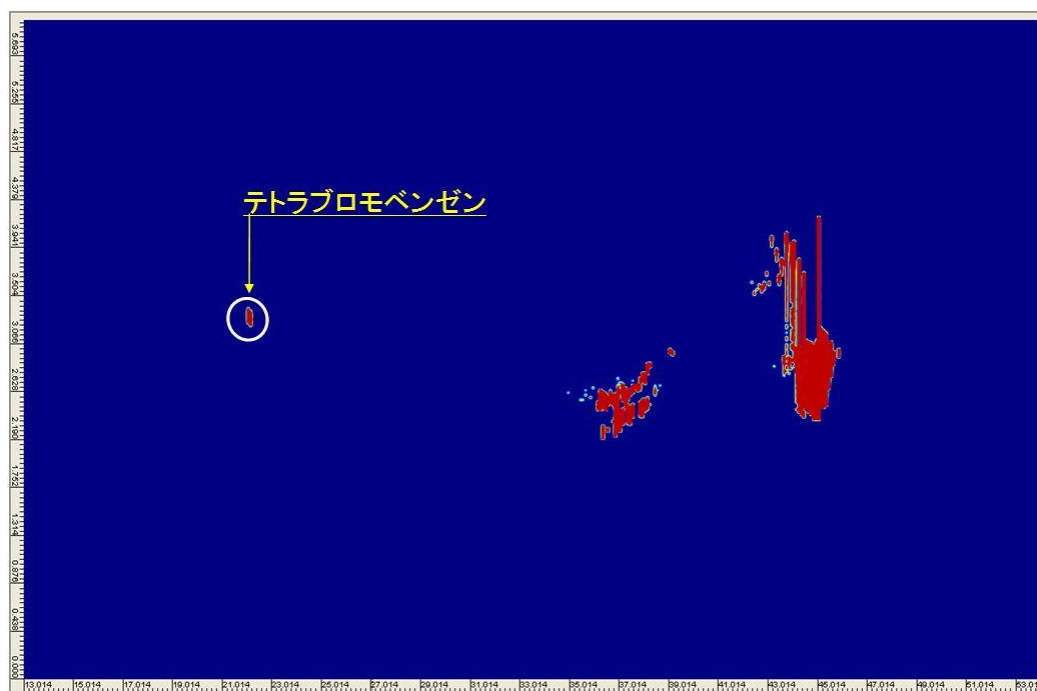
## 参考資料(4)-8

被験者のクロマトグラム一例である。POPsに関しては、HCB、trans-nonachlor及びp,p'-DDEが検出された。



## 参考資料(4)-9

被験者のクロマトグラム一例である。マススペクトルパターンからテトラブロモベンゼンと推測された化合物が存在した。標準物質を用いて確認し、テトラブロモベンゼンであるとアサインされた。



課題番号: C-1008 研究代表機関名: 東北大学

## 課題名: エピゲノム変異に着目した環境由来化学物質の男性精子への影響に関する症例対照研究

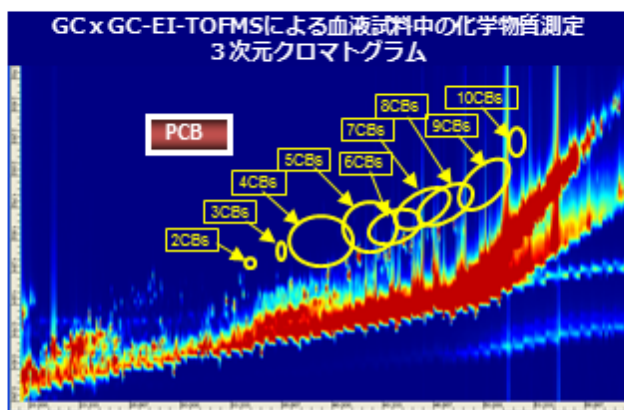
《研究目的》 環境由来化学物質曝露とエピゲノム異常との関連性についてヒト精子を用いて明らかにする

### 《研究方法》

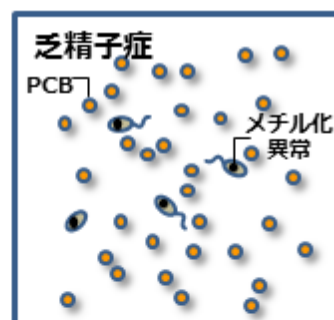
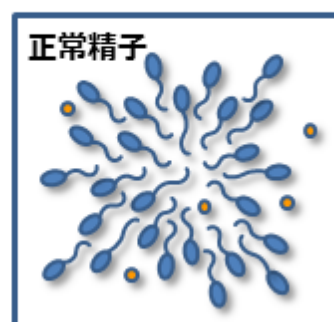
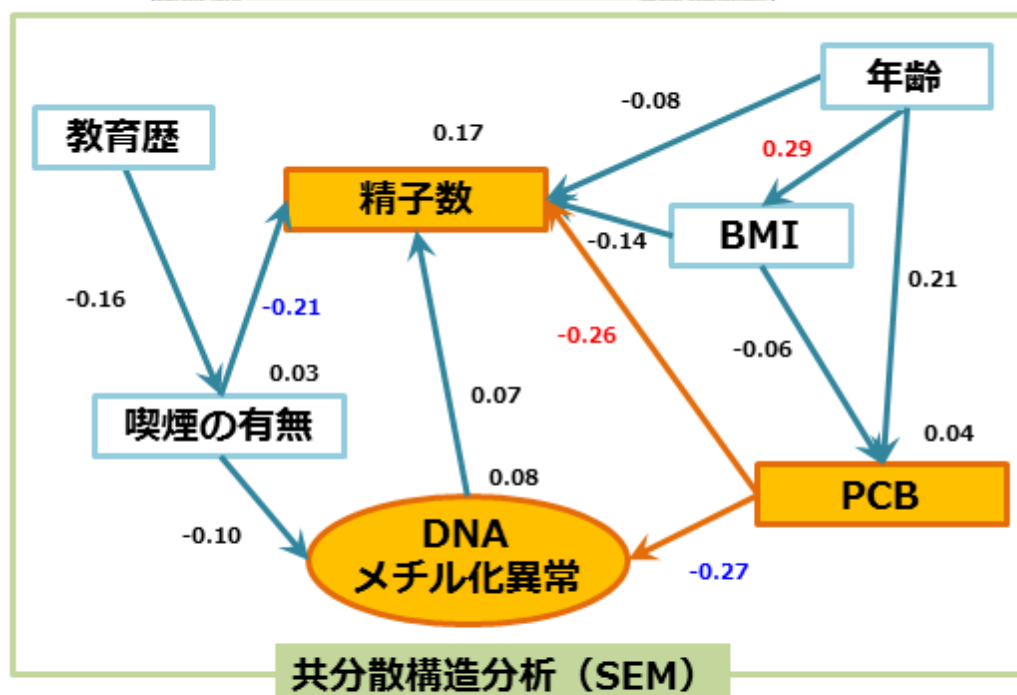
症例（乏精子症患者精子）・対照（正常精子）研究手法を用い、エピゲノム異常の頻度、程度について解析し、さらに環境由来化学物質濃度を比較する

1. 症例対照試験の実施・患者登録に関する研究
2. エピゲノム解析（精子）に関する研究
3. 環境化学物質の測定（末梢血および精漿）・網羅的TOF-MS解析に関する研究
4. 症例対照試験の評価・解析とリスク要因の評価に関する研究

### 《結果》



GCxGC/TOF-MSによる網羅的脂溶性化学物質の測定



### 《結論》

本研究の結果から、血中PCB濃度が増加すると精子数などの指標が減少し、乏精子症の発生が増える。精子減少とメチル化異常に相関が示された。