

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

H22.5.31~H25.3.29

54,698,000円-

東北大学大学院医学系研究科
有馬 隆博

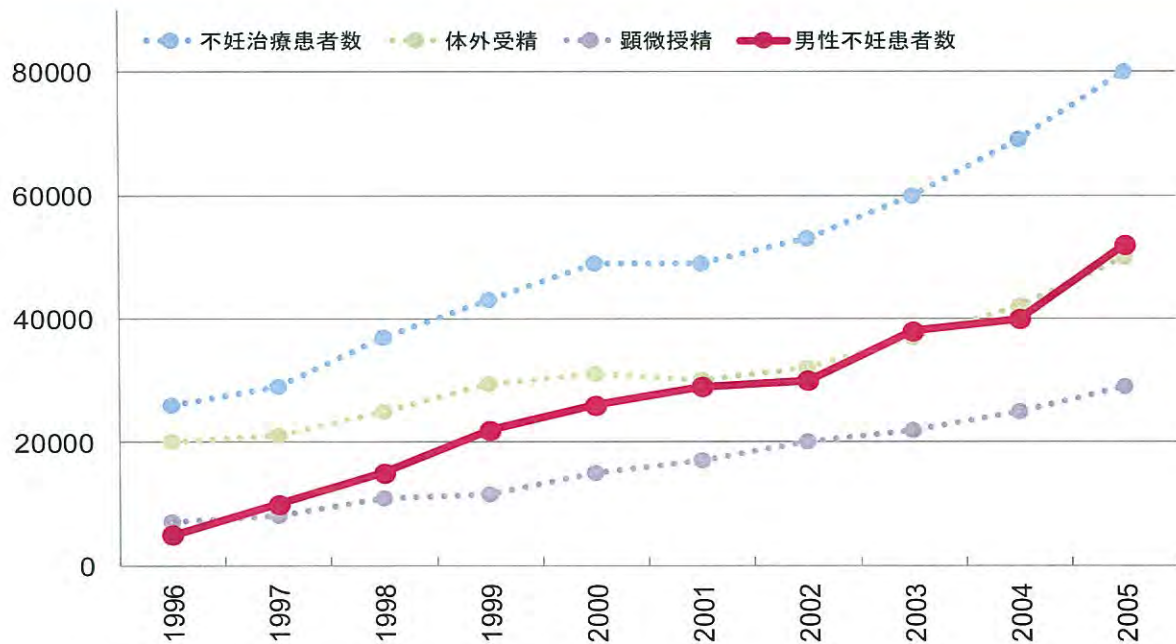
八重樫伸生、仲井邦彦
(東北大学医学系研究科)

佐藤晶子
(セント・ルカ生殖医療研究所)

松村徹
(いであ(株)環境創造研究所)

研究協力企業：G&Gサイエンス

我が国の男性不妊症患者は
過去10年間で約25倍増加（精子の数と質の低下）



2006年 日本産婦人科学会報告

環境由来化学物質の影響は？

研究の背景

環境由来化学物質は、遺伝子プロモーター等のエピジェネティックな修飾（エピゲノム）に影響を及ぼす

エピゲノムは、生殖細胞形成過程では、遺伝子刷り込み（ゲノムインプリンティング）として知られ、その分子機構の本体はDNAメチル化である

インプリント遺伝子制御領域のメチル化は生涯安定だが、生殖細胞では最も鋭敏に影響を受ける

メチル化の異常は、先天性疾患に限らず、乳幼児の行動・性格異常等に影響を与えることである

インプリント遺伝子のエピゲノム研究は環境科学分野で有用

環境由来化学物質曝露による生殖細胞への影響
についての的確な解析手法をもとに正確に評価する

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

- ・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

研究体制

テーマ1

東北大学医学系研究科 八重樫伸生
セント・ルカ生殖医療研究所 佐藤晶子

患者登録に関する研究

テーマ2

東北大学医学系研究科 有馬隆博

精子のエピゲノム
解析に関する研究



テーマ3

いであ(株)環境創造研究所 松村徹

GCxGC/TOF-MSによる網羅的脂溶性化学物質の測定



テーマ4

東北大学医学系研究科 仲井邦彦

解析とリスク要因の評価に関する研究

サブテーマ1 患者登録に関する研究

(1) 症例の登録

- ・ 症例(乏精子症) 128例(重症型61例)、対照(正常精子) 209例 総計 337名の登録
- ・ 年齢の比較：症例群 37.1±5.6 (28-52歳)
対照群 36.1±5.5 (25-53歳) (P=0.421)
- ・ 内分泌異常を示す 2 例は除外 (Cushing 症候群、Klinefelter 症候群疑い)

(2) アンケート調査

職業、運動習慣、喫煙、飲酒、食物摂取 等
30項目 (質問数 80)

(3) 精液検査

数、運動率、奇形率など測定

(4) 生体試料 (精子・血液) の保管

精子形態学的検査後の精子を凍結保存

(5) その他

東北大学大学院医学系研究科倫理委員会
および関連医療機関に本研究の申請と承認

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学術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○を付けるか、必要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) ()
離婚は? 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 ()
毎く汗をかき運動をしますか? 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
寝やすいですか? 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
ボリ塩化ドブ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
これまで一番長く居んだことのある職場は? 1.工務所 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

成果1

年齢、居住地をマッチさせた症例・対照試験

	精子正常群	乏精子群	p
年齢 (year)	36.1±5.5	37.1±5.6	0.42
BMI (kg/m ²)	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

(1) 生活習慣と基本属性

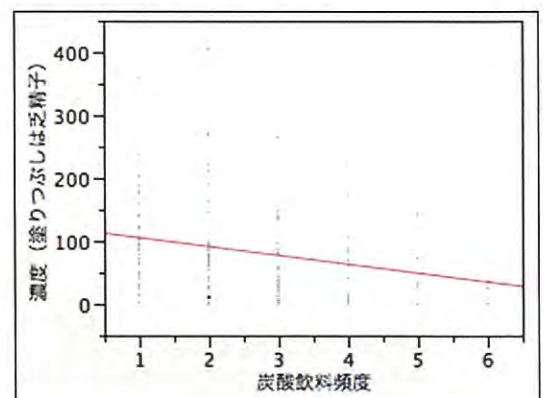
- 乏精子症では喫煙する人が多い
- 飲酒、ビタミン剤の内服などで相関なし(単変量解析)
- BMI (kg/m²) : 症例群 24.1±3.1
対照群 24.8±3.7 (P=0.37)

(2) 食事・栄養

- コーヒー摂取、食物摂取でも相関なし
- 例外として、炭酸飲料で負の相関

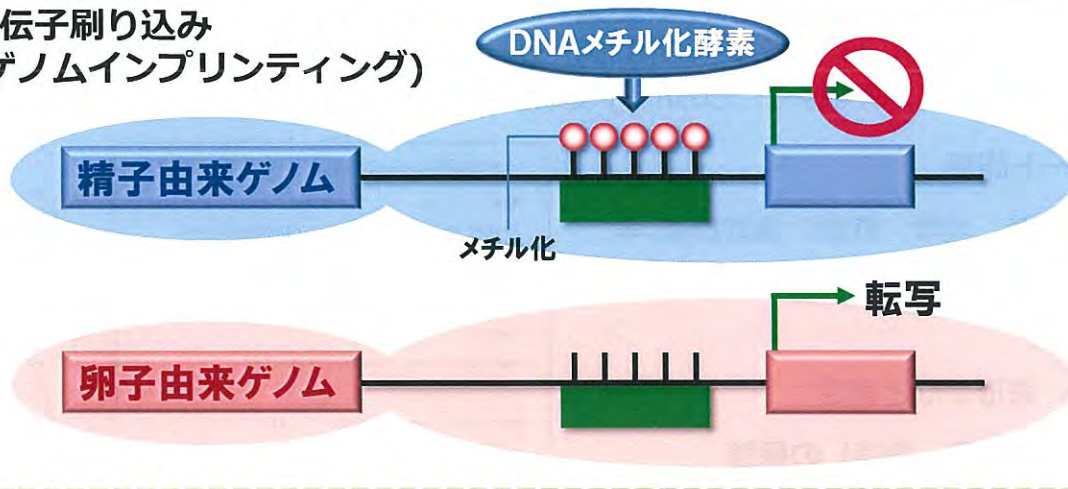
(3) その他

- 職業については染料を扱う場合に乏精子症が多い傾向にある (n=7)



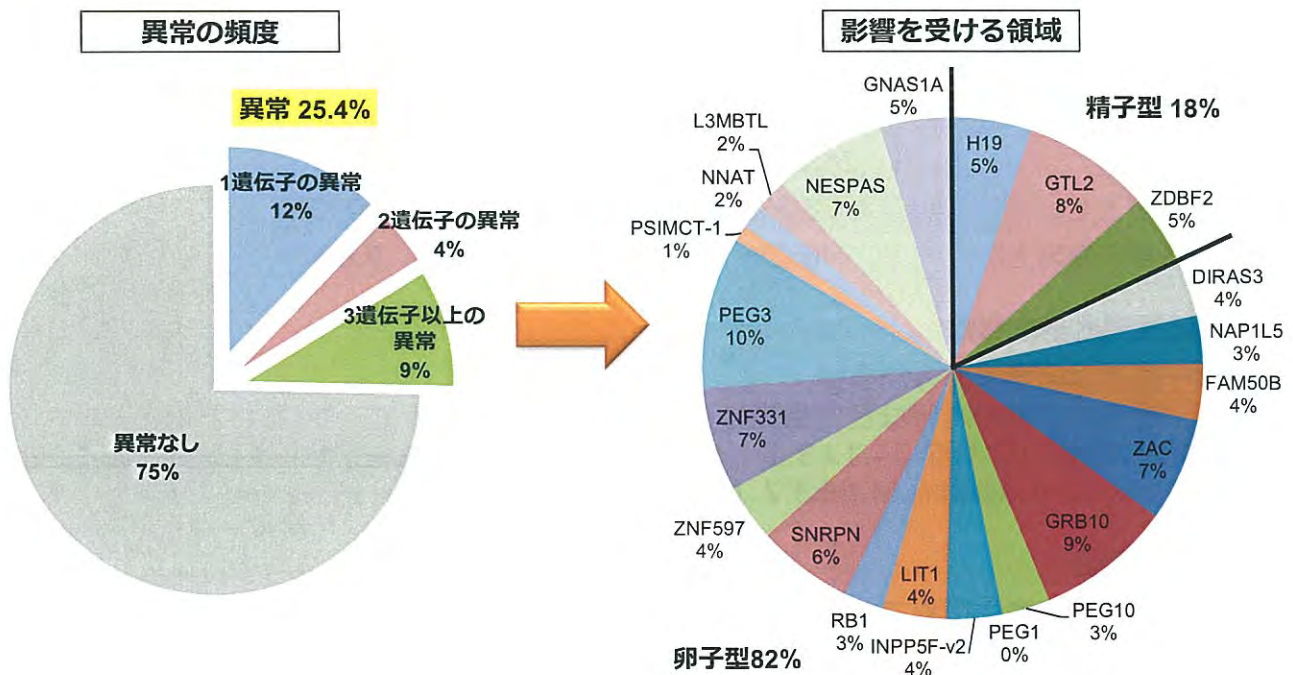
精子由来と卵子由来のゲノムが異なる発現様式を示す現象ヒトを含め、哺乳類の（胚）発生・分化、恒常性の維持に必須な現象

遺伝子刷り込み
(ゲノムインプリンティング)



- 分子機構の本体はDNAメチル化で、細胞の「目印」として遺伝子発現を調節する
- いずれか一方の親由来のゲノムはメチル化され、遺伝子の発現は抑制され、もう一方の親由来ゲノムはメチル化されず機能する (片親性発現)
- インプリント遺伝子のDNAメチル化は、生殖細胞形成過程で開始し、確立後、体細胞に至るまで安定に維持される。また、次世代となる始原生殖細胞で消去され、リプログラミングされる
- インプリント遺伝子の場合、DNAメチル化は一旦確立すると、「細胞の記憶」として生涯安定に維持される
- 例外として、生殖細胞では可塑性 (可逆性) を示す (化学物質曝露などの環境要因の影響を受けやすい)

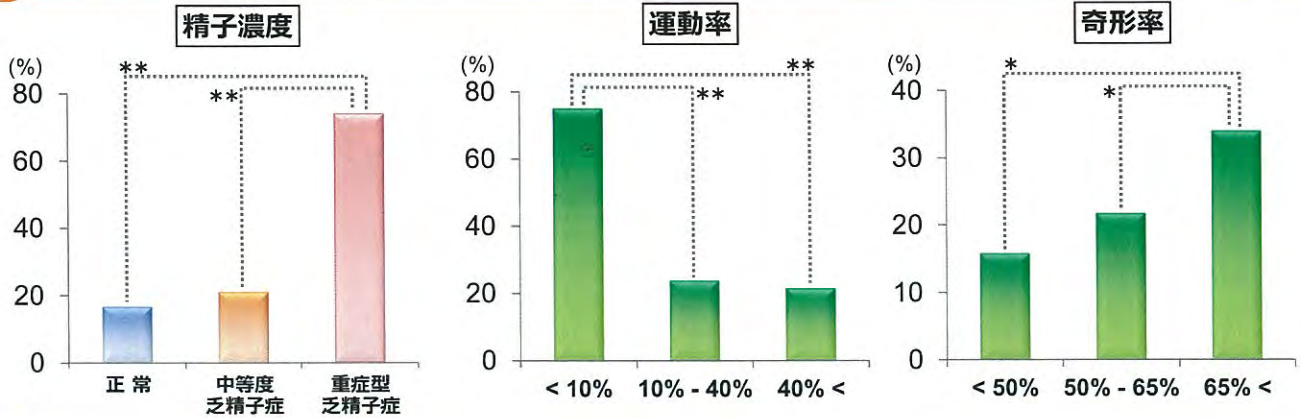
精子におけるDNAメチル化の頻度



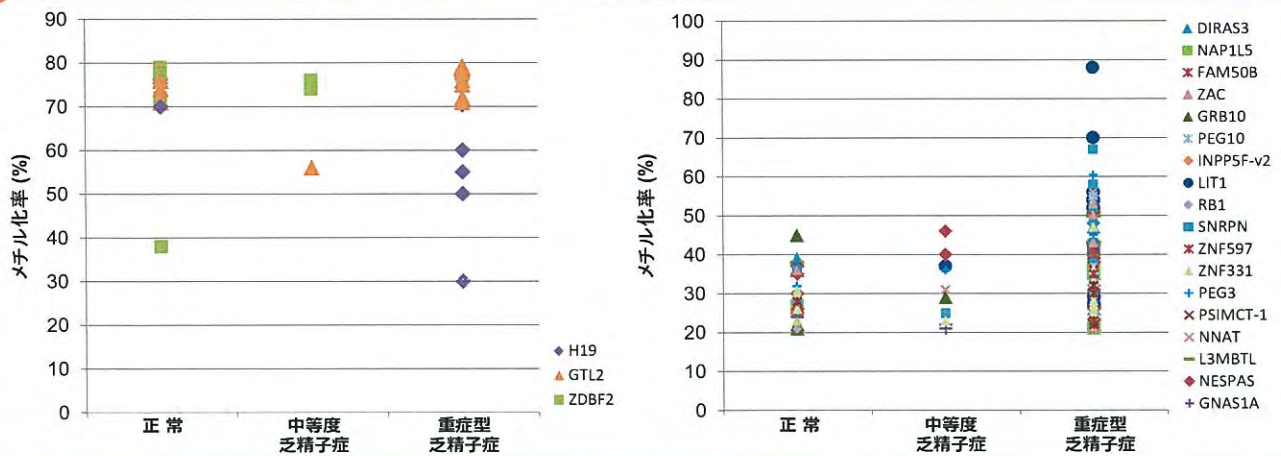
- ・論文 Sato A et al. Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation PCR-Luminex analysis. Fertil Steril. 2011.
- ・特許出願『不妊症患者精子におけるインプリンティング異常発生リスクの判定方法』 (東北大学 平成20年1月16日)
- ・特許出願『ZDBF2のメチル化領域とその検出方法(PCR-Lunimex)』 (東北大学 平成22年8月24日)

A メチル化異常と精液所見

* < 0.05, ** < 0.01



B メチル化異常の程度と精液所見



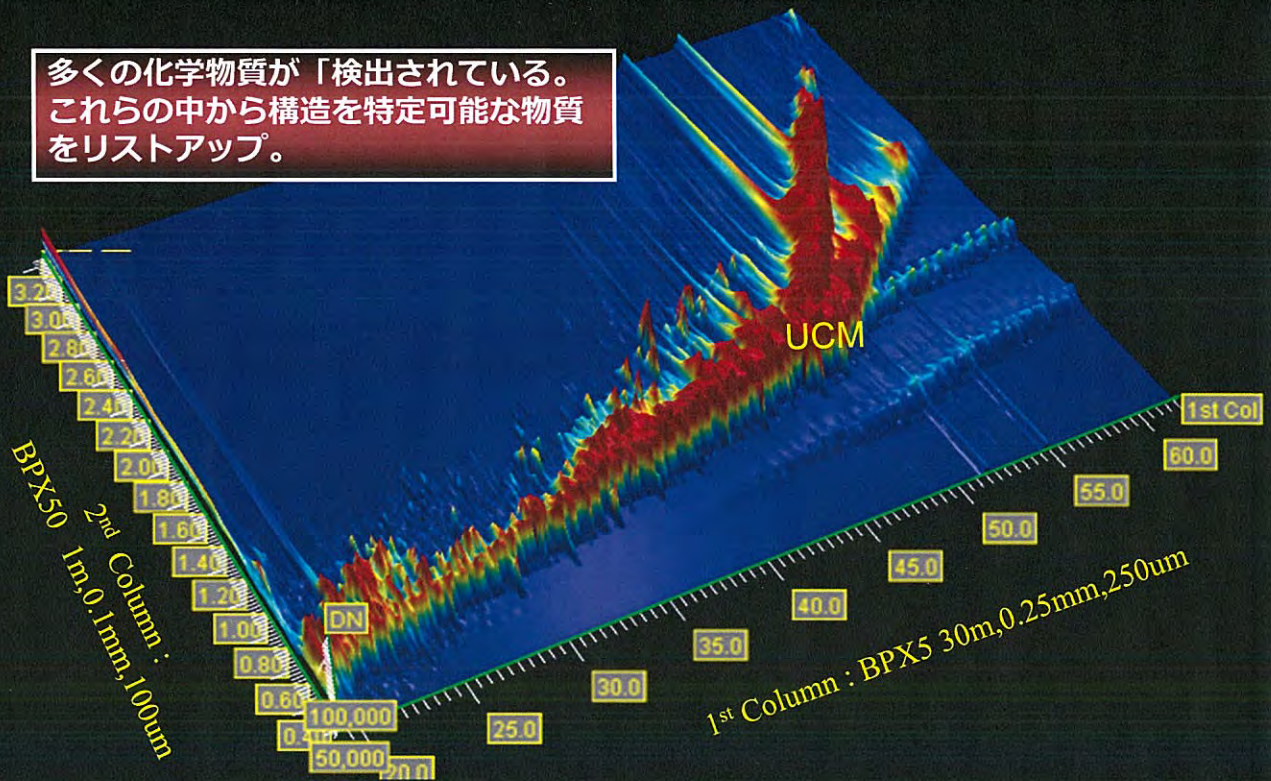
サブテーマ3 網羅的脂溶性化学物質の測定 (GCxGC/TOF-MS法)

GC x GC とは、Comprehensive GC、包括的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。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。

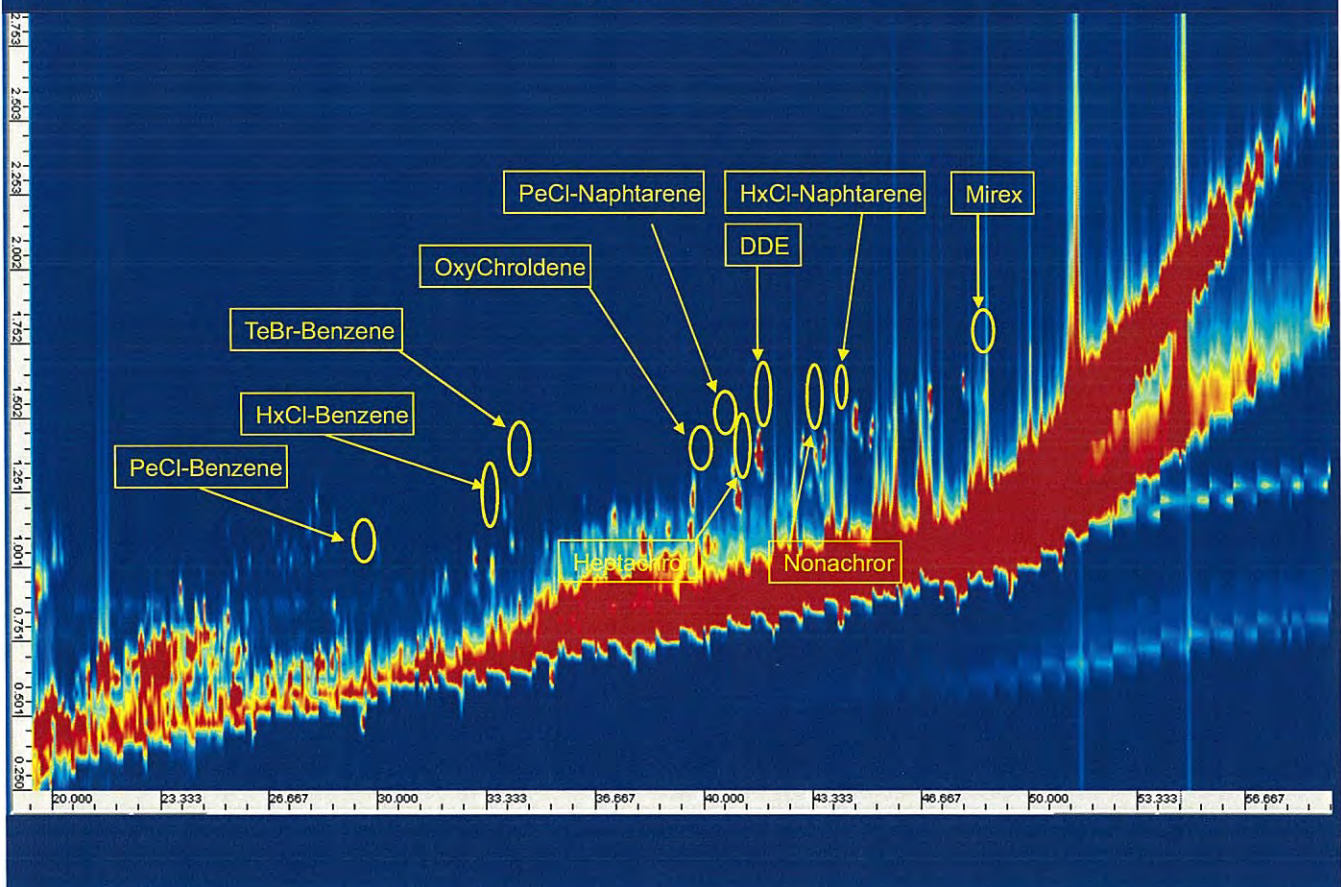
1. 位置情報が判明している特定の脂溶性の有機化学物質 (PCBs, DDT, DDE, DDD, HCB等) について、一度に解析できる
2. 同時に非特定化学物質についても、質量スペクトルライブラリーや標準品を用いて同定することが可能である
3. 比較対象群 (試料) 間において濃度差の検出された化合物を同定し、数値化する研究に適する

GC x GC-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

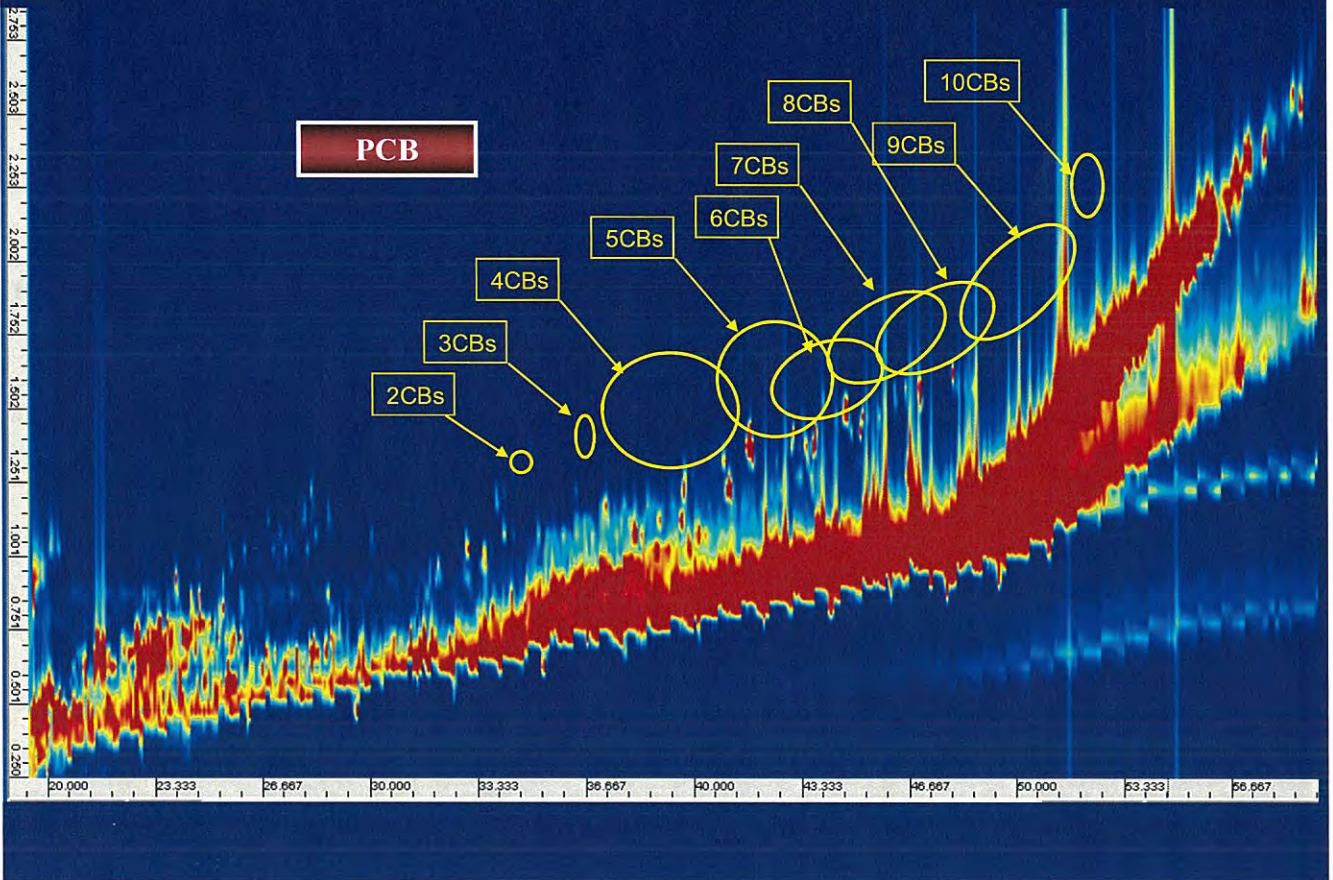
多くの化学物質が「検出されている。
これらの中から構造を特定可能な物質
をリストアップ。



GC x GC-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



GC x GC-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

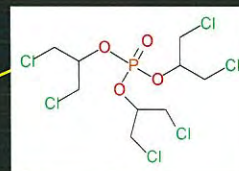
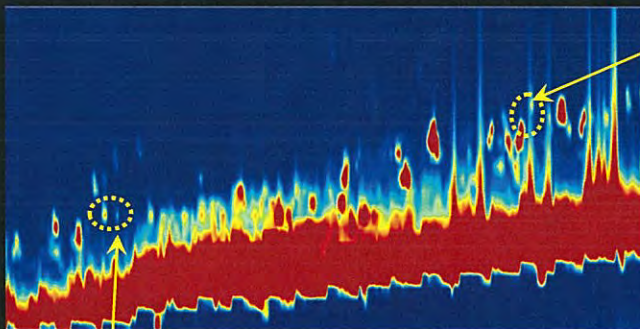


【成果3】 GCxGC/TOF-MSによる網羅的脂溶性化学物質の測定

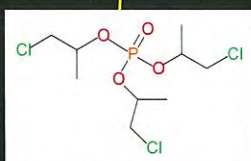
GC x GC-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定
2及び3次元クロマトグラムの例

リン系難燃剤

GCxGC 2Dクロマトグラム

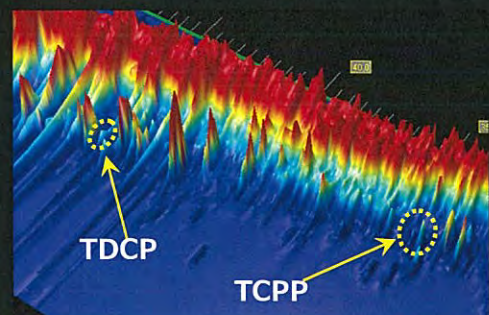


TDCP
トリス (ジクロロプロピル) ホスフェート



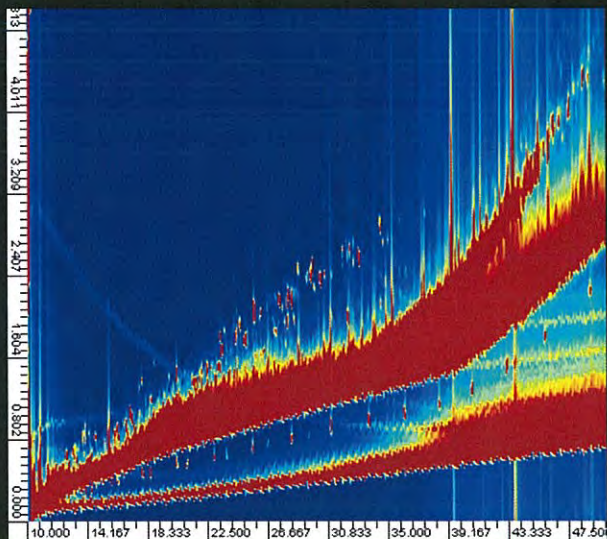
TCP
トリス (1-クロロ-2-プロピル) ホスファート

GC x GC 3Dクロマトグラム

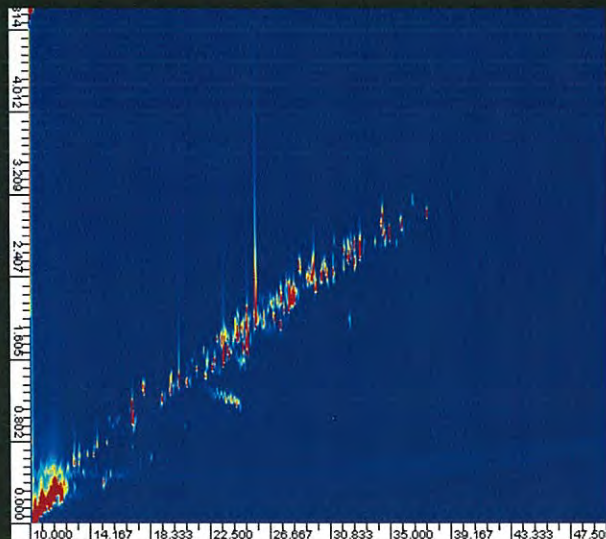


GC x GC-TOFMSによる血液試料中の化学物質測定 -イオン化方法の違いによる-

GCxGC-EI法 2Dクロマトグラム



GCxGC-CI法 2Dクロマトグラム



成果3

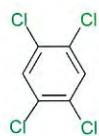
GCxGC/TOF-MSによる網羅的脂溶性化学物質の測定

アサインされた化合物

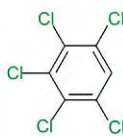
塩化ビフェニル, 塩化ベンゼン, 臭化ベンゼン, 塩化スチレン, 塩化ナフタレン, 塩化アニリン,
4,4'-(2-塩化ビニリデン)ビス(塩化ベンゼン), トリス(塩化プロピル)ホスフェート, 塩化シクロヘキサン, TCPP, TDCP,
DDE, DDD, DDT, ヘプタクロル, クロルデン, オキシクロルデン, ノナクロル, HCH, トキサフェン
(parlar26,32,50), マイレックス, ポリ塩化ジフェニルエーテル, 塩化ターフェニル(異性体数が多いので異性体毎のアサイ
ンは未実施)

構造式の例 (一部)

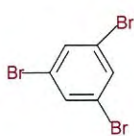
テトラクロロ
ベンゼン



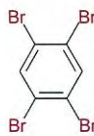
ペンタクロロ
ベンゼン



トリブロモ
ベンゼン



テトラブロモ
ベンゼン



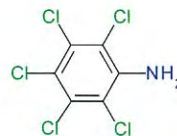
ペンタブロモ
ベンゼン



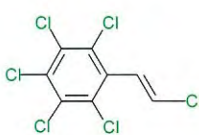
ヘキサブロモ
ベンゼン



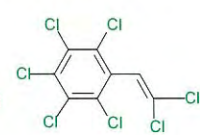
ペンタクロロ
アニリン



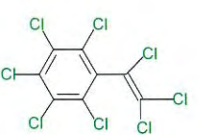
ヘキサクロロ
スチレン



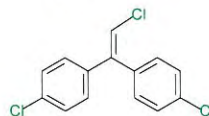
ヘプタクロロ
スチレン



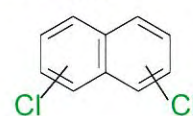
オクタクロロ
スチレン



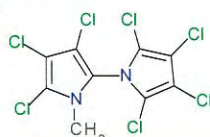
4,4'-DDMU



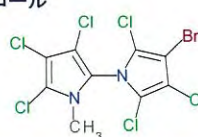
4-6塩素化ナフタレン



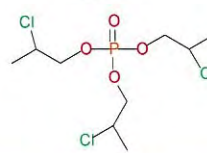
ヘプタクロロメチル
ピピロール



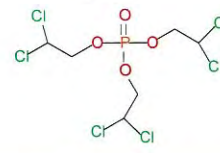
モノブロモヘキサクロロメチル
ピピロール



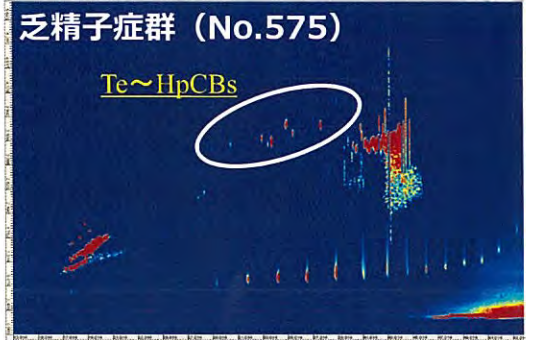
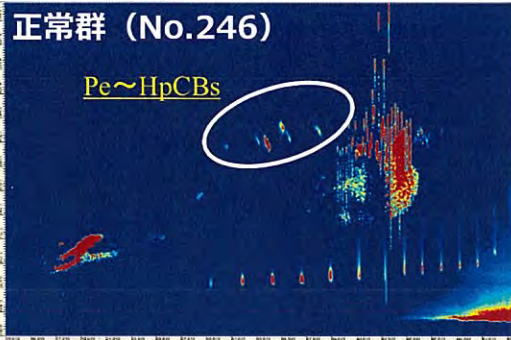
TCPP



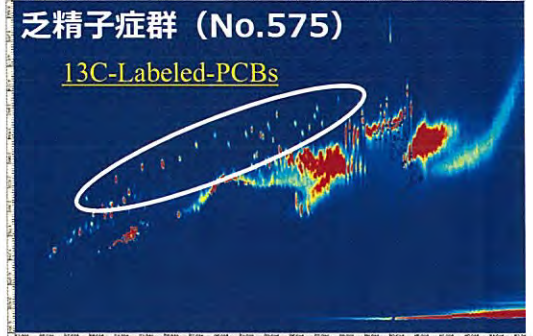
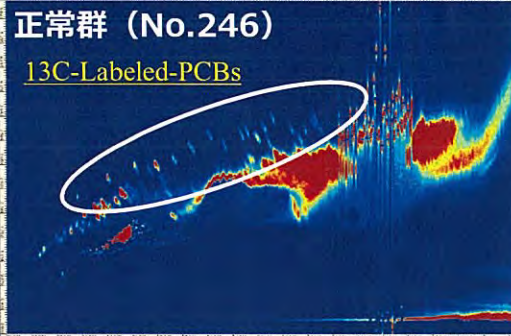
TDCP



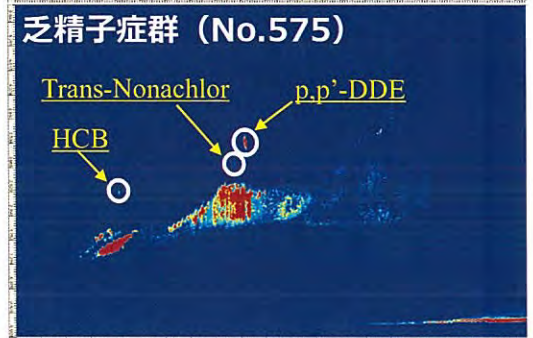
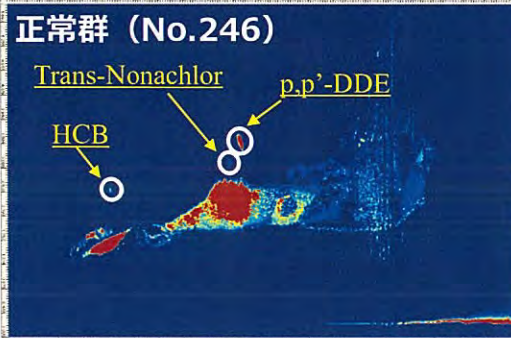
PCBs抽出EIC
による2D Map



13C-Labeled
-PCBs抽出EIC
による2D Map

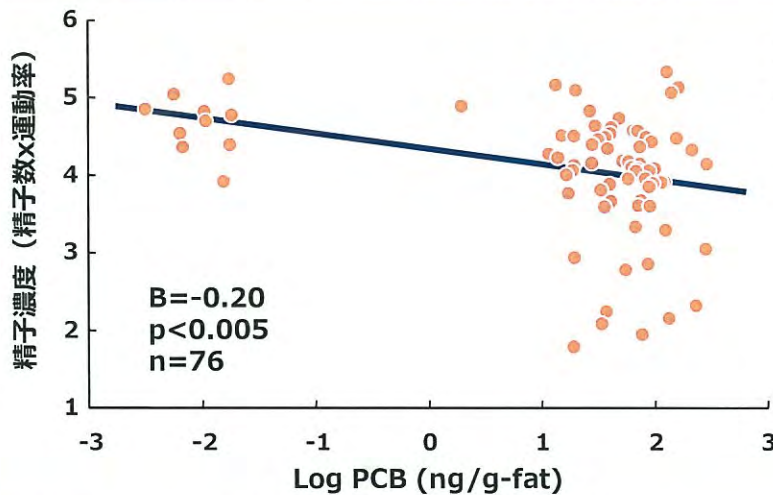


POPs抽出EIC
による2D Map



サブテーマ4 解析とリスク要因の評価に関する研究

PCB濃度と精液所見



PCB濃度と精液所見は
負の相関

血中PCB	低濃度群	中等度群	高濃度群	P-trend
モデル1	1.00 (reference)	4.81 (1.65-15.2)	22.4 (5.78-111.5)	< 0.001
モデル2	1.00 (reference)	3.78 (1.15-13.5)	16.1 (3.91-82.4)	< 0.001
モデル3	1.00 (reference)	4.10 (1.20-15.1)	17.5 (4.13-95.1)	< 0.001

モデル1：年齢補正
モデル2：年齢・喫煙補正
モデル3：年齢・喫煙・BMI・
教育歴による補正

共変数（モデル1～3）を検討しても、血中PCB濃度と乏精子症精子が正常精子かの2値でのロジスティック回帰との関連性に影響は認められない。

PCB異性体と精子濃度（数×運動率）との関連性
（Spearmanの順位相関係数）（n=90）

	相関係数	P値
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

- PCB異性体同士の間でも高い関連性がある
- 原因となる異性体を推定することは困難
- 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

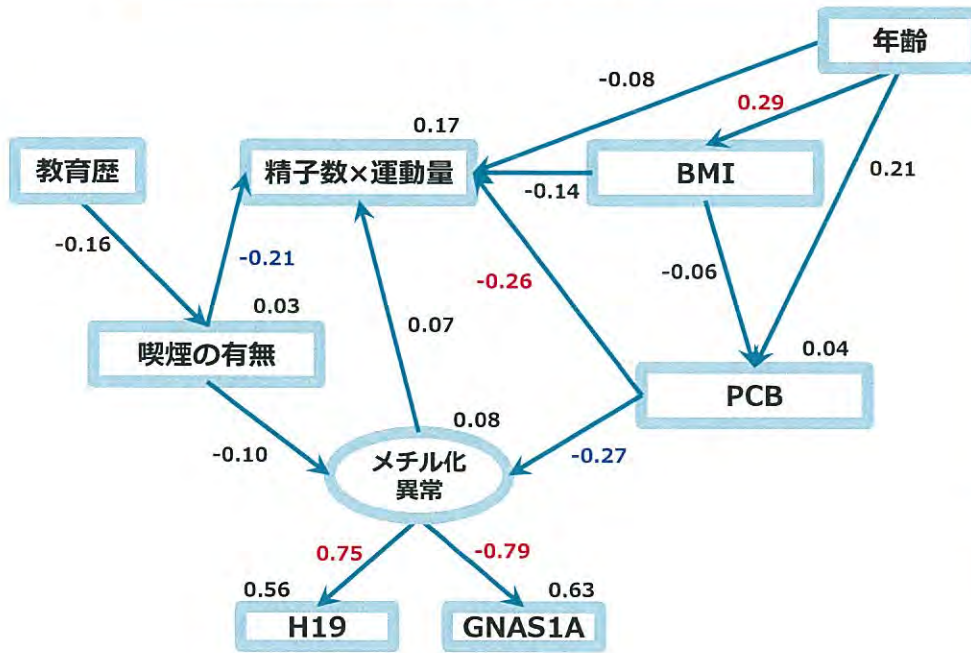
血中PCBとその他の属性との関連性

	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 ²)	24.8±3.7	24.1±31	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

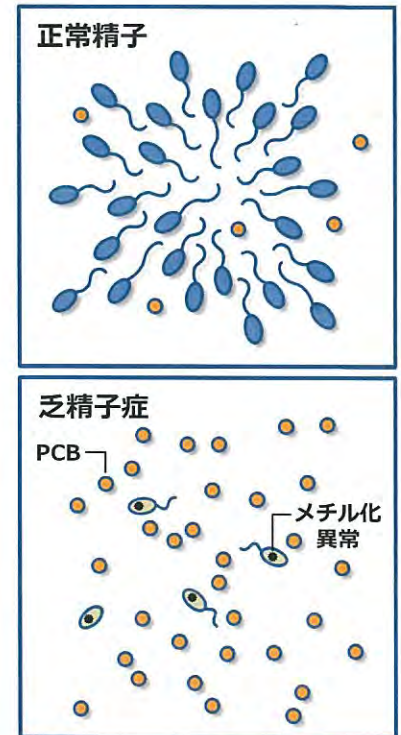
- 平均±SD。n=90、*喫煙データについてはn=76。
- PCB分析で、検出下限値 (=0.1) 以下はその半値 (=0.05) を代入して計算した。
- PCB検出率は、検出下限値以上となるデータが得られた検体数の割合を示した。
- 統計解析はt-testまたはχ²乗検定による。

研究成果のまとめ

共分散構造分析 (SEM)



$\chi^2(15)=14.636$, $p=0.478$, $GFI=0.948$, $AGFI=0.875$
 $RMSEA=0.000$, $RMR=9.760$, $AIC=56.636$



今後の展望

1. 環境由来化学物質とエピゲノム異常の関連性：

- ・ PCB濃度と乏精子症との関連性が明らかとなった
- ・ エピゲノム異常は乏精子症で圧倒的に多いことより、PCBは、精子の数・質の両方（精子成熟過程）に影響を及ぼすことが示唆された
- ・ 確実な結果を得るために、研究の継続が必要である

2. 化学物質のリスク研究への網羅的解析技術の導入：

- ・ GC/GC TOF-MS法による網羅的な化学物質の測定は、他の生体試料にも適応拡大