

実験3；肥満と血中 ChE および有機リン系殺虫剤の影響

急性毒性試験（投与～72 時間(3 日目)）および短期（亜急性）毒性試験（投与後 72 時間(3 日目)～432 時間(18 日目)）

肥満・やせ・正常体重ラットの比較では急性期（投与～72 時間(3 日目)）では3者間とも AChE 低下率は時間とともに大きくなっているが3者間での比較ではやせラットが大きい傾向であった。72 時間(3 日目)以降は徐々に活性上昇がみられ 432 時間(18 日目)ではやせ・正常体重ラット AChE のそれぞれは 78%、66% と低下率が大きかったが、肥満ラットの AChE は 114% と活性の回復が速く投与時より強い活性が示された。一方、PChE に関しては肥満ラット・やせ・正常体重ラットで、農薬投与3時間後から低下が72 時間後までみられ、その後ゆっくりと上昇し 432 時間(18 日目)での肥満・やせ・正常体重ラット間の PChE 比較ではそれぞれ 94%、91%、100% とやせラットの回復がおくっていた。従って、実際の有機リン系農薬等の殺虫剤撒布の人達の暴露状況を ChE 活性の動きよりみると、急性中毒期（～3 日目）では AChE および PChE で体型からの活性への影響はみられないが、短期中毒期（亜急性：2 週～3 週

目）では正常体重のヒトに比して肥満のヒトでは AChE が高めに現れる傾向が予想される。

高脂血症における血清 ChE 活性値の上昇が報告され、その上昇の機序の第 1 に、脂質合成速度の亢進に伴って産生されるリポタンパクからの ChE の遊離の増加が示され、第 2 に脂質代謝回転速度の増加により ChE の基質であるアシルコリンの蓄積が生じ、肝における ChE 合成が亢進し増加することが示されている。肥満では脂質の代謝亢進が考えられ第 1 の機序が関係するものと考えられた。

D. 結論

1 剤投与による ChE への阻害について

1) 急性中毒時における有機リン系農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン）による ChE への阻害では血漿 PChE の方が敏感に作用し、低下も速やかで、低下も血球 AChE より大きい結果を示した。

2) 短期（亜急性）中毒時および急性中毒回復期における有機リン系農薬（ダイアジノン、フェニトロチオン）による ChE への阻害では、血球 AChE の方が低下率が大きい。したがってこのような場合の診断的用途には血球 ChE の方が優れていると思われる。

2 剤混合投与による ChE への阻害について

1) 急性中毒時における①有機リン系+有機リン系 (D+F) および②有機リン系+カーバメート系(D+M)の混合薬剤による ChE への阻害では投与後 48 時間までは両者①②で血漿 PChE の方が敏感に作用し、低下も速やかで、低下も血球 AChE より大きい結果を示した。

2) 短期(亜急性)中毒時および急性中毒回復期における①有機リン系+有機リン系 (D+F) および②有機リン系+カーバメート系(D+M)の混合薬剤による ChE への阻害では血球 AChE の方が低下率が大きい。したがってこのような場合の診断的用途には血球 AChE の方が優れていると思われる。なおカーバメート系農薬 1 剤では ChE への阻害が認められなかったが、カーバメート系+有機リン系の混合薬剤では ChE への相乗阻害が認められた。個々の薬剤で低毒性であっても日常接する農薬(殺虫剤)は複数であり、また農薬以外の化学物質も加わることが考えられるから、ここで見られるように複合した毒性の評価が重要となることが示唆された。

3) 実際の有機リン剤農薬等の殺虫剤撒布の人達の暴露状況を ChE 活性の動きよりみると、正常体重のヒ

トに比して肥満のヒトでは AChE が高めに現れる傾向が予想される。

参考文献

- 1) 上田喜一、平田潔：農薬中毒—基礎と臨床—，(1978) 南江堂
- 2) 吉村正一郎、早田道治、森博美：急性中毒情報ファイル第 3 版,p21～82,(1996)廣川書店
- 3) 木本正七郎、千田重雄：最新有機薬品化学 第 3 版稿版,(1987) 廣川書店
- 4) 伊規須英輝、松村浩彦、松岡雅人；赤血球膜アセチルコリンエステラーゼ,JUOEH (産業医科大学雑誌) 16(3)p253～262(1994)
- 5) 石松維世、伊規須英輝、田中勇武；フェニロチオン粉剤反復吸入暴露実験による ChE 活性の低下:JUOEH (産業医科大学雑誌) 10(1)p71～75(1998)
- 6) 河合忠、玄蕃昭夫、屋形稔：異常値のであるメカニズム p189～194(2000)医学書院
- 7) 赤堀四郎、沖中重雄:臨床酵素学 p339～348(1964) 朝倉書店
- 8) WORLD HEALTH ORGANIZATION:IPCS Enviromental Health Criteria 133 Fenitrothion (1992), 178 Methomyl(1996), 198 Diazinon (1998)

- 9) 田嶋嘉雄：実験動物学—技術編
—p183～185(1997) 朝倉書店
- 10) 藤井儔子、小山良修：動物実手
技—ラットを中心として—p103～
112(1975)協同医書出版
- 11) 高垣善男、坂口孝、鍵山直子：
長期動物実験 p214～219(1981)清至書
院
- 12) 白須泰彦、松岡理：新しい毒性
試験と安全性の評価 p145(1975)ソフ
トサイエンス社
- 13) 奥木実：実験動験 取り扱いと
実験手技 p107～109(1968) 南江堂
- 14) 藤原公策、堀内茂友：毒性試験
講座 4 毒性試験に用いられる実験動
物 p494～497(1990)地上書館
- 15) 日本実験動物技術者協会編：図
解・実験動物技術集 p22～27(1998)ア
ドスリー

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用

検出のための新たなバイオマーカーの開発

— 殺虫剤散布作業者の尿中代謝物モニタリング —

分担研究者

柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科

社会生命科学講座環境労働衛生学

高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究協力者

五藤 雅博 五藤労働衛生コンサルタント事務所

斎藤 勲 東海コープ商品安全検査センター

上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究要旨

殺虫剤撒布職域従業員を対象に有機リン殺虫剤尿中代謝物(4種類のジアルキルリン酸(DAP))および血中コリンエステラーゼ活性の測定をおこなった。尿中代謝物による暴露管理は作業員への負担が少なく、高濃度はもちろん低濃度暴露をも鋭敏に反映する点で、作業管理への応用が可能であり、今後殺虫剤、農薬等を取り扱う作業員だけでなく、非暴露一般集団に対する暴露指標としても有用と考えられる。また、子供ができないという訴えは44名中4名で集団として特に問題となる数値ではなく、生まれた子について第1~4子及び全子で誕生月による偏りは観察されなかった。

A. 研究目的

殺虫剤、農薬は近年、その一部が内分泌攪乱化学物質とされるなど、

生殖系への影響が懸念されている。

現在は室内環境などで問題にされているが、これらの化学物質に職業的

に暴露されている作業者の暴露実態は十分に明らかになっていない。ジクロルボス、ダイアジノン、フェニトロチオン、マラチオンなど有機リン系化合物は、農薬として広く世界で使用されているほか、ゴキブリ、ダニなどの衛生害虫の駆除にも使われており、一般環境中にも存在している(Bardin ら, 1994)。有機リン系化合物は、神経刺激伝達物質アセチルコリン分解作用をもつコリンエステラーゼ活性の阻害によって神経中毒を引き起こすことにより殺虫効果を発揮するが、ヒトに対しても大量の暴露により急性、慢性中毒を引き起こすことがよく知られているため、ヒトでの正確な暴露評価が必要とされている(Steenland ら, 1994)。この目的で血中コリンエステラーゼ活性を指標とした有機リン系化合物の暴露評価が現在行われているが、赤血球コリンエステラーゼを優位に阻害する薬剤と血清(または血漿)コリンエステラーゼを優位に阻害する薬剤があること、低用量暴露の指標としては鋭敏でないことより、通常行われるように1種類のコリンエステラーゼの測定のみでは長期低用量暴露の評価指標としては十分ではない(Maroni ら, 1986; Shafik ら, 1971)。そこで近年、有機リン系化合物の尿中代謝産物である尿中ジアルキルリン

酸(DAP)の排泄量を指標とした新たな暴露評価法が注目されている。

ほとんどの有機リン系化合物は、DAPのうち、ジメチルリン酸(DMP)・ジエチルリン酸(DEP)・ジメチルチオリン酸(DMTP)・ジエチルチオリン酸(DETP)のいずれかに代謝されて尿中に排出される(Bravo ら, 2002)。近年は、一般環境に比べ高濃度暴露が起こりうる有機リン系化合物取り扱い作業者においても、コリンエステラーゼ活性が阻害されて低下することは大きく減っており、尿中代謝物の生物学的モニタリングによる有機リン暴露評価を行い、労働衛生管理に生かすことが必要である。

我々は今回、殺虫剤を撒布する約50の事業場を組織する業者団体が自主的に実施する定期健康診断にあわせ、尿中代謝物および血中コリンエステラーゼ活性の測定と自覚症状調査をおこなった。本稿では、このうち尿中DAPについてまとめる。調査全体の詳細については、平成16年度分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法

本調査研究は平成16年12月の3日間、業者団体が主催する定期健康診断に組み込む形で行った。この団体を構成するのは従業員数が30名未

満の中小の事業所で、単一企業に所属し、地理的に分散している事業所、地元の単独事業所などが中心である。尿中有機リン代謝物については受診日当日の早朝尿を試料として使用した。早朝尿の採取については、あらかじめ業者団体の事務局を通じて受診希望者に依頼を行った。また、受診者にはあらかじめ、研究者らが作成した問診票に記入を依頼した。問診票の項目は以下の通りである。

殺虫剤取扱い作業歴

最近 3 日間の散布作業の時間、使用した薬剤名

最近 1 カ月間の薬剤散布頻度
薬剤散布頻度の高い季節および低い季節とその頻度

最近 1 カ月に使用した薬剤名

最近 6 カ月間の自覚症状

殺虫剤散布時の症状

急性症状の有無

ハチによる虫刺症の既往

既往歴、家族歴、飲酒・喫煙歴

受診日には作業者に面接による問診を行い、問診票への回答内容を確認するとともに、作業管理に必要な情報の聴取を行った。

尿中有機リン代謝物（ジアルキルリン酸）の分析

尿中有機リン代謝物(4 種類の DAP)の測定は、本報告書の別稿で高木らが述べたガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた簡便な測定法を用いて行った。

C. 研究結果

受診者の属性

17 事業所から 104 名(男 96 名 女 8 名)が受診した。

殺虫剤等散布作業従事年数

受診者 104 名のうち、現在管理職、営業職、間接業務等で最近の薬剤取り扱い頻度が年 1 回に満たない者、研究参加への同意を得られなかった者の合計 18 名を除いた 86 名の殺虫剤、殺鼠剤等薬剤散布作業の従事年数は 8.3 ± 7.5 年であった。

最近 3 日間の散布作業で使用した薬剤名

検診当日

当日に作業を行ったものはいなかった。

検診前日

検査前日に散布作業をした作業者は 35 名、これらの作業者の作業時間は 4.1 ± 3.7 時間であった。

検診 2 日前の散布作業

検査 2 日前に散布作業をした作業者は 19 名、これらの作業者の作業時間は 4.5±2.9 時間であった。

使用薬剤

以下の薬剤が挙げられた。

フェニトロチオン、ジクロルボス、ダイアジノン、プロペタンホス、ペルメトリン、フェノトリン、エトフェンプロックス、プラレトリン、フィプロニル、クマリン系殺鼠剤

最近 1 カ月の散布頻度(週あたりの回数、n=86)

下表にみられるように週 2 回以下がほぼ 70%を閉めていた。

頻度	n (%)
1 回未満	13 (15.1)
1 回	22 (25.6)
2 回	25 (29.1)
3 回	9 (10.4)
4 回	8 (9.3)
5 回	6 (7.0)
6 回	4 (4.7)

散布頻度が高い月(8 名が無回答、n=86)

全体に 4 月から 9 月と回答した受診者が半数を超えており、5 月から 8

月にかけての期間は 70%を超える受診者が頻度が高いと回答した。

月	n (%)
1 月	2 (2.3)
2 月	1 (1.2)
3 月	13 (15.1)
4 月	45 (52.3)
5 月	62 (72.1)
6 月	72 (83.7)
7 月	67 (77.9)
8 月	63 (73.2)
9 月	56 (65.1)
10 月	37 (43.0)
11 月	12 (14.0)
12 月	4 (4.7)

散布頻度が高い月の週あたりの散布頻度(n=86,無回答 7)

全体にばらつきはあるが、週 2 回から頻度の高いのは 6 回以上にわたっていた。

頻度	n (%)
1 回未満	6 (9.0)
1 回	7 (8.1)
2 回	14 (16.3)
3 回	16 (18.6)
4 回	13 (15.1)
5 回	12 (14.0)
6 回以上	11 (12.8)

散布頻度が低い月(n=86,無回答 7)

12月から3月までの期間は約半数が頻度が低いと回答し、特に1月、2月は75%を超える受診者が頻度が低いとのことであった。

月	n (%)
1月	66 (76.7)
2月	66 (76.7)
3月	46 (53.5)
4月	16 (18.6)
5月	8 (9.3)
6月	3 (3.5)
7月	2 (2.3)
8月	2 (2.3)
9月	2 (2.3)
10月	6 (7.0)
11月	17 (19.8)
12月	39 (45.3)

最近1カ月間に使用した薬剤(n=86) フェニトロチオン、ダイアジノンなどの有機リン系薬剤は30~50%の作業者が使用していた。

薬剤名	n (%)
ヒドラメチルノン	47 (54.7)
フェニトロチオン・ジクロルボス合剤	42 (48.8)
ペルメトリン	32 (37.2)
ダイアジノン	29 (33.7)

有機リン尿中代謝物の幾何平均±幾何標準偏差($\mu\text{g/g}$ クレアチニン)、(最小値-最大値)

プロマジオロン	24 (27.9)
ワルファリン	21 (24.4)
クロロピリホスメチル	18 (20.9)
フェノトリン	15 (17.4)
クマテトラリル	14 (16.3)
プロペタンホス	9 (10.5)

その他に使用された薬剤

ヒドラメチルノン、シフルトリン、ジフルベンズロン、シフェノトリン炭酸ガス製剤、プロボクスル、除虫菊乳剤、エトフェンプロックス、テトラメスリン、イミダクロプリド、シラフルオフエン、フィプロニル、クロチアニジン、ピフェントリン、クロルフェナピル、オキシクマリン

尿中有機リン代謝物について

当日早朝尿が採取できなかった4名、及び現在管理職、営業職、間接業務等で最近の薬剤取り扱い頻度が年1回に満たない者18名、及び人数の少なかった女性作業員4名を尿中代謝物の解析対象から外し、男性作業員78名について検討した。

年齢 男 (n=78) 37.1±11.2 歳

DMTP が最も多く検出され、続いて DMP が多かった。

DMP 1.3 ± 7.3 (ND-124.2)

DEP 0.5 ± 9.4 (ND-115.0)

DMTP 3.3 ± 10.9 (ND-130.8)

DETP 0.4 ± 6.3 (ND-95.2)

有機リン尿中代謝物の分布

DMP

測定値	n
ND	28
定量下限超、1.0 以下	8
1.0 超、5.0 以下	22
5.0 超、10.0 以下	9
10.0 超	11

DEP

測定値	n
ND	18
定量下限超、1.0 以下	34
1.0 超、5.0 以下	10
5.0 超、10.0 以下	7
10.0 超	9

DMTP

測定値	n
ND	8
定量下限超、0.5 以下	12
0.5 超、5.0 以下	17
5.0 超、20.0 以下	20
20.0 超	21

DETP

測定値	n
ND	20
定量下限超、0.5 以下	20
0.5 超、5.0 以下	32
5.0 超、20.0 以下	5
20.0 超	1

前日に有機リン剤を使用した作業員(n=17)、使用しなかった作業員(n=61)の比較

(幾何平均±幾何標準偏差)

両群に差はみられなかったが、DMTP はむしろ前日に使用しなかった作業員で高い傾向がみられた。

	前日に有機リン剤を使用した作業員 (n=17)	使用しなかった作業員 (n=61)
DMP	1.8±9.9	1.2±6.8
DEP	0.7±1.4	0.5±9.0
DMTP	2.1±12.4	3.7±10.7
DETP	0.3±7.2	0.5±6.2

最近 1 カ月間に有機リン剤を使用した作業員(n=53)、使用しなかった作業員(n=25)の比較

(幾何平均±幾何標準偏差)

DMP、DMTP はいずれも使用した作業員で高い傾向がみられた。DEP、DETP には差がみられなかった。

	有機リン剤を使用した作業員 (n=53)	使用しなかった作業員 (n=25)
DMP	1.8±7.8	0.6±5.1
DEP	0.5±8.3	0.5±12.3
DMTP	5.5±8.8	1.1±12.3
DETP	0.4±6.2	0.5±7.0

78名の作業員の血球コリンエステラーゼの値は 3.1 ± 0.4 (Δ pH)であった。血清、血球コリンエステラーゼと尿中DMP、DEP、DMTP、DETPの相関を図1~8に示した。

子供の有無

薬剤を取り扱っていた男性作業員78名のうち、子供を持っているのは40名、持っていないのは36名、不明が1名であった。子供を持たない36名で、その

理由を尋ねたところ、「結婚していない」が 29 名、「子供を持つと思わなかった」が 3 名、「子供を持つとしてもできなかった」が 4 名であった。

また、第 1 子から第 4 子までの誕生月の分布は以下の通りであった。

月	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
第 1 子	1	3	4	2	2	1	7	4	3	7	3	2
第 2 子	6	0	1	1	3	2	2	4	3	1	7	0
第 3 子	1	0	1	1	0	0	0	0	0	2	1	0
第 4 子	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
計	8	3	6	5	5	3	9	8	6	10	11	2

第 1～4 子及び全子で誕生月による偏りは観察されなかった。

C. 考察

殺虫剤、殺鼠剤、シロアリ防除剤などの薬剤を取り扱う作業員集団の散布作業の頻度には年間を通じて大きな偏りがあり、主に夏季に多く、冬季に少ないことが明らかになった。このことは今後のモニタリングを指標とした健康診断にあたっては特に夏季に重点をおく必要があることを示唆している。

有機リン取り扱い作業員としての殺虫剤散布作業員の有機リン暴露の生物学的モニタリングによる暴露評価はこれまで世界的にも報告はきわめて限られている。本調査研究では、4 種類の尿中 DAP 測定により、従来行われてきた血清コリンエステラー

ゼによるモニタリングでは非暴露者と区別できなかった有機リン系殺虫剤への暴露量を評価可能なことが示された。

もともと尿中有機リン代謝物の分析は煩雑な上に時間がかかるため、多数の検体処理を必要とするスクリーニングには不向きであった。最近では少数ではあるが、一般人口集団での尿中代謝物のデータも出始めている。

われわれは前述のようにこの約 2 年間の検討により、簡便かつ十分な精度をもつ尿中有機リン代謝物分析法を開発し、研究ではこの方法を用いた。

本調査研究では問診により、受診

露の大きい作業を明らかにする必要がある。

本方法は作業者への負担が少なく、高濃度はもちろん低濃度暴露をも鋭敏に反映する点で、作業管理への応用が可能であり、今後殺虫剤、農薬等を取り扱う作業者だけでなく、非暴露一般集団に対する暴露指標としても有用と考えられる。

文献

- Bardin, G. et al., *Arch. Intern. Med.* 154 (1994), p. 1433.
- Barr, B. et al., *Environ. Health. Perspect.* 112 (2004), p. 186.
- Bravo, R. et al., *J. Anal. Toxicol.* 26 (2002), p. 245.
- Hardt, J. and Angerer, J., *J. Anal. Toxicol.* 24 (2000), p. 678.
- Maroni, M. et al., *Toxicol. Lett.* 33 (1986), p. 115.
- Oglobline, N. et al., *Analyst.* 126 (2001), p. 1037.
- Shafik, M. et al., *J. Agric. Food. Chem.* 19 (1971), p. 885.
- Steenland, K. et al., *Am. J. Public. Health.* 84 (1994), p. 731.

本研究の一部は中央労働災害防止協会平成16年度労働安全衛生に関する調査研究として行われた。

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用
検出のための新たなバイオマーカーの開発

— 有機リン系殺虫剤ジクロロボスの男性生殖器毒性の実験的検討 —

研究協力者

岡村 愛 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
大谷 勝己 産業医学総合研究所
上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
柴田 英治 愛知医科大学医学部衛生学講座
市原 学 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学
高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻

研究要旨

殺虫剤暴露職域集団でみられた運動性の低下した精子の増加、暴露作業の閑散期における血中テストステロン値の上昇をふまえ、雄性ラットを用いた DDVP の 9 週間皮下投与実験を行った。精子数、精子形態に有意な差は見られなかったが、精子運動性は量反応関係が不明瞭ながら投与群で有意に低下した。精子自動解析装置を用いた場合、精子運動性の詳細な評価が可能であるが、量反応関係を伴った変化はみられなかった。このため、最終年度には、尿中代謝物ジメチルリン酸(DMP)を測定し、血中アセチルコリンエステラーゼ活性および尿中 DMP との量反応関係を解析した。尿中 DMP 量は、投与量にしたがい増加した。投与量からみたとき量反応関係は不明瞭であるものの精子運動性の軽度の低下がみとめられ、体内暴露指標である赤血球コリンエステラーゼ活性や尿中 DMP 量に運動精子率は有意に回帰した。したがって、DDVP は精巣病理組織学的

変化やテストステロン値に有意な変化をもたらさないが、赤血球コリンエステラーゼ活性を著明に減少させる暴露量においては、軽度の運動精子率低下をきたすことが示唆された。

過去にジクロロボスを扱う作業員集団で斎藤らが測定した尿中 DMP の最大値は 0.71 mg/l (斎藤ら、1984) で、この値を本研究で得られた回帰式に用いると運動精子率の低下は 0.63% と計算された。すなわち、DDVP は高用量下で精子運動性を低下させる可能性があるが、職域の暴露量で運動精子率としては DDVP 単独で低下することはなく、一般生活環境の暴露レベルではリスクを無視して問題ないと考えられる。

A. 研究目的

有機リン系殺虫剤は世界中の農薬売上高の 1/3 を占め、その生殖毒性の評価は重要な課題となっている。これまでに我々は殺虫剤散布作業員を対象に行った生殖機能調査において、作業員の精子運動性が非暴露群と比較して散布頻度の高い夏期に有意に低下していることを報告した。殺虫剤や温熱への暴露、繁忙期の生活スタイルなど、殺虫剤散布作業との関連を示唆する結果であり、作業に関連する有害要因を殺虫剤に限定して考えた場合、調査集団が使用していた殺虫剤の中で使用頻度が高く、動物実験で精巣毒性の報告 (Krause et al; 1974 他) のある殺虫剤はジクロロボス (DDVP) であった。しかし、これらの報告は米国環境保護庁 (EPA) 等においてリスク評価の資料とはされていない。これは、1970 年代以前

に発表された報告内容のいくつかは、現在からみると固定、包埋方法、一群あたりの動物数、群の数などが不十分で、判断を十分に下せないことが一因であろう。

その後、男性殺虫剤暴露作業員の生殖機能健康調査のデータをより詳細に再解析した結果、血中テストステロン濃度が非暴露対照群に比べ冬に有意に高値であることが新たに判明した。ヒト集団での精子運動性の低下は、WHO 基準に基づき運動性を 4 段階に区別して計測した場合にはじめて明らかになる内容であり、動物を用いた生殖毒性評価において強い精巣毒性物質でない場合は、従来の運動率算出法では運動性への軽微な影響を鋭敏に明らかにできない可能性が認識された。

このため、ラットを用いた 9 週間皮下投与実験を行い、暴露指標とし

て血中アセチルコリンエステラーゼ、尿中代謝物を測定するとともに、各種精子指標、精巣組織標本、血中テストステロンの解析を行った。また、精子自動解析装置(CASA)を用いた精子運動性の各種パラメーターについても検討した。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本実験は、名古屋大学医学部動物実験指針に準拠して行った。あらかじめ実験計画を動物実験施設に提出し審査を受けた上で、動物が受ける苦痛を最小限とするよう、飼育管理、取り扱い等に留意しつつ実施した。

材料

試薬

- ・ ネンブタール注射液 (大日本製薬)
- ・ 生理食塩水 (扶桑薬品株式会社)
- ・ ハンクス液 (インビトロジェン株式会社)
- ・ 残留農薬試験用ジクロロボス標準品(関東化学株式会社)

病理組織固定液

- ・ ブアン液
- ・ ホルマリン液
- ・ 染色液

<PAS 染色>

- ・ 0.5 %過ヨウ素酸水
- ・ 亜硫酸水
- ・ Schiff 試薬

<その他必要な試薬>

- ・ エタノール
- ・ キシレン
- ・ 封入剤

ラット

Wistar 系 10 週齢雄ラット 34 匹

上記ラットをランダムに4群(n=8 or 9)に分け、生理食塩水に溶解した DDVP 溶液(1, 2, 4 mg/kg)と生理食塩水のみ4種類の投与薬を頸背部に週6日、9週間皮下投与した。翌日にネンブタール麻酔下で腹部大動脈より採血を行った。次に輸精管、精巣上体尾部を摘出し、それぞれの精子運動率を精液自動解析装置(CASA)を用いて測定した。また、精巣上体尾部に関しては光学顕微鏡下で精子数を測定した。同様に肝臓、腎臓、前立腺、精嚢腺、副腎を摘出し、重量を測定後 -80℃に凍結保存した。精巣、精巣上体に関しては病理組織標本作製のため、ブアン固定液に浸した。

精子検査方法

a) 精子原液作製

予め 37°C に加温したハンクス液 2.5 ml をシャーレに入れ、左側精巣上体尾部を均一になるまで細切し、懸濁液とした。これをガーゼで濾過したものを精子原液とし、その後の検査までの間、インキュベータで 37°C に保った。

b) 精子運動能測定

精子原液を予め 37°C に加温したハンクス液で 20 倍に希釈した。軽く混ぜた後、血球計算盤内(改良 Neubauer 型)に少量の精子希釈液を入れ、精子自動解析装置および倍率 200 倍で光学顕微鏡にて観察した。手作業による観察では、精子は運動精子及び非運動精子に区別して、合計約 100 個の精子を計数した。頭部のみ、あるいは尾部のみの精子については計数の対象から外した。

c) 精子数測定(精巣上体尾部重量あたり)

精子原液を 0.5 % 中性緩衝ホルマリン液にて 100 倍希釈した。血球計算盤内に少量の精子希釈液を入れ、倍率 200 倍で鏡検し、1×1 mm 区画中の精子数を計数

した。区画を変え計 5 区画について計数し、平均値を求めた。左側精巣上体尾部の単位重量あたりの精子数を以下に従って算出した。

$$\text{精子数 [1/g]} = [\text{区画内精子数平均値} \times 10^4 \times 100(\text{希釈倍率}) \times 2.5(\text{原液作製時の液量})] / \text{精巣上体尾部重量 (g)}$$

組織検査法

GMA (2-ヒドロキシエチルメタクリレート) 樹脂を用いて包埋後、3 μm 切片の標本作製し、PAS 染色の後に鏡検した。各個体の精巣標本に関して、3 つの精細管断面(stage VII)を観察後、固体ごとに精細管あたりの精子細胞/セルトリ細胞数比を求めた。

血液生化学検査

採取した血液から赤血球コリンエステラーゼ活性値 (Voss and Sachsse の変法利用)、および血中テストステロン濃度 (RIA 法) を測定した。

尿中代謝物

DDVP の代謝物であるジメチルリン酸 (DMP) を本報告書に記した高木らの方法により測定した。

C. 研究結果

(詳細は各年度の報告書を参照)

今回の投与量の範囲では、4 mg/kg 群でのみ解剖時の体重に対照群と比較し有意差が見られた。臓器重量は 4 mg/kg 群で副腎が増加、体重、肝臓が減少していた。

赤血球コリンエステラーゼ活性値は量依存的に減少し、1 mg/kg, 4 mg/kg でそれぞれ 44%および 55%阻害された。

精子数に有意な差は見られなかったが、目視による評価では運動精子率は 1, 4 mg/kg 群で有意に低下し、4 mg/kg 群の低下は対照群の約 14%であった。一方、精子運動自動解析装置を用いた場合、運動精子率の低下は 2 mg/kg 群のみで有意で、ヒトにおける WHO 基準に準じた運動性評価を行うと、高速直進運動精子率の低下傾向、不動精子の増加傾向が認められた。

尿中 DMP 量は、投与量にしたがい増加した。運動精子率は赤血球コリンエステラーゼ活性および尿中 DMP 濃度に有意に回帰した ($p < 0.05$) が、血漿コリンエステラーゼ活性への回帰は有意ではなかった。

血中テストステロン値に関してはコントロールと比較して有意差は見られなかった。病理組織検査ではステージ VII において、円形精子細胞／

セルトリ細胞数の比に有意な変化は見られなかった。

D. 考察

投与量からみたとき量反応関係は不明瞭であるものの精子運動性の軽度の低下がみとめられ、体内暴露指標である赤血球コリンエステラーゼ活性や尿中 DMP 量に運動精子率は有意に回帰した。精子自動解析装置を用いた場合、精子運動性の詳細な評価が可能であるが、量反応関係を伴った変化はみられなかった。

したがって、DDVP はパイナップル畑などで 1970 年代に使われ強い生殖毒性の存在が明らかになった殺線虫剤 1,2-ジブromo-3-クロロプロパン (DBCP) とは少なくとも異なり、精粗細胞の消失など明瞭な精細管変性を伴う強い生殖毒性はないと考えられる。しかし、赤血球コリンエステラーゼ活性を著明に減少させる暴露量においては、軽度の運動精子率低下をきたすことが示唆される。

過去にジクロロボスを扱う作業者集団で斎藤らが測定した尿中 DMP の最大値は 0.71 mg/l (斎藤ら、1984) で、この値を本研究で得られた回帰式に用いると運動精子率の低下は 0.63%と計算された。これは、ラットと人間との間の種差の不確定係数を用いない仮定であるが、暴露量の多

い職域でもジクロロボスによる運動精子率の低下は事実上観察されないことになる。このことは、職域集団で観察された現象、すなわち、運動精子率が変わらずに動きの遅い精子が増えた原因がジクロロボスにある可能性を否定するものではないが、職域の数十倍の DMP が尿中に排泄される状況でも精子数や組織学的な変化、テストステロン値の変動を伴わないことを考えると、ジクロロボス単独の精子運動性への影響は、暴露がきわめて多くアセチルコリンエステラーゼ活性が低下する特殊な状況を除き事実上問題にならないと考えられる。

E. 結論

雄性ラットに対する DDVP の 9 週間皮下投与後、運動精子率はアセチルコリンエステラーゼ活性が著明に阻害される 4mg/kg で最大で約 14% 低下し、運動率は赤血球コリンエステラーゼ活性や尿中 DMP 濃度に有意に回帰した。したがって、DDVP は高用量下で精子運動性を軽度に低下させる可能性があるが、トータルの運動精子率としては職域の暴露量で低下することはなく、一般生活環境の暴露レベルではリスクを無視して問題ないと考えられる。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質によるヒト生殖・次世代影響の解明と内分泌かく乱作用
検出のための新たなバイオマーカーの開発

— 有機リン殺虫剤暴露と PON1 遺伝子型によるヒト白血球、精子の 8-ヒドロ
キシデオキシグアノシンレベル —

研究協力者

李チュルホ 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

主任研究者

那須民江 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

分担研究者

上島 通浩 名古屋大学大学院医学系研究科社会生命科学講座環境労働衛生学

研究要旨

有機リン殺虫剤は *vitro* や *vivo* で活性酸素種(ROS)の産生を誘発すると報告されてきた。パラオキシナーゼは、有機リン殺虫剤のオキシソンを加水分解する酵素であるが、これはマクロファージや血清中の酸化ストレスをダイレクトに減少させる。パラオキシナーゼ 1(PON1)の Q アレルはパラオキシソンの加水分解の効率が R アレルの数分の一である。我々は有機リン殺虫剤がヒト体内で酸化ストレスレベルを上昇させ、PON1 遺伝子型が Q/R や R/R よりも Q/Q を持つヒトでより多くの ROS が産生されるという仮説を調べるためにこの研究を行った。

有機リン殺虫剤を使用する 18 人と使用しない 18 人の末梢血の白血球及び尿から抽出した DNA 中の 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OHdG)レベルを測定し、殺虫剤暴露の状況と PON1 遺伝子型による比較を行った。殺虫剤暴露の影響、PON1 遺伝子型、および両者の交互作用による白血球と精子細胞の 8-OHdG への影響は、他の変数をコントロールした後、一般線型モデルを使って統計的に検定した。血液白血球中の 8-OHdG の平均値はコントロールに比べて殺虫剤