

た。

Quantitative real time-PCR は PE Biosystems 社製 ABI PRISM 7000 Sequence Detection System で行った。各測定物質はそれぞれのアンプリコンを Rromega 社製 pGEM -T Easy vector 又は Invitrogen life technology 社製 pCR2.1 vector に組み込み、解析した数値は GAPDH に対する比として表した。

使用したプライマーあるいはプローブは以下の通りである。

- HMG-CoA synthase (HS): forward primer: 5'-TGTGGCACCGGATGTCTTT-3', reverse primer: 5'-GACCAGATACCACGTTCCCTCAA-3';
- HMG-CoA reductase (HR): forward primer: 5'-TGTGGTTTGTGAAGCCGTCAT-3', reverse primer: 5'-CGTCAACCATAGCTTCCGTAGTT-3';
- steroidogenic acute regulatory protein (StAR): forward primer: 5'-AAGGAAAGCCAGCAGGAGAAC-3', reverse primer: 5'-TCCATGCGGTCACAAGTT-3';
- peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR): forward primer: 5'-AGTTCGTGGCACTGCATAAGC-3', reverse primer: 5'-GCTGCCCATTCTCCTCCTA-3';
- cytochrome P450<sub>scc</sub> (CYP11A): forward primer: 5'-CCATCAGATGCAGAG

TTTCCAA-3',

reverse primer: 5'-TGAGAAGAGTATCGACGCATCCT-3';

- 3<sub>β</sub>-hydroxysteroid dehydrogenase/Δ5-Δ4-isomerase (3β-HSD):

forward primer: 5'-GGAGGCCTGTGTTCAAGCAA-3',

reverse primer: 5'-GGCCCTGCAACATCAACTG-3';

- cytochrome P450<sub>17α</sub> (CYP17):

forward primer: 5'-CCATCCCGAAGGACACACAT-3',

reverse primer: 5'-CTGGCTGGTCCCATTTCATTT-3';

- 17β-HSD: forward primer: 5'-CAACGATTCCTCCTGACACGAT-3',

reverse primer: 5'-GCTGATGTTGCGTTTGAGGTAA-3';

- PPARα: GI 7106384, forward primer: 5'-TTTCCCTGTTTGIGGCTGCTA-3',

reverse primer: 5'-CCCTCCTGCAACTCTCAATG-3'

Taq Man probe, 5'-AATTTGCTGTGGAGATCGGCCTGG-3'

- GAPDH: PE Biosystems 社製 TaqMan Rodent GAPDH Control Reagents を使用

Taq Man probe, 5'-CCCGTTCTCAGCCTTGACAGTGCC-3'

SYBR Green 反応は、25 μl 中に SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 400 nM プライマー, および 1 ng cDNA をテンプレートとして加え、95 °C で 10 分間インキュ

バージョンをして Amplitaq Gold polymerase の活性化を行った。引き続き 95 °C で 15 sec、40 cycles denaturation を、60 °C で 1 分間 annealing と extension を行った。

#### 5) 統計学的検定

実験結果の有意差の検定には分散分析後 Dunnett の多重比較を使用した。

### C. 研究結果

(詳細は平成 15 年度研究報告書を参照)

塩化トリメチルスズを添加した場合、細胞数は 0.033mM から減少し、細胞毒性が強い物質であった。例えば 0.1mM ではビスフェノール A を添加した場合細胞数は 60% 残っていたのに対し、塩化トリメチルスズの場合は 20% 残っていたのみであった。

プロゲステロン濃度は 0.033mM から上昇したが、テストステロン濃度に変化はみられなかった。しかし、プロゲステロンに対するテストステロンの生成割合をみると、0.01M から著しく減少した。減少のパターンは過去に検討したフタル酸モノエチルヘキシルや 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸添加後に類似していたが、これらの化学物質より低濃度から減少した。

塩化トリメチルスズのテストステロン合成に関連した遺伝子発現への影響については、0.33mM 以上の濃度

においては残存する細胞数が少ないため、解析を省略した。内因性のコレステロール合成に係る HR と HS、核内受容体である PPAR $\alpha$  の遺伝子発現には殆ど影響を与えなかった。ミトコンドリアのプレグネノロン合成に関わる CYP11A の発現も殆ど変化しなかった。しかし、ミトコンドリアへのコレステロール輸送にかかわる PBR と StAR の遺伝子発現は高濃度塩化トリメチルスズ暴露により上昇する傾向であった。これらの遺伝子発現の変化はプロゲステロン濃度の変化と類似していた。塩化トリメチルスズはミクロソームにおけるテストステロン合成に関わる 3 $\beta$ HSD と 17 $\beta$ HSD の発現にも殆ど影響を与えなかったが、CYP17 の遺伝子発現を、量依存的に低下させた。特に 0.01mM を超えた濃度においては有意に低下させた。

### D. 考察

今回の実験から、塩化トリメチルスズは比較的細胞毒性が強く、生殖腺ステロイドホルモン合成に影響を与えることが示唆された。プロゲステロン生成は増加させる傾向であり、テストステロンも増加させる傾向がみられた。しかしこれはおそらくプロゲステロン合成が誘導されていることが影響しているものと思われる。実際、プロゲステロンに対するテストステロンの割合は、塩化トリメチルスズに対して量依存的に低下している。これはおそらく CYP17 の遺伝

子発現の低下が影響しているものと思われる。

山崎ら<sup>7</sup>は、最近トリブチルスズのニューロステロイドへの影響を報告している。彼らはラット（10日齢）の脳から海馬を抽出し、トリブチルスズを添加して、48時間培養した。その結果 CYP17-mRNA量はトリブチルスズ 0.001mMで10分の1以下に減少したことを報告している。この結果は、今回行われた塩化トリメチルスズの生殖腺ステロイド代謝に与える影響と類似している。すなわち、塩化トリメチルスズも海馬のニューロステロイド代謝にも影響を与える可能性がある。

この結果を参考にして、最終年度に塩化トリメチルスズの海馬への影響を念頭に質問項目を作成し、疫学調査を行った。

#### E. 文献

1. Annau Z. 1988. Organometals and brain development. *Progr. Brain Res.* **73**: 295-303.
2. Smith P and Smith L. 1975. Organotin compounds and applications. *Chem. Br.* **11**: 208-226.
3. Guard HE., Cobet AB., Coleman WM. 1981. Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science* **213**: 770-771
4. Hallas LE., Means JC., Coney JJ. 1982. Methylation of tin estuarine microorganisms. *Science* **215**: 1505-1507.
5. Paule MG., Reuhl K., Chen JJ., Ali SF., Slikker W JR. 1986. Developmental toxicology of trimethyltin in the rat. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **84**: 412-417
6. Miyake K., Misawa T., Aikawa H., Joshida T., Shigita S. 1989. The effects of prenatal trimethyltin exposure on development and learning in the rat. *Jpn J. Industr. Health* **31**: 363-371
7. 山崎岳、澤田大樹、小南思郎、古川愛造、木本哲也、川戸 佳 (2003) ニューロステロイド合成酵素 mRNA のトリブチルスズによる攪乱 環境ホルモン学会代 6 回研究発表会要旨集 119.

## II-4. 有機溶剤

上島通浩、那須民江、市原 学、糸原誠一朗

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  
— 有機溶剤使用職場における暴露—

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

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

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

研究協力者

糸原誠一朗 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

グラビア印刷工場で暴露の多い印刷機周囲の作業者について、拡散型サンプラーによる時間加重平均個人暴露濃度をガスクロマトグラフで、尿中馬尿酸濃度を高速液体クロマトグラフで測定した。個人暴露濃度はトルエン含有のインキを使用していた印刷機周囲の作業者で許容濃度 50 ppm の 3 倍を超え、尿中馬尿酸濃度は 5.4～13.4 g/L と高い結果だった。トルエン含有インキは使用しないが同インキを使用する印刷機の近傍でグラビア印刷の作業をしていた作業者の馬尿酸濃度も、4～6 g/L と高かった。この作業者集団は、調査を行った当時、許容濃度を超える暴露を受ける者を含んでいた可能性が考えられた。

## A. 研究目的

有機溶剤は、現在、国内で年間 50 万人が特殊健康診断を受けている重要な産業化学物質である（平成 16 年度版労働衛生のしおり）。有機溶剤の中には 2-プロモプロパンやグリコールエーテル類のように特異的な機序により精巣や卵巣を傷害するものがあるが、性腺を直接傷害しない溶剤でも一般に中枢神経系の抑制作用を有するため、性腺刺激ホルモンまたは性腺刺激ホルモン放出ホルモンの分泌抑制による視床下部—下垂体—性腺系への作用が考えられる。

このように、有機溶剤は生殖次世代影響を及ぼしうる物質群と言えるが、個人のレベルで生殖への影響が顕在化する前に集団的にサブクリニカルに生じる現象を早期に把握することが重要になってくる。

本報告では、暴露量が多いと思われる作業における、尿を用いた生物学的モニタリングのパイロットスタディー結果について述べる。

## B. 研究方法

グラビア印刷工場の印刷機周囲の作業者に就業中パッシブガスクューブを装着し、終業直後に採尿を行っ

た。この工場では、グラビア印刷やラミネート接着などで有機溶剤を使用している。現在インキはほとんど水性のものを使用しており、トルエンの使用量は以前に比べて減少し調査時点で年間約 85t となっていた。また、トルエンのほかにイソプロピルアルコール、メチルエチルケトン、酢酸エチルを調査時使用していた。

個人暴露量の測定は印刷業務に携わる作業者を対象として調査を行った。9 台の印刷機のうちトルエンを使用している 1 台の印刷機から 2 名、トルエンを使用している印刷機と同室にある印刷機を使用している作業者を 6 名（うち 3 名は局所排気装置のそばで作業）、別室で印刷を行っている作業者を 6 名対象とした。

拡散型サンプラーによる時間加重平均個人暴露濃度はガスクロマトグラフで、有機溶剤の尿中代謝物（馬尿酸）濃度は高速液体クロマトグラフにより測定した。

## C. 研究結果と考察

### 1) 拡散型サンプラーによる暴露評価

トルエンについては、この日唯一トルエンを使用した機械での作業者 7, 8 の個人暴露濃度は許容濃度 50 ppm の 3 倍を超えていた。また同じ部

屋の隣の機械での作業員 4～6 では許容暴露濃度を僅かに上回っていた。同じ部屋でもトルエン使用の機械から最も遠くの機械で作業していた作業員 1～3 の個人暴露濃度は低い値

であった。一方、トルエンを一切使用しなかった部屋の作業員 9～14 では許容濃度を下回るものの一定の暴露が見られた (表 1)。

表 1 作業員のトルエン個人暴露濃度、混合暴露評価および尿中馬尿酸量

作業員 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
トルエン暴露濃度 (ppm)	11.9	18.2	19.7	55.5	53.9	51.3	152.3	189	4.3	11	7.3	12.8	19.3	15.2
混合溶剤暴露評価値(I)	0.8	1.2	1	1.5	1.5	1.5	3.6	4.4	0.3	0.5	0.4	0.8	1.3	1.1
尿中馬尿酸濃度 (g/l)	1.7	0.6	1.6	4	5.4	6	13.4	5.4	1.6	1.4	1.5	1.3	2.2	3.5

以上の結果から、この事業所ではトルエン使用の機械で作業した場合に、作業員の個人暴露濃度は許容濃度を上回る場合のあることがわかった。またトルエンを直接使用してなくても、近くの機械で作業をした場合、その作業員は許容濃度を超えるトルエン暴露を受けている可能性が示された。

IPA、酢酸エチルに関しては全ての作業員の個人暴露濃度が許容暴露濃度を大きく下回っていたが、MEK については、作業員 1～3、12～14 で他より高い個人暴露濃度であった。許容濃度の 75% に達している作業員もお

り、全員の個人暴露濃度が許容濃度の 4 割を超えていた。

作業員は複数の有機溶剤に暴露されているため、各溶剤の作用が相加的と仮定し、混合溶剤として暴露評価を行った結果を表 1 に示した。

$$I = Ct/Tt + Cm/Tm + Ci/Ti + Ce/Te$$

C: 各成分の平均暴露濃度

T: 各成分の許容濃度

t: トルエン m: MEK i: IPA

e: 酢酸エチル

トルエン取り扱い者を中心に 14 人中 9 人の個人暴露濃度が許容濃度を

越えていたものと考えられた。さらに混合溶剤としての暴露評価値（I）の値はトルエン使用区画に近いほど上昇し、トルエンを使用していない部屋区画では MEK 高暴露者で高かった。

このように、個々の溶剤は許容濃度以下でも、混合溶剤の見地で評価すると許容濃度を越える区画が見られた。

## 2) 尿中代謝物測定

尿中馬尿酸濃度は全体的に高かった（表1）。有機溶剤中毒予防規則で定められる分布を当てはめると、3相当が6人、2相当が7人、1相当が1人でありトルエン暴露が極めて高かった。尿中馬尿酸濃度とトルエン暴露濃度の相関係数は 0.7656 であった。

以上より、この作業者集団は許容濃度を越えた暴露を受けている者を含む可能性が示された。保護具の使用に関して、尿中馬尿酸の分布が3相当でも自覚症状がほとんどない者が見られ、調査日の防毒マスクの着用は十分ではなかった。局所排気装置は設置されていたが、印刷の品質を保つため十分に運転しない場合がありえたようである。トルエン使用量の削減、水溶性溶剤の利用、構内の自動搬送化などさまざまな労働環

境改善努力により、現在の状況は調査時に比べ大きく改善されているが、引き続き、マスクの着用など作業管理が望まれる状態といえる。



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

— 不妊外来受診者における有機溶剤取り扱い職歴の調査 —

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

有機溶剤は共通の性質として麻酔作用を持つため、排卵障害のリスク要因であるとの仮説を検証する目的で、不妊患者の有機溶剤取り扱い歴を含む職業歴、生活習慣、飲酒・喫煙等の状況について横断研究を実施した。不妊外来受診者に占める有機溶剤使用歴のある者の割合は、一般集団に比べ多い可能性があるため、排卵障害に注目した解析に加え、今後は不妊症全体に占める暴露のオッズの上昇についても検証する必要がある。

A. 研究目的

日常生活や職場において暴露する様々な化学物質や物理的因子の中には、生殖機能に影響を及ぼし、不妊症のリスク要因になりうると考えられるものがある。有機溶剤については、グリコールエーテル類やプロモプロパンの生殖腺への直接作用による生殖毒性が知られている他、直接作用がない溶剤についても中枢神経を介した生理周期のかく乱や妊孕性の低下の報告が欧米からなされている。しかし、日本国内において不妊

症の原因として有機溶剤暴露を検討した報告はほとんどない。そこで、有機溶剤を含む生殖器系に影響を与えている可能性のある職業因子を明らかにする目的で、不妊患者の職業歴、生活習慣、飲酒・喫煙等の状況について横断研究を実施した。有機溶剤は共通の性質として麻酔作用を持つため、排卵障害のリスク要因であるとの仮説を検証する目的で、リコールバイアスを考慮する必要のない不妊外来受診者間で比較を行った。

## B. 研究方法

調査対象：

名古屋市および近郊の3医療機関の不妊外来を受診した女性336人を対象に、飲酒・喫煙、仕事や趣味で暴露を受けた化学物質（有機溶剤、農薬、金属、医薬品、その他）および物理的因子（放射線、紫外線、電磁波、温熱、騒音、その他）などについての自記式質問票を、インフォームドコンセントを得て実施した。上記のうち、記載に不備のなかった292人を対象として解析した。

症例・対照の分類は、各医療機関から得た診断名を基に、排卵障害の存在が確認、あるいは強く予想される者を症例群、排卵障害がおそらくないといえる症例および排卵障害の有無について決めがたい不妊症と考えられる者を対照群とした。

## C. 研究結果及び考察

対象者の背景要因：

症例、対照を含む平均年齢は31歳、初潮年齢は13歳、結婚後月数は57カ月、不妊期間は44カ月であった。症例群と対照群の間には有意差はみられなかった。

飲酒・喫煙の状況：

飲酒・喫煙と排卵障害との間には有意な関連は見られなかった。先行研究では飲酒・喫煙と不妊の間に有意な関係が示されているものがあつ

たが、今回の結果から排卵障害に限定したリスクではないと考えられる。

有機溶剤職歴を含む物理化学因子との関連：

症例、対照を含む暴露者数とその割合を表に示した。職業性の有機溶剤使用歴のある者の割合は、8%に達し、このうちほとんどの者は有機溶剤健康診断を受診していなかった。有機溶剤使用者数に関する国の統計としては、特殊健康診断受診者数に関するものが唯一であるが、平成15年には男女をあわせ年間約50万人が受診している（平成16年度版「労働衛生のしおり」）。これは同年の就業者人口6316万人（うち女性は2597万人）の0.8%、生産年齢（15-64歳）人口8540万人の0.6%に相当するが、有機溶剤健康診断受診対象業務への従事者は男性が多いことを考えると、不妊外来受診者に占める有機溶剤使用歴のある者の割合は、一般集団に比べ多い可能性がある。したがって、排卵障害に注目した解析に加え、今後は一般女性に対しての不妊症全体に占める暴露のオッズの上昇についても検証する必要がある。

表 調査対象者の職業的な有害因子への暴露状況

症例+対照 (N=292)	
有機溶剤	23
殺虫剤	2
金属	9
放射線	13
電磁波	6
温熱	5
騒音	12
交代制勤務	31
医薬品・抗生物質	6
屋外作業	5

## II-5. その他バイオマーカーに関する検討

那須民江、上島通浩、柴田英治、日比初紀、山野優子、  
高木健次、市原 学、五藤雅博、内藤久雄、岡村 愛、  
李チュルホ、上山 純、鈴木隆佳、斎藤 勲

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

— 職域集団における生殖機能評価の指標に関する検討 —

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  
日比 初紀 みなと医療生活協同組合協立総合病院泌尿器科  
山野 優子 昭和大学医学部衛生学教室  
高木 健次 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻  
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

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

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  
内藤 久雄 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  
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  
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  
上山 純 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻  
鈴木 隆佳 名古屋大学医学部保健学科検査技術科学専攻  
斎藤 勲 東海コープ事業連合商品安全検査センター

## 研究要旨

平成 14-16 年度の 3 年間にわたり、職域集団を中心に生殖・次世代影響の有無の調査とともにバイオマーカー候補の検討を行ってきた。対照者群との間に有意差のみられたマーカーはごく一部であったが、これらについては暴露とマーカー候補の変動との関連の強さ、用量反応関係、関連の一貫性を確認する検証していくことが必要である。職域での暴露量が一般集団に近い水準まで下がりつつある現状をふまえると、生殖次世代影響の予防には、一般集団でも適用可能な高感度な暴露マーカー測定によるリスク管理が現実的であろう。

## A. 研究目的

本研究では、化学物質への暴露を職業的に受ける職域で生殖・次世代影響の評価を行ってきた。一般に化学物質の毒性評価においては通常げっ歯類を用いた実験が行われ、暴露終了後に解剖を行って臓器重量の測定、組織標本の病理学的検討、血液・尿の生化学的検査を行うのが一般的である。男性生殖器関係については、血中性ホルモン、精巣、前立腺、精嚢を検索し、必要に応じて精巣上体尾部の精子数、運動精子率を計測する。一方、ヒト集団で男性生殖器系への影響を評価する場合、血液・尿検査は比較的实施しやすいが、これらに加えて腹部超音波検査で測定を行う前立腺体積、精巣容積は精液検査と同様に動物実験結果と直接比較できる指標である。

職域集団を対象とした研究では、動物実験モデルに比べ暴露量が微少で、暴露以外の交絡要因が入るという特徴に加え、調査研究を被験者と

なる方々の健康の保護、保持増進という視点と無関係に行うことはあり得ないことを念頭に置く必要がある。また、臨床ではよく使われるバイオマーカーであっても、職域の年齢層が医療機関を受診する年齢層と異なる場合があるなど臨床と職域の集団は同等とみなせないことが少なくなく、医療機関で用いられる「正常値（標準値）」をそのまま職域の「正常値」としてよいとは限らない。こうした点を考慮し、本研究では、職域で暴露量を確実に把握し、交絡要因をできるだけ調整して暴露量の異なる集団間でバイオマーカーおよびその候補を比較することに重点を置いた。以下に、検討した結果をまとめる。

## B. 研究方法

本研究課題のうち、殺虫剤に暴露する職域で調査した結果を抜粋した。バイオマーカー候補を、暴露マーカー、影響マーカー、感受性マーカー

に分けて整理した。同一の職域は同じ記号で示した。精巣容積の測定はオーキドメーターにより、前立腺推定体積は超音波診断装置（東芝 SSA-550A）により求めた。

### C. 研究結果

結果を表に示した。暴露マーカ－に関しては、職域 A-1 の調査において有機リン系殺虫剤へのマーカ－である赤血球コリンエステラーゼ活性に、また、職域 B-1 の調査において尿中臭化物イオンの暴露群と対照群との差が有意であった。

影響マーカ－については、職域 A-1 において精液指標のうち緩徐な直進運動精子率および非直進運動精子率について有意差が見られ、職域 B-1 では自覚症状有訴数に有意差があった。精巣容積は A-1 で対照職域に比較し小さい傾向がみられたが ( $p=0.06$ )、同じ職域の中に対照群をおいた A-2 では差がみられなかった。なお、表には示していないが、精子運動についてはジクロロボスを投与したラットで精子自動解析装置を用いて精子運動の詳細な指標についても解析した。しかし、顕微鏡下に目視で観察した運動精子率以上に群間の有意差を鋭敏に反映する指標はなかった。また、性ホルモンのうち、黄体形成ホルモンと卵胞刺激ホルモンについては、年齢に有意に回帰した (図)。

感受性マーカ－については、オキ

ソ型有機リン殺虫剤の分解酵素であるパラオキシナーゼ 1 (PON1) の多型を A-1 で検討した。現時点までの解析で白血球の酸化ストレスの上昇と関連を示唆する結果を得ているが、精巣など生殖器系への負荷の直接の決定要因であることを示す結果は得られていない。

### D. 考察

職域集団を対象とした調査研究では、特殊な場合を除き、比較を行った群間で「生殖次世代影響のあることが明らかな集団で既知のバイオマーカ－というポジティブコントロールをおき、新しいバイオマーカ－候補の有効性を比較検討する」というアプローチは通常はなりたない。すなわち、対象とする集団で影響の有無を知る探索的なアプローチをとらざるをえないため、すべての指標で有意差がなかった場合には、バイオマーカ－候補が既存のマーカ－に比べ高感度でないのか、あるいは単に対象集団で影響が生じていないのかどちらかで、新たなマーカ－候補の有効性が十分に検証されたかについてはよく吟味する必要がある。

A-1 の職域では緩徐な直進運動精子率および非直進運動精子率に有意差があったが、化学物質への暴露以外の交絡要因が原因である可能性が現時点では残っている。しかし、運動精子率全体としては有意差がなかったため、起こりうる影響を感度良

く検出できるマーカーという点では、WHO 基準にしたがった詳細な精子運動性の解析は有効であると考えられる。また、B の職域では暴露群と対照群との間で有意差のある生殖次世代影響を検出しなかったが、標的臓器となることが既に知られている神経系をふくむ健康評価を並行して行ったところ、B-1 では自覚症状の訴えに差が見られた。B-2 の調査ではこの結果は再現されなかったが、少なくとも職域においては生殖影響のみにとらわれず、既知の毒性影響の有無についても評価することが健康管理という視点からは重要であることが示された。

尿中クレアチンは、動物では化学物質による精巣障害において上昇することが Timbrell (2000) により報告されているが、今回、精液指標を含む各種指標との間で有意な関連はみられなかった。

## E. 結論

本解析の範囲では、一般集団に比

較し高い暴露を受けている職域集団において、調査した範囲での暴露量では顕性の生殖次世代影響を見いださなかった。しかし、研究の一部では対照群との有意な差が検出されている項目があり、これが不顕性の影響であるか交絡要因によるものか、今後明らかにする必要がある。暴露とバイオマーカー候補の変動との関連の強さ、用量反応関係、関連の一貫性を確認することが必要である。

職場の労働衛生の向上を反映して職域での暴露量が一般集団に近い水準まで下がりつつある現状をふまえると、生殖次世代影響の予防には、高感度な、すなわち職域だけでなく一般集団でも適用可能な暴露マーカー測定によるリスク管理が現実的であろう。食品中からの残留農薬の経口摂取や室内空気環境からの経気道暴露により多種類の混合暴露を受ける農薬類については特に、職域に加え一般集団も含むより大規模な生物学的暴露モニタリングが望ましいと考えられる。



表 バイオマーカー候補の測定結果 (平均±標準偏差. 群間で有意差( $p < 0.05$ )のあるものは枠内を灰色で示した.)

年齢	職域 A-1 <sup>a</sup>		職域 A-1 対照		職域 A-2 <sup>b</sup>		職域 A-2 <sup>b</sup>		職域 A-3		職域 A-3		職域 B-1		職域 B-1		職域 B-2		職域 B-2		泌尿器科 外来患者
	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露	暴露	非暴露			
n	15	16	28	6	78	20	22	12	8	30 (8 <sup>c</sup> )	46										
年齢	33.8±7.6	34.3±7.8	37.1±10.9	49.7±17.6	37.1	38.5	44.9	45.7	49.1	44.8	40.2										±12.7

暴露マーカー

総 DAP <sup>d</sup> (μg/l)	38.6±6.3	20.3±2.6	21.3±4.9	16.7±5.5	15.1±4.7	8.5±5.2	ND	ND	ND	ND	ND										ND	
E-ChF <sup>e</sup> (unit)	1.5±0.2 <sup>a</sup>	1.7±0.2 <sup>b</sup>	1.8±0.2 <sup>b</sup>	1.8±0.2 <sup>b</sup>	3.1	3.2	ND	ND	ND	ND	ND											ND
P-ChF <sup>e</sup> (unit)	5.8±0.7 <sup>a</sup>	6.2±0.6 <sup>b</sup>	5.6±0.8 <sup>b</sup>	5.3±0.6 <sup>b</sup>	378.5	358.8	ND	ND	ND	ND	ND											ND
尿中 Br (μg/mgCre)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	12.6	8.1	9.7	8.2	ND											ND

影響マーカー

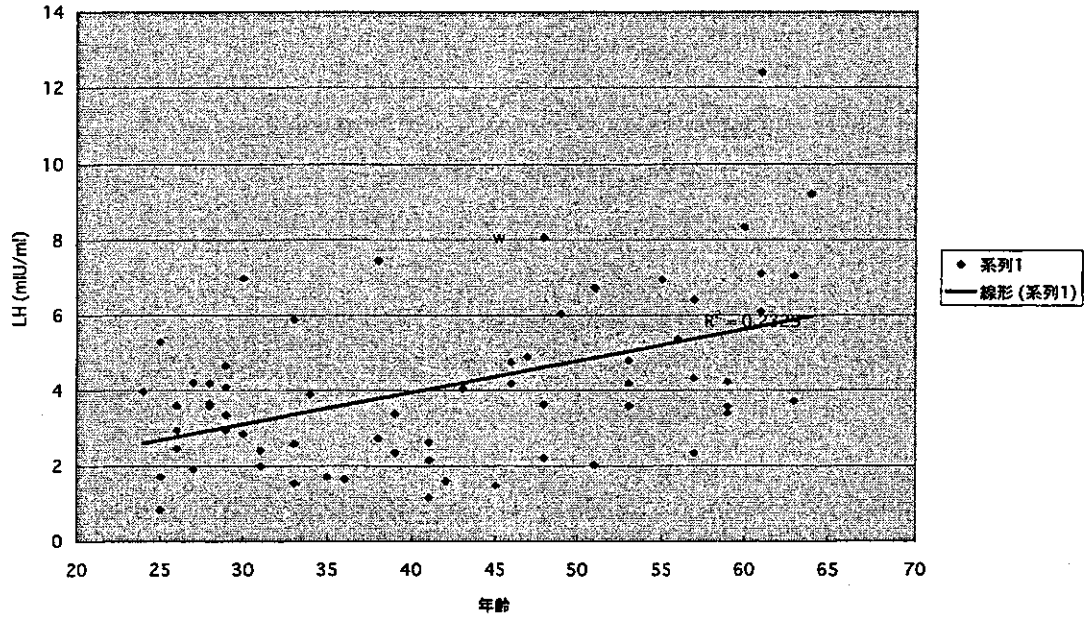
黄体形成ホル モン (mIU/ml)	3.2±1.1	2.9±1.5	3.5±1.7	5.9±3.7	ND	ND	5.1	3.5	5.6	5.6	ND											ND
卵胞刺激ホル モン (mIU/ml)	6.2±3.2	4.9±2.8	5.7±3.9	10.6±12.7	ND	ND	6.5	6.9	6.7	11.8	ND											ND
テストステロ ン (ng/dl)	500±133	445±139	505±149	476±156	ND	ND	570	504	5.3	5.5	ND											ND

精巣容積 (左) (ml)	18.4 ±4.3	21.1 ±3.8	17.3±3.9	16.7±4.8	ND	ND	17.8 ±5.4	16.8 ±4.5	ND	ND	16.3±4.7
尿クレーション <sup>o</sup> (mg/dl)	1.6±2.6	2.4±4.0	0.4±0.6	2.3±4.3	ND	ND	3.4 ±4.6	1.5 ±3.4	ND	ND	ND
前立腺体積 (ml)	ND	ND	14.4±4.1	14.9±3.2	ND	ND	14.7 ±6.2	15.6 ±1.9	ND	ND	ND
PSA <sup>1</sup> (ng/ml)	ND	ND	1.2±1.2	0.75±0.26	ND	ND	1.2 ±0.9	1.0 ±0.4	0.8 ±0.5	0.9 ±0.3	ND
精子濃度	72.2 ±33.6	94.0 ±59.6	ND	ND	ND	ND	78.0 ±46.1 (n=6)	ND	122, 10 (n=2)	76 (n=1)	ND
精子運動性 (%)	15.6 ±7.1 <sup>a</sup>	8.8 ±2.8 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	50.9 ±13.9 <sup>a</sup>	ND	28 <sup>a</sup> ,	49 <sup>a</sup>	64 <sup>a</sup>
自覚症状 <sup>o</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.3 ±3.5	1.1 ±1.0	1.1 ±1.5	1.5 ±1.7	ND
神経伝導速度	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	有意差無し	有意差無し	ND
感受性マーカー											
PON1 <sup>p</sup>	白血球 8-OHdG と関連?	関連 なし	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

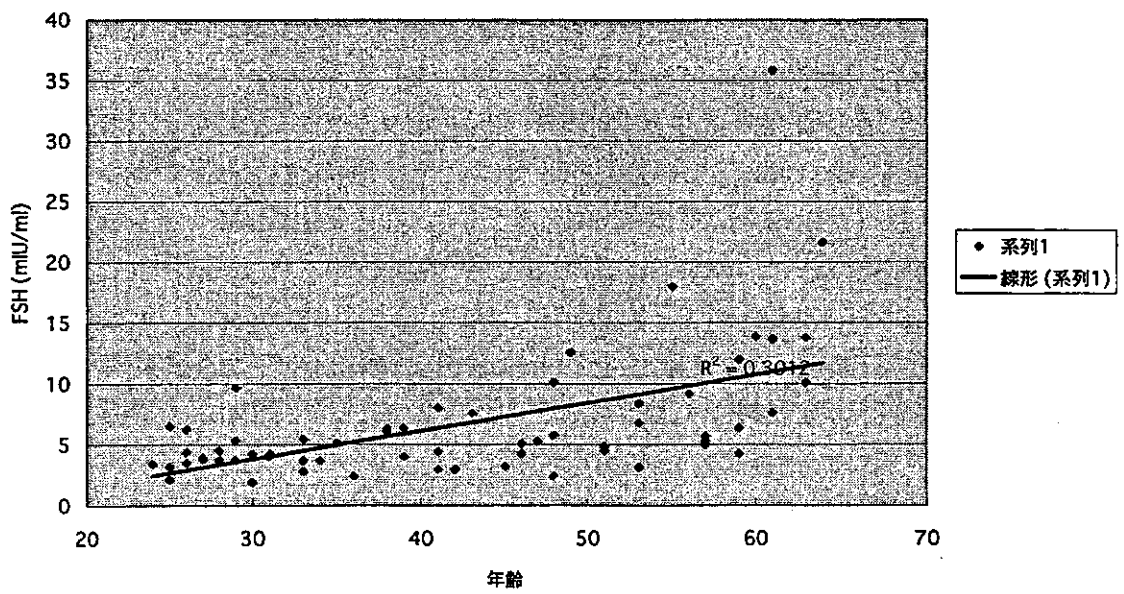
ND, 検討せず<sup>a</sup>。繁忙期<sup>b</sup> 閑散期<sup>c</sup>。男性<sup>d</sup> DAP, ジアルキルリノ酸<sup>e</sup>。幾何平均±幾何標準偏差<sup>f</sup>。E-CHE, 赤血球コリンエステラーゼ<sup>g</sup>。P-CHE, 血漿コリンエステラーゼ<sup>h</sup>。Routh 法<sup>i</sup>。チオコリンエステラル DTNB 法<sup>j</sup>。Rate assay (血清、P-ヒドロキシベンゾイルコリン基質)<sup>k</sup>。ng/ml<sup>l</sup>。PSA, 前立腺特異抗原<sup>m</sup>。緩徐な直進運動精子率<sup>n</sup>。高速直進運動精子率<sup>o</sup>。訴えのあった項目数<sup>p</sup>。PON1, パラオキソナーゼ<sup>1</sup>。



年齢と黄体形成ホルモン



年齢と卵胞刺激ホルモン



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

— 男性生殖毒性バイオマーカーとしての  
クレアチンキナーゼの有効性の検討 —

研究協力者

王 海蘭 日本学術振興会外国人特別研究員 (H16.4-8)・  
日本食品衛生協会リサーチ・レジデント (H16.9-H17.3)

分担研究者

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

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

研究要旨

クレアチンキナーゼ(CK)はアデノシン 3 リン酸(ATP)の $\gamma$ 位のリン酸がクレアチンに転移する反応を触媒する酵素である。サブユニットにはM型(筋型)とB型(脳型)の2種があり、二量体であるため、アイソザイム3種(MM, MB, BB)が電気泳動的に分離される。CKは神経毒性のバイオマーカーとしてよく使用されているが、今回の研究では生殖器影響のバイオマーカーとしてのCKの利用可能性を検討した。Western Blot方法では、CKを多量に含む組織のサンプルについては定量できるが、CK量が少ない精巣上体から分離した精子サンプルの定量は難しい。酵素免疫法はWestern Blot法より感度が高く、精子中のCK-B、および精巣、精巣上体中のCK-B、CK-Mが定量出来ることが明らかになった。その後、人間の精子の塗抹標本で免疫染色を行った。市販の抗体ではうまく染まらなかったが、発達障害研究所神経制御学部で精製したCK-B抗体により精子の頭部を染めることができた。今回は定性的な評価にとどまっているが、CK-Bの着色度で未成熟精子の割合を求め、男性生殖毒性の評価指標として使うことが出来るかもしれない。