

1, 2, 3, 4, 6, 7-六塩化ナフタレンへの胎仔期-授乳期 曝露によるラットでの精子発生の開始時期の早期化

大村, 実
九州大学大学院医学研究院衛生学分野 : 助手

<https://doi.org/10.15017/7218253>

出版情報 : 福岡医学雑誌. 92 (7), pp.251-257, 2001-07-25. Fukuoka Medical Association
バージョン :
権利関係 :



第3回福岡医学会賞受賞者及び受賞論文紹介

1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレンへの胎仔期-授乳期曝露による ラットでの精子発生の開始時期の早期化

九州大学大学院医学研究院衛生学
大 村 実

Onset of Spermatogenesis is Accelerated by a Gestational
Administration of 1,2,3,4,6,7-Hexachlorinated
Naphthalene in Male Rat Offspring

Environ Health Perspect 108; 539-544, 2000

はじめに

さすがに一時期のパニック的な状況は脱したもの、内分泌かく乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）に対しては今でも社会的に大きな関心が向けられています。内分泌かく乱化学物質とは、内分泌系に干渉することで内分泌系のバランスを崩し、その結果として生物に何らかの悪影響を及ぼす化学物質のことを指します。内分泌かく乱化学物質による悪影響というとまず頭に思い浮かぶのは精子数の減少などの性内分泌系への影響ですが、実際には甲状腺ホルモン系などの他の内分泌系への影響も同じように重要視されています。また“生物に悪影響を与える”という点では内分泌かく乱物質も従来の毒物と同じなのですが、従来の毒物の概念では考えられないような少ない量でも悪影響を及ぼす可能性がある（これを low dose effect といいます）という点から、従来の毒物とは一線を画す可能性が指摘されています（ただし、これについてはまだ学問的に完全に確認されたものではありません）。内分泌かく乱化学物質に関する研究では、化学物質の環境調査や受容体レベルでの *in vitro* 系アッセイが先行しました。そして、（非常に弱いながらも）ホルモン様活性を有する化学物質が、私たちの身のまわりにごく普通に存在することが分かってきました。しかし、“実際に私たち

が摂取する量で、これらの化学物質がヒトに対して悪影響を及ぼす可能性があるか否か”については、実はほとんど分かっていません。これは、内分泌かく乱化学物質に関する研究で動物実験が大きく立ち遅れたためです（環境省でも動物実験に取り組み始めたのは昨年の暮れからです）。

私が籍を置く衛生学講座では、“whole body を使わなければ実際に毒性があるかどうかは分からない”という信念に基づいて、昔から一貫して動物実験による化学物質の毒性研究を行っています。また、衛生学を標榜する毒性学者の一人として“その化学物質には毒性があるか否か”の解明 (hazard assessment) だけで満足することは許されず、“その化学物質の摂取量は我々にとって安全なレベルか否か”を明らかにする (risk assessment) ことが常に求められていると私は考えています。今回、福岡医学会賞を受賞させていただくことになった本研究も、そのような観点から行われた内分泌かく乱化学物質研究の一つです。

さて、本研究で評価対象となった1,2,3,4,6,7-六塩化ナフタレン（以下、1,2,3,4,6,7-HxCN と省略します）ですが、聞き慣れない名前だと思います。この化学物質はポリ塩化ナフタレン類という塩素化芳香族化合物に分類される物質です。あの“悪名高い”ダイオキシンも塩素化芳香族化合物に分類されるのですが、

実はポリ塩化ナフタレン類もダイオキシンと同じように一般廃棄物の焼却過程で発生する物質なのです⁵⁾。同じように一般廃棄物の焼却過程で発生する物質であるにもかかわらず、その毒性がほとんど解明されていない、というのがこの研究の動機でした。ポリ塩化ナフタレン類は、ダイオキシン類、ダイベンゾフラン類、コプラナー PCB 類といったダイオキシンと構造的にもよく似ており、その毒性についても従来はダイオキシンとほぼ同じであるとされていました。また、ダイオキシンには Ah 受容体を介した共通の作用があるのですが、ポリ塩化ナフタレン類のいくつか (1,2,3,4,6,7-HxCN を含む) についても Ah 受容体を介した作用が報告されています。そのため、研究の準備段階では“おそらく、1,2,3,4,6,7-HxCN もダイオキシンと同じような内分泌かく乱による影響を示すだろう”と考えていました。具体的には、ダイオキシンではごく微量の胎仔期-授乳期曝露でオス動物の精子数を減少させることが分かっていたので²⁾、1,2,3,4,6,7-HxCN への胎仔期-授乳期曝露でも精子数の減少が起きる可能性があると考えて、本実験を進めました⁴⁾。

実 験 方 法

本実験では1,2,3,4,6,7-HxCN を評価対象物質としました。ポリ塩化ナフタレン類の数多くの異性体の中で1,2,3,4,6,7-HxCN を選んだのは、ポリ塩化ナフタレン類の中でこの物質は Ah 受容体を介した作用が非常に強く、また、油症患者のデータなどから生体残留性も飛び抜けて高いことが分かっていたからです (カネミ油には不純物としてポリ塩化ナフタレン類が含まれていました)¹⁾。実験動物としてはラット (Kud: Wistar) を用いました。動物は室温をコントロールした部屋で、飲料水としては水道水を、飼料としては通常の動物用飼料をそれぞれ自由摂取させて飼育しました。ただ“通常の動物用飼料”というのが曲者で、念のために分析を行ってみたところ DDE や PCB 類といった内分泌かく乱化学物質が数百 ppt の濃度で含まれていました (別の実験で同じ飼料にトリブチルスズ (これも内分泌かく乱物質) も含まれていることを確認しています³⁾)。これは、1日あたり数十 ng (1 ng は 10 億分の 1 g) の DDE や PCB 類をラットが餌から摂取していたことを意味します。非常に微量

に思えるかもしれませんが、極微量での影響が問題となる内分泌かく乱化学物質の影響評価では決して馬鹿にできない量です。ただ、幸いなことに本実験の評価対象物質である 1,2,3,4,6,7-HxCN は動物飼料中には検出限界値以上には見出されませんでした。

1,2,3,4,6,7-HxCN は、妊娠 14, 15, 16 日目の 3 日間、妊娠ラットに対して体重 1 kg あたり 1 μ g の量で経口的に投与しました。投与はラットの胃袋の内容物がほぼなくなっていると考えられる午後 4 時~5 時の間に行いました。これは、1,2,3,4,6,7-HxCN の投与量が微量だったので、胃内容物への投与物質の吸着によって生体内への吸収量がばらつくことを避けたかったからです。ちなみに、体重 1 kg あたり 1 μ g という投与量は、ダイオキシンへの胎仔期-授乳期曝露による精子数の減少を最初に報告した Mably らの報告²⁾でのダイオキシンの投与量と同じ値です。仔ラットは出生後、直ちに仔ラットの数・生死の区別・性別・外表奇形の有無を調べ、可能な限り一腹あたりの仔ラットの数をおス 5 匹・メス 5 匹の計 10 匹に調整しました。これは、一腹あたりの授乳動物数の違いによって仔ラットの発育に差が生じることを避けるためです。

仔ラットは、生後 1 日目、4 日目、21 日目に肛門性器間距離を測定しました。肛門性器間距離は肛門と生殖器結節 (genital tubercle) の間の距離であり、雌雄で明確な性差があるため (メス<オス)、メスのオス化やオスのメス化といった性内分泌系のかく乱の指標として用いられています。ダイオキシンへの胎仔期-授乳期曝露ではオスラットで肛門性器間距離の短縮 (=メス化) が報告されていたため²⁾、本実験でもこの指標の評価を行いました。仔ラットの安楽死・剖検は生後 31 日目、48 日目、62 日目、89 日目に行いました。オス動物では以下の指標について評価を行いました。

- 精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精囊の各重量
- 精巣の破碎抵抗性精細胞数 (homogenization-resistant spermatid count)
- 精巣上体尾部の精子数、精子運動能
- 精巣の病理組織学的変化および精子発生の進行状況
- テストステロンおよびゴナドトロピンの血清中濃度

これらは、化学物質のオス生殖器系への影響評価で必

要とされる内容にほぼ準拠しています。一方、メス動物では脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN（およびDDE、PCB類）の分析を行いました。これは、この測定値を一般住民の脂肪中のポリ塩化ナフタレン類濃度の報告値¹⁾⁶⁾⁷⁾と比較することで、本実験でのラットの1,2,3,4,6,7-HxCNへの曝露条件が現実的なものかどうか（＝risk assessmentに用いることが出来るデータになりうるか否か）を検証しようとしたためです。

ちなみに本実験は2回に分けて行いました。マンパワーや飼育スペースの関係で1回で行うことが出来なかったのが理由なのですが、結果的には2回に分けて実験を行ったことで、実験結果の再現性の検証が可能になるというおまけが付くことになりました。

結果および考察

本実験の実験仮説は、“1,2,3,4,6,7-HxCNへの胎仔期-授乳期曝露では、ダイオキシンへの曝露と同じようにオス動物で精子数が減少する”というものでした。このような仮説を立てた理由は先に述べたように、ポリ塩化ナフタレン類はその生体影響も作用機序もダイオキシンの酷似している、とされていたからです。それでは、実際には実験結果は怎么样了でしょうか。

まず、私たちが立てた実験仮説はあっさり否定されてしまいました。生後89日目という成熟ラットで1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群での精子数の減少は全く見られませんでした(図1)。Mablyらの報告²⁾などで認められたオス動物の肛門性器間距離の延長も見られませんでした。さらに、生後89日目では血清テストステロン濃度を除くいかなる指標においても1,2,3,4,6,7-HxCN曝露によるオス生殖系への影響を認めませんでした(血清テストステロン濃度については受賞対象論文⁴⁾では触れていませんので、本稿でも割愛させていただきます)。もし、私たちが成熟ラットしか剖検していなかったならば“体重1kgあたり1μgの1,2,3,4,6,7-HxCNの胎仔期-授乳期曝露ではダイオキシンのような精子数減少を来たさなかった。1,2,3,4,6,7-HxCNのAh受容体を介した作用が(ポリ塩化ナフタレン類としては非常に強くても)必ずしも強くないので、本実験での投与量では不足だったのであろうと考えられた。”というような実に平凡な結論で終わっていたのではないかと思います。しかし、

本実験では成熟ラットだけでなく、生後31日目、48日目、62日目のオスラットについても剖検を行っていました。そのため、思いもよらなかった結果が得られることになりました。

図1をご覧ください。上段は減数分裂以降の発生段階にある生殖細胞が存在する精細管の割合が、中段は精巣の破碎抵抗性精細胞数が、下段は精巣上体尾部の精子数が、それぞれ1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群で対照群の何%であったかを示しています。確かに、生後89日目では1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群の精巣上体尾部の精子数は対照群とほとんど変わりませんでした。ところが、生後62日目では1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群の精子数が対照群の約2倍にまで増加していたのです。同様に、同群では精巣の破碎抵抗性精細胞数は生後48日目で、減数分裂以降の発生段階にある生殖細胞が存在する精細管の割合は生後31日目で、対照群の約2倍に増加していました。次の剖検時点では正常化していた、つまり、一過性の変化であったという点も精巣上体尾部の精子数と同じでした。これらの変化は生殖毒性を専門とする者にしてみれば極めてunusualなものでした。しかし、2回に分けて行った実験のいずれにおいてもほぼ同じ変化が認められており、これらを“偶然の産物”として切り捨てることはできませんでした。これらの変化があくまでも一過性であったということは、精子の産生能力が増加した結果ではないことを意味しています。この結果はどのように解釈できるのでしょうか。

精子は精細管と呼ばれる直径数百ミクロンの管の内腔で発生します。幹細胞から発生を開始した生殖細胞は2回の減数分裂を経て精細胞という一倍体の細胞になります。精細胞も初期にはごく普通の細胞の形態をしています。精子発生が進行するにつれて著しくその形態を変え、また、細胞核が濃縮し硬くなっていきます(そのため、ある程度以上の段階まで精子発生が進行した精細胞はホモジェナイズしても破碎されなくなります。これが破碎抵抗性精細胞です)。やがておたまじゃくし様の形態になった精細胞(＝精子)は精細管の内腔へと放出され、精巣から精巣上体へと移動し、精巣上体の尾部で射精されるまで貯えられることになります。ラットでは、出生前後に精子発生の第一波が始まるとされています。また、ラットでは幹細胞から

精子が形成されるまで7-8週間、精巣から精巣上体尾部まで精子が移動するのに1.5-2週間かかるとされています。つまり、生後62日目まででは、精子発生の第一波が先頭を切って進行中と考えられます。さらに、第一波の減数分裂が起きるのは生後4週前後、第一波の精細胞が破碎抵抗性を獲得するのは生後6-7週頃とされています。つまり、図1で示したデータのうち、生後31日目での減数分裂以降の発生段階にある生殖細胞が存在する精細管の割合、生後48日目での精巣の破碎抵抗性精細胞数、生後62日目の精巣上体尾部の精子数は、精子発生の第一波を反映していると考えられるのです。そして、いずれにおいても1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群が対照群よりも増加していたということは、1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群では精子発生の第一波が対照群よりも常に先に進んでいたことを示すと考えられるのです。本実験では、精子発生の第一波の開始時期を実際には確認したわけではありません。しかし、図2に示した5コママンガを見ればお分かりいた

だけるかと思いますが、本実験の結果については、1,2,3,4,6,7-HxCNへの胎仔期-授乳期曝露によって、精子発生の第一波の開始時期が早まったというのが最も妥当な解釈であろうと考えられました。ちなみに、本実験では血清ゴナドトロピン濃度がピークに達する日齢が1,2,3,4,6,7-HxCN曝露群では若くなるという結果も得られており、これもゴナドトロピンの分泌開始時期が早期化したためだと考えられました。ラットでは脳下垂体からのFSHの分泌増加が精子発生開始の引き金になると考えられることから、1,2,3,4,6,7-HxCNへの胎仔期-授乳期曝露によって脳下垂体からのゴナドトロピン分泌の開始時期が早まり、その結果として精子発生の開始時期も早まったものと、最終的には結論致しました。実験前に予想したのとは全く異なるものでしたが、1,2,3,4,6,7-HxCNへの胎仔期-授乳期曝露によってラットで性内分泌系のかく乱が引き起こされることが、この動物実験では示されたのでした。

1,2,3,4,6,7-HxCNが性内分泌系のかく乱を引き起こすことは分かりました。では、本実験でのラットに対する曝露条件は、ヒトでの曝露状況を考えると現実的なものと言えるのでしょうか。ポリ塩化ナフタレン類のヒトの脂肪中での濃度については、これまでに三つの論文があります。TakeshitaとYoshidaの研究⁶⁾は1970年代半ばに日本で法医解剖に付された検死体の脂肪を分析したものであり、総ポリ塩化ナフタレン類として平均濃度で 6.5 ± 4.5 ppbという値を報告しています。Williamsらの研究⁷⁾はカナダの七つの地域で一般住民(検死体?)の脂肪を分析したものであり、七地域での総ポリ塩化ナフタレン類の濃度の平均値は最低0.56 ppb・最高4.89 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCNの濃度の平均値(この当時は分析においてこの両異性体の分離が困難であったため、両異性体の合計濃度として出されています)は最低0.43 ppb・最高1.04 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCNを除いた六塩化ナフタレンの平均値は最低0.02 ppb・最高0.48 ppbであったとしています。さらに、Haglundらの研究¹⁾ではあるカネミ油症患者の脂肪中濃度として、総ポリ塩化ナフタレン類で1.401 ppb、1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCN濃度で0.605 ppbという値を出しています。こ

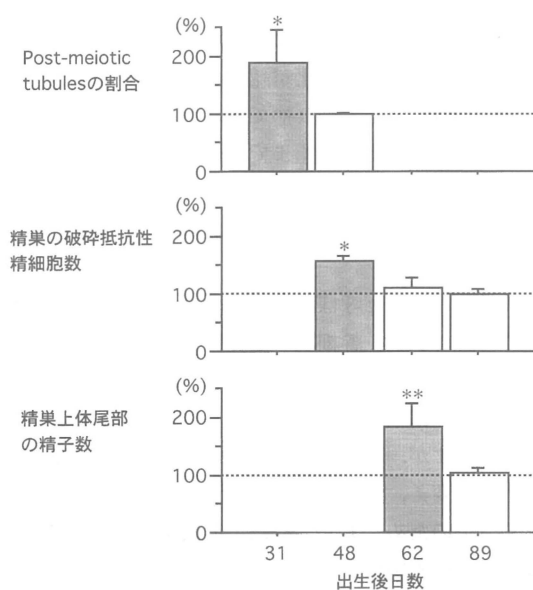


図1 生後31, 48, 62, 89日目の1,2,3,4,6,7-HxCN曝露ラットでのpost-meiotic tubulesの割合、精巣の破碎抵抗性精細胞数、精巣上体尾部の精子数(対照群の平均値の何%かで表示)。データは平均値±標準偏差で表示(n=7)。平均値の統計学的な有意差はstudent's t-testで検定。* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

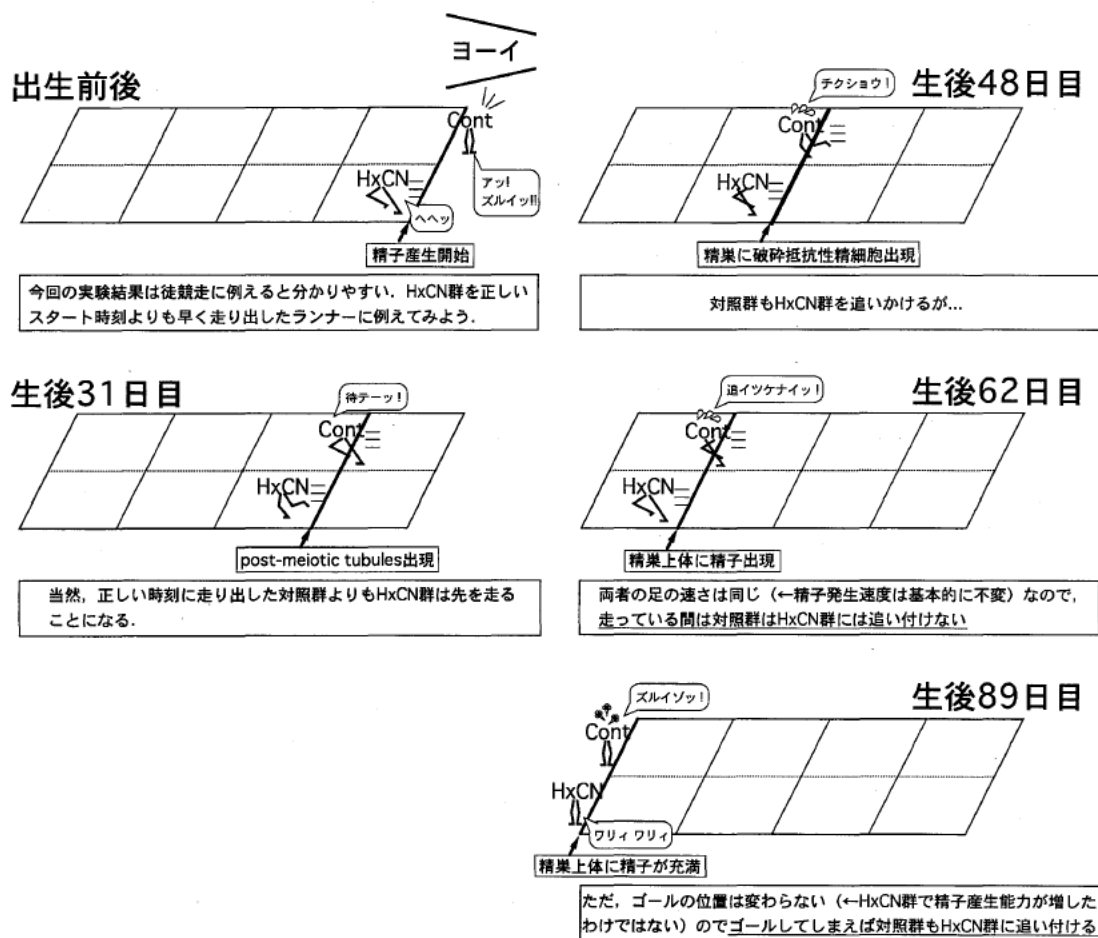


図2 精子発生の第一波の開始時期が早まった場合、なぜ生後31日目では post-meiotic tubules の割合が、生後48日目では精巣の破碎抵抗性精細胞数が、生後62日目では精巣上体尾部の精子数が一過性に増加し、なぜ生後89日目では精巣上体尾部の精子数が対照値に戻るのか? (精子発生を徒競走に例えた説明)。

これらの論文から判断する限りでは、ヒト脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN濃度はおおむね1 ppb弱ということになります。しかし、1999年に愛媛大学の脇本らは大阪府と愛媛県の一般住民の脂肪(病理解剖時に採取)の分析結果を学会で報告しており、総ポリ塩化ナフタレン類として大阪府で平均5.9 ppb、愛媛県で平均32 ppb、最高では250 ppb(大阪府)という高い値を報告しています(第8回環境化学討論会)。前述のように1,2,3,4,6,7-HxCNはポリ塩化ナフタレン類の中でも特に脂肪への残留性が高く、Haglundらの研究¹⁾でも示されているように、ヒトにおいてもポリ塩化ナフタ

レン類の数十%は1,2,3,4,6,7-HxCN/1,2,3,5,6,7-HxCNであると考えられます。脇本らの研究では1,2,3,4,6,7-HxCNの分析は行われていませんが、平均濃度でも数 ppb から十数 ppb、最高濃度では百 ppb 前後の1,2,3,4,6,7-HxCNが脂肪に含まれていたものと推定されます。

表をご覧ください。これが本実験でのメスラットでの1,2,3,4,6,7-HxCN、(およびDDE, PCB類)の脂肪中濃度です。この表で最も重要なのは、実際に1,2,3,4,6,7-HxCNへの曝露を受けた母動物の脂肪中濃度です。母動物の脂肪中での1,2,3,4,6,7-HxCN濃度

表 メスラットの脂肪中の1,2,3,4,6,7-HxCN, DDE, PCB 類の濃度 (ppb)

		1,2,3,4,6,7-HxCN	DDE	PCB 類
仔ラット				
出生直後	対照群	(検出限界以下)	10.52±4.89	6.36±1.00
	1,2,3,4,6,7-HxCN 群	22.18±6.59	13.49±6.37	6.73±3.17
生後 21 日目	対照群	(検出限界以下)	35.56±12.86	13.59±4.81
	1,2,3,4,6,7-HxCN 群	9.78±2.86	27.98±9.39	9.28±3.89
生後 89 日目	対照群	(検出限界以下)	16.44±2.88	9.01±1.07
	1,2,3,4,6,7-HxCN 群	0.45±0.08	15.86±3.40	9.70±1.01
母ラット				
	対照群	(検出限界以下)	15.78±2.98	14.06±5.17
	1,2,3,4,6,7-HxCN 群	5.75±2.81	15.43±3.11	14.57±3.95

データは平均値±標準偏差で表示 (n=7)。

1,2,3,4,6,7-HxCN の検出限界値は、出生直後の仔ラットで 5 ppb、生後 21 日目の仔ラットで 2 ppb、生後 89 日目の仔ラットで 0.05 ppb、母ラットで 0.1 ppb。

(仔動物離乳直後時点での) は 5.75 ± 2.81 ppb でした。前述のヒトでのデータと比較すると、論文化された研究のデータと比較では 5-10 倍あまり高い値です。しかし、動物実験での作用量（影響を認めた曝露量）が現実のヒトでの曝露量の 10 倍程度でしかないというのは、化学物質の安全性評価において“ヒトでの影響はありえない”とは言いきれないような差です。また、脳本らのデータとの比較では、本実験での曝露を上回るような 1,2,3,4,6,7-HxCN への曝露がヒトでも発生している可能性が示唆されています。もちろん、動物実験で認められた影響からヒトへの影響を類推する場合、種差を無視してはなりません。特に、1,2,3,4,6,7-HxCN のように毒性だけでなく体内動態に関するデータも乏しい場合はその判断は慎重にならざるを得ません。ただ、ヒトでの現実の曝露状況に近い曝露条件下で 1,2,3,4,6,7-HxCN の内分泌かく乱影響を再現性をもって示すことが出来たこの研究の意義は、決して小さくないと私たちは考えています。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に対して平成 12 年度福岡医学会賞を授与いただき、福岡医学会幹事の諸先生方に深謝申し上げます。私自身は様々な社会医学的な要請に応えることが出来る衛生学という研究分野に誇りを持っておりませんが、“研究手法が古い”“impact factor が低い”などといった感じで、なかなかその研究を評価してもらえません。そのような中で、私たちの研究を評価していただいた今回の賞は本当に嬉しいものでした。あらためて心より感謝申し上げます。

げます。ありがとうございました。また、研究の御指導をいただきました九州大学大学院医学研究院衛生学 井上尚英教授に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Haglund P, Jakobsson E and Masuda Y: Isomer-specific analysis of polychlorinated naphthalenes in Kanechlor KC 400 Yusho rice oil, and adipose tissue of a Yusho victim. *Organohalogen Compounds*. 26: 405-410, 1995.
- 2) Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A and Peterson RE: In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol*. 114: 118-126, 1992.
- 3) Ogata R, Omura M, Shimasaki Y, Kubo K, Oshima Y, Aou S and Inoue N: Two-generation reproductive toxicity study of tributyltin chloride in female rats. *Journal of Toxicology and Environmental Health* (in press).
- 4) Omura M, Masuda Y, Hirata M, Tanaka A, Makita Y, Ogata R and Inoue N: Onset of Spermatogenesis Is Accelerated by Gestational Administration of 1,2,3,4,6,7-Hexachlorinated Naphthalene in Male Rat Offspring. *Environ Health Perspect*. 108: 539-544, 2000.
- 5) Takasuga T, Inoue T, Ohi E, Ireland P, Suzuki T and Takeda N: Determination of halogenated aromatic and polycyclic aromatic hydrocarbons formed during MSW incineration. *Organohalogen Compounds*. 19: 41-44, 1994.

6) Takeshita R and Yoshida H: Studies on environmental contamination by polychlorinated naphthalenes (PCN). III. Contamination of human body by PCN. Eisei Kagaku. 25: 24-28, 1979 (in Japanese).

7) Williams DT, Kennedy B and LeBel GL: Chlorinated naphthalenes in human adipose tissue from Ontario municipalities. Chemosphere. 27: 795-806, 1993.

著者プロフィール

大村 実（おおむら みのる）

九州大学大学院医学研究院衛生学分野 助手 博士（医学）

1987年 九州大学医学部卒業 '87年6月-'88年3月 同大学医学部附属病院研修医（第三内科） '88年4月 同大学大学院医学系研究科社会医学専攻入学 '92年3月 同上修了（博士（医学）取得） '92年4月 同大学医学部衛生学講座（現 大学院医学研究院衛生学分野）助手 現在に至る。◇研究テーマ：一般環境や作業環境に見い出される化学物質の男性生殖系への影響評価。◇趣味：テレビゲーム，野鳥観察。

