

表6 第2群：人間に対しておそらく生殖障害性があると考えられる因子で、証拠が比較的不十分なもの

職業因子因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連程度	動物の所見	関連程度	関連の程度と所見
カーバリル	精子形態異常	2	精巣障害	2	
マンガン	性欲減退	2	精巣障害	2, 3	
塩化メチレン	精子数減少	2	精巣障害	2, 3	±混合曝露で自然流産の増加
スチレン		2			混合曝露による生殖毒性 ±胎仔毒性
トリクロロエチレン		2			±中枢神経発達障害
ジメチルジクロロビニル フオスフェート(DDVP)			精子数減少	1	
エピクロロヒドリン			精巣障害	1, 3	
酸化エチレン			精巣障害	2	±自然流産、動物で奇形
ポリ臭化ビフェニル			精巣障害	2	胎児死亡率の増加
ポリ塩化ビフェニル			精巣障害	2	子供の色素沈着、低体重児、 月経周期の変化
一酸化炭素			精巣障害	2	胎仔神経障害、 中枢神経奇形
*1-ブロモプロパン			精子数減少，活動精子率減少	1	ラット性周期の遅延乃至停止
*塩化アリル			精巣萎縮	1	
*ヘキサン			精巣障害	1	
*シクロヘキサノール			精巣障害	1	
*ジエチルヘキシルフタレート(DEHP)			精巣障害	1	

1:強い関連性を示すデータあり、 2:関連性を示す限定的データあり、 3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、-: 関連性情報なし、

(*:Ellenhorn¹⁾ のデータに新たに追加したもの)

表7 第3群：人に対して生殖毒性が疑われるが、上記のように分類できないもの

職業因子因子	男性生殖障害				女性生殖障害
	人の所見	関連 程度	動物の所見	関連 程度	関連の程度と所見
ベンゼン			精子活動率低 下、精巣障害	2	
ベンゾ [a] ピレン			精巣障害	2	
四塩化炭素			精巣障害	2	
キシレン					混合曝露による生殖毒性 ±動物で骨化の遅延
テトラクロロエチ レン					±自然流産の増加、 動物で発達障害
トルエン等芳香族 炭化水素					+低体重児、奇形、 胎仔溶剤症候群
水銀					+死産、新生児性比の変化
*1,1,1-トリクロロ エタン					不十分な証拠
*塩化メチル			精子形成の遅延	2	

1:強い関連性を示すデータあり、 2:関連性を示す限定的データあり、 3:関連性示さない限定的なデータあり、+: 確定的関連性あり乃至その可能性あり、±: 疑問のある関連性データあり、-: 関連性情報なし。(※:Ellenhorn¹⁾ のデータに追加したもの)

5. 次世代影響としての神経行動毒性評価と今後の研究課題

北海道大学医学部予防医学講座公衆衛生学分野 岸 玲子

1. 次世代影響評価としての神経行動毒性の重要性

内分泌攪乱化学物質（いわゆる環境ホルモン）の問題を契機として、ヒトでの次世代影響、発達毒性は世界的に大きな関心を呼んでいる。私たちが日常曝露している環境化学物質のうち、65,000 物質は何らかの毒性をもつと報告されている⁽¹⁾にもかかわらず、これまで次世代影響については、生殖への影響、催奇形性などの形態的異常、あるいは出生した仔動物の発達や諸機能についてはほとんど系統的には調べられてこなかった。

一方、産業職場で用いられることが多い幾つかの化学物質については、女性労働者を対象とした疫学研究から、不妊や流産、生下時体重の低下などの次世代への影響が報告されている。これまでの中毒学の多くの知見からも、動物実験では胎盤を通過して胎仔に移行すること、胎仔には排泄器官がなく薬物代謝酵素も未発達なため、母親よりも長く停留蓄積することが報告されている物質もある。さらに環境中に存在する化学物質の中には脂溶性に富み、神経系へ取り込まれ易いものもあることを考えると、中枢神経系の発生に影響を及ぼし、さらに生体の統合機能としての行動にまで影響を与える可能性もありうると考えられる。よって今後はこのような次世代影響を生殖毒性にとどまらず、神経行動発達についても調べることで、あるいはヒトでの実際のリスク評価につながる疫学研究を行うことは重要になってくる。

図1には化学物質の用量（Dose）と、毒性発現率との関係を示した。次世代影響は複数の outcome をもつが、その中でも仔の行動機能異常は、不妊や子宮内死亡、出生仔での先天奇形（形態構造の異常）、仔の発達及び成長の遅れなどの outcome よりも低い用量で発現する可能性がある鋭敏な健康影響指標である。

図2にはヒトの初期発生（受精後 56 日まで）の過程を示した。図のように受精後 6-7 日目に胚は着床し、20-23 日目までに 3 胚葉への初期分化が起こり、その後 56 日目までの間に器官形成が行われる。循環器系や呼吸器系などの多くの系はこの器官形成期の間には大部分の器官原基の形成を終えるが、神経系、特に中枢神経系の発達はその後生後約 1 年くらいまで時間をかけて徐々に発達する。

図3は発生段階のごとに、発達毒性をもつ化学物質に対する仔の感受性の変化を示した。ヒトの場合器官形成期である受精後 22-56 日が、最も催奇形性の感受性が高い時期に相当する。発達毒性をもつ化学物質は多くの場合、物質に曝された胚のわずかな部分にしか影響を与えないが、胚が初期のものであればあるほど、その後の発生分化によって形成される器官のより多くの部分に影響が発現すると考えられる。このため、一般的には胚発生

が進むにつれて発達毒性をもつ化学物質による影響は小さくなると考えられる。しかしながら、中枢神経系の発達は受精後 22-56 日の器官形成期（多くの器官の）後も継続し続けるため、神経毒性及び行動毒性の化学物質に対する感受性は、長い期間にわたって高いまま、より後の時期まで渡ると考えられる。

以上のように、神経行動毒性はその他の毒性と比べてより感度が高いと考えられること、またその感受性の高い時期が長く、出生後にまで渡ると考えられることから、次世代影響の神経行動毒性の重要性が示唆される。

2. 神経行動毒性評価法について

（1）最近の動向

神経行動毒性の評価については、1985 年にアメリカの EPA（環境保護庁）による有害物質規則法（TSCA）の神経毒性試験ガイドラインに発表され、ついで 1987 年にはアメリカ EDA と FDA の共通プロトコールが発表された。最近では 1997 年に OECD（経済協力開発機構）によって、化学物質の 28 日間反復毒性試験ガイドラインに、免疫毒性とともに神経行動毒性の評価項目が追加された。

一方、次世代の発達神経行動毒性の評価法に関しては、1986 年に WHO で「行動奇形（behavioral teratogenicity）」についてのガイドラインが発表された。1998 年には OECD 検討会議で、神経系の発生から発達までを含め、妊娠期及び授乳期の曝露影響についての安全性評価を行うことが決議された。

（2）神経行動毒性評価の手法（表 1）

神経行動毒性を評価する場合には、化学物質の神経系への形態的影響及び機能的影響の両方の面から行う。具体的には、形態的影響は曝露によって生じる神経系の病理学的及び組織学的変化のほか、脳の重量及び体積（サイズ）の変化、GFAP などの神経細胞障害の指標となるようなマーカー測定などを評価する。また機能的影響は、1) 末梢神経の伝導速度、誘発電位、脳波の変化などの神経生理学的影響、2) 神経伝達物質の合成・分解などの活性のほか、伝達物質濃度、代謝活性の変化などの生化学的影響、3) 行動については運動協調性（ロータロッド試験など）や感覚機能（聴覚・視覚・嗅覚・痛覚異常など）の測定を行い、行動機能については自発運動量測定、情動性の検査（オープンフィールドテストなど）、不安行動や性行動の検査（社会相互作用テストなど）、学習及び記憶能力の検査（オペラント学習テスト、迷路テストなど）を評価する。

（3）発達神経行動毒性評価の手法（表 2）

化学物質による発達神経毒性を正確かつ鋭敏に評価するためには、適切なテストバッテリーの選択が重要である。発達神経毒性評価の場合は、1) 体重、開眼時期、歯牙崩出時

期などの仔動物の発育、2) 神経反射や神経筋機能といった生理運動機能の発達、3) 嗅覚、聴覚、視覚などの感覚の発達、4) 自発運動量や情動性の発達、5) 学習能力の発達、6) 性成熟度などの試験を行う。発達神経毒性評価の具体例を表3にあげる。

どのようなテスト項目を選択するかは、その化学物質についての既存データの有無による。既にヒトでの発達神経毒性学的データや、動物実験での神経行動毒性学的データがある場合は、既知のデータに関連した分野に焦点をあてたテストを行うことが多い。また、ヒトおよび動物実験いずれのデータもない場合は、上述した全ての神経機能について検討できるようにテストバッテリーを組んで評価する。

観察期間については、上述のような出生直後の発育から、性成熟までを含めた評価を行う場合、出生直後から成熟年齢までの期間を通して継続するのが適当である。

投与（曝露）濃度は、対照に加えて少なくとも3段階とする。最高投与量は発達神経毒性の評価に支障をきたす（胎生期及び新生児）死亡、奇形発生などが現れない、最大量を用いる。また投与開始日、投与期間、1日の投与回数については、投与する化学物質の吸収及び代謝速度、薬物代謝酵素の誘導の有無、肝機能障害の有無なども考慮に入れて検討すべきであろう。

3. スチレンの次世代影響（私どもの研究から）

プラスチック硬化剤として産業界で広く製造、使用されている有機溶剤スチレンについて、生殖毒性、発達毒性の検討を行った。

（1）胎盤及び胎仔側への移行率⁽²⁾

放射性同位元素 ^{14}C で標識したスチレンを妊娠マウスに注入し、注入後5及び30分、1、2、6及び24時間後に、母マウス及び胎仔組織および血液、胎盤、羊水、羊膜、子宮中のスチレン及びその代謝物濃度を測定したところ、スチレン注入後5分で母マウスの肺、腎臓、肝臓、脂肪組織、脳に、そして胎仔組織にも（濃度は低い）スチレンが分布しているのが観察された。胎盤中の濃度 ($0.21 \pm 0.13 \mu\text{mol/g tissue}$) は5分後でピークに達していた。注入後1時間では、胎仔血中の濃度がピークに達し、注入後24時間には、母の血中及び脳濃度と胎仔の血中濃度はほぼ同程度になった。このことから母マウスに注入されたスチレンは、胎盤を通して容易に胎児に移行しうること、さらに子宮内の仔は排泄器官がないことから（母の体内濃度が、腎臓および尿からの溶剤排泄によって低下した後も）体内に長く貯留していることが明らかになった。

（2）生殖への影響⁽³⁾

スチレン曝露による生殖への影響については、妊娠7-21日の母ラットに0、50、300 ppmで6hr/day スチレンを吸入させると、300 ppm曝露で母ラットの体重増加がcontrol (0 ppm) よりも低下し、出生後21及び77日目の仔の体重がcontrol よりも有意に低下す

るが、妊娠期間、産児数、仔の出生直後の死亡率には差が認められなかった（表 4、表 5）。

（3）発達神経行動毒性評価による検討⁽³⁾

妊娠 7-21 日に 0、50、300 ppm で 6hr/day スチレンを吸入させた母ラットから産まれた仔では、身体的発達に関しては歯崩出、開眼について曝露による影響が認められた（表 6）。また生理運動機能に関しては、驚愕反射、正向反射、ピボッティング移動、棒把握（握力）の項目で曝露による影響が認められた（表 6、図 4、図 5）が、置き直し反応、断崖回避反応については曝露による影響は認められなかった。ロータロッド平衡機能に関しては 300 ppm 曝露で影響が認められた（表 7）。情報行動に関しては、300 ppm 曝露でオープンフィールド行動（表 8）、活動性（表 9）、に差が認められた。またオペラント学習（表 10）にも影響が認められた。性成熟に関しては、雌の膈開口時期は曝露による影響を受けなかった（表 6）。

（4）病理組織学的/生化学的背景⁽⁴⁾

妊娠 7-21 日に 0、50、300 ppm で 6hr/day スチレンを吸入させた母ラットから産まれた仔の脳重量、脳内タンパク量、大脳及び小脳中の神経伝達物質量を測定したところ、脳重量及び脳内タンパク質量には曝露による影響は認められなかった。大脳中の神経伝達物質量については、300 ppm 曝露で 5-HT (5-hydroxytryptamine, serotonin) とその代謝物である 5-HIAA (5-hydroxyindoleacetic acid)、NA (norepinephrine) の代謝物である HVA (homovanillic acid) 量が有意に低下しているのが認められた。一方、DP (dopamine)、NA、DOPAC (3,4-dihydroxyphenylacetic acid, DP 代謝物) 量には影響が認められなかった（表 11）。小脳中の神経伝達物質量については、影響は認められなかった。

（5）肝薬物代謝酵素活性⁽⁵⁾

スチレンやトルエンなど有機溶剤は主に肝ミクロソーム分画に存在する薬物代謝酵素（チトクローム P450）によって代謝されるが、この代謝には性差とともに、仔の発達時期による差、また妊娠時／非妊娠時の差が認められる。肝ミクロソーム分画にトルエンを加えた際に生じる、ベンジルアルコール量を測定して代謝活性を調べたところ、トルエンを高濃度（5.0 mM）加えたときの成熟雄ラット（18 週令）の代謝活性は成熟雌ラットや、未成熟雄ラット（3 週令）のものより有意に高かった。雌ラットでは成熟個体と未成熟個体の代謝活性に差は認められなかった。また妊娠ラット（妊娠 10 日及び 21 日）では代謝活性は低下していた（表 12）。

また、スチレン代謝が主に P450 のどの isotype に支配されるかを調べるために、肝ミクロソーム分画を anti-P450IIC11/C6 及び anti-P450IIE1 モノクローナル抗体で前処理した場合のベンジルアルコール量を測定した。未成熟ラットでは雌雄とも anti-P450IIE1 抗体処理を行った場合に、成熟雄ラットでは anti-P450IIC11/C6 抗体処理を行

った場合に代謝活性が阻害され、成熟雌ラットでは anti-P450IIC11/C6、anti-P450IIE1 抗体のいずれの抗体処理でも同程度に代謝活性阻害が見られた。また、妊娠ラットでもその傾向は変わらなかった（図6）。

4. 文献レビュー（ステレンの生殖及び次世代への影響についての研究）

有機溶剤の1つであるスチレンの、ヒト及び動物での妊娠及び次世代影響についてのこれまでの報告を以下にまとめる。

（1）ヒトでの報告（表13）

スチレンの職業的曝露による妊娠に対するリスク要因（ヒトへの生殖毒性としての報告）が数多く出されているが、現在のところまだその毒性に関しては議論が続いている状況である。スチレンの女性労働者の生殖毒性について、1970年代はじめにロシアからいくつかの報告がなされたが、曝露濃度など詳細な記述がないこと、対照の有無などの重要な点について不明確であり信頼性に欠けるため、ここでは除外している。フィンランドの Holmberg ら⁽⁶⁾のグループが行った化学工場労働者の調査では、1976年から1977年までのフィンランド先天異常登録から43人の中枢神経系欠損をもつ子供を抽出し、母親へのインタビューを行った。43人中2人の子供の母親は強化プラスチック工場で働いており、スチレン、ポリエステル、有機パーオキシサイド、アセトンの曝露を受けていた。しかしこの報告では研究集団が小さく、化学物質曝露濃度の測定が行われていないなどの問題がある。これ以降もフィンランド先天異常登録に基づく調査が続けられ、132人の中枢神経系欠損の子供達についての調査が行われたが、スチレン曝露と関連した先天異常の例は報告されていない。またスウェーデンの Ahlborg ら⁽⁷⁾の報告では43人と人数は少ないが、強化プラスチック工場作業員では低体重児出産が対照に比べて多かったという結果も得られている。Lemaster ら⁽⁸⁾の強化プラスチック工場での調査では、環境濃度の測定も行われている。30 ppm 以下の低濃度曝露者では子供の体重は対照群と差がなかったが、82 ppm の高濃度曝露者（積層作業など）では子の体重は、対照群の母親の子の体重よりも4%低かったことが報告されている。

自然流産に関しては、フィンランドの Hemminki ら⁽⁹⁾が1973年から1976年までのフィンランド国民健康登録から得られた15,482人の自然流産に関する調査がある。化学工場で働く女性労働者の流産の率は、一般国民全体の流産の率よりも有意に高かった（15.57% vs. 7.98%）。これらの化学工場で働く女性労働者はスチレン曝露していたが、この報告では症例数が6例と少ないことが問題となっている。Harkonen ら⁽¹⁰⁾の同様の調査結果では、67人の lamination 作業を行っている女性労働者では自然流産の発生率に関して、対照である化学物質を取り扱わない工業労働者と比較して差がなかったと報告している。

内分泌系やホルモンに対する影響の発現例として生理不順を考え、Holmberg ら⁽¹¹⁾は

上述の 14 人の lamination 作業従事女性労働者で調査を行った。スチレンに曝露した女性労働者と対照者との間に有意差はなかった。Lemaster ら⁽¹²⁾ は米国内の 36 の強化プラスチック会社の 174 人の女性労働者と、449 人の年齢、人種、収入をマッチさせたスチレン非曝露者との電話聞き取り調査を行った（スチレンの曝露程度は作業内容に基づいて層化している）。その結果、生理期間、生理不順などについての差は認められなかった。また多変量（回帰）分析においても、職業的スチレン曝露と生理不順に関連性は見られなかったと報告されている。

以上のように次世代影響として発生、発達毒性の面から先天的奇形、胚/胎児死亡、出生時低体重の増加についての報告はあるが、正確なスチレン曝露濃度やスチレン以外の化学物質への曝露程度などが十分に明らかになっておらず、またバイオロジカルモニタリングの欠如、及び交絡要因の調整などもなされていないため、スチレン曝露による因果関係を明確化したものは現在までのところ見られない。

（2）動物実験での報告（表 1 4）

スチレンの次世代影響、および生殖学的影響については 1989 年の Brown⁽¹³⁾ の総説に詳しい。妊娠中スチレン曝露による胎児への影響は Ragule ら⁽¹⁴⁾ がスチレン 0、5、50 mg/m³ の妊娠中曝露を行っている。50 mg/m³ の高濃度曝露では胚/胎児死亡数が有意に増加したが、低濃度曝露では影響は見られなかった。また、0、1.5、5 mg/m³ の曝露を妊娠全期間中行った群と、妊娠前期のみ行った群の 2 群での実験を行った。両群において胎仔死亡の増加が見られ、有意に母ラット当たりの総胎仔死亡が増加したと報告しているが、必ずしも詳しいデータが記載されているわけではなかった。またスチレンの催奇形性については、Vainio ら⁽¹⁵⁾ がニワトリを用いて、胚の器官形成期に 2.5 mg/kg のスチレンを卵腔内に注入後 9 日間保温し、孵化した雛では骨の奇形が認められている。Murray ら⁽¹⁶⁾ はラットとウサギの発達毒性について調べ、ウサギには 300 及び 600 ppm のスチレンを 7 時間/日曝露し、ラットには 180 mg/kg/day のスチレンを経口で与えた。ラットではスチレン投与によって、母ラットの妊娠 6 日から 9 日の体重増加の低下をもたらしたが、これは餌摂取量の減少によるものと考察している。一方、着床数、生存仔数、仔の体重、外的奇形及び骨奇形には影響は見られなかった。ウサギでは曝露による影響は見られなかった。これらの結果から彼らは、母体に影響の生じるくらいの高濃度でも胎児に対する発達毒性はごくわずかであると結論している。Kankaanpää ら⁽¹⁷⁾ はマウスにスチレン曝露を 250 ppm、6 時間/日、妊娠 6-16 日で行った。新生仔死亡数、胎児死亡数、奇形（骨格欠損）が対照に比べて有意に増加（2.9% vs. 0.9%）したと報告しているが、統計的検定が不十分であった。また彼らは、ハムスターにも 300、500、750、1000 ppm のスチレン曝露を妊娠 6-18 日に行い、1000 ppm 曝露でのみ胎児死亡数が増加していたが、奇形はみられなかったと報告している。

Beliles ら⁽¹⁸⁾ は 3 世代生殖実験を行っている。飲料水にスチレンを 0、25、250