

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2019

課題番号：15K00562

研究課題名(和文) 化学物質の多様性に応じた雄性生殖毒性試験法の開発

研究課題名(英文) Development of male reproductive toxicity test method according to the biological characteristics of chemical substances

研究代表者

大谷 勝己(Ohtani, Katsumi)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・化学物質情報管理研究センター・有害性評価研究部  
・統括研究員

研究者番号：50333373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：従来の精子数や精子運動能の測定を中心とする精子検査法では化学物質の雄性生殖毒性を評価するには限界があることから、主として精子ミトコンドリア代謝能や精子尾部の形態などに着目した新規の精子検査法の開発を目的とした。まず、試験物質をラットに投与し新規精子試験法WST-8法による精子代謝能測定法、精子尾部形態測定法が従来の雄性生殖毒性試験法では検出できない影響を検出できることを示した。次に、マウスにおいては、精子浮遊液を固定し遠心後、塗抹し、染色することで、尾部形態の他、頭部形態の解析を可能とした。それ以外に、精巣毒性を計測する客観的指標として精巣中の精子頭数をCASAで測定することも可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において提案された方法(精子代謝能測定法、精子尾部形態解析法、精巣中の精子頭数測定法)を従来の精子検査法とも比較検討および追加・応用することにより、より簡便な解析法の確立、作用機序に応じた測定法の開発(精子運動持続性等の精子検査法の他、精巣毒性評価法も含む)、既存法の改良を通して、いままでには見いだせなかった化学物質の精子への作用の解明、および従来のガイドラインの変更ないし詳細化が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The conventional sperm test method, which mainly measures the sperm count and sperm motility, has a limit in assessing the male reproductive toxicity of chemical substances. Therefore, we focused on sperm mitochondrial metabolism and sperm tail morphology. The purpose was to develop a method for sperm inspection. First, it was shown that the test substance was administered to rats and that the sperm metabolism assay and sperm tail morphology assay by the novel sperm assay method WST-8 method could detect the effects that cannot be detected by the conventional male reproductive toxicity assay (the sperm count and sperm motility). Next, in the mouse, the sperm suspension was fixed, centrifuged, smeared, and stained to allow analysis of the head morphology as well as the tail morphology. In addition, it was possible to measure the sperm head count in the testis by Computer-assisted sperm analysis (CASA) as an objective index for measuring testicular toxicity.

研究分野：生殖毒性

キーワード：雄性生殖毒性試験法 精子代謝能 精子形態

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱化学物質の問題が物議をかもし、特にヒトの精液性状に異常がみられるという報告が相次いだこともあり、動物実験の分野でも、雄性生殖毒性の重要性が再認識された。また時は遡るが労働衛生の分野においても前世紀後半に薰蒸剤(農薬の一つ)として用いられていたジプロモクロプロパン(DBCP)の製造業者および散布業者に無精子症の被害が生じていた。さらに前世紀末には半導体の洗浄剤として用いられていた 2 - プロモプロパン(2BP)を取り扱っていた労働者にやはり無精子症の被害が生じた。そして今世紀初頭には有機リン系農薬の散布業者の精液性状に変化が生じたという報告もでた。これらの生殖障害事例は疫学調査が先行して行われているが、それだけでは因果関係が明確にならず、動物実験が行われて最終結論が導き出されている。

ところが、動物実験における雄性生殖毒性試験は精巣病理、精子数と浮遊直後の精子運動能のパラメーター解析が中心であり、まれに精子形態の解析がされるがそれは精子頭部が主であり、化学物質の特性に応じた評価になっていない。雄性生殖毒性を引き起こす化学物質は一律ではなく作用時期、作用部位、作用機序、作用量、作用形式もそれぞれ違う。

筆者らを取り扱ってきたのは、下記のような労働現場で扱われる化学物質である。ア)DBCP(燻蒸剤)：精巣に作用し精祖細胞を消滅させ最終的には不可逆的無精子症に導くが、その過程で精子運動性が低下。イ)2BP(DBCPの構造類似体、半導体の洗浄剤に用いる)；DBCPの20倍以上の用量でなければ作用は現れないが、最終的には不可逆的無精子症に導く。ウ)セロソルブ(塗装材、インクの溶剤)：精巣には殆ど作用せず、精子に直接作用するため、吸入後わずか一日後には明らかな精子運動能低下が認められるが、無精子症になることはなく、作用は可逆的である。エ)ジクロロボス(DDVP)及びダイアジノン(DZN)(有機リン殺虫剤)：精子数や浮遊直後の精子運動能および精子頭部形態に異常は殆どないが、運動持続性の低下、精子尾部の形態異常が認められた。筆者らのこれらの知見(参考文献 1-3 等)だけでも従来の雄性生殖毒性試験として一般的な精巣病理、精子数、精子運動能、精子頭部の形態解析では方法論として不十分であり、新たな指標による試験法が必要であることを示している。

## 2. 研究の目的

従来の精子数や精子運動能の測定を中心とする精子検査法では化学物質の雄性生殖毒性を評価するには限界があることから、主として精子ミトコンドリア代謝能や精子尾部の形態などに着目した新規の精子検査法を提案し、従来の精子検査法とも比較検討することにより、より簡便な解析法の確立、作用機序に応じた測定法の開発(精子運動持続性等の精子検査法他、精巣毒性評価法も含む)、既存法の改良を通して、いままでには見いだせなかった化学物質の精子への作用の解明を目的とし、従来のガイドラインの変更ないし詳細化を将来的目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、まず効率的な雄性生殖毒性試験の開発を目指し精子の代謝能に対する新しい検出試薬のスクリーニングを行い、従来法と比較してその簡便性・有効性や特徴を明らかとすることをめざす。次に、従来法から得られた画像を利用し、精子尾部の新しい形態分析法の確立を行なう。次年度以降は、化学物質の作用機序に応じた雄性生殖毒性評価法の開発が中心となり、見落とされてきた精子運動持続性の解析法、有用といわれる従来法の欠点克服のための方法も考案する。

## 4. 研究成果

初年度に 2-プロモプロパン等を試験物質としてラットに投与し新規精子試験である精子尾部形態測定法が従来の雄性生殖毒性試験法である精子運動能や精子数解析では検出できな

い影響（図 1,2,4）を、精子代謝能測定法は精子数と同様の検出はできるが（図 2,3）、精子運動能では検出できない影響を検出できる（図 1,3）ことを示した。

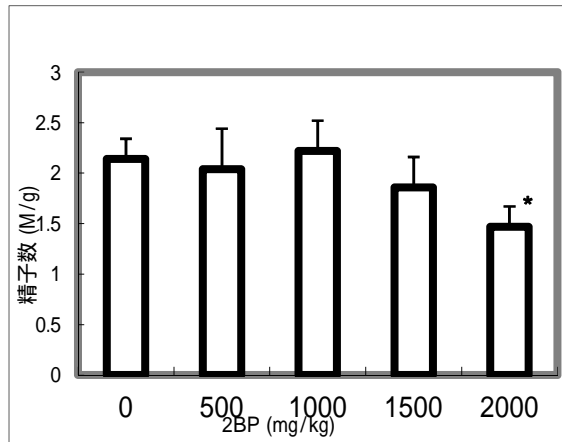


図 1 . 精子数

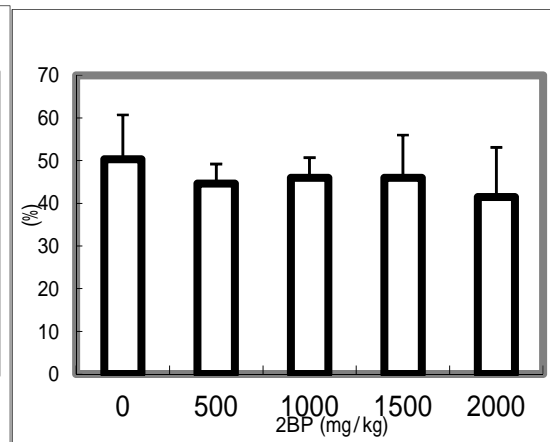


図 2 . 精子運動能

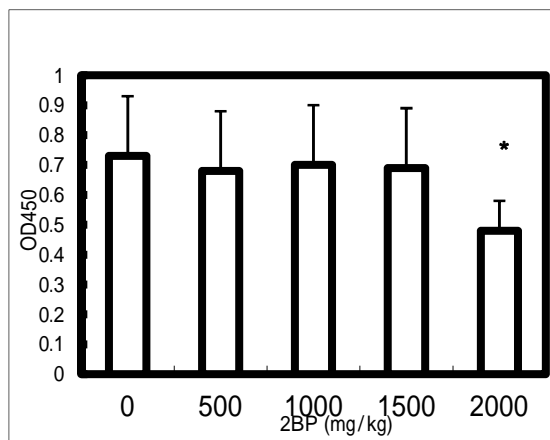


図 3 . 精子代謝能

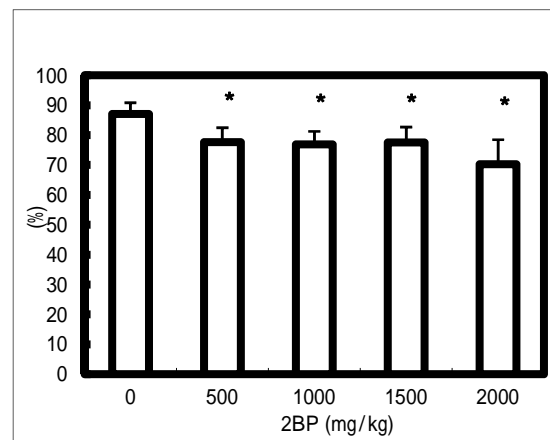


図 4 . 正常精子尾部形態

第 2 年度には、新たに入手した 30 種類以上のテトラゾリウム塩をラットおよびマウスの精子浮遊液を用いて一斉にスクリーニングし、WST-8 以外に WST-3, WST-5 等細胞毒性試験では用いられていないテトラゾリウムでも精子では感度よく応答することが示された。また、マウスに重金属や有機溶剤を投与して CASA(従来の精子解析法)の画像を大量に保存した。

第 3 年度は、マウス精子尾部の形態解析のための手法開発を試みた。その結果、CASA による暗視野画像で尾部形態の解析を試み、未成熟精子、短尾精子の検出に成功した。さらに、マウスの精子浮遊液の一部を固定し遠心後、MAS コート付きスライドガラスに塗抹し、ヘマトキシリン・エオシン染色することで、尾部形態だけでなく頭部形態の解析を可能とした。また、精巣毒性を計測する客観的指標として精巣中の精子頭数を CASA で測定することも可能とした。現在、ラットを用いた実験からマウスを用いた実験に移行しつつ、これらの手法を応用している。

第 4 年度は、マウスを用いた実験に移行し、通常明暗と変則的明暗条件により雄マウス飼育しただけ（化学物質は未投与）で、精子数及び精子形態に変化を生ずることを突き止めた。また、ラットでは 1,2-ジクロロプロパンを皮下投与した結果、精子数、精子運動能に変化が認められない投与条件（図 5、図 6）でも、精子代謝能の変化(図 7)や精子

尾部形態に異常が認められる(図 8)ことが示せ、本研究課題で提案している暗視野精子形態解析法の有用性が確認された

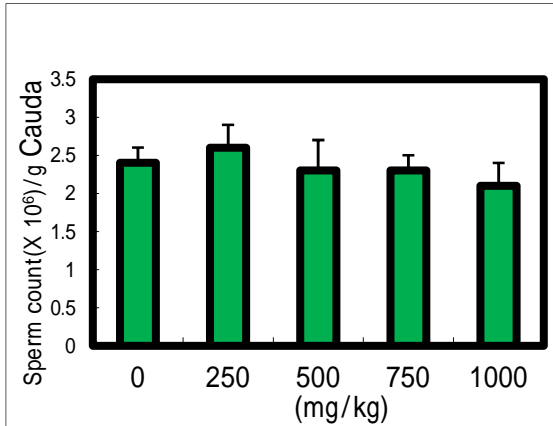


図 5 . 精子数

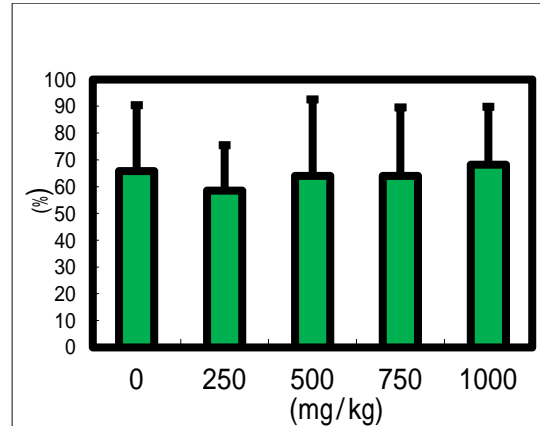


図 6 . 精子運動能

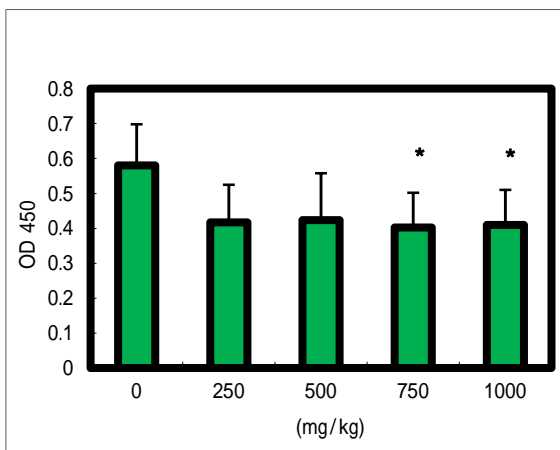


図 7 . 精子代謝能

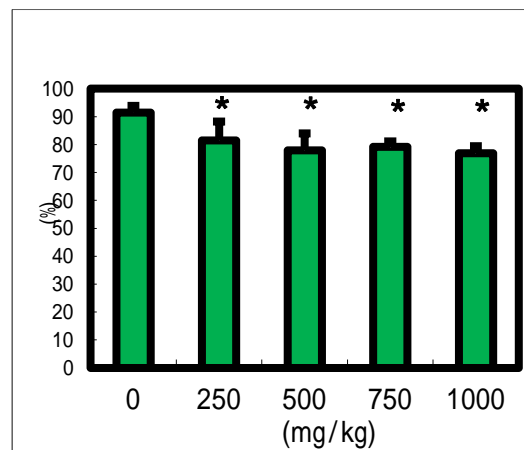


図 8 . 正常精子尾部形態

第 5 年度 (最終年度) は残予算を用いて、これまでの研究結果の未解明部分及び当初計画した研究のうちの実検未検討部分を中心に解析を行い、以下の成果を得た。

- (1) 1,2-ジクロロプロパンの作用点 (精巣か精巣上体か) を病理組織標本によって確認した。
- (2) 精巣毒性を客観的指標で評価できるようにするために、マウス精巣を均質化し分散後、CASA により精子頭の数測定できる系を確立した。
- (3) CASA による精子運動能解析法の欠点を補うために 通常の PC に微分干渉装置を装着して暗視野画像を作成し、計算盤上で精子浮遊液を動画撮影して保存し、その動画を CASA 上で出力して取り込ませ、運動性を測定することに成功した。また 通常の PC に粒子運動解析用ソフトウェアをインストールし、保存前の同上暗視野画像から直接運動性を測定することに成功した。これにより大型機器を運搬しなければならない欠点が
- (4) 精子運動持続性を検討するために同一サンプルを 37℃ で保温し 60 分後に再測定し有害物質により、どれくらい運動性が低下するか測定できる系を確立した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mio Miyake, Yuki Ito, Himiko Suzuki, Motohiro Tominaga, Hirotaka Sato, Ming Liu, Ai Okamura, Tamie Nakajima, Katsumi Ohtani, Hisashi Takino, Hiroshi Inagaki, Michihiro Kamijima	4. 巻 285
2. 論文標題 Epididymal phospholipidosis is a possible mechanism for spermatotoxicity induced by organophosphorus insecticide fenitrothion in rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxicol Lett	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大谷勝己, 三浦伸彦	4. 巻 9
2. 論文標題 労働安全衛生分野における精子分析法の活用	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 労働安全衛生研究	6. 最初と最後の頁 37-42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン, 小林健一
2. 発表標題 1,2-ジクロロプロパンによるラット精子の形態異常評価
3. 学会等名 第91回日本産業衛生学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン, 小林健一
2. 発表標題 ジプロモクロプロパン投与によるラット精子形態の変化
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一
2. 発表標題 1,2-ジクロロプロパン投与ラットにおける精子形態異常の検出
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一, ヴィージェ モーセン
2. 発表標題 コンピュータ精子画像解析法(CASA)における暗視野画像を利用した1-プロモプロパンのラット精子形態の影響解析
3. 学会等名 環境ホルモン学会第20回研究発表会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン
2. 発表標題 暗視野画像を利用した1 - プロモプロパンの精子形態異常解析
3. 学会等名 第86回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン
2. 発表標題 1, 2 - ジクロロプロパン投与によるラット精子形態の変化
3. 学会等名 第43回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Katsumi Ohtani, Mohsen Vigeh, Kenich Kobayashi
2. 発表標題 The evaluation of morphological effect on sperm in the 1-bromopropane-given rat by utilizing dark field image.
3. 学会等名 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン
2. 発表標題 1, 2 - ジクロロプロパン投与ラットにおける精子形態の変化
3. 学会等名 第75回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 大谷勝己, ヴィージェ・モーセン, 小林健一
2. 発表標題 暗視野画像を利用した1,2-ジクロロプロパンの精子形態異常解析
3. 学会等名 第87回日本衛生学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一, 柳場由絵
2. 発表標題 機器分析を利用した精子分析方法の過去・現在・未来
3. 学会等名 第29回Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷勝己
2. 発表標題 精巢毒性と精子毒性
3. 学会等名 第29回Testis Workshop 精子形成・精巢毒性研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一
2. 発表標題 コンピュータ精子解析画面による1-プロモプロパン投与ラットの精子形態異常評価
3. 学会等名 第92回日本産業衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一
2. 発表標題 コンピュータ画像解析法による1-プロモプロパン投与ラットにおける精子運動能、精子数、精子尾部形態の変化
3. 学会等名 日本アンドロロジー学会第38回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷勝己
2. 発表標題 雄性生殖毒性を示す化学物質の多様性
3. 学会等名 第38回生体と金属・化学物質に関する研究会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 大谷勝己, 小林健一, Vige Mohsen
2. 発表標題 胆管がん誘発物質として知られる1,2-ジクロロプロバンのラット精子形態に及ぼす影響
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦伸彦, 吉岡弘毅, 大谷勝己
2. 発表標題 概日リズム攪乱は精巣機能障害を誘発する
3. 学会等名 フォーラム2019: 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦伸彦, 大谷勝己
2. 発表標題 概日リズム攪乱と精巣機能障害
3. 学会等名 第50回精子研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>労働安全衛生総合研究所ホームページ「精子分析法の進歩と新しい取り組み」大谷勝己  <a href="https://www.jniosh.johas.go.jp/publication/mail_mag/2015/84-column-2.html">https://www.jniosh.johas.go.jp/publication/mail_mag/2015/84-column-2.html</a></p>
---

## 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小林 健一  (Kobayashi Kenichi)  (00332396)	独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・ 化学物質情報管理研究センター・有害性評価研究部・上席研 究員    (82629)	