

Fig.1 ライディッヒ細胞におけるテストステロン合成

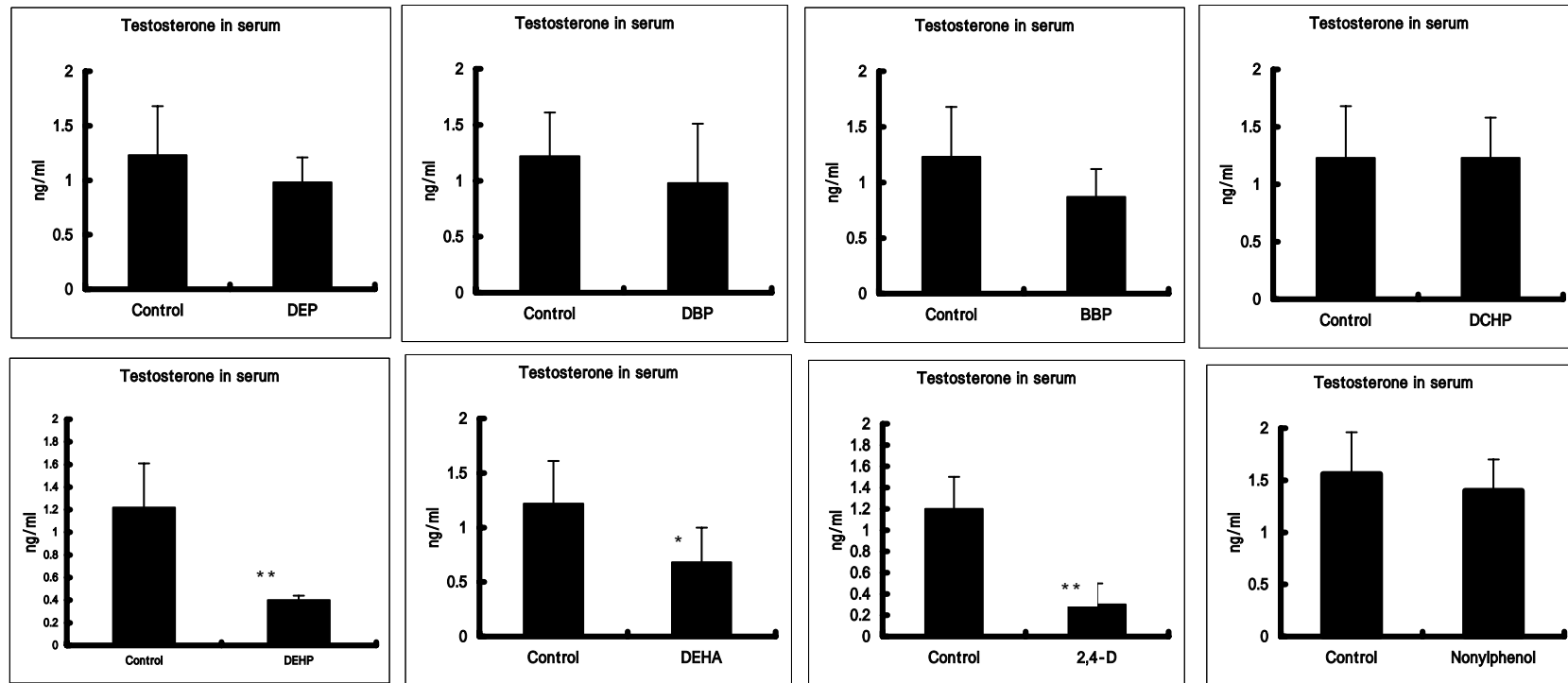


Fig.2 種々の化学物質の血清テストステロンへの影響

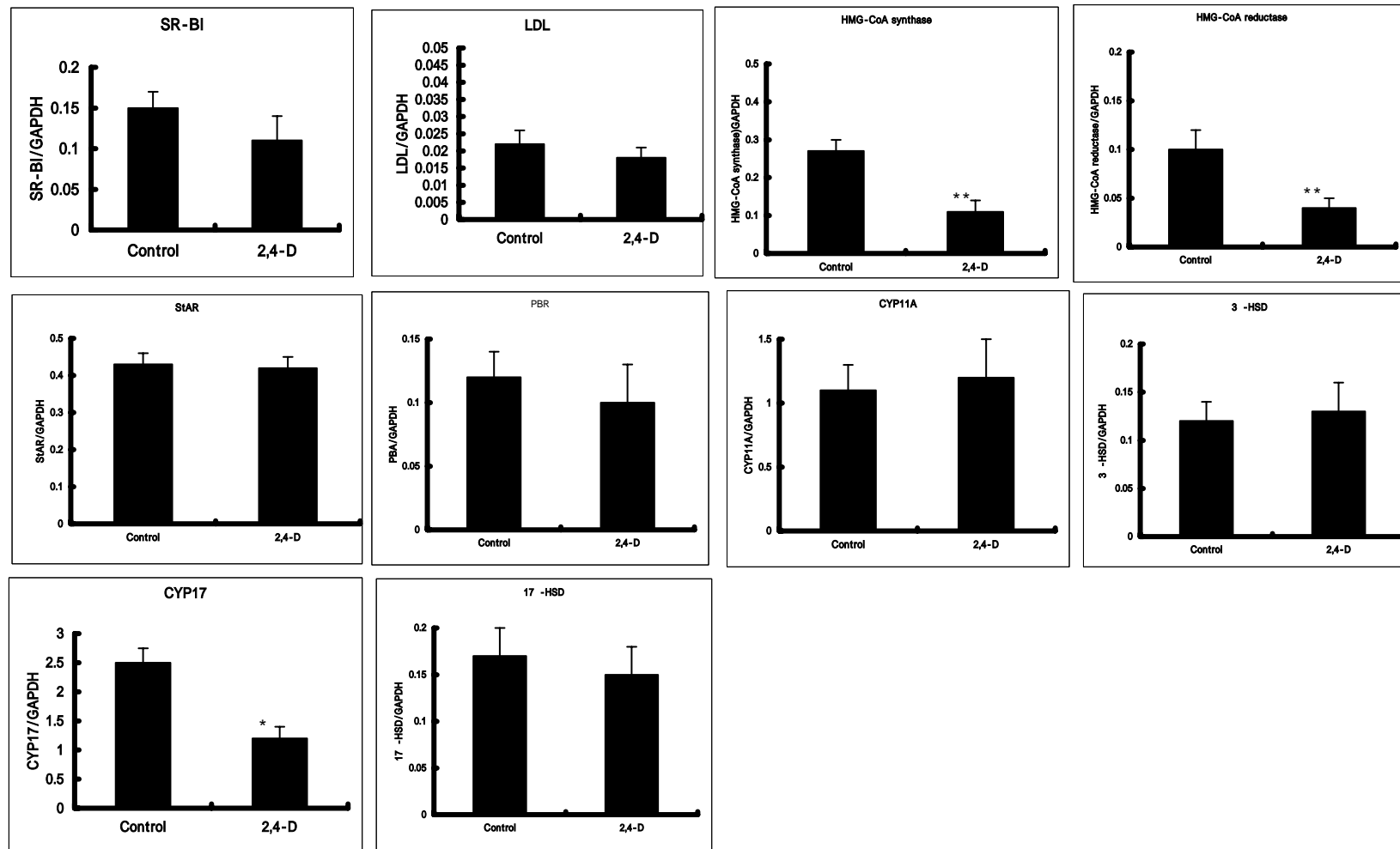


Fig.3 2,4-Dのコレステロール・テストステロン合成系への影響

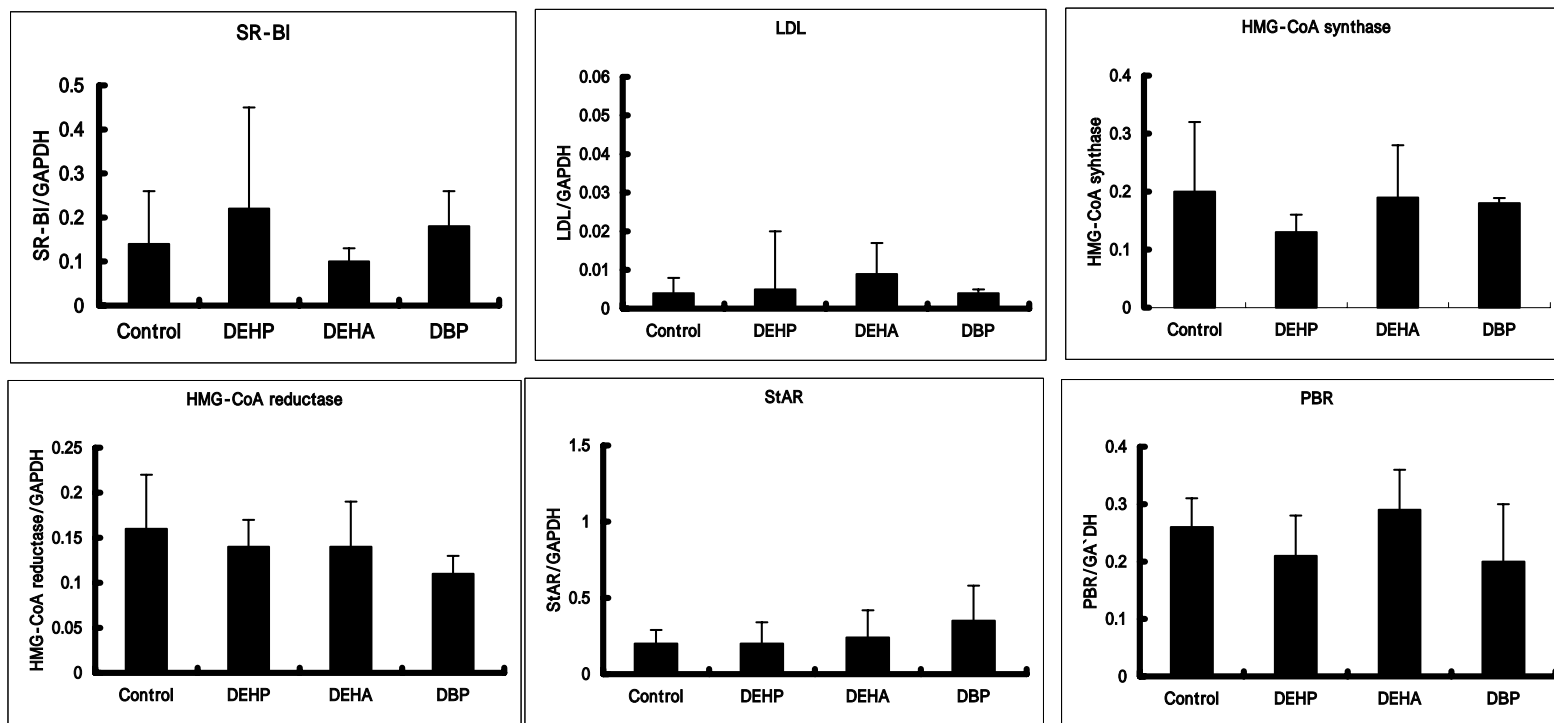


Fig.4 プラスチック可塑剤のコレステロール・テストステロン合成系への影響

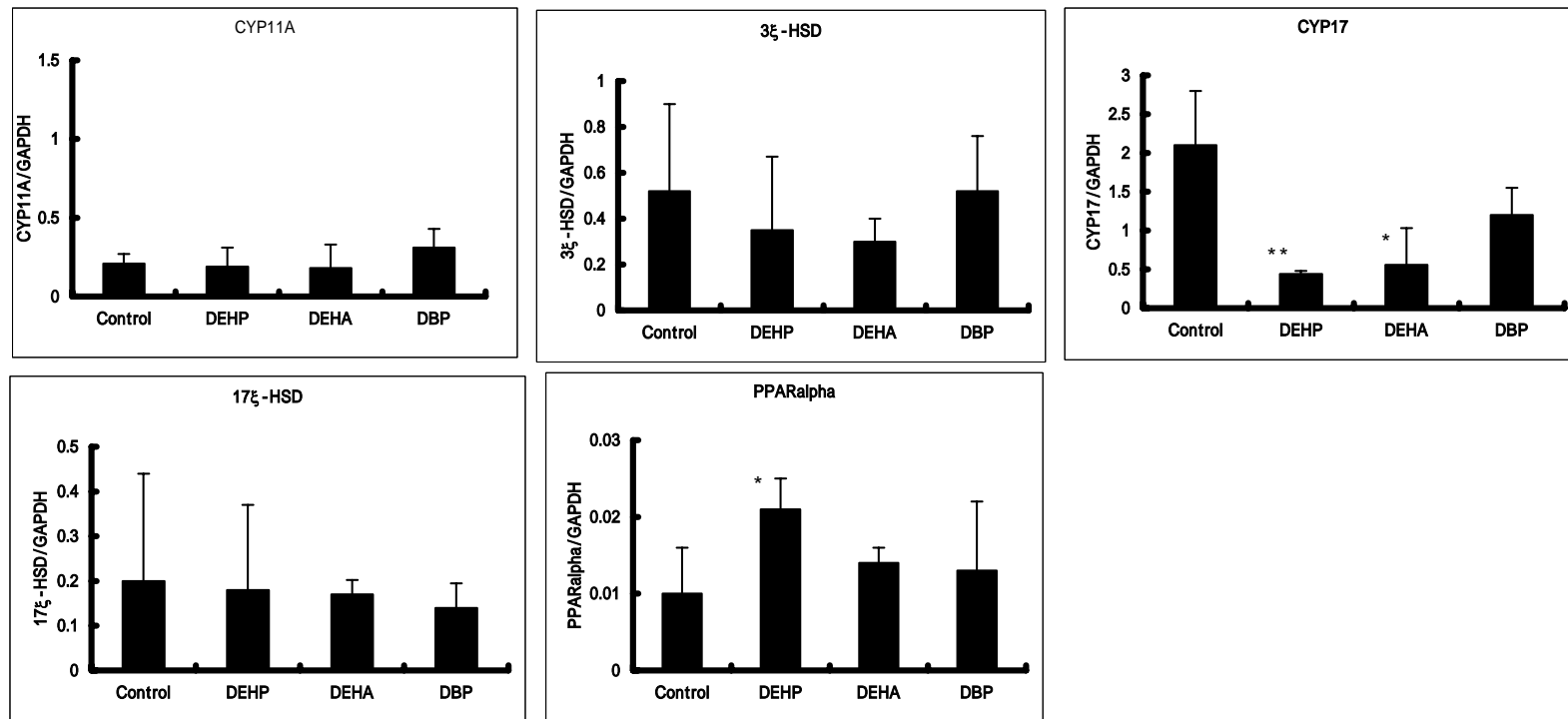


Fig.5 プラスチック可塑剤のコレステロール・テストステロン合成系への影響

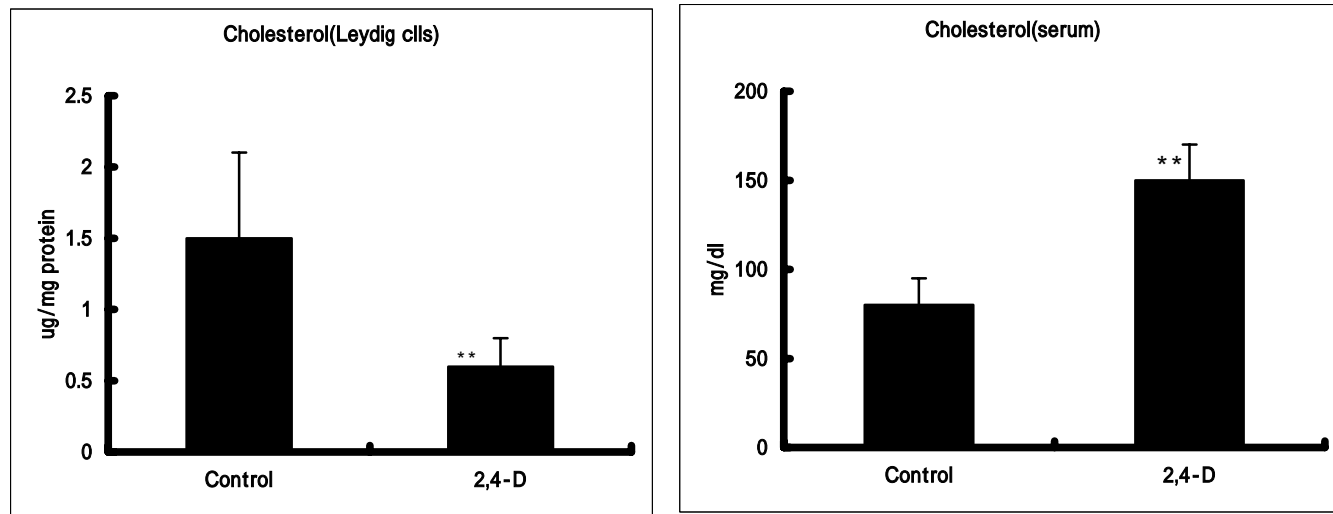


Fig.6 2,4-D の血清、ライディッヒ細胞のコレステロールへの影響

Effects of probable endocrine disruptors on cholesterol and/or testosterone synthesis in Leydig cells

Nakajima T, Ichihara G, Kamijima M, Yamada T, Itohara S, Furuhashi K and Yamanoshita O.

Department of Occupational and Environmental Health,
Nagoya University Graduate School of Medicine,

Abstract

We investigated the effects of diethylphthalate, dibutylphthalate, butylbenzylphthalate, dicyclohexylphthalate, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), and nonylphenol on serum testosterone levels and also on cholesterol and/or testosterone synthesis in Leydig cells. Of these disruptors, DEHP, DEHA and 2,4-D decreased the levels of serum testosterone. However, there were differences in the mechanism for influencing among them: 2,4-D decreased mRNA levels of HGM-CoA synthase, HGM-CoA reductase and cytochrome P450_{17 α} ·17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase (CYP17) in Leydig cells, whereas DEHP and DEHA decreased only the level of CYP17-mRNA. These results suggest that the former may decrease serum testosterone level by affecting both cholesterol *de novo* synthesis and testosterone synthesis in Leydig cells, but the latter may decrease the level only by affecting testosterone synthesis. Although these three chemicals are grouped in ligands of peroxisome proliferators-activated receptor alpha, the mechanism of decreasing serum testosterone levels may be different from each other.

(5) フタル酸エステル吸入曝露による生体影響の解明とリスク評価

研究者 岸 玲子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野教授)

研究要旨

フタル酸エステル類は動物実験で、内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。大気、水、土壌など様々な環境中から検出されることから、人への影響が懸念される。しかし、多くの研究報告には、経口摂取による生体影響であり、人におけるより自然な摂取経路である吸入曝露による影響についての報告は殆どないことから、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。そこで、本研究ではフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP) 吸入曝露を行い、(1)体内動態、(2)生殖毒性、(3)次世代影響の検討を行った。

(1) DEHP25 mg/m³ 吸入曝露により、血清からは DEHP とその代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP)は検出されなかった。DEHP が検出されたのは肺のみであった。その他の臓器では DEHP の代謝物である MEHP が検出された。特に DEHP の代謝器官とされる小腸、肝臓で検出されたが、同時に精巣でも検出された。また、対照群でも、肺、腎臓、小腸、脳でも検出された。MEHP の群間での差が認められたのは小腸、肝臓、精巣であった。

(2) DEHP 吸入曝露により、精巣重量 / 体重の増加、成熟した精巣組織像が見られた。また、血漿テストステロン濃度も有意に高かったが、精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に差は見られなかった。幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、精巣へ影響を与えることが示唆された。

(3) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、胎児の体重の有意な増加が認められた。また、メス胎児での胎盤重量、AGD / 体重の値の減少が見られた。その他の影響は母、胎児共に認められなかった。

今後、幼若ラットから精巣の形成が完成する時期まで吸入曝露期間を延長し、精巣成熟に与える影響を明らかにする。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系 (成長ホルモン、テストステロン、エストロゲン分泌) への影響を検討する。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、胎児の精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

研究協力者

佐田 文宏 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師)

玉置 淳子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助手)

近藤 朋子 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野研究員)

梅村 朋宏 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

倉橋 典絵 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

馬 明月 (北海道大学大学院医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生)

大村 実 (九州大学大学院医学研究院衛生学教室助手)

A．研究目的

フタル酸エステル類の用途は広範囲で、ポリ塩化ビニル、人工皮、ホース、機械器具部品、日用雑貨のほか、ラップやカップ麺などの食品包装材、医療器具などのプラスチック製品に添加される可塑剤として使用されている。また、農薬、化粧品、染料、印刷インキの溶媒や保留剤としても使用されている。

フタル酸エステル類は親油性があるので、油分を多く含む食品の梱包により、成分が溶出し食品中に移行し、経口的に摂取する可能性、輸液パックなどの医療器具を介して血液中に移行する可能性、プラスチック製品の低温焼却野、製品製造過程において、大気中へ放出され、呼吸器を介して体内に移行する可能性等が考えられる。

大気中にも、フタル酸ジエチルヘキシル DEHP で $0.038\sim 0.79 \mu\text{m}^3$ 、フタル酸ジブチル DBP で $0.017\sim 0.37 \mu\text{m}^3$ (環境庁 1997) 存在し、DEHP に関して、一般人口でも、1日の最大曝露量は $2 \text{mg} / \text{m}^3$ であるという報告 (ATSDR 1993) もある。現在の産業現場における基準は、許容濃度が $5 \text{mg} / \text{m}^3$ (日本産業衛生学会、ACGIH TLV) である。しかし、プラスチック工場周辺に住む妊娠した女性の血液中のフタル酸濃度を計測したところ、高濃度の女性に妊娠合併症が多く見られたと 1999 年の報告もあり、生体への悪影響が疑われる。

フタル酸エステル類の内分泌攪乱作用としては、*in vivo* において、弱いエストロゲン作用があることが報告されている。生体への影響としては、生殖毒性として、妊娠ラットへの曝露実験において、胎児の体重減少、胎児奇形、雄ラットへの曝露実験による精子濃度減少、精細管萎縮、前立腺重量減少をおこすといった報告がある。発達毒性としては、生育遅延が報告されている。また、その親油性から、神経障害も指摘している報告もある。しかし、フタル酸エステル類を扱う工場労働者の健康調査によると、多発性神経炎、知覚鈍麻、前庭機能の低下、嗅覚低下が認められている。臓器障害としては、肝重量増加、中葉壊死・炎症反応といった組織学的変化、肝酵素の低下が報告されている。

しかし、これらの報告は、フタル酸エステル類の経口摂取による影響であり、吸入曝露による報告はほとんどない。代謝経路は、肺または消化管から速やかに吸収され血液により広く生体内に分布し、主として腎臓から尿中へ排泄されるようであるが、フタル酸エステル類の体内蓄積の報告によると、吸入曝露において脳における蓄積がほかの臓器に比べて比較的高いことが指摘されている。また、経口投与により肝への障害が多く報告されているが、吸入曝露における肺と肝の cytochrome P450 への影響を検討すると、吸入曝露による主要標的臓器は肺である、という報告もある。このように、経口摂取と吸入曝露による差があるようであるが、詳しくわかっていないのが現状である。

本研究における目的は、今まで、ほとんど行われていないフタル酸エステル類の吸入曝露における生体への影響を検討することである。平成 13 年度は吸入曝露を行うための曝露装置を作成した。今年度は、DEHP の吸入曝露による DEHP とその代謝物の体内動態、経口投与で報告されている生殖毒性、さらに次世代影響についても検討する。

B．研究方法

1．実験動物

実験動物は Wistar Rat を用いた。オスラットは北海道大学大学院医学研究科附属動物

実験施設より、妊娠ラットは三協ラボサービス(日本エスエルシー株式会社)より購入した。

2．空气中的 DEHP の測定

曝露チャンバー設置室内、ラットを曝露時間以外に飼育する部屋の大気中 DEHP 測定を行った。測定分析方法は、吸引ポンプ(ジーエルサイエンス KK SP208 1000Dual)に固相捕集管(SUPELCO、ORBO - 5020Tenax TA35/60 OVS Tubes)を床面より 1.5m になるように設置し、吸引流量 1 l/min で曝露装置稼働中の 3 時間、空気の吸引を行った。捕集管内のガラス繊維フィルターに 140 mg Tenax TA 4ml バイアル瓶に入れ、4 ml トルエン、4 µg サロゲートを加えて 30 分放置し、上澄みを 2ml 採取し、GC-MS 測定試料として測定し、内標準法により定量を行った。

3．DEHP 吸入曝露実験

(1) 吸入曝露による DEHP、MEHP の体内動態の検討

吸入曝露：曝露濃度は 25 mg/m³ に設定したが実測値は 20.1 ± 3.9 mg/m³ であった。8 週齢 Wistar rat オス 16 匹をコントロール、25 mg/m³ 吸入曝露群の 2 群に分け曝露を 1 日 6 時間、2 週間(5 日連続曝露後 2 日休みを 2 週間)行った。曝露中水は自由摂取できるようにしたが、餌への DEHP 吸着を避けるため餌は与えなかった。また、コントロール群は、曝露時間内は曝露群と同じステンレス製ケージに入れ、別室で飼育した。曝露最終日、曝露終了直後に解剖を行い血清、脳、肺、肝臓、腎臓、小腸、精巣の摘出を行いアセトンで洗浄、乾熱滅菌を行ったガラス瓶に入れ DEHP、MEHP 測定まで - 80 で保存した。

DEHP、MEHP 抽出：DEHP、MEHP 抽出はガラス製試験管を用いて行った。これらの器具は使用前にすべてアセトニトリルで洗浄後使用した。

血液からの抽出：- 80 で保存した血清を 50 µl に 1 M NaOH 200 µl を混和し、アセトニトリル 850 µl を加え、冷却しながら 5 分間超音波によりホモジナイズし、リン酸 10 µl を加え、1,500 rpm、4 、10 分間遠心分離後、上清を HPLC サンプルとし、ガラス瓶に入れ、測定まで - 20 で保存した。

臓器からの抽出：- 80 で保存した臓器は 150mg 秤量し、はさみで細分化してガラス管に移した。細分化した臓器に 1M NaOH 600 µl 加え冷却しながら組織が 5 分間超音波によるホモジナイズ後、アセトニトリル 2550 µl 加え更に 5 分間超音波でホモジナイズした。リン酸 30 µl を加え、1500 rpm、4 、10 分間遠心分離後、上清を HPLC サンプルとし、ガラス瓶に入れ、測定まで - 20 で保存した。

HPLC 分析条件は、カラム：SC-50DS(3.0mmID × 150mm, EICOMPAK)を用い、UV：230nm、Absorbance：0.1、流速：0.5ml/min で行った。

MEHP 検出：MEHP 検出はステップグラディエント法を用いた。移動相は、A 液：1 % リン酸 / 水 40%、アセトニトリル 60%、B 液：1 % リン酸 / 水 10%、アセトニトリル 90%で、A 液 10 分 B 液 20 分のグラディエントにより検出した。

DEHP 検出：DEHP 検出は B 液を移動相とした。

(2) 生殖に及ぼす影響に関する検討

4 週齢のオス Wistar rat に、特殊吸入曝露装置を用いて、曝露濃度を 0mg / m³ (コン

トロール)、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $25\text{mg}/\text{m}^3$ の3点・各8匹ずつに、6時間/日(週5日)4週間曝露を行った。曝露終了後、エーテル麻酔を行い、心採血し、精巢摘出を行った。血液は、血漿分離され、EIAによるLH濃度測定まで、 -80°C で凍結保存した。また、左側精巢は、重量計測後、ブアン固定し、組織標本を作製した。右側精巢は、液体窒素により凍結し、RNA抽出まで -80°C で保存した。

結果は、一元配置分散分析(ANOVA)で検定し、有意差が見られたものには、Scheffeの多重比較を行った。

(3) 次世代影響の検討

吸入曝露：曝露濃度は $25\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ に設定したが実測値は $19.7 \pm 3.2\text{mg}/\text{m}^3$ 、 $2.9 \pm 0.9\text{mg}/\text{m}^3$ であった。妊娠Wistar ratはプラグ確認日を0日として、妊娠1日目に購入した。30匹をコントロール、 $25\text{mg}/\text{m}^3$ (高濃度)、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ (低濃度) DEHP吸入曝露群の3群に分け、DEHP曝露を妊娠2日目から妊娠19日目まで1日6時間連続して吸入曝露を行った。曝露最終日、曝露終了後、帝王切開を行い、母、胎児それぞれ以下の項目の検討を行った。

母：体重、妊娠黄体数、着床数、胚の生死、臓器の重量測定(卵巣、子宮、肝臓)

胎児：体重、外形観察(形状、大きさ、位置、数、色調)、雌雄確認、体長、尾長、AGD測定、DEHPの移行の検討(胎盤、肝臓)

結果は、一元配置分散分析(ANOVA)で検定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設の動物実験に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

1. 空気中のDEHPの測定

空気中のDEHPの測定結果、曝露装置稼動中の実験室内のDEHP濃度は $0.18\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。一方、コントロールラットを飼育する動物実験施設内のDEHP濃度は検出下限以下であった。(検出下限は $0.04\ \mu\text{g}/\text{m}^3$)

2. DEHP吸入曝露実験

(1) 体内動態の検討

DEHP吸入曝露による体内へのDEHP、MEHPの蓄積を、血清、精巢、肝臓、肺、腎臓、脳(大脳)、小腸で検討した。吸入曝露によるラットの体重増加率は、曝露群とコントロールで差は見られなかった。DEHP、MEHPは、血清中からは、DEHP、MEHP共に検出限界以下であった。DEHPが検出された臓器は肺のみで、曝露群が $18.8 \pm 2.6\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールは検出限界以下であった。MEHPに関しては、肺では $3.3 \pm 2.8\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $2.75 \pm 0.8\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、大脳では、曝露群が $1.4 \pm 1.6\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $1.6 \pm 0.8\ \mu\text{g}/\text{g}$ と有意な差は見られなかった。一方、精巢では、曝露群が $4.5 \pm 1.4\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールが $2.7 \pm 1.8\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、肝臓は曝露群が $2.4 \pm 0.5\ \mu\text{g}/\text{g}$ に対し、コントロールは検出限界以下、小腸も曝露群は $4.1 \pm 3.5\ \mu\text{g}/\text{g}$ 、コントロールは検出限界以下で有意な差があっ

た。(p<0.01、図1)

(2) 生殖に及ぼす影響に関する検討

曝露濃度の実測値は、5mg/m³群で8.7±2.2mg/m³、25mg/m³群で21.2±2.9 mg/m³であった。曝露終了後の体重は、コントロール群と比較して、5mg/m³群、25mg/m³群で重い傾向が見られたが、有意ではなかった。(表1)。精巣重量と精巣重量/体重は、コントロールに比べて、5mg/m³・25mg/m³曝露群で有意に重かった(図2、図3)。血漿テストステロン濃度は、コントロールに比べて、5mg/m³・25mg/m³曝露群で、有意に高かった(図4)。精巣におけるテストステロン合成酵素である、P450scc、3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3HSD)、CYP17、及び、テストステロンからエストロゲンへの変換酵素であるCYP19のmRNA発現量に差はなかった(図5)。精巣組織においては、コントロール群に比べて、曝露群で成熟した精巣が見られた。血漿LH濃度に差は見られなかった(図6)。精巣重量/体重とテストステロン濃度に、有意な相関(R²=0.42 P>0.01)が見られた(図7)。

(3) 次世代影響の検討

曝露濃度は25 mg/m³、5 mg/m³に設定をしていたが、曝露期間中のチャンバー内濃度は、平均19.8 mg/m³、2.9 mg/m³であった。

母ラットへの影響：妊娠ラットは、各群10匹ずつ曝露を行ったが、妊娠19日目解剖時に妊娠が確認されたラットは、コントロール群7匹、5 mg/m³群7匹、25 mg/m³群8匹であった。曝露中の母ラットの体重増加率は、曝露群とコントロールで差は見られなかった(図8)。また、その他の項目、肝臓重量、卵巣重量、子宮重量、黄体数、着床数、生児数についても影響は認められなかった(表2)。

胎児への影響：全胎児を比較すると、体重の増加(対照群2.25±0.17 g、5 mg/m³曝露群2.33±0.18 g、25 mg/m³曝露群2.44±0.16 g、p<0.01)と胎盤重量の減少(対照群0.56±0.08 g、5 mg/m³曝露群0.57±0.1 g、25 mg/m³曝露群0.53±0.09 g、p=0.02)が認められたが、その他の項目(体長、尾長)に関しては有意差はなかった。

また、胎児を雌雄に分けて分析をした場合、オス胎児では曝露群で有意な体重増加(対照群2.34±0.16 g、5 mg/m³曝露群2.37±0.16 g、25 mg/m³曝露群2.47±0.16 g、p<0.01)が認められたが、胎盤重量、体長、尾長、AGD、AGD/体重の各項目では有意な差は見られなかった。

メス胎児においても曝露群で体重の増加(対照群2.18±0.15 g、5 mg/m³曝露群2.27±0.2 g、25 mg/m³曝露群2.4±0.16 g、p<0.01)が認められたが、それに加え、胎盤重量(対照群0.56±0.08 g、5 mg/m³曝露群0.6±0.12 g、25 mg/m³曝露群0.54±0.07 g、p=0.02)とAGD/体重(対照群0.80±0.2 g、5 mg/m³曝露群0.73±0.19 g、25 mg/m³曝露群0.69±0.14 g、p=0.04)が減少していた。体長、尾長、AGDの各項目については有意差がなかった。

DEHP、MEHPの胎児への移行について胎盤、肝臓で調べた。その結果、胎盤でのDEHP、MEHPは共に検出限界以下であった。肝臓に関しては、現在測定中である。

D. 考察

1. DEHP 吸入曝露による DEHP、MEHP の体内動態

経口投与の場合、DEHP は消化管においてすい臓リパーゼにより加水分解され、MEHP および 2 - エチルヘキサノールに代謝、吸収され、尿中、糞中で排泄される。体内に取り込まれてから排出されるまでの時間は非常に短く、ラットの場合ほぼ 1 週間であると言われている。これまでの DEHP の体内動態の報告としては、放射線ラベル DEHP で分布を見ると言うものが多く、各臓器の代謝物まで見ていると言う報告は少ない。放射線ラベルした DEHP をラットに経口投与することにより(1000 ppm) 肝臓、腎臓、肺、精巣、心臓、脂肪組織などから検出されるが、直ぐに活性は検出できなくなることから体内での蓄積はないといわれている。(D.T. Williams, 1974) 経口投与による DEHP と MEHP の蓄積は、血液、肝臓、精巣、心臓での MEHP の生物学的半減期は DEHP よりも長いことから、MEHP は DEHP よりも多く検出される(S.Onishi, 1982) などと報告されているが、全ての臓器中の代謝物までの検出は行われていない。

今回の結果では、血清中からは DEHP、MEHP が検出されなかった。過去に血清中の DEHP、MEHP を経口投与(2.8 g/kg)で調べた結果、DEHP:8.8 μ g/ml、MEHP:63.2 μ g/ml 検出されるという報告がある。(O.A. Teirlynck, 1999) この報告での投与量は、今回の吸入実験に比べて非常に高く、吸入実験の場合の 25 mg/m³では、1 日当たりの曝露量は約 50 mg/kg とであるため検出限界以下となったと考えられる。

また、MEHP に関して精巣、肺、腎臓、脳においてはコントロールでも検出され、肝臓、小腸においては殆ど検出されなかった。代謝された MEHP はグルクロン酸転移酵素によりグルクロン酸化 MEHP に代謝、または p450 により水酸化 MEHP に代謝される。これらの代謝酵素は肝臓、小腸で分泌されるということから、コントロールの臓器中での検出が他の臓器と比べて低かったと考えられる。

曝露群の MEHP の蓄積が有意に高かった器官は、精巣、肝臓、小腸であった。経口投与による MEHP の蓄積に関して小腸、肝臓で主に代謝されるということや、精巣での蓄積が報告されていることから、今回の結果から、摂取経路が異なるたことで、DEHP に関しては異なっていたが、MEHP に関しては今まで報告されていた経口投与と同様であるということが示唆された。

2. DEHP 吸入曝露による生殖に及ぼす影響に関する検討

DEHP は、in vitro でエストロゲン活性を持たず(CA.Harris 1997)、アンドロゲンレセプターとも結合しないが(Malgaard 2001)、in vivo で、発達期のアンドロゲン依存性の男性生殖器に影響を与える(LG.Parks 2000, LE.Gray 2000)ことから、抗アンドロゲン作用と考えられている。

DEHP 経口投与により、テストステロンレベルや酵素活性の低下(BT.Akingberr 2001)、精巣組織のアポトーシスの増加による精巣萎縮(JD.Park 2002, Malgaard 2001)、精巣重量の減少(E.Kasahara 2002)といった精巣毒性が報告されている。しかし、この報告のほとんどが、経口投与による実験であり、吸入曝露による影響は調べられていない。

今回の実験結果は、過去の DEHP 経口投与の報告に見られる、抗アンドロゲン作用とは異なる結果が得られた。DEHP 吸入曝露により、曝露開始前、終了後の体重に、コントロ

ールと曝露群の有意な差は見られなかったが、精巣重量 / 体重が曝露群で大きかったこと、組織像において、コントロール群と比較して、曝露群で成熟した精巣が見られたことから、幼若ラットへの DEHP 吸入曝露は、精巣の成熟を促すことが示唆された。

また、血漿テストステロン濃度は、コントロール群と比較して、曝露群で高かったが、血漿 LH の濃度に差が見られなかったこと、精巣重量 / 体重に有意な相関が見られることから、精巣重量の増加に伴う結果と考えられる。

今回の結果から、DEHP 吸入曝露は、幼若ラットの精巣へ影響を及ぼすことが示唆されたが、今回は、曝露後すぐに精巣を摘出したため、ラットの精巣が発達の途中段階である可能性もあり、この結果が、精巣の成熟に特異的に及ぼす影響なのか、身体の成長に伴う精巣の成熟であるのか、明らかではない。性成熟(第2次性徴)には、脂肪細胞中の leptin の影響があることが報告されている(CS.Mantzoros 1997)ので、精巣重量と身体の発達とは、密接な関連がある。

DEHP 吸入曝露が、精巣の成熟を促進するか否かは、幼若時に DEHP 吸入曝露を受けたラットが、完全に成長した時の生殖に与える影響に関して検討する必要がある。

3 . DEHP 吸入曝露による次世代影響

DEHP 曝露により胎児の体重が減少するという報告(Hellwig J, 2000)はいくつかみられるが、今回の我々の研究では過去の報告とは異なり、胎児の体重が雌雄ともに増加した。過去の報告では、経口投与による曝露が主であり本研究のように吸入曝露ではないために、母ラットにおける DEHP の体内動態が異なる事もその一因として考えられる。フタル酸を経口で曝露した場合は、主に小腸などの器官で代謝される。しかし、吸入曝露をした場合、まず肺に取り込まれそこから血中に DEHP が入り込み、そのまま DEHP が胎盤を通過してしまう。それゆえ、経口曝露と吸入曝露では胎盤を通過する DEHP の量が異なることが十分に考えられるので、胎児への影響も異なると考えられる。

また、本研究において、胎盤重量は減少した。一般的に、妊娠中毒症などで胎盤重量が減少するとそれに伴って胎児の体重も減少するように、胎盤重量と胎児体重は比例関係にある。しかし、今回の結果は胎児の体重は増加し、胎盤重量は減少した。この結果から胎盤重量の減少は DEHP 曝露による母体への影響によるものであり、胎児体重の増加は胎盤を通過した DEHP によるもので、それぞれ独立したメカニズムによって引き起こされると推察される。DEHP は脂溶性であるために、脳の神経内分泌器官に影響を与え、その結果として成長ホルモンなどの分泌に影響が生じた可能性もある。また、DEHP は胎盤を通過する際、胎盤増殖に関わるオートクリン、パラクリン因子の分泌を阻害することで胎盤の成長を妨げる可能性などが考えられるが、こういった DEHP の生殖毒性、特に、胎児や胎盤形成への影響は不明な点が多いために、今後さらなる研究が必要と考えられる。

曝露群のメス胎児において、AGD/胎児体重の値が小さくなった事は、胎盤を通過した DEHP による抗アンドロゲン作用によると考えられるが、オス胎児ではその影響はみられなかった。この事から、メス胎児の方が DEHP 曝露に鋭敏に反応すると考えられるが、このメカニズムに関しては、今後検討が必要である。

そのためには、成長や生殖系に関わる内分泌系(成長ホルモン、テストステロン、エストロゲンなど)について経時的に検討することが重要であると思われる。さらに、メス胎

児には AGD/体重に影響がみられたが、そのまま成長を続けた場合のメス胎児の生殖能や、見かけ上は AGD/体重には影響はなかったオス曝露群の胎児についても、その後成熟した時の生殖能も検討すべきであると思われる。

今後、幼若ラットから精巣の形成が完成する時期まで吸入曝露期間を延長し、精巣成熟に与える影響を明らかにする。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系(成長ホルモンなど)への影響を検討する。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

E. 結論

今まで殆ど行われていないフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の吸入曝露による生体への影響の検討を行った。

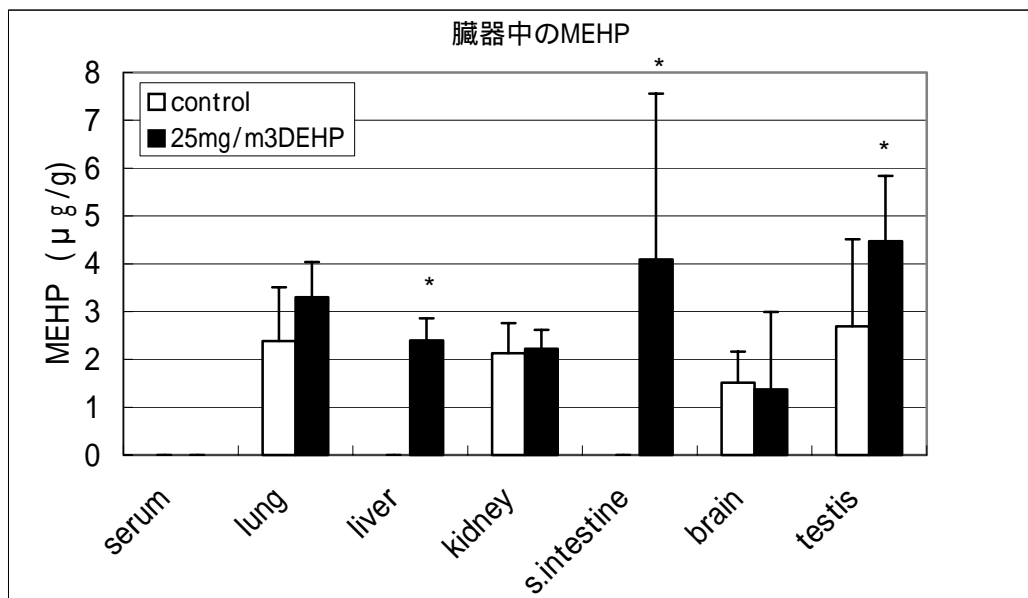
DEHP を 8 週令オスラットに 25 mg/m³ 吸入曝露することにより、血清中の DEHP、MEHP に関しては検出限界以下であった。DEHP が検出されたのは肺のみであった。また、その代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) は、肝臓、小腸、精巣に認められた。DEHP に関しては摂取経路の違いにより検出される器官が異なるが、MEHP に関しては経口摂取によるものと同様であるということが示唆された。

DEHP 吸入曝露により、精巣重量 / 体重の増加、成熟した精巣組織像が見られた。また、血漿テストステロン濃度も有意に高かったが、精巣におけるテストステロン合成酵素 mRNA の発現量や、血漿 LH に有意な差は見られなかった。幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、精巣の成熟を促進する可能性が示唆された。

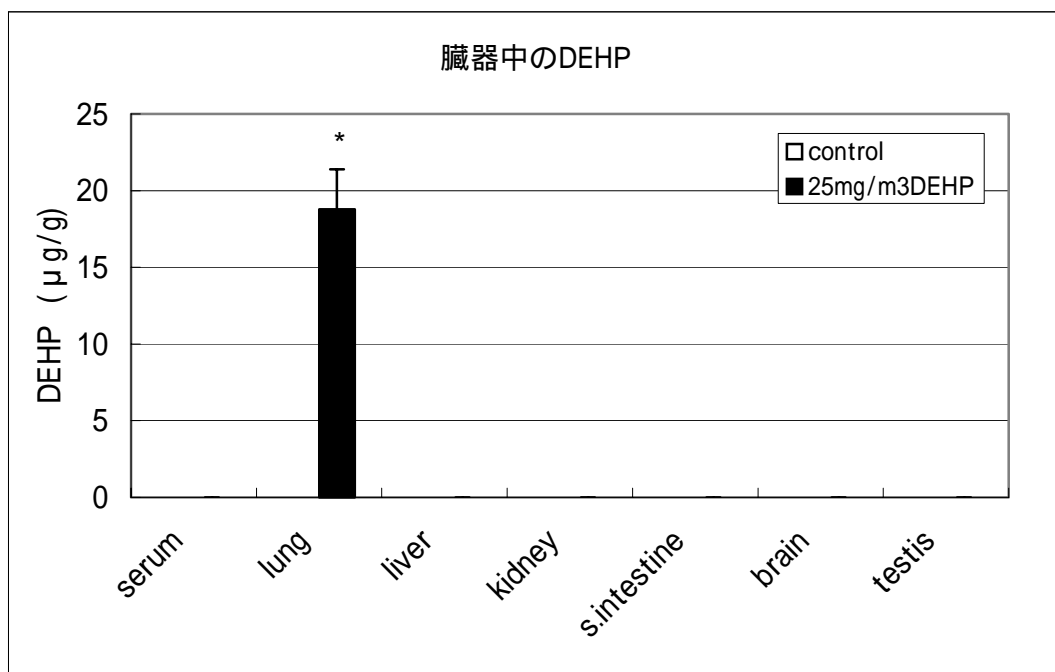
次世代影響の検討の結果、妊娠初期から後期にかけて 20 mg/m³、3 mg/m³ 吸入曝露した際の胎児への影響は、高濃度群での体重増加のみであった。母の体重増加率に影響は見られなかった。また、胎盤での DEHP、MEHP の移行は見られなかった。

今後、精巣の成熟を促進するか否かは、幼若時に DEHP 吸入曝露をうけたラットが、完全に成長した時の生殖に与える影響に関して検討する必要がある。次世代影響に関しては、体重増加への影響、その影響の性差に繋がるメカニズムを明らかにするために、出生後の仔の内分泌系(成長ホルモンなど)への影響を検討する必要がある。また、現在、胎児期 DEHP 曝露による精巣形成への影響として、精巣内テストステロン濃度とテストステロン合成酵素 mRNA 発現量の検討を開始している。

図 1



* : p < 0.01



* : p < 0.01

表1

	control	5mg/m ³	25mg/m ³
曝露開始時体重(g)	65 ± 8	66 ± 5	69 ± 8
曝露終了後体重(g)	187 ± 17	205 ± 10	193 ± 13

図2

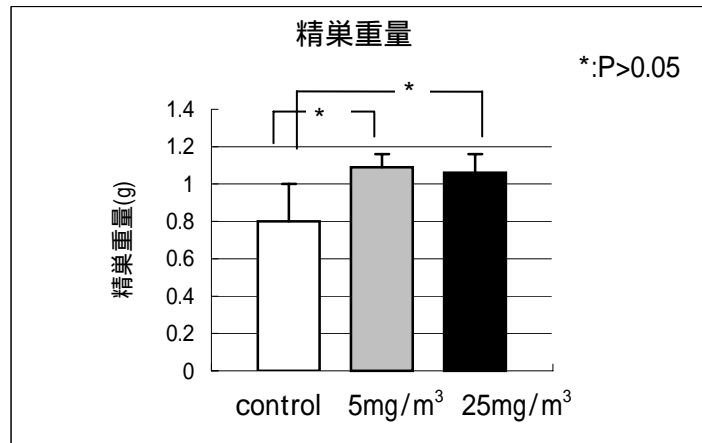


図3

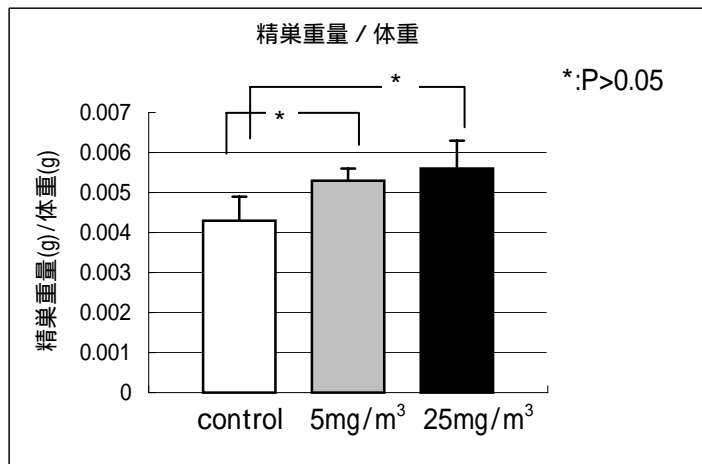


図4

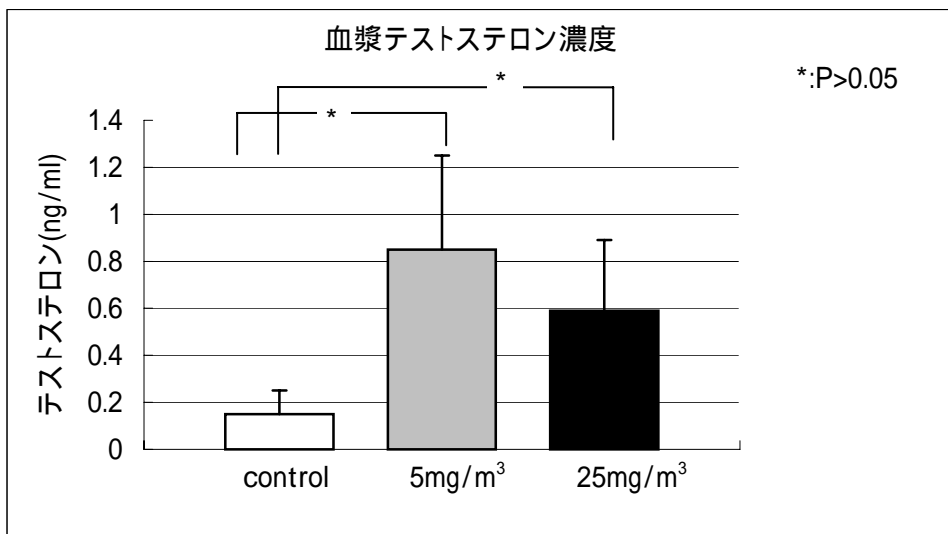


図5

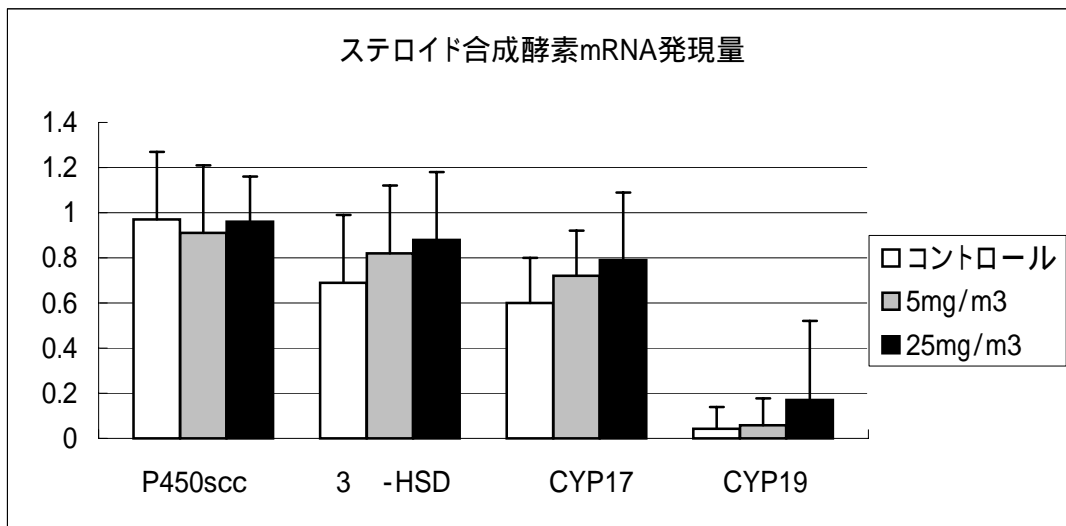


図6

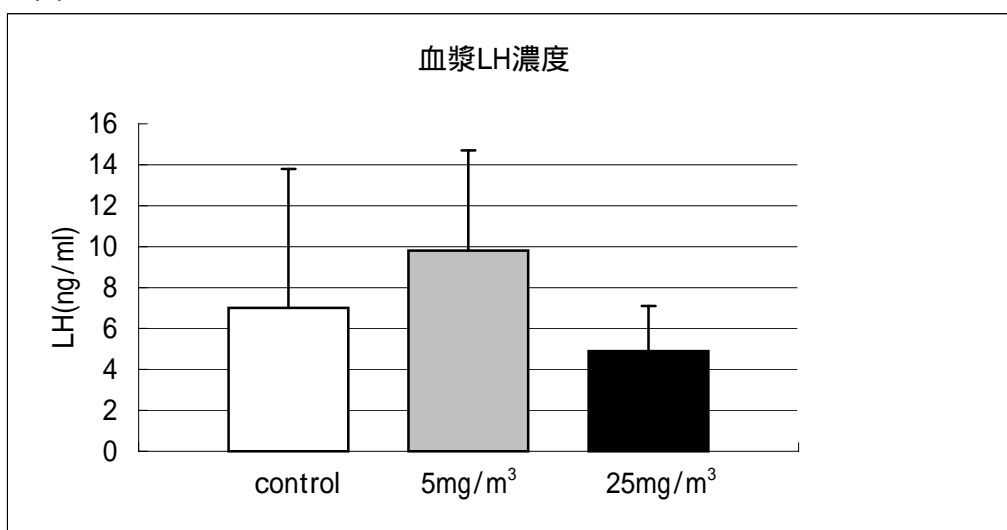


図7

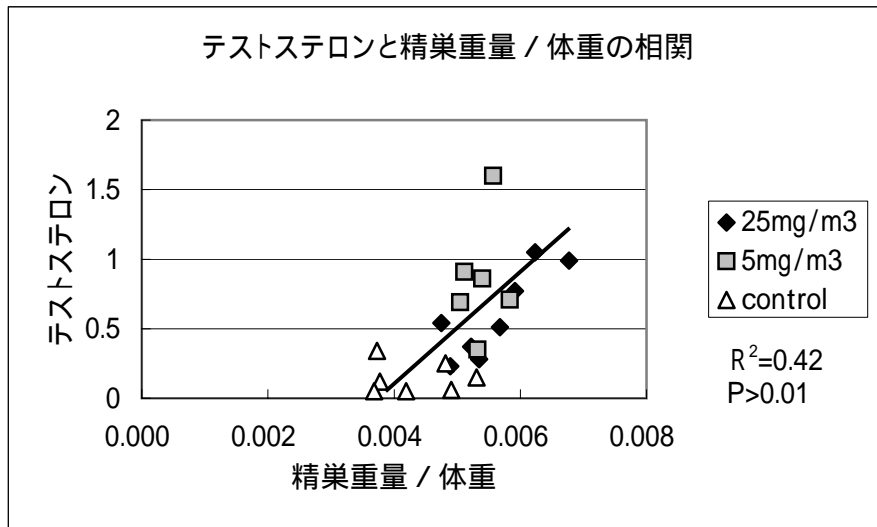


図 8

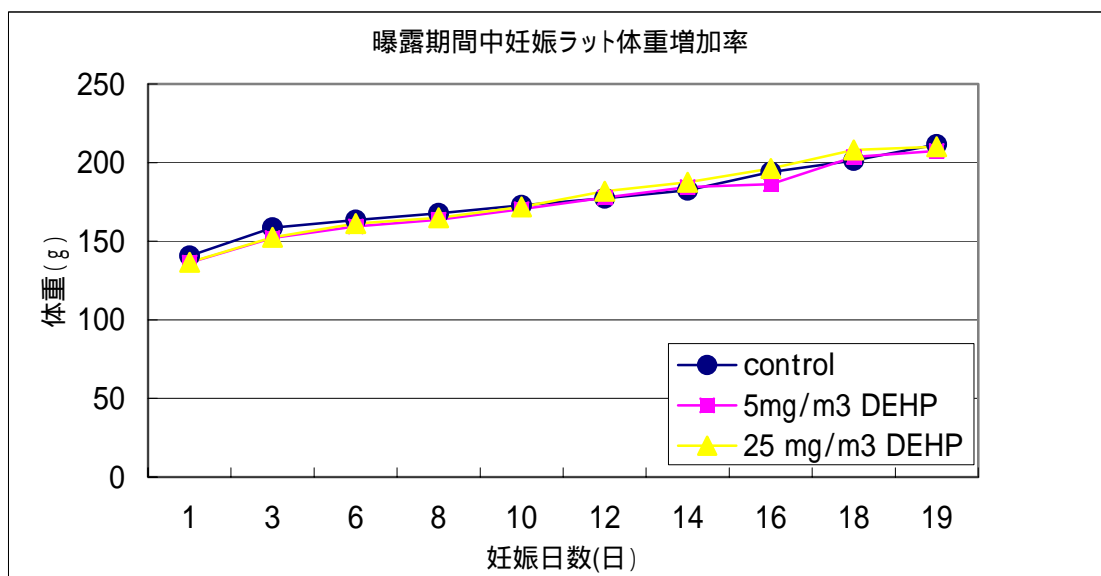


表 2

	コントロール	5 mg/m ³ DEHP	25 mg/m ³ DEHP
	n=7	n=7	n=8
体重 (g)	211.5 ± 32.7	207.5 ± 32.9	210.0 ± 32.0
肝臓重量 (g)	8.4 ± 0.8	8.0 ± 0.7	7.6 ± 0.5
卵巣重量 (g)	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.03	0.15 ± 0.04
子宮重量 (g)	38.3 ± 8.7	40.6 ± 5.5	40.3 ± 7.8
黄体数(計)	10.1 ± 2.2	10.9 ± 1.2	11.0 ± 1.5
着床数	10.0 ± 2.6	10.6 ± 1.5	10.6 ± 1.9
生児数	10.0 ± 2.6	10.6 ± 1.2	10.4 ± 2.1
死亡胎児数	0.0	0.0	0.3 ± 0.5

Endocrine disrupting effect of the Di (2-ethylhexyl)phthalate inhalation toxicity in rat

Reiko Kishi

Department of Public Health Hokkaido University School of Medicine

Professor and Chair

Key Word: Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP), inhalation, reproduction, metabolism, development, rat

Abstract:

It has been reported phthalate esters (PAEs) have the potential of endocrine disrupting effect, reproductive toxicity, development toxicity and systemics toxicity in animal experiments. The adverse effects of PAEs on humans have been suspected because PAEs are found in many different environments, such as air, water and soil. Most papers focused on the adverse effects of PAEs by oral dosing, not by inhalation which enables stabler supply of low volatile PAEs. In this study, we investigated the following effects of inhaled Di (2-ethylhexyl) phthalate in rat: 1) distribution of DEHP and the metabolism in the organ, 2) the reproductive effects, and 3) the developmental effects.

1) We could not detect DEHP and its metabolite MEHP in the serum of DEHP inhaled rats. DEHP was detected only in the lung. High volume of MEHP was detected not only in small intestine and liver, which are the DEHP metabolic organs but also in testis. We could also detect MEHP in lung, kidney, small intestine and brain of control rats.

2) A small increase in body weight and testis weight/body weight was observed at DEHP inhaled young male rats, compared with controls. Inhaled rats had more matured testis than controls. Although the testosterone concentration of plasma was higher than controls, we could not observe the effects of inhalation in the expression of testosterone synthetase mRNA and the concentration of luteinizing hormone (LH). Therefore it was indicated that the DEHP inhalation to young male rats had a possibility to affect testes.

3) The embryonic effects of DEHP inhaled in pregnant rat were studied. The weight gain were observed in the pups of DEHP inhaled rat. In female pups, body weights were raised, placental weights were decreased, and AGD/body weights were also decreased. We could not see other effect not only in inhaled rats but also in their pups.

(6) TBTによるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムと 生存胚における生殖細胞での突然変異誘発の可能性に関する研究

研究者 鈴木勝士（日本獣医畜産大学教授）

研究要旨

昨年、塩化トリブチルスズ(TBT)0、4、8、16mg/kg およびメチルメタンスルホン酸 20mg/kg をウイスターイマミチラット近交系の妊娠動物に妊娠0日から3日までの4日間強制経口投与し、着床前の胚に子宮内暴露を行い、分娩保育させて、生後6日までの出生児から肝臓と性腺由来のDNAを抽出し、20個のマイクロサテライトマーカの電気泳動パターンに比較的高率で変異が検出された。今年度は16mg/kg TBTとMMSによるサンプルをさらに増やすとともに、昨年のゲノムサンプルを用いて、より詳細にマイクロサテライト電気泳動パターンの変化を調べた。個々のバンドパターンの変動、父親、母親、子供での垂直的伝搬のより詳細な比較を実施しているが、今までのところ妊娠初期の胚にTBTによって遺伝性の突然変異が生殖細胞に確実に生じるとの証拠が得られるに至っていない。この実験系が、もっと変異原性の強い環境物質により、初期胚の内部細胞塊に生じる可能性のある劣性の変異を効率的に検出できる可能性もっていることを示すことが、生物集団の遺伝性突然変異の起源を解明し、そうしたリスクを防ぐ上で重要である。

研究協力者

鈴木 浩悦（日本獣医畜産大学獣医学部講師）
斉藤 賢一（日本獣医畜産大学獣医学部助教授）
竹中 基郎（日本獣医畜産大学獣医学部大学院生）
八木 美央（日本獣医畜産大学獣医学部大学院生）
千葉 純子（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
大村 彰（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
佐々木 哲（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
栗原 孝宏（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
安斉有希子（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
小山絵里子（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
甘粕 晃平（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）
小笠 原慶（日本獣医畜産大学獣医学部大学学部学生）

A. 研究目的

本研究は、平成13年度「TBTによるラット妊娠初期胚の着床不全のメカニズムの解明」として、ウイスターイマミチラット近交系で実施された研究を継続し、さらに深化させる目的で実施されたものである。TBTに関しては、イボニシ類でのインボセックスが低用量で引き起こされること、ラットなどで妊娠初期の喪失（妊娠不成立）や妊娠中期暴露での口蓋裂の発生など、アロマターゼ阻害による内分泌攪乱作用が疑われると報告されている。しかし、ラットでの妊娠初期の悪影響は、母親に妊娠を準備させるための内分泌的環境が

攪乱されるために生じるという可能性と、胚の側で着床を母胎に知らせる胚表面のシグナル分子などの変化が生じるために着床できないという可能性のいずれに起因するのか未解明のままである。体外受精卵を使用するか、受精卵を集めて、*in vitro* で TBT に暴露した後、偽妊娠子宮角内に移植して経過を調べる、あるいは偽妊娠処置動物を TBT に暴露し、その後体外受精卵をその動物に移植するなどの方法を採用できれば上述の謎を調べることができる可能性があるが、当初考えたが、技術的に困難な点があったため、別の方法を考案した。その作業仮説は以下のようなものである。すなわち、妊娠初期の胚喪失に関連して、着床前の胚に対して TBT の影響があるとすれば、胞胚期の内細胞塊で何らかの変化があるはずと考えられるが、実際には、これまでの実験計画では着床不全のため胚を追跡するのは不可能であった。着床不全の見られない用量では、表現型正常な胎児が得られているが、表現型正常であるため通常の場合、発生初期に何らかの影響があったとは考えられてはいない。そのためそうした胎児の分娩後の成長、器官分化、生殖能に関する情報はほとんど得られていない。初期胚に何らかの TBT に起因する変異が DNA レベルであるのであれば、生後において体細胞系列と生殖細胞系列の両方で検出できる可能性がある。もし、そのような変異が検出されれば、妊娠初期における TBT の悪影響は初期胚に対する影響に起因する部分があることを意味することになるし、そのような変異が発見できない場合には、母体の着床に関わる内分泌環境がかく乱されることに起因する部分が大きく貢献することを意味することになる。この仮説で問題になるのは TBT に何らかの変異原性があるという根拠はあるのかという点である。結論からいうと、疑いなきにしもあらずということになる。以下がその理由である。これまでの多くの *in vitro* の実験では TBT には変異原性はないとされているが、その強い細胞毒性のために検出できないという可能性はないわけではない。ムール貝の幼生で姉妹染色体分体交換が高まったという成績が報告されているほか、貝類でのインポセックスなどの変化は明らかに遺伝子発現に影響があることを示唆している。また、一般に *in vivo* での誘発突然変異試験では、初期胚で仮に突然変異が起きて劣性であれば、胎児の表現型は正常であるので検出できないので、優性致死突然変異試験が陰性だったから変異原性作用がないと完全否定はできない。DNA レベルでの変異以外にもエピジェネティックな現象が関与している可能性も否定はできない。

上述の仮説に基づいて、平成 13 年度に背景遺伝子が均一な近交系ラットを用い、クローズドコロニーラットでは区別できない処置以前に含まれていた遺伝的不均一性から誘発された異常を分離する試みが行われた。この際、着床前の胚発生の期間はラットでは交配翌日（妊娠 0 日）から 3 日までの 4 日間に相当すると考えられるので、この期間に母親に強制経口投与して初期胚に TBT 暴露を行った。誘発される可能性のある遺伝的異常については、各染色体に特異的なマイクロサテライトを用いて、PCR 増幅産物の電気泳動上、出現するバンドパターンの相違の有無として検出する。材料としては、処置母親を出産、保育させ、生後 6 日までの児動物の肝臓と性腺、および母親と父親の肝臓から抽出された DNA を用い増幅パターンの比較を行う。陽性対照物質としてはメチルメタンスルホン酸(MMS)を用いた。この結果、20 種類のマイクロサテライトのうち 8 種類で次世代の動物の性腺から採取した DNA サンプルの増幅パターンに変異が発見され、TBT の投与用量に関連した発生頻度があることが認められた。

平成 13 年度の実験成績は、一見、作業仮説に比較的適合するように見える結果ではあ

ったが、検出された電気泳動パターンの相違が突然変異を示すものであるとすれば、体細胞系列での結果に何ら相違するパターンが見られないことや、全体として変異パターンの頻度が高すぎることなどの点で、直ちに TBT にこうした変異原作用があるとは断定できないと考えられた。決定的な結論を得るためには、DNA の調整から増幅、電気泳動に関わる技術的な問題があるのではないかという問題、父親、母親、子供のためのマイクロサテライトパターンをもっと丁寧に分析する必要があるという問題、全体として、サンプル数をもっと大きくする必要があるという問題を解決するのが本年度の研究の具体的な目的である。

B．研究方法

1．被験物質

基本的に平成 13 年度と同じであるが、再掲する。

塩化トリブチルスズ（ ） 和光一級、Lot No. SEN340 を用いた（環境省 1 世代試験に用いた残りの剤を JANUS より分与）。純度 95%以上とされているが、化評研の分析値は 97.57%であった（JANUS より情報）。少量のエタノールで溶解し、局方ごま油（宮沢薬品株式会社）に溶解して投与液を調整した。

陰性対照には高用量群に含まれるのと同量のエタノールを含むごま油を用いた。

陽性対照にはメチルメタンスルホン酸(MMS)(Shigma Chemical Co., St. Louis, MO: 純度 99%; Lot No. 50K3647) を用いた。

2．用量

動物の体重 100 g あたり 1ml の投与液量とし、本年度は昨年 の 3 用量群のうち最高用量のみ、すなわち TBT 16mg/kg とし、その用量になるよう投与液を予め作成し、遮光保存した。MMS については昨年 の 用量が 50mg/kg と報告したが、その後調整記録をチェックしたところ 20mg/kg であったことが判明したため、50mg/kg と 20mg/kg の 2 群を設け、その用量になるよう投与液を上記のごま油に溶解して調整保存した。妊娠 0 日から 3 日まで、当日の体重に基づいて投与量を決定し、強制経口投与を実施した。各動物について決められたゾンデと注射筒を投与に用いた。陰性対照、TBT 投与群、MMS 投与群の成績については、昨年 の データと比較して同等と考えられればデータを統合することとする。TBT の用量設定根拠は昨年 の 成績と江馬らの報告から、若干の着床阻害が期待される用量として 16mg/kg を選んだものである。

3．動物

ウィスターイマミチラットの SPF 近交系を動物繁殖研究所から購入し実験に用いた。9 週齢の雌 20 匹と雄 10 匹のセットを 2 回導入し、いずれも 12 日以上当教室の動物舎内に設置したラミナフローラック内に収容し検疫した。検疫期間中に雌の膣垢検査を継続し、検疫期間終了後に発情前期の雌と雄を 1 番同居させ、翌朝膣栓と膣垢中の精子の確認できたものを妊娠成立とし（妊娠 0 日）、体重測定した上で各投与群に割り当てた。動物舎は温湿度および照明時間調節（温度 22 ± 1 、湿度 $55 \pm 1\%$ 、14L10D: 0800 on 2200 off）され、換気回数 10 回 / hr の空調施設で、クリーンコンベンショナルな環境に維持されて

いる。基礎飼料には低植物エストロゲン飼料の NIH-07PLD フォーミュラ（オリエンタル酵母工業株式会社製）を用いた。妊娠の確認された動物はポリカーボネート製ケージに個別に収容され、床敷きには木屑（千葉アニマル資材）を用いた。

妊娠動物はそのまま動物舎内で分娩保育させ、分娩 0 または 1 日に分娩児数、性別、体重を記録し、採材の実施される 6 日まで毎日観察を継続した。途中死亡した出生児、瀕死の出生児については発見後直ちに体重を測定するとともに、肝臓を無菌的に摘出し DNA 抽出の材料とした。本年は途中死亡動物については性腺からの DNA 抽出は断念した。母動物に関しては後日まとめてエーテル麻酔下で開腹し、後大静脈から採血後、肝臓を無菌的に摘出して一部を DNA 抽出の材料とした。その際、体長、尾長を記録し、陰核腺、卵巣、卵管、子宮、膀胱、副腎、脾臓、膵臓、腎臓、顎下腺、舌下腺、外涙腺、胸腺、甲状腺、心臓、肺、脳、下垂体、腓腹筋、眼球、および腎周囲脂肪を摘出秤量し、併せて子宮の着床痕数を記録した。雄については、雌および児動物からの採材終了後、上記の雌性生殖器を除く臓器と雄性生殖器（精巣、精巣上体、精管、精管腺、精嚢、凝固腺、前立腺、カウパー氏腺、尿道球、肛門拳筋、包皮腺、陰茎）を摘出秤量した。

最初の交配は平成 14 年 10 月末に実施され、2 回目の交配実験は平成 15 年 3 月中旬に実施された。従って実験は年度を越えて持ち越されることになった。DNA 抽出用の臓器は個別に番号が付けられ、液体窒素中で凍結ののち、抽出まで -80 で保存された。

4 . DNA の抽出

昨年抽出された DNA のうち、実験条件の確立、親子関係のパターン分析に用いられるサンプルと今年度 1 回目の採材によるもの（+数字として表記）を以下の表に示す。これらのサンプルは常法に則ってフェノール法により抽出された。

サンプル内訳

	0	4	8	16	MMS20	MMS50	
母親	4+8	5+0	5+0	6+5	5+0	+0	25+13
父親							9+10
子肝臓							
雄	16+46	15+0	20+0	30+27	18+0	+0	99+73
雌	9+53	17+0	22+0	21+16	18+0		87+69
子生殖腺							
雄	15+46	13+0	20+0	30+27	23+0	+0	101+73
雌	7+35	13+0	13+0	16+13	15+0	+0	64+48

5 . マイクロサテライトマーカー

ラットの常染色体 20 組について、各染色体について、既知のマイクロサテライトマーカーをランダムに 1 組選び、抽出した DNA を用いて、各プライマーにより PCR 増幅し、アクリルアミドゲル電気泳動により増幅された DNA を泳動し、泳動パターンを分析した。

以下に用いたマイクロサテライト一覧を示す。

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1 番染色体 : D1Mgh6 | 11 番染色体 : D11Mgh3 |
| 2 番染色体 : D2Mgh2 | 12 番染色体 : D12Mit2 |
| 3 番染色体 : D3Mgh3 | 13 番染色体 : D13Mgh5 |
| 4 番染色体 : D4Mgh14 | 14 番染色体 : D14Mgh2 |
| 5 番染色体 : D5Mgh4 | 15 番染色体 : D15Mgh2 |
| 6 番染色体 : D6Mgh6 | 16 番染色体 : D16Mgh2 |
| 7 番染色体 : D7Mgh7 | 17 番染色体 : D17Mgh3 |
| 8 番染色体 : D8Mgh1 | 18 番染色体 : D18Mgh1 |
| 9 番染色体 : D9Mit2 | 19 番染色体 : Eta |
| 10 番染色体 : D10Mgh3 | 20 番染色体 : D20Mgh2 |

6 . 統計学

群間の平均値の比較に際しては、Student の t 検定を用い、有意水準を $p < 0.05$ とした。

(倫理面への配慮)

動物に関しては、動物愛護の精神に則り、無用な苦痛を与えることなく飼育、サクリファイスを実施するものとする。また、投与中の環境暴露と人員の暴露を避けるため、オールフレッシュエア-空調で陽圧の動物舎(準 SPF 環境)のなかでラミナフローラックの内部を陰圧に設定して動物を飼育する。

C . 研究結果

1 . 妊娠動物の体重に及ぼす TBT および MMS 妊娠初期投与の影響

各群の妊娠動物の体重変化は以下の表 1 に示されている。TBT 投与群においても対照群の各妊娠日の体重との間に有意差は認められなかった。MMS50mg/kg 投与群では投与期間中に母親の体重は減少し、出産に至らなかった。

表1 妊娠動物の体重変化

		妊娠0日	1日	2日	3日	14日	21日
control (5)	平均	245.4	246.6	250.0	252.2	314.8	365.0
	SD	16.9	16.5	17.9	13.6	17.6	19.0
TBT16mg/kg (4)	平均	246.5	238.0	242.5	248.0	319.0	367.0
	SD	15.0	20.3	15.2	15.6	28.4	34.4
MMS50mg/kg (2)	平均	239.5	234.0	228.0	217.5	273.5	291.0
	SD	6.4	2.8	1.4	4.9	3.5	5.7

()内は腹数

2 . TBT および MMS の出生児数、出生児体重および外表奇形出現に及ぼす影響

TBT および MMS は、以下の表 2 に示すように、用いられた用量の範囲では出生児数に統計学的に有意な低下を生じなかった。TBT に関しては出生児数の低下があるように見え