（4）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に関する研究

研究者　　岸　玲子　（北海道大学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、内分泌撹乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。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ている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人での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ほとんどない。本研究では、揮発性の低いフタル酸エステルを発生する曝露装置を完成させた。曝露チャンバー内での濃度の検討を行った結果、3.6mg/m^{3}から18mg/m^{3}までの濃度の安定性が確認出来た。今後、動物への吸入曝露による生体への影響を検討し、リスク評価を行うことが可能になる。

研究協力者　佐田　文宏（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野講師）
玉置　淳子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野助手）
片倉　洋子（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野研究員）
近藤　朋子（北海道大学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（北海道大学医学研究科予防医学講座公衆衛生学分野大学院生）

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①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、②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、③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 0.038~0.79μ/m^3、フタル酸ジブチル DBP で 0.017~0.37μ/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２mg／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 5mg／m^3（日本産業衛生学会、米国産業衛生専門家会議）であるが、内分泌撹乱科学物質の問題が出現する前（1995 年）に決められており、生殖毒性などが配慮された数値ではない。職域以外の一般環境については、より低い安全性のリスク評価を検討する必要がある。

これまでヒトでは、軽度の胃腸障害、実験動物での報告は、内分泌撹乱作用、生殖毒性、発達毒性、臓器障害などが報告されているが、そのほとんどが、経口投与による影響をみており、人での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研究はこれまで国際的にも

ほとんど行われていない。本研究では、吸入曝露による影響を明らかにするために、揮発性の低いフタル酸エステルの発生を安定供給できる曝露装置を完成させる。

B.　　研究方法

Ⅰ．発生器の作成

フタル酸エステルは、沸点が３００℃以上と高く、蒸発法によって高濃度のガスを発生させることは技術的に容易ではない。しかも常温の環境中ではガスが凝縮しミストとなる。このため、低濃度（０．２mg/m^3）から高濃度（５０mg/m^3）のガスを一元的に発生することは困難であると判断し高沸点発生装置を作成した。

高沸点発生装置

発生方法は低濃度発生用と同様、バブリング蒸発方式を採用した。但し高濃度領域のため、ガスはミスト状態となる。ミストを流量計に通すことは、ガス濃度の不安定化の原因となる。この状態を避けるため、吸入チャンバー毎に発生量をコントロールできるよう、発生部を個別に設けることにした。こうして発生量は、清浄空気を流量計により制御することにより変えることが可能となった。発生部の加熱媒体はオイルバスを採用し１８０℃までの発生が可能である。本装置での発生濃度は、おおよそ１mg/m^3～５０mg/m^3の発生を目標とした。

Ⅱ．発生器の安定性の検討

フタル酸エステルの各チャンバー内での濃度の安定性を、ガスクロマトグラフィーを用いて確認した。

①デジタル粉塵計による存在の確認

完成後、まず、簡易的に、曝露チャンバー内のフタル酸エステルの存在をデジタル粉塵計で確認した。デジタル粉塵計で存在を確認できたことから、チャンバー内ではミスト状であることが確認された。

②濾紙法による計測

ミスト状であることが確認されたので、ミストを吸引して濾紙に吸収させ、重量変化で評価する濾紙法により計測を試みた。その結果、温度・流量の変化による重量の変化がみられず、濾紙法では補修しきれない状態のフタル酸エステルの存在が示唆された。

③ガスクロマトグラフィーによる計測

同時に、ガスクロマトグラフィーによる計測も行った。サンプリングは、以下の方法で行った。

ｉ）テドラーバックによるサンプリング

100ml/min の吸引ポンプで１０分間吸引し、1l のテドラーバッグに捕集し、ガスタイトシリンジにてサンプリングを行った。その結果、ガスクロマトグラフィーにてピークを検出できなかった。これは、フタル酸２－エチルエステルが完全に拡散していなかったためと考えられる。

ⅱ）ミゼットインピンジャーによるサンプリング

DEHP の捕集溶媒としてエタノール１０ｍｌを容器に入れ、吸引ポンプに接続し、SPC ミゼットインピンジャーG－１型により 2.5 l/min で２０分間吸引し、サンプリングを行った。こうして得られたサンプルをガスクロマトグラフィーに注入し、DEHP の濃度を求めた。

III. 発生器の改良

高沸点曝露装置を用いて濃度を測定した結果、高濃度の安定性を確認することが出来なかった。その原因としてバブリング方式は、ミスト状態になるガスを安定化させるために、発生量をコントロールするための個別流量計をつけていたが、ミスト状になったフタル酸を曝露チャンバーに流す過程でミスト化が不完全であったため、また、テフロンチューブ内で、フタル酸エステルが液化してトラップされていたためであるということが、考えられた。

そこで、フタル酸エステルをミスト状に保つために、発生装置から曝露チャンバーへの間に希釈器を取り付けた。

C. 研究結果

Ｉ. 発生器の製作

揮発性の低い高沸点のフタル酸エステルは、高濃度のガスを安定して発生させる発生器の設計、作成は、非常に難しい課題で、長い時間がかかった。柴田化学株式会社と共同で作成した。

フタル酸エステルガス発生器（改良前）

曝露チャンバー

Ⅱ．発生器の安定性の検討

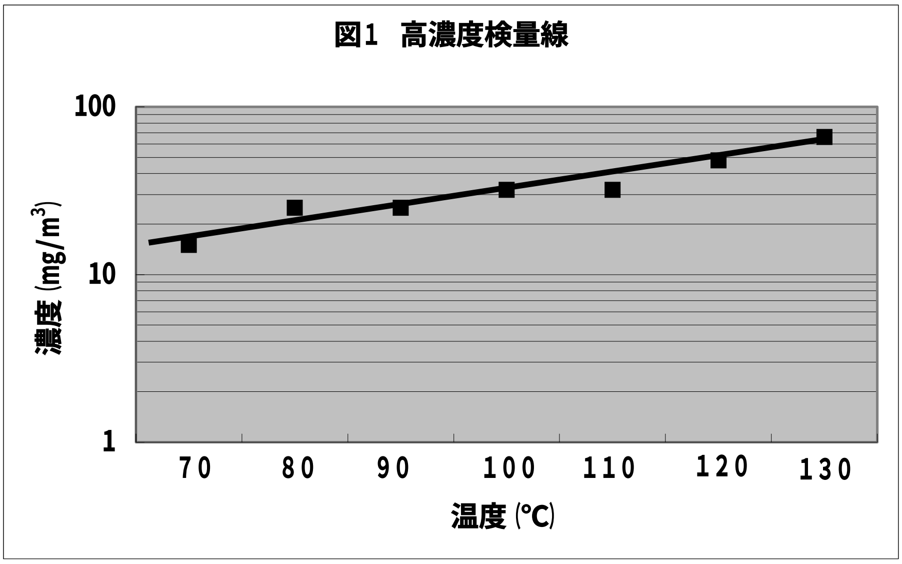
曝露量として、産業現場の許容濃度の５ｍｇ/ｍ^{3}と、１０倍高濃度の５０ｍｇ/ｍ^3、５分の１の濃度の１ｍｇ/ｍ^{3}を目標に、実際に曝露チャンバーに、発生させたフタル酸エステルを導入し、安定性の検討を行った。

① 発生器の温度による濃度変化

温度と濃度の高い相関性が得られた。（表１、図１）しかしながら、高濃度の時間経過に伴う曝露濃度の安定性についての確認はできていない。

表１

温　度 (℃)	流　量 (l/min)	濃　度 (mg/m^3)
７０	２５	15
８０	２５	25
９０	２５	25
１００	２５	32
１１０	２５	32
１２０	２５	48
１３０	２５	66

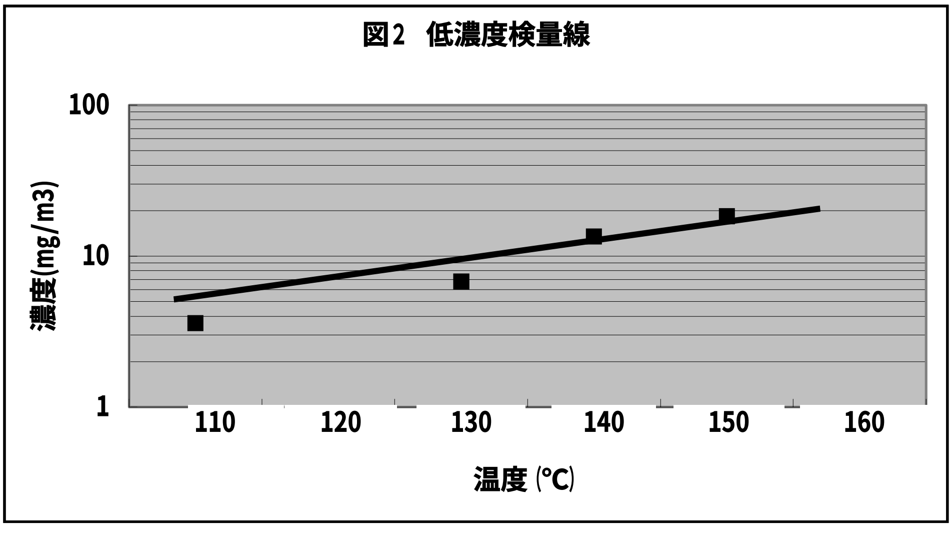


②　発生器改良後の温度による濃度変化

温度と濃度の高い相関性が得られた。（表２、図２）また、改良することにより、フタル酸２ーエチルエステルを安定して発生させることができた。また、この場合は時間経過に伴う濃度の安定性を確認することが出来た。

表２

温　　度 (℃)	流　　量 (l/min)	濃　　度 (mg/m³)
１１０	５＋希釈 20	3.6
１３０	５＋希釈 20	6.8
１４０	５＋希釈 20	13.5
１５０	５＋希釈 20	18.4



III. 発生器の改良

発生装置から曝露チャンバーへの間に希釈器を取り付けることで、チューブ内で冷却されることでミスト化するフタル酸エステルが、空気と一気に混合され、ミスト化を促進することが出来るので安定したフタル酸エステルを発生させることが出来た。

フタル酸エステルガス発生装置（改良型）

D. 考察

フタル酸エステル類は、動物実験において内分泌攪乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。さまざまな環境中から検出されていることから、ヒトへの影響が懸念されている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人手の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ほとんどない。大気中にも、フタル酸ジエチルヘキシル DEHP で 0.038~0.79μ/m^3、フタル酸ジブチル DBP で 0.017~0.37μ/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２mg／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 5mg／m^3（日本産業衛生学会、米国産業衛生専門家会議）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、と言う最近の報告(Tabacova 1999)があるように、生体への悪影響が疑われる。このことから、吸入曝露による影響を解明することが不可欠である。

本研究で作成した発生器は、バブリング蒸発方式を用いている。当初のバブリング方式は、ミスト状態になるガスを安定化させるために、発生量をコントロールするための個別流量計をつけていた。こうすることで発生量は、清浄空気を流量計により制御することで変えることが可能となるはずであった。しかしながら、流量計により調節したミスト状のフタル酸を曝露チャンバーへ流すまでの過程において、ミスト化が不完全であったため、また、テフロンチューブ内でフタル酸エステルが液化してトラップされていたために、曝露チャンバー内で安定したフタル酸エステルの濃度を得ることができなかったと考えられた。
そこで、フタル酸エステルをミスト状に保つために、発生装置から曝露チャンバーへの間に希釈器を取り付けた。この希釈器を取り付けることにより、チューブ内で冷却されることでミスト化されるフタル酸エステルが、空気と一気に混合されミスト化を促進することができるので安定したミスト状のフタル酸エステルを発生させることが出来る。実際に濃度を測定した結果、作業現場の許容濃度の２倍である１０mg/m^3 までの安定性を確認することが出来た。しかし、許容濃度の１０倍である 50mg/m^3 の安定性の確認には至っておらず、今後更に改良を加えていく予定である。

E．結論

フタル酸エステル類は、これまで内分泌攪乱作用、生殖毒性発達毒性等が報告されているが、経口投与、あるいは in vitro によるリスク評価であり、吸入曝露による影響についてはほとんど検討されていない。フタル酸エステル類は揮発性が低いが、大気中に存在することが報告されているので、吸入曝露によるリスク評価を行い、毒性を解明することが不可欠である。

今年度は、フタル酸ジ-2-エチルヘキシルをミスト状に低濃度で発生させるための発生器を作成し、その安定性を確認した。

参考文献

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological Profile for Di-(2-ethylhexyl) Phthalate, Update. NTIS Publication Number PB/93/182400. Atlanta,GA.

研究要旨
フタル酸エステル類は、動物実験で、内分泌撹乱作用、生殖毒性、発達毒性、組織障害などが報告されている。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ている。しかし、多くの報告は、経口摂取による影響であり、人での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ほとんどない。本研究では、揮発性の低いフタル酸エステルの発生を安定供給できる曝露装置を完成させ、現在、安定性を検討中である。今後、吸入曝露による生体への影響を検討することが可能となる。

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. Most papers focused on the adverse effects of PAEs by oral dosing , not by inhalation which is more natural intaking for humans. In this study, we are aiming to make the exposure device which enables stable supply of low volatile PAEs. The stability of the device is still under consideration. This device will help us research the various effects of PAE inhalation on the living body in the future.

（５）ＴＢＴによるラット妊娠初期胚の着床不全に関わるメカニズムの解明

研究者　　鈴木　勝士　　（日本獣医畜産大学　教授）

研究要旨　塩化トリブチルすず(TBT)0，4，8、16mg/kg およびメチルメタンスルフォン酸 50mg/kg をウィ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ーを用いて変異が生じるか否か検討した。その結果合計 8 個のマーカーにおいて、TBT と MMS 投与群で、性腺由来の DNA に 1/64～5/101 程度の頻度で変異が検出された。MMS 投与群では外表奇形が 2/76 で検出されたが、TBT 群では奇形は検出されなかったので、これらの変異は劣性の突然変異であると結論された。母親、父親の肝臓、陰性対照群での肝臓と性腺からの DNA では変異は検出されず、近交系として斉一な遺伝的背景をもっていることが確認された。今回性腺でのみ変異が検出された事に関して、その機序等は不明であるが、生殖細胞での劣性の突然変異が生じる可能性は否定できないと結論された。また、今回の結果から、従来知られていた TBT による着床阻害には、初期胚の障害が関与している可能性があることが示唆された。

研究協力者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

鈴木浩悦	日本獣医畜産大学　獣医学部	講師
斉藤賢一	同上	助教授
竹中基郎	同上	大学院生
八木美央	同上	大学院生

千葉純子、大村　彰、佐々木哲、栗原孝宏、安斉有希子、
小山絵里子、甘粕晃平、椎名純子、小笠原慶　　　　学部学生

A.研究目的

TBT については、イボニシ類でのインポ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、内分泌撹乱作用が疑われている。特に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撹乱されるためなのか、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なのか、依然として解明されていない。着床前の胚へ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であるが、着床不全の

ため追跡ができていない。着床不全の見られない最高用量で、表現型正常な胎児が得られているが、分娩後の情報が乏しい。多くの in vitro の実験では変異原性はないとされているが、貝類での変化に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。初期胚で仮に突然変異が起きても劣性であれば、胎児の表現型は正常であるので検出できない。遺伝子レベルで突然変異が検出できれば、着床不全のメカニズムが TBT による胚への影響に起因することになる。結果が陰性であれば、母体への影響に的を絞ることができる。

実験に用いるラットについては、背景遺伝子が均一な近交系を用いる。これはクローズドコロニーのラットを用いると、処置以前に含まれていた遺伝的不均一性と誘発された異常を区別できないからである。また、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する。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 を用いる。

B.研究方法

被験物質：

塩化トリブチルすず（Ⅳ)、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 よりの情報)。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フォン酸(MMS)（Shigma Chemical Co., St. Louis, MO: 純度 99%; Lot No. 50K3647）を用いた。

用量：

動物の体重 100ｇあたり 1ml の投与液量とし、TBT 4、8、および 16mg/kg になるよう 3 種類の投与液を予め作成し、遮光保存した。MMS については 50mg/kg になるよう投与液を上述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。従って、用量群としては陰性対照(0mg/kg)、TBT４mg/kg、TBT8mg/kg、TBT16mg/kg および MMS50mg/kg の５群が設定され､各群５腹の妊娠動物で構成された。今回の TBT の用量設定には江馬らの報告を参考に、最高用量で若干の着床阻害が期待される用量として 16mg/kg を選んだ。

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 50 匹と雄 10 匹を、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±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 18 日に動物をケージごと教室内に設置したラミナフローラックに移動し、分娩保育させた。急激な環境の変化等のために保育が芳しくなかったため、途中から動物舎内で分娩保育する方式に改めた。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、肝臓と性腺を無菌的に摘出し DNA 抽出の材料とした。母動物に関しても同日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、肛門挙筋、包皮腺、陰茎）を摘出秤量した。

最初の交配は 2002 年 10 月 31 日、最終的な雌動物と児動物の採材は同年 12 月 8 日に実施された。

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。

DNA の抽出：

最終的に DNA は以下の表に示すサンプルからフェノール法により抽出された。

サンプル内訳

	0	4	8	16	MMS50	
母親	4	5	5	6	5	25
父親						9
子肝臓						
雄	16	15	20	30	18	99
雌	9	17	22	21	18	87
子生殖腺						
雄	15	13	20	30	23	101
雌	7	13	13	16	15	64
合計						385

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

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ー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

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。いずれの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。

表1　妊娠動物の体重変化

		交配日	妊娠0日	1日	2日	3日	7日	11日	14日	21日
control (5)	平均	254.6	258.0	260.2	265.0	267.8	297.5	315.0	333.4	423.5
	SD	16.0	8.3	10.8	9.7	8.4	2.1	4.2	7.8	24.7
TBT4mg/kg (5)	平均	254.6	261.6	261.6	267.2	270.4	288.7	311.8	331.5	418.4
	SD	16.3	11.2	13.5	11.6	12.3	9.7	8.2	7.8	15.3
TBT8mg/kg (5)	平均	254.0	258.3	261.8	259.2	262.0	286.3	312.3	327.0	418.0
	SD	16.4	10.7	12.1	13.3	11.1	9.3	8.7	17.4	20.3
TBT16mg/kg (6)	平均	250.8	251.5	249.2	249.0	249.8	269.8	295.0	318.7	406.8
	SD	13.6	16.4	17.2	20.2	20.8	19.6	14.7	15.3	13.2
MMS50mg/kg (5)	平均	253.0	257.4	258.6	262.6	264.4	287.0	302.4	322.8	387.8
	SD	11.0	12.9	12.3	13.6	12.4	7.8	13.0	10.9	42.8

() 内は腹数

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 に関しては一見用量に相関した出生児数の低下があるように見えるが、腹数が少なかったことと、今回妊娠黄体数が調べられていないことから、過去の報告に見られるような着床阻害に関しては情報が得られなかった。TBT処置群では、16mg/kg 群の雄で有意な体重の高値が認められた以外、いずれの群でも出生時体重は対照群と差がなかった。MMS50mg/kg群の出生児体重も対照群との間に差を示さなかった。

TBT 投与群では全ての出生児が外観では異常を示さず、過去の報告を再現した。MMS投与群では76例の出生児のうち2例が奇形であった（頭部の異常１例、無尾１例）。

今回の報告では母動物の最終解剖成績は参考データとして巻末に示し、投与には関係の無かった雄親の解剖データについては割愛する。

表2　　TBT 0, 4, 8, 16mg/kgおよびMMS 50mg/kg投与群の出生児数と出生時体重並びに外貌異常

	0mg/kg (5)	TBT4mg/kg (5)	TBT8mg/kg (5)	TBT16mg/kg (6)	MMS 50mg/kg (6)
産児数	16.60 ± 1.67	16.00 ± 1.41	15.20 ± 1.79	14.83 ± 1.47	15.20 ± 2.05
着床痕	17.00 ± 0.82	16.80 ± 0.84	15.80 ± 2.28	15.80 ± 2.28	16.00 ± 2.24
出生児体重					
雌 (g)	5.24 ± 0.33	5.3 ± 0.80	5.66 ± 0.37	5.67 ± 0.34	5.54 ± 0.28
雄 (g)	5.66 ± 0.34	5.67 ± 0.46	5.99 ± 0.12	6.15 ± 0.19 *	5.88 ± 0.18
外表奇形	0/83	0/80	0/76	0/89	2/76

*:t検定により対照群との間にP<0.05で有意差
( )内は腹数
外表奇形の頻度は総出生児数あたりの出現数

マイクロサテライトマーカー泳動パターンにおける変異の検出

以下の表に示されるように、20 種類のマイクロサテライトマーカーのうち 8 種類のマーカーで泳動パターンに異常が認められた。陰性対照群では、母親、父親、児動物の肝臓、性腺のいずれのサンプルでも各マイクロサテライトマーカーに特有の斉一なパターンが観察され、近交系動物の特徴を示した。TBT のみに変異が認められたのは、5、6、9、17 および 20 番染色体上の 5 種類のマーカーであり、MMS のみに変異が認められたのは 7 および 11 番染色体上の 2 種類のマーカーであり、TBT と MMS の両方で変異が認められたのは 2 番染色体上のマーカーであった。

変異が認められたサンプルは性腺由来の DNA に限られており、20 番染色体上のマーカーの場合には TBT4、8、16mg/kg 群の順に雄雌を合計した変異の頻度は、1/33、1/33 および 5/46 であり、高用量ほど変異を示す個体数が多かった。

児動物の肝臓に関しては、調べられた全てのマイクロサテライトマーカーについて変異は検出されなかった。

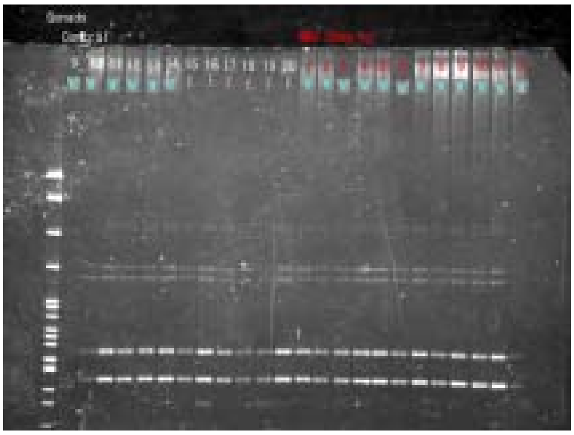
表 変異の検出された染色体と変異の出現率

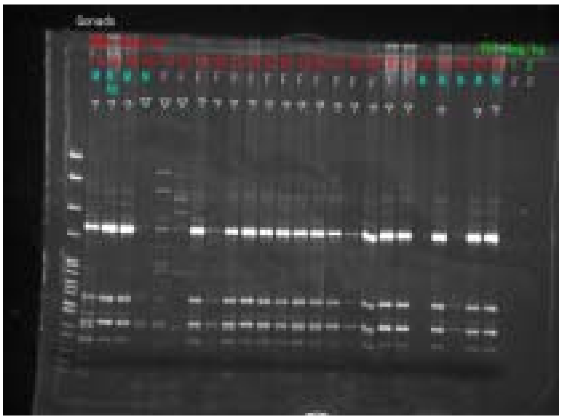
染色体	用量	母	父	雄子肝臓	雄子生殖腺	雌子肝臓	雌子生殖腺
2	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	2//15
	total	0/25	0/9	0/99	2/101	0/87	2/64
5	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
6	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//23
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
7	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	1//23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
9	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	0/64
11	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	0/30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	1//15
	total	0/25	0/9	0/99	0/101	0/87	1/64
17	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/13	0/17	0/13
	8	0/5		0/20	0/20	0/22	1//13
	16	0/6		0/30	1//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	1/101	0/87	1/64
20	0	0/4		0/16	0/15	0/9	0/7
	4	0/5		0/15	0/20	0/17	1//13
	8	0/5		0/20	1//20	0/22	0/13
	16	0/6		0/30	5//30	0/21	0/16
	MMS50	0/5		0/18	0/23	0/18	0/15
	total	0/25	0/9	0/99	6/101	0/87	1/64

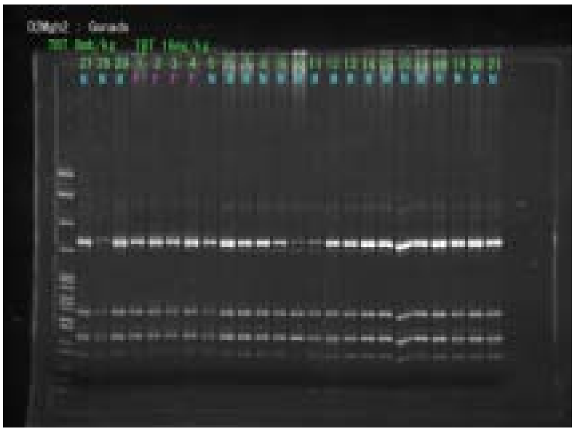
全ての電気泳動の像を示すのは煩雑になるので、本報告では TBT と MMS の両方に変異が認められた 2 番染色体上のマーカーについて例示することとする。図中、タイトルとしてサンプリングした臓器を示し、母親と父親に関しては肝臓の結果のみ、また各レーンの

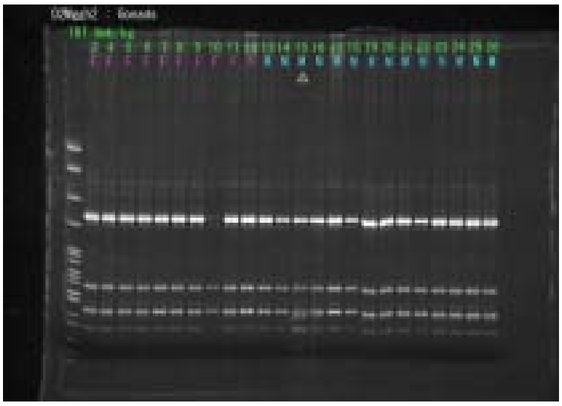
上に各群での個体ナンバーを、その下に雌雄の別を示し、さらにその下に下向きの白△で変異した個体を識別してある。一部の図に？が付されているのは、変異の可能性がないわけではないが、泳動条件が若干他のものと異なったため一見異常に見えるだけと判定された事例である。

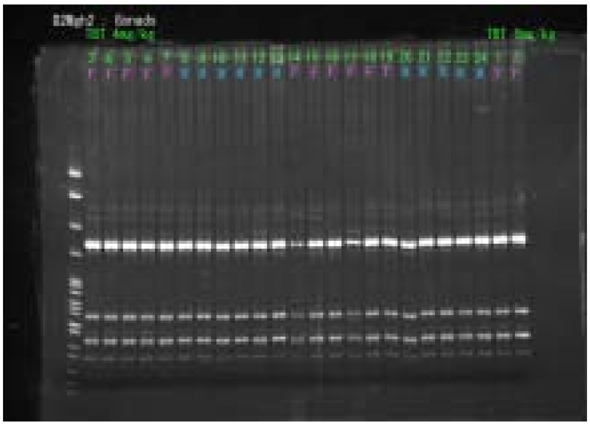
マイクロサテライトマーカーD2Mgh2を用いて検出された泳動パターンの多型（変異）



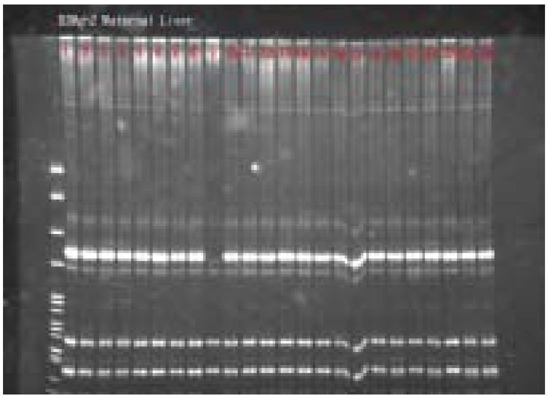


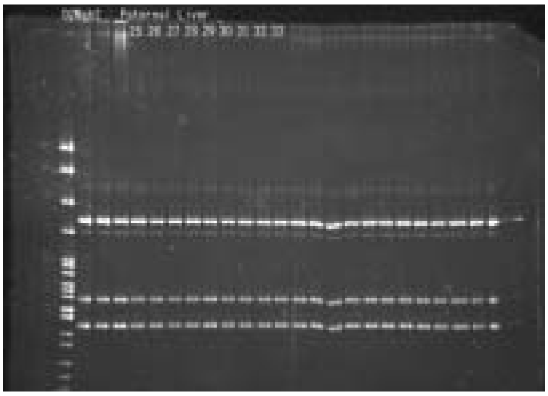




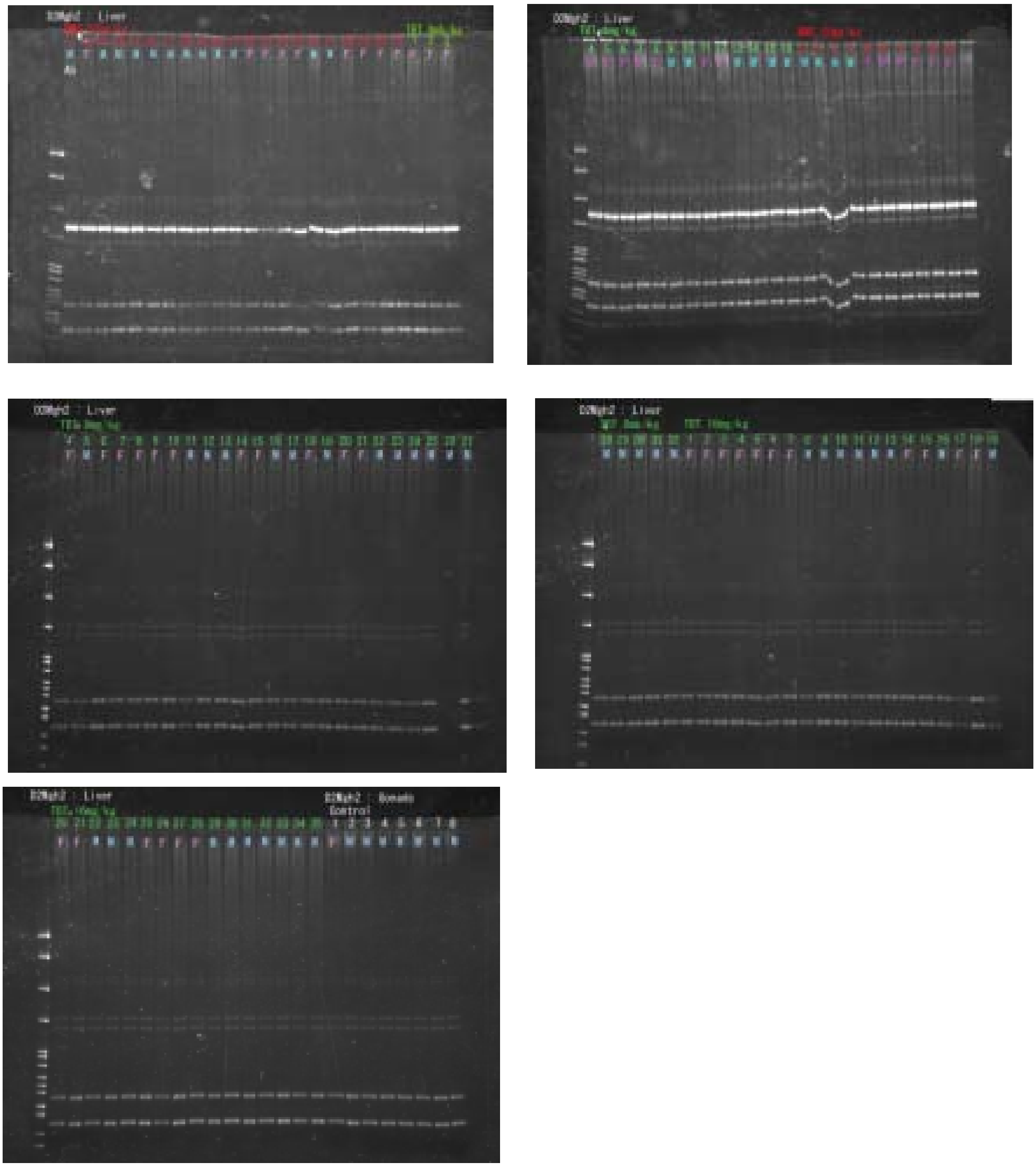


マイクロサテライトマーカーD2Mgh2 を用いて検出された母親と父親の肝臓からの DNA サンプルにおける泳動パターン





マイクロサテライトマーカーD2Mgh2 を用いて検出された F1 児動物の肝臓からの DNA サンプルにおける電気泳動パターン



D.考察

TBT には、ミュール貝の胚において高率に姉妹染色体分体交換を引き起こすと言う報告以外に現存する変異原検出系で陽性の報告は存在していない。その意味で、今回得られた妊娠初期胚での母体経由での暴露が、胎児の外観に何ら影響を及ぼさないのに胎児の性腺で突然変異を生じるという成績はにわかには信じがたい。陽性対照として用いた MMS では、妊娠初期投与による影響は知られていないが、今回の実験では、変異原物質に時に見られる重篤な体軸形成に関わる異常が検出された。また、MMS 投与群でも TBS と同様な変異が生殖腺でのみ検出され、かつ D2Mgh2 の場合には、個体によってバンドパターンが異なっており、この物質が至るところで DNA メチル化を引き起こしていると考えられるので、同一のマイクロサテライト座で異なる変異が生じても不思議はないと考えられる。全体として今回のデータが何らかのアーティファクトではないことは、陰性対照での全ての検体においていずれのマイクロサテライトマーカーについても変異が検出できなかったと言う事実によって担保されている。

今回投与された妊娠時期は、受精後着床する前までの初期胚の発生期に相当する。着床前の胚盤胞の段階では、胚は内部細胞塊という一種の多能性の幹細胞の集合を形成している。古典的な催奇形性の学説では、この時期に何らかの外因の感作を受けた場合、悪影響が著しい場合には胚は死亡し影響を見ることができない、あるいは影響が内部細胞塊の一部であった場合にはその細胞が死んでも、他の細胞がその部分を置換するのでやはり影響を見ることができないとされていた。比較的最近になって、原腸胚期にメチルニトロソウレアなどの強い変異原、レチノイン酸等の影響を受けると、最大約 30%の胎児に重篤な体軸形成異常、顔面形成異常、浮腫などを伴う奇形が生じることが知られるようになった。しかし、これらの研究では、表現型正常だった同腹児については形態学的に異常がないとしか記載されておらず、分娩させてその後の発生、成長がどのような経緯をたどるのか全く知られていない。少なくとも今回の実験の内 MMS で見られた外表奇形は、上述の変異原の範疇で生じる奇形であると考えられる。このことは、妊娠 0 日から 3 日迄の MMS が何らかの影響を初期胚に与えたことを意味しており、同時期に投与された TBT も胚に達していたことを裏付けるものである。

今回得られた突然変異の検出率は、その他の in vivo での検出系での検出率が 10000 匹に数匹と言った低頻度でしかないのに比べると、極めて高い。マイクロサテライトはイントロンに存在する無意味な遺伝子配列である。今回検出された突然変異がどの様な機序で、どの様なタイプの突然変異なのかについては今回は明らかになっておらず、今後の検討課題である。突然変異の起こる頻度についても各染色体に１つのマーカーしか用いていないので、より多数のマーカーを用いてより正確にその発生頻度を推計する必要がある。MMS についてはランダムヒットのメチル化が変異原作用の本体であるとされているが、TBT についてはミュール貝での SCE の頻度上昇から、何らかの機序で染色体と相互作用がある可能性はあるが、哺乳動物で波実証されていない。特定の DNA 配列に親和性があるのか否かなどの問題も未知のままである。したがって、実際の機能的な遺伝子にどの程度に影響を及ぼすのかについて、現時点では正確な推論はできない。

今回検出された突然変異は、TBT と MMS で妊娠初期に処置された出生児の卵巣と精巣

から採集されたDNAでのみ検出され、体細胞の代表である肝臓からのDNAでは検出されなかった。これらの体細胞由来のDNAのマイクロサテライトパターンは、親のパターンと変わらず、基本的に遺伝的な背景が斉一な近交系の特徴を良く表していた。出生児の性腺には体細胞と生殖細胞が混在しており、今回はそれらを分離できていないので、検出された変異が、体細胞で起きたのか、生殖細胞で起きたのかは確定できない。肝臓では変異が検出できなかったことを考えると生殖腺の体細胞にも変異は無かった可能性もあり、生殖細胞での突然変異が生じた可能性を否定できない。また、今回の実験で生じた突然変異は、TBT の場合には出生児の外見に異常を生じていないと考えられるところから、劣性の突然変異であると考えられる。マイクロサテライトマーカー周辺のみがTBTに感受性がある可能性も否定できない。これらの可能性については、近交系動物に妊娠初期投与してF1を得て、それらを兄妹交配してF3まで追跡すれば、その変異についてのホモ接合体を得ることができるので、実際にどの様な変異が生じたのかを検証することができる。こうした試みは全くされたことがないので、生殖細胞に劣性突然変が生じる、すなわち遺伝性の突然変異が生じる可能性があるとしても、現時点では断定できない。これらの機序が実際に存在するとすれば、人間で数千種類あることが知られている遺伝性疾患の生じた過程のひとつに何らかの化学物質に起因するものがあることを意味することになる。

今回の実験が生殖細胞での突然変異を否定できないとすると、このことは、胚盤胞の段階で既に生殖細胞系列に分化する細胞の運命決定がされていることを示唆することになる。我々は既に発生学的には相同な時期の鶏胚がエストロゲン、ビスフェノールA、電磁波によって重篤な体軸形成異常を含む発生かく乱を受けることを実証している。今回の成績は機序は不明ではあるが、ほ乳類の初期胚において性腺を構成する細胞で突然変異が生じることを示しており、初期胚がこうした外因性の作因に著しく無防備である可能性を示唆している。比較的高濃度のTBTの妊娠初期投与によって着床阻害、あるいは着床前の胚喪失がおこることについて、胚に対する影響なのか、母体に対する影響なのかについて、決着がついていない。今回の成績は、TBT の高濃度で初期胚に何らかの悪影響を及ばす可能性があることを示唆している。

従来、催奇形性試験では排卵数（妊娠黄体数）から着床数を差し引き、それらを着床前の杯喪失と表現してきた。この実体は実際には不明である。人間でのこうした初期胚の喪失は極めて高いとの報告もあり、今後初期胚に対する化学物質の悪影響について、より詳細な調査と研究をする必要があることが今回の実験により明らかになったと言えよう。

E.結論

ＴＢＴがラットの初期胚に対して、貝類で報告されているような何らかの突然変異を誘発する可能性を示すのであれば、初期胚の着床不全が胚の側におきた悪　影響に起因するとの結論が得られるとの仮説を立てて、妊娠初期ラットにTBTを投与し、分娩させた後生後６日までの保育児について肝臓と性腺を無菌的に摘出し、常法によりDNAを抽出し、２０個の染色体の代表的なマイクロサテライトマーカーをそれぞれ１つ選択して増幅し、多型が生じるか否かを調べたところ、この仮説をサポートするような研究成果が得られた。

付表１　母親の臓器重量(分娩後 6日で解剖)

	Control (5)			TBT 4mg/kg (5)			TBT 8mg/kg (5)			TBT 16mg/kg (6)			MMS 50mg/kg (5)		
体重(g)	274.9	±	41.0	283.7	±	30.2	283.4	±	22.1	269.7	±	45.3	288.2	±	35.7
体長(cm)	21.0	±	1.0	21.3	±	1.6	21.2	±	0.5	21.7	±	1.6	21.2	±	0.6
尾長(cm)	16.4	±	1.0	16.9	±	0.2	16.7	±	0.6	18.2	±	4.3	16.4	±	1.3
陰核腺(mg)	107.1	±	15.2	108.1	±	10.5	95.9	±	14.8	127.8	±	26.4	105.4	±	27.9
卵巣(mg)	125.8	±	6.9	119.6	±	10.8	116.0	±	4.3	115.1	±	9.3	100.7	±	11.7
卵管(mg)	23.5	±	1.4	21.5	±	3.8	20.9	±	5.3	27.7	±	4.4	21.7	±	3.9
子宮(mg)	677.0	±	408.9	438.8	±	63.0	473.8	±	98.3	487.7	±	156.2	337.0	±	82.2
膀胱(mg)	122.7	±	14.7	130.0	±	11.1	126.9	±	10.6	120.6	±	7.7	106.1	±	21.2
副腎(mg)	85.4	±	9.7	88.1	±	9.3	83.3	±	13.4	93.9	±	6.7	84.5	±	7.3
脾臓(mg)	1088.1	±	329.0	1000.9	±	149.8	997.0	±	39.7	992.8	±	123.7	1074.4	±	159.9
膵臓(mg)	884.4	±	155.0	1229.1	±	276.7	1096.0	±	197.4	1086.7	±	362.7	990.8	±	179.9
腎臓(mg)	2051.9	±	184.7	2072.7	±	196.6	2151.5	±	162.2	2046.4	±	154.6	2083.7	±	124.8
顎下腺(mg)	503.4	±	36.3	522.4	±	25.9	527.6	±	35.7	527.9	±	27.0	507.9	±	32.1
舌下腺(mg)	111.6	±	29.3	101.4	±	28.6	108.3	±	9.5	132.2	±	20.8	108.1	±	22.9
外涙腺(mg)	199.6	±	44.9	205.2	±	34.0	209.7	±	24.6	259.4	±	51.8	199.1	±	18.6
胸腺(mg)	272.6	±	47.8	253.5	±	24.4	281.5	±	37.4	264.8	±	57.8	287.4	±	47.5
甲状腺(mg)	23.5	±	2.8	25.8	±	1.7	21.6	±	5.0	25.9	±	5.2	21.5	±	4.3
心臓(mg)	920.8	±	66.6	972.0	±	98.3	952.2	±	94.8	916.3	±	58.2	835.7	±	37.7
肺(mg)	1178.8	±	197.1	1286.1	±	156.3	1177.3	±	62.6	1278.6	±	136.3	1289.6	±	208.9
脳(mg)	1784.7	±	69.4	1759.1	±	91.6	1812.0	±	49.5	1846.2	±	64.4	1749.9	±	88.1
下垂体(mg)	10.6	±	2.8	10.5	±	1.2	10.6	±	2.6	12.6	±	1.5	9.4	±	2.6
腓腹筋(mg)	1513.0	±	70.6	1514.0	±	288.0	1583.7	±	83.9	1538.6	±	127.2	1377.3	±	187.7
眼球(mg)	257.7	±	8.6	247.0	±	31.7	239.4	±	21.9	257.3	±	18.3	237.3	±	32.4
腎周囲脂肪(mg)	3447.1	±	564.1	3301.5	±	297.1	3362.2	±	431.0	3068.9	±	620.1	3267.9	±	308.4
着床痕	17.0	±	0.8	16.8	±	0.8	15.8	±	2.3	15.8	±	2.3	16.0	±	2.2

( )内は腹数

着色した部分は対照群との間に有意差 ($p<0.05$)

Studies on mechanisms of implantation loss induced by TBT treatment during early pregnancy in rats

Katsushi Suzuki, Professor, Nippon Veterinary and Animal Science University

Key word:
TBT, implantation loss, embryo toxicity, mutagenesis, MMS, rat

Abstract:
Tributyl tin chloride (TBT) was administered orally to pregnant rats at 0, 4, 8 or 16mg/kg/day for 4 days from day 0 to 3 of pregnancy to allow the preimplantation embryos to be exposed to TBT. As the positive control, methyl methane sulfonate at 50mg/kg/day was similarly treated to the pregnant rats. In order to warrant genetical homogeneity, inbred strain of Wistar Imamichi rat were used in this experiment. Mother rats were allowed to deliver the pups and nurse them by 6 days after parturition. On the day, the animals were sacrificed and the liver and gonad (testis for male and ovary for female) were excised for DNA extraction. Extracted DNA was amplified according to selected micro-satellite markers by PCR and possible variation in the marker pattern was checked. Twenty microsatellite markers were selected. Of these, 8 markers showed some degree of variations in DNA extracted from the gonads in TBT and MMS treated groups. The frequency was around 1/64 to 5/101. Two external malformations were detected in 76 pups in MMS treated group, although no abnormality was observed in TBT treated groups. Therefore, the variation in microsatellite patterns in TBT group was concluded to be recessive mutation. DNA samples from dam and sire rats, and those from negative control did not show any variations in the pattern of microsatellite markers examined, indicating homogeneous genetical back ground of the inbred strain of the rat. The fact that the variations were detected only in the DNA form the gonad could not omit the possibility that recessive mutation would occur in the germ cells, although the exact mechanisms was not known. The present result would also suggest that a known effect of TBT, the implantation loss may result from TBT's adverse effects on early embryos.

Ⅱ-4．指定研究結果の評価

Ⅱ-3．指定研究結果報告について内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会の委員　による評価を行った。

Ⅱ-5．公募研究の実施

以下に定める委員からなる専門委員会を設置し、公募研究の募集を行い研究課題の選定（１回開催）と研究成果の確認（１回開催）を行った。

Ⅱ-5-1．内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会名簿

委 員 長　高杉　　暹（横浜市教育委員会委員長）
委　　員　有薗　孝司（熊本県立大学教授）
井口　泰泉（岡崎国立共同研究機構教授）
近藤　健文（慶應義塾大学医学部教授）
堤　　　治（東京大学教授）
長濱　嘉孝（岡崎国立共同研究機構教授）
（行政側は、臨時委員とした。）

Ⅱ-5-2．公募採択結果

募集要領により公募研究の募集を行った結果、18課題の応募があり、内分泌攪乱化学物質等研究推進専門委員会にて研究課題の選定を行った結果、下記の４課題について採用した。

（１）内分泌攪乱化学物質のアンタゴニスト活性の評価とその作用メカニズムに関する研究
（２）化学物質のエストロゲン様作用における種間差の解明に関する研究
（３）エストロジェン様物質暴露によるメダカ精巣卵発現の精子形成に及ぼす影響の解明
（４）脳及び生殖腺の性分化に対する内分泌攪乱作用評価法に関する研究