

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ため、吸入曝露実験とそれに基づくリスク評価が必要である。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) 精巣毒性、(2) 次世代影響の検討を行った。

(1) DEHP 吸入曝露により、コントロール群と曝露群で体重の差は見られなかったが、4週間曝露と8週間曝露で血漿テストステロン濃度も有意に高く、精巣重量は、4週間曝露では有意ではないが曝露群で重い傾向に、8週間曝露で有意に重かった。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。4週間曝露雄ラットの精巣組織像では、個体差が多く、明らかな差は見られなかったが、曝露群でも成熟増が観察された。8週間曝露ではコントロール群と曝露群で差は見られず、成熟した組織像が見られた。4週齢幼若ラットへの DEHP 吸入曝露により、内分泌への影響が示唆された。

(2) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目での雄仔ラットの精巣組織テストステロン濃度は、有意ではないが、減少傾向に、精巣合成酵素 mRNA 発現量は、曝露濃度依存性に、有意に減少した。母には有意な影響は見られなかった。

生後 2, 7, 14 日目の雄仔ラットの体重、AGD、AGD / 体重には、成長に伴う変化が認められた。この変化が成長に伴う変化なのか、DEHP による変化なのか、今後、成長後の精巣、テストステロン濃度などを検討し、評価する予定である。

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 助教授)
西條 泰明 (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や、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。一方、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。実際、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。動物実験では、臓器障害として、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、平成 14 年度は、DEHP 吸入曝露実験により、体内動態、生殖毒性、次世代影響について検討を行った。今年度は、DEHP の吸入曝露による影響として、経口投与で報告されている精巣毒性、さらに次世代影響についても検討を行った。

B. 研究方法

1. 実験動物

実験動物は Wistar 系ラットを用いた。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. 幼若雄ラット精巣への影響に関する検討

4 週齢のオス Wistar 系ラットに、特殊吸入曝露装置を用いて、曝露濃度を $0 \text{mg} / \text{m}^3$ (コントロール) $5 \text{mg} / \text{m}^3$ 、 $25 \text{mg} / \text{m}^3$ の 3 点・各 6 匹ずつに、6 時間 / 日 (週 5 日) 4 週間曝露、8 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、精巣を摘出した。血液は、血漿分離され、RIA によるテストステロン濃度測定、EIA による LH 濃度測定まで、 -80°C で凍結保存した。また、左側精巣は、重量計測後、ブアン固定し、組織標本を作製した。右側精巣は、液体窒素により凍結し、RNA 抽出まで -80°C で保存した。

検討項目は、雄ラット（8週令、12週令ともに）体重、精巣重量、精巣上体重量、精嚢重量、前立腺重量、精巣組織、血漿テストステロン濃度、血漿 LH、血漿 FSH、精巣テストステロン合成酵素 mRNA、である。

統計解析は、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、妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

曝露（1）:

妊娠 Wistar 系ラットはプラグ確認日を 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 mg/m³ (高濃度)、5 mg/m³ (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、帝王切開を行った。胎子は精巣の確認によって、雌雄を確認し、精巣は RIA によるテストステロン濃度測定、RNA 抽出まで -80 で保存した。母ラット、雄仔ラットは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）

雄胎子：体重、AGD 測定、精巣組織テストステロン濃度、精巣テストステロン合成酵素 mRNA

統計解析は、一元配置分散分析（ANOVA）で検定した。

曝露（2）:

吸入曝露（1）と同じ条件で、コントロール、25 mg/m³ (高濃度)、5 mg/m³ (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。曝露終了後、雄ラットを 12 週令まで飼育し、精巣への影響を検討する。現在は、生後 14 日(PND 14)で飼育中である。

(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

() 幼若雄ラット精巣への影響

曝露濃度の実測値は、5mg / m³群で 5.1 ± 1.3mg / m³、25mg / m³群で 24.6 ± 5.2 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群で有意な差はみられなかった。(表 1)

精巣重量、精巣上体重量、前立腺重量は 4 週間曝露群、8 週間曝露群ともに有意な差はみられなかったが、精嚢重量は、コントロールに比べて、4 週間曝露群では有意ではないが、精嚢重量が重い傾向にあり (P=0.06)、8 週間曝露群の 5mg / m³・25mg / m³曝露群で有意に重かった (P<0.001) (表 2)

血漿テストステロン濃度は、コントロールに比べて、4 週間曝露 5mg / m³曝露群で有意に高濃度、25mg / m³曝露群で有意ではないが高く、8 週間曝露 5mg / m³・25mg / m³曝露群で有意に高かった (図 1)

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 発現量は、4 週間曝露群、8 週間曝露群ともに差はなかった (図 2, 3)

精巣組織について、Society of Toxicologic Pathology が提唱している評価基準 (Toxicologic Pathology

2002;30:507-520)により分類した。サンプル数が少なく、個体差が大きいため生物学的に有意な変化であるかどうかについては断定できなかったが、曝露群で成熟した精巣もみられた(表3, 図4, 5)。8週間曝露群の精巣組織像には、コントロール群との差は見られず、成熟した組織像がみられた。

血漿 LH 濃度は、有意な差は見られなかったが、4週間、8週間曝露群でコントロールより高い傾向にあった($P=0.14$) (表4)。

() 妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄仔ラット精巣への影響

曝露濃度は 25 mg/m^3 、 5 mg/m^3 に設定をしていたが、曝露期間中実際のチャンバー内濃度は、平均 $19.7 \pm 3.2 \text{ mg/m}^3$ 、 $2.9 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$ であった。

吸入曝露(1)

母ラットへの影響:

妊娠 19 日目の曝露終了時の体重に、コントロール群と曝露群で有意な差は見られず、肝臓重量は減少傾向が、子宮重量は増加傾向があったが、有意差は認められなかった(表5)。

胎仔への影響:

妊娠 19 日目の胎仔の体重、胎盤重量、体長、尾長、AGD / 体重の値に有意な差はみとめられなかった(表6)。精巣重量にも有意な差はなかった(表7)。精巣組織中のテストステロン濃度は、曝露濃度依存性に減少傾向にあったが、有意差は無かった(図6)。精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量は、曝露濃度依存性に有意差をもって減少した($P < 0.05$)(図7)。

吸入曝露(2)

雄ラットの体重、AGD を生後 1, 7, 14 日で、測定した(表8)。生後 1 日目の体重、AGD の長さでは有意な差はなかったが、AGD / 体重値が、 25 mg/m^3 曝露群で有意に大きかった($P < 0.05$)。生後 7 日目の体重、AGD の長さでは有意な差はなかったが、AGD / 体重が、 5 mg/m^3 曝露群で有意に大きかった($P < 0.01$)。生後 14 日目の体重、AGD は、濃度依存性に有意に小さかった($P < 0.05$)。AGD / 体重に有意な差は見られなかった。

D. 考察

() DEHP 吸入曝露による精巣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を有すると考えられている。

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)や、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、これら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かった。そこで、我々は、 5 mg/m^3 、 25 mg/m^3 の 2 点の濃度で吸入曝露実験を行い、幼若雄ラットの精巣への影響と、妊娠期曝露による雄仔ラットへの影響の検討を行った。

今回の実験では、過去の DEHP 経口投与の報告で見られた、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、4週間曝露終了後(8週齢)の体重にはコントロールと曝露群の有意な差は見られなかったが、血漿テストステロンは曝露群では有意に高濃度であり、精巣重量が重い傾向にあったこと、また、8週間曝露終了後(12週齢)も血漿テストステロン濃度が曝露群で

有意に高濃度であったこと、精囊の重量が有意に重かったことから、抗アンドロゲン作用とは逆の影響を与えることが示唆された。

今回の実験で、DEHP 経口投与での作用であると考えられている抗アンドロゲン作用と異なった結果が示唆されたことには、従来の報告とは曝露経路が異なることが一つの原因と考えられる。経口投与により、DEHP は消化管でリパーゼによって MEHP に代謝され、腸管から吸収される。一方、Pollack(1985)らは、経口投与と経動脈、経腹腔内投与による代謝の違いを検討した結果、経口投与の80%はすみやかに MEHP に変換されるが、経動脈、経腹腔内投与では、1%だけが MEHP に変換される、と報告している。現在級謬曝露での代謝の報告は無いが、吸入曝露も、肺を経て直接血流にのり、代謝されるので、経口投与と比較して体内の MEHP 濃度が低い (DEHP 濃度が高い) ことが予測される。精巣の影響は MEHP によるということが報告されているが、経口投与ではない場合には、DEHP そのものや、MEHP 以外の代謝物は、別の作用を持つ可能性があると考えられる。

血漿テストステロン濃度に差が見られた原因について今回の実験では、血漿 LH の濃度に差が見られず、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量に差が見られなかったことから、今回の実験では、明らかではない。曝露終了後の体重に差は見られなかったため、単なる体重など発育の差の結果とは考えづらいため、今後の検討課題である。

() DEHP 吸入曝露による次世代影響

妊娠ラットへの吸入曝露により、低濃度群 (実測値 $3\text{mg}/\text{m}^3$) でも、経胎盤性に胎仔に移行し、胎仔の精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量を濃度依存性に減少させ、精巣組織のテストステロン濃度に影響を与えることが示唆された。また、その影響を受けた雄ラットの AGD に影響を及ぼすことが示唆された。

Benson(2000)らは、妊娠ラットへの妊娠 12 日～21 日までの経口投与 ($100\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) では、出生した雄ラットの血清 LH 濃度が減少することにより、血清テストステロン濃度が減少すると報告している。今回の実験では、LH は測定していないので明らかではないが、LH の影響も受けている可能性も考えられる。

Gray(2000)らは、妊娠ラットへの妊娠 14 日から生後 3 日までの DEHP 経口投与 ($750\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$) を行ったところ、曝露群で、精巣重量の減少と、生後 2 日目での AGD の減少を報告している。今回の実験では、精巣重量に差は認められず、生後 1 日目の AGD は、 $5\text{mg}/\text{m}^3$ 群で有意に長く、生後 7 日目の AGD は、曝露群で有意に長かった。しかし、生後 14 日目になると、曝露群で体重の減少と、AGD の減少が見られ、成長に伴う変化が見られた。

経胎盤性の胎仔期曝露の精巣への影響は、経口投与による場合には、DEHP の抗アンドロゲン作用であると考えられているが、生後 1 日、7 日における AGD / 体重の結果が逆の作用を示唆された。生後 14 日目の AGD は、抗アンドロゲン作用の結果を示し、成長に伴う変化が見られた。AGD の増加が、一時的なものなのか、内分泌攪乱作用の結果なのか、現時点では不明であるが、可能性として経胎盤性による血液を介した曝露、胎内での羊水中に排泄された MEHP による曝露、出生後の経母乳性の曝露に違いがある可能性が考えられる。

胎仔期に DEHP を経胎盤性に曝露された結果、精巣組織中のテストステロンや、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量に変化が見られた。雄ラットの成長を追うために、曝露 (2) では、生後 21 日目での体重、AGD の測定を行い、さらに、成熟後の血清テストステロン濃度や、LH 濃度、精巣へ、どのような影響を及ぼすのか検討する計画で研究を進めている。

E. 結論

今まで殆ど行われていなかった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。

4週齢の幼若雄ラットへのDEHP4週間吸入曝露により、テストステロン濃度を上昇させ、精嚢重量を増加させるという、従来の、経口投与による抗アンドロゲン作用とは異なる結果となった。今後、この内分泌攪乱のメカニズムの解明についての検討を行うことが課題である。

妊娠ラットへの18日間吸入曝露により、高濃度群(実測値 $20\text{mg}/\text{m}^3$)でも、低濃度群(実測値 $3\text{mg}/\text{m}^3$)でも、胎子の精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量を濃度依存性に減少させた。精巣組織のテストステロン濃度に影響を与えた。また、雄ラットのAGDに影響した。

フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)の吸入曝露での現在の作業現場における許容濃度は $5\text{mg}/\text{m}^3$ であるが、それよりも低い濃度 ($3\text{mg}/\text{m}^3$) においても今回の検討で影響が見られた。今後、更に幼若ラット、妊娠ラットの次世代影響について検討を進める必要がある。