

### 3. 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。また、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について述べたものであり、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) 次世代影響、(2) 幼若雌ラットの生殖内分泌系への影響、について検討を行った。

(1) 妊娠初期から後期までの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目での雄胎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、減少傾向が見られた。また、精巣合成酵素 mRNA 発現量は、DEHP 曝露濃度依存性に、有意に減少した。母ラットでは、DEHP 吸入曝露による有意な影響は見られなかった。さらに、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露による雄仔ラット生殖器の成熟への影響を調べたところ、8 週齢における精巣重量がコントロール群と比較して 5 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群で有意に高いこと、12 週齢における前立腺重量が 5 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群で有意に低いことが認められた。

(2) 幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露によって、膻開口の日齢を早めることが明らかになった。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加しており、幼若期における DEHP の吸入曝露は性周期に影響を与えていると考えられる。さらに DEHP 吸入曝露によって、エストラジオールの産生に必要なアロマターゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られたが、血清エストラジオール量には、DEHP 吸入曝露によって減少傾向はみられるものの、有意差は認められなかった。今後、エストラジオールの代謝に関わる 17β-HSD IV などへの DEHP 吸入曝露による影響を明らかにし、幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露が生殖内分泌系への影響の機構を検討していく必要がある。

#### 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）  
森 ゆうこ（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）  
坂 晋（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）  
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）

#### 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であるので、①油分を多く含む食品の梱包により、成分が食品中に溶出し、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。

大気中において、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は  $0.038\sim 0.79 \mu/m^3$ 、フタル酸ジブチル (DBP) は  $0.017\sim 0.37 \mu/m^3$  (環境庁 1997) 存在することや、一般人口において、DEHP の 1 日あたりの最大曝露量は  $2 mg/m^3$  であるという報告 (ATSDR 1993) もある。また、現在の産業現場における基準として、許容濃度は  $5 mg/m^3$  に設定 (日本産業衛生学会、ACGIH TLV) されている。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の報告 (1999 年) もあり、フタル酸による生体への悪影響が疑われている。

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、生殖毒性に関して、妊娠ラットへの曝露実験における、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、前立腺重量減少といった報告がある。また、発達毒性に関して、生育遅延も報告されている。さらに、その親油性から、神経障害を指摘する報告もある。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、経口投与による肝への障害が多く報告されている一方、吸入曝露における肺と肝の cytochrome P450 への影響を検討したところ、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存在するようであるが、詳しく分かっていないのが現状である。

そこで、本研究では、現在までほとんど行われてこなかった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を目的とした。平成 13 年度は、吸入曝露を行うための曝露装置を作製し、平成 14 年度は、DEHP 吸入曝露による体内動態、生殖毒性、次世代影響についての検討を行い、平成 15 年度は、DEHP の吸入曝露による精巣毒性、次世代影響についての検討を行った。今年度は、次世代影響についての検討を昨年度に引き続いて行うとともに、幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露による内分泌系への影響について検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 実験動物

妊娠ラットは、Wistar 系ラットを用いた。幼若雌ラットは、Wistar-imamichi ラット、日齢 21 日に離乳した雌ラットを用いた。妊娠ラット、幼若雌ラットはともに三協ラボサービス (日本エスエルシー株式会社) より購入した。

### 2. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

#### ① 妊娠ラットへの曝露による母ならびに雄胎仔への影響

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。妊娠ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m<sup>3</sup> (コントロール)、5 mg/m<sup>3</sup> (低濃度)、25 mg/m<sup>3</sup> (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を妊娠 2 日目から 19 日目まで行った。曝露最終日に、曝露終了後、帝王切開を行い、胎仔を取り出した。胎仔は、精巣の確認によって、雌雄を確認した。精巣は、RIA によるテストステロン濃度測定、RNA 抽出に用いるまで -80°C で凍結保存した。母ラット、雄胎仔ラットはそれぞれ以下の項目について検討を行った。

- ・母 : 体重、妊娠黄体数、着床数、胚の生死および各組織 (卵巣、子宮、肝臓) 重量
- ・雄胎仔 : 体重、胎盤重量、体長、尾長、AGD 測定、精巣重量、精巣組織テストステロン濃度および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) によって検定した。

## ② 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラットの生殖器成熟への影響

上記①と同様に、妊娠 Wistar 系ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m<sup>3</sup> (コントロール)、5 mg/m<sup>3</sup> (低濃度)、25 mg/m<sup>3</sup> (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を妊娠 2 日目から 19 日目まで行った。曝露終了後、雄胎仔を 8 週齢ならびに 12 週齢まで飼育した後、体重、各組織 (精巣、精巣上体、精嚢、前立腺) の測定を行い、検討した。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) によって検定し、有意差がみられたものについては、Scheffe の多重検定を行った。

## 3. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響に関する検討

A) 日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m<sup>3</sup> (コントロール)、5 mg/m<sup>3</sup> (低濃度)、25 mg/m<sup>3</sup> (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を日齢 84 日まで 9 週間行った。毎日午前 9 時から 10 時の間に体重、膣開口およびスメアを検査した。曝露終了後、発情終止期を認定した後、エーテル麻酔を行い、心採血し、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) を摘出した。血液は、血漿分離され、FSH、LH、estradiol 濃度測定まで、-80°C で凍結保存した。卵巣は重量計測後、液体窒素により -80°C で凍結保存した。

検討項目は、体重変化、膣開口の日齢および体重、スメアの確認による一回目の発情期の日齢および体重、性周期の変化、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) 重量、血清 FSH、LH、estradiol 濃度、卵巣中の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、Student-Newman-Keuls の多重比較を行った。また、共分散分析 (ANCOVA-GLM) で調整し、Bonferroni の多重比較を行ったものについては、表中に明記した。

B) 日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットを 30 匹 (遺伝的素因をできるだけ均一にするため、7 匹の母ラットから同腹仔 30 匹を用意した) を 0 mg/m<sup>3</sup> (コントロール)、5 mg/m<sup>3</sup> (低濃度)、25 mg/m<sup>3</sup> (高濃度) の 3 点・各 10 匹ずつ分配した。ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、それぞれの濃度で 6 時間/日の条件で、DEHP 吸入曝露を 6 時間/日 (週 5 日) の条件で、日齢 42 日まで 3 週間行った。毎日午前 9 時から 10 時の間に体重、膣開口、スメアおよび食餌量、飲水量 (曝露 1 日目から 2 日目の間の食餌量、飲水量を 1 日目とした) を検査した。曝露終了後、エーテル麻酔を行い、心採血し、各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) を摘出した。血液は、血漿分離され、FSH、LH、estradiol 濃度測定まで、

-80°Cで凍結保存した。左側卵巢は重量計測後、液体窒素により-80°Cで凍結保存し、子宮ならびに右側卵巢は、顕微鏡観察に用いるために、固定液（70%ピクリン酸飽和水溶液、25%ホルマリン、5%酢酸）で固定し組織標本を作製した。

（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. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

DEHP曝露濃度の実測値は、5 mg/m<sup>3</sup>群で2.9±0.9 mg/m<sup>3</sup>、25 mg/m<sup>3</sup>群で19.7±3.2 mg/m<sup>3</sup>であった。

#### ① 妊娠ラットへの曝露による母ならびに雄胎仔への影響

##### ・母ラットへの影響

妊娠19日目のDEHP吸入曝露終了時の体重においては、コントロール群とDEHP吸入曝露群では有意差は認められなかった。また、コントロール群と比較してDEHP吸入曝露群において、肝臓重量では減少傾向、子宮重量では増加傾向がみられたが有意差は認められなかった（表1）。

##### ・胎仔への影響

妊娠19日目のDEHP吸入曝露終了時における胎仔の体重、胎盤重量、体長、尾長およびAGD/体重の値においては、コントロール群とDEHP吸入曝露群で有意差は認められなかった（表2）。また、精巣重量においても、両者の間で有意差は認められなかった（表3）。精巣組織中のテストステロン濃度においては、DEHP吸入濃度依存的に減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった（図1）。また、精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量は、DEHP吸入曝露濃度依存的に有意に減少した（P<0.05）（図2）。

#### ② 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラットの生殖器成熟への影響

DEHP吸入曝露された妊娠ラットより産まれた雄仔ラットの体重については、8週齢において5 mg/m<sup>3</sup> DEHP吸入曝露群と比較して25 mg/m<sup>3</sup> DEHP吸入曝露群では有意に低かった（P<0.05）が、12週齢における体重差に有意差は認められなかった（図3）。各有性生殖器（精巣、精巣上体、精囊、前立腺）重量については、8週齢における精囊重量がコントロール群と比較して5 mg/m<sup>3</sup> DEHP吸入曝露群で有意に高いこと（P<0.05）、12週齢における前立腺重量が5 mg/m<sup>3</sup> DEHP吸入曝露群と比較して25 mg/m<sup>3</sup> DEHP吸入曝露群で有意に低いことが認められた（P<0.05）（表4）。

### 2. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響

A) DEHP曝露濃度の実測値は、5 mg/m<sup>3</sup>群で4.1±0.1 mg/m<sup>3</sup>、25 mg/m<sup>3</sup>群で19.8±0.4 mg/m<sup>3</sup>であった。

#### ① 思春期発来への影響

DEHP吸入曝露群（5 mg/m<sup>3</sup>と25 mg/m<sup>3</sup>）における膣開口と1回目の発情期の日齢は、コントロール群と比較して有意に低かった（膣開口：P<0.05、1回目の発情期の日齢：P<0.05）。また、膣開口と

1 回目の発情期における体重においても、DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) は、コントロール群と比較して有意に低かった (膣開口時の体重 :  $P<0.05$ 、1 回目の発情期における体重 :  $P<0.05$ ) (表 5)。

## ② 体重変化

DEHP 吸入曝露 24 日目以降において、 $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意に低かった ( $P<0.05$ )。また、 $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意な差は見られなかったが、低い傾向にあった (図 4)。

## ③ 性周期の変化

ラットは通常、1 サイクル 4 日間 (発情前期、発情期、発情後期、間期を各 1 日) の性周期を繰り返す。 $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群、 $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群およびコントロール群の性周期を比較したところ、 $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が  $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群やコントロール群と比較して有意に高かった ( $P<0.05$ ) (表 6、図 5)。なお、ラットにおける異常性周期とは、1 サイクルが 5 日以上あるいは 3 日以内の場合、1 サイクル 4 日であってもサイクル中に異常が見られる場合である。

## ④ 各臓器重量の変化

各種臓器 (子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺) の重量を計測したところ、DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) では、腎臓の重量がコントロール群と比較して有意に低かった ( $P<0.05$ )。腎臓以外の臓器に関しては、有意な変化は見られなかった。しかし、共分散分析 (ANCOVA-GLM) によって体重を調節したところ、腎臓においても DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) とコントロール群では、有意な重量変化は見られなかった (表 7)。

## ⑤ 血清ホルモン値ならびに卵巣ステロイド合成酵素 mRNA 発現量の変化

血清エストラジオールは、コントロール群と比較して DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) では減少傾向が見られたが、有意差は認められなかった。また、血清 FSH は、コントロール群と比較して DEHP 吸入曝露群では増加傾向が見られたが、有意差は認められなかった ( $P=0.065$ )。血清 LH については、コントロール群と DEHP 吸入曝露群において、有意な変化は認められなかった (図 6)。

卵巣ステロイド合成酵素 mRNA 発現量について調べたところ、アロマターゼ mRNA 発現量では、コントロール群、 $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群と比較して  $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群では、それぞれ有意に増加していた ( $P<0.05$ ) (図 7)。

B) DEHP 曝露濃度の実測値は、 $5 \text{ mg/m}^3$  群で  $5.2 \pm 2.7 \text{ mg/m}^3$ 、 $25 \text{ mg/m}^3$  群で  $22.7 \pm 7.6 \text{ mg/m}^3$  であった。

## ① 思春期発来への影響

DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) における膣開口と 1 回目の発情期の日齢は、コントロール群と比較して有意に低かった (膣開口 :  $P<0.05$ 、1 回目の発情期の日齢 :  $P<0.05$ )。また、1 回目の発情期における体重においても、DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) は、コントロール群と比

較して有意に低かった ( $P<0.05$ )。さらに、膈開口における体重において、DEHP 吸入曝露群 ( $5 \text{ mg/m}^3$  と  $25 \text{ mg/m}^3$ ) は、コントロール群と比較して低い傾向が見られた (表 8)。

## ② 食餌量ならびに飲水量への影響

2-A-①でみられた体重変化が DEHP 吸入曝露による生理学的影響か、あるいは食餌量、飲水量などによる 2 次的な影響かを判断するために、DEHP 吸入曝露中の食事量ならびに飲水量を群別に調べた。その結果、食事量ならびに飲水量について、群別に有意な差は見られないことから、DEHP 吸入曝露による幼若雌ラットの体重減少には、食餌量ならびに飲水量は影響していないことが明らかとなった (図 8-11、表 9)。

## ③ DEHP 吸入曝露による幼若雌ラット子宮ならびに卵巣への影響

DEHP 吸入曝露による幼若雌ラット子宮ならびに卵巣への影響を評価するために、子宮ならびに卵巣の組織標本を作製し、現在、組織像の観察を行っている。また、卵巣中の各性ホルモン値についても、現在測定中である。

## D. 考察

### 1. 妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響

本研究において、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露により、妊娠 19 日目における次世代雄性ラットの P450<sub>scc</sub>、3- $\beta$ HSD、CYP17 などの精巣テストステロン合成酵素 mRNA 発現量が有意に低下することが明らかになった。また、妊娠 19 日目における次世代雄性ラットの精巣組織テストステロン濃度においても DEHP 濃度依存的に減少傾向が見られた。これまで、妊娠ラットへの経口投与実験においては、出生した雄胎仔の血清 LH が低下することによる血清テストステロンの低下が報告されている (Benson, 2000) が、今回の実験では、血清 LH を測定していないため、*in vivo* における DEHP による血清テストステロンの低下が血清 LH の影響を受けていることについて、確認することはできなかった。今後、血清 LH を測定することによって明らかにする必要がある。さらに、今回、影響の見られた DEHP 吸入曝露による P450<sub>cc</sub>、CYP17 などの mRNA 発現量は、 $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群においても有意な低下がみられた。 $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群の実測値は、 $2.9 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$  で、現在の労働現場の DEHP 許容濃度 (ACGIH、日本労働協会ともに  $5 \text{ mg/m}^3$ ) よりも低いため、今後、さらに幼若ラット、妊娠ラットの次世代影響における L $\ddot{O}$ AEL、N $\ddot{O}$ AEL について詳細な検討を進める必要があると考えられる。

さらに、妊娠ラットへの DEHP 曝露による雄仔ラット生殖器の成熟への影響を調べたところ、8 週齢における精囊重量がコントロール群と比較して  $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群で有意に高いこと、12 週齢における前立腺重量が  $5 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群と比較して  $25 \text{ mg/m}^3$  DEHP 吸入曝露群で有意に低いことが認められた。これらは、DEHP の経口投与実験 ( $750 \text{ mg/kg/day}$ ) で報告されてきたように、抗アンドロゲン作用の影響を受けているものと考えられる。このことは、妊娠ラットへの DEHP 吸入曝露により、比較的低濃度曝露でも、出生後の雄胎仔の生殖器の成熟に影響を与えることを示唆している。

### 2. 幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響

DEHP の生殖機能への影響に関しては数多く報告されているが、その多くは雄性への影響を調べたものであり、雌性への影響を調べたものは数少ない。また、DEHP 曝露実験の多くは、経口投与によ

る影響を評価したものであり、吸入曝露による影響を評価した報告も少ない。そこで、本研究は、幼若雌ラットを対象とした DEHP 吸入曝露実験を行うことにより、思春期発来ならびに生殖機能への影響を調べるために、A)の実験を行った。

性周期発来検定は、内分泌攪乱物のスクリーニング試験として推薦されている。今回の性周期発来検定では、DEHP 吸入曝露により思春期発来ならびに膣開口の日齢を早めることが明らかになった。ただし、今回の実験においては、性周期の発来時ではなく、発情終止期認定時に生理学的検査を行っているために、思春期早期発来の原因を特定することはできなかった。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加していることから、幼若期における DEHP の吸入曝露は雌の性周期に影響を与えていると考えられる。しかし、通常の動物用餌自体には植物性エストロゲンが存在する可能性もあり、検討する必要があると考えられる。

DEHP 吸入曝露によって、曝露 24 日目以降において、25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群の体重は、コントロール群の体重と比較して有意に低い結果が得られた。しかし、この原因として、DEHP 吸入曝露による生理学的影響ならびに食餌量、飲水量などを介した 2 次的な影響が考えられた。

そこで、思春期早期発来、膣開口などの原因を特定するために、生理学検査を曝露開始から 3 週間後に早めた B)の実験を行った。また、B)の実験では、体重変化の原因として食餌量、飲水量などが関係しているか調べるために、曝露期間中、群別に食事量ならびに飲水量を毎日検査した。その結果、曝露期間全体における食事量ならびに飲水量については、群別に有意な差は見られなかった。しかし、膣開口 (29-32 日齢) より前の時期においては、5 mg/m<sup>3</sup>ならびに 25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群の飲水量はコントロール群と比較して多い傾向が見られたことから、DEHP の経口曝露で見られるような PPAR を介した脂肪酸酸化への影響が、膣開口前の未成熟な段階で見られたと考えられる。しかし、膣開口前の未成熟な段階であっても、各曝露群とコントロール群で食餌量には有意な差が見られないことから、A)の実験で認められたような DEHP 吸入曝露による体重の減少に食餌量と飲水量は関係していないと考えられる。そのため、DEHP 吸入曝露による幼若雌ラットの体重変化は、脂肪酸によるものというよりも内分泌系などに影響を与えた結果である可能性が高い。また、体重で補正した場合、膣開口以後において、食餌量ならびに飲水量のばらつきが大きくなったが、この原因として、性周期が関与している疑いが挙げられる。B)の実験においても、DEHP 吸入曝露が思春期早期発来、膣開口へ有意に影響を与えていることを確認することができた。また、思春期早期発来、膣開口などの原因を特定するためのエストラジオール、FSH および LH などのホルモン値や卵巣中のステロイドホルモン合成酵素などの評価については、現在行っている段階である。さらに、卵巣、子宮への影響についても考慮する必要があると考え、卵巣、子宮については組織標本作製した。今後、これらの標本を顕微鏡で観察する予定である。

幼若ラットへの DEHP 経口投与実験においては、DEHP による血清エストラジオールの低下、性周期の延長が報告されている (Davis, 1994)。また、*in vitro* における実験より、DEHP の中間代謝物である MEHP が、DEHP とともに卵巣内の PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor)を活性化することにより、ステロイド合成酵素であるアロマターゼの活性ならびに mRNA 発現量を抑制し、エストラジオールの産生を低下させている (Lovekamp, 2001, Lovekamp-Swan, 2003)。また、PPAR の活性化は、エストラジオールをエストロンに変換する酵素である 17 $\beta$ -HSD IVの活性を上昇させて、エストラジオールの代謝を促進させる (Lovekamp-Swan, 2003)。しかし、今回の *in vivo* における幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露実験では、25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群においては、*in vitro* で見られた結果と異なり、アロマターゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られた。また、血清エストラジオール

量は、DEHP 吸入曝露によって減少傾向はみられるものの、有意差は認められなかった。これらの原因として、*in vivo* においては、アロマトラーゼ mRNA の発現量が亢進しているにもかかわらず、17 $\beta$ -HSD IVの活性が上昇しているためにエストラジオールの代謝が促進されており、血清エストラジオール量に有意な変化が見られないことが考えられる。本研究では、PPAR、17 $\beta$ -HSD IVについて調べることはできなかった。今後、DEHP 吸入曝露が PPAR から 17 $\beta$ -HSD IVへの経路に与える影響を明らかにしていくことが重要である。

また、その他に、*in vitro* で見られたアロマトラーゼ mRNA 発現量の有意な増加の原因として、経口投与と吸入曝露による投与経路の違いが挙げられる。経口投与では、投与された DEHP の約 80%は、速やかに腭液、腸内粘膜、肝、肺で多く分泌されるリパーゼにより MEHP に変換されるが、経動脈、経腹腔内投与では、わずか1%が MEHP に変換される (Pollack, 1985)。現在のところ、吸入曝露による DEHP 代謝に関する報告はほとんどないが、吸入曝露も肺を経て直接血流に乗って代謝されることから、経口投与と比較して MEHP 濃度が低いことが予想されている。そのために、吸入曝露による少量の MEHP はアロマトラーゼの活性を低下させ、そのフィードバックとしてアロマトラーゼ mRNA の発現量を増加させているために、血清エストラジオール量に有意な変化が見られないことも考えられる。今後、これらのことを明らかにするための詳細な実験が必要である。

## E. 結論

現在までほとんど行われてこなかった DEHP の吸入曝露により、妊娠ラットへの曝露による雄仔ラット精巣への影響ならびに幼若雌ラットの思春期の発来と生殖機能への影響について、検討を行った。

妊娠ラットへの 18 日間の吸入曝露によって、25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群 (高濃度群) においても 5 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群 (低濃度群) においても、雄胎仔の精巣 mRNA 発現量を DEHP 濃度依存的に低下させた。また、精巣組織テストステロン濃度にも DEHP 濃度依存的に低下させることを示唆した。

幼若雌ラットへの DEHP 吸入曝露によって、思春期の発来を早めることが示唆された。また、性周期に関しても、コントロール群と比較して 25 mg/m<sup>3</sup> DEHP 吸入曝露群では、異常性周期の割合が有意に増加しており、幼若期における DEHP の吸入曝露は雌の性周期に影響を与えていると考えられる。DEHP 吸入曝露によって、エストラジオールの産生に必要なアロマトラーゼ mRNA 発現量の有意な増加が見られた。今後、アロマトラーゼ mRNA の有意な増加が見られたにも関わらず、血清エストラジオール値の有意な変化が見られなかったことを踏まえて、17 $\beta$ -HSD IVなどのエストラジオールの代謝に関与する因子について、DEHP 吸入曝露による変動を詳細に研究していく必要がある。

最近、フタル酸類によるヒトへの影響の可能性が報告された (Swan, S. H., 2005)。この報告では、DBP や DEP などのフタル酸の尿中代謝物である MBP、MEP の濃度と男児の AGD に有意差が見られるのに対して、DEHP の尿中代謝物である MEHP の濃度と AGD には有意差が見られなかったと述べている。この原因として、DEHP を MEHP に代謝するリパーゼには、ラットなどのげっ鼠類とヒトでは種差が存在するために、ヒトでは、ラットと比較して DEHP による影響を受けにくいことが予想される。また、DBP、DEP の環境中濃度は、DEHP の環境中濃度と比較して数倍高いことが報告されており、DBP や DEP と比較して DEHP を正しく評価するのが難しいと考えられる。さらに、環境中 DEHP 濃度と妊婦尿中代謝物濃度を測定した報告 (Jennifer, J. A., 2003) では、尿中代謝物 MEHP の濃度が MBP など他の尿中代謝物濃度と比較してばらつきがあることから、ヒトにおける DEHP の代謝には個体差が存在する可能性がある。このため、DEHP による生体影響にも個体によって差が現れ

ることも十分考えられることから、DEHP の曝露によるリスク評価を今後も継続し、曝露影響、機序をさらに解明していく必要がある。