

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：82736

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15860

研究課題名（和文）ヒトの妊娠期におけるフタル酸エステル類の代謝変動と生物学的モニタリングへの応用

研究課題名（英文）Metabolic changes in pregnant women and application for the biomonitoring of phthalates

研究代表者

後藤 裕子 (Goto, Yuko)

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター（試験管理部、病理検査部）・その他部局等・室長補佐

研究者番号：80722090

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：フタル酸エステル類の次世代影響が動物実験・疫学研究において報告されている。本研究では、これらの適切な曝露評価と毒性評価のため、妊娠期における代謝変動及び血液の曝露モニタリングへの利用可能性を検討することを目標に、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)の代謝速度測定方法の酵素学的検討を行った上で、妊娠期の異なる妊婦血液におけるDEHP代謝速度を求めた。その結果、低濃度であればいずれの妊娠期においても血液をDEHPモニタリングに利用可能であった。また、DEHPの代謝速度測定方法をフタル酸ジブチルに応用し、検量線の直線性を認めたことから、引き続き妊婦での代謝を解明することが課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトにおけるフタル酸エステル類の代謝は肝臓や小腸などのいくつかの器官において行われるが、それらの代謝活性をヒトの臓器で直接計測することは倫理的に難しいことから、疫学研究や動物実験によるフタル酸エステル類の毒性の知見が収集されている。しかしながら、生物種によるフタル酸エステル類の代謝速度の違いも示されていることから、ヒトにおけるフタル酸エステル類の代謝を知るためには、ヒト試料を用いることが望ましい。本研究の結果により、ヒトの妊娠期のフタル酸エステル類の代謝状況が明らかとなり、ヒト母体中のフタル酸エステル類が胎児に与える影響との関連性がより鮮明となる。

研究成果の概要（英文）：Recently, phthalates, which are softener additives for plastics, were pointed out the effects for next generation in animal and epidemiological studies. The purpose of this study was elucidation of the metabolic changes for phthalates in pregnant women and the potential for exposure monitoring for the appropriate exposure evaluation. Therefore, the effects of temperature, incubation time and concentration on the metabolism in the blood collected from pregnant women of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) were tested. In the case of low DEHP concentration, the DEHP metabolic rate did not changed during pregnancy, indicating the possibility of DEHP exposure monitoring using the blood collected from pregnant women. In the future, this measurement method of DEHP metabolic rate is desired to apply other phthalates.

研究分野：環境衛生

キーワード：フタル酸エステル 妊婦 代謝速度

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

フタル酸エステル類は、樹脂を軟化させるために広く使用されている可塑剤で、塗料、顔料、接着剤、潤滑油の添加剤である (HSDB, 2001)。これらのフタル酸エステル類は高温下や脂溶性物質との接触により樹脂から溶出することから、ヒトは食物を介してフタル酸エステル類に曝露される (林ら、2014)。体内に入ったフタル酸エステル類は、小腸や肝臓等のリパーゼにより加水分解されモノエステルとなり、一部はグルクロン酸抱合を受けて尿や糞便中に排泄される。残りはさらに酸化された後にグルクロン酸抱合され尿中に排泄される (Nakajima et al, 2015)。これまでに、妊婦を含むヒトの尿や血液、母乳、羊水からもフタル酸エステル類やその代謝物が検出されている (Chen et al, 2008; Liou et al, 2014; Jensen et al, 2012)。

動物実験ではフタル酸エステル類が繁殖力の低下や精巣萎縮を引き起こすことが報告されている (Dobrzynska et al, 2012; Sharpe, 2001; Nakajima et al 2015)。疫学研究でも、男女ともに生殖器に対する影響が示唆されている (Benson, 2009; Hannon and Flaws, 2015; Mariana et al, 2016)。また、動物実験、疫学研究ともにフタル酸エステル類の妊娠期曝露による児への神経発達毒性を示唆する報告があることから (Komada et al, 2016; Doherty et al, 2017)、次世代影響が目玉され (Nakajima et al, 2015)、我が国ではエコチル事業により全国的な拠点調査も開始されている。

我々は胎児の DEHP 曝露量と甲状腺ホルモン濃度および精神発達との関係や臍帯血中のアディポカイン濃度および出生サイズとの関係について研究を進める中で (Jia et al, 2015)、活性代謝物であるフタル酸モノエチルヘキシル (MEHP) の血中濃度が妊娠期後半において低い可能性を報告している (Nakajima et al, 2015)。妊娠期の差異により代謝能が変化する場合、試料の採取時期により DEHP の曝露評価や毒性評価の結果が過大もしくは過小になる可能性が考えられた。DEHP の次世代への影響を明らかにするためには、まず児の母体である妊婦における代謝を検討し、適切な曝露評価を行うことが必須である。フタル酸エステル類の主要代謝臓器は小腸と肝臓であるが、ヒトのこれらを用いた研究は不可能である。一方で、フタル酸エステル類は血中でも代謝されるが、それ故に曝露量モニタリングに不適切との意見もある。しかしながら、血液における酵素反応速度論的検討 (至適温度や最大反応速度の 1/2 が得られる基質濃度である K_m 値など) はされておらず、不明である。

2. 研究の目的

比較的利用の可能性のある血液を用い、フタル酸エステル類の妊娠期における代謝変動を明らかにし、曝露モニタリングへの利用可能性を検討することを目的に、血中 DEHP 代謝の酵素反応速度論的検討を行い、妊婦の血液中的でのフタル酸エステル類の代謝速度を測定した。

3. 研究の方法

フタル酸エステル類のうち、代謝物の毒性が高い DEHP を対象として、血液における代謝速度の測定法を確立するため、まず DEHP の代謝反応温度 (4、25、37) と反応時間 (0、2、4、8、24 時間) との関連性を検討した。次に基質濃度 (4.7、9.4、19 μM) との関連性を検討した。最後に、妊婦の血液を用いて最終濃度 0.2 μM および 0.9 μM DEHP の代謝速度を求め、妊娠期 (前期: 23–31 週、中期: 32–34 週、後期: 35–41 週) による差異を検討した。

その後、他の主要フタル酸エステルとしてフタル酸ジブチル (DBP) の代謝速度測定に応用すべく、まず検量線の直線性を確認することとした。

4. 研究成果

培養温度と時間による DEHP 代謝の変化を検討した。DEHP を添加しない場合の MEHP 濃度は 4、25、37 のいずれの濃度でも 24 時間までの培養で 0 時間 (培養開始時) と変化は見られなかった。最終濃度 0.1 μM の DEHP を添加した場合、0 時間と 24 時間の MEHP 濃度は、4 では変化は見られなかったが、25 で 24 時間培養した場合に MEHP 濃度が有意に上昇し、37 では培養 8 時間と 24 時間で有意に上昇した (Dunnett test, $P < 0.05$)。これらの結果から、0.1 μM の DEHP の血中濃度では 37 で 4 時間までの培養では代謝が起きにくいと考えた。

血液に最終濃度 4.7–19 μM の DEHP を添加して 37 で 4 時間培養して得られた DEHP の代謝速度から Lineweaver-Burk plot を描き、最大反応速度 V_{max} およびミカエリス定数 K_m を求めたところ、 V_{max} は 2.34 $\text{nmol mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ 、 K_m 値は 25.4 μM であった。得られた K_m 値は先行研究による肝臓での DEHP に対する K_m 値と比較して高く (Ito et al, 2014)、血漿中の DEHP 濃度は 0.0358 μM との報告もあることから (Takatori et al, 2014)、血液の場合は特殊な高温度に放置しない限り血中の DEHP が代謝されることはないだろうと考えられた。つまり、

DEHP が低濃度であれば血液をモニタリングに利用することが可能であると考えられた。

最後に妊娠時期による代謝能変化を明らかにするため、妊娠前期、中期、後期に採取した妊婦の血液中での最終濃度 0.2 μM と 0.9 μM DEHP の代謝速度を求めた。0.2 μM DEHP を添加した血液の代謝速度はいずれの時期でも同様であったが、0.9 μM DEHP の代謝は 35–41 週の妊娠後期において低い傾向が見られた。結果として、いずれの濃度で添加した場合でも、妊娠時期による代謝能の有意な差は見られなかった。つまり、妊娠中のいずれの時期においても血液を DEHP 曝露モニタリングに利用することは可能であると考えられた。

その後、DEHP の代謝速度測定方法をフタル酸ジブチル (DBP) の代謝速度測定に応用するため、検量線を作成して分析を行ったところ、検量線の直線性が確認された。引き続き、DBP でも DEHP と同様の酵素反応速度論的検討を行い、妊婦での代謝変化を解明することが課題である。

<引用文献>

1. Benson R. Hazard to the developing male reproductive system from cumulative exposure to phthalate esters—dibutyl phthalate, diisobutyl phthalate, butylbenzyl phthalate, diethylhexyl phthalate, dipentyl phthalate, and diisononyl phthalate. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* (2009) 53: 90–101.
2. Chen J., Liu H., Qiu Z., Shu W. Analysis of di-n-butyl phthalate and other organic pollutants in Chongqing women undergoing parturition. *Environmental Pollution* (2008) 156: 849–853.
3. Dobrzyńska M. M., Tyrkiel E. J., Derezińska E., Pachocki K. A. Ludwicki J. K. Two generation reproductive and developmental toxicity following subchronic exposure of pubescent male mice to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* (2012) 19: 31–37.
4. Doherty B. T., Engel S. M., Buckley J. P., Silva M. J., Calafat A. M., Wolff M. S. Prenatal phthalate biomarker concentrations and performance on the Bayley Scales of Infant Development-II in a population of young urban children. *Environmental Research* (2017) 152: 51–58.
5. Hannon P. R., Flaws J. A. The effects of phthalates on the ovary. *Frontiers in Endocrinology*. (2015) 6:8. doi: 10.3389/fendo.2015.00008
6. 林由美, 伊藤由起, 那須民江. 胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露による低栄養環境と生活習慣病. *日本衛生学雑誌* (2014) 67: 22–25.
7. Hazardous Substances Data Bank. (2001) 339.
8. Ito Y., Kamijima M., Hasegawa C., Tagawa M., Kawai T., Miyake M., Hayashi Y., Naito H., Nakajima T. Species and inter-individual differences in metabolic capacity of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) between human and mouse livers. *Environmental Health and Preventive Medicine* (2014) 19:117–125.
9. Jensen M. S., Nørgaard-Pedersen B., Toft G., Hougaard D. M., Bonde J. P., Cohen A., Thulstrup A. M., Ivell R., Anand-Ivell R., Lindh C. H., Jönsson B. A.G. Phthalates and Perfluorooctanesulfonic Acid in Human Amniotic Fluid: Temporal Trends and Timing of Amniocentesis in Pregnancy. *Environmental Health Perspectives* (2012) 120: 897–903.
10. Jia X., Harada Y., Tagawa M., Naito H., Hayashi Y., Yetti H., Kato M., Sasaki S., Araki A., Miyashita C., Ikeno T., Kishi R., Nakajima T. Prenatal maternal blood triglyceride and fatty acid levels in relation to exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate: a cross-sectional study. *Environmental Health and Preventive Medicine* (2015) 20: 168–178.
11. Komada M., Gendai Y., Kagawa N., Nagao T. Prenatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate impairs development of the mouse neocortex. *Toxicology Letters* (2016) 259: 69–79.
12. Liou et al, Monitoring of PAEMs and beta-agonists in urine for a small group of experimental subjects and PAEs and beta-agonists in drinking water consumed by the same subjects. *Journal of Hazardous Materials* (2014) 277: 169–179.
13. Mariana M., Feiteiro J., Verde I., Cairrao E. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environment International* (2016) 94: 758–776.
14. Nakajima T., Hayashi Y., Ito Y. Prenatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate and subsequent infant and child health effects. *Food Safety* (2015) 3: 70–83.
15. Sharpe R. M. Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicology Letters* (2001) 120: 221–232.
16. Takatori S., Kitagawa Y., Kitagawa M., Nakazawa H., Hori S. Determination of di (2-ethylhexyl) phthalate and mono (2-ethylhexyl) phthalate in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, (2004) 804:

397-401.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤裕子、伊藤由起、内藤久雄、荒木敦子、岸玲子、 那須民江
2. 発表標題 妊婦血液中のフタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝
3. 学会等名 第28回環境化学討論会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	那須 民江 (Nasu Tamie)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------