

機関番号：30110

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19790408

研究課題名 (和文) 幼若期・妊娠期におけるフタル酸エステル吸入曝露による生殖系への影響と体内動態

研究課題名 (英文)

The effect of inhaled Di(2-ethylhexyl)phthalate exposed to prepubertal or pregnant female rats for the reproductive function and pharmacokinetics.

研究代表者 近藤 朋子

(KONDO TOMOKO)

北海道医療大学・薬学部・講師

研究者番号：70374254

研究成果の概要 (和文)：

フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) の吸入曝露による生殖への影響、特に生殖器官形成期である思春期前、次世代影響を明らかにする目的で、ラットを用いた吸入曝露実験を行った。幼若メスラットへの吸入曝露実験では、性周期に影響がでること、特に性周期の始まりとその後の生殖機能へ影響があることが明らかとなった。また、妊娠期吸入曝露による次世代影響の検討では、胎児期での体重、ホルモン濃度などに変化が認められた。

研究成果の概要 (英文)：

I evaluated the effects of inhaled Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on the reproductive of immature female rats and next-generation effects. It was cleared that DEHP exposure via inhalation for immature female rats may advance puberty onset and alter postpubertal reproductive functions. In the study of DEHP inhalation for pregnant rats, fetal body weight was decreased and fetal testicular testosterone concentration and the expression of mRNA were also decreased.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	0	2,000,000
平成 22 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学 ・衛生学

キーワード：フタル酸、DEHP、吸入曝露、生殖、毒性

1. 研究開始当初の背景

現在、内分泌かく乱化学物質に関して最も懸念されるのは、成人ではなく胎児や成長期といった感受性の高いいわゆる「Windows期」での影響である。特にフタル酸エステル類はプラスチック可塑剤として食品、化粧品など生活用品、輸血用バッグなどの医療器具に広く用いられ、様々な経路により曝露される可能性が指摘されている。フタル酸エステル類の中でも最も検出されるフタル酸ジエチルヘキシル (DEHP) は大気中にも存在し、ヒトの一日の最大曝露量は2 mg/m³と産業現場のTLV基準と近い値である。現在、DEHPの産業現場における基準は5mg/m³にされているが、内分泌かく乱化学物質の問題が出現する前の値であり、研究結果などを配慮した値ではない。特に疫学調査によると、プラスチック工場周辺に住むDEHPが高濃度の女性では妊娠合併症の割合が高いことから、急いで吸入曝露による影響を明らかにする必要があるが、未だに検討されていない。加えて、DEHPによるこれまでの研究では、肝毒性、生殖発生毒性、催腫瘍性などが疑われているが、この報告はいずれも成熟動物を用いた実験結果であり、思春期前の感受性が高い幼若期や胎児期曝露での影響については報告されていない。幼若期、胎児期における曝露影響、特に吸入曝露による影響を検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、DEHPの吸入による生殖への影響、特に生殖器官形成期である思春期前、次世代影響を明らかにする目的で、胎児期、離乳後の幼若ラットを用いた吸入曝露実験を行った。曝露影響を評価する場合、生殖器の奇形などの肉眼的な変化に焦点を当てた高用量のみの研究では、胎児期、幼若期曝露に関して正確な安全濃度を提示することが出来ない。そこで、濃度をヒトが実際に曝露される可能性があるバックグラウンドレベルに近い低濃度と、中濃度、高濃度の3点を設定し吸入曝露後、以下の検討を行った。

(1) 幼若期曝露による生殖器への影響：メスの子宮、卵巣の組織観察、膣開口時期、性周期と卵巣内ステロイド合成酵素mRNA発現とホルモン動態の測定により雌性生殖

器形成、成熟への作用の検討。

(2) 胎児期吸入曝露による影響：オス精巣内の精子形成の組織学的観察、ステロイド合成酵素mRNA発現、テストステロン、LH、FSH分泌の測定、DEHP吸入曝露による精巣内での雄性生殖器形成、成熟への作用の検討。

以上により、これまで明らかに出来なかったDEHPの吸入曝露による生殖器官形成期である思春期前、幼若期での影響、次世代影響を明らかにすることで、ヒトでの外挿を行う際の重要なデータが得られる。

3. 研究の方法

(1) 幼若メスラットにおける生殖機能の検討

21日齢のメスラットを用いて、22日齢から84日齢まで0, 5, 25 mg/m³のDEHP吸入曝露を1日6時間行い、以下の2つの検討を行った。

- ①膣開口後、膣スメアによる性周期への影響を49日齢から84日齢まで調べた。
- ②42日齢での体重、各臓器重量測定、EIAによる血清中ホルモン定量 (FSH、LH、テストステロン、エストラジオール)、血清中コレステロール定量、卵巣内での遺伝子発現の検討 (RT-PCR法)

(2) 妊娠中曝露による仔の生殖性への影響を特にオスラットについて検討した。妊娠2-19日まで0, 5, 25 mg/m³のDEHP吸入曝露を1日6時間連続して行い、以下の組織学的・分子生物学的検討を行った。

- ①曝露終了後、帝王切開を行い、精巣により雌雄の確認を行った。胎児の精巣は摘出し、RIAによるテストステロンの定量と遺伝子発現の検討として、精巣テストステロン合成酵素mRNA (P450scc、3β-HSD、CYP17、CYP19) 定量を行った。
- ②出生後の仔を生後1, 7, 21, 56, 84日で体重測定の後、血清中ホルモン定量、遺伝子発現の検討と組織学的検討を行った

統計解析は、二元配置分散分析 (ANOVA) により検定した。

4. 研究成果

(1) DEHP 吸入曝露による幼若メスラットへの外見上の影響は認められなかった。しかし、体重は DEHP 濃度依存的に減少していた。餌摂取量への影響も認められなかった。

①思春期における影響

曝露群において、メスラットの性周期に影響が認められた(図1)。とくに、性周期の発来である膣開口時期が DEHP 曝露群で濃度依存的に早まっていた。曝露群における LH、エストラジオールの濃度の有意な上昇が認められた(図2)。また、異常な性周期を示した曝露群では、血清コレステロールの減少やアロマターゼ (CYP19) mRNA 発現の上昇が認められた。

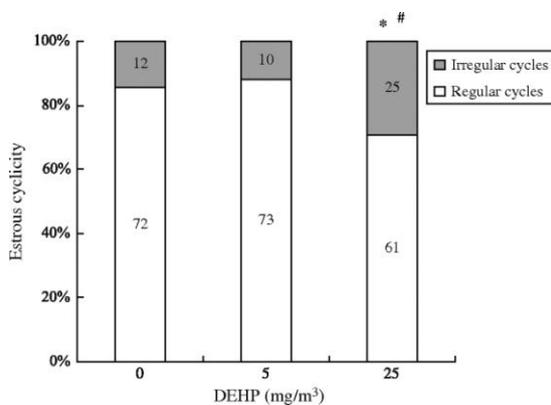


図1 生後49日から84日までの性周期正常周期は4日周期からなる。

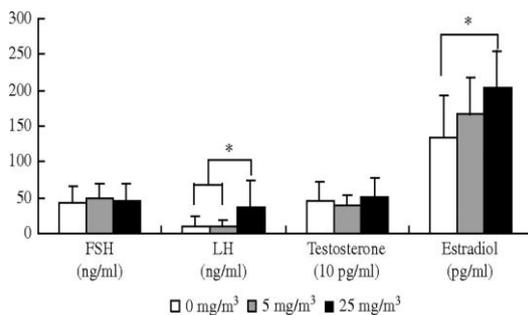


図2 血清中のホルモン濃度

幼若期曝露による影響では、性周期などに影響が出ることが明らかになった。しかしながら、低濃度曝露群(産業現場における許容濃度である5 mg/m³に設定した)では、今回の検討ではほとんど影響が認められなかったが、より詳細に検討していく必要があると思われる。

(2) 妊娠期の DEHP 曝露による次世代影響では、妊娠2-19日の間吸入曝露を行い、胎児、出生子の成長、成熟に関する検討を行い、以下のような影響が認められた。

①体重、生殖線重量、胎児数への有意な影響は認められなかった。また、胎児のオスにおいて、精巣中テストステロン濃度は、曝露濃度依存的に減少傾向にあった(図3)が、有意差はなかった。精巣テストステロン合成酵素mRNA発現(P450scc、3βHSD、CYP17、CYP19)は、曝露濃度依存的に有意差をもって減少していた(図4)。

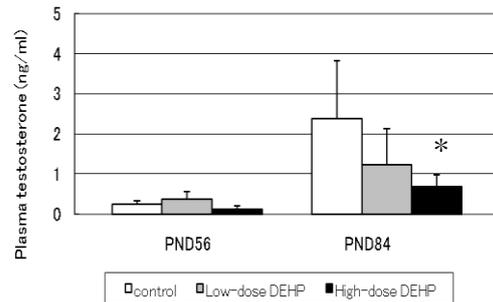


図3 妊娠2日-19日 DEHP 曝露による血清中テストステロンの変化

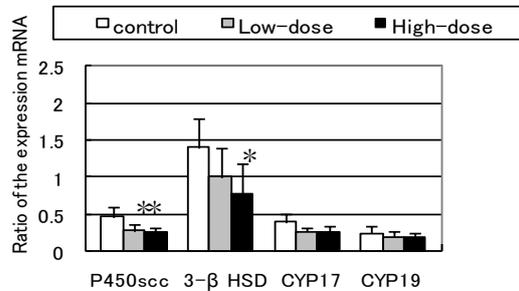


図4、妊娠期 DEHP 曝露後の胎児精巣中 mRNA 発現の変化

②出生後の仔の影響では、体重、精巣重量において高濃度群での低下が認められた。血清中テストステロンについても濃度依存的に低下していたが、血清中 LH、FSH については影響が認められなかった。遺伝子発現、組織観察についても、有意な影響は認められなかった。

妊娠ラットへの吸入曝露により、低濃度群でも、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 発現量を濃度依存的に減少させ、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。これまでの報告で、妊娠ラットへの経口投与により、出生した雄ラットの血清LH の減少による血清テストステロン濃度の減少が報告されている。本研究でも、LH の測定を行ったが、影響は認められなかった。また、胎仔期で見られたmRNA 発現量の低下が出生後では見られなかったが、有意差はないが減少傾向にある遺伝子も見られた。出生後の影響についてはさらに詳細に検討していく必要があると思われる。

これらの結果から、DEHP の幼若期、胎児期曝露により影響があること明らかとなった。特に、現在の産業現場における基準は、許容濃度が5mg/m³である。今回の実験により許容濃度と近い濃度においても影響があるということはとても重要な結果である。今後更に幼若期・次世代影響を詳細に検討していく他に、吸入曝露によるDEHP の体内での分布や標的器官における代謝についても検討していく必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① M Mingyue, T Kondo, S Ban, T Umemura, N Kurahashi, M Takeda and R Kishi、Exposure of Prepubertal Female Rats to Inhaled Di(2-ethylhexyl)phthalate Affects the Onset of Puberty and Postpubertal Reproductive Functions、Toxicol.Sci. 査読あり、93(1) 164-171 (2006)

[学会発表] (計 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 朋子 (KONDO TOMOKO)
北海道医療大学・薬学部・講師
研究者番号：70374254

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：