

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K10609

研究課題名（和文）胎児期・幼若期における環境因子/栄養因子の交互作用による雌性生殖発達攪乱の解明

研究課題名（英文）Disruption of female reproductive development by pDCB exposure during fetal and juvenile stages

研究代表者

坂 晋（Ban, Susumu）

鈴鹿医療科学大学・薬学部・准教授

研究者番号：30399828

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：女性生殖発達の攪乱は、多くの成人疾病（乳がん、子宮がん、メタボリックシンドローム等）のリスク要因であることが明らかとなっている。本研究は、女性生殖発達の攪乱因子として、最近の疫学研究で相次いで報告されているパラジクロロベンゼン（pDCB）に着目した。そして、内分泌かく乱化学物質などに対して最も脆弱な時期である胎児期・幼若期のpDCB曝露による雌性生殖発達の攪乱影響について調べた。その結果、胎児期pDCB曝露により、エストロゲン合成に関与する遺伝子群の発現量変化を伴った膣開口の早期化と異常性周期割合の増加、ならびに幼若期pDCB曝露による異常性周期割合の増加が起こることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の疫学研究により、pDCB曝露による女性生殖発達の攪乱影響が明らかとなっているにもかかわらず、pDCB曝露による雌性生殖発達の攪乱影響に関する動物実験等による基礎知見は非常に不足している。本研究による内分泌かく乱化学物質などに対して最も脆弱な時期である胎児期・幼若期におけるpDCB曝露による雌性生殖発達の攪乱影響に対する評価は、ヒト女性生殖発達の攪乱を解明するためのモデルを示すことができ、ヒト成人女性の疾病予防のための基礎知見を提供することが期待できるため、予防医学上重要である。

研究成果の概要（英文）：Disruptions in female reproductive development have been shown to be risk factors for many adult diseases, including breast cancer, uterine cancer, and metabolic syndrome. Paradichlorobenzene (pDCB), which has been reported successively in recent epidemiological studies, as a disruptor of female reproductive development. In this study, perturbation effect of pDCB exposure during the fetal and juvenile stages on female reproductive development was investigated. As a result, prenatal exposure to pDCB hastened the vaginal opening and increased the rate of abnormal estrogen cycle associated with changes in the expression levels of genes involved in estrogen synthesis, and it was found that pDCB exposure at the juvenile stage increased the rate of abnormal vaginal estrogen cycle.

研究分野：医歯薬学

キーワード：環境中毒 内分泌かく乱物質 次世代影響

1. 研究開始当初の背景

現在、多くの女性の初潮は13歳までに生じる。これは、1世紀前の16-17歳と比べて非常に早期化している。初潮の早期化や月経異常の増加など、女性生殖発達の攪乱は、多くの成人疾病（乳がん、子宮がん、メタボリックシンドローム、2型糖尿病等）のリスク要因であることが明らかとなっている。そのため、女性生殖発達の攪乱の原因を解明することは、女性における成人疾病の予防上重要であると考えられる。

女性生殖発達の攪乱には、主に胎児期・幼若期における社会経済因子、栄養因子の他、環境化学物質への曝露などが、視床下部-下垂体、卵巣、子宮などへの作用を介して、相互的に影響するが、その詳細は不明である。これまでも、動物実験等の基礎研究において、女性生殖発達の攪乱因子については各々検討されてきたものの、必要とされる知見は非常に不足している。

芳香族塩素化合物のパラジクロロベンゼン (*p*DCB) は、防虫剤や消臭剤などに使用され、その多くが環境中へ排出されている。*p*DCBはヒト体内へ吸収された後に、肝臓においてP450により主に2,5-ジクロロフェノール (2,5-DCP) に代謝され、尿中に排泄される。そのため、*p*DCBの曝露指標として尿中2,5-DCPが利用されている。また、6-8歳の女児を対象としたコホート研究により、尿中2,5-DCP濃度が高値であると初潮年齢が早期化することが明らかになるなど、2,5-DCPの尿中濃度と初潮早期化や卵巣成熟に関与するFSH量などとの関連が相次ぎ報告されている。このように、現在、日常レベルの*p*DCB曝露によるヒト女性生殖発達の攪乱が懸念されており、その詳細の解明が求められている。しかし、このようにヒトにおいて*p*DCB曝露による女性生殖発達の攪乱影響が明らかとなっているにもかかわらず、*p*DCB曝露による雌性生殖発達の攪乱影響に関する動物実験等の基礎知見は非常に不足している。特に、胎児期・幼若期は、内分泌かく乱化学物質などに対して最も脆弱な時期であることから、この時期における*p*DCB曝露による女性生殖発達の攪乱影響に対する評価は予防医学上重要である。

2. 研究の目的

本研究は、女性生殖発達の攪乱因子として、最近の疫学研究で相次いで報告されている*p*DCB曝露に着目し、内分泌かく乱化学物質などに対して最も脆弱な時期である胎児期ならびに幼若期に焦点をあててその雌性生殖発達の攪乱影響を明らかにすることを目的とした。女性生殖発達の攪乱は、多くの成人疾病のリスク要因であることが明らかとなっている。本研究による胎児期・幼若期*p*DCB曝露による雌性生殖発達の攪乱影響に対する評価は、ヒト女性生殖発達の攪乱を解明するためのモデルを示すことができ、ヒト成人女性の疾病予防のための基礎知見を提供することが期待できる。

3. 研究の方法

3-1 *p*DCB胎児期曝露による雌性生殖発達の攪乱影響

① *p*DCB胎児期曝露による8週齢時における影響

Wistar妊娠ラットを対照群、低曝露群 (2 mg/kg/day)、高曝露群 (20 mg/kg/day) の3群に分類し、妊娠1から20日目までパラジクロロベンゼンをそれぞれの濃度で胃管経口投与した。その後、出生した雌仔ラットについて、膣開口日を調べるとともに、以後の各日における性周期のステージ判定を行った。通常、ラットの性周期は1サイクル4~5日であり、本研究では1サイクルあたり4~5日の場合を正常周期、それ以外の場合を異常周期と判定した。また、出生56日目以降の最初の発情間に血液、下垂体と卵巣を採取した。その後、ELISA法により血清エストロゲン、LH、FSH量を測定するとともに、エストロゲンや卵巣ホルモンに関与する下垂体遺伝子 (*fshb*, *lhb*) や卵巣遺伝子 (*fshr*, *lhcg*, *star*, *cyp11a1*, *cyp17a1*, *cyp19a1*) の発現量変化をリアルタイムPCR法により調べた。

② *p*DCB胎児期曝露による4週齢時における影響

Wistar妊娠ラットを対照群、低曝露群 (2 mg/kg/day)、高曝露群 (20 mg/kg/day) の3群に分類し、妊娠1から20日目までパラジクロロベンゼンをそれぞれの濃度で胃管経口投与した。その後、膣開口前である出生28日目に血液、下垂体と卵巣を採取した。その後、ELISA法により血清エストロゲン、LH、FSH量を測定するとともに、エストロゲンや卵巣ホルモンに関与する下垂体遺伝子 (*fshb*, *lhb*) と卵巣遺伝子 (*fshr*, *lhcg*, *star*, *cyp11a1*, *cyp17a1*, *cyp19a1*) の発現量変化をリアルタイムPCR法により調べた。

3-2 *p*DCB幼若期曝露による雌性生殖発達の攪乱影響

4週齢の雌Wistarラットを対照群、低曝露群 (2 mg/kg/day)、高曝露群 (20 mg/kg/day) の3群に分類し、膣開口後、最初の発情期を1日目として胃管経口投与を3週間実施した。投与期間中の各日における性周期のステージ判定を行った。また、ELISA法による血清エストロゲン、LH、FSH量の測定、リアルタイムPCR法による下垂体遺伝子 (*fshb*, *lhb*) と卵巣遺伝子 (*fshr*, *lhcg*, *star*, *cyp11a1*, *cyp17a1*, *cyp19a1*) の発現量の測定を実施した。

4. 研究成果

4-1 pDCB 胎児期曝露による雌性生殖発達の攪乱影響

① pDCB 胎児期曝露による 8 週齢時における影響

出生した雌仔の膣開口日を調べたところ、高曝露群では平均 34.2 日であり、対照群の 35.6 日や低曝露群の 35.6 日に比べて有意に早くなった ($p < 0.05$)。また、低曝露群や高曝露群に比べて異常性周期の割合が有意に高くなることが明らかとなった (それぞれ $p < 0.01$) (表 1)。

8 週齢時における血清ホルモン量を測定したところ、高曝露群では対照群や低曝露群に比べて血清 LH 量が有意に低くなった ($p < 0.05$) (図 1)。また、高曝露群ならびに低曝露群の卵巣 *cyp19a1* の発現量が、対照群に比べて有意に低下していた (それぞれ $p < 0.05$) (図 2)。

表 1 pDCB 胎児期曝露による膣開口日と異常性周期の割合への影響

	Control (n = 27)	Low (n = 27)	High (n = 21)	p-value
Vaginal opening (day)	35.56 ± 1.80 ^a	35.59 ± 1.82 ^b	34.19 ± 1.94 ^{a, b}	0.018
Abnormal cycle ratio (%)	15.7 ± 12.8 ^{a, b}	29.0 ± 16.4 ^a	29.3 ± 22.4 ^b	0.008

図 1 pDCB 胎児期曝露による 8 週齢時の血清ホルモン量の変化

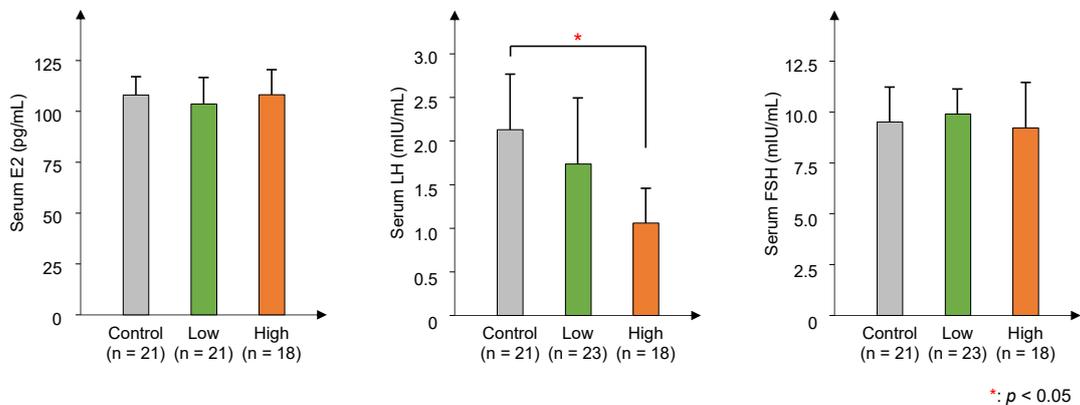
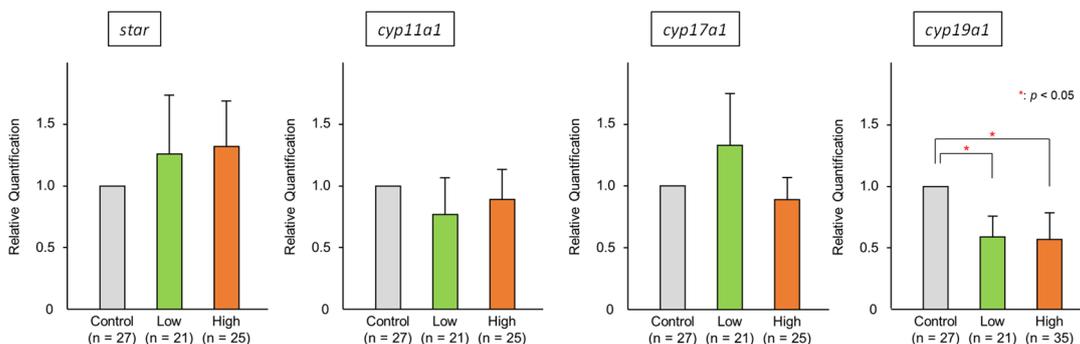


図 2 pDCB 胎児期曝露による 8 週齢時のエストロゲン合成に関与する遺伝子の発現量変化



② pDCB 胎児期曝露による 4 週齢時における影響

4 週齢時における血清ホルモン量を測定したところ、高曝露群では対照群や低曝露群に比べて血清エストロゲン量ならびに LH 量がそれぞれ有意に高くなった ($p < 0.05$) (図 3)。また、エストロゲン合成に関与する遺伝子の発現量を調べたところ、対照群に比べて高曝露群では卵巣 *cyp11a1* の発現量が有意に低下する一方で、*cyp17a1* と *cyp19a1* の発現量が、有意に低下していた (それぞれ $p < 0.05$) (図 4)。甲状腺ホルモンに関与する遺伝子においては、下垂体の *lhb* の発現量が対照群に比べて高曝露群で高くなる傾向が認められた ($p = 0.067$) (図 5)。

図 3 *p*DCB 胎児期曝露による 4 週齢時の血清ホルモン量の変化

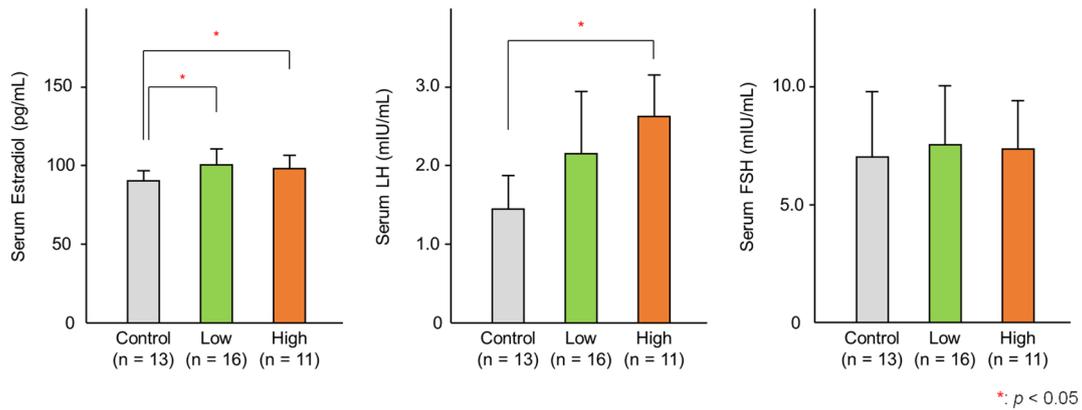


図 4 *p*DCB 胎児期曝露による 4 週齢時のエストロゲン合成に関与する遺伝子の発現量変化

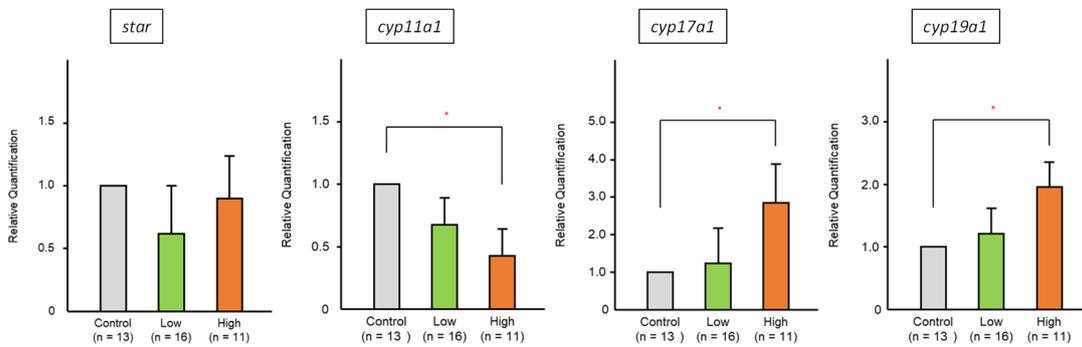
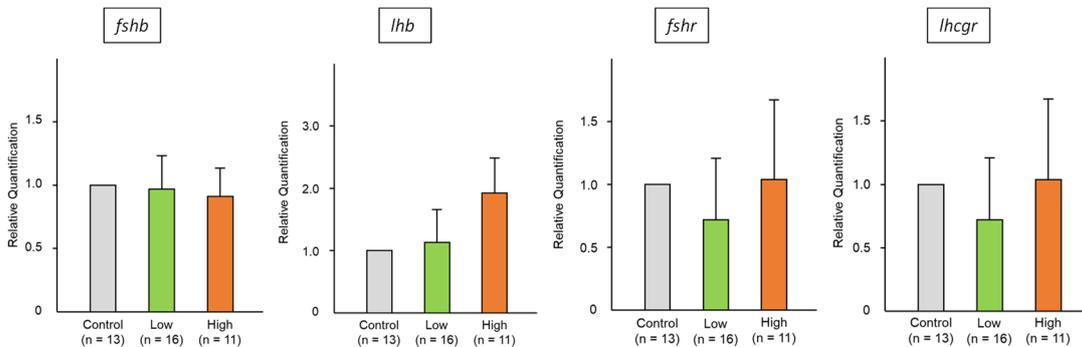


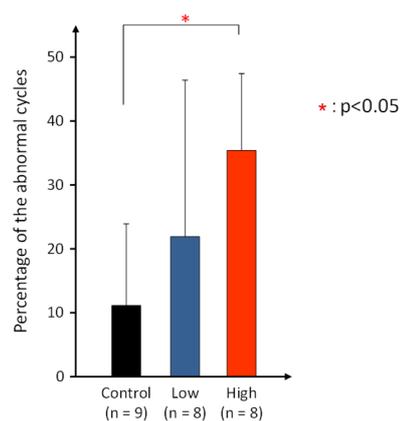
図 5 *p*DCB 胎児期曝露による 4 週齢時の下垂体ホルモンに関与する遺伝子の発現量変化



4-2 *p*DCB 幼若期曝露による雌性生殖発達の攪乱影響

*p*DCB 幼若期曝露により、高曝露群では対照群に比べてその割合が有意に高くなった ($p < 0.05$) (図 6)。また、高曝露群の卵巣 *cyp19a1* の発現量が、対照群に比べて有意に低下していた (それぞれ $p < 0.05$)。 *p*DCB 幼若期曝露による血清ホルモン量に変化は認められなかった。

図 6 *p*DCB 幼若期曝露による異常性周期割合への影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 坂 晋、原田 千里、佐藤 美来、水上 太我
2. 発表標題 胎児期パラジクロロベンゼン曝露による性成熟への影響
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂 晋、浜中 麻里奈、森 有里沙、二木 純平、堀谷 咲椋子、村木 麻美
2. 発表標題 幼若期パラジクロロベンゼン曝露による性周期への影響
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------