

学位論文題名

Exposure of Prepubertal Female Rats to Inhaled Di (2-ethylhexyl) phthalate Affects the Onset of Puberty and Postpubertal Reproductive Functions

(フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露による
幼若メスラット思春期発来と生殖機能への影響)

学位論文内容の要旨

背景と目的

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) はプラスチック可塑剤として広く使われており、プラスチック製品の低温焼却や、製品製造過程において、直接大気中へも放出されている。低い蒸気圧と低い水溶性のため、室外の DEHP の濃度は低いとこれまで考えられてきたが、室内環境では、ポリ塩化ビニル(PVC)を使っている家庭の製品、床-カバー、壁紙と電子製品による曝露を起こす可能性が高いことから、欧米ではフタル酸エステルは室内の主要な汚染物質と認められている。

疫学調査研究により、フタル酸曝露と少女の早熟との正の関連が指摘されている (Colon et al, 2000)。実験的には、DEHP をラットに経口投与し、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 et al, 1994)。しかし、環境と生体が最も接触するのは呼吸器では、食物や水などより、はるかに膨大な量の空気を取り入れているにもかかわらず、DEHP 吸入曝露についての報告はほとんどない。我々の研究室は、低揮発性化学物質吸入曝露装置を開発し、幼若期の雄ラットへの DEHP 吸入曝露では、血中テストステロンの増加、精巢の早熟化が起こることを明らかにした (Kurahashi et al, 2005)。しかし、雌ラットへの影響についてこれまで全く調べられていなかった。そこで、本研究は、幼若ラットを対象に DEHP 吸入曝露実験を行うことにより、雌の思春期発来ならびに生殖機能への影響とそのメカニズムを検討した。

方 法

<曝露条件>

実験 1

幼若雌ラットの思春期発来と生殖機能への影響に関する検討するため、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^3 、 5 mg/m^3 、 25 mg/m^3 の 3 段階の曝露濃度で各 10 匹ずつに、6 時間/日 (週 5 日) の条件で、DEHP 吸入曝露を 84 日まで、9 週間行った。

実験 2

思春期発来のメカニズムを検討するため、日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットに実

験 1 と同じ条件で、DEHP 吸入曝露を 41 日まで、20 日曝露を行った。

<測定項目>

毎日、体重、膣開口およびスメアを検査した。曝露終了後、エーテル麻酔を行った後、心採血し、各種臓器（子宮、卵巣、肝臓、腎臓、肺）の重量を測定した。採取した血液サンプルを用いて、血中性ホルモン濃度（FSH、LH、テストステロン、エストラジオール）及びコレステロール濃度を測定した。卵巣から抽出した RNA を用いて逆転写を行い、SYBR Green 法でステロイド合成酵素 mRNA 発現量を調べた。

結 果

実験 1

DEHP 吸入曝露 24 日目以降において、高濃度曝露群（25 mg/m³）の体重は、対照群（0 mg/m³）の体重と比較して有意に低かった。5 mg/m³ と 25 mg/m³ 両群ともにおける膣開口と 1 回目の発情期の日齢は、0 mg/m³ 群と比較して有意に早かった。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 曝露群は、0 mg/m³ 群と比較して有意に低かった。25 mg/m³ 群では、異常性周期の割合が 5 mg/m³ 群や 0 mg/m³ 群と比較して有意に高かった。血清ホルモン値に有意差は認められなかったが、卵巣ステロイド合成酵素のアロマターゼ（CYP19）mRNA 発現量は、0 mg/m³ 群、5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、それぞれ有意に増加していた。血清コレステロールは、DEHP 曝露群で、0 mg/m³ 群より有意に低かった。

実験 2

実験 1 と同様に膣開口は約 30 日で、思春期の発来が早期化していた。血清 LH、エストラジオールは、0 mg/m³ 群と比較して 25 mg/m³ では有意に増加したが卵巣ステロイド合成酵素 RNA 発現量に有意な変化は認められなかった。血清コレステロールは、DEHP 曝露群で、0 mg/m³ 群より有意に高かった。

考 察

本研究は、DEHP へ吸入曝露が雌生殖系へ影響を及ぼすことを証明した初めての報告である。幼若メスラットへの DEHP 吸入曝露により血中ホルモン濃度と総コレステロールの変化を伴った思春期の早期化、性周期の異常が示唆された。労働現場における環境基準は 5mg/m³ であるが、それと同じ濃度でも雌ラットの生殖機能に影響を与えることが明らかになった。メカニズムとしては、思春期前動物への短時間 DEHP 吸入曝露が、hypothalamic-pituitary-ovarian 軸機能に影響を及ぼし、雌の思春期のタイミングを変化させる可能性があると考えられる。思春期の開始を評価することは、環境と思春期の相互作用に影響する点において、遺伝的感受性高感度標識となる可能性があることが示唆された。

DEHP 経口投与では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が、本研究における吸入曝露では、血清エストラジオールは変化せず、むしろ性周期の短い性周期異常が認められるなど、経口とは異なる影響が明らかになった。経口では腸管において MEHP に代謝され、その後肝臓にて 2 次代謝を受け排泄されるが、吸入曝露の場合、腸肝循環を経ず、直接肺を通じて血中に取り込まれることから、経口曝露と吸入曝露の作用に対する違いは、体内での代謝と臓器への分布の違いに可能性がある。今後吸入曝露時の代謝と分布について検討すべきと考えられる。

本研究は、DEHP への曝露のタイミング、期間及びルートが DEHP によるステロイド生合成における曝露影響を決定する重要な因子である可能性を示唆する。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 岸 玲 子

学位論文題名

Exposure of Prepubertal Female Rats to Inhaled Di (2-ethylhexyl) phthalate Affects the Onset of Puberty and Postpubertal Reproductive Functions

(フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) 吸入曝露による
幼若メスラット思春期発来と生殖機能への影響)

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) はプラスチック可塑剤として子供用玩具、医療器具、建築材料、自動車用内装材などに幅広く使われている。室内環境では、ポリ塩化ビニル (PVC) を使っている家庭の製品、床-カバー、壁紙と電子製品などに含まれており曝露を起こす可能性が高いことから、欧米ではフタル酸エステルは室内の主要な汚染物質と認められている。疫学調査研究により、フタル酸曝露と少女の早熟との関連が指摘されている。実験的には、DEHP をラットに経口投与による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。しかし、環境と生体が最も接触する呼吸器では、食物や水などより、はるかに膨大な量の空気をとり入れているにもかかわらず、DEHP 吸入曝露についての報告はほとんどない。申請者らは、低揮発性化学物質吸入曝露装置を開発し、幼若期の雄ラットへの DEHP 吸入曝露によるテストステロンの増加、精巣の早熟化が起こることを明らかにした。しかし、雌ラットへの影響についてこれまで全く調べられていなかった。そこで、申請者らは、幼若ラットを対象に DEHP 吸入曝露実験を行うことにより、雌の思春期発来ならびに生殖機能への影響とそのメカニズムを検討した。

実験 1 では日齢 22 日の雌 Wistar-imamichi ラットに特殊吸入曝露装置を用いて、0 mg/m³、5 mg/m³、25 mg/m³ の 3 濃度を各群 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。また、実験 2 では同様の条件で DEHP 吸入曝露を日齢 41 日まで 20 日間行った。いずれの実験でも曝露期間中は連日、体重、膣開口および膣開口後は膣スメアを検査した。曝露終了後には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、重量を測定した。採取した血液サンプルを用いて、血中性ホルモン濃度 (FSH、LH、テストステロン、エストラジオール) 及びコレステロー

ル濃度を測定した。卵巢のサンプルから抽出した RNA を用いて逆転写を行い、SYBR Green 法でステロイド合成酵素 mRNA 発現量を調べた。

その結果、実験 1 で DEHP 吸入曝露 24 日目以降において、高濃度曝露群 (25 mg/m³) の体重は、対照群 (0 mg/m³) の体重と比較して有意に低く、低濃度曝露群 (5 mg/m³) でも低い傾向を示した。また、5 mg/m³ と 25 mg/m³ 両群ともに膣開口と 1 回目の発情期の日齢は、0 mg/m³ 群と比較して有意に早く、25 mg/m³ 群では、異常性周期の割合が 5 mg/m³ 群や 0 mg/m³ 群と比較して有意に高かった。さらに、血清ホルモン値に有意差は認められなかったが、卵巢ステロイド合成酵素のアロマターゼ (CYP19) mRNA 発現量は、0 mg/m³ 群、5 mg/m³ DEHP 吸入曝露群と比較して 25 mg/m³ DEHP 吸入曝露群では、それぞれ有意に増加していた。血清コレステロール値は、DEHP 曝露群で、0 mg/m³ 群より有意に低値を示した。実験 2 でも、実験 1 と同様に思春期の発来が早期化していた。また、血清 LH、エストラジオール値は、0 mg/m³ 群と比較して 25 mg/m³ では有意に増加したが卵巢ステロイド合成酵素 RNA 発現量に有意な変化は認められなかった。血清コレステロール値は、DEHP 曝露群で、0 mg/m³ 群より有意に高値を示した。

これらの結果は、思春期発来前ラットに DHEP を曝露すると思春期が早期化すること、曝露のタイミング、期間及びルートがステロイド生合成に大きな影響を与える可能性を示唆した。

口頭発表に際し、副査の吉岡教授から、「曝露期間により血清コレステロール値に及ぼす影響が異なることについてのメカニズム」に対する質問があった。次いで主査の水上教授から、「DEHP 曝露による思春期発来の早期化についてのメカニズムをどのように考えているか」、「思春期発来の早期化は、視床下部-下垂体の影響が考えられるということだが、具体的にどのように DEHP が視床下部に影響を与えているか」との質問があった。さらに、副査の岸教授から、「DEHP 室内曝露と子供のアレルギーとの関係が指摘されていることについて、動物実験などの知見をふまえたうえでの考え」、「本研究では、5mg/m³ の濃度で影響がみられている。ヒト、ラット、マーモセットなどの間で DEHP 代謝の種差を含め、現在の許容濃度を改正する必要性」についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づき、また文献的知識を引用し、誠実にかつ概ね適切に回答した。

この論文は、DEHP 吸入曝露が思春期前雌生殖系へ影響を及ぼすこと、またそのメカニズムを初めて明らかにしたことで高く評価された。また本研究は DEHP がヒトにおいても無視できない環境汚染物質であることを強く示唆した点で予防医学的に価値の高い論文である。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。