

B-3. DEHA の遅延型過敏症反応への影響

BALB/c マウス (6 週齢メス) に 5 週間、Low Dose 投与群は 10mg/kg/day、High Dose 群は 100mg/kg/day になるように DEHA をコーンオイルに混ぜたものを経口投与し、ヒツジ赤血球を腹腔内に注射し、さらに 1 週間後に後ろ足蹠の厚さを測定した後、足蹠にヒツジ赤血球を皮下注射し、24 時間後に足蹠の厚さを測定して足の腫れを算出した。さらに、脾臓、胸腺重量を測定し、FACS にてリンパ球サブセットの構成について解析を行った。

C. 研究結果

C-1. E-SCREEN Assay

DEHA の T47D 細胞の細胞増殖促進作用について図 1 に示す。DEHA には、非常に弱いながらもエストロゲン様活性がみられた。また、この活性はエストロゲンレセプターアンタゴニストによって抑制され、エストロゲンレセプターを介した作用であることが明らかになった。

C-2. 胎児期及び授乳期 DEHA 暴露仔マウスへの影響

DEHA 投与したマウスから生まれた仔マウスの体重は出生後離乳まで Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ変化はみられなかった (図 2)。生殖器重量に関しては、メスの子宮重量は Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ変化はみられなかったものの、オスの精巣は Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ有意に小さくなった (図 3)。また、胸腺重量は Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ変化はみられなかったものの、脾臓は Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ大きくなる傾向がみられた (図 4)。脾臓及び胸腺についてリンパ球サブセットの解析を行ったが、Low Dose 投与群、High Dose 投与群

ともに、コントロール群に比べ特に変化はみられなかった。

C-3. DEHA の遅延型過敏症反応への影響

足の腫れはコントロール群 0.272 ± 0.069 mm、Low Dose 投与群 0.405 ± 0.142 mm、High Dose 投与群 0.322 ± 0.111 mm で、DEHA 投与群はコントロール群に比べ、足が腫れる傾向にあることが明らかになった。胸腺重量、脾臓重量は、Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ変化はみられなかった。胸腺におけるリンパ球サブセットは、Low Dose 投与群、High Dose 投与群ともに、コントロール群に比べ $CD4^+CD8^+$ ダブルポジティブ細胞が増加し、 $CD4^+CD8^-$ ダブルネガティブ細胞が減少し、 $CD4^+CD8^+$ シングルポジティブ細胞が減少する傾向があった。また、脾臓においては、 $CD3^+CD4^+$ 細胞が増加し、 $CD19^+$ 細胞が減少する傾向があった (図 5)。

D. 考察

DEHA は、フタル酸エステル類同様に精巢毒性の可能性、さらに、免疫系に影響を及ぼす可能性もあると考えられる。したがって、DEHP の代替物質として DEHA を用いることには、さらに詳細な検討が必要と思われる。

E. 結論

DEHA は、*in vitro* の研究より、エストロゲン様作用が検出された。また、DEHA を投与したマウスから生まれた仔において、精巣重量の減少、脾臓重量の増加が見られた。さらに、DEHA を投与したマウスの胸腺及び脾臓の構成細胞の比率に変化を生じさせ、遅延型過敏症反応を強めた。

F. 健康危険情報

現在のところ、特になし。

G. 研究発表

学会発表

マクロファージ系培養細胞における内分泌攪乱化学物質の影響

加藤未歩、山崎聖美

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001.12.14-15、研究発表会要旨集、326, 2001.

アジピン酸ジエチルヘキシル(DEHA)の生体影響

川口研、山崎聖美、中澤裕之

第 4 回日本内分泌攪乱化学物質学会、つくば、2001.12.14-15、研究発表会要旨集、355, 2001.

H. 知的所有権の取得状況

特になし。

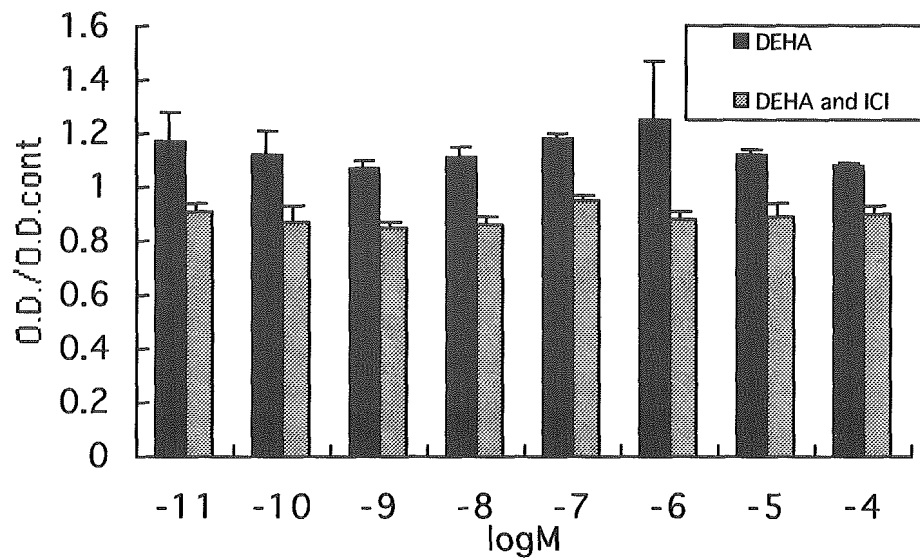


図1 DEHA の T47D 細胞増殖促進作用とエストロゲンレセプターアンタゴニストの効果

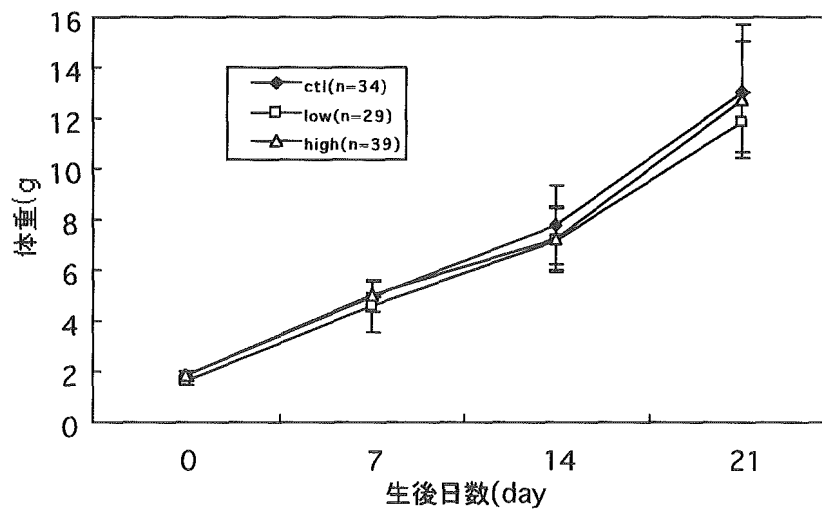


図2 DEHA 投与マウスから生まれた仔マウスの体重変化

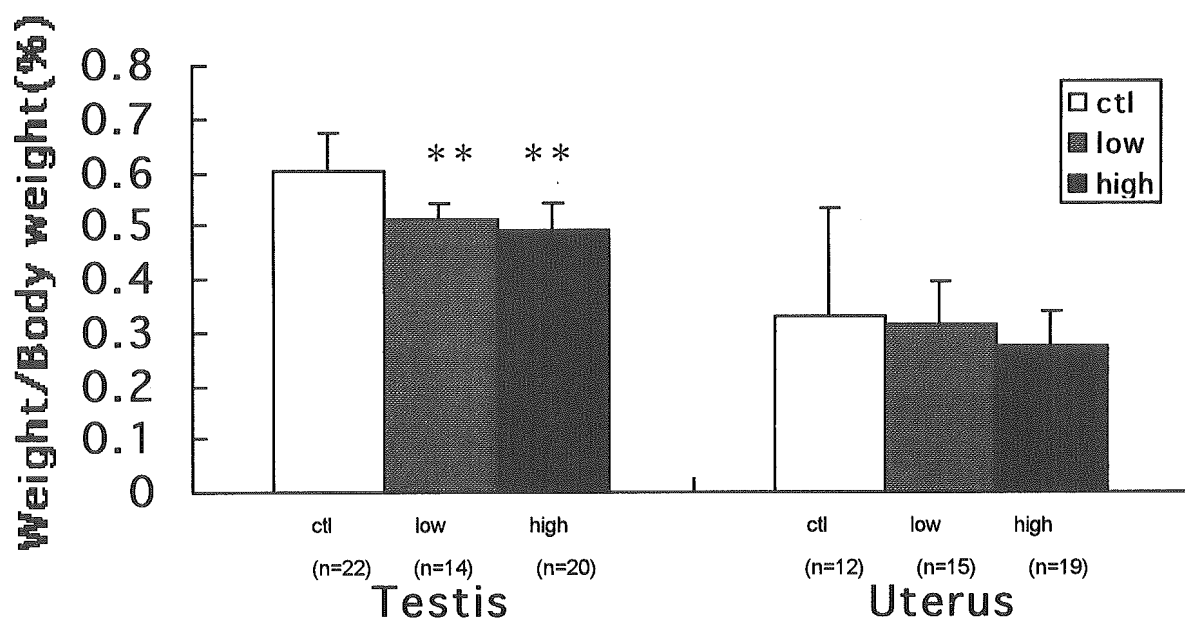


図3 DEHA 投与マウスから生まれた仔マウスの生殖器重量
** $p < 0.01$

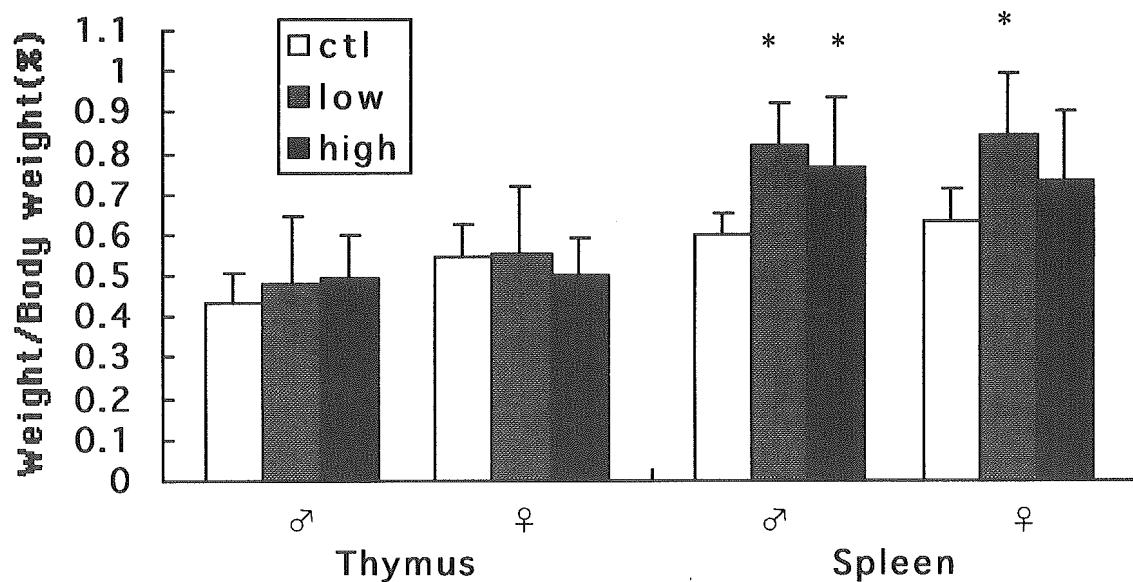


図4 DEHA 投与マウスから生まれた仔マウスの胸腺・脾臓重量
* $p < 0.05$

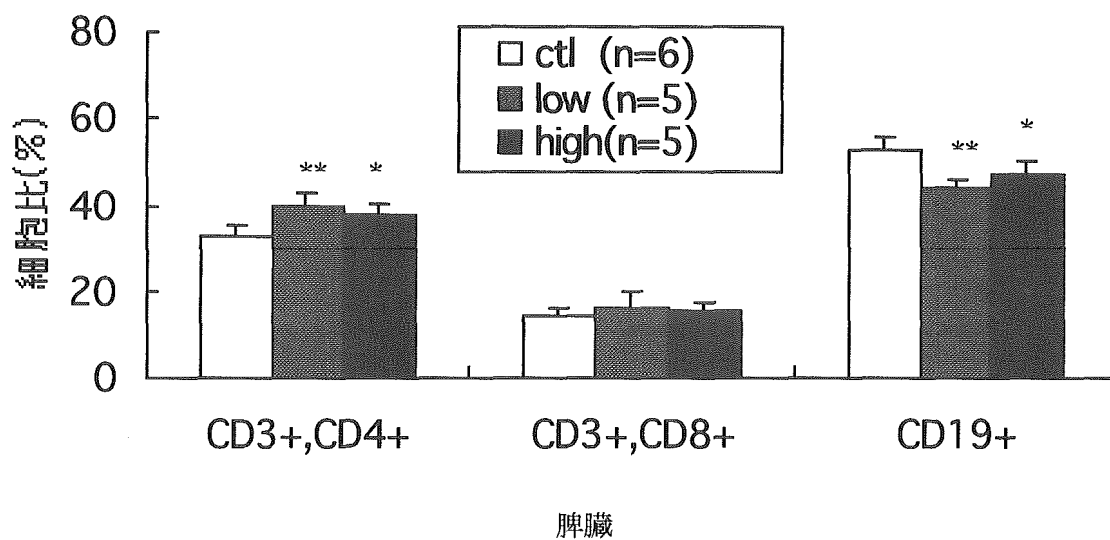
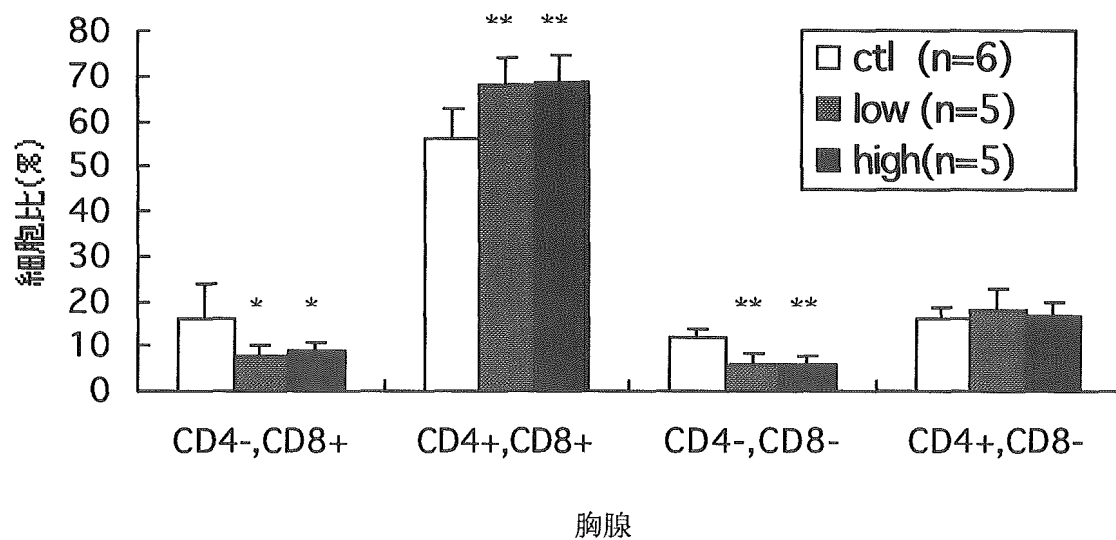


図5 DEHA 投与マウスの胸腺・脾臓におけるリンパ球サブセット構成比

* $p < 0.05$

** $p < 0.01$

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と

その実試料分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

医療用ポリ塩化ビニル製樹脂に含まれる可塑剤 Di (2-ethylhexyl) phthalate
の生殖系への影響

主任研究者	牧野 恒久	東海大学医学部
分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学
研究協力者	小林 直	星薬科大学
	吉村 吉博	星薬科大学
	加藤 嘉代子	星薬科大学
	井之上 浩一	星薬科大学

研究要旨

医療分野において幅広く使用され、高分子素材の重要な地位を占めているポリ塩化ビニル製樹脂は、種々の機能を付与させるため、様々な添加剤が用いられている。特に Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は、全可塑剤生産量の 50% 以上を占めている。本研究では PVC 製医療用具の安全性評価を目的に、DEHP の医療行為からの暴露を想定した生殖系への影響を検討した。投与計画は、DEHP 0.2 (Low-dose 群), 20 (Middle-dose 群), 200 (High-dose 群) mg/kg/day 及び 0.2% EtOH 生理食塩液 (Control 群) を尾静脈内投与とした。又、実験には、成熟期及び妊娠期マウスを利用した。その結果、DEHP は精巣の精母細胞に影響を及ぼすことより、精子形成を阻害すると推測された。又、この障害は Low-dose 群では一時的な影響であるが、Middle-dose 及び High-dose 群のような高濃度 DEHP は、精細管内の幹細胞にも影響し、精巣機能を障害することが推測された。妊娠中胎児の精巣器官形成期に DEHP に暴露された場合には、次世代の雄性生殖に影響を及ぼす事が観察された。この影響は性成熟する生後 9 週においても観察されたことより、生殖能に影響を与えることが推測された。

A. 研究目的

PVC は 1920 年代、アメリカにおいてその研究が始まり、1930 年代になって、工業生産が本格化した。当時の使用用途は、軟質シートや電線被覆材等の天然ゴムに対する代替用途が主で

あった。第 2 次世界大戦中、各国での天然ゴムの不足に対し、PVC の加工技術の向上を図り、フィルムやホース等の軟質製品から水道配管等の硬質製品に至るまで、その用途は拡大し、現

在では、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレンとともに高分子産業における重要な地位を占めている (Table 1).

PVC には、種々の機能を付与させるために様々な添加剤が用いられている。中でも、可塑剤はその利便性から、プラスチック添加剤として最も多く利用されている。その作用は、樹脂の分子間に入り込み、硬い網状構造の原因である分子間結合を弱め、柔軟な性質を与えることにある。この様な可塑剤には、フタル酸エステル類、リン酸エステル類、脂肪酸エステル類、アジピン酸エステル類等が挙げられる。特にフタル酸エステル類の使用が最も高く、Fig. 1 に示す Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は、全可塑剤生産量の約 50% 以上を占めている。

医療分野においても PVC は 1940 年代から利用されており、輸血輸液セット、血液バッグへの応用が進められてきた。特に、PVC は医療用樹脂として最も多く使用されており、近年、その生産量が増加しつつある (Table 1)。透明性、硬軟自由な製品が得られること、安価、化学的に安定、高圧蒸気滅菌に耐えること、軽量である、落下しても壊れない等の点から、その用途は輸血セット、血液バッグ、人工心肺、人工腎臓用の血液回路等として幅広く使用されている。

ベトナム戦争中、戦場で輸血を受けたアメリカ人負傷者が、肺ショックを引き起こした。その原因として、PVC 製の血液バッグから溶出したフタル

酸エステル類の影響が疑われた。フタル酸エステル類は、生殖・発生毒性を引き起こすことが明らかとされており、外因性内分泌攪乱化学物質として疑われている物質の 1 つである。2000 年 6 月、厚生省は DEHP を含む調理用 PVC 製手袋の使用を自粛するよう指導し、2001 年 7 月には PVC 製玩具への DEHP 及びフタル酸ジイソノニル (DINP) の使用を禁止した。食品分野における DEHP の規制により、医療分野においても、今後 DEHP を使用するにあたり、その安全性に対する見直しが必要である。そこで、PVC 製医療用具の安全性評価を目的に、可塑剤として多く添加されている DEHP の医療行為からの暴露を前提とした生体影響評価を行った。

はじめに、輸液や成分献血等の医療行為から DEHP が暴露することを想定し、DEHP の性成熟期雄性マウス投与における精巣への影響について検討した。更に、化学物質の感受性が高いと考えられる妊娠期投与による次世代への影響についても検討した。

B. 研究方法

B-1 試薬・試料

・DEHP は和光純薬社製を使用した。

組織切片染色

・Hematoxylin 染色には、リリーマイヤー Hematoxylin 液、病理研究用 (和光純薬社製) を使用した。

・Eosin 染色には、エオジン Y (Nacal tesque 社製) を使用した。

B-2 DEHP の投与

DEHP 0.2 (Low-dose 群), 20 (Middle-dose 群), 200 (High-dose 群) mg/kg/day 及び 0.2% EtOH 生理食塩液 (Control 群) を尾静脈内投与した。濃度の設定は, 2001 年 Food and Drug Administration (FDA) の報告を参考に, 各種医療行為 (輸液, 輸血, 経腸栄養等) によって, 成人が静脈投与により暴露される DEHP 摂取量を本検討の Low-dose 群に相当させ, その 100 倍を Middle-dose, 1000 倍を High-dose とした。

B-3 精巣内精子頭部数の測定 (SHC)

マウスより摘出した精巣の白膜を除去した後, テフロン製ホモジナイザーを用い, 生理食塩液中にてホモジナイズした。その後, 超音波破碎機器により, 45 秒間ソニケーションを行い, 細胞を粉碎した。ソニケーション耐性のアクロソーム (先体) の数を顕微鏡下で測定した。

B-4 精巣の組織切片の観察

マウスより摘出した精巣をブアン液 (飽和ピクリン酸水 150 mL + 中性ホルマリン 50 mL + 酢酸 10 mL) にて 24 時間固定し, その後, パラフィン包埋切片を調製して, ヘマトキシリン液とエオジン液 (1% エオジンアルコール 40 mL + 80% EtOH 120 mL + 酢酸 0.8 mL) により H. E. 染色を行った。

B-5 DEHP の性成熟期雄性マウス投与による精巣への影響

ICR マウス (6 週齢・雄) に DEHP を 3 日間, 尾静脈内投与し, 最終投与日から 11, 29, 56 日目に精巣への影響に

ついて, 精巣重量, 精巣内精子頭部数の測定 (SHC) 及び組織切片の観察により, 検討した (Fig. 2)。

B-6 DEHP の妊娠期投与による次世代影響

自由交配による妊娠マウス (ICR) に DEHP を妊娠成立 11 日目 (膣栓確認日を 0 日とする) から 4 日間, 尾静脈内投与し, その後自然分娩させた。出生仔はそのまま哺育させ, 仔の離乳にあたる生後 3 週目及び性成熟する生後 9 週目に精巣を摘出し, 次世代への影響を検討した (Fig. 3)。

C. 研究結果

C-1 DEHP の性成熟期雄性マウス投与による精巣への影響

DEHP 最終投与日から 11 日目に, 精巣重量及び SHC の減少が観察された (Fig. 4)。又, 組織切片において, 精細管内に (多核) 巨細胞が観察され, 精母細胞から減数分裂を経て, 精子細胞へ分化する段階に, DEHP が影響を及ぼすことが推測された。その後, 29 日目の観察では, DEHP による精巣への影響は認められなかった。しかし, 56 日目の観察において, Middle-dose, High-dose 群で SHC が減少し (Fig. 5), 組織切片上に, 精細管間隙の拡大が生じた。

これらの結果から, DEHP は精巣の精母細胞に影響を及ぼすことより, 精子形成を阻害すると推測される。又, この障害は Low-dose 群では一時的な影響であるが, Middle-dose 及び High-dose 群のような高濃度 DEHP は,

精細管内の幹細胞にも影響し、精巣機能を障害することが推測された (Table 2).

C-2 DEHP の妊娠期投与による次世代影響

母動物 (F0) に対する影響は観察されなかったが、出生仔 (F1) の生後 4 日生存率が DEHP 投与により低下した (Table 3). 離乳にあたる生後 3 週目、雄出生仔 (F1) の精巣重量において大きな影響は観察されなかったが、High-dose 群の精巣組織切片で、一部、精細管内に空胞化が観察された (Fig. 6). 又、性成熟に至る生後 9 週目の観察では、High-dose 投与群において、雄仔マウス精巣の SHC が有意に減少し (Fig. 7), 組織切片の観察により、一部、精細管内に空胞化が観察された。

これらの結果より、妊娠中の精巣器官形成期に DEHP に暴露された場合、次世代の雄性生殖に影響を及ぼすことが判明した。又、この影響は性成熟する生後 9 週においても観察されたことより、生殖能に影響を与えることが推測される。

D. 考察

近年、医療分野において汎用されている PVC 製医療用具から、可塑剤として使用される DEHP が溶出することが問題とされている。2001 年、FDA は各種医療行為によって静脈投与により暴露される DEHP 摂取量を報告し、DEHP の安全性について Tolerable Intake (TI) value (患者がある一定期

間に DEHP に暴露された時に副作用を生じないと推定される量) と比較した。しかし、これら TI 値の基準となる動物試験は、いずれも FDA の報告から考慮した DEHP 摂取量の 1000 倍以上とはるかに高い値での影響であり、安全性評価に対する再検討が必要である。本研究において、PVC 製医療用具から溶出する DEHP のヒト暴露量における雄性生殖機能への影響、次世代への影響について検討したところ、雄性生殖へ影響を及ぼすことが危惧される。

E. 結論

今後、PVC 製医療用具の使用にあたり、DEHP 代替物質の探索や可塑剤の溶出を抑制した新規医療用具の研究及び開発が必要である。

その方法として、1) トリメリット酸エステルのような DEHP 代替物質の使用 2) プラズマ処理コーティング 3) DEHP を含有しないポリブタジエン (PB) やポリエチレン (PE), シリコン製等への変更 4) 液に接触する内層に PVC 製以外の樹脂を使用した多層構造チューブの使用等が研究されている。又、これらの医療用具により、DEHP の溶出が抑制されることも報告されている。このように様々な対応が実施されているが、いずれの方法も数倍から数十倍のコストアップは避けられない。そこで、医療行為からの DEHP 溶出量の把握及び安全性評価に対し、現実を踏まえた評価法が必要である。本研究は FDA の報告を参考に、現実の医療行為からの暴露を想定した DEHP の生殖系

への影響を検討し、その目的にも応用
することができると考えられる。

F. 研究業績

第 122 年会日本薬学会；「ポリ塩化ビ
ニル製医療用具の安全性評価(第5報)
マウスに対する Di (2-ethylhexyl)
phthalate の妊娠期及び性成熟期投与
による影響」(2002)；小林 直, 佐藤麻
紀, 井之上浩一, 吉村吉博, 中澤裕之
(星薬大)熊坂謙一(神奈川県衛生研究
所)牧野恒久(東海大)

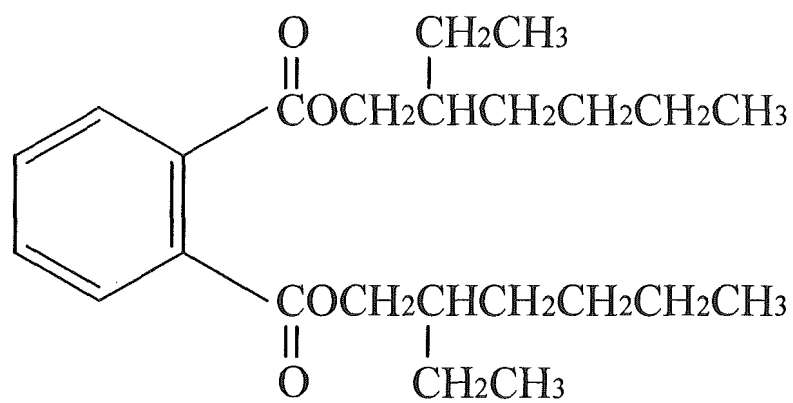


Fig.1 Structure of Di (2-ethylhexyl) phthalate

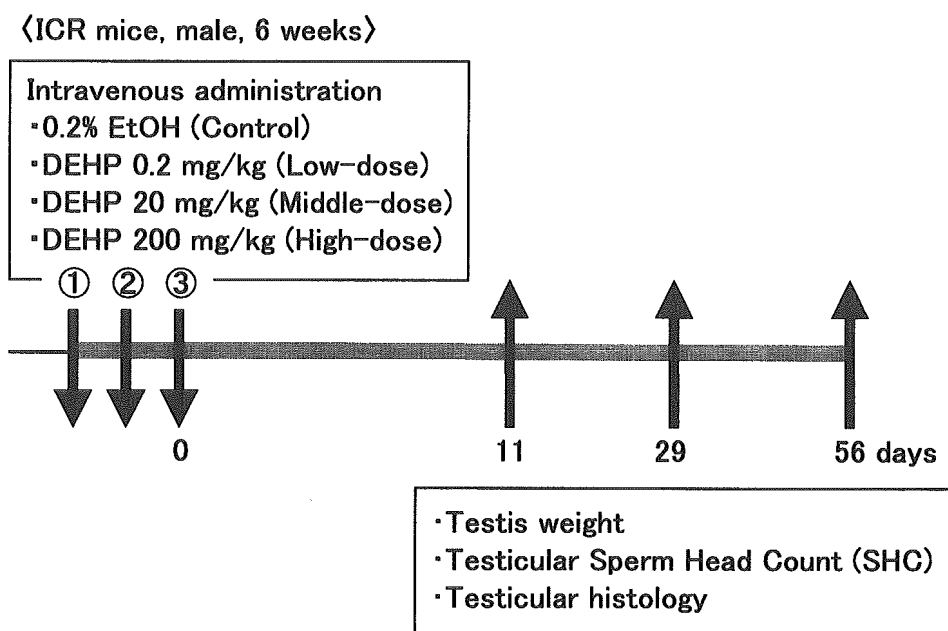


Fig.2 Experimental schedule

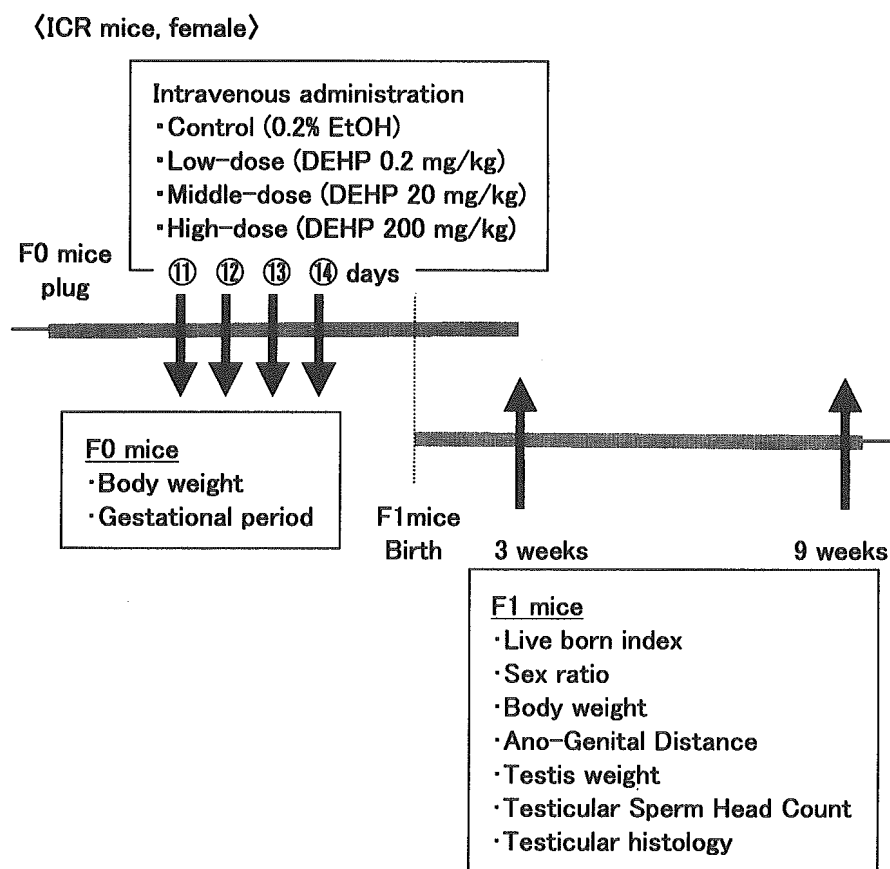


Fig.3 Experimental schedule

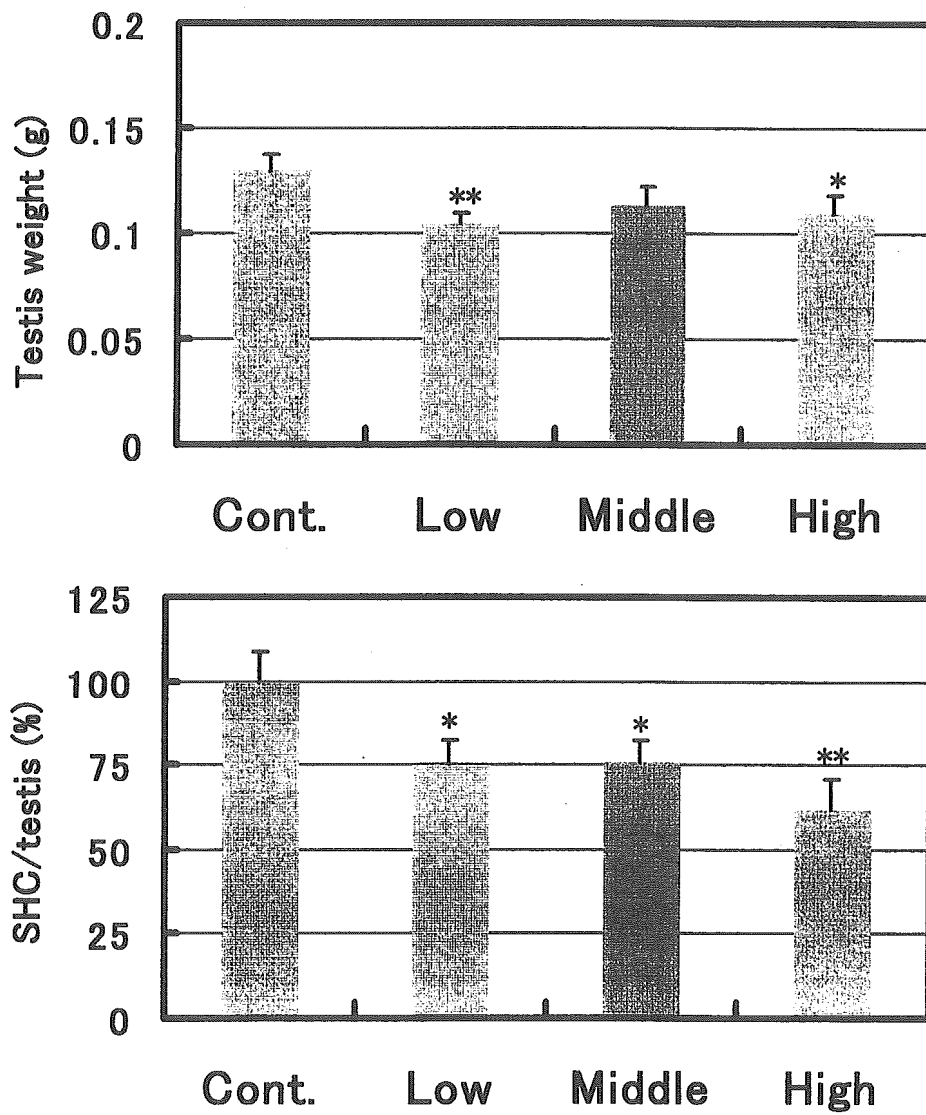


Fig.4 Testis weight and SHC on days 11

*** $P < 0.05$: significantly different from control value**

**** $P < 0.01$: significantly different from control value**

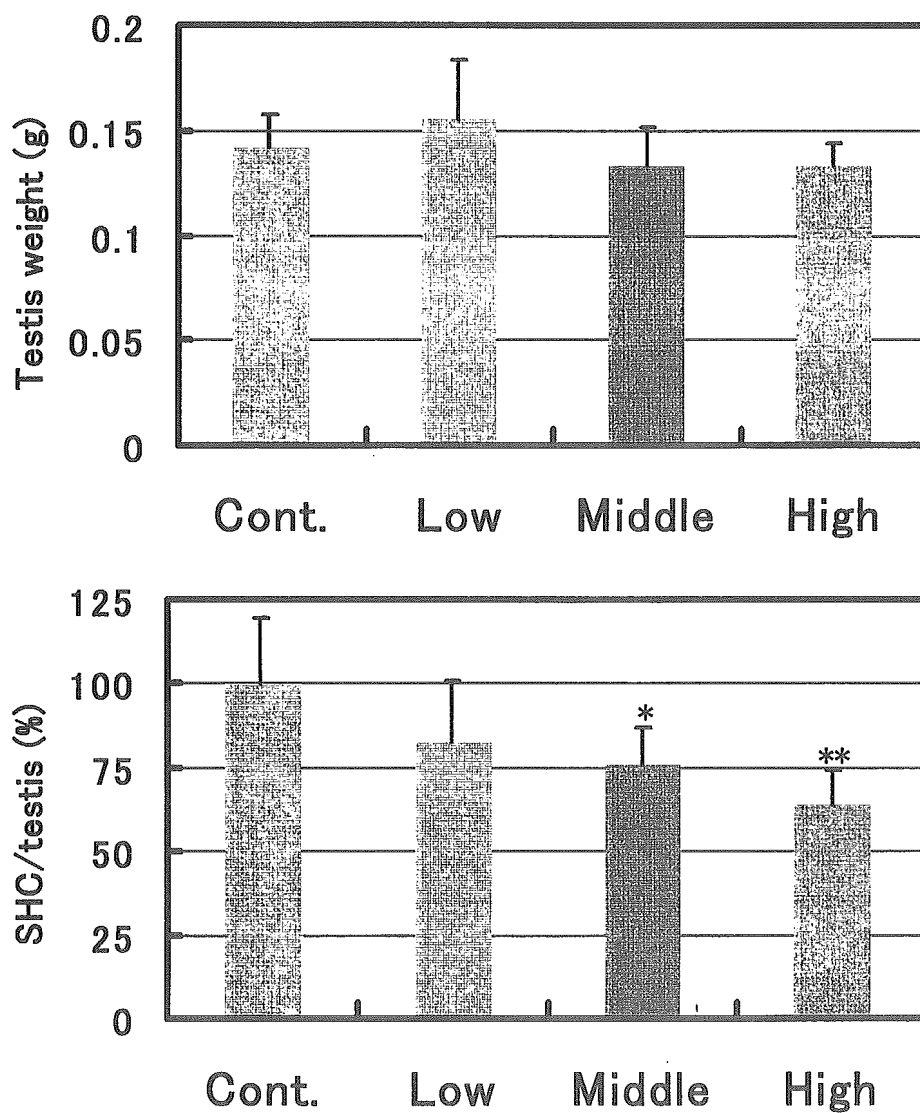
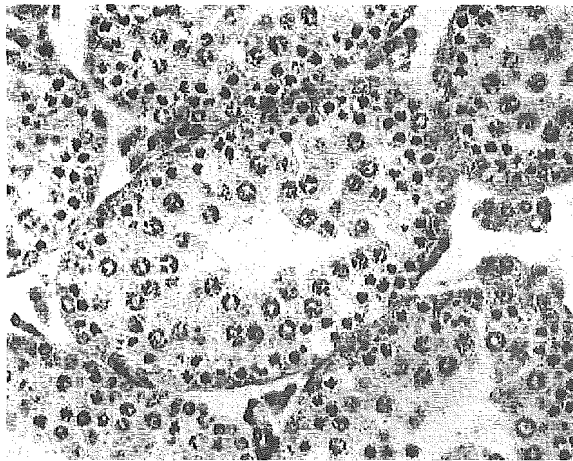


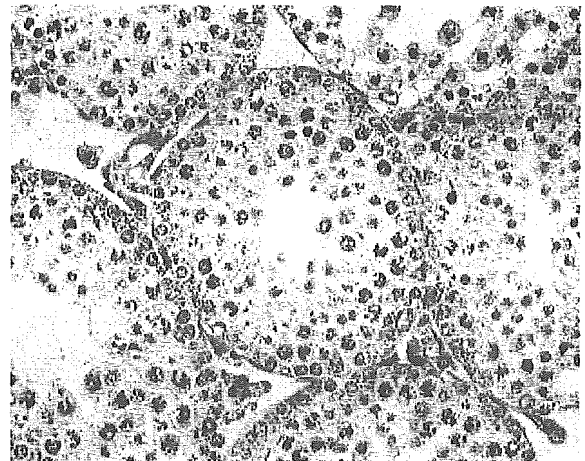
Fig.5 Testis weight and SHC on days 56

* $P < 0.05$: significantly different from control value

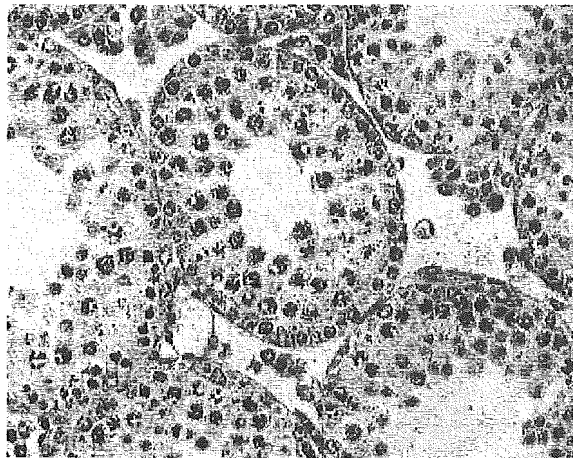
** $P < 0.01$: significantly different from control value



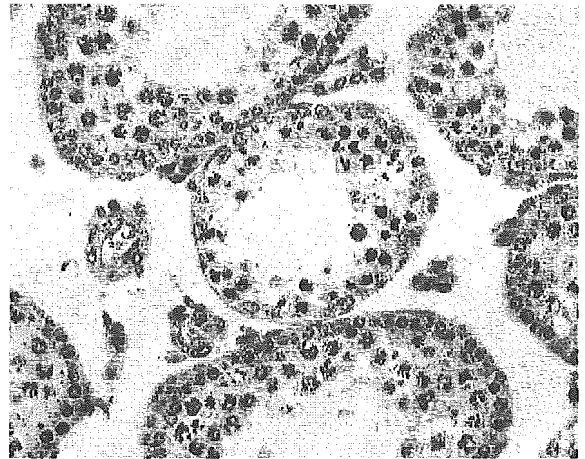
Control



Low

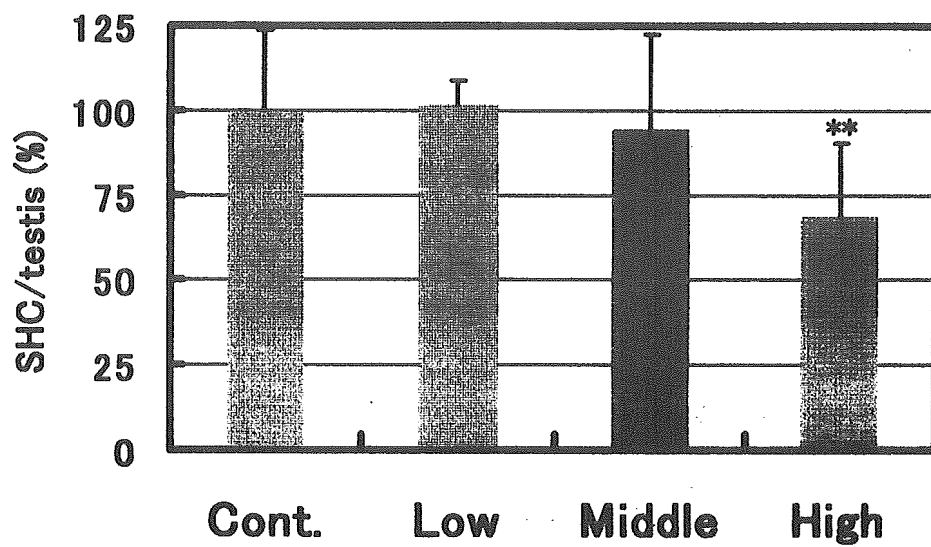


Middle



High

Fig.6 Testicular histology of F1 mice at 3 weeks after birth



**Fig.7 Testicular Sperm Head Count of F1 mice
at 9 weeks after birth**

****P<0.01 : significantly different from control value**

Table 1 Total production and demand for medical treatment of macromolecule resin in USA and Japan

USA

macromolecule resin	total production	demand for medical treatment	
	1983	1983	1971
PVC	2,800,000	64,000	5,000
PP	2,029,000	43,000	60
PE			50
PS	1,639,000	24,000	70

Japan

macromolecule resin	total production	demand for medical treatment	
	1983	1980	1977
PVC	1,420,400	8,200	1,600
PP	1,062,100	5,900	3,800
PE	1,773,000	1,300	1,200
PS			

(t.)

PVC:Polyvinyl chloride, PP:Polypropylene, PE:Polyethylene
PS:Polystyrene

Table 2 Observed toxicity of DEHP to mouse testis

Endpoint	11 days (Spermatocyte)				29 days (Spermatogonium)				56 days (Stem cell)			
	Cont.	Low	Middle	High	Cont.	Low	Middle	High	Cont.	Low	Middle	High
Testis weight				↓								
Testicular SHC		↓	↓								↓	
Testicular histology												

■ : significantly different from control (P<0.01)

▨ : significantly different from control (P<0.05)

▤ : trend

Table 3 Effect on reproductive parameters of DEHP

	Cont.	Low	Middle	High
Number of F0 mice	5	5	5	6
Gestational period (days)	18.4	18.6	18.6	18.7
Number of F1 mice	67	65	64	80
Number of F1/F0 mice	13.4	13.0	12.8	13.3
Viability index on day 4 (%)	98.5	96.9	96.9	92.5
Sex ratio (male) (%)	50	60	45	50
AGD (male) (mm)	5.5	5.8	5.6	5.7
AGD (female) (mm)	3.9	3.9	4.0	4.0

平成 13 年度 厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質に関する生体試料（さい帯血等）分析法の開発と
その実試料の分析結果に基づくヒト健康影響についての研究

ステロイドホルモン産生に及ぼす有機スズ化合物のリスク評価
（副腎由来 H295R 細胞のコルチゾール産生及び精巣ライディッヒ細胞の
テストステロン産生に及ぼす影響）

主任研究者 牧野恒久 東海大学医学部教授
分担研究者 中澤裕之 星薬科大学教授
研究協力者 中陳静男 星薬科大学教授

研究要旨

内分泌かく乱化学物質のステロイドホルモン産生に及ぼす影響を解明する一環として有機スズ化合物を取り上げ、副腎由来の H295R 細胞のコルチゾール産生及び精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼすメチルスズ化合物、ブチルスズ化合物、オクチルスズ化合物及びフェニルスズ化合物、計 15 種の影響を検討した。その結果、トリブチルスズオキシド (TBT0)、トリブチルスズ (TBT)、ジブチルスズ (DBT) 及びトリフェニルスズ (TPT) は 0.3 - 1.0 μM の曝露で H295R 細胞の産生するコルチゾール産生を抑制した。このコルチゾール産生の低下は、ステロイド合成酵素である P450c21 や P45011 β の阻害が一因と考えられる。一方、精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生も TBT、DBT 及び TPT の曝露により有意に抑制され、その濃度は更に低く 0.03 μM 程度であることを明らかにした。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の多くは、活性は低いけれども天然のエストロゲンと同様な生理活性を有することから、“環境エストロゲン”とも言われており、化学物質のエストロゲン受容体との結合能やその後のイベントに関連する多くの研究がなされている。一方、内分泌かく乱化学物質の曝露により内性ホルモンの産生が乱された場合、正常な内分泌機能がかく乱される可能性が十分考えられる。特にこれらの化

学物質が胎生期から新生仔期の限られた時期に曝露されることでステロイドホルモン合成が阻害された場合、発生・分化や生殖において深刻な影響が現れることが懸念される。我々は、ヒト副腎由来のステロイドホルモン産生細胞である H295R をヒトステロイド産生細胞のモデルとして利用し、内分泌かく乱化学物質のステロイドホルモン産生、特にコルチゾールの産生に及ぼす数種の内分泌かく乱化学物質の影響を検討し、報告してきた^{1,2)}。

一方、有機スズ化合物は塩化ビニルポリマー (PVC) 形成時の熱分解安定化剤や製品の紫外線耐久性を高めるための安定化剤として、また船底塗料や漁網の防汚剤として永年世界中で広く使用されてきた。しかし、海洋生物に対する悪影響が懸念されたことから、1987 年以降、英国、米国において、更には我が国においても 1990 年以降その使用が制限され、それ以降は使用量が減少したと考えられる。しかし、極めて低濃度の海洋汚染にも関わらず、生物濃縮等により今なお高濃度の有機スズ化合物が海洋生物に蓄積していることが報告されている³⁻¹⁰⁾。有機スズ化合物の海洋生物に及ぼす影響として良く知られているのは、沿岸に生息する雌の巻き貝 (gastropods) に発生する生殖器異常、インポセックス (imposex) であり¹¹⁻¹⁴⁾、ステロイドホルモンの産生に関する異常が考えられている。

本研究では、ステロイドホルモン産生に及ぼす有機スズの影響を検討する目的で、15 種の有機スズ化合物を取り上げ、ヒト副腎 H295R 細胞のコルチゾール産生及びブタ精巣ライディッヒ細胞のテストステロン産生に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

B-1. 実験材料及び試薬

ヒト副腎皮質由来 H295R 細胞は J. Ian Mason 博士 (University of Edinburgh, Royal Infirmary of Edinburgh, Edinburgh, Scotland) より供与された。Methyltin trichloride、

butyltin trichloride (MBT)、dibutyltin dichloride (DBT)、tributyltin chloride (TBT)、tetrabutyltin、bis(tributyltin) oxide (TBT0)、dioctyltin dichloride、phenyltin trichloride (MPT)、diphenyltin dichloride (DBT)、triphenyltin chloride (TPT)、tetraphenyltin、trypsin inhibitor、insulin、transferrin、vitamin E 及び 8-bromo-cyclic AMP (8Br-cAMP) はシグマアルドリッチジャパンより購入した。Dimethyltin dichloride はメルクジャパンより、trimethyltin chloride は関東化学工業より、trioctyltin chloride は Fluka よりそれぞれ購入した。Epidermal growth factor (EGF, human recombinant) はフナコシより購入した。Monooctyltin oxide 及び dibutyl cAMP は和光純薬工業より購入した。Collagenase / dispase はロシュ・ダイアグノスティックより購入した。Percoll® はアマシャムバイオサイエンスより購入した。Fetal bovine serum は三光純薬より購入した。抗生物質は ICN Biomedicals より購入した。D-MEM / F-12 培地はインビトロジェンより購入した。コルチゾール測定用の DPC・Cortisol kit 及びテストステロン測定用の DPC・Total testosterone kit (Diagnostic Product Corporation) は日本アイソトープ協会より購入した。LDH 活性測定用の CytoTox96® non-radioactive cytotoxicity assay kit はプロメガより購入した。蛋白質質量測定用の BCA assay kit は Pierce