

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏 名 机 直美

指導教官名 局 博一

論文題目 ディーゼル排気微粒子の雌性生殖器作用および繁殖機能障害に関する研究

ディーゼル排気 (DE) は、国内外で深刻な社会問題となっている大気汚染発生源の一つである。DE の健康影響に関する研究は、これまで喘息性疾患、肺癌あるいは気管支炎等の呼吸器に及ぼす影響を中心に行われてきた。しかしながら、近年は人の死亡率に関する疫学的研究の結果や次世代影響の面から、DE の循環器系や生殖器系に対する影響が注目されるようになった。そこで本研究では、まず DE 曝露が雄の生殖器系に及ぼす影響の有無を検索するために Fischer 344 雄ラットに高脂肪食を摂取させた後、8 ヶ月間の DE 吸入曝露を行った。その結果、精巣自体には影響がみられなかったが副生殖腺重量の低下や血清テストステロン値の増加といった内分泌系に変化が観察された。次いで、DE 中には多くの多環芳香族炭化水素が含まれることに着目し、Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の感受性が高いといわれている C57BL/6N 雌マウスを用いて、DE による生体影響として重要視される次世代への影響あるいは繁殖機能に対する影響を明らかにするために、雌性生殖器および繁殖機能に及ぼす影響について検討した。

DE 吸入曝露は、DE 中の粒子濃度が 0.3、1.0 および 3.0 mg/m³ の 3 群と対照群 (清浄空気のみ) をおき、曝露期間は約 4 ヶ月間 (午後 10 時から午前 10 時まで 12 時間/日、7 日/週) とした。さらに次世代影響を調べるために上記の曝露終了後、曝露されていない 10 週齢の雄と一週間同居交配させた。

その結果、母マウスの流産や娩出不全等の繁殖異常が認められたが有意ではなかった。また、新生子の外貌異常についても曝露群と対照群との間に有意な差はみられなかった。しかし、親の営巣行動の評点は、正常出産雌の 3.0 mgDEP/m³ 群では有意に低下した。また、出生子の体重変化は、成長するにしたがって雌雄ともに高濃度曝露群で有意に減少した。雄子マウスは、30 日齢では 0.3 mgDEP/m³ 群で生殖突起肛門間距離 (AGD) が有意に短くなった。一方、雌子マウスでは、70 日齢における頭臀長の有意な短縮 (1.0 mgDEP/m³ 群、3.0 mgDEP/m³ 群) が示された。一方、雌子マウスにおける腔開口時期については、0.3 および 1.0 mgDEP/m³ 群で有意に早まった。

このように親の繁殖機能への影響については行動学的な変化以外はほとんどみられなかったが、出生子に関しては臓器重量や腔開口時期の早期化といった次世代にわたる間接的な影響がみられた。そこで、このような DE の生体影響の根源と考えられているディーゼル排気微粒子 (DEP) を直接同系統の妊娠マウスに皮下投与した際にどのような変化が現れるかについて詳細に検討することにした。

C57BL/6N マウス雌 145 匹 (10 週齢) を同系統同週齢の雄と一週間同居交配後、妊娠 8、10、12 日目に DEP 抽出物 (DEPE) を皮下投与 (計 0.006、0.06、0.6、6.0 あるいは 60mg/ mouse) して、生殖機能および出生マウスの生後発育に及ぼす影響を調べた。交配後毎日体重計測を行ったが、分娩まではほぼ順調に体重が増加したマウスは正常出産する一方、非妊娠マウスはごくわずかな通常の体重増加しか示さないことから、妊娠と非妊娠の区別が可能であった。また、妊娠後途中まで体重が増加したが、ある時点で急激に体重が減少した個体は流産が生じたものとみなされ、DEPE 投与群に多かった。すなわち、0.006、0.06、0.6、6.0 あるいは 60 mg/mouse の全曝露濃度で有意な流産率の増加が認められた。流産率は高用量投与群よりも低用量投与群に高い傾向がみられた。DEPE 皮下投与群では出生子の体重減少および雌マウスの腔開口時期に対する影響がみられた。この現象は上述した DE の吸入曝露実験による成績に類似した。また、特に低用量投与群で頭臀長に変化が観察され、雄の副生殖腺重量の減少も低用量投与群でより明瞭であった。これらの成績により、DEPE の皮下投与によって DE の吸入曝露と同様に出生子 (第二世代) への影響、特に生後発達に異常が生じることが明らかとなった。

上述の流産や娩出不全などの生殖機能異常が生じる要因には、子宮筋、胎盤および胎子の側における様々な因子が考えられる。それらの一部として子宮筋の収縮感受性の変化も挙げることができる。そこで、DE あるいは DEP 曝露による子宮収縮反応の変化の有無を明らかにするために以下の実験を行った。子宮収縮反応はオキシトシン (OT) に対する収縮反応の相違を比

較する方法で行った。この実験においては、卵巣ホルモンの関与による影響を考慮して、まず C57BL 雌マウスを卵巣摘出 (OVX) 群と卵巣非摘出 (無処置) 群に分け、それぞれ DE に 1 ヶ月間または 4 ヶ月間吸入曝露した上記のマウスの子宮収縮反応を調べた。

その結果、DE4 ヶ月間曝露の無処置群において、0.3 および 3.0 mgDEP/m³ 曝露群で有意な体重の減少が生じたが、子宮重量および子宮収縮反応には有意な変化は示されなかった。しかしながら、3.0 mgDEP/m³ 群で OT 滴下による収縮頻度の有意な減少がみられた。1 ヶ月 DE を吸入曝露させた OVX 群において、0.3 および 1.0 mgDEP/m³ 群では有意な体重の増加が生じたものの、子宮重量には変化が認められなかった。しかしながら、3.0 mgDEP/m³ 群の OT に対する子宮収縮反応は有意に増加した。このように、卵巣存在下のマウスでは DE による OT 誘発子宮収縮への影響は見られなかったことから、卵巣機能が維持されている個体では DE による子宮筋影響が何らかの機序によって緩衝されている可能性が示唆された。

次いで、OVX マウスに DEPE (0.006、0.6 あるいは 60 mg/mouse) を皮下投与した実験において、対照群と比較して有意な収縮の増強が示された。その結果、非経気道的に投与された個体においても DEP は子宮の OT 収縮反応を増強することが明らかになった。さらに、DEPE を子宮筋に対して短時間または長時間直接作用させたときの OT 収縮反応を検討した。その結果、OVX マウスの子宮に DEPE 3×10⁻⁴~3 mg/ml を滴下したときの投与直後および投与後の最大収縮反応は、DEPE を滴下しない標本と比べて有意な収縮の増加を示した。OVX マウスの子宮標本で OT 収縮反応を確認した後、DEPE (0.3 mg/ml) を 24 時間持続的に作用させたときの OT に対する収縮反応は有意な変化を示さなかった。以上の成績により、DEPE は体内の血液循環を介して子宮筋に対する収縮増強効果を与えること、その場合このような変化は内分泌系に対する影響の他に DEPE が直接的にも子宮に影響する可能性が示唆された。このような子宮筋収縮反応変化の詳細な機序は不明であるが、流産や娩出不全などの生殖機能障害をもたらす一因となる可能性は否定できない。DEPE 皮下投与では出生子の成長にも影響を与えるなど次世代に及ぶ影響が生じることも明らかになったことから、DEPE あるいはその代謝物質は胎盤を介して胎子へと移行するか、また母マウスの生理学的状態の変化が発生段階にある胎子の細胞に何らかの異常を来すことが推測される。上記までの研究によって DE あるいはその抽出物質である DEPE は C57BL/6N マウスに対してかなり強い生体毒性を有することが明らかになった。

DEPE 中には多種多様な生体影響物質が含まれていると報告されており、そのうちフタル酸エステル類は内分泌攪乱化学物質の観点から重要である。そこで、この研究で使用した DEP から抽出分離された 4-ヒドロキシフタル酸 (以下、free 体と略) および 4-ヒドロキシイソフタ

ル酸（以下、iso 体と略）、また構造類似体の 4-ヒドロキシフタル酸-1-メチルエステル（以下、dimethyl 体と略）および 4-ヒドロキシフタル酸-2-メチルエステル（以下、2Me 体と略）の 4 種類のフタル酸エステル類を用いてこれまでと同様な実験を試みた。

その結果、4 種類のフタル酸エステル類で母マウスの出産率の変化は出現せず、DEPE 皮下投与でみられたような異常出産もみられなかった。しかし、営巣行動は iso 体や 2Me 体の非妊娠マウスで有意に評点の高い巣の形成がみられた。また、群内における妊娠マウスと非妊娠マウスとの比較では、フタル酸エステル類投与群では変化がみられなかったが、対照群（DMSO および estradiol）内の比較で有意に高い巣の形成がみられた。また産子数にも変化はみられなかったが、出生子マウスの異常個体数は、iso 体で有意に増加し特に成長不良が多かった。その他の奇形として、DE 曝露や DEPE 皮下投与で観察されたときと同様に眼に異常を示す個体がみられた。30 日齢における子の身体計測では、2Me 体、free 体、estradiol の投与で雌雄とも AGD が有意に長くなった。このように妊娠マウスへのフタル酸エステル類の投与により、DEPE 投与で観察された例に類似した出生子の成長影響が認められたことから、DEPE 投与による生殖機能障害の少なくとも一部はフタル酸エステル類が関与する可能性が示唆された。

次に上記 4 種類のフタル酸エステル類における子宮収縮反応について OVX マウスを用いて観察した。フタル酸エステル類（1 mg/kgBW）を皮下投与された OVX マウスの OT に対する子宮収縮反応の変化、ならびに投与を受けていない OVX マウスの OT 直接作用に対する子宮収縮反応を調べた。その結果、free 体および 2Me 体を皮下投与したマウスの子宮では投与直後および投与後の最大収縮反応に有意な収縮の増加がみられた。一方、フタル酸エステル類を短時間および 24 時間作用させたときの OT に対する収縮反応は、特に有意な変化を示さなかった。このように、一部のフタル酸エステル類は子宮筋に対して間接的あるいは直接的に収縮を与えることが明らかになった。これらの現象は、DEPE の作用と類似することから、フタル酸エステル類は DE および DEPE による生体毒性、特に生殖機能障害や次世代の発達障害の原因物質として関与する可能性が濃厚であることが推測された。

以上の実験成績および考察から、近年における大気汚染物質の主要因である DEP は、それを構成するフタル酸エステル類などの作用を通じて第一世代の生殖機能障害ならびに第二世代の成長、発達障害をもたらす潜在的リスクを有することが明らかになり、これらの知見は今後の大気環境科学分野での諸研究を推進する上で重要な基礎を与えるものと考えられる。