

博士論文

ラットを用いた化学物質曝露による
生体内ホルモンレベルの変動要因解析

2019年9月

山口 尊史

岡山大学大学院
環境生命科学研究科

目次

第 1 章 序論

1. 化学物質曝露による生体制御機構への影響評価……………4
2. 生体内ホルモンレベルの調節機構……………5
3. 内分泌かく乱物質の研究調査……………6
4. 肝毒性と生体内ホルモンレベル変動の関係……………10

第 2 章 肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) の内分泌組織に対する影響の検討～短期曝露 (幼若期)～

1. 緒言……………13
2. 材料および方法……………14
3. 結果……………25
4. 考察……………31

第 3 章 肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) の内分泌組織に対する影響の検討～幼若期から性成熟期まで反復曝露～

1. 緒言	33
2. 材料および方法	34
3. 結果	42
4. 考察	57

第 4 章 総合考察 63

引用文献 66

謝辞 75

第1章

序論

1. 化学物質曝露による生体制御機構への影響評価

世界的な安全管理意識の向上を受けて、化学物質曝露による生体制御機構(神経系、内分泌系、免疫系)に対する影響評価の重要性は急速に高まっている。しかしながら、異物(人工的に合成された化学物質)を生体内に取り込むことで惹起される生体影響は、ニューロンから分泌されるアセチルコリン、グルタミン酸、ドーパミンなどの神経伝達物質を介する神経機能調節機構、内分泌腺から分泌されるホルモン(性ホルモン、甲状腺ホルモン、インスリンなど)を介する内分泌機能調節機構あるいはサイトカインなどの免疫調節因子を介する免疫機能調節機構が複雑に交絡して発現することから、精緻に評価することが難しい。また、このような生体制御機構には、科学的に未解明な現象／課題が今もなお数多く存在している。

特に内分泌系に作用する化学物質は、内分泌かく乱物質(Endocrine disruptor、ED物質)としての懸念が呈されることから、ヒトあるいは環境生物に対する生体影響を適正管理するために必要な基礎研究が世界中で取り組まれている。

2. 生体内ホルモンレベルの調節機構

ヒトはホルモンレベル、体温、血圧および血糖値等の生理状態を一定に維持するためのホメオスタシス(生体恒常性)と言われる機構を有している。具体的には、外的要因からの生体防御機構(例えば、気温変動による体温調節、心理的ストレスに対する自律神経系の調節、感染に対応した免疫機能調節、化学物質曝露による生体機能調節など)である。

内分泌系に関連した主要な内分泌腺軸として、視床下部-下垂体-性腺(HPG)軸、視床下部-下垂体-甲状腺(HPT)軸および視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸が知られている。各軸が正常に機能している状況では、生体内ホルモンレベルの変化を各内分泌組織が感知し、ホルモンの産生あるいは抑制を促すことで生命活動が維持される。しかしながら、過剰な生体内環境の変化は生体防御機構の破綻につながり、液性因子(ホルモン、神経伝達物質、サイトカインなど)の分泌不全を経て、生命活動の維持に影響する。例えば、化学物質の曝露量増加に応じて、生体防御機構は調節可能な水準から破綻する水準までシフトする。したがって、汎用されている化学物質の許容曝露量は世界的に規定されており、ヒト/環境生物に対する安全性が担保されている。

生体内ホルモンの調節機構としては、視床下部、下垂体などの脳内組織が内分泌中枢として生体内ホルモンレベルの変動を検知し、ホルモン産生のシグナル(ホルモン産生を促す刺激ホルモン)を発することで始動する。また、内分泌中枢で産生されたホルモンは血管内を全身的に循環し、標的となる内分泌組織に分布するとホルモン受容体に結合する。続いて生殖器、副腎などの内分泌組織では、ステロイドホルモンのような内分泌機能調節に関連するホルモン(テストステロン、エストラジオール、コルチゾールなど)が産生される。科学的な既知見情報は豊富に集積されている領域であるものの、ホルモン制御機構は非常に緻密であり、今もなお未解明な部分は残されている。

3. 内分泌かく乱物質の研究調査

ED 物質とは、世界保健機構(WHO)によって次のとおり定義されている物質である(WHO/IPCS、2002)。

【生物個体の内分泌機能を変化させることによって、その個体あるいはその子孫の健康に有害な影響を誘発する外因性物質】

「Our Stolen Future(奪われし未来)」(Colborn ら、1996)の出版に端を発して世界中で環境中に存在する ED 物質の存在が注目を浴びることになり、ED 物質は環境生物減少(絶滅)の一因であるとの仮説が提唱された。以降、世界各地で化学物質の環境モニタリング、ならびに環境生物の繁殖性に対する影響調査が盛んに実施されている。また、環境生物のみならず、ヒトにおいても有機塩素系化合物、フタル酸類、農薬などが内分泌機能の変化(精子数減少など)に関連しているとの疫学調査の報告もある(Richthoff ら、2003; Duty ら、2003)。一方で、関連を見出せないと主張する報告例(Smith ら、2004)もあるなど、ヒトにおける危険性が明確に実証された事例はなく、今もなお研究調査は継続されている。以下は各国の取組み事例の一部である。

日本;1998年より環境省主導で「内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について –環境ホルモン戦略計画SPEED'98–」を策定し、本格的にED物質の調査/研究に着手。現在は化学物質の環境リスクを適正管理するために、ED物質の評価試験法確立と評価実施を目指した「化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応 –EXTEND2016–」を通じて継続的な研究・調査が進行中(環境省、2016)。

米国;1998年に米国保護庁(the US Environmental Protection Agency: EPA)が「内分泌かく乱物質スクリーニング計画 (Endocrine Disruptor Screening Program; EDSP)」の概要を公表し、化学物質の調査を開始 (U.S.

EPA、1998)。各種試験法を開発し、試験法ガイドラインとして発効。一部の化学物質は、評価結果を公表済（南ら、2016）。

欧州；2018年に欧州化学品庁（European Chemical Agency：ECHA）と欧州食品安全機関（European Food Safety Authority：EFSA）は、ED物質判別のスキームを定めたガイダンスを公表（ECHAおよびEFSA、2018）。欧州各国は本ガイダンスにしたがった化学物質の評価開始。

ED 物質を適切に評価／分類し、管理／規制するための国際的な統一基準は未だ存在していない。上述のとおり、各国の規制当局は、独自の基準を設定するべく、様々な調査を実施し、管理計画を策定している。ED 物質は、内分泌機能を変化させる過程で生体内のホルモンレベルの変動を生じさせる。Fig. 1 に代表的な生体内の内分泌組織およびその組織で産生されるホルモンを示す。ヒトは生活環境において無数の自然界に存在する天然物質あるいは人工的な化学物質の曝露を受けている。しかしながら、それらの物質による内分泌機能への影響を調査する研究報告は一部に留まっている。

多くの化学物質は、既存の毒性試験結果を解析すると、肝毒性、腎毒性、神経毒性、体重減少のような代表的な毒性を介して間接的に内分泌影響を示すと報告されている（Kertenkamp ら、2012）。化学物質の内分泌系に対する影響調査のための評価試験としては、経済開発協力機構（Office of Economic Cooperation and Development; OECD）および EPA によって試験法ガイドラインが制定されており、内分泌系に対する影響に関する科学的な情報が取得できる（U.S. EPA、2011；Day ら、2018）。一方、内分泌系の組織以外に作用して発現する毒性（1次影響）を介して内分泌組織に2次影響（間接影響）を誘発する物質は、ED 物質と見なすべきではないとする意見がある（Stump ら、2014）。例えば雄性生殖器に対する直接影響の検証には、OECD あるい

は EPA の試験ガイドラインに準拠したアンドロゲン受容体 (Androgen receptor; AR) 転写活性化試験 (OECD TG458、2016)、Hershberger 試験 (OECD TG441、2009; EPA OPPTS 890.1400、2009) などの実施が推奨されている。AR 転写活性化試験では、AR 応答レポータープラスミドを安定的に導入した細胞株 (AR-EcoScreen™ cell) を用いて化学物質と AR の結合による転写活性化を指標とすることで (抗) アンドロゲン作用を検出する。また、Hershberger 試験では、生体内の HPG 軸の機能が消失した去勢 (精巣摘出) ラットに化学物質を反復投与し、前立腺や精嚢といった副生殖器の重量変化を指標とすることで (抗) アンドロゲン作用を検出する。このように直接影響を検出する試験法は上記を含めて数多く開発されている。一方、間接影響を検証する公定法化された試験法は未開発であることから、ED 物質を的確に判別するために試験法の早期確立が望ましい。

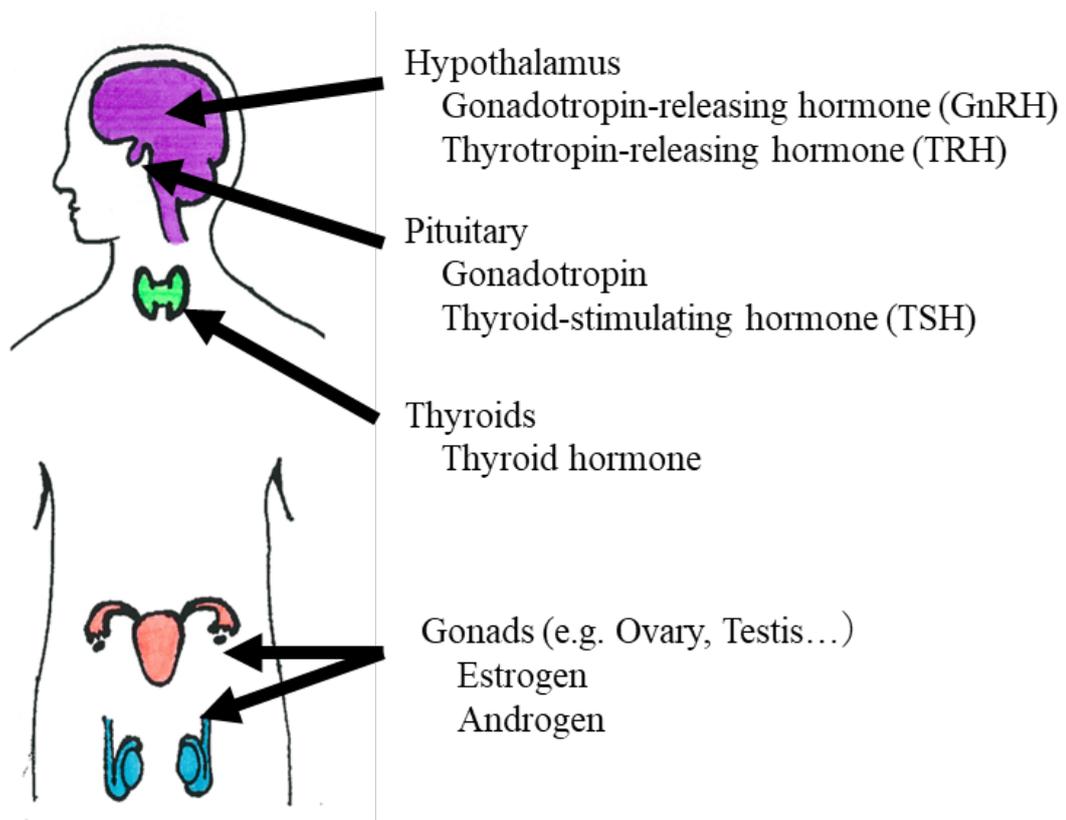


Figure 1. Representative endocrine tissues and produced hormones

4. 肝毒性と生体内ホルモンレベル変動の関係

肝臓は、化学物質投与による毒性影響として最も検出頻度の高い組織の一つである。生命活動を維持するために異物(生体にとって有害な物質)の代謝および解毒を担う重要な組織であり、生体内ホルモンのような内因性物質を代謝する機能も有している。肝臓に対する毒性影響(肝毒性)の発現に伴って、肝臓の代謝能に変化が認められた場合、生体内ホルモンレベルも同時に変動する可能性がある。このような生体反応は、肝毒性を介した内分泌系に対する間接影響と考えられる。

本研究では、化学物質曝露による肝臓影響と生体内ホルモンの変動の関係性に着目し、ホルモンレベル変動の要因解析に取り組んだ。甲状腺ホルモンの変動要因に関する報告事例は多いが、肝臓影響とステロイドホルモンとの関係性について言及したものは少ない。本研究で用いる代表的な肝毒性物質としては、毒性試験研究で汎用されており、肝臓影響に関する既知見情報が豊富な Phenobarbital (PB) および Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) を選択した (IARC, 2001 ; IARC, 2013)。

PB は、不眠症、不安症状あるいはてんかんによるけいれん発作の治療で広く臨床現場で処方されているバルビツール系の医薬品である。また、肝臓においてステロイドホルモンおよび甲状腺ホルモンの代謝に関連する酵素であるシトクロム P450 (CYP) および UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) の誘導剤としても良く知られている (Waxman および Azaroff, 1992)。PB 投与によって実験動物のラットで報告されている甲状腺腫瘍は、肝臓で誘導された UGT によって甲状腺ホルモンがグルクロン酸抱合化され、胆汁排泄が亢進されたことによる代償性変化として下垂体から甲状腺刺激ホルモン (TSH) の分泌増加によって発現することが知られている (IARC, 2001)。しかしながら、PB 投与による肝酵素誘導とステロイドホルモン代謝の関係については十分な知見は報告されていない。

DEHP は、フタル酸類に属する化学物質である。プラスチック製品(医療器具など)

可塑剤として広く用いられているが、妊婦および幼児の生体内において高濃度で検出されるとの報告があるため、ヒトに対する健康影響が懸念されている (Lottrup ら、2006)。また、多くの研究者が DEHP を含むフタル酸類は ED 物質であると主張しており、抗アンドロゲン作用、エストロゲン作用あるいは甲状腺ホルモンに対する影響作用を有すると報告している (Ema ら、2001; Dong ら、2017; Ghisari ら、2009; Cha ら、2018)。さらに、肝毒性物質としても良く知られており、肝臓の Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) の受容体発現を活性化するペルオキシソーム増殖剤の一つである (Rusyn ら、2006; IARC、2013)。

肝臓中の薬物代謝酵素誘導を介した内分泌組織に対する間接影響の一例として、肝臓におけるテストステロン代謝亢進に付随した血中ホルモンレベルの低値が挙げられる (Coulson ら、2003; Rasoulpour ら、2015; Masubuchi ら、1997; Wilson および LeBlanc、1998)。テストステロンを含めたアンドロゲンの代謝 (体外排泄) 亢進は、脊椎動物において性成熟および繁殖性に影響する可能性がある。ED 物質の懸念があり、内分泌系への影響を評価する際には、発現した毒性影響について作用機序を解明することが重要となる。したがって、本研究では、肝臓中の薬物代謝酵素の誘導を惹起し、かつ肝毒性物質としても良く知られている PB および DEHP による生殖関連組織および甲状腺を含めた内分泌系への影響を検討した。また、PB および DEHP は、肝薬物代謝酵素の誘導に先行して核内受容体である Constitutive androstane receptor (CAR) および／あるいは PPAR α を活性化する。PB と DEHP は、単一あるいは複数の核内受容体のアゴニストとして異なるタイプの酵素誘導剤である (Eveillard ら、2009; Ren ら、2010)。さらに、肝細胞肥大のような肝臓影響は、肝酵素誘導に続発する病理組織学的変化として発現する。一方、生体内ホルモンレベルに対する影響は、肝細胞肥大を惹起する全肝毒性物質で必ずしも共通する毒性影響として報告されているわけではない。すなわち薬物代謝酵素誘導とホルモン変動を同時に調査して比較して

いる研究事例は少ない。幼若期の雄ラットに PB および DEHP を反復投与することで精巣および甲状腺を含めた内分泌組織で産生されるホルモンの変動に着目し、誘導される薬物代謝酵素と血中ホルモン値の変動に関連性があるかどうかを検討した。本研究の成果は、ED 物質同定のための研究アプローチ(作用機序の解明法)の一つとして ED 物質の適正管理に資することが期待される。

第 2 章

肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) の 内分泌組織に対する影響の検討 ～ 短期曝露 (幼若期) ～

1. 緒言

化学物質曝露による生体影響は、一般的に性成熟後よりも幼若期あるいは性成熟期前後の成長期に感受性が高い (Rice ら、2000; Picut ら、2017)。生殖器を含めた内分泌組織は、成長ステージ毎にその機能が大きく変動する組織／器官であり、成長ステージ毎の生体影響の感受性を調査することは重要となる。本章では、2 種の肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) を雄の実験動物 (ラット) に離乳直後の幼若期 (生後 23 日齢) から短期曝露 (7 日間) し、肝臓影響の発現下における性成熟 (包皮分離) 前の内分泌組織を中心とした生体影響について検討する。

2. 材料および方法

2-1. 実験施設

住友化学株式会社 生物環境科学研究所(大阪府大阪市)で各検討実験を実施した。

2-2. 被験物質

毒性研究において汎用されている肝毒性物質のうち、以下の 2 物質を研究材料として選択した。

2-3①. Phenobarbital (PB)

Phenobarbital sodium(ロット番号;EPG6760、純度;98.0%)は、富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)より購入した。

2-3②. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)

Di-2-ethylhexyl phthalate(ロット番号;DCP6102、純度;97.0%)は、富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)より購入した。

投与媒体は既存の研究事例を参照し、活用実績の多いコーンオイル(供給元;ナカライテスク株式会社(京都))を選択した。

2-4. 試験系

全動物実験は、住友化学株式会社 生物環境科学研究所の動物実験実施要領（住友化学株式会社生物環境科学研究所動物実験倫理指針）にしたがって実施した。

本研究では、遺伝学および微生物学的統御が明確であり、実験動物として汎用されているラットを使用した。チャールスリバー株式会社（滋賀、日野飼育センター）より雄のラット（CrI:CD(SD)）を生後 14 日齢で哺育動物（母動物）とともに入荷し、8 匹／母動物で飼育した。入荷後、7 日間の検疫期間を設定し、一般症状および体重推移に異常のない動物を試験に供試した。飼育条件は、温度；22～26°C、湿度；40～70%、飼育室の換気回数；10 回以上／時間、明暗周期；14 時間明期（6:00～20:00）＋10 時間暗期（20:00～6:00）、飼育ケージ；前・床面ステンレス製、壁面アルミ・ステンレス製ケージとした。オリエンタル酵母株式会社（東京）製造の固形の CRF-1（非滅菌）を給餌し、飲料水には濾過処理した水道水を自由摂取させた。本研究は血中ホルモン測定を検査項目として設定していることから、餌中の植物性エストロゲンが低水準であることを一般財団法人 日本食品分析センターにて測定（ダイゼイン；2.2 mg/100g 未満、ゲニステイン；1.6 mg/100g 未満）した。生後 21 日齢で母動物から離乳し、生後 23 日から実験に供試した。哺育期間中（離乳前まで）は、1 ケージあたり 8 匹／母動物で飼育し、離乳後は母動物から隔離して 1 ケージあたり 2 あるいは 3 匹ずつで飼育した。試験期間中、解剖に供するまで絶食・絶飲処置は実施しなかった。

2-4. 曝露方法

2-4①. 群構成

媒体（コーンオイル）のみを投与する対照群、PB 投与群（投与量；100 mg/kg）および DEHP 群（投与量；500 mg/kg）の計 3 群を設定し、各群ともに 5 匹ずつ割り当てた。

投与量は、肝臓影響の発現が認められ、肝薬物代謝酵素の誘導が十分に期待されるように先行研究事例(IARC、2001;Jo ら、2011;IARC、2013)を参照した。投与液量は、OECD 試験ガイドラインの各種反復投与毒性試験の推奨範囲内にある 5 mL/kg とし、毎日の体重測定結果から個体別に算出した。

2-4②. 投与方法

投与経路には、ヒトにおける想定曝露経路の一つである経口経路を選択した。PB 投与液は懸濁状態にあったため、マグネチックスターラーで攪拌しながら投与した。弾性カテーテル(テルモ株式会社、東京)を装着したシリンジ(テルモ株式会社)を用いて強制経口投与した。投与回数は、1 回/日とし、8:00~10:00 に作業した。投与期間は、7 日間とし、生後 23 日から投与を開始した。

2-5. 検査項目

2-5①. 症状観察

2 回/日、投与前後に生死確認を含めて実施した。投与後の観察は、投与後 1 時間以内に対応した。

2-5②. 体重

1 回/日、投与液量算出のため、毎日投与前に実施した。

2-5③. 採血

採血前(生後 30 日)に各動物は飼育室から別室に移動させて 1 時間静置した。全

動物の採血順はランダム化し、投与最終日の投与後 2～3 時間以内に安楽殺(無麻酔下での断頭)することによって採血した。血中ホルモン値は日内変動することが知られているので、採血は 10:00 ～11:30 までに終了した。血液サンプルは遠心分離し、血清サンプルとして-80℃で保管した。

2-5④. 血液生化学検査

生化学自動分析装置 JCA-BM1250(日本電子株式会社、東京)を用いて総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素(Table 1)について測定した。

Table 1. Biochemistry

Item (abbreviation)	Unit	Method
Total protein (TP)	g/dL	Biuret method
Albumin (Alb)	g/dL	Bromcresol green method
Total cholesterol (T-Cho)	mg/dL	Enzymatic method
Triglycerides (TG)	mg/dL	Enzymatic method
Phospholipids (PL)	mg/dL	Enzymatic method
Urea nitrogen (BUN)	mg/dL	Enzymatic method
Creatinine (Cre)	mg/dL	Enzymatic method

2-5⑤. ホルモン測定

甲状腺刺激ホルモン(TSH)および甲状腺ホルモン(T3、T4)の測定を以下の方法で実施した。

1) TSH(ng/mL)

ラジオイムノアッセイ法を採用し、以下の使用キットおよび測定機器を用いて測定した。

使用キット ;Rat thyroid stimulating hormone (rTSH) [¹²⁵I] assay system:

CodeRK-554 (Institute of Isotopes Co., Ltd., ハンガリー)

測定機器 ; γ 線カウンターAccFLX γ 7010(日立アロカメディカル株式会社、東京)

抗ラット TSH 抗体に対して、標識した TSH[¹²⁵I]とサンプル中 TSH を 16~24 時間競合反応させた後、第 2 抗体を加えて 10 分間インキュベートし、遠心分離 (2150 x g、10 分間)によって結合型と遊離型を分離した。上清を除去した沈殿部分(結合型)を γ 線カウンターにて計測した。精度管理用には、未処置ラットから採取した血清(プール血清)を用いた。

2) T3 および T4

Table 2 で示す項目について Access2 Immunoassay System(Beckman Coulter Inc., U.S.A.)を用いて測定した。

T3;1 Step 競合法としてアルカリフォスファターゼ標識・抗 T3 マウスモノクローナル抗体(抗体結合性磁性マイクロビーズ)に対して、ビオチン化 T3(T3 標識液)とサンプル中 T3 を 20 分間競合させて洗浄後、基質液を加えて発光強度(540nm)を測定した。

T4;1 Step 競合法として抗サイロキシシンマウスモノクローナル抗体(抗体液)と抗マウス IgG ヤギ結合磁性マイクロビーズ(抗体結合性磁性マイクロビーズ)に対して、アルカリフォスファターゼ標識サイロキシシン(酵素標識液)とサンプル中 T4 を 10 分間競合させて洗浄後、基質液を加えて発光強度(540nm)を測定した。

Table 2. Thyroid hormone measurement

Item	Unit	Method
T3 (Total triiodothyronine)	ng/mL	Chemiluminescent Enzyme Immunoassay
T4 (Total thyroxine)	μg/dL	Chemiluminescent Enzyme Immunoassay

2-5⑥. 酵素活性

肝臓および精巢のホモジネートを次の方法で調製した。肝臓(一部)および精巢(片側)は生後 30 日に摘出後、ホモジネートを調製するまで-80°Cで保管した。

肝臓;ポッター型ホモジナイザーを用いて 50mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4、154mM KCl含有) 中でホモジネートを調製し、S9 画分を得るために 9000×g で 20 分間(4°C)遠心分離した。ホモジネート画分中のタンパク質量は、タンパク質標準物質としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いて DC protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., 米国)で定量した。

精巢;ポッター型ホモジナイザーを用いて50mM Tris/HCl緩衝液(pH 7.4、0.25M sucrose・1mM EDTA・0.1 mg/mL PMSF 含有) 中でホモジネートを調製した。ホモジネート画分中のタンパク質量は、タンパク質標準物質としてウシ血清アルブミン(BSA)を用いて BCA protein assay (Thermo Fisher Scientific 株式会社、東京)で定量した。

肝臓中のシトクロムP450(CYP)としてCYP2B(Yamadaら、2014)、CYP4A(Pinotら、1998)、CYP3A(Saitoら、2006)、UGT;UDT グルクロン酸転移酵素(Barterら、1992) および精巢中の 17β-HSD;17β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ(Huら、2009; Fukutaら、1999)の酵素活性は、既報の方法を参照して測定した。なお、CYP2B、CYP4A、CYP3A、UGT および 17β-HSD の酵素活性は、それぞれ 7-Pentoxoresorufin O-depentyase、Lauric acid ω-hydroxylase、Testosterone 6β-hydroxylase、Thyroxine-glucuronide formation、Androstenedione dehydrogenase の活性を指標として測定した。測定条件の詳細は次表 (Table 3) にまとめた。

Table 3. Summarized assay conditions for the measurement of enzyme activities

	Substrate	Buffer and other components	Incubation	Analysis
Liver-CYP2B (7-Pentoxoresorufin O-depentyase activity)	Pentoxoresorufin (3 μ M)	Liver S9 (<i>ca</i> 0.2 mg/mL), Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4), Dicoumarol (10 μ M), NADPH (1 mM)	37°C, 10 min, stopped with acetonitrile	FL, Safire II (Tecan, Männedorf, Switzerland), Excitation 550 nm, Emission 589 nm
Liver-CYP4A (Lauric acid ω -hydroxylase activity)	[1- ¹⁴ C] Lauric acid (100 μ M)	Liver S9 (<i>ca</i> 0.5–4.0 mg/mL), Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4), NADPH (1 mM)	37°C, 30 min, stopped with methanol	TLC, 5715 plate (Merck, Darmstadt, Germany), Diethyl ether/kerosene/formic acid, 50:50:1 (v/v/v), visualized with Imaging Plate (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) and Fluoro Image Analyzer FLA-5000 (GE Healthcare, IL, USA)
Liver-CYP3A (Testosterone 6 β -hydroxylase activity)	Testosterone (250 μ M)	Liver S9 (<i>ca</i> 0.4 mg/mL), Phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), NADPH (1 mM)	37°C, 15 min, stopped with acetonitrile	HPLC, UFLC system (Shimadzu Corporation), Cosmosil 2.5C18-MS-II column (Nacalai Tesque, Inc.), Water/Acetonitrile = 80/20 (0 min) – 0/100 (6 min), 0.3 mL/min, UV detection 254 nm
Liver-UGT (Thyroxine-glucuronide formation activity)	[¹²⁵ I] Thyroxine (1 μ M)	Liver S9 (<i>ca</i> 1.0 mg/mL), Tris/HCl buffer (66 mM, pH 7.4), UDPGA (4 mM), MgCl ₂ (10 mM), Brij58 (0.05%), D-saccharic acid-1,4-lactone (1.4 mM)	37°C, 2 hr, stopped with methanol	TLC, 5715 plate (Merck), Ethyl acetate/methyl ethyl ketone/formic acid/water, 5:3:1:1 (v/v/v/v), visualized with Imaging Plate and Fluoro Image Analyzer FLA-5000
Testis-17 β -HSD (Androstenedione dehydrogenase activity)	[4- ¹⁴ C] Androstenedione (10 μ M)	Testis homogenate (<i>ca</i> 0.1 mg/mL), Tris/HCl buffer (50 mM, pH 7.4), Sucrose (0.25 M), EDTA (1 mM), PMSF (0.1 mg/mL), NADPH (1 mM)	37°C, 90 min, stopped with ethyl acetate	TLC, 5715 plate (Merck), Chloroform/ethyl acetate, 3:1 (v/v), visualized with Imaging Plate and Fluoro Image Analyzer FLA-5000

UGT, UDP-glucuronosyltransferase; 17 β -HSD, 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenase; UDPGA, Uridine 5 -diphosphoglucuronic acid; NADPH, Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PMSF, Phenylmethylsulfonyl fluoride; FL, Fluorometric analysis; TLC, Thin-layer chromatography; HPLC, High-performance liquid chromatography

2-5⑦. 病理検査

1) 器官重量

生後 30 日齢で安楽殺した全動物について以下の組織／器官を摘出し、重量を測定した。また、生後 30 日の最終体重値に基づいて相対重量(体重比重量)を算出した。測定した組織／器官は次のとおりとした。

精巣^{a)}、精巣上体^{a)}、前立腺腹葉、肛門挙筋+球海綿体筋、甲状腺^{a)+b)}、肝臓、腎臓^{a)}

a): 両側ともに合わせて測定

b): 気管とともに 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、トリミングして重量測定

2) 剖検

全動物の組織、器官を全身的に肉眼検査した。

2-5⑩. 統計解析

対照群との間で有意水準 1%および 5%として統計解析した。

血液生化学検査、ホルモン測定、酵素活性および器官重量は、F 検定を用いた。等分散の場合には Student の t 検定、不等分散の場合には Welch 検定で解析した。いずれの検査項目も全て両側検定で解析した。

3. 結果

3-1. 症状観察

投与期間を通じて症状所見は認められなかった。

3-2. 体重

投与期間を通じて明確な体重影響は認められなかった。

3-3. 血液生化学検査

血液生化学検査の結果は Table 4 のとおりであった。

対照群と比較して統計学的に有意な変動は PB 投与群および DEHP 投与群ともに認められなかった。

3-4. ホルモン測定

TSH、T3 および T4 の測定結果は Table 5 のとおりであった。

対照群と比較して統計学的に有意な変動として PB 投与群では TSH の高値 ($p<0.05$)、DEHP 投与群では T3 の低値 ($p<0.01$) が認められた。

3-5. 酵素活性

① 肝臓;

Table 6 のとおり、PB 投与群および DEHP 投与群ともに対照群と比較して測定した全ての薬物代謝酵素 (CYP2B、CYP4A、CYP3A および UGT) について統計学的有意な酵素誘導 ($p<0.01$) が認められた。誘導パターンとして、特に CYP2B は PB 投与

群で強く誘導されていたのに対し、DEHP 投与群では CYP4A が強く誘導された。

② 精巣；

Table 7 のとおり、PB 投与群および DEHP 投与群ともに 17 β -HSD の酵素誘導は認められなかった。

3-6. 病理検査

① 器官重量

各器官の絶対および相対重量は Table 8-1、8-2、8-3、8-4 のとおりであった。

多くの先行研究の報告事例と同様、PB および DEHP 投与群において、対照群と比較して肝臓の絶対および相対重量ともに統計学的有意な高値 ($p < 0.01$) が認められた (IARC, 2001; IARC, 2013)。

その他、内分泌関連の組織(甲状腺、精巣など)において PB あるいは DEHP 投与の影響と思われる器官重量の変動は認められなかった。

② 剖検

肝臓の大型化が PB および DEHP 投与群において認められた。

その他、対照群を含めて同週齢、同系統のラットにおいて自然発生的に認められる所見(腎臓の透明巣など)が散見されたが、投与の影響と思われる顕著な変化は認められなかった。

Table 4. Summary of biochemistry

Group		TP (g/dL)	Alb (g/dL)	T-Cho (mg/dL)	PL (mg/dL)	TG (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)
Control	Mean	5.1	2.3	89	185	189	14	0.2
	SD	0.18	0.09	9.3	21.3	83.2	3.4	0.00
	n	5	5	5	5	5	5	5
PB	Mean	5.0	2.2	114	219	246	14	0.2
	SD	0.12	0.05	18.4	12.9	127.1	1.7	0.00
	n	5	5	5	5	5	5	5
DEHP	Mean	5.0	2.5	77	166	106	12	0.2
	SD	0.17	0.11	10.0	15.2	31.2	1.7	0.04
	n	5	5	5	5	5	5	5

Table 5. Summary of hormone levels in serum

Group		TSH (ng/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μ g/dL)
Control	Mean	7.5	0.8	4.05
	SD	0.95	0.04	0.270
	n	5	5	5
PB	Mean	9.5#	0.7	4.53
	SD	1.43	0.13	0.899
	n	5	5	5
DEHP	Mean	9.2	0.6 ##	3.95
	SD	3.50	0.07	0.694
	n	5	5	5

#: Significantly different from control group ($p < 0.05$)

##: Significantly different from control group ($p < 0.01$)

Table 6. Summary of enzyme activities

Group	S9 protein [mg/g liver]	CYP2B [pmol/min/mg S9 protein]	CYP4A [pmol/min/mg S9 protein]	CYP3A [pmol/min/mg S8 protein]	UGT [pmol/min/mg S9 protein]
Control	165 ±11.2 (5)	14 ±2.0 (5)	186 ±50.4 (5)	3008 ±153.8 (4)	0.25 ±0.019 (5)
PB	173 ±7.1 (5)	218### ±34.9 (5)	273### ±13.2 (5)	7700### ±878.1 (4)	0.45### ±0.039 (5)
DEHP	162 ±2.2 (5)	28### ±5.6 (5)	1825### ±384.4 (5)	3748### ±251.7 (4)	0.61### ±0.059 (5)
Mean ± SD, (n)					
###: Significantly different from control group (p<0.01)					

Table 7. Enzyme activity of 17β-HSD

Group	17β-HSD [pmol/min/mg testis homogenate]
Control	25.7 ±4.07 (5)
PB	29.0 ±6.38 (5)
DEHP	31.5 ±6.10 (5)
Mean ± SD, (n)	

Table 8-1. Summary of absolute organ weights

Group		Liver g	Kidneys g	Testes mg
Control	n	5	5	5
	Mean	6.31	1.37	933
	SD	± 0.36	± 0.07	± 116
PB	n	5	5	5
	Mean	8.35##	1.38	894
	SD	± 0.86	± 0.10	± 98
DEHP	n	5	5	5
	Mean	8.10##	1.43	820
	SD	± 0.47	± 0.11	± 48
##: Significantly different from control group (p<0.01)				

Table 8-2. Summary of absolute organ weights (continued)

Group		Thyroid mg	Ventral prostate mg	LABC mg
Control	n	5	5	5
	Mean	10.8	69.1	111
	SD	± 0.87	± 15.1	± 8.8
PB	n	5	5	5
	Mean	11.9	71.6	98
	SD	± 1.99	± 10.0	± 3.8
DEHP	n	5	5	5
	Mean	10.0	72.2	106
	SD	± 1.63	± 9.3	± 14.4
LABC: Levator ani plus bulbocavernosus muscles complex				

Table 8-3. Summary of relative organ weights

Group		Final body weights	Liver	Kidneys	Testes
		g	g%	g%	mg%
Control	n	5	5	5	5
	Mean	128	4.96	1.07	730
	SD	± 5.5	± 0.17	± 0.093	± 58.7
PB	n	5	5	5	5
	Mean	126	6.59##	1.09	707
	SD	± 6.0	± 0.34	± 0.054	± 65.7
DEHP	n	5	5	5	5
	Mean	124	6.53##	1.15	661
	SD	± 5.3	± 0.22	± 0.041	± 8.0

##: Significantly different from control group (p<0.01)

Table 8-4. Summary of relative organ weights (continued)

Group		Final body weights	Thyroid	Ventral prostate	LABC
		g	mg%	mg%	mg%
Control	n	5	5	5	5
	Mean	128	8.50	53.9	87.4
	SD	± 5.5	± 0.76	± 9.76	± 5.93
PB	n	5	5	5	5
	Mean	126	9.43	56.8	77.6
	SD	± 6.0	± 1.39	± 8.93	± 6.89
DEHP	n	5	5	5	5
	Mean	124	8.13	58.3	85.3
	SD	± 5.3	± 1.65	± 8.14	± 7.97

LABC: Levator ani plus bulbocavernosus muscles complex

4. 考察

第 1 章序論で既述のとおり、Phenobarbital (PB) および Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は肝毒性物質として既知見情報が豊富である (Haines ら、2019; Rusyn ら、2006; IARC、2001; IARC、2013)。本章の検討においても既知見情報を再現する結果となり、肝重量の増加および肝臓の大型化といった肝臓影響が発現した。7 日間の短期曝露条件においても肝臓影響は十分に認められており、幼若期の曝露でも性成熟後の曝露と同様の生体反応を示した。なお、一般症状、体重あるいは腎臓機能に対する顕著な影響は認められていないことから、肝毒性物質の投与量 (PB; 100 mg/kg/日、DEHP; 500 mg/kg/日) は妥当な設定であると考えられた。

肝臓の最も重要な役割の一つは、化学物質などの生体異物に対する代謝機能である。PB 投与群および DEHP 投与群ともに肝臓における各代謝酵素活性の結果からシトクロム P450 (CYP) などの薬物代謝酵素の誘導が認められた。このような異物代謝に関連する酵素群の活性亢進は適応性変化と考えられることから、離乳直後の幼若期に相当するラットにおいても生体防御機構が機能していることを示唆した結果と考えられた。ただし、化学物質の反復投与によって異物代謝機能が過剰に亢進される場合には、生体にとって有害影響 (機能異常) に進展し、毒性変化 (肝障害の発現) として顕在化することに留意する必要がある。

各薬物代謝酵素活性の結果から注目すべき点は、化学物質毎に誘導される酵素種のパターンに差異があることである。PB 投与群では 7-pentoxoresorufin O-depeptylase (CYP2B)、DEHP 投与群では Lauric acid ω -hydroxylase (CYP4A) が特徴的に誘導されている。CYP を含む肝臓中の代謝酵素は、生体内において化学物質のような生体外物質の異物代謝 (解毒作用) を担っているだけでなく、ステロイドホルモンあるいは脂質などといった内因性生理活性物質にも高い基質特異性を有するものがある。したがって、解毒作用亢進に伴って誘導された薬物代謝酵素のサブタイプ

次第では、内因性生理活性物質に対する影響の有無を考慮することも重要になると思われる。既存の研究報告では、薬物代謝酵素誘導の発現下の内因性生理活性物質に対する影響の調査事例が少ない。薬物代謝酵素は肝臓だけではなく腎臓、生殖器(精巣、卵巣)などにも発現している。本章の検討は、幼若期の実験動物(ラット)を用いているため、曝露期間中における生殖器(精巣)の機能は未成熟の段階にあり、肝毒性物質を投与しても薬物代謝酵素誘導を介した内因性生理活性物質の変動影響に関連した生殖機能異常を示唆するような兆候は検出されなかった。PB 投与群において甲状腺刺激ホルモン(TSH)の高値、DEHP 投与群において甲状腺ホルモン(T3)の低値が認められた。PB 投与群および DEHP 投与群ともに甲状腺ホルモンの代謝の関係する UGT グルクロン酸転移酵素(UGT)の誘導が検出されていることから、甲状腺ホルモンの胆汁排泄亢進に関連した代償性変化が認められている可能性が考えられた。一方、精巣では、特定の CYP(アロマトラーゼ;CYP19 など)を阻害する物質(レトロゾール(医薬品)など)は知られているものの、肝臓とは対照的に酵素を誘導するような物質は少ないのかもしれない(Pilutin ら、2014;Cappon ら、2011)。

本章で検討した肝毒性物質曝露による幼若期の生体反応、あるいは次章で検討する性成熟期前後における生体反応に着目した研究成果は、今後とも研究が継続され、老齢期を含めたヒトの成長ステージに応じた内分泌組織の反応性の変化を見極める参照情報としての有意性は高いと考えられる。薬物代謝酵素誘導に伴って内因性生理活性物質の代謝能が変調する懸念に対して、化学物質曝露との関連影響を報告しているような研究事例は少ない。本研究の成果は、薬物代謝酵素誘導と内因性生理活性物質の代謝亢進との関係に注目した研究の重要性を示す一助となることが期待される。

第 3 章

肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) の 内分泌組織に対する影響の検討 ～ 幼若期から性成熟期まで反復曝露 ～

1. 緒言

内分泌組織への影響評価では、化学物質曝露による影響が鋭敏に認められる幼若期から性成熟期にかけての評価が重要となる。本章では、2 種の肝毒性物質 (Phenobarbital、Di-2-ethylhexyl phthalate) を実験動物(ラット)に離乳直後の幼若期から性成熟期まで中期 (31 日間) 曝露し、肝臓影響発現下における生殖器あるいは甲状腺に対する生体影響を検討する。また、認められた影響については発現作用機序を解明する。さらに、本章と前章 (幼若期の短期曝露) の結果を比較し、曝露期間あるいは成長ステージ毎の内分泌組織に対する影響の感受性差を考察する。

2. 材料および方法

2-1. 実験施設

住友化学株式会社 生物環境科学研究所(大阪府大阪市)で各実験を実施した。

2-2. 被験物質

毒性研究において汎用されている肝毒性物質のうち、第 2 章の検討で用いた以下の 2 物質を研究材料として選択した。

2-3①. Phenobarbital (PB)

Phenobarbital sodium(ロット番号;EPG6760、純度;98.0%)は、富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)より購入した。

2-3②. Di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP)

Di-2-ethylhexyl phthalate(ロット番号;DCP6102、純度;97.0%)は、富士フイルム和光純薬株式会社(大阪)より購入した。

投与媒体には第 2 章と同様に既存の毒性報告を参照し、活用実績の多いコーンオイル(ナカライテスク株式会社、京都)を選択した。

2-3. 試験系

第 2 章の検討と同様にラットを用いて試験を実施した。性別、系統、供給源、入荷時

日齢および飼育条件も第 2 章の検討と合わせた。試験供試時の体重範囲は 63.5～86.4 g であった。

2-4. 曝露方法

2-4①. 群構成

媒体(コーンオイル)のみを投与する対照群、PB 投与群(投与量;100 mg/kg)および DEHP 群(投与量;500 mg/kg)の計 3 群を設定し、各群ともに 10 匹ずつ割り当てた。ただし、PB 群において投与ミスと思われる動物死亡(1 例)が認められたため、9 匹で評価した。各動物に対する投与量および投与液量は第 2 章の検討と合わせた。

2-4②. 投与方法

第 2 章の検討と同様の投与経路および投与方法を選択した。投与回数は、1 回/日とし、8:00～10:00 に作業した。投与期間は、31 日間とし、生後 23 日から投与を開始した。

2-5. 検査項目

2-5①. 症状観察

2 回/日、投与前後に生死確認を含めて実施した。投与後の観察は、投与後 1 時間以内に対応した。

2-5②. 体重

1 回/日、投与液量算出のため、投与前に実施した。

2-5③. 摂餌量

1 回／週、連続 72 時間にわたって摂餌量を測定し、動物 1 匹あたりの 1 日摂取量を算出した。

2-5④. 性成熟(包皮分離)

生後 30 日から毎日 (8:00~12:00) 検査し、各動物について包皮分離が完了するまで継続した (Korenbrodt ら、1977)。未成熟の動物は、包皮分離完了するまでに A; 未分離 ⇒ B; 部分的分離 ⇒ C; 筋状 ⇒ D; 分離完了の過程を経る (Figure 2)。D の状態を包皮分離完了の基準としたが、C の状態が 3 日間以上継続する場合には包皮分離を完了と見なした。

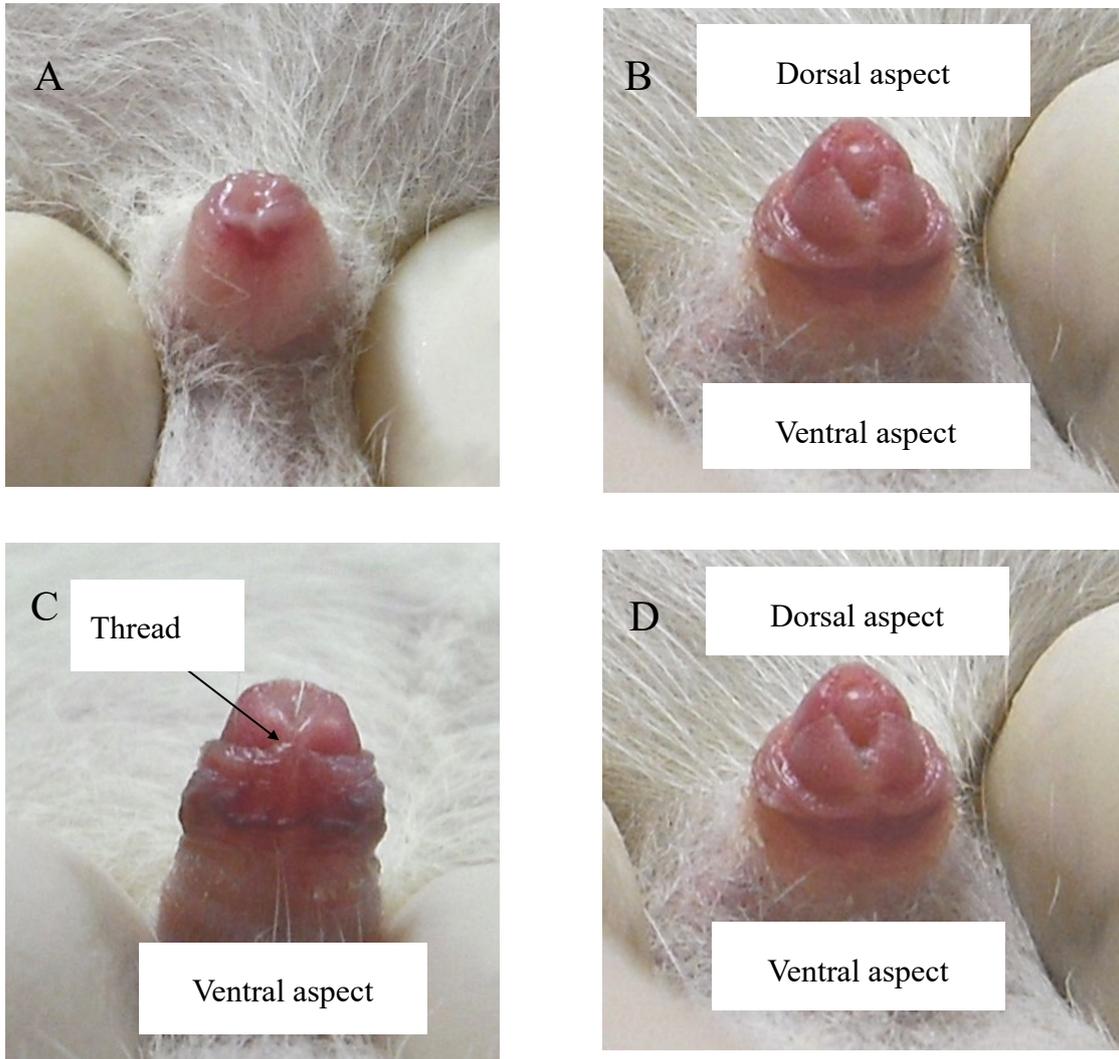


Figure 2. Process to preputial separation (PPS) completion

A; No separation B; Partial separation C; Thread D; Completion

2-5⑤. 採血

採血前(生後 54 日)に各動物は飼育室から別室に移動させて 1 時間静置した。全動物の採血順はランダム化し、投与最終日の投与後 2~3 時間以内に安楽殺(無麻酔下での断頭)することによって採血した。血中ホルモン値は日内変動することが知られているので、採血は 10:00~13:20 までに終了した。血液サンプルは遠心分離し、血清サンプルとして-80℃で保管した。

2-5⑥. 血液生化学検査

生化学自動分析装置 JCA-BM1250(日本電子株式会社、東京)を用いて総タンパク、アルブミン、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、尿素窒素について第 2 章と同様の方法で測定した。

2-5⑦. ホルモン測定

テストステロン、甲状腺ホルモン(T3、T4)および甲状腺刺激ホルモン(TSH)の測定を以下の方法で実施した。

1) テストステロン (ng/mL)

高速液体クロマトグラフィー Prominence UFLC system(株式会社島津製作所、東京)と質量分析計 Thermo TSQ™ Vantage triple quadrupole mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bedford, MA, USA)を連結させて測定した。TSQ Vantage のイオン源としては、低極性物質の測定に適しており、移動相の影響を受けにくい大気圧化学イオン化(APCI)を採用した。内部標準物質は重水素で標識した 16, 16, 17-d3 テストステロン(Sigma-Aldrich、東京)とし、アセトニトリルで希釈して用いた。

<UFLC の設定条件>

波長 ;254 nm

カラム ;COSMOSIL 3C18-EB Packed Column(ナカライテスク株式会社)

移動相 ;勾配溶離(0.1%ギ酸添加の水およびメタノール)

<APCI 条件>

ソース温度 ;400°C

Sheath gas フロー ;10 arb

Aux gas フロー ;5 arb

放電電流 ;4.0 μ A

キャピラリー温度 ;200°C

モニタリングイオン ;テストステロン Precursor ion m/z 289 (Product ion m/z 97
および 109)、d3 体テストステロン Precursor ion m/z 292
(Product ion m/z 97 および 109)

2) TSH (ng/mL)

第 2 章と同様の方法で測定した。

3) T3 および T4

第 2 章と同様の方法で測定した。

2-5⑧. 酵素活性

各群から 6 例の動物を選抜し、肝臓および精巣のホモジネートを第 2 章と同様の方法で調製した。肝臓(一部)および精巣(片側)は生後 54 日に摘出後、ホモジネートを調製するまで-80°Cで保管した。

2-5⑨. 病理検査

1) 器官重量

生後 54 日齢で安楽殺した全動物について以下の組織／器官を摘出し、重量を測定した。また、生後 54 日の安楽殺前に測定した最終体重値に基づいて相対重量(体重比重量)を算出した。測定した組織／器官は次のとおりとした。

精巣^{a)}、精巣上部^{a)}、前立腺腹葉、凝固線＋精嚢

肛門挙筋＋球海綿体筋、甲状腺^{a)+b)}、肝臓、腎臓^{a)}

a): 両側ともに合わせて測定

b): 気管とともに 10%中性緩衝ホルマリンで固定後、トリミングして重量測定

2) 剖検

全動物の組織、器官を全身的に肉眼検査した。

3) 病理組織学的検査

剖検後、肝臓の一部および片側の精巣を除き、1)で器官重量を測定した組織／器官は 10%中性緩衝ホルマリンで固定した。肝臓(一部)と精巣(片側)は酵素活性の項で記載のとおり、-80℃で保管した。残りの精巣は、ホルマリン・ショ糖・酢酸混合液(FSA)で固定後、10%中性緩衝ホルマリンに移した。肝臓、甲状腺、腎臓、精巣、精巣上部について病理組織標本を作製(切り出し、包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色、封入)し、光学顕微鏡を用いて検査した。

2-5⑩. 肝臓中のテストステロン代謝反応測定

1) S9 画分を用いたテストステロン代謝

2-5⑧で調製し、凍結保存していた肝 S9 画分(各群から 6 例)を氷上で溶解後、37°Cで 5 分間インキュベートし、肝臓中に残存している内因性テストステロンを代謝消失させた。14C 標識した[4-¹⁴C]テストステロン、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)、MgCl₂・6H₂O、PBS (pH 7.4)を次に示した終濃度で調製した試料(190 μL)に肝 S9 を 10 μL 添加し、37°Cで 15 分間インキュベートした。

[4-¹⁴C]テストステロン;

非標識テストステロンで 10 倍希釈、テストステロン終濃度 45μM

NADPH;

反応液中終濃度 3 mM

MgCl₂・6H₂O;

反応液中終濃度 3 mM

PBS;

100 mM

インキュベート後、200 μL のアセトニトリルを添加、ボルテックスすることで反応を停止させ、氷上で 5 分間静置した。その後、再度ボルテックスし、遠心分離(15000 rpm、10 分間、4°C)した上清を 100 μL 回収した。

2) 未反応の[4-¹⁴C]テストステロン測定

上清中の未反応[4-¹⁴C]テストステロンを薄層クロマトグラフィー(TLC)で測定した。

【分析条件】

TLC Plate : TLC Plate 20 x 20 Silica Gel 60 F254 Merck No.5715

展開溶媒 : Chloroform/ethyl acetate/ethanol = 4/1/0.7 (v/v)

展開後、風乾し、イメージングプレート(富士フィルム)に密着し、フルオロイメージアナライザ(富士フィルム)で現像した。得られた結果から試料中における[4-¹⁴C]テストステロンの減少率を算出した。

2-5⑪. 統計解析

対照群との間で有意水準 1%および 5%として統計解析した。

一般症状所見は、片側の Fisher の直接確率検定を用いて解析した。その他の検査項目は全て両側検定で解析した。

体重、摂餌量、包皮分離時の体重・日齢、血液生化学検査、ホルモン測定、酵素活性および器官重量は、F 検定を用いた。等分散の場合には Student の t 検定、不等分散の場合には Welch 検定で解析した。剖検所見および病理組織所見(グレード区分なし)は、Fisher の直接確率検定を用いて解析した。グレード区分のある病理組織所見は Mann-Whitney U 検定を用いて解析した。

テストステロン代謝反応の測定は、t 検定を実施した。

3. 結果

3-1. 症状観察

痂皮を認める動物が投与期間中にわたって対照群を含めて散見された。同週齢、同系統のラットにおいて自然発生的に認められる所見であることから、投与の影響ではないと判断した。

3-2. 体重

各群の体重推移は Fig. 3 に示した。PB 投与群および DEHP 投与群ともに一般状態の悪化あるいは毒性影響を示唆するような体重変化は認められず、投与期間を通じて統計学的有意な変動は検出されなかった。

3-3. 摂餌量

次表 (Table 9) で示すとおり、PB 投与群で生後 26 日に統計学的に有意な一過性の摂餌量の高値 ($p < 0.01$) が認められた。しなしながら、投与期間を通じて一貫性のある摂餌量の変動傾向は検出されていないことから、投与の影響ではないと考えられた。したがって、PB 投与群および DEHP 投与群ともに摂餌量への影響は認められなかった。

3-4. 性成熟(包皮分離)

Table 10 のとおり、PB 投与群および DEHP 投与群ともに包皮分離完了時の日齢および体重ともに投与の影響は認められなかった。対照群および各投与群の全動物は、投与期間終了までに包皮分離を完了した。

3-5. 血液生化学検査

血液生化学検査の結果は Table 11 のとおりであった。

対照群と比較して統計学的に有意なアルブミンの高値が DEHP 投与群 ($p<0.01$) で認められた。他の検査項目に統計学有意差は認められなかった。ラットを用いた先行事例研究でも同様の報告があり、肝毒性も認められていることから、タンパク代謝異常の可能性が考えられた(産業技術総合研究所、2005)。

PB 投与群では何ら変動は認められなかった。

3-6. ホルモン測定

Table 12 のとおり、対照群と比較して PB 投与群では、統計学的に有意なテストステロンの低値 ($p<0.01$) が認められた。PB 投与群および DEHP 投与群ともに TSH の高値が認められたが、DEHP 投与群は対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。ただし、PB 投与群よりも TSH 値が高いことから、投与の影響であると判断した。T3 は PB 投与群および DEHP 投与群ともにわずかな変動であるものの、統計学的に有意な低値 ($p<0.05$) が認められた。T4 は DEHP 投与群で統計学的に有意な低値 ($p<0.01$) が認められた。

3-7. 酵素活性

① 肝臓;

各酵素の活性は Table 13 のとおりであった。

PB 投与群では、CYP2B、CYP3A、CYP4A および UGT の酵素誘導が認められた。特に CYP2B は、強く酵素誘導(対照群の 27.2 倍の活性)された。

DEHP 投与群では、CYP4A が強く酵素誘導(対照群の 6.5 倍の活性)されていたの

に対し、CYP2B および CYP3A の酵素誘導は認められなかった。UGT についてはわずかに酵素誘導されている傾向は認められたが、統計学的有意差($p=0.097$)はなかった。

PB 投与群および DEHP 投与群ともに薬物代謝酵素が強く誘導しているものの、誘導されている酵素の誘導パターンは異なっていた。

② 精巣;

Table 14 のとおり、PB 投与群および DEHP 投与群ともに 17 β -HSD の酵素誘導は認められなかった。各投与群の動物の精巣は、対照群と同程度のテストステロン産生能を有しているものと考えられた。

3-8. 病理検査

① 器官重量

各器官の絶対および相対重量は Table 15-1、15-2、15-3、15-4 のとおりであった。

多くの研究報告事例と同様、本研究においても PB および DEHP 投与群において、対照群と比較して肝臓の絶対および相対重量ともに統計学的に有意な高値($p<0.01$)が認められた(IARC、2001; IARC、2013)。さらに肛門挙筋+球海綿体筋(LABC)の絶対および相対重量の高値($p<0.01$)が PB 投与群、相対重量の高値($p<0.05$)が DEHP 投与群で統計学的有意に認められた。DEHP 投与群では、腎臓の絶対および相対重量の統計学的に有意な高値(絶対; $p<0.05$ 、相対; $p<0.01$)が認められた。

その他、内分泌関連の組織(甲状腺、精巣など)において PB あるいは DEHP 投与の影響と思われる器官重量の変動は認められなかった。

② 剖検

肝臓の大型化が PB および DEHP 投与群において認められた。

DEHP 投与群の 1 例で精巣(片側のみ)の軟化、精嚢の小型化、精巣上体の小型が認められた。

PB 投与群の 1 例で精巣(片側のみ)の大型化が認められた。

その他、対照群を含めて同週齢、同系統のラットにおいて自然発生的に認められる所見(肝臓の灰白色巣、腎臓の陥凹巣など)が散見されたが、投与の影響ではないと判断した。

③ 病理組織学的検査

PB 投与群の肝臓において小葉中心性の肝細胞肥大(Fig. 4B)が認められたのに対し、DEHP 投与群ではびまん性の肝細胞肥大(Fig. 4C)および好酸性顆粒が認められた。肝臓における各所見については、先行研究で報告されている結果と類似するものであった(Haines ら、2019; Rusyn ら、2006)。

PB 投与群および DEHP 投与群の甲状腺においてコロイド領域の減少および濾胞上皮細胞の高さ増加が認められた(Fig. 5B)。さらに PB 投与群では、1 例において濾胞上皮細胞の過形成が認められた(Fig. 5C)。

PB 投与群の剖検において精巣に所見を認めた 1 例では、成熟精子の減少を伴うびまん性の精細管拡張、ならびに剥離精原細胞および細胞残屑が認められた。別の 1 例では局所性の精細管萎縮が認められた。ただし、片側性の変化であり、2 例の所見は質的に異なっている。さらに、同投与群の他の動物では同様の変化は認められていない。また、精巣機能の指標として性成熟(包皮分離)の遅れはなく、他の副生殖器およびテストステロン値に異常は認められていない。したがって、投与の影響ではなく、偶発的な変化であると考えられた。

DEHP 投与群の剖検において精巣および精巣上体に所見を認めた1例では、多核巨細胞形成および成熟精子を伴うびまん性の精細管萎縮が認められた。同所見は同系統のラットにおいては自然発生的に認められる所見であり、同投与群の他の動物において異常は認められていないことから、投与の影響ではなく、偶発的な変化であると考えられた。また、他の副生殖器およびテストステロン値にも異常は認められなかった。

器官重量の測定において DEHP 投与群において腎臓重量の高値が認められていたが、血液生化学検査および病理組織学的検査に何ら影響は認められていないことから、毒性学的意義のない変化と考えられた。

その他、対照群も含めて同週齢、同系統のラットにおいて自然発生的に認められる所見が散見されたが、いずれも小数例であり投与の影響ではないと判断した。

3-9. 肝臓中のテストステロン代謝反応測定

Fig. 6 のとおり、対照群と比較して PB 投与群においてテストステロン消失の顕著な亢進 ($p < 0.01$) が認められた。DEHP 投与群におけるテストステロン消失は対照群と同程度であった。

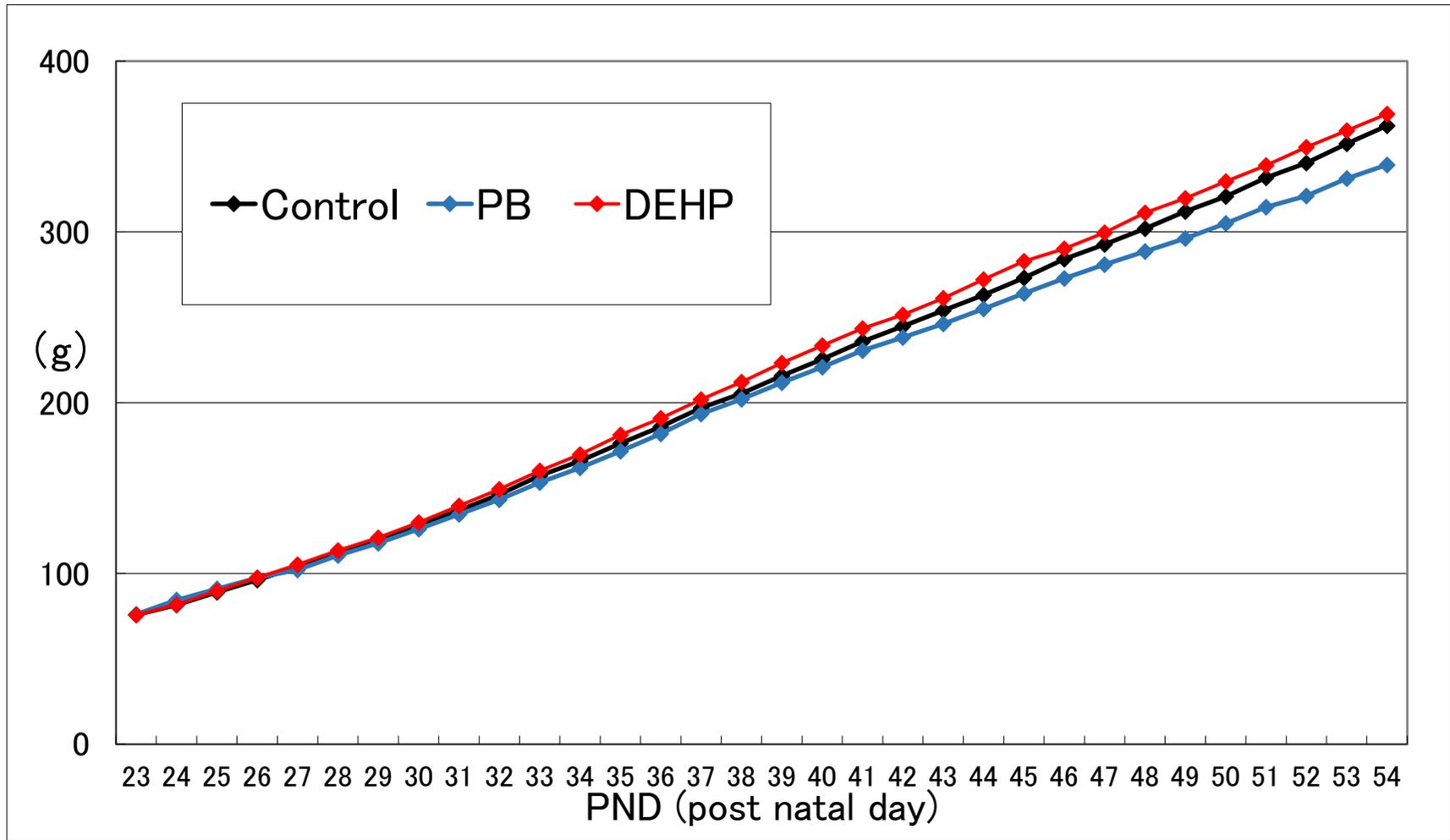


Figure 3. Body weight during treatment period

Table 9. Summary of food consumption during treatment period

Group	PND			
	26	33	40	47
Control	12	17	22	24
	± 0.8	± 1.2	± 1.9	± 1.6
	(5)	(5)	(5)	(5)
PB	13##	17	22	24
	± 0.5	± 0.5	± 0.5	± 1.6
	(5)	(5)	(5)	(5)
DEHP	12	17	23	24
	± 0.0	± 0.9	± 0.7	± 1.8
	(5)	(5)	(5)	(5)
Mean ± SD, g/animal/day, (n)				
Days represent the terminal day of the measurement period.				
##: Significantly different from the vehicle group (p<0.01)				

Table 10. Summary of age and body weight at preputial separation

Group		Age at PPS	Body weight at PPS
			(g)
Control	n	10	10
	Mean	42.2	247.1
	SD	± 1.32	± 25.18
	CV	3	10
PB	n	9	9
	Mean	44.4	259.0
	SD	± 3.28	± 31.60
	CV	7	12
DEHP	n	10	10
	Mean	43.8	269.9
	SD	± 2.15	± 24.83
	CV	5	9
PPS: Preputial separation			

Table 11. Summary of biochemistry

Group	TP (g/dL)	Alb (g/dL)	T-Cho (mg/dL)	PL (mg/dL)	TG (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Cre (mg/dL)
Control	6.5	2.6	89	208	667	13	0.3
	± 1.06	± 0.25	± 11.2	± 35.5	± 546.2	± 4.9	± 0.13
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
PB	6.2	2.4	97	206	460	15	0.3
	± 0.31	± 0.09	± 17.7	± 32.3	± 151.3	± 5.0	± 0.13
	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)
DEHP	6.3	2.9##	82	189	274	13	0.2
	± 0.24	± 0.15	± 14.3	± 26.7	± 172.4	± 1.8	± 0.03
	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
Mean ± SD, (n)							
##: Significantly different from control group (p<0.01)							

Table 12. Summary of hormone levels in serum

Group	Testosterone (ng/mL)	TSH (ng/mL)	T3 (ng/mL)	T4 (μg/dL)
Control	2.6	10.5	0.7	6.04
	± 1.66	± 2.16	± 0.10	± 1.041
	(10)	(10)	(10)	(10)
PB	0.5##	12.8#	0.6#	6.07
	± 0.32	± 2.51	± 0.10	± 1.020
	(9)	(9)	(9)	(9)
DEHP	1.7	13.5	0.6#	4.27##
	± 1.12	± 6.32	± 0.09	± 0.736
	(10)	(10)	(10)	(10)
Mean ± SD, (n)				
#: Significantly different from control group (p<0.05)				
##: Significantly different from control group (p<0.01)				

Table 13. Summary of enzyme activities

	S9 protein	CYP2B	CYP4A	CYP3A	UGT
Group	[mg/g liver]	[pmol/min/mg S9 protein]	[pmol/min/mg S9 protein]	[pmol/min/mg S9 protein]	[pmol/min/mg S9 protein]
Control	174	5	225	1465	0.28
	±21.8	±0.8	±50.2	±355.3	±0.074
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
PB	180	136##	307#	4898##	0.52##
	±7.1	±26.2	±47.6	±1433.0	±0.068
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
DEHP	194	6	1472##	1599	0.36
	±11.8	±2.2	±294.0	±457.8	±0.080
	(6)	(6)	(6)	(6)	(6)
Mean ± SD, (n)					
#: Significantly different from control group (p<0.05)					
##: Significantly different from control group (p<0.01)					

Table 14. Enzyme activity of 17β-HSD

	17 β -HSD
Group	[pmol/min/mg testis homogenate]
Control	72.3
	±14.83
	(6)
PB	68.2
	±21.20
	(6)
DEHP	73.3
	±12.71
	(6)
Mean ± SD, (n)	

Table 15-1. Summary of absolute organ weights

		Liver	Kidneys	Testes	Epididymides
Group		g	g	mg	mg
Control	n	10	10	10	10
	Mean	16.85	2.71	2945	476.8
	SD	± 2.287	± 0.341	± 285.8	± 57.27
	CV	14	13	10	12
PB	n	9	9	9	9
	Mean	20.02##	2.72	3035	443.9
	SD	± 1.439	± 0.253	± 495.8	± 34.77
	CV	7	9	16	8
DEHP	n	10	10	10	9
	Mean	25.65##	3.06#	2996	461.3
	SD	± 2.970	± 0.285	± 397.4	± 62.23
	CV	12	9	13	13
#: Significantly different from control group (p<0.05)					
##: Significantly different from control group (p<0.01)					

Table 15-2. Summary of absolute organ weights (continued)

		Thyroid	Ventral prostate	LABC	SVCG
Group		mg	mg	mg	mg
Control	n	10	10	10	10
	Mean	21.23	244.3	816.5	649.1
	SD	± 5.290	± 71.17	± 151.84	± 191.56
	CV	25	29	19	30
PB	n	9	9	9	9
	Mean	20.71	219.9	640.1##	601.8
	SD	± 3.772	± 41.18	± 52.01	± 122.50
	CV	18	19	8	20
DEHP	n	9	10	10	10
	Mean	20.34	258.2	728.6	634.0
	SD	± 3.082	± 22.88	± 72.77	± 136.69
	CV	15	9	10	22
SVCG: Seminal vesicles plus coagulating glands					
LABC: Levator ani plus bulbocavernosus muscles complex					
##: Significantly different from control group (p<0.01)					

Table 15-3. Summary of relative organ weights

		Final body weights	Liver	Kidneys	Testes	Epididymides
Group		g	g%	g%	mg%	mg%
Control	n	10	10	10	10	10
	Mean	362.2	4.64	0.75	815.1	131.8
	SD	± 37.08	± 0.294	± 0.056	± 51.93	± 10.81
	CV		6	7	6	8
PB	n	9	9	9	9	9
	Mean	339.3	5.90##	0.80	895.3	131.0
	SD	± 13.82	± 0.317	± 0.054	± 150.58	± 11.57
	CV		5	7	17	9
DEHP	n	10	10	10	10	9
	Mean	369.1	6.93##	0.83##	812.1	124.5
	SD	± 26.17	± 0.402	± 0.048	± 95.19	± 13.70
	CV		6	6	12	11

##: Significantly different from control group (p<0.01)

Table 15-4. Summary of relative organ weights (continued)

		Final body weights	Thyroid	Ventral prostate	LABC	SVCG
Group		g	mg%	mg%	mg%	mg%
Control	n	10	10	10	10	10
	Mean	362.2	5.90	67.3	225.3	178.9
	SD	± 37.08	± 1.457	± 17.01	± 32.86	± 48.89
	CV		25	25	15	27
PB	n	9	9	9	9	9
	Mean	339.3	6.11	64.7	188.7##	177.0
	SD	± 13.82	± 1.129	± 11.08	± 14.09	± 34.15
	CV		18	17	7	19
DEHP	n	10	9	10	10	10
	Mean	369.1	5.47	70.2	198.1#	171.9
	SD	± 26.17	± 0.657	± 7.80	± 22.39	± 35.02
	CV		12	11	11	20

SVCG: Seminal vesicles plus coagulating glands
LABC: Levator ani plus bulbocavernosus muscles complex
#: Significantly different from control group (p<0.05)
##: Significantly different from control group (p<0.01)

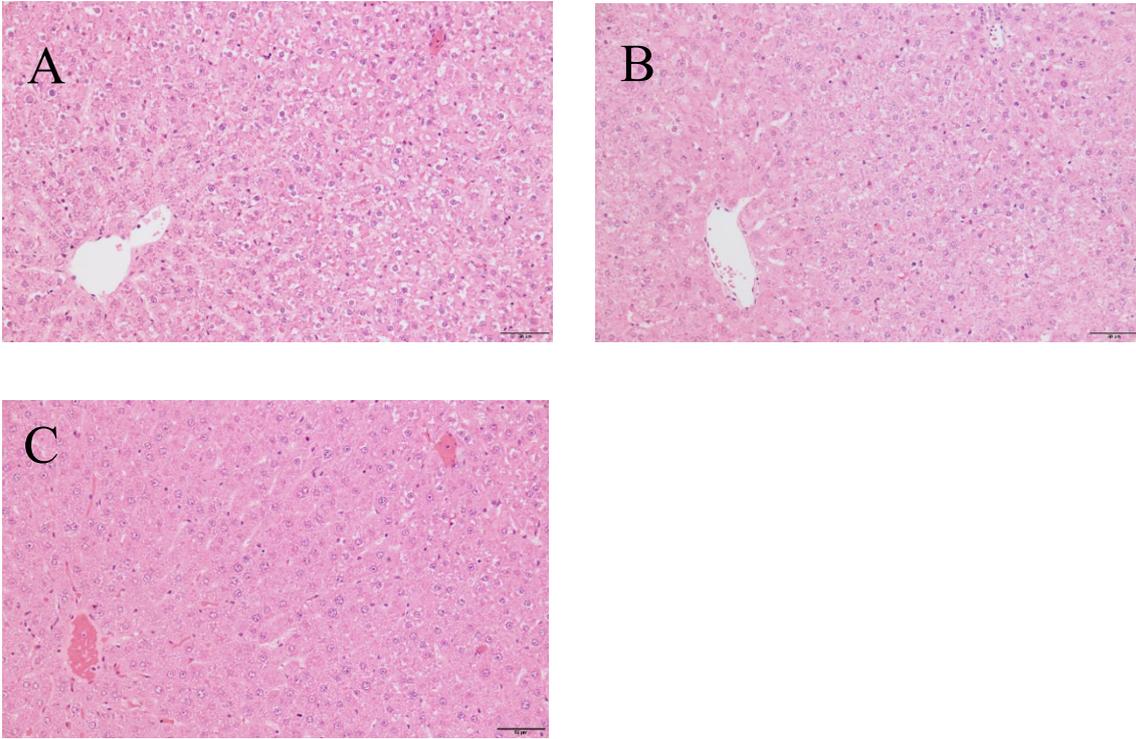


Figure 4. Histopathological lesions induced by exposure of PB and DEHP in Liver. H&E staining.

(A) Control group; normal liver. Bar=50 µm.

(B) PB group; centrilobular hepatocellular hypertrophy. Bar=50 µm.

(C) DEHP group; diffuse hepatocellular hypertrophy. Bar=50 µm.

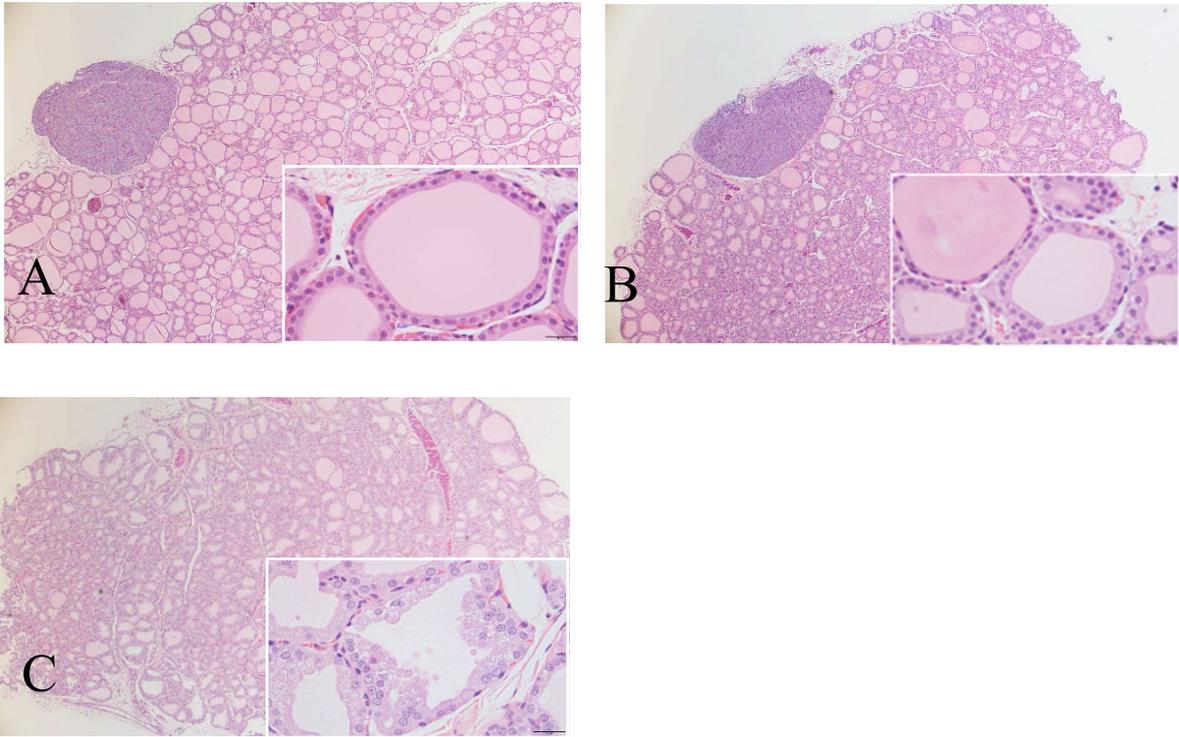
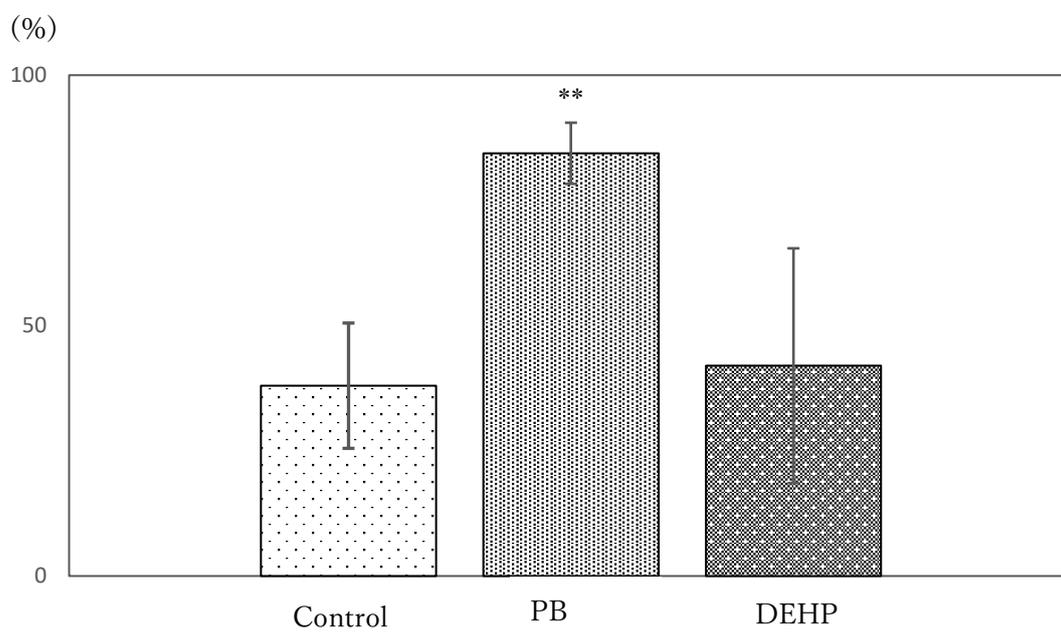


Figure 5C. Histopathological lesions induced by exposure of PB and DEHP in thyroid gland. H&E staining.

(A) Control group; normal thyroid gland. Bar=20 μm .

(B) PB group; reduced colloid area and increased height of follicular cell in the thyroid gland. Bar=20 μm .

(C) PB group; hyperplasia of follicular cell in the thyroid gland. Bar=20 μm .



** : Significantly different from control group ($p < 0.01$)

Figure 6. Reduction rate of Testosterone

4. 考察

既述のとおり、Phenobarbital (PB) および Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は肝毒性物質として既知見情報が豊富である (Haines ら、2019; Rusyn ら、2006; IARC、2001; IARC、2013)。さらに、DEHP を含むフタル酸類は内分泌かく乱物質 (Endocrine disruptor、ED 物質) であるとの研究事例が多数報告されている (Martinez-Arguelles ら、2013; Akingbemi ら、2004; Dong ら、2019)。PB および DEHP は肝臓の薬物代謝酵素誘導剤であり、誘導される酵素の中にはテストステロンやエストラジオールのようなステロイドホルモンの代謝に関連するものがある。しかしながら、薬物代謝酵素誘導の程度と生体内ホルモンレベルの変化との間の量的な関係性については報告事例が少ない (Coulson ら、2003; Rasoulpour ら、2015; Masubuchi ら、1997; Wilson および LeBlanc、1998)。そこで本章では離乳後の幼若期に相当する雄ラットに PB および DEHP を 31 日間反復投与して生殖器や甲状腺を含む内分泌組織 (生体内ホルモン制御機構) への影響を検討した。

PB 投与群では、投与期間を通じて摂餌量に一貫した影響はなく、体重値の有意な変動あるいは腎毒性は認められなかった。また、過度のストレス環境下では生体内ホルモンの不均衡が生じた結果、非特異的な所見の発現が懸念されるため、内分泌系に対する影響評価では留意すべきである。したがって、ED 物質の同定に重要な特異的な作用 (生体内ホルモンの産生阻害、受容体結合の阻害など) の有無を精緻に判別するためには、過度の毒性影響を伴わない適切な投与量の設定が必要となる。PB の投与量 (100 mg/kg 日) は、症状観察や体重などの各種検査項目の結果、過剰なストレス反応あるいは毒性影響の発現が認められず、肝臓影響は期待どおりに認められたことからの確な設定であったと思われる。肝重量の増加および肝細胞肥大は肝臓における薬物代謝酵素誘導に関連した適応性変化であり、既存の毒性知見に基づいた期待どおりの肝臓影響であった (IARC、2001)。血中テストステロンの低値が認められ

たが、DEHP 投与群では変動しなかった。妊娠後期のラットに PB 曝露した結果、児動物の胎児期、乳児期、思春期、性成熟期の各成長ステージにおいて血中および脳中テストステロンの低値が認められたとの報告事例がある (Gupta ら、1982)。しかしながら、PB 曝露による精巣機能と性成熟への影響に関する毒性情報は十分に知られている状況にない。肛門挙筋+球海綿体筋 (levator ani plus bulbocavernosus; LABC) の発達はアンドロゲン (テストステロンなど) によって影響を受けることが知られており (Breedlove ら、1999)、LABC の重量変化は血中アンドロゲンの変動と強い相関関係を持つ。PB 曝露による LABC の低値は、血中テストステロンの変動と関連しているものと考えられた。軽度の甲状腺影響として TSH 高値、T3 低値、コロイド領域の減少、濾胞上皮細胞の高さ増加が認められた。

PB 投与群における血中テストステロン低値に至るまでの想定作用機序は、次のとおりと考えられた。既述のとおり、PB は肝臓における薬物代謝酵素誘導と関連した適用性変化として、肝重量の増加および肝細胞肥大のような肝臓影響を惹起する。各代謝酵素活性の解析結果は、7-pentoxoresorufin O-depeptylase (CYP2B)、Testosterone 6 β -hydroxylase (CYP3A) および Lauric acid ω -hydroxylase (CYP4A) のようなチトクローム P450 (CYP) が PB 曝露によって誘導されていることを示した。一般的にテストステロンは、肝臓中の CYP2B および CYP3A などで代謝されることが報告されており、CYP2B は 16 α/β -水酸化、CYP3A は 6 β -水酸化に関与していることが知られている (Figure 7) (Turan ら、2001; Kandel ら、2017)。さらに、肝臓におけるテストステロン代謝反応をテストステロンの消失を指標に測定した結果、PB 投与群に

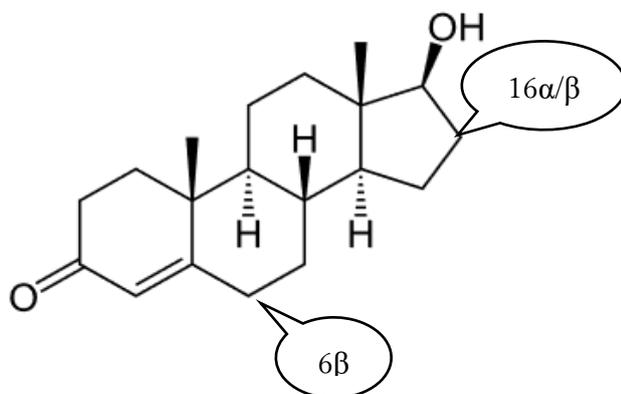


Figure 7. Structural formula of testosterone

において[4-¹⁴C]テストステロンの代謝反応の亢進が確認できた。一方、CYP4Aの誘導剤として知られているDEHPを投与した群では、CYP4Aの誘導は検出されたものの、血中テストステロンの変動を検出することはなく、CYP2BおよびCYP3Aの誘導も認められなかった。肝臓における[4-¹⁴C]テストステロンの代謝反応も対照群と同程度であった。17β-hydroxysteroid dehydrogenase (17β-HSD)の活性は、PB投与群およびDEHP投与群ともに変動しなかった。したがって、テストステロン産生組織である精巣に何ら影響が認められていないことから、PB投与群における血中テストステロンの低値はCYP2BおよびCYP3Aといったテストステロン代謝を担う酵素群の誘導によって惹起されたものと思われた。血中のアンドロゲンレベルと密接な関係にある前立腺腹葉および精嚢+凝固線 (seminal vesicle plus coagulating glands; SVCG)の重量変化ならびに性成熟(包皮分離)の完了日齢の遅延は認められなかった。また、血中のテストステロンレベルが低下し、下垂体から分泌される黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) 分泌が亢進した場合、精巣はLHの刺激を継続的に受けることになり、重量増加およびライディッヒ細胞の過形成の発現が想定される。しかしながら、本章の検討では精巣を含めた雄性生殖器の重量変化および病理組織学的変化が認められていないことから、LHの血中濃度は正常範囲内に維持されていると推察される。血中テストステロン値の変動と視床下部-下垂体-性腺 (HPG) 軸のフィードバック機構への影響の関係性は、限定的であり、個体差も大きいことが知られている (Damassa ら、1976)。少なくとも本章においてPB投与で惹起された血中テストステロン値の変動は、HPG軸の恒常性維持に影響するような重篤なものではないと考えられた。病理組織学的変化あるいは性成熟への影響を伴わないようなテストステロンレベルの変動は、生体にとって生理的に意義のある現象と認知する必要性が低いと推察された。

PB投与群で認められた甲状腺影響の想定作用機序は次のとおりと考えられた。PBは異物応答に関与する核内受容体である Constitutive androstane receptor (CAR)を

活性化することで CYP2B や UGT グルクロン酸転移酵素(UGT)といった多様な薬物代謝酵素を誘導することが知られている(Qatanani ら、2005)。UGT は甲状腺ホルモン(T3 および T4)をグルクロン酸抱合化することで代謝し、胆汁排泄を促進する(Meek ら、2003;Papineni ら、2015)。すなわち肝臓中で UGT が誘導されると血中からの T3 および T4 の半減期は短くなる。PB 投与によって発現する血中の甲状腺刺激ホルモン(TSH)の高値は、甲状腺ホルモンの循環血からの消失速度亢進によって惹起された視床下部-下垂体-甲状腺(HPT) 軸のフィードバック機構が機能したことによるものと考えられた。TSH の分泌亢進は、甲状腺を持続的に刺激することで T3 および T4 の産生を促し、濾胞上皮細胞の高さを増加させる。また、甲状腺中に貯蔵している甲状腺ホルモンが枯渇した結果、コロイド領域が減少する。

PB 投与群と同様に DEHP 投与群では、投与期間を通じて摂餌量に一貫した影響はなく、体重値の有意な変動あるいは重篤な腎毒性は検出されなかった。DEHP の投与量(100 mg/kg 日)は、過度のストレスあるいは毒性変化の発現がなく、肝臓影響(肝重量の高値、肝細胞肥大)は既知の毒性報告から期待された程度に認められたことからの確な設定であった(IARC、2013)。軽度の甲状腺影響として TSH 高値、T3 低値、コロイド領域の減少、濾胞上皮細胞の高さの増加が認められた。既存の報告事例において DEHP は、精巣の重量変化および病理組織学的変化の誘発、HPT 軸への影響、テストステロン産生能の抑制などが報告されている(Ha ら、2016;Lin ら 2009; Akingbemi ら、2001;Barakat ら、2017)。しかしながら、本章の検討では、DEHP の設定投与量が既存の報告事例と比較して十分に高いにも係わらず、DEHP 投与群において血中テストステロンレベルの変動は認められなかった。加えて、DEHP は一般的に抗アンドロゲン作用およびエストロゲン作用を有する ED 物質として認知されているが、性成熟(包皮分離)日齢の遅延あるいは生殖器の病理変化なども認められなかった(Ema および Miyawaki、2001;Ghisari および Bonefeld-Jorgensen、2009;Cha ら、2018)。

明確な肝臓影響を示す条件下において、先行研究と比較して生殖器関連の影響が認められなかった理由は不明確であったが、生殖器よりも肝臓の方が高感度で毒性発現する可能性がある。あるいは DEHP 曝露による投与影響には閾値があると考えられ、胎児期、乳児期、幼若期といった成長ステージ間で感受性が異なっているのかもしれない。実験に供する動物種、系統、投与期間、投与経路なども先行研究との結果乖離の原因として推測され得る。

DEHP 投与群で認められた甲状腺影響の想定作用機序は次のとおりと考えられた。DEHP は核内受容体の 1 種である Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) だけではなく、PB と同様に CAR も活性化する (Eveillard ら、2009; Ren ら、2010)。PB 投与群で認められた甲状腺影響の作用機序に関する考察で既述のとおり、CAR の活性化を介して誘導された UGT は、T3 および T4 のような甲状腺ホルモンの代謝を促進する。したがって、DEHP 投与による甲状腺影響は、CAR 活性化を介した作用機序により認められたものであると考えられた。さらに、PPAR α 活性化を介した甲状腺影響の報告事例もあり、PPAR α 依存性の CAR 活性化による甲状腺ホルモン代謝亢進といった相乗作用が考えられる (Wieneke ら、2009)。加えて DEHP は肝臓中で Type 1、2、3 の Iodothyronine deiodinase (D1、D2、D3) の mRNA 発現量を変動させること、血中でトランスサイレチン (Transthyretin ; TTR)、甲状腺ペルオキシターゼ (Thyroperoxidase; TPO)、ヨウ化ナトリウム共輸送体 (Sodium iodide symporter; NIS) の遺伝子/タンパク発現量を抑制することも報告されている (Liu ら、2015; Dong ら、2019)。TTR は甲状腺ホルモンの結合タンパクとして輸送担体の役割を担っている。また、TPO はチロシン代謝酵素の一種であり甲状腺ホルモンの合成に関与しており、NIS は甲状腺へのヨウ素取込むことで甲状腺ホルモン合成に寄与している。以上のことを勘案すると、DEHP 投与による甲状腺影響は、甲状腺ホルモンの代謝、合成、輸送、生体内変換に対する影響が複合的に発現している可能性が考えられる。

甲状腺影響に関連してヒトとげっ歯類の間には次の種差が知られている。げっ歯類は甲状腺ホルモンの総量(遊離型+結合型)に対する遊離型甲状腺ホルモンの割合がヒトよりも高い。遊離型甲状腺ホルモンは不安定であるため、容易に代謝、生体内変換などに移行する。したがって、一般的にげっ歯類は化学物質曝露による甲状腺影響に高感受性であり、ヒトにおいて同様のリスクが生じ得るかどうかは不明である(Döhler ら、1979;Jahnke ら、2004)。また、ラットおよびマウスのようなげっ歯類では肝臓中で PPAR α mRNA が高発現しているのに対して、ヒトの肝臓では低発現である(Palmer ら、1998;IARC、2013)。したがって、げっ歯類と比較してヒトでは、PPAR α 活性化を介した毒性影響が発現するリスクは低いと考えられる。

第 4 章

総合考察

第 3 章の検討において、実験動物(ラット)に幼若期から性成熟期に至るまで肝毒性物質を曝露することによって内分泌系に影響が認められた。Phenobarbital (PB) 投与では性ホルモンの変動として血中テストステロンの低値および甲状腺影響、Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 投与では甲状腺影響が認められた。いずれも肝臓における薬物代謝酵素誘導に起因した変化であると考えられた。また、血中テストステロンの低値の作用機序については、肝臓におけるテストステロンの代謝亢進の可能性を肝臓 S9 画分を用いた *ex vivo* 実験において直接的に証明した。

PB および DEHP ともに先行報告と同じく肝臓影響が発現したものの、DEHP では生殖器関連への影響が認められなかった。DEHP を含めたフタル酸類では、生殖器関連の影響に関する先行研究の報告事例が多い。DEHP は内分泌かく乱物質(ED 物質)であると一般的に認知されているが、本研究で生殖器に影響は認められていない要因として、生殖器よりも肝臓の方が高感度で毒性変化を発現した可能性、あるいは胎児期、乳児期、幼若期といった成長ステージ間で DEHP 曝露による感受性が異なる可能性があるかもしれない。実験に供試する動物種、系統、投与期間、投与経路なども先行研究との結果乖離の原因として推測され得る。DEHP の投与量(500 mg/kg) は、ヒトに対する安全性を確保するリスク評価を考慮する上で極めて高曝露条件であり、一般環境においては実現し得ない曝露量である。世界中で汎用されているフタル酸類を適切に管理/規制していくためには、今後とも継続した研究成果の蓄積が求められ、適切にリスク評価していく必要性が高いと考えられた。

DEHP のように複数の核内受容体を活性化させることで毒性を発現する化学物質の評価では、甲状腺影響の作用機序として甲状腺ホルモンの代謝だけではなく、合成

阻害、輸送あるいは生体変換への影響を考慮した解析を進める必要がある。また、PB については医療用医薬品として長期にわたって臨床現場でてんかんなどの精神疾患患者に投薬されている実績がある。しかしながら、男性生殖器に影響が認められたとの信頼性の高い根拠データは報告されていない。実験動物で認められた血中テストステロン低値がヒトにおいて毒性学的意義を持つかどうかの判断は難しい。特に化学物質曝露による肝臓中の薬物代謝酵素誘導の感受性は、種差も考慮されるべきであり、実験動物で認められた所見(生体内ホルモンレベルの変動)が必ずしもヒトで認められないかもしれない。

第 2 章と第 3 章の結果から 7 日間という短期曝露(幼若期のみ)でも十分に肝臓において薬物代謝酵素誘導は認められており、性成熟期にあるラットと同様の肝臓影響が幼若ラットでも確認できたことから、幼若期においても異物に対する反応は十分に機能していると考えられた。また、本研究の検討結果からは、7 日間の短期曝露の方が薬物代謝酵素誘導の程度が強く、異物代謝に対する反応は 31 日間の曝露期間(幼若期から性成熟期)の間に減弱する傾向にあることが示された。さらに、DEHP 群の幼若期において認められた軽微な CYP2B および CYP3A の誘導が性成熟期には消失していた点にも注目すべきである。DEHP 投与群では、短期曝露の方が薬物代謝酵素を強く誘導していることから、短期的にはステロイドホルモンの代謝亢進を惹起する可能性もあるかもしれない。研究計画においては、成長ステージ、投与期間を精査する重要性は高いと考えられる。

以上、本研究の成果として肝毒性物質曝露による肝臓影響(直接影響)を介した内分泌系への影響(間接影響)は、生体内で容易に生じ得る現象であることが示唆された。化学物質曝露において最も毒性が頻発する組織は肝臓である(Roberts ら、2015)。化学物質曝露による影響を評価する際には、肝毒性の有無、各毒性所見が肝臓を介した影響であるかどうかの判断が重要になると思われた。世界的に安全に対する意識

は高まってきており、化学物質曝露によって惹起された毒性所見においては、毒性発現経路 (Adverse outcome pathway; AOP) を理解して作用機序を明らかにする必要性がある。本研究の成果は、ホルモン変動要因を解明するための一助になることが期待される。ヒトは頑健なホルモン調節機構を有していると考えられるため、肝臓影響を介したホルモン代謝亢進に伴う間接影響を受けても正常な生理状態を維持できるかもしれない。一方、精巣におけるステロイド産生阻害のような直接的に生殖器官に影響するような場合には、生殖機能への影響を示唆する報告事例も多いことから、ホルモン調節機構が破綻しやすい傾向にあるかもしれない。ホルモンレベルの軽微な変化を含め、本研究のように肝臓影響を介した二次的変化の作用機序および毒性学的意義を追究するような報告事例が今後とも蓄積されていくことが期待される。

引用文献

Akingbemi, B. T., Ge, R., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R., Hardy, M. P. (2004): Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **101**, 775-780.

Akingbemi, B.T., Youker, R.T., Sottas, C.M., Ge, R., Katz, E., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R., Hardy, M. P. (2001): Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol. Reprod.*, **65**, 1252–1259.

Barakat, R., Lin, P. P., Rattan, S., Brehm, E., Canisso, I. F., Abosalum, M. E., Flaws, J. A., Hess, R., Ko, C. (2017): Prenatal Exposure to DEHP Induces Premature Reproductive Senescence in Male Mice. *Toxicol. Sci.*, **156 (1)**, 96-108.

Barter, R.A., Klaassen, C.D. (1992): Rat liver microsomal UDP-glucuronosyltransferase activity toward thyroxine: characterization, induction and form specificity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **115**, 261-267.

Breedlove, S. M., Cooke, B. M., Jordan, C. L. (1999): The orthodox view of brain sexual differentiation. *Brain Behav Evol.*, **54 (1)**, 8-14

Cappon, G. D., Chapin, R. E., Hurtt, M. E., Wajnrajch, M. P., Burns-Naas, L. A. (2011): Impaired reproduction in adult male, but not female, rats following juvenile treatment with the aromatase inhibitor, exemestane. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, **92(4)**, 304-313.

Cha, S., Jung, K., Lee, M. Y., Hwang, Y. J., Yang, E., Lee, S. H., Jung, H. I., Cheon, Y. P. (2018): Nonmonotonic effects of chronic low-dose Di(2-ethylhexyl) phthalate on gonadal weight and reproductive. *Dev. Reprod.*, **22 (1)**, 85-94.

Colborn, T., Dumanoski, D., Myers, J. P. (1996): *Our Stolen Future*. Dutton/Penguin Books.

Coulson, M., Gibson, G. G., Plant, N., Hammond, T., Graham, M. (2003): Lansoprazole increases testosterone metabolism and clearance in male Sprague-Dawley rats: implications for Leydig cell carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **192**, 154-163.

Damassa, D. A., Kobashigawa, D., Smith, E. R., Davidson, J. M. (1976): Negative feedback control of LH by testosterone: a quantitative study in male rats. *Endocrinology*, **99** (3), 736-742.

Day, P., Green, R. M., Gross, M., Weltje, L., Wheeler, J. R. (2018): Endocrine Disruption: Current approaches for regulatory testing and assessment of plant protection products are fit for purpose. *Toxicol Lett.*, **296**, 10-22.

Döhler, K.D., Wong, C. C., von zur Mühlen, A. (1979): The rat as a model for the study of drug effects on thyroid function: consideration of methodological problems. *Pharmacol Ther. [B]*, **5**, 305-318.

Dong, J., Cong, Z., You, M., Fu, Y., Wang, Y., Wang, Y., Fu, H., Wei, L., Chen, J. (2019): Effects of perinatal di (2-ethylhexyl) phthalate exposure on thyroid function in rat offspring. *Environ Toxicol Pharmacol.*, **67**, 53-60.

Dong, X., Dong, J., Zhao, Y., Guo, J., Wang, Z., Liu, M., Zhang, Y., Na, X. (2017): Effects of Long-Term *In Vivo* Exposure to Di-2-Ethylhexylphthalate on Thyroid Hormones and the TSH/TSHR Signaling Pathways in Wistar Rats. *Int J Environ Res Public Health.*, **14**, 44.

Duty, S. M., Singh, N. P., Silva, M. J., Barr, D. B., Brock, J. W., Ryan, L., Herrick, R. F., Christiani, D. C., Hauser, R. (2003): The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect.*, **Jul 111**(9), 1164-9.

Ema, M., Miyawaki, E. (2001): Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod Toxicol.*, **15**, 189–194.

Eveillard, A., Mselli-Lakhal, L., Mogha, A., Lasserre, F., Polizzi, A., Pascussi, J. M., Guillou, H., Martin, P. G., Pineau, T. (2009): Di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) activates the constitutive androstane receptor (CAR): a novel signalling pathway sensitive to phthalates. *Biochem Pharmacol.*, **77** (11), 1735-1746.

EPA OPPTS 890.1400 (2009): Endocrine Disruptor Screening Program Test Guidelines; Hershberger Bioassay.

<https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2009-0576-0008> (accessed 30.06.2019)

European Chemical Agency (ECHA) and European Food Safety Authority (EFSA) with the technical support of the Joint Research Centre (JRC) (2018): Guidance for the identification of endocrine disruptors in the context of Regulations (EU) No 528/2012 and (EC) No 1107/2009. EFSA Journal, 2018;16(6):5311.

Fukuta, Y., Fukuda, Y., Higashino, R., Yoshida, K., Ogishima, M., Tamaki, H., Takei, M. (1999): Z-350, a novel compound with α 1-adrenoceptor antagonistic and steroid 5 α -reductase inhibitory actions: pharmacological properties *in vivo*. J Pharmacol Exp Ther., **290**, 1013-1018.

Ghisari, M., Bonfeld-Jorgensen, E. C. (2009): Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. Toxicol Lett., **189 (1)**, 67-77.

Gupta, C., Yaffe, S. J., Shapiro, B. H. (1982): Prenatal exposure to phenobarbital permanently decreases testosterone and causes reproductive dysfunction. Science, **216 (4546)**, 640–642.

Ha, M., Guan, X., Wei, L., Li, P., Yang, M., Liu, C. (2016): Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed hypothalamic-pituitary-testis axis and ERK-mediated 5 α -Reductase 2. Sci Total Environ., **563-564**, 566–575.

Haines, C., Chatham, L. R., Vardy, A., Elcombe, C. R., Foster, J. R., Lake, B. G. (2019): Comparison of the hepatic and thyroid gland effects of sodium phenobarbital and pregnenolone-16 α -carbonitrile in wild-type and constitutive androstane receptor (CAR)/pregnane X receptor (PXR) knockout rats. Xenobiotica., **49**, 227-238.

Hu, G. X., Zhou, H. Y., Li, X. W., Chen, B. B., Xiao, Y. C., Lian, Q. Q., Liang, G., Kim, H. H., Zheng, Z. Q., Hardy, D. O., Ge, R. S. (2009): The (+)- and (-)-gossypols potently inhibit both 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 3 in human and rat testes. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **115**, 14-19.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2001): IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, Phenobarbital and sodium salt, Volume 79.

International Agency for Research on Cancer (IARC) (2013): IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS, Di(2-ethylhexyl) phthalate, Volume 101.

Jahnke, G. D., Choksi, N. Y., Moore, J. A., Shelby, M. D. (2004): Thyroid Toxicants: Assessing Reproductive Health Effects. *Environ Health Perspect.*, **112** (3), 363-368.

Jo, J. Y., Kim, T. H., Jeong, H. Y., Lim, S. M., Kim, H. S., Im, D. S. (2011): Effect of Di-(2-ethylhexyl)-phthalate on Sphingolipid Metabolic Enzymes in Rat Liver. *Toxicol. Res.*, **27** (3), 185-190.

Kandel, S. E., Han, L. W., Mao, Q., Lampe, J. N. (2017): Digging Deeper into CYP3A Testosterone Metabolism: Kinetic, Regioselectivity, and Stereoselectivity Differences between CYP3A4/5 and CYP3A7. *Drug Metab Dispos.*, **45**(12), 1266-1275.

Korenbrot, C. C., Huhtaniemi, I. T., Weiner, R. W. (1977): Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biol. Reprod.*, **17**, 298-303.

Kortenkamp, A., Evans, R., Martin, O., Mckinlay, R. (2012): STATE OF THE ART ASSESSMENT OF ENDOCRINE DISRUPTERS. European Commission/Environment/Chemicals/Endocrine Disruptors.

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/annex1_summary_state_of_science.pdf (Accessed 21.01.2019)

Lin, H., Lian, Q. Q., Hu, G. X., Jin, Y., Zhang, Y., Hardy, D. O., Chen, G. R., Lu, Z. Q., Sottas, C. M., Hardy, M. P., Ge, R. S. (2009): In utero and lactational exposures to diethylhexyl-phthalate affect two populations of Leydig cells in male Long-Evans rats. *Biol Reprod.*, **80**, 882-888.

Liu, C., Zhao, L., Wei, L., Li, L. (2015): DEHP reduces thyroid hormones via interacting with hormone synthesis-related proteins, deiodinases, transthyretin, receptors, and hepatic enzymes in rats. *Environ Sci Pollut Res Int.*, **22**, 12711-12719.

Lottrup, G., Andersson, A. M., Leffers, H., Mortensen, G. K., Toppari, J., Skakkebaek, N. E., Main, K. M. (2006): Possible impact of phthalates on infant reproductive health. *Int J Androl.*, **29**, 172–180, discussion, 181-185.

Martinez-Arguelles, D. B., Campioli, E., Culty, M., Zirkin, B. R., Papadopoulou, V. (2006): Fetal origin of endocrine dysfunction in the adult: the phthalate model. *J Steroid Mol Biol.* **137**, 5–17.

Masubuchi, N., Hokusui, H., Okazaki, O. (1997): Effects of pantoprazole on xenobiotic metabolizing enzymes in rat liver microsomes: a comparison with other proton pump inhibitors. *Drug Metab Dispos.*, **25 (5)**, 584-589.

Meek, M. E., Bucher, J. R., Cohen, S. M., Dellarco, V., Hill, R. N., Lehman-McKeeman, L. D., Longfellow, D. G., Pastoor, T., Seed, J., Patton, D. E. (2003): A Framework for Human Relevance Analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit Rev Toxicol.*, **33**, 591-653.

OECD TG441 (2009): OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS; Hershberger Bioassay in Rats: A Short-term Screening Assay for (Anti)Androgenic Properties.

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-441-hershberger-bioassay-in-rats_9789264076334-en (accessed 30.06.2019)

OECD TG458 (2016): OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS; Stably Transfected Human Androgen Receptor Transcriptional Activation Assay for Detection of Androgenic Agonist and Antagonist Activity of Chemicals.

https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-458-stably-transfected-human-androgen-receptor-transcriptional-activation-assay-for-detection-of-androgenic-agonist-and-antagonist-activity-of-chemicals_9789264264366-en (accessed 30.06.2019)

Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, K. J., Raucy, J. L., Johnson, E. F. (1998): Peroxisome proliferator activated receptor-alpha expression in human liver. *Mol Pharmacol.*, **53** (1), 14-22.

Papineni, S., Marty, M. S., Rasoulpour, R. J., LeBaron, M. J., Pottenger, L. H., Eisenbrandt, D. L. (2015): Mode of action and human relevance of pronamide-induced rat thyroid tumors. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **71**, 541–551.

Picut, C. A., Remick, A. K. (2017): Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologists Perspective. *Toxicol Pathol.*, **45**(1), 195-205.

Pilutin, A., Misiakiewicz-Has, K., Kolasa, A., Baranowska-Bosiacka, I., Marchlewicz, M., Wiszniewska, B. (2014): The immunoexpression of androgen receptor, estrogen receptors alpha and beta, vanilloid type 1 receptor and cytochrome p450 aromatase in rats testis chronically treated with letrozole, an aromatase inhibitor. *Folia Histochem Cytobiol.*, **52** (3), 206-217.

Pinot, F., Benveniste, I., Salaün, J. P., Durst, F. (1998): Methyl jasmonate induces lauric acid ω -hydroxylase activity and accumulation of CYP94A1 transcripts but does not affect epoxide hydrolase activities in *Vicia sativa* seedlings. *Plant Physiol.*, **118**, 1481-1486.

Qatanani, M., Zhang, J., Moore, D. D. (2005): Role of the constitutive androstane receptor in xenobiotic-induced thyroid hormone metabolism. *Endocrinology*, **146** (3), 995-1002.

Rasoulpour, R. J., Andrus, A. K., Marty, M. S., Zhang, F., Thomas, J., LeBaron, M. J., Papineni, S., Pottenger, L. H., Eisenbrandt, D. L. (2015): Pronamide: Human relevance of liver-mediated rat leydig cell tumors. *Regul Toxicol Pharmacol.*, **72** (2), 394–404.

Ren, H., Aleksunes, L. M., Wood, C., Vallanat, B., George, M. H., Klaassen, C. D., Corton, J. C. (2010): Characterization of peroxisome proliferator-activated receptor alpha-independent effects of PPARalpha activators in the rodent liver: di-(2-ethylhexyl) phthalate also activates the constitutive-activated receptor. *Toxicol Sci.*, **113(1)**, 45-59.

Rice, D., Barone, S. Jr. (2000): Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Human and Animal Models. *Environ Health Perspect.*, **108**, 511-533.

Richthoff, J., Rylander, L., Jonsson, B. A., Akesson, H., Hagmar, L., Nilsson-Ehle, P., Stridsberg, M., Giwercman, A. (2003): Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population. *Environ Health Perspect.*, **111(4)**, 409-13.

Roberts, R., Callander, R., Duffy, P., Jacobsen, M., Knight, R., Boobis, A. (2015): Target organ profiles in toxicity studies supporting human dosing: Does severity progress with longer duration of exposure? *Regul Toxicol Pharmacol.*, **73(3)**, 737-46.

Rusyn, I., Peters, J., Cunningham, M. (2006): Effects of DEHP in the Liver: Modes of Action and Species-Specific Differences. *Crit Rev Toxicol.*, **36**, 459-479.

Saito, M., Okutomi, T., Shimizu, M., Matsumoto, Y., Yamazaki, H., Hoka, S. (2006): Activities of rat cytochrome P450 3A and 2C isoforms are increased *in vivo* by magnesium sulfate as evidenced by enhanced oxidation of bupivacaine and testosterone in liver microsomes. *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **21**, 201-207.

Smith, J. L., Garry, V. F., Rademaker, A. W., Martin, R. H. (2004): Human sperm aneuploidy after exposure to pesticides. *Mol Reprod Dev.*, **Mar 67(3)**, 353-9.

Stump, D. G., O'Connor, J. C., Lewis, J. M., Marty, M. S. (2014): Key lessons from performance of the U.S. EPA Endocrine Disruptor Screening Program (EDSP) Tier 1 male and female pubertal assays. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.*, **101(1)**, 43-62.

Turan, V. K., Mishin, V. M., Thomas, P. E. (2001): Clotrimazole is a Selective and Potent Inhibitor of Rat Cytochrome P450 3A Subfamily-Related Testosterone Metabolism. *Drug Metab Dispos.*, **29(6)**, 837-842.

U.S. EPA (2011): ENDOCRINE DISRUPTOR SCREENING PROGRAM, Weight-of-Evidence: Evaluating Results of EDSP Tier 1 Screening to Identify the Need for Tier 2 Testing.

<https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPPT-2010-0877-0021> (accessed 30.06.2019)

U.S. EPA (1998): Endocrine Disruptor Screening Program; Proposed Statement of Policy. *Federal Register*, Vol. 63, No. 248

Waxman, D. J., Azaroff, L. (1992): Phenobarbital induction of cytochrome P-450 gene expression. *Biochem. J.*, **281**, 577–592.

WHO/IPCS (2002): Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors. World Health Organization/International Programme on Chemical Safety. WHO/IPCS/EDC/0.2.2.

http://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en (accessed 30.06.2019)

Wieneke, N., Neuschäfer-Rube, F., Bode, L. M., Kuna, M., Andres, J., Carnevali, L. C. Jr., Hirsch-Ernst, K. I., Püschel, G. P. (2009): Synergistic acceleration of thyroid hormone degradation by phenobarbital and the PPAR alpha agonist WY14643 in rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **240 (1)**, 99-107.

Wilson, V. S., LeBlanc, G. A. (1998): Endosulfan Elevates Testosterone Biotransformation and Clearance in CD-1 Mice. *Toxicol Appl Pharmacol.*, **148**, 158-168.

Yamada, T., Okuda, Y., Kushida, M., Sumida, K., Takeuchi, H., Nagahori, H., Fukuda, T., Lake, B.G., Cohen, S.M., Kawamura, S. (2014): Human hepatocytes support the hypertrophic but not the hyperplastic response to the murine nongenotoxic hepatocarcinogen sodium phenobarbital in an *in vivo* study using a chimeric mouse with humanized liver. *Toxicol Sci.*, **142**, 137-157.

環境省(2016): 化学物質の内分泌かく乱作用に関する今後の対応— EXTEND 2016 —.

https://www.env.go.jp/chemi/end/extend2016/HP_EXTEND2016re3.pdf (accessed 30.06.2019)

産業技術総合研究所 化学物質リスク管理研究センター(2005): 詳細リスク評価書
フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)

https://unit.aist.go.jp/riss/crm/mainmenu/zantei_0.4/DEHP_0.4.pdf (accessed 30.06.2019)

南 健太、於勢 佳子、山口 尊史(2016): 米国環境保護庁の内分泌かく乱物質スクリーニング計画に対する取り組み. 住友化学 技術誌., 総説, 18-27.

https://www.sumitomo-chem.co.jp/rd/report/files/docs/2016J_2.pdf (accessed 30.06.2019)

謝辞

本研究を学位論文として完成させるにあたり、岡山大学大学院 環境生命科学研究科 動物機能開発学講座 木村 康二教授には終始熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに深く感謝の意を表します。

当講座の所属研究員の皆様には常に心温まるサポートを頂戴し、細やかなご配慮ならびにご助言をいただいたことに関しまして御礼申し上げます。

本研究にご尽力いただいた住友化学株式会社 生物環境科学研究所のメンバーの皆様、研究の計画、実施および結果解析などのへのご協力、本当にありがとうございました。

最後になりましたが、これまで研究活動に理解を示し、温かい目で見守ってくれた家族に感謝します。