

尿中代謝産物分析に基づくフタル酸エステル曝露評価と健康影響評価
～ DEHP の女性ホルモンへの影響～

環境システムコース・環境健康システム学

46758 藤巻可弓

1. 緒言および目的

フタル酸エステル類は各種プラスチックの可塑剤として多用されているが、特にフタル酸ジエチルヘキシル（以下 DEHP）は、そのうち最も多く生産・使用されている。フタル酸エステル類は環境省の SPEED'98 にもリストアップされた、代表的な内分泌攪乱物質のひとつで、動物実験では、成熟雌ラットへの比較的高用量経口投与による、血清エストラジオール（以下 E2）（女性ホルモンの一つ）レベルの低下、性周期の延長が報告されている（1）。このような影響がヒトにおいても起こりうるとすれば、DEHP 曝露による生殖影響が懸念される。しかし、現時点で生殖影響を含むヒト健康への影響については情報がほぼ皆無である。

一般的に、ヒト健康影響の評価には曝露レベルの把握が不可欠であるが、これまで日本国内におけるフタル酸エステル類の曝露評価（2、3）は極めて数が限られている上に、トータルダイエットの分析など、食物中レベルの測定に基づくもののみであり、ヒトの総曝露量あるいは internal dose に関する報告はごく最近になるまでなかった（4）。しかし各種プラスチック類への添加剤としての用途を考えると、必ずしも食物だけでなく、各種 consumer product からの曝露も無視できない可能性があり、バイオマーカーを利用した包括的な曝露評価が望まれていたところ、最近になって尿中フタル酸エステル類代謝産物の分析法が報告され（5）、尿を用いた包括的な曝露評価が可能になりつつある。

本研究では、既往の研究に改良を加えて尿中 DEHP 代謝産物濃度定量法を確立、評価する、を用いて尿中に含まれる 3 種類の DEHP 代謝産物（MEHP、MEHHP、MEOHP）尿中排泄量を定量し、成人女性の DEHP 曝露評価を行なう、推定した DEHP 摂取量の個人間変動、個人内変動を検討する、DEHP の生殖影響の一つの指標として、血清 E2 と相関のある尿中 E1、E2 排泄量を用い、DEHP 摂取量との関連を調べる、ことを目的とした。

2. 方法

2.1 尿試料の採取

非喫煙かつホルモン剤非使用の女子学生 5 名（22～26 歳）を対象とし、1 ヶ月間の基礎体温測定と月経を申告してもらうことで各人の月経周期を把握し、次の月経周期の月経期（低 E2 レベル時期）に連続 5 日間、排卵期（高 E2 レベル時期）に連続 5 日間の計 10 日間、毎日の早朝尿を提供してもらった。

2.2 操作方法

尿中 DEHP 代謝産物濃度および尿中 E1、E2 濃度は既往の研究に著者が改良を加え、それぞれ Fig. 1、Fig. 2 で示す前処理後 HPLC/MS/MS を用いて測定し、クレアチニン排泄量で補正した。

3. 結果および考察

3.1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定の基本検討

全ての採尿用器具から DEHP 代謝産物は検出されなかった。

添加回収試験

各代謝産物の既知量を尿に添加した後、通常操作（Fig. 1）を行って求めた回収率の平均値（n = 5）は、尿 1 ml に対し 30 ng 添加においては MEHP では $96 \pm 7\%$ 、MEOHP では $90 \pm 10\%$ 、MEHHP では $90 \pm 2\%$ であり、150 ng 添加においてはそれぞれ $97 \pm 6\%$ 、 $91 \pm 4\%$ 、 $93 \pm 3\%$ であった。

本法による尿中濃度に換算した検出下限

MEHP が 0.01 ng/ml、MEOHP が 0.005 ng/ml、MEHHP が 0.005 ng/ml であった。

本法による尿中 DEHP 代謝産物測定における再現性

同一の尿サンプルを異なる 6 日にそれぞれ前処理、測定したところ、測定値の相対標準偏差(RSD, %)は MEHP では 11 %、MEOHP では 7 %、MEHHP では 7 %であった。

以上より、尿中 MEHP、MEHHP、MEOHP 濃度の定量において、回収率、検出下限、再現性について満足できる分析法を確立した (Fig. 1)。

3.2 尿中 E1、E2 濃度測定の基本検討

全ての採尿用器具から E1、E2 は検出されなかった。

添加回収試験

各代謝産物の既知量を尿に添加した後、通常操作 (Fig. 2) を行って求めた回収率の平均値 (n=3) は、尿 1 ml に対し 5 ng 添加においては E1 では 83 ± 3 %、E2 では 97 ± 1 % であり、25 ng 添加においてはそれぞれ 86 ± 3 %、91 ± 2 % であった。

本法による尿中濃度に換算した検出下限

E1 が 0.01 ng/ml、E2 が 0.005 ng/ml であった。

本法による尿中 E 代謝産物測定における再現性

同一の尿サンプルを異なる 3 日にそれぞれ前処理、測定したところ、測定値の相対標準偏差(RSD, %)は E1 では 3 %、E2 では 9 % であった。

以上より、尿中エストラジオール代謝産物濃度の定量において、回収率、検出下限、再現性について満足できる分析法を確立した (Fig. 2)。

3.3 尿中 DEHP 代謝産物濃度

対象者 5 名の 10 日間のクレアチニン補正した尿中 DEHP 代謝産物濃度は既往の研究の中央値と比較してみると (Table 1)、今回の対象者はほぼ同レベルである。このようなことから、生活習慣、年齢および性別などによらず、集団レベルの DEHP 摂取量代表値に桁が違うほどの大きな差はないということが示唆される。

Table 1 既往の研究と本研究の尿中 DEHP 代謝産物濃度 (µg/g cre) の比較

	MEHP (中央値)	MEOHP (中央値)	MEHHP (中央値)
アメリカ人男女 (n=289) (6)	<LOD*1-192 (2.70)		
ドイツ人男女 (n=85) (7)	<LOQ*2-123 (9.20)	6.40-262 (30.4)	6.9-449 (40.2)
日本人男女 (n=36) (4)	0.79-27.0 (4.50)		
日本人妊婦 (n=40) (8)	3.27-39.5 (9.83)	1.51-41.0 (10.4)	4.60-26.6 (10.9)
本研究 (n=50) (5 名 10 日間分)	1.56-10.6	6.32-30.6	3.03-16.6

注：*1 LOD 1.2 ng/ml、*2 LOQ 0.5-1.2 ng/ml

3.4 推定 DEHP 摂取量

既往の研究 (9) をもとに尿中 DEHP 代謝産物濃度から推定した対象者 5 名の DEHP 摂取量 (Table 2) はどの代謝産物濃度に基づくかによって多少の差があるが、我が国における DEHP の TDI (40 ~ 140 µg/kg/day) や EPA の RfD (20 µg/kg/day) よりも 1 桁から 2 桁低い値であった。

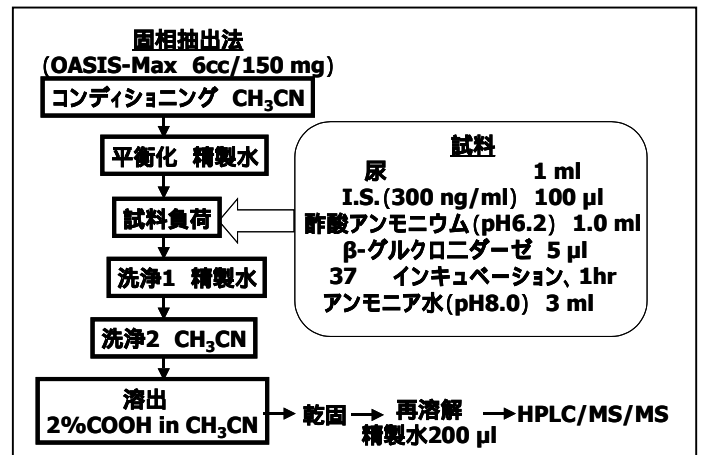


Fig. 1 尿中 DEHP 代謝産物濃度測定操作手順

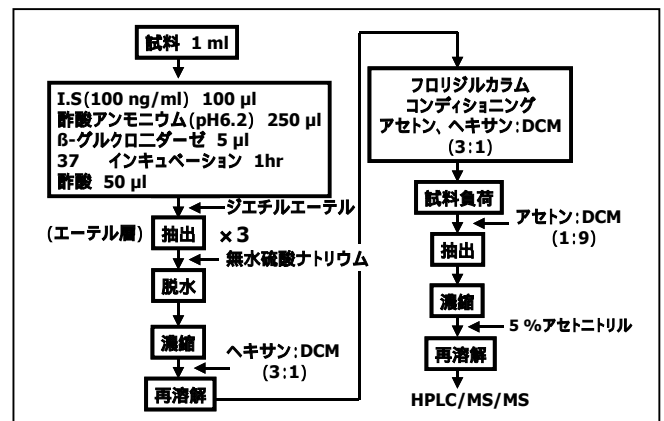


Fig. 2 尿中 E1、E2 濃度測定操作手順

3.5 尿中 DEHP 代謝産物濃度の個人内・個人間変動

Fig. 3 に、対象者 5 名のうち C の合計 10 日間の早朝尿中 MEHP 濃度をプロットした。この測定結果をもとに分散分析を適用して算出した、MEHP、MEOHP、MEHHP の個人間変動は 87%、90 %、70 % であり、個人内（日間）変動は各々 36 %、37 %、37 % であった。個人内（日間）変動が ~40 % と比較的小さいことから、日常生活を送る上で、DEHP への曝露はある種の加工食品から起こるということを考慮すると、現在は、PVC 製手袋使用規制前の市販弁当のような高レベルの DEHP 汚染食品は存在しないことが示唆される。また、個人内変動が小さいので、スポット尿を使ってその人の日常の DEHP 摂取量を推定することが可能であることがわかった。

Scheffe の多重比較検定を行なったところ、D のみ尿中 DEHP 代謝産物濃度が他の対象者よりも有意に高かった。すなわち、D を除く 4 名の尿中 DEHP 代謝産物濃度には差がない。しかし、本研究の対象者と我が国における既往の研究で報告されている尿中 DEHP 代謝産物濃度を比較したところ（Table 1）、既往の研究のデータの幅は女子学生よりもやや大きい。今回の対象者が全て女子学生であるという、均質的な集団であったことが考えられる。

3.6 尿中 E1、E2 濃度

対象者 C と D の月経期および排卵期のクリアチニン補正した尿中 E1、E2 濃度を Fig. 4、5 に示した（両時期における尿中 E1、E2 濃度の最小値と最大値の差を Fig 中に記載）。なお、他 3 名は D（Fig. 5）とほぼ同じ傾向であった。C 以外は排卵期の E1、E2 濃度の上昇が小さかったことから、最近多くの女性でみられる無排無排卵月経であることが懸念されるが、今回のような 1 ヶ月間の基礎体温測定や尿中 E1、E2 測定だけで判断することは困難である。

Table 2 推定 DEHP 摂取量（平均 ± 標準偏差）（ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）

	A	B	C	D	E
MEHP 濃度から算出	2.90 ± 0.93	5.42 ± 1.39	4.79 ± 1.75	6.70 ± 2.90	5.23 ± 1.30
MEOHP 濃度から算出	4.70 ± 1.59	5.30 ± 1.50	4.08 ± 0.92	7.60 ± 3.10	3.63 ± 0.77*
MEHHP 濃度から算出	1.29 ± 0.63	2.84 ± 0.88	1.93 ± 0.39	2.60 ± 1.30	1.72 ± 0.62

*5 日間の尿サンプル

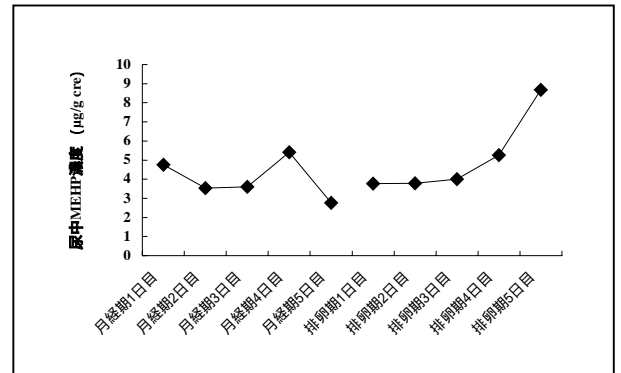


Fig. 3 対象者 C の月経期・排卵期の尿中 MEHP 濃度

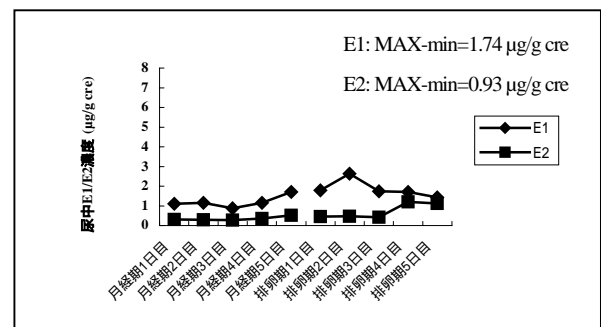
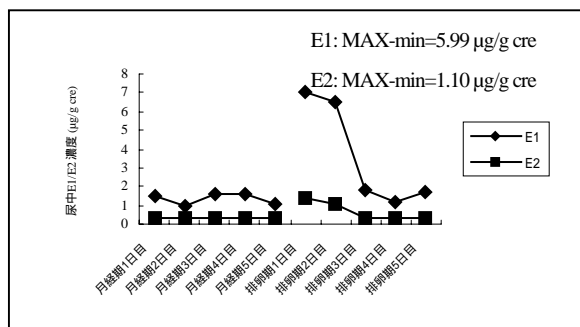


Fig. 4 対象者 C の月経期・排卵期の尿中 E1、E2 濃度 Fig. 5 対象者 D の月経期・排卵期の尿中 E1、E2 濃度

3.7 DEHP 曝露による性ホルモンレベルへの影響

Davis ら（1）の動物実験では、比較的高用量の DEHP 経口投与によって成熟雌ラットの発情前期（排卵期）の血清 E2 濃度の低下が報告されていることから、今回の対象者について、DEHP 曝露レベルと排卵期の尿中 E1、E2 レベルの関連を検討したが、有意な関連はみられなかった（Fig. 6）。

なお、ここで対象者の DEHP 曝露レベルは、尿中 MEHP 濃度に基づく 10 日間の摂取量を計算したうえで、その平均値をとって用いた。

Lovekamp-Swan ら (10、11) は in vivo における実験で、MEHP が、DEHP とともに卵巣内の PPAR (peroxisome proliferators-activated receptor) を活性化することにより、ステロイド合成酵素であるアロマトラーゼ活性ならびにアロマトラーゼ mRNA 発現量を抑制し、E2 の産生を低下させることを報告していることから、ヒトにおいても DEHP 曝露が卵巣機能に影響を及ぼし、月経期から排卵期にかけての E2 レベルの上昇が小さくなるということが考えられる。よって、DEHP 曝露レベルと月経期・排卵期における尿中 E1、E2 レベルの差の関連を検討したが、有意な関連はみられなかった (Fig. 7)。なお、ここで対象者の DEHP 曝露レベルは、先に述べた方法と同じである。

以上のように、尿中 E1、E2 レベルと DEHP 曝露量との間に関連がない、という結果であったが、対象者数がまだ 5 人と少ないこと、今回の対象者の DEHP 曝露量が動物実験で E2 に影響を及ぼすと報告されている用量に比べると数桁低かったことなどが相関が見られなかった原因であると考えられる。しかしながら、環境ホルモン類には低用量作用が見られることがあること、動物実験では女性ホルモンへの影響以外の健康影響 (たとえば精子産生など) にはもっと低い用量で影響があることが疑われていることなど、今後もヒト影響に関する検証を続けていく必要がある。その際に本研究で確立した尿中代謝産物定量法が有用になるであろう。

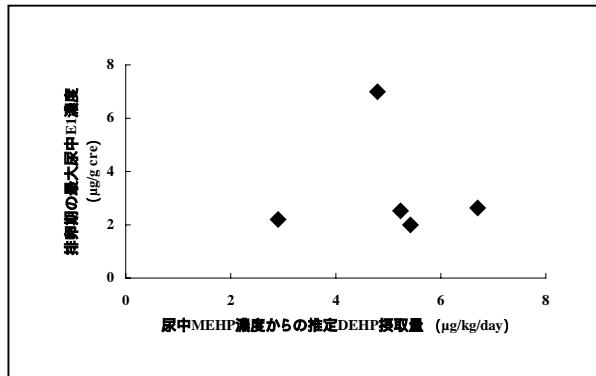


Fig. 6 推定 DEHP 摂取量と排卵期の最大尿中 E1 濃度の相関

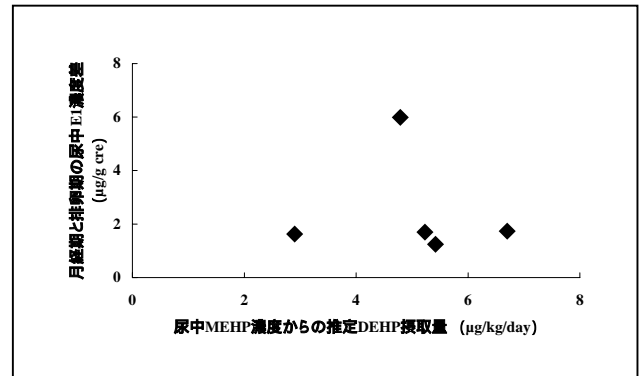


Fig. 7 推定 DEHP 摂取量と月経期・排卵期の尿中 E1 濃度差の相関

4.まとめ

既往の研究に改良を加え著者が確立した尿中 DEHP 代謝産物濃度定量法を用いて、尿中に含まれる 3 種類の DEHP 代謝産物 (MEHP、MEHHP、MEOHP) 尿中排泄量を定量することで成人女性の DEHP 曝露評価を行ない、DEHP 曝露の生殖影響のひとつとして女性ホルモンレベルとの関連について調べた。その結果、今回の対象者の DEHP 曝露量は既往の研究の代表値と同程度であり、生活習慣、年齢および性別等による差は小さかった。さらに、DEHP 摂取量の日間変動が小さいことをはじめて明らかにし、スポット尿を用いた日常の摂取レベルの推定が可能であることを示した。対象者の尿中代謝産物濃度をもとに推定した DEHP 摂取量は我が国の TDI (40 ~ 140 µg/kg/day) や EPA の RfD (20 µg/kg/day) を下回っていた。また、DEHP 曝露量 (推定 DEHP 摂取量) と女性ホルモン (尿中 E1、E2 濃度) の間には関係は見出せなかった。

【参考文献】

- (1) Davis BJ et al., Toxicol Appl Pharmacol, 128: 216 (1994).
- (2) Tsumura Y et al., Food Add Contam, 18: 449 (2001).
- (3) Tsumura Y et al., Food Add Contam, 20: 317 (2003).
- (4) Itoh H et al., Int J Hyg Environ Health, 208: 237 (2005).
- (5) Blount BC et al., Anal Chem, 72: 4127 (2000).
- (6) Blount BC et al., Environ Health Perspect, 108: 979 (2000b).

- (7) Koch HM et al., Environ Res, 93: 177 (2003).
- (8) 藤巻可弓ら、日衛誌、投稿中。
- (9) Kohn MC et al., Environ Health Perspect, 108: A440 (2000).
- (10) Lovelkamp TN et al., Toxicol Appl Pharmacol, 172: 217 (2001).
- (11) Lovekamp-Swan T et al, Environ Health Perspect, 111: 139 (2003).

