

## ディーゼル車排出ガス曝露が雌ラットの生殖機能に及ぼす影響

渡辺 伸枝\*, 西中 彩菜\*\*, 玉田 智佳\*\*, 大澤 誠喜\*

### Pathological changes of female reproductive system exposed to diesel exhaust during fetal, suckling and weaning periods

Nobue WATANABE\*, Ayana NISHINAKA\*\*, Tomoka TAMADA\*\* and Masanobu OHSAWA\*

**Keywords:** ディーゼル排出ガス diesel exhaust, ラット rat, 卵巣 ovary, 卵胞刺激ホルモン Follicle stimulating hormone, 黄体形成ホルモン luteinizing hormone, 胎仔期 fetal-period, 哺乳期 suckling-period, 離乳期 weaning-period

#### 緒言

ディーゼル車からの排出ガスには多環芳香族炭化水素、二酸化窒素等、内分泌機能攪乱作用を持つ化学物質が含有されていることが指摘されている<sup>1-3)</sup>。著者らは、成長段階の異なる雄ラットを用いて、排出ガスの生殖器の形成、機能に及ぼす影響について研究を進めてきた。排出ガスの胎仔期における曝露はセルトリ細胞の形成を阻害し、性成熟後の精子数の減少を起こすこと<sup>4)</sup>、また、新生仔期からの曝露は、内分泌機能を攪乱し精子形成を低下させることを報告した<sup>5)</sup>。

一方、排出ガス曝露の雌の生殖機能に及ぼす影響については研究報告が少ないが、著者らは排出ガスに胎生7日目から曝露された雌胎仔の卵巣では、原始卵胞の形成が阻害されることを報告した<sup>6)</sup>。これは排出ガスの胎仔期における曝露は、生後の生殖機能の低下を招く可能性があることを示唆している。本研究では、ディーゼル排出ガスの胎仔期における曝露が雌の生殖機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、胎仔期・哺乳期あるいは離乳後に排出ガスに曝露されたラットについて生後28日目、90日目の卵巣所見と性ホルモン・性腺刺激ホルモンについて検討した。また、曝露は排出ガスを曝露した全排出ガス曝露と、全排出ガスから粒子状成分を除去した除塵排出ガス曝露を行い、排出ガスに含まれる粒子状成分・ガス状成分の各々の作用についても検討した。さらに、各々の曝露条件に濃度段階を設定し、量・反応関係について検討を行った。

#### 実験方法

**曝露方法:** 曝露実験に用いる排出ガスの発生源として、排出量309ccの小型のディーゼルエンジン(ヤンマーディーゼルエンジンNFAD-50-EX)、燃料には軽油(JIS2号相当、日本石油)を用い、回転数2,600rpmで運転した。その排出ガスを清浄空気希釈し、曝露チャンバー内に導入

した。チャンバーの容量は1.6m<sup>3</sup>、換気回数は15回/時、換気容量は405/minであった。全排出ガス曝露チャンバーには希釈したディーゼル排出ガスを導入した。除塵排出ガス曝露チャンバーには、希釈排出ガスをヘパフィルター(ATM 3QA,日本無機)に通し、0.05μm以上の粒子状成分を除去して導入した。対照群には室内空気を活性炭層(SX, HC-6:ツルミコール)とヘパフィルターを通した清浄空気を導入した。

**曝露条件:** 各チャンバー内の環境濃度は、粉塵濃度計(線式質量濃度計BAM-102型、SHIBATA)と、窒素酸化物測定器(9841型 Monitor Lobs Co.)で常時モニターした。全排出ガス曝露群、除塵排出ガス曝露群並びに対照群のチャンバー内の曝露時間内平均粉塵濃度と二酸化窒素濃度を表1に示した。

表1. ディーゼル排出ガスの曝露条件

	粒子状物質		NO <sub>2</sub>
		(mg/m <sup>3</sup> )	(ppm)
対照群		<0.01	0.02
全排気ガス曝露群	高濃度群	1.71	0.79
	低濃度群	0.17	0.10
除塵排気ガス曝露群	高濃度群	<0.01	0.80
	低濃度群	<0.01	0.10

**動物曝露のスケジュール:**62匹の妊娠ラット(F344/DuCrj)を日本チャールスリバーから購入し、実験はこれらの妊娠ラット由来の仔ラットを用いて行った。妊娠ラットを図1に示した様に曝露の時期と曝露濃度によって11群にわけた。胎生7日目から出生まで曝露したラットを胎仔期曝露群、生後2日目から17日目まで曝露したラットを哺乳期曝露群、生後24日目から41日目まで曝露したラットを離乳後曝露群とした。曝露時間は午前10時から午後4時まで

\* 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科 169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京理科大学薬学部衛生化学研究室

で1日6時間, 週5日間行い, 曝露日数は12日間で全群同じである. なお, 離乳後曝露群については高濃度曝露による成熟期における解析を行った.

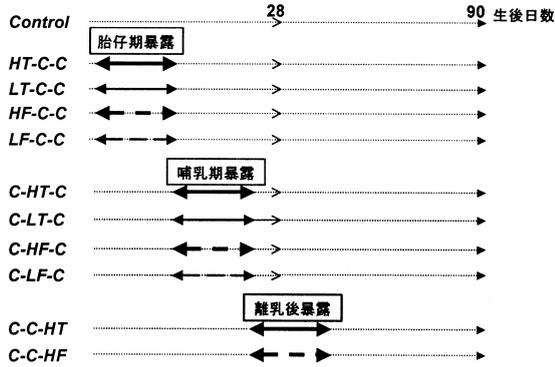


図1. 各群の曝露とサンプリングのスケジュール

Control: 対照群

- HT-C-C: 胎仔期高濃度全排出ガス曝露群
- LT-C-C: 胎仔期低濃度全排出ガス曝露群
- HF-C-C: 胎仔期高濃度除塵排出ガス曝露群
- LF-C-C: 胎仔期低濃度除塵排出ガス曝露群
- C-HT-C: 哺乳期高濃度全排出ガス曝露群
- C-LT-C: 哺乳期低濃度全排出ガス曝露群
- C-HF-C: 哺乳期高濃度除塵排出ガス曝露群
- C-LF-C: 哺乳期低濃度除塵排出ガス曝露群
- C-C-HT: 離乳後高濃度全排出ガス曝露群
- C-C-HF: 離乳後高濃度除塵排出ガス曝露群

卵巣の形態学的検査: 離乳後曝露群をのぞく各群の生後28日目に, 卵巣を摘出しホルマリン固定後, 4µmの連続切片を作成し, ヘマトキシリン・エオジン染色し顕微鏡でその形態を観察した. 生後90日目の卵巣については, スメアで確認後, 発情期ものを順次摘出し形態学的検査に供した. 卵胞の形態的分類は Pedersen らの方法によった<sup>7)</sup>. 性ホルモン・性腺刺激ホルモンの測定: 血清中のテストステロン(17-hydroxyandrost-4-en-3-one), エストロゲン(estradiol)濃度は, 酵素免疫測定キット(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)によって, 卵胞刺激ホルモン(FSH), 黄体形成ホルモン(LH)は酵素免疫測定キット(Amersham, Buckinghamshire, England) を用いて測定した.

結 果

体重・卵巣重量 曝露群の生後28日目の卵巣重量は, 対照群と比較してどの群も有意に低かった(表2). 生後90日目の卵巣重量は, 胎仔期高濃度除塵排出ガス群(HF-C-C)以外の曝露群で対照群と比較して有意に低かった(表3).

表2. 生後28日目の各群の体重と卵巣重量

no.	体重 (g)	卵巣重量 (g)	卵巣 / 体重 (mg/g)
Control	16 48.0 ± 4.6	0.020 ± 0.005	0.40 ± 0.08
TCC	10 46.0 ± 4.9	0.016 ± 0.002	0.34 ± 0.04
FCC	14 44.2 ± 2.6	0.016 ± 0.001	0.37 ± 0.04
CTC	10 44.0 ± 4.8	0.014 ± 0.002	0.32 ± 0.05
CFC	12 44.2 ± 4.1	0.015 ± 0.003	0.33 ± 0.05
L-TCC	10 46.1 ± 4.1	0.016 ± 0.001	0.35 ± 0.04
L-FCC	10 47.5 ± 6.1	0.014 ± 0.006	0.35 ± 0.13
L-CTC	11 47.9 ± 3.0	0.016 ± 0.003	0.36 ± 0.03
L-CFC	12 44.6 ± 2.5	0.016 ± 0.006	0.37 ± 0.04

Values±means. Different from control \*P<0.05, \*\*P,0.01

表3. 生後90日目の各群の体重と卵巣重量

no.	体重 (g)	卵巣重量 (g)	卵巣 / 体重 (mg/g)
Control	9 144.8 ± 12.2	0.057 ± 0.004	0.41 ± 0.03
TCC	8 142.0 ± 10.9	0.048 ± 0.006	0.35 ± 0.03
FCC	8 139.3 ± 10.8	0.052 ± 0.006	0.37 ± 0.04
CTC	9 140.5 ± 7.4	0.053 ± 0.005	0.38 ± 0.03
CFC	11 139.9 ± 11.8	0.054 ± 0.005	0.39 ± 0.04
L-TCC	9 134.7 ± 9.9	0.049 ± 0.006	0.36 ± 0.05
L-FCC	5 140.8 ± 7.8	0.050 ± 0.005	0.37 ± 0.04
L-CTC	13 136.5 ± 8.4	0.049 ± 0.007	0.35 ± 0.03
L-CFC	7 139.9 ± 10.4	0.047 ± 0.001	0.21 ± 0.07

Values±means. Different from control \*P<0.05, \*\*P,0.01

性ホルモン・性腺刺激ホルモンの測定結果 FSHは, 胎仔期・哺乳期における全排出ガス・除塵排出ガス高濃度曝露で対照群に比べて有意に低下した(図2). LHは, 哺乳期における全排出ガス・除塵排出ガス高濃度曝露で対照群に比べて有意に低下した(図2). テストステロン, エストロゲン濃度には, 曝露による有意な違いはみられなかった. 離乳後曝露群では, 性ホルモン・性腺刺激ホルモンの濃度は対照群と同様であった.

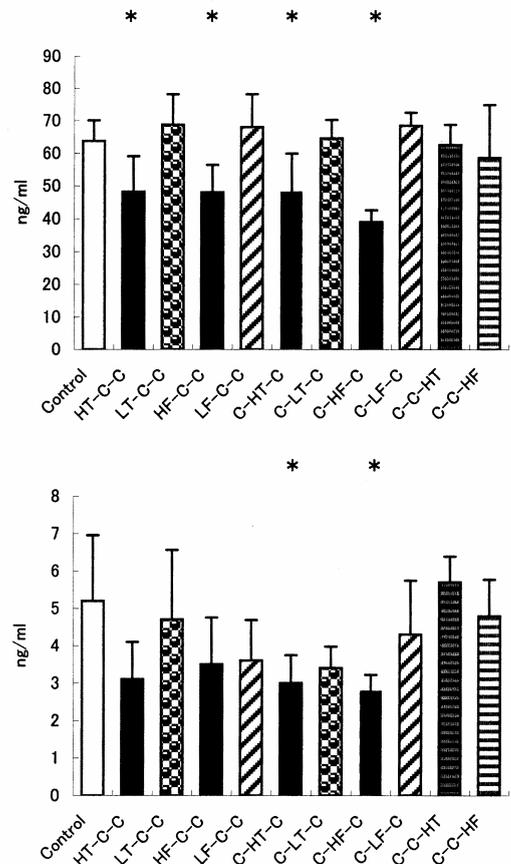


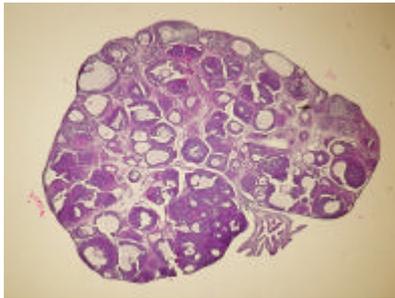
図2. 各群生後90日目の卵胞刺激ホルモン(上図) 黄体形成ホルモン(下図).

\*対象群と間に有意差, P<0.05

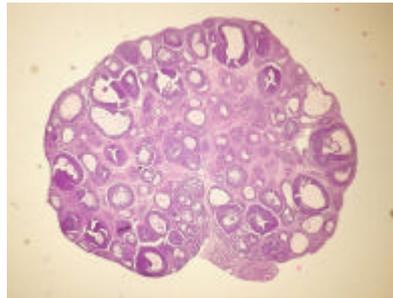
卵巣の形態学所見 生後28日目の卵巣の組織所見は、胎仔期高濃度全排出ガス(*HT-C-C*)と除塵排出ガス曝露群(*HF-C-C*)では、対照群にくらべて原始、一次、二次卵胞が少なく、退行した卵胞が多くみられた。哺乳期曝露の各群(*C-HT-C*, *C-LT-C*, *C-HF-C*, *C-LF-C*)の卵巣は対照群と同様であった。また、全排出ガス群と除塵排出ガス群の卵巣の所見は同様に、曝露物質による違いは明らかではなかった。

生後90日目の卵巣の組織所見は、胎仔期・哺乳期高濃

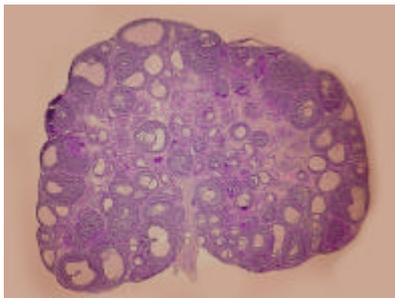
度全排出ガス(*HT-C-C*, *C-HT-C*)・除塵排出ガス曝露群(*HF-C-C*, *C-HF-C*)では、対照群に比べて様々な発育段階にある卵胞が少なく、閉鎖卵胞と大きな黄体が目立った。低濃度曝露群(*C-LT-C*, *C-LF-C*)の卵巣は対照群とほぼ同様であったが、発育卵胞が少なく退行した卵胞が目立つ場合があった。離乳後曝露(*C-C-HT*, *C-C-HF*)の成熟期卵巣では対照群の卵巣と同様に、原始卵胞からグラーフ胞まで様々な発育卵胞が多く見られた(写真)。



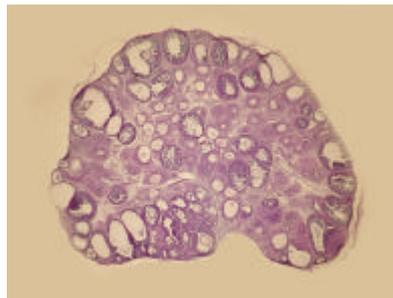
生後28日対照群卵巣



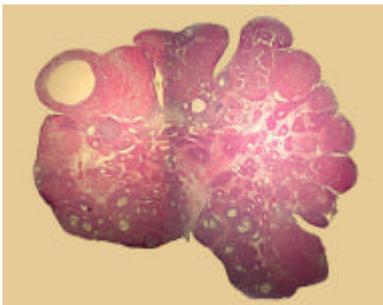
胎仔期高濃度全排出ガス群



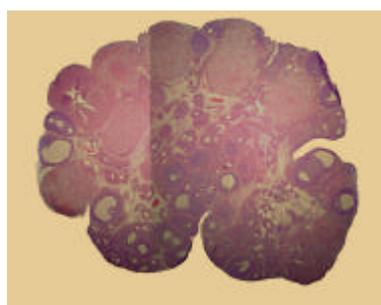
胎仔期高濃度除塵排出ガス群



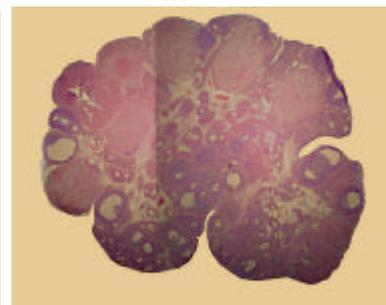
哺乳期高濃度除塵排出ガス群



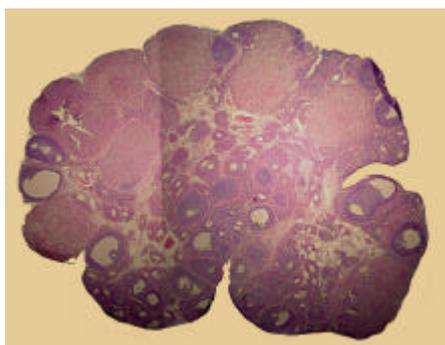
生後90日対照群卵巣



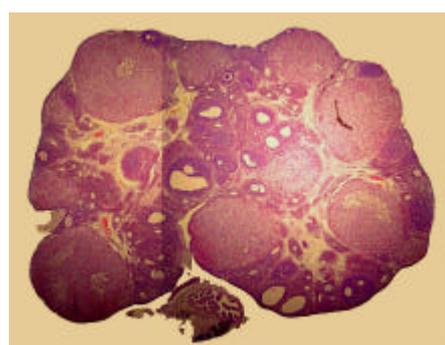
胎仔期高濃度全排出ガス群



胎仔期高濃度除塵排出ガス群



哺乳期高濃度全排出ガス群



哺乳期高濃度除塵排出ガス群

写真 生後28(×40), 90日(×10)の各群の卵巣所見(ヘマトキシリン・エオジン染色)

## 考 察

排出ガスの胎仔期における高濃度の全排出ガス・除塵排出ガスの曝露は、生後 90 日目すなわち性成熟後における性腺刺激ホルモンの低下と卵巢中の発育卵胞数の減少・閉鎖卵胞の増加・黄体残存を起こすことが示された。また、哺乳期における高濃度全排出ガス・除塵排出ガスの曝露の場合も胎仔期曝露と同様な変化がみられた。離乳後に曝露された場合には排出ガスの雌性生殖機能への影響は明らかではなかった。

胎仔期曝露群と哺乳期曝露群では生後 90 日目の発育卵胞数の減少がみられたが、その成因は異なることが考えられた。すなわち、排出ガスに胎生 7 日目から曝露された胎仔の胎生 20 日目における卵巢で原始卵胞形成不全が観察されていること<sup>6)</sup>、本実験において胎仔期曝露群の生後 28 日目の卵巢には原始卵胞が少なかった。このことから、胎仔期曝露にみられた生後 90 日目の発育卵胞数の減少には、下垂体機能の低下の他に、卵胞の絶対数が少ないことも関与していると考えられた。

胎仔期曝露群の生後 28 日目の卵巢に原始卵胞が少なかったことから、母親を介しての排出ガスの間接曝露は胎仔卵巢の分化・発育に影響を及ぼすと考えられる。胎児期には、着床した原始生殖細胞が性腺の原基である生殖隆起に移動する。この生殖隆起は原始生殖卵胞の移動期に活発に分裂増殖し、移動してくる原始生殖細胞を取り囲み、原始卵胞へと成長させる。雌の生殖線では途中、髄質の退化が進み、同時に皮質の分裂増殖が盛んになり、卵巢皮質が形成される。胎生 6 日目の卵巢には、休止期、減数分裂前期の細糸期、接合期、太糸期、複糸期、あるいは退行変性をしている生殖細胞など種々の分裂経過中の卵祖細胞が含まれる<sup>8-10)</sup>。こうした卵巢の分化・形成期における排出ガスの曝露は、卵祖細胞に直接あるいは周囲結合組織に影響し卵祖細胞の分裂を遅延させた可能性がある。

また、胎仔期曝露群の下垂体機能低下の原因として、排出ガス曝露によって母体の内分泌機能攪乱が起り、これが胎盤を介して胎仔に移行したことが考えられる。排出ガスに曝露された妊娠ラットでは卵巢アロマターゼ活性の低下<sup>11)</sup>、血中テストステロン上昇が起こることが報告されている<sup>6)</sup>。周生期の雌にアンドロゲンあるいはエストロゲンを投与すると、性中枢がオス化して、生殖腺刺激ホルモンの分泌パターンに周期性がみられなくなることが報告されている<sup>12)</sup>。高濃度のテストステロンが胎盤を介して胎仔へ移行し、あるいは排出ガス中の多環芳香族炭化水素等の有害物質が胎盤を介して胎仔に移行し<sup>13)</sup>、これらの物質がエストロゲンとして作用し<sup>14)</sup>、下垂体機能の異常による性腺刺激ホルモンの分泌の変化を起こしていることが考えられた。今後、排出ガスが脳の性分化に及ぼす影響についての研究も必要である。

哺乳期における曝露は、生後 28 日目の卵巢には原始卵胞が対照群と同様に存在したことが、卵胞形成刺激ホルモンの低下とともに黄体形成ホルモンの低下がみられたことが

ら、性成熟後における原始卵胞の生育過程で下垂体機能の低下によって卵胞が退行するために発育卵胞数の減少を起こしていることが考えられた。哺乳期の卵巢ではすでに有糸分裂による増殖過程を終え、成熟分裂に入っていて、その前期(複糸期)の状態で行進が止まっている卵母細胞を含む多数の原始卵胞が存在する。この時期以降の卵胞発達には卵胞形成刺激ホルモン、黄体形成ホルモンの関与が必須である<sup>15)</sup>。哺乳期曝露で卵巢の発育卵胞が少なかった原因として、排出ガス曝露で引き起こされ副腎皮質からの過剰なステロイドホルモンによって<sup>16)</sup>、あるいは、排出ガス中の多環芳香族炭化水素のエストロゲン作用によって、視床下部 下垂体系に負のフィードバックがかかり性腺刺激ホルモンの分泌抑制が起こった結果、卵巢機能低下を起こしたことが考えられた。

本研究の結果では、雌の下垂体・卵巢に及ぼす胎仔期曝露と哺乳期曝露の影響の違いは明確ではなかった。一方、雄仔の場合は、胎仔期曝露は不可逆的な精巣機能低下がみられ<sup>4)</sup>、性差のあることが示唆された。雌仔の場合には形成された原始卵胞が一定数まで死滅していくことで性成熟前の卵巢が完成される<sup>8-10)</sup>。これに対して、雄仔の場合には Y 染色体上の Sry の発現によるセルトリ細胞の分化とそれに続く一連の細胞間相互作用で胎仔精巣が形成され<sup>17-20)</sup>、性成熟期にいたって精子がつくられることから、胎仔期における排出ガスの作用が雌仔に比べて顕著に現れることが考えられた。

量 反応関係に関して、低濃度曝露では高濃度のように顕著ではないものの、発育卵胞の減少と、閉鎖卵胞が増加した卵巢が観察された。卵巢形態や性ホルモンの変化は主に高濃度曝露で見られ、低濃度ではあまり見られなかったが、本実験で卵巢重量が減少したことを考えると、低濃度の曝露においても卵巢機能に何らかの影響があると思われる。

また、排出ガス中の何が卵巢機能に影響を及ぼしたのかに関して、この変化は全排出ガス曝露群、除塵排出ガス曝露群両群に見られたことから、生殖機能に及ぼす影響は主にガス状成分あるいは 0.05 $\mu$ m 以下の超微粒子によるのではないかと考えられた。

## 文 献

- 1) Miyabara, Y., Hashimoto, S., Sagai, M., *et al.*: *Chemosphere* **39**, 143-150, 1999.
- 2) Yoshida, S., Sagai, M., Oshio, S., *et al.*: *Int. J. Androl.* **22**(5), 307-315, 1999.
- 3) Mori, Y., Taneda, S., Hayashi, H., *et al.*: *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 145-146, 2002.
- 4) Watanabe, N. *BMC* (in press).
- 5) Watanabe, N. and Oonuki, Y.: *Environ. Health Perspect.* **107**, 539-544, 1999.
- 6) Watanabe, N. and Kurita, M.: *Environ. Health Perspect.* **109**, 111-119, 2001.

- 7) Pedersen, T., and Peters, H.J., *Reprod. Fertil* **17** , 555-557 , 1968 .
- 8) Wartenberg, H., Ihmer, A., Schwarz, S., *et al.*: *Anat. Embryol. (Berl)* **204** , 421-435 , 2001 .
- 9) Wartenberg, H., Hilscher, B. and Hilscher, W.: *Microsc. Res. Tech.*, **40** , 377-397 , 1998 .
- 10) McLaren, A. and Southee, D. *Dev. Biol.* **187** , 107-113 , 1997 .
- 11) Chikura, T., Ikenoya, M., Satoh, K., Nagai, F., Takeda, K., Watanabe, N.: *Effects of diesel exhaust on ovarian aromatase activities in pregnant rats*. Presented at the Annual Meeting forum 2001: environmental toxicology (Kanazawa, Japan), 2001.
- 12) Pfeiffer, C.A. *Am. J. Anat.*, **58** , 195-202 , 1936 .
- 13) Tozuka, Y., Watanabe, N., Ohsawa, M., Toriba, A., Kizu, R., Hayakawa, K.: *Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in rat mother's tissues and the fetuses exposed to diesel exhaust*. Presented at the Annual Meeting Japan Society of Endocrine Disrupter Research, (Hiroshima, Japan), 2002.
- 14) Santodonato, J. *Chemosphere*, **34** , 835-848 , 1997 .
- 15) Pelliniemi, L.J. and Dyn, M.: The fetal gonad and sexual differentiation. In Tulchinsky, D. and Little, B. (eds.), *Maternal-Fetal Endocrinology* 297-320 , 1993 , Saunders, Philadelphia.
- 16) Watanabe, N. and Nakamura, T.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30** , 407-411 , 1996 .
- 17) Koopman, P., Münsterberg, A., Capel, B., *et al.*: *Nature*, **348** , 50-52 , 1990 .
- 18) Hacker, A., Capel, B., Goodfellow, P., *et al.*: *Development*, **121** , 1603-1614 , 1995 .
- 19) Gomperts, M., Garcia-Castro, M., Wylie, C., *et al.*: *Development* **120** , 135-141 , 1994 .
- 20) Pelliniemi, L.J., Frojdmann, K. and Paranko, J.: Cell biology of testicular development. In Kretser, D. (ed.), *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. 21-65 , 1993 , Academic Press, New York.