

Fig. 1 The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus (AVpVN-POA and SDN-POA) of female rats after exposure to estradiol benzoate on postnatal day 4. Error bars represent standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

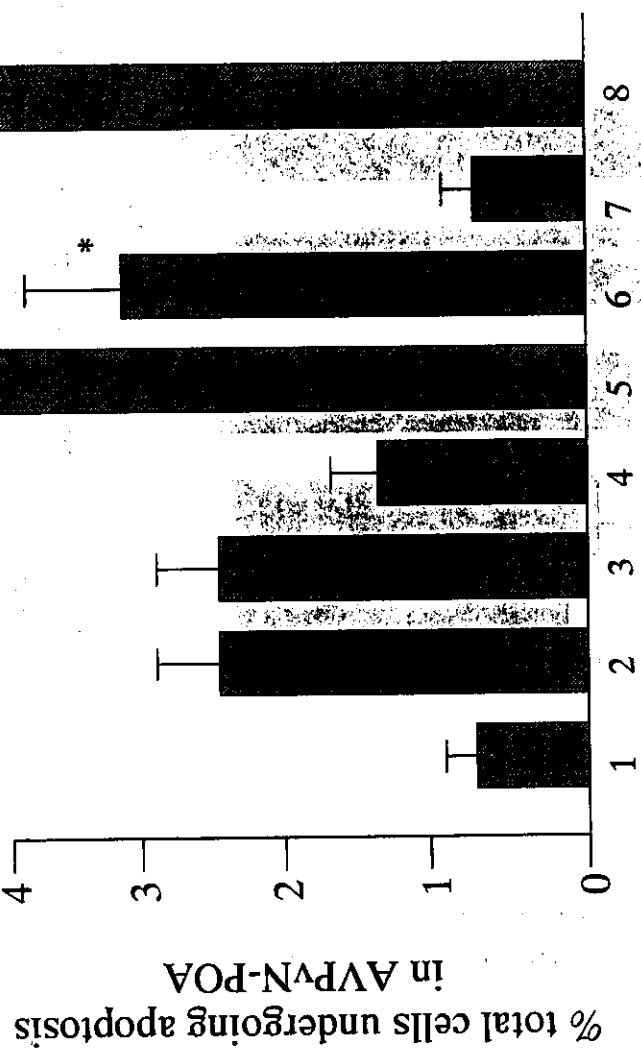


Fig.2 The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus of female rats after exposure to various endocrine disrupting chemicals on postnatal day 4. Error bars represent standard error of the mean. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.
 1, control; 2, genistein; 3, butyl benzyl phthalate; 4, bisphenol A; 5, tamoxifen; 6, clomiphene; 7, diethylstilbestrol; 8, nonylphenol

9. 哺乳動物培養胚を用いた内分泌かく乱化学物質の 中枢神経および生殖細胞に及ぼす影響の検討

研究者 渡辺敏明、大川恵子 山形大学医学部衛生学教室

研究要旨：哺乳動物培養胚を利用して、内分泌かく乱化学物質の神経細胞および生殖細胞の増殖・分化に及ぼす影響を検討した。17 β -estradiol(E2)、bisphenol A(BPA)および *p*-nonylphenol(NP)暴露によって、ラット培養胚の神経上皮細胞にアポトーシスの誘発が認められたが、始原生殖細胞の増殖への影響は明らかではなかった。一方、エストロゲンレセプター (ER) への結合能を 50%阻害濃度からみると、E2、diethylstilbestrol(DES)、estriol(E3)と比べて、BPA および NP では 10⁻³M 以上と、強い親和性はみられなかった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質は、胚発育の特定な時期に高い感受性を示すことが知られている。しかしながら、哺乳動物における胎生期の未分化の神経細胞や生殖細胞利用した内分泌攪乱物質の試験法は、これまでほとんど確立されていない。とくに内分泌攪乱物質の生殖細胞での影響評価は、次世代における生殖障害を知ることができる有用な 1 つの方法である。そこで、本年度は、培養胚を利用して、神経細胞のみでなく生殖細胞における内分泌攪乱物質の影響を検討した。また、内分泌攪乱物質の作用機序を明らかにするために、ER への結合能についても検討した。

B. 研究方法

1. 全胚培養

実験に使用した動物は、市販の成熟雌ラットで、雄ラットと交配させて、妊娠動物を得た（受精栓確認日=ED0）。妊娠 11.5 日にラットの子宮から器官形成期にある胚を取り出し、定法に従って、42 時間回転培養を行った。培養開始時

に、tamoxifen(TA), 17 β -estradiol(E2), estriol (E3), bisphenol A(BPA), あるいは *p*-nonylphenol(NP)を 10⁻⁶M~10⁻⁴M の濃度で添加した。

培養終了後、胚の生死を確認し、発育の様子および形態異常の有無を観察した。

2. 神経細胞の TUNEL 染色

培養胚のパラフィン切片を作成し、市販のアポトーシス検出キットを用いて、神経上皮細胞における免疫組織化学染色を行った。神経上皮細胞におけるアポトーシスの有無を観察した。

3. 始原生殖細胞の組織化学染色

培養胚の生殖原基における始原生殖細胞の増殖への影響を検討した。培養胚の体幹をコンバウンドで包埋し、そのまま凍結させた。クリオスタットで胚子体の横断切片を作成し、スライドガラスを風乾させた。始原生殖細胞は、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性によって確認することができるので、市販の反応発色液を用いて検出した。ALP 陽性細胞を始原生殖細胞とし、生殖原基における頻度

を計数した。

4. エストロゲンレセプター (ER) への結合能

化学物質の作用機序を明らかにするために、競合結合試験を利用した方法で ER への結合能を測定した。この方法は、精製したヒト組換え ER- α および β とほぼ同等の結合親和力を持つ蛍光リガンドを混合し、形成した複合体を利用する方法である。市販のエストロゲンレセプターバインディング測定キット (FP Screen-for-Competitors Kit、ER- α および β 、宝酒造、京都) を用い、この溶液に種々の濃度の被検物質を加え、競合置換された蛍光リガンドを蛍光偏光度測定装置 (Full-Range BECON 2000、宝酒造、京都) で測定する。

被検物質としては、胚培養で用いた TA、E2、E3、BPA、NP、diethylstilbestrol (DES)、estradiol benzoate (EB) および glufosinate ammonium (GLA) を、対象とした。これらの物質について、蛍光偏光度の測定によって得られた異方性値 (mA) から阻害率 (%) を求めた。さらに、阻害率の用量依存曲線から、50% 阻害濃度 (IC50%) および RBA (relative binding affinity) を算出した。なお、RBA とは、標準物質である E2 の IC50% を 100 として、各サンプルの IC50% を比率化した。

なお、これらの研究は動物の福祉に配慮し、すべての動物実験は山形大学医学部の「動物実験指針」に基づいて、実施した。

C. 研究結果

内分泌攪乱化学物質のラット培養胚の発育への影響をまとめたものが表 1 であ

る。すべての化学物質で、軽度の発育抑制がみられた。しかし、これらの暴露胚に重得な形態異常はみられなかった。観察された形態異常としては、DES 群で頭部の浮腫、EB および BPA 群で腹部の血腫、E3 群で心臓の血腫、および NP 群で心臓の血腫などであった。

免疫組織化学染色によって、培養胚の神経上皮細胞の様子をみると、E2 では $3.7 \times 10^{-8} \text{M}$ および $3.7 \times 10^{-6} \text{M}$ でアポトーシスのわずかな増加が観察された。また BPA では $4.4 \times 10^{-6} \text{M}$ 以上および NP では $4.5 \times 10^{-7} \text{M}$ 以上で高頻度に誘発された。BPA 10^{-4}M 暴露胚では、培養胚の心臓や肝臓においてもアポトーシスが観察された。しかし、DES、TA、EB および E3 では $10^{-6} \text{M} \sim 10^{-4} \text{M}$ レベルでも、神経上皮細胞にアポトーシスの誘発は観察されなかった。

培養胚の生殖原基における ALP 陽性細胞の頻度をまとめたものが表 2 である。DMSO 対照群における ALP 陽性細胞数は平均 27.0 であった。しかし、E2 および BPA を 10^{-6}M レベルで暴露しても ALP 陽性細胞数に変化は見られなかった。

ER に対する化学物質の親和性をみたものが、表 3 および表 4 である。標準物質の E2 の ER α および ER β に対する IC50% (α および β) は、それぞれ 5.1 nM ($5.1 \times 10^{-6} \text{M}$) および 25.7 nM ($2.6 \times 10^{-5} \text{M}$) であった。DES は、ER α に対しては E2 と同じ程度の親和性が認められたが、ER β に対しては約 2 倍の親和性の強さであった (図 1)。一方、BPA および NP の IC50% (α) は、それぞれ $11.7 \times 10^{-3} \text{M}$ 以上および $1.8 \times 10^{-3} \text{M}$ であり、BPA および NP の ER α および β に対する親和力は、ともに E2 のおよそ 1/100 以下であった。なお、GLA については、 10^{-4}M でも ER 結合能への影響は観察さ

れず、ER α および ER β との親和性は認められなかった (図2)。

D. 考察

E2、BPA および NP 暴露培養胚では、神経上皮細胞にアポトーシスによる細胞死が観察された。一方、DES、TA、EB および E3 においては 10^{-6} M 以上の暴露でも、細胞死は観察されなかった。内分泌攪乱化学物質によるアポトーシス誘発の相違および発現機序については明らかではない。ただし、E2 は、BPA や NP と比べ、より低濃度でアポトーシスの誘発および ER との結合阻害が見られていた。

培養胚の始原生殖細胞は、ALP 活性を指標した組織化学染色によって検出されることが確認された。しかしながら、今回の観察においては、内分泌攪乱化学物質の暴露によって、ALP 陽性細胞の出現頻度に変化は見られなかった。このようなことから、始原生殖細胞を指標とした内分泌攪乱物質の評価法については、さらに検討が必要である。たとえば、内分泌攪乱物質の暴露時期 (胚培養時期)、胚子体の観察法などの改良が必要と考えられる。また、生殖細胞の増殖・分化について、より感度の高い指標を検討する必要がある。

なお、GLA は培養胚の神経上皮細胞に特異的にアポトーシスを誘発したが、GLA 自体には ER との結合阻害は認められなかった。このようなことから、神経上皮細胞でみられたアポトーシス誘発の機序は、E2、BPA および NP によるものと異なっているのかもしれない。

E. 結語

ラット培養胚において、E2、BPA および NP の暴露によって、神経上皮細胞

にアポトーシスが誘発された。一方、生殖原基の始原生殖細胞の増殖に対する内分泌攪乱化学物質の影響は観察されなかった。これらを内分泌攪乱物質の評価法として確立するためには、アポトーシス誘発の機序や感度の高い指標の開発などの検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kuwagata, K., Watanabe, C., Takeda, K., Aoyama, H., Watanabe, T., and Ono, H.: Embryotoxicity of estrogenic compounds on rat embryos using whole embryo culture. *Altern. Animal Test. Experiment.* (in submission)

2) Iwase, T., and Watanabe, T.: Embryotoxicity of glufosinate ammonium on cultured embryos of rats in the neural fold stage. (in preparation)

3) 渡辺敏明、桑形麻樹子、岩瀬隆之 (2000) 哺乳動物培養胚を用いた神経細胞に及ぼす影響。井上達監修、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編集「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」、pp.171-178、平成12年9月、シュプリンガー・ファラーク東京、東京。

4) 渡辺敏明、大川恵子 (2000) 哺乳動物培養胚を用いた生殖細胞に及ぼす影響。井上達監修、今井清、長村義之、加藤正信、菅野純編集「内分泌攪乱化学物質の生物試験研究法」、pp.186-193、平成12年9月、シュプリンガー・ファラーク東京、東京。

表1 ラット培養胚における化学物質の形態学および病理組織学的影響

Chemicals	Doses		Growth (mm)	Morphological defects	Apoptosis induction [#]
	(mL ⁻¹)	(M)			
DMSO			7.2	-	-
Diethylstilbestrol(DES)	50 μg	1.9x10 ⁻⁴	6.0*	b	-
	500ng	1.9x10 ⁻⁶	6.9	-	-
Tamoxifen(TA)	1 μg	1.8x10 ⁻⁶	6.9	-	-
	10ng	1.8x10 ⁻⁸	6.4*	-	-
Estradiol benzoate(EB)	10 μg	2.7x10 ⁻⁵	7.0	-	-
	100ng	2.7x10 ⁻⁷	6.9	a	-
17β-estradiol(E2)	1 μg	3.7x10 ⁻⁶	6.3*	-	+
	10ng	3.7x10 ⁻⁸	6.5*	-	+
Estriol(E3)	1 μg	3.4x10 ⁻⁶	6.6	c	-
	10ng	3.4x10 ⁻⁸	7.6	-	-
Bisphenol A(BPA)	100 μg	4.4x10 ⁻⁴	6.7*	a	+
	1 μg	4.4x10 ⁻⁶	6.6*	-	+
p-Nonylphenol(NP)	10 μg	4.5x10 ⁻⁵	6.3*	c,d	+
	1 μg	4.5x10 ⁻⁷	7.0	-	+
Glufosinate(GLA)	10 μg	5.1x10 ⁻⁵	6.6	a	+
	100ng	5.1x10 ⁻⁷	7.1	-	+

[#]Neuroepithelial cells by TUNEL staining. *p<0.05.

^aabdominal hemostasis. ^bswelling of head.

^cheart hemostasis. ^dedema.

表2 ラット培養胚における生殖原基の始原生殖細胞に及ぼす内分泌攪乱物質の影響

Chemicals	Doses(M)	No. of genital ridges analyzed	No. of primordial germ cells
DMSO(CONTROL)		7	27.0±4.8
diethylstilbestrol(DES)	2.7x10 ⁻⁵	5	27.6±5.6
estradiol benzoate(EB)	2.7x10 ⁻⁵	6	24.8±4.2
17β-estradiol(E2)	3.7x10 ⁻⁶	5	25.2±4.4
bisphenol A(BPA)	4.4x10 ⁻⁶	5	23.8±2.9
p-nonylphenol(NP)	4.5x10 ⁻⁷	6	26.3±2.7

mean±s.d.

表3. エストロゲンレセプターαに対する化学物質の親和性

Chemicals	IC50%	RBA
17β-estradiol(E2)	5.1nM	100
diethylstilbestrol(DES)	5.4nM	94
estriol(E3)	219nM	2.3
bisphenol A(BPA)	11.7mM<	<0.04
p-nonylphenol(NP)	1.8mM	0.28
glufosinate(GLA)	ND	ND

IC50:50%阻害濃度

RBA:相対結合能

表4. エストロゲンレセプターβに対する化学物質の親和性

Chemicals	IC50%	RBA
17β-estradiol(E2)	25.7nM	100
diethylstilbestrol(DES)	11.5nM	223
estriol(E3)	309nM	8.3
bisphenol A(BPA)	26.9mM<	<0.10
p-nonylphenol(NP)	4.9mM	0.52
glufosinate(GLA)	ND	ND

IC50%:50%阻害濃度

RBA:相対結合能

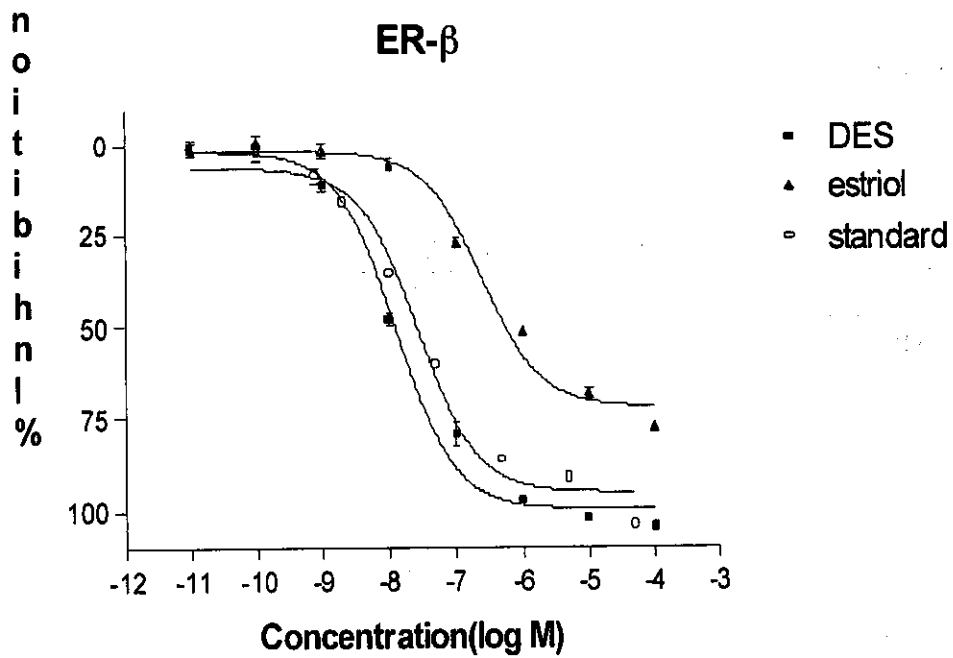
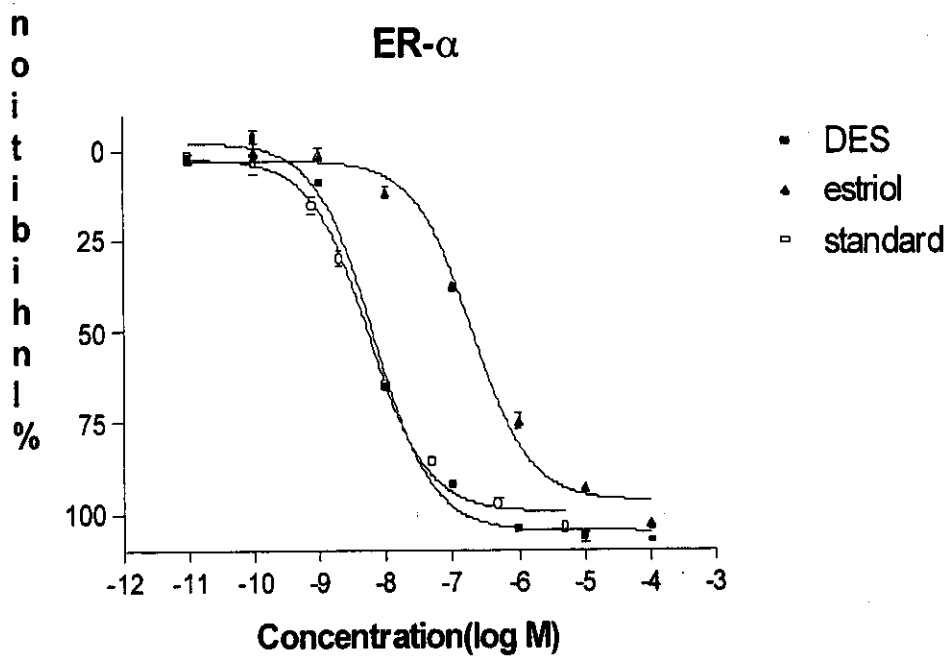


図1 エストロゲンレセプターに対する内分泌攪乱物質の競合結合反応

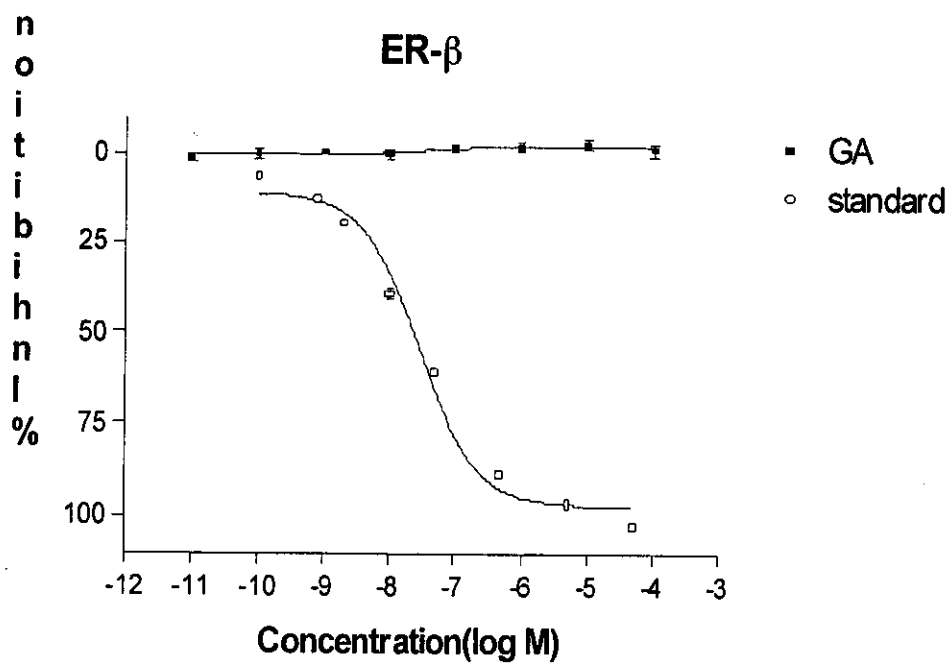
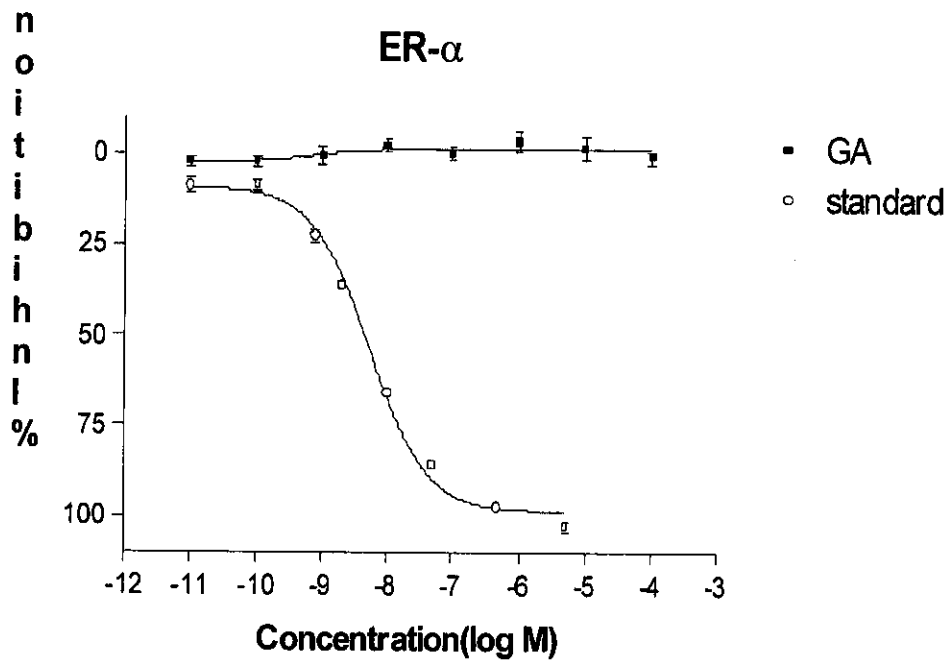


図2 エストロゲンレセプターに対する化学物質の競合結合反応
 GA:glufosinate ammonium

10. フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究

分担研究者 江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所大阪支所生物試験部第二室長

研究要旨：ラットの妊娠 0-8 日に 250, 500, 750 または 1000 mg/kg の monobutyl phthalate (MBuP) を経口投与して胎児に対する影響を調べた。1000 mg/kg で着床前胚死亡率及び着床後胚死亡率が有意に上昇した。同用量の MBuP を偽妊娠 0-8 日に経口投与したところ、脱落膜反応を惹起した偽妊娠ラットの子宮重量は 1000 mg/kg で有意に低かった。これらの結果から、MBuP による早期胚致死作用は子宮機能の低下に起因することが示唆された。

A. 研究目的

可塑剤として使われているフタル酸エステル類 (PAEs) は地球規模の環境汚染物質である。PAEs の一つである dibutyl phthalate (DBP) は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤等に使用されており、また、各種化粧品にも使われている。

DBP はラット及びマウスにおいて発生毒性を示すことが知られている。我々は先に、ラット胎児の器官形成期に DBP を投与したとき、胚致死作用と催奇形作用を示すことを明らかにした。更に、ラットの妊娠 7-9 日または妊娠 13-15 日に DBP を投与したときに催奇形作用を示し、妊娠前半に DBP を投与したとき強い胚致死作用を示すことを報告した。Monobutyl phthalate (MBuP) は DBP 及び butyl benzyl phthalate (BBP) を投与したときの共通の代謝物であり、ラットにおいて DBP 及び BBP と同様な催奇形性を示すことを我々は先に明らかにした。

最近、DBP や BBP などの PAEs が組み替え酵母やヒト乳癌細胞を用いた *in vitro* の実験においてエストロ

ゲン作用を示すことが報告され、DBP 及び BBP 等の PAEs は内分泌攪乱作用が疑われる化学物質として注目されている。このようなことから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの重要性は益々高まっている。

第 1 年度においては、ラットの妊娠前半に DBP を与えたとき著しい胚致死作用を示すことを報告した。

第 2 年度においては、DBP をラットの妊娠初期に与えたときの影響について更に詳細に検討し、胚の生存にとって重要な役割を果たす子宮機能に対する DBP の影響について偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応を指標として調べた。

第 3 年度においては、DBP の主要な代謝物である MBuP をラットの妊娠初期に与えたときの影響及び偽妊娠ラットの脱落膜反応に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは、室温 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12:12 時間 明/暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育した。膣垢検査により少なくとも 2 回連続

4日の性周期を示したメスラットを使用した。

メスラットを同系統のオスラットと同居させ、翌朝膣垢内に精子を認めたメスを妊娠とし、この日を妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。ラットは妊娠20日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎児数、吸収胚数を記録した。子宮は2%水酸化ナトリウム溶液に浸けて着床痕の有無を確認した。

メスラットを同系統の精管結紮したオスラットと同居させ、翌朝膣栓を認めたメスを偽妊娠とし、この日を偽妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。偽妊娠4日の11:00から13:00の間に、エーテル麻酔下で開腹して偽手術または両子宮角の創傷を行った。先の曲がった細針金を子宮角分岐部に挿入し卵管接合部まで子宮内膜を創傷することによって脱落膜反応を惹起した。ラットは偽妊娠9日に開腹し、子宮及び卵巣重量を測定した。偽妊娠9日の子宮重量を子宮の脱落膜反応の指標とした。また、このときの血清中のプロゲステロン及びエストラジオール濃度を測定した。

妊娠及び偽妊娠ラットの0日から8日まで250、500、750または1000 mg/kgのMBuPを経口投与した。MBuPはアンモニウム塩水溶液(pH 6.8-7.2)として、投与日の体重に基づいて5 ml/kg与えた。対照群のラットには塩化アンモニウム水溶液を妊娠0-8日に経口投与した。

血清中プロゲステロン及びエストラジオールの測定はラディオイムノアッセイキットによって行った。

胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

動物実験は国立医薬品食品衛生研

究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

妊娠ラットの所見をTable 1に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられなかった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。妊娠0-9日の母体体重増加及び摂餌量が500 mg/kg以上の投与群において有意に低下した。また、750 mg/kg投与群においては妊娠9-20日の摂餌量が有意に増加した。子宮を除いた補正母体重増加にはMBuP投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

生殖に関する所見をTable 2に示した。対照群、250 mg/kg投与群における交配成立メスラットは全て妊娠していた。500 mg/kg投与群の16匹中1匹、750 mg/kg投与群の16匹中2匹のメスラットが不妊であった。1000 mg/kg投与群において着床数が有意に減少し、着床前胚死亡率が有意に上昇した。妊娠ラットについての集計では、黄体数、着床数、着床前胚死亡率及び生存胎児の性比にはMBuP投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。1000 mg/kg投与群で吸収胚数が有意に増加し、生存胎児数が有意に減少し、着床後胚死亡率が有意に上昇した。

偽妊娠ラットの所見をTable 3に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられなかった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。偽妊娠0-9日の母体体重増加及び摂餌量が500 mg/kg以上の投与群で有意に低下した。

偽妊娠9日の卵巣重量をFig. 1に示した。MBuP投与群と対照群の間に卵巣重量の差は認められなかった。

Fig. 2 に偽妊娠 9 日の黄体数を示した。MBuP 投与群と対照群の間に有意の差はみられなかった。

偽妊娠 9 日の子宮重量を Fig. 3 に示した。1000 mg/kg 投与群の子宮重量は対照群と比べて有意の低下が観察された。

偽妊娠 9 日の血清中プロゲステロン濃度を Fig. 4 に示した。プロゲステロン濃度には MBuP 投与群と対照群及び偽手術群との間の有意の差は認められなかった。

Fig. 5 に偽妊娠 9 日の血清中エストラジオール濃度を示した。MBuP 投与群の血清中エストラジオール濃度には対照群及び偽手術群と較べて有意な差はみられなかった。

D. 考察

投与期間中の母体体重増加及び摂餌量の低下などの MBuP の母体に対する悪影響が、500 mg/kg 以上の投与量で観察された。このことは、MBuP が 500 mg/kg 以上で母体ラットに対して毒性を及ぼすことを示している。

今回及び以前の DBP に関する実験における投与期間は、着床前、着床中及び着床後の期間に相当している。胚に対する化学物質の着床前の悪影響は着床前胚死亡、すなわち着床数減少、着床後の悪影響は着床後胚死亡、すなわち吸収胚増加、を引き起こすと考えられる。初年度の実験において、妊娠 0-11 日に DBP を 2.0 % 含む飼料を与えたラットにおいて着床後胚死亡の著しい増加が観察された。昨年度の実験においては妊娠初期における DBP の胚に対する影響をより詳しく調べるために、比較的高用量の DBP を投与した。1250 mg/kg (4.49 mmol/kg) 以上の投与量で着床

前胚死亡率の有意な上昇が、500 mg/kg (2.69 mmol/kg) 以上の投与量で着床後胚死亡率の有意の上昇が観察された。今回の実験では、比較的高用量の MBuP 投与を行ったが、750 mg/kg (3.37 mmol/kg) 以下の投与量では着床前及び着床後の胚死亡率には有意な上昇は認められなかった。着床前及び着床後の胚死亡率の有意な上昇は 1000 mg/kg (4.50 mmol/kg) で観察された。このようにラットの妊娠初期における胚致死作用発現には親化合物よりも高用量の MBuP を要することが示された。これらの結果は、DBP による早期の胚致死はその代謝物の MBuP だけの作用によるものではないことを示唆している。

MBuP 投与後の妊娠ラットにおいて着床後胚死亡の有意な増加が 1000 mg/kg の投与量でみられ、偽妊娠ラットにおいて子宮重量の有意の低下、すなわち子宮の脱落膜反応の抑制、が 1000 mg/kg の投与量でみられた。これらの所見は MBuP による早期の胚死亡は子宮の脱落膜腫形成の抑制に起因することを示唆している。

妊娠 0-11 日に DBP を 2.0 % 含む飼料を与えると、卵巣重量の低下、子宮重量の低下及び血中プロゲステロンの低下を引き起こすことを我々は先に報告した。脱落膜反応の抑制が、妊娠子宮重量の低下の要因と考えられる。プロゲステロンは妊娠の維持及び胚・胎児の正常な発育に不可欠な役割を果たしており、十分量のプロゲステロンが子宮の脱落膜反応、すなわち子宮機能維持、に必要であるが、今回の実験では脱落膜反応抑制とプロゲステロン濃度低下との明確な相関性は示されなかった。

これらのことから、プロゲステロン濃度の低下が子宮の脱落膜反応抑制の第一の要因ではないと考えられる。

我々は先に、DBP 及び BBP の代謝物である MBuP によって引き起こされる胚致死や胎児奇形の投与日による差が、DBP 及び BBP によるものとよく一致していることを明かにし、MBuP が DBP 及び BBP による発生毒性の活性代謝物であることを示唆した。この仮説は、ラットの妊娠 14 日に DBP を投与したとき血清及び胚組織には微量の DBP と多量の MBuP が検出されることから支持されている。さらに我々は、MBuP が DBP による抗アンドロゲン作用と同様の作用を示すことを明らかにした。今回の実験では、MBuP は DBP による早期の胚致死作用に部分的に関与していることが示唆された。

E. 結論

妊娠ラットの早期に DBP の主要な代謝物である MBuP を与えて胚致死作用、偽妊娠ラットに MBuP を与えて子宮の脱落膜反応に対する影響を調べたところ、胚死亡率の上昇と脱落膜腫形成の抑制が観察された。これらのことから、妊娠初期に与えた MBuP による胚致死作用には子宮における脱落膜反応の抑制、すなわち子宮機能の低下、が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Ema, M. and Miyawaki, E. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Effects of 4-tert octylphenol on

initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. Harazono, A. and Ema, M. *Toxicol. Lett.*, in press.

Adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. Ema, M. and Miyawaki, E. *Reprod. Toxicol.*, in press.

Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. Ema, M. and Harazono, A. *Cong. Anom.*, in press.

Suppression of decidual cell response induced by tributyltin chloride in pseudopregnant rats: As a cause of early embryonic loss. Harazono, A. and Ema, M. (2000) *Arch. Toxicol.*, 74, 632-637.

Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. Ema, M. and Harazono, A. (2000) *Reprod. Toxicol.*, 14, 451-456.

フタル酸エステルの生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究: 主として Di(2-ethylhexyl)phthalate および Di-n-butyl phthalate について、小泉睦子、江馬 真、広瀬明雄、長谷川隆一 (2000) *食品化学学会誌*, 7, 65-71.

Reproductive and developmental toxicity of triphenyltin chloride in rats. Ema, M. (2000) *Cong. Anom.*, 40, 8-13.

学会発表

Decreased anogenital distance

(AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBP) during pregnancy. Ema, M. and Miyawaki, E. 40th Annual Meeting, Society of Toxicology

環境ホルモン物質としてのリスク評価の検討、関沢 純、江馬 眞 第3回内分泌攪乱化学物質学会

Developmental and reproductive toxicity of tributyltin and its metabolite, dibutyltin, in rats. Ema, M. 6th Scientific Meeting of the International Federation of Teratology Society, Satellite Meeting

ジブチルフタレートの子ラットにおける雄胎児の性分化に及ぼす影響 江馬 眞、宮脇英美子 第40回日本先天異常学会

ラットの妊娠初期に投与した dibutyltin dichloride の胚致死作用 江馬 眞、原園 景 第27回日本トキシコロジー学会

【協力研究者】

原園 景 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部)

宮脇英美子 (国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部)

Table 1. Body weight gain and food consumption in rats given MBuP on days 0 to 8 of pregnancy

MBuP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000
No. of females successfully mated	16	16	16	16	16
No. of dead females	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	230 ± 7	225 ± 7	230 ± 19	225 ± 5	228 ± 7
Body weight gain (g) ^a					
Days 0-9	20 ± 10	22 ± 7	9 ± 7*	8 ± 14*	0 ± 12*
Days 9-20	84 ± 12	87 ± 12	84 ± 22	82 ± 20	70 ± 25
Adjusted weight gain ^b	33 ± 13	38 ± 9	31 ± 10	37 ± 13	25 ± 12
Food consumption (g) ^a					
Days 0-9	140 ± 14	138 ± 18	115 ± 18*	111 ± 26*	97 ± 16*
Days 9-20	193 ± 18	199 ± 14	200 ± 16	215 ± 17*	208 ± 21

^a Values are given as the mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 2. Reproductive findings in rats given MBuP on days 0 to 8 of pregnancy

MBuP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000
No. of females successfully mated	16	16	16	16	16
No. (%) of nonpregnant females	0 (0)	0 (0)	1 (6.3)	2 (12.5)	2 (12.5)
No. (%) of pregnant females	16(100)	16(100)	15(93.7)	14(87.5)	14(87.5)
No. of implantations per female ^a	15.5 ± 1.3	14.6 ± 2.5	14.6 ± 4.2	13.2 ± 5.4	12.7 ± 5.1*
Preimplantation loss per female(%) ^b	5.9	8.7	9.8	19.2	20.2*
No. of litters	16	16	15	14	14
No. of litters totally resorbed	0	0	0	0	1
No. of corpora lutea per litter ^a	16.5 ± 1.2	16.0 ± 1.2	16.2 ± 1.0	16.4 ± 1.8	15.9 ± 0.9
No. of implantations per litter ^a	15.5 ± 1.3	14.6 ± 2.5	15.6 ± 1.5	15.1 ± 1.8	14.5 ± 1.3
Preimplantation loss per litter (%) ^b	5.9	8.7	3.7	7.6	8.7
No. of resorption and dead fetuses per litter ^a	1.4 ± 1.5	1.0 ± 1.0	1.7 ± 1.7	2.4 ± 2.0	3.7 ± 3.1*
Postimplantation loss per litter (%) ^c	9.1	6.4	11.3	15.9	26.3*
No. of live fetuses per litter ^a	14.1 ± 1.6	13.7 ± 2.7	13.9 ± 2.4	12.7 ± 2.7	10.8 ± 3.7*
Sex ratio of live fetuses (male / female)	121 / 104	120 / 99	108 / 100	98 / 80	77 / 74
Body weight of live fetuses (g) ^a					
Male	3.35 ± 0.25	3.42 ± 0.10	3.01 ± 0.36*	2.71 ± 0.30*	2.47 ± 0.29*
Female	3.17 ± 0.22	3.15 ± 0.15	2.80 ± 0.30*	2.58 ± 0.23*	2.32 ± 0.29*

^a Values are given as the mean ± SD.

^b [(No. of corpora lutea - no. of implantations)/no. of corpora lutea] x 100.

^c (No. of resorptions and dead fetuses/no. of implantations) x 100.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

Table 3. Body weight gain and food consumption in rats given MBuP on days 0-8 of pseudopregnancy

MBuP (mg/kg)	0 (Control)	250	500	750	1000
No. of pseudopregnant rats	16	16	16	16	16
No. of dead rats	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	228 ± 8	232 ± 13	228 ± 10	226 ± 7	231 ± 6
Body weight gain (g) ^a					
Days 0-9	13 ± 5	12 ± 8	3 ± 11*	-2 ± 10*	-11 ± 14*
Food consumption (g)					
Days 0-9	124 ± 12	112 ± 22	106 ± 23*	85 ± 21*	78 ± 20*

^a Values are given as the mean ± SD.

* Significantly different from the control, $P < 0.05$.

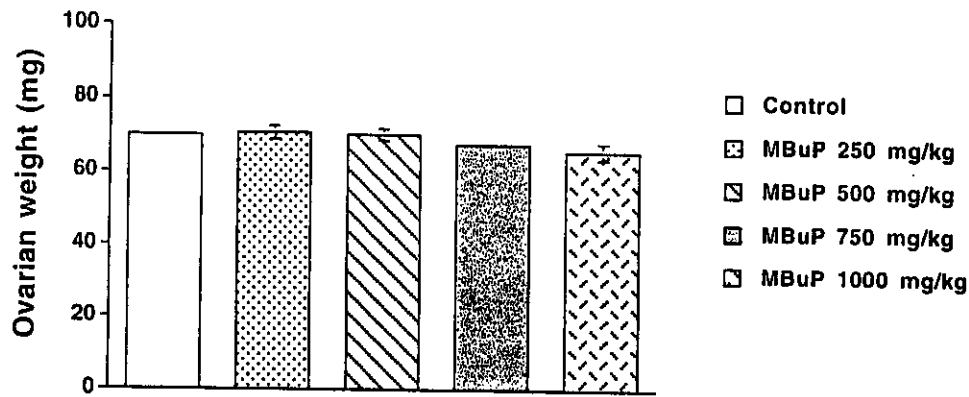


Fig. 1. Ovarian weights of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as the mean \pm SEM of 16 animals.

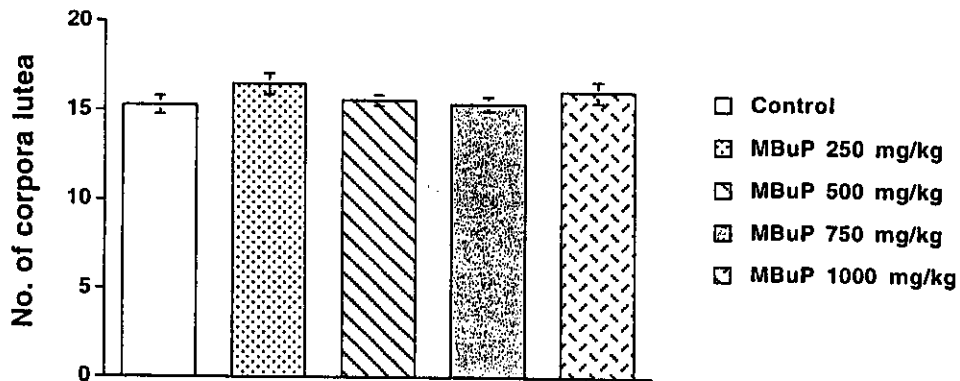


Fig. 2. Number of corpora lutea of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as the mean \pm SEM of 16 animals.

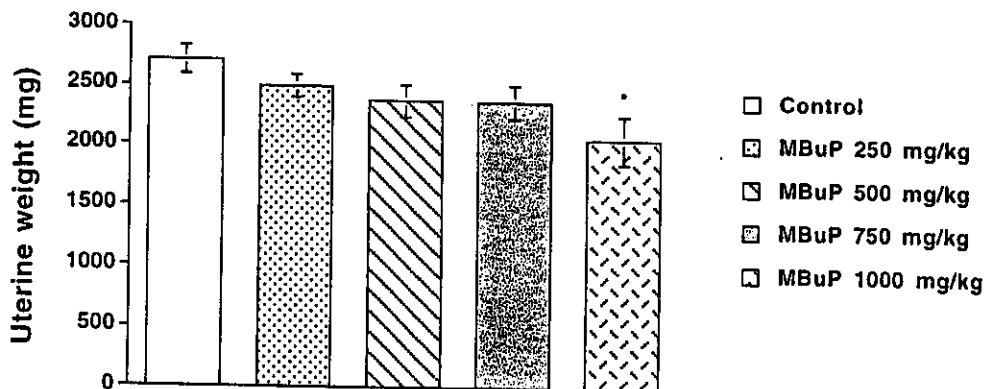


Fig. 3. Uterine weights of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as the mean \pm SEM of 16 animals. * Significantly different from the control group, $P < 0.05$.

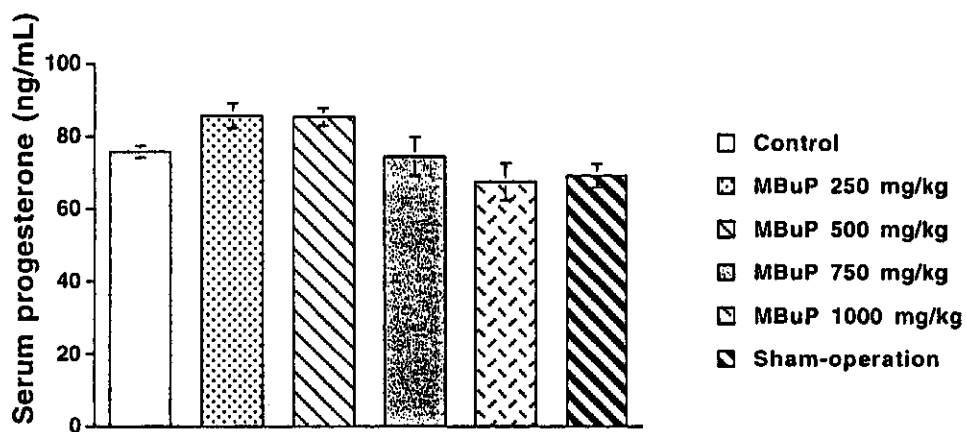


Fig. 4. Serum progesterone levels in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as the mean \pm SEM of 16 animals.

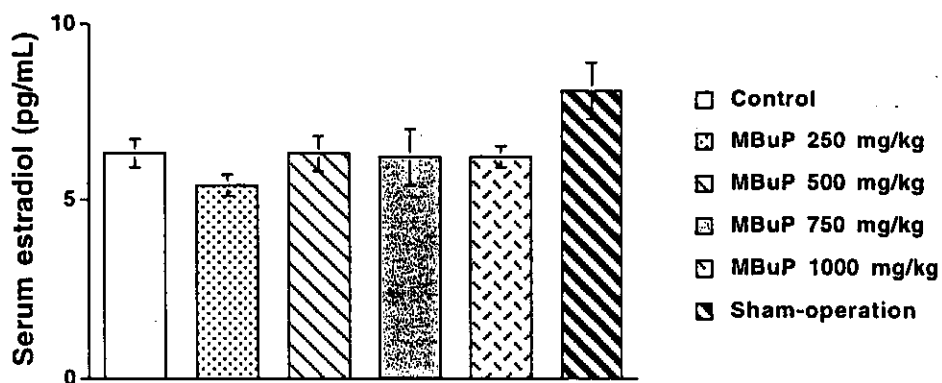


Fig. 5. Serum estradiol levels in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as the mean \pm SEM of 16 animals.