

M. Takatsuki, A. Kubo, A. Itai, and T. Inoue, ESTROGEN RECEPTOR ALPHA POINT MUTATION ALTERED RESPONSES TO FLAVONES IN THE REPORTER ASSAY 11th International Congress of Endocrinology, 2000.10.

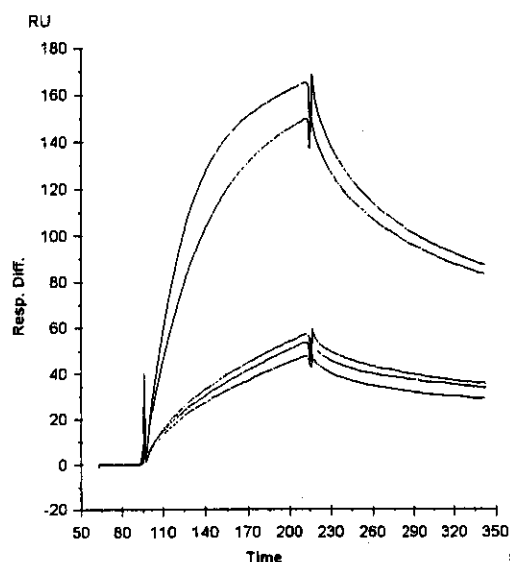


図1 エストロゲンに (E2) による ER-ERE 相互作用の変化 ; ER (10nM) に対して 10^{-10} ~ 10^{-7} M E2 を添加して ER-ERE 相互作用を測定した。ER-ERE 相互作用は E2 濃度依存的に増加した。

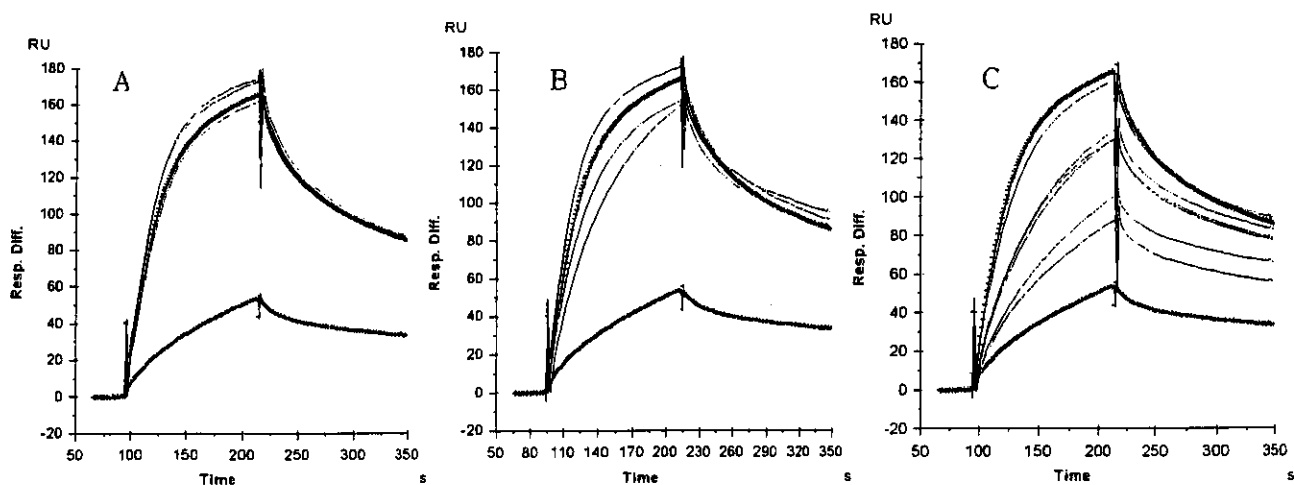


図2 各種化合物による ER-ERE 相互作用の変化 : A ; エチニルエストラジオールや DES では E2 と同様の变化を示した。B ; ビスフェノール A やゲニスタインでは E2 に比べ解離が遅い傾向を示した。C ; 3D-QSAR で探索された化合物はいずれも ER-ERE 相互作用を増加させた。それぞれアッセイを行った最大濃度でのセンサーグラムを示す。下の太線は ER10nM のみ、上の太線は ER+E2 の反応。

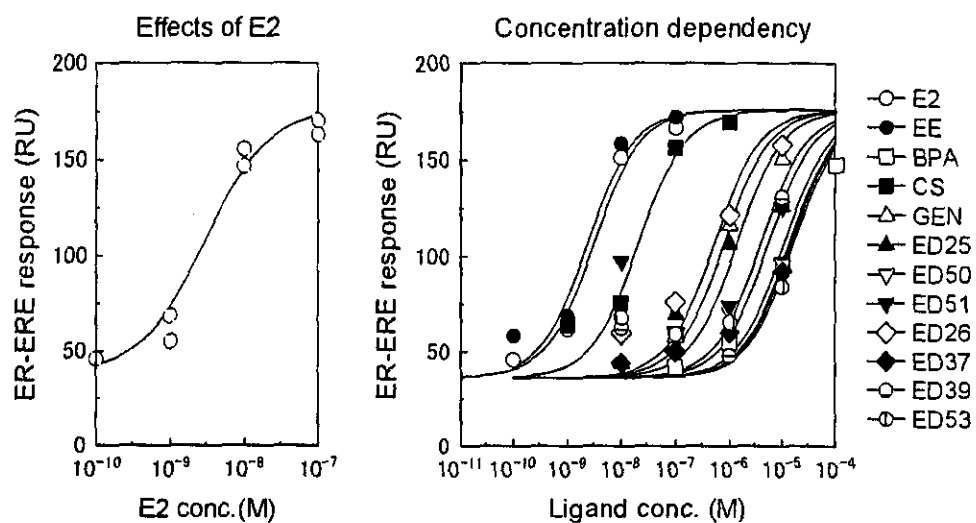


図3 ER-ERE 相互作用の各種 ER 活性物質濃度依存性変化；結合反応 2 分後のレスポンスを化合物濃度に対してフィッティングして EC50 値を求めた

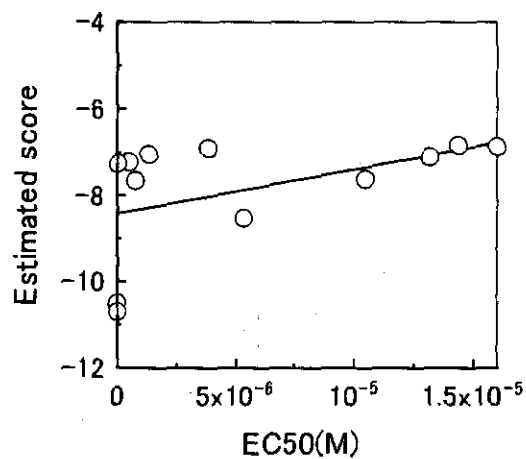


図4 ER-ERE 相互作用における EC50 と 3D-QSAR により計算された推定活性値 (Estimated score) の関係

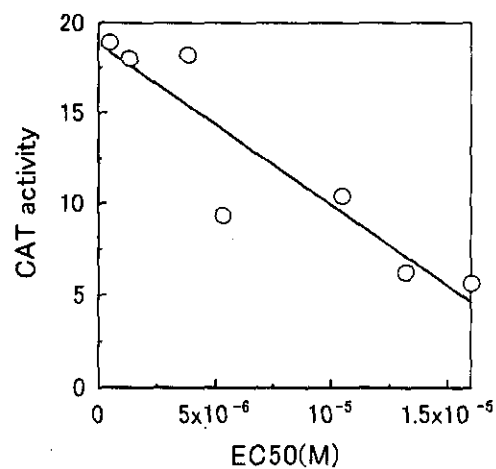


図5 ER-ERE 相互作用における EC50 と COS-1 細胞 CAT レポーター活性値との比較

18. マウスからヒトへの外挿モデル系構築のための実験動物 トキシコゲノミックス・プロテオミックス系の試行実験

井上 達

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・毒性部

研究要旨：バテル社へ研究委託による共同研究で、約 5000 種の配列既知のマウス遺伝子を載せた cDNA マイクロアレイを用い、エストロゲンによる子宮肥大反応時の遺伝子発現変動を検討した。卵巢摘出マウスに、0.2 $\mu\text{g/kg/day}$ のエストロゲンを皮下投与し摘出した子宮における遺伝子発現変動を検討した結果、約 250 種の遺伝子が発現変動を示した。さらに、それらの遺伝子の変動パターンをクラスター解析した結果、様々な変動パターンに分類できることがわかった。

A. 目的

遺伝子発現変動パターンにより被検物質のエストロゲン様活性を検出する系を構築するための基礎検討として、本研究では卵巢摘出マウス子宮肥大試験をモデルに、エストロゲンによる遺伝子発現変動を cDNA マイクロアレイによって網羅的に解析する系を実施することを目的とした。

B. 方法

マウスは CD-1 を用いた。卵巢摘出後 2 週間おいたマウスに対し、0.25 $\mu\text{g/kg/day}$ のエストロゲンを 3 日間連日皮下投与し、投与開始 1 日後、2 日後、3 日後、7 日後に子宮を摘出した。摘出した子宮から全 RNA を抽出し、TSA 法にて Cy3 もしくは Cy5 ラベルした cDNA

を合成後、cDNA マイクロアレイアッセイにかけた。同時に子宮重量を測定し、エストロゲン作用を確認した。

C. 結果

Figure 1 に経時的な子宮重量の変化を示した。子宮重量は、投与期間およびエストロゲン濃度に依存して増加した。また、その増加は、投与終了後 4 日目（開始後 7 日目）にはほぼ消失していた。0.2 $\mu\text{g/kg/day}$ のエストロゲンを投与した場合、重量の増加はわずかであったが、有意であった。またこの際に抽出される全 RNA 量を Figure 2 にまとめた。その結果、子宮重量の増加がほとんど見られない投与後 1 日目でも高い全 RNA の増加が認められた。

マウス cDNA 約 5000 種を PCR 増幅し、

精製後スポットして作製した cDNA マイクロアレイチップを用い、0.2 $\mu\text{g/kg/day}$ のエストロジェン投与時の遺伝子発現変動を検討した。投与により 2 倍以上の変動した遺伝子数について Table 1 にまとめた。その際のシグナル強度が 1000 以上であり、複数回の実験で確認が取れた遺伝子数は、約 250 であった。これらの遺伝子について経時的な発現変動パターンによりクラスター解析した結果を Figure 3 に示す。各点が遺伝子を示し、点の集合に対し、経時的な変動パターンが表示されている。遺伝子が集合し、クラスターを形成している変動パターンと、クラスターを形成せず遺伝子が偏在している変動パターンを容易に見分けることができる。

D. 考察

約 5000 種の遺伝子の発現変動を網羅的に検討した結果、5%にあたる約 250 の遺伝子の発現がエストロジェンによって変動することがわかった。それらの経時的な発現変動パターンによりクラスター解析した結果、クラスターを形成して同様のパターンで変動する遺伝子群が存在することがわかった。今後は、定量的 RT-PCR 法を用いたこれら変動遺伝子群の変動パターンを検討し、マイクロアレイによって得られた結果の検証を行う。さらに、興味ある発現変動パターンを示す遺伝子を複数選択し、それらの遺伝子が子宮内でどのような空間的・時間的発現

変動を示すのか、in situ hybridization 法にて検討する。今回は、ごく低用量のエストロジェンによる変動を検討するために 0.2 $\mu\text{g/kg/day}$ という濃度を選んだが、他の濃度でも同様の変動パターンを示すかについても検討する。

以上の検討を経、エストロジェンにより子宮において誘導される遺伝子発現変動パターンについて基礎データを得た後に、構造の異なる他のエストロジェン様化合物による遺伝子発現変動パターンについても検討し、遺伝子発現変動パターンで被検物質のエストロジェン様活性を検出するという本研究の目標を完成させていく。

E. 結論

約 5000 種と多数の遺伝子群からなる cDNA マイクロアレイチップを自家調製し、検出感度を上昇させるために必要な条件検討を行い、TSA 法によるかたよりの生じない感度上昇を実現させることによって本研究は成功した。これまでの結果から、基本的な系の構築は終了したと考えられ、今後は、別の手法を用いた結果の検証と条件を変えた検討によってデータを蓄積することによって、遺伝子発現変動パターンにより被検物質のエストロジェン様活性を検出する系を構築するという本研究の目的により近づくことが可能と考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

Figure 1

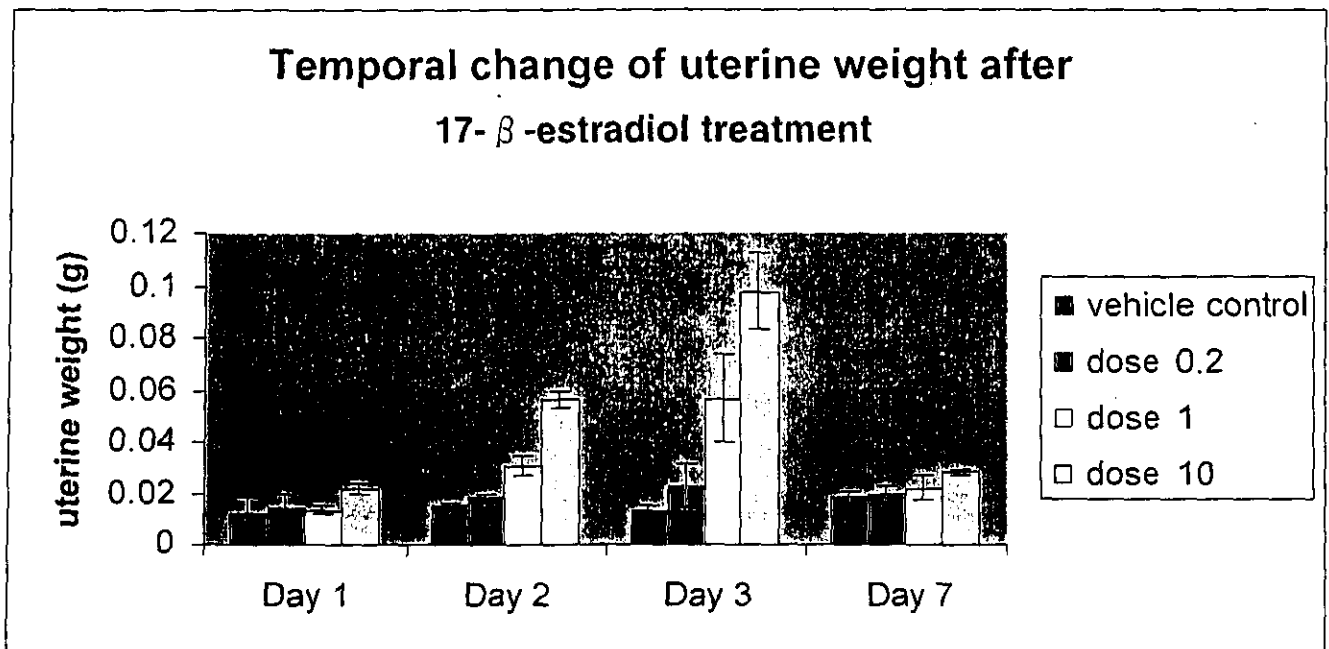


Figure 2

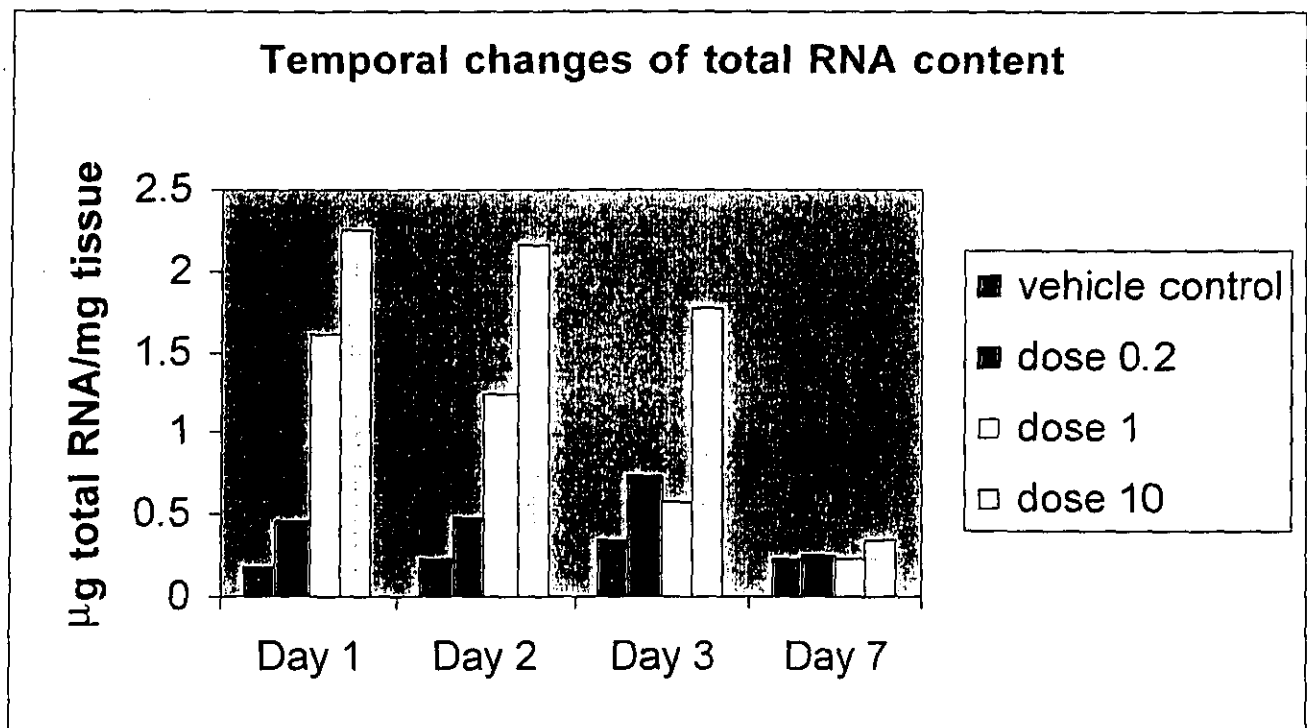
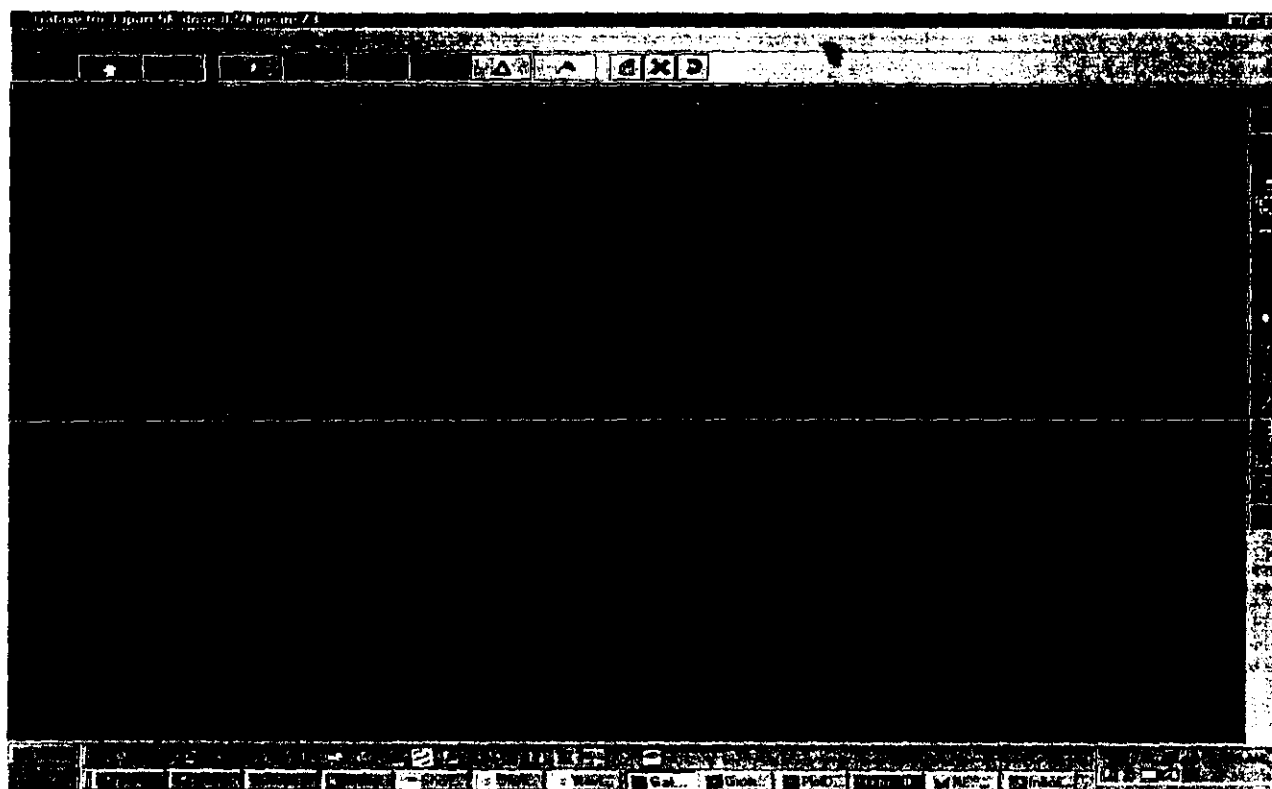


Table 1

	number of genes induced > 2-fold		
	> 2-fold	& > 1000	confirmed
Day 1	125	121	86
Day 2	1660	541	282
Day 3	1174	518	250

Figure 3



19. 子宮肥大試験等対応の為の試験開発としてのトキシコゲノミックス・データベース構築の基礎的試行実験

○小野 敦、五十嵐 勝秀

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター毒性部 研究員

研究要旨：投与方法の違いによる遺伝子発現変動パターンの違いを調べるために、卵巣摘出マウスにエストロジェンを（１）皮下投与、（２）浸透圧ポンプを埋め込んで投与した場合の、視床下部における遺伝子発現変動を比較した。子宮肥大程度によるエストロジェン作用の比較では、浸透圧ポンプ投与の子宮肥大程度が低い結果となり、投与方法によりエストロジェン効果が異なる可能性が示唆された。実際、視床下部における遺伝子発現変動パターンも異なっており、各投与法に共通して発現上昇する遺伝子はむしろ少ない結果が得られた。

A. 目的

エストロジェンによる子宮肥大反応時の遺伝子発現変動を検討する際、バテル社への委託研究では皮下投与方法を選択しているが、今後検討する化合物によっては、他の投与方法を選択する必要性が生じると考えられる。

そこで本研究は、化合物の投与方法の違いによって遺伝子発現変動の違いが生じるかを明らかにすることを目的とした。

B. 方法

卵巣摘出後３週間おいたマウスに対し、0.25 µg/kg/day のエストロジェンを７日間連日皮下投与または浸透

圧ポンプ投与し、視床下部を摘出した。同時に子宮重量を測定し、エストロジェン作用を比較した。視床下部全 RNA を抽出精製し、溶媒コントロールの RNA を Cy3 でラベルした cDNA に変換し、エストロジェン投与の RNA を Cy5 でラベルした cDNA に変換した。クロスハイブリダイゼーションによる非得意的な結合シグナルが生じないように、各遺伝子間で相同性の低い領域を選び設計した 80 塩基からなる一本鎖 DNA をスポットした 1081 種のマウス遺伝子を載せた DNA チップに、両プローブ cDNA を同時にハイブリさせ、エストロジェン投与に伴う遺伝子発現パターンを

検討した。

C. 結果

図 1 に示すように、溶媒にコーンオイルを用い皮下投与した場合に子宮肥大程度が最も高かった。一方、浸透圧ポンプによる投与では顕著な子宮肥大を検出することはできなかった。表 1 に、視床下部において 0.25 $\mu\text{g/kg/day}$ のエストロジェン投与に伴い 1.5 倍以上発現が上昇した遺伝子を抽出した結果をまとめた。どの投与方法によっても発現が上昇する遺伝子として GATA4 が、皮下投与に共通する遺伝子として NOS2 が見出された。また、生理食塩水-皮下投与、浸透圧ポンプ投与に共通する遺伝子として Fli-1, NURR が、コーンオイル-皮下投与、浸透圧ポンプ投与に共通する遺伝子として TLX1 が見出された。

D. 考察

エストロジェンの一日当たりの量が同じでも、投与方法が異なると子宮肥大程度のみならず、遺伝子発現変動パターンも異なることがわかった。皮下投与では、エストロジェンの血中濃度がピークを有しながら一過的に上昇していると考えられる。一方、浸透圧ポンプによる投与では、エストロジェン血中濃度にピークは存在

せず、一定濃度に保たれていることが予想される。

よって本研究の結果は、子宮肥大反応など細胞増殖を要する反応においては特に、エストロジェン血中濃度がピークを有しながら上昇し、エストロジェンレセプターに依存した細胞増殖関連遺伝子の急激かつ一過的な発現変動が起こることが必要であることを示していると考えられ興味深い。エストロジェン様活性検出の感度を上げるという観点からは皮下投与が良いが、皮下投与では一定量の化合物に慢性的に暴露した場合の遺伝子発現変動を検討することはできないことは留意すべき点である。

E. 結論

本研究により、EDC-トキシコゲノミクスデータベース構築に必要な技術導入を基本的に完了した。投与方法によりエストロジェンで応答する遺伝子群が異なることが示されたことから、研究目的に応じ投与方法を統一した上で検討を進めることが必須であると考えられる。

F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

図1 投与方法の違いによる子宮肥大反応

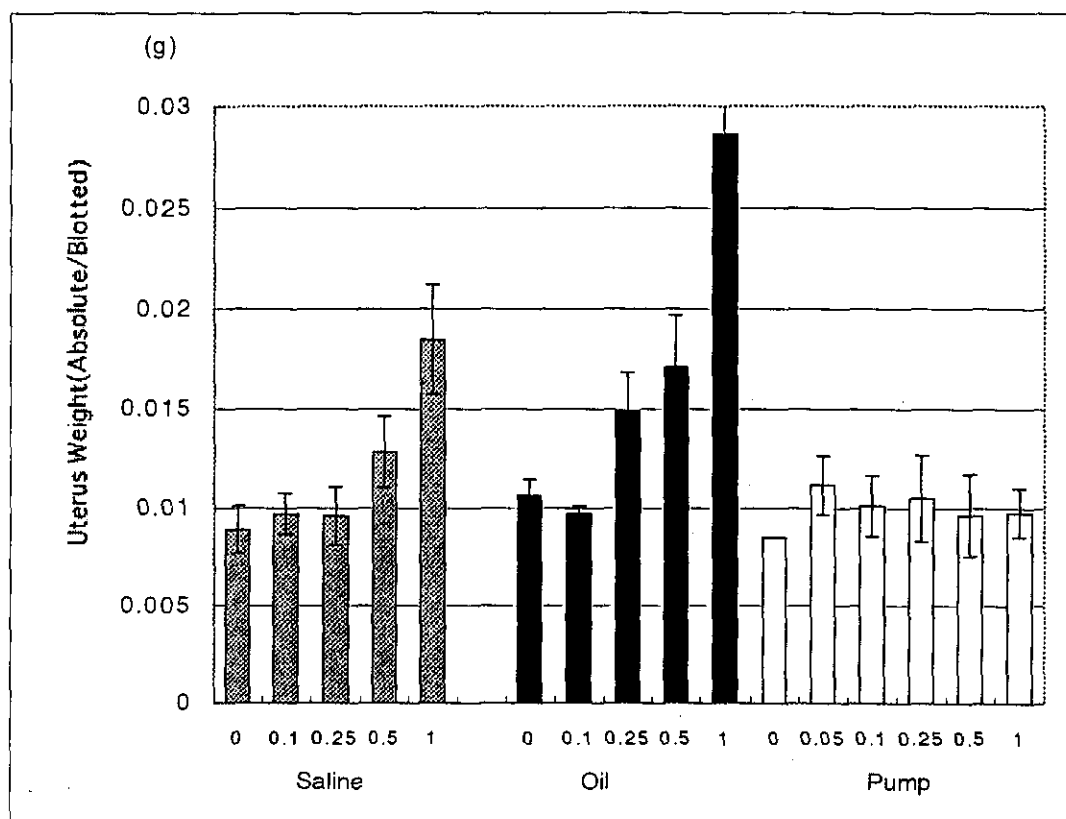


表1 x1.5以上発現が上昇した遺伝子

皮下投与

Saline	Oil
Name	Name
abl proto-oncogene	GATA-binding protein 4 (GATA4)
src proto-oncogene	guanine nucleotide binding protein, alpha
transcription elongation factor A4 (TCEA)	interleukin 1 receptor antagonist protei
thyroid hormone receptor alpha (THRA); e	T-cell leukemia homeobox 1 (TLX1); homeo
CCCTC-binding factor (CTCF)	c-src kinase (CSK)
phospholipase C gamma 1 (PLC-gamma 1; PL	transducin beta-2 subunit
nitric oxide synthase 2 (NOS2); macropha	sodium-dependent noradrenaline transport
GATA-binding protein 4 (GATA4)	peripherin (PRPH)
genomic screened homeobox protein 2 (GSH	nitric oxide synthase 2 (NOS2); macropha
G13; G-alpha-13 guanine nucleotide regul	
Fli-1 ets-related proto-oncogene	
homeobox protein 11L1 (HOX11L1); T-cell	
beta 2 adrenergic receptor (ADRB2; ADRB2	
brain specific transcription factor NURR	
aryl hydrocarbon receptor nuclear transl	

浸透圧ポンプ

Name
U2 small nuclear ribonucleoprotein auxil
chromobox homolog 4 (CBX4); homolog of D
brain specific transcription factor NURR
myeloblastosis proto-oncogene (MYB)
fos proto-oncogene
rho GDP dissociation inhibitor beta (GDI
interferon regulatory factor 1 (IRF1)
G2/mitotic-specific cyclin B1 (CCNB1; CY
homeobox protein 2.4 (HOX2.4)
Fli-1 ets-related proto-oncogene
serine proteinase inhibitor 3 (SPI3)
transcription factor 4 (TCF4); immunoglo
T-cell leukemia homeobox 1 (TLX1); homeo
GATA-binding protein 4 (GATA4)

全ての投与方法に共通して上昇した遺伝子
 SalineおよびOilに共通して上昇した遺伝子
 Oilおよび浸透圧ポンプに共通して上昇した遺伝子
 Salineおよび浸透圧ポンプに共通して上昇した遺伝子

(4) 〈内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門〉

20. 内分泌かく乱物質等の文献情報に関する調査研究

分担研究者 長谷川隆一

協力研究者 小泉睦子、江馬真、廣瀬明彦

国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長

研究要旨

本年度はフタル酸エステルのげっ歯類における生殖および発生に対する毒性影響およびその推測されるメカニズムについて、最近の文献を中心に整理した。多くのフタル酸エステルが *in vitro* 試験系において弱いエストロゲン様活性を示すことが報告されているが、di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) および di-n-butyl phthalate (DBP) のようなフタル酸エステルが子宮肥大を引き起こしたという証拠はない。また、フタル酸エステルはエストロゲン受容体に結合するための共通の構造を有していないことから、フタル酸エステルは生体内でエストロゲン様作用を示さないものと考えられる。しかし、フタル酸エステルは雄ラットに投与したときには抗アンドロゲン様作用が認められ、雌ラットに投与したときには血中 17 β -estradiol 濃度の低下が引き起こされたことが報告されている。また、妊娠後半のラットに投与したときにはアンドロゲン受容体を介さない機構で典型的な抗アンドロゲン作用が発現し、この作用は胚致死作用および生殖器官以外の催奇形性作用より低い量で発現することが示されている。これらのことから、一部のフタル酸エステルはげっ歯類において内分泌かく乱作用を示すと判断することができる。なお、生殖器以外の奇形発現に関しては、その機構が不明であり、内分泌かく乱作用によるものと判断できる証拠は得られていない。

A. 研究目的

本研究では、近年、内分泌かく乱作用が問題となった化学物質のうち、特にプラスチックや樹脂の原料として使用されている物質を取り上げ、各化学物質の内分泌かく乱作用に関する情報の信憑性を調査し、それらの物質の内分泌かく乱作用について評価する。そこで、本年度はフタル酸エステルのげっ歯類における生殖および発生に対する毒性影響およびその推測されるメカニズムについて、最近の文献を中心に整理した。

B. 研究方法

フタル酸エステルのげっ歯類における生殖・発生毒性について、主にそのメカニズムに焦点を当て、最近数年の文献を中心に整理した。特に、エストロゲン様作用、雌雄の生殖機能への影響およびその機構について、主に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) および di-n-butyl phthalate (DBP) についての文献を中心にまとめた。

C. 研究結果および考察

1. エストロゲン様作用

各種のフタル酸エステルについて、エストロゲン様作用が検出されている。最近の報告と

しては、Harris ら(1997)および Zacharewski ら(1998)のエストロゲン受容体を組み込んだ酵母を用いた試験で、多くの種類のフタル酸エステルが弱いながらもエストロゲン様活性を示している。一方で、Harris ら(1997)は一部の陽性結果は bisphenol A の混在による影響であること、フタル酸エステルの活性本体と考えられているモノエステル体にはエストロゲン様活性のないことを報告している。Zacharewski ら(1998)はヒト乳がん由来の培養細胞株(MCF-7)を用いた試験で、DBP、*n*-butyl benzyl phthalate (BBP)および di-*n*-hexyl phthalate (DHP)にはエストロゲン様活性が認められたものの、DEHP を含むその他のフタル酸エステルにはエストロゲン様活性が認められなかったことを報告したが、Blom ら(1998)は、同様の試験系において DEHP は用量依存的なエストロゲン様活性を示したことを報告している。しかしながら、Zacharewski ら(1998)は、未成熟 SD ラットを用いた *in vivo* 試験で、DBP および DEHP を含む 8 種のフタル酸エステルがいずれも子宮肥大を引き起こさないことを報告した。

以上の結果から、フタル酸エステルは *in vivo* ではエストロゲン様作用を示さないと考えられる。また、フタル酸エステルはエストロゲン受容体に結合するための共通の構造を有していないことから、生体内でエストロゲン受容体を介した作用を示さないものと考えられる。

2. 雄の生殖器系への影響

ラット、マウス、モルモットなどの実験動物の雄に対して、フタル酸エステルが精細管萎縮、精子形成阻害などの精巣毒性および雄副生殖器萎縮を引き起こすことは良く知られている。最近、これらの作用機構の一部が解明されつつあるので、ここでは、精細管への影響とライディッヒ細胞への影響を分けてまとめる。

①精細管への影響

フタル酸エステルはモノエステル体に加水分解された後吸収されると考えられている(Lake

ら: 1977)ため、この研究は DEHP のモノエステル体である mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) を用いて行われている。

FSH はセルトリ細胞の膜受容体に結合し、G 蛋白を介して *adenylate cyclase* を活性化させ、cAMP を産生させることにより生理作用を発現すると考えられている。Heindel & Chapin (1989) は、ラットの培養セルトリ細胞において、MEHP が FSH 刺激による cAMP の蓄積を用量依存的に抑制したことから、MEHP の作用点は細胞膜または FSH 受容体そのものであると予測した。Grasso ら(1993)は、同セルトリ細胞を MEHP とインキュベーションしたところ、FSH 結合性の低下が認められたが、MEHP と FSH の同時存在下では FSH 結合性の低下は認められなかったことから、MEHP の作用部位は FSH 受容体よりむしろ G 蛋白であろうと推定している。しかし、その後、フタル酸エステルの FSH-cAMP 経路への作用に関する研究報告はない。

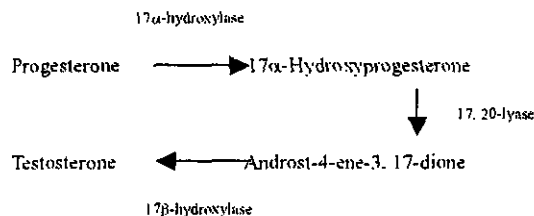
一方、フタル酸エステルは精子形成阻害を引き起こすが、その作用機構の 1 つとしてセルトリ細胞からの生殖細胞の遊離とその結果生じる生殖細胞のアポトーシス誘導が考えられている。精巣では常にアポトーシスによる生殖細胞の自発的な削除が行なわれており、この生殖細胞のアポトーシスには、Fas システムが重要な役割を果たしていると考えられている(Nagata: 1997, Nagata & Golstein: 1995)。Fas システムとは生殖細胞に存在する膜レセプター蛋白である Fas、セルトリ細胞に存在するそのリガンド(FasL)からなるパラクラインシグナリングシステムで、FasL の Fas への結合により、生殖細胞のアポトーシスが引き起こされる(図-1A)。Richburg & Boekelheide (1996)はラットに MEHP を単回経口投与し、3、6、12 時間後にセルトリ細胞および生殖細胞への影響を解析した結果、生殖細胞のアポトーシスが 3 時間後には一過性に低下したものの、6 時間以後には著しく増加することを観察した。また、投与後 3 時間の時点から

セルトリ細胞内で生殖細胞の結合維持に重要な役割を果たしていると考えられているビメチンフィラメントの崩壊が観察された。また、Lee ら(1999)は MEHP の Fas システムへの影響を解析し、ラットの投与6時間後に精巣内 Fas mRNA および FasL mRNA の増加を示した。さらに、Richburg ら(1999)は MEHP を投与したラットの精巣において、セルトリ細胞膜上に発現した FasL が可溶型(sFasL)となって遊離すること、および生殖細胞細胞膜分面の Fas が増加することを報告している。これらの結果に基づいて、Richburg ら(1999)は MEHP の作用機構について図-1B に示したような仮説を立てた。すなわち、MEHP はセルトリ細胞のビメチンフィラメントを崩壊させることにより、生殖細胞をセルトリ細胞から分離させ、Fas シグナル伝達経路を崩壊させる。その後、sFasL の形成および生殖細胞膜で Fas 発現が増加し、sFasL が Fas に結合することによって生殖細胞のアポトーシスが起こるという考え方である。

しかしながら、精細管への影響について推測されるこれら二つのメカニズムの関連性については検討されていない。

②ライディッヒ細胞への影響

精巣の間質組織に局在するライディッヒ細胞は LH の刺激により progesterone から以下の経路で testosterone を合成する。



一部のフタル酸エステルは血中 testosterone 濃度の低下を引き起こすが、それに伴って血中 FSH および LH 濃度の増加、副生殖器官重量の低下、脳下垂体肥大が生じる。Foster ら(1983)はラットに di-*n*-pentyl phthalate (DPP)を4日間投与した。その結果、精巣において progesterone のミクロソームへの結合およびチトクローム P-450 含量の低下が認められ、また、17α-

hydroxylase および 17, 20-lyase 活性が低下した。一方、ラットを用いた幾つかの実験では血中 testosterone 濃度の低下と共に精巣 testosterone 濃度の増加が報告されているが、Agarwal ら(1989)は DEHP によって間質組織の線維化が引き起こされたことから、DEHP によりライディッヒ細胞からの testosterone の放出が抑制されたのではないかと推測している。その後、Jones ら(1993)はラットに対する DEHP の経口投与により、ライディッヒ細胞のミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などの超微細構造が変化すること、また、ラットから調製した培養ライディッヒ細胞の LH 刺激による testosterone 分泌を MEHP が用量依存的に低下させることを示した。

これらの結果から、一部のフタル酸エステルはライディッヒ細胞に直接作用して機能障害を惹起し、その結果として testosterone の合成および分泌を減少させたと推定される。その後、ライディッヒ細胞への影響に関する研究報告はない。

3. 雌の生殖器系への影響

Davis ら(1994a)は、成熟雌ラットへの DEHP の経口投与により、性周期の延長、排卵阻害、血中 17β-estradiol および progesterone 濃度の低下、GTH サージの阻害が引き起こされることを示した。形態学的変化として排卵前卵胞で顆粒膜細胞面積の減少が観察され、これが血中 17β-estradiol 濃度低下の原因と考えられた。一方、Berman & Laskey (1993)は、DEHP を経口投与された成熟雌ラットから摘出した卵巣の培養系において、生成ステロイドプロファイル (progesterone、17β-estradiol、testosterone) は変化した、副腎の培養系ではこのような変化は起こらなかったことを報告している。

排卵前の顆粒膜細胞では、FSH が cAMP を介してアロマターゼ活性を増加させるこ

とにより testosterone から 17β -estradiol を生成する。Treinen ら(1990)は diethylstilbestrol の入ったカプセルを埋植したラットから調製した培養顆粒膜細胞を用いて、MEHP が FSH 刺激による cAMP 蓄積を抑制することを示した。また、Davis ら(1994b)は同じ実験系で MEHP が 17β -estradiol の生成を低下させたが、分離したアロマターゼ酵素には MEHP が影響しないことを示した。その後、Davis (1999)は培養顆粒膜細胞に MEHP を添加することによりアロマターゼ遺伝子の発現量が 2 分の 1 に減少する結果を得た。

以上の報告から、MEHP の標的部位は排卵前の顆粒膜細胞で、FSH の作用を阻害することにより 17β -estradiol の合成抑制を引き起こすと考えられる。この機構が後述する DEHP の雌に対する生殖毒性の原因と推定される。

4. 生殖への影響

Lamb ら(1987)は雌雄の CD-1 マウスに DEHP を餌に混ぜて与え、同一ペアによる複数回の交配を行った。その結果、0.1 % (144 mg/kg/day) 以上の投与群で不妊およびペア当たりの生存児数などの生殖指標の低下が認められた。0.3 % (432 mg/kg/day) 投与雌雄動物と無処置雌雄動物との交配を行ったところ、いずれの場合も妊娠率は著しく低下し、雌雄ともに DEHP の影響が強く発現していることが確認された。なお、この試験では病理組織学的検査や次世代の生殖機能の検討は行われていない。

最近、Wine ら(1997)は米国国家毒性計画(National Toxicology Program)による DBP の生殖試験結果を報告した。SD ラットを用い、0.1 ~ 1.0 % (66 ~ 652 mg/kg/day) の DBP を餌に混ぜて与え、同一ペアによる複数回の交配および投与雌雄動物と無処置雌雄動物との交配を行った結果、新生児数の軽度の減少や新生児体重の減少を認めたが、親動物での精子数および性周期の異常は認められなかった。しかし、次世代同

士の交配では、1.0 % (652 mg/kg/day) 投与群で、交配率、妊娠率および受胎率は著しく低下し、その原因と考えられる精巣および精巣上体中の精子数の減少が認められた。病理組織学的検査では、精細管変性および精巣上体の発育不全が明らかであったが、卵巣および子宮には異常は認められなかった。

Gray ら(1999)は Long Evans (LE) ラットに 250 ~ 1,000 mg/kg/day の DBP を強制経口投与し、生殖試験を行った結果、500 mg/kg/day 以上の投与群で受胎率が低下し、組織学的検査では、雄動物で精細管萎縮および精子形成阻害を認めたが、雌動物では影響を認めなかった。次世代動物では雌雄の生殖器を含む奇形が観察され、複数回の交配を行ったところ、250 mg/kg/day 以上の投与群で生殖機能低下がみられた。

これらの結果から、DEHP は雌雄それぞれの生殖機能に悪影響を及ぼし、DBP は妊娠後期および授乳期暴露によって次世代雄の精巣等の形態的变化を伴う生殖機能障害により、不妊を引き起こすことが示された。

5. 発生毒性 (表-1)

妊娠期にフタル酸エステルに暴露された実験動物において、吸収胚数の増加、胎児体重の低下および奇形発現率の増加などが観察される。

DEHP を LE ラットの妊娠 1 日から分娩後 21 日まで 32.5 または 325 μ g/l の濃度で飲水中に混合して与えた (妊娠中: 3.0-3.5 または 30-35 mg/kg/day、授乳中: これらの値の少なくとも 30 % 増に相当) ところ、次世代において、腎および精巣重量が低下し、精巣では精細管上皮の崩壊等の損傷が認められた。また、高用量群の児に学習能力の低下が観察された (Arcadi ら: 1998)。また、F344 ラットの妊娠 0 日から 20 日、CD-1 マウスの妊娠 0 日から 17 日に DEHP を飼料中に混じて与えたところ、ラットでは 2.0 % (1,055 mg/kg/day) 投与により、胚致死作用がみられたが、催奇形作用は認められなかつ

た。マウスでは 0.10 % (191 mg/kg/day)以上の投与により胚致死作用が、また、0.05 % (91 mg/kg/day)以上の投与により催奇形作用が認められ、水頭症、眼瞼開裂、尾奇形等が多く観察された(Tyl ら: 1988)。以下に投与時期による毒性発現の違いの詳細をまとめる。

①妊娠初期および中期投与の影響

Wistar ラットの妊娠 0 日から 11 日に 2.0 % (895 mg/kg/day)の DBP を含む飼料を与えたところ、胚死亡率が著しく上昇した(Ema ら: 1997a)。このような早期の胚致死は DBP による子宮の脱落膜反応抑制、すなわち子宮機能の低下に起因することが示唆されている(Ema ら: 2000a)。DBP を妊娠 7 日から 15 日(器官形成期)まで Wistar ラットに強制経口投与したとき、630 mg/kg/day 以上の投与で着床後胚死亡率が、750 mg/kg/day 投与で口蓋裂の発現頻度が上昇した(Ema ら: 1993)。Wistar ラットの妊娠 7 日から 9 日、10 日から 12 日または 13 日から 15 日に DBP (750~1,500 mg/kg/day)を強制経口投与したところ、投与日に関わらず、着床後胚死亡率が上昇した。妊娠 7-9 日の投与では頸椎、胸椎および肋骨等の奇形の発現頻度が、妊娠 13 日から 15 日投与群では口蓋裂および胸骨分節癒合等の奇形の発現頻度が上昇したが、妊娠 10 日から 12 日の投与では奇形の発現頻度の上昇はみられなかった(Ema ら: 1994)。Wistar ラットの妊娠 6 日から 16 日までの間に DBP (1,500 mg/kg)を単回強制経口投与した結果、着床後胚死亡率が妊娠 7 日および 11 日の投与を除くすべての投与群で上昇した。妊娠 8 日または 9 日の投与では頸椎および胸椎の奇形および腎盂拡張等の発現頻度が、妊娠 15 日投与群では口蓋裂および胸骨分節癒合等の発現頻度が上昇した(Ema ら: 1997b)。SD ラットの妊娠 13 日、14 日または 15 日に DBP 3,000 mg/kg を単回強制経口投与したところ、それぞれ 33 %, 87 %, 64 %の胚死亡率が認められ、また、口蓋裂発現頻度は 2.4-15.4 %であった(Saillenfait ら: 1998)。

以上のように、妊娠初期の投与では胚致死

作用が、妊娠中期の投与では生殖器以外の催奇形作用が現れた。

②妊娠後期および授乳初期投与の影響

Wistar ラットの妊娠 11 日から 21 日に 0.5~2.0 % (331~661 mg/kg/day)の DBP を含む飼料を与えたところ、着床後胚死亡率には変化はみられなかったが、2.0 % (661 mg/kg/day)投与群では胎児体重の低下がみられた。また、1.0 % (555 mg/kg/day)以上の投与群では口蓋裂、胸骨分節癒合および雄胎児の精巣下降不全の発現頻度上昇および肛門生殖突起間距離 (AGD)の短縮が認められた(Ema ら: 1998)。これらの雄胎児の生殖器官に対する影響は妊娠 15-17 日に 500 mg/kg/day 以上の DBP を強制経口投与したときにも観察された(Ema ら: 2000b)。LE ラットを用いた実験でも次世代雄に持続的な生殖器重量の低下が観察されている(Gray ら: 1999)。

DEHP、DBP および BBP 等のフタル酸エステルは妊娠および授乳期暴露により、次世代の雄に精子形成障害を引き起こすことがすでに報告されている。上述の Wine ら(1997)の報告でも DBP の子宮内および授乳期暴露が雄の生殖器に重大な障害を及ぼすことが示された。そこで、Mylchreest ら(1998)は SD ラットの妊娠 3 日から分娩後 20 日まで、250~750 mg/kg/day の DBP を強制経口投与し、次世代雌雄の生殖器の形態観察を行った。雄では AGD の短縮、尿道下裂、停留睪丸、精巣および副生殖器官の発育不全などの生殖器異常が認められた。これらの変化はアンドロゲン受容体アンタゴニストである flutamide が引き起こす雄性生殖器発育異常(Imperato-McGinley ら: 1992, van der Schoot: 1992, Kassim ら: 1997)と類似していた。一方、雌においては明確な影響は認められず、DBP にエストロゲン様作用のないことを示唆する結果であった。

in vitro において DBP およびその代謝物である mono-*n*-butyl phthalate (MBP)がアンドロゲン受容体と相互作用を示さないこと(Gray ら: 1998)から、Mylchreest ら(1999)はその作用機構

を比較する目的で、アンドロゲン受容体アンタゴニストである flutamide を対照とした研究を行った。SD ラットに妊娠 12 日から 21 日まで DBP (100~500 mg/kg/day) および flutamide (100 mg/kg/day) の強制経口投与を行い、次世代雄への影響を解析した結果、尿道下裂、停留睪丸、副生殖器官の発育阻害などの異常が DBP および flutamide 投与群で認められた。しかし、flutamide が前立腺異常を高頻度で引き起こしたのにも関わらず DBP は前立腺にはほとんど影響を与えず、一方で、flutamide と比べ、DBP は精巣上体および輸精管に強い影響を示した。このように DBP および flutamide の毒性発現プロファイルは著しく異なり、両者は明らかに別の作用機構で抗アンドロゲン作用を発現すると考えられた。同様に、Gray ら(1999)が同モル等量の DBP (500 mg/kg/day) および DEHP (750 mg/kg/day) を SD ラットの妊娠 14 日から授乳 3 日まで投与した実験では、次世代の雄生殖器官の形態的变化および持続的重量低下が認められたが、その毒性発現プロファイルが典型的な抗アンドロゲン物質である flutamide や vinclozolin とは明確に異なることが示されている。さらに、Gray ら(1999)は DEHP の次世代の雄生殖器官への作用が DBP よりも強いことを示した。

以上のことから、DEHP および DBP は妊娠後期および授乳初期に投与することにより、児の雄生殖器官発育に悪影響を及ぼし、生殖機能障害を引き起こすが、この作用はアンドロゲン受容体との結合を介さない抗アンドロゲン作用であると考えられる。

一方、DEHP は新生児期ラットのセルトリ細胞に対して影響を及ぼす。Dostal ら(1988)は 6 日齢の SD ラットに DEHP を 1,000 mg/kg/day で 5 日間経口投与し、精巣重量の低下を伴ったセルトリ細胞数の減少を認めた。セルトリ細胞は生後 10-14 日までに細胞分裂を終了するため、Li ら(1998)は分娩翌日の新生児 SD ラットの精巣から調製したセルトリ細胞および胚細胞(gonocyte)の共

培養系を用いて MEHP の作用を検討した。MEHP は用量依存的なセルトリ細胞からの胚細胞の分離を引き起こすと共に、セルトリ細胞の増殖を抑制した。また、MEHP は FSH 刺激によるセルトリ細胞の増殖を抑制したが、MEHP のセルトリ細胞の増殖抑制に対する cAMP の添加効果は認められなかった。これらのことから、Li ら(1998)は新生児期ラットのセルトリ細胞に対する MEHP の作用機構は、セルトリ細胞の細胞分裂終了以降の場合とは異なるのではないかと考えている。

6. その他の毒性について

フタル酸エステルによる既知の肝毒性以外に、腎毒性に関する研究が最近報告されている。Rothenbacher ら(1998)は DEHP の長期経口投与による腎毒性発現機構として、そのモノエステル体である MEHP が腎上皮培養細胞の生存率低下を招くことを示し、また、Caldwell ら(1999)は diisononyl phthalate による雄ラット腎腫瘍の原因が $\alpha_2\mu$ -globulin の蓄積によるものであることを示した。

遊離型フタル酸については、Ema ら(1997c)はラットにおいて発生毒性を示さなかったと報告しているが、Jha ら(1998)は精原細胞突然変異原物質であることをマウスの *in vivo* 試験で示した。通常フタル酸エステルはモノエステル体となった後、代謝あるいはグルクロン酸抱合されると考えられているが、透析患者では高い血中フタル酸濃度を示すとの報告もあり、さらに詳細な研究が必要であると考えられる。

7. おわりに

フタル酸エステルはエストロゲン様作用を有する内分泌かく乱物質の可能性が指摘されていたが、現段階では、少なくとも *in vivo* ではエストロゲン様作用は有しないものと考えられる。しかし、フタル酸エステルは雄ラットに投与したときには抗アンドロゲン様作用が認められ、雌ラットに投与したときには血中 17β -estradiol

濃度の低下が引き起こされたことが報告されている。また、妊娠後半のラットに投与したときにはアンドロゲン受容体を介さない機構で典型的な抗アンドロゲン作用が発現し、この作用は胚致死作用および生殖器官以外の催奇形性作用より低い量で発現することが示されている。これらのことから、一部のフタル酸エステルはげっ歯類において内分泌かく乱作用を示すと判断することができる。なお、生殖器以外の奇形発現に関しては、その機構が不明であり、内分泌かく乱作用によるものと判断できる証拠は得られておらず、今後の研究の進展が望まれる。

D. 参考文献

- Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J (1989) Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **26**, 39-59.
- Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, Salemi M, Trimarchi GR, Costa G (1998) Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 963-970.
- Berman E and Laskey JW (1993) Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. *Reprod. Toxicol.*, **7**, 349-358.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 306-310.
- Caldwell DJ, Eldridge SR, Lington AW, McKee RH (1999) Retrospective evaluation of alpha 2u-globulin accumulation in male rat kidneys following high doses of diisononyl phthalate. *Toxicol. Sci.*, **51**, 153-160.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994a) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 216-223.
- Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ (1994b) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 224-228.
- Davis BJ (1999) Endocrine disrupting activity of phthalates. International Symposium on Environmental Endocrine Disruptor '99, pp 72.
- Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA (1988) Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**, 104-121.
- Ema M, Amano H, Itami T, Kawasaki H (1993) Teratogenic evaluation of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicol. Lett.*, **69**, 197-203.
- Ema M, Amano H, Ogawa Y (1994) Characterization of the developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicology*, **86**, 163-174.
- Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y (1997a) Embryoletality following maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 636-643.
- Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y (1997b) Developmental effects of di-*n*-butyl phthalate after a single administration in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 223-229.
- Ema M, Miyawaki E, Harazono A, Kawashima K (1997c) Developmental toxicity evaluation of phthalic acid, one of the metabolites of phthalic

- acid esters, in rats. *Toxicol. Lett.*, **93**, 109-115.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (1998) Further evaluation of developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, **98**, 87-93.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (2000a) Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, **14**, 13-19.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (2000b) Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Lett.*, **111**, 271-278.
- Foster PM, Thomas LV, Cook MW, Walters DG (1983) Effect of di-*n*-pentyl phthalate treatment on testicular steroidogenic enzymes and cytochrome P-450 in the rat. *Toxicol. Lett.*, **15**, 265-271.
- Grasso P, Heindel JJ, Powell CJ, Reichert LE Jr (1993) Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate, a testicular toxicant, on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultured rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, **48**, 454-459.
- Gray LE Jr., Ostby JS, Mylchreest E, Foster PM, Kelce WR (1998) Dibutyl phthalate (DBP) induces antiandrogenic but not estrogenic in vivo effects in LE hooded rats. *Toxicol. Sci.*, **42**(1-S), 176.
- Gray LE Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999) Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 94-118.
- Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 802-811.
- Heindel JJ and Chapin RE (1989) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation by mono(2-ethylhexyl)phthalate in primary rat Sertoli cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 377-385.
- Imperato-McGinley J, Sanchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED (1992) Comparison of the effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology*, **131**, 1149-1156.
- Jha AM, Singh AC, Bharti M (1998) Germ cell mutagenicity of phthalic acid in mice. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.*, **422**, 207-212.
- Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC (1993) The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Mol. Pathol.*, **58**, 179-193.
- Kassim NM, McDonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP (1997) The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J. Anat.*, **190**, 577-588.
- Lake BG, Phillips JC, Linnell JC, Gangolli SD (1977) The *in vitro* hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 239-248.
- Lamb JC IV, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR (1987) Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 255-269.
- Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K (1999) The Fas system, a