

厚生労働科学研究研究費補助金

食品・化学物質安全総合研究事業

フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する
調査研究 —発達期ないし有病時暴露による影響評価—

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成15（2003）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究 — 発達期ないし有病時暴露による影響評価 —	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 周産期曝露による影響評価研究	23
渋谷 淳	
(資料) 図 1-7、表 1-12	
2. 性行動に対する影響評価研究	29
西原真杉	
(資料) 図 1-4	
3. 肝基礎疾患による修飾作用	32
福島 昭治	
(資料) 図 1-3、表 1-5	
4. 腎基礎疾患による修飾作用	34
白井智之	
(資料) 図 1-6、表 1-6	
5. 種差による影響評価	39
九郎丸 正道	
(資料) 図 1-6	
6. 精巣障害メカニズムに関する研究	41
江崎 治	
(資料) 図 1	
7. 文献調査による健康影響評価研究-発達期の曝露影響と感受性要因の検索	46
長谷川隆一	
(資料) なし	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷	66

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究
—発達期ないし有病時暴露による影響評価—
総括研究報告書（平成14年度）

主任研究者 渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：本研究は、フタル酸／アジピン酸エステルについて、ラットを用いた周産期曝露による脳の性分化障害影響と基礎疾患による精巣障害修飾作用に関する *in vivo* 評価研究、精巣障害に関する感受性種差と分子メカニズムの研究、及びこれらについての文献調査研究から構成される。*In vivo* 評価研究では、14年度は di-*n*-butyl phthalate (DBP) について解析を進め、毒性発現の種差やメカニズムに関する研究では、毒性作用の最も強い di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)の活性本体であるモノエステル体 (MEHP)を用いた。

周産期曝露による影響評価研究では、妊娠及び哺乳期間に母ラットに経口投与を行い、離乳時及び性成熟後での内分泌・生殖器官の病理組織学的評価、脳の性分化臨界時期での視床下部における遺伝子発現解析、性成熟後での性行動評価を行う。14年度は DBP について 20,200, 2000, 10,000 ppm の4用量を設定し、妊娠15日目から生後21日目までの間、混餌投与を行った。その結果、現在までのところ、雄性児動物で DBP による精巣障害に起因した性分化障害を検出すると共に、雌では今まで報告のない春期発動の遅延、下垂体重量の低下、性周期異常を検出し、生殖機能に対する影響が示唆された。また、雌の低用量で Mylchreest らの報告結果と同様の体重増加が認められたが、病理組織学的検索結果等を待って総合的に評価する。脳の性分化影響については、視床下部の内側視索前野での microarray 解析を企画しているが、そのためメタカーン固定法を利用して、パラフィン包埋切片中の微小組織領域での網羅的発現解析手法の開発に着手し、回収した微量の total RNA を2回 *invitro* 転写することにより、poly(A⁺) RNA を50万倍増幅することに成功した。また増幅した aRNA の GeneChip による解析の結果、発現の忠実性は比較的高いことが確認された。一方、視床下部での性分化関連遺伝子として granulin 及び p130 遺伝子の発現を解析し、DBP 曝露により両遺伝子ともに発現低下することを見出した。

基礎疾患による修飾作用については、薬物により肝ないし腎障害を負荷したラットを用い、被検物質による精巣障害への修飾作用を検討した。肝障害は thioacetamide を選択して4週間腹腔内投与し、DBP を500, 125, 31.25 mg/kg 体重の割合で同時期に連日経口投与を行った。その結果、肝障害の負荷により500 mg/kg DBP 群で精巣毒性が増強することを明らかにした。腎障害修飾作用に関しては、葉酸を5週間皮下投与し、その後 DBP を1200, 5000, 20,000 ppm の用量で4週間混餌投与した結果、腎機能障害の負荷により、20,000 ppm 群で精巣毒性の増強が明らかとなった。

精巣障害の感受性種差に関する研究では、いくつかの動物種の精巣と培養セルトリ細胞に MEHP を曝露した時の影響を形態学的に比較し、種差を規定する遺伝子の探索を行うが、14年度はラット種を対象として解析を進めた。*In vivo* では、ラットに MEHP を5日間連続経口投与した結果、1000 mg/kg/day 投与群で精細胞傷害が確認され、培養セルトリ細胞では、MEHP を 1×10^{-6} ~ $100 \mu\text{M}$ の濃度範囲で添加した結果、 $0.1 \mu\text{M}$ 以上の濃度では全ての細胞が変性を起こし、濃度依存性に変性細胞の増加を確認した。

精巣障害の分子メカニズム研究では、MEHP による標的遺伝子を探索するが、14年度はコレステロール代謝に対する修飾作用を検討するために、マウス・ライディッヒ細胞由来の MA-10 培養細胞を用いた評価系を作製し、MEHP で刺激した結果、細胞内に脂質滴の蓄積と細胞内コレステロールエステル量の増加が見出され、コレステロール合成あるいはステロイドホルモン合成の何れかの段階での影響が示唆された。

文献調査として、14年度はフタル酸／アジピン酸エステルについて、発育期曝露影響、感受性の種差・時期に関して文献の収集・解析を行った。その結果、フタル酸エステルでは DEHP 及び DBP の研究報告が主に見出され、妊娠曝露による雄性生殖器影響はテストステロン合成低下によること、若齢げっ歯類の精巣毒性はセルトリ細胞傷害によることの確認データが得られた。また、DEHP はマーモセットで精巣傷害を誘発しないとの確認研究も示された。アジピン酸エステルに関しては、di(2-ethylhexyl) adipate は2000年の OECD の初期評価会議により生殖器影響を示さないと判断された。

分担研究者

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

西原真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

福島 昭治

大阪市立大学大学院医学研究科 教授

白井 智之

名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

九郎丸正道

東京大学大学院農学生命科学研究科 助教授

江崎 治

国立健康・栄養研究所 健康増進・人間栄養学研究系長、生活習慣病研究部長

長谷川隆一

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部 部長

A. 研究目的

フタル酸/アジピン酸エステルは食品の包装材料及び医療用具等の多くのプラスチック製品の可塑性として広く利用され、特に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の使用量が多い。ヒトへの曝露として、特に、弁当類の製造過程での手袋からの溶出による高濃度曝露が近年問題となり、diisononyl phthalate (DINP) に関しては、乳幼児の長時間に及ぶ mouthing 行動による玩具からの口腔内溶出による曝露が懸念されている。

フタル酸/アジピン酸エステルの毒性として現在問題になっているのは精巣毒性と生殖・発生毒性であり、その活性本体は加水分解代謝産物であるモノエステル体であると考えられている。その毒性発現の機序としては、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による内分泌かく乱作用の存在や PPAR の subtype の関与が示唆されているものの、その分子的な証明はなされていない。また、精巣障害に関しては幼弱な時期で感受性の高いことが知られており、ヒト新生児では大人に見られるようなグルクロン酸抱合による解毒が未発達であることから、これらの解毒・排泄機構が成人のそれと異なる可能性がある。よって、脳の性分化の臨界期に曝露された場合、化学物質の内分泌かく乱作用の可能性とは別に、未熟な精巣からのテストステ

ロン・サージの阻害による脳の性分化障害が生じ、性成熟後での性行動に影響を与える可能性がある。一方、げっ歯類で見られる精巣毒性がマーマセットやカニクイザルでは見られないとの報告があり、その毒性の感受性に種差の存在する可能性がある。更に、肝臓や腎臓の基礎疾患がある場合、フタル酸エステル類の体内動態に影響を与える可能性が高く、モノエステル体による影響の増強される可能性がある。

以上より、フタル酸/アジピン酸エステルによる毒性発現に関して、感受性の高い胎生期ないし新生時期や基礎疾患等による高感受性状態での曝露影響、及び霊長類で感受性が低い理由や受容体を介した分子メカニズム等については未解決な部分が多い。本研究では、フタル酸/アジピン酸エステルのヒトへの影響評価上問題となる不確実性要因の解明を目的として、精巣と発達の毒性に焦点を絞り、周産期や基礎疾患存在下での曝露影響評価、感受性種差と分子メカニズムについての研究を行う。周産期曝露影響評価として、母ラットへの混餌投与を行い、児動物に対する離乳時と性成熟後での生殖器官の病理組織学的評価により、曝露期間中の標的臓器への直接影響と、性成熟後影響を判別する。また脳の性分化影響について視床下部での性分化関連遺伝子の発現解析と性成熟後での性行動評価を行う。基礎疾患による修飾作用については、薬物により肝ないし腎障害を負荷したラットを用い、被検物質による精巣障害への修飾作用を病理形態学的に検討する。これらの検索により、既に報告されている NOAEL と高感受性時期/状態での NOAEL を比較・検討する。平成 14 年度は、①周産期曝露影響評価では di-*n*-butyl phthalate (DBP)、DINP、di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) について用量設定試験を行い、次いで DBP の本実験を継続した。②基礎疾患による修飾作用については、予備的検討により肝/腎障害モデルを確定し、DBP 投与実験を継続ないし終了した。③精巣毒性の感受性種差に関する研究では、各種動物種の精巣と培養セルトリ細胞に、DEHP の活性化モノエステル (MEHP) を曝露した時の影響を形態学的に比較し、種差を規定する遺伝子の探索を行う。14 年度は、ラットの系での曝露実験を行い、細胞変性を示す用量(濃度)を検討した。④精巣毒性の分子メカニズム研究では、MEHP による標的遺伝子の探索を *in vivo/in vitro* の系で追求する。14 年度はマウス・ライディック細胞 MA-10 を用いた MEHP によるコレステロール代謝修飾作用について検討を行った。最後に、⑤文献調査として、発達の曝露影響や種差等の感受性要因に関する各種文献を検索し、ヒトでの健康影

響に関するリスク評価の資料とする。

B. 研究方法

①周産期曝露影響評価では、まず今年度は、DBPとDEHAについて予備的な用量設定試験を行い、引き続きDBPの本実験を実施した。病理組織学的解析を中心とした評価研究では、被検物質を妊娠・授乳期ラットに投与し、児動物への影響の評価を行った。被検物質は想定されるヒトへの曝露形態を考慮して、基礎飼料に混じて母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に曝露した。まず最初に、妊娠SD:IGSラットを用いて、今後検索予定のDBP(5000, 10,000, 15,000 ppm)とDEHA(6000, 12,000, 18,000 ppm)について、妊娠15日目から出産21日目までの間の混餌投与による予備的な用量設定試験を行った。曝露期間での母動物体重・摂餌量、出生児数、出生時体重、出生児の体重増加率、離乳時体重・生存率を指標に検討した結果、DBPについては10,000 ppm、DEHAは12,000 ppmを妊娠・保育を維持できる最大耐量と判断し、各々の投与実験の最高用量とした。引き続きDBPについて、20, 200, 2000, 10,000 ppmの4用量を設定し、妊娠15日目から出産21日目まで混餌投与を行い、投与終了時と11週目及び20週目の解剖を終了した。被検物質投与のための基礎飼料は、大豆由来のphytoestrogenを除いたSF(NIH-07変型)飼料を用いた。離乳後は、通常の基礎飼料に切り替えて児動物を飼育した。In life parameterとしては、母動物の体重、摂餌量の推移、出生児数及び雄性児率、生後2日目での体重と肛門・生殖突起間距離(AGD)、雄性児での生後14日目での乳頭・乳輪の出現、春期発動、児動物体重の推移を経時的に検索した。生後3週の解剖時には、肝、腎、脳、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、乳腺を採材し、乳腺以外の臓器に関して臓器重量を測定した。精巣はブアン固定を行い、他の臓器はホルマリン固定を行った。11及び20週目には更に、前立腺、精囊(＋凝固腺)、下垂体の重量をホルマリン固定後に測定した。今後、各時期での解剖例の病理組織学的検討とともに、血清ホルモンの測定や下垂体ホルモンの免疫染色を予定している。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化影響評価に関しては、視床下部の性的二型核(SDN-POA)を含む内側視索前野(MPOA)特異的なmicroarray解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を予定している。分担研究者らは最近、組織をパラフィン包埋してもRNAや蛋白質の発現解析やDNAの配列解析に未固定凍結組織に準ずるパフォーマンスを保證する組織固定法としてメタカーン固定法を見出し、マイクロダイセクション法により採取された微量組織での発現解析に有効な方法であることを示してき

た。MPOA特異的なmicroarray解析のためには基礎条件の検討が必要であることから、今年度は予備的にメタカーン固定法を利用して、パラフィン包埋切片を用いた微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手した。予備的な検討として、発現誘導遺伝子の特性がよくなされているphenobarbital(PB)を80 mg/kg/日、3回、連日投与したラットの肝臓を用い、メタカーン固定・パラフィン包埋後、10 µmの薄切片を作製し、脱パラフィン後、total RNAを調製した。抽出した50 ngのtotal RNAから*in vitro*転写によるpoly(A)⁺ RNAの増幅をMessage AmpTM aRNAキット(Ambion)を用いて2回を行い、変性後Affymetrix GeneChip[®] Rat Genome U34A Arrayとハイブリダイズし、発現遺伝子数などについて解析を行った。比較の対照として、同一動物の未固定凍結肝組織から直接調製したtotal RNAから、1回増幅、2回増幅して得られたaRNAを用いた。

別に企画した、DBPの周産期曝露による脳の性分化関連遺伝子の視床下部での発現解析と性成熟後の性行動評価に関しては、外来性ステロイドの脳の性分化に対する影響を確認するため、生後2日齢の雌ラットにestradiol benzoate(EB)を20 µg、あるいはtestosterone propionate(TP)を1 mg皮下投与した群、およびそれらの対照群を設けた。生後3日齢の雌雄ラット、およびステロイド処置ラットを断頭屠殺し、採血を行うとともに視床下部を摘出した。視床下部からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によりgranulin(grn)およびp130遺伝子の発現を解析した。さらに、estradiol(E₂)及びtestosterone(T)の血中濃度をELISA法により測定した。

倫理面への配慮として、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテルないしネンブタール深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては国立医薬品食品衛生研究所ないし東京大学農学部の利用規程に従った。

②DBPによる精巣障害に対する肝障害負荷の影響評価として、10週齢の雄性F344ラット72匹を8群に分け、第1-4群(各9匹)には第1-5週まで5週にわたりthioacetamide(TAA)200 mg/kg体重をPBS 0.3 mlに混じて週3回腹腔内投与し肝障害を誘導した。一方、第5-8群(各9匹)にはPBSのみを投与し、比較対照とした。第2週より第1,5群には500 mg/kg体重、第2,6群には125 mg/kg体重、第3,7群には31.25 mg/kg体重のDBPをおのおのcorn oil 0.4 mlに混じて毎日4週間、強制経口投与した。第4,8群にはcorn oilのみを投与し、対照群とした。その後屠殺剖検を行い、精子検査ならびに生化学的、組

織学的検索を行った。

DBPによる精巣障害に対する腎障害負荷の影響評価として、雄 F344 ラット 40 匹 (6 週齢) を 8 群 (各群 5 匹) に分け、5 群から 8 群には腎障害の誘導を目的に葉酸 (重炭酸ナトリウムに溶解) 300 mg/kg の濃度で週に一回計 5 回皮下投与した。これにより両側腎臓に慢性腎症 (間質性腎炎) が発症することは予備試験にて確認した。葉酸投与後、5 週目から飼料に DBP を最高用量 20,000 ppm として (第 8 群)、5,000 (第 7 群) および 1,200 ppm (第 6 群) で混ぜて 4 週間自由摂取させた。第 5 群には DBP を含まない基礎食を与えた。第 1 群から 4 群は第 5 群から 8 群に対する対照群で、葉酸の代わりに溶媒である重炭酸ナトリウムを 5 回皮下投与し、DBP を各濃度で投与した。体重、摂餌量を毎週計測し、実験終了時、肝、腎、前立腺、精囊、精巣、精巣上体の各臓器重量を測定すると共に、病理組織学的評価のため、パラフィン包埋組織標本を作製した。また精巣上体から精子を取り出し、その精子数、運動能、および形態異常の比率について検討した。また屠殺週には採尿ケージによる採尿を行い、尿量の測定と尿中成分の検討を行った。屠殺時に採血し、腎機能についても検討した。

使用動物への処置は可能な限り非侵襲的に行い、その屠殺は麻酔薬の過量投与によった。動物飼育については大阪市立大学ないし名古屋市立大学医学研究科動物飼育規約を遵守した。

③精巣障害の感受性種差の検索では、20 日齢 SD ラット精巣よりセルトリ細胞を分離し、セルトリ細胞初代培養系を確立した後、この培養系に MEHP につき濃度勾配をかけて添加し、24 時間後に観察した。同時に 4 週齢 SD ラットに MEHP について用量を振って 5 日間連続経口投与し、24 時間後に精巣を採材、顕微鏡で観察した。倫理面への配慮としては、精巣の採材においては、ラットにペントバルビタールによる深麻酔を施し、苦痛が全くない状態で行った。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、MA-10 細胞をガラス底ディッシュに 2×10^5 個/ml になるようにまき、一晚、37°C、5% CO₂ 中で培養した後、MEHP を添加し、さらに 24 時間培養し、hCG を最終濃度 50 ng/ml になるように加え、さらに 2.5 時間培養後、Nile Red を最終濃度 400 nM になるように添加し、蛍光顕微鏡にて細胞内の脂質滴を観察した。陰性対照として、DMSO のみを添加したもの、陽性対照としてオレイン酸—ウシ血清アルブミンを添加したものを用意し、同時に観察した。

細胞内コレステロールエステル量の測定のために、MA-10 細胞をガラス底ディッシュに 2×10^5 個/ml に

なるように撒き、一晚、37°C、5% CO₂ 中で培養した後、MEHP を添加し、更に 24 時間培養し、hCG を最終濃度 50 ng/ml になるように加え、さらに 2.5 時間培養した後、50 mM Tris-HCl (150 mM NaCl, 2 mg/ml BSA, pH 7.4) で 3 回、50 mM Tris-HCl (150 mM NaCl, pH 7.4) で 3 回洗浄後、n-ヘキサン-プロピルアルコール (3:2, v/v) を加えて 20 分間室温で攪拌して細胞からコレステロールを抽出した。抽出液は、窒素気流下で溶媒を除去し、残渣を n-ヘキサンに溶解した。酵素-蛍光法による細胞内コレステロールの測定は、Gamble らの方法 (J.Lipid.Res., 19, 1068-1070, 1978) に従った。総コレステロールは cholesteryl oleate を、遊離型コレステロールはコレステロールを標準物質として定量し、総コレステロール値から遊離型コレステロール値を差し引いて細胞内コレステロールエステル量を算出した。なお、脂質抽出後の細胞を 0.2N NaOH に溶解し、タンパク質量を測定して、細胞内コレステロールエステル量を補正した。

⑤文献調査として、フタル酸エステルの検索は 2000 年から 2003 年の 2 月まで、Medline 及び Current Contents を用い、*phthalate*, *DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate)*, *DBP (di-n-butyl phthalate)*, *BBP (n-butyl benzyl phthalate)* をキーワードに生殖・発生毒性関連の文献を検索した。アジピン酸エステルについては、1984 年から 2003 年 2 月まで、同データベースを用いて検索した。検索した文献のタイトル及び要旨に基づいて、本目的との関連性を判断し、必要に応じて原著を入手し、内容をまとめた。アジピン酸エステルのうち、DEHA については 2000 年の OECD (Organization of Economic Cooperation and Development) 高生産量化学物質初期評価会議で討議され、評価が終了しているため、その文書を手入し、資料とした。

C. 研究結果

①周産期曝露影響評価のうち、病理組織学的解析を中心とした評価研究では、DBP の投与期間中の母動物における体重と摂餌量は、対照群を含めて群間に明らかな差を認めなかった。即ち、DBP は用量に依存して母動物に摂取されていた。また、妊娠期間、リッターサイズには群間に差は認めなかったものの、雄性出生児率は 2000 ppm より有意な低下を示した。更に、有意差はないものの、児動物の生後 2 日目における体重は 10,000 ppm 群で低値傾向を示した。その日における AGD は雌では変動を認めなかったものの、雄では 10,000 ppm 群で有意に短縮した。生後 14 日目の雄性児動物における乳頭・乳輪の出現は、2000 ppm から用量依存的に増加し、10,000 ppm で有意に増加した。春期発動の時期に関しては、雄では

200 ppm 群で早く認められた。また、発動を示した時期の体重は 10,000 ppm 群で増加したものの、この群では発動時期に変動を認めなかった。雌では 10,000 ppm 群で春期発動は遅延し、発動時期の体重は用量依存性はないものの、200 ppm 以上で増加を示した。離乳時(3 週齢)の解剖では雌雄共に有意差はないものの 10,000 ppm 群で体重の低値を認めた。また、雄では 10,000 ppm 群で肝、脳、副腎の相対重量の増加、精巢の相対重量の低下を認めた。雌では、雄と同様に肝臓の相対重量の増加を認めた。生後の児動物体重の推移として、雄では生後 11 週目に 200 ppm 群での増加が認められたのみであった。雌では 200 ppm 群で生後 17 日目から 11 週にかけて体重増加を認め、20 ppm 群でも同様に生後 17 日目から 4 週にかけて高値を示した。11 週齢時の解剖では、雌雄とも明らかな体重の変動を検出できなかった。臓器重量に関しては、雄の 10,000 ppm 群で腎相対重量の若干の低値を認め、明らかな用量依存性はないものの、20, 200, 2000 ppm 群で下垂体相対重量の増加を認めた。また、200 ppm 群で腹側前立腺相対重量が増加を示した。雌では 10,000 ppm で明らかな下垂体重量の低下を認めた。雄の児動物のうち、10,000 ppm 群で生後 11 週齢までの間、死亡例が増加し、生後 20 週目の解剖時に必要な匹数が得られなかった。20 週目の解剖時では、雌雄共に DBP 投与に起因した体重変動は認められなかった。臓器重量に関しては、雌の下垂体の相対重量が 200 ppm 以上の群でほぼ用量依存的に低下を示した。性周期の変動を生後 8-11 週の間と 17-20 週の間で検討した結果、8-11 週の間で有意差はないものの休止期の延長を示す例が 2000 ppm 群で 8 例中 2 例、10,000 ppm で 8 例中 4 例と増加した。17-20 週の間では 2000 ppm 群で 10 例中 3 例が休止期の延長を示した。

メタカーン固定法を利用した、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析法の確立に向けて、PB 投与したラット肝臓を用いて、メタカーン固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した 50 ng の total RNA から *in vitro* 転写により得られた aRNA の増幅効率の至適化を検討した。その結果、2 回の増幅で poly(A⁺) RNA を 50 万倍に増幅することに成功した。次いで、この増幅した aRNA を用いて GeneChip による解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った。まず、搭載遺伝子のうち、発現が presence call あるいは absence call を示す遺伝子数と発現が marginal である遺伝子数について、未固定組織から調製した total RNA の 1 回増幅及び 2 回増幅サンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片から得られた total RNA の 2 回増幅サンプルを比較した結果、サンプル間でそれぞれに分類される遺伝子数に大きな違いは認められなかつ

た。また、5'末端から 3'末端にかけて広くプローブが設定されている GAPDH 遺伝子の 3'/5'のシグナル比を検討した結果、未固定組織の 1 回増幅サンプル(組織のマイクロアレイ解析に通常用いられる方法で調製されたサンプル)ではシグナル比がほぼ 1 であったのに対して、2 回増幅したサンプルでは、固定・包埋の有無を問わず、3'側のシグナルが強く現れていた。次に、未固定組織で 1 回ないし 2 回増幅したサンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅サンプルから得られた発現データについて相関を比較した結果、2 回増幅したサンプル同士の比較では、非補正データでの比較及び normalize したデータでの比較ともに高い相関係数が得られた。一方、1 回増幅と 2 回増幅したものの非補正データでの比較では、メタカーン固定・パラフィン包埋の有無に関わらず、2 回増幅例同士の比較に比べて若干相関係数が低く現れたが、normalize したデータでの比較ではメタカーン固定・パラフィン包埋した切片から調製した aRNA と未固定組織での 1 回増幅 aRNA サンプルの間の相関は高い ($R_2=0.91$) という結果が得られた。また、2 回増幅例同士(未固定組織 vs. メタカーン固定・パラフィン包埋切片)での発現に差のある遺伝子はなかったものの、1 回増幅例と 2 回増幅例での発現データで発現に有意差を伴った違いを示した遺伝子数は、固定・包埋の有無を問わず、全体の 20-30% に及ぶことが明らかとなった。次に、未固定組織の 1 回ないし 2 回増幅サンプルとメタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅して得られた aRNA サンプルのそれぞれの間で、発現が共通している遺伝子と各々でのみ発現している遺伝子の数を求めた結果、2 回増幅例特異的に発現が変動する遺伝子が 330-370 程度であり、未固定組織で 1 回増幅したもので 800 前後の遺伝子であった。これらの遺伝子のうち、3'末端の遺伝子情報が明らかなものにつき、プローブと poly(A⁺) tail 間の距離を求めた結果、未固定組織の 1 回増幅例のみで発現していた遺伝子は、2 回増幅サンプルのみで発現していた遺伝子に比べ、プローブ・poly(A⁺) tail 間距離の短いことが明らかとなった。このような予備検討結果を得て、フタル酸エステル類の混餌投与による脳の性分化影響を検索するために、抗アンドロジェン作用を示すフルタミドの単回投与 (250 μ g/pup, 皮下投与, 生後 1 日目)を陽性対照として、フタル酸エステル類のうち最も毒性が強い DEHP について妊娠 15 日からの混餌投与 (6000 ppm)を行った。これらの児動物につき、生後 2 日目での視床下部 MPOA 特異的な microarray 解析を行う予定であるが、一部の動物についてはメタカーン固定・パラフィン包埋切片からマイクロダイセクションによる MPOA 組織の回収を開始した。

一方、別に行った DBP の周産期曝露実験において、脳の性分化関連遺伝子の視床下部における発現解析を実施した結果、妊娠 15 日目からの DBP 20, 200, 2000 ppm の混餌投与は産子数に影響を与えなかったが、10,000 ppm の混餌投与群では産子数が有意に少なく、今回の実験では雌新生仔のデータは得られなかった。また、生後 3 日齢の雌雄ラットの視床下部における gm 遺伝子の発現を検索した結果、対照群では有意ではないものの、雄で高い傾向が見られた。雌ラットにおける gm 遺伝子の発現は EB によって変化しなかったが、TP により低下した。母ラットへ DBP を摂取させた群では、用いた全ての用量で視床下部における gm 遺伝子の発現は低下した。視床下部における p130 遺伝子の発現に対する DBP の影響を検索した結果、対照群では雌よりも雄で高い傾向が見られたものの有意ではなく、また雌ラットへの EB あるいは TP の投与はいずれも p130 遺伝子の発現に影響しなかった。p130 遺伝子の発現も、DBP により全ての用量で低下した。しかし、gm および p130 遺伝子ともにその変化に明確な用量反応性は認められなかった。また、生後 3 日齢の雌雄ラットの血中 T および E₂ の濃度を測定した結果、血中 T 濃度は雌よりも雄で顕著に高かったが、血中 E₂ 濃度は雌雄で差は認められなかった。DBP の影響については、低用量 (20 ppm および 200 ppm) 投与群で E₂ の上昇が見られた以外には有意な変化は観察されなかった。

②DBP による精巣障害に対する肝障害負荷の影響評価として、TAA 処置群において AST, ALT の有意な上昇を認め、組織学的検索では TAA 処置群の肝臓に中心静脈—門脈間の線維化やグリソン鞘の拡大、炎症性細胞浸潤といった肝障害所見を認めた。対照群と比較し肝障害を誘導した各群では摂餌量の減少を認め、体重増加抑制を認めた。肝臓、腎臓および前立腺各葉、精囊腺の相対臓器重量は肝障害を誘導した各群では有意な増加を認めた。一方、精巣、精巣上体の相対臓器重量については第 1 群においてのみ肝障害非誘発群、DBP 非投与群の双方に対し、有意に低値であった。屠殺時の精子検査では精液 1 ml あたりの精子数が肝障害を誘導した各群では有意に減少しており、また DBP 非投与群との比較においては第 1 群で有意な減少が見られた。精子運動率では第 1 群においてのみ肝障害非誘発群、DBP 非投与群の双方に対し有意に低値を示した。精子奇形率は肝障害を誘導した各群で有意に増大していたが、一方、DBP 非投与群との比較においては肝障害非誘発群でのみ有意な増大を認めた。精巣、精巣上体についての組織学的検索では第 1 群でのみ精細管の著明な荒唐像、精巣上体管内への多数の脱落細胞像を認めた

が、その他の各群では明らかではなかった。また血清中、精巣中のテストステロンレベルの検索では各群間に TAA または DBP 投与に由来すると思われるような有意な差を認め得なかった。腎臓、前立腺および精囊腺においては各群共、特記すべき組織学的変化を認めなかった。

DBP による精巣障害に対する腎障害負荷の影響評価として、葉酸投与による軽微な体重増加抑制が見られたほか、20,000 ppm の DBP 投与によって葉酸投与の有無に関係なく、体重の減少と増加抑制が観察された。葉酸投与群の腎臓は表面は粗造で、組織学的に間質の線維化を伴った尿細管の萎縮など間質性腎障害のあることが確認された。葉酸投与群では尿の pH と比重および浸透圧に減少が観察され、さらに血中の尿素窒素やクレアチニンの上昇など葉酸投与による腎機能の低下は明らかであった。精巣と精巣上体の重量は 20,000 ppm DBP 投与群で減少があり、精巣重量は葉酸投与後 DBP 投与した第 8 群で高度に減少し、DBP 非投与群のみならず、葉酸非投与 20,000 ppm DBP 投与群のそれとも有意な減少を認めた。精巣上体の重量も精巣重量と極めて類似した動向を示した。また腹葉前立腺および精囊重量も第 8 群で有意に減少した。精巣と精巣上体の病理組織学的検討を行ったところ、葉酸投与後 20,000 ppm DBP 投与した第 8 群で精細管の高度な萎縮、精母細胞や精子細胞の消失があり、さらに多くの精細管において精祖細胞の空胞変性が認められた。精祖細胞の空胞変性は 20,000 ppm DBP のみ投与した第 4 群にも軽度ながら観察された。精巣上体では精細管から脱落して来たものと考えられる多量の変性壊死細胞を腺腔内に認めた。精巣上体管の上皮には著変は認められなかった。精巣上体における精子数や精子運動能は第 8 群で著明な低下が認められ、DBP 20,000 ppm のみ投与群 (第 4 群) でも精子運動能の有意な低下が見られたが、葉酸前処置群ではより高度な低下を示した。精子の形態異常率も同様の傾向が認められたが、ばらつきが大きく統計学的には有意差は得られなかった。

③精巣障害の感受性種差の検索では、MEHP のセルトリ細胞培養系への添加試験では、0.1 μM 以上の濃度では、すべてのセルトリ細胞が変性を起こしていた。0.01 μM 以下の濃度では、正常な細胞も観察され、濃度依存性に変性セルトリ細胞が増加を示した。In vivo での MEHP 経口投与試験の結果、500 mg/kg/day 投与群では、対照群との間に形態的差異は認められなかった。これに対し、1000 mg/kg/day 投与群では、精細胞の変性、脱落が多数観察され、精上皮が著しく損傷を受けていた。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、Nile Red 染色による脂質滴観察の結果、DMSO で処理した後 hCG を添加した場合に比べ、MEHP 処理した後 hCG を添加した場合の方が、より赤い蛍光がみられる傾向があったが、前者もよく染まっており、明らかな差はみられなかった。次いで、細胞内コレステロールエステル量を測定した結果、hCG 刺激がある場合は、DMSO のみの場合と、MEHP がある場合とで細胞内コレステロールエステル量に有意な差がみられなかったが、 10^{-8} ~ 10^{-5} M の MEHP で細胞内コレステロール量が増える傾向にあった。また、hCG がいない場合では、 10^{-6} M 及び 10^{-5} M の MEHP で細胞内コレステロールが有意に増加した。また、hCG 刺激がない場合とある場合で比較すると、 10^{-6} M 及び 10^{-5} M の MEHP で処理した場合、hCG 刺激により有意に細胞内コレステロール量が減少した。

⑤文献調査結果を以下に示す。

1. フタル酸エステルの精巣毒性

ヒトに関連した情報

不妊男性(21 人)の精液中のフタル酸エステル濃度 (DMP (dimethyl phthalate), DEP (diethyl phthalate), DBP, BBP, DEHP, DOP (di-*n*-octyl phthalate))は正常男性(32 人)と比較して有意に高かった。精液中フタル酸エステル濃度と正常な形態の精子数および一本鎖 DNA を持つ精子の割合との間には有意な関連性があった。しかしながら、本研究では、精液中のフタル酸モノエステル体濃度の分析は行われていない。[Rozati ら, 2002]

メカニズムに関連した研究

生殖細胞アポトーシスへの影響

雄生殖細胞のアポトーシスにおけるセルトリ細胞の役割についてのレビューで、フタル酸エステルに関連した新しい知見として、フタル酸エステルのターゲットの一つと考えられていたセルトリ細胞のビメンチンフィラメントの欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、精巣の組織学的な違いは認められず、また、少なくとも見かけ上の生殖・発生は正常であった。[Boekelheide ら, 2000]

FasL の C 末端に点変異を持った *gld* マウス(FasL は Fas と結合出来ない)は、野生型マウスと比較して、精巣重量および精巣あたりの精子数が高かったが、一方で 3 つ以上の生殖細胞がアポトーシスを示す精細管数も高かった。1.0 g/kg/day MEHP の単回強制経口投与後、野生型マウスでは生殖細胞のアポトーシスの顕著な増加が認められたが、*gld* マウスでは有意な増加は観察されなかった。[Richburg ら, 2000]

Flamingo 1 は、細胞間の接着に関わっていると考えられている G タンパク結合性受容体ファミリーの一つであり、セルトリ細胞において発現が認められている。28 日齢のラットでは、MEHP 1 g/kg の単回強制経口投与後、2 時間からセルトリ細胞における Flamingo1 分布の変化が見られ、12 時間後には Flamingo1 は観察されなくなった。このことから、Flamingo1 は、フタル酸エステルのターゲットの一つであると考えられた。Death Receptor (DR) 4, 5, 6 は、アポトーシス誘導性の情報伝達系であり、精巣で発現が認められている。*gld* マウスの精巣では野生型マウスに比べてこれら受容体の濃度が高いため、Fas 情報伝達系の機能が損なわれた時、これら受容体はその代償として機能するのではないかと考えられている。野生型マウスに対する MEHP 1 g/kg の単回強制経口投与では、DR5 は、Fas と同様に、投与 1.5 時間後に増加した一方で、DR6 は投与の 12 時間後に増加が認められた。*gld* マウスでは、MEHP 曝露後、DR5 レベルに変化が見られず、DR6 レベルは投与 3 時間後から増加した。[Richburg ら, 2002]

MEHP を投与した *gld* マウスの精巣で、軽微なアポトーシスが進行していたことから、MEHP が引き起こす生殖細胞アポトーシスには Fas-system 以外の系が関わっていると考えられた。SD ラットの精巣膜分画の DR5 レベルは MEHP 投与後に増加した。DR の ligand activation は活性型 caspase-8 の生成および転写因子 NFkB の活性化を引き起こすが、*gld* マウスでは MEHP 曝露後、caspase-8 および NFkB-DNA binding の増加が認められた。これらの結果から、MEHP が引き起こす生殖細胞アポトーシスには DR を介した反応が関わっていると推定されるが、その主体は Fas システムであると考えられた。[Giammona, 2002]

ライディッヒ細胞(ステロイド合成)への影響

MA-10 細胞(ライディッヒ腫瘍培養細胞)を用いた *in vitro* 試験が行われた。MEHP は MA-10 細胞の生存率および蛋白量に影響を及ぼさない濃度で、プロゲステロン生成を抑制した。MEHP は濃度依存的に、MA-10 細胞の構造を変化させ、特に脂肪滴の蓄積を引き起こした。組織形態の計測分析では、MEHP 添加により細胞内脂肪滴が増加し、一方で、ミトコンドリア容積の減少することが示された。[Dees ら, 2001].

MA-10 細胞において、MEHP はホルモン刺激後のコレステロールのミトコンドリア内への輸送およびミトコンドリア内ステロイド合成を抑制した。MEHP は、ミトコンドリア膜間のコレステロール輸送に関わる peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) の転

写を直接阻害することにより、PBR レベルを減少させた。in vivo 試験では、SV126 マウスへの DEHP 1.0 g/kg の 7 日間強制経口投与で精巣 PBR mRNA および血清テストステロンレベルの低下が認められたが、PPAR α 欠損マウスではこれらの変化は観察されなかった。これらのことから、フタル酸エステル類のステロイド合成への影響は PPAR α 依存性のライディヒ細胞 PBR 発現阻害によるものだと考えられた。[Gazouli ら, 2002]

Long-Evans ラットに対する 0, 1, 10, 100 および 200 mg/kg/day の DEHP の強制経口投与が行われた。21 または 35 日齢からの 14 日間投与では、血清ホルモンレベル、精巣および精嚢重量に影響は見られなかったが、投与後、精巣より調製したライディヒ細胞のテストステロン生成低下が認められた (21 日齢: 100 mg/kg 以上, 35 日齢: 10 mg/kg 以上)。21 日齢からの 28 日間投与では、10 mg/kg 以上で血清テストステロンおよび LH レベル増加し、ライディヒ細胞のテストステロン分泌能も増加した。62 日齢からの 28 日間投与ではホルモンレベルおよびライディヒ細胞のテストステロン分泌能に変化は見られなかった。いずれの群においても精巣に組織学的変化は観察されなかった。[Akingbemi ら, 2001]

10 週齢の雄の SD ラットに DBP (0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/day) を 15 日間強制経口投与した結果、750 mg/kg 以上で精巣上体の、また 1,000 mg/kg で精巣の組織学的変化が観察されたが、精巣および副生殖器官重量に変化は見られなかった。500 mg/kg 以上で血清テストステロンレベルの低下および LH レベルの増加、全ての投与群でエストラジオールレベルの低下が観察された。[O'Connor ら, 2002]

酸化ストレスに関する研究

5 週齢の SD ラットに 2.0% の DEHP を 2 週間混餌投与した結果、精子形成阻害を伴った精巣萎縮が観察された。ビタミンの同時投与 (3.0 mg/mL のビタミン C および 1.5 mg/mL のビタミン E, 飲水投与) では、DEHP 単独投与群と比較して精巣への影響が有意に改善されていることがわかった。[Ishihara ら, 2000]

25 日齢の Wistar ラットに 0, 500, 2000 mg/kg/day の DBP を 10 日間強制経口投与した。その結果、精子形成阻害を伴う精巣萎縮が観察されたが、精巣の酸化的 DNA 損傷レベルに有意な変化は観察されなかった。本試験では、通常、酸化的 DNA 損傷レベルが高いことが知られている生殖細胞は、DBP 投与により著しく減少していることから、DBP が引き起こす精巣毒性と酸化的 DNA 損傷との関連性を完全に

否定するとは出来ない。[Wellejus ら, 2002]

4-5 週齢の Wistar ラットに 0, 1, 2 g/kg/day の DEHP を 7 日間強制経口投与した結果、精巣のチオール、グルタチオンおよびアスコルビン酸濃度の減少、グルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の増加、および活性酸素種の生成が引き起こされた。In vitro 試験では、14 日齢 Wistar ラットから調製した生殖細胞とセルトリ細胞への MEHP 添加により、酸化ストレスは生殖細胞で引き起こされたが、セルトリ細胞では引き起こされなかった。また、MEHP は精巣から分離したミトコンドリアからのチトクローム C 放出を引き起こした。これらの結果から、DEHP は酸化ストレスによりミトコンドリアの機能を損傷し、生殖細胞のアポトーシスを引き起こすのではないかと考えられた。[Kasahara ら, 2002]

その他の精巣毒性メカニズムに関連した研究

7 週齢の雄の Wistar Imamichi ラットに 8.0 mmol/kg (2394 mg/kg) の DBP の単回経口投与を行い、精巣の PPAR regulated 遺伝子および inhibin/activin-follistatin system 遺伝子発現の変化を調べた。投与 6 時間後より精巣の組織学的変化が観察された。PPAR α については、シトクローム P450 4A1 mRNA が投与 6 時間後に一過性に増加したが、fatty acyl-CoA oxidase 1 mRNA レベルに変化は見られなかった。PPAR γ については、投与 3 時間後より plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNA の顕著な増加が認められたが、uncoupling protein-2 mRNA レベルに変化は見られていない。一方で、投与 12 時間後より inhibin β_B mRNA レベルの有意な低下、投与 24 時間後に follistatin mRNA レベルの有意な増加が認められた。[Kobayashi ら, 2003]

28 日齢の Wistar ラットに 400 mg/kg の MEHP を単回強制経口投与した結果、精巣ではアンドロゲンおよび cAMP の応答領域を持つ TRPM (testosterone-repressed-prostatic-message)-2 遺伝子の発現が投与後一時的に増加した。前立腺ではこのような変化が認められなかったことから、精巣で観察された TRPM-2 遺伝子発現レベルの増加は、cAMP 減少によるものであると考えられた。この結果に加え、精巣および前立腺のアンドロゲン受容体分布に変化が見られなかったことより、MEHP が引き起こす精巣毒性のメカニズムにはアンドロゲンレセプターは含まれないと考えられた。[Dalgaard ら, 2001]

25 日齢の SD ラットに 2000 mg/kg/day の DEHP を 14 日間強制経口投与した結果、投与 1 日目より生殖細胞のアポトーシスが認められた。精巣の亜鉛量は投

与3日目から有意に低下したが、亜鉛トランスポーターZnT1 mRNA 発現レベルに変化は見られなかった。これらの結果から DEHP による精巣毒性発現には生殖細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしており、亜鉛の枯渇は二次的な変化であると考えられた。[Park ら, 2002]

種差に関連した研究

6週齢の B6C3F1 マウスに DEHP(0, 100, 500, 1500, 6000 ppm) を 104 週間混餌投与した結果, 1500 ppm (292 mg/kg/day) 以上の投与群で精巣および精巣上体の精液減少症および精巣上体の未成熟および異常精子が観察され, 無毒性量は 98.5 mg/kg/day とされた。同じ方法で行われたラットの試験 (無毒性量: 5.8 mg/kg/day) において観察された多くの変化が, 本試験では観察されなかった。[David ら, 2000]

生後 100 日齢の雌雄マーマーモセットに 65 週間 DEHP を 2500 mg/kg まで経口投与した結果, 精巣を含む全ての臓器, 並びに各種ホルモン類に影響は見られなかった。また, Ring-U ¹⁴C DEHP を 3ヶ月齢, 18ヶ月齢及び 65 週間 DEHP 投与後に単回投与した結果, 精巣を含む雄生殖器官への蓄積性は認められなかった。[Tomonari ら, 2003 & Kurata ら, 2003]

その他の精巣毒性に関連した研究

6週齢 F344 ラットおよび B6C3F₁ マウスにそれぞれ 12,500 ppm (approx. 804 mg/kg/day) および 6000 ppm (approx. 1,318 mg/kg/day) の DEHP を 78 週間混餌投与後, 26 週間の回復期間を設け, 観察された影響を, 同じ条件で行われた 104 週間連続投与試験の結果と比較した。肝臓への影響については, 連続投与群と比較して回復群ではその発症率は有意に低下した。一方で, ラットで観察された精巣および下垂体への影響(去勢細胞および精子形成欠如)に回復性は見られなかった。[David ら, 2001]

2. フタル酸エステルの発生毒性

抗アンドロゲン作用 (妊娠期投与)

フタル酸エステルによる抗アンドロゲン作用は妊娠後期に投与された時, 精巣ライディッヒ細胞でのテストステロンの合成低下を起し, その結果テストステロンによる雄性生殖器の発育を抑制したためと考えられていたが, この毒性発現機構を支持する研究結果が以下の様に報告された。

DEHP

SD ラットの妊娠 3 日から出産後 21 日まで 375, 750, 1500 mg/kg/day の DEHP を強制経口投与した結果,

750 mg/kg 以上の投与群の雄児で AGD の短縮, 乳頭・乳輪の出現, 精巣包皮分離の遅れ, 精巣下降不全などの抗アンドロゲン作用が認められた。375 mg/kg 投与群でも乳頭・乳輪の出現, 精巣および腹側前立腺重量の有意な低下が引き起こされた。また, すべての DEHP 投与群では, 雄動物の成熟後の性行動に異常が見られた。[Moore ら, 2001]

SD ラットの妊娠 14 日から出産後 2 日まで DEHP 750 mg/kg/day を強制経口投与した結果, 胎児期及び新生児期の雄の精巣テストステロン生産量および精巣テストステロン濃度は有意に低下した。新生児期には, AGD の短縮, ライディッヒ細胞の肥大および胚細胞 (gonocyte) の増加, 多核化が観察された。[Parks ら, 2001]

Long-Evans ラットの妊娠 12 から 21 日まで DEHP 100 mg/kg/day を強制経口投与した。出生 21, 35, 90 日後の雄児を検査した結果, 精巣および精囊重量に変化は見られなかった。21 および 35 日齢では, 血清テストステロンおよび LH レベルの低下が, また, 21 日齢では, 精巣より調整したライディッヒ細胞のテストステロン分泌能低下が認められたが, 90 日齢ではこれらの変化は見られなかった。[Akingbemi ら, 2001]

DBP

Wistar ラットの妊娠 15 から 17 日に MBP (mono-n-butyl phthalate) (250, 500, 750 mg/kg) を経口強制投与した催奇形性試験で, すべての投与群で停留率丸および AGD の短縮が観察された。この試験は, 抗アンドロゲン作用が MBP によることを直接的に示している。[Ema & Miyawaki, 2001a]

SD ラットの妊娠 12 から 21 日まで DBP 200 mg/kg を強制経口投与した結果, 雄胎児の精巣のテストステロンおよびアンドロステンジオンレベル, またステロイド合成関連遺伝子の発現レベルの低下が認められた。また, 胎児の精巣では, 細胞増殖および生存に関連した遺伝子発現の変化が認められたが, TRPM-2 と bcl-2 の発現増加はライディッヒ細胞の過形成に関係し, c-kit のダウンレギュレーションが生殖細胞の変性に関与していると考えられた。[Shultz ら, 2001]

CD ラットの妊娠後期に DBP を投与した結果, 胎児精巣のテストステロン濃度の減少, ライディッヒ細胞の過形成, 多核生殖細胞の増殖が認められた。ライディッヒ細胞の過形成はテストステロンの減少の代償効果で, それが不十分のため生殖器奇形が生じると考えられた。生殖細胞の多核化と増殖はセルト

リ細胞の機能低下を示唆している。[Mylchreest ら, 2002]

Wistar King A ラットの妊娠 7-10 日, 11-14 日, 15-18 日に MBP (300 mg/day) を強制経口投与し, 妊娠 20 日に雄胎児を解剖した結果, MBP 投与群では対照群と比較して精巣が腹腔内上部に位置していた。その影響は妊娠 7-10 日投与<11-14 日投与<15-18 日投与の順で強かった。また, MBP 投与群では伸張した精巣導帯および肥大した精巣提靭帯が観察された。組織学的検査では, MBP 投与群では未発育の精巣上体が観察された。精巣テストステロン濃度は減少した。[Shono ら, 2000]

Wistar King A ラットの妊娠 15-18 日に MBP (300 mg/day) の強制経口投与し, 妊娠 19 日目に雄胎児を解剖した結果, 精巣は腹腔内の上部に位置し, 導帯は対照群と比較して細かった。この実験で MBP は精巣下降の前半時期に影響を及ぼすことを示した。[Imajima ら, 2001]

BBP

ラット(Harlan Cpb-WV strain)の妊娠 5-16 および 6-20 日に 270-2,100 mg/kg/day の BBP を強制経口投与した催奇形性試験で, 雄胎児に精巣転位が見られ, ベンチマークドースを 95 mg/kg/day と算出している。[Piersma ら, 2000]

Wistar ラットの妊娠 15-17 日に BBP (250, 500, 1000 mg/kg/day) を強制経口投与した結果, 雄胎児の 500 mg/kg 以上に辜丸停留, AGD の短縮が認められ, この頻度は MBP により引き起こされたものと同程度であった。[Ema & Miyawaki, 2002]

全般的な機構

ほ乳類における発育初期のアンドロゲンは生殖器の雄化発育に必須である。すなわち, 出生前後に雄が抗アンドロゲンに暴露されると永久に形態的にも, 生理的にも雄化が失われる。逆に, 雌が外因的にアンドロゲンに暴露されると雄化されてしまう。妊娠動物にテストステロンやビクロゾリンを投与して, その証明を行った。[Hotchkiss ら, 2002]

精巣発生毒性 (新生児期投与)

DEHP

生後 3 日のラットに DEHP または MEHP を単回投与すると, 投与 24 時間後に多くの大型多核生殖細胞が認められ, 48 時間まで持続した。セルトリ細胞への BrdU の取り込みは明らかに減少した。しかし, 血清 FSH レベルの変化は認められなかった。また, 細胞分裂に関連した蛋白の p27^{Kip1}, cyclins D₁, D₂, D₃ のう

ち, cyclin D₂ の mRNA が用量依存的に特異的にダウンレギュレーションされた。[Li ら, 2000]

Long-Evans ラットの授乳期(出産後 1-21 日)に, DEHP 100 mg/kg/day を強制経口投与し, 出生 21, 35, 90 日齢の雄児を検査した。その結果, 21 日齢で, 血清テストステロンレベルの低下が観察されたが, LH レベルに影響は認められなかった。35 および 90 日齢では血清ホルモンレベルに影響は見られなかった。[Akingbemi ら, 2001]

DBP

DBP による精巣毒性に酸化的ストレスが関与しているかどうかを検索する目的で, Wistar ラットの妊娠 7 日から分娩後 17 日まで DBP 500 mg/kg/day を強制経口投与したが, 精巣の 8-OH-dG レベルの変化は認められなかった。[Wellejus ら, 2002]

In vitro 試験

TM4 cell (11-13 日齢マウスのセルトリ細胞) に DEHP を添加した。9 時間後, gap junctional intercellular communication のダウンレギュレーションが観察されたが, 用量依存性は認められなかった。DEHP は, クロマチン縮合, 核の切断など, セルトリ細胞のアポトーシス様変化を阻害した。[Kang ら, 2002]

その他の in vivo 発生毒性

DEHP

Crlj: CD-1 マウスに 5 週齢から次世代の 9 週齢まで, DEHP (0, 0.01, 0.03, 0.09 %) 混餌投与し, 5 種の神経行動毒性を試験したところ, 正向反射の遅延のみが全般的に見られ, 生後 7 日目の雄 (0.09 %) においては顕著であった。[Tanaka, 2002]

DBP

SD ラットの妊娠 10 日に DBP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/kg) および MBP (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 g/kg) の単回強制経口投与を行い, 妊娠 12 日目に胎児を検査した結果, 用量依存的な発生毒性(頭殿長の短縮および体節数の減少など)が観察された。[Saillenfait ら, 2001]

妊娠および偽妊娠ラット(Wistar)の妊娠 0-8 日目まで 0, 250, 500, 750, 1000 mg/kg/day MBP の強制経口投与による催奇形試験で, 妊娠ラットに着床数低下, 着床前胚致死, 胎児死亡の増加, 同産群あたりの生存胎児数の低下が観察された。[Ema & Miyawaki, 2001b]

BBP

ラット(Harlan Cpb-WV strain)の妊娠 5-16 および 6-20 日に 270-2100 mg/kg/day の BBP を強制経口投与した

催奇形試験で、胎児の体重低下、骨格変異および内臓奇形発現率等の増加が認められた。[Piersma ら, 2000]

Wistar ラットの妊娠15-17日にBBP (250, 500, 1000 mg/kg/day) を強制経口投与した結果、雄胎児の生殖器形態異常以外に生存胎児数及び胎児体重の減少が認められた。[Ema & Miyawaki, 2002]

SD ラットの妊娠 11-13 日に BBP (250, 1000, 1500, 2000 mg/kg/day) を強制経口投与した催奇形性試験で、生存胎児数の低下、吸収胚数の増加、骨化の減少、口蓋裂等が見られた。母動物では、肝臓メタロチオネイン濃度が有意に増加したが、肝臓および血清亜鉛濃度に影響は認められず、BBP が引き起こす発生毒性は亜鉛代謝に関連したものではないと考えられた。[Uriu-Adams ら, 2001]

D79P (di-(C₇-C₉ alkyl) phthalate), D911P (di-(C₉-C₁₁ alkyl) phthalate)

D79P は側鎖が C7 から C9 までの混合物で、D911P は側鎖が C9 から C11 までの混合物である。したがって、本試験は D1NP の毒性試験と考えることが出来る。

SD ラットの妊娠 1-19 日に D79P (250, 500, 1,000 mg/kg/day) を強制経口投与した発生毒性試験で、1000 mg/kg/day 投与群の胎児に腰肋過剰発現率の有意な増加が見られ、無毒性量は 500 mg/kg/day であった。また、同ラットの妊娠 1-19 日に D911P (250, 500, 1000 mg/kg/day) を強制経口投与し発生毒性試験では、500 mg/kg/day 以上の投与群の胎児に腰肋過剰発現率の有意な増加が見られ、無毒性量は 250 mg/kg/day であった。なお、母体毒性はいずれの群でも見られなかった。[Fulcher ら, 2001]

その他の *in vitro* 発生毒性

マウスの原始胚細胞(妊娠 11.5 日の胎児より摘出)を用いた *in vitro* の試験で、*N*-ethyl-*N*-nitrosourea および adriamycin は増殖抑制およびアポトーシスの誘導を起こしたが、MEHP にはこうした作用はなく単層体細胞への吸着を低下させた。なお、*in vivo* の試験では MEHP の影響は見られなかった。[Iona ら, 2002]

妊娠 12.5 日のラットから摘出した胚四肢芽細胞培養系において、DBP および MBP は細胞毒性と分化抑制を引き起こす。その強度は DBP ≫ MBP である。抗酸化剤であるビタミン E およびカタラーゼは DBP のこの作用を抑制した。[Kim ら, 2002]

Wistar ラットの妊娠 9.5 日に摘出した胎児および妊

娠 12.5 日に摘出した胎児の中脳および体肢芽に DEHP, DBP, BBP を添加した培養試験で、DEHP > DBP > BBP の順に胎児毒性が強く、中脳より体肢芽の方が感受性の高かった。しかし、活性代謝体であるモノ体での試験は行われていない。[Rhee ら, 2002]

Pyla cells (不死化ラット骨芽細胞)を用いた試験で、DBP および BBP は FGF-2 (fibroblast growth factor: 線維芽細胞成長因子)の核内移動に影響を及ぼした。[Menghi ら, 2001]

DBP および BBP は Pylacells のアクチン細胞骨格に特異的な変異を引き起こし、細胞は紡錘型から円形に変わった。アポトーシスに影響は与えなかった。[Marchetti ら, 2002]

SD ラットの妊娠 10 日の胎児を培養し、MBP に 48 時間曝露した結果、頭殿長の短縮および体節数の減少などが観察された。[Saillenfait ら, 2001]

3. フタル酸エステル

DEHP

Crj: CD-1 マウスに 5 週齢から次世代の 9 週齢まで、DEHP (0, 0.01, 0.03, 0.09 %) 混餌投与した結果、高用量群で、新生児生存率が有意に低下した。[Tanaka, 2002]

DBP

SD ラットによる NTP の連続繁殖試験を DBP について実施した。親世代ではリッターサイズの減少や児の体重減少程度であったが、F1 では精子数の減少と生殖器形態異常を伴った顕著な受胎減少が 650 mg/kg/day に見られた。NOAEL は得られず、LOAEL は 66 mg/kg/day であった。CIIT の試験でも同様の結果が得られ、RfD は 66 mg/kg/day とされた。ヒトの曝露データから乳児は最悪の場合 RfD のレベルを摂取していると推定されたが、加水分解によりモノ体のできる可能性が非常に低いことから、DBP による毒性発現の可能性は非常に低いと思われる。

[Foster ら, 2000]

DIDP (di-iso-decyl phthalate)

CrI: CD BR-VAF/Plus (Sprague Dawley) ラットを用いた DIDP の 2 世代試験が行われ、出生率、新生児生存率および体重の低下、肝細胞肥大が見られたが、0.4 % までは生殖指標に影響は見られなかった。一方、陰開口及び包皮分離の遅延は傾向のみで、その他の抗アンドロゲン作用は認められなかった。[Hushka ら, 2001]

4. フタル酸エステルと卵巣

全般的な機構

フタル酸エステルの雌生殖器への作用機構についてのレビューで、新しい情報としては、雌ラットに DEHP, DBP, DPP, BBP を投与した結果、DEHP および DBP 投与群では、卵巣で多くの嚢胞が観察され、血清エストロンおよびエストラジオール濃度等が変化した。この結果から、DEHP はエストラジオールの生成および代謝に影響を及ぼすが、DBP はエストラジオールの代謝にのみ影響を及ぼすのではないかと考えられた。ラットの顆粒膜細胞を用いた *in vitro* 試験では、MEHP はエストラジール生成および RNA アロマターゼ活性を低下させた。PPAR α および PPAR γ に特異的なリガンドも同様な影響を示したが、PPAR γ に特異的なアンタゴニストを用いた試験ではアロマターゼは部分的にしか抑制されなかった。[Lovekamp-Swan & Davis, 2003]

BBP

卵巣摘出ラットに BBP を投与すると、視索前野における progesterone receptor mRNA が増加した。[Funabashi ら, 2001]

エストロゲンは卵巣摘出ラットでインスリン処理（低血糖）後の LH パルス数のみを減少させたが（強さは変化なし）、BBP も同様の作用があった。[Kawaguchi ら, 2002]

5. アジピン酸エステルの生殖・発生毒性

DEHA については、OECD 高生産量化学物質初期評価において米国 EPA の作成した評価文書が 2000 年に合意された。その後の新しい試験報告はないので、評価文書の要点を以下に要約する。なお、その他のアジピン酸に関する報告も以下の 1 件だけである。

DEHA の反復毒性試験では生殖器系への毒性発現は見られていない。ラットの一世代繁殖試験（交配前 10 週間の混餌投与）では 12,000 ppm で母獣および次世代の体重減少のみが認められたが、生殖指標には影響は見られなかった (CEFIC, 1988a)。雄マウスへの高用量単回腹腔内投与により、受精率の低下、胎児死亡率の増加が認められた (Singh ら, 1975)。催奇形性試験ではラットの妊娠 5, 10, 15 日に腹腔内投与により、胎児の体重減少が見られたが、奇形は見られなかった (Singh ら, 1973)。ラットの妊娠期間を通して混餌投与した試験では 1080 mg/kg/day で着床前胚致死が見られたが、奇形の有意な発生は見られなかった (CEFIC, 1988b)。しかし、有意ではないものの、170 mg/kg/day で骨形成の遅延が見られたことから、実験者は 28 mg/kg/day を NOEL と判定している。

化粧品として使用されている stearamide DIBA-stearate の評価文書の中に、その成分として dibutyl adipate (DBA) と diisopropyl adipate (DIPA) の毒性に関する記載がある (Lanigan, 2001)。DBA については、ラットの妊娠中に約 500 mg/kg 腹腔内注射した結果、胎児の形態異常の頻度が増加したが、それより低い用量では影響はなかった。DIPA については生殖毒性関係の情報の記載はなかった。

その他の情報

DEHA はラット及びマウスへの反復投与により、体重増加抑制、肝肥大、肝ペルオキシソーム増殖が見られ、マウスにおいてのみ肝腫瘍の発生が見られている (NTP, 1982)。

以上のように、ある程度評価が出来る情報は DEHA についてのみであり、その結果も高用量での軽微な影響のようである。しかし、試験が行われた年代が古く、十分な検査が行われていたかどうかは不明である。

D. 考察

① 周産期曝露影響評価として、今年度は DBP の評価を行い、その動物実験は終了した。現在まで得られた結果として、雄性出生児率は 2000 ppm より有意な低下を示した。しかし、群間で明らかなリッターサイズの変動を認めなかったことから、対照群で雄性出生児率が高いことに起因していると考えられた。また、雄性児動物の生後 3 週時における精巣重量の低値は、この化合物の精巣を標的とした毒性を反映した結果と考えられる。また、この時期における雌雄の肝重量の高値は、この化学物質のペルオキシソーム増殖作用による肝肥大によるものと考えられた。更に、これら雄性児動物での AGD の短縮、乳頭・乳輪の出現等の変化は幼若期の精巣障害に起因した抗アンドロゲン作用に因るものと考えられた。

雌で認められた春期発動の遅延、性成熟後での下垂体重量の低値、性周期異常は、フタル酸エステル類の今まで知られていない雌での生殖機能に対する影響を示唆している。また、雌の児動物で認められた低用量での体重増加は、明らかな用量依存性はないものの Mylchreest らの報告 (Toxicol. Sci. 55, 143-151, 2000) でも認められており、類似した現象と考えられるが、NOAEL の策定も含め評価については、病理組織学的検索結果等を待って総合的に行う。

脳の性分化影響については、視床下部 MPOA 特異的な microarray 解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を目的としているが、その予備的な検討として、メタカーン固定法を利用して、パラフィン包

埋切片を用いた微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手し、ラット肝臓をメタカーン固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した50 ng の total RNA から *in vitro* 転写による aRNA の増幅効率を検討し、2 回の増幅で poly(A⁺) RNA を 50 万倍に増幅することに成功した。次いで、この増幅した aRNA を用いて GeneChip による解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った結果、メタカーン固定・パラフィン包埋しても、比較的忠実性の高い発現データが得られることが分かった。また、未固定肝組織を用いた場合と発現レベルの食い違う遺伝子は、設定されたプローブの 3' 末端からの距離が異なり、その食い違いはメタカーン固定・パラフィン包埋による影響ではなく、aRNA の 2 回増幅による影響であることが判明した。

ラットの脳の性分化の臨界期である新生仔期の視床下部において性ステロイド依存性に発現し、脳の性分化に関与する遺伝子として *gn* 遺伝子や *p130* 遺伝子を同定した。これらの遺伝子の視床下部における発現は、生後 3 日齢ではともに雌よりも雄で高いことが我々の従来の実験により示されている。本実験においても、雌よりも雄で高い傾向が認められた。しかし、外来性ステロイドは従来の結果とは異なり明確な効果を示さず、今後に課題を残した。DBP は用いた全ての用量で雌雄ともに視床下部における *gn* と *p130* の遺伝子発現を低下させたが、明確な用量反応性は認められなかった。DBP は新生仔視床下部における性分化関連遺伝子の発現を変化させることにより脳の性分化に影響を与える可能性が示唆されたが、用量反応性が認められないことなどから、さらに検討を要するものと考えられた。一方、DBP は精巣毒性を持つことが報告されているが、本実験においては DBP 暴露の血中の T に対する影響は認められなかった。このことから、DBP の視床下部における性分化関連遺伝子の発現に対する影響は、精巣からの T 分泌に対する影響を介した間接的なものではなく、視床下部に対する直接作用である可能性が考えられた。今後は、生後 7 日齢のラット視床下部における *gn* および *p130* 遺伝子の発現を解析するとともに、性成熟後の性行動や性腺刺激ホルモンの分泌パターンを解析し、脳の性分化に対する DBP の影響を総合的に評価していく予定である。

②肝障害負荷による修飾作用を検討する研究において、今回の動物実験モデルで適切な肝障害を誘発し得たと考える。肝障害を誘発しなかった動物においては DBP による雄生殖器への毒性が有意にみられたのは精子奇形率においてのみであった。しかし肝障害を誘導した動物では DBP 500 mg/kg 体重/day 投与群で精液 1 ml あたりの精子頭部数や精子運動

率、精巣、精巣上体の相対臓器重量および組織学的所見でその毒性を認めた。以上のことから肝障害下においては DBP による雄生殖器への毒性は増強されることが判明した。また精子数や精子奇形率、前立腺各葉、精囊腺の相対臓器重量においては、DBP 非投与群も含めた肝障害誘発動物で有意な雄生殖器への毒性所見を認めたことから、肝障害の存在それのみでも雄性生殖器への抑制作用が観察されることが考えられる。今後、今回の結果の背景に存在する仕組みの解明が必要であると考えられる。

腎障害負荷による修飾作用の検討に関しても、葉酸投与によって確実に腎障害が発生する事が組織形態学および尿検査から確認できた。DBP の最高用量の設定は雄性生殖器に確実に障害を引き起こすとの過去の報告を参考にしたが、今回の実験でも 20,000 ppm で精巣障害や精子数、精子運動能に異常を来したことから、これまでの報告を確認する結果となった。本研究の目的である腎機能低下状況下での DBP の毒性発現に対する修飾作用は精巣や精巣上体の病理組織学的所見や精子数、精子運動能の著明な低下から明らかに増強されることが判明した。この増強の原因として、腎機能低下によって DBP の代謝や排泄に変化を来し、血中濃度が上昇したと考えられる。今回は DBP ならびにその代謝物であるモノエステル体の血中濃度が測定されていないので、推測の域を出ない。ただし、DBP 投与による体重増加抑制率をみると葉酸の投与の有無に係わらずほぼ類似の低下率であり、このことから特段に血中濃度が上昇していたとするには無理があるかもしれない。従って血中濃度の上昇ではなく、他の要因が関与している可能性が高い。葉酸による腎障害は葉酸投与中止後、徐々に回復する傾向にあることが、葉酸投与終了直後と 4 週間たったあとの病理組織学的所見の比較から容易に推察される。今後、葉酸による DBP 精巣毒性の増強作用の発現機構を追究する必要がある。

③MEHP のラット・セルトリ細胞初代培養系への添加試験の結果、ラットでは MEHP が直接セルトリ細胞に影響を与えることが示唆された。今後、MEHP 添加後、6, 12 時間後の変化、Fas-L、ビメンチン免疫染色、他種動物のセルトリ細胞培養系への添加試験等を行い、その機序、種差を検討する。また、MEHP 経口投与試験により、500-1000 mg/kg/day の間で精巣に影響を与えることが明らかとなった。今後、この範囲で投与試験を行い、精巣への最小毒性濃度を決定する。また、マウス、モルモット、ハムスターへの経口投与試験を平行して進め、種差について検討する。

④MA-10 細胞の MEHP による脂質滴蓄積について、電顕で観察すると、MEHP 非存在下で hCG 刺激した場合は脂質滴が全く観察されないが、MEHP 存在下で hCG 刺激した場合、脂質滴が観察されたという報告がある。本研究結果からは、同条件では有意な差がみられなかったが、細胞内コレステロール量が増加する傾向は認められた。また、hCG 刺激がない場合は、MEHP 存在下での細胞内コレステロール蓄積が顕著であり、MEHP が、コレステロール合成、あるいはコレステロールからのステロイドホルモン合成経路のいずれかの段階で作用しているものと考えられる。また、ジアシルグリセロールからトリアシルグリセロールを合成する酵素であるアシル CoA:ジアシルグリセロール アシルトランスフェラーゼ(DGAT)の発現が精巣で顕著に認められており、コレステロールのみならず、中性脂肪の合成にも影響を及ぼしている可能性がある。今後、これら影響のみられた条件における RNA を MA-10 から調製し、Gene chip による解析を進め、遺伝子の発現変化を確認後、さらにそれら遺伝子の発現調節メカニズムについて解明を行うことにより、MEHP のライディッシュ細胞への影響を明らかにできると考える。

⑤フタル酸エステルの生殖系への毒性発現は、主に親動物を介した影響として抗アンドロジェン作用、卵巣への影響としてエストラジオール合成抑制作用、出生 4-6 週後の精巣への影響としてセルトリ細胞の機能障害である。前二者は両作用とも PPAR α を介した作用のようで、実際クロフィブレート系ペルオキシ増殖剤によっても同作用が発現すると共に、PPAR α ノックアウト動物では作用が発現しないようである。このことは、げっ歯類以外の動物ではこうした影響は発現しないであろうことを示唆している。一方、精巣への作用は PPAR α ではなく、PPAR γ との説があるが、その証明はなされていない。しかし、すでに報告されているカニクイザル及びマーモセットを用いた試験では離乳直後からの投与で精巣毒性は発現しておらず、今回のマーモセットを用いた再試験においても、全く精巣毒性は発現していない。この原因として、体内動態の違いも指摘されているが、モノ体のセルトリ細胞に対する直接作用が霊長類では実験されておらず、そうしたデータが得られれば、ヒトへの外挿を考える上で有益な資料となる。また、催奇形性もフタル酸エステルの特徴的作用であるが、これに関しては、PPAR α ノックアウト動物を用いた試験が行われておらず、実験の実施が待たれる。アジピン酸エステルについては、軽微な生殖毒性は認められているものの、フタル酸エステルに比べるとかなり弱く、肝腫瘍をマーカーとした場合でもラットでは腫瘍発

現が見られない。最後に、フタル酸エステルの発生神経毒性に関する研究はまだ途についたばかりであり、明確な結果は得られていない。今後の研究の進展が待たれるところである。

E. 結論

①周産期曝露影響評価として、今年度は DBP の評価を行った結果、雄性児動物において DBP による精巣障害に伴ったテストステロン・サージ阻害に起因したと考えられる変化を検出すると共に、雌においては、春期発動の遅延、性成熟後での下垂体重量の低値、性周期異常を検出した。このことは、フタル酸エステル類の今まで知られていない雌での生殖機能に対する影響を示唆している。また、雌の児動物で認められた低用量での体重増加は、明らかな用量依存性はないものの Mylchreest らの報告でも認められており、類似した現象と考えられるが、病理組織学的検索結果等を待って総合的に評価する。

また、マイクロダイセクション法を利用したパラフィン包埋切片中の微量組織からの網羅的遺伝子発現解析に関する予備的検討の結果、メタカーン固定材料においてパラフィン切片中の微量の RNA 分子を高い忠実性をもって増幅することに世界で初めて成功した。この技術を利用した網羅的遺伝子発現解析法が確立された場合、神経科学や発がんの分野のみならず、多くの分野での利用が期待できる。今後、フルタミドやフタル酸エステルにつき MPOA での遺伝子発現プロファイルを検索し、抗アンドロジェン作用による脳の性分化障害に関する発現クラスターの同定を予定している。

胎仔期、新生仔期に胎盤や乳汁を介して DBP に暴露されることにより、視床下部における性分化関連遺伝子の発現が変化し、脳の性分化が影響を受ける可能性が示された。しかし、今回の実験では用量反応性が認められないことなどから今後さらに検討を要するものと考えられ、さらに、性成熟後の性行動や性腺刺激ホルモンの分泌パターンの解析により、脳の機能的性差に対する影響を詳細に解析する必要があると考えられた。

②ラットを用いた実験により肝障害下において DBP の雄生殖器への毒性が増強することが判明した。また、葉酸による腎機能抑制状態においても DBP 精巣毒性を著明に増強することが示された。ただし、その増強作用は DBP の最高用量にのみ認められた。

③MEHP の *in vitro*, *in vivo* 試験を行い、MEHP がセルトリ細胞に直接影響を及ぼし、経口投与では 1000 mg/kg/day でラット精巣に影響を及ぼした。

④MEHPによりマウスライディッヒ細胞の細胞内コレステロールエステル量が増加することが明らかになり、コレステロール合成あるいはコレステロールからのステロイドホルモン合成の何れかの段階に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

⑤フタル酸エステルについては主に DEHP 及び DBP の研究で次の毒性発現機構を支持する結果が得られている。妊娠中の曝露による次世代雄生殖器への影響はテストステロンの合成低下による。若齢げっ歯類の雄ではセルトリ細胞への作用の結果、生殖細胞のアポトーシスが起る。なお、マーモセットでは DEHP による精巣毒性の発現が見られないことも確認された。アジピン酸エステルに関しては、DEHA により引き起こされた着床前胚致死以外には明確な生殖毒性は報告されていない。

⑤の引用文献

研究目的の項

小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬明彦, 長谷川隆一 (2000) 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。日本食品化学学会誌, 7, 65-73.

小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬明彦, 黒川雄二, 長谷川隆一 (2001) フタル酸エステルの生殖・発生無毒性量, 精巣毒性の週齢差, 種差および DEHP の 1 日耐容摂取量。日本食品化学学会誌, 8, 1-10.

フタル酸エステルの精巣毒性

Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2001) Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol. Reprod.*, **65**, 1252-1259.

Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA (2000) Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **225**, 105-115.

Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell*, **79**, 679-694.

Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK, Ladefoged O (2001) The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicol. Lett.*, **122**, 69-79.

David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice.

Toxicol. Sci., **58**, 377-385.

David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2001) Reversibility of the chronic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.*, **29**, 430-439.

Dees JH, Gazouli M, Papadopoulos V (2001) Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 171-187.

Gazouli M, Yao ZX, Boujrad N, Corton JC, Culty M, Papadopoulos V (2002) Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: Role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology*, **143**, 2571-2583.

Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH (2002) Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **185**, 119-127.

Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenaka I, Jitsunari F (2000) Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int. J. Androl.*, **23**, 85-94.

Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, Nakano Y, Inoue M (2002) Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem. J.*, **365**, 849-856.

Kobayashi T, Niimi S, Kawanishi T, Fukuoka M, Hayakawa T (2003) Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-*n*-butyl phthalate. *Toxicol. Lett.*, **138**, 215-225.

Kurata Y, Makinodan F, Okada T, Kawasuso T, David R, Gans G, Regnier J, Katoh M (2003) Blood concentration and tissue distribution of ¹⁴C-di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile and adult common marmoset. The 42nd Annual Meeting of Society of Toxicology, # 1865.

O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS (2002) Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol. Sci.*, **69**, 92-108.

Park JD, Habeebu SSM, Klaassen CD (2002) Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, **171**, 105-115.

Richburg JH, Johnson KJ, Schoenfeld HA, Meistrich ML, Dix DJ (2002) Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol. Lett.*, **135**, 167-183.

Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K (2000) Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology*, **141**, 787-793.

Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil. Steril.*, **78**, 1187-1194.

Tomonari Y, Kurata Y, Kawasuso T, David R, Gans G, Tsuchitani M, Katoh M (2003) Testicular toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile common marmoset. The 42nd Annual Meeting of Society of Toxicology, # 1866.

Wellejus A, Dalgaard M, Loft S (2002) Oxidative DNA damage in male wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *J. Toxicol. Environ. Health PT A*, **65**, 813-824.

フタル酸エステルの発生毒性

Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2001) Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol. Reprod.*, **65**, 1252-1259.

Ema M, Miyawaki E (2001a) 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.

Ema M, Miyawaki E (2001b) Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 261-267.

Ema M, Miyawaki E (2002) Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, **16**, 71-76.

Fulcher, SM, Willoughby, CR, Heath, JA, Veenstra, GE, Moore, NP (2001) Developmental toxicity of di-(C(7)-C(9) alkyl) phthalate and di-(C(9)-C(11) alkyl) phthalate in the rat. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 95-102.

Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE (2002) Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ. Health Perspect.*, **110**(Suppl. 3), 435-439.

Imajima T, Shono T, Kai H, Zakaria O, Suita S. (2001) The biological effect of phthalate esters on transabdominal migration of the testis in fetal rats in comparison with the antiandrogen flutamide. *Pediatr. Surg. Int.*, **17**, 164-166.

Iona S, Klinger FG, Sisti R, Ciccalese R, Nunziata A, Defelici M (2002) A comparative study of cytotoxic effects of N-ethyl-N-nitrosourea, adriamycin, and mono-(2-ethylhexyl)phthalate on mouse primordial germ cells. *Cell Biol. Toxicol.*, **18**, 131-145.

Kang KS, Lee YS, Kim HS, Kim SH (2002) Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *J. Toxicol. Environ. Health PT A*, **65**, 447-459.

Kim SH, Kim SS, Kwon O, Sohn KH, Kwack SJ, Choi YW, Han SY, Lee MK, Park KL (2002) Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic limb bud cells; Protection by antioxidants. *J. Toxicol. Environ. Health PT A*, **65**, 461-472.

Li, LH, Jester, WF Jr., Laslett, AL, Orth, JM (2000) A single dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **166**, 222-229.

Marchetti L, Sabbieti MG, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM, Menghi G (2002) Effects of phthalate esters on actin cytoskeleton of Pyl1a rat osteoblasts. *Histol. Histopathol.*, **17**, 1061-1066.

Menghi G, Sabbieti MG, Marchetti L, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM (2001) Phthalate esters influence FGF-2 translocation in Pyl1a rat osteoblasts. *Eur J Morphol*, **39**, 155-162.

Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect.*, **109**, 229-237.

Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PMD (2002) Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(N-butyl) phthalate. *Reprod. Toxicol.*, **16**, 19-28.

Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE (2001) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol. Sci.*, **58**, 339-349.

Piersma AH, Verhoef A, te Biesebeek J, Pieters MN, Slob W (2000) Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design. *Reprod. Toxicol.*, **14**, 417-425.

Rhee GS, Kim SH, Kim SS, Sohn KH, Kwack SJ, Kim BH, Park KL (2002) Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an *in vitro* battery system. *Toxicol. in Vitro*, **16**, 443-448.

Saillenfait AM, Langonne I, Leheup B. (2001) Effects of mono-n-butyl phthalate on the development of rat embryos: *in vivo* and *in vitro* observations. *Pharmacol. Toxicol.*, **89**, 104-112.

Shono, T., Kai, H., Suita, S., Nawata, H., (2000) Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses. *BJU Int.*, **86**, 121-125.

Shultz VD, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2001) Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Sci.*, **64**, 233-242.

Tanaka T (2002) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1499-1506.

Uriu-Adams JY, Kevin Reece C, Nguyen LK, Horvath BJ, Nair R, Barter RA, Keen CL (2001) Effect of butyl benzyl phthalate on reproduction and zinc metabolism. *Toxicology*, **159**, 55-68.

Wellejus A, Dalgaard M, Loft S (2002) Oxidative DNA damage in male wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *J. Toxicol. Environ. Health PT A*, **65**, 813-824.

フタル酸エステルの生殖毒性

Foster, PM, Cattley, RC, Mylchreest, E (2000) Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem. Toxicol.*, **38**, S97-99.

Hushka LJ, Waterman SJ, Keller LH, Trimmer GW, Freeman JJ, Ambroso JL, Nicolich M, McKee RH (2001) Two-generation reproduction studies in Rats fed diisodecyl phthalate. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 153-169.

Tanaka T (2002) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 1499-1506.

フタル酸エステルと卵巣

Funabashi T, Kawaguchi M, Kimura F. (2001) The endocrine disrupters butyl benzyl phthalate and bisphenol A increase the expression of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the preoptic area of adult ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, **74**, 77-81.

Kawaguchi M, Funabashi T, Aiba S, Kimura F (2002) Butyl benzyl phthalate, an endocrine disrupter, inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion under an insulin-induced hypoglycaemic state in ovariectomized rats. *J. Neuroendocrinol.*, **14**, 486-491.

Lovekamp-Swan T, Davis BJ, (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.*, **111**, 139-46.

アジピン酸エステルの生殖・発生毒性

CEFIC (1988a). Di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) fertility study in rats. Unpublished report, CTL Study RR0374.

CEFIC (1988b). Di(2-ethylhexyl) adipate: teratogenicity study in the rat. Unpublished report, CTL Study RR0372.

Singh, A.R., Lawrence, W.H., Autian, J. (1973). Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of adipic acid esters in rats. *J. Pharm. Sci.*, **10**, 1596-1600.

Singh, A.R., Lawrence, W.H., and Autian, J. (1975). Dominant lethal mutations and antifertility effects of di-2-ethylhexyl adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **32**, 566-576.

Lanigan, RS (2001) Final report on the safety assessment of stearamide DIBA-stearate. *Int. J. Toxicol.*, **20 Suppl 3**, 91-97.

NTP (1982) Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl) adipate (CAS No. 103-23-1) in F344 rats and B6C3F1 mice (Feed study). U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Technical Report Series, No.212.

その他の関連情報

ヒトに関連した情報

Brock JW, Caudill SP, Silva MJ, Needham LL, Hilborn ED (2002) Phthalate monoesters levels in the urine of young children. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **68**, 309-314

Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD (2002) Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 515-518.

Koo JW, Parham F, Kohn MC, Masten SA, Brock JW, Needham LL, Portier CJ (2002) The association between biomarker-based exposure estimates for phthalates and demographic factors in a human reference population. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 405-410.

DEHP

Bernal CA, Martinelli MI, Mocchiutti NO (2002) Effect

of the dietary exposure of rat to di(2-ethyl hexyl) phthalate on their metabolic efficiency., *Food Addit. Contam.*, **19**, 1091-1096.

Dalgaard M, Ostergaard G, Lam HR, Hansen EV, Ladefoged O (2000) Toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in combination with acetone in rats. *Pharmacol. Toxicol.*, **86**, 92-100.

Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K. (2002) Elucidation of the toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, putative endocrine disrupters: effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 705-710.

Howarth JA, Price SC, Dobrota M, Kentish PA, Hinton RH (2001) Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol. Lett.*, **121**, 35-43.

IARC (2000) Di(2-ethylhexyl) phthalate. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.*, **77**, 41-148.

Kertai E, Hollosi G, Kovacs J, Varga V (2000) Effect of glycerol-induced acute renal failure and di-2-ethylhexyl phthalate on the enzymes involved in biotransformation of xenobiotics. *Acta Physiol. Hung.*, **87**, 253-265.

Lovekamp TN & Davis BJ (2001) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **172**, 217-224.

Mortensen A, Bertram M, Aarup V, Sorensen IK (2002) Assessment of carcinogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in a short-term assay using Xpa(-/-) and Xpa(-/-)/p53(+/-) mice. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 188-199.

Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. (2001) Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am. J. Ind. Med.*, **39**, 100-111.

斎藤義明, 白見憲司, 渡辺千朗, 永田伴子, 大澤徳子, 吉村慎介, 今井 清, 加藤正信 (2002) Di(2-ethylhexyl) phthalate の胎生期曝露による雄性生殖器への影響. 秦野研究所年報, **25**, 26-30.

DBP

Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M (2001) Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum. Reprod. Update*, **7**, 231-235.

DINP

McKee RH, ElHawari M, Stoltz M, Pallas F, Lington AW (2002) Absorption, disposition and metabolism of

di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *J. Appl. Toxicol.*, **22**, 293-302.

BBP

Long G, Meek ME (2001) Butylbenzylphthalate: hazard characterization and exposure-response analysis. *Environ. Sci. Health C-Envir.*, **19**, 105-123.

DEP

Api AM (2001) Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients. *Food Chem. Toxicol.*, **39**, 97-108.

DHP (dihexyl phthalate)

Howarth JA, Price SC, Dobrota M, Kentish PA, Hinton RH (2001) Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination., *Toxicol. Lett.*, **121**, 35-43.

Adipates

Takahashi T, Tanaka A, Yamaha T (1981) Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in rats. *Toxicology*, **22**, 223-233.

Kluwe WM, Huff JE, Matthews HB, Irwin R, Haseman JK (1985) Comparative chronic toxicities and carcinogenic potentials of 2-ethylhexyl-containing compounds in rats and mice. *Carcinogenesis*, **6**, 1577-1583.

Bergman K, Albanus LSO (1987) Di-(2-ethylhexyl)adipate: absorption, autoradiographic distribution and elimination in mice and rats. *Food Chem. Toxicol.*, **25**, 309-316.

Loftus NJ, Laird WJ, Steel GT, Wilks MF, Woollen BH (1993) Metabolism and pharmacokinetics of deuterium-labelled di-2-(ethylhexyl) adipate (DEHA) in humans. *Food Chem. Toxicol.*, **31**, 609-614.

BUA (1996) Di-(2-ethylhexyl)adipate (BUA Report 196 by the GDCh-Advisory Committee on Existing Chemicals of Environmental Relevance (BUA)), Stuttgart, S. Hirzel.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues. In: *Methods Enzymol*, M. Conn (ed.) Academic Press (New York). Vol. 356, pp. 114-125, 2002