

Fig. 5. Correlation analysis of gene expression data between unfixed-frozen tissue and methacarn-fixed PET

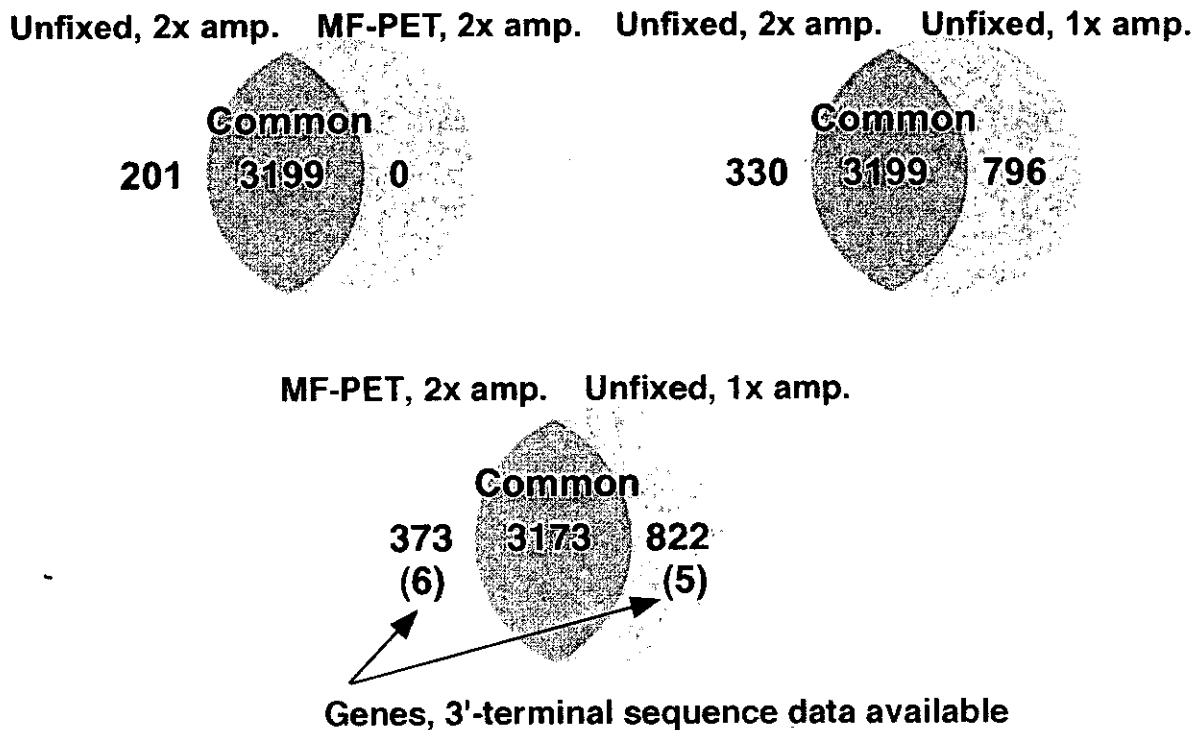


Fig. 6. Gene populations showing presence call in each preparation

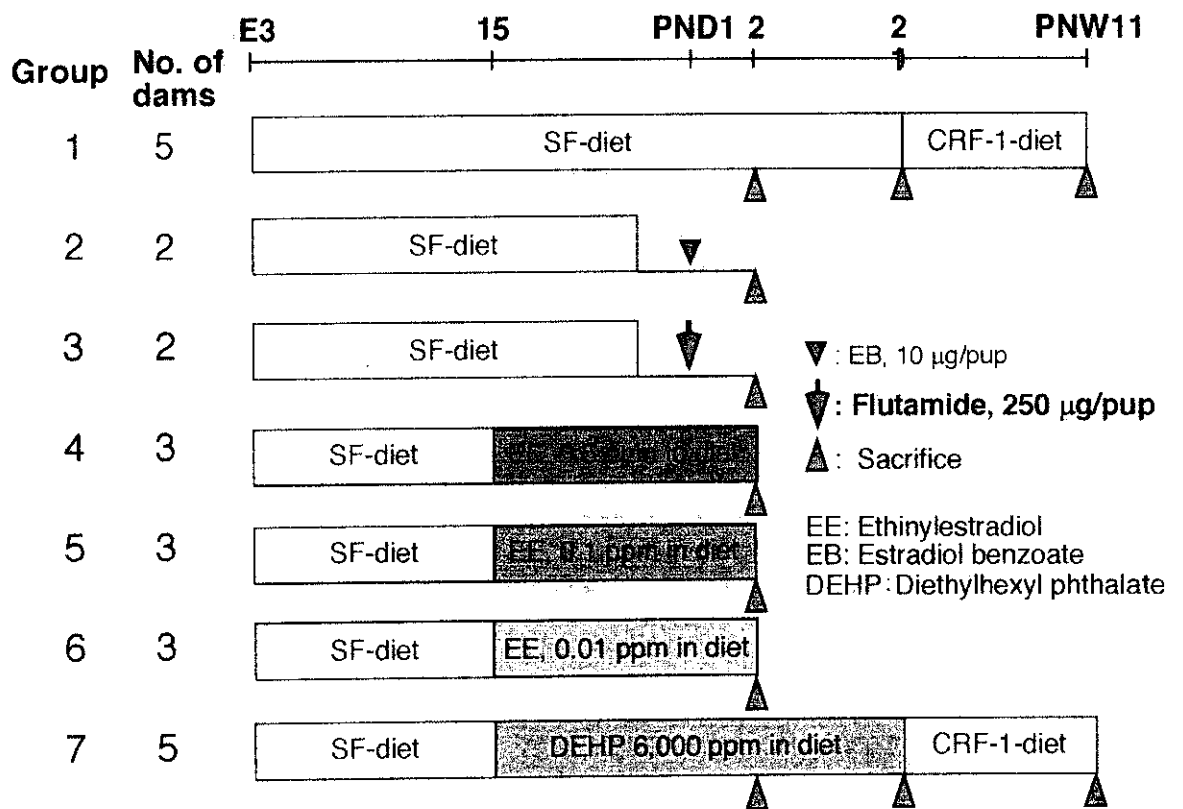


Fig. 7. Animal study for global gene expression analysis in the microdissected medial preoptic area

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—
分担研究報告書（平成14年度）

性行動に対する影響評価研究
—脳の性分化障害に関する研究—

分担研究者 西原 真杉 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨：本研究は、周生期におけるフタル酸／アジピン酸エステル類の暴露が脳の性分化へどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的としたものである。具体的には、妊娠・哺乳期の母ラットにフタル酸／アジピン酸エステル類を経口的に摂取させ、新生ラットの視床下部における性分化関連遺伝子の発現および性成熟後の生殖内分泌系や性行動への影響を解析していく予定である。本年度においては、実験条件を確立するための予備的な研究を行うとともに、新生仔の視床下部における性分化関連遺伝子の発現に対する di-n-butyl phthalate (DBP) の影響を検討した。SD 系雌ラットに妊娠 15 日目から DBP を 20、200、2000、10000 ppm 含む餌を与え、生後 3 日齢の新生ラット視床下部を摘出し、性分化関連遺伝子として granulin (grn) および p130 遺伝子の発現を解析するとともに、estradiol (E2) および testosterone (T) の血中濃度を測定した。その結果、grn と p130 の遺伝子発現は雌雄ともに全ての用量の DBP により低下していたが、明確な用量反応性は認められなかった。血中の性ステロイドレベルは、低用量の DBP 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。以上の結果より、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。今後、生後 7 日齢の新生ラット視床下部における遺伝子の発現を解析するとともに、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フタル酸／アジピン酸エステル類の影響を総合的に評価していく予定である。

A. 研究目的

成熟した哺乳動物に見られる性行動の発現パターンや性腺刺激ホルモンの分泌パターンなどの雄雌差は、脳の機能的・形態的な雌雄差に基づいて発現する。このような脳の性分化は、発生過程の特定の時期（臨界期）に脳がアンドロジェンに暴露されることにより起こる。例えば、ラットの場合、出生後数日の特定の時期に精巣から分泌されるアンドロジェンが脳内で芳香化酵素によりエストロジェンへと代謝され、未分化な脳に作用して雄型に分化誘導すると考えられている。本研究は、母体がフタル酸／アジピン酸エステル類を摂取した場合、新生仔の脳の性分化の過程や、性成熟後の性行動などにどのよ

うな影響を与えるかを解明すること目的としている。

平成 14 年度では、di-n-butyl phthalate (DBP) を段階的な濃度で妊娠・哺乳ラットに混餌摂取させ、新生仔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を解析した。

B. 研究方法

実験には SD 系ラットを用いた。妊娠 15 日目から phytoestrogen を含まないの粉末飼料 (SAF) に DBP を 20、200、2000、10000 ppm となるように混和した餌を与えた。また、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 μ g、

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) および testosterone (T) の血中濃度を ELISA 法により測定した。なお、これらの研究を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

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、10000 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。

生後 3 日齢の雌雄ラットの視床下部における grn 遺伝子の発現を図 1 に示した。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 grn 遺伝子の発現は EB によっては変化しなかったが、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 grn 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 の影響を図 2 に示した。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、grn 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。

生後 3 日齢の雌雄ラットの血中 T および E2 の濃度を、それぞれ図 3 および 4 に示した。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。

D. 考察

我々は、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 grn 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 grn 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 は精巢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、精巢からの 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 grn 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フタル酸/アジピン酸エステル類の影響を総合的に評価していく予定である。

E. 結論

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、脳の性分化に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。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yonehara K, Suzuki M, Nishihara M. Sex-related differences in gene expression in neonatal rat hypothalamus assessed by cDNA microarray analysis. *Endocrine J* 49, 131-137, 2002.
- 2) Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M. Androgen induces p130 mRNA expression in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 334, 107-110, 2002.

2. 学会発表

- 1) Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Effect of perinatal exposure to environmental endocrine disrupting chemicals on sexual behaviors and serum hormone levels in rats. 5th International Congress of Neuroendocrinology. Bristol, UK, August, 2002.
- 2) Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Perinatal exposure of female rats to environmental endocrine disrupting chemicals interferes with lordosis behavior and LH surge on the proestrous day in adulthood. 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. Orland, USA, November, 2002.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

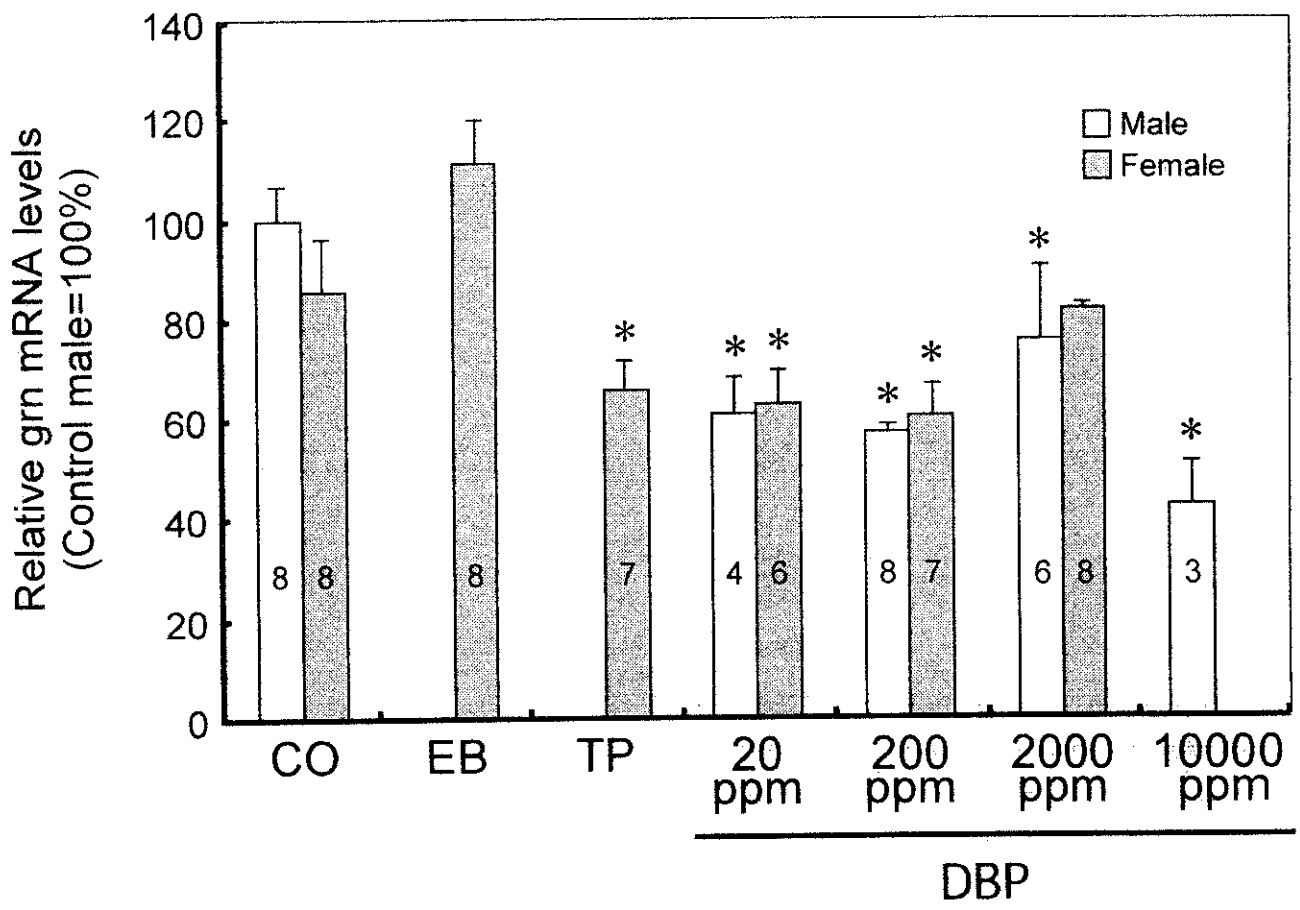


図1. 視床下部 granulin (grn) 遺伝子発現に対する性ステロイドおよび DBP の影響.

* : $p < 0.05$ vs. CO

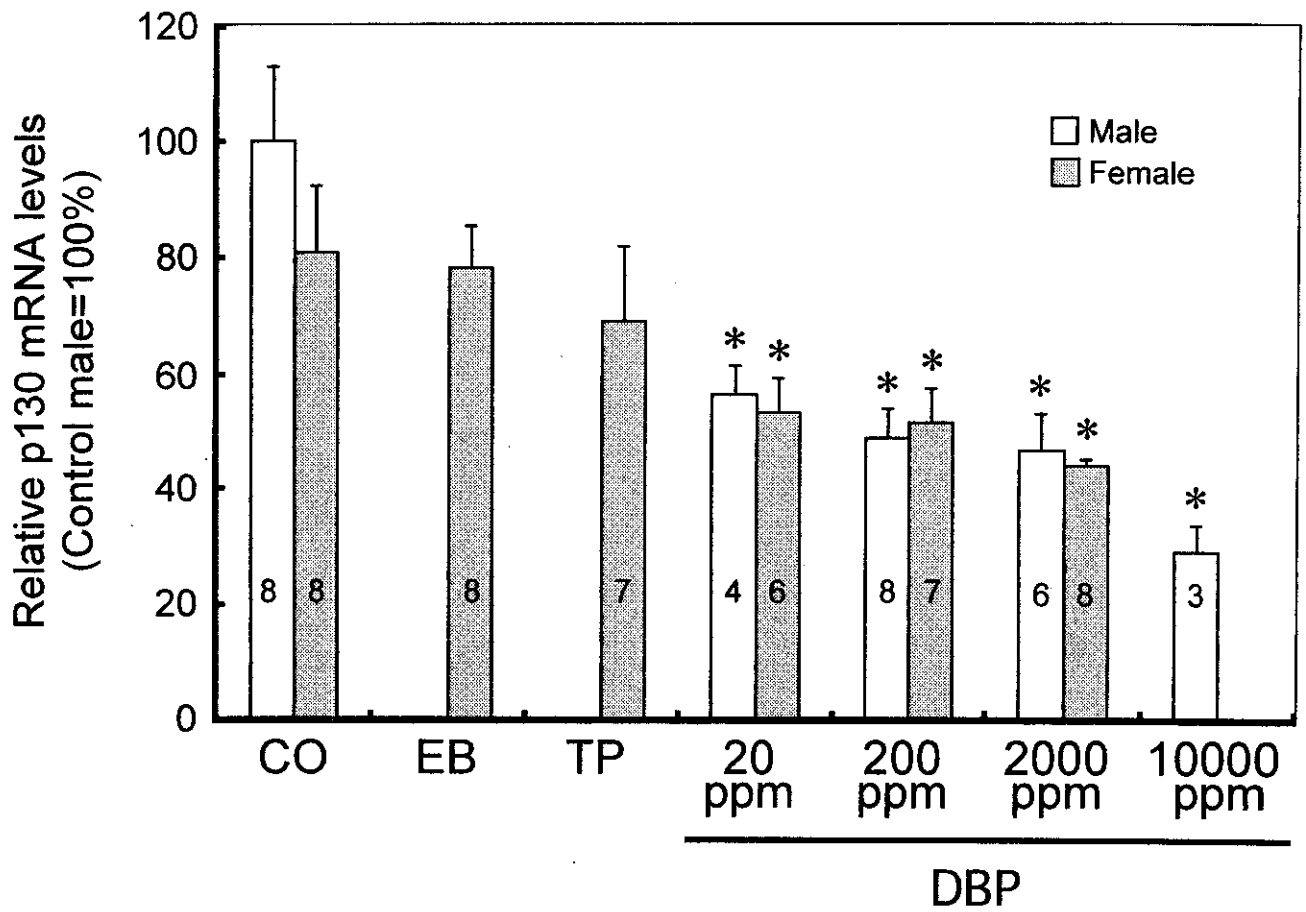


図2. 視床下部p130遺伝子発現に対する性ステロイドおよびDBPの影響.
* : $p < 0.05$ vs. CO

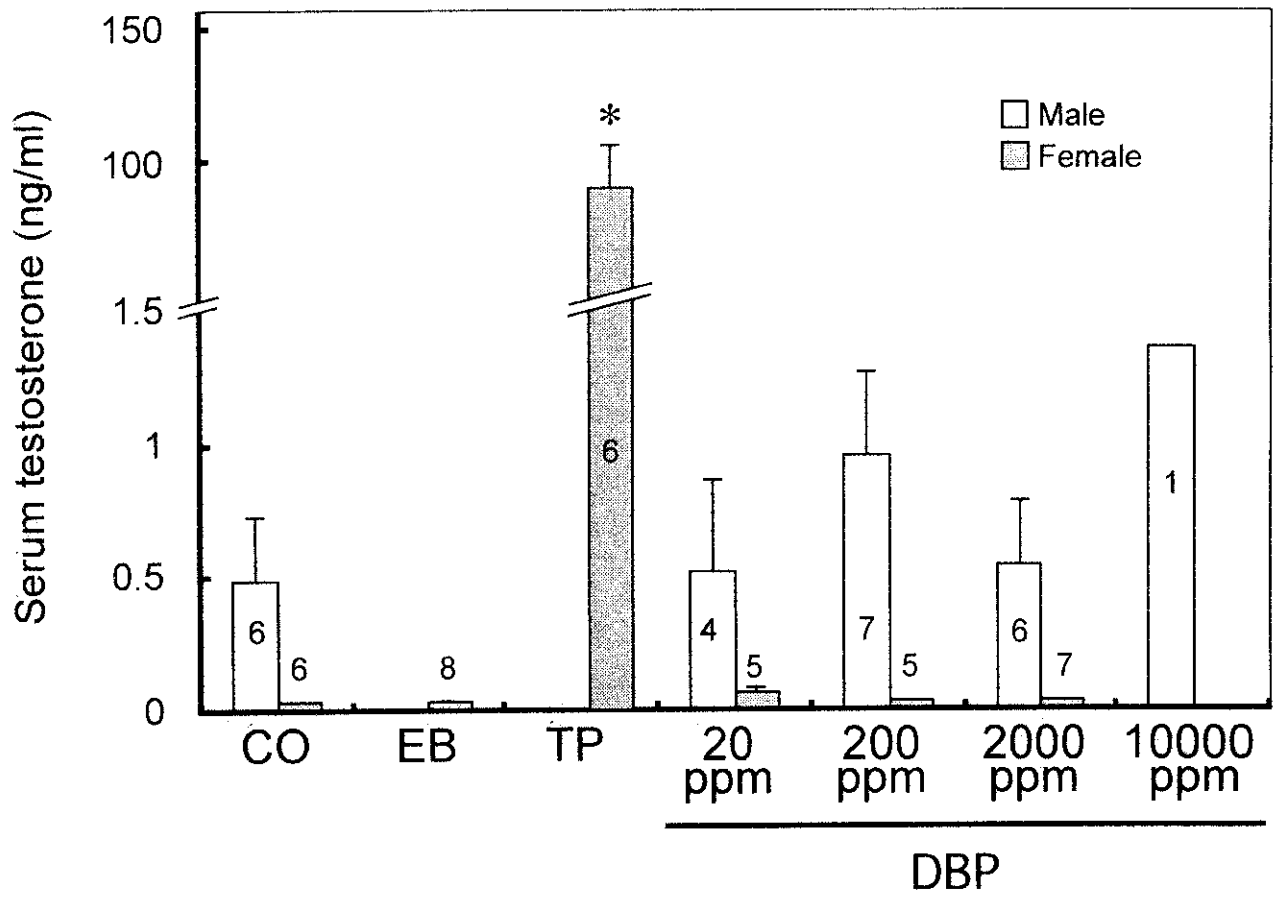


図3. 血清中testosterone濃度に対する性ステロイドおよびDBPの影響.
 * : p<0.05 vs. CO

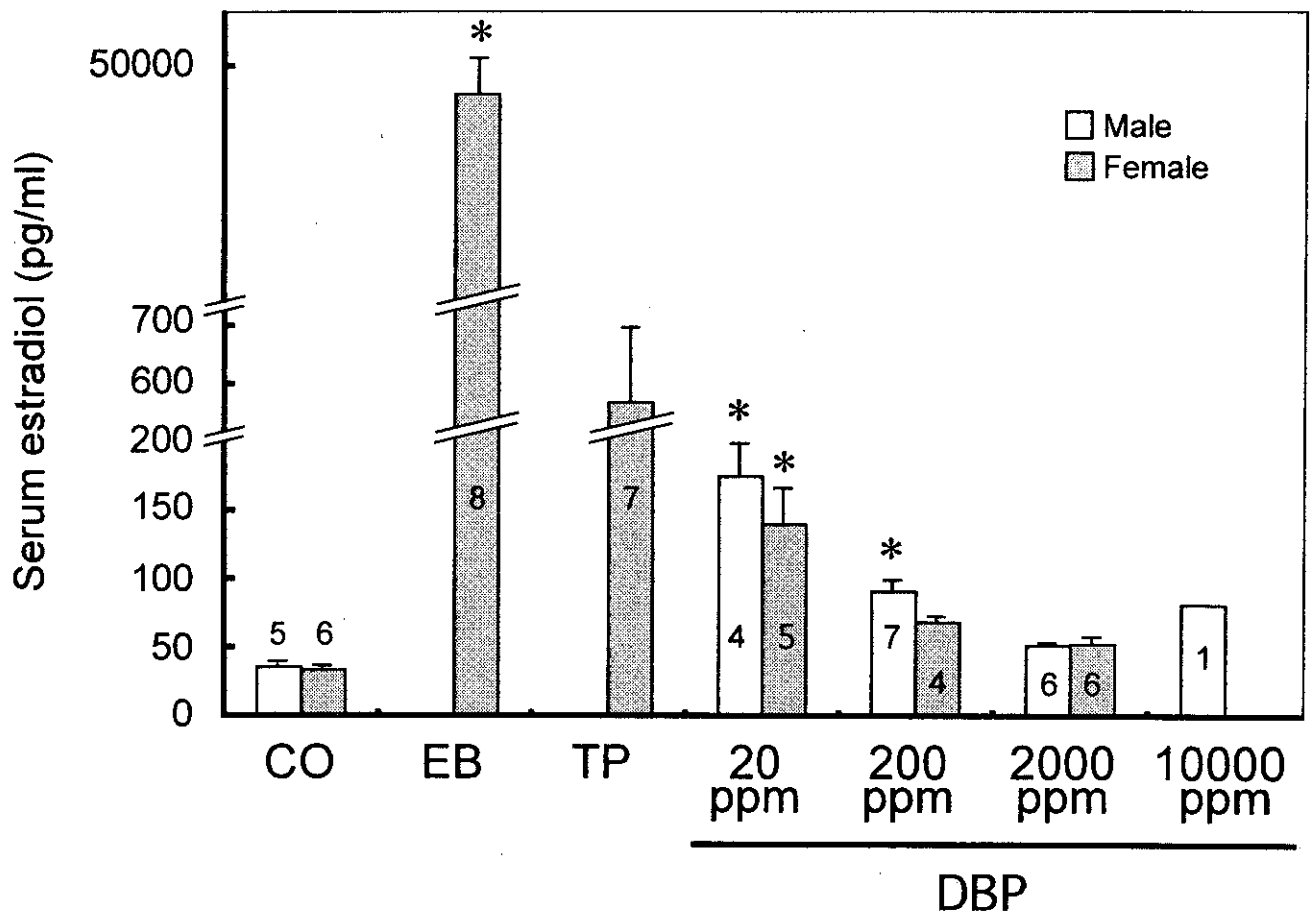


図4. 血清中estradiol濃度に対する性ステロイドおよびDBPの影響.
 * : p<0.05 vs. CO

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）
分担研究報告書（平成14年度）

肝基礎疾患による修飾作用

分担研究者 福島 昭治 大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学講座 教授

研究要旨：Thioacetamide(TAA)投与により雄性 F344 ラットに肝障害を誘発した。肝障害非誘発動物では dibutylphthalate(DBP)による雄性生殖器毒性所見として精子奇形率のみで認められたが、肝障害誘発動物では DBP 高用量投与群で精子数や精子運動率、精巣、精巣上体の相対臓器重量と組織学的検索でその毒性を認めた。よって肝障害下では DBP の雄生殖器毒性が増強することが判明した。

A. 研究目的

フタル酸/アジピン酸エステル類の高濃度曝露が近年問題となっており、その精巣毒性、生殖・発生毒性が現在、懸念されている。フタル酸エステルは腓リパーゼによってモノエステル体に加水分解され、さらに肝臓での酸化を受けた後、尿中に排泄されることが知られている。この物質の雄性生殖機能への毒性に及ぼす肝障害による修飾作用については未だよくわかっていない。今回、肝障害を誘発した雄性 F344 ラットにおいて、DBP の雄性生殖器への毒性作用の増強について検討した。

B. 研究方法

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 bw を PBS 0.3 ml に混じて週 3 回腹腔内投与を行い肝障害を誘導した (Fig. 1)。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 bw, 第 2, 6 群には 125 mg/kg bw, 第 3, 7 群には 31.25 mg/kg bw 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。

(倫理面への配慮)

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医学研究科動物飼育規約を順守した。

C. 研究結果

TAA 処置群において AST, ALT の有意な上昇を認め (Table 1), 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 Glisson 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 (Fig. 2), 体重増加抑制を認めた (Fig. 3)。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発した各群では有意な増加を認めた (Table 2, 3)。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 (Table 2)。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 (Table 4)。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 (Table 4)。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 (Table 4)。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廃像、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(Table 5)。腎臓、前立腺および精嚢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。

D. 考察

今回の動物実験モデルにおいて適切な肝障害を誘発し得たと考えた。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 bw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。また精液1 mlあたりの精子数や精子奇形率、前立腺各葉、精嚢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える。

E. 結論

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。

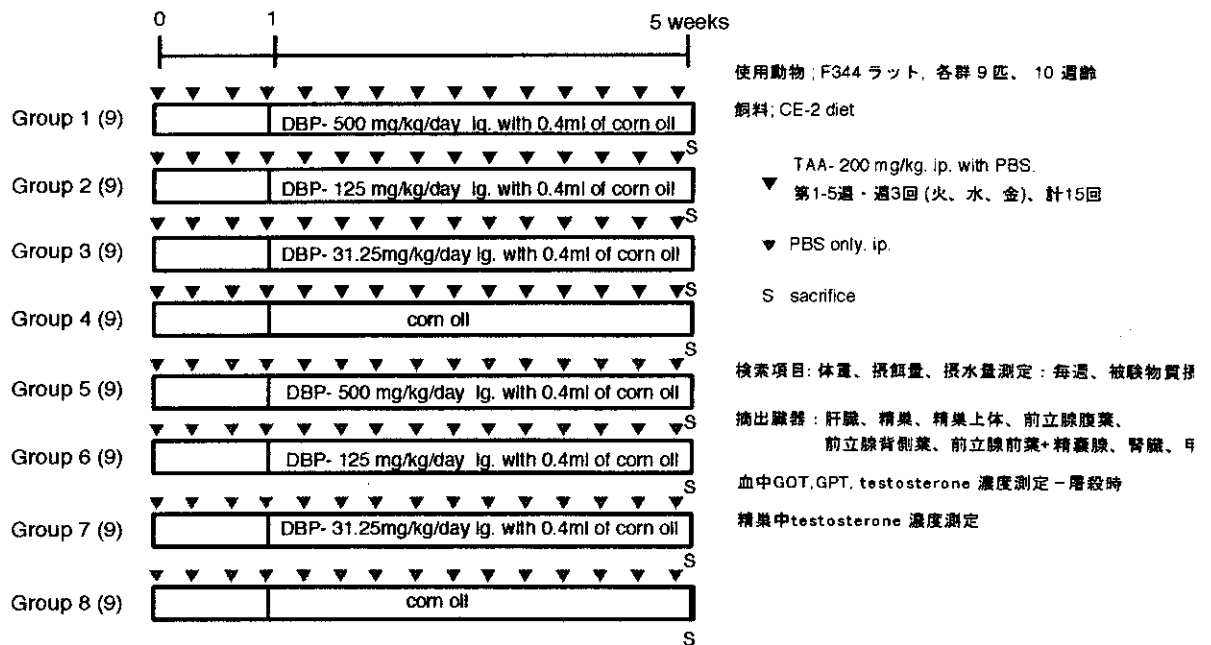
F. 研究発表

1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

G. 知的所有権の取得状況

特になし。



本実験プロトコール

Fig.1

Table 1

屠殺時の血清中肝逸脱酵素レベル検査結果

	処置		有効匹数	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
	TAA	DBP			
第1群	+	500 mg/kg/day ig	9	259 ^a	136 ^{a*}
第2群	+	125 mg/kg/day ig	7	191 ^a	90.4 ^a
第3群	+	31.25 mg/kg/day ig	7	132 ^a	64.4 ^a
第4群	+	corn oil only	9	192 ^a	88.4 ^a
TAA処置群全体			32	197 ^a	97.1 ^a
第5群	—	500 mg/kg/day ig	8	83.8	41.4
第6群	—	125 mg/kg/day ig	9	74.8	41.6
第7群	—	31.25 mg/kg/day ig	9	76.9	47.3
第8群	—	corn oil only	9	83.6	45
TAA非処置群全体			35	79.6	43.9

値; 平均 * ; group 4に対して有意差有り。(p< 0.05)、a ; 各TAA非投与群に対して有意差有り。(p< 0.01)

Table 2

本実験-最終体重、相対臓器重量

	処置		有効匹数	最終体重 (g)	相対臓器重量(%)			
	TAA	DBP			肝臓	腎臓	精巣	精巣上体
第1群	+	500 mg/kg/day ig	9	206.3 ^a	4.97	0.85 ^a	0.39 ^{a*}	0.18 ^{a*}
第2群	+	125 mg/kg/day ig	9	210.5 ^a	4.77 ^a	0.82 ^a	1.06	0.28
第3群	+	31.25 mg/kg/day ig	9	207.1 ^a	5.03 ^a	0.83 ^a	1.11 ^a	0.3
第4群	+	corn oil only	9	206.2 ^a	4.85 ^a	0.82 ^a	1.07	0.28
第5群	—	500 mg/kg/day ig	9	269.7 ^{**}	4.4 ^{**}	0.71 ^{**}	1	0.3
第6群	—	125 mg/kg/day ig	9	278.2	3.72 ^{**}	0.66 ^{**}	0.99	0.29
第7群	—	31.25 mg/kg/day ig	9	276.2	3.5	0.64	1.05	0.31
第8群	—	corn oil only	9	284.8	3.33	0.63	1.02	0.3

値 ; 平均 * ; group 4に対して有意差有り。(p< 0.05)、a ; 各TAA非投与群に対して有意差有り。(p< 0.01)
** : group 8に対して有意差有り。(p< 0.05)

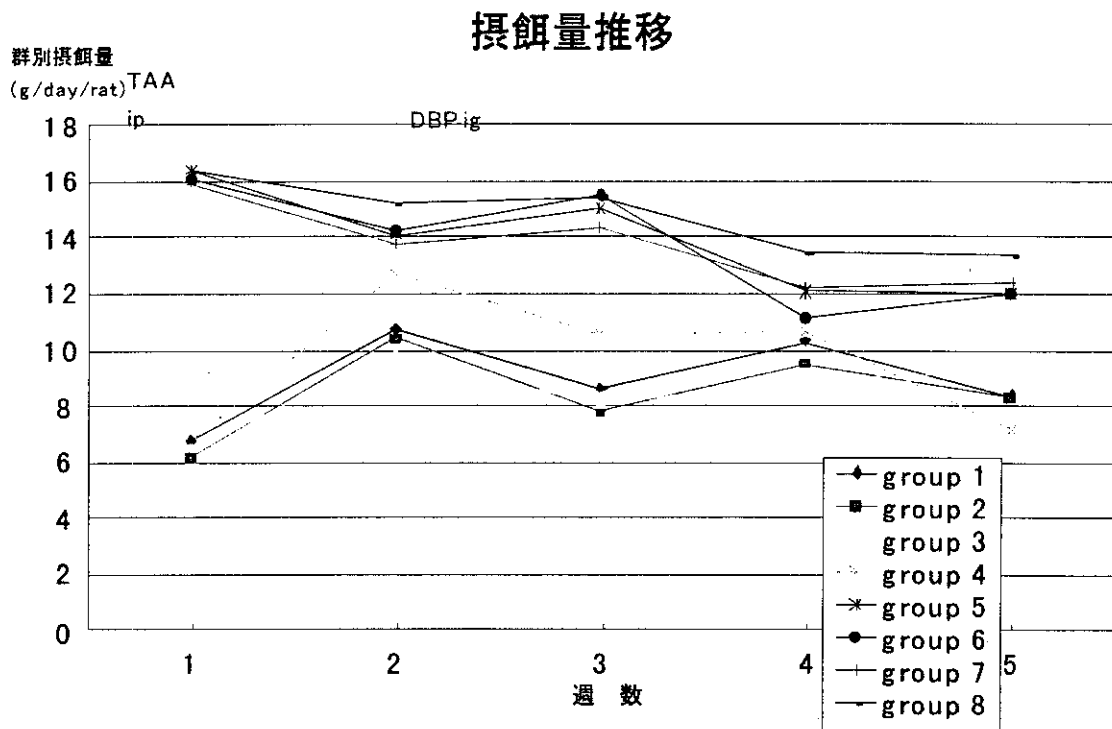


Fig. 2

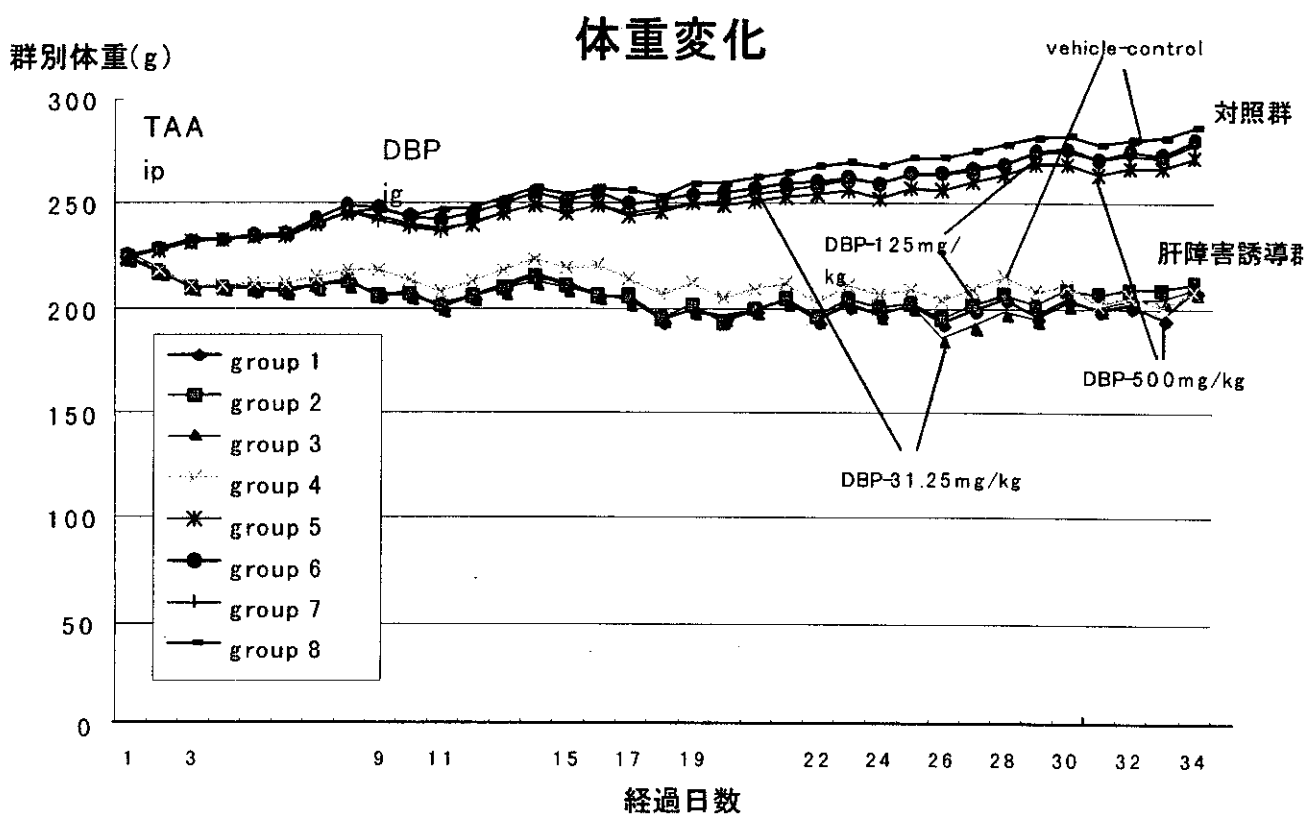


Fig. 3

Table 3

前立腺各葉および精囊腺の相対重量

	処置		有効匹数	相対前立腺重量(%)		
	TAA	DBP		腹葉	背側葉	前葉+精囊腺
第1群	+	500 mg/kg/day ig	6	0.06 ^a	0.04 ^b	0.06 ^a
第2群	+	125 mg/kg/day ig	9	0.06 ^a	0.07 ^a	0.07 ^a
第3群	+	31.25 mg/kg/day ig	9	0.06 ^a	0.05 ^a	0.07 ^a
第4群	+	corn oil only	8	0.08 ^a	0.06 ^b	0.07 ^a
第5群	-	500 mg/kg/day ig	8	0.14	0.09	0.28
第6群	-	125 mg/kg/day ig	9	0.15	0.11	0.29
第7群	-	31.25 mg/kg/day ig	9	0.14	0.11	0.29
第8群	-	corn oil only	9	0.15	0.11	0.31

値: 平均 a; 各TAA非投与群に対して有意差有り。(p<0.01)

b; 各TAA非投与群に対して有意差有り。(p<0.05)

Table 4

精子検査結果 (屠殺時測定)

	処置		有効匹数	精子運動率 (%)	精液1ml中の精子頭部数(x10 ⁴)	精子奇形率 (%)
	TAA	DBP				
第1群	+	500 mg/kg/day ig	6	2.9 ^{a*}	45 ^{a*}	23.2
第2群	+	125 mg/kg/day ig	6	57.6	1083 ^a	30 ^a
第3群	+	31.25 mg/kg/day ig	6	75.4	1245 ^a	20.9 ^a
第4群	+	corn oil only	6	78.5	1452 ^a	29.1 ^a
第5群	-	500 mg/kg/day ig	6	82.4	2748	17.7 ^{**}
第6群	-	125 mg/kg/day ig	6	85.1	2067 ^{**}	16.4 ^{**}
第7群	-	31.25 mg/kg/day ig	6	86.1	3093	9.33 ^{**}
第8群	-	corn oil only	6	74.2	3172	2.42

値: 平均 *; group 4に対して有意差有り。(p<0.05)、a; 各TAA非投与群に対して有意差有り。(p<0.01)

** ; group 8に対して有意差有り。(p<0.05)

Table 5

血清中および精巢中テストステロンレベル検査結果

	処置		血清中テストステロン		精巢中テストステロン	
	TAA	DBP	有効匹数	(ng/ml)	有効匹数	(ng/ml)
第1群	+	500 mg/kg/day ig	9	0.74	5	22.8
第2群	+	125 mg/kg/day ig	7	1.29 [*]	5	42.7
第3群	+	31.25 mg/kg/day ig	7	1.62	4	37.1
第4群	+	corn oil only	9	1.09	5	13.5
TAA処置群全体			32	1.24	24	29.3
第5群	-	500 mg/kg/day ig	8	1.71	5	29.1
第6群	-	125 mg/kg/day ig	9	3.16	5	24.9
第7群	-	31.25 mg/kg/day ig	9	1.61	5	24.9
第8群	-	corn oil only	9	1.36	5	11.7
TAA非処置群全体			35	1.96	25	22.4

値: 平均 *; group 4に対して有意差有り。(p<0.05)

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）

分担研究報告書

腎基礎疾患による修飾作用

分担研究者 白井智之 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 教授

研究要旨 F344 雄5週令ラットに葉酸を 300 mg/kg にて週一回計5回皮下投与したあと di-N-butylphthalate (DBP)を 0, 1200, 5000, 20000 ppm で飼料に混じて4週間連続投与する全経過9週の実験を行った。対照群として、葉酸の代わりに溶媒のみを投与し、そのあと同様に DBP を4用量で投与する群も設けた。その結果、20000 ppm DBP を葉酸投与後に投与した群では精巣重量が著明に減少し、精細管の萎縮や荒廃あるいは精子母細胞や精子細胞の消失がみとめられ、同時に精巣上体腺腔内には変性した脱落細胞屑が多く混入していた。精巣上体内の精子数や精子運動能は明らかに低下していた。これらの変化は葉酸を投与していない群では軽微であり、葉酸投与による腎障害がDBPの雄性生殖器障害を増強することが明らかとなった。

A. 研究目的

ほとんどの個体を用いた毒性発現の研究は正常の動物を用い、リスクの同定およびリスク評価を行い、毒性の特徴、強度をもとにNOELやNOAELなどが決定されている。ヒトにおけるリスクを評価する場合、幼少期、若齢期など年齢要因は良く検討されている課題であるが、病的状態での評価はほとんどされていない。内分泌かく乱作用におけるリスク評価において腎臓や肝臓機能の低下状態での検討は重要であるが、これまではっきりと行われてきていない。本研究では内分泌かく乱作用物質の雄性生殖器に対する毒性が、腎機能が低下した状態で

如何に修飾を受けるかについてラットを用いて追究することを目的としている。

B. 研究方法

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群には腎障害の形成を目的に葉酸（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（図1）。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 di-n-butyl phthalate(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

混じて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、摂餌料を毎週計測し、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。

(倫理面への配慮)

動物実験については、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮して行った。

C. 研究結果

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係わらず、体重の減少と増加抑制が観察された(図2、表1)。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があることが確認された(図3)。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(表2)、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(表3)。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みとめた(表4)。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(表5)。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(図4、5)。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(図6)。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(図4)。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(表6)、DBP20,000 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。

D. 考察

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、徐々に快復する傾向にあることが、葉酸投与終了直後と4週間たったあとで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。

E. 結論

葉酸による腎機能抑制状態は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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Futakuchi, M., Hirose, M., Imaida, K., Takahashi, S., Ogawa, K., Asamoto, M., Miki, T.,

T., S.: Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis*, 23(2): 283-287, 2002.

Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Shirai, T.: Effects of genetic background on prostate and taste bud carcinogenesis due to SV40 T antigen expression under probasin gene promoter control. *Carcinogenesis*, 23(3): 463-467, 2002.

Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ. Mol. Mutagen.*, 39: 271-278, 2002.

Futakuchi, M., Cheng, J. L., Hirose, M., Kimoto, N., Cho, Y.-M., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Shirai, T.: Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Cancer Lett.*, 178: 131-139, 2002.

Takahashi, S., Inaguma, S., Cho, Y.-M., Imaida, K., Wang, J., Fujiwara, O., Shirai, T.: Lack of mutation induction with exposure to 1.5 GHz electromagnetic near fields used for cellular phones in brains of big blue mice. *Cancer Res.*, 62: 1956-1960, 2002.

- Takahashi, S., Inaguma, S., Sakakibara, M., Cho, Y.-M., Suzuki, S., Ikeda, Y., Cui, L., Shirai, T.: DNA methylation in the androgen receptor gene promoter region in rat prostate cancer. *The Prostates*, 52: 82-88, 2002.
- Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Shirai, T.: A transgenic rat model of prostate carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.*, 15: 191-196, 2002.
- Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Konishi, Y., Tsuda, H., Uehara, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F., Wakabayashi, K., Totsuka, Y.: Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or *N*-Nitrosodiethylamine. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1076-1082, 2002.
- Futakuchi, M., Ogawa, K., Sano, M., Tamano, S., Takeshita, F., Shirai, T.: Suppression of lung metastasis by aspirin but not indomethacin in an *in vivo* model of chemically induced hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93: 1175-1181, 2002.
- Shirai, T., Kato, K., Futakuchi, M., Takahashi, S., Suzuki, S., Imaida, K., Asamoto, M.: Organ differences in the enhancing potential of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on carcinogenicity in the prostate, colon and pancreas. *Mutation Res.*, 506-507: 129-136, 2002.
- Suzuki, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Inaguma, S., Ogiso, T., Hirose, M., Shirai, T.: Lack of modification of 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced hepatocarcinogenesis in rats by fenbendazole - a CYP1A2 inducer. *Cancer Lett.*, 185: 39-45, 2002.
- Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N., Shirai, T.: Age dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats : Lack of influence of carcinogen or testosterone treatment., *Cancer Sci.*, 94(2):153-157, 2003.
- Ito, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Shirai, T.: Regulation of cell proliferation by induction of p21/WAF1 in rat bladder carcinoma cells using the Cre-loxP system., *Cancer Sci.*, inpress.
- Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine., *Cancer Lett.*, inpress.

2. 学会発表

竹下文隆、今井田克己、二口充、小川久美子、鈴木周五、白井智之、4-Nonylphenol 投与によるラット再生尿細管の増加、第 19 回日本毒性病理学会、東京、2003 年 1 月 23、

24 日。(第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集、p.65)

稲熊真悟、今井田克己、鈴木周五、二口充、加藤浩司、竹下文隆、朝元誠人、白井智之、前立腺発がんに関与する 4-nonylphenol の影響、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月 1-3 日。(日本癌学会総会記事 P.359)

竹下文隆、今井田克己、小川久美子、稲熊真悟、曹永暉、加藤浩司、白井智之、DMAB ラット前立腺発がんに対する Nonylphenol と Genistein の影響、第 61 回日本癌学会総会、東京、2002 年 10 月 1-3 日。(日本癌学会総会記事 P.359)

今井則夫、玉野静光、市原敏夫、今井田克己、白井智之、内分泌攪乱作用の疑われている Nonylphenol によるラット肝発がん修飾作用および生殖器の形態学的変化、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1 月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、p. 44)

堤友子、吉野裕子、河部真弓、今井則夫、白井智之、出生児の性成熟期での内分泌攪乱物質 (Nonylphenol) の経胎盤あるいは授乳曝露による影響、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1 月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、p. 44)

竹下文隆、小川久美子、今井田克己、二口充、白井智之、DMAB ラット前立腺発がんに対する Nonylphenol と Genistein の影響、第 18 回日本毒性病理学会、東京、2002 年 1

月 24、25 日。(第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集、p. 93)

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし