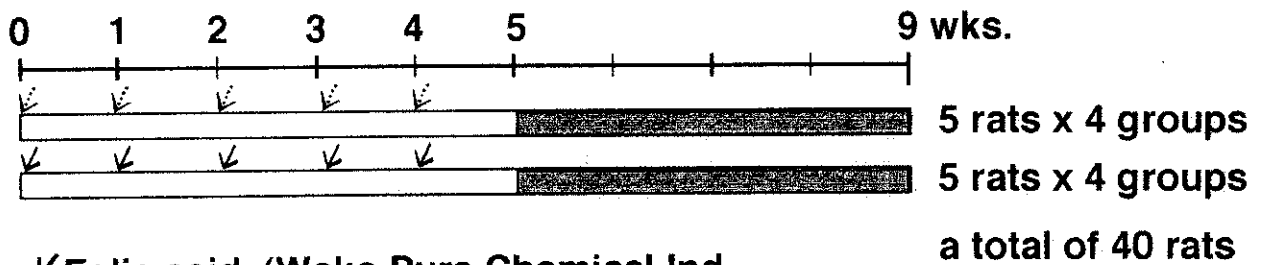


実験計画



↙ Folic acid (Wako Pure Chemical Ind. Co)
300 mg / kg sc once a week (0.3 M NaHCO₃)

↙ Vehicle

Animals: male F344 rats 6 weeks-old

■ di-n-butyl phthalate (DBP)
20,000 ppm in diet
5,000 ppm
1,200 ppm
0 ppm

図 1 .

体重推移

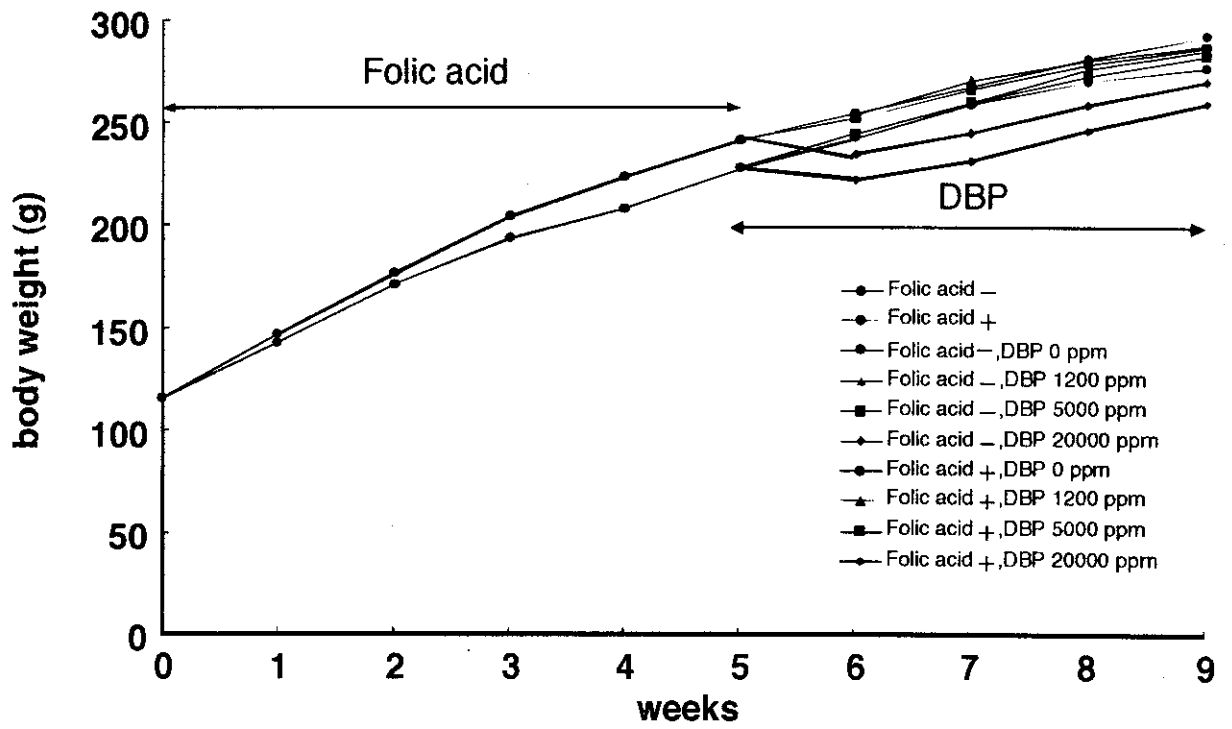


図 2.

表 1.

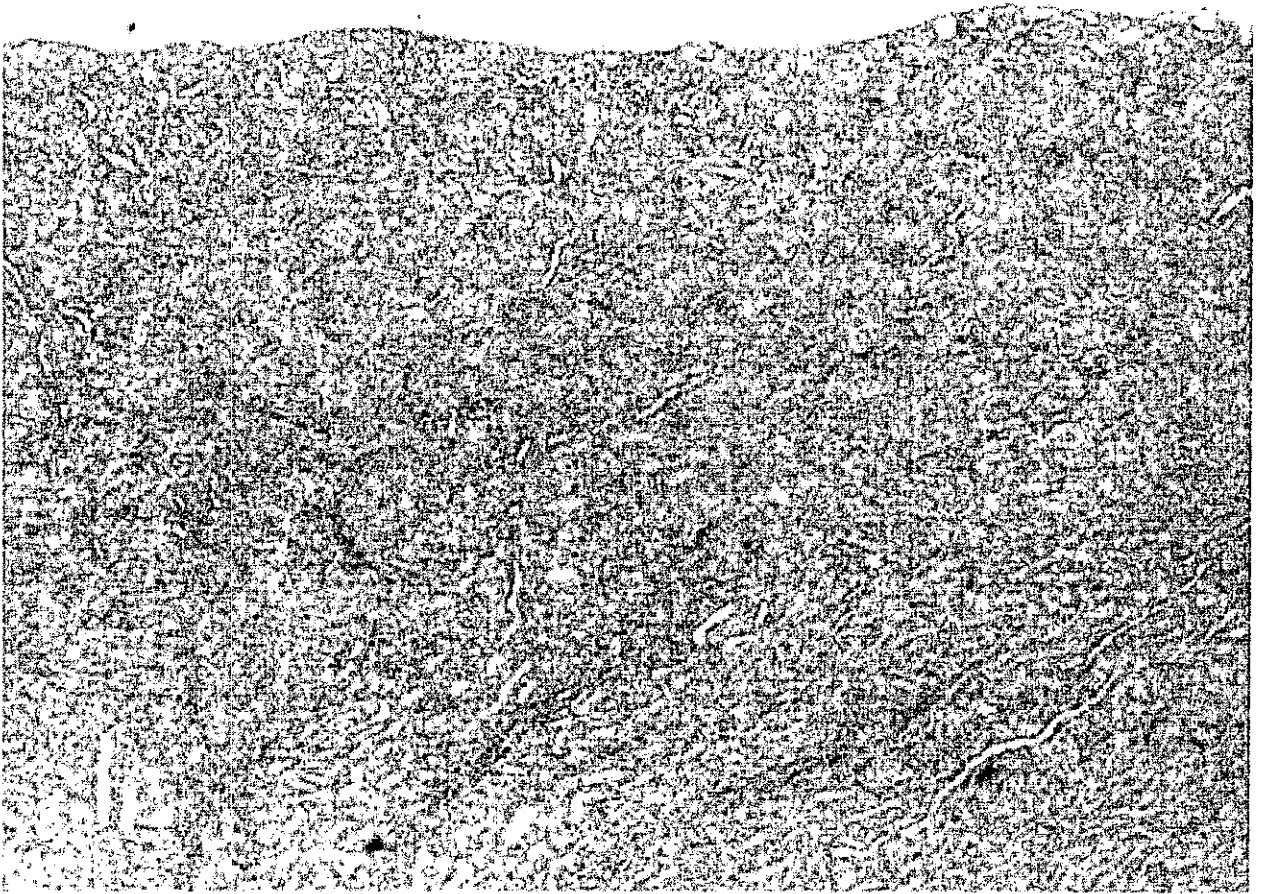
最終体重および肝、腎の相対重量

Group No.	Folic acid	DBP (ppm)	Final B.W. (g)	Liver	Kidneys
1	—	0	275.6 ± 11.8	2.5 ± 0.1	0.65 ± 0.04
2	—	1200	274.0 ± 5.0	2.5 ± 0.1	0.65 ± 0.01
3	—	5000	271.6 ± 10.7	2.8 ± 0.1*	0.68 ± 0.01
4	—	20000	256.6 ± 10.5*	3.7 ± 0.7*	0.72 ± 0.02**
5	+	0	263.4 ± 12.5	2.5 ± 0.1	0.71 ± 0.02##
6	+	1200	272.6 ± 6.9	2.5 ± 0.1	0.70 ± 0.02##
7	+	5000	265.4 ± 17.8	2.9 ± 0.1**	0.75 ± 0.03*, ##
8	+	20000	245.2 ± 12.2*	4.0 ± 0.2**	0.78 ± 0.03**, ##

*,** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

: Significantly different from the corresponding control groups without folic acid at P< 0.01.

No. of rat in each group is 5.



葉酸投与後 4 週の腎障害

図 3.

表 2.

尿の性状

No. of rat in each group is 5.

Group No.	Folic acid	DBP (ppm)	Urine volume (In grams)	pH	Specific gravity	Osmolality (oSm/kg)
1	—	0	3.36 ± 1.13	6.90 ± 0.22	1.0716 ± 0.0059	2.3382 ± 0.1821
2	—	1200	2.94 ± 0.62	7.40 ± 0.42*	1.0704 ± 0.0037	2.2650 ± 0.1325
3	—	5000	2.12 ± 0.49	7.40 ± 0.65	1.0690 ± 0.0060	2.2392 ± 0.1789
4	—	20000	1.92 ± 0.41*	6.40 ± 0.42*	0.0826 ± 0.0019**	2.3892 ± 0.0258
5	+	0	3.29 ± 0.69	7.17 ± 0.39	1.0554 ± 0.0067##	1.8426 ± 0.2469##
6	+	1200	3.34 ± 0.31	7.50 ± 0.30	1.0444 ± 0.0087##	1.4720 ± 0.3048##
7	+	5000	3.64 ± 0.43	7.01 ± 0.32	1.0508 ± 0.0076##	1.6634 ± 0.2573##
8	+	20000	2.90 ± 0.60	6.96 ± 0.35#	1.0644 ± 0.0083##	1.8252 ± 0.2187##

*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively

#, ##: P<0.05, 0.01 from the corresponding controls without folic acid

表 3.

血中の尿素窒素および血中と尿中のクレアチニン値

Group No.	Folic acid	DBP Level (ppm)	Serum		Urine
			BUN (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)	Creatinine (mg/dl)
1	—	0	21.90 ± 2.29	0.50 ± 0.07	144.08 ± 22.73
2	—	1200	23.06 ± 1.25	0.50 ± 0.00	165.36 ± 14.25
3	—	5000	22.06 ± 1.69	0.52 ± 0.04	150.80 ± 18.88
4	—	20000	21.32 ± 1.19	0.54 ± 0.05	125.68 ± 21.47
5	+	0	29.94 ± 2.61##	0.58 ± 0.04	116.80 ± 23.59
6	+	1200	28.16 ± 4.30	0.56 ± 0.05	98.08 ± 18.83 ##
7	+	5000	28.80 ± 2.43##	0.52 ± 0.04*	100.48 ± 18.11 ##
8	+	20000	26.58 ± 3.13##	0.56 ± 0.05	101.84 ± 20.81

* : Significantly different from control group at P<0.05.

: Significantly different from control group (group 1 vs 5) at P<0.01.

: Significantly different from control group (group 2 vs 6) at P<0.01.

: Significantly different from control group (group 3 vs 7) at P<0.01.

: Significantly different from control group (group 4 vs 8) at P<0.01.

No. of rat in each group is 5.

表 4.

精巣と精巣上体の相対重量

Group No.	Folic acid	DBP (ppm)	Testes	Epididymides
1	—	0	1.09 ± 0.08	0.83 ± 0.05
2	—	1200	1.11 ± 0.02	0.85 ± 0.03
3	—	5000	1.12 ± 0.06	0.84 ± 0.03
4	—	20000	0.99 ± 0.11	0.70 ± 0.08 *
5	+	0	1.10 ± 0.12	0.83 ± 0.09
6	+	1200	1.09 ± 0.04	0.83 ± 0.01
7	+	5000	1.14 ± 0.07	0.83 ± 0.03
8	+	20000	0.62 ± 0.27 **, ##	0.54 ± 0.13 **, #

* , ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

: Significantly different from the corresponding control groups without folic acid at P<0.05, 0.01, respectively.

No. of rat in each group is 5.

表 5.

前立腺と精囊の重量

Group No.	Folic acid	DBP (ppm)	Ventral prostate	Dorsolateral prostate	Seminal vesicles
1	—	0	0.31 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.76 ± 0.05
2	—	1200	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.74 ± 0.12
3	—	5000	0.34 ± 0.03	0.23 ± 0.02	0.72 ± 0.07
4	—	20000	0.28 ± 0.05	0.21 ± 0.02*	0.63 ± 0.10
5	+	0	0.29 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.72 ± 0.04
6	+	1200	0.36 ± 0.09	0.25 ± 0.03	0.76 ± 0.07
7	+	5000	0.32 ± 0.08	0.24 ± 0.03	0.67 ± 0.12
8	+	20000	0.21 ± 0.02**, #	0.20 ± 0.03*, #	0.57 ± 0.05**

The data are shown by gram.

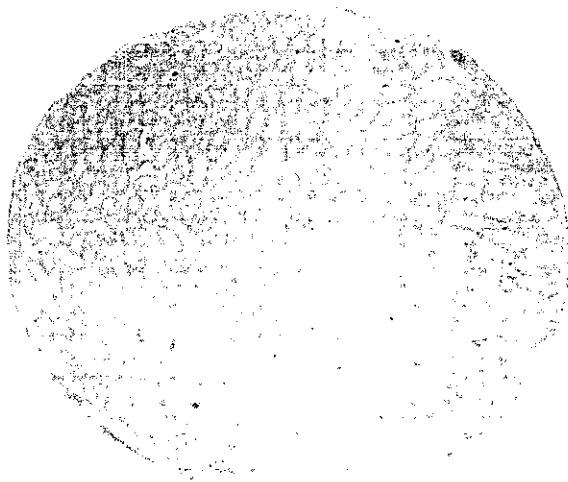
*, ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

: Significantly different from the corresponding control groups without folic acid at P<0.05.

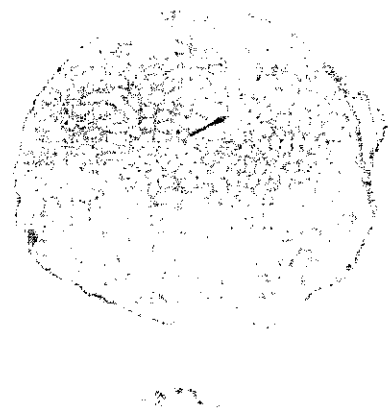
No. of rat in each group is 5.

図 4.

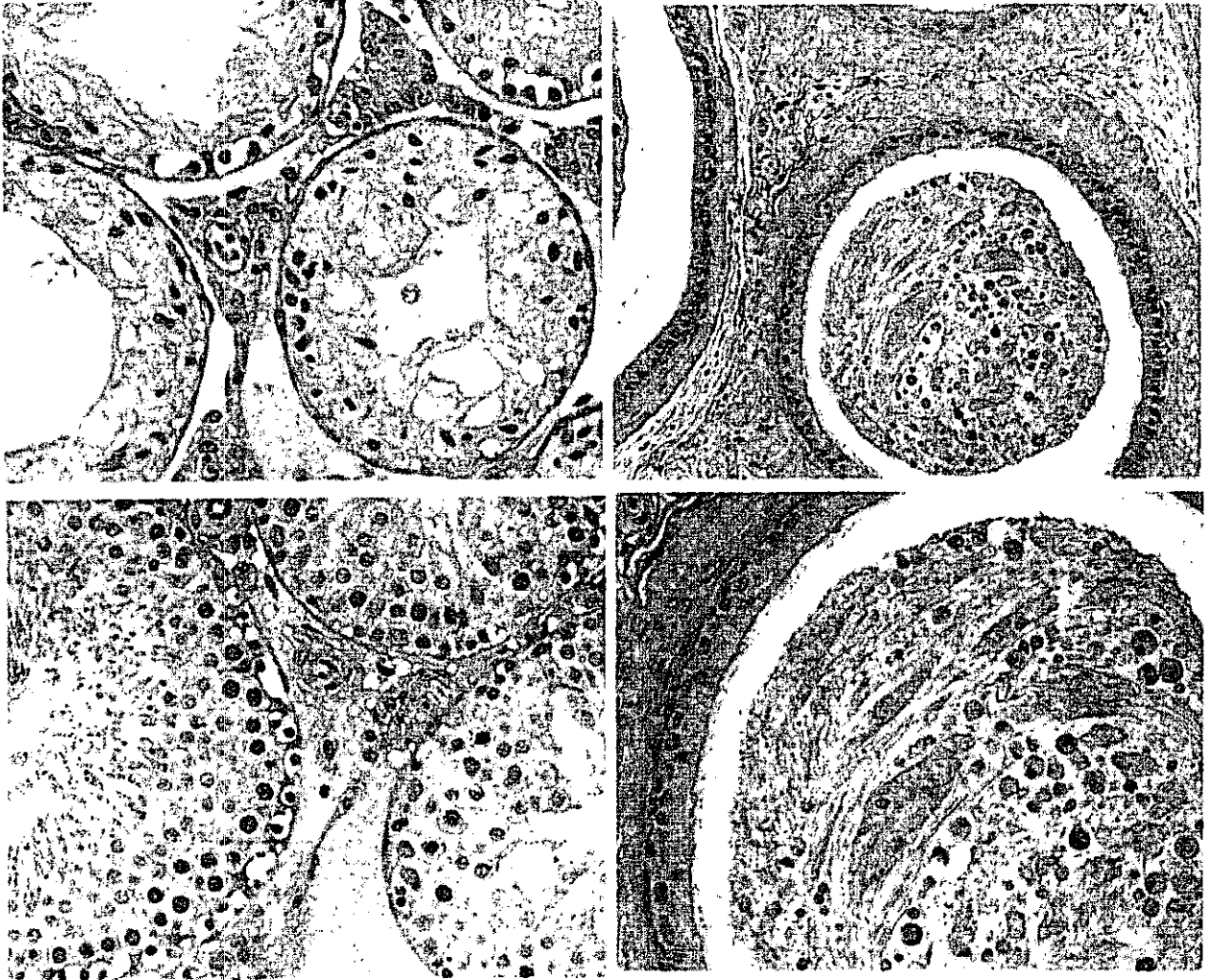
精巢の断面



DBP 20,000 ppm

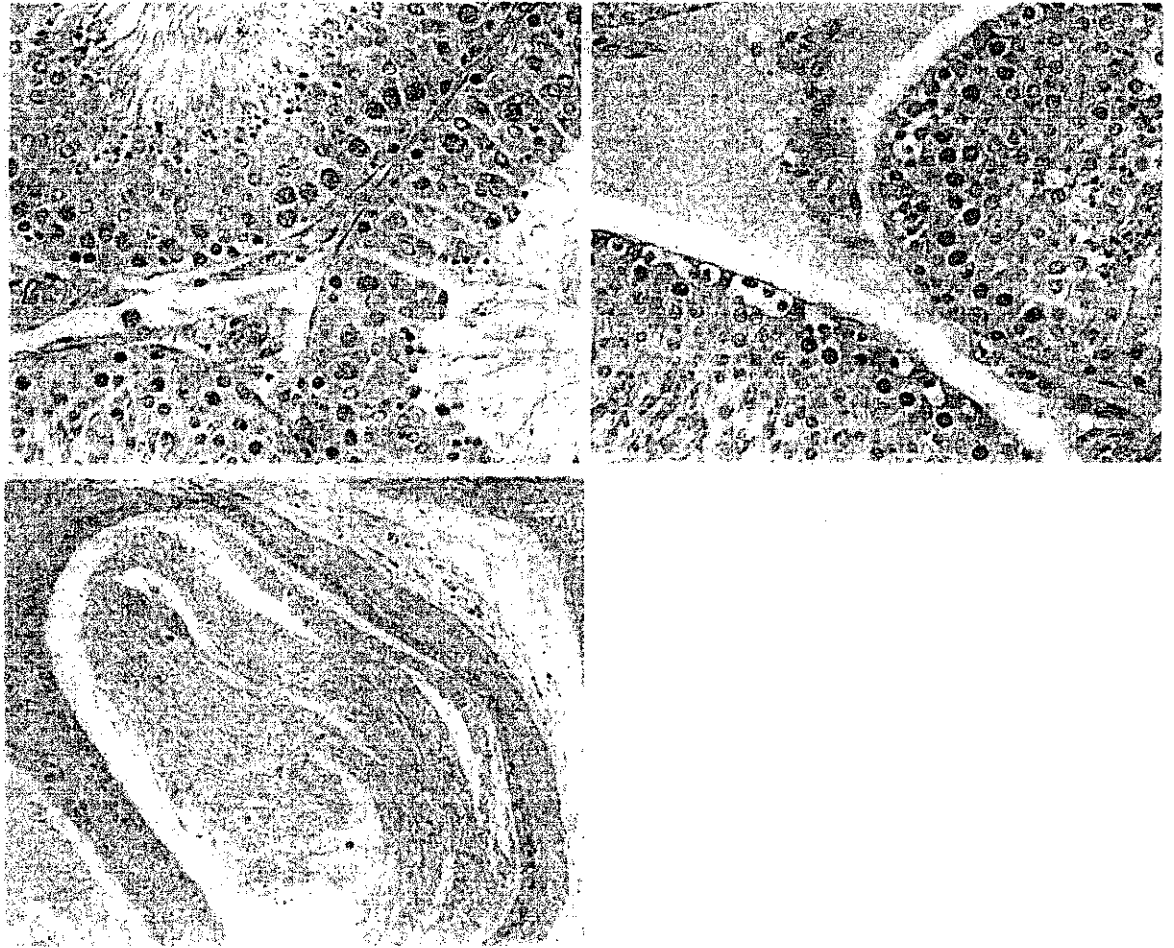


葉酸 +DBP 20,000 ppm



葉酸 + DBP 20,000 ppmによる精巣障害増強

図 5.



DBP 20,000 ppm投与による精巢障害

図 6.

表 6. 精子数、精子運動能および精子形態異常

No. of rat in each group is 5.

Group No.	Folic acid	DBP (ppm)	Number (x 10 ⁷ / ml)	Movement ability (%)	Morphology Abnormality (%)
			Epididymis	5 minutes	
1	—	0	2.662 ± 0.596	86.58 ± 6.89	0.80 ± 0.84
2	—	1200	2.744 ± 0.517	89.02 ± 5.68	0.40 ± 0.55
3	—	5000	3.022 ± 0.474	81.62 ± 9.46	0.60 ± 0.55
4	—	20000	2.440 ± 1.138	66.06 ± 18.48 *	1.60 ± 2.61
5	+	0	2.390 ± 0.604	82.38 ± 13.61	1.00 ± 1.00
6	+	1200	2.768 ± 0.380	90.14 ± 5.89	0.80 ± 0.84
7	+	5000	2.782 ± 0.322	84.74 ± 6.07	0.80 ± 0.84
8	+	20000	0.636 ± 0.755 ** ##	20.98 ± 39.85 * #	4.60 ± 4.16

*, **: Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively

#, ##: P<0.05, 0.01 from the corresponding controls without folic acid

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

フタル酸/アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する研究

—発達期ないし有病時暴露による影響評価—

種差による影響評価

分担研究者 九郎丸 正道（東京大学助教授）

研究要旨：セルトリ細胞培養系への添加試験より、MEHP は直接セルトリ細胞に影響を及ぼすことが示唆された。ラットへの経口投与試験から、1000mg/kg/day で精巣に影響を及ぼすことが判明した。

A. 研究目的

食料品の包装材、医療器具など多くのプラスチック可塑剤として広く使用されている DEHP が雄の生殖器官に影響を及ぼすことがラット等で報告されているが、その加水分解代謝物であり、活性本体とされる MEHP を直接用いた実験は必ずしも多くない。また、その影響する機序についても十分な理解が得られているわけではない。本研究では MEHP のセルトリ細胞への直接的影響を検討するため、セルトリ細胞初代培養系への添加試験を試み、同時に MEHP の *in vivo* での精巣への影響を検討するため、若齢ラットへの強制経口投与試験を試みた。

B. 研究方法

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、この培養系に MEHP を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 を用量を振って 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）

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。

C. 研究結果

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。

D. 考察

MEHP のセルトリ細胞初代培養系への添加試験の結果，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。

E. 結論

MEHP 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 1000mg/ kg/ day でラット精巣に影響を及ぼした。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表：

Kano,K., Kurohmaru,M., Hayashi,Y., Taniguchi,K.: Smad2 and Smad3 accumulate in the nucleus of spermatocytes in the regressed testis of

the Syrian hamster. Journal of Reproduction and Development Vol.48, No.1, 97 – 101 (2002)

Sakaue,M., Ishimura,R., Kurosawa,S., Fukuzawa,N., Kurohmaru,M., Hayashi,Y., Tohyama,C., Ohsako,S.: Administration of estradiol-3 benzoate down-regulates the expression of testicular steroidogenic enzyme genes for testosterone production in the adult rat. Journal of Veterinary Medical Science 64 :107 – 113 (2002)

Awal,M.A., Kurohmaru,M., Mizukami,T., Andriana,B.B., Kanai,Y., Hayashi,Y.: Effect of Bisphenol-A on the Sertoli cell culture from prepubertal male Wistar rats. The Sciences 2:19 – 23 (2002)

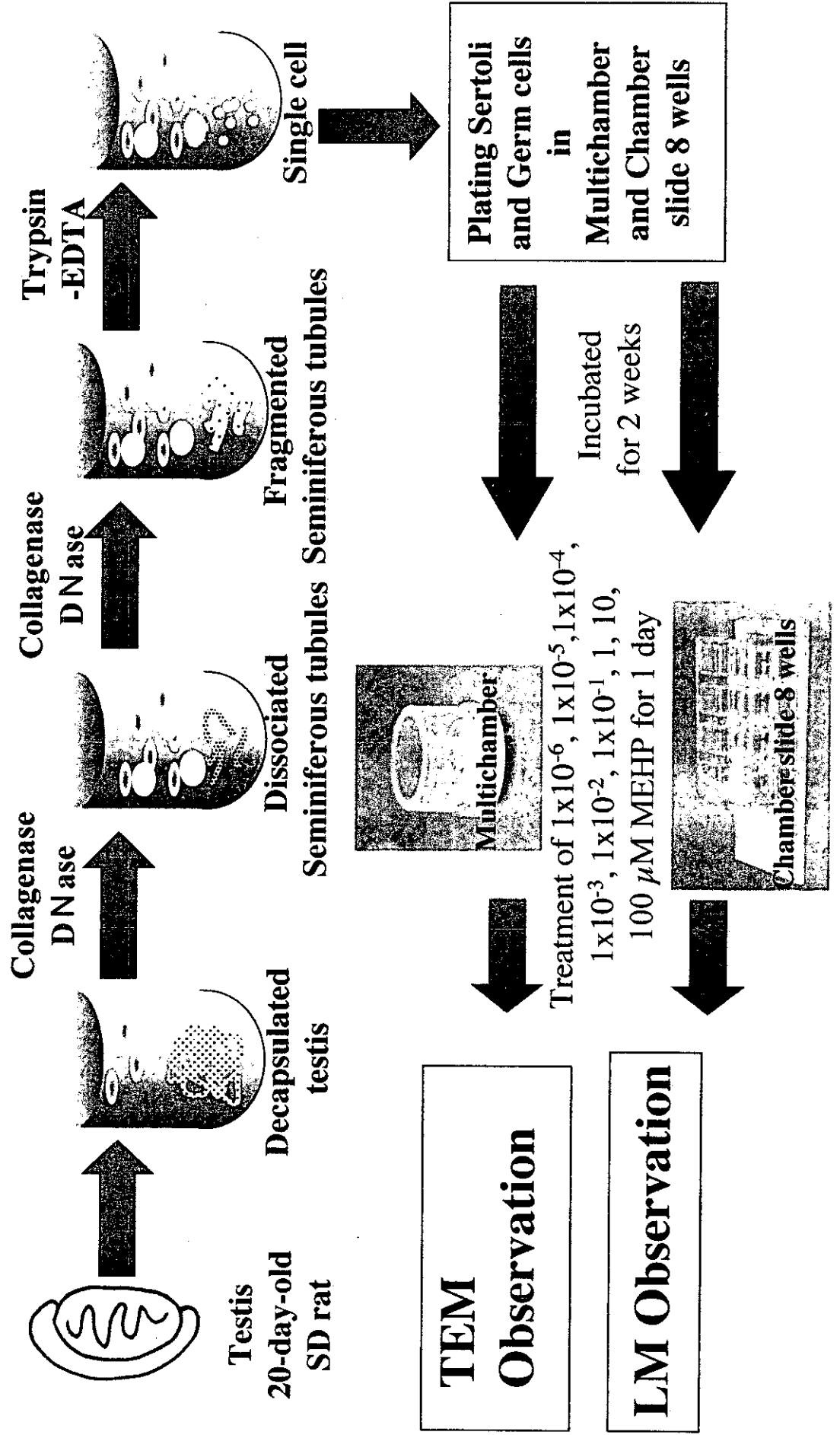
2. 学会発表：なし

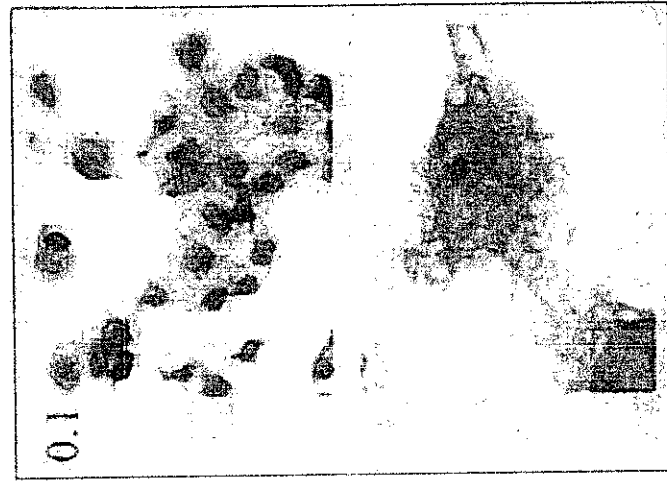
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：なし

2. 実用新案登録：なし

Isolation of Sertoli Cells

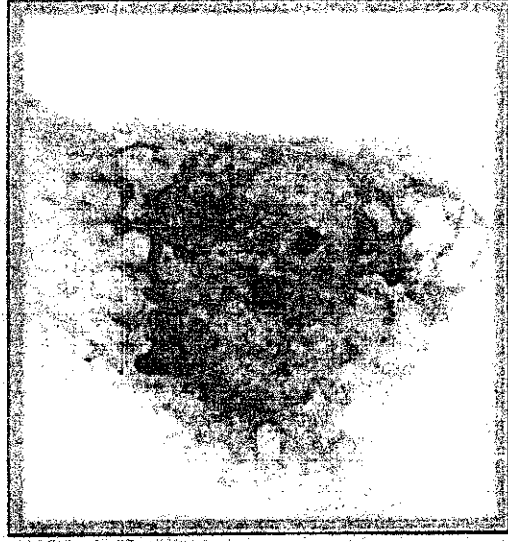




0.1



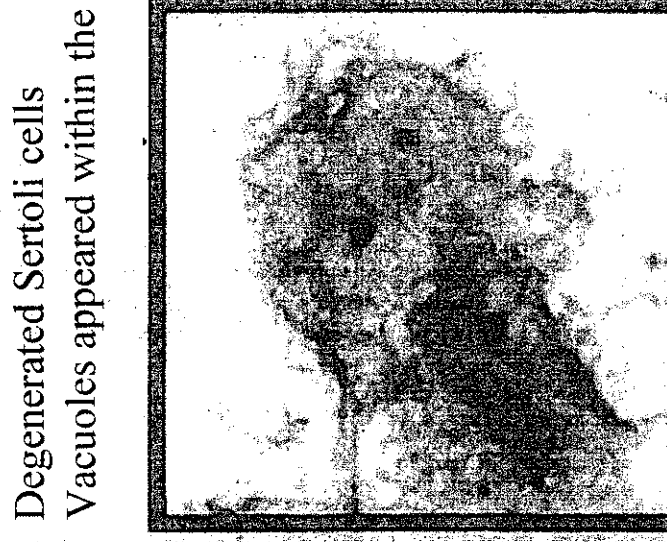
10



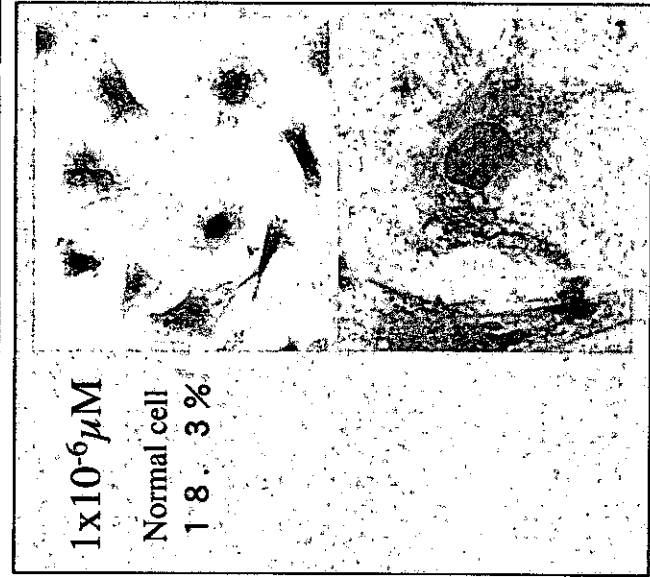
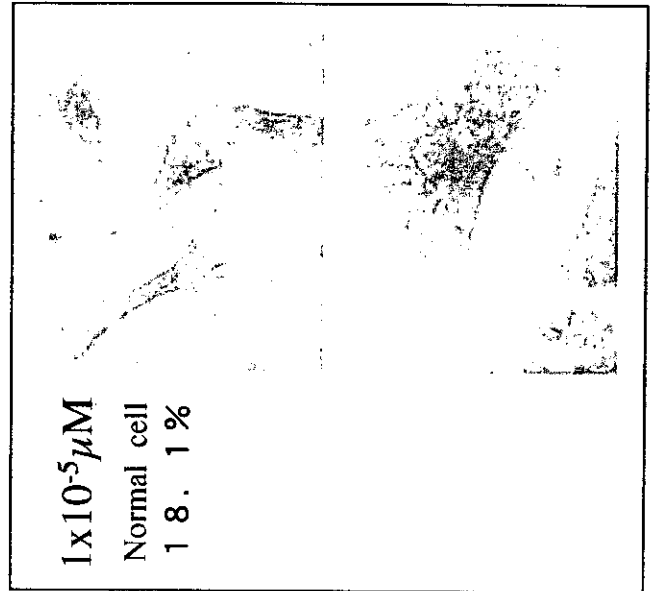
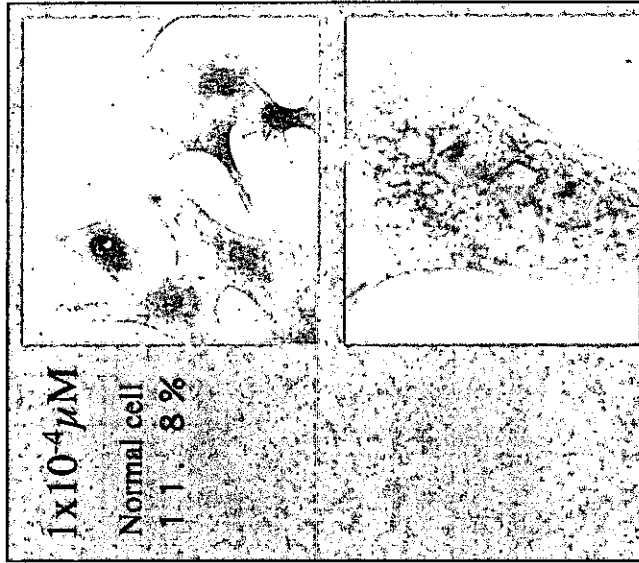
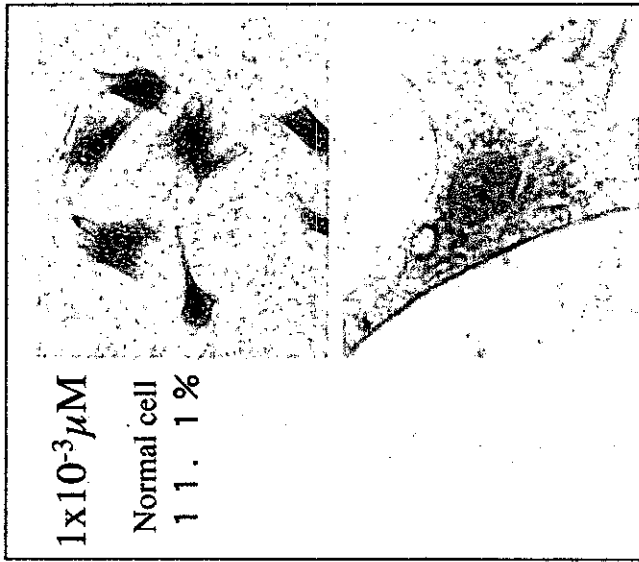
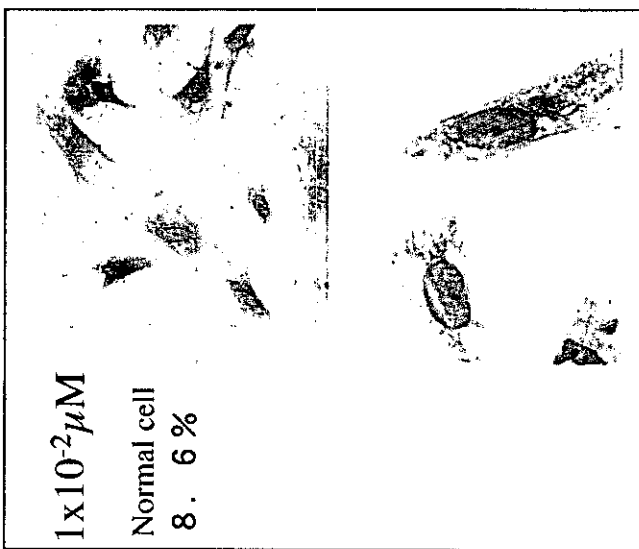
Rat (SD) Sertoli cell culture treated
with 0.1, 1, 10, and 100 μ M
MEHP for 1 day



1

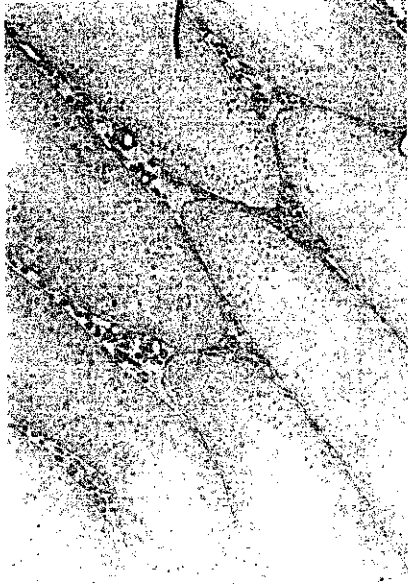


Degenerated Sertoli cells
Vacuoles appeared within the cytoplasm



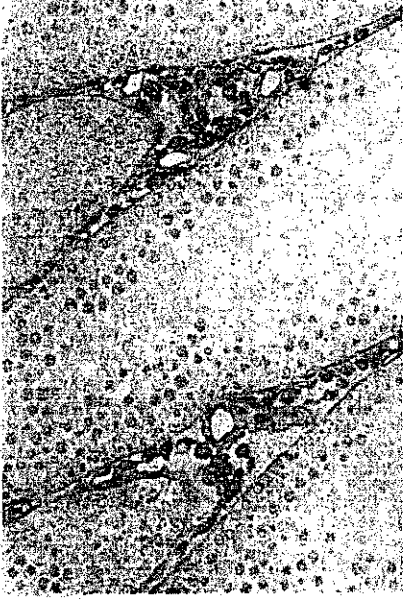
- Exposure to MEHP at lower concentration for 1 day (1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} , $1 \times 10^{-2} \mu\text{M}$).
- Some degenerative changes still occurred.

Normal rat seminiferous tubules



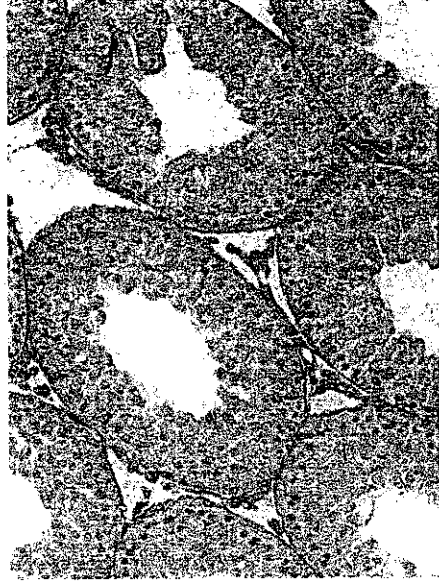
Toluidine blue stained

(Mag 10x10)

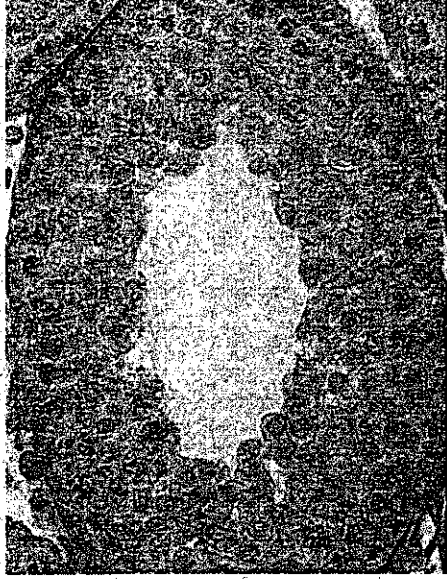


Toluidine blue stained

(Mag 10x40)



HE stained (Mag 10x20)

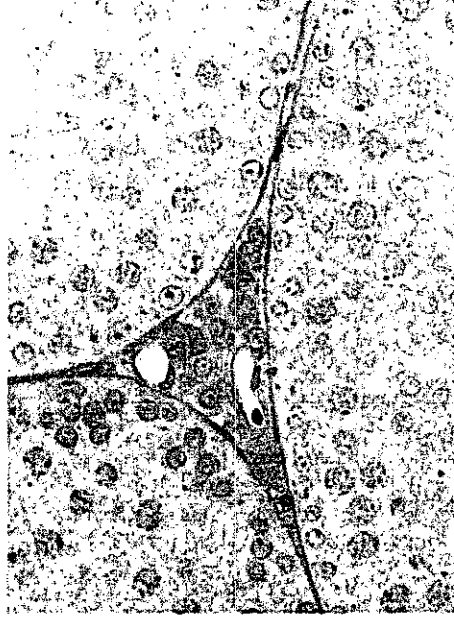


HE stained (Mag 10x40)

Seminiferous tubules of rats treated with 500mg/kg/day MEHP for 5 days.



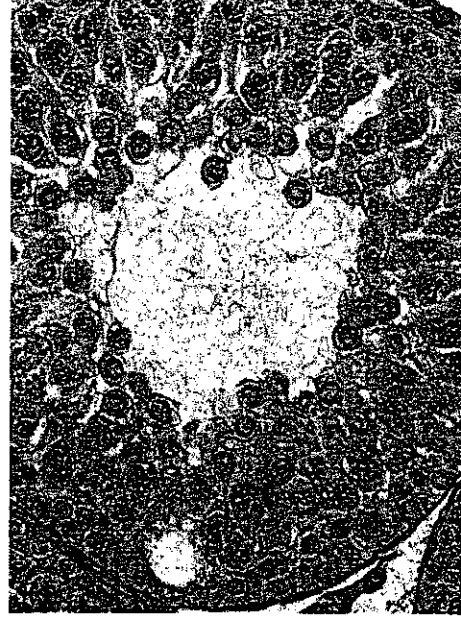
Toluidine blue stained (Mag 10x20)



Toluidine blue stained (Mag 10x40)



HE stained (Mag 10x20)

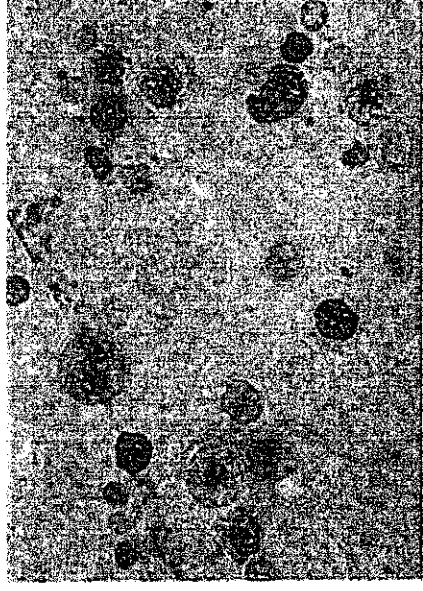


HE stained (Mag 10x40)

Seminiferous tubules of rats treated with 1000mg/kg/day MEHP for 5 days.



Toluidine blue stained (Mag 10x20)



Toluidine blue stained (Mag 10x40)



Toluidine blue stained (Mag 10x20)