

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  
分担研究報告書

精巣障害メカニズムに関する研究

分担研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部部長  
研究協力者 山崎聖美 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部主任研究員

研究要旨：

フタル酸（2-エチルヘキシル）の代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）の精巣毒性について、その分子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、MEHP がマウスライディッヒ細胞へ及ぼす影響について調べた。その結果、MEHP 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。

A. 研究目的

フタル酸ジ（2-エチルヘキシル）（DEHP）による生殖器障害は、その活性代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）によると考えられている。MEHP による生殖器障害については、精巣毒性に関して報告されている。そのメカニズムについては、FasL を介したセルトリ細胞への系などその毒性メカニズムが一部解明されつつあるが、その詳細についてはまだ明らかにされていない。

そこで、MEHP の精巣毒性についてその分子レベル、特に遺伝子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、マウスライディッヒ

細胞 MA-10 を用いて、MEHP の及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

1. Nile Red 染色

MA-10 細胞をガラス底ディッシュに  $2 \times 10^5$  コ/ml になるようにまき、一晚、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  中でインキュベーションした後、MEHP を添加し、さらに 24 時間インキュベーションし、hCG を最終濃度  $50\text{ng/ml}$  になるように加え、さらに 2.5 時間インキュベーションした後、Nile Red を最終濃度  $400\text{nM}$  になるように添加し、蛍光顕微鏡にて細胞内の Lipid droplet を観察した。ネガティブコントロールとして、DMSO

のみを添加したものを、ポジティブコントロールとしてオレイン酸—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。

## 2. 細胞内コレステロールエステル量の測定

MA-10 細胞をガラス底ディッシュに  $2 \times 10^5$  個/ml になるようにまき、一晩、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  中でインキュベーションした後、MEHP を添加し、さらに 24 時間インキュベーションし、hCG を最終濃度  $50\text{ng/ml}$  になるように加え、さらに 2.5 時間インキュベーションした後、 $50\text{mM}$  Tris-HCl ( $150\text{mM}$  NaCl,  $2\text{mg/ml}$  BSA,  $\text{pH}$  7.4) で 3 回、 $50\text{mM}$  Tris-HCl ( $150\text{mM}$  NaCl,  $\text{pH}$  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  $0.2\text{N}$  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。

## C. 研究結果

### 1. Nile Red 染色による Lipid droplet 観察

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。

### 2. 細胞内コレステロールエステル量の測定

図 1 に示すように、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、 $10^{-8}\text{M}$ ~ $10^{-5}\text{M}$  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、 $10^{-6}\text{M}$  及び  $10^{-5}\text{M}$  の MEHP で細胞内コレステロールが有意に ( $p < 0.05$ ) 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、 $10^{-6}\text{M}$  及び  $10^{-5}\text{M}$  の MEHP で処理した場合、hCG 刺激により有意に ( $p < 0.05$ ) 細胞内コレステロール量が減少した。

## D. 考察

MA-10 細胞の MEHP による Lipid droplet 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 Lipid droplet が全く観察されないが、MEHP 存在下で hCG 刺激した場合 Lipid droplet 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みとめられた。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のライディッヒ細胞への影響を明らかにできると考える。

#### E. 結論

MEHP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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Nakatani T, Kim H-J, Kaburagi Y, Yasuda K, **Ezaki O**. A low fish oil feeding inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high fish oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: its relationship to anti-obesity effect. *J. Lipid. Res.* 2003, In press.

Ikeda S, Miyazaki H, Nakatani T, Kai Y, Kamei Y, Miura S, Tsuboyama-Kasaoka N, **Ezaki O**. Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in

skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, 296(2):395-400.

Terada S, Takizawa M, Yamamoto S, **Ezaki O**, Itakura H, Akagawa KS. Eicosapentaenoic acid inhibits CSF-induced human monocyte survival and maturation into macrophage through the stimulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production. *J. Leukoc. Biol.* 2002, 71(6):981-6.

Takahashi M, Tsuboyama-Kasaoka N, Nakatani T, Ishii M, Tsutsumi S, Aburatani H, and **Ezaki O**. Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR $\alpha$  activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2002, 282: G338-G348.

Nakatani T, Tsuboyama-Kasaoka N, Takahashi M, Miura S, and **Ezaki O**. Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2002, 277:9562-9569.

##### 2. 学会発表

Higuchi M, Yamakawa J, Tanaka-Takeuji S, Sekine T, Oka J, Takimoto H, **Ezaki O**: Effect of swimming training on maximal aerobic capacity of middle-aged and elderly women. The Sixth IOC World Congress on Sport Sciences, 2002. 05. 28, St. Louis, MO. U.S.A.

Yamazaki T, **Ezaki O**: Effect of endocrine disruptors on lymphocyte responses. DIOXIN2002,

2002. 08. 11, Barcelona

Wu J, Mu G, Yamada K, Higuchi M, Ezaki O,  
Ishimi Y.: Combined intervention of soy isoflavone  
and a moderate exercise prevents bone loss and  
hypercholesterolemia in ovariectomized mice. 日  
中医学大会 2002, 2002. 11. 04, 北京

Tsuboyama-Kasaoka N, Kamei Y, Miura S,  
Takahashi M, Ezaki O: LOW LEVEL  
OVEREXPRESSION OF UCP2 IN ADIPOSE  
TISSUES UP-REGULATES PGC-1 AND  
AMELIORATES HIGH FAT DIET-INDUCED  
OBESITY AND METABOLIC ABNORMALITIES.  
National Institute of Health and Nutrition, Tokyo,  
Japan. 9th International congress on obesity, 2002 .  
08, SAO PAULO

江崎治：ヒトにおける脂質，糖代謝の側面か  
ら。第37回日本循環器管理研究協議会総会・  
日本循環器病予防学会，2002 .05 .30，東京

江崎治，仲谷照代：魚油摂取による中性脂肪，  
コレステロール低下機序。第75回日本生化学  
学会大会，2002 .10 .16，国立京都国際会館（京  
都）

呉堅，王新祥，山田和彦，樋口満，江崎治，  
石見佳子：大豆イソフラボンと運動の併用は  
骨代謝ばかりでなく脂質代謝も改善する。第20  
回日本骨代謝学会，2002 .07 .26，岡山

仲谷照代，金賢珠，江崎治：魚油摂取による  
SREBP-1 を介した脂肪合成抑制のメカニズム。  
第34回日本動脈硬化学会，2002 .07 .18，神戸

宮崎裕美，笠岡(坪山)宜代，江崎治：運動トレ  
ーニングによる骨格筋内の脂肪合成系遺伝子  
発現の増加機序。第56回日本栄養・食糧学会  
大会，2002 .07.20，北海道

笠岡(坪山)宜代，宮崎裕美，江崎治：共役リノ  
ール酸（CLA）の適正摂取条件に関する検討  
および SREBP1 を介した肝臓脂肪蓄積メカニ  
ズムの解析。第56回日本栄養・食糧学会大会，  
2002 .07.21，北海道

高橋真由美，笠岡(坪山)宜代，油谷浩幸，江崎  
治：高脂肪食摂取マウスの白色脂肪細胞にお  
ける遺伝子発現：ジーンチップを用いた解析。  
第56回日本栄養・食糧学会大会，2002 .07 .21，  
北海道

仲谷照代，笠岡(坪山)宜代，高橋真由美，三浦  
進司，江崎治：PPAR  $\alpha$  活性化を介したマウス  
及びラット肝実質細胞での UCP2mRNA 発現  
増加メカニズム。第56回日本栄養・食糧学会  
大会，2002 .07 .21，北海道

三浦進司，池田仁子，甲斐裕子，亀井康富，  
江崎治：糖輸送体 GLUT4 発現と転写共役因子  
PGC-1 の関連性について。第56回日本栄養・  
食糧学会大会，2002.07.21，北海道

矢島宏昭，柳原恵美子，近藤恵二，笠岡(坪山)  
宜代，江崎治，及川眞一：ビール苦味成分の  
肥満抑制作用。

第23回日本肥満学会，2002 .10.04，京都

高橋真由美，笠岡(坪山)宜代，江崎治：高脂肪

食による肥満発症機序・白色脂肪細胞における遺伝子発現の検討. 第23回日本肥満学会, 2002.10.04, 京都

廣田晃一, 杉山みち子, 高田和子, 平原文子, 江崎治: ITを利用した生活習慣改善のための自己学習システムに関する研究---コンピュータシステムの設計と開発---. 第49回日本栄養改善学会学術総会, 2002.11.14, 沖縄

杉山みち子, 廣田晃一, 高田和子, 平原文子, 江崎治: 生活習慣改善のための自己学習システムへのインターネットの応用: 第22回医療情報学連合大会, 2002.11.15, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし。

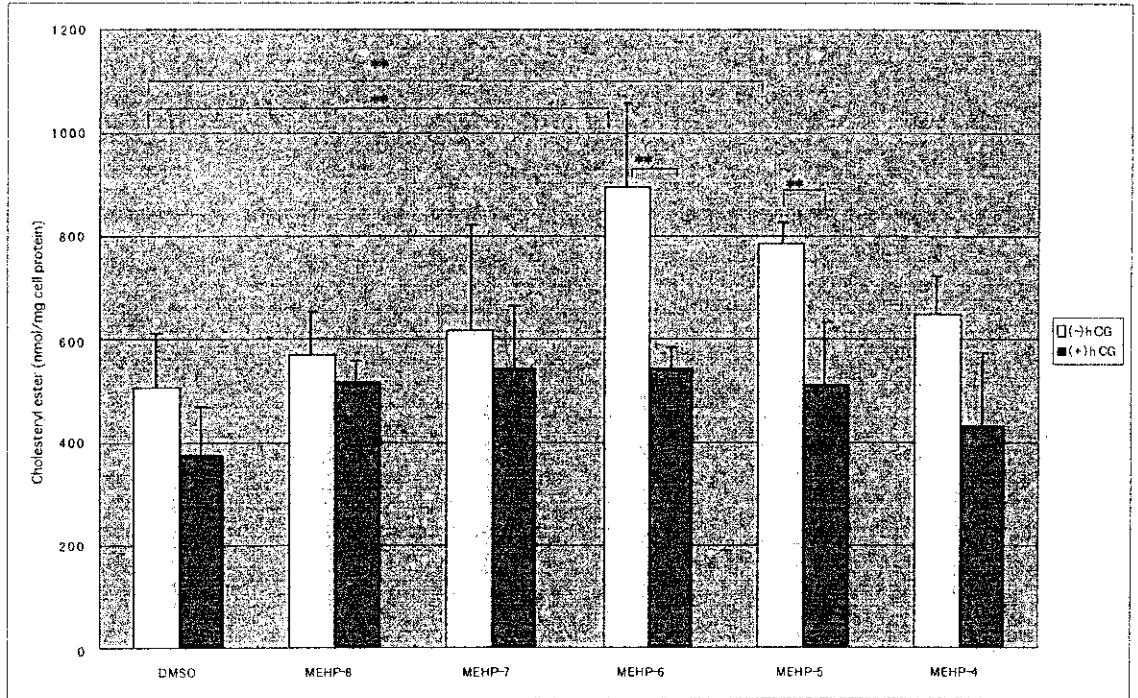


図1 MEHPによる細胞内コレステロールエステルの蓄積

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

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

分担研究者 長谷川隆一 国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部長  
研究協力者 小泉睦子 国立医薬品食品衛生研究所・医薬安全科学部

### 研究要旨

フタル酸/アジピン酸エステルについての文献検索を実施し、発育期曝露による生殖系への影響並びに種差あるいは曝露時期による感受性の違いに関する情報を収集・解析することを目的とした。フタル酸エステルについては 2000 年～2003 年 2 月の最新情報を Medline、Current Contents、IARC、EHC 等のデータベースを検索し、アジピン酸エステルについては 1984 年以降の同データベースを検索し、文献の収集・解析をおこなった。フタル酸エステルは主に DEHP 及び DBP の研究が報告され、妊娠中曝露による雄生殖器への影響はテストステロンの合成低下によること、また若齢げっ歯類雄の精巣毒性はセルトリ細胞への影響であることについての詳細な研究が行われた。なお、マーモセットでは DEHP により精巣を含むすべての臓器に影響が認められないとの確認実験がなされた。アジピン酸エステルに関しては 2000 年に OECD の初期評価会議で、DEHA により着床前胚致死が高用量で認められるものの、生殖器系への明確な影響はないと評価されたことから、フタル酸エステルの生殖系への影響との共通性は少ないと推定された。

#### A. 研究目的

フタル酸エステルの生殖系への影響としては生殖毒性、催奇形性及び精巣毒性が知られているが、近年フタル酸エステルが抗アンドロゲン作用を有することが明らかとなった[小泉ら, 2000]。こうした毒性の発現は主にげっ歯類で認められており、特に精巣毒性については著しい種差のあることが報告されている。さらに、中枢神経系への影響の可能性も疑われている。すでに主なフタル酸エステルについては、その毒性の種類、作用機構、構造活性相関などについて、2000 年までの文献を調査し、解析・評価して報告した[小泉ら, 2001]。本研究では、妊娠期あるいは新生児期の曝露による生殖器への影響を中心に、2000 年以降の新規情報を収

集・整理した。また、アジピン酸エステルもフタル酸エステルと同様にペルオキシソーム増殖作用を示し、肝腫瘍を誘発することが知られているので、生殖系への影響を調査するため 1984 年以降の文献調査を行った。

#### B. 研究方法

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 (di(2-ethylhexyl) adipate)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、その文書を手に入れ、資料とした。

(倫理面への配慮)

本研究は文献情報を検索、収集、整理することであるため、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

### 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 (mono(2-ethylhexyl) phthalate)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 1g/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 1g/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 NFκB の活性化を引き起こすが、*gld* マウスでは MEHP 暴露後、caspase-8 および NFκB-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、PPARα 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、フタル酸エステルのステロイド合成への影響は PPARα 依存性のライディッヒ細胞 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、精巣および精囊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ッ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、ライディッ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ッ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, 1,000 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、精子形成障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 (2,394 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 $\alpha$ 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 $\gamma$ 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 $\beta$ 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 TRPM2 (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 2,000 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 ZnT-1 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, 1,500, 6,000 ppm) を 104 週間混餌投与した結果、1,500 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セットに 65 週間 DEHP を 2,500mg/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 <sup>14</sup>C 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 B6C3F(1)マウスにそれぞれ 12,500 ppm (approx. 804 mg/kg/day) および 6,000 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, 1,500 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肛門生殖器間距離の短縮、乳頭および乳輪保持、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 投与群でも乳頭および乳輪保持、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、肛門生殖器間距離の短縮、ライディ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辜丸および肛門生殖器間距離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ノジオンレベル、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チ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、ライディッチ細胞の過形成、多核生殖細胞の増殖が認められた。ライディッチ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鞅帯が観察された。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 以上に睾丸停留、肛門生殖器間距離の短縮が認められ、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 p27kip1, 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 (GJIC)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**

Crl: 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, 1,000 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 270-2,100 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, 1,000, 1,500, 2,000 mg/kg/day)を強制経口投与した催奇形試験で、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-(C<sub>7</sub>-C<sub>9</sub> alkyl) phthalate), D911P (di-(C<sub>9</sub>-C<sub>11</sub> 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 DINP (di-iso-nonyl phthalate)の毒性試験と考えることができる。

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, 1,000 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 日の胎児より抽出)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 日のラットから抽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 日に抽出した胎児および妊娠 12.5 日に抽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なり、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 Pyla cells 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. フタル酸エステル類の生殖毒性

#### DEHP

Crl: 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 µg/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)

Crl: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、膈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 アロマトラーゼ活性を低下させた。PPAR $\alpha$  および PPAR $\gamma$  に特異的なリガンドも同様な影響を示したが、PPAR $\gamma$  に特異的なアンタゴニストを用いた試験ではアロマトラ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（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 12,000ppm 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 1,080 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。

## 6. 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 <sup>14</sup>C-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 Py1a 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 Py1a 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 PM (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 di-isodecyl 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.