

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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 一発達期ないし有病時暴露による影響評価一

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成16（2004）年 4月

別添 3

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. 周産期暴露による影響評価研究	25
渋谷 淳	
(資料) 図 1-9、表 1-18	
2. 性行動に対する影響評価研究	37
西原真杉	
(資料) 図 1-12	
3. 肝基礎疾患による修飾作用	40
福島 昭治	
(資料) 図 1、表 1-4	
4. 腎基礎疾患による修飾作用	42
白井智之	
(資料) 図 1-2、表 1-5	
5. 種差による影響評価	45
九郎丸 正道	
(資料) 図 1-29、表 1	
6. 精巣障害メカニズムに関する研究	49
江崎 治	
(資料) 表 1-3	
7. 文献調査による健康影響評価研究-発達期の暴露影響と感受性要因の検索	52
長谷川隆一	
(資料) なし	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	64
IV. 研究成果の刊行物・別刷	67

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
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
一発達期ないし有病時暴露による影響評価一
総括研究報告書（平成15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。

周産期曝露影響の評価研究では、妊娠及び哺乳期間に母ラットに混餌による経口投与を行い、児動物について、離乳時及び性成熟後での内分泌・生殖器官の病理組織評価、性成熟後での性行動評価、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を行う。そのうち、病理評価研究では14年度に引き続きフタル酸ジブチル(DBP)について評価を継続・終了し、雌では今まで報告のない下垂体機能を含む性分化影響が明らかとなり、雄では殆ど可逆的な精巣影響の他に永続的な乳腺影響が20 ppmより認められ、NOAELは求められずLOAELは20 ppm (1.5-3.0 mg/kg/day)と判断された。引き続きフタル酸ジイソノニル(DINP)の周産期曝露実験を行い、雄性児の乳頭・乳輪の出現、離乳時での精巣影響が400 ppm以上で確認されたが、全臓器の病理組織検索を待って総合的に評価する。性行動評価では、DBPは雄性児の血中テストステロン(T)濃度、成熟雄の性腺刺激ホルモンレベルには影響を与えなかったが、性行動を低下させる傾向が見られ、Tレベルの変動を介さない脳への直接作用による性分化影響が示唆された。一方、DINPは全ての用量で雄のT濃度を一過的に上昇させ、間接的な脳の性分化影響の可能性が示唆された。脳の性分化障害の責任遺伝子の探索に関しては、14年度に組織部位特異的な網羅的遺伝子発現解析法を確立したので、15年度はまず脳の性分化障害を誘発するエチニルエストラジオール(EE)を周産期曝露し、生後2日目での児動物視床下部内側視索前野(MPOA)のマイクロアレイ解析を行った。その結果、EEにより発現が用量依存的に雄で低下ないし雌で上昇するものの中に、雄で優勢な発現を示す複数のG蛋白質とその関連蛋白質が見出され、脳の性分化障害へのG蛋白質シグナリングの関与が示唆された。次にフタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)混餌投与例で同様の検討を行い、雄での発現低下遺伝子にEEと同様のG蛋白質シグナリングの構成要素が見出された。

基礎疾患による修飾作用については、肝障害においては、14年度にラットに対するチオアセタミド(TAA)による肝障害誘発と同時のDBP投与により精巣毒性の増強が確認されたが、15年度はTAA誘発肝障害後でのDBP投与によっても精巣毒性の増強を確認した。腎障害の影響に関しては、14年度に葉酸誘発腎障害の状態でのDBPによる精巣毒性の増強を明らかにしたが、そのメカニズム解明のためDBPの活性代謝物(MBP)の腎障害誘発後での体内動態を測定した結果、血中MBP濃度の増加と尿中MBPの減少傾向が認められ、精巣毒性の増強に対する血中MBPの関与が示唆された。

精巣障害の感受性種差に関する研究では、いくつかの動物種に関して若齢期精巣とその培養系のDEHPのモノエステル(MEHP)に対する感受性を形態学的に比較し、種差を規定する要因を探索するが、15年度はラットへの経口投与(5日間)では800 mg/kg/day、マウス(3日間)では700 mg/kg/dayで、精上皮のアポトーシス細胞数が最大となり、モルモットへの単回経口投与(2000 mg/kg)では、時間依存的にアポトーシスが増大した。若齢のシバヤギ、ラット、モルモットの精巣器官培養でも、濃度及び時間依存的にアポトーシスが増加した。いずれの実験においてもセルトリ細胞の空胞化が観察された。

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年度確立したマウス・ライディッヒ細胞由来のMA-10培養細胞を用いたMEHPによるコレステロール代謝修飾作用に関して、 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} M MEHP添加24時間後でのマイクロアレイ解析の結果、 10^{-6} Mで発現増加する遺伝子が多くみられたが、プロモーター領域にPPREを有するものは非常に少なかった。

文献調査では、今年度新たに36報の論文が見出され、その中でDEHPに関する論文が最も多く、フタル酸エステル類のヒト疫学に関する報告では、精子性状、在胎期間または子宮内膜症との関連が検討されたが、直接的な関連性については不明である。アジピン酸エステルに関しては1報あり、ラットの妊娠期アジピン酸ジエチルヘキシル曝露により性分化影響は認められていない。今年度の調査ではTDIの見直しを必要とするような論文は出版されていない。

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 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

江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長

A. 研究目的

フタル酸／アジピン酸エステルは食料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剤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，アンドロジェン受容体との結合を介さない抗アンドロジェ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 testosterone surge 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モ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，精巣と発達期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 15 年度は，①周産期曝露影響評価として，14 年度に SD:IGS ラットを用いて投与実験を行った di-*n*-butyl phthalate (DBP) について病理組織学的検討を終了した。更に引き続いて，DINP に関して投与実験を行った。もう一つの Wistar.Imamichi ラットを用いた曝露実験では，DBP 及び DINP の曝露動物について，血中性ステロイドレベルや性成熟後の性行動等を解析した。また，脳の性分化影響評価として，性ステロイドの作用により雌雄で異なる分化を示す視床下部の性的二型核 (SDN-POA) を含む内側視索前野 (MPOA) 特異的なマイクロアレイ解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を行ったが，そのためには，昨年度確立したメタカーン固定法を用いたパラフィン包埋微量組織からのマイクロアレイ解析法をマイクロダイセクション法と組み合わせて用いた。まず，脳の性分化障害を誘発する対照物質として ethinylestradiol (EE) を用いて周産期曝露を行い，脳の性分化臨界期の MPOA における発現変動遺伝子について，発現の性差と EE の用量依存性の観点

から分類し、標的候補遺伝子を抽出した。次いで、EEと同様のプロトコールでフタル酸エステルの中で最も毒性の強いDEHPの周産期暴露を行い、発現遺伝子のプロファイリングを行って、この物質による脳の性分化障害遺伝子の同定を図った。②基礎疾患による修飾作用については、まず肝障害に関しては、14年度はF344ラットを用いた実験で、肝障害物質とDBPの併用投与によるDBP精巣毒性の増強作用を見出したため、15年度はラットに肝障害を誘発した後、DBP投与することによる雄性生殖器への毒性作用の増強について検討した。腎障害に関しては、14年度に腎障害下でのDBPによる精巣毒性の増強を見出したため、15年度はその増強メカニズムの解明の一環として、DBP代謝物であるモノエステル体(MBP)が腎機能低下によって上昇するかどうかについて検討した。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その初代培養系に、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。15年度は、各種動物種の経口投与試験ならびに精巣器官培養系への添加試験を実施した。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行うが、15年度は14年度に確立したマウス・ライディッヒ細胞MA-10を用いたコレステロール代謝修飾モデルを用いて、MEHPの影響に関するマイクロアレイ解析を行った。最後に、⑤文献調査として、発達期の曝露影響や種差等の感受性要因に関する各種文献検索をアップ・デートし、ヒトでの健康影響に関するリスク評価の資料とした。

B. 研究方法

①周産期暴露影響評価として、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暴露形態を考慮して、飼料に混じて母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に暴露した。この研究では二つの異なる系統のラットを用いて、それぞれ病理組織学的解析、性ステロイドレベルの測定と性行動評価を行った。まずSD:IGSラットを用いた実験系では、昨年度はDBPについて母動物に対して20, 200, 2000, 10,000 ppmの4用量を設定し、妊娠15日目から出産21日目までの間、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。妊娠・授乳期の母動物について体重と摂餌量を測定し、児動物については、生後2日目に出生児数、体重、肛門・生殖突起間距離(AGD)

を測定し、生後3日目に一匹の母動物あたり雌雄各4匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後14日目には、雄性動物について乳頭・乳輪の出現の有無を検索し、離乳(生後21日目)までの間、児動物の体重を毎週測定した。離乳時には、母動物に対するDBPの投与を終了し、児動物は通常の基礎飼料であるCRF-1に切り替えて飼育した。春期発動前の解剖は生後21日目に行った。残りの動物に対して春期発動(包皮分離、膻開口)の日と体重を求め、生後11週目と20週目に解剖を行った。雌においては、解剖の3週間より膻スミアの観察による性周期回帰の検討を行い、発情休止期を示す日に解剖を行った。

生後3週の解剖時には、肝、腎、脳、副腎、精巣、精巣上部、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、精嚢(+凝固腺)、下垂体の各重量をホルマリン固定後に測定した。次いで、これらの臓器に関して、HE染色標本を作製して病理組織学的検索を行った。また、下垂体におけるluteinizing hormone(LH)、follicle-stimulating hormone(FSH)、prolactin(PRL)等の免疫組織染色を生後21日目と11週目の雌雄で行い、VECTSTAIN Elite ABCキットを用いてDABにて発色し、それぞれの陽性細胞率を求めた。また、雄児動物において性成熟後の乳腺萎縮が明らかであったため、11週目の動物について乳腺腺房の面積を測定した。また、本年度実施予定のDINPの妊娠後期及び授乳期暴露実験は、DBPの実験プロトコールに準じて、0, 400, 4000, 20,000 ppmの用量を餌に混じて行った。

Wistar-Imamichi系ラットを用いた別の周産期暴露実験では、出生児の性ステロイドレベルの測定と性成熟後の性行動評価を行った。即ち、SD:IGSラットを用いた暴露実験と実験プロトコールを統一して、妊娠15日目から産後21日目(離乳時)までSF飼料にDBPを20, 200, 2000, 10,000 ppm、DINPを40, 400, 4000, 20,000 ppmとなるように混和した餌を与えた。生後3日齢及び7日齢の雌雄ラットを断頭屠殺し、採血を行ってestradiol及びtestosteroneの血清中濃度をEIA法により測定した。更に、DBP周産期暴露群については、性成熟後にLH、FSHの血清中濃度をEIA法により測定するとともに、性行動、性周期についても検討を行った。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化障害の責任遺伝子の探索については、14年度はパラフィン包埋切片を用いた組織部位特異的な網羅的遺伝子発現解析法を確立したので、15年度はまず周産期暴露により性成熟後での生殖器傷害を生じさせることが知られているEEを、0.01, 0.1, 0.5 ppmの割合で

妊娠 SD:IGS ラットに妊娠 15 日から出産後 2 日目まで混餌投与した際の、投与終了時における児動物の視床下部神経核での網羅的遺伝子発現解析をマイクロアレイを用いて行った。標的部位は、雌雄で異なる性分化を示し、主に雄の性行動に機能すると考えられている SDN-POA の全領域を含む MPOA を選択した。EE を選定した理由として、出生前あるいは出生直後の児動物にエストロゲン化合物を投与することにより精巣障害に起因した *testosterone surge* の障害が生じ、フタル酸エステル類による雄性児の脳の性分化傷害の機序と同様ないわゆる抗アンドロゲン作用の関与していることが挙げられ、実際我々は EE を周産期暴露した雄児動物で血中 *testosterone* レベルの低下を既に確認している。解剖時摘出した脳はメタカーン液にて 4°C、2 時間固定し、視床下部を含む部位について冠状断面を作製後、定法に従って脱水・パラフィン包埋した。包埋脳組織について、18 μm 厚の薄切片を連続して 3 枚作製してマイクロダイセクション用とし、その後 6 μm 切片を作製して HE 観察用とした。そのサイクルを数回繰り返して、マイクロダイセクション用の切片は PEN-foil フィルムにマウントした。マイクロダイセクションは、第 3 脳室周囲の SDN-POA の全領域が含まれる MPOA 領域 (300x500 μm) を対象とした。Total RNA の抽出は RNAqueous-Micro kit (Ambion) を用い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて測定した。回収した 50 ng の total RNA について MessageAmp aRNA kit (Ambion) を用いて 2 回増幅した。その際、枯草菌由来の spike RNA を添加した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome U34A Array (Affymetrix) を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、発現の性差と EE に対する反応性を用量依存性の観点から検索・分類し、内分泌中枢かく乱影響に関与すると考えられる遺伝子クラスターの同定を行った。方法としては、GeneSpring ver.5 (Silicon Genetics) を用いて、per chip normalization は spike RNA のシグナルにより行い、Student's t-test にて発現レベルの比較を行った。次いで、同様の投与実験プロトコルを用いて、DEHP について、明らかに雄性の性分化を傷害する用量である 6000 ppm を設定して妊娠ラットに対して妊娠 15 日目から生後 2 日目まで混餌投与を行い、投与終了時における視床下部 MPOA の遺伝子発現プロファイルを検討した。

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臓器障害負荷による影響評価に関しては、まず、肝障害負荷の影響評価では、昨年度は DBP と肝障害物質である thioacetamide (TAA) のラットに対する併用投与による精巣毒性の増強効果を検討したが、得られた増強効果に対して化学物質間の相互作用による影響が否定できなかったため、15 年度においては肝障害を負荷した後に DBP 投与を行い、精巣障害への修飾作用について検討した。すなわち、6 週齢雄性 F344 ラット 80 匹を 8 群(各 10 匹)に分け第 1-4 群に第 1-4 週まで 4 週にわたり TAA 200 mg/kg 体重を 0.5 ml の PBS に混じて週 3 回腹腔内投与を行い、肝障害を誘導した。一方、第 5-8 群には PBS のみを投与し肝障害非誘発群とした。その後、第 5-9 週に DBP を混餌投与した。第 1, 5 群は 20,000 ppm、第 2, 6 群は 10,000 ppm、第 3, 7 群は 2500 ppm の用量で、第 4, 8 群は基礎飼料のみの投与とし、対照群とした。第 9 週目に屠殺・剖検を行い、肝、腎、前立腺、精囊、精巣、及び精巣上体の各臓器重量を測定するとともに、病理組織学的検索を行った。また、血液生化学及び病理学的検索による肝機能障害の評価を行い、精巣上体から精子を取り出し、精巣毒性の評価として精子数、運動能、及び形態異常の比率について検討した。

次に、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、6 週齢の雄性 F344 ラットに葉酸を 300 mg/kg 体重にて週一回の割合で背部皮下に 5 回投与し、1 週間後に DBP を 1000 mg/kg にて胃チューブにて一回投与した。また 4 週間後も DBP を同様に投与し、何れも投与 12 時間後に尿の採取、一部では 4 時間蓄尿を行い、そのあと動物を屠殺・剖検して、血液と精巣、腎臓、肝臓を採取し、実験試料として供した。対照群には葉酸の溶媒である 0.3M の炭酸ナトリウムを葉酸の代わりに投与し、実験群と同様のスケジュールにて DBP を投与した。血液、尿及び精巣中の DBP と MBP の濃度を HPLC にて測定し、実験群と対照群での濃度を比較した。その際グルクロン酸抱合体も酵素処理の前処理 (β -glucuronidase) によって検討した。更に肝臓と精巣の β -glucuronidase の活性を検討した。またもう一つの対照群として溶媒も投与しないで、DBP を投与した群も設けた。

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、いくつかの動物種に対して *in vivo* あるいは器官培養系を用いた MEHP の暴露実験を行った。まず、若齢ラットへの MEHP 連続経口投与試験においては、28 日齢の SD 雄ラットに 600~1000 mg/kg/day を、5 日間連続経口投与し、6 日目に精巣を採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本は通常の光顕観察及び Tunel 法によるアポトーシス細胞の観察に用い、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。次に、若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験においては、28 日齢の雄 C57B マウスに 500~900 mg/kg/day を、3 日間連続経口投与し、4 日目に精巣を採材して 4%パラフォルムアルデヒド固定を施し、通常の光顕観察及び Tunel 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。更に、若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験として、35 日齢のモルモット (Hartley 系)に MEHP 2000 mg/kg を経口投与し、投与 3, 6, 9 時間後に精巣を採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本は通常の光顕観察及び Tunel 法によるアポトーシス細胞数の観察に用い、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

次に、器官培養系としては、まず若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、2 ヶ月齢のシバヤギ精巣を用い、MEHP (100, 1, 1×10^{-3} , 1×10^{-6} , 0 nmol/ml) を添加して 1, 3, 6, 9 時間後に採材し、5%グルタルアルデヒド固定して電顕で観察した。次いで、若齢ラット精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、20 日齢の SD ラット精巣を用いて、MEHP (100, 1, 1×10^{-3} , 1×10^{-6} , 0 nmol/ml) を添加して 1, 3, 6, 9 時間後に採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本は通常の光顕観察及び Tunel 法によるアポトーシス細胞の観察に用い、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。更に、若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、35 日齢のモルモット (Hartley 系)精巣を用いて、MEHP (100, 10, 1, 0 nmol/ml) を添加して 3, 6, 9 時間後に採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の光顕観察及び Tunel 法によるアポトーシス細胞の観察に用い、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

倫理面への配慮としては、精巣の採材においては、ラットにベ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、マウス・ライディッヒ細胞 MA-10 を 6 穴プレートに 10% FCS-DMEM 中 2×10^5 個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO₂ 中でインキュベーションした後、FCS を含まない DMEM で細胞を洗浄した後、FCS(-) DMDM 中で MEHP を最終濃度 10^{-6} M, 10^{-5} M, 及び

10^{-4} M になるように添加、あるいはコントロールとして DMSO を添加し、更に 24 時間インキュベーションして PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。この抽出 total RNA について、Affymetrix 社製 Mouse Expression 430A Array を用いて Gene Chip による解析を行った。次に、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)遺伝子の MEHP による発現変化について Northern Blotting による解析を行った。すなわち MA-10 を 6 穴プレートに 10%FCS-DMEM 中 2×10^5 個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO₂ 中でインキュベーションした後、FCS(-) DMEM で細胞を洗浄した後、FCS(-)DMDM 中で MEHP を最終濃度 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 及び 10^{-4} M になるよう添加、あるいはコントロールとして DMSO を添加し、更に 24 時間インキュベーションして PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。得られた total RNA についてそれぞれ 20 µg をアガロースゲルで電気泳動し Northern Blotting を行った。

⑤文献調査として、フタル酸エステルの検索は 2000 年から 2004 年の 2 月まで、Medline 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類については、adipate をキーワードとし同様に検索した。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、原著を入手し、内容をまとめた。また、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周産期暴露評価研究のうち、DBP の母動物に対する影響として、妊娠 15-20 日の体重増加率が 20, 10,000 ppm 群で軽度低下したが、摂餌量は各群とも同等であった。出生後から離乳時までは、各群とも体重増加率、摂餌量とも変化を認めていない。以上より、DBP は概ね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、リッターあたりの雄の比率が 2000 ppm で若干低下し、10,000 ppm で強く低下していた。AGD (生後 2 日目) は、雄の 10,000 ppm 群で短縮したものの、雄の他の群や雌では変動を認めなかった。この時期の体重は 20 ppm の雌雄で若干増加していた。生後 14 日目の雄性児動物における乳頭・乳輪の出現頻度は、10,000 ppm で有意に

増加し、低用量から用量依存的な増加傾向を示した。生後 21 日目の解剖時では、雌雄の 10,000 ppm で有意差はないものの体重の低値を示し、これらの動物では肝臓の相対重量が明らかに増加した。雄では、同用量で脳相対重量の増加と精巣の絶対・相対重量の低下も認めた。雌では、雄と同様に脳相対重量の低下傾向を認めた。春期発動の時期に関しては、雄では 200 ppm 群で早く包皮分離が認められたが、それはこの群の中の 1 匹が非常に早い時期に包皮分離を示したことに起因した。雄の他の用量では、包皮分離の時期に変化を認めなかったが、雌では 10,000 ppm 群で有意ではないものの、膣開口の遅延を示した。性周期に関しては、生後 8-11 週の観察では、休止期の延長を示す例が対照群、20 及び 200 ppm 群で各 8 匹中 1 匹づつに認められたが、2000 ppm, 10,000 ppm 群では、それぞれ 2, 4 匹認められた（対照群との間に有意差なし）。生後 17-20 週の観察では、休止期の延長が 2000 ppm の 10 例中 3 例に認められたが（有意差なし）、対照群 20 ppm, 10,000 ppm 群の各 10 例中 1 例にも同様の变化を認めた。また、200 ppm 群の 8 例中 1 例に発情期の延長を認めた。両時期を通じて、他の動物は正常の 4-5 日の性周期サイクルを示した。11 週齢時の解剖では、雌雄とも明らかな体重の変動を認めなかった。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 群で腹側前立腺絶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以外に明らかな変動は認めなかった。生後 21 日目の病理組織学的検索では、10,000 ppm 投与群の雌雄で、エオジン好性の肝細胞肥大を認めた。雄では精細管中の精子細胞数の減少として見出される精子細胞の分化の減少が明らかであった。この変化は 20 ppm より認められ、発生頻度と変化の強さは用量依存的であった。また、Leydig 細胞の集簇巢（50~100 個の細胞塊）も DBP 投与群の精巣で散在していた。この変化は 200 ppm 投与群の 8 例中 1 例に認められ、2000 ppm 以上では発生頻度・強度において有意であった。精巣上体では、精巣上体管のコイリングの減少を反映した切片上の精巣上体管の横断面数の減少が 2000 ppm 以上で認められた。乳腺では乳腺腺房の拡張が 20 ppm より有意差はないものの低頻度で認められた。雌では乳腺腺房の低形成

が 20 ppm より認められ、発生頻度あるいは病変の程度の統計的有意差は 20, 200, 10,000 ppm で確認された。性成熟後の病理組織学的検索結果として、まず精巣及び精巣上体の病理変化は片側性あるいは両側性に出現し、11 週目では、精上皮の部分的な欠落が 200 ppm より見られ、2000 ppm 以上で有意であった。この変化は精巣の 1 横断切面あたり 1~2 本から 10 本程度の精細管に認められる場合が多く、精細管当たりでは部分的な欠落から精細管全体に及ぶものまで様々であった。部分的な病変ではセルトリ細胞の空胞化を示す場合が多く、精上皮細胞が完全に脱落している場合は、いわゆる 'Sertoli cell only appearance' を呈していた。また、巨細胞の形成もしばしば認められた。10,000 ppm 投与例のうち強く障害を受けた例ではライディッヒ細胞の過形成も明らかであり、そのうち 4 例では精巣上体管内に細胞残渣が認められた。また、2 例は精巣上体の萎縮を示した。腹側前立腺は DBP 投与により表面上皮の扁平化を示し、20 及び 10,000 ppm で病変の発生頻度・強度が有意に増加した。乳腺では腺房上皮の空胞変性が明らかで、腺房萎縮も認められた。空胞変性は 20 ppm より有意に増加したが、投与群間での発生頻度や変性の強さは同等であった。雌では 10,000 ppm 群で下垂体の小型化が明らかであった。20 週目の解剖例においても、諸臓器の病理変化は 11 週目での変化と同等であった。精巣では対照群の 1 例にも DBP 投与例と同様の变化を認めている。2000 ppm 群において精上皮の部分的脱落の発生頻度が増加したものの、統計学的有意差はなく、程度も軽微であった。腹側前立腺では '表面上皮の扁平化' が投与例で散見されたものの、有意な変化ではなかった。乳腺の変化は、この時点では対照群でも認められたが、DBP 投与群において '空胞変性' の発生頻度ないし強度の有意な増加が 200 ppm より '腺房萎縮' に関しては 200 と 2000 ppm で認められた。雌では、特記すべき病変は認めなかった。次に、下垂体前葉において下垂体ホルモン陽性細胞率を免疫組織学的に検討した結果、生後 21 日目の検索では、雄の 10,000 ppm で FSH と PRL 陽性細胞率の減少を示したが、LH 陽性細胞率は増加を示した。雌では更に、用量依存的ではないものの FSH 陽性細胞率が 200 ppm より減少を示した。LH 細胞は 2000 と 10,000 ppm で増加し、PRL 細胞は 10,000 ppm で減少した。11 週目においては FSH 陽性細胞率が雌雄とも 10,000 ppm で増加を示したが、LH, PRL 陽性細胞率には変動を認めなかった。更に、11 週齢の雄の乳腺の萎縮性変化に関して、腺房の面積測定を行ったところ、病理組織学的な萎縮性変化のスコアと同等の変化を DBP 投与各群で確認した。

DINP の妊娠後期・授乳期暴露実験を行った結果、

20,000 ppmのみで母動物の体重増加及び摂餌量が強く抑制された。出生児数と雄性児率はDNP投与により変動しなかったが、生後2日目の体重は20,000 ppmで雌雄とも有意に低下した。この時期のAGDは雌において400, 4000 ppm群で若干の延長を認めたのみであった。生後14日目の雄性児動物における乳輪・乳頭の出現は400 ppmより有意に増加を示した。生後21日目の解剖時において、雌雄とも400 ppm以上で体重の低値を示し、20,000 ppmでは、対照群に比べて半分以下の値を示した。臓器の相対重量は、腎臓は雄で4000 ppm以上で、雌では20,000 ppmで増加し、脳は雌雄とも4000 ppm以上で増加を示した。その他、雄の20,000 ppmで精巣と精巣上体重量の若干の増加、雌の4000 ppm以上で子宮重量の若干の増加を認めた。春期発動の時期は、雌雄とも20,000 ppmで遅延したが、雌での8-11週齢時、17-20週齢時での膣スメアの観察による性周期回帰に投与に起因した異常は認められなかった。生後11週の解剖時、体重は雄で400 ppm以上で低値傾向を示し、4000 ppm以上で有意であった。雌では、体重変動に明らかな用量依存性はなく、20,000 ppmのみで体重の低値を示した。臓器相対重量では、雄では精巣が4000 ppm以上で高値を示し、脳は2000 ppmで高値を示した。雌では2000 ppmで肝臓が若干の低値を示した他、脳、下垂体が高値を示した。生後20週においても、雄の体重の用量依存的な低値傾向が明らかで20,000 ppm用量において有意であった。雌では20,000 ppmのみで体重低値を示した。臓器相対重量では、雄では20,000 ppmのみで、脳、精巣、精巣上体の若干の高値を認め、雌においても同用量で脳、子宮相対重量の若干の高値を認めた。病理組織学的検索は継続中であるが、雄の21日目、11週時での精巣・乳腺を検索した途中経過を示すと、投与終了時の21日目において精巣の'精子細胞の発達低下'と'ライディッヒ細胞の過形成'が400 ppmより明らかで、乳腺においては20,000 ppmでalveolar budの低形成が認められた。生後11週時では、精上皮の欠落とライディッヒ細胞の過形成を示す例が4000 ppmより認められた。

フタル酸エステル類による脳の性分化影響の検索に関して、まず、MPOAにおける遺伝子群の構成的発現の性差(>2-fold, p<0.05)を検討したところ、マイクロアレイに搭載されている約8000遺伝子中、雄では57遺伝子が優勢に発現し、雌では14遺伝子が優勢に発現していた。次いで、EEの0.5 ppm投与により発現変動(>2-fold, p<0.05)した遺伝子数を検索したところ、雄で発現上昇するものが20個であるのに対して、低下したものが183個であった。雌では逆に、発現上昇したのが55個で、低下を示したのが2個のみであった。その中で、組み合わせで、雄で発現低

下し、雌で発現上昇した遺伝子数は22個あり、その中で、構成的発現に性差のあるものが8個認められた。次に、EE暴露により、雄のMPOAで用量に応じて発現低下した遺伝子(>2-fold, p<0.05)を検討した結果、0.5 ppmのみで低下したものは139、0.1 ppmからは37、0.01 ppmから用量依存性のみられたものは7遺伝子であった。0.01 ppmあるいは0.1 ppmより変動した遺伝子(>2-fold, p<0.05)を検索したところ、多くは構成的発現に性差が認められ、その中でG蛋白質のシグナリングに関連するGTPase Rab14は強い発現性差を示した。また、雌でEE投与により用量に応じて発現上昇した遺伝子(>2-fold, p<0.05)を検討したところ、0.5 ppmのみでは35遺伝子が上昇し、0.1 ppmからは13遺伝子、0.01 ppmからは7個の遺伝子が用量依存的に発現上昇を示した。0.01あるいは0.1 ppmから発現上昇した遺伝子の多くは、発現に性差を認め、G蛋白質、あるいはそのシグナリングに関連する遺伝子が見いだされた。また、用量に依存しない変動する遺伝子は認められなかった。次に、検索範囲を少し拡大して、雄で優性的に発現した57遺伝子について0.5 ppm EEでの雌雄の反応性(>2-fold, p<0.05)を検討したところ、その内41遺伝子が0.5 ppm EEにより雄で発現低下し、更にもうその中で8遺伝子が雌で発現上昇を示した。また、雄で優性的に発現した57遺伝子の中から、G蛋白質あるいはそのシグナリングに関連する22遺伝子を集計された。そのうち、計16遺伝子は雄で0.5 ppm EEにより発現低下を示し、更にもうその中で3遺伝子(GTPase Rab14, G-protein α 12, Mypt1)は雌で0.5 ppm EE投与により逆の変動を示した。また、発現に性差を認めないもののEE投与により雄で発現低下し、雌で発現上昇する遺伝子として14遺伝子が得られた。そのうち、synaptic vesicle glycoprotein 2 a, synuclein, synaptotagmin 4はシナプスの機能に係わる遺伝子であった。

次に、6000 ppm DEHP投与により、雌雄のMPOAで発現変動(>2-fold, p<0.05)した遺伝子数を集計した結果、雄で増減する遺伝子は少なく、発現上昇を示すものが4個、減少を示すものが12個得られたのみであった。雌では発現上昇するものが3個のみであったのに対して、低下するものが348個であった。また、発現の性差との関連で検索した結果、DEHP投与により雄で発現上昇したものの、雌で発現上昇あるいは低下した遺伝子には、その発現に雌雄差のあるものは含まれていなかったが、雄で発現低下した12遺伝子中10個が雄での構成的発現が高いものであった。その中で、GTPase-activating protein, Endothelin receptor type B, nonselective-type endothelin receptor (ETB receptor), GTPase Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, Sodium channel

III の 6 遺伝子が G 蛋白質のシグナリングに関与し、そのうち GTPase-activating protein, GTPase Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, Sodium channel III の 4 遺伝子が、0.5 ppm EE により発現減少を示す遺伝子であった。

一方、Wistar: Imamichi 系ラットを用いて行った DBP あるいは DINP の周産期曝露実験においては、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、今回の一部の実験ではデータが得られなかった。DINP 投与では、全ての実験群で産子数に有意な変化はなかった。また、生後 3 日齢及び 7 日齢の雌雄ラットの血清中 testosterone 及び estradiol 濃度を検討した結果、DBP 投与実験においては、血清中 testosterone 濃度には 3 日齢では変化はなく、7 日齢の雄の 2000 ppm 群で上昇が見られたが、顕著な変化ではなかった。血清中 estradiol 濃度には、3 日齢の雌の高用量群で上昇が、また 7 日齢の雌雄で低用量群では上昇、高用量群では低下が見られた。一方、DINP 投与は 3 日齢の雄の testosterone 濃度を上昇させたが、7 日齢では変化はなく、また estradiol 濃度に対しては 3 日齢、7 日齢の雌雄ともに顕著な影響は与えなかった。性成熟後の性行動評価の結果、DBP は成熟後（20 週齢）の雄の性行動を高用量で抑制する傾向を示し、特に 200 ppm 群においては射精頻度を有意に抑制した。しかし、射精後の不応期の時間（PEI）には影響を与えなかった。また、血清中 LH, FSH の濃度に変化はなかった。一方、成熟雌ラットにおいては、性周期には特に変化は見られなかったが、ロードーシス商（LQ）を有意ではないが低下させた。また、2000 ppm 投与群では、発情前期の午後に起こる性腺刺激ホルモンのサージのレベルが有意に上昇していた。

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 処置群における肝障害の評価については、血清中 AST と ALT は有意な上昇を認めず、同群では組織学的検索でもわずかに線維化を認めるのみであった。DBP 高用量投与群では非投与群に対し体重増加抑制を認めたが、TAA による付加的影響は見られなかった。肝臓、腎臓の相対重量は DBP の用量に依存して増加を認めた。精巣、精巣上体の相対重量は各群間について有意な差を認めなかった。精子奇形率は、第 1 群において増加し、第 4, 5 群に対して有意な差を認めた。精巣上体における精子数は第 1 群において減少し、同じく第 4, 5 群に対して有意な差を認めた。運動率については同様の傾向を認めなかった。また前立腺重量についても第 1, 5 群がそれぞれ第 4, 8 群に対して有意に減少した

が、TAA 負荷による影響では有意な差を認めなかった。

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、葉酸投与終了後 5 週目で屠殺剖検したラットでは尿の比重の有意な減少と血清中の BUN の上昇を認めたが、葉酸投与 1 週目では明らかな変化はこれらのパラメーターには認められなかった。DBP 投与後 12 時間の強制排尿では十分量の尿が採取できない症例が多くあった。9 週目（葉酸投与終了後 5 週目）での葉酸投与群で尿中の MBP と抱合体の量が有意に減少していたが、6 週目（葉酸投与 1 週目）ではその減少は見られなかった。更に DBP 投与後 4 時間の蓄尿における MBP と抱合体は減少傾向は見られるものの統計学的有意差はなかった。血中の DBP はほとんど検出限界以下であった。MBP の濃度は 6 週と 9 週の両時点で葉酸投与群で軽度上昇を認めたが、統計学的には有意差はなかった。抱合体の量は 6 週目では有意に上昇していたが、9 週目では減少し、一定の傾向は見られなかった。精巣中の DBP は測定限界以下であり、MBP の濃度は何れの時点でも実験群と対照群に差はなかった。精巣と肝臓における β -glucuronidase の活性を SIGMA の測定キットを用いて検討したが、6 週目で肝臓の β -glucuronidase の活性な有意な減少を、9 週目には減少傾向を認めた。

③精巣障害の感受性種差の検索では、まず、in vivo 投与実験のうち、若齢ラットへの MEHP 連続経口投与の結果、精巣重量は 700 mg/kg/day 以上の投与群において、対照群と比べて有意に高い値を示した。顕像においては濃度依存的に精上皮の異常が増大した。アポトーシス細胞数は、800 mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べて有意な増加を示した。顕像観察においては、セルトリ細胞内における空胞の出現、精細胞の脱落による精上皮内における巨大空胞の出現が認められ、またアポトーシス細胞に加えてネクローシスを示すセルトリ細胞、精細胞も観察された。次に、若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験において、精巣重量に関しては実験群と対照群の間で有意差は認められなかった。アポトーシス細胞数は 700 mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べて有意な増加を示した。また、若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験では、投与後 6 時間では精細胞の脱落が、9 時間後では精細胞の脱落による精上皮の薄層化と精巣輸尿管の内腔に充満した脱落精細胞が観察された。アポトーシス細胞数は時間依存的に増加した。顕像ではセルトリ細胞内に空胞出現が認められた。

器官培養系では、まず若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、添加後 3 時間以降にお

いては、アポトーシスを示す精細胞（クロマチン濃縮、形質膜の崩壊を伴わない細胞質萎縮等を示す）、ネクローシスを示す精細胞（膨化、崩壊したミトコンドリア、形質膜の溶解等を示す）、アポトーシスを示すセルトリ細胞（核膜の溶解、核質の濃縮等を示す）及びネクローシスを示すセルトリ細胞（核周囲に沿う辺縁クロマチン、膨化崩壊した細胞小器官等を示す）が認められた。次に、若齢ラット精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、アポトーシス細胞数は、濃度及び時間依存的に増加した。電顕観察においては、若齢シバヤギの実験と同様、アポトーシスを示す精細胞、セルトリ細胞、ネクローシスを示す精細胞、セルトリ細胞が認められた。若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験においては、セルトリ細胞内の空胞出現、精細胞の脱落が認められた。アポトーシス細胞は、濃度及び時間依存的に増加した。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、まず MA-10 細胞において 10^{-6} M, 10^{-5} M, 及び 10^{-4} M MEHP により発現が変化する遺伝子のマイクロアレイ解析を行った。次いで、MEHP により発現上昇した遺伝子に関して、開始コドンの位置が明らかになっているものについてその上流 1 kb までのプロモーター領域での PPRE 配列の有無の検索を行った。その結果、検索したものの中では、PPRE を持たないものが多かった。次に、DGAT 遺伝子の MEHP による発現変化について Northern Blotting により調べたところ、DGAT1 遺伝子の発現には変化がみられなかったが、DGAT2 遺伝子の発現が 10^{-6} M, 10^{-5} M, 及び 10^{-4} M MEHP で約 1.5 倍に増加することが明らかになった。

⑤文献調査結果については、以下に示す。

1. ヒトに関連した情報

低受胎性のカップルの男性 168 人の尿中フタル酸代謝物 8 種の量を測定し、精子の濃度、動き、形態との関係を調べた結果、MBP 量と精子の運動、モノベンジルフタレート (MBzP) 量と精子の濃度に関係があることが分かった [Duty et al., 2003a]。

168 名の男性の精液と尿を採取し、尿中 8 種のフタル酸モノエステルレベルと精子の DNA 損傷の関係をコメントアッセイで調べた結果、尿中モノエチルフタレート (MEP) と精子 DNA 損傷との間に相関関係があることが分かった。MBP, MBzP, MMethyIP, MEHP とは有意な相関関係はなかった [Duty et al., 2003b]。

新生児 84 人の臍帯血中 DEHP 及び MEHP を測定した結果、MEHP 陽性の新生児の在胎期間は MEHP 陰性の新生児より短かった(陽性: 38.16 +/- 2.34 週, 陰性: 39.35 +/- 1.35 週) [Latini et al., 2003]。

子宮内膜症の女性と、対照群の女性の血中 DEHP と MEHP 濃度を測定した結果、DEHP の濃度は子宮内膜症の女性で高い値であった [Cobellis et al., 2003]。

2. DEHP (MEHP)に関連した情報

雄児の精巣

Wistar ラットの妊娠中、授乳中に DEHP(300, 750 mg/kg)単独, DINP(750 mg/kg)単独, DEHP(750 mg/kg)と DEHA(400 mg/kg)の複合, または DEHP(300 mg/kg)と DINP(750 mg/kg)の複合で投与した結果, DINP と DEHP が雄胎児(妊娠 21 日)の精巣 testosterone (T) 産生と精巣及び血中の T レベルを減少, 血中 LH レベルを上昇させた。AGD の短縮と乳頭数の増加が DEHP 暴露の新生児雄ラット(生後 13 日)にみられた。血中インヒピン B レベルの減少は春期発動前の雄ラットで顕著で, 成体でもみられた。DEHP の内分泌への作用は DEHA によって変化しなかったが, DEHP と DINP の複合投与で T 合成の抑制傾向が認められた [Borch et al., 2004]。

精巣

DEHP(100, 1000 mg/kg) を 4 週齢の雄 Wistar ラットに 5 日間与えた結果, DEHP の精巣に与える効果はアンドロステジオンの変化によるものというより, むしろ精巣内の testosterone (T) 5 α -R, アロマトラーゼ及び CYP2C11/3A2 を変化させ, T 代謝を変化させているものと考えられた [Kim et al., 2003]。

DEHP (0.004-4 mg/g) を雄 ddY マウスに暴露させ, 精巣における FasL, Fas 及び Caspase-3 発現と DNA 断片化を 12 時間後に調べた結果, 4 mg/g の DEHP 暴露群のセルトリ細胞内の FasL と精母細胞近くの Fas と精母細胞内の Fas と Caspase-3 の分布が明らかになった。Fas 陽性の精母細胞には DNA 断片化があった。精巣 0.5 μ g 中の断片化した DNA の核の最大数は, 3 (0.004 mg/g), 5 (0.04 mg/g), 7 (0.4 mg/g), 22 (4 mg/g) であった。また 4 mg/g DEHP 暴露では, 断片化した DNA がコントロール群の 2.2 倍であった。DEHP 0.04 mg/g の曝露でも精母細胞の DNA 断片化及びアポトーシスを惹起することが示唆された [Ichimura et al., 2003]。

CD-1 マウスの精細管を MEHP (0.01, 0.1 mM) と共に 4, 8, 24 時間インキュベーションした結果, 8 時間でアポトーシス細胞が増加し, DNA 合成は減少傾向にあった [Suominen et al., 2003]。

遺伝子(雄児)

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が, 雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ, ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する

DEHP, DBP, BBP の *insl3* 遺伝子発現に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠 14-18 日に経口投与し、18 日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンと *insl3* 遺伝子発現の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson et al., 2004]。

遺伝子 (雄)

DEHP の標的遺伝子を特定するために、雄 C57BL/6 マウスに 13 週間 DEHP (0.2, 1.0%) 混餌投与した後、肝臓の遺伝子発現についてマイクロアレイ解析を行った。DEHP により、*Vanin-1* (精巣発生制御)、ホルモン代謝に関与する酵素などは発現増加し、*11βHSDI*, *HSD3β5* は発現減少が認められた。また、ステロイド産生遺伝子 *cyp7B1* は発現減少したが、リン脂質輸送蛋白と *cyp2B9* は誘発された。また、*ALDH3*, *GETtheta2*, *Id2* などの発現も DEHP に影響された [Wong et al., 2002]。

ヒトプロトタイプ *c-Ha-ras* 遺伝子を持った *rasH2* マウスと野生型のマウスに DEHP の混餌投与を 26 週間行った結果、*rasH2* マウスと野生型マウスの両方に、肝臓、腎臓異常のほか、精巣の萎縮、鼻腔エオジン好性体増加などがみられた。肝細胞腺腫は雄 *rasH2* マウスで上昇した [Toyosawa et al., 2001]。

卵巣

ウシの卵細胞 (Cumulus-oocyte complexes) を MEHP (0, 25, 50, 75, 100 μ M) と共に培養すると、MEHP (75, 100 μ M) 存在下では卵細胞が胚胞の状態に残ることが多かった。また、メタフェーズ II に至った卵細胞も減少した。卵丘の発現には変化はなかった。裸化卵細胞では反応がより顕著で、特に MEHP 50 μ M 以上ではメタフェーズ II に至った卵細胞が存在しなかったが、MEHP の存在しない培地を用いてその後続けて 24 時間培養すると、多くの卵細胞がメタフェーズ II に至った [Anas et al., 2003]。

性腺刺激ホルモン (eCG) を未成熟雌 F344 ラットに投与して排卵を誘発させ、DEHP 投与の排卵に対する影響を調べた結果、DEHP (500 mg/kg), 4 日間の投与群では、対象群と比較して排卵される卵の数に減少がみられた [Sekiguchi et al., 2003]。

繁殖

DEHP 0%, 0.03% (44-58 mg/kg/day) を含む飼料を雌雄の CD-1 マウスに対して生後 5 週から与え、生後 9 週で cross-mating して、児分娩まで与えた。繁殖成績に DEHP の有害影響は認められなかった [Tanaka, 2003]。

形態異常

ESBO (epoxidized soy bean oil), DEHP, BBP, DBP の胚に対する影響を whole embryo culture, midbrain 及び limb bud culture で調べた。whole embryo culture では DEHP (1, 10, 100 μ g/ml), BBP 及び DBP (10, 100, 1000 μ g/ml) は胚の発生及び成長に対する阻害作用を示した。BBP, DBP による影響は脳細胞より肢芽細胞で強くみられた。ESBO の胚に対する影響はみられなかった [Seek et al., 2002]。

新生児の肺

Wistar ラットの妊娠 15 日から分娩後 2 日までに DEHP を 1% の割合で混じた飼料を与え (1000 mg/kg/day 以上)、生後 2 日目の新生児ラットの肺 (組織学的に 24-36 週齢のヒトの胎児の肺と類似) を調べたところ、慢性肺疾患のヒト児の異常組織所見と類似していた [Magliozzi et al., 2003]。

3. DBP (MBP) に関係した情報

雄児の精巣

SD ラットの妊娠 12-17 日に 500 mg/kg の DBP を与え、胎児の精巣、コレステロール輸送やステロイド産生経路への影響を調べた結果、*testosterone* (T) 産生低下、*SR-B1*, *P450SCC*, *StAR*, *CYP17* の mRNA 発現減少がみられた。T, mRNA, タンパクレベルは DBP 投与後 24 時間は低かったが、DBP 投与後 48 時間目では増加した。精巣の培養実験においても DBP はコレステロール輸送や *17β-HSD* を除く T 合成経路機能を減少させた。高レベルの DBP は胎児精巣においてコレステロール輸送及びステロイド産生に必要なタンパク発現の急激な増加と可逆性の低下を惹起し、これらが T 合成を低下させ雄生殖器の異常発現の原因になると考えられる [Thompson et al., 2003]。

SD ラットの妊娠 12-21 日に DBP (500 mg/kg/day) を経口投与して雄児の生殖器を調べた。ライディッヒ細胞の凝集、多核細胞化始原生殖細胞の増加、始原生殖細胞数の増加が胎児精巣では認められたが、新生児ラットにはみられなかった。出生後 16 及び 21 日の子で精母細胞数の減少、45-70 日では精上皮に変性が見られ、その程度は 70 日齢で最も顕著であった。70 日齢の子に精巣上体の形態奇形が認められた [Barlow and Foster, 2003]。

Dutch-Belted ウサギの妊娠 15-29 日、雄ウサギの出生後 4-12 週または生後 6-8 ヶ月 (12 週間) に DBP (0, 400 mg/kg/day) を暴露させて、雄ウサギを検査した。その結果、経母体暴露を受けた雄ウサギに最も顕著な毒性が認められ、精子数の減少、精巣及び副生殖腺の重量減少、血中 *testosterone* レベル低下、精巣の組織学的変化、異常精子数増加が認められた。尿道下裂、前立腺低形成、癌化細胞を伴う停留精巣

が認められた [Higuchi et al., 2003]。

Wistar-King ラットの妊娠 15-17 日に MBP (125, 250, 500, 1000 mg/kg) を強制経口投与し、出生前後のラットの精巣の下降の程度を測定した。500 mg/kg 以上の投与量で出生前後における精巣下降不全が認められた [Shono et al., 2003]。

精巣

本班研究の分担研究 (白井) の成果の一つであるが、DBP の毒性が腎機能低下によって影響を受けるかを調べるために、葉酸の皮下注射 (300 mg/kg を 5 週間) により腎機能障害を誘発させた雄 F344 ラットに DBP を 4 週間 1200, 5000, 20,000 ppm (60, 250, 1000 mg/kg) 混餌投与した結果、精細管変性、精子形成減少、異常の精子数増加は、葉酸+DBP 2000 ppm 群で DBP 単独群よりも顕著であった [Tsutsumi et al., 2004]。

SD ラットに DBP, BBP, DCHP を投与したところ、セルトリ細胞の細胞質の微小管網に対する影響は観察されなかった [Nakagomi et al., 2001]。

遺伝子 (雄児)

Wistar-Imamichi ラットに DBP (8.6 mmol/kg: 2393 mg/kg) を 1 回経口投与し、精巣中の PPAR γ に誘発される遺伝子発現変化、インヒビン/アクチビン-フォリスタチンシステムに関連する遺伝子発現変化を調べた。その結果、精巣における PPAR α に調節される CYP4A1 mRNA の増加は有意であったが肝臓での増加ほどでなかった。一方、精巣中の PAI-1 の mRNA レベルが著しく増加し、DBP による PPAR γ の活性化を示唆した。PAI-1 の増加は、精子形成の破壊に関係がある可能性がある。アクチビン B (インヒビン β (B) のホモ二量体) は、精原細胞増殖を促進することが知られているが、インヒビン β (B) の mRNA 減少とフォリスタチン (アクチビン結合蛋白質) の mRNA の上昇が DBP 投与でみられた。DBP による精巣萎縮症のメカニズムの一つとしてインヒビン/アクチビン-フォリスタチンシステムに関連する遺伝子発現の変化が示唆された [Kobayashi et al., 2003]。

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ、ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する DEHP, DBP, BBP の胎生期精巣における insl3 遺伝子の発現に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠 14-18 日に経口投与し、18 日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンと insl3 遺伝子の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson et al., 2004] (前掲-DEHP)。

雄ガエル

遺伝的に雄ガエル (*Rana rugosa*) である受精後 19-23 日のオタマジヤクシを DBP に暴露させ、40 日に生殖腺を調べた。ポジティブコントロールである 17 β -estradiol (0.01, 0.1, 1 μ g) の暴露では一部もしくはすべてのオタマジヤクシの生殖腺が卵巣様構造となった。DBP (1, 10 μ g) 暴露の一部のオタマジヤクシでも同様の結果がみられた [Ohtani et al., 2000]。

形態異常

BBP (281-1687 mg/kg) とその代謝物である MBP (200-1200 mg/kg) と MBzP (231-1384 mg/kg) を妊娠 8 日の OF1 マウスと妊娠 10 日の SD ラットに経口投与したところ、マウスでは胚致死と奇形がみられたが、ラットでは影響は認められなかった。Whole embryo culture でも MBP 及び MBzP に対する感受性はマウスの方が高かった [Saillenfait et al., 2003]。

ESBO (Epoxidized soy bean oil), DEHP, DBP, BBP の胚に対する影響を whole embryo culture, midbrain and limb bud culture で調べた。Whole embryo culture では DEHP (1, 10, 100 μ g/ml), BBP 及び DBP (10, 100, 1000 μ g/ml) は胚の発生及び成長に対する阻害作用を示した。BBP, DBP による影響は、脳細胞より肢芽細胞で強くみられた。ESBO に胚に対する影響はみられなかったが、高濃度の DEHP, DBP, BBP では胚に対する影響がみられた [Seek et al., 2002] (前掲-DEHP)。

4. BBP (MBP and MBzP) に関連した情報

雄児

分担研究者 (江馬) らの報告で、Wistar ラットの妊娠 15-17 日に MBzP を経口投与して胎児に対する影響を検索したところ、250 mg/kg 以上の投与群で雄胎児の AGD 短縮及び精巣下降不全の頻度の増加がみられた [Ema et al., 2003]。

雄児の精巣

Wistar-King ラットの妊娠 15-17 日に MBP (125, 250, 500, 1000 mg/kg) を強制経口投与し、出生前後のラットの精巣の下降度を測定した。その結果、500 mg/kg 以上の投与量で出生前後に精巣下降不全が認められた [Shono et al., 2003] (前掲-DBP)。

遺伝子 (雄児)

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が、雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ、ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する DEHP, DBP, BBP の胎生期精巣における insl3 遺伝子の発現に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠

14-18日に経口投与し、18日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンとinsl3遺伝子の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson et al., 2004] (前掲-DEHP, DBP)。

精巣

SDラットにDBP, BBP, DCHPを投与したところ、セルトリ細胞の細胞質の微小管網に対する影響は観察されなかった [Nakagomi et al., 2001] (前掲-DBP)。

形態異常

BBP (281-1687 mg/kg)とその代謝物であるMBP (200-1200 mg/kg)とMBzP (231-1384 mg/kg)を妊娠8日目のOF1マウスと妊娠10日目のSDラットに経口投与したところ、マウスでは胚致死と形態異常がみられたが、ラットでは影響は認められなかった。Whole embryo cultureでもMBP及びMBzPに対する感受性はマウスの方が高かった [Saillenfait et al., 2003] (前掲-DBP)。

ESBO (Epoxidized soy bean oil), DEHP, DBP, BBPの胚に対する影響をwhole embryo culture, midbrain and limb bud cultureで調べた。Whole embryo cultureではDEHP (1, 10, 100 µg/ml), BBP及びDBP (10, 100, 1000 µg/ml)は胚の発生及び成長に対する阻害作用を示した。BBP, DBPによる影響は、脳細胞より肢芽細胞で強くみられた。ESBOに胚に対する影響はみられなかったが、DEHP, DBP, BBPの高濃度では胚に対する影響がみられた [Seek et al., 2002] (前掲-DEHP, DBP)。

5. DINP (MINP)に関連した情報

雌雄児

分担研究者(渋谷)らの報告で、SDラットの妊娠15日-分娩後10日にDINP (400, 4000, 20,000 ppm)を混餌投与し、新生児ラットを調べた結果、20,000 ppm投与群の児に減数分裂精母細胞及びセルトリ細胞の変性、黄体減少がみられたが、変化はわずかで最小限にとどまっていた。視床下部SDN-POAのサイズにも変化がなかった [Masutomi et al., 2003]。

雄児の精巣

Wistarラットの妊娠中、授乳中にDEHP(300, 750 mg/kg)単独, DINP(750 mg/kg)単独, DEHP(750 mg/kg)とDEHA(400 mg/kg)の複合, またはDEHP(300 mg/kg)とDINP(750 mg/kg)の複合で投与した結果, DINPとDEHPが雄胎児(妊娠21日)の精巣testosterone (T)産生, 精巣及び血中のTレベル減少, 血中LHレベル上昇させた。AGDの短縮と乳頭数の増加がDEHP暴露の新生児雄ラット(生後13日)

にみられた。血中インヒピンBレベルの減少は春期発動前の雄ラットで顕著で、成体でもみられた。DEHPの内分泌への作用はDEHAによって変化しなかったが、DEHPとDINPの複合投与でT合成の抑制傾向が認められた [Borch et al., 2004] (前掲-DEHP)。

6. Polyvinylacetate Phthalate についての情報 生殖発生

ラット, マウス, ウサギ, ビーグル犬に対するPVAPの発生, 生殖, 急性, 慢性毒性などを調べた結果, 急性経口毒性はマウス, ラットでは低かったが(LD50>8000 mg/kg), ビーグル犬では若干高かった(致死量:5000 mg/kg)。生殖発生毒性は認められなかった。NOAELはウサギ発生毒性試験で100 mg/kg/day, 24ヶ月ラットとイヌ試験で500 mg/kg/day, ラット1世代繁殖で1000 mg/kg/dayであった [Schoncker et al., 2003]。

7. 総説

NTP-CERHRの7種のフタル酸エステル類(DBP, BBP, DnHP, DEHP, DnOP, DINP, DIDP)に関する評価文書作製(2002年)後の研究について評価し, 以下の4項目にまとめられた。

- 1) 一般集団内のフタル酸エステル類の暴露はNTP-CERHRの推定値と同等かそれよりも低いレベルであった。
- 2) げっ歯類の実験から得られたデータはヒトのリスク評価に有用である。
- 3) 霊長類のある特定のフタル酸に対する感受性は, げっ歯類のものより低いかもしれない。
- 4) 医療器具からのDEHP摂取はNTP-CERHRが設定したNOAELより高い可能性があるが, 玩具からのDINP摂取は危険なレベルには達していないと推測される [McKee et al., 2004]。

8. アジピン酸エステルについての情報

Wistarラットを用いdi(2-ethylhexyl)adipate (DEHA)投与による発生毒性を調べた結果, DEHAによる妊娠期間の延長(800 mg/kg/day), 出生後の死亡率増加(400, 800 mg/kg/day), 新生児ラットの持続的体重減少(800 mg/kg/day)が認められたが, 抗アントロゲン作用は認められなかった [Dalgaard et al., 2003]。

D. 考察

①SD:IGSラットを用いた周産期暴露影響評価として, 今年度はDBPの評価を終了し, DINPについては, その動物実験は終了した。DBPの評価結果としては, 既に報告があるような雄の性分化傷害 [Mylchreest et al., 1998; Barlow and Foster, 2003]が確

認され、精巣に関しては生後 21 日目の暴露終了時では毒性影響が 20 ppm より出現するものの、その精巣の変化は既に報告にあるように殆ど可逆的であった [Barlow and Foster, 2003]。しかし一方で、DBP による永続的な影響として雄での乳腺変化が、それも 20 ppm より生じることを世界で初めて見出した。また、雌においても、離乳時の乳腺変化、性成熟後の下垂体重量やホルモン産生細胞率の変動など、性分化障害を示唆する変化を初めて見出す結果となった。統計的に有意な変動ではないが、10,000 ppm で観察された春期発動の遅延や性周期の異常は、雌の性分化障害を支持する結果となっている。

DBP を含むフタル酸エステル類による発達途上の精巣に対する毒性影響として重要なポイントは、雄の性分化に必要な testosterone の生成・分泌阻害に起因した抗アンドロゲン作用に類似した影響である [Gray et al., 2000; Mylchreest et al., 2002]。もしこれが雄の脳の性分化の臨界期に生じた場合、生殖行動を含む生殖機能は影響を受ける可能性がある。抗アンドロゲンであるフルタミドをラットに対して周産期投与した場合、視床下部に存在する雌雄で異なる分化を示す神経核群のサイズに、雄のみならず雌においても影響を与えることが知られている [Lund et al., 2000]。一方、フタル酸エステル類による実験動物を使った脳の性分化影響に関しては、我々が以前行った DINP による視床下部 SDN-POA のサイズに変化がないとする報告 [Masutomi et al., 2003] 以外、殆ど報告がない。DBP は DINP に比較して、発達期のラットに対してより強い精巣毒性を示すことが知られているが [Gray et al., 2000]、本研究においては、雄ラットに対して春期発動前と性成熟後の両方で、下垂体や乳腺に対する明らかな影響を示している。このことは、おそらく testosterone 生成・分泌不全に起因した視床下部—下垂体軸への影響を介した、雄の内分泌系に対する構造的な影響を示唆している。

抗アンドロゲンと同様に、フタル酸エステル類による雌の生殖器系の発達に対する影響は報告はされていないが、DEHP と DBP は成熟後の雌の卵巣に対して多嚢胞性の変化を誘発することが報告されている [Lovekamp-Swan and Davis, 2003]。DEHP の活性代謝産物である MEHP は、卵巣の顆粒膜細胞に対して peroxisome proliferator-activated receptor を活性化することにより、cAMP を低下させてエストロゲン合成を直接に阻害することが報告されている [Lovekamp and Davis, 2001; Lovekamp-Swan and Davis, 2003; Lovekamp-Swan et al., 2003]。DEHP は更に 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV を誘導して estradiol の代謝を促進することが報告されている [Fan et al., 1998]。以上より、フタル酸エステル類は

雌のエストロジェンの作用に対して複数のポイントで影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、発達期のラット卵巣は少なくとも生後 24 日までの間は estradiol を合成できないので [Csemus, 1986]、DBP が発達期の卵巣に対してどのような影響を及ぼすのかは不明なままである。本研究においては、DBP により雌の性分化に対する影響は性成熟後にも認められたため、視床下部—下垂体軸を介した影響と考えられ、脳の性分化に必要な内因性の性ステロイドの代謝に影響を与えることにより、雌においてさえ視床下部の分化に影響を及ぼした可能性がある。また、フタル酸エステルの一つであるフタル酸ベンジルブチルは、その周産期の暴露により、雌ラットにおいて不妊と性行動の障害を及ぼすことが報告されている [Gotz et al., 2001]。

本研究において DBP 暴露を受けた雄児動物は、生後 11 週目で明らかな用量依存性を認めないものの、下垂体相対重量の増加と乳腺の病理組織学的変化を 20 ppm の用量より誘発した。この下垂体重量の変化をもって、毒性影響と断定することは危険であるが、20 週齢の雌で 200 ppm より逆の変化（減少）を認めており、生後 21 日目でも下垂体ホルモン産生細胞率の変動を同用量から認めている。雄でも、下垂体ホルモン産生細胞率の変動を 21 日目、11 週目で認めていることから、雄においても低い用量から下垂体機能が影響を受けている可能性がある。性成熟後の雄における乳腺の変性あるいは萎縮性変化の生物学的意義は明らかではないが、これらの変化は 11 週目のみならず 20 週目でも観察されていることから、非可逆的で永続的なものであると結論づけられる。

我々は別の研究において、若齢の雄性ラットに対するフルタミドの反復経口投与により、乳腺腺房の萎縮性変化を検出しており [Toyoda et al., 2000]、いくつかの *in vivo* 及び *in vitro* の研究でフルタミドは乳腺腺房細胞の発達に対して直接作用して抗アンドロゲン作用を示すことが報告されている [Di Monaco et al., 1993; Sourla et al., 1998]。我々の DBP による雄乳腺に対する影響は、このフルタミドによる直接的なメカニズムと異なるものと考えられる。現在のところ、春期発動以降の雄の乳腺の発達に対する内分泌コントロールや DBP による抗アンドロゲン作用に関しては殆ど情報が無いが、エストロゲン作用を示すことが知られている methoxychlor と genistein に関して、母ラットに対して妊娠から授乳期にかけてこれらの物質を投与することにより、雄の出生児での乳腺の発達が促進されるとの報告がある [You et al., 2002]。またこの報告では、PRL 等のホルモンは変動していないため、これらの物質が乳腺の発達に影響を及ぼす成長因子等の局所的因子に影

響を与えている可能性が指摘されている。ただし、この報告では暴露終了時での変化のみを検索しており、病変の可逆性あるいは不可逆性に関して検討を進めていない。我々の研究では血清 PRL レベルを測定していないが、生後 11 週目の雄においては下垂体 PRL 陽性細胞率の変動を認めていないことから、PRL の関与に関しては否定的である。

我々の以前の報告において、下垂体ホルモン陽性細胞率の変動は、そのホルモンの血清レベルとよく相関していることを議論している[Masutomi et al., 2004]。今回の DBP の影響評価に関しては、生後 21 日目の雄で 10,000 ppm 暴露により LH 陽性細胞率が増加している。LH はライディッチ細胞機能の調節をしており、発達期ではその分化を促進し、成熟した細胞に対してはステロイド合成酵素の発現維持に機能することが知られている[Ewing and Zirkin, 1983]。我々の今回の研究結果は、testosterone レベルの減少に対するネガティブ・フィードバックを反映して、結果として反応性のライディッチ細胞の過形成を生じているものと考えられる。一方、発達期の精巣において最初の減数分裂細胞の出現に先んじて FSH が分泌されること[Döhler and Wuttke, 1974]、また幼若な雄ラットに対して FSH を注射することにより精祖細胞数と血清中 testosterone レベルの増加することが知られており[Kula et al., 2001]、アンドロジェンと FSH の両方が精子形成の開始に必要なことが示唆される。更に、発達過程での PRL の阻害により、精巣の成熟障害と不妊の誘発されることが報告されている[Bohnet and Friesen, 1976]。報告によると、妊娠期間中での DBP 暴露により精子細胞が消失するが、これは gonocyte の傷害によりこれらの細胞が精祖細胞へ分化するための基底部への移動が阻害されるためだと言われている[Barlow and Foster, 2003]。今回の DBP の暴露評価においても、DBP により春期発動前で精子細胞の発達の減少と FSH 及び PRL 陽性細胞率の減少を認めており、gonocyte の変性に伴う精子形成の遅延が関与していると考えられる。

本研究において、DBP 暴露した生後 21 日目の雌の下垂体で、FSH 陽性細胞率と PRL 陽性細胞率がそれぞれ 200 ppm 以上、10,000 ppm で減少を示した。一般的に、PRL レベルの持続的な上昇が雌のラットにおける春期発動のタイミング決定に必要であると考えられている[Kawagoe and Hiroi, 1989; Becu-Villalobos et al., 1992]。人工的に春期発動を遅延させた雌ラットでは、春期発動前に血中の LH レベルは変化しないものの、FSH と PRL レベルが低下する[Fomeris and Aguado, 2002]。他方、環境エストロジェンである nonylphenol の暴露を受けた雌ラットでは血中 LH レベルの減少と春期発動の促進を認めて

いる[Nagao et al., 2001]。以上より、LH の果たす役割は明らかではないが、春期発動前の雌の下垂体に認められた一連の変化は、少なくとも 10,000 ppm においては、春期発動の遅延に関連していると考えられた。

DBP 暴露評価実験において、2000 ppm と 10,000 ppm 群で雄性児率が減少を示した。2000 ppm での減少は軽度であり、対照群で雄性児率が高かったことが、この用量での相対的な減少を招いたと思われるが、10,000 ppm での減少率は大きく、その原因は不明なままである。

最近、フタル酸エステル類の周産期暴露影響評価として、USEPA の Gray らが 2003 年の米国トキシコロジー学会において、DEHP について十分な動物数(ラット)を用いての評価結果を発表し、11 mg/kg 体重以上の用量で、重量変化を伴った雄性生殖器の障害と肝臓と副腎の重量変化を確認し、その結果、NOAEL を求めることができず LOAEL が 11 mg/kg 体重と判断された[Gray et al., 2003]。この新たに提出された研究結果から、マウスによる生殖発生毒性試験[Lamb et al., 1987; NOAEL: 14 mg/kg/day] やラット精巣毒性[Poon et al., 1997; NOAEL: 3.7 mg/kg/day] をもとに設定された、本邦での DEHP の TDI の見直しが必要になると考えられる。DBP に関しては、発達期暴露による NOAEL と LOAEL は、Mylchreest らの報告(2000)で示された雄性の性分化障害を指標として、それぞれ 50 mg/kg, 100 mg/kg/day とされている[Kavlock et al., 2002]。我々の今回の研究成果からは NOAEL は求められなかったが、LOAEL は母動物に対する混餌用量で 20 ppm [1.5-3.0 mg/kg/day]となった。DBP や DEHP の発達期毒性に関しては、脳の性分化障害のリスクはあるものの、殆どの報告では下垂体や乳腺影響を検索していないため、これからはこれらの化合物による視床下部-下垂体軸の発達期毒性のメカニズムについて更なる研究が求められる。また、今回の研究により、下垂体を含む雌での性分化影響も見出されたことから、フタル酸エステル類の毒性標的性のみならず毒性発現用量に関しても再検討が必要と考えられる。

次に、DINP に関して今回、400, 4000, 20,000 ppm の周産期暴露実験を行った結果、20,000 ppm において新生児期から実験終了時(性成熟後の時期)まで、雌雄の体重の減少を認め、投与終了時(21 日目)の時点においては、雌雄とも対照群の半分以下の低値を示した。他方、雄性児の乳頭・乳輪の出現(生後 14 日目)は 400 ppm 以上の群で認められ、離乳時の雄で精巣の精子細胞の分化の減少が 400 ppm 以上で用量依存性に認められている。また、雌雄とも 20,000 ppm 群で春期発動が有意な遅延を示したが、性周期

に有意な変動は認められなかった。病理組織学的検索は全臓器について終了していないが、雄で精巣と乳腺を検索した結果では、11週目では非常に弱いながらも4000 ppm以上で精巣変化を認めた。乳腺は離乳時に20,000 ppm群で腺房の低形成を認めたのみであった。以上より、DINPに関しては、20,000 ppm群で認められた変化は、体重の低値に起因ないし影響を受けるものが多かったが、400 ppm以上で認められた雄性児の乳頭・乳輪の出現、暴露終了時での精巣障害は雄の性分化傷害を示唆する変化と考えられた。この化合物については、全臓器の病理組織学的検索結果を待つ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MPOA特異的な性分化障害の指標遺伝子群の探索を、脳の性分化障害の対照物質であるEEと、フタル酸エステル類のうち、明らかに雄で性分化障害を誘発することが知られているDEHPのラットを用いた周産期暴露例で、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法を組み合わせを行ったが、まず、MPOAで発現性差を示す遺伝子を探索したところ、雌より雄で高い発現を示すものが多く、これらは雄性児での生後直後のtestosterone surgeに対応したMPOA内で反応する遺伝子群である可能性が指摘された。また、これらの多くは、周産期のEE暴露により雌雄で発現変動を示すものが多いことが判明した。その中で雄で発現低下し、雌で発現上昇するものが多く、それらの遺伝子の脳の性分化への関与が示唆された。

また、雄で優勢に発現し、EE投与により雌雄で発現変動する遺伝子の中にG蛋白質とその関連遺伝子が多く見いだされ、EEによる脳の性分化障害にG蛋白質のシグナリングの関与している可能性が示唆された。その中で、GTP-binding protein (G α i)は、エストロジェンの転写を介さないnon-genomicな急性反応への関与が報告されており[Wyckoff et al., 2001]、同様の発現挙動を示すGTPase Rab14と共に、脳の性分化障害時にnon-genomicな反応の介在する可能性が指摘された。一方、DEHP暴露例では、雄で変動する遺伝子は少数であったものの、雌で発現減少を示す遺伝子が多数見出され、この時期での雌のMPOAの分化が著しく傷害されている可能性が指摘できる。また、雄でDEHP投与により発現低下した12遺伝子のうち10遺伝子が構成的に雄で優勢な発現を示していたことから、これらの遺伝子は雄のMPOAの性分化に関与し、その性分化がDEHP投与により障害された可能性が指摘される。更に、そのうちの6遺伝子がG蛋白質シグナリングに係わるものであり、その中で4遺伝子(GTPase-activating protein, GTPase Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, Sodium channel III)がEE暴露例の雄でも発現低下を示していることから、これらの遺伝子は

EE投与例と同様のtestosterone surgeの阻害による雄での性分化障害に関連する遺伝子である可能性が指摘された。また、EEの0.01 ppmという非常に低い用量から反応する遺伝子であるため、内分泌かく乱化学物質による脳の性分化障害の検出指標としての有用性に期待が持たれる。今後、EE、DEHPの検索の結果得られた候補遺伝子についてreal-time RT-PCRによる発現変動の検証を行う予定である。

Wistar: Imamichi系ラットを用いた血中性ステロイドレベルと性行動に関する評価研究においては、DBPの周産期暴露によっても、3日齢、7日齢の血清中testosterone濃度の低下は認められなかった。このことから、精巣のステロイド産生機能は、少なくとも脳の性分化の臨界期である新生子期には一時的に回復している可能性が考えられた。一方、血清中estradiol濃度にも変化が認められたが、これが母体に対する効果によるものか、あるいは胎子・新生子に対する直接的な効果によるものかについては、今後更に検討を要する。一方、DINPの投与群では血清中estradiol濃度には変化はなかったが、3日齢の雄で一過的なtestosterone濃度の上昇が見られた。これは精巣に対する直接的な効果によるものと考えられるが、中枢に対する抗アンドロゲン作用により性腺刺激ホルモンレベルが上昇することによる可能性も否定はできない。また、DBPの周産期暴露により、成熟雄ラットにおいては性腺刺激ホルモンレベルに変化はないにもかかわらず性行動の抑制が見られた。また、成熟雌ラットにおいても、性周期に異常は認められなかったが、性行動の低下傾向や性腺刺激ホルモンサージの上昇が見られた。これらの原因の解明については、成熟動物における血清中性ステロイドレベルを更に調べる必要がある。ただ、上記のように脳の性分化の臨界期の血清中testosterone濃度に低下が認められなかったことから、この時期の脳にDBPが直接作用し、脳の性分化に影響を与えた結果である可能性が考えられる。今後は、DINPの成熟動物における実験ならびにDEHAを用いた実験を行うとともに、視床下部遺伝子の発現に対する影響についても解析を行い、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。

②基礎疾患による修飾作用に関する研究のうち、肝障害負荷による修飾作用を検討する研究において、今年度はTAA投与により肝障害を誘導した後DBPを投与するという系でDBPの精巣毒性を検討した。結果については、TAAとDBPを同時併用投与した実験系(昨年度実施)とほぼ同様の傾向を認めた。肝障害の程度は血液中肝逸脱酵素及び、組織学的検索で明らかな差を認めず、屠殺時には肝障害が回復

していた。にもかかわらず精子数、奇形率において TAA 投与群と非投与群の間で DBP 高用量投与により毒性の増強を認めた。この結果は、可逆的な肝障害時にも DBP の精巣毒性が増強するという結果を支持する。今回は 20,000 ppm という高用量において精巣毒性の有意な増強効果を認めたが、DBP の活性代謝物である MBP が肝機能低下により何らかの影響を受けている可能性がある。メカニズム解明の目的で、肝障害誘導後の DBP 投与を行い血液中、精巣中の MBP 濃度を測定したが、一定の結果を得ることができず、現在、再実験中である。今後、TAA による DBP 精巣毒性増強作用の発現メカニズムについては更なる追究が必要である。また今回の実験系が、肝障害状態における種々の化学物質による雄性生殖器毒性増強効果の検出手段のひとつとなりうることも判明した。同様の内分泌攪乱物質についての検索に活用されることが期待できる。

腎障害負荷による修飾作用の検討に関しても、昨年度認められた腎障害下での DBP の精巣毒性の増強作用は極めて明瞭であった。その増強作用メカニズムとして、経口投与された DBP は速やかに腸内で加水分解されて MBP になり、体内に吸収されて毒性を発揮する。したがって腎障害下では血中の MBP の濃度が対照に比して高く保たれ、そのために精巣毒性がより強く現れるという仮説を立てた。血中の MBP の上昇の一因として腎からの排泄量の減少のほか、グルクロン酸抱合体の形成への影響やそれを左右する肝や精巣の β -glucuronidase の活性にも葉酸が作用しているとの推察をして今回の実験を行った。その結果、血中の MBP が上昇と尿中の MBP の減少傾向が見られ、MBP の血中濃度上昇が一因であることが示唆される結果であった。ただし、観察された精巣毒性の増強作用を十分に説明できるものではなさそうであり、更に水酸化体など他の代謝物の関与についても検討する必要がある。尿中の抱合体の減少は肝臓における β -glucuronidase 活性の減少によるものかもしれない。精巣の β -glucuronidase の活性は変化しないことが明らかとなった。

③精巣障害の感受性種差に関する研究で、MEHP のラット及びマウスへの連続経口投与試験の結果、5日間連続投与したラットでは 800 mg/kg/day で、3日間連続投与した 700 mg/kg/day で精上皮中のアポトーシス細胞数が最大となった。また、電顕観察の結果から、これまでの報告と同様、MEHP 投与→セルトリ細胞の変性（空泡出現等）→精細胞（主に精母細胞）のアポトーシスによる脱落→精上皮の薄層化→精細管の萎縮→精巣萎縮の順に変化が進行することが示唆された。セルトリ細胞の変性に伴う精細胞の脱落については、MEHP 投与によるセルトリ細胞

内のビメンチンフィラメントの異常が指摘されているが、精細胞接着部におけるアクチンフィラメントの異常の可能性もあり、今後更に検討が必要である。MEHP の精巣器官培養系への添加試験では、アポトーシス細胞数の変化を指標とした場合、ラット及びモルモットにおいて、類似した影響が認められた。すなわち両者ともに濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。今後、マウス及びサル類の精巣器官培養系への MEHP 添加試験、モルモットへの連続経口投与試験等を試み、種差の要因（経口投与による代謝経路の差異か、セルトリ細胞自身の感受性の差異か）について更に検討を進める予定である。

④精巣障害の分子メカニズムに関する研究で、MEHP はマウス・ライディッヒ細胞 MA-10 において複数の遺伝子の発現を変化させることが明らかになった。しかし、これらの遺伝子の中で働きに関連のあるものはなかった。また、プロモーター領域に PPRE を有するものもほとんどなかった。今後、検索するプロモーター領域を上流 2 kb まで広げて検討を行う。一方、フタル酸エステル類は PPAR α や PPAR γ に結合することが報告されている。しかし、これはあくまでもフタル酸エステル類が PPAR のリガンドとして働き得ることを示しているだけで、フタル酸エステル類が他のメカニズムで作用している可能性もある。また今回の研究で、DGAT2 遺伝子の発現が MEHP により上昇した。TG を合成する本酵素が精巣内でどのような働きをしているのかは不明だが、MEHP がコレステロールのみならず（昨年度報告）、中性脂肪の合成にも影響を及ぼしている可能性がある。精巣では、セルトリ細胞とライディッヒ細胞の両方が影響を受けていると考えられる。今後、マイクロアレイ解析から得られた遺伝子の発現変化を Northern Blotting により確認後、更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。

⑤文献調査研究において、ヒトの疫学に関する報告では男性尿中フタル酸エステル・レベルと精子性状との関係、臍帯血中フタル酸エステル・レベルと在胎期間との関係、子宮内膜症女性の高血中フタル酸エステル・レベルを示唆する報告がなされているが、これらの直接的な関連性については現在のところ不明である。フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響に関する論文においても精巣に対する影響が遺伝子レベルで検討されている。発現メカニズムとして testosterone レベルの低下とこれに関連する遺伝子発現の変化が示唆されている。妊

娠中曝露による次世代での形態異常発現に関する研究では、ラットよりもマウスの方が感受性が高いことが報告された。また、*in vitro*の実験により、BBPの主要な代謝物であるMBP及びMBzPがラット胚に形態異常を惹起することが示された。このことは、MBP及びMBzPを妊娠ラットに投与したときにも胎児奇形を発現することと共に、BBPの催奇形性が代謝物により発現することを示唆している。

アジピン酸エステル類に関してはラットの妊娠中に投与したDEHAにより妊娠期間の延長と児体重増加抑制がみられたが、抗アンドロゲン作用は認められなかったことが報告されており、今のところフタル酸エステル類よりも強い生殖発生毒性を示唆する報告は見当たらない。

今年度の文献調査では、TDIの見直しを必要とするような論文は出版されていないが、Society of Toxicologyの2003年年会(2003年3月)において、GrayらはDEHPをラットの妊娠中、生後に投与した際、雄児で精巣及び精巣上体の異常、性成熟の遅れ等の抗アンドロゲン作用が認められたことからLOAELは11 mg/kgであると報告した。この結果はマウスによる生殖発生毒性試験[Lamb et al., 1987; NOAEL: 14 mg/kg/day]やラット精巣毒性[Poon et al., 1997; NOAEL: 3.7 mg/kg/day]をもとに設定されたTDIの見直しが必要になることを示唆している。来年度には彼らの論文が出版されると予想され、内容の詳細な検討が必要となる。

E. 結論

①SD:IGSラットを用いた周産期曝露影響評価として、DBPについて病理検索を中心とした解析を実施したところ、雌では下垂体機能を含む性分化の傷害が明らかとなり、雄では精巣毒性は殆ど可逆的ではあるものの、乳腺影響は非可逆的であり、かつ20 ppmより認められた。DBPに関しては、発達期曝露によるNOAELとLOAELは、2000年に発表されたMylchreestらの報告をもとに、それぞれ50 mg/kg、100 mg/kg/dayとされている。我々の今回の研究成果からはNOAELは求められなかったが、LOAELは母動物に対する混餌用量で20 ppm (1.5~3.0 mg/kg/day)となった。DINPに関しては、20,000 ppm群で認められた変化は体重の低値に起因ないし影響を受けるものが多かったが、400 ppm以上で認められた雄性児の乳頭・乳輪の出現、曝露終了時での精巣障害は雄の性分化傷害を示唆する変化と考えられた。この化合物については、全臓器の病理組織学的検索結果を待って総合的に評価する。

脳の性分化障害に関する責任遺伝子の探索については、視床下部MPOA特異的な性分化障害の指標遺伝

子群の探索を、EEとDEHPのラット周産期曝露例で、マイクロダイセクション法とマイクロアレイ法を組み合わせて行ったが、まず発現性差に関しては雌より雄で高い発現を示すものが多く、雄性児での生後直後のtestosterone surgeに対応したMPOA内で反応する遺伝子群である可能性が指摘された。これらの中に周産期のEE曝露により雄で発現低下し、雌で発現上昇するものが複数見出され、それらの遺伝子の脳の性分化への関与が示唆された。更に、雄で優勢に発現し、EE投与により雌雄で発現変動する遺伝子の中にG蛋白質とその関連遺伝子が多く見いだされ、EEによる脳の性分化障害にG蛋白質のシグナリングの関与している可能性が示唆された。DEHP曝露例では、変動遺伝子の絶対数からこの時期での雌のMPOAの分化が著しく傷害されている可能性が示唆された。また、雄でDEHP投与により発現低下した12遺伝子中10個が構成的に雄で優勢な発現を示し、そのうちの6遺伝子がG蛋白質シグナリングに係わるものであり、その中で4遺伝子がEE曝露例の雄でも発現低下を示していることから、これらの遺伝子はEE投与例と同様のtestosterone surgeの阻害による雄での性分化障害に関連する遺伝子である可能性が指摘された。

Wistar:Imamichiラットを用いたDBPの周産期曝露により、新生子期にはステロイド産生能は一時的に回復していることが示唆された。しかし、脳に直接作用してその性分化に影響している可能性がある。また、DINPの周産期曝露は新生子期の雄のアンドロゲン産生を一過的に高めることが示唆された。

②基礎疾患による修飾作用については、まず肝障害モデルにおいて、TAAにより肝障害を誘発した状態で、DBPの精巣毒性は増強された。昨年度報告したTAAとDBP同時投与の系のみならず、今回のTAA投与後にDBPを投与する系でも毒性は増強された。ただし、その増強作用はDBP最高用量にのみ認められた。また、腎障害モデルにおいては、葉酸による腎障害下でのDBPの精巣毒性増強作用は血中のDBPの主要代謝物であるMBPの濃度が上昇することが要因の一つであると結論付けられる。

③精巣障害の感受性種差に関する研究では、MEHPのラット及びマウスへの連続経口投与試験の結果、ラットでは800 mg/kg/dayで、マウスでは700 mg/kg/dayで精上皮中のアポトーシス細胞数が最大となった。Tunel法及び電顕観察により、MEHP投与による精巣の萎縮は、セルトリ細胞の変性(空泡出現等)→精細胞(主に精母細胞)のアポトーシスによる脱落→精上皮の薄層化→精細管の萎縮→精巣萎縮の順に進行することが示唆された。MEHPのラ

ット及びモルモット精巣器官培養系への添加試験では、両者ともに濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。

④精巣障害の分子メカニズムに関する研究では、MEHPの精巣毒性について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・ライディッシュ細胞 MA-10 を用いて、細胞内コレステロール量が増加する MEHP 濃度におけるマイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析の結果、 $10^{-6}M$ で発現増加する遺伝子が多くみられた。それら遺伝子のプロモーター領域を解析した結果、PPRE を有するものは非常に少なかった。一方、DG から TG を合成する酵素である DGAT の発現が精巣で顕著に認められたため、DGAT 遺伝子の MEHP による発現変化について Northern Blotting により調べたところ、DGAT2 遺伝子の発現が増加することが明らかになった。

⑤文献調査研究においては、ヒトの疫学に関する報告ではフタル酸エステル・レベルと精子性状、在胎期間または子宮内膜症との関連が検討されたが、直接的な関連性については不明である。フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響に関しては、精巣に対する影響が遺伝子レベルで検討され testosterone レベルの低下とこれに関連する遺伝子発現の変化が示唆されている。妊娠中曝露による次世代に形態異常発現に関しては BBP の催奇形性が代謝物により発現することが示唆された。アジピン酸エステル類に関してはラットの妊娠中に投与した高用量の DEHA により妊娠期間の延長と児体重増加抑制がみられたが、抗アンドロゲン作用は認められなかったことが報告されており、今のところフタル酸エステル類よりも強い生殖発生毒性を示唆する報告は見当たらない。今年度の文献調査では、TDI の見しを必要とするような論文は出版されていなかった。

①の引用文献

Barlow, N.J., Foster, P.M., 2003. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following *in utero* exposure to di(*n*-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* 31, 397-410.

Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M., Diaz-Torga, G.S., Libertun, C., 1992. Ontogenic studies of the neural control of adenohipophyseal hormones in the rat. II. Prolactin. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 1-19.

Bohnet, H.G., Friesen, H.G., 1976. Effect of prolactin and growth hormone on prolactin and LH receptors in the dwarf mouse. *J. Reprod. Fertil.* 48, 307-311.

Csemus, V., 1986. Production of sexual steroids in rats during pre- and early postnatal life. *Exp. Clin. Endocrinol.*

88, 1-5.

Di Monaco, M., Brignardello, E., Leonardi, L., Gatto, V., Gallo, M., Pizzini, A., Bocuzzi, G., 1993. The antiandrogen flutamide inhibits growth of the MCF-7 human breast cancer cell line. *Int. J. Oncol.* 2, 653-656.

Döhler, K.D., Wuttke, W., 1974. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 94, 1003-1008.

Ewing, L.L., Zirkin, B., 1983. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog. Horm. Res.* 39, 599-635.

Fan, L.Q., Cattley, R.C., Corton, J.C., 1998. Tissue-specific induction of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV by peroxisome proliferator chemicals is dependent on the peroxisome proliferator-activated receptor α . *J. Endocrinol.* 158, 237-246.

Fomeris, M.L., Aguado, L.I., 2002. Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82, 75-82.

Gotz, F., Thieme, S., Dömer, G., 2001. Female infertility - effect of perinatal xenoestrogen exposure on reproductive functions in animals and humans. *Folia Histochem. Cytobiol.* 2, 40-43.

Gray, L.E. Jr, Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L., 2000. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* 58, 350-365.

Gray, L.E. Jr, Barlow, N.J., Furr, J.R., Brock, J., Silva, M.J., Barr, D.B., Ostby, J.S., 2003. Transgenerational effects of di(2-ethylhexyl) phthalate in the male rat. *J. Toxicol. Sci.* 72, 283, proceedings of the 42nd annual meeting.

Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M., Henderson, R., Hinberg, I., Little, R., Seed, J., Shea, K., Tabacova, S., Tyl, R., Williams, P., Zacharewski, T., 2002. NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate. *Reprod. Toxicol.* 16, 489-527.

Kawagoe, S., Hiroi, M., 1989. Further evidence that prolactin controls the prepubertal sexual development in the female rat. *Gynecol. Obstet. Invest.* 27, 197-200.

Kula, K., Walczak-Jedrzejowska, R., Slowikowska-Hilczler, J., Oszukowska, E., 2001. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 89-97.

Lamb JC 4th, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. 1987. Reproductive effects of four phthalic acid esters in