

the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 88, 255–269.

Lovekamp, T.N., Davis, B.J., 2001. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 217–224.

Lovekamp-Swan, T., Davis, B.J., 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111, 139–145.

Lovekamp-Swan, T., Jetten, A.M., Davis, B.J., 2003. Dual activation of PPAR α and PPAR γ by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 133–141.

Lund, T.D., Salyer, D.L., Fleming, D.E., Lephart, E.D., 2000. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 261–266.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M., 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192, 149–170.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.Y., Hirose, M., 2004. Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch. Toxicol.* 78, 232–240.

Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43, 47–60.

Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 2000. Dose-dependent alteration in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(*n*-butyl)phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.* 55, 143–151.

Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., Foster, P.M., 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.

Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono, H. 2001. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol.* 15, 293–315.

Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. 1997. Subchronic oral toxicity of di-*n*-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol.* 35, 225–239.

Sourla, A., Martel, C., Labrie, C., Labrie, F., 1998.

Almost exclusive androgenic action of dehydrocpiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology* 139, 753–764.

Toyoda, K., Shibutani, M., Tamura, T., Koujitani, T., Uneyama, C., Hirose, M., 2000. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* 74, 127–132.

Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW. 2001. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G α i. *J Biol Chem.* 276: 27071-27076.

You, L., Sar, M., Bartolucci, E.J., McIntyre, B.S., Sriperumbudur, R., 2002. Modulation of mammary gland development in prepubertal male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol. Sci.* 66, 216–225.

⑤の引用文献

研究目的の項

小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬明彦, 長谷川隆一, 2000. フタル酸エステルの生殖及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.

ヒトに関連した情報

Cobellis L, Latini G, De Felice C, Razzi S, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P, Petraglia F. 2003. High plasma concentrations of di-(2-ethylhexyl)-phthalate in women with endometriosis. *Hum Reprod.* 18: 1512-1515.

Duty SM, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Chen Z, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. 2003a. Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology* 14: 269-277.

Duty SM, Singh NP, Silva MJ, Barr DB, Brock JW, Ryan L, Herrick RF, Christiani DC, Hauser R. 2003b. The relationship between environmental exposures to phthalates and DNA damage in human sperm using the neutral comet assay. *Environ Health Perspect.* 111: 1164-1169.

Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. 2003. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect.* 111: 1783-1785.

DEHP(MEHP)に関連した情報

- Anas MK, Suzuki C, Yoshioka K, Iwamura S. 2003. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on bovine oocyte maturation in vitro. *Reprod Toxicol.* 17: 305-310.
- Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol.* 18: 53-61.
- Ichimura T, Kawamura M, Mitani A. 2003. Co-localized expression of FasL, Fas, Caspase-3 and apoptotic DNA fragmentation in mouse testis after oral exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology* 194: 35-42.
- Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. 2003. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol.* 77: 446-451.
- Magliozzi R, Nardacci R, Scarsella G, Di Carlo V, Stefanini S. 2003. Effects of the plasticiser DEHP on lung of newborn rats: catalase immunocytochemistry and morphometric analysis. *Histochem Cell Biol.* 120: 41-49.
- Seek Rhee G, Hee Kim S, Sun Kim S, Hee Sohn K, Jun Kwack S, Ho Kim B, Lea Park K. 2002. Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicol In Vitro* 16: 443-448.
- Sekiguchi S, Ito S, Honma T. 2003. Experimental model to study reproductive toxicity of chemicals using induced ovulation in immature F344 rats. *Ind Health* 41: 287-290.
- Suominen JS, Linderborg J, Nikula H, Hakovirta H, Parvinen M, Toppari J. 2003. The effects of mono-2-ethylhexyl phthalate, adriamycin and N-ethyl-N-nitrosourea on stage-specific apoptosis and DNA synthesis in the mouse spermatogenesis. *Toxicol Lett.* 143: 163-173.
- Tanaka T. 2003. Effects of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on secondary sex ratio of mice in a cross-mating study. *Food Chem Toxicol.* 41: 1429-1432.
- Toyosawa K, Okimoto K, Kobayashi I, Kijima K, Kikawa E, Kohchi M, Koujitani T, Tanaka K, Matsuoka N. 2001. Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatocellular adenoma in transgenic mice carrying a human prototype c-Ha-ras gene in a 26-week carcinogenicity study. *Toxicol Pathol.* 29: 458-466.
- Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE. 2004. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett.* 146: 207-215.
- Wong JS, Gill SS. 2002. Gene expression changes induced in mouse liver by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 185: 180-196.
- Barlow NJ, Foster PM. 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.
- Higuchi TT, Palmer JS, Gray LE Jr, Veeramachaneni DN. 2003. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicol Sci.* 72: 301-313.
- 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.
- Nakagomi M, Suzuki E, Usumi K, Saitoh Y, Yoshimura S, Nagao T, Ono H. 2001. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratog Carcinog Mutagen.* 21: 453-462.
- Ohtani H, Miura I, Ichikawa Y. 2000. Effects of dibutyl phthalate as an environmental endocrine disruptor on gonadal sex differentiation of genetic males of the frog *Rana rugosa*. *Environ Health Perspect.* 108: 1189-1193.
- Saillenfait AM, Sabate JP, Gallissot F. 2003. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations. *Reprod Toxicol.* 17: 575-583.
- Seek Rhee G, Hee Kim S, Sun Kim S, Hee Sohn K, Jun Kwack S, Ho Kim B, Lea Park K. 2002. Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicol In Vitro* 16: 443-448.
- Shono T, Suita S. 2003. Dose-dependent effect of phthalate ester on testicular descent in pre-and post natal rats. *Urol Res.* 31(5):293-296.
- Thompson CJ, Ross SM, Gaido KW (2003) Di(n-butyl) phthalate impairs cholesterol transport and steroidogenesis in the fetal rat testis through a rapid and reversible mechanism. *Endocrinology* 145: 1227-1237.
- Tsutsumi T, Ichihara T, Kawabe M, Yoshino H, Asamoto M, Suzuki S, Shirai T 2004. Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl)phthalate in rats. *Reprod Toxicol.* 18: 35-42.
- Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE. 2004. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced *insl3* gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett.* 146: 207-215.

DBP(MBP)に関連した情報

BBP (MBP and MBzP)に関連した情報

- Ema M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. 2003. Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl

phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol.* 17: 407-412.

Nakagomi M, Suzuki E, Usumi K, Saitoh Y, Yoshimura S, Nagao T, Ono H. 2001. Effects of endocrine disrupting chemicals on the microtubule network in Chinese hamster V79 cells in culture and in Sertoli cells in rats. *Teratog Carcinog Mutagen.* 21: 453-462.

Saillenfait AM, Sabate JP, Gallissot F. 2003. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, mono-*n*-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations. *Reprod Toxicol.* 17: 575-583.

Seek Rhee G, Hee Kim S, Sun Kim S, Hee Sohn K, Jun Kwack S, Ho Kim B, Lea Park K. 2002. Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicol In Vitro* 16: 443-448.

Shono T, Suita S. 2003. Dose-dependent effect of phthalate ester on testicular descent in pre-and post natal rats. *Urol Res.* 31: 293-296.

Wilson VS, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE. 2004. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicol Lett.* 146: 207-215.

DINP(MINP)に関連した情報

Borch J, Ladefoged O, Hass U, Vinggaard AM. 2004. Steroidogenesis in fetal male rats is reduced by DEHP and DINP, but endocrine effects of DEHP are not modulated by DEHA in fetal, prepubertal and adult male rats. *Reprod Toxicol.* 18: 53-61.

Masutomi N, Shibutani M, Takagi H, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192: 149-170.

Polyvinylacetate Phthalate についての情報

Schoneker DR, DeMeris CC, Borzelleca JF. 2003. Evaluation of the toxicity of polyvinylacetate phthalate in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* 41: 405-413.

総説

McKee RH, Butala JH, David RM, Gans G. 2004. NTP center for the evaluation of risks to human reproduction reports on phthalates: addressing the data gaps. *Reprod Toxicol.* 18: 1-22

アジピン酸エステルについての情報

Dalgaard M, Hass U, Vinggaard AM, Jarfelt K, Lam HR, Sorensen IK, Sommer HM, Ladefoged O. 2003. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. *Reprod Toxicol.* 17: 163-170.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192: 149-170, 2003

Ueda, M., Niho, N., Imai, T., Shibutani, M., Mitsumori, K., Matsui, T., Hirose M.: Lack of Significant Effects of Genistein on the Progression of 7, 12-dimethylbenz(a)anthracene-Induced Mammary Tumors in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *Nutr Cancer* 47: 141-147, 2003.

Arai, K., Nakano, H., Shibutani, M., Naoi, M., Matsuda, H.: Expression of class II β -tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. *Vet Pathol.* 40: 670-676, 2003.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol.* 78: 232-40, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K., Hirose, M.: Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol.* 78: 97-105, 2004.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M. Dietary influence on the impact of ethinylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure. *Reprod Toxicol.* 18: 23-33, 2004.

Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Arimura, T., Takigami, S., Uneyama, C., Kato, N., Hirose, M.: Subchronic toxicity study of dietary *N*-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 42: 687-695, 2004.

Arimura, T., Hayashi, T., Terada, H., Lee, S.Y., Zhou, Q., Takahashi, M., Ueda, K., Nouchi, T., Hohda, S., Shibutani, M., Hirose, M., Chen, J., Park, J.E., Yasunami, M., Hayashi, H., Kimura, A.: A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J Biol Chem.* 279: 6746-6752, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K.-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-

time RT-PCR. *J Histochem Cytochem.* 52: 903-914, 2004.

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacram fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray GI, and Curran S, editors. *Laser Capture Microdissection and its Applications. Methods Mol Biol.* Totowa: Humana Press, (in press).

Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M.: Expression analysis of estrogen and androgen target genes in neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev* 49, 547-552, 2003.

Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H., Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima, S., Shirai, T. Narita, M.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-644, 2003.

Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nishikawa, T., Hirata, K., Yoshikawa, J. Fukushima, S.: Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. *Cancer Lett.*, 192, 25-36, 2003.

Shen, J., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Kinoshita, A., Yoshida, K., Endo, G. Fukushima, S.: Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats-association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation. *Carcinogenesis*, 24, 1827-1835, 2003.

Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N., Shirai, T.: Age-dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: Lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. *Cancer Sci.*, 94: 153-157, 2003.

Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Lett.*, 194: 25-35, 2003.

Ichihara, T., Yoshino, H., Imai, N., Tsutsumi, T., Kawabe, M., Tamano, S., Inaguma, S., Suzuki, S., Shirai, T.: Lack of carcinogenic risk in the prostate with transplacental and lactational exposure to bisphenol A in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 28(3): 165-171, 2003.

Inaguma, S., Takahashi, S., Ohnishi, H., Suzuki, S., Cho, Y.-M., Shirai, T.: High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis. *Cancer Sci.*, 94: 974-979, 2003.

Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.: Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and

development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 16: 259-266, 2003.

Shirai, T., Asamoto, M.: Application of toxicogenomics to the endocrine disruption issue. *Pure Appl. Chem.*, 75: 2419-2422, 2003.

Futakuchi, M., Ogawa, K., Tamano, S., Takahashi, S., Shirai, T.: Suppression of metastasis by nuclear factor KB inhibitors in an *in vivo* lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.*, 95: 18-24, 2004.

Tsutsumi, T., Ichihara, T., Kawabe, M., Yoshino, H., Asamoto, M., Suzuki, S., Shirai, T.: Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl)phthalate in rats. *Reprod. Toxicol.*, 18: 35-42, 2004.

Andriana, B. B., Tay, T. W., Tachiwana, T., Sato, T., Ishii, M., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M. Hayashi, Y.: Effects of mono (2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in rats *in vitro*. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 80:127-136, 2004.

Ena, M., Harazono, A., Hirose, A., Kamata, E.: Protective effects of progesterone on implantation failure induced by dibutyltin dichloride in rats. *Toxicol Lett.* 143, 233-238, 2003.

Koizumi, M., Noda, A., Ito, Y., Furukawa, M., Fujii, S., Kamata, E., Ena, M., Hasegawa, R.: Higher susceptibility of newborn than young rats to 3-methylphenol. *J Toxicol Sci.* 28, 59-70, 2003.

Harazono, A., Ena, M.: Suppression of decidual cell response induced by dibutyltin in pseudopregnant rats as a cause of early embryonic loss. *Reprod Toxicol.* 17, 393-399, 2003.

Ena, M., Miyawaki, E., Hirose, A., Kamata, E.: Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. *Reprod Toxicol.* 17, 407-412, 2003.

広瀬明彦, 江馬 眞, 鎌田栄一, 小泉睦子, 長谷川隆一: ビスフェノール A の内分泌かく乱作用のヒトへの影響評価, *日本食品化学会誌*, 10, 1-12, 2003.

2. 学会発表

Makoto Shibutani: Application of Methacram Fixation for Genetic Analysis in Microdissected Paraffin-embedded Tissue Specimens. 2003 International Symposium, Newly Emerging Issues in Veterinary Sciences, The Korean Society of Veterinary Science, Daejeon, Korea, J. Vet. Sci. 4(S-1): 19-21, 2003.5.23

渋谷 淳: マイクロダイセクション法によりパラフィン包埋組織切片から採取された微量組織での遺伝

子解析解析についてーメタカーン固定法の利用ー, 実験病理組織技術研究会・第10回記念総会, 東京, 第10回記念総会・学術集会プログラム: p25, 2003.6

渋谷 淳, 井上弘子, 高木広憲, 加藤奈津美, 李 京烈, 有村卓朗, 畝山智香子, 瀧上 周, 広瀬雅雄: 非遺伝子傷害性肝発がん物質を長期間投与したラット肝臓での発現変動遺伝子のプロファイリング, 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, 神奈川, 第30回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: p237 (P-122), 2003.7

渋谷 淳, 井上弘子, 高木広憲, 加藤奈津美, 李 京烈, 有村卓朗, 畝山智香子, 瀧上 周, 広瀬雅雄: 非遺伝子傷害性肝発がん物質を長期間投与したラット肝臓での発現変動遺伝子のプロファイリング, 文部科学省特定領域研究「発がんと防御」蓼科「個体レベル」若手ワークショップ, 長野(蓼科), プログラム集: p 30, 2004.1

Makoto Shibutani, Kyoung-Youl Lee, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose. Methacarn, a versatile fixation tool for quantitative mRNA expression analysis in microdissected paraffin-embedded tissues using real-time RT-PCR and microarray systems. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p158 (P-50), Kobe, 2004.2

Kyoung-Youl Lee, Makoto Shibutani, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to di(2-ethylhexyl)phthalate. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p161 (P-53), Kobe, 2004.2

Makoto Shibutani, Kyoung-Youl Lee, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, Maryland, U.S.A. 2004.3.21-25

Kyoung-Youl Lee, Makoto Shibutani, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Dose-dependent global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to ethinylestradiol. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, Maryland, U.S.A. 2004.3.21-25

白井智之: ラット前立腺癌モデルを用いてのイソフラボンによる化学予防, 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 2003.9

稲熊真悟, 大西浩之, 村崎敏也, 彦坂敦也, 曹永晩,

朝元誠人, 白井智之: PhP ラット前立腺発がんに関する遺伝的背景としての系統差異: SHR の高感受性, 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 2003.9.

栗林正伯, 朝元誠人, 鈴木周五, 白井智之: 薬物代謝酵素誘導物質による MeIQx の肝発がん修飾作用, 第62回日本癌学会総会, 名古屋, 2003.9

Andriana, B. B., Tay, T. W., Tachiwana, T., Ishii, M., Sato, T., Awal, M. A., Kanai, Y., Kurohmani, M. Hayashi, Y.: Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in rats *in vitro*. 第136回日本獣医学会学術集会, 青森, 2003.10.03

Tay, T.W., Andriana, B.B., Ishii, M., Sato, T., Matsui, T., Matoba, S., Tachiwana, T., Kanai, Y., Kurohmani, M. and Hayashi, Y. Chronic effects of mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal SD rats. 第136回日本獣医学会学術集会, 青森, 2003.10.03

Tay, T.W., Andriana, B.B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmani, M. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in prepubertal mice. 7th National Biology Symposium, Genting Highlands, Malaysia, 2004.5

Ena M., Miyawaki E.: Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.3

Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Ena M., Hasegawa R.: Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.3

Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Ena M.: Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. Society of Toxicology, 42th Annual Meeting, 2003.3

江馬 眞: 可塑剤フタル酸エステルのラット次世代の発生に及ぼす影響, 第5回生殖・発生毒性東京セミナー, 2003.

江馬 眞, 宮脇英美子, 広瀬明彦, 鎌田栄一: モノブチルフタレートによるラット雄胎児における肛門生殖突起間距離の短縮及び精巣下降不全, 第43回日本先天異常学会, 2003.

江馬 眞, 原園 景, 広瀬明彦, 鎌田栄一: ジブチルスズによるラットにおける着床阻害に対するプロゲステロンの効果, 第30回日本トキシコロジー学会, 2003.

原園 景, 江馬 眞: ラット妊娠初期に投与した塩

化トリブチルスズの着床阻害作用, 第 30 回日本トキシコロジー学会, 2003.

Takagi A., Hirose A, Hirabayashi Y, Kaneko T, Ema M, Kanno J.: Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003). 2003.

Sekizawa J, Miyairi S, Ema M: Possible modification of dioxin risk in the presence of endogenous ligands for arylhydrocarbone receptor. 23rd International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2003). 2003.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書（平成15年度）

周産期暴露による影響評価研究

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨：フタル酸／アジピン酸エステル類の周産期暴露による影響評価として、妊娠ラットを用い、妊娠及び哺乳期間中に母ラットへの混餌による経口投与を行い、離乳時及び性成熟後での内分泌・生殖器官の病理組織学的評価により、暴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、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。15年度は14年度に引き続き、妊娠15日目から離乳時（出産後21日目）まで di-n-butyl phthalate (DBP) を 0, 20, 200, 2000, 10,000 ppm の用量で暴露した児動物について病理組織評価を継続・終了した。その結果、今まで報告のない雌での下垂体機能を含む性分化影響が明らかとなり、雄では精巣そのものに対する影響は殆ど可逆性であったものの、新たに性成熟後での乳腺影響が 20 ppm より認められた。以上の結果から、DBP に関しては NOAEL は求められず、LOAEL は 20 ppm (1.5~3.0 mg/kg/day) と判断された。15年度は引き続き diisononyl phthalate (DINP) に関して、DBP と同様に 400, 4000, 20,000 ppm の周産期暴露実験を行った。その結果、20,000 ppm 暴露した雌雄で投与終了時（生後21日目）をピークに強い体重の低値を認め、この群の同時期での雄乳腺の発達（低形成）と春期発動（遅延）に影響を与えた可能性が高い。一方、雄性児の乳頭・乳輪の出現（生後14日目）、離乳時での精巣における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、これら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。

フタル酸エステル類による脳の性分化影響に関して、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、今年度はまず周産期暴露により生殖器傷害を誘発する ethinylestradiol (EE) を、0.01, 0.1, 0.5 ppm の割合で母ラットに妊娠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でのマイクロアレイ解析を行った。標的部位は、雄の性行動や雌の母性行動に機能する性的二型核を含む内側視索前野 (MPOA) をマイクロダイセクション法により採取し、その遺伝子発現データについて、発現性差と EE に対する反応性を用量依存性の観点から解析した。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ものが複数認められ、その多くは G 蛋白質ないしその関連蛋白質であった。特に EE 投与により雌雄で反対の発現挙動をするものとして GTPase Rab14, G 蛋白質 ($G\alpha_{12}$), myosine phosphatase が得られ、EE による脳の性分化障害時での G 蛋白質のシグナリングの変化が示唆された。また、用量非依存的な反応を示す遺伝子は殆どなかった。次に、げっ歯類で雄の性分化障害を誘発することが知られているフタル酸エステルの di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) 6000 ppm 混餌投与例で、MPOA における遺伝子発現プロファイルを求めたところ、雌で発現低下するものが最も多く、雌においてこの神経核の分化が障害されている可能性が示唆された。また、雄で DEHP により発現低下したのものの中に、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。

A. 研究目的

フタル酸／アジピン酸エステルは食品の包装材料及び医療用具等の多くのプラスチック製品の可塑剤として広く利用され、特に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の使用量が多い。ヒトへの暴露として、特に、弁当類の製造過程での手袋からの溶出による DEHP の高濃度暴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暴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乏しい。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暴露された場合、化学物質の内分泌かく乱作用の可能性

とは別に、未熟な精巣からのテストステロン・サージの阻害による脳の性分化障害が生じ、性成熟後での性行動に影響を与える可能性がある。一方、げっ歯類で見られる精巣毒性がマー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児期や基礎疾患等による高感受性状態での暴露影響、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。本分担研究では、それらのうち、胎生期ないし新生時期での暴露影響についてラットを用いた病理組織学的研究を実施している。昨年度は、*d*-*n*-butyl phthalate (DBP)について本実験を実施し、今年度、その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。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、昨年度までに予備的な検討により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 *reference drug* として *ethinylestradiol* (EE)を用いて周産期暴露を行い、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、用量依存性の観点から発現遺伝子を分類した。次いで、EE と同様のプロトコールで最も毒性の強いフタル酸エステルである 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。

B. 研究方法

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。まず昨年度は、DBP について予備的検討結果を基に、妊娠 SD:IGS ラットを用いて、20, 200, 2000, 10,000 ppm

の 4 用量を設定し、妊娠 15 日目から出産 21 日目までの間、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 (Fig. 1)。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査し、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、陰開口) 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 週間より陰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、精囊 (+ 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、VECTSTAINelite 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。

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 (Fig. 2)。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化影響に関して、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、今年度はまず周産期暴露により性成熟後の生殖器傷害を生じさせることが知られている *ethinylestradiol* (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 (Fig. 3)。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* の阻害が生じ、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テストステロン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 (Fig. 4)。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 (Fig. 3)。

(倫理面への配慮)

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、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

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 群で軽度に低下したが、摂餌量は各群とも同等であった (Table 1)。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 (Table 1)。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 (Table 1)。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 (Table 2)。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 (Table 2; 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 例にも同様の変化を認めた。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 (Table 3)。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 (Table 3)。臓器重量に関しては、雌の下垂体の相対重量が 200 ppm 以上の群では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 (Table 4)。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 (Fig. 5A, B) 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 細胞の集簇巣 (50~100 個の細胞塊) も DBP 投与群の精巣で散在していた (Fig. 5B)。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 (Fig. 5C, D)。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 (Fig. 6A, B)。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 (Fig. 6C, D)。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 (Table 4)、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 (Fig. 7A)、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 (Fig. 7B)。また、巨細胞の形成もしばしば認められた (Fig. 7A)。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 (Fig. 7C-E) が明らかで、腺房萎縮も認められた (Fig.

7D, E)。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 (Fig. 8)。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 (Fig. 9)。

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 (Table 5)。出生児数と雄性児率は DINP 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 週齢時での膺スミ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 (Table 6)。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 (Table 7)。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 (Table 7)。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。病理組織学的検査は継続中であるが、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‘精子細胞の発達の低下’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 (Table 8)。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 (Table 9)。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のリストを Table 10 に示した (>2-fold, $p < 0.05$)。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リストを Table 11 に示した。その多くは、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、用量に依存しないで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 (Table 12)、その内 41 遺伝子が 0.5 ppm EE により雄で発現低下し、更なる中で 8 遺伝子が雌で発現上昇を示した。Table 13 に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 遺伝子を集計した。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、更なる中で 3 遺伝子 (GTPase Rab14, G-protein $\alpha 2$, 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 (Table 14)。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 (Table 15)。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。これらの発現変動を示した遺伝子のリストを Table 16, 17 に示した。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 (Table 18)。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 (Table 13)。

D. 考察

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テストステロンの生成・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)。もしこれが雄性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、おそらくテストステロン生成・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; Lovecamp-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ゲ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(Csernus, 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、雌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 はライディッヒ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、テストステロン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ヒ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テストステロンレベルの増加することが知られており(Kula et al., 2001)、アンドロゲンと FSH の両方が精子形成の開始に必要であることが示唆される。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(Forneris and Aguado, 2002)。他方、環境エストロゲンである 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、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 *reference drug* 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検索したところ、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テストステロン・サージに対応した 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 ($G\alpha i$) 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 投与例と同様のテストステロン・サージ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。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。

E. 結論

DBP について妊娠 15 日目から生後 21 日目までの間、母ラットに対して 0, 20, 200, 10000 ppm の用量で混餌投与を行ったところ、雄の出生児において 10,000 ppm で AGD の短縮、乳頭・乳輪の保持、雌では同用量で春期発動の遅延（傾向）を認めた。生後 21 日目では、20 ppm の用量から精子細胞の発達低下と雌雄乳腺の病理変化を認めた。この時期で、下垂体ホルモン陽性細胞率の変動が、雌では 200 ppm から、雄では 2000 ppm から認められた。生後 8-11 週目の膣スミア検査では、10,000 ppm で有意差はないものの性周期異常を検出した。性成熟後の解剖時には、雄での精巣変化は殆どの例で微弱であったが、乳腺腺房の変性・萎縮が 20 ppm より明らかであり、下垂体相対重量の増加も中間用量で認められた。雌では下垂体相対重量は逆に 200 ppm より低下を示し、FSH 陽性細胞率が雌雄とも 10,000 ppm で増加を示した。以上より、発達期の DBP 暴露により、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、発達期暴露による 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。フタル酸エステル類の発達期毒性に関しては、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。

今回行った 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、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って総合的に評価する。

脳の性分化影響については、視床下部 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テストステロン・サージに対応した MPOA 内で反応する遺伝子群である可能性が指摘された。これらの中に周生期の EE 暴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 暴露例では、変動遺伝子の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 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 投与例と同様のテストステロン・サージ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。

参考文献

- 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 adenohipophysial 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.
- Csernus, 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., Boccuzzi, 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 alpha. *J. Endocrinol.* 158, 237-246.
- Forneris, 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-Jedrzejska, 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 the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 88, 255–269.
- Lovekamp, T.N., Davis, B.J., 2001. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 172, 217–224.
- Lovekamp-Swan, T., Davis, B.J., 2003. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ. Health Perspect.* 111, 139–145.
- Lovekamp-Swan, T., Jetten, A.M., Davis, B.J., 2003. Dual activation of PPAR α and PPAR γ by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 133–141.
- Lund, T.D., Salyer, D.L., Fleming, D.E., Lephart, E.D., 2000. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 261–266.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M., 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192, 149–170.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.Y., Hirose, M., 2004. Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch. Toxicol.* 78, 232–240.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(*n*-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43, 47–60.
- Mylchreest, E., Wallace, D.G., Cattley, R.C., Foster, P.M.D., 2000. Dose-dependent alteration in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(*n*-butyl)phthalate during late gestation. *Toxicol. Sci.* 55, 143–151.
- Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D.G., Foster, P.M., 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.
- Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono, H. 2001. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod Toxicol.* 15, 293–315.
- Poon R, Lecavalier P, Mueller R, Valli VE, Procter BG, Chu I. 1997. Subchronic oral toxicity of di-*n*-octyl phthalate and di(2-Ethylhexyl) phthalate in the rat. *Food Chem Toxicol.* 35, 225–239.
- Sourla, A., Martel, C., Labrie, C., Labrie, F., 1998. Almost exclusive androgenic action of dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology* 139, 753–764.
- Toyoda, K., Shibutani, M., Tamura, T., Koujitan, T., Uneyama, C., Hirose, M., 2000. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* 74, 127–132.
- Wyckoff MH, Chambliss KL, Mineo C, Yuhanna IS, Mendelsohn ME, Mumby SM, Shaul PW. 2001. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G α i. *J Biol Chem.* 276: 27071-27076.
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E.J., McIntyre, B.S.,

Sriperumbudur, R., 2002. Modulation of mammary gland development in prepubertal male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol. Sci.* 66, 216-225.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192: 149-170, 2003

Ueda, M., Niho, N., Imai, T., Shibutani, M., Mitsumori, K., Matsui, T., Hirose M.: Lack of Significant Effects of Genistein on the Progression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-Induced Mammary Tumors in Ovariectomized Sprague-Dawley Rats. *Nutr Cancer* 47: 141-147, 2003.

Arai, K., Nakano, H., Shibutani, M., Naoi, M., Matsuda, H.: Expression of class II b-tubulin by proliferative myoepithelial cells in canine mammary mixed tumors. *Vet Pathol.* 40: 670-676, 2003.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol.* 78: 232-40, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K., Hirose, M.: Lack of maternal dietary exposure effects of bisphenol A and nonylphenol during the critical period for brain sexual differentiation on the reproductive/endocrine systems in later life. *Arch Toxicol.* 78: 97-105, 2004.

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M. Dietary influence on the impact of ethinylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure. *Reprod Toxicol.* 18: 23-33, 2004.

Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Arimura, T., Takigami, S., Uneyama, C., Kato, N., Hirose, M.: Subchronic toxicity study of dietary *N*-acetylglucosamine in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 42: 687-695, 2004.

Arimura, T., Hayashi, T., Terada, H., Lee, S.Y., Zhou,

Q., Takahashi, M., Ueda, K., Nouchi, T., Hohda, S., Shibutani, M., Hirose, M., Chen, J., Park, J.E., Yasunami, M., Hayashi, H., Kimura, A.: A Cypher/ZASP mutation associated with dilated cardiomyopathy alters the binding affinity to protein kinase C. *J Biol Chem.* 279: 6746-6752, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K.-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J Histochem Cytochem.* 52: 903-914, 2004.

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray GI, and Curran S, editors. *Laser Capture Microdissection and its Applications.* Methods Mol Biol. Totowa: Humana Press, (in press).

Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Uneyama, C., Hirose, M.: Diverse developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology.* (submitted).

2. 学会発表

Makoto Shibutani: Application of Methacarn Fixation for Genetic Analysis in Microdissected Paraffin-embedded Tissue Specimens. 2003 International Symposium, Newly Emerging Issues in Veterinary Sciences, The Korean Society of Veterinary Science, Daejeon, Korea, J. Vet. Sci. 4(S-1): 19-21, 2003.5.23

渋谷 淳: マイクロダイセクション法によりパラフィン包埋組織切片から採取された微量組織での遺伝子解析について —メタカーン固定法の利用—, 実験病理組織技術研究会・第10回記念総会, 東京, 第10回記念総会・学術集会プログラム: p25, 2003.6

渋谷 淳, 井上弘子, 高木広憲, 加藤奈津美, 李京烈, 有村卓朗, 畝山智香子, 瀧上 周, 広瀬雅雄: 非遺伝子傷害性肝発がん物質を長期間投与したラット肝臓での発現変動遺伝子のプロファイリング, 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, 神奈川, 第30回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: p237 (P-122), 2003.7

渋谷 淳, 井上弘子, 高木広憲, 加藤奈津美, 李京烈, 有村卓朗, 畝山智香子, 瀧上 周, 広瀬雅雄: 非遺伝子傷害性肝発がん物質を長期間投与したラッ

ト肝臓での発現変動遺伝子のプロファイリング, 文部科学省特定領域研究「発がんと防御」蓼科「個体レベル」若手ワークショップ, 長野(蓼科), プログラム集: p 30, 2004.1

Makoto Shibutani, Kyoung-Youl Lee, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose. Methacarn, a versatile fixation tool for quantitative mRNA expression analysis in microdissected paraffin-embedded tissues using real-time RT-PCR and microarray systems. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p158 (P-50), Kobe, 2004.2

Kyoung-Youl Lee, Makoto Shibutani, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to di(2-ethylhexyl)phthalate. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p161 (P-53), Kobe, 2004.2

Makoto Shibutani, Kyoung-Youl Lee, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, Maryland, U.S.A. 2004.3.21-25

Kyoung-Youl Lee, Makoto Shibutani, Hironori Takagi, Natsumi Kato, Shu Takigami, Masao Hirose: Dose-dependent global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to ethinylestradiol. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology, Baltimore, Maryland, U.S.A. 2004.3.21-25

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

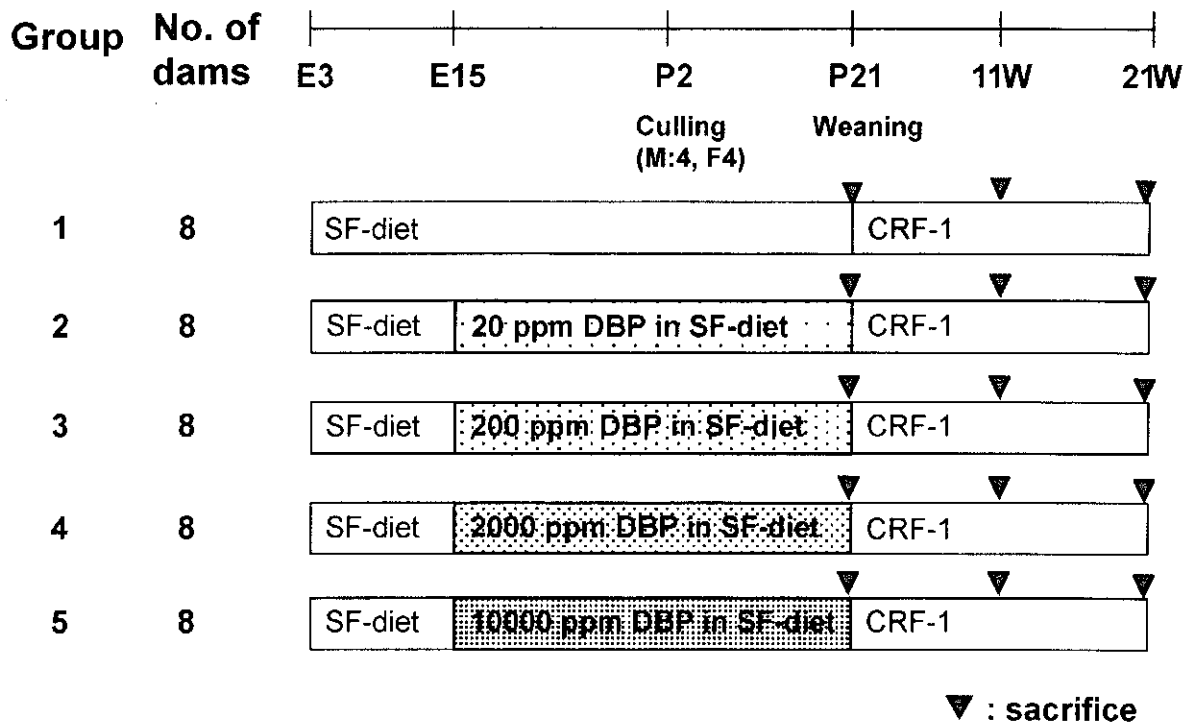
なし

2. 実用新案登録

なし

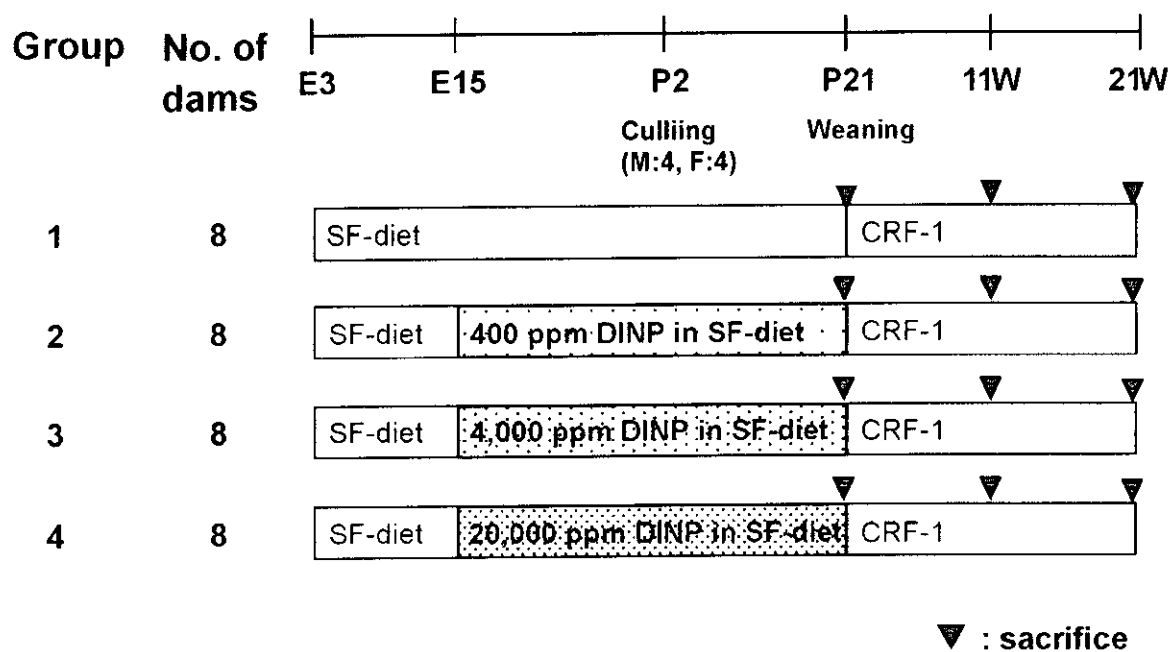
3. その他

なし



ANIMAL SPECIES: RAT STRAIN: Crj:CD(SD)IGS

Fig. 1
Experimental design of DBP Study



ANIMAL SPECIES: RAT STRAIN: Crj:CD(SD)IGS

Fig. 2
Experimental design of DINP Study