

Table 14

List of genes showing down-regulation in males and up-regulation in females by ethinylestradiol (EE) at 0.5 ppm without sexual dimorphic expression.

Accession No.	Gene name	Description	M>F	Changes at 0.5 ppm EE	
				M	F
L13619	CL-6	growth response protein (CL-6)	-	0.18 ^a	2.31 ^b
D00688	Maoa	Monoamine oxidase	-	0.23	2.68
AA799537		EST	-	0.26	2.05
D87991		highly similar to UDP-N-acetylglucosamine transporter	-	0.27	2.10
L05435	SV2	synaptic vesicle glycoprotein 2 a	-	0.28	2.31
AI008074		EST, highly similar to heat shock protein HSP 90-beta	-	0.28	2.39
AF077354	Irp94	ischemia responsive 94 kDa protein	-	0.30	2.31
S73007	SYN1	synuclein	-	0.31	2.99
D14418	PP2A ARa	regulatory subunit of protein phosphatase 2A	-	0.38	2.18
U14398	Syt4	synaptotagmin 4	-	0.39	2.31
AA859896	Mac3	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	-	0.41	2.95
AI177503	H3f3b	H3 histone, family 3B	-	0.42	2.17
AA965154	Ywhae	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	-	0.46	2.07
H31489		EST	-	0.49	2.14

^a Relative expression ratio in EE exposed males as compared to control males.

^b Relative expression ratio in EE exposed females as compared to control females.

Abbreviations: EE, ethinylestradiol; M, Males; F, females; EST, expressed sequence tag.

Table 15

Number of genes showing altered expression in the microdissected medial preoptic area of rats by di(2-ethylhexyl)phthalate (DHEP) at 6000 ppm (>2-fold, $p < 0.05$).

DEHP at 6000 ppm	Males	Females
Up-regulated	4	3
Down-regulated	12	348

Abbreviation: DEHP, di(2-ethylhexyl)phthalate.

Table 16

List of genes showing altered expression in the microdissected medial preoptic area of male rats by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP).

Accession No.	Fold	P-value	Gene name	Description
Up-regulated (4)				
AA799971	2.06	0.027		EST
AA800250	2.33	0.034	Sdha	succinate dehydrogenase complex
AA800243	2.26	0.042		EST
AA892332	2.03	0.049	Zyx	zyxin
Down-regulated (12)				
L13151	0.43	0.005	GAP	GTPase-activating protein (GAP) gene
S65355	0.35	0.010	ETB receptor	nonselective-type endothelin receptor
AF090135	0.38	0.011	Veli1	lin-7-Ba
AI638989	0.44	0.012		EST
U66478	0.45	0.012	Mad1	MAD (mothers against decapentaplegic)
X57764	0.47	0.016	Ednrb	endothelin receptor type B
AF090134	0.50	0.026	Veli1	lin-7-Ba
AA957917	0.46	0.029	Slc7a1	Solute carrier family 7 member A1
AA925762	0.45	0.030	Macs	Myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
Y00766	0.45	0.032	Scn3a	Sodium channel, type III, alpha polypeptide
M83680	0.43	0.045	RAB14	GTPase Rab14
X17682	0.50	0.047	Map2	microtubule-associated protein 2

Table 17

List of genes showing altered expression in the microdissected medial preoptic area of female rats by di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP).

Accession No.	Fold	P-value	Gene name	Description
Up regulated (3) >2-fold				
AA965147	3.09	0.037	Hnrpa1	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1
M25892	2.08	0.006	Il4	Interleukin 4
M84725	2.03	0.013	NP25	transgelin 3
Down regulated (148) >3-fold				
D45247	0.07	0.017	Psmb5	proteasome subunit RCX
AA891812	0.09	0.005		EST
M19533	0.09	0.023	Ppia	ribosomal protein L18
J00797	0.10	0.015		aminolevulinic acid synthase 1
L24896	0.11	0.022	Gpx4	phosphofructokinase C (PFK-C)
X51536	0.11	0.020	Rps3	ribosomal protein L9
AA946532	0.12	0.018	Abcd3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3
AB017711	0.12	0.048	RPB6	polymerase II
X62146	0.12	0.008		dynactin 1
AA893194	0.12	0.007		EST
S45392	0.14	0.010	hsp90	synaptic glycoprotein
D10699	0.14	0.003	Uchl1	ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1
U36482	0.14	0.022	Erp29	mitogen activated protein kinase kinase 5
AI234604	0.15	0.017	Hspa8	heat shock 70kD protein 8
S76511	0.15	0.014	bax	apolipoprotein E
AA892394	0.15	0.038		EST
AI232012	0.15	0.025		EST
D13120	0.16	0.014	Atp5jd	ATP synthase subunit d
X51706	0.16	0.041	Rpl9	ribosomal protein L28
S45663	0.16	0.027	SC2	S-100 beta subunit
S77858	0.17	0.020		protein phosphatase 1 alpha
X58465	0.17	0.045	Rps5	putative zinc finger protein
U78977	0.17	0.017	Atp9a	RalA binding protein 1
X53232	0.17	0.019		ribosomal protein L12
AI104528	0.17	0.019		EST
AF052042	0.17	0.021	RLZF-Y	zinc finger protein Y 1
S78218	0.17	0.018	PP1 beta	endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor
X62145	0.18	0.026	Rpl8	ribosomal protein L11
S71021	0.18	0.007		apoptosis inducer
AJ007291	0.18	0.007	CAP1	fertility protein SP22
M57664	0.18	0.002	CKB	ubiquitin conjugating enzyme
AI230256	0.18	0.019	Id2	inhibitor of DNA binding 2
AA946040	0.19	0.033		EST
AB010119	0.19	0.020	Tctex1	t-complex testis expressed 1
X13549	0.19	0.014	Rps10	ribosomal protein S4
D10754	0.19	0.012	Psmb6	proteasome subunit R-DELTA
AA892123	0.19	0.003	Rpl36	ribosomal protein L36
L11007	0.19	0.036	cdk4	signal peptidase complex (18kD)
AI176308	0.20	0.010		EST
X14210	0.20	0.023	Rps4x	ribosomal protein L7a.
AA892378	0.20	0.024		EST
X62160	0.20	0.013	Dctn1	High Mobility Group Protein I (Y)
D21799	0.20	0.009	Psmb2	proteasome subunit RC7-I
S76779	0.20	0.014	rApoE	non-muscle myosin alkali light chain
X52619	0.20	0.005	Rpl28	preoptic regulatory factor-2 (PORF-2)
AA944361	0.21	0.016		EST
AA800738	0.21	0.003		EST
AB020504	0.21	0.046	Pmf31	PMF32 protein
AF007107	0.21	0.010	Cyb5	cytochrome b5
D13985	0.21	0.007	Clns1a	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A
AI104389	0.21	0.000	Th	tyrosine hydroxylase
X02231	0.21	0.026	Gapd	protein disulfide isomerase
AA817892	0.21	0.008	Gnb2	guanine nucleotide binding protein beta 2
AA799279	0.21	0.033		EST
E05646	0.21	0.210		
AB011528	0.21	0.014	MEGF2	cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3
D13124	0.22	0.014	Atp5g2	ATP synthase, H+ transporting

U75917	0.22	0.028	AP17	cAMP-regulated guanine nucleotide exchange factor II
AF007758	0.22	0.029	Snca	synuclein, alpha
D00636	0.23	0.012	b5R	NADH-cytochrome b5 reductase
AA800175	0.23	0.008		EST
D30804	0.23	0.019	PsmA7	proteasome subunit RC6-1
AF045564	0.23	0.027	AF045564	development-related protein
AA875019	0.23	0.026		EST
M28647	0.23	0.033	Na,K-ATPase	nucleolin gene.
U95161	0.23	0.013	LOC56769	cytoplasmic beta-actin.
X57432	0.23	0.035		ribosomal protein L17.
L20821	0.24	0.001	Stx4a	glutathione peroxidase 4
U52663	0.24	0.008	PAM	calpain, small subunit 1
M55015	0.24	0.026	Ncl	creatine kinase, brain
U41164	0.24	0.003	rKr1	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
AF016047	0.24	0.010	PAF-AH	platelet-activating factor acetylhydrolase
AA945806	0.24	0.022	Rps14	ribosomal protein S14
E01534	0.24	0.002		EST
AI172411	0.25	0.032	Gpxp	plasma glutathione peroxidase precursor
X73411	0.25	0.010	FE 294	
L11319	0.25	0.018	Spc18	immature protein, tricarboxylate transport protein
L17127	0.25	0.028	Psemb4	syntaxin 4
Y09332	0.25	0.014	Bach	DAD-1 gene.
U00926	0.25	0.011	Atp5d	selectin, endothelial cell, ligand
AA892680	0.25	0.047		EST
M94918	0.26	0.029	Hbb	beta-globin gene, exons 1-3.
X02918	0.26	0.018	P4hb	glutathione peroxidase 1
AA875126	0.26	0.004		EST
M24542	0.26	0.010		cyclin (PCNA, proliferating cell nuclear antigen).
D45254	0.26	0.024	Cnbp	cellular nucleic acid binding protein
AJ006971	0.27	0.011	dIk	death-associated like kinase
AI169631	0.27	0.048	Phb	prohibitin
AA799389	0.27	0.006	Rab3b	Rab3B protein
D45412	0.27	0.005	Ptpro	protein tyrosine phosphatase
AA892234	0.27	0.006		EST
AB004267	0.27	0.046	Camk1b	calcium/calmodulin-dependent protein kinase 1, beta
U18314	0.27	0.045	LAP2	RAB26, member RAS oncogene family
X60212	0.27	0.044	AS1	ribosomal protein L8.
AI171630	0.27	0.009	Mapk14	mitogen activated protein kinase 14
M94919	0.27	0.025		syntaxin 2
D87991	0.27	0.020		UDP-galactose transporter related isozyme 1
M20156	0.27	0.011	Rpl18	mitochondrial NADH dehydrogenase
M83298	0.28	0.031	PP2A	cofactor mRNA sequence.
AJ000485	0.28	0.038	CLIP-115	cytoplasmic linker 2
AA892814	0.28	0.004	Capns1	calpain, small subunit 1
AA891871	0.28	0.039	Prpsap1	phosphoribosylpyrophosphate synthetase-associated protein
X84047	0.28	0.021	Gas	CDC-like kinase 3
X97772	0.28	0.011	Phgdh	brain acyl-CoA hydrolase
AA859788	0.28	0.007		EST
X15013	0.28	0.043		ribosomal protein L21.
U37464	0.28	0.007	MEK5	DNA polymerase beta
S61973	0.28	0.016		malignancy-related C140 product
L08814	0.29	0.003	CIIDBP	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)
AA891226	0.29	0.017		EST
X15216	0.29	0.013	Rpl21	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1
U37462	0.29	0.016	MEK5	mitogen activated protein kinase kinase 5
L25633	0.30	0.010	RESP18	transcription elongation factor B polypeptide 2
AA849648	0.30	0.010	Rpl21	ribosomal protein L21
AA800190	0.30	0.004		EST
U83883	0.30	0.009	U83883	glutathione S-transferase, mu 5
X63281	0.30	0.013	N-myc	cytosolic resiniferatoxin-binding protein
U26397	0.30	0.042	Inpp4a	DNA-damage inducible transcript 3
J03190	0.30	0.012	Alas1	protein phosphatase type 1A
AA892373	0.30	0.025	Sdcbp	syntenin
X58389	0.31	0.038		ribosomal protein S5.
X68283	0.31	0.024	Rpl29	snRNP-associated polypeptide N
AI112237	0.31	0.004		EST
X07365	0.31	0.008	Gpx1	amyloidogenic glycoprotein
AI013297	0.31	0.016		EST

S78215	0.31	0.005	PP1 alpha	protein phosphatase 1 beta
M17701	0.31	0.036	Gapd	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)
D30647	0.31	0.006	VLCAD	acyl-Coa dehydrogenase, Very long chain
AA891727	0.31	0.027		EST
AA800291	0.31	0.011		EST
AA800198	0.32	0.040		EST
D10926	0.32	0.015	Tfpi	tissue factor pathway inhibitor
AI102031	0.32	0.019	Bin1	myc box dependent interacting protein 1
X54250	0.32	0.012		ribosomal protein P2.
AA892753	0.32	0.005		EST
AA858641	0.32	0.005		EST
AA874794	0.32	0.021	Ngfrap1	nerve growth factor receptor associated protein 1
AA799671	0.32	0.019		EST
AI007614	0.32	0.001		
AA859700	0.33	0.032		EST
D26180	0.33	0.008	Prkl1	protein kinase C-like 1
AI102505	0.33	0.021	Cox8a	cytochrome c oxidase, subunit VIIIa
D32249	0.33	0.012	Neurodap1	rotein carrying the RING-H2 sequence motif
AA875286	0.33	0.035		EST
M75168	0.33	0.025	liver nuclear protein p47	fatty acid synthase
AB008807	0.33	0.020	Gsto1	glutathione-dependent dehydroascorbate reductase
L42855	0.33	0.013	TCEB2	protein kinase C, type I (gamma type)
AF062740	0.33	0.008	PDP1	pyruvate dehydrogenase phosphatase isoenzyme 1

Table 18

Genes showing down-regulation in the medial preoptic area of males by DEHP among genes expressed predominantly in males.

Accession No.	Gene name	Description
Down-regulated by DEHP in males (10)		
U66478	Mad1	MAD (mothers against decapentaplegic, Drosophila) homolog 1
L13151	GAP	GTPase-activating protein
AF090135	Veli1	lin-7-Ba
X17682	Map2	microtubule-associated protein 2
X57764	Ednrb	Endothelin receptor type B
S65355		nonselective-type endothelin receptor, ETB receptor
M83680	RAB14	GTPase Rab14
AA925762	Macs	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
AI638989		ESTs,
Y00766	Scn3a	Sodium channel III

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
分担研究報告書（平成15年度）

脳の性分化障害に関する研究—性行動に対する影響評価研究
分担研究者 西原 真杉 東京大学大学院農学生命科学研究科教授

研究要旨：本研究は、周産期におけるフタル酸／アジピン酸エステル類の暴露が脳の性分化へのどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的としたものである。具体的には、妊娠・哺乳期の母ラットにフタル酸／アジピン酸エステル類を経口的に摂取させ、新生ラットの視床下部における性分化関連遺伝子の発現および性成熟後の生殖内分泌系や性行動への影響を解析する。本年度においては、Wistar-Imamichi 系ラットを用いて、di-n-butyl phthalate (DBP)を20、200、2000、10000 ppm、diisononyl phthalate (DINP)を40、400、4000、20000 ppmを含む餌を妊娠15日目から産後21日目まで与え、新生子の性ステロイドレベルや成熟後の性行動等を解析した。その結果、DBPは新生子の血中テストステロン濃度には影響を与えなかったが、エストラジオール濃度は特に生後7日目の雌雄で低用量では上昇、高用量では低下させた。DINPは全ての用量で雄のテストステロン濃度を一過的に上昇させたが、エストラジオール濃度には顕著な影響は与えなかった。さらに、DBPは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た。また、成熟雌の性周期や性行動には影響を与えなかったが、排卵前に起こる性腺刺激ホルモンサージのレベルを高めた。DBPは周産期暴露により精巣毒性を示すことが報告されているが、新生子期の血中テストステロン濃度に影響を与えなかったことから、この時期には精巣機能が回復する可能性がある。また、テストステロン濃度に影響を与えることなく成熟後の動物の性行動などに影響を与えたことから、DBPは脳に直接作用して性分化に影響を与えることが考えられた。一方、DINPは新生子期のテストステロン濃度を上昇させたことから、間接的に脳の性分化に影響を与える可能性が示唆された。今後、DINPの成熟動物における実験ならびに di-2-ethylhexyl adipate (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う予定である。

A. 研究目的

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

アジピン酸エステル類を摂取した場合、新生子の脳の性分化の過程や、性成熟後の性行動などにどのような影響を与えるかを解明すること目的としている。平成15年度では、di-n-butyl phthalate (DBP)および diisononyl phthalate (DINP)を段階的な濃度で妊娠・哺乳ラットに混餌摂取させ、新生子の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。

B. 研究方法

実験には Wistar-Imamichi 系ラットを用いた。

妊娠 15 日目から産後 21 日目（離乳時）まで phytoestrogen を含まないの粉末飼料（SF）に DBP を 20、200、2000、10000 ppm、DINP を 40、400、4000、20000 ppm となるように混和した餌を与えた。生後 3 日齢およびの 7 日齢の雌雄ラットを断頭屠殺し、採血を行ってエストラジオールおよびテストステロンの血清中濃度を EIA 法により測定した。さらに、DBP 周産期暴露群については、性成熟後に黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（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。なお、これらの実験を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

妊娠 15 日目からの DBP 20、200、2000 ppm の混餌投与は産子数に影響を与えなかったが、10000 ppm の混餌投与群では産子数が有意に少なく、今回の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。

生後 3 日齢および 7 日齢の雌雄ラットの血清中テストステロンおよびエストラジオール濃度を図 1 から図 8 に示した。DBP 投与実験においては、血清中テストステロン濃度には 3 日齢では変化はなく（図 1）、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（図 2）。血清中エストラジオール濃度には、3 日齢の雌の高用量群で上昇が（図 3）、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（図 4）。一方、DINP 投与は 3 日齢の雄のテストステロン濃度を上昇させたが（図 5）、7 日齢では変化はなく（図 6）、またエストラジオール濃度に対しては 3 日齢（図 7）、7 日齢（図 8）の雌雄ともに顕著な影響は与えなかった。

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（図 9）。しかし、射精後の不応期の時間（PEI）には影響を与えなかつ

た。また、血清中 LH、FSH の濃度に変化はなかった（図 10）。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、ロードシス商（LQ）を有意ではないが低下させた（図 11）。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（図 12）。

D. 考察

DBP は精巣毒性を持つことが報告されているが、本実験においては DBP の周産期暴露によっても、3 日齢、7 日齢の血清中テストステロン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、血清中エストラジオール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、今後さらに検討を要する。一方、DINP の投与群では血清中エストラジオール濃度には変化はなかったが、3 日齢の雄で一過的なテストステロン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。

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さら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テストステロン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 di-2-ethylhexyl adipate (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。

E. 結論

DBP は精巣毒性を持つと考えられているが、周産期暴露によっても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 の周産期暴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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

該当なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

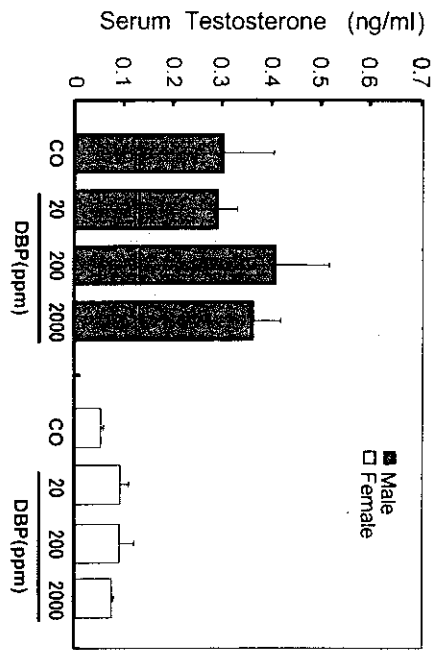


図1. 生後3日目の血清中テストステロン濃度に対するDBPの影響

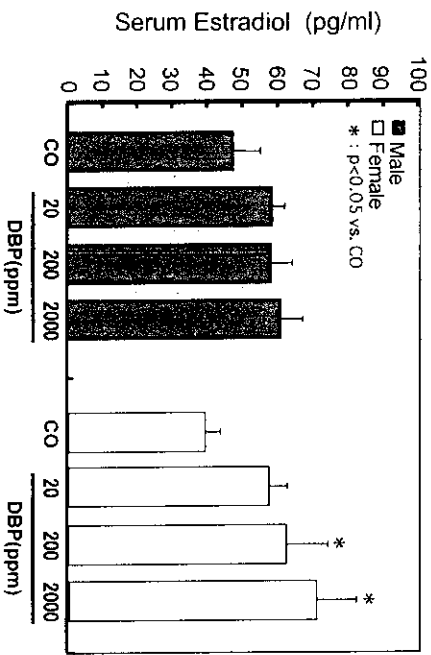


図3. 生後3日目の血清中エストロジール濃度に対するDBPの影響

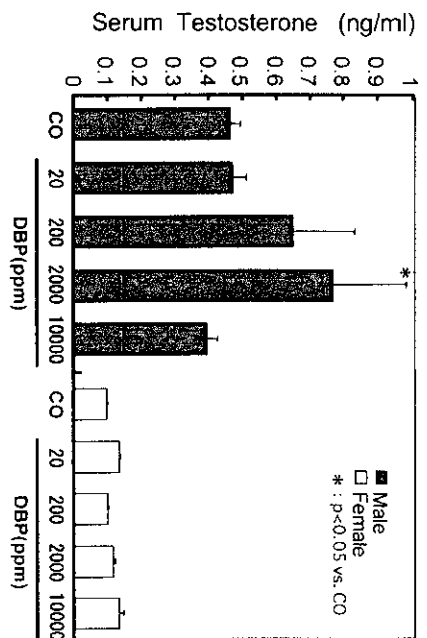


図2. 生後7日目の血清中テストステロン濃度に対するDBPの影響

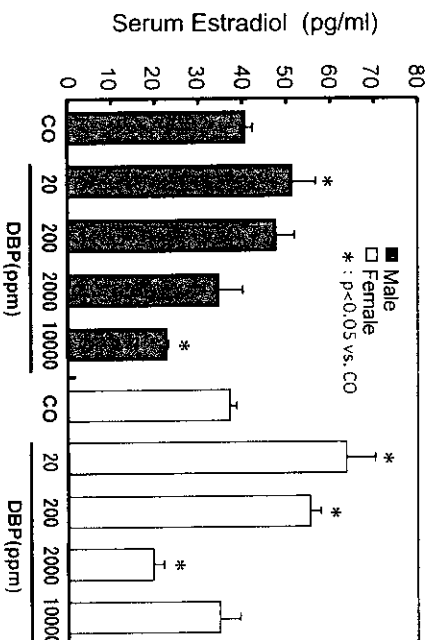


図4. 生後7日目の血清中エストロジール濃度に対するDBPの影響

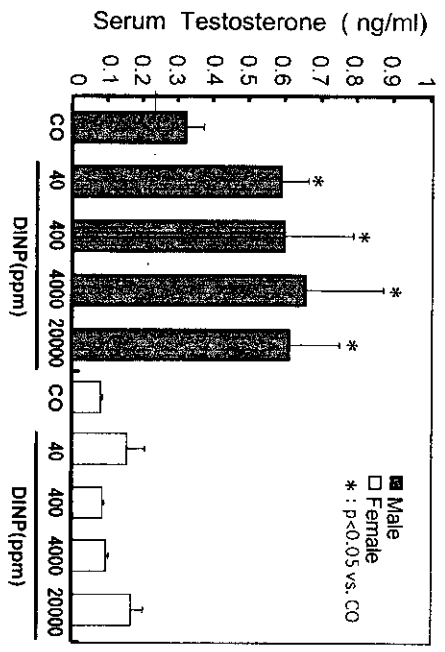


図5. 生後3日目の血清中テストステロン濃度に対するDINPの影響

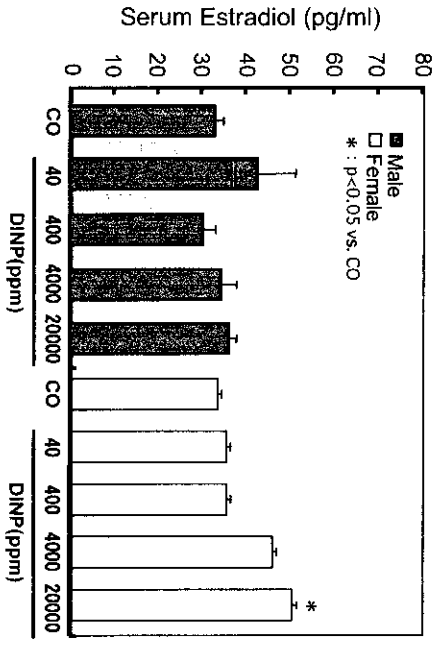


図7. 生後3日目の血清中エストラジール濃度に対するDINPの影響

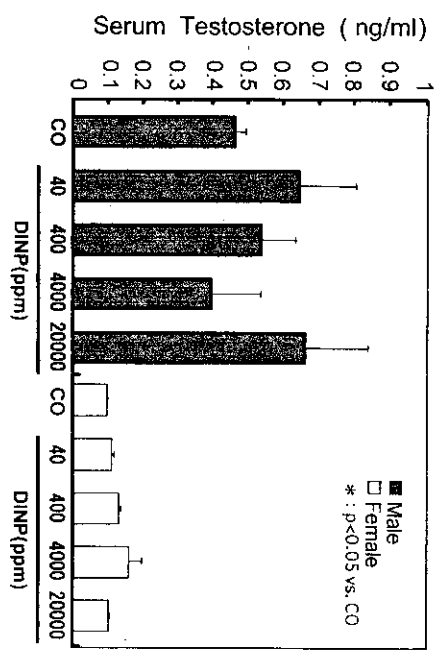


図6. 生後7日目の血清中テストステロン濃度に対するDINPの影響

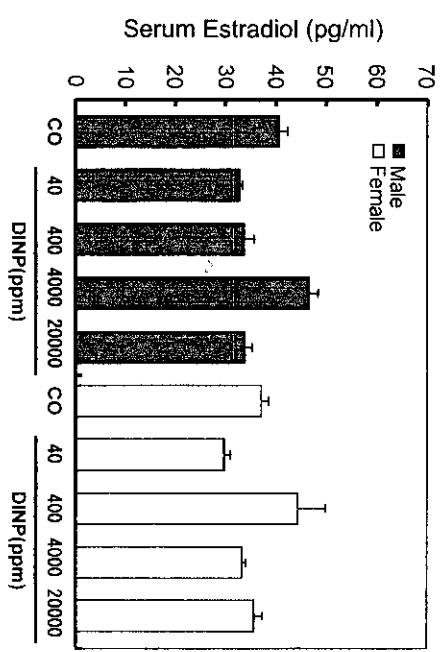


図8. 生後7日目の血清中エストラジール濃度に対するDINPの影響

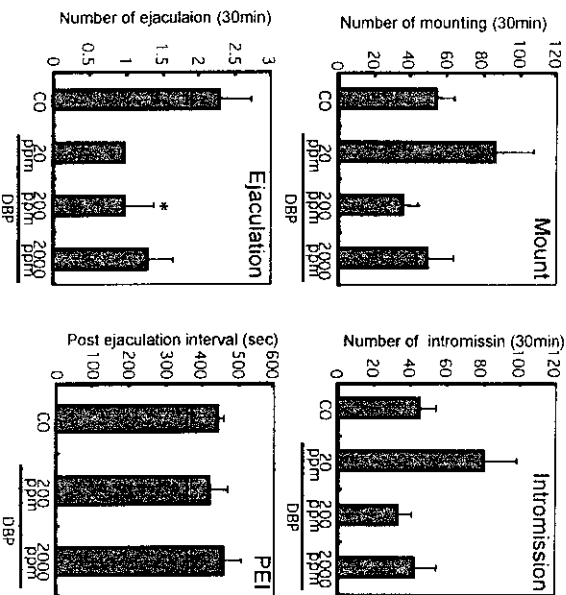


図9. 雌ラットの性行動に対するDBPの影響 * : $p < 0.05$ vs. CO

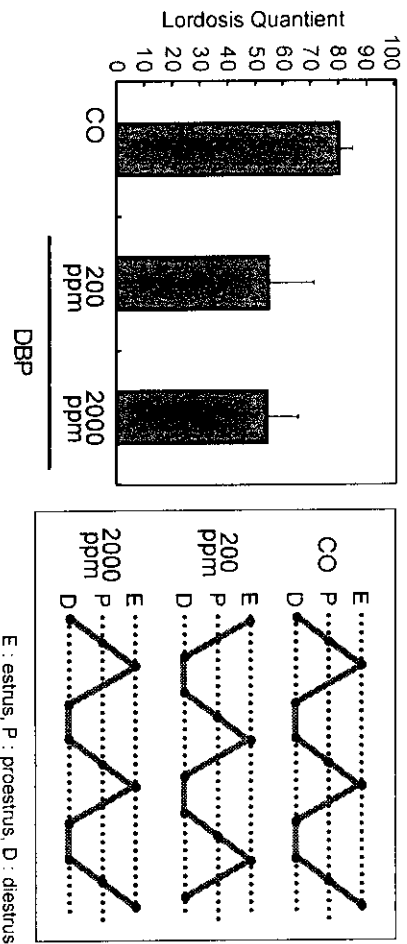


図11. 雌ラットの性行動および性周期に対するDBPの影響

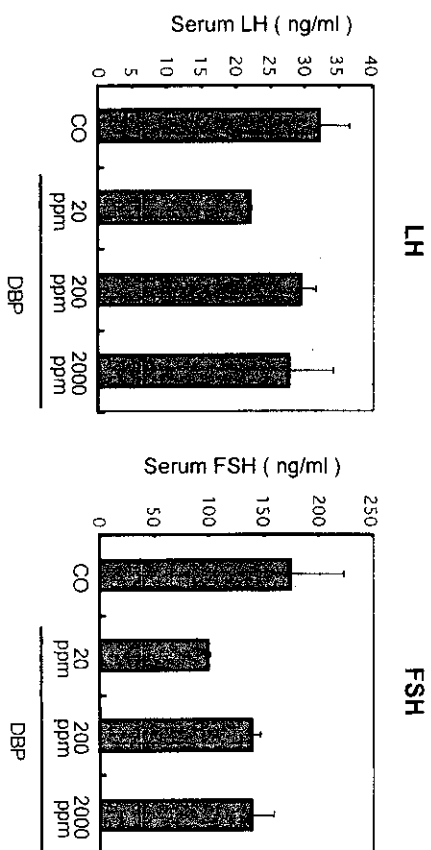


図10. 雌ラットの血清中LHおよびFSH濃度に対するDBPの影響

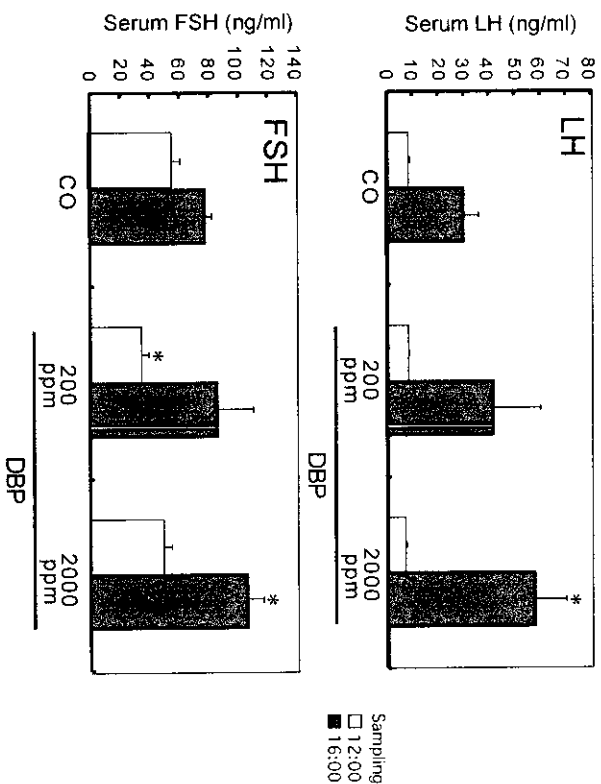


図12. 雌ラットの血清中LHおよびFSH濃度に対するDBPの影響

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）

肝基礎疾患による修飾作用

分担研究者 福島 昭治

大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 教授

研究要旨：雄性 F344 ラットに thioacetamide(TAA)を投与し肝障害を誘発した後、di-N-butylphthalate(DBP)を 20000, 10000, 2500, 及び 0ppm の用量で混餌投与し、その精巣毒性増強効果を検討した。肝障害誘発動物では DBP 高用量投与群で精子数、精子奇形率において DBP の雄生殖器毒性が増強することが判明した。精巣、精巣上体の相対臓器重量では肝障害誘発による影響は認めなかった。

A. 研究目的

フタル酸/アジピン酸エステル類の高濃度曝露が近年問題となっており、その精巣毒性、生殖・発生毒性が懸念されている。フタル酸エステルは腓リパーゼによってモノエステル体に加水分解され、さらに肝臓で酸化を受けた後、尿中に排泄されることが知られている。この物質の雄性生殖機能への毒性に及ぼす肝障害による修飾作用は未だ報告が無い。今回、F344 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。

B. 研究方法

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 thioacetamide (TAA) 200mg/kg bw を PBS 0.5ml 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 20000 ppm、第 2,6 群は 10000ppm、第 3,7 群は 2500ppm 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 (図 1)。第 9 週目に屠殺剖検を行い、肝、腎、前立腺、精囊、精巣、およ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。また血液生化学と病理組織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、および形態異常の比率について検討した。

(倫理面への配慮)

投与実験は、可能な限り非侵襲的に行い、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、大阪市立大学医学研究科動物飼育規約に従った。

C. 研究結果

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(表 1)、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(表 2)。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(表 3)。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(表 4)。

D. 考察

本実験では、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 20000 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 の代謝物であるモノエステル体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、精巣中のモノエステル体濃度を測定したが、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さら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。

E. 結論

TAA により肝障害を誘発した状態で、DBP の精巢毒性は増強された。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。

F. 研究発表

1. 論文発表

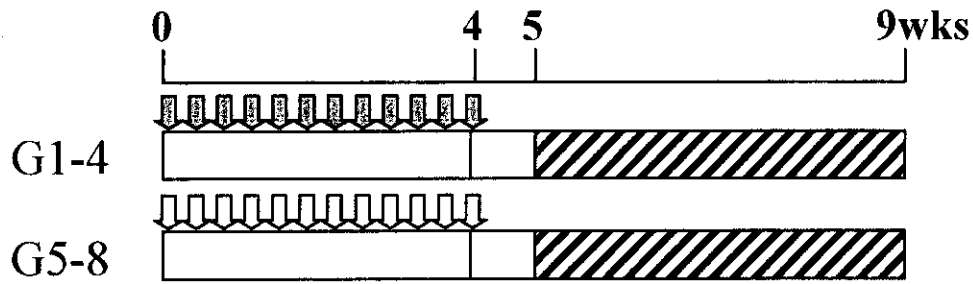
Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H., Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima, S., Shirai, T. and Narita, M.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-644,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

Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nishikawa, T., Hirata, K., Yoshikawa, J. and 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. and 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.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。



Animals: male F344 rats 6 weeks old 10 rats per each group

↓ Thioacetamide (TAA), 200 mg/kg bw, i.p. Total 12 times

↑ PBS (vehicle), i.p. Total 12 times

▨ Di-n-butyl phthalate (DBP) mixed in MF diet

G1,5 : 20000 ppm

G2,6 : 10000 ppm

G3,7 : 2500 ppm

G4,8 : 0 ppm

図1 実験計画

表1. 肝機能障害評価

	TAA	DBP (ppm)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
G1	+	20000	106	38
G2	+	10000	103	38
G3	+	2500	98	42
G4	+	0	106	38
G5	-	20000	94	51
G6	-	10000	104	46
G7	-	2500	94	40
G8	-	0	107	49

表2. 最終体重および諸臓器相対重量

	TAA	DBP (ppm)	最終体重	肝 (%)	腎 (%)	精巣 (%)	精巣上体 (%)
G1	+	20000	260.0 *	5.07 *	0.79 *	0.95	0.29
G2	+	10000	274.0	4.47 *	0.76	1.05	0.31
G3	+	2500	283.2	3.77 *	0.70	1.01	0.31
G4	+	0	282.6	3.44	0.69	1.02	0.31
G5	-	20000	270.4 **	4.72 **	0.77 **	0.96	0.31
G6	-	10000	294.0	4.26 **	0.74 **	1.03	0.31
G7	-	2500	306.5	3.56 **	0.68 **	1.00	0.30
G8	-	0	298.9	3.22	0.66	1.03	0.32

*, p<0.05 vs G4; **, p<0.05 vs G8

表3. 精巣機能障害評価

	TAA	DBP (ppm)	精子運動率 (%)	精子奇形率 (%)	精子頭部数 (x10 ⁴ /ml)
G1	+	20000	85.7 #	19.2 *#	1656 **
G2	+	10000	77.3	10.2	2192
G3	+	2500	71.5	9.2	2311
G4	+	0	78.5	9.8	2574
G5	-	20000	71.7	9.9	2588
G6	-	10000	84.5	9.3	2977
G7	-	2500	83.1	8.5	3186
G8	-	0	79.1	8.8	3117

*, p<0.05 vs G4; #, p<0.05 vs G5

表4. 前立腺重量

	TAA	DBP (ppm)	腹葉 (g)	背側葉 (g)	前葉+精囊腺 (g)
G1	+	20000	0.272 *	0.175 *	0.636 *
G2	+	10000	0.304	0.190	0.738
G3	+	2500	0.347	0.190	0.741
G4	+	0	0.372	0.216	0.811
G5	-	20000	0.303 **	0.197 **	0.661 **
G6	-	10000	0.354	0.220	0.765
G7	-	2500	0.341	0.200	0.739
G8	-	0	0.377	0.240	0.817

*, p<0.05 vs G4; **, p<0.05 vs G8

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

腎基礎疾患による内分泌かく乱作用の修飾に関する研究

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨: 葉酸誘発腎障害の状態では di-N-butylphthalate(DBP)による精巣毒性が増強されることを平成 14 年度に明らかにしたが、そのメカニズム解明のため、葉酸誘発腎障害によって DBP の代謝物である monobutylphthalate(MBP)の血中、尿中、精巣における濃度を DBP 投与 12 時間後に HPLC にて測定した。その結果、血中 MBP の濃度増加と尿中 MBP の減少傾向が認められた。昨年度認めた精巣毒性の増強作用は血中 MBP の上昇が関与していることが示唆された。今後他の代謝物の関与について残っている試料を用いて追究する予定である。

A. 研究目的

F344 雄ラットに葉酸を 300 mg/kg にて週一回 5 回投与し、慢性の腎障害を誘発しておいた状態で di-N-butylphthalate(DBP)を 4 週間飼料に混じて投与したところ精巣毒性が顕著に増加し、葉酸投与による腎障害が DBP の雄性生殖器障害を増強することを明らかにした。このように本研究では内分泌かく乱作用物質の雄性生殖器に対する毒性が、腎機能が低下した病的状態で如何に修飾を受けるかについてラットを用いて追究することを目的としているが、正常の動物におけるリスク評価では得られない成果であり、化学物質のヒトにおける毒性評価の上で極めて貴重なデータであり、今までにないユニークな研究である。本年度はその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が腎機能低下によって上昇するかどうかを明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

6 週齢 F344 ラット雄に 300mg/kg bw にて葉酸を週一回背部皮下に 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 週後にも 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（図 1）。血液、尿および精巣中の 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。さらに肝と精巣の 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。

（倫理面への配慮）

動物実験については、名古屋市立大学動物実験委員会の許可を得、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮して行った。

C. 研究結果

葉酸投与終了後 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 (表 1)。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 (表 2)。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。さらに 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 (表 3)。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において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 週目において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 (表 4)。図 2 には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みとめた。

D. 考察

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、さら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。

E. 結論

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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.

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.

2. 学会発表

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 年 9 月。

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、PhIP ラット前立腺発がんに関与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 年 9 月。

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 年 9 月。

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