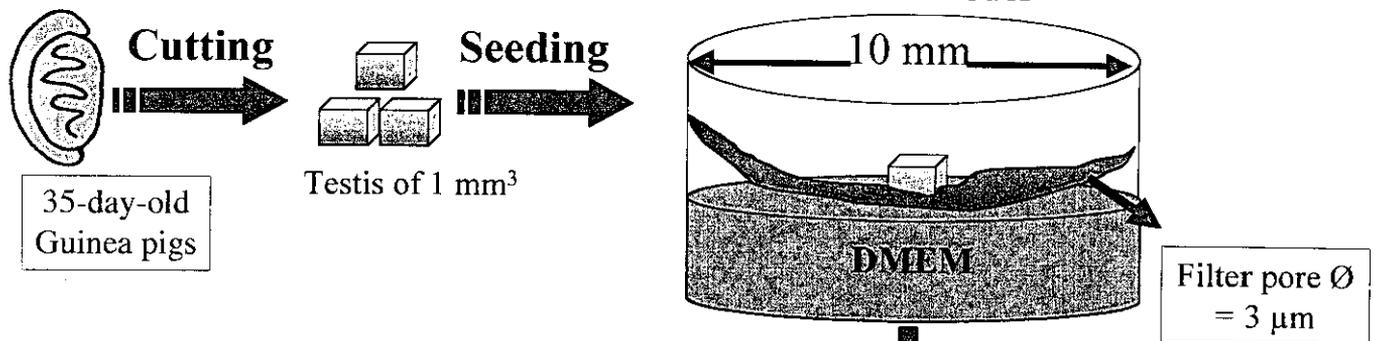


**Fig. 24.** Ultrastructural appearances of control and MEHP-treated testicular cells at 6 hr.

(a); Apoptotic Sertoli cell. Vacuolization (asterisk) and nuclear membrane lysis (red arrows) occur, while swollen cytoplasm (#) and condensed nuclei in spermatogenic cells are recognizable, (b); In necrotic spermatogenic cell, no organelles are functioning, (c); Apoptotic cell depicts nuclear membrane lysis, (d); By MEHP-treatment, apoptotic spermatogenic cell is frequently found. Organelles are still functioning.

**Fig. 25. Guinea pig  
(Testicular tissue culture)**

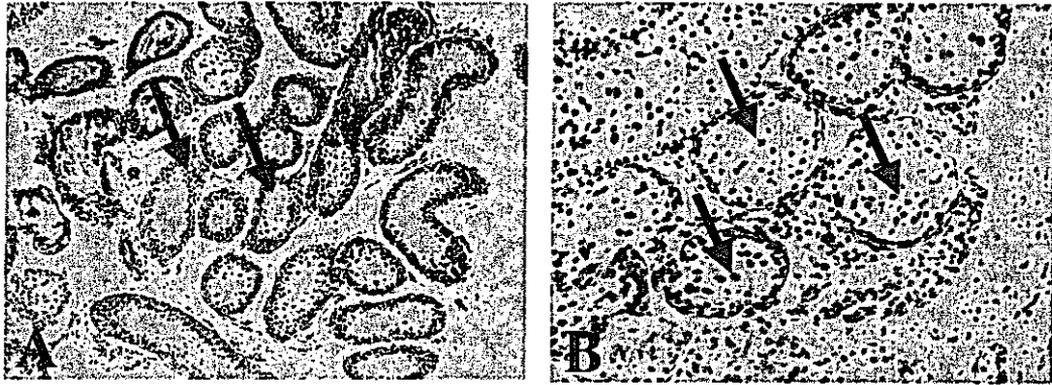


Fixation with 4% paraformaldehyde for light microscopic observation (TUNEL staining for apoptotic spermatogenic cell)

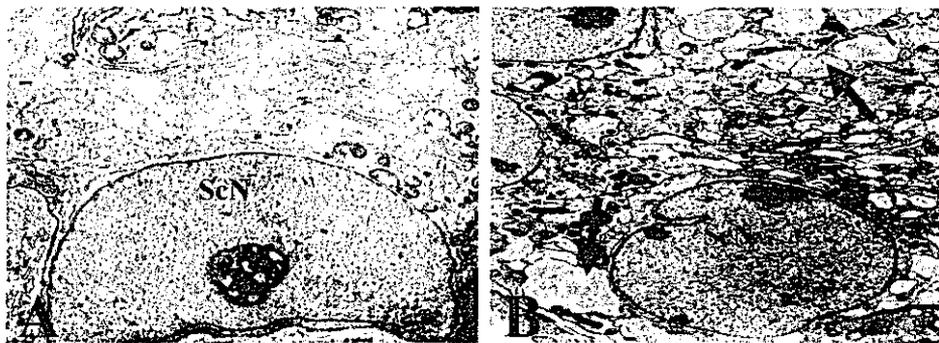
Fixation with 5 % glutaraldehyde for ultrastructural study (TEM)

The cultured medium contains:  
 -MEHP at dosage of 100,  
 10, 1 nmol.ml<sup>-1</sup>, and 0 (control, corn oil)  
 -Treatment duration: 3, 6, and 9 hr  
 after administration of MEHP

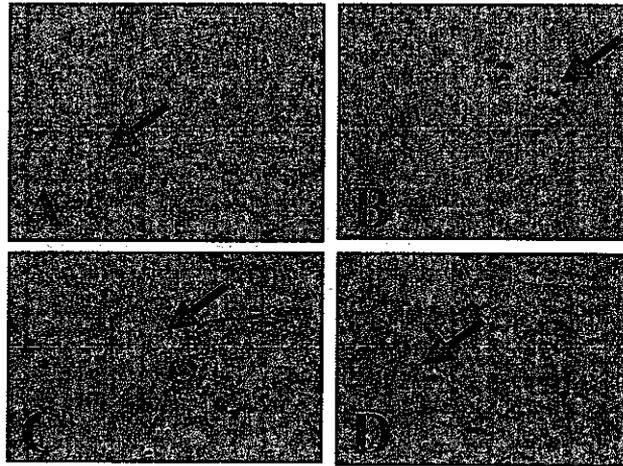
The data, calculated as a percentage, were expressed as the mean ±SD. The significance between each group (\*p< 0.05; \*\*p<0.01) was determined by single factor analysis of variance (ANOVA)



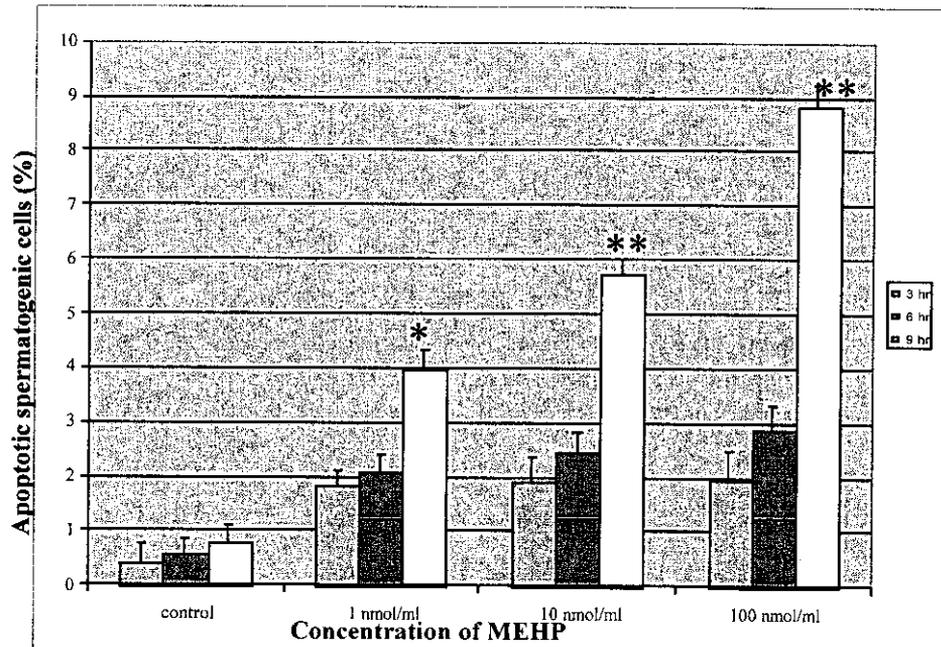
**Fig. 26. Testicular tissue culture of guinea pig. Seminiferous tubules reveal normal in structure in control (A). Detachment and displacement of spermatogenic cells are recognized in MEHP-treated group (B).**



**Fig.27. Transmission electron micrographs of Sertoli cells. Sertoli cells show normal in structure in control (A). Vacuoles of different sizes are frequently observed in MEHP-treated Sertoli cells (B) ( 100 nmol/ml of MEHP treatment for 9 hr). ScN: Sertoli cell nucleus.**



**Fig. 28. TUNEL-positive spermatogenic cells gradually and significantly increased in dose- and time-dependent manners. Maximal increase of apoptotic spermatogenic cells are observed at 100 nmol/ml of MEHP treatment for 9 hr.**



**Fig. 29. In *in vitro* study, apoptotic spermatogenic cells significantly increased in dose- and time-dependent manners. Values were expressed as mean  $\pm$  SEM (n=3). Statistically significant differences in means from vehicle control were analyzed by ANOVA followed by Fisher's PLSD test (\*p<0.05; \*\*p<0.01). The similar pattern of apoptotic spermatogenic cell changes was observed in *in vivo* study in guinea pigs. MEHP altered apoptosis process in a time-dependent manner.**

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

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

分担研究者 江崎 治 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部部長

研究協力者 山崎聖美 国立健康・栄養研究所生活習慣病研究部主任研究員

研究要旨

フタル酸（2-エチルヘキシル）の代謝産物であるフタル酸モノ-2-エチルヘキシル（MEHP）の精巣毒性について、その分子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、MEHP がマウスライディッチ細胞へ及ぼす影響について調べた。マウスライディッチ細胞 MA-10 を用いて、 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、及び  $10^{-4}$ M MEHP で MA-10 細胞を処理し、コントロールとして同様に DMSO で細胞を処理し、24 時間後に細胞から RNA を調製した。Gene Chip によるこれら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。

A. 研究目的

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

そこで、MEHP の精巣毒性についてそ

の分子レベル、特に遺伝子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、マウスライディッチ細胞 MA-10 を用いて、MEHP の及ぼす影響について調べた。

B. 研究方法

1. RNA 調製

マウスライディッチ細胞 MA-10 を 6 穴プレートに 10%FCS-DMEM 中  $2 \times 10^5$  個/ml になるようにまき、一晚、37℃、5%CO<sub>2</sub> 中でインキュベーションした後、FCS 無しの DMEM で細胞を洗った後、FCS 無し DMDM 中で MEHP を最終濃度  $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M、及び  $10^{-4}$ M になるよう添

加、あるいはコントロールとして DMSO を添加し、さらに 24 時間インキュベーションし PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。

## 2. Gene Chip による解析

Affymetrix 社製 Mouse Expression 430A にて 1 で調製した RNA について解析を行った。

## 3. Northern Blotting による解析

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  $2 \times 10^5$  個/ml になるようにまき、一晩、37°C、5%CO<sub>2</sub> 中でインキュベーションした後、FCS(-)DMEM で細胞を洗った後、FCS(-)DMEM 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、さらに 24 時間インキュベーションし PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。得られた RNA 20  $\mu$ g をアガロースゲルで電気泳動し Northern Blotting を行った。

## C. 研究結果

### 1. MA-10 細胞において MEHP により発現が変化する遺伝子の Gene Chip による解析

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 Gene Chip による解析結果について、発現が増加したものを表 1 に、発現

が減少したものを表 2 に示す。

### 2. プロモーター領域における PPRE の検索

表 1 にあげられた遺伝子のうち、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 1kb までに PPRE があるか検索を行った。その結果を表 3 に示すが、PPRE を持たないものが多かった。

### 3. DGAT 遺伝子発現変化の Northern Blotting による解析

ジアシルグリセロール(DG)からトリアシルグリセロール(TG)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。

## D. 考察

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無かった。今後、検索するプロモーター領域を上流 2kb まで広げて検討を行う。一方、フタル酸エステル類は PPAR  $\alpha$  や PPAR  $\gamma$

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、DGAT 2 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不明だが、この遺伝子の発現上昇は、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を示唆している。

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、Gene Chip 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、さらにそれら遺伝子の発現調節メカニズムについて解明を行うことにより、MEHP のライディッヒ細胞への影響を明らかにできると考える。

#### E. 結論

MEHP の精巣毒性についてその分子レベル、特に遺伝子レベルにおけるメカニズムを解明する目的で、マウスライディッヒ細胞 MA-10 を用いて、MEHP の及ぼす影響について調べた。細胞内コレステロール量が増加する  $10^{-6}$ M 及び  $10^{-5}$ M、及び  $10^{-4}$ M MEHP で MA-10 細胞を処理し、コントロールとして同様に DMSO で細胞を処理し、24 時間後に細胞から RNA

を調製した。Gene Chip によるこれら遺伝子発現の解析の結果、 $10^{-6}$ 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。また、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。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

表1 MEHPにより発現が増加する遺伝子

	Accession No.	DMSO	MEHP10 <sup>-4</sup> M	MEHP10 <sup>-5</sup> M	MEHP10 <sup>-6</sup> M	Fold	
1420466	NM_009268	1.7	6.4	4	3.12	7.06	salivary protein 2
1421639	NM_028564	4.4	8.5	15.4	27.9	6.34	RIKEN cDNA 1700082M22 gene
1420660	NM_019457	1.7	5.1	2.2	5.1	3.00	leucine-rich repeat-containing 6 (testis)
1425293	BC017627	11.9	15.1	18.9	34.1	2.87	RIKEN cDNA 1500031H04 gene
1421583	AF448508	8.4	7.1	15.8	22.4	2.67	
1420217	BB556127	43.9	86.8	83	112.2	2.56	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1
1416832	BC006731	4.9	9.4	9.8	11.9	2.43	RIKEN cDNA 4933419D20 gene
1447958	BB165262	15.9	28.8	29	36.1	2.27	"Mus musculus 16 days neonate thymus cDNA,RIKEN full-length enriched library,clone:A130082C12 product:unknown EST,full insert sequence."
1417651	NM_007815	35.3	48	39.2	75.9	2.15	cytochrome P450, 2c29
1449337	AI098840	22.9	34.1	38.6	47.8	2.09	tryptophan 2,3-dioxygenase
1438374	AV348729	11.9	20.5	17.7	24.6	2.07	amyloid beta (A4) precursor protein
1450330	NM_010548	13.3	16.4	22.7	27.2	2.05	interleukin 10
1448280	NM_009305	20.6	35	46.3	40.6	1.97	synaptophysin
1432249	AK013216	75.4	88.1	120.5	147.8	1.96	Cockayne syndrome 1 homolog (human)
1450854	BM232515	23.4	25	28.9	45.4	1.94	"proliferation-associated 2G4,38kD"
1416787	NM_007394	44.8	64.1	90.1	86.2	1.92	activin A receptor, type 1
1449817	NM_021022	20	22.2	33.7	37.5	1.88	"ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11"
1448783	NM_021291	16.7	21.9	25.2	31.1	1.86	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y-system), member 9
1428074	AK009669	10.7	11.7	22.4	19.8	1.85	RIKEN cDNA 2310037P21 gene
1436936	BC806300	50.2	63.9	71.4	92.5	1.84	inactive X specific transcripts
1425250	AF366052	26.4	23.9	29	48.1	1.82	solute carrier family 14 (urea transporter), member 2
1426640	BC027159	72.9	107.3	107.9	130.1	1.78	TRB-2
1420275	AV369255	122	147.7	204.5	215.2	1.76	"transporter 1,ATP-binding cassette,sub-family B (MDR/TAP)
1425253	BC024372	20.5	30.9	26.2	36.1	1.76	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
1418674	NM_011019	9.2	12.5	14.5	16	1.74	oncostatin receptor
1421641	NM_009209	25.8	22.9	42.2	44.2	1.71	"solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter,noradrenalin),member 2"
1424998	AY032690	23.8	22.9	21.7	40.7	1.71	EGF-like module containing,mucin-like,hormone receptor-like sequence 4
1427775	AJ437645	17.3	25.4	17.4	29.1	1.68	defensin bata 10
1435415	BB491008	18.3	18.2	21.8	29.8	1.63	MARCKS-like protein
1420722	BC016468	21.9	36.3	25.4	35.5	1.62	"elongation of very long chain fatty acid (FEN1/Eco2,SUR4/Elo3,yeast)-like 3"
1426095	AY046551	48.4	79	60.8	78.2	1.62	"tumor necrosis factor receptor superfamily,member 22"
1425886	AY049085	49.9	54.1	64.8	79	1.58	ETS-domain transcription factor Pet-1
1423858	BC014714	124.2	179.9	127.1	196.1	1.58	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2
1453827	AI450336	27.4	32.6	27.5	43.2	1.58	RIKEN cDNA 1110035H17 gene
1420048	C78859	16.3	23.5	18.8	25.5	1.56	"Mus musculus adult male hypothalamus cDNA,RIKEN full-length enriched library,clone:A230020L22 product:unknown EST,full insert sequence."
1418554	NM_007412	27	22.4	28.9	42.2	1.56	adrenomedullin receptor
1437607	BB357165	21.2	16.3	28	33	1.56	"glucosaminyltransferase,l-branching enzyme"
1420788	NM_016970	55.9	56.4	67.8	86.8	1.55	"killer cell lectin-like receptor subfamily G,member 1"
1455987	BF148622	77.3	69.8	78.5	119.4	1.54	"SEC61, alpha subunit (S.cerevisiae)"
1425181	AV344708	17.6	16	14.5	27	1.53	RIKEN cDNA 3110007P09 gene
1424287	BB367549	21.2	22.5	31.8	32.5	1.53	putative serine/threonine kinase
1430586	BB552785	22	18.1	20.2	33.4	1.52	RIKEN cDNA 2700007P21 gene
1452335	AV024565	17.9	22.5	17.9	27.1	1.51	RIKEN cDNA 2810423E13 gene
1428015	BC027567	44.7	36.8	39.6	67.1	1.50	"Mus musculus,clone IMAGE:3472070,mRNA"

表2 MEHPにより発現が減少する遺伝子

	Accession No.	DMSO	MEHP10 <sup>-4</sup> M	MEHP10 <sup>-5</sup> M	MEHP10 <sup>-6</sup> M	Fold	
1437767	AA138720	18.6	7.3	17.9	9.4	0.51	retinoblastoma-like 2
1418189	AA560093	37.5	23.6	15	19.4	0.52	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2
1417136	BG805074	67.2	74.9	63.4	38.9	0.58	serine/arginine-rich protein specific kinase 2
1438887	BM239632	39.9	48.3	36.6	23.9	0.60	"ESTs,Moderately similar to germ cell-less homolog (Drosophila) [Mus musculus][M.musculus]"
1426924	AK013592	315.5	276.7	244.4	198.9	0.63	RIKEN cDNA 2900024N03 gene
1431213	BG297038	171.7	166.3	164.4	108.3	0.63	
1425195	AF356876	322.6	326	308.7	205.6	0.64	"t-complex protein 1,related sequence 1"
1416190	AF145253	112	110.6	98.9	76.9	0.69	"SEC61, alpha subunit (S.cerevisiae)"
1438069	BE446879	28.4	24.8	22.3	19.5	0.69	RNA binding motif protein 5
1419277	NM_130879	167.5	174.5	148.7	115.7	0.69	cDNA sequence BC021769
1454791	AUC40918	330.9	307	262.1	229.8	0.69	retinoblastoma binding protein 4
1426051	BC006628	58	54.3	49.1	40.3	0.69	centromere autoantigen B
1448605	NM_007484	48.8	51.9	44.8	34.1	0.70	"ras homolog gene family,member C"
1421313	NM_007803	80.4	75.9	86.6	56.2	0.70	cortactin

表3 MEHPにより発現が増加する遺伝子のプロモーター領域のPPRE検索

Accession No.	Fold		染色体	PPRE
NM_009268	7.06	salivary protein 2	15	なし
NM_019457	3.00	leucine-rich repeat-containing 6 (testis)	15	なし
BB556127	2.56	nuclear receptor subfamily 5,group A, member 1	2	なし
NM_007815	2.15	cytochrome P450, 2c29	19	なし
NM_010548	2.05	interleukin 10	1	なし
NM_007394	1.92	activin A receptor, type 1	2	なし
NM_021022	1.88	"ATP-binding cassette,sub-family B (MDR/TAP),member 11"	2	なし
NM_021291	1.86	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+system), member 9	7	なし
AF366052	1.82	solute carrier family 14 (urea transporter), member 2	18	なし
NM_011019	1.74	oncostatin receptor	15	なし
AJ437645	1.68	defensin beta 10	8	なし
BC014714	1.58	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2	3	あり

## 文献調査による健康影響評価研究-発達期の曝露影響と感受性要因の検索

分担研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室長  
研究協力者 松本 真理子 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

### 研究要旨

フタル酸 (PAEs) 及びアジピン酸エステル (AAEs) についての文献検索を実施し、発育期曝露による生殖系への影響並びに種差あるいは曝露時期による感受性の違いに関する情報を収集・解析することを目的とした。PAEs 及び AAEs については 2000 年～2004 年 2 月の情報を Medline で検索し、文献の収集・解析をおこなった。昨年度の報告会で示された論文を除いて生殖発生毒性に関しては、36 報の論文があり、PAEs については DEHP に関する論文が最も多く、次いで DBP, BBP, DINP に関する論文であった。ヒトの疫学に関する報告では男性尿中 PAEs レベルと精子性状との関係、臍帯血中 PAEs レベルと在胎期間との関係、子宮内膜症女性の高血中 PAEs レベルを示唆する報告がなされている。PAEs の妊娠中曝露による雄生殖器への影響及び精巣毒性について遺伝子レベルでの解析が進みつつある。AAEs に関する論文は 1 報あり、ラットの妊娠中に投与したアジピン酸ジエチルヘキシル(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いる。

### A. 研究目的

フタル酸エステル (PAEs) の生殖系への影響としては生殖毒性、催奇形性及び精巣毒性が知られているが、近年 PAEs が抗アンドロゲン作用を有することが明らかとなった[小泉ら, 2000]。こうした毒性の発現は主にげっ歯類で認められており、特に精巣毒性については著しい種差のあることが報告されている。さらに、中枢神経系への影響の可能性も疑われている。すでに主な PAEs については、その毒性の種類、作用機構、構造活性相関などについて、2000 年までの文献を調査し、解析・評価して報告した[小泉ら, 2001]。本研究では、生殖発生毒性に関する報告を中心に、昨年度の本研究班で報告された論文以外の 2000 年以降の新規情報を収集・整理した。また、アジピン酸エステル (AAEs) も PAEs と同様にペルオキシソーム

増殖作用を示し、肝腫瘍を誘発することが知られているので、生殖発生毒性に関する情報を調査するため 2000 年以降の文献調査を行った。

### B. 研究方法

PAEs 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。AAEs 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。

(倫理面への配慮)

本研究は文献情報を検索、収集、整理すること

であるため、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

### 1. 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、モノブチルフタレート (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 ら, 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 ダメージ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) と精子の DNA のダメージの間に相関関係があることが分かった。MBP, MBzP, MMethylP, MEHP とは有意な相関関係はなかった [Duty ら, 2003b]。

新生児 84 人の臍帯血中 DEHP および 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 ら, 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 ら, 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 (300mg/kg) と DINP (750 mg/kg) の複合投与した結果、DINP と DEHP が雄胎児 (妊娠 21 日) の精巣テストステロン (T) 産生と精巣及び血中の T レベルを減少させ、血中 LH

レベルを上昇させた。肛門生殖突起間距離 (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。血中インヒビン 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 ら, 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ンジオンの変化によるものというより、むしろ精巣内のテストステロン (T) 5 $\alpha$ -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 ら, 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 フラグメンテーションを 12 時間後に調べた。免疫細胞学的検索により 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 フラグメンテーションがあった。精巣 0.5  $\mu$ g 中の断片化した DNA の核の最大数は、3 (0.004 mg/g)、5 (0.04mg/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 フラグメンテーション及びアポトーシスを惹起することが示唆された [Ichimura ら, 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 ら,

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 ら, 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 によるアップレギュレーションは、Vanin-1 (精巣発生調整)、ホルモン代謝に関与する酵素などでみられ、11betaHSDI、HSD3b5 ではダウンレギュレーションが認められた。また、ステロイド産生遺伝子 cyp7B1 では発現が低下したが、リン脂質輸送蛋白と cyp2B9 は発現誘導された。また、ALDH3、GETtheta2、Id2 などの発現も DEHP に影響された [Wong ら, 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、鼻腔エオシ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 ら, 2001]。

### 卵巣

ウシの卵細胞 (Cumulus-oocyte complexes) を MEHP (0,25,50,75,100  $\mu$ M) と共に培養すると MEHP (75, 100  $\mu$ M) 存在下では卵細胞が

胚胞の状態に残っていることが多かった。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  $\mu$ 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、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 ら, 2003]。

性腺刺激ホルモン (eCG) を未成熟雌 F344 ラットに投与し排卵を誘発させ、DEHP 摂取の排卵に対する影響を調べた。DEHP(500 mg/kg) の 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 ら, 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  $\mu$ g/ml)、BBP 及び DBP (10, 100, 1000  $\mu$ 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 ら, 2002]。

### 新生児の肺

Wistar ラットの妊娠 15 日から分娩後 2 日目までに DEHP 1%含有飼料を与え (1000 mg/kg/day 以上)、生後 2 日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 ら, 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、テストステロン(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 時間では低かったが、DBP 投与停止 48 時間後には増加した。精巣の培養実験においても DBP はコレステロール輸送や 17 $\beta$ -HSD を除く T 合成経路機能を減少させた。高濃度の 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官の異常発現の原因と考えられる [Thompson ら, 2003]。

SD ラットの妊娠 12-21 日に DBP (500 mg/kg/day) を経口投与し雄児の生殖器を調べた。ライディヒ細胞の凝集、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 日の児で精母細胞数の減少、45-70 日では精上皮に変性がみられ、その程度は 70 日齢で最も顕著であった。70 日齢の児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。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、血中テストステロンレベル低下、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 ら, 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 以上の投与量において出生前後における精巣下降不全が認められた [Shono ら, 2003]。

#### 精巣

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。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 ら, 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 ら, 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 $\gamma$  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。PPAR $\alpha$  に調節される CYP450, 4A1, mRNA の増加は有意だ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 $\gamma$  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 $\beta$  (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 $\beta$  (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係する遺伝発現の変化が示唆された [Kobayashi ら, 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 ら, 2004] (前掲-DEHP)。

#### 雄カエル

遺伝子的に雄ガエル (*Rana rugosa*) である受精後 19-23 日のオタマジャクシを 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 $\alpha$ -エストラジオール (0.01, 0.1, 1  $\mu$ g) の暴露では一部もしくはすべてのオタマジャクシの生殖腺が卵巣様構造となった。DBP (1, 10  $\mu$ g) 暴露の一部のオタマジャクシでも同様の結果がみられた [Ohtani ら, 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 ら, 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  $\mu$ g/ml)、BBP 及び DBP (10, 100, 1000  $\mu$ 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 ら, 2002] (前掲-DEHP)。

#### 4. BBP (MBP and MBzP) に関連した情報

##### 雄児

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しらべたところ、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 ら, 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。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 ら, 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 ら, 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 ら, 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 ら, 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  $\mu$ g/ml)、BBP 及び DBP (10, 100, 1000  $\mu$ 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、DEHP、DBP、BBP の高濃度では胚に対する影響がみられた。[Seek ら, 2002] (前掲-DEHP, DBP)

## 5. DINP(MINP)に関連した情報

### 雌雄児

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。視床下部の SDN-POA のサイズにも変化がなかった [Masutomi ら, 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(300mg/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) の精巣テストステロン (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。血中インヒビン 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 ら, 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 (lethal dose = 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 [Schoneker ら, 2003]。

## 7. 総説

NTP-CERHR の 7 種のフタル酸エステル類 (PAEs: 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 PAEs 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 ら, 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 ら, 2003]。

#### 9. 引用文献

##### 研究目的の項

小泉睦子、江馬 眞、広瀬明彦、長谷川隆一 (2000) フタル酸エステルの生殖および発生に対する毒性影響についての最近の研究：主として Di(2-ethylhexyl) phthalate および Di-*n*-butyl phthalate について。日本食品化学学会誌, 7, 65-73.

小泉睦子、江馬 眞、広瀬明彦、黒川雄二、長谷川隆一 (2001) フタル酸エステルの生殖・発生無毒性量、精巣毒性の週齢差、種差および DEHP の 1 日耐容摂取量。日本食品化学学会誌, 8, 1-10.

##### 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(7): 1512-5.

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(3):269-77.

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(9):1164-9.

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(14): 1783-5.

##### 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(3):305-10.

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(1):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(1-2):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(8):446-51.

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(1):41-9.

Seok 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(4):443-8.

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(3):287-90.

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.* 20;143(2):163-73.

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(10):1429-32.

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(4):458-66.

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(3):207-15.

Wong JS, Gill SS. (2002) Gene expression changes induced in mouse liver by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15;185(3):180-96.

#### **DBP(MBP)に関連した情報**

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(4):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(2):301-13.

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: 215-25

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(6):453-62.

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(12):1189-93.

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(5):575-83.

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(4):443-8.

Shono T, Suita S. (2003) Dose-dependent effect of phthalate ester on testicular descent in pre-and post natal rats. *Urol Res.* 31(5):293-6

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(3):1227-37

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(1):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(3):207-15.

#### **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(4):407-12.

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(6):453-62.

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(5):575-83.

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(4):443-8.

Shono T, Suita S. (2003) Dose-dependent effect of phthalate ester on testicular descent in pre-and post natal rats. *Urol Res.* 31(5):293-6

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(3):207-15.

#### **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(1):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* 5;192(2-3):149-70.

#### Polyvinylacetate Phthalate についての情報

Schoneker DR, DeMerlis CC, Borzelleca JF. (2003) Evaluation of the toxicity of polyvinylacetate phthalate in experimental animals. *Food Chem Toxicol.* 41(3):405-13.

#### 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):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(2):163-70.

#### **D. 考察**

ヒトの疫学に関する報告では男性尿中 PAEs レベルと精子性状との関係、臍帯血中 PAEs レベルと在胎期間との関係、子宮内膜症女性の血中 PAEs 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。

PAEs 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テストステロン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。

AAEs 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 PAEs 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**

ヒトの疫学に関する報告では PAEs 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。

PAEs 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、テストステロン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。

AAEs 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 PAEs 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。

## F. 健康危機情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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

Emma M, Miyawaki E, Hirose A, Kamata E. (2003) 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.

広瀬明彦、江馬 眞、鎌田栄一、小泉睦子、長谷川隆一 (2003) 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.

### 2. 学会発表

Emma M, Miyawaki E. (2003) Decreased anogenital distance (AGD) and undescended testes in fetuses of rats given monobutyl phthalate (MBEP) during pregnancy. *Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting.*

Koizumi M, Nishida N, Enami T, Sunaga M, Horikawa H, Kamata E, Emma M, Hasegawa R. (2003) Comparative toxicity study of 3-aminophenol in newborn and young rats. *Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting.*

Hasegawa R, Koizumi M, Noda A, Ito Y, Furukawa M, Fujii S, Kamata E, Emma M. (2003) Higher susceptibility of newborn rats to 3-methylphenol than young. *Society of Toxicology, 42<sup>th</sup> Annual Meeting.*

江馬 眞 (2003) 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

江馬 眞、宮脇英美子、広瀬明彦、鎌田栄一  
(2003) 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