

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

ダイオキシン類の健康影響特にその TEF を中心とした
リスク評価のための実験的基盤研究

H13-生活-010

2003 (平成15年度)

総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞
国立医薬品食品衛生研究所

平成16年 (2004) 4月

別添3

目 次

I. 総括研究報告書

ダイオキシン類の健康影響特にそのTEFを中心としたリスク評価のための

実験的基盤研究 (H13 - 生活 - 010)

江馬 真 ----- 1

II. 分担研究報告書

1. 奇形発生とTEF

江馬 真/高木 篤也 ----- 17

2. ダイオキシンの胎生期暴露のサル鼠の行動発達に及ぼす影響

安田 峯生 ----- 21

3. 胚幹細胞 (ES細胞) に対するダイオキシンの影響

高木 篤也 ----- 25

4. ダイオキシンの発がん性とTEF

菅野 純 ----- 27

5. 細胞アレイを指標とした発がん評価

矢守 隆夫 ----- 31

6. Ahr/Arntの作用メカニズムの分子的基盤と標的遺伝子の検索

藤井 義明 ----- 35

7. Aryl hydrocarbon receptor (AhR) の機能

鎌滝 哲也 ----- 39

8. ダイオキシン類の短期間雌雄ラットへの暴露が生殖器に及ぼす影響

鈴木 勝士 ----- 43

9. 幼若ラットに対する誘起排卵抑制におけToxic Equivalency Factors

(TEF) の妥当性に関する検証

松木 容彦 ----- 51

10. ダイオキシン等のリスクコミュニケーションに関する検討

井上 達 ----- 67

11. ダイオキシン類の毒性学的研究における国際動向に関する研究

広瀬 明彦 ----- 69

12. ダイオキシン様毒性物質の試験スキームの開発に関する基礎的研究

高木 篤也/菅野 純 ----- 75

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 79

IV. 研究成果の刊行物・別冊

----- 85

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

I. 総括研究報告書

ダイオキシン類の健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための 実験的基盤研究（H13 - 生活 - 010）

主任研究者 江馬真 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

本厚生労働科学研究ダイオキシンの健康影響とくにその TEF を中心としたリスク評価のための実験的基盤研究の課題は、次の 3 点に亘って、全体研究を推進した。すなわち 1) 各種のシグナル分子（AhR、AhR リプレッサー、CYP 系分子種、その他の新しい関連分子種）の各種ダイオキシン類の暴露に対する誘導、並びに、発現抑制に関する毒性等価指数（TEF: Toxic Equivalency Factor）を求めること、2) すでに明らかにされつつある、ダイオキシン類の受容体原性毒性に対して、口蓋裂発生の分子背景の解明を含む、種々のシグナル分子の相互作用を明らかにすること、3) 短期および長期の暴露実験の継続とそこから得られる新しい、生体影響リスクの上記 1) との比較検討である。

平成 15 年度においては上記計画に沿って研究を継続実施した。これまでに得られた主な成果として、【奇形発生】に関しては、ダイオキシン類による口蓋裂誘導能と TEF は良い相関性を示すことを明らかにした。TCDD は胎児上顎において扁平上皮化に関連する遺伝発現を誘導した。TCDD のアカゲザル胎生期・授乳期曝露は児の歯の形成を障害し、その LOAEL はげっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられた。TCDD は ES 細胞培養系において、細胞数を減少させ、EB においては増加させた。また、双方で、薬物代謝酵素の Cyp1a1 の発現を強く誘導したことから、ES 細胞培養系が、ダイオキシンの影響を調べる良い系であることが明らかとなった。【発がん】に関しては、TCDD による *in vivo* 肝発がんのプロモーター試験については実験が終了し、低用量における非単調用量相関の存在が示唆された。*In vitro* 系ではヒトガン細胞パネルにおける遺伝子発現プロファイルおよび細胞増殖促進・抑制効果との対比を開始し、用いる細胞株のバラエティーの増加を含めデータの蓄積を行った。TCDD と TCDF を「がん細胞パネル」で評価した結果、TCDF は顕著な細胞増殖阻害効果を示したが、

TCDD はほとんど効果を示さなかった。これは、TEF による評価と矛盾する現象であり、これを説明するには、本研究で見られた TCDD と TCDF の違いを生み出す分子メカニズムの解明が今後の課題であると思われた。【障害性発現メカニズム】に関しては、ヒト型 AhR を導入した高感受性(C57BL/6)マウスは、ダイオキシンに対して低感受性(DBA/2)マウスと同程度あるいは、それ以下になることが分かった。メチルコランスレン(MC)による PPAR α 標的遺伝子の抑制は脂肪酸代謝能の低下、ひいては脂肪酸の蓄積を引き起こすことを明らかにした。また、AhR シグナル伝達系は RXR α タンパク質の分解を促進することにより、PPAR α シグナル伝達系を抑制することを明らかにした。【TEF 技術評価】に関しては、TCDD は卵巣に到達して AhR を活性化できるが、性腺刺激ホルモンによる卵巣重量増加抑制や排卵数の減少といった既報にあるような影響を卵巣には及ぼさず、本モデルは雌性生殖の影響評価における TEF の検証には用いることはできないと結論された。また、胸腺重量および体重増加抑制から試算された TCDF の TEF は従来の値を下回っていると結論された。【リスクコミュニケーション・調査】に関しては、AhR 作用性化学物質をスクリーニングし、その有害性を同定するスキームの整備とそれに用いる手法を開発するために必要な手技の情報の収集を行った結果、各種の受容体を介したシグナル伝達系とそれらの複雑なクロストークを介する受容体原性としての包括的なスキームが必要であり、そのためには「内分泌かく乱化学物質試験スキーム」に基づいたダイオキシンを組み込んだ拡張作業が、もっとも適切な手段であると考えられた。

以上、平成 15 年度においては、これまでに得られた情報をもとに TEF を中心にさらに発展並びに詳細な検討を行い、国民の健康に関わる、より確度の高いリスクアセスメントに役立つ研究を遂行することが出来た。

分担研究者

江馬眞（国立医薬品食品衛生研究所）
安田峯生（広島国際大学保健医療部）
高木篤也（国立医薬品食品衛生研究所）
菅野純（国立医薬品食品衛生研究所）
矢守隆夫（癌研究会癌化学療法センター）
藤井義明（筑波大学先端学際領域研究センター）

鎌滝哲也（北海道大学薬学部）
鈴木勝士（日本獣医畜産大学獣医学部）
松木容彦（食品薬品安全センター秦野研究所）
井上達（国立医薬品食品衛生研究所）
広瀬明彦（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

本研究の目的は、ダイオキシン類の生体影響に関する様々な分子種の発現を指標として TEF を求めると共に、発現の亢進と抑制を介在する分子種を指標とし、これらの結果を短期および長期の暴露実験と関連づけて進めることにある。非意図的に生活空間で産生されるダイオキシン類の生体障害に対する正確なリスクアセスメントはそれらの生体障害の機構が十分に明らかでない中でも設定されなければならない。しかしながら、ダイオキシン類の本体に関する様々な分子種の働きについての解明はこの3年間で飛躍的に発展した。この認識に対応した TEF の設定、それを修飾するそれら分子種の変化の可能性をとらえることはリスクアセスメントの信頼性を高めるために必要である。本研究の3つの構成部分はこのに貢献する上で必要であり、成果が期待されるものである。具体的には、上皮・間充織の相互作用に対する TCDD の影響について遺伝子レベルで明らかにするとともに各種ダイオキシン類の C57BL/6 マウスにおける口蓋裂の発現用量を求め、TEF の決定に役立つ生物学的指標の確立を目指す(江馬、高木)。胎生期暴露がヒトの中枢神経系の発達に悪影響を及ぼしているのではないかと検討する(安田)。ダイオキシン類の発生毒性検出のモデル系として ES 細胞培養系の有用性を調べる(高木)。ダイオキシン発がんの分子メカニズムの解明を進める(菅野、矢守)。AhR の作用メカニズムや標的遺伝子等を明

らかにして、ダイオキシンやその他の多環性芳香族化合物の生体に対する作用を明らかにすると共に、AhR の本来の発生、生殖における役割を明らかにする。これはダイオキシンやその他の環境汚染物質の生体に対する影響を考える上で必須の情報を与え、その対策を考える上でも不可欠な知見である。AhR の機能について外来異物に対する生体応答から発生・分化まで、より包括的な理解が期待できる(藤井、鎌滝)。ダイオキシンのラット母体投与後、次世代の雄の生殖に及ぼす影響の用量相関を解明する。着床と初期発生に対するダイオキシンの影響、雄性副生殖器形成に関わる遺伝子発現機構とダイオキシンあるいは AhR との関係解明などが期待される(鈴木)。幼若ラットに対する誘起排卵モデルを用いて、ダイオキシン類投与後の誘起排卵などの雌性生殖の変化をダイオキシン類の動態と併せて対比することにより、雌性生殖に対する影響評価における TEF の妥当性を検証する(松木)。海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集する(井上)、(広瀬)。AhR 作用性化学物質をスクリーニングし、その有害性を同定するスキームの整備とそれに用いる手法を開発するために必要があると考える。そこで、必要な手技の情報の収集ならびに基礎的な検討を行い、それらの有用性・問題点を明らかにすることは、リスク評価に重要であり、その基礎となる信頼性の高いスクリーニング手法

の開発の概要を確立することが期待される

B. 研究方法

C57BL/6 の妊娠マウス（妊娠 12.5 日）に 2, 3, 7, 8-TCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDF、2, 3, 4, 7, 8-PCDF、1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD あるいは、2, 3, 7, 8-TCDF の 7 化合物をそれぞれ、単回経口投与し、口蓋裂発生用量と TEF 値を比較し、口蓋裂発生用量と TEF 値の相関性に関する検討を引き続き実施した。また、C57BL/6 の妊娠マウス（妊娠 12.5 日）に 20ug/kg 体重の 2, 3, 7, 8-TCDD を単回経口投与し、投与 48 時間後に胎児を採取し、上顎部位で変化する遺伝子を検索した結果を引き続き解析した。また、口蓋突起からの RNA 抽出法の技術的検討を行った。

（江馬、高木）。アカゲザルを交配し、約 60 匹を 3 群に分け、妊娠 20 日 TCDD 0（溶媒）、30 または 300 ng/kg を皮下投与し、その後 30 日毎に初回投与量の 5% 量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児（F1a）を哺育させた。母体への TCDD 投与は分娩後 90 日まで続けた。F1a の離乳後、期間をおいて母体を再度交配し、同様に TCDD を負荷して、第 2 産児（F1b）を得た。F1a については生後約 1000 日、F1b については生後約 200 日に軽麻酔下で児の歯を肉眼および X 線により観察した。なお、300 ng/kg では新しい母体を数匹追加し、これらより生まれた F1a は生後約 200 日に観

察した。また、妊娠 80 日の時点で採血し、 -80°C で保存してあった母体血漿の TCDD 濃度をガスクロマトグラフィー質量分析計で測定した（安田）。ES 細胞（E14-2a）をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在あるいは非存在 ES 培地で培養した。TCDD は DMSO に溶解して、最終濃度 0、1、10 あるいは 100nM で添加した。対照群には DMSO を 0.1% の最終濃度で添加し、それぞれ、コロニーの分化状態並びに細胞数を計測した。また、ES 細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体（EB）の細胞数を計測した。また、RNA を抽出し、RT-PCR 法により CYP1A1 の誘導を検索した（高木）。C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスに Diethyl nitrosamine (DEN) を 10mg/kg 体重の用量で単回腹腔内投与し、投与 7 日後より、2, 3, 7, 8-TCDD を 0.0003、0.001、0.003、0.01、0.03 及び 0.1ug/kg 体重の用量で週 2 回経口投与した。一群の動物数は 8 匹とし、生涯観察を行った。プロモーター作用高感受性動物として TgAC マウス（癌遺伝子の v-Ha-ras 導入トランスジェニックマウス）を用いた TCDD の発がん作用の解析に適したマウスを樹立し、TCDD のプロモーター作用を調べる。TCDD、TCDF ほか 11 種のダイオキシン類のがん細胞パネルにおいての結果を受けて、遺伝子発現のプロファイリングを Affymetrics 社の GeneChip を用いて行った（菅野）。TCDD および TCDF の 42 種がん細胞パネルにおける増殖阻害効果の比較および

Finger Print の解析を行った。42 種がん細胞パネルは、乳がん 10 系、胃がん 21 系および肝がん 11 系よりなる (矢守)。ヒトの AhR の cDNA を高感受性マウスの AhR 遺伝子座に相同組み換え法によって置き換え高感受性マウス (C57BL/6) の薬物代謝酵素の誘導、水腎症、口蓋裂の発症の 3MC やダイオキシンに対する感受性を検討した (藤井)。7 週齢の野生型および AhR 欠損マウスに MC (80 mg/kg bdw) を腹腔内単回投与した。1 週間後に肝臓を摘出し、組織標本を作製し、H. E. 染色および中性脂肪酸を染色する oil red O 染色を行った。また、MC 投与後、経時的に肝臓を摘出し、RXR α の mRNA およびタンパク質量をリアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット分析により調べた。MC による PPAR α シグナル伝達抑制の分子機構の解析には、AhR および PPAR α /RXR α シグナル伝達経路の両経路が働くヒト肝がん由来 HepG2 細胞を用いた。RXR α タンパク質は 26S プロテアソーム経路を介して分解されることが知られているため、26S プロテアソーム阻害剤である MG132 および lactacystin が RXR α タンパク質レベルに及ぼす影響をウェスタンブロット分析により調べた。また、PPAR α /RXR α ヘテロダイマーを介した転写活性に与える影響は PPAR 応答配列を連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを用いて調べた (鎌滝)。精巣摘出ラットにテストステロン及び、2, 3, 7, 8-TCDD または 1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD を併用投与した際の各 TCDD の

抗アンドロゲン作用の影響を副生殖器重量の変化の程度によって検討した (鈴木)。24 日齢のラットに、TCDD の媒体であるコーン油、あるいは TCDD の 1、4 あるいは 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を経口投与し、その 24 時間後にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (eCG) 5IU を皮下投与して 96 時間以上経過した後に排卵検査を行い、卵巣試料における TCDD の動態ならびに遺伝子発現の定量解析をおこなった。また、TCDD 投与による既報再現性の確認と TCDF 投与との組織中濃度ならびに影響の相関性に関する比較を行った (松木)。最近の国際機関や各国政府機関で行われていたダイオキシン類の健康リスク評価の状況をうけて、化学物質安全評価における毒性病理と作用機序研究の動向について調査した (井上)。米国のポストンで開かれた 23th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and Persistent Organic Pollutants (POPs) : Dioxin' 2003 における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集した (広瀬)。既に存在する内分泌かく乱化学物質試験スキームを解析し、ダイオキシン独自、あるいは、内分泌かく乱化学物質のためのスキームを「受容体原性毒性試験スキーム」として拡張、一本化するかを検討した。また、virtual screening 系の情報収集、in vitro 試験系の利用可能なものの検討、in vivo 試験系の利用可能なものを検討した (高木、

菅野)。

C. D. 研究結果と考察

【奇形発生】

2, 3, 7, 8-TCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDF、2, 3, 4, 7, 8-PCDF、1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD 及び、2, 3, 7, 8-TCDF の 7 化合物をそれぞれ投与したマウス胎児での口蓋裂発生の用量—反応曲線をプロビット変換し、ED50 を求め、REP (relative potency) と WHO の TEF と比較したところ、ほぼ同様の結果が得られた。2, 3, 7, 8-TCDD 投与マウス胎児の上顎部位を対照に変化する遺伝子をマイクロアレイ法で検索した。12000 遺伝子のうち、約 20 遺伝子が 2 倍以上増加した。これらの遺伝子の変化を、さらに Real-time 定量 PCR 法にて確認し、発現の変化を定量化した。最も変動したのは薬物代謝酵素でダイオキシンにより誘導されることが知られている CYP1A1 であり、10 倍以上の顕著な増加が認められた。その他の変化で特徴的であったのは複数のケラチン遺伝子及び扁平上皮のマーカである *sprr1b* の増加が認められたが、これら遺伝子の発現パターンを検討した結果、これらの変化は表皮由来の遺伝子の変化を反映している可能性が否定出来ないものと考えられた。さらに、口蓋に限局した遺伝子解析を行うため、口蓋からの RNA 抽出法について検討した結果、抽出法を確立した。以上の結果、ダイオキシン類 7 化合物をそれぞれ投与したマウス胎児での口蓋裂発生の用量—

反応曲線をプロビット変換し、ED50 を求め、REP と WHO の TEF と比較したところ、ほぼ同様の結果が得られ、口蓋裂発生量は TEF と相関していることが示された。胎児上顎での遺伝子解析の結果、最も増加したのはダイオキシンで増加することが知られている薬物代謝酵素の CYP1A1 であった。その他の変化で特徴的であったのは複数のケラチン遺伝子及び扁平上皮のマーカである *sprr1b* の増加で、これらは表皮の変化を反映していることが否定出来ないと思われた。また、より組織を限局した遺伝子解析が重要であるとの考えから、胎児口蓋からの RNA 抽出法を検討、確立したので、今後の遺伝子解析に利用出来ることが期待された (江馬、高木)。

アカゲザル児の F1a での対照群および 30 ng/kg 群では乳歯および永久歯胚に異常は認められなかった。これに対して、300 ng/kg 群では 8 例中 4 例、300 ng/kg 追加群では 2 例中 1 例に歯あるいは歯胚の欠如が見出された。欠如していたのは上顎乳中・側切歯、上顎永久側切歯胚、下顎永久中切歯胚などで、犬歯や臼歯には欠如はみられなかった。F1b では乳歯の観察のみ可能であったが、全群で明らかな異常は認められなかった。母体の血漿中 TCDD 濃度は、対照群では検出限界以下、30 ng/kg 4 例の平均値±標準偏差は 0.20 ± 0.01 pg/g (湿重量) であった。300 ng/kg では測定値が 1.1~8.7 pg/g とばらついていたが、児に歯異常が認められなかった 6 母体の平均値±標準偏

差が 1.98 ± 0.88 pg/kg であったのに対し、児に歯の異常があった 5 母体の平均値は 5.42 ± 2.48 pg/kg で、異常のない母体よりも有意に高かった。この結果、アカゲザルでダイオキシン類の胎生期・授乳期曝露により歯の形成異常が誘発され、歯はダイオキシン類の発生障害作用に感受性の高い器官と考えられた（安田）。

ES 細胞をゼラチンコート Dish 上で LIF が存在下で培養すると対照群では 3 日後で殆ど未分化コロニーであり、TCDD の添加は 1、10、100nM 群ともこの未分化コロニー形成率に影響を与えなかった。また、LIF 非存在 ES 培地で ES 細胞を 3 日間、培養すると対照群では殆ど全てのコロニーで分化した。TCDD の添加は 1、10、100nM 群ともこの分化コロニー率に影響を与えなかった。また、培養 4 日後に ES 細胞の細胞数を計測した結果、LIF 添加、非添加群とも、TCDD の用量相関的に有意な減少または減少傾向が認められた。また、RT-PCR の結果、LIF 存在下で TCDD 添加 2 日間培養後、TCDD の 1nM から CYP1A1 の増加を確認した。ES 細胞を LIF が非存在 ES 培地で浮遊培養し、4 日後に形成された胚様体 (EB) の細胞数を計測した結果、100nM 群で有意な増加、1、10nM 群で増加傾向が認められた。また、RT-PCR 法により CYP1A1 の誘導が 1nM 群より確認された。以上の結果、ES 細胞培養系はダイオキシン類の反応を調べる良い系であることが明らかになった（高木）。

【発がん】

C3B6F1 p53 ヘテロ欠失あるいはワイルド マウスを用いた 2 段階発がん試験の生涯観察を終了し、病理検査を進めている。P53 ヘテロマウス群および野生型動物での中間用量群における腫瘍発生促進傾向が認められたが、全体としては、有意差は明瞭ではなかった。プロモーター作用高感受性動物として Tg. AC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のためのマウスの樹立に関しては、動物の SPF 化と TCDD 高感受性系統の C57BL/6 への back cross を継続した。その過程で胃の前胃に発生する乳頭腫が TCDD 経口投与実験の標的として適当であることが示唆され、追加的に Tg. AC マウスに上記 1) で使用した用量の投与を開始した。遺伝子発現プロファイリングのための絶対遺伝子発現相対化手法を開発し、次いで、TEF との関連における展開として、少数種類の代表的 TCDD と TCDF と内因性の AhR リガンドである indirubin 遺伝子発現プロファイリングを行い、その結果、リガンド依存的なプロファイル（の差）が存在することを明らかにした。プロモーター作用高感受性動物として TgAC マウスを用いた TCDD の発がん作用の解析のためのマウスの樹立に関しては、昨年度来 Tg. AC/AhRKO マウス作成に向けての C57BL/6 (TCDD 高感受性マウス) へ Back cross を行い、その過程で Papilloma 発生感受性が C57BL/6 背景でも保たれることを確認し、さらに、前胃の乳頭腫が経口投与実験には観測項目として皮膚乳頭腫の代替として使用可能であることが示唆

された。前胃の乳頭腫を標的とした Tg. AC マウス経口投与による逆U字型用量相関の有無の追試検証を実施中である。さらに、副次的所見として戻し交配により B6 背景が濃くなるに連れて、胸腺腫（胸腺リンパ腫）の発生が高率となり、歯芽腫および前胃乳頭腫と近い発生率・発生時期を示すことが判明した。また、TEF との関連における展開として、細胞アレイの結果に基づき、TCDD、TCDF 及び indirubin の遺伝子発現プロファイリングを行い、その結果、リガンド依存的なプロファイル（の差）が存在することを明らかにした（菅野）。

新たなパネルとして 42 種がん細胞パネルを用いても TCDF の増殖阻害効果が見られるのかどうか、TCDD を対照に検討した。その結果、TCDF は、新たな 42 種がん細胞パネルにおいても多くの細胞株で顕著な細胞増殖阻害を示し、TCDD はほとんど効果を示さなかった。TCDF の Finger Print は、42 種がん細胞パネルにおける COMPARE 解析では、少なくとも既知の抗癌剤約 70 種類とは異なる固有のパターンであることが判明した。TCDF は、39 種がん細胞パネルで見られた現象と同じく、42 種がん細胞パネルにおいても顕著な細胞増殖阻害効果を示し、対照的に TCDD はほとんど効果を示さなかった。両者のがん細胞に対する増殖阻害効果の違いは、かなり普遍的であると考えられる。わずかな構造上の違いから大きな増殖阻害能の違いを生じることが判明し、構造活性相関の見

地から興味深い。TCDF は、その Finger Print 解析から種々の抗がん剤、阻害剤とは異なるユニークな作用機作を持つことが示唆されたが、その作用機作の解明は今後の課題である。さらに、TEF による比較では、TCDF は TCDD の 1/10 の力価とされるが、本研究結果は、がん細胞増殖阻害効果で見ると両者の力は逆転することを示すもので、この違いが固体レベルでも何らかの生物学的影響の差違を生ずるのかどうかも新たな問題と思われた（矢守）。

【障害性発現機構】

各種動物の AhR の解離定数及び LD₅₀ と ED₅₀ の関係を Hahn の総説と我々によって得られた値を加えて調べた。その結果をモルモット、ラット (Sprague-Dawley)、モンキー、マウス (C57B/6) と (DBA/2)、ハムスターの AhR のダイオキシンに対する解離定数と各動物種の LD₅₀ 及び薬物代謝酵素 CYP1A1 誘導に対する ED₅₀ はハムスターの場合を除いて、よい平行関係にあることが分った。ヒト化 AhR マウス (C57BL/6) は、その cDNA をマウス (C57BL/6) AhR の第 1 エクソンに相同組み換えによって導入することによって作製した。そして、AhR の発現を調べると肺、肝、腎、小腸、胸腺などでマウスの AhR と同程度に発現していることが分かった。免疫組織学的方法によって肺における AhR の発現を検討した結果もタンパク質としての AhR の発現が確認された。このマウスを用いて 3MC による CYP1A1 と CYP1A2 の誘導的

発現を肝組織において見ると 3MC 80 mg/kg の投与で (C57BL/6) マウスにおける発現が最も顕著で、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスの発現は不感受性 (DBA/2) マウスの発現と同程度に弱かった。TCDD 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与すると (C57BL/6) マウスにおける CYP1A1 と CYP1A2 は顕著に誘導され、低感受 (DBA/2) マウスでは、中程度に誘導されるが、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスでは、誘導の程度が (DBA/2) マウスよりも明らかに劣ることが分かった。また、妊娠マウスの 12.5 日目に TCDD 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を経口的に与え 18.5 日の胎児に水腎症と口蓋裂の発症を観察すると (C57BL/6) マウスでは、殆どすべての胎児マウスに口蓋裂と水腎症の発症が観察されたが、(DBA/2) マウスでは、水腎症は 80% に観察され、口蓋裂は、軽度で胎児マウスの 30% にその発症が認められた。一方、ヒト化 AhR (C57BL/6) マウスでは、水腎症の発症は 80% 程度で (DBA/2) マウスと同程度であったが、口蓋裂は殆ど観察されないことが、明らかになった。ヒト AhR はダイオキシンの毒性発現に対して (DBA/2) マウスの AhR と同程度か、それより低い感受性を動物に与えるものと推論される。また、各種動物の AhR の解離定数及び LD_{50} と ED_{50} は、ハムスターの場合を除いて、よい平行関係にあることから、動物のダイオキシンに対する感受性は AhR によって決められることが示された。ハムスターの場合には、異物の取込み、分布に何か特有のものがあることが示唆される。AhR

を横軸としたダイオキシンの用量作用関係よりヒトの場合のダイオキシンに対する LD_{50} は、600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、薬物代謝酵素の誘導の ED_{50} は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と算出され、モンキーの LD_{50} 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 ED_{50} 0.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$ より遥かに高い値であることが分かった (藤井)。

野生型マウスに MC を投与したところ、中心静脈周辺部に脂肪滴の蓄積 (中心性小脂肪滴症) が認められた。一方、AhR 欠損マウスでは脂肪滴の蓄積は認められなかった。MC による PPAR α シグナル伝達抑制の分子機構を検討するために、PPAR α シグナル伝達の構成因子である PPAR α および RXR α の発現量を調べた。その結果、MC により RXR α の発現量が mRNA およびタンパク質の両レベルで減少した。また、MC による RXR α の抑制の経時変化を調べたところ、mRNA は MC 投与後約 24 時間で減少したのに対し、タンパク質は MC 投与後約 2 時間で急速に減少することが明らかとなった。さらに、HepG2 細胞に MC (5 μM) と 26S プロテアソーム阻害剤を共処置したところ、MC による RXR α タンパク質量の減少は認められず、また、PPAR α /RXR α を介した転写活性の抑制も認められなかった。RXR α はリン酸化修飾を受けることにより、その核外排出およびタンパク質分解が促進されることが知られている。このことから、AhR が直接的あるいは間接的に RXR α をリン酸化することにより、そのタンパク質分解を促進する可能性が考えられた (鎌滝)。

【TEF 技術評価】

TCDD の雄性副生殖器の重量増加抑制作用についてはいずれの TP の用量でもほとんど抑制しなかったが、各副生殖器について 1mg/kgTP での反応を TCDD がやや強く抑制するという類似したパターンが認められた。一方で、TP に対する反応率（重量増加作用）および TCDD によるその抑制作用においては各副生殖腺で大きく異なっていた。これとは対照的に、胸腺については TP による用量相関的な重量減少を TCDD はさらに低下させた。その低下の割合は平行的で、TP と TCDD の反応が相加的であることを示唆していた。胸腺の重量変化から考えて、今回選択した TCDD の用量で、動物に対して十分に影響があったと考えられた。副生殖腺について AR-AhR の相互作用を見るには TCDD のこの用量では不十分であった可能性がある。しかし、発生期における母体投与では明らかに雄性副生殖器は影響を受けるので、成熟動物での AR-AhR 相互作用は胎生期とは異なっている可能性がある。したがって、成熟動物での雄性副生殖器の反応を指標として TEF を求めるのは少し無理がある可能性があると思われた。（鈴木）。

卵巣試料について TCDD 濃度および cytochrome P450 (CYP)1A1 mRNA 発現量を測定し、TCDD が卵巣に到達し、誘起排卵後まで残存してその間 aryl hydrocarbon receptor (AhR) を活性化していることを確認した。既報より高い用量の TCDD を用いて、既報が再現されないことを確認するとともに、卵

胞発育に関連する数種の遺伝子を定量したが、投与の影響は認められなかった。さらに、TCD-furan (TCDF) を投与して組織中濃度および影響を TCDD 投与によるものと比較したところ、1) TCDF の肝臓における残留性は TCDD と比較して乏しく、重量にも影響を及ぼさないこと、2) 胸腺および卵巣中濃度は TCDD と同様であったが、卵巣には用量に依存した CYP1A1 の誘導は行わないこと、3) TCDF の TEF はエンドポイントによって異なっていた（鈴木）。

【リスクコミュニケーション・調査】

米国ニューヨーク州のニューヨーク医科大学にて開かれた、化学物質安全アセスメント：毒性病理特に発癌性に関する研究検討会に出席し、化学発がんの閾値問題、最新のマイクロアレイ等の遺伝子解析のリスクアセスメントへの応用、受容体原性の発がん、ホルモンを介した卵巣発がん機構等、いずれもダイオキシンのリスクアセスメントに関連する課題について情報の収集・討議を行った。今後も、引き続き、国際的な視野に立ち、科学的認識に基づいた研究交流、科学的情報の行政への反響等を継続していくことの重要性が認識された（井上）。

海外における最新のダイオキシン類の汚染・暴露状況や健康影響に関する研究の進展状況に関する情報を収集するため、米国のボストン開かれた Dioxin' 2003 で得られたリスク評価上有用な知見について整理した（広瀬）。

既に存在する内分泌かく乱化学物質

試験スキームを解析し、ダイオキシン独自、あるいは、内分泌かく乱化学物質のためのスキームを「受容体原性毒性試験スキーム」として拡張、一本化するかを検討した。また、virtual screening系の情報収集を行った結果、現在、直ちに利用可能な適切な系は存在しないことが判明した。in vitro試験系として、リガンド検出系としてはArntに対する抗体を利用したELISA測定法がある。Calux法、酵母、CHO細胞などを用いたレポーターアッセイが利用可能であった。in vivo試験系としては、従来どおりの暴露-cyp1a1誘導(酵素活性測定を含む)の系等が研究レベルで実施されている。体系化された、あるいはガイドライン化されたものは今のところ存在しなかった。本研究は、本班研究の成果を元に、今後の対応への可能な範囲での包括的指針の提案を目的に、最終年度に行ったものである。受容体原性毒性評価を包括的に支援する試験スキームを、現存する「内分泌かく乱化学物質試験スキーム」を元に拡張することが、もっとも適切であることが考えられた。これにより、最近話題となっているエストロゲン受容体シグナル伝達系と、ダイオキシン受容体シグナル伝達系とのクロストーク問題も包含して扱える柔軟性を付加できる利点があると考えられた(高木、菅野)。

E. 結論

口蓋裂誘導能とTEFは良い相関性を示した。TCDDは胎児上顎において扁

平上皮化に関連する遺伝発現を誘導した。TCDDのアカゲザル胎生期・授乳期曝露は児の歯の形成を障害し、そのLOAELはげっ歯類における発生毒性のそれとほぼ同じ桁にあると考えられた。TCDDはES細胞培養系において、細胞数を減少させ、EBにおいては増加させた。また、双方で、薬物代謝酵素のCyp1a1の発現を強く誘導したことから、ES細胞培養系が、ダイオキシンの影響を調べる良い系であることが明らかとなった。

TCDDとTCDFをはじめとする42種がん細胞パネルで評価した結果、TCDFは顕著な細胞増殖阻害効果を示したが、TCDDはほとんど効果を示さなかった。

これは、TEFによる評価と矛盾する現象であり、これを説明するには、本研究で見られたTCDDとTCDFの違いを生み出す分子メカニズムの解明が今後の課題であると思われた。TCDDによるIn vivo肝発がんのプロモーター試験については実験が終了し、低用量における非単調用量相関の存在が示唆された。In vitro系ではヒトガン細胞パネルにおける遺伝子発現プロファイルおよび細胞増殖促進・抑制効果との対比を開始し、用いる細胞株のバラエティーの増加を含めデータの蓄積を行った。ヒト型AhRを導入した高感受性(C57BL/6)マウスは、ダイオキシンに対して低感受性(DBA/2)マウスと同程度あるいは、それ以下になることが分かった。MCによるPPAR α 標的遺伝子の抑制は脂肪酸代謝能の低下、ひいては脂肪酸の蓄積を引き起こすことを明

らかにした。また、AhR シグナル伝達系は RXR α タンパク質の分解を促進することにより、PPAR α シグナル伝達系を抑制することを明らかにした。

5 μ g/kg TCDD の 0.5、1 μ g/kg/day TP による精巣摘出ラットでの雄性副生殖器重量増加に対する抑制効果は、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、肛門挙筋とも、ほとんど認められなかった。

TCDD は卵巣に到達して AhR を活性化できるが、性腺刺激ホルモンによる卵巣重量増加抑制や排卵数の減少といった既報にあるような影響を卵巣には及ぼさず、本モデルは雌性生殖の影響評価における TEF の検証には用いることはできないと結論された。また、胸腺重量および体重増加抑制から試算された TCDF の TEF は従来の値を下回っていると結論された。各種の受容体を介したシグナル伝達系とそれらの複雑なクロストークを介する受容体原性としての包括的なスキームが必要であり、そのためには「内分泌かく乱化学物質試験スキーム」を元にダイオキシンを組み込んだ拡張作業が、もっとも適切な手段であると考えられた。以上、本研究班における研究の進展の結果、これまで全く説明することの困難であったダイオキシンの生体影響本体の解明に近づきつつある。他方、解明される分子種を TEF 設定することにより、より現実的なリスクアセスメントに寄与することが期待された。

以上、平成 15 年度においては、これまでに得られた情報をもとに TEF を中心にさらに発展並びに詳細な検討を

行い、国民の健康に関わる、より確度の高いリスクアセスメントに役立つ研究を遂行することが出来た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K (2004) Evaluation of developmental toxicity of β -thujaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. *Food Chem Toxicol*, 42 465-470.

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健康影響評価. *日本食品化学学会誌* 10: 1-12.

Ema, -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.

Ema, M. and 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 (2003).

Ema, M. and Miyawaki, E. (2002) Suppression of uterine deciduarization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. *Reprod. Toxicol.*, 16, 309-317.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2002) Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzylphthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 16, 71-76.

広瀬明彦、西川秋佳、江馬 眞、紅林秀雄、山田雅巳、長谷川隆一 (2002). メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE) の毒性情報、水環境学会誌、25, 491-496.

小泉睦子、大野泰雄、広瀬雅雄、江馬 眞、広瀬明彦、井上 達、長谷川隆一 (2002) DINP の毒性評価と耐容1日摂取量の算定、日本食品化学会雑誌 9, 39-45.

江馬 眞、峯島 浩 (2001) 第5節 生殖発生毒性試験、非臨床試験マニュアル (野村 護、堀井郁夫、吉田武美 編)、エル・アイ・シー、東京

広瀬明彦、鎌田栄一、西川秋佳、紅林秀雄、江馬 眞、安藤正典、黒川雄二、長谷川隆一 (2001). ホルムアルデヒドの経口および吸入暴露による毒性と水道水における安全性評価、水環境学会誌、24, 308-316.

Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Ikka, T. and Harazono, A. (2001) Rattwo-generation reproductive study of bisphenol A. *Reprod Toxicol.*, 15, 505-523.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Effects of nomobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 15, 261-267.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given nomobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 15, 189-194.

Ema, M. and Harazono, A. (2001) Toxic effects of butyltin trichloride during early pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, 125, 99-106.

Harazono, A. and Ema, M. (2001) Effects of 4-tert-octylphenol on

initiation and maintenance of pregnancy following oral administration during early pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, 119, 79-84.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Effects on progesterone on suppression of uterine decidualization and implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. *Cong. Anom.*, 42, 106-111.

前川京子、小出達夫、斎藤博幸、原園 景、江馬 眞、谷本 剛、岡田敏史 (2001)、エルカトニン製剤の含有評価、*医薬品研究*、32, 465-471.

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 日耐用摂取量、*日本食品化学会雑誌* 8, 1-8.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2000) Adverse effects of dibutyltin dichloride on initiation and maintenance of rat pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 14, 451-456.

Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (2000). Effects of dibutylphthalate on reproductive

function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.* 14, 13-19.

Ema, M., Miyawaki, E. and

学会発表

Assessment of the cleft palate induction by seven PCDD/F congeners in the mouse fetus.

Atsuya Takagi, Akihiko Hirose, Yoko Hirabayashi, Toyozo Kaneko, Makoto Ema and Jun Kanno, The 23rd

International Symposium on halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. USA, 2003 年 8 月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願状況

1) 血清アポリポタンパク質 A-II 量変化の検出方法

(1) 発明者：矢守隆夫、西村由美子、志和美重子、若田部るみ、有國尚

(2) 出願日：2003年5月7日

(3) 出願番号：特願2003-129028

(4) 出願人：財団法人癌研究会、サイファージエン・バイオシステムズ株式会社

- 2) 腫瘍細胞の抗癌剤に対する感受性を判定する方法 48号)
- (1) 発明者：矢守隆夫、吉田陽子 2. 実用新案登録なし
- (2) 出願日：2003年4月25日
- (3) 出願番号：特願2003-122338
- (4) 出願人：財団法人癌研究会
- 3) 大腸癌細胞の測定方法
- (1) 発明者：矢守 隆夫、西村由美子、志和美重子、府川 愛、有國 尚
- (2) 出願日：2003年2月7日
- (3) 出願番号：特願2003-031049
- (4) 出願人：財団法人癌研究会、サイファージエン・バイオシステムズ株式会社
- 4) ダイオキシンに対するモノクローナル抗体（特願 2000-3159

奇形発生と TEF

江馬眞 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

研究要旨

TEF の決定に役立つ生物学的指標の確立を目指し、PCDD、HCDD、TCDF、PCDF 等各種ダイオキシン類を C57BL/6 妊娠マウスに投与し、口蓋裂発生用量を求めた結果、TEF と良い相関を示した。胎児上顎での TCDD の遺伝子発現に及ぼす影響をマイクロアレイを用いて、解析した結果、薬物代謝酵素 CYP1A1 の増加、扁平上皮化に関連するケラチンや SPRR1b 遺伝子の増加を認めたが、表皮組織由来の変化の可能性が否定出来なかった。さらに口蓋に限局した遺伝子解析のため、口蓋突起からの RNA 抽出法を確立した。

A. 研究目的

TCDD による口蓋裂発生機序を明らかにすること及び TEF の決定に役立つ生物学的指標（遺伝子発現）を確立することを目的とした。

後に胎児を採取し、上顎部位で変化する遺伝子を検索した結果を引き続き解析した。また、口蓋突起からの RNA 抽出法の技術的検討を行った。

B. 方法 :

実験 1. C57BL/6 の妊娠マウス（妊娠 12.5 日）に 2, 3, 7, 8-TCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDF、2, 3, 4, 7, 8-PCDF、1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD あるいは、2, 3, 7, 8-TCDF の 7 化合物をそれぞれ、単回経口投与し、口蓋裂発生用量と TEF 値を比較し、口蓋裂発生用量と TEF 値の相関性に関する検討を引き続き実施した。

実験 2. C57BL/6 の妊娠マウス（妊娠 12.5 日）に 20 μ g/kg 体重の 2, 3, 7, 8-TCDD を単回経口投与し、投与 48 時間

C. 研究結果

- 2, 3, 7, 8-TCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDD、1, 2, 3, 7, 8-PCDF、2, 3, 4, 7, 8-PCDF、1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD、1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD 及び、2, 3, 7, 8-TCDF の 7 化合物をそれぞれ投与したマウス胎児での口蓋裂発生の用量—反応曲線をプロビット変換し、ED50 を求め、REP (relative potency) と WHO の TEF と比較したところ、ほぼ同様の結果が得られた。
- 2, 3, 7, 8-TCDD 投与マウス胎児の上顎部位を対照に変化する遺伝子をマイクロアレイ法で検索した。12000 遺伝子のうち、約 20 遺伝子

が2倍以上増加した。これらの遺伝子の変化を、さらに Real-time 定量 PCR 法にて確認し、発現の変化を定量化した。最も変動したのは薬物代謝酵素でダイオキシンにより誘導されることが知られている CYP1A1 であり、10 倍以上の顕著な増加が認められた。その他の変化で特徴的であったのは複数のケラチン遺伝子及び扁平上皮のマーカである sprr1b の増加が認められたが、これら遺伝子の発現パターンを検討した結果、これらの変化は表皮由来の遺伝子の変化を反映している可能性が否定出来ないものと考えられた。さらに、口蓋に限局した遺伝子解析を行うため、口蓋からの RNA 抽出法を確立した。

D. 考 察

ダイオキシン類7化合物をそれぞれ投与したマウス胎児での口蓋裂発生の用量-反応曲線をプロビット変換し、ED50 を求め、REP と WHO の TEF と比較したところ、ほぼ同様の結果が得られ、口蓋裂発生量は TEF と相関していることが示された。胎児上顎での遺伝子解析の結果、最も増加したのはダイオキシンで増加することが知られている薬物代謝酵素の CYP1A1 であった。その他の変化で特徴的であったのは複数のケラチン遺伝子及び扁平上皮のマーカである sprr1b の増加で、これらは表皮の変化を反映していることが否定出来ないと思われた。また、より組織を

限局した遺伝子解析が重要であるとの考えから、胎児口蓋からの RNA 抽出法を検討、確立したので、今後の遺伝子解析に利用出来ることが期待される。

E. 結 論

口蓋裂誘導能と TEF は良い相関性を示した。TCDD は胎児上顎において扁平上皮化に関連する遺伝発現を誘導した。胎児口蓋からの RNA 抽出法を確立した。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

Ema M, Harazono A, Fujii S, Kawashima K (2004) Evaluation of developmental toxicity of β -thujaplicin (hinokitiol) following oral administration during organogenesis in rats. Food Chem Toxicol, 42 465-470.

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健康影響評価. 日本食品化学学会誌 10: 1-12.

Ema, -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.

Ema, M. and 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 (2003).

Ema, M. and Miyawaki, E. (2002) Suppression of uterine deciduarization correlated with reduction in serum progesterone levels as a cause of preimplantation embryonic loss induced by diphenyltin in rats. *Reprod. Toxicol.*, 16, 309-317.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2002) Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzylphthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.*, 16, 71-76.

広瀬明彦、西川秋佳、江馬 眞、紅林秀雄、山田雅巳、長谷川隆一 (2002). メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE) の毒性情報、水環境学会誌、25, 491-496.

小泉睦子、大野泰雄、広瀬雅雄、江馬 眞、広瀬明彦、井上 達、長谷

川隆一 (2002) DINP の毒性評価と耐容 1 日摂取量の算定、日本食品化学会雑誌 9, 39-45.

江馬 眞、峯島 浩 (2001) 第 5 節 生殖発生毒性試験、非臨床試験マニュアル (野村 護、堀井郁夫、吉田武美 編)、エル・アイ・シー、東京

広瀬明彦、鎌田栄一、西川秋佳、紅林秀雄、江馬 眞、安藤正典、黒川雄二、長谷川隆一 (2001). ホルムアルデヒドの経口および吸入暴露による毒性と水道水における安全性評価、水環境学会誌、24, 308-316.

Ema, M., Fujii, S., Furukawa, M., Ikka, T. and Harazono, A. (2001) Rattwo-generation reproductive study of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*, 15, 505-523.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, 15, 261-267.

Ema, M. and Miyawaki, E. (2001) Adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate during late pregnancy. *Reprod. Toxicol.* 15, 189-194.