

厚生労働科学研究研究費補助金

化学物質リスク研究事業

フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する  
調査研究 —発達期ないし有病時暴露による影響評価—

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究 —発達期ないし有病時暴露による影響評価—	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 周産期暴露による影響評価研究	23
渋谷 淳	
(資料) 図 1-13、表 1-10	
2. 性行動に対する影響評価研究	36
西原真杉	
(資料) 図 1-10	
3. 肝基礎疾患による修飾作用	38
福島 昭治	
(資料) 表 1	
4. 腎基礎疾患による修飾作用	40
白井智之	
(資料) 図 1-7、表 1-2	
5. 種差による影響評価	44
九郎丸 正道	
(資料) 図 1-7、表 1-3	
6. 精巣障害メカニズムに関する研究	47
江崎 治	
(資料) 図 1-5	
7. 文献調査による健康影響評価研究-発達期の暴露影響と感受性要因の検索	51
江馬 眞	
(資料) なし	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	63
IV. 研究成果の刊行物・別刷	65

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  
 -発達期ないし有病時暴露による影響評価-  
 総括研究報告書(平成16年度)

主任研究者 渋谷 淳  
 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨: 周産期曝露影響の評価研究では、妊娠及び哺乳期間に母ラットに混餌経口投与を行い、児動物について、離乳時及び性成熟後での内分泌・生殖器官の病理組織評価、性成熟後での性行動評価、脳の性分化臨界時期での視床下部における遺伝子発現解析を行った。そのうち、SD系ラットを用いた病理評価研究では15年度に引き続き diisononyl phthalate (DINP)の暴露評価を継続・終了し、更に同様のプロトコールでアジピン酸である di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA)の暴露評価も行った。その結果、DINP では暴露終了時に精巣毒性影響が4000 ppmより出現したものの、昨年評価した DBPと同様に殆ど可逆的であった。しかし、雄での抗アンドロジェン作用影響である乳頭・乳輪の出現と、雌での離乳時の卵巣変化を400 ppmから見出した。雌での変化は性成熟後の卵胞数の増加など、永続的な卵巣影響を示唆する変化と考えられた。DEHA に関しては、かなり弱いものの発達期精巣影響が最高用量で認められたが、DINP と同様に雄での乳頭・乳輪の出現が480 ppmより見出された。以上より、DINP、DEHAともにNOAELは求められず、LOAELはそれぞれ400 ppm (28.4~62.8 mg/kg/day)、480 ppm (32.9~97.6 mg/kg/day)となった。脳の性分化影響解析については、15年度に ethinylestradiol (EE)と di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)のラット周産期暴露例で、生後2日目の視床下部内側視索前野 (MPOA)特異的な性分化障害の指標遺伝子群のマイクロアレイ解析を行った結果、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 (Rab14,  $G\alpha_{12}$ , myosine phosphatase等)が多く見いだされ、DEHPに共通するものもあった。今年度、real-time RT-PCRによる解析により、これらの代表的な遺伝子の発現レベルは検証された。更に、EEを脳の性分化障害の陽性対照としてDINP等の周産期暴露を受けたラットにおいて、生後10日目のMPOAにおける性分化関連遺伝子の発現量をreal-time RT-PCR解析した結果、プロゲステロン受容体の発現量がEE暴露雌の他に、既存パラメーターで雌雄の性分化障害が確認されている1200 ppm methoxychlor 暴露の雌雄及び20,000 ppm DINP 暴露雌で変動を示し、この遺伝子の発現変化は脳の性分化障害の指標となり得る事が示された。

Wistar-Imamichi系ラットを用いた性行動評価では、DEHAは新生仔の血中ステロイド濃度には影響を与えなかったが、性分化関連遺伝子であるgranulinやp130遺伝子の視床下部での発現を低下させた。しかし、その影響に用量依存性はなかった。成熟後、雄ラットでは性腺刺激ホルモン濃度に変化はなく、雌ラットでも発情前期の性腺刺激ホルモンのサージ上分泌は変化せず、性周期も正常に回帰していた。しかし、雄では480 ppm投与群で性行動の低下が認められ、雌では全ての用量でロードーシス商が低下した。以上の結果より、DEHAは周産期における中枢に対する性ステロイドの作用への影響が示唆されたが、雌型性行動の発現に関与する神経機構に限定した作用と考えられた。

基礎疾患による修飾作用については、肝障害に関しては、雄F344ラットにthioacetamide (TAA)を投与し肝障害を誘発した後、DEHPとDEHAを6000と25,000 ppmの用量で混餌投与した結果、DEHP高用量で精巣毒性の増強を認めた。しかし、DEHAでは精巣毒性は見られなかった。腎障害の影響に関しても、肝障害モデルと同系統のラットを用いて葉酸誘発腎障害の状態でのDEHAとDEHPによる精巣毒性の増強作用を検討した結果、DEHPによる精巣毒性の増強が明らかとなった。DEHAでは精巣毒性及びその増強作用は見られなかった。DEHPによる精巣毒性の主体と考えられるモノエステル(MEHP)の血中や精巣中のレベルは腎障害によって有意に上昇し、逆に尿中では減少しており、これが腎障害による精巣毒性増強の要因と考えられた。

精巣障害の感受性種差に関する研究では、in vivoでの精巣とその培養系のDEHPのモノエステル(MEHP)に対する感受性をいくつかの動物種で形態学的に比較し、種差を規定する要因を探索したが、16年度は若齢マウスへのMEHP単回経口投与試験では、3日目の高濃度投与群でアポトーシス細胞数がピークを示した。若齢マウス精巣器官培養系へのMEHP添加試験では、濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞の増加が確認された。またFASは精細胞に、Fas-Lはセルトリ細胞に陽性反応を示した。成体ニホンザル精巣器官培養系へのMEHP添加試験でも、少数ながら濃度・時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは昨年度の成体ヤギより高い値を示した。

精巣障害の分子メカニズム研究では、14年度確立したマウス・ライディッシュ細胞由来のMA-10培養細胞を用いたMEHPによるコレステロール代謝修飾作用モデルで、15年度にHMG CoA Synthase 2遺伝子の発現増加をマイクロアレイ及びNorthern Blotの解析により明らかとしたが、今年度は、この遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、レポータージェンアッセイを行い、MEHPによりプロモーター活性の上昇を明らかにした。また、ヒトHMG CoA synthase 2プロモーターにはPPREは存在せず、この遺伝子は精巣毒性の感受性を規定している可能性が指摘された。

文献調査では、今年度新たに27報の論文が見出され、その中でDEHPに関する論文が最も多く、フタル酸エステル類のヒトでの研究に関する報告では、新生児期に医療品からのDEHP暴露を受けていた14-16歳の男女の成長と性成熟への影響はみられず、男性の尿中MBep濃度はFSH濃度減少に関与することが示唆されている。また、これらのラット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。アジピン酸エステルに関する報告はなかった。

分担研究者

渋谷 淳

国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

西原真杉

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

福島 昭治

大阪市立大学大学院医学研究科 教授

白井 智之

名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

九郎丸正道

東京大学大学院農学生命科学研究科 教授

江崎 治

国立健康・栄養研究所 健康増進・人間栄養学研究系長, 生活習慣病研究部長

江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長

A. 研究目的

フタル酸/アジピン酸エステルは食料品の包装材及び医療用具等の多くのプラスチック製品の可塑剤として広く利用され、特に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の使用量が多い。ヒトへの曝露として、特に、弁当類の製造過程での手袋からの溶出による高濃度曝露が近年問題となり、diisononyl phthalate (DINP) に関しては、乳幼児の長時間に及ぶ mouthing 行動による玩具からの口腔内容出による曝露が懸念されている。

フタル酸/アジピン酸エステルの毒性として現在問題になっているのは精巣毒性と生殖・発生毒性であり、その活性本体は加水分解代謝産物であるモノエステル体であると考えられている。その毒性発現の機序としては、アンドロジェン受容体との結合を介さない抗アンドロジェン作用による内分泌かく乱作用の存在や PPAR の subtype の関与が示唆されているものの、その分子的な証明はなされていない。また、精巣障害に関しては幼弱な時期で感受性の高いことが知られており、ヒト新生児では大人に見られるようなグルクロン酸抱合による解毒が未発達であることから、これらの解毒・排泄機構が成人のそれと異なる可能性がある。よって、脳の性分化の臨界期に曝露された場合、化学物質の内分泌かく乱作用の可能性とは別に、未熟な精巣からの testosterone surge の阻害による脳の性分化障害が生じ、性成熟後での性行動に影響を与える可能性がある。一方、げっ歯類で見られる精巣毒性がマーモセットやカニクイザルでは見られないとの報告があり、その毒性の感受性に種差の存在する可能性がある。更に、肝臓や腎臓の基礎疾患がある場合、フタル酸エステル類の体内動態に影

響を与える可能性が高く、モノエステル体による影響の増強される可能性がある。

以上より、フタル酸/アジピン酸エステルによる毒性発現に関して、感受性の高い胎生期ないし新生時期や基礎疾患等による高感受性状態での曝露影響、及び霊長類で感受性が低い理由や受容体を介した分子メカニズム等については未解決な部分が多い。本研究では、フタル酸/アジピン酸エステルのヒトへの影響評価上問題となる不確実性要因の解明を目的として、精巣と発達期の毒性に焦点を絞り、周産期や基礎疾患存在下での曝露影響評価、感受性種差と分子メカニズムについての研究を行う。周産期曝露影響評価として、母ラットへの混餌投与を行い、児動物に対する離乳時と性成熟後での生殖器官の病理組織学的評価により、曝露期間中の標的臓器への直接影響と、性成熟後影響を判別する。また脳の性分化影響について視床下部での性分化関連遺伝子の発現解析と性成熟後での性行動評価を行う。基礎疾患による修飾作用については、薬物により肝ないし腎障害を負荷したラットを用い、被検物質による精巣障害への修飾作用を病理形態学的に検討する。これらの検索により、既に報告されている NOAEL と高感受性時期/状態での NOAEL を比較・検討する。

平成 16 年度は、①周産期曝露影響評価として、15 年度に SD:IGS ラットを用いて投与実験を行った DINP について、今年度、病理組織学的評価を終了した。更に引き続いて、アジピン酸である di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) の評価を行った。もう一つの Wistar:Imamichi ラットを用いた性行動評価研究では、DEHA 暴露動物について、新生時期の視床下部での granulin および p130 遺伝子の発現、血中中性ステロイドレベルや性成熟後の性行動、性周期を解析した。また、脳の性分化影響評価として、昨年度に、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。即ち、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 の周産期暴露例での指標遺伝子を探索した。今年度は、EE、DEHP 暴露例で見いだされた指標候補遺伝子につき、マイクロアレイによる発現レベルの検証を real-time RT-PCR により行った。更に、MPOA における脳の性分化関連遺伝子の発現解析として、EE 混餌投与例を陽性対照として、以前我々が実施した研究のうち、その周産期暴露により明らかな生後性分化障害を示した methoxychlor (MXC) や、いずれの性分化障害も示さなかった genistein (GEN) とともに、DINP の周産期暴露を受けたラットにおいて、脳の性分化臨界期(生後 10 日目)の MPOA における各種の性分化関連遺伝子の

mRNA 発現量について real-time RT-PCR 法により定量的に評価した。性分化関連遺伝子としては、ER  $\alpha$ 、ER  $\beta$ 、プロゲステロン受容体 (PR)、ステロイド受容体コアクティベーター (SRC)-1、SRC-2、GnRH 及び calbindin-D (CALB) を選択した。ER  $\alpha$  及び ER  $\beta$  は視床下部において共に部位特異的な分布を示して高発現しており (Orikasa et al., 2002; Yokosuka et al., 1997)、その遮断薬投与により脳や行動の雄化が阻害されることから、性分化に重要な役割を果たしている (McEwen et al., 1977)。PR は脳の発達期の MPOA においてその発現量に明らかな性差があり、この発現量の二形性は外因性のステロイドにより影響を受けることが知られている (Quadros et al., 2002b)。視床下部における SRC-1 あるいは SRC-2 は、性ステロイドにより誘発され雌での性行動の制御に関与しており (Apostolakis et al., 2002)、ラット新生仔視床下部における SRC-1 の減少は、雄において発達期以降の雄型行動の障害の要因となることが知られている (Auger et al., 2000)。GnRH はブローカ対角帯、中隔野核と同様、MPOA においても生合成され (Witkin et al., 1982)、GnRH 遺伝子はそのプロモーター領域にエストロジェン応答配列を持つことが知られている (Radovick et al., 1991)。CALB は、カルシウムイオン透過孔誘発によるグリア細胞の細胞死 (Wernyj et al., 1999) と同様、神経細胞においても興奮性神経伝達物質に対しても保護作用を有している (Figueredo-Cardenas et al., 1998; McMahan et al., 1998)。また、ラットにおいては、生後 8~26 日の間は SDN-POA 神経細胞において特異的に高発現しており、雌の幼若動物をテストステロンあるいはエストラジオール処理することによりその発現量が増加し、雄の幼若動物を去勢することにより発現量が減少するとの報告がある (Sickel et al., 2000)。本研究においては、まず初めに、EE を周産期に暴露し、ラット産仔の脳の性分化臨界期の MPOA における性分化関連遺伝子発現量の性差及び EE による影響について検討した。次に、以前実施した内分泌影響が示唆されている環境化学物質に関する発達期暴露研究において (Masutomi et al., 2003)、内分泌・生殖関連システムに明らかな影響を及ぼした methoxychlor (MXC) と明らかな影響を及ぼさなかった genistein (GEN) とともに、DINP について、EE において投与影響あるいは発現の雌雄差が認められた遺伝子を選択し、MPOA における発現解析を実施した。発現レベルのノーマライゼーション法としては、total RNA 当たりと 2 種類のハウスキーピング遺伝子 (GAPDH 及びヒポキサンチン-グアニン ホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT)) による方法を併用した。②基礎疾患による修飾作用については、まず肝及び腎障害に関しては昨年度まで di-n-butyl phthalate (DBP) による増強作用を見出したが、今年度は F344 ラットに対して、thioacetamide (TAA) で肝障害、あるいは葉酸で腎障害を誘発し、DEHP、DEHA の雄性生殖器への毒性作用の増強の有無について検討した。③精巢毒性の感受性種差に関する研究では、各種動物種の精巢とその初代培養系に、

DEHP の活性化モノエステル (MEHP) を曝露した時の影響を形態学的に比較し、種差を規定する要因を検討する。16 年度は 15 年度に引き続き若齢マウスの経口投与試験ならびに若齢マウスや成体ニホンザルの精巣器官培養系への添加試験を実施した。④精巢毒性の分子メカニズム研究では、MEHP による標的遺伝子の探索を行うが、15 年度は 14 年度に確立したマウス・ライディッチ細胞 MA-10 を用いたコレステロール代謝修飾モデルを用いて、MEHP の影響に関するマイクロアレイ解析を行い、いくつかの候補遺伝子につき Northern blot 解析を行い、HMG CoA Synthase2 を得た。今年度は、この遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、レポータージーンアッセイを行い、MEHP によるプロモーター活性の上昇の有無を検討した。最後に、⑤文献調査として、発達期の曝露影響や種差等の感受性要因に関する各種文献検索をアップ・デートし、ヒトでの健康影響に関するリスク評価の資料とした。

## B. 研究方法

①周産期暴露影響評価として、被検物質を妊娠・授乳期ラットに投与し、児動物への影響の評価を行った。被検物質は、想定されるヒトへの暴露形態を考慮して、飼料に混じて母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に暴露した。この研究では二つの異なる系統のラットを用いて、それぞれ病理組織学的解析、性ステロイドレベルの測定と性行動評価を行った。まず SD:IGS ラットを用いた実験系では、まず昨年度は、DINP について以前実施した実験結果 (妊娠 15 日目から出産後 10 日目まで; Masutomi et al., 2003) を基に、妊娠 SD:IGS ラットを用いて、400、4000、20,000 ppm の 3 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 週目に解剖を行った。被検物質投与のための基礎飼料は、大豆由来の phytoestrogen を除いた SF (NIH-07 変型) 飼料を用いた。離乳後は、通常の基礎飼料に切り替えて仔動物を飼育した。妊娠・授乳期の母動物について体重と摂餌量を測定し、仔動物については、生後 2 日目に出生仔数、体重、肛門・生殖突起間距離 (AGD) を測定し、生後 3 日目に一匹の母動物あたり雌雄各 4 匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後 14 日目には、雄性動物について乳頭・乳輪の出現の有無を検索し、離乳 (生後 21 日目) までの間、仔動物の体重を毎週測定した。離乳時には、母動物に対する DINP の投与を終了し、仔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。春機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機発動 (包皮分離、膣開口) 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 週間より膣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 21 日の解剖時には、肝、腎、脳、副腎、精巢、精巢上体、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。精巢はブアン固定を行

い、他の臓器はホルマリン固定を行った。11 及び 20 週目には更に、前立腺、精嚢(+凝固腺)、下垂体の各重量をホルマリン固定後に測定した。次いで、これらの臓器に関して、HE 染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

DEHA の妊娠後期及び授乳期暴露実験は、DINP の実験プロトコールに準じて、0, 480, 2400, 12,000 ppm の用量を餌に混ぜて行った。

DINP 及び DEHA のすべての群の仔動物につき、15 年度に既に評価の終了した DBP 暴露例(対照群と最高用量群のみ)とともに、投与終了時の血清中 testosterone 及び estradiol レベルをそれぞれ EIA 法により測定した。

Wistar-Imamichi 系ラットを用いた別の周産期暴露実験では、今年度は DEHA を評価し、出生児の性ステロイドレベルの測定と性成熟後の性行動評価を行った。即ち、SD:IGS ラットを用いた暴露実験と実験プロトコールを統一して、妊娠 15 日目から産後 21 日目(離乳時)まで SF 飼料に DEHA を 480 ppm, 2400 ppm, 1,2000 ppm となるように混和した餌を与えた。また、外来性ステロイドの脳の性分化に対する影響を確認するため、生後 2 日齢の雌ラットに estradiol benzoate (EB) を 20 µg, あるいは testosterone propionate (TP) を 1 mg 皮下投与した群、およびそれらの対照群を設けた。生後 7 日齢のラットを断頭・屠殺し、採血を行うとともに視床下部を摘出し、抽出した RNA を用いて、real-time RT-PCR 法により granulin および p130 遺伝子の発現を解析した。さらに、エストラジオールおよびテストステロンの血中濃度を ELISA 法により測定した。また、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。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化障害の責任遺伝子の探索については、15 年度に周産期暴露により性成熟後での生殖器傷害を生じさせることが知られている EE を、0.01, 0.1, 0.5 ppm の割合で妊娠 SD:IGS ラットに妊娠 15 日から出産後 2 日目まで混餌投与した際の、投与終了時における仔動物の視床下部 MPOA の部位特異的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。EE を選定した理由として、出生前あるいは出生直後の仔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仔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仔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 (Takagi et al., 2004)。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。次いで、同様の投与実験プロトコールを用いて、DEHP について、明らかに雄性の性分化を傷害する用量である 6000 ppm を設定して妊娠ラットに対して妊娠 15 日目から生後 2 日目まで混餌投与を行い、投与終了時におけ

る視床下部 MPOA の遺伝子発現プロファイルを検討した。

本年度は、EE の暴露により明らかな発現の雌雄差と用量依存的な反応の認められた GTPase Rab14 (accession no. M83680 in GenBank/EMBL data bank), GTP-binding protein Gnai2 (M12672), Myosine phosphatase, target subunit 1 (Mypt1; U50185) について発現レベルを ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) を用いて、その発現の雌雄差、用量反応性を real-time RT-PCR により検証した。それぞれのプライマー及び相当する TaqMan MGB プローブ(6-FAM™-dye-labeled)は Assays-on-Demand™ Gene Expression Products (Applied Biosystems) を使用した。DEHP 暴露例でも、発現の雌雄差と雄で DEHP 投与により発現減少を示し、EE と共通に変動した Rab14 と Scn3a (Y00766) について発現レベルに関する同様の検討を行った。逆転写反応はマイクロアレイに用いた 1<sup>st</sup> round aRNAs から 100 ng を用いて High-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) により 100 µl の反应用量で行った。Real-time PCR は TaqMan probe detection system を用いて、50 µl の反应用量 (25 µl TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2.5 µl target primer mix, 2.5 µl RT product) で行い、サイクル・パラメーターとしては、50°C, 2 min, initial activation 95°C, 10 min に次いで、95°C, 15 sec と 60°C, 60 sec を 45 サイクル行った。また、spike RNA として添加した pGIBS-Phe の in vitro 転写レベルを SYBR® Green detection system にて one-step real-time RT-PCR により測定した。即ち、50 µl の反应用量 (25 µl 2x QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (QIAGEN GmbH), 8 ng 1<sup>st</sup> round amplified aRNA, 17.5U Multiscribe RTase, 20 U RNase inhibitor, 250 nM primers) で、サイクル・パラメーターとして 48°C, 30 min, 95°C, 10 min に次いで、95°C, 15 sec, 60°C, 60 sec を 45 サイクル行った。この spike 遺伝子の primer 配列は Primer Express® software (Version 2.0; Applied Biosystems) を用いて探索し、5'-AGCGCCCCGACTGA-3' (forward; nucleotides 3152-3166), 5'-CTCTAGGCCCAAACGACCTT-3' (reverse; nucleotides 3107-3127) とした。得られたこれらの遺伝子の発現量は、spike RNA の転写量当たり換算し、ノーマライズを行った。

Real-time RT-PCR による MPOA における脳の性分化関連遺伝子の発現変動解析においては、EE と MXC のラットを用いた動物実験は、それぞれに対照群をもつ別々の独立した実験として実施した。DINP と GEN に関しては、同じタイミングで実施し、対照群の動物を共有した。EE の実験においては、母動物をランダムに 2 群に分類し (7 匹/群)、EE を 0 あるいは 0.5 ppm となるように CRF-1 に混ぜて妊娠 15 日から自由摂食させた。産後 10 日において、7 匹の産仔 (1 匹/母動物) から断頭によって脳を採取し、残りの産仔は他の解析に使用するためそのまま飼育した。0.5 ppm EE を CRF-1 に混ぜて周産期投与した際の生殖・内分泌システムへの影響を Table 1 に示す。MXC, DINP 及び GEN の実験におい

ては、母ラットは妊娠3日に入荷後ただちにSF-dietで飼育した。各実験において、母動物を妊娠15日に4群に分類し(3匹/群)、MXCの0, 24, 240, 1200 ppm群、及びDINPの4000, 20,000 ppm, GENの1000 ppm, 無添加群をそれぞれ設定した。MXCの投与量は、1200 ppm MXCでは0.5 ppm EEと類似の明らかな内分泌・生殖システムへの影響を誘発し、下垂体ホルモン陽性細胞率の変動をその下の用量である240 ppmから認めた過去の研究結果から選択した。DINPの20,000 ppmは性成熟後の精巣と卵巣に弱い病理学的な変化を認めた用量であり、GENの1000 ppmは性成熟後の雄に体重減少を認めたが、雌雄いずれにおいても内分泌・生殖システムへの影響がみられなかった用量である。いずれの実験においても産後10日において全仔動物を断頭し、脳を採取した。採取した産仔の脳はただちにメタカーン(4°C)で固定し、パラフィン包埋の後、2枚の20 µm厚切片に挟まれた6 µm厚切片を連続的に作製した。作製した20 µm厚切片はPEN-foil film上にマウントし、6 µm厚切片は通常のスライドグラスにマウントしてHE染色した。6 µm厚切片においてSDN-POAの位置を確認し、隣の20 µm厚切片におけるSDN-POAを含むMPOA(1000 x 600 µm, 両側)をマイクロダイセクションした。SDN-POAのサイズに性差があるため、雄においては6~10枚、雌においては4~6枚の切片をマイクロダイセクションに使用した。MPOAサンプルは各個体ごとにマイクロチューブにて-80°Cに保存し、total RNAを調製した。リアルタイムRT-PCRによる発現解析は9種の遺伝子(ER $\alpha$ , ER $\beta$ , PR, GnRH, SRC-1, SRC-2, CALB, GAPDH, HPRT)について実施した(n=6/群)。GAPDHとHPRTはその他の遺伝子の発現量をノーマライズするために測定した。RTに用いたtotal RNAは比較する群間で同量を用いた(EEの実験では雌雄共に24 ng, MXCの実験では雄は42 ng, 雌は19 ng, DINPとGENの実験では雄は22 ng, 雌は10 ng)。リアルタイムPCRに使用したプライマー及びプローブの配列をTable 2に示す。SYBR Green システムにおいては、ER $\beta$ とPRのmRNAレベルを測定した(合計25 µlの反応液中に、1 µlのRT産物、12.5 µlの2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 300 nMのプライマー)。本システムにおいては、初期活性化95°C、15分の後、94°C-15秒、アニーリング30秒、72°C-30秒の3ステップを50サイクル実施した(アニーリング温度はER $\beta$ で54°C, PRで53°C)。TaqMan probe及びTaqMan MGB probeシステムにおいては、ER $\alpha$ , GnRH, SRC-1, SRC-2, CALB, HPRTのmRNAレベルを測定した(合計25 µlの反応液中に、1 µlのRT産物、12.5 µlの2x TaqMan Universal PCR Master Mix, 900 nMのプライマー, 250 nMのプローブ)。GAPDHに関しては、プライマー濃度を100 nMに減らし、200 nMのプローブを加えた。本システムにおいては、1ステップの50°C-2分、初期活性化95°C-10分の後、95°C-15秒、60°C-60秒の2ステップを50サイクル実施した。RTの陰性対照として、reverse transcriptase (-) mock RTサンプルをPCR実験毎

に設定した。倫理面への配慮として、投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテルないしネンプター深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては国立医薬品食品衛生研究所ないし東京大学農学部の利用規程に従った。

②フタル酸/アジピン酸エステル類による精巣障害に対する臓器障害負荷による影響評価に関しては、まず、肝障害負荷の影響評価では、6週齢雄性F344ラット60匹を10群(各6匹)に分け、第1-5群に第1-4週まで4週にわたりTAAを週3回腹腔内投与し、肝障害を誘発した。一方、第6-10群にはphosphate-buffered saline (PBS)のみを投与し、肝障害非誘発群とした。その後、第1, 6群はDEHP 25,000 ppm, 第2, 7群は6000 ppm, 第3, 8群はDEHA 25,000 ppm, 第4, 9群は6000 ppmの用量で混餌投与した。第5, 10群は基礎飼料のみを投与し、対照群とした。第9週目に屠殺・剖検を行い、肝、腎、前立腺、精囊、精巣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。

次に、腎障害負荷の影響評価として、雄F344ラット40匹(6週齢)を10群(各群5匹)に分け、1群から5群には腎障害の誘導を目的に葉酸(重炭酸ナトリウムに溶解)300 mg/kgの濃度で週に一回計5回皮下投与した。これにより両側腎臓に慢性腎症(間質性腎炎)が発症することは14年度の研究で確認できている。葉酸投与後、5週目から飼料にDEHAとDEHPをそれぞれ0, 6000 ppm, 25,000 ppmの濃度で混ぜて4週間連続投与した。対照群には葉酸を投与せずDEHAとDEHPを3用量で投与した。第1群は葉酸のみ、2群はDEHA 6000 ppm, 3群はDEHA 25,000 ppm, 4群はDEHP 6000 ppm, 5群はDEHP 25,000 ppmである。6群は完全な対照群で葉酸、DEHAおよびDEHPも投与していない。7群から10群は2群から5群の対照群で、葉酸の代わりに溶媒である重炭酸ナトリウムを5回皮下投与し、DEHAあるいはDEHPを所定の濃度で投与した。体重、摂餌料を毎週計測し、実験終了時、肝、腎、前立腺、精囊、精巣、精巣上体の各臓器重量を測定すると共に、病理組織学的評価のため、パラフィン包埋組織標本作製した。また精巣上体から精子を取り出し、その精子数、運動能、および形態異常の比率について検討した。また屠殺時には採尿ケージによる採尿を行い、尿量の測定と尿中成分の検討を行った。屠殺時に採血し、腎機能についても検討した。

使用動物への処置は可能な限り非侵襲的に行い、その屠殺は麻酔薬の過量投与によった。動物飼育については大阪市立大学ないし名古屋市立大学医学研究科動物飼育規約を遵守した。

③精巣障害の感受性種差の検索では、いくつかの動

物種に対して *in vivo* あるいは器官培養系を用いた MEHP の暴露実験を行った。まず、若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験として、28 日齢の C57B 雄マウスに 700~900 mg/kg/day を単回経口投与し、3 日目ないし 5 日目に精巣を採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定後、通常の光顕観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。次に、若齢マウス精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、20 日齢の C57B 雄マウス精巣器官培養系に MEHP (100, 1,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-6}$ , 0 nmol/ml) を添加し、添加 1, 3, 6, 9 時間後に採材し、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、TUNEL 法によるアポトーシス細胞及び Fas, Fas-L 抗体を用いた陽性細胞の確認を行った。更に、成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、10 才齢のニホンザル精巣器官培養系に MEHP (100, 1, 0 nmol/ml) を添加し、添加 3, 6, 9 時間後に採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の光顕観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に用い、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

倫理面への配慮としては、精巣の採材においては、各動物にペントバルビタールによる深麻酔を施し、苦痛が全くない状態で行った。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、マウス・ライディッヒ細胞 MA-10 を 6 穴プレートに 10%FCS-DMEM 中  $2 \times 10^5$  個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO<sub>2</sub> 中でインキュベーションし、FCS 無しの DMEM で細胞を洗った後、FCS 無し DMEM 中で MEHP を最終濃度  $10^{-6}$ M 及び  $10^{-5}$ M, 及び  $10^{-4}$ M になるよう添加、あるいはコントロールとして DMSO を添加し、更に 24 時間インキュベーションし PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。次いで、Affymetrix 社製 Mouse Expression 430A にて解析を行い、更に候補遺伝子等について、Northern Blotting を行った。プロモーター領域の解析により、PPRE 配列を有する遺伝子として、HMG CoA Synthase 2 を見出し、この遺伝子のプロモーター領域(2 kb)をプロメガ社ホタルルシフェラーゼレポーターベクターにクローニングした。ルシフェラーゼ活性は、プロメガ社 Steady-Glo Luciferase Assay System を用いて測定した。

⑤文献調査として、フタル酸エステルの検索は 2004 年 1 月から 2005 年の 2 月まで、Medline を用い、phthalate, DEHP (di(2-ethylhexyl) phthalate), DBP (di-n-butyl phthalate), BBP (n-butyl benzyl phthalate) をキーワードに生殖発生毒性関連の文献を検索した。アジピン酸エステル類については、adipate をキーワードとし同様に検索した。検索した文献のタイトル及び要旨に基づいて、本目的との関連性を判断し、原著を入手し、内容をまとめた。また、本研究は文献情報を検索、収集、整理することであるため、倫理面での問題はない。

## C. 研究結果

①周産期暴露評価研究のうち、DINP の妊娠後期・授乳期暴露実験において、20,000 ppm のみで母動物の体重増加及び摂餌量が強く抑制された。出生仔数と雄性仔率は 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 日目の雄性仔動物における乳輪・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。春機発動の時期は、雌雄とも 20,000 ppm で遅延したが、雌での 8-11 週齢時、17-20 週齢時での腔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。生後 11 週の解剖時、体重は雄で 400 ppm 以上で低値傾向を示し、4000 ppm 以上で有意であった。雌では、体重変動に明らかな用量依存性はなく、20,000 ppm のみで体重の低値を示した。臓器相対重量では、雄では精巣が 4000 ppm 以上で高値を示し、脳は 2000 ppm で高値を示した。雌では 2000 ppm で肝臓が若干の低値を示した他、脳、下垂体が高値を示した。生後 20 週においても、雄の体重の用量依存的な低値傾向が明らかで 20,000 ppm 用量において有意であった。雌では 20,000 ppm のみで体重低値を示した。臓器相対重量では、雄では 20,000 ppm のみで、脳、精巣、精巣上体の若干の高値を認め、雌においても同用量で脳、子宮相対重量の若干の高値を認めた。病理組織学的検索結果として、21 日目の解剖時の雄では、精巣で精細管サイズの減少、精母細胞の発達の減少が 20,000 ppm で明らかであったが、後者の変化は 4000 ppm においても発現の強さが増加する傾向を示した。20 細胞以上の数のライディッヒ細胞の集塊は 4000 ppm から有意に出現し、20 細胞以下の集塊の数は 400 ppm より増加(傾向)を示し、4000 ppm 以上で増加は明らかであった。精巣上体では、精巣上体管の横断面数の減少で表現されるコイルングの減少が 400 ppm より出現し始め、4000 ppm 以上で明らかであった。また、精巣上体管のサイズの減少も 400 ppm より見いだされ、20,000 ppm で明らかであった。乳腺では alveolar bud の低形成が 20,000 ppm で明らかで、副腎皮質の萎縮が有意差はないものの 400 ppm から出現し始め、20,000 ppm で明らかとなった。下垂体前葉の萎縮も 4000 ppm で 1 例、20,000 ppm で全例に認めた。その他、肝臓では肝細胞のグリコーゲン顆粒の減少が 4000 ppm より明らかとなり、細胞質の好酸性の増加を示す例が 400 ppm より出現し始め、4000 ppm 以上で明らかとなった。腎臓では髄質集合管の拡張(一部巨細胞の出現)を 20,000 ppm で認め、髄質に鉍質沈着を示す例も同群で見いだされた。雌では、卵巣の卵胞のサイズと間質腺のボリューム



ームの減少で表現される卵巣の小型化が 400 ppm 以上で明らかであり、乳腺の alveolar bud の低形成は 4000 ppm より出現し始め、20,000 ppm で明らかであった。副腎皮質の萎縮を示す例は、400, 4000 ppm でそれぞれ 1 例ずつ見いだされ、20,000 ppm 群で雄と同様に全例に出現した。下垂体前葉の萎縮も 20,000 ppm で全例に出現した。肝臓と腎臓の変化は雄と同様であり、肝細胞のグリコーゲン顆粒の減少と細胞質の好酸性の増加が 4000 ppm 以上で明らかとなり、腎髄質集合管の拡張は 4000 ppm で 1 例出現し、20,000 ppm では殆どの例に認められ、鉍質沈着出現例も同群で認められた。11 週目の病理組織検索では、雄においては、精巣変化はごくわずかであり、一匹あたり 1-数本程度の精細管の萎縮性変化、セルトリ細胞の空胞化が 4000 ppm 以上で出現した(後者は有意)。また、用量依存性はないものの、精巣上体管内での細胞残屑の増加が 4000 ppm 以上で明らかであった。副腎皮質の萎縮も 4000 ppm で 1 例、20,000 ppm で 7 例出現した。雌では卵胞数の増加を示す例が 400 ppm から出現し始め、4000 ppm 以上で有意に増加した。20 週目では、雄の精巣で精細管のごく軽度の部分萎縮を示す例が 20,000 ppm で増加傾向を示した。精巣上体管内での細胞残屑の増加、雌の卵巣における卵胞数の増加は DINP による有意な変動を示さなかった。

DEHA の周産期暴露の実験では、投与期間中の母動物の体重に明らかな変動はなく、摂餌量も妊娠期間中に 12,000 ppm 群で低値を示したのみであった。妊娠期間、出生数、出生子の性比に投与による影響は認められなかった。出生子の生後 2 日目での体重は、12,000 ppm 群の雌雄で低値を示したのみであったが、AGD に群間の差は認められなかった。一方、雄仔動物における生後 14 日目での乳頭・乳輪の出現は 400 ppm 以上から認められた。投与終了時(生後 21 日目)では、雄では 12,000 ppm 群で体重の低値傾向を認めたが、臓器重量に明らかな変動を認めなかった。雌では、12,000 ppm 群で体重の低値を示し、脳の体重あたりの相対重量は逆に増加した。DEHA 投与による春機発動に対する影響としては、12,000 ppm の雄で若干の遅延を認めたものの雌では明らかな差を認めなかった。性周期についても投与による影響を認めていない。性成熟後の解剖では、11, 20 週目とも 12,000 ppm の雌雄で体重の低値傾向を認めたが、20 週目の雄の下垂体の相対重量が同群で認められた以外、明らかな変動を認めなかった。DEHA 暴露例での病理組織学的検索の結果、生後 21 日目では、雄の精巣の精母細胞の発達の減少を示す例が 480 ppm 以上で増加傾向を示し、12,000 ppm 群では精母細胞のアポトーシスの増加が明らかであった。20 細胞以上の数のライディッヒ細胞の集塊の出現は 2400 ppm 以上で増加傾向を示したが、個体間のばらつきを反映して有意な差を認めなかった。20 細胞以下の集塊の数は 480 ppm より増加傾向を示し、12,000 ppm で増加は明らかであった。また、有意差はないものの、精巣上体のコイリングの減少が 2400 ppm 群で 1 例、

12,000 ppm 群で 3 例認められた。12,000 ppm 群では更に、乳腺の低形成を認めた。雌では、この時期では特記する変化を認めなかった。性成熟後では、11 週目の雌で卵巣の卵胞数の増数を示す例が増加傾向を示した以外は、特記する所見を示さなかった。

DINP 暴露例の暴露終了時での血清中の testosterone, estradiol レベルを測定したところ、雄では 20,000 ppm 群で testosterone, estradiol とも増加を示し、雌では estradiol が 4000 ppm 以上で用量依存的に増加を示した。雌での estradiol の増加は、昨年度評価を終了した DBP の 10,000 ppm 群と同様であった。DEHA 暴露例では DINP とは異なり、用量依存性はないものの雄で estradiol レベルの低値を認め、480 ppm 群で有意であった。

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、昨年度 EE の周産期暴露により新生ラットの MPOA において、雄に構成的に強く発現する遺伝子の中に、EE に反応して雄で発現減少し、雌では用量依存的に発現増加した遺伝子として G 蛋白質のシグナリングの構成要素が多数見いだされたが、その中で Rab14, Gαi2, Mypt1 のマイクロアレイでの発現レベルを real-time RT-PCR にて検討した結果、それぞれの遺伝子で所々有意差は見出せないものの、発現性差、用量反応性ともマイクロアレイのデータとパラレルな結果を示した。また、DEHP 暴露例においても Rab14, Scn3a ともマイクロアレイと real-time RT-PCR の結果はほぼパラレルであった。

MPOA における脳の性分化関連遺伝子の発現解析では、ERα と PR の mRNA 発現量は性差を示した。雌においては ERα 発現量の高値が認められた(total RNA 当たり及び GAPDH 当たりで有意、HPRT 当たりでも類似の傾向)。PR に関しては、全てのノーマライゼーション法において、雄における PR 発現量の有意な高値が認められた。ERβ, SRC-1, SRC-2, GnRH, CALB に関しては、mRNA 発現量の性差は認められなかった。EE 暴露の影響としては、SRC-1 発現量が雄において有意に増加した(GAPDH 当たり及び HPRT 当たり)。雌においては、ERβ 及び PR の発現量の有意な増加が GAPDH 当たり及び HPRT 当たりのノーマライゼーションで認められ、PR においては total RNA 当たりでも類似の傾向を示した。ERα, SRC-2, GnRH, CALB に関しては、発現量の変動は認められなかった。また、MXC 暴露による遺伝子発現の変化として、発現の性差あるいは EE による発現変動が認められる遺伝子として、ERα, ERβ, PR, SRC-1 を MXC, DINP, GEN の暴露影響を検討するための遺伝子として選択した。雄においては、1200 ppm MXC において PR 発現量の有意な減少が GAPDH 当たりのノーマライゼーションで認められ、同様の傾向が 24 ppm から認められた。同様の傾向は他のノーマライゼーション法においても認められた。MXC 暴露による ERα, ERβ, SRC-1 の発現変動は認められなかった。雌においては、1200 ppm MXC において PR 発現量の有意な増加が HPRT 当たりのノーマライゼーション

ンで認められ、同様の傾向が GAPDH 当たりにおいても認められた。ER  $\beta$  と SRC-1 に関しては、投与量に相関しない発現量の減少が 240 ppm において total RNA 当たりノーマライゼーションにより認められた。ER  $\alpha$  の発現量はいずれの用量においても変動は認められなかった。DINP 及び GEN 暴露による遺伝子発現の変化として、雄においては、DINP 及び GEN 暴露による ER  $\alpha$ , ER  $\beta$ , PR, SRC-1 の発現量の変化は認められなかった。雌においては、20,000 ppm DINP に 20,000 ppm DINP における PR の発現量の有意な減少が GAPDH 当たりのノーマライゼーションで認められ、HPRT 当たりにおいても同様の傾向を示した。GEN の 1000 ppm においては、雌で発現変動が認められる遺伝子はなかった。

一方、Wistar: Imamichi 系ラットを用いて行った DEHA の周産期曝露による性行動評価実験においては、生後 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には、DEHA 投与によっても変化はなかった。視床下部における granulin 遺伝子の発現は雄で、また p130 遺伝子の発現は雌で低下が見られた。性成熟後の雄における LH, FSH の血清中濃度に、DEHA 投与の影響は見られなかった。雌ラットにおいても発情前期の性腺刺激ホルモンのサージ上分泌に変化は認められず、性周期も正常に回帰していた。しかし、雄では特に 480 ppm 投与群でマウント、挿入、射精の低下が認められ、雌ではすべての用量でロードーシスの低下が認められた。

②DEHP, DEHA による精巣障害に対する肝障害負荷の影響評価として、屠殺時の精子検査では、TAA 非投与群において DEHP 高用量(第 6 群)で精子数や精子運動率の減少傾向が、精子奇形率では逆に増加傾向があり、精巣毒性を認めた。また、TAA と DEHP 高用量を受けた群(第 1 群)では TAA 対照群(第 5 群)と DEHP 高用量のみの群(第 6 群)と比較して精子数、精子運動率の有意な減少が、精子奇形率は有意な増加が見られた。また、肝障害を誘発した後 DEHP 高用量の投与の第 1 群は肝障害対照群(第 5 群)と DEHP 高用量のみの群と比較して、精巣の相対臓器重量の有意な減少が、精巣上体は第 5 群と比較して有意な減少がみられた。また、病理組織学的検索で第 1 群では精巣の毒性の増加を認めた。さらに DEHA は肝障害下にかかわらず高用量群でも精巣毒性が見られなかった。

DEHP, DEHA による精巣障害に対する腎障害負荷の影響評価として、葉酸投与による軽微な体重増加抑制が見られたほか、DEHA および DEHP の 25,000 ppm 投与によって葉酸投与の有無に係わらず、著しい体重の減少と増加抑制が観察された。葉酸投与群の腎臓は表面は粗造で、組織学的に間質の線維化を伴った尿管の萎縮など間質性腎障害があることが確認された。葉酸投与群では尿量の増加と比重に減少が観察され、さらに血中の尿素窒素やクレアチニンの上昇など葉酸投与による腎機能の低下は明らかであった。ただし DEHP 単独でも 25000 ppm では尿量の増加や血清 BUN 上昇および尿中のクレアチニンの減少など、腎毒

性を示すことが明らかとなった。精巣と精巣上体の重量は葉酸投与後に 25,000 ppm DEHP の投与群で減少があり、葉酸非投与群では DEHP による精巣・精巣上体重量の減少は観察されていない。6000ppm の DEHP ではこれらの臓器重量の明らかな変化は認められなかった。DEHA の 25000 ppm では臓器重量の相対増加が見られたがこれは体重の著明な増加抑制による見かけ上の減少と考えられた。精巣上体における精子数や精子運動能は第 5 群で著明な低下が認められ、および異常形態精子が有意に増加していた。DEHP 単独でも 25000 ppm で精子数の減少が観察されているが、葉酸による腎障害下ではより一層の減少が認められた。DEHA では精巣機能の異常を示すいずれのパラメーターも認められなかった。精巣と精巣上体の病理組織学的検討を行ったところ、葉酸投与後 25000 ppm DEHP 投与した第 5 群で精細管の高度な萎縮、精母細胞や精子細胞の消失があり、さらに多くの精細管において精祖細胞の空胞変性が認められた。精巣上体では精細管から脱落して来たものと考えられる多量の変性壊死細胞を腺腔内に認めた。精巣上体管の上皮には著変は認められなかった。

予備的な解析において血中と精巣中の DEHP のモノエステルが腎障害下で有意に上昇すること、逆に尿中のモノエステルが減少することが示された(名城大学薬学部小嶋仲夫教授との共同研究)。

③精巣障害の感受性種差の検索では、まず、in vivo 投与実験のうち、若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験では、投与後 3 日目の高濃度投与群(800, 900 mg/kg)で高いアポトーシス細胞(TUNEL 陽性細胞)数を示したが、投与後 5 日目では投与群は対照群に比べ、アポトーシス細胞数は減少した。器官培養系では、若齢マウスにおいて MEHP の濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。1 及び 100 nm/ml 投与群では、いずれの時間帯でも対照群に比べ、アポトーシス細胞数は有意に高い値を示した。また、投与後 9 時間では、いずれの濃度でも有意かつ著明なアポトーシス細胞数の増加が見られた。また、免疫組織化学の結果、Fas は精細胞に、Fas-L はセルトリ細胞に陽性反応が確認された。成体ニホンザル精巣器官培養系では、未成熟個体を用いた他種動物の実験結果に比べ、かなり少数ながら濃度依存的、時間依存的なアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは成体ヤギより高い値を示した。電顕像ではアポトーシスないしネクローシスを示すセルトリ細胞及び精細胞が認められた。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、MA-10 細胞において  $10^{-6}$ M 及び  $10^{-5}$ M,  $10^{-4}$ M MEHP により発現が変化する遺伝子の GeneChip によるマイクロアレイ解析を行った結果、発現が増加すると予想された P450, 2c29, IL-10, Activin receptor 1 及び HMG CoA synthase2 について確認するために、MA-10 細胞を MEHP 処理して得られた RNA を用いて Northern blotting を行った。その結果、HMG CoA synthase2 遺伝子のみ MEHP により発現が増加した。次に、MEHP は PPAR  $\alpha$  を活性化するこ

とが知られているため、MA-10細胞を用いたシステムでもMEHPによるPPAR $\alpha$ の活性化がみられるかどうか調べるために、PPRE配列の下流にtkプロモーター、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトをpUC8ベクターにクローニングした。コントロールベクターとしてはtkプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトをpUC8ベクターにクローニングしたものを用いた。これらのベクターを用い、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ が入っているプラスミドを条件に応じて同時にトランスフェクションし、MEHPによりPPAR $\alpha$ が活性化されるかどうかレポーター遺伝子アッセイにより調べた。ポジティブコントロールとしてFenofibrateを用いた。その結果、MEHPはPPAR $\alpha$ を活性化することが判明した。次に、MEHPがHMG CoA synthase 2プロモーターを活性化するかどうかレポーター遺伝子アッセイにより調べた。まず、HMG CoA synthase 2プロモーター領域の下流にSV40プロモーター、ルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトをpGL2-promoter Vectorにクローニングした。コントロールベクターとしてはSV40プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子をつないだコンストラクトをpGL2-promoter Vectorにクローニングしたものを用いた。これらのベクターを用い、PPAR $\alpha$ 、PGC-1 $\alpha$ が入っているプラスミドを条件に応じて同時にトランスフェクションし、MEHPによりHMG CoA synthase 2プロモーターが活性化されるかどうかレポーター遺伝子アッセイにより調べた。その結果、MEHPがHMG CoA synthase 2プロモーターを活性化することが明らかになった。

⑤文献調査結果については、以下に示す。

#### 1. ヒトに関連した情報

新生児期に医療品からのDEHP暴露を受けていた14-16歳の男女(男13,女6)の身体的成長および性成熟度を調べた結果、甲状腺、肝臓、腎臓、性腺機能などは正常の範囲内であり、成長、性成熟への影響はみられなかった[Rais-Bahraら,2004]。

295人の男性(1999-2003年)の尿中フタル酸モノエステル濃度と、血中性ホルモンレベル(FSH, LH, 性ホルモン結合グロブリン, テストステロン, インヒビンB)との関係を調べた結果、MBeP暴露はFSH濃度減少(10%)に関与していた。MBuPはインヒビンBレベルの増加(4.8%)に関与していたが、統計的に有意となるボーダーライン上であった[Dutyら,2005]。

環境中または代謝の過程で起こり得るフタル酸エステルの水酸化が、ヒトのエストロゲン受容体(ERs)との結合親和性に関与していることを示した。ERsとの結合親和性はフタル酸の直鎖の長さや、分枝鎖の存在で強化された[Todaら,2004]。

#### ヒトPPAR

様々なフタル酸モノエステルによるマウスおよびヒトのPPAR $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の活性化を調べた結果、PPAR $\alpha$ とPPAR $\gamma$ の活性化は、側鎖の長さともなって上昇した。

また、マウスPPAR $\alpha$ とPPAR $\beta$ はヒトPPAR $\alpha$ とPPAR $\beta$ より、低濃度で活性化されたが、PPAR $\gamma$ についてはマウス、ヒトとも同じような感受性を示した。フタル酸モノエステルによるPPAR $\alpha$ とPPAR $\gamma$ のトランス活性化とPPAR $\alpha$ ターゲット遺伝子mRNAとPPAR $\gamma$ による脂肪細胞変異の誘発には各々相関関係があった[Bilityら,2004]。

#### 2. DEHP(MEHP)に関連した情報

##### 精巣

DEHP(30,95,300 mg/kg)の長期混餌投与(159週まで)によるSDラットの肝臓と精巣に対する影響を調べた。300 mg/kg投与群では肝臓、精巣での腫瘍が増加した。また腫瘍の程度は投与量に依存していた。初期では精巣の腫瘍発生が肝臓の腫瘍より顕著であったが、時の経過と共に多様化した。300 mg/kg投与では精細管萎縮の増加もみられた[Vossら,2005]。

DEHP(100,1000 mg/kg,5日間)経口投与の思春期前ラットの精巣におけるアラキドン酸の生成と代謝に対する影響を調べた結果、DEHPはcPLA2の活性を抑制し、12-リポキシナーゼやCYP4A1などのアラキドン酸代謝酵素を誘発しアラキドン酸レベルを下げた。アラキドン酸代謝カスケードの変化がテストステロン濃度の減少を引き起こすことが示唆された[Kimら,2004]。

セルトリ細胞の障害はFas由来の生殖細胞のアポトーシスによるものとされるが、Fasなどのアポトーシス関連蛋白の転写を調節しているp53蛋白の作用を調べるために、野生型マウス(p53+/+)とp53ノックアウトマウス(p53-/-)を用いMEHP暴露(1 g/kg経口単回投与)による影響を調べた。アポトーシス検出(TUNEL-positive)細胞は、(p53-/-)マウスで有意に低く、Fasとdeath receptor 5(DR5)は(p53+/+)マウス生殖細胞の細胞膜でのみ認められた。c-FLIP(L)(caspase-8阻害蛋白)は(p53-/-)マウスで2-5倍高いレベルであった。MEHPによるアポトーシスはp53蛋白に依存することが示唆された[Chandrasekaranら,2005]。

2ヶ月齢のシバヤギの精巣におけるMEHP(0.001,1,100 nmol/ml)暴露の影響をin vitro試験で調べた結果、低濃度のMEHPでは精子形成細胞とセルトリ細胞のアポトーシス誘発傾向にあり、高濃度のMEHPでは壊死誘発傾向にあった[Andrianaら,2004]。

20日齢のSDラットの精巣を用い、spermatogenic cellのアポトーシス検出(TUNEL-positive)試験を行った結果、MEHPは精子形成細胞壊死を誘発させ、精巣の組織/細胞培養は精巣毒性検出の有用であることが示された[Andrianaら,2004]。

LEラットのPNDs 21-90に強制経口投与した10 mg/kgのDEHPにより、黄体形成ホルモン、テストステロン、17 $\beta$ -estradiol(E2)の血清レベルを上昇させた。精巣中ラ

イディッヒ細胞数は DEHP 投与のラットで多かった。テストステロンや E2 レベルの変化は、アンドロジェン、エストロジェン、ステロイドホルモンレセプターのクロストークの可能性を示唆し、生殖器以外の組織のエストロジェンレセプターの存在は、血中 E2 レベルの上昇が生殖作用を超えた意味を持つことを示唆された [Akingbemi ら, 2004]。

#### 精巣遺伝子

28 日齢 F344 ラットへの MEHP(1g/kg)経口投与により、NF- $\kappa$ B 遺伝子サブユニット(p-65,p50,c-Rel)の転座を誘引することから、MEHP による精巣障害に NF- $\kappa$ B が関与していることが示された [Rasoulpour ら, 2005]。

ラット精巣の遺伝子発現に対する DEHP の影響を調べるために、6 週齢の SD ラットに DEHP(20, 2000 mg/kg)を単回経口投与し、3, 6, 24, 72 時間後の状態を調べた。アポトーシス検出(TUNEL-positive)細胞は、2000 mg/kg 暴露の 24 及び 72 時間後に有意に増加した。cDNA マイクロアレイと逆転写 PCR で解析した結果、20 mg/kg 投与ではアポトーシスに関与する bcl-2 が増加し、2000 mg/kg 投与ではアポトーシスアクチベータカスケードの Fas/FasL, FADD/caspase-8/caspase-3 カスケード, Apaf-1/caspase-9/caspase-2 カスケードが増加し、bcl-2 は減少した。これらの結果から、FADD/caspase-10/caspase-6 カスケード, caspase-11/caspase-3 は DEHP によるアポトーシスに関与しないことが示唆された [Kijima ら, 2004]。

#### 雄生殖器系(抗アンドロジェン作用)

未成熟去勢ラットの Hershberger 試験により、DEHP(4, 20, 100, 200, 400, 600, 800, 10000 mg/kg/d)作用を調べた。DEHP は、陰茎海綿体筋/肛門挙筋(100 mg/kg 以上)、前立腺(200 mg/kg 以上)、精囊(400 mg/kg 以上)の相対重量を減少させ、肝臓(100 mg/kg 以上)の相対重量を増加させた。また、pMMTVneo-Luc をトランスフェクションした MDA-MB453 細胞を用いて、DEHP とその代謝物(MEHP,5 $\alpha$ -MEHP,5OH-MEHP)の作用を調べた結果、5 $\alpha$ -MEHP 及び 5OH-MEHP は抗アンドロジェン作用を示した [Stroheker ら, 2005]。

#### 胎盤

DEHP およびその代謝物(MEHP, EHA)による PPAR 活性に伴う必須脂肪酸ホメオスタシスに対する影響を、ラット HRP-1 栄養膜細胞(胎盤)を用いて調べた。DEHP, MEHP, EHA は PPAR  $\alpha$ , PPAR  $\gamma$ , 脂肪酸輸送蛋白(FATP1), 心臓由来脂肪酸結合蛋白(HFABP)を暴露、時間に依存しアップレギュレーションさせたが、PPAR  $\beta$  および細胞膜脂肪酸結合蛋白(FABPpm)への影響は変則的であった。また、必須脂肪酸の取り込み率が増加し、アラキドン酸( $\omega$ -6)および DHA( $\omega$ -3)の輸送が誘発された。DEHP と代謝物が胎盤の必須脂肪酸ホメオスタシスの変化を通じて胎児の発育異常をもたらせる可能性を示唆した [Xu ら, in press]。

#### 形態異常

亜鉛ホメオスタシスの変化が催奇形に関与していると言う仮説を基に、子宮内胎児における DEHP 暴露の亜鉛代謝キー遺伝子(MT-I,MT-II,AnT-1)に対する影響を調べた。交配後 9 日に DEHP 800 mg/kg を強制経口投与した妊娠マウスの肝臓、胚の前脳、visceral yolk sac の MT-I,MT-II,AnT-1 遺伝子発現を調べた結果、器官形成期の母体への DEHP 暴露は胎児の亜鉛ホメオスタシスに対するキー遺伝子の発現を変化させることがわかった。また、その程度は暴露量に依存していた [Lee ら, 2004]。

### 3. DBP に関連した情報

#### 雄児精巣

DBP(500 mg/kg)の経口投与は Wistar ラット胚/胎児(胎齢 13.5-20.5 日)精巣中ライディッヒ細胞の異常凝集を起こしたが、これはライディッヒ細胞数の増加によるものではなかった。ライディッヒ細胞(胎齢 21.5 日)凝集箇所にはセルトリ細胞が囲われるように存在していた。これら細胞の混在状態は生後 4 日ラットの精細管内にも認められた。精細管内のライディッヒ細胞の凝集が精子形成を阻害していることが示唆された [Mahood ら, 2005]。

妊娠 12-19 日の SD ラットに DBP(0.1, 1.0, 10, 50, 100, 500 mg/kg/day)を強制経口投与し、妊娠 19 日の胎児の精巣中のステロイド生成に対する影響を調べた。胎児精巣中のコレステロール輸送やステロイド生成に関係する遺伝子・蛋白の発現や testosterone レベルは、母体の DBP 投与量に依存して減少した [Lehmann ら, 2004]。

#### 児生殖器系

雄ラットの PNDs 5-14 に DBP(5, 10, 20 mg/rat)を皮下投与し生殖器に対する影響を調べた結果、新生児期の DBP 暴露は内分泌系に永久的な変化を与え、生殖器の異常発達を思春機まで継続させるものと考えられた。また、DBP は新生児期におけるアンドロジェン受容体と ER  $\beta$  発現の阻害を通じて抗アンドロジェン作用をもたらせることが示唆された [Kim ら, 2004]。

妊娠 12-21 日の CrI:CD(SD)BR ラットに BBP(100, 500 mg/kg)を強制経口投与し、6, 12, 18 月齢の雄児を調べた。DBP(500 mg/kg)子宮内暴露による児の AGD および乳輪に対する変化は成体時まで持続した。また、AGD の変化が生殖器の奇形と有意に関係していたことから、AGD の減少が生殖器奇形の予測指標となることが示唆された [Barlow ら, 2004]。

DBP(0, 20, 200, 2000, 10000 ppm)を含む飼料(soy-free)を妊娠 15 日から分娩後 21 日まで雌ラットに与え、児に対する影響を調べた。DBP は脳下垂体に関与する雌の性発育に影響を及ぼした。また 20 ppm(1.5-3.0 mg/kg/day)以上で可逆的な精巣毒性、持続的な乳腺に対する影響が観察された。本実験の LOAEL は 1.5-3.0 mg/kg/day であった [Lee ら, 2004]。

## 次世代発生

2ヶ月齢の雌LEラットにDBP(12, 50 mg/kg)を含む飼料(soy-free)を交配前2.5ヶ月、交配・妊娠中、実験終了(PND 14またはPNWs 12)まで与えF1児への影響を調べた結果、12 mg/kgで児体重低下、胸腺・精巣重量低下、膣開口遅延がみられた。DBPの影響は雄児において顕著であった [Salazarら, 2004]。

DBP(0, 50, 250, 500 mg/kg)をラットの妊娠1日からPND 21日まで強制経口投与し、F1ラットの発育やF1雄ラットの成熟期の生殖器系に対する影響を調べた。250 mg/kgでF1ラットの体重低下、精巣・精巣上体・前立腺重量の低下、精子指標等に悪影響が認められ、雄の生殖器系がDBP暴露の標的器官であることが示された [Zhangら, 2004]。

## 4. BBPに関連した情報

### 精巣

BBP(500 mg/kg)とlinuron(75 mg/kg)の精巣テストステロンに対する影響、生殖発生における影響、新生児AGDと若年期乳輪数と成体時の生殖変化の関係を調べるために、BBP単独、linuron単独、linuronとBBPの併用を妊娠15-19日のラットに投与した。何れの投与でも精巣T及びP低下、雄AGD短縮・乳輪数増加がみられた。併用投与の作用は相乗的というよりも相加的であった。また、新生児のAGDや乳輪数増加は成熟期のAGDや乳頭保持、生殖器の奇形や生殖器官や組織の重量と有意に関連していた。[Hotchkissら, 2004]

### 2世代繁殖試験

BBP(0, 750, 3750, 11250 ppm; 0, 50, 250, 750 mg/kg)のラット2世代繁殖試験を行った。F0の全身毒性およびF1の全身毒性と生殖毒性は750 mg/kgで認められた。雄AGDと体重の減少、F1雌雄ラットの性成熟遅延、F1,F2雄ラットの乳頭・乳輪の保持が11250ppmの投与で認められた。F1,F2の出生時雄AGD短縮は3750ppm投与でも認められた。本実験のNOAELは50 mg/kg/dayであった [Tylら, 2004]。

## 5. 総説

DEHPの生殖発生毒性についての総説 [Latiniら, 2004]。

ヒト乳児における食事からのDEHP摂取と生殖毒性についての総説 [Latiniら, 2004]。

フタル酸エステル類による雄生殖器系に対するPPARの役割についての総説。1)フタル酸エステル類の雄生殖器に対する毒性、2)精巣中PPARsの発現、3)フタル酸エステル類によるPPARsの活性化、4)PPAR $\alpha$ の精巣毒性における役割、5)ステロイド合成とカタボリズムに関与するフタル酸エステル類の遺伝子ターゲット、6)精巣発達とホメオスタシスに関与するPPARsと他の核内受容体との相互作用 [Cortonら, 2005]。

## 6. 環境省によるラット1世代試験

(哺乳類を用いた人健康影響への内分泌攪乱作用に関する試験結果)

ジー2-エチルヘキシルフタレート

ブチルベンジルフタレート

ジブチルフタレート

ジシクロヘキシルフタレート

ジエチルフタレート

ジペンチルフタレート

ジヘキシルフタレート

ジプロピルフタレート

ジー2-エチルヘキシルアジペート

何れも高用量(既報告で影響が認められた用量)において一般毒性と考えられる影響が認められた。

## 7. 経済産業省によるラット2世代繁殖試験

ブチルベンジルフタレート

0, 100, 200 mg/kgをCrj:CD(SD)IGSラットの2世代に渡って強制経口投与した。100 mg/kg以上で雄児での低体重、AGD短縮が観察された。NOAELは100 mg/kg/day未満であった。

ジシクロヘキシルフタレート

0, 240, 1200, 6000 ppmをCrj:CD(SD)IGSラットの2世代に渡って混餌投与した。1200 ppm以上で雄児AGD短縮、乳輪保持がみられた。NOAELは240 ppm(16 mg/kg/day)であった。

ジエチルフタレート

0, 600, 3000, 15000 ppmをCrj:CD(SD)IGSラットの2世代に渡って混餌投与した。1500 ppm以上で授乳中児体重低下、肝重量の高値、胸腺・脾臓・副腎・前立腺・子宮重量の低値がみられた。NOAELは3000 ppm(1083 mg/kg/day)であった。

## D. 考察

①周産期暴露影響評価として、今年度はDINPとDEHAの評価を終了した。DINP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(Gray et al., 2000)が確認され、精巣/精巣上体に関しては生後21日目の暴露終了時では毒性影響が4000 ppmより出現するものの、その精巣の変化は昨年実施したDBPで既に報告したように殆ど可逆的であった(Lee et al., 2004)。最高用量では雌雄とも暴露期間での体重増加抑制がかなり強く、雌雄での春機発動の遅延や、離乳時に認められた乳腺、副腎、下垂体等の低形成あるいは萎縮性変化の原因となった可能性がある。しかし一方で、DINPによる影響として雄での乳頭・乳輪の出現が、それも400 ppmより生じることを初めて見出した。また、雌においても、離乳時の卵巣変化を同用量から見出し、性成熟後の卵胞数の増加など、永続的な卵巣影響を示唆する変化を初めて見出す結果となった。後述するように、その原因は不明であるがDBPと同様に離乳時の血清中estradiolレベルの上昇はDINPによる雌のホルモン環境への影響を示唆した。アジピン酸であるDEHAに関しては、かなり弱いものの発達期の精巣影響が最高用量で

認められており、これらの雄で乳腺の低形成も認めている。この群では DINP に比べ発達期の体重増加抑制は弱いいため、発達期の雄の性分化障害を示唆した。また、DINP と同様に雄での乳頭・乳輪の出現が、それも 480 ppm より生じることを初めて見出した。

DBP や DINP 等の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。DINP は DBP に比較して、発達期のラットに対して精巣毒性作用は弱いことが知られているが(Gray et al., 2000)、本研究においては、雄ラットに対して典型的な抗アンドロゲン作用である乳頭・乳輪の出現を低用量から見出している。同様に DEHA においても、最高用量 (12,000 ppm)での発達期精巣影響、及び最低用量 (480 ppm)からの乳頭・乳輪の出現を認めている。離乳時では DINP 暴露例では testosterone レベルは逆に 20,000 ppm 群で増加しており、投与初期でのライディッヒ細胞障害に対する反応性変化(ライディッヒ細胞の集積)を反映した変化かもしれない。以上より、DINP のみならず DEHA においても、投与初期で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低用量からの影響が示唆された。DEHA に関しては、近年、Wistar ラットに対する発達期の暴露により抗アンドロゲン作用を示さないとの報告がなされているが(Dalgaard et al., 2003)、我々の今回得た結果とは矛盾している。この報告では、妊娠 7 日目から産後 17 日まで母動物に対する強制経口投与を行っているため、我々が今回用いた混餌投与の場合より、一般的に強い影響が生じることが期待される。両者の違いは不明であるが、我々の研究では大豆由来の植物エストロゲン(-)の飼料を用いていること、あるいは系統の異なるラット (SD 系)を用いていることが原因かもしれない。

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的変化を誘発することが報告されている(Lovekamp-Swan and Davis, 2003)。DEHP の活性代謝産物である MEHP は、卵巣の顆粒膜細胞に対して peroxisome proliferator-activated receptor を活性化することにより、cAMP を低下させてエストロゲン合成を直接に阻害することが報告されている(Lovekamp and Davis, 2001; Lovekamp-Swan and Davis, 2003; Lovekamp-Swan

et al., 2003)。DEHP は更に  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type IV を誘導して estradiol の代謝を促進することが報告されている(Fan et al., 1998)。以上より、フタル酸エステル類は雌のエストロジェンの作用に対して複数のポイントで影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、発達期のラット卵巣は少なくとも生後 24 日までの間は estradiol を合成できないので(Csernus, 1986)、DINP 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、DINP による雌の卵巣影響は離乳時のみならず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)。また、DEHA 投与例においても最高用量で、成熟後卵巣の卵胞数の増加傾向を見いだしており、程度は弱いながらも同様な影響が示唆された。この点については、単位面積あたりの卵胞/黄体数の定量解析を待って最終的に判断する。

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)。昨年我々の DBP に関する研究成果からは 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。今年度実施した DINP に関しても、雄の乳頭・乳輪の出現、雌の卵巣への影響(小型化)から、NOAEL は求められず、LOAEL は 400 ppm (28.4~62.8 mg/kg/day)となった。DEHA においても、雄の乳頭・乳輪の出現を根拠に LOAEL が 480 ppm (32.9~97.6 mg/kg/day)となった。フタル酸/アジピン酸エステル類の発達期毒性に関しては、脳の性分化障害のリスクはあるものの、殆どの報告では下垂体や神経中枢への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、DBP と同様に雌での性分化影響も見出されたことから、フタル酸/アジピン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。

また、昨年度の脳の性分化障害に関する遺伝子発現解析の結果、雄で優勢に発現し、EE 投与により雄で発現減少し、雌で発現上昇(用量依存的)した遺伝子の中に 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。今年度は候補遺伝子の機能を詳細に検索した結果、Rab14 はゴルジ装置からエンドソームへの membrane trafficking に機能し、シナプス機能の効率化に関連することが知られている (Junutula et al., 2004)。また、G $\alpha$ i2 はシナプス末端に広く分布し、ドパミン受容体、 $\mu$  オピオイド受容体の機能発現に関与することが報告されている (Straiker et al., 2002)。また、エストロジェン受容体を介さないエストロジェンの即時的な反応を媒介することも報告されている (Wyckoff et al., 2001)。Mypt1 はシナプス末端に広く分布し、axon guidance に機能し (Lontay et al., 2004)、Adaptor-related protein complex 3,  $\mu$ 2 はシナプスの vesicular trafficking に機能し、エストロジェンに対する反応性が知られている (Collins et al., 2002)。これらのうち、検索した 3 遺伝子は real-time RT-PCR により発現レベルが検証されている。これらの遺伝子の機能を考慮すると、EE による脳の性分化障害時にはシナプスの可塑性が影響を受け、雄の雌化/雌の雄化の生じている可能性が示唆された。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, Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, sodium channel III (Scn3a) 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。

マイクロダイセクションしたパラフィン包埋切片における部位特異的な定量的遺伝子発現解析により、免疫染色の結果をもとに報告されている ER $\alpha$  と PR の発現量の性差 (PR: Quadros et al., 2002a,b; ER $\alpha$ : Yokosuka et al., 1997) と矛盾の無い mRNA 発現量の性差を生後 10 日のラット MPOA において検出可能であった。0.5 ppm の EE は雌雄の春機発動に影響を及ぼし、雌においては内分泌・生殖システムの明らかな異常の原因となり、雄においては内分泌・生殖システムへの異常は認められないが、SDN-POA サイズ減少の原因となることを報告している (Masutomi et al., 2004b; Shibutani et al., 2005)。今回の研究においては、0.5 ppm EE は雌における PR と ER $\beta$  の発現量増加及び雄における SRC-1 の

発現量増加の要因となった。先に実施した研究において、我々は 1200 ppm MXC が EE によるものと類似の内分泌・生殖器システムの異常を誘発することを見出しており、今回の研究では、1200 ppm MXC により PR の発現量が雌で増加し、雄で減少することを見出した。また、20,000 ppm DINP においては雌で PR 発現量が減少した。一方で 1000 ppm GEN においては雌雄いずれにおいても PR の発現変動は認められなかった。

ラットの PR 遺伝子は複数の広域におよぶエストロジェン応答配列をプロモーター領域に有しており、その領域に ER が結合する (Kraus et al., 1994)。Quadros 等 (2002a) は、胎生期 19 日から生後 28 日までの間では、雄ラットの MPOA における PR 発現量は雌と比較して高いことを示し、母動物由来のプロゲステロンが雄産仔の脳の雄化に関与しているとする仮説を立てている。この雄 MPOA における PR 発現量の雌に対する高値は ER $\alpha$  ノックアウトマウスでは認められないことから (Wagner et al., 2001)、発達期における ER $\alpha$  を介したメカニズムによる PR 転写活性化の関与が示唆される。出生前あるいは生後にエストロジェンアナログに暴露された雌ラットは、MPOA を含む視床下部領域において PR の発現量増加を示す (Arrieta et al., 2003; Quadros et al., 2002b)。一方で、雄ラットを出生前にテストステロン処理するとこれらの領域における PR 免疫染色陽性細胞の減少が認められることから、PR 遺伝子の発現抑制におけるアンドロジェン受容体 (AR) の関与も示唆される (Quadros et al., 2002b)。今回の研究においては、他の研究結果と矛盾しない結果として、EE は雌の MPOA において PR 発現量を増加しており、ER $\alpha$  を介した反応であると考えられた。MXC に関しては、1200 ppm を暴露することにより、PR 発現量が雄において減少し、雌において増加した。MXC は ER に対する親和性は低く、in vivo におけるエストロジェン様作用は主として代謝物である 2,2-bis(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane (HPTE) によるものである (Gaido et al., 2000)。この HPTE は ER $\alpha$  に対してはアゴニストとして作用し、ER $\beta$  と AR に対してはアンタゴニストとして作用することが報告されている (Gaido et al., 1999; Maness et al., 1998)。今回の研究の MXC 暴露を受けた雌における PR の発現量増加は、EE と同様、ER $\alpha$  を介したメカニズムが作用しているのかも知れない。しかしながら、PR 発現の誘導を最大にするには、機能的に作用する ER $\beta$  及び ER $\alpha$  両遺伝子の存在が必要であることが、エストラジオール処理した成熟雄マウスの MPOA に関して報告されている (Kudwa et al., 2004)。今回の研究における MXC の暴露を受けた雄における PR の発現量減少は、発達期の雄においてテストステロンから変換される内因性エストロジェンによる ER $\beta$  を介した PR 発現量の増加に対して、MXC が拮抗的に作用したことが要因かもしれない。

脳の性分化期間における SRC-1 の役割に関しては、雌新生仔の視床下部にアンチセンス SRC-1 を投与するとテストステロンにより誘導される雄化が抑制されることが報告されている (Auger et al., 2000)。この処置により、成熟後において脳の雌化の指標となるロードシス指数

が雄において増加する。外因性のステロイドに対する SRC-1 の発現制御に関しては充分わかっていないが、エストラジオール処理により SRC-1 の mRNA 発現量が増加し、卵巣摘出によりその発現量が減少することが雌ラットの視床下部腹内側核において報告されている (Mitev et al., 2003)。今回の研究においては、SRC-1 発現量は EE に暴露された雄の MPOA においてのみ増加した。今回の EE 投与により雄産仔の性的行動が影響を受けるか否かについては明らかではないが、我々は今回の研究と類似のプロトコールにより、雄産仔の性成熟後の SDN-POA 体積がわずかに減少することを見出している (Shibutani et al., 2005)。雄新生仔にエストラジオールベンゾエイトを直接投与した研究においては、SDN-POA 体積が明らかに減少すると報告されている (Nagao et al., 1999) ことから、雄の SDN-POA 発達における EE の作用とそれに対する SRC-1 の関与が示唆される。今回の研究で SRC-1 発現量の変動が認められなかった MXC, DINP, GEN に関しては、我々が類似のプロトコールで実施した研究において、SDN-POA 体積の減少は認められていない (Masutomi et al., 2003)。その反応は投与量の増加に伴うものではなかったが、ER $\beta$  及び SRC-1 の発現量の減少が雌の 240 ppm MXC において認められた (total RNA 当たりのノーマライゼーションにおいてのみ)。一方で、EE においては、SRC-1 の発現変動は認められず、ER $\beta$  の発現量は雌で増加した。MXC と EE が雌ラットに及ぼす毒性影響は類似しているが、下垂体ホルモン陽性細胞率の変動パターンは異なっており、このことは 2 つの化合物の下垂体-視床下部軸における作用の違いを反映していると考えられる。

一般的に、フタル酸エステル類の発達期における投与は、精巣への直接作用とそれに伴う雄型への性分化に必須であるテストステロン合成能の低下の機序により、主として雄に悪影響を及ぼすと考えられている (Gray et al., 2000; Mylchreest et al., 2002)。我々が先に実施した研究では、周産期の 20,000 ppm DINP 暴露においては、雄産仔の性成熟後の精巣において弱い病理組織学的変化を認めたのみであった (Masutomi et al., 2003)。同研究においては、雌においても 20,000 ppm DINP 暴露により卵巣に弱い病理組織学的変化を認めた。今回の研究では、20,000 ppm DINP 暴露による雌の PR 発現量の減少が認められたが、雄では発現変動は認められなかった。化合物は異なるが、我々は昨年度の成果として DBP の周産期暴露による雌雄双方における性的発達への影響を認めている (Lee et al., 2004)、本研究での DEHP 周産期暴露においても、生後 2 日の雌 MPOA で多数の遺伝子の発現量低下が認められている。今回の研究では、PR の発現量が EE 暴露を受けた雌の他に、1200 ppm MXC 暴露を受けた雌雄及び 20,000 ppm DINP 暴露を受けた雌で変動した。GEN は下垂体ホルモン陽性細胞率に影響を及ぼさない 1000 ppm においては、雌雄いずれにおいても PR の発現量に影響を及ぼさなかった。MXC と DINP による産仔の発達への影

響を考慮すると、脳の性分化期の MPOA における PR 発現量の変動はその化合物が内分泌かく乱作用を示すことの指標となるかも知れない。

Wistar: Imamichi 系ラットを用いた性行動に関する評価研究においては、DEHA は、新生子の血中テストステロン、エストラジオール濃度に有意な影響は与えなかったが、視床下部における性ステロイド依存性遺伝子発現に影響を与えた。このことは、DEHA は周生期の性ステロイドの中枢作用を修飾しうることを示唆している。

一方、性成熟後、雄ラットでは性腺刺激ホルモンの血中濃度に有意な変化は認められなかった。さらに、雌ラットにおいても発情前期の性腺刺激ホルモンのサージ上分泌に変化は認められず、性周期も正常に回帰していた。しかし、雄では 480 ppm 投与群でマウント、挿入、射精のいずれの性行動にも低下が認められ、雌ではすべての用量でロードーシス商の低下が認められた。雄ラットで作用に用量依存性が見られなかった原因は不明であるが、さらに低用量の効果を検討する必要があるかもしれない。また性行動に変化が認められたにもかかわらず性周期や性腺刺激ホルモン濃度には影響がないことから、DEHA は脳においては性行動の発現に関与する神経機構にのみ限定的な作用を及ぼしていることが考えられた。

②基礎疾患による修飾作用に関する研究のうち、肝障害負荷による修飾作用を検討する研究において、今年度の検索で、DEHP は高用量で雄生殖器への毒性をもたらし、肝障害下においては DEHP による雄生殖器への毒性はより増強されることが判明した。肝障害の程度は組織学的検索で肝線維化が多少残っていた。しかし、DEHP 低用量と DEHA の場合はそれら自身で精巣毒性を示さず、肝障害下でも毒性は発現しなかった。肝障害状態における DEHP の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。このことから、この TAA 肝障害モデルが他の内分泌かく乱物質についての検索に活用されることが期待される。

腎障害負荷による修飾作用の検討に関しても、薬酸投与によって腎障害を発生させた状態では 14 年度で観察されたと同様にフタル酸エステルによる精巣毒性が増強することが明らかとなった。今回は DEHP と DEHA の 2 種類の化合物を検討したが、以前からの発表のごとく DEHA には精巣毒性が無いことがはっきりと示された。しかし DEHP は高濃度で精巣毒性が誘発され、その毒性が腎障害下でさらに増強されることがはっきりと示された。生化学的研究から血中と精巣中のモノエステルの増加が精巣毒性の増強に関与していることが示唆された。DEHA にも同じ現象が観察されたが、もともと DEHA には精巣毒性が無いことから DEHP のような所見は得られなかったと考えられる。今後単独では精巣毒性の発現されない濃度でも腎毒性下では精巣毒性の表れる実験条件を確立し、腎障害におけるリスク評



価の一助となるデータの確立が望まれる。

③精巣障害の感受性種差に関する研究で、若齢マウスの精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、アポトーシス細胞数 (TUNEL 陽性細胞) の変化を指標とした場合、若齢ラットやモルモットと同様、濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。しかし、その増加の程度には明らかな種差が認められた。また、成体ニホンザルの精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、少数ながら濃度依存的、時間依存的なアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは成体ヤギより高い値を示した。

④精巣障害の分子メカニズムに関する研究で、MEHP が転写因子 PPAR $\alpha$  を活性化し、ターゲット遺伝子のプロモーター領域の PPRE に結合してその遺伝子の発現を増加させることが知られているが、本研究により MEHP が HMG CoA synthase 2 の遺伝子発現を増加させること及び HMG CoA synthase 2 のプロモーターを活性化することが明らかになった。このプロモーター領域における転写因子結合部位について検索したところ、PPAR $\alpha$  が結合する配列があることがわかった。したがって、MA-10 細胞内で、MEHP は PPAR $\alpha$  に結合し、活性化された PPAR $\alpha$  がさらに HMG CoA synthase 2 のプロモーター領域中の PPRE に結合し、HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加したものと考えられる。しかし、ヒト HMG CoA synthase 2 遺伝子のプロモーター領域についても同様に転写因子結合部位について検索したところ、PPRE が存在しなかった。このようなプロモーター領域の違いにより遺伝子発現変化の違いがみられ、MEHP による精巣への影響のヒトとマウスにおける種差が現れると考えられる。この結果はヒトへの影響を予測する上で重要な情報になると考えられる。

ところで、MA-10 細胞を用いたレポータージーンアッセイの結果では、外来性由来の PPAR $\alpha$  がなければ MEHP による転写活性は上がらず、MA-10 細胞における内因性の PPAR $\alpha$  の欠如が示されたが、マウスライディツヒ細胞には PPAR $\alpha$  の発現が報告されており、*in vivo* における MEHP による HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現増加の可能性は十分にありとされる。

HMG CoA synthase 2 は、細胞内のコレステロール及びステロイドホルモン合成へとつながる経路で働いている (MA-10 細胞はコレステロールからステロイドホルモンを合成できない)。MEHP により MA-10 細胞内でコレステロールエステルが蓄積するので (本研究により一昨年に報告)、今後、HMG CoA synthase 2 を MA-10 細胞内でレトロウィルスを用いて過剰発現させ、同様にコレステロールエステルの蓄積が観察されるかどうか調べる必要がある。

⑤文献調査研究において、ヒト男性の尿中 MBep 濃度は FSH 濃度減少に関与していることが示されている。一方、ヒト新生児期に医療品からの DEHP 暴露を受けていた男女の成長及び性成熟への影響は確認されて

いない。このようにフタル酸エステル類とヒト生殖障害との直接的な関連性については現在のところ統一的な見解は示されていない。

フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響に関する論文において精巣に対する影響が遺伝子レベルで検討され、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。また、シバヤギの精巣も MEHP に対して感受性を示すことが報告されている。子宮内曝露による児の AGD および乳輪に対する変化は成体時まで持続し、AGD 短縮が生殖器形態異常の予測指標となることが示唆されている。催奇形性に関しては、胎児の亜鉛ホメオスターシスに関与する遺伝子の発現を変化させることが示され、奇形発現との関連が示唆されている。今年度の文献調査では、従来よりも低用量において影響が発現することが報告されている。Lee ら(2004)は DBP を含む飼料を妊娠 15 日から分娩後 21 日まで雌ラットに与えた結果、20 ppm (1.5-3.0 mg/kg/day) 以上で持続的な乳腺に対する影響が観察されたことから本実験の LOAEL は 1.5-3.0 mg/kg/day であったと報告している。また、Salazar ら(2004)は雌ラットに DBP を交配前 2.5 ヶ月、交配・妊娠中、実験終了 (PND 14 または PNWs 12) まで与えた結果、12 mg/kg で児の体重低下、胸腺・精巣重量低下、膈開口遅延がみられたと報告している。これらの実験では soy-free の飼料を使用していることが他の報告とは異なっている。通常の飼料を用いて行われた実験と比較しながら詳細な検討を行う必要がある。

## E. 結論

①SD:IGS ラットを用いた周産期曝露影響評価として、周産期曝露影響評価として、今年度は DINP と DEHA の評価を終了した。DINP 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が確認され、精巣/精巣上体に関しては生後 21 日目の曝露終了時では毒性影響が 4000 ppm より出現するものの、その精巣の変化は昨年実施した DBP で既に報告したように殆ど可逆的であった。最高用量では雌雄とも曝露期間での体重増加抑制がかなり強く、雌雄での春機発動の遅延や、離乳時に認められた乳腺、副腎、下垂体等の低形成あるいは萎縮性変化の原因となった可能性がある。しかし一方で、DINP による影響として雄での乳頭・乳輪の出現が、それも 400 ppm より生じることを見出した。また、雌においても、離乳時の卵巣変化を同用量から見出し、性成熟後の卵胞数の増加など、永続的な卵巣影響を示唆する変化を初めて見出す結果となった。また、その原因は不明であるが DBP と同様に DINP による離乳時での血清中 estradiol レベルの上昇は雌のホルモン環境への影響を示唆した。アジピン酸である DEHA に関しては、かなり弱いものの発達期の精巣影響が最高用量で認められており、これらの雄で乳腺の低形成も認めている。この群では DINP に比べ発達期の体重増加抑制は弱いため、発達期の雄の性分化障害を示唆した。また、DINP と同様に雄での乳頭・乳輪の出現が、それも 480

ppm より生じることを初めて見出した。以上より、DINP、DEHA ともに NOAEL は求められず、LOAEL はそれぞれ 400 ppm (28.4~62.8 mg/kg/day)、480 ppm (32.9~97.6 mg/kg/day) となった。

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で行った結果、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。また、これらの遺伝子の機能を考慮すると、EE による脳の性分化障害時にはシナプスの可塑性が影響を受け、雄の雌化/雌の雄化の生じ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遺伝子の多くは G 蛋白質シグナリングに係わるものであり、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。これらの遺伝子のマイクロアレイでの発現レベルは real-time RT-PCR 法により検証された。

EE、MXC、DINP、GEN の周産期暴露を受けたラットにおいて、脳の性分化臨界期の MPOA における性分化関連遺伝子の発現量について定量的に評価した。その結果、PR の発現量が EE 暴露を受けた雌の他に、1200 ppm MXC 暴露を受けた雌雄及び 20,000 ppm DINP 暴露を受けた雌で変動した。GEN は下垂体ホルモン陽性細胞率に影響を及ぼさない 1000 ppm においては、雌雄いずれにおいても PR の発現量に影響を及ぼさなかった。MXC と DINP による産仔の発達への影響を考慮すると、脳の性分化期の MPOA における PR 発現量の変動はその化合物が内分泌中枢のかく乱作用を示すことの指標となり得る事が示された。

Wistar: Imamichi ラットを用いた性行動評価研究では、DEHA の周産期暴露により、480 ppm の低用量から新生子の視床下部における性ステロイド依存性遺伝子発現に影響を与え、また性成熟後の雌雄ラットの性行動を低下させた。しかし、作用に用量依存性が見られなかったり、また性周期や性腺刺激ホルモン濃度には影響がないことから、DEHA は脳においては特定部位にのみ限定的な作用を及ぼしていることが考えられた。

②基礎疾患による修飾作用については、まず肝障害モデルにおいて、TAA による肝障害状態で、DEHP 高用量の投与によって雄生殖器毒性が増強することが判明した。しかし、DEHA は精巢毒性を発揮しないことが判明した。また、腎障害モデルにおいては、葉酸による腎機能抑制状態は DEHP の精巢毒性を著明に増強することが示された。ただし、その増強作用は DEHP の高用量にのみ認められた。その増強作用の機構として血中および精巢中のモノエステルの増量が示唆された。

③精巢障害の感受性種差に関する研究では、これまでの実験結果から、種差の要因として、セルトリ細胞自身の MEHP に対する感受性の差異が関わっていることが推測された。同時に MEHP の代謝経路の種差も関わっている可能性が高い。

④精巢障害の分子メカニズムに関する研究では、マウスライディヒ細胞 MA-10 を  $10^{-6}$ M の MEHP で処理すると 24 時間後に HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加することが、遺伝子チップ及び Northern Blot の解析により明らかになった。また、HMG CoA synthase 2 プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上位に組み込んだコンストラクトを作成し、レポーター遺伝子アッセイを行った結果、MEHP により HMG CoA synthase 2 のプロモーターが活性化されることが明らかになった。この遺伝子のプロモーター領域を解析した結果、PPRE が存在することがわかった。したがって、MEHP が PPAR  $\alpha$  を活性化して HMG CoA synthase 2 の遺伝子の発現が増加したものと考えられる。ヒト HMG CoA synthase 2 プロモーターについても同様に検索を行ったが、PPRE は存在しなかった。

⑤文献調査研究においては、フタル酸エステル類とヒト生殖障害との直接的な関連性については現在のところ統一的な見解は示されていない。フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響には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。また、シバヤギの精巢も MEHP に対して感受性を示すことが報告されている。子宮内曝露による児の AGD 短縮が生殖器形態異常の予測指標となることが示唆されている。胎児の亜鉛ホメオスターシスに關与する遺伝子の発現を変化と奇形発現との関連が示唆されている。今年度の文献調査では、従来よりも低用量において影響が発現することが報告されている。DBP を含む飼料を妊娠・授乳中のラットに投与したとき、LOAEL は 1.5-3.0 mg/kg/day であり、また、交配前・交配・妊娠・授乳中の 12 mg/kg/day の DBP 投与により、児の体重低下、胸腺・精巢重量低下、膈開口遅延がみられたと報告されている。これらの実験では soy-free の飼料を使用していることが他の報告とは異なっている。通常の飼料を用いて行われた実験と比較しながら詳細な検討を行う必要がある。

#### ①の引用文献

Apostolakis, E.M., Ramamurphy, M., Zhou, D., Onate, S., O'Malley, B.W., 2002. Acute disruption of select steroid receptor coactivators prevents reproductive behavior in rats and unmasks genetic adaptation in knockout mice. *Mol. Endocrinol.* 16, 1511-1523.

Arrieta, I., Diaz-Ibanez, L.B., Morales, T., Mendoza-Garcés, L., Morimoto, S., Moreno-Mendoza, N., Cerbon, M.A., 2003. Progesterone receptor gene and protein expression in the anterior preoptic area and hypothalamus of defeminized rats. *J. Neurobiol.* 56, 338-346.

- Auger, A.P., Tetel, M.J., McCarthy, M.M., 2000. Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7551–7555.
- Csernus, V., 1986. Production of sexual steroids in rats during pre- and early postnatal life. *Exp. Clin. Endocrinol.* 88, 1-5.
- Collins, B.M., McCoy, A.J., Kent, H.M., Evans, P.R., Owen, D.J., 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell.* 109, 523-535.
- Fan, L.Q., Cattley, R.C., Corton, J.C., 1998. Tissue-specific induction of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type IV by peroxisome proliferator chemicals is dependent on the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J. Endocrinol.* 158, 237-246.
- Figueredo-Cardenas, G., Harris, C.L., Anderson, K.D., Reiner, A., 1998. Relative resistance of striatal neurons containing calbindin or parvalbumin to quinolinic acid-mediated excitotoxicity compared to other striatal neuron types. *Exp. Neurol.* 149, 356–372.
- Gaido, K.W., Leonard, L.S., Maness, S.C., Hall, J.M., McDonnell, D.P., Saville, B., Safe, S., 1999. Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Endocrinology* 140, 5746–5753.
- Gaido, K.W., Maness, S.C., McDonnell, D.P., Dehal, S.S., Kupfer, D., Safe, S., 2000. Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , and androgen receptor: structure-activity studies. *Mol. Pharmacol.* 58, 852–858.
- Gotz, F., Thieme, S., Dorner, 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.
- Junutula, J.R., De Maziere, A.M., Peden, A.A., Ervin, K.E., Advani, R.J., van Dijk, S.M., Klumperman, J., Scheller, R.H., 2004. Rab14 is involved in membrane trafficking between the Golgi complex and endosomes. *Mol. Biol. Cell.* 15, 2218-2229.
- 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.
- Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S., 1994. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 8, 952–969.
- Kudwa, A.E., Gustafsson, J.A., Rissman, E.F., 2004. Estrogen receptor modulates estradiol induction of progesterin receptor immunoreactivity in male, but not in female, mouse medial preoptic area. *Endocrinology* 145, 4500–4506.
- 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.
- Lee, K-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Natsumi, K., Takigami, S., Uneyama, C., Hirose, M., 2004. 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* 203, 221–238.
- Lontay, B., Serfozo, Z., Gergely, P., Ito, M., Hartshorne, D.J., Erdodi, F., 2004. Localization of myosin phosphatase target subunit 1 in rat brain and in primary cultures of neuronal cells. *J. Comp. Neurol.* 478, 72-87.
- 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  $\alpha$  and PPAR  $\gamma$  by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 133-141.
- Maness, S.C., McDonnell, D.P., Gaido, K.W., 1998. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 135–142.
- 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., 2004a. Alteration of pituitary

- hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch. Toxicol.* 78, 232–240.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M., 2004b. Dietary influence on the impact of ethinylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure. *Reprod. Toxicol.* 18, 23–33.
- McEwen, B.S., Lieberburg, I., Maclusky, N., Plapinger, L., 1977. Do estrogen receptors play a role in the sexual differentiation of the rat brain? *J. Steroid Biochem.* 8, 593–598.
- McMahon, A., Wong, B.S., Iacopino, A.M., Ng, M.C., Chi, S., and German, D.C., 1998. Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 56–63.
- Mitev, Y.A., Wolf, S.S., Almeida, O.F., Patchev, V.K., 2003. Developmental expression profiles and distinct regional estrogen responsiveness suggest a novel role for the steroid receptor coactivator SRC-1 as discriminative amplifier of estrogen signaling in the rat brain. *FASEB J.* 17, 518–519.
- 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., Saito, Y., Usumi, K., Kuwagata, M., Imai, K., 1999. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. *Reprod. Toxicol.* 13, 303–311.
- Orikasa, C., Kondo, Y., Hayashi, S., McEwen, B.S., Sakuma, Y., 2002. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor  $\beta$  in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 3306–3311.
- 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.
- Quadros, P.S., Goldstein, A. Y.N., De Vries, G.J., Wagner, C.K., 2002a. Regulation of sex differences in progesterone receptor expression in the medial preoptic nucleus of postnatal rats. *J. Neuroendocrinol.* 14, 761–767.
- Quadros, P.S., Pfau, J.L., Goldstein, A. Y., De Vries, G.J., Wagner, C.K., 2002b. Sex differences in progesterone receptor expression: a potential mechanism for estradiol-mediated sexual differentiation. *Endocrinology* 143, 3727–3739.
- Radovick, S., Ticknor, C.M., Nakayama, Y., Notides, A.C., Rahman, A., Weintraub, B.D., Cutler, G.B. Jr., Wondisford, F.E., 1991. Evidence for direct estrogen regulation of the human gonadotropin-releasing hormone gene. *J. Clin. Invest.* 88, 1649–1655.
- Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Abe, N., Takagi, H., Lee, K-Y., Hirose, M., 2005. Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology* 208, 35–48.
- Sickel, M.J., McCarthy, M.M., 2000. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. *J. Neuroendocrinol.* 12, 397–402.
- Straiker, A.J., Borden, C.R., Sullivan, J.M., 2002. G-protein alpha subunit isoforms couple differentially to receptors that mediate presynaptic inhibition at rat hippocampal synapses. *J. Neurosci.* 22, 2460–2468.
- Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K-Y., Lee, H.-C., Nishihara, M., Uneyama, C., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M., 2004. Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. *Reprod. Toxicol.* 18, 687–700.
- Wagner, C.K., Pfau, J.L., De Vries, G.J., Merchenthaler, I.J., 2001. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor  $\alpha$  expression. *J. Neurobiol.* 47, 176–182.
- Wernyj, R.P., Mattson, M.P., Christakos, S., 1999. Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid  $\beta$ -peptide. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64, 69–79.
- Wyckoff, M.H., Chambliss, K.L., Mineo, C., Yuhanna, I.S., Mendelsohn, M.E., Mumby, S.M., Shaul, P.W., 2001. Plasma membrane estrogen receptors are coupled to endothelial nitric-oxide synthase through G  $\alpha$  i. *J Biol Chem.* 276: 27071-27076.
- Witkin, J.W., Paden, C.M., Silverman, A.J., 1982. The luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) systems in the rat brain. *Neuroendocrinology* 35, 429–438.
- Yokosuka, M., Okamura, H., Hayashi, S., 1997. Postnatal development and sex difference in neurons containing estrogen receptor  $\alpha$  immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J. Comp. Neurol.* 389, 81–93.

⑤の引用文献

ヒトに関連した情報

Rais-Bahrami K, Nunez S, Revenis ME, Luban NL, Short