

BL. (2004) Follow-up study of adolescents exposed to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) as neonates on extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) support. *Environ Health Perspect.* 112(13):1339-40.

Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. (2005) *Hum Reprod* 20(3):604-610.

Toda C, Okamoto Y, Ueda K, Hashizume K, Itoh K, Kojima N. (2004) Unequivocal estrogen receptor-binding affinity of phthalate esters featured with ring hydroxylation and proper alkyl chain size. *Arch Biochem Biophys.* 431(1):16-21.

Bility MT, Thompson JT, McKee RH, David RM, Butala JH, Vanden Heuvel JP, Peters JM. (2004) Activation of Mouse and Human Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) by Phthalate Monoesters. *Toxicol Sci.* 82(1):170-182.

DEHP(MEHP)に関連した情報

Voss C, Zerbán H, Bannasch P, Berger MR. (2005) Lifelong exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate induces tumors in liver and testes of Sprague-Dawley rats. *Toxicology.* 206(3):359-71.

Kim HS, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. (2004) Alterations of activities of cytosolic phospholipase A2 and arachidonic acid-metabolizing enzymes in di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced testicular atrophy. *J Vet Med Sci.* 66(9):1119-24.

Chandrasekaran Y, Richburg JH. (2005) The p53 Protein Influences the Sensitivity of Testicular Germ Cells to Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate-Induced Apoptosis by Increasing the Membrane Level of Fas and DR5 and Decreasing the Intracellular Amount of c-FLIP. *Biol Reprod.* 72(1):206-13.

Andriana BB, Tay TW, Maki I, Awal MA, Kanai Y, Kurohmaru M, Hayashi Y. (2004) An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goat in vitro. *J Vet Sci.* 5(3):235-40.

Andriana BB, Tay TW, Tachiwana T, Sato T, Ishii M, Awal MA, Kanai Y, Kurohmaru M, Hayashi Y. (2004) Effect of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in rats in vitro. *Okajimas Folia Anat Jpn.* 80(5-6):127-36.

Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2004) Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(3):775-80.

Rasoulpour RJ, Boekelheide K. (2005)

NF- κ B Is Activated in the Rat Testis Following Exposure to Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate. *Biol Reprod.* 72(2):479-86.

Kijima K, Toyosawa K, Yasuba M, Matsuoka N, Adachi T, Komiyama M, Mori C. (2004) Gene expression analysis of the rat testis after treatment with di(2-ethylhexyl) phthalate using cDNA microarray and real-time RT-PCR. *Toxicol Appl Pharmacol.* 200(2):103-10.

Stroheker T, Cabaton N, Nourdin G, Regnier JF, Lhuguenot JC, Chagnon MC. (2005) Evaluation of anti-androgenic activity of di-(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology.* 208(1):115-121.

Xu Y, Cook TJ, Knipp GT. Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and its metabolites on fatty acid homeostasis regulating proteins in rat placental HRP-1 trophoblast cells. *Toxicol Sci.* (in press).

Lee J, Park J, Jang B, Knudsen TB. (2004) Altered expression of genes related to zinc homeostasis in early mouse embryos exposed to di-2-ethylhexyl phthalate. *Toxicol Lett.* 152(1):1-10.

DBPに関連した情報

Mahood IK, Hallmark N, McKinnell C, Walker M, Fisher JS, Sharpe RM. (2005) Abnormal Leydig Cell Aggregation in the Fetal Testis of Rats Exposed to Di (n-Butyl) Phthalate and Its Possible Role in Testicular Dysgenesis. *Endocrinology.* 146(2):613-23.

Lehmann KP, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW. (2004) Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci.* 81(1):60-8.

Kim H, Kim T, Shin JH, Moon H, Kang I, Kim I, Oh J, Han S. (2004) Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (dbp) alters male reproductive-tract development. *J Toxicol Environ Health A.* 67(23-24):2045-60.

Barlow NJ, McIntyre BS, Foster PM. (2004) Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol.* 32(1):79-90.

Lee KY, Shibutani M, Takagi H, Kato N, 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(1-3):221-38.

Salazar V, Castillo C, Ariznavarreta C, Campon R, Tresguerras JA. (2004) Effect of oral intake of dibutyl phthalate on reproductive parameters of

Long Evans rats and pre-pubertal development of their offspring. *Toxicology*. 205(1-2):131-7.

Zhang Y, Jiang X, Chen B. (2004) Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reprod Toxicol*. 18(5):669-76.

BBPに関連した情報

Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG, Gray Jr LE. (2004) A Mixture of the "Antiandrogens" Linuron and Butyl Benzyl Phthalate Alters Sexual Differentiation of the Male Rat in a Cumulative Fashion. *Biol Reprod*. 71(6):1852-61.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Fail PA, Seely JC, Brine DR, Barter RA, Butala JH. (2004) Reproductive toxicity evaluation of dietary butyl benzyl phthalate (BBP) in rats. *Reprod Toxicol*. 18(2):241-64.

総説

Latini G, Verrotti A, De Felice C. (2004) DI-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*. 4(1):37-40.

Latini G, De Felice C, Verrotti A. (2004) Plasticizers, infant nutrition and reproductive health. *Reprod Toxicol*. 19(1):27-33.

Corton JC, Lapinskas PJ. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci*. 83(1):4-17.

環境省の報告

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-19.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-20.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-21.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-22.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-23.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-24.pdf>

<http://www.env.go.jp/chemi/end/speed98/speed98-25.pdf>

経済産業省の報告

<http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30701d46j.pdf>

<http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30701d45j.pdf>

<http://www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g30701d42j.pdf>

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol*. 78(4): 232-240, 2004.

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray, G.I., Curran, S. (Eds). *Laser Capture Microdissection and its Applications*. Methods Mol Biol. Totowa: Humana Press, pp. 11-25, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K.-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J Histochem Cytochem*. 52(7): 903-913, 2004.

Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Uneyama, C., Hirose, M.: Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology*. 203(1-3): 221-238, 2004.

Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Abe, N., Takagi, H., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology*. 208 (1): 35-48, 2005.

Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K.-Y., Masutomi, N., Fujita, H., Inoue, K., Mitsumori, K., Hirose, M.: Impact of maternal dietary exposure to endocrine-acting chemicals on progesterone receptor expression in microdissected hypothalamic medial preoptic areas of rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* in press.

Suzuki, M., Lee, H.-C., Chiba, S., Yonezawa, T., Nishihara, M.: Effects of methoxychlor exposure during perinatal period on reproductive function after maturation in rats. *J Reprod. Dev*. 50, 455-461, 2004.

鈴木正寿, 西原真杉: 脳の性分化における分子機構—グラニユリンの関わり—. *性差と医療* 2, 157-160, 2005.

Mitsunashi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Hayashi, S., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T., Fukushima, S.: Di-n-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. *J. Toxicol. Pathol*. 17, 177-185, 2004.

Tsutsumi, T., Ichihara, T., Kawabe, M., Yoshino, H., Asamoto, M., Suzuki, S., Shirai, T.: Renal toxicity induced by folic acid is associated with the enhancement of male

reproductive toxicity of di(n-butyl)phthalate in rats. *Reprod. Toxicol.*, 18: 35-42, 2004.

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

Andriana, B.B., Tay, T.W., Ishii, M., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M., Hayashi, Y.: An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goats in vitro. *J. Vet. Sci.* 5: 235-240, 2004.

Awal, M.A., Kurohmaru, M., Ishii, M., Andriana, B.B., Kanai, Y., Hayashi, Y.: Mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) induces spermatogenic cell apoptosis in guinea pig testes at prepubertal stage in vitro. *Int. J. Toxicol.* 23: 349-355, 2004.

Awal, M.A., Kurohmaru, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue & Cell.* in press

Yajima, H., Ikeshima, E., Shiraki, M., Kanaya, T., Fujiwara, D., Odai, H., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O., Oikawa, S., Kondo, K.: Isohumulones, bitter acids derived from hops, activate both peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) and reduce insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 279 33456-33462, 2004.

高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞: OECD化学物質対策の動向(第6報), 第14回OECD高生産量化学物質初期評価会議(2002年パリ), 化学生物総合管理学会誌, 1, 46-55, 2004.

高橋美加, 平田睦子, 松本真理子, 広瀬明彦, 鎌田栄一, 長谷川隆一, 江馬 眞: OECD 化学物質対策の動向(第5報), 衛研報告, 122, 37-42, 2004.

Hirose A, Hasegawa R, Nishikawa A, Takahashi M, Ema M.: Revision and establishment of Japanese drinking water quality guidelines for di(2-ethylhexyl) phthalate, toluene and vinyl chloride-differences from the latest WHO guideline drafts. *J. Toxicol. Sci.* 29, 535-539, 2004.

Fukui Y, Ema M., Fujiwara M, Higuchi H, Inouye M, Iwase T, Kihara T, Nishimura T, Oi A, Oshima Y, Otani H, Shinomiya M, Sugioka K, Yamano T, Yamashita KH, Tanimura T.: Comments from the Behavioral Teratology Committee of the Japanese Teratology Society on OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Proposal for a New Guideline 426, Developmental Neurotoxicity Study, Draft Document (September 2003). *Cong Anom.* 44,172-177, 2004.

2. 学会発表

Shibutani, M., Lee, K-Y., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Hirose, M.: Methacarn, a versatile fixation tool for quantitative mRNA expression analysis in microdissected

paraffin-embedded tissues using real-time RT-PCR and microarray systems. *IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts*: p158 (P-50), Kobe, February, 2004

Lee, K-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Hirose, M.: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to di(2-ethylhexyl)phthalate. *IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts*: p161 (P-53), Kobe, February, 2004

Shibutani, M., Lee, K-Y., Takagi, H., Kato, N., Takigami, N., Hirose, M.: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology (2004. 3. 21-25), Baltimore, Maryland, U.S.A., *Toxicol. Sci.* 73.

Lee, K-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, Sh., Hirose, M.: Dose-dependent global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to ethinylestradiol. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology (2004. 3. 21-25), Baltimore, Maryland, U.S.A., *Toxicol. Sci.* 73.

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 藤田春香, 瀧上 周, 広瀬雅雄: メタカーン固定法を利用したパラフィン包埋組織でのリアルタイム RT-PCR とマイクロアレイによる定量的遺伝子発現解析, 第137回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 第137回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-33, p 68, 4月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 瀧上 周, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol を周産期曝露したラット新生児の視床下部内側視索前野における網羅的遺伝子発現解析-用量依存性の検討-, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 プログラム・要旨集: O-15, p. 238, 7月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 井上 薫, 広瀬雅雄: ラットを用いたフタル酸ジブチルの妊娠後期・授乳期曝露による児動物の性分化障害評価, 第138回日本獣医学会学術集会, 札幌, 第138回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-54, p. 60, 9月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 井上 薫, 黒岩敬子, 広瀬雅雄: メタカーン固定パラフィン包埋組織の固定・脱水及び保存条件の検討, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p97 (P-92), 1月, 2005

高木 広憲, 渋谷 淳, 藤田 春香, 李 京烈, 井上 薫, 広瀬 雅雄: 内分泌かく乱化学物質の周産期曝露によるラット視床下部内側視索前野での progesterone receptor 発現の変化, 第21回日本毒性病理学会, 浜松,

第21回日本毒性病理学会講演要旨集:p48(W-2-3), 1月, 2005

渋谷 淳, 李 京烈, 高木 広憲: 分子病理学的手法を用いた毒性発現の分子標的の解析-内分泌かく乱化学物質による脳の性分化障害について-, 第139回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会, シンポジウム「生物化学の深化と獣医病理学研究への応用」, 和光, 第139回日本獣医学会学術集会講演要旨集:p109(B-SY-3), 3月31日, 2005

Lee, H-C., Yamanouchi, K., Nishihara, M.: Effects of perinatal exposure to DBP, DINP and DEHA on hypothalamic gene expression and sexual behavior in rats. IV Meeting of Society for Biology of Reproduction, Krakow, Poland, 2005

Ichihara, T., Tsutsumi, T., Kawabe, M., Yoshino, H., Asamoto, M., Suzuki, S., Shirai, T.: Renal toxicity induced by folic acid is directly responsible for the enhancement of male reproductive toxicity of di(n-butyl) phthalate in male rats. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p264 (P-156), Kobe, February, 2004

Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in prepubertal mice. 7th National Biology Symposium, Genting Highlands, Malaysia, May, 2004

Kurohmaru, M., Andriana, B. B., Tay, T. W., Awal, M. A., Ishii, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in some prepubertal laboratory animals in vivo and in vitro. Proceeding of the 20th meeting of the Korean Association for Laboratory Animal Science, Korea, June, 2004

Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) causes cell death in testes of prepubertal mice. 第138回日本獣医学会学術集会, 2004.9.11, 札幌

Andriana, B. B., Tay, T. W., Ishii, M., Choi, E. K., Kanai, Y., Suzuki, J. and Kurohmaru, M. Biochemical effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on the testicular tissue culture from adult monkey. 第139回日本獣医学会学術集会, 2005.3.29, 和光

Tay, T. W., Andriana, B. B., Ishii, M., Choi, E. K., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. Apoptosis in mono(2-ethylhexyl) phthalate-treated mice testes in vitro. 第139回日本獣医学会学術集会, 2005.3.29, 和光

Ema, M.: Decreased anogenital distance and increased incidence of undescended testes in fetuses of rats given monobenzyl phthalate, a major metabolite of butyl benzyl phthalate. Congress of the 5th Royan International Research Award, 2004

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書（平成16年度）

周産期暴露による影響評価研究

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨：フタル酸／アジピン酸エステル類の周産期暴露による影響評価として、妊娠ラットを用い、妊娠及び哺乳期間中に母ラットへの混餌による経口投与を行い、仔動物について離乳時及び性成熟後の内分泌・生殖器官の病理組織学的評価を行った。また脳の性分化影響について、脳の性分化臨界時期での視床下部における遺伝子発現解析を行った。16年度は15年度に引き続き、妊娠15日目から離乳時（出産後21日目）まで diisononyl phthalate (DINP) を 400, 4000, 20,000 ppm の用量での暴露評価を継続・終了し、更に同様のプロトコールで di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) について 480, 2400, 12,000 ppm 暴露の評価も行った。その結果、DINP では、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 と同様に殆ど可逆的であった。しかし一方で、雄での抗アンドロゲ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。また、その原因は不明であるが DBP と同様に離乳時の血清中 estradiol レベルの上昇は雌のホルモン環境への影響を示唆した。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、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。

フタル酸エステル類による脳の性分化影響については、15年度に ethinylestradiol (EE) と di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) のラット周産期暴露例で、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探索を行った結果、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 (GTPase Rab14, G 蛋白質 ($G\alpha_{12}$), myosine phosphatase 等) 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が示唆された。また、今年度これらの遺伝子の機能を詳細に検索した結果、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関わるものであり、EE 暴露例の雄でも発現低下を示していることから、EE 投与例と同様のテストステロン・サージの阻害による雄での性分化障害に関連する遺伝子である可能性が指摘された。今年度、real-time RT-PCR 解析により、これらの代表的な遺伝子のマイクロアレイでの発現レベルは検証された。

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、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 real-time RT-PCR 法により定量的に解析した結果、progesterone receptor (PR) の発現量が EE 暴露を受けた雌の他に、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 (MXC) 暴露の雌雄及び 20,000 ppm DINP 暴露雌で変動を示した。Genistein (GEN) は既存パラメーターでなんら影響を及ぼさない 1000 ppm においては、雌雄とも PR の発現量に影響を及ぼさなかった。以上より、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指標となり得る事が示された。

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料及び医療用具等の多くのプラスチック製品の可塑剤として広く利用され、特に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の使用量が多い。ヒトへの暴露として、特に、弁当類の製造過程での手袋からの溶出による DEHP の高濃度暴露が近年問題となり、diisononyl phthalate (DINP) に関しては、乳幼児の長時間に及ぶ mouthing 行動による玩具からの口腔内溶出による暴露が懸念されている。

フタル酸／アジピン酸エステルの毒性として現在問題になっているのは精巣毒性と生殖・発生毒性で

あり、その活性本体は加水分解代謝産物であるモノエステル体であると考えられている。その毒性発現の機序としては、アンドロゲン受容体との結合を介さない抗アンドロゲン作用による内分泌かく乱作用の存在や PPAR の subtype の関与が示唆されているものの、その分子的な証明は乏しい。また、精巣障害に関しては幼弱な時期で感受性の高いことが知られており、ヒト新生児では大人に見られるようなグルクロン酸抱合による解毒が未発達であることから、これらの解毒・排泄機構が成人のそれと異なる可能性がある。よって、脳の性分化の臨界期に暴露された場合、化学物質の内分泌かく乱作用の可能

性とは別に、未熟な精巣からのテストステロン・サージの阻害による脳の性分化障害が生じ、性成熟後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ンクイザルでは見られないとの報告があり、その毒性の感受性に種差の存在する可能性がある。更に、肝臓や腎臓の基礎疾患がある場合、フタル酸エステル類の体内動態に影響を与える可能性が高く、モノエステル体による影響の増強される可能性がある。

以上より、フタル酸/アジピン酸エステルによる毒性発現に関して、感受性の高い胎生期ないし新生児期や基礎疾患等による高感受性状態での暴露影響、及び霊長類で感受性が低い理由や受容体を介した分子メカニズム等については未解決な部分が多い。本分担研究では、それらのうち、胎生期ないし新生時期での暴露影響についてラットを用いた病理組織学的研究を実施してきた。昨年度は、DINPについて本実験を実施し、今年度、その病理組織学的検討を終了した。更に引き続いて、アジピン酸である di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) に関して評価を行った。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。

また、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 α 、ER β 、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 α 及び ER β 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ゲ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; McMahon 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。

B. 研究方法

周産期暴露影響評価として、被検物質を妊娠・授乳期ラットに投与し、仔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・経乳的に仔動物に暴露した。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 (Fig. 1)。被検物質投与のための基礎飼料は、大豆由来の phytoestrogen を除いた SF (NIH-07 変型) 飼料を用いた。離乳後は、通常の基礎飼料に切り替えて仔動物を飼育した。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。春期発動前の解剖は生後 21 日目に行った。残りの動物に対して春期発動 (包皮分離、陰開口) の日と体重を求め、生後 11 週目と 20 週目に解剖を行った。雌においては、解剖の 3 週間より陰スメ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、精巣、精巣上体、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。精巣はブアン固定を行い、他の臓器はホルマリン固定を行った。11 及び 20 週目には更に、前立腺、精囊 (+凝固腺)、下垂体の各重量をホルマリン固定後に測定した。次いで、これらの臓器に関して、HE 染色標本を作製して病理組織学的検索を行った。

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 の用量を餌に混じて行った (Fig. 2)。

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。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化影響に関して、15 年度に周産期暴露により性成熟後の生殖器傷害を生じさせることが知られている 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 で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 (Fig. 3)。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 μ m) を対象とした (Fig. 4)。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 (Fig. 3)。

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 Gna12 (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-FAMTM-dye-labeled) は Assays-on-DemandTM 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 1st round aRNAs から 100 ng を用いて High-capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) により 100 μ l の反应用量で行った。Real-time PCR は TaqMan probe detection system を用いて、50 μ l の反应用量 (25 μ l TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2.5 μ l target primer mix, 2.5 μ l 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 μ l の反应用量 (25 μ l 2x QuantiTectTM SYBR[®] Green PCR Master Mix (QIAGEN GmbH), 8 ng 1st 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'-CTCTAGGCCCAAAACGACCTT-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

に換算し、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に混じて妊娠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に混じ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(Table 1)。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(Table 1)。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(Fig. 5)、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 α , ER β , 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 β 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 β で54°C, PRで53°C)。TaqMan probe及びTaqMan MGB probe システムにおいては、ER α , 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)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

周産期暴露評価研究のうち、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(Table 3)。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。春期発動の時期は、雌雄とも20,000 ppmで遅延したが、雌での8-11週齢時、17-20週齢時での膣スミアの観察による性周期回帰に投与に起因した異常は認められなかった(Table 4)。生後11週の解剖時、体重

は雄で 400 ppm 以上で低値傾向を示し、4000 ppm 以上で有意であった (Table 5)。雌では、体重変動に明らかな用量依存性はなく、20,000 ppm のみで体重の低値を示した。臓器相対重量では、雄では精巣が 4000 ppm 以上で高値を示し、脳は 2000 ppm で高値を示した。雌では 2000 ppm で肝臓が若干の低値を示した他、脳、下垂体が高値を示した。生後 20 週においても、雄の体重の用量依存的な低値傾向が明らかで 20,000 ppm 用量において有意であった (Table 5)。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 (Table 6)。20 細胞以上の数のライディッシュ細胞の集塊は 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リングの減少が 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。腎臓では髓質集合管の拡張 (一部巨細胞の出現) を 20,000 ppm で認め、髓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、腎髓質集合管の拡張は 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 ; Table 6)。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 (Table 7)。妊娠期間、出生仔数、出生仔の性比に投与による影響は認められなかった。出生仔の生後 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 (Table 8)。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 (Table 9)。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 (Table 10)。20 細胞以上の数のライディッシュ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 とともに増加を

示し、雌では estradiol が 4000 ppm 以上で用量依存的に増加を示した (Fig. 6)。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, G α i2, 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 (Fig. 7)。また、DEHP 暴露例においても Rab14, Scn3a とともにマイクロアレイと real-time RT-PCR の結果はほぼパラレルであった (Fig. 8)。

MPOA における脳の性分化関連遺伝子の発現解析では、ER α と PR の mRNA 発現量は性差を示した (Fig. 9)。雌においては ER α 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。ER β , 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, Fig. 9)。雌においては、ER β 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。ER α , 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、ER α , ER β , 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

(Fig. 10)。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 ER α , ER β , 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 (Fig. 11)。ER β 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 α 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 α , ER β , PR, SRC-1 の発現量の変化は認められなかった (Fig. 12)。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 (Fig. 13)。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。

D. 考察

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の変化を誘発することが報告されている(Lovekamp-Swan and Davis, 2003)。DEHP の活性代謝産物である MEHP は、卵巣の顆粒膜細胞に対して peroxisome proliferator-activated receptor を活性化することにより、cAMP を低下させてエストロゲン合成を直接に阻害することが報告されている(Lovekamp and Davis, 2001; Lovekamp-Swan and Davis, 2003; Lovekamp-Swan et al., 2003)。DEHP は更に 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type IV を誘導して estradiol の代謝を促進することが報告されている(Fan et al., 1998)。以上より、フタル酸エステル類は雌のエストロゲンの作用に対して複数のポイントで影響を及ぼす可能性がある。しかしながら、発達期

のラット卵巣は少なくとも生後 24 日までの間は estradiol を合成できないので(Csernus, 1986)、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つ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)。昨年の我々の 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 α i2 はシナプス末端に広く分布し、ドパミン受容体、 μ 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、エストロゲン受容体を介さないエストロゲ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、 μ 2 はシナプスの vesicular trafficking に機能し、エストロゲ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 α と PR の発現量の性差 (PR: Quadros et al., 2002a,b; ER α : 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 β 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ゲ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 α 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 α 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ゲ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ゲン受容体 (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 α 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 におけるエストロゲ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 α に対してはアゴニストとして作用し、ER β 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 α 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 β 及びER α 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ゲンによるER β 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EDCs(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 β 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 β 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、フタレート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し(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。

E. 結論

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。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。

参考文献

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-Garcas, 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 β -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 α and β . *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 α and β , 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 progesterone 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 α and PPAR γ 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., Macluskay, 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 β 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 α expression. *J. Neurobiol.* 47, 176–182.

Werny, 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 β -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 α 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 α immunoreactivity in the preoptic brain, the diencephalon, and the amygdala in the rat. *J. Comp. Neurol.* 389, 81–93.

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch Toxicol.* 78(4): 232–240, 2004.

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: Murray, G.I., Curran, S. (Eds). *Laser Capture Microdissection and its Applications. Methods Mol Biol.* Totowa: Humana Press, pp. 11–25, 2004.

Takagi, H., Shibutani, M., Kato, N., Fujita, H., Lee, K.-Y., Takigami, S., Mitsumori, K., Hirose, M.: Microdissected region-specific gene expression analysis with methacarn-fixed paraffin-embedded tissues by real-time RT-PCR. *J Histochem Cytochem.* 52(7): 903–913, 2004.

Lee, K.-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Uneyama, C., Hirose, M.: Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology.* 203(1–3): 221–238, 2004.

Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Abe, N., Takagi, H., Lee, K.-Y., Hirose, M.: Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology.* 208 (1): 35–48, 2005.

Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K.-Y., Masutomi, N., Fujita, H., Inoue, K., Mitsumori, K., Hirose, M.: Impact of maternal dietary exposure to endocrine-acting chemicals on progesterone receptor expression in microdissected hypothalamic medial preoptic areas of rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* in press.

2. 学会発表

Shibutani, M., Lee, K-Y., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Hirose, M.: Methacarn, a versatile fixation tool for quantitative mRNA expression analysis in microdissected paraffin-embedded tissues using real-time RT-PCR and microarray systems. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p158 (P-50), Kobe, February, 2004

Lee, K-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, S., Hirose, M.: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to di(2-ethylhexyl)phthalate. IFSTP-JSTP Joint Meeting, Program and Abstracts: p161 (P-53), Kobe, February, 2004

Shibutani, M., Lee, K-Y., Takagi, H., Kato, N., Takigami, N., Hirose, M.: Region-specific global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide, 43th Annual Meeting of Society of Toxicology (2004. 3. 21-25), Baltimore, Maryland, U.S.A., Toxicol. Sci. 73.

Lee, K-Y., Shibutani, M., Takagi, H., Kato, N., Takigami, Sh., Hirose, M.: Dose-dependent global gene expression analysis in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat neonates exposed perinatally to ethinylestradiol. 43th Annual Meeting of Society of Toxicology (2004. 3. 21-25), Baltimore, Maryland, U.S.A., Toxicol. Sci. 73.

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 藤田春香, 瀧上 周, 広瀬雅雄: メタカーン固定法を利用したパラフィン包埋組織でのリアルタイム RT-PCR とマイクロアレイによる定量的遺伝子発現解析, 第137回日本獣医学会学術集会, 藤沢, 第137回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-33, p 68, 4月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 瀧上周, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol を周産期曝露したラット新生児の視床下部内側視索前野における網羅的遺伝子発現解析- 用量依存性の検討-, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会, 大阪, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 プログラム・要旨集: O-15, p.238, 7月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 高木広憲, 加藤奈津美, 井上薫, 広瀬雅雄: ラットを用いたフタル酸ジブチルの妊娠後期・授乳期曝露による児動物の性分化障害評価, 第138回日本獣医学会学術集会, 札幌, 第138回日本獣医学会学術集会講演要旨集: B-54, p. 60, 9月, 2004

渋谷 淳, 李 京烈, 井上 薫, 黒岩敬子, 広瀬雅雄: メタカーン固定パラフィン包埋組織の固定・脱水及び保存条件の検討, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p97 (P-92), 1月, 2005

高木 広憲, 渋谷 淳, 藤田 春香, 李 京烈, 井上薫, 広瀬 雅雄: 内分泌かく乱化学物質の周産期曝露によるラット視床下部内側視索前野での progesterone receptor 発現の変化, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p48 (W-2-3), 1月, 2005

渋谷 淳, 李 京烈, 高木 広憲: 分子病理学的手法を用いた毒性発現の分子標的の解析- 内分泌かく乱化学物質による脳の性分化障害について-, 第139回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会, シンポジウム「生物化学の深化と獣医病理学研究への応用」, 和光, 第139回日本獣医学会学術集会講演要旨集: p109 (B-SY-3), 3月31日, 2005

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

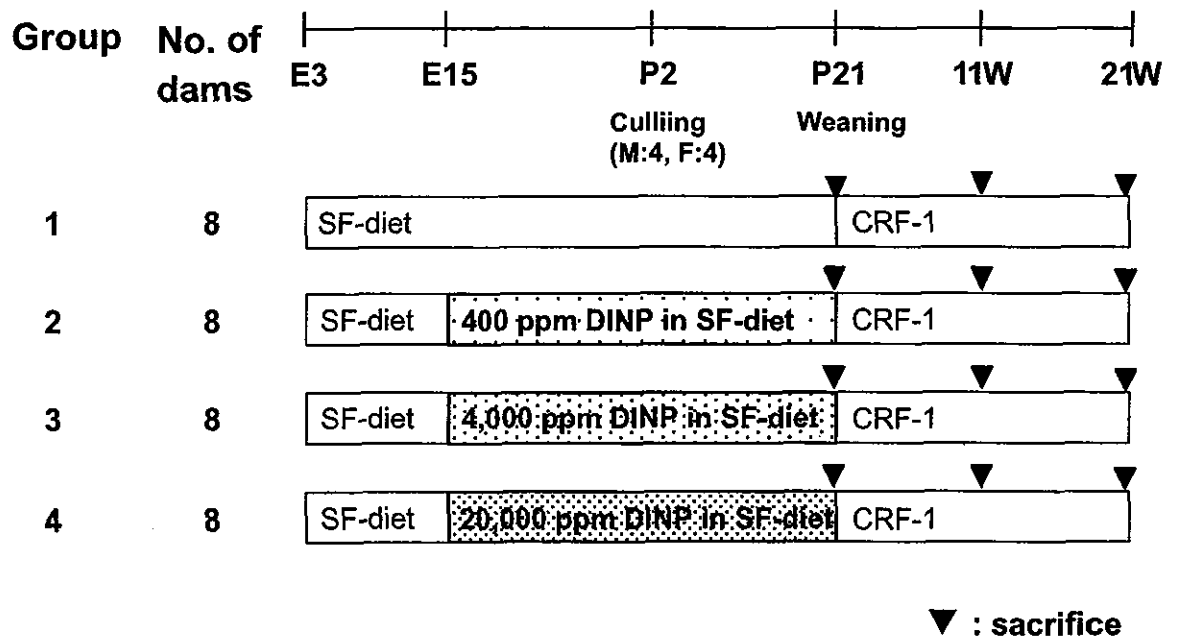
なし

2. 実用新案登録

なし

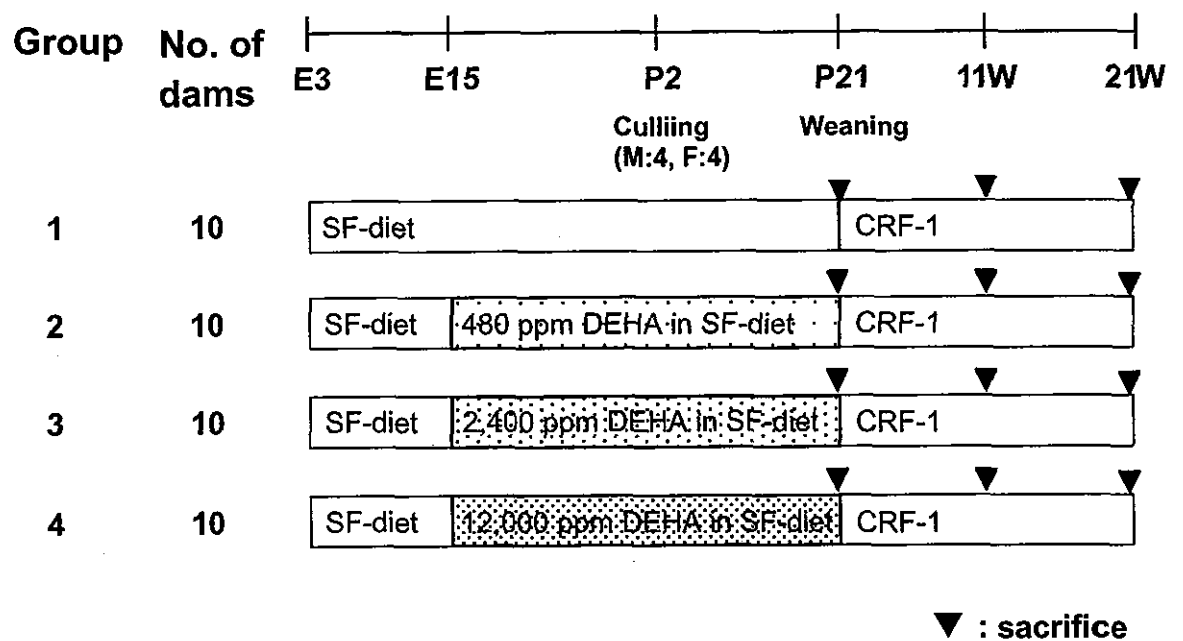
3. その他

なし



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

Fig. 1
Experimental design of DINP Study



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

Fig. 2
Experimental design of DEHA Study

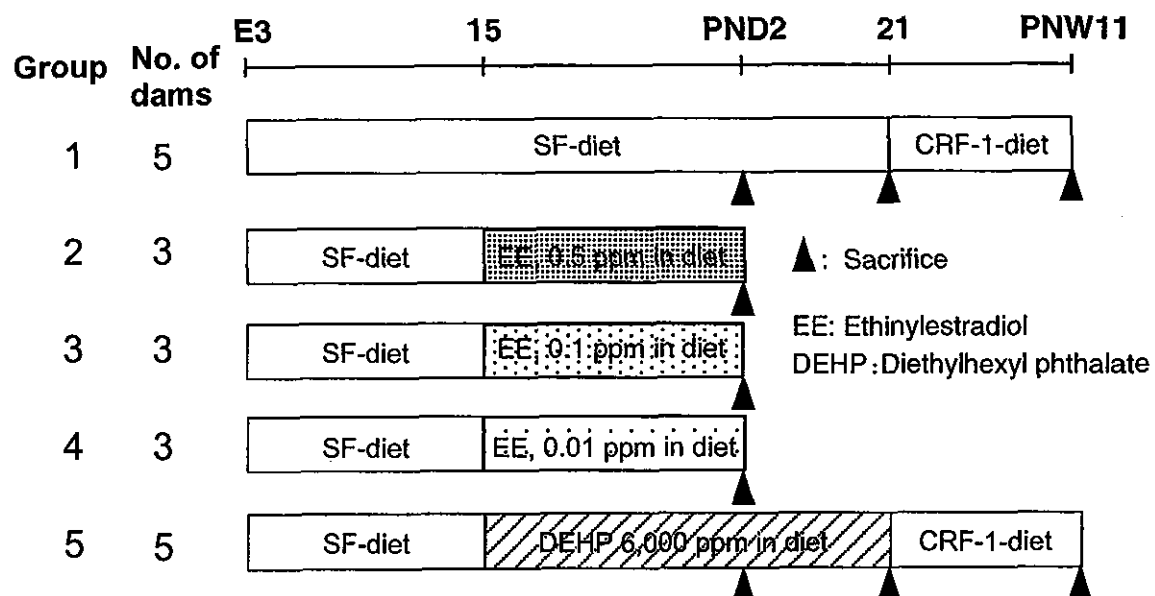


Fig. 3
Animal studies for global gene expression profiling for disruption of the brain sexual differentiation.