

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する調査研究
分担研究報告書（平成16年度）

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

研究要旨：本研究は、周生期におけるフタル酸／アジピン酸エステル類の暴露が脳の性分化へどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的としたものである。具体的には、妊娠・哺乳期の母ラットにフタル酸／アジピン酸エステル類を経口的に摂取させ、新生ラットの視床下部における性分化関連遺伝子の発現および性成熟後の生殖内分泌系や性行動への影響を解析する。本年度においては、Wistar-Imamichi 系ラットを用いて、di-ethylhexyl adipate (DEHA) を 480 ppm、2400 ppm、1,2000 ppm 含有する餌を妊娠 15 日目から産後 21 日目まで与え、その影響を検討した。その結果、DEHA は新生子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グラニューリン遺伝子や p130 遺伝子の視床下部における発現を低下させた。しかし、その効果に特に用量依存性は見られなかった。成熟後、雄ラットでは性腺刺激ホルモン濃度に有意な変化はなかった。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 480 ppm 投与群で性行動の低下が認められ、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。以上の結果より、DEHA は周生期における中枢に対する性ステロイドの作用に影響を及ぼすことが示唆された。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 は脳においては雌型性行動の発現に関与する神経機構に限定的な作用を及ぼしていることが考えられた。

A. 研究目的

成熟した哺乳動物に見られる性行動の発現パターンや性腺刺激ホルモンの分泌パターンなどの雄雌差は、脳の機能的・形態的な雌雄差に基づいて発現する。このような脳の性分化は、発生過程の特定の時期（臨界期）に脳がアンドロジェンに暴露されることにより起こる。例えば、ラットの場合、出生後数日の特定の時期に精巣から分泌されるアンドロジェンが脳内で芳香化酵素によりエストロジェンへと代謝され、未分化な脳に作用して雄型に分化誘導すると考えられている。我々は従来の研究により、グラニューリン遺伝子や p130 遺伝子が新生子の視床下部において性ステロイドにより発現誘導され、脳の性分化に関与することを示唆している。本研究は、母体がフタル酸／アジピン酸エステル類を摂取した場合、新生子の脳の性分化の過程や、性成熟後の性行動などにどのような影響を与えるかを解明すること目的

としている。平成 16 年度では、di-ethylhexyl adipate (DEHA) を段階的な濃度で妊娠・哺乳ラットに混餌摂取させ、新生子の血中性ステロイドレベルや視床下部における性分化関連遺伝子の発現、および性成熟後の性行動等を解析した。

B. 研究方法

実験には Wistar-Imamichi 系ラットを用いた。妊娠 15 日目から産後 21 日目（離乳時）まで phytoestrogen を含まないの粉末飼料 (SF) に 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 g、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

もに視床下部を摘出した。視床下部からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法によりグラニューリンおよび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。なお、これらの研究を行うに当たっては、東京大学農学部動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を得た上で実施した。

C. 研究結果

生後7日齢の雌雄ラットの血清中テストステロン（図1）およびエストラジオール濃度（図2）には、DEHA投与によっても変化はなかった。視床下部におけるグラニューリン遺伝子の発現（図3）は雄で、またp130遺伝子の発現（図4）は雌で低下が見られた。性成熟後の雄におけるLH（図5）、FSH（図6）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（図7、図8）に変化は認められず、性周期も正常に回帰していた（図10）。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（図9）、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（図10）。

D. 考察

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樞作用を修飾しうることを示唆している。

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。

E. 結論

DEHAの周産期暴露は、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。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

鈴木正寿, 西原真杉 (2005) 脳の性分化における分子機構—グラニューリンの関わり—。性差と医療 2, 157-160.

2. 学会発表

Lee HC, Yamanouchi K, Nishihara M (2005) 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.

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

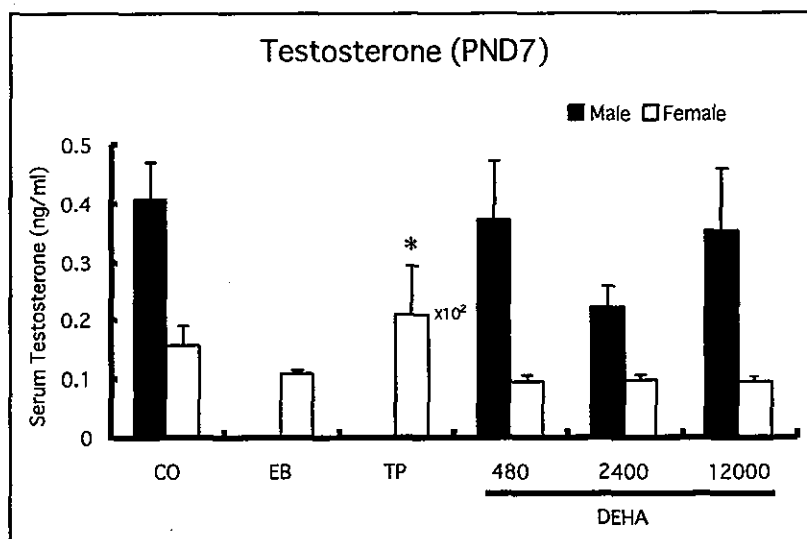


図1. 7日齢ラットの血清中testosterone濃度に対する性ステロイドおよびDEHAの影響. * : $p < 0.05$ vs. CO

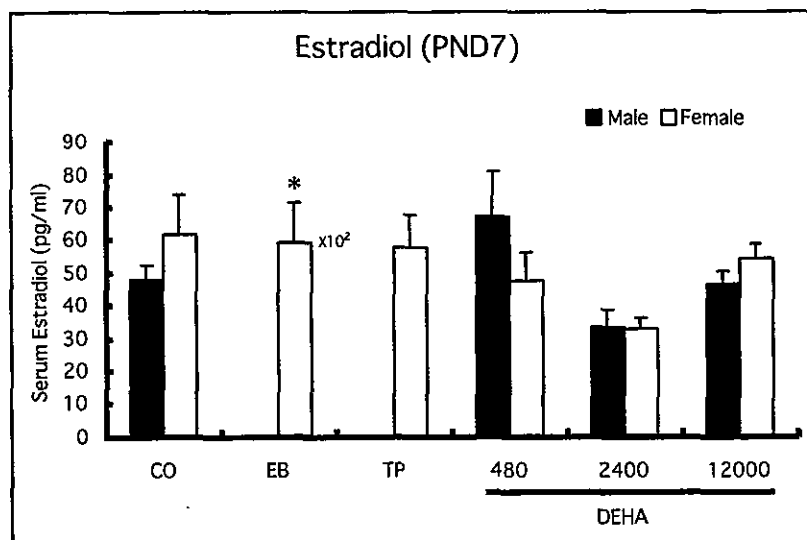


図2. 7日齢ラットの血清中estradiol濃度に対する性ステロイドおよびDEHAの影響. * : $p < 0.05$ vs. CO

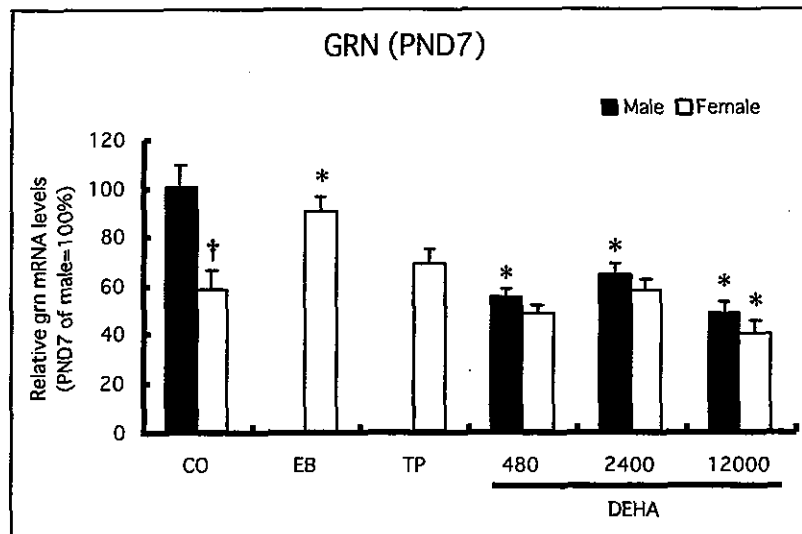


図3. 7日齢ラットの視床下部 granulin (grn) 遺伝子発現に対する性ステロイドおよびDEHAの影響。
† : $p < 0.05$ male vs. female, * : $p < 0.05$ vs. CO

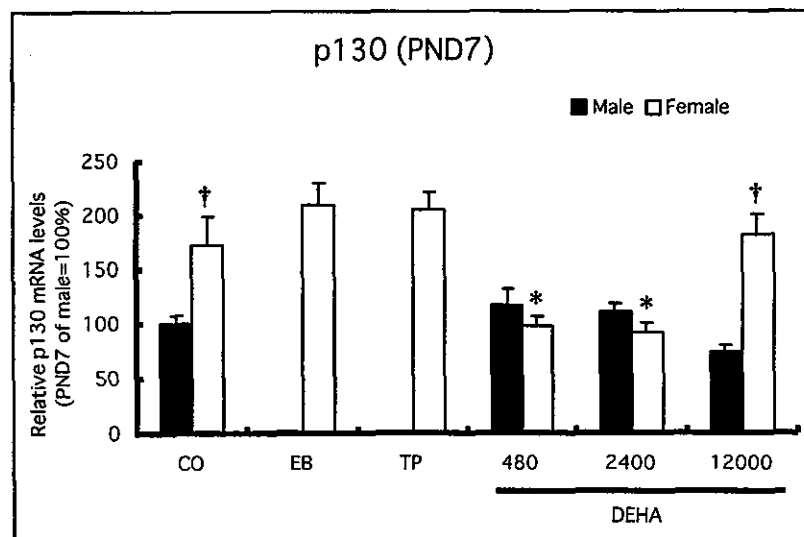


図4. 7日齢ラットの視床下部 p130 遺伝子発現に対する性ステロイドおよびDEHAの影響。
† : $p < 0.05$ male vs. female, * : $p < 0.05$ vs. CO

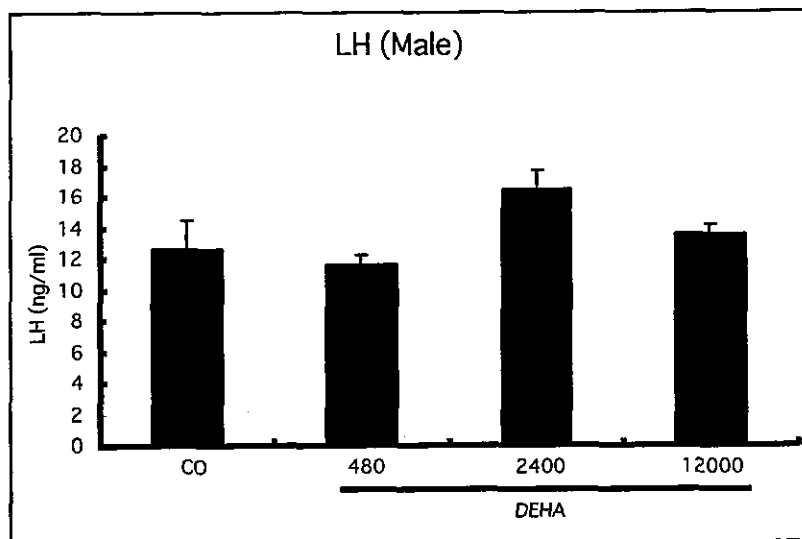


図5. 21週齢雄ラットの血清中LH濃度に対するDEHAの影響.

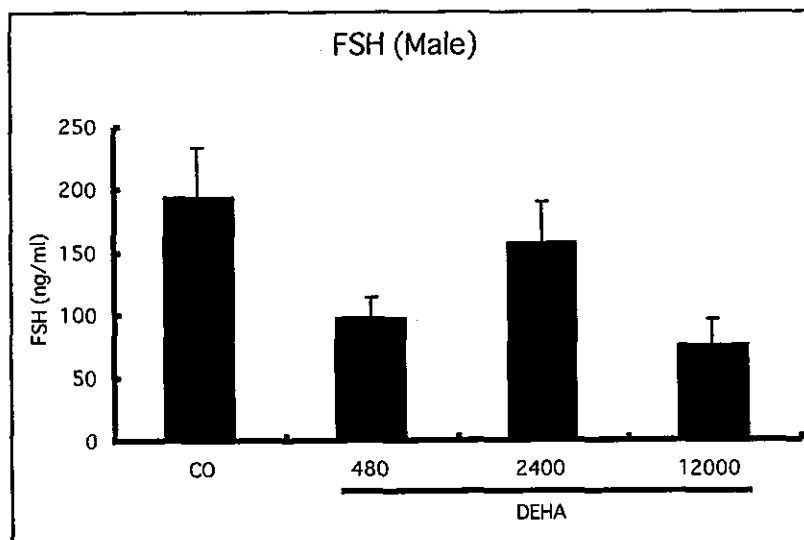


図6. 21週齢雄ラットの血清中FSH濃度に対するDEHAの影響.

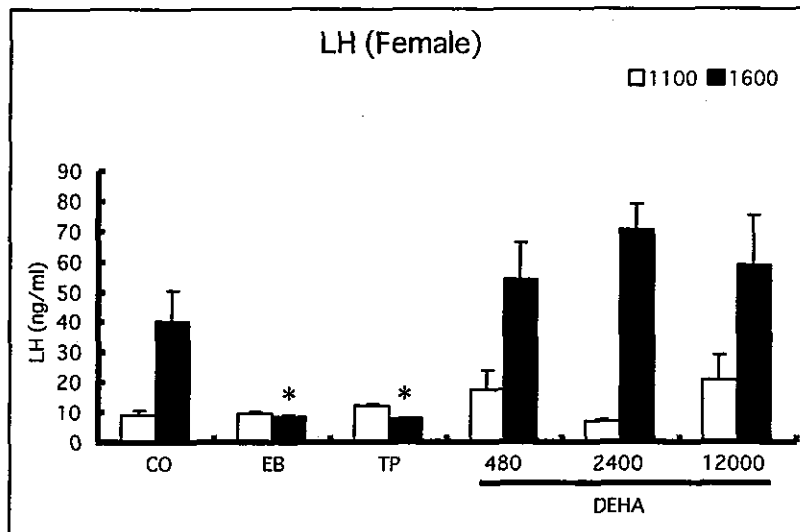


図7. 21週齢雌ラットの血清中LH濃度に対するDEHAの影響.
* : $p < 0.05$ vs. CO

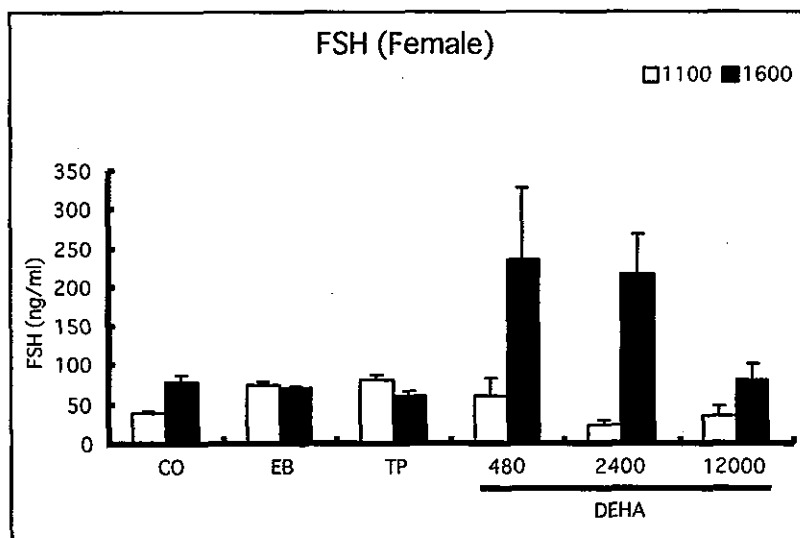


図8. 21週齢雌ラットの血清中FSH濃度に対するDEHAの影響.

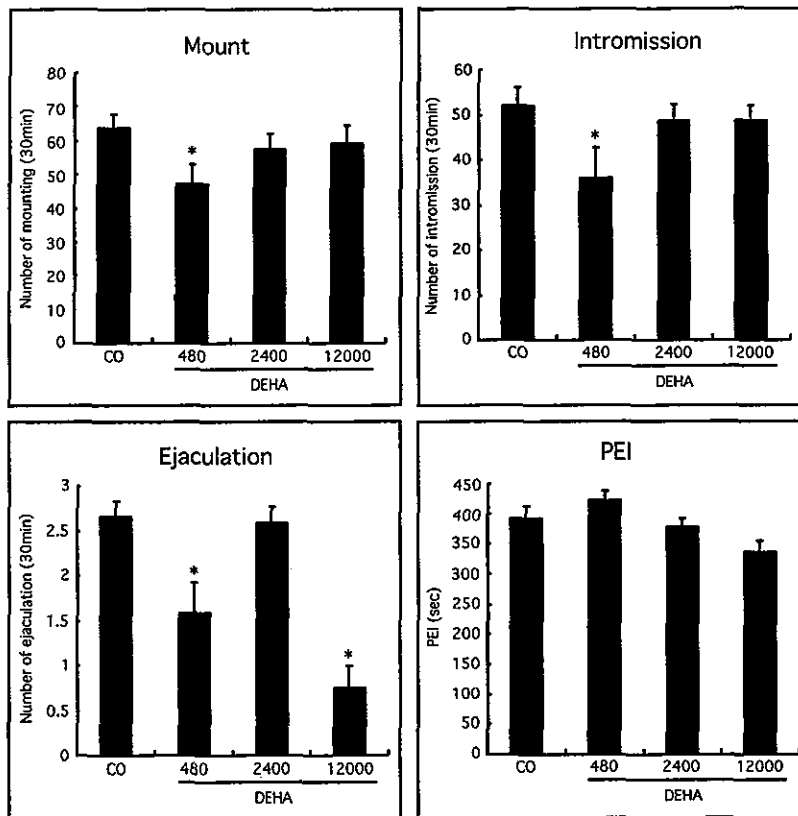


図9. 11週齢雄ラットの性行動に対するDEHAの影響。
* : $p < 0.05$ vs. CO

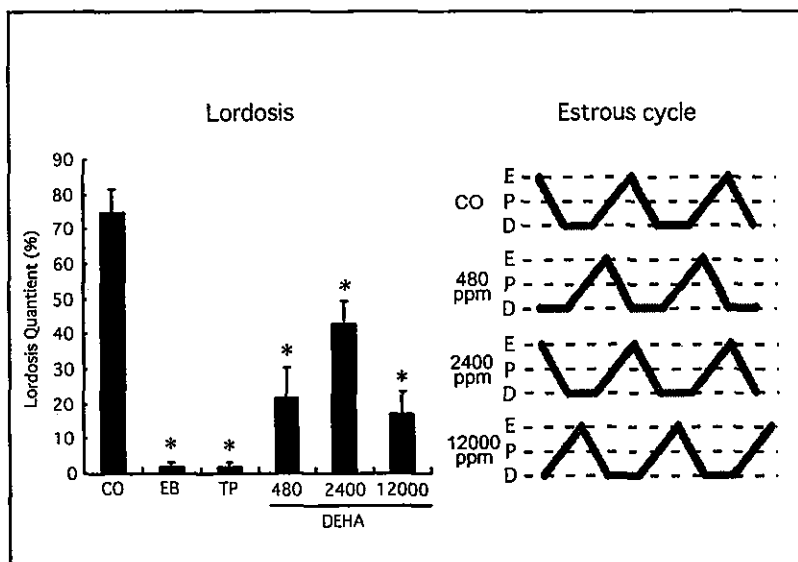


図10. 11週齢雌ラットのロードーシス反射の出現及び性周期に対するDEHAの影響 * : $p < 0.05$ vs. CO

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）

肝基礎疾患による修飾作用

分担研究者 福島 昭治
大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学 教授

研究要旨：雄性 F344 ラットに thioacetamide (TAA)を投与し肝障害を誘発した後、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)と di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA)を 6000 と 25000 ppm の用量で混餌投与した。その結果、DEHP 高用量で精子数や精子運動率は減少傾向が、精子奇形率では増加傾向があり、精巣組織学的検索でその毒性を認めた。また、TAA による肝障害を誘発した後、DEHP を混餌投与した結果、TAA と DEHP 高用量を受けた群では TAA 対照群と DEHP 高用量のみの群と比較して精子数、精子運動率の有意な減少が、精子奇形率では有意な増加が見られた。また、TAA と DEHP 高用量を投与した群は TAA 対照群と 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、精巣上体では TAA 対照群と比較して有意な減少が見られた。さらに、病理組織学的に TAA と DEHP 高用量を受けた群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。以上、肝障害状態では DEHP 高用量の投与によって雄生殖毒性が増強することが判明した。

A. 研究目的

フタル酸／アジピン酸エステル類の高濃度曝露が近年問題となっており、その精巣毒性、生殖・発生毒性が懸念されている。フタル酸エステルは腓リパーゼによってモノエステル体に加水分解され、さらに肝臓で酸化を受けた後、尿中に排泄されることが知られている。この物質の雄性生殖機能への毒性に及ぼす肝障害による修飾作用は未だ報告が少ない。そこで thioacetamide (TAA)で肝障害を誘発されたラットにおいて、di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)、di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA)の雄性生殖器への毒性作用の増強について検討した。

B. 研究方法

6 週齢雄性 F344 ラット 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 回腹腔内投与を行い、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 25000 ppm, 第 2, 7 群は 6000 ppm, 第 3, 8 群は DEHA 25000 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。

（倫理面への配慮） 大阪市立大学の動物飼育施設における動物実験取扱い規約に基づき、動物を飼育した。屠殺は動物に苦痛を与えないためにエーテル麻酔下にて実施した。

C. 研究結果

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 (Table 1)。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は見られなかった。

D. 考察

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攪乱物質についての検索に活用されることが期待される。

E. 結論

ラットを用いた実験により 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 は精巣毒性を発揮しないことが判明した。

F. 研究発表

1. 論文発表

Mitsubishi, M., Morimura, K., Wanibuchi, H., Hayashi, S., Kiyota, A., Wada, S., Nakatani, T. and 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.

Seike, N., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nishikawa, T., Hirata, K., Yoshikawa, J. and Fukushima, S.: Enhancement of lung carcinogenesis by nonylphenol and genistein in a F344 rat multiorgan carcinogenesis model. Cancer Lett., 192, 25-36, 2003.

Shen, J., Wanibuchi, H., Salim, E.I., Wei, M., Kinoshita, A., Yoshida, K., Endo, G. and Fukushima, S.: Liver tumorigenicity of trimethylarsine oxide in male Fischer 344 rats-association with oxidative DNA damage and enhanced cell proliferation. Carcinogenesis, 24, 1827-1835, 2003.

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

Table 1. Sperm number, movement ability and morphology abnormality in rats treated with DEHP or DEHA

Group	TAA	Chemical and dose (ppm)	Number ($\times 10^7$ /ml)	Movement ability (%)		Morphology abnormality (%)	
			Epididymis	5 min			
1	+	DEHP 25000	0.465 $\pm$ 0.574 ^{a, b}	25.83 $\pm$ 40.23 ^{a, b}		32.83 $\pm$ 35.74 ^{a, b}	
2	+	DEHP 6000	2.608 $\pm$ 0.457	84.85 $\pm$ 5.14		2.83 $\pm$ 2.52	
3	+	DEHA 25000	2.434 $\pm$ 0.358	88.74 $\pm$ 8.67		3.00 $\pm$ 1.46	
4	+	DEHA 6000	2.355 $\pm$ 0.312	93.23 $\pm$ 1.97		2.17 $\pm$ 2.25	
5	+	0	2.236 $\pm$ 0.717	84.82 $\pm$ 8.37		3.75 $\pm$ 2.73	
6	-	DEHP 25000	1.773 $\pm$ 0.929	77.52 $\pm$ 14.30		4.17 $\pm$ 2.91	
7	-	DEHP 6000	2.999 $\pm$ 0.414	91.55 $\pm$ 5.21		2.92 $\pm$ 1.66	
8	-	DEHA 25000	2.792 $\pm$ 0.752	83.04 $\pm$ 17.52		2.50 $\pm$ 1.55	
9	-	DEHA 6000	2.811 $\pm$ 0.800	82.92 $\pm$ 13.07		2.00 $\pm$ 1.14	
10	-	0	2.769 $\pm$ 0.584	87.93 $\pm$ 5.35		2.00 $\pm$ 1.34	

Data represent mean $\pm$ SD

^aSignificantly different from group 5 at $p < 0.01$

^bSignificantly different from group 6 at $p < 0.01$

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

腎基礎疾患による内分泌かく乱作用の修飾に関する研究

分担研究者 白井 智之 名古屋市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨 F344 雄 5 週令ラットに葉酸を皮下投与し、腎障害を起こしたあと di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) と di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) をそれぞれ 0, 6000, 25000 ppm で飼料に混じて 4 週間連続投与する全経過 9 週の実験を行った。対照群には葉酸を投与せず DEHA と DEHP を 3 用量で投与した。その結果、腎障害群では 25000 ppm DEHP によって精巣重量の著明な減少と精細管の萎縮や荒廃あるいは精子母細胞や精子細胞の消失がみとめられ、精子数や精子運動能が明らかに低下した。これらの変化は葉酸非投与群では観察されなかった。DEHA ではいずれの群においても精巣毒性は見られなかった。以上葉酸投与による腎障害が DEHP の雄性生殖器障害を増強することが明らかとなった。血中や精巣中の DEHP のモノ体は腎障害によって有意に上昇し、逆に尿中のモノ体が減少しており、これが腎障害による精巣毒性増強につながったものと推察される。

A. 研究目的

ほとんどの個体を用いた毒性発現の研究は正常の動物を用い、リスクの同定およびリスク評価を行い、毒性の特徴、強度をもとに NOEL や NOAEL などが決定されている。ヒトにおけるリスクを評価する場合、幼少期、若齢期など年齢要因は良く検討されている課題であるが、病的状態での評価はほとんどされていない。内分泌かく乱作用におけるリスク評価において腎臓や肝臓機能の低下状態での検討は重要であるが、これまではつきり行われてきていない。本研究では内分泌かく乱作用物質の雄性生殖器に対する毒性が、腎機能が低下した状態で如何に修飾を受けるかについて平成 14 年・15 年の研究に引き続いてラットを用いて追究することを目的としている。

B. 研究方法

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（図 1）。これにより両側腎臓に慢性腎症（間質性腎炎）が発症することは平成 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 di(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) と di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) をそれぞれ 0, 6000 ppm, 25000 ppm の濃度で混じて 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 25000 ppm、4 群は DEHP 6000 ppm、5 群は DEHP 25000 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を作製した。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。また屠殺週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。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験指針を遵守して行い、動物愛護を十分配慮して行った。

C. 研究結果

葉酸投与による軽微な体重増加抑制が見られたほか（図 1）、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（図 2）。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細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（表 1）、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（表 1）。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（表 1）。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（表 2）、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（図 4、5）、および異常形態精子が有意に増加していた（図 6）。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（図 7）。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腹腔内に認めた。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 のモノ体が腎障害下で有意に上昇すること、逆に尿中のモノ体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）。

D. 考察

葉酸投与によって腎障害を発生させた状態では平成 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体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。

E. 結論

葉酸による腎機能抑制状態は DEHP の精巣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巣中のモノ体の増量が示唆された。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

Hikosaka, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Kato, K., Kuzutani, K., Kohri, K., Shirai, T. Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis*, 25: 381-387, 2004.

Inaguma, S., Takahashi, S., Imaida, K., Suzuki,

S., Shirai, T. p-Nonylphenol pretreatment during the late neonatal period has no effect on 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl-induced prostate carcinogenesis in male F344 rats. *Cancer Lett.*, 212: 159-166, 2004.

Ichihara, T., Miyashita, K., Kawabe, M., Imaida, K., Asamoto, M., Ogiso, T., Tamano, S., Hirose, M., Shirai, T. Lack of combination hepatocarcinogenicity of harman, norharman and amitrole when given with NaNO₂ in the rat. *J. Toxicol. Sci.*, 30: 1-6, 2005.

Kawabe, M., Ichihara, T., Sano, M., Hagiwara A., Tamano, S., Ogawa, K., Shirai, T. Lack of Carcinogenicity of Silicone Resin (KS66) in F344 RATS. *Food Chem. Toxicol.*, in press.

2. 学会発表

栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、白井智之、薬物代謝酵素 CYP1A2 誘導物質である caffeine による MeIQx 肝発がんの修飾作用、第 63 回日本癌学会学術総会、福岡、2004 年 9 月。

外岩戸尚美、朝元誠人、小川久美子、鈴木周五、高橋智、白井智之、変異コネクシン 32 トランスジェニックラットの DEN およびフェノバルビタールによる肝発がんに対する感受性、第 19 回発癌病理研究会、長野、2004 年 8 月。

白井智之、彦坂敦也、外岩戸尚美、加藤浩司、小川久美子、朝元誠人、大豆イソフラボン抽出物の 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)誘発ラット前立腺癌に対する抑制効果、第 11 回日本がん予防研究会・第 27 回日本がん疫学研究会、東京、2004 年 7 月。

栗林正伯、朝元誠人、鈴木周五、外岩戸尚美、
高橋智、白井智之、薬物代謝酵素 CYP1A2
誘導物質である caffeine による MeIQx 肝発がんの修飾作用、第 11 回日本がん予防研究会・第 27 回日本がん疫学研究会、東京、2004 年 7 月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図1.

実験計画

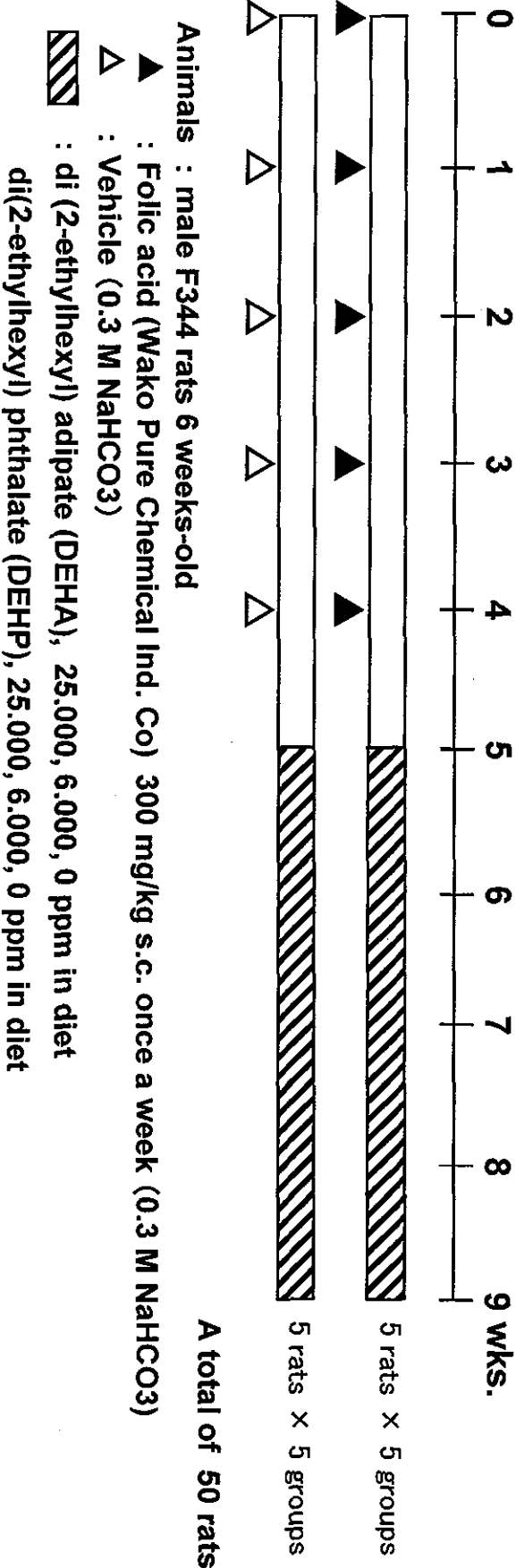
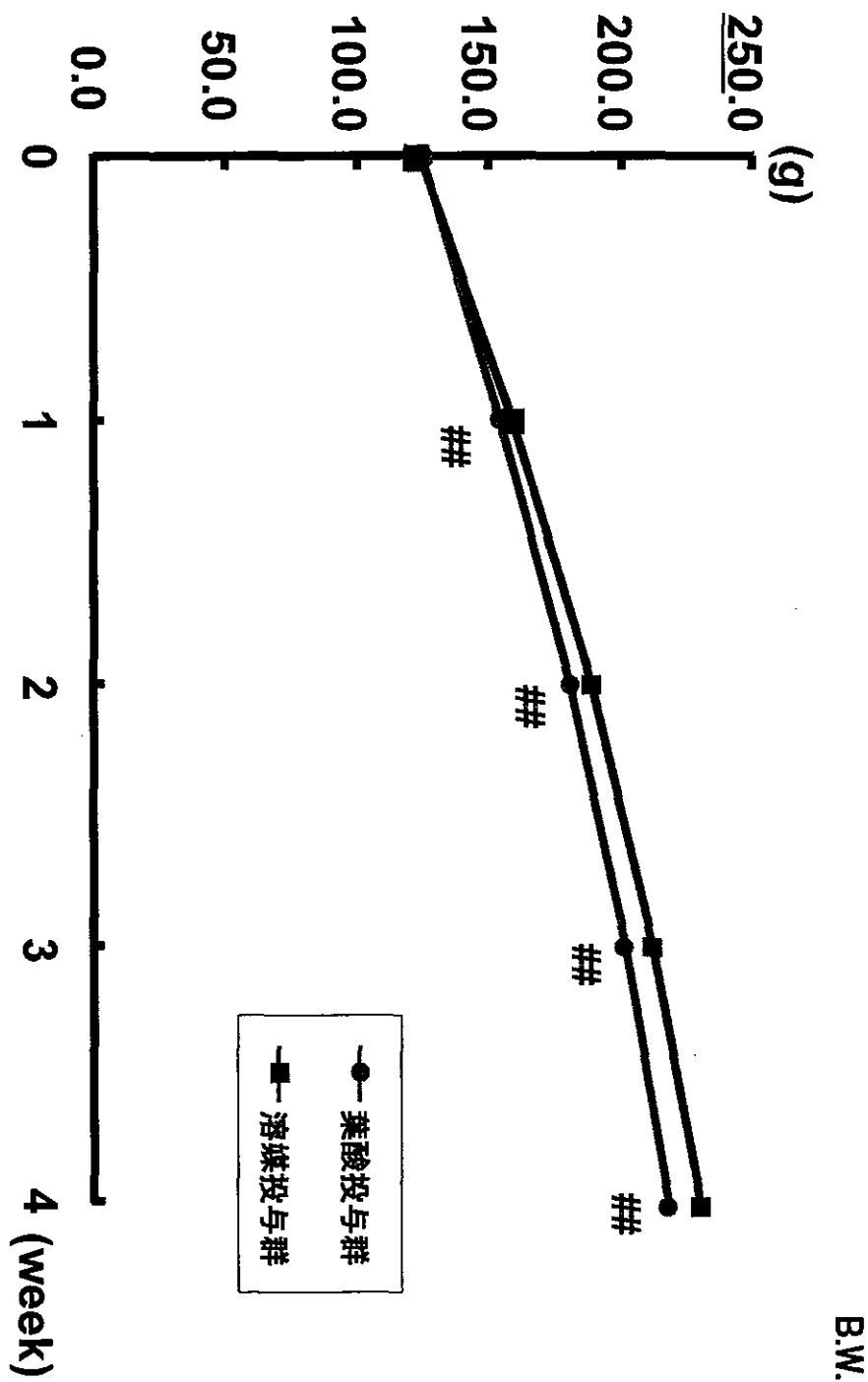


図2.



葉酸投与による体重増加抑制

図3.

体重曲線

B.W.

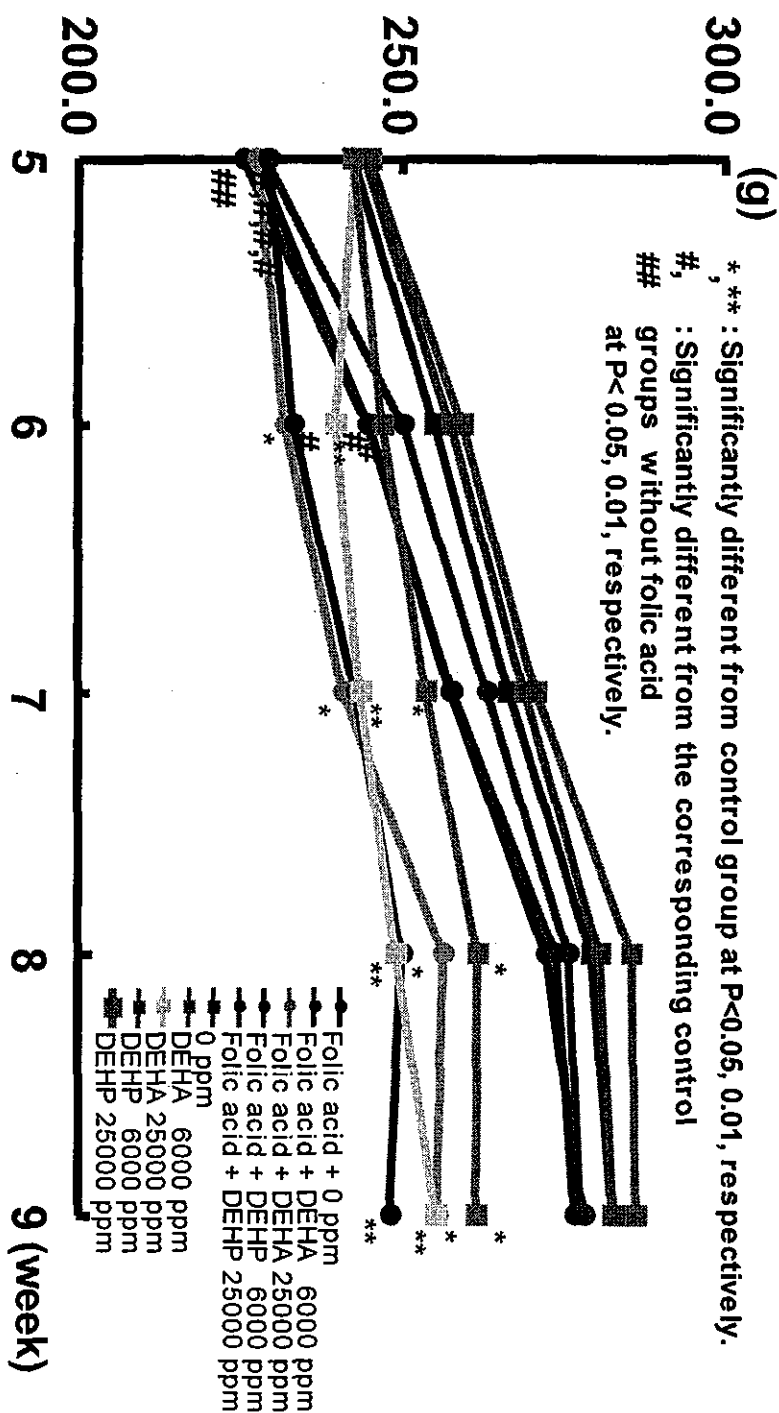


表1.

最終体重および各種腎機能指標値

Folic acid		Test chemical		Level (ppm)		Final B.W. (g)		Weight of kidneys (%)		Urine specific gravity		Urine volume (g)		Serum BUN		Serum Creatinine (mg/dl)	
+	-	0	281.6	0.73##	1.060	1.96#	25.64#	0.50									
+	DEHA	6000	280.0	0.82** , ##	1.056	2.18##	25.90##	0.50#									
+	DEHA	25000	259.8*	0.88#	1.062	2.50##	27.78##	0.56*									
+	DEHP	6000	280.4	0.81** , ##	1.050* , #	2.20#	28.18#	0.50									
+	DEHP	25000	250.0**	0.96	1.068	2.50	41.78** , ##	0.60** , #									
-	-	0	286.0	0.64	1.069	1.32	20.04	0.50									
-	DEHA	6000	289.8	0.68*	1.071	1.28	20.00	0.56*									
-	DEHA	25000	258.6**	0.80**	1.060	1.58	20.02	0.52									
-	DEHP	6000	285.6	0.72**	1.078	0.96	22.06	0.52									
-	DEHP	25000	263.2*	0.80**	1.070	1.98	29.26**	0.54									

*** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.
, ## : Significantly different from the corresponding control groups without folic acid at P< 0.05, 0.01, respectively.

表2.

精巢、精巢上体、精囊および前立腺重量

Group No.	Folic acid	Test chemical	Level (ppm)	Testes	Epididymides	Seminal vesicles	Prostate
1	+	-	0	1.05±0.06	0.31±0.02	0.31±0.04	0.25±0.03
2	+	DEHA	6000	1.05±0.05	0.29±0.02	0.32±0.05	0.23±0.03
3	+	DEHA	25000	1.16±0.04 **	0.31±0.03	0.30±0.03 ##	0.21±0.04
4	+	DEHP	6000	1.07±0.07	0.29±0.01	0.32±0.03	0.22±0.02
5	+	DEHP	25000	0.74±0.24 *, #	0.27±0.06 *	0.25±0.05 *	0.19±0.03 **
6	-	-	0	1.07±0.07	0.30±0.02	0.30±0.03	0.22±0.02
7	-	DEHA	6000	1.06±0.04	0.29±0.02	0.30±0.02	0.21±0.03
8	-	DEHA	25000	1.17±0.04 *	0.34±0.04 *	0.36±0.02 **	0.23±0.02 *
9	-	DEHP	6000	1.04±0.06	0.29±0.03	0.33±0.05	0.23±0.02
10	-	DEHP	25000	1.01±0.06	0.30±0.02	0.25±0.06	0.19±0.03

The data are shown by g/100g.

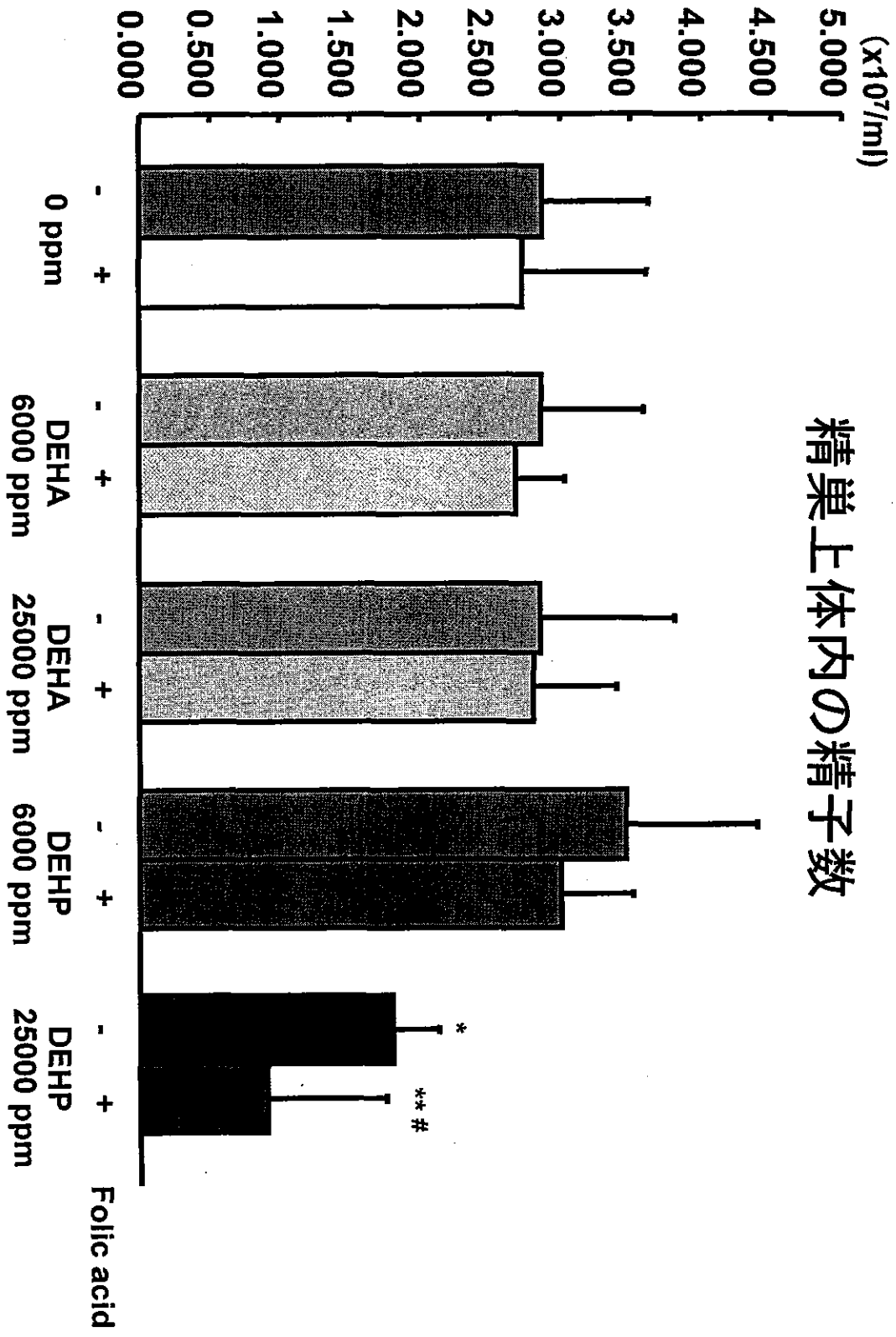
*, ** : Significantly different from control group at P<0.05, 0.01, respectively.

#, ## : Significantly different from the corresponding control groups without folic acid at P< 0.05, 0.01 respectively.

No. of rat in each group is 5.

図4.

精巢上体内の精子数



*** : Significantly different from control group at P < 0.05, 0.01, respectively.
: Significantly different from initiation group at P < 0.05, respectively.