

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14年度～16年度 総合研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成17（2005）年 4月

目 次

I. 総合研究報告書

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

一発達期ないし有病時暴露による影響評価一 _____ 1

渋谷 淳

(資料) 図 1 - 1 ~ 図 1 - 5 2

表 1 - 1 ~ 表 1 - 2 7

図 2 - 1 ~ 図 2 - 1 4

表 2 - 1 ~ 表 2 - 1 5

図 3 - 1 ~ 図 3 - 2 4

表 3 - 1 ~ 表 3 - 4

図 4 - 1 ~ 図 4 - 6

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____ 47

III. 研究成果の刊行物・別刷 _____ 50

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-
 総合研究報告書(平成14-16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: 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混餌経口投与を行い、仔動物の内分泌・生殖器官の病理評価及び性行動評価を行った。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。そのうち、SD系ラットを用いた病理評価研究では、14-15年度は、妊娠15日目から離乳時(出産後21日目)まで di-n-butyl phthalate (DBP) について4用量を設定して暴露評価を行い、雌での下垂体機能を含む性分化影響を明らかにした他、雄では精巣影響は殆ど可逆的であったものの、新たに性成熟後での乳腺影響が20 ppmより見出され、NOAELは求められず、LOAELは20 ppm (1.5~3.0 mg/kg/day)と判断された。15-16年度は diisononyl phthalate (DINP)、16年度は更に di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) について各々3用量を設定して評価した。その結果、DINPでは暴露終了時の精巣毒性が4000 ppmから出現したが、殆ど可逆的であった。しかし、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最低用量から見出した。卵巣変化は性成熟後にも見出され、永続的な変化と考えられた。DEHAでは、かなり弱い発達期精巣毒性が最高用量で認められた他、DINPと同様に雄での乳頭・乳輪の出現が最低用量より見出された。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。

脳の性分化影響については、視床下部の性的二型核 (SDN-POA) を含む内側視索前野 (MPOA) 特異的な性分化障害の指標遺伝子群の探索を目的に、14年度はメタカーン固定法を利用したパラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的なマイクロアレイ解析手法を確立した。次いで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MPOA特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、雄で優勢に発現しEEにより雌雄で発現変動した遺伝子の中にG蛋白質とその関連遺伝子が多く見いだされ、DEHPに共通するものもあった。16年度に real-time RT-PCR 解析により、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たDINP等の周産期暴露ラットにおいて、生後10日目のMPOAでの性分化関連遺伝子の発現量について 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 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、DINP、DEHAは新生仔の血中 testosterone と estradiol 濃度に影響を与えなかったが、DBPは低用量で estradiol 濃度を上昇させた。性分化関連遺伝子である granulin や p130 の視床下部での発現は、DBPとDINPで上昇し、DEHAで低下傾向を示したが、用量依存性はなかった。性成熟後、全ての物質で性腺刺激ホルモンの血中濃度、性周期への影響はなかった。一方、性行動はDINP、DEHAの最低用量で雄のマウント、挿入、射精の抑制、また全ての群で雌のロードーシスの抑制が観察された。以上より、これらの物質は周生期中枢でアンドロゲン作用に対する修飾等を介して脳の性分化に影響を及ぼし、特に雌の性行動を低下させることが示唆されたが、それは脳の特定部位にのみ限定的な作用と考えられた。

基礎疾患による修飾作用については、肝障害においては、雄F344ラットに thioacetamide (TAA) による肝障害を誘発すると同時に誘発後にDBPを経口投与した結果、高用量での精巣毒性増強が見出された。また、肝障害誘発後のDEHPないしDEHAの混餌投与で、DEHPの高用量での精巣毒性の増強が判明した。DEHAは生殖器毒性を示さなかった。腎障害の影響に関しても雄F344ラットで薬酸誘発腎障害の状態でのDBP、DEHA、DEHPによる精巣毒性の増強作用を検討し、高用量のDBPやDEHPでの毒性増強が明らかとなった。また、腎機能低下状態ではフタル酸類のモノエステルが血中に増加し、これがフタル酸類による精巣毒性の増強の原因と考えられた。

精巣障害の感受性種差に関する研究では、若齢期精巣とその培養系のDEHPのモノエステル(MEHP)に対する感受性を形態学的にいくつかの動物種で比較し、種差を規定する要因を探索した。精巣器官培養系では、いずれの動物種でも濃度・時間依存的にアポトーシスの増加が確認されたが、その程度には明らかな種差が認められ、MEHPの標的であるセトリ細胞自身の感受性の種差が示唆された。成体サル精巣器官培養系でのアポトーシス細胞数の濃度・時間依存的増加が認められたこと、ラット、マウスでは in vivo と in vitro で感受性が必ずしもパラレルではないことから、MEHPの代謝経路の種差も感受性種差に関与している可能性が考えられた。

精巣障害の分子メカニズム研究では、14年度にマウス・ライディヒ細胞由来のMA-10培養細胞でMEHPによって、細胞内コレステロール・エステル量の増加することを明らかにし、この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にしたが、16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、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しては、それらの男性尿中レベルと精子性状との関係、臍帯血中レベルと在胎期間との関係、新生児期の曝露と成長との関係、子宮内膜症女性と高血中レベルとの関係が報告されている。フタル酸エステルの発達期を含む精巣毒性については、遺伝子解析研究が進みつつある。アジピン酸に関してはDEHAの高用量で着床前胚死亡やラット発達期暴露で抗アンドロゲン作用は認められないことが報告されており、生殖器影響を示すフタル酸エステルとの共通性は少ないと考えられた。

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

長谷川 隆一 (平成14年度)

国立医薬品食品衛生研究所 医薬安全科学部部長

江馬 眞 (平成15-16年度)

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溶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。

分担研究のうち、①周産期曝露影響評価として、SD:IGS ラットを用いた病理評価研究では、14年度は、di-n-butyl phthalate (DBP) について本実験を実施し、15年度、その病理組織学的評価を終了した。引き続き、DINP について本実験を実施し、16年度、その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) に関して評価を行った。もう一つの Wistar:Imamichi ラットを用いた性行動評価研究でも同様に、年次ごとに、DBP, DINP, DEHA 暴露動物について、新生時期の視床下部での granulin, p130 遺伝子等の性分化関連遺伝子の発現、血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、15年度は、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が、そのためには、14年度に予備的な検討により確立したメタカーン固定法を用いたパラフィン包埋微量組織からのマイクロアレイ解析法をマイクロダイセクション法と組み合わせて用いた。まず、脳の性分化障害を誘発する reference drug として ethinylestradiol (EE) を用いて周産期曝露を行い、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 の周産期曝露を行い、発現

遺伝子のプロファイリングを行って、この物質による脳の性分化障害遺伝子を探索した。16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16年度には、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 、プロジェステロン受容体(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; 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。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14年度に各モデルを確立し、15年度までDBPによる増強作用を見出したが、16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精巣毒性の感受性種差に関する研究では、各種動物種の精巣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した。④精巣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・ライディッヒ細胞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、性行動評価を行った。まずSD:IGSラットを用いた病理評価研究では、14年度は、検索予定のDBP(5000, 10,000, 15,000 ppm)とDEHA(6000, 12,000, 18,000 ppm)について、妊娠15日目から出産21日目までの間の混餌投与による予備的な用量設定試験を行った。曝露期間での母動物体重・摂餌量、出生児数、出生時体重、出生児の体重増加率、離乳時体重・生存率を指標に検討した結果、DBPについては10,000 ppm、DEHAは12,000 ppmを妊娠・保育を維持できる最大耐量と判断し、各々の投与実験の最高用量とした。引き続き、DBPについて、20, 200, 2000, 10,000 ppmの4用量を設定し、妊娠15日目から出産21日目までの間、母動物に対する混餌投与を行い、投与終了時と11週目及び20週目の病理組織評価を行った(Fig. 1-1)。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DBP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。15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、400, 4000, 20,000 ppmの3用量を設定し、同様の混餌投与試験を行った (Fig. 1-2)。16年度は、同様のプロトコルでDEHAの妊娠後期及び授乳期暴露を、0, 480, 2400, 12,000 ppmの混餌用量を設定して行った (Fig. 1-3)。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索を行った。DBPの周産期暴露実験においては更に、下垂体におけるluteinizing hormone (LH), follicle-stimulating hormone (FSH), prolactin (PRL)等の免疫組織染色を生後21日目と11週目の雌雄で行い、VECTSTAIN Elite ABCキットを用いてDABにて発色し、それぞれの陽性細胞率を求めた。また、雄仔動物において性成熟後の乳腺萎縮が明らかであったため、11週目の動物について乳腺腺房の面積を測定した。また、DINP及びDEHAの全ての群の仔動物につき、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系ラットを用いた性行動評価研究では、年次ごとにDBP, DINP, 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DBPを20, 200, 2000, 10000 ppm, DINPを40, 400, 4000, 20000 ppm, 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(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LH, 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影響に関して、14年度はMPOAでの脳の性分化障害指標遺伝子を得る目的で、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析法の開発研究に着手した。予備的な検討として、発現誘導遺伝子の特性がよく検索されているphenobarbitalを80 mg/kg/日、3回、連日投与したラットの肝臓を用い、メタカーン固定・パラフィン包埋後、10 µmの薄切片を作製し、脱パラフィン後、total RNAを調製した。抽出した50 ngのtotal RNAからpoly(A⁺) RNAの増幅をMessage AmpTM aRNAキット (Ambion)を用いて2回行い、変性後Affymetrix GeneChip[®] Rat Genome U34A Arrayとハイブリダイズし、発現遺伝子数などについて解析を行った (Fig. 1-4)。比較の対照として、同一動物の未固定凍結肝組織から直接調製したtotal RNAから、1回増幅、2回増幅して得られたaRNAを用いた。次いで15年度には、実際に脳の性分化障害の指標遺伝子を探る目的で、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での部位特異的な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. 1-5)。標的部位は、雌雄で異なる性分化を示し、主に雄の性行動に機能すると考えられているSDN-POAの全領域を含むMPOAを選択した。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が報告されており (Atanassova et al., 1999), 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)。解剖時摘出した脳はメタカーン液にて4°C、2時間固定し、視床下部を含む部位について冠状断面を作製後、定法に従って脱水・パラフィン包埋した。包埋脳組織について、18 µm厚の薄切片を連続して3枚作製してマイクロダイセクション用とし、その後6 µm切片を作製してHE観察用とした。そのサイクルを数回繰り返して、マイクロダイセクション用の切片はPEN-foilフィルムにマウントした。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 (Fig. 1-6)。Total RNAの抽出はRNAqueous-Micro kit (Ambion)を用い、回収量はRiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。回収した50 ngのtotal RNAについてMessageAmp aRNA kit (Ambion)を用いて2回増幅した。その際、枯草菌由来のspike RNAを添加した。マイクロアレイはGeneChip Rat Genome U34A Array

(Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000(Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、発現の性差とEEに対する反応性を用量依存性の観点から検索・分類し、内分泌中枢かく乱影響に関与すると考えられる遺伝子クラスターの同定を行った。方法としては、GeneSpring ver.5(Silicon Genetics)を用いて、per chip normalizationはspike RNAのシグナルにより行い、Student's t-testにて発現レベルの比較を行った。次いで、同様の投与実験プロトコルを用いて、DEHPについて、明らかに雄性的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. 1-5)。16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の反応用量で行った。Real-time PCRはTaqMan probe detection systemを用いて、50 μ lの反応用量(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の反応用量(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'-AGCGCCCCGGACTGA-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の転写量当りに換算し、ノーマライズを行った。

16年度に行った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 1-1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 1-1)。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 1-1)。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 μ m厚切片に挟まれた6 μ m厚切片を連続的に作製した。作製した20 μ m厚切片はPEN-foil film上にマウントし、6 μ m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 μ m厚切片においてSDN-POAの位置を確認し(Fig. 1-7)、隣の20 μ m厚切片におけるSDN-POAを含むMPOA(1000 x 600 μ m, 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 1-2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 μ lの反応液中に、1 μ lのRT産物, 12.5 μ l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 μ l の反応液中に、1 μ l の RT 産物、12.5 μ l 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ブータ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、実験 1 として、10 週齢の雄性 F344 ラット 72 匹を 8 群に分け、第 1-4 群には 5 週にわたり TAA (200 mg/kg) を週 3 回腹腔内投与し、肝障害を誘発した。一方、第 5-8 群には phosphate buffered saline (PBS) のみを投与し、比較対照とした。第 2 週より第 1、5 群には 500、第 2、6 群には 125、第 3、7 群には 31.25 mg/kg の DBP を毎日 4 週間、強制経口投与した。第 4、8 群には corn oil のみを投与し、対照群とした。その後屠殺剖検を行い、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。次いで実験 2 として、6 週齢雄性 F344 ラット 80 匹を 8 群に分け、第 1-4 群には第 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 5-8 群には PBS のみを投与し、肝障害非誘発群とした。その後、第 5-9 週に DBP を混餌投与した。第 1、5 群は 20,000、第 2、6 群は 10,000、第 3、7 群は 2,500 ppm の用量で、第 4、8 群は基礎飼料のみを投与し、対照群とした。第 9 週目に屠殺し、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。最後に、実験 3 として、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 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 6,000 ppm、第 3、8 群は DEHA 25,000 ppm、第 4、9 群は 6,000 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、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、14 年度には、雄 F344 ラット 40 匹 (6 週齢) を 8 群 (各群 5 匹) に分け、5 群から 8 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 (Fig. 2-1)。これにより両側腎臓に慢性腎症 (間質性腎炎) が発症することは予備試験にて確認した。葉酸投与後、5 週目から飼料に DBP を最高用量 20,000 ppm として (第 8 群)、5,000 (第 7 群) および 1,200 ppm (第 6 群) で混じて 4 週間自由摂取させた。第 5 群には DBP を含まない基礎食を与えた。第 1 群から 4 群は第 5 群から 8 群に対する対照群で、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、DBP を各濃度で投与した。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。15 年度には、6 週齢 F344 ラット雄に葉酸を週一回 5 回投与し、1 週間後に DBP を 1,000 mg/kg にて胃チューブにて一回投与した。また 4 週間後も DBP を同様に投与し、何れも投与 12 時間後に尿の採取、一部では 4 時間蓄尿を行い、そのあと動物を屠殺剖検して、血液と精巣、腎臓、肝臓を採取し、実験試料として供した。対照群には葉酸の溶媒である 0.3M の炭酸ナトリウムを葉酸の代わりに投与し、実験群と同様のスケジュールにて DBP を投与した (Table 2-1)。血液、尿および精巣中の DBP と MBP の濃度を HPLC にて測定し、実験群と対照群での濃度を比較した。その際グルクロン酸抱合体も酵素処理の前処理 (β -glucuronidase) によって検討した。さらに肝と精巣の β -glucuronidase の活性を検討した。またもう一つの対照群として溶媒も投与しないで、DBP を投与した群も設けた。16 年度には、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 群には腎障害の形成を目的に葉酸 (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 (Fig. 2-2)。葉酸投与後、5 週目から飼料に DEHA と DEHP をそれぞれ 0、6,000 ppm、25,000 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 6,000 ppm、3 群は DEHA 25,000 ppm、4 群は DEHP 6,000 ppm、5 群は DEHP 25,000 ppm である。6 群は完全な対照群で葉酸もフタル酸も投与していない。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。14 年度と同様な検討課題を追求した。さらに血液および尿中のモノエステルの量を生化学的に追求した。

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、若齢ラットへの MEHP 連続経口投与試験(Fig. 3-1)では、28 日齢の SD 雄ラットに 600~1000mg/kg/day を、5 日間連続経口投与し、6 日目に精巣を採材した。4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験では、28 日齢の C57B 雄マウスに 500~900 mg/kg/day を 3 日間連続経口投与し、4 日目に精巣を採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定を施し、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。若齢マウスへの MEHP 単回経口投与試験では、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 日目に精巣を採材の後、4%パラフォルムアルデヒド固定を施し、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察を行った。若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験では、35 日齢のモルモット (Hartley 系)に MEHP2000mg/kg を経口投与し、投与 3, 6, 9 時間後に精巣を採材し、4%パラフォルムアルデヒド固定標本作製し、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞数の観察に用いた。また、5%グルタルアルデヒド固定標本も作製し、電顕観察に用いた。若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験として、2 ヶ月齢のシバヤギ精巣を用い、MEHP (100, 1, 1×10^{-3} , 1×10^{-6} , 0 nmol/ml)を添加し、添加 1, 3, 6, 9 時間後に採材し、5%グルタルアルデヒド固定後、電顕にて観察した。若齢ラット精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、20 日齢の SD ラット精巣を用い、MEHP (100, 1, 1×10^{-3} , 1×10^{-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。若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験には、35 日齢のモルモット (Hartley 系)の精巣を用い、MEHP (100, 10, 1, 0 nmol/ml)を添加し、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、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。若齢マウス精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、20 日齢の C57B 雄マウス精巣を用い、MEHP (100, 1, 1×10^{-3} , 1×10^{-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。次いで、成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、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、通常の光顕観察及び TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に、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 2×10^5 個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO₂ 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 を各濃度で添加、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、hCG を最終濃度 50 ng/ml になるように加え、更に 2.5 時間インキュベーションした後、Nile Red を最終濃度 400nM になるように添加し、蛍光顕微鏡にて細胞内の Lipid droplet を観察した。ネガティブコントロールとして、DMSO のみを添加したもの、ポジティブコントロールとしてオレイン酸—ウシ血清アルブミンを添加したものを用意し、同時に観察した。細胞内コレステロールエステル量の測定として、MA-10 細胞をガラス底ディッシュに 2×10^5 個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO₂ 中でインキュベーションした後、MEHP を添加し、さらに 24 時間インキュベーションし、hCG を最終濃度 50 ng/ml になるように加え、さらに 2.5 時間インキュベーションした後、50 mM Tris-HCl (150 mM NaCl, 2 mg/ml BSA, pH 7.4)で 3 回、50 mM Tris-HCl (150 mM NaCl, pH 7.4)で 3 回洗浄後、n-ヘキサソプロピルアルコール(3:2, v/v)を加えて 20 分間室温で攪拌して細胞からコレステロールを抽出した。抽出液は、窒素気流下で溶媒を除去し、残渣を n-ヘキサソに溶解した。酵素-蛍光法による細胞内コレステロールの測定は、Gamble らの方法 (J. Lipid. Res., 19, 1068-1070, 1978)に従った。総コレステロールは cholesteryl oleate を、遊離型コレステロールはコレステロールを標準物質として定量し、総コレステロール値から遊離型コレステロール値を差し引いて細胞内コレステロールエステル量を算出した。なお、脂質抽出後の細胞を 0.2N NaOH に溶解し、タンパク質量を測定して、細胞内コレステロールエステル量を補正した。遺伝子発現解析には、MA-10 を 6 穴プレートに 10%FCS-DMEM 中 2×10^5 個/ml になるように撒き、一晚、37°C, 5%CO₂ 中でインキュベーションした後、FCS 無しの DMEM で細胞を洗った後、FCS 無し 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、さらに 24 時間インキュベーションし PBS で細胞を洗浄後、Trizol にて RNA を調製した。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。本研究はマウスの細胞株を用いているため、倫理上の問題はない。

⑤文献調査として、フタル酸エステルの検索は2000年から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、1984年から2005年2月まで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、SD:IGS ラットを用いた病理評価研究では、DBPの母動物に対する影響として、妊娠15-20日の体重増加率が20, 10,000 ppm群で軽度低下したが、摂餌量は各群とも同等であった(Table 1-3)。出生後から離乳時までは、各群とも体重増加率、摂餌量とも変化を認めていない。以上より、DBPは概ね用量に依存して母動物に摂取されていた(Table 1-3)。また、妊娠期間、リッターサイズには群間に差は認めなかったものの、リッターあたりの雄の比率が2000 ppmで若干低下し、10,000 ppmで強く低下していた(Table 1-3)。AGD(生後2日目)は、雄の10,000 ppm群で短縮したものの、雄の他の群や雌では変動を認めなかった。この時期の体重は20 ppmの雌雄で若干増加していた。生後14日目の雄性仔動物における乳頭・乳輪の出現頻度は、10,000 ppmで有意に増加し、低用量から用量依存的な増加傾向を示した。生後21日目の解剖時では、雌雄の10,000 ppmで有意差はないものの体重の低値を示し、これらの動物では肝臓の相対重量が明らかに増加した。雄では、同用量で脳相対重量の増加と精巣の絶対・相対重量の低下も認めた。雌では、雄と同様に脳相対重量の低下傾向を認めた。春機発動の時期に関しては、雄では200 ppm群で早く包皮分離が認められたが、それはこの群の中の1匹が非常に早い時期に包皮分離を示したことに起因した。雄の他の用量では、包皮分離の時期に変化を認めなかったが、雌では10,000 ppm群で有意ではないものの、陰開口の遅延を示した(Table 1-4)。性周期に関しては、生後8-11週の観察では、休止期の延長を示す例が対照群、20及び200 ppm群で各8匹中1匹づつに認められたが、2000 ppm, 10,000 ppm群では、それぞれ2, 4匹認められた(Table 1-4; 対照群との間に有意差なし)。生後17-20週の観察では、休止期の延長が2000 ppmの10例中3例に認められたが(有意差なし)、対照群20 ppm, 10,000 ppm群の各10例中1例にも同様の变化を認めた。また、200 ppm群の8例中1例に発情期の延長を認めた。両時期を通じて、他の動物は正常の4-5日の

性周期サイクルを示した。11週齢時の解剖では、雌雄とも明らかな体重の変動を認めなかった。臓器重量に関しては、雄の10,000 ppm群で腎相対重量の若干の低値を認め、明らかな用量依存性はないものの、20, 200, 2000 ppm群で下垂体相対重量の増加を認めた(Table 1-5)。また、200 ppm群で腹側前立腺絶対重量が増加を示した。雌では10,000 ppmで明らかな下垂体重量の低下を認めた。雄の仔動物のうち、10,000 ppm群で生後11週齢までの間、死亡例が増加し、生後20週目の解剖時に必要な匹数が得られなかった。20週目の解剖時では、雌雄共にDBP投与に起因した体重変動は認められなかった(Table 1-5)。臓器重量に関しては、雌の下垂体の相対重量が200 ppm以上の群でほぼ用量依存的に低下を示した以外に明らかな変動は認めなかった。生後21日目の病理組織学的検索では、10,000 ppm投与群の雌雄で、エオジン好性の肝細胞肥大を認めた(Table 1-6)。雄では精細管中の精子細胞数の減少として見出される精子細胞の分化の減少(Fig. 1-8A, B)が明らかであった。この変化は20 ppmより認められ、発生頻度と変化の強さは用量依存的であった。また、Leydig細胞の集簇(50~100個の細胞塊)もDBP投与群の精巣で散在していた(Fig. 1-8B)。この変化は200 ppm投与群の8例中1例に認められ、2000 ppm以上では発生頻度・強度において有意であった。精巣上体では、精巣上体管のコイルリングの減少を反映した切片上の精巣上体管の横断面数の減少が2000 ppm以上で認められた(Fig. 1-8C, D)。乳腺では乳腺腺房の拡張が20 ppmより有意差はないものの低頻度で認められた(Fig. 1-9A, B)。雌では乳腺腺房の低形成が20 ppmより認められ、発生頻度あるいは病変の程度の統計的有意差は20, 200, 10,000 ppmで確認された(Fig. 1-9C, D)。性成熟後の病理組織学的検索結果として、まず精巣及び精巣上体の病理変化は片側性あるいは両側性に出現し(Table 1-6)、11週目では、精上皮の部分的な欠落が200 ppmより見られ、2000 ppm以上で有意であった。この変化は精巣の1横断切面あたり1~2本から10本程度の精細管に認められる場合が多く、精細管当たりでは部分的な欠落から精細管全体に及ぶものまで様々であった。部分的な病変ではセルトリ細胞の空胞化を示す場合が多く(Fig. 1-10A)、精上皮細胞が完全に脱落している場合は、いわゆる'Sertoli cell only appearance'を呈していた(Fig. 1-10B)。また、巨細胞の形成もしばしば認められた(Fig. 1-10A)。10,000 ppm投与例のうち強く障害を受けた例ではライディッヒ細胞の過形成も明らかであり、そのうち4例では精巣上体管内に細胞残渣が認められた。また、2例は精巣上体の萎縮を示した。腹側前立腺はDBP投与により表面上皮の扁平化を示し、20及び10,000 ppmで病変の発生頻度・強度が有意に増加した。乳腺では腺房上皮の空胞変性(Fig. 1-10C-E)が明らかで、腺房萎縮も認められた(Fig. 1-10D, E)。空胞変性は20 ppmより有意に増加したが、投与群間での発生頻度や変性の強さは同等であった。雌では10,000 ppm群で下垂体の小型化が明ら

かであった。20 週目の解剖例においても、諸臓器の病理変化は11 週目での変化と同等であった。精巣では対照群の1 例にもDBP 投与例と同様の变化を認めている。2000 ppm 群において精上皮の部分的脱落の発生頻度が増加したものの、統計学的有意差はなく、程度も軽微であった。腹側前立腺では‘表面上皮の扁平化’が投与例で散見されたものの、有意な変化ではなかった。乳腺の変化は、この時点では対照群でも認められたが、DBP 投与群において‘空胞変性’の発生頻度ないし強度の有意な増加が200 ppm より‘腺房萎縮’に関しては200 と2000 ppm で認められた。雌では、特記すべき病変は認めなかった。次に、下垂体前葉において下垂体ホルモン陽性細胞率を免疫組織学的に検討した結果、生後21 日目の検索では、雄の10,000 ppm でFSH とPRL 陽性細胞率の減少を示したが、LH 陽性細胞率は増加を示した (Fig. 1-11)。雌では更に、用量依存的ではないもののFSH 陽性細胞率が200 ppm より減少を示した。LH 細胞は2000 と10,000 ppm で増加し、PRL 細胞は10,000 ppm で減少した。11 週目においてはFSH 陽性細胞率が雌雄とも10,000 ppm で増加を示したが、LH、PRL 陽性細胞率には変動を認めなかった。更に、11 週齢の雄の乳腺の萎縮性変化に関して、腺房の面積測定を行ったところ、病理組織学的な萎縮性変化のスコアと同等の変化をDBP 投与各群で確認した (Fig. 1-12)。

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 1-7)。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上の値を示した。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 1-8)。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 1-9)。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 1-9)。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 1-10)。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 1-10)。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 1-11)。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 1-12)。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 1-13)。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 1-14)。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 (Fig. 1-13)。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、14 年度はメタカーン固定法を利用した、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発を行い、PB 投与したラット肝臓を用いて、メタカーン固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した 50 ng の total RNA から得られた aRNA の増幅効率の至適化を検討した (Fig. 1-4)。その結果、2 回の増幅で poly(A⁺) RNA を 50 万倍に増幅することに成功した。次いで、この増幅された aRNA を用いて GeneChip による解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った (Table 1-15~17, Fig. 1-14,15)。まず、搭載遺伝子のうち、発現が presence call あるいは absence call を示す遺伝子数と発現が marginal である遺伝子数

について、未固定組織から調製した total RNA の 1 回増幅及び 2 回増幅サンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片から得られた total RNA の 2 回増幅サンプルを比較した結果、サンプル間でそれぞれに分類される遺伝子数に大きな違いは認められなかった (Table 1-15)。また、5'末端から 3'末端にかけて広くプローブが設定されている GAPDH 遺伝子の 3'/5'のシグナル比を検討した結果、未固定組織の 1 回増幅サンプル(組織のマイクロアレイ解析に通常用いられる方法で調製されたサンプル)ではシグナル比がほぼ 1 であったのに対して、2 回増幅したサンプルでは、固定・包埋の有無を問わず、3'側のシグナルが強く現れていた (Table 1-15)。次に、未固定組織で 1 回ないし 2 回増幅したサンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅サンプルから得られた発現データについて相関を比較した結果、2 回増幅したサンプル同士の比較では、非補正データでの比較及び normalize したデータでの比較ともに高い相関係数が得られた (Fig. 1-14, Table 1-16)。一方、1 回増幅と 2 回増幅したものの非補正データでの比較では、メタカーン固定・パラフィン包埋の有無に関わらず、2 回増幅例同士の比較に比べて若干相関係数が低く現れたが、normalize したデータでの比較ではメタカーン固定・パラフィン包埋した切片から調製した aRNA と未固定組織での 1 回増幅 aRNA サンプルの間の相関は高い (R=0.91)という結果が得られた (Table 1-16)。また、2 回増幅例同士(未固定組織 vs. メタカーン固定・パラフィン包埋切片)での発現に差のある遺伝子はなかったものの、1 回増幅例と 2 回増幅例での発現データで発現に有意差を伴った違いを示した遺伝子数は、固定・包埋の有無を問わず、全体の 20-30%に及ぶことが明らかとなった (Table 1-16)。次に、未固定組織の 1 回ないし 2 回増幅サンプルとメタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅して得られた aRNA サンプルのそれぞれの間で、発現が共通している遺伝子と各々でのみ発現している遺伝子の数を求めた結果、2 回増幅例特異的に発現が変動する遺伝子が 330-370 程度であり、未固定組織で 1 回増幅したもので 800 前後の遺伝子であった (Fig. 1-15)。これらの遺伝子のうち、3'末端の遺伝子情報が明らかなものにつき、プローブと poly (A⁺) tail 間の距離を求めた結果、未固定組織の 1 回増幅例のみで発現していた遺伝子は、2 回増幅サンプルのみで発現していた遺伝子に比べ、プローブ・poly (A⁺) tail 間距離の短いことが明らかとなった (Table 1-17)。

15 年度は、まず無処置動物の MPOA における遺伝子群の構成的発現の性差(>2-fold, p<0.05)を検討したところ、マイクロアレイに搭載されている約 8000 遺伝子中、雄では 57 遺伝子が優勢に発現し、雌では 14 遺伝子が優勢に発現していた (Table 1-18)。次いで、EE の 0.5 ppm 投与により発現変動(>2-fold, p<0.05)した遺伝子数を検索したところ、雄で発現上昇するものが 20 個であるのに対して、低下したものが 183 個であった。雌では逆に、発現上昇したのが 55 個で、低下を示したのが 2 個のみであった。その中で、組み合わせで、雄で発現低

下し、雌で発現上昇した遺伝子数は22個あり、その中で、構成的発現に性差のあるものが8個認められた。次に、EE暴露により、雄のMPOAで用量に応じて発現低下した遺伝子(>2-fold, $p<0.05$)を検討した結果、0.5 ppmのみで低下したものは139、0.1 ppmからは37、0.01 ppmから用量依存性のみられたものは7遺伝子であった。0.01 ppmあるいは0.1 ppmより変動した遺伝子のリストをTable 1-19に示した(>2-fold, $p<0.05$)。多くは構成的発現に性差が認められ、その中でG蛋白質のシグナリングに関連するGTPase Rab14は強い発現性差を示した。また、雌でEE投与により用量に応じて発現上昇した遺伝子(>2-fold, $p<0.05$)を検討したところ、0.5 ppmのみでは35遺伝子が上昇し、0.1 ppmからは13遺伝子、0.01 ppmからは7個の遺伝子が用量依存的に発現上昇を示した。0.01あるいは0.1 ppmから発現上昇した遺伝子のリストをTable 1-20に示した。その多くは、発現に性差を認め、G蛋白質、あるいはそのシグナリングに関連する遺伝子が見いだされた。また、用量に依存しないで変動する遺伝子は認められなかった。次に、検索範囲を少し拡大して、雄で優性的に発現した57遺伝子について0.5 ppm EEでの雌雄の反応性(>2-fold, $p<0.05$)を検討したところ(Table 1-21)、その内41遺伝子が0.5 ppm EEにより雄で発現低下し、更にその中で8遺伝子が雌で発現上昇を示した。Table 1-22に雄で優性的に発現した57遺伝子の中から、G蛋白質あるいはそのシグナリングに関連する22遺伝子を集計した。そのうち、計16遺伝子は雄で0.5 ppm EEにより発現低下を示し、更にその中で3遺伝子(GTPase Rab14, G-protein α i2, Mypt1)は雌で0.5 ppm EE投与により逆の変動を示した。また、発現に性差を認めないもののEE投与により雄で発現低下し、雌で発現上昇する遺伝子として14遺伝子が得られた(Table 1-23)。そのうち、synaptic vesicle glycoprotein 2 a, synuclein, synaptotagmin 4はシナプスの機能に係わる遺伝子であった。

次に、6000 ppm DEHP投与により、雌雄のMPOAで発現変動(>2-fold, $p<0.05$)した遺伝子数を集計した結果、雄で増減する遺伝子は少なく、発現上昇を示すものが4個、減少を示すものが12個得られたのみであった(Table 1-24)。雌では発現上昇するものが3個のみであったのに対して、低下するものが348個であった。これらの発現変動を示した遺伝子のリストをTable 1-25, 26に示した。また、発現の性差との関連で検索した結果、DEHP投与により雄で発現上昇したものの、雌で発現上昇あるいは低下した遺伝子には、その発現に雌雄差のあるものは含まれていなかったが、雄で発現低下した12遺伝子中10個が雄での構成的発現が高いものであった(Table 1-27)。その中で、GTPase-activating protein, Endothelin receptor type B, nonselective-type endothelin receptor (ETB receptor), GTPase Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate, Sodium channel IIIの6遺伝子がG蛋白質のシグナリングに関与し、そのうちGTPase-activating protein, GTPase Rab14, myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate,

Sodium channel IIIの4遺伝子が、0.5 ppm EEにより発現減少を示す遺伝子であった(Table 1-22)。

16年度は、15年度に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平行な結果を示した(Fig. 1-16)。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の結果はほぼ平行であった(Fig. 1-17)。

EE, MXC, DINP, GEN暴露例でのreal-time RT-PCR法を用いた、生後10日目の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. 1-18)。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. 1-18)。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. 1-19)。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. 1-20)。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. 1-21)。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. 1-22)。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性行動評価研究のうち、DBP の結果を Fig. 1-23~32、DINP の結果を Fig. 1-33~42、DEHA の結果を Fig. 1-43~52 に示した。新生子の血中テストステロンとエストラジオール濃度に対して、DINP (Fig. 1-33, 34) と DEHA (Fig. 1-43, 44) は影響を与えなかったが、DBP はエストラジオール濃度を低用量で上昇、高用量で低下させた (Fig. 1-23, 24)。性ステロイド依存性に発現が変化する性分化関連遺伝子である *granulin* 遺伝子や *p130* 遺伝子の新生子視床下部における発現に対しては、DBP (Fig. 1-25, 26) と DINP (Fig. 1-35, 36) は上昇させ、DEHA (Fig. 1-45, 46) は低下させる傾向を示したが、どの物質においても作用に特に用量依存性は見られなかった。

性成熟後、雄ラットにおける性腺刺激ホルモンの血中濃度には、DBP (Fig. 1-27, 29)、DINP (Fig. 1-36, 37)、DEHA (Fig. 1-47, 48) いずれも影響を与えなかった。また、雌ラットにおける発情前期の性腺刺激ホルモンのサーージ状分泌に対しても DBP (Fig. 1-29, 30)、DINP (Fig. 1-38, 39)、DEHA (Fig. 1-49, 50) は有意な影響を与えず、性周期もいずれの群においても正常に回帰した (Fig. 1-32, 42, 52)。しかし、雄ラットの性行動に対しては、DBP (Fig. 1-31) は射精と射精後不応期に影響を与え、DINP (Fig. 1-41)、DEHA (Fig. 1-51) の最低用量でマウント、挿入、射精に対する抑制が認められた。また、DBP (Fig. 1-32)、DINP (Fig. 1-42)、DEHA (Fig. 1-52) いずれもすべての用量で雌ラットのロードーシスに対する抑制が観察された。

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肝障害負荷の影響評価として、実験 1 では、肝障害を誘発した DBP 高用量群は対照群と非誘発群に比較し、精子数と精子運動率の有意な減少を示した (Table 2-2)。実験 2 では、肝障害を誘発した DBP 高用量群は対照群と非誘発群に比較し、精子数の有意な減少と精子奇形率の有意な増加を示した (Table 2-3)。実験 3 では、肝障害を誘発した DEHP 高用量群は 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 (Table 2-4)。しかし、DEHA で精巣毒性は見られなかった。

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腎障害負荷の影響評価として、14 年度は、葉酸投与による軽微な体重増加抑制が見られたほか、20,000 ppm の DBP 投与によって葉酸投与の有無に係わらず、体重の減少と増加抑制が観察された (Fig. 2-3, Table 2-5)。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 (Fig. 2-4)。葉酸投与群では尿の pH と比重および浸透圧に減少が観察され (Table 2-6)、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 (Table

2-7)。精巣と精巣上体の重量は 20,000 ppm DBP 投与群で減少があり、精巣重量は葉酸投与後 DBP 投与した第 8 群で高度に減少し、DBP 非投与群のみならず、葉酸非投与 20,000 ppm DBP 投与群のそれとも有意な減少をみとめた (Table 2-8)。精巣上体の重量も精巣重量と極めて類似した動向を示した。また腹葉前立腺および精囊重量も第 8 群で有意に減少した。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 20,000 ppm DBP 投与した第 8 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 (Fig. 2-5, 6)。精祖細胞の空胞変性は 20,000 ppm DBP のみ投与した第 4 群にも軽度ながら観察された (Fig. 2-7)。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腺腔内に認めた (Fig. 2-6)。精巣上体管の上皮には著変は認められなかった。精巣上体における精子数や精子運動能は第 8 群で著明な低下が認められ (Table 2-9)、DBP 20,000 ppm のみ投与群 (第 4 群) でも精子運動能の有意な低下が見られたが、葉酸前処置群ではより高度な低下を示した。精子の形態異常率も同様の傾向が認められたが、ばらつきが大きく統計学的には有意差は得られなかった。

15 年度は、葉酸投与終了後 5 週目で屠殺剖検したラットでは尿の比重の有意な減少と血清中の BUN の上昇を認めたが、葉酸投与 1 週目では明らかな変化はこれらのパラメーターには認められなかった (Table 2-10)。DBP 投与後 12 時間の強制排尿は十分量の尿が採取できない症例が多くあった (Table 2-11)。9 週目 (葉酸投与終了後 5 週目) での葉酸投与群で尿中の MBP と抱合体の量が有意に減少していたが、6 週目 (葉酸投与 1 週目) ではその減少は見られなかった。さらに DBP 投与後 4 時間の蓄尿における MBP と抱合体は減少傾向は見られるものの統計学的有意さはなかった (Table 2-12)。血中の DBP はほとんど検出限界以下であった。MBP の濃度は 6 週と 9 週の両時点で葉酸投与群で軽度上昇を認めたが、統計学的には有意差はなかった。抱合体の量は 6 週めでは有意に上昇していたが、9 週目では減少し、一定の傾向は見られなかった。精巣中の DBP は測定限界以下であり、MBP の濃度は何れの時点でも実験群と対照群に差はなかった (Table 2-13)。Fig. 2-8 には精巣と肝臓における β -glucuronidase の活性を SIGMA の測定キットを用いて検討したが、6 週目で肝臓の β -glucuronidase の活性は有意な減少を、9 週目には減少傾向を認めた。

16 年度は、葉酸投与による軽微な体重増加抑制が見られたほか (Fig. 2-9)、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 (Fig. 2-10)。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 (Table 2-14)、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 (Table 2-14)。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 (Table 2-14)。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 (Table 2-15)、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。6,000ppm 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 25,000 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 (Fig. 2-11,12)、および異常形態精子が有意に増加していた (Fig. 2-13)。DEHP 単独でも 25,000 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 25,000 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 (Fig. 2-14)。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、若齢ラットへの MEHP 連続経口投与試験では、精巣重量は 700 mg/kg/day 以上の投与群において、対照群と比べ、有意に高い値を示した。顕像は、濃度依存的に精上皮の異常が増大した (Fig. 3-1)。アポトーシス細胞数は、800 mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べ、有意な増加を示した (Figs. 3-2, 3)。電顕観察においては、セルトリ細胞内における空胞の出現、精細胞の脱落による精上皮内における巨大空胞の出現が認められた (Fig. 3-4)。若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験では、精巣重量に関しては、実験群と対照群の間で有意差は認められなかった。アポトーシス細胞数は 700 mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べ、有意な増加を示した (Figs. 3-5, 6)。Fig. 3-7 は各濃度における精上皮の形態変化を示す顕像 (トルイジンブルー染色、厚切り切片)、Fig. 3-8 は変性した精細胞、セルトリ細胞を示す電顕像である。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 (Fig. 3-9)。若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験では、投与後 6 時間では精細胞の脱落が、9 時間後では精細胞の脱落による精上皮の薄層化と精巣輸尿管の内腔に充満した脱落精細胞が観察された (Fig.

3-10)。アポトーシス細胞数は時間依存的に増加した (Fig. 3-11)。また、電顕像ではセルトリ細胞内の空胞出現が認められた。若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、添加後 3 時間以降においては、アポトーシスを示す精細胞 (クロマチン濃縮、形質膜の崩壊を伴わない細胞質萎縮等を示す)、ネクローシスを示す精細胞 (膨化、崩壊したミトコンドリア、形質膜の溶解等を示す)、アポトーシスを示すセルトリ細胞 (核膜の溶解、核質の濃縮等を示す) およびネクローシスを示すセルトリ細胞 (核周囲に沿う辺縁クロマチン、膨化崩壊した細胞小器官等を示す) が認められた (Figs. 3-12~14)。若齢ラット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は、濃度依存的、時間依存的に増加した (Table 3-1)。電顕観察においては、若齢シバヤギの実験と同様、アポトーシスを示す精細胞、セルトリ細胞、ネクローシスを示す精細胞、セルトリ細胞が認められた (Figs. 3-15, 16)。若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、セルトリ細胞内の空胞出現、精細胞の脱落が認められた。また、アポトーシス細胞は、時間依存的、濃度依存的に増加した (Figs. 3-17, 18)。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数の増加が確認された (Table 3-2)。1 及び 100 nm/ml 投与群では、いずれのタイムポイントでも対照群に比べ、アポトーシス細胞数は有意に高い値を示した (Fig. 3-19)。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 (Fig. 3-20)。更に、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 (Fig. 3-21)。最後に、成体ニホンザル精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、未成熟個体を用いた他種動物の実験結果に比べ (Fig. 3-22)、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 (Fig. 3-23, Table 3-3)、それは成体ヤギより高い値を示した (Fig. 3-23, Table 3-4)。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 (Fig. 3-24)。

④精巣毒性の分子メカニズム研究では、MEHP 添加後の MA-10 細胞の Nile Red 染色による Lipid droplet 観察として、DMSO で処理した後 hCG を添加した場合に比べ、MEHP 処理した後 hCG を添加した場合の方が、より赤い蛍光がみられる傾向があったが、前者もよく染まっており、明らかな差はみられなかった。MEHP 添加後の細胞内コレステロールエステル量を測定したところ、Fig. 4-1 に示すように、hCG 刺激がある場合は、DMSO のみの場合と、MEHP がある場合とで細胞内コレステロールエステル量に有意な差がみられなかったが、 10^{-8} M~ 10^{-5} M の MEHP で細胞内コレステロール量が増える傾向にあった。また、hCG がいない場合では、 10^{-6} M 及び 10^{-5} M の MEHP で細胞内コレステロールが有意に ($p<0.05$) 増加した。また、hCG 刺激がない場合とある場合で比較すると、 10^{-6} M 及び 10^{-5} M の MEHP で処理した場合、hCG 刺激により有意に ($p<0.05$) 細胞内コレステ

ロール量が減少した。MA-10 細胞において 10^{-6} M 及び 10^{-5} M、及び 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で、発現が増加した遺伝子のなかから、プロモーター領域での PPRE の検索として、開始コドンの位置が明らかになっているものについてその上流 2 kb までに PPRE があるか検索を行った。その結果、HMG CoA synthase 2 のみに PPRE の存在があることがわかった。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 synthase 2 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 synthase 2 遺伝子のみ MEHP により発現が増加した (Fig. 4-2)。次に、MEHP は PPAR α 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 α 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 α 、PGC-1 α 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 α が活性化されるかどうかレポータージーン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、Fig. 4-3 に示すように MEHP は PPAR α を活性化した。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ジーン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 α 、PGC-1 α 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ジーン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 (Fig. 4-4)。

⑤文献調査結果については、以下に示す。

平成 14 年度調査分

1. フタル酸エステルの精巣毒性

ヒトに関連した情報

不妊男性(21 人)の精液中のフタル酸エステル濃度 (DMP (dimethyl phthalate), DEP (diethyl phthalate), DBP, BBP, DEHP, DOP (di-n-octyl phthalate))は正常男性(32 人)と比較して有意に高かった。精液中フタル酸エステル濃度と正常な形態の精子数および一本鎖 DNA を持つ精子の割合との間には有意な関連性があ

った。しかしながら、本研究では、精液中のフタル酸モノエステル体濃度の分析は行われていない [Rozati ら, 2002]。

メカニズムに関連した研究

生殖細胞アポトーシスへの影響

雄生殖細胞のアポトーシスにおけるセルトリ細胞の役割についてのレビューで、フタル酸エステルに関連した新しい知見として、フタル酸エステルのターゲットの一つと考えられていたセルトリ細胞のビメンチンフィラメントの欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、精巣の組織学的な違いは認められず、また、少なくとも見かけ上の生殖・発生は正常であった [Boekelheide ら, 2000]。

FasL の C 末端に点変異を持った *gld* マウス (FasL は Fas と結合出来ない)は、野生型マウスと比較して、精巣重量および精巣あたりの精子数が高かったが、一方で 3 つ以上の生殖細胞がアポトーシスを示す精細管数も高かった。1.0 g/kg/day MEHP (mono(2-ethylhexyl) phthalate)の単回強制経口投与後、野生型マウスでは生殖細胞のアポトーシスの顕著な増加が認められたが、*gld* マウスでは有意な増加は観察されなかった [Richburg ら, 2000]。

Flamingo 1 は、細胞間の接着に関わっていると考えられている G タンパク結合性受容体ファミリーの一つであり、セルトリ細胞において発現が認められている。28 日齢のラットでは、MEHP 1g/kg の単回強制経口投与後、2 時間からセルトリ細胞における Flamingo1 分布の変化が見られ、12 時間後には Flamingo1 は観察されなくなった。このことから、Flamingo1 は、フタル酸エステルのターゲットの一つであると考えられた。

Death Receptor (DR) 4, 5, 6 は、アポトーシス誘導性の情報伝達系であり、精巣で発現が認められている。*gld* マウスの精巣では野生型マウスに比べてこれら受容体の濃度が高いため、Fas 情報伝達系の機能が損なわれた時、これら受容体とその代償として機能するのではないかと考えられている。野生型マウスに対する MEHP 1g/kg の単回強制経口投与では、DR5 は、Fas と同様に、投与 1.5 時間後に増加した一方で、DR6 は投与の 12 時間後に増加が認められた。*gld* マウスでは、MEHP 曝露後、DR5 レベルに変化が見られず、DR6 レベルは投与 3 時間後から増加した [Richburg ら, 2002]。

MEHP を投与した *gld* マウスの精巣で、軽微なアポトーシスが進行していたことから、MEHP が引き起こす生殖細胞アポトーシスには Fas-system 以外の系が関わっていると考えられた。SD ラットの精巣膜分画の DR5 レベルは MEHP 投与後に増加した。DR の ligand activation は活性型 caspase-8 の生成および転写因子 NF B の活性化を引き起こすが、*gld* マウスでは MEHP 曝露後、caspase-8 および NF B-DNA binding の増加が認められた。これらの結果から、MEHP が引き起こす生殖細胞アポトーシスには DR を介した反応が関わっていると推定

されるが、その主体は Fas システムであると考えられた [Giammona, 2002]。

ライディッヒ細胞(ステロイド合成)への影響

MA-10 細胞(ライディッヒ腫瘍培養細胞)を用いた *in vitro* 試験が行われた。MEHP は MA-10 細胞の生存率および蛋白量に影響を及ぼさない濃度で、プロゲステロン生成を抑制した。MEHP は濃度依存的に、MA-10 細胞の構造を変化させ、特に脂肪滴の蓄積を引き起こした。組織形態の計測分析では、MEHP 添加により細胞内脂肪滴が増加し、一方で、ミトコンドリア容積の減少することが示された [Dees ら, 2001]。

MA-10 細胞において、MEHP はホルモン刺激後のコレステロールのミトコンドリア内への輸送およびミトコンドリア内ステロイド合成を抑制した。MEHP は、ミトコンドリア膜間のコレステロール輸送に関わる peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) の転写を直接阻害することにより、PBR レベルを減少させた。 *in vivo* 試験では、SV126 マウスへの DEHP 1.0 g/kg の 7 日間強制経口投与で精巣 PBR mRNA および血清テストステロンレベルの低下が認められたが、PPAR 欠損マウスではこれらの変化は観察されなかった。これらのことから、フタル酸エステルのステロイド合成への影響は PPAR 依存性のライディッヒ細胞 PBR 発現阻害によるものだと考えられた [Gazouli ら, 2002]。

Long-Evans ラットに対する 0, 1, 10, 100 および 200 mg/kg/day の DEHP の強制経口投与が行われた。21 または 35 日齢からの 14 日間投与では、血清ホルモンレベル、精巣および精囊重量に影響は見られなかったが、投与後、精巣より調製したライディッヒ細胞のテストステロン生成低下が認められた(21 日齢: 100 mg/kg 以上, 35 日齢: 10 mg/kg 以上)。21 日齢からの 28 日間投与では、10 mg/kg 以上で血清テストステロンおよび LH レベル増加し、ライディッヒ細胞のテストステロン分泌能も増加した。62 日齢からの 28 日間投与ではホルモンレベルおよびライディッヒ細胞のテストステロン分泌能に変化は見られなかった。いずれの群においても精巣に組織学的変化は観察されなかった [Akingbemi ら, 2001]。

10 週齢の雄の SD ラットに DBP (0, 250, 500, 750, 1,000 mg/kg/day) を 15 日間強制経口投与した結果、750 mg/kg 以上で精巣上体の、また 1,000 mg/kg で精巣の組織学的変化が観察されたが、精巣および副生殖器官重量に変化は見られなかった。500 mg/kg 以上で血清テストステロンレベルの低下および LH レベルの増加、全ての投与群でエストラジオールレベルの低下が観察された [O'Connor ら, 2002]。

酸化ストレスに関する研究

5 週齢の SD ラットに 2.0 % の DEHP を 2 週間混餌投与した結果、精子形成阻害を伴った精巣萎縮が観察された。ビタミンの同時投与(3.0 mg/mL のビタミン C および

1.5 mg/mL のビタミン E, 飲水投与)では、DEHP 単独投与群と比較して精巣への影響が有意に改善されていることがわかった [Ishihara ら, 2000]。

25 日齢の Wistar ラットに 0, 500, 2000 mg/kg/day の DBP を 10 日間強制経口投与した。その結果、精子形成阻害を伴う精巣萎縮が観察されたが、精巣の酸化的 DNA 損傷レベルに有意な変化は観察されなかった。本試験では、通常、酸化的 DNA 損傷レベルが高いことが知られている生殖細胞は、DBP 投与により著しく減少していることから、DBP が引き起こす精巣毒性と酸化的 DNA 損傷との関連性を完全に否定するとは出来ない [Wellejus ら, 2002]。

4-5 週齢の Wistar ラットに 0, 1, 2 g/kg/day の DEHP を 7 日間強制経口投与した結果、精巣のチオール、グルタチオンおよびアスコルビン酸濃度の減少、グルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼ活性の増加、および活性酸素種の生成が引き起こされた。 *In vitro* 試験では、14 日齢 Wistar ラットから調製した生殖細胞とセルトリ細胞への MEHP 添加により、酸化ストレスは生殖細胞で引き起こされたが、セルトリ細胞では引き起こされなかった。また、MEHP は精巣から分離したミトコンドリアからのチトクローム C 放出を引き起こした。これらの結果から、DEHP は酸化ストレスによりミトコンドリアの機能を損傷し、生殖細胞のアポトーシスを引き起こすのではないかと考えられた [Kasahara ら, 2002]。

その他の精巣毒性メカニズムに関連した研究

7 週齢の雄の Wistar Imamichi ラットに 8.0 mmol/kg (2,394 mg/kg) の DBP の単回経口投与を行い、精巣の PPAR regulated 遺伝子および inhibin/activin-follistatin system 遺伝子発現の変化を調べた。投与 6 時間後より精巣の組織学的変化が観察された。PPAR については、シトクローム P450 4A1 mRNA が投与 6 時間後に一過性に増加したが、fatty acyl-CoA oxidase 1 mRNA レベルに変化は見られなかった。PPAR については、投与 時間後より plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) mRNA の顕著な増加が認められたが、uncoupling protein-2 mRNA レベルに変化は見られていない。一方で、投与 12 時間後より inhibin_B mRNA レベルの有意な低下、投与 24 時間後に follistatin mRNA レベルの有意な増加が認められた [Kobayashi ら, 2003]。

28 日齢の Wistar ラットに 400 mg/kg の MEHP を単回強制経口投与した結果、精巣ではアンドロジェンおよび cAMP の応答領域を持つ TRPM (testosterone-repressed-prostatic-message)-2 遺伝子の発現が投与後一時的に増加した。前立腺ではこのような変化が認められなかったことから、精巣で観察された TRPM-2 遺伝子発現レベルの増加は、cAMP 減少によるものであると考えられた。この結果に加え、精巣および前立腺のアンドロジェン受容体分布に変化が見られなかったことより、MEHP が引き起こす精巣毒性のメカニ

ズムにはアンドロゲンレセプターは含まれないと考えられた [Dalgaard ら, 2001]。

25 日齢の SD ラットに 2,000 mg/kg/day の DEHP を 14 日間強制経口投与した結果、投与 1 日目より生殖細胞のアポトーシスが認められた。精巣の亜鉛量は投与 3 日目から有意に低下したが、亜鉛トランスポーター ZnT-1 mRNA 発現レベルに変化は見られなかった。これらの結果から DEHP による精巣毒性発現には生殖細胞のアポトーシスが重要な役割を果たしており、亜鉛の枯渇は二次的な変化であると考えられた [Park ら, 2002]。

種差に関連した研究

6 週齢の B6C3F1 マウスに DEHP (0, 100, 500, 1,500, 6,000 ppm) を 104 週間混餌投与した結果、1,500 ppm (292 mg/kg/day) 以上の投与群で精巣および精巣上体の精液減少症および精巣上体の未成熟および異常精子が観察され、無毒性量は 98.5 mg/kg/day とされた。同じ方法で行われたラットの試験(無毒性量: 5.8 mg/kg/day)において観察された多くの変化が、本試験では観察されなかった [David ら, 2000]。

生後 100 日齢の雌雄マーマーモセットに 65 週間 DEHP を 2,500mg/kg まで経口投与した結果、精巣を含む全ての臓器、並びに各種ホルモン類に影響は見られなかった。また、Ring-U ¹⁴C DEHP を 3 ヶ月齢、18 ヶ月齢及び 65 週間 DEHP 投与後に単回投与した結果、精巣を含む雄生殖器への蓄積性は認められなかった [Tomonari ら, 2003 & Kurata ら, 2003]。

その他の精巣毒性に関連した研究

6 週齢 F344 ラットおよび B6C3F(1)マウスにそれぞれ 12,500 ppm (approx. 804 mg/kg/day) および 6,000 ppm (approx. 1,318 mg/kg/day) の DEHP を 78 週間混餌投与後、26 週間の回復期間を設け、観察された影響を、同じ条件で行われた 104 週間連続投与試験の結果と比較した。肝臓への影響については、連続投与群と比較して回復群ではその発症率は有意に低下した。一方で、ラットで観察された精巣および下垂体への影響(去勢細胞および精子形成欠如)に回復性は見られなかった [David ら, 2001]。

2. フタル酸エステルの発生毒性

抗アンドロゲン作用(妊娠期投与)

フタル酸エステルによる抗アンドロゲン作用は妊娠後期に投与された時、精巣ライディッヒ細胞でのテストステロンの合成低下を起こし、その結果テストステロンによる雄性生殖器の発育を抑制したためと考えられていたが、この毒性発現機構を支持する研究結果が以下の様に報告された。

DEHP

SD ラットの妊娠 3 日から出産後 21 日まで 375, 750, 1,500 mg/kg/day の DEHP を強制経口投与した結果、

750 mg/kg 以上の投与群の雄児で肛門生殖器間距離の短縮、乳頭および乳輪保持、精巣包皮分離の遅れ、精巣下降不全などの抗アンドロゲン作用が認められた。375 mg/kg 投与群でも乳頭および乳輪保持、精巣および腹側前立腺重量の有意な低下が引き起こされた。また、すべての DEHP 投与群では、雄動物の成熟後の性行動に異常が見られた [Moore ら, 2001]。

SD ラットの妊娠 14 日から出産後 2 日まで DEHP 750 mg/kg/day を強制経口投与した結果、胎児期及び新生児期の雄の精巣テストステロン生産量および精巣テストステロン濃度は有意に低下した。新生児期には、肛門生殖器間距離の短縮、ライディッヒ細胞の肥大および胚細胞(gonocyte)の増加、多核化が観察された [Parks ら, 2001]。

Long-Evans ラットの妊娠 12 から 21 日まで DEHP 100 mg/kg/day を強制経口投与した。出生 21, 35, 90 日後の雄児を検査した結果、精巣および精囊重量に変化は見られなかった。21 および 35 日齢では、血清テストステロンおよび LH レベルの低下が、また、21 日齢では、精巣より調整したライディッヒ細胞のテストステロン分泌能低下が認められたが、90 日齢ではこれらの変化は見られなかった [Akingbemi ら, 2001]。

DBP

Wistar ラットの妊娠 15 から 17 日に MBP (mono-*n*-butyl phthalate) (250, 500, 750 mg/kg)を経口強制投与した催奇形性試験で、すべての投与群で停留辜丸および肛門生殖器間距離の短縮が観察された。この試験は、抗アンドロゲン作用が MBP によることを直接的に示している [Ema & Miyawaki, 2001a]。

SD ラットの妊娠 12 から 21 日まで DBP 200 mg/kg を強制経口投与した結果、雄胎児の精巣のテストステロンおよびアンドロステンジオンレベル、またステロイド合成関連遺伝子の発現レベルの低下が認められた。また、胎児の精巣では、細胞増殖および生存に関連した遺伝子発現の変化が認められたが、TRPM-2 と bcl-2 の発現増加はライディッヒ細胞の過形成に関係し、c-kit のダウンレギュレーションが生殖細胞の変性に関与していると考えられた [Shultz ら, 2001]。

CD ラットの妊娠後期に DBP を投与した結果、胎児精巣のテストステロン濃度の減少、ライディッヒ細胞の過形成、多核生殖細胞の増殖が認められた。ライディッヒ細胞の過形成はテストステロンの減少の代償効果で、それが不十分のため生殖器奇形が生じると考えられた。生殖細胞の多核化と増殖はセルトリ細胞の機能低下を示唆している [Mylchreest ら, 2002]。

Wistar King A ラットの妊娠 7-10 日、11-14 日、15-18 日に MBP (300 mg/day)を経口強制投与し、妊娠 20 日に雄胎児を解剖した結果、MBP 投与群では対照群と比較して精巣が腹腔内上部に位置していた。その影響は

妊娠7-10日投与<11-14日投与<15-18日投与の順で強かった。また、MBP投与群では伸張した精巣導帯および肥大した精巣提帯が観察された。組織学的検査では、MBP投与群では未発育の精巣上部が観察された。精巣テストステロン濃度は減少した [Shonoら, 2000]。

Wistar King A ラットの妊娠15-18日にMBP (300 mg/day)の強制経口投与し、妊娠19日目に雄胎児を解剖した結果、精巣は腹腔内の上部に位置し、導帯は対照群と比較して細かった。この実験でMBPは精巣下降の前半時期に影響を及ぼすことを示した [Imajimaら, 2001]。

BBP

ラット(Harlan Cpb-WV strain)の妊娠5-16および6-20日に270-2,100 mg/kg/dayのBBPを強制経口投与した催奇形性試験で、雄胎児に精巣転位が見られ、ベンチマークドースを95 mg/kg/dayと算出している [Piersmaら, 2000]。

Wistarラットの妊娠15-17日にBBP (250, 500, 1000 mg/kg/day)を強制経口投与した結果、雄胎児の500 mg/kg以上に辜丸停留、肛門生殖器間距離の短縮が認められ、この頻度はMBPにより引き起こされたものと同程度であった [Ema & Miyawaki, 2002]。

全般的な機構

ほ乳類における発育初期のアンドロジェンは生殖器の雄化発育に必須である。すなわち、出生前後に雄が抗アンドロジェンに暴露されると永久に形態的にも、生理的にも雄化が失われる。逆に、雌が外因的にアンドロジェンに暴露されると雄化されてしまう。妊娠動物にテストステロンやビンクロゾリンを投与して、その証明を行った [Hotchkissら, 2002]。

精巣発生毒性(新生児期投与)

DEHP

生後3日のラットにDEHPまたはMEHPを単回投与すると、投与24時間後に多くの大型多核生殖細胞が認められ、48時間まで持続した。セルトリ細胞へのBrdUの取り込みは明らかに減少した。しかし、血清FSHレベルの変化は認められなかった。また、細胞分裂に関連した蛋白のp27kip1, cyclins D1, D2, D3のうち、cyclin D2のmRNAが用量依存的に特異的にダウンレギュレーションされた [Liら, 2000]。

Long-Evans ラットの授乳期(出産後1-21日)に、DEHP 100 mg/kg/dayを強制経口投与し、出生21, 35, 90日齢の雄児を検査した。その結果、21日齢で、血清テストステロンレベルの低下が観察されたが、LHレベルに影響は認められなかった。35および90日齢では血清ホルモンレベルに影響は見られなかった [Akingbemiら, 2001]。

DBP

DBPによる精巣毒性に酸化的ストレスが関与しているかどうかを検索する目的で、Wistarラットの妊娠7日から分娩後17日までDBP 500 mg/kg/dayを強制経口投与したが、精巣の8-OH-dGレベルの変化は認められなかった [Wellejusら, 2002]。

In vitro 試験

TM4 cell (11-13日齢マウスのセルトリ細胞)にDEHPを添加した。9時間後、gap junctional intercellular communication (GJIC)のダウンレギュレーションが観察されたが、用量依存性は認められなかった。DEHPは、クロマチン縮合、核の切断など、セルトリ細胞のアポトーシス様変化を阻害した [Kangら, 2002]。

その他の in vivo 発生毒性

DEHP

Crlj: CD-1 マウスに5週齢から次世代の9週齢まで、DEHP (0, 0.01, 0.03, 0.09%) 混餌投与し、5種の神経行動毒性を試験したところ、正向反射の遅延のみが全般的に見られ、生後7日目の雄(0.09%)においては顕著であった [Tanaka, 2002]。

DBP

SDラットの妊娠10日にDBP (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 g/kg) およびMBP (0.4, 0.8, 1.2, 1.6 g/kg)の単回強制経口投与を行い、妊娠12日目に胎児を検査した結果、用量依存的な発生毒性(頭殿長の短縮および体節数の減少など)が観察された [Saillenfaitら, 2001]。

妊娠および偽妊娠ラット(Wistar)の妊娠0-8日目まで0, 250, 500, 750, 1,000 mg/kg/day MBPの強制経口投与による催奇形試験で、妊娠ラットに着床数低下、着床前胚致死、胎児死亡の増加、同産群あたりの生存胎児数の低下が観察された [Ema & Miyawaki, 2001b]。

BBP

ラット(Harlan Cpb-WV strain)の妊娠5-16および6-20日に270-2,100 mg/kg/dayのBBPを強制経口投与した催奇形試験で、胎児の体重低下、骨格変異および内臓奇形発現率等の増加が認められた [Piersmaら, 2000]。

Wistarラットの妊娠15-17日にBBP (250, 500, 1000 mg/kg/day)を強制経口投与した結果、雄胎児の生殖器形態異常以外に生存胎児数及び胎児体重の減少が認められた [Ema & Miyawaki, 2002]。

SDラットの妊娠11-13日にBBP (250, 1,000, 1,500, 2,000 mg/kg/day)を強制経口投与した催奇形性試験で、生存胎児数の低下、吸収胚数の増加、骨化の減少、口蓋裂等が見られた。母動物では、肝臓メタロチオネイン濃度が有意に増加したが、肝臓および血清亜鉛濃度に影響は認められず、BBPが引き起こす発生毒性は亜鉛代謝に関連したものではないと考えられた [Uriu-Adamsら, 2001]。

D79P (di-(C₇-C₉ alkyl) phthalate), D911P (di-(C₉-C₁₁ alkyl) phthalate)

D79P は側鎖が C7 から C9 までの混合物で、D911P は側鎖が C9 から C11 までの混合物である。したがって、本試験は DINP (di-*iso*-nonyl phthalate) の毒性試験と考えることが出来る。

SD ラットの妊娠 1-19 日に D79P (250, 500, 1,000 mg/kg/day) を強制経口投与した発生毒性試験で、1000 mg/kg/day 投与群の胎児に腰肋過剰発現率の有意な増加が見られ、無毒性量は 500 mg/kg/day であった。また、同ラットの妊娠 1-19 日に D911P (250, 500, 1,000 mg/kg/day) を強制経口投与し発生毒性試験では、500 mg/kg/day 以上の投与群の胎児に腰肋過剰発現率の有意な増加が見られ、無毒性量は 250 mg/kg/day であった。なお、母体毒性はいずれの群でも見られなかった [Fulcher ら, 2001]。

その他の *in vitro* 発生毒性

マウスの原始胚細胞(妊娠 11.5 日の胎児より摘出)を用いた *in vitro* の試験で、N-ethyl-N- nitrosourea および adriamycin は増殖抑制およびアポトーシスの誘導を起こしたが、MEHP にはこうした作用はなく単層体細胞への吸着を低下させた。なお、*in vivo* の試験では MEHP の影響は見られなかった [Iona ら, 2002]。

妊娠 12.5 日のラットから摘出した胚四肢芽細胞培養系において、DBP および MBP は細胞毒性と分化抑制を引き起こす。その強度は DBP ≫ MBP である。抗酸化剤であるビタミン E およびカタラーゼは DBP のこの作用を抑制した [Kim ら, 2002]。

Wistar ラットの妊娠 9.5 日に摘出した胎児および妊娠 12.5 日に摘出した胎児の中脳および体肢芽に DEHP, DBP, BBP を添加した培養試験で、DEHP > DBP > BBP の順に胎児毒性が強く、中脳より体肢芽の方が感受性の高かった。しかし、活性代謝体であるモノエステルでの試験は行われていない [Rhee ら, 2002]。

Pyla cells (不死化ラット骨芽細胞)を用いた試験で、DBP および BBP は FGF-2 (fibroblast growth factor: 線維芽細胞成長因子)の核内移動に影響を及ぼした [Menghi ら, 2001]。

DBP および BBP は Pyla cells のアクチン細胞骨格に特異的な変異を引き起こし、細胞は紡錘型から円形に変わった。アポトーシスに影響は与えなかった [Marchetti ら, 2002]。

SD ラットの妊娠 10 日の胎児を培養し、MBP に 48 時間曝露した結果、頭殿長の短縮および体節数の減少などが観察された [Saillenfait ら, 2001]。

3. フタル酸エステルの生殖毒性

DEHP

Crj: CD-1 マウスに 5 週齢から次世代の 9 週齢まで、DEHP (0, 0.01, 0.03, 0.09 %) 混餌投与した結果、高用量群で、新生児生存率が有意に低下した [Tanaka, 2002]。

DBP

SD ラットによる NTP の連続繁殖試験を DBP について実施した。親世代ではリッターサイズの減少や児の体重減少程度であったが、F1 では精子数の減少と生殖器形態異常を伴った顕著な受胎減少が 650 mg/kg/day に見られた。NOAEL は得られず、LOAEL は 66 mg/kg/day であった。CHIT の試験でも同様の結果が得られ、RfD は 66 g/kg/day とされた。ヒトの曝露データから乳児は最悪の場合 RfD のレベルを摂取していると推定されたが、加水分解によりモノエステルのできる可能性が非常に低いことから、DBP による毒性発現の可能性は非常に低いと思われる [Foster ら, 2000]。

DIDP (di-*iso*-decyl phthalate)

CrI: CD BR- VAF/Plus (Sprague Dawley) ラットを用いた DIDP の 2 世代試験が行われ、出生率、新生児生存率および体重の低下、肝細胞肥大が見られたが、0.4% までは生殖指標に影響は見られなかった。一方、膈開口及び包皮分離の遅延は傾向のみで、その他の抗アンドロゲン作用は認められなかった [Hushka ら, 2001]。

4. フタル酸エステルと卵巣

全般的な機構

フタル酸エステルの雌生殖器への作用機構についてのレビューで、新しい情報としては、雌ラットに DEHP, DBP, DPP, BBP を投与した結果、DEHP および DBP 投与群では、卵巣で多くの嚢胞が観察され、血清エストロンおよびエストラジオール濃度等が変化した。この結果から、DEHP はエストラジオールの生成および代謝に影響を及ぼすが、DBP はエストラジオールの代謝にのみ影響を及ぼすのではないかと考えられた。ラットの顆粒膜細胞を用いた *in vitro* 試験では、MEHP はエストラジール生成および RNA アロマターゼ活性を低下させた。PPAR および PPAR に特異的なリガンドも同様な影響を示したが、PPAR に特異的なアンタゴニストを用いた試験ではアロマターゼは部分的にしか抑制されなかった [Lovekamp-Swan & Davis, 2003]。

BBP

卵巣摘出ラットに BBP を投与すると、視索前野における progesterone receptor mRNA が増加した [Funabashi ら, 2001]。

エストロジェンは卵巣摘出ラットでインスリン処理(低血糖)後の LH パルス数のみを減少させたが(強さは変化なし)、BBP も同様の作用があった [Kawaguchi ら, 2002]。

5. アジピン酸エステルの生殖・発生毒性