

DEHA については、OECD 高生産量化学物質初期評価において米国 EPA の作成した評価文書が 2000 年に合意された。その後の新しい試験報告はないので、評価文書の要点を以下に要約する。なお、その他のアジピン酸に関する報告も以下の 1 件だけである。

DEHA の反復毒性試験では生殖器系への毒性発現は見られていない。ラットの一世代繁殖試験(交配前 10 週間の混餌投与)では 12,000ppm で母獣および次世代の体重減少のみが認められたが、生殖指標には影響は見られなかった(CEFIC, 1988a)。雄マウスへの高用量単回腹腔内投与により、受精率の低下、胎児死亡率の増加が認められた(Singh ら, 1975)。催奇形性試験ではラットの妊娠 5, 10, 15 日に腹腔内投与により、胎児の体重減少が見られたが、奇形は見られなかった(Singh ら, 1973)。ラットの妊娠期間を通して混餌投与した試験では 1,080 mg/kg/day で着床前胚致死が見られたが、奇形の有意な発生は見られなかった(CEFIC, 1988b)。しかし、有意ではないものの、170 mg/kg/day で骨形成の遅延が見られたことから、実験者は 28 mg/kg/day を NOEL と判定している。

化粧品として使用されている stearamide DIBA-stearate の評価文書の中に、その成分として dibutyl adipate (DBA) と diisopropyl adipate (DIPA) の毒性に関する記載がある(Lanigan, 2001)。DBA については、ラットの妊娠中に約 500 mg/kg 腹腔内注射した結果、胎児の形態異常の頻度が増加したが、それより低い用量では影響はなかった。DIPA については生殖毒性関係の情報の記載はなかった。

その他の情報

DEHA はラット及びマウスへの反復投与により、体重増加抑制、肝肥大、肝ペルオキシソーム増殖が見られ、マウスにおいてのみ肝腫瘍の発生が見られている(NTP, 1982)。

以上のように、ある程度評価が出来る情報は DEHA についてのみであり、その結果も高用量での軽微な影響のようである。しかし、試験が行われた年代が古く、十分な検査が行われていたかどうかは不明である。

平成 15 年度調査分

1. ヒトに関連した情報

低受胎性のカップルの男性 168 人の尿中フタル酸代謝物 8 種の量を測定し、精子の濃度、動き、形態との関係を調べた結果、モノブチルフタレート(MBP)量と精子の運動、モノベンジルフタレート(MBzP)量と精子の濃度に関係があることが分かった [Duty ら, 2003a]。

168 名の男性の精液と尿を採取し、尿中 8 種のフタル酸モノエステルレベルと精子の DNA ダメージの関係をコメントアッセイで調べた結果、尿中モノエチルフタレート(MEP)と精子の DNA のダメージの間に相関関係があ

ることが分かった。MBP, MBzP, MMethylP, MEHP とは有意な相関関係はなかった [Duty ら, 2003b]。

新生児 84 人の臍帯血中 DEHP および MEHP を測定した結果、MEHP 陽性の新生児の在胎期間は MEHP 陰性の新生児より短かった(陽性: 38.16 $\pm$ 2.34 週, 陰性: 39.35 $\pm$ 1.35 週) [Latini ら, 2003]。

子宮内膜症の女性と、対照群の女性の血中 DEHP と MEHP 濃度を測定した結果、DEHP の濃度は子宮内膜症の女性で高い値であった [Cobellis ら, 2003]。

2. DEHP(MEHP)に関連した情報

雄児の精巣

Wistar ラットの妊娠中、授乳中に DEHP (300, 750 mg/kg) 単独、DINP (750 mg/kg) 単独、DEHP (750 mg/kg) と DEHA (400 mg/kg) の複合、または DEHP (300mg/kg) と DINP (750 mg/kg) の複合投与した結果、DINP と DEHP が雄胎児(妊娠 21 日)の精巣テストステロン(T)産生、精巣及び血中の T レベル減少、血中 LH レベル上昇させた。肛門生殖突起間距離(AGD)の短縮と乳頭数の増加が DEHP 暴露の新生児雄ラット(生後 13 日)にみられた。血中インヒビン B レベルの減少は春機発動前の雄ラットで顕著で、成体でもみられた。DEHP の内分泌への作用は DEHA によって変化しなかったが、DEHP と DINP の複合投与で T 合成の抑制傾向が認められた [Borch ら, 2004]。

精巣

DEHP (100, 1000 mg/kg) を 4 週齢の雄 Wistar ラットに 5 日間与えた結果、DEHP の精巣に与える効果はアンドロステンジオンの変化によるものというよりむしろ、精巣内のテストステロン(T) 5 α -R, アロマトラーゼ及び CYP2C11/3A2 を変化させ、T 代謝を変化させているものと考えられた [Kim ら, 2003]。

DEHP (0.004-4 mg/g) を雄 ddy マウスに暴露させ、精巣における FasL, Fas 及び Caspase-3 発現と DNA フラグメンテーションを 12 時間後に調べた。免疫細胞学的実験により 4 mg/g の DEHP 暴露群のセルトリ細胞内の FasL と精母細胞近くの Fas と精母細胞内の Fas と Caspase-3 の分布が明らかになった。Fas ポジティブの精母細胞には DNA フラグメンテーションがあった。精巣 0.5 g 中の断片化した DNA の核の最大数は、3 (0.004 mg/g), 5 (0.04mg/g), 7 (0.4 mg/g), 22 (4 mg/g) であった。また 4 mg/g DEHP 暴露では、断片化した DNA がコントロール群の 2.2 倍であった。DEHP 0.04 mg/g の曝露でも精巣のフラグメンテーション及びアポトーシスを惹起することが示唆された [Ichimura ら, 2003]。

CD-1 マウスの精細管を MEHP (0.01, 0.1 mM) と共に 4, 8, 24 時間インキュベーションした結果、8 時間でアポトーシス細胞が増加し、DNA 合成は減少傾向にあった [Suominen ら, 2003]。

遺伝子(雄児)

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が、雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ、ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する DEHP, DBP, BBP の insl3 遺伝子に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠 14-18 日に経口投与し、18 日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンと insl3 遺伝子の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson ら, 2004]。

遺伝子(雄)

DEHP のターゲット遺伝子を特定するために、雄 C57BL/6 マウスに 13 週間 DEHP (0.2, 1.0%) 混餌投与で育てた後、肝臓の遺伝子発現のマクロアレイ解析を行った。DEHP によるアップレギュレーションは、Vanin-1 (精巣発生調整)、ホルモン代謝に関与する酵素などでみられ、11betaHSDI, HSD3b5 ではダウンレギュレーションが認められた。また、ステロイド産生遺伝子 cyp7B1 では発現が低下したが、リン脂質輸送蛋白と cyp2B9 は誘発された。また、ALDH3, GETtheta2, Id2 などとも DEHP に影響された [Wong ら, 2002]。

ヒトプロトタイプ c-Ha-ras 遺伝子を持った rasH2 マウスと野生型のマウスに DEHP の混餌投与を 26 週間行った結果、rasH2 マウスと野生型マウスの両方に、肝臓、腎臓異常のほか、精巣の萎縮、鼻腔エオシン好性体増加などがみられた。肝臓のセルのアデノーマは雄 rasHs マウスで上昇した [Toyosawa ら, 2001]。

卵巣

ウシの卵細胞 (Cumulus-oocyte complexes) を MEHP (0, 25, 50, 75, 100 M) と共に培養すると MEHP (75, 100 M) 存在下では卵細胞が胚胞の状態に残っていることが多かった。また、メタフェーズ II に至った卵細胞も減少した。卵丘の発現には変化はなかった。裸化卵細胞では反応がより顕著で、特に MEHP 50 M 以上ではメタフェーズ II に至った卵細胞が存在しなかったが、MEHP の存在しない培地を用い、その後続けて 24 時間培養すると多くの卵細胞がメタフェーズ II に至った [Anas ら, 2003]。

性腺刺激ホルモン (eCG) を未成熟雌 F344 ラットに投与し排卵を誘発させ、DEHP 摂取の排卵に対する影響を調べた。DEHP (500 mg/kg) 4 日間の摂取群では、対象群と比較して排卵される卵の数に減少がみられた [Sekiguchi ら, 2003]。

繁殖

DEHP 0%, 0.03% (44-58 mg/kg/day) を含む飼料を雌雄の CD-1 マウスの生後 5 週から与え、生後 9 週で cross-mating して、児分娩まで与えた。繁殖成績に DEHP の有害影響は認められなかった [Tanaka, 2003]。

形態異常

ESBO (epoxidized soy bean oil), DEHP, BBP, DBP の胚に対する影響を whole embryo culture, midbrain 及び limb bud culture で調べた。whole embryo culture では DEHP (1, 10, 100 g/ml), BBP 及び DBP (10, 100, 1000 g/ml) は胚の発生及び成長に対する阻害作用がみられた。BBP, DBP による影響は、脳細胞より肢芽細胞で強くみられた。ESBO の胚に対する影響はみられなかった [Seek ら, 2002]。

新生児の肺

Wistar ラットの妊娠 15 日から分娩後 2 日までに DEHP 1% 含有飼料を与え (1000 mg/kg/day 以上)、生後 2 日の新生児ラットの肺 (組織学的に 24-36 週齢のヒトの胎児の肺と類似) を調べたところ、慢性肺疾患のヒト児の異常組織所見と類似していた [Magliozzi ら, 2003]。

3. DBP(MBP)に関係した情報

雄児の精巣

SD ラットの妊娠 12-17 日に 500 mg/kg の DBP を与え、胎児の精巣、コレステロール輸送やステロイド産生経路への影響を調べた結果、テストステロン (T) 産生低下、SR-B1, P450SCC, StAR, CYP17 の mRNA 発現減少がみられた。T, mRNA, タンパクレベルは DBP 投与後 24 時間は低かったが、DBP 投与停止 48 時間後には増加した。精巣の培養実験においても DBP はコレステロール輸送や 17beta-HSD を除く T 合成経路機能を減少させた。高 DBP は胎児精巣においてコレステロール輸送及びステロイド産生に必要なタンパク発現の急激な増加と可逆性の低下を惹起し、これらが T 合成を低下させ雄生殖器の異常発現の原因と考えられる [Thompson ら, 2003]。

SD ラットの妊娠 12-21 日に DBP (500 mg/kg/day) を経口投与し雄児の生殖器を調べた。ライディヒ細胞の凝集、多核細胞化始原生殖細胞の増加、始原生殖細胞数の増加が胎児精巣では認められたが、新生児ラットにはみられなかった。出生後 16-日の子で精母細胞数の減少、45-70 日では精上皮に変性がみられ、その程度は 70 日齢で最も顕著であった。70 日齢の子に精巣上体の形態奇形が認められた [Barlow ら, 2003]。

Dutch-Belted ウサギの妊娠 15-29 日、雄ウサギの出生後 4-12 週または生後 6-8 ヶ月の 12 週間に DBP (0, 400 mg/kg/day) を暴露させて、雄ウサギを検査した。経母体暴露を受けた雄ウサギにもっとも顕著な毒性が認められた。精子数の減少、精巣及び副生殖腺の重量減少、血中テストステロンレベル低下、精巣の組織学的変化、異常精子数増加が認められた。尿道下裂、前立腺低形成、癌化細胞を伴う停留精巣が認められた [Higuchi ら, 2003]。

Wistar-King ラットの妊娠 15-17 日に MBP (125, 250, 500, 1000 mg/kg) を強制経口投与し、出生前後のラットの精

巢の下降の程度を測定した。500 mg/kg 以上の投与量で出生前後で精巣下降不全が認められた [Shono ら, 2003]。

精巣

DBP の毒性が腎機能低下によって影響を受けるかを調べるために、葉酸の皮下注射 (300 mg/kg を 5 週間) により腎機能障害を誘発させた雄 F344 ラットに DBP を 4 週間 1200, 5000, 20,000 ppm (60, 250, 1000 mg/kg) 混餌投与した。精細管変性、精子形成減少、異常の精子数増加は、葉酸 + DBP 2000 ppm 群で DBP 単独群よりも顕著であった [Tsutsumi ら, 2004]。

SD ラットに DBP, BBP, DCHP を投与したところ、セルトリ細胞の細胞質の微小管網に対する影響は観察されなかった [Nakagomi ら, 2001]。

遺伝子 (雄児)

Wistar-Imamichi ラットに DBP (8.6 mmol/kg: 2393 mg/kg) を 1 回経口投与し精巣中の PPAR に誘発される遺伝子発現変化、インヒビン/アクチビン-フォリスタチンシステムに関連する遺伝子発現変化を調べた。PPAR に調節される CYP450, 4A1, mRNA の増加は有意だが肝中での増加ほどでなかった。一方、精巣中の PAI-1 の mRNA レベルが著しく増加し、DBP による PPAR の活性化を示唆した。PAI-1 の増加は、精子形成の破壊に関係がある可能性がある。アクチビン B (インヒビン (B) のホモ二量体) は、精原細胞増殖を促進することが知られているが、インヒビン (B) の mRNA 減少とフォリスタチン (アクチビン結合蛋白質) の mRNA の上昇が DBP 投与でみられた。DBP による精巣萎縮症のメカニズムの一つとしてインヒビン/アクチビン-フォリスタチンシステムに関連する遺伝発現の変化が示唆された [Kobayashi ら, 2003]。

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ、ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する DEHP, DBP, BBP の insl3 遺伝子に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠 14-18 日に経口投与し、18 日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンと insl3 遺伝子の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson ら, 2004] (前掲-DEHP)。

雄カエル

遺伝子的に雄ガエル (*Rana rugosa*) である受精後 19-23 日のオタマジャクシを DBP に暴露させ、40 日に生殖腺を調べた。ポジティブコントロールである 17-エストラジオール (0.01, 0.1, 1 g) の暴露では一部もしくはすべてのオタマジャクシの生殖腺が卵巣様構造となった。DBP (1, 10 g) 暴露の一部のオタマジャクシでも同様の結果がみられた [Ohtani ら, 2000]。

形態異常

BBP (281-1687 mg/kg) とその代謝物である MBP (200-1200 mg/kg) と MBzP (231-1384 mg/kg) を妊娠 8 日の OF1 マウスと妊娠 10 日の SD ラットに経口投与したところ、マウスでは胚致死と奇形がみられたが、ラットでは影響は認められなかった。Whole embryo culture でも MBP 及び MBzP に対する感受性はマウスの方が高かった [Saillenfait ら, 2003]。

ESBO (Epoxidized soy bean oil), DEHP, DBP, BBP の胚に対する影響を whole embryo culture, midbrain and limb bud culture で調べた。Whole embryo culture では DEHP (1, 10, 100 g/ml), BBP 及び DBP (10, 100, 1000 g/ml) は胚の発生及び成長に対する阻害作用がみられた。BBP, DBP による影響は、脳細胞より肢芽細胞で強くみられた。ESBO に胚に対する影響はみられなかったが、DEHP, DBP, BBP の高濃度では胚に対する影響がみられた [Seek ら, 2002] (前掲-DEHP)。

4. BBP (MBP and MBzP) に関連した情報

雄児

Wistar ラットの妊娠 15-17 日に MBzP を経口投与して胎児に対する影響をしらべたところ、250 mg/kg 以上の投与群で雄胎児の AGD 短縮及び精巣下降不全の頻度の増加がみられた [Ema ら, 2003]。

雄児の精巣

Wistar-King ラットの妊娠 15-17 日に MBP (125, 250, 500, 1000 mg/kg) を強制経口投与し、出生前後のラットの精巣の下降度を測定した。500 mg/kg 以上の投与量で出生前後に精巣下降不全が認められた [Shono ら, 2003] (前掲-DBP)。

遺伝子 (雄児)

Insulin-like hormone 3 (insl3) 遺伝子の不活性化が、雄マウスの生殖器の発生に影響を及ぼすことを踏まえ、ラットで雄生殖器発生への影響を惹起する DEHP, DBP, BBP の insl3 遺伝子に対する影響を調べた。SD ラットの妊娠 14-18 日に経口投与し、18 日齢の雄胎児を調べた結果、ステロイドホルモンと insl3 遺伝子の減少が認められ、精巣毒性における新たなメカニズムが示唆された [Wilson ら, 2004] (前掲-DEHP, DBP)。

精巣

SD ラットに DBP, BBP, DCHP を投与したところ、セルトリ細胞の細胞質の微小管網に対する影響は観察されなかった [Nakagomi ら, 2001] (前掲-DBP)。

形態異常

BBP (281-1687 mg/kg) とその代謝物である MBP (200-1200 mg/kg) と MBzP (231-1384 mg/kg) を妊娠 8 日の OF1 マウスと妊娠 10 日の SD ラットに経口投与したところ、マウスでは胚致死と形態異常がみられたが、ラットでは影響は認められなかった。Whole embryo culture でも MBP 及び MBzP に対する感受性はマウスの方が高

かった [Saillenfaitら, 2003] (前掲-DBP)。

ESBO (Epoxidized soy bean oil), DEHP, DBP, BBP の胚に対する影響を whole embryo culture, midbrain and limb bud culture で調べた。Whole embryo culture では DEHP (1, 10, 100 g/ml), BBP 及び DBP (10, 100, 1000 g/ml) は胚の発生及び成長に対する阻害作用がみられた。BBP, DBP による影響は、脳細胞より胚芽細胞で強くみられた。ESBO に胚に対する影響はみられなかったが、DEHP, DBP, BBP の高濃度では胚に対する影響がみられた。[Seekら, 2002] (前掲-DEHP, DBP)

5. DINP(MINP)に関連した情報

雌雄児

SD ラットの妊娠 15 日-分娩後 10 日に DINP (400, 4000, 20,000 ppm) を混餌投与し、新生児ラットを調べた結果、20,000 ppm 投与群の児に減数分裂精母細胞及びセルトリ細胞の変性、黄体減少がみられたが、変化はわずかで最小限にとどまっていた。SDN-POA 量にも変化がなかった [Masutomiら, 2003]。

雄児の精巣

Wistar ラットの妊娠中、授乳中に DEHP (300, 750 mg/kg) 単独, DINP (750 mg/kg) 単独, DEHP (750 mg/kg) と DEHA (400 mg/kg) の複合、または DEHP (300mg/kg) と DINP (750 mg/kg) の複合投与した結果、DINP と DEHP が雄胎児 (妊娠 21 日) の精巣テストステロン (T) 産生、精巣及び血中の T レベル減少、血中 LH レベル上昇させた。肛門生殖突起間距離 (AGD) の短縮と乳頭数の増加が DEHP 暴露の新生児雄ラット (生後 13 日) にみられた。血中インヒビン B レベルの減少は春機発動前の雄ラットで顕著で、成体でもみられた。DEHP の内分泌への作用は DEHA によって変化しなかったが、DEHP と DINP の複合投与で T 合成の抑制傾向が認められた [Borchら, 2004] (前掲-DEHP)。

6. Polyvinylacetate Phthalate についての情報

生殖発生

ラット、マウス、ウサギ、ビーグル犬に対する PVAP の発生、生殖、急性、慢性毒性などを調べた結果、急性経口毒性はマウス、ラットでは低かったが (LD50 > 8000 mg/kg)、ビーグル犬では若干高かった (lethal dose = 5000 mg/kg)。生殖発生毒性は認められなかった。NOAEL はウサギ発生毒性試験で 100 mg/kg/day、24 ヶ月ラットとイヌ試験で 500 mg/kg/day、ラット 1 世代繁殖で 1000 mg/kg/day であった [Schonekerら, 2003]。

7. 総説

NTP-CERHR の 7 種のフタル酸エステル類 (フタル酸エステル類: DBP, BBP, DnHP, DEHP, DnOP, DINP, DIDP) に関する評価文書作製 (2002 年) 後の研究について評価し以下の 4 項目にまとめられた。

- 1) 一般集団内のフタル酸エステル類の暴露は NTP-CERHR の推定値と同等かそれよりも低いレベ

ルであった。

- 2) げっ歯類の実験から得られたデータはヒトのリスク評価にへ有用である。
- 3) 霊長類のある特定のフタル酸に対する感受性は、げっ歯類のものより低いかもしれない。
- 4) 医療器具からの DEHP 摂取は NTP-CERHR が設定した NOAEL より高い可能性があるが、玩具からの DINP 摂取は危険なレベルには達していないと推測される [McKeeら, 2004]。

8. アジピン酸エステルについての情報

Wistar ラットを用い DEHA 投与による発生毒性を調べた結果、DEHA による妊娠期間の延長 (800 mg/kg/day)、出生後の死亡率増加 (400, 800 mg/kg/day)、新生児ラットの持続的体重減少 (800 mg/kg/day) が認められた。抗アントロゲン作用は認められなかった [Dalgaardら, 2003]。

平成 16 年度調査分

1. ヒトに関連した情報

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

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

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

ヒト PPAR

様々なフタル酸モノエステルによるマウスおよびヒトの PPAR α , β , γ の活性化を調べた結果、PPAR α と PPAR γ の活性化は、側鎖の長さにもなって上昇した。また、マウス PPAR α と PPAR β はヒト PPAR α と PPAR β より、低濃度で活性化されたが、PPAR γ についてはマウス、ヒトとも同じような感受性を示した。フタル酸モノエステルによる PPAR α と PPAR γ のトランス活性化と PPAR α ターゲット遺伝子 mRNA と PPAR γ による脂肪細胞変異の誘発には各々相関関係があった [Bilityら, 2004]。

2. DEHP (MEHP) に関連した情報 精巣

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

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

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

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

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

LE ラットの PNDs 21-90 に強制経口投与した 10 mg/kg の DEHP により、黄体形成ホルモン、テストステロン、17 β -estradiol (E2)の血清レベルを上昇させた。精巣中ライディッヒ細胞数は DEHP 投与のラットで多かった。テストステロンや E2 レベルの変化は、アンドロジェン、エストロジェン、ステロイドホルモンレセプターのクロストークの可能性を示唆し、生殖器以外の組織のエストロジェンレセプターの存在は、血中 E2 レベルの上昇が生殖作用を超えた意味を持つことを示唆された [Akingbemi ら, 2004]。

精巣遺伝子

28 日齢 F344 ラットへの MEHP(1g/kg)経口投与により、

NF-kB 遺伝子サブユニット(p-65,p50,c-Rel)の転座を誘引をすることから、MEHP による精巣障害に NF-kB が関与していることが示された [Rasoulpour ら, 2005]。

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

雄生殖系系(抗アンドロジェン作用)

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

胎盤

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

形態異常

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

た。また、その程度は暴露量に依存していた [Lee ら, 2004]。

3. DBP に関連した情報

雄児精巣

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

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

児生殖器系

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

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

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

次世代発生

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

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

4. BBP に関連した情報

精巣

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

2 世代繁殖試験

BBP (0, 750, 3750, 11250 ppm; 0, 50, 250, 750 mg/kg) のラット 2 世代繁殖試験を行った。F0 の全身毒性および F1 の全身毒性と生殖毒性は 750 mg/kg で認められた。雄 AGD と体重の減少、F1 雌雄ラットの性成熟遅延、F1, F2 雄ラットの乳頭・乳輪の保持が 11250 ppm の投与で認められた。F1, F2 の出生時雄 AGD 短縮は 3750 ppm 投与でも認められた。本実験の NOAEL は 50 mg/kg/day であった [Ty1 ら, 2004]。

5. 総説

DEHP の生殖発生毒性についての総説 [Latini ら, 2004]。

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

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

6. 環境省によるラット 1 世代試験

(哺乳類を用いた人健康影響への内分泌攪乱作用に関する試験結果)

ジ-2-エチルヘキシルフタレート

ブチルベンジルフタレート

ジブチルフタレート

ジシクロヘキシルフタレート

ジエチルフタレート

ジペンチルフタレート

ジヘキシルフタレート

ジプロピルフタレート

ジー2-エチルヘキシルアジペート

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

7. 経済産業省によるラット2世代繁殖試験

ブチルベンジルフタレート

0, 100, 200 mg/kg を Crj:CD(SD)IGS ラットの2世代に渡って強制経口投与した。

100 mg/kg 以上で雄児での低体重, AGD 短縮が観察された。

NOAEL は 100 mg/kg/day 未満。

ジシクロヘキシルフタレート

0, 240, 1200, 6000 ppm を Crj:CD(SD)IGS ラットの2世代に渡って混餌投与した。

1200 ppm 以上で雄児 AGD 短縮, 乳輪保持がみられた。

NOAEL は 240 ppm (16 mg/kg/day)。

ジエチルフタレート

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

NOAEL は 3000 ppm (1083 mg/kg/day)。

D. 考察

①周産期暴露影響評価のうち, 病理部評価研究の DBP 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(Mylchreest et al., 1998; Barlow and Foster, 2003)が確認され, 精巣に関しては生後 21 日目の暴露終了時では毒性影響が 20 ppm より出現するものの, その精巣の変化は既に報告にあるように殆ど可逆的であった(Barlow and Foster, 2003)。しかし一方で, DBP による永続的な影響として雄での乳腺変化が, それも 20 ppm より生じることを世界で初めて見出した。また, 雌においても, 離乳時の乳腺変化, 性成熟後の下垂体重量やホルモン産生細胞率の変動など, 性分化障害を示唆する変化を初めて見出す結果となった。統計的に有意な変動ではないが, 10,000 ppm で観察された春機発動の遅延や性周期の異常は, 雌の性分化障害を支持する結果となっている。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, その変化は DBP でみられ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中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の存在が示唆され, 実際に DINP と同様な雄での乳頭・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。

DEHP や DBP, 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。DBP は DINP に比較して, 発達期のラットに対してより強い精巣毒性を示すことが知られているが(Gray et al., 2000), 本研究においては, 雄ラットに対して春機発動前と性成熟後の両方で, 下垂体や乳腺に対する明らかな影響を示している。このことは, 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構造的な影響を示唆している。

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 17 β -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), DBP 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、DBPにより雌の性分化に対する影響は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)。

本研究においてDBP暴露を受けた雄仔動物は、生後11週目で明らかな用量依存性を認めないものの、下垂体相対重量の増加と乳腺の病理組織学的変化を20 ppmの用量より誘発した。この下垂体重量の変化をもって、毒性影響と断定することは危険であるが、20週齢の雌で200 ppmより逆の変化(減少)を認めており、生後21日目でも下垂体ホルモン産生細胞率の変動を同用量から認めている。雄でも、下垂体ホルモン産生細胞率の変動を21日目、11週目で認めていることから、雄においても低い用量から下垂体機能が影響を受けている可能性がある。性成熟後の雄における乳腺の変性性あるいは萎縮性変化の生物学的意義は明らかではないが、これらの変化は11週目のみならず20週目でも観察されていることから、非可逆的で永続的なものであると結論づけられる。

我々は別の研究において、若齢の雄性ラットに対するフルタミドの反復経口投与により、乳腺腺房の萎縮性変化を検出しており(Toyoda et al., 2000)、いくつかの *in vivo* 及び *in vitro* の研究でフルタミドは乳腺腺房細胞の発達に対して直接作用して抗アンドロゲン作用を示すことが報告されている(Di Monaco et al., 1993; Sourla et al., 1998)。我々のDBPによる雄乳腺に対する影響は、このフルタミドによる直接的なメカニズムと異なるものと考えられる。現在のところ、春機発動以降の雄の乳腺の発達に対する内分泌コントロールやDBPによる抗アンドロゲン作用に関しては殆ど情報が無いが、エストロゲン作用を示すことが知られている methoxychlor と genistein に関して、母ラットに対して妊娠から授乳期にかけてこれらの物質を投与することにより、雄の出生児での乳腺の発達が促進されるとの報告がある(You et al., 2002)。またこの報告では、PRL等のホルモンは変動していないため、これらの物質が乳腺の発達に影響を及ぼす成長因子等の局所的因子に影響を与えている可能性が指摘されている。ただし、この報告では暴露終了時での変化のみを検索しており、病変の可逆性あるいは不可逆性に関して検討を進めていない。我々の研究では血清PRLレベルを測定していないが、生後11週目の雄においては下垂体PRL陽性細胞率の変動を認めていないことから、PRLの関与に関しては否定的である。

我々の以前の報告において、下垂体ホルモン陽性細胞率の変動は、そのホルモンの血清レベルとよく関連していることを議論している(Masutomi et al., 2004)。今回

のDBPの影響評価に関しては、生後21日目の雄で10,000 ppm暴露によりLH陽性細胞率が増加している。LHはライディッシュ細胞機能の調節をしており、発達期ではその分化を促進し、成熟した細胞に対してはステロイド合成酵素の発現維持に機能することが知られている(Ewing and Zirkin, 1983)。我々の今回の研究結果は、テストステロンレベルの減少に対するネガティブ・フィードバックを反映して、結果として反応性のライディッシュ細胞の過形成を生じていたものと考えられる。一方、発達期の精巣において最初の減数分裂細胞の出現に先んじてFSHが分泌されること(Döhler and Wuttke, 1974)、また幼若な雄ラットに対してFSHを注射することにより精祖細胞数と血清中テストステロンレベルの増加することが知られており(Kula et al., 2001)、アンドロゲンとFSHの両方が精子形成の開始に必要であることが示唆される。更に、発達過程でのPRLの阻害により、精巣の成熟障害と不妊の誘発されることが報告されている(Bohnet and Friesen, 1976)。報告によると、妊娠期間中でのDBP暴露により精子細胞が消失するが、これは gonocyte の傷害によりこれらの細胞が精祖細胞へ分化するための基底部への移動が阻害されるためだと言われている(Barlow and Foster, 2003)。今回のDBPの暴露評価においても、DBPにより春機発動前で精子細胞の発達の減少とFSH及びPRL陽性細胞率の減少を認めており、gonocyteの変性に伴う精子形成の遅延が関与していると考えられる。

本研究において、DBP暴露した生後21日目の雌の下垂体で、FSH陽性細胞率とPRL陽性細胞率がそれぞれ200 ppm以上、10,000 ppmで減少を示した。一般的に、PRLレベルの持続的な上昇が雌のラットにおける春機発動のタイミング決定に必要であると考えられている(Kawagoe and Hiroi, 1989; Becu-Villalobos et al., 1992)。人工的に春機発動を遅延させた雌ラットでは、春機発動前に血中のLHレベルは変化しないものの、FSHとPRLレベルが低下する(Fornieris and Aguado, 2002)。他方、環境エストロゲンであるnonylphenolの暴露を受けた雌ラットでは血中LHレベルの減少と春機発動の促進を認めている(Nagao et al., 2001)。以上より、LHの果たす役割は明らかではないが、春機発動前の雌の下垂体に認められた一連の変化は、少なくとも10,000 ppmにおいては、春機発動の遅延に関連していると考えられた。

DBP暴露評価実験において、2000 ppmと10,000 ppm群で雄性児率が減少を示した。2000 ppmでの減少は軽度であり、対照群で雄性児率が高かったことが、この用量での相対的な減少を招いたと思われるが、10,000 ppmでの減少率は大きく、その原因は不明なままである。

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(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シュ細胞障害に対する反応性変化(ライディッシュ細胞の集積)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。

DBPによる雌仔動物に対する影響に関連して議論したように、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)で示された雄性的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-下垂体軸の発達期毒性のメカニズムについて更なる研究が求められる。また、今回の研究により、DBPと同様に雌での性分化影響も見出されたことから、フタル酸/アジピン酸エステル類の毒性標的性のみならず毒性発現用量に関しても再検討が必要と考えられる。

脳の性分化影響については、視床下部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目的として検討を進めてきたが、14年度はその予備的な検討として、メタカーン固定法を利用して、パラフィン包埋切片を用いた微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手し、ラット肝臓をメタカーン固定・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poly(A)⁺ RNAの増幅効率を検討し、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によるマイクロアレイ解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った結果、メタカーン固定・パラフィン包埋しても、比較的忠実性の高い発現データが得られることが分かった。また、未固定肝組織を用いた場合と発現レベルの食い違い遺伝子は、設定されたプローブの3'末端からの距離が異なり、その食い違いはメタカーン固定・パラフィン包埋による影響ではなく、aRNAの2回増幅による影響であることが判明した。

また、15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、Gαi2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ジェンの即時的な反応を媒介することも報告されている(Wyckoff et al., 2001)。Mypt1はシナプス末端に広く分布し、axon guidanceに機能し(Lontay et al., 2004)、

Adaptor-related protein complex 3, $\mu 2$ はシナプスの vesicular trafficking に機能し、エストロ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、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)。雌新生仔にエストラジオールベンゾエイトを直接投与した研究においては、SDN-POA 体積が明らかに減少すると報告されている (Nagao et al., 1999) ことから、雄の SDN-POA 発達における EE の作用とそれに対する SRC-1 の関与が示唆される。今回の研究で SRC-1 発現量の変動が認められなかった MXC, DINP, GEN に関しては、我々が類似のプ

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

Wistar: Imamichi 系ラットを用いた性行動に関する評価研究においては、DBP、DINP、DEHA を周産期に暴露した新生子において、まず血中性ステロイド濃度と、視床下部における性分化関連遺伝子の発現を検討した。新生子の血中性ステロイド濃度については、DBP のみエストラジオール濃度に影響を与えたが、これが母体に対する効果によるものか、あるいは胎子・新生子に対する直接的な効果によるものかについては現時点では不明であり、今後さらに検討を要する。いずれにせよ、今回用いた物質は新生子の血中テストステロン濃度には有意な影響は与えなかった。しかし、用量依存性は明確ではないものの、いずれの物質も視床下部における *granulin* と *p130* 遺伝子の発現には影響を与えた。これらの遺伝子は性ステロイド依存性に発現が変化し、脳の性分化に関与していると考えられている遺伝子である。

興味深いことに DBP と DINP は上昇、DEHA は低下とその効果は逆であったが、性成熟後、特に雌ラットではすべての物質投与群で性行動は抑制された。これらのことは、今回用いた物質が性ステロイドの中核作用を修飾するとともに、*granulin* や *p130* の下流の機構にもより直接的な作用を及ぼす可能性を示唆している。

一方、性成熟後、いずれの物質投与群においても、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。これらの結果は、視床下部・下垂体・性腺から構成される生殖内分泌系に対しては、DBP、DINP、DEHA の周産期暴露は影響を及ぼさないことを示唆している。しかし、雌の性行動に対しては、いずれの物質も今回用いたすべての用量でロードシスと呼ばれる姿勢反射を抑制した。一方、雄の性行動に対しては、DBP は高用量で射精に影響を与え、また DINP と DEHA は用いた最低用量でマウント、挿入、射精を抑制した。これらのことから、DBP、DINP、DEHA の周産期暴露により特に雌の性行動に対する抑制が共通して観察され、脳の正常な雌型への性分化に対して何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

②基礎疾患による修飾作用に関する研究のうち、肝障害負荷による修飾作用を検討する研究において、DBP または DEHP による雄生殖器への毒性は増強されることが判明した。今後、肝障害状態で DEHP の精巣毒性増強作用の発現メカニズムについてはさらなる追究が必要である。また今回の実験系が、肝障害状態における種々の化学物質による雄性生殖器毒性増強効果の検出手段のひとつとなりうることも判明した。このことから、この TAA 肝障害モデルが他の内分泌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。

腎障害負荷による修飾作用の検討に関しては、まず葉酸投与によって確実に腎障害が発生することが 3 年間の 3 度の研究成果で確認できた。DBP の最高用量の設定は雄性生殖器に確実に障害を引き起こすとの過去の報告を参考にしたが、今回の実験でも 20,000 ppm の DBP で精巣障害や精子数、精子運動能に異常を来したことから、これまでの報告を確認する結果となった。また DEHP の精巣毒性も従来の研究報告を裏付ける結果であり、さらに DEHA の精巣毒性の欠如についてもこれまでの研究成果と一致する点である。本研究の目的である腎機能低下状況下での DBP と DEHP の精巣毒性発現に対する修飾作用は精巣や精巣上体の病理組織学的所見や精子数、精子運動能の著明な低下から明らかに増強されることが判明した。14 年度認められた腎障害下での DBP の精巣毒性の増強作用は極めて明瞭であった。その増強作用メカニズムとして、経口投与された DBP は速やかに腸内で加水分解されて MBP になり、体内に吸収されて毒性を発揮する。したがって腎障害下では血中の MBP の濃度が対照に比して高く保たれ、そのために精巣毒性がより強く現れるという仮説を立て

た。血中の MBP の上昇の一因として腎からの排泄量の減少のほか、グルクロン酸抱合体の形成への影響やそれを左右する肝や精巣の β -glucuronidase の活性にも葉酸が作用しているとの推察をして今回の実験を行った。その結果、血中の MBP が上昇と尿中の MBP の減少傾向が見られ、MBP の血中濃度上昇が一因であることが示唆される結果であった。15 年度の研究成果では明確にできなかったが、16 年度の研究成果ではモノエステルの明瞭な上昇が血清中や精巣中に認められており、精巣毒性の増強につながったと結論付けられる成果と考えられる、尿中の抱合体の減少は肝臓における β -glucuronidase 活性の減少によるものかもしれない。

③精巣障害の感受性種差に関する研究で、電顕観察の結果から、これまでの報告と同様、MEHP 投与→セルトリ細胞の変性(空胞出現等)→精細胞(主に精母細胞)のアポトーシスによる脱落→精上皮の薄層化→精細管の萎縮→精巣萎縮の順に変化が進行することが示唆された。

MEHP の *in vivo* 投与試験では、その感受性の程度は、概ねラット≧マウスであった。また、MEHP の精巣器官培養系への添加試験では、アポトーシス細胞(TUNEL 陽性細胞)数の変化を指標とした場合、いずれの動物種においても濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認されたが、その増加の程度には明らかな種差が認められたことから、MEHP の標的細胞とされるセルトリ細胞自身の感受性に種差が存在することが示唆された。その感受性の程度は、概ねマウス>ラット>モルモット>シバヤギであった。さらに、成体ニホンザルの精巣器官培養系への MEHP 添加試験では、少数ながら濃度依存的、時間依存的なアポトーシス細胞数の増加が確認され、それは成体ヤギより高い値を示した。今後、若齢サルの精巣器官培養系を用いた MEHP 添加試験の実行が不可欠だが、これまで *in vivo* 試験で、MEHP に対して感受性がないとされている成体及びサルが、*in vitro* 試験において多少とも感受性を示したこと、またラット、マウスでは *in vivo* 試験と *in vitro* 試験で感受性が必ずしもパラレルではないことなどから、MEHP の代謝経路の種差も感受性の種差に関わっている可能性が考えられた。

④精巣障害の分子メカニズムに関する研究で、MEHP が転写因子 PPAR α を活性化し、ターゲット遺伝子のプロモーター領域の PPRE に結合してその遺伝子の発現を増加させることが知られているが、本研究により MEHP が HMG CoA synthase 2 の遺伝子発現を増加させること及び HMG CoA synthase 2 のプロモーターを活性化することが明らかになった。このプロモーター領域における転写因子結合部位について検索したところ、PPAR α が結合する配列があることがわかった(Fig. 4-5)。したがって、MA-10 細胞内で、MEHP は PPAR α に結合し、活性化された PPAR α がさらに HMG CoA synthase 2 のプロモーター領域中の PPRE に結合し、HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加したものと

考えられる。しかし、ヒト HMG CoA synthase 2 遺伝子のプロモーター領域についても同様に転写因子結合部位について検索したところ、PPRE が存在しなかった。このようなプロモーター領域の違いにより遺伝子発現変化の違いがみられ、MEHP による精巣への影響のヒトとマウスにおける種差が現れると考えられる。この結果はヒトへの影響を予測するうえで重要な情報になると考えられる。

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

HMG CoA synthase 2 は、Fig. 4-6 に示すように細胞内のコレステロール及びステロイドホルモン合成へとつながる経路で働いている(MA-10 細胞はコレステロールからステロイドホルモンを合成できない)。MEHP 存在下で MA-10 細胞内コレステロール蓄積が顕著であったことから、MEHP が、コレステロール合成、あるいはコレステロールからのステロイドホルモン合成経路のいずれかの段階に影響を及ぼしているものと考えられる。今後、HMG CoA synthase 2 を MA-10 細胞内でレトロウィルスを用いて過剰発現させ、同様にコレステロールエステルの蓄積が観察されるかどうか調べる必要がある。

⑤文献調査研究において、ヒトでの研究に関する報告では男性尿中フタル酸エステル類レベルと精子性状との関係、臍帯血中フタル酸エステル類レベルと在胎期間との関係、新生児期のフタル酸エステル類曝露と成長との関係、子宮内膜症女性と高血中フタル酸エステル類レベルとの関係が報告されているが、現在のところフタル酸エステル類とヒト生殖障害との直接的な関連性についての明確な証拠は示されていない。

フタル酸エステルの生殖系への毒性発現は、主に親動物を介した影響として抗アンドロゲン作用、卵巣への影響としてエストラジオール合成抑制作用、出生 4-6 週後の精巣への影響としてセルトリ細胞の機能障害である。前二者は両作用とも PPAR を介した作用のようで、実際クロフィブレート系ペルオキシ増殖剤によっても同作用が発現すると共に、PPAR α ノックアウト動物では作用が発現しないようである。このことは、げっ歯類以外の動物ではこうした影響は発現しないであろうことを示唆している。一方、精巣への作用は PPAR α ではなく、PPAR γ との説があるが、その証明はなされていない。しかし、すでに報告されているカニクイザル及びマーモセットを用いた試験では離乳直後からの投与で精巣毒性は発現しておらず、マーモセットを用いた再試験においても、全く精巣毒性は発現していない。この原因として、体内動態の違いも指摘されているが、モノエステルのセルトリ細胞に対する直接作用が霊長類では実験されておらず、そうしたデータが得られれば、ヒトへの外挿を考える上で有益な資料となる。

フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響に関する研究では精巣に対する影響が遺伝子レベルで検討され、発現メカニズムとしてテストステロンレベルの低下とこれに関連する遺伝子発現の変化が示唆されている。また、シバヤギの精巣も MEHP に対して感受性を示すことが報告されている。子宮内曝露による児の AGD および乳輪に対する変化は成体時まで持続し、AGD 短縮が生殖器形態異常の予測指標となることが示唆されている。

催奇形性もフタル酸エステル類の特徴的作用であるが、これに関しては、PPAR ノックアウト動物を用いた試験が行われておらず、実験の実施が待たれる。催奇形性に関してはラットよりもマウスで感受性が高いことが報告された。また、*in vitro* の実験により、BBP の主要な代謝物である MBP 及び MBzP がラット胚に形態異常を惹起することが示された。このことは、MBP 及び MBzP を妊娠ラットに投与したときにも胎児奇形を発現することと共に、BBP の催奇形性が代謝物により発現することを示唆している。従来から催奇形性の機序として考えられている亜鉛との関係について遺伝子レベルでの解析が行われ、胎児の亜鉛ホメオスターシスに関与する遺伝子発現の変化と奇形発現との関連が示唆されている。

アジピン酸エステル類については、軽微な生殖毒性は認められているものの、フタル酸エステル類に比べるとかなり弱く、肝腫瘍をマーカーとした場合でもラットでは腫瘍発現が見られない。DEHA の高用量で着床前胚死亡がみられ、ラットの妊娠中に投与した DEHA により妊娠期間の延長と児体重増加抑制がみられるが、抗アンドロゲン作用は認められなかったことが報告されており、今のところフタル酸エステル類よりも強い生殖発生毒性を示唆する報告は見当たらない。

Society of Toxicology の 2003 年年回において、Gray らは DEHP をラットの妊娠中、生後に投与したとき雄児で精巣及び精巣上体の異常、性成熟の遅れ等の抗アンドロゲン作用が認められたことから LOAEL は 11 mg/kg であると報告した。この結果は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 TDI の見直しが必要になることを示唆している。また、DBP に関しては、従来よりも低用量において影響が発現することが報告されている。Lee ら(2004)は DBP を含む飼料を妊娠・授乳中の雌ラットに与えた結果、20 ppm (1.5-3.0 mg/kg/day) 以上で持続的な乳腺に対する影響が観察されたことから、LOAEL は 1.5-3.0 mg/kg/day であったと報告し、Salazar ら(2004)は雌ラットに DBP を交配前から児の生後まで与えた結果、12 mg/kg/day で児の体重低下、胸腺・精巣重量低下、陰開口遅延がみられたと報告している。これらの実験では soy-free の飼料を使用していることが他の報告とは異なっている。通常の飼料を用いて行われた実験と比較しながら詳細な検討を行う必要がある。

E. 結論

①SD:IGS ラットを用いた周産期曝露影響の病理評価として、DBP 曝露により、雌では下垂体機能を含む性分化の傷害が明らかとなり、雄では精巣毒性は殆ど可逆的ではあるものの、乳腺影響は非可逆的であり、かつ 20 ppm より認められた。DBP に関しては、発達期曝露による NOAEL と LOAEL は、2000 年に発表された Mylchreest らの報告をもとに、それぞれ 50 mg/kg, 100 mg/kg/day とされている。我々の今回の研究成果からは 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。フタル酸エステル類の発達期毒性に関しては、殆どの報告では下垂体や乳腺影響を検索していないため、これからこれらの化合物による視床下部-下垂体軸の発達期毒性のメカニズムについて更なる研究が求められる。また、今回の研究により、下垂体を含む雌での性分化影響も見出されたことから、フタル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。

DINP の評価結果としては、精巣/精巣上体に関しては毒性影響が 4000 ppm より出現するものの、その精巣の変化は DBP と同様に殆ど可逆的であった。しかし一方で、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、同時期での血中 estradiol の増加に引き続いて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。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。

脳の性分化影響に関する標的遺伝子の探索については、まずパラフィン包埋切片での微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析法を確立し、神経科学や発がんの分野のみならず、多くの分野での利用が期待できる。次いで、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 のラット周産期曝露例で、マイクロディセクション法とマイクロアレイ法を組み合わせで行った結果、まず発現性差に関しては雌より雄で高い発現を示すものが多く、雄性児での生後直後のテストステロン・サージに対応した MPOA 内で反応する遺伝子群である可能性が指摘された。これらの中に、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

ブスの可塑性が影響を受け、雄の雌化／雌の雄化の生じている可能性が示唆された。DEHP 暴露例では、変動遺伝子の数からこの時期での雌の MPOA の分化が著しく傷害されている可能性が示唆された。また、雄で DEHP 投与により発現低下した遺伝子の多くは G 蛋白質シグナリングに係わるものであり、EE 暴露例の雄でも発現低下を示していることから、これらの遺伝子は EE 投与例と同様のテストステロン・サージの阻害による雄での性分化障害に関連する遺伝子である可能性が指摘された。これらの遺伝子のマイクロアレイでの発現レベルは real-time RT-PCR 法により検証された。

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

Wistar: Imamichi ラットを用いた性行動評価研究では、DBP, DINP, DEHA の周産期暴露は、新生子の血中性ステロイド濃度には顕著な影響を与えなかったが、視床下部における性ステロイド依存性遺伝子発現を変化させる傾向を示した。また、性成熟後の血中性腺刺激ホルモン濃度や性周期に対しては影響を与えなかったが、性行動に対しては特に雌のロードーシス反射を低下させた。これらのことから、DBP, DINP, DEHA の周産期暴露は、生殖内分泌系には影響を与えないが、雌新生子において性行動を司る神経機構の正常な雌型への分化に対して何らかの限局的な影響を及ぼしている可能性が考えられた。しかし、作用に明確な用量依存性が見られず、その作用機序の詳細な検討は今後の課題である。

②基礎疾患による修飾作用については、まず肝障害モデルにおいて、ラットを用いた実験により TAA による肝障害状態で、DBP または 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 にはその毒性がないことが判明した。また、腎障害モデルにおいては、葉酸による腎機能抑制状態では DBP や DEHP の精巣毒性が著明に増強されることが示された。ただし、その増強作用はこれらのフタル酸エステル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エステルの増量が示唆された。

③精巣障害の感受性種差に関する研究では、種々の動物種を用いてこれまで行った in vivo 試験及び in vitro 試験の結果から、MEHP の感受性に関する種差の要因として、MEHP の直接的な標的細胞とされるセルト

リ細胞自身の感受性の差異と MEHP の代謝経路の差異の両方が関与している可能性が高いことが推測された。

④精巣障害の分子メカニズムに関する研究では、マウス・ライディツヒ細胞 MA-10 を 10^{-6} M の MEHP で処理すると 24 時間後に HMG CoA synthase 2 遺伝子の発現が増加することが、遺伝子チップ及び Northern Blot の解析により明らかになった。また、HMG CoA synthase 2 プロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼ遺伝子の上位に組み込んだコンストラクトを作成し、レポータージーンアッセイを行った結果、MEHP により HMG CoA synthase 2 のプロモーターが活性化されることが明らかになった。この遺伝子のプロモーター領域を解析した結果、PPRE が存在することがわかった。したがって、MEHP が PPAR α を活性化して HMG CoA synthase 2 の遺伝子の発現が増加したものと考えられる。ヒト HMG CoA synthase 2 プロモーターについても同様に検索を行ったが、PPRE は存在しなかった。また、MEHP によりマウスライディツヒ細胞の細胞内コレステロールエステル量が増加することが明らかになり、コレステロール合成あるいはコレステロールからのステロイドホルモン合成の何れかの段階に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

⑤文献調査研究においては、現在のところフタル酸エステル類とヒト生殖障害との直接的な関連性についての明確な証拠は示されていない。フタル酸エステル類の妊娠中曝露による雄生殖器への影響及び精巣毒性に関しては遺伝子レベルで解析が進みつつある。精巣毒性の種差についても検討され、マーマセットを用いた再試験では全く精巣毒性は発現していないが、シバヤギの精巣は MEHP に対して感受性を示すことが報告されている。子宮内曝露による児の AGD および乳輪に対する変化は成体時まで持続し、AGD 短縮が生殖器形態異常の予測指標となることが示唆されている。催奇形性については、代謝物であるモノエステルがラット胚に形態異常を惹起することが示された。アジピン酸エステル類については、軽微な生殖毒性は認められているもののフタル酸エステル類に比べるとかなり弱く、DEHA の高用量で着床前胚死亡、妊娠期間の延長と児体重増加抑制がみられるが、抗アンドロゲン作用は認められなかったことが報告されており、今のところフタル酸エステル類よりも強い生殖発生毒性を示唆する報告は見当たらない。DEHP の LOAEL は 11 mg/kg であることが報告され、TDI の見直しが必要になることを示唆している。また、DBP に関しては、従来よりも低用量において影響が発現することが報告されており、LOAEL は 1.5-3.0 mg/kg/day と報告されている。

①の引用文献

Atanassova, N., McKinnell, C., Walker, M., Turner, K.J., Fisher, J.S., Morley, M., Millar, M.R., Groome, N.P., Sharpe, R.M., 1999. Permanent effects of neonatal estrogen exposure in rats on reproductive hormone levels,

Sertoli cell number, and the efficiency of spermatogenesis in adulthood. *Endocrinology* 140, 5364–5373.

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

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

Auger, A.P., Tetel, M.J., McCarthy, M.M., 2000. Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) mediates the development of sex-specific brain morphology and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7551–7555.

Barlow, N.J., Foster, P.M., 2003. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol. Pathol.* 31, 397–410.

Becu-Villalobos, D., Lacau-Mengido, I.M., Diaz-Torga, G.S., Libertun, C., 1992. Ontogenic studies of the neural control of adenohipophyseal hormones in the rat. II. Prolactin. *Cell. Mol. Neurobiol.* 12, 1–19.

Bohnet, H.G., Friesen, H.G., 1976. Effect of prolactin and growth hormone on prolactin and LH receptors in the dwarf mouse. *J. Reprod. Fertil.* 48, 307–311.

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.

Di Monaco, M., Brignardello, E., Leonardi, L., Gatto, V., Gallo, M., Pizzini, A., Boccuzzi, G., 1993. The antiandrogen flutamide inhibits growth of the MCF-7 human breast cancer cell line. *Int. J. Oncol.* 2, 653–656.

Döhler, K.D., Wuttke, W., 1974. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 94, 1003–1008.

Ewing, L.L., Zirkin, B., 1983. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog. Horm. Res.* 39, 599–635.

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.

Forneris, M.L., Aguado, L.I., 2002. Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 82, 75–82.

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., Dörner, 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.

Kawagoe, S., Hiroi, M., 1989. Further evidence that prolactin controls the prepubertal sexual development in the female rat. *Gynecol. Obstet. Invest.* 27, 197–200.

Kraus, W.L., Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S., 1994. Identification of multiple, widely spaced estrogen-responsive regions in the rat progesterone receptor gene. *Mol. Endocrinol.* 8, 952–969.

- Kudwa, A.E., Gustafsson, J.A., Rissman, E.F., 2004. Estrogen receptor modulates estradiol induction of progesterin receptor immunoreactivity in male, but not in female, mouse medial preoptic area. *Endocrinology* 145, 4500–4506.
- Kula, K., Walczak-Jedrzejska, R., Slowikowska-Hilczek, J., Oszukowska, E., 2001. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178, 89–97.
- 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.
- Lund, T.D., Salyer, D.L., Fleming, D.E., Lephart, E.D., 2000. Pre- or postnatal testosterone and flutamide effects on sexually dimorphic nuclei of the rat hypothalamus. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 120, 261–266.
- Maness, S.C., McDonnell, D.P., Gaido, K.W., 1998. Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 151, 135–142.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M., 2003. Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* 192, 149–170.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Lee, K-Y., Hirose, M., 2004a. Alteration of pituitary hormone-immunoreactive cell populations in rat offspring after maternal dietary exposure to endocrine-active chemicals. *Arch. Toxicol.* 78, 232–240.
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M., 2004b. Dietary influence on the impact of ethinylestradiol-induced alterations in the endocrine/reproductive system with perinatal maternal exposure. *Reprod. Toxicol.* 18, 23–33.
- McEwen, B.S., Lieberburg, I., MacLusky, N., Plapinger, L., 1977. Do estrogen receptors play a role in the sexual differentiation of the rat brain? *J. Steroid Biochem.* 8, 593–598.
- McMahon, A., Wong, B.S., Iacopino, A.M., Ng, M.C., Chi, S., and German, D.C., 1998. Calbindin-D28k buffers intracellular calcium and promotes resistance to degeneration in PC12 cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 54, 56–63.
- Mitev, Y.A., Wolf, S.S., Almeida, O.F., Patchev, V.K., 2003. Developmental expression profiles and distinct regional estrogen responsiveness suggest a novel role for the steroid receptor coactivator SRC-1 as discriminative amplifier of estrogen signaling in the rat brain. *FASEB J.* 17, 518–519.
- Mylchreest, E., Cattley, R.C., Foster, P.M., 1998. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicol. Sci.* 43, 47–60.
- 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.
- Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono, H. 2001. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: a two-generation study. *Reprod. Toxicol.* 15, 293–315.
- 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.
- Sourla, A., Martel, C., Labrie, C., Labrie, F., 1998. Almost exclusive androgenic action of dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology* 139, 753-764.
- 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.
- Toyoda, K., Shibutani, M., Tamura, T., Koujitani, T., Uneyama, C., Hirose, M., 2000. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch. Toxicol.* 74, 127-132.
- Wagner, C.K., Pfau, J.L., De Vries, G.J., Merchanthaler, I.J., 2001. Sex differences in progesterone receptor immunoreactivity in neonatal mouse brain depend on estrogen receptor α expression. *J. Neurobiol.* 47, 176-182.
- Wernyj, R.P., Mattson, M.P., Christakos, S., 1999. Expression of calbindin-D28k in C6 glial cells stabilizes intracellular calcium levels and protects against apoptosis induced by calcium ionophore and amyloid 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.
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E.J., McIntyre, B.S., Sriperumbudur, R., 2002. Modulation of mammary gland development in prepubertal male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol. Sci.* 66, 216-225.

⑤の引用文献

平成 14 年度分

フタル酸エステルの精巣毒性

- Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2001) Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod.* 65, 1252-1259.
- Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA (2000) Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. *Proc Soc Exp Biol Med.* 225, 105-115.
- Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell.* 79, 679-694.
- Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK, Ladefoged O (2001) The acute effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal Wistar rats. *Toxicol Lett.* 122, 69-79.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2000) Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol Sci.* 58, 377-385.
- David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D (2001) Reversibility of the chronic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicol Pathol.* 29, 430-439.
- Dees JH, Gazouli M, Papadopoulos V (2001) Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells. *Reprod Toxicol.* 15, 171-187.

- Gazouli M, Yao ZX, Boujrad N, Corton JC, Culty M, Papadopoulos V (2002) Effect of peroxisome proliferators on Leydig cell peripheral-type benzodiazepine receptor gene expression, hormone-stimulated cholesterol transport, and steroidogenesis: Role of the peroxisome proliferator-activator receptor alpha. *Endocrinology*. **143**, 2571-2583.
- Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH (2002) Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. **185**, 119-127.
- Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, Suna S, Takeuchi Y, Takenaka I, Jitsunari F (2000) Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *Int. J. Androl*. **23**, 85-94.
- Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, Konaka R, Hiramoto K, Sasaki J, Tokuda M, Nakano Y, Inoue M (2002) Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biochem J*. **365**, 849-856.
- Kobayashi T, Niimi S, Kawanishi T, Fukuoka M, Hayakawa T (2003) Changes in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-regulated gene expression and inhibin/activin-follistatin system gene expression in rat testis after an administration of di-n-butyl phthalate. *Toxicol Lett*. **138**, 215-225.
- Kurata Y, Makinodan F, Okada T, Kawasuso T, David R, Gans G, Regnier J, Katoh M (2003) Blood concentration and tissue distribution of 14C-di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile and adult common marmoset. The 42nd Annual Meeting of Society of Toxicology, # 1865.
- O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS (2002) Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci*. **69**, 92-108.
- Park JD, Habeebu SSM, Klaassen CD (2002) Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl)phthalate in young Sprague-Dawley rats. *Toxicology* **171**, 105-115.
- Richburg JH, Johnson KJ, Schoenfeld HA, Meistrich ML, Dix DJ (2002) Defining the cellular and molecular mechanisms of toxicant action in the testis. *Toxicol Lett*. **135**, 167-183.
- Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K (2000) Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in gld mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology*. **141**, 787-793.
- Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. *Fertil Steril*. **78**, 1187-1194.
- Tomonari Y, Kurata Y, Kawasuso T, David R, Gans G, Tsuchitani M, Katoh M (2003) Testicular toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in juvenile common marmoset. The 42nd Annual Meeting of Society of Toxicology, # 1866.
- Wellejus A, Dalgaard M, Loft S (2002) Oxidative DNA damage in male wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *J Toxicol Environ Health PT A*, **65**, 813-824.
- フタル酸エステルの発生毒性**
- Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, Ge R, Katz E, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. (2001) Modulation of rat Leydig cell steroidogenic function by di(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol Reprod*. **65**, 1252-1259.
- Ema M, Miyawaki E (2001a) Adverse effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given monobutyl phthalate, a metabolite of dibutyl phthalate, during late pregnancy. *Reprod Toxicol*. **15**, 189-194.
- Ema M, Miyawaki E (2001b) Effects of monobutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod Toxicol*. **15**, 261-267.
- Ema M, Miyawaki E (2002) Effects on development of the reproductive system in male offspring of rats given butyl benzyl phthalate during late pregnancy. *Reprod Toxicol*. **16**, 71-76.
- Fulcher, SM, Willoughby, CR, Heath, JA, Veenstra, GE, Moore, NP (2001) Developmental toxicity of di-(C(7)-C(9) alkyl) phthalate and di-(C(9)-C(11) alkyl) phthalate in the rat. *Reprod Toxicol*. **15**, 95-102.
- Hotchkiss AK, Ostby JS, Vandenberg JG, Gray LE (2002) Androgens and environmental antiandrogens affect reproductive development and play behavior in the Sprague-Dawley rat. *Environ. Health Perspect*. **110(Suppl. 3)**, 435-439.
- Imajima T, Shono T, Kai H, Zakaria O, Suita S. (2001) The biological effect of phthalate esters on transabdominal migration of the testis in fetal rats in comparison with the antiandrogen flutamide. *Pediatr. Surg Int*. **17**, 164-166.
- Iona S, Klinger FG, Sisti R, Ciccalese R, Nunziata A, Defelici M (2002) A comparative study of cytotoxic effects of N-ethyl-N-nitrosourea, adriamycin, and mono-(2-ethylhexyl)phthalate on mouse primordial germ cells. *Cell Biol Toxicol*. **18**, 131-145.
- Kang KS, Lee YS, Kim HS, Kim SH (2002) Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *J Toxicol Environ Health PT A*, **65**, 447-459.
- Kim SH, Kim SS, Kwon O, Sohn KH, Kwack SJ, Choi YW, Han SY, Lee MK, Park KL (2002) Effects of dibutyl phthalate and monobutyl phthalate on cytotoxicity and differentiation in cultured rat embryonic

limb bud cells; Protection by antioxidants. *J. Toxicol Environ Health PT A*, **65**, 461-472.

Li, LH, Jester, WF Jr., Laslett, AL, Orth, JM (2000) A single dose of di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal rats alters gonocytes, reduces sertoli cell proliferation, and decreases cyclin D2 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. **166**, 222-229.

Marchetti L, Sabbieti MG, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM, Menghi G (2002) Effects of phthalate esters on actin cytoskeleton of Pyl1a rat osteoblasts. *Histol Histopathol*. **17**, 1061-1066.

Menghi G, Sabbieti MG, Marchetti L, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM (2001) Phthalate esters influence FGF-2 translocation in Pyl1a rat osteoblasts. *Eur J Morphol*. **39**, 155-162.

Moore RW, Rudy TA, Lin TM, Ko K, Peterson RE (2001) Abnormalities of sexual development in male rats with in utero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Health Perspect*. **109**, 229-237.

Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster PMD (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.

Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, Abbott BD, Klinefelter GR, Barlow NJ, Gray LE (2001) The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci*. **58**, 339-349.

Piersma AH, Verhoef A, te Biesebeek J, Pieters MN, Slob W (2000) Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design. *Reprod Toxicol*. **14**, 417-425.

Rhee GS, Kim SH, Kim SS, Sohn KH, Kwack SJ, Kim BH, Park KL (2002) Comparison of embryotoxicity of ESBO and phthalate esters using an in vitro battery system. *Toxicol in Vitro*. **16**, 443-448.

Saillenfait AM, Langanne I, Leheup B. (2001) Effects of mono-n-butyl phthalate on the development of rat embryos: *in vivo* and *in vitro* observations. *Pharmacol Toxicol*. **89**, 104-112.

Shono, T., Kai, H., Suita, S., Nawata, H., (2000) Time-specific effects of mono-n-butyl phthalate on the transabdominal descent of the testis in rat fetuses. *BJU Int*. **86**, 121-125.

Shultz VD, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW (2001) Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci*. **64**, 233-242.

Tanaka T (2002) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)

administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol*. **40**, 1499-1506.

Uriu-Adams JY, Kevin Reece C, Nguyen LK, Horvath BJ, Nair R, Barter RA, Keen CL (2001) Effect of butyl benzyl phthalate on reproduction and zinc metabolism. *Toxicology*. **159**, 55-68.

Wellejus A, Dalgaard M, Loft S (2002) Oxidative DNA damage in male wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *J Toxicol Environ Health PT A*. **65**, 813-824.

フタル酸エステルの生殖毒性

Foster, PM, Cattley, RC, Mylchreest, E (2000) Effects of di-n-butyl phthalate (DBP) on male reproductive development in the rat: implications for human risk assessment. *Food Chem Toxicol*. **38**, S97-99.

Hushka LJ, Waterman SJ, Keller LH, Trimmer GW, Freeman JJ, Ambroso JL, Nicolich M, McKee RH (2001) Two-generation reproduction studies in Rats fed di-isodecyl phthalate. *Reprod Toxicol*. **15**, 153-169.

Tanaka T (2002) Reproductive and neurobehavioural toxicity study of bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) administered to mice in the diet. *Food Chem Toxicol*. **40**, 1499-1506.

フタル酸エステルと卵巣

Funabashi T, Kawaguchi M, Kimura F. (2001) The endocrine disrupters butyl benzyl phthalate and bisphenol A increase the expression of progesterone receptor messenger ribonucleic acid in the preoptic area of adult ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*. **74**, 77-81.

Kawaguchi M, Funabashi T, Aiba S, Kimura F (2002) Butyl benzyl phthalate, an endocrine disrupter, inhibits pulsatile luteinizing hormone secretion under an insulin-induced hypoglycaemic state in ovariectomized rats. *J Neuroendocrinol*. **14**, 486-491.

Lovekamp-Swan T, Davis BJ, (2003) Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect*. **111**, 139-46.

アジピン酸エステルの生殖・発生毒性

CEFIC (1988a). Di-(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) fertility study in rats. Unpublished report, CTL Study RR0374.

CEFIC (1988b). Di(2-ethylhexyl) adipate: teratogenicity study in the rat. Unpublished report, CTL Study RR0372.

Singh, A.R., Lawrence, W.H., Autian, J. (1973). Embryonic-fetal toxicity and teratogenic effects of adipic acid esters in rats. *J Pharm Sci*. **10**, 1596-1600.

Singh, A.R., Lawrence, W.H., and Autian, J. (1975). Dominant lethal mutations and antifertility effects of di-2-ethylhexyl adipate and diethyl adipate in male mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. **32**, 566-576.

Lanigan, RS (2001) Final report on the safety assessment of stearamide DIBA-stearate. *Int J Toxicol.* **20 Suppl 3**, 91-97.

NTP (1982) Carcinogenesis bioassay of di(2-ethylhexyl)adipate (CAS No. 103-23-1) in F344 rats and B6C3F1 mice (Feed study). U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Technical Report Series. No.212.

その他の関連情報

ヒトに関連した情報

Brock JW, Caudill SP, Silva MJ, Needham LL, Hilborn ED (2002) Phthalate monoesters levels in the urine of young children. *Bull Environ Contam Toxicol.* **68**, 309-314

Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD (2002) Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect.* **110**, 515-518.

Koo JW, Parham F, Kohn MC, Masten SA, Brock JW, Needham LL, Portier CJ (2002) The association between biomarker-based exposure estimates for phthalates and demographic factors in a human reference population. *Environ Health Perspect.* **110**, 405-410.

DEHP

Bernal CA, Martinelli MI, Mocchiutti NO (2002) Effect of the dietary exposure of rat to di(2-ethyl hexyl) phthalate on their metabolic efficiency. *Food Addit Contam.* **19**, 1091-1096.

Dalgaard M, Ostergaard G, Lam HR, Hansen EV, Ladefoged O (2000) Toxicity study of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in combination with acetone in rats. *Pharmacol Toxicol.* **86**, 92-100.

Fukuwatari T, Suzuki Y, Sugimoto E, Shibata K. (2002) Elucidation of the toxic mechanism of the plasticizers, phthalic acid esters, putative endocrine disrupters: effects of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate on the metabolism of tryptophan to niacin in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* **66**, 705-710.

Howarth JA, Price SC, Dobrota M, Kentish PA, Hinton RH (2001) Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol Lett.* **121**, 35-43.

IARC (2000) Di(2-ethylhexyl) phthalate. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* **77**, 41-148.

Kertai E, Hollosi G, Kovacs J, Varga V (2000) Effect of glycerol-induced acute renal failure and di-2-ethylhexyl phthalate on the enzymes involved in biotransformation of xenobiotics. *Acta Physiol Hung.* **87**, 253-265.

Lovekamp TN & Davis BJ (2001) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* **172**, 217-224.

Mortensen A, Bertram M, Aarup V, Sorensen IK (2002) Assessment of carcinogenicity of di(2-ethylhexyl) phthalate in a short-term assay using Xpa(-/-) and Xpa(-/-)/p53(+/-) mice. *Toxicol. Pathol.* **30**, 188-199.

Tickner JA, Schettler T, Guidotti T, McCally M, Rossi M. (2001) Health risks posed by use of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in PVC medical devices: a critical review. *Am J Ind Med.* **39**, 100-111.

斎藤義明, 白見憲司, 渡辺千朗, 永田伴子, 大澤徳子, 吉村慎介, 今井 清, 加藤正信 (2002)

Di(2-ethylhexyl) phthalate の胎生期曝露による雄性生殖器官への影響. 秦野研究所年報, **25**, 26-30.

DBP

Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M (2001) Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update.* **7**, 231-235.

DINP

McKee RH, ElHawari M, Stoltz M, Pallas F, Lington AW (2002) Absorption, disposition and metabolism of di-isononyl phthalate (DINP) in F-344 rats. *J Appl Toxicol.* **22**, 293-302.

BBP

Long G, Meek ME (2001) Butylbenzylphthalate: hazard characterization and exposure-response analysis. *Environ. Sci. Health C-Envir.* **19**, 105-123.

DEP

Api AM (2001) Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients. *Food Chem Toxicol.* **39**, 97-108.

DHP (dihexyl phthalate)

Howarth JA, Price SC, Dobrota M, Kentish PA, Hinton RH (2001) Effects on male rats of di-(2-ethylhexyl) phthalate and di-n-hexylphthalate administered alone or in combination. *Toxicol Lett.* **121**, 35-43.

Adipates

Takahashi T, Tanaka A, Yamaha T (1981) Elimination, distribution and metabolism of di-(2-ethylhexyl)adipate (DEHA) in rats. *Toxicology.* **22**, 223-233.

Kluwe WM, Huff JE, Matthews HB, Irwin R, Haseman JK (1985) Comparative chronic toxicities and carcinogenic potentials of 2-ethylhexyl-containing compounds in rats and mice. *Carcinogenesis.* **6**, 1577-1583.

Bergman K, Albanus LSO (1987)

Di-(2-ethylhexyl)adipate: absorption, autoradiographic distribution and elimination in mice and rats. *Food Chem Toxicol.* **25**, 309-316.

Loftus NJ, Laird WJ, Steel GT, Wilks MF, Woollen BH (1993) Metabolism and pharmacokinetics of deuterium-labelled di-2-(ethylhexyl) adipate (DEHA) in humans. *Food Chem Toxicol.* **31**, 609-614.