

2. 内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に

及ぼす影響

五十嵐勝秀・菅野 純

2. 1. 要旨

神経幹細胞は自己複製能と多分化能，すなわち神経細胞，グリア細胞(アストロサイト，オリゴデンドロサイト)といった神経系を構成する3種類のすべての細胞に分化する能力をもつ幹細胞である．神経幹細胞は胎児の脳形成および発達を司るのみならず，成熟後の脳にも存在し神経新生を行っている．一方，脳内にはエストロゲン受容体を始めさまざまな核内受容体が発現していることから，内分泌攪乱化学物質の脳に対する影響が研究されているが，神経幹細胞に標的を定めた研究例は少ない．本章ではまず神経幹細胞について概説し，次に核内受容体，特にエストロゲン受容体と神経幹細胞のかかわりに関する研究について紹介し，われわれがジエチルベストロール(DES)を用いて得た研究結果にもふれる．

2. 2. 神経幹細胞と神経幹細胞分化を誘導する因子

神経幹細胞は哺乳類の中樞神経系に存在する幹細胞で，未分化な状態を保ったまま増殖する自己複製能と，複数の種類の細胞(ニューロン，アストロサイト，オリゴデンドロサイト)に分化する多分化能を併せもつ細胞である(図2・1)．発生期の脳には神経幹細胞が多数存在し，脳の形成・発達を担っているが，成熟後の脳にも神経幹細胞は見出され，神経新生を行い，脳機能維持に寄与していると考えられている．神経幹細胞の存在が初めて実験的に確認されたのは，Weissらによる，

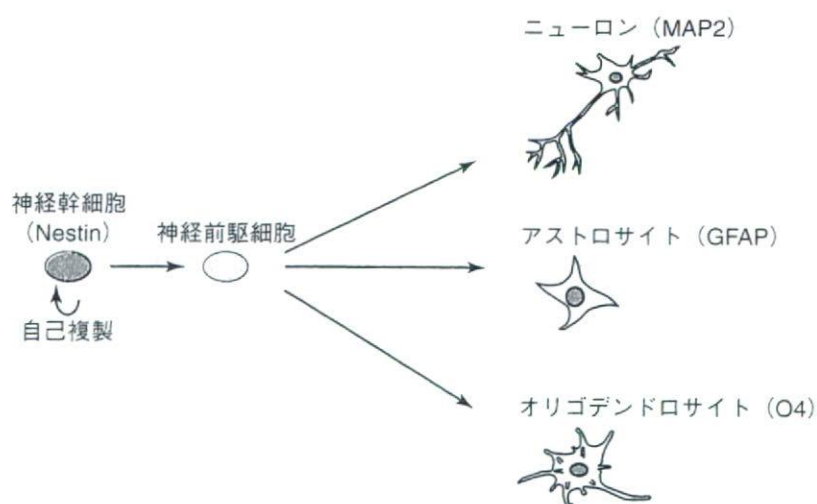


図2・1 神経幹細胞の自己複製と分化．神経幹細胞は，未分化な状態を保ったまま自己複製し，神経系を構成する3種類の細胞(ニューロン，アストロサイト，オリゴデンドロサイト)に分化する幹細胞である．おのおのの細胞には特異的なマーカータンパク質が同定されている(かっこ内に示した)．

“ニューロスフェア(neurosphere)法”という培養法を用いた研究によってである(図2・3参照)^[1]。ニューロスフェアは、脳神経組織細胞を単一細胞化した後、basic fibroblast growth factor(bFGF)とepidermal growth factor(EGF)の存在下浮遊培養することにより、1週間程度後に形成される単クローン性の細胞凝集塊である。ニューロスフェアを構成する細胞は、神経幹細胞に特異的な中間線維タンパク質であるNestin陽性の細胞が主で、形成されたニューロスフェアを再度分散し浮遊培養すると、単一細胞から再びニューロスフェアが形成されることから、これらの細胞が自己複製能を有していると考えられている。また、ニューロスフェアを接着性の容器に移して血清などの存在下で培養するとニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトを産生する多分化能を示す。

神経幹細胞からの分化を誘導する細胞外因子については、ニューロンへの分化を促す因子としてplatelet derived growth factor(PDGF)、アストロサイトへの分化を促す因子としてleukemia inhibitory factor(LIF)とbone morphogenic protein(BMP)、オリゴデンドロサイトへの分化を促進する因子として甲状腺ホルモン(T_3)が同定されている^[2](図2・2A, 口絵7参照)。これらのなかで特に、LIFとBMPによるアストロサイトへの分化促進作用に関して、それぞれの下流で活性化される転写因子Stat3とSmad1が、アストロサイト特異的遺伝子の1つであるglial fibrillary acidic protein(GFAP)遺伝

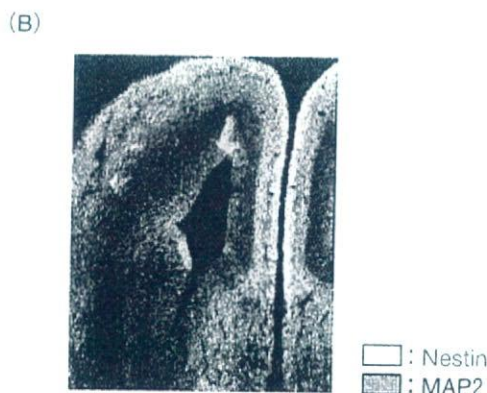
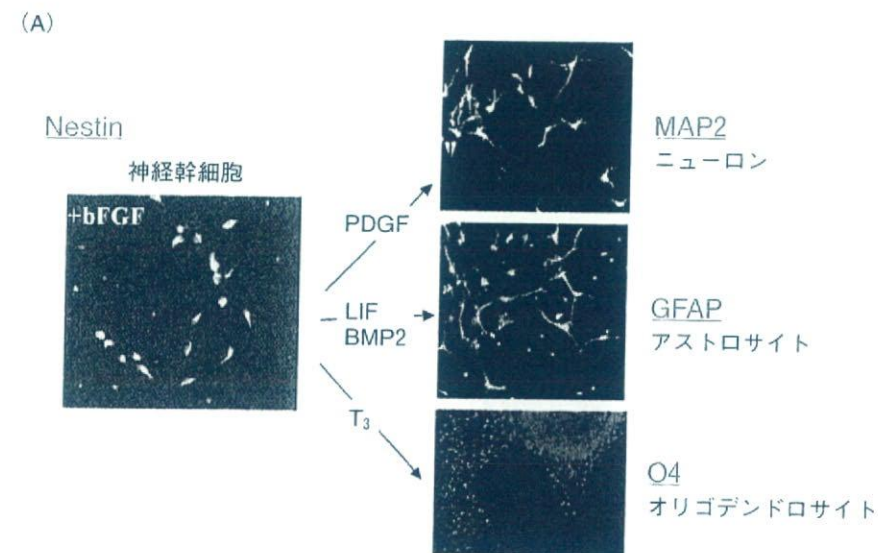


図2・2 神経幹細胞分化を誘導する因子と胎児脳におけるNestin, MAP2の発現。(A) *in vitro*培養下、Nestin陽性の神経幹細胞は特定の細胞外因子に反応し、各種細胞に分化する。PDGFはニューロンへの分化、LIFやBMP2はアストロサイトへの分化、甲状腺ホルモン T_3 はオリゴデンドロサイトへの分化を促進する。(B)胎生14.5日の脳におけるNestin, MAP2の発現。側脳室周囲領域はNestin陽性の細胞(中央の陰の部分)で占められ、皮質側はMAP2陽性細胞(外縁部)で占められている(口絵7)。

子のプロモーター領域上でp300タンパク質を介した複合体を形成し、直接的にGFAP発現を誘導することが明らかにされている^[3]。LIFとBMPは相乗的にアストロサイト分化を促進するが、その相乗効果を説明しうる分子実体がこの転写因子複合体なのである。

以上のように、神経幹細胞は細胞外因子によって分化制御される細胞であり、細胞外因子のシグナルは最終的に神経幹細胞内の特定の転写因子群に到達する。一方で、内分泌攪乱化学物質は、転写因子である核内受容体が細胞内標的である。このことから、内分泌攪乱化学物質が転写制御機構を介し、神経幹細胞に何らかの影響を及ぼすことが予想される。

2. 3. 胎児神経幹細胞と成体神経幹細胞

現在、発生初期の神経誘導によって形成される神経板・神経管を構成する神経上皮細胞が、神経幹細胞そのものであると考えられている。

発生初期に神経幹細胞は増殖を繰り返すが、胎児にはこの時点ですでに頭部から尾部にかけてHoxをはじめとする転写因子群の発現の組み合わせパターンを伴う領域化が起こっており、神経幹細胞自体もその存在部位によって異なる性質を獲得している^[4,5]。すなわち、神経幹細胞はヘテロな集団であり、自己複製能と多分化能を有するという点では共通の性質をもつが、発生初期にすでに個性をもっており、増殖速度も異なっていると考えられている。また、胎児期の神経幹細胞には通常予想されるのとは異なる性質がある。すなわち、神経幹細胞は始めはニューロンにのみ分化する能力を有しているにすぎず、そのため発生初期はニューロンが優先的に産生される時期が続く。産生されたニューロンは定まった位置に移動し、神経核や層構造を形成する。発生中期から後期にかけて神経幹細胞はアストロサイトやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞にも分化する能力を獲得し、ニューロンに加えてグリア細胞を産生し、脳の形成発達が進む。このような、発生に伴って多能性を獲得していくという性質が胎児神経幹細胞の特徴である^[6]。

一方、神経幹細胞は成体の脳においても存在することが示されている^[7-11]。すなわち、海馬をはじめとする成体の脳のさまざまな領域から、bFGF、EGFに反応し、ニューロスフェアを形成する細胞が同定されている。神経幹細胞の局在については、脳室を直接取り囲む上衣層(ventricular zone, VZ)もしくはVZのすぐ内側の上衣下層(subventricular zone, SVZ)に存在するという2つの説が唱えられている^[12,13]。いずれにせよ、成体の神経幹細胞は脳室の周囲領域に存在していると考えられている。しかし、成体の神経幹細胞と胎児神経幹細胞とが、どの程度異なった性質を有しているかはほとんど明らかになっていない。

2. 4. 核内受容体の神経幹細胞における機能

内分泌攪乱化学物質の標的はそのほとんどが核内受容体である。よって、神経幹細胞で発現し機能している核内受容体は内分泌攪乱化学物質研究において重要な対象と考えられる。しかし、これまで神経幹細胞と核内受容体とを関連づけて研究された例は少ない。

そのなかで最近、オーファン受容体の1つTLXが成体神経幹細胞の未分化性の維持に必須であるという報告が、米国ソーク研究所のEvansらのグループによりなされた^[14]。マウスにおけるTLXの発現は胎生初期から認められ、中期にピークを迎え、出生直後にはいったん消失する。その後発現は上昇し、成体の脳では高い発現が保たれる。TLXのノックアウトマウスを用いた解析により、TLXを欠く成体の神経幹細胞は増殖せず、TLXを再度導入することで増殖能を回復すること、TLXは転写抑制因子として働き、アストロサイト特異的遺伝子であるGFAPの発現を抑制することで神経幹細胞の未分化性を保っていることが示された。

TLXはオーファン受容体でありリガンドが不明であることから、この結果をすぐに内分泌攪乱化学物質と結びつけて考えることはできないが、核内受容体による神経幹細胞機能の制御の例として注目される。

エストロゲン受容体については、イタリアのMaggiらのグループによるヒト神経芽細胞腫細胞株SK-N-BEを用いた研究がある。TGF α による細胞増殖刺激が、エストロゲン受容体 α 型を強制発現させることで分化刺激に変換されることが報告されている^[15]。この場合、発現したエストロゲン受容体 α 型は、TGF- α により活性化されたStat3と結合し、分化を促進するとのモデルが提唱されている。また、Maggiらは2004年のKeystone Symposiaにて、エストロゲンは成体脳に作用し、脳室周囲領域の細胞によるBrdUの取り込みを促進すること、その領域でエストロゲン受容体 α 型依存的にProthymosin α の発現を上昇させること、Prothymosin α のアンチセンスRNAを脳室内に投与してその発現を抑制するとBrdUの取り込みが低下し、エストロゲンによって誘発されるロードーシス反応(雌の受容反応)が抑制されることを報告した。彼女らは、成体の神経幹細胞はエストロゲンに反応し増殖すると考えている。さらにTanapatらにより、エストロゲンはラット成体脳海馬における神経新生を促進することも報告されている^[16]。すなわち、雌の卵巣を除去すると海馬において新生される神経幹細胞の数が減少し、エストロゲンを投与すると回復することが示されている。加えて、Brannvallらは、神経幹細胞にエストロゲン受容体 α 型、 β 型ともに発現しており、分化能の制御にかかわっているとの報告をした^[17]。しかし、彼らは神経幹細胞マーカーの発現を検討していないことから、その報告ではエストロゲン受容体が神経幹細胞を含む領域で発現していることを示したにとどまっている。

次に神経幹細胞と核内受容体、特にエストロゲン受容体に関するわれわれのデータを紹介したい。

2. 5. エストロゲン受容体の神経幹細胞における発現

身のまわりの化学物質のうち、ホルモン活性が報告されているものにはエストロゲンアゴニスト様作用、あるいはアンドロゲンアンタゴニスト作用を有するものが多いことが知られている。特にエストロゲン受容体系は、ピコモル(10^{-12} M)の低い濃度域で作動することから、外因性影響を受ける可能性が高いことが考えられる。われわれは、エストロゲン受容体を重要な標的として位置づけ、まず神経幹細胞での発現を検討した。神経幹細胞が豊富な胎生14.5日のマウス終脳を分離し(図2・3, 口絵8参照), ニューロスフェアを形成させ, RNAを抽出した後, RT-PCRによってエストロゲン受容体 α 型および β 型のmRNA発現を調べた。図2・4(口絵9参照)に示すように, どちらの型の受容体もニューロスフェア内で発現していることが確認された。なお, データは示さないが, 同じRNAにおけるNestinの発現も検出されている。さらに, α 型についてはタンパク質レベルでもニューロスフェア細胞に発現していることが確認されている(図2・4B)。これらのことから, 前述のラットでの報告^[17]とともに, エストロゲン受容体は胎児神経幹細胞において発現していることが強く示唆される。この事実, 内分泌攪乱化学物質が胎児神経幹細胞に対して何らかの作用を発揮する可能性を示唆するものである。

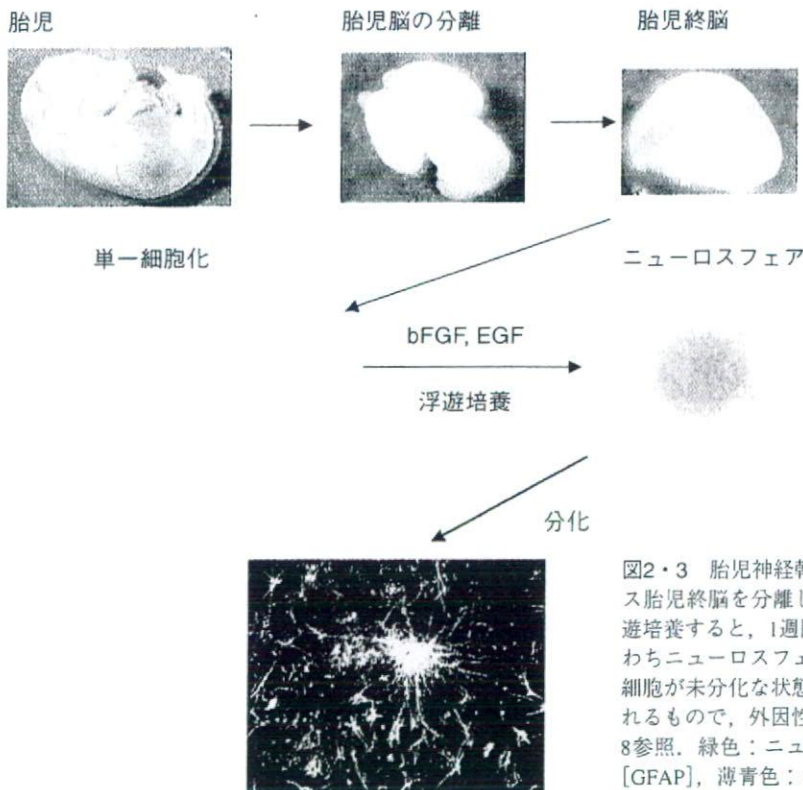


図2・3 胎児神経幹細胞の培養(ニューロスフェア法)。マウス胎児終脳を分離し単一細胞化した後, bFGF, EGF存在下浮遊培養すると, 1週間ほどで単クローン性の細胞凝集体, すなわちニューロスフェアが得られる。ニューロスフェアは単一細胞が未分化な状態を保ったまま自己複製することで形成されるもので, 外因性刺激により, 神経系の3種類の細胞(口絵8参照。緑色:ニューロン[MAP2], 赤色:アストロサイト[GFAP], 薄青色:オリゴデンドロサイト[O4])に分化する。

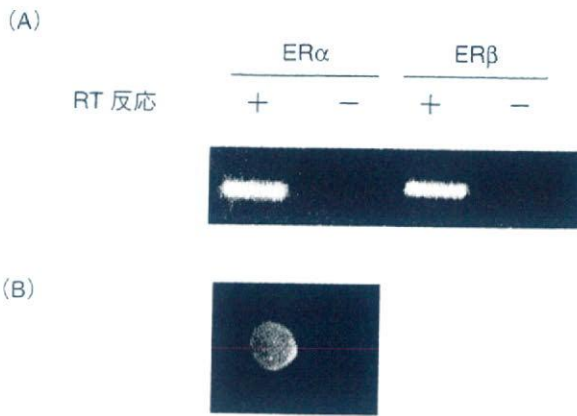


図2・4 神経幹細胞におけるER α , ER β の発現。(A) mRNA検出. ニューロスフェアより抽出した全RNAをオリゴdTで逆転写し, ER α , ER β 特異的なプライマーでPCRした. ER α , ER β ともにニューロスフェアに発現していることが示された。(A)タンパク質検出. ニューロスフェアをNestin((口絵9参照:緑色), ER α (口絵9参照:赤色)に対する抗体で免疫染色した. Nestin陽性のニューロスフェアでER α の発現が検出された。(B)タンパク質検出. ニューロスフェアをNestin(緑色), ER α (赤色)に対する抗体で免疫染色した. Nestin陽性のニューロスフェアでER α の発現が検出された.

2. 6. 内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化・増殖に対する影響をモニターする方法 —— 神経系細胞種特異的マーカーとニューロスフェア法 ——

神経幹細胞に対する影響を調べるためには, 脳内または培養下で神経幹細胞を含む神経系の細胞を正確に同定する技術と, 神経幹細胞の増殖能・分化能を評価する技術が必要である.

前者の目的には, 神経幹細胞および分化した細胞に特異的なマーカータンパク質が利用されている(図2・2参照). 神経幹細胞のマーカーとして汎用されているのはNestinであり, ニューロンはMAP2, アストロサイトはGFAP, オリゴデンドロサイトはO4が用いられている. Nestinは中枢神経系前駆細胞の中間径線維タンパク質の主要な構成成分である. その神経幹細胞における特異的な発現を利用し, 岡野らはNestinのプロモーター下流にEGFPを接続したトランスジェニックマウスを用い, 神経幹細胞をFACS(fluorescence activated cell sorting)により分離できることを報告している^[18]. MAP2は, ニューロンの中間径線維タンパク質に結合し, 中間径線維タンパク質の集合を促進することが知られているタンパク質である. GFAPは中枢神経系でおもにアストロサイトに発現が検出される中間径線維タンパク質である. O4はI型およびII型のオリゴデンドロサイトによって形成されるスルファチド(硫脂質)で, ミエリンの構成脂質である.

一方, 後者の目的である神経幹細胞の増殖・分化能を評価する方法としては, 1) 単一細胞から細胞凝集塊(ニューロスフェア)を形成する自己複製能を調べる方法(ニューロスフェア法)や, 2) ニューロスフェアの多分化能を調べる方法がある. 以下にそれらの方法の概略を示す.

- 1) 神経幹細胞の機能の1つである自己複製能を反映する指標であるニューロスフェアの大きさの検討: 胎児終脳(胎生11.5日から14.5日曝露)からbFGF, EGF存在下, 1週間培養することにより形成されるニューロスフェアについて, その径の分布を計測する. 溶媒対照群で直径200 μm 以上のものが20%程度存在する条件下で, 曝露群との比較を行う.
- 2) 神経幹細胞の分化能に対する胎内曝露の影響の検討: 胎内曝露胎児由来(胎生11.5日から14.5

白)のニューロスフェアを20個取り、容器に接着させ血清存在下1週間培養し、MAP2, GFAP, O4の抗体を用いた三重染色によってニューロスフェアの3系統への分化を半定量的に測定する。溶媒対照群では、NAO(Neuron, Astrocyte, Oligodendrocyte), すなわち、3種類の細胞すべてに分化するニューロスフェアが90%を占める条件下で、検体投与群におけるNAOの割合の変化、2種類の細胞にしか分化しないものや、1種類の細胞にのみ分化するものの割合の変化をもって神経幹細胞分化能への影響とする。

2. 7. DESの神経幹細胞自己複製能に対する影響

われわれはDES(ジエチルstilbestロール)を内分泌攪乱化学物質のモデル化合物に選び(DESは17 β -エストラジオールと同等のエストロゲン活性を有するが、血漿タンパク質との結合が比較的弱いことが知られ、そのため胎児影響が強調されることが考えられる), その胎生期曝露による神経幹細胞への影響を検討した。

神経幹細胞がさかんに増殖する時期であると同時にそれらにエストロゲン受容体や, Hoxをはじめとする分節マーカーが順次発現する胎生11.5日から14.5日の神経管形成中期におけるエストロゲン影響を検討する目的で、母親体重1 kgあたり2 μ gのDESを母獣の皮下に3日間反復投与した。胎生15日目に胎児終脳を採取し、前述の方法によりニューロスフェアを得た。

まず、神経幹細胞の機能の1つである自己複製能を反映する指標であるニューロスフェアの大きさについて検討した結果、図2・5に示すように、DESに曝露された胎児終脳から形成されたニューロスフェアはその径が小さく、溶媒対照群で見られるような直径300 μ mを超えるサイズのものは形成されないことが明らかとなった。この結果はDESが胎児脳において神経幹細胞の自己複製能に影響する可能性があることを示唆するものであると考えられる。

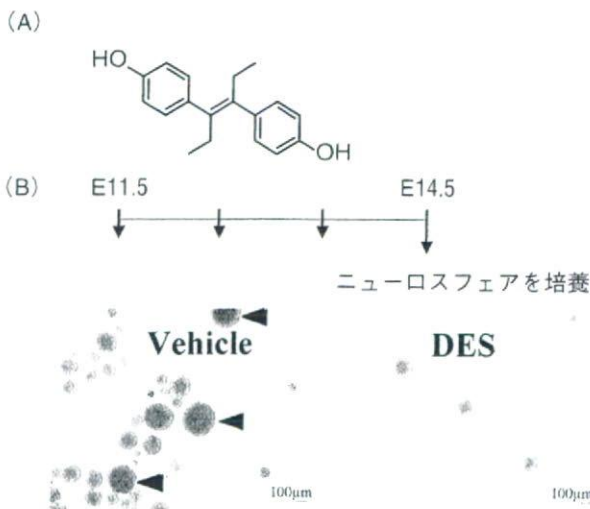


図2・5 胎生期神経幹細胞に対するDESの影響。(A) DESの化学構造, (B)胎生期DES *in utero*曝露による胎児終脳神経幹細胞に対する影響の検討。DESをマウス胎生11.5日から14.5日まで連日2 μ g/kg dam body weight/day投与し、胎児終脳からニューロスフェアを得た。DES投与群では溶媒対照投与群にみられるような径の大きいニューロスフェアの形成が阻害されていた。

2. 8. DESの神経幹細胞分化に対する影響

次に、DES曝露胎児由来のニューロスフェアの分化能について検討した(図2・6)。DES曝露胎児由来のニューロスフェアを20個取り、容器に接着させ血清存在下1週間培養し、MAP2, GFAP, O4の抗体を用いた三重染色によって分化程度を検討した。Vehicle投与群では、NAO, すなわち、3種類の細胞すべてに分化するニューロスフェアが90%を占めたのに対し、DES 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与した群ではNAOの割合は低下し、2種類の細胞にしか分化しないものや、1種類の細胞にのみ分化するものの割合が増えていた。特に、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群ではアストロサイトにのみ分化するものが40%以上を占めた。

以上のことから、胎内DES曝露により、胎児の神経幹細胞の自己複製能および分化能の両方に影響が生じることが明らかとなった。殊に、胎児脳から細胞を分離し、ニューロスフェアを得る1週間の培養期間中の培養液中にはDESが存在していないにもかかわらず、これらの影響が観測されたことから、DESの神経幹細胞に対する作用は一過性のものではなく持続する性質のものであることが示唆された。そのメカニズムは現在不明であるが、1週間の培養期間中には、神経幹細胞はおおよそ10回の分裂を繰り返していると計算されることから、われわれはDNAメチル化などのエピジェネティックなメカニズムが関与している可能性を考えている。

2. 9. まとめ

以上紹介してきたように、内分泌攪乱化学物質は発生・発達の過程で、内分泌系、免疫系と共に

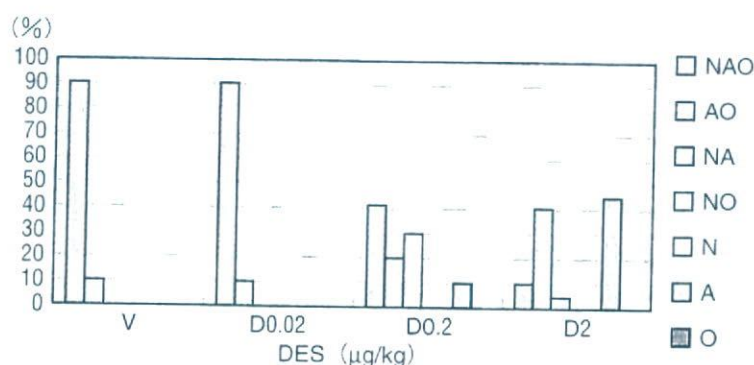


図2・6 DESの神経幹細胞分化に対する影響。図2・5と同様のスケジュールでDESに曝露した胎児終脳から形成されたニューロスフェアの分化能を調べた。bFGF, EGF存在下で未分化状態を保って浮遊培養したニューロスフェアを、コーティングした容器に移し、ウシ胎仔血清1%を加え1週間培養することで分化させた結果をグラフにまとめた。グラフ中の略号は以下を示す。N:ニューロン, A:アストロサイト, O:O4。たとえば、NAOはニューロン(N), アストロサイト(A), オリゴデンドロサイト(O)の3種類の細胞に分化したニューロスフェアを示す。Vehicle群(V)およびDES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群(D0.02)では、3種類の細胞に分化したニューロスフェア(NAO)が90%を占めたのに対し、DES 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (D0.2)以上の群では、3種類の細胞に分化するニューロスフェアの割合は減り、アストロサイトにのみ分化するもの(A)の割合が増える傾向があった。

神経系，殊にその基幹となる神経幹細胞の機能にも影響を与える可能性があり，その影響を具体的に検討する研究が徐々に展開して来ている．エストロゲン受容体が神経幹細胞に発現していること，オーファン受容体であるTLXが成体神経幹細胞に発現し，少なくとも成体においてはその未分化性の維持に必須であること，甲状腺ホルモン T_3 が神経幹細胞からオリゴデンドロサイトへの分化を促進しうることなどが，内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞への影響の可能性を具体的に示しつつある例である．しかし，その影響が実際にどのような表現形として，何時どこに現れるのかは現在不明な点が多い．よって，これらの影響の分子メカニズムに踏み込んだ解析から表現型を見定めていく方策と，器質的变化としては捕らえにくい行動異常などの機能障害を詳細に検討する方策との両面からのアプローチが今後重要となろう．分子メカニズムの面からは，一時的な曝露によるエピジェネティックな変化が，何回もの細胞分裂を経た後にまで影響を及ぼす可能性が示唆されており，機能障害の詳細の解明とともにリスク評価の観点からも重要な毒性学的検討課題の1つであると考えられる．

参考文献

1. Reynolds, B.A., W. Tetzlaff, and S. Weiss, A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor cell produces neurons and astrocytes. *J Neurosci*, 1992. **12**(11): p. 4565-74.
2. McKay, R., Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997. **276**(5309): p. 66-71.
3. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Taga, T., Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300. *Science*, 1999. **284**(5413): p. 479-2.
4. Suslov, O., Kukekov, V., Ignatova, T., and Steindler, D. (2002). Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 14506-14511.
5. Hitoshi, S., Tropepe, V., Ekker, M., and van der Kooy, D., Neural stem cell lineages are regionally specified, but not committed, within distinct compartments of the developing brain. *Development*. 2002 Jan;129(1):233-44, 2002. **129**: p. 233-244.
6. Qian, X., Shen, Q., Goderie, S., He, W., Capela, A., Davis, A., and Temple, S., Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, 2000. **28**: p. 69-80.
7. Reynolds, B.A. and S. Weiss, Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 1992. **255**(5052): p. 1707-10.
8. Temple, S. and A. Alvarez-Buylla, Stem cells in the adult mammalian central nervous system. *Curr Opin Neurobiol.*, 1999. **9**: p. 135-141.
9. Gage, F., Mammalian neural stem cells. *Science*. 2000, 2000. **287**: p. 1433-1438.
10. Gould, E., Reeves, A., Fallah, M., Tanapat, P., Gross, C., and Fuchs, E., Hippocampal neurogenesis in adult Old World primates. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 1999. **96**: p. 5263-5267.
11. Eriksson, P., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A., Nordborg, C., Peterson, D., and Gage, F., Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med.*, 1998. **4**: p. 1313-1317.
12. Doetsch, F., Caille, I., Lim, D. A., Garcia-Verdugo, J. M., and Alvarez-Buylla, A., Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 1999. **97**(6): p. 703-16.
13. Johansson, C. B., Momma, S., Clarke, D. L., Risling, M., Lendahl, U., and Frisen, J., Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell*, 1999. **96**(1): p. 25-34.
14. Shi, Y., Chichung Lie, D., Taupin, P., Nakashima, K., Ray, J., Yu, R. T., Gage, F. H., and Evans, R. M., Expression and function of orphan nuclear receptor TLX in adult neural stem cells. *Nature*, 2004. **427**(6969): p. 78-83.

15. Ciana, P., Ghisletti, S., Mussi, P., Eberini, I., Vegeto, E., and Maggi, A., Estrogen receptor alpha, a molecular switch converting transforming growth factor-alpha-mediated proliferation into differentiation in neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 2003. **278**(34): p. 31737-44.
16. Tanapat, P., Hastings, N. B., Reeves, A. J., and Gould, E., Estrogen stimulates a transient increase in the number of new neurons in the dentate gyrus of the adult female rat. *J Neurosci*, 1999. **19**(14): p. 5792-801.
17. Brannvall, K., L. Korhonen, and D. Lindholm, Estrogen-receptor-dependent regulation of neural stem cell proliferation and differentiation. *Mol Cell Neurosci*, 2002. **21**(3): p. 512-20.
18. Sawamoto, K., et al., Generation of dopaminergic neurons in the adult brain from mesencephalic precursor cells labeled with a nestin-GFP transgene. *J Neurosci.*, 2001. **21**: p. 3895-3903.

生体統御システムと内分泌攪乱

定価(本体5,800円+税)

発行 2005年5月27日
編集 井上 達 (いのうえとおる) / 井口 泰泉 (いぐちたいせん)
発行者 平野 皓正
発行所 シュプリンガー・フェアラーク東京株式会社
〒113-0033 東京都文京区本郷3丁目3番13号
TEL (03) 3812-0757 (営業直通)
印刷所 株式会社シナノ
〈検印省略〉許可なしに転載、複製することを禁じます。
落丁本、乱丁本はお取り替えます。

ISBN 4-431-71112-0 C3045
©Springer-Verlag Tokyo 2005
Printed in Japan

<http://www.springer-tokyo.co.jp>

雜誌

INFLUENCE OF DI-(2-ETHYLHEXYL)PHTHALATE ON FETAL TESTICULAR DEVELOPMENT BY ORAL ADMINISTRATION TO PREGNANT RATS

Mariko SHIROTA¹, Yoshiaki SAITO¹, Kiyoshi IMAI^{1*}, Shinji HORIUCHI¹, Shinsuke YOSHIMURA¹, Masako SATO^{1**}, Tetsuji NAGAO^{1***}, Hiroshi ONO¹ and Masanobu KATO^{H2}

¹ Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center, 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa 257-8523, Japan

² Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd, 2-1-30 Shiba, Minato-ku Tokyo 105-0014, Japan

(Received January 18, 2005; Accepted April 8, 2005)

ABSTRACT — Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on testicular development was studied by oral administration of DEHP at doses of 500 and 1000 mg/kg/day to pregnant rats on gestational days (G) 7 to 18. Ethinyl estradiol (EE) at dose levels of 0.25 and 0.5 mg/kg/day was used as a reference substance. Each 5-6 pregnant rats were sacrificed and their fetuses were examined on G12, 14, 16, 18 and 20. Fetal deaths averaging 20-36% were observed at every examination in the group receiving 1000 mg/kg of DEHP. Increases of fetal deaths over 50% were also observed in the reference group that received 0.5 mg/kg of EE. Microscopic examination of the fetal testis in groups treated with DEHP revealed degeneration of germ cells in G16 fetuses and localized proliferation or hyperplasia of interstitial cells in G18 and 20 fetuses. Germ cells having more than two nuclei were observed in a few cases including the control testes of G14 fetuses. These multinucleated cells were observed frequently in G20 fetuses treated with DEHP. Examination of testes of naturally delivered offspring of dams treated with 1000 mg/kg of DEHP at 7 weeks of age revealed scattered atrophy or dilatation of seminiferous tubules.

Another experiment was carried out to confirm the dose of DEHP affecting testicular development and spermatogenesis. DEHP was given to pregnant rats at doses of 125, 250 and 500 mg/kg/day during G7-18. Similar histopathological changes were observed in fetal testes of the group exposed to 500 and 250 mg/kg of DEHP, but not in those exposed to 125 mg/kg. In postnatal examinations, however, no abnormality was found in the testes at 5 and 10 weeks after birth in any of the treated groups. Furthermore, no abnormal findings were observed in the function of sperm, sperm counts and sperm morphology in the offspring of the group treated with DEHP during the fetal period at 10 weeks of age. Thus, 125 mg/kg/day is considered the no-observed-effect-level of DEHP on testicular development of rats by exposure *in utero* during the period of organogenesis.

KEY WORDS: Phthalic acid ester, Developmental toxicity, Testicular toxicity, Sertoli cells, Sperm function, Rats

INTRODUCTION

It has been shown that high doses of phthalic acid esters exert testicular toxicity in animals (Calley *et al.*, 1966; Gangolli, 1982). Toxic effects on the testis were similarly observed with a variety of phthalate esters such as di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) (Gray *et*

al., 1977), dibutylphthalate, (Cater *et al.*, 1977) and di-n-pentylphthalate (Creasy *et al.*, 1983, 1987). Among a variety of phthalate esters, DEHP has been investigated most frequently as a representative substance of phthalic acid esters. The mechanism of the testicular toxicity of phthalates is not yet wholly clear, although the damaging effect on Sertoli cells and blood-testis

Correspondence: Hiroshi ONO

Present address: * Biosafety Research Center, Foods, Drugs and Pesticides, 582-9 Shioshinden, Fukude-cho, Iwata-gun, Shizuoka 437-1213, Japan

** Syngenta Japan, 1-8-10 Harumi, Chuo-ku, Tokyo 104-6021, Japan

*** Department of Life Sciences, Faculty of Science and Technology, Kinki University, 3-4-1 Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka 557-8502, Japan

Vol. 30 No. 3

barrier has been considered (Gray and Butterworth, 1980). We have conducted a series of experiments on testicular toxicity of DEHP in rats, and have clarified that ultrastructural changes were induced in seminiferous tubules at stages from IX to I of the spermatogenic cycle in 8 week-old Sprague-Dawley rats, 3 to 18 hr after single-dose administration of 2,800 mg/kg of DEHP (Saitoh *et al.*, 1997). Noteworthy changes were degeneration of spermatocytes, dilatation of rough-surfaced endoplasmic reticulum, especially those in the vicinity of the tight junction of ectoplasmic specialization of Sertoli cells, and disintegration of the intercellular junction between Sertoli cells. In a study utilizing electron microscopic autoradiography, we have demonstrated the distribution of phthalic acid into the testis, especially to Sertoli cells (Ono *et al.*, 2004). We have also observed that clear structural changes of testes were induced with single oral dose of 1400 mg/kg, and that the non-toxic dose level of DEHP on testes was 700 mg/kg in mature rats. Furthermore, we have employed a lanthanum trace method to examine the effects of DEHP on Sertoli cell function, especially on the condition of blood-testis barrier in rats (Saitoh *et al.*, 1997). In this study, lanthanum particles were observed 6 hr after administration at the tight junction between Sertoli cells, which showed that the function of Sertoli cells to maintain the blood-testis-barrier was affected with DEHP as early as 6 hr after oral administration, but had recovered by 24 hr. The fetal stage is known to be vulnerable to chemical exposure, and the effects on gonadal and endocrine systems are of special concern. In this context, de Kretser and Kerr (1994) described that the blood-testis barrier in rats was established during 16~19 days of postnatal life. In the present study, influence of *in utero* exposure to DEHP on development of testes in rats was examined. Ethinyl estradiol was used as a reference substance for estrogenic activity of DEHP, if any.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) was purchased from Wako Pure Chemical Industries Ltd. and was diluted with corn oil (Nacalai Tesque Inc.) to a concentration appropriate for administration at the constant volume of 5 mL/kg. Ethinyl estradiol (EE, Wako Pure Chemical) was suspended in corn oil on the same principle and used as the reference compound.

Animals

Adult rats of Sprague-Dawley strain (Crj: CD IGS) were purchased from Charles River Japan Inc., and were kept for a week to acclimatize them to the laboratory condition. The animals were reared individually in a metallic cage sized 220 × 270 × 190 mm, in a room with conditioned temperature at 24~26°C and relative humidity within 50~65%. Lighting was alternated at 12 hr intervals (lights on 7:00~19:00). Appropriate bedding material such as White flake (Charles River) was provided for pregnant and nursing rats. The animals were fed with pellet food (CE-2, CLEA Japan Inc.) *ad libitum* and were supplied with tap water.

A female rat was mated with a male and a vaginal smear specimen was examined every morning. The day when a vaginal plug or sperm in the specimen was confirmed was defined as gestational day (G) 0. The pregnant animals were allocated to groups in a random fashion stratified by body weight on the day of administration (G7).

Dosage and administration

Preliminary dose-finding study showed that administration of 2000 mg/kg/day DEHP to pregnant rats from G7 to G18 caused high incidence of absorption of embryos and fetal deaths. Similar administration of 1000 mg/kg/day of DEHP caused a few fetal deaths and some pathological findings in the testis. Thus the doses of DEHP were decided on 1000 mg/kg for the highest and 500 mg/kg for the lowest in the first experiment. The doses of DEHP in Experiment 2 were selected to be 500, 250 and 125 mg/kg, considering the results of the first experiment. The doses of EE were set at 0.5 and 0.25 mg/kg referring to the study by Yasuda *et al.* (1985) in mice. Oral administration by gavage was started on G7 and continued till G18.

Experimental design

The study was designed in two phases; observation of the histopathological changes of testicular development by intra-uterine exposure to DEHP was made in Experiment 1, including the dose finding, and in Experiment 2 a search for the no-effect level was attempted, together with confirmation of the findings in Experiment 1.

In Experiment 1, 28-30 dams per group were given oral administration of DEHP, EE or the vehicle from G7 to G18. Each 6 of these dams were killed by ether inhalation on G12, 14, 16, 18 and 20 to examine their fetuses. In addition, each 5 dams of groups given 500 and 1000 mg/kg of DEHP were allowed to deliver

spontaneously to examine postnatal changes in the testis and epididymis of their offspring. The male offspring were reared and kept until examination at 7 weeks of age.

In Experiment 2, each 11-12 pregnant females were given oral administration of DEHP or vehicle. Each 3 dams of the groups were submitted to Caesarean section on G20 to examine their fetuses. Other dams were allowed to deliver spontaneously and male offspring chosen for examination at 5 and 10 weeks of age. The day of delivery was defined as Day 0 of lactation.

Observations of dams

Dams were examined daily for general conditions in all experiments and body weight was measured occasionally. Delivery and nursing conditions were observed and the numbers of fetuses delivered and live offspring were determined. From these data and the number of implantations counted at the necropsy, viability of the offspring, namely, delivery index (fetuses delivered/implantation sites, %), birth index (live offspring at birth/implantation sites, %), viability index (live offspring on day 4 of lactation/live offspring at birth, %) and weaning index (live offspring on day 21 of lactation/live offspring on day 4 of lactation, %), were determined.

Examination of the fetuses and offspring

In Experiment 1, fetuses on G12 were collected only for histopathological examination. Live fetuses collected on G14, 16, 18 and 20 were weighed and the external appearances examined. Whole bodies and testes from these live fetuses were submitted for histopathological or electron microscopic examination. The testes and epididymides of male offspring of the DEHP-treated groups were collected at 7 weeks of age for histopathological examination.

For histopathological examination, the specimens were fixated in Bouin's solution and then immersed in a buffered neutral formalin solution. The fixed tissues were embedded in paraffin and cut in 4 μm slices. These sections were stained with hematoxylin and eosin (HE) and were examined under light microscopy.

For electron microscopic examination, the tissues were immersed in an ice-cold mixture of 2% paraformaldehyde buffered with 0.1 M *s*-collidine and 1.25% glutaraldehyde for 3 hr. The fixed tissues were cut into small pieces and post-fixed with 2% osmium tetroxide buffered with 0.1 M *s*-collidine. The post-fixed tis-

ues were dehydrated in ethanol and embedded in epoxy resin (Quetol-651, Nissin EM, Tokyo). Semi-thin sections (1 μm) were stained with toluidine blue and observed under a light microscope. Representative areas were selected from the testis preparations and ultra-thin sections were prepared and stained with uranyl acetate and lead citrate, and then examined with an electron microscope (H-7100, Hitachi, Tokyo).

In Experiment 2, all of the live fetuses examined on G20 were weighed by sex and examined for their external appearance, and then testes were dissected from live male fetuses for histopathological examination as described in Experiment 1, and for staining of androgen receptors. The offspring were weighed and reared until examination. Each 4 male offspring from each group were killed at 5 and 10 weeks of age, and testes with epididymides were dissected and HE-stained thin sections prepared as described above. For electron microscopic examination, each 2 male offspring were used and fixation was performed by a systemic perfusion of a mixture solution of 2% paraformaldehyde buffered with 0.1 M *s*-collidine and 2.5% glutaraldehyde from the aorta to the body with a perfusion pump under sodium pentobarbital anesthesia. The testes were submitted to electron microscopic observation. The other 4 offspring of each group were killed by ether inhalation at 10 weeks of age to obtain their testes and epididymides for sperm examination.

Immunohistochemistry of androgen receptors

In addition, in order to confirm the development of hormone receptors, expression of androgen receptors in the testis was observed by an immunohistochemical method (Dalgaard *et al.*, 2001), using a rabbit polyclonal antibody for N-terminal of the androgen receptor (AR-20, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Examination of spermatogenesis

In Experiment 2 the seminiferous epithelium cycle was examined on testis sections stained with HE obtained at 5 weeks of age, and the spermatogenic stage was determined according to the simplified method described by Matsui *et al.* (1996). Briefly, seminiferous tubules on a specimen were classified into four groups by spermatogenic stages I-VI, VII-VIII, IX-XI and XII-XIV (Dym and Clermont, 1970). One corresponding section of the testis was stained with periodic acid Schiff (PAS) to confirm acrosomes of spermatogonia. Each 5 seminiferous tubules belonging to 4 groups were chosen and the numbers of germ

cells and Sertoli cells in a tubule determined to calculate a ratio of germ cells to Sertoli cells in each group.

Analysis of morphology and function of sperm

Sperm were collected through micropuncture of the cauda epididymis of rats at 10 weeks of age, and were examined as previously described (Sato *et al.*, 2000). Sperm motility was measured using a computer-assisted sperm motion analysis system (HTM-IVOS ver 10.6, Hamilton-Thorne Research, Beverly, MA, USA) and for morphological analysis of spermatozoa as described previously (Sato *et al.*, 2002a). After the collection of sperm for motility analysis, the cauda epididymis was dissected at the transition point to the vas deferens and at the middle of the cauda and body of epididymis, weighed and then stored at -20°C . The frozen cauda epididymis was thawed to room temperature and homogenized in distilled water. The sperm heads in the homogenate were counted with HTM-IVOS as previously described (Sato *et al.*, 2002b).

Statistical analysis

When uniformity of variance was confirmed among the groups by the method of Bartlett, data obtained were analyzed by ANOVA (Yoshimura, 1986). When the uniformity was not confirmed, Kruskal-Wallis's rank-sum test was applied instead (Yoshimura, 1986). When significant differences between groups were observed in either of the analyses, Dunnett test was applied for a comparison between the control and treated groups of either DEHP or EE (Yoshimura, 1986). A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Effects of DEHP treatment on dams

Daily oral administration of DEHP at a level of 1000 mg/kg and EE at levels of 0.25 and 0.5 mg/kg slightly suppressed body weight gain of pregnant rats during the treatment period. Administration of the lower dose levels of DEHP did not affect maternal body weight (Tables 1 and 2).

Effects of maternal treatment with DEHP on fetuses and offspring

Reproductive performance data, including fetal weights on G14, 16, 18 and 20 in Experiment 1, are summarized in Table 1. Oral DEHP treatment at 1000 mg/kg reduced fetal body weights at G14 and 18 sig-

nificantly ($p < 0.01$) as compared with those of the control group. Furthermore, 1000 mg/kg of DEHP treatment increased intrauterine mortality to 20-36%. DEHP treatment at 500 mg/kg did not cause increase in fetal deaths and changes in fetal body weight significantly. Treatment with 0.5 mg/kg of EE also increased intrauterine mortality of fetuses, even to more than 50% on G16 and 20.

External observation of fetuses on G20 revealed various malformations in treated groups. Two fetuses with branchyury from a single dam given 500 mg/kg DEHP were observed and each one fetus with general edema, club foot or anal atresia and 3 fetuses with kinked tail from a single dam given 1000 mg/kg of DEHP were observed. In the group treated with 0.5 mg/kg of EE, one fetus with kinked tail was observed. Two out of 5 dams given 500 mg/kg DEHP did not deliver any offspring because of early embryonic loss. However, 1000 mg/kg of DEHP did not cause any abnormality in delivery.

In Experiment 2, DEHP-treatment up to 500 mg/kg did not show any marked effect on fetuses (Table 2). External malformations observed in the 500 mg/kg group in Experiment 1 were not reproduced in Experiment 2. Birth weights of the offspring were significantly higher in the groups exposed to DEHP at 250 and 500 mg/kg than control. Viability and growth rate of the offspring are summarized in Table 3. Differences of body weight among the groups were insignificant on the 4th day of lactation.

Histopathological findings of fetuses and offspring

Histopathological findings of fetal testes in Experiment 1 are summarized in Table 4. Representative photographs are shown in Photos 1-3. The testis was not distinguishable in the fetuses on G12, when a few round germ cells with clear cytoplasm were scattered in mesenchyma around mesonephros. The testis was distinguished morphologically on G14, when the germinal ridge was formed and a few germ cells, some showing mitosis, were seen in the gonadal cord. On G16, the testicular cord became prominent, containing many round nucleated germ cells and Sertoli cells on its margin (Photo 1a). On G18, the interstitium was widened in the center of the gonad containing rich interstitial cells (Photo 2a), when the density of germ cells in the reproductive tract was increased. On G20, the testicular cord developed further, although the tubular structure was not yet formed (Photo 3a).

No abnormalities were observed in any group on G14. On G16, degeneration of germ cells was noted in

DEHP on rat testicular development.

Table 1. Viability and development of fetuses exposed to di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) or ethinyl estradiol (EE) during gestational days 7-18 (Experiment 1).

	DEHP (mg/kg)			EE (mg/kg)	
	0 ^a	500	1000	0.25	0.5
<u>Gestational day 14</u>	(6)	(6)	(6)	(5)	(5)
Maternal body weight (g)	336.9 ± 17.4	326.5 ± 31.0	320.2 ± 14.9**	295.7 ± 14.7**	278.4 ± 22.7**
Implantations	17.0 ± 1.4	15.0 ± 1.7	16.2 ± 1.2	15.6 ± 1.1	13.6 ± 4.7
Intrauterine mortality (%)	7.1 ± 5.9	3.0 ± 5.0	20.3 ± 18.4	3.8 ± 5.6	6.9 ± 9.4
Live fetuses	15.8 ± 2.1	14.5 ± 1.2	12.8 ± 2.9	15.0 ± 1.4	12.6 ± 4.5
Mean fetal weight (g)	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.12 ± 0.02**	0.15 ± 0.01	0.15 ± 0.02
<u>Gestational day 16</u>	(5)	(6)	(6)	(0)	(5)
Maternal body weight (g)	344.9 ± 4.9	344.3 ± 21.3	311.4 ± 20.0**		285.7 ± 30.4**
Implantations	15.4 ± 1.3	16.0 ± 1.3	15.3 ± 1.6		13.6 ± 6.2
Intrauterine mortality (%)	1.3 ± 2.8	12.4 ± 7.6	33.1 ± 31.3		72.0 ± 36.9
Live fetuses	15.2 ± 1.3	14.0 ± 1.4	10.2 ± 4.8		4.2 ± 5.4
Mean fetal weight (g)	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.37 ± 0.04		0.42 ± 0.02 ^b
<u>Gestational day 18</u>	(6)	(6)	(6)	(4)	(5)
Maternal body weight (g)	370.7 ± 36.5	360.0 ± 36.6	335.5 ± 20.2*	327.6 ± 42.4*	321.7 ± 16.3**
Implantations	14.5 ± 1.4	15.2 ± 2.6	14.8 ± 1.6	15.3 ± 2.2	14.4 ± 2.4
Intrauterine mortality (%)	3.6 ± 6.3	1.0 ± 2.4	35.6 ± 36.5	5.7 ± 7.9	1.3 ± 3.0
Live fetuses	14.0 ± 1.8	15.0 ± 2.5	9.5 ± 5.6	14.3 ± 1.0	14.2 ± 2.4
Mean fetal weight (g)	1.35 ± 0.07	1.32 ± 0.06	1.03 ± 0.13**	1.33 ± 0.05	1.25 ± 0.10
<u>Gestational day 20</u>	(6)	(6)	(6)	(0)	(2)
Maternal body weight (g)	404.2 ± 6.5	410.8 ± 30.2	365.0 ± 25.4**		322.8
Implantations	14.7 ± 1.6	14.8 ± 2.6	14.5 ± 1.5		15.5
Intrauterine mortality (%)	0.0 ± 0.0	2.7 ± 4.4	36.4 ± 26.5		50.8
Live fetuses	14.7 ± 1.6	14.5 ± 2.9	9.0 ± 3.5		7.5
Mean fetal weight (g)	3.68 ± 0.20	3.52 ± 0.14	2.82 ± 0.11		2.90
External malformations	0.0 ± 0.0	2.22 ± 5.44	6.25 ± 15.31		7.14

^a Vehicle control (corn oil, 5 mL/kg). ^b Data from 3 dams having live fetuses.

* Significantly different from control (p<0.05). ** Significantly different from control (p<0.01).

Table 2. Reproductive parameters on gestational day 20 in rats treated with di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during gestational days 7-18 (Experiment 2).

	DEHP (mg/kg)			
	0 ^a	125	250	500
<u>Gestational day 20</u>				
Dams examined	3	3	3	3
Maternal body weight (g)	408.3 ± 32.6	428.8 ± 42.5	399.3 ± 43.4	427.9 ± 50.8
Implantations	14.7 ± 0.6	15.0 ± 2.6	14.0 ± 1.7	16.0 ± 1.7
Intrauterine mortality (%)	2.2 ± 3.9	0	2.8 ± 4.8	4.1 ± 3.6
Live fetuses	14.3 ± 0.6	15.0 ± 2.6	13.7 ± 2.3	15.3 ± 1.5
Males	5.3 ± 1.2	7.0 ± 3.5	6.3 ± 2.1	9.3 ± 2.1
Females	9.0 ± 1.0	8.0 ± 1.0	7.3 ± 0.6	6.0 ± 1.0
Sex ratio (%)	37.2 ± 7.6	44.7 ± 17.2	45.5 ± 8.5	60.5 ± 9.1
Fetal body weight (g)	14.0 ± 1.8	15.0 ± 2.5	9.5 ± 5.6	14.2 ± 2.4
Males	3.77 ± 0.13	3.86 ± 0.40	4.02 ± 0.13	3.57 ± 0.14
Females	3.51 ± 0.14	3.67 ± 0.34	3.77 ± 0.16	3.40 ± 0.03
External malformations	0	0	0	0

Values represent mean ± S.D.

^a Vehicle control (corn oil, 5 mL/kg).

one of 12 examined fetuses of the 1000 mg/kg DEHP group (Photos 1b, 1c). No such findings were noted in other fetuses of the group exposed to DEHP at 1000 mg/kg and also at 500 mg/kg. On G18, interstitial cells were increased in number and aggregated topically in the 500 mg/kg DEHP group (Photo 2b), and the hyperplasia of interstitial cells was intensified in the 1000 mg/kg DEHP group (Photo 2c), while such findings were not noted in any testes of fetuses exposed to EE. Testicular size was smaller in the groups of 1000 mg/kg DEHP and 0.5 mg/kg EE on G18 and G20. On G20, germ cells having more than two nuclei were noted and thickened seminiferous cords containing rich germ cells were seldom observed in the 500 mg/kg DEHP group. In fetal testes of the 1000 mg/kg DEHP group hyperplasia of interstitial cells, multinucleated germ cells were also seen (Photos 3b, 3c). Topically thickened seminiferous cords due to aggregation of germ

cells were observed frequently in this group.

Table 5 summarizes histopathological findings in the testis of the offspring in Experiment 1. Representative pictures are shown in Photos 4~6. In the offspring at 7 weeks after birth prenatally exposed to DEHP at a level of 500 mg/kg, no obvious abnormalities were found except for multinucleated giant cells in the seminiferous tubules and cell debris in the epididymal lumens (Photos 4a, 4b). In the 1000 mg/kg-exposed group, however, most of the animals had developed abnormalities, such as branched seminiferous tubules with atrophy and/or dilatation, multinucleated giant cells and dilatation of rete testis (Photos 4c, 5a, 5b). In addition to these findings, testes from several animals in this group showed hyperplasia of the interstitial cells (Photo 4c), necrosis and/or mineralization of testes, foreign body giant cells, focal loss of seminiferous tubules and malformed seminiferous tubules (Photos

Table 3. Reproductive data and development of the offspring treated with di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) during gestational days 7-18 (Experiment 2).

	DEHP (mg/kg)			
	0 ^a	125	250	500
Dams examined	8	9	8	8
Gestation length (days)	21.8 ± 0.5	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0
Implantation sites	15.4 ± 1.2	15.6 ± 2.4	15.4 ± 1.1	14.9 ± 1.2
<u>At birth (Day 0 of lactation)</u>				
Live offspring	14.0 ± 2.1	14.6 ± 2.6	14.4 ± 1.7	14.1 ± 1.2
Birth index (%) ^b	90.8 ± 9.0	93.2 ± 6.3	93.5 ± 8.8	95.1 ± 5.7
Sex ratio (%)	42.0 ± 10.4	45.7 ± 8.9	42.9 ± 12.3	50.5 ± 12.3
Body weight, males (g)	6.5 ± 0.3	6.7 ± 0.5	7.0 ± 0.5	7.1 ± 0.3*
Body weight, females (g)	6.1 ± 0.3	6.3 ± 0.5	6.7 ± 0.6*	6.7 ± 0.3*
<u>Day 4 of lactation</u>				
Live offspring	13.9 ± 2.2	14.3 ± 2.5	14.4 ± 1.7	14.0 ± 1.3
Viability (%)	99.0 ± 2.7	98.6 ± 2.8	100.0 ± 0.0	99.1 ± 2.5
Sex ratio (%)	42.3 ± 10.1	46.3 ± 8.5	42.9 ± 12.3	50.9 ± 11.4
Body weight, males (g)	10.3 ± 1.1	10.4 ± 1.0	10.7 ± 0.7	10.5 ± 1.3
Body weight, females (g)	9.8 ± 1.2	9.7 ± 1.0	10.3 ± 0.8	10.0 ± 1.3
Body weight, preserved males (g) ^c	10.4 ± 0.9	10.7 ± 0.7	11.0 ± 0.5	10.7 ± 0.1
<u>Day 7 of lactation</u>				
Body weight, preserved males (g)	17.1 ± 2.3	16.9 ± 1.0	18.2 ± 0.7	17.2 ± 0.2
<u>Day 14 of lactation</u>				
Body weight, preserved males (g)	36.1 ± 2.8	34.5 ± 1.5	37.5 ± 0.8	37.6 ± 1.3
<u>At weaning (Day 21 of lactation)</u>				
Body weight, preserved males (g)	58.7 ± 4.7	57.1 ± 4.1	62.2 ± 1.5	60.5 ± 3.3
Weaning index (%)	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0

Values represent mean ± S.D. * Significantly different from control (p<0.05).

^a Vehicle control (corn oil, 5 mL/kg). ^b Live offspring/implantation sites.

^c Each 2~3 male offspring from dams were preserved.

DEHP on rat testicular development.

Table 4. Histopathological findings of testes of fetuses exposed to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) or ethinyl estradiol (EE) during gestational days 7-18 (Experiment 1).

Group	DEHP 0 mg/kg					DEHP 500 mg/kg					DEHP 1000 mg/kg					EE 0.25 mg/kg					EE 0.5 mg/kg				
	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++	-	±	+	++	+++
Gestational day 12	(12)					(10)					(10)					(10)					(10)				
Degeneration of fetal tissue	12	0	0	0	0	10	0	0	0	0	8	0	0	2	0						2	0	0	8	0
Gestational day 14	(9)					(9)					(9)					(9)					(9)				
Multinucleated germ cells	8	1	0	0	0	9	0	0	0	0	8	1	0	0	0	9	0	0	0	0	8	1	0	0	0
Gestational day 16	(10)					(10)					(12)					(4)					(4)				
Degeneration of germ cells	10	0	0	0	0	10	0	0	0	0	11	0	0	1	0						4	0	0	0	0
Multinucleated germ cells	10	0	0	0	0	9	1	0	0	0	10	2	0	0	0						4	0	0	0	0
Gestational day 18	(20)					(20)					(10)					(11)					(16)				
Multinucleated germ cells	20	0	0	0	0	18	2	0	0	0	10	0	0	0	0	11	0	0	0	0	14	2	0	0	0
Increased germ cells in a cord	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	8	2	0	0	0	11	0	0	0	0	16	0	0	0	0
Hyperplasia of interstitial cells	20	0	0	0	0	8	12	0	0	0	0	3	7	0	0	11	0	0	0	0	16	0	0	0	0
Decrease in testicular size	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	4	0	6	0	0	11	0	0	0	0	9	7	0	0	0
Gestational day 20	(17)					(17)					(18)					(8)					(8)				
Multinucleated germ cells	16	1	0	0	0	0	0	0	10	7	0	3	13	2	0						4	4	0	0	0
Increased germ cells in a cord	17	0	0	0	0	14	3	0	0	0	1	12	5	0	0						5	3	0	0	0
Hyperplasia of interstitial cells	17	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	1	17	0	0						8	0	0	0	0
Decrease in testicular size	17	0	0	0	0	17	0	0	0	0	5	8	5	0	0						5	3	0	0	0

- : negative, ± : very slight, + : slight, ++ : moderate, +++ : severe.
 Figures in parentheses show number of dams examined.

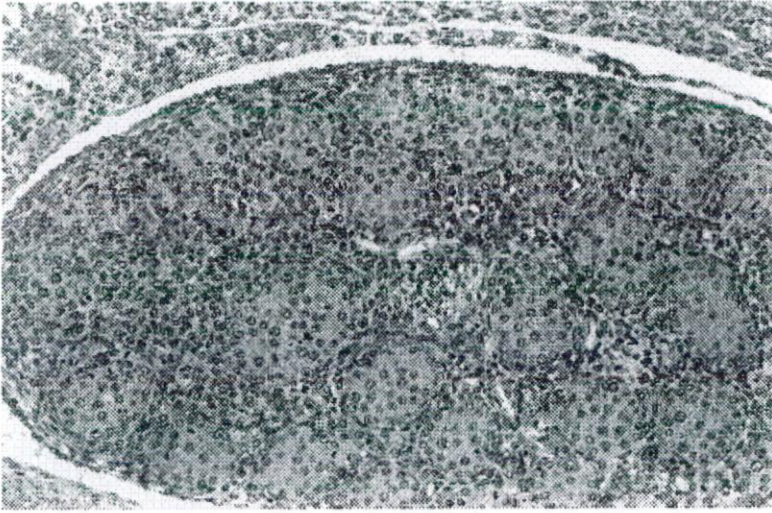


Photo 1-a. Transverse section of a fetus from the control group on G16 showing the genital ridge. HE stain, $\times 160$.

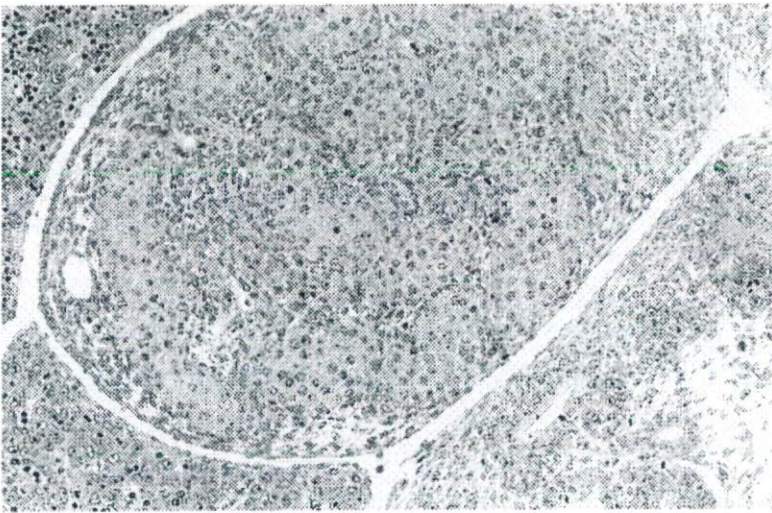


Photo 1-b. Transverse section of a fetus from the 1000 mg/kg DEHP group on G16 showing no abnormality in the genital ridge. HE stain, $\times 160$.

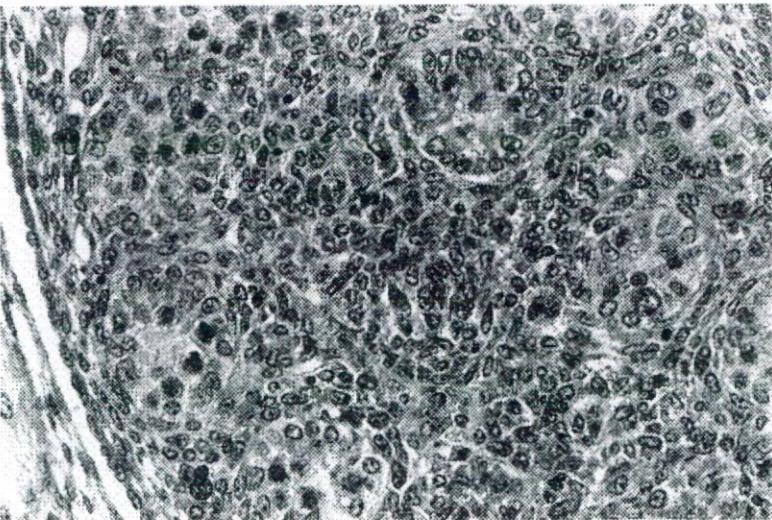


Photo 1-c. Transverse section of a fetus from the 1000 mg/kg DEHP group on G16 showing the genital ridge. Many germ cells are degenerated and densely stained. HE stain, $\times 310$.