

フタル酸エステルの生殖および発生に対する 毒性影響についての最近の研究： 主としてDi(2-ethylhexyl) phthalateおよび Di-*n*-butyl phthalateについて

(2000年3月8日受付)

(2000年6月26日受理)

小泉睦子^{a)}、江馬 眞^{b)}、広瀬明彦^{a)}、長谷川隆一^{a)}

a) 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室

b) 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所 生物試験部

キーワード： フタル酸エステル、内分泌かく乱物質、生殖・発生毒性、Di(2-ethylhexyl) phthalate、Di-*n*-butyl phthalate

はじめに

フタル酸エステルは食料品の包装材および医療器具などの多くのプラスチック製品の可塑剤として広く使用され、特にdi(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)の使用量が多い。ヒトへの暴露として、各種食品中、食品包装材からの溶出液中、血液保存バックや血液透析器由来の血清中に検出されている。フタル酸エステルの毒性としては肝がんの誘発および生殖・発生毒性が明らかとされており、その活性本体は加水分解代謝物であるフタル酸モノエステルであると考えられている。肝がん誘発についてはげっ歯類で特異的に強く現れる生体影響と考えられているが、生殖・発生毒性のメカニズムはまだ明らかにされていない。現在、フタル酸エステルは内分泌かく乱物質の一つとして疑われており、生殖・発生毒性のメカニズムを解明することは人への影響を評価する上で重要な第一ステップである。

本稿ではフタル酸エステルのげっ歯類における生殖・発生毒性について、主にそのメカニズムに焦点を当て、最近数年の文献を中心に整理する。最初に、雌雄の生殖器官についての簡単な説明の後、エストロゲン様作用、雌雄の生殖機能への影響およびその機構について、主にDEHPおよびdi-*n*-butyl phthalate (DBP)についての文献を中心にまとめる。

1. 雌雄の生殖器官について

げっ歯類の雌雄生殖器官について以下にまとめた。

雄の生殖器は、精子形成およびアンドロゲンの合成・分泌を行う精巣、および副生殖器官として、精巣上体、輸精管、精囊、前立腺などからなる。精巣内は精細管および間質組織で

満たされている。精細管はその内部上皮を支持している基底膜によってとり囲まれており、その基底膜に接して精原細胞およびセルトリ細胞がある。精原細胞は精母細胞、精子細胞と分化を遂げながら管腔の中心に向かって移動し、精子として精細管内に遊離される。セルトリ細胞は隣接した細胞同士で強固に結合して血液・精巣関門バリアーを形成し、生殖細胞を保護しており、精子形成に必要とされる栄養やホルモン作用などはセルトリ細胞を通して生殖細胞に供給される。アンドロゲンは精巣の間質組織に存在するライディッヒ細胞で合成される。これらの精巣の機能は、視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン(GTH)放出ホルモン刺激により下垂体前葉から分泌されるGTH、すなわち卵巣刺激ホルモン(FSH)および黄体ホルモン(LH)によって制御されている。FSHはセルトリ細胞を刺激することにより、精子形成を促進させ、LHはライディッヒ細胞を刺激してアンドロゲン分泌を促進させる。

雌の生殖器は、卵形成およびエストロゲンとプロゲステロンの合成・分泌を行う卵巣、および副生殖器官として輸卵管、子宮、膣などからなる。卵巣は密な基質層により覆われており、間質には種々の発育段階にある多数の卵胞(卵とその周囲を取り囲む細胞集団)が存在する。血中エストロゲン濃度が低くなると負のフィードバック系を介して視床下部および下垂体前葉が刺激され、FSHおよびLH分泌が促進されるが、これらのホルモンは卵巣に作用して卵胞の発育を促す。まず、卵胞細胞が増殖し、卵を取り囲んで顆粒膜細胞層を形成する。次に、顆粒膜細胞層内の所々に小さな卵胞腔が形成されるようになるが、卵胞の発育増大につれて、これらの卵胞腔は合一し、卵胞液で満たされた大きな卵胞腔が

形成される。顆粒膜細胞層の外側には基底膜を挟んで莢膜細胞が分化する。排卵前の成熟卵胞では、卵は透明なゲル状物質からなる透明層および多くの顆粒膜細胞によって取り囲まれ、卵胞本体の顆粒膜細胞層に付着し、全体として卵丘を形成する。卵胞は発育に伴い、エストロゲンを活発に分泌するようになる。プロゲステロンが存在しない状態で血中エストロゲン濃度が極大値に達すると、正のフィードバック作用が引き起こされ、LHを主体としたGTHの一過性の大放出(GTHサージ)によって、卵を卵胞外に放出し、排卵が起こる。GTHサージはLH放出だけでなく、FSH放出も随伴する。GTHサージが開始すると、エストロゲンが急減し、プロゲステロンの一過性の分泌が起こる。GTHサージにより排卵すれば、破裂卵胞から黄体が形成されるが、交尾が行われしないと機能黄体とはならず退行する。発情期に交尾が行われれば、その子宮頸管刺激により夜半前および夜半後の毎日2回のプロラクチン(PRL)のサージが出現し、排卵後の新生黄体はこのPRLサージによって機能化され、プロゲステロンの持続分泌が起こる。このように性周期黄体は機能化しプロゲステロンを持続分泌する黄体を獲得するが、受精不成功の時には偽妊娠となり、黄体は妊娠期間のほぼ二分の一程度の期間までプロゲステロン分泌を続けるが、黄体退行因子の作用により黄体は退行して、偽妊娠は終了する。受精卵が子宮内に運ばれ子宮内膜に着床し受胎すれば、黄体は退行せず、その後胎盤ラクトゲンによって維持され黄体寿命は延長し妊娠黄体となり、妊娠を維持する。このように、視床下部・下垂体・卵巢系の機能閉鎖環の相互調節によって内分泌の状態の周期的変化が生ずるが、この変化に基づいて卵巢のみならず、子宮、膣、外陰などの性器、および性器外に周期的変化が認められる。

2. エストロゲン様作用

各種のフタル酸エステルについて、エストロゲン様作用が検出されている。最近の報告としては、Harrisら(1997)およびZacharewskiら(1998)のエストロゲン受容体を組み込んだ酵母を用いた試験で、多くの種類のフタル酸エステルが弱いながらもエストロゲン様活性を示している。一方で、Harrisら(1997)は一部の陽性結果はbisphenol Aの混在による影響であること、フタル酸エステルの活性本体と考えられているモノエステル体にはエストロゲン様活性のないことを報告している。Zacharewskiら(1998)はヒト乳がん由来の培養細胞株(MCF-7)を用いた試験で、DBP、*n*-butyl benzyl phthalate (BBP)および*di*-*n*-hexyl phthalate (DHP)にはエストロゲン様活性が認められたものの、DEHPを含むその他のフタル酸エステルにはエストロゲン様活性が認められなかったことを報告したが、Blomら(1998)は、同様の試験系においてDEHPは用量依存的なエストロゲン様活性を示したことを報告している。しかしながら、Zacharewskiら(1998)は、未成熟SDラットを用いた*in vivo*試験で、DBPおよびDEHPを含む8種のフタル酸エステルがいずれも子宮肥大を引き起こさないことを報告した。

以上の結果から、フタル酸エステルは*in vivo*ではエストロ

ゲン様作用を示さないと考えられる。また、フタル酸エステルはエストロゲン受容体に結合するための共通の構造を有していないことから、生体内でエストロゲン受容体を介した作用を示さないものと考えられる。

3. 雄の生殖系への影響

ラット、マウス、モルモットなどの実験動物の雄に対して、フタル酸エステルが精細管萎縮、精子形成阻害などの精巢毒性および雄副生殖器官萎縮を引き起こすことは良く知られている。最近、これらの作用機構の一部が解明されつつあるので、ここでは、精細管への影響とライディッシュ細胞への影響を分けてまとめる。

①精細管への影響

フタル酸エステルはモノエステル体に加水分解された後吸収されると考えられている(Lakeら: 1977)ため、この研究はDEHPのモノエステル体であるmono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP)を用いて行われている。

FSHはセルトリ細胞の膜受容体に結合し、G蛋白を介してadenylate cyclaseを活性化させ、cAMPを産生させることにより生理作用を発現すると考えられている。Heindel & Chapin (1989)は、ラットの培養セルトリ細胞において、MEHPがFSH刺激によるcAMPの蓄積を用量依存的に抑制したことから、MEHPの作用点は細胞膜またはFSH受容体そのものであると予測した。Grassoら(1993)は、同セルトリ細胞をMEHPとインキュベーションしたところ、FSH結合性の低下が認められたが、MEHPとFSHの同時存在下ではFSH結合性の低下は認められなかったことから、MEHPの作用部位はFSH受容体よりむしろG蛋白であろうと推定している。しかし、その後、フタル酸エステルのFSH-cAMP経路への作用に関する研究報告はない。

一方、フタル酸エステルは精子形成阻害を引き起こすが、その作用機構の1つとしてセルトリ細胞からの生殖細胞の遊離とその結果生じる生殖細胞のアポトーシス誘導が考えられている。精巣では常にアポトーシスによる生殖細胞の自発的な削除が行われており、この生殖細胞のアポトーシスには、Fasシステムが重要な役割を果たしていると考えられている(Nagata: 1997, Nagata & Golstein: 1995)。Fasシステムとは生殖細胞に存在する膜レセプター蛋白であるFas、セルトリ細胞に存在するそのリガンド(FasL)からなるパラクラインシグナリングシステムで、FasLのFasへの結合により、生殖細胞のアポトーシスが引き起こされる(図-1A)。Richburg & Boekelheide (1996)はラットにMEHPを単回経口投与し、3、6、12時間後にセルトリ細胞および生殖細胞への影響を解析した結果、生殖細胞のアポトーシスが3時間後には一過性に低下したものの、6時間以後には著しく増加することを観察した。また、投与後3時間の時点からセルトリ細胞内で生殖細胞の結合維持に重要な役割を果たしていると考えられているビメチンフィラメントの崩壊が観察された。また、Leeら(1999)はMEHPのFasシステムへの影響を解析し、ラットの投与6時間後に精巣内Fas mRNAおよびFasL

mRNAの増加を示した。さらに、Richburgら(1999)はMEHPを投与したラットの精巣において、セルトリ細胞膜上に発現したFasLが可溶型(sFasL)となって遊離すること、および生殖細胞細胞膜分画のFasが増加することを報告している。これらの結果に基づいて、Richburgら(1999)はMEHPの作用機構について図-1Bに示したような仮説を立てた。すなわち、MEHPはセルトリ細胞のビメチンフィラメントを崩壊させることにより、生殖細胞をセルトリ細胞から分離させ、Fasシグナル伝達経路を崩壊させる。その後、sFasLの形成および生殖細胞膜でFas発現が増加し、sFasLがFasに結合することによって生殖細胞のアポトーシスが起こるという考え方である。

しかしながら、精細管への影響について推測されるこれら二つのメカニズムの関連性については検討されていない。

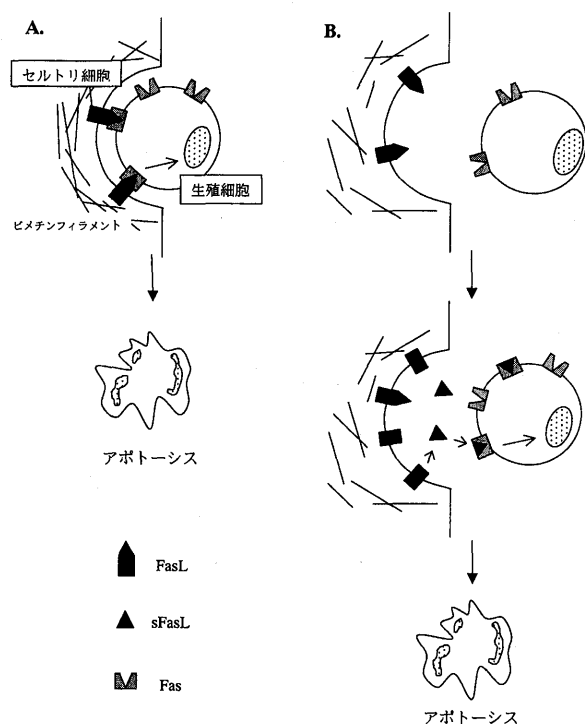
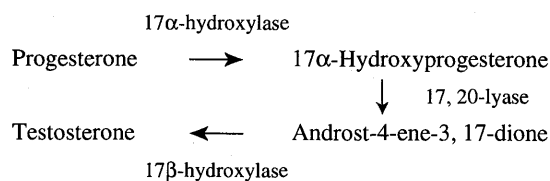


図-1 MEHPのセルトリ細胞への作用による生殖細胞のアポトーシスの推定作用機構 (Richburgら(1999)の仮説)

正常状態において常に行なわれている生殖細胞のアポトーシスには、生殖細胞に存在する膜レセプター蛋白であるFas、およびセルトリ細胞に存在するそのリガンド(FasL)からなるFasシステムが重要な役割を果たしていると考えられている(A)。MEHPはセルトリ細胞のビメチンフィラメントを崩壊させることにより、生殖細胞をセルトリ細胞から分離させ、Fasシグナル伝達経路を崩壊させる。その後、可溶型FasL(sFasL)の形成および生殖細胞膜でFas発現が増加し、sFasLがFasに結合することによってアポトーシスが起こり生殖細胞が死滅する(B)。

②ライディッヒ細胞への影響

精巣の間質組織に局在するライディッヒ細胞はLHの刺激によりprogesteroneから以下の経路でtestosteroneを合成する。



一部のフタル酸エステルは血中testosterone濃度の低下を引き起こすが、それに伴って血中FSHおよびLH濃度の増加、副生殖器官重量の低下、脳下垂体肥大が生じる。Fosterら(1983)はラットにdi-*n*-pentyl phthalate (DPP)を4日間投与した。その結果、精巣においてprogesteroneのミクロソームへの結合およびチトクロームP-450含量の低下が認められ、また、17 α -hydroxylaseおよび17, 20-lyase活性が低下した。一方、ラットを用いた幾つかの実験では血中testosterone濃度の低下と共に精巣testosterone濃度の増加が報告されているが、Agarwalら(1989)はDEHPによって間質組織の線維化が引き起こされたことから、DEHPによりライディッヒ細胞からのtestosteroneの放出が抑制されたのではないかと推測している。その後、Jonesら(1993)はラットに対するDEHPの経口投与により、ライディッヒ細胞のミトコンドリア、小胞体、ゴルジ装置などの超微細構造が変化すること、また、ラットから調製した培養ライディッヒ細胞のLH刺激によるtestosterone分泌をMEHPが用量依存的に低下させることを示した。

これらの結果から、一部のフタル酸エステルはライディッヒ細胞に直接作用して機能障害を惹起し、その結果としてtestosteroneの合成および分泌を減少させたと推定される。その後、ライディッヒ細胞への影響に関する研究報告はない。

4. 雌の生殖系への影響

Davisら(1994a)は、成熟雌ラットへのDEHPの経口投与により、性周期の延長、排卵阻害、血中17 β -estradiolおよびprogesterone濃度の低下、GTHサージの阻害が引き起こされることを示した。形態学的変化として排卵前卵胞で顆粒膜細胞面積の減少が観察され、これが血中17 β -estradiol濃度低下の原因と考えられた。一方、Berman & Laskey (1993)は、DEHPを経口投与された成熟雌ラットから摘出した卵巣の培養系において、生成ステロイドプロファイル(progesterone、17 β -estradiol、testosterone)は変化した、副腎の培養系ではこのような変化は起こらなかったことを報告している。

排卵前の顆粒膜細胞では、FSHがcAMPを介してアロマターゼ活性を増加させることによりtestosteroneから17 β -estradiolを生成する。Treinenら(1990)はdiethylstilbestrolの入ったカプセルを埋植したラットから調製した培養顆粒膜細胞を用いて、MEHPがFSH刺激によるcAMP蓄積を抑制することを示した。また、Davisら(1994b)は同じ実験系でMEHPが17 β -estradiolの生成を低下させた、分離したアロマターゼ酵素にはMEHPが影響しないことを示した。その後、Davis(1999)は培養顆粒膜細胞にMEHPを添加することによりアロマターゼ遺伝子の発現量が2分の1に減少する結果を得た。

以上の報告から、MEHPの標的部位は排卵前の顆粒膜細胞で、FSHの作用を阻害することにより17 β -estradiolの合成抑制を引き起こすと考えられる。この機構が後述するDEHPの雌に対する生殖毒性の原因と推定される。

5. 生殖への影響

Lambら(1987)は雌雄のCD-1マウスにDEHPを餌に混ぜて与え、同一ペアによる複数回の交配を行った。その結果、0.1 % (144 mg/kg/day)以上の投与群で不妊およびペア当たりの生存児数などの生殖指標の低下が認められた。0.3 % (432 mg/kg/day)投与雌雄動物と無処置雌雄動物との交配を行ったところ、いずれの場合も妊娠率は著しく低下し、雌雄ともにDEHPの影響が強く発現していることが確認された。なお、この試験では病理組織学的検査や次世代の生殖機能の検討は行われていない。

最近、Wineら(1997)は米国国家毒性計画(National Toxicology Program)によるDBPの生殖試験結果を報告した。SDラットを用い、0.1~1.0 % (66~652 mg/kg/day)のDBPを餌に混ぜて与え、同一ペアによる複数回の交配および投与雌雄動物と無処置雌雄動物との交配を行った結果、新生児数の軽度の減少や新生児体重の減少を認めたが、親動物での精子数および性周期の異常は認められなかった。しかし、次世代同士の交配では、1.0 % (652 mg/kg/day)投与群で、交配率、妊娠率および受胎率は著しく低下し、その原因と考えられる精巣および精巣上体中の精子数の減少が認められた。病理組織学的検査では、精細管変性および精巣上体の発育不全が明らかであったが、卵巣および子宮には異常は認められなかった。

Grayら(1999)はLong Evans (LE)ラットに250~1,000 mg/kg/dayのDBPを強制経口投与し、生殖試験を行った結果、500 mg/kg/day以上の投与群で受胎率が低下し、組織学的検査では、雄動物で精細管萎縮および精子形成阻害を認めたが、雌動物では影響を認めなかった。次世代動物では雌雄の生殖器を含む奇形が観察され、複数回の交配を行ったところ、250 mg/kg/day以上の投与群で生殖機能低下がみられた。

これらの結果から、DEHPは雌雄それぞれの生殖機能に悪影響を及ぼし、DBPは妊娠後期および授乳期暴露によって次世代雄の精巣等の形態的变化を伴う生殖機能障害により、不妊を引き起こすことが示された。

6. 発生毒性(表-1)

妊娠期にフタル酸エステルに暴露された実験動物において、吸収胚数の増加、胎児体重の低下および奇形発現率の増加などが観察される。

DEHPをLEラットの妊娠1日から分娩後21日まで32.5または325 μ g/lの濃度で飲水中に混合して与えた(妊娠中: 3.0-3.5または30-35 mg/kg/day、授乳中: これらの値の少なくとも30 %増に相当)ところ、次世代において、腎および精巣重量が低下し、精巣では精細管上皮の崩壊等の損傷が認められた。また、高用量群の児に学習能力の低下が観察された(Arcadiら: 1998)。また、F344ラットの妊娠0日から20日、CD-

1マウスの妊娠0日から17日にDEHPを飼料中に混じて与えたところ、ラットでは2.0 % (1,055 mg/kg/day)投与により、胚致死作用がみられたが、催奇形作用は認められなかった。マウスでは0.10 % (191 mg/kg/day)以上の投与により胚致死作用が、また、0.05 % (91 mg/kg/day)以上の投与により催奇形作用が認められ、水頭症、眼瞼開裂、尾奇形等が多く観察された(Tylら: 1988)。以下に投与時期による毒性発現の違いの詳細をまとめる。

①妊娠初期および中期投与の影響

Wistarラットの妊娠0日から11日に2.0 % (895 mg/kg/day)のDBPを含む飼料を与えたところ、胚死亡率が著しく上昇した(Emaら: 1997a)。このような早期の胚致死はDBPによる子宮の脱落膜反応抑制、すなわち子宮機能の低下に起因することが示唆されている(Emaら: 2000a)。DBPを妊娠7日から15日(器官形成期)までWistarラットに強制経口投与したとき、630 mg/kg/day以上の投与で着床後胚死亡率が、750 mg/kg/day投与で口蓋裂の発現頻度が上昇した(Emaら: 1993)。Wistarラットの妊娠7日から9日、10日から12日または13日から15日にDBP (750~1,500 mg/kg/day)を強制経口投与したところ、投与日に関わらず、着床後胚死亡率が上昇した。妊娠7-9日の投与では頸椎、胸椎および肋骨等の奇形の発現頻度が、妊娠13日から15日投与群では口蓋裂および胸骨分節癒合等の奇形の発現頻度が上昇したが、妊娠10日から12日の投与では奇形の発現頻度の上昇はみられなかった(Emaら: 1994)。Wistarラットの妊娠6日から16日までの間にDBP (1,500 mg/kg)を単回強制経口投与した結果、着床後胚死亡率が妊娠7日および11日の投与を除くすべての投与群で上昇した。妊娠8日または9日の投与では頸椎および胸椎の奇形および腎盂拡張等の発現頻度が、妊娠15日投与群では口蓋裂および胸骨分節融合等の発現頻度が上昇した(Emaら: 1997b)。SDラットの妊娠13日、14日または15日にDBP 3,000 mg/kgを単回強制経口投与したところ、それぞれ33 %, 87 %, 64 %の胚死亡率が認められ、また、口蓋裂発現頻度は2.4-15.4 %であった(Saillenfaitら: 1998)。

以上のように、妊娠初期の投与では胚致死作用が、妊娠中期の投与では生殖器以外の催奇形作用が現れた。

②妊娠後期および授乳初期投与の影響

Wistarラットの妊娠11日から21日に0.5~2.0 % (331~661 mg/kg/day)のDBPを含む飼料を与えたところ、着床後胚死亡率には変化はみられなかったが、2.0 % (661 mg/kg/day)投与群では胎児体重の低下がみられた。また、1.0 % (555 mg/kg/day)以上の投与群では口蓋裂、胸骨分節癒合および雄胎児の精巣下降不全の発現頻度上昇および肛門生殖突起間距離(AGD)の短縮が認められた(Emaら: 1998)。これらの雄胎児の生殖器官に対する影響は妊娠15-17日に500 mg/kg/day以上のDBPを強制経口投与したときにも観察された(Emaら: 2000b)。LEラットを用いた実験でも次世代雄に持続的な生殖器重量の低下が観察されている(Grayら: 1999)。

DEHP、DBPおよびBBP等のフタル酸エステルは妊娠およ

び授乳期暴露により、次世代の雄に精子形成障害を引き起こすことがすでに報告されている。上述のWineら(1997)の報告でもDBPの子宮内および授乳期暴露が雄の生殖器に重大な障害を及ぼすことが示された。そこで、Mylchreestら(1998)はSDラットの妊娠3日から分娩後20日まで、250~750 mg/kg/dayのDBPを強制経口投与し、次世代雌雄の生殖器の形態観察を行った。雄ではAGDの短縮、尿道下裂、停留睾丸、精巣および副生殖器官の発育不全などの生殖器異常が認められた。これらの変化はアンドロゲン受容体アンタゴニストであるflutamideが引き起こす雄性生殖器発育異常(Imperato-McGinleyら: 1992, van der Schoot: 1992, Kassimら: 1997)と類似していた。一方、雌においては明確な影響は認められず、DBPにエストロゲン様作用のないことを示唆する結果であった。

*in vitro*においてDBPおよびその代謝物であるmono-*n*-butyl phthalate (MBP)がアンドロゲン受容体と相互作用を示さないこと(Grayら: 1998)から、Mylchreestら(1999)はその作用機構を比較する目的で、アンドロゲン受容体アンタゴニストであるflutamideを対照とした研究を行った。SDラットに妊娠12日から21日までDBP (100~500 mg/kg/day)およびflutamide (100 mg/kg/day)の強制経口投与を行い、次世代雄への影響を解析した結果、尿道下裂、停留睾丸、副生殖器の発育阻害などの異常がDBPおよびflutamide投与群で認められた。しかし、flutamideが前立腺異常を高頻度で引き起こしたのにも関わらずDBPは前立腺にはほとんど影響を与えず、一方で、flutamideと比べ、DBPは精巣上体および輸精管に強い影響を示した。このようにDBPおよびflutamideの毒性発現プロファイルは著しく異なり、両者は明らかに別の作用機構で抗アンドロゲン作用を発現すると考えられた。同様にして、Grayら(1999)が同モル等量のDBP (500 mg/kg/day)およびDEHP (750 mg/kg/day)をSDラットの妊娠14日から授乳3日まで投与した実験では、次世代の雄生殖器の形態的变化および持続的体重低下が認められたが、その毒性発現プロファイルが典型的な抗アンドロゲン物質であるflutamideやvinclozolinとは明確に異なることが示されている。さらに、Grayら(1999)はDEHPの次世代の雄生殖器への作用がDBPよりも強いことを示した。

以上のことから、DEHPおよびDBPは妊娠後期および授乳初期に投与することにより、児の雄生殖器官発育に悪影響を及ぼし、生殖機能障害を引き起こすが、この作用はアンドロゲン受容体との結合を介さない抗アンドロゲン作用であると考えられる。

一方、DEHPは新生児期ラットのセルトリ細胞に対して影響を及ぼす。Dostalら(1988)は6日齢のSDラットにDEHPを1,000 mg/kg/dayで5日間経口投与し、精巣重量の低下を伴ったセルトリ細胞数の減少を認めた。セルトリ細胞は生後10-14日までに細胞分裂を終了するため、Liら(1998)は分娩翌日の新生児SDラットの精巣から調製したセルトリ細胞および胚細胞(gonocyte)の共培養系を用いてMEHPの作用を検討した。MEHPは用量依存的なセルトリ細胞からの胚細胞の分離を引き起こすと共に、セルトリ細胞の増殖を抑制した。ま

た、MEHPはFSH刺激によるセルトリ細胞の増殖を抑制したが、MEHPのセルトリ細胞の増殖抑制に対するcAMPの添加効果は認められなかった。これらのことから、Liら(1998)は新生児期ラットのセルトリ細胞に対するMEHPの作用機構は、セルトリ細胞の細胞分裂終了以降の場合とは異なるのではないかと考えている。

表-1 フタル酸エステルの発生への影響

動物種	検体	投与日	毒性影響	文献
妊娠全期間投与の影響				
F344ラット	DEHP	GD 0-20	胚致死	Tylら(1988)
CD-1マウス	DEHP	GD 0-17	胚致死、水頭症、眼瞼開裂 尾奇形	Tylら(1988)
妊娠初期および中期投与の影響				
Wistarラット	DBP	GD 0-11	胚致死	Emaら(1997a)
Wistarラット	DBP	GD 7-15	胚致死、口蓋裂	Emaら(1993)
Wistarラット	DBP	GD 7-9	胚致死、頸椎および胸椎奇形、 肋骨奇形	Emaら(1994)
Wistarラット	DBP	GD 10-12	胚致死	Emaら(1994)
Wistarラット	DBP	GD 13-15	胚致死、口蓋裂、胸骨分節癒合	Emaら(1994)
Wistarラット	DBP	GD 8 or 9	胚致死、頸椎および胸椎奇形 腎盂拡張	Emaら(1997b)
Wistarラット	DBP	GD 15	胚致死、口蓋裂、胸骨分節癒合	Emaら(1997b)
SDラット	DBP	GD 13, 14 or 15	胚致死、口蓋裂	Saillenfaitら(1998)
妊娠後期および授乳初期の投与				
Wistarラット	DBP	GD 11-21	口蓋裂、精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Emaら(1998)
Wistarラット	DBP	GD 15-17	精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Emaら(2000b)
LEラット	DBP	GD 16-19	精巣下降不全 肛門生殖突起間距離の短縮	Grayら(1999)
SDラット	DBP	GD12-21	雄尿道下裂、停留睾丸	Mylchreestら(1999)
SDラット	DBP	GD14-LD3	精巣障害	Grayら(1999)
SDラット	DEHP	GD14-LD3	雄尿道下裂、精巣障害	Grayら(1999)
その他				
LEラット	DEHP	GD1-LD21	精巣重量低下、精細管上皮崩壊	Arcadiら(1998)
SDラット	DBP	GD3-LD20	雄尿道下裂、停留睾丸	Mylchreestら(1998)

GD: 妊娠日、LD: 授乳日

7. その他の毒性について

フタル酸エステルによる既知の肝毒性以外に、腎毒性に関する研究が最近報告されている。Rothenbacherら(1998)はDEHPの長期経口投与による腎毒性発現機構として、そのモノエステル体であるMEHPが腎上皮培養細胞の生存率低下を招くことを示し、また、Caldwellら(1999)はdiisononyl phthalateによる雄ラット腎腫瘍の原因が α_{2u} -globulinの蓄積によるものであることを示した。

遊離型フタル酸については、Emaら(1997c)はラットにおいて発生毒性を示さなかったと報告しているが、Jhaら(1998)は精原細胞突然変異原物質であることをマウスの*in vivo*試験で示した。通常フタル酸エステルはモノエステル体となった後、代謝あるいはグルクロン酸抱合されると考えられているが、透析患者では高い血中フタル酸濃度を示すとの報告もあり、さらに詳細な研究が必要であると考えられる。

おわりに

フタル酸エステルはエストロゲン様作用を有する内分泌かく乱物質の可能性が指摘されていたが、現段階では、少なくとも*in vivo*ではエストロゲン様作用は有しないものと考えられる。しかし、フタル酸エステルは雄ラットに投与したときには抗アンドロゲン様作用が認められ、雌ラットに投与したときには血中17 β -estradiol濃度の低下が引き起こされたことが報告されている。また、妊娠後半のラットに投与したときにはアンドロゲン受容体を介さない機構で典型的な抗アンドロゲン作用が発現し、この作用は胚致死作用および生殖器官以外の催奇形性作用より低い量で発現することが示されている。これらのことから、一部のフタル酸エステルはげっ歯類において内分泌かく乱作用を示すと判断することができる。なお、生殖器以外の奇形発現に関しては、その機構が不明であり、内分泌かく乱作用によるものと判断できる証拠は得られていない。現在、様々な側鎖を持つフタル酸エステルが10種類以上合成され、広く使用されている。その側鎖により毒性の種類、強度も様々であるが、本稿では特に強く発現した毒性についてまとめた。しかし、これらを一律に評価することは不適切であることから、側鎖の違いによる毒性発現の違いおよび種差については稿を新たに整理する。

引用文献

- Agarwal DK, Lawrence WH, Turner JE, Autian J (1989) Effects of parenteral di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) on gonadal biochemistry, pathology, and reproductive performance of mice. *J. Toxicol. Environ. Health*, **26**, 39-59.
- Arcadi FA, Costa C, Imperatore C, Marchese A, Rapisarda A, Salemi M, Trimarchi GR, Costa G (1998) Oral toxicity of bis(2-ethylhexyl) phthalate during pregnancy and suckling in the Long-Evans rat. *Food Chem. Toxicol.*, **36**, 963-970.
- Berman E and Laskey JW (1993) Altered steroidogenesis in whole-ovary and adrenal culture in cycling rats. *Reprod. Toxicol.*, **7**, 349-358.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M (1998) Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 306-310.
- Caldwell DJ, Eldridge SR, Lington AW, Mckee RH (1999) Retrospective evaluation of alpha 2u-globulin accumulation in male rat kidneys following high doses of diisononyl phthalate. *Toxicol. Sci.*, **51**, 153-160.
- Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ (1994a) Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 216-223.
- Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ (1994b) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 224-228.
- Davis BJ (1999) Endocrine disrupting activity of phthalates. International Symposium on Environmental Endocrine Disruptor '99. pp 72.
- Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA (1988) Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl)phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **95**, 104-121.
- Ema M, Amano H, Itami T, Kawasaki H (1993) Teratogenic evaluation of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicol. Lett.*, **69**, 197-203.
- Ema M, Amano H, Ogawa Y (1994) Characterization of the developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate in rats. *Toxicology*, **86**, 163-174.
- Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y (1997a) Embryo lethality following maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **58**, 636-643.
- Ema M, Harazono A, Miyawaki E, Ogawa Y (1997b) Developmental effects of di-*n*-butyl phthalate after a single administration in rats. *J. Appl. Toxicol.*, **17**, 223-229.
- Ema M, Miyawaki E, Harazono A, Kawashima K (1997c) Developmental toxicity evaluation of phthalic acid, one of the metabolites of phthalic acid esters, in rats. *Toxicol. Lett.*, **93**, 109-115.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (1998) Further evaluation of developmental toxicity of di-*n*-butyl phthalate following administration during late pregnancy in rats. *Toxicol. Lett.*, **98**, 87-93.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (2000a) Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.*, **14**, 13-19.
- Ema M, Miyawaki E, Kawashima K (2000b) Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicol. Lett.*, **111**, 271-278.
- Foster PM, Thomas LV, Cook MW, Walters DG (1983) Effect of di-*n*-pentyl phthalate treatment on testicular steroidogenic enzymes and cytochrome P-450 in the rat. *Toxicol. Lett.*, **15**, 265-271.
- Grasso P, Heindel JJ, Powell CJ, Reichert LE Jr (1993) Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate, a testicular toxicant, on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultured rat Sertoli cells. *Biol. Reprod.*, **48**, 454-459.
- Gray LE Jr., Ostby JS, Mylchreest E, Foster PM, Kelce WR (1998) Dibutyl phthalate (DBP) induces antiandrogenic but not estrogenic *in vivo* effects in LE hooded rats. *Toxicol. Sci.*, **42**(1-S), 176.
- Gray LE Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999) Administration of potentially

- antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, 15, 94-118.
- Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997) The estrogenic activity of phthalate esters *in vitro*. *Environ. Health Perspect.*, 105, 802-811.
- Heindel JJ and Chapin RE (1989) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation by mono(2-ethylhexyl)phthalate in primary rat Sertoli cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 97, 377-385.
- Imperato-McGinley J, Sanchez RS, Spencer JR, Yee B, Vaughan ED (1992) Comparison of the effects of the 5 α -reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology*, 131, 1149-1156.
- Jha AM, Singh AC, Bharti M (1998) Germ cell mutagenicity of phthalic acid in mice. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mut.*, 422, 207-212.
- Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC (1993) The influence of phthalate esters on Leydig cell structure and function *in vitro* and *in vivo*. *Exp. Mol. Pathol.*, 58, 179-193.
- Kassim NM, McDonald SW, Reid O, Bennett NK, Gilmore DP, Payne AP (1997) The effects of pre- and postnatal exposure to the nonsteroidal antiandrogen flutamide on testis descent and morphology in the Albino Swiss rat. *J. Anat.*, 190, 577-588.
- Lake BG, Phillips JC, Linnell JC, Gangolli SD (1977) The *in vitro* hydrolysis of some phthalate diesters by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 39, 239-248.
- Lamb JC IV, 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 J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology*, 140, 852-858.
- Li LH, Jester WF Jr., Orth JM (1998) Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cocultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 258-265.
- Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM (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, Sar M, Cattley RC, Foster PM (1999) Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 156, 81-95.
- Nagata S (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.
- Nagata S, Golstein P (1995) The Fas death factor. *Science*, 267, 1449-1456.
- Richburg JH and Boekelheide K (1996) Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 137, 42-50.
- Richburg JH, Nanéz A, Gao H (1999) Participation of the Fas-signaling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 160, 271-278.
- Rothenbacher KP, Kimmel R, Hildenbrand S, Schmahl FW, Dartsch PC (1998) Nephrotoxic effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) hydrolysis products on cultured kidney epithelial cells. *Hum. Exp. Toxicol.*, 17, 336-342.
- Saillenfait AM, Payan JP, Fabry JP, Beydon D, Langonne I, Gallissot F, Sabate JP (1998) Assessment of the developmental toxicity, metabolism, and placental transfer of di-n-butyl phthalate administered to pregnant rats. *Toxicol. Sci.*, 45, 212-224.
- Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ (1990) Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106, 334-340.
- Tyl RW, Price CJ, Marr MC, Kimmel CA (1988) Developmental toxicity evaluation of dietary di(2-ethylhexyl)phthalate in Fischer 344 rats and CD-1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 10, 395-412.
- van der Schoot P (1992) Disturbed testicular descent in the rat after prenatal exposure to the antiandrogen flutamide. *J. Reprod. Fertil.*, 96, 483-496.
- Wine RN, Li LH, Barnes LH, Gulati DK, Chapin RE (1997) Reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.*, 105, 102-107.
- Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998) Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters. *Toxicol. Sci.*, 46, 282-293.

Recent Studies on Toxic Effects of Phthalate Esters on Reproduction and Development : Focus on Di(2-ethylhexyl) phthalate and Di-*n*-butyl phthalate

(Received March 8, 2000)

(Accepted June 26, 2000)

Mutsuko Koizumi^{a)}, Makoto Ema^{b)}, Akihiko Hirose^{a)} and Ryuichi Hasegawa^{a)}

a) Division of Risk Assessment, National Institute of Health Sciences

b) Division of Biological Evaluation, National Institute of Health Sciences Osaka Branch

Keywords : Phthalate esters, Endocrine disruptors, Reproductive/developmental toxicity, Di(2-ethylhexyl) phthalate, Di-*n*-butyl phthalate

Abstract

Phthalate esters extensively used as plasticizers in the plastic industry, are suspected of being endocrine disruptors. In this article, data for toxicity and the possible mechanisms of phthalate ester action in rodents are summarized for each endpoint related to reproduction and development, based on the latest research. As it is considered that the hydrolyzed metabolite of phthalate esters, the phthalate monoester, is the active material, this has been employed in most *in vitro* studies.

Many kinds of phthalate esters have been reported to have weak estrogenic activity *in vitro* but there is no evidence of uterotrophic activity by phthalate esters such as di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and di-*n*-butyl phthalate (DBP). In addition, phthalate esters do not have a structure likely to bind to estrogen receptors. Therefore, they are not considered to be estrogenic compounds *in vivo*.

It has been clearly shown that phthalate esters can exert testicular toxicity such as testicular atrophy and degenerative spermatogenesis in rats, mice and guinea pigs. Recent *in vitro* studies showed mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) to inhibit FSH stimulated c-AMP accumulation in cultured Sertoli cells and induce apoptosis of germ cells in coculture with Sertoli cells. The proposed mechanism is as follows. First, MEHP affects Sertoli cells and separates germ cells from Sertoli cells. Secondly, solubilized FasL (sFasL) is produced from Sertoli cells and Fas is expressed on surface of the separated germ cells. Finally, the binding of sFasL and Fas induces apoptosis of the germ cells. Another effect of phthalate esters in the testis is known to be reduction of the biosynthesis of testosterone in Leydig cells. Therefore, the direct target sites of phthalate esters are probably both Sertoli cells and Leydig cells rather than germ cells.

Oral administration of DEHP has been found to induce prolonged estrous cycle, suppression of ovulation and decrease of 17 β -estradiol level in blood. On the bases of histopathological examination, preovulatory follicle granulosa cells in the ovary has been speculated to be target sites of phthalate esters. In *in vitro* studies using cultured granulosa cells, MEHP inhibited FSH stimulated c-AMP accumulation, and reduced 17 β -estradiol production and aromatase m-RNA expression. This might be the major cause of infertility in females in reproductive toxicity studies.

In reproductive toxicity studies using mice and rats, DEHP and DBP induced infertility and decreased in the numbers and body weights of live offspring. Furthermore, this reproductive toxicity also occurs with mating of either phthalate esters-treated males or females with untreated animals. In the male case, the cause of infertility is presumably reduction of sperm counts in testis and epididymis due to degeneration of seminiferous tubules.

One of the major toxic effects of phthalate esters is on development. The administration of DBP in the early pregnancy period results in embryoletality, and the exposure in mid pregnancy is teratogenic such as cleft palates, malformation of cervical and thoracic vertebrae, ribs, and dilatation of renal pelvis, but no changes in reproductive organs. When DEHP, DBP or *n*-butyl benzyl phthalate was administered to dams at late pregnancy and lactation periods, decreased anogenital distance, hypospadias, cryptorchidism, testicular and accessory organ atrophy in male offspring appeared but there were no effects in female offspring. Although these toxic effects were also induced by administration with flutamide, a typical androgen receptor antagonist, the mechanism of action of phthalate esters is not considered to be via androgen receptors because of the lack of interaction with androgen receptor.

Oral administration of DEHP to neonatal males produced reduction of Sertoli cell number and MEHP induced separation of gonocytes from Sertoli cells in coculture system prepared from neonatal males. However, the mechanism of MEHP action in neonatal males may be different from that in adults because FSH stimulated cAMP accumulation in Sertoli cells was not affected by MEHP.

Based on the above information, although phthalate esters are not estrogenic compounds, some of them are considered as endocrine disruptors in rodents because of antiandrogenic effect in male rats and decrease of 17β -estradiol level in blood in female rats. Other than abnormalities of the reproductive organs, the mechanisms of teratogenesis such as cleft palate and skeletal malformation remain to be elucidated. Presently, more than ten different phthalate esters are employed in industry and their toxicity seems to depend on their side chains. We will discuss the structure toxicity relationship of phthalate esters in the next article.