

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

内分泌かく乱化学物質等、生活環境中化学物質による人の影響についての
試験法に関する調査研究（H11-生活-018）
分担研究 フタル酸エステルによる生殖障害に関する研究

分担研究者 川島邦夫 国立医薬品食品衛生研究所大阪支所
生物試験部第二室長

研究要旨

ラットの妊娠 0-8 日に 250, 500, 750, 1000, 1250 または 1500 mg/kg の dibutyl phthalate (DBP) を経口投与して胎児に対する影響を調べた。1250 及び 15000 mg/kg で着床前胚死亡率が有意に上昇し、750 mg/kg 以上で着床後胚死亡率が有意に上昇した。同用量の DBP を偽妊娠 0-8 日のラットに経口投与して偽妊娠 9 日の子宮重量を脱落膜反応の指標とした。子宮の脱落膜腫形成は 750 mg/kg 以上で有意に抑制された。これらの結果から、DBP による早期胚致死作用は子宮機能の低下に起因することが示唆された。

A. 研究目的

可塑剤として使われているフタル酸エステル類 (PAEs) は地球規模の環境汚染物質である。PAEs の一つである dibutyl phthalate (DBP) は安全ガラス、印刷用インク、紙のコーティング剤、接着剤等に使われており、また、各種化粧品にも使われている。

DBP はラット及びマウスにおいて発生毒性を示すことが知られている。我々は先に、ラット胎児の器官形成期に DBP を投与したとき、胚致死作用と催奇形作用を示すことを明らかにした。更に、ラットの妊娠 7-9 日または妊娠 13-15 日に DBP を投与したときに催奇形作用を示し、妊娠前半に DBP を投与したとき強い胚致死作用を示すことを報告した。

最近、DBP や butyl benzyl phthalate (BBP) などの PAEs が組み替え酵母やヒト乳癌細胞を用いた in

vitro の実験においてエストロゲン作用を示すことが報告され、DBP 及び BBP 等の PAEs は内分泌攪乱化学物質として注目されている。このようなことから、PAEs の生殖発生毒性を研究することの重要性は益々高まっている。

昨年度においては、ラットの妊娠前半に DBP を与えたとき著しい胚致死作用を示すことを報告した。

本年度においては、DBP をラットの妊娠初期に与えたときの影響について再検討し、更に、胚の生存にとって重要な役割を果たす子宮機能に対する DBP の影響について偽妊娠ラット子宮における脱落膜反応を指標として調べた。

B. 研究方法

Wistar ラットを使用した。ラットは、室温 24 ± 1 °C、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12: 12

時間 明/暗の動物室にて、水道水と飼料を自由に与えて飼育した。膣垢検査により少なくとも2回連続4日の性周期を示したメスラットを使用した。

メスラットを同系統のオスラットと同居させ、翌朝膣垢内に精子を認めたメスを妊娠とし、この日を妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。ラットは妊娠20日に開腹し、着床数、生存及び死亡胎児数、吸収胚数を記録した。子宮は2%水酸化ナトリウム溶液に浸けて着床の有無を確認した。

メスラットを同系統の精管結紮したオスラットと同居させ、翌朝膣栓を認めたメスを偽妊娠とし、この日を偽妊娠0日として、以後個別ケージにて飼育した。偽妊娠4日の11:00から13:00の間に、エーテル麻酔下で開腹して両子宮角の創傷または疑似手術を行った。先の曲がった細針金を子宮角分岐部に挿入し卵管接合部まで子宮内膜を創傷することによって脱落膜反応を惹起した。ラットは偽妊娠9日に開腹し、子宮及び卵巢重量を測定した。偽妊娠9日の子宮重量を子宮の脱落膜反応の指標とした。また、このときの血清中のプロゲステロン及びエストラジオール濃度を測定した。

妊娠及び偽妊娠ラットの0日から8日まで250, 500, 750, 1000, 1250または1500 mg/kgのDBPを経口投与した。DBPはオリーブ油に溶解し、投与日の体重に基づいて5 ml/kg与えた。対照群のラットにはオリーブ油だけを経口投与した。

胎児に関する成績は一腹を単位として統計処理を行った。

動物実験は国立医薬品食品衛生研究所動物倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

妊娠ラットの所見をTable 1に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられな

かった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。妊娠0-9日の母体体重増加及び摂餌量が500 mg/kg以上の投与群において有意に低下した。また、1500 mg/kg投与群においては妊娠9-20日の母体体重増加も有意に低下した。子宮を除いた補正母体体重増加にはDBP投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

生殖に関する所見をTable 2に示した。対照群、200, 500, 750及び1000 mg/kg投与群における交配成立メスラットは全て妊娠していた。1250 mg/kg投与群の13匹中5匹、1500 mg/kg投与群の13匹中7匹のメスラットが不妊であり、これらの投与群における妊娠率は対照群に比べて有意に低かった。1250及び1500 mg/kg投与群において着床数が有意に減少し、着床前胚死亡率が有意に上昇した。妊娠ラットについての集計では、黄体数及び着床数にはDBP投与群と対照群の間に有意差はみられなかった。1000 mg/kg以上の投与群で死亡胚数が有意に増加し、750 mg/kg以上の投与群で生存胎児数が有意に減少した。1500 mg/kg投与群で着床前胚死亡率が有意に上昇し、750 mg/kg以上の投与群で着床後胚死亡率が有意に上昇した。

偽妊娠ラットの所見をTable 3に示した。いずれの群にも死亡ラットはみられなかった。高投与量群では被毛の汚れや立毛等の毒性徴候を示すラットが観察された。偽妊娠0-9日の母体体重増加が750 mg/kg以上の投与群において有意に低下した。偽妊娠0-9日の摂餌量が500 mg/kg以上の投与群で有意に低下した。

偽妊娠9日の卵巢重量をFig. 1に示した。1250及び1500 mg/kg投与群において有意に低い卵巢重量が認められた。

Fig. 2に偽妊娠9日の黄体数を示した。DBP 投与群と対照群の間に有意の差はみられなかった。

偽妊娠9日の子宮重量を Fig. 3 に示した。750 mg/kg 以上の投与群の子宮重量は対照群と比べて有意の低下が観察され、特に 1250 及び 1500 mg/kg 投与群における低下は著しかった。

偽妊娠9日の血清中プロゲステロン濃度を Fig. 4 に示した。1500 mg/kg 投与群において対照群及び偽手術群と較べて血清中プロゲステロン濃度の有意な減少がみられた。

Fig. 5に偽妊娠9日の血清中エストラジオール濃度を示した。DBP 投与群の血清中エストラジオール濃度には対照群及び偽手術群と較べて有意な差はみられなかった。

D. 考察

投与期間中の母体体重増加及び摂餌量の低下などの DBP の母体に対する悪影響が、500 mg/kg 以上の投与量で観察された。低投与量では、DBP 投与終了後妊娠ラットの母体体重及び摂餌量は回復したが、高投与量では実験終了まで回復しなかった。これらは高用量では胎児を欠いていることによるものと考えられる。更に、高投与量でも補正体重の増加には有意な減少はみられなかったことは、DBP の母体ラットに対する毒性が一過性であることを示している。

今回の実験における投与期間は、着床前、着床中及び着床後の期間に相当している。胚に対する化学物質の着床前の悪影響は着床前胚死亡、すなわち着床数減少、着床後の悪影響は着床後胚死亡、すなわち吸収胚増加、を引き起こすと考えられる。我々の以前の実験において、妊娠 0-11 日に DBP を 2.0% 含む飼料を与えたラットにおいて着床後胚死亡の著しい増加が観察された。今回の実験におい

ては妊娠初期の DBP の胚に対する影響をより詳しく調べるために、比較的高投与量の DBP を投与した。1250 及び 1500 mg/kg の投与量で着床前胚死亡率の有意な上昇が、500 mg/kg 以上の投与量で着床後胚死亡率の有意な上昇が観察された。これらのことから、DBP は着床前期間より着床後期間により強い悪影響を及ぼすと考えられる。

妊娠ラットにおいて着床後胚死亡の有意な増加が 750 mg/kg 以上の投与量でみられ、偽妊娠ラットにおいて子宮重量の有意の低下、すなわち子宮の脱落膜反応の抑制、が 750 mg/kg 以上の投与量でみられた。これらの所見は DBP による早期の胚死亡は子宮の脱落膜腫形成の抑制に起因することを示唆している。

妊娠 0-11 日に DBP を 2.0% 含む飼料を与えると、卵巣重量の低下、子宮重量の低下及び血清中プロゲステロンの低下を引き起こすことを我々は先に報告した。今回の実験で観察された DBP 投与後の脱落膜反応の抑制が、妊娠子宮重量の低下の要因と考えられる。プロゲステロンは妊娠の維持及び胚・胎児の正常な発育に不可欠な役割を果たしており、十分量のプロゲステロンが子宮の脱落膜反応、すなわち子宮機能維持、に必要である。今回の実験では、750 mg/kg 以上で脱落膜反応抑制、1500 mg/kg で血清中プロゲステロン濃度の著しい減少が観察され、脱落膜反応抑制とプロゲステロン濃度低下との明確な相関性は示されなかった。これらのことから、プロゲステロン濃度の低下が子宮の脱落膜反応抑制の第一の要因ではないと考えられる。しかしながら、Gray らは、メスラットに DBP を離乳から継続的に投与すると、妊娠率、着床数、胚の生存率及びプロゲステロンの分泌が低下することを示し、DBP が卵巣機能を障害し繁殖障害を引き起こすこと

を示唆した。このことは DBP の黄体機能に対する悪影響が胚致死を惹起する可能性を示唆している。今回の実験成績は、DBP を妊娠 1-8 日に投与したとき、着床数、妊娠子宮重量、卵巣重量、プロゲステロン濃度及び脱落膜反応に影響を与えなかったという Cummmings と Gray の実験成績とは一致しない。彼らの実験成績との相違は、ラットの系統差、投与期間の違い等の実験条件の差異によるのかもしれない。

我々は先に、DBP 及び BBP の代謝物であるモノブチルフタレート (MBuP) によって引き起こされる胚致死や胎児奇形の投与日による差が、DBP 及び BBP によるものとよく一致していることを明かにし、MBuP が DBP 及び BBP による発生毒性の活性代謝物であることを示唆した。この仮説は、ラットの妊娠 14 日に DBP を投与したとき血清及び胚組織には微量の DBP と多量の MBuP が検出されることから支持されている。我々は以前、BBP が妊娠ラット及び偽妊娠ラットの生殖機能に悪影響を及ぼすことを報告した。妊娠 0-8 日に BBP を投与したとき、750 mg/kg 以上の用量で着床前及び着床後の胚死亡率の有意の上昇がみられ、同じ投与量で子宮の脱落膜反応の有意な抑制が引き起こされた。これらの成績から、モノエステル体の MBuP が早期の胚死亡に関与していると考えられる。このような観点から更なる研究を進めている。

E. 結論

ラットの妊娠に DBP を与えて胚致死作用、偽妊娠に DBP を与えて子宮の脱落膜反応に対する影響を調べたところ、同じ投与量で胚死亡率の上昇と脱落膜腫形成の抑制が観察された。これらのことから、妊娠初期に与えた DBP による胚致死作用には子宮における脱落膜反応の

抑制、すなわち子宮機能の低下、が関与していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (in press). Reprod. Toxicol.

Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-*n*-butyl phthalate during late pregnancy. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (in press). Toxicol. Lett.

ジクロロ酢酸の毒性評価と経口摂取による耐用 1 日摂取量の算定、長谷川隆一、広瀬明雄、紅林秀雄、江馬 眞、黒川雄二 (1999) 水環境学会誌、22, 821-826. Developmental effects of plasticizer butyl benzyl phthalate after a single administration in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). J. Appl. Toxicol., 19, 357-365.

Adverse effects of diphenyltin dichloride on initiation and maintenance of pregnancy in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). Toxicol. Lett., 108, 17-25.

Suppression of uterine decidualization as a cause of implantation failure induced by triphenyltin chloride in rats. Ema, M., Miyawaki, E. and Kawashima, K. (1999). Arch. Toxicol., 73, 175-179. Developmental toxicity of triphenyltin chloride after administration on three consecutive

days during organogenesis in rats.
Ema, M., Miyawaki, E. and
Kawashima, K. (1999). Bull. Environ.
Contam. Toxicol., 62, 363-370.

2. 学会発表

Early embryonic loss induced by
dibutyltin dichloride (DBTCl) in rats.
Ema, M., Harazono, A. and
Kawashima, K. 39th Annual Meeting,
Society of Toxicology

トリブチルスズによるラットにおける
着床害作用 原園 景、江馬 眞、川島
邦夫 第 64 回関西実験動物研究会

妊娠初期に投与した diphenyltin
dichloride による胚致死作用 江馬
眞、宮脇英美子、川島邦夫 第 26 回日
本トキシコロジー学会

可塑剤 dibutyl phthalate の妊娠及び偽
妊娠ラットにおける生殖障害 江馬
眞、宮脇英美子、川島邦夫 第 39 回日
本先天異常学会

Triphenyltin chloride のラットにおけ
る発生毒性 江馬 眞、宮脇英美子、川
島邦夫 第 39 回日本先天異常学会
有機スズ化合物のラット生殖発生毒性

江馬 眞 第 39 回日本先天異常学会
CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
I. Nitrobenzene 宮脇英美子、前田秀
子、原園 景、江馬 眞、川島邦夫 第
4 回 Testes Workshop 精子形成・精巢
毒性研究会

CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
II. 1, 4-dichloro-2-nitrobenzene 前
田秀子、宮脇英美子、原園 景、江馬 眞、
川島邦夫 第 4 回 Testes Workshop 精
子形成・精巢毒性研究会

CASA-System を用いた
Nitrobenzene 関連化合物の精子試験
III. Nitrobenzene 及び 1, 4-dichloro-
2-nitrobenzene の相対効力検定 原
園 景、前田秀子、宮脇英美子、前田秀
子、江馬 眞、川島邦夫 第 4 回 Testes
Workshop 精子形成・精巢毒性研究会

【協力研究者】

原園 景 (国立医薬品食品衛生研究所大
阪支所 生物試験部)

宮脇英美子 (国立医薬品食品衛生研究所
大阪支所 生物試験部)

Table 1. Body weight gain and food consumption in rats given DBP on days 0 to 8 of pregnancy

DBP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of females successfully mated	13	13	13	13	13	13	13
No. of dead females	0	0	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	234 ± 12	230 ± 3	236 ± 10	230 ± 7	234 ± 9	230 ± 5	233 ± 9
Body weight gain (g) ^a							
Days 0-9	15 ± 9	19 ± 6	-3 ± 26*	-16 ± 24**	-23 ± 17**	-27 ± 16**	-13 ± 11**
Days 9-20	81 ± 16	88 ± 9	93 ± 11	90 ± 13	77 ± 20	63 ± 22	49 ± 26**
Adjusted weight gain ^b	28 ± 10	34 ± 9	33 ± 10	31 ± 13	26 ± 8	17 ± 16	22 ± 15
Food consumption (g) ^a							
Days 0-9	107 ± 11	110 ± 8	63 ± 29**	47 ± 31**	47 ± 21**	48 ± 21**	60 ± 24**
Days 9-20	195 ± 16	199 ± 19	212 ± 21	213 ± 33	212 ± 16	192 ± 20	207 ± 23

^a Values are given as mean ± SD.

^b Adjusted weight gain refers to body weight gain excluding the uterus.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Table 2. Reproductive findings in rats given DBP on days 0 to 8 of pregnancy

DBP (mg/kg)	0 (control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of females successfully mated	13	13	13	13	13	13	13
No. (%) of nonpregnant females	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0(0)	0(0)	5 (38.5)*	7 (53)
No. (%) of pregnant females	13(100)	13(100)	13(100)	13(100)	13(100)	8 (61.5)*	6 (46)
No. of implantations per female ^a	15.0 ± 1.8	14.8 ± 1.5	15.0 ± 1.4	13.9 ± 2.0	13.5 ± 3.1	8.8 ± 7.4**	6.4 ± 7.2
Preimplantation loss per female(%) ^b	4.6	5.8	6.6	12.9	13.2	43.7*	62.0**
No. of litters	13	13	13	13	13	8	6
No. of litters totally resorbed	0	0	0	1	1	0	0
No. of corpora lutea per litter ^a	15.7 ± 1.4	15.7 ± 1.5	16.1 ± 1.1	16.2 ± 1.7	15.5 ± 0.9	15.5 ± 1.3	16.8 ± 1.3
No. of implantations per litter ^a	15.0 ± 1.8	14.8 ± 1.5	15.0 ± 1.4	13.9 ± 2.0	13.5 ± 3.1	14.3 ± 2.3	13.8 ± 1.0
Preimplantation loss per litter (%) ^b	4.6	5.8	6.3	12.9	13.2	8.5	17.6**
No. of resorption and dead fetuses per litter ^a	1.4 ± 2.0	0.5 ± 0.7	3.4 ± 3.8	4.2 ± 3.3	7.9 ± 2.5**	8.6 ± 4.4**	8.7 ± 2.9
Postimplantation loss per litter (%) ^b	9.4	3.3	22.8	31.6**	61.1**	59.2**	62.7*
No. of live fetuses per litter ^a	13.6 ± 2.8	14.3 ± 1.8	11.6 ± 3.8	9.8 ± 4.2*	5.5 ± 3.0**	5.6 ± 3.6**	5.2 ± 2.9
Sex ratio of live fetuses (male / female)	91 / 86	99 / 87	77 / 74	60 / 67	39 / 33	26 / 19	20 / 11
Body weight of live fetuses (g) ^a							
Male	3.30 ± 0.21	3.43 ± 0.23*	2.91 ± 0.39**	2.58 ± 0.32**	2.26 ± 0.34**	2.11 ± 0.46**	2.25 ± 0.3
Female	3.16 ± 0.20	3.22 ± 0.16**	2.71 ± 0.40**	2.33 ± 0.29**	2.08 ± 0.34**	1.98 ± 0.45**	1.98 ± 0.6

^a Values are given as mean ± SD.

^b [(No. of corpora lutea - no. of implantations) / no. of corpora lutea] × 100.

^c (No. of resorptions and dead fetuses / no. of implantations) × 100.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

Table 3. Body weight gain and food consumption in rats given DBP by gastric intubation on days 0-8 of pseudopregnancy

DBP (mg/kg)	0 (Control)	250	500	750	1000	1250	1500
No. of pseudopregnant rats	10	10	10	10	10	10	13
No. of dead rats	0	0	0	0	0	0	0
Initial body weight (g) ^a	235 ± 6	230 ± 18	235 ± 10	236 ± 13	237 ± 12	235 ± 13	235 ± 8
Body weight gain (g) ^a							
Days 0-9	7 ± 5	8 ± 5	-6 ± 8	-20 ± 22**	-16 ± 13**	-24 ± 14**	-23 ± 8**
Food consumption (g) ^a							
Days 0-9	81 ± 12	85 ± 7	60 ± 17*	43 ± 20**	47 ± 14**	41 ± 18**	49 ± 16**

^a Values are given as mean ± SD.

*,** Significantly different from the control, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

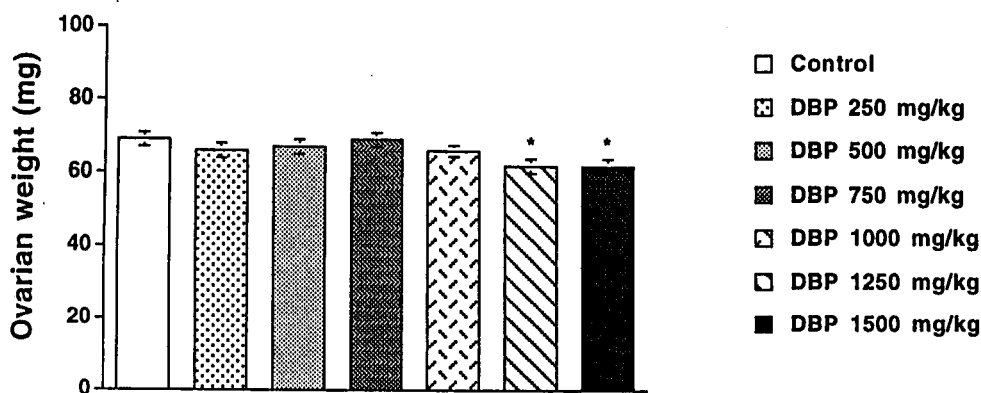


Fig. 1. Ovarian weight of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean $\pm$ SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group.

* Significantly different from the control group, $P < 0.05$.

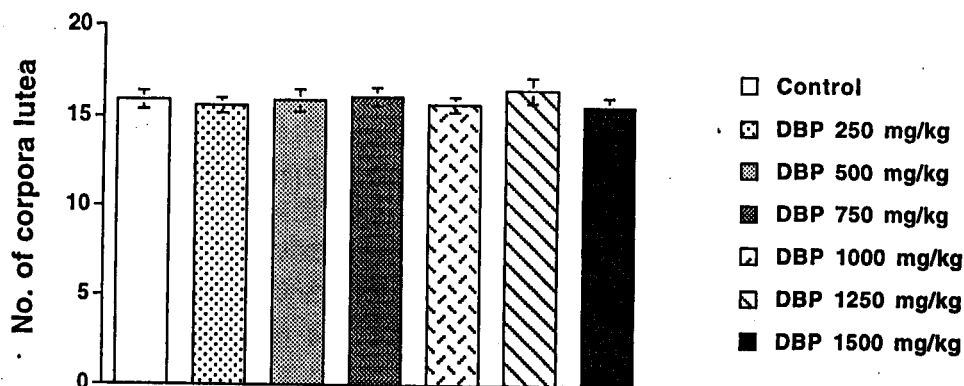


Fig. 2. Number of corpora lutea of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean $\pm$ SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group.

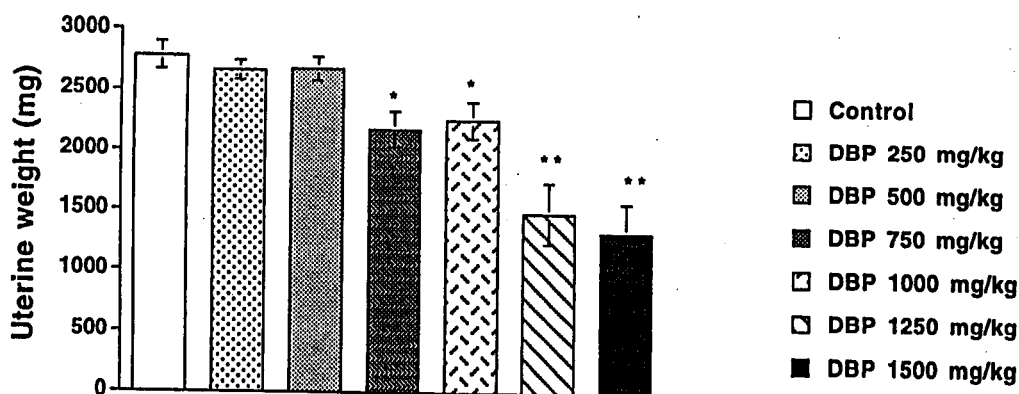


Fig. 3. Uterine weight of rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean $\pm$ SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups and 13 different rats for the 1500 mg/kg group. *, ** Significantly different from the control group, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

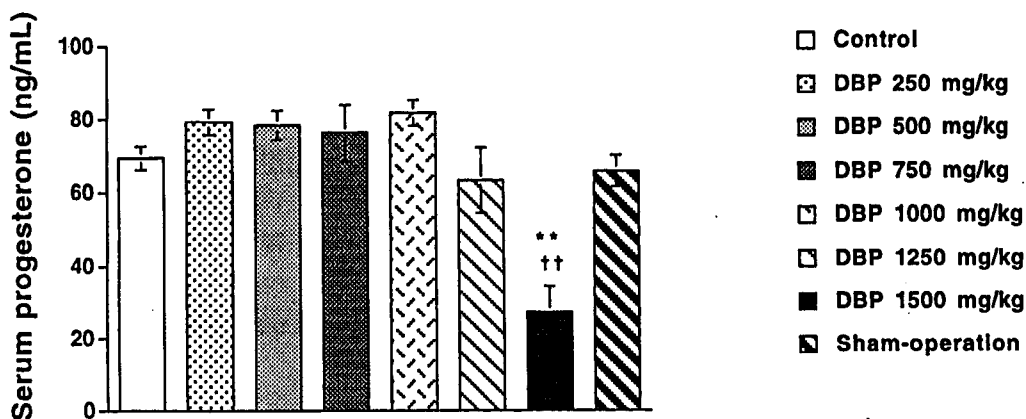


Fig. 4. Serum progesterone level in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean $\pm$ SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups, 13 different rats for the 1500 mg/kg group and 11 different rats for the sham-operation group. ** Significantly different from the control group, $P < 0.01$. †† Significantly different from the sham-operation group, $P < 0.01$.

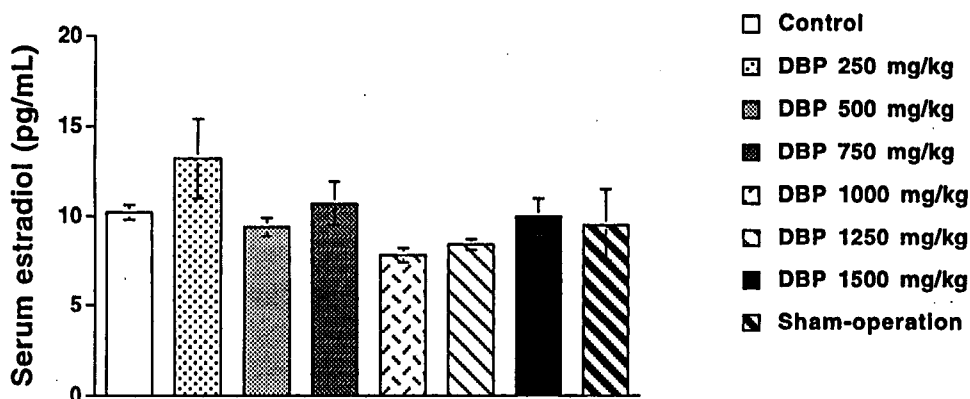


Fig. 5. Serum estradiol level in rats on day 9 of pseudopregnancy. Values are given as mean $\pm$ SEM of 10 different rats for the control, 250, 500, 750, 1000, and 1250 mg/kg groups, 13 different rats for the 1500 mg/kg group and 11 different rats for the sham-operation group.