

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

プラスチック製医療機器の安全性に関する研究
—フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究—
(H18-医薬-一般-008)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 清

平成 20(2008)年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

プラスチック製医療機器の安全性に関する研究
—フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究—
(H18-医薬-一般-008)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 今井 清

平成 20(2008)年 3 月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

- プラスチック製医療機器の安全性に関する研究—フタル酸エステルDEHPと
その活性代謝産物MEHPの比較毒性学的研究— …… 1
今井 清

II. 分担研究報告書

1. マウスを用いた反復投与毒性試験による DEHP および MEHP の
比較 …… 11
関田 清司
2. MEHP および DEHP のラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験 …… 29
今井 清
3. マウスを用いた遺伝子発現解析による MEHP と DEHP の比較研究 …… 73
北嶋 聡
4. 文献や国際動向に関する調査研究による MEHP と DEHP の比較研究 …… 79
高木 篤也

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …… 213

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …… 215

別添 3

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

I. 総括研究報告書

プラスチック製医療機器の安全性に関する研究
—フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究—

主任研究者 今井 清 (財) 食品農医薬品安全性評価センター 技術統括部長

研究要旨

MEHP を 50～500 mg/kg および 70～700 mg/kg の用量でそれぞれマウスおよびラットに、また DEHP を 150～1,500 mg/kg および 200～2,000 mg/kg の用量でそれぞれマウスおよびラットに 1 日一回 28 日間連続経口投与して、一般状態の観察、体重、摂餌量の測定、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を実施した結果、マウス、ラットともに MEHP、DEHP 投与群いずれにも肝毒性および精巣毒性が確認されたほか、MEHP 投与群では、ラットの高用量群で呼吸障害あるいは神経症状を伴って食餌摂取量の著明な低下と衰弱により投与 22 日目および 28 日目にそれぞれ 1 例が切迫屠殺された。一方、マウスにおいては、新たに DEHP、MEHP 投与により腎尿細管障害が起きる事、MEHP は DEHP と比較して肝、精巣よりも腎標的性が高いことが見いだされた。また、マウス腎 mRNA を用いた遺伝子発現変動解析の結果、この腎障害の発現にスフィンゴシン-1-リン酸シグナルカスケードが関与する可能性が示唆された。さらに、文献調査の結果、MEHP が PPAR α のみならず PPAR γ のアゴニストであることが判明したほか、ミトコンドリア、Na⁺-K⁺-ATPase、cAMP、アセチルコリン受容体等への影響が報告されていることから、これらの PPAR 非依存的な作用にも注目する必要があると思われた。

分担研究者名・所属機関名および所属機関
における職名

今井 清 (財団法人 食品農医薬品安全性評価
センター 技術統括部長)、関田清司 (国立医
薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究セン

ター 毒性部 室長)、高木篤也 (国立医薬品食
品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
毒性部 室長)、北嶋 聡 (国立医薬品食品衛生
研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部
室長)

A. 研究目的

ポリ塩化ビニルは、素材が化学的に安定であり、柔軟性・耐久性に優れていることなどから、輸液ポンプなどの医療用具として汎用されている。一方、ポリ塩化ビニルには、柔軟性を保持する目的で材質中に可塑剤としてフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) が添加されており、塩化ビニル性の医療用具からも DEHP の溶出が明らかにされている。DEHP は、齧歯類を用いた毒性研究において、肝毒性、精巣毒性及び生殖発生毒性が確認されており、我が国においては耐用 1 日摂取量(TDI)が 40~140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と設定されているが、医療現場では DEHP の暴露量が TDI を上回る事例も報告されており、可能な限り DEHP の暴露を避けるよう配慮が求められている。

これまでの研究から、DEHP は生体内のリパーゼによりフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) に代謝され、MEHP が毒性を惹起するものと考えられている。最近になって、プラスチック製医療用具をガンマ線滅菌することにより、これまで医療用具等から溶出することが報告されていなかった MEHP が溶出することが報告されたが、MEHP は DEHP に比較して、10~1,000 倍以上強い毒性を示すことが *in vitro* 試験において明らかにされているものの、*in vivo* においては MEHP の毒性はほとんど検証されていない。

従って、本研究では DEHP および MEHP の毒性プロファイルの質的な差異を明らかにすることに主眼において、齧歯類を用いて単回及び反復投与した時の毒性プロファイルの比較検討、遺伝子発現変動を指標にした作用機序の比較検討、さらに両化合物の毒性研究に関する国際的な動向及び文献調査を行うことを主な目的とした。

前年度実施した予備的研究において、MEHP 単回投与では、1,000 mg/kg 以上の投与群で間代性痙攣を伴った死亡例が認められ、さらに MEHP を連続経口投与したマウスあるいはラットでは、腹臥、間代性痙攣、自発運動低下、などの中毒症状が見られたほか、MEHP、DEHP 連続投与群において肝毒性と精巣障害が確認された。また、MEHP および DEHP を単回投与したマウスの遺伝子解析の結果、MEHP 投与群のみで、肝では *Ulk1* 遺伝子、*Ipmk* 遺伝子、精巣

では *Mrpl13* 遺伝子、*Fyb* 遺伝子および *Cyp4f18* 遺伝子の発現が亢進した。さらに文献調査の結果、MEHP は、*in vitro* の試験系において心毒性を示唆する報告がなされていることが明らかとなった。

以上の結果を参考にして、平成 19 年度は、MEHP を 50~500 mg/kg および 70~700 mg/kg の用量でそれぞれマウスおよびラットに、DEHP を 150~1,500 mg/kg および MEHP 200~2,000 mg/kg の用量でそれぞれマウスおよびラットに 1 日 1 回 28 日間連続経口投与して 28 日間経口投与毒性試験を実施した。さらに、新たにマウスにおいて MEHP の高感受性標的器官であることが確認された腎を対象に網羅的遺伝子解析を行い、DEHP のそれと比較検討した。

B. 研究方法

1. MEHP および DEHP のラットおよびマウスにおける 28 日間経口投与毒性試験

1) マウスにおける 28 日間投与毒性試験：5 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (SPF、日本 SLC) を、1 週間に亘り動物の検疫および飼育環境への馴化期間を設けた後、1 群 10 匹からなる 8 群に無作為に割り付けた。飼育は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、換気 18 回/時、照明サイクル 12 時間 (照明 5:00~17:00 時) に制御された動物飼育室で行い、ポリカーボネート製ケージ (床敷使用) に個別に収容し、飼料として CRF-1 固形飼料 (オリエンタル酵母工業(株)) を、飲料水として上水道水を自由に摂取させた。

群構成および投与用量は以下の通りである。

群	投与量 (mg/kg/day)	動物番号
D-Cont	0	1~10
D-150 mg	150	11~20
D-500 mg	100	21~30
D-1500 mg	1500	31~40
M-Cont	0	51~60
M-50 mg	50	61~70
M-150 mg	150	71~80
M-500 mg	500	81~90

投与容量を5mL/kgとし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回、28日間強制経口投与した。投与開始日を投与第1日とし、投与期間中は、毎日投与開始前と投与後約30分に、解剖日は体重測定時に一般状態を観察し、投与第1日、8日、15日、22日および29日に体重を測定した。摂餌量は投与第8日、15日、22日および28日に、各動物の6～7日間の累積摂餌量を測定し、個体ごとの1日摂餌量を算出した。最終投与日の翌日にエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より全例から採血した。血液学的検査では、赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板数 (Plt)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球色素量 (MCH)、平均赤血球色素濃度

(MCHC) をSysmex K-4500 (シスメックス (株)) を用いて測定した。血液生化学的検査では、血清中の総蛋白 (TP)、尿素窒素 (BUN)、クレアチニン (CRN)、グルコース (Glc)、トリグリセリド (TG)、総コレステロール (TCho)、総ビリルビン (TBil)、アルカリホスファターゼ (ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、γ-グルタミルトランスぺプチターゼ (γ-GTP)、カルシウム (Ca)、リン (P)、ナトリウム (Na)、カリウム (K) およびクロール (Cl) を7180形自動分析装置 (日立製作所) で測定した。またアルブミン/グロブリン比 (A/G) を計算により求めた。血液試料採取後麻酔状態で、動物を腋窩動脈血の放血により致死させて剖検し、脳、心、肺、胸腺、肝、腎、脾、精巣および精巣上体重量を測定した。精巣はブアン液で固定し、その他の臓器については10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いH-E染色標本作製して、肝、腎、脾、精巣および精巣上体について病理組織学的検査を実施した。

体重、摂餌量、血液学的検査値、血液生化学的検査値および臓器重量については、群毎に平均値および標準偏差を求めた。また、平均値の有意差は、最初にBartlettの方法で分散を検定し、分散が一樣な場合で

各群の例数が同じ場合は、対照群との間でDunnettの多重比較、同じでない場合はScheffeの多重比較で検定した。分散が一樣でない場合はノンパラメトリックのDunnett法あるいはScheffe法により検定した。いずれも有意水準は5%とした。

2) ラットにおける28日間投与毒生試験：生後4週齢の雄性Crl:CD (SD) [SPF] ラット (日本チャールス・リバー) 60匹を購入し、バリアシステムの飼育室 (W6.4×D10.3×H2.6m) で飼育した。環境調節の基準値は、温度23±3°C、湿度55±20%RH、換気回数12回以上/時、空気差圧30Pa以上、照明12時間 (午前7時点灯、午後7時消灯) とした。自動水洗式飼育機に前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W19.7×D26.3×H18.0cm) を設置し、1ケージにつき動物を1匹ずつ収容して、飼料として放射線滅菌固型飼料CRF-1 (オリエンタル酵母工業) を、飲水として上水道水を自由に摂取させた。1週間に亘り動物の検疫および飼育環境への馴化期間を設けた後、投与開始日の投与前に測定した体重を基に、1群7匹からなる7群に割り付けた。

群構成および投与用量は以下の通りである。

群	被験物質及び用量 (mg/kg/day)	動物番号
1	0 (媒体)	1001～1007
2	MEHP 70	1101～1107
3	MEHP 200	12011～1207
4	MEHP 700	1301～1307
5	DEHP 200	1401～1407
6	DEHP 700	1501～1507
7	DEHP 2,000	1601～1607

投与容量は、5mL/kgとし、テフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、28日間強制経口投与した。投与開始日を投与第1日とし、毎日2回 (投与前および投与後) 以上、動物の一般状態を観察した。投与第1、8、15、22および28日目の投与前に全動物の体重を測定し、瀕死動物はその搬出時に、計画解剖動物は解剖当日にも体重を測定した。ま

た、第1日に給餌量、第8、15、22および28日目に残餌量および給餌量を測定し、測定日間の摂餌量 (g/day) を算出した。

瀕死状態で十分な採血量が得られなかった1例を除く全例について、血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査を実施した。検査前日(投与終了日)から16時間以上絶食させたのち、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血した。血液学検査では総合血液学検査装置 ADVIA 120 (パリエル) を用いて、赤血球数 (RBC)、白血球数 (WBC)、ヘモグロビン量 (Hb)、ヘマトクリット値 (Ht)、血小板数 (Plt)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球血色素量 (MCH)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を測定し、白血球百分率を算出した。さらに、全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact (ロシュ) を用いて、プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノーゲン (Fibrinogen) を測定した。血液生化学検査では、多項目生化学自動分析装置日立 7170 (日立製作所) および全自動電解質分析装置 EA06R (アットウィル) を用いて総蛋白、アルブミン、血糖、トリグリセライド (TG)、総コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、総ビリルビン、AST、ALT、ALP、 γ -GTP、カルシウム、無機リン、ナトリウム、カリウム、塩素を測定し、A/G比を算出した。

エーテル麻酔下にて採血後、剖検し、肝、腎、脾、肺、副腎、精巣、精囊、前立腺および精巣上体の重量を測定した。各器官臓器の肉眼観察後、肝、腎、脾、肺、精巣、精囊、前立腺、精巣上体、脳(下垂体、副腎、大腿部筋肉、横隔膜)ならびに肉眼観察において異常が認められた器官・組織について、十分な量の10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し(精巣はブアン液で前固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定)、型の如くHE染色標本を作製し鏡検した。

各試験群の体重値、摂餌量値、臨床検査、器官重量値および器官重量/体重比の統計学的解析については、Bartlettの等分散検定を実施し、等分散が認められた場合は、Dunnnettの多重比較検定を、不等分散が認められた場合は、Steelの検定を実施して、対照群と各投与群間の有意差を検定し

た。諸器官の肉眼観察および病理組織学検査の各発生例数については、Fisherの正確検定法を用いた。いずれも有意水準は5%とした。

2. マウスの腎に対する作用の遺伝子発現変動解析によるMEHPとDEHPの比較

雄性マウス C57BL/6CrSlc (日本エスエルシー) に、MEHP (0、70、200、700 mg/kg)、あるいは DEHP (0、200、700、2,000 mg/kg) を単回強制経口投与し、経時的(投与2、4、8、24時間後)にサンプリングした腎の mRNA につき、マイクロアレイ [Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0] を用いて、Perccellome 法による網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。投与容量は10 (ml/kg)、溶媒はコーンオイルとした。なお、700 mg/kg の MEHP 投与により、12 匹中 1 匹が投与後 2 時間後に死亡した。

3. 文献、国際動向に関する調査研究

MEHP の一般毒性、生殖毒性、薬理学的研究、毒性発現メカニズム研究等に関する直近までの文献の調査を継続して実施するとともに、標的臓器であることが示されている精巣、心臓、神経毒性、腎毒性に焦点をあてて情報収集を行った。

(倫理面の配慮)

動物の飼育および取り扱いに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「国立医薬品食品衛生研究所 動物実験に関する指針等の動物倫理規定」、「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」に従い、適正に使用した。

C. 研究結果

1. MEHP および DEHP のラットおよびマウスにおける 28 日間経口投与毒性試験

1) マウスにおける 28 日間投与毒性試験 : DEHP 投与群では、投与期間中被験物質投与の影響を示唆するような特異症状の発現は認められなかったが、1500 mg 群の摂餌量が投与 15 日以降に連続して有意

に増加した。血液学的検査では、対照群と比較して有意差の認められる項目はなかったが、血液生化学的検査では Alb および A/G の有意な減少と CRN および T-Chol の有意な増加が 500 mg 投与以上の群で認められ、1500 mg 群では、T-Bil の有意な減少と ALP および ALT の有意な増加が認められた。病理学的検査では、肝臓が 500 mg 群で 1 例、1500 mg 群で 7 例認められ、これに伴って、肝実重量および相対重量が有意に増加した。さらに、1500mg 群では精巣の実重量および相対重量の有意な減少が認められた。病理組織学的には、肝細胞の腫大と細胞質内の好酸性顆粒の出現が 1500 mg 群で全例に、また細胞質内の好酸性顆粒の出現が 500 mg 群で 3 例に観察された。腎では、近位尿細管上皮細胞の軽度の変性と再生が対照群、150 mg、500 mg および 1500 mg 群で、それぞれ 1、1、4 および 9 例に、水腎症が 1500 mg 群で 1 例に観察された。さらに、精巣においては 1500 mg 群で精上皮細胞の変性あるいはセルトリ細胞からの脱落が 8 例、精巣上体管腔内の変性精上皮細胞の貯留が 5 例に観察された。

一方、MEHP 投与群では投与期間中、被験物質投与の影響を示唆するような特異症状の発現は認められず、体重および摂餌量にも群間で明らかな差は認められなかった。血液学的検査では、Hb、MCV および MCH の有意な減少と WBC の有意な増加が 500 mg 群で認められた。血液生化学的検査では、500 mg 投与以上の群で Alb および A/G 比の有意な減少あるいは減少傾向、T-Chol の有意な増加が認められた。病理学的検査では、肉眼所見として肝の肥大、腎表面の粗糙化および精巣萎縮（一側）が 500 mg 群で、それぞれ 8 例、9 例および 1 例に認められ、これとともに肝実重量および相対重量の有意な増加が 150 mg および 500 mg 群で認められた。この他に 500 mg 群では、脾の実重量と相対重量および腎の相対重量の有意な増加、精巣の実重量および相対重量の有意な減少が認められた。病理組織学的検査では、肝細胞の腫大と細胞質内の好酸性顆粒の出現が 500

mg 群で全例に、また細胞質内の好酸性顆粒の出現が 150 mg 群で 1 例に観察された。腎においては楔状に広がる近位尿細管上皮細胞の中度から極高度の変性と再生が 50 mg、150 mg および 500 mg 群で、それぞれ 1、6 および 10 例に観察された。さらに、精巣では 500mg 群で精上皮細胞の変性あるいはセルトリ細胞からの脱落が 7 例、精細管の拡張が 1 例、精巣上体管腔内の変性精上皮細胞の貯留が 6 例に観察された。

2) ラットにおける 28 日間投与毒生試験：DEHP 投与群では一過性の流涎が 2,000 mg 群の 3 例に認められたが、2,000 mg 群の他の動物ならびにそれ以下の用量群では、一般状態の異常は認められなかった。2,000 mg 群で対照群に比し僅かな体重増加抑制が認められたが、摂餌量には対照群との間に有意な差は認められなかった。血液学的検査では、Ht ならびに Hb 量が 2,000 mg 群で有意に減少し、700 および 2,000 mg 群でフィブリノーゲン濃度の有意な減少と赤血球数の減少傾向が認められた。血液生化学的変化として、Alb が用量依存的に増加し、700 および 2,000 mg 群では統計学的に有意であった。これに伴って、A/G 比は DEHP 投与全群で有意に上昇した。また、総ビリルビンが 700 および 2,000 mg 群で、ALT 活性が 2,000 mg 群で、ALP 活性が 700 および 2,000 mg 群でそれぞれ有意に増加/上昇した。さらに、DEHP 投与全群で TG の減少傾向、2,000 mg 群で AST 活性の上昇傾向が認められた。病理学的検査では、肝の肥大が 200、700、2,000 mg 群でそれぞれ 2、5、7 例に認められ、これに伴って 700mg/kg 群の一部の例で暗色化、白色斑も観察され、精巣、精巣上体、前立腺および精囊の小型化が 2,000 mg/kg 群に認められた。これら肉眼所見の変化とともに、肝の絶対および相対重量が DEHP 投与全群で有意に増加し、2,000 mg 群で精巣、前立腺、精囊および精巣上体の絶対および相対重量の有意な減少ないし減少傾向が認められたほか、2,0 腎の相対重量が有意に増加した。病理組織学的には、肝で肝細胞の好酸性顆粒状変化と好酸性化粒状変化を伴う肝細胞の肥大が 200 mg 以上の群に認められ、用量の増加に伴い発生数の増加および

程度の増強が認められた。また、2,000 mg 群に肝細胞の巣状壊死が認められた。精巣では、700 mg 以上の群に Sertoli only syndrome、セルトリ細胞の空胞化、精細管の萎縮、間細胞の過形成、生殖細胞の変性および多核巨細胞形成が認められた。これらの病変は DEHP の用量の増加に伴い、発生数が増加し病変の強さも増強した。なお、2,000 mg 群では、精細管内に生殖細胞がほとんど観察されなかった。精巣の変化に伴って精巣上体では、700 mg 以上の群で精子の減少と管腔内の細胞残渣の増加が認められ、2,000 mg 群の多くの例では、精巣上体管腔内は無精子であった。腎では、2,000 mg 群の 1 例で皮質尿細管上皮細胞の変性が認められ、副腎では、200、700 および 2,000 mg/kg 群のそれぞれ 3、5、6 例に球状帯細胞のび慢性空胞化が認められた。

一方 MEHP 投与群では、投与期間中に 700 mg 群の 2 例が、それぞれ投与第 22 および 28 日目に瀕死状態となり、切迫屠殺に供された。これらの 2 例では一過性の流涎が観察された後、呼吸不整が認められるようになり、さらに第 22 日目に屠殺剖検した例では軟便、第 28 日目に屠殺剖検した例では被毛粗剛、腹部膨満、間代性痙攣を伴って瀕死状態となった。700 mg 群の他の動物ならびにそれ以下の用量群では、投与期間を通じて一般状態の異常は認められなかった。途中剖検された 700 mg 群の 2 例では、体重の増加量が対照群に比し明らかに少なく、同群の他の例においても、体重増加が僅かに抑制された動物が散見された。また、切迫屠殺された 2 例の平均 1 日摂餌量も、対照群に比し低下傾向を示したが、同群の他の例では、摂餌量は対照群とほぼ同等に推移し、その他の MEHP 投与群では平均 1 日摂餌量はいずれも対照群と大差は見られなかった。血液学検査の結果、700 mg 群でフィブリノーゲン濃度が有意に減少し、血液生化学検査では、Alb の用量依存的な増加傾向が見られ、これに伴い A/G 比が 200 および 700 mg 群で有意に上昇した。また、総ビリルビンが 200 および 700 mg 群で有意に減少したほか、MEHP 全投与群で TG の減少、700 mg 群で AST 活性、ALT 活性および ALP 活性の上昇傾向が認められた。病理学的検査では、途中剖検された 700

mg 群の 2 例で全身の消瘦、胃から大腸に及ぶガス状内容物を含む内腔拡張、脾および胸腺の萎縮、脾の淡色化ならびに肝および腎の暗色化、肝の白色斑が共通して認められた。これら 2 例を含む 200 および 700 mg 群で肝の肥大がそれぞれ 1 および 3 例に見られ、200 mg/kg 群の 1 例、700 mg/kg 群の 4 例に白色斑が認められた。さらに 700 mg 群の一部の例では肝の暗色化、小型の精巣、精巣上体、前立腺および精囊、腎の暗色化が観察された。これに伴って肝では、絶対重量が 700 mg 群で、相対重量が 200 および 700 mg 群でそれぞれ対照群に比し有意に増加し、腎では、相対重量が 700 mg 群で有意に増加したほか、同群では精巣、前立腺および精囊の絶対ならびに相対重量の減少傾向が認められた。病理組織学検査の結果、肝では肝細胞の好酸性顆粒状変化を伴う肝細胞の肥大が 200 mg 以上の群に認められ、用量の増加に伴い発生数が増加し、病変の強さも増強した。さらに、肝細胞の巣状壊死が 700 mg 群の 4 例に認められた。精巣では、700 mg 群で Sertoli only syndrome、セルトリ細胞の空胞化、精細管の萎縮、間細胞の過形成、生殖細胞の変性および多核巨細胞形成が認められたが、DEHP 投与群と比較すると精巣の変化は極めて軽い変化であった。これらの精巣の変化に伴って、精巣上体では管腔内の精子が減少し細胞残渣が増加した。腎では、皮質尿細管上皮細胞の変性が 700 mg 群の 1 例に認められた。さらに 200 mg 群の 2 例、700 mg 群の 4 例に副腎球状帯細胞のび慢性空胞化が認められた。

2. マウスの腎に対する作用の遺伝子発現変動解析による MEHP と DEHP の比較

腎での遺伝子発現が、MEHP 投与で変動し DEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子として、スフィンゴシン-1-リン酸 (SIP) シグナルカスケードに関係する遺伝子群 (Sphk1、Edg1 Asah31、Sgms1 遺伝子) が見いだされた。その他、酸化的ストレス時に誘導される Sesn1、Sesn2、Srxn1 遺伝子及びサイトカインシグナルに関与する Socs2、Socs3 遺伝子の発現増加が認められた。

腎において発現が、DEHP 投与で変動し MEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子として、ミトコ

ンドリア電子伝達系の複合体 I (NADH dehydrogenase) を構成する遺伝子群 (Ndufa2、Ndufa12、Ndufa5、Ndufb2、Ndufb10、Ndufs2 遺伝子) の発現増加が見いだされたが、その増加量は S1P シグナル関連遺伝子および、後で示す PPAR 関連遺伝子のものと比較して低いものであった。

腎において発現が、投与により DEHP、MEHP 両者で共通して増加する遺伝子として、PPAR α のシグナルカスケードに関係する遺伝子群が見いだされた (Cebpb、Acot3、Acs11、Crat、Hac11、Pex11a 遺伝子など)。この時の遺伝子発現は、MEHP 投与時の方が DEHP 投与時よりも経時的に早く、また用量依存的に大きな増加を示した。このほかに、Fabp1、Adfp、Sgk、Scnn1、UCP2 遺伝子など PPAR γ のシグナルカスケードに関係する遺伝子群も見いだされたが、この場合は MEHP 投与時と DEHP 投与時で同様な用量反応性を示した。

3. 文献、国際動向に関する調査研究

ラットのセルトリ細胞を用いた *in vitro* の系でミトコンドリアがセルトリ細胞での MEHP 標的の一つであることが示唆された (Chapin RE et al., 1988) ほか、セルトリ細胞の機能に対する MEHP の影響として、FSH 刺激による cAMP の蓄積を阻害し、乳酸の分泌を促進することが明らかにされた (Heindel J. and Powell CJ, 1992)。また、ラットに MEHP を単回強制経口投与後短時間内に精巣で Germ cell の分離と脱皮とセルトリ細胞内での中間フィラメントのビメンチンの崩壊、Testosterone-repressed-prostatic message-2 遺伝子の発現増加が明らかにされている (Dalgaard M et al., 2001)。その他、MEHP 単回経口投与後のラット精巣において Thbs1 遺伝子、転写因子 (Nr0b1)、ステロイド合成遺伝子 (Cyp17a1、StAR)、コレステロール代謝遺伝子 (Dhcr7) が用量依存的に変化したことを報告している (Lahousse SA et al., 2006)。

MEHP の腎障害に関連する論文として *in vitro* の系では Opposum (袋鼠) 近位尿細管由来の OK 細胞に MEHP あるいは 2-EHP を添加すると MEHP は用量に依存した細胞生存率の低下をおこし、

F-actin が減少するが、2-EHP では変化はなかったと報告している (Rothenbacher K et al., 1998)。さらに、B6C3F1 マウスに DEHP を 6000ppm の濃度で飼料に添加し、104 週間投与すると雌雄に、1500ppm で雌に慢性進行性ネフロパチーが惹起されるが (David RM et al., 2000)、一方、DEHP 混入飼料を PPAR α ノックアウトマウスに与えると腎障害炎が見られたことから、PPAR α は腎障害に対してむしろ防御的に働いていることを示唆する実験もある (Kamiyo Y. et al., 2007)。いずれにせよ MEHP による腎障害の機序については、現時点では明らかでない。

一方、摘出ラット胃の筋肉を用いた *in vitro* の系で、PGE2 やアセチルコリンによる収縮作用が MEHP により減少したとの報告がある (Tavares et al., 1985) が、MEHP の脳に対する影響を調べた文献は見つからず、心毒性についての新たな情報も得られなかった。

D. 考察

これまでにフタル酸の毒性変化あるいは関連する反応として、特にラットでは肝におけるペルオキシソームの増生と薬物代謝酵素の誘導、精巣における精子形成阻害が明らかにされているが、これらの変化はいずれもラットをはじめとする齧歯類に特異的な変化と考えられている。今回、DEHP とその生体内での主な代謝物と考えられている MEHP を用いてマウスおよびラットにおける 28 日間連続経口投与毒性試験を実施して毒性発現を比較検討した。その結果、マウス、ラットともに、DEHP および MEHP 投与により肝ではペルオキシソームと考えられる好酸性微細顆粒の増生を伴った肝細胞の腫大/肥大が認められ、精巣では精子形成阻害を特徴とする精巣毒性が観察された。これらの毒性発現をマウスとラットで比較するとラットにおける変化が明らかに強く、マウス、ラットともに肝および精巣に同程度の毒性を発現させる投与用量即ち MEHP:DEHP の毒性発現用量の比は約 1:3 であると推察された。一方、マウスにおいては DEHP に比較すると MEHP 投与

により明らかに強い近位尿細管上皮細胞の変性・脱落と再生を特徴とする腎毒性が発現し、MEHP:DEHPの毒性発現用量の比は明らかに1:3を超えていた。

DEHPの肝毒性の発現機序としては、DEHPが核内受容体の1種であるPeroxisome Proliferator Activated Receptor- α (PPAR- α)にリガンドとして結合した結果引き続いて起きるPPAR- α の活性化が関与していると考えられている。一方、精巣毒性に関しては、精細管における精細胞の支持細胞であるセルトリ細胞の細胞骨格を形成するアクチンフィラメントあるいは中間径フィラメントを傷害する結果、精巣毒性が惹起されると推察されている。因みに今回の文献調査で、ラットにMEHPを単回強制経口投与短時間内に精巣でGerm cellの分離と脱皮とセルトリ細胞内での中間フィラメントのビメンチンの崩壊が起こることが明らかにされている。さらに、DEHPを投与するとセルトリ細胞内に精細管の精子形成周期に依存して、2-エチルヘキシル側鎖よりフタル酸がより多量に存在することから、フタル酸が精巣毒性の発現に関与している可能性が示唆されている。

DEHPの毒性は、主に小腸内のリパーゼあるいは小腸組織内の加水分解酵素により代謝物として生成されるMEHPよると考えられているが、ラット、モルモットではMEHPの2-エチルヘキシル側鎖の ω -酸化が主要な代謝経路であるのに対しマウス、ヒト、マーモセット、ミドリザルでは尿中にはMEHPのグルクロン酸抱合体が大量に検出されてくる。一方、ラットの尿中からはMEHPのグルクロン酸抱合体は検出されていない。従って、DEHPあるいはMEHPの生体内での分布、代謝、排泄の様式が毒性発現に影響を与えるの大きな要因の一つになると思われる。本研究において、DEHP、MEHP単回投与時の腎における遺伝子発現変動解析結果から、1) MEHPはDEHPと異なり、スフィンゴシン-1-リン酸(SIP)シグナルカスケードを活性化すること、2) DEHPはMEHPと異なり、ミトコンドリア電子伝達系の複合体I (NADH dehydrogenase) を標的分子とすること、3)

DEHP、MEHP共に、核内受容体PPAR α 受容体およびPPAR γ 受容体を介したシグナルカスケードを活性化することが示唆された。これらの遺伝子発現変動がMEHP投与による腎毒性発現にどのように関与しているのか今後の研究成果が注目される。

われわれは、これまでの研究においてMEHPのマウスにおける急性毒性実験では、1,000 mg/kg投与では1/3例が投与後1日に、2,000 mg/kg投与では、3/3例が投与後1日(翌朝)まで一過性の間代性痙攣を伴って死亡し、ラットに2,000 mg/kgのMEHPを連続投与すると投与2日目の投与直後から間代性痙攣、流涎、自発運動低下、腹臥位、体温低下、異常呼吸など死亡すること、マウスに2,000 mg/kgのMEHPを投与すると投与3日目に間代性痙攣が認められることを明らかにしてきた。さらに、ラットにおいても700 mg/kgのMEHPを連続経口投与した一部の例に消化管障害を伴った一般状態の悪化が観察され、間代性痙攣が発現することが明らかとなった。これまでに、DEHPをはじめとするフタル酸エステル類に関しては膨大な毒性実験の結果が報告されているが、神経毒性に関する報告としては現時点では*in vitro*の実験においてニコチンアセチルコリン受容体のカルシウムシグナルを抑制するとの報告があるのみで、*in vivo*の実験系では神経毒性に関する報告はなされていない。PPAR α の標的細胞内小器官であるペルオキシソームは、肝細胞、消化管上皮細胞、心筋細胞、精巣間細胞およびセルトリ細胞、卵巣濾胞細胞、子宮内膜細胞および腺上皮細胞、心筋細胞などに多く存在するほか、神経系においては海馬特に歯状回、小脳顆粒細胞などにも存在することが明らかにされていることから、MEHPの神経毒性の発現にPPAR α が関与している可能性も考えられる。一方、PPARsの発現には大きな種族差が認められていることから、今後MEHPの毒性評価に当たっては神経毒性発現の機序の解明が重要であると思われる。

いずれにせよ、マウスとラットではMEHPの

代謝様式が異なっており、ヒトはマウスに類似した代謝様式を示すと考えられていることから、MEHP のヒトでの毒性評価に際してはヒトの代謝様式を十分考慮することが肝要であろう。

以上の結果から、「28 日間反復経口投与毒性試験」における DEHP の無毒性量はマウスでは 150 mg/kg、ラットでは 200 mg/kg 以下、MEHP の無毒性量はマウスでは 50 mg/kg、ラットでは 70 mg/kg と判断した。

E. 結論

フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の毒性を比較する目的で MEHP、DEHP のマウスおよびラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性試験を実施するとともにマウス腎 mRNA を用いた遺伝子発現変動解析および MEHP の毒性に関連した文献調査を行った。その結果、マウス、ラットともに MEHP、DEHP 投与群いずれにも肝毒性および精巣毒性が確認されたほか、MEHP 投与群では、ラットの高用量群で呼吸障害あるいは神経症状を伴って瀕死状態におちる例が観察され、マウスでは、DEHP、MEHP 投与により腎尿細管障害が起きるが、MEHP は DEHP と比較して肝、精巣よりも腎標的性が高いことが明らかにされた。また、マウス腎 mRNA を用いた遺伝子発現変動解析の結果、この腎障害の発現にスフィンゴシン-1-リン酸シグナルカスケードが関与する可能性が示唆された。さらに、文献調査の結果、MEHP が PPAR α のみならず PPAR γ のアゴニストであることが半明したほか、ミトコンドリア、Na⁺K⁺-ATPase、cAMP、アセチルコリン受容体等への影響が報告されていることから、これらの PPAR 非依存的な作用にも注目する必要があると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリ

プトミクスの新しい試み、
細胞工学、26、71-77、2007)

- 2) 菅野純、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、
細胞工学、26、71-77、2007

2. 学会発表

- 1) 菅野 純、相崎 健一、小川 幸男、関田清司、北嶋 聡、ヒドロキシクエン酸による精巣毒性のトキシコゲノクス解析、[第 96 回日本病理学会総会] 2007 年 3 月

- 2) TAKAGI A, KITAJIMA S, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K, EMA M AND KANNO J, Quantitative microarray analysis by "Percellome" method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, USA, 2008 年 3 月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1) 特許取得

該当なし

2) 実用新案登録

該当なし

3) その他

該当なし

別添 4

Ⅱ. 分担研究報告書

プラスチック製医療機器の安全性に関する研究

—フタル酸エステル DEHP とその活性代謝産物 MEHP の比較毒性学的研究—

-マウスを用いた反復投与毒性試験によるDEHPおよびMEHPの比較-

分担研究者 関田清司 国立医薬品食品衛生研究所

安全性生物試験研究センター 毒性部室長

研究要旨 DEHP (0、150、500、1500 mg/kg) および MEHP (0、50、150、500 mg/kg) のマウス 28 日間反復投与毒性試験により、両化学物質の毒性について比較検討した。DEHP および MEHP とともに投与に起因したと考えられる肝、腎および精巣の毒性変化が認められた。両物質を病理学的に比較すると、肝および精巣の毒性は DEHP 1500 mg/kg と MEHP 500mg/kg、及び DEHP 500 mg/kg と MEHP 150 mg/kg がほぼ同等であり、mg/kg についてほぼ 3 倍の隔たりがあったが、腎毒性については、MEHP 投与群で明らかに 3 倍を超える強い変化が観察された。DEHP の毒性は代謝物 MEHP によるものと考えられているが、MEHP を直接投与した場合は、DEHP とは異なる標的臓器選択性が現れることが明らかとなった。なお、DEHP 150 mg および MEHP 50 mg/kg 投与群では変化は認められず、本試験での無毒性量 (NOAEL) は DEHP で 150 mg/kg および MEHP で 50 mg/kg と判断した

A. 研究目的

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) を可塑剤として使用しているプラスチック製医療用具のγ線照射用具からフタル酸モノ-2-エチルヘキシル (MEHP) の溶出が報告された。このため MEHP の毒性プロファイルの把握が急務となった。

生体内では、MEHP は小腸内のリパーゼあるいは小腸組織内の加水分解酵素により DEHP の代謝物として生成される。DEHP の毒性は

MEHP の作用と考えられているが、MEHP についての毒性情報は乏しく、評価が遅れている。

本研究では、両化学物質のマウス 28 日間反復投与毒性試験により、DEHP と MEHP の毒性プロファイルの同異について明らかにし、MEHP の安全性評価と安全性の確保に貢献する。

B. 研究方法

B-1. DEHP の 28 日間反復投与毒性試験

B-1-1. 被験物質

DEHP は純度 99.7% (東京化成工業株式会社、Lot KIKQC) を用いた。保存は冷暗所で行った。

B-1-2. 投与液の調製

調製は7日に1回の頻度で行った。冷暗保存しておいた DEHP を秤量し、媒体としてコーン油を用いて希釈・混和し、300、100 および 30 mg/mL 濃度の投与液を調製した。100 および 30 mg/mL 濃度投与液は段階希釈により調製した。調製した投与液は投与日毎に必要量をガラス褐色瓶に分注し、投与日まで冷暗所で保存した。なお、安定性については(財)食品農医薬品安全性評価センター(主任研究者 今井 清)で確認されている。

B-1-3. 動物および飼育条件

DEHP および MEHP 試験用として5週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (SPF、日本 SLC) を 93 匹入手し、入荷日に DEHP 用 46 匹と MEHP 用 47 匹に無作為割付した。1 週間馴化飼育後、DEHP 試験用の内から健康状態と体重を基準に 40 匹を選んで用いた。

本系統を選択した理由は分担研究者(北嶋)により MEHP 誘発毒性をより詳細に把握する目的で遺伝子発現変動解析が実施される。また当毒性部には本系統を用い化学物質による影響の検討を遺伝子発現変動解析により実施しており豊富なデータを保有している。このことから本系統を選択した。

飼育は室温 24±1℃、湿度 55±5%、換気 18 回/時、照明サイクル 12 時間(照明 5:00~17:00 時)に制御された動物飼育室で行い、ポリカーボネート製ケージ(床敷使用)に個別収容し、飼料(CRF-1 固形飼料、オリエンタル酵母工業

(株))と水は自由に摂取させた。

B-1-4. 投与方法、投与用量および群構成

投与量は、mg(被験物質)/5mL(溶媒)/kg(体重)とし、金属製胃ゾンデを用いて1日1回、28日間行った。個体ごとの投与量は最新の体重を基に算出した。

投与量の設定は、当該試験の用量設定を目的に、DEHP (150、500 および 1,500 mg/kg) および MEHP (50、150 および 500 mg/kg) の7日間投与毒性試験を行ったところ、両化学物質の高用量では肝への影響が、低用量では影響は観察されなかった。このことから両化学物質ともに7日間反復投与毒性試験と同じ用量を設定した。

群構成は下記の通りである。

群名	投与量 (mg/kg/day)	動物数 雄(個体番号)
D-Cont	0	1~10
D-150 mg	150	11~20
D-500 mg	100	21~30
D-1500 mg	1500	31~40

各群への動物の割付けは、投与開始前日に、当日の体重による層別化を行い各群の平均体重ができるだけ近づくように40匹を各群へ割付けた。

B-1-5. 観察および検査項目

下記の項目について行った。なお、日と週の記載については投与開始日を投与第1日とし、第1日から7日を投与第1週とした。

B-1-5-1. 一般状態の観察

投与期間中は、毎日投与開始前と投与後約

30分に、解剖日は体重測定時に行った。

B-1-5-2. 体重および摂餌量

体重は投与第1日、8日、15日、22日および29日に行った。摂餌量は投与第8日、15日、22日および28日に、各動物の6~7日間の累積摂餌量を測定し、個体ごとの1日摂餌量を算出した。なお、測定はその日の投与前に行った。

B-1-5-3. 血液形態学的検査および血液生化学的検査

最終投与日の翌日に、全例について行った。採血はエーテル麻酔下で眼窩静脈叢より行った。血液形態学的検査では、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、ヘモグロビン量(Hb)、ヘマトクリット値(Ht)、血小板数(Plt)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)をSysmex K-4500(シスメックス(株))を用い全血を希釈法で測定した。血液生化学的検査は、血清を用いて、総蛋白(TP)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、グルコース(Glc)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、総ビリルビン(T-Bil)、アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ(γ -GTP)、カルシウム(Ca)、リン(P)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)およびクロール(Cl)について7180形自動分析装置(日立製作所)で測定した。またアルブミン/グロブリン比(A/G)を計算により求めた。

B-1-5-4. 剖検、臓器重量および病理組織学的検査

血液試料採取後麻酔状態で、動物は腋下動脈血の放血により致死させた後、剖検を行った。重量測定は脳、心、肺、胸腺、肝、腎、脾、精巣および精巣上体について行った。また、精巣はブアン液で固定し、その他の臓器については10%中性緩衝ホルマリン液で固定、その後常法に従いH-E染色標本を作製し、肝、腎、脾、精巣および精巣上体について病理組織学的検査を実施した。

B-1-5-5. 計学的解析

体重、摂餌量、血液形態学的検査値、血液生化学的検査値および臓器重量については、群毎に平均値および標準偏差を求めた。また、平均値の有意差検定を行った。検定は最初にBartlettの方法で分散を検定し、分散が一樣な場合で各群の例数が同じ場合は、対照群との間でDunnettの多重比較、同じでない場合はScheffeの多重比較で検定した。分散が一樣でない場合はノンパラメトリックのDunnett法あるいはScheffe法により検定した。いずれも有意水準は5%とした。

B-2. MEHPの28日間反復投与毒性試験

B-2-1. 被験物質

MEHPは純度96.9%(和光純薬株式会社、Lot PL0238)を用いた。保存は冷暗所で行った。

B-2-2. 投与液の調製

調製は7日に1回の頻度で行った。冷暗保存しておいた結晶状態のMEHPを室温で3時間放置し、結晶を溶解させた。所定量の被験物質を秤量し、媒体としてコーン油を用いて希釈・混和し、100、30および10 mg/mL

濃度の投与液を調製した。30 および 10 mg/mL 濃度投与液は段階希釈により調製した。調製した投与液は投与日毎に必要量をガラス褐色瓶に分注し、投与日まで冷暗所で保存した。なお、安定性については和光純薬および (財)食品農医薬品安全性評価センター (主任研究者 今井 清) で確認されている。

B-2-3. 動物および飼育条件

MEHP 試験用として割付けられた 47 匹のなかから健康状態と体重を基準に 40 匹を選び試験に供した。飼育条件は DEHP と同じにした。

なお、MEHP の投与開始年月日は DEHP より 1 日遅れて開始した。

B-2-4. 投与方法、投与用量および群構成

投与方法は DEHP と同じにした。用量は 0 (コーンオイル)、50、150 および 500 mg/kg を設定した。用量設定根拠は B-1-4 で述べた通りである。

群構成は下記の通りである。

群名	投与量 (mg/kg/day)	動物数 雄(個体番号)
M-Cont	0	51~60
M-50 mg	50	61~70
M-150 mg	150	71~80
M-500 mg	500	81~90

各群への動物の割付けは、投与開始前日に、当日の体重による層別化を行い各群の平均体重ができるだけ近づくように 40 匹を各群へ割付けた。

B-2-5. 観察および検査項目

DEHP と同じ項目について同じ方法で実施

した。

(倫理面の配慮) 試験は「国立医薬品食品衛生研究所動物実験の適切な使用に関する規定」に基づき実施した。具体的には、採血などは全身麻酔下で実施した。

C. 研究結果

C-1-1. DEHP28 日間反復投与毒性試験

C-1-1. 一般状態

投与期間中、被験物質投与の影響を示唆するような特異症状の発現は認められなかった。

C-1-2. 体重および摂餌量 (図 1)

D-1500 mg 群の摂餌量で、投与 15 日以降に連続して有意な増加が認められた。

C-1-3. 血液形態学的検査 (表 1)

有意差を認める項目は認められなかった。

C-1-4. 血液生化学的検査 (表 2)

Alb および A/G の有意な減少と CRN および T-Cho の有意な増加が 500 mg 投与以上の群で認められた。この他、D-1500 mg 群では、T-Bill の有意な減少と ALP および ALT の有意な増加が認められた。

C-1-5. 剖検所見

肝肥大が D-500 mg 群で 1 例および D-1500 mg 群で 7 例認められた。精巣上体頭部の肥大が D-Cont 群で 1 例およびのう胞性水腎 (一側、実質なし) が D-1500 mg 群で 1 例認められた。この他、特記するような変化は認められなかった。

C-1-6. 臓器重量 (表 3)

肝実重量および相対重量の有意な増加が D

-500 mg およびD-1500 mg 群で認められた。また、精巣実重量および相対重量の有意な減少がD-1500 mg 群で認められた。この他、心実重量および相対重量の有意な減少が中間用量のD-500 mg 群で認められた。

C-1-7. 病理組織学的検査 (表4)

肝においては肝細胞の腫大と細胞質内の好酸性顆粒の出現がD-1500 mg 群で全例に、また細胞質内の好酸性顆粒の出現がD-500 mg 群で3例に観察された。腎においては近位尿細管上皮細胞の軽度の変性と再生がD-Cont、D-150 mg、D-500 mg および1500 mg 群で、それぞれ1、1、4および9例に、水腎症がD-1500 mg 群で1例に観察された。精巣においてはD-1500 mg 群で精上皮細胞の変性あるいはセルトリ細胞からの脱落が8例、精巣上体の管腔内の変性精上皮細胞の貯留が5例に観察された。

C-2. MEHP28 日間反復投与毒性試験

C-2-1. 一般状態

投与期間中、被験物質投与の影響を示唆するような特異症状の発現は認められなかった。

C-2-2. 体重および摂餌量 (図2)

群間に明らかな差は認められなかった。

C-2-3. 血液形態学的検査 (表5)

Hb、MCV および MCH の有意な減少とWBC の有意な増加がM-500 mg 群で認められた。

C-2-4. 血液生化学的検査 (表6)

500 mg 投与以上の群でAlb およびA/G 比の有意な減少あるいは減少傾向が、また、T-Cho

の有意な増加が認められた。この他、M-500 mg 群では、TG の有意な減少とBUN、CRN およびALT の有意な増加が認められた。

C-2-5. 剖検所見

肝の肥大、腎表面の粗糙および精巣萎縮(一側)がM-500 mg 群で、それぞれ8例、9例および1例に認められた。この他、特記するような変化は認められなかった。

C-2-6. 臓器重量 (表7)

肝実重量および相対重量の有意な増加がM-150 mg およびM-500 mg 群で認められた。この他にM-500 mg 群では、脾の実重量と相対重量および腎の相対重量の有意な増加、精巣の実重量および相対重量の有意な減少が認められた。

C-2-7. 病理組織学的検査 (表8)

肝においては肝細胞の腫大と細胞質内の好酸性顆粒の出現(写真1)がM-500 mg 群で全例に、また細胞質内の好酸性顆粒の出現がM-150 mg 群で1例に観察された。腎においては楔状に広がる近位尿細管上皮細胞の中度から極高度の変性と再生(写真2)がM-50 mg、M-150 mg およびM-500 mg 群で、それぞれ1、6および10例に観察された。精巣においてはM-500mg 群で精上皮細胞の変性あるいはセルトリ細胞からの脱落が7例、精細管の拡張が1例、精巣上体の管腔内の変性精上皮細胞の貯留が6例に観察された。

D. 考察

一般状態の観察において、マウスに間代性痙攣の発現がMEHP単回強制経口投与試験(1,000あるいは2,000 mg/kg)の死亡例と500 mg/kgの7日間反復強制経口投与試験の投与3日に一過

性的間代性痙攣が観察された(1/4例)ことを昨年の本事業報告書で報告した。しかし、今回の28日間反復投与毒性試験では、MEHPおよびDEHPのいずれの投与群でも被験物質投与によると考えられる症状の発現は認められなかった。

体重および摂餌量において、MEHP投与群では変化が認められなかった。DEHP投与では、1500 mg/kg投与群で摂餌量の有意な増加が認められたが、増加であること、有意差は認めるものの軽度な変化であることから毒性変化と判断しなかった。

DEHPおよびMEHPの両物質で、投与に起因したと考えられる肝、腎および精巣の毒性所見を認めた。肝においては重量増加と、肝細胞の腫大と細胞質の好酸性顆粒の出現が認められた。精巣においては、重量減少と精上皮細胞の変性およびセルトリ細胞からの脱落、精巣上体の管腔内の変性精上皮細胞の貯留が観察された。また腎においては重量増加あるいは増加傾向と尿細管上皮細胞の変性と再生よりなる陥凹を伴う皮質の楔状病変の誘発を認めた。

DEHPとMEHPの病理組織所見および臓器重量の結果を基に肝、精巣および腎の毒性を比較すると、肝および精巣では、DEHP 1500 mg/kg投与群とMEHP 500 mg/kg投与群、およびDEHP 500 mg/kg投与群とMEHP 150 mg/kg投与群がほぼ同程度であり、MEHP:DEHPの毒性発現用量の比は約1:3であると推察された。これに対して腎ではMEHP投与群で明らかに1:3を超える強い変化が観察された。

血液形態学的検査では、DEHPにおいては有意差を認めるような変化は認められなかったが、MEHPの500 mg/kg投与群ではHb、MCVおよびMCHの有意な減少と、有意差は認め

られないもののRBCおよびHtの減少傾向が認められた。また同群では白血球の有意な増加が認められた。MEHP 500mg/kg投与群では、造血機能に關与する脾、肝および腎重量の有意な増加あるいは増加傾向および、肝細胞の肥大および腎の尿細管の変性が認められた。特に、MEHP 500 mg投与群ではDEHPでは観察されなかった脾重量増加が認められたこと、および腎の表面の粗糙や尿細管の変性がDEHP投与に比べ著しく強く発現していることなどから、変化の程度は軽度であるものの、被験物質投与との関連性が示唆された。

血液生化学的検査では、いずれの変化も軽度にとどまるものの、DEHPおよびMEHPの投与による肝、腎あるいは両者の影響を反映したと考えられる共通の変化あるいは傾向がAlb、A/G、CRN、T-Cho、T-BilおよびALTで観察された。これらの変化の程度は、DEHP 1500 mg/kg投与群とMEHP 500 mg/kg投与群、およびDEHP 500 mg/kg投与群とMEHP 150 mg/kg投与群でほぼ同程度の変化であった。また、腎機能障害の代表的な指標の一つである、CRNおよびBUNについて見ると、両物質でCRNの有意な増加は認められるものの、BUNの増加はMEHP投与群だけで認められた。BUNの変化はMEHP投与による腎機能障害の強さを示したものと考えられた。なお、血液生化学的検査においてDEHPの150 mg/kg投与およびMEHPの50mg投与ではいずれの項目でも有意差は認められなかった。

DEHPの毒性は、主に小腸内のリパーゼあるいは小腸組織内の加水分解酵素により代謝物として生成されるMEHPによると考えられているが、MEHPを直接投与した場合は、DEHPとは