

Table 5. Coagulation

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	PT (sec.)	APTT (sec.)	Fibrinogen (mg/dL)
Male	0	7	16.8 ± 1.1	23.3 ± 1.9	300 ± 34
	MEHP 70	7	18.0 ± 1.2	25.8 ± 2.1	298 ± 20
	MEHP 200	7	18.3 ± 1.6	25.5 ± 2.3	272 ± 18
	MEHP 700	5	16.7 ± 1.3	23.4 ± 3.5	243 ± 31**
	DEHP 200	7	17.6 ± 2.6	25.9 ± 3.9	278 ± 31
	DEHP 700	7	17.1 ± 2.5	25.5 ± 3.1	257 ± 18*
	DEHP 2,000	7	17.0 ± 1.4	23.8 ± 3.1	236 ± 15**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 6. Blood chemistry

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	T.protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Glucose (mg/dL)
Male	0	7	5.97 ± 0.14	3.02 ± 0.07	1.03 ± 0.05	145 ± 17
	MEHP 70	7	5.84 ± 0.29	3.03 ± 0.09	1.08 ± 0.05	140 ± 20
	MEHP 200	7	5.97 ± 0.31	3.18 ± 0.19	1.14 ± 0.04*	140 ± 18
	MEHP 700	5	5.81 ± 0.29	3.24 ± 0.13	1.27 ± 0.07**	144 ± 11
	DEHP 200	7	5.85 ± 0.21	3.13 ± 0.17	1.15 ± 0.12**	167 ± 20
	DEHP 700	7	6.01 ± 0.37	3.29 ± 0.19**	1.21 ± 0.05**	168 ± 32
	DEHP 2,000	7	6.01 ± 0.26	3.41 ± 0.14**	1.31 ± 0.08**	156 ± 14

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 6. -continued Blood chemistry

Exp. No. RD-07-007

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Triglyceride (mg/dL)	T.cholesterol (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)	T.bilirubin (mg/dL)
Male	0	7	70.5 ± 23.7	70 ± 10	11.4 ± 1.9N	0.26 ± 0.05N	0.04 ± 0.01
	MEHP 70	7	48.0 ± 10.2	61 ± 18	11.3 ± 0.8	0.24 ± 0.04	0.03 ± 0.01
	MEHP 200	7	46.6 ± 26.1	63 ± 11	12.4 ± 1.8	0.21 ± 0.02	0.03 ± 0.01*
	MEHP 700	5	49.5 ± 27.9	56 ± 11	12.9 ± 2.0	0.18 ± 0.04	0.01 ± 0.01**
	DEHP 200	7	61.7 ± 35.3	63 ± 17	15.2 ± 5.5	0.26 ± 0.11	0.03 ± 0.01
	DEHP 700	7	54.2 ± 37.6	68 ± 20	13.6 ± 2.1	0.22 ± 0.04	0.02 ± 0.01**
	DEHP 2,000	7	47.8 ± 21.8	62 ± 4	13.9 ± 3.6	0.21 ± 0.03	0.02 ± 0.01**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group;

*: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Blood chemistry

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)	Gamma-GTP (U/L)
Male	0	7	80 ± 11N	27 ± 4N	705 ± 135	0.5 ± 0.1
	MEHP 70	7	77 ± 4	29 ± 4	709 ± 117	0.4 ± 0.1
	MEHP 200	7	76 ± 12	31 ± 5	725 ± 78	0.4 ± 0.1
	MEHP 700	5	93 ± 25	37 ± 12	812 ± 175	0.5 ± 0.2
	DEHP 200	7	71 ± 8	28 ± 3	661 ± 101	0.3 ± 0.1
	DEHP 700	7	78 ± 8	31 ± 4	930 ± 159*	0.5 ± 0.1
	DEHP 2,000	7	91 ± 12	43 ± 11*	935 ± 190*	0.5 ± 0.2

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 **; P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 6. -continued Blood chemistry

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Calcium (mg/dL)	I. phosphorus (mg/dL)	Sodium (mmol/L)	Potassium (mmol/L)	Chloride (mmol/L)
Male	0	7	10.03 ± 0.18	8.60 ± 0.72	143.3 ± 0.8	4.58 ± 0.38	106.3 ± 0.8
	MEHP 70	7	9.80 ± 0.19	8.26 ± 0.48	143.2 ± 0.6	4.59 ± 0.23	107.0 ± 1.7
	MEHP 200	7	9.93 ± 0.31	8.39 ± 0.60	142.6 ± 0.8	4.65 ± 0.37	106.0 ± 2.7
	MEHP 700	5	9.87 ± 0.20	8.28 ± 0.74	141.9 ± 1.1	4.97 ± 0.28	106.5 ± 2.0
	DEHP 200	7	9.94 ± 0.39	8.38 ± 0.45	142.3 ± 1.1	4.73 ± 0.38	105.3 ± 1.9
	DEHP 700	7	10.08 ± 0.16	8.50 ± 0.51	141.5 ± 1.1**	4.71 ± 0.38	104.1 ± 0.9
	DEHP 2,000	7	9.90 ± 0.28	8.61 ± 0.57	142.0 ± 1.1	4.81 ± 0.18	104.8 ± 1.4

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 7. Organ weight

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Body weight (g)	Lungs (g)	Liver (g)	Kidneys (g)	Spleen (g)
Male	0	7	346 ± 28	1.20 ± 0.14	11.06 ± 1.37	2.59 ± 0.33	0.70 ± 0.16
	MEHP 70	7	330 ± 27	1.18 ± 0.07	11.48 ± 1.45	2.58 ± 0.27	0.59 ± 0.09
	MEHP 200	7	333 ± 23	1.16 ± 0.17	13.82 ± 1.68	2.61 ± 0.20	0.64 ± 0.12
	MEHP 700	5	316 ± 29	1.15 ± 0.14	15.97 ± 3.00**	2.66 ± 0.20	0.59 ± 0.11
	DEHP 200	7	369 ± 40	1.30 ± 0.19	15.68 ± 2.91**	2.88 ± 0.32	0.81 ± 0.12
	DEHP 700	7	359 ± 22	1.21 ± 0.11	18.06 ± 2.11**	2.77 ± 0.26	0.73 ± 0.12
	DEHP 2,000	7	306 ± 19	1.17 ± 0.09	19.52 ± 2.40**	2.69 ± 0.28	0.68 ± 0.08

Mean ± S.D.

Significant difference from control group;

*: P ≤ 0.05

**: P ≤ 0.01

Table 7. -continued Organ weight

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Adrenals (mg)	Testes (g)	Prostate (mg)	Seminal vesicle (g)	Epididymides (mg)
Male	0	7	52 ± 6	3.13 ± 0.23N	794 ± 277	0.70 ± 0.22	651 ± 53
	MEHP 70	7	48 ± 8	3.05 ± 0.14	852 ± 88	0.84 ± 0.11	687 ± 51
	MEHP 200	7	52 ± 12	3.10 ± 0.14	803 ± 108	0.77 ± 0.16	663 ± 52
	MEHP 700	5	48 ± 8	2.62 ± 0.66	631 ± 141	0.60 ± 0.26	614 ± 88
	DEHP 200	7	54 ± 9	3.09 ± 0.27	866 ± 146	0.77 ± 0.19	676 ± 83
	DEHP 700	7	46 ± 9	3.06 ± 0.19	865 ± 138	0.78 ± 0.11	672 ± 69
	DEHP 2,000	7	46 ± 6	1.06 ± 0.23**	633 ± 183	0.50 ± 0.20	430 ± 99**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 8. Organ weight per body weight

Exp. No. RD-07-007

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Body weight (g)	Lungs (%)	Liver (%)	Kidneys (%)	Spleen (%)
Male	0	7	346 ± 28	0.346 ± 0.034	3.190 ± 0.151N	0.748 ± 0.064	0.200 ± 0.031
	MEHP 70	7	330 ± 27	0.361 ± 0.026	3.471 ± 0.207	0.782 ± 0.038	0.179 ± 0.019
	MEHP 200	7	333 ± 23	0.348 ± 0.031	4.138 ± 0.282**	0.785 ± 0.059	0.192 ± 0.026
	MEHP 700	5	316 ± 29	0.363 ± 0.035	5.025 ± 0.511*	0.844 ± 0.023**	0.188 ± 0.031
	DEHP 200	7	369 ± 40	0.353 ± 0.025	4.222 ± 0.348**	0.781 ± 0.046	0.221 ± 0.026
	DEHP 700	7	359 ± 22	0.336 ± 0.019	5.026 ± 0.413**	0.771 ± 0.035	0.203 ± 0.035
	DEHP 2,000	7	306 ± 19	0.383 ± 0.026	6.384 ± 0.745**	0.877 ± 0.047**	0.221 ± 0.025

Mean ± S.D.

Significant difference from control group;

*: P ≤ 0.05 **: P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 8. -continued Organ weight per body weight

Exp. No. RD-07-007

Day: 29

Sex	Dose level (mg/kg/day)	No. of animals	Adrenals (%)	Testes (%)	Prostate (%)	Seminal vesicle (%)	Epididymides (%)
Male	0	7	0.015 ± 0.001N	0.910 ± 0.095N	0.227 ± 0.067	0.200 ± 0.055	0.189 ± 0.019
	MEHP 70	7	0.015 ± 0.003	0.930 ± 0.102	0.259 ± 0.023	0.254 ± 0.022	0.210 ± 0.031
	MEHP 200	7	0.016 ± 0.003	0.934 ± 0.087	0.243 ± 0.045	0.235 ± 0.061	0.200 ± 0.028
	MEHP 700	5	0.015 ± 0.002	0.842 ± 0.246	0.199 ± 0.032	0.187 ± 0.071	0.196 ± 0.034
	DEHP 200	7	0.015 ± 0.001	0.841 ± 0.059	0.234 ± 0.024	0.208 ± 0.040	0.184 ± 0.017
	DEHP 700	7	0.013 ± 0.002	0.853 ± 0.053	0.241 ± 0.036	0.217 ± 0.033	0.188 ± 0.021
	DEHP 2,000	7	0.015 ± 0.001	0.345 ± 0.062**	0.206 ± 0.055	0.164 ± 0.060	0.140 ± 0.028**

Mean ± S.D.

Significant difference from control group; *: P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

N: Non parametric analysis

Table 9. Summary of gross findings with statistical analysis (29 Days experiment) Exp. No. RD-07-007

Dose level (mg/kg/day) No. of animals necropsied Organ	Male animals						
	Am	Bm	Cm	Dm	Em	Fm	Gm
CARDIOVASCULAR SYSTEM							
heart	0	0	0	1	0	0	0
white patch							
HEMATOPOIETIC SYSTEM							
spleen	0	0	0	2	0	0	0
atrophic							
nodule	0	0	0	0	0	1	0
pale	0	0	0	2	0	0	0
white patch	0	1	0	1	0	1	1
atrophic	0	0	0	2	0	0	0
RESPIRATORY SYSTEM							
lung	1	0	1	1	1	0	0
brown patch							
reddish	0	0	0	2	1	0	0
DIGESTIVE SYSTEM							
stomach	0	0	0	2	0	0	0
dilated lumen							
red patch	0	0	0	1	0	0	0
small intestine							
dilated lumen	0	0	0	2	0	0	0
large intestine							
dilated lumen	0	0	0	2	0	0	0
dark	0	0	0	2	0	0	0
enlarged	0	0	1	3	2	1	6**
white patch	0	0	1	4	0	3	7**
URINARY SYSTEM							
kidney							
cyst	1	1	1	1	0	1	0
dark	0	0	0	2	0	0	0
dilated pelvis	0	0	1	0	1	1	0
scarred	0	1	0	1	0	1	1
REPRODUCTIVE SYSTEM							
testis							
small	0	0	0	2	0	0	7**
epidichymis	0	0	0	2	0	0	7**
prostate	0	0	0	1	0	0	2
seminal vesicle							
small	0	0	0	3	0	0	3

Am: 0 Bm: MEHP 70 Cm: MEHP 200 Dm: MEHP 700 Em: DEHP 200
 Fm: DEHP 700 Gm: DEHP 2000
 Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

Table 9. -continued Summary of gross findings with statistical analysis (29 Days experiment) Exp. No. RD-07-007

Dose level (mg/kg/day)	Male animals					
	Am	Em	Cm	Dm	Em	Gm
No. of animals necropsied	7	7	7	7	7	7
Organ						
Findings						
OTHERS						
whole body	0	0	0	2	0	0
wasting						
Am: 0						
Fm: DEHP 700						
Em: MEHP 70						
Gm: DEHP 2000						
Cm: MEHP 200						
Dm: MEHP 700						
Em: DEHP 200						
Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01						

Table 10. Summary of histological findings with statistical analysis (29 Days experiment)

Dose level (mg/kg/day) No. of animals necropsied	Male animals										
	Organ Findings		Am	Em	Cm	Dm	Em	Fm	Gm		
			(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
			0	0	0	1	0	0	0	0	0
			1	0	0	2	0	0	0	0	0
			2	0	1	3	0	4	2	2	2
			0	0	0	1	0	1	0	0	0
			0	1	0	0	0	0	0	0	0
			0	1	0	1	0	0	0	0	0
			(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
			0	0	0	7**	7**	5*	7**	7**	7**
			1	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	0	4	1	3	3	3	3
			0	0	0	0	0	0	0	1	1
			1	2	0	0	0	1	0	0	0
			0	0	6**	7**	4	7**	7**	7**	7**
			(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
			6	3	4	3	4	5	5	5	5
			1	1	1	1	0	1	0	0	0
			0	0	0	1	0	0	1	1	1
			4	6	6	6	6	6	6	6	6
			1	0	0	0	0	0	0	0	0
			0	0	1	0	1	2	0	0	1
			0	1	0	0	1	1	1	1	1
			(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
			0	0	0	1	0	0	0	6**	6**
			0	0	0	4	0	1	7**	7**	7**
			0	0	0	5*	0	2	0	0	0
			0	0	0	4	0	2	7**	7**	7**
			0	0	0	0	0	0	0	0	1
			Am: 0	Em: MEHP 70	Cm: MEHP 200	Dm: MEHP 700	Em: DEHP 200				
			Fm: DEHP 700	Gm: DEHP 2000							
			(): No. of animals examined microscopically at this site.								
			Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01								

Table 10. -continued Summary of histological findings with statistical analysis
(29 Days experiment)

Exp. No. RD-07-007

Dose level (mg/kg/day) No. of animals necropsied Organ	Male animals						
	Am	Bm	Cm	Dm	Em	Fm	Gm
7	7	7	7	7	7	7	7
REPRODUCTIVE SYSTEM							
testis							
multinucleated giant cell	0	0	0	1	0	0	2
interstitial cell hyperplasia	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
epididymis							
cell debris, lumen	0	0	0	4	0	1	2
no sperm	0	0	0	0	0	0	6**
decrease, sperm	0	0	0	2	0	5*	1
ENDOCRINE SYSTEM							
adrenal gland							
infarct	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)	(7)
vacuolation, glomerulosa cell, diffuse	0	0	0	1	0	0	0
focal hypertrophy, cortex	0	0	2	4	3	5*	6**

Am: 0 Bm: MEHP 70 Cm: MEHP 200 Dm: MEHP 700 Em: DEHP 200
 Fm: DEHP 700 Gm: DEHP 2000
 (): No. of animals examined microscopically at this site.
 Significant difference from control group; * : P ≤ 0.05 ** : P ≤ 0.01

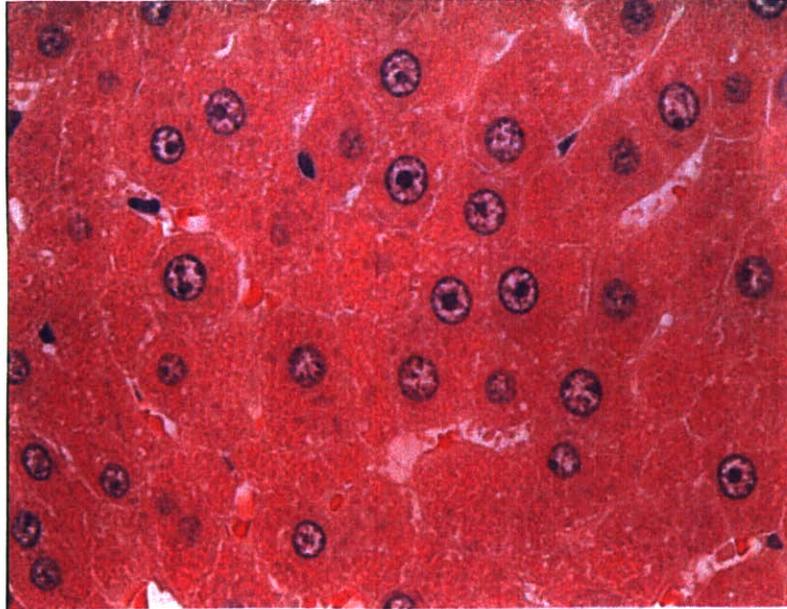


写真1 DEHP 2000 mg/kg 投与群の肝

著明に腫大した肝細胞の細胞質内に好酸性に富む微細顆粒が充満しており、核小体の肥大、核の大小不同も認められる。

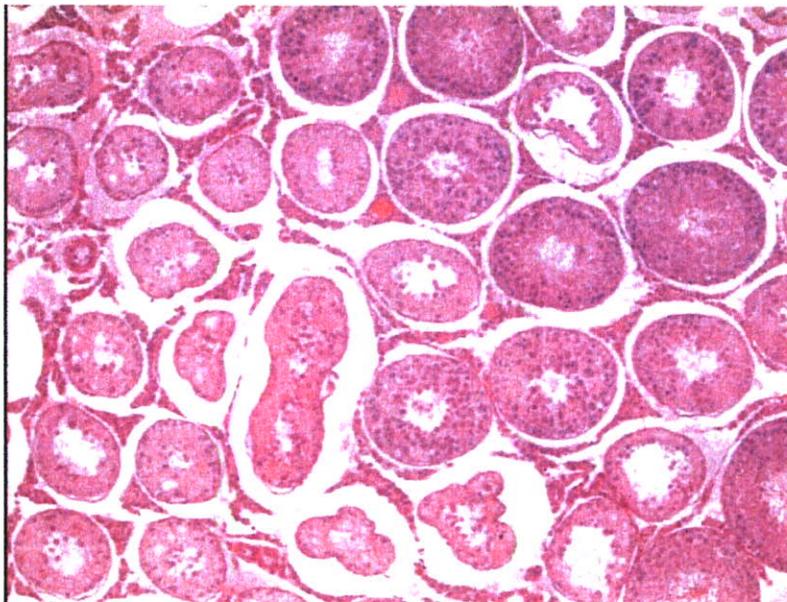


写真2 DEHP 2000 mg/kg 投与群の精巣

管腔内に全く精上皮細胞が観察されずセルトリ細胞のみが存在する精細管、精上皮細胞が部分的に欠落して精母細胞とセルトリ細胞で構成される精細管あるいは精子は消失しているがその他に著変の認められない精細管など様々な段階の精子形成阻害が観察される精細管が混在している。これに伴って Leydig 細胞の増生も認められる。

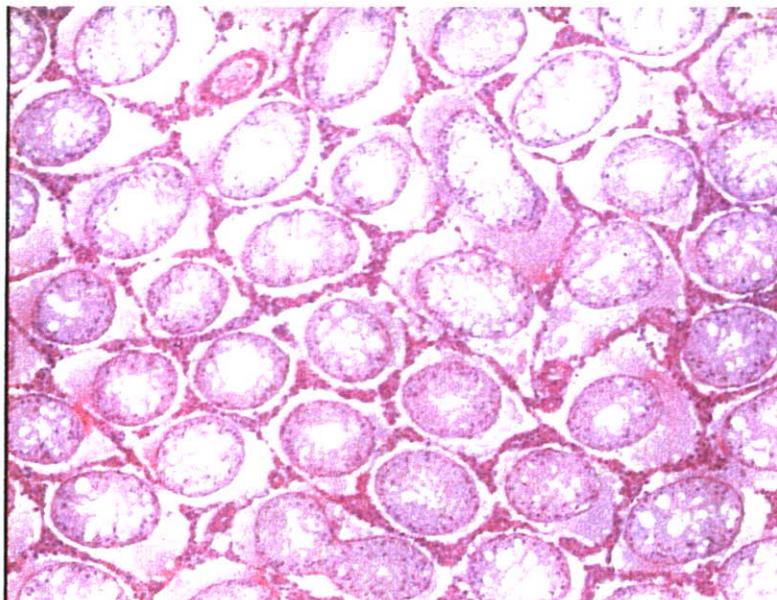


写真3 DEHP 2000 mg/kg 投与群の精巣

ほとんどすべての精細管管腔内には精上皮細胞が観察されず、セ
ルトリ細胞のみが残存している (Sertoli only syndrome)。間質では
Leydig 細胞の著明な増生も観察される。

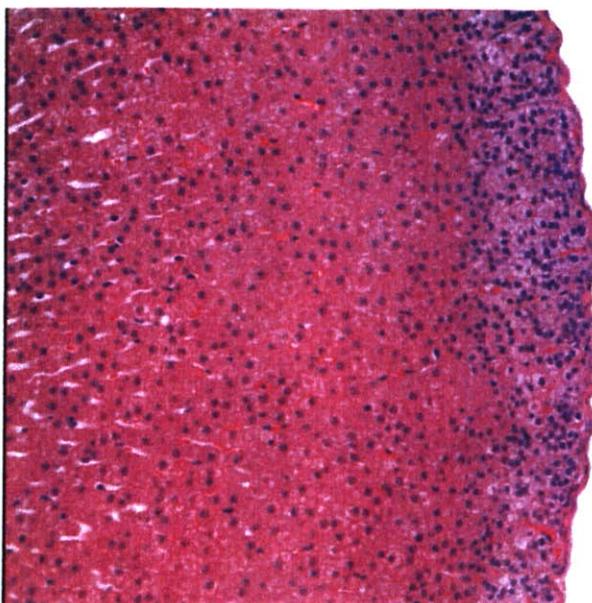


写真4 DEHP 2000 mg/kg 投与群の副腎

副腎球状帯細胞は慢性に軽度に腫大し、細胞質の泡沫状空胞化
が認められる。このために球状帯と束状帯の境界は明瞭となっている。

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 の比較毒性的研究—

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

分担研究者：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

研究要旨

マウスを用いた 28 日間反復投与実験において、DEHP より強く MEHP に誘発された腎毒性の障害機序を詳細に把握する目的で、本研究では、雄性マウスに MEHP 及び DEHP を単回強制経口投与し、腎の遺伝子発現変動解析を行った。その結果、MEHP に特有の腎標的として、スフィンゴシン-1-リン酸シグナルカスケードが抽出された。

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。本研究班では、その為の反復投与毒性試験が、関連物質 DEHP と共に実施されている。マウスを用いた 28 日間強制経口投与実験において、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。本分担研究では、DEHP との比較において、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を実施した。今年度は、DEHP、MEHP 両物質単回投与時の腎に及ぼす遺伝子発現変動を比較・解析し、MEHP 誘発腎障害機序をより詳細に把握することを試みた。本研究の結果は MEHP の安全性評価に大きく貢献することが期待される。

B. 研究方法

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、Percellome 法による網羅的

遺伝子発現変動解析を検討した。各用量の設定は、予備実験結果によった。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。投与容量は 10 (ml/kg)、溶媒はコーンオイル (シグマ社製) とした。MEHP (CAS No. 4376-20-9) は和光純薬 (Cat No. 327-65641) (HPLC で純度 99%) のものを、DEHP (CAS No. 117-81-7) は東京化成 (Cat No. P0297) (純度 98%以上) のものを使用した。なお、この DEHP に MEHP が含まれていない (0.0%) ことを GC 分析により確認済みである。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月版)」が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

腎の遺伝子発現変動解析を、特に MEHP 誘発腎障害機序の詳細な把握に留意して、比較検討した。以下、遺伝子発現プロファイルとして 3 種すなわち、遺伝子発現が 1) MEHP 投与で変動し DEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子、2) DEHP 投与で変動し MEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子、3) 投与により、両者で共通して

変動する遺伝子、に分けて結果を記載する。

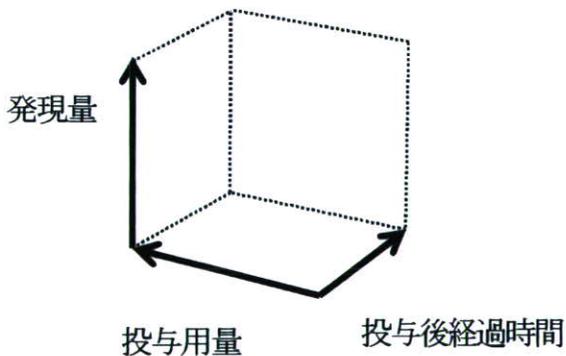
C-1) 腎において発現が、MEHP 投与で変動し DEHP 投与では顕著に変動しない遺伝子：

解析の結果、腎において発現が、MEHP 投与で増加し 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(S1P)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。この代表的な遺伝子の変動を図1に示す。

なお以降、図はすべて下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフとして示す。

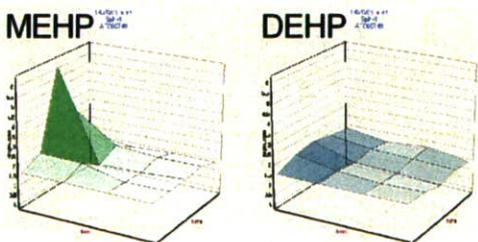
S1Pは脂質シグナル分子であり、細胞膜のスフィンゴシンが、スフィンゴシンキナーゼ(Sphk1 遺伝子)によりリン酸化され生成され細胞外に放出される。このS1Pの受容体がEDG受容体(Edg1分子等)である。なお、このスフィンゴシンは、セラミドからセラミダーゼ(Asah31分子等)により生成される。

その他、酸化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。



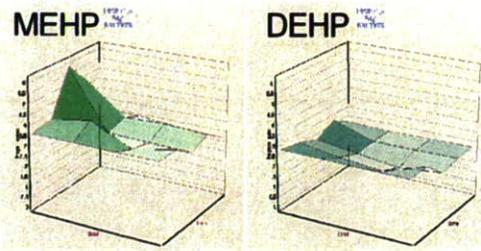
A) Sphk1 遺伝子

[sphingosine kinase 1]



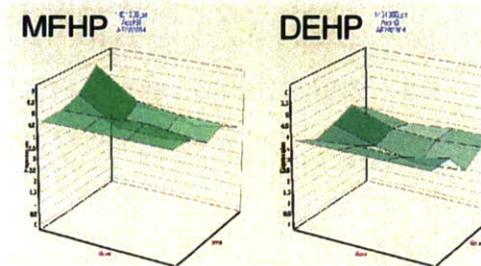
B) Edg1 遺伝子

[endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1]



C) Asah31 遺伝子

[N-acylsphingosine amidohydrolase 3-like]



D) Sgms1 遺伝子

[sphingomyelin synthase 1]

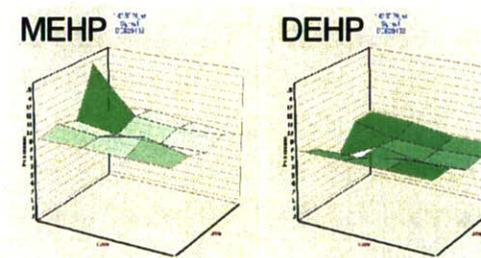


図1 スフィンゴシン-1-リン酸シグナルカスケードに関与する遺伝子の発現変動

-DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較-

(A: Sphk1、B: Edg1、C: Asah31、D: Sgms1)

C-2) 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：

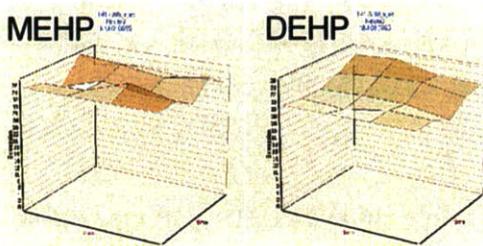
解析の結果、腎において発現が、DEHP 投与で変動し

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。この増加量は、先に示した S1P シグナル関連遺伝子および、後で示す PPAR 関連遺伝子のもとの比較し低いものであった。以下に、この代表的な遺伝子を示す (図 2)。

この複合体 I 分子は、脱共役剤でありマメ科植物のデリス根部に含まれる毒の主成分ロテノンの標的分子であることから、DEHP は、弱いながらも、電子伝達系の阻害作用とそれに続く活性酸素の産生増加、細胞内 ATP の低下作用を有する可能性が示唆された。

A) Ndufa2 遺伝子

[NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2]



B) Ndufs2 遺伝子

[NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2]

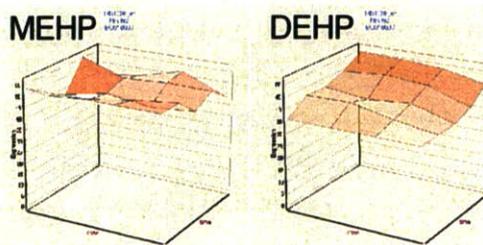


図2 ミトコンドリア電子伝達系の複合体Iを構成する遺伝子の発現変動

- DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較-

(A: Ndufa2, B: Ndufs2)

C-3) 腎において発現が、投与により DEHP、MEHP 両者で

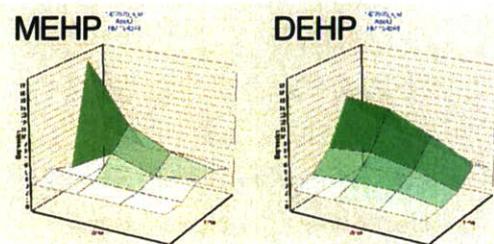
共通して変動する遺伝子:

解析の結果、腎において発現が、投与により DEHP、MEHP 両者で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、Acsl1、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。このシグナルカスケードに加えて、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 (Fabp1、Adfp、Sgk、Scnn1、UCP2 遺伝子など)。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。なお、PPAR α 、PPAR γ 、RXR については顕著な発現変動は認められなかった。

以下に、これらの遺伝子のうち代表的なものを示す (図 3)。

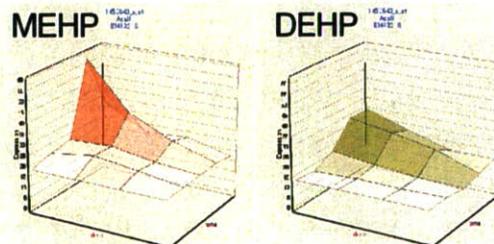
A) Acot3 遺伝子

[acyl-CoA thioesterase 3]



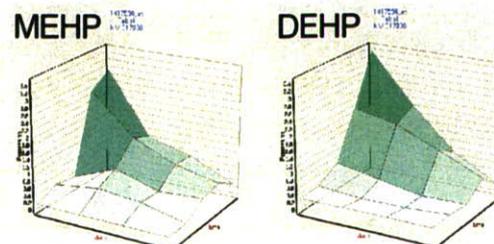
B) Acsl1 遺伝子

[acyl-CoA synthetase long-chain family member 1]



C) Fabp1 遺伝子

[fatty acid binding protein 1]



D) Ucp2 遺伝子

[uncoupling protein 2]

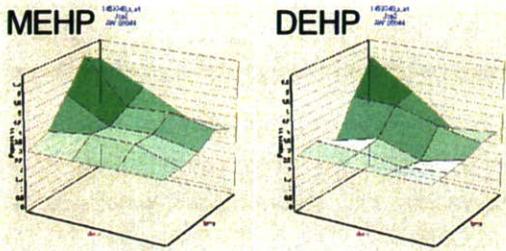


図3 PPAR α および PPAR γ のシグナルカスケードに関係する遺伝子の発現変動

- DEHP 投与時と MEHP 投与時との比較-

(PPAR α : Acot3(A)、Acs11(B); PPAR γ : Fabp1(C)、UCP2(D))

D. 考察

以上の 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(S1P)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。

1) の S1P シグナルカスケードと腎障害との関連性については不明な点が多い。この点、Kim ら(Kim et al, J Toxicol Environ Health A 69: 2071-2082, 2006)は、セラミド合成酵素阻害作用を有するかび毒「フモニシン」投与により誘発されるマウスでの腎障害時(尿細管の拡張と壊死)に腎での S1P 量が有意に増加することを報告している。また、*in vitro* 実験において、5 μ M の S1P が、ヒト近位尿細管由来細胞株(HK-2)の細胞死を引き起こすことが報告されている(Iwata M et al, Proc Natl Acad Sci U S A 92: 8970-8974, 1995)。これらの報告は、S1P シグナルカスケードが、腎尿細管の障害に関与することを示唆しており、本解析結果を支持するものと考えられた。また S1P シグナル以外でも、Sesn1、Srxn1 遺伝子など酸化的ストレス時に誘導される遺伝子の発現変動も認められているが、これらの分子と S1P シグナルとの関連は不明である。今後、この

腎障害における S1P シグナルカスケードの分子機序について、さらに検討が必要であるものと考えられた。

一方、DEHP は生体内で MEHP に代謝されることが報告されているため、DEHP 投与時も MEHP 投与時と同様にこの S1P カスケードに影響を与えてもよいものと考えられる。影響が認められない理由として、1) MEHP の作用が、細胞外から働く場合と、DEHP の細胞内代謝を介して細胞内から働く場合とで異なる可能性、2) DEHP が腎においては MEHP に代謝されにくく、MEHP 生成量が少ない可能性、が考えられた。今後、より詳細な検討が必要なものと考えられた。

2) のミトコンドリア電子伝達系への影響については、単離肝ミトコンドリアを用いた *in vitro* 実験において、DEHP では影響がほとんど認められないが、その代謝物 MEHP がミトコンドリア呼吸鎖の複合体 II (succinate dehydrogenase) を阻害するという報告がある(Melnick and Schiller, Environ Health Perspect 45: 51-56, 1982)。他方、本解析結果では、腎において DEHP が複合体 I (NADH dehydrogenase) に影響を与える可能性が示唆され、MEHP にはこの発現への影響は認められず、また DEHP、MEHP 投与時共に、複合体 II の遺伝子発現変動は認められないことから、従来の報告とは異なるものとなった。今後、DEHP には MEHP と異なり、複合体 I に作用する可能性という観点からの検討が必要なものと考えられた。ただし、この発現変動は、比較的軽微であることに留意する必要がある。

3) の DEHP、MEHP 共に PPAR α 受容体を介したシグナルカスケードを活性化することに関して、DEHP が肝において PPAR α 受容体を活性化し、ペルオキシゾーム増生を通じ、脂肪酸の β 酸化をはじめ脂質代謝関連遺伝子の発現上昇を引き起こすことはよく知られている。本解析結果は、DEHP、MEHP 投与時、腎においてもペルオキシゾーム関連遺伝子の発現が増加することを明らかにした。最近になって、DEHP 誘発糸球体腎炎が、PPAR α 受容体欠失マウスでも認められたことから、DEHP による腎障害には PPAR α 受容体は関与せず、酸化的ストレスが関与する可能性を示唆する報告がなされた(マウスでの 22 ヶ月混餌投与実験)(Kamijo et al, J Am Soc Nephrol 18: 176-188, 2007)。したがって、MEHP 投与で認められたマウス腎障害に PPAR α 受容体は関与しない可能性が示唆された。

他方、3) の DEHP、MEHP 共に 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に関し、最近になって、MEHP が 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報告され、本解析結果を支持するものと考えられた(Feige et al, J Biol Chem 282: 19152-19166, 2007)。PPAR γ 受容体作動薬(抗2型糖尿病薬)投与時の副作用として腎障害の報告は少なく、PPAR γ 受容体と腎障害については不明な点が多いため、今後、検討が必要である。なお、最近になって、PPAR γ 受容体欠失マウスを用いた実験により、PPAR γ 受容体作動薬(チアゾリジンジオン)投与時の副作用である浮腫は、PPAR γ 受容体の標的分子である尿細管のNaチャンネル(Scnn1)の発現誘導によりNa⁺の再吸収が亢進するため引き起こされる、という報告がなされた(Guan Y et al, Nat Med 11: 861-866, 2005)。このNa⁺チャンネル(Scnn1)の遺伝子発現増加は、本実験でも認められている。

E. 結論

今年度我々は、マウスを用いた28日間強制経口投与実験において、MEHP投与群ではDEHP投与群と比べ、肝障害、精巣障害に比較し腎障害が、より強く発現することを見いだした。そこで本分担研究では、このMEHP誘発毒性をより詳細に把握する目的で、雄性マウスにMEHP及びDEHPを単回強制経口投与し、腎の遺伝子発現変動解析をおこなった。その結果、1) MEHPはDEHPと異なり、S1P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。したがって、MEHPの腎標的性には、MEHP投与時に発現が誘導され、DEHP投与時には発現変動が認められなかった、S1Pシグナルカスケードが関与する可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表(平成19年度分)

1. 論文発表

1) 書籍

1) 菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、高木篤也、小川幸夫、児玉幸夫
Special Review: 「Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み」監修: 澤 明、細胞工学 特集 精神疾患研究の新たな戦略 vol. 26 No. 1, 2007、秀潤社、東京、2007年、71-77 ページ

2) 菅野 純、相崎 健一、五十嵐 勝秀、北嶋 聡、中津 則之、児玉幸夫、高木篤也

「トキシコゲノミクスの新展開-Percellome Project による2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF比較-」監修: 加藤茂明、細胞工学 特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす vol. 26 No. 12, 2007、秀潤社、東京、2007年、1391-1396 ページ

2. 学会発表

(発表誌名、巻号、ページ、発行年も記入)

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

H. 知的所有権の出願・取得状況

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