

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)

### 総合研究報告書

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)

総合研究報告書

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. 総合研究報告書

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

(資料1)平成 18 年度

- 1) ラットを用いた反復投与毒性試験による MEHP と DEHP の比較研究
- 2) マウスを用いた反復投与毒性試験による MEHP と DEHP の比較研究
- 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
- 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

(資料 2)平成 19 年度

- 1) MEHP および DEHP のラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験
- 2) マウスを用いた反復投与毒性試験による MEHP と DEHP の比較研究
- 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
- 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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ……109

III. 研究成果の刊行物・別刷 ……111

別添 3

# I . 総合研究報告書

I. 総合研究報告書

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

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単回経口投与試験あるいは短期連続経口投与試験を実施した。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、マウス、ラットともに高用量群で神経障害が発現する可能性が示唆され、さらに、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。文献調査の結果、MEHP が PPAR  $\alpha$  のみならず PPAR  $\gamma$  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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、cAMP、アセチルコリン受容体等へ影響を及ぼすことが明らかとなった。

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をおいて、齧歯類を用いて単回およ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および文献調査を行うことを主な目的とした。

## B. 研究方法

### 1. MEHP および DEHP の濃度測定法の適正確認とコーンオイル中での安定性の確認

MEHP あるいは DEHP をコーンオイルに溶解して 1 および 400 mg/mL 溶液を調製し、テトラヒドロフランに溶解した 0.01～0.1 mg/mL の MEHP あるいは DEHP 溶液を標準溶液として、HPLC による MEHP あるいは DEHP 濃度の測定方法の適正を確認した。さらに、MEHP あるいは DEHP の 1 および 400 mg/mL コーンオイル溶液を調製して、冷蔵庫内で 9 日間保存しさらに室温で 24 時間放置した後、調製中の MEHP および DEHP の安定性を確認した。

### 2. MEHP および DEHP のマウスにおける急性経口投与毒性試験

生後 6 ヶ月の雄性 C57BL/6CrSlc (体重 25.0～31.0 g) にコーンオイルに溶解した MEHP を 300 mg/kg、1,000 mg/kg、2,000 mg/kg、DEHP を 5,000 g/kg の用量で金属性ゾンデを用いて単回経口投与した。投与日を 0 日と起算し、投与後 14 日まで一般状態の観察、死亡の有無の確認、体重測定を行い、死亡動物については発見後直ちに、投与後 14 日まで生存した動物はエーテル麻酔下で放血により致死させ、剖検した。

### 3. MEHP および DEHP 7 日間連続経口投与によるマウス、ラットにおける毒性プロファイルの確認

生後 6 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (SPF、

日本 SLC) を 1 群 4 匹からなる 7 群に分け、1 群を対照群とし、他の 3 群に MEHP 500 mg/kg、150 mg/kg あるいは 50 mg/kg、または DEHP 1,500 mg/kg、500 mg/kg あるいは 150 mg/kg を、金属性胃ゾンデを用いて 1 日 1 回、7 日間経口投与した。投与期間中は、毎日動物の一般状態を観察し、体重および摂餌量を測定した。最終投与日の翌日に、全例についてエーテル麻酔下で採血して、型の如く血液学的検査、血液生化学的検査を実施するとともに、剖検して、脳、心、肺、肝、腎、脾、精巣及び精巣上体について重量測定後、常法に従い HE 染色標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。

また、生後 5 週齢の雄性 CrI: CD (SD) ラット [SPF] を 1 群 3 匹からなる 4 群に分け、1 群を対照群とし、他の 3 群には MEHP を 1 日 1 回それぞれ 200、700 あるいは 2,000 mg/kg の用量で、テフロン製胃ゾンデを用いて 7 日間強制経口投与した。投与期間中は毎日動物の一般状態を観察し、生死の確認を行うとともに、投与開始日 (投与 1 日とする)、3、5 および 7 日に体重および摂餌量を測定した。死亡例は可及的速やかに剖検した。投与期間終了時の計画解剖動物は、エーテル麻酔下で放血によって安楽死させた後剖検して、肝、心および精巣の重量を測定し、肝、心、精巣および肉眼観察において異常が認められた器官・組織について常法に従って HE 染色標本を作製したほか、精巣は免疫組織化学的にビメンチン染色を施して光学顕微鏡にて観察した。

### 4. MEHP および DEHP のラット、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: 生後 6 週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス (SPF、日本 SLC) を 1 群 10 匹からなる 8 群に分け、コーン油に溶解した DEHP あるいは MEHP を、下表に示す用量で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。なお、対照群にはコーン油を同様に投与した。

群構成および投与用量

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

投与開始日を投与第1日とし、投与期間中は毎日動物の一般状態の観察を行い、投与第1日、8日、15日、22日および29日に体重を、投与第8日、15日、22日および28日に摂餌量を測定した。最終投与日の翌日にエーテル麻酔下で全例から採血し、型の如く血液学的検査、血液生化学的検査を実施した。血液試料採取後、動物を剖検し、脳、心、肺、胸腺、肝、腎、脾、精巣および精巣上体の重量を測定した後、常法に従い HE 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。

2) ラットにおける28日間投与毒生試験: 生後5週齢の雄性 Crl: CD(SD) [SPF] ラット(日本チャールス・リバー)を下表のように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

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	1201~1207
4	MEHP 700	1301~1307
5	DEHP 200	1401~1407
6	DEHP 700	1501~1507
7	DEHP 2,000	1601~1607

MEHP および DEHP はコーン油に溶解し、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。なお、対照群にはコーン油を同様に投与した。投与開始日を投与第1日とし、毎日動物の一般状態を観察し、投与第1、8、15、22および28日目に体重および摂餌量を測定した。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検査前日(投与終了日)から16時間以上絶食させた後、エーテル麻酔下で採血し、型の如く血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査を実施した。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、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、常法に従って HE 染色標本を作製し鏡検した。

5. マウスの腎臓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

生後6週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウスに、コーンオイルに溶解した MEHP (0、70、200、700 mg/kg)、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肝・腎・精巣各 mRNA につき、マイクロアレイ[Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0]を用いて、Percellome 法により網羅的遺伝子発現変動を解析した。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。

6. 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実施するとともに、主として標的臓器であることが示されている精巣、心、神経毒性、腎毒性に焦点をあてて情報収集を行い、MEHP の毒性研究の現状についてとりまとめた。

(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 の濃度測定法の適正確認とコーンオイル中での安定性の確認

コーンオイル中の MEHP および DEHP の HPLC を用いた濃度測定法は、注入再現性、直線性、特異性、真度および併行精度ならびに実測試料の安定性の結果から適正であると判断した。また、MEHP および DEHP の 1 および 400 mg/mL コーンオイル溶液は、冷蔵庫内で 9 日間保存し、さらに室温で 24 時間放置した場合、何れも安定であることが確認された。

#### 2. MEHP および DEHP のマウスにおける単回経口投与毒性試験

DEHP 投与においては 5,000 mg/kg 投与でも死亡は認められなかったが、MEHP 投与群では 300 mg/kg 投与で 0/3 例、1,000 mg/kg 投与で 1/3 例および 2,000 mg/kg 投与で 3/3 例の死亡が認められ、MEHP の LD<sub>50</sub> 値は 1,000~2,000mg と推定された。MEHP の死亡例では一過性の間代性痙攣が認められた。

#### 3. MEHP および DEHP 7 日間連続経口投与によるマウス、ラットにおける毒性プロファイルの確認

7 日間反復投与試験では、一般状態観察において、MEHP 500 mg 群の 1 例で投与 3 日の投与直後に腹臥と間代性痙攣が観察された。MEHP 投与群ではさらに、500 mg 群において血液学的検査ではヘモグロビン量の有意な減少が認められ、血液生化学的検査では、クレアチニンおよび総コレステロールの有意な増加が認められた。病理所見として、500 mg 群で、肝細胞の肥大を伴っ

た肝重量の増加があり、腎重量の増加傾向も認められた。一方、DEHP 投与群では一般状態に著変は認められなかったが、1,500 mg 群で血中の尿素窒素及び ALT が有意に増加した。病理学的検査では 1,500 mg 群で肝細胞の肥大を伴った肝重量の増加があり、さらに同群の 1 例で精巢の精上皮細胞の変性、脱落が見られた。

MEHP 投与ラットでは、2,000 mg 群で投与 2 日の投与後に間代性痙攣、流涎、自発運動低下および腹臥、体温低下、流涙、呼吸異常などを伴って全例が死亡した。死亡例の剖検所見として全例の前胃に白色斑、十二指腸および空腸に水様性内容物の貯留、空腸に内腔の拡張が観察され、組織学的所見として死亡例全例の肝に小葉中心性の肝細胞の細胞質内に好酸性顆粒状変化が観察された。さらに、一部の動物の精巢では精細胞の変性とセルトリ細胞の空胞化が認められたほか、セルトリ細胞内のビメンチンの減少、凝集が観察された。200 および 700 mg 群では MEHP 投与に起因したと考えられる一般状態の変化はなく死亡例も認められなかったが、病理学的検査で 200 および 700 mg 群で小葉中心性の肝細胞の肥大、肝細胞細胞質の好酸性顆粒状変化があり、700 mg 群で精上皮細胞の変性と精細管腔内への脱落、セルトリ細胞内のビメンチンの減少・凝集が観察された。

#### 4. 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、1,500 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。血液生化学的検査で 500 mg 投与以上の群で Alb および A/G 比の有意な減少と CRN および T-Chol の有意な増加があり、1,500 mg 群では、T-Bil の有意な減少と ALP および ALT の有意な増加も認められた。病理学的検査では、肝肥大が 500 mg 群で 1 例、1,500 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、1,500 mg 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 1,500 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 1,500 mg 群で、それぞれ 1、1、4 および 9 例に観察された。さらに、精巣においては 1,500 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明らかな差は認められなかったが、500 mg 群において血液学的検査では、Hb、MCV および MCH の有意な減少と WBC の有意な増加が、血液生化学的検査では 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 500 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 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 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、T-Bil が 700 および 2,000 mg 群で、ALT が 2,000 mg 群で、ALP 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 の上昇傾向が認められた。病理学的検査では、肝において、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 700 mg/kg 群の一部の例で暗色化、白色斑も観察された。また、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、肝臓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、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 以上の投与群に認められ、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、200 mg 群に肝細胞の巣状壊死が認められた。精巣では、700 mg 以上の投与群に 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 以上の投与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 群のそれぞれ3、5、6例に球状帯細胞のび慢性空胞化が観察された。

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を、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。切迫屠殺された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。血液凝固能検査の結果、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、T-Bill 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、ALT および ALP 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 群の1例、700 mg 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、肝では肝細胞細胞質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。

##### 5. マウスの腎臓に対する作用の遺伝子発現解析によるMEHPとDEHPの比較

雄性マウスに、MEHP(0、70、200、700 mg/kg)、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)にサンプリングして肝臓および精巣のmRNAにつき、遺伝子発現変動解析を検討した。肝においては両物質共に、Cyp4a10、Acsl1、Hsd12、Slc25a20 など PPAR $\alpha$  活性剤投与時あるいは CAR $\beta$  活性剤投与時に発現が誘発された遺伝子と共通のものが多く認められたが、肝において両物質で発現パターンが異なる遺伝子群として Utk1 遺伝子および Ipmk 遺伝子が見いだされた。

精巣においては、両物質共に、精巣の筋様細胞(myoid細胞)に発現し、細胞骨格や細胞の収縮に関与する遺伝子 Tpm (tropomyosin)、Acta (alpha smooth muscle actin)、Cald (caldesmon)の用量依存的な増加が認められた。また、精巣において両物質で発現パターンが異なる遺伝子群と

して Mrpl13 遺伝子、Fyb 遺伝子および Cyp4f18 遺伝子が見いだされた。

腎では、遺伝子発現が 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、Asah3l、Sgms1 遺伝子)が見いだされたほか、酸化ストレス時に誘導される Sesn1、Sesn2、Srxn1 遺伝子およ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。一方、DEHP 投与で増加し 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)が見いだされた。また、DEHP、MEHP 投与により共通して増加する遺伝子として、PPAR $\alpha$  のシグナルカスケードに関係する遺伝子群 (Cebpb、Acot3、Acs1l、Crat、Hacl1、Pex11a 遺伝子など)が見出されたが、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。さらに、Fabp1、Adfp、Sgk、Scnn1、UCP2 遺伝子など PPAR $\gamma$  のシグナルカスケードに関係する遺伝子群の発現も増加したが、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。

## 6. 文献、国際動向に関する調査研究

これまでに、*in vivo* における MEHP の肝毒性に関する報告として、500 mg/kg/日の用量で 14 日間経口投与すると肝相対重量の増加、肝 P-450 の増加、ペルオキシソーム系酵素活性の増加が報告されている (Lake BG et al. 1984)。一方、精巣毒性に関しては、ラットにおける Teirlyick O.ら (1988) の報告、ラットおよびシリアンハムスターにおける Gray TJB ら (1982) の報告、マウスにおける Giammona CJ らの報告 (2002) などがある。さらに、ラットのセルトリ細胞を用いた *in vitro* の系では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ている (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)。ラットに MEHP を単回強制経口投与すると、短時間内に精巣で Germ cell の分離・脱皮とセルトリ細胞内で細胞骨格を構築する中間フィラメント、ビメンチンの崩壊にともなって 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) ほか、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)。

フタル酸の腎毒性に関しては、B6C3F1 マウスに DEHP を飼料に添加し、104 週間投与すると雌雄に、1500 ppm で雌に慢性進行性ネフロパチーが惹起されること (David RM et al., 2000)、B6C3F1 マウスに DEHP を飼料に添加し、104 週間投与すると 1,500 ppm 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)、DEHP 混入飼料を PPAR $\alpha$  ノックアウトマウスに与えると腎障害が見られないことが報告されている (Kamijo Y et al.)。しかし、MEHP に関しては腎毒性に関する報告はなく、MEHP と腎障害との関連を示唆する研究として、唯一 *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 は用量に依存して細胞の生存率が低下し、F-actin も減少するが、2-EHP では変化はなかったことが報告されている (Rothenbacher K et al., 1998)。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。

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。本研究において、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、ラットともに肝臓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と比較すると、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1:3を著しく超えていた。

遺伝子発現変動の網羅的解析において、肝では薬物代謝酵素の誘導に関連したCyp2b10遺伝子発現の誘導のみならずCAR $\beta$ 活性化作用を有する可能性が示唆されたほか、精巣においては、DEHP、MEHP共に細胞骨格や細胞の収縮に影響を与える遺伝子発現が変化している可能性が示唆された。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- $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )にリガンドとして結合した結果、引き続いて起きるPPAR $\alpha$ 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すると短時間内に精巣でGerm cellの分離・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き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に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 $\omega$ -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いる。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 $\alpha$ 受容体およびPPAR $\gamma$ 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。これらの遺伝子変化が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。

また、本研究において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)までに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、700 mg/kg の MEHP を連続経口投与したラットの一部分に消化管障害を伴った一般状態の悪化が観察され、間代性痙攣が発現した。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 $\alpha$  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、精巢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 $\alpha$  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 の毒性評価にあ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と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

MEHP、DEHP をマウスあるいはラットに単回ないし短期間連続経口投与すると、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巢毒性が確認された。また、MEHP 投与群では、マウス、ラットともに高用量群で神経障害が発現する可能性が示唆され、さらに、マウスでは DEHP、MEHP 投与により腎尿管障害が起きるが、MEHP は DEHP と比較して肝、精巢よりも腎標的性が高いことが明らかにされた。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。文献調査の結果、MEHP が PPAR $\alpha$  のみならず PPAR $\gamma$  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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase、cAMP、アセチルコリン受容体等へ影響を及ぼすことが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 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
- 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、細胞工学、26、1391-1396、2007

### 2. 学会発表

- 1) 北嶋 聡、発生毒性の Percellome トキシコゲノクス解析 第 1 回毒性オミクスフォーラム(第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会との共催) 2006 年 7 月
  - 2) 北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、中津 則之、相賀 裕美子、菅野 純、Percellome 手法を用いた遺伝子発現変動解析の発生毒性実験への適用 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 2006 年 7 月
  - 3) 高木篤也、北嶋 聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎 健一、菅野純、Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 2006 年 7 月
  - 4) 五十嵐 勝秀、中津 則之、相崎 健一、北嶋 聡、児玉 幸夫、菅野 純、核内受容体作動性物質による遺伝子発現変動の Percellome 解析 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 2006 年 7 月
  - 5) 相崎 健一、中津 則之、北嶋 聡、五十嵐 勝秀、菅野 純、Percellome データ解析システム (Millefeuille システム) の開発 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 2006 年 7 月
  - 6) 中津 則之、北嶋 聡、相崎 健一、五十嵐 勝秀、児玉 幸夫、菅野 純、Percellome 手法を用いた Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 2006 年 7 月
  - 7) Takagi A, Kitajima S, Nakatsu N, Igarashi K, Aisaki K and Kanno J, Global gene expression profiling in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies. 第 20 回国際生化学・分子生物学会議/第 29 回日本分子生物学会年会 2006 年 6 月
  - 8) 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
  - 9) 高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、マウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子発現パターンの解析 (その2)、第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会、2007 年 6 月、東京
  - 10) 高木篤也、北嶋聡、中津則之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分化系における分化マーカー遺伝子の発現パターンの解析、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会、2006 年 7 月、名古屋
  - 11) TAKAGI A, KITAJIMA S, NAKATSU N, IGARASHI K, AISAKI K and KANNO J, Global gene expression profiling in mouse embryonic stem cells and embryoid bodies. 20th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006 年 6 月、京都
- 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

## 資料 1-1)

### ラットを用いた反復投与毒性試験による MEHP と DEHP の比較研究 分担研究者 今井 清財 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター

**研究要旨** 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実施する、「MEHPのラットを用いた28日間反復経口投与毒性実験」に先立って、当該実験を実施するために必要な基礎的な情報を得るために、MEHP および DEHP を動物に投与する際の投与液中の濃度測定法の確認および投与液中の両化合物の安定性の確認ならびに用量設定および MEHP の毒性プロファイルの把握のためのラットにおける7日間反復経口投与毒性実験を実施した。

その結果、コーンオイル中の MEHP および DEHP の濃度測定に HPLC による測定法を利用することが可能あり、コーンオイル中の MEHP および DEHP は少なくとも9日間冷蔵保存後24時間室温に放置しても安定であることが明らかにされた。さらに、雄ラットに2,000 mg/kg、700 mg/kg あるいは200 mg/kg の用量で MEHP を7日間連続経口投与した結果、2,000 mg/kg 投与群では2日目の投与直後に間代性痙攣、流涎、自発運動低下、腹臥位、体温低下、異常呼吸などを伴って、投与後約90～180分で全例が死亡した。また、200mg/kg 以上の投与群で肝臓においては小葉中心性に肝細胞の肥大を伴った細胞質の好酸性顆粒状変化が認められ、2,000 mg/kg および700 mg/kg 投与群の精巣において Sertoli 細胞の空胞化を伴った精細胞の変性が認められた。

以上の結果から、「28日間反復経口投与毒性試験」では700 mg/kg/day 付近を最高用量に設定するのが適切であると考えられる。

#### A. 研究目的

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 Mono-ethylhexylphthalate (MEHP) が溶出することが報告されたが、MEHP の毒性はほとんど検証されていない。一方、MEHP と化学構造的に類似体である Di-ethylhexylphthalate (DEHP) に関しては、豊富な実験成績に基づいた毒性評価が行われてきており、肝毒性、精巣毒性および生殖発生毒性を有することが確認されている<sup>1)</sup>。特に肝毒性はペルオキシゾームの増殖による肝肥大と薬物代謝酵素の誘導を特徴とし<sup>2)</sup>、精巣毒性の発現発現機序としては Sertoli 細胞の細胞骨格を構成するアクチ

ンフィラメントあるいは中間径フィラメントの機能障害に基づく可能性が指摘されており<sup>3)、4)</sup>、さらに生殖発生毒性の発現には内分泌かく乱作用が関与していると考えられている<sup>5)</sup>。これまでの研究から、DEHP は生体内のリパーゼにより MEHP に代謝され、MEHP が毒性を惹起すると報告されている<sup>1)</sup>。一方、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* の実験において明らかにされているもの<sup>6)、7)</sup>、*in vivo* においては MEHP の毒性はほとんど検証されておらず、わずかに数日程度の反復投与実験が報告されているに過ぎない。

このような背景から本研究では DEHP および MEHP の毒性プロファイルの質的な差異を

明らかにすることを目的としているが、研究の初年度である本年度は、MEHP の反復投与毒性実験を実施する際に必要な情報を得るための予備実験を行った。

## B. 研究方法

### 1) MEHP および DEHP の濃度測定法の適正確認とコーンオイル中での安定性の確認

MEHP および DEHP は、動物に経口投与する際にはコーンオイル中に溶解または懸濁して投与液が調製されることが予定されている。従って、コーンオイル中の MEHP と DEHP の濃度測定に既存の濃度測定法が利用出来るか否かを確認するために、MEHP あるいは DEHP をコーンオイルに溶解して 1 および 400 mg/mL 溶液を調製し、テトラヒドロフランに溶解した 0.01~0.1 mg/mL の MEHP あるいは DEHP 溶液を標準溶液として、以下の条件下で HPLC により MEHP あるいは DEHP 濃度を測定し、測定結果から得られた注入再現性、直線性、特異性、真度および併行精度をもとに測定方法の適正を確認した。さらに、MEHP あるいは DEHP の 1 および 400 mg/mL コーンオイル溶液の濃度を調製直後に HPLC により測定した後、ガラス製気密容器に入れて、1~9°C の範囲に調製された冷蔵庫内で 9 日間保存し、さらに室温で 24 時間放置した後、再度同方法を用いて濃度を測定して、調製直後の濃度と保存後の濃度を比較して、当該保存条件下における MEHP および DEHP の安定性を確認した。

#### 高速液体クロマトグラフ (HPLC) の条件

カラム: CAPCELLPAK C18 UG120  
カラム温度: 40°C  
移動相: アセトニトリル/蒸留水(9/1, v/v)  
流量: 1.0 mL/min  
測定波長: 225 nm  
注入量: 10 µL  
オートサンブラ: 設定温度 5°C  
洗浄液: アセトニトリル/水 (9/1, v/v)

### 2) MEHP 7日間連続経口投与によるラットにおける毒性プロファイルの確認

日本チャールス・リバー株式会社(厚木飼育センター)から4週齢の雄15匹のCrI: CD (SD) ラット[SPF]を2006年7月24日に搬入し、8日間検疫・馴化飼育して、この間に異常の認められない動物を実験に供した。動物は、前面・床ステンレス網目アルミ製飼育ケージ(W 19.7 × D 26.3 × H 18.0 cm, 9,326 cm<sup>3</sup>)に1匹ずつ収容し、バリアシステム動物飼育施設内で飼育した。動物飼育期間中の飼育環境は、温度 22.7~23.3°C および湿度 51.7~55.5%、換気回数 12 回以上/時間、空気差圧 30 Pa 以上、照明 12 時間(午前7時点灯、午後7時消灯)であった。各動物には、飼料として放射線滅菌固型飼料(CRF-1, Lot No. 051006、オリエンタル酵母工業)を、飲水として、水道水を自由に摂取させた。

動物は、投与開始当日の投与開始日(投与1日投与前)に測定した体重によってLATOX-F システムを用いて層別化し、無作為割り付け法により1群3匹からなる4群に分けた。1群を対照群として媒体であるコーンオイルを投与し、他の3群には、コーンオイルに溶解した MEHP を1日1回それぞれ 200、700 あるいは 2,000 mg/kg の用量で、プラスチック製胃ゾンデを用いて7日間強制経口投与した。なお、投与容量は、体重 100 g 当たり 0.5 mL として、個体別に測定した最新の体重に基づいて算出した。

全動物の一般状態を毎日 2 回(投与前および投与約 30~60 分後)、ただし、解剖当日は 1 回以上観察し、観察所見を記録するとともに生死の確認を行った。全動物の体重を投与開始日(投与 1 日とする)、3、5 および 7 日に測定・記録し、死亡動物については発見時に、投与終了時の解剖動物については、解剖当日にも体重を測定した。さらに、全動物について、投与 1、3、5 日に給餌量、投与 3、5 および 7 日に残餌量を電子天秤(XS4001S、メラー・

トド)を用いて測定し、摂餌量(g/day)を算出した。

死亡例は可及的速やかに剖検した。投与期間終了時の計画解剖動物は、エーテル麻酔下で放血によって安楽死させた後剖検して、肝臓、心臓および精巣の重量を測定し、剖検当日測定した体重および器官重量から器官重量/体重比(相対重量)算出した(器官重量/最終体重 × 100)。

死亡例、計画解剖例何れも、肝臓、心臓および肉眼観察において異常が認められた器官・組織を 10 vol%中性緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。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し、保存した。全試験群全例の肝臓および精巣から、定法に従ってパラフィン包埋・薄切切片を作製しヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施したほか、精巣については免疫組織化学的にビメンチンを染色して光学顕微鏡にて観察した。

各試験群の体重、摂餌量、器官重量および器官重量/体重比の対照群と各被験物質の投与群間の統計学的有意差検定は、まず Bartlett の等分散検定を実施し(p<0.01)、等分散の場合は、Dunnnett の多重比較検定により、不等分散の場合は、Steel の検定により実施した(5%および 1%を有意水準とした)。

(倫理面の配慮)

動物の飼育および取り扱いに際しては、「動物の愛護および管理に関する法律」、「実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「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 の濃度測定法の適正確認とコーンオイル中での安定性の確認

コーンオイル中の MEHP および DEHP の HPLC を用いた濃度測定においては、注入再

現性、直線性、特異性、真度および併行精度ならびに実測試料の安定性の結果から、測定方法は適正であると判断した(表1)。

また、MEHPあるいはDEHPの1および400 mg/mL コーンオイル溶液中の濃度を、調製直後およびガラス製気密容器に入れて、1~9°Cの範囲に調製された冷蔵庫内で9日間保存し、さらに室温で24時間放置した後測定し比較した結果、保存後の、調製直後に対する濃度の割合が MEHP では 100.1~102.4%、DEHP では 103.0~103.8%で、媒体中の MEHP、DEHP ともに 1~400 mg/mL の濃度範囲において本保存条件下では安定であると判定された(表2および3)。

2) MEHP7日間連続経口投与によるラットにおける毒性プロファイルの確認

2,000 mg/kg 投与群では、投与2日の投与直後に間代性痙攣、流涎、自発運動低下および腹臥位が全例にみられ、一部の例で体温低下、流涙、呼吸異常を伴って、投与後約 90~180 分で全例死亡した。なお、死亡例の剖検所見として全例の前胃に白色斑、十二指腸および空腸に水様性内容物の貯留が認められ、空腸では内腔拡張も観察された(表4)。さらに、病理組織学的所見として、死亡例全例の肝臓に小葉中心性の肝細胞の細胞質内に好酸性顆粒状変化が観察され、精巣では包膜炎および一部の精細管に精細胞の変性と Sertoli 細胞の空胞化が認められたほか、精細胞の変性が認められた精細管のみならず、精細胞に変性が見られない精細管においても Sertoli 細胞内のビメンチンの減少、凝集が観察された。

200 mg/kg 投与群および 700 mg/kg 投与群では死亡例および MEHP 投与に起因したと考えられる一般状態の変化は認められず、投与期間を通じて、200 mg/kg 投与群および 700 mg/kg 投与群ともに対照群と比較して体重および摂餌量にも統計学的に有意な差はみられなかった(表4)。

200 mg/kg 投与群および 700 mg/kg 投与群では、ともに肝臓の絶対重量および相対重量が、対照群と比較して統計学的に有意に増加したが、精巣重量には有意な差は認められなかった。計画解剖動物の剖検所見として 200 mg/kg 投与群の 2 例および 700 mg/kg 投与群の全例に肝臓の肥大が認められたが、精巣には肉眼的に異常は認められなかった(表 5)。病理組織学的観察においては、700 mg/kg 投与群の全例の肝臓では小葉中心性に肝細胞の肥大があり、これに伴って肝細胞の細胞質内に好酸性顆粒状変化が認められた。また、精巣では、精細管の一部で Sertoli 細胞内のビメンチンの減少・凝集が見られ、1 例に精細胞の変性と管腔内への脱落が観察された。さらに、200 mg/kg 投与群の 1 例では、肝臓において小葉中心性に肝細胞の細胞質の好酸性顆粒状変化が認められた。

#### D. 考察

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実施する、「MEHP のラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性実験」に先立って、当該実験を実施するために必要な基礎的な情報を得るために、MEHP および DEHP に動物に投与する際の投与液中の濃度測定法の確認および投与液中の両化合物の安定性の確認ならびに用量設定および毒性プロファイルの把握のためのラットにおける 7 日間反復経口投与毒性実験を実施した。

その結果、コーンオイル中の MEHP および DEHP の濃度測定に HPLC による測定法を利用することが可能あり、コーンオイル中の MEHP および DEHP は少なくとも 9 日間冷蔵保存後 24 時間室温に放置しても安定であることが明らかにされた。このことから、「MEHP および DEHP のラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性実験」においては 1 週間に 1 度投与液を調製することで対応可能であることが明ら

かになった。

雄ラットに 200 mg/kg、700 mg/kg あるいは 2,000 mg/kg の用量で MEHP を 7 日間連続経口投与した結果、2,000 mg/kg 投与群では投与 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、異常呼吸などを見られるようになり、投与後約 90~180 分で全例が死亡した。これらの結果から、新たに MEHP 投与により神経毒性が惹起される可能性が示唆された。これまでに、DEHP に関しては膨大な毒性実験の結果が報告されているが、現時点では神経毒性に関する報告はなされておらず、今回の実験により MEHP が DEHP と質的に異なる毒性を有することが明らかとなった。前述のように、DEHP 投与による主な毒性として肝毒性および精巣毒性が報告されているが、今回 MEHP 投与により、DEHP 投与による変化と同質の肝細胞の肥大とその形態学的特徴から恐らくペルオキシゾームの増殖によると考えられる細胞質の好酸性化粒状変化、および精巣の sertoli 細胞の空胞化および精細胞の変性が観察された。現時点では、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- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) にリガンドとして結合した結果引き続いて起きる PPAR- $\alpha$  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 Sertoli 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。PPAR- $\alpha$  は、肝臓の肝細胞、消化管上皮細胞、心筋細胞、精巣間細胞および Sertoli 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<sup>8)</sup>、MEHP の神経毒性の発現に PPAR- $\alpha$  が関与している可能性も考えられるが、PPARs の発現

に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。今回、MEHP 投与により観察された肝臓の小葉中心性肝細胞の肥大を伴った細胞質の好酸性顆粒状変化および精巣の Sertoli 細胞の空胞化を伴った精細胞の変性は、何れも DEHP 投与による典型的な毒性変化として報告されている変化と質的には同じであると考えられるが、*in vitro* の実験では MEHP は DEHP に比較して、10~1,000 倍以上強い毒性を示すことが明らかにされていることから *in vivo* 実験においても MEHP と DEHP との無毒性量の比較が重要となる。

以上の結果から、「28 日間反復経口投与毒性試験」では 700 mg/kg/day 付近を最高用量に設定するのが適切であると考えられる。

#### 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実施する、「MEHP のラットを用いた 28 日間反復経口投与毒性実験」に先立って、当該実験を実施するために必要な基礎的な情報を得るために、MEHP および DEHP に動物に投与する際の投与液中の濃度測定法の確認および投与液中の両化合物の安定性の確認並びに用量設定および毒性プロファイルの把握のためのラットにおける 7 日間反復経口投与毒性実験を実施した。

その結果、コーンオイル中の MEHP および DEHP の濃度測定に HPLC による測定法を利用することが可能あり、コーンオイル中の MEHP および DEHP は少なくとも 9 日間冷蔵保存後 24 時間室温に放置しても安定であることが明らかにされた。さらに、雄ラットに 2,000 mg/kg の用量で MEHP を連続経口投与すると投与 2 日目の神経症状を伴って全例が死亡し、

7 日間の連続経口投与によって 200mg/kg 以上の投与群で肝毒性が、700 mg/kg 投与群では精巣毒性が観察された。

#### 参考文献

- 1) Thomas J.A. and Thomas. M.J. (1984) Biological effects of di-(2-ethyl- hexyl) phthalate and other phthalic esters, Crit.Rev. Toxicol.13, 283-317
- 2) Reddy, J.K. and Lalwai, N.D. (1983). Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: Evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. Crit. Rev. Toxicol. 12, 1-58
- 3) Richburg, J.H. 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
- 4) Saitoh, Y., Usumi, K., Nagata, T., Marumo, H., Imai, K. and Katoh, M. (1997). Early changes in the rat testis induced by Di-(2-ethylhexyl) phthalate and 2,5-hexanedione -Ultrastructure and Lanthanum Trace Study-. J. Toxicol. Pathol. 51-57
- 5) Mylchreest, E., Cattley R.C. and Foster, M.D. (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
- 6) Oishi S. and Hiraga K. Testicular atrophy induced by phthalic acid monoesters: effects of zinc and testosterone concentrations. Toxicology, 15, 197-202, 1980.
- 7) Sjoberg, P., Bondesson, U., Gray T.G.B. and Ploen, L. (1986). Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and five of its metabolites on rats testes *in vivo* and *in vitro*. Acta. Pharmacol. Toxicol. 58, 225-233
- 8) Braissant, O., Fougelle, F, Scotto, C., Dsuga, M. and Wahli, W. (1996). Differential expression of peroxisome proliferator-activated- $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  in the adult rat. Endocrinology, 137, 354-366

表1 MEHP,DEHPの濃度分析法適正確認の結果

測定項目	判定基準	結果	
		MEHP	DEHP
注入再現性 (相対標準偏差)	3%以下	0.5%以下	0.8%以下
直線性 (一致度 (R <sup>2</sup> ))	0.99以上	1.0000	1.0000
特異性	以下のどちらか一方を満たすこと。 1)媒体から得られるクロマトグラム上に被験物質のピークと重なる夾雑ピークがないこと。 2)濃度算出用の標準溶液のピークレスポンスの1/100以下であること。	重なるピークが観察されなかった。	濃度算出用の標準溶液のピークレスポンスの1/100以下。
真度および併行精度	以下の両方を満たすこと。 1)低濃度および高濃度投与液から得られる真度 (%) が±10%以内であること。 2)相対標準偏差が5%以下であること。	-1.9~-1.5% 1.6%以下	-0.6~0.4% 3.0%以下
実測試料の安定性 (調製直後に対する割合)	100±5%以内	98.4~102.1%	100.7~102.7%

表2 MEHPの溶媒内での安定性試験結果

設定濃度 (mg/mL)	測定濃度 (mg/mL)				安定性 (%)	適否
	調製直後		保存後 <sup>1)</sup>			
	平均値		平均値			
1	0.9901		0.9995		102.4	適合
	0.9891	0.9807	0.9943	1.004		
	0.9629		1.017			
400	387.7		386.4		100.1	適合
	400.7	394.1	401.2	394.6		
	393.9		396.3			

- 1): 9日間冷蔵保存後さらに室温にて24時間保存
- 2): 保存後の濃度平均値/調製直後の濃度平均値×100
- 3): 判定基準: 調製直後の濃度に対する比率が90%以上あれば適合