

表3 DEHP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 ¹⁾			
	平均値		平均値			
1	1.001		1.023		103.0	適合
	1.005	1.004	1.043	1.034		
	1.007		1.035			
400	400.4		414.4		103.8	適合
	384.8	397.7	418.8	413.0		
	408.0		405.7			

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

表4 MEHP7日間連続経口投与による体重および摂餌量の変化

投与群	体重(g)						
	投与期間(日)						
	-8	-1	1	3	5	7	Final
対照群	88±1	151±2	161±4	175±5	189±6	202±9	213±11
200 mg/kg 群	88±0	150±5	161±7	176±8	191±12	205±14	215±13
700 mg/kg 群	86±4	149±5	161±5	174±7	190±10	201±4	209±5
2000 mg/kg 群	86±3	151±3	161±7	—	—	—	—

投与群	摂餌量(g/animal/day)		
	投与期間(日)		
	1~3	3~5	5~7
対照群	19±2	19±2	20±3
200 mg/kg 群	20±2	20±2	21±2
700 mg/kg 群	19±2	21±2	19±2
2000 mg/kg 群	—	—	—

表5 MEHP連続経口投与ラットの剖検所見および臓器重量

①死亡例

動物番号	死亡時体重	剖検所見
1301	155 g	十二指腸から空腸にかけて 水様性内容物, 空腸拡張
1302	154 g	十二指腸から空腸にかけて 水様性内容物, 空腸拡張
1303	149 g	十二指腸から空腸にかけて 水様性内容物, 空腸拡張

②計画解剖例

投与群	臓器重量 (相対重量)						剖検所見
	心臓		肝臓		精巣		
対照群	0.78±0.11	(0.37±0.04)	10.21±0.25	(4.81±0.15)	2.08±0.19	(0.98±0.10)	著変なし
200 mg/kg群	0.82±0.06	(0.38±0.01)	12.57±0.79*	(5.85±0.14)*	1.88±0.17	(0.87±0.04)	肝肥大(2/3)
700 mg/kg群	0.80±0.02	(0.38±0.01)	13.31±1.43*	(6.36±0.53)**	2.22±0.05	(1.06±0.03)	肝肥大(3/3)

Statistical Significance *: p<0.05, **: p<0.01

資料 1-2)

マウスを用いた反復投与毒性試験によるDEHP及びMEHPの比較研究 分担研究者 関田清司 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨 本研究の目的は、DEHP及びMEHPのマウス28日間反復投与毒性試験により、両化合物の毒性について比較検討することにある。今年度は、28日間投与試験に先立ち、当該試験の用量設定を目的に、両化合物の急性及び7日間投与毒性試験を行った。28日間投与毒性試験での両化合物の用量は、7日間投与毒性試験で肝臓に毒性が認められた用量を最高用量に、公比3で除し、更に両化合物の投与量の一部が相対する用量、即ち、DEHPの投与量(mg/kg)を0(対照)、150、500及び1500、MEHPの投与量を0(対照)、50、150及び500に設定し実施すると結論に至った。

A. 研究目的

ポリ塩化ビニル製医療用具に使用されている可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)の活性代謝産物と考えられているフタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)が、医療用具のγ線照射滅菌により溶出することが明らかにされた。DEHPの毒性に関しては、PPAR α 受容体を介した肝毒性、精巢の Sertoli 細胞を標的とする精巣毒性、MEHP に関しては、コリン作動性神経を介した心臓毒性が報告されているが毒性情報が極めて乏しく、毒性評価が著しく遅れている。本研究の目的は、両化合物のマウスによる28日間反復投与毒性試験を行い、両化合物の毒性について比較検討することにある。今年度は、急性(単回)及び7日間反復経口投与試験を行い、28日間投与毒性試験実施のための基本的情報、特に用量設定に関する情報を得る。

B. 研究方法

B-1. 被験物質

DEHPは純度98%以上(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。

MEHPは純度96%以上(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. 投与液の調製

DEHPは急性経口投与毒性試験では希釈せずに、7日間経口投与毒性試験ではコーン油(シグマ社)で希釈し、投与液を調製した。調製後は冷暗所で保存し8日以内に使用した。

MEHPは室温で一晩放置後、38度の温水槽で加温、結晶を溶解させた。これをコーン油で希釈し、投与液を調製した。調製後は冷暗所で保存し8日以内に使用した。なお、安定性については和光純薬あるいは(財)食品農医薬品安全性評価センター(主任研究者 今井 清)で確認した。

B-3. 急性経口投与毒性試験

当部で飼育していた雄性 C57BL/6CrSlc(体重 25.0~31.0g)を用いて行った。

飼育は室温 24 \pm 1 $^{\circ}$ 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)に收容し、飼料(CRF-1粉末飼料、オリエンタル酵母工業(株))と水は自由に摂取させた。

投与は mg(被験物質)/5mL(溶媒)/kg(体重)とし、金属製胃ゾンデを用いて行い、投与前の除餌は行わなかった。群構成は下記の通りである。

【群構成】

被験物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/ml)	動物数 (雄・匹)
DEHP	5000	1000	3
MEHP	2000	400	3
	1000	200	3
	300	60	3

観察期間は投与日を 0 日と起算し、投与後 14 日までとし、一般状態及び死亡の有無の観察は投与後 6 時間までは継続的に、その後は少なくとも1日1回行った。体重測定は期間中に 3 回以上行った。また、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、解剖し、肉眼的観察を行った。

B-4. 7日間経口投与毒性試験

5週齢の雄性 C57BL/6CrSlc マウス(SPF、日本 SLC))を入手し、1 週間馴化飼育後、健康なマウスを用いた。飼育は急性経口毒性試験と同じに行った。

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、7日間行った。MEHPの投与量の設定は、マウスの急性経口投与毒性試験で死亡が認められた最低用量(1000 mg/kg)と一般状態に変化が認められない用量(300 mg)を参考に、MEHPの最高用量を500 mg/kg、最高用量の10分1量を最低用量に設定した。これに中間量の150 mgを加え3用量を設定した。DEHPの用量は、両物質のラット単回経口投与による精巢毒性発現用量比(DEHP/MEHP)は3.5の報告(Teirlynck et al., 1988)を参考に、MEHPの3倍量を設定した。毎日の投与量は前日の体重を基に求めた。群分けは投与開始前日に、体重層別化により各群の平均体重が近づくように群分けした。群構成は下記の通りである。

【群構成】

DEHP 投与群

群名	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/ml)	動物数 (雄・匹)
D-0 mg (対照)	0(コーン油)	0	4
D-150 mg	150	30	4
D-500 mg	500	100	4
D-1500 mg	1500	300	4

MEHP 投与群

群名	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/ml)	動物数 (雄・匹)
M-0 mg (対照)	0(コーン油)	0	4
M-50 mg	50	10	4
M-150 mg	150	30	4
M-500 mg	500	100	4

動物は、投与開始日を投与 1 日とし、7日間反復投与し、最終投与日の翌日に解剖を行った。この間に次のような観察及び検査を実施した。

一般状態:投与期間中は、毎日投与開始前と投与後約 30 分、解剖日は体重測定時に行った。

体重及び摂餌量:体重は投与開始前日から解剖日まで、また摂餌量は投与開始日から解剖日まで、毎日、その日の投与前に行った。

血液学的検査及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。血液生化学的検査には、血清を用いて、総蛋白(TP)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRN)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-Cho)、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)、コリンエステラーゼ (ChE)、 γ -グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GTP) について 7180 形自動分析装置 (日立製作所) で測定した。

剖検、臓器重量及び病理組織学的検査: 全例について行った。血液試料採取後、エーテル麻酔下で腋下動脈放血により動物を致死させた後、剖検と脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣及び精巣上体について重量測定を行った。また、肝臓及び腎臓は 10% 中性緩衝ホルマリン液で、精巣はブアン液で固定し、その後常法に従い H-E 染色標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。

統計学的解析: 体重、摂餌量、血液学的検査値、血液生化学的検査値及び臓器重量については、群毎に平均値及び標準偏差を求めた。また被験物質ごとに、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。

(倫理面の配慮) 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に基づき、動物への苦痛等を避けるため採血などは麻酔下で実施した。

C. 研究結果

C-1. 急性経口投与毒性試験

C-1-1. DEHP

死亡率 (表 1) 及び一般状態 (表 2): 5000 mg 投与で、死亡は認められなかった。一般状態では、投与日に自発運動亢進、尾根部を頻りに舐める動作及び臀部及び尾部周囲の被毛の濡れが観察された。

体重: 0 日 (投与前)、投与後 5 日及び 14 日の平均体重はそれぞれ 26.2g、27.4g、27.4g で減少

は認められなかった。

剖検所見: 変化は認められなかった。

C-1-2. MEHP

死亡率 (表 1) 及び一般状態 (表 2): 300 mg 投与では、死亡及び異常は認められなかった。1000 mg 投与では、1/3 例が投与後 1 日に死亡した。2000 mg 投与では、3/3 例が投与後 1 日 (翌朝) までに死亡した。死亡動物では、1000 mg 及び 2000 mg 投与のいずれでも、一過性の間代性痙攣が認められた。また、死亡発見時の状態は背弯姿勢を示し、筋肉の硬直が観察された。

体重: 生存動物の投与前、投与後 3 日、7 日及び 14 日の平均体重は、それぞれ 1000 投与で 29.3g、27.3g、28.3g、29.6g、300 mg 投与では 27.2g、27.7g、27.6g、28.4g と、1000 mg 投与では投与後 3 日に軽度の体重減少が認められた。

剖検: 2000 mg 投与の死亡例 (3/3) で肝臓左葉辺縁の白色化が認められた。1000 mg 投与の死亡例では変化が認められなかった。生存例では明らかな変化は認められなかった。

C-2. 7 日間経口投与毒性試験

C-2-1. DEHP

一般状態: 変化は認められなかった。

体重及び摂餌量 (図 1): いずれの群でも同様の推移を示し、変化は認められなかった。

血液学的検査 (表 3): 対照群と各投与群の間に差は認められなかった。

血液生化学的検査 (表 4): D-1500mg 群で BUN 及び ALT の有意な増加が認められた。

剖検及び臓器重量 (表 5): D-1500mg 群で肝臓の軽度肥大と実重量及び相対重量の有意な増加が認められた。

病理組織学的検査: D-1500mg 群で、肝細胞肥大が全例で観察された。また、精巣の精上皮細胞の変性、壊死、脱落、空胞化が 1 例に見られた。これらの変化は D-500 及び 150mg 群では認められなかった。

C-2-1. MEHP

一般状態:M-500mg 群の1例に、投与3日の投与直後に腹臥と間代性痙攣が観察された。1時間後にも自発運動低下を認めたが、3時間後には変化は認められなかった。このほかの動物では投与期間中に変化は認められなかった。

体重及び摂餌量(図2):いずれの群でも同様の推移を示し、変化は認められなかった。

血液学的検査(表6):M-150mg 群でHbの有意な減少が認められた。

血液生化学的検査(表7):M-500mg 群でCRN及びT-Choの有意な増加が認められた。

剖検及び臓器重量(表8):M-500mg 群で肝臓の軽度肥大と実重量及び相対重量の有意な増加が認められた。また、腎臓相対重量の有意な増加も認められた。この他、M-150mg 群で脳相対重量の有意な減少が認められた。

病理組織学的検査:M-500mg 群で、肝細胞の肥大が全例に観察された。

D. 考察

D-1. 急性経口毒性試験

DEHPでは、5000 mg/kg 投与でも死亡は認められなかった。MEHPでは、300 mg 投与で0/3例、1000 mg/kg 投与で1/3及び2000 mg/kg 投与で3/3例の死亡が見られ、LD₅₀は1,000~2,000mgと推定された。MEHPの死亡例では一過性に間代性痙攣が認められた。

D-2. 7日間反復投与毒性試験

DEHPでは1500 mg/kg 投与で肝臓重量増加と肝細胞肥大(4/4例)及び精巣の精上皮細胞の変性、壊死、脱落、空胞化が1例に認められた。一方、MEHPでは500 mg/kg 投与で、DEHPの2000 mg 投与と同様の肝臓変化が認められた。また、投与3日の投与後に間代性痙攣が1例に認められた。肝臓量増加及び肝細胞肥大を指標にDEHP/MEHPの投与量の比を求めると3倍程度と推察された。また、MEHP投与では、急性毒性試験と同様に間代性痙攣が認められたことから、間代性痙攣の発現について今後の試験で注視していく必要があると考えた。

今回の試験目的である28日間投与毒性試験での用量設定については、DEHPの1500 mg/kg及びMEHPの500 mg/kgの7日間投与により肝臓への明らかな影響が認められたこと、また、肝臓への影響を指標にしたDEHP/MEHPの投与量比は3倍程度であることから、両化合物とも、今回と同じ用量で28日間反復投与試験を実施するのが適当であると判断した。即ち、7日間投与毒性試験で肝臓に毒性が見られた用量を最高用量に、公比3で除し、更に両化合物の投与量の一部が相対する量、DEHP投与量(mg/kg)を0(対照)、150、500及び1500、MEHPの投与量を0(対照)、50、150及び500に設定し実施するとの結論に至った。

E. 結論

本研究の目的は、DEHP及びMEHPのマウス28日間反復投与毒性試験により、両化合物の毒性について比較検討することにある。今年度は、28日間投与毒性試験に先立ち、当該試験の用量設定を目的に、両化合物の急性及び7日間投与毒性試験を行った。DEHPの1500 mg/kg 投与とMEHPの500 mg/kg 投与で肝臓への影響が明らかとなった。肝臓への影響を指標にしたDEHP/MEHPの投与量比は3倍程度と推察された。28日間投与毒性試験での両化合物の用量は、7日間投与毒性試験で肝臓に毒性が見られた用量を最高用量に、公比3で除し、更に両化合物の用量の一部が相対する量、即ち、DEHPの投与量(mg/kg)を0(対照)、150、500及び1500、MEHPの投与量を0(対照)、50、150及び500に設定し実施するとの結論に至った。

参考文献:

- 1).Teirlynck, O., Kaufman, J.M., Bogaert, M.G., and Roels, H. (1988). Testicular toxicity induced by single dosing of di- and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. Toxicol. Lett. 40, 85-91.

図1 DEHP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の体重・摂餌量

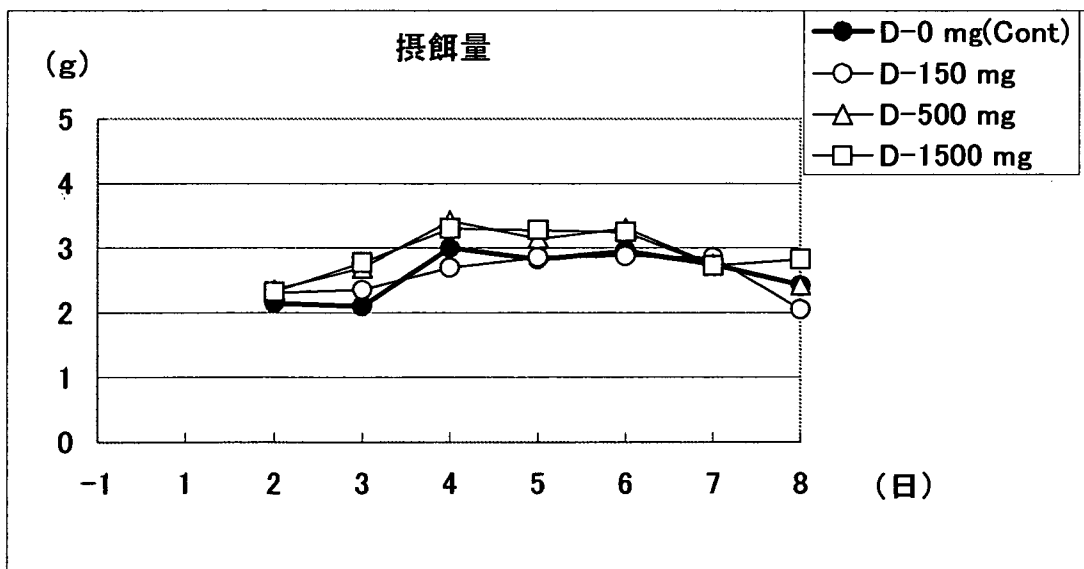
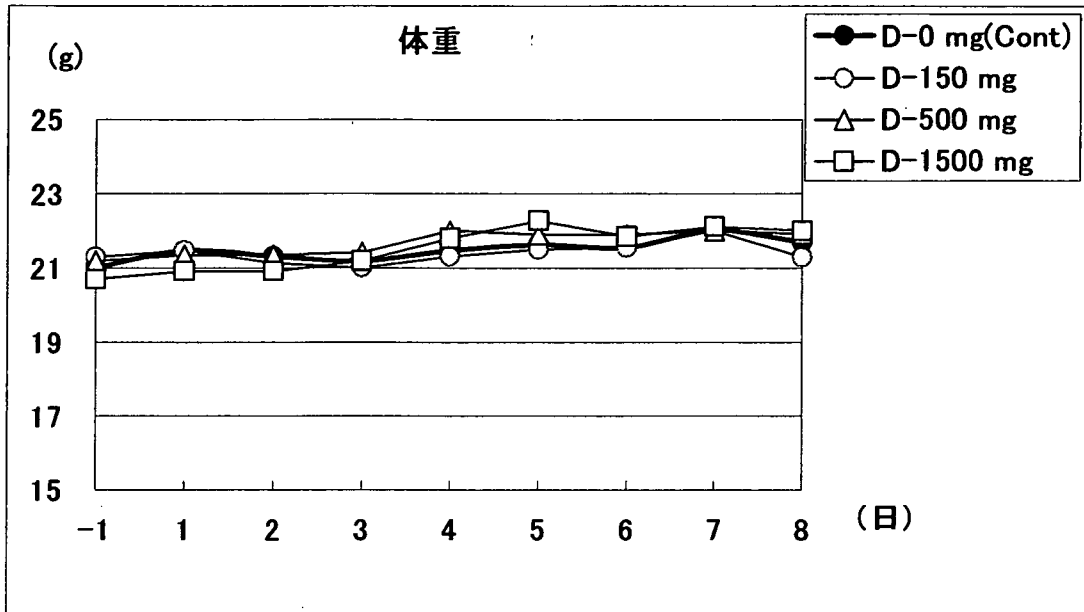


図2 MEHP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の体重・摂餌量

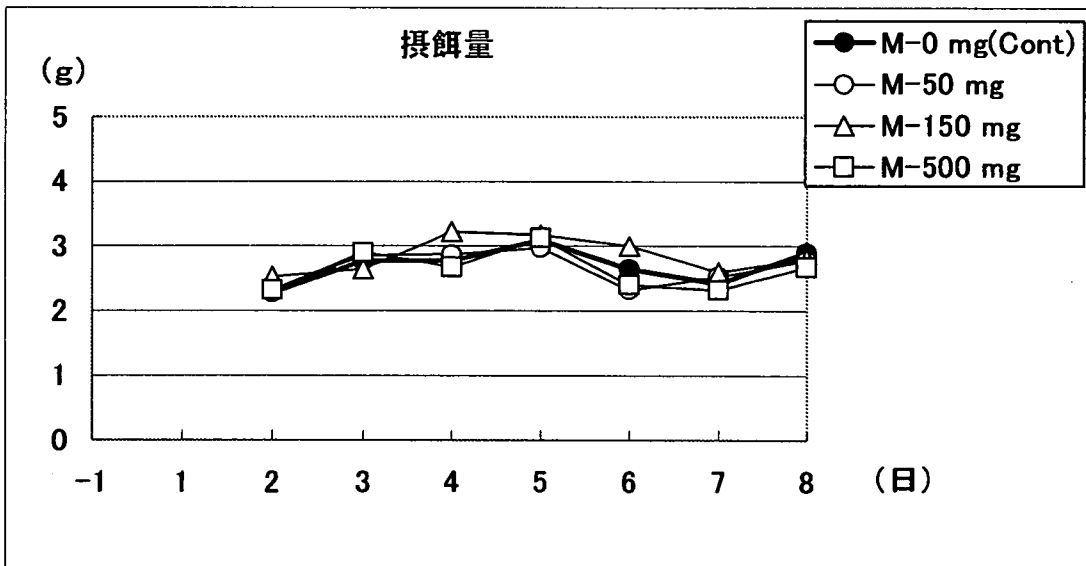
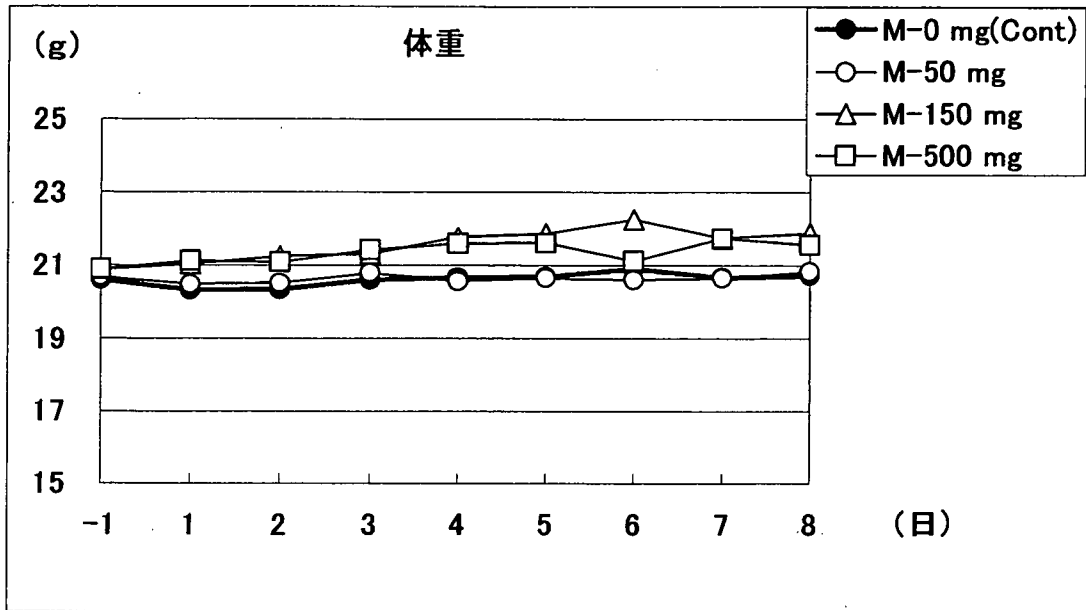


表 1 死亡率(雄マウス:C57BL/6による急性毒性試験)

被験物質 投与量	時間			日				死亡率	概算LD50
	0	3	6	1	2	7	14		
DEHP 5000 mg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	5000 mg/kg以上
MEHP 300 mg	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	1000~2000 mg/kg
1000 mg	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3	
2000 mg	0/3	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	

表 2 一般状態(雄マウス:C57BL/6による急性毒性試験)

被験物質 用量	時間・日	主な症状
DEHP 5000 mg	0~1時間	自発運動亢進。
	4時間	臀部及び尾部周囲湿潤。
	1日(翌朝)	湿潤なし。
MEHP 300 mg	~14日	変化なし。
1000 mg	0~1時間	1例(動物番号19)に、歩行異常(腰部軽度不安定)、音、接触に対する反応亢進、腹臥姿勢、間代性痙攣。残りの2例では軽度の歩行不安。
	1~6時間	腹臥姿勢、呼吸数減数(No.19)。残りの2例は変化なし。
	1日(翌朝)	立毛、投与24時間後に死亡(No.19)。死亡発見時の状態:背弯姿勢、筋肉硬直。残りの2例は変化なし。
	2日~14日	変化なし。
2000 mg	0~1時間	3例とも、歩行異常(腰部軽度不安定)、音、接触に対する反応亢進、間代性痙攣。
	2~4時間	自発運動低下、歩行不安定。
	6時間	体温下降。
	1日(翌朝)	死亡動物発見(3/3例)、死亡発見時の状態:背弯姿勢、筋肉硬直。

表 3 DEHEP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の血液学的検査

Group		D-Cont (0 mg/kg)	D-150 mg (150 mg/kg)	D-500 mg (500 mg/kg)	D-1500 mg (1500 mg/kg)
No. of animals		4	4	4	4
RBC	10 ⁶ /μl	10.55 ± 0.30	10.25 ± 0.71	11.10 ± 0.06	10.43 ± 0.29
Hb	g/dl	16.0 ± 0.3	15.5 ± 1.1	16.7 ± 0.1	15.8 ± 0.7
Ht	%	56.8 ± 1.5	55.3 ± 3.2	59.3 ± 0.4	56.6 ± 1.8
MCV	fl	53.9 ± 0.7	54.0 ± 0.8	53.4 ± 0.2	54.3 ± 0.4
MCH	pg	15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.2	15.0 ± 0.1	15.2 ± 0.3
MCHC	g/dl	28.1 ± 0.4	27.9 ± 0.4	28.2 ± 0.1	28.0 ± 0.3
Plt	10 ⁶ /μl	0.82 ± 0.15	0.83 ± 0.15	0.89 ± 0.07	1.00 ± 0.12
WBC	10 ³ /μl	8.20 ± 2.21	6.33 ± 0.38	6.00 ± 2.15	6.08 ± 1.30

Each value represents mean ±SD.

RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, Plt: platelet count, WBC: white blood cell count.

表 4 DEHEP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の血液生化学的検査

Group		D-Cont (0 mg/kg)	D-150 mg (150 mg/kg)	D-500 mg (500 mg/kg)	D-1500 mg (1500 mg/kg)
No. of animals		4	4	4	4
TP	g/dl	5.3 ± 0.2	5.0 ± 0.3	5.3 ± 0.2	5.1 ± 0.3
BUN	mg/dl	18.2 ± 1.5	17.7 ± 1.6	18.1 ± 0.8	23.4 ± 3.3 **
CRN	mg/dl	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.02
TG	mg/dl	68 ± 5	62 ± 16	67 ± 30	56 ± 10
T-Cho	mg/dl	118 ± 6	104 ± 28	131 ± 7	139 ± 16
ALP	mu/ml	510 ± 108	547 ± 113	496 ± 31	621 ± 47
ALT	mu/ml	22 ± 1	22 ± 5	25 ± 2	31 ± 5 *
AST	mu/ml	80 ± 10	85 ± 11	86 ± 18	78 ± 10
γ-GTP	mu/ml	2.10 ± 0.61	1.73 ± 0.33	1.43 ± 0.83	2.47 ± 0.19

Each value represents mean ±SD.

Significantly different from the control : * P<0.05. ** P<0.01.

TP: total protein, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine,

TG: triglyceride, T-Cho: total cholesterol, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase,

AST: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase.

表 5 DEHEP 7日間投与雄マウス (C57BL/6) の臓器重量

Group	D-Cont (0 mg/kg)	D-150 mg (150 mg/kg)	D-500 mg (500 mg/kg)	D-1500 mg (1500 mg/kg)
No. of Animals	4	4	4	4
Body weight (g)	21.7 ± 0.8	21.3 ± 0.9	21.9 ± 1.4	22.0 ± 0.5
Brain (g)	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01
(g/100g b.w.)	1.95 ± 0.07	1.95 ± 0.11	1.93 ± 0.09	1.91 ± 0.04
Heart (g)	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.47 ± 0.03	0.50 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.48 ± 0.03
Lung (g)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.13 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.55 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.57 ± 0.03
Liver (g)	1.13 ± 0.07	1.04 ± 0.10	1.26 ± 0.06	1.64 ± 0.13 **
(g/100g b.w.)	5.21 ± 0.25	4.88 ± 0.64	5.75 ± 0.18	7.42 ± 0.48 **
Kidney (g)	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.02	0.30 ± 0.01
(g/100g b.w.)	1.27 ± 0.08	1.31 ± 0.11	1.29 ± 0.03	1.34 ± 0.02
Spleen (g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.25 ± 0.02	0.29 ± 0.08	0.26 ± 0.01	0.25 ± 0.02
Testis (g)	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02
(g/100g b.w.)	0.70 ± 0.07	0.74 ± 0.08	0.79 ± 0.01	0.71 ± 0.07
Epididymis (g)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.03	0.23 ± 0.05	0.24 ± 0.04

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : ** P<0.01.

表 6 MEHEP 7日間投与雄マウス (C57BL/6) の血液学的検査

Group	M-Cont (0 mg/kg)	M-50 mg (50 mg/kg)	M-150 mg (150 mg/kg)	M-500 mg (500 mg/kg)
No. of animals	4	4	4	4
RBC $10^6/\mu\text{l}$	10.72 ± 0.24	10.66 ± 0.27	10.04 ± 0.60	10.04 ± 0.43
Hb g/dl	16.2 ± 0.4	16.1 ± 0.4	14.8 ± 0.8 *	15.1 ± 0.8
Ht %	57.4 ± 1.5	56.9 ± 1.3	54.1 ± 3.5	53.9 ± 2.5
MCV fl	53.5 ± 0.6	53.4 ± 0.3	53.9 ± 0.2	53.7 ± 0.4
MCH pg	15.1 ± 0.2	15.1 ± 0.1	15.1 ± 0.2	15.0 ± 0.2
MCHC g/dl	28.2 ± 0.1	28.3 ± 0.2	28.0 ± 0.2	28.0 ± 0.4
Plt $10^6/\mu\text{l}$	0.86 ± 0.13	0.81 ± 0.08	0.93 ± 0.09	0.97 ± 0.13
WBC $10^3/\mu\text{l}$	6.40 ± 1.06	6.88 ± 1.80	6.23 ± 1.55	7.08 ± 1.50

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05.

RBC: red blood cell count, Hb: hemoglobin, Ht: hematocrit, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration, Plt: platelet count, WBC: white blood cell count.

表 7 MEHEP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の血液生化学的検査

Group		M-Cont (0 mg/kg)	M-50 mg (50 mg/kg)	M-150 mg (150 mg/kg)	M-500 mg (500 mg/kg)
No. of animals		4	4	4	4
TP	g/dl	5.4 ± 0.2	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.2	5.0 ± 0.2
BUN	mg/dl	21.1 ± 1.6	23.2 ± 2.7	22.5 ± 1.7	23.0 ± 3.3
CRN	mg/dl	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.14 ± 0.01 *
TG	mg/dl	77 ± 11	92 ± 58	65 ± 21	54 ± 21
T-Cho	mg/dl	101 ± 6	107 ± 4	115 ± 10	138 ± 13 **
ALP	mu/ml	514 ± 52	509 ± 42	553 ± 64	531 ± 44
ALT	mu/ml	23 ± 3	24 ± 4	32 ± 19	24 ± 5
AST	mu/ml	89 ± 8	97 ± 14	90 ± 38	81 ± 8
γ-GTP	mu/ml	1.76 ± 0.43	1.72 ± 0.87	2.22 ± 0.85	1.69 ± 0.94

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : * P<0.05, ** P<0.01.

TP: total protein, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine,

TG: triglyceride, T-Cho: total cholesterol, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase,

AsT: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase.

表 8 MEHEP 7日間投与雄マウス(C57BL/6)の臓器重量

Group		M-Cont (0 mg/kg)	M-50 mg (50 mg/kg)	M-150 mg (150 mg/kg)	M-500 mg (500 mg/kg)
No. of Animals		4	4	4	4
Body weight (g)		20.7 ± 1.6	20.8 ± 1.4	21.9 ± 1.4	21.6 ± 0.8
Brain	(g)	0.42 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.02	0.42 ± 0.02
	(g/100g b.w.)	2.04 ± 0.10	1.98 ± 0.09	1.84 ± 0.08 **	1.95 ± 0.02
Heart	(g)	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.00
	(g/100g b.w.)	0.48 ± 0.03	0.53 ± 0.06	0.49 ± 0.04	0.46 ± 0.02
Lung	(g)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.01
	(g/100g b.w.)	0.56 ± 0.05	0.59 ± 0.06	0.56 ± 0.05	0.59 ± 0.02
Liver	(g)	1.12 ± 0.10	1.20 ± 0.18	1.33 ± 0.16	1.49 ± 0.06 **
	(g/100g b.w.)	5.38 ± 0.09	5.74 ± 0.61	6.03 ± 0.36	6.92 ± 0.17 **
Kidney	(g)	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.01
	(g/100g b.w.)	1.27 ± 0.08	1.31 ± 0.11	1.29 ± 0.03	1.34 ± 0.02 **
Spleen	(g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01
	(g/100g b.w.)	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.30 ± 0.03	0.27 ± 0.02
Testis	(g)	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01
	(g/100g b.w.)	0.78 ± 0.10	0.71 ± 0.09	0.69 ± 0.10	0.75 ± 0.02
Epididymis	(g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
	(g/100g b.w.)	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.08	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.05

Each value represents mean ± SD.

Significantly different from the control : ** P<0.01.

資料 1-3)

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

分担研究者 北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨 本分担研究では、MEHP 誘発毒性をより詳細に把握する目的で、雄性マウスに各種用量の MEHP 及び DEHP を単回強制経口投与し、肝臓および精巣の mRNA につき遺伝子発現変動解析をおこなった。その結果、肝臓における遺伝子発現プロファイルが両物質ともに PPAR α 活性化剤および CAR β 活性化剤投与時のものと似た様式であること、精巣では両物質ともに筋様細胞に特異的な遺伝子の発現変動を引き起こすことが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究全体の目的は、毒性評価が遅れているプラスチック製医療機器由来フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)による毒性プロファイルを早急に明らかにすることにある。この為に、反復投与毒性試験を、関連物質フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)と共に実施しているが、本分担研究では、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。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

雄性マウスに、MEHP(0、70、200、700 mg/kg)、DEHP(0、200、700、2,000mg/kg) 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臓・腎臓・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、網羅的遺伝子発現変動解析を検討した。各用量の設定は、予備実験結果を鑑みておこなった。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 /kgBW)、溶媒はコーンオイル(シグマ社製)とした。マウスの系統は、C57BL/6CrSlc (日本エスエルシー)を用いた。フタル酸モノ-2-エチルヘキシル(MEHP)(CAS No. 4376-20-9)は和光純薬(Cat No. 327-65641)(HPLC で純度 99%)のものを、フタル酸ジ-2-エチルヘキ

シル(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。

なお、肝臓におけるクロフィレートおよびフェノバルビタールの遺伝子発現データは、我々が有している遺伝子発現データベース*を利用した。

*:「厚労科研費・H15-化学-002」による。

(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、下記、所属の研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守する。「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験倫理委員会の制定になる国立医薬品食品衛生研究所・動物実験に関する指針(平成 9 年 7 月版)」。

C. 研究結果

雄性マウスに、MEHP(0、70、200、700 mg/kg)、DEHP(0、200、700、2,000mg/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。

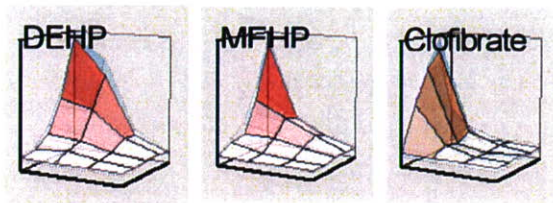
C-1)肝臓における遺伝子発現解析

解析の結果、肝臓においては両物質共に、PPAR α 活性化剤投与時あるいは CAR β 活性化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。図 1 に、PPAR α 活性化剤(クロ

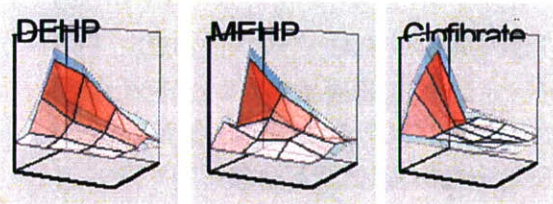
フィブレート)投与時に発現が誘導される遺伝子のうち代表的な例として Cyp4a10、Acs11、Hsd12、Slc25a20 の4種の各遺伝子について、その発現変化を DEHP、MEHP、クロフィブレートについて示す。なお以降示す図はすべて、下記のように濃度依存性、経時変化、遺伝子発現量についての3次元グラフとして示す。



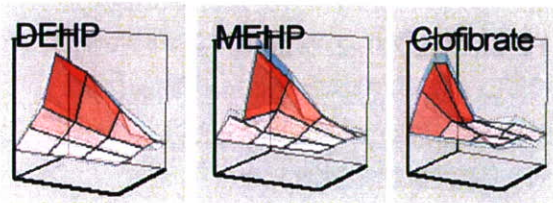
A) Cyp4a10 遺伝子



B) Acs11 遺伝子



C) Hsd12 遺伝子



D) Slc25a20 遺伝子

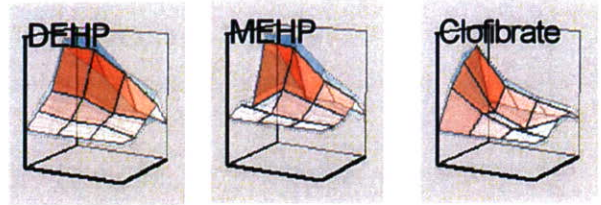


図1 PPAR α 活性化剤投与時と似た発現上昇を示す遺伝子のうち代表的な4つの遺伝子発現変動 -ClofibrateとDEHP、MEHPとの比較-

また、図2に CAR β 活性化剤(フェノバルビタール)投与時に発現が誘導される遺伝子のうち代表的な例として Cyp2b10、Ces6、Gst3 の3種の各遺伝子について、その発現変化を DEHP、MEHP、フェノバルビタールについて示す。

A) Cyp2b10 遺伝子



B) Ces6 遺伝子



C) Gst3 遺伝子



図 2 CAR β 活性剤投与時と似た発現上昇を示す遺伝子のうち代表的な 3 つの遺伝子発現変動 -Phenobarbital と DEHP、MEHP との比較-

さらに DEHP と MEHP の毒性プロファイルの質的な差異の有無の検討のために、肝臓において両物質で発現パターンが異なる遺伝子群の抽出を検討したところ、現時点で *Ulk1* 遺伝子および *Ipmk* 遺伝子が見いだされた。引き続き、この毒性学的・生物学的な意味を含め、さらに両物質で発現が異なる遺伝子群の抽出を検討中である。図 3 にこのうち、*Ulk* 遺伝子の発現変化を示す。

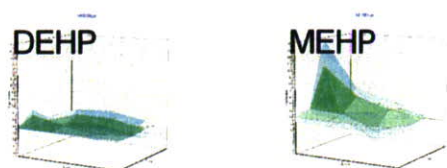
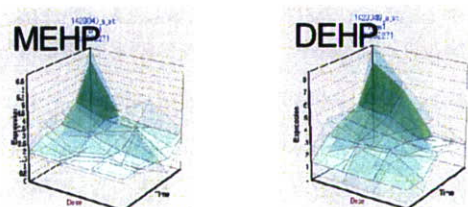


図 3 肝臓における *Ulk* 遺伝子の発現変動 -DEHP、MEHP との比較-

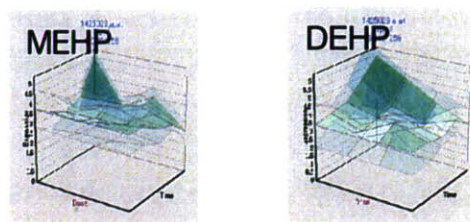
C-2) 精巢における遺伝子発現解析

解析の結果精巢においては、両物質共に、精巢の筋様細胞(myoid 細胞)に発現し、細胞骨格や細胞の収縮に参与する *Tpm* (tropomyosin), *Acta*(alpha smooth muscle actin), *Cald* (caldesmon) の遺伝子について、投与後 24 時間後に濃度依存的な増加が認められた。図 4 に各遺伝子について、その発現変化を DEHP、MEHP について示す。

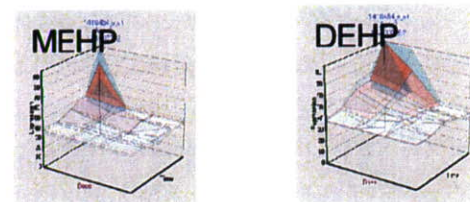
A) *Tpm1* 遺伝子



B) *Tpm2* 遺伝子



C) *Acta2* 遺伝子



D) *Cald1* 遺伝子

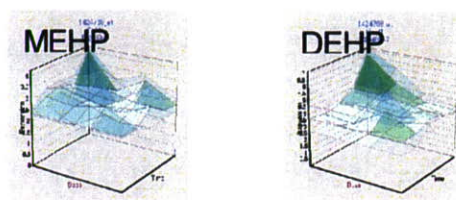


図 4 精巢の筋様細胞に発現する 4 つの遺伝子の発現変動 -DEHP、MEHP との比較-

さらに DEHP と MEHP の毒性プロファイルの質的な差異の有無の検討のために、精巢において両物質で発現パターンが異なる遺伝子群の抽出を検討したところ、現時点で *Mrp13* 遺伝子、*Fyb* 遺伝子および *Cyp4f18* 遺伝子が見いだされた。引き続き、この毒性学的・生物学的な意味を含め、さらに両物質で発現が異なる遺伝子群の抽出を検討中である。図 5 にこのうち、*Mrp13* 遺伝子の発現変化を示す。

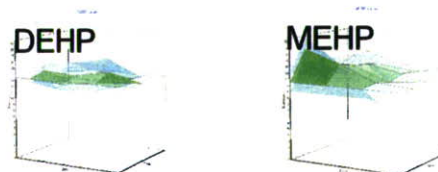


図 5 精巢における *Mrp13* 遺伝子の発現変動 -DEHP、MEHP との比較-

D. 考察

以上の肝臓における解析結果から、DEHP、MEHP 共に PPAR α 受容体に作用し、この活性に影響を与えている可能性が示唆された。またしたがって、両化合物ともに脂質代謝系に変化を与える可能性が示唆された。なお、この解析結果を支持する文献は比較的多数報告されている。加えて、両化合物ともに CYP 誘導剤としても知られるフェノバルビタール投与時と同様な遺伝子発現変動を示し、少なくとも Cyp2b10 遺伝子の発現誘導が明らかに認められた。この結果は、フタル酸エステル類は PPAR α 受容体活性化作用に加えて、直接・間接は不明であるがフェノバルビタール様の CAR β 活性化作用を有する可能性という新知見を示唆しており、これまでこのような報告が見いだせないことから安全性評価上、今後、注意を要する。

他方、精巣における解析結果からは、DEHP、MEHP 共に、機序は不明ながら、投与 24 時間後には、筋様細胞に作用し細胞骨格や細胞の収縮に影響を与えている可能性という新知見を示唆され、これまでこのような報告が見いだせないことから安全性評価上、今後、注意を要する。精巣毒性におけるこの筋様細胞の役割については不明な点が多いが、これに関連して、精巣毒性を示す H2 ブロッカーのシメチジンの標的細胞が筋様細胞であるとする報告がなされた(Franca et al., Biol Reprod 63:1403-1412, 2000)。したがって今後、筋様細胞を考慮した、MEHP 誘発精巣毒性の詳細な解析が必要なものと考えられた。

なお、両化合物の投与用量設定については、本実験では MEHP は「0、70、200、700 mg/kg」、DEHP は「0、200、700、2,000mg/kg」であったが、肝臓ならびに精巣における遺伝子発現変動の解析結果から、両化合物ともによく似た発現パターンを示し、本実験の用量設定の妥当性を示しているものと考えられる。

DEHP と MEHP の毒性プロファイルの質的な差異の有無の検討のために、肝臓および精巣において両物質で発現パターンが異なる遺伝子群の抽出を検討したところ、現時点で、肝臓で少なくと

も 2 つ、精巣で少なくとも 3 つの遺伝子が見いだされた。今後、より詳細な解析をおこない、正確な遺伝子発現プロファイルの把握に努める。

来年度は、以上の結果を踏まえて、反復投与毒性プロファイルの検討に基づき、またそこから得られる標的臓器を中心に据え、DEHP、MEHP 両化学物質をマウスに単回投与し、マイクロアレイを用いて、DEHP、MEHP の毒性標的臓器を含む、多臓器における遺伝子発現解析を検討する予定である。具体的には、毒性標的臓器ならびに少なくとも、肝臓、腎臓、脳の 4 部位(視床下部、大脳皮質、海馬、小脳)と心臓について、mRNA を抽出し、GeneChip を用いて、網羅的な遺伝子発現データを得、DEHP、MEHP 両化合物投与による各臓器での遺伝子発現プロファイルを比較・検討し、両化合物誘発毒性の質的差異につき検討する予定である。本研究を通して、MEHP 誘発毒性をより詳細に把握することにより、MEHP の安全性評価に大きく貢献することが期待される。

E. 結論

MEHP による毒性プロファイルを早急に明らかにすることを目的として、本分担研究では、MEHP 誘発毒性をより詳細に把握する目的で、雄性マウスに各種用量の MEHP 及び DEHP を単回強制経口投与し、肝臓および精巣の mRNA につき遺伝子発現変動解析をおこなった。その結果、肝臓においては、両物質投与時の遺伝子発現プロファイルが PPAR α 活性化剤および CAR β 活性化剤投与時のものと似た様式であることが明らかとなり、MEHP の安全性評価上、意義深いものとなった。また精巣においては、両物質ともに機序は不明ながら、投与 24 時間後には、筋様細胞に特異的な遺伝子の発現変動を引き起こすことが明らかとなり、細胞骨格や細胞の収縮に影響を与えている可能性が示唆された。肝臓ならびに精巣において両物質で発現が異なる遺伝子群もいくつか得られているが、さらに現在、解析中である。

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

分担研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部

研究要旨 毒性評価が遅れている MEHP による毒性プロファイルを明らかにするとともに、その内容を当班で行う実験プロトコール作成に役立てることを目的に、MEHP の毒性に関する内外の情報を収集し整理した。その結果、精巣毒性と肝毒性についての情報が確認された。精巣毒性については親化合物の DEHP の 3 倍程度の強さであったが、いずれも高用量を投与する必要があった。肝臓については DEHP と同様にペルオキシソーム酵素系の増加が報告されている。一方、MEHP のラット 3 及び 6 ヶ月試験において飼料中濃度で最低用量 1ppm 以上の全群で心筋への影響が報告されていた。心臓への毒性はラットを用いた試験、ヒトの心筋を用いた *in vitro* 試験で示されており、MEHP の心毒性についても注意していく必要があると思われる。

A. 研究目的

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、最近になって、ガンマ線滅菌することによりプラスチック製医療器具等から溶出してくることが報告されたため、この MEHP の毒性プロファイルを把握する必要がある。そこで、MEHP の毒性プロファイルを明らかにするとともに、その内容を当班で行う実験プロトコール作成に役立てることを目的に、MEHP の毒性に関する内外の情報を収集し整理する。

B. 研究方法

本年度は、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文献調査を実施し、MEHP の毒性研究の現状についてとりまとめた。

C, D. 結果と考察

1) 急性毒性

LD50 はラット経口投与で 1340mg/kg 体重、マウス腹腔内投与で 240mg/kg 体重、ラット腹腔内投与で 415mg/kg 体重、マウス静脈内投与で 208mg/kg 体重、ラット静脈内投与で 150mg/kg 体重との報告が有る (RTECS)。

2) 局所刺激性、感作性

ラットの皮膚に MEHP を塗布すると刺激と壊死が見られたとの報告が有る (Peterson RV, 1975)。

3) 亜慢性毒性試験

【28 日間試験】雄の離乳 SD ラットに MEHP (純度 > 99%) を 1、25、100、400、1600 または

6400ppm の濃度で飼料に添加して混餌投与し、28 日後に解剖した。MEHP はコーン油に溶かし、粉末飼料に均一に混ぜた。コーン油の量は 4% とした。なお、検体の飼料中での安定性に関する情報は無かった。死亡及び臨床症状はいずれの群とも見られなかった。体重増加抑制が 6400ppm 群で見られた。臓器重量では肝臓と心臓の比重量増加が 1600 と 6400ppm 群で見られた。血清生化学検査では Mg、Ca、GPT には変化は見られなかったが、ソルビール脱水素酵素 (SDH) が 400ppm 以上の群で軽度に減少した。ALP が 100 及び 6400ppm 群で軽度に増加した。血液学的検査ではヘモグロビンとヘマトクリット値が 25ppm 以上の群で軽度に減少した。また、白血球が 100、1600、6400ppm 群で減少した。組織学的検査では投与に関連した異常は見られなかった (Chu L., et al., 1981)。

【3 及び 6 ヶ月試験】雌雄の離乳 SD ラットに MEHP を 1、5、25、125 または 625ppm の濃度で飼料に添加して、3 及び 6 ヶ月間混餌投与した。3 ヶ月後の検査では、体重、摂餌量に各群とも変化は無かった。臓器重量にも変化は見られなかった。血清生化学検査では雄の 125 と 625ppm 群で LDH が減少した。また、雄 625ppm 群で血糖値が軽度に増加した。組織学的検査では中程度の変化が肝臓、心臓、副腎に両性とも見られた。肝臓の変化は、好酸性封入体と空胞化であったが、用量依存性は見られなかった。心臓では心筋線維の核のクロマチンの分布に変化が見られ、owl eye (フクロウの目) 状の所見が見られた。Chu らは、これらの変化は MEHP による心筋のストレスによる

ものとしている。副腎では副腎束状帯の空胞化が見られたが、用量依存性は明らかではなかった。6ヶ月では体重と摂餌量には変化は無かった。死亡は雄の5ppm群で2匹、25ppm群で1匹、125ppm群で1匹見られた。Chuらは死因は不明だが、検体投与によるものではないとしている。雌の625ppm群で肝臓比重量の有意な増加が認められた。血清生化学的検査、血液学的検査では雄の625ppmで無機リンが軽度増加、カリウムが軽度減少した以外は特に変化は見られなかった。組織学的検査で、肝臓の所見は3ヶ月で見られたものと同様であった。心臓では心筋の軽度の核の小胞化、心筋横紋の分節化などの組織学的変化が1ppm群より増加した。副腎の変化は3ヶ月試験で見られたものと同じであったが、より軽度であった (Chu L., et al., 1981)。

雄のSDラット(5週齢)にMEHPを500mg/kg/日の用量で14日間経口投与したところ、肝臓比重量の増加、肝臓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)。

4)慢性/発癌性試験

慢性/発癌性試験の報告は無い。

5)生殖・発生毒性試験

雄の幼若Wistarラット(26日齢)にDEHPを2.8g/kg体重あるいはMEHPを0.4gまたは0.8g/kg体重の用量で単回経口投与し、7日後に精巣の組織学的検査を実施したところ、DEHP投与群とMEHP0.8g/kg群で精巣の萎縮が明らかであった。MEHP0.4g/kg群では精細管の直径が有意に減少したが、組織学的変化は軽度であった。さらにラットの週令による感受性の差を見るため、25、44、71日齢の雄WistarラットMEHPを0.8g/kgの用量で単回経口投与したところ、精巣の萎縮は25日齢のみ見られ、週令により感受性が異なることが示された。なお、血漿中のFSHレベルにはMEHPの影響は見られなかった (Teirlyick O. et al., 1988)。

雄Wistarラット(5週齢)にMEHPを2%の濃度で飼料に添加し、1週間混餌投与したところ、

体重増加抑制、精巣実/比重量の減少が見られた。精巣と血清のテストステロン量には変化が無かったが、精巣、肝、血清の亜鉛濃度の減少が報告されている (Oishi S. et al., 1980)。

雄のSDラット(4-6週齢)にMEHPを1g/kg体重/dayの用量で5日間経口投与後に精巣の組織学的検査を実施したところ、MEHP投与により精細管の萎縮と精巣重量の減少が見られた。同様の変化は同じプロトコールで実施されたシリアンハムスターでも見られた (Gray TJB et al., 1982)。

28日齢のB6マウスにMEHPを1g/kgの用量で単回経口投与したところ、精巣の生殖細胞のアポトーシスが投与後6時間から48時間にかけて有意に増加することを報告した (Giammona CJ. et al., 2002)。

雌のICRマウスの妊娠7、8、9日にMEHPを50、100、200、400mg/kgで経口投与あるいは50、100、200mg/kgで腹腔内投与したところ催奇形性は認められなかった。一方、母獣の死亡が経口投与、腹腔内投与の最高用量群で見られたことを報告した (Shiota K. et al., 1985)。

妊娠ddyマウス(交配雄はCBAマウス)の妊娠8日目にMEHPを0.5または1ml/kg単回経口投与したところ、外表異常と骨格異常が見られたことが報告されている (Yagi Y. et al., 1980)。

雄のF-344ラット(28日齢)にMEHPを1g/kg体重/dayの用量で単回経口投与後、1、3、6、12時間後に精巣の組織学的検索を行った結果、NF-kbサブユニットであるp65とc-Relが投与1時間後に生殖細胞の核に移行することが報告されている (Rasoulpour RJ. et al., 2005)。

6)その他の毒性

心毒性について

カナダのグループによりラットを用いて心臓に対するMEHPの影響が調べられている。実験を行った理由として、ヒトがMEHPに直接、高い濃度に接触する機会があるのは輸液(輸

血)であるため、MEHPを注射して、急性の毒性を調べたとしている。実験は、麻酔したラット5匹にMEHPを大腿動脈より注射すると、総投与量として20-30mgより心拍数の減少、40-50mgより血圧低下が認められている。投与の速度は20mgまでは、0.46mg/分、20mg-36.8mgで0.92mg/分、36.8mgからは1.9mg/分で2分間投与し、次いで、3.7mg/分で2分、最後に、動物が死ぬまでは、4.6mg/分であった。拍動数のNOELは10mg(28.5mg/kg bw)であった。一方、血圧でのNOELは55mgであり、心毒性において血圧より心拍数の方が感度が高かった。著者らは、さらに、ヒトでのMEHPの最大暴露の可能性を想定して、安全域を推定している。出血した患者が15リットルの輸血を1時間に行った場合、35日間保存した赤血球中のMEHP濃度が6.3 μ g/mlとして、MEHPの摂取量を計算すると70kgのヒトで1.3mg/kg bwと計算され、本実験のNOELに安全係数の1000で割った値の0.03mg/kg bwを超えている。最後に、このようなケースはありそうもないことわっているが、貯蔵した血液を大量に輸血する場合には比較的新鮮なものを使うことを推奨している。(Rock G. et al., 1987)。

カナダの同じグループはヒトの心臓心室縁柱標本を用いた*in vitro*試験を行った。MEHPは心筋収縮を可逆的、濃度依存的に抑制し(15-200 μ g/ml)、IC50は85 μ g/mlであった。また、著者らはヒトの心臓、肺バイパス手術患者での血液中MEHPは0-2.7 μ g/mlで、これはIC50の約35分の1であり、さらに、Sjobergら(1985)のデータでは交換輸液を受けた新生児ではMEHPが15 μ g/mlで、IC50の6分の1であることを指摘している。一方、MEHPの心筋抑制作用をアトロピンが防御した(22-32 μ g/ml)ところから、MEHPの心筋に対する作用にコリン作動性受容体を一部介していることが示唆されたと結論している(Barry YA. Et al., 1990)。また、カナダの同じグループはラットの単離還流心-肺標本に対するMEHPの影響を調べ、肺動脈圧が増加したことを報告しているが、その機序については不明であるとしている(Labow R.S. et al., 1990)。

以上、心臓への影響は*in vitro*の系で明らかであると思われるので、MEHPの標的臓器として心臓にも着目する必要があると思われる。な

お、DEHPについては心臓への影響は認められないとカナダのグループは論文中で指摘しているが、データが示されていないので詳細は不明であった。

脳への影響

当研究班でのMEHPの急性毒性試験での痙攣誘発作用、*in vitro*の系でのコリン作動性作用からMEHPの脳、神経系に対する影響が示唆され、文献検索を行ったが、MEHPの脳に対する影響を調べた文献は見つからなかった。一方、DEHPをはじめとするフタル酸類に*in vitro*の系でヒトの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有り(Kaun-Yu L. et al., 2004)、MEHPも同様の作用を有することが考えられた。今後、MEHPの脳への影響についても着目する必要があると思われる。

7)吸収、分布、代謝、排泄(ADME)

ラジオリベルしたMEHPをラットに単回経口投与(69mg/kg bw)したところ、胃腸管より容易に吸収された。単回静脈内投与では(35mg/kg bw)、調べたすべての臓器(膀胱、腎、肝、副腎、心、脾、肺、脂肪、脾、精巣、腸管、筋肉、甲状腺)に分布し、特に肝、腎、膀胱で高かった。排出は急速で、経口投与24時間後に72%が尿に、8%が糞中に排泄されている(Chu I et al., 1978)。なお、脳への分布は調べられていない。

E. まとめ

MEHPの毒性試験の文献調査を実施した結果、精巣毒性と肝毒性が確認された。精巣毒性については親化合物のDEHPの3倍程度の強さであったが、いずれも高用量を投与する必要があった。肝臓についてはDEHPと同様にペルオキシソーム酵素系の増加が報告されている。また、心臓においてはMEHPのラット3及び6ヶ月試験で最低用量1ppm以上(飼料中濃度)の全群で心筋への影響が見られている(NOELは得られなかった)。心臓への毒性はラットを用いた試験、ヒトの心筋を用いた*in vitro*試験で示されており、MEHPの心毒性については注意していく必要があると思われる。

参考文献

- Barry YA., Labow RS., Keon WJ. and Tocchi M. Atropine inhibition of the cardiodepressive effect of mono(2-ethylhexyl)phthalate on human myocardium, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 106, 48-52, 1990.
- Chu L., Secours VE., Marino IA., Villeneuve DC. and Valli VE. Sub-acute and sub-chronic toxicity of mono-2-ethylhexyl phthalate in the rat, *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 10, 271-280, 1981.
- Chu I., Villeneuve DC., Secours V., Franklin C., Rock G., and Viau A., Metabolism and tissue distribuon of mono-2-ethylhexyl phthalate in the rat, *Drug Metab Dispos.*, 6, 146- 149, 1978.
- Giammona CJ., Sawhney P., Chandrasekaran Y. and Richburg JH. Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl)phthalate exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185, 119-127, 2002.
- Gray TJB., Rowland IR., Foster PMD. and Gangolli SD. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. *Toxicol. Lett.*, 11, 141-147, 1982.
- Kaun-Yu L., Fu-Wei T, Chia-Jung W. and Pei-Shan L., Suppression by phthalates of the calcium signaling of human nicotinic acetylcholine receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Toxicol.*, 200, 113-121, 2004.
- Lake BG., Gray TJB, Foster JR. Stubberfield CR. And Gangolli SD. Comparative studies of di-(2-ethylhexyl)phthalate-induced hepatic peroxisome proliferation in the rat and hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 72, 46-60, 1984.
- Labow RS, Barry YA, Tocchi M. and Keon WJ., The effect of mono(2-ethylhexyl) phthalate on an isolated perfused rat heart-lung preparation. *Environ Health Perspect.*, 89, 189-193, 1990.
- Oishi S. and Hiraga K. Testicular atrophy induced by phthalic acid monoesters: effects of zinc and testosterone concentrations. *Toxicology*, 15, 197-202, 1980.
- Oishi S. and Hiraga K. Testicular atrophy induced by phthalic acid esters; effect on testosterone and zinc concentrations, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53, 35-41, 1980.
- Peterson RV. Final report. Toxicology of plastic devices having contact with blood. University of Utah, Salt Lake City, UT, 1975.
- Rasoulpour RJ. And Boekelheide K. NF-kappaB is activated in the rat testis following exposure to mono-(2-ethylhexyl)phthalate. *Biol. Reprod.*, 72, 479-486, 2005.
- Rock G, Labow RS., Fanklin C., Burnett R., and Tocchi M. Hypotension and cardiac arrest in rats after infusion of mono(2-ethylhexyl) phthalate(MEHP), a contaminant of stored blood. *N.Engl.J.Med.*, 316, 1218-1219, 1987.
- RTECS) US National Institute for Occupational Safety and Health Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS) Database.
- Shoberg PO., Bondesson UG., Sedin EG., and Gustafsson JP., Exposure of newborn infants to plasticizers. Plasma levels of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-2(ethylhexyl) phthalate during exchange transfusion, *Transfusion*, 25, 424-428, 1985.
- Shiota K. and Mima S. Assessment of the teratogenicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Arch. Toxicol.*, 56, 263-266, 1985.
- Teirlyick O., Maufman JM., Bogaert MG., Roels H., Testicular toxicity induced by single dosing of di and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol. Lett.*, 40, 85-91, 1988.
- Yagi Y., Nakamura Y., Tomita I., Tsuchikawa K., Shimoi N., Teratogenic potential of di-and mono-(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 4, 533-544-,1980.