

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。

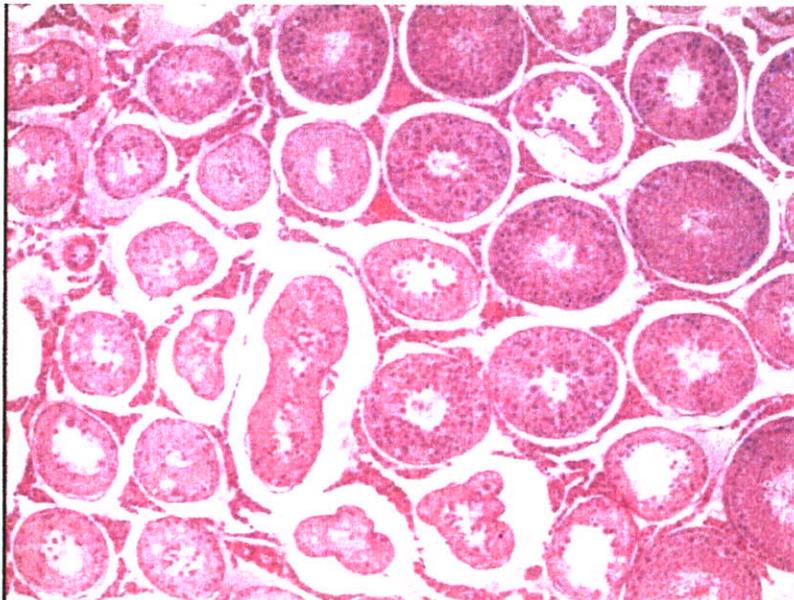


写真2 DEHP 2000 mg/kg 投与群の精巣

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。

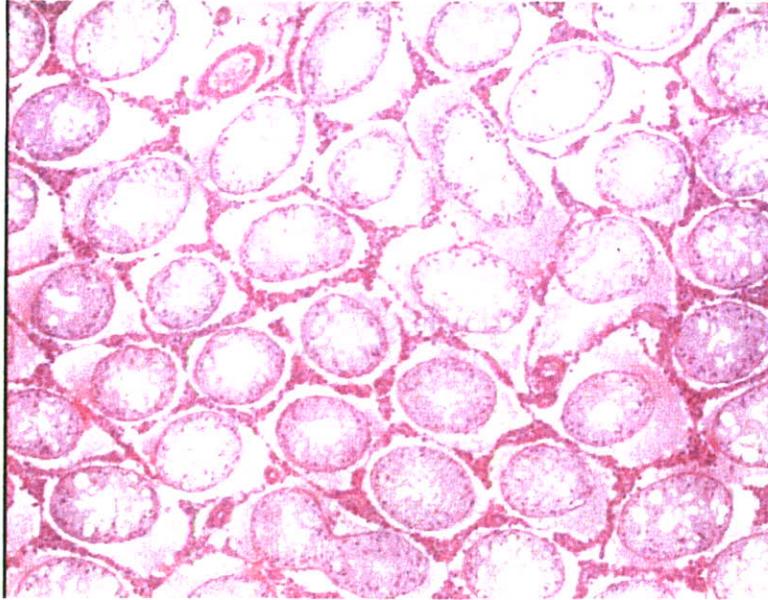


写真3 DEHP 2000 mg/kg 投与群の精巣

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。

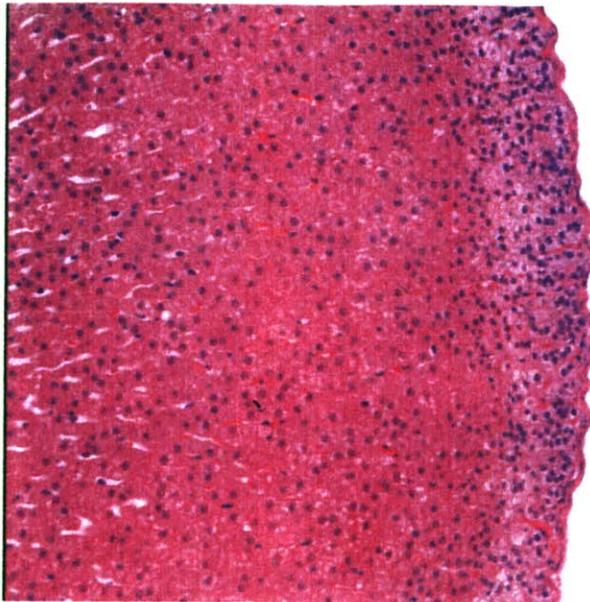


写真4 DEHP 2000 mg/kg 投与群の副腎

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。

資料 2-2)

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 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 についてはほぼ 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な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。精巢上部頭部の肥大が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、精巢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。精巢においては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、精巢上部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-Chol 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、マウスに間代性癌の発現が 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 日に一過性の間代性癌が観察された(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、造血機能に関与する脾、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糲や尿細管の変性が 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 とは異なる標的臓器選択性が現れることが明らかとなった。

本試験での無毒性量 (NOAEL) は DEHP で 150 mg/kg、MEHP で 50 mg/kg と判断した。

E. 結論

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。その結果、DEHP および MEHP とともに投与に起因したと考えられる肝、腎および精巣の変化が認められた。両物質のこれらの臓器への影響を病理組織所見および臓器重量の結果を基に比較すると、肝および精巣の変化は 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。

いずれの検査でも、DEHP 150mg および MEHP 50mg/kg 投与群では変化は認められず、本試験での無毒性量は DEHP で 150 mg/kg および MEHP で 50mg/kg と判断した。

図 1 DEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の体重・摂餌量

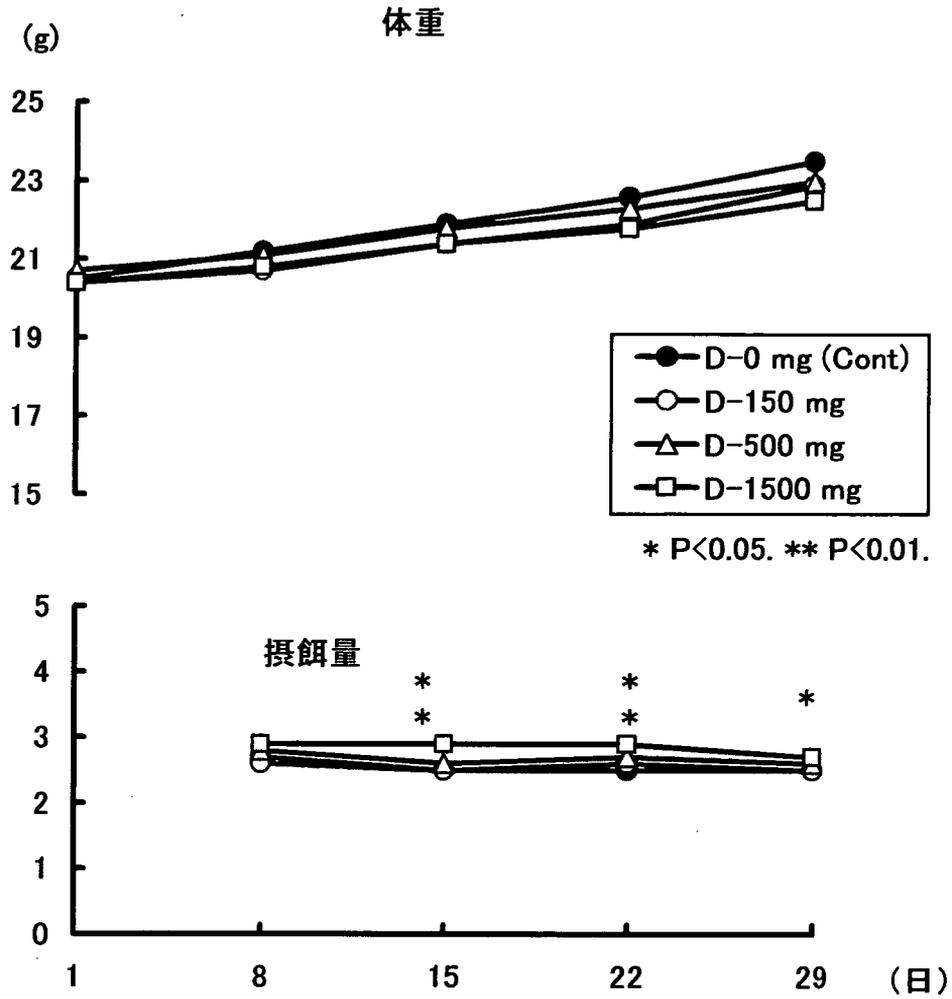


表 1 DEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の血液 学的検査

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		10	10	10	10
RBC	$10^6/\mu\text{l}$	9.81 \pm 0.26	9.84 \pm 0.29	10.00 \pm 0.48	9.73 \pm 0.39
Hb	g/dl	14.6 \pm 0.4	14.6 \pm 0.3	14.7 \pm 0.8	14.3 \pm 0.5
Ht	%	52.1 \pm 1.4	52.2 \pm 1.5	52.8 \pm 2.6	51.4 \pm 1.9
MCV	f l	53.1 \pm 0.5	53.0 \pm 0.2	52.8 \pm 0.4	52.9 \pm 0.4
MCH	pg	14.8 \pm 0.2	14.8 \pm 0.2	14.7 \pm 0.3	14.7 \pm 0.2
MCHC	g/dl	27.8 \pm 0.4	28.0 \pm 0.4	27.8 \pm 0.4	27.8 \pm 0.3
Plt	$10^6/\mu\text{l}$	0.67 \pm 0.18	0.74 \pm 0.15	0.81 \pm 0.19	0.75 \pm 0.13
WBC	$10^3/\mu\text{l}$	9.60 \pm 2.88	9.36 \pm 2.00	11.31 \pm 2.53	9.71 \pm 2.32

Each value represents mean \pm 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 2 DEHP 28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		10	10	10	10
TP	g/dl	5.2 ± 0.1	5.1 ± 0.3	5.1 ± 0.1	5.1 ± 0.2
Alb	g/dl	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1 **	3.8 ± 0.1 **
A/G		3.4 ± 0.4	3.4 ± 0.4	3.0 ± 0.2 *	3.0 ± 0.1 **
BUN	mg/dl	20.4 ± 2.5	21.2 ± 3.2	22.0 ± 2.0	22.0 ± 3.4
CRN	mg/dl	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01 **	0.14 ± 0.01 **
Glc	mg/dl	190 ± 36	194 ± 17	191 ± 12	189 ± 13
TG	mg/dl	64 ± 27	64 ± 23	63 ± 18	53 ± 20
T-Bil	mg/dl	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01 **
T-Cho	mg/dl	120 ± 8	123 ± 10	140 ± 7 **	158 ± 10 **
ALP	mu/ml	403 ± 30	407 ± 28	425 ± 21	455 ± 43 **
ALT	mu/ml	25 ± 9	21 ± 4	25 ± 6	29 ± 4 *
AST	mu/ml	111 ± 66	91 ± 27	89 ± 17	88 ± 27
γ-GTP	mu/ml	0.40 ± 0.36	0.24 ± 0.52	0.27 ± 0.50	0.63 ± 0.50
Ca	mg/dl	9.5 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.7 ± 0.2
P	mg/dl	7.2 ± 1.0	7.3 ± 0.9	7.4 ± 1.5	7.4 ± 0.5
Na	mEq/l	160 ± 1	161 ± 3	162 ± 3	162 ± 2
K	mEq/l	6.2 ± 0.3	6.3 ± 0.3	6.3 ± 0.4	6.1 ± 0.4
Cl	mEq/l	120 ± 1	121 ± 2	121 ± 3	121 ± 1

Each value represents mean ± SD.

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

TP: total protein, Alb: albumin, A/G: albumin-globulin ratio, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine, Glc: glucose, TG: triglyceride, T-Bil: total bilirubin, T-Cho: total cholesterol, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, Ca: calcium, P: inorganic phosphorus, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride.

表 3 DEHP 28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	10	10	10	10
Body weight (g)	23.5 ± 1.0	22.9 ± 0.8	23.0 ± 1.1	22.5 ± 0.7
Brain (g)	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.41 ± 0.02
(g/100g b.w.)	1.78 ± 0.07	1.81 ± 0.04	1.83 ± 0.06	1.81 ± 0.06
Heart (g)	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01 *	0.10 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.45 ± 0.02	0.44 ± 0.03	0.41 ± 0.04 *	0.45 ± 0.03
Lung (g)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.51 ± 0.02	0.52 ± 0.05	0.53 ± 0.02	0.55 ± 0.03
Liver (g)	1.30 ± 0.08	1.32 ± 0.10	1.45 ± 0.11 *	1.64 ± 0.14 **
(g/100g b.w.)				
Kidney (g)	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02
(g/100g b.w.)	1.27 ± 0.05	1.24 ± 0.06	1.24 ± 0.04	1.32 ± 0.04
Spleen (g)	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03
Testis (g)	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01 **
(g/100g b.w.)	0.79 ± 0.04	0.75 ± 0.07	0.76 ± 0.04	0.69 ± 0.05 **
Epididym (g)	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.29 ± 0.07	0.26 ± 0.02	0.25 ± 0.03	0.25 ± 0.03
Thymus (g)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.23 ± 0.02	0.21 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.21 ± 0.05

Each value represents mean ± SD.

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

表 4 DEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の病理組織所見

Organ and findings	Group No.	D-Cort (0 mg/kg)	D-150 mg (150 mg/kg)	D-500 mg (500 mg/kg)	D-1500 mg (1500 mg/kg)
Liver					
Swelling, hepatocyte	+	0	0	0	4
	++	0	0	0	6
Eosinophilic granules	+	0	0	3	4
	++	0	0	0	6
Kidney					
degenerated/regenerated epithelium	+	1	1	4	9
	++	0	0	0	0
	+++	0	0	0	0
	++++	0	0	0	0
hydronephrosis	+++	0	0	0	1
immature renal tissue	+	1	0	0	0
Testis					
decreased/throwing germ cells	+	0	0	0	8
dilatation,tubules	+	0	0	0	0
Epididymis					
degenerated germ cells	+	0	0	0	5

+:slight, ++:moderate, +++:severe,++++: extremely

図 2 MEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の体重・摂餌量

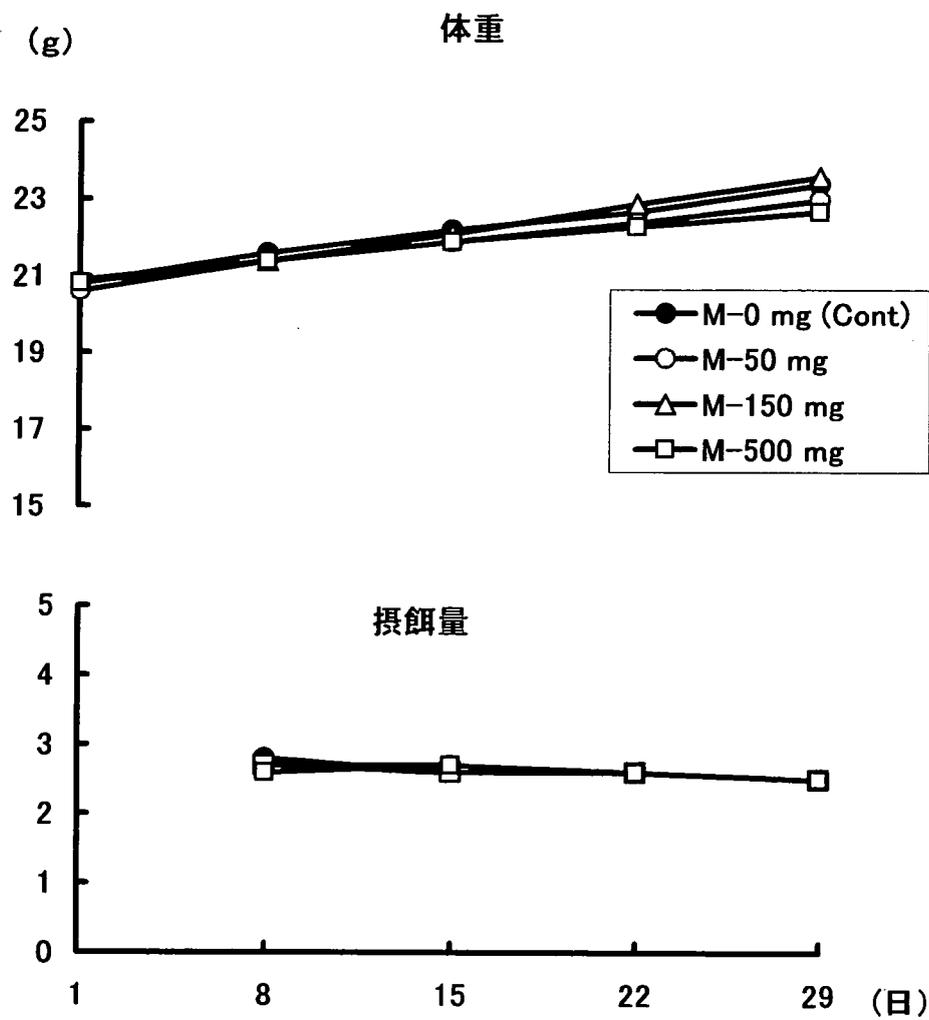


表 5 MEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の血液学的検査

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		10	10	10	10
RBC	$10^6/\mu\text{l}$	10.21 \pm 0.42	10.18 \pm 0.54	10.13 \pm 0.42	9.90 \pm 0.34
Hb	g/dl	15.1 \pm 0.5	15.1 \pm 0.7	15.0 \pm 0.5	14.4 \pm 0.6 *
Ht	%	54.1 \pm 2.1	53.8 \pm 2.9	53.3 \pm 2.1	51.7 \pm 1.8
MCV	f l	53.0 \pm 0.3	52.8 \pm 0.3	52.7 \pm 0.2	52.2 \pm 0.4 **
MCH	pg	14.8 \pm 0.2	14.8 \pm 0.2	14.8 \pm 0.1	14.5 \pm 0.1 **
MCHC	g/dl	27.9 \pm 0.4	28.0 \pm 0.3	28.1 \pm 0.2	27.8 \pm 0.2
Plt	$10^6/\mu\text{l}$	0.57 \pm 0.14	0.50 \pm 0.19	0.60 \pm 0.17	0.65 \pm 0.18
WBC	$10^3/\mu\text{l}$	10.81 \pm 2.26	14.06 \pm 2.63	13.86 \pm 4.44	15.70 \pm 3.77 **

Each value represents mean \pm SD.

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

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 6 MEHP 28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		10	10	10	10
TP	g/dl	5.3 ± 0.2	5.2 ± 0.1	5.1 ± 0.2	5.1 ± 0.2
Alb	g/dl	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1 **	3.7 ± 0.1 **
A/G		3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.2	2.6 ± 0.1 **
BUN	mg/dl	25.1 ± 3.3	23.4 ± 2.9	23.8 ± 3.6	31.0 ± 2.5 **
CRN	mg/dl	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.02 **
Glc	mg/dl	187 ± 10	203 ± 24	204 ± 26	189 ± 19
TG	mg/dl	73 ± 23	58 ± 21	66 ± 17	33 ± 13 **
T-Bil	mg/dl	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01
T-Cho	mg/dl	107 ± 7	106 ± 11	124 ± 9 **	163 ± 11 **
ALP	mu/ml	433 ± 39	403 ± 28	413 ± 25	461 ± 42
ALT	mu/ml	22 ± 2	24 ± 3	23 ± 2	26 ± 3 *
AST	mu/ml	92 ± 25	114 ± 31	98 ± 15	96 ± 33
γ-GTP	mu/ml	0.86 ± 0.31	0.67 ± 0.20	0.61 ± 0.16	2.44 ± 0.98
Ca	mg/dl	9.6 ± 0.2	9.6 ± 0.2	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.2
P	mg/dl	7.3 ± 1.2	8.0 ± 1.0	7.6 ± 0.8	7.2 ± 0.8
Na	mEq/l	155 ± 1	155 ± 2	155 ± 2	154 ± 2
K	mEq/l	6.1 ± 0.3	6.0 ± 0.4	6.0 ± 0.4	5.8 ± 0.4
Cl	mEq/l	116 ± 1	116 ± 2	116 ± 2	115 ± 3

Each value represents mean ± SD.

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

TP: total protein, Alb: albumin, A/G: albumin-globulin ratio, BUN: blood urea nitrogen, CRN: creatinine, Glc: glucose, TG: triglyceride, T-Bil: total bilirubin, T-Cho: total cholesterol, ALP: alkaline phosphatase, ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, γ-GTP: γ-glutamyltranspeptidase, Ca: calcium, P: inorganic phosphorus, Na: sodium, K: potassium, Cl: chloride.

表 7 MEHP 28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	10	10	10	10
Body weight (g)	23.4 ± 1.2	23.0 ± 0.7	23.6 ± 1.0	22.7 ± 1.2
Brain (g)	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.42 ± 0.01
(g/100g b.w.)	1.81 ± 0.08	1.83 ± 0.06	1.78 ± 0.05	1.84 ± 0.08
Heart (g)	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.10 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.44 ± 0.03
Lung (g)	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.51 ± 0.02	0.53 ± 0.04	0.51 ± 0.04	0.54 ± 0.03
Liver (g)	1.28 ± 0.07	1.28 ± 0.06	1.40 ± 0.03 *	1.60 ± 0.14 **
(g/100g b.w.)	5.50 ± 0.18	5.57 ± 0.16	5.94 ± 0.29 **	7.04 ± 0.33 **
Kidney (g)	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.03
(g/100g b.w.)	1.24 ± 0.06	1.27 ± 0.05	1.21 ± 0.07	1.33 ± 0.06 **
Spleen (g)	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.01 *
(g/100g b.w.)	0.26 ± 0.01	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.05 *
Testis (g)	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.02 **
(g/100g b.w.)	0.77 ± 0.05	0.82 ± 0.04	0.75 ± 0.07	0.65 ± 0.09 *
Epididym (g)	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.25 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.05	0.24 ± 0.04
Thymus (g)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01
(g/100g b.w.)	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.20 ± 0.04

Each value represents mean ± SD.

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

表 8 MEHP 28日間投与雄マウス(C57BL/6)の病理組織所見

Organ and findings	Group No.	M-Cont (0 mg/kg)	M-50 mg (50 mg/kg)	M-150 mg (150 mg/kg)	M-500 mg (500 mg/kg)
Liver					
Swelling, hepatocyte	+	0	0	0	0
	++	0	0	0	10
Eosinophilic granules	+	0	0	1	0
	++	0	0	0	10
Kidney					
degenerated/regenerated epithelium	+	0	0	6	0
	++	0	0	0	1
	+++	0	0	0	8
	++++	0	0	0	1
hydronephrosis	+++	0	0	0	0
immature renal tissue	+	0	0	0	0
Testis					
decreased/throwing germ cells	+	0	0	0	7
dilatation,tubules	+	0	0	0	1
Epididymis					
degenerated germ cells	+	0	0	0	6

+:slight, ++:moderate, +++:severe,++++: extremely

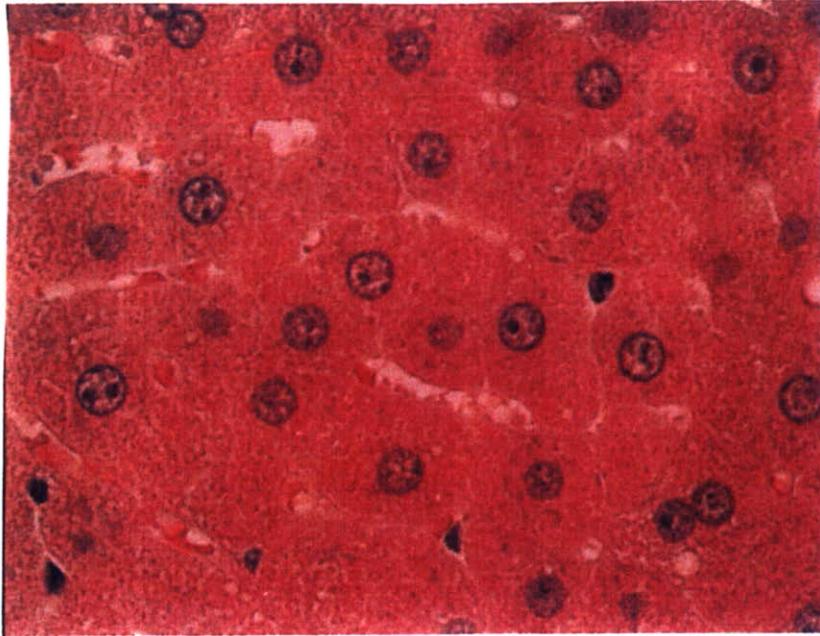


写真1 MEHP 500 mg/kg 投与群の肝

肝細胞の細胞質内に好酸性微細顆粒が充満しており、これに伴って肝細胞も著明に腫大している。

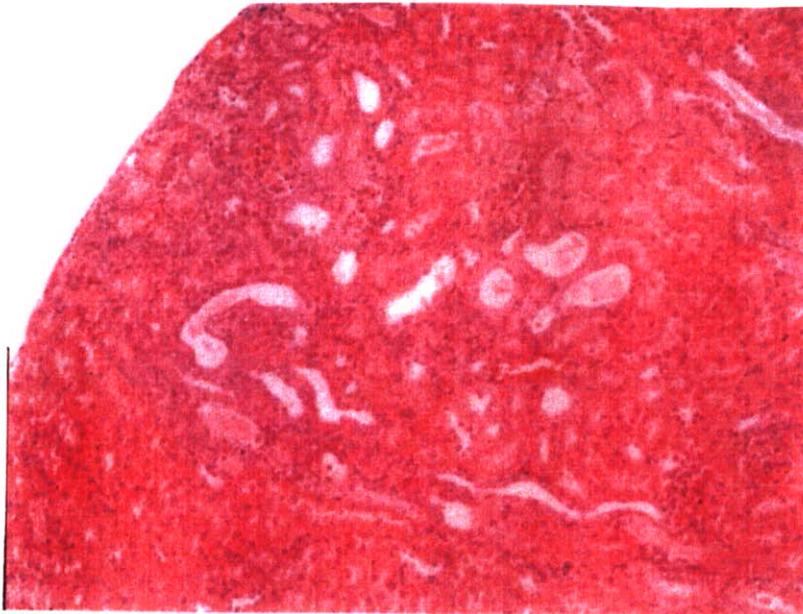


写真2 MEHP 500 mg/kg 投与群の腎

腎皮質に楔状に広がる限局性の尿細管の拡張が見られ、拡張した尿細管は好塩基性に富む小型の再生上皮細胞に覆われており、一部の尿細管内には細胞残屑を含む尿円柱も観察される。

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 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、