

200939055A

厚生労働科学研究費補助金

食品の安心・安全確保推進研究事業

母乳を介したフタル酸ジエー（2-エチルヘキシル）による乳幼児の発達毒性と  
成熟後の脂質量への影響に関する研究

平成 21 年度 総括研究報告書

研究代表者 伊藤 由起

平成 22 (2010) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

母乳を介したフタル酸ジ- (2-エチルヘキシル) による 乳幼児の発達毒性と成熟後の脂質量への影響に関する研究 伊藤由起	----- 1
--	---------

II. 研究成果の刊行に関わる一覧表	----- 45
--------------------	----------

厚生労働科学研究費補助金（食品の安心・安全確保推進研究事業）

## 総括研究報告書

母乳を介したフタル酸ジ(2-エチルヘキシル)による乳幼児の発達毒性と  
成熟後の脂質量への影響に関する研究

研究代表者 伊藤由起 名古屋市立大学大学院医学研究科

### 研究要旨

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP)は、プラスチック可塑剤として広く用いられている。DEHPは動物実験において生殖・発達毒性があり、胎仔・新生仔の体重減少や産仔数減少、生仔数減少、奇形胎仔増加、胚吸収増加等をもたらすことが明らかになっている。また、近年いくつかのヒトでの調査で、DEHPをはじめとするフタル酸エステル類によるヒトでの生殖影響が示唆されている。DEHPは体内で加水分解され、モノエチルヘキシル(MEHP)となり、peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ )に配位し、上記毒性に関わると推測されているが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない。DEHP以外のフタル酸エステル類も同様にPPAR $\alpha$ のリガンドとなることが知られている。しかしながら、PPAR $\alpha$ の機能には種差があり、動物実験によって得られたリスクをヒトに外挿する場合の妨げとなっている。そこで、野生型マウスに加え、*Ppara*-null (KO)マウス、ヒトのPPAR $\alpha$ を組み込んだ*hPPAR $\alpha$* マウスを用いてDEHPによる生殖・発達毒性のメカニズムとPPAR $\alpha$ の種差が仔に与える影響を検討した。また、現在使用されている新生児栄養補給チューブに含まれる可塑剤の種類と、ミルクへの溶出量の測定を行った。

#### a. 動物実験

12週齢の雌雄Sv/129野生型マウス、KOマウス、*hPPAR $\alpha$* マウスに、DEHP 0、0.01、0.05、0.1%を含んだ固形飼料を4週間与えた。その後、同遺伝子型、同曝露量のマウスを交配させ、妊娠18日目、出産後2日目に母獣を解剖し、血液、肝臓、脳、海馬、副腎、卵巣を採取した。同時に胎仔、生後2日目の新生仔も解剖し、血液、肝臓、脳、褐色脂肪、尻尾を採取した。解剖時のデータに加え、PPAR $\alpha$ に関連した脂肪酸 $\beta$ 酸化酵素、脂質の合成に関与する遺伝子のmRNA発現量を測定した。脂肪酸 $\beta$ 酸化酵素のタンパク発現量をWestern Blot法により解析した。また、Folch法で肝臓中の脂質を抽出し、肝臓中および血漿中のトリグリセライド (TG) と総コレステロール (T-Cho)、また血漿中葉酸濃度、エストラジオール濃度、テストステロン濃度を市販キットを用いて測定した。

胎仔、新生仔の数や重量の減少が野生型や*hPPAR $\alpha$* マウスで見られ、KOでは認めら

れなかった。したがってこれらの影響には PPAR $\alpha$  が関与していることが示唆される。*hPPAR $\alpha$*  マウスは、野生型と同様に DEHP 曝露の影響を受けていた。しかし、野生型では胎仔、新生仔の生存数の減少を特徴とするに対して、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは、新生仔の生存数は減少せず、一方胚吸収・死亡胎仔の割合は野生型よりも低い濃度から影響がみられた。このように野生型と *hPPAR $\alpha$*  マウスで、影響の受け方に差があることから、DEHP 曝露による生殖毒性影響において、マウスとヒトの PPAR $\alpha$  の果たす役割が異なっているのかもしれない。

#### b. 曝露量の把握

経鼻栄養チューブは人工ミルクに 40°C で 0.5 時間浸し溶出させ、7 種類のフタル酸エステル類、1 種のアジピン酸エステル、1 種のトリメット酸エステルをガスクロマトグラフィー質量分析計(GC/MS)にて測定をした。また、胃内での溶出も考慮に入れるため、pH3 の胃酸想定水溶液に 40°C で 24 時間浸し溶出させたものも測定した。

3 種類のチューブを用いたが、1 種のチューブ以外 DEHP は定量下限値以下であった。残りの 2 種類ではトリメット酸エステルが検出、もしくは、測定対象物質は検出されなかった。

現在経鼻栄養チューブによる DEHP の曝露は減ってきていることが確認された。しかしながら今回は食品容器包装等に含まれる可塑剤の移行等、妊娠・授乳期の他の曝露要因を検討しておらず、今後とも引き続き研究が必要である。

研究協力者：林 由美（名古屋大学大学院医学系研究科博士課程）

研究協力者：王 棟（名古屋大学大学院医学系研究科博士課程）

研究協力者：山岸 希（名古屋大学大学院医学系研究科修士課程）

研究協力者：玉田葉月（名古屋大学大学院医学系研究科修士課程）

研究協力者：中島亮輔（名古屋大学大学院医学系研究科修士課程）

#### A. 研究目的

フタル酸ジ(2-エチルヘキシル) (DEHP) は、分子式 C<sub>24</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>、分子量 390.6 の無色油状の液体である。DEHP は、フタル酸エステル類の中で最も代表的な汎用可塑

剤であり、塩化ビニル (PVC) 製品の可塑性や弾力性を増強するために 10%~60% (w/w) 程度含有される。建材関係や電線被覆、一般用フィルム・シート、食品容器や、血液バッグや人工腎臓や人工心肺の血液回路など医療の分野でも用いられてきた (Japan Plasticizer Industry Association, 2002)。DEHP は、PVC と化学結合していないため、PVC 製品から容易に溶出し、大気や食品、あるいは直接体内へと移動することで、環境中の生物やヒトは曝露される(Koch et al., 2006)。

DEHP は、まず体内でリパーゼの働きにより mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) と 2-ethylhexanol (2-EH) へと加水分解される。MEHP の一部はグルクロン

酸抱合されて尿中に排泄される。抱合を受けなかった MEHP は直接尿中に排泄されるか、cytochrome P450 (CYP4A)によって酸化され、さらに、alcohol dehydrogenase (ADH)や aldehyde dehydrogenase (ALDH)によってジカルボン酸やケトンへと酸化される。2-EH は、主にカルボン酸 (2-EHA)に代謝される。これは、さらにジカルボン酸へと酸化される (Albro and Lavenhar, 1989)。

モノ、ジカルボン酸代謝物は、Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ )を活性化しうる (Maloney and Waxman, 1999)。PPAR $\alpha$  は、レチノイド X 受容体  $\alpha$  (RXR $\alpha$ )とヘテロダイマーを形成する。この核内受容体複合体は標的遺伝子のプロモーター領域のペルオキシゾーム増殖剤応答配列に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。PPAR $\alpha$  は主に肝細胞や心筋細胞、十二指腸腺窩、腎近位尿細管、生殖器などに分布しており、標的遺伝子の転写を制御することで脂肪酸酸化、リポタンパク代謝、胆汁酸代謝、アミノ酸代謝、糖代謝、炎症、アポトーシスや細胞分裂などに影響を与えている (Braissant et al., 1996 ; Mandard et al., 2004)。

私達は最近動物実験で PPAR $\alpha$  が胎仔期における DEHP の発達毒性に関連することを明らかにした。すなわち DEHP は、PPAR $\alpha$  を持つ野生型 (Wild-type) マウスでのみ、出産数や生存数を減少させ、*Ppara*-null (KO) マウスではこれらに影響を与えなかった (unpublished data)。

PPAR $\alpha$  の機能には種差があり、リスクをヒトに外挿する場合の妨げとなっている。しかし米国 NIH の Gonzalez らによっ

て、ヒトの PPAR $\alpha$  を発現させたトランスジェニックマウスが開発され、PPAR $\alpha$  の機能の種差を解く手段として利用されている (Cheung et al., 2004)。そこで、Wild-type マウス、KO マウスに加え、KO マウスにヒトの PPAR $\alpha$  を組み込んだ *hPPAR $\alpha$*  マウスを用いて胎仔期、乳仔期における DEHP の発達毒性における PPAR $\alpha$  の関わりとそのメカニズムについて検討した。

近年化学物質のリスク評価は感受性の高い子供を基準に行われることが要求されている。DEHP の曝露に関しては、一般成人集団の1日の環境曝露量は 3-30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重であり、その 90%以上が食物に由来するといわれている (Kavlock et al., 2006)。成人や妊産婦を対象とした疫学研究はいくつか存在するか、胎児や新生児の曝露、またこの曝露が新生児期の発達に与える影響はいまだ不明な点が多く、この時期の曝露の観点からリスクが評価されていない。

DEHP の食品容器中濃度は近年減少傾向にあるが、想定外の高濃度で曝露を受ける場面がある。栄養補給に DEHP 含有のチューブを使用した児 (低体重児) の DEHP 代謝物量は DEHP フリー (他の可塑剤使用) を使用した場合に比べて高く、透析患者の 5 倍の DEHP 曝露を受けている (Kamijo et al, 2007; 小西ら論文準備中)。しかしながら、平成 14 年に厚生労働省は新生児、乳児のフィーディングチューブには DEHP が溶出しない代替品を用いるように通達を出しており、これにより現在の DEHP 曝露は減っていると考えられる。したがって、リスクの高いと考えら

れる乳幼児の現状の曝露状況の把握を行うため、経鼻栄養チューブからの溶出試験も同時に行い、現状把握と曝露メカニズムの解明を行うことを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 動物実験

DEHP は PPAR $\alpha$  のアゴニストである。しかし PPAR $\alpha$  の機能には種差があるので、マウスから得られた結果をそのままヒトに外挿し難い。そこで、この研究では種差の影響を解消させるために DEHP が配位する PPAR $\alpha$  の 3 種の遺伝子型マウス、即ちマウス型 *Ppara* (*mPPAR $\alpha$* ) (Wild-type) マウス、*Ppara*-null およびヒト型 *PPAR $\alpha$*  (*hPPAR $\alpha$* ) マウス、を用いて実験を行った。0~0.1% DEHP (混餌) を雌雄の 3 種の遺伝子型のマウスに摂食させ、その後同遺伝子型、同曝露量のマウスを交配させた。DEHP の妊娠マウスに与える影響とともに次世代の胎仔期、新生仔期、離乳期の仔マウスに与える影響を検討した。DEHP 曝露は解剖まで継続した。解剖時に、血液、肝臓、生殖器、脳を採取し、以下のことを明らかにするために実験を行った。

- 1) それぞれの遺伝子型の雌マウスの妊娠率、胎仔数、仔の生存率、仔の性比。
- 2) それぞれの遺伝子型の雄マウスの精子数、精子運動率。
- 3) 妊娠の維持に必要なホルモン、脂質量、葉酸値などへの影響。
- 4) 胎仔や新生仔および離乳時の体重、体長、肛門生殖器官距離への影響。
- 5) 新生仔期および離乳期の生殖器の発達への影響。

- 6) 胎仔期、新生仔期に見られた低体重などの毒性影響と成獣時の体重、脂質量との関連性 (遅延性影響)。
- 7) 上記の結果から胎児期、乳幼児期曝露に基づいた DEHP の発達影響における PPAR $\alpha$  の役割と毒性機序を明らかにし、健康リスク評価の知見を得ること。

### 倫理面への配慮

動物実験は名古屋大学大学院医学系研究科付属動物実験施設が定めるガイドラインに基づき、動物愛護に配慮し行った。

### 実験動物

前述の通り本研究は名古屋大学大学院医学系研究科付属動物実験施設が定めるガイドラインに基づき行った。動物は Sv/129 野生型 (Wild-type) マウス、*Ppara*-null (KO) マウス、KO マウスの肝臓にヒトの PPAR $\alpha$  を組み込んだ *hPpara* マウスを用いた。使用した動物は、室温 23-25°C、湿度 57-60%、明暗 12h サイクルという一定の環境下、市販の固形飼料及び水を自由に摂取させて飼育した。12 週齢のマウスを各遺伝子、雌雄別に各 4 群に分けた。1 群を対照(Control)とし、残り 3 群には DEHP 0.01%、0.05%、0.1% を含んだ固形飼料を自由摂取させた。4 週間後、同遺伝子型、同曝露量のマウスを交配させ、プラグの確認を妊娠 0 日とした。妊娠 18 日目、出産後 2 日目に母獣を解剖し、血液、肝臓、脳、海馬、副腎、卵巣を採取した。肝臓は、秤量し、一部を RNA later に保存した。同時に胎仔、生後 2 日目の新生仔も解剖し、血液、肝臓、脳、褐色

脂肪、尻尾を採取した。血液はヘパリン処理を行い、血漿を分離した。これらは使用するまで-80℃で凍結保存した。胎仔・新生仔においては、体重、体長、肛門生殖突起間距離 (AGD)、臓器重量を測定した。また、離乳後 10 週齢まで普通食を与え、胎仔期、乳仔期の DEHP 曝露の影響が成熟期の体重や脂質量にどのような影響があるかを検討した。

#### 性決定

マウスの胎仔・新生仔は、生殖器の発達が未熟であるため、Y 染色体上の雄性決定遺伝子である *Sry gene* を PCR 法で確認した。胎仔・新生仔の尻尾に 50 mM NaOH 180  $\mu$ l を加え、Vortex にてよく攪拌し、95℃で 10 分間加温した。1 M Tris-HCl (pH 8.0) 20  $\mu$ l を加えよく攪拌したのち、12000 rpm で 10 分間遠心し、上清を回収した。上清と KOD FX (TOYOBO 社製) を用いて PCR 反応液を調整した。*Sry gene* と、コントロールとして muscle-specific regulatory factor である myogenin gene を使用し、Yano (1993) らの報告に従ってプライマーを設計した。PCR 反応液を 94℃で 1 分間インキュベーションし、94℃で 15 秒、60℃で 30 秒、72℃で 30 秒のサイクルを 35 回行った。続けて 72℃で 5 分間反応させたのち、4℃で反応を停止した。PCR 産物を 2.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し、*Sry gene* および myogenin gene を確認した。

#### 肝臓

肝臓は 3 倍量の 0.25 M スクロースを含む 10 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を加

え、ホモジネートした。ホモジネートサンプルのタンパク濃度は Protein Assay kit (Bio-Rad 社製)を用いて測定した。

#### 脂質濃度測定

肝臓の脂質は Folch ら (1957) の方法で抽出し、トリグリセライド(TG)、総コレステロール(T-Cho)測定用の試料とした。血漿および肝臓の TG、T-Cho は、トリグリセライド E-テストワコー(WAKO 社製)及びコレステロール E-テストワコー(WAKO 社製)を用いて測定した。

#### ウェスタンブロット

肝ホモジネートの泳動用サンプルを用い、10%SDS-PAGE を行った後、ニトロセルロース膜 0.45  $\mu$ m (Bio-Rad Laboratories 社製)に転写した。3%スキムミルクでブロッキングした後、各膜をそれぞれ 1 次抗体でインキュベーションした。50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.8)、0.05%Tween 含有 50 mM Tris-HCl 緩衝溶液 (pH 7.8) で洗浄後、2 次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識 goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Reseach 社製))と反応させた。一次抗体は bifunctional protein (hydrase + 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase) (PH) (Osumi T et al., 1980)、Peroxisomal thiolase (PT) (Furuta et al., 1981)、medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) (Miyazawa et al., 1980)、very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) (Izai K et al., 1992) を使用した。発色は 1-Step<sup>TM</sup>NBT/BCIP (PIERCE 社製)を用いた。それぞれのバンドは Lane & Spot Analyzer version 5.0 (ATTO 社製)を用いて

検出し、数値化した。

#### 定量リアルタイム PCR

RNA は、RNeasy Mini kit (QIAGEN 社製) を用いて抽出した。抽出した RNA の量、質を Gene Quant II RNA/DNA 分光光度計 (Pharmacia Biotech 社製) で確認した。相補的 DNA (cDNA) は RNA 1 $\mu$ g から Oligo (dT)<sub>20</sub> primer、SuperScript III<sup>TM</sup> reverse transcriptase (Invitrogen 社製) 反応溶液 20 $\mu$ l を用いて合成した。プライマーは Primer Express 2.0.0 (Applied Biosystems Japan 社製) を使用し、設計した。用いたプライマーの配列は Table 1 に示す。それぞれの mRNA 発現量は、ABI PRISM 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems Japan 社製) で測定した。PCR 反応は 1 $\times$ SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)、100 nM プライマー溶液を含む反応液 25  $\mu$ l を用いて行った。50 $^{\circ}$ C で 2 min, 95 $^{\circ}$ C で 10 min の反応の後、95 $^{\circ}$ C で 15 sec, 60 $^{\circ}$ C で 1 min のサイクルを 40 回行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をハウスキーピング遺伝子として使用してデータ解析に用いた。すべての遺伝子の mRNA 発現量は GAPDH 発現量によって補正した。

#### ホルモン濃度と葉酸の測定

血中のテストステロン、エストラジオールと葉酸は、EIA キット(それぞれ Cayman 社、Endocrine Technologies 社、Immunodiagnostik AG 社) を用いて測定した。精巢のテストステロン濃度は、精巢に 5 倍量の PBS を添加しホモジナイズしたのち、4 $^{\circ}$ C、15000 rpm で 10 分間遠心し、上

清を血漿と同様に測定した。

#### 統計解析

すべてのデータは平均  $\pm$  標準偏差で表した。また、統計解析は 2 元配置分散分析をした後、Dunnett の多重比較を用いて検定を行った。p<0.05 を有意差があるものとして表記した。

#### 2. 現状把握

DEHP の曝露状況の把握をするため、現在医療機関で使用されている栄養補給チューブをミルクに浸し、DEHP を溶出させ、栄養チューブ中の DEHP 濃度の把握を行った。

#### サンプル

愛知県内の A 病院より、過去に主に使用していた「DEHP フリー」と表記のあるもの (チューブ I)、現在主に使用している「PVC フリー」と表記のあるもの (チューブ II)、また通常はあまり使わないがまれなケースで用いる可能性がある多用途のもの (チューブ III) の 3 種類の経鼻栄養チューブを提供していただいた。

#### 溶出条件

溶出は片面溶出が無困難であったため、両面溶出を行い、後に表面積あたりで補正をした。溶出試験は、人間の体温を考慮し、40 $^{\circ}$ C で行った。溶出溶媒には、人工ミルクの他、実際に胃の中に管が入っていることを想定し、胃酸に近い pH 3 の溶液を用いた。人工ミルクは所定の方法で粉末を溶かしたものを用いた。人工ミルクは、チューブからの溶出時間を 0.5



時間、pH 3 の溶液中は 24 時間とした。また、チューブを入れていない操作ブランクをとり、コンタミがないかを確認した。測定はそれぞれ 3 検体ずつ行った。各チューブは表面積 1 cm<sup>2</sup>あたり、1.7 ml の溶媒に浸した。

#### フタル酸類の測定

溶出試験を行った溶媒に内部標準である DBP の重水素置換体を加えた後、ヘキサンを用いて 2 回フタル酸エステル類を抽出し、その後濃縮しサンプルとした。

フタル酸類のコンタミを防ぐため、基本的にディスポーザブルのガラス器具を用い、使用前に 200°C で 2 時間以上加熱をしてから用いた。また、試薬は和光純薬より入手し、環境測定用または HPLC グレードのもの、これらが無い場合は特級を使用した。フタル酸エステル類の標準品も同様に和光純薬より入手し、トリメット酸エステルのみ東京化成より入手した。測定物質は、di-ethyl phthalate (DEP), di-isobutyl phthalate (DIBP), di-propyl phthalate (DPP), di-butyl phthalate (DBP), benzyl butyl phthalate (BBP), di-cyclohexyl phthalate (DCHP), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の 7 種類のフタル酸エステル類に加え、アジピン酸エステルである di-(2-ethylhexyl) adipate (DOA)、最近 DEHP の代替品として使用が増えていると考えられているトリメット酸エステル類の tri-(2-ethylhexyl)-trimellitate (TOTM) の計 9 種類とした。

GC/MS の条件は、Shen (2005) の論文を参考にした。キャピラリカラムは HP-5 5%phenyl Methyl Siloxane を用い、150°C

0.5min の後、5°C/min で 220°C まで昇温の後、3°C/min で最終的に 275°C まで昇温した。インジェクション量は 1.0 ml でスプリットレス、ヘリウムガス流量は 1.0 ml/min であった。EI モードにて、イオン化を行い SIM モードで測定した。(定量イオンは 129, 149, 153, 305)。得られたクロマトグラフを元に溶出溶媒あたりの濃度を計算した。

#### C. 研究結果

##### <動物実験結果>

##### 1. 妊娠・出産後マウスの体重と臓器重量

妊娠・出産後マウスとも体重、肝臓、海馬、副腎、卵巣重量の遺伝子型の違いは見られなかった。Control 群の脳重量は遺伝子型間の差が見られ、KO マウスは Wild-type マウスに比べ低値を示した。妊娠マウスの体重は、Wild-type マウスの高濃度曝露群で Control 群に比べ低値であった (Table 2-A)。肝臓の絶対重量は、遺伝子型、DEHP 曝露による変化は見られなかったが、相対重量では、Wild-type マウスの高濃度曝露群で増加していた。出産後マウスでは、Wild-type マウス高濃度曝露群の体重は低値を示した (Table 2-B)。

##### 2. 胎仔・新生仔の数、重量

胎仔、生仔、胎盤数、胎盤重量は、遺伝子型間による違いは見られなかった (Table 3-A)。Wild-type マウスでは、胎仔数、生仔数が DEHP 高濃度曝露群で有意に減少していた。また、胎盤重量、胎盤あたりの胎仔数、胎盤あたりの生仔数においても高濃度曝露群で減少していた。KO マウスでは、DEHP 曝露による影響は

見られなかった。*hPPAR $\alpha$*  マウスでは、数による有意な差は見られなかったが、胎盤重量、胎盤あたりの胎仔数、胎盤あたりの生仔数は、中濃度、高濃度曝露群で、胎仔あたりの生仔数は高濃度曝露群で減少していた。また、胚吸収・死亡胎仔の割合は Wild-type の高濃度群、*hPPAR $\alpha$*  マウスの中濃度、高濃度群で有意に増加していた。

新生仔の出産数、生仔、死亡数は、遺伝子型間による違いは見られなかった (Table 3-B)。生仔数は、Wild-type マウスで濃度依存的に減少したが、KO マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは有意な差は認められなかった。また、死亡数、生存率、死亡率は DEHP 曝露による有意な差は認められなかった。

### 3. 胎仔・新生仔の体重・臓器重量・長さ

胎仔 (Table 4) 及び新生仔 (Table 5) の体重・臓器重量・長さを雌雄別に示した。AGD は体重で補正した。胎仔の体重は、雌の Control 群において遺伝子間に差がみられ、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは雌の Wild-type マウスよりも低値を示した。雌の *hPPAR $\alpha$*  マウスでは中濃度、高濃度 DEHP 曝露により体重が減少した。AGD/体重は、雄の *hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度群と、雌 KO マウスの中濃度、高濃度も有意に高かった。ただし、雌 KO マウスの Control 群は有意に野生型の Control 群に比べて短く、DEHP による影響ではないかもしれない。Wild-type マウスの変化は、DEHP 曝露量に依存した変化ではなかった。長さは、雌の *hPPAR $\alpha$*  マウスで有意に短く、主に、頭部の大きさと尾部の長さの減少による

ものと考えられる。雄の *hPPAR $\alpha$*  マウスにおいても高濃度群で頭部の減少がみられている。尾部に関しては、Wild-type マウスの高濃度群でも有意に短くなっていた。胎仔の肝臓重量は Control 群において遺伝子型間で差があり、雌雄の KO マウス、雌の *hPPAR $\alpha$*  マウスで、雌雄それぞれの Wild-type マウスに比べ、低値を示した。また、DEHP 曝露により、*hPPAR $\alpha$*  マウスの雌の中濃度、高濃度曝露群で *hPPAR $\alpha$*  マウスの Control 群に比べ減少していたが、相対肝重量では有意差は見られなかった。

胎仔の脳重量は、雌の *hPPAR $\alpha$*  マウスが他の遺伝子型に比べ低値を示した。DEHP 曝露による影響は、雌の Wild-type マウス高濃度曝露群と、雌雄の *hPPAR $\alpha$*  マウス中濃度曝露群で、それぞれの Control 群に比べ減少していた。

新生仔では、体重、脳重量において雌雄ともに遺伝子型間で差が見られ、Wild-type マウスに比べ、KO マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスで低値を示した。雄の AGD/体重は、Wild-type マウスより KO マウスで高値となった。雌の肝臓重量は Wild-type マウスに比べ、KO マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスで低値を示した。DEHP 曝露によって、Wild-type マウス雄の中濃度曝露群と *hPPAR $\alpha$*  マウス中濃度曝露群の雄と低濃度曝露群の雌で AGD/体重が上昇していた。*hPPAR $\alpha$*  マウス高濃度曝露群では、体重が約 1.5~1.8 倍の新生仔が生まれたため、体重、長さ、肝臓、脳の重量が Control 群に比べ有意に上昇していた。

#### 4. 脂質

血漿中の TG は、全ての遺伝子型のマウスで出産後に比べ妊娠期で非常に高値を示した (Fig.1-A,C)。妊娠マウスの血漿中 TG には Control 群において遺伝子間で差があり、*hPPARα* マウスが、Wild-type マウスに比べ低値を示した。DEHP 曝露では、Wild-type マウスの DEHP 高濃度曝露群で有意に低下した (Fig.1-A)。妊娠期の肝臓中 TG は、Wild-type マウスの高濃度曝露群で増加した (Fig.1-B)。出産後マウスの血漿中 TG は DEHP 曝露による有意な変化は認められず (Fig.1-C)、肝臓中 TG は Wild-type マウスの高濃度曝露群のみで高値を示した (Fig.1-D)。血漿中 T-Chol は、妊娠マウスでは影響を与えなかった (Fig.2-A)。出産後マウスの血漿中 T-Chol は、Wild-type マウスの中濃度、高濃度曝露群、*hPPARα* マウスの高濃度曝露群で有意に増加した (Fig.2-C)。肝臓中の T-Chol は、妊娠 KO マウスの中濃度、高濃度曝露群で増加したが、出産後マウスでは、DEHP 曝露による影響は認められなかった (Fig.2-B,D)。

#### 5. マウス型およびヒト型 PPARα

(*mPPARα* と *hPpara*) の mRNA 発現量

DEHP 曝露により血漿・肝の TG に変化が見られたので、これを制御している PPARα の発現量を測定した。妊娠マウスの *mPPARα*-mRNA または *hPpara*-mRNA 発現量は、DEHP 曝露による変化が見られなかった (Fig.3-A)。一方、出産後マウスの *mPPARα*-mRNA 発現量は、DEHP 曝露により濃度依存的に上昇していたが、

*hPpara*-mRNA 発現量は変化が見られなかった (Fig.3-B)。

#### 6. ペルオキシゾーム系脂肪酸 β 酸化酵素 (PH、PT)

PPARα のペルオキシゾーム系標的遺伝子として肝臓の PH と PT の発現を検討した。妊娠マウスの PH のタンパク発現量は、DEHP 曝露により Wild-type マウスの中濃度、高濃度曝露群で有意に上昇した (Fig.4-A)。KO マウスの高濃度曝露群においても Control 群に比べて上昇したが、Wild-type マウスの高濃度曝露群に比べると、発現量は 1/3 程度であった。PT のタンパク発現量は、野生型の高濃度曝露群で上昇していた。出産後マウスでは、Wild-type マウスの高濃度曝露群で PH のタンパク発現量が上昇していた (Fig.4-B)。PT のタンパク発現量に有意な差は認められなかった。

mRNA 発現量に関しては、妊娠マウスにおいて、PH、PT ともに Wild-type マウスの高濃度曝露群で Control 群に比べ有意に上昇した。KO マウスでは変化は見られなかったが、*hPPARα* マウスでは PT のみ高濃度曝露群で上昇していた (Fig.5-A)。出産後マウスでは、DEHP 曝露により、Wild-type マウスの中濃度、高濃度曝露群で PH は Control 群に比べ有意に上昇したが、KO マウス、Wild-type マウスの高濃度曝露群で Control 群に比べ有意に上昇した。KO マウス、*hPPARα* マウスでは有意な差は認められなかった (Fig.5-B)。PT は、Wild-type マウスと *hPPARα* マウスの中濃度と高濃度曝露群で有意に上昇していた。

## 7. ミトコンドリア系脂肪酸β酸化酵素 (MCAD、VLCAD)

PPAR $\alpha$  のミトコンドリア系標的遺伝子として肝臓の MCAD と VLCAD の発現量を検討した。妊娠マウスの MCAD のタンパク発現量は、曝露による有意な差は認められなかった(Fig.6-A)。VLCAD のタンパク発現量は、Wild-type マウスの中濃度曝露群で有意に上昇したが、KO マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは有意な差は認められなかった。出産後マウスの MCAD タンパク発現量は、Wild-type マウスの高濃度曝露群で増加していた (Fig.6-B)。VLCAD のタンパク発現量に有意な差は見られなかった。

mRNA 発現に関しては、妊娠マウスでは、*hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度曝露群で MCAD の上昇が見られたが、VLCAD はどの遺伝子型マウスにおいても変化は見られなかった(Fig.7-A)。出産後マウスでは、MCAD と VLCAD の mRNA 発現が、Wild-type マウスの中濃度、高濃度曝露群、*hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度曝露群でそれぞれの Control 群に比べて上昇した。また、KO マウスでは曝露による変化は見られなかった(Fig.7-B)。

## 8. 脂質合成酵素

脂質合成に関与する遺伝子として肝臓の diacylglycerol acyltransferase (Dgat) の 1、2 (Dgat1、Dgat2) と、HMG-CoA synthase の mRNA 発現量を検討した。DEHP 曝露により、妊娠期の *hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度曝露群で Dgat1 発現量が有意に上昇していた (Fig.8-A)。しかし Dgat2 発現量には有意な差が見られなかった。HMG-CoA

synthase は、KO マウスの低濃度と *hPPAR $\alpha$*  マウスの中濃度群で上昇していた。出産後マウスの Dgat1 の発現量は、*hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度群で有意に上昇していたが、Wild-type および KO マウスでは変化は見られなかった(Fig.8-B)。Dgat2 は KO マウスの低濃度曝露群で減少していた。

HMG-CoA synthase は、Wild-type マウスの中濃度、高濃度曝露群、*hPpara* マウスの高濃度曝露群で各遺伝子型の Control 群に比べ上昇していた。

## 9. 胎盤中 PPAR $\alpha$ とその標的遺伝子の mRNA

胎盤や仔の発育に関与し、胎盤における必須脂肪酸のホメオスタシスに関与している遺伝子として、胎盤中の PPAR $\alpha$  を測定した(Fig.9)。胎盤中の PPAR $\alpha$  発現量は、母獣マウスの肝臓の発現量に比べ 1/100 以下であった。胎盤中の PPAR $\alpha$  発現量は、遺伝子型間で差が見られ、Wild-type マウスが KO マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスに比べ高値を示した。DEHP 曝露は Wild-type マウスの高濃度曝露で PPAR $\alpha$  発現量を有意に減少させた。

胎盤中の PH も PPAR $\alpha$  と同様に DEHP 曝露により Wild-type マウスで減少する傾向がみられたが有意な差は認められなかった。

## 10. 血漿中葉酸濃度

妊娠時に必要な葉酸の濃度を測定したが、遺伝子型、DEHP 曝露濃度ともに影響を与えなかった(Fig. 10)。*hPPAR $\alpha$*  マウスに関しては、高濃度曝露群で匹数が十

分に揃う前に測定したため、今後匹数を増やして測定しなおす必要がある。

#### 11. 血漿中エストラジオール濃度

妊娠マウスの血漿中エストラジオール濃度は、Wild-type マウスの中濃度、高濃度群で減少傾向にはあるものの、有意な差は見られなかった(Fig. 11)。Control 群の遺伝子型間も KO が低い傾向にはあるが、有意ではなかった。出産後マウスのエストラジオールは、今回使用したキットでは検出限界以下であった。

#### 12. 血漿、精巢中テストステロン濃度

交配させた雄マウスの血漿中、精巢中テストステロン濃度は遺伝子型、DEHP 曝露による影響は見られなかった(Fig. 12)。特に、Wild-type マウスの精巢中のテストステロン濃度は、曝露濃度依存的に上昇傾向を示したが、個体差が大きく、有意差は見られなかった。また、精巢上体尾部中の精子数、精子運動率も DEHP 曝露による影響は見られなかった(data not shown)。

#### 13. 離乳後の体重変化

胎仔期、乳仔期中濃度の DEHP 曝露マウスから生まれた雄の仔マウスの遅発影響を観察した(Fig. 13)。離乳時の体重はいずれの遺伝子型マウスにおいても Control 群と DEHP 曝露群との間に差は見られないが、*hPPAR $\alpha$*  マウスのみ DEHP 曝露群では体重が増加する傾向が見られた。

#### 14. 成熟期の血漿中 TG 濃度

雄 10 週齢時の血漿中の TG 濃度は、Wild-type マウスでは Control 群と DEHP 曝露群では変化は見られないが、KO マウスでは DEHP 曝露群の方が低く、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは逆に DEHP 曝露群の方が高かった(Fig. 14)。しかしながら、曝露群はまだ匹数が十分ではないため、今後も継続して実験を行い匹数を確保していく予定である。

#### <現状把握>

##### 1. 測定法の検討

標準品を用いて定量イオンと保持時間の確認を行った(Fig. 15)。Shen (2005)の論文で測定を行っていなかった DOA、TOTM についても同時測定を行うことができた。Shen の報告では、LC-18 固相抽出カラムを用いて 85–96%の回収率を得ているが、同様に高い回収率を求めてもこのような高い回収率にならず、今回は固相抽出カラムは用いず、ヘキサン抽出のみを行った。

##### 2. 測定結果

チューブ I, II, III のクロマトグラフを Fig. 16-18 に示す。チューブを入れていない操作ブランクでは、DIBP, DBP, DEHP の保持時間にピークらしきものが見られるが、定量限界(0.05  $\mu\text{g/L}$ ) 以下であった。チューブ I は主に TOTM が検出され、濃度は  $271 \pm 46 \mu\text{g/L}$  であった。このチューブの包装には DEHP フリーとの表記があり、実際に DEHP は定量限界以下であった。チューブ II は今回測定対象とした物質は全て定量限界以下であった。チューブ III は主に DEHP が  $518 \pm 91 \mu\text{g/L}$  検出された。

また、胃酸を想定した pH3 の水溶液に 24 時間浸した結果、DEHP はチューブ III からのみ検出され、その濃度は  $796 \pm 90$   $\mu\text{g/L}$ 、TOTM はチューブ I からのみ検出され、その濃度は  $241 \pm 60$   $\mu\text{g/L}$  であった。

#### D. 考察

妊娠期の DEHP 曝露は、胎仔数や、生仔数を減少させることが知られている (Lamb et al., 1987)。本実験でも、Wild-type マウスで、胎仔数や生仔数が減少した。また、*hPPAR $\alpha$*  マウスでも、胎盤あたりの胎仔数や生仔数に影響がみられた。一方、KO マウスでは DEHP 曝露による影響がなかったことから、胎仔や新生仔に対する毒性には PPAR $\alpha$  が関与していることが再確認された。マウス型のみならず、ヒトの PPAR $\alpha$  が胎児仔期における DEHP の発達毒性を制御している点に興味を持たれる。

DEHP の胎仔や新生仔への影響のメカニズムは、母側と仔側の両面から検討する必要があるが、この研究では、まず、母側への影響を検討した。DEHP 曝露による妊娠期の母獣では、体重の減少と相対肝重量の増加が Wild-type マウスの高濃度曝露群でみられた。母獣の体重が減少した理由の 1 つは、胎仔数が減少したことが関与していると考えられる。Wild-type マウス高濃度曝露群の母獣の体重に減少した胎仔の体重、つまり (Control 群の仔の数の平均 - 高濃度曝露群の仔の数の平均)  $\times$  高濃度曝露群の仔の体重の平均、これを加えると約 33g となる。これは、Control 群の体重 (約 37g) に

接近するが、依然として Control 群の体重よりも低いため、仔の数の減少以外にも原因があるのかもしれない。母獣の体重減少は Wild-type マウスでのみ観察されたことから、DEHP 曝露による PPAR $\alpha$  の転写活性化が大きく関わっていると考えられる。Wild-type マウスでは、DEHP により母獣の肝 PPAR $\alpha$  が強く転写活性化されると、脂肪酸の $\beta$ 酸化が促進され、血漿 TG が減少した。このようなエネルギーのアンバランスが、母獣の体重に影響を与えているのかもしれない。実際 DEHP による転写活性化が弱い *hPPAR $\alpha$*  マウスや PPAR $\alpha$  を欠損する KO マウスでは、母獣の体重減少は観察されなかった。

胎盤は母親と胎仔の間で栄養の輸送を制御している。胎盤は輸送や異物代謝に関わる酵素やトランスポーターなどのタンパクを大量に発現しているため、胎盤の機能の変化は、胎仔の成長に影響を与えると考えられる (Xu et al., 2008)。これらのタンパクの多くを直接的あるいは間接的に制御しているのが PPAR である (Fournier et al., 2006; Xu et al., 2007) PPARs は reproductive cycle において独自の役割を果たしているようである。

胎芽や胎盤形成、発達には PPAR $\gamma$  や  $\beta/\delta$  が関与している。また、胎仔発達の後期から出産後にかけてエネルギー代謝を制御しているのは PPAR $\alpha$  である (Rees et al., 2008)。本研究では、妊娠 18 日目に採取した胎盤中の PPAR $\alpha$  と PPAR $\gamma$  を測定した。PPAR $\alpha$  の発現量に比べ PPAR $\gamma$  の発現量は非常に小さく、検出限界以下であったことから、妊娠後期には、PPAR $\gamma$  ではなく PPAR $\alpha$  が重要な役割を持っていることが

推測できる。

胎盤数は、PPAR $\alpha$  遺伝子型、DEHP 曝露による影響は見られなかった。つまり、遺伝子型、DEHP 曝露は、胎盤の形成には影響を与えていないと考えられる。DEHP の代謝物は $\beta/\delta$ には配位せず、 $\gamma$ には配位するが、非常に弱いため、胎芽や胎盤形成には影響を与えなかったのであろう。一方、胎盤重量が Wild-type マウスと *hPpara* マウスにおいて DEHP 曝露によって減少したのは、死亡胎仔の胎盤や、胎仔が欠損した胎盤数が増えていたことが原因かもしれない。これらの胎盤は、正常胎仔の胎盤重量に比べると 1/2 以下であった。胎仔の成長には適切な胎盤発達が必要であり、胎盤が小さいと利用できる栄養も制限される(Rees et al., 2008)。これらのことから、DEHP 曝露は胎盤形成後の発達の段階に影響を与えていることが考えられる。

先に述べたように、PPAR $\alpha$  は、胎仔の発達において非常に重要な意味を持っており、PPAR $\alpha$  の発現量の変化は、仔の成長へ様々な影響を及ぼすと考えられる。そこで、胎盤中の PPAR $\alpha$  を測定したところ、母獣の肝臓中とは違い、DEHP 曝露で減少していた。すなわち胎盤の PPAR $\alpha$  は DEHP 曝露により転写活性化されず、むしろ発現が低下した。結局、DEHP 曝露は胎盤の PPAR $\alpha$  の発現を抑制し、胎盤の発達を抑制し、脂肪酸の代謝を抑えてエネルギー代謝を抑え、このことが胎仔数の減少や生存数の減少へつながったのかもしれない。

新生仔の体重は、遺伝子型による差があり、Wild-type マウスに比べ、KO マウ

スや *hPPAR $\alpha$*  マウスでは低体重であった。胎盤中の PPAR $\alpha$  が KO マウスや *hPPAR $\alpha$*  マウスではほとんど発現していないことから、仔の発達に關与する物質が PPAR $\alpha$  の発現量の変化によって制御されているのかもしれない。

*hPPAR $\alpha$*  マウスの高濃度曝露群では、プラグは観察できたもののお腹が大きくなるマウスが多くいた。これらのうちマウス 14 匹中 5 匹では、胎芽の段階で発達が止まり、胎盤は形成されていなかった。胎芽の段階で発達が止まってしまう原因は不明である。また、14 匹中 6 匹ではプラグを確認したが、胎芽や胎盤の形成は見られなかった。Control の雄と雌、0.3%DEHP 曝露雄と Control の雌、Control の雄と 0.3%DEHP 曝露の雌を曝露した Lamb らの実験では、3 群間にプラグの割合の違いは見られなかったが、0.3%DEHP 曝露の雄と Control の雌では、曝露により妊娠率は低下した。また、Control の雄と 0.3%DEHP 曝露の雌の組み合わせでは、1 匹も妊娠が成立しなかった(Lamb et al., 1986)。本実験では、組み換え交配試験は行っていないが、Lamb の報告と同様に DEHP 曝露によるプラグの割合には大きな影響を与えず、妊娠率は減少したと考えられる。DEHP は、精巣重量の減少や精巣の委縮、精子数の減少や形態異常を引き起こすことが知られている(Agarwal et al., 1986 ; David et al., 2000)。妊娠が成立しなかった理由として、雄マウスの生殖毒性についても検討する必要がある。そこで、精子数、精子運動率を検討したが、遺伝子型、DEHP 曝露による違いは見られなかった。精子の奇形率は検討してい

ないが、妊娠が成立していなかった要因は雌にあることが示唆される。

血漿中 TG は、非妊娠期に比べ妊娠期で上昇する。ラットでは、妊娠が進むにつれ TG は上昇し、妊娠 17 日目には非妊娠時の約 2.5 倍になる。妊娠 21 日目には 17 日目より少し減少するものの、非妊娠時の約 2 倍高い値となる。TG は妊娠後期の胎仔発達のために消費されるが、母獣の貯蔵脂質からの供給によって血中の TG は上昇すると考えられる(Honda et al., 2008)。このように、妊娠期の TG は妊娠維持に重要な意味をもっている。よって、DEHP 曝露による Wild-type マウスの血漿中 TG の低下は、胎仔の発育を妨げるような影響を与えているのかもしれない。

Wild-type マウスの相対肝重量の上昇には TG の蓄積が関与していると思われる。これは妊娠期の Wild-type マウス高濃度曝露群の肝臓中 TG 濃度が増加していることと一致する。

肝臓中の TG は、Wild-type マウスの高濃度曝露群で上昇したため、TG の合成について検討した。Dgat は、TG 合成の最終段階でアシル CoA とジアシルグリセロールから TG を合成する。Dgat1 は小胞体で TG を合成し、血中の VLDL 合成に関与している。一方、Dgat2 は細胞質で TG を合成し、Dgat2 過剰発現で脂肪肝を誘発する(Yamazaki et al., 2005)。肝臓中 TG 濃度が上昇した妊娠期の Wild-type マウスでは、Dgat には変化が見られなかった。つまり、肝臓中の TG が上昇したのは、TG の合成が亢進したためではないということになる。

コレステロールも TG と同様に、胎仔の

発達には必要である。コレステロールは、細胞膜の構成成分やホルモンの原料となる。胎仔のコレステロールは、母親から胎盤を経由して輸送される。母親のコレステロールの減少や、胎盤のリポタンパク受容体の発現の減少は、胎仔の発育不全や小頭症を引き起こす(Burke et al., 2009)。コレステロールは、TG とは違い、妊娠期で急激に増加することはなく、むしろ妊娠初期から中期にかけては非妊娠時よりも低値を示す。その後次第に上昇し、妊娠 21 日目のラットでは 14 日目に比べ、約 1.7 倍になるが、非妊娠時と比べると 1.2 倍程度である(Honda et al., 2008)。血中 T-Cho 濃度が減少するのは、妊娠期に血漿量が増加することによるもので、その後起こる T-Cho の上昇は、母獣の代謝が、TG や乳糖などの基質へシフトしていくためと考えられる(de Rijk et al., 2002)。本研究では、妊娠 KO マウスの肝臓中と出産後 Wild-type マウス、*hPPAR $\alpha$*  マウスの血漿で T-Cho の上昇がみられた。また、合成酵素である HMG-CoA synthase も上昇していたことから、DEHP 曝露によりコレステロール合成が亢進し、肝臓中または血中の T-Cho が上昇したと考えられる。また、Wild-type マウスと KO マウスで T-Cho の上昇がみられたことから、*PPAR $\alpha$*  が関与しない反応であるのかもしれない。しかしながら、本実験における胎仔数や生存数の減少との相関は見られず、DEHP 曝露による T-Cho の上昇と胎仔への影響については更なる検討が必要である。

DEHP は *PPAR $\alpha$*  のアゴニストであるため、DEHP 曝露により *PPAR $\alpha$*  の発現量は



上昇する。また、PPAR $\alpha$ の標的遺伝子であるPHやPTも上昇した。一方、MCADやVLCADの発現量には変化がみられないか、みられた場合でもその割合はPHやPTに比べ小さかった。このことから、DEHP曝露により、脂肪酸の代謝はミトコンドリア系よりもペルオキシゾーム系において強い影響を受けることが考えられる。また、PPAR $\alpha$ 自身やこれらの標的遺伝子の誘導は、Wild-typeマウスに比べて*hPPAR $\alpha$* マウスで弱く、*hPPAR $\alpha$* は脂質代謝能が*mPPAR $\alpha$* に比べて劣るかもしれない。

また、経鼻栄養チューブのミルクへの溶出試験でDEHPとTOTMが検出された。TOTMは近年使用が増えている物質である。TOTMはDEHPに比べて溶出が少ないとされており(Horne et al., 2009)、Itoら(2008)の報告によると、TOTMの溶出はDEHPに比べて約10分の1である。今回の人工ミルクへの溶出試験の結果では、DEHPを主の可塑剤と考えられるチューブIIIのDEHPの溶出モル量は、TOTMを主の可塑剤と考えられるチューブIからのTOTMの溶出モル量の約2.7倍であった。

前述のItoらの報告ではTOTMのPVCから静脈内投与製剤への溶出濃度は160–5600  $\mu\text{g/L}$ であり、今回の人工ミルクの溶出結果は似たような値であった。また、DEHPのミルクへの溶出濃度を報告している論文はないが、経腸栄養剤への溶出を行った論文(Takatori et al., 2008)を参考にすると、栄養剤の種類や脂質量によって値が異なるが、144–1080  $\mu\text{g/L}$ 程溶出している。これらの論文とは溶出

溶媒ならびに溶出条件が異なり一概には比較できないが、DEHPを主に使用してあると思われるチューブIIIでは同程度の結果が得られた。

TOTMの毒性はDEHPに比べて低いと言われているが、肝細胞毒性(Kambia et al., 2004)や肝臓の酵素の誘導を評価した研究(Rathinam et al., 1990)しか報告されておらず、安全性確認のためには更なる研究が必要である。

また、今回は胃酸でのチューブからの溶出も想定して今回はpH3での溶出試験も実施した。体温想定時の溶出条件である40°Cで、チューブの先が胃の中に入っていることから24時間という溶出条件で行ったが、40°C、0.5時間という条件で行った人工ミルク中への溶出とほぼ同程度の溶出が見られた。実際の経鼻栄養チューブ使用児の曝露が、人工ミルクを介したものと、胃の中での溶出と併せて起こっているかどうかは今後の検討課題である。

今回用いたものの中にはPVCフリーのチューブがあり、これからは測定物質のいずれも検出されなかった。チューブの素材は包装には明記されておらず、何が含まれているかは特定できなかった。ただし、クロマトグラフを確認しても、測定物質以外の所に大きなピークは確認できず、溶出の少ないチューブであると推定できた。

## E. 結論

DEHPは、PPAR $\alpha$ をもつマウスに対して、胎仔、新生仔の数や生仔数の減少を引き起こした。一方、PPAR $\alpha$ を持たない

KO マウスでは、これらの影響がなかったことから、胎仔期における発達毒性には PPAR $\alpha$  が深く関与していると考えられる。また、母獣の血漿中 TG の減少や胎盤中 PPAR $\alpha$  発現量の減少が、何らかの形で仔の成長に影響を与えていることが示唆された。

*hPPAR $\alpha$*  マウスは、Wild-type マウスと同様に DEHP 曝露の影響を受けていた。しかし、新生仔の生存数の減少を特徴とする Wild-type マウスに対して、*hPPAR $\alpha$*  マウスでは、新生仔の生存数は減少せず、妊娠が成立しなかったマウスが多くいた。このように Wild-type マウスと *hPPAR $\alpha$*  マウスで、影響の受け方に差があることから、生殖発達毒性において、マウス型とヒト型の PPAR $\alpha$  の果たす役割が異なっているのかもしれない。

今までの厚生労働省の通達等の行政努力により、経鼻栄養チューブとして現在主に使用されるものからの DEHP の溶出は見られなかった。また、まれに使用するものの中には DEHP が主成分として入っているものの溶出量はそれほど多くなかった。しかしながら今回は食品容器包装等に含まれる可塑剤の移行等、妊娠・授乳期の他の曝露要因を検討しておらず、今後とも引き続き研究が必要である。

#### 参考文献

Agarwal DK, Eustis S, Lamb JC 4th, Reel JR, Kluwe WM. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on the gonadal pathophysiology, sperm morphology, and reproductive performance of male rats. *Environ Health*

*Perspect.* 1986;65:343-50.

Albro Pwand Lavenhar SR. Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metabolism Reviews.* 1989;21:13-34

Braissant O, Foufelle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* 1996;137(1):354-66.

Burke KT, Colvin PL, Myatt L, Graf GA, Schroeder F, Woollett LA. Transport of maternal cholesterol to the fetus is affected by maternal plasma cholesterol concentrations in the golden syrian hamster. *J Lipid Res.* 2009 Jan 3.

Cheung, C., T.E. Akiyama, J.M. Ward, C.J. Nicol, L. Feigenbaum, C. Vinson, and F.J. Gonzalez. Diminished hepatocellular proliferation in mice humanized for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Cancer Res.* 2004; 64(11):3849-54.

David RM, Moore MR, Finney DC, Guest D. Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol Sci.* 2000;58(2):377-85

de Rijk EP, van Esch E, Flik G. Pregnancy dating in the rat: placental morphology and maternal blood parameters. *Toxicol Pathol.* 2002;30(2):271-82.

- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957;226(1):497-509.
- Fournier T, Tsatsaris V, Handschuh K, Evain-Brion D. PPARs and the placenta. *Placenta.* 2007;28(2-3):65-76.
- Furuta S, Miyazawa S, Hashimoto T. Purification and properties of rat liver acyl-CoA dehydrogenases and electron transfer flavoprotein. *J Biochem.* 1981;90(6):1739-50.
- Hao-Yu Shen. Simultaneous screening and determination eight phthalates in plastic products for food use by sonication-assisted extraction/GC-MS methods. *Talanta.* 2005; 66:34-739
- Honda T, Honda K, Kokubun C, Nishimura T, Hasegawa M, Nishida A, Inui T, Kitamura K. Time-course changes of hematology and clinical chemistry values in pregnant rats. *J Toxicol Sci.* 2008;33(3):375-80.
- Horne DC, Torrance I, Modine T, Gourlay T. The effect of priming solutions and storage time on plasticizer migration in different PVC tubing types--implications for wet storage of ECMO systems. *J Extra Corpor Technol.* 2009; 41(4):199-205.
- Ito R, Miura N, Iguchi H, Nakamura H, Ushiro M, Wakui N, Nakahashi K, Iwasaki Y, Saito K, Suzuki T, Nakazawa H. Determination of tris(2-ethylhexyl) trimellitate released from PVC tube by LC-MS/MS. *Int J Pharm.* 2008; 360(1-2): 91-5.
- Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *J Biol Chem.* 1992; 267(2): 1027-33.
- Japan Plasticizer Industry Association. 内分泌攪乱物質に関する食事調査（フタル酸エステル類）  
<http://www.kasozai.gr.jp/kurasi/kurasi04.html>
- Kavlock R, Barr D, Boekelheide K, Breslin W, Breysse P, Chapin R, Gaido K, Hodgson E, Marcus M, Shea K, Williams P. NTP-CERHR Expert Panel update on the reproductive and developmental toxicity of di(2-ethylhexyl) phthalate. *Reprod toxicol.* 2006;22: 291-399
- Kambia K, Dine T, Gressier B, Dupin-Spriet T, Luyckx M, Brunet C. Evaluation of the direct toxicity of trioctyltrimellitate (TOTM), di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and their hydrolysis products on isolated rat hepatocytes. *Int J Artif Organs.* 2004; 27(11):971-8.

- Koch HM, Preuss R, Angerer J. Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): human metabolism and internal exposure – an update and latest results. *Int J Androl.* 2006; 29(1):155-65; discussion 181-5.
- Kurata, Y., Kidachi, F., Yokoyama, M., Toyota, N., Tsuchitani, M., and Katoh, M. Subchronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in common marmosets: lack of hepatic peroxisome proliferation, testicular atrophy, or pancreatic acinar cell hyperplasia. *Toxicol Sci.* 1998; 42, 49 - 56.
- Lamb JC 4th, Chapin RE, Teague J, Lawton AD, Reel JR. Reproductive Effects of Four Phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1987;88(2):255-69
- Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, Blanchard S, Swanson C, Cattley RC, Corton JC. Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology.* 2005;207(1):149-63.
- Mandard S, Müller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *Cell Mol Life Sci.* 2004; 61(4):393-416.
- Maroney EK, Waxman DJ. trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1999;161(2):209-18
- Ministry of the Environment  
<http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1402/mat/mat03-1.pdf>
- Miura S, Ezaki O. Increased very low density lipoprotein secretion and gonadal fat mass in mice overexpressing liver DGAT1. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21506-14.
- Miyazawa S, Osumi T, Hashimoto T. The presence of a new 3-oxoacyl-CoA thiolase in rat liver peroxisomes. *Eur J Biochem.* 1980; 103(3): 589-96.
- National Toxicology Program. Carcinogenesis Bioassay of Di(2-ethylhexyl)phthalate (CAS No. 117-81-7) in F344 Rats and B6C3F1 Mice (Feed Studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.* 1982; 217:1-127
- Osumi T, Hashimoto T. Purification and properties of mitochondrial and peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Arch Biochem Biophys.* 1980; 203(1):372-83
- Peters JM, Taubeneck MW, Keen CL, Gonzalez FJ. Di(2-ethylhexyl) phthalate induces a functional zinc deficiency during pregnancy and teratogenesis that is independent of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Teratology.* 1997;56(5):311-6.