

201033055A

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

プラスチックから溶出する可塑剤DEHPのヒトPPAR α トランスジェニックマウス
を用いた肝発がんリスク評価

平成22年度 総括研究年度終了報告書

研究代表者 伊藤 由起

平成22(2010)年 3月

目次

I. 総括研究年度終了報告

プラスチックから溶出する可塑剤DEHPのヒトPPAR α

トランスジェニックマウスを用いた肝発がんリスク評価 ----- 1

伊藤由起

II. 研究成果の刊行に関わる一覧表 ----- 13

プラスチックから溶出する可塑剤DEHPのヒトPPAR α トランスジェニックマウスを用いた肝発がんリスク評価

研究代表者 伊藤由起 名古屋市立大学

研究要旨 ポリ塩化ビニル製プラスチックの可塑剤として用いられているフタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) は、動物実験で発がん性が明らかとなっているが、IARCは2000年にPPAR α の発現が極端に低いヒトでは発がんの可能性が低いとして発がんリスクを2bから3に引き下げた。本研究ではヒトのPPAR α を持ったノックインマウス (*hPPAR α*)、PPAR α ノックアウトマウス (*Ppar α -null*)、129/Sv野生型マウス (*mPPAR α*) の3種類のマウスに0, 0.01, 0.05, 0.4% DEHPを6週齢から混餌投与した。各遺伝子型マウスにおいて、DEHP投与による体重変化、摂餌量変化に影響は見られなかった。一部52週間で解剖した以外は78週間曝露後解剖し、血液と肝臓を採取した。肝臓の一部はホルマリン固定を行った。PPAR α 遺伝子型により生存曲線に違いが観察されたが、DEHP曝露による生存曲線への影響は見られなかった。解剖時には、肝臓の肉眼所見の記録を行っているが、78週曝露後の肝重量は個体差が大きく、DEHP濃度依存的な顕著な変化は見られなかった。52週曝露後の肝重量はどの遺伝子型マウスでも増加していた。ホルマリン固定後の肝臓は、パラフィン切片を作成しHE染色して鏡検を行った。DEHPの投与により腫瘍の発生率がどの遺伝子型においても増加している傾向が見られたが、用量依存的な変化ではなく、有意差は見られなかった。

A. 研究目的

フタル酸ジ-2-エチルヘキシル (DEHP) はポリ塩化ビニル製品の可塑剤で、曝露源は主に食事である。DEHPは動物実験で様々な毒性が報告されており、中でもヒトでの肝発がんリスクについては注目されてきた (Ito & Nakajima., 2009)。DEHPの代謝物はPPAR α のリガンドの為、2000年にIARCはPPAR α の発現が極端に低いヒトでは発がんの可能性が低いとして発がんリスクを2bから3に引き下げた。しかし我々が*Ppar α -null*マウスを用いてDEHPを2年間混餌投与した結果、野生型に比べ*Ppar α -null*型で高頻度 (10% vs 23%) に肝腫瘍が形成され、PPAR α を介さない炎症持続による発がん機構の可能性が明らかになった (Ito et al., 2007)。

本研究では新たに *hPPAR α* マウスを用いて比較的 low 濃度の DEHP を OECD のガイドラインに従って曝露することにより、①肝腫瘍形成における PPAR α の役割、②PPAR α のヒトとげっ歯類間の機能差が肝腫瘍形成に与える影響を検討する。さらに③DEHPの肝発がん機序を明らかにし、ヒトでの DEHP の肝発がんリスク評価を行う。PPAR α のリガンドは環境化学物質に加え治療薬として広く用いられており、本研究はこれらの薬物の安全性評価にも役立つ。

B. 研究方法

1. 動物実験

動物実験は基本的に OECD のガイドラインに則

り行った。DEHP による肝発がんにおける PPAR α の関与と、機能が異なると言われているヒトの PPAR α が肝発がんにどう関わるのかを検討するため、マウスの PPAR α を持つ mPPAR α (野生型)、PPAR α ノックアウトマウス (*Ppar α -null*)、ヒトの PPAR α を持つ hPPAR α の3種類のマウスを用いた。3種の遺伝子型のマウスを各4群に分け、前回の実験結果と過去の野生型マウスを用いた発がん実験の LOAEL を考慮し、0, 0.01, 0.05%に加え、0.4%DEHP を6週齢から混餌投与した。体重・摂餌量変化を週1回測定した。一部のマウスは腫瘍形成の前段階の変化をとらえるため52週間曝露後解剖し、78週間曝露後全ての個体を解剖した。一部マウスは衰弱したため動物愛護の観点から途中で実験を中止した。屠殺したマウスは血液と肝臓を採取し、肝臓の一部は4%パラホルムアルデヒドで固定を行い、残りは使用まで-80°Cで保存した。

2. 病理組織学標本の作製

ホルマリン固定後の肝臓は、3 μ m のパラフィン切片を作成し HE 染色して鏡検した。腫瘍の最終的な診断をマウスの毒性病理の専門家に依頼し確認を行った。

3. 統計解析

SPSS16.0 又は JMP5.0.1J を用いて行った。生存分析プロットは Wilcoxon とログランク分析を、肝腫瘍の個体はコ克蘭・アーミテージ傾向検定を行い、それ以外は二元配置分散分析後 Dunnet の多重比較を行った。

C. 研究結果

1. 動物実験

1) 体重推移

体重推移を Fig.1 に示した。各遺伝子型マウス間で実験開始時 (0 週) の体重に差は見られなかった。*Ppar α -null* マウスと hPPAR α マウスの体重の一部を加えていない途中結果であるが、各遺伝子型マウスにおいて、DEHP 曝露濃度による体重、体重増加量への影響は見られなかった。野生型と *Ppar α -null* マウスでは体重が 30 g 前後で頭打ち

であったが、hPPAR α マウスは 35 g 強まで増加した。

2) 摂餌量推移

摂餌量は個体差があるものの1匹 3.0-3.5 g/日で推移しており、DEHP 曝露による影響は見られなかった。hPPAR α マウスでは、徐々に摂餌量が多くなっており、最終的には平均 4.0 g/日程度まで増加しており、体重増加の一因となっていたと考えられた。

3) 生存分析

生存分析プロットを Fig. 2, 3 に示す。途中動物愛護の観点から安楽死を選択したマウス (野生型低濃度群2匹、*Ppar α -null* マウス対照群1匹、中濃度群1匹) も含む。各遺伝子型マウスにおいて、DEHP 曝露濃度による生存率の違いは見られなかった。対照群のみを比較すると、野生型マウスでは死亡が観察されなかったが、*Ppar α -null* マウスでは52週経過後、hPPAR α マウスでは70週経過後徐々に死亡が観察され、遺伝子型間で有意な差が観察された (Fig. 3)。高濃度曝露群のみを比較した場合も、対照群の場合同様に遺伝子型間で差が見られた。*Ppar α -null* マウスでは30週間曝露後あたりに一度死亡率が上がっており、肝腫瘍以外の毒性要因で死亡した可能性も考えられる。途中で死亡したマウスは剖検所見で肝臓に腫瘍が見られた個体はいなかった。

4) 解剖時体重、臓器重量

Fig. 4 に78週間曝露後解剖時の、Fig. 5 に52週間曝露後解剖時の体重、肝重量を示した。解剖時の体重は78週間曝露、52週間曝露ともに遺伝子型により有意に異なり、hPPAR α マウスが最も重く、次いで野生型、*Ppar α -null* マウスであった。DEHP 濃度による影響はみられなかった。遺伝子型、DEHP 曝露濃度ともに絶対肝重量には影響を与えなかったが、相対肝重量は *Ppar α -null* で最も大きく、次いで hPPAR α 、野生型の順であった。肝重量は、隆起状病変の有無により大きく異なっていた。

5) 肉眼病変

78 週曝露のマウスで、隆起した巣状腫瘍様病変やびまん性の腫瘍様病変を認めたものが存在した (Fig. 6)。78 週曝露では全ての群で腫瘍様肉眼病変が観察され、DEHP 濃度依存的変化は見られなかった。52 週曝露では、*Ppara*-null の低濃度群及び *hPPARα* マウスの低、中濃度群で肉眼病変が観察されたが、野生型では見られなかった。野生型マウスの高濃度曝露群では肝臓が黒色化していたが、他の遺伝子型マウスではそのような変化は見られなかった。

2. 病理組織学的変化

野生型マウス、*Ppara*-null、*hPPARα* マウスでの DEHP 投与による肝腫瘍の病理組織写真の 1 例を示した (Fig. 7, 8, 9)。DEHP 投与により、肝細胞がん (カルシノーマ)、肝細胞腺腫 (アデノーマ)、血管肉腫が観察された。腫瘍の発生率は、野生型の対照群で 28.1、低濃度群で 31.3、中濃度で 47.1、高濃度 45.5%、*Ppara*-null マウスの対照群で 25.9、低濃度群で 42.9、中濃度で 30.0、高濃度 33.3%、*hPPARα* マウスの対照群で 12.9、低濃度群で 27.8、中濃度で 13.3、高濃度 32.4%であった。*Ppara*-null マウス、*hPPARα* マウスでは DEHP 投与群において肝腫瘍の観察された個体が増えているものの、用量依存性が明らかではなかった。コ克蘭・アーミテージ傾向検定の結果、肝腫瘍発生率は野生型の片側検定のみで有意な上昇をみとめたが、その他では DEHP 投与による有意な変化は見られなかった。同一個体の肝臓切片に同種の腫瘍性病変や多種の腫瘍性病変がある個体も存在し、他種の腫瘍が観察されたのは、DEHP 投与群のみであった。

D. 健康危険情報
該当なし

E. 研究発表
1. 論文発表
(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)
該当なし

2. 学会発表
1) 伊藤由起、ドニヒクマットラムダン、柳場由絵、林由美、内藤久雄、上島通浩、那須民江。

ヒト PPARα トランスジェニックマウスを用いた DEHP の発がん性評価. 第 81 回日本衛生学会総会 (誌上発表、東京 2011/3/26-28)

F. 知的財産権の出願・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

Fig. 1 野生型マウス、*Ppara*-nullマウス、hPPAR α マウスの体重推移

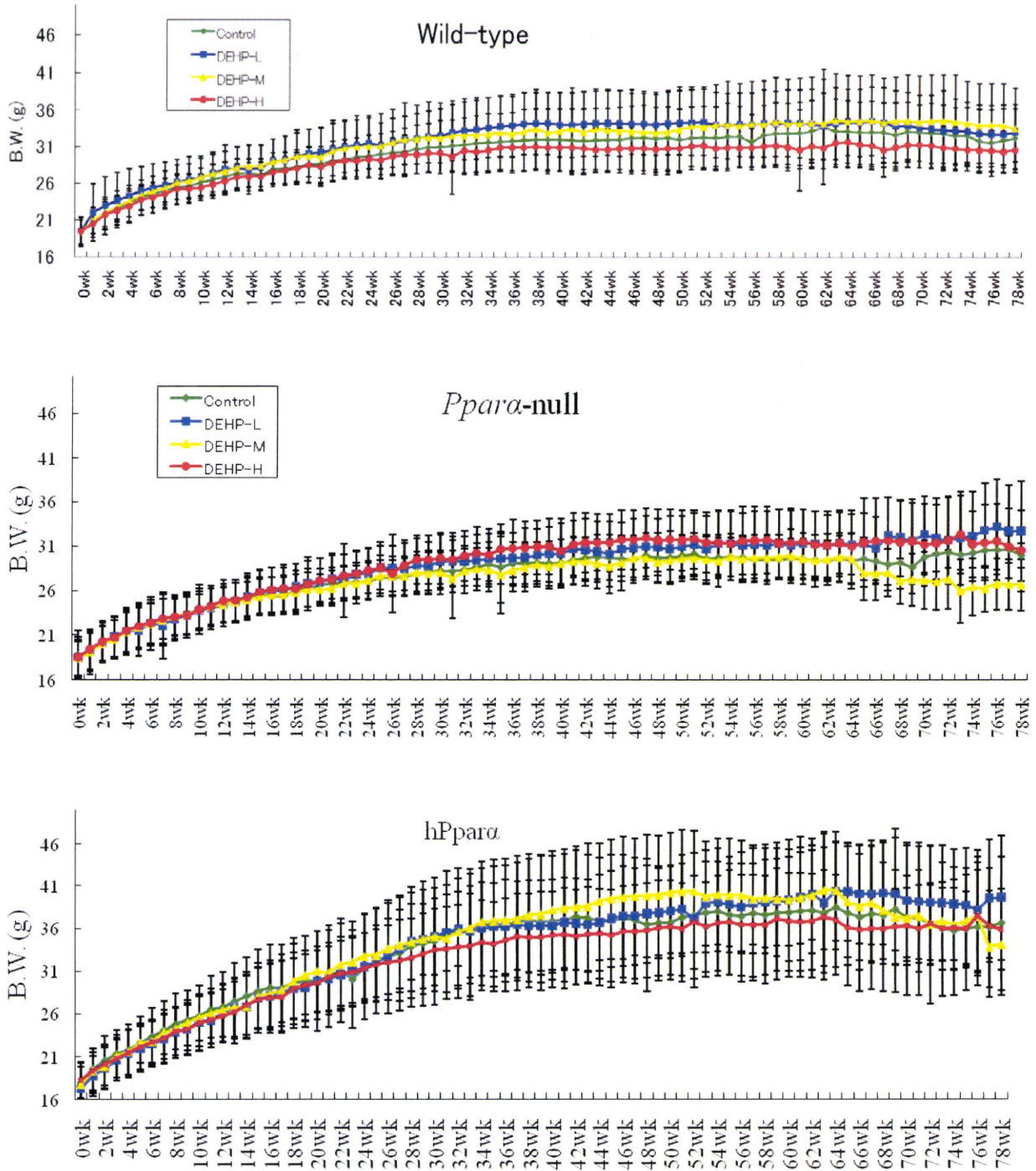
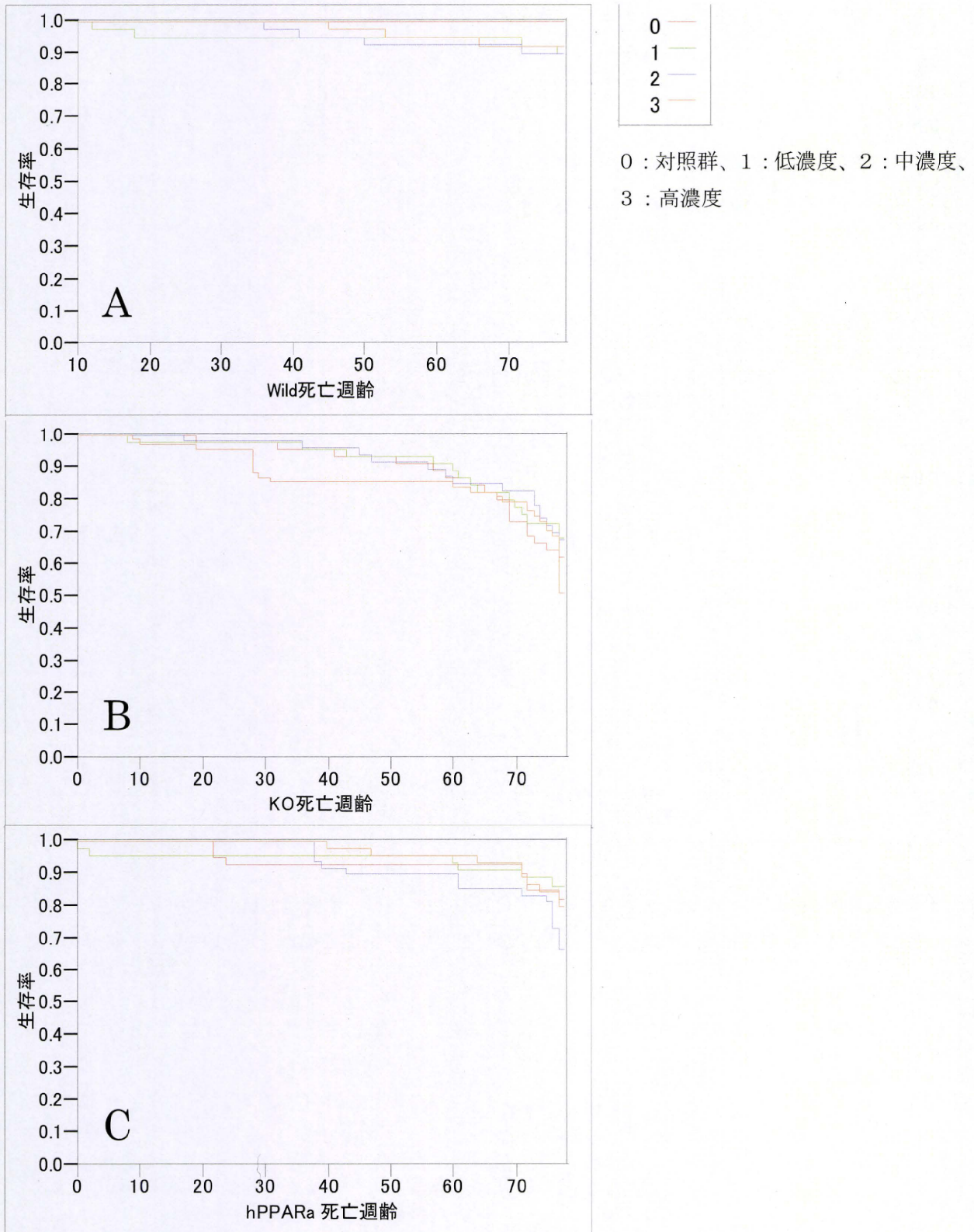
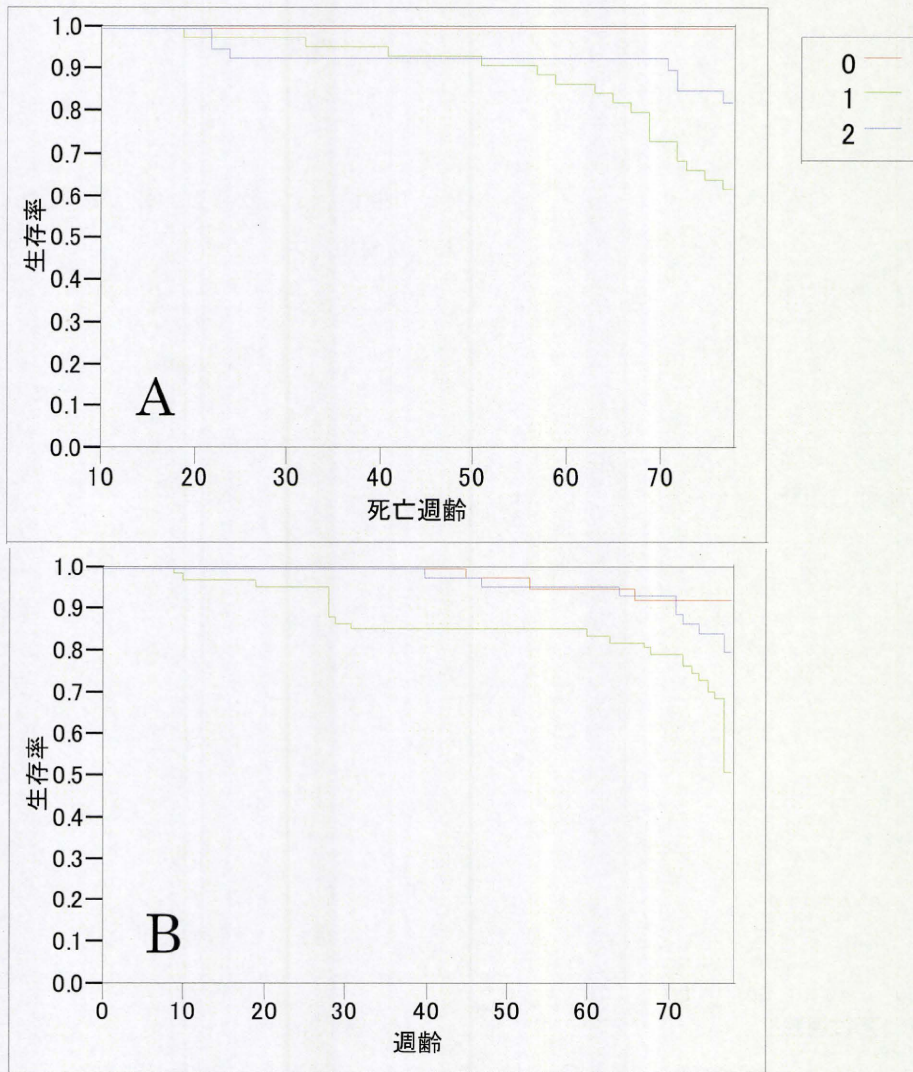


Fig. 2 生存分析プロット



78 週間曝露群の 78 週で解剖を行うまでの生存率をプロットした。横軸は週齢、縦軸は生存率を示す。
A: 野生型マウス, B: Ppar α -null マウス, C: hPPAR α マウス

Fig. 3 対照群および高濃度曝露群間の生存率の比較



78週間曝露群の78週で解剖を行うまでの生存率をプロットした。横軸は週齢、縦軸は生存率を示す。
A: 対照群間, B: 高濃度群間で比較したもの。0:野生型マウス、1:Ppar α -null マウス、2:hPPAR α マウス

Fig. 4 78週間曝露群解剖時体重と肝臓重量

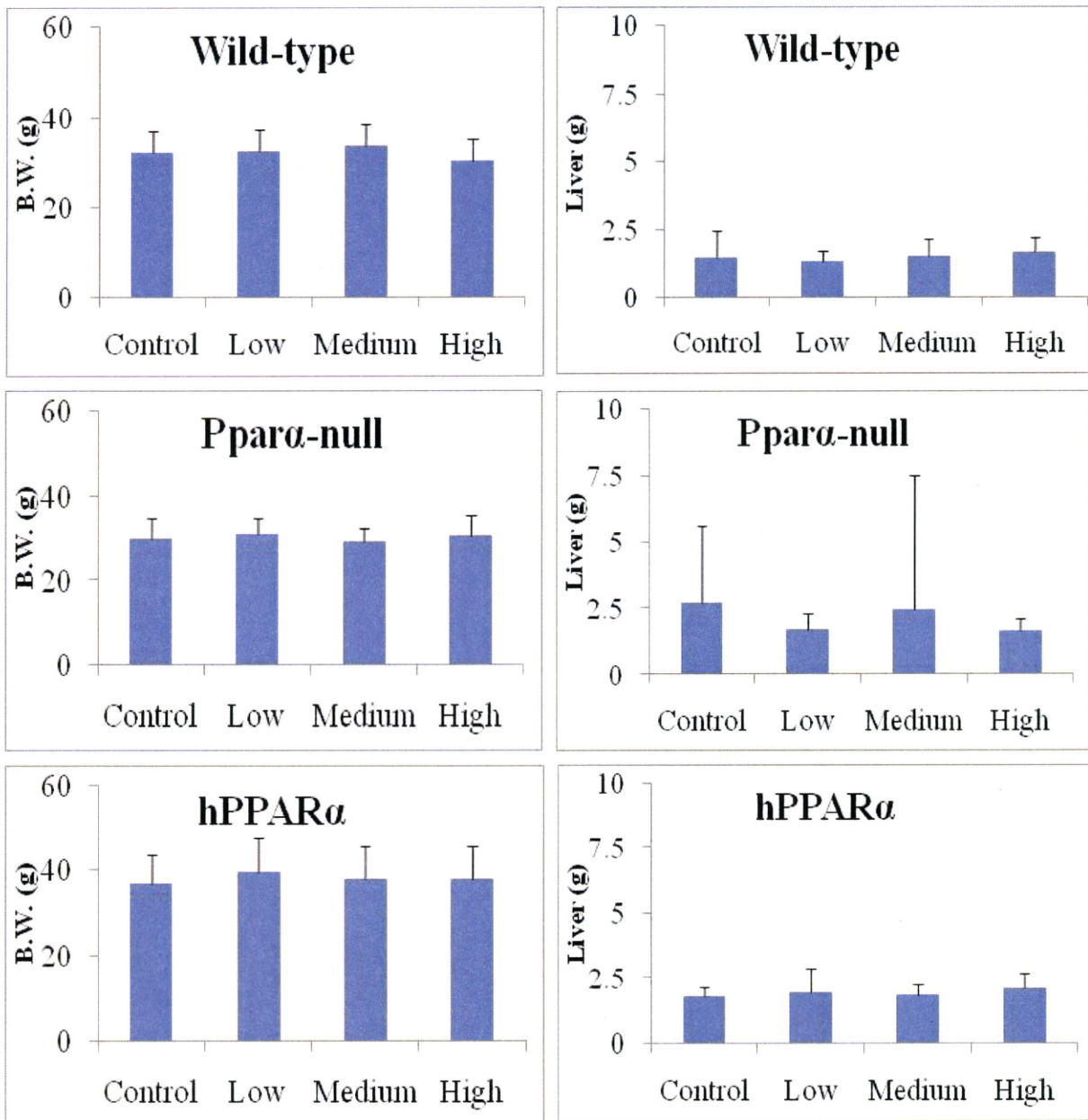
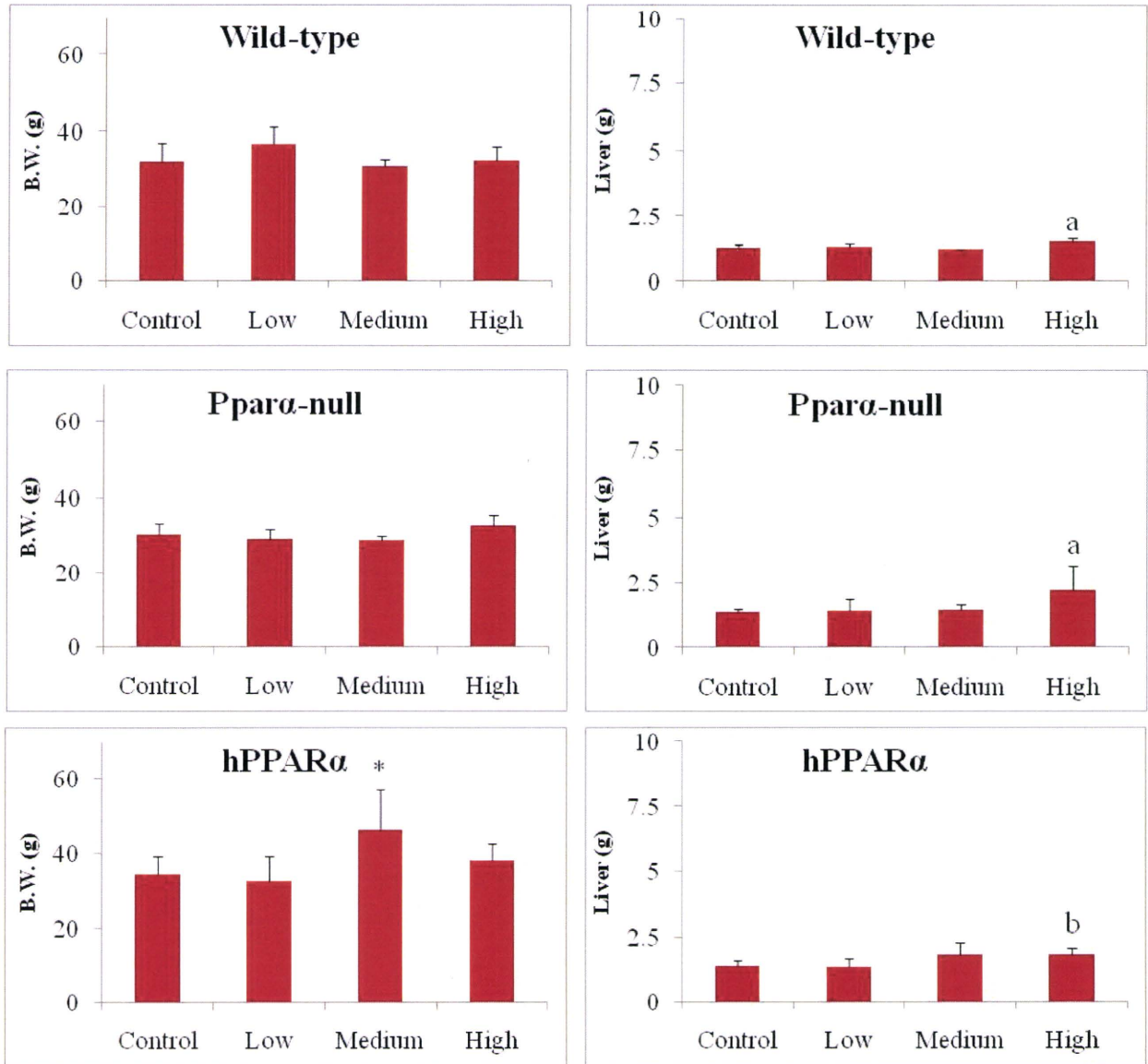


Fig. 5 52週間曝露群解剖時体重と肝臓重量

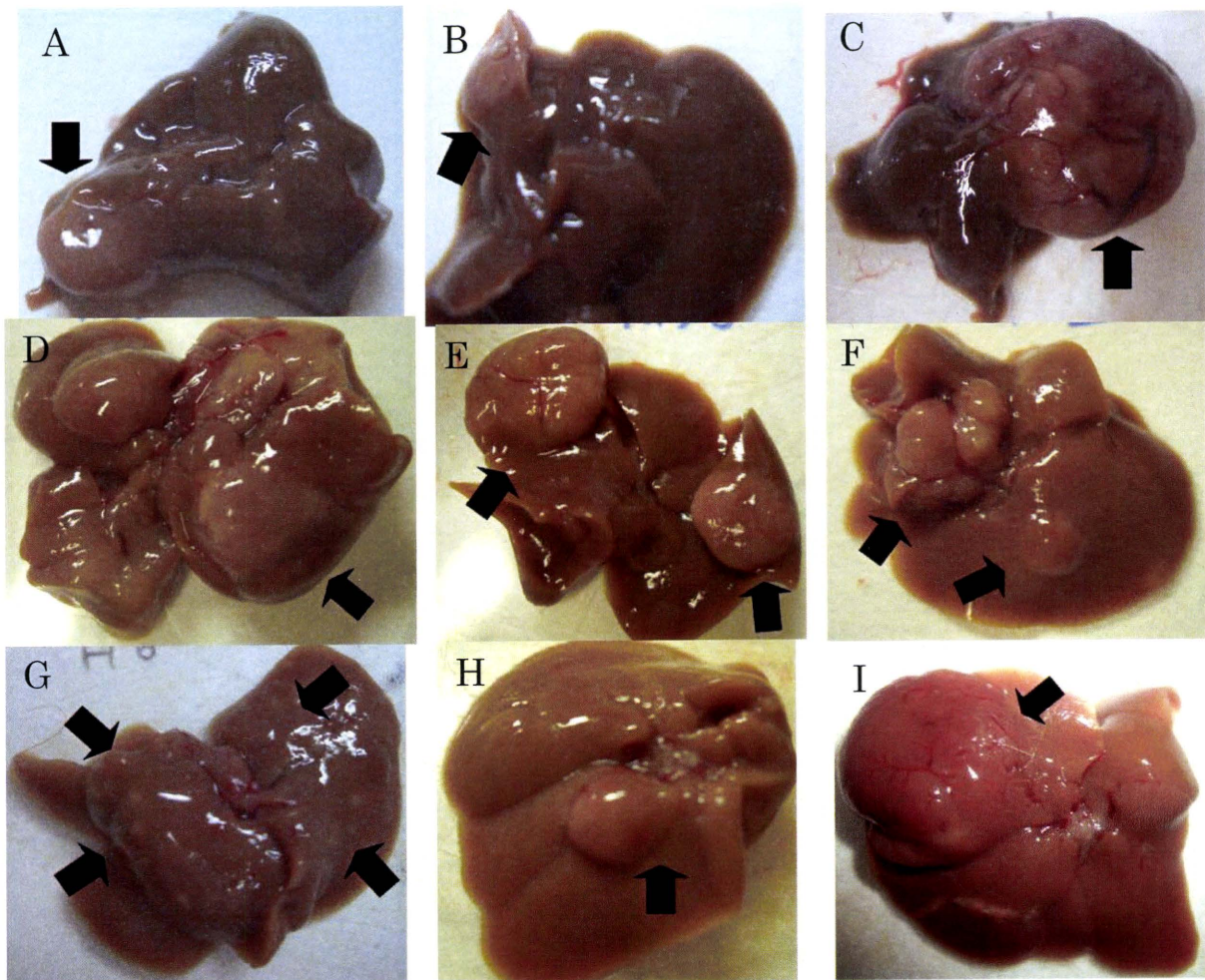


*Control 群(対照群)と比較して $p < 0.05$

^a絶対重量、相対重量ともに Control(対照群)と比較して $p < 0.05$

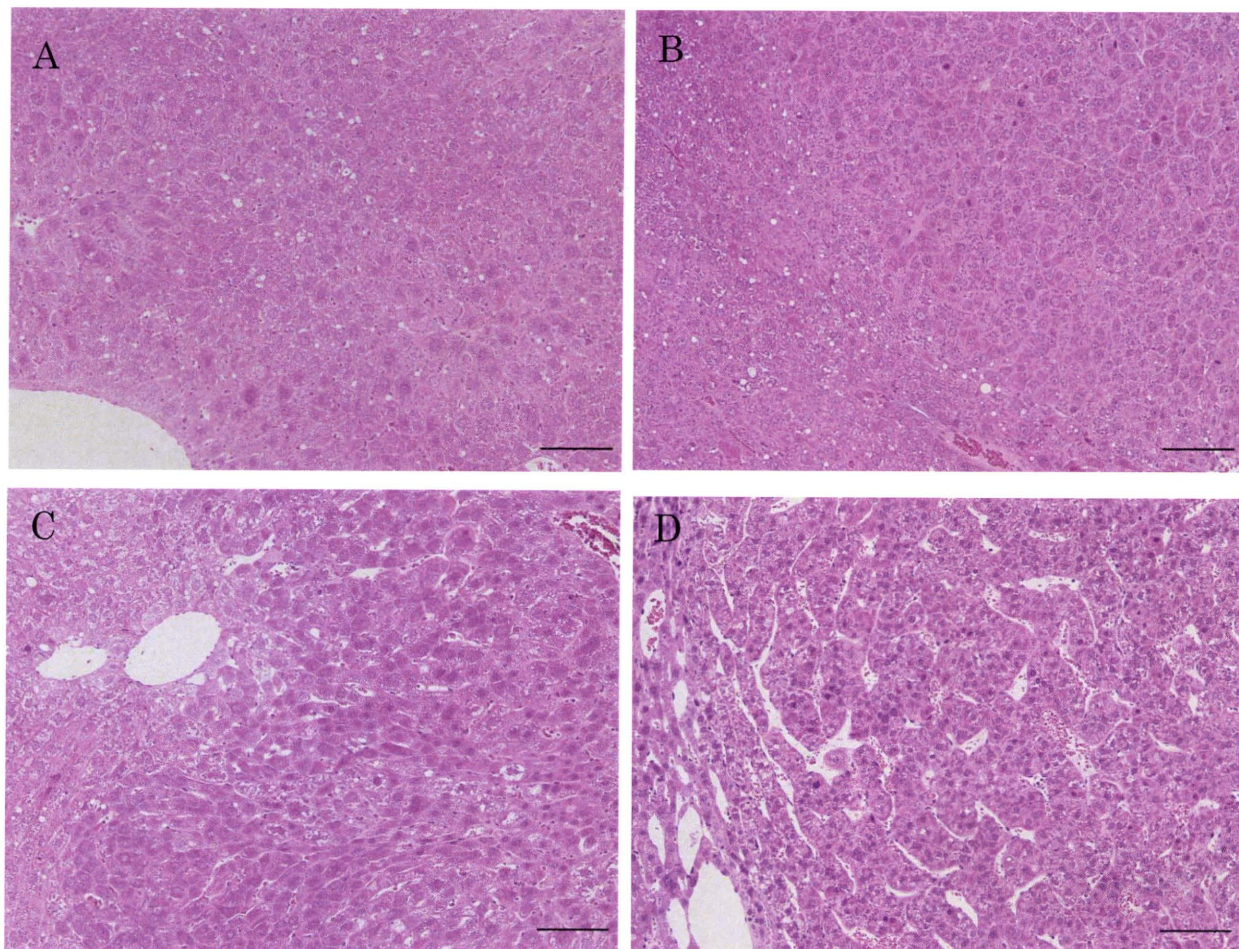
^b相対重量のみ Control 群(対照群)と比較して $p < 0.05$

Fig. 6 解剖時肝臓肉眼所見



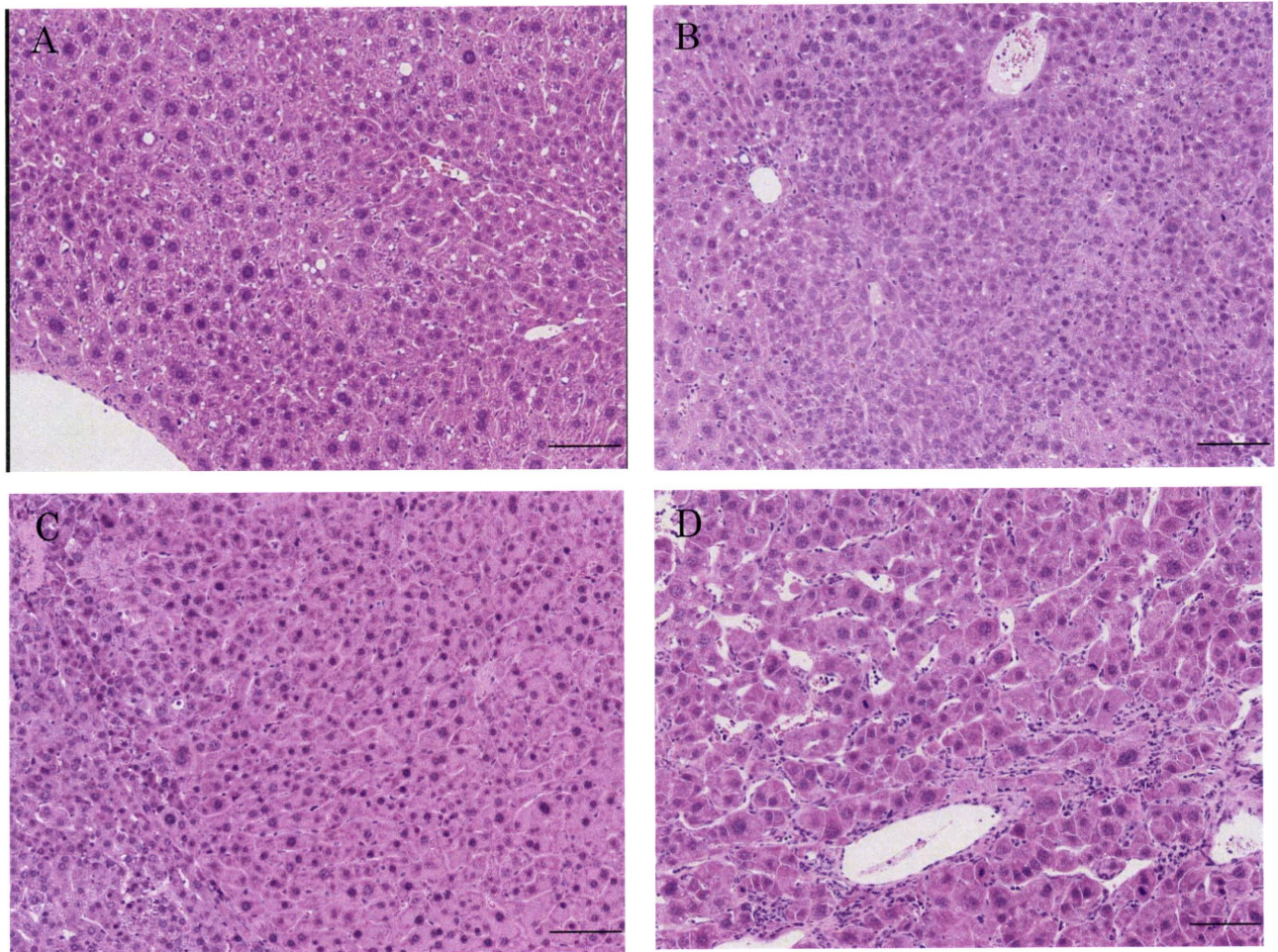
矢印は腫瘍部位を示す。A, B, Cは野生型マウス、D, E, Fは *Pparα*-null マウス、G, H, Iは *hPPARα* マウスの一例である。A, D, Gはアデノーマ(eosinophilic)、B, E, Hはアデノーマ(basophilic)、C, F, Iはカルシノーマであった肝腫瘍病変

Fig. 7 野生型マウスの病理組織



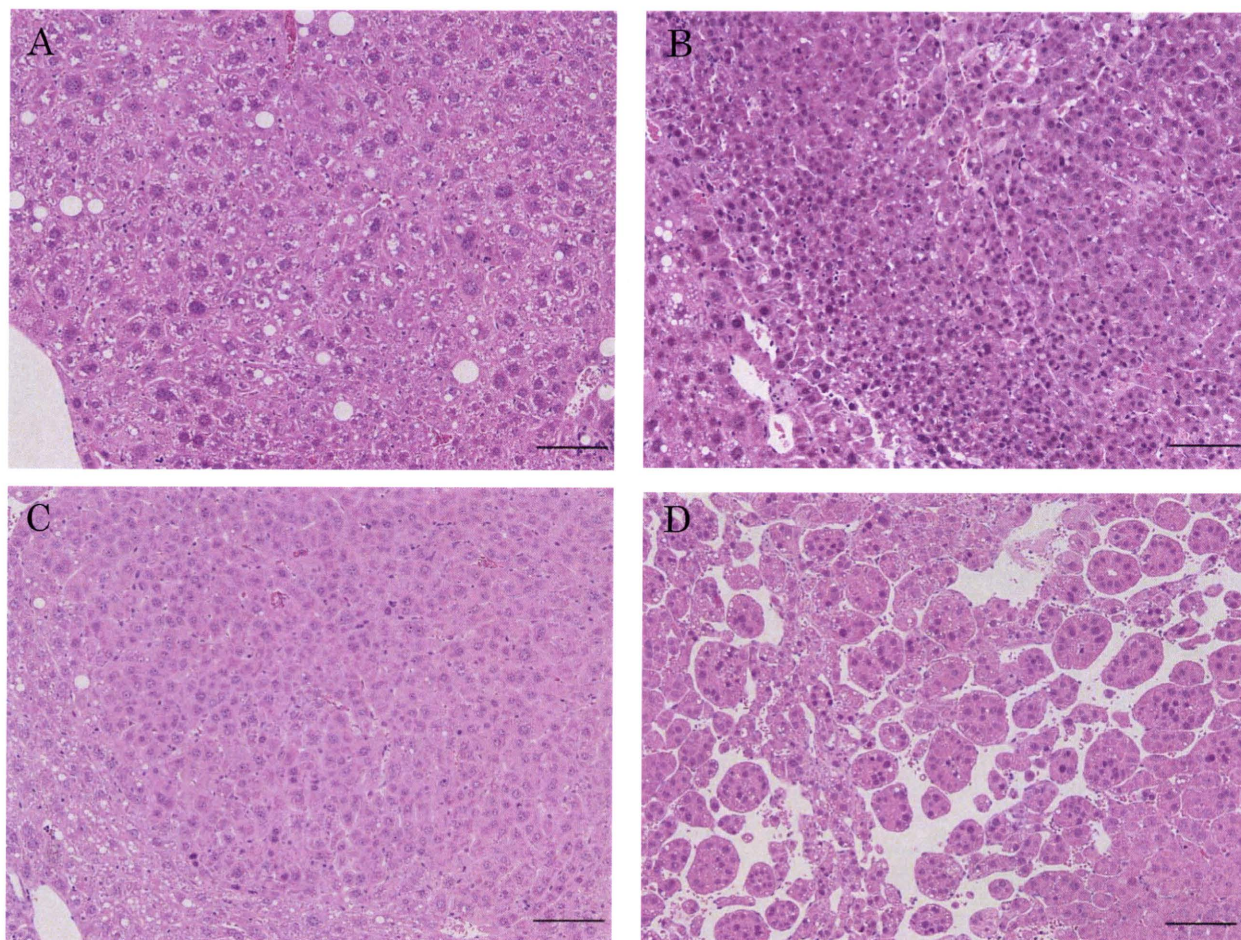
100 倍の病理組織像、右下の黒いバーは 100 μm を示す。A : 非腫瘍、B : アデノーマ (basophilic) 、C : アデノーマ (eosinophilic) 、D : カルシノーマ

Fig. 8 *Ppar* α -null マウスの病理組織



100倍の病理組織像、右下の黒いバーは100 μ mを示す。A：非腫瘍、B：アデノーマ (basophilic) 、C：アデノーマ (eosinophilic) 、D：カルシノーマ

Fig. 9 hPPAR α マウスの病理組織



100倍の病理組織像、右下の黒いバーは100 μ mを示す。A：非腫瘍、B：アデノーマ (basophilic) 、C：アデノーマ (eosinophilic) 、D：カルシノーマ

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし				

