

201131035B

厚生労働科学研究費補助金

食品の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に関する研究

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 由起

平成24(2012)年 3月

厚生労働科学研究費補助金

食品の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に関する研究

平成22年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 伊藤 由起

平成24(2012)年 3月

目次

I. 総合研究報告	
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に関する研究 -----	1
伊藤由起	
II. 研究成果の刊行に関わる一覧表 -----	27
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	28

総合研究報告書

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に関する研究

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、肝臓の肉眼所見の記録と血液、肝臓の採取を行った。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。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が、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。全ての遺伝子型マウスにおいてDEHP曝露により肝腫瘍が形成されており、*Ppar α null*マウスにおいても肝細胞腺腫発生率がDEHP曝露により上昇していた。したがって、DEHPによる肝腫瘍形成はPPAR α 依存的な経路とPPAR α 非依存的な経路の両方が関与している可能性が示唆された。DNAマイクロアレイの結果、腫瘍の有無に関連して幾つかの経路が動いていたが、その多くは代謝に関するもので、細胞周期等の腫瘍形成に直接結びつくものは抽出されてこなかった。PPAR α 非依存的な経路の同定は今後の課題である。

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特に注目されてきた(Ito & Nakajima., 2009)。DEHPの代謝物は peroxisome proliferator-activated receptor alpha (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低濃度の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ことを目的とした。

B. 研究方法

1. 動物実験

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。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. マイクロアレイ解析

RNA は RNeasy Mini kit (QIAGEN) を用いて肝臓から抽出した。抽出した RNA は、ナノドロップで収量、波形を確認した後、バイオアナライザー (Agilent) で電気泳動を行い、不純物や分解のない RNA であることを確認した。DNA マイクロアレイ解析は各遺伝子型の 0.4%DEHP 群の個体のうち、鏡検で腫瘍病変及び前腫瘍病変が見られなかった DEHP 高濃度曝露マウス (各遺伝子型マウス 4-5 匹) の肝臓由来 RNA を遺伝子型ごとにプールしたもの、アデノーマ (Basophilic) と判定された DEHP 高濃度曝露マウスの剖検時非腫瘍部位の肝臓由来の RNA を遺伝子型ごとにプールしたもの (各遺伝子型マウス 4-5 匹)、DEHP 高濃度曝露マウスの肝細胞腺腫 (Basophilic) 部位の肝臓由来の RNA を用いて行った。DNA マイクロアレイ解析は東レ株式会社に委託し実施した。1 µg の total RNA を用いて aRNA の増幅を行った後、10 µg の増幅 RNA を用いて CyDye 標識及び精製を行った。各 1 µg を用いて 37°C で 16 時間ハイブリダイゼーションをおこなった。高感度 DNA チップ 3D-Gene を用いて、1 色法で解析を行った。グローバルノーマライゼーションによるデータの標準化の後、変動比 2 倍を閾値にして発現変動のある遺伝子を同定した。抽出された遺伝子は GenMAPP を用いてパスウェイ解析を行った。

3. 病理組織学的検討

4%パラホルムアルデヒド固定後の肝臓は、3 µm 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。78 週間曝露後の肝臓を用いて、免疫組織化学的検討を行った。クエン酸バッファーで抗原賦活化および 3%過酸化水素メタノールで内因性ペルオキシダーゼの除去を行った後、proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Santa

Cruz 社製)、Ki-67 (Dako 社製) の各 1 次抗体と 2 次抗体としてシンプルステイン Max-PO (ニチレイ社製) で反応させた後、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) (ニチレイ社製) を用いて免疫染色を行った。

4. 統計解析

JMP5.0.1J またはエクセル統計を用いて行った。

肝腫瘍の個体はコ克蘭・アーミテージ傾向検定、適合度の検定を行い、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。*Ppara*^α null マウスと *hPPARα* 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 *Ppara*^α null マウスでは体重が 30 g 前後で頭打ちであったが、*hPPARα* 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。*hPPARα* マウスでは、徐々に摂餌量が少なくなっており、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、*Ppara*^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、*Ppara*^α null マウスでは 52 週経過後、*hPPARα* 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。*Ppara*^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、*hPPARα* マウスが最も重く、次いで野生型、*Ppara* 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。78 週間曝露後、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 *Ppara* α -null で最も大きく、次いで *hPPARα*、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。52 週間曝露後 *hPPARα* マウスのみ DEHP 中濃度曝露群で有意に体重の増加が見られた。78 週間曝露後 DEHP 曝露による肝重量の変化が不明瞭であったが、52 週曝露後では野生型マウス、*Ppara* α -null マウスにおいて絶対肝重量、相対肝重量ともに、*hPPARα* マウスにおいては相対肝重量で高濃度 DEHP 曝露群のみ有意な増加がみられた。

2) 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* α -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

本実験では、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。野生型マウス、*Ppara* α -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)。腫瘍の発生率は一部訂正があり、最終的に野生型の対照群で 28.1、低濃度群で 31.3、中濃度で 47.1、高濃度 45.5%、*Ppara* α -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 35.3%であった。統計処理方法を見直した結果、肝腫瘍発生率は *hPPARα* マウスのみで DEHP 曝露により有意に上昇していた。腫瘍の数を考慮に入れた場合は野生型と *hPPARα* マウスの両方で、DEHP 曝露により有意に上昇していた。コクラン・アーミテージ傾向検定の結果、野生型では DEHP 濃度依

存的に肝腫瘍の延べ数が増加していた。肝細胞癌の発生率は、野生型の 0.01%群が少ないが、0.05%、0.4%で上昇していた。肝細胞腺腫発生率は、*Ppara* α -null と *hPPARα* マウスのみで、DEHP 曝露により上昇していた。野生型で発生率は上昇傾向 ($p=0.0521$) であったが、有意差は見られなかった。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。

Ki67 と PCNA の免疫染色の結果の一例をそれぞれ Fig. 10, 11 に示す。Ki67、PCNA とともに個体差が大きいため、DEHP 曝露による顕著な増加は認められなかった。Ki67 は野生型対照群ではほとんど観察されなかったが、*Ppara* α -null と *hPPARα* マウスの方が発現が認められる個体が多い傾向があった。

3. マイクロアレイ結果

非腫瘍個体に対する腫瘍個体の比較で変動比が 2 倍以上又は以下だった遺伝子は、野生型で 224 と 325 個、*hPPARα* マウスで 550 と 659 個、*Ppara* α -null マウスで 390 と 694 個であった。その内、変動比が 8 倍以上だった遺伝子は、野生型で trefoil factor 3 (Tff3), glypican 3 (Gpc3), telomeric repeat binding factor 2 (Terf2), aldo-keto reductase family 1, member C18 (Akr1c18), macrophage receptor with collagenous structure (Marco), H19 fetal liver mRNA (H19)、*hPPARα* マウスで major facilitator superfamily domain containing 2 (Mfsd2), phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Z (Pigz), carbamoyl-phosphate synthetase 1 (Cps1), mucin 13 (Muc13)、*Ppara* α -null マウスで H19 であった。一方、8 倍以下だった遺伝子は、野生型で ubiquitin protein ligase E3C (Ube3c), solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1 (Slc22a1), pterin-4 alpha-carbinolamine dehydratase (Pcbd1), Exportin 7 (Xpo7)、*hPPARα* マウスで S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A) (S100a8), lactotransferrin (Ltf), membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (Ms4a3), S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B) (S100a9), cathepsin G (Ctsg), matrix metalloproteinase 8 (Mmp8), cathelicidin antimicrobial peptide (Camp), neutrophilic granule protein (Ngp), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), epsilon (Cebpe), myeloperoxidase (Mpo),

chitinase 3-like 3 (Chi3l3), BTG family, member 3 (Btg3), RIKEN cDNA 9130218O11 gene、*Ppara* α -null マウスで olfactory receptor 122 (Olfr122), S100a8, Ltf, membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (Ms4a3), matrix metalloproteinase 1a (Mmp1a), chemokine (C-X-C motif) ligand 4 (Cxcl4), T-cell specific GTPase (Tgtp), protein kinase, cGMP-dependent, type I (Prkg1), S100a9, cathepsin G (Ctsg), cathelicidin antimicrobial peptide (Camp), neutrophilic granule protein (Ngp), fibroblast growth factor 2 (Fgf2), triggering receptor expressed on myeloid cells 3 (Trem3), cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A (Cidea), Mpo, Chi3l3, elastase 2, neutrophil (Ela2)であった。

非腫瘍個体に対する腫瘍個体の比較で抽出された遺伝子を元にパスウェイ解析を行った結果を Table 1 に示す。腫瘍個体と非腫瘍個体の比較では全ての遺伝子型マウスで共通した経路はなかった。T 細胞受容体シグナル経路 (Fig. 12) と細胞周期に関する経路 (Fig. 13) は *hPPAR α* マウスと *Ppara* α -null とマウスの腫瘍個体では抑制されていた。PPAR α アゴニストによる発がんの mode of action の一つに gap junction の阻害が考えられているが、野生型のみで抽出されたカルシウム制御経路の中には gap junction の遺伝子 gap junction membrane channel protein alpha (GJA)10, gap junction membrane channel protein alpha 12 (Gjc2)の上昇が観察された。

腫瘍部位と腫瘍が見られなかったマウスとの比較で変動比が2倍以上又は以下だった遺伝子は、野生型で858と1819個、*hPPAR α* マウスで838と1829個、*Ppara* α -nullマウスで1375と1542個であった。その内、変動比が50倍以上だった遺伝子は、野生型でTff3, S100 calcium binding protein G (S100g), insulin-like growth factor binding protein 1 (Igfbp1), Gpc3, aldo-keto reductase family 1, member C18 (Akr1c18), lymphocyte antigen 6 complex, locus D (Ly6d), lymphocyte antigen 6 complex, locus K (Ly6k), myo-inositol oxygenase (Miox), H19, fibroblast growth factor 5 (Fgf5)、*hPPAR α* マウスでneuroigin 1 (Nlgn1), Tff3, brain expressed gene 1 (Bex1), Gpc3, arachidonate 5-lipoxygenase (Alox5), Akr1c18, carboxypeptidase E (Cpe), tetraspanin 8 (Tspan8), Miox、*Ppara* α -nullマウスでGpc3,

alpha-2-macroglobulin (A2m), Alox5, cadherin 17 (Cdh17), Cpe, Ly6d, Ly6k, tetraspanin 8 (Tspan8), Miox, H19であった。

一方変動比が50倍以下は野生型では見られなかったが、*hPPAR α* マウスでcytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1 (Cyp2e1), cytochrome P450, family 8, subfamily b, polypeptide 1 (Cyp8b1), Ltf, cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14 (Cyp4a14), ornithine aminotransferase (Oat), elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 3 (Elov13), orosomucoid 2 (Orm2), zinc finger protein 474 (Zfp474), follicle stimulating hormone beta (Fshb), cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 50 (Cyp2c50), serum amyloid A 2 (Saa2), neutrophilic granule protein (Ngp), cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 2 (Cyp1a2), cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 39 (Cyp2c39), alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 1 (Agxt2l1), arginine vasopressin receptor 1A (Avpr1a), complement factor D (adipsin) (Cfd), myeloperoxidase (Mpo), cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 29 (Cyp2c29), cytochrome P450, family 7, subfamily b, polypeptide 1 (Cyp7b1), lipocalin 13 (Lcn13), RIKEN cDNA 2310007H09 gene、*Ppara* α -nullマウスではnicotinamide N-methyltransferase (Nnmt), serum amyloid A 3 (Saa3), Cyp4a14, cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 13 (Cyp2b13), Elov13, Zfp474, Sad1 and UNC84 domain containing 1 (Sunc1), Fshb, Saa2, cathelicidin antimicrobial peptide (Camp), neutrophilic granule protein (Ngp), Mpo, ficolin B (Fcnb)であった。

非腫瘍個体に対する腫瘍部位の比較で抽出された遺伝子を元にパスウェイ解析を行った結果を Table 2 に示す。抽出された経路のほとんどが腫瘍部位で低下しているもので、その多くが様々な代謝に関与する経路であった。上記の通り、他種のCyps腫瘍部位で低下していることから多くの代謝経路が抽出されたと思われる。特にレチノール代謝酵素に関与する遺伝子の発現変化が多く観察された

(Fig. 14)。この経路は、*Ppara* α -nullマウスでは低下を、野生型、*hPpara*マウスでは上昇していた。また、DEHPによる発がんのキーイベントとされている脂肪酸酸化経路をFig. 15, 16, 17に示した。脂肪酸酸化経路はいずれも低下で抽出されているが、

脂肪酸がAcyl-CoAに変化するところはいずれの遺伝子型マウスにおいても亢進傾向が観察された。Fig. 18にPPAR α 等の脂質代謝に関与する核内受容体経路の変化を示したが、PPAR α の標的遺伝子のATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2 (Abcd2) は、全ての遺伝子型で上昇が観察された。

D. 考察

本研究ではDEHP曝露により見られた肝腫瘍の種類が遺伝子型で異なることが示唆された。観察された肝腫瘍全てで見た場合、野生型マウスでは曝露濃度依存的に腫瘍発生率が上昇していたが、肝細胞腺腫に限った場合、*Ppara* α nullと*hPPAR* α マウスではDEHP曝露により発生率が増加しており、野生型も増加傾向にあった。このことから、DEHPによる肝腫瘍形成は、PPAR α 依存的な経路とPPAR α 非依存的な経路の両方が関与しており、肝細胞癌には前者の、肝細胞腺腫には後者の方の関与が大きいかもしれない。また、*hPPAR* α マウスでは、野生型よりもむしろ*Ppara* α nullマウスと腫瘍発生傾向が似ていることから、PPAR α の機能差はあるかもしれないが、今回の結果はヒトのPPAR α は機能的にマウスのPPAR α とは異なり、腫瘍形成には関与しないのではないかという報告(Shah et al., 2007)を支持するものではなかった。

PPAR α 非依存的な経路を検討する為、マイクロアレイ解析を行ったが、現在DEHP等のPPAR α リガンドによる肝発がんのmode of actionとして考えられている、PPAR α の活性化、ペルオキシゾーム増殖と遺伝子発現の誘導、細胞増殖、アポトーシス低下、ギャップ結合阻害、酸化ストレス産生等(Klaunig et al., 2003) は、パスウェイ解析の結果全ての遺伝子型で共通して抽出されたものはなかった。今回はDEHP曝露により変化する各種遺伝子(ペルオキシゾームやミトコンドリアの β 酸化酵素の誘導等)の影響を除外するためにDEHP高濃度曝露群の非腫瘍個体との比較で行った。したがって、DEHPにより腫瘍と関係なく変動する遺伝子の影響は除去され、腫瘍に特化した解析ができると思われる。代謝酵素の変動が大きい為、パスウェイ解析結果では代謝関連経路が多く抽出されているため、今後は各遺伝子にターゲットを絞って解析をすることが必要であると考えられる。以前の我々の研究で*Ppara* α nullマウスでの肝腫瘍形成に関与していると考えられたのはNF κ B p65やc-jun, c-fosであるが(Ito et al., 2007)、今回はc-fosは変化が見られなかつ

たが、c-junは*Ppara* α nullマウスで上昇が確認された。PPAR α はNF κ B p65とp50のヘテロダイマーやc-junとc-fosのヘテロダイマーの転写活性化を阻害するため(Kostadinova et al., 2005)、*Ppara* α nullマウスでの腫瘍につながったと考えられた。NF κ B p65についてはアレイ上にはない遺伝子の為、今後定量的リアルタイムPCR法等により確認が必要と考えられる。最近DEHPによる毒性にはフェノバルビタール等が作用するconstitutive androstane receptor (CAR)も関与しているのではないかと考えられている(Ren et al., 2010)。実際DEHP曝露によりCARが誘導されること、*hPPAR* α マウスの方が野生型マウスよりもCARの反応領域への結合が強いことを我々は最近報告した(Ito et al., in press)。肝腫瘍組織でのCARの発現を検討しているが、こちらも個体差が大きく結論が出るには至っていない。

前腫瘍病変の細胞増殖マーカーとしてKi67とPCNAを染めることを試みたが、個体差が大きく、DEHP曝露によりどの遺伝子型マウスで細胞増殖が起きているか、現時点で結論を出すことは望ましくないと思われる(腫瘍部位ではいずれも多数検出されているため、方法に問題はないと思われる)。DEHPの曝露濃度、腫瘍の種別以外に、腫瘍の色調、大きさ等の剖検時の評価や炎症、脂質蓄積度等を加味して細分化をして比較をする必要があるかもしれない。

今回用いた曝露濃度は、前回実験に用いて*Ppara* α nullマウスで有意に肝腫瘍発生率の増加した0.05%と腫瘍増加が見られなかった0.01%に加え、過去のnational toxicology programの結果B6C3F1マウスで肝腫瘍発生が増加した0.3, 0.6%を加味し、0.4%を加えた4用量を用いた。0.4%群で曝露量40 mg/kg b.w./day程度だと思われる。

最後に、IARCはPPAR α 非依存的な経路の関与が否定できないとして昨年DEHPの発がんリスクを3から2bに再度引き上げた。PPAR α 非依存的な経路の解明が非常に重要であるため、今後も引き続き検討が必要である。

E. 結論

DEHPによる肝腫瘍形成はPPAR α 依存的な経路とPPAR α 非依存的な経路の両方が関与している可能性が示唆された。PPAR α 非依存的な経路の同定には至っておらず、今後の課題である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Ito Y*, Nakamura T, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Yamagishi N, Naito H, Kamijima M, Gonzalenz FJ, Nakajima T. Plasticizers may activate human hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α less than that of a mouse but may activate constitutive androstane receptor in liver. PPAR Research, in press *Correspondence author

2. 学会発表

- 1) 伊藤由起、柳場由絵、林由美、内藤久雄、三宅美緒、上島通浩、那須民江. ヒト PPAR α トランスジェニックマウスを用いた DEHP の肝発がん性評価. 第 85 回日本産業衛生学会 (名古屋 2012/5/30-6/2)
- 2) 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 PPAR α 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)

H. 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

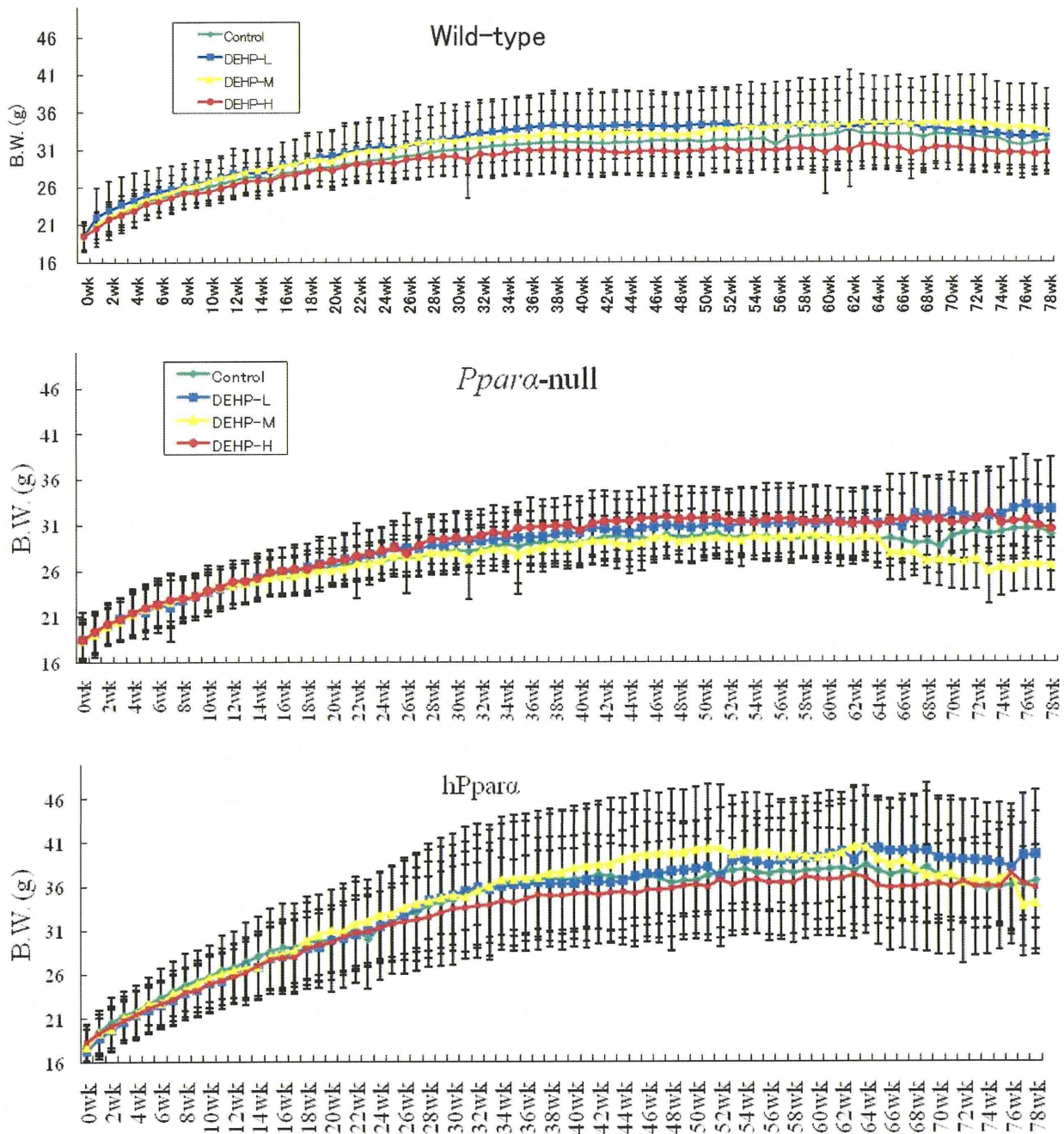
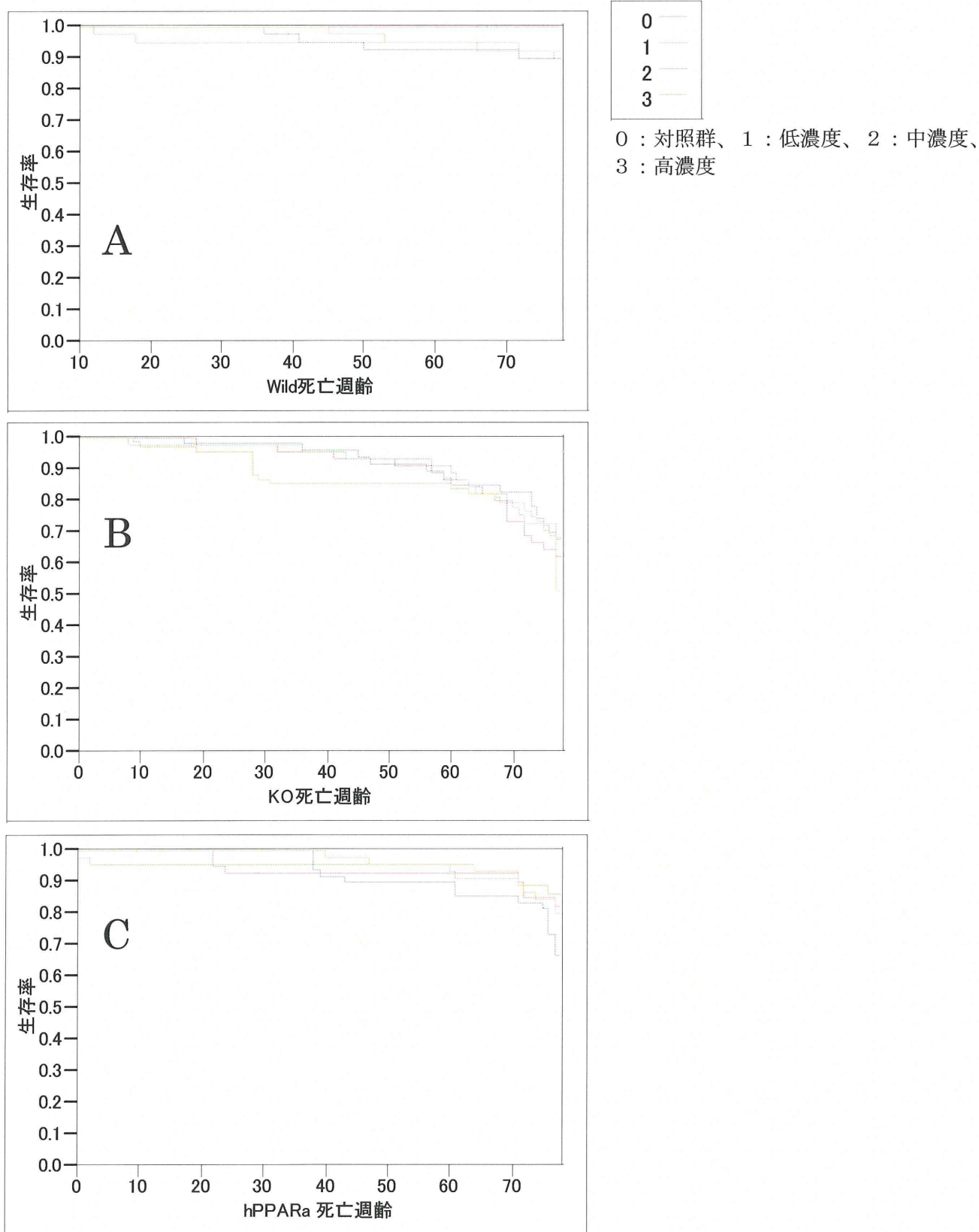
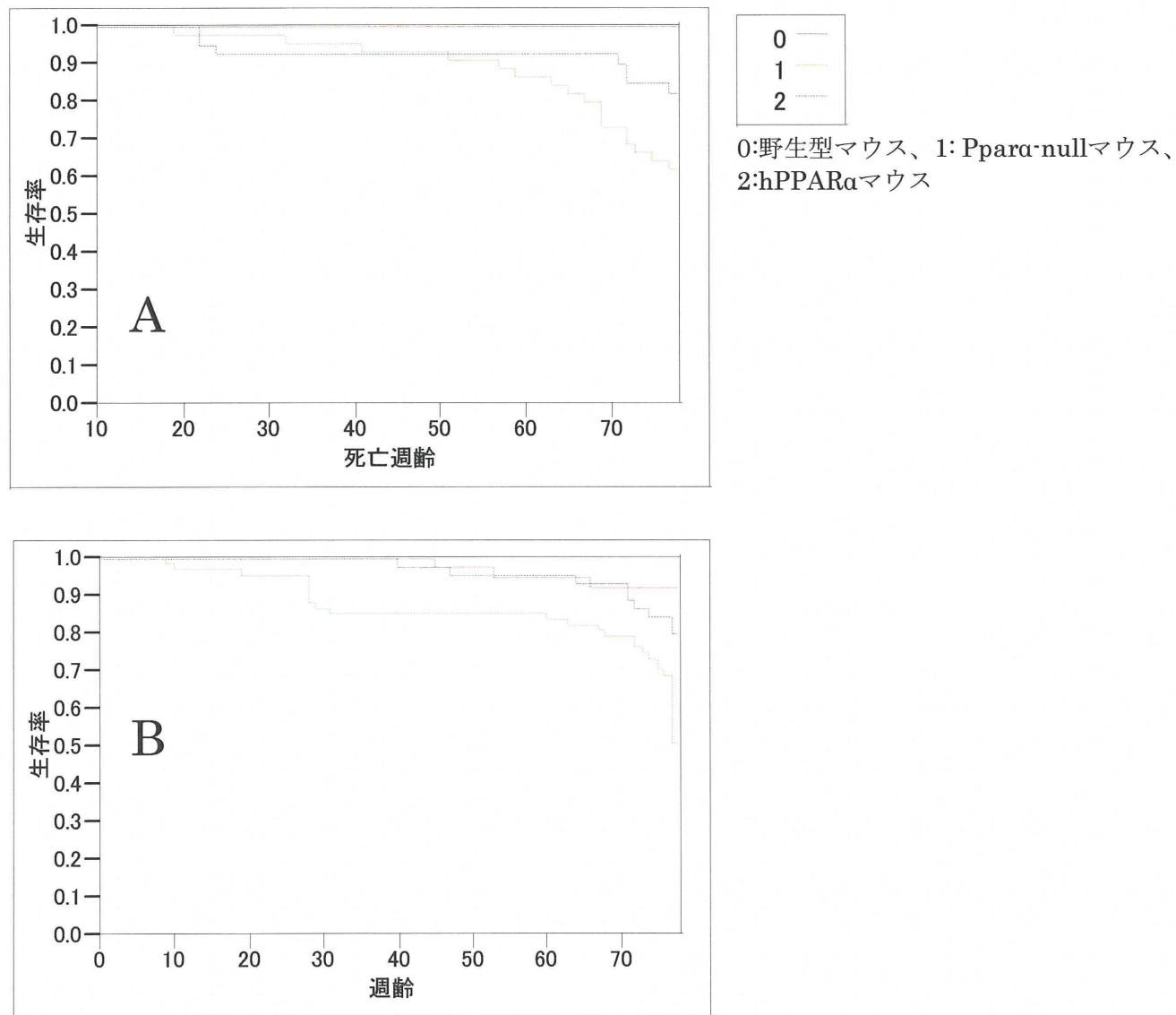


Fig. 2 生存分析プロット



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: Ppara-null マウス, C: hPPARa 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。

Fig. 4 78週間曝露群解剖時体重と肝臓重量

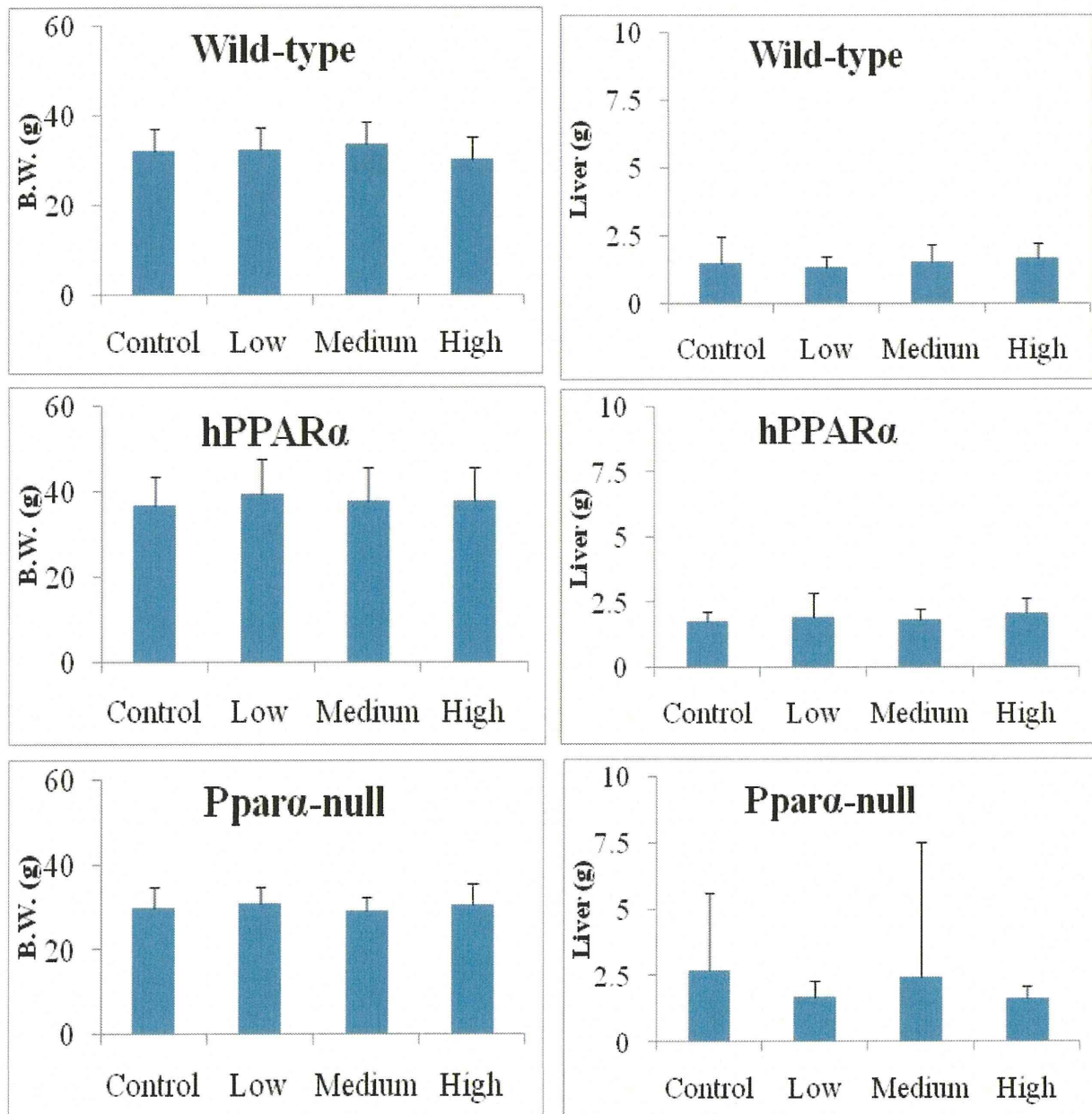
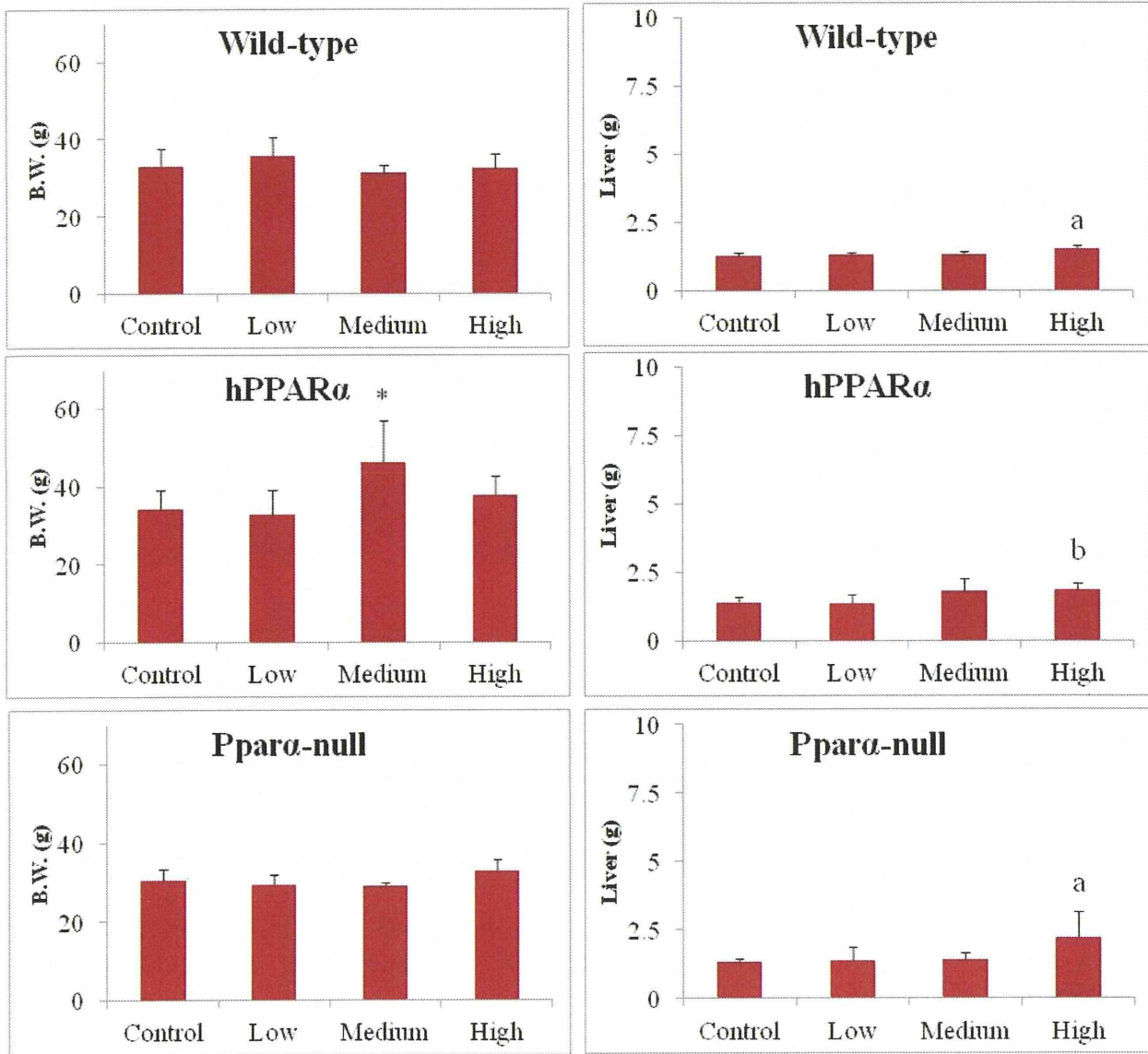


Fig. 5 52週間曝露群解剖時体重と肝臓重量

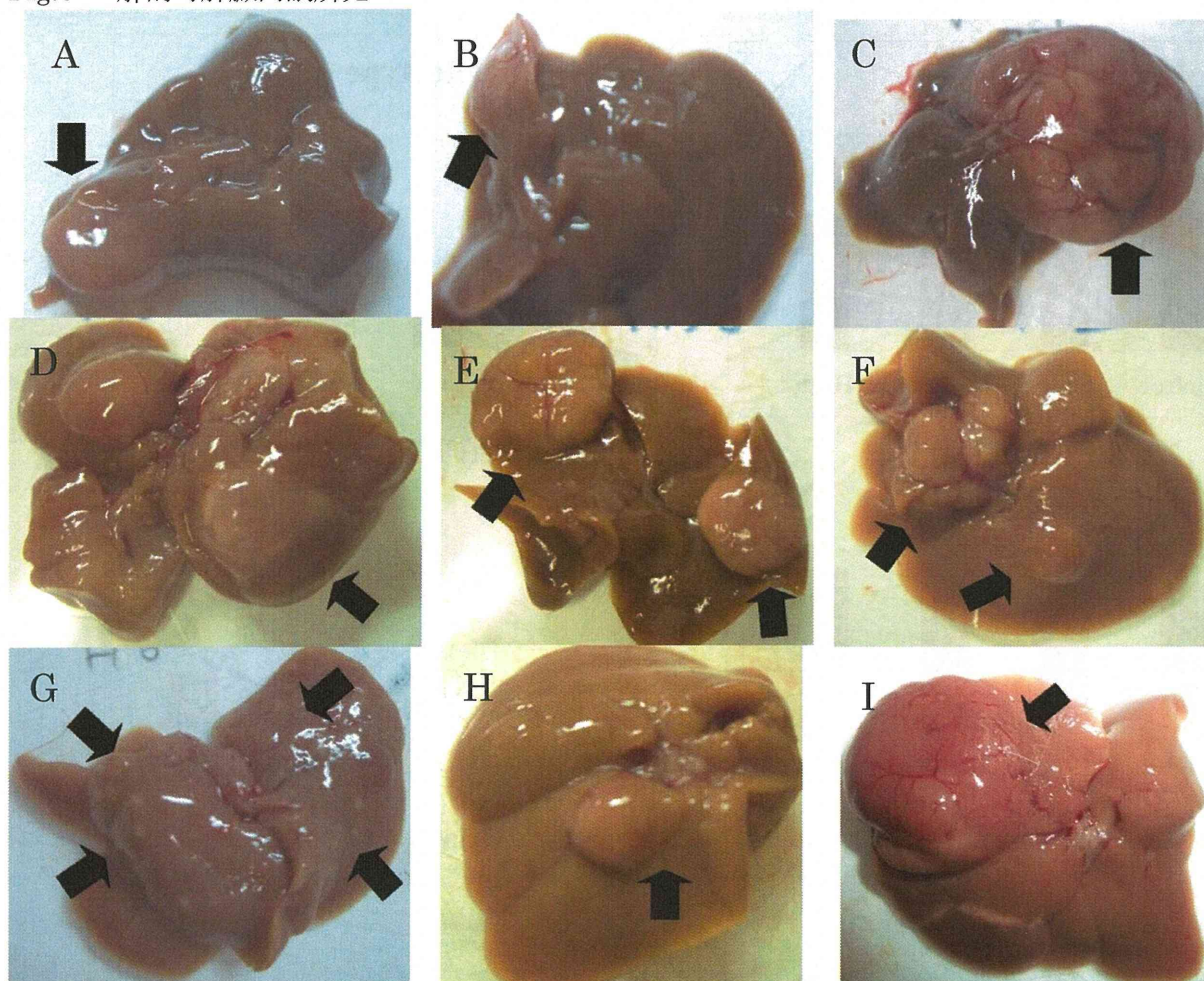


*Control 群(対照群)と比較して $p < 0.05$

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

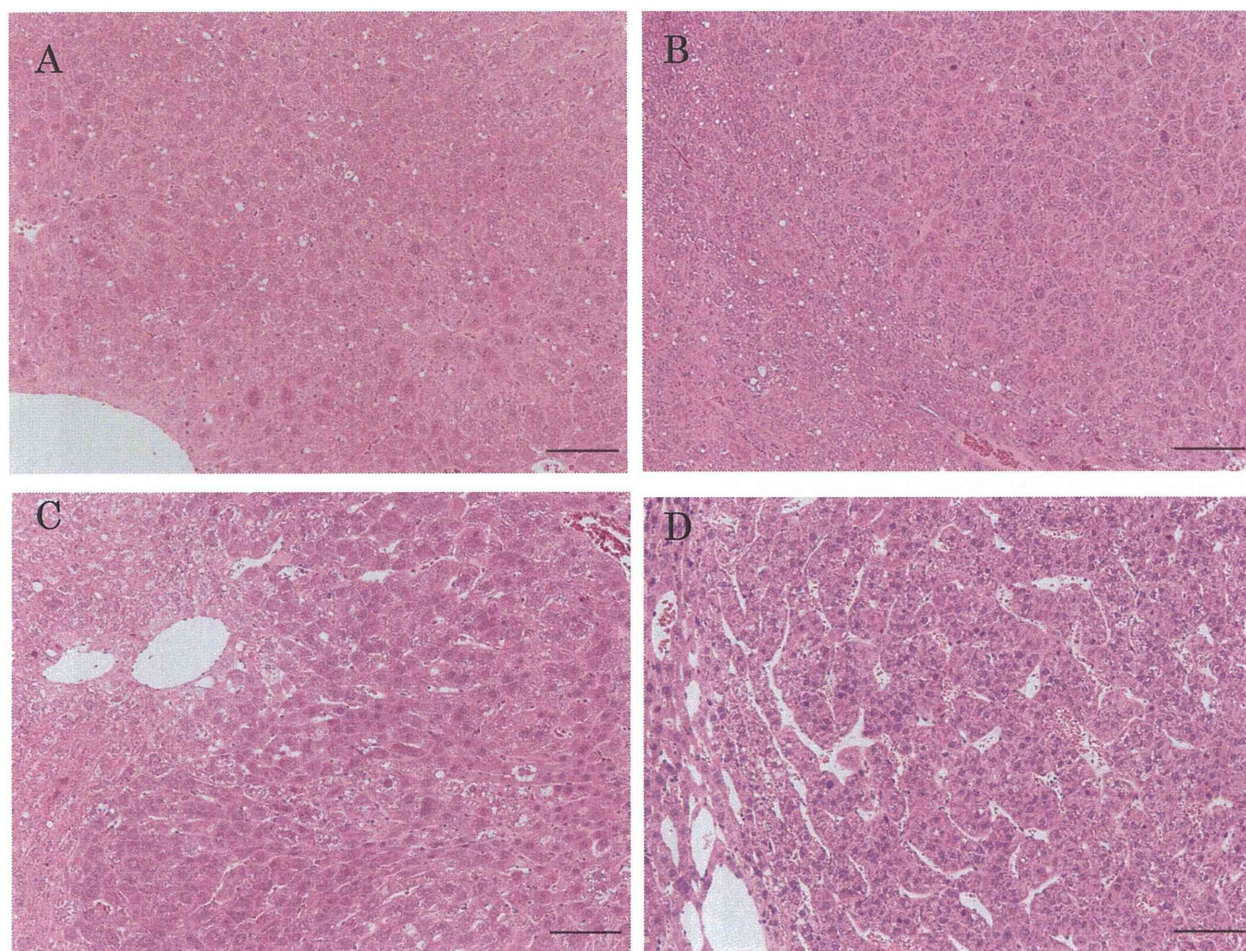
b 相対重量のみ Control 群(対照群)と比較して $p < 0.05$

Fig.6 解剖時肝臓肉眼所見



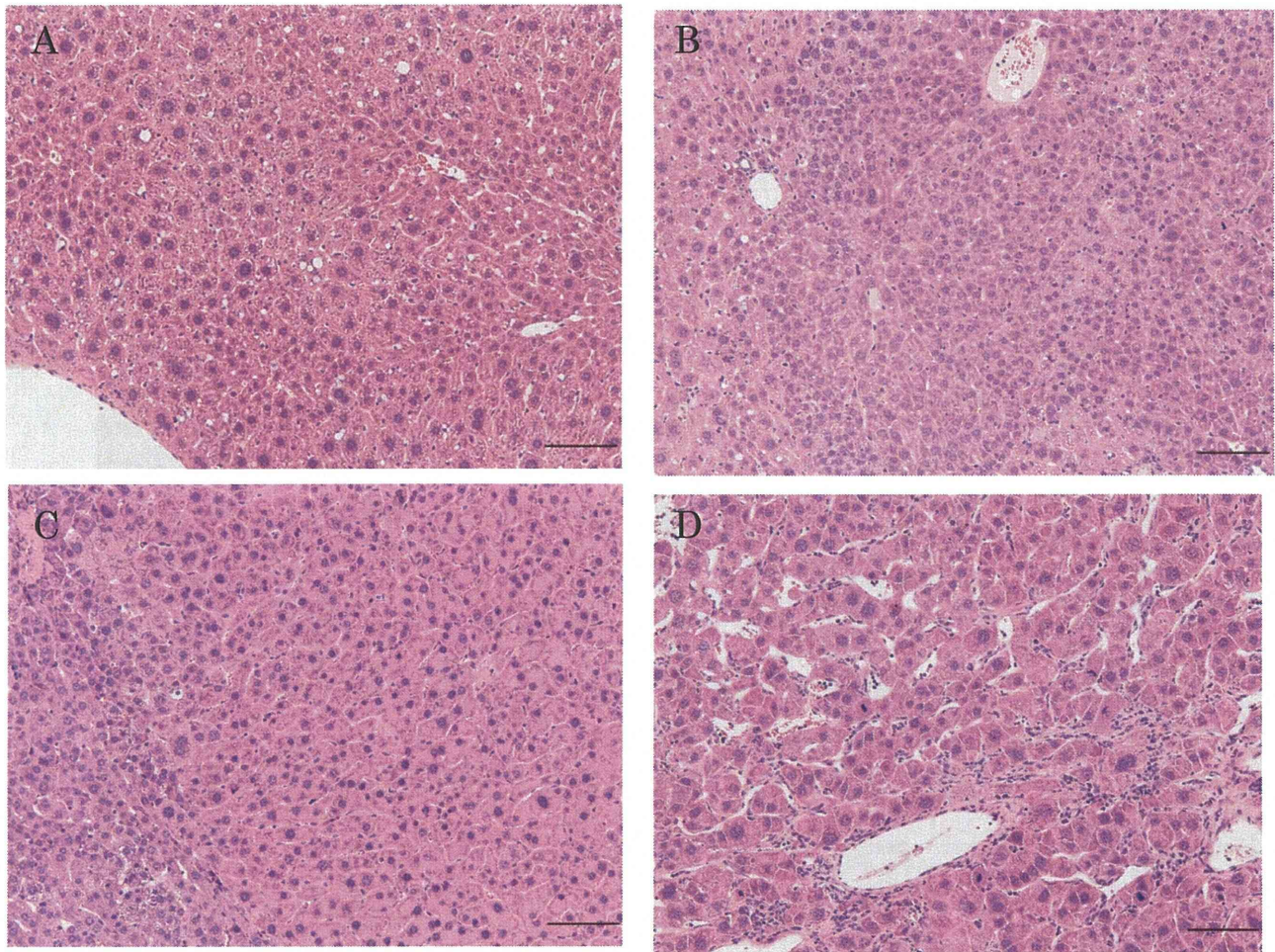
矢印は腫瘍部位を示す。A, B, Cは野生型マウス、D,E,Fは *Ppara* α -null マウス、G, H, Iは *hPPAR* α マウスの一例である。A, D, Gはアデノーマ(eosinophilic)、B, E,Hはアデノーマ(basophilic)、C, F, Iはカルシノーマであった肝腫瘍病変

Fig. 7 野生型マウスの病理組織



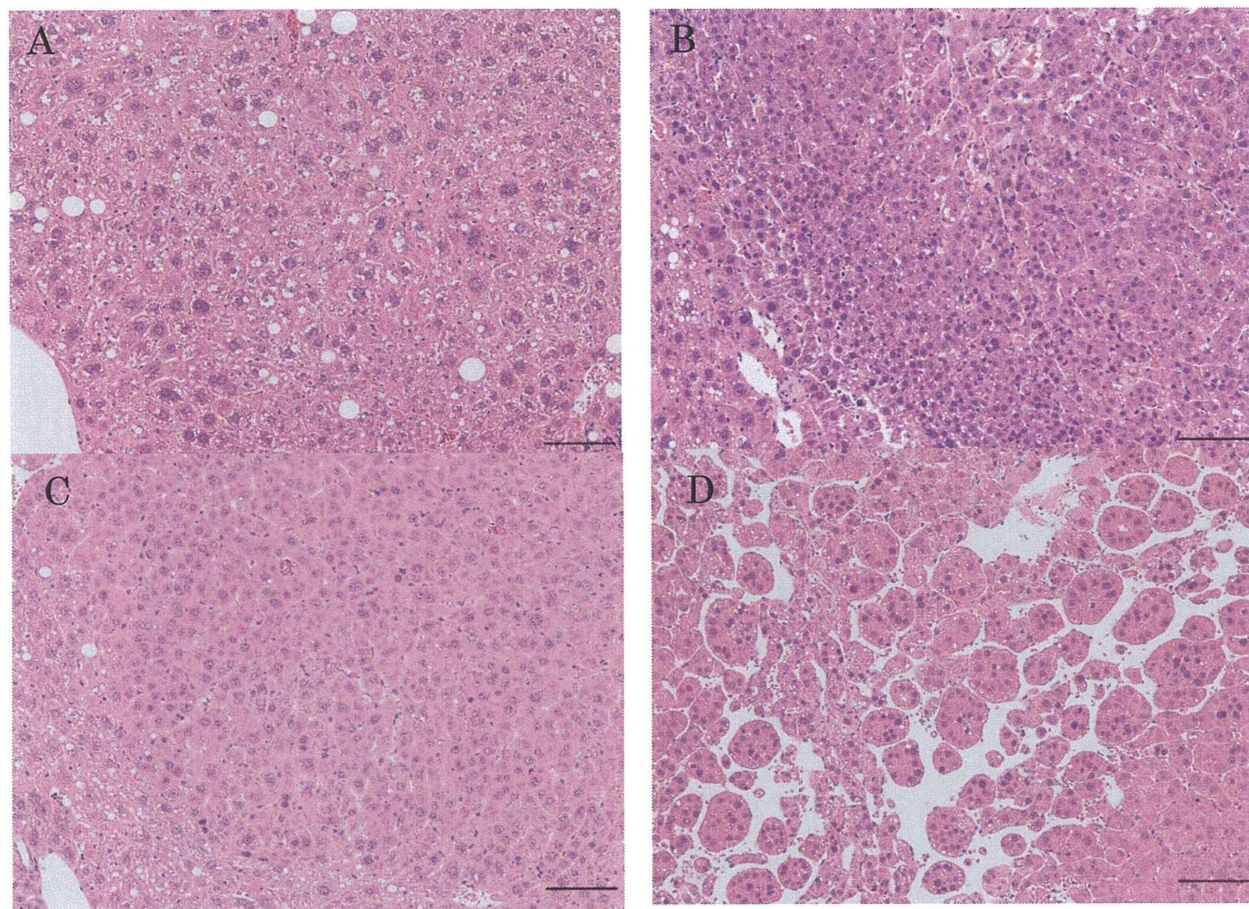
100 倍の病理組織像、右下の黒いバーは 100 μm を示す。A : 非腫瘍、B : アデノーマ (basophilic) 、
C:アデノーマ (eosinophilic) 、D : カルシノーマ

Fig. 8 *Ppar α* null マウスの病理組織



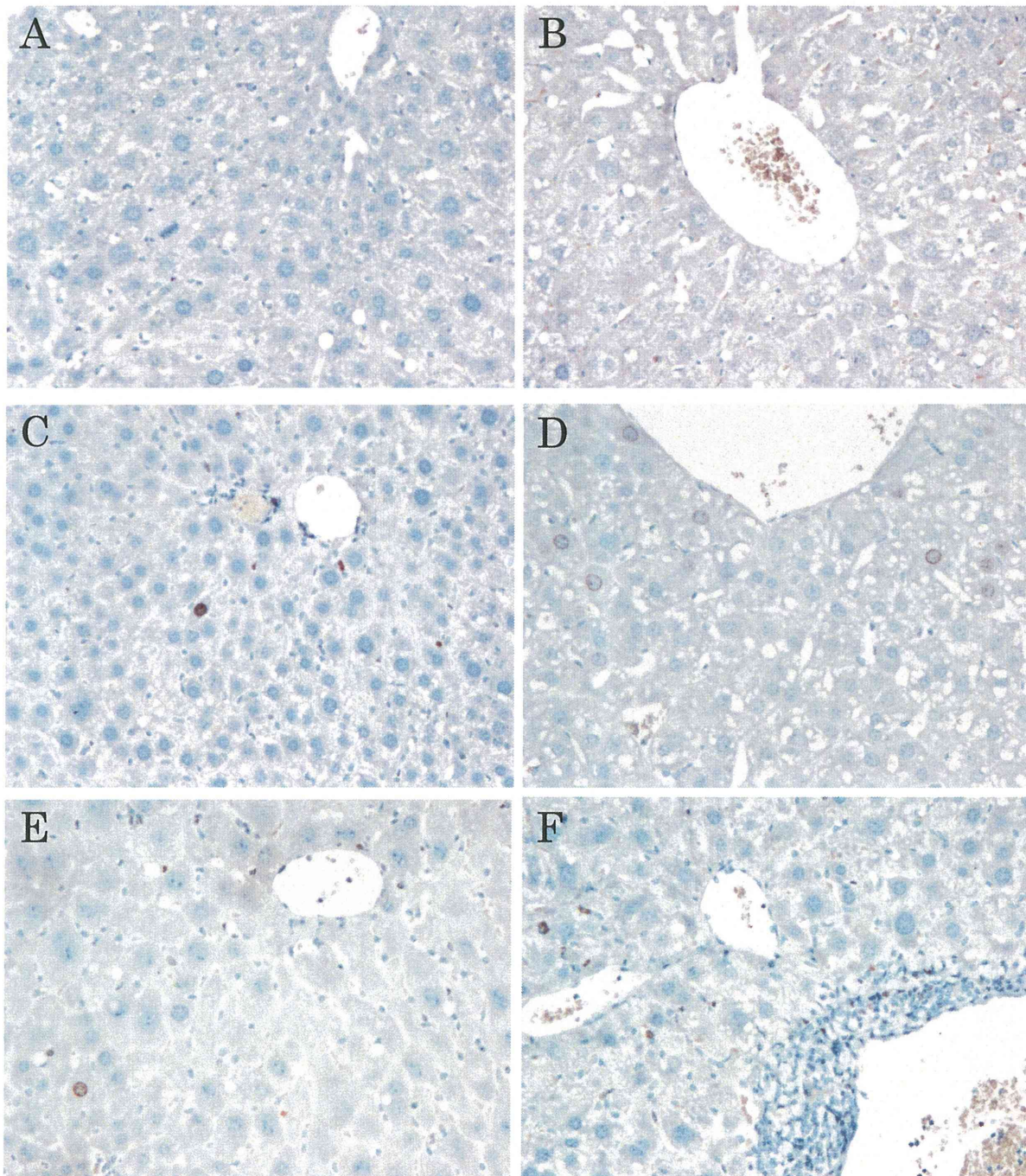
100倍の病理組織像、右下の黒いバーは100 μm を示す。A : 非腫瘍、B : アデノーマ (basophilic) 、
C:アデノーマ (eosinophilic) 、D : カルシノーマ

Fig. 9 hPPAR α マウスの病理組織



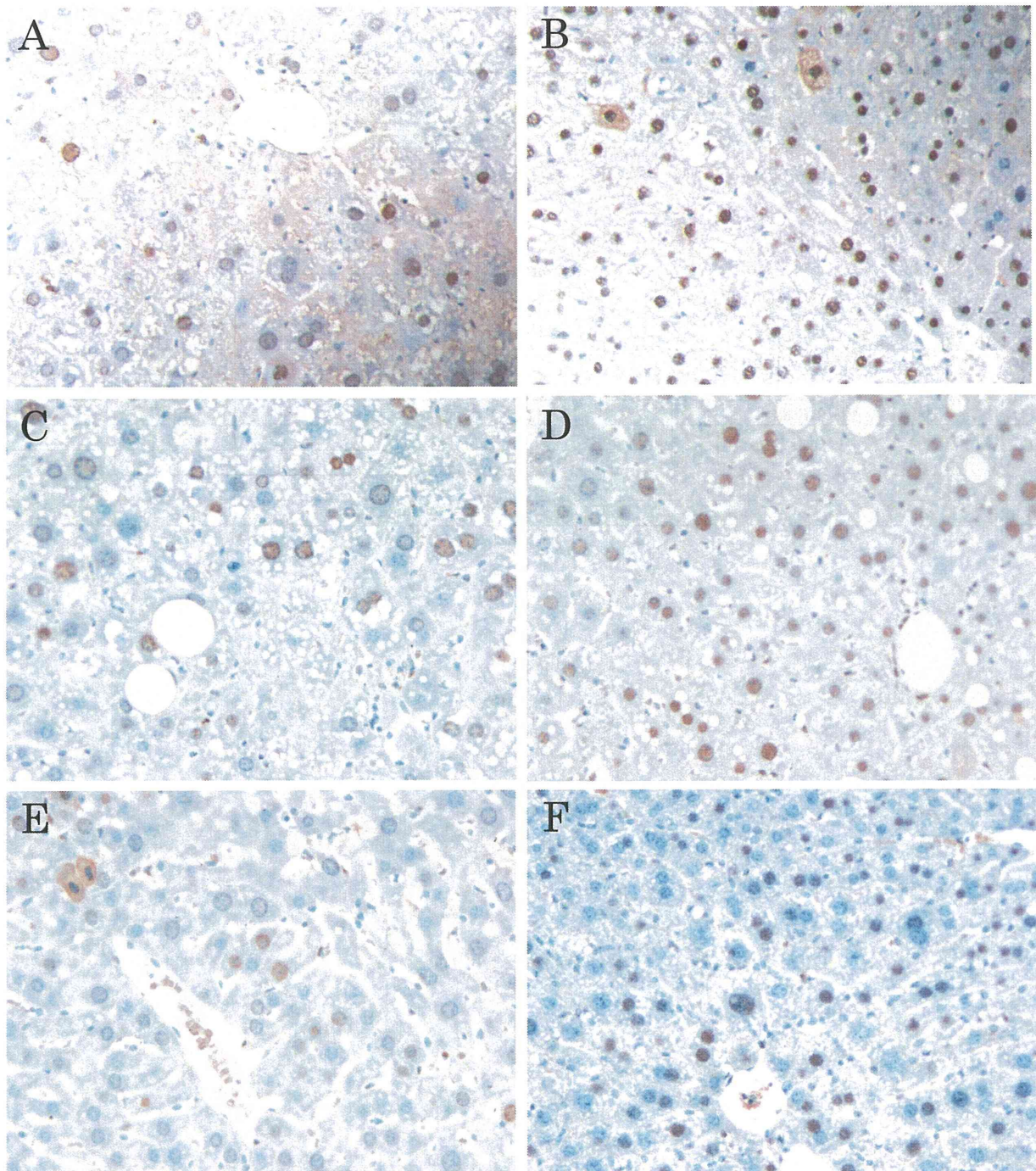
100倍の病理組織像、右下の黒いバーは100 μm を示す。A : 非腫瘍、B : アデノーマ (basophilic) 、C:アデノーマ (eosinophilic) 、D : カルシノーマ

Fig. 10 各遺伝子型マウスのKi67発現



A, Bは野生型、C, Dは*hPPAR α* 、E, Fは*Ppar α* -nullマウス、A, C, Eは対照群、B, D, Fは高濃度群の肝腫瘍の見られなかった個体の倍率200倍の結果を示す。

Fig. 11 各遺伝子型マウスのPCNA発現



A, Bは野生型、C, Dは*hPPARα*、E, Fは*Ppara*-nullマウス、A, C, Eは対照群、B, D, Fは高濃度群の肝腫瘍の見られなかった個体の倍率200倍の結果を示す。