



カニクイザルの肝臓ペルオキシゾームに対する di(2-ethylhexyl) phthalateの影響

佐竹 茂^{1, 2)} 御領政信³⁾ 岡田幸助³⁾

要 約

カニクイザルがペルオキシゾーム増殖誘導剤に対してどのような反応を示すかについての基礎的な背景データを得る目的で投与試験を行った。雄3匹、雌4匹のカニクイザルにdi(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の1,000mg/kg/dayを28日間経口投与、対照として、雌雄各3匹にコーンオイルを同様に投与した。電子顕微鏡検査では投与開始前に肝臓生検を実施し、投与前と投与後について動物個別に比較した。肝臓におけるペルオキシゾームおよびミトコンドリア関連酵素であるhepatic fatty acid β -oxidation system (FAOS), carnitine acetyltransferase (CAT) およびcarnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性の測定を実施した。電子顕微鏡検査では、長軸に沿ったクリステの層状配列を伴ったミトコンドリアの腫大が肝細胞に認められた。肝ペルオキシゾーム数は、DEHP投与前に比較して増加傾向を示したが、非常に軽微な変化であった。CPT活性の軽微な増加が認められたが、FAOS活性およびCAT活性に変化は認められなかった。ペルオキシゾーム増加およびミトコンドリアの腫大は雌で明確であり、反応態度に僅かながら雌雄差がある可能性が示唆された。カニクイザルのペルオキシゾーム増殖誘導剤に対する反応は、げっ歯類に比較すると非常に弱いことが確認され、げっ歯類に比較すると、反応性が低いという点でよりヒトに類似した反応であると考えられた。

キーワード：カニクイザル、肝臓、ペルオキシゾーム、di(2-ethylhexyl) phthalate

開発段階にある新規薬物や化合物はヒト臨床試験に入る前には、必ず動物を用いた安全性試験が実施されている。一般的に、安全性試験でヒトへの有害性が危惧された場合には、科学的根拠に基づいた説明がされない限り、その開発

は中断されるため、ヒトにおける重大な有害作用を未然に防ぐ役割を担っている。最近の傾向としてカニクイザルが非げっ歯類として安全性試験に繁用されている。カニクイザルは、他に非げっ歯類として用いられているイヌに比べ系

¹⁾ 岐阜大学大学院連合獣医学研究科病態獣医学連合講座

²⁾ 株式会社新日本科学

³⁾ 岩大支会 岩手大学農学部獣医学科獣医病理学研究室

統発生学的にヒトに近く、得られた結果をヒトへ外挿し易い利点がある。反面、背景データが絶対的に少なく、特に反応に動物種差が存在する薬物や化合物の安全性評価では苦慮することが多い。

近年、脂質低下薬あるいは抗糖尿病薬等として peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) に対する作動薬（アゴニスト）が注目されているが、これら薬物・化合物にも大きな動物種差が存在することはよく知られている。PPARは、ペルオキシゾーム増殖誘導剤をリガンドとする核内受容体の一つとして1990年に発見された[11]核内受容体ホルモンスーパーファミリーの一つであり、糖および脂質代謝に関与する標的遺伝子を調節している転写因子でもある。現在まで、PPARにはPPAR α 、PPAR β およびPPAR γ の3種類のサブタイプが確認されており、肝臓では主としてPPAR α が発現している[11, 14, 15]。

ペルオキシゾームは動・植物および真核微生物に広く分布し、直径約300nmの比較的電子密度の高い細胞内顆粒であり、リソゾームに類似した形態学的特徴を持つ細胞内小器官である。この小器官はD-アミノ酸、尿酸、L- α -オキシ酸などを基質とする酸化酵素群とそれを分解するカタラーゼを含むことを特徴とし、ミトコンドリアとは別の脂肪酸酸化系 (fatty acid β -oxidation system : FAOS) が見出されている[37]。

PPAR α アゴニストとして、フィブレート系薬物である脂質低下薬、プラスチック可塑剤、抗糖尿病薬、脂肪酸、ステロイドが知られており、共通して肝ペルオキシゾームを増加させる。これら別名“ペルオキシゾーム増殖誘導剤”とも言われるが、大きな動物種差が認められる[4, 18, 24, 29]。一般に、げっ歯類のラットやマウスはペルオキシゾーム増殖誘導剤に対する感受性が高く、ペルオキシゾーム増加と同時に肝細胞の腫大・増殖、その結果として肝細胞癌を誘発すること[4, 18, 24, 29]が問題視されている。

一方、霊長類では肝ペルオキシゾームは増加しなかったという報告は多数あり[1, 7, 16, 25, 32]、ペルオキシゾーム増殖誘導剤に対して反応しないという認識が一般的であった。しかし、Reddyら[26]は1984年に、フィブレート系薬物 ciprofibrateが、カニクイザル、アカゲザル、ブタ、ネコおよびニワトリ全てに肝ペルオキシゾームの増加を誘導したことを報告した。同様にHoivikら[8]は2004年に、カニクイザルに fenofibrate および ciprofibrate を投与すると、用量依存性に肝ペルオキシゾームが増加したことを報告した。カニクイザルでペルオキシゾーム増加が報告された化合物は、いずれもフィブレート系薬物であった。しかし、他ペルオキシゾーム増殖誘導剤では、これまでカニクイザルでの肝ペルオキシゾーム増加の報告は見当たらない。

前臨床段階で、ペルオキシゾーム増殖誘導剤の安全性評価をカニクイザルで行う場合、どのような反応を示すか予め把握しておく必要がある。

そこで本研究では、ペルオキシゾーム増殖誘導剤に対するカニクイザルの反応を明らかにする目的で、フィブレート系薬物以外の化合物、すなわち di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を取り上げ検討を行った。

DEHPは一般にプラスチック可塑剤として利用されており、塩化ビニル製品やラッカーの製造の際に用いられ、代謝物がPPAR α アゴニスト作用を有する[20, 23]。物理化学的性状として、水に溶けにくく、常温で無色の液体であり、合成樹脂を軟らかくする性質を持っている。DEHPの化学構造は図1に示す通りである。

DEHPの前臨床データとして、雄ラットに100 mg/kg/dayの用量で14-21日間投与すると肝ペルオキシゾーム増加が誘導される[17, 34]。雌雄コモンマーモセットに2, 500mg/kg/dayで13週間[16]、雄カニクイザルに500mg/kg/dayで14-21日間[27, 34]投与しても肝ペルオキシ

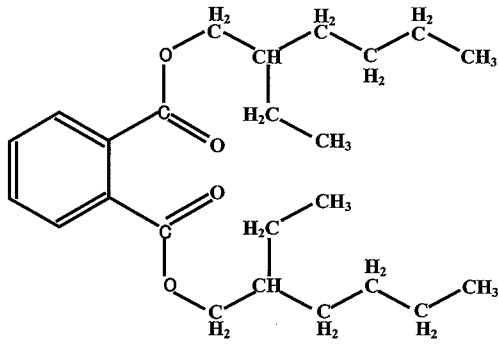


図1 Chemical structure of di(2-ethylhexyl) phthalate $C_{24}H_{38}O_4$: molecular weight 390.55
 Synonyms: 1,2-Benzenedicarboxylic acid bis(2-ethylhexyl) ester; bis(2-ethylhexyl) phthalate; dioctyl phthalate; Octoil.

ゾームは増加しなかったと報告がある。2000年にWHOは、DEHPは哺乳類において *in vivo* および *in vitro* とともに遺伝子変異，染色体異常などの遺伝毒性を示さないこと，DEHP誘発肝臓腫瘍はラットおよびマウスにおいてペルオキシゾーム増加などのnon-DNA-reactiveな機序で発生すること，DEHPに起因するペルオキシゾーム増加や肝細胞増殖はラットおよびマウスの癌原性試験以外では報告がないこと，ならびにヒトの培養細胞およびヒト以外の霊長類においてDEHPに起因するペルオキシゾーム増加が示されていないことを根拠に，ヒトへの発癌リスクはないと結論付けた[40]。

本研究では，DEHPの大量投与において，カニクイザルの肝細胞にペルオキシゾーム増加が誘導されるかを検証した。

材料および方法

化合物：Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, Lot No. 4YNPE, 東京化成工業株式会社, 東京) をコーンオイルに溶解し，200mg/mLの濃度に調製した。

動物および飼育条件：実験用に繁殖され中国から輸入し検疫が終了した3～5歳のカニクイザル (*Macaca fascicularis*) 雄6匹と雌7匹

の計13匹を入手し，実験に供した。動物は個別にステンレス製ケージ (680mmD×620mmW×770mmH) に収容し，1日12時間の人工照明 (07:00～19:00点灯)，温度範囲：23～29℃，湿度範囲：35～75%，換気回数：15回/時間の条件下で飼育した。固型飼料 (Teklad Global Certified 25% Protein Primate Diet, Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, USA) 約108g (約12g 9個) を1日1回14:30～16:00に与え，翌日の08:30～10:00に残った餌を回収した。投与期間中は投与前に餌の回収を行った。血液学的検査および血液生化学的検査のための採血前日，剖検前日は17:00前後に残った餌を回収した。水道法水質基準に適合した水を自動給水装置 (Edstrom Industries, Inc., Waterford, UK) を用いて自由に摂取させた。

本実験は，株式会社新日本科学安全性研究所の動物実験倫理指針に従って実施した。

群構成：DEHP投与群1群，溶媒対照群 (対照群) 1群の2群構成とした。DEHPの投与量は1,000 mg/kg/dayを設定した (表1)。

雄3匹，雌4匹のカニクイザルに，コーンオイルに溶解して調製したDEHPを5 mL/kg/dayの投与量で1日1回，28日間，経鼻カテーテル (ニプロネラトンカテーテル，10Fr，ニプロ株式会社，大阪) を用いて経口投与した。対照として，雌雄各3匹のカニクイザルにコーンオイルを5 mL/kg/dayの投与量で同様に投与した。

なお，投与開始前の馴化期間を4週間設けた。馴化開始週に全例の肝臓の生検を実施した。肝臓生検後は，一般状態，摂餌量，体重，血液学的検査および血液生化学的検査結果から，動物

表1 群構成

被験物質	投与用量 (mg/kg/day)	投与液量 (mL/kg/day)	投与液 濃度 (mg/mL)	動物数 (動物番号)	
				雄	雌
コーンオイル	-	5	-	3(1～3)	3(4～6)
DEHP	1000	5	200	3(7～9)	4(10～13)

カニクイザルに4週間 (28日間) 経口投与した。

が十分に回復したことを確認してから投与を開始した。

肝臓の生検：塩酸ケタミン（50mg/mL, Kamud Drugs Pvt. Ltd, Mumbai, India）を筋肉内投与（0.2mL/kg）し、麻酔下で剣状軟骨の直下から腹部正中を3～4 cm切開、内側左葉の先端部をピンセットでつまみ、電気メス（MESU-150, 瑞穂医科工業株式会社, 東京）にて肝組織を切離した。採取した組織について、両刃剃刀を用いて、直ちに電顕用に細切し、氷冷した3%グルタルアルデヒドに浸漬固定した。

一般状態の観察：馴化期間中は毎日1回、投与期間中は毎日3回（投与前、投与直後、投与後約4時間）、生死の確認とともに一般状態を観察した。

体重測定：馴化期間中は1週間に1回、投与期間中は1週間に2回、全例の体重を測定した。

摂餌量測定：馴化開始翌日から毎日摂餌量を測定した。給餌個数と残餌個数を記録して、摂餌量(g)を算出した。

血液学的検査および血液生化学的検査：馴化期間中は肝臓生検実施前、肝臓生検後2週間および3週間の計3回、投与期間中は投与26日目（投与開始日を1日目で起算）の計1回実施した。

血液学的検査には、大腿静脈より注射器で約1 mL/個体採血し、EDTA-2Kで抗凝固処理した全血を使用した。血液生化学的検査には、大腿静脈から約2 mL/個体採血し、室温で20～60分間静置後、遠心分離（室温, 1710×g, 3000rpm, 15分間）して得られた血清を用いた。

トキシコキネティクス：投与26日目（投与開始日を1日目で起算）に、投与前、投与後1, 2, 4, 6および24時間の6ポイントについて、全例の大腿静脈からヘパリンナトリウム加注射器を用いて採血した。採血量は約0.5mL/個体（各採血ポイント、血漿量として約0.2mL/個体）で、採血した血液は遠心分離まで氷冷し、速や

かに遠心分離（4℃, 1,710×g, 3,000rpm, 15分間）して、得られた血漿を冷凍庫（許容範囲：-10℃以下）で凍結保存した。DEHP群の血漿中のDEHPおよびその第一代謝物であるMEHPの濃度を、HPLCシステム（Alliance2795, ウォーターズ株式会社, Milford, USA）, HPLCカラム（Mightysil RP-18 GP, 4.6mmi.d.x75mm, 5μm, 関東化学株式会社, 東京）, ならびにUV検出器（2497, ウォーターズ株式会社, Milford, USA）を用いて測定した。

得られた血漿中MEHP濃度から台形法により投与後24時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）を算出した。血漿中DEHP濃度は検出限界以下のポイントが多く、AUC_{0-24h}は算出できなかった。

剖検および肝臓重量：28日間の投与が終了した翌日、全ての動物の体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム（64.8mg/mL, 0.4mL/kg, 東京化成工業株式会社, 東京）を静脈内注射し、麻酔下で放血死させ剖検に供した。剖検時に、全例の肝臓重量を測定後、肝臓組織を採取し、光学顕微鏡検査、電子顕微鏡検査および肝臓組織内酵素活性測定に供した。

光学顕微鏡検査：剖検時に肝臓組織を採取し、直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬固定した。固定後に組織を切り出し、常法に従いパラフィン包埋、薄切してヘマトキシリン・エオジン染色を施し鏡検に供した。

電子顕微鏡検査：肝臓生検時および剖検時に、新鮮な肝臓組織を採取、細切し、直ちに氷冷した3%グルタルアルデヒド溶液に浸漬固定し1%オスミウム酸溶液で後固定後、常法に従いエポキシ樹脂（Quetol 812）に包埋した。エポキシ樹脂包埋標本から超薄切切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重染色を施した。染色した標本から透過型電子顕微鏡（JEM-1200EX, 日本電子株式会社, 東京）を用いて写真を撮影し、観察に供した。

全例の各時期（投与前および剖検時）につい

て、各動物の小葉中心部および小葉辺縁部を各2ブロック、計8ブロック/個体の包埋標本から超薄切切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重染色を施した。×6,500の倍率にて各切片につき20枚の写真を撮影した。各動物の各時期に小葉中心部および小葉辺縁部の各40枚の写真について、ペルオキシゾームおよびミトコンドリアの計数を実施した。40枚の写真の総面積は3,300 μ m²に相当した。

肝臓組織内酵素活性測定：剖検時に肝臓右葉を切り離し、氷冷した生理食塩液で灌流した後、組織の一部（約2g×2本）を採取し、ただちに液体窒素で凍結した。サンプルは超低温フリーザー（許容範囲：-70℃以下）で保管した。

以下の操作は全て氷冷下で実施した。鋏を用いて肝臓組織を小片に切り刻み、1mmol/L EDTAを含むトリス緩衝液（pH7.4）を肝臓組織重量の9倍量加えた。これをホモジナイズして10%肝臓ホモジネートを作製した。

10%肝臓ホモジネートにおけるFAOS, CATおよびCPTの酵素活性を、井上ら[10]の方法に従い分光測光器（U-3010, 株式会社日立製作所, 東京）を用いて測定した。酵素活性単位は“ μ mol/min/g liver”とした。

結 果

剖検および肝臓重量：全例において諸臓器および組織に肉眼的異常は認められなかった。肝臓重量では、雌雄ともに媒体群に比較して有意差は認められなかった。肝臓重量個別値では、体重低下がみられなかったDEHP群の雌2例（動物番号10, 13）において、絶対および相対重量の軽微な増加が認められた。媒体群の平均値と比較して、これらの相対重量は22あるいは24%増加していた（表2）。

光学顕微鏡検査：全例の肝臓に異常は認められなかった。

電子顕微鏡検査：肝細胞において、長軸に沿ったクリステの層状配列を伴うミトコンドリアの

表2 肝臓重量

a. 絶対重量

Group	Male		Female	
	Animal No.	(g)	Animal No.	(g)
Com oil	1	70.6	4	59.4
	2	70.4	5	44.7
	3	79.4	6	61.5
	Mean±SD	73.5±5.1	Mean±SD	55.2±9.2
DEHP	7	81.1	10	66.2
	8	65.3	11	57.2
	9	68.0	12	48.9
	-	-	13	71.9
	Mean±SD	71.5±8.5	Mean±SD	61.1±10.1

Not significantly different from the corn oil group.

b. 相対重量 (liver weight/body weight)

Group	Male		Female	
	Animal No.	(%)	Animal No.	(%)
Corn oil	1	16.2	4	22.0
	2	17.8	5	19.0
	3	20.7	6	18.9
	Mean±SD	18.2±2.3	Mean±SD	20.0±1.8
DEHP	7	19.7	10	24.4
	8	20.2	11	25.8
	9	21.1	12	20.0
	-	-	13	24.7
	Mean±SD	20.3±0.7	Mean±SD	23.7±2.5

Not significantly different from the corn oil group.

腫大が、DEHP群の雌1例（動物番号13）に認められた（図2, 3, 4）。ペルオキシゾームの形態およびその他に異常は認められなかった。DEHP群の雌において、肝小葉辺縁部および中心部のペルオキシゾーム数が投与前に比較し有

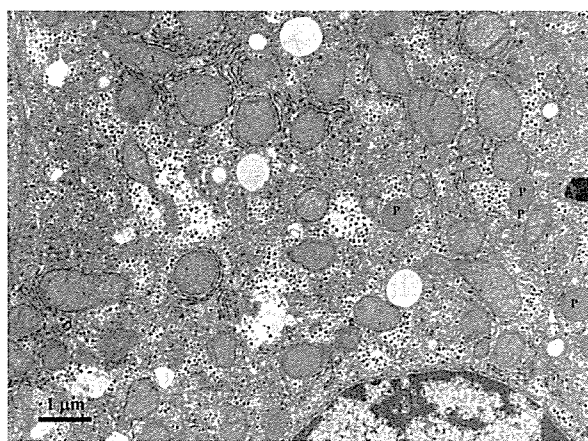


図2 DEHP群雌の小葉辺縁部肝細胞
投与前
異常はみられない。
電子顕微鏡写真 P：ペルオキシゾーム

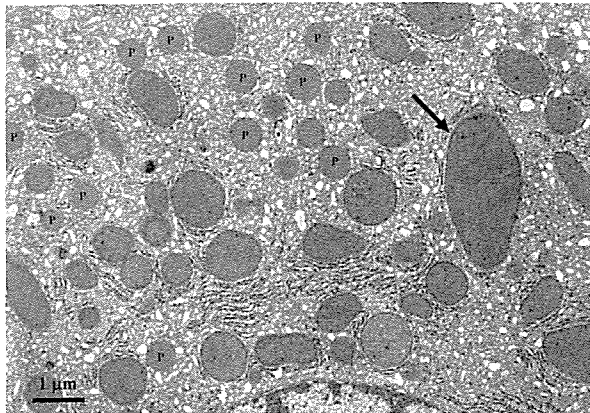


図3 DEHP群雌の小葉辺縁部肝細胞
投与終了後
ペルオキシゾームの増加およびミトコンドリアの腫大(矢印)。
電子顕微鏡写真 P:ペルオキシゾーム

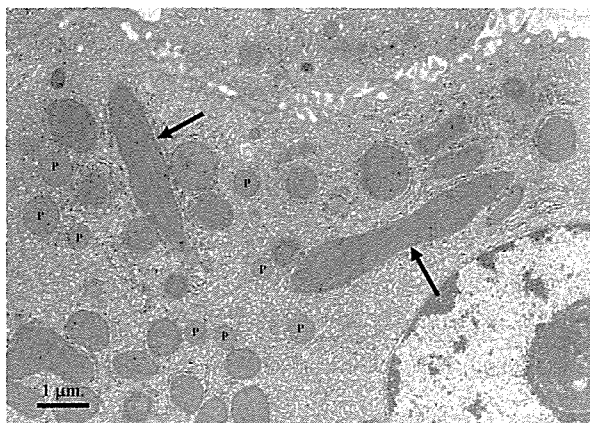


図4 DEHP群雌の小葉辺縁部肝細胞
投与終了後
ペルオキシゾームが増加し、細長く伸張・腫大したミトコンドリア内にてクリステが長軸の方向に沿って層状に配列している(矢印)。
電子顕微鏡写真 P:ペルオキシゾーム

意 ($p < 0.01$) に増加した。個体別の増加率は、小葉中心部で33.3~111.4%，小葉辺縁部で38.5~81.3%であった。ミトコンドリア数に有意差は認められなかった。DEHP群の雄においては、ペルオキシゾーム数およびミトコンドリア数ともに、投与前と比較して有意差は認められなかったが、小葉辺縁部のペルオキシゾーム数は、平均値が投与前および媒体群と比較しても高値を示していることから、増加傾向を示したと考えられた。媒体群との比較においては、雌雄の小葉辺縁部および中心部ともに、ペルオキシゾーム数およびミトコンドリア数に有意差が認めら

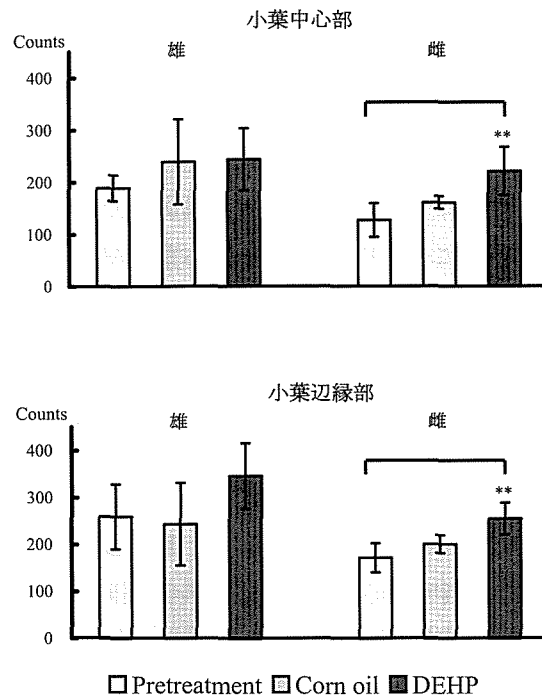


図5 3,300μm²あたりの肝細胞ペルオキシゾーム数
The monkeys given corn oil in the same way served as the vehicle control.
Each column and vertical bar shows mean values and SD of 3-7 animals.
*: $P < 0.01$: significantly different from the values at pretreatment.

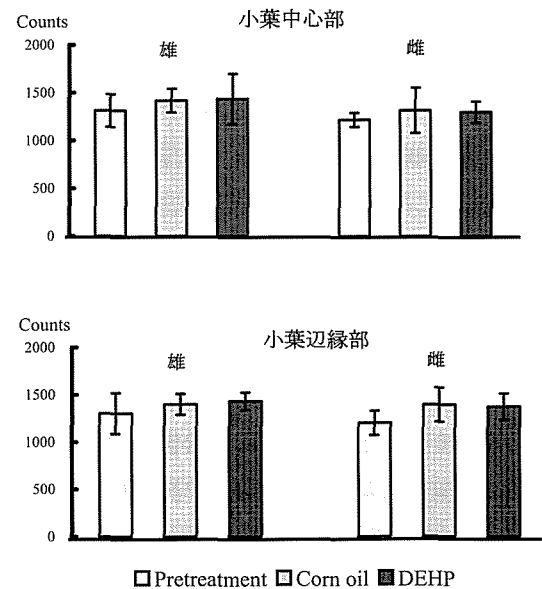


図6 3,300μm²あたりの肝細胞ミトコンドリア数
The monkeys given corn oil in the same way served as the vehicle control.
Each column and vertical bar shows mean values and SD of 3-7 animals.

れなかった(図5, 6)。

肝臓組織内酵素活性測定: DEHP群の雄におい

て、CPT活性が媒体群に比較して有意に増加した。増加程度は、媒体群の約1.6倍（媒体群：2.043units VS DEHP群：3.313units）であった。FAOSおよびCAT活性においては、雌雄ともに媒体群に比較して有意差は認められなかった（図7）。

トキシコキネティクス：血漿中DEHP濃度を表3に、MEHPの血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC_{0-24h}）および濃度推移をそれぞれ表4および図8に示した。血漿中DEHPは、雌雄各2例において投与後1～6時間に散発して僅かに検出されたものの（2.0～9.0 μg/mL），その他の動物およびポイントでは検出限界以下であった。一方、DEHPの第一代謝物であるMEHPの血漿中濃度は、全例においてDEHP投与後に時間とともに増加した。血漿中MEHP濃度はDEHP投与後4～6時間で最高値に達し、個別のC_{max}は39.2～70.5 μg/mLであり、C_{max}平均値は51.3 ± 10.8 μg/mLであった。個別のAUC_{0-24h}は517.6～1374.2 μg · h/mLであり、AUC_{0-24h}平均値は826.6 ± 271.2 μg · h/mLであった。

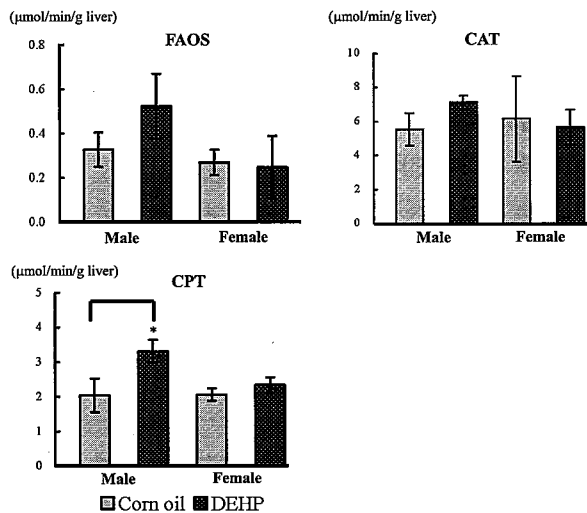


図7 Fatty acid -oxidation system (FAOS), carnitine acetyltransferase (CAT) および carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性 The monkeys given corn oil in the same way served as the vehicle control. Each column and vertical bar shows mean values and SD of 3 or 4 animals. *: P<0.05: significantly different from the corn oil group.

一般状態：DEHP群では、軟便および下痢が全例においてほぼ毎日認められた。その他、嘔吐が雌雄各1例に各1回認められた。対照群では、軟便が雄2例に各2日あるいは4日認められた。

表3 投与26日目における血漿中DEHP濃度（投与開始日を投与1日目として起算）

Animal No.	Dosing point (h)	Plasma DEHP concentration (g/mL)					
		0(pre)	1	2	4	6	24
7		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
8		NQ	2.0	NQ	NQ	NQ	NQ
9		NQ	NQ	NQ	NQ	4.3	NQ
10		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
11		NQ	NQ	NQ	8.8	9.0	NQ
12		NQ	NQ	NQ	NQ	NQ	NQ
13		NQ	NQ	2.2	2.4	NQ	NQ

NQ: Not Quantifiable.

表4 The area under the plasma concentration-time curve of MEHP (AUC_{0-24h}) on Day 26 (the first day of dosing was designated as day 1) in cynomolgus monkeys administrated DEHP at 1,000 mg/kg/day for 28 consecutive days

Group	Animal No.	Male	Female	
		AUC(g [*] h/mL)	Animal No. AUC(g [*] h/mL)	
DEHP	7	921.2	10	766.5
	8	1374.2	11	788.8
	9	754.3	12	663.4
	-	-	13	517.6
Mean ± SD		1016.6 ± 320.8	Mean ± SD 684.1 ± 123.7	
Whole mean ± SD 826.6 ± 271.2				

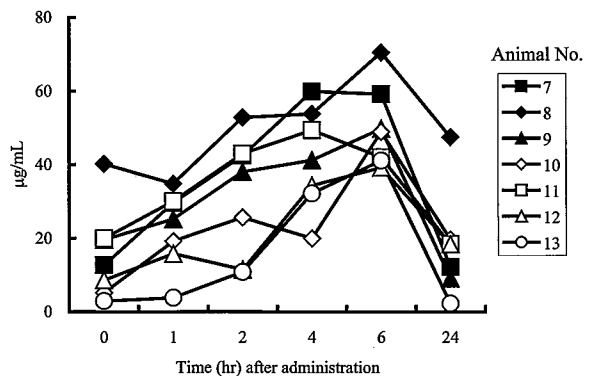


図8 投与26日目における血漿中MEHP濃度推移（投与開始日を投与1日目として起算）

その他の動物に異常は認められなかった。

体重：DEHP群の雄2例，雌1例（動物番号8，9，11）において体重減少が認められ，投与最終日の体重が投与開始日に比較して10.0～24.2%減少した。その他の動物では異常は認められなかった（図9）。

摂餌量：DEHP群の体重減少が認められた雌雄各1例（動物番号9，11）において，投与前1および2週目に比較して，摂餌量が全投与期間を通じて減少した。その他，一時的に摂餌量が減少した動物がいたが，ばらつきの範囲と考えられた（図10）。

血液学的および血液生化学的検査：好中球数，好中球比率，トリグリセリドおよび血中尿素窒素の増加，ならびにブドウ糖の減少が，体重および摂餌量減少を示したDEHP群の雌1例（動物番号11）に認められた。その他の動物および検査項目では異常は認められなかった。また，全例において，PPAR α を介した作用と考えら

れる血清中脂質（トリグリセリド，総コレステロール）の低下は認められなかった。

考 察

DEHP群の雌では，投与開始前に比較して，肝小葉辺縁部および中心部の肝ペルオキシゾーム数が有意に増加していた。DEHP群の雄では，有意差は認められなかったが，投与前および媒体群に比較して，肝小葉辺縁部の肝ペルオキシゾーム数が高値を示した。これらの結果は，DEHPの大量投与が，カニクイザルにおいて肝ペルオキシゾーム増加を誘導したことを示唆していた。一方，肝ミトコンドリア数は，DEHP群の雌雄ともに増加しなかった。媒体群との比較では，肝ペルオキシゾーム数は雌雄ともに有意差は認められず，肝臓ホモジネートにおけるペルオキシゾーム関連酵素活性にも有意差は認められなかった。これらの結果は，カニクイザルにおけるDEHP投与に起因した肝ペルオキシゾーム増加が，非常に軽微であると考えられた。

著者らの過去の結果[33]では，ミトコンドリアのクリステの長軸に沿った層状配列を伴う腫大がDEHP 1,000mg/kg/day群の雌2例に認められた。これら2例では，摂餌量減少に伴って10.7%あるいは11.7%の体重減少がみられ，栄養不良がミトコンドリアの形態変化に関与した可能性が推察された。今回の実験では，ミトコンドリアの形態変化を示した動物に体重減少は認められなかった。ペルオキシゾーム増殖誘導剤とミトコンドリアの変化については，DEHPがラットにおいてミトコンドリアの大きさと数を増加させた例[21, 22]，ciprofibrateおよびfenofibrateがカニクイザルにおいてミトコンドリア数の増加およびミトコンドリアの伸長を誘発した報告[8]がある。ペルオキシゾームとミトコンドリアは，PPAR α アゴニストが関連する代謝系に，相互に密接に関係している。したがって，今回の実験で認められたミトコンドリアのクリステの長軸に沿った層状配列を伴う腫

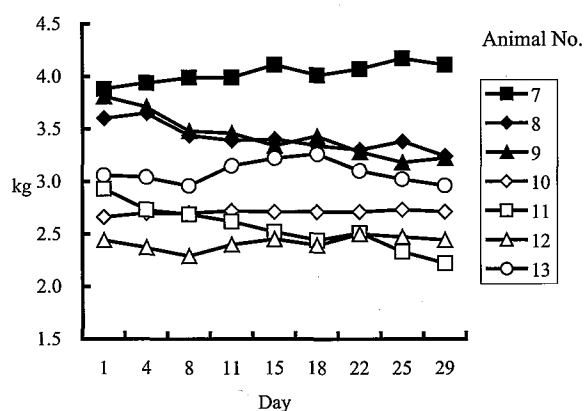


図9 体重推移（投与開始日をDay 1として起算）

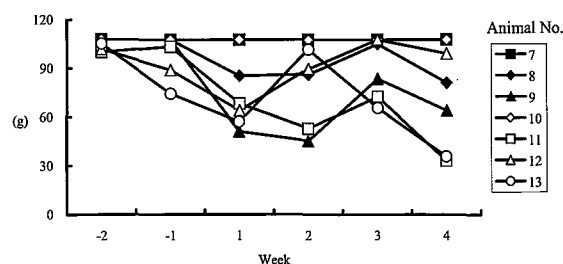


図10 摂餌量推移（投与開始週をWeek 1として起算）

大は、DEHPの肝細胞への直接の影響に起因した可能性が高いと考えられた。

CPTはミトコンドリアの脂肪酸酸化関連酵素としてよく知られている。CPT活性は、DEHP群の雄で増加し雌では変化がみられなかった。一方、ミトコンドリアの形態変化は雌のみに認められた。したがって、ミトコンドリアの形態変化とCPT増加の関連は不明であった。ラットにおいて、フィブレート系薬物の投与によって肝臓のCPT、FAOSおよびCAT活性が2~5倍あるいはそれ以上に増加し、血清中脂質が減少することが報告されている[37]。今回の実験では、DEHP群雄のCPT活性は対照群の1.6倍程度であり、血清脂質に変化は認められなかった。

電子顕微鏡検査における形態変化およびペルオキシゾーム数の変化は雄よりも雌において明確であった。雌雄ともに変化は軽微であるため雌雄差も小さいものであるが、カニクイザルのペルオキシゾーム増殖誘導剤に対する反応に雌雄差がある可能性が示唆された。ペルオキシゾーム増殖誘導剤に対する反応の雌雄差について、crofibrateのラットへの投与では雌よりも雄で感受性が高いことが報告されており[35, 36]、テストステロンの影響に起因することが示唆されている[35]。今回の実験結果は、これらラットにおける過去の報告と異なっている。カニクイザルではテストステロン以外の因子が関与している可能性がある。また、過去のDEHPをカニクイザルに投与した報告では、いずれも雄の動物に投与していた[27, 34]。現時点まで、カニクイザルにおいてDEHP誘発の肝ペルオキシゾーム増加の報告がなかったのは、反応に雌雄差がある可能性を示しているとも考えられた。

PPAR α の発現程度、PPAR α アゴニストに対する反応（受容体活性、ペルオキシゾーム増加、標的遺伝子の誘導などにおける相違）には種差があり、げっ歯類が他の種に比較していずれも高いことは、多くの実験が示唆している[2-

4, 9, 12, 13, 18, 26, 29-31]。加えて、リガンドごとにPPAR α への親和性が大きく異なることも報告されている[13]。カニクイザルのDEHPに対する反応が弱いことは、これらの違いで説明できるかもしれない。

トキシコキネティクスでは、未変化体であるDEHPは血漿中にほとんど検出されず、MEHPが検出された。MEHPはDEHPの第一代謝物であり、PPAR α アゴニストとして作用する。DEHPの代謝における最初の段階は、MEHPと2-ethylhexanolへの加水分解である。MEHPへの加水分解は腸において急速になされ、その後の加水分解は腸からの吸収後に起きる[32, 38]。加えて、MEHPの加水分解は、血液サンプル中の血漿リパーゼによっても起きる[25]。血漿サンプルの分離時あるいは保存期間中に、DEHPからMEHPへの加水分解が進んでいた可能性は否定できなかった。今回の実験の血漿中DEHPおよびMEHP濃度は真の値を示していない可能性があるが、血漿中MEHP濃度の上昇は、消化管からのDEHPの吸収が十分であったことを裏付けている。

本結果から、DEHPはカニクイザルにおいて肝ペルオキシゾーム増加を誘導することが判明した。しかしながら、その程度は非常に軽微であり、肝細胞の腫大や増殖は認められず、DEHP暴露量も非現実的に高いレベル（1,000 mg/kg/day）であった。対照的に、ラットではDEHP 100mg/kg/dayの投与量でペルオキシゾーム増加が誘導される[17, 27]。

また、カニクイザルがペルオキシゾーム増殖誘導剤に対して感受性を有することが再確認された。Reddyら[28]およびHoivikら[8]は、fenofibrateおよびciprofibrateの投与量を上げることによって、カニクイザルにおいて用量依存性に肝ペルオキシゾーム増加が誘導されることを報告した。ヒトでは、肝細胞はペルオキシゾーム増殖誘導剤に対して感受性が無いことが報告されている[19, 39]。一方、Ganningら[5, 6]

は、腎臓透析患者において、肝臓生検の結果から肝ペロキシゾームが増加しており、透析に使用されたプラスチック製のチューブおよびバッグから溶出したフタル酸エステル (DEHP含む) が原因と結論している。

ただし、ペロキシゾーム増殖誘導剤の毒性的問題は、ペロキシゾーム増加そのものではなく、肝臓の発癌リスクにある。カニクイザルのフィブラート系薬物への反応がげっ歯類とは異なり、肝細胞増殖の傾向が認められず、酸化ストレスに関与することが知られているほとんどの蛋白のmRNA発現が顕著でなかったことなどから、Hoivikら[8]は、霊長類にはPPARを介した肝臓発癌に抵抗性がある可能性を示唆している。これまで、ペロキシゾーム増殖誘導剤がヒトを含む霊長類で肝臓発癌を誘発したという報告は見当たらない。

DEHPがヒト以外の霊長類でペロキシゾーム増殖を誘導したという報告は見当たらず、本研究結果は、毒性研究において貴重な基礎データを示した。また、カニクイザルのDEHPに対する反応は、げっ歯類の反応に比較すると、反応性が低いという点で、よりヒトに近いと考えられた。

謝 辞

本研究を終えるにあたり、御助言を頂きました岩手大学農学部獣医学課程獣医薬理学研究室の古濱和久教授、岩手大学農学部獣医学科獣医病理学研究室の沼宮内茂先生に謹んで感謝申し上げます。また、本研究にご協力を賜りました株式会社新日本科学安全性研究所の各位に心より感謝いたします。

引用文献

[1] Blane GF, Pinaroli F: Fenofibrate: Animal toxicology in relation to side-effects in man (author's transl). *Nouv Presse Med*, 22, 3737-3746 (1980)

- [2] Cariello NF, Romach EH, Colton HM, Ni H, Yoon L, Falls JG, Casey W, Creech D, Anderson SP, Benavides GR, Hoivik DJ, Brown R, Miller RT: *Toxicol Sci*, 88, 250-264 (2005)
- [3] Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, Gemert MV: *Toxicol Pharmacol*, 29, 327-357 (1999)
- [4] Fahimi HD, Baumgart E, Beier K, Pill J, Hartig F, Volkl A: *Peroxisomes, Biology and Importance in Toxicology and Medicine*. Gibson G, Lake B, eds, 395-424 Washington: Taylor and Francis. (1993)
- [5] Ganning AE, Brunk U, Dallner G: *Hepatology*, 4, 541-547 (1984)
- [6] Ganning AE, Brunk U, Edlund C, Elhammer A, Dallner G: *Envir Heal Perspec*, 73, 251-258 (1987)
- [7] Graham MJ, Wilson SA, Winham MA, Spencer AJ, Rees JA, Old SL, Bonner FW: *Fundam Appl Toxicol*, 22, 58-64 (1994)
- [8] Hoivik DJ, Qualls CW Jr., Mirabile RC, Cariello NF, Kimbrough CL, Colton HM, Anderson SP, Santostefano MJ, Morgan RJ, Dahl RR, Brown AR, Zhao Z, Mudd PN Jr., Oliver WB Jr., Brown HR, Miller RT: *Carcinogenesis*, 25, 1757-1769 (2004)
- [9] Holden PR, Tugwood JD: *J. Mol. Endocrinol*, 22, 1-8 (1999)
- [10] Inoue K, Nakagawa S: *Iix Seibutsu Yakkagaku Jikken Koza* 3, Hirokawa Publishing Co. Tokyo, pp. 100-112 (2002)
- [11] Issemann I, Green S: *Nature*, 347, 645-650 (1990)
- [12] Ito Y, Yamanoshita O, Kurata Y, Kamijima M, Aoyama T, Nakajima T: *Arch Toxicol*, 81, 219-226 (2007)
- [13] Jeffrey M, Connie C, Frank JG: *J*

- Mol Med, 83, 774-785 (2005)
- [14] Kersten S: Eur J Pharmacol, 440, 223-34 (2002)
- [15] Kersten S, Desvergne B, Wahli W: Nature, 405, 421-424 (2000)
- [16] Kurata Y, Kidachi F, Yokoyama M, Toyota N, Tsuchitani M, Katoh M: Toxicol Sci, 42, 49-56 (1988)
- [17] Lake BG, Gray TJ, Foster JR, Stubberfield CR, Gangolli SD: Toxicol Appl Pharmacol, 72, 46-60 (1984)
- [18] Lake BG, Gray TJ: Biochem Soc Trans, 13, 859-861 (1985)
- [19] Lawrence JW, Li Y, Chen S, DeLuca JG, Berger JP, Umbenhauer DR, Moller DE, Zhou G: J Biol Chem, 276, 31521-31527 (2001)
- [20] Mandard S, Muller M, Kersten S: Cell Mol Life Sci, 61, 393-416 (2004)
- [21] Mitchell FE, Prince SC, Hinton RH, Grasso P, Bridges JW: Toxicol Appl Pharmacol, 81, 371-392 (1985)
- [22] Nair N, Kurup CK: Biochim Biophys Acta, 925, 332-340 (1987)
- [23] Nakajima T, Kamijo Y, Tanaka N, Sugiyama E, Tanaka E, Kiyosawa K, Fukushima Y, Paters JM, Gonzalez FJ, Aoyama T: Hepatology, 40, 972-980 (2004)
- [24] Norman FC: *In* Cell Pathology 2nd ed: The Iowa State University Press, Iowa, pp. 124-126 (1983)
- [25] Peck CC, Odom DG, Friedman HI, Albro PW Jr., Hass, JR, Brady JT, Jess DA: Transfusion, 19, 137-146 (2003)
- [26] Platt DS, Thorp JM: Biochem Pharmacol, 15, 915-925 (1966)
- [27] Pugh G Jr., Isenberg JS, Kamendulis LM, Ackley DC, Clare LJ, Brown R, Lington AW, Smith JH, Klaunig JE: Toxicol Sci, 56, 181-188 (2000)
- [28] Reddy JK, Lalwani ND, Qureshi SA, Reddy MK, Moehle CM: Am J Pathol, 114, 171-183 (1984)
- [29] Roberts RA: Arch Toxicol, 73, 413-418 (1999)
- [30] Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, Macdonald N, West D, Woodyatt NJ, Whitcome D: Toxicol Lett, 89, 49-57 (2000)
- [31] Rodricks JV, Turnbull D: Toxicol Ind Health, 3, 197-212 (1987)
- [32] Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML: Crit Rev Toxicol, 36, 459-479 (2006)
- [33] Satake S, Tanigawa Y, Maeda H, Kamimura Y, Chihaya Y, Miyajima H, Goryo M, Okada K: J Toxicol Pathol, 21, 73-75 (2008)
- [34] Short RD, Robinson EC, Lington AW, Chin AE: Toxicol Ind Health, 3, 185-95 (1987)
- [35] Svoboda DJ: J Cell Biol, 78, 810-822 (1978)
- [36] Yamoto T, Ohashi Y, Furukawa T, Teranishi M, Manabe S, Makita T: Toxicol Lett, 85, 77-83 (1996)
- [37] Watanabe T: Drug Metab Pharmacokinet, 1, 179-189 (1986)
- [38] Williams DF, de Jong W, Thomsen M, Farre ER, Gatti AM, Paunio MK, Petersen AH, Marquardt H: Opinion on Medical Devices Containing DEHP Plasticised PVC, <http://www.hosmat.eu/toxicovigilance/PvcDehpd.pdf> (2002)
- [39] Woodyatt NJ, Lambe KG, Myers KA, Tugwood JD, Roberts RA: Carcinogenesis, 20, 369-372 (1999)
- [40] World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Di(2-ethylhexyl) phthalate. *In* IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 77, p. 41 (2000)