

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	フタル酸エステル of 生殖・次世代影響の健康リスク評価に関する研究 (課題番号：1002) (研究期間：平成22年度～平成24年度)
主任研究者名	研究者名：那須 民江 所属機関：学校法人中部大学生命健康科学部

フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) のマウス胎生期・授乳期曝露の次世代影響を検討した。

妊娠した Sv/129 野生型、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) α -欠損およびヒト PPAR α (hPPAR α) マウスに 0, 0.01, 0.05 または 0.1% DEHP を胎仔期・授乳期曝露した。離乳後マウスを2群に分け、市販の固形飼料と高脂肪食を8週間与え、11週齢目に解剖した。

胎生期・新生仔期の影響については、DEHP は野生型と hPPAR α マウスの胎仔と PND2 仔の生存仔数を減少させ、胚吸収数を増加させた。

離乳後の影響については、0.05% DEHP 曝露は離乳後の野生型と hPPAR α マウスの摂餌量を増加させた。高脂肪食群では観察されなかった。DEHP は PPAR α 依存的に PND2 と PND21 の仔血漿のレプチン濃度を減少させた。この減少が、離乳後の摂餌量増加に関連したのであろう。離乳期マウスの精巣には PPAR α 遺伝子に関わらず、DEHP 曝露によるアポトーシスの増加等の精巣毒性が観察された。

成熟期の影響については、0.05% DEHP は、野生型 11 週齢マウスの血漿テストステロンを減少させた。一方、精巣セルトリ細胞の空胞変性数は高脂肪食を摂取させた場合に増加した。0.05% DEHP 曝露は PPAR α 欠損マウスの肝臓 TG 濃度を上昇させた。

親マウスへの影響については、野生型妊娠マウスの DEHP 曝露は血漿 TG のみならず4種の脂肪酸濃度を減少させたが、胎仔や PND2 仔の肝臓の脂肪酸には影響を与えなかった。DEHP は親マウスの精巣や卵巣には影響を与えなかった。

DEHP 代謝の種差・個体差については、リパーゼの活性はヒトの方がマウスより低かった。ヒトの UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ活性値と、アルデヒド脱水素酵素活性値 (2-エチルヘキサナールを基質) はマウスのそれぞれ 1/6 と 1/2 であった。一方、ヒトのアルコール脱水素酵素活性値 (2-エチルヘキサナールを基質) はマウスの 2 倍であった。ヒトとマウスの間に DEHP 代謝経路の違いが観察された。ヒトの4種の DEHP 代謝酵素活性の個体差は 10 から 26 倍あった。総合すると、ヒトとマウスの間の DEHP 代謝の種差は活性の大きさのみならず代謝経路も違うので、マウスの実験結果をヒトに外挿する場合の不確実係数は 10 を使用した方が無難であろう。個体差は種差より大きい可能性がある。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	フタル酸エステルの生殖・次世代影響の健康リスク評価に関する研究 (研究期間：平成22年度～平成24年度)
主任研究者名	所属：中部大学生命健康科学部 氏名：那須 民江（研究課題番号：1002）

I. 研究の期間及び研究目標等

1 研究期間

平成22年度～24年度（3年間）

2 研究目的

代表的なプラスチック可塑剤のフタル酸ジ2-エチルヘキシル（DEHP）には生殖・発達毒性があり、胎仔・新生仔の体重や産仔数、生存数の減少、奇形胎仔や胚吸収の増加が知られている。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 α ）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。加えて、PPAR α の機能や発現に種差があり、DEHPのリスク評価を困難にしている。さらに、上記の毒性の分子メカニズムは不明のままである。一方、最近胎仔期の低栄養は成人病リスクを高めることが報告され、成人病胎児期発症説（DOHaD）として注目されているが、化学物質曝露による栄養状態の変化や、これに関連した生活習慣病リスクに関する研究は皆無である。

DEHPが脂質や糖代謝を制御するPPAR α を活性化し、その標的遺伝子発現に影響を与えることによって毒性に影響を与えることが予想されることから、この研究は、PPAR α に着目し、1) DEHPの体内動態の種差およびPPAR α の関与、2) DEHP胎仔期曝露の生殖・次世代影響（仔の生殖・発達影響、栄養状態や脳への影響およびエピジェネティクス変化（特にPPAR α ）と生活習慣病リスク、雌雄親世代における生殖器・栄養状態への影響、を3種の遺伝子型マウス（野生型マウス・PPAR α ノックアウトマウス・ヒト型PPAR α マウス）を用いて解析し、これらの分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。これらの結果から、上記DEHPの毒性に深くかかわるPPAR α の機能の種差を解明し、動物からヒトへの外挿の際の正しい不確実係数を求め、新しいリスク評価技術を開発する。

3 研究体制

研究項目名	個別課題名	研究担当者名（所属機関名）
フタル酸エステルの生殖・次世代影響の健康リスク評価に関する研究	1) DEHP胎仔期曝露の次世代影響 ①栄養状態（必須脂肪酸）への影響 および分子メカニズム解析 ②生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明	内藤久雄 (名古屋大学大学院医学系研究科) 那須民江 (中部大学生命健康科学部)

	③PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響 ④脳への影響：摂食行動（視床下部・下垂体） ⑤脳への影響：学習・行動（海馬） ⑥DEHP 曝露の親世代への影響 2)DEHP 代謝の種間差と PPAR α の役割 ①マウス、ヒト肝の DEHP 代謝酵素の種間差・体内動態における PPAR α の役割および種間差	那須民江 （中部大学生命健康科学部） 上島通浩 （名古屋市立大学大学院医学研究科） 那須民江 （中部大学生命健康科学部） 上島通浩 （名古屋市立大学大学院医学研究科） 上島通浩 （名古屋市立大学大学院医学研究科）
--	--	---

4 倫理面への配慮について

動物実験は「動物の愛護及び管理に関する法律」（平成 17 年 6 月 22 日法律第 68 号）を遵守する。予め実験計画書を名古屋大学大学院医学系研究科実験動物委員会に提出し、承認を得た後、実験を開始する。実験計画は上記法律に明文化された動物実験の国際原則の 3R、即ち科学上の利用の目的を達することができる範囲において、出来る限り動物を供する方法に代わりうるものを利用すること（replacement）、科学上の利用目的を達することができる範囲において、出来る限りその利用に供される動物の数を少なくすること（reduction）、その利用に必要な限度において、その動物に苦痛を与えない方法によってすること（refinement）に則り立案し、実行する。

ヒトの組織を用いた実験は、ヘルシンキ宣言に基づき名古屋市立大学の倫理審査委員会の承認を経て行う。

II. 研究内容及び成果等

1 研究内容及び方法

(1) 研究項目名：DEHP 胎仔期曝露の次世代影響

1) 個別課題名：栄養状態（必須脂肪酸）への影響および分子メカニズム解析

（研究担当者名：内藤久雄、所属機関名：名古屋大学）

DEHP 曝露による仔の栄養状態、脂質および必須脂肪酸への影響を解明するため、仔の肝臓中脂肪酸濃度を計測した。測定対象物質は、体内で合成することが可能な非必須脂肪酸の飽和脂肪酸のパルミチン酸, ステアリン酸, n-9 系不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸, オレイン酸の 4 種と、必須脂肪酸の中から n-6 系のリノール酸, アラキドン酸, n-3 系の α -リノレン酸, EPA 及び DHA の 5 種、計 9 種とした。DEHP は、後述の様に野生型母マウス血漿の数種脂肪酸濃度を減少させたため、野生型の胎仔（妊娠 18 日目）、出産後 2 日目マウス（以下新生仔）を用い肝臓中の脂肪酸濃度を測定した。

母マウスの栄養状態、脂質および必須脂肪酸への影響を解明するため、妊娠期、出産後

2日目の血漿、肝臓中のTG濃度、また、総コレステロール(T-Cho)量を計測した。

DEHP曝露が妊娠期マウスで血漿や肝臓TG濃度に影響を及ぼしたため、その代謝・合成・輸送に関わる受容体・酵素・蛋白(PPAR α 、ペルオキシゾーム系のPTとPH、ミトコンドリア系のMCADとVLCAD、ミクロソーム系のCYP4A10、TG合成酵素のDgat1とDgat2、肝臓から血漿中にTGを輸送する蛋白(MTP)のmRNA量を定量リアルタイムPCRにより測定した。PT、PH、MCAD、VLCADについては、ウェスタンブロットによるタンパク発現量定量を行った。DEHPは母マウス血漿・肝臓中TG濃度に影響を与えたため、仔と同様の9種の脂肪酸を測定した。DEHP曝露と必須脂肪酸代謝の関連を調べるため、脂質合成や脂肪酸の不飽和化に関わる遺伝子Fads1,2、脂肪酸伸長酵素であるElov12,5を定量RT-PCRによるmRNA量測定とウェスタンブロットによるタンパク発現量を測定した。

母マウスから胎仔への栄養輸送は胎盤を介しているため、脂肪酸輸送に関わる胎盤のFABPpm、H-FABP、L-FABP、FATP-1、2、4、FAT、PPAR α 、 β 酸化酵素のPHのmRNA量を計測した。

DEHP 0.01%曝露の最低曝露量でも必須脂肪酸であるリノール酸、 α -リノレン酸、EPA、DHAに影響が見られたため、さらに低い濃度でのDEHP曝露実験を行った。濃度は0.001%とし、妊娠18日目、出産後マウスの血漿中脂肪酸濃度を計測した。材料・方法は、上述したもので統一し、DEHP曝露が影響を与えた野生型のみ実験を行った。

2) 個別題目名：生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
(研究担当者名：那須民江・内藤久雄、所属機関名：中部大学・名古屋大学)

○実験方法

胎生期にDEHPを曝露した離乳期マウスおよび離乳後普通食または高脂肪食を摂取した成熟期マウスの雄生殖器・性腺ホルモン系への影響とその分子メカニズムの解明を行うため、実験には3種の遺伝子型(野生型、PPAR α -null(KO)、ヒト型PPAR α)マウスを用いた。12週齢の3種雌雄遺伝子型マウス、0または0.05%DEHP混餌投与を4週間行い、同投与量・遺伝子型間の雌雄マウスを交配した。これらの餌は仔の誕生後21日目まで続けた(胎仔期-授乳期DEHP曝露)。仔が21日目に達した時、一部を解剖し、離乳期マウスとした。残りの仔は普通食または高脂肪食(HFD)を与え、11週齢で解剖し、成熟期マウスとした(図1)。

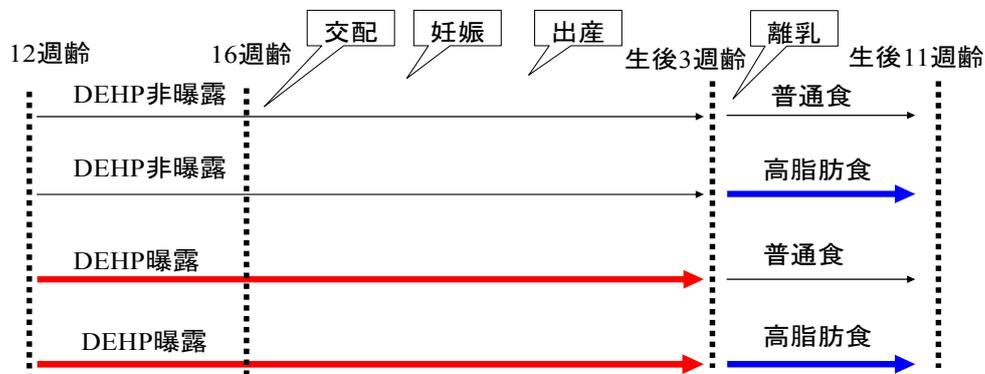


図1 動物実験

○血漿・精巣テストステロン濃度測定

胎仔期-授乳期 DEHP の生殖毒性について検討するため、11 週齢雄成熟期マウスの血漿及び精巣テストステロン濃度を測定した。血漿・精巣テストステロン濃度測定は、ヘキサノーエチルエーテル (3:2) で抽出後、ヘキサン層をバイアルに移し、乾固し、バッファーに置換した。Enzyme Immuno-assay Kit (Cayman Chemical Co. USA) を用いて行った。マウス抗ウサギ IgG モノクローナル抗体で予めコーティングされた 96 穴プレートに、サンプルおよびテストステロンスタンダードを入れ、テストステロントレーサー (Acetyl cholinesterase Linked to Testosterone) とテストステロン抗体 (Testosterone-specific rabbit antiserum) を加え (50 μ l) 攪拌した。その後 Wash Buffer を加えてプレート洗浄し、発色剤である Ellman's Reagent を加えインキュベートした。インキュベートした後、マイクロプレートリーダー (Power Scan4) を用いて 415nm で吸光度を測定した。

○ステロイド合成系の遺伝子発現量測定

普通食摂取の野生型マウスにおいて、DEHP 曝露による血漿テストステロン濃度の減少が認められたことから、11 週齢の成熟期マウスの精巣を用い、ステロイド合成系の遺伝子発現量に変化があるかどうか定量リアルタイム PCR 法にて調べた。

凍結した精巣 10~30 μ g 切り出し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) と RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。SuperScriptsTM III reverse transcriptase (Invitrogen)、70ng RNA と Oligo(dT)20 を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、定量リアルタイム PCR 解析を行い、遺伝子の発現量の変化を計測した。

3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta-5-delta-4 isomerase type II (Hsd3b)、steroidogenic acute regulatory protein (Star)、peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR)、aromatase cytochrome P450 (CYP19)、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial) (Hmgcs2)、cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp17a1)、hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3 (Hsd17b3)、cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp11a1)、3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (Hmgcr) の 9 項目の測定を行った。

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、全量を 25 μ l とし、1XSYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)、0.1 μ M forward and reverse primer、に TE で希釈した cDNA を加えた。反応は 40 サイクル行った。また、GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準とした。使用したプライマーは表 1 に示す。

表 1 ステロイド合成系プライマー

遺伝子	ACCESSION No.		塩基配列
CYP11a1	NM_017286	Forward	CCTGCTGGAAGGTGTAGCTC
		Reverse	CGCTCCCAAATACAACACT

CYP17a1	NM_012753	Forward	GCCCCAGATGGTGA CTCAA
		Reverse	GGAGCTACCAGCATCTGCAA
CYP19a1	NM_017085	Forward	ATGCTGAACCCCATGCACTAT
		Reverse	ACTTCTGCTGATCATGGGCCT
Hmgcr	NM_013134	Forward	ACATCCGTCTCCAGTCCAAAA
		Reverse	TTGCACCGACAAGAAACCTG
Hmgcs2	NM_173094	Forward	TACCTGCGGGCCTTGGA
		Reverse	GGAAACAACCAGCCTTTCACC
Hsd17b3	NM_054007	Forward	CCAGGTGCTGACCCCTTATTC
		Reverse	ACTCATCGGCGGTCTTGGT
Hsd3b1	NM_001007719	Forward	CCGCTGCTGTCATTGATGTCT
		Reverse	GAACATATTGGAGGCCTGCG
PBR (PKBS)	NM_009775	Forward	GGCTTCATGGGAGCCTACTTT
		Reverse	TAGCTTGAGAAACCTCCTG
Star	NM_031558	Forward	CAGGTGTGGCAAGGTGTTC
		Reverse	GAAGAACTGGTGGACCGCA
GAPDH	NM_008084.2	Forward	AGAACATCATCCCTGCATCCA
		Reverse	CCGTTCACTCTGGGATGAC

○CYP2b10 の遺伝子発現量測定

CYP2b10 がテストステロンの代謝に影響を及ぼすという報告 (Thuerl et al., 1997) があるため、11 週齢成熟期マウスと PND21 離乳期マウスの肝臓の Cyp2b10 の mRNA 発現量を、前述と同様の方法にて定量リアルタイム PCR 法にて測定した。使用したプライマーは表 2 に示す。

表 2 CYP2b10 プライマー

遺伝子	ACCESSION No.		塩基配列
Cyp2b10	NM_009999.3	Forward	CCAACCAGCACACGGAGTT
		Reverse	TCTTCTTGCTGGCACCG
GAPDH	NM_008084.2	Forward	AGAACATCATCCCTGCATCCA
		Reverse	CCGTTCACTCTGGGATGAC

○精巣の病理学的検索

本研究では DEHP (0, 0.05%) 胎仔期-授乳期 DEHP 曝露の成熟期雄マウス (11 週齢時解剖) の精巣への影響を評価した。比較のため、12 週齢の野生型、KO, ヒト型 PPAR α 雄雌マウスに DEHP (0, 0.01%, 0.05%, 0.1%) を 20 週齢まで混餌投与 (親マウス曝露) の影響を掲載した。また、離乳期であり、高脂肪食負荷開始時期である 21 日齢の雄仔マウスの精巣を評価した。それぞれのマウスの精巣は解剖時に改良ダビットソン液に

数時間浸漬後、10%中性緩衝ホルマリン溶液に置換した。固定後、パラフィン包埋し4 μm で薄切を作成した。ヘマトキシリン・エオジン染色ならびにPAS染色を行い、精細管内の精細胞ならびにライディッヒ細胞等の形態学的観察とステージ判別を行った。
(各曝露方法の詳細は平成 22, 23 年度の部分を参照)

3) 個別題目名：PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
(研究担当者名：那須民江、所属機関名：名古屋大学)

○PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響についての検討

胎生期に DEHP を曝露された離乳期マウスおよび離乳後普通食または高脂肪食を摂取した成熟期マウスを用いて、PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響について検討した。実験は3種の遺伝子型(野生型、KO、ヒト型 PPAR α) マウスを用い、DEHP は0 または 0.05%混餌投与した。生後 21 日目に解剖したマウスを離乳期マウス、離乳後、普通食または高脂肪食を8週間摂取させ解剖したマウスを成熟期マウスとする(図2)。

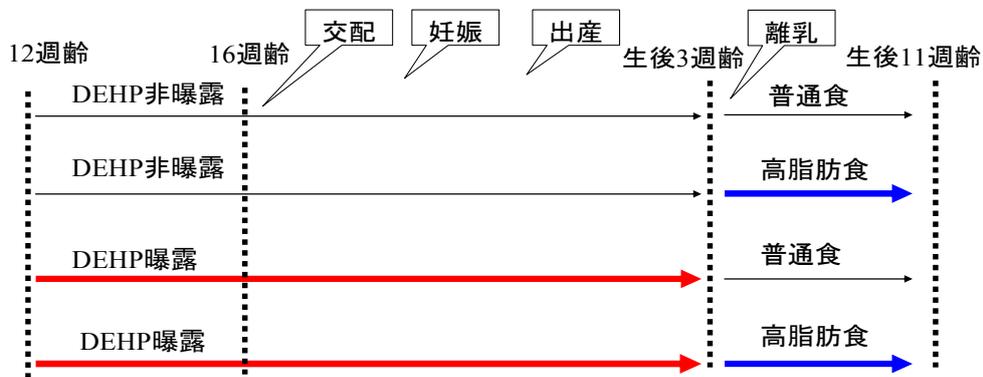


図2 動物実験

今回の実験では、PPAR α 遺伝子の CpG に富むプロモーター領域のメチル化解析を行うこととした(エクソン1開始点の上流 200~300bp)。解析部位は、CpG に富むプロモーター領域であるため、メチル化感受性制限酵素によるリアルタイム PCR を用いた DNA メチル化検出手法で行うこととした。そこで PPAR α の CpG に富むプロモーター領域を含む Primer を参考文献 (Slater-Jefferies JL et al. Burdge GC et al.) を参考にタカラバイオに作成を依頼した。制限酵素は HpaII を使用した。この Primer 間には、HpaII で切断されるサイトが7か所存在する。マウスの肝臓から抽出した DNA を用いて解析を行なった。また、プロモーター領域のメチル化による PPAR α 発現量の変化を検討するため、PPAR α およびその標的遺伝子 CYP4A14 の遺伝子発現量を測定した。

○胎生期曝露による影響の検討

DEHP は PPAR α のリガンドであることから、これらの影響が胎生期曝露による影響か DEHP 曝露による影響かを明らかにするため、授乳期(生後0日~生後21日)のみ曝露した野生型仔マウスを用い、追加実験を行った(図3)。授乳期のみ曝露した仔マウスの肝臓中 PPAR α 及びその標的遺伝子である CYP4A14 を測定した。

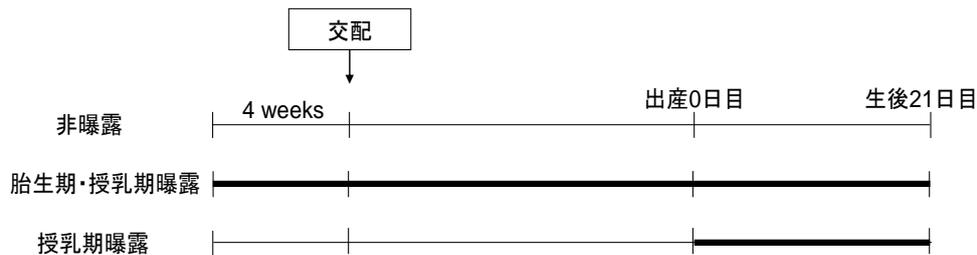


図3 動物実験

○胎生期 DEHP 曝露と生活習慣病の関連性の検討

胎生期 DEHP 曝露と生活習慣病の関連性を明らかにするために、血漿および肝臓中のトリグリセライド(TG)および総コレステロール(T-Cho)を測定した。肝臓の脂質は Folch ら (1957) の方法で抽出し、TG、T-Cho 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。

○脂質代謝・合成に関わる遺伝子発現量測定

脂質代謝や合成に関わる遺伝子として、肝臓の SREBP1, DGAT1, DGAT2, FAS, PPAR α 遺伝子発現量を測定した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN) RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて凍結した肝臓サンプルから RNA を抽出した。RNA 抽出後、GoTaq 2-step RT-qPCR System (promega) を用いて cDNA 合成し、定量リアルタイム PCR にて測定した。ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、内部標準として GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を測定した。使用したプライマーを以下に示す。

表3 脂質代謝・合成に関わる遺伝子のプライマー

遺伝子	ACCESSION No.		塩基配列
Srebp1	NM_011480.3	Forward	GCCCACAATGCCATTGAGA
		Reverse	GCAAGAAGCGGATGTAGTCGAT
dgat1	NM_010046	Forward	GGCGGTCCCAACCAT
		Reverse	GCTCTGCCACAGCATTGAGA
dgat2	NM_02638	Forward	TGGCCTGCAGTGCATCCT
		Reverse	GGGCGTGTCCAGTCAAATG
fas	NM_007988.3	Forward	CCCAGAGGCTTGTGCTGACT
		Reverse	CGAATGTGCTTGGCTTGGT
mPPAR α	NM_001113418	Forward	CCTCAGGGTACCACTACGGAGT
		Reverse	GCCGAATAGTTCGCCGAA
hPpara	BC000052	Forward	GCGATCTAGAGAGCCCGTTATC
		Reverse	GCCAAAGCTTCCAGAACTATCC

GAPDH

NM_008084.2

Forward AGAACATCATCCCTGCATCCA

Reverse CCGTTCAGCTCTGGGATGAC

○成熟期マウスの肝臓の病理評価

成熟期マウスの肝臓の病理評価を行った。

【評価基準】

脂肪滴は大脂肪滴と小脂肪滴の合計

脂肪滴 0：脂肪滴が存在しない

1：脂肪滴の割合が 33%未満

2：脂肪滴の割合が 33-66%

3：脂肪滴の割合が 66%以上

壊死 0：壊死なし

1：全体の中で数か所存在

2：全体の 3 分の 1 程度存在

3：全体の半分程度

炎症 リンパ球集積範囲の合計面積 (μm^2)

4) 個別題目名：脳への影響：摂食行動（視床下部・下垂体）

（研究担当者名：上島通浩 所属機関名 名古屋市立大学）

○胎生期 DEHP 曝露マウスは離乳後から体重および摂餌量の測定・評価

生後 21 日目に離乳させ、2 日に 1 回体重を測定した。摂餌量は 4 週齢から 2 日に 1 回測定した。摂取カロリーは 4 週齢から解剖する 11 週齢までの平均の 1 日摂餌量を元に摂取カロリーを計算した。

○摂食行動に関与する因子として、成熟期マウスの血中レプチン濃度、視床下部の NPY および POMC-mRNA 発現量の測定

胎生期 DEHP 曝露によって摂食行動に変化が見られたため、摂食調節を行う血漿中レプチン濃度をモリナガマウスレプチン測定キット（森永生科学研究所）を用いて測定した。

視床下部は、ドライアイス上で凍らせたまま QIAzol を加えホモジナイズし、3~5 分放置した。その後、クロロホルム 200 μl 添加しボルテックスにかけ、再び 2~3 分放置した。4°C で 12000rpm 15 分遠心した後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) と RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。RNA 抽出後、GoTaq 2-step RT-qPCR System (promega) を用いて cDNA 合成し、定量リアルタイム PCR にて測定した。内部標準として GAPDH を測定した。新しく作成したプライマーを以下に示す。

表 4 摂食行動に関する遺伝子のプライマー

遺伝子	ACCESSION No.		塩基配列
NPY	NM_023456.2	Forward	GTGGATCTCTTCTCTCACAGAGG
		Reverse	GCCCAAACACACGAGCAGAG
POMC	NM_008895.3	Forward	AGAACGCCATCATCAAGAAC
		Reverse	AAGAGGCTAGAGGTCATCAG

○離乳期における血漿中レプチン濃度の測定

離乳期から成熟期にかけて摂食行動に変化が見られたが成熟期マウスでは血漿中レプチン濃度に変化が見られなかったため、離乳期の血漿中レプチン濃度についても解析を行った。また、胎生期曝露による影響を明らかにするために、授乳期のみ曝露した仔マウスの血漿中レプチン濃度も測定した。

5) 個別題目名：脳への影響：学習・行動（海馬）

（研究担当者名：那須民江、所属機関名：名古屋大学）

胎仔期-授乳期 DEHP 曝露による次世代仔の学習・行動に関連する海馬への影響を明らかにするため、離乳期（生後 21 日目）まで曝露した仔マウスを普通食または高脂肪食 (HFD) を 8 週間自由摂取させた後、海馬を採取した。GABA レセプターやグルタミン酸レセプターを測定し、学習・行動への影響を検討した。以上の結果から、DEHP 胎仔期曝露の脳への影響、PPAR α との関わり、種差を明らかにする。

○海馬 学習・行動機能遺伝子発現量測定

凍結した海馬 10~30 μ g を切り出し、ドライアイス上で凍らせたまま QIAzol を加えホモジナイズした。3~5 分放置後、クロロホルム 200 μ l 添加しボルテックスにかけ、再び 2~3 分放置した。4°C で 12000rpm15 分遠心した後、精巢と同様に RNeasy Mini Kit (QIAGEN) RNase-Free DNase Set (QIAGEN) を用いて、RNA を抽出した。SuperScriptsTM III reverse transcriptase (Invitrogen)、70ng RNA と Oligo(dT) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を用いて、定量リアルタイム PCR を行い、遺伝子の発現量の変化を計測した。

cAMP responsive element binding protein 1 (Creb1), transcript variant A、activating transcription factor 4 (Atf4)、glutamate receptor, ionotropic, NMDA1 (zeta 1) (Grin1)、glutamate receptor, ionotropic, NMDA2A (epsilon 1) (Grin2a)、glutamate receptor, ionotropic, NMDA2B (epsilon 2) (Grin2b)、dopamine receptor D1A (Drd1a)、dopamine receptor D2 (Drd2)、nerve growth factor (Ngf), transcript variant B、brain derived neurotrophic factor (Bdnf), transcript variant 1、Mus musculus glutamate decarboxylase 1 (Gad1)、Mus musculus glutamic acid decarboxylase 2 (Gad2)、Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 1 (Gabra1)、Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor,

subunit alpha 2 (Gabra2)、Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 3 (Gabra3)、Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 5 (Gabra5)、Mus musculus gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha 6 (Gabra6), transcript variant 1 の 16 項目の測定を行った。

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い、全量を 25 μ l とし、1xSYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems), 0.1 μ M forward and reverse primer、に TE で希釈した cDNA を加えた。反応は 40 サイクル行った。また、GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準とした。使用したプライマーは表 5 に示す。また、海馬のグルタミン酸および GABA 濃度は株式会社エスアールエルに委託し HPLC 法で測定した。

表 5 海馬 学習・行動機能 プライマー

遺伝子	ACCESSION No.		塩基配列
creb1	NM_133828.2	Forward	GCGTGCAGAAGTTGTAATCTCTAA
		Reverse	ATCCAAC TAGGAAGTATGGCTGAG
Atf4	NM_009716.2	Forward	TCCTGAACAGCGAAGTGTG
		Reverse	ACCCATGAGGTTTCAAGTGC
Grin1	NM_008169.2	Forward	GATAAGACATGGGTTCCGGTATCA
		Reverse	AAAATGAGGAAGATCCCAGCTAC
Grin2a	NM_008170.2	Forward	CTGCATCGACATCCTTAAGAAAC
		Reverse	CCATAACTGCTCGTTGATAGACC
Grin2b	NM_008171.3	Forward	TGCGCTCTCCCTTAATCTGT
		Reverse	GCCAACACCAACCAGAACTT
Drd1a	NM_010076.3	Forward	GCTCCTGATGGAACACCATT
		Reverse	GCTTAGCCCTCACGTTCTTG
Drd2	NM_010077.2	Forward	TGCCATTGTTCTTGGTGTGT
		Reverse	GTGAAGGCGCTGTAGAGGAC
Ngf	NM_001112698.1	Forward	GCAGTGAGGTGCATAGCGTA
		Reverse	TCTCCTTCTGGGACATTGCT
Bdnf	NM_007540.4	Forward	GCGCCCATGAAAGAAGTAAA
		Reverse	TCGTCAGACCTCTCGAACCT
Gad1	NM_008077	Forward	CTTCCGGATGGTCATCTCTAAC
		Reverse	TACAGATCCTGACCCAACCTCT
Gad2	NM_008078	Forward	AGAGAGGGCCAACCTGTGA
		Reverse	CTGCATCAGTCCCTCCTCTC
Gabra1	NM_010250.4	Forward	GTCACCAGTTTCGGACCAGT
		Reverse	GAGCACTGTCATGGGTCCTT

Gabra2	NM_008066.3	Forward	ATGCCCACTGAAATTTGGAA
		Reverse	ACTGGCCCAGCAAATCATAC
Gabra3	NM_008067.4	Forward	TCCTGCTGAGACCAAGACCT
		Reverse	TGATAGCTGATTCCTGGTTC
Gabra5	NM_176942.4	Forward	CCCATCTTGTTTGGCACTTT
		Reverse	TCCGCAGTTTCATTTCTGTG
Gabra6	NM_001099641.1	Forward	CGTTTTTCTGGCAAACCATT
		Reverse	CGGTCACCCTCCTGTTTTTA
GAPDH	NM_008084.2	Forward	AGAACATCATCCCTGCATCCA
		Reverse	CCGTCAGCTCTGGGATGAC

○統計解析

各系統のコントロール群と曝露群との有意差は、JMP version 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、t 検定によって行った。p < 0.05 を有意差があるものとして表記した。

系統間の有意差は、JMP version 5.0 (SAS Institute Inc.) を用いて一元配置分散分析 (ANOVA) を行った後、Tukey 検定によって行った。P < 0.05 を有意差があるものとして表記した。

6) 個別題目名：DEHP 曝露の親世代への影響

(研究担当者名：那須民江 所属機関名 名古屋大学)

DEHP は、野生型マウスの、胎仔・新生仔の生存数を減少させ、胚吸収を増加させた。PPAR α ノックアウトマウスでは、これらの影響は見られなかった。ヒト型 PPAR α マウスにおいては、胚吸収を有意に増加させ、出産数・新生仔生存数を有意に減少させた。これらのメカニズムを解明するために以下の、親マウスに関する研究を行った。

○精巣重量の比較、テストステロン濃度の測定

○精巣のステロイド合成系遺伝子の発現量測定

定量リアルタイム PCR 法にて計測した。コレステロール合成酵素 HMG-CoA reductase、コレステロール輸送酵素 StAR、側鎖切断酵素 P450scc、ホルモン合成酵素 CYP17 α 、3 β -HSD 17 β -HSD、aromatase の 7 項目の測定を行った。

○精巣の病理評価

評価方法は、Society of Toxicologic Pathology が提唱している評価基準 (Toxicologic Pathology. 72. 2002; 30:507-520) により分類した。

○臓器重量の比較

○卵巣のエストラジオール、プロゲステロン濃度測定

野生型、ヒト型 PPAR α マウスでは、DEHP 曝露が胎仔・新生仔の生存数の減少を引き起こしたため、妊娠期野生型、ヒト型 PPAR α マウスの卵巣のエストラジオール、プロゲステロン濃度を LC/MS/MS により測定した。エストラジオールは子宮の成長、プロゲステロンは妊娠維持に働くホルモンである。

○卵巣ステロイド合成系遺伝子発現量測定

精巢と同様にステロイド合成系遺伝子発現を計測した。

(2) 研究題目名：DEHP 代謝の種間差と PPAR α の役割

(研究担当者名：上島通浩 所属機関名 名古屋市立大学)

1) マウス、ヒト肝の DEHP 代謝酵素の種間差・体内動態における PPAR α の役割および種間差

体内に摂取された DEHP はリパーゼによって MEHP と 2-エチルヘキサノールに加水分解される (Albro and Lavenhar, 1989)。DEHP の毒性は DEHP よりもむしろ MEHP やその代謝産物によるものと考えられている (Davis et al. 1994; Albro et al. 1989)。DEHP の代謝・排泄に関わる酵素にはリパーゼ、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ (UGT)、アルコール脱水素酵素 (ADH)、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) などがある。これまでの研究で、これら 4 つの酵素の活性には明らかな種差があり、特にリパーゼの活性はげっ歯類であるマウスやラットと比べ、哺乳類であるマーモセットでは著しく低いことが分かっている (Ito et al. 2005)。他の酵素活性の種差はリパーゼほど大きくないことから、DEHP の代謝における種差にはリパーゼの活性の種差が主要な役割を果たしている。これまでヒトの DEHP 代謝酵素活性についての報告はなく、実験動物の結果をもとにした DEHP のリスク評価の際の妨げとなっている。そこで今回は、マウスの肝組織とヒトの肝組織を用いて、実験動物とヒトでのリパーゼ、UGT、ADH、ALDH の活性を測定・比較することで、DEHP の代謝の種差を明らかにした。また、PPAR α や DEHP の曝露が DEHP の代謝に与える影響も明らかにすることを目的とした。

以下の方法で行った。

○対象

ヒトの肝臓は倫理審査委員会承認後、NPO 法人 HAB 研究機構より入手した。内訳は、白人男性 24 人 (10 代:1、20 代:1、30 代:5、40 代:5、50 代:5、60 代:4、70 代:2、80 代:1)、白人女性 5 人 (40 代:5)、アジア系:1 人、黒人:3 人、ヒスパニック:5 人である。これらの肝臓は、米国で脳死判定後、移植不適合になり、国外での研究使用のインフォームドコンセントが得られたものである。対象者の人種、年齢、性、死因、BMI、その他アルコール飲酒の有無と頻度、喫煙の有無、最近 1 年間の麻薬使用の有無は表 6 に示した。比較対照として、20~21 週齢の野生型雄マウスの肝臓を用いた。また、これまでの研究から、DEHP の曝露により DEHP の代謝が変わる可能性が示唆されているため、0 又は 0.1% の DEHP を 8 週間混餌投与した 129/Sv 野生型マウス (各 n=8, 9)、PPAR α ノックアウトマウス (KO) (各 n=4, 5)、ヒト型 PPAR α マウス (hPpar α) (各 n=3, 6) をリパーゼ活性の測定に用いた。

表 6 対象者 38 名の特性、死因と嗜好品の使用有無

Race	Sex	Age	Causes of death	BMI	Drinking status	Drinking frequency	Smoking status	Recent drug use
Non-Hispanic white	Male	16	Accident	39.4	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	25	Accident	22.1	Drinker	Frequently	Smoker	Yes
Non-Hispanic white	Male	35	Accident	27.1	Drinker	Frequently	Smoker	Yes
Non-Hispanic white	Male	36	Accident	28.7	Drinker	Occasionally	Smoker	Yes
Non-Hispanic white	Male	36	Cerebrovascular disease	41.8	Drinker	Occasionally	Ex-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	38	Cerebrovascular disease	34.4	Drinker	Frequently	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	38	Accident	19.4	Drinker	Occasionally	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	41	Accident	24.2	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	44	Cerebrovascular disease	21.8	Non-Drinker	—	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	46	Accident	24.2	Drinker	Frequently	Smoker	Yes
Non-Hispanic white	Male	46	Accident	28.4	Drinker	Seldom	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	47	Aneurysm	32.1	Drinker	Frequently	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	51	Cerebrovascular disease	20.2	Drinker	Occasionally	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	52	Cerebrovascular disease	40.4	Non-Drinker	—	Ex-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	53	Cerebrovascular disease	27.3	Drinker	Frequently	Ex-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	56	Subdural hemorrhage	28.4	Drinker, abuse	Always	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	56	Cerebrovascular disease	29.9	Drinker	Frequently	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	60	Cerebrovascular disease	62.1	Drinker	N.I.	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	63	Cerebrovascular disease	28.4	Drinker	Frequently	Smoker	No
Non-Hispanic white	Male	65	Cerebrovascular disease	25.5	Drinker	Frequently	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	68	Cerebrovascular disease	36.1	Non-Drinker	—	Ex-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	71	Cerebrovascular disease	23.7	Non-Drinker	—	Ex-smoker	Yes
Non-Hispanic white	Male	71	Cerebrovascular disease	26.2	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Male	80	Cerebrovascular disease	24.7	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Female	41	Cerebrovascular disease	19.9	Drinker	Occasionally	Smoker	No
Non-Hispanic white	Female	41	Cerebrovascular disease	27.7	Drinker	Seldom	Smoker	Yes
Non-Hispanic white	Female	45	Cerebrovascular disease	41.5	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Non-Hispanic white	Female	47	Cerebrovascular disease	24.5	Drinker	Occasionally	Smoker	No
Non-Hispanic white	Female	49	Subdural hemorrhage	34.8	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Asian	Male	57	Cerebrovascular disease	45.0	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
African-American	Male	62	Cerebrovascular disease	31.4	Drinker	N.I.	Non-smoker	No
African-American	Female	34	Cerebrovascular disease	37.9	Drinker	Seldom	Smoker	Yes
African-American	Female	52	Cerebrovascular disease	22.8	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Hispanic	Male	24	Ischaemic heart disease	16.9	Non-Drinker	—	Non-smoker	No
Hispanic	Male	49	Accident	29.3	Drinker	Frequently	Ex-smoker	No
Hispanic	Male	55	Cerebrovascular disease	23.8	Drinker, abuse	Always	Ex-smoker	No
Hispanic	Male	60	Cerebrovascular disease	22.1	Drinker	Occasionally	Smoker	No
Hispanic	Female	35	Cerebrovascular disease	31.6	Drinker	Seldom	Non-smoker	No

○サンプル調整

肝臓をリン酸バッファーでホモジナイズ後 12000rpm、4℃で 10 分遠心し、さらに超遠心機で遠心してマイクロソーム画分とサイトゾール画分を作成した。タンパク濃度は、Thermo Scientific 社の Pierce® BCA Protein Assay Kit を用いて測定をした。

○リパーゼ活性の測定

タンパク 100 μg 量を用いて DEHP 添加後 37℃で 10 分間反応させ、生成した MEHP 量をガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) で測定した。内部標準には MEHP-d4 を用いた。GC/MS の条件は、HP-5MS 5%フェニルメチルシロキシンキャピラリーカラムを用い、ヘリウムをキャリアガスとし、1 μl をスプリットレスで注入した。オーブ

ンは80°C 2分の後、20°C/minで昇温し、260°C 5分保持した。223をMEHP、227をMEHP-d4の定量イオンとし、335をMEHP、339をMEHP-d4の確認イオンとして測定を行った。

○リパーゼ活性 Km 値、Vmax 測定

ヒト、マウスのマイクロソームをプールし、ヒトでは2-50 mM、マウスでは1-100 mMのDEHPを5 μ l加え(終濃度ヒト:20-5000 μ M、マウス:10-1000 μ M)、生成したMEHPを測定して得られたラインウィーバー・バークプロットからVmax, Km 値を求めた。

○UGT 活性の測定

UGT 活性は、プロメガ社のUGT-GloTM Assay Kit を使用説明書通りに測定を行った。終濃度はマイクロソームが0.1mg/ml、マルチエンザイム基質が50 μ Mになるようにし、37°C で15分反応させた。

○ADH と ALDH 活性の測定

ADH 活性はサイトゾール、ALDH 活性は、ホモジネートを用いた。Wang et al. (1999)の方法を参考に340 nmにおける吸光度増加を90秒間記録し、 $\epsilon=6220\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いてNADHの単位時間当たりの生成量を算出した。基質は、ADHが10 μ Mの2-EH、ALDHは80 μ Mの2-ethylhexanalをそれぞれ用いた。

○尿中代謝物の測定

曝露終了日にマウスの尿は24時間採取し、使用まで-80°Cで保存した。45mM酢酸バッファー(pH 4.8)、60ユニットの β グルクロニダーゼ、100ngのMEHP-d4を含む1110 μ lの反応液で37°C一晩反応させた。その後、酢酸エチルで抽出し、tert-butyldimethylsilyl化させ、GC/MSで測定をした。測定方法はIto et al., 2005を参考にした。

○DEHP 曝露マウスの血漿中、肝臓中 MEHP 測定

12週齢の野生型PPAR α (mPPAR α) およびKO、hPPAR α の雄マウスに0%、0.01%、0.05%、0.1%のDEHPの混餌投与による曝露試験を8週間行った。その後すべてのマウスを解剖し、血漿および肝臓中MEHP濃度を測定した(Ito et al., 2007)。

○統計解析

統計解析はJMP5.0.1J (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行った。p<0.05を統計学的に有意とした。ANOVAの後、Tukey-Kramer HSD post-hoc test 又は student's t-test を行った。また、各酵素活性間の相関は、スピアマンの順位相関検定を行った。

2 研究成果、考察、今後の課題

(1) 研究項目名：DEHP 胎仔期曝露の次世代影響

- 1) 個別課題名：栄養状態（必須脂肪酸）への影響および分子メカニズム解析
(研究担当者名：内藤久雄、所属機関名：名古屋大学)

0、0.01、0.05、0.1% DEHP を母マウスに曝露し、妊娠 18 日目の胎仔と誕生から 2 日目の新生仔の肝臓を用いて 9 種類の脂肪酸を測定した。DEHP 曝露は、新生仔肝臓中脂肪酸濃度に影響を与えなかった。しかし、胎仔肝のパルミトレイン酸を有意に増加させた。今回用いた胎仔・新生仔は全て生仔のものであったため、肝臓中脂肪酸濃度に影響があったものは死亡してしまった可能性は否定できないが、生仔肝臓の脂肪酸濃度への影響は少ないと判断された。興味あることに、新生仔肝臓中脂肪酸濃度は胎仔よりもはるかに高かった。この傾向は PPAR α ノックアウトマウスで最も顕著であり（リノール酸 31 倍、リノレン酸 37 倍）、次いでヒト型 PPAR α マウス（それぞれ 21 倍、29 倍）、野生型マウス（それぞれ 12 倍、15 倍）であった。即ち、胎盤よりも母乳からの種々の脂肪酸の供給が高いことを示す。野生型胎仔肝のトリグリセライド (TG) は DEHP 曝露の影響を受けず、血漿濃度は若干上昇した。このように、DEHP 曝露が、胎仔や新生仔マウス肝臓中脂肪酸濃度へ及ぼす影響はパルミトレイン酸を除けば極めて小さいが、生仔のデータしか得られていないことに留意すべきである。

<母マウスの栄養状態、脂質および必須脂肪酸への影響の解明>

○血漿、肝臓中脂質濃度

野生型マウスでは、DEHP は曝露量依存的に妊娠期血漿 TG 濃度を減少させ、一方妊娠期、出産後ともに肝臓 TG 濃度を上昇させた（図 4）。また、血漿 T-Cho 量は出産後で DEHP 曝露により増加した。ヒト型 PPAR α マウスでは、DEHP は出産後血漿 T-Cho 量を増加させたのみであった。PPAR α ノックアウトマウスではこれらの影響はなかった。これらを出産前後で比べると、血漿 TG 濃度は全遺伝子型とも妊娠期は、出産後に比べ有意に高かった。

○血漿、肝臓 TG 濃度の代謝・合成・輸送に関わる受容体・酵素・蛋白の mRNA 量測定

野生型では、妊娠期出産後ともにペルオキシゾーム系の PT, PH が DEHP 曝露量依存的に上昇していたが、ミトコンドリア系遺伝子の MCAD、VLCAD は出産後のみで上昇した（図 5, 6）。ヒト型 PPAR α マウスでも同様の傾向が見られたが、MCAD は妊娠期でも曝露量依存的に上昇した。またミクロソーム系 CYP4A10 は、野生型、ヒト型 PPAR α マウスにおいて妊娠期、出産後ともに上昇した。さらに、MTP は妊娠期野生型において DEHP 曝露量依存的に減少した。また、妊娠期は出産後に比べ有意に高かった。DEHP は PPAR α ノックアウトマウスでは、これらの mRNA 量に影響を及ぼさなかった。

○PT、PH、MCAD、VLCAD については、ウェスタンブロットによるタンパク発現量定量

タンパク発現量は、mRNA 量の変化と同様の変化を示し、DEHP はペルオキシゾーム系の PT, PH を妊娠期・出産後ともに上昇させたが、ミトコンドリア系遺伝子の MCAD、VLCAD には影響を与えなかった。

○脂肪酸輸送に関わる mRNA 量測定

DEHP 曝露はこれらの遺伝子に影響を与えなかった（図 7）。

○仔と同様の9種の脂肪酸の測定

野生型マウスでは、DEHP 曝露は妊娠期のリノール酸、 α -リノレン酸、パルミチン酸、オレイン酸を曝露量依存的に減少させた（表 7）。また、出産後は、 α -リノレン酸、EPA を減少させた。しかし、PPAR α ノックアウト、ヒト型 PPAR α マウスでは測定した9種の脂肪酸濃度に影響を及ぼさなかった。

これら脂肪酸濃度を出産前後で比べると、アラキドン酸を除き、仔マウスとは逆で、妊娠期は出産後に比べ高かった。

○DEHP 曝露と必須脂肪酸代謝の関連を調べるため、脂質合成や脂肪酸の不飽和化に関わる遺伝子 Fads1, 2、脂肪酸伸長酵素である Elovl2, 5 を定量 RT-PCR により mRNA 量を測定した（図 8）。また、ウェスタンブロットによりタンパク発現量を測定した（図 9）。定量リアルタイム PCR の結果、出産後 PPAR α ノックアウトマウスにおいて、DEHP 0.05% 曝露は、Fads1 を有意に上昇させたが、他の遺伝子に影響を与えなかった。また、タンパク発現量においては、出産後ヒト型 PPAR α マウスで、DEHP 曝露は、Fads1, 2 を曝露量依存的に上昇させた。一方、出産後 PPAR α ノックアウトマウスでは、DEHP 0.05% 曝露が Fads2 を減少させた。

○さらに低い濃度である 0.001% での DEHP 曝露による出産後マウスの血漿中脂肪酸濃度測定

妊娠マウスにおいて、DEHP 曝露は血漿中これらの濃度に影響を与えなかった。

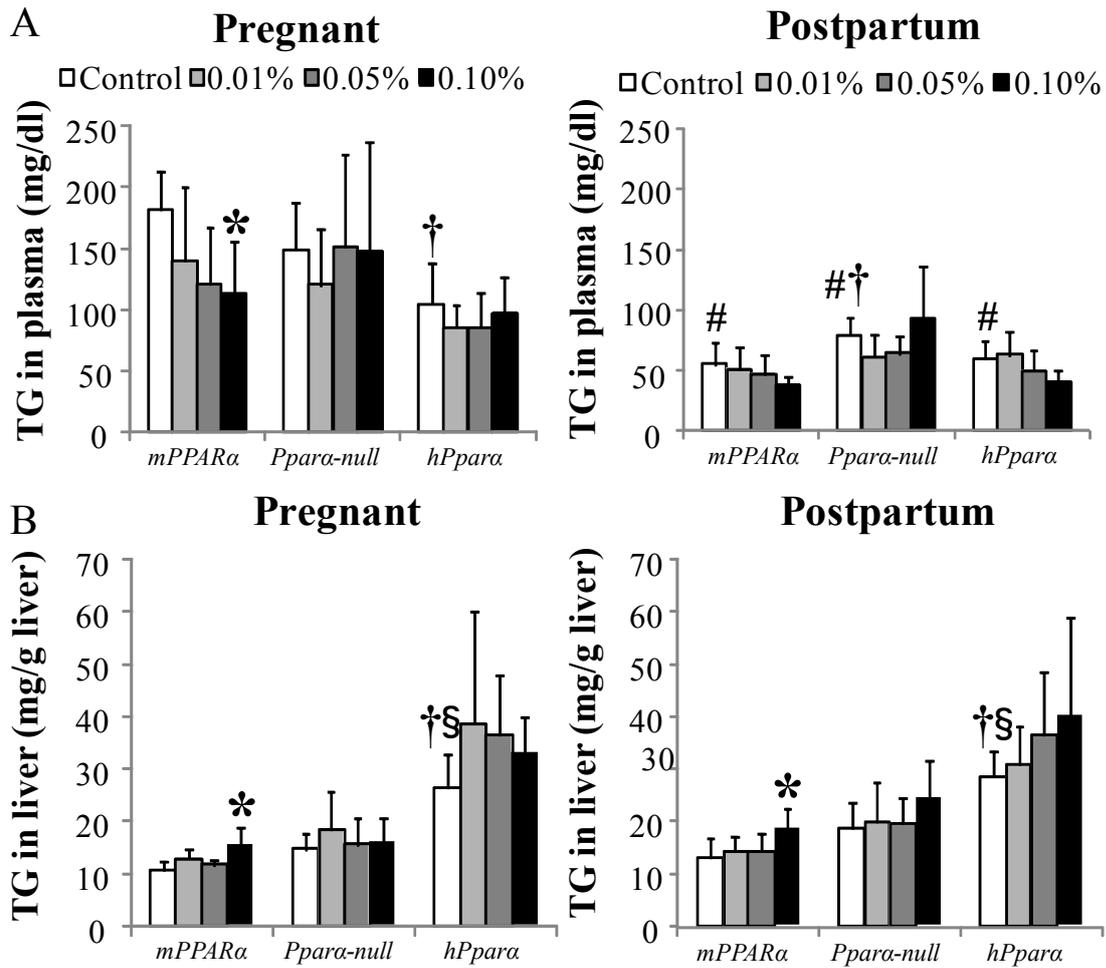
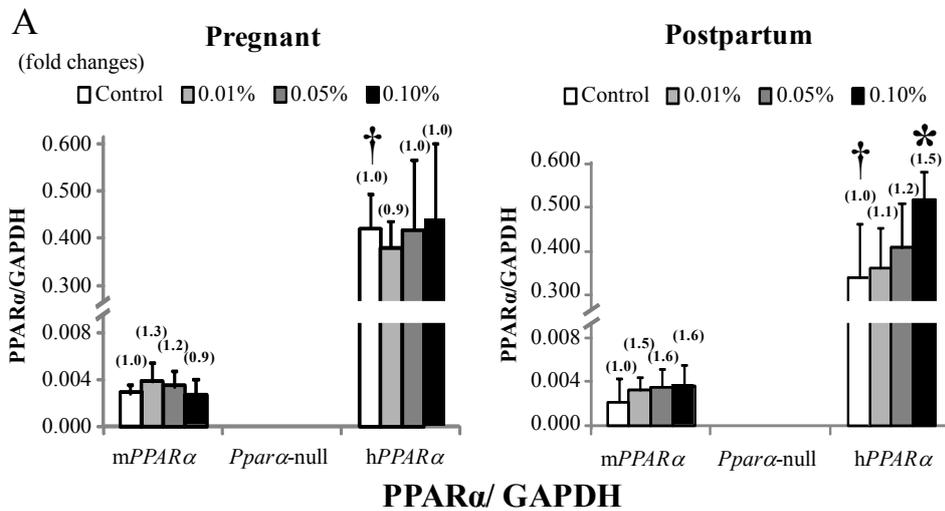


図4 血漿及び肝臓中TG濃度

- * 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり
- † 同期 野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり
- § 同期 PPAR α ノックアウトマウス コントロール群と比べて有意差あり
- # 同遺伝子型 妊娠期コントロール群と比べて有意差あり $p < 0.05$



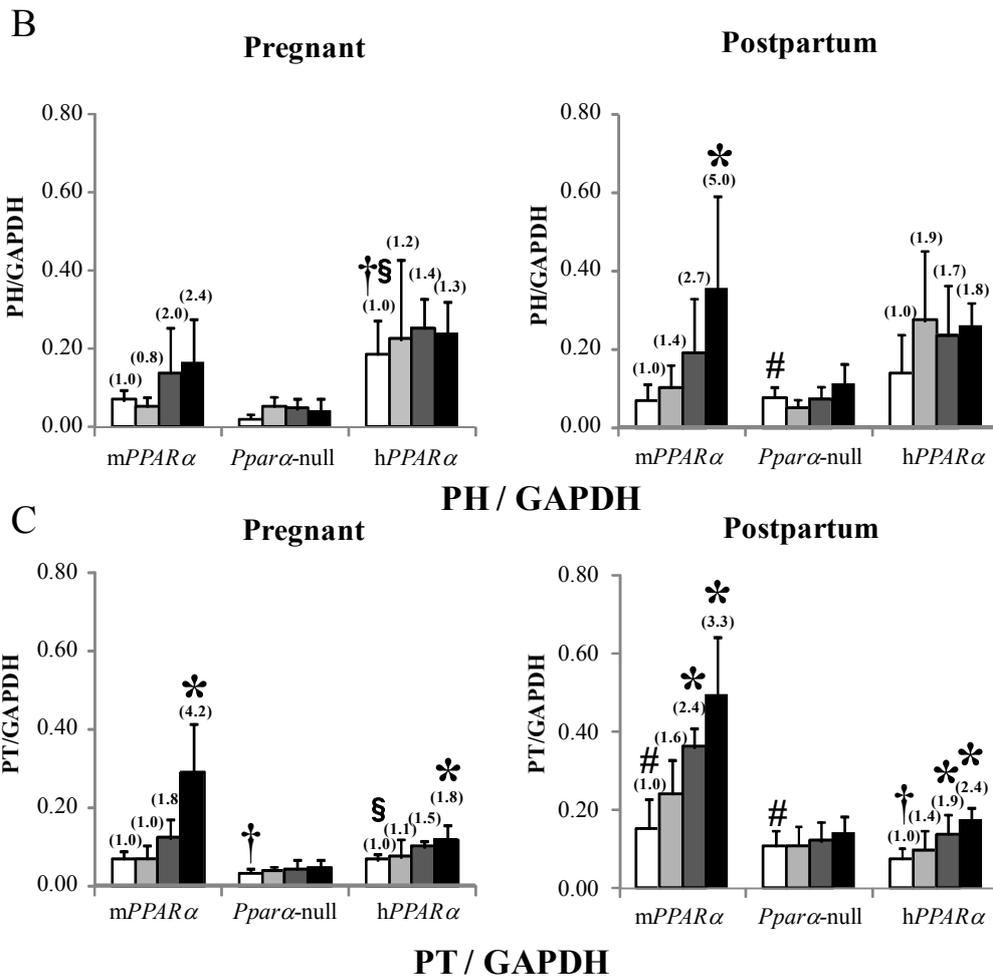


図5 母マウス肝臓 mRNA 発現量

- * 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり
- † 同期 野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり
- § 同期 PPARαノックアウトマウス コントロール群と比べて有意差あり
- # 同遺伝子型 妊娠期コントロール群と比べて有意差あり $p < 0.05$

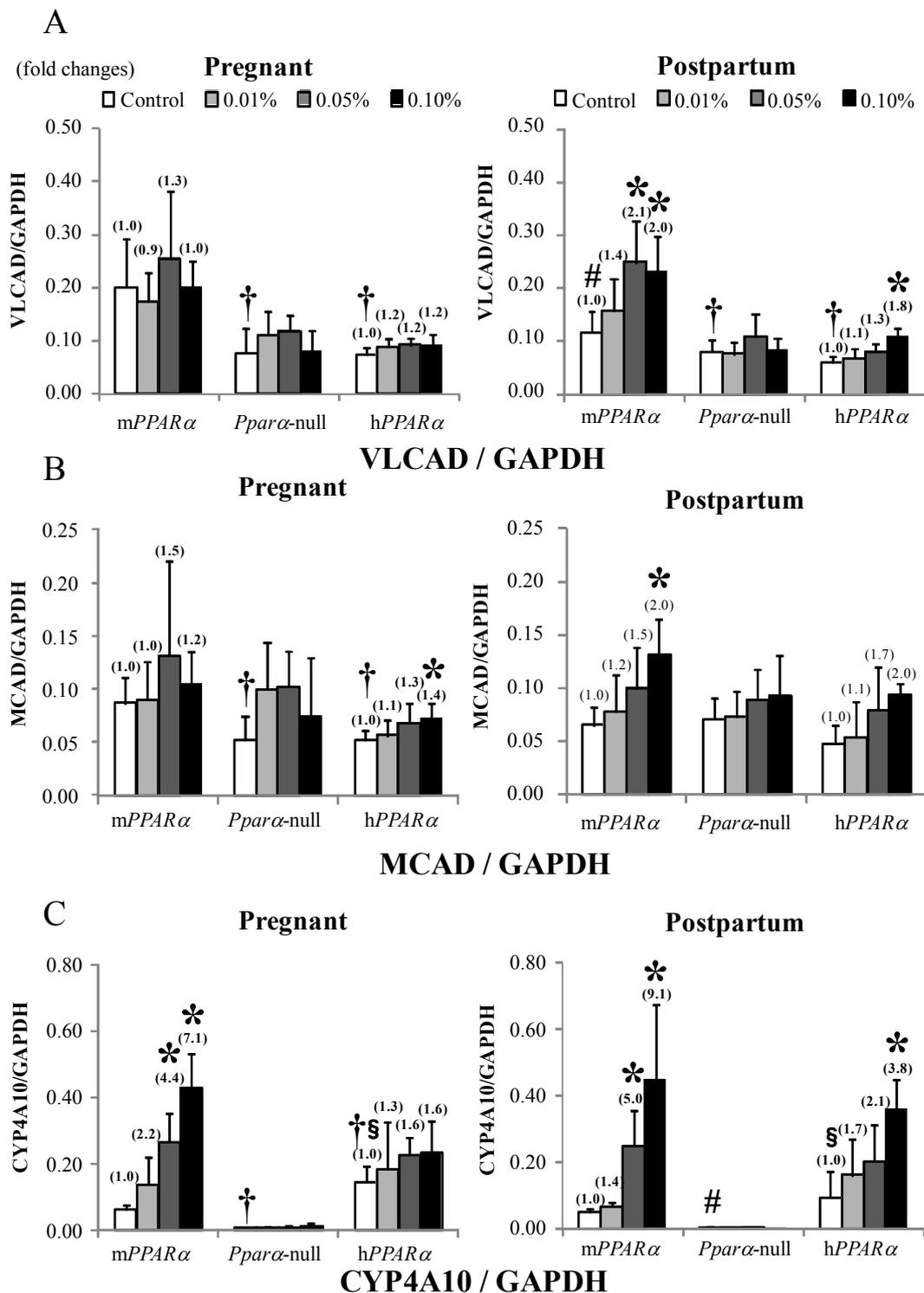


図6 母マウス肝臓 mRNA 発現量

- * 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり
- † 同期 野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり
- § 同期 PPARα ノックアウトマウス コントロール群と比べて有意差あり
- # 同遺伝子型 妊娠期コントロール群と比べて有意差あり p<0.05

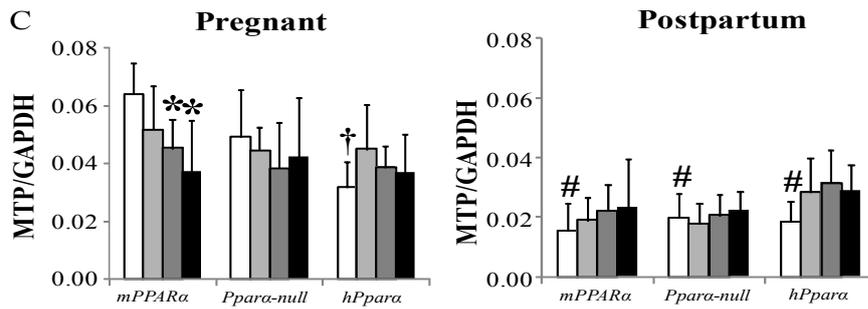


図7 母マウス肝臓 mRNA 発現量

* 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり
 † 同期 野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり
 # 同遺伝子型 妊娠期コントロール群と比べて有意差あり $p < 0.05$

表1 母マウス血漿中脂肪酸濃度変化

	Wild		KO		hPPAR α	
	妊娠	出産後	妊娠	出産後	妊娠	出産後
リノール酸 (18:2n-6)	↓:0.51倍 #:3.11倍		†:0.46倍		†:0.44倍	
アラキドン酸 (20:4n-6)						
α -リノレン酸 (18:3n-3)	↓:0.35倍 #:6.26倍	↓:0.53倍	†:0.35倍 #:1.40倍		†:0.33倍	
EPA (20:5n-3)		↓:0.57倍 #:1.98倍				#:1.58倍
DHA (22:6n-3)		#:3.18倍		#:2.17倍		#:2.42倍
パルミチン酸 (16:0)	↓:0.55倍 #:3.11倍		†:0.50倍 #:1.74倍		†:0.54倍	
パルミトレイン酸 (16:1n-9)		#:2.26倍		#:2.58倍		#:2.17倍
ステアリン酸 (18:0)		#:2.25倍		#:1.73倍		#:1.55倍
オレイン酸 (18:1n-9)	↓:0.46倍 #:5.47倍	↓:0.76倍	†:0.36倍 #:1.90倍		†:0.30倍	

↓: DEHP曝露による濃度の減少を示す。右の数値は 0.1%曝露群濃度 / Control群濃度 の倍率を示す。

†: 野生型のControl群に比べ低濃度のものを示す。右の数値は KO 又はhPPAR α Control群濃度 / 野生型Control群濃度の倍率を示す。

#: 出産後のControl群に比べ高濃度のものを示す。右の数値は妊娠中Control群濃度 / 出産後Control群濃度の倍率を示す。

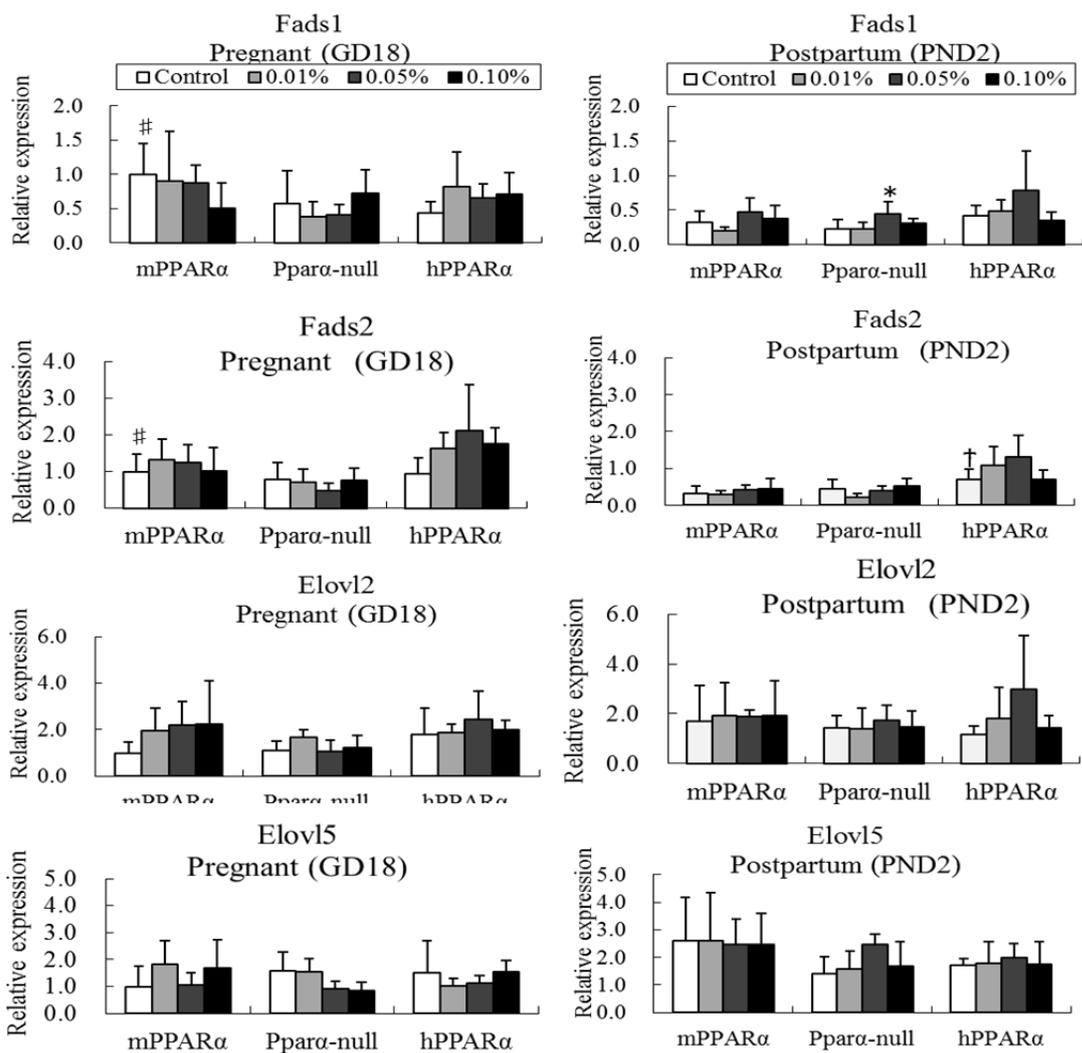


図8 母マウス肝臓中必須脂肪酸代謝関連酵素 mRNA 発現量

* 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり

† 同期野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり

同遺伝子型出産後マウスと比べて有意差あり

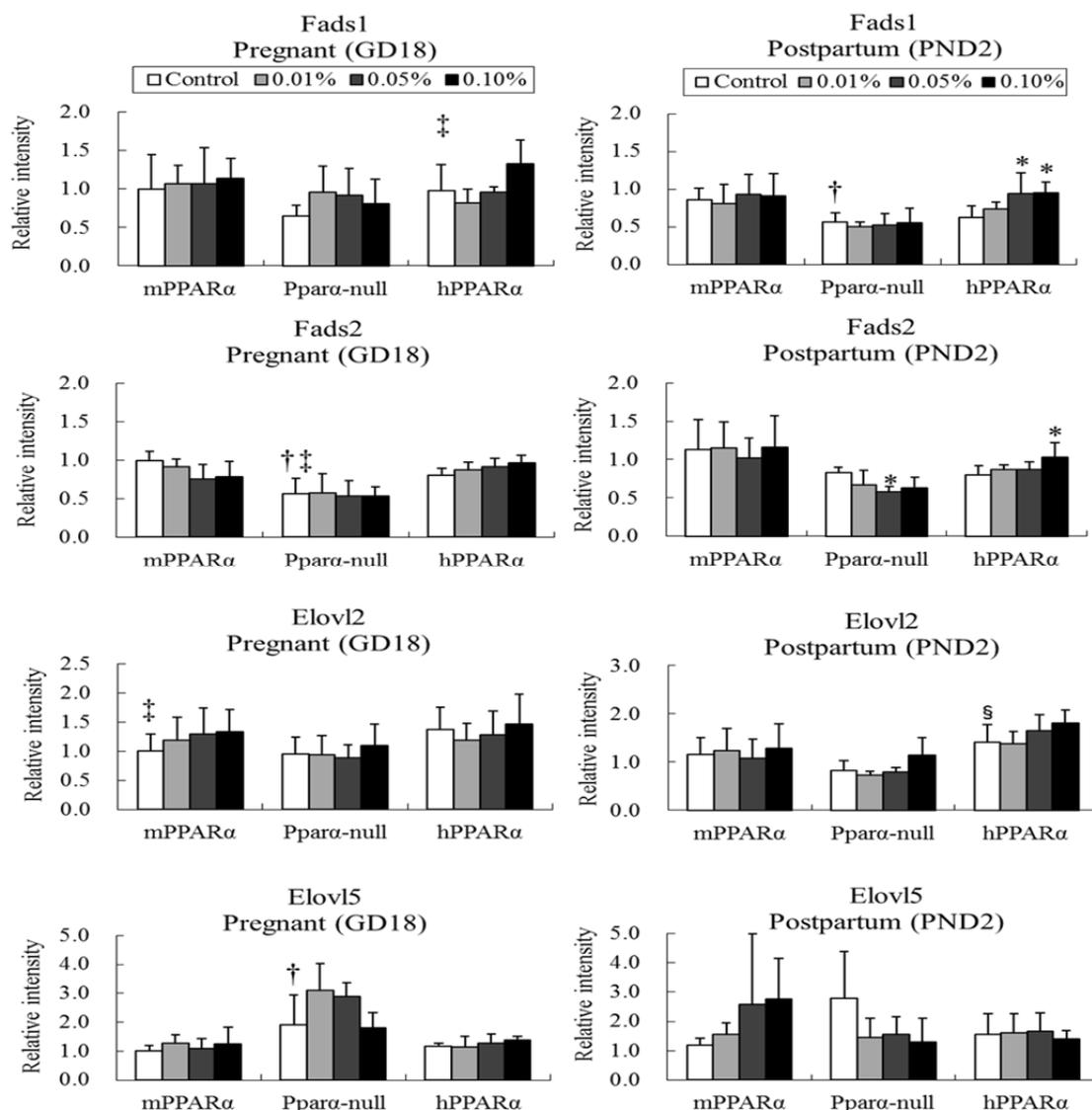


図9 母マウス肝臓中必須脂肪酸代謝関連酵素タンパク発現量

* 同期・同遺伝子型コントロール群に比べて有意差あり

† 同期野生型マウスコントロール群と比べて有意差あり

‡ 同遺伝子型出産後マウスと比べて有意差あり

§ 同期ノックアウトマウスコントロール群と比べて有意差あり

2) 個別題目名：生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明

(研究担当者名：那須民江・内藤久雄、所属機関名：中部大学・名古屋大学)

11 週齢の成熟期マウスの血漿テストステロンを測定した結果、野生型マウスで DEHP の胎仔期-授乳期曝露による濃度の減少が認められた。Control の普通食摂取 (CE2 群) マウスにおいて、野生型とヒト型 PPAR α マウスの間で種差が認められた。また、高脂肪食による影響は認められなかった (図 10)。

血漿テストステロン濃度

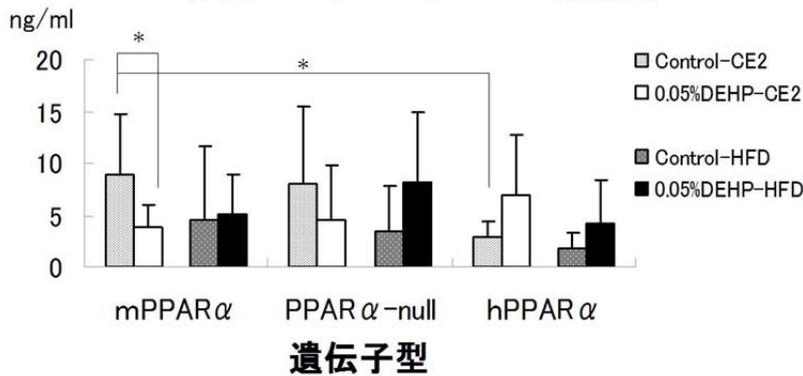


図 10 11 週齢成熟期マウス 血漿テストステロン濃度

* $p < 0.05$ 、2 群間に有意差あり

11 週齢成熟期マウスの精巣テストステロン濃度は血漿テストステロン濃度と類似した結果が得られた。しかし群間で観察された有意差検定はかならずしも同じではなかった。つまり、普通食摂取のヒト型 PPAR α マウスにおいて DEHP 曝露によるテストステロン濃度の有意な上昇が認められた。また KO の DEHP 曝露群において、普通食摂取群と比較して高脂肪食群で有意にテストステロン濃度が上昇していた(図 11)。

精巣テストステロン濃度

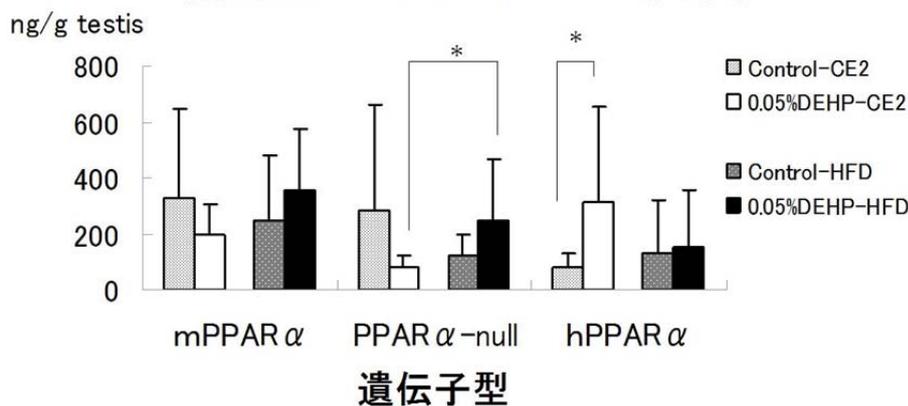


図 11 11 週齢成熟期マウス 精巣テストステロン濃度

* $p < 0.05$ 、2 群間に有意差あり

比較のために、親世代への DEHP 曝露時の血漿・精巣中のテストステロンへの影響を図 12 に示した。血漿テストステロンは PPAR α -null マウスの 0.05% DEHP 群のみ有意な上昇をしていたが、0.1%DEHP 曝露では上昇は見られず、DEHP 濃度依存性が見られなかった。またそれ以外の遺伝子

型、曝露濃度では有意差は見られなかった。一方精巣中のテストステロン濃度は野生型の 0.1% DEHP 曝露群で有意な上昇が見られた。これらの結果は胎仔期-授乳期の DEHP 曝露はテストステロンを低下傾向に、成熟期（親マウス）曝露はテストステロンを上昇傾向に影響を与えることを示し、DEHP の曝露ステージにより DEHP の影響が正反対方向であることを示し、注目すべきである。

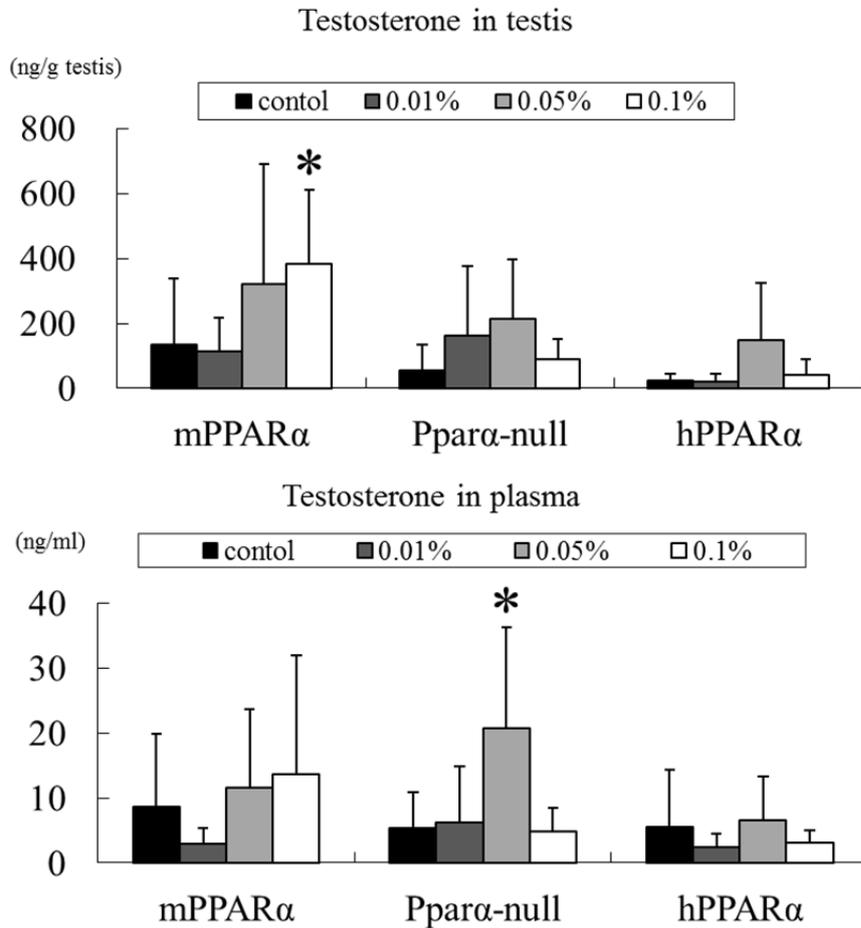


図 12 DEHP 親世代の精巣および血漿中テストステロン濃度
*同遺伝子型コントロール群と比べて有意差あり

○ステロイド合成系の遺伝子発現量測定

比較のために、親世代への DEHP 曝露時のステロイド合成系遺伝子の発現を図 13 に示した。親では、StAR, CYP17α が KO マウスの 0.1% 群で上昇していたが、11 週成熟マウスにおいて同一系統内において DEHP 曝露 (0.05%) による影響が認められたのは、ヒト型 PPARα マウスの HMG-CoA reductase の遺伝子発現量のみで、他には DEHP 曝露による変化は見られなかった (図 14)。また種差も認められなかった。従って、DEHP 胎仔期-授乳期曝露のテストステロン低下のメカニズムは合成系への影響ではないことが判明した。

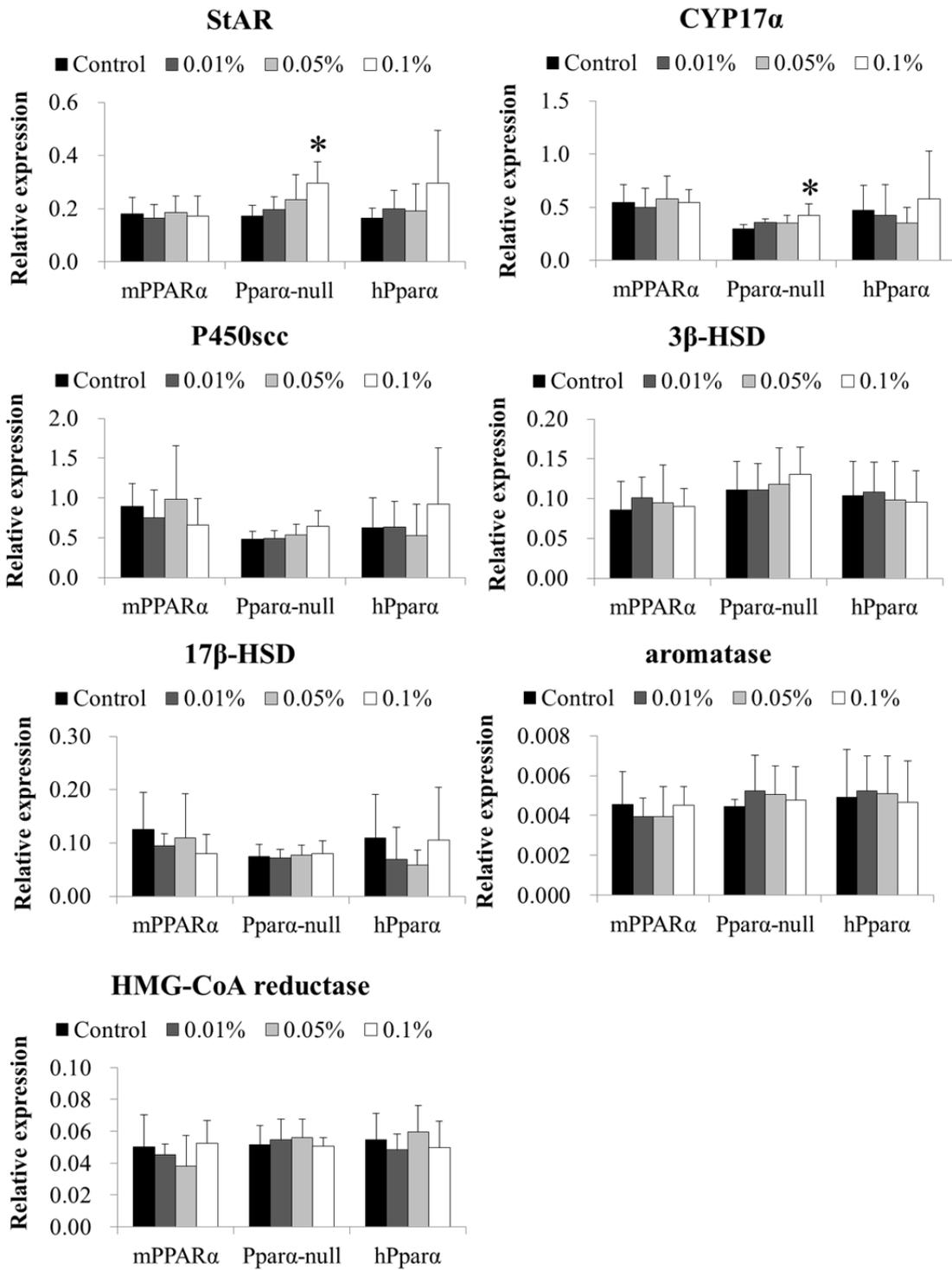
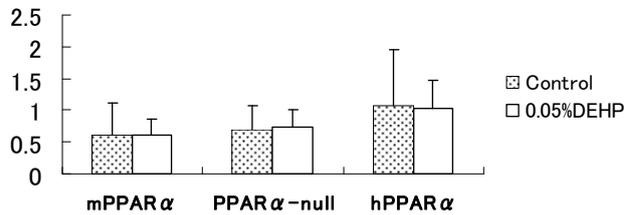


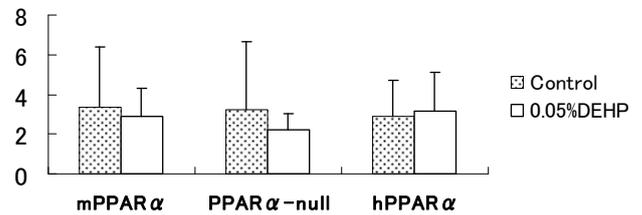
図 13 DEHP 親世代の精巢のステロイド合成系遺伝子の発現

*同遺伝子型コントロール群と比べて有意差あり

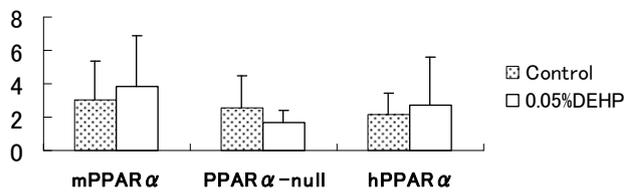
Mus musculus steroidogenic acute regulatory protein (Star), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA/GAPDH mRNA



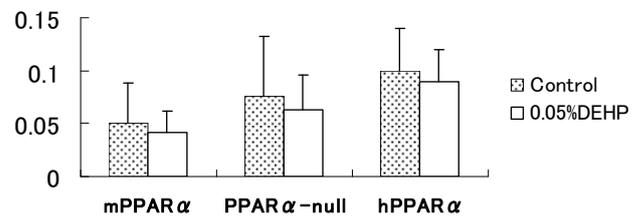
Mus musculus hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 3 (Hsd17b3), mRNA/GAPDH mRNA



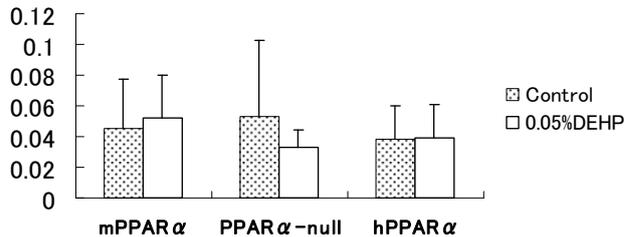
Mus musculus cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp11a1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA/GAPDH mRNA



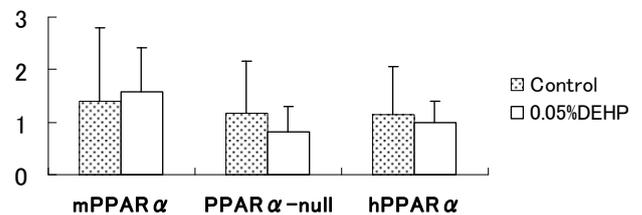
Mus musculus cytochrome P450, family 19, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp19a1), mRNA/GAPDH mRNA



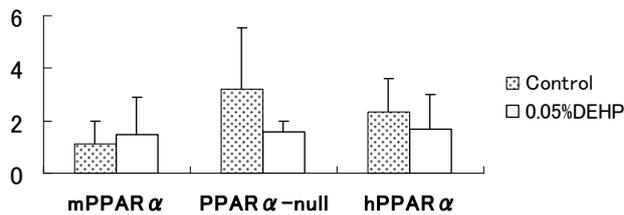
Mouse peripheral-type benzodiazepine receptor mRNA/GAPDH mRNA



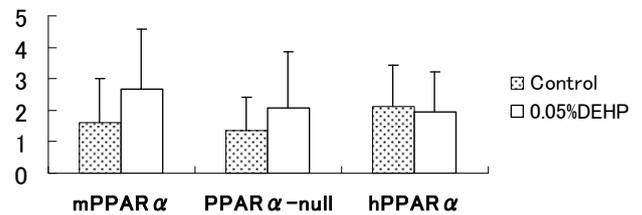
Mus musculus cytochrome P450, family 17, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp17a1), mRNA/GAPDH mRNA



Mus musculus hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 (Hsd3b1), mRNA/GAPDH mRNA



Mus musculus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 2 (mitochondrial) (Hmgcs2)/GAPDH mRNA



Mus musculus 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (Hmgcr), mRNA/GAPDH mRNA

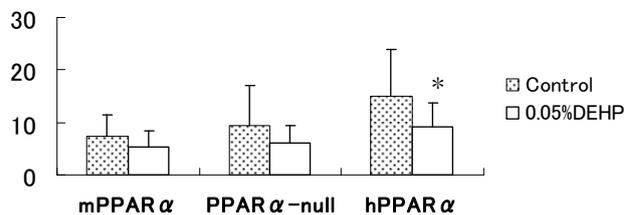


図 14 11 週齢成熟期マウステストステロン合成系 mRNA 発現量
 *t 検定・同系統内で control と比較して有意差あり (p<0.05)

○肝臓 Cyp2b10 の遺伝子発現量測定

DEHP 胎仔期-授乳期曝露のテストステロン低下のメカニズムは合成系への影響ではないことが判明したので、肝臓におけるテストステロン代謝酵素への影響を知るため、Cyp2b10 遺伝子発現への影響を解析した。11 週齢成熟期マウスでは、DEHP の胎仔期-授乳期曝露による有意な影響は認められないが、低下する傾向であった。一方、KO とヒト型 PPAR α マウスでは、高脂肪食 (HFD) 摂取により、発現が上昇する傾向であった。野生型マウスのコントロール群では HFD 食摂取により Cyp2b10 発現量が減少することが分かった (図 15)。

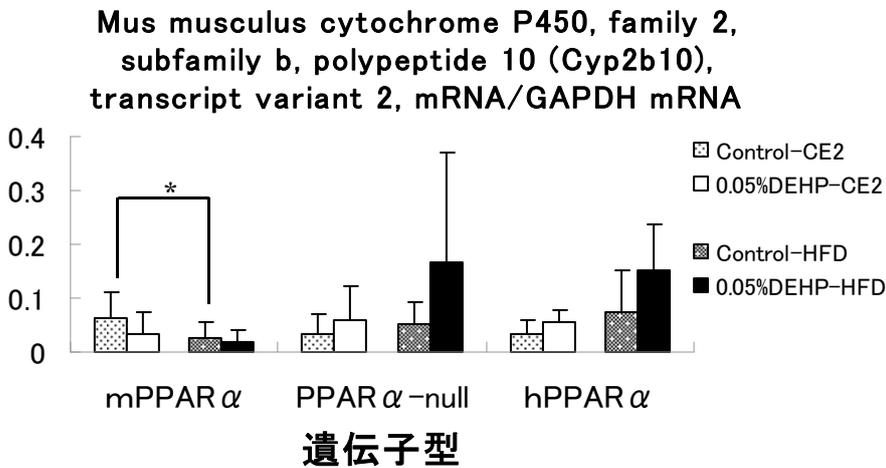


図 15 11 週齢成熟期マウス 肝臓 CYP2b10 mRNA 発現量
 mPPAR α Control-CE2—mPPAR α Control-HFD (t 検定 p<0.05)

上記の様に、野生型マウスでは胎仔期-授乳期 DEHP 曝露により成熟期マウスの Cyp2b10 遺伝子発現の減少傾向が、一方、KO やヒト型 PPAR α マウスでは高脂肪食が加わることにより上昇傾向がみられたので、出発点、即ち、PND21 離乳期マウスの Cyp2b10 の発現を検討した。野生型において 0.01%DEHP 曝露によって CYP2b10 の発現量が有意に低下した。KO マウスでは野生型より明らかに発現量が低く、ヒト型 PPAR α マウスの Cyp2b10 発現量は KO マウスより全体的に発現量が高かったが、胎仔期-授乳期 DEHP 曝露の影響は認められなかった (図 16)。これらの結果から、野生型マウスでは胎仔期-授乳期の DEHP 曝露が明らかに Cyp2b10 の発現を抑制することが明らかとなった。この離乳期での影響が 11 週齢の成熟マウスに多少残っているのかもしれない。これらの結果は、胎仔期-授乳期 DEHP 曝露が Cyp2b10 を制御する Constitutive Androstene Receptor (CAR) の発現に影響を与えている可能性もあり、今後検討を要する。

Mus musculus cytochrome P450, family 2, subfamily b,
polypeptide 10 (Cyp2b10), transcript variant 2,
mRNA/GAPDH mRNA

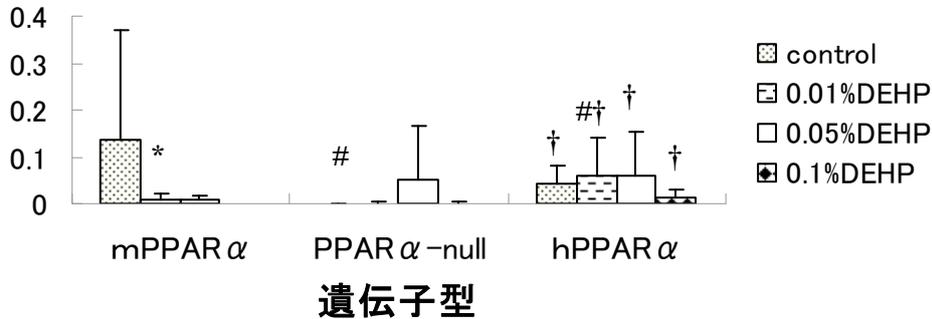


図 16 PND21 離乳期マウス 肝臓 CYP2b10 mRNA 発現量

* : 同遺伝子型 control と比較して有意差有り (Dunnett 検定 $p < 0.05$)

: 同曝露量 mPPAR α 群と比較して有意差有り (tukey 検定 $p < 0.05$)

† : 同曝露量 PPAR-null 群と比較して有意差有り (tukey 検定 $p < 0.05$)

胎仔期-授乳期 DEHP 曝露の Cyp2b10 への影響が、胎仔期と授乳期どちらの曝露に起因するか明らかにするために、出産後のみ 0.05%DEHP を曝露したマウス (野生型のみ) を作成し (授乳期曝露) た。結果は図 17 に示す通りで、両群で低下傾向が観察され、DEHP 曝露による Cyp2b10 の発現抑制は胎仔期曝露に起因するか、授乳期曝露に起因するか特定できなかった。

Mus musculus cytochrome P450, family 2, subfamily b,
polypeptide 10 (Cyp2b10), transcript variant 2,
mRNA/GAPDH mRNA

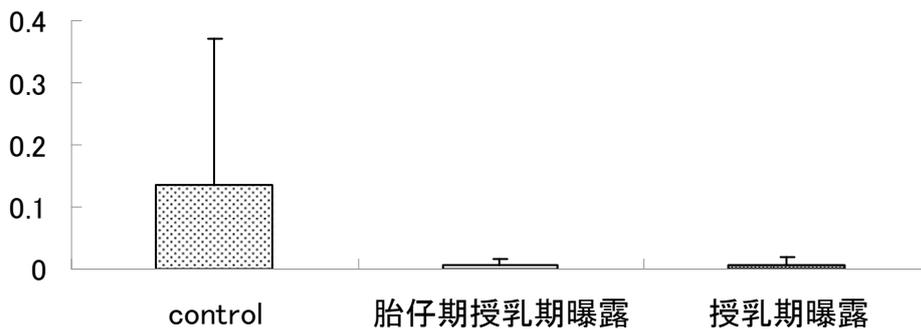


図 17 PND21 離乳期マウス CYP2b10 mRNA 発現量

DEHP 曝露時期による比較

上記の様に胎仔期-授乳期 DEHP 曝露は 11 週齢の野生型成熟期マウスの血漿テストステロン濃度を低下させ、精巢のテストステロンも同傾向を示した。おして、これらはライディッヒ細胞に

おける合成系の変化ではないと言える。さらに肝臓のテストステロン代謝酵素は逆に低下させている可能性があることが明らかとなった。野生型マウスの血漿テストステロンの濃度低下には、ステロイド合成や代謝酵素以外の原因があると考えられることから、血漿中 Luteinizing hormone (LH) を測定した(図 18)。しかし、LH 濃度に変化は見られず、野生型マウスの血漿中テストステロン濃度低下の原因については明らかにできなかった。

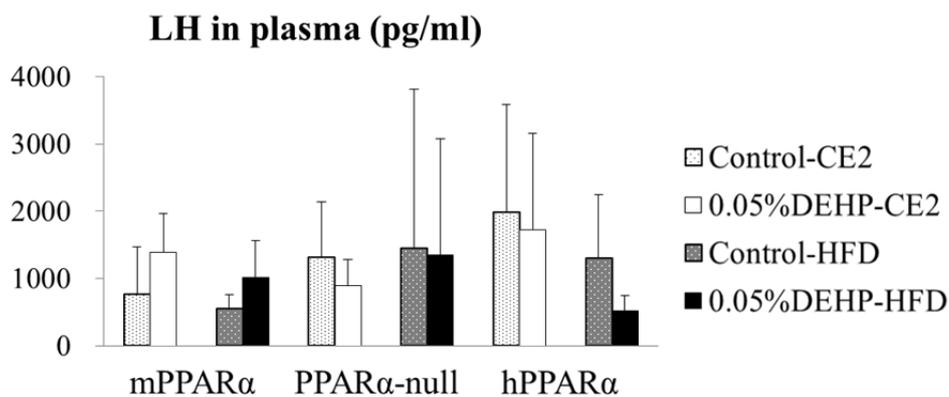


図 18 11 週齢成熟期マウス 血漿中 LH 濃度

今回、全体的に非常に個体差が大きく、同系統内でもばらつきが大きかったため、血漿と精巣のテストステロン濃度において、全体としては似た傾向を示したけれども、有意差が得られた項目としては結果に違いが出たのかもしれない。また、解剖の際に麻酔下で臓器摘出を行ったことも関係しているのかもしれない。胎仔期・授乳期 DEHP 曝露 KO マウスでは高脂肪食摂取によって精巣のテストステロン濃度が増加しており、この相互作用の原因については今後の検討課題である。

今回の実験で測定した CYP2b10 は、マウス肝臓での DEHP における CAR 標的遺伝子であり、CAR によって誘導されることが分かっている。また、CAR、PXR それぞれの活性因子であるフェノバルビタールや PCN は、マウスやラットの肝臓で薬物代謝酵素として働く CYP2B、CYP3A を誘導することが知られており、これらの酵素がテストステロンの代謝に関与しているという報告もある。野生型マウスでは高脂肪食摂取による Cyp2b10 の発現量の減少が認められた。さらに興味ある知見は、胎仔期-授乳期の DEHP 曝露が PND21 離乳期マウスの CYP2b10 を有意に減少させたことである。胎仔期-授乳期の DEHP 曝露により CAR の発現が抑制されているかもしれない、また高脂肪食摂取によって、野生型では CAR の発現が抑制されているかもしれない。CAR は肝臓毒性のある胆汁酸排泄に関わる核内受容体であるので、この低下の生理的意義を今後検討する必要がある。

○精巣の病理学的検索

11 週齢の成熟マウスは野生型の高脂肪食 (HFD) 摂取群で胎仔期-授乳期 DEHP 曝露によりセルトリ細胞の空胞の有意な増加が観察された (図 19)。精母細胞付近の空胞や精細管全体に見られる空胞数も同群で増加傾向が見られたが、個体差が大きく、有意差は見られなかった (図 19)。

また、胎仔期-授乳期 DEHP 曝露はセルトリ細胞の空胞変性には影響を与えなかった

が、ヒト型 PPAR α マウスにおいて、高脂肪食摂取はセルトリ細胞の空胞変性を増加させた。

その他、ステージの割合や剥離した細胞数に胎仔期-授乳期 DEHP 曝露や高脂肪食摂取の影響は観察されなかった (図 19)。

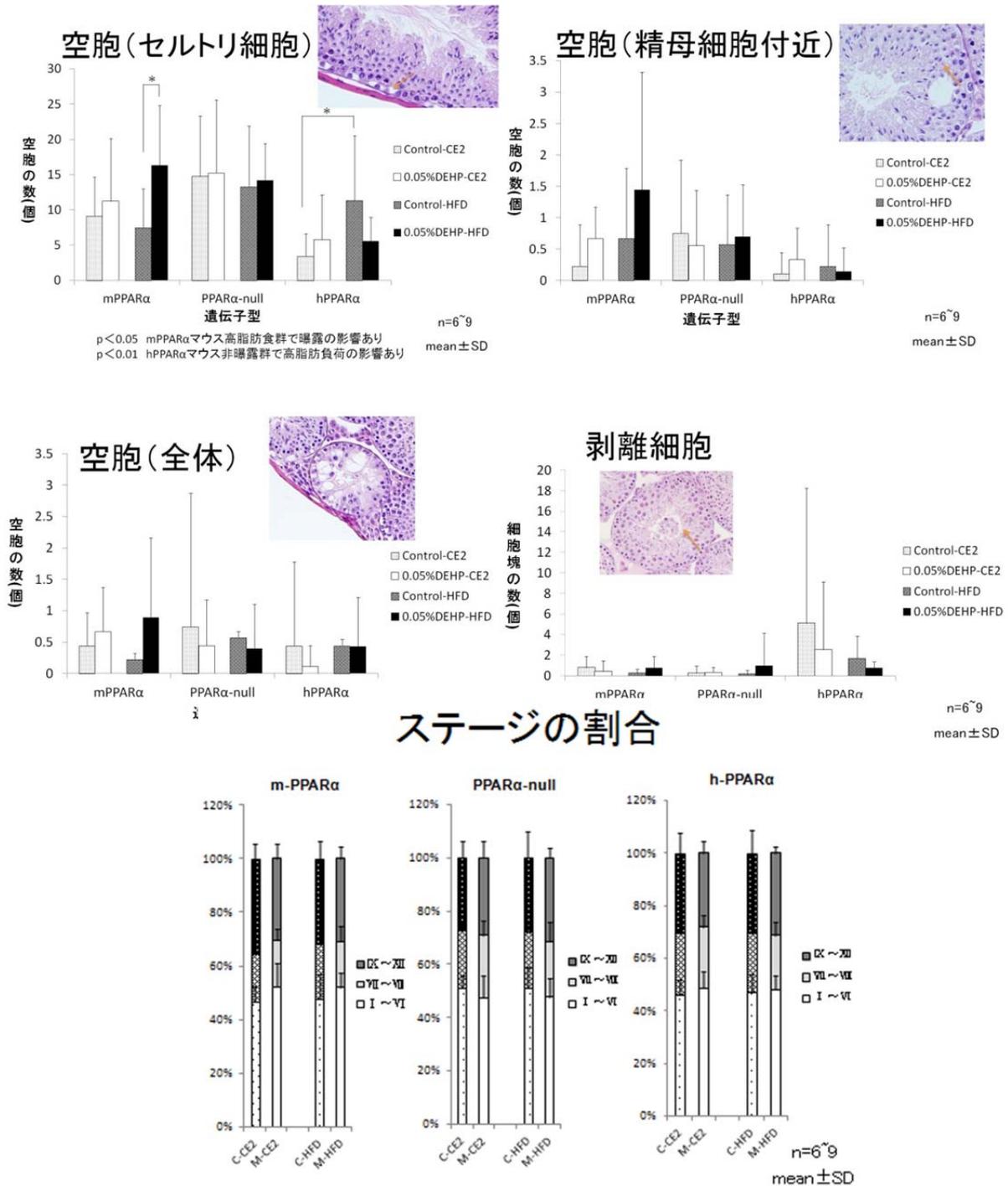


図 19. 11 週齢の成熟マウスの精巣病理学的変化

高脂肪負荷によりセルトリ細胞の空胞数が増加したことから、高脂肪負荷群では DEHP 代謝物の

MEHP 濃度が高い可能性が考えられたため、精巣中の MEHP 濃度を測定したが、むしろ mPPAR α や Ppar α -null マウスの高脂肪負荷群では MEHP 濃度が低く、Ppar α -null マウスと hPPAR α マウスでは DEHP 投与により精巣中の濃度が減っていた (図 20)。この原因は今回の研究では明らかにすることが出来なかった。

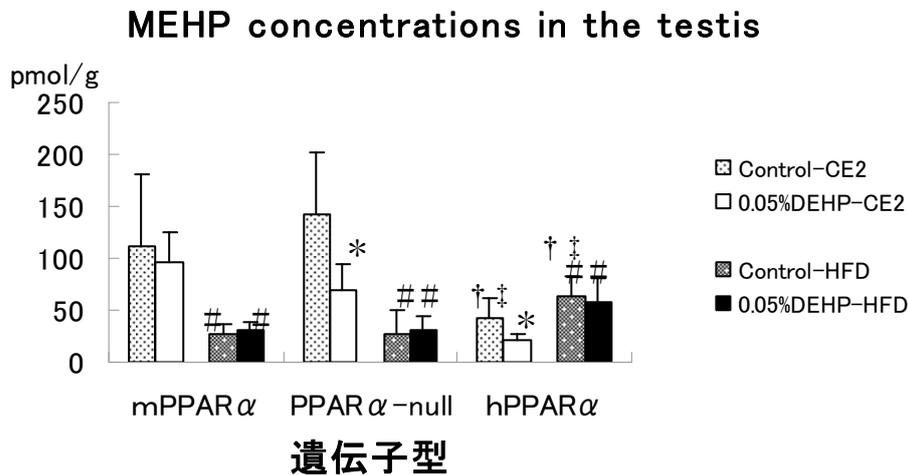


図 20 精巣中の MEHP 濃度

*同遺伝子型・同餌摂取コントロール群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

#同遺伝子型・同曝露量 CE2 摂取群と比較して有意差あり ($p < 0.05$)

†CE2 摂取コントロール群系統間比較 mPPAR α に比べて有意差あり ($p < 0.05$)

21 日齢の幼若雄マウスについてはまず初めに、精巣の精子形成過程に DEHP の影響があるか、また、遺伝子型マウス間に差が見られるかどうかを確認した (図 21)。Wild マウスの高濃度群 (0.1%DEHP) は、出生仔マウスの減少ならびに、低体重出生による衰弱のために 21 日齢で観察することができなかった。精子形成サイクルは遺伝子型間に差は見られず、21 日齢では精子細胞 1~2, 3 あたりの円形精子細胞が観察される精細管が多く観察されたが、一部は精子細胞がみられず、精母細胞のみであった。DEHP 曝露による精子形成サイクルの促進、遅延は見られなかった。

次に、精巣病理学的所見を図 22 に示した。21 日齢の雄マウスにおいて、11 週齢の成熟マウスと同様に空胞が観察された。hPPAR α マウスと KO マウスの高濃度群 (0.1%DEHP) でコントロールに比べて上昇、Wild マウスの中濃度群で逆に減少していた。Wild マウスでは剥離細胞数が中濃度 (0.05%DEHP) で増加しており、この影響を受けたと考えられる。空胞は主にセルトリ細胞で観察された。剥離細胞は Wild に加えて hPPAR α マウスの中濃度曝露群 (0.05%DEHP) でも増加していたが、hPPAR α マウスの高濃度群では観察的な変化ではなかった。KO マウスでは低濃度 (0.01%DEHP) から、Wild マウスでは中濃度 (0.05%DEHP) で壊死が観察された。また Wild マウスの中濃度群、KO マウスの中濃度、高濃度群、hPPAR α マウスの高濃度群でアポトーシスの増加が観察された。壊死やアポトーシスは主に精母細胞で観察された。

精巣病理学的変化は全ての遺伝子型マウスでも観察されており、PPAR α を関与せずに引き起こ

されていると考えられた。過去の報告の通り (Maloney and Waxman, 1999)、PPAR γ が関与するのかもしれない。

このような精巣毒性は、まず初めに DEHP の主標的であるセルトリ細胞の空胞化が起き、それにより栄養補給がされず、精母細胞の壊死、アポトーシス、剥離を引き起こしたのかもしれない。

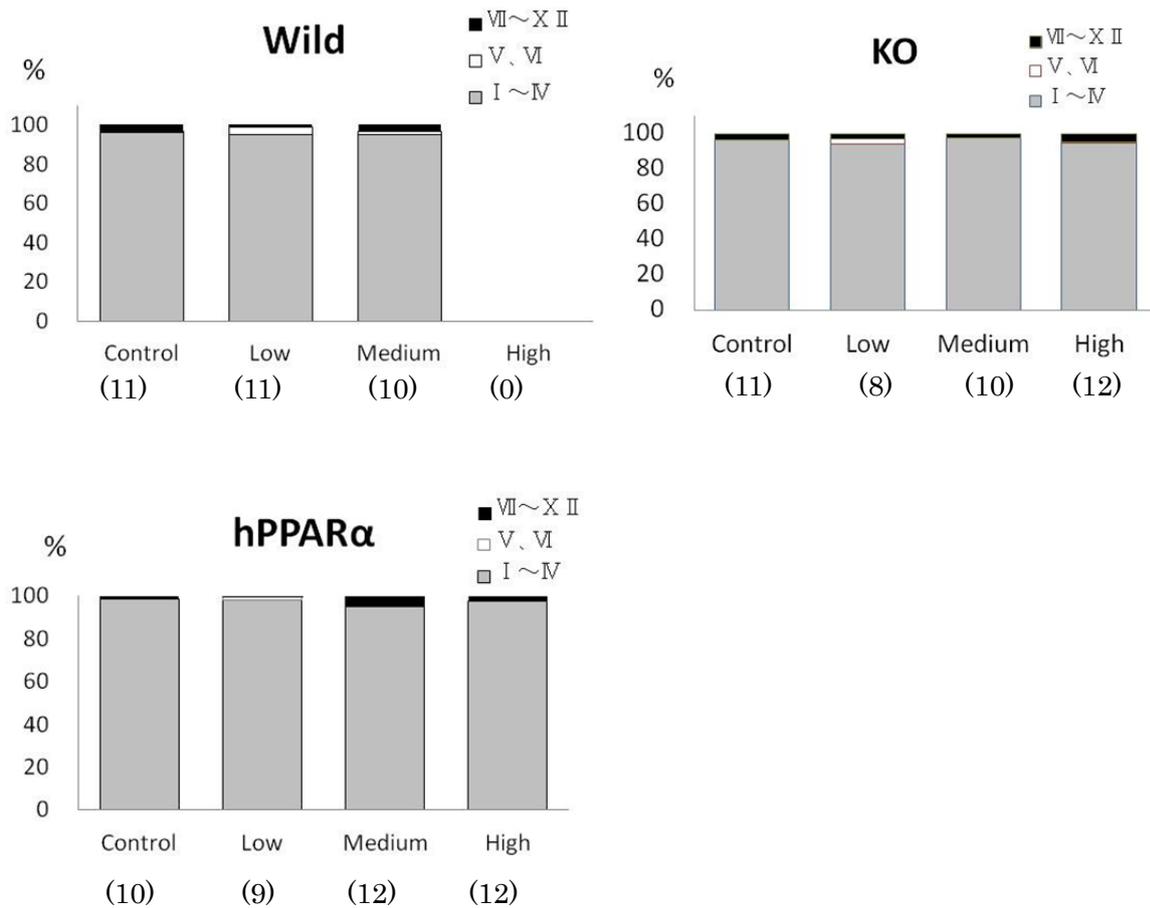


図 21. 21 日齢の幼若マウスの精巣精子形成ステージ比率

かつこ内は観察した匹数、灰色が I~IV ステージ、白色が V~VI ステージ、黒色が VII~XII ステージを示す。

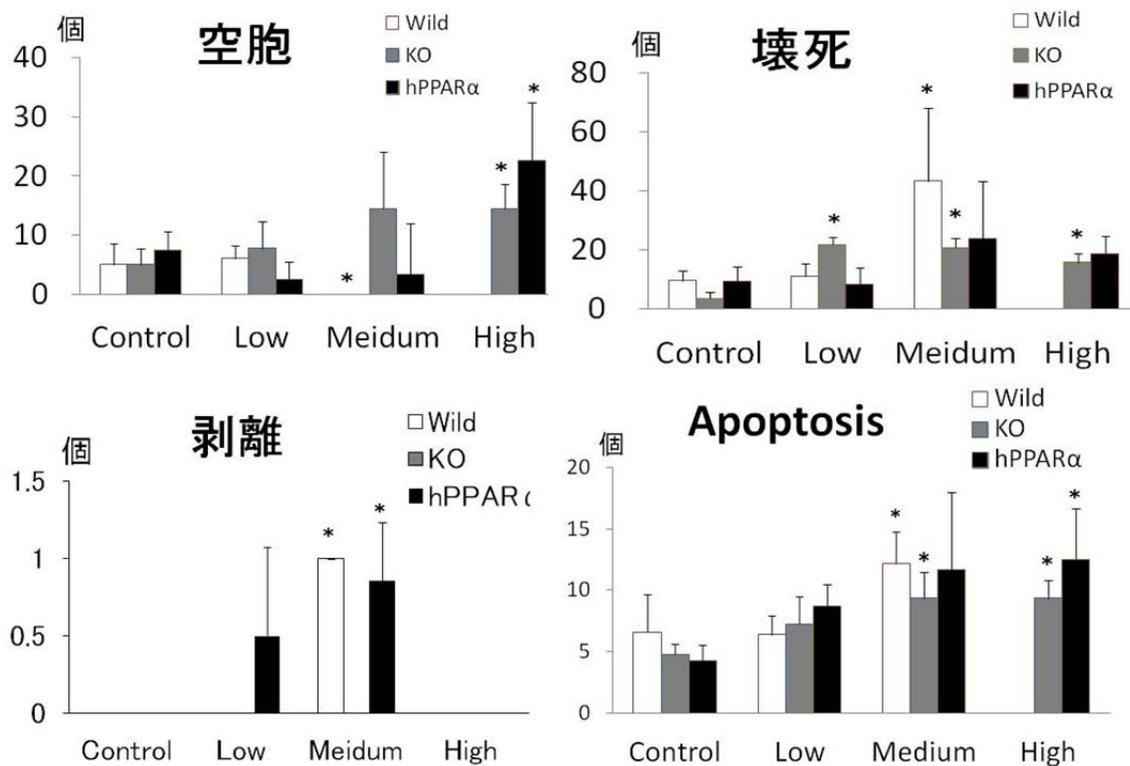


図 22. 21 日齢の幼若マウスの精巣病理学的変化
*各遺伝子型コントロールと比較して $p < 0.05$

3) 個別題目名：PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
(研究担当者名：那須民江、所属機関名：名古屋大学)

○PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響について検討

11 週齢で解剖した成熟期マウスの体重及び臓器重量を表 8 に示した。高脂肪食摂取によりヒト型 PPAR α の体重と野生型の前立腺・精嚢重量の有意な増加が見られたが、DEHP 曝露による影響は認められなかった。

表 8 成熟期マウスの体重および臓器重量

		mPPAR α	PPAR α -null	hPPAR α
体重				
CE-2	Control	23.9 \pm 1.9	20.8 \pm 1.9	21.1
	DEHP	23.8 \pm 1.0	21.3 \pm 1.4	22.1
				± 2.1
				± 1.8
HFD	Control	25.0 \pm 2.2	22.4 \pm 2.2	25.5
	DEHP	23.7 \pm 2.7	21.3 \pm 1.8	24.6
				$\pm 3.1 \uparrow$

±2.8

脳

CE-2	Control	0.45±0.03	0.40±0.03	0.42±0.02
	DEHP	0.42±0.01	0.40±0.02	0.43±0.03
HFD	Control	0.43±0.02	0.39±0.02	0.42±0.03
	DEHP	0.41±0.02	0.39±0.01	0.42±0.01

精巣 (左)

CE-2	Control	0.09±0.01	0.08±0.01	0.11±0.02
	DEHP	0.09±0.00	0.08±0.03	0.11±0.01
HFD	Control	0.09±0.05	0.07±0.02	0.10±0.01
	DEHP	0.08±0.01	0.08±0.01	0.10±0.01

精巣 (右)

CE-2	Control	0.09±0.01	0.08±0.02	0.11±0.01
	DEHP	0.09±0.00	0.08±0.01	0.11±0.01
HFD	Control	0.09±0.01	0.08±0.01	0.10±0.01
	DEHP	0.08±0.01	0.08±0.00	0.10±0.01

精巣上部 (左)

CE-2	Control	0.03±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00
	DEHP	0.03±0.00	0.02±0.01	0.03±0.00
HFD	Control	0.02±0.01	0.02±0.00	0.03±0.00
	DEHP	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.01

精巣上部 (右)

CE-2	Control	0.03±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00
	DEHP	0.03±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00
HFD	Control	0.03±0.00	0.02±0.00	0.03±0.01
	DEHP	0.02±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00

前立腺・精囊

CE-2	Control	0.25±0.04	0.20±0.04	0.19±0.03
	DEHP	0.27±0.03	0.20±0.02	0.21±0.04
HFD	Control	0.30±0.05 †	0.22±0.03	0.20±0.03
	DEHP	0.27±0.04	0.21±0.03	0.23±0.03

†:それぞれの遺伝子型の CE-2 Control との間に有意差あり

PPAR α の発現量に関しては、離乳期の肝臓中の mRNA は、マウス型およびヒト型 PPAR α マウスの両遺伝子型で DEHP 曝露により上昇しており、PPAR α の標的遺伝子である CYP4A14 も上昇していた (図 23)。

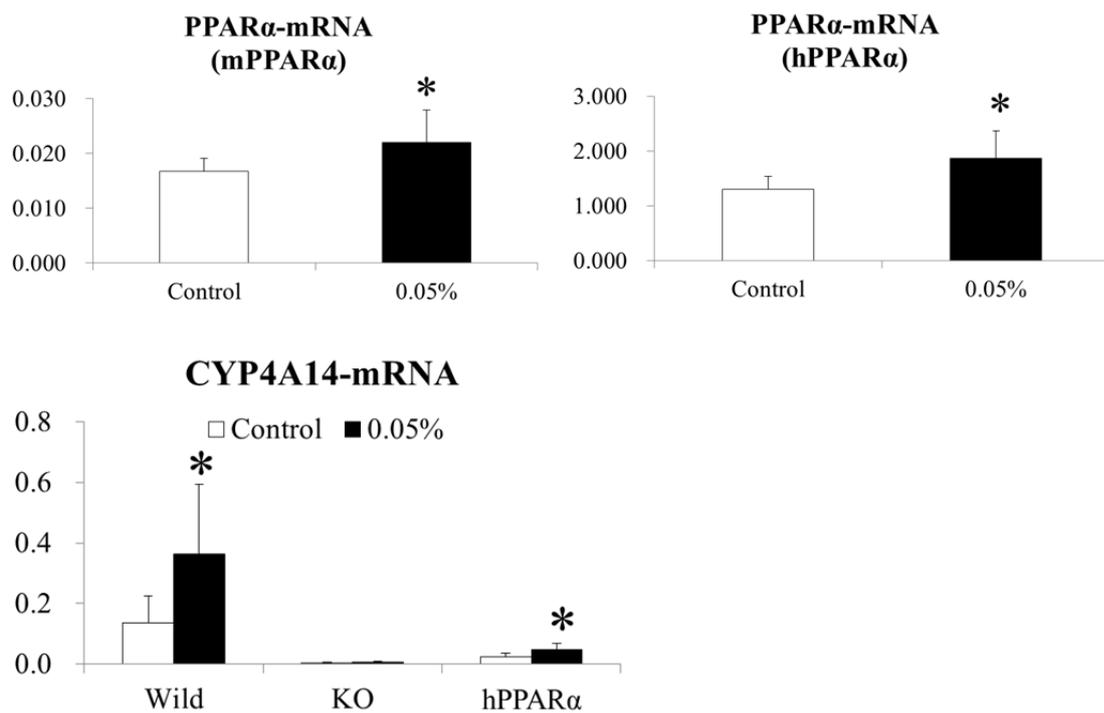


図 23 PPAR α および CYP4A14 遺伝子発現量
*同遺伝子型 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

○胎生期曝露による影響の検討

胎生期曝露による影響を明らかにするために、授乳期のみ曝露した仔マウスについても測定したところ、この群においても PPAR α およびその標的遺伝子発現量は上昇していた (図 24)。その結果から、授乳期のみの DEHP 曝露も PPAR α を転写活性化させることが明らかとなった。

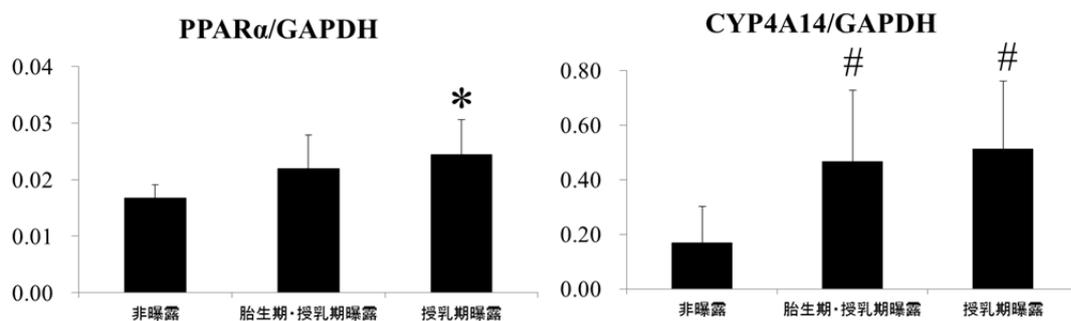


図 24 野生型 PPAR α および CYP4A14 遺伝子発現量
*非曝露群に比べ有意差あり (p<0.05)

○胎生期 DEHP 曝露と生活習慣病の関連性の検討

血漿中 TG は DEHP 曝露や高脂肪食摂取による影響は見られなかった (図 25)。一方、

肝臓中濃度は普通食群の KO マウスにおいて DEHP 曝露により上昇し、高脂肪食摂取はすべての遺伝子型マウスにおいて普通食群より濃度が高かった。コレステロール濃度はすべての遺伝子型マウスにおいて血漿中および肝臓中濃度が高脂肪食摂取で高くなっており、DEHP 曝露によって高脂肪食ヒト型 PPAR α マウスの肝臓中濃度が上昇していた。

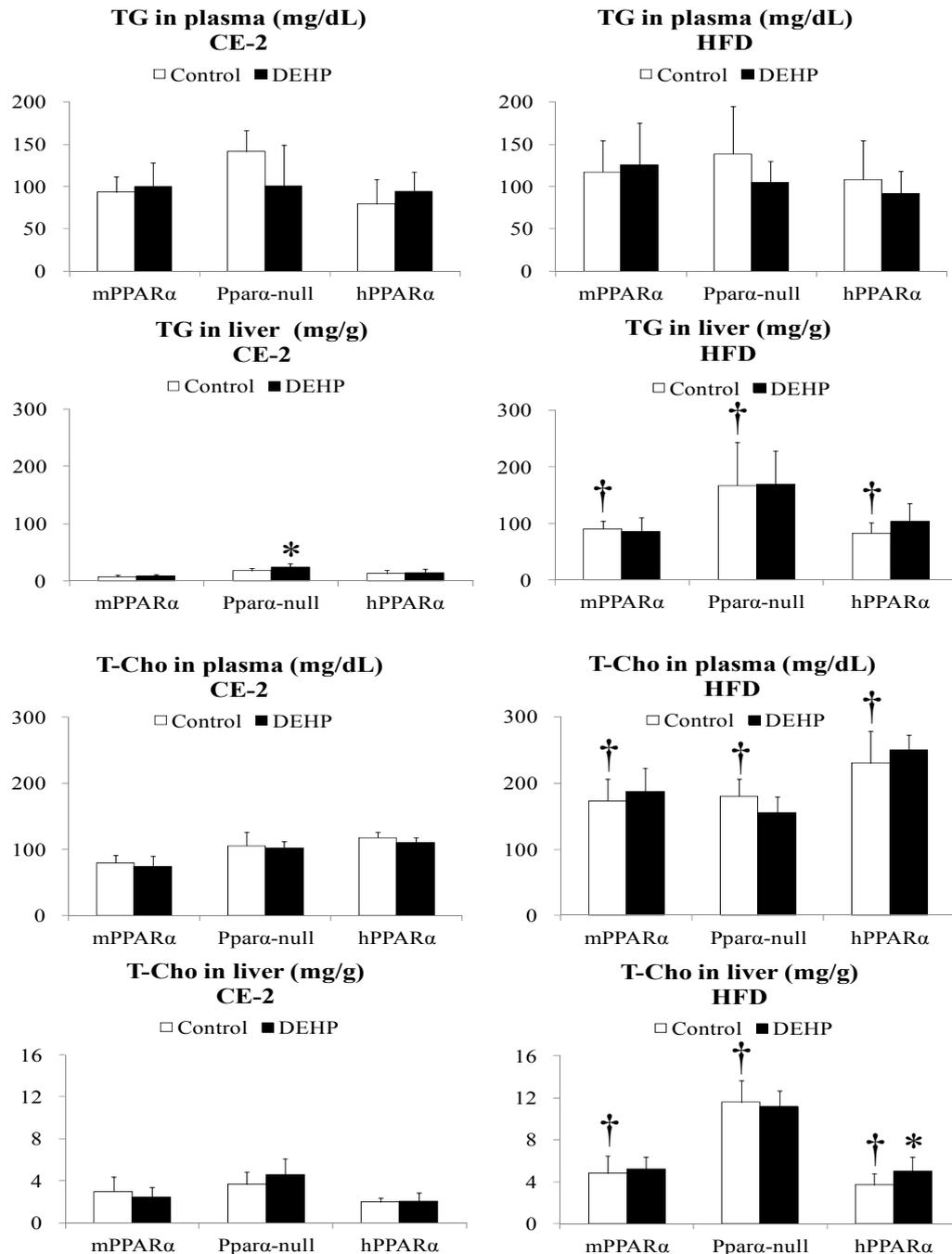


図 25 肝臓および血漿中脂質濃度

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり ($p < 0.05$)

†同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり ($p < 0.05$)

○脂質代謝・合成に関わる遺伝子発現量測定

普通食群に関してはDEHP曝露によってSREBP1、DGAT1、FAS、PPAR α 発現量に有意な差は見られなかったが、野生型マウスのDGAT2発現量はDEHP曝露で上昇した(図26)。高脂肪食群ではKOマウスのSREBP1-mRNAがDEHP曝露で減少したが、他の遺伝子には変化が見られなかった。一方、普通食群に比べ高脂肪食群で野生型のSREBP1、DGAT1発現量が減少し、すべての遺伝子型のDGAT2、FAS、野生型およびヒト型PPAR α マウスのPPAR α 発現量が上昇した。

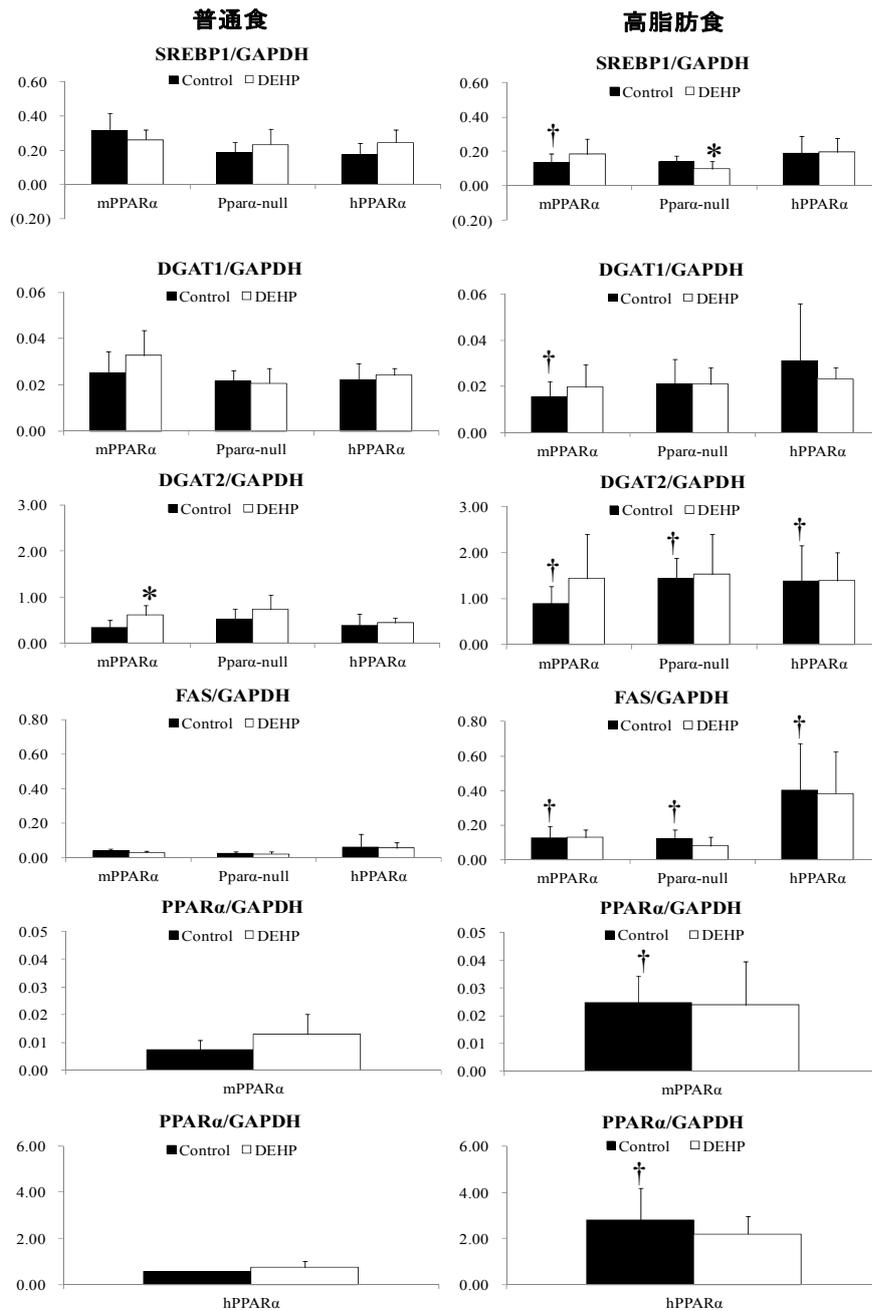


図 26 成熟期 mRNA 発現量

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり (p < 0.05)

† 同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

○成熟期マウスの肝臓の病理評価

DEHP 曝露による影響が見られたのは肝臓中 TG 濃度に変化が見られた普通食群の KO マウスで、脂肪の沈着が有意に増加していたが壊死や炎症細胞浸潤に関しては DEHP 曝露による影響はみられなかった (図 27)。高脂肪食摂取により野生型およびヒト型 PPAR α マウスの Control 群で脂肪滴が多く見られ、ヒト型 PPAR α マウスでは壊死の増加が認められた。

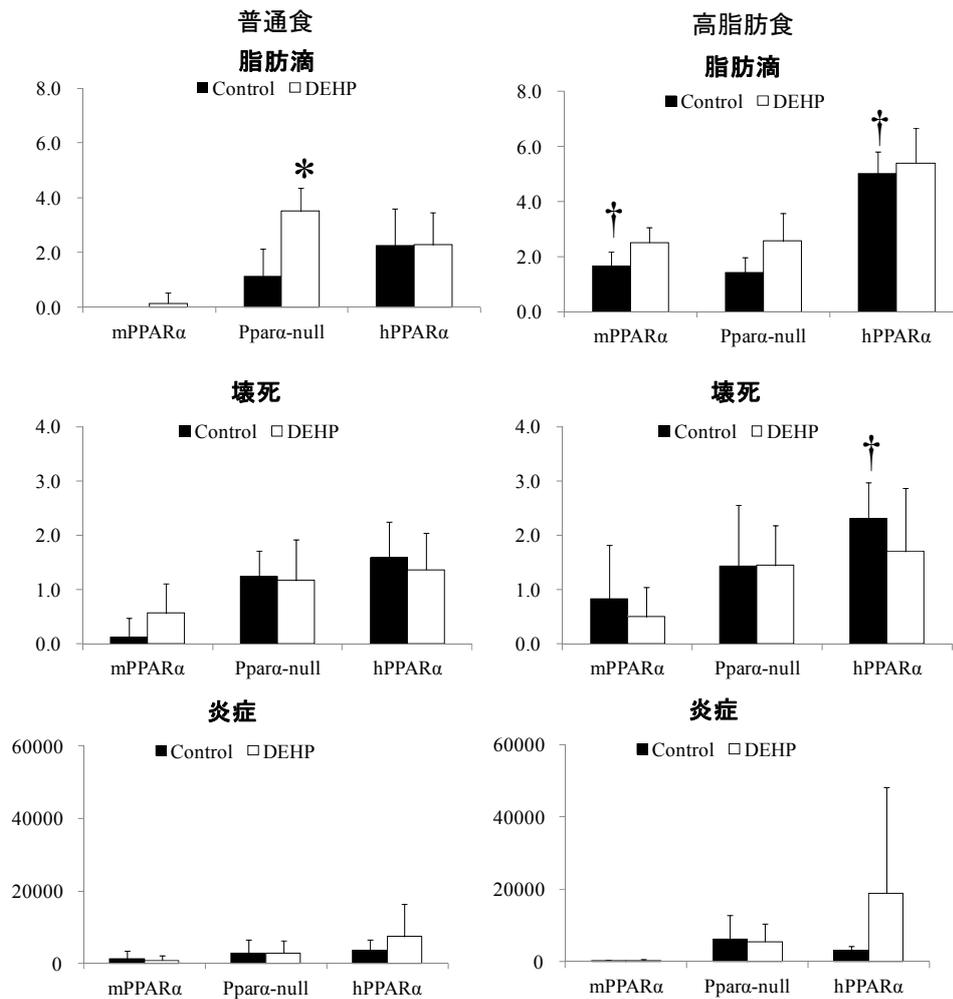


図 27 肝臓病理スコア

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

† 同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

4) 個別題目名：脳への影響：摂食行動 (視床下部・下垂体)

(研究担当者名：上島通浩 所属機関名 名古屋市立大学)

DEHP 曝露および高脂肪食摂取による影響を次に示す (図 28, 29)。

DEHP 曝露による影響 (Control 群と DEHP 曝露群の比較)

【普通食群】

DEHP 曝露は成熟期の体重に影響を与えなかった。

摂餌量に関しては、野生型マウスでは6-8週齢で、ヒト型 PPAR α マウスでは5, 6, 9, 11 週齢の DEHP 曝露群で摂餌量が多かった (図 28)。また、離乳後から成熟期までの1日当たりの平均摂取カロリーも野生型およびヒト型 PPAR α マウスの DEHP 曝露群で多くなっていた (表 9)。

【高脂肪食群】

DHEP 曝露は成熟期の体重に影響を与えなかった。

摂餌量は野生型マウスの7週齢目の DEHP 曝露群が Control 群に比べ多くなっていたが、離乳期から成熟期までの一日当たりの平均摂取カロリーはすべての遺伝子型で有意な差は認められなかった。

高脂肪食群による影響 (普通食 Control 群と高脂肪食 Control 群の比較)

成熟期の体重に有意な差は見られなかった。

離乳期から成熟期までの一日当たりの摂餌量は普通食群では一日当たり 3.0-3.3g であるのに対し、高脂肪食群は 2.0-2.3g と少なかったが、平均摂取カロリーは普通食群が 10.4-11.2kcal であり、高脂肪食群では 10.0-11.8kcal と同程度となった (表 9)。

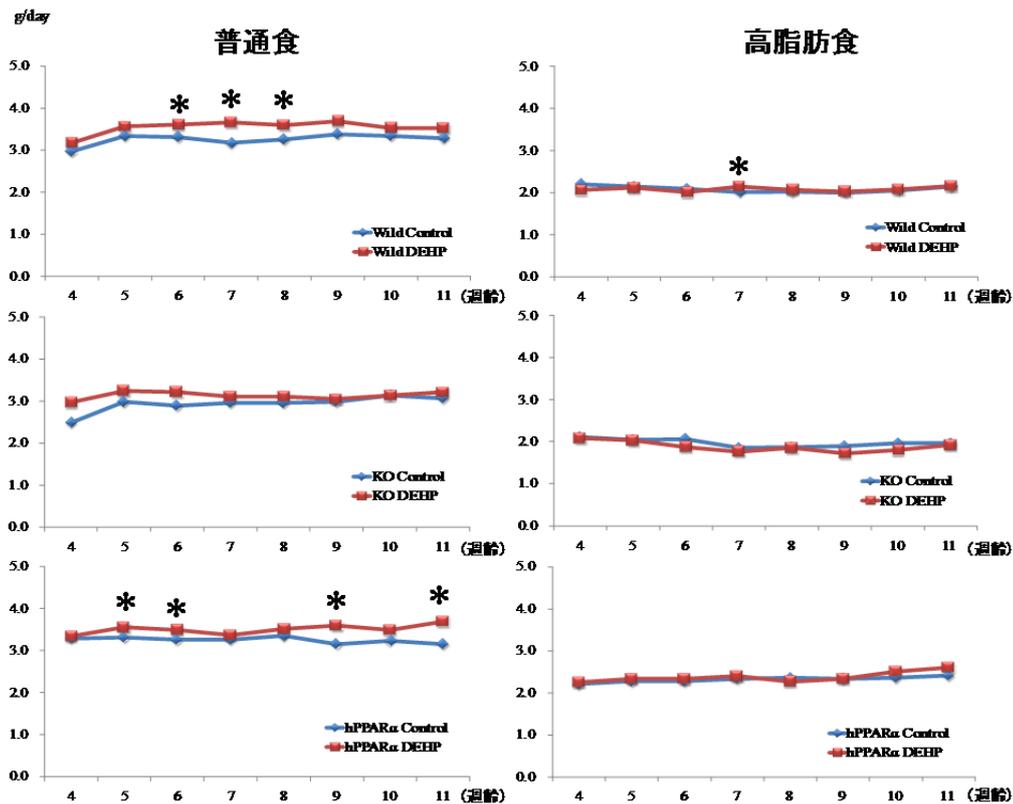


図 28 一日当たりの雄の摂餌量 (週齢別)

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり p < 0.05

			普通食	高脂肪食
摂餌量(g/day)	Wild	Control	3.3 ± 0.3	2.1 ± 0.1 [†]
		DEHP	3.5 ± 0.3*	2.1 ± 0.1
	KO	Control	3.0 ± 0.3	2.0 ± 0.1 [†]
		DEHP	3.1 ± 0.3	1.8 ± 0.2
	hPPAR α	Control	3.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1 [†]
		DEHP	3.5 ± 0.2*	2.4 ± 0.2
摂取カロリー(kcal/day)	Wild	Control	11.2 ± 0.9	10.6 ± 0.6
		DEHP	12.1 ± 0.9*	10.6 ± 0.8
	KO	Control	10.4 ± 1.0	10.0 ± 0.6
		DEHP	10.7 ± 0.9	9.2 ± 0.8
	hPPAR α	Control	11.2 ± 0.6	11.8 ± 0.6
		DEHP	12.1 ± 0.6*	12.1 ± 1.1

表9 4週齢から11週齢までの平均摂餌量および摂取カロリー

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

†同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

また、雌に関しては、体重に有意な変化は見られず、摂餌量は、普通食ヒト型 PPAR α マウスの DEHP 曝露群で増加したが、野生型での影響は見られなかった (図 29)。雄に比べ雌での影響は小さかったため、雄に焦点を絞り解析を行った。

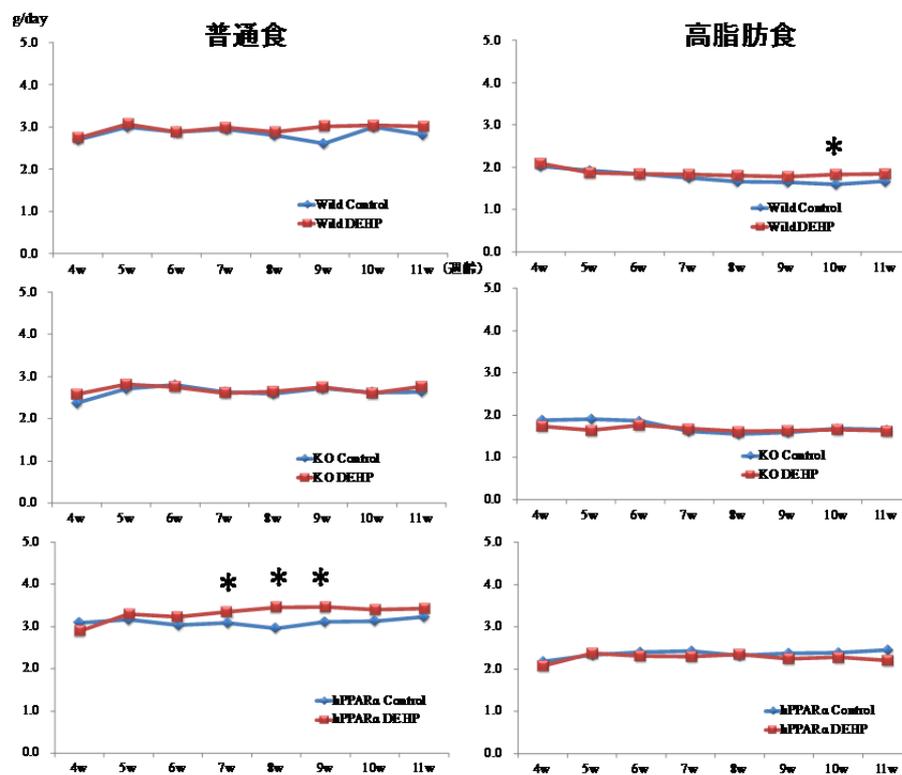


図 29 一日当たりの雌の摂餌量 (週齢別)

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり p<0.05

○血中レプチン濃度、視床下部の NPY および POMC-mRNA 発現量の測定

胎生期 DEHP 曝露は野生型マウスおよびヒト型 PPAR α マウスの摂餌量を増加させることが分かった。そこで、摂食行動に関与する因子として血中レプチン濃度、視床下部の NPY および POMC-mRNA 発現量を測定した (図 30, 31)。

DEHP 曝露による影響 (Control 群と DEHP 曝露群の比較)

【普通食群】

成熟期マウスではレプチン濃度に影響は見られなかった。

視床下部の NPY-mRNA は hPPAR α マウスで DEHP 曝露により減少が見られたが、POMC はすべての遺伝子型で影響を受けなかった。

【高脂肪食群】

成熟期 KO マウスで DEHP 曝露によりレプチンの減少が見られたが、この群では摂食行動に変化は見られていなかった。

NPY および POMC-mRNA に影響は見られなかった。

高脂肪食群による影響 (普通食 Control 群と高脂肪食 Control 群の比較)

高脂肪食摂取はすべての遺伝子型マウスにおいて血漿中レプチン濃度を上昇させ、NPY-mRNA 発現量を減少させた。POMC 発現量に変化は見られなかった。

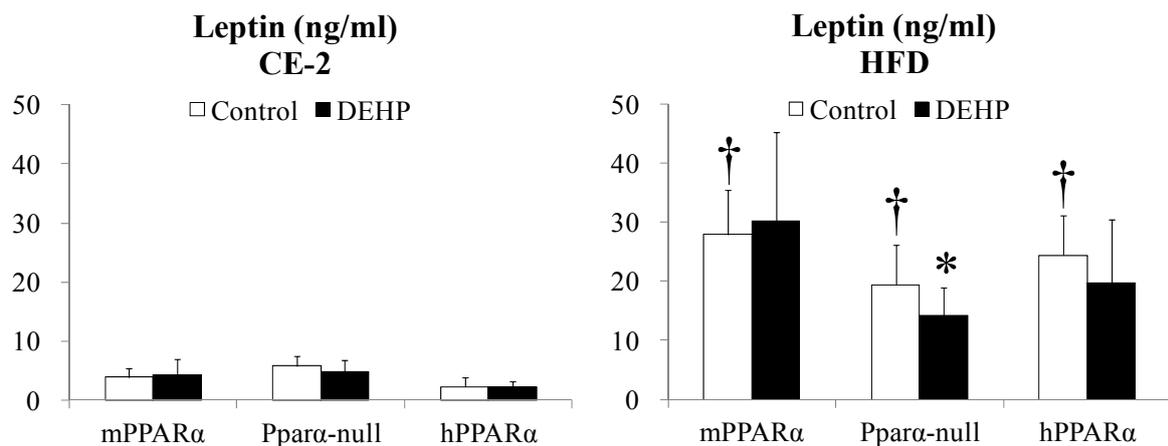


図 30 成熟期血漿中レプチン濃度

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり ($p < 0.05$)

†同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり ($p < 0.05$)

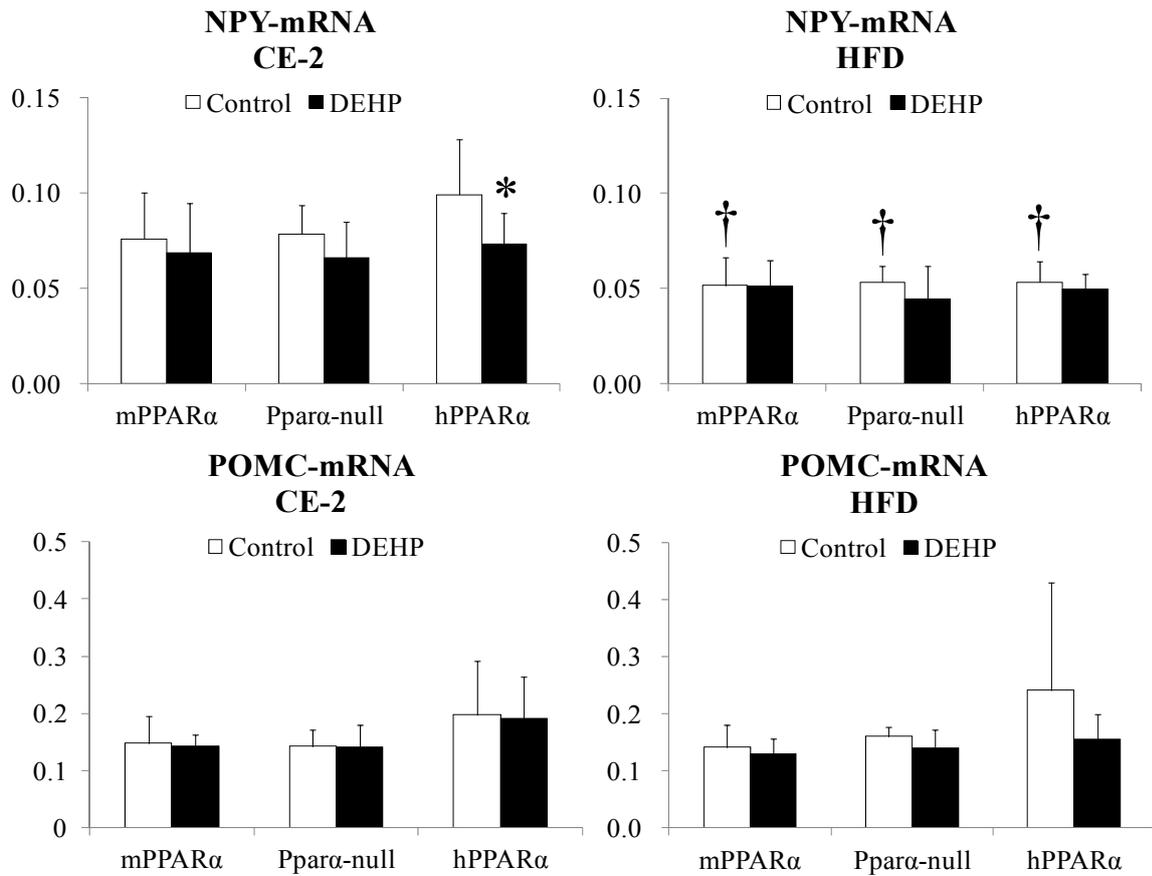


図 31 視床下部 NPY-, POMC-mRNA 発現量

*同遺伝子型・同飼料摂取 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

†同遺伝子型・普通食群 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

○離乳期における血漿中レプチン濃度を測定

成熟期のレプチン濃度に変化がみられなかったが離乳期から成熟期に摂餌量に影響がみられたため、離乳期における血漿中レプチン濃度を測定した (図 32)。その結果、DEHP 曝露は野生型マウスのレプチン濃度を有意に減少させた。また、授乳期のみ曝露した野生型マウスでは、レプチンの減少は見られなかった (図 33)。

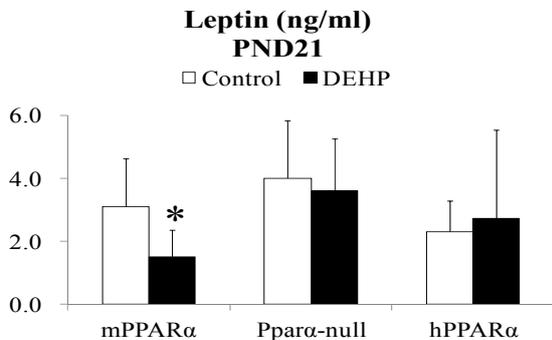


図 32 離乳期血漿中レプチン濃度

*同遺伝子型 Control 群に比べ有意差あり (p<0.05)

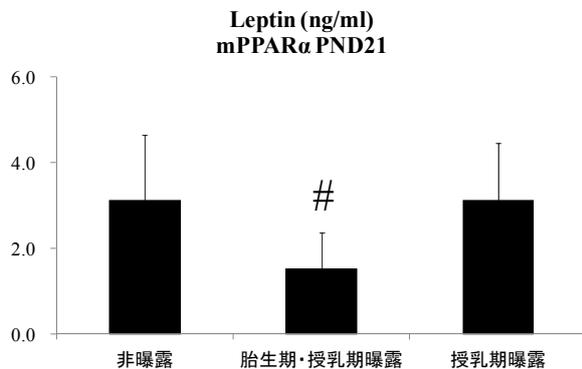


図 33 離乳期血漿中レプチン濃度 (野生型)

#他の群との間に有意差あり (p<0.05)

生活習慣病の要因として近年注目されている胎生期低栄養は、母親の飢餓や摂食制限によるものが報告されている。しかし、この研究から DEHP という化学物質曝露によっても生活習慣病に関わる摂食行動に影響を与える可能性が考えられた。胎生期 DEHP 曝露は野生型およびヒト型 PPAR α の摂餌量が増えたことから、PPAR α が関与していると思われる。一方で、野生型とヒト型 PPAR α マウスの摂餌量に変化が見られた時期が異なること、レプチンや NPY への影響の出方に違いがあることからマウス型とヒト型の PPAR α には種差があるのかもしれない。

摂食行動はレプチンや NPY、POMC などによって制御されている。成熟期マウスでは摂餌量に変化のあった野生型およびヒト型 PPAR α マウスのレプチンに変化は見られなかったが、離乳期の野生型マウスでは有意な減少が見られた。一方で、授乳期のみ曝露したマウスや成熟期からの DEHP 曝露マウス (未発表データ) ではレプチンに変化が見られなかったことから、胎生期の DEHP 曝露がこのレプチン減少に関与していることが考えられる。高脂肪食摂取は血漿中レプチン濃度を上昇させ、NPY-mRNA 発現量を減少させた。普通食群に比べ高脂肪食群の摂餌量が少なかった理由として、これらの因子が摂食行動を調節していたのかもしれない。また、普通食群の NPY 発現量がヒト型 PPAR α マウスの DEHP 曝露群で減少していた。この群では解剖直前まで摂餌量の増加が見られていたことから、摂餌量増加を調節するために NPY 発現量の減少が見られていたのかもしれない。一方、野生型マウスでは、6-8 週齢で摂餌量の増加が見られていたが、それ以降の摂餌量に有意な差は見られていなかったため、NPY は変化しなかったのかもしれない。今回のサンプリングは 11 週齢の 1 回のみであり、サンプリングの時期によっては野生型においても NPY 発現量に変化が見られる可能性はあると思われる。

DEHP は PPAR α のリガンドであり、DEHP 曝露は PPAR α の標的遺伝子の発現量を上昇させた。DEHP およびその代謝物である MEHP は胎盤や母乳を介して仔へ移行する。一方、胎生期低栄養環境下で育った仔は PPAR α プロモーター領域の低メチル化により、PPAR α の発現量の上昇が見られることが報告されている (Lillycrop, 2005)。すなわち、胎生期 DEHP 曝露では、低栄養環境下による PPAR α 発現量の上昇と、PPAR α のリガンド曝露による PPAR α 発現量の上昇の 2 つが考えられる。実際、胎生期・授乳期曝露群だけではなく、授乳期曝露群でも PPAR α およびその標的遺伝子の発現量は上昇していた。そこで、PPAR α のプロモーター領域のメチル化を測

定した (図 34)。メチル化は DEHP 曝露濃度や曝露時期による影響は認められなかった。今後、切断されるサイトが異なる AciI (切断箇所 14 箇所) を用いてメチル化を測定し、メチル化と PPAR α 発現量の関係について検討する。

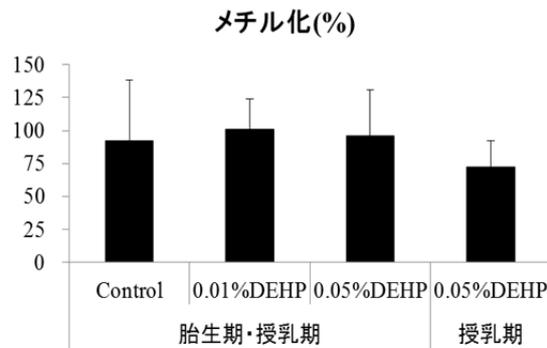


図 34 生後 21 日目野生型マウス PPAR α プロモーター領域のメチル化

肝臓中 TG は、KO マウスの DEHP 曝露群で上昇が見られた。また、この群では病理所見においても脂肪の蓄積が観察されていた。そこで、脂質の合成・代謝に関わる因子の mRNA 測定を行ったところ、この群では変化が見られなかった。普通食群野生型マウスでは DEHP 曝露により DGAT2 の上昇がみられたが、脂質濃度に影響は見られていなかった。胎生期 DEHP 曝露による普通食 KO マウスの肝臓中脂質濃度および脂質の沈着には脂質合成・代謝に関わる遺伝子発現量は関与していないのかもしれない、このメカニズムは明らかにできなかった。

5) 個別題目名：脳への影響：学習・行動 (海馬)

(研究担当者名：那須民江、所属機関名：名古屋大学)

海馬における学習・行動機能に関わる遺伝子の発現量測定の結果は図 34 のようになった。ヒト型マウスの Grin2A のみで胎仔期-授乳期 DEHP 曝露による上昇が見られたが、残りの項目では DEHP 曝露による影響は見られず、むしろ高脂肪食摂取による影響が大きいことが明らかとなった。

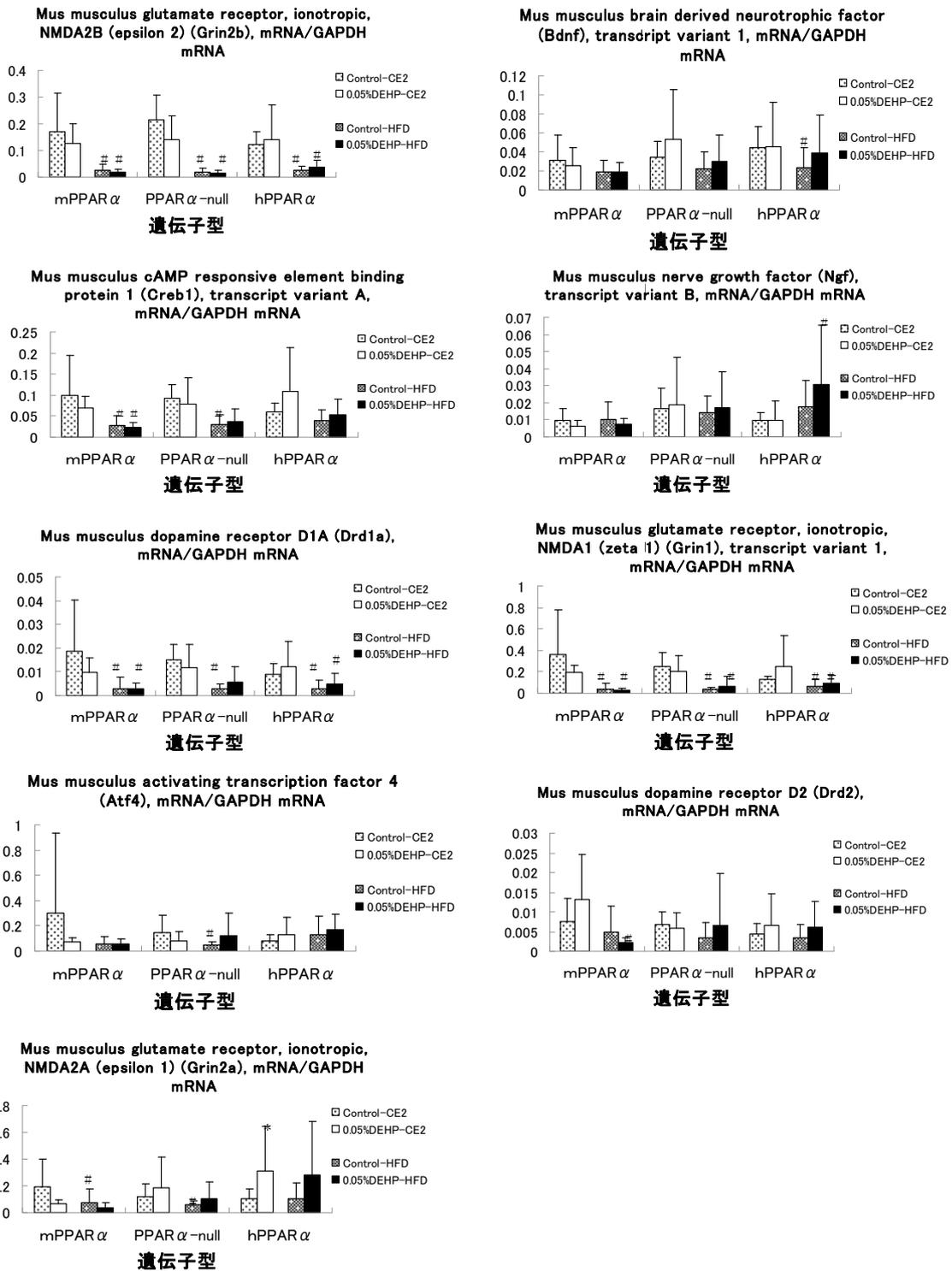


図 35 11 週齢成熟期海馬学習・行動機能 mRNA 発現量

: 同遺伝子型同曝露量 CE-2 摂取群と比較して有意差あり (t 検定 $p < 0.05$)

* : 同遺伝子型同餌摂取 Control 群と比較して有意差あり (t 検定 $p < 0.05$)

NR2B は幼少期に多く発現しており、この時期の記憶力の高さは NR2B 発現が関与していると考えられている。また、記憶・学習に関わる長期増強 (LTP) には NR2A ではなく NR2B が重要な役

割を果たしており、NR2A と NR2B のバランスが重要であると考えられている。そこで、NR2B と NR2A の発現量の比を取り、比較した(図 36)。

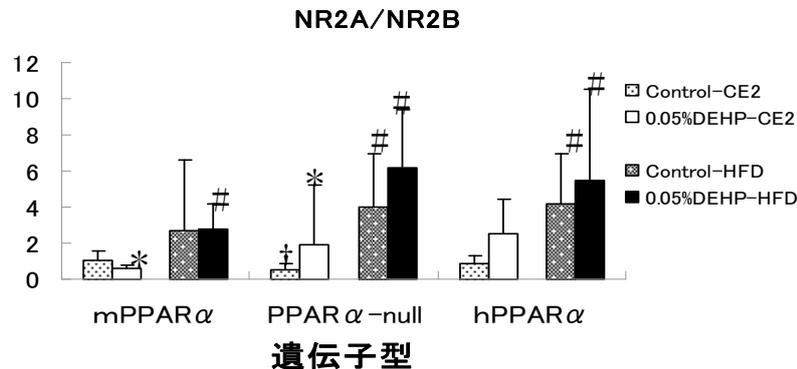


図 36 NR2A/NR2B 比

* : 同遺伝子型・同餌摂取 control 群と比較して有意差有り (t 検定 $p < 0.05$)

: 同遺伝子型・同曝露量 CE-2 摂取群と比較して有意差有り (t 検定 $p < 0.05$)

† : CE-2 摂取 control 群系統間比較 wild に比べて有意差有り (tukey 検定 $p < 0.05$)

結果は、高脂肪食摂取で NR2A/NR2B が上昇し、野生型普通食群において DEHP 曝露による減少が見られた。NR2B が LTP に重要な役割があるとする、高脂肪食摂取は記憶・学習能力の低下を引き起こす可能性が考えられる。一方で、動物実験において、パーキンソン病は NR2A/NR2B が低下すると報告されており、また、NR2A が LTP に重要であるとする論文もある。すなわち、個々の濃度だけではなく、NR2A と NR2B のバランスが崩れることが記憶・学習に影響を与える可能性がある。したがって、野生型普通食群の NR2A/NR2B の減少も記憶・学習に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

以上のことをまとめると、脳海馬のグルタミン酸受容体関連の遺伝子発現には胎仔期-授乳期 DEHP 曝露の影響はなく、高脂肪食の影響が大きいと言える。

次に、神経伝達物質であるグルタミン酸と γ -アミノ酪酸(GABA)、またこれらに関連する遺伝子発現量について解析を行った。グルタミン酸と GABA は、中枢神経系の主要な神経伝達物質であり、興奮と抑制のバランスの主役である。GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (Glutamic Acid Decarboxylase, GAD) には、分子量が 67kDa (GAD1) と 65kDa (GAD2) の 2 種類がある。また、GABA は GABA 受容体を介して情報伝達が行われることから、GABA 受容体の解析を行った。特に中枢神経系に広く存在する GABAA 受容体は α 、 β 、 γ または δ といったサブユニットが 4 ~ 5 個集合して形成されている。これらのサブユニットのうち、 α (GABARA) の局在に注目し、解析を行った。すなわち、GABARA には、1~6 までのサブユニットが存在し、1~3 はシナプス領域 GABA 受容体であるのに対し、4~6 はシナプス領域外 GABA 受容体であり、A4 は視床に、A5 は海馬に、A6 は小脳に多く発現していることが報告されている。そこで、海馬のグルタミン酸と GABA 濃度、また GAD1、GAD2 及び GABARA1~6 の遺伝子発現量を測定し、DEHP 曝露や HFD によりどのように GABA の情報伝達が行われているかを解析した (図 37)。なお、 α 4 は検出限界以下であった。DEH 曝露による影響は、野生型普通食 GAD1、ノックアウト普通食

およびヒト型高脂肪食の GABRA6 で見られた。一方、高脂肪食摂取による影響は GAD1、2、GABRA1、2、5、6 で見られており、グルタミン酸受容体関連遺伝子と同様、高脂肪食による影響の方が大きいと考えられる。野生型に関しては、グルタミン酸および GABA 濃度に有意な差は見られず、また DEHP 曝露による受容体への影響も見られなかった。

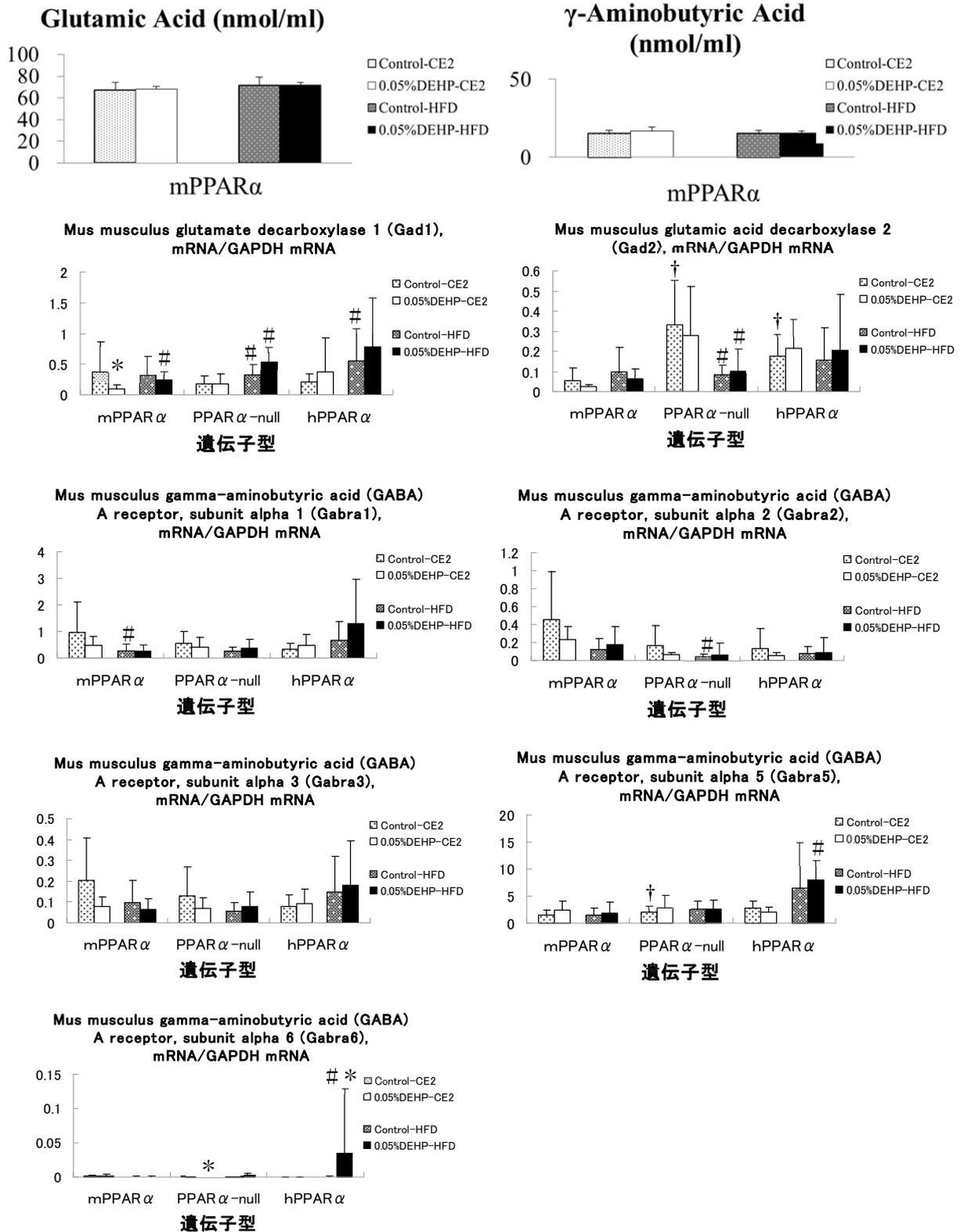


図 37 11 週齢成熟期海馬 GABA のシグナル伝達系 mRNA 発現量

: 同遺伝子型同曝露量 CE-2 摂取群と比較して有意差あり (t 検定 $p < 0.05$)

* : 同遺伝子型同餌摂取 Control 群と比較して有意差あり (t 検定 $p < 0.05$)

† : 同曝露量同餌摂取系統間比較 mPPAR α 群と比較して有意差あり (tukey 検定 $p < 0.05$)

6) 個別題目名 : DEHP 曝露の親世代への影響

(研究担当者名 : 那須民江 所属機関名 名古屋大学)

○精巣重量の比較、テストステロン濃度の測定

DEHP 0.1%曝露はヒト型 PPAR α マウスの精巣重量を有意に減少させたが、野生型および遺伝子型 PPAR α ノックアウトマウスにおいてはどの臓器重量にも影響は与えなかった。次に、血漿と精巣に含まれるテストステロン濃度を測定した (図 12)。各遺伝子型のコントロール群のテストステロン濃度を比較すると、ヒト型 PPAR α マウスの精巣中テストステロン濃度は、野生型と比べ減少傾向を示したが、有意差は認められなかった。DEHP は、野生型マウスの精巣中テストステロン濃度を曝露量依存的に上昇させた。PPAR α ノックアウトマウスでは増加傾向であったが、有意差は見られなかった。一方 0.05%の DEHP は PPAR α ノックアウトマウスの血漿中濃度を有意に上昇させた。総合すると、DEHP 曝露の血漿テストステロンレベルへの影響には PPAR α の発現は関連しないかもしれない。また、精子運動率も曝露および種間による影響は認められなかった。

○精巣のステロイド合成系遺伝子の発現を定量リアルタイム PCR

野生型、ヒト型 PPAR α マウスでは、DEHP 曝露はコレステロール合成酵素 HMG-CoA reductase、コレステロール輸送酵素 StAR、側鎖切断酵素 P450scc、ホルモン合成酵素 CYP17 α 、3 β -HSD、17 β -HSD、aromatase の発現量に影響を与えなかった (図 13)。しかし、PPAR α ノックアウト型において、DEHP 0.1%曝露は StAR、CYP17 α を有意に上昇させた。これらの発現量は各遺伝子型間で差はなかった。

○精巣病理評価

各遺伝子型コントロール群で比較すると、ヒト型 PPAR α マウスでは、精細管の精母細胞に多くの空胞が観察された。また、萎縮した精巣や異常形態を持つ精細管がある精巣も観察された。しかし、DEHP 曝露による影響は見られなかった (表 10)。

表 10 野生型、KO、ヒト型 PPAR α 親マウスの精巣病理学的所見

		n	空胞			剥離
			Sertoli	精母	大空胞	
野生型	control	6	0.00	0.00	0.00	0.17
	0.01%	6	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.05%	6	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.1%	6	0.00	0.17	0.00	0.33
KO	control	5	0.00	0.20	0.00	0.00
	0.01%	5	0.00	0.00	0.25	0.25
	0.05%	5	0.00	0.00	0.00	0.40
	0.1%	4	0.00	0.00	0.00	0.00
ヒト型	control	10	0.10	0.30	0.40	0.10
	0.01%	10	0.00	0.22	0.22	0.11
	0.05%	10	0.00	0.25	0.00	0.00
	0.1%	9	0.14	0.86	0.29	0.00

細管全体あたりの空胞数ならびに剥離細胞が見られた精細管数の平均値を示す

○臓器重量の比較

DEHP 0.1%曝露は野生型マウスの妊娠期、出産後の体重を有意に減少させ、また妊娠期の相対肝重量を増加させた。

○卵巣プロゲステロン・エストラジオール濃度測定

DEHP 曝露は、野生型、ヒト型 PPAR α マウスともにエストラジオール濃度を減少させ、プロゲステロン濃度を上昇させる傾向があった。0.1%DEHP 曝露野生型マウスのプロゲステロン/エストラジオール比を有意に上昇させた。各遺伝子型コントロール群のホルモン濃度に差はなかった (図 38)。

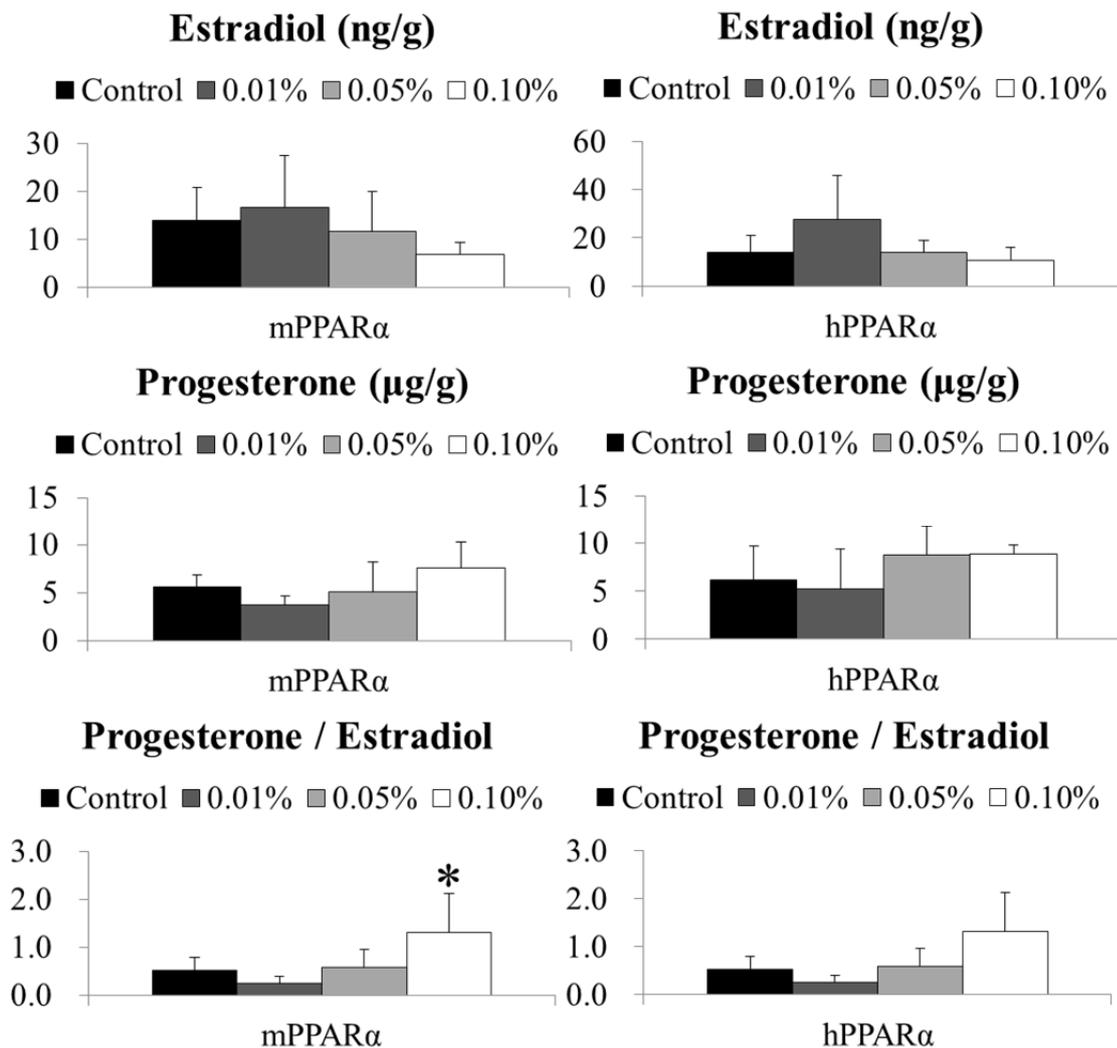


図 38 卵巣プロゲステロン・エストラジオール濃度測定
*同遺伝子型コントロール群と比べて有意差あり

○卵巣ステロイド合成系遺伝子発現量測定

野生型、PPAR α ノックアウト、ヒト型 PPAR α マウスのコントロール群間で 7 種類のステロイド合成に関わる遺伝子発現を比較したが、有意な差はなかった。DEHP 0.1% 曝露は野生型マウスの 3 β -HSD を有意に減少させ、ヒト型 PPAR α マウスの P450scc、3 β -HSD の発現を有意に上昇させた (図 39) が、他のステロイド合成酵素系の発現には影響を与えなかった。

PPAR α ノックアウトマウスにおいて DEHP はこれらの発現量に影響を及ぼさなかった。

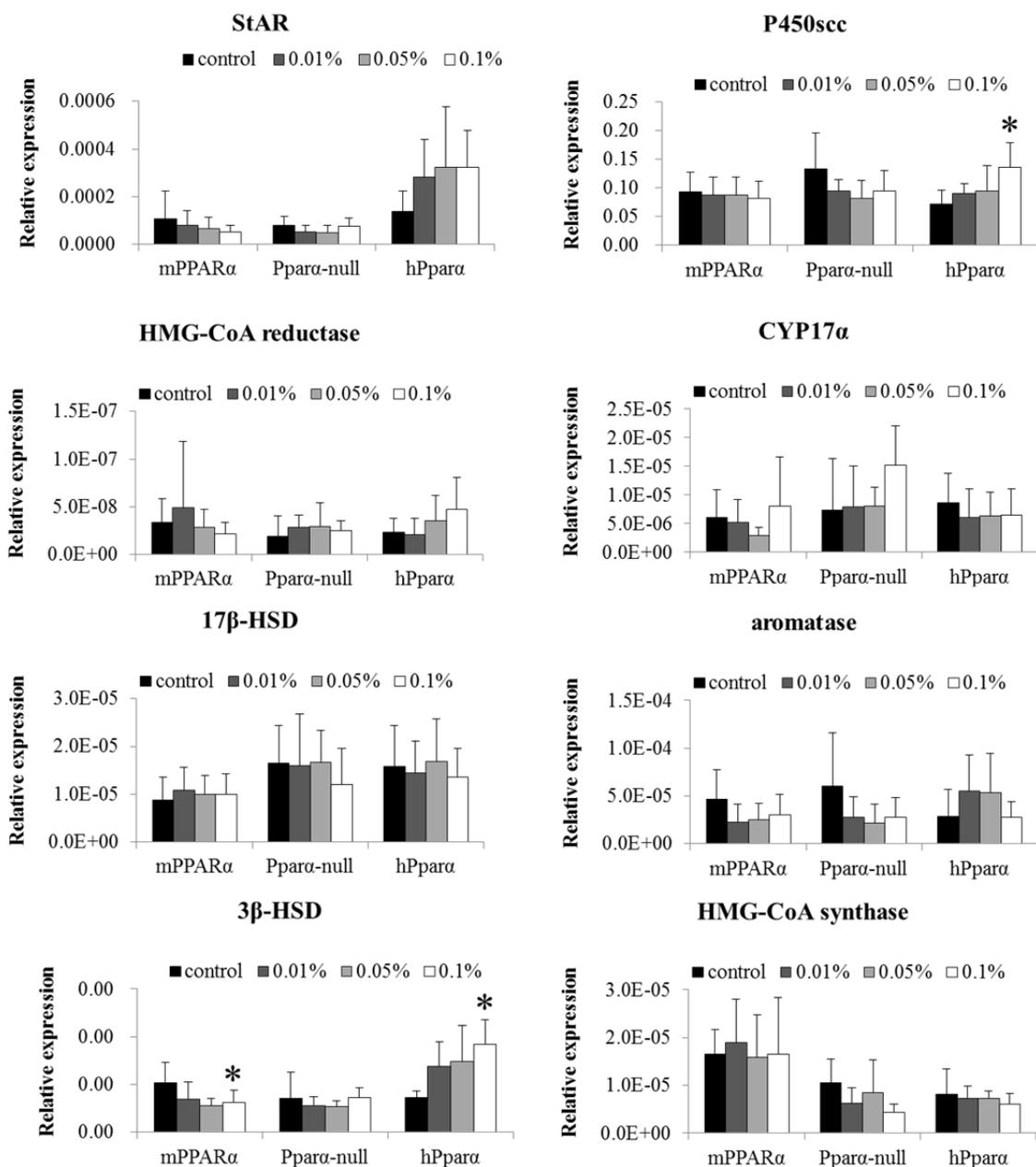


図 39 卵巣ステロイド合成系遺伝子発現量測定
*同遺伝子型コントロール群と比べて有意差あり

妊娠マウスに DEHP を曝露したところ胚吸収の増加や胎仔及び新生仔生存数の減少が PPAR α に関連して観察された。この原因を明らかにするために、親の血漿中 TG や脂肪酸濃度およびそのメカニズム、生殖器への影響を検討した。DEHP 曝露は血漿 TG や検討した多くの脂肪酸濃度を減少させ、これが DEHP の発達毒性の一因であると考えられた。この現象が野生型マウスのみで観察されたこと、また、DEHP 曝露により脂肪酸の β 酸化が亢進し、microsomal triglyceride transfer protein (MTP) 発現が抑制していたことから、DEHP が脂肪酸の代謝や輸送に影響を与えていることが推察された。雄マウスにおいて、DEHP は、野生型、PPAR α ノックアウトマウス

でテストステロンを上昇させたが、形態学的な変化を引き起こさなかったため、今回観察された DEHP の発達毒性への雄の関与は少ないと考えられた。一方、0.1%DEHP 曝露は野生型雌マウス卵巣のプロゲステロン/エストラジオールを有意に上昇させ、ヒト型 PPAR α マウス卵巣においては上昇傾向を示した。このホルモン変化は DEHP の発達毒性に影響を与えているかもしれず、今後さらに検討をする必要がある。

(2) 研究題目名：DEHP 代謝の種間差と PPAR α の役割

(研究担当者名：上島通浩 所属機関名 名古屋市立大学)

1) マウス、ヒト肝の DEHP 代謝酵素の種間差・体内動態における PPAR α の役割および種間差

○リパーゼ活性

マウスのリパーゼ活性は平均 6.22 nmol/mg protein/min であったが、ヒトでは平均 1.22 nmol/mg protein/min とマウスに比べて低かった (表 11)。ヒトの肝臓ミクロソームのリパーゼ活性は 0.36~3.49 nmol/mg protein/min (中央値 1.12) であった。個人差が非常に大きく、10 倍近くの差が見られた。年齢、性別、人種による影響は見られなかった。飲酒歴、喫煙歴、麻薬使用歴の有無のリパーゼ活性への影響は観察されなかった。

基質である DEHP の濃度を変えてラインウィーバー・バークプロットを描いた (図 40)。このグラフから Km 値、Vmax を求めた結果、マウスに比べ、ヒトでは Vmax は小さく、Km 値が大きいことから、最大速度は小さく、DEHP のリパーゼに対する親和性が低いことが分かる。Vmax/Km を比較すると、野生型マウスのリパーゼ活性はヒトの約 6.7 倍であった (表 12)。hPPAR α マウスの方が若干他の遺伝子型マウスに比べて低い傾向にあった。この理由は不明である。

各遺伝子型マウスのコントロール群のリパーゼ活性は野生型マウスが他の遺伝子型マウスに比べて高かった (図 41)。また、野生型マウスでは DEHP 投与によりリパーゼ活性は減少する傾向が見られたのに対し、KO、hPPAR α マウスではむしろ増加する傾向が見られた (遺伝子型と DEHP 曝露の交互作用あり)。

○UGT 活性

UGT 活性はマウスで 121.9 nmol/mg protein/min、ヒトが 22.2 nmol/mg protein/min であった (表 11)。ヒトの個人差は非常に大きく、高いものが 58.94 nmol/mg protein/min、低いものが 3.38 nmol/mg protein/min であった。年齢、性別、人種による影響は見られなかった。ヒトの UGT 活性はリパーゼ活性(rs = 0.33)と正の相関がみられた。

○ADH 活性

2-EH に対する ADH 活性は、マウスで 4.22 nmol/mg protein/min、ヒトで 8.61 nmol/mg protein/min と、測定した酵素の中で唯一ヒトの方が高かった (表 11)。しかしながら、個人差が約 10 倍あり (最高値: 15.50 nmol/mg protein/min, 最低値: 1.50 nmol/mg

protein/min)、マウスと同程度のヒトもいた。アルコール乱用者の2名は他のヒトに比べて活性が有意に低かった。性別、人種の影響は見られなかったが、60歳以上と未滿を比較すると、前者で有意に活性が高かった。ヒトの ADH 活性はリパーゼ ($r_s = 0.36$) や UGT ($r_s = 0.40$) 活性と正の相関がみられた。

○ALDH 活性

2-ethylhexanal に対する ALDH 活性は、マウスで 5.61 nmol/mg protein/min、ヒトで 3.63 nmol/mg protein/min とマウスの方がヒトより高かった(表 11)。しかしながら、個人差が約 28 倍あり(最高値: 10.50 nmol/mg protein/min, 最低値: 0.38 nmol/mg protein/min)あり、マウスと同程度のヒトもいた。40 歳代の白人男女で比較をすると、女性の方が男性に比べて有意に高かった。そのほかの因子は活性に影響を与えなかった。ALDH 活性は他の酵素活性や MEHP 濃度との間に有意な相関は見られなかったが、リパーゼとの間に正の相関傾向が見られた。

○尿中代謝物

コントロールのマウスの 24 時間畜尿中の DEHP 代謝物総和は、米国 6 歳以上の一般住民 (CDC, 2012) に比べて 37 倍高かった(表 13)。尿中 MEHP 濃度はマウスの方が幾何平均で 20 倍、中央値で 77 倍高かったが、5oxo-MEHP や 5cx-MEPP はヒトの方がマウスに比べて幾何平均でそれぞれ 2 又は 7 倍、中央値で 6 又は 7 倍高かった。

○DEHP 曝露マウスの血漿中、肝臓中 MEHP 測定

どの遺伝子型においても、DEHP の投与により、濃度依存的に肝臓中ならびに血漿中 MEHP 濃度が上昇した (図 42)。肝臓中 MEHP 濃度は、0.01, 0.05, 0.1%DEHP 投与の KO マウスは同用量投与の hPPAR α マウスに比べて有意に低かった。同様に、血漿中 MEHP 濃度も 0.01, 0.1%DEHP 投与の KO マウスでは、同一用量投与の hPPAR α マウスに比べて有意に低かった。摂餌量は遺伝子型マウス間で変わらなかった。KO マウスの血漿中、肝臓中代謝物量は hPPAR α に比べて少ないが、リパーゼの V_{max}/K_m はむしろ高い傾向にあり、今後の検討課題である。

表 11 各年代および各人種のヒトと野生型マウスの MEHP 濃度および酵素活性

Species	Race/Strain	Age-group	Sex	N	Lipase			UGT			ADH			ALDH		
					Mean	Min - Max	(95% CI)	Mean	Min - Max	(95% CI)	Mean	Min - Max	(95% CI)	Mean	Min - Max	(95% CI)
Human		16-80	M, F	38	1.21	0.36 - 3.51	(1.03 - 1.40)	22.2	3.38 - 58.94	(17.40 - 27.07)	8.6	1.5 - 15.5	(7.4 - 9.8)	3.6	0.4 - 10.5	(3.0 - 4.3)
	Non-Hispanic white	16	M	1	1.73	—	—	5.5	—	—	8.4	—	—	10.5	—	—
	Non-Hispanic white	25	M	1	0.95	—	—	8.8	—	—	4.7	—	—	4.0	—	—
	Non-Hispanic white	30's	M	5	1.08	0.36 - 1.62	(0.48 - 1.69)	25.1	9.95 - 39.90	(7.57 - 42.69)	9.8	6.3 - 12.8	(6.9 - 12.7)	3.6	2.0 - 6.2	(1.7 - 5.6)
	Non-Hispanic white	40's	M	5	0.96	0.80 - 1.15	(0.79 - 1.13)	22.3	11.44 - 33.48	(12.22 - 32.33)	8.2	4.2 - 12.0	(3.9 - 12.6)	3.2	1.4 - 5.0	(1.6 - 4.9)
	Non-Hispanic white	40's	F	5	1.30	* 0.53 - 2.05	(0.54 - 2.05)	22.8	* 3.38 - 58.94	(-4.80 - 50.32)	8.2	* 6.3 - 10.6	(5.4 - 10.9)	5.0	* 4.0 - 5.8	(4.2 - 5.8)
	Non-Hispanic white	50's	M	5	1.17	0.65 - 1.74	(0.63 - 1.72)	24.3	9.04 - 54.62	(2.22 - 46.34)	7.1	3.0 - 10.6	(3.0 - 11.2)	3.2	1.4 - 5.8	(1.0 - 5.3)
	Non-Hispanic white	60's	M	4	1.20	0.87 - 1.62	(0.70 - 1.69)	15.1	6.76 - 23.32	(4.27 - 25.98)	9.7	1.5 - 13.2	(1.0 - 18.5)	3.4	2.8 - 4.6	(2.1 - 4.7)
	Non-Hispanic white	71-80	M	3	2.08	0.55 - 3.51	(-1.60 - 5.76)	37.0	5.68 - 56.02	(-30.91 - 104.93)	14.5	13.1 - 15.5	(11.4 - 17.6)	4.6	1.0 - 7.2	(-3.4 - 12.5)
	Asian	57	M	1	1.01	—	—	32.6	—	—	3.7	—	—	3.6	—	—
	African-American	34-62	M, F	3	1.05	0.80 - 1.46	(0.17 - 1.94)	21.2	13.94 - 33.77	(-5.85 - 48.32)	9.1	7.0 - 12.1	(2.5 - 15.7)	2.7	1.7 - 3.2	(0.6 - 4.8)
	Hispanic	24-60	M, F	5	1.14	0.61 - 1.60	(0.58 - 1.70)	18.1	7.94 - 30.30	(8.12 - 28.13)	6.8	1.6 - 11.4	(1.8 - 11.7)	1.8	0.4 - 3.7	(0.2 - 3.4)
Mouse	129/Sv		M	8	6.22	3.91 - 7.54	(5.31 - 7.12)	121.9	101.15 - 128.27	(113.6 - 130.3)	4.2	3.3 - 5.0	(3.7 - 4.7)	5.6	4.2 - 7.4	(4.6 - 6.6)

*p<0.05 活性の値は平均値、()内は95%信頼区間を示す。単位は nmol/mg protein/min

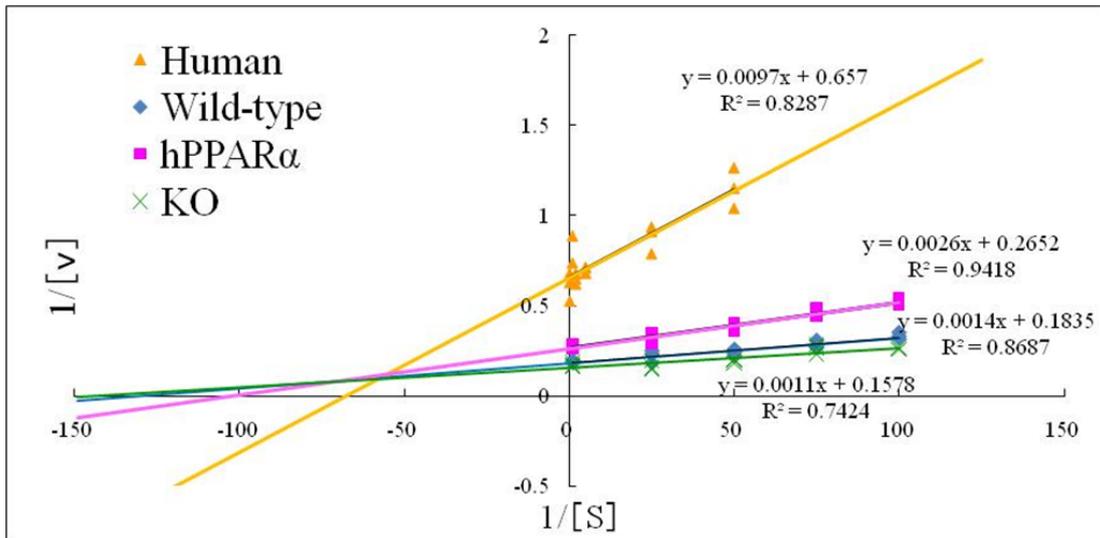


図 40 ヒトとマウスのプール肝ミクロソームによる Lineweaver-Burk plot
各点は 3 重測定の結果を示す。

表 12 ヒトのマウスのプール肝ミクロソームの Km および Vmax 値

	Human	Wild-type	hPPAR α	KO
Km (mmol/L)	0.0144	0.0076	0.0098	0.0070
Vmax (nmol/mg protein/min)	1.52	5.45	3.77	6.34
Vmax/Km	106	714	385	909

値は 3 重測定の結果を示す。

表 13 マウスと一般集団の DEHP 尿中代謝物濃度 (ng/ml urine) と代謝物総和 (nmol/ml urine)

	Human		Mouse	
	Mean	Median	Mean	Median
MEHP	2.3	2.1	132.2	162
Phthalic acid & 2cx-MMHP	NI.	NI.	2557.3	2502
5oxo-MEHP	14.4	15.9	8.3	2.5
5cx-MEPP	34.5	35.3	< 5	< 5
5OH-MEHP	21.8	23.1	NI.	NI.
SUM (nmol/l)	0.24		8.8	

ヒトのデータは2003～2004年の米国国民健康栄養調査の結果を用いている Colacino et al. (2010)を引用した。データは幾何平均ならびに中央値を示す。

N. I., no information; MEHP, mono(2-ethylhexyl)phthalate; 2cx-MMHP, mono(2-carboxymethylhexyl)phthalate; 5oxo-MEHP, mono(2-ethyl-5-oxo-hexyl)phthalate; 5cx-MEHP, mono(2-ethyl-5-carboxypentyl)phthalate; 5OH-MEHP, mono(2-ethyl-5-hydroxyhexyl)phthalate.

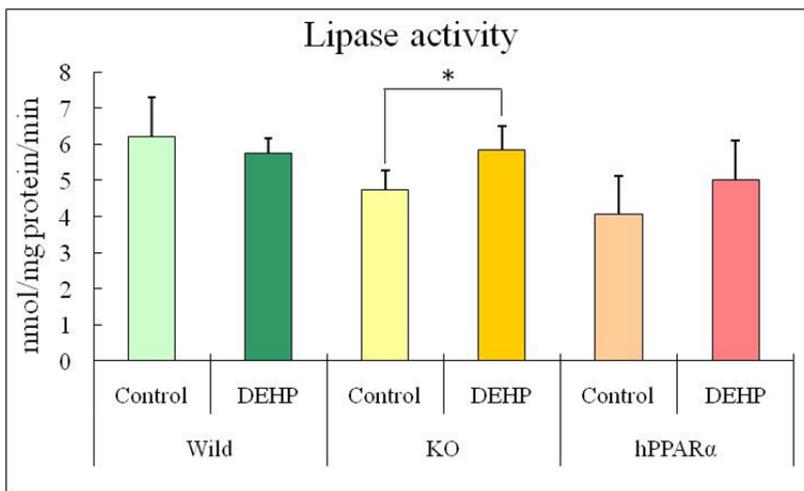
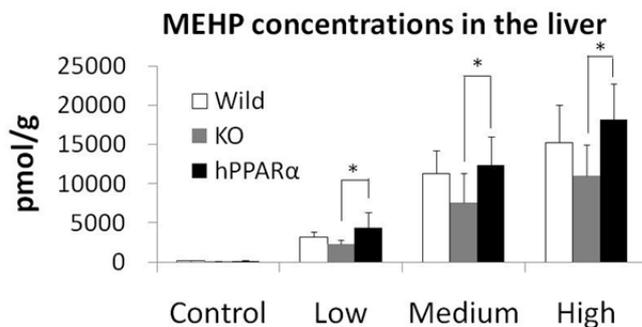


図 41 DEHP 曝露によるリパーゼ活性への影響
 平均値 \pm SD. * $p < 0.05$ 同一遺伝子型のコントロールとの間に有意差あり



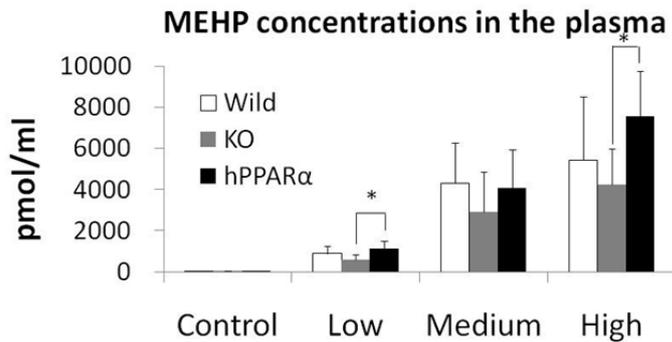


図 42 野生型マウス、PPAR α ノックアウトマウス、ヒト型 PPAR α マウスの肝臓中の MEHP 濃度（上段）と血漿中の MEHP 濃度（下段）

平均値 \pm SD. * $p < 0.05$ 同一濃度の曝露マウスの genotype の間に有意差あり

考察

雄マウスにおける DEHP 曝露実験は多く行われているがテストステロンの増加・減少については様々な報告がある。今回、DEHP 曝露は、野生型マウスで精巣中テストステロン濃度、PPAR α ノックアウトマウスで血漿テストステロン濃度を増加させた。しかし、そのメカニズムは検討した中では明らかにすることはできなかった。ヒト型 PPAR α マウスにおいては、精細管の異常や、形成不全のマウスが見られた。各遺伝子型コントロール群の比較においてヒト型 PPAR α マウスで血漿また精巣テストステロン濃度が低かったのは、このためかもしれない。DEHP 曝露は、野生型、また PPAR α ノックアウトマウスへの影響としてテストステロンの上昇を引き起こしたが、形態学的な変化は伴わず、精子の運動率や形態にも影響を及ぼさなかった。しかし、使用動物の週齢、曝露期間・濃度などにより、相反する結果が報告がされているため、胎仔期曝露や、新生仔期曝露なども視野に入れ、更に検討が必要であると考えている。

雌マウスにおいて、妊娠期野生型、ヒト型 PPAR α マウスで、DEHP 曝露は卵巣中のエストラジオール・プロゲステロン濃度に有意ではないが、その濃度比が上昇し、エストラジオールが上昇する傾向がみられた。ヒト型 PPAR α マウスで胎仔・新生仔の減少や胚吸収の増加に、卵巣におけるステロイド濃度の影響があるかもしれない、さらに検討を要する。

一方、野生型マウスでは、DEHP 曝露は血漿中 TG の減少、胎仔・新生仔生存数の有意な減少を引き起こした。血漿 TG 濃度減少と MTP の発現量低下および脂肪酸の β 酸化系酵素の発現上昇には相関があった。すなわち、 β 酸化系酵素の発現上昇による脂肪酸の代謝促進に加えて、肝臓における MTP の発現量が減少し、血漿中 TG の減少が引き起こされ母マウスが低栄養状態になっていると考えられた。このことが、胎仔の減少を引き起こしていると思われる。また、DEHP 曝露は、妊娠マウス血漿中リノール酸、 α -リノレン酸、パルミチン酸、オレイン酸の減少、出産後マウスでの EPA の減少を引き起こした。これは、DEHP の

代謝産物である MEHP が、PPAR α のリガンドとなり、脂肪酸 β 酸化が強く亢進したためと考えられる。TG の側鎖はオレイン酸 44%、パルミチン酸 26%、リノール酸 16%とされているため（臨床検査学講座 臨床化学検査学より）、これらの脂肪酸の減少は TG の減少と相関があると考えられた。DHA は、合成の過程にペルオキシゾーム内での前駆物質の β 酸化が必要とされるため、DEHP 曝露による前駆物質減少により DHA が減少するが、一方でペルオキシゾーム内での β 酸化亢進により DHA 合成も亢進する。その結果出産前後のどちらでも血漿中濃度に変化がみられなかったと考えられる。また、DEHP 曝露により濃度が減少した脂肪酸は、出産後の EPA 以外全て炭素鎖が 18 以下であったため、DEHP 曝露による脂肪酸濃度の減少に、脂肪酸の炭素鎖の長さが関連している可能性もある。

このように、親マウスの妊娠期 DEHP 曝露では TG や脂肪酸濃度が減少したが、胎仔や新生仔マウスの肝臓中 TG や脂肪酸濃度へ及ぼす影響はパルミトレイン酸を除けば極めて小さいと思われた。妊娠期母ラットへの DEHP 曝露が胎仔の肝臓中アラキドン酸濃度や、血漿 DHA 濃度を減少させるという報告もある (Xu., et al. 2008) が、この研究では 1500mg/kg/day という本研究の 0.1%曝露 (120mg/kg/day) よりはるかに高濃度で曝露を行っているため結果が一致しないと考えられた。また一方で、今回の仔マウスのデータは胎仔・新生仔ともに生仔のものであった。生仔の肝臓中必須脂肪酸濃度に変化は見られなかったのは、脂肪酸濃度が減少した仔が死亡し、脂肪酸濃度に変化が起きなかった仔のみが生存したためかもしれない。また種差を明らかにするために、PPAR α ノックアウト、ヒト型 PPAR α マウスの胎仔・新生仔の脂肪酸濃度も測定する必要がある。血漿中のパルミトレイン酸は、インスリン抵抗性と関連するという疫学調査も報告されているため (Mozaffarian., et al. 2010, Cao., et al.)、来年度課題である次世代仔での摂食行動、またその結果からの生活習慣病リスク解析に重要かもしれない。

PPAR α ノックアウトマウスでは、DEHP 曝露の胎仔・新生仔の減少、血漿・肝臓 TG 濃度、T-Cho 量、脂肪酸量に影響が観察されなかった。この結果は、野生型、ヒト型 PPAR α マウスで観察された DEHP の発達毒性の一部は PPAR α を介して起きている裏付けとなった。また、ヒト型 PPAR α マウスでは DEHP 曝露による新生仔数の減少が見られたが、母マウスの栄養状態、TG、各脂肪酸濃度に影響が見られなかったため、DEHP による毒性のメカニズムには種差があるのかもしれない。

各遺伝子型コントロール群を比較すると、野生型の TG や脂肪酸濃度は他の遺伝子型に比べ高かった。肝臓内の脂肪酸は Dgat1、2 により TG に合成され、MTP により肝臓から血中へ輸送される。一方 TG は LPL によりグリセロールと脂肪酸に分解される。分解を受けた脂肪酸は β 酸化酵素により代謝され、この過程は PPAR α の活性化により促進される。野生型マウスの血漿中 TG 濃度が PPAR α ノックアウトマウス及びヒト型 PPAR α マウスより明らかに高く、MTP mRNA も野生型マウスで高かったため、その原因が主に肝臓 MTP の mRNA の発現の差にあると考えられた。今回測定した血漿中脂肪酸の多くが TG の形で存在するため、3 系統マウス間に観察されたこれらの脂肪酸濃度の差も、MTP による TG 輸送の違いに依存し

ている可能性があると考えられた。

DEHP 曝露の毒性には PPAR α が深く関与しているが、その発現や機能に種間差があるので、動物から得られた結果をヒトに外挿することが難しい。そこで本研究は、マウスの肝臓およびヒトの肝組織を用いて DEHP 代謝酵素の種間差を明らかにすること、野生型マウスとヒト型 PPAR α マウスを用いて DEHP の体内動態における PPAR α の役割を明らかにすることを目的に行った。

その結果、DEHP の代謝に係る 4 つの酵素（リパーゼ、UGT、ADH、ALDH）のヒトとマウス間の種差は 2 から 7 倍程度であったが、ヒトの個人差は 10~26 倍の差が見られた。特に個人差が大きかったのは ALDH で、次いで UGT であった。ALDH のどのアイソザイムが DEHP の代謝に関与しているかは分かっていないが、メジャーなアイソザイムである ALDH2 や ALDH1A はコーカサスの人には遺伝子多型が見られることはまれであり、この大きな個人差がこれらの遺伝子多型によるものとは考えにくい。他のアイソザイムの遺伝子多型がもしかしたら関与しているかもしれない。UGT に関しては、MEHP をグルクロン酸抱合するのは、主に UGT2B7 だと分かっている。UGT2B7 の遺伝子多型は北アメリカ人ではよくみられる (Mehlotra et al., 2007)。この遺伝子多型は UGT の活性と関与しており (Girard et al., 2004; Innocenti et al., 2008)、これが個人差の原因である可能性が考えられる。

一方、種差が最も大きかったのは、リパーゼ、次いで UGT 活性であった。以前我々はヒトと同じ霊長類のマーモセットとマウス間の肝リパーゼ活性の種差が 240 倍であることを報告している (Ito et al., 2005)。今回の結果からは、ヒトのリパーゼ活性はマーモセットよりもむしろマウスの方が近いことが示唆された。

尿中代謝物は、リパーゼが高いことから想像される通り、マウスの方が、6 歳以上の米国一般住民のデータに比べて高かった。マウスの尿中 DEHP 代謝物が MEHP, 2cx-MMHP, 5oxo-MEHP, 5cx-MEPP だと仮定した場合、ヒトの 37 倍の代謝物総量が排泄されていることになる。今回の実験に用いたマウスの固形餌、飲料水からの推定 DEHP 摂取量は、比較に用いた 6 歳以上の米国一般住民の推定 DEHP 摂取量と同等である (マウス 11.6~51.1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, ヒト 8.2~18.9 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)。したがって、この尿中 MEHP の差は、摂取量の違いによるものではないと考えられる。

一方、尿中 5oxo-MEHP や 5cx-MEPP はヒトの方がマウスに比べて高かった。この経路には、CYP に加え、ADH, ALDH が関与するが (Albro, 1986)、ADH や ALDH の種差がそれ程大きくなかったことから CYP の種差によるものと思われる。ヒトの尿中 2cx-MMHP 量については、マウスに比べても、他の代謝物 5cx-MEPP や 5OH-MEHP の量に比べても少なく、これはヒトにおける主要な代謝物ではないことが示唆される (図 42)。

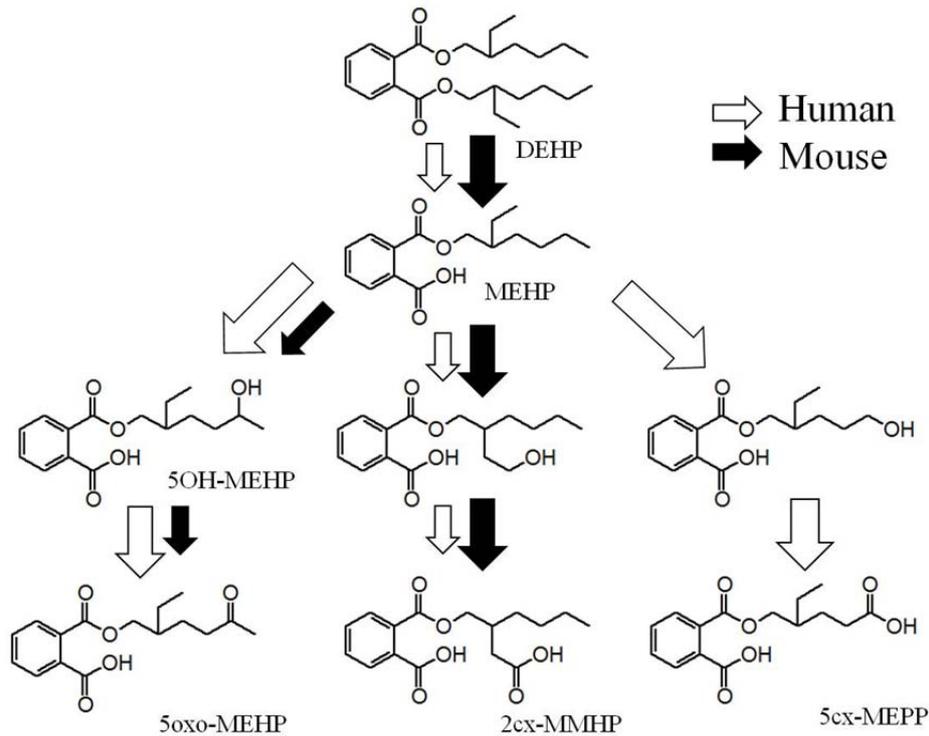


図 42 Major DEHP metabolism referred to in this study.

White and black arrows represent possible pathway DEHP metabolism in mouse and human, respectively. Size of the arrow represents metabolic capacity of each step.

今回の研究では、白人男性において 2-EH に対する ADH 活性が高齢者で高い傾向にあった。エタノールに対する ADH 活性では、ADH I, III は年齢との関係は見られないが、ADH IV 活性が加齢とともに減少するとの報告がある (Matsumoto et al., 2001)。今回の対象者では、エタノールに対する ADH 活性も高齢者で高く、これが白人男性集団を代表しているかどうかは対象者数を増やして確認をする必要がある。

本研究では、喫煙、アルコール摂取、ドラッグの使用の正確なデータを入手することができなかったため、これらの DEHP 代謝への影響を考察することは出来なかった。また、ADH と ALDH 活性については、2-EH、2-ethylhexanal を基質として測定をしたのみであり、MEHP の酸化経路での活性を正確に反映しているかは分からない。

以上をまとめると、本研究ではヒトとマウスの明らかな種差は観察されたが、個人差の方が大きかった。

また、DEHP の代謝における PPAR α の役割についての実験の結果、雌マウスと同様、雄マウスにおいても DEHP 曝露後の肝臓 MEHP 濃度は PPAR α の発現がない KO マウスで低いこと

が明らかとなった。PPAR α の発現量が DEHP の体内動態に影響を与えていることが示唆された。今後は血漿、肝臓に加え、尿、糞中の MEHP 濃度を測定しさらに考察を深める必要がある。このような報告はこれまでない。

(3) 研究全体の成果、考察及び結論

目的：フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) のマウス胎生期・授乳期曝露の次世代影響とそのメカニズムを検討した。

方法：妊娠した Sv/129 野生型、ペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (PPAR) α -欠損および ヒト PPAR α (hPPAR α) マウスに 0, 0.01, 0.05 or 0.1% DEHP を混ぜた餌を生後 21 日まで与えた。一部のマウスはそれぞれ妊娠 18 日目 (胎仔)、生後 2 日目 (PND2 仔) and および生後 21 日目 (PND21 仔) に親と一緒に解剖した。離乳後 0 と 0.05%DEHP 群の残りのマウスをそれぞれ 2 群に分け、市販の固形飼料と高脂肪食を 8 週間与え、11 週齢の次世代仔 (11-week-offspring) とした。

結果と考察：DEHP の発達段階別の次世代への影響が観察された。

胎生期・新生仔期の影響：DEHP は胎仔期と新生仔期には野生型と hPPAR α マウスの胎仔と PND2 仔の生存仔数を減少させ、胚吸収数を増加させた。PPAR α 欠損マウスにはこのような影響は観察されなかった。

離乳後の影響：0.05% DEHP の胎生期・授乳期曝露は離乳後の野生型と hPPAR α マウスの摂餌量を増加させたが、PPAR α 欠損マウスにはこのような影響は観察されなかった。この現象は離乳後高脂肪食を与えた場合は観察されなかった。DEHP 胎生期・授乳期曝露は野生型の PND2 と PND21 の仔血漿のレプチン濃度を減少させた。しかし、11-week-offspring の血漿レプチン濃度には影響を与えなかった。DEHP の授乳期のみの曝露は PND21 の仔の血漿レプチン濃度には影響を与えなかったため、レプチン濃度に影響を与えたのは DEHP の胎生期曝露であると考えられた。結局、胎生期の DEHP 曝露が血漿レプチン濃度を減少させ、離乳後に摂餌量が増加したと考えられた。また、これらの現象が野生型マウスにのみ観察されたことから、PPAR α に関連した影響であると推察された。離乳後の摂餌量の増加は hPPAR α マウスでも観察されたが、この原因は不明である。DEHP 曝露濃度、曝露時期による PPAR α プロモーター領域のメチル化に影響は見られなかった。PND21 の精巣には PPAR α の遺伝子型に関わらず、DEHP 曝露による精細胞のアポトーシスの増加等の精巣毒性が観察された。

成熟期の影響：0.05%DEHP の胎生期と授乳期曝露は、野生型 11-week-offspring の血漿テストステロンを減少させた。一方、精巣セルトリ細胞の空胞変性数を高脂肪食を摂取させた場合増加させた。PPAR α 欠損および hPPAR α 11-week-offspring にはこのような現象は観察されなかった。0.05%DEHP の胎生期と授乳期曝露は PPAR α 欠損マウスの肝臓 TG noudo wo 上昇させた。野生型マウスではこのような結果は観察されなかつ

た。

親マウスへの影響：妊娠マウスの DEHP の曝露は血漿 TG のみならずいくつかの脂肪酸濃度を減少させた。この現象は野生型マウスでのみ認められ、PPAR α 欠損および hPPAR α マウスでは観察されなかった。また、妊娠期の DEHP 曝露は胎仔や PND2 仔の肝臓の脂肪酸には影響を与えなかった。

DEHP 代謝の種差・個体差：DEHP の肝臓における代謝の種差と個体差を明らかにするため、38 名のヒトの肝臓と 8 匹の Sv/128 マウス肝臓のリパーゼの代謝活性をフタル酸モノ 2-エチルヘキシル (MEHP) の生成速度から求めたリパーゼの活性はヒトの方がマウスより低かった。ヒトの V_{max}/K_m 値はマウスの 1/7 であった。ヒトの UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ活性値と 2-エチルヘキサノールを基質とした時のアルデヒド脱水素酵素の活性値はマウスのそれぞれ 1/6 と 1/2 であった。一方、ヒトの 2-エチルヘキサノールを基質とした場合のアルコール脱水素酵素活性はマウスの 2 倍であった。アメリカに一般人の尿中 DEHP の代謝物とマウスの尿中代謝物を比較した。両者は同程度の DEHP 曝露と考えられた。ヒト尿中の DEHP の総代謝物量と MRHP はマウスより高かった。しかし、フタル酸モノ(2-ethyl-5-oxo-hexyl) (5oxo-MEHP) とフタル酸モノ(2-ethyl-5-carboxypentyl) (5cx-MEPP) 濃度はヒトの方がマウスより高かった。ヒトの 4 種の DEHP 代謝酵素活性の個体差は 10 から 26 倍あった。

以上まとめると、ヒトとマウス間の DEHP 代謝の種差は活性の大きさのみならず代謝経路も違うことがあきらかとなった。キネティクスが同じ場合は種差の不確実係数として 2.5 が使用できるとする理論があるが、DEHP の場合はキネティクスが全く異なるので、マウスの実験結果をヒトに外挿する場合の不確実係数は 10 を使用した方が無難である。個体差は種差より大きい可能性がある。

今後の課題

この 3 年間の実験は DEHP 胎生期・授乳期曝露が次世代マウスの度の成長段階でどのような影響がみられるか観察することに重点を置いた。3 系統の遺伝子型マウスを用いたので、ある程度メカニズム解析もできたが、十分ではない。今後影響がみられた減少に対するさらなるメカニズム解析が望まれる。

III. 本研究を基に発表した論文等

1 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

論文

英文

Hayashi Y, Ito Y, Yamagishi N, Yanagiba Y, Tamada H, Wang D, Ramdhan DH, Naito H, Harada Y, Kamijima M, Gonzales FJ, Nakajima T. Hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α may have an important role in the toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on offspring of mice. *Toxicology* 289(1):1-10 (2011) PMID:21354252

Hayashi Y, Ito Y, Kamijima M, Naito H, Nakajima T. Differences in metabolite burden of di(2-ethylhexyl)phthalate in pregnant and postpartum dams and their offspring in relation to drug-metabolizing enzymes in mice. *Arch Toxicol.* 96(4): 563-569, 2012. PMID:21996759

Ito Y, Nakamura T, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Yamagishi N, Naito H, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. [Plasticizers May Activate Human Hepatic Peroxisome Proliferator-Activated Receptor \$\alpha\$ Less Than That of a Mouse but May Activate Constitutive Androstane Receptor in Liver.](#) *PPAR Res.* 2012;2012:201284 PMID:22792086

Nakashima R, Hayashi Y, Khalequzzaman M, Jia X, Wang D, Naito H, Ito Y, Kamijima M, Gonzalez FJ, Nakajima T. Exposure to DEHP decreased four fatty acid levels in plasma of prepartum mice. *Toxicology* 227 (2013 in press)

Ito Y, Kamijima M, Hasegawa C, Tagawa M, Kawai T, Miyake M, Hayashi Y, Naito H, Nakajima T. Species and inter-individual differences in metabolic capacity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) between human and mouse livers. *Environ Health Prev Med* (2013 in press)

和文

林 由美, 伊藤由起, 那須民江. 胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露による低栄養環境と生活習慣病. 第 81 回日本衛生学会次世代影響連携研究会ミニ特集 日本衛生学雑誌 67(1):22-25 (2011) PMID: 22449817

那須民江、岸玲子. 胎生期低栄養と小児の健康 日本衛生学雑誌 67(1):21 (2011)

PMID: 22449817

本研究を基にした学会発表の実績

国際学会

Hayashi Y, Ito Y, Yanagiba Y, Wang D, Yamagishi N, Tamada H, Naito H, Nakajima T. Di (2-ethylhexyl) phthalate may cause reproductive and developmental toxicity through PPAR α .

XII International Congress of Toxicology. July 19–23, 2010, Barcelona, Spain.

シンポジウム

那須民江. 妊娠期プラスチック可塑剤曝露の次世代影響—マウスの発達段階の影響の違いについて. 第 83 回日本衛生学会学術総会 (金沢 2013/3/24-26)

那須民江 胎生期化学物質曝露の次世代影響—動物実験からのアプローチ— 2012 年 3 月 第 82 回日本衛生学会発表予定 (京都 2012/3/24~26)

学会発表

伊藤由起、上島通浩、河合俊夫、那須民江. フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの尿中代謝物プロファイルにおける PPAR α の関与. 第 83 回日本衛生学会学術総会 (金沢 2013/3/24-26)

林由美、伊藤由起、内藤久雄、近藤高明、上島通浩、那須民江. 胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露がレプチンに及ぼす影響. 第 15 回環境ホルモン学会研究発表会 (東京 2012/12/18-19)

伊藤由起、上島通浩、長谷川知恵、田川雅大、河合俊夫、三宅美緒、林由美、那須民江. ヒトのフタル酸ジ-2-エチルヘキシル代謝能とマウスとの種差. 第 40 回 産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (川崎 2012/11/15-16)

伊藤由起、上島通浩、長谷川知恵、田川雅大、三宅美緒、林由美、那須民江. プラスチック可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差および個人差の検討. 第 82 回日本衛生学会総会(京都 2012/3/24-26)

林由美、伊藤由起、内藤久雄、王棟、賈小芳、田川雅大、上島通浩、那須民江. 胎生期 DEHP 曝露による低栄養と摂食行動. 第 82 回日本衛生学会総会(京都 2012/3/24-26)

伊藤由起、上島通浩、長谷川知恵、田川雅大、三宅美緒、林由美、那須民江. プラスチック可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差および個人差の検討. 第 39 回産業中毒・バイオモニタリング研究会 (東京 2011/10/15)

伊藤由起、長谷川千恵、三宅美緒、上島通浩. プラスチック可塑剤フタル酸ジ-2-エチルヘキシルの代謝の種差および個人差の検討. 第 155 回名古屋市立大学医学会例会

(名古屋 2011/6/21)

林由美、伊藤由起、那須民江. 胎生期 DEHP 曝露による低栄養環境と生活習慣病. 生殖次世代影響連携研究会企画シンポジウム「胎生期低栄養と小児の健康」第 81 回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

林 由美、山岸 希、伊藤由起、内藤久雄、那須民江. 妊娠期 DEHP 曝露による母獣の血漿中トリグリセライド減少メカニズム. 第 81 回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

山岸 希、林 由美、王 棟、伊藤由起、ドニヒクマットラムダン、内藤久雄、那須民江. DEHP 曝露の雌雄マウス生殖器への影響. 第 81 回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

田川雅大、林 由美、山岸 希、中島亮輔、伊藤由起、内藤久雄、那須民江. PPAR α と DEHP の動態に関する研究. 第 81 回日本衛生学会総会(誌上発表、東京 2011/3/26-28)

林由美、伊藤由起、柳場由絵、王棟、山岸希、賈小芳、内藤久雄、那須民江. 胎生期 DEHP 曝露による低栄養と生活習慣病リスクとの関連. 第 80 回日本衛生学会総会(仙台)2010/5/9-11

中島亮輔、林由美、王棟、伊藤由起、Ramdhan Doni Hikmat、内藤久雄、上島通浩、那須民江. DEHP 曝露による PPAR α の活性化で妊娠マウスの血漿中必須脂肪酸濃度が低下する. 第 80 回日本衛生学会学術総会(仙台) 2010/5/9-11

2 特許及び特許出願の数と概要

なし

3 その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

林 由美 第 81 回日本衛生学会若手抄録賞受賞 (2011/3/26-28)

伊藤由起 第 83 回日本衛生学会若手優秀演題賞 (2013/3/24-26)

IV 主任研究者による研究全体の自己評価

項目	評価結果	評価コメント
1 研究の妥当性	5	プラスチック可塑剤 DEHP の次世代影響を明らかにし、リスク評価の際の種差と個体差の理論的な不確実係数を提案できた。
2 研究目標の達成度	4	研究費が途中から削減されたため、次世代影響の研究の dose を 1 点しか (0.05%) 取れなかった点が後悔される
3 研究成果の有用性	5	目的とした結果はすべて得られた。DEHP の親世代への影響のみならず次世代への影響が明らかとなり、リスク評価の理論的な不確実係数も提言できたので、有用性は大と考える。
合計	14	

総合コメント

DEHP の親世代のみならず次世代への影響(成長の段階によって影響は異なった形で表れる)とそのメカニズムの一部が明らかとなった。研究費が縮小されたので、投与量を 1 点しか取れなかった点は残念であるが、目的はほぼ達成できたと考えている。加えて、種差の不確実係数の理論的な提言ができたことは、リスク評価に大きく貢献できると考えている。

注) 評価結果欄は、「5」を最高点、「1」を最低点として5段階で記述する。