

氏名(本(国)籍)	佐竹 茂(長野県)
主指導教員名	岩手大学 教授 岡田 幸助
学位の種類	博士(獣医)
学位記番号	獣医博甲第295号
学位授与年月日	平成22年3月15日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	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の影響に関する研究
審査委員	主査 岩手大学 教授 古濱和久 副査 帯広畜産大学 教授 松井高峯 副査 岩手大学 教授 岡田幸助 副査 東京農工大学 教授 三森国敏 副査 岐阜大学 教授 柳井徳磨

## 論文の内容の要旨

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。PPAR は核内受容体ホルンモンスーパーファミリーの一つである。これまで、 $\alpha$ 、 $\beta$  および $\gamma$  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 $\alpha$  が発現している。PPAR $\alpha$ アゴニストは、共通して肝ペルオキシゾームを増加させ、別名“ペルオキシゾーム増殖誘導剤”とも称されているが、大きな動物種差が認められる。一般に、げっ歯類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・増殖および肝細胞癌を誘発することが問題視されている。霊長類は、ペルオキシゾーム増殖誘導剤に感受性がないあるいは低いとされているが、報告数は非常に少なく、カニクイザルの反応について不明な点が多い。たとえば、フィブラート系薬物をカニクイザルに投与すると肝臓ペルオキシゾームが増加したとの報告があるが、フィブラート系薬物以外では報告は見当たらない。

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、ゲッ歯類で肝臓ペルオキシゾーム増殖誘導が知られている di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を取り上げ検討した。DEHP はプラスチック可塑剤として塩化ビニル製品やラッカーの製造に用いられ、代謝物が PPAR $\alpha$ アゴニスト作用を有する。これまで DEHP の 500 mg/kg/day を雄性カニクイザルに 14 あるいは 21 日間経口投与した報告があるが、いずれもペルオキシゾームに対して影響はみられていない。

第一章では、カニクイザルに DEHP を大量に投与した場合、ペルオキシゾームが増加するか、ならびに最大投与可能量を確認する目的で実験を行った。雄 1 匹、雌 3 匹の計 4 匹

のカニクイザルに DEHP の 1,000 および 2,500 mg/kg/day を 28 日間経口投与した。1,000 mg/kg/day 以上において、肝細胞ミトコンドリアの長軸に沿ったクリステの層状配列を伴う腫大が雌に認められた。また、ペルオキシゾームおよびミトコンドリアの増加傾向が観察された。2,500 mg/kg/day では、摂餌量の減少に伴う著しい体重減少および肝細胞萎縮が認められ、ペルオキシゾーム増加の有無を評価するには不適切な用量と判断した。

第二章では、これらの結果を踏まえ、雄 3 匹、雌 4 匹のカニクイザルに DEHP の 1,000 mg/kg/day を 28 日間経口投与した。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。投与開始前に肝生検を実施し、投与開始前と投与後の変化について、動物毎に電子顕微鏡で検索した。その後、肝小葉中心部および辺縁部のそれぞれから×6,500 の倍率で 40 枚の写真を撮影し、ペルオキシゾームおよびミトコンドリアの数を計数した。また、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  $\beta$ -oxidation system (FAOS), carnitine acetyltransferase (CAT) および carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性を測定した。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、げっ歯類と比較して非常に軽微な変化であった。ミトコンドリア数に変化は認められなかった。また、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。肝臓酵素のうち、CPT 活性のみに軽微な増加が認められた。

以上の結果から、ペルオキシゾーム増殖誘導作用を有する DEHP の大量投与はカニクイザルの肝細胞において、ミトコンドリアの腫大を伴ったペルオキシゾームの増加を誘導することが確認された。しかし、この作用は軽微であり、本剤の感受性はげっ歯類よりヒトに近いと考えられた。本研究結果はカニクイザルを用いた毒性研究において、ヒトへのリスクを評価する際の一助になるものと考えられた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本論文は、カニクイザルにおけるペルオキシゾーム増殖誘導剤の影響を、プラスチック可塑剤である di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) を用いて検討した結果を報告した論文である。

申請者は、第一章において、過去に肝ペルオキシゾームが増加しないと報告された用量を上回る DEHP の 1,000 および 2,500 mg/kg/day を雌雄 4 匹のカニクイザルに 28 日間経口投与して、その影響を検索した。その結果、1,000 mg/kg/day 以上で肝ペルオキシゾーム増加とミトコンドリアの形態変化を誘導する傾向が見られた。反面、2,500 mg/kg/day では体重減少などの 2 次的な影響が強く、肝ペルオキシゾーム増加を評価するには適さないことが判明した。この結果を踏まえ、第二章では DEHP の 1,000 mg/kg/day を雄 3 匹、雌 4 匹のカニクイザルに 28 日間経口投与した。投与開始前に肝生検を実施し、投与開始前と投与後の変化について、動物個別に電子顕微鏡で検索し、さらに、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  $\beta$ -oxidation system (FAOS), carnitine acetyltransferase (CAT) および carnitine palmitoyltransferase (CPT) 活性を測定した。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観察された。肝ペルオキシゾーム数は、軽微ながら DEHP 投与前に比較して増加傾向を示した。また、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、感受性には僅かながら雌雄差がある可能性が示唆された。肝臓の CPT 活性には軽微な増加が認められたが、FAOS および CAT 活性に変化は認められなかった。

霊長類ではペルオキシゾーム増殖誘導剤に対して感受性が無いあるいは低いとされているが、報告は非常に少なく不明な点が多い。また、DEHP 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報告は見当たらない。このような背景のもと、本研究結果は毒性学研究において非常に貴重な基礎データを提示するものである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Morphological changes of mitochondria in the hepatocytes induced by administration of a large amount of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)  
著 者 名 : Satake, S., Tanigawa, Y., Maeda, H., Kamimura, Y., Chihaya, Y., Miyajima, H., Goryo, M. and Okada, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 21 (1) : 73-75, 2008
- 2) 題 目 : Effect of a large dose of di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on hepatic peroxisome in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*)  
著 者 名 : Satake, S., Nakamura, C., Minamide, Y., Kudo, S., Maeda, H., Chihaya, Y., Kamimura, Y., Miyajima, H., Sasaki, J., Goryo, M. and Okada, K.  
学術雑誌名 : Journal of Toxicologic Pathology  
巻・号・頁・発行年 : 23 (2) : - , 2010 in press