

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総合研究

1

名古屋大学名誉教授
中部大学生命健康科学部客員教授
那須民江

2013年8月29日

(中部大学・名古屋大学・名古屋市立大学共同研究)

* Developmental Origins of Health and Diseases (DOHaD)

食事由来

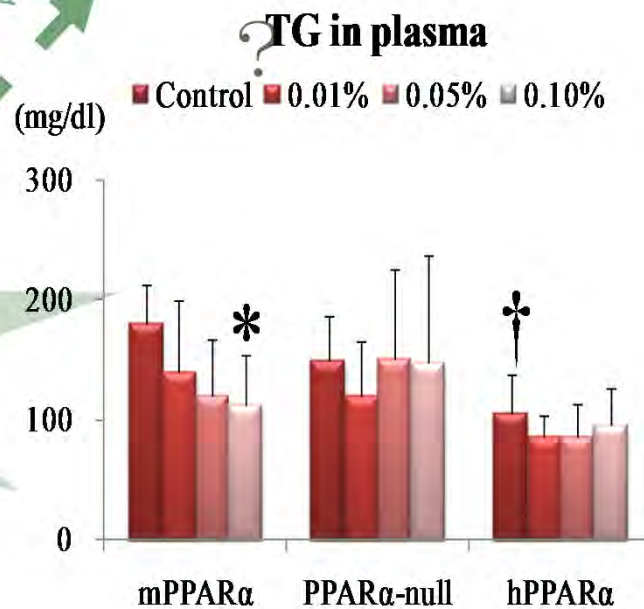
低栄養

生活習慣病

次世代児(仔)

母

化学物質由来
(PPAR α アゴニスト)



私たちの研究室では国に先駆けて化学物質曝露の子供の健康への影響を検討しています

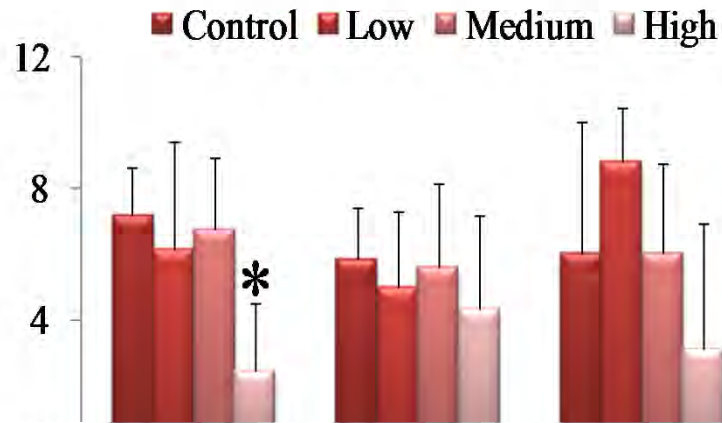
子どもたちは、あしたの地球を生きてゆく。

子どもたちが、次の世代が、
すこやかに成長できる地球環境を未来に残すには
どうしたらよいのでしょうか。

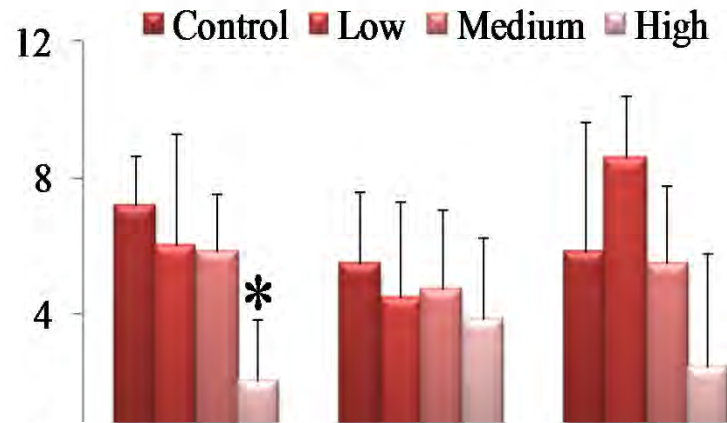
2011年にスタートする「エコチル調査」。
環境が人間の健康にもたらす影響をさぐる、全国的な調査です。

DEHP研究の背景

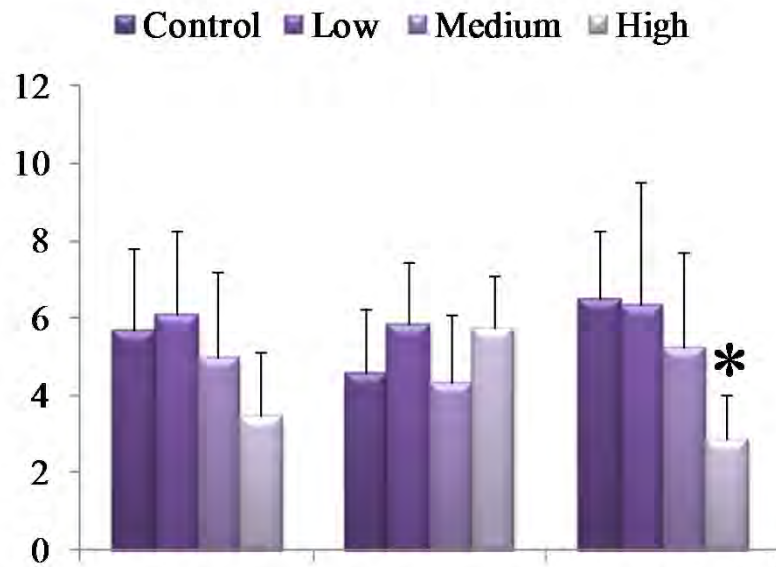
Fetuses / litter



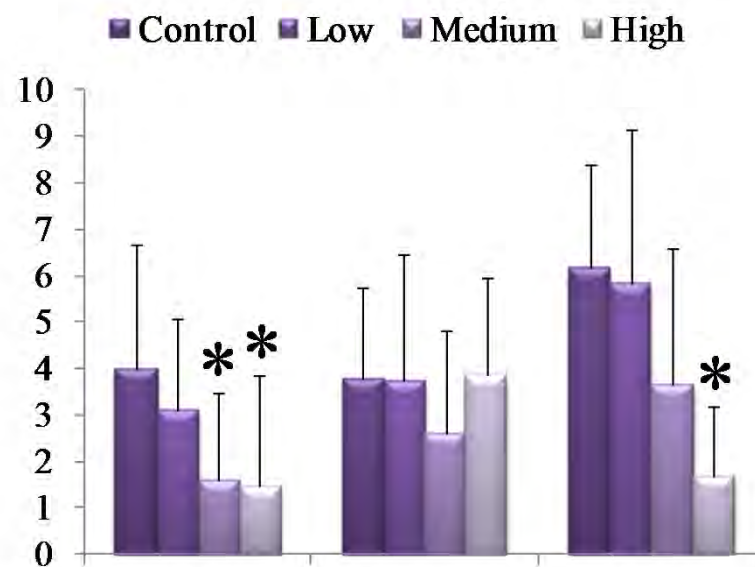
Live fetuses / litter



Pups born / litter



Live pups / litter



胎仔・新生仔の生存数の減少は肝臓PPARαに関係している 母親の栄養状態に着目

(0.05)

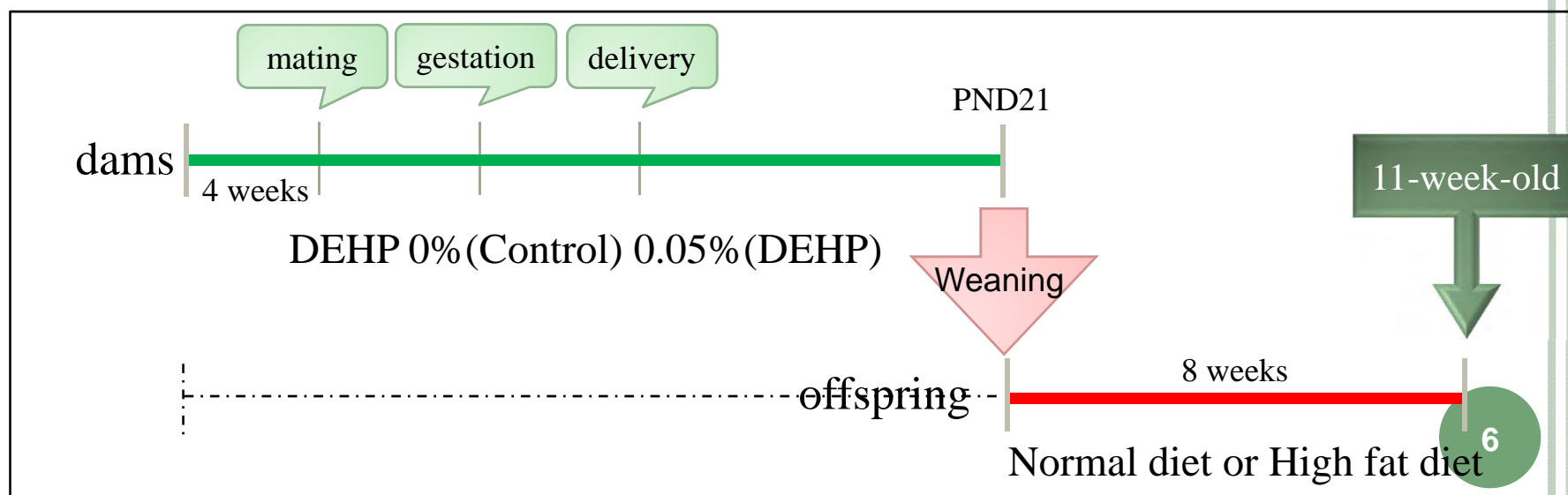
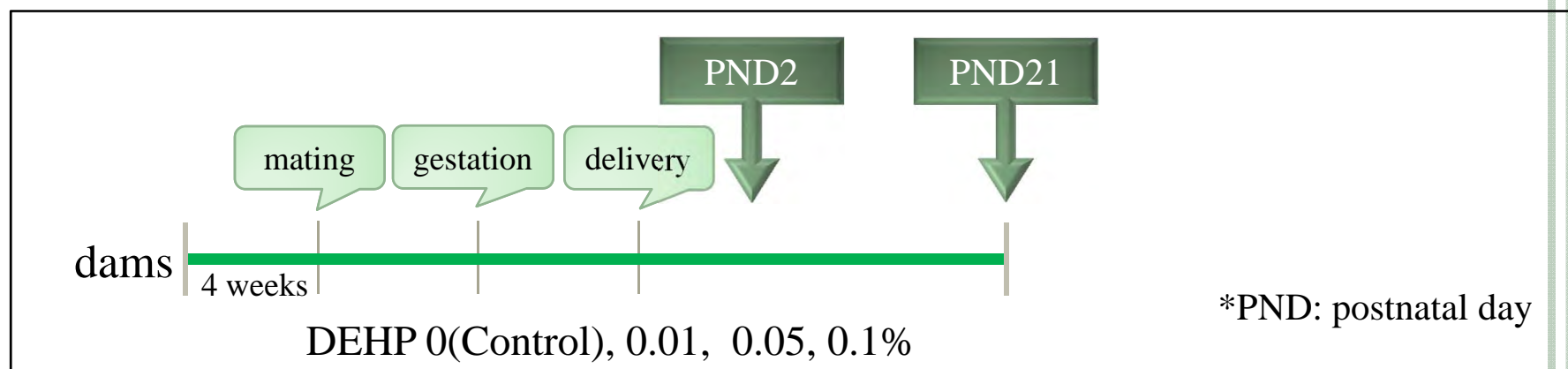
DEHP研究の目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
 - 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
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - 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

実験方法

12 weeks of age (male and female)

129/sv (mPPAR α), Ppara α -null, humanized PPAR α (hPPAR α)

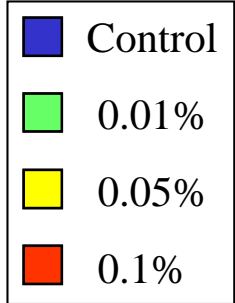


目的

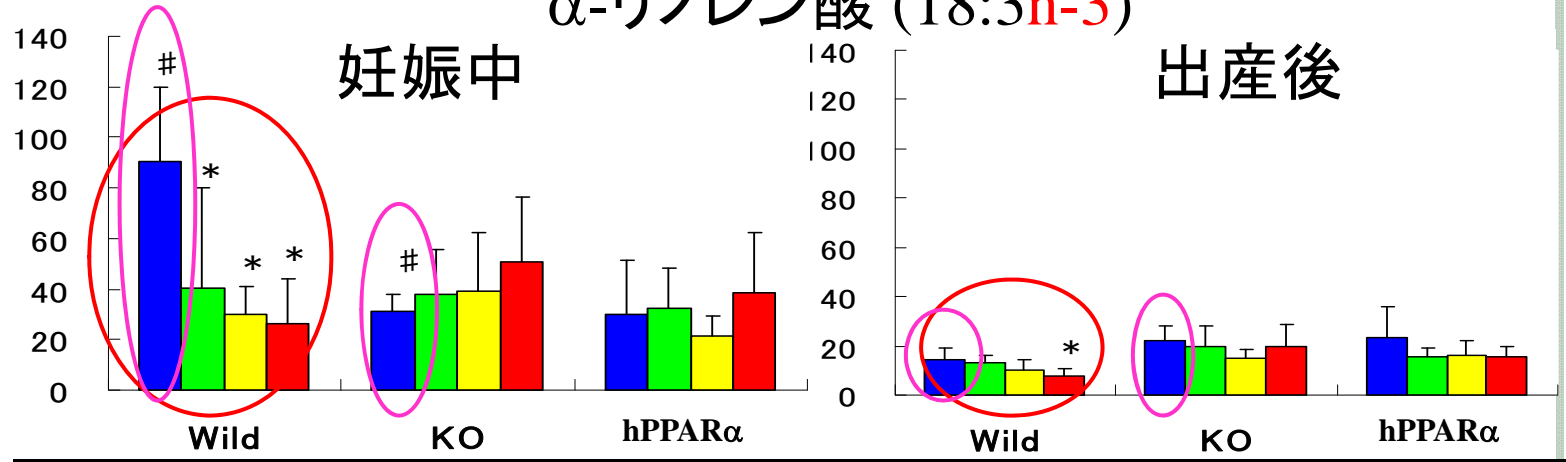
- 1) **DEHP曝露の親世代への影響**
- 2) DEHP胎生期(・授乳期曝露)の次世代影響
 - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR α の役割および種間差

n-3系

(nmol/ml)



α-リノレン酸 (18:3n-3)

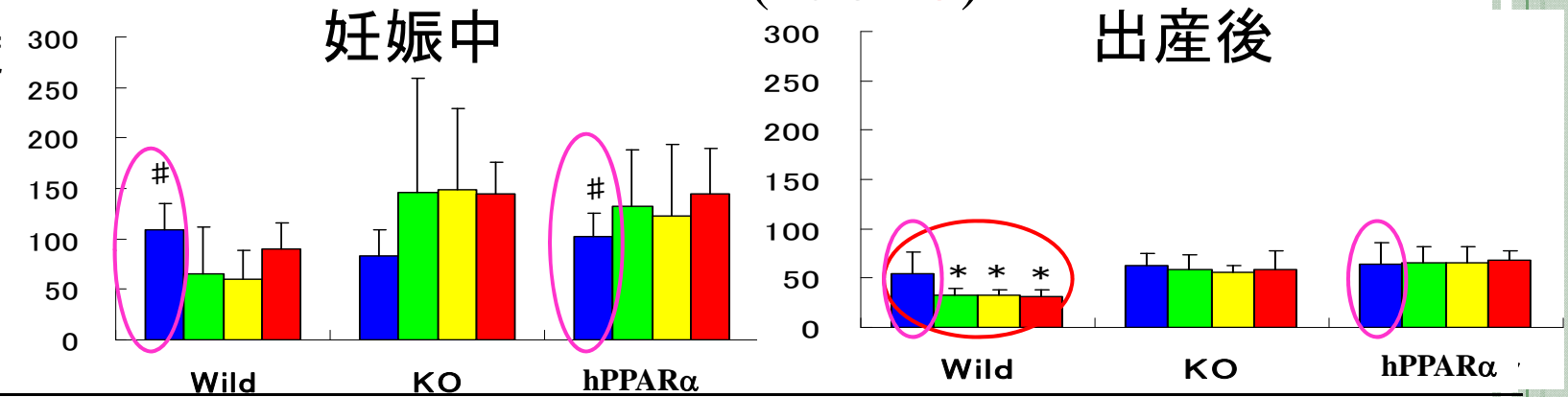


飼料中の DEHP濃度

EPA (20:5n-3)

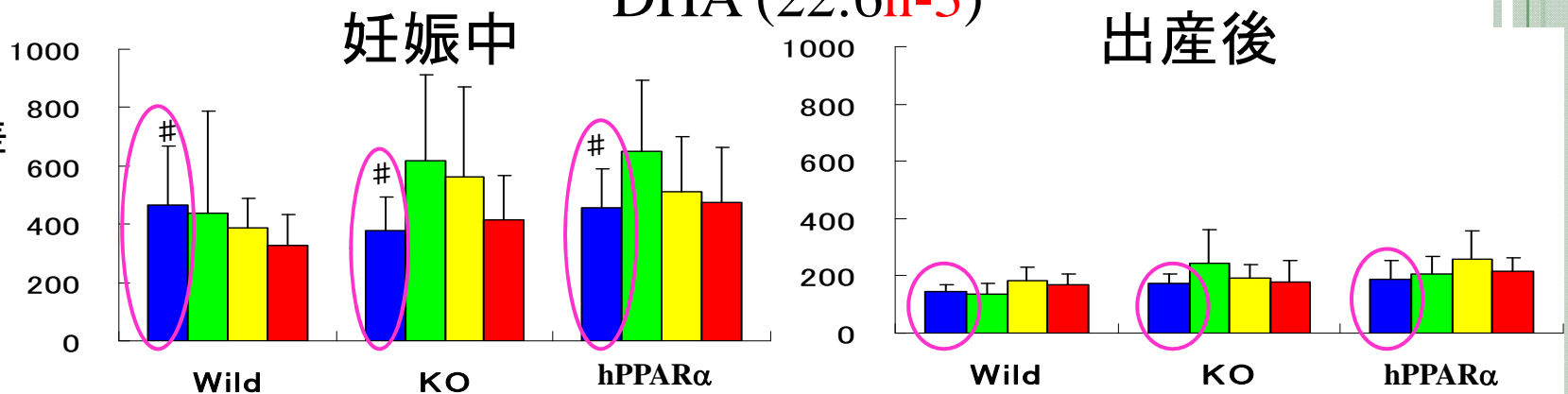
mean ± SD

* Control 群と比較し有意差有り(p<0.05)

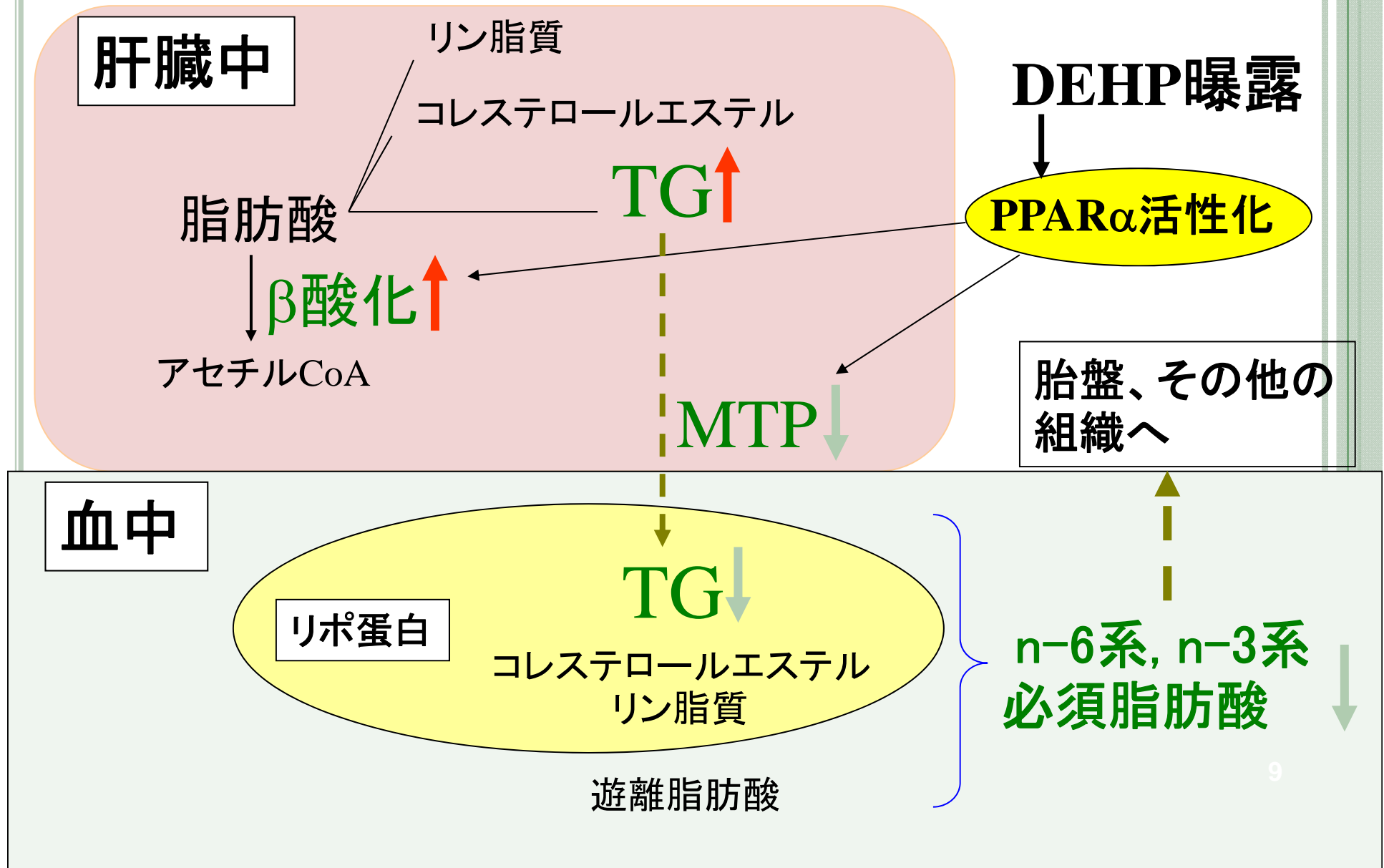


出産後の Control 群と比較し有意差有り(p<0.05)

DHA (22:6n-3)



胎生期DEHP曝露による野生型妊娠マウス体内変化



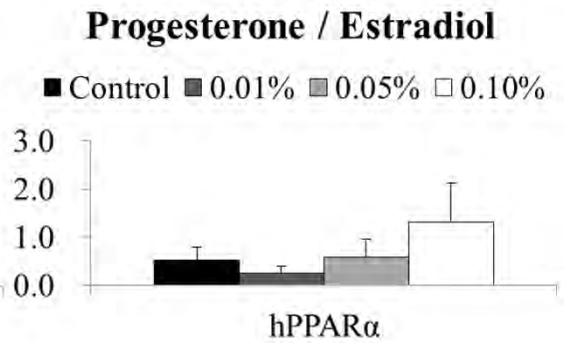
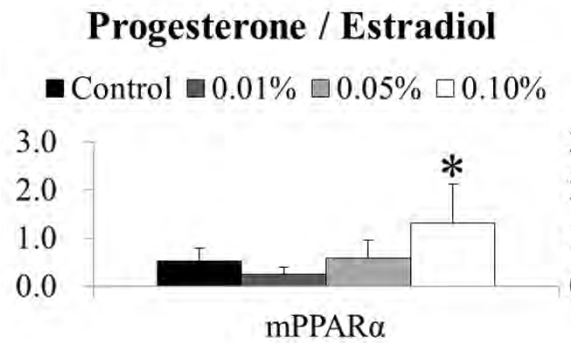
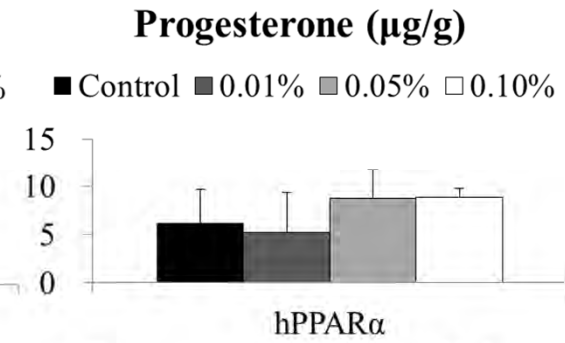
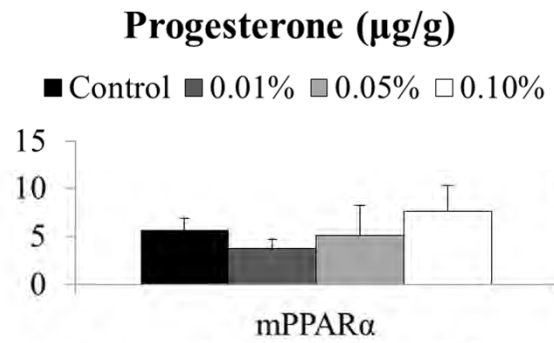
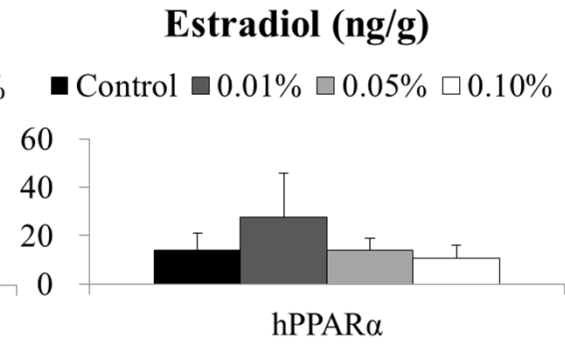
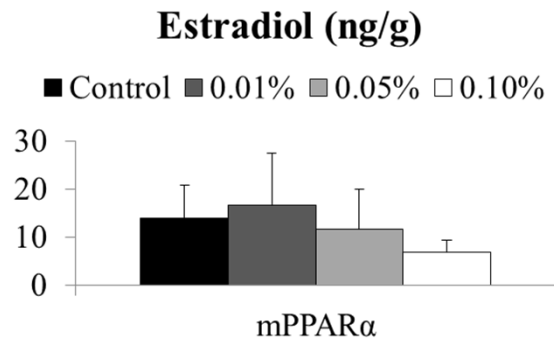
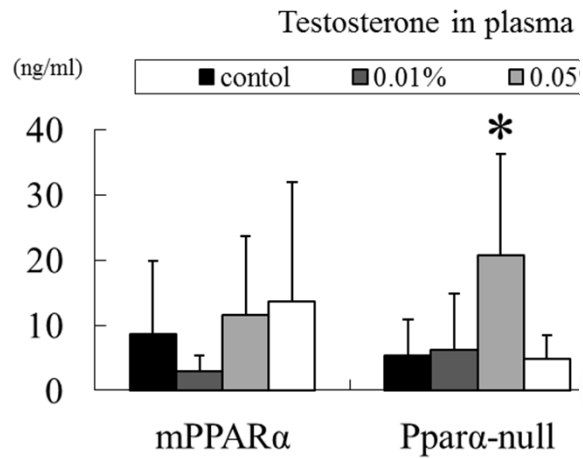
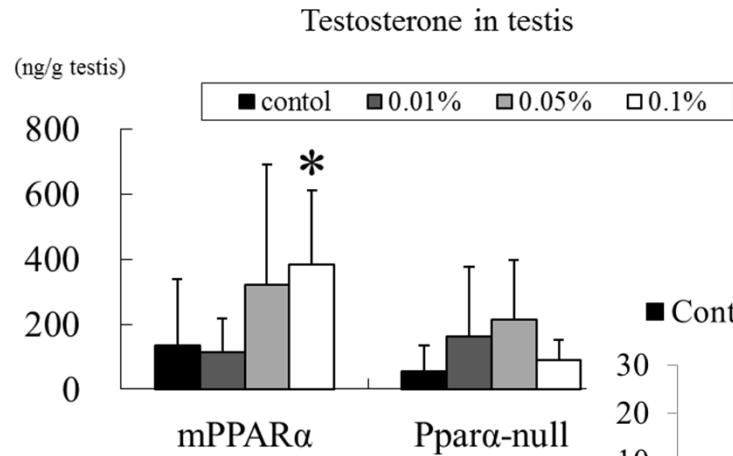
母マウス血漿脂質と肝臓脂質代謝への影響

- 出産前は出産後より血漿中トリグリセライドが高い
- 出産前は出産後より血漿中脂肪酸(アラキドン酸を除く)濃度が高い
- 野生型妊娠マウス血漿中トリグリセライドの増加抑制
- 野生型妊娠マウス血漿中脂肪酸、特に、リノール酸(C18)、 α -リノレン酸(C18)、パルミチン酸(C16)、オレイン酸(C18)の増加抑制
- 野生型マウスでのみ観察されるので、PPAR α 依存性の変化である。
- 肝臓MTP(TG 輸送蛋白)の発現抑制が一因

Hayashi et al Toxicology 2011
Nakashima et al Toxicology (2013)

親世代の生殖器への影響(次頁PP)

- DEHP曝露は雄の生殖器病理には殆ど影響を与えないが、血漿テストステロン濃度を上昇
- DEHP曝露は雌の卵巣のプロゲステロン/エストラジオール比を上昇。



目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) *DEHP胎仔期曝露の次世代影響*
 - 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
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - 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

胎生期DEHP曝露の仔の栄養状態 (必須脂肪酸)への影響

- 出産後2日目 (PND2)の肝臓中TG,脂肪酸濃度の方が胎仔よりはるかに高い(親マウスは妊娠期>出産後)
- DEHP曝露による影響は大きくない(死亡胎仔の測定は行っていないことに留意)
- PND2の肝脂肪酸の割合は母マウスの血漿中濃度の割合と類似
- 胎仔肝脂肪酸濃度の割合は母マウスと若干異なる(リノレン酸が少なく、ステアリン酸が多い)

Hayashi et al Toxicology 2011
Nakashima et al Toxicology 2013

	Pregnant ($\mu\text{mol/ml plasma}$)	Postpartum ($\mu\text{mol/ml plasma}$)	Fetus ($\mu\text{mol/g liver}$)	New-born pup ($\mu\text{mol/g liver}$)
LA	2.91 \pm 0.92 (34.4)	0.93 \pm 0.05 (34.5)	3.69 \pm 0.73 (8.6)	47.21 \pm 31.01 (24.5)
AA	0.46 \pm 0.19 (5.5)	0.28 \pm 0.09 (10.5)	2.76 \pm 0.44 (6.4)	13.86 \pm 2.67 (7.2)
ALA	0.09 \pm 0.03 (1.1)	0.01 \pm 0.00 (0.5)	0.04 \pm 0.01 (0.1)	0.60 \pm 0.45 (0.3)
EPA	0.11 \pm 0.03 (1.3)	0.06 \pm 0.02 (2.0)	0.29 \pm 0.06 (0.7)	1.40 \pm 0.77 (0.7)
DHA	0.47 \pm 0.20 (5.5)	0.15 \pm 0.02 (5.4)	3.58 \pm 0.68 (8.3)	21.76 \pm 5.31 (11.3)
Palmitic acid	1.90 \pm 0.71 (22.4)	0.59 \pm 0.12 (21.7)	12.32 \pm 2.93 (28.7)	45.66 \pm 16.17 (23.7)
Palmitoleic acid	0.08 \pm 0.04 (1.0)	0.04 \pm 0.02 (1.4)	0.60 \pm 0.10 (1.4)	1.83 \pm 1.13 (0.9)
Stearic acid	0.76 \pm 0.25 (9.0)	0.34 \pm 0.05 (12.6)	15.85 \pm 4.08 (36.9)	32.57 \pm 2.78 (16.9)
Oleic acid	1.67 \pm 0.59 (19.7)	0.31 \pm 0.04 (11.3)	3.81 \pm 0.67 (8.9)	27.92 \pm 20.78 (14.5)
Total FAs	8.46 \pm 2.83	2.71 \pm 0.15	42.95 \pm 8.90	192.80 \pm 78.65

Nakashima et al., 2013¹⁵

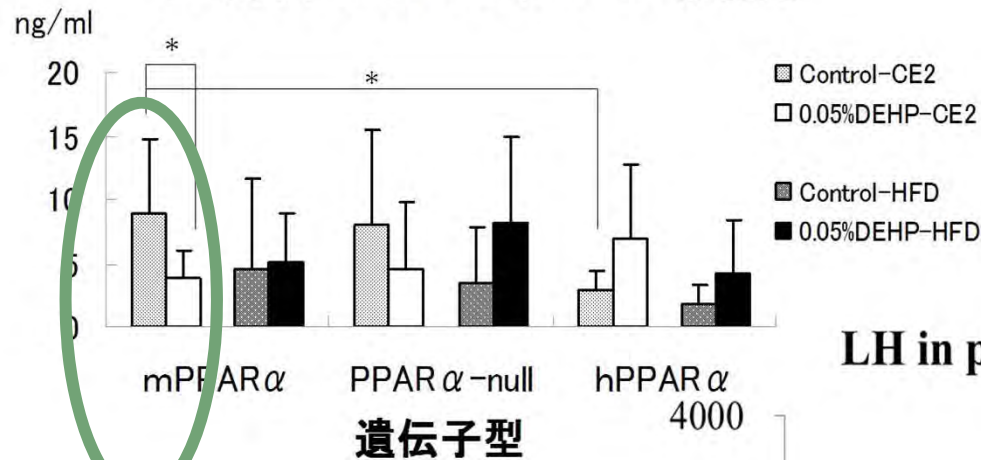
野生型コントロールマウス血漿あるいは肝臓脂肪酸構成割合

目的

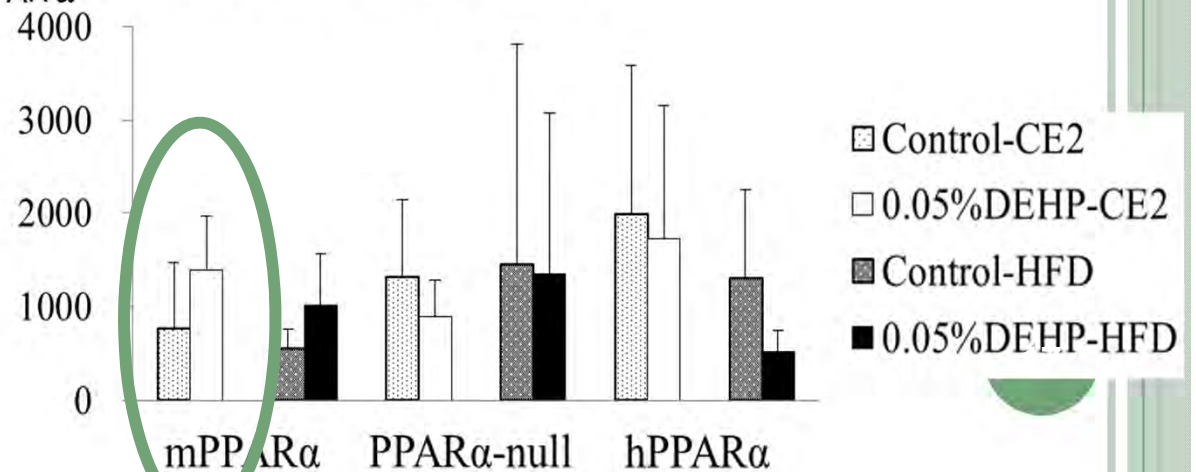
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- **2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響**
 - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
 - **生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明**
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR α の役割および種間差

胎生期・授乳期DEHP曝露の 次世代影響(11週齢)

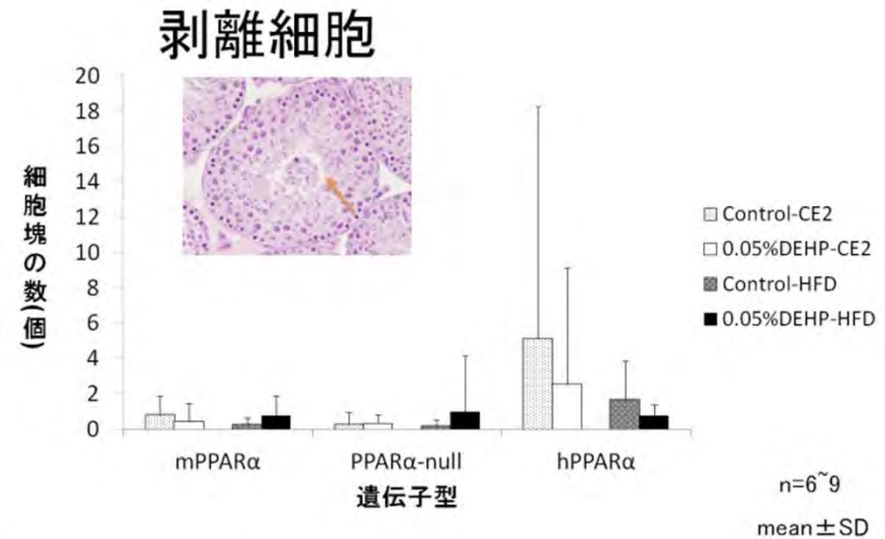
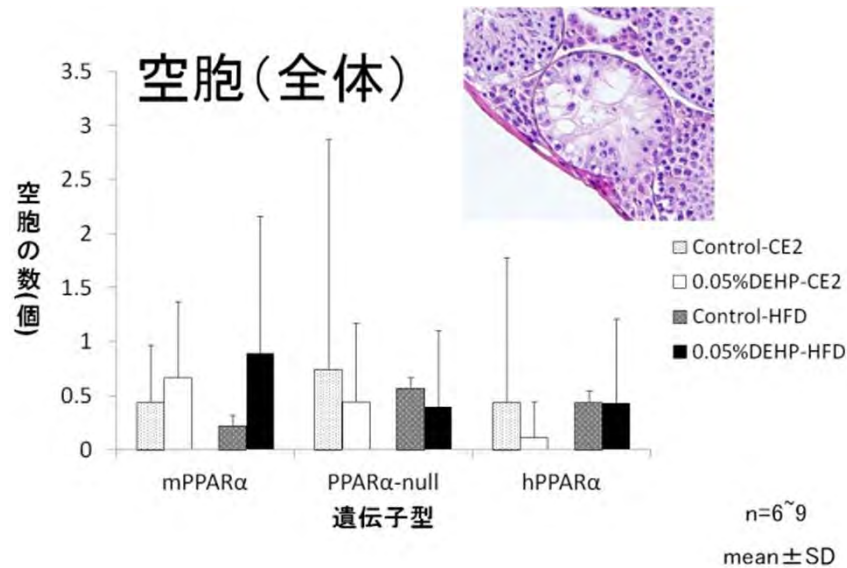
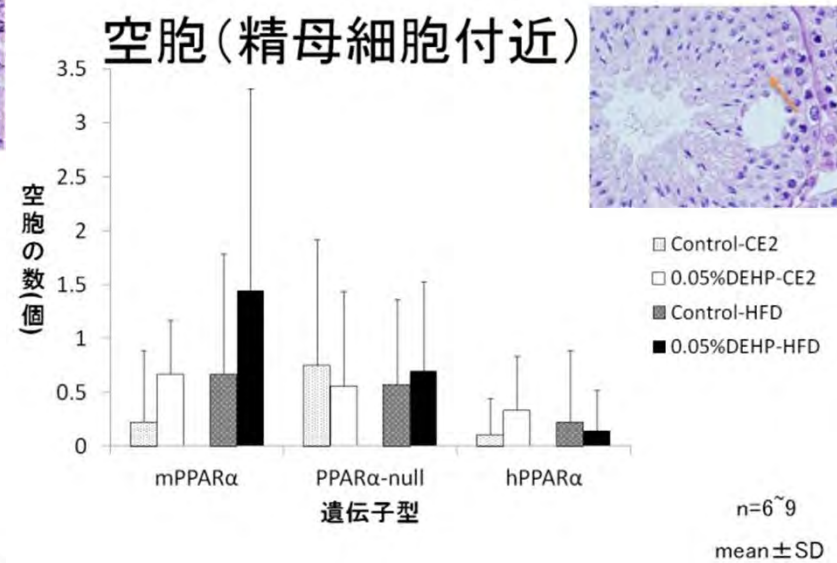
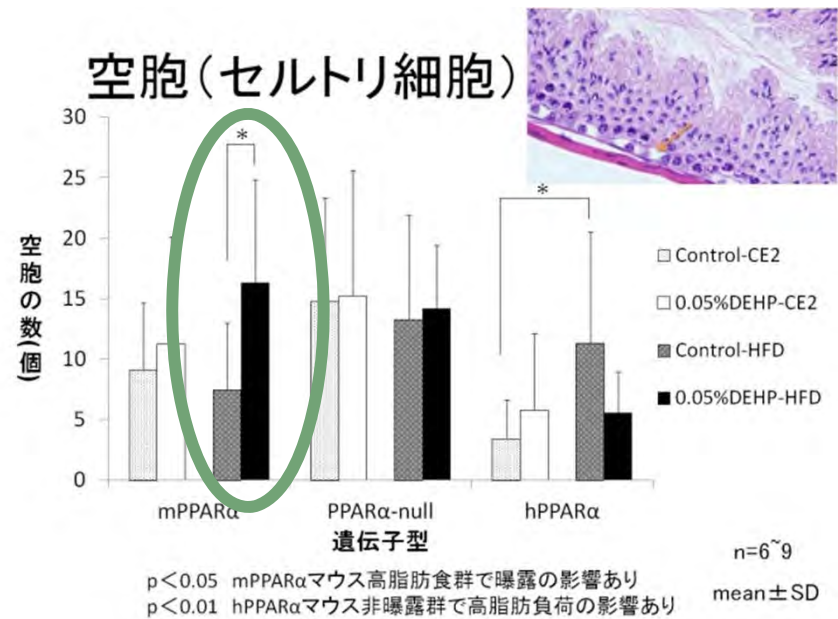
血漿テストステロン濃度



LH in plasma (pg/ml)



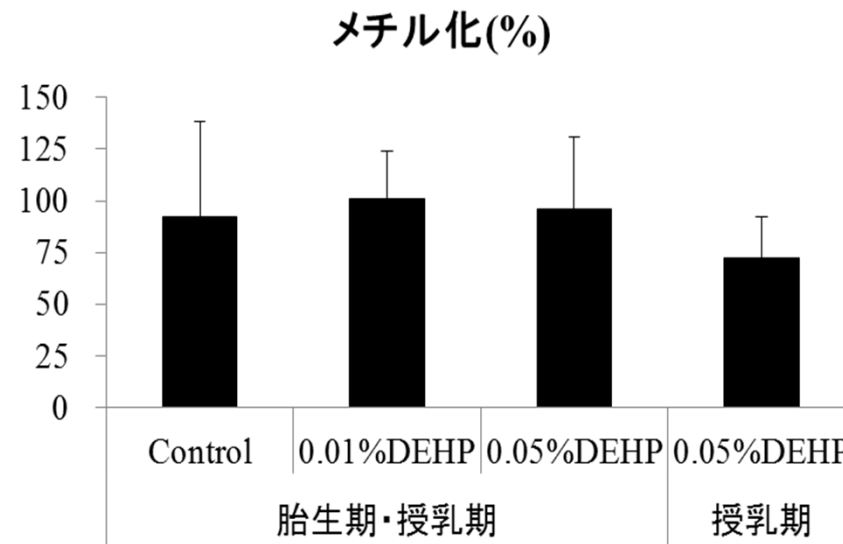
胎生期・授乳期DEHP曝露の次世代影響(11週齢)



目的

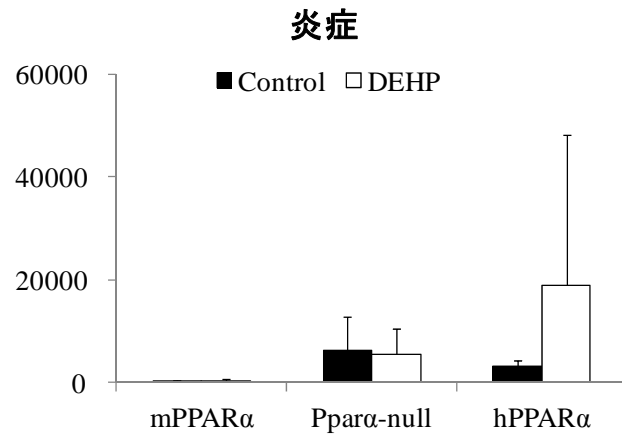
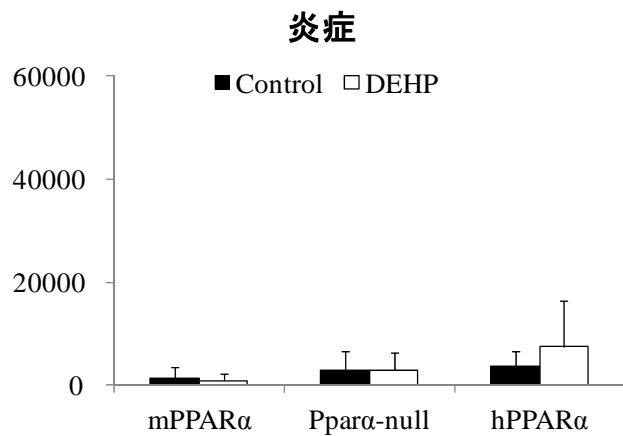
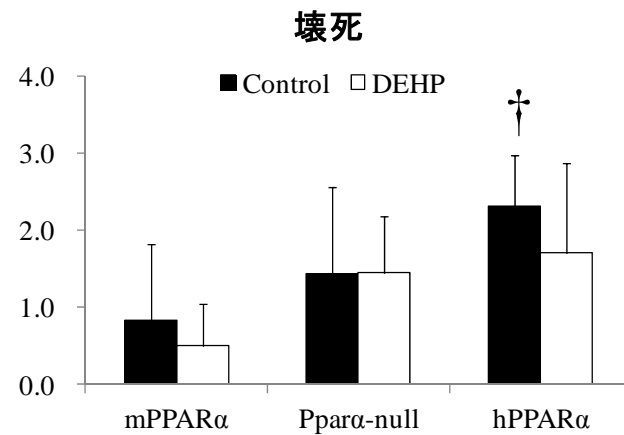
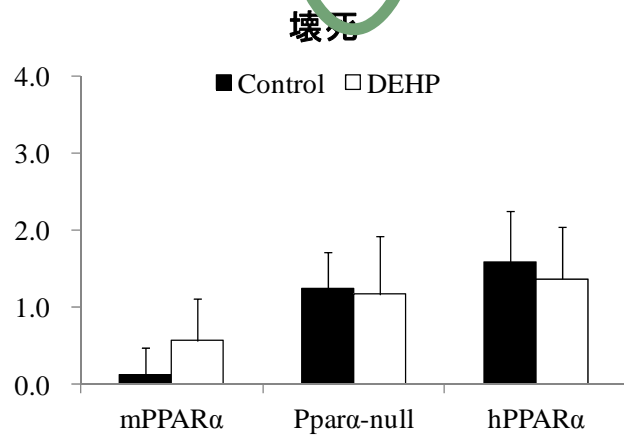
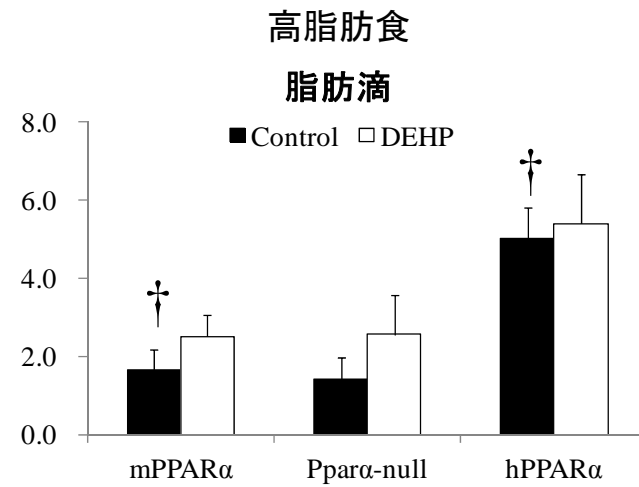
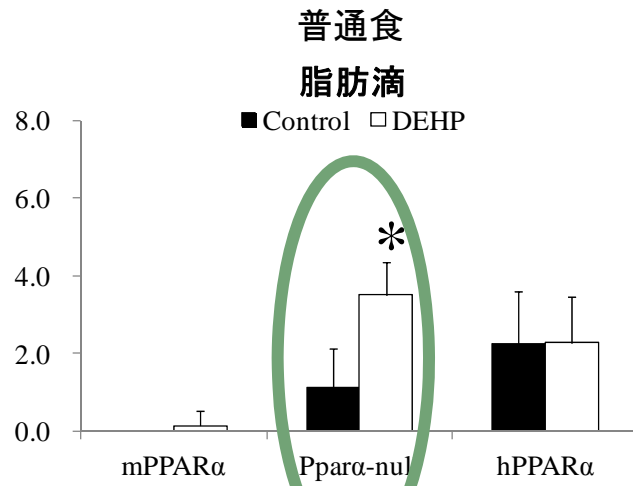
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) **DEHP胎仔期曝露の次世代影響**
 - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - **PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響**
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR α の役割および種間差

DEHPの胎生期曝露はPPAR α のメチル化割合には影響を与えなかった

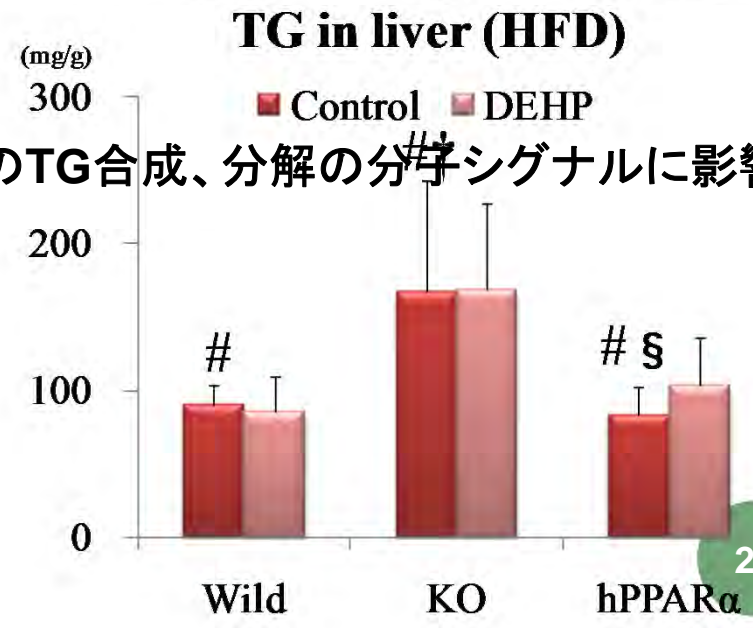
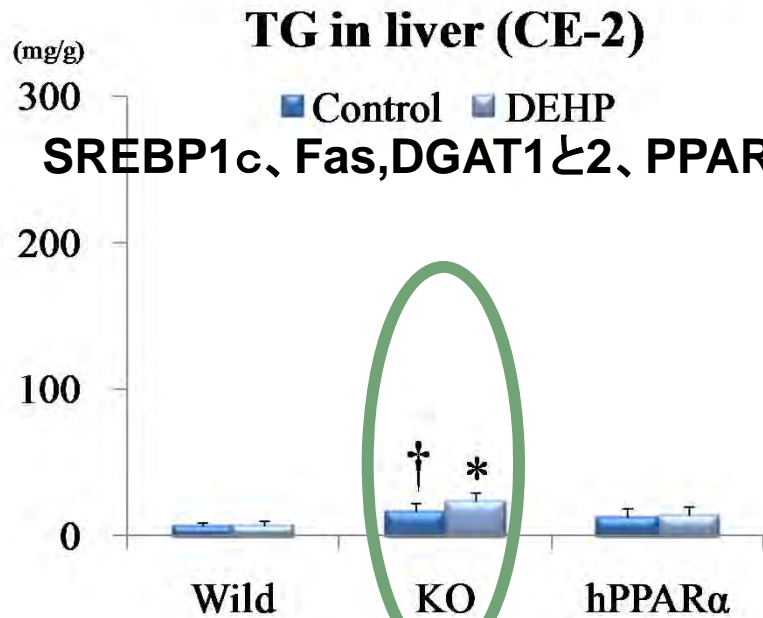
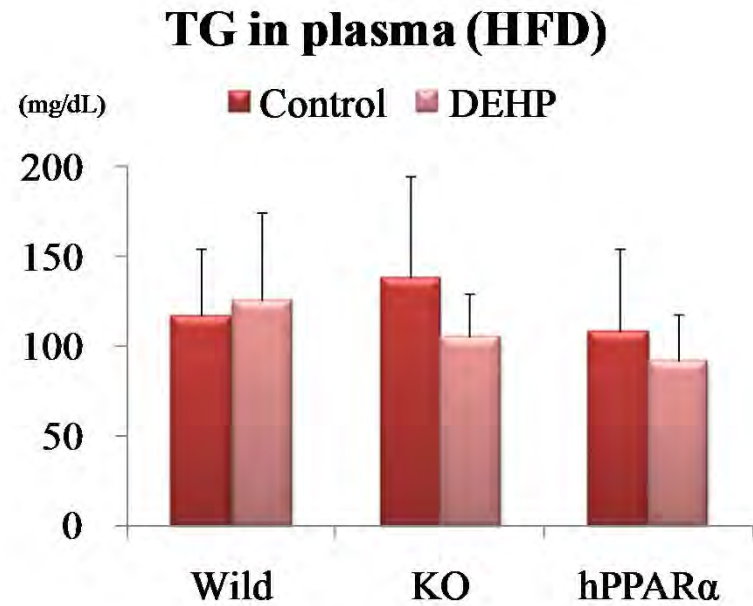
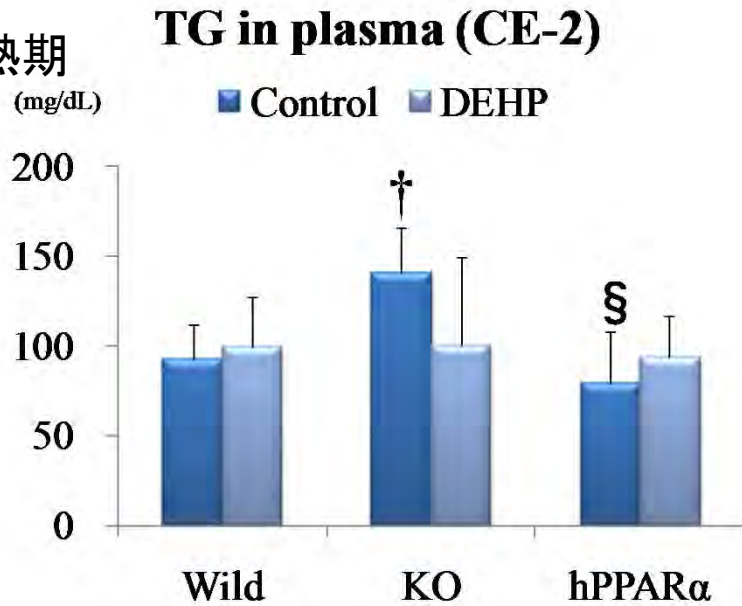


20

肝臓の脂質濃度 (TG) に影響を与えたが、TC には影響を与えなかった (PPAR α ノックアウトマウス)



成熟期



SREBP1c、Fas、DGAT1と2、PPAR α 等のTG合成、分解の分子シグナルに影響なし

*significantly different from respective control group. (p<0.05) †Significantly different from control group in wild-type mice. (p<0.05)

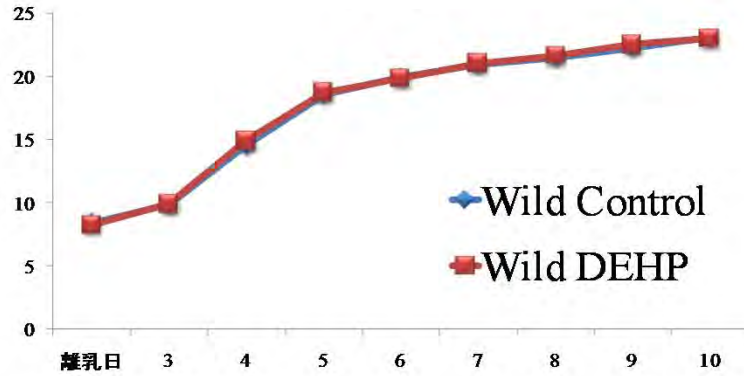
#Significantly different from respective CE-2 control group. (p<0.05) § Significantly different from control group in KO mice(p<0.05)

目的

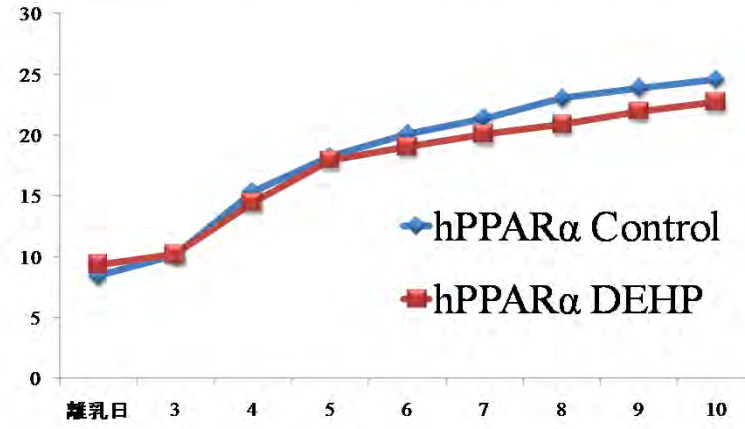
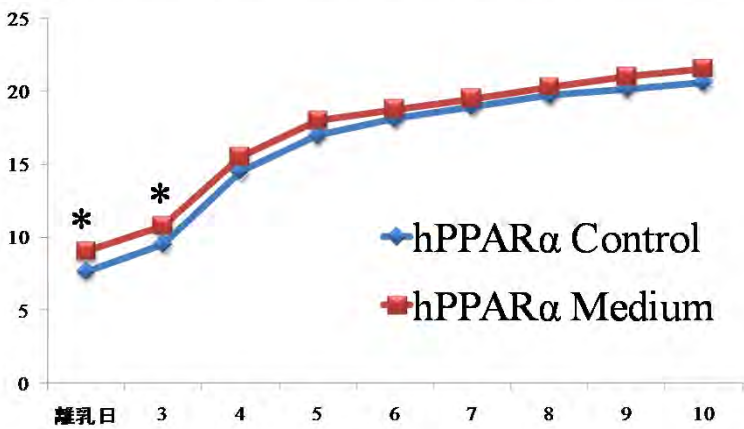
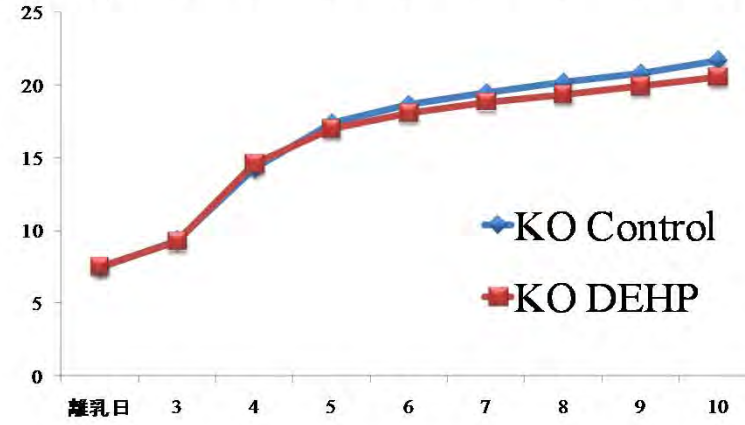
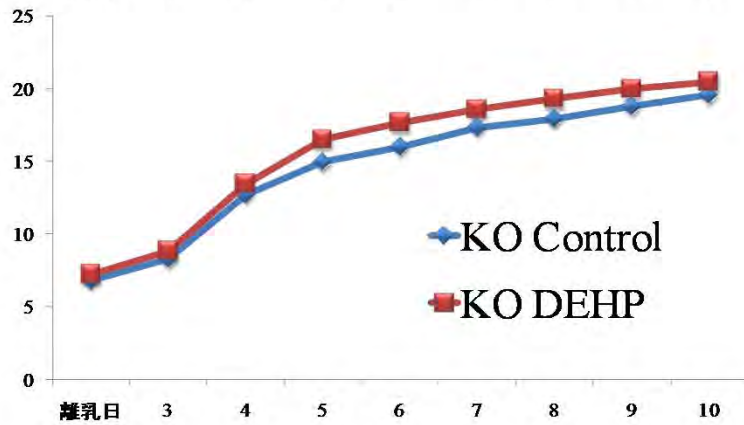
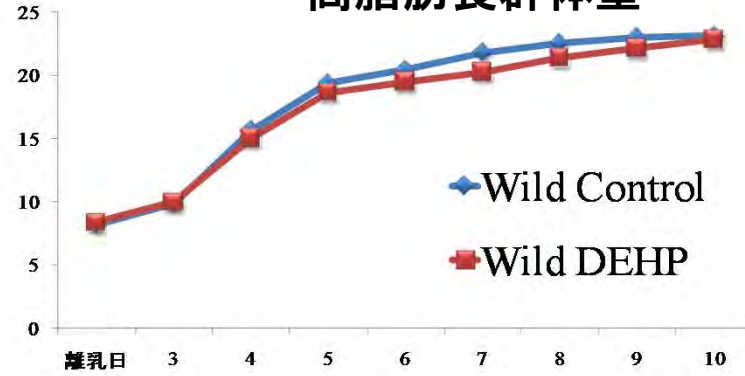
- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
 - 栄養状態(必須脂肪酸)への影響および分子メカニズム解析
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - マウス、ヒト肝のDEHP代謝酵素の種間差・体内動態におけるPPAR α の役割および種間差

離乳後の体重・摂餌量への影響

普通食群体重



高脂肪食群体重



考察

- DEHP曝露により離乳期に血漿中レプチン濃度の減少は、離乳期から成熟期にかけての摂餌量増加に関与しているのかもしれない。
- 成熟期・授乳期DEHPはレプチン濃度を上昇させたが、授乳期の曝露した場合レプチンの減少は認められなかったことから、**胎生期曝露**の重要性が明らかとなった (DEHPの曝露は胎生期>授乳期 Hayashi et al, Arch Toxicol 2011)。
- 胎生期DEHP曝露による影響は**PPAR α 遺伝子を持つ**マウスのみでみられたことから、PPAR α が重要な役割を担っているのかもしれない。

目的

- 1) DEHP曝露の親世代への影響
- 2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響
 - 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
 - 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
 - PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
 - 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
 - 脳への影響: 学習・行動(海馬)
- 3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割
 - 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

胎生期DEHP曝露の学習・行動への影響

- 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。
- 胎生期DEHP曝露のこれらの遺伝子発現系にはほとんど影響を与えなかった
- 一方、高脂肪食の影響は多くの遺伝子発現に観察され、成長期の栄養状態(特に高脂肪食摂取)の重要性が提示された。別の研究費で詳細に検討する必要がある。

目的

➤1) DEHP曝露の親世代への影響

➤2) DEHP胎仔期曝露の次世代影響

- 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
- 生殖器・性腺ホルモン系への影響、分子メカニズムの解明
- PPAR α のエピジェネティクス変化と生活習慣病への影響
- 脳への影響: 摂食行動(視床下部・下垂体)
- 脳への影響: 学習・行動(海馬)

➤3) DEHP代謝の種間差とPPAR α の役割

- 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

方法と結果

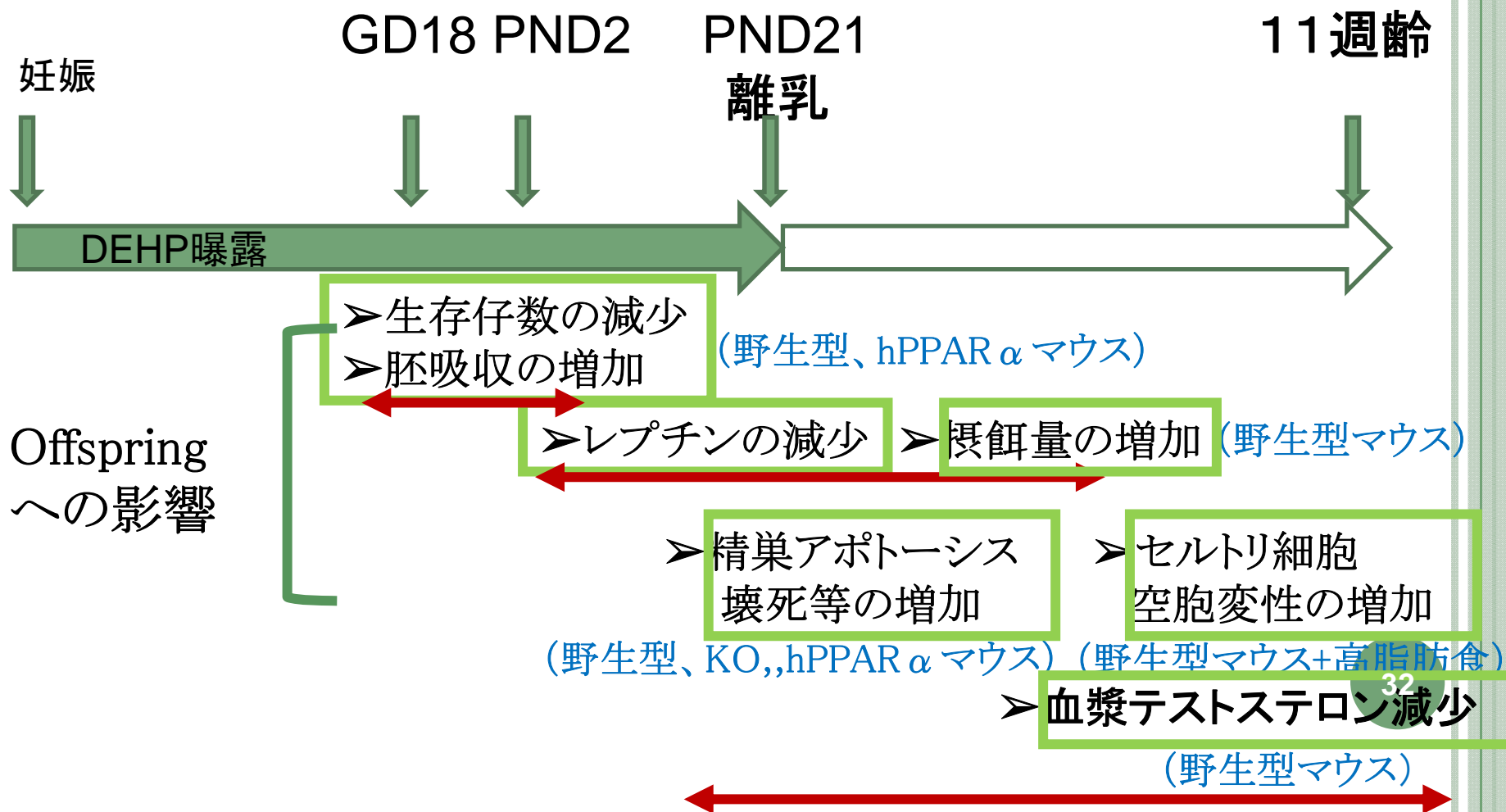
- ヒトの肝臓は倫理審査委員会承認後、NPO法人 HAB研究機構より入手した。内訳は、白人男性24人(10代:1、20代:1、30代:5、40代:5、50代:5、60代:4、70代:2、80代:1)、白人女性5人(40代:5)、アジア系:1人、黒人:3人、ヒスパニック:5人である。
- リパーゼ活性、UGT活性、ADH、ALDH活性、マウスの尿中代謝物を測定



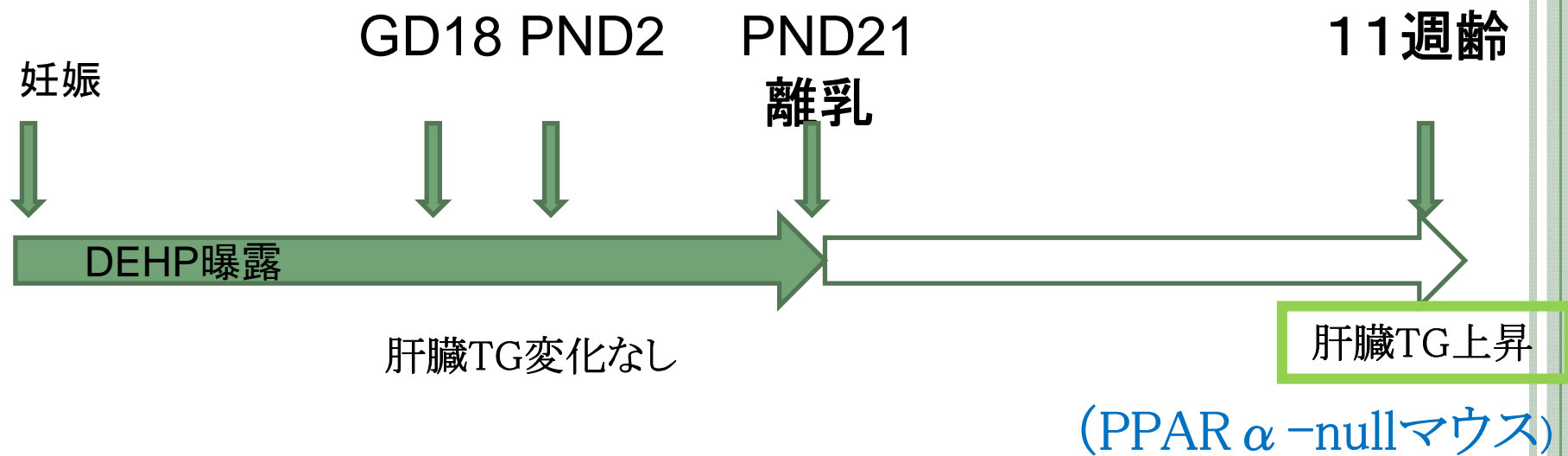
3年間の研究総括

31

DEHP胎生期・授乳期曝露の次世代影響とPPAR α 遺伝子



DEHP胎生期・授乳期曝露の 次世代影響(11週齢肝臓脂質)とPPAR α 遺伝子



DEHP胎生期・授乳期曝露とDOHaD

- PPAR α -nullマウスの肝臓脂質 (TG)の上昇
- 病的にはPPAR α -nullマウスの肝臓脂肪滴の増加
- 離乳後の高脂肪食負荷すると影響は消える
- 上記所見は野生型マウスではみられない
- PPAR α -nullマウスは β 酸化酵素の活性が極めて低いので、これが影響しているか検討が必要

DEHP代謝の種差と個体差

- **DEHP**代謝の種間差と**PPAR α** の役割
- リパーゼ(5.1倍)、UGT(5倍)、ALDH(1.5倍) : マウス > ヒト
ADH(2倍) : マウス < ヒト
- **DEHP**の尿中代謝物はマウス > ヒト、しかし、代謝物によってはヒト > マウス (特に5cx-MEPPと5OH-MEHP)
- PPAR α は5cx-MEPPの経路に関与
- いずれの酵素活性も個人差が10から28倍
- 種差と個体差の不確実係数はすくなくとも、それぞれ10

今後の課題

- 野生型のみを観察された影響が多く、PPAR α に關与しているかもしれないが、詳細なメカニズム解析は今後の課題
- 仔マウス(次世代)への影響は研究費の關係で1doseしか検討していない。量-反応關係も検討する必要がある。
- DEHPの胎生期曝露の生存仔マウスの減少は、DEHPの直接影響か、親マウスの脂質代謝への影響の間接影響か？
- ヒトでの疫学研究が必要