

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K16343

研究課題名(和文) 生体コンディションに依存した可塑剤毒性増幅現象の解明

研究課題名(英文) Analysis of health condition depending augmentation of plasticizer toxicity

研究代表者

藤澤 彩乃 (Fujisawa, Ayano)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・特任助教

研究者番号：10624885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：医療機器をはじめ多くのポリ塩化ビニル(PVC)製品に柔軟性を付与する目的で添加されている可塑剤は、生体への溶出とそれによる潜在毒性について疑義が呈されているが、感度の良い毒性評価法が存在せず、潜在リスクの見逃しにつながっている。

本研究では、可塑剤として従来使用されてきたBis-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP)の炎症惹起性が末梢血の細胞性免疫に由来することを明らかにし、他の代替可塑剤候補の炎症惹起性についても同様の機構が働いていることが示唆された。また、評価試験系の候補として細胞株および指標となる因子について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかにした可塑剤の炎症惹起機構は、新規可塑剤の開発においてより安全性の高いものを選択する指標として有意義である。同時に、こうした可塑剤の炎症惹起性を試験する方法として、単純かつ検出可能な感度を有する試験系を発見したことで、スクリーニングの時間を短縮し、生体に近い反応を評価できる点において社会的意義が高い。

研究成果の概要(英文)：Although plasticizers are told to remain health risks, we can't live without non-rigid plastic products that are made from polyvinyl chloride and plasticizer. In this study, we elucidated that the plasticizer-derived inflammation is a result of the cell-mediated immune response. We also proposed a test sequence which consists of T-cell and inflammatory cytokines. These results would improve developmental efficiency of substantial plasticizer, mainly in the meaning of safety.

研究分野：医用工学

キーワード：可塑剤 毒性

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体適合性の高い材料であるポリ塩化ビニル (PVC) は、その柔軟性を可塑剤の混合割合によって調整している。使用中の PVC 製品からの可塑剤溶出は、安全性においてリスクを孕むことが世界的に疑義として呈されており、可塑剤として従来多用されてきた Bis-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) はげっ歯類への雄性生殖障害が報告されていることから、外挿性の観点から実質的な毒性なしと結論されていながらも、乳幼児玩具および乳幼児が口にする可能性のある育児用品について使用が規制されている。

医療分野においても軟質 PVC 製品を欠くことはできないが、上述のリスクから DEHP の代替可塑剤を使用した製品への移行が進んでいる一方で、医療機器からの DEHP 溶出・生体移行は、その使用期間と同様に永続的でないという点から、一部代替不可能な製品や代替が遅れている分野においては DEHP 使用を容認している。実際には、半永続的な曝露が行われる慢性病態であっても DEHP 使用 PVC が利用される局面があり、慢性腎不全の例では、透析熱の原因として DEHP の炎症惹起作用が一端となる可能性を有する。ヒト新鮮血を用いた発熱性試験において、DEHP の濃度依存的に炎症性サイトカイン産生量が増加することを確認しているが、反応性については実験回によって偏差が大きく、免疫系の活性状態に依存する可能性が伺えた。すなわち、健康な動物を用いての安全性評価は、一般状態の良くない患者に対しての炎症惹起性を検出できない可能性があり、潜在的なリスクを見逃す危険性を有すると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、炎症反応を増幅するものを明らかにし、また、関連する因子を解析することで DEHP などの可塑剤が持つ炎症惹起性を高感度で評価できる試験系を提案することを目的とした。

### 3. 研究の方法

DEHP の他に代替可塑剤候補として、Di(2-ethylhexyl)terephthalate (DEHTP)、Di(2-ethylhexyl)-1,2,3,6-tetrahydrophthalate (DOTP)、Trioctyltrimellitate (TOTM)、Acethyltributylcitrate (ATBC) をそれぞれ用い、血清に一定量を懸濁したものをサンプルとして 24 時間の共培養を行った。

(1) ラットを用い、発熱・運動・栄養の観点から負荷をかけた個体から得た血液を用いて、可塑剤との共培養を行い、反応性の高い条件を探索した。

(2) 健常ヒト新鮮血と可塑剤との共培養を行い、白血球分画から抽出した mRNA を精製して網羅的解析とパスウェイ解析を実施し、炎症惹起の作用点を解析した。

(3) 炎症惹起の作用点を発現する単一細胞の試験系を立ち上げ、炎症惹起性の検討を行った。

### 4. 研究成果

(1) 負荷をかけたラット由来の血液と、可塑剤とを共培養し、炎症性サイトカインを測定したが、容量依存的な炎症反応を増強して検出することはできなかった。

(2) 健常ヒト新鮮血を用いた可塑剤との共培養試験において、可塑剤の種類ごとの反応の差異および容量依存性を観察することができた (図 1)。

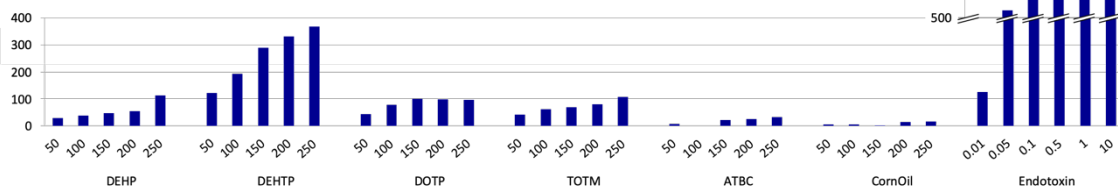
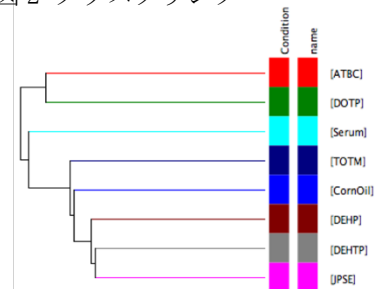


図 1 培養上清中の IL-6 濃度。縦軸は IL-6 濃度 (µg/mL)、横軸は添加サンプルの濃度 (µg/mL)、Endotoxin のみ (EU/mL)。

また、培養後血液の白血球分画から mRNA を抽出し、Microarray 解析に供した (図 2 および表 1)。図 2 で示すように、発現パターンから判断すると、炎症惹起性の低い可塑剤あるいは抑制性に働く結果を示した可塑剤に対して、容量依存的に炎症惹起性を示した可塑剤は、異なるクラスターに属することが示された。発現量の増減を認められた因子数については表 1 に示した通りであるが、さらにパスウェイ解析を行ったところ、炎症惹起性を示した可塑剤群において、免疫関連の複数のパスウェイが関連しており、特に貪食による免疫機構が強く関連することが

図 2 クラスタリング



示唆された。

表 1 Microarray およびパスウェイ解析結果

	Chenged Entities		Related Pathway (Representative)	
	2.0 >	< -2.0	UP	DOWN
DEHP	8202	724	Cytokines&Inflammatory Response (0.066), Inflammatory Response Pathway (0.142), Type III Interferon Signaling (0.247)	IL1&megakaryocytes (0.004), Inflammatory Response Pathway (0.065), Cytokines&Inflammatory Response (0.297), IL17 Signaling Pathway (0.343), Nuclear Receptors in Lipid Metabolism and Toxicity (0.361), IL3 Signaling Pathway (0.485)
DEHTP	5131	1000	Nuclear Receptors in Lipid Metabolism and Toxicity (0.074), Cytokines&Inflammatory Response (0.206), TGFb Signaling Pathway (0.366)	TGFb Signaling Pathway (0.020), Inflammatory Response Pathway (0.022), TGFb Signaling Pathway (0.113), IL1&megakaryocytes (0.374), T-cell Receptor&Co-stimulatory Signaling (0.421)
DOTH	6753	2130	IFNG Signaling (10 <sup>-5</sup> ), Cytokines&Inflammatory Response (10 <sup>-4</sup> ), Inflammatory Response Pathway (0.010), TLR Signaling Pathway (0.075), Type III Interferon Signaling (0.114), Regulation of TLR Signaling Pathway (0.166), IL1&megakaryocytes (0.339), TGFb Signaling Pathway (0.499)	IL1&megakaryocytes (10 <sup>-4</sup> ), TGFb Signaling Pathway (0.003), Inflammatory Response Pathway (0.011), TGFb Signaling Pathway (0.034), Regulation of TLR Signaling Pathway (0.042), Cytokines&Inflammatory Response (0.107), TLR Signaling Pathway (0.135), IL3 Signaling Pathway (0.172), TCR Signaling Pathway (0.211), IL1 Signaling Pathway (0.228), IL4 Signaling Pathway (0.228), IL6 Signaling Pathway (0.311)
TOTM	7022	859	Inflammatory Response Pathway (0.335)	Inflammatory Response Pathway (0.013), TGFb Signaling Pathway (0.159), TGFb Signaling Pathway (0.212), Eicosanoid Synthesis (0.274), IL1&megakaryocytes (0.319), T-Cell Receptor&Co-stimulatory Signaling (0.362), TCR Signaling Pathway (0.420), IFNG Signaling (0.447), TLR Signaling Pathway (0.452)
ATBC	7353	2015	Cytokines&Inflammatory Response (0.121)	IL1&megakaryocytes (10 <sup>-8</sup> ), Cytokines&Inflammatory Response (10 <sup>-7</sup> ), Eicosanoid Synthesis (10 <sup>-6</sup> ), TLR Signaling Pathway (10 <sup>-4</sup> ), Regulation of TLR Signaling Pathway (0.004), PG Synthesis&Regulation (0.007), TGFb Signaling Pathway (0.008), Inflammatory Response Pathway (0.008), IFNG Signaling (0.016), TGFb Signaling Pathway (0.022), IL6 Signaling Pathway (0.032), IL4 Signaling Pathway (0.072), TCR Signaling Pathway (0.073), Pathogenic Escherichia coli Infection (0.083)

(3) (2)の結果を受け、食食を主とした免疫反応を行う細胞系での毒性試験を行った。同時に、指標とする因子についても検討を行った。

T リンパ球由来細胞株である HuT78 細胞および単球由来細胞株である THP-1 細胞について、可塑剤懸濁液との共培養試験を行った結果、HuT78 細胞では添加による炎症性サイトカインの上昇が見られたが、THP-1 細胞では測定圏内での反応は見られなかった。右に示した図 3 は、HuT78 細胞を用いた試験の、培養上清中 IL-2 および IL-13 濃度である。添加後の時間に応じた産生量の推移が見られ、また、最大反応時における血清との反応性の差も観察することができた。IFN- $\gamma$  を指標とした系では同様の変化を検出することはできなかった。

この結果は、末梢血を用いた試験において容量依存的な炎症性サイトカインの産生が見られた現象とも一致し、可塑剤に対する炎症反応の主体は T リンパ球であると考えられる。また、(1)の負荷はいずれも細胞性免疫を効率よく活性化させるものではなかったことから、可塑剤の炎症惹起性を増強することに失敗した現象とも一致している。

本研究では到達できなかったが、T リンパ球が主体となる免疫亢進状態において、可塑剤の炎症惹起性が増強されて検出されることを確認することが必要である。

また、本研究で用いた HuT78 細胞株の反応性についても、十分に良いと判断できるものではなかった。IL-2 と IL-13 を指標とし、より反応性の高い細胞株を探索あるいは遺伝子導入等の手法にて得ることは、今後継続して研究する必要がある。

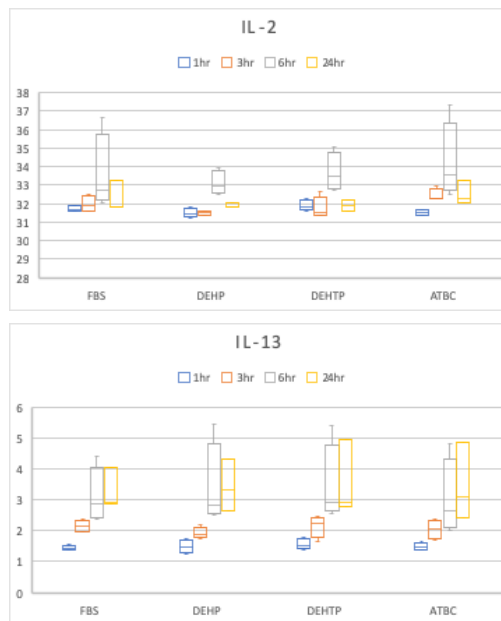


図 3 HuT78 細胞の毒性試験結果

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 3 件）

- ① 「医療用プラスチック製品の各種可塑剤に対する炎症誘導能評価法の再現性・頑健性評価」第 3 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 優秀ポスター賞受賞（2017 年 9 月・東京）
- ② 「医療用プラスチック製品の各種可塑剤に対する炎症惹起メカニズムの解析」第 38 回日本バイオマテリアル学会大会（2016 年 11 月・福岡）
- ③ 「医療用プラスチック製品の各種可塑剤に対する炎症惹起性の評価」第 37 回日本バイオマテリアル学会大会（2015 年 11 月・京都）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。