

2005011557A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

— 恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚した

リスク評価研究— (H17-化学-001)

平成 17 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 18(2006)年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究  
—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—  
(H17-化学-001)

平成 17 年度 総括研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 18(2006)年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告書

研究の総括

江馬 眞

..... 1

### II. 分担研究報告書

1. 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析

江馬 眞

..... 7

2. 胎生期化学物質暴露により誘発される脳発達障害の胎児脳における解析

桑形 麻樹子

..... 15

3. 神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究

中島 欽一

..... 23

4. 自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤に関する研究

竹田 潔

..... 31

5. 子どもに対する化学物質暴露影響の内分泌的観点からの解明

渡邊 肇

..... 41

6. 成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究

菅野 純

..... 47

7. 小児白血病・小児腫瘍の発生における母体を介した化学物質・発ガン物質・薬物等による影響及び、ES 細胞を用いた化学物質影響解析

田上 昭人

..... 59

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... 63

### IV. 研究成果の刊行物・別刷

..... 65

別添 3

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—

主任研究者 江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・総合評価研究室・室長

研究要旨

本研究は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で子どもが経験する、高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえた、化学物質の有害作用発現の、子どもとしての特異性を解明することを目的とする。これにより、従来より盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とする。背景として、日常生活に於いて使用される数万種類に及ぶ化学物質の、子どもに対する有害性に関する研究は、催奇形性の評価を別にすれば大人に対するそれと比べ十分ではないとの指摘がある。具体的には、研究班を「恒常性維持機構発達解析」と「外挿問題解析」に分けて組織した。「恒常性維持機構発達解析」は更に、発生成長段階検討、神経、免疫、及び内分泌に、「外挿問題解析」、化学物質の大人への影響評価結果を子どもへの評価に外挿する研究と、実験動物とヒトの間を結びつける研究とに分けて研究を進め、化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見を集積した。

分担研究者

江馬眞 国立医薬品食品衛生研究所  
総合評価室室長  
中島欽一 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・動物代謝調節学講座・分子神経分化制御学分野  
桑形麻樹子(財)食品薬品安全センター・秦野研究所・試験部・安全性試験室・研究員  
竹田潔 九州大学・生体防御医学研究所・発生活工学分野・教授  
渡邊肇 自然科学研究機構・基礎生物学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンタ

一・生命環境・助教授

菅野純 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター毒性部部长  
田上昭人 国立生育医療研究センター・薬剤治療研究部部长

A. 研究目的

本研究の目的は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で、子どもが経験する高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえた、化学物質の有害作用の発現の、子どもと

しての特異性を解明することである。これにより、従来より盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とする。

## B. 方法

研究班を【恒常性維持機構発達解析】と【外挿問題解析】に分けて組織した。

### 【恒常性維持機構発達解析】

#### <発生成長段階検討>

14日間反復投与毒性試験、反復投与毒性、生殖発生毒性併合試験、新生児投与試験を実施した(江馬)。

#### <神経>

ES細胞から神経系細胞への分化に於けるRAの影響、RAの胎仔神経幹細胞分化に於ける影響、神経幹細胞分化に於けるVPAの影響について検討した(中島)。及び、胎生期BrdU暴露誘発性の多動性障害モデルを用いて、生後に発現する多動性障害発現の臨界期を検討した(桑形)。

#### <免疫>

自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する自然免疫系特異的Stat3欠損マウス、IL-10ノックアウトマウスを用いて活性を制御する分子機構を解析し、さらに子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を解析した(竹田)。

#### <内分泌>

マウス(C57BL/6J)を動物実験に関する指針に従い飼育し、交配した新生仔マウスを用いて新生仔期(出生直後から5日間)、成熟期(生後10週間)に化学物質としてジエチルスチルベストロール(DES)暴露を行った。暴露による組織学的な変化について解析を進めると同時に、エストロゲンの主要な標的機関である子宮と膈からRNAを調製し遺伝子発現プロファイルの解析を進めた(渡邊)。

### 【外挿問題解析】

モデル化合物を用いた解析として、ヒドロキシクエン酸によるラットに於ける精巣毒性に関して網羅的遺伝子発現解析結果を基に、幼若、成体の感受性の差の原因の解明を進めた(菅野)。

ES細胞を用いた各臓器への化学物質影響のモデル解析として、小児白血病、小児腫瘍の発生に於ける母体を介した化学物質による影響の検討、またマウスES細胞を用いた化学物質に対する毒性の検討を行った(田上)。

## C. 結果

### 【恒常性維持機構発達解析】

発生成長段階検討に加え、脳神経系、免疫系、内分泌系の3つの高次生体機能について化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見を集積した。

#### <発生成長段階検討>

紫外線吸収剤DBHCBを6週齢のラットに反復経口投与したところ、雄では肝臓重量増加等が認められたが、雌では全く影響がみられなかった。新生児期雌雄ラットへの経口投与では、雌雄ともに肝臓への影響が認められた(江馬)。

#### <神経>

神経幹細胞分化に於ける作用及び作用機序の検討を行い、催奇形物質であるレチノイン酸がマウスES細胞の早期アストロサイト分化を誘導し、抗痙攣剤であり自閉症を誘発するとされているバルプロ酸がマウス胚神経幹細胞からオリゴデンドロサイト分化を抑制することを見出した(中島)。

遺伝子毒性物質として知られているBrdUをラットの9-15日に投与したとき出生児に多動性障害が認められ、妊娠9-10日投与では多動性障害はみられず、投与が後期になるほど多動性障害が顕著になった(桑形)。

## <免疫>

多細胞生物に共通に保存された免疫系である自然免疫系に関し、自然免疫系がToll-like receptor (TLR)を介して病原体を認識し活性化されるメカニズムの一端を明らかにした。自然免疫系の活性を制御するメカニズムを、DNAマイクロアレイを用いて解析した結果、核に発現するI $\kappa$ B分子であるI $\kappa$ BNSが、炎症刺激によって発現変動する遺伝子の中で特定のサブセットの発現を選択的にブロックし、個体レベルでも炎症を抑制することを明らかにした(竹田)。

## <内分泌>

マウスの新生児期、幼若期、成熟期にエストロゲン様化学物質ジエチルstilbestロールを暴露し、臍からRNAを調製し、DNAマイクロアレイによりその遺伝子発現変化を解析した(渡邊)。

## 【外挿問題解析】

化学物質の大人への影響評価結果を子どもへの影響評価に外挿するための研究、実験動物とヒトとを結びつける研究を進め、子どもの特性を踏まえた化学物質リスク評価に寄与する知見を集積した。

ヒドロキシエン酸による精巣毒性はラットに於いて若齢ほど毒性が強く発現することを見だし、成長段階の違いにより毒性影響に差が出るメカニズムを精巣恒常性維持機構発達と関連づけて解析した(菅野)。

マウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いたEST法にて薬物の毒性評価を行った。抗ガン剤の5FU、AraCは強毒性と評価された。バルプロ酸、カルマバゼピンは弱毒性と判定され、これらの評価は動物を用いた評価と一致した。一方、抗うつ剤のパロキセチンはEST法では強毒性との評価が得られた(田上)。

## D. 考察

本研究によって期待される成果は、子どもに対する化学物質の影響を高次生体機能の恒常性維持機構発達メカニズムの成熟過程に基づいて考察し、リスク評価することが可能となることにある。高次生体機能恒常性維持機構発達メカニズムは医学的、生理学的な観点から基礎研究が進められている分野であるが、それらにより得られる知見は、化学物質の影響評価に直接役立てることは難しいものがほとんどである。それに対し本研究では、化学物質影響の発現が強く予想される高次生体機能恒常性維持機構の発達に焦点を絞って戦略的に基礎研究を進め、リスク評価に応用可能な基礎的知見の取得を目指した。具体的には、【恒常性維持機構発達解析】に於いて、神経系、免疫系、内分泌系のそれぞれについて次の知見を得た。神経系について、神経幹細胞分化に対しレチノイン酸とバルプロ酸が影響を与えること、レチノイン酸は早期アストロサイト分化誘導、バルプロ酸はオリゴデンドロサイト分化抑制作用を有することを明らかにした。免疫系について、自然免疫系の活性制御分子としてI $\kappa$ BNSを同定し、I $\kappa$ BNSが個体レベルで炎症を抑制する機能を担っていることを明らかにした。内分泌について、新生児期、幼若期、成熟期にジエチルstilbestロール暴露を行った臍のマイクロアレイデータを取得した。【外挿問題解析】に於いては、ヒドロキシエン酸による精巣毒性について、暴露時期が早いほど毒性が強く出ることを明らかにし、そのメカニズムとして複数の遺伝子が関与していることを示唆する結果を得た。マウスES細胞を用いたEST法について、本法による毒性評価結果は従来の方法による評価とほぼ一致する一方、パロキセチンについては異なる評価結果となることが分かった。

今後はこれら今年度取得した成果を生かし、化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見を引き続き集積する。

## E. 結論

化学物質による子どもへの健康影響リスク評価に役立てる基礎的知見を得るため、発生成長段階検討、脳神経系、免疫系、内分泌系、外挿問題解析の各テーマについて基礎研究を推進し、研究課題初年度として次年度につながる成果を上げた。次年度以降も同じ構成で基礎研究を進め、「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎を固める。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Emma M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol* (in press)

Emma M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol* (in press)

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Emma M. Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto* (in press)

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向(第8報)－第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第18回初期評価会議までの概

要、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Emma M, Hasegawa R. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific  $\alpha 2u$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35-47, 2006.

Emma M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Emma M. In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, 588, 129-135, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Emma M, Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-*tert*-butylphenol and 2,4-di-*tert*-butyl phenol toxicity. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 146-153, 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Emma M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 137-145, 2005.

松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第20回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 445-453, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向(第7報)－第15回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議(2002年ボストン)、衛研報告、123, 46-52, 2005.

松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第

19 回初期評価会議概要, 化学生物総合管理学会誌 1, 280-288, 2005.

Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Enami T, Wada H, Ogata H, Yamamoto Y, Ito Y, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42, 2005.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD化学物質対策の動向(第6報)－第14回OECD高生産量化学物質初期評価会議(2002年パリ)、化学生物総合管理学会誌、1, 46-55, 2005.

#### 学会発表

江馬 眞、OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005.

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性:ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第7回環境ホルモン学会研究会、2005.

Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. Susceptibility of new born rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤 2-(3,5-di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発生毒性、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する新生児の感受性に関する研究:1,3-ジブチルプロパン及び 1,1,2,2-テトラブチルエタン、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第 45 回日本先天異常学会学術集会、2005.

江馬 眞、OECD 神経発生毒性試験ガイドライン 426 (ドラフト)の進捗状況、第 45 回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム、2005.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ema M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

#### H. 知的財産所有権の取得状況

##### 1. 特許取得:

特になし

##### 2. 実用新案登録

該当しない

##### 3. その他(データベース等)

該当しない

## Ⅱ. 分担研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究— (H17-化学-001)

研究課題名: 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析

主任研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究協力者 鎌田栄一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究協力者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

本研究は、児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析目的としており、平成 17 年度では、紫外線吸収剤として使われている 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) を用いて毒性発現の週齢差、性差について SD ラットを用いて検討した。6 週齢の雌雄のラットに DBHCB を反復強制経口投与したとき、雄で肝臓に重量増加を伴う影響が観察されたが、雌では影響は認められなかった。生後 4-21 日の雌雄の新生児ラットに直接 DBHCB を強制経口投与したところ、DBHCB は雌雄の肝臓に対して影響を及ぼし、雌雄差が発現しないことが明らかとなった。さらに、去勢した 6 週齢の雌雄のラットに DBHCB を 28 日間強制経口投与したところ、雌では去勢の有無にかかわらず影響は認められなかったが、雄では去勢した群で肝臓への影響が軽減された。これらにことから DBHCB の毒性発現には内分泌学的性差が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

化学物質等の外因性要因に対する出生前及び出生後の児における悪影響は着床障害、胚死亡、奇形、生殖器の異常、行動異常等の様々な発現様式で観察される。児の発生成育段階により外因性要因に対する感受性が変化し、発現様式にしたがった window があることが認識されており、また児における外因性要因に対する悪影響は成体における反応とも異なり、悪影響発現の感受性も大きく異なる場合のあることが認識されつつある。本研究においては、化学物質を児の発生成育の種々の段階に投与し、毒性発現、感受性の違

いを明らかにし、各発生成育段階の児における毒性発現機序の解析を行うことを目的として実験を行った。今年度は、反復投与毒性において肝臓に対する影響に性差紫外線吸収剤として使われている 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) のラットの週齢による毒性発現の差について検討した。

B. 研究方法

使用動物: Crj:CD(SD)IGS ラットマウスを 5 週齢で購入し、7 日間の検疫を行った後に使用した。

被験物質: 紫外線吸収剤として使われている 2-(3,5-Di-tert-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro benzotriazole (CAS No. 3864-99-1: DBHCB)を用いた。用いた DBHCB はムサシノチバガイギー製で、純度は 99.9%であった。

投与: 被験物質は 5 w/v%アラビアゴムに懸濁した。投与液は用時調整とした。

投与経路及び投与方法: 強制経口投与した。投与量は 10 mL/kg とし、個別別に投与日の体重に基づいて算出した。

#### 試験及び観察方法:

14 日間反復投与毒性試験: 6 週齢の雌雄 (5 匹/群) に 0, 250, 500, 1000 mg/kg bw/day を 14 日間強制経口投与し、最終投与の翌日にラットを剖検した。体重、摂餌量、剖検所見、肝臓及び腎臓重量について調べた。

反復投与毒性、生殖発生毒性併合試験: 0, 2.5, 25 or 250 mg/kg bw/day を強制経口投与した。6 週齢の雄の交配前 28 日から交配中を含めて 56-57 日間投与した。6 週齢の雌の交配前 28 日から交配中、妊娠中及び分娩後 3 日まで投与した。最終投与の翌日ラットを剖検した。

新生児投与試験: 雌雄のラット (16 匹/群) の生後 4-21 日に 0, 250 または 500 mg/kg bw/day を強制経口投与し、生後 22 日にラットを剖検した。

#### (倫理面への配慮)

動物実験は株式会社新日本科学の実験動物倫理委員会規則において定める倫理基準に従って実施された実験であり、株式会社新日本科学の実験動物倫理委員会により承認されている。

## C. 研究結果

### 14 日間反復投与毒性試験:

いずれの群においても死亡はみられなかった。一般状態の観察では被験物質投与に起因すると考えられる変化は観察されなかった。いずれの測定時においても、雌雄ともに対照群と被験物質群との間に体重あるいは体重増加量に有意な差はみられなかった。いずれの測定時においても、雌雄とも対照群と被験物質群との間に有意な差はみられなかった。いずれの群においても被験物質投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。雄の被験物質を投与した全ての群で、用量相関はみられなかったが対照群と比較して肝臓重量 (絶対値及び相対値) に有意な増加がみられた (Fig. 1)。雌では被験物質群と対照群との間に有意な差はみられなかった。腎臓重量は雌雄で絶対値及び相対値ともに被験物質群と対照群との間に有意な差はみられなかった。

### 反復投与毒性、生殖発生毒性併合試験:

親動物に対する影響: いずれの群においても死亡はなかった。投与期間及び休薬期間を通して一般状態、体重及び摂餌量に被験物質投与の影響はみられなかった。

生殖能力については、交尾率、受(授)胎率、交尾成立までの平均日数、妊娠期間、着床痕数及び出産率に、被験物質投与の影響はみられなかった。

投与期間終了時の血液学的検査では、雄の 25 mg/kg 群以上で活性化部分トロンボプラスチン時間が短縮した。その他に 250 mg/kg 群では赤血球数が減少し、好中球数が有意に増加した。休薬期間終了時の血液学的検査では雄の 250 mg/kg 群で血小板数及び好中球数が増加した。雌では、投与期間終了時の血液学的検査で、25 mg/kg 群以上で好酸球数が減少したが、休薬期間終了時の検査では被験物質投与の影響はみられなかった。

投与期間終了時の血液生化学的検査では、雄の 25 mg/kg 群以上でアルブミンが高値を示し、A/G 比が増加し、 $\alpha_2$ -グロブリン比率及び $\alpha_1$ -グロブリン比率が減少した。その他にクレアチニンの低値がみられた。250 mg/kg 群では ALP が増加し総ビリルビンが減少した。また、雄ではすべての被験物質投与群の $\alpha_1$ -グロブリン比率が減少した。25 mg/kg 群では ALAT、総蛋白及び Ca が増加した。雌では 2.5 及び 25 mg/kg 群で総コレステロールが減少したが、250 mg/kg 群ではいずれの測定項目においても被験物質投与の影響はみられなかった。休薬期間終了時の血液生化学的検査では雄の 250 mg/kg 群で総蛋白、アルブミン及び総コレステロールが高値を示し、クレアチニン及び $\alpha_2$ -グロブリン比率が減少した。アルブミンの高値及びクレアチニンの低値は投与期間終了時と同様であった。雌では 250 mg/kg においても、いずれの測定項目にも被験物質投与の影響はみられなかった。投与期間終了時及び休薬期間終了時の剖検においては、雄及び雌動物に被験物質投与に起因する変化は認められなかった。

投与期間終了時の器官重量では、雄の肝臓重量(絶対値及び相対値)が 25 mg/kg 群以上で増加した、雌では被験物質投与の影響は認められなかった(Fig. 2)。休薬期間終了時の器官重量では、雄の 250 mg/kg 群で肝臓重量(絶対値及び相対値)及び心臓重量(絶対値及び相対値)が増加した。雌では器官重量に被験物質投与の影響は認められなかった。

投与期間終了時の病理組織学的検査は相対及び絶対重量で器官重量が増加した肝臓を除き対照群と 250 mg/kg 群で実施した。投与期間終了時の病理組織学的検査では、250 mg/kg 群の雄で副腎に細胞の空胞化、心臓に心室心筋の繊維化及び単核細胞浸潤がみられた。腎臓では尿細管の好塩基性変化、肺では肺胞の泡沫細胞蓄積、血

管周囲の炎症性細胞浸潤がみられた。雌で、250 mg/kg 群で腎臓の皮質髄質境界部の鉍質沈着、肺胞の泡沫細胞蓄積、動脈壁の鉍質沈着、気管の線毛上皮の扁平上皮化生、腸間膜リンパ節の樹状細胞様細胞の増加が認められた。雄の肝臓重量が増加したため雌雄の対照群及びすべての被験物質投与群で病理組織学的検査を実施した肝臓では、雄で単核細胞浸潤が対照群、2.5, 25 mg/kg 群及び 250 mg/kg 群でみられた。250 mg/kg 群では限局性胆管の増殖がみられた。雌では単核細胞浸潤が対照群及び被験物質投与群でみられた。その他に肝細胞の空胞化が対照群及び 2.5 mg/kg 群でみられた。投与期間終了時の病理組織学的検査で認められた変化の程度はいずれも軽度なもので当社背景データにみられる変化であり、発現頻度も対照群と 250 mg/kg 群との間に差はみられなかった。このように被験物質投与に起因する病理組織学的異常所見がみられなかったことからいずれの器官についても休薬期間終了時の病理組織学的検査は実施しなかった。

出生児への影響: 出産児数、出生率、性比及び生後 4 日の生存率に被験物質投与の影響はみられなかった。いずれの群にも外形異常児はみられず。一般状態、体重及び生後 4 日の剖検で被験物質投与の影響は認められなかった。

新生児投与試験: 500 mg/kg 群では死亡はみられず、一般状態にも異常はみられなかった。雌雄の体重増加は投与期間後半に抑制された。血液生化学的検査では、雄で ASAT、ALAT、ALP、総ビリルビン及び BUN の高値、CPK 及びグルコースの低値がみられた。雌では ASAT、ALAT、ALP、総ビリルビン及び BUN の高値、総蛋白、グルコース及び無機リンの低値がみられた。剖検では雄の 11/16 例及び雌の 8/16 例で肝臓の肥大がみられた。器官重量では雌雄の肝臓重量(絶対重量及び相対重量)の高値、また、雌雄の脾臓重量(絶対重量及び相対重量)の低

値がみられた (Fig. 3)。肝臓の病理組織学的検査では肝細胞の肥大、好酸性顆粒状変化、グリコーゲンの減少及び単細胞壊死がみられ、当該変化の程度は 250 mg/kg 群と比較して強い傾向を示した。250 mg/kg 群では一般状態に異常はみられなかった。雌雄の体重増加は投与期間後半に抑制された。血液生化学的検査では、雄で ASAT、ALAT、ALP、総ビリルビン及び BUN の高値がみられた。雌では ASAT、ALAT、ALP、総ビリルビン及び BUN の高値、総蛋白、グルコース及び無機リンの低値がみられた。剖検では雄の 3/16 例及び雌の 6/16 例で肝臓の肥大がみられた。器官重量では雌雄の肝臓重量 (絶対重量及び相対重量) の高値、また、雌雄の脾臓重量 (絶対重量及び相対重量) の低値がみられた (Fig. 3)。肝臓の病理組織学的検査では肝細胞の肥大、好酸性顆粒状変化、グリコーゲンの減少及び単細胞壊死がみられた。

#### D. 考察

紫外線吸収剤として使われている DBHCB を 6 週齢のラットに投与したとき毒性発現に雌雄差がみられ、雄で肝臓重量の増加を伴う肝臓に対する影響が認められた。しかしながら、6 週齢の雌ラットに投与したときには毒性影響は観察されなかった。毒性発現の雌雄差については、肝臓の代謝酵素 CYP の性差が関与している可能性があり (Wivi et al, 2004)、トリブチルスズ代謝にも性差のあることが報告されている (Ohhira et al, 2006)。

新生児ラットの 4-21 日に直接強制経口投与したときには、雌にも肝臓の重量増加を伴う影響が発現し、肝臓に対する影響には性差がみられなくなった。ラットの性成熟は雄では生後 40-43 日、雌では生後 30-32 日 (Ema et al, 2001) であり、離乳前のラットでは雌雄とも性成熟に達していない。この時期のラットでは、内分泌学的に未成熟であり、この時期に投与した DBHCB により雌雄とも肝臓に対

する影響が発現した。これらのことは DBHCB の毒性発現には内分泌学的な性差が関与している可能性を示している。

DBHCB と構造が良く類似している

2-(3',5'-di-*tert*-butylphenyl)-2'-hydroxy)benzotriazole (DBHB) を 6 週齢の雌雄のラットに投与したとき、DBHCB よりも毒性が強く発現し、DBHB の毒性は雄ラットにおいてより強く発現し、雌では雄よりも弱いとされている。来年度においては DBHB を雌雄の離乳前のラットに投与し、雌雄の毒性を比較し、また DBHCB による毒性と比較する予定である。

#### E. 結論

DBHCB を用いて毒性発現の週齢差、性差について SD ラットを用いて検討した。6 週齢の雌雄のラットに DBHCB を反復強制経口投与したとき、雄でのみ肝臓への重量増加を伴う影響が観察された。雌雄の新生児ラットに直接 DBHCB を強制経口投与したところ、DBHCB は雌雄の肝臓に対して影響を及ぼした。さらに、去勢した 6 週齢の雌雄のラットに DBHCB を 28 日間強制経口投与したところ、雌では去勢の有無にかかわらず影響は認められなかったが、雄では去勢した群で肝臓への影響が軽減された。

#### F. 健康危惧情報

特になし

#### G. 研究発表

論文発表

**Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol* (in press)**

**Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A,**

Kamata E. Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in Rat. Drug Chem Toxicol (in press)

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ema M. Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. Congenit Anom Kyoto (in press)

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第 8 報) - 第 16 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2003 年パリ)、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 18 回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌 (印刷中)

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific  $\alpha 2u$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. J Toxicol Sci, 31, 35-47, 2006.

Ema M, Hirose A. Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity, CRC Press, Boca Raton, 2006, pp. 23-64.

Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M. In silico assessment of

chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. Mutat Res, 588, 129-135, 2005.

Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-tert-butylphenol and 2,4-di-tert-butyl phenol toxicity. Congenit Anom Kyoto, 45, 146-153, 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Ema M. Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. Congenit Anom Kyoto, 45, 137-145, 2005.

松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 20 回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 445-453, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第 7 報) - 第 15 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002 年ボストン)、衛研報告、123, 46-52, 2005.

松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム: 第 19 回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 280-288, 2005.

Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Enami T, Wada H, Ogata H, Yamamoto Y, Ito Y, Kamata E, Ema M, Hasegawa R. Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42, 2005.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331, 2005.

高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD化学物質対策の動向（第6報）－第14回OECD高生産量化学物質初期評価会議（2002年パリ）、化学生物総合管理学会誌、1, 46-55, 2005.

#### 学会発表

江馬 眞、OECD 発生神経毒性試験ガイドラインについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005.

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、有機スズ化合物の生殖発生毒性：ジブチルスズのマウスにおける胚致死作用、第 7 回環境ホルモン学会研究会、2005.

Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005.

Hasegawa R, Hirata-Koizumi M, Takahashi M, Kamata E, Ema M. Susceptibility of new born rats to six chemicals, compared with young rats. EUROTOX 2005

Hirose A, Aisaki H, Hara H, Takahashi M, Igarashi K, Kanno J, Ema M. DNA micro-array analysis of gene expressions in mice uterus exposed to dibutyltin dichloride during implantatio. The 25<sup>th</sup> International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005).

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、紫外線吸収剤 2-(3,5-di-tert-butyl

-2-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラットにおける発生毒性、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

平田睦子、楠岡 修、西村信雄、和田 肇、緒方英博、福田苗美、伊藤義彦、鎌田栄一、江馬 眞、長谷川隆一、化学物質に対する新生児の感受性に関する研究：1,3-ジブプロモプロパン及び 1,1,2,2-テトラブプロモエタン、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005.

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、ブタノールのラットにおける発生毒性の検討、第 45 回日本先天異常学会学術集会、2005.

江馬 眞、OECD 神経発生毒性試験ガイドライン 426（ドラフト）の進捗状況、第 45 回日本先天異常学会学術集会 BT シンポジウム、2005.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. Developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

Tahara M, Kubota R, Nakazawa H, Hirose A, Ema M, Tokunaga H, Nishimura T. Evaluation for the additive toxic influence of organophosphorus pesticides The 44th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2005.

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得：  
特になし
2. 実用新案登録  
該当しない
3. その他（データベース等）  
該当しない

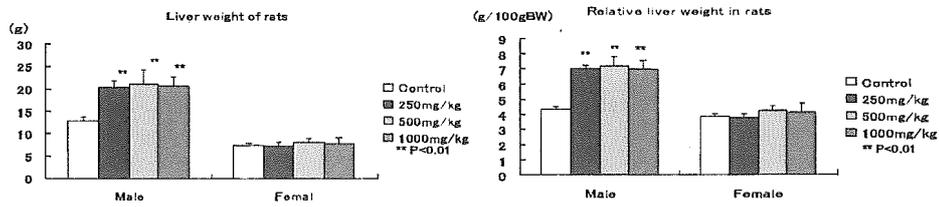


Fig. 1. Male and female 6-week old rats were given DBHCB by gavage for 14 days.

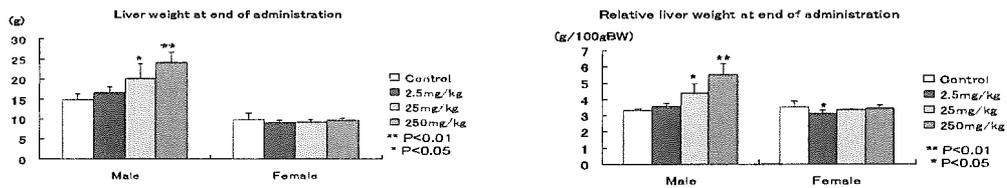


Fig.2. Male and female 6-week old rats were given DBHCB by gavage beginning 28 days before mating. Males were dosed for 56-57 days. Females were dosed to day 3 of lactation throughout the mating and pregnancy period.

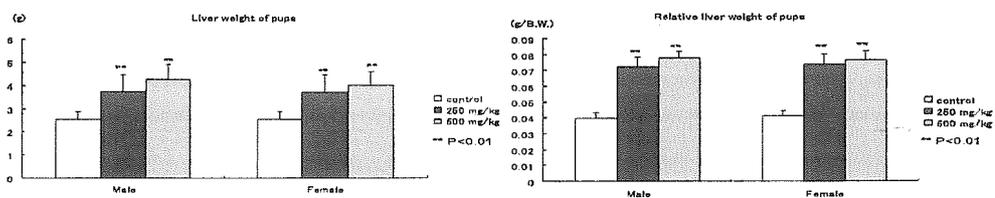


Fig.3. Male and female neonatal rats were given DBHCB by gavage on postnatal days 4-21.

胎生期化学物質暴露により誘発される脳発達障害の胎児脳における解析

分担研究者 桑形 麻樹子 (財)食品薬品安全センター秦野研究所・毒性部・病理 研究員

研究要旨;

生後に発現する脳発達障害と胎生期の化学物質暴露との関係を明らかにするために、背景データが豊富であり作用機序が比較的明らかになっている遺伝子毒性物質(5-bromo-2'-deoxyuridine; BrdU)を用いて、胎生期暴露により、(1)生後に発現する行動異常、(2)暴露直後の胎児脳に発現する組織学的変化の発現臨界期(暴露時期、発現領域)を検討するとともに、(3) BrdU の脳内分布、神経細胞の突然変異の有無を確認することにより、遺伝子毒性化学物質の脳発達障害発症との関与を検討する。

A. 研究目的

本研究では、胎生期化学物質暴露により、生後に脳発達障害を誘発する疾患動物モデルを用いて、化学物質暴露直後の胎児脳に注目し、神経発生への直接的な影響を組織学的に検索し、出生後に発現する行動学的異常と化学物質暴露直後の胎児脳所見との関連性を明らかにする。

B. 研究方法

本年度は、胎生期 BrdU 暴露誘発性の多動性障害モデルを用いて、生後に発現する多動性障害発現の臨界期を検討した。我々は既に、SD ラットの妊娠 9-15 日の BrdU 暴露(50 mg/kg, ip)により、出生児に顕著な多動が発現すること、投与直後である胎齢 16 日の胎児脳において細胞死、大脳皮質皮質板の形態異常が認められることから神経幹あるいは前駆細胞の分裂・移動障害の可能性のあることを報告している。また、バルプロ酸あるいはサリドマイド誘発性の自閉症の事例は、神経回路の構築が行われる新生児期ではなく、神経管閉鎖前後に社会性行動の障害の臨界期があることを示した。本研究では、投与時期を神経管の閉鎖前後で分割し、離乳後に、BrdU 誘発多動性障害の発現の臨界期を検討した。

B-1. 動物及び薬物投与

10 週齢の Sprague Dawley 系(Crlj:CD(SD))雌雄ラ

ットを日本チャールスリバーラボラトリーズから購入し、一週間以上の検疫・馴化期間の後、実験に用いた。動物は、温度 21-25℃、湿度 40-75%、12 時間の明暗サイクル(午前 7 時点灯、午後 7 時消灯)に統御された動物室で飼育した。雄 1 匹に対し、雌 1-2 匹を終夜同居させ、翌朝、膣垢内に精子あるいは膣栓が観察された動物を交配成立とみなし、妊娠 0 日とした。

投与量及び投与時期は、既報に基づき設定した。即ち、BrdU の投与時期を妊娠 9-10 日(B-I 群)、妊娠 11-13 日(B-II 群)、妊娠 14-15 日投与群(B-III 群)に分割し、BrdU(50 mg/kg)を腹腔内投与した。陽性対照として妊娠 9-15 日投与群(B-all 群)を、溶媒対照として 0.5%メチルセルロースナトリウム溶液投与群(対照群)を設定した。投与初回日の体重を基準にして投与液量を算出し、午前 11 時から 12 時の間に投与した。投与容量は 5 mL/kg とした。

B-2. 出生児の観察

全妊娠動物を自然分娩させ、出生児を得た。生後 1 日に同腹児数を雄 4 匹雌 4 匹に可能な限り調整し、生後 21 日に出生児を離乳させた。また、週 1 回、出生児の体重を測定した。

B-2-1. 胎生期 BrdU 暴露動物における多動性障害発現の臨界期の検討

生後 5 週にオープンフィールドにて自発運動量を

調べた。即ち、直径 140cm 高さ 40cm の円形のフィールドにて、3 分間における移動距離、立ち上がり、身づくろい、糞尿数を行動試験画像解析装置(Unicom Inc. Japan)を用いて午後 1 時から 3 時半の間に観察した。なお、一腹から 2-4 匹の雄出生児を試験に供した。

#### B-2-2. 脳の病理学的観察

生後 10 週に、ペントバルビタール深麻酔下で放血致死させ、剖検した。その際、脳重量を測定し、一部の動物は脳の部位別重量(大脳、中脳、橋・延髄、小脳)を測定した。

また、各腹 1 例の雄動物は、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて灌流固定し、脳を採取し、再固定後、10%ゼラチンブロックにて包埋し、前頭断面でビブラトームにて 45 $\mu$ m に薄切した。その際、1 ブロックに対し 5 本のバイアル瓶に交互に薄切した脳を回収し染色時まで 4 $^{\circ}$ C で保管した。

#### B-3. 胎児脳の観察

BrdU 投与後、妊娠 16 日(午前 11 時から 12 時の間)に帝王切開にて胎児を摘出した。胎児は 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に固定後、脳を摘出し、10%ゼラチンに包埋した。前頭断方向にビブラトームにて 45 $\mu$ m に薄切した。その際、1 ブロックに対し 3 本のバイアル瓶に交互に薄切した脳を回収し染色時まで 4 $^{\circ}$ C で保管した。

##### B-3-1. 胎児脳の病理学的観察

薄切した胎児脳切片の一部はニッスル染色を行い、形態学的異常の有無を観察した。また、浮遊法にてチロシン水酸化酵素(TH)免疫組織染色を実施した。前処理として、3%の過酸化水素・10mM リン酸緩衝生理食塩液中にて内因性ペルオキシターゼ活性を不活化し、5%正常ウサギ血清・0.5% Triton X を含む 10mM リン酸緩衝生理食塩液中で 2 次抗体の非特異性反応をブロックした。抗 TH 抗体(Pel Freez 社、ポリクロナール、500 倍希釈)を 4 $^{\circ}$  C、2 日間反応させ、2 次抗体としてビオチン化抗ヒツジ IgG 抗体を用い、ABC 法(アビジン・ビオジン法)にて diaminobenzidine

(DAB)を用いて可視化させた。

#### B-4. 統計学的解析

統計は統計ソフト SigmaStat3.1(Systat Software Inc.)を用いて実施した。体重、脳重量及び行動試験にて得られたデータは一元配置分散分析を行った後、Tukey 法あるいは Dunnet 法、あるいは Kruskal-Wallis の順位型分散分析の後 Dunn 法により解析した。また、2 群間の比較には Student't-test を用いた。なお、有意水準は 5%とした。

#### (倫理面への配慮)

動物実験の実施にあたり、動物愛護を配慮した動物実験計画書を作成し、(財)食品薬品安全センター秦野研究所動物実験委員会において承認を得た後、動物実験を開始した。また、実験を実施するに際しては、動物に過度の負荷、苦痛を与えない様に十分に配慮して実施した。

#### C. 研究結果

##### C-1. 母動物及び出生児の発育への影響

BrdU 投与による妊娠維持、分娩への影響は観察されず、全妊娠動物は正常に分娩した。また、哺育状態にも異常は認められなかった。

出生児の体重推移は B-II 群及び B-all 群において体重増加抑制が認められた(Table 1)。なお、児の生存率には BrdU 投与による影響は認められなかった。

##### C-2. オープンフィールド試験における自発運動量 (Figure 1)

生後 5 週(出生後 35-38 日)に実施したオープンフィールド試験の結果、既報と同様に B-all 群の自発運動量に対照群と比較して有意な増加が観察された。B-I 群では自発運動量の増加は認められなかったが、B-II 群では増加傾向を示し、B-III 群では対照群と比較して有意に自発運動量は増加した。BrdU 各投与群間での比較では、B-all 群の自発運動量は他の分割投与群(B-I, B-II, B-III 投与群)と比較して有意に増加を示した。また、B-all 群の自発運動量の増加の

程度は、B-II 群及び B-III 群の自発運動量の増加を加算した値に近似していた。B-II 群及び B-III 群間の比較では統計学的な差は認められなかった。

他の観察項目である立ち上がり回数、身づくろい回数、糞尿数には BrdU 投与による影響は観察されなかった。

### C-3. 脳重量への影響 (Table 2)

生後 10 週に実施した剖検の結果、解剖体重は B-II 群及び B-all 群が対照群と比較して有意な低値を示し、脳実重量は B-II、B-III 及び B-all 群において対照群と比較して有意な低値を示した。脳の比体重値は、BrdU 各投与群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

脳重量に対する部位別重量(大脳、中脳、橋・延髄、小脳)の割合を算出した結果、小脳の割合が B-II 群及び B-all 群で有意な低値が認められた。

### C-4. 生後 10 週齢における脳の病理学検査

胎児脳の病理学検査終了後、観察する領域の選択及び免疫組織染色の実施を行う予定である。現時点では、構築異常の有無を観察するために脳の全ての領域の Nissl 染色及び NeuN(neuronal nuclei)の免疫染色を、BrdU の取り込み状態を確認するために BrdU の免疫染色を実施している(未解析)。

### C-5. 胎児脳(胎齢 16 日)における TH 免疫組織染色 (Figure 2)

陽性対照群である B-all 群から胎児脳の観察を開始している。BrdU 暴露により細胞死が誘発されるが、脳領域によってその発現程度が異なること、大脳皮質皮質板の形態異常が発現することを我々はすでに報告している。本研究では、多動性障害との関連性が疑われているドーパミンニューロンの発生に BrdU が影響を及ぼしているかを検討した。

胎齢 16 日のラット胎児では、TH 陽性細胞は大脳皮質、線条体、尾状核、黒質、外側被蓋野、青斑核といった広範囲に観察された。しかし、TH 陽性細胞の分布は B-all 群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。

### D. 考察

近年、妊娠期の環境化学物質、一部の医薬品、嗜好品などの服用(暴露)、免疫低下、ウイルス感染がこどもの脳発達障害の発症に関与することが報告されている。バルプロ酸やサリドマイド誘発性の自閉症の事例は、神経回路の構築(シナプス形成)が行われる新生児期ではなく、神経管閉鎖前後の暴露によって社会性行動の障害の臨界期があることを示している。現行の発生神経毒性(developmental neurotoxicity; DNT)試験のガイドラインでは投与時期は妊娠期から哺育期までの長期にわたっているため、神経毒性(行動異常)を発現する感受性の高い投与時期(臨界期)は明確にならないが、医薬品における DNT 試験では臨界期を考慮することも重要である。

また、神経幹あるいは前駆細胞が盛んに分裂増殖を繰り返す時期における化学物質の暴露は、その増殖過程に作用し、後の神経発生にも影響を及ぼす可能性は高い。これまでの動物実験において、BrdU 以外にも methylazoxymethanol(MAM)、ethylnitrosourea(ENU)、5-azacytidine あるいは 1-beta-d- arabinofuranosylcytosine などの遺伝子毒性物質で胎生期暴露が胎児脳に作用し、生後に行動異常を誘発することが報告されている。中枢神経系で働く遺伝子の変異は、神経幹細胞が盛んに分裂している胎生期の神経幹細胞に発現する可能性が最も高いことから、また、脳発達障害の原因遺伝子が見出された場合その起源を考えたとき、遺伝子毒の胎児脳への影響を検討することは重要と考えられる。そこで、本研究では、背景データが豊富である遺伝子毒性物質 BrdU を用いて胎生期 BrdU 暴露により、出生児に発現する多動性障害の臨界期を解析した。その結果、胎生期 BrdU 暴露誘発性の多動性障害の臨界期は神経管の閉鎖後に存在するが、その期間は比較的長く、行動への影響は総投与日数に依存することが考えられた。バルプロ酸誘発自閉症では神経管の閉鎖前後に臨界期が存在することが臨床報告から明らかになっている(ラットを用いた実験では妊娠 9 日あるいは 11 日にバルプロ酸を投与している)。最近統合失調症のモデルと考えられるようになった胎生期 MAM 暴露動物では多動性は神経