

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の

確立とその高度化に関する研究

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成18（2006）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の確立とその高度化に関する研究 -----	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 脳発達のかく乱影響評価 -----	19
渋谷 淳	
(資料) 図 1-19、表 1-20	
2. 神経機能・行動影響評価 -----	26
鈴木 勉	
(資料) 図 1-5	
3. 免疫機能影響評価 -----	30
手島玲子	
(資料) 図 1-7、表 1-7	
4. 感染影響評価 -----	36
黒川昌彦	
(資料) 図 1-3、表 1-2	
5. 幼若期暴露発がん性評価 -----	40
今井俊夫	
(資料) 図 1-3、表 1	
6. 各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究 ----	44
広瀬明彦	
(資料) 図 1-9	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	48
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	51

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の確立とその高度化に関する研究
総括研究報告書（平成17年度）

主任研究者 渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：この班研究では、毒性影響が検出されにくい難分解・高蓄積性化学物質に対応できる、げっ歯類を用いた標準化可能な発達期暴露影響評価系の確立を目的として、臭素化難燃剤(BFRs)をモデルケースとした各種生後影響の用量反応性についての定量評価を行う。BFRsによる発達期毒性には甲状腺機能低下の関与が強く示唆されるため、プロピルチオウラシル(PTU)、メチマゾール(MMI)等の抗甲状腺剤を評価系の陽性対照として確立する。BFRsは本邦で使用頻度の高いものを選別し、17年度はデカブロモディフェニルエーテル (DBDE)を対象とした。

まず神経発達かく乱影響評価では、母ラットに妊娠10日目から離乳時まで（生後21日目）PTUやMMIを飲水投与し、仔動物に投与終了時での甲状腺機能低下と、成熟後(11週目)でのニューロン及び白質構成成分の不可逆的变化（ニューロンのmigrationの異常、白質影響：脳梁面積と大脳皮質中間層に分布するCNPase陽性オリゴデンドロサイト密度の減少）が確認された。また、PTU、MMIに共通して海馬CA1領域特異的に発現変動する遺伝子群をマイクロアレイ法により同定した。DBDEの暴露実験（0, 10, 100, 1000 ppm 混餌）では、10 ppmから母動物甲状腺重量が増加したものの、用量依存的な反応ではなく、仔動物の血清甲状腺関連ホルモンは1000 ppmで軽微な変化を示したのみであった。一方、成熟後で白質影響が用量依存的ではないものの100 ppm以上で明らかとなり、10 ppmでも同様の減少傾向が確認された。以上、抗甲状腺作用の弱いDBDEでも100 ppm以上で脳に対する不可逆的影響が確認され、その反応性は非直線的であることが見出された。また、次年度以降検索予定のヘキサブロモシクロドデカン、テトラブロモビスフェノールAの予備試験を終了したが、これらにより誘発される甲状腺機能低下症に用量に応じた反応性が認められなかった。

神経機能・行動影響評価では、ラットに対する同様の発達期暴露により、成熟後の一般行動観察でPTUが著しい自発運動量の増加を示したものの、DBDEでは異常は認められなかった。また、高架式十字迷路法による不安感受性を検討し、雄ではいずれの物質も変化を誘発しなかったものの、雌ではPTUでopen arms滞在時間及び侵入回数の増加を示した。更に条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤メタンフェタミン(METH)誘発報酬効果への影響を検討した結果、PTUと1000 ppm DBDEで報酬効果に強い減弱を認めた。そこで、側坐核でのドパミン遊離量を*in vivo* microdialysis法により検討した結果、PTU、DBDEともに基礎遊離量の低下に伴うMETH誘発ドパミン遊離量の著明な低下を認めた（統計的有意差はPTUのみ）。以上の結果から、DBDEは1000 ppmでPTUと同様のドパミン神経の発達障害を惹起することが示唆された。

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と同一実験の動物を用いて検索を行い、PTU、MMIにより、暴露終了時に脾臓の重量・細胞数の顕著な減少、胸腺重量の減少、脾臓と末梢血におけるTリンパ球並びにNK細胞の増加、Bリンパ球並びに活性型のT、Bリンパ球の減少を見出し、成熟後においては、脾重量の減少は継続したが、末梢血においてNK細胞と活性化T細胞の減少のみが認められた。DBDEでは、脾臓、胸腺重量に変動はなかったが、1000 ppmの暴露終了時に脾臓でのCD4陽性T細胞と活性化T細胞の減少、成熟後は末梢血NK細胞の減少が観察され、免疫担当細胞への影響が示唆された。

感染影響評価では、17年度は乳幼児ウイルス感染症モデルであるRespiratory syncytial (RS)ウイルス・マウス感染モデルを用いて、PTUによる感染増強実験系の確立を試みたところ、成熟マウスに対する高用量のPTU(1000 ppm)暴露により血中T4の減少が確認でき、肺でRSウイルスが増加する傾向を得た。また、10 ppm PTUの周産期暴露により、仔マウスのBALF中で感染の指標とされるIFN- γ レベルの上昇が判明した。

発がん性評価に関しては、ラットに対して幼若期での暴露終了後、肝臓、腎臓、肺、乳腺、甲状腺を標的とした発がん物質処置を行い、40週目での腫瘍の発生状況を検討して多臓器発がん性検出モデルの確立を図るが、17年度はDBDEを被験物質として4用量（0.001, 0.01, 0.25及び2.5%）にて混餌投与し、現在、実験開始から24週が経過している。

次に、国際的調和に基づいた定量的な化学物質リスク評価法の確立に関する研究では、17年度は、米国EPAのIRISとWHOの水質ガイドライン第3版で評価された物質について解析した。その結果、近年は種差・個体差の不確実係数は体内動態に関する情報を取り入れたものに、TDI算定の出発根拠とする値（NOAEL等）は体内動態に関する情報やベンチマークドース法を用いた、より定量的な数値による置き換えが行われていることが示された。

渋谷 淳
 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

 鈴木 勉
 星薬科大学薬品毒性学 教授

 手島玲子
 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

 黒川昌彦
 九州保健福祉大学 薬学部薬学科
 生化学第二講座 教授

 今井俊夫
 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

 広瀬明彦
 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
 主任研究官

A. 研究目的

化学物質の管理体制に関連して、将来計画に対応できる化学物質の評価手法の高度化が望まれており、その一つとして乳幼児期を含む発達期暴露による評価系の確立が挙げられる。その中でも特に神経毒性や免疫毒性、発がん性に関する高度な定量・定性的評価系の確立が急務である。

本班研究は、既存の毒性評価系では影響が検出されにくく、健康影響が懸念される難分解・高蓄積性化学物質を研究候補物質として取り上げ、それらの発達期毒性に焦点を当て、高度な化学物質健康影響評価及び管理体制の確立に資することを目的とする。そのためには、有害影響と判定出来るパラメーターの開発・導入により、それらの定量的な解析を行う必要がある。そのモデルケースとして、既存の一般毒性や変異原性試験ではその影響があいまいか検出されないものの、欧米で近年環境汚染やヒトへの暴露が明らかとなり、ポスト内分泌かく乱物質として発達期暴露による影響が強く懸念されている臭素化難燃剤 (BFRs) に着目する合目的性は高いと考えられる。BFRs による発達期生体影響には、PCB 類と同様に甲状腺機能障害の関与が示唆されている。甲状腺ホルモンは種々の機能発達に重要であり、発達期での甲状腺機能低下により、生後の脳発達に対する不可逆的影響が現れて神経機能や行動に影響を及ぼすことが知られている。また、内分泌中枢の障害に起因する恒常性の変化により、発がんに対する感受性が変化する可能性も指摘される。同様に、細胞免疫機能も障害を受けるため、感染等に対する防御能も影響される。そのため抗甲状腺剤を用いた発達期甲状腺機能低下症モデルを比較対照として、これ

らの諸点について検討する必要がある。それにより、BFR による直接作用と甲状腺機能低下に起因する影響を弁別でき、甲状腺機能低下を軸とした乳幼児期有害影響評価に関する、より包括的なシステムの構築が可能となる。また、評価系の確立に伴い、化学物質評価の高度化手法として期待されている、トキシコゲノミクス、QSAR、カテゴリー・アプローチ等に有用な情報提供が可能となる。

本班研究で検討するエンドポイントは、神経発達、神経機能・行動、免疫機能、感染、発がんとし、3ないし4用量を設定して、発達期での化学物質暴露によって生じるこれらの影響について、定量・定性的評価系の確立を図ることを目的としている。そのためには、暴露と関連して発達過程に生じる不可逆的影響の普遍的パラメーターを開発、あるいは導入し、各パラメーターに対する反応性を検討する必要がある。まず神経発達かく乱影響評価では、ラットを用いて既に確立してある性分化評価の他、投与終了時での灰白質・白質特異的なマイクロアレイ解析を行い、化学物質に固有或いは共通する神経障害の標的遺伝子を同定し、各 BFR 投与例での発現解析に利用する。成熟後では、灰白質や白質構成成分の密度を測定し、不可逆影響の評価系を確立する。神経機能・行動影響評価では、ラットを用いて成熟後の一般行動や不安関連行動、中枢性薬物に対する反応性を検討し、出現する異常行動に関連する脳部位での *in vivo* microdialysis 法によるモノアミン評価系を確立する。免疫機能影響評価は、暴露終了時及び成熟後でのラットの胸腺、脾臓の病理評価とリンパ球の各種サブポピュレーションやNK細胞の割合の解析による評価系を確立する。感染影響評価は、RS ウイルス・マウス感染モデルを作製し、暴露直後と成熟後の肺組織中のウイルス感染体・分布状態、各種サイトカインレベルの解析や、病理検索による評価系を確立する。発がん性評価に関しては、ラットを用い、幼若期暴露終了後、肝臓、腎臓、肺、乳腺、甲状腺を標的とした発がん物質処置を行い、40週目での腫瘍の発生状況を検討して多臓器発がん性検出モデルの確立を図る。以上の各影響の解析において、物質固有或いはPTUと共通する毒性影響を弁別して評価する。最終的には、後述する本班研究のもう一つの分担課題である「各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究」の結果導き出される、合理性の高い数理モデルに適用して、発達期暴露影響のリスクレベルを算出、提示する。本研究で検討するBFRsは、本邦で主に使用されているデカブロモディフェニルエーテル(DBDE)、1,2,5,6,9,10-ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)、テトラブロモビスフェノールA(TBBPA)を解析対象とする。17年度はまず、発がんを除く各

エンドポイントで抗甲状腺剤であるプロピルチオウ
ラシル (PTU)等を甲状腺機能低下に起因する各種
発達障害の陽性比較対照とした評価系を確立し、次
いでBFRsのうちDBDEを対象とした評価系の確立
に努めた。また、次年度以降解析対象となるHBCD、
TBBPAの用量設定試験を実施した。

一方、化学物質リスク評価・管理の実際面での規
制・基準値の算出方法に関しては、各国で一様でな
いのが現状である。特に神経毒性や免疫毒性、発が
ん性について、一般化し得る評価方針を策定するこ
とは重要であり、それにより、本邦におけるリスク
管理遂行にあたっての国際的に通用しうる指針を与
えられる。そこで本研究のもう一つの分担課題であ
る「各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容
量等の設定に関する調査研究」では、国際的調和に
基づいた化学物質リスク評価法の確立を目的として、
評価事例の情報解析を行って一般化し得る評価方針
を策定する。次いで、本研究で得られるBFRsの影
響評価に適用してその高度化を図る。17年度は、欧
米や国際機関において、耐容（許容）摂取量評価や
水質基準設定がなされている物質について、クリテ
ィカルエンドポイントの種類、不確実性係数の配分、
各種数理モデルの適用状況の情報収集を行い、次年
度のデータベース化のための必須項目やデータ形式
を決定した。

B. 研究方法

①脳発達のかく乱影響評価：

発達期化学物質暴露モデルとして、妊娠・授乳期
ラットを用い、被験物質を、想定されるヒトへの暴
露形態を考慮して、飲水(抗甲状腺剤)、あるいは飼
料(BFRs)に混じて母動物に摂取させることにより、
妊娠10日から離乳時(生後21日目)まで経胎盤・経
乳的に仔動物に暴露し、投与終了時と11週目に解剖
を行った。使用する動物は妊娠SD:IGSラットとし、
BFRの本実験は公比10として、3用量を設定した。
基礎飼料は、大豆由来のphytoestrogenを除いたSF
(NIH-07変型)飼料を用いた。離乳後は、通常の基
礎飼料に切り替えて仔動物を飼育した。妊娠・授乳
期の母動物について体重と摂餌量を測定し、仔動物
については、生後2日目に出生数、体重、肛門・
生殖突起間距離(AGD)を測定し、生後3日目に一匹
の母動物あたり雌雄各4匹となるようにリッター・
サイズを調整した。離乳(生後21日目)までの間、
仔動物の体重を毎週測定した。離乳時には、母動物
に対する被験物質投与を終了し、仔動物は通常の基
礎飼料であるCRF-1に切り替えて飼育した。春期発
動前の解剖は生後21日目の離乳時に行った。残りの
動物に対して春期発動(包皮分離、膣開口)の日と
体重を求め、生後11週目に解剖を行った。雌におい

ては、解剖の3週間より膣スミアの観察による性周
期回帰の検討を行い、発情休止期を示す日に解剖を
行った。

各化合物の本実験に於いて、生後21日の解剖時
には、肝、腎、脳、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子
宮、乳腺を採材し、乳腺以外の臓器に関して臓器重
量を測定した。精巣と一部の脳はプアン固定を行い、
他の臓器はホルマリン固定を行った。また、各群5
匹の雄性仔動物について、遺伝子発現解析用に大脳
をメタカーン固定・パラフィン包埋した。11週目
には更に、前立腺、精嚢(+凝固腺)、下垂体の各重量
をホルマリン固定後に測定した。脳についてはホル
マリン固定を行った。これらの臓器に関して、ヘマ
トキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製して病
理組織学的検索を行う予定である(未実施)。また、
離乳時、11週目ともに血液を採取し、血清中のT3、T4、
TSHレベルを測定した。21日目の解剖時、母動物に
ついては甲状腺を採取して病理組織学的検索を実施
し、子宮の着床痕数を確認した。

まず、PTU、MMIとDBDEに関して、予備的な用
量設定試験を文献値を参考にして行った。即ち、
MMIに関しては200及び250ppm、PTUに関しては
9及び12ppm、DBDEに関しては文献によってデー
タは異なるものの60及び80ppmを設定して、各群
2匹の母動物を用いて行った。DBDEに関しては更
に確認試験として、10、100、10,000ppmを設定して、
各群3匹の母動物を用いて投与実験を行った。

次に、予備試験結果を基に、抗甲状腺剤として200
ppm MMI(1用量)、3ないし12ppm PTU(2用量)の
飲水投与実験を、各群8匹の母動物を用いて行った。
更にDBDEに関しては、10、100、1000ppmを設定し
て、各群8匹の母動物を用いて本実験を行った。

最後に、次年度以降に予定しているTBBPA、
HBCDについて各々1000、10,000ppmの混餌用量で、
各群3匹の母動物を用いて用量設定試験を実施した。

発達期の甲状腺機能低下により、ニューロンの
migrationの異常やそれに伴う特定神経部位での成熟
ニューロン数の減少、白質を構成するオリゴデンド
ロサイトの減数、あるいはミエリン形成の阻害・抑
制による白質の形成障害が報告されている。そこで、
離乳時(生後21日目)の脳では、海馬CA1領域、脳
梁(Corpus callosum: CC)での部位特異的な遺伝子発
現プロファイルを求めて、甲状腺機能低下に起因す
るニューロンとオリゴデンドロサイトの標的遺伝子
を同定する。そのためには、PTU、MMIの実験では、
大脳についてメタカーン固定した後、Bregmaの前
方+1.2mmと後方-3.4mmの2カ所ので冠状断面を作製
し、それぞれの尾側断面が薄切面になる様にパラフ
イン包埋して、20 μ m厚の切片を10-12枚作製し、
マイクロダイセクション用サンプルとした。切片は

脱パラフィン後に Cresyl violet stain (Ambion)で染色し、Laser Microdissection System (Leica)を用いて、個体ごとに左右の CA1 と CC を採取した。DBDE 暴露実験の 21 日目の脳に関しては、Bregma の後方約 -3.4 mm の 1 カ所で冠状断面を作製し、その対称面が薄切面となるように前後の脳を包埋した（マイクロダイセクション以降の解析は未実施）。PTU, MMI の実験では、それぞれ各個体の CA1, CC のサンプルから total RNA 抽出を RNAqueous-Micro (Ambion)にて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe)を用いて測定した。その結果、CA1 からは 100 ng 以上の RNA が採取できたが、MMI 群, 12 ppm PTU 群において CC からの RNA 回収量が 100 ng に及ばないものが多かったため、今回は CA1 のみの解析を進めた。即ち、100 ng の total RNA をマイクロアレイ解析用サンプルとし、MessageAmp™ II aRNA kit (Ambion)を用いて 2 回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix)を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix)にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、MMI, 3 及び 12 ppm PTU 各群で無処置動物に比較して有意に 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現の増減している遺伝子群を選別した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics)を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、発現の信頼性を示す flag が比較する無処置対照と MMI, あるいは PTU の各群の 10 サンプル全てにおいて absent であった遺伝子を除外し、更に、無処置対照に比べ 2 倍以上、あるいは 0.5 倍以下の発現がみられる遺伝子については、MMI あるいは PTU の各群のサンプルの 5 サンプル中 4 サンプルの flag が present であったものを選別した。次いで、flag で選別された MMI あるいは PTU の遺伝子について One-way ANOVA による比較を行い、無処置対照との間に有意差が認められた遺伝子群を選別した。その中から PTU の用量に関連して変動した遺伝子、MMI と 12 ppm PTU との間で共通に変動した遺伝子を選別した。

生後 11 週目では、PTU, MMI の実験、DBDE の実験ともに大脳について Bregma の後方約 -3.3 mm の 1 カ所で冠状断面を作製し、その対称面が薄切面となるようにし、Bregma の後方 -4.5, -2.3 mm で、3 μ m 厚の連続切片を作製した。切片は HE 染色とともに、postmitotic neuron の核（まれに細胞質も）を特異的に認識する抗マウス NeuN 抗体(MAB377, IgG1, x1000 倍, Chemicon), オリゴデンドロサイトを特異的に標識する抗体である抗マウス 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase; MAB326R, IgG1, clone 11-5B, x300 倍, Chemicon)を用いて、ABC 法 (Vector Lab. Elite kit)による免疫染色を行った。

CNPase については、抗原賦活化として脱パラフィンした切片について 0.01M citrate buffer (pH6.0)中でマイクロウェーブ処理 (90°C, 10 min)を行った。海馬 CA1 領域でのニューロン分布を検討する場所として、NeuN 染色切片を用いて、Bregma の後方 -4.5 mm の冠状断面において 200 倍の顕微鏡視野で左右 1 箇所の CA1 領域（海馬台の頭側）を観察対象とした。また、白質構成成分の測定に関しては、まず脳梁の面積として、CNPase 染色切片を用いて、一個体につき大脳の 2 つの冠状断面での面積を測定した。即ち、左右の大脳半球をまたぎ、cingulum と dorsal hippocampal commissure に挟まれた CC 領域のうち、上縁(外側縁)が頭頂部に最も近いところで区切った面積の和を求めた。次に、大脳皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの単位面積当たりの数を、対物レンズで 10 倍の視野の内側下端が cingulum の上端に重なるように視野を固定した状態で、拡大を 20 倍にした際の頭頂部大脳皮質中間層における数とし、いずれも 2 断面の左右の平均値を求めた。

②神経機能・行動影響評価：

全ての投与実験には SD 系雌/雄性ラットを用い、前述の「①脳発達のかく乱影響評価」の実験プロトコールに従い、PTU 12 ppm の飲水投与、DBDE の 0, 10, 100, 1000 ppm の混餌投与を妊娠 10 日目から離乳時(生後 21 日目)まで行った。

一般行動観察では オープンフィールドにラットを入れ、馴化期間である 5 分間の行動を観察した。特に、水平方向の運動量である horizontal activity と立ち上がり行動である vertical activity を測定した。また、ドパミン神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 及び circling, 並びに serotonin syndrome の指標である head-twitch 行動等、モノアミン神経系の機能破綻に起因するとされる異常行動の発現の有無についても確認した。

不安感受性の検討は高架式十字迷路試験に従った。

脳内報酬系への影響は条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤であるメタンフェタミン(METH; 1 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に及ぼす DBDE 及び PTU の胎児期及び授乳期暴露の影響を検討した。

脳内モノアミン濃度の測定は *in vivo* microdialysis 法に従い、脳内報酬系に関与する mesolimbic dopamine 神経の投射先である側坐核におけるドパミンとその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)及び homovanillic acid (HVA)の細胞外遊離量を測定した。

③免疫機能影響評価：

動物は「①脳発達のかく乱影響評価」で実験に供

した動物を用い、3週目(離乳時)、11週目(成熟時)に屠殺した動物につき以下の解析を行った。

血液学的検査のうち、末梢白血球数は、ラット腹大動脈より採血した血液20 mlをあらかじめ80 mlの0.5%EDTA-2K溶液が入った1.5 mlチューブに入れて混和し、多項目自動血球計数装置(M-2000, Sysmex corp)に供した。赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、ヘモグロビン数(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、及び平均赤血球色素濃度(MCHC)の測定を行なった。白血球百分比は、Wright染色した塗抹標本を作製し、かん状核好中球(Band)、分葉核好中球(Seg)、好酸球(Eosino)、好塩基球(Baso)、リンパ球(Lympho)、単球(Mono)及び有核赤血球(Ebl)について血液細胞自動分析装置(Microx MEG50S, Sysmex)を用いて計測した。

免疫系器官として、胸腺と脾臓の重量を測定し、その後、臓器を2つに分け、一方を病理組織学的検査用としてホルマリン固定し、残りをフローサイトメトリー用に供した。

体液性免疫の検索として、抗体産生への影響を調べるために、生後23, 33, 43日にKLH(keyhole limpet hemocyanin) 50 mgをalum 1 mgとともに腹腔内投与し、50日目に採血し、KLH特異的IgM, IgG抗体産生をELISA法にて測定した。また、脾臓、末梢血、血液中Bリンパ球の割合の解析をフローサイトメトリーを用いて行なうためにPECy5標識抗CD45RA抗体を用いた。

細胞性免疫に関与する検討として、胸腺、脾臓、末梢血中Tリンパ球の割合についてフローサイトメトリーによる解析を行なった。全T細胞数は、FITC標識抗CD3抗体を用い、CD4, CD8 T細胞サブセットは、PECy5標識抗CD4抗体及びPE標識抗CD8a抗体を用い、調節性T細胞(CD4⁺CD25⁺)については、PE標識抗CD25抗体を併用し、活性化T細胞(CD3⁺CD71⁺)については、PE標識抗CD71抗体を併用して解析を行なった。

非特異的免疫として、脾臓、末梢血中のNK細胞数の割合をフローサイトメトリーで解析した。抗体は、FITC標識抗NKRP1A抗体を用いた。

尚、本実験でフローサイトメトリーを用いて行ったリンパ球サブpopulation解析は、脾臓、胸腺、末梢血細胞を3種の蛍光で標識した抗体を用い三重染色後、Facs Caliber (Becton Dickinson)を用いて行なった。

④感染影響評価：

成体マウスでのPTU暴露実験として、九動(株)より購入したBALB/c雌性マウス8週齢(22-24 g)に

PTU(SIGMA P3755, Lot. 094K2502)を0.1%(1000 ppm)の濃度で精製水に溶解して6週間自由摂水させた。対照群には精製水を用いた。大豆由来のphytoestrogenを除いたSF(NIH-07変型)飼料を用い、自由摂食させた。なお、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

PTUの周産期暴露実験として、日本クレア(株)より購入したBALB/cマウス(雄:8-9週齢、雌:6-7週齢)を感染実験室内飼育ケージにて馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より4日後(GD3)から餌をSF飼料に変更し、11日後(GD10)からPTU 10 ppmを3匹に、精製水を2匹に対してそれぞれ成体マウスでの実験と同様に飲料水として与えた。出産後21日目(PND21)に離乳を行い、餌を通常食CRF-1(オリエンタル酵母)に切り替えて通常飼育を行った。

RSウイルス感染実験として、Respiratory syncytial virus(RSV) A2株はヒト咽頭がんHep-2細胞で増殖・取得した。次いで、キシラジン・ケタミン混合麻酔液をマウス右大腿部に筋肉注射し、麻酔下でRSV 3×10^5 PFUを経鼻感染させた。感染実験対照マウスには2%ウシ胎児血清(FCS)含有MEM培地を経鼻投与した。感染5あるいは6日後に眼窩採血を実施し、常法により血清を調製した。血清は使用時まで-30℃に保存した。採血後のマウス気道にカテーテル経由で冷PBS(-) 0.8-1.0 mLを注入し、肺洗浄液(BALF)を取得した。BALFは使用時まで-80℃に保管した。その後肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

RSウイルス感染価の測定は、プラーク法により行った。24穴マルチプレート中で予め単層培養しておいたHep-2細胞に2% FCS添加MEM培地(維持培地)で連続希釈したBALFサンプルをそれぞれ各穴0.2 mLずつ添加した。これらのプレートを5% CO₂存在下、37℃で1時間インキュベート後、各穴を1.0 mLずつ維持培地で洗浄し、続いて0.8%メチルセルロース含有維持培地を添加して同様に4日間培養した。培養終了後、2.5%ホルマリン溶液を添加・処理し、続いてクリスタルバイオレット染色後に、ウイルス由来のプラーク数をカウントして感染価を算出した。肺組織中のウイルス感染価の測定は、-80℃で凍結保存しておいた肺組織を冷乳鉢中でホモジナイズし、その遠心上清(1800 g, 4℃, 15分間)をBALFサンプルと同様に維持培地で希釈して用い、その後の方法も同様に行った。

Real-time RT-PCR法によるウイルスコピー数の測定として、まず肺組織ホモジネートの一部からTrizol試薬(Invitrogen)を用いて添付のプロトコールに準じてRNAサンプルを取得した。次にRSウイルスN-geneに設定したセンスプライマー(nt.

1096-1119) を用いて逆転写反応 (ReverTra Ace; TOYOBO) により cDNA サンプルを調製した。この cDNA サンプルについて Roche LightCycler SYBR Green I システム (Forward primer; nt. 1137-1169, Reverse primer; nt. 1191- 1223) を利用して real-time PCR を行い、専用ソフトウェア上で算出される Crossing point 値をスタンダードサンプルから得られるそれらと比較することによりウイルスコピー数を計測した。なお、スタンダードサンプルには RS ウイルス N 領域の塩基配列情報 (nt. 1096-1347) を導入したプラスミド pWGC-1 を用いた。

血清中 T4 及び BALF 中のサイトカインの定量は、それぞれ Endocrine 社製の Rodent T4 ELISA キット及び eBioscience 社製の Mouse Th1/Th2 cytokine ELISA キットを用いて添付のプロトコールに準じて行った。

⑤ 幼若期暴露発がん性評価：

妊娠 F344 ラット 25 匹を日本チャールズリバーより購入し、各群 5 匹の 5 群に分けた。出生後の児動物は、各群雌雄各 20 匹に揃えた。各群の母動物には、出産直後より 3 週後の離乳まで、DBDE を 0 (対照)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5% 濃度で SF 飼料 (NIH 変型、オリエンタル酵母工業) に混じて自由摂取させた。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺し、肝、腎及び甲状腺重量を測定後、常法に従ってパラフィン切片、HE 染色標本を作製して病理組織学的に観察した。離乳後の各群の児動物には DBDE を母動物と同様の方法及び用量で 2 週間投与した。最高投与量の 2.5% は、NTP の文献値を参考にしたラットの長期試験における発がん用量であり、低用量の 0.01 あるいは 0.001% は、本研究の主任研究者らが予備的に実施した SD(IGS) ラットに対し妊娠 10 日から離乳時まで投与した際に、甲状腺濾胞上皮細胞のびまん性過形成の認められた用量である。DBDE 投与終了 1 週間より、児動物は基礎飼料 (CRF-1、オリエンタル酵母工業) で飼育した。発がん物質処置として、生後 6~10 週の 4 週間、肝、腎、肺、甲状腺など多臓器に発がん標的性を示す N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を児動物の雄には 0.08%、雌には 0.2% 濃度で飲水に混じて投与し、生後 7 週時の雌の児動物には更に 50 mg/kg 体重の 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を 1 回強制経口投与した。実験期間中、体重及び摂餌量を週 1 回測定した。また生後 14 週目より週 1 回、触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してノギスにてその大きさ(縦×横×高さ)を測定した。現在、生後 24 週間が経過した。実験期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺し、剖検においては剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを、肝、腎、甲状腺については摘出後重量を測定する。更に肺、

食道、乳腺、膀胱、卵巣あるいは精巣、及び肉眼的異常部位を摘出し、病理組織学的検索を行う。なお、触診及び剖検時に測定した腫瘍(腫瘍)の大きさより、次の式により体積を計算する。

$$\text{体積}=(\text{縦})\times(\text{横})\times(\text{高さ})\times\pi/6$$

統計方法としては、体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発生数、体積については F 検定の後、Student あるいは Welch の t 検定を、乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織所見の発生頻度については Fisher の直接確率検定法を用いる。

⑥ 各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究：

17 年度は、耐用摂取量設定としては、比較的情報のまとまった米国 EPA の IRIS (Integrated Risk Information System) と、WHO の水質ガイドライン (Guidelines for Drinking-Water Quality: GDWQ) 第 3 版(2004)で取り上げられた物質について情報収集を行った。IRIS からは、該当する化合物リストを示した Web site (<http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>) より、WHO の水質ガイドラインからは、ガイドライン値算出のための背景資料のある Web site (http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/chemicals/en/index.html) より評価文書を収集した。各々の文書の有害性評価にあたる部分より、NOAEL または LOAEL とその設定根拠となった毒性とその臓器、更に個人差、種差の不確実係数及びその他の不確実性因子とその理由、評価の結果得られた耐用摂取量について、化合物毎に情報を収集整理した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌あるいは飲水による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物に対する処置は、麻酔下で行い、屠殺はすべてエーテルあるいはキシラジン・ケタミン混合麻酔液による深麻酔下で大動脈からの脱血により行い、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、各研究所、大学の利用規程に従った。

耐容量等の設定に関する調査研究は、主に文献や評価資料等の調査研究を行なったものであるため、特に倫理的に配慮すべき事項はない。

C. 研究結果

① 脳発達のかく乱影響評価：

PTU, MMI, DBDE の予備実験では、200 ないし 250 ppm の MMI, 9 ないし 12 ppm の PTU とともに、暴露終了時(離乳時)の母動物の甲状腺重量を著明に増加させた。MMI 暴露例では暴露終了時の母動物体重は用量依存的に減少する傾向が認められ、250 ppm でその時点での仔動物数が子宮着床痕数に比較して

減少を示し、この用量は母動物及び仔動物のいずれに対しても毒性量と考えられた。PTU 暴露例では、対照群に比較して母動物体重はいずれの用量でも差はなく、出生仔数にも明らかな差を認めなかった。DBDE に関しては、80 ppm で母動物の甲状腺重量を若干増加させたが、母動物体重、離乳時での生存仔動物数に対照群との間に明らかな差は認めなかった。出生後から離乳時までの仔動物の体重の推移を検討した結果、雌雄とも PTU, MMI のいずれの用量においても、対照群に比較して明らかな体重増加抑制を示した。また、甲状腺機能低下状態の誘発に関しては、PTU のいずれの濃度、MMI ともに母動物の投与終了時での甲状腺重量が明らかに増加し、びまん性濾胞上皮過形成が明らかであった。また、DBDE では 80 ppm で甲状腺相対重量が軽度増加したが、病理検索により 80 ppm のみならず 60 ppm 暴露例でもびまん性濾胞上皮過形成を認めたため、各群母動物数を 3 とし、10, 100, 10,000 ppm の用量で、再度追加実験を行ったところ、明らかな用量依存性はないものの、投与全群で母動物の甲状腺重量の軽度の増加を認めた。病理組織学的には、びまん性濾胞上皮過形成を示す例が 10 ppm 群から認められ、明らかな用量依存性はないものの、用量に伴いこの病変を示す例が明らかに増加した。

PTU, MMI の本実験では、投与期間中の母動物の摂水量の推移として、投与初めの GD10-15 に 200 ppm MMI で低値を示し、生後 2 日目以降では、200 ppm MMI とともに 12 ppm PTU でも投与終了時まで低値を示した。摂餌量に関しては、200 ppm MMI 群では GD15-20 より、12 ppm PTU 群では PND2-7 より、実験期間を通じて対照群に比し低値を示した。

出生後の暴露期間中（離乳時まで）の仔動物の体重は、雌雄とも 200 ppm MMI では生後 7 日目から、12 ppm PTU では生後 10 日目から低値を示し、3 ppm PTU では雌で生後 21 日目に若干の低値を示した。

離乳後は、PTU, MMI の各投与群とも摂餌量の低値、あるいは低値傾向を認め、雄では 12 ppm PTU において生後 6-7 週で、200 ppm MMI において生後 10-11 週で、雌では、投与各群において生後 3-4 週で、12 ppm PTU において生後 6-8 週、200 ppm MMI において生後 6-7 週に低値を示した。体重に関しては、12 ppm PTU, 200 ppm MMI の雌雄で離乳時から最終屠殺時まで、3 ppm PTU の雄では離乳時から 7 週齢時まで、雌では離乳時のみに低値を示した。

生後 21 日目の解剖時、母動物は 200 ppm MMI と 12 ppm PTU 投与群で、甲状腺重量の絶対、相対値の有意な増加を示し、病理組織学的検索の結果、濾胞上皮細胞のびまん性かつ高度の肥大、濾胞内の colloid の減少、消失を認めた。

母動物の子宮着床痕数、生存仔数とその性比、出

生時仔動物体重、AGD に投与による明らかな差を認めなかった。21 日目解剖時、体重は 200 ppm MMI と 12 ppm PTU 群の雌雄で低下を示し、雌では 3 ppm PTU でも低値を示した。臓器重量は、投与各群で精巣の相対重量の減少の他、雌雄とも脳の相対重量の増加を認めた。

春期発動は 12 ppm PTU 群の雌雄、200 ppm MMI 群の雄で遅延したが、性周期の変化は認めなかった。11 週目の解剖時では、200 ppm MMI 群の雄で、脳、甲状腺、精巣、精巣上体の相対重量の増加、同群の雌では脳、子宮相対重量のそれぞれ増加、減少を認めた。12 ppm PTU 群の雄でも脳、甲状腺、精巣、精巣上体の相対重量の増加を認め、腎相対重量も増加を示したが、雌では体重以外に有意な変動を認めなかった。3 ppm PTU では雄で精巣重量の軽度増加を認めたのみであった。仔動物の血清甲状腺関連ホルモン検索の結果、21 日目の 200 ppm MMI 群と 12 ppm PTU 群で T3 と T4 値が無処置群に比べて減少し、TSH 値は増加を示した。TSH の増加は 3 ppm PTU 群でも認めた。11 週目では、200 ppm MMI 群と 12 ppm PTU 群の T3 値が軽度に減少したが、T4 と TSH 値の変動は認められなかった。

次に、暴露終了時での雄性仔動物の海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、3 ppm PTU, 12 ppm PTU, 200 ppm MMI の各群で有意に発現変動した遺伝子 ($p < 0.05$, 2 倍以上、あるいは 0.5 倍以下)のうち、発現増加遺伝子は 200 ppm MMI 群で 32 個、12 ppm PTU 群で 38 個が得られ、そのうち 16 個の遺伝子が両群で共通に増加を示した。発現減少遺伝子として 200 ppm MMI 群で 17 個、12 ppm PTU 群で 37 個が得られ、そのうち 7 遺伝子が共通に低下を示した。PTU, MMI に共通の発現増加遺伝子のうち、遺伝子名が同定されているものは、Purkinje cell protein 4 (Pcp4); Lysyl oxidase (Lox); FXYD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxyd6); integrin, beta-like 1; Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 (Cte1); STRA6; Degenerin (Accn1) の 7 つであった。発現減少遺伝子のうち、遺伝子名が同定されているものは、Wingless-related MMTV integration site 2 (Wnt2); Basic helix-loop-helix domain containing, class B3 (Bhlhb3); Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (Ptpn3); Kallikrein 8 (neurosin/ovasin; Kik8); Histone deacetylase 11 (Hdac11) の 5 つであった。しかし、更に解析を進めて、12 ppm PTU と 3 ppm PTU, 更に 200 ppm MMI に共通して発現変動を示した遺伝子を検索したところ、統計的有意差を持って変動したものは得られなかった。

次に、PTU, MMI 発達期暴露例の生後 11 週目での CA1 領域での細胞変化の有無を病理組織学的に検討したところ、海馬台より前方の CA1 領域で錐体ニュー

一ロンが密にまとまらずにばらついて存在する傾向が認められた。現在、このCAIでの細胞分布のばらつきを表現するために、この領域を数層に分けて一定面積当たりのNeuN陽性細胞数の分布を形態計測している。一方、同一の脳で、甲状腺機能低下に起因する白質影響を検討した結果、CC領域はPTUの用量に依存して小さくなっており、無処置対照に比べてその縮小は有意であった。200 ppm MMIでも面積の縮小が明らかであった。また、大脳頭頂部皮質でのCNPase陽性オリゴデンドロサイトの数はPTU暴露で明らかに減少し、3 ppmでは有意ではないものの用量依存的な低下を示した。200 ppm MMIでも陽性細胞数は有意に減少した。

次に、PTU、MMIと同様のプロトコールで、DBDEについて3用量を設定して混餌暴露を行った結果、暴露期間中の母動物の摂餌量は群間で差が認められず、仔動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差を認めなかった。この期間での母動物の体重増加量にも群間での差を認めなかった。暴露終了時の母動物の甲状腺重量は、予備実験と同様に、用量依存的ではないものの、相対重量の増加が10及び1000 ppmで認められた。出産及び出生仔のパラメーターとして、着床痕数、出生仔数、雄の割合、生後2日目の体重とAGDには群間で差を認めなかった。暴露終了時での解剖において臓器重量の変動を検討したところ、肝臓相対重量の増加が雄では10 ppm以上で、雌では最高用量のみで認められた。他の臓器重量には明らかな変動は認められなかった。暴露終了後での体重の推移については、雄の仔動物で、100 ppm暴露により、観察期間を通じて無処置対照に比べて有意に高い値を推移した。雌でも同様の傾向を認めたものの、有意な変化ではなかった。

離乳後は、雌雄とも春期発動の時期に投与による影響を示唆する変動は認めず、雌においても性周期の異常所見は認めなかった。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時では、1000 ppm群でT3の弱い低値、生後11週目でT4の弱い低値を認めたのみであった。TSHは群間で明らかな変動を示さなかったが、高用量群で高い傾向を示した。

生後11週目の解剖例では雄で10と100 ppm群の体重が高値を示し、雌でも有意ではないものの同様の傾向を示した。それに伴い、雄の10、100 ppm、雌の100 ppmで脳の相対重量が有意に低値を示した。次に、これらの動物(雄を検索)で、CC領域の面積を測定したところ、用量依存的ではないものの100 ppm以上で有意な縮小が見られた。大脳頭頂部皮質でのCNPase陽性オリゴデンドロサイトの数も用量依存的ではないものの100 ppm以上で有意な減数が見られた。

最後に、HBCD、TBBPAとも1000、10,000 ppmの

2用量で予備試験を実施した。母動物の投与終了時の体重に群間での差は認めなかったが、甲状腺の相対重量はいずれの物質も10,000 ppmで弱い増加を示した。HBCDでは肝臓重量も若干増加した。一方、妊娠期間、子宮着床痕の数、出生仔数等には投与による明らかな影響は認められなかった。また、暴露期間中の母動物の体重、摂餌量の推移に関しても明らかな投与による影響は認められなかった。暴露終了時の母動物の甲状腺の病理組織学的検索の結果、HBCD暴露例ではびまん性濾胞上皮肥大が1000 ppmから増強し、TBBPAでもまた10,000 ppmで明らかであった。しかし、いずれの物質もPTU、MMIに見られた様な強い変化は誘発しておらず、用量比に比較して反応性強度が弱いという結果となった。

出生仔のAGD、出生後の暴露期間中の体重は、群間での差を認めなかった。

②神経機能・行動影響評価：

DBDE(10, 100, 1000 ppm混餌)ないしPTU(12 ppm飲水)の胎児期及び授乳期暴露による一般成長に及ぼす影響を、出生時、離乳時(3週齢)及び行動実験開始時(7週齢)の体重を指標として検討した結果、離乳時(3週齢)及び行動実験開始時(7週齢)において、雌雄共にPTU暴露による著明な体重減少が認められた。一方、DBDE暴露ラットでは、むしろ体重の増加傾向が認められた。

一般行動観察の結果、PTU暴露により雌雄共に著しい自発運動量の増加が認められた。一方、DBDE暴露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの暴露動物において、その他の特筆すべき異常行動は観察されなかった。

高架式十字迷路法に従いPTUないしDBDE暴露による不安感受性の変化について検討したところ、雄性ラットではいずれの化学物質暴露による変化は認められなかった。一方、雌性ラットでは、PTU暴露においてのみ、open arms滞在時間及び侵入回数に有意な増加が認められた。

条件づけ場所嗜好性試験に従い、METH誘発報酬効果に及ぼすDBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露の影響を検討した結果、DBDE暴露群では、暴露量に依存した報酬効果の減弱が認められ、1000 ppmで有意を示した。また、PTUの暴露においても著明かつ有意なMETH誘発報酬効果の減弱が認められた。

側坐核におけるドパミン及びその主要代謝物の遊離量を、*in vivo* microdialysis法に従い検討した結果、1000 ppm DBDEないし12 ppm PTUの暴露により、側坐核におけるドパミン基礎遊離量及びMETH誘発ドパミン遊離量の著明な低下が認められた(PTUで無処置対照に比較して有意)。更に、DOPAC及び

HVA においてもその基礎遊離量の減少が認められた。

③免疫機能影響評価：

抗甲状腺剤投与の影響として、まず体重は3週齢の時点で、12 ppm PTU, 200 ppm MMI 群で対照群に比べて70%程度に低下していた。11週齢の時点においては、3週齢時に比べ回復傾向はみられるが、12 ppm PTU, 200 ppm MMI 群で、体重の低値が観察された。脾臓、胸腺重量については、特に、3週齢時の12 ppm PTU, 200 ppm MMI 投与群で強く減少し、いずれの臓器も対照群に比べ40%程度に低下していた。11週齢の時点では、脾臓重量は対照の80%程度にまで回復し、胸腺重量は対照群と差を認めなかった。次いで、3, 11週齢時の脾臓、胸腺細胞数の計測の結果、3週目の脾臓細胞数の低下が顕著で、200 ppm MMI で対照の30%程度、12 ppm PTU で20%程度にまで低下していた。11週目では対照の70%にまで回復していた。胸腺細胞数はラット間でのばらつきが大きいこともあり、有意差はみられなかった。

血液学的検査を行なった結果、PTU, MMI とともに、3, 11週齢時における末梢血白血球数、白血球百分比に明らかな変動を認めなかった。

フローサイトメトリーによるリンパ球ポピュレーションの解析の結果、3週齢の時点で、200 ppm MMI により脾臓ないし末梢血でB細胞比率の低下、T細胞比率の上昇が観察された。一方、T細胞ポピュレーションの中では、CD71(トランスフェリン受容体)抗原陽性の活性化T細胞の割合の減少、非活性化T細胞の割合の上昇が観察された。T細胞CD4, CD8抗原陽性細胞の比率については、両方とも上昇する傾向がみられた。200 ppm MMI とともに12 ppm PTU においても、脾臓のB細胞(CD3⁺CD45RA⁺)の比率が対照群の70%に低下し、末梢血では40%程度に低下していた。これに対してT細胞(CD3⁺CD45RA⁻)の比率は、脾臓で200%、末梢血で150%程度まで上昇した。このB細胞比率の低下、T細胞比率の上昇の傾向は、11週齢時には殆ど見られず、回復傾向にあることが示された。また、200 ppm MMI, 12 ppm PTU 投与群では、3週齢時の末梢血の活性化T細胞(CD3⁺CD71⁺)の割合が対照群の50%程度に減少し、一方で、非活性化T細胞(CD3⁺CD71⁻)の割合が170%程度に上昇した。この活性化T細胞の減少も、11週齢時にはほぼ回復する傾向がみられた。制御T細胞、NK細胞のフローサイトメーターによる解析の結果、PTU, MMI 投与群とも3週齢での末梢血における制御T細胞(CD25⁺CD4⁺)の割合の上昇を示し、NK細胞については、NKRP1A (NK受容体)陽性細胞の割合の上

昇が3週齢の時点で見られ、11週齢においてはむしろ抑制する傾向がみられた。尚、NKRP1A陽性細胞のうち、NKRP1A⁺CD4⁺のNK細胞はNKT細胞と考えられるが、3週齢時において、このNKT細胞と思われる細胞の比率の上昇の方が、NKRP1A⁺CD4⁻のNK細胞に比べ大きい傾向にあった。

DBDE暴露雄児動物の体重、脾臓、胸腺重量変化は、3, 11週齢時共に、投与各群で対照群と明らかな差を認めず、10及び100 ppm 群で11週齢の時点で体重の増加傾向がみられたのみであった。また、脾臓、胸腺細胞の細胞数を検討した結果、3週齢での脾臓細胞数が100及び1000 ppm で減少する傾向がみられた。胸腺細胞数については明らかな差はみられなかった。

血液学的検査の結果、3, 11週齢時ともに、末梢血白血球数、白血球百分比に明らかな変化はみられなかった。また、3週齢のDBDE投与群で、有核赤血球(Ebl)のわずかな上昇がみられた。

次いで、フローサイトメトリーによるリンパ球ポピュレーションの解析では、DBDE投与群と対照群との間にPTU, MMI 投与の時にみられたようなB細胞の比率の低下等の大きなポピュレーション変化は観察されなかったが、幾つかの項目で、リンパ球サブポピュレーションの変化が観察された。T細胞のサブポピュレーション解析では、3週齢時において、10, 1000 ppm で脾臓リンパ球のCD4⁺T細胞の減少、100及び1000 ppm で脾臓の活性化B細胞の割合の低下がみられた。更にNK細胞については、NKRP1A (NK受容体)陽性細胞の割合の減少が、DBDE投与3週、11週齢のどちらにおいても観察され、その抑制効果は1000 ppm で顕著であった。

DBDE投与ラットのKLHに対する抗体産生への影響を検討する目的で、3回KLHで免疫したラットから得た血清を、50, 500, 5000倍希釈し、KLHを固相抗原としたELISAにて、KLH特異的IgG抗体価を測定した。その結果、投与したDBDEの濃度が上昇するにつれ、血清50倍希釈でも発色程度の低い個体がみられるようになった。各DBDE投与群のKLH-IgG抗体価を対照群と比較しても、群内の個体差が大きい関係で、有意差は得られなかったが、IgG抗体価5000以上、50-5000、50以下で分類すると、10 ppm 群ではIgG抗体価5000以上を示す個体が多いのに比べ、1000 ppm 群ではIgG抗体価50以下の個体が多くなる傾向が得られた。

④感染影響評価：

成体マウスにおけるPTU暴露の感染影響の有無を検証するために、ラットで設定した投与濃度よりかなり高い濃度である0.1%(1000 ppm)を6週間飲料水として成体マウスに投与し、その後RSウイ

ルスを感染させて各種検討を行った。対照群での血清中の平均 T4 レベルが 24.7 ng/mL であるのに対して、PTU 暴露群では 11.8 ng/mL と 50%以下に低下していた。これらの PTU 暴露マウスでは体重の抑制ならびに摂餌量低下も認められており、これらのマウスで甲状腺機能低下が誘導されていることが示唆された。RS ウイルス感染病態に関しては、肺組織中及び BALF 中の RS ウイルス感染価並びに肺組織中のウイルス RNA コピー数が PTU 暴露マウスで対照群のマウスより高い傾向が認められた。これらの結果より、PTU 暴露マウス群では肺におけるウイルスの増殖が対照群より盛んである可能性が示された。更に、肺組織中のウイルス RNA コピー数が感染影響の指標として有用であることが強く示唆された。

次に、低い PTU 濃度 (10 ppm) を設定して親マウスの周産期 (GD10 - PND21) に飲水投与後、仔マウスに RS ウイルスを感染させ、感染 5、6 日後に前述の実験と同様の検討を行った。今回の試験では、PTU 暴露により仔マウス血清中の T4 レベルの低下は認められなかったが、平均体重は対照群の仔マウスより明らかに下回った。周産期における PTU 暴露が 10 ppm と成体マウスでの試験用量と比較してかなり低く、かつ暴露期間も約 1/2 と短い為、甲状腺機能については明らかでないが、仔マウスの発育に対して影響を与えることが確認された。次に、PTU 暴露のウイルス感染価への影響を検討した結果、本試験では、肺組織及び BALF 中のウイルス感染価の PTU 暴露による明確な変化は認められなかった。また、肺組織中のウイルス RNA コピー数に関しても、PTU 暴露群と対照群との間に差は無かった。RS ウイルス感染モデルにおいて、ウイルス感染の進行に伴って気道や肺組織中に様々なサイトカインやケモカインが誘導されることが知られている。そこで、本試験では代表的な Th1 サイトカインとして IFN- γ と IL-2、Th2 サイトカインとして IL-4 と IL-10 について BALF 中のレベルを ELISA により定量した。BALF 中の IFN- γ は RS ウイルス感染により誘導され、感染 6 日後では PTU 暴露群において有意に増加していた。一方、IL-2、IL-4 及び IL-10 の BALF 中量は全ての群で検出限界程度もしくは、それ以下であり、PTU 暴露による顕著な変化は認められなかった。

⑤ 幼若期暴露発がん性評価：

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態及び体重に DBDE 投与による影響は認められなかった。対照群の 1 例については、全児動物が育児不良により死亡したため、評価より除外した。剖検時の肝重量は、0.25 及び 2.5% 群で対照群に比して増加傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。腎及

び甲状腺重量に DBDE 投与による影響はみられなかった。肝、腎及び甲状腺の病理組織学的検索では、対照群を含む各群に著明な変化は認められなかった。

児動物に DBDE 投与によると考えられる死亡例はみられていないが、出生後の保育不良あるいは DMBA 投与時の投与過誤により、有効匹数は 0 (対照)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5% 群の雄では 16、20、20、20、20 匹、雌では 15、18、17、20、19 となった。一般状態、体重及び摂餌量については生後 24 週目の現在、DBDE 投与による影響は認められていない。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、生後 24 週目である現在、0.25% 群の雌 1 例の腹部皮下に結節がみられている。他の群には結節/腫瘍の発生は認められていない。

⑥ 各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究：

IRIS については、544 化合物(群)がエントリーされており、そのうち非発がん性の RfD 値 (TDI に相当) が評価されている物質 429 化合物について、情報を整理した。収集した項目は、化合物数、CASRN、NO(A)EL、LO(A)EL、NOAEL の根拠、標的器官、その根拠文献、総合不確実係数、個人差の係数、種差の係数、その他の係数 (Modifying Factor)、不確実係数の設定理由、RfD また RfC (Reference Concentration : 吸入暴露の場合)、最終評価年月、用量換算などの補足情報に従って整理し、RfD 算定のために採用されたエンドポイントとしての標的器官の頻度分布と、各不確実係数の分布を求めた。

エンドポイントは、一つの NOAEL (または LOAEL) の設定に複数の所見を用いることもあり、総数としては約 550 項目になり、それらを 25 種類に分類した。その結果、肝臓に対する所見が 117 件と最も多く、次に 40 件を越えるものとして、体重変化、中枢・末梢の神経系への影響、腎臓、血液生化学的パラメータの変化が多く見受けられた。本研究の目的である発達期毒性との関連が比較的高いと思われる生殖発生毒性や甲状腺への影響については各々約 20 件であった。免疫系への影響を RfD 算定のためのエンドポイントとした例は 2 件しか見受けられないが、これは関連する論文数や標準的な試験法の整備状況等に依存している可能性も考えられる。

不確実係数 (UF) の適用状況としては、実験動物の慢性影響の NOAEL から基本的に算用されるのは、100 が最も多く、429 件中の 4 割近くの 162 件で使用されていた。その次に多いのは UF: 1000 の約 120 件で、UF: 300 と UF: 3000 がこれに次ぎ、これら 4 種類の UF の使用が約 90% を占めていた。

次に、これらの不確実係数の意義を解析するために、使用された総合不確実係数を構成する因子についての解析を行った。なお、評価時期が古い場合や使用説明がなく使用された UF: 100 については、個人差: 10 及び種差 10 で構成されているものとし、また、使用されていない場合は、解析上便宜的に UF: 1 とした。まず個人差に使用された不確実係数としては、約 95% がデフォルトの 10 を使用している。これは、殆どが実験動物結果を用いて RfD が設定されていることや、ヒトにおける定量的な解析が少ないことに依存しているものと考えられる。一方、16 件については、UF: 1 または UF: 3 が用いられているが、これらの例では、NOAEL の設定がヒトの高感受性集団におけるデータに基づいており、デフォルトの 10 は必要ないという判断がなされているためである。また、1 件、UF: 6.32 という値が使用されているが、これはヒトにおける PBPK 解析を行ったデータに基づき算定されたものである。

種差に関しては、約 4 分の 3 において 10 が採用されている。約 1 割で UF: 1 になっているが、これは殆どがヒトにおける NOAEL を RfD 設定のために採用していることによるものである。その他、53 件で UF: 3 が採用されている。その殆どは、吸入実験による実験動物からヒトへの外挿として用いられたものであるが、そのうち 7 件と UF: 10.428 としているケースでは、動物とヒトでの体内動態解析データに基づいた判断によって決定されていた。また、2 件は、サルを用いた実験の NOAEL を用いたことによるものであった。

その他の UF として追加されたものについては、137 件が UF: 10 で最も多く、UF: 3 と UF: 30 が各約 50 件でこれに次いで多かった。ここで追加された理由の殆どが、短期試験の結果を NOAEL (または LOAEL) として採用したことと、LOAEL しか求められなかったことによるものである。各々のケースで、化合物の蓄積・排泄に関する情報を考慮した結果や、LOAEL での毒性所見の程度 (NOAEL に近いとか軽微な変化であるとか等) に応じて、UF として 10 及び 3 を割り当てており、各々の組み合わせに従って、合計として 3~100 の追加の UF が使用されていた。

一方、LOAEL しか求められない場合は、近年ベンチマークドースを用いたアプローチが有用であることが知られており、IRIS の中でも NOAEL が求められなかった 53 件のうち、29 件でベンチマークドース解析が行われており、より科学的根拠に基づいた RfD の算定が行われていることが示された。

同様の情報整理及び解析を WHO の飲料水ガイドラインの設定根拠となった評価文書中の 162 物質について行った。その結果、TDI アプローチによる評

価基準算定方法として、78 件の情報を整理することができた。最終評価そのものが、JECFA や JMPR 等の他の WHO 関係の評価文書を引用している関係で、エンドポイント等の記載の明記がないものもあり、標的器官の整理はできていないが、使用した不確実係数については明示されている。総合の UF としては、100 または、1000 が殆どであり、IRIS で見られたような UF: 300 や UF: 3000 といった例は数件しか認められない。これらは、不確実係数の各構成因子の解析でも明らかなように、種差や個体差に関する UF も 10 以外を殆ど用いていないことや、追加の UF も必要な 43 件中 30 件に UF: 10 を用いていることに依存していることが示された。また、ベンチマークドースの適用もごく最近再評価された 2 件のみであった。

D. 考察

① 脳発達のかく乱影響評価:

PTU, MMI の発達期暴露により、仔動物に対して強い甲状腺機能低下状態が誘発され、成熟後での海馬 CA1 ニューロン、白質構成成分に異常の出現することが明らかとなった。性分化指標関連では 12 ppm PTU 群の雌雄、200 ppm MMI 群の雄で春期発動が遅延し、雌で化学物質による違いが見出され、雌での遅延に関しては、PTU そのものによる影響が示唆された。ただし、雄では成因が不明であるものの、甲状腺機能低下に関連した性成熟遅延が示唆されたが、その他の性分化指標には異常を認めなかったことから、重篤な性分化障害の生じている可能性は低いと考えられた。

PTU, MMI で誘発された CA1 ニューロンの変化に関しては、通常集合して層構造を形成しているニューロン集団の細胞分布のばらつきとして表現され、ラットを用いて既に報告のある妊娠期間中のヨード欠乏による甲状腺機能低下により生じるニューロンの migration の異常と同等の変化であると考えられた。本研究で、細胞分布のばらつきに関して形態計測による定量化は未実施であるが、NeuN 免疫染色において CA1 領域を層状にいくつかのセグメントに区切った時の各部位に分布するニューロン数、あるいは、CA1 細胞層のベースラインからの各ニューロンの位置 (核の近位端) を求める予定である。また、暴露終了時での CA1 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の結果、PTU, MMI に共通の発現変動を示した遺伝子が見出された。発現増加遺伝子のうち、機能既知の遺伝子は、sodium channel protein である Purkinje cell protein 4 (Pcp4); 細胞外マトリックス蛋白質を架橋する Lysyl oxidase (Lox); イオン輸送調節遺伝子である FXYD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxyd6); 細胞外マトリックス蛋白質であ

る integrin, beta-like 1; 脂肪酸酸化に關与する Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 (Cte1); Wnt シグナルを介したレチノイン酸反応性遺伝子で、血液臓器開門に機能することが知られている STRA6; amiloride-sensitive epithelial Na channel である Degenerin (Accn1) の7つであった。この中の Fxyd6 以外の遺伝子は脳の発達との関連での機能が報告されている。発現減少遺伝子のうち、機能既知のものは Wingless-related MMTV integration site 2 (Wnt2); 神経分化に關連する転写因子である Basic helix-loop-helix domain containing, class B3 (Bhlhb3); 細胞増殖シグナル因子である Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (Ptpn3); Extracellular serine protease で neurite outgrowth や fasciculation に關与する Kallikrein 8 (neurosin/ovasin; Kik8); 新生仔脳で甲状腺ホルモンによって機能調節される corepressor Hairless である Histone deacetylase 11 (Hdac11) の5つであり、これらの全ては脳の発達との関連での機能が報告されている。今後は、代表的なものにつき real-time RT-PCR による発現レベルの検証と共に、免疫染色による解析が可能なものについては、甲状腺機能低下による細胞分布の変動の有無について検討を加える。次いで行う DBDE 暴露例での網羅的標的遺伝子探索の結果と併せて、蛋白質あるいは mRNA 発現のいずれかで BFR を用いた脳障害の評価系の確立を図る予定である。

甲状腺機能低下による白質に対する影響評価系として、暴露終了時での CC における標的遺伝子の網羅的探索を行う予定であったが、抽出した RNA 量が必要量に足りず、再度、動物実験からやり直すこととなった。また、PTU, MMI 暴露例での白質形成障害に關連して、成熟後(11週)での CC の領域測定、皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度測定が有効であることが判明した。

DBDE の暴露実験では、予備実験における母動物の甲状腺の病理組織学的解析で、母動物に対しては甲状腺機能低下の誘発が明らかであった。本実験に於いても、10 ppm 用量から母動物の甲状腺重量の増加がみられたが、予備実験と同様に明らかな用量依存性は認められなかった。仔動物における血清中の甲状腺関連ホルモンは、投与終了時、11週目の両時点で、最高用量においてのみごく軽度な変化を示した。以上より、DBDE による甲状腺機能低下は程度がより弱い、低い濃度でも影響を及ぼしている可能性がある。実際、11週目で甲状腺機能低下と關連した不可逆的な大脳白質変化 (CC 面積の減少、CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度の減少) が、100 ppm 以上で見られており、また 10 ppm でも統計的有意差はないものの同様の傾向が見られている。一方、1000 ppm でも有意に変化したものの、100 ppm

での反応に比較して、用量依存的な増強を認めていない。TBBPA, HBCD の予備的な検討でも、誘発される甲状腺病変の強さに投与用量に応じた用量反応性が認められていない。DBDE は他の臭素数の少ない臭素化ディフェニルエーテルに比較して、分解しやすく蓄積しにくい物質であるが、低用量から生じる用量依存性の乏しい反応性は、難分解・高蓄積性のカテゴリーに入る化合物の生体作用の特性かも知れない。一方、PTU, MMI に比較して DBDE では甲状腺影響のレベルに対する中枢神経障害の程度が強く出現した。甲状腺機能低下影響に対しては、当然、発達期脳の感受性が重要な要因となるが、3 ppm PTU により軽度の甲状腺機能低下症を誘発した状態では、DBDE と同等の脳変化を認めなかったことから、DBDE 自身が脳に対して甲状腺機能低下症と同等の影響を示すものと考えられた。その考えの一つとして、DBDE が甲状腺機能低下を介さず直接的に中枢神経系に分布する甲状腺ホルモン受容体アンタゴニストとして作用する可能性がある。今後、これらの諸点を解決する目的で、共同研究の形で外部の研究者の協力を仰ぎ、仔動物における被験物質の脳などの組織分布を測定する予定である。

今後は、PTU, MMI の実験に関しては、CC での遺伝子発現プロファイルをマイクロダイセクション法を利用して求め、発達期甲状腺機能低下による脳の影響に關与する白質での標的遺伝子の同定を進める。また、CA1 ニューロンで得られた結果と共に、その発現解析結果を real-time PCR 法で検証する。更に、DBDE 暴露による脳の影響に關与する遺伝子群も上記の方法で解析し、甲状腺機能低下による脳の影響に關与する遺伝子群と比較する。その結果から得られた特異的な遺伝子群を他の臭素化難燃剤 (HBCD, TBBPA) に広げて適応し、胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな不可逆的影響の評価系の確立を図る。更に、可能であれば細胞局在などの解析を行い、BFR による発達期脳障害の評価手法を mRNA レベルで検討するのか、蛋白質局在で進めるのかを決定する。

②神経機能・行動影響評価：

PTU の胎児期及び授乳期暴露により、3週齢及び7週齢における著明な体重減少が認められた。一方、DBDE の胎児期及び授乳期暴露においては、むしろ増加傾向を示した。一般に、甲状腺機能低下症である橋本病やクレチン症患者では体重増加の認められることが知られている。このことから、DBDE を暴露されたラットでは、持続的な甲状腺機能の低下が引き起こされ、体重の増加傾向を示した可能性が考えられる。また、暴露を中止して4週後においても同様の傾向が認められたことは 吸収された DBDE

の蓄積性を反映したものであり、暴露中止後も甲状腺機能低下作用が維持されている可能性を示唆している。一方、PTUの暴露では、著しい体重減少が認められ、これは暴露中止後、少なくとも4週間は維持されていたことから、本研究で用いたPTUの暴露量は毒性用量である可能性も考慮しなくてはならない。

一般行動観察の結果、PTUの胎児期及び授乳期暴露により雌雄共に著しい自発運動量の増加が認められた。PTUの周産期暴露は多動性を示し、注意欠陥多動性障害のモデル動物と考えられていることから、本研究で得られたPTUの胎児期及び授乳期暴露による自発運動亢進は、過去の報告と一致する。一方、DBDEの胎児期及び授乳期暴露ラットでは、PTUの暴露で認められるような著しい自発運動量の増加は認められなかった。これらのことから、DBDEはPTU程強度な甲状腺機能低下作用を有さない可能性が示唆された。

高架式十字迷路法に従い不安感受性の変化について検討したところ、PTU暴露雌性ラットにおいてのみ、open arms 滞在時間及び侵入回数の有意な増加が認められた。これらの結果から、DBDEの胎児期及び授乳期暴露は不安感受性に何ら変化を及ぼさず、PTUの暴露では抗不安効果が引き起こされることが明らかとなった。甲状腺機能低下症の治療初期に高濃度の甲状腺ホルモンを処方することにより、警戒を要する重症の気分障害が引き起こされることが臨床経験上明らかにされていることから、逆に、甲状腺機能の低下が、抗不安を示した可能性も否定できない。また、PTUの暴露ラットでは著しい自発運動量の増加が認められたこと、高架式十字迷路試験においても、open arms と enclosed arms への総侵入回数の増加が認められたことから、本研究で得られた結果は、抗不安効果というよりはむしろ、運動量の増加がもたらした結果である可能性も考えられる。

次に、条件づけ場所嗜好性試験に従い、METH誘発報酬効果に及ぼすDBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露の影響を検討した結果、DBDEの暴露量依存的なMETHによる報酬効果の減弱が認められ、PTUの胎児期及び授乳期暴露においても著明かつ有意なMETH誘発報酬効果の減弱が認められた。脳内報酬系には腹側被蓋野から側坐核に投射している中脳辺縁ドパミン神経系が深く関与していることから、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、ドパミン神経の機能異常が引き起こされている可能性が考えられる。そこで、側坐核におけるドパミン及びその主要代謝物であるDOPACならびにHVAの細胞外遊離量の変化について、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、側坐核

ドパミンの基礎遊離量の低下、これに伴うDOPAC及びHVA量の低下が認められた。更に、METH誘発ドパミン遊離量について同様に検討を行ったところ、基礎遊離量と相関し、DBDEないしPTUの暴露ラットにおいてドパミン遊離量の著明な低下が認められた。これらの結果から、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、ドパミン神経系の可塑的変化の引き起こされる可能性が示唆された。

以上、本研究の結果から、DBDEの胎児期及び授乳期暴露により、特に、ドパミン神経の発達障害が引き起こされることが明らかとなった。また、PTUの胎児期及び授乳期暴露においても同様の結果が認められたことから、DBDE暴露によるドパミン神経発達障害は、一部甲状腺機能低下作用が関与している可能性が考えられた。

注意欠陥多動性障害はドパミン神経の機能低下、ドパミン遊離量の低下が原因であると考えられており、PTUの周産期暴露動物が注意欠陥多動性障害のモデルになり得ると考えられている。本研究においても、PTUの胎児期及び授乳期暴露によりドパミン遊離量の減少に伴う、自発運動量の亢進が認められたことから、甲状腺機能低下がドパミン神経の発達障害を引き起こし、結果として「多動」になったと考えられる。一方、DBDEの胎児期及び授乳期暴露はドパミン神経の発達障害を惹起すると考えられるものの、本研究の結果においては「多動」という表現型としては現れなかった。このことは、DBDEがPTU程強度な甲状腺機能低下作用を有していないことを示唆するものである。

③免疫機能影響評価：

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と同一実験の動物を用いて検索を行い、PTU、MMIにより、暴露終了時に脾臓の重量・細胞数の顕著な減少、胸腺重量の減少、脾臓と末梢血におけるTリンパ球並びにNK細胞の増加、Bリンパ球並びに活性型のT、Bリンパ球の減少を見出し、成熟後においては、脾重量の減少は継続したが、末梢血においてNK細胞と活性化T細胞の減少のみが認められた。MMI、PTU投与による甲状腺機能への影響については、3週齢時においてT3、T4の有意な減少、TSHの有意な上昇がみられ、甲状腺機能が顕著に抑制されているが、11週齢時では甲状腺ホルモンT3の軽度の減少がみられるのみで、甲状腺機能はほぼ回復していることが確認されている(主任研究者報告分)。従って、MMI、PTUによる免疫細胞系への影響と甲状腺機能低下との間には、関連があると考えられ、特に、3週齢時ラットにおいて顕著にみられた免疫細胞系への影響(B細胞の比率の低下、活性化T細胞の低下等)は、この時期の強い甲状腺機能

低下と連動し、いわゆる thyroid-immune 連関によるものと考えられた。

DBDE では、脾臓、胸腺重量に変動はなかったが、1000 ppm において、暴露終了時に脾臓での CD4 陽性 T 細胞と活性化 T 細胞の減少、成熟後は末梢血 NK 細胞の減少が観察され、免疫担当細胞への影響が示唆された。DBDE 投与による甲状腺機能への影響については、1000 ppm 群において、3 週齢時に強い甲状腺機能低下を示し、11 週においても T4 値の低下が遷延していたことから、この群における NK 細胞の比率の低下に甲状腺機能低下による影響が示唆された。また、DBDE 投与ラットの KLH に対する抗体産生への影響を性成熟後に検討した結果、10 ppm 群では IgG 抗体価 5000 以上を示す個体が多いの 비해、1000 ppm 群では IgG 抗体価 50 以下の個体が多くなる傾向が得られ、このことは、DBDE 暴露後の性成熟後において、体液性免疫に対する影響が性成熟後でも残る可能性を示唆した。

④感染影響評価：

RS ウイルスマウス感染モデルは、乳幼児・小児における RS ウイルス感染症での臨床像を良く反映したモデルとして知られており、ワクチン開発や感染病態解明のための研究に利用されている。そして感染病態の進行は、肺を中心に呼吸器官でのウイルス増殖の進行と高い相関性を有していることも判っている。本試験では、成体マウスでの高用量の PTU 暴露の結果、RS ウイルス量が増加している傾向が認められたことにより、甲状腺機能低下と感染病態の進行に直接的あるいは間接的な因果関係のある可能性が明らかとなった。一方、周産期暴露実験では仔マウスにおいて明確な甲状腺機能低下 (T4 レベル低下) が認められず、ウイルス量の増加も見られなかった。本試験における PTU 投与量は成体マウス実験での 1/100 であり、暴露期間も 1/2 程度であること、またラットと比較してマウスでは血中 T4 レベルが低いことが知られていること等から、甲状腺機能低下の評価は、T4 レベル測定のみでは困難である可能性が否定できない。今後、BFRs の評価に際しては、TSH レベル測定など他の方法の導入も視野に入れて甲状腺機能の評価していく。本試験では、BALF 中の IFN- γ レベルが PTU 暴露により有意に上昇していることが判明した。乳幼児・小児において、RS ウイルス感染病態が進行すると気道分泌液中の IFN- γ レベルが上昇し、これと軽度の気道障害

(airway obstruction) の進行が良く相関していることが報告されている。また、IFN- γ ノックアウトマウスでは RS ウイルス感染時に気道障害が生じないことも報告されている。これらのことより、今後実施する化学物質暴露による感染影響の評価において、

BALF 中の IFN- γ が感染病態の評価に重要な指標になることが強く示唆された。

⑤幼若期暴露発がん性評価：

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的として、被験物質の幼若期投与とその後の化学発がん物質である DHPN と DMBA 処置によるラット多臓器発がんモデルの有用性を検討している。今年度は、被験物質としてラットに肝臓への発がん標的性を示すことが知られている DBDE の 4 用量による実験を開始した。BFRs のうち polybrominated biphenyl mixture (PBB) は、F344 ラットの交配 60 日前から妊娠期間中、及び生後 8 週齢までを通した胎児・乳幼児期の投与のみでは肝腫瘍を誘発しないが、8 週齢以降 2 年間投与した際には肝腫瘍の有意な増加がみられ、交配前から生後 8 週、更にその後 2 年間通して投与した場合にはその発生頻度の増加することが報告されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993)。このラットにおける PBB の結果に関しては、発がん感受性の高い胎児・乳幼児期暴露により肝腫瘍の発生頻度が増加したのか、単に投与期間が長くなったことによるのかについては不明である。しかし、PBB のマウスを用いた実験では、胎児・乳幼児期暴露では肝に対する発がん感受性が高いことを示唆する結果が報告されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993)。今回検討している DBDE についても、幼若期投与ではその発がん感受性が高いと仮定した場合、DHPN と DMBA 処理によるラット多臓器発がんモデルにおいて肝腫瘍の発生を促進することが期待される。今後、生後 40 週時を予定している剖検に向け観察を継続した後、剖検、病理組織学的検索を行い、肝をはじめとした諸臓器に対する腫瘍性病変の発生状況を観察して最終評価する。

⑥各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究：

本年度は、耐用摂取量等の評価された物質情報をまとめて入手しやすく、不確実係数の適用理由も比較的明確な情報源として、米国 EPA の IRIS と WHO の水質ガイドライン評価文書をもとに、定量的評価手法の入手と整理を試みた。WHO の水質ガイドラインに比べて、IRIS の方は、体内動態情報やベンチマークドース手法を積極的に取り入れている様であり、不確実係数をより科学的に論理だったものに置き換えようとしていると考えられた。WHO の方の評価は基本的には、各国で評価ドラフトを分担しているという経緯や各国の専門家との調整作業等が入ることにも依存しているかもしれないが、IRIS ほど

の不確実係数の解釈にそれほど先進的な試みがとられていないようである。しかし、最近、IPCS のリスクアセスメントの評価手法のハーモナイゼーションプログラムにおいて、種差や個体差の不確実係数を化学物質特異的調整係数 (Chemical-Specific Adjustment Factors) に置き換えたものにするためのガイダンスが公表され、ベンチマークドース手法に関しても、その適用に関するガイダンスについても IPCS の EHC (Environmental Health Criteria) シリーズの中での刊行が予定されている。これらの動きは、WHO 各機関の評価の中でも次第に浸透していくものと思われる。

次年度は更に JECFA や JMPR, Health Canada 等の評価文章からの情報収集を行う予定であるが、本年度得られた解析を更に進めてエンドポイント毎の詳細な整理・解析を行う予定である。

E. 結論

甲状腺機能低下症を基盤とした脳発達のかく乱影響評価モデルを検討し、PTU, MMI による中枢神経への不可逆的影響として、中枢ニューロンの migration の異常、白質構成成分の減少を確認した。また、発達期甲状腺機能低下症での中枢ニューロンの標的候補遺伝子を同定した。以上の得られたデータを基に、遺伝子発現解析手法を用いた発達期評価系では、標的遺伝子の機能発現等の評価系への組み込み、成熟後評価系では、migration の乱れから生じた CA1 ニューロン分布のばらつきの定量評価が、次年度の検討課題として残っているが、定量評価し得る脳への不可逆的影響を検出できることが確認できた。更に、抗甲状腺作用の弱い DBDE の比較的低濃度において、脳に対する不可逆的影響を確認することができ、この物質による甲状腺機能低下と脳影響の反応性は、非直線的であることが見出された。

神経機能・行動影響評価では、PTU ないし DBDE の胎児期及び授乳期暴露により、ドパミン神経発達障害が引き起こされる可能性が示唆された。また、条件づけ場所嗜好性試験及び *in vivo* microdialysis 法が甲状腺機能低下作用を有する環境化学物質の評価系として妥当であることが示された。

免疫機能影響評価では、各臓器中のリンパ球のポピュレーション、サブポピュレーションの解析、NK 細胞の割合の解析法を確立した。PTU, MMI の胎児期、小児期投与で、投与終了時に、胸腺、脾臓重量の減少が観察され、脾臓での B リンパ球並びに活性型の T, B リンパ球の減少等の免疫系影響を示唆するデータが得られた。また、成熟後においては、末梢血において、NK 細胞や活性化 T 細胞の減少が確認された。DBDE では、胸腺、脾臓重量の変動はなかったが、3 週目で脾臓 CD4⁺T 細胞、活性化 T 細胞

の減少が観察され、11 週目で、末梢血 NK 細胞の減少が観察された。以上、陽性対照の PTU, MMI に比べ、DBDE の場合は、軽度ではあるが、免疫担当細胞への影響が示唆されるデータが得られた。特に、DBDE の NK 細胞活性抑制を含めた免疫影響は、甲状腺機能抑制と連関する可能性が考えられた。

感染影響評価では、PTU を用いて評価系の構築を行った。成体マウスでの評価において、肺における RS ウイルス増殖を指標に、甲状腺機能低下と感染病態の進行に直接的あるいは間接的な因果関係がある可能性が明らかとなった。更に周産期暴露実験から、仔マウスにおいて RS ウイルス感染により誘導される BALF 中の IFN- γ レベルが感染病態修飾作用の評価への指標としての有用性が示唆された。

発がん性評価では、ラットに出生直後より 5 週間、4 用量を設定して DBDE を混餌投与し、その 1 週間後より乳腺発がん物質である DMBA と共に、多臓器に発がん標的性を有する DHPN 処置を行い、実験を継続している。生後 24 週目の現在、一般状態、体重、摂餌量に DBDE 投与による影響は認められていない。生後 40 週時を予定している剖検に向け観察を継続した後、病理組織学的検索を行い、最終評価する。

各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究では、耐用摂取量設定としては、比較的情報のまとまった米国 EPA の IRIS と、WHO の水質ガイドライン第 3 版 (2004) で評価された物質について情報収集と整理を行った。その結果、近年は種差・個体差の不確実係数や TDI 算定の出発根拠とする値 (NOAEL 等) の設定に関して、体内動態に関する情報やベンチマークドース法を用いた、より定量的な数値による置き換えが行われていることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Abe, N., Takagi, H., Lee, K-Y., Hirose, M.: Down-regulation of GAT-1 mRNA expression in the microdissected hypothalamic medial preoptic area of rat offspring exposed maternally to ethinylestradiol. *Toxicology*. 208: 35-48, 2005.

Takagi, H., Shibutani, M., Lee, K-Y, Masutomi, N., Fujita, H., Inoue, K., Mitsumori, K., Hirose, M.: Impact of maternal dietary exposure to endocrine-acting chemicals on progesterone receptor expression in microdissected hypothalamic medial preoptic areas of rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208: 127-136,

2005.

Lee, K-Y, Shibutani, M., Inoue, K., Kuroiwa, K., U, M., Woo, G-H., Hirose, M.: Methacarn fixation – Effects of tissue processing and storage conditions on detection of mRNAs and proteins in paraffin-embedded tissues. *Anal. Biochem.* 351: 36-43, 2006.

Narita, M., Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Shindo, K., Nakamura, A., Kuzumaki, N., Nagumo Y., Suzuki, T.: Direct evidence of astrocytic modulation in the development of rewarding effects induced by drugs of abuse. *Neuropsychopharmacology*, 2005, (in press).

Miyatake, M., Narita, M., Shibasaki, M., Nakamura, A., Suzuki, T.: Glutamatergic neurotransmission and protein kinase C play a role in neuron-glia communication during the development of methamphetamine-induced psychological dependence. *Eur. J. Neurosci.*, 22: 1476-1488, 2005.

Narita, M., Shibasaki, M., Nagumo, Y., Narita, M., Yajima, Y., Suzuki, T.: Implication of cyclin-dependent kinase 5 in the development of psychological dependence on and behavioral sensitization to morphine. *J. Neurochem.* 93: 1463-1468, 2005.

Narita, M., Miyatake, M., Shibasaki, M., Tsuda, M., Koizumi, S., Narita, M., Yajima, Y., Inoue, K., Suzuki, T.: Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.* 93: 1383-1392, 2005.

Narita, M., Akai, H., Kita, T., Nagumo, Y., Narita, M., Sunagawa, N., Hara, C., Hasebe, K., Nagase H., Suzuki, T.: Involvement of mitogen-stimulated p70-S6 kinase in the development of sensitization to the methamphetamine-induced rewarding effect in rats. *Neuroscience*.132: 553-560, 2005.

Miwa, N., Kurosaki, K., Yoshida, Y., Kurokawa, M., Saito, S. and Shiraki, K.: Comparative efficacy of acyclovir and vidarabine on the replication of varicella-zoster virus. *Antiviral Res.* 65: 49-55, 2005.

Yoshida, Y., Li, Z-H., Kurokawa, M., Kawana, T., Imakita, M. and Shiraki, K.: Growth of herpes simplex virus in epidermal keratinocytes determines cutaneous pathogenicity in mice. *J. Med. Virol.* 75: 421-426, 2005.

黒川昌彦, 南嶋洋一: ノロウイルス感染症, 化学と薬学の教室, 152: 17-22, 2005.

Park, Hye-Jin, Kurokawa, M., Shiraki, K., Nakamura, N., Choi, Jae-Sue, Hattori, M.: Antiviral activity of the

marine alga *Symphycladia latiuscula* against herpes simplex virus (HSV-1) in vitro and its therapeutic efficacy against HSV-1 infection in mice. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 2258-2262, 2005.

Jo, M., Nakamura, N., Kurokawa, M., Komatsu, K., Shiraki, K., Hattori, M.: Anti-herpes simplex virus activities of traditional Chinese medicines, used in Yunnan and Tibetan provinces of China. *J. Trad. Med.* 22: 321-328, 2005.

Shin, K., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Tamura, Y., Kurokawa, M., Shiraki, K.: Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *J. Med. Microbiol.* 54: 717-723, 2005.

Ueda, M., Imai, T., Takizawa, T., Onodera, H., Mitsumori, K., Matsui, T., Hirose, M.: Possible enhancing effects of atrazine on growth of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Cancer Sci.* 96: 19-25, 2005.

Imai, T., Hasumura, M., Onose, J., Ueda, M., Takizawa, T., Cho, Y-M., Hirose, M.: Development of invasive follicular cell carcinomas in a rat thyroid carcinogenesis model: biological impact of capsular inflammation and reduced cyclooxygenase-2. *Cancer Sci.* 96: 31-37, 2005.

Cho, Y-M., Imai, T., Hasumura, M., Onose, J., Ueda, M., Hirose, M.: Lack of prepubertal administration of ethinyl estradiol on susceptibility to multiple organ carcinogenesis in rats exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine during adolescence. *Cancer Lett.* 223: 37-46, 2005.

Hasumura, M., Imai, T., Takizawa, T., Ueda, M., Hirose, M.: Promoting effect of *para*-amino- benzoic acid on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2- hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol. Sci.* 86: 61-67, 2005.

Imai, T., Cho, Y-M., Hasumura, M., Hirose, M.: Enhancement by acrylamide of N-methyl-N-nitrosourea-induced rat mammary tumor development – possible application for a model to detect co-modifiers of carcinogenesis. *Cancer Lett.* 230: 25-32, 2005.

Takizawa, T., Imai, T., Ueda, M., Onodera, H., Hirose, M.: Comparison of enhancing effects of different goitrogen treatments in combination with b-estradiol-3-benzoate for establishing a rat two-stage thyroid carcinogenesis model to detect modifying effects of estrogenic compounds. *Cancer Sci.* 97: 25-31, 2006.

Imai, T., Onose, J., Hasumura, M., Takizawa, T., Hirose, M.: Indomethacin induces small intestinal damage and inhibits amitrole-associated thyroid carcinogenesis in rats initiated with *N*-bis(2-hydroxypropyl)-nitrosamine. *Toxicol. Lett.* (in press).

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)-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J. Toxicol. Sci.* 31: 35-47, 2006.

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)

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

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).

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.

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.

総説

成田 年, 宮竹真由美, 矢島義識, 鈴木 勉: モルヒネ依存における持続的神経内プロテインキナーゼCの活性化と細胞-細胞間相互作用. *日本薬理学雑誌* 2006, 127, 32-35

成田 年, 宮竹真由美, 鈴木雅美, 葛巻直子, 鈴木 勉: 薬物依存形成の分子機構: 細胞間相互作用とグリア細胞の役割. *日本神経精神薬理学雑誌* 2006, 26, 33-39

鈴木 勉, 水尾圭祐, 宮川和也, 成田 年: Bisphenol-Aの胎児期および授乳期暴露による脳内

報酬系に及ぼす影響. *日本神経精神薬理学雑誌* 2005, 25, 125-128

成田 年, 宮川和也, 富田真理子, 水尾圭祐, 鈴木 勉: Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性暴露によるdopamine神経行動毒性発現. *精神科* 2005, 6, 256-262

成田 年, 宮竹真由美, 鈴木雅美, 鈴木 勉: 薬物依存時におけるシナプス可塑性とグリア細胞. グリアから依存を考える. *日本薬理学雑誌* 2005, 126, 43-48

2. 学会発表

渋谷 淳, 李 京烈, 井上 薫, 黒岩敬子, 広瀬雅雄: メタカーン固定パラフィン包埋組織の固定・脱水及び保存条件の検討, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 1月, 2005.

高木 広憲, 渋谷 淳, 藤田 春香, 李 京烈, 井上 薫, 広瀬 雅雄: 内分泌かく乱化学物質の周産期暴露によるラット視床下部内側視索前野でのprogesterone receptor発現の変化, 第21回日本毒性病理学会, 浜松, 1月, 2005.

渋谷 淳, 李 京烈, 高木 広憲: 分子病理学的手法を用いた毒性発現の分子標的の解析-内分泌かく乱化学物質による脳の性分化障害について-, 第139回日本獣医学会学術集会 日本獣医病理学会, シンポジウム「生物化学の深化と獣医病理学研究への応用」, 和光, 3月, 2005.

宮川和也, 成田 年, 湯浅茂樹, 武田 健, 鈴木 勉: 環境化学物質と神経行動毒性, 第18回神経行動毒性研究会, 東京, 12月, 2005.

宮川和也, 成田 年, 押尾 茂, 富田真理子, 宮竹真由美, 水尾圭祐, 武田 健, 鈴木 勉: 薬物依存の研究(第410報)環境化学物質の胎児期および授乳期慢性暴露によるdopamine神経障害, 第35回日本神経精神薬理学会, 大阪, 7月, 2005.

Miyagawa, K., Narita, M., Miyatake, M., Mizuo, K., Tomita, M., Suzuki, T.: Influence of an endocrine disruptor bisphenol-A in dopamine-dependent rewarding effect and astrocytic activation. CPDD 67th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING, Orlando, Florida, 6月, 2005.

Nakamura, R., Teshima, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Takagi, K., Woo, G-H., Shibutani, M., Sawada J.: Effects of antithyroids on the developing immune system. 20th IUBMB Congress, 京都, 6月, 2006.

黒川昌彦, 渡辺 渡, 清水寛美, 白木公康, 湯上 進, 野本亀久雄: ウイルス感染症に対するプロポリスの有効性, 第42回日本ウイルス学会九州支部総会, 沖縄, プログラムおよび抄録: p. 44, 7月, 2005

清水寛美, 渡辺 渡, 黒川昌彦, 白木公康, 堤 重敏: インフルエンザウイルス感染に対するプロポリスの病態改善効果, 第53回日本ウイルス学会, 横浜, 第53回日本ウイルス学会学術集会 プログラム・抄録集: p. 329, 11月, 2005

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: ウイルス感染症に対するプロポリスの治療効果, 日本薬学会九州支部第22例会, 福岡, 第22回日本薬学会九州支部大会 講演要旨集: p. 15, 12月, 2005

清水寛美, 渡辺 渡, 黒川昌彦: インフルエンザウイルス感染症に有効なサブプリメントの発見, 第2回高梁学園学術研究コンファレンス, 岡山, 第2回高梁学園学術研究コンファレンス収録集: p. 4, 3月, 2006

渡辺 渡, 清水寛美, 黒川昌彦: 病原性の異なる単純ヘルペスウイルスの神経組織間における遺伝子発現の様相, 日本薬学会第126年会, 仙台, 第126年会日本薬学会 要旨集 3: p. 102, 3月, 2006

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: インフルエンザウイルス感染マウスモデルを用いたプロポリスの抗ウイルス活性評価, 日本薬学会第126年会, 仙台, 第126年会日本薬学会要旨集 3: p. 102, 3月, 2006

Ema M, Kimura E, Hirose A, Kamata E. Reproductive and developmental toxicity screening test of 1,3-di-o-tolylguanidine in rats. EUROTOX 2005, Cracow, Poland, 9月, 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.

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.

Hirose, A., Aisaki, K., Hara, H., Takahashi, M., Igarashi, K., Kanno, J., Ema, M.: DNA Micro-Array Analysis of

Gene Expressions in Mice Uterus Exposed with Dibutyltin Chloride during Implantation. The 25th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2005). Toronto, Canada, 8月, 2005.

Hirose, A., Kanno, J., Tokunaga, H., Nakazawa, K., Honma, M., Inoue, T.: Initial investigation on the assessment of nanomaterial safety by the Japanese MHLW. 2nd International Symposium on Nanotechnology and Occupational Health, Minneapolis, USA, 10月, 2005.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし