

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
 分担研究報告書（平成17年度）
 脳発達のかく乱影響評価

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨：既存毒性評価系では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、発達期暴露影響評価系の確立を目的とした班研究のうち、神経発達影響評価を分担課題として、臭素化難燃剤(BFRs)を例としたラットを用いた用量反応性の定量評価を開始した。BFRsにより懸念され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、17年度は、まず抗甲状腺剤の飲水投与モデルを用いた評価系の確立を図った。その結果、妊娠10日目から離乳時(出産後21日目)まで propylthiouracil (PTU), methimazole (MMI) を母ラットに暴露した結果、投与終了時での仔動物の甲状腺機能の低下(血清中 T3, T4 の減少, TSH の増加)が見られ、成熟後では、ニューロン及び白質構成成分の不可逆的変化(海馬 CA1 ニューロンの migration の異常, CNPase 陽性白質領域(脳梁)の面積の減少と皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度の減少)が確認された。また、CA1 ニューロン特異的に PTU, MMI に共通して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、その殆どに神経発達過程での機能が文献的に確認された。BFRs の実験に関しては、本邦で使用頻度の高いものを選別して予備試験結果を基に投与用量を設定し、17年度は decabromodiphenyl ether (DBDE) の評価を開始した。また、次年度以降の検索予定物質である 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), tetrabromobisphenol A (TBBPA) の予備試験を終了した。DBDE の暴露実験(0, 10, 100, 1000 ppm 混餌)では、明らかな用量依存的な反応性はないものの、10 ppm から母動物の甲状腺重量の増加がみられ、仔動物の血清中の甲状腺関連ホルモンは、投与終了時、11 週目とも 1000 ppm においてのみ軽微な変化を示した。一方、11 週目で脳梁面積と CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度のそれぞれの減少が 100 ppm 以上で明らかとなり、10 ppm でも同様の傾向が確認されたが、1000 ppm での反応に明らかな用量依存性を認めなかった。以上、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、この物質の抗甲状腺作用と脳影響の反応性は、非直線的であることが見出された。TBBPA, HBCD の予備的な検討でも、誘発される甲状腺機能低下症に投与用量に応じた反応性が認められなかった。

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、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。本研究では本邦で主に使用されている decabromodiphenyl ether (DBDE), 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), tetrabromobisphenol A (TBBPA) を解析対象とする。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、発癌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。

本分担研究では、発達期での化学物質暴露によって生じる脳発達への影響について、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、暴露と関連して神経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、あるいは導入する必要がある。発達期に暴露された化学物質による中枢神経系への不可逆的影響は、標的細胞の発達過程に生じる現象(programmed cell death, migration, 細胞増殖・分化等)に対して生じ、脳発達後での標的細胞あるいはそれらの細胞の形成する構成要素

(軸索, 髄鞘, ニューロピル等)の数や分布の変化, または異常構造の出現として表現される。以上より, 本分担研究では, まず甲状腺機能低下症により誘発される中枢神経障害の定量的検出系を, 神経組織の普遍的な構成要素であるニューロンとオリゴデンドロサイトに区分して確立し, 次いでBFRsによる影響の用量反応性の有無と程度を検討する。その方法としては, 暴露終了時でのニューロンあるいはオリゴデンドロサイト特異的なマイクロアレイ解析による標的遺伝子の探索とその評価系への活用, 成熟後での各構成成分の形態計測からなる。また, 発達期の甲状腺機能障害により, 内分泌環境や恒常性への永続的な影響が想定され, TBBPA で指摘されている様な性分化障害の誘発される可能性があるため, 既に確立してある各種性分化指標についても検討を加える。最終的には, 本班研究で実施している別の分担課題である「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。今年度はまず, 抗甲状腺剤である propylthiouracil (PTU) と methimazole (MMI)の投与モデルを用いて脳発達に対する影響を検討した。次いで, BFR のうち DBDE の投与実験を行った。また, 3年間を通じて解析対象となるそれぞれの化学物質の用量設定試験を実施した。

B. 研究方法

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。精巣と一部の脳はブアン固定を行い, 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 250 ppm, PTU に関しては 9 及び 12 ppm, 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 80 ppm を設定して, 各群2匹の母動物を用いて行った (Fig. 1)。DBDE に関しては更に確認試験として, 10, 100, 10,000 ppm 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 12 ppm PTU (2 用量)の飲水投与実験 (本実験)を, 各群8匹の母動物を用いて行った (Fig. 2)。更に DBDE に関しては, 10, 100, 1000 ppm を設定して, 各群8匹の母動物を用いて本実験を行った (Fig. 3)。

最後に, 次年度以降に予定している TBBPA, HBCD について各々 1000, 10,000 ppm 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 (Fig. 4)。

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, 脳についてメタカーン固定した後, Bregma の前

方+1.2 mmと後方-3.4 mmの2カ所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ィン包埋して、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、さらに、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であったものを選択した。次いで、flagで選抜された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抜した。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)中でマイクロウエーブ処理(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(Fig. 5)。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(Fig. 5)。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌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、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、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、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

PTU, MMI, DBDE 予備実験 :

200ないし250 ppmのMMI, 9ないし12 ppmのPTU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(Table 1)。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(Fig. 6)。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(Fig. 7)。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として、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(Table 2)。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(Table 3)。

PTU, MMI の本実験

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(Fig. 8)。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(Fig. 8)。

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(Fig. 9)。

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(Fig. 10)。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(Fig. 11)。

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(Table 4)、病理組織学的検索の結果、濾胞上皮細胞のび慢性かつ高度の肥大、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(Table 4)。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(Table 5)。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(Table 6)。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(Table 7)。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(Fig. 12)、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(Table 8)。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 (Ct1); 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 (Bhlh3); Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (Ptpn3); Kallikrein 8 (neurotrophin/ovastin; Kik8); Histone deacetylase 11 (Hdac11)の5つであった。これらの発現増加・減少遺伝子について、脳発達との関連での報告の有無について文献検索したところ、7発現増加遺伝子中6個、5発現減少遺伝子の全てで、関連報告が認められた(Table 9)。一方、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(Fig. 13)。現在、このCA1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 (Table 10)。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。

DBDE の本実験：

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 (Fig. 14)、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 (Fig. 15)。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 (Table 11)。暴露終了時で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 (Table 11)。出産及び出生仔のパラメータとして、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 (Table 11)。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 (Fig. 16)。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 (Table 12)。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 (Table 13)。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 (Table 14)。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 (Table 14)。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 (Table 15)。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 (Table 15)。

HBCD, TBBPA 予備試験：

HBCD, TBBPA とともに 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 (Table 16)。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 (Table 17)。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 (Fig. 17)。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 (Fig. 18)、TBBPA でもまた 10,000 ppm で明らかであった (Fig. 18, Table 18)。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 (Table 19, Fig. 19)。

D. 考察

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、雄では成因为不明であるものの、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 FXD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxd6); 細胞外マトリックス蛋白質である integrin, beta-like 1; 脂肪酸酸化に参与する 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、血液臓器閉鎖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 Fxd6 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); 神経分化に関連する転写因子である Basic helix-loop-helix domain containing, class B3 (Bhlh3); 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 に参与する Kallikrein 8 (neuropsin/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関連して、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関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参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参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参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。

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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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(1): 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(2): 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

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, 第21回日本毒性病理学会講演要旨集: p97(P-92), 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, 第21回日本毒性病理学会講演要

旨集: p48(W-2-39), 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, 第139回日本獣医学会学術集会講演要旨集: p109(B-SY-3), 3月31日, 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

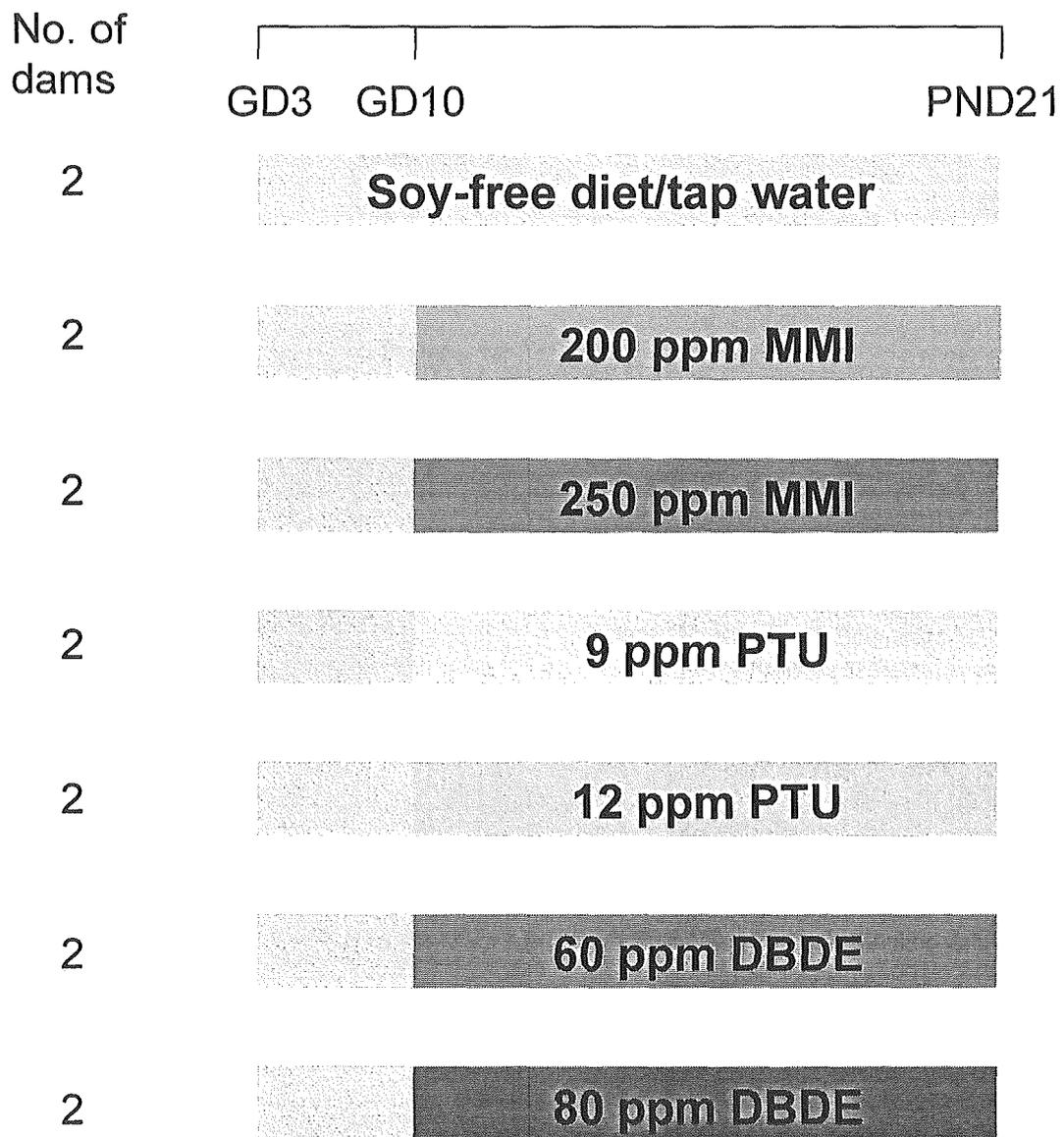
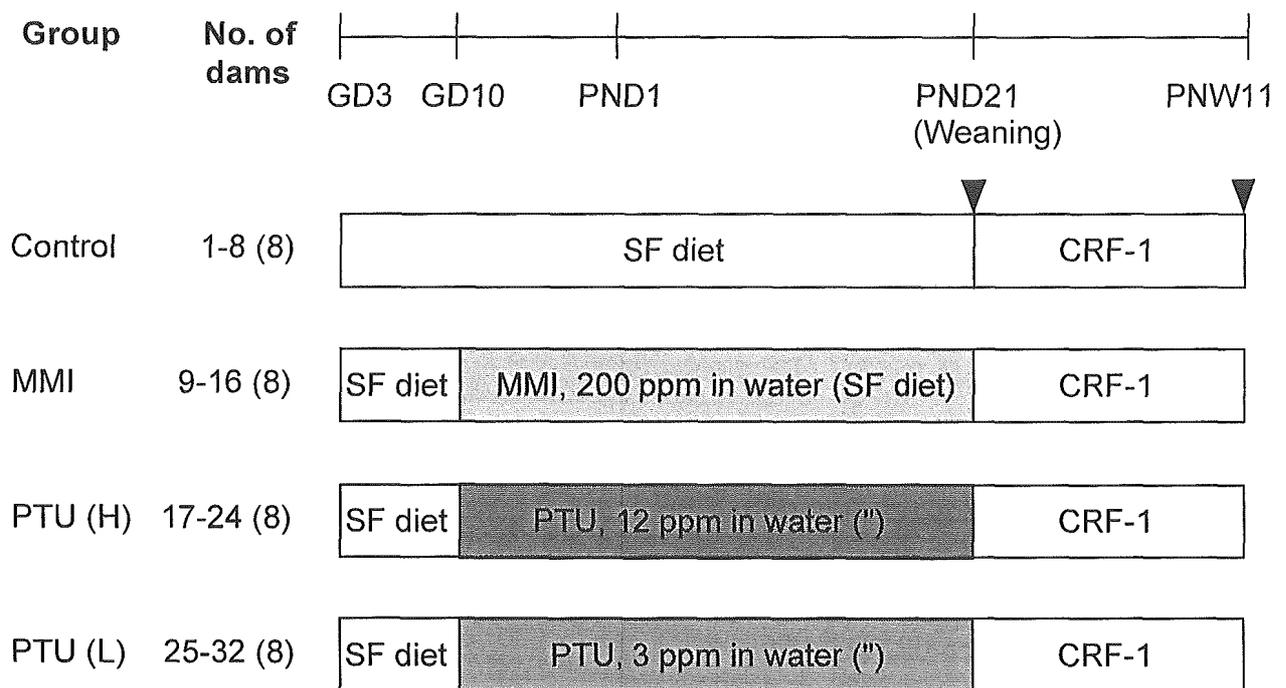


Fig. 1.
Preliminary dose finding study of methimazole (MMI), propylthiouracil (PTU), and decabromodiphenyl ether (DBDE) by a perinatal developmental exposure protocol using rats



▼ Sacrifice

Abbreviations:

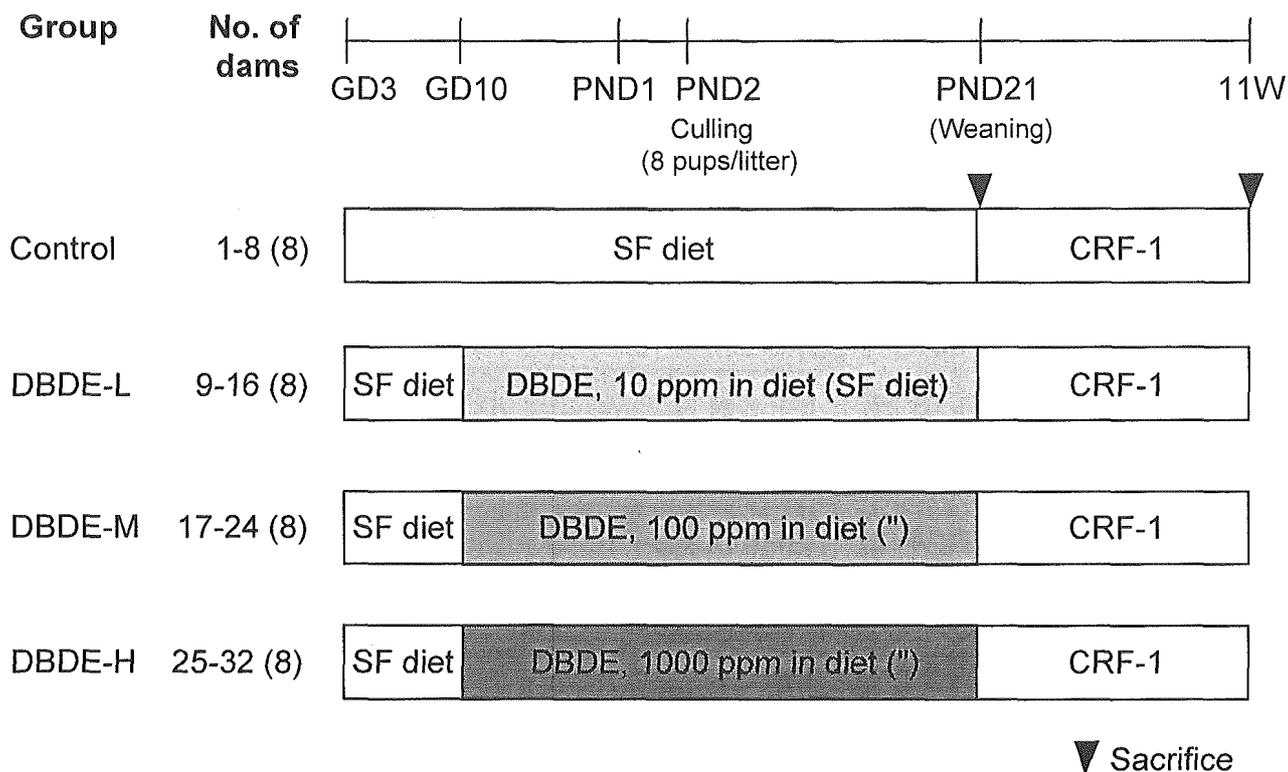
MMI: Methimazole

PTU: Propylthiouracil

Parameters to be examined

- Implantation (PND21)
- Body and organs weights (Dams and offspring) (PND2)
- Offspring count (PND2)
- Feed and water consumption (throughout the experiment)
- Puberty, vaginal opening, and estrous cycle
- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Serology (T3, T4, TSH) (PND21)
- Gene expression profiling in hippocampus and corpus callosum by microarray and real-time RT-PCR (PND21)

Fig. 2.
Developmental exposure study of anti-thyroid agents using rats to establish an evaluation system of the brain retardation due to hypothyroidism

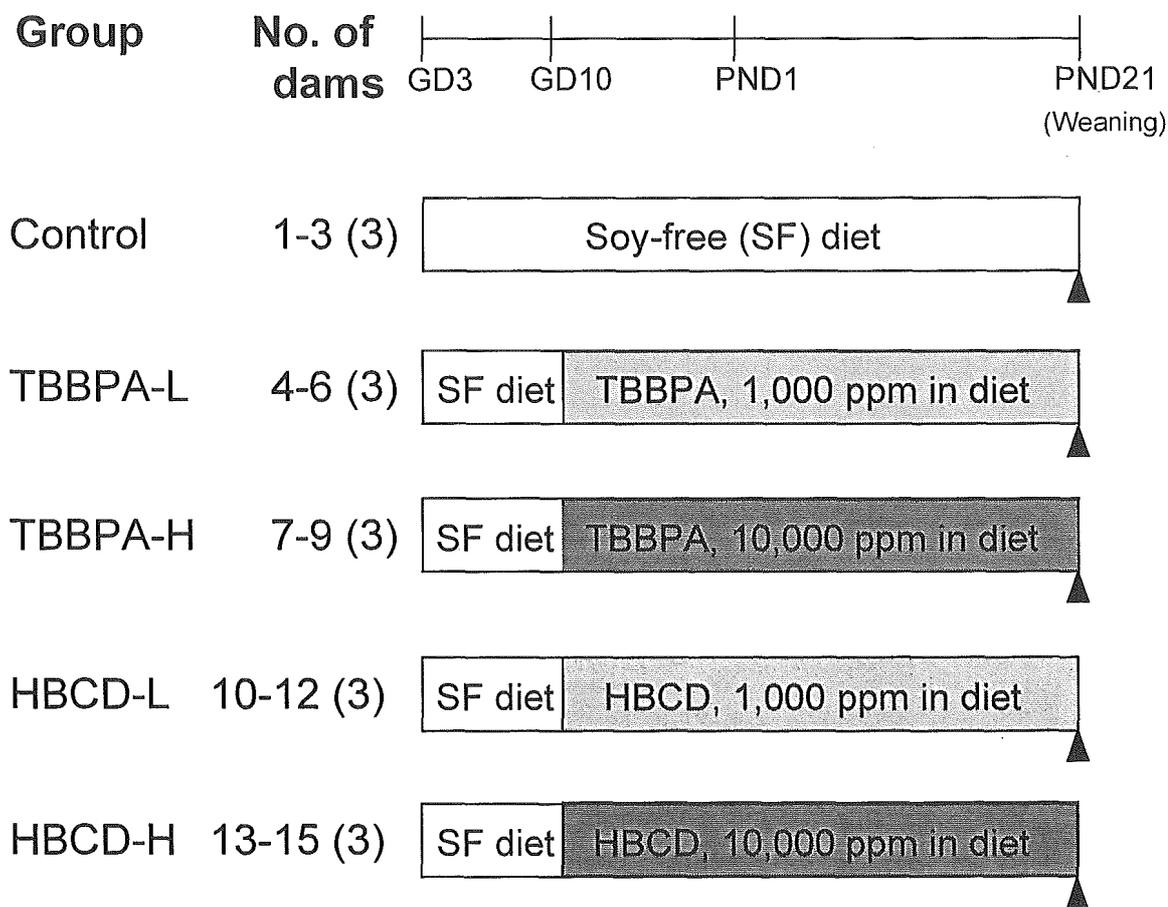


Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; SF, soy-free.

Parameters to be examined

- Implantation (PND21)
- Body and organs weights (Dams and offspring) (PND2)
- Offspring count (PND2)
- Feed and water consumption (throughout the experiment)
- Puberty, vaginal opening, and estrous cycle
- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Serology (T3, T4, TSH) (PND21)
- Gene expression profiling in the hippocampus and corpus callosum by microarray and real time RT-PCR (PND21, males)

Fig. 3.
Developmental exposure study of decabromodiphenyl ether (DBDE) using rats to establish an evaluation system of the brain retardation related to hypothyroidism

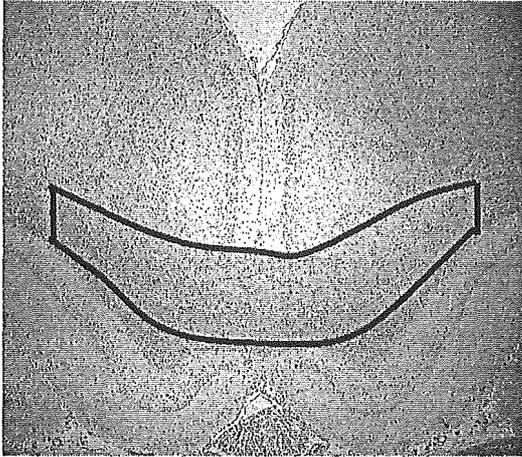


- Parameters to be examined**
- Implantation
 - Body and organs weights (Dams and offspring)
 - Offspring count
 - Feed consumption
 - Histopathology of liver and thyroid (Dams)

▲: Sacrifice (All animals)

Fig. 4.
Preliminary dose finding study of tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecane (HBCD) by a perinatal developmental exposure protocol using rats

<Area of corpus callosum>



<CNPase-positive oligodendrocytes>

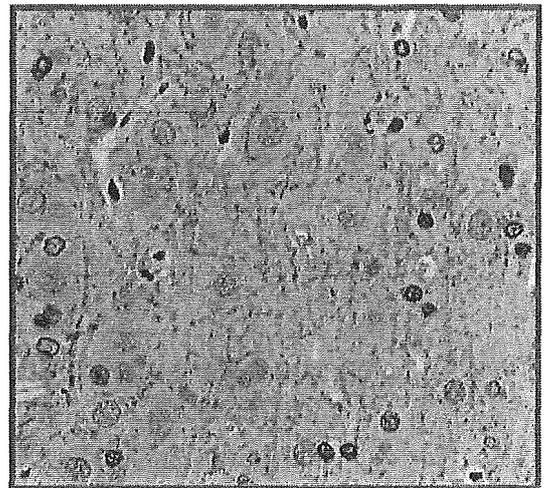
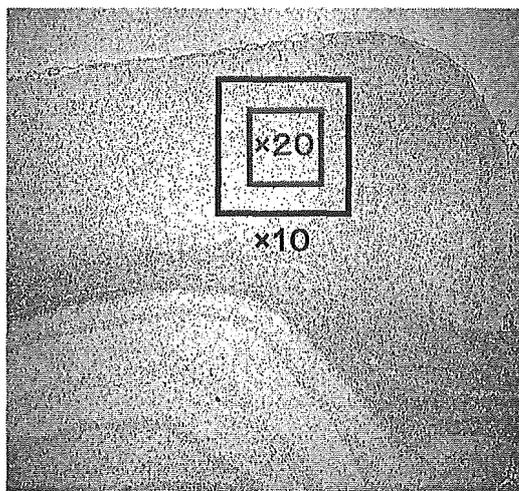


Fig. 5.
Morphometry of white matter components in rats exposed
developmentally to anti-thyroid agents or brominated fire
retardants

Table 1
Toxicity parameters of the preliminary dose finding study of MMI, PTU, and DBDE

	MMI (ppm in diet)			PTU (ppm in diet)		DBDE (ppm in diet)	
	Control	200	250	9	12	60	80
No of dams	2	2	2	2	2	2	2
BW at PND21 (g)	335.4±41.6	309.8±29.7	301.6±41.5	310.1±83.2	332.4±2.8	332.1±16.9	337.9±26.3
Thyroid (mg)	13.7±1.1	67.3±22.1	76.2±22.6	47.3±15.6	50.8±7.6	13.3±0.4	20.3±2.1
Thyroid (mg/100gBW)	4.1±0.2	21.5±5.1	25.0±4.1	15.1±1.0	15.3±2.2	4.0±0.3	6.1±1.1
Implantation trace	14±1	16±1	14±1	14±1	15±0	15±1	15±1
No. of offspring at PND21	12.0±1.4	15.5±0.7	9.5±3.5	12.5±0.7	14.5±0.7	14.5±0.7	13.5±0.7
Offspring' BW at PND2 (M+F)	15.7±1.2	10.7±0.4	12.8±2.9	14.1±1.0	12.7±0.1	13.0±1.3	15.2±0.0

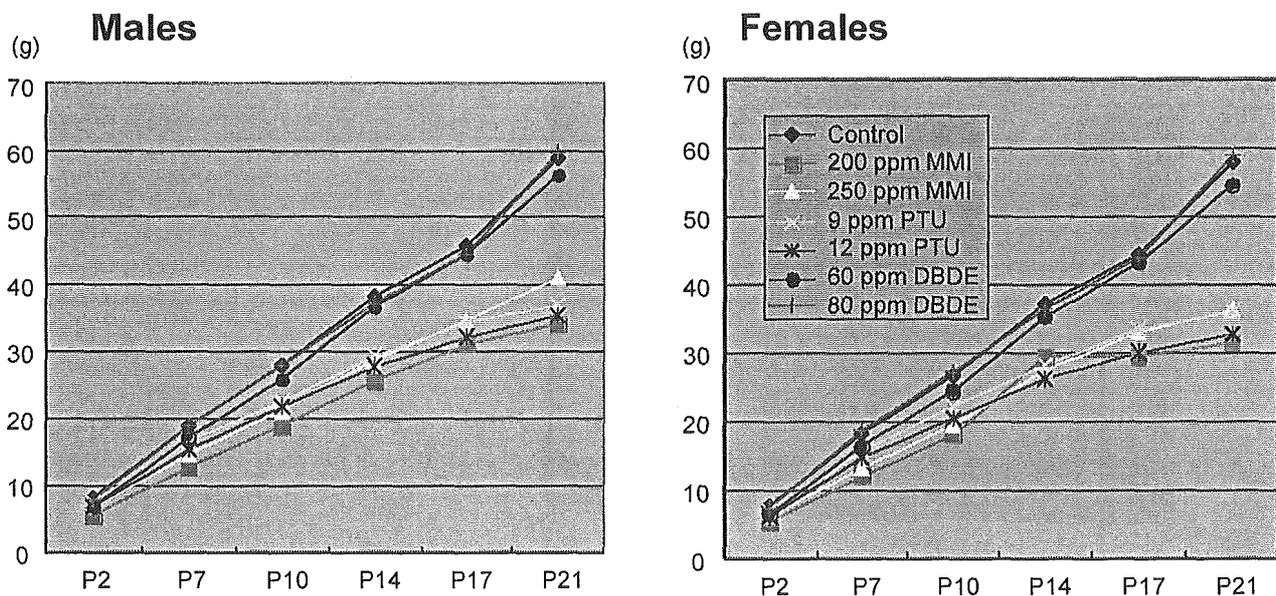


Fig. 6.
Growth curves of offspring perinatally exposed to MMI, PTU, or DBDE. Changes during the lactation period.

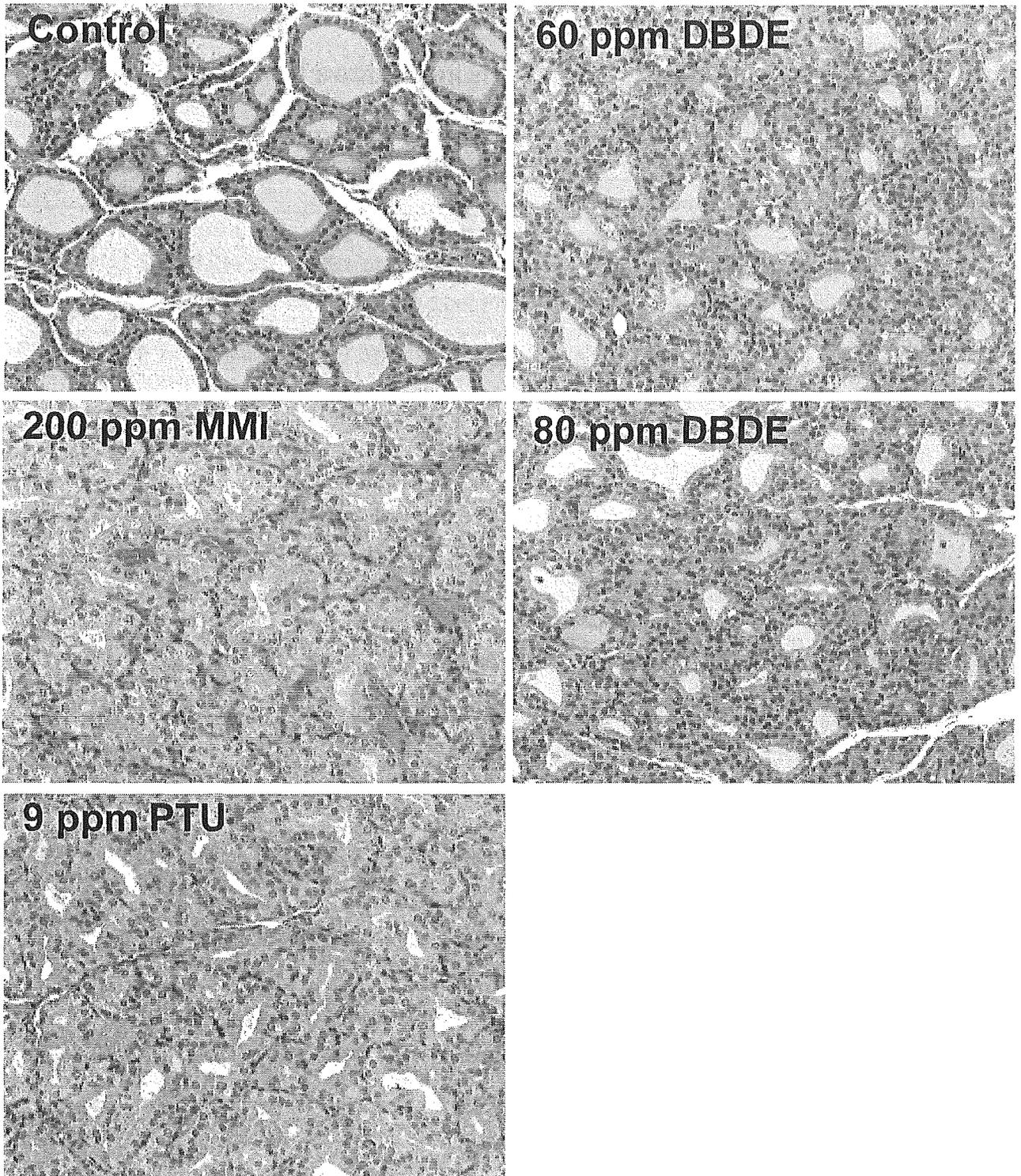


Fig. 7.
Histopathology of the thyroid lesions of dams exposed to MMI, PTU or DBDE during the period from mid-pregnancy and lactation

Table 2.

Thyroid weight of dams exposed to DBDE during the period from mid-pregnancy to lactation. The 2nd preliminary dose-finding study.

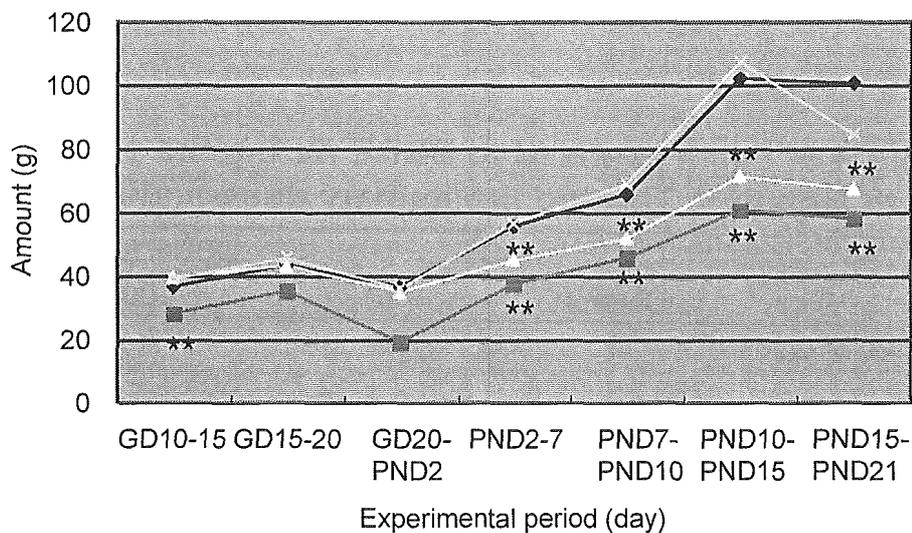
	Control	DBDE (ppm)		
		10	100	10,000
No. of dams	3	3	3	3
Body weight (g)	298.2 ± 25.6	308.2 ± 12.7	305.1 ± 18.1	307.7 ± 27.7
Thyroid weight				
Absolute (mg)	18.7 ± 0.5	22.7 ± 2.3	21.0 ± 1.4	21.7 ± 3.4
Relative (mg/100g BW)	6.3 ± 0.45	7.38 ± 0.89	6.89 ± 0.23	7.09 ± 1.27

Table 3.

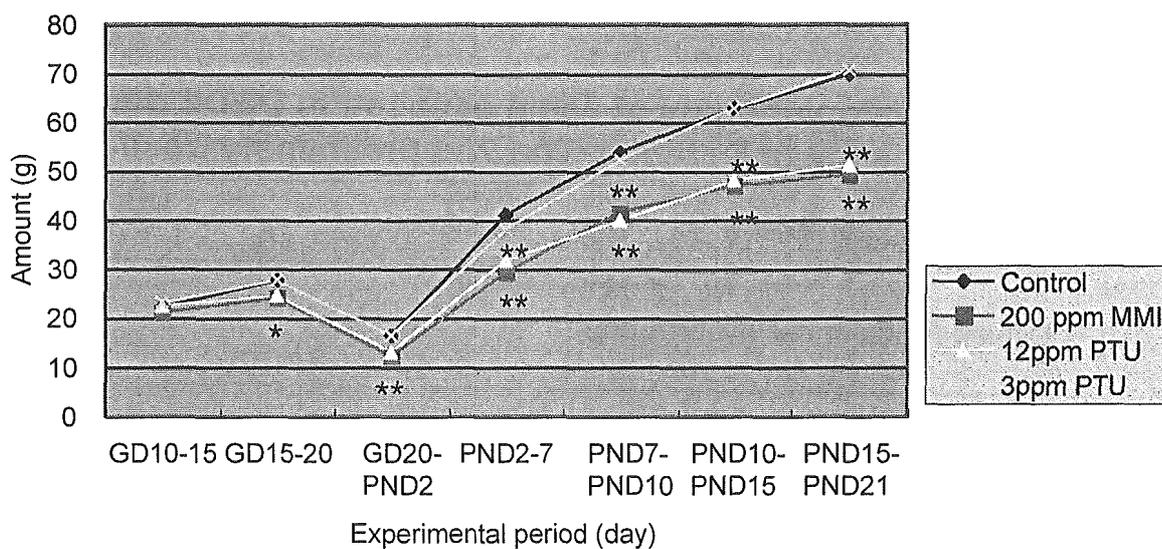
Thyroid histopathology of dams exposed to DBDE during the period from mid-pregnancy to lactation. The 2nd preliminary dose-finding study.

Histopathological finding	Control	DBDE (ppm)		
		10	100	10,000
No. of dams	3	3	3	3
Diffuse follicular cell hypertrophy (± /+)	0	1(1/0)	2(2/0)	3(2/1)

Water consumption



Food intake

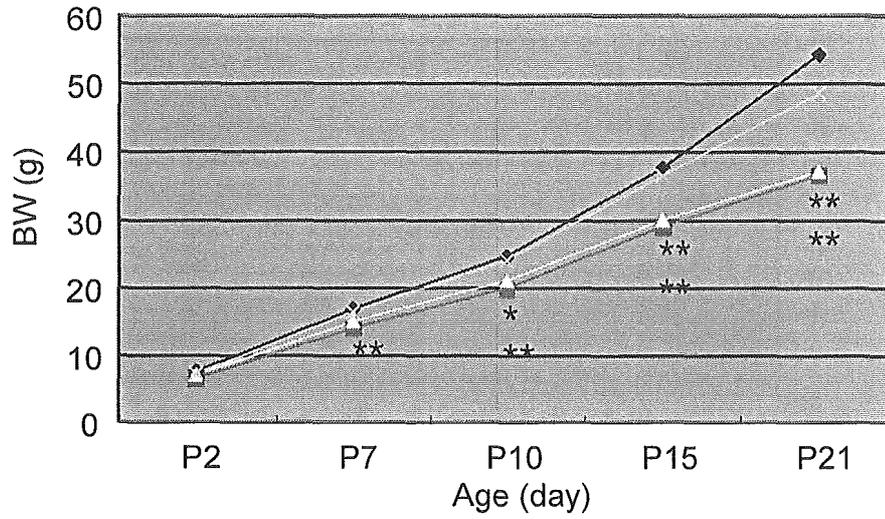


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control

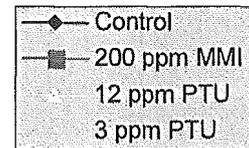
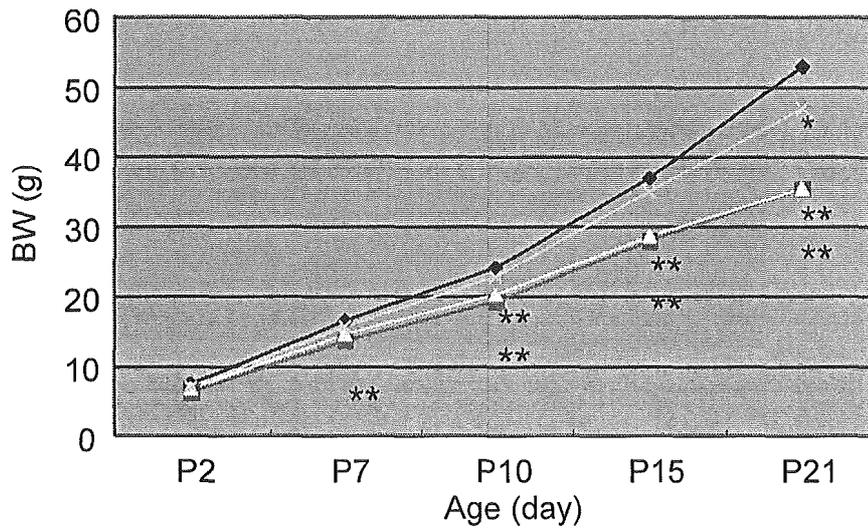
Fig. 8.

Water consumption and food intake of dams during exposure to anti-thyroid agents

Males



Females

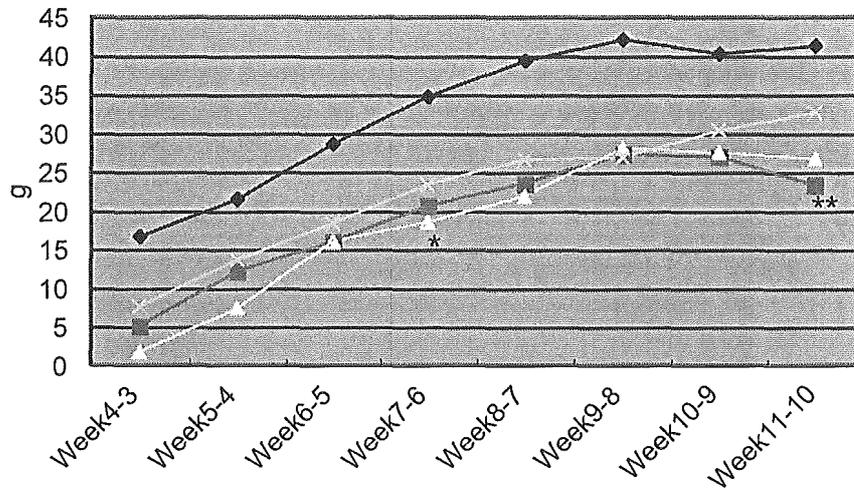


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control

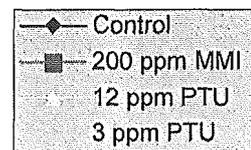
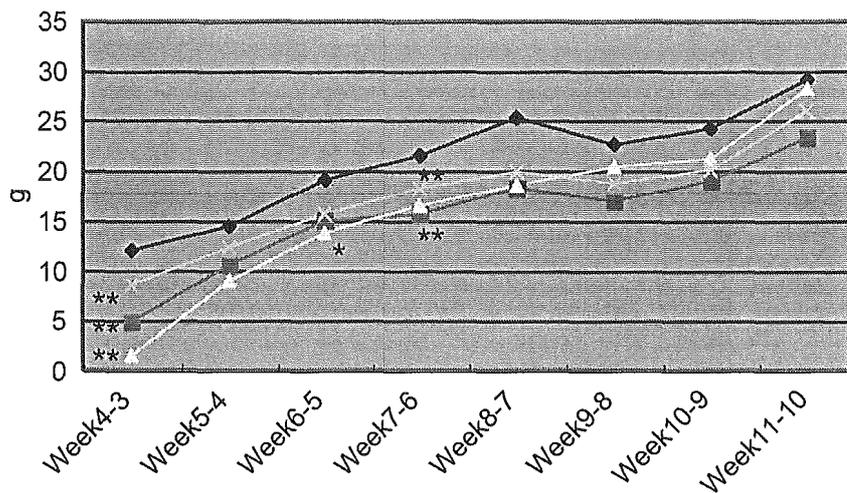
Fig. 9.

Growth curves of offspring perinatally exposed to anti-thyroid agents. Changes during the lactation period.

Males



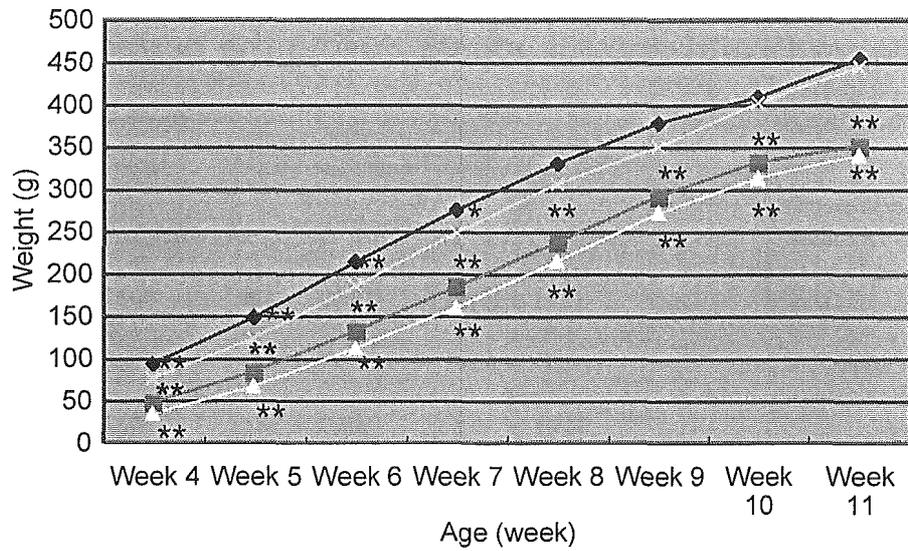
Females



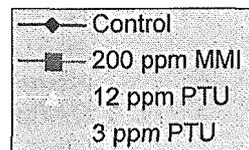
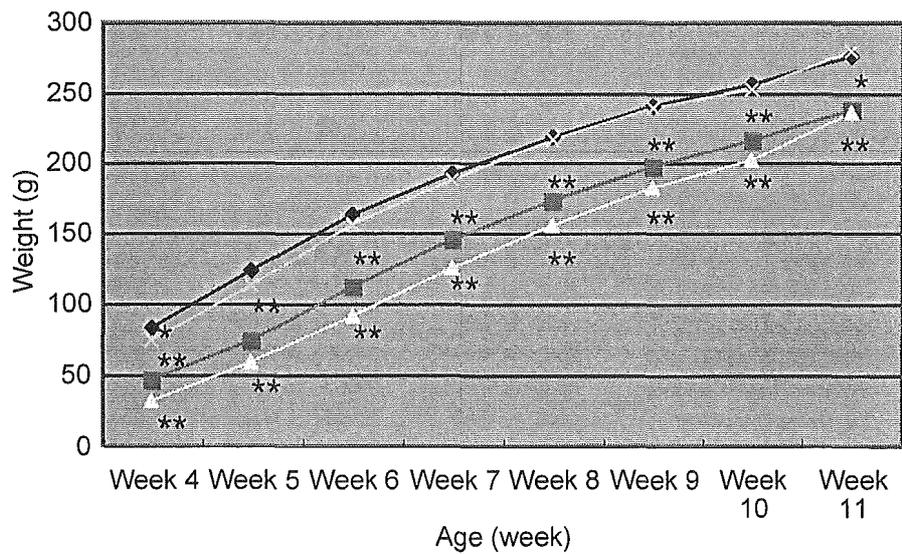
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control

Fig. 10.
Food consumption of offspring after perinatal exposure to anti-thyroid agents until weaning

Males



Females



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control

Fig. 11.

Growth curves of offspring after perinatal exposure to anti-thyroid agents until weaning

Table 4.
Effects on dams and offspring until prepubertal necropsy of exposure to anti-thyroid agents during the period from mid-gestation to lactation

	Anti-thyroid agent in the drinking water			
	Untreated control	200 ppm MMI	12 ppm PTU	3 ppm PTU
No. of dams examined	8	8	8	8
Maternal parameter				
Body weight gain (g/day)				
GD 10-GD 20	11.12 ± 1.13 ^a	10.00 ± 1.66	10.42 ± 1.34	11.61 ± 1.34
PND 2-PND 10	4.86 ± 1.66	4.27 ± 1.59	3.48 ± 1.59	5.66 ± 1.38
PND 10-PND 21	-0.67 ± 0.96	0.97 ± 0.71	0.83 ± 1.04	0.21 ± 1.42
PND 21				
BW (g)	304.6 ± 19.1	305.0 ± 26.3	302.2 ± 19.0	322.7 ± 16.8
Thyroid weight (mg/100 g BW)	6.04 ± 1.17	19.64 ± 4.48 **	18.01 ± 4.68 **	8.85 ± 1.58
Offspring parameter				
No. of implantation sites	13.0 ± 1.6	13.6 ± 1.4	13.0 ± 1.6	13.9 ± 1.7
No. of live offspring	12.6 ± 1.6	12.5 ± 2.1	12.3 ± 2.0	12.9 ± 1.4
Male ratio (%)	47.8 ± 9.6	50.8 ± 14.9	41.5 ± 8.5	49.3 ± 9.1
BW, PND 2 (g)				
Males	7.57 ± 0.92	6.56 ± 0.59	6.95 ± 0.83	7.17 ± 0.76
Females	7.22 ± 0.94	6.24 ± 0.61	6.63 ± 0.83	6.78 ± 0.74
AGD, PND 2 (mm)				
Males	4.02 ± 0.25	3.95 ± 0.15	4.14 ± 0.35	3.97 ± 0.22
Females	1.91 ± 0.10	1.88 ± 0.07	1.96 ± 0.13	1.93 ± 0.09
Relative organ weights, PND 21				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Males				
BW (g)	52.2 ± 4.4	35.1 ± 2.5 **	35.9 ± 2.9 **	46.8 ± 8.4
Liver (g/100g BW)	3.62 ± 0.22	3.91 ± 0.39	3.50 ± 0.30	3.43 ± 0.28
Kidneys (g/100g BW)	1.10 ± 0.09	1.10 ± 0.09	1.17 ± 0.06	1.06 ± 0.07
Brain (g/100g BW)	2.82 ± 0.17	4.00 ± 0.28 **	4.00 ± 0.33 **	3.20 ± 0.42 *
Adrenals (mg/100g BW)	20.0 ± 8.7	22.3 ± 6.5	14.8 ± 9.5	17.4 ± 7.3
Testes (g/100g BW)	0.41 ± 0.63	0.26 ± 0.02 **	0.26 ± 0.04 **	0.29 ± 0.04 **
Epididymides (g/100g BW)	0.062 ± 0.01	0.0889 ± 0.028 *	0.079 ± 0.02	0.0764 ± 0.017
Females				
BW (g)	53.1 ± 2.6	34.1 ± 2.6 **	34.5 ± 3.2 **	45.8 ± 5.5 **
Liver (g/100g BW)	3.63 ± 0.15	3.85 ± 0.29	3.60 ± 0.25	3.47 ± 0.04
Kidneys (g/100g BW)	1.12 ± 0.09	1.12 ± 0.09	1.20 ± 0.08	1.11 ± 0.07
Brain (g/100g BW)	2.74 ± 0.14	4.03 ± 0.35 **	4.03 ± 0.33 **	3.14 ± 0.32 *
Adrenals (mg/100g BW)	14.8 ± 6.7	19.4 ± 7.4	16.6 ± 7.1	18.6 ± 12.0
Ovaries (mg/100g BW)	38.2 ± 15.6	34.2 ± 20.7	24.2 ± 14.6	35.9 ± 11.8
Uterus (g/100g BW)	0.055 ± 0.014	0.064 ± 0.017	0.058 ± 0.018	0.056 ± 0.014

^a Mean ± SD.

Abbreviations: PTU, propylthiouracil; MMI, methimazole; GD, gestational day; PND, postnatal day; BW, body weight; AGD, anogenital

* ** Significantly different from the controls by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

^{##} Significantly different from the controls by Fisher's exact probability test ($p < 0.01$).