

**Table 5.****Onset of puberty and estrous cyclicity of offspring exposed to anti-thyroid agents during the period from mid-gestation to lactation**

	Anti-thyroid agent in the drinking water			
	Untreated control	3 ppm PTU	12 ppm PTU	200 ppm MMI
Onset of puberty				
Males				
No. of animals examined	11	12	6	11
Age by day	40.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	43.1 ± 1.6	49.5 ± 3.0 <sup>**</sup>	45.0 ± 2.2 <sup>**</sup>
BW	204.0 ± 14.1	190.2 ± 32.4	169.0 ± 12.1 <sup>*</sup>	160.1 ± 20.6 <sup>**</sup>
Females				
No. of animals examined	12	12	4	12
Age by day	36.2 ± 1.9	37.3 ± 2.8	42.5 ± 3.7 <sup>**</sup>	36.7 ± 3.4
BW	135.3 ± 17.1	129.2 ± 26.7	98.1 ± 21.4 <sup>*</sup>	85.6 ± 21.0 <sup>**</sup>
Estrous cyclicity during PNW 8–11				
No. of animals examined	10	10	4	10
Irregularity (ED/EE)	1/0	1/0	0/1	0/0

<sup>a</sup> Mean ± SD

Abbreviations: PTU, propylthiouracil; MMI, methimazole; PNW, postnatal week; ED, extended diestrus; EE, extended estrus.

\*, \*\* Significantly different from the controls by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test (\* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01).

**Table 6.****Body and organ weights of offspring exposed to anti-thyroid agents during the period from mid-gestation to lactation. PNW 11**

	Anti-thyroid agent in the drinking water			
	Untreated control	3 ppm PTU	12 ppm PTU	200 ppm MMI
Males				
No. of animals examined	10	10	6	10
BW (g)	452 ± 32.2 <sup>a</sup>	451 ± 30.7	332 ± 26 <sup>**</sup>	347 ± 36.8 <sup>**</sup>
Liver (g/100g BW)	3.84 ± 0.25	3.86 ± 0.26	4.11 ± 0.38	4.03 ± 0.16
Kidneys (g/100g BW)	0.67 ± 0.03	0.64 ± 0.06	0.76 ± 0.07 <sup>**</sup>	0.67 ± 0.05
Brain (g/100g BW)	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.03	0.57 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.57 ± 0.07 <sup>**</sup>
Pituitary (mg/100g BW)	3.45 ± 0.22	3.34 ± 0.4	3.33 ± 0.27	3.63 ± 0.49
Thyroid (mg/100g BW)	5.43 ± 0.82	6.66 ± 1.49	9.36 ± 1.82 <sup>**</sup>	7.67 ± 1.03 <sup>**</sup>
Adrenals (mg/100g BW)	11.6 ± 2.27	11.3 ± 2.11	10.7 ± 1.14	10.4 ± 1.36
Testes (g/100 g BW)	0.73 ± 0.08	0.88 ± 0.09 <sup>**</sup>	1.22 ± 0.08 <sup>**</sup>	1.09 ± 0.01 <sup>**</sup>
Epididymides (g/100g BW)	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.25 ± 0.03 <sup>**</sup>
Prostate dorsolateral (g/100 g BW)	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.03	0.14 ± 0.03
Prostate ventral (g/100 g BW)	0.12 ± 0.02	0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.05	0.12 ± 0.03
Seminal vesicle (g/100 g BW)	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.27 ± 0.04
Females				
No. of animals examined	10	10	4	10
BW (g)	282 ± 22.6	279 ± 21.3	237 ± 22.1 <sup>*</sup>	247 ± 35.1 <sup>*</sup>
Liver (g/100g BW)	3.34 ± 0.14	3.51 ± 0.34	3.6 ± 0.23	3.59 ± 0.29
Kidneys (g/100g BW)	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.03	0.65 ± 0.05
Brain (g/100g BW)	0.68 ± 0.06	0.7 ± 0.06	0.77 ± 0.04	0.76 ± 0.08 <sup>*</sup>
Pituitary (mg/100g BW)	5.8 ± 0.91	4.96 ± 0.9	4.19 ± 0.48 <sup>*</sup>	4.64 ± 0.71 <sup>*</sup>
Thyroid (mg/100g BW)	7.49 ± 1.35	7.39 ± 1.09	8.5 ± 0.69	8.44 ± 1.24
Adrenals (mg/100g BW)	23.8 ± 3.63	20.2 ± 4.93	21.5 ± 2.07	21.8 ± 3.43
Ovaries (mg/100g BW)	28 ± 3.36	31.9 ± 4.83	35.4 ± 6.61	37.5 ± 6.75
Uterus (g/100g BW)	0.21 ± 0.08	0.18 ± 0.02	0.23 ± 0.08	0.18 ± 0.03 <sup>**</sup>

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: PTU, propylthiouracil; MMI, methimazole; PNW, postnatal week.

\*, \*\* Significantly different from the controls by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test (\* p&lt;0.05, \*\* p&lt;0.01).

**Table 7.**

**Serum levels of thyroid-related hormones of the offspring exposed to anti-thyroid agents during the period from mid-gestation to lactation**

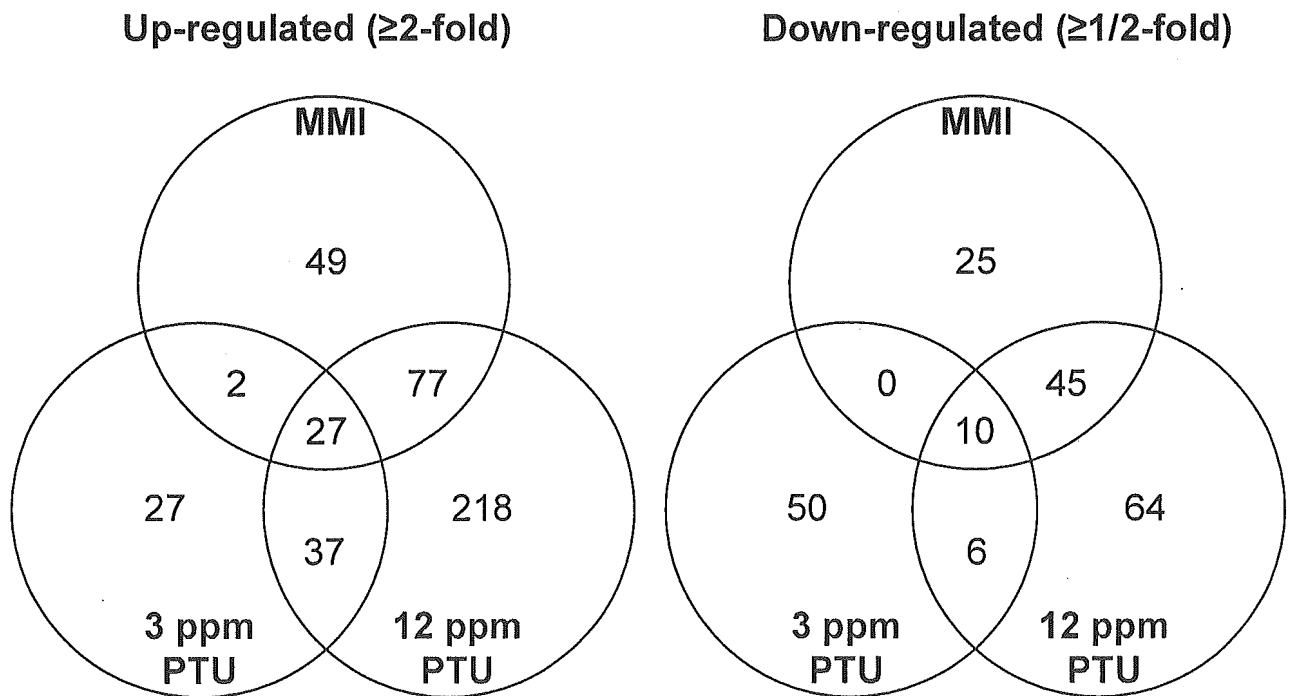
	Anti-thyroid agent in the drinking water			
	Untreated control	3 ppm PTU	12 ppm PTU	200 ppm MMI
<b>PND 21</b>				
No. of offspring examined	10	10	9 <sup>a</sup>	9
T3 (ng/ml)	1.22 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.97 ± 0.31	0.25 ± 0.03 **	0.43 ± 0.19 **
T4 (ug/ml)	4.72 ± 0.84	1.86 ± 0.41	1.06 ± 0.32 **	1.06 ± 0.44 **
TSH (ng/ml)	6.80 ± 2.11	27.38 ± 13.66 **	27.69 ± 5.74 **	35.33 ± 12.69 **
<b>PNW 11</b>				
No. of offspring examined	10	10	6	10
T3 (ng/ml)	1.02 ± 0.08	0.93 ± 0.11	0.84 ± 0.10 **	0.88 ± 0.09 **
T4 (ug/ml)	5.11 ± 0.70	5.12 ± 0.73	4.05 ± 0.71	4.57 ± 1.04
TSH (ng/ml)	9.81 ± 3.16	9.10 ± 3.25	7.75 ± 2.23	9.41 ± 4.40

<sup>a</sup> N=7 for measurement of T3 and T4 levels.

<sup>b</sup> Mean±SD.

Abbreviations: PTU, propylthiouracil; MMI, methimazole; PND, postnatal day; PNW, postnatal week.

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



**Fig. 12.**

**Venn diagram of genes showing altered expression in the hippocampal CA1 of rats at weaning exposed perinatally to PTU or MMI**

**Table 8.**

**List of genes showing up- or down-regulation in the hippocampal CA1 common to anti-thyroid agents at PND 21 ( $\geq 2$ -fold or  $\leq 0.5$ -fold,  $p < 0.05$ )**

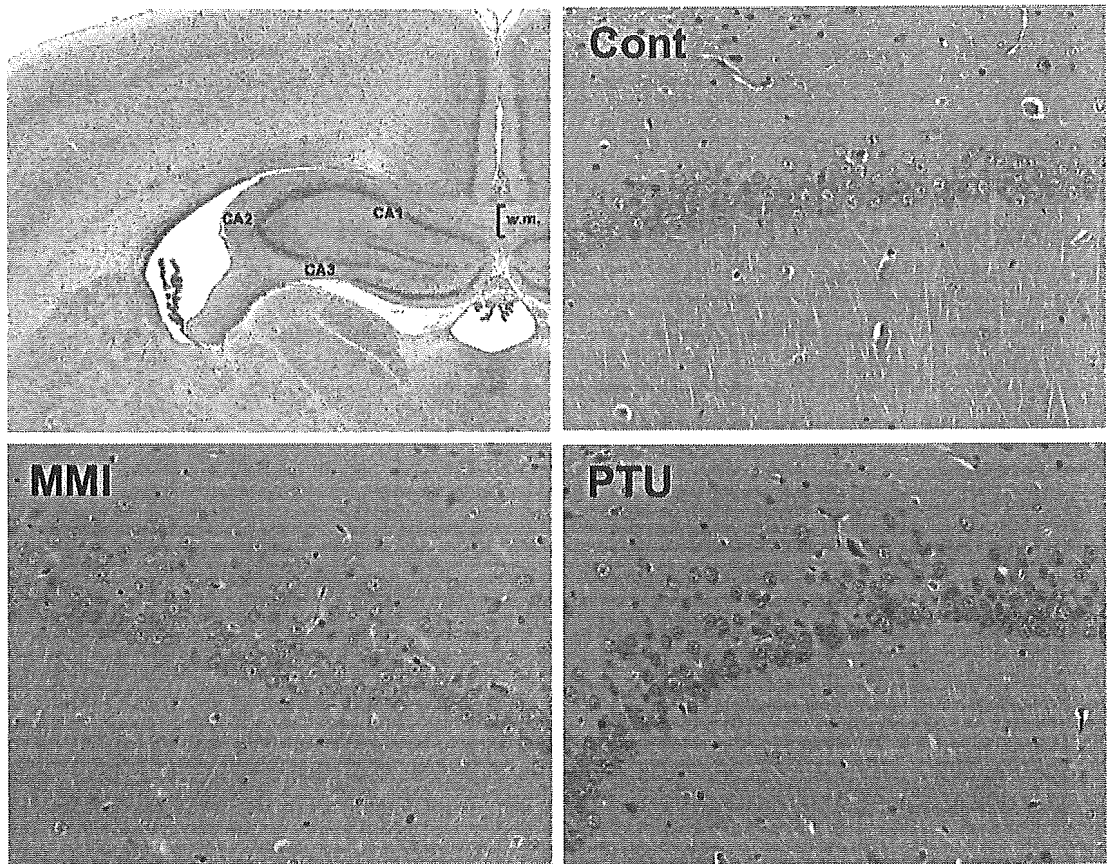
Accession No	Gene title	Symbol	12 ppm PTU	200 ppm MMI
<b>Up-regulated</b>				
NM_013002.1	Purkinge cell protein 4	Pcp4	4.72	4.51
B1304009	Lysyl oxidase	Lox	3.05	4.07
AA851939	FXYD domain-containing ion transport regulator 6	Fxyd6	3.68	3.36
B1303923	Similar to integrin, beta-like 1		2.62	2.23
NM_031315.1	Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	Cte1	2.44	2.24
B1284420	Similar to retinoic acid-responsive protein; STRA6		2.25	2.35
NM_012892.1	Amiloride-sensitive cation channel 1, neuronal (degenerin) ESTs: 9	Accn1	2.08	2.17
<b>Down-regulated</b>				
AA997477	Wingless-related MMTV integration site 2	Wnt2	0.26	0.45
NM_133303.1	Basic helix-loop-helix domain containing, class B3	Bhlhb3	0.28	0.35
A1317821	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	Ptpn3	0.31	0.33
B1282567	Kallikrein 8 (neuropsin/ovasin)	Klk8	0.34	0.47
AA891760	Similar to hypothetical protein		0.36	0.38
A1101322	Histone deacetylase 11 EST: 1	Hdac11	0.43	0.46

Abbreviations: PTU, propylthiouracil; MMI, methimazole; PND, postnatal day; EST, expressed sequence tag.

**Table 9.**

**Function of genes showing altered expression in the hippocampal CA1 common to anti-thyroid agents at PND 21**

	Function	Relation with brain development
<b>Up-regulated genes:</b>		
Purkinge cell protein 4	sodium channel protein	○
Lysyl oxidase	crosslinks extracellular matrix proteins	○
FXYD domain-containing ion transport regulator 6	ion transport regulator	?
integrin, beta-like 1	extracellular matrix protein	○
Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1	Fatty acid oxidation	○
STRA6	Retinoic acid responsible gene, Wnt signal-mediated	○
Degenerin	Role for blood-organ barrier amiloride-sensitive epithelial Na channel	○
<b>Down-regulated genes:</b>		
Wingless-related MMTV integration site 2	Wnt2	○
Basic helix-loop-helix domain containing, class B3	transcription factor, neural differentiation-related	○
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3	Cell growth related signaling molecule	○
Kallikrein 8 (neuropsin/ovasin)	Extracellular serine protease modulates neurite outgrowth and fasciculation	○
Histone deacetylase 11	associated with the thyroid hormone-regulated corepressor Hairless in neonatal brain	○



**Fig. 13.**  
**Changes in the hippocampal CA1 neurons of rats at PNW11**  
**exposed perinatally to PTU or MMI**

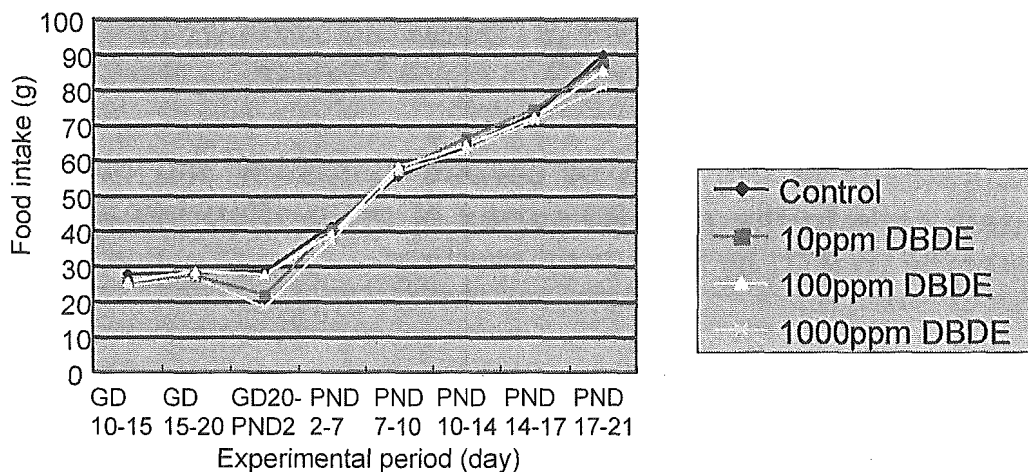
**Table 10.**

**Measurement of the area of corpus callosum and density of CNPase-positive cells in the parietal cortex of male offspring at PNW11 exposed perinatally to PTU or MMI until weaning**

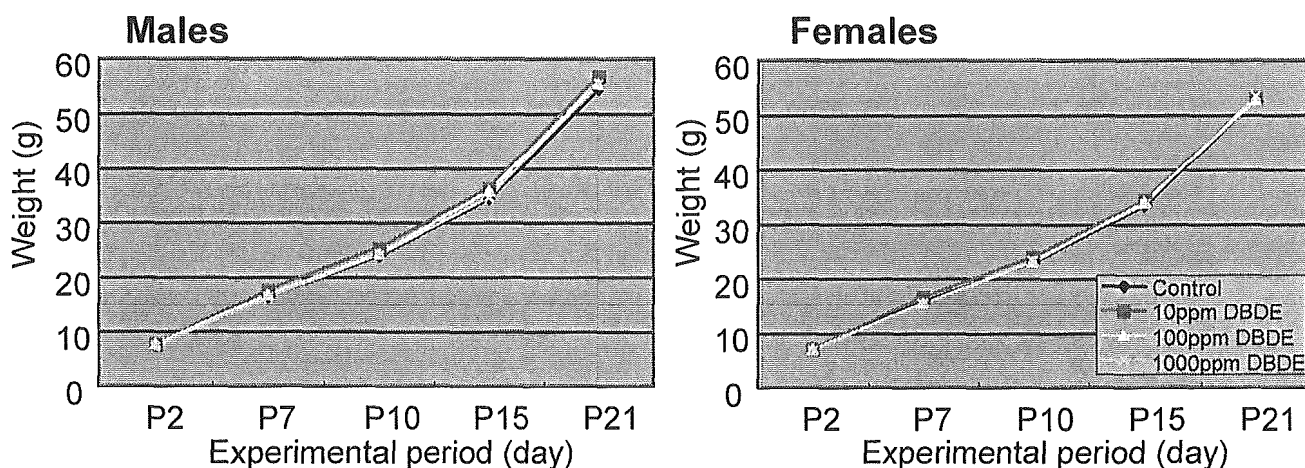
	Control	PTU (ppm)		MMI (ppm)
		3	12	200
No. of animals examined	10	10	6	10
Corpus callosum				
Area (mm <sup>2</sup> )	0.137 ± 0.014 <sup>a</sup>	0.114 ± 0.022*	0.08 ± 0.029**	0.093 ± 0.023**
CNPase-positive cells				
Counts/mm <sup>2</sup>	144.0 ± 22.1	115.3 ± 17.5	92.6 ± 9.5**	87.6 ± 6.8**

<sup>a</sup>Mean±SD.

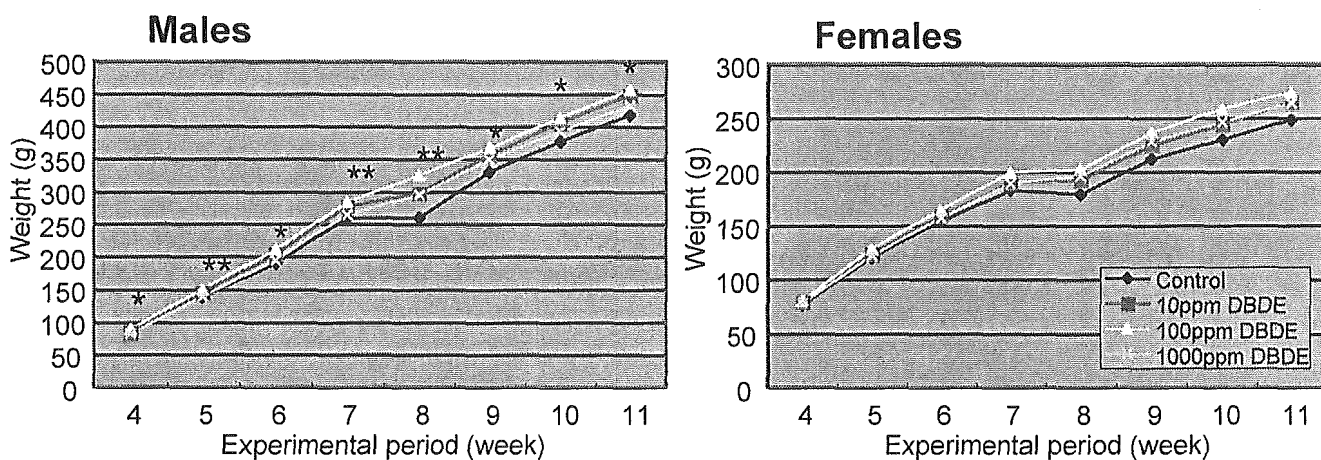
\*, \*\*: Significantly different from the controls at  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ , respectively



**Fig. 14.**  
**Food intake of dams exposed perinatally to DBDE during the period from mid-gestation to lactation**



**Fig. 15.**  
**Growth curves during the lactation period of offspring exposed perinatally to DBDE during the period from mid-gestation**



**Fig. 16.**  
**Growth curves after weaning for offspring exposed perinatally to DBDE during the period from mid-gestation**

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

**Table 11.**

**Effects on dams and offspring until prepubertal necropsy of exposure to DBDE during the period from mid-gestation to lactation**

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of dams examined	8	8	8	8
Maternal parameter				
Body weight gain (g/day)				
GD 10-GD 20	10.37 ± 1.55 <sup>a</sup>	10.47 ± 1.51	11.05 ± 1.67	10.99 ± 1.04
PND 2-PND 10	4.6 ± 1.17	5.59 ± 1.92	5.06 ± 1.54	5.54 ± 2.23
PND 10-PND 21	-0.23 ± 0.86	-0.37 ± 1.37	-0.7 ± 1.74	0.14 ± 1.48
PND 21				
BW (g)	302.0 ± 25.3	302.3 ± 21.8	311.4 ± 24.0	302.2 ± 23.5
Thyroid weight (mg/100 g BW)	5.95 ± 0.56	7.20 ± 0.93 <sup>*</sup>	6.48 ± 0.93	7.17 ± 1.08 <sup>*</sup>
Offspring parameter				
No. of implantation sites	13.0 ± 2.4	13.1 ± 1.5	12.4 ± 1.9	13.4 ± 1.3
No. of live offspring	12.4 ± 2.6	12.1 ± 1.7	11.5 ± 2.4	12.5 ± 2.0
Male ratio (%)	47.5 ± 16.2	53.7 ± 14.6	46.7 ± 17.3	38.4 ± 7.0
BW, PND 2 (g)				
Males	7.46 ± 0.58	7.45 ± 1.00	7.50 ± 1.06	7.07 ± 0.73
Females	7.05 ± 0.57	6.99 ± 0.87	6.92 ± 1.10	6.69 ± 0.82
AGD, PND 2 (mm)				
Males	3.89 ± 0.05	3.88 ± 0.29	4.07 ± 0.47	3.84 ± 0.12
Females	1.93 ± 0.14	1.87 ± 0.02	1.93 ± 0.01	1.78 ± 0.02
Relative organ weights, PND 21				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Males				
BW (g)	51.6 ± 6.2	55.8 ± 4.0	52.7 ± 6.0	54.0 ± 3.0
Liver (g/100g BW)	3.62 ± 0.26	3.98 ± 0.12 <sup>*</sup>	3.90 ± 0.29 <sup>*</sup>	4.39 ± 0.27 <sup>**</sup>
Kidneys (g/100g BW)	1.08 ± 0.07	1.10 ± 0.04	1.09 ± 0.14	1.08 ± 0.08
Brain (g/100g BW)	2.94 ± 0.36	2.72 ± 0.15	2.83 ± 0.28	2.73 ± 0.17
Adrenals (mg/100g BW)	17.7 ± 6.9	21.9 ± 4.2	24.6 ± 8.6	19.3 ± 6.7
Testes (g/100g BW)	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.05
Epididymides (g/100g BW)	0.062 ± 0.009	0.074 ± 0.045	0.068 ± 0.047	0.056 ± 0.012
Females				
BW (g)	49.8 ± 4.2	48.4 ± 7.3	48.0 ± 4.5	51.3 ± 4.5
Liver (g/100g BW)	3.71 ± 0.23	3.77 ± 0.26	3.80 ± 0.26	4.31 ± 0.20 <sup>**</sup>
Kidneys (g/100g BW)	1.16 ± 0.06	1.17 ± 0.11	1.14 ± 0.10	1.15 ± 0.09
Brain (g/100g BW)	2.83 ± 0.16	2.98 ± 0.37	2.98 ± 0.29	2.74 ± 0.13
Adrenals (mg/100g BW)	22.7 ± 10.4	20.5 ± 6.3	18.4 ± 7.7	22.0 ± 4.9
Ovaries (mg/100g BW)	33.3 ± 17.9	29.0 ± 8.1	34.9 ± 15.4	31.5 ± 6.4
Uterus (g/100g BW)	0.072 ± 0.053	0.070 ± 0.015	0.069 ± 0.016	0.067 ± 0.013

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; GD, gestational day; PND, postnatal day; BW, body weight; AGD

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

**Table 12.****Onset of puberty and estrous cyclicity of offspring exposed to DBDE during the period from mid-gestation to lactation**

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
Onset of puberty				
Males				
No. of animals examined	11	12	11	12
Age by day	41.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	40.1 ± 1.5	41.5 ± 1.6	41.3 ± 2.1
BW	190 ± 14.4	192 ± 18.8	209 ± 28.6	193 ± 19.2
Females				
No. of animals examined	11	12	12	11
Age by day	35.1 ± 2.4	34.4 ± 2.0	34.7 ± 2.4	34.8 ± 2.4
BW	121.5 ± 8.99	126.0 ± 19.8	126.6 ± 15.2	121.9 ± 11.8
Estrous cyclicity during PNW 8–11				
No. of animals examined	10	10	10	10
Irregularity (Extended diestrus)	1	1	2	1

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; BW, body weight; PNW, postnatal week.

**Table 13.****Serum levels of thyroid-related hormones of the offspring exposed to DBDE during the period from mid-gestation to lactation**

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
PND 21				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	1.39 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.35 ± 0.15	1.33 ± 0.18	1.17 ± 0.10 <sup>**</sup>
T4 (ug/ml)	5.19 ± 0.74	4.89 ± 0.84	5.66 ± 0.71	4.89 ± 0.54
TSH (ng/ml)	5.38 ± 0.89	5.12 ± 0.71	5.85 ± 1.22	4.74 ± 0.69
PNW 11				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	0.99 ± 0.09	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.11	1.02 ± 0.11
T4 (ug/ml)	6.02 ± 0.70	6.00 ± 0.66	5.98 ± 0.94	5.17 ± 0.57 <sup>*</sup>
TSH (ng/ml)	8.30 ± 3.40	8.81 ± 1.63	9.71 ± 3.45	10.47 ± 2.35

<sup>a</sup> Mean±SD.Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PND, postnatal day; PNW, postnatal week  
\*,\*\* Significantly different from the controls by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test (\* p<0.05, \*\* p <0.01).



**Table 14.****Body and organ weights of offspring exposed to DBDE during the period from mid-gestation to lactation. PNW 11.**

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
<b>Males</b>				
No. of animals examined	10	10	10	10
BW (g)	414.4 ± 22.3 <sup>a</sup>	447.8 ± 24.1 *	455.1 ± 22.9 **	423.2 ± 34.5
Liver (g/100g BW)	3.66 ± 0.18	3.65 ± 0.20	3.62 ± 0.10	3.42 ± 0.29
Kidneys (g/100g BW)	0.69 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.70 ± 0.03	0.66 ± 0.06
Brain (g/100g BW)	0.50 ± 0.03	0.47 ± 0.03 *	0.46 ± 0.02 *	0.50 ± 0.04
Adrenals (mg/100g BW)	10.9 ± 1.8	9.8 ± 1.8	11.0 ± 1.8	10.9 ± 2.5
Testes (g/100 g BW)	0.74 ± 0.14	0.73 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.77 ± 0.04
Epididymides (g/100g BW)	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.24 ± 0.03
<b>Females</b>				
No. of animals examined	10	11	10	11
BW (g)	254.0 ± 20.8	260.4 ± 17.8	278.2 ± 26.7	267.7 ± 30.3
Liver (g/100g BW)	3.34 ± 0.2	3.36 ± 0.28	3.44 ± 0.22	3.45 ± 0.35
Kidneys (g/100g BW)	0.68 ± 0	0.65 ± 0.04	0.67 ± 0.04	0.63 ± 0.06
Brain (g/100g BW)	0.78 ± 0.1	0.75 ± 0.06	0.70 ± 0.06 *	0.73 ± 0.06
Adrenals (mg/100g BW)	21.1 ± 2.2	20.4 ± 3.1	19.7 ± 3.4	20.7 ± 3.0
Ovaries (mg/100g BW)	32.0 ± 5.1	32.1 ± 3.8	32.4 ± 5.5	34.4 ± 6.6
Uterus (g/100g BW)	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.06	0.16 ± 0.02	0.20 ± 0.05

<sup>a</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PNW, postnatal week.

\* , \*\* Significantly different from the controls (\* p&lt;0.05, \*\* p &lt;0.01).

**Table 15.****Measurement of the area of corpus callosum and density of CNPase-positive cells in the parietal cortex of male offspring at PNW11 exposed perinatally to DBDE until weaning**

	DBDE (ppm)			
	0	10	100	1000
<b>No. of animals examined</b>				
<b>Corpus callosum</b>				
Area (mm <sup>2</sup> )	0.18 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.15 ± 0.02	0.12 ± 0.02 **	0.13 ± 0.03 **
<b>CNPase-positive cells</b>				
Counts/mm <sup>2</sup>	150.9 ± 23.0	137.7 ± 10.8	122.4 ± 13.9 **	124.9 ± 13.0 **

\*\* Significantly different from the controls (\*\*p&lt;0.01).

**Table 16.**

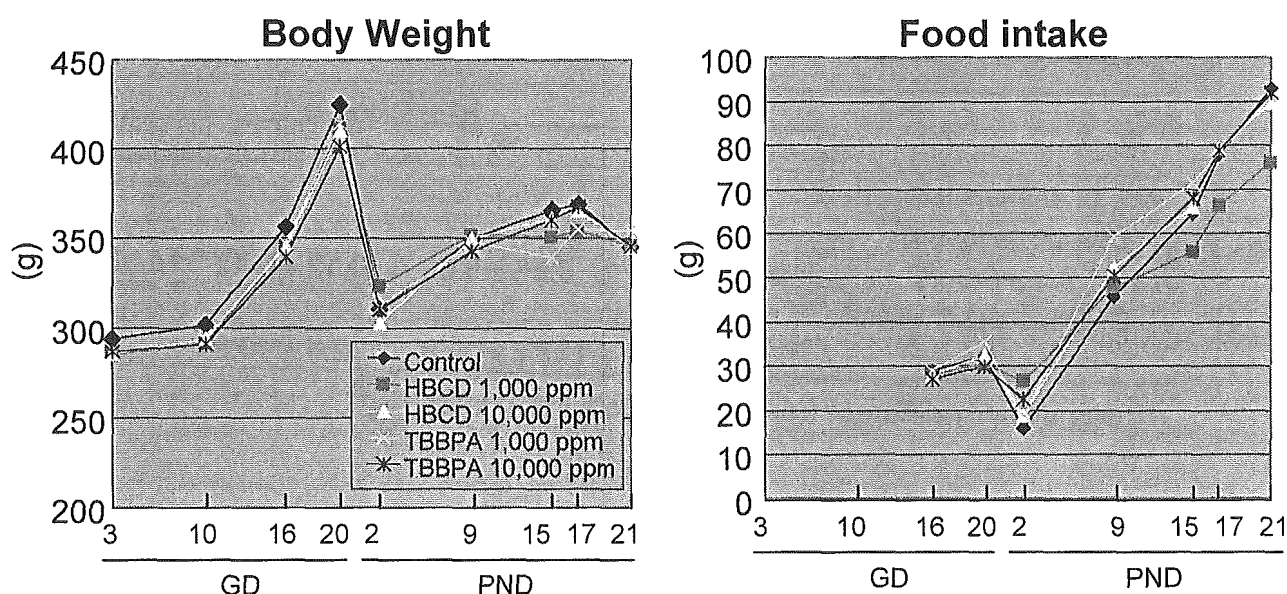
**Body and organ weights of dams at weaning in the preliminary dose-finding studies of HBCD and TBBPA**

	Control	HBCD (ppm)		TBBPA (ppm)	
		1000	10,000	1000	10,000
No of animals	3	3	3	3	3
Body weight (g)	337.7±43.0	342.7±21.8	334.5±5.3	344.9±39.2	340.6±20.2
Thyroid (mg)	17.6±2.5	19.4±3.3	21.0±4.9	15.5±4.3	23.2±3.6
Thyroid (mg/100g BW)	5.23±0.76	5.64±0.61	6.28±1.53	4.44±0.74	6.81±0.79
Liver (g)	16.9±1.7	16.4±0.8	18.5±0.4	16.5±2.4	16.2±1.1
Liver (g/100g BW)	5.0±0.3	4.8±0.3	5.5±0.2	4.8±0.1	4.8±0.1

**Table 17.**

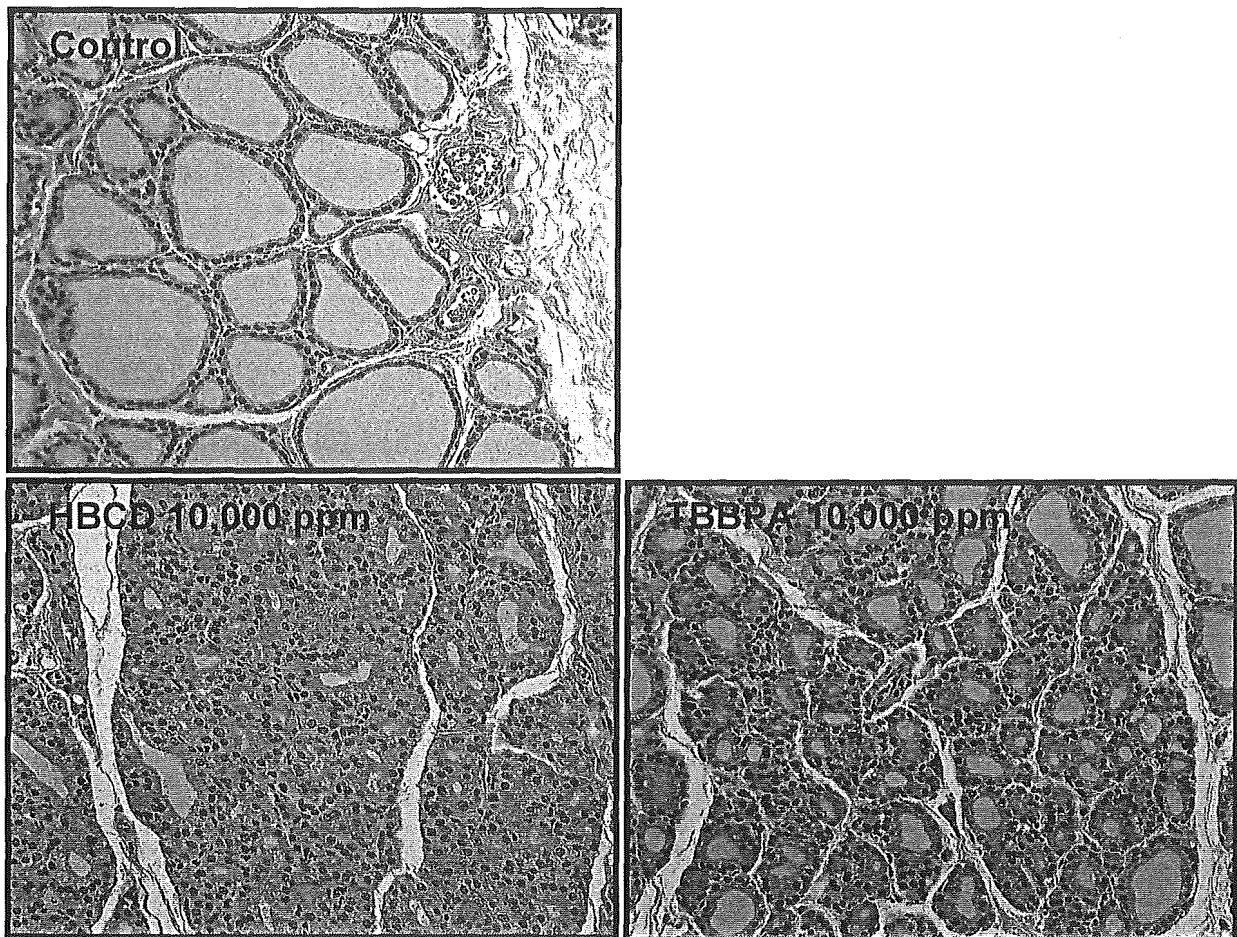
**Pregnancy and delivery-related parameters in the preliminary dose-finding studies of HBCD and TBBPA**

	Control	HBCD (ppm)		TBBPA (ppm)	
		1000	10,000	1,000	10,000
No of animals	3	3	3	3	3
Duration of pregnancy (d)	21.7±0.6	21.3±0.6	22.0±0.0	21.0±0.0	21.7±0.6
No. of implantation sites	14.7±1.2	13.7±1.2	14.0±2.0	13.3±1.5	13.3±2.5
No. of pups delivered	14.3±0.6	12.7±0.6	13.7±2.1	13.0±1.0	12.0±2.6
No. of dead offspring	0.33±0.58	0	0	0	0.33±0.58
Male ratio	44.1±21.6	60.2±9.7	42.5±10.0	28.1±11.1	55.5±1.7



**Fig. 17.**

**Growth curves and food intake of dams during exposure in the preliminary dose-finding studies of HBCD and TBBPA**



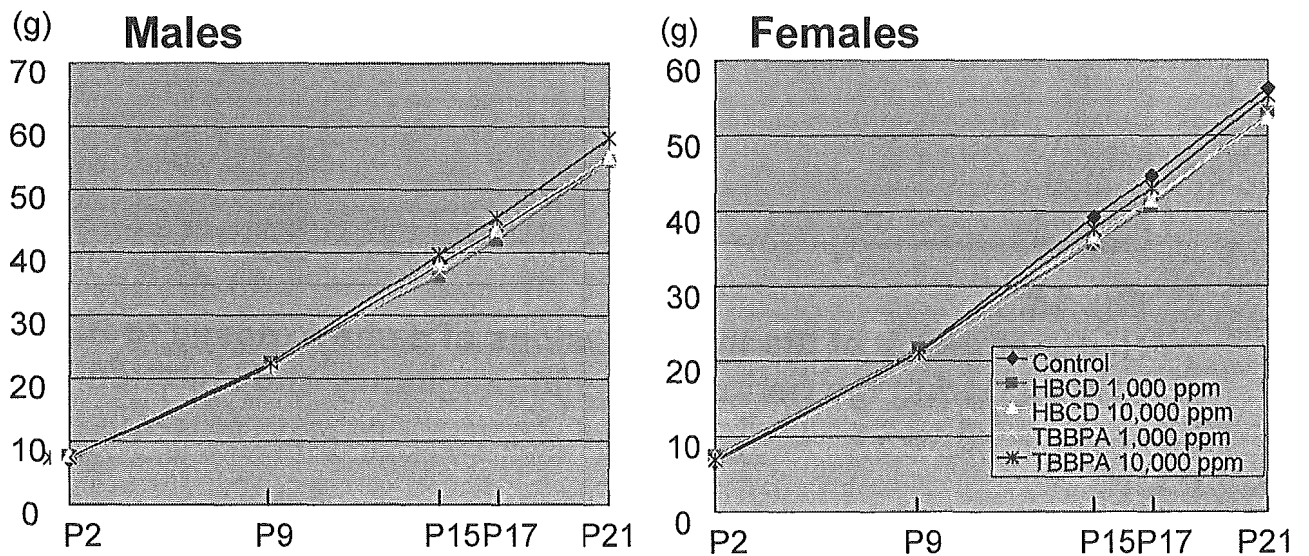
**Fig. 18.**  
**Histopathology of the thyroid lesions of dams exposed to HBCD or TBBPA during the period from mid-pregnancy and lactation**

**Table 18.**  
**Histopathological grading of diffuse follicular cell hypertrophy of dams exposed to HBCD or TBBPA during the period from mid-pregnancy and lactation**

	Control	HBCD (ppm)		TBBPA (ppm)	
		1000	10,000	1,000	10,000
Diffuse follicular cell Hypertrophy (-/±/+/++)	(2, 1, 0, 0)	(0, 2, 1, 0)	(0, 0, 2, 1)	(1, 2, 0, 0)	(0, 2, 1, 0)

**Table 19.**  
**Anogenital distance of offspring at PND2 exposed to HBCD or TBBPA during the period from mid-pregnancy and lactation**

AGD (mm)	Control	HBCD (ppm)		TBBPA (ppm)	
		1000	10,000	1000	10,000
Males	3.90±0.20	3.93±0.23	3.93±0.06	3.70±0.20	4.07±0.15
Females	1.93±0.06	1.93±0.06	1.93±0.06	1.87±0.12	1.93±0.06



**Fig. 19.**  
**Body weight of offspring exposed to HBCD or TBBPA during the period from mid-pregnancy and lactation**

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）

分担研究名 神経機能・行動影響評価

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学・薬品毒性学教室 教授  
（協力分担研究者 成田 年 星薬科大学・薬品毒性学教室 助教授）

**研究要旨：**甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の生体に対する影響の評価系の確立を目的として、decabromodiphenyl ether (DBDE) の胎児期及び授乳期慢性曝露による中枢神経系に対する影響を検討した。なお、陽性対照として甲状腺ホルモン阻害薬である propylthiouracil (PTU) を用いた。一般行動観察の結果、PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露により著しい自発運動量の増加が認められたが、DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露では、特筆すべき異常行動は認められなかった。また、高架式十字迷路法に従い PTU ないし DBDE 曝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、いずれの化学物質を慢性曝露しても不安感受性の変化は認められなかった。一方、雌性ラットでは、PTU 慢性曝露においてのみ、open arms 滞在時間及び侵入回数の有意な増加が認められた。さらに、条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤である methamphetamine 誘発報酬効果に対する DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した結果、DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露による著明かつ有意な methamphetamine 誘発報酬効果の減弱が認められた。そこで次に、側坐核における dopamine の遊離量について、*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慢性曝露では、側坐核における dopamine の基礎遊離量の低下に伴う、methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量の著明な低下が認められた。以上の結果から、DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露は、PTU 慢性曝露と同様の dopamine 神経の発達障害が惹起されることが明らかとなり、DBDE が甲状腺ホルモンかく乱作用を有する可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

近年、血液脳関門等の防御機構が未成熟である胎児期及び授乳期において環境化学物質を曝露されることにより、中枢神経系の発達異常及び成長後の行動異常が惹起されるといった概念が一般化されつつある。また、甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に重要な役割を担っていることから、甲状腺ホルモンかく乱作用を有する環境化学物質が中枢神経系の発達障害を引き起こす可能性が考えられる。そこで本研究では、臭素系難燃剤として広く使用されており、甲状腺ホルモンかく乱作用が懸念されている DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露による中枢神経系に及ぼす影響を行動薬理的に検討した。なお、陽性対照として甲状腺ホルモン阻害薬である PTU を用いることで、発達期における甲状腺機能低下を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の影響評価系の確立を目的とした。

#### B. 研究方法

全ての実験には SD 系雌/雄性ラットを用いた。

DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露は、薬物混入試料法に従い、妊娠 10 日目より離乳（生後 21 日）に至るまで DBDE を 0、10、100 及び 1000 ppm の濃度で粉末飼料に混入させた。PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露は、薬物混入飲水法に従い、妊娠 10 日目より離乳に至るまで飲み水に PTU 12 ppm を混入することで曝露した。なお、全ての曝露動物は妊娠 3

日目より離乳に至るまでは soy-free 飼料にて、離乳後は CRF-1 飼料にて飼育した。

一般行動観察では open field 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、dopamine 神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 及び circling、ならびに 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 methamphetamine (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慢性曝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 dopamine 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。

（倫理面への配慮）

本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験

指針に従い、動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

### C. 研究結果

DBDE (10, 100, 1000 ppm 混餌) ないし PTU (12 ppm 飲水) の胎児期及び授乳期慢性曝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。その結果、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 慢性曝露による著明な体重減少が認められた。一方、DBDE 慢性曝露ラットでは、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 の慢性曝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 の慢性曝露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの曝露動物において、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 慢性曝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曝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 慢性曝露においてのみ、open arms 滞在時間及び侵入回数の有意な増加が認められた。

条件づけ場所嗜好性試験に従い、methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した。その結果、DBDE 曝露群では、曝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 の慢性曝露においても著明かつ有意な methamphetamine 誘発報酬効果の減弱が認められた。

側坐核における dopamine 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。その結果、1000 ppm DBDE ないし 12 ppm PTU の慢性曝露により、側坐核における dopamine 基礎遊離量及び methamphetamine 誘発 dopamine 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)。さらに、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。

### D. 考察

甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の影響評価系の確立を目的として、本年度は本邦で最も使用量の多い臭素系難燃剤である DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響につい

て行動薬理学的検討を行った。なお、本年度は陽性対照として甲状腺ホルモン阻害薬である PTU を用いて、甲状腺機能低下に起因する神経機能・行動影響評価系の確立を図った。まず、一般的な成長に対する影響について体重を指標に検討したところ、PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露により、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慢性曝露においては、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の増加が認められることが知られている。このことから、DBDE を慢性曝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、曝露を中止して 4 週後においても同様の傾向が認められたことは DBDE が難分解・高蓄積性であり、曝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 の慢性曝露では、著しい体重減少が認められ、これは曝露中止後、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 の曝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慢性曝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 の周産期曝露は多動性を示し、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慢性曝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慢性曝露ラットでは、PTU の慢性曝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 慢性曝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慢性曝露は不安感受性に何ら変化を及ぼさず、PTU の慢性曝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 の慢性曝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、methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した結果、DBDE の曝露量依存的な methamphetamine 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慢性曝露においても著明かつ有意な methamphetamine 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 dopamine 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慢性曝露により、dopamine 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 dopamine 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慢性曝露により、側坐核 dopamine 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。さらに、methamphetamine 誘発 dopamine 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 の慢性曝露ラットにおいて dopamine 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慢性曝露により、dopamine 神経系の可塑的変化が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慢性曝露により、特に、dopamine 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慢性曝露においても同様の結果が認められたことから、DBDE 慢性曝露による dopamine 神経発達障害は、一部甲状腺機能低下作用の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 dopamine 神経の機能低下、dopamine 遊離量の低下が原因であると考えられており、PTU の周産期曝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慢性曝露により dopamine 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 dopamine 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慢性曝露は dopamine 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。しかしながら、環境中には DBDE 以外にも甲状腺ホルモンかく乱作用を有すると考えられている環境化学物質は数多く存在する。我々は日常生活において様々な

環境化学物質に曝露されていることから、これらの複合曝露も考慮しなくてはならない。環境化学物質の周産期曝露が惹起する dopamine 神経発達障害に起因した、注意欠陥多動性障害のリスクファクターに DBDE がなり得る可能性は十分考えられる。

## E. 結論

周産期曝露影響評価として、本年度は PTU ないし DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露による神経機能・行動影響を検討した。その結果、DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露により dopamine 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。

## F. 健康危険情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

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

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

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

M. Narita, M. Miyatake, M. Shibasaki, M. Tsuda, S. Koizumi, M. Narita, Y. Yajima, K. Inoue and T. Suzuki: Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine: enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J. Neurochem.*, 2005, 93: 383-392,

M. Narita, H. Akai, T. Kita, Y. Nagumo, M. Narita, N. Sunagawa, C. Hara, K. Hasebe, H. Nagase and T. Suzuki: Involvement of mitogen-stimulated p70-S6

kinase in the development of sensitization to the methamphetamine-induced rewarding effect in rats. *Neuroscience*, 2005, 132: 553-560.

#### 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 の胎児期及び授乳期曝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 の胎児期及び授乳期慢性曝露による 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

・第 18 回神経行動毒性研究会  
2005 年 12 月 9 日、東京  
環境化学物質と神経行動毒性  
宮川和也、成田 年、湯浅茂樹、武田 健、鈴木 勉

・第 35 回日本神経精神薬理学会  
2005 年 7 月 6 日～8 日、大阪  
薬物依存の研究 (第 410 報) 環境化学物質の胎児期及び授乳期慢性曝露による dopamine 神経障害  
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

・CPDD 67<sup>th</sup> ANNUAL SCIENTIFIC MEETING  
2005 年 6 月 18 日～23 日、Orlando, Florida  
Influence of an endocrine disruptor bisphenol-A in dopamine-dependent rewarding effect and astrocytic activation  
Kazuya Miyagawa, Minoru Narita, Mayumi Miyatake, Keisuke Mizuo, Mariko Tomita, and Tsutomu Suzuki

## 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



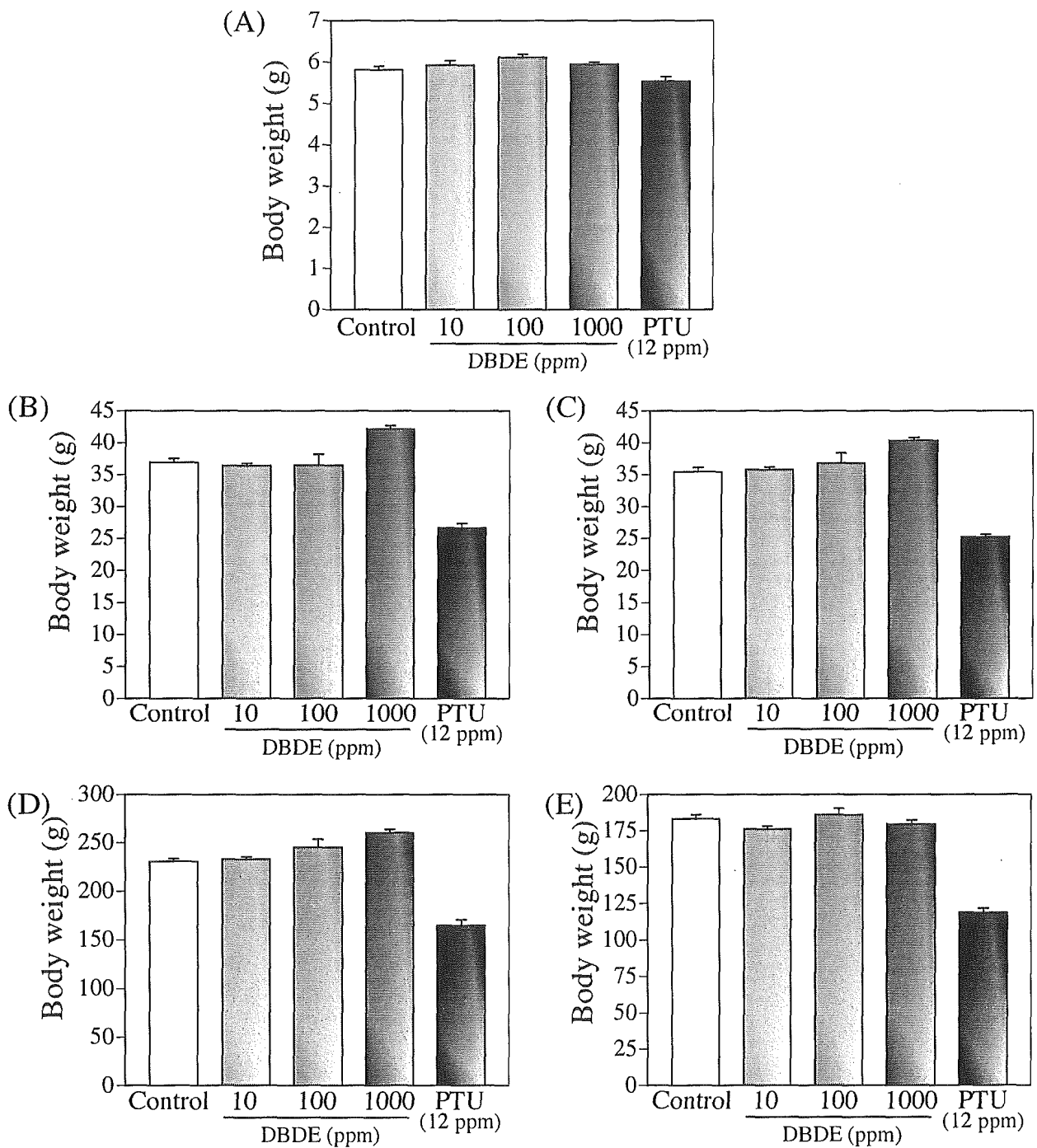


図1 Decabromodiphenyl ether (DBDE) および propylthiouracil (PTU) の胎児期および授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響。DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響を、出生時 (A)、離乳時 (3 週齢、B; 雄、C; 雌) および行動実験開始時 (7 週齢、D; 雄、E; 雌) の体重を指標として検討した。その結果、離乳時 (3 週齢) および行動実験開始時 (7 週齢) において、雌雄共に PTU 慢性曝露による著明な体重減少が認められた。一方、DBDE 慢性曝露ラットでは、むしろ体重の増加傾向が認められた。

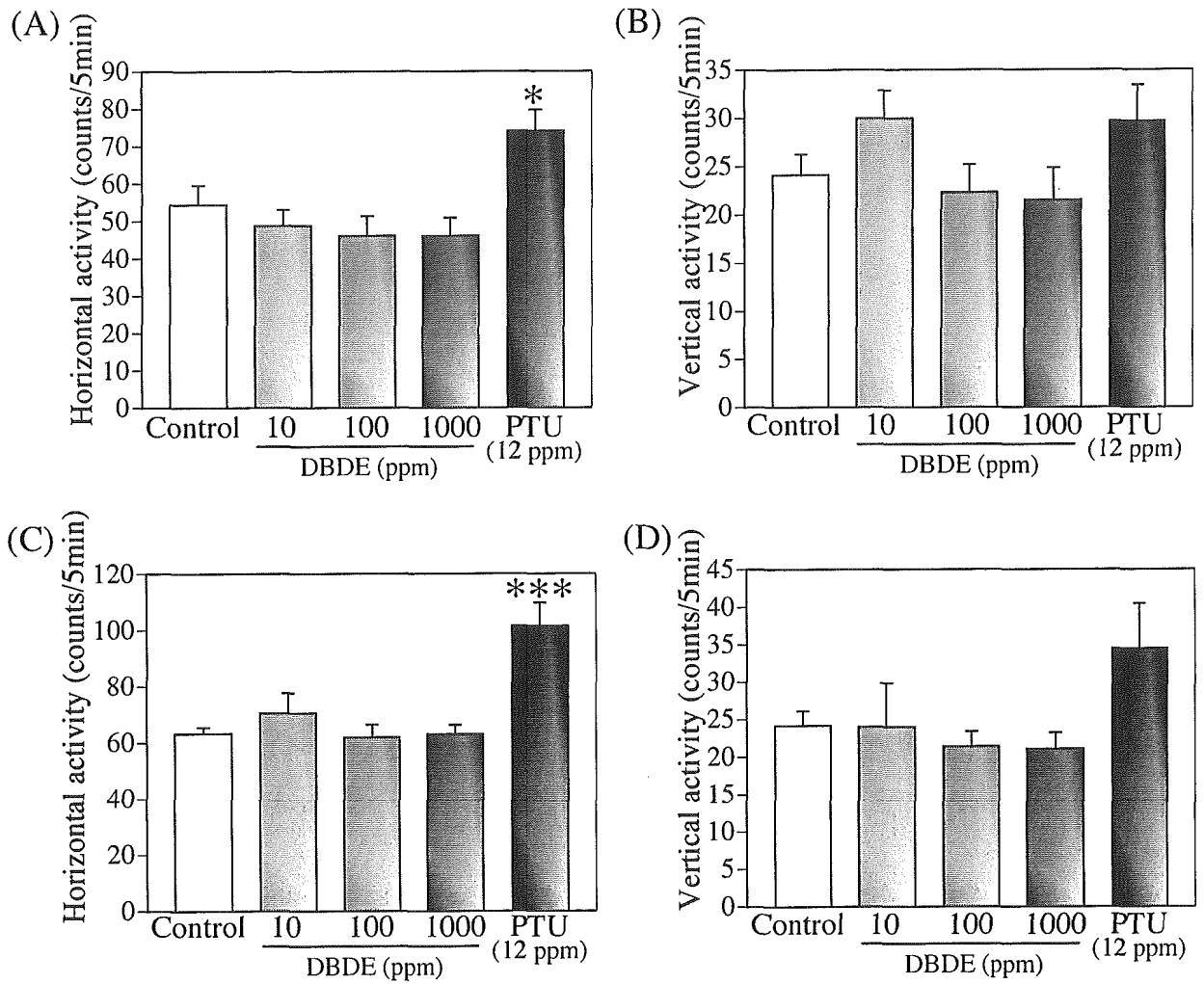


図 2 DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露による自発運動量に及ぼす影響。一般行動観察の結果、PTU の慢性曝露により雄 (A, B)、雌 (C, D) 共に著しい自発運動量の増加が認められた。一方、DBDE の慢性曝露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。  
\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs. control group

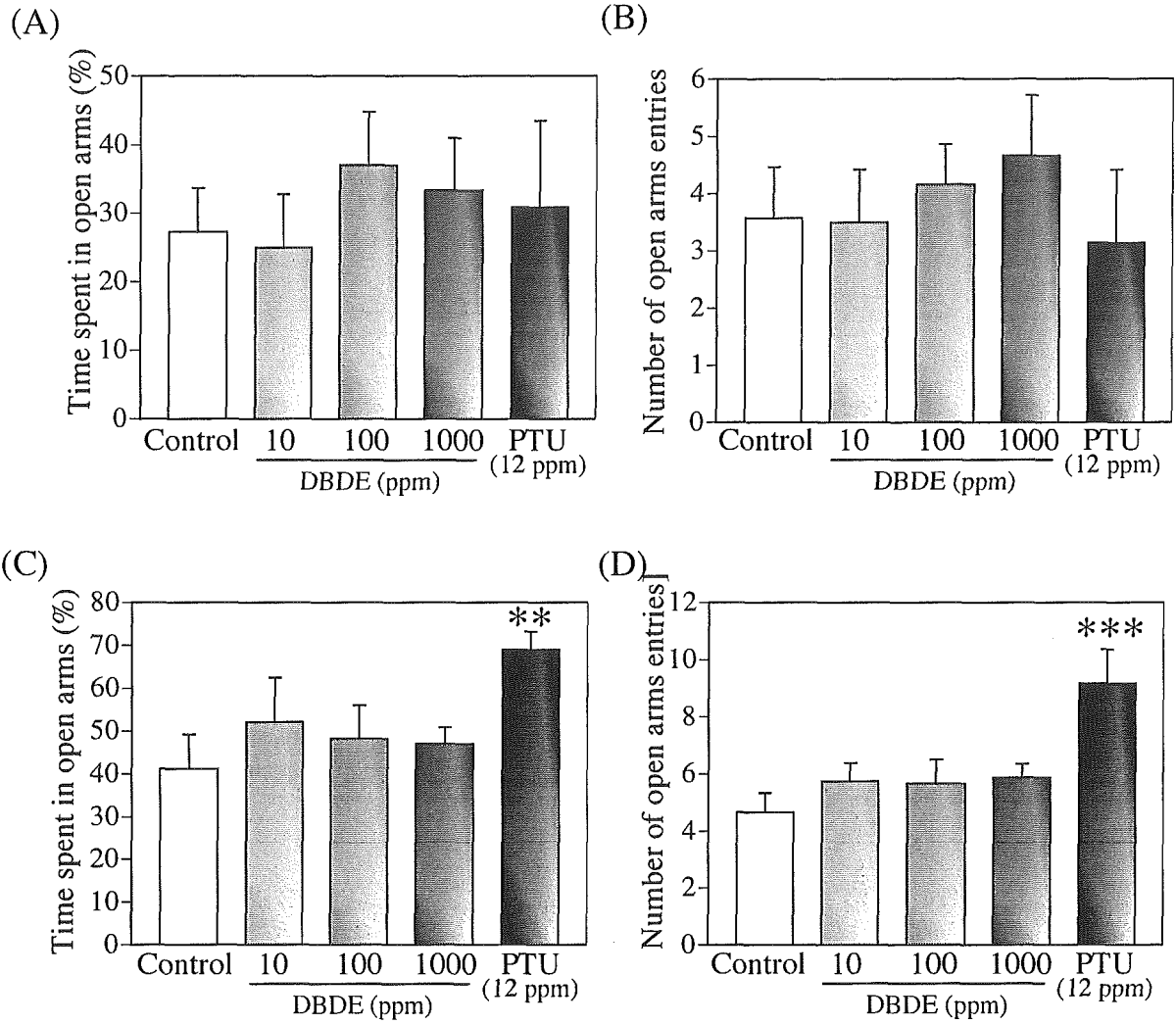


図 3 DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露による不安感受性に及ぼす影響。高架式十字迷路法に従い PTU および DBDE 慢性曝露による不安感受性の変化について検討したところ、雄 (A, B) ではいずれの化学物質曝露でも有意な変化は認められなかった。一方、雌 (C, D) では、PTU 慢性曝露においてのみ、open arms 滞在時間の割合および侵入回数<sup>1</sup>の有意な増加が認められた。 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 vs. control group

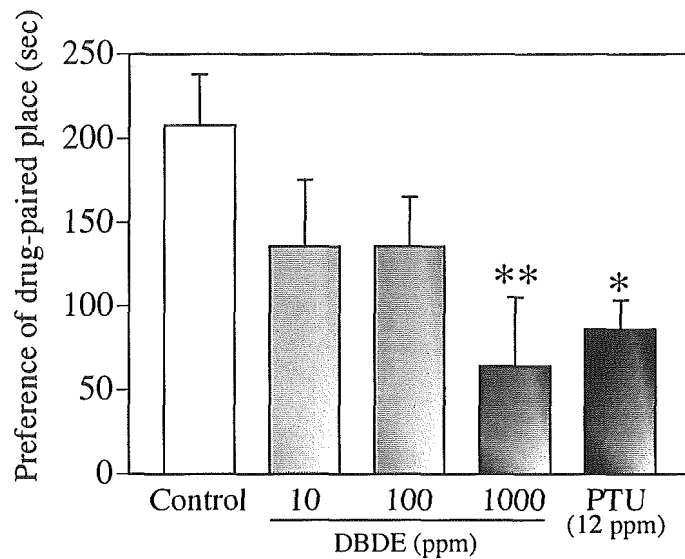


図 4 DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露による methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす影響。条件づけ場所嗜好性試験に従い、methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に及ぼす DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露の影響を雄性ラットにおいて検討した。その結果、DBDE 曝露群では、曝露量に依存した報酬効果の減弱が認められた。また、PTU の慢性曝露においても著明かつ有意な methamphetamine 誘発報酬効果の減弱が認められた。 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control group