

図 5 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 dopamine 遊離量および dopamine 基礎遊離量に及ぼす影響。側坐核における dopamine およびその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA) の細胞外遊離量を *in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、DBDE および PTU の慢性曝露により、側坐核における dopamine 基礎遊離量 (A) および methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) 誘発 dopamine 遊離量 (B) の著明な低下が認められた。さらに、DOPAC および HVA においても基礎遊離量の減少が認められた (C, E)。\* $p < 0.05$  vs. control group

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」

分担研究報告書

「免疫機能影響評価」

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部室長

**研究要旨** 本研究は、免疫機能に関する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、生体組織・機能が発育段階にある幼児期のラットを用いて、3種の臭素化難燃剤の暴露を行い、胸腺、脾臓、血液細胞を中心に免疫機能影響評価を行い、甲状腺機能影響と免疫毒性の関連を調べる。平成17年度は、陽性対象として、甲状腺作用物質 propylthiouracil (PTU) 12 ppm, 3 ppm, methimazole (MMI) 200 ppm, 並びに、臭素化難燃剤 DBDE (decabromodiphenyl ether) 10,100, 1000 ppm を妊娠10日目から出産3週目までSD系親ラットに投与し、幼児期ラットの免疫系への影響を検討した。胸腺、脾臓の重量に関しては、PTU, MMI 投与親から生まれた3週令SDラットにおいて、脾臓重量、脾細胞数の減少が顕著であり、胸腺重量の減少も有意であった。離乳後の11週令において、胸腺重量の減少は回復傾向にあるが、脾臓重量の減少は、MMI 200 ppm, PTU 12 ppm において、まだ有意であった。DBDE 投与親から生まれた3週令SDラットにおいては、脾臓重量、胸腺重量に対照群との差はなく、離乳後の11週令においても、両臓器重量に差はみられなかった。それぞれの臓器のリンパ球のポピュレーションのフローサイトメータによる解析から、PTU, MMI 投与で、3週令ラットで、脾臓、末梢血においてTリンパ球並びにNatural Killer細胞 (NK cell) の上昇、Bリンパ球並びに活性化型T, Bリンパ球の減少が有意であった。11週令においては、末梢血において、NK細胞の減少、活性化T細胞の減少のみが有意であった。また、DBDEの投与では、対照群との間に大きな変化は観察されなかったが、3週令の脾臓において、CD4<sup>+</sup>T細胞、活性化T細胞の減少が観察され、11週令において、末梢血における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。

研究協力者  
蜂須賀暁子, 中村亮介, 高木加代子  
(国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

A. 研究目的

胎児期から小児期にかけては生体組織・機能が発育段階にあり未熟であるために環境有害因子に対して感受性が高い時期 (critical window) と考えられており、胎児期から小児

期に受けた影響は生涯にわたって続く障害となる場合が少なくない。免疫機構は外界からの影響に抵抗するための生体防御機構において極めて重要な機構であり、生体防御機構の要である免疫機構に対する毒性 (免疫毒性) 評価は重要なテーマである。

本研究においては、幼児期のラットを用いて、甲状腺機能障害を有する化学物質の暴露をおこない、胸腺、脾臓の機能を中心にした

免疫毒性試験を行うことを目的とする。化学物質の発達期暴露による免疫影響についての検討は、一般毒性試験の中では行われておらず、免疫毒性試験評価手法の高度化、標準化が、国際的にも望まれており、本研究は、その一助となると考えられる。

免疫系とその機能は環境化学物質や薬物の有害影響に鋭敏に反応し、かつその健康影響はアレルギー、感染症、発がんなど多様な形で発現することが知られ、環境因子の影響を評価するための有用性が指摘されてきた。また、胎児期から小児期にかけては生体組織・機能が発育段階にあり未熟であるために環境有害因子に対して感受性が高い時期（critical window）と考えられており、胎児期から小児期に受けた影響は生涯にわたって続く障害となる場合が少なくない。少子高齢化を迎えた我が国にとって将来を担う小児の健康の確保は至上命題である。

本研究においては、臭素系難燃剤のうち、本邦で最も使用頻度の高いtetrabromobisphenol A (TBBPA), hexabromocyclododecane (HBCD), decabromodiphenyl ether (DBDE)の3化合物につき、発達期暴露を行った際の免疫機能影響に対する影響評価研究を行う。これら化合物は、甲状腺機能障害を有することが示唆されている化学物質であるため<sup>1)</sup>、明らかに甲状腺機能障害を有する薬物（propylthiouracil, Methimazole）を対照として用い<sup>2)3)</sup>、その効果との比較から、免疫影響について考察することを目的とする。

## B. 研究方法

動物は、SD:IGSラットを用い、妊娠10日目から出産3週目まで、陽性コントロールであるPTU (propylthiouracil) 12 ppm, 3 ppm及びM

MI (methimazole) 200 ppmは、飲料水に溶解し、親に投与を行った。また、被検物質であるDBDEは、10 ppm, 100 ppm, 1000 ppmの濃度で餌（大豆除去飼料）に混ぜ、親に投与を行った。出産3週目に離乳を行い、各群10匹づつの雄子ラットの解剖を行なった。残りの雄ラットについては、3週目からは、通常のCRF-1飼料を与え、11週まで飼育し、回復の程度を見る実験に供した。3週目、11週目の解剖時の免疫影響評価のための項目は、表1に示した通りである。

(1) 血液学的検査：末梢血白血球数は、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), 平均赤血球血色素量 (MCH), 及び平均赤血球血色素濃度 (MCHC)の測定を行なった。白血球百分比は、Wright染色した塗沫標本を作製し、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。

(2) 免疫系臓器の重量：胸腺, 脾臓：採血終了後、動物を放血死させ、免疫系器官としては、胸腺, 脾臓の重量を測定した。重量測定後、臓器を2つにわけ、一方を、病理組織学的検査用とし、残りをフローサイトメトリー用に供した。

(3) 免疫関連組織の病理組織学的検査：上記(2)で記した胸腺, 脾臓の1部を、中性緩衝ホルマリン液で固定を行い、常法に従って薄切

切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

(4) 体液性免疫：抗体産生への影響を調べるために、生後23日、33日、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<sup>4)</sup>。また、脾臓、末梢血、血液中Bリンパ球の割合をフローサイトメトリーを用いて解析を行なうためにPECy5標識抗CD45RA抗体を用いた。

(5) 細胞性免疫：細胞性免疫に関与する胸腺、脾臓、末梢血中Tリンパ球の割合の解析のため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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>)<sup>5)</sup>については、PE標識抗CD25抗体を併用し、活性化T細胞(CD3<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>)については、PE標識抗CD71抗体を併用して解析を行なった<sup>6)</sup>。

(6)非特異的免疫：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。

(7)フローサイトメトリー：上記(4)-(6)で示したリンパ球サブポピュレーション解析は、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。

### C. 研究結果・考察

#### (1) PTU, MMI の免疫担当細胞への影響

図1に、MMI, PTU 親ラット投与による子雄ラットの体重、臓器重量変化の結果を示す。体重は、3週令ラットにおいて、PTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、対照群に比べて70%

程度に低下していた。11週令時においては、3週令時に比べ回復傾向はみられるが、PTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、対照群に比べて有意な体重減少が観察された。脾臓、胸腺重量については、特に、3週令時ラットのPTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、減少が著しく、脾臓、胸腺ともに対照群に比べ40%程度に低下していた。11週令においては、脾臓重量は対照の80%程度にまで回復し、胸腺の重量低下は、対照群に比べ有意差はみられなかった。次いで、3週令時、及び11週令時のラットの脾臓、胸腺細胞数の計測を行なった結果を図2に示すが、3週令時ラットの脾臓細胞数の低下が顕著で、MMI 200 ppm で、対照の30%程度、PTU 12 ppm で、20%程度にまで低下していた。11週令においては、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。

次に表2、表3に、3週令ラットと11週令ラットの血液学的検査を行なった結果を示す。末梢血白血球数(表2)、白血球百分比(表3)ともに、3週令、11週令時ラットにおいて、対照と比べて大きな変化はみられなかった。

次いで、フローサイトメトリーにて、リンパ球ポピュレーションの解析を行った結果を示す。図3に、MMI 投与3週令ラットの脾臓または末梢血のリンパ球ポピュレーションを解析した結果を図で例示したものを示すが、MMI 200 ppm 投与により、まず、B細胞の比率の低下、T細胞の比率の上昇が観察される。一方、T細胞の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。表4には、MMIとPTU投与ラットのリンパ球のフローサイトメーターによる解析のうち、5%以上の有意差を持って変化のみられた項目につき、解析したリンパ球のサブポピュレーションの割合を数値で表したものを示した。3週令時ラットにおいて、脾臓のB細胞(CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)の比率が、MMI 200 ppm, PTU 12 ppm 投与群で、対照群の70%に低下し、末梢血においては、40%程度に低下していた。これに対して、T細胞(CD3<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>)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週令時のラットにおいては、ほとんどみられず、11週令時においては、回復傾向にあることが示された。なお、活性化T細胞(CD3<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>)の割合について、3週令時の末梢血において、MMI 200 ppm, PTU 12 ppm 投与群で、対照群の50%程度に減少し、一方で、非活性化T細胞(CD3<sup>+</sup>CD71<sup>-</sup>)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週令時には、ほぼ回復する傾向がみられた。さらに、制御T細胞、NK細胞のフローサイトメーターによる解析結果も示しているが、MMI, PTU投与群とも3週令ラットの末梢血において制御T細胞(CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>)の割合の上昇がみられた。また、NK細胞については、NKRP1A(NK受容体)陽性細胞の割合の上昇が、MMI, PTU投与3週令ラットにおいてみられ、11週令においては、むしろ抑制する傾向がみられた。なお、NKRP1A(NK受容体)陽性細胞のうち、NKRP1A<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>のNK細胞は、NKT細胞と考えられるが、3週令時において、このNKT細胞と思われる細胞の比率の上昇の方が、NKRP1A<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>のNK細胞に比べ大きい傾向にあった。

なお、MMI, PTU投与による甲状腺機能への影響については、3週令時において、甲状腺ホルモン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こと、11週令時に甲状腺ホルモンT3の経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(渋谷主任研究者報告分)。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週令時ラットにおいて顕著にみられる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、この時期に顕著にみられる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。

#### (2) DBDEの免疫担当細胞への影響

図4に、臭素化難燃剤DBDE親ラット投与による子雄ラットの体重、臓器重量変化の結果を示す。3週令時、11週令時共に、DBDE 10, 100, 1000 ppm 投与群で対照群と比較して、体重、脾臓、胸腺重量にほとんど有意な差はみられず、DBDE 10 ppm, 100 ppm 投与11週令ラット群において、体重の増加傾向がみられたのみであった。また、図5には、DBDE投与ラットの脾臓、胸腺細胞の細胞数について示しているが、3週令ラットの脾臓細胞数が、100 ppm, 1000 ppm で、減少する傾向がみられた。胸腺細胞数については、有意差はみられなかった。

次に表5、表6に、3週令ラットと11週令ラットの血液学的検査を行なった結果を示すが、末梢血白血球数(表5)、白血球百分比(表6)ともに、3週令、11週令時ラットにおいて、対照と比べて有意な変化はみられなかった。なお、3週令ラットにおいて、DBDE投与群で、有核赤血球(EbI)のわずかな上昇がみられ

た(表 6).

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の変化を伴う現象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における変化が観察された。表 7 に、5%以上の有意差を持って変化のみられた項目につき、解析したリンパ球サブポピュレーションの割合を数値で表したものを示した。T 細胞のサブポピュレーション解析では、脾臓リンパ球において、DBDE 10 ppm, 1000 ppm 投与 3 週令時で、CD4<sup>+</sup> T 細胞の減少が認められた。また、脾臓における活性化 B 細胞の割合の低下が、3 週令時ラット DBDE 100 ppm, 1000 ppm 投与群でみられた。さらに、NK 細胞については、NKRPIA (NK 受容体) 陽性細胞の割合の減少が、DBDE 投与 3 週令ラット、11 週令ラット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。図 6 に、DBDE 投与 11 週令ラットの末梢血の NK 細胞マーカーの出現をプロットした図を示すが、1000 ppm での抑制が顕著であることが示されている。なお、DBDE 投与による甲状腺機能への影響については、3 週令時において、甲状腺ホルモン T3 の有意な減少が、1000 ppm DBDE 投与群でみられ、11 週令時における T4 の有意な低下、1000 ppm DBDE 投与群でみられているが(渋谷主任研究者報告分)、上記 NK 細胞の比率の低下が高濃度 DBDE 投与群でみられている減少と、甲状腺機能低下には、何らかの連関がある可能性も考えられる。

次に、DBDE 投与ラットの KLH に対する抗体産生への影響を示した結果を図 8 に示す。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。図 8 には、KLH 特異的 IgG の結合の程度を発色基質(TMB)の 450 nm の吸光度(Abs)で表した図を示しているが、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、左下図に示すように、IgG 抗体価 5000 以上、50-5000, 50 以下で分類すると、DBDE10 ppm 投与群では、IgG 抗体価 5000 以上を示す個体が多いのに比べ、DBDE1000 ppm 投与群では IgG 抗体価 50 以下の個体が多くなる傾向が得られた。

#### D. 結論

陽性対象として、甲状腺作用物質 PTU, MMI, 並びに、臭素化難燃剤 DBDE の幼児期ラットの免疫系への影響を検討し、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化型の 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<sup>+</sup>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。

E. 参考文献

1) Birnbaum L.S. et al: Brominated flame retardants: Cause for concern? *Environ. Health Perspect.* 112, 9-17, 2004

2) Rooney A.A. et al.: Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus., *Cell. Immunology* 223, 91-102, 2003

3) Volpe R: *The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signaling: review*, *Curr. Pharm.Des.* 7(6),451-460, 2001

4) Ulrich P. et al: Validation of immune function testing during a 4-week oral toxicity study with FK506. *Toxicol. Lett.* 149, 123-131, 2004

5) Dieckmann D. et al: Activated CD4 CD25 T cells suppress antigen-specific CD4 and CD8 T cells but induce a suppressive phenotype only CD4 T cells., *Immunology* 15(3), 305-314, 2005

6) Ohashi H., Itoh M.: Effects of thyroid hormones on the lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid hormone. *Endocrine regulat.* 28, 117-123, 1994

F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

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. 20<sup>th</sup> IUBMB Congress, 2006, 6

表1 本実験で用いた免疫毒性のマーカー

|   |
|---|
| (1) 血液学的検査: 末梢血白血球数、白血球百分比、   |
| (2) 免疫系臓器の重量: 胸腺、脾臓   |
| (3) 免疫関連組織の病理組織学的検査: 胸腺、脾臓  |
| (4) 体液性免疫:<br>血中抗体レベル (IgG)<br>KLHに対するIgM, IgG抗体産生 (ELISA)<br>脾臓、末梢血、リンパ節のフローサイトメトリー: B細胞数(CD45RA)等               |
| (5) 細胞性免疫<br>脾臓、末梢血、リンパ節のフローサイトメトリー: T細胞数(CD3)及び<br>T細胞サブセット(CD4及びCD8a), 調節性T細胞(CD4+CD25+),<br>活性化T細胞 (CD3+CD71+) |
| (6) 非特異的免疫<br>脾臓、末梢血のNK細胞数  |

図 1 MMI ないし PTU 投与ラットの体重・臓器重量変化

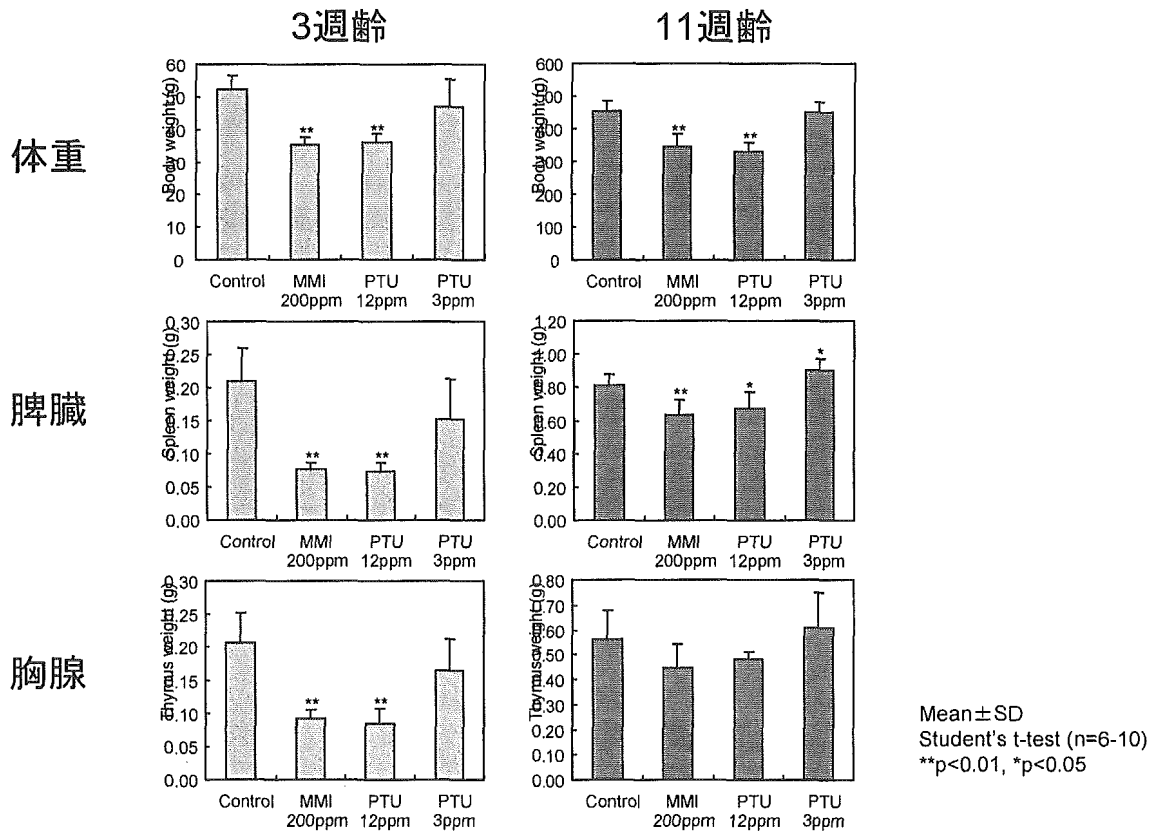




図 2 MMI および PTU 投与ラットの免疫系臓器細胞数の変化

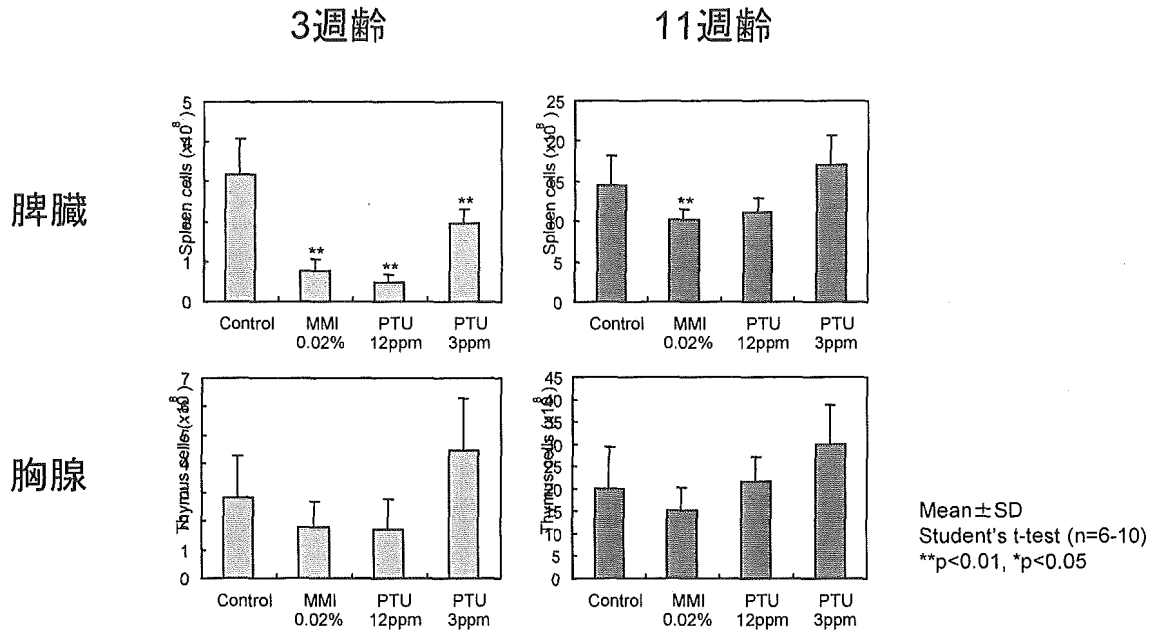


図 3 MMI投与3週令ラットのリンパ球サブポピュレーション解析の例

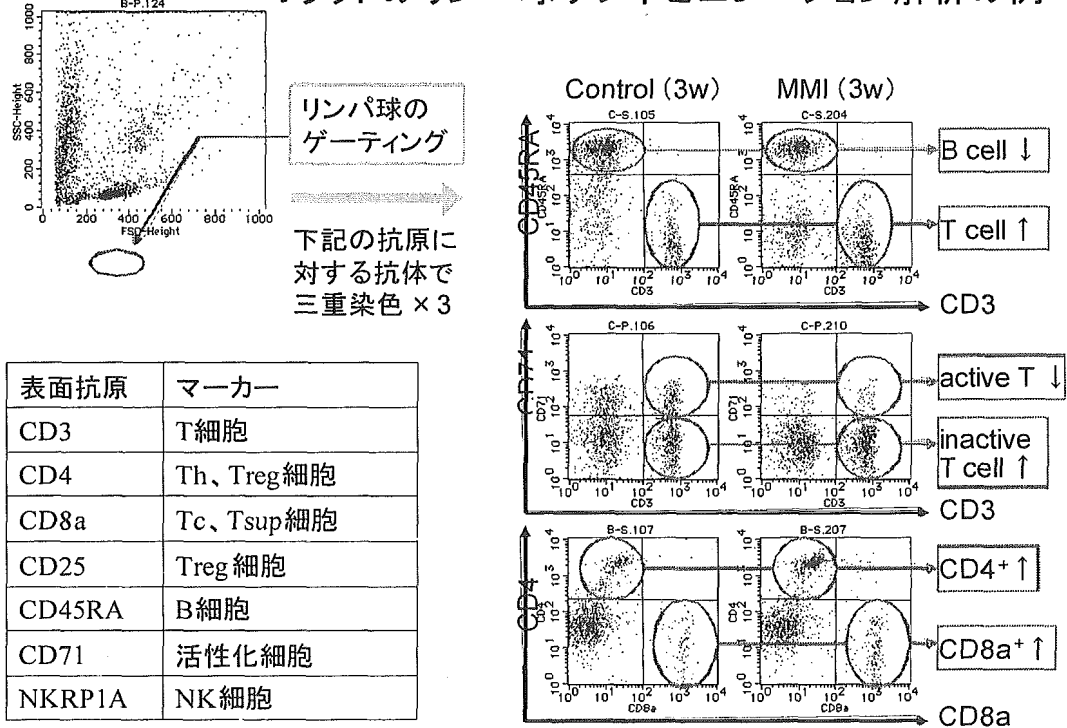


表2 Hematological changes in male rats exposed to anti-thyroid drug during the fetus and neonatal period

| group              | $\times 10^2 / \mu\text{l}$<br>WBC | $\times 10^4 / \mu\text{l}$<br>RBC | g/dl<br>HGB     | %<br>HCT        | fL<br>MCV       | pg<br>MCH       | g/dL<br>MCHC    | $\times 10^4 / \mu\text{l}$<br>PLT |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------------------------|
| 3-week old rats    |                                    |                                    |                 |                 |                 |                 |                 |                                    |
| control            | 41.2 ± 19.7                        | 335.0 ± 31.9                       | 5.74 ± 1.05     | 20.67 ± 3.27    | 61.50 ± 5.68    | 17.12 ± 2.28    | 27.73 ± 1.53    | 101.12 ± 26.62                     |
| Methimazole 200ppm | 41.1 ± 12.7                        | 388.8 ± 34.3 **                    | 8.58 ± 1.46 **  | 28.61 ± 3.89 ** | 73.41 ± 5.89 ** | 22.00 ± 2.59 ** | 29.90 ± 1.46 ** | 84.92 ± 11.15                      |
| PTU 12ppm          | 39.7 ± 15.2                        | 410.1 ± 56.7 **                    | 8.04 ± 1.69 **  | 28.20 ± 4.86 ** | 68.71 ± 6.45 *  | 19.57 ± 2.52 *  | 28.40 ± 1.26    | 82.76 ± 15.17                      |
| PTU 3ppm           | 45.1 ± 12.2                        | 381.9 ± 47.1 *                     | 7.28 ± 1.32 *   | 24.90 ± 3.59 *  | 65.11 ± 4.83    | 19.02 ± 2.21    | 29.16 ± 1.56    | 95.09 ± 13.26                      |
| 11-week old rats   |                                    |                                    |                 |                 |                 |                 |                 |                                    |
| control            | 69.0 ± 18.4                        | 723.6 ± 39.9                       | 13.74 ± 0.89    | 43.40 ± 2.07    | 60.04 ± 2.07    | 19.01 ± 0.82    | 31.67 ± 0.84    | 97.70 ± 6.21                       |
| Methimazole 200ppm | 84.3 ± 14.7                        | 696.2 ± 35.2                       | 13.87 ± 0.55    | 43.29 ± 2.03    | 62.23 ± 1.76 *  | 19.95 ± 0.70 *  | 32.06 ± 0.54    | 87.78 ± 7.48 **                    |
| PTU 12ppm          | 86.9 ± 29.3                        | 700.2 ± 49.8                       | 13.64 ± 0.77    | 42.71 ± 2.42    | 61.07 ± 1.35    | 19.51 ± 0.69    | 31.95 ± 0.64    | 87.98 ± 4.24 **                    |
| PTU 3ppm           | 102.2 ± 20.0 **                    | 702.5 ± 34.5 **                    | 13.89 ± 0.46 ** | 43.09 ± 2.07    | 61.37 ± 1.67    | 19.79 ± 0.67 *  | 32.27 ± 0.85    | 91.67 ± 18.64                      |

Values are mean ± SD of 10 rats. 11-weeks old rats were used.

\*\* <0.01, \* <0.05 (t-test)

表3 White blood cell classification in male rats exposed to anti-thyroid drug during the fetus and neonatal period

| group              | n  | Lymp<br>%    | Seg<br>%     | Eosi<br>%   | Mono<br>%   | Band<br>%   | Ebl<br>n/100 WBC |
|--------------------|----|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------------|
| 3-week old rats    |    |              |              |             |             |             |                  |
| control            | 7  | 75.09 ± 7.04 | 19.73 ± 7.54 | 4.97 ± 3.74 | 0 ± 0       | 0.21 ± 0.57 | 0.2 ± 0.37       |
| Methimazole 200ppm | 6  | 78.70 ± 3.02 | 16.32 ± 3.86 | 4.90 ± 3.40 | 0.08 ± 0.2  | 0.00 ± 0.00 | 0 ± 0            |
| PTU 12 ppm         | 8  | 72.46 ± 6.69 | 24.94 ± 6.19 | 2.45 ± 1.58 | 0.08 ± 0.21 | 0.08 ± 0.21 | 0.85 ± 1.1       |
| PTU 3 ppm          | 9  | 78.53 ± 6.97 | 17.83 ± 5.87 | 2.94 ± 3.28 | 0.26 ± 0.41 | 0.43 ± 0.56 | 0.42 ± 0.4       |
| 11-week old rats   |    |              |              |             |             |             |                  |
| control            | 10 | 81.78 ± 4.82 | 16.45 ± 5.01 | 0.95 ± 0.77 | 0.82 ± 0.77 | 0 ± 0       | 0.15 ± 0.48      |
| Methimazole 200ppm | 10 | 84.58 ± 4.29 | 12.65 ± 4.15 | 1.91 ± 0.90 | 0.86 ± 0.55 | 0 ± 0       | 0 ± 0            |
| PTU 12 ppm         | 10 | 83.90 ± 5.01 | 14.02 ± 4.57 | 1.83 ± 1.47 | 0.25 ± 0.27 | 0 ± 0       | 0 ± 0            |
| PTU 3 ppm          | 10 | 82.70 ± 6.34 | 15.14 ± 6.14 | 1.33 ± 0.66 | 0.83 ± 0.77 | 0 ± 0       | 0.08 ± 0.24      |

\*\* <0.01, \* <0.05 (t-test)

Values are mean ± SD.

表 4 Effects of MMI and PTU on subpopulations of immune cells

Activation of T/B cells

| Treatment:       | Spleen 3w    |                     |                 | Spleen 11w   |                      |              | Note           |                 |
|------------------|--------------|---------------------|-----------------|--------------|----------------------|--------------|----------------|-----------------|
|                  | Control      | MMI 200ppm          | PTU 12ppm       | Control      | MMI 200ppm           | PTU 12ppm    |                | PTU 3ppm        |
| CD3(-) CD45RA(+) | 53.79 ± 3.91 | 36.24 ± 4.97**      | 37.97 ± 7.71**  | 38.82 ± 3.63 | 37.87 ± 4.63         | 41.45 ± 3.32 | 43.5 ± 6.25    | B cell          |
| CD3(+)           | 17.67 ± 4.13 | 37.81 ± 5.28**      | 35.94 ± 11.33** | 44.86 ± 5.88 | 46.46 ± 5.52         | 42.46 ± 3.09 | 36.97 ± 4.86** | T cell          |
|                  |              | Peripheral Blood 3w |                 |              | Peripheral Blood 11w |              |                | Note            |
| Treatment:       | Control      | MMI 200ppm          | PTU 12ppm       | Control      | MMI 200ppm           | PTU 12ppm    | PTU 3ppm       |                 |
| CD3(+)           | 10.88 ± 2.24 | 5.48 ± 3.37**       | 5.1 ± 3.29**    | 0.67 ± 0.27  | 0.37 ± 0.21*         | 0.69 ± 0.2   | 0.77 ± 0.14    | active T cell   |
| CD3(+)           | 29.45 ± 8.5  | 52.31 ± 11.76**     | 47.88 ± 13.15** | 57.33 ± 8.59 | 66.2 ± 2.78*         | 64.2 ± 3.87  | 58.64 ± 5.84   | inactive T cell |
| CD3(-)           | 35.03 ± 8.59 | 15.18 ± 3.71**      | 16.9 ± 5.26**   | 20.62 ± 5.08 | 17 ± 4.93            | 17.21 ± 1.8  | 22.13 ± 7.28   | B cell          |
| CD3(+)           | 39.53 ± 9.54 | 57.41 ± 9.83**      | 52.6 ± 12.05*   | 57.56 ± 8.68 | 66 ± 2.83*           | 64.29 ± 3.91 | 58.84 ± 5.97   | T cell          |

Treg, NK, NKT(?) cells

| Treatment: | Peripheral Blood 3w |               |                | Peripheral Blood 11w |             |             | Note         |           |
|------------|---------------------|---------------|----------------|----------------------|-------------|-------------|--------------|-----------|
|            | Control             | MMI 200ppm    | PTU 12ppm      | Control              | MMI 200ppm  | PTU 12ppm   |              | PTU 3ppm  |
| CD25(+)    | 1.73 ± 0.42         | 2.88 ± 0.62** | 3.28 ± 0.92**  | 3.89 ± 0.64          | 4.68 ± 1.36 | 4.41 ± 1.24 | 4.1 ± 0.69   | Treg      |
| NKRP1A(+)  | 11.48 ± 2.87        | 21.4 ± 9.3*   | 21.38 ± 8.16** | 8.31 ± 2.45          | 6.25 ± 1.62 | 7.33 ± 1.05 | 6.84 ± 1.35  | CD4NKT(?) |
| NKRP1A(+)  | 5.67 ± 1.56         | 6.16 ± 1.1    | 8.88 ± 1.32**  | 12.79 ± 3.13         | 9.7 ± 2.2*  | 8.9 ± 1.12* | 11.52 ± 2.86 | NK cell   |

Values are mean ± S.D. (%gated), n=6-10

\*, \*\* Significant difference from control at p<0.05, p<0.001

図 4 DBDE 投与による体重・臓器重量変化

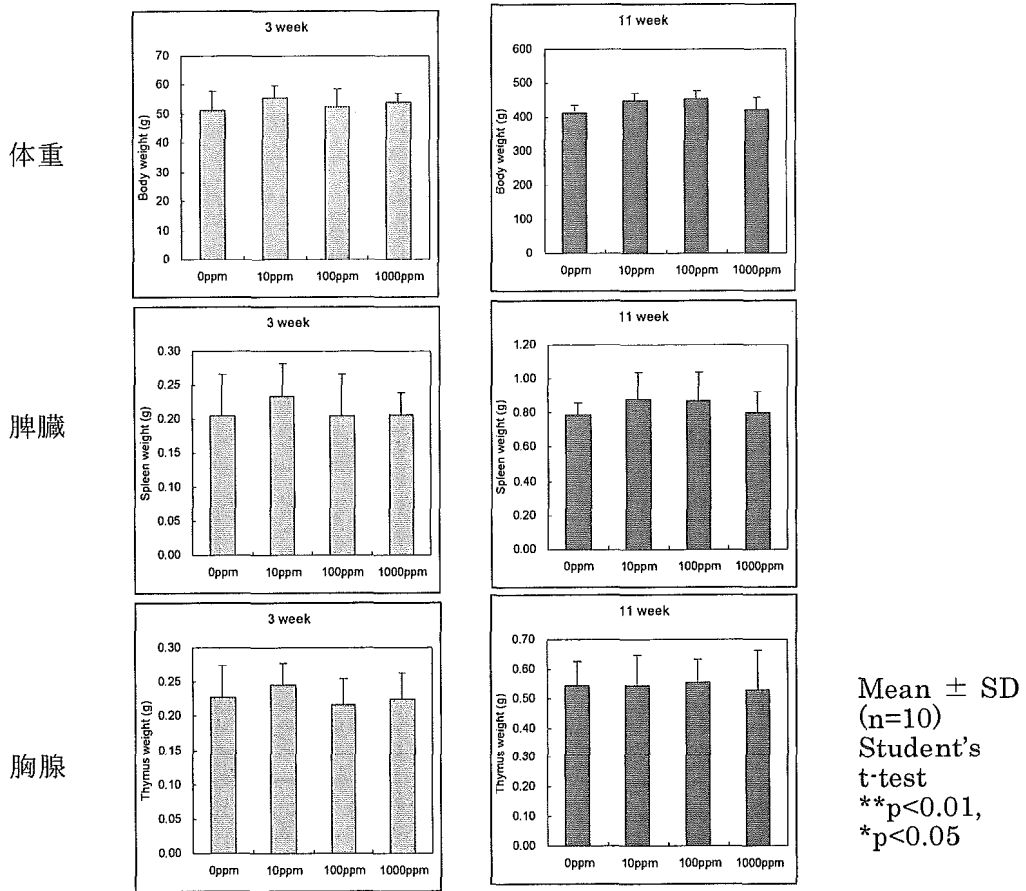


図 5 DBDE 投与ラットの免疫系臓器細胞数の変化

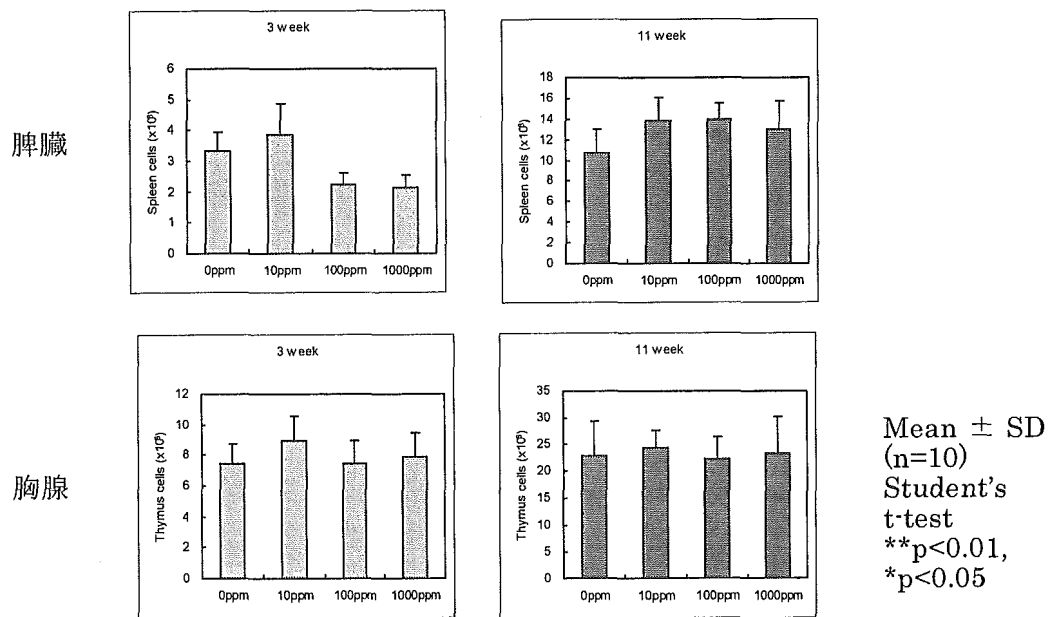


表5 Hematological changes in male rats exposed to DBDE during the fetus and neonatal period

| group            | $\times 10^2 / \mu\text{l}$ | $\times 10^4 / \mu\text{l}$ | g/dl         | %            | fL           | pg           | g/dL         | $\times 10^4 / \mu\text{l}$ |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------------------|
|                  | WBC                         | RBC                         | HGB          | HCT          | MCV          | MCH          | MCHC         | PLT                         |
| 3-week old rats  |                             |                             |              |              |              |              |              |                             |
| control          | 48.4 ± 10.5                 | 373.4 ± 24.1                | 6.78 ± 0.84  | 24.56 ± 2.17 | 65.79 ± 3.85 | 18.12 ± 1.37 | 27.53 ± 1.38 | 107.89 ± 12.52              |
| DBDE 10 ppm      | 50.3 ± 13.8                 | 377.7 ± 21.8                | 6.63 ± 0.52  | 24.63 ± 1.46 | 65.35 ± 4.66 | 17.60 ± 1.80 | 26.87 ± 0.89 | 113.05 ± 14.01              |
| DBDE 100 ppm     | 47.4 ± 8.4                  | 368.9 ± 33.7                | 6.27 ± 0.91  | 23.23 ± 2.69 | 63.09 ± 6.24 | 16.99 ± 2.21 | 26.89 ± 1.26 | 125.16 ± 20.95 *            |
| DBDE 1000 ppm    | 58.7 ± 19.1                 | 355.0 ± 30.1                | 6.21 ± 0.58  | 22.71 ± 1.86 | 64.25 ± 6.04 | 17.59 ± 2.08 | 27.32 ± 1.12 | 95.54 ± 30.32               |
| 11-week old rats |                             |                             |              |              |              |              |              |                             |
| control          | 84.3 ± 28.1                 | 697.8 ± 35.8                | 13.66 ± 0.69 | 43.56 ± 2.24 | 62.45 ± 1.87 | 19.58 ± 0.51 | 31.37 ± 0.55 | 96.46 ± 15.39               |
| DBDE 10 ppm      | 93.4 ± 23.0                 | 716.4 ± 34.5                | 13.75 ± 0.63 | 44.08 ± 1.78 | 61.56 ± 1.22 | 19.20 ± 0.42 | 31.20 ± 0.33 | 91.48 ± 12.27               |
| DBDE 100 ppm     | 107.6 ± 41.4                | 700.5 ± 36.4                | 13.63 ± 0.54 | 43.81 ± 2.27 | 62.58 ± 1.98 | 19.49 ± 0.84 | 31.12 ± 0.71 | 93.54 ± 10.29               |
| DBDE 1000 ppm    | 82.1 ± 13.7                 | 708.2 ± 26.7                | 13.61 ± 0.33 | 43.71 ± 1.31 | 61.74 ± 1.28 | 19.24 ± 0.49 | 31.14 ± 0.49 | 96.82 ± 7.04                |

\*\* <0.01, \* <0.05 (t-test) Values are mean ± SD of 10 rats. 11-weeks old rats were used.

表6 White blood cell classification in male rats exposed to DBDE during the fetus and neonatal period

| group            | n  | Lymp %       | Seg %        | Eosi %      | Mono %      | Band %      | Ebl n/100 WBC |
|------------------|----|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|---------------|
| 3-week old rats  |    |              |              |             |             |             |               |
| control          | 10 | 80.75 ± 5.20 | 16.66 ± 5.11 | 1.58 ± 1.59 | 0.51 ± 0.77 | 0.5 ± 1.58  | 0.15 ± 0.32   |
| DBDE 10 ppm      | 10 | 78.99 ± 4.94 | 18.64 ± 5.08 | 1.88 ± 2.62 | 0.49 ± 0.81 | 0 ± 0       | 0.68 ± 1.21   |
| DBDE 100 ppm     | 10 | 80.90 ± 8.56 | 15.68 ± 7.13 | 2.12 ± 2.47 | 1.30 ± 1.26 | 0 ± 0       | 1.14 ± 0.89 * |
| DBDE 1000 ppm    | 9  | 79.48 ± 5.96 | 17.78 ± 6.14 | 1.61 ± 1.11 | 1.07 ± 0.95 | 0.07 ± 0.02 | 0.53 ± 0.08   |
| 11-week old rats |    |              |              |             |             |             |               |
| control          | 10 | 79.83 ± 5.82 | 18.39 ± 5.74 | 1.12 ± 0.88 | 0.66 ± 0.54 | 0 ± 0       | 0 ± 0         |
| DBDE 10 ppm      | 10 | 84.29 ± 5.14 | 14.12 ± 5.60 | 1.03 ± 0.84 | 0.56 ± 0.51 | 0 ± 0       | 0 ± 0         |
| DBDE 100 ppm     | 10 | 80.32 ± 8.00 | 17.58 ± 7.65 | 1.18 ± 0.95 | 0.92 ± 0.69 | 0 ± 0       | 0 ± 0         |
| DBDE 1000 ppm    | 10 | 83.55 ± 3.71 | 14.64 ± 3.52 | 0.82 ± 0.52 | 0.99 ± 0.90 | 0 ± 0       | 0.53 ± 0.05   |

\*\* <0.01, \* <0.05 (t-test)

Values are mean ± SD.

表 7 Effects of DBDE on subpopulations of immune cells

| DBDE:             | Spleen 3w    |               |              | Spleen 11w    |              |              | Note                       |
|-------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|----------------------------|
|                   | 0ppm         | 10ppm         | 1000ppm      | 0ppm          | 10ppm        | 1000ppm      |                            |
| CD8a(-) CD4(+)    | 14.98 ± 2.43 | 12.25 ± 1.61* | 12.59 ± 3.08 | 27.99 ± 11.13 | 21.62 ± 3.01 | 23.33 ± 3.07 | 21.9 ± 3.66<br>CD4         |
| CD8a(+)<br>CD4(-) | 6.99 ± 1.49  | 5.28 ± 0.92*  | 6.91 ± 1.62  | 18.99 ± 3.73  | 18.02 ± 2.05 | 18.27 ± 3.29 | 17.74 ± 1.63<br>CD8        |
| CD3(+)<br>CD4(+)  | 6.28 ± 1.57  | 4.68 ± 0.86*  | 6.27 ± 2.53  | 20.26 ± 4.12  | 19.1 ± 3.13  | 20.94 ± 2.98 | 19.02 ± 3.92<br>CD4 T cell |

Activation of T/B cells

| DBDE:                | Spleen 3w     |               |              | Spleen 11w   |              |             | Note                         |
|----------------------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|-------------|------------------------------|
|                      | 0ppm          | 10ppm         | 100ppm       | 0ppm         | 10ppm        | 1000ppm     |                              |
| CD3(+)<br>CD71(+)    | 0.51 ± 0.1    | 0.47 ± 0.14   | 0.42 ± 0.13  | 0.36 ± 0.12  | 0.31 ± 0.09  | 0.39 ± 0.19 | 0.34 ± 0.13<br>active T cell |
| CD71(+)<br>CD45RA(+) | 3.92 ± 1.12   | 3.16 ± 0.73   | 2.69 ± 0.84* | 1.13 ± 0.41  | 1.09 ± 0.4   | 1.29 ± 0.46 | 1.15 ± 0.38<br>active B cell |
| CD3(-)<br>CD45RA(+)  | 50.67 ± 10.11 | 49.05 ± 7.13  | 51.82 ± 7.32 | 31.13 ± 5.79 | 34.46 ± 2.97 | 33.83 ± 7.5 | 36.62 ± 3.12*<br>B cell      |
| CD3(+)<br>CD45RA(-)  | 15.21 ± 3.65  | 11.88 ± 2.21* | 14.83 ± 4.41 | 50.35 ± 7.72 | 46.42 ± 4.09 | 49.51 ± 6.3 | 46.32 ± 4.11<br>T cell       |

T reg, NK, NKT(?) cells

| DBDE:                | Peripheral Blood 3w |              |               | Peripheral Blood 11w |              |              | Note                       |
|----------------------|---------------------|--------------|---------------|----------------------|--------------|--------------|----------------------------|
|                      | 0ppm                | 10ppm        | 100ppm        | 0ppm                 | 10ppm        | 1000ppm      |                            |
| NKRP1A(+)<br>CD25(+) | 0.28 ± 0.1          | 0.25 ± 0.06  | 0.26 ± 0.09   | 0.3 ± 0.16           | 0.38 ± 0.35  | 0.14 ± 0.08* | 0.13 ± 0.05**<br>CD25NK(?) |
| NKRP1A(+)<br>CD25(-) | 22.84 ± 4.27        | 17.37 ± 7.19 | 15.73 ± 5.29  | 22.4 ± 3.76          | 19.08 ± 5.03 | 20.35 ± 3.92 | 16.01 ± 1.73**<br>NK cell  |
| CD25(+)<br>CD4(+)    | 2.33 ± 0.66         | 2.58 ± 0.79  | 2.32 ± 0.74   | 3.11 ± 0.65          | 2.9 ± 0.6    | 2.44 ± 0.52* | 2.28 ± 0.52*<br>Treg       |
| NKRP1A(+)<br>CD4(+)  | 17.04 ± 3.84        | 12.14 ± 5.9  | 10.92 ± 4.62* | 9.95 ± 2.61          | 7.37 ± 2.59  | 7.86 ± 2.38  | 7.02 ± 1.38*<br>CD4NKT(?)  |
| NKRP1A(+)<br>CD4(-)  | 6.07 ± 1.37         | 5.48 ± 1.69  | 5.07 ± 1.21   | 12.75 ± 2.55         | 12.1 ± 3.03  | 12.62 ± 2.62 | 9.12 ± 0.85**<br>NK cell   |

Values are mean ± S.D. (%(gated)), n=10

\*,\*\* Significant difference from control at p<0.05, p<0.001

図 6

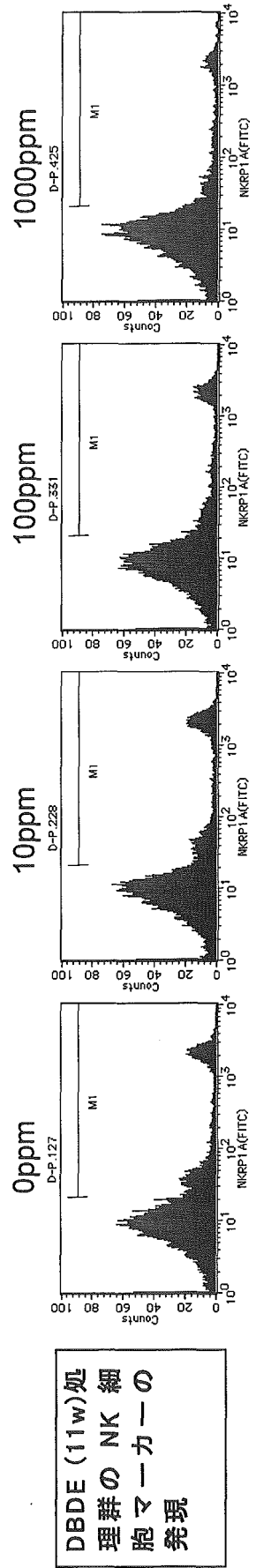
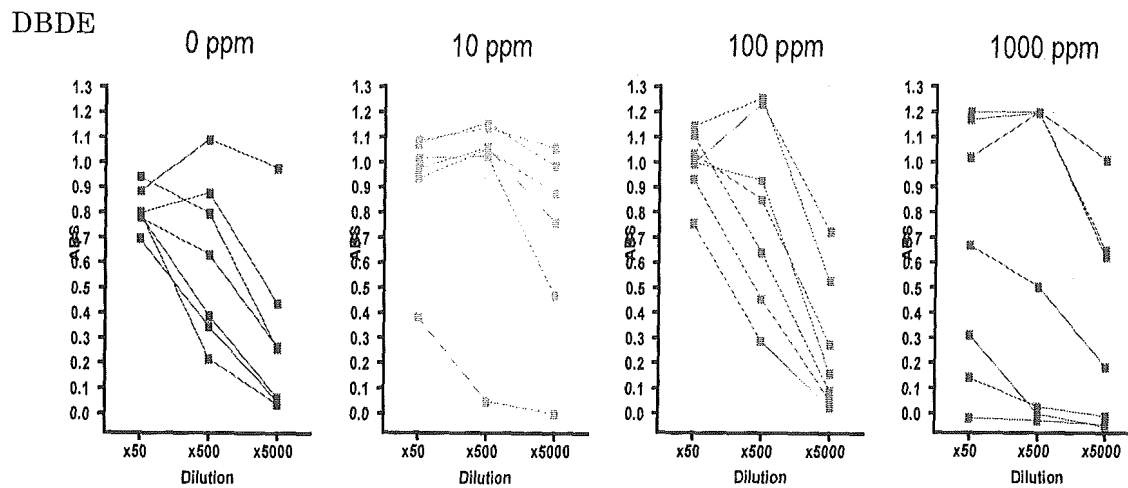


図7 DBDE 処理ラットの KLH に対する IgG 抗体産生への影響

(a) 各血清希釈における KLH-IgG 抗体の ELISA による測定



(b) DBDE 投与ラットの KLH-IgG 抗体価の分布

|         | DBDE (ppm) |    |     |      |
|---------|------------|----|-----|------|
| Titer   | 0          | 10 | 100 | 1000 |
| >5000   | 2          | 4  | 1   | 1    |
| 50-5000 | 5          | 1  | 6   | 3    |
| <50     | 0          | 1  | 0   | 3    |

(数字 匹数)

(c) 免疫方法

免疫原 25  $\mu$ g KLH with alum

免疫回数 3 回 (at PND 23, 33, 43)

投与方法 i.p.

血清分取 at PND50

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）

感染影響評価

分担研究者 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

**研究要旨：**難分解・高蓄積性化学物質に対応できる化学物質評価系のリスク評価系確立を目的として、臭素化難燃剤（BFRs）を例としたげっ歯類動物の周産期曝露による胎児・新生児影響を検討する班研究を実施しているが、本研究ではそのエンドポイントの一つである感染影響について、乳幼児ウイルス感染症モデルである Respiratory syncytial ウイルス（RS ウイルス）感染マウス実験モデルを用いてウイルス学的、免疫・生化学的手法により解析を実施している。今年度は陽性対照化合物である 6-プロピル 2-チオウラシル(PTU)を用いて評価系の構築を実施した。その結果、成体マウスでは高用量（1000 ppm）の PTU 曝露によって肺における RS ウイルス増殖が対照マウスと比較して盛んになる傾向が判明した。また血中の T4（thyroxin）レベルも低下しており、10 ppm PTU 曝露による甲状腺機能低下が確認できた。RS ウイルスの感染病態の進行は、従来の臨床および基礎的な検討を通じて、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が知られている。これらより、甲状腺機能低下と RS ウイルス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。さらに PTU の周産期曝露実験から、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- $\gamma$ レベルが PTU 曝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- $\gamma$ 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。以上より、BALF 中の IFN- $\gamma$ レベルが化学物質曝露による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。

**A. 研究目的**

難分解・高蓄積性化学物質に対応できる化学物質評価系のリスク評価系確立を目的として、臭素化難燃剤（BFRs）を例としたげっ歯類動物の周産期曝露による胎児・新生児影響を検討する班研究を実施しているが、本研究ではそのエンドポイントの一つである感染影響について、乳幼児ウイルス感染症モデルである Respiratory syncytial ウイルス（RS ウイルス）感染マウス実験モデルを用いてウイルス学的、免疫・生化学的手法により解析を実施している。今年度は陽性対照化合物である 6-プロピル 2-チオウラシル（PTU）を用いて評価系の構築を実施する。

**B. 研究方法**

成体マウスでの PTU 曝露実験：九動(株)より購入した BALB/c 雌性マウス 8 週齢（22-24 g）に 6-プロピル 2-チオウラシル（PTU; SIGMA P3755, Lot. 094K2502）を精製水に 0.1%（1000 ppm）の濃度で溶解して 6 週間自由摂水させた。対照群には精製水を用いた。餌は NIH 変型 Soybean free 食を用い、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 の周産期曝露実験：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週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より 4 日後（GD3）から餌を西川食に変更し、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：Respiratory syncytial virus (RSV) A2 株はヒト咽頭ガン Hep-2 細胞で増殖・取得した。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  $3 \times 10^5$  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：プラーク法により感染



価を測定した。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% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C 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°C 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°C, 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：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 (thyroxin) および BALF 中のサイトカインの定量：それぞれ Endocrine 社製の Rodent T4 ELISA キットおよび 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定量を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は九州保健福祉大学動物実験指針に則って実施した。

## C. 研究結果

成体マウスにおける PTU 曝露の感染影響：PTU

曝露の RS ウイルス感染病態への明確な影響を検証するために、研究班で設定した投与濃度の 83 倍に相当する 0.1%（1000 ppm）を 6 週間飲料水として成体マウスに投与し、その後に 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 曝露群では 11.8 ng/mL と 50% 以下に低下していた（表 1-A）。これらの PTU 曝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、肺組織中および 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 曝露マウスで対照群のマウスより高い傾向が認められた（表 1-B）。これらの結果より、PTU 曝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。さらに、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。

PTU の周産期曝露評価：研究班の統一プロトコールに則り、PTU（10 ppm）を親マウスの周産期（GD10 - PND21）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 曝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（表 2-A, B）。周産期における PTU 曝露が 10 ppm と成体マウスでの試験用量と比較して低く、かつ曝露期間も約 1/2 と短い為、甲状腺機能については明らかでないが、仔マウスにネガティブな影響を与えることが確認された。図-1 に PTU 曝露のウイルス感染価への影響を示した。本試験では、肺組織および BALF 中のウイルス感染価の PTU 曝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 曝露群と対照群との間に差は無かった（図-2）。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- $\gamma$  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- $\gamma$  は RS ウイルス感染により誘導され、感染 6 日後で

はPTU曝露群において有意に増加していた(図-3)。一方、IL-2、IL-4 および 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 曝露による顕著な変化は認められなかった(結果は示さず)。

#### D. 考察

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曝露の結果、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、周産期曝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(表 2-A)、ウイルス量の増加も見られなかった(図-1、2)。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、曝露期間も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- $\gamma$  レベルが PTU 曝露により有意に上昇していることが判明した(図-3)。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- $\gamma$  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- $\gamma$  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曝露による感染影響の評価において、BALF 中の IFN- $\gamma$  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。

#### E. 結論

難分解・高蓄積性化学物質の代表的な化合物である BFRs の周産期曝露による胎児・新生児への感染

影響評価系の確立を図る前段階として、陽性対照 6-プロピル 2-チオウラシル (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。さらに周産期曝露実験から、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- $\gamma$  レベルが化学物質曝露による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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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 and Hattori, M.: Antiviral activity of the marine alga *Symphyocladia 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. and 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. and Shiraki, K.: Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. J. Med. Microbiol., 54: 717-723, 2005.

## 2. 学会発表

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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許所得

European Patent Office: Date of Filing: 25.11.03; Title: Interleukin 6 production inhibitor; Priority: JP/24.02.03/JPA 2003045509.

### 2. 実用新案登録 なし

### 3. その他 なし

**表 1—A Effect of PTU treatment on RSV infection in adult mice**

| Treatment             | Toxicological sign        |                              |                           |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------|---------------------------|
|                       | Body weight change<br>(g) | Food consumption<br>(g/week) | Serum T4 level<br>(ng/mL) |
| Control<br>N=3        | 1.2 ± 1.5                 | 46.9 ± 4.7                   | 24.7 ± 4.3                |
| PTU (1000 ppm)<br>N=3 | -1.7 ± 2.3                | 37.2 ± 5.6                   | 11.8 ± 1.3                |

**表 1—B Effect of PTU treatment on RSV infection in adult mice**

| Treatment             | Pulmonary RSV titers        |                          |                                    |                                   |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
|                       | Infectivity<br>(PFU/g lung) | Viral RNA<br>(copies/μL) | Infectivity in<br>BALF<br>(PFU/mL) | IFN-γ level in<br>BALF<br>(pg/mL) |
| Control<br>N=3        | 2,630 ± 1,368               | 16,181 ± 4,479           | 139 ± 19                           | 1,144 ± 115                       |
| PTU (1000 ppm)<br>N=3 | 6,973 ± 7,325               | 46,681 ± 15,560          | 433 ± 335                          | 1,258 ± 528                       |