

2006380|3A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の確立と
その高度化に関する研究

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成19（2007）年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
胎児期	
関する研究 -----	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 脳発達のかく乱影響評価 -----	16
渋谷 淳	
(資料) 図 1-32、表 1-13	
2. 神経機能 -----	23
鈴木 勉	
(資料) 図 1-5	
3. 免疫機能影響評価 -----	26
手島玲子	
(資料) 図 1-2、表 1-6	
4. 感染影響評価 -----	31
黒川昌彦	
(資料) 図 1-4、表 1	
5. 幼若期暴露発がん性評価 -----	34
今井俊夫	
(資料) 図 1-4、表 1-4	
6. 各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究 ----	39
広瀬明彦	
(資料) 図 1-5、表 1	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	43
IV. 研究成果の刊行物 -----	44

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の確立とその高度化に関する研究
総括研究報告書(平成18年度)

主任研究者 渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨:この班研究では、既存の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、げっ歯類を用いた標準化可能な発達期暴露影響評価系の確立を目的として、臭素化難燃剤(BFRs)をモデルケースとした各種生後影響の用量反応性を定量評価する。BFRsによる発達期毒性には甲状腺機能低下の関与が示唆されるため、抗甲状腺剤を比較モデルとした評価系を確立する。BFRsは本邦で使用頻度の高いデカブロモジフェニルエーテル(DBDE)、ヘキサブロモシクロデカン(HBCD)、テトラブロモビスフェノール A(TBBPA)を選択した。

まず神経発達かく乱影響評価では、17年度より抗甲状腺剤を用いたラット評価系の確立を図り、18年度はニューロンの移動に関する不可逆的影響の定量評価法を確立した。またDBDEでは成熟後のニューロンに影響のないことを明らかにし、新たにHBCD、TBBPAの暴露実験(共に0, 100, 1000, 10,000 ppm 混餌)を行った結果、HBCDでは、高用量で児動物に軽度の甲状腺機能低下と共に脳での白質形成の低下を10,000 ppmで検出した。一方、TBBPAでは、投与終了時のみに中・低用量での弱い甲状腺機能低下を認めただものの、脳白質影響は認めなかった。更に、脳内での発達期脳障害指標探索として、抗甲状腺剤及びDBDEの暴露児動物(雄)の離乳時での白質及び海馬CA1領域特異的なマイクロアレイ解析を行い、多くの神経発達関連分子の発現変動を同定した。

神経機能・行動影響評価では、ラットを用いた評価系の確立を図り、18年度はHBCDを評価したところ、一般行動観察、不安感受性及び覚せい剤メタンフェタミンに対する感受性、側坐核におけるドーパミン遊離量に影響は認めなかった。尚、前年度見出したDBDEによる側坐核ドーパミン遊離量の低下について用量反応性を検討したところ、用量に関連せず一様に低下を示した。

免疫機能影響評価では、ラットを用い18年度はHBCDの影響を検討し、最高用量(10,000 ppm)で離乳時の脾臓でNK細胞の減少、末梢血の活性化T細胞の減少、非活性化B細胞の増加が見出された。成熟後では、リンパ球がピュレーションに変化は観察されなかった。一方、最高用量で投与終了後のKLHに対するIgG抗体産生の抑制が見られ、免疫担当細胞への影響が示唆された。

感染影響評価では、RSウイルス・マウス感染モデルを用い、18年度はDBDE及びHBCDの周産期暴露による評価を実施し、DBDEでは肺組織中のウイルス感染価の暴露量に応じた上昇と感染病態の悪化が見出された。また、肺洗浄液中のIFN- γ の上昇、肺組織RANTES mRNA量の高値も認めた。一方、1000 ppmのみの検索であるが、HBCD暴露による影響は全く認められなかった。

発がん性評価に関しては、ラットを用いて多臓器発がん性検出モデルの確立を図り、18年度は17年度開始したDBDEについて、4用量(10, 100, 2500及び25,000 ppm)での腫瘍発生状況を検討した結果、25,000 ppmで雌の甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌と雌雄の腎間葉性腫瘍が減少した。現在、HBCD(0, 100, 1000, 10,000 ppm 混餌)とPTU(6 ppm 飲水)について暴露実験を継続中である。

もう一つの課題として、国際的調和に基づいた化学物質リスク評価法の確立を目的として、評価事例の情報解析を行って一般化し得る評価方針を策定し、本研究で得られるBFRsの影響評価に適用してその高度化を図る。18年度は、17年の調査に加えてATSDR, JMPRの評価文書における耐容摂取量の設定方法や、不確実係数の配分に関する情報追加を行った。その結果、約770の評価事例のうち、約440で、種差・個体差以外の係数適用が明らかとなった。その理由の90%以上は、LOAELや短期試験結果の採択、または評価試験データ不足によるものであった。

渋谷 淳
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

鈴木 勉
星薬科大学薬品毒性学 教授

手島 玲子
国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長

黒川昌彦
九州保健福祉大学 薬学部薬学科
生化学第二講座 教授

今井俊夫
国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

広瀬明彦
国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室
主任研究官

A. 研究目的

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

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

本班研究で検討するエンドポイントは、神経発達、神経機能・行動、免疫機能、感染、発がんとし、3ないし4用量を設定して、発達期での化学物質暴露によって生じるこれらの影響について、定量・定性的評価系の確立を図ることを目的としている。そのためには、暴露と関連して発達過程に生じる不可逆的影響の普遍的パラメーターを開発、あるいは導入し、各パラメーターに対する反応性を検討する必要がある。まず神経発達かく乱影響評価では、ラットを用いて既に確立してある性分化評価の他、投与終了時での灰白質・白質特異的なマイクロアレイ解析を行い、化学物質に固有或いは共通する神経障害の標的遺伝子を同定し、各 BFR 投与例での発現解析に利用する。成熟後では、灰白質や白質構成

分の密度を測定し、不可逆影響の評価系を確立する。神経機能・行動影響評価では、ラットを用いて成熟後の一般行動や不安関連行動、中枢性薬物に対する反応性を検討し、出現する異常行動に関連する脳部位での *in vivo* microdialysis 法によるモノアミン評価系を確立する。免疫機能影響評価は、暴露終了時及び成熟後でのラットの胸腺、脾臓の病理評価とリンパ球の各種サブポピュレーションやNK細胞の割合の解析による評価系を確立する。感染影響評価は、RSウイルス・マウス感染モデルを作製し、暴露直後と成熟後の肺組織中のウイルス感染価・分布状態、各種サイトカインレベルの解析や、病理検索による評価系を確立する。発がん性評価に関しては、ラットを用い、幼若期暴露終了後、肝臓、腎臓、肺、乳腺、甲状腺を標的とした発がん物質処置を行い、40週目での腫瘍の発生状況を検討して多臓器発がん性検出モデルの確立を図る。以上の各影響の解析において、物質固有或いはPTUと共通する毒性影響を弁別して評価する。最終的には、後述する本班研究のもう一つの分担課題である「各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究」の結果導き出される、合理性の高い数理モデルに適用して、発達期暴露影響のリスクレベルを算出、提示する。本研究で検討する BFRs は、本邦で主に使用されているデカブプロモディフェニルエーテル(DBDE)、1,2,5,6,9,10-ヘキサブプロモシクロドデカン(HBCD)、テトラブプロモビスフェノール A (TBBPA)を解析対象とする。17年度はまず、発がんを除く各エンドポイントにおいては、抗甲状腺剤であるプロピルチオウラシル (PTU)等を甲状腺機能低下に起因する各種発達障害の陽性比較対照とした評価系を確立し、次いで BFRs のうち DBDE を対象とした評価系の確立に努めた。18年度は、HBCD あるいは更に19年度解析予定の TBBPA を用いた評価系の確立に努めた。発がん性のエンドポイントにおいては、17年度に DBDE について検討した後、18年度に PTU と HBCD についての検討を開始した。

一方、化学物質リスク評価・管理の実際面での規制・基準値の算出方法に関しては、各国で様でないのが現状である。特に神経毒性や免疫毒性、発がん性について、一般化し得る評価方針を策定することは重要であり、それにより、本邦におけるリスク管理遂行にあたっての国際的に通用しうる指針を与えられる。そこで本研究のもう一つの分担課題である「各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究」では、国際的調和に基づいた化学物質リスク評価法の確立を目的として、評価事例の情報解析を行って一般化し得る評価方針を策定する。次いで、本研究で得られる BFRs の影響評価に適用してその高度化を図る。17年度に引き続き18年度は、欧米や国際機関において、耐容(許容)摂取量評価や水質基準設定がなされている物質について、クリティカルエンドポイントの種

類, 不確実性係数の配分, 各種数理モデルの適用状況の情報収集を行い, これらのデータベース化のための必須項目やデータ形式を決定した。

B. 研究方法

①脳発達のかく乱影響評価:

<BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立>

発達期化学物質暴露モデルとして, 被験物質を飼料に混じて母動物に摂取させることにより, 妊娠 10 日目から離乳時(生後 21 日目)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し, 投与終了時と 11 週目に解剖を行った。使用した動物は妊娠 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。即ち, 昨年度行った予備試験結果を基に, HBCD は各群 10 匹, TBBPA は各群 8 匹の母動物を用いて 100, 1000, 10,000 ppm の用量設定で本実験を行った。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児動物を飼育した。妊娠・授乳期の母動物について体重と摂餌量を測定し, 児動物については, 生後 2 日目に出生児数, 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, 児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, 児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, 膻開口)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, 最終解剖の 3 週間より膻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 日目の解剖時には, 肝, 腎, 脳, 甲状腺, 下垂体, 副腎, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 精嚢(+凝固腺), 卵巣, 子宮, 乳腺を採材し, 乳腺, 甲状腺, 下垂体, 前立腺, 精嚢(+凝固腺)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 匹の雄性児動物について, 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), 甲状腺, 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) 染色標本作製して病理組織学的検索を行った(HBCD 試験, TBBPA 試験については未実施)。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重量測定, 病理組織学的検索を実施し, 子宮の着床痕数を確認した。更に, 生後 21 日目, 11 週目の小脳, 脳幹, 肝臓, 腎臓, 脂肪について, 各臓器に

おける BFRs の蓄積量の検討を LC/MS/MS 法等を用いて開始した。

また, 生後 11 週目の脳を用い, 大脳の Bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製してパラフィン包埋し, その前後の対称面(2 切面)が薄切面となるようにして 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), DAB 発色による免疫染色を行った。CNPase については, 抗原賦活化として脱パラフィンした切片について 0.01M citrate buffer (pH6.0)中でマイクロウェーブ処理 (90°C, 10 min)を行った。白質構成成分の測定に関しては, まず脳梁 (Corpus callosum: CC) の面積として, CNPase 染色切片を用いて, 一頭体につき大脳の 2 つの冠状断面での面積を測定した。即ち, 左右の大脳半球をまたぎ, cingulum と dorsal hippocampal commissure に挟まれた CC 領域のうち, 上縁(外側縁)が頭頂部に最も近いところで区切った面積の和を求めた。次に, 大脳皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの単位面積(mm²)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 割面の左右の平均値を求めた。また, 海馬 CA1 領域でのニューロン分布の検討では, NeuN 染色切片を用いて 200 倍の顕微鏡視野で左右 1 箇所 CA1 領域(海馬台の頭側)を観察対象とし, 錐体細胞層外に存在するニューロン数及びその割合, 全ニューロンのベースラインからの平均距離を求めた。

<発達期脳障害指標探索>

発達期の甲状腺機能低下によるニューロンの 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についての高感度指標を探索するため, 昨年度動物実験を行った抗甲状腺剤試験 (PTU: 3, 12 ppm; MMI: 200 ppm 飲水), DBDE 試験 (10, 100, 1000 ppm 混餌)それぞれについて投与終了時(離乳時: 生後 21 日目)の脳を用い, 海馬 CA1 領域, 白質領域(脳梁及び左右大脳白質)での部位特異的な遺伝子発現プロファイルを求めて, 甲状腺機能低下及び DBDE 暴露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した(昨年度報告した抗甲状腺剤試験での海馬 CA1 のプロファイルは発現データのばらつきが大きかったため, 今年度, 動物実験を再度行い, 解析した。

白質のプロファイルも新たな動物実験材料を用いて得た)。PTU, MMI 試験, DBDE 試験の 21 日目の脳を用い、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パラフィン包埋して、20 μ m 厚の切片を 40 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 と白質を各群 4 個体ずつ採取した。その後、それぞれの CA1、白質のサンプルから RNAqueous-Micro (Ambion) にて total RNA 抽出を行い、RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて回収量を測定した。100 ng の total RNA をマイクロアレイ解析用サンプルとし、MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion) を用いて 2 回増幅後、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、各被験物質投与群で無処置動物に比較して 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、抗甲状腺剤暴露試験については、MMI, 3 ppm PTU, 12 ppm PTU の 3 群に共通して変動した遺伝子、PTU の用量に関連して変動した遺伝子を選別した。DBDE 試験については、全ての用量で共通して変動した遺伝子及び 100, 1000 ppm 暴露に共通して変動した遺伝子を選別した。

②神経機能・行動影響評価:

全ての投与実験には SD 系の妊娠ラットを用い、前述の「①脳発達のかく乱影響評価」の実験プロトコールに従い、HBCD の 0, 100, 1000, 10,000 ppm の混餌投与を妊娠 10 日目から離乳時(生後 21 日目)まで行った。

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

不安感受性の検討は高架式十字迷路試験に従った。

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

脳内モノアミン濃度の測定は *in vivo* microdialysis 法に従い、脳内報酬系に関与する mesolimbic ドパミン神

経の投射先である側坐核におけるドパミンとその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び homovanillic acid (HVA) の細胞外遊離量を測定した。

③免疫機能影響評価:

動物は「①脳発達のかく乱影響評価」で実験に供した HBCD 暴露試験のものを用い、3 週目(離乳時)、11 週目(成熟時)において以下の解析を行った。

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

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

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

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

非特異的免疫として、脾臓、末梢血中の NK 細胞数の割合をフローサイトメトリーで解析した。抗体は、FITC 標識抗 NKR P1A 抗体を用いた。

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

④感染影響評価:

BFRsの周産期暴露実験では、九動(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一週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より4日後(GD3)から餌をNIH変型SF飼料に変更し、11日後(GD10)からSF飼料でDBDE(10,100,1000ppm)及びHBCD(1000ppm)を混餌投与した。飲料水は精製水を用い、餌・飲料水共に自由摂取させた。出産後21日目(PND21)に離乳を行い、餌を通常食CRF-1に切り替えて通常飼育を行った。尚、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

ウイルス感染実験において、respiratory syncytial ウイルス(RSウイルス)A2株はヒト咽頭癌HEp-2細胞で増殖・取得した。4週齢の仔マウスにキシラジン・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RSウイルス 3×10^5 PFUを経鼻感染させた。感染実験対照マウスには2%ウシ胎児血清(FCS)含有MEM培地(維持培地)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°C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(-)0.8-1.0mLを注入し、肺洗浄液(BALF)を取得した。BALFは使用時まで-80°Cに保管した。その後に肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

RSウイルス感染価はプラーク法により測定した。即ち、-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た。その際に、ホモジネートを一部分取した。残りのホモジネートの遠心上清(1800g,4°C,15分間)を維持培地で連続希釈し、24穴マルチプレート中で予め単層培養しておいたHEp-2細胞にそれぞれ各穴0.2mLずつ添加した。これらのプレートを5%CO₂存在下、37°Cで1時間インキュベート後、各穴を1.0mL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(PFU/mL)を算出した。

血清中T4(thyroxin)及びBALF中のIFN- γ の定量に関しては、それぞれEndocrine社製のRodent T4 ELISAキット及びeBioscience社製のMouse IFN- γ 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。

RANTES mRNAの定量を目的として、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oligo-dTプライマー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システムを用いて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コピー数を計測した。

RANTESについてはハイブプローブキット(No. 410827; 日本遺伝子研究所)を用いて添付のプロトコールに準じて定量を行った。ハウスキーピング遺伝子 β アクチンのcDNA量をSYBR Green I法で定量し(Forward primer; nt. 728-752, Reverse primer; nt. 1052-1076), 10,000コピー当たりのRANTES cDNAコピー数をデータとした。尚、 β アクチンスタンダードサンプルには、この塩基配列情報(nt.728-1076)を導入したプラスミドpSACT-1を用いた。

⑤幼若期暴露発がん性評価:

まずDBDEを用いた評価系の確立に関しては、妊娠F344ラット25匹を日本チャールズリバーより購入し、各群5匹の5群に分けた。出生後の児動物は、各群雌雄各20例に揃えた。各群の母動物には、出産直後より3週後の離乳まで、DBDEを0(対照), 10, 100, 2500及び25,000ppm濃度でSF飼料(NIH変型, オリエンタル酵母工業)に混じて自由摂取させた。離乳後、母動物はエーテル麻酔下で屠殺し、肝、腎及び甲状腺重量を測定後、常法に従ってパラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。離乳後の各群の児動物にはDBDEを母動物と同様の方法及び用量で2週間投与した。最高投与量の25,000ppmは、ラットの長期試験における発がん用量であり(NTP, 1986), 低用量の10あるいは100ppmは、主任研究者らが実施したSD(IGS)ラットを用いた実験で妊娠10日から離乳時まで投与した際に、甲状腺濾胞上皮細胞のびまん性過形成の認められた用量である。DBDE投与終了1週間より、児動物は基礎飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業)で飼育した。発がん物質処置として生後6~10週の4週間、肝、腎、肺、甲状腺など多臓器に発がん標的性を示すN-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN)を雄には0.08%, 雌には0.2%濃度で飲水に混じて投与し、更に生後7週時の雌には50mg/kg体重の7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)を1回強制経口投与した。実験期間中、体重及び摂餌量を週1回測定した。DHPN投与期間中は摂水量を週1回測定した。また生後14週目より週1回、触診により乳腺腫瘍の発生状況を観察してノギスにてその大きさ(タテ×ヨコ×高さ)を測定した。雄については生後40週、雌は46週時点でエーテル深麻酔下にて放血屠殺し、剖検においては剥皮後、皮下結節/腫瘍を詳細に観察して大きさを、肝、腎、甲状腺については摘出後重量を測定した。更に肺、食道、膀胱、乳腺、卵巣あるいは精巣、及び肉眼的異常部位を摘出し、常法に従って組織標本を作製、病理学的検索を行っている。尚、触診及び剖検時に測定した腫瘍(腫瘍)の大きさより、次の式により体積を計算した。

$$\text{体積}=(\text{タテ}) \times (\text{ヨコ}) \times (\text{高さ}) \times \pi / 6$$

次に、HBCD に関しては、DBDE を用いた検討と同じ方法により、0(対照)、100、1000 及び 10,000 ppm 濃度で混餌投与し、PTU に関しては 6 ppm 濃度で飲水投与する実験を開始した。

⑥各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究:

18 年度は 17 年度の米国 EPA の IRIS と、WHO の水質ガイドライン第 3 版に引き続き、米国の ATSDR、WHO/JMPR の Monograph における耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分に関する情報について、情報収集整理を行った。ATSDR については、該当する化合物リストを示した WEB ページ (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxpro2.html>) より、WHO/JMPR の評価文書については、200X 年までの ADI 設定値が示されている WEB ページ (<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpeval/jmpr2002.htm>) より、評価の基となった評価文書を INCHEM データベース (<http://www.inchem.org>) より評価文書を抽出し収集作業を行った。各々の文書の有害性評価にあたる部分より、NOAEL または LOAEL とその設定根拠となった毒性とその臓器、更に個人差、種差の不確実係数及びその他の不確実性因子とその理由、評価の結果得られた耐用摂取量について、化合物毎に情報を収集・整理した。

(倫理面への配慮)

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

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

C. 研究結果

①脳発達のかく乱影響評価:

<BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立>

抗甲状腺剤暴露試験:

PTU、MMI 発達期暴露(飲水)例の生後 11 週目の脳を用い、昨年度実施した発達期甲状腺機能低下に起因する白質影響の検討に続き、ニューロンの migration に与える影響を定量的に検討するため、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海馬 CA1 領域における形態計測を実施した。その結果、3、12 ppm での用量依存性は認められないものの、錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離が PTU 投与により増加し、同様のニ

ューロン分布のばらつきが 200 ppm MMI 投与によっても認められた。

DBDE 試験:

また、PTU、MMI 発達期暴露例と同様に、DBDE 試験の生後 11 週目の脳を用い、海馬 CA1 領域における錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離を形態計測したが、DBDE 暴露に起因する変動は認められなかった。これらの動物について、生後 21 日目、11 週目に採取した各臓器について病理組織学的検索を行ったところ、生後 21 日目では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雌雄共に 10 ppm 以上で認められ、雄の 1000 ppm で発生頻度・強度共に増加した。その他の所見としては、肝臓で慢性肝細胞肥大の発生頻度・強度が雄の 10 ppm 以上、雌の 1000 ppm で増加し、腎臓で皮質近位尿細管上皮の細胞質の好酸性増加の発生頻度・強度が雄の 100 ppm 以上、雌の 10 ppm 以上で増加した。生後 11 週目では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雄の 10 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上で認められたが、いずれも対照群と比較して有意な増加ではなく用量との関連性もなかった。その他、雌雄全動物に肝臓で微小肉芽腫が認められた他、雄の全群で乳腺に慢性小葉萎縮、雌の 10 ないし 1000 ppm の少数例で子宮腔水腫が認められたが、いずれも対照群と比較して有意な増加ではなかった。

HBCD 試験:

次に、HBCD について、抗甲状腺剤暴露試験、DBDE 試験と同様のプロトコールで 100、1000、10,000 ppm の 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、児動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差は認められなかった。この期間での母動物の体重増加量にも群間での差は認められなかったが、暴露終了時での母動物の甲状腺相対重量の増加が 10,000 ppm で認められた。出産及び出生児のパラメーターとして、着床痕数、出生児数、雄の割合、生後 2 日目の体重と AGD には群間で差は認められなかった。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、雌雄ともに肝臓相対重量が 10,000 ppm で増加し、雌では 100 ppm で腎臓相対重量が減少した。他の臓器重量には明らかな変動は認められなかった。暴露終了後での体重の推移については、雄の児動物で 10,000 ppm 暴露により、9、11 週後を除いた観察期間を通じて低い値を推移した。雌でも同様の傾向が認められ、5、10 週後では低値が認められた。暴露終了後の摂餌量については、雌の児動物が 10,000 ppm 暴露で 4 週齢時に低い値を認めた以外は、雌雄ともに観察期間を通じて明らかな変化は認められなかった。

離乳後は、雌雄とも春期発動の時期に投与による影

響は認められず、雌においても性周期の異常所見は認められなかった。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時では、10,000 ppm 群で T3 の軽度の低値、TSH の軽度の高値が認められ、生後 11 週目では 1000, 10,000 ppm 群で T3 の軽度の低値が認められた。

生後 11 週目の解剖例では雄の 100 ppm 群で肝臓相対重量の増加、精巢上体相対重量の減少が認められ、1000, 10,000 ppm 群においては甲状腺相対重量の増加が認められた。

HBCD 試験において、生後 11 週目の脳での白質領域の形態計測を行ったところ、CC 領域の面積に変化は認めないものの、大脳頭頂部皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイト数の減少が 10,000 ppm 群で認められた。

TBBPA 試験:

TBBPA についても 100, 1000, 10,000 ppm の 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、児動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差は認められなかった。この期間での母動物の体重増加量については、生後 10 日目から離乳時の間で 10,000 ppm 群において増加が認められた。暴露終了時での母動物の体重、甲状腺重量は群間で変化が認められず、着床痕数、出生児数、雄の割合、生後 2 日目の体重、AGD においても群間で差は認められなかった。暴露終了時での解剖においては、採取したいずれの臓器についても雌雄ともに重量変化は認められなかった。

離乳後は、雌雄ともに体重、春期発動の時期について TBBPA 投与による変化は認められず、雌における摂餌量の変化、性周期の異常所見も認められなかったが、雄の摂餌量の推移において 1000, 10,000 ppm で有意ではないものの低値を示した。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時に 100, 1000 ppm 群で T3 の弱い低値が認められたが、10,000 ppm では変化が認められなかった。また、生後 11 週目では投与による変化は認められなかった。

生後 11 週目の解剖例では雄の臓器重量変化は認められなかったが、雌の 1000 ppm 群で腎臓相対重量の減少、10,000 ppm 群で子宮相対重量の減少が認められた。しかし、いずれにおいても絶対重量に変動はないことから、やや増加傾向であった体重の影響であると考えられた。

生後 21 日目、11 週目の小脳、脳幹、肝臓、腎臓、脂肪における TBBPA の蓄積量を検討したところ、生後 21 日目では、脳幹を除き、投与量依存的な蓄積性が確認されたが、脳幹では 1000 ppm 群が最も高い TBBPA の蓄積量を示した。生後 11 週目の各臓器では、TBBPA は検出されず、蓄積量は検出限度である 0.02 pg/mg

tissue 以下であることが確認された。

TBBPA 試験の生後 11 週目での脳を用い、白質領域の形態計測を行ったところ、CC 領域の面積には有意な変動は認められなかった。大脳頭頂部皮質に存在する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの数も有意な変動は認められなかったが、100, 1000 ppm で低値傾向が認められた。

<発達期脳障害指標探索>

前年度実施した抗甲状腺剤暴露試験の暴露終了時での雄性児動物を用いて白質及び海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、白質において、3 ppm PTU, 12 ppm PTU, 200 ppm MMI の全群に共通して発現増加した遺伝子は 428 個、減少した遺伝子は 58 個であった。発現増加・減少した遺伝子のうち約 1 割が神経関連分子であり、その殆んどが神経発達に関連する分子であった。海馬では、3 ppm PTU, 12 ppm PTU, 200 ppm MMI の全群で共通して発現増加した遺伝子は 119 個、減少した遺伝子は 97 個であった。海馬において発現変動を示した遺伝子に関しても、神経発達に関連する分子が多く認められた。

引き続き、DBDE 試験での暴露終了時での雄性児動物の白質及び海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、白質において全ての用量に共通して発現増加した遺伝子は 129 個、減少した遺伝子は 16 個であった。発現減少した遺伝子で神経関連の分子は認められなかったが、発現増加した遺伝子では約 1 割が神経関連分子であり、その半数が神経発達に関連する分子であった。海馬では、DBDE の全ての用量に共通して発現増加した遺伝子は 133 個、減少した遺伝子は 80 個であった。海馬において発現変動を示した遺伝子でも、約 1 割が神経発達に関連する分子であった。

抗甲状腺剤暴露試験、DBDE 試験のマイクロアレイ結果をまとめたところ、白質での発現増加遺伝子は、「DBDE 3 用量で共通して発現増加した遺伝子」、「DBDE 100, 1000 ppm で共通して発現増加した遺伝子」いずれにおいても、約 1 割が「抗甲状腺剤投与 3 群で共通して発現増加した遺伝子」と共通しており、約 5% が「PTU 暴露の 2 群のみに共通して発現増加した遺伝子」と共通していた。一方、白質で発現減少した遺伝子については、抗甲状腺剤暴露と DBDE 暴露で共通した分子は殆んど認められなかった。海馬では、発現増加・減少いずれにおいても、「DBDE 3 用量で共通して発現増加した遺伝子」、「DBDE 100, 1000 ppm で共通して発現増加した遺伝子」と「抗甲状腺剤投与 3 群で共通して発現増加した遺伝子」、「PTU 暴露の 2 群のみに共通して発現増加した遺伝子」の組み合わせで共通して変動している遺伝子数は 5% 以下であり、殆んど共通性が見出せなかった。

②神経機能・行動影響評価:

HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露による一般成長に及ぼす影響を、出生時、離乳時 (3 週齢) 及び行動実験開始時 (7 週齢) の体重を指標として検討した。その結果、HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露による体重変動は認められなかった。

一般行動観察の結果、HBCD の慢性暴露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの暴露動物において、その他の特筆すべき異常行動は観察されなかった。

高架式十字迷路法に従い、HBCD 慢性暴露による不安感受性の変化について検討したところ、雌雄共に変化は認められなかった。

条件づけ場所嗜好性試験に従い、メタンフェタミン誘発報酬効果に及ぼす HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露の影響を検討した。その結果、HBCD 慢性暴露はメタンフェタミン誘発報酬効果に何ら影響を及ぼさなかった。

側坐核におけるドーパミン及びその主要代謝物の遊離量を、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、HBCD の慢性暴露により、側坐核におけるドーパミン基礎遊離量及びメタンフェタミン誘発ドーパミン遊離量、更に、代謝物である DOPAC 及び HVA の細胞外遊離量に変化は認められなかった。

前年度の被検物質である DBDE の胎児期及び授乳期慢性暴露による側坐核ドーパミン遊離量に及ぼす影響について用量反応性を検討したところ、一様にドーパミン遊離量の低下が認められたものの、用量反応性は認められなかった。

③免疫機能影響評価:

HBCD の免疫担当細胞への影響としてまず、3 週齢時、11 週齢時共に、HBCD 100, 1000, 10,000 ppm 投与群で対照群と比較して、体重、脾臓、胸腺重量に有意な差はみられなかった。また、HBCD 投与ラットの脾臓、胸腺細胞の白血球数についても明らかな差はみられなかった。尚、肝臓重量は、1,000, 10,000ppm 投与群の 3 週齢時において増加したが、11 週齢時においては差は認められなかった。

3 週齢ラットと 11 週齢ラットの血液学的検査を行なった結果、末梢血白血球数、白血球百分比ともに、3 週齢、11 週齢時ラットにおいて、対照と比べて変化はみられなかった。尚、3 週齢で赤血球容積、11 週齢時で色素濃度の用量依存的な上昇が観察され、また 3 週齢で有核赤血球(EbI)のわずかな上昇が見られた。

次いで、フローサイトメトリーによるリンパ球ポピュレーションの解析では、HBCD 投与群と対照群との間に、昨年度の陽性対照として用いた抗甲状腺剤である PTU、MMI 投与の時に見られたような 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。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、HBCD 100 ppm, 10,000 ppm 暴露 11 週齢時で、CD8+ T 細胞の上昇が認められた。また、末梢血における活性化 T 細胞の割合の低下、並びに非活性化 B 細胞の割合の上昇が、3 週齢時の 10,000 ppm 群で見られた。更に、NK 細胞については、脾臓における NKRP1A (NK 受容体)陽性細胞の割合の減少が、3 週齢時の 10,000 ppm 群で観察された。

HBCD 投与による血液生化学的検査の結果、3 週齢時において、甲状腺ホルモン T3 の減少が、10,000 ppm でみられ、TSH の上昇も観察された。11 週齢時においても T3 の低下が 1,000, 10,000 ppm で見られた。また、血清のアルブミン値の上昇が、11 週齢時の 10,000 ppm において観察された。

次に、DBDE 投与ラットの KLH に対する抗体産生への影響について、2 回 KLH で免疫したラットから得た血清(at PND40)を、500, 5,000, 50,000, 500,000 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。KLH 特異的 IgG 抗体価と HBCD の用量依存性を調べた結果、HBCD の濃度が上昇するにつれ、抗体価の減少する傾向が得られ、HBCD 10,000 ppm 投与群で抗体価の減少が観察された。

④感染影響評価:

DBDE の感染影響評価:

DBDE 周産期暴露の動物個体への影響を検討するため、離乳時における親マウス及び仔マウスの体重比較、並びに親マウスの DBDE 暴露期間中の摂餌量を探索したところ、親マウスでは DBDE 暴露量に関わらず平均体重及び摂餌量に対照群との差が認められなかった。一方、仔マウスでは、1000 ppm 暴露群で体重の増加抑制が見られた。尚、DBDE 暴露による血清中の T4 レベルの変化を検討したが、対照群における値の変動幅が大きく、判定が出来なかった。RS ウイルス感染仔マウスにおいて、肺組織中の RS ウイルス感染価が暴露量に依存して上昇し、1000 ppm では陽性対照シクロフォスファミド(CY)前投与群での感染価の約 70 %に該当した。更に RS ウイルス感染病態の指標の 1 つである IFN- γ レベルが、1000 ppm 暴露群の BALF 中で上昇していた。RS ウイルス感染による下気道炎において、様々なケモカインの誘導が知られている。その 1 つである RANTES の肺組織における mRNA 量を定量した。その結果、暴露量依存性は認められなかったが、DBDE 暴露群では何れも対照と比較して二倍程度 mRNA 量が高く、RANTES の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった。これらの結果より、DBDE 暴露により、RS ウイルス感染病態が悪化することが強く示唆された。特に肺ウイルス感染価は用量反応性が高く、感染影響の指標と

して有用であることが明らかとなった。

HBCD の感染影響評価:

DBDEと同様のプロトコールで、HBCDの感染影響を評価した。本試験では、暴露用量設定のための予備試験的な目的で1000 ppm 暴露のみを実施した。HBCD 1000 ppm 暴露では、親マウス及び仔マウスの体重は対照群と比較して差が認められず、親マウスの摂餌量についても対照群と差がなかった。また、血清中のT4レベルもHBCD 暴露群と対照群の間に差が認められなかった。仔マウスにRSウイルス感染させ、5日後の肺組織中のウイルス感染価及びBALF中のIFN- γ レベルを評価した。その結果、HBCD 暴露群ではウイルス感染価及びIFN- γ レベルにおいて対照群との差が認められなかった。

⑤幼若期暴露発がん性評価:

DBDE の発がん性評価:

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態及び体重にDBDE投与による明らかな影響は認められなかった。対照群の1例については、育児不良により全児動物が死亡したため、評価より除外した。剖検時の肝重量は、2500及び25,000 ppm群で対照群に比して増加傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。腎及び甲状腺重量にDBDE投与による影響はみられなかった。肝、腎及び甲状腺の病理組織学的検索では、対照群を含む各群に著明な変化は認められなかった。

児動物にDBDE投与によると考えられる死亡例はみられなかったが、出生後の保育不良あるいはDMBA投与時の投与過誤により、有効匹数は0(対照)、10、100、2500及び25,000 ppm群の雄では16、20、20、20、20匹、雌では15、18、17、20、19匹となった。生存率、一般状態、体重、摂餌量及びDHPN投与期間中の摂水量については、DBDE投与による影響は認められなかった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察においても結節/腫瘍の発生状況に群間の明らかな違いは認められなかったが、病理組織学的診断結果を考慮した最終評価を要する。剖検時の臓器重量に関しては、雄の2500及び25,000 ppm群と雌の25,000 ppm群において腎重量が対照群と比して低値を示したが、肝及び甲状腺重量には群間の明らかな違いはみられなかった。病理組織学的評価は、肝、腎、甲状腺及び食道について終了した。腎間葉性腫瘍の発生頻度が雌雄の25,000 ppm群で、発生数が雄の25,000 ppm群で減少した。腎芽腫については群間の差は認められなかった。腎細胞腺腫/腎細胞癌の発生頻度が雌の25,000 ppm群で減少あるいは雌の10 ppm群で増加したが、同病変については群間の発生状況のばらつきが大きく、DBDE投与との関連性は明らかではなかった。腎盂の移行上皮については雄の100 ppm群で乳頭腫/癌の増加が見られたが、

他の群に関連した変化は認められなかった。また、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度が雌の25,000 ppm群で減少した。肝及び食道においては、増殖/腫瘍性病変の発生状況に群間の明らかな違いは認められなかった。肺、膀胱、乳腺、卵巣あるいは精巣、肉眼的異常部位については評価を継続している。

HBCD と PTU の発がん性評価:

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態及び体重にHBCDあるいはPTU投与による明らかな影響は認められなかった。剖検時の肝重量は、HBCDの1000及び10,000 ppm群で増加、甲状腺重量はPTU群で増加を示した。甲状腺の病理組織学的検索では、PTU群に濾胞上皮細胞のびまん性過形成が見られたが、HBCD各群に著明な変化は認められなかった。肝には何れの群においても明らかな病理組織学的変化は認められなかった。

児動物については、授乳時に死亡例が散見されたが、HBCDあるいはPTUの投与による影響は認められなかった。離乳時における有効匹数は0(対照)、HBCDの100、1000、10,000 ppm群及びPTU群の雄では21、21、25、25、25匹、雌では24、23、23、17、18匹となった。体重はHBCDの10,000 ppm群の雄で生後3-22週目に、雌では生後3週目より現在まで増加抑制を示した。PTU群の雄では、生後4及び5週目に、雌では生後4-7週目に増加抑制を示した。摂餌量については、HBCDの10,000 ppm群の雌雄において、離乳後より生後13週あるいは17週目まで減少傾向を示した。DHPN投与期間中の摂水量については、HBCDの10,000 ppm群の雄において減少傾向を示した。一般状態にHBCDあるいはPTU投与による顕著な影響はみられなかった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察において、生後33週目の現在、雌の対照群及び100 ppm群の各2/21例に皮下結節がみられている。他の群には結節/腫瘍の発生は認められていない。

⑥各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究:

昨年度の米国EPAのIRISとWHOの水質ガイドライン評価文書の情報収集に加えて、今年度は米国のATSDR、WHO/JMPRを加え、合計で約770の評価文書について情報整理を行った。収集した項目は、化合物数、CASRN、NO(A)EL、LO(A)EL、NOAELの根拠、標的器官、その根拠文献、総合不確実係数、個人差の係数、種差の係数、その他の係数、不確実係数の設定理由、RfDまたRfC(Reference Concentration:吸入暴露の場合)、最終評価年月、用量換算などの補足情報に従って整理した。また、今年度は、その他の係数を適用した理由を、その適用頻度から、LOAELの適用、短期試験結果の適用、発がん性の考慮、データベース不足

に分類して整理を行った。

エンドポイントは、一つのNOAEL(またはLOAEL)の設定に複数の所見を用いることもあり、総数としては約900項目になり、37種類に分類した。その結果、肝臓に対する所見が約200件と最も多く、次に腎臓への影響と血液生化学的パラメータの変化がそれぞれ約100件となり、これらのエンドポイントで約半数を占める結果となった。これらについて多いものとして体重変化、中枢・末梢神経系への影響、生殖発生影響、甲状腺への影響などが認められ、本研究の目的である発達期毒性との関連が比較的高いと思われる生殖発生毒性や甲状腺への影響については各々約40件であった。また、発達期での影響ではないが、関連あるエンドポイントとしての神経系への影響も約40件認められている。一方、免疫系への影響をエンドポイントとした例は4件しか見られなかった。

不確実係数(UF)の適用状況としては、実験動物の慢性影響のNOAELから基本的に算用されるのは、“100”が最も多く、約770件中の約半数の357件で適用されていた。その次に多いのは“UF:1000”の約170件で、“UF:300(70件)”と“UF:3000(45件)”がこれに次ぎ、約30の“UF:10”と“UF:30”を加え、これら6種類のUFの適用が90%以上を占めていた。

これらの不確実係数の意義を解析するために、適用された総合不確実係数を構成する因子についての解析を行った。尚、評価時期が古い場合や適用説明がなく適用された“UF:100”については、個人差:10及び種差:10で構成されているものとし、また、適用されていない場合は、解析上便宜的に“UF:1”とした。まず個人差に適用された不確実係数としては、約95%がデフォルトの10を適用している。これは、個人の感受性や代謝に関する定量的な解析が少ないことに依存しているものと考えられる。一方、10以下の係数が採用された例では、NOAELの設定がヒトの高感受性集団におけるデータに基づいており、デフォルトの10は必要ないという判断がなされているためである。また、1件、“UF:6.32”という値が適用されているが、これはヒトにおけるPBPK解析を行ったデータに基づき算定されたものである。

種差に関しては、約4分の3においてデフォルトの10が採用されていた。約90件で“UF:1”になっていたが、これは殆どがヒトにおけるNOAELをTDI設定のために採用していることによるものである。その他、約1割の77件で“UF:3”が採用されていた。それらの多くは、吸入実験による、実験動物からヒトへの摂取量換算による外挿として用いられたものであるが、そのうちの一部と“UF:10.428”としているケースでは、動物とヒトでの体内動態解析データに基づいた判断によって決定されていた。

種差と個体差に加えてUFが追加された例として443件が認められ、その理由としては、約3分の1が“短期

間試験結果の適用“によるもので、それに続く“データベース不足”と約100件の“LOAELの適用”を合計すると約90%を占めていた。また、26件は“発がん性の考慮”に関してUFが追加されていた。

また、上記の各々の理由で、UFの適用状況を解析してみると、“短期間試験結果の適用”と“LOAELの適用”では、殆どがUF:10を適用していたが、約2割程度は、UF:3を適用していた。一方、“データベース不足”に関しては、主に生殖発生試験データの不足によるものであるが、上記理由とは、逆に殆どが、UF:3を適用し、約4分の1において、UF:10を適用していた。また、“発がん性の考慮”に関しては、殆どが、UF:10を適用していた。その他、これらの理由に分類できないUFが約30件認められるが、“UF:3”または“UF:10”がそれぞれ半数であった。その多くは、上記の理由に近いものあるいは、いくつかの理由の組み合わせで総合的に判断されたというものであった。

D. 考察

①脳発達のかく乱影響評価:

<BFRsを用いた発達期暴露評価系の確立>

抗甲状腺剤の発達期暴露による甲状腺機能低下に起因した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は昨年度示したが、ニューロンmigration障害に関連する測定項目としては、抗甲状腺剤暴露例で今回明らかになった様に、海馬CA1領域の錐体細胞層外に存在するニューロン数及びその割合、各ニューロンの錐体細胞層ベースラインからの距離の平均値の測定が有効であることが判明した。

DBDE発達期暴露例では、抗甲状腺剤暴露試験で構築した成熟後の白質形成障害指標において100ppm以上で対照群と有意な差異が認められる事を昨年度示したが、ニューロンmigration障害指標では変化は認められなかった。このことから、DBDEに起因する甲状腺機能低下の程度ではニューロンのmigrationに影響を与えなかったか、与えたとしても可塑性により回復した可能性がある。いずれにしても、白質形成に対する影響との間に感受性の差を認め、甲状腺機能低下を介した影響とともにDBDEの脳(白質形成)に対する直接作用も考慮する必要がある。

DBDE暴露実験の病理組織学的検索を行ったところ、生後21日目では、雄の1000ppm群で甲状腺濾胞上皮肥大が増加した。また、雄のみでの計測であるが、1000ppm群でT3の弱い低値のみを認めている。よって、弱いながらも雄では暴露終了時点で甲状腺機能低下が生じていたものと考えられた。一方、雌では、10、1000ppmで同様の病変を数例認めたものの、対照群と比較して増加は示さなかったことから、DBDE投与による甲

甲状腺機能低下は、雄でより高い感受性を示すことが示唆された。また、暴露終了時の甲状腺機能低下影響に比べて白質形成障害の出現した用量が1/10低かったことから、DBDEに関しては非可逆的な白質影響は甲状腺影響よりも感度の高い指標であることが示された。その他の病変としては、肝臓で重量増加とともにびまん性肝細胞肥大を認めたが、同様の病変はマウスを用いた2年間がん原性試験でも認められている。また、同試験においては、肝臓で腺腫、腺がんの発生率の増加も認められており、ラットを用いた2年間がん原性試験でも肝臓で腫瘍性結節の発生率の増加が認められている。DBDEはAmes試験、マウスリンフォーマ試験、*in vitro*、*in vivo*における姉妹染色分体交換試験いずれも陰性であり、遺伝毒性は示さず、投与によってCYP、UDP-GT、benzo[a]pyrene hydroxylase、*p*-nitroanisole demethylaseといった肝酵素誘導も示さないことが報告されている。しかし、ラット、マウスではDBDEは主に肝臓に蓄積するとの報告があり、蓄積性を反映した肝細胞肥大であると考えられた。今回見出された腎臓の所見(近位尿細管上皮の細胞質の好酸性増加)については、ラットを用いた30日間反復投与試験でhyaline degenerationを認めているが、この試験では純度77%のDBDEが用いられていた。純度が94%以上のDBDEを用いた、ラット及びマウスにおける14日、28日間反復投与試験、亜慢性毒性試験、がん原性試験いずれにおいても腎臓での病変は報告されていない。以上より、本研究で認められた腎臓病変の成因と毒性学的意義ははっきりしない。生後11週目で認めた病変はいずれも対照群と比較して増加は示さないものの、甲状腺濾胞上皮肥大が雄で特に認められ、T4も低値を示したことから、部分的な甲状腺機能低下状態が弱いながらも持続していると考えられ、臓器蓄積性による影響の可能性が推察された。

HBCD試験では、100 ppmから母動物の甲状腺重量の増加がみられ、10,000 ppmでは増加を示したが明らかな用量依存性は認めなかった。児動物での血清中の甲状腺関連ホルモンは、投与終了時では10,000 ppmのみ、11週目の時点では1000、10,000 ppmで軽度な変化を示しており、11週目の解剖時には、雄の1000、10,000 ppm群で甲状腺の相対重量の増加も認めた。よって、現時点では甲状腺の病理組織学的検索は未実施であるものの、HBCDによる甲状腺機能低下は程度が弱いながらも成熟後まで持続していたものと考えられた。しかし、甲状腺機能低下と関連した不可逆的な白質影響に関する形態計測(CC面積、CNPase陽性オリゴデンドロサイトの密度)では、10,000 ppm群でCNPase陽性細胞の密度減少が確認されたものの、CC面積に関しては変化を認めなかった。このことは、CC面積よりもCNPase陽性細胞密度の方が感度の高い指標である可能性があるものの、HBCDに関しては暴露終了時

の甲状腺機能低下の出現(T3の低値、TSHの高値)用量と白質影響の用量は同等であり、甲状腺機能低下を反映した白質影響の可能性が示唆された。今後、ニューロンのmigrationに対する影響検索も実施する。

TBBPA暴露試験では、母動物の甲状腺重量の変化は認めず、児動物の血清中甲状腺関連ホルモンは、投与終了時でのみ100、1000 ppmで弱い変化(T3の低値)を示し、用量反応性は認めなかった。TBBPAは*in vitro*では甲状腺ホルモンアゴニストとして作用する報告があるが、*in vivo*では発達期暴露により胎児に甲状腺機能低下作用が生じるとの報告がある。今回、暴露終了時のTBBPAの臓器分布を検討したところ、肝臓において用量依存的な蓄積性を認めたため、TBBPA発達期暴露による甲状腺機能低下作用はUDP-GTなどの肝酵素によるものではないと推察されるが、用量反応性を示さない甲状腺機能低下の原因は不明である。また、暴露終了時の脳幹におけるTBBPAは1000 ppmで10,000 ppmよりも高い蓄積性を示した。白質影響に関しては、有意差はないものの、100、1000 ppmでCNPase陽性細胞密度の弱い低値を見出しており、暴露終了時での甲状腺機能低下との関連性も推測される。白質影響に関しては、今後、ニューロンのmigrationに対する影響検索と病理組織学的検索を実施し、その影響を示唆する変化があるか検討する予定である。

<発達期脳障害指標探索>

暴露終了時での白質特異的な網羅的遺伝子発現解析の結果、抗甲状腺剤暴露、DBDE暴露いずれにおいても、発現増加遺伝子数が発現減少遺伝子数の約8倍という同様の変動を示した。また、発現増加遺伝子では抗甲状腺剤、DBDEに共通して変動した遺伝子も多く認められ、神経幹細胞の分化に関与するHairy and enhancer of split, Nuclear receptor co-repressor 1, Gastrulation brain homeobox, ミエリン形成に関与するClaudin, 細胞移動に関与するDeleted in colorectal carcinomaなどが含まれていた。一方、海馬CA1領域特異的な網羅的遺伝子発現解析では、抗甲状腺剤暴露、DBDE暴露いずれにおいても、発現増加・減少する遺伝子数がほぼ同数である傾向が認められた。抗甲状腺剤暴露、DBDE暴露に共通して変動した遺伝子を検索したところ、増加・減少ともに共通して変動した遺伝子は殆んど認められず、白質での解析結果とは異なる結果となった。DBDE暴露を行った性成熟後の雄児動物脳において、白質では抗甲状腺剤暴露と同様の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を認め、DBDE暴露がオリゴデンドロサイトに不可逆的な影響を与えることが示されたが、海馬では、抗甲状腺剤暴露例で観察されたニューロンmigration異常をDBDE暴露例で認めなかったことがこの結果に反映されていると考えられた。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、発現局在の変動の有無について検討を加える。それらの検討を基に、甲状腺機能低下に起因して変動する分子、DBDE 暴露直接影響に起因して変動する分子に分類するとともに、分布の解析を他の臭素化難燃剤 (HBCD, TBBPA) に広げて適用し、胎児期・新生児期化学物質暴露に関する皮質・白質構成成分の新たな評価指標の確立を図る予定である。

②神経機能・行動影響評価:

本年度は HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露の影響について行動薬理学的検討を行った。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、HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露による変化は認められなかった。また、一般行動観察の結果、HBCD の胎児期及び授乳期慢性暴露ラットでは、自発運動量の変化は認められなかった。また、ドパミン神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 及び circling 並びに serotonin syndrome の指標である head-twitch 行動等、モノアミン神経系の機能破綻に起因するとされる異常行動の発現の有無についても確認したが、特筆すべき異常行動は認められなかった。更に、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、変化は認められなかった。

前年度、本分担研究者らは DBDE 及び PTU の胎児期及び授乳期慢性暴露によりドパミン神経発達障害が引き起こされる可能性を報告した。本研究においても HBCD のドパミン神経機能に及ぼす影響を検討した。まず、メタンフェタミン誘発報酬効果に及ぼす影響を条件づけ場所嗜好性試験に従い検討した結果、HBCD 慢性暴露の影響は認められなかった。更に、側坐核ドパミン遊離について *in vivo* microdialysis 法に従い検討した結果、HBCD 慢性暴露の影響は認められなかった。以上のことから、HBCD は DBDE や PTU とは異なり、ドパミン神経の発達に影響を及ぼさない事が示唆された。

一方、前年度、研究者らは高用量 DBDE の胎児期及び授乳期慢性暴露により、側坐核ドパミン遊離量の減少が引き起こされることを明らかにした。本年度は更に、側坐核ドパミン遊離に及ぼす DBDE の用量反応性を検討した。その結果、一様にドパミン遊離量の低下が認められたものの、用量反応性は認められなかった。以上のことから、低用量の暴露であっても、DBDE の胎児期及び授乳期慢性暴露はドパミン神経系の発達障害を引き起こす可能性が考えられた。また、現段階ではドパミン神経発達に及ぼす DBDE 無作用量等を算出することは極めて困難である。

③免疫機能影響評価:

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と

同一実験の動物を用いて検索を行い、HBCD 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。

HBCD の胎児期、小児期投与による仔ラットの胸腺、脾臓重量に対照群との間に差は認められなかったが、3 週齢の脾臓において NK 細胞の減少が観察され、末梢血の活性化 T 細胞の減少、非活性化 B 細胞の上昇も観察された。回復期の 11 週齢においては、リンパ球ポピュレーションに変化は観察されなかった。以上、HBCD の場合は、軽度ではあるが免疫担当細胞への影響を示唆するデータが得られ、甲状腺ホルモン T3 の低下と連動することから、これらの影響は甲状腺機能抑制と連関する可能性が考えられた。尚、血清アルブミンの上昇、肝臓の臓器重量の増加も観察されたことにより、HBCD の甲状腺機能への影響は、HBCD の肝臓への影響に関連する二次的影響の可能性が考えられた。

HBCD と昨年度行った DBDE とともに、3 週齢時で、甲状腺機能抑制活性と連関すると思われる活性化 T 細胞群の低下がみられ、抗体産生の低下が見られた。NK 細胞の割合の低下も両化合物で見られたが、HBCD の場合 3 週齢時での抑制が 11 週齢で回復しているのに比べ、DBDE の場合、11 週齢でも抑制が有意であるという違いが見られた。以上、HBCD と DBDE は、幼少期ラットに対し同様の免疫影響を示すが、DBDE の方が、抑制活性は、持続する傾向のあることが示された。

④感染影響評価:

代表的な BFRs である DBDE と HBCD について周産期暴露による RS ウイルスマウス感染モデルでの感染影響を評価した。DBDE では、肺組織中の RS ウイルス感染価が暴露量に依存して上昇し、肺炎などの感染病態が悪化していることが強く示唆された。BALF 中の IFN- γ レベルが 1000 ppm で上昇していることや肺組織で RANTES の mRNA 発現が亢進していることも感染病態の悪化を強く支持している。今後、病理組織学的な解析を行い、感染病態像を明確にする必要がある。一般に、ウイルス感染症において、対象臓器・組織でのウイルス量と病態の重症度が正比例することが知られている。肺組織でのウイルス感染価が暴露用量依存性を示した結果は、これが感染影響評価に適した指標であることを示すものと考えられた。

RS ウイルス感染実験における陽性対照として CY を利用した。この化合物は、非特異的な免疫抑制を引き起こし、易感染状態を誘導して本モデルにおいて肺組織でのウイルス感染価を上昇させることが知られている。CY 前投与マウスでは、その免疫抑制作用から BALF 中の IFN- γ レベルは低下した。これより、DBDE のウイルス感染病態を悪化させるメカニズムは、CY とは異なり非特異的な免疫抑制作用ではないと考えられる。

今回の試験では、HBCD 1000 ppm 暴露による感染影響は全く認められなかった。現在、HBCD の暴露量を 1000, 3000, 10, 000 ppm と高用量に設定して再評価を行っている。また、DBDE 暴露においても、より簡便で用量反応性の高い指標を得る目的で、BALF 中での RANTES の定量評価を視野に入れている。

⑤幼若期暴露発がん性評価:

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的として、被験物質の幼若期投与とその後の化学発がん物質である DHPN と DMBA 処置によるラット多臓器発がんモデルの有用性を検討している。17 年度は、被験物質として臭素化難燃剤である DBDE の 4 用量を用いた実験を開始した。DBDE は、マウスの長期発がん性試験では肝及び甲状腺に、ラットの長期試験では肝に発がん性を示す (NTP, 1986)。また polybrominated biphenyl mixture (PBB) は、F344 ラットの交配 60 日前から妊娠期間中、及び生後 8 週齢までを通した胎児・乳幼児期の投与のみでは肝腫瘍を誘発しないが、8 週齢以降 2 年間投与した際には肝腫瘍の増加がみられ、交配前から生後 8 週、更にその後 2 年間通して投与した場合にはその発生頻度の増加することが報告されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993)。このラットにおける PBB の結果に関しては、胎児・乳幼児期の発がん感受性が高かったことにより肝腫瘍の発生頻度が増加したのか、単に投与期間が長くなったことにより増加したのかについては不明である。ところが PBB のマウスを用いた実験では、胎児・乳幼児期のみの暴露により肝腫瘍が増加し、胎児・乳幼児期の発がん感受性の高いことが示唆された (Chhabra RS et al., 1993)。従って、今回の実験に用いた DBDE についても幼若期投与により肝発がんを示す可能性は否定できないと予測された。しかし、DBDE の乳幼児期投与は、DHPN と DMBA 処理によるラット多臓器発がんモデルにおいて肝腫瘍の発生を促進しなかった。また、DBDE の投与は、食道発がんに対しても影響を示さなかった。

一方、腎間葉性腫瘍の発生頻度は雌雄の 25,000 ppm 群で、発生数は雄の 25,000 ppm 群で対照群に比して減少し、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度は雌の 25,000 ppm 群で減少した。化学物質の胎児・乳幼児期暴露による腎腫瘍の発生に及ぼす影響については報告が見当たらないが、ラットを用いた ethylene thiourea の実験で、成熟期のみ 2 年間投与した群に比し、胎児・乳幼児から成熟期まで通して投与した群では甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の増加が報告されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 18, 405, 1992)。今回の実験において DBDE の幼若期投与により、その後の DHPN 投与による甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の発生が抑制された原因として、i) ニトロ

サミンの代謝活性化/排泄に対する影響 ii) 視床下部-下垂体-甲状腺軸の変調 iii) 甲状腺における発がん標的細胞の感受性の変化 が可能性として挙げられる。腎間葉性腫瘍についても i) あるいは iii) の関与している可能性が考えられた。今後、肺、膀胱、乳腺、卵巣あるいは精巣、肉眼的異常部位について病理組織評価を終了して最終評価するとともに、DBDE の乳幼児期投与による肝あるいは腎などにおける薬物代謝酵素の活性、血中の甲状腺関連ホルモン値、あるいは標的臓器における細胞増殖率の変動などについて検索を加え、DBDE の乳幼児期投与により腎と甲状腺で発がん感受性の低下した原因を明らかにする必要がある。また、18 年度に開始した HBCD と PTU に関する実験についても剖検、病理組織評価を終了して最終評価する。

⑥各種毒性指標の用量反応評価手法における耐容量等の設定に関する調査研究:

18 年度は、昨年度の米国 EPA の IRIS と WHO の水質ガイドライン評価文書の情報収集に加え、米国の ATSDR, WHO/JMPR に対する評価文書の情報整理を行った。更に、個人差及び種差に対する不確実係数に追加されて適用されている不確実係数の理由とその適用状況について解析を行った。多くは、デフォルトの最大 10 が適用されているが、2-3 割のケースで UF:3 が適用されている。これらは、実際にはケースバイケースの判定で適用されているが、“短期間試験結果の適用”と“LOEL の適用”においては、用量反応性や経験的知見が適用されていると考えられ、定量的評価手法による置き換えが可能な領域かもしれない。しかし、データベース不足による不確実係数に関して、とくに何故 UF:3 が多く適用されているについては、どんな因子が寄与しているかを明らかにするために、さらなる解析が必要であると考えられた。

E. 結論

甲状腺機能低下症を軸に脳発達のかく乱影響評価モデルを用いて BFRs の評価を実施し、昨年度実施した DBDE に引き続き、HBCD を用いて大脳白質影響の評価系の確立を図った。その結果、DBDE で明らかになった様に、HBCD においてもその発達期暴露により、白質構成成分の減少が確認されたが、TBBPA 暴露では白質への明らかな影響は認められなかった。PTU, MMI 暴露でのニューロンの migration 異常に関する定量評価を行ったところ、海馬 CA1 領域でのニューロン分布のばらつきが確認できたが、DBDE 暴露では変化は認められなかった。また、抗甲状腺剤や DBDE の発達期暴露による中枢ニューロン、グリア細胞での傷害標的候補遺伝子を同定した。

神経機能・行動影響評価では、広い用量域で HBCD について検索したものの、明らかな影響を及ぼさない可

能性が示唆された。一方、DBDE 暴露では低用量においても側坐核ドパミン遊離量の減少が認められたことから、神経機能・行動の観点からは、DBDE よりも HBCD の方が、毒性影響が少ないと考えられた。

免疫機能影響評価でも HBCD 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。また、HBCD の場合は、甲状腺機能低下との関連が示唆される軽度の免疫担当細胞影響が見い出された。また、血清アルブミンの上昇、肝臓の臓器重量の増加も観察されたことから、HBCD の甲状腺機能への影響は、肝臓影響を介した二次的影響の可能性が考えられた。HBCD と昨年度行った DBDE による影響を比較すると、HBCD と DBDE は、幼若期ラットに対し同様の免疫影響を示すが、DBDE の方が抑制活性の持続する傾向のあることが示された。

感染影響評価では、RS ウイルス感染マウス実験モデルを用いて DBDE の感染影響を評価し、肺組織ウイルス感染価が用量反応性の高い評価指標であることを明らかにした。今回、感染影響が見られなかった HBCD については、更に高用量を設定して再評価を行っている。更に、より簡便で用量反応性の高い感染影響指標を得る目的で、RANTES を指標とした評価を実施する予定である。

発がん性評価では、SD ラットに出生直後より 5 週間 DBDE を混餌投与し、その 1 週間後より多臓器に発がん標的性を有する DHPN と乳腺発がん物質である DMBA による処置を行った結果、高用量で腎間葉性腫瘍と甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の発生が抑制された。今後その原因について検討する必要がある。

米国 EPA の IRIS と、WHO の水質ガイドライン第 3 版に引き続き、米国の ATSDR、WHO/JMPR の評価文書における耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分に関する情報及び化学構造式について、情報収集整理を行った。その結果、約 770 評価事例のうち 440 で、種差・個体差に関わる不確実係数以外の係数を適用していることが明らかとなった。その採用理由の 90% 以上は、NOAEL が求められなかったことによる LOAEL の適用と、評価可能な慢性影響試験が無かったことによる短期試験結果の適用、及び評価試験データ不足（主に生殖発生試験データ）によるもので占められていることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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(1): 36-43, 2006.

Shibutani, M., Lee, K-Y, Igarashi, K., Woo, G-H., Inoue, K., Nishimura, T., Hirose, M.: Hypothalamus region-specific global gene expression profiling in early stages of central endocrine disruption in rat neonates injected with estradiol benzoate or flutamide. *Dev. Neurobiol.*, 67(3): 253-269, 2007.

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

Onose, J., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Hirose, M.: A new medium-term rat colon bioassay applying neoplastic lesions as endpoints for detection of carcinogenesis modifiers-validation with known modifiers. *Cancer Lett.*, 232, 272-278, 2006.

Cho, Y.M., Imai, T., Hasumura, M., Hirose, M.: Lack of enhancement of susceptibility to mammary and thyroid carcinogenesis in rats exposed to DMBA and DHPN following prepubertal iodine deficiency. *Cancer Sci.*, 97, 1031-1036, 2006.

Ema, M., Fujii, S., Ikka, T., Matsumoto, M., Hirose, A., Kamata, E.: Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. *Environ. Toxicol.*, 22, 44-52, 2007.

Ema, M., Fujii, S., Matsumoto, M., Hirose, A., Kamata, E.: Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod. Toxicol.*, 22, 672-678, 2006.

Ema, M., Fukunishi, K., Matsumoto, M., Hirose, A., Kamata, E.: Evaluation of developmental toxicity of ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rat. *Drug Chem. Toxicol.*, 29, 215-225, 2006.

Ema, M., Fukunishi, K., Matsumoto, M., Hirose, A., Kamata, E., Ihara, T.: Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. *Reprod. Toxicol.*, 23, 12-19, 2007.

2. 学会発表

富士本仁, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 井上 薫, 禹 麻美, 高橋美和, 広瀬雅雄: 発達期甲状腺機能低下に起因するラット脳の発達遅延における標的脳領域特異的な遺伝子発現変動のプロファイリング, 第 23 回日本毒性病理

学会, 東京, 1 月, 2007

宮川和也, 成田 年, 赤間久彦, 鈴木 勉: 甲状腺ホルモンの乱環境化学物質の胎児期及び授乳期慢性暴露による中枢神経発達障害, 第 33 回日本トキシコロジー学会, 名古屋, 7 月 3-5 日, 2006

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

中村亮介, 手島玲子, 蜂須賀暁子, 高木加代子, 禹桂炯, 渋谷 淳, 澤田純一, 胎児期・新生児期のラット免疫系に及ぼす抗甲状腺薬の影響; 第 13 回日本免疫毒性学会学術大会, 倉敷, 9 月 14-15 日, 2006.

手島玲子, 中村亮介, 中村里香, 蜂須賀暁子, 澤田純一, 渋谷 淳, 臭素化難燃剤 DBDE (decabromodiphenyl ether) の胎児期・新生児期暴露による免疫影響について: 第 13 回日本免疫毒性学会学術大会, 倉敷, 9 月 14-15 日, 2006.

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 淳子, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: インフルエンザ感染症に対するプロポリスの治療効果, 第 16 回抗ウイルス化学療法研究会, 5 月, 2006.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: RS ウイルス感染マウスモデルを用いた化学物質のリスク評価の試み, 第 43 回日本ウイルス学会九州支部総会, プログラム及び抄録 p 28, 9 月, 2006.

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 淳子, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: インフルエンザ感染症に対するプロポリスの効果, 第 43 回日本ウイルス学会九州支部総会, プログラム及び抄録 p 29, 9 月, 2006.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: RS ウイルス感染マウスモデルを用いた化学物質のリスク評価系の構築, 第 54 回日本ウイルス学会, 学術集会プログラム・抄録集 p 341, 11 月, 2006.

清水寛美, 渡辺 渡, 堤 淳子, 堤 重敏, 黒川昌彦: プロポリスの抗インフルエンザウイルス作用, 第 54 回日本ウイルス学会, 学術集会プログラム・抄録集 p 356, 11 月, 2006.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: RS ウイルス感染マウスモデルを用いた化学物質のリスク評価の試み, 第 23 回日本薬学会九州支部大会, 講演要旨集 p 183, 12 月, 2006.

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 淳子, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: プロポリスの抗インフルエンザ作用, 第 23 回日本薬学会九州支部大会, 講演要旨集 p 182, 12 月, 2006.

Tolo, F.M., Rukunga, G.M., Muli, F.W., Ochora, J., Kurokawa, M., Orwa, J., Mungai, G.M., Muthaura, C.N., Wanjiku, C.K., Kofi-Tsekpo, M.W.: Antiviral formulations from Kenyan medicinal plants; activity against herpes simplex virus infection in mice. The 27th African Health Sciences Congress, 2006. Dec. Durban, South Africa.

黒川昌彦, 清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡: ウイルス感染動物モデルを用いた免疫賦活(抗ストレス)食品の検索, 科学シンポジウム in 宮崎, 2 月, 2007.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: RS ウイルス感染マウスモデルを用いた化学物質のリスク評価系の構築, 日本薬学会第 127 年会, 3 月, 2007.

清水寛美, 日野あかね, 渡辺 渡, 堤 淳子, 堤 重敏, Y. K. Park, 黒川昌彦: プロポリス(AF-08)の抗インフルエンザ作用, 日本薬学会第 127 年会, 3 月, 2007.

Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Ema M. Gene Expression analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/24), 2006.

Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/21, 2006.

Hirose A, Yamazoe Y, Ema M, Kawamura Y. Toxicity testing schema for the initial risk assessment of food contact plastics based on the concept of ttc and usage probabilistic factors. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2007.

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

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18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：神経発達影響評価系の確立を分担課題として、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実施した。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年度より抗甲状腺剤を用いた発達期暴露評価系の確立を図り、18年度は成熟後脳でのニューロンへの不可逆的変化（海馬 CA1 ニューロンの migration の異常）の評価法を確立した。また、17年度に暴露実験の終了した decabromodiphenyl ether (DBDE)では成熟後のニューロンの migration に変化がないことを明らかにした。18年度は新たに 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), tetrabromobisphenol A (TBBPA)の暴露実験(共に 0, 100, 1000, 10,000 ppm 混餌)を行った。HBCD では、投与終了時（離乳時）に母動物の甲状腺相対重量の増加、児動物の弱い T3 の低値と TSH の高値を 10,000 ppm で認め、11 週目に T3 の軽度の低下を 1000, 10,000 ppm で認めた。神経影響としては、11 週目で脳梁面積に変化はないものの、CNPase 陽性オリゴデンドロサイト密度の減少を 10,000 ppm で検出した。一方、TBBPA では、投与終了時のみに、母動物甲状腺相対重量の最低用量からの有意差のない軽度の増加、児動物の 100, 1000 ppm での T3 の軽度低下を認めたものの、11 週目の脳白質構成成分の明らかな変化は認めなかった。また、HBCD, TBBPA とともに、肛門・生殖突起間距離、春機発動、性周期等の性分化障害を示す変化は認めなかった。さらに、脳内での発達期脳障害指標の探索を目的として、抗甲状腺剤及び DBDE の暴露児動物（雄）の離乳時での白質及び海馬 CA1 領域特異的に発現変動する遺伝子群をマイクロアレイ法により解析し、多くの神経発達に関連する分子を同定した。白質においては、抗甲状腺剤、DBDE 暴露に共通して発現増加遺伝子が多く同定されたが、海馬では暴露に共通した変動遺伝子は殆んど認めなかった。以上、HBCD と TBBPA でのニューロン影響の検索は今後行うが、現時点では、DBDE と HBCD 暴露例で白質に対する不可逆的影響の反応性を検出したものの、TBBPA では同様の影響は確認されなかった。

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、昨年度実施した抗甲状腺剤とDBDE暴露動物での脳発達影響評価手法の確立を終了し、HBCD、TBBPAの暴露実験とその評価を開始、ないし継続した。

B. 研究方法

<BFRsを用いた発達期暴露評価系の確立>

発達期化学物質暴露モデルとして、被験物質を飼料に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠10日目から離乳時(生後21日目)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、投与終了時と11週目に解剖を行った。使用した動物は妊娠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。即ち、昨年度行った予備試験結果を基に、HBCDは各群10匹、TBBPAは各群8匹の母動物を用いて100, 1000, 10,000 ppmの用量設定で本実験を行った(Fig. 1, 2)。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児動物を飼育した。妊娠・授乳期の母動物について体重と摂餌量を測定し、児動物については、生後2日目に出生児数、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、児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、児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、陰開口)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、最終解剖の3週間より膣スメアの観察による

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日目の解剖時には、肝、腎、脳、甲状腺、下垂体、副腎、精巣、精巣上体、前立腺、精囊(+凝固腺)、卵巣、子宮、乳腺を採材し、乳腺、甲状腺、下垂体、前立腺、精囊(+凝固腺)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匹の雄性児動物について、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、精囊(+凝固腺)、甲状腺、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った(HBCD試験、TBBPA試験については未実施)。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重量測定、病理組織学的検索を実施し、子宮の着床痕数を確認した。さらに、生後21日目、11週目の小脳、脳幹、肝臓、腎臓、脂肪について、各臓器におけるBFRsの蓄積量の検討をLC/MS/MS法等を用いて開始した(Fig. 3, 4, 5)。

また、生後11週目の脳を用い、大脳のBregmaの後方約-3.5 mmの1カ所で冠状断面を作製してパラフィン包埋し、その前後の対称面(2切面)が薄切面となるようにして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)、DAB発色による免疫染色を行った。CNPaseについては、抗原賦活化として脱パラフィンした切片について0.01M citrate buffer(pH6.0)中でマイクロウェーブ処理(90°C, 10 min)を行った。白質構成成分の測定に関しては、まず脳梁(Corpus callosum: CC)の面積として、CNPase染色切片を用いて、一頭体につき大脳の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. 6)。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(mm²)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割面の左右の平均値を求めた (Fig. 6)。また、海馬 CA1 領域でのニューロン分布の検討では、NeuN 染色切片を用いて 200 倍の顕微鏡視野で左右 1 箇所 CA1 領域 (海馬台の頭側) を観察対象とし、錐体細胞層外に存在するニューロン数及びその割合、全ニューロンのベースラインからの平均距離を求めた (Fig. 7)。

< 発達期脳障害指標探索 >

発達期の甲状腺機能低下によるニューロンの 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についての高感度指標を探索するため、昨年度動物実験を行った抗甲状腺剤試験 (PTU: 3, 12 ppm; MMI: 200 ppm 飲水)、DBDE 試験 (10, 100, 1000 ppm 混餌) それぞれについて投与終了時 (離乳時: 生後 21 日目) の脳を用い、海馬 CA1 領域、白質領域 (脳梁及び左右大脳白質) での部位特異的な遺伝子発現プロファイルを求めて、甲状腺機能低下及び DBDE 暴露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した (昨年度報告した抗甲状腺剤試験での海馬 CA1 のプロファイルは発現データのばらつきが大きかったため、今年度、動物実験を再度行い、解析した。白質のプロファイルも新たな動物実験材料を用いて得た)。PTU, MMI 試験, DBDE 試験の 21 日目の脳を用い、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パラフィン包埋して、20 μ m 厚の切片を 40 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 と白質を各群 4 個体ずつ採取した。その後、それぞれの CA1、白質のサンプルから RNAqueous-Micro (Ambion) にて total RNA 抽出を行い、RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて回収量を測定した。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 回増幅後、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、各被験物質投与群で無処置動物に比較して 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、抗甲状腺剤暴露試験につ

いては、MMI, 3 及び 12 ppm PTU の 3 群に共通して変動した遺伝子、PTU の用量に関連して変動した遺伝子を選別した。DBDE 試験については、全ての用量で共通して変動した遺伝子及び 100, 1000 ppm 暴露に共通して変動した遺伝子を選別した。

(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

< BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立 >

抗甲状腺剤暴露試験 :

PTU, MMI 発達期暴露 (飲水) 例の生後 11 週目の脳を用い、昨年度実施した発達期甲状腺機能低下に起因する白質影響の検討に続き、ニューロンの migration に与える影響を定量的に検討するため、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海馬 CA1 領域における形態計測を実施した。その結果、3, 12 ppm での用量依存性は認められないものの、錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離が PTU 投与により増加し、同様のニューロン分布のばらつきが 200 ppm MMI 投与によっても認められた (Table 1)。

DBDE 試験 :

PTU, MMI 発達期暴露例と同様に、DBDE 試験の生後 11 週目の脳を用い、海馬 CA1 領域における錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離を形態計測したが、DBDE 暴露に起因する変動は認められなかった (Table 2)。

また、生後 21 日目、11 週目に採取した各臓器について病理組織学的検索を行ったところ、生後 21 日目では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雌雄共に 10 ppm 以上で認められ、雄の 1000 ppm で発生頻度・強度共に増加した。その他の所見としては、肝臓で慢性肝細胞肥大の発生頻度・強度が雄の 10 ppm 以上、雌の 1000 ppm で有意に増加し、腎臓で皮質近位尿管管上皮の細胞質の好酸性増加の発生頻度・強度が雄の 100 ppm 以上、雌の 10 ppm 以上で有意に増加した (Table 3)。生後 11 週目では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雄の 10 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上で認められたが、いずれも対照群と比較して有意な増加ではなく用量との関連性もなかった。その他、雌雄全動物に肝臓で微小肉芽腫が認められた他、雄の全群で乳腺に慢性小葉萎縮、雌の 10 ないし 1000