

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 (Table 3)。

HBCD 試験：

抗甲状腺剤暴露試験、DBDE 試験と同様のプロトコールで、HBCD について 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 (Fig. 8)、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 (Fig. 9)。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 (Table 4)。出産及び出生児のパラメータとして、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 (Table 4)。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対照群に比べて有意に低い値を推移した (Fig. 10)。雌でも同様の傾向が認められ、5, 10 週後では有意に低い値が認められた。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対照群に比べて有意な変化は認められなかった (Fig. 11)。

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 (Table 5)。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 (Table 6)。

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、精巣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 (Table 7)。

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の数の有意な減数が 10,000 ppm 群で認められた (Table 8)。

TBBPA 試験：

HBCD 試験と同様に、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 (Fig. 12)、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 (Fig. 13)。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 群において有意な増加が認められた (Table 9)。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 (Table 9)。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 (Table 9)。

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 (Fig. 14, 15, Table 10)。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 (Table 11)。

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 (Table 12)。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 (Fig. 16)。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 (Table 13)。

<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雌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 (Fig. 17)。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 (Fig. 18, 19)。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 (Fig. 20)。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 (Fig. 21, 22)。

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 (Fig. 23)。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 (Fig. 24, 25)。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 (Fig. 26)。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 (Fig. 27, 28)。

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 (Fig. 29)。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 (Fig. 30)。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 (Fig. 31, 32)。

D. 考察

<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100 ppm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1000 ppm群で甲状腺濾胞上皮肥大が有意に増加した。また、雄のみでの計測であるが、1000 ppm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, 1000 ppmで同様の病変を数例認めたものの、対照群と比較して有意な増加は示さなかったことから、DBDE投与による甲状腺機能低下は、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年間癌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年間癌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、癌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有意な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 では有意な増加を示したが明らかな用量依存性は認めなかった。児動物における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で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。

E. 結論

甲状腺機能低下症を軸に確立した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、昨年度明らかとなった DBDE 暴露に加え、HBCD 暴露においても白質構成成分の減少が確認されたが、TBBPA 暴露では白質構成成分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の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、発達期抗甲状腺剤暴露、DBDE 暴露にお

ける中枢ニューロン，グリア細胞での標的候補遺伝子を同定した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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.

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，第23回日本毒性病理学会講演要旨集：p82(P-61)，1月，2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

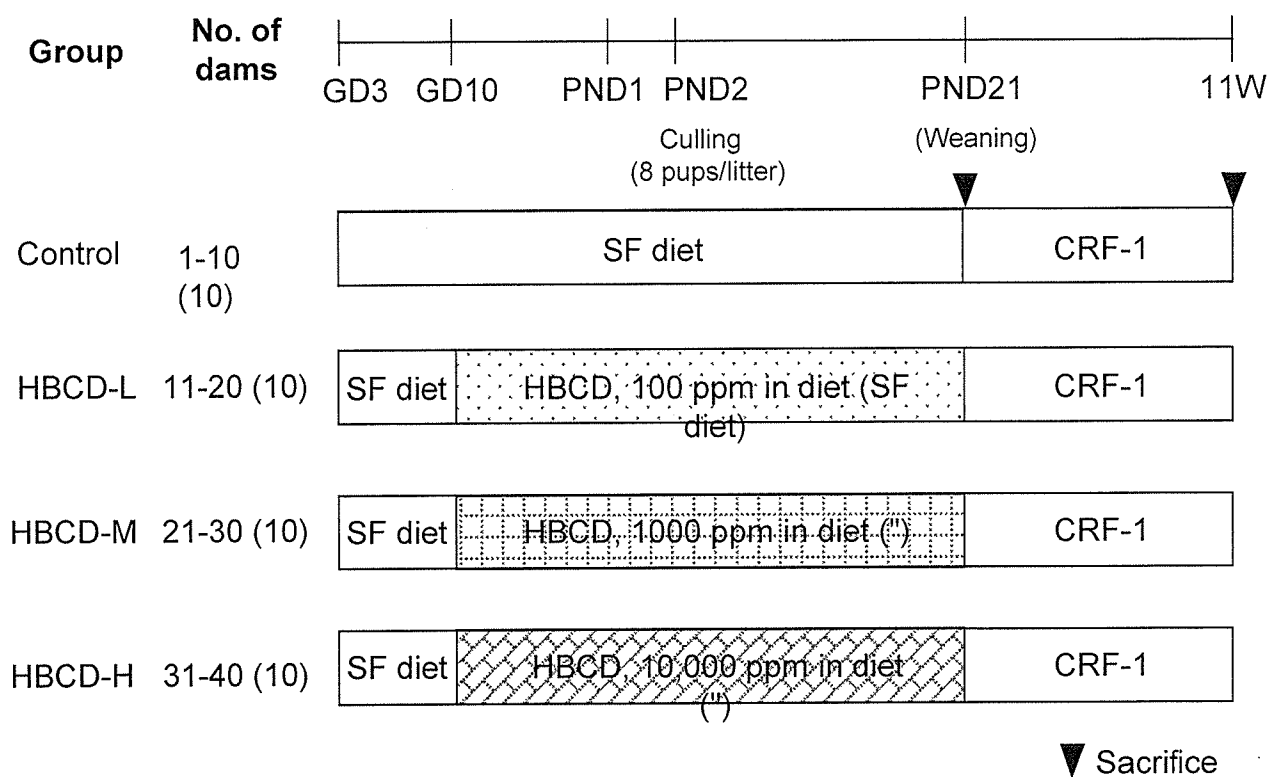
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

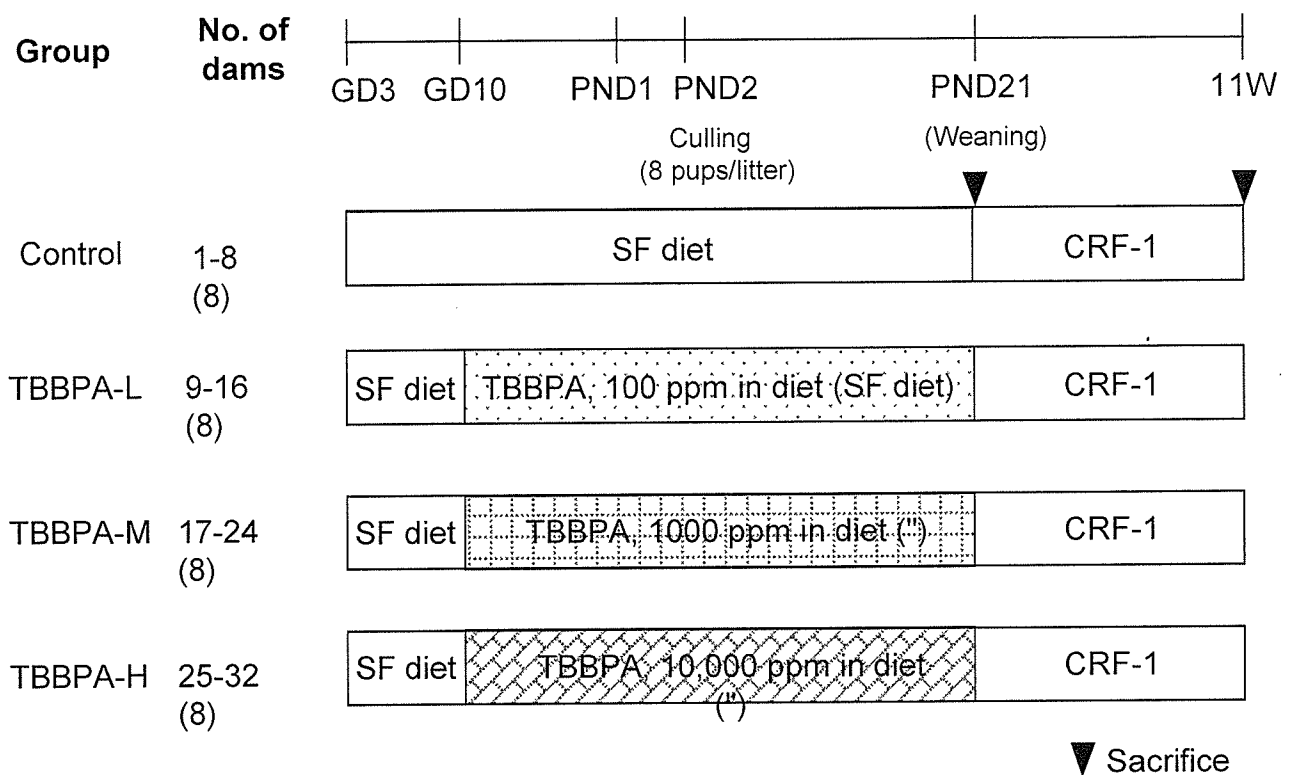


Abbreviations: HBCD, hexabromocyclododecane; SF, soy-free.

Parameters to be examined

- Implantation (PND21)
- Body and organs weights (Dams and offspring) (PND2)
- Offspring count (PND2)
- Feed and water consumption (throughout the experiment)
- Puberty, vaginal opening, and estrous cycle
- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Serology (T3, T4, TSH) (PND21)

Fig. 1.
Developmental exposure study of hexabromocyclododecane (HBCD) using rats to establish an evaluation system of the brain retardation related to hypothyroidism.



Abbreviations: TBBPA, tetrabromobisphenol A; SF, soy-free.

Parameters to be examined

- Implantation (PND21)
- Body and organs weights (Dams and offspring) (PND2)
- Offspring count (PND2)
- Feed and water consumption (throughout the experiment)
- Puberty, vaginal opening, and estrous cycle
- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Serology (T3, T4, TSH) (PND21)

Fig. 2.
Developmental exposure study of tetrabromobisphenol A (TBBPA) using rats to establish an evaluation system of the brain retardation related to hypothyroidism.

【 Materials 】

Acetonitrile (HPLC用)	関東化学株式会社
Hexane (HPLC用)	和光純薬工業株式会社
Ethyl acetate (HPLC用)	和光純薬工業株式会社
H ₂ O (ultra pure water)	オルガノ株式会社
Nitrogen gas	仙台日酸株式会社
Tetrabromobisphenol A (standard)	東京化成工業株式会社
Tetrabromobisphenol A ring- ¹³ C ₁₂	Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (internal standard, IS)

Fig. 3.
TBBPA臓器蓄積量測定に用いた材料.

【 LC system 】

Liquid chromatograph	NANOSPACE SI-2 (Shiseido)
Column	Capcell Pak C ₁₈ MG II (Shiseido 1.5×150 mm , 5 μm)
Mobile phase	Acetonitrile/H ₂ O 70/30 (v/v)
Flow rate	200 μL/min
Sample volume	50 μL
Injection volume	10 μL

【 MS system 】

Mass spectrometer	API 5000 (Applied Biosystems)	
Ionization	ESI(-)	
SRM	TBBPA	<i>m/z</i> 542.7→ <i>m/z</i> 78.8
	TBBPA- ¹³ C ₁₂ (IS)	<i>m/z</i> 554.8→ <i>m/z</i> 78.9

Fig. 4.
TBBPA臓器蓄積量測定を行ったLC system、MS systemの詳細。

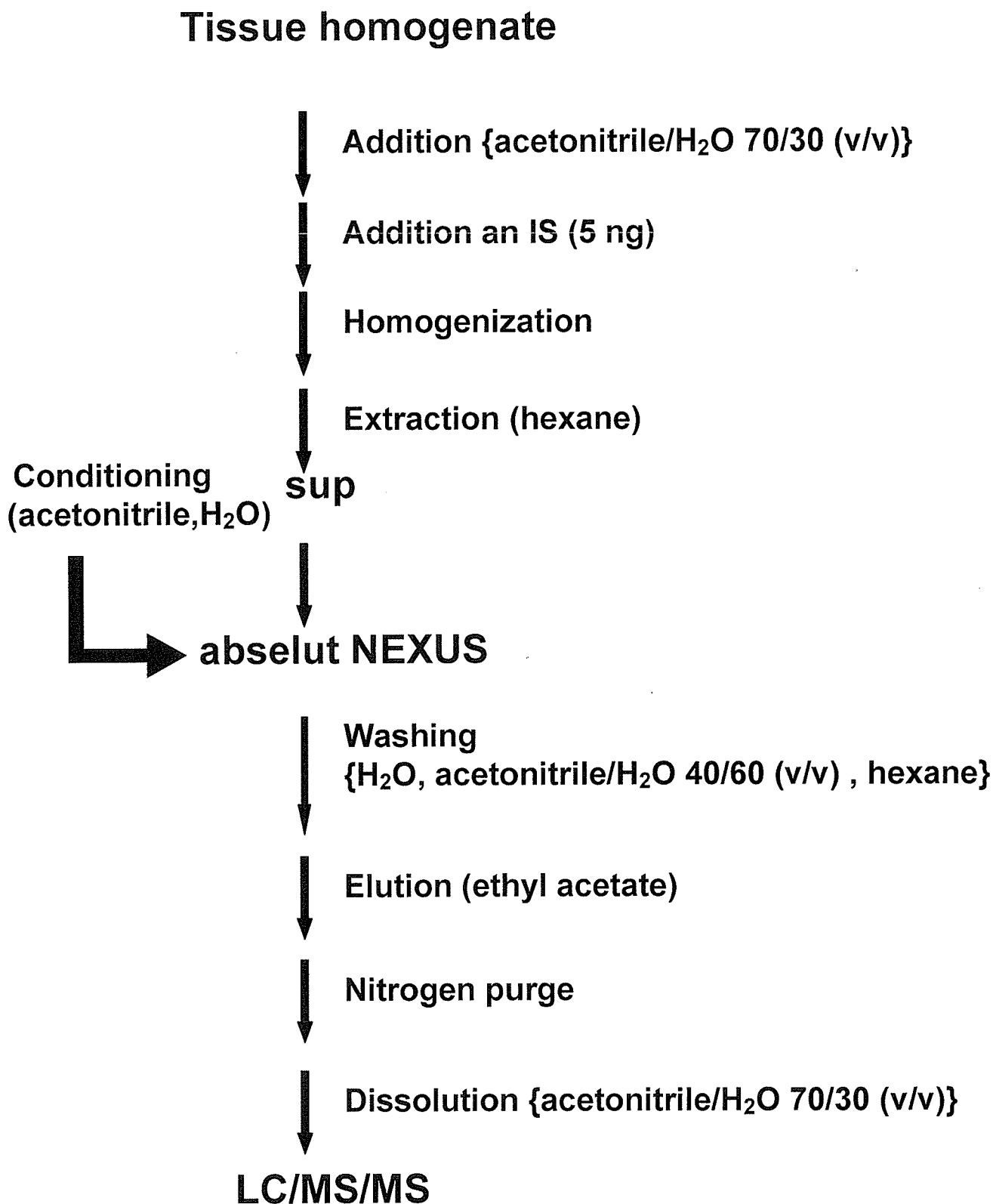
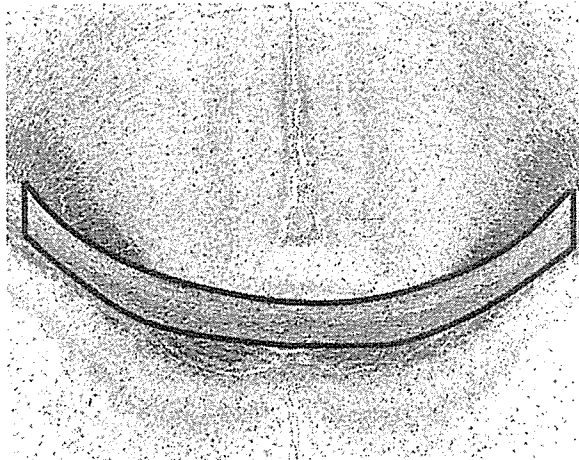
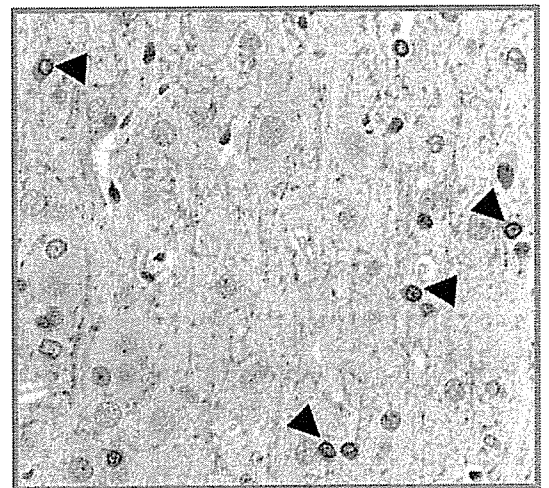
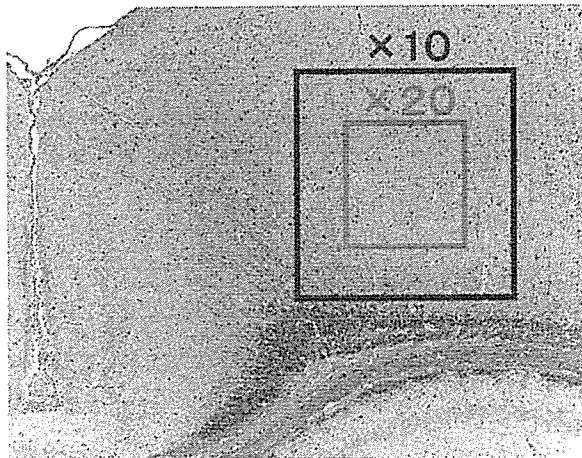


Fig. 5. Procedure of the extraction of TBBPA from tissue homogenate

<Area of corpus callosum>



<CNPase-positive oligodendrocytes>



◄ : 陽性細胞

Fig. 6.
Morphometry of white matter components of rats exposed
developmentally to anti-thyroid agents or brominated fire retardants.

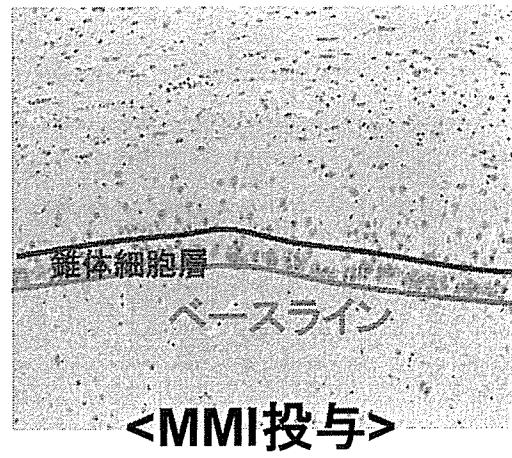
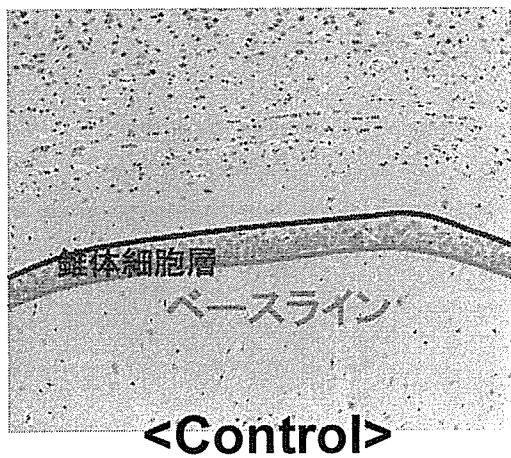


Fig. 7.
Morphometry of hippocampal CA1 neurons of rats exposed developmentally to anti-thyroid agents or brominated flame retardants.

Table 1.
Morphometry of the hippocampal CA1 region of the offspring exposed to antithyroid agents during the period from the mid-gestation to the end of lactation examined at PNW11.

	0	MMI (ppm)	PTU (ppm)	
		200	3	12
No. of offspring examined	10	10	10	6
Hippocampal CA1 neurons				
Mean distance from the baseline of the pyramidal cell layer (μm)	29.2 \pm 2.6 ^a	49.7 \pm 11.1*	65.2 \pm 13**	61.0 \pm 13.2**
No. of neurons located outside of the pyramidal cell layer (/mm baseline)	11.0 \pm 3.9	86.8 \pm 32.8**	110.8 \pm 25.7**	82.7 \pm 19.5**
Ratio of abnormally migrated neurons/ total neurons (%)	4.6 \pm 1.4	31.1 \pm 11.1**	29.9 \pm 7.6**	37.0 \pm 11.1**

^a Mean \pm SD.

Abbreviations: MMI, methimazole; PTU, proptlthiouracil; 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 2.
Morphometry of the hippocampal CA1 region of the offspring exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation examined at PNW11.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of offspring examined	10	10	10	10
Hippocampal CA1 neurons				
Mean distance from the baseline of the pyramidal cell layer (μm)	33.8 \pm 4.4 ^a	32.5 \pm 3.4	32.3 \pm 3.5	32.2 \pm 5.3
No. of neurons located outside of the pyramidal cell layer (/mm baseline)	5.3 \pm 2.4	7.2 \pm 3.2	5.8 \pm 2.6	5.2 \pm 2.4
Ratio of abnormally migrated neurons/ total neurons (%)	2.7 \pm 0.9	3.2 \pm 1.3	2.9 \pm 1.1	2.6 \pm 1.0

^a Mean \pm SD.

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PNW, postnatal week

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

Table 3.
Histopathologic findings for male and female rats exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
PNW 3				
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
Liver				
Diffuse liver cell hypertrophy ($\pm/+/\++$) ^a	0	10 ^b (8/2/0) ^{c, **, ##}	10 (4/6/0) ^{*, **, ##}	10 (0/2/8) ^{*, **, ##}
Kidneys				
Increased eosinophilia, cytoplasm, cortical proximal tubules ($\pm/+$)	1 (1/0)	4 (4/0)	7 (5/2) ^{*, #}	10 (1/9) ^{*, **, ##}
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy ($\pm/+$)	0	1 (1/0)	3 (2/1)	9 (3/6) ^{*, **, ##}
Females				
No. of animals examined	10	10	10	10
Liver				
Diffuse liver cell hypertrophy ($\pm/+$)	0	0	3 (2/1)	7 (1/6) ^{*, **, ##}
Kidneys				
Increased eosinophilia, cytoplasm, cortical proximal tubules ($\pm/+$)	0	7 (5/2) ^{*, **, ##}	6 (5/1) ^{*, #}	7 (4/3) ^{*, **, ##}
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy ($\pm/+$)	0	2 (2/0)	0	3 (3/0)
Ovaries				
Increase of interstitial glands (+)	0	0	0	2
PNW 11				
Males				
No. of animals examined	10	10	10	10
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy ($\pm/+/\++$)	0	3 (1/2/0)	2 (2/0/0)	4 (2/1/1)
Mammary gland				
Diffuse lobular atrophy ($\pm/+/\++$)	2 (0/1/1)	3 (1/2/0)	6 (2/2/2)	3 (2/0/1)
Females				
No. of animals examined	10	11	10	11
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy ($\pm/+$)	0	0	1 (1/0)	1 (0/1)
Uterus				
Hydrometra (+)	0	1	0	3

^a Grade of change: ($\pm/+$), slight; ($\++$), moderate, marked.

^b Total No. of animals with each finding.

^c No. of animals with each grade.

^{*} ^{**} Significantly different from the controls by Fisher's exact probability test (^{*} $p < 0.05$, ^{**} $p < 0.01$).

^{#, ##} Significantly different from the controls by Mann-Whitney's *U*-test ([#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$).

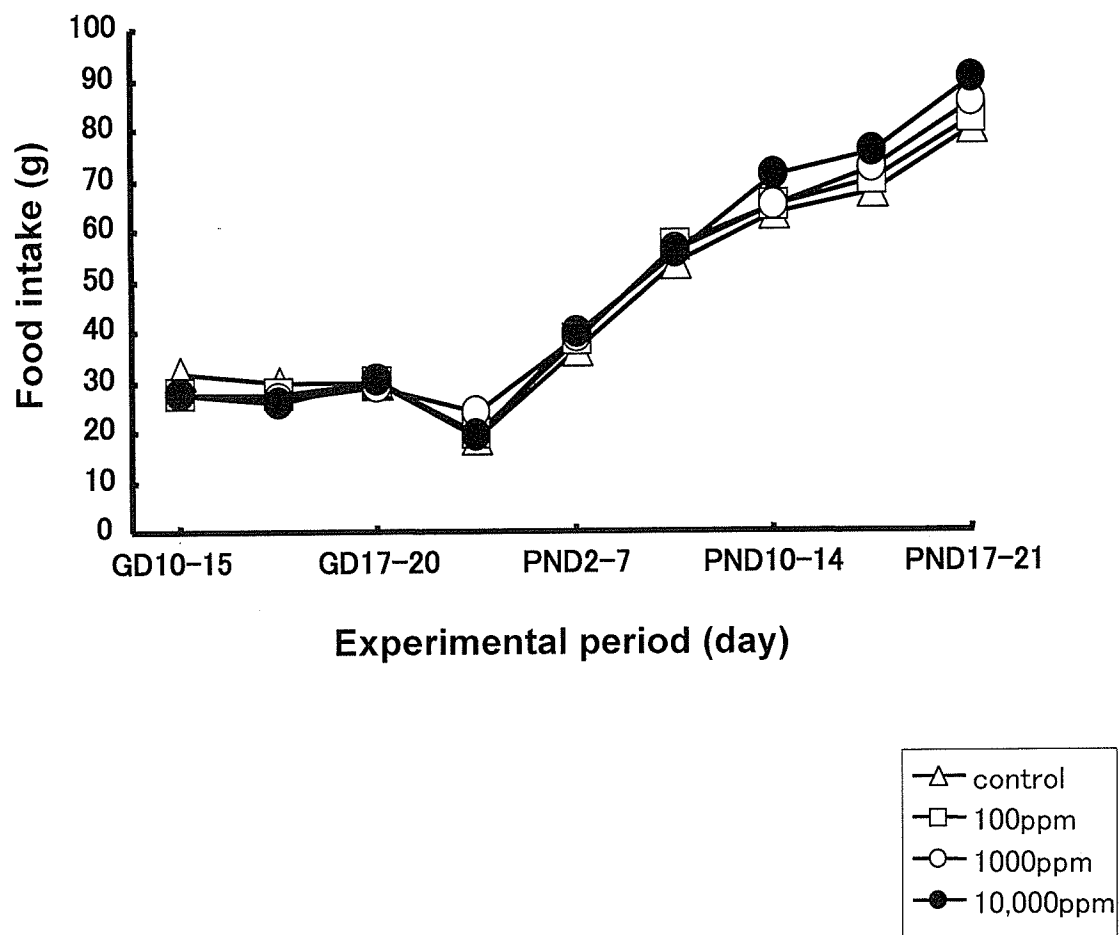


Fig. 8.
Food intake of dams exposed to hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

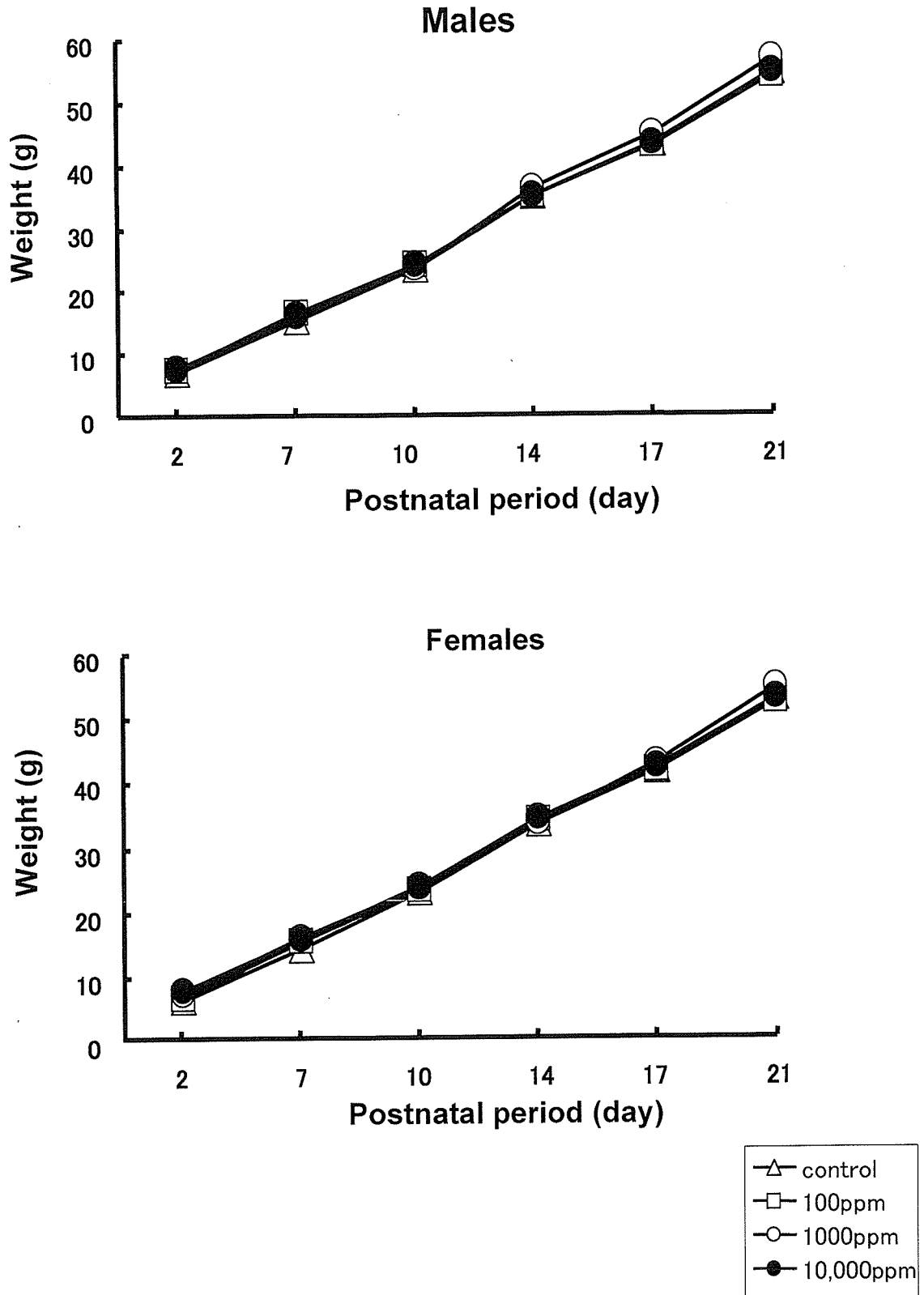


Fig. 9.
Growth curves during the lactation period of offspring exposed to hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

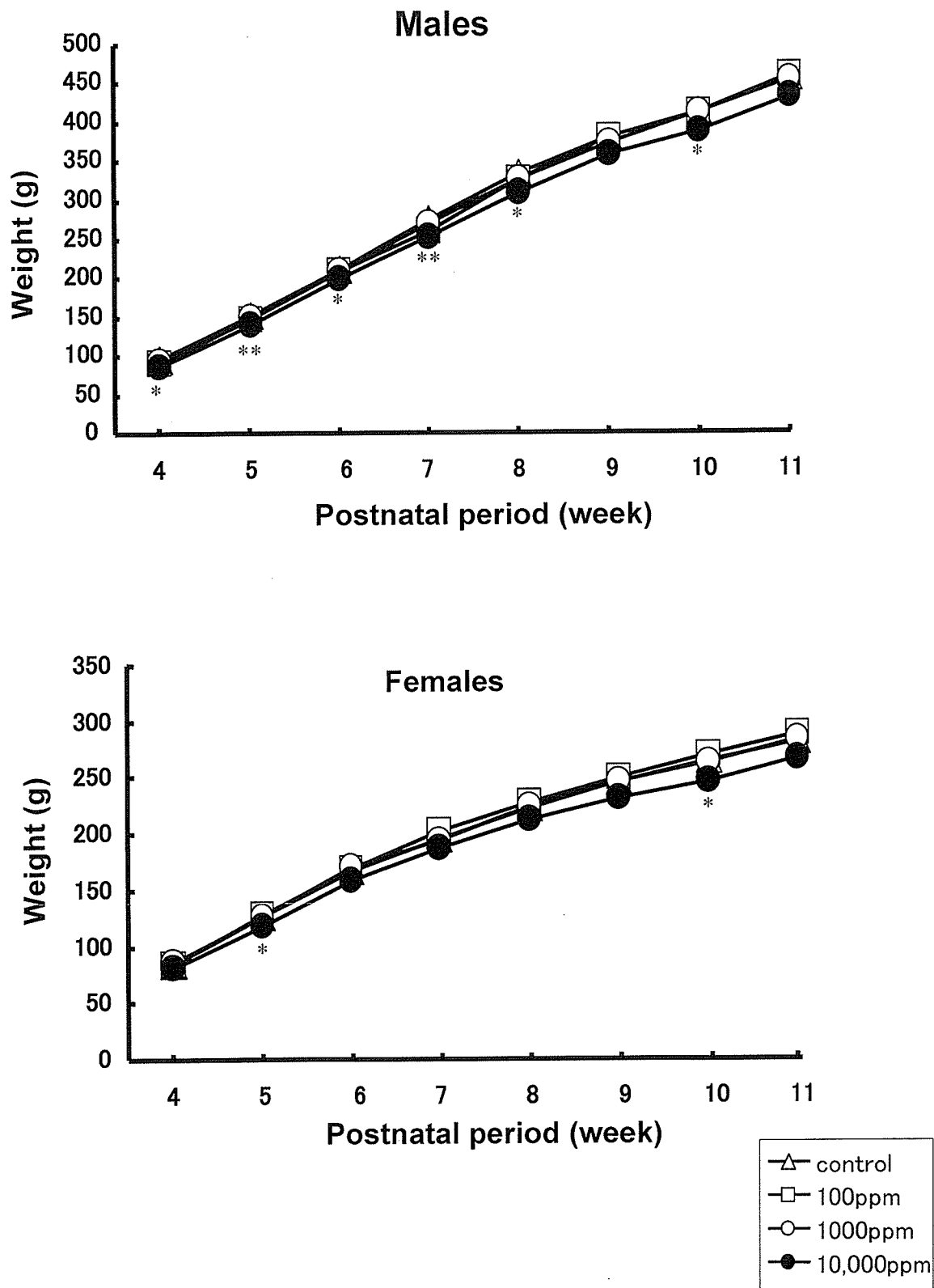
Table 4.
Effects on dams and offspring until prepubertal necropsy in the exposure study of hexabromocyclododecane during the period from the mid-gestation to the end of lactation

	HBCD in diet (ppm)				
	0	100	1000	10,000	
No. of dams examined	10	10	10	10	
Maternal parameter					
Body weight gain (g/day)					
GD 10-GD 20	11.22 ± 1.85 ^a	11.08 ± 1.34	10.72 ± 1.18	11.34 ± 1.12	
PND 2-PND 10	4.70 ± 1.82	4.20 ± 2.70	4.00 ± 1.49	5.02 ± 1.74	
PND 10-PND 21	1.58 ± 1.11	0.64 ± 0.96	1.16 ± 1.15	1.13 ± 1.17	
PND 21					
BW (g)	339.3 ± 27.3	323.3 ± 26.6	334.0 ± 25.7	336.5 ± 26.4	
Thyroid weight (mg/100 g BW)	5.73 ± 0.90	6.75 ± 0.99	6.30 ± 0.80	7.47 ± 1.05*	
Offspring parameter					
No. of implantation sites	13.7 ± 1.9	14.2 ± 1.6	12.4 ± 1.4	14.0 ± 1.6	
No. of live offspring	13.0 ± 1.8	13.0 ± 1.6	11.6 ± 1.6	12.9 ± 1.4	
Male ratio (%)	48.5 ± 16.2	59.3 ± 14.2	48.7 ± 20.2	45.7 ± 9.5	
BW, PND 2 (g)					
Males	7.11 ± 0.66	7.22 ± 0.56	7.65 ± 0.95	7.15 ± 0.80	
Females	6.53 ± 0.59	6.84 ± 0.50	7.28 ± 0.75	6.84 ± 0.81	
AGD, PND 2 (mm)					
Males	3.88 ± 0.23	3.96 ± 0.20	4.08 ± 0.30	4.01 ± 0.23	
Females	2.13 ± 0.60	1.94 ± 0.08	2.00 ± 0.17	2.03 ± 0.12	
Relative organ weights, PND 21					
No. of offspring examined		10	10	10	10
Males					
BW (g)	54.3 ± 3.5	51.2 ± 7.3	56.7 ± 4.1	54.0 ± 3.3	
Liver (g/100g BW)	3.68 ± 0.11	3.82 ± 0.31	3.98 ± 0.15	4.66 ± 0.35*	
Kidneys (g/100g BW)	1.12 ± 0.05	1.12 ± 0.05	1.12 ± 0.05	1.09 ± 0.05	
Brain (g/100g BW)	2.76 ± 0.20	3.00 ± 0.46	2.67 ± 0.18	2.78 ± 0.34	
Spleen (g/100g BW)	0.39 ± 0.05	0.35 ± 0.09	0.41 ± 0.06	0.37 ± 0.06	
Thymus (g/100g BW)	0.36 ± 0.06	0.40 ± 0.06	0.42 ± 0.04	0.39 ± 0.05	
Adrenals (mg/100g BW)	26.6 ± 2.5	29.7 ± 2.6	31.9 ± 5.2*	31.0 ± 5.5	
Testes (g/100g BW)	0.43 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.05	0.40 ± 0.03	
Epididymides (g/100g BW)	0.063 ± 0.016	0.068 ± 0.008	0.071 ± 0.012	0.068 ± 0.013	
Females					
BW (g)	50.3 ± 3.4	50.0 ± 6.0	53.7 ± 5.5	51.3 ± 2.9	
Liver (g/100g BW)	3.77 ± 0.17	3.83 ± 0.23	4.01 ± 0.25	4.83 ± 0.26*	
Kidneys (g/100g BW)	1.21 ± 0.07	1.12 ± 0.08*	1.17 ± 0.08	1.17 ± 0.05	
Brain (g/100g BW)	2.88 ± 0.23	2.89 ± 0.29	2.72 ± 0.23	2.73 ± 0.12	
Spleen (g/100g BW)	0.38 ± 0.05	0.36 ± 0.06	0.41 ± 0.05	0.37 ± 0.04	
Thymus (g/100g BW)	0.39 ± 0.08	0.41 ± 0.09	0.46 ± 0.07	0.42 ± 0.07	
Adrenals (mg/100g BW)	31.4 ± 6.3	30.3 ± 3.6	30.3 ± 2.1	27.8 ± 4.9	
Ovaries (mg/100g BW)	32.3 ± 3.9	30.9 ± 4.9	28.1 ± 6.3	28.7 ± 3.4	
Uterus (g/100g BW)	0.078 ± 0.013	0.078 ± 0.010	0.075 ± 0.010	0.071 ± 0.011	

^a Mean ± SD.

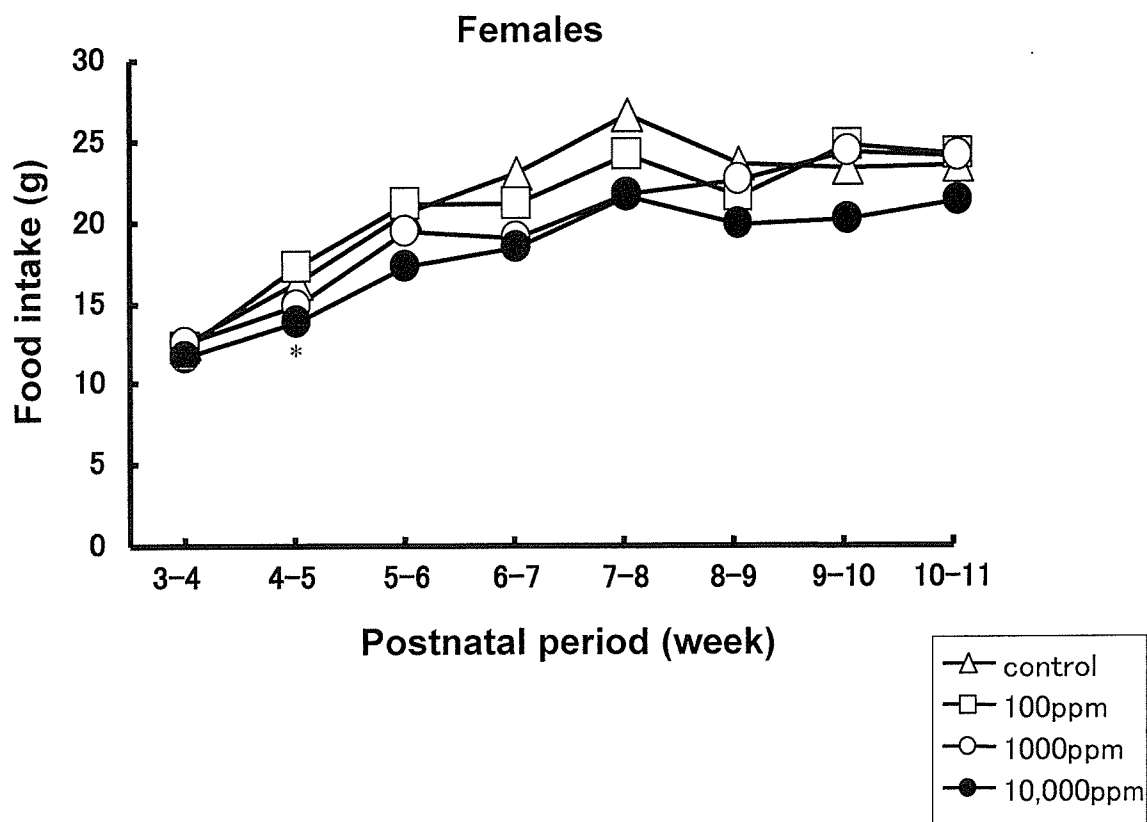
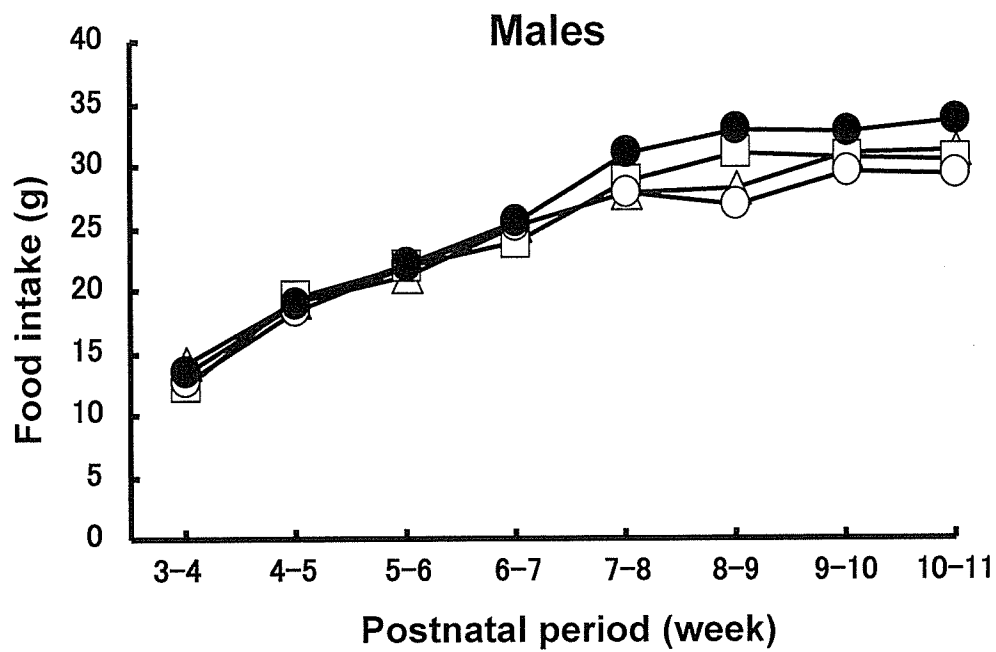
Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; GD, gestational day; PND, postnatal day; BW, body weight; AGD, anogenital distance.

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



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

Fig. 10.
 Growth curves after weaning for offspring exposed to hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of the lactation.



* $P < 0.05$, vs. control

Fig. 11. Food intake of offspring exposed to hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

Table 5.
Onset of puberty and estrous cyclicity of the offspring exposed to hexabromocyclododecane during the period from the mid-gestation to the end of lactation

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
Onset of puberty				
Males				
No. of animals examined	13	14	12	14
Age by day	40.7 ± 1.9 ^a	40.6 ± 1.3	40.8 ± 2.0	41.1 ± 1.6
BW	204.3 ± 15.7	198.3 ± 20.4	203.2 ± 15.0	195.8 ± 10.1
Females				
No. of animals examined	14	12	14	13
Age by day	35.4 ± 1.9	35.6 ± 1.8	34.9 ± 1.7	34.4 ± 2.1
BW	130.8 ± 11.7	133.8 ± 10.8	129.2 ± 13.5	118.6 ± 11.7*
Estrous cyclicity during PNW 8-11				
No. of animals examined	10	10	10	10
Irregularity (Extended diestrus)	1	2	0	0

^a Mean ± SD.

Abbreviations: HBCD, hexabromocyclododecane; BW, body weight; PNW, postnatal week.

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