

neural	10	<p style="text-align: center;">example</p> Deleted in colorectal carcinoma Hairy and enhancer of split 2 Gastrulation brain homeobox 2 Neuregulin 1 Suppressor of cytokine signaling 1 Follistatin-like 3 Bcl2-interacting killer Myc-like oncogene
(central nervous system development	6)	
cell migration	0	
apoptosis	2	
proliferation	1	
cell adhesion	3	
others	30	
EST	77	
<hr/>		
total	129	

Fig. 24.

Ontology analysis of genes showing increased expression in the white matter of rats at weaning exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

neural (central nervous system development	0 0)
cell migration	0
apoptosis	1
proliferation	0
cell adhesion	1
others	7
EST	7
<hr/>	
total	16

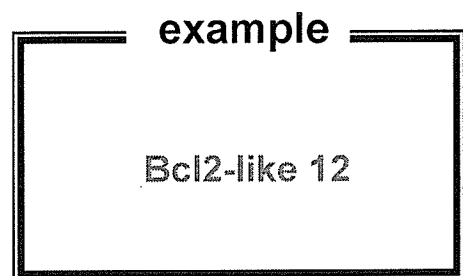


Fig. 25.
Ontology analysis of genes showing decreased expression in the white matter of rats at weaning exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

Up-regulated (≥ 2 -fold)

Down-regulated ($\geq 1/2$ -fold)

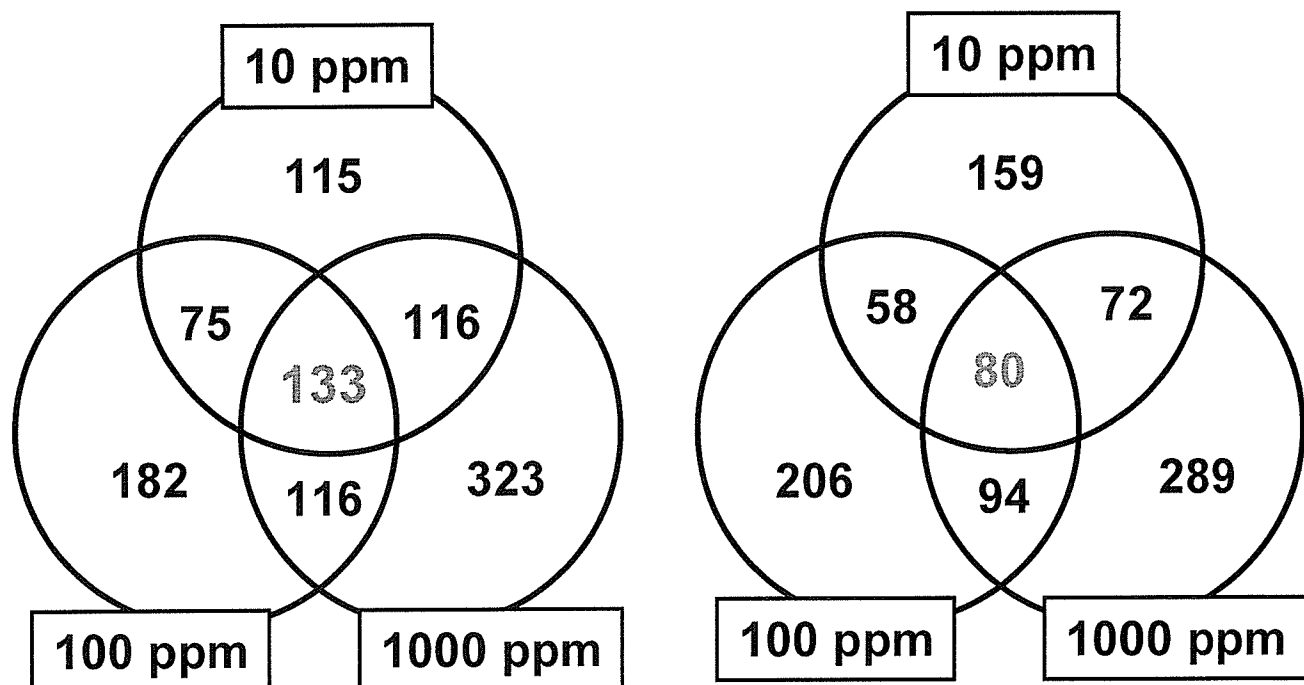


Fig. 26.

Venn diagram of genes showing altered expression in the hippocampal CA1 region of rats at weaning exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

neural	11
(central nervous system	
development	8)
cell migration	3
apoptosis	3
proliferation	0
cell adhesion	3
others	53
EST	52
<hr/>	
total	133

example
Neuregulin 1
Forkhead box D1
Notch 1
Cholecystokinin
Granzyme G
Histone deacetylase 3

Fig. 27.

Ontology analysis of genes showing increased expression in the hippocampal CA1 region of rats at weaning exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

neural (central nervous system development	7 4)
cell migration	1
apoptosis	1
proliferation	1
cell adhesion	1
others	26
EST	43
total	80

example
Nerve growth factor receptor
Reelin
Claudin 1
Zinc finger homeobox 1b
Thioredoxin-like 1

Fig. 28.
Ontology analysis of genes showing decreased expression in the hippocampal CA1 region of rats at weaning exposed to decabromodiphenyl ether during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

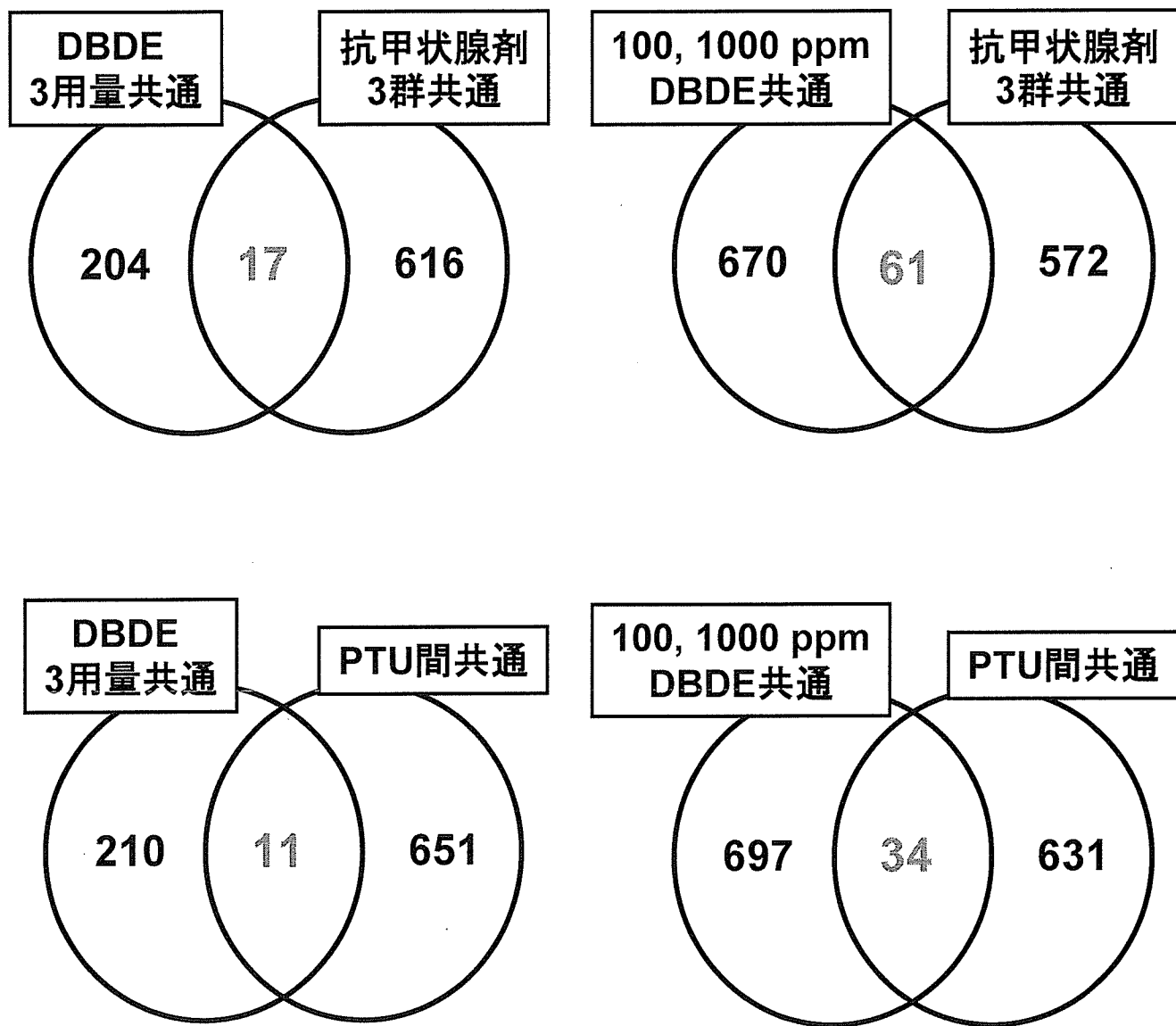


Fig. 29.
 白質において抗甲状腺剤投与、DBDE投与に共通して発現増加した遺伝子数.

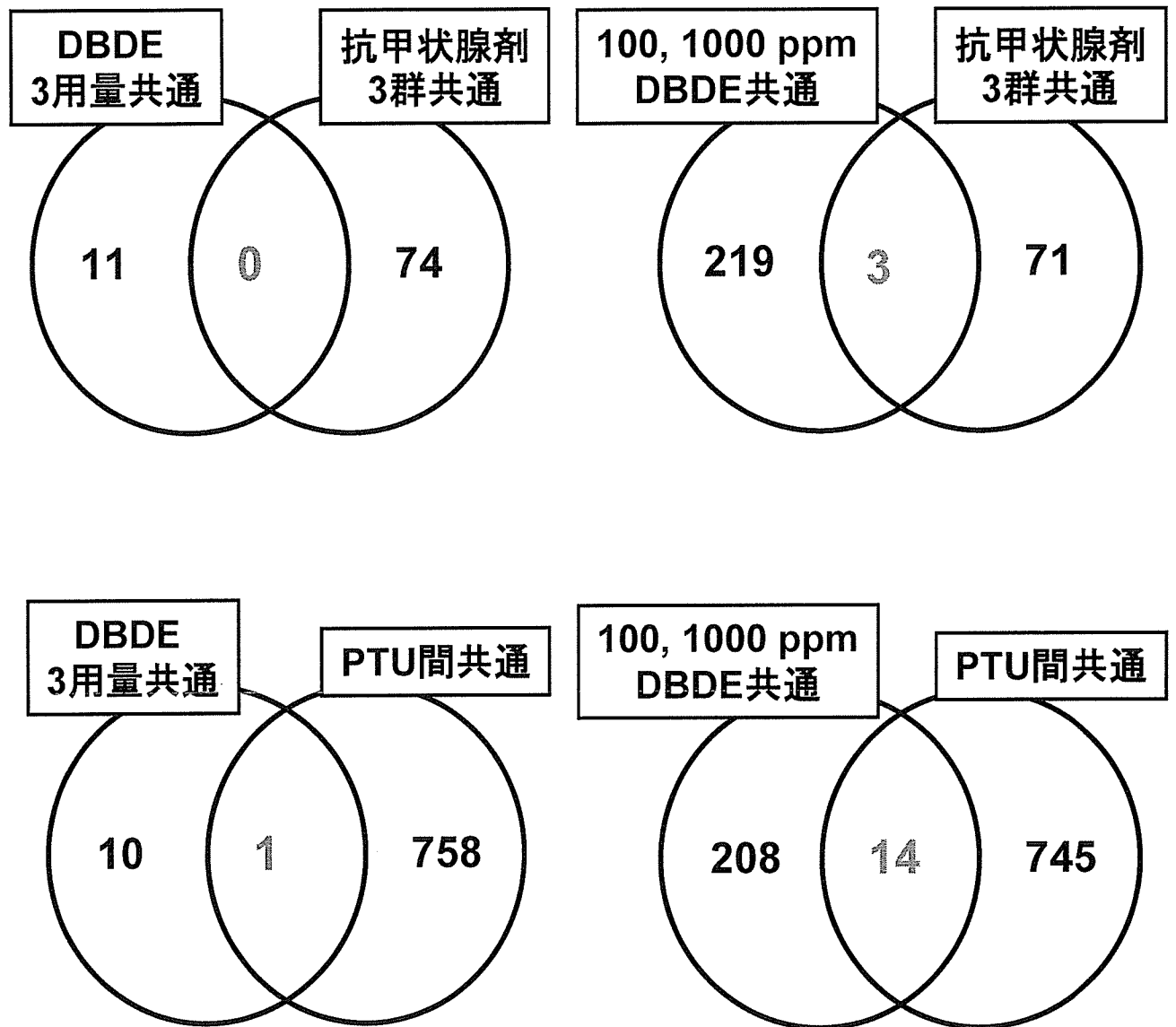


Fig. 30.
 白質において抗甲状腺剤投与、DBDE投与に共通して発現減少した遺伝子数.

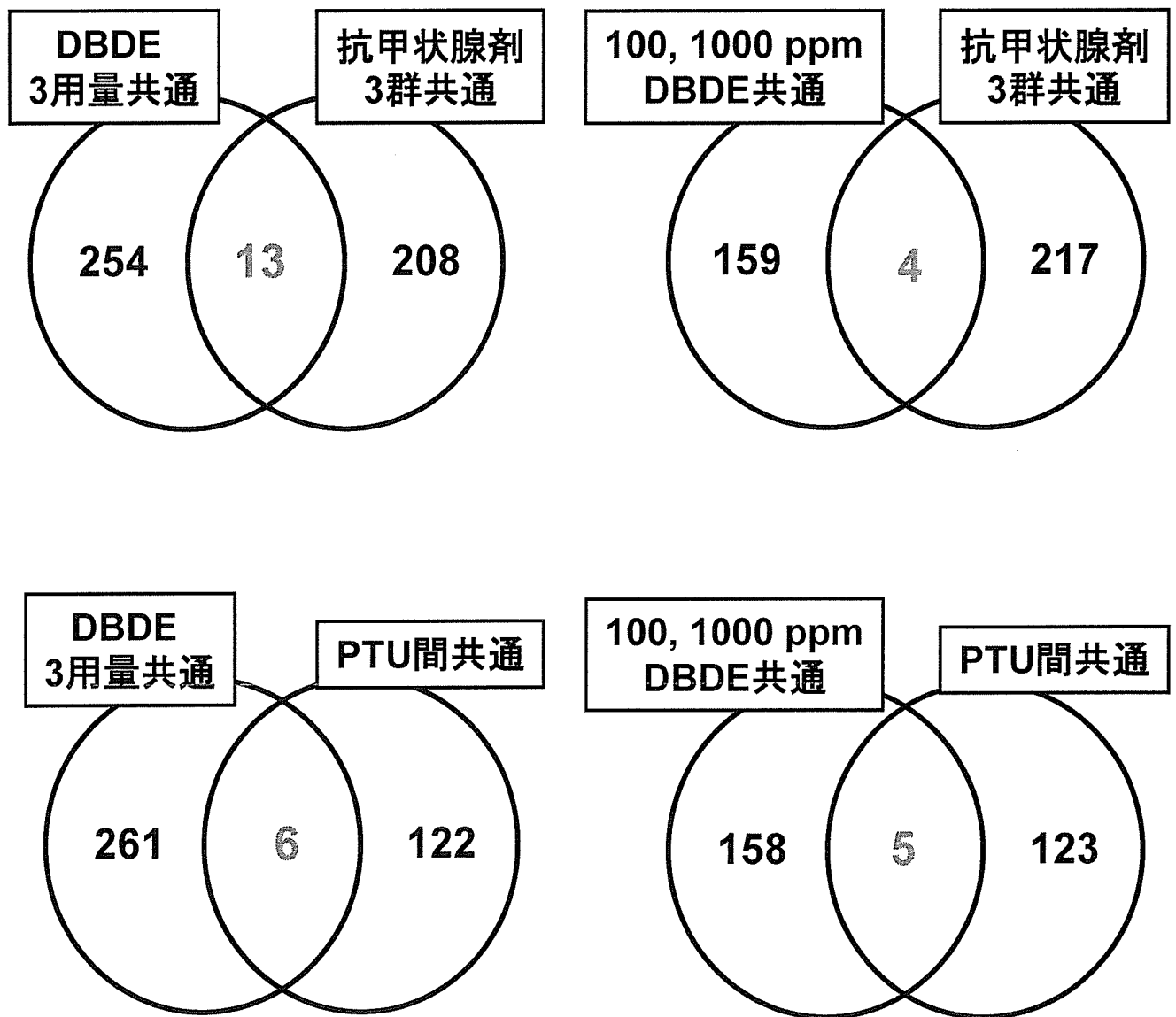


Fig. 31.
海馬CA1において抗甲状腺剤投与、DBDE投与に共通して発現増加した遺伝子数.

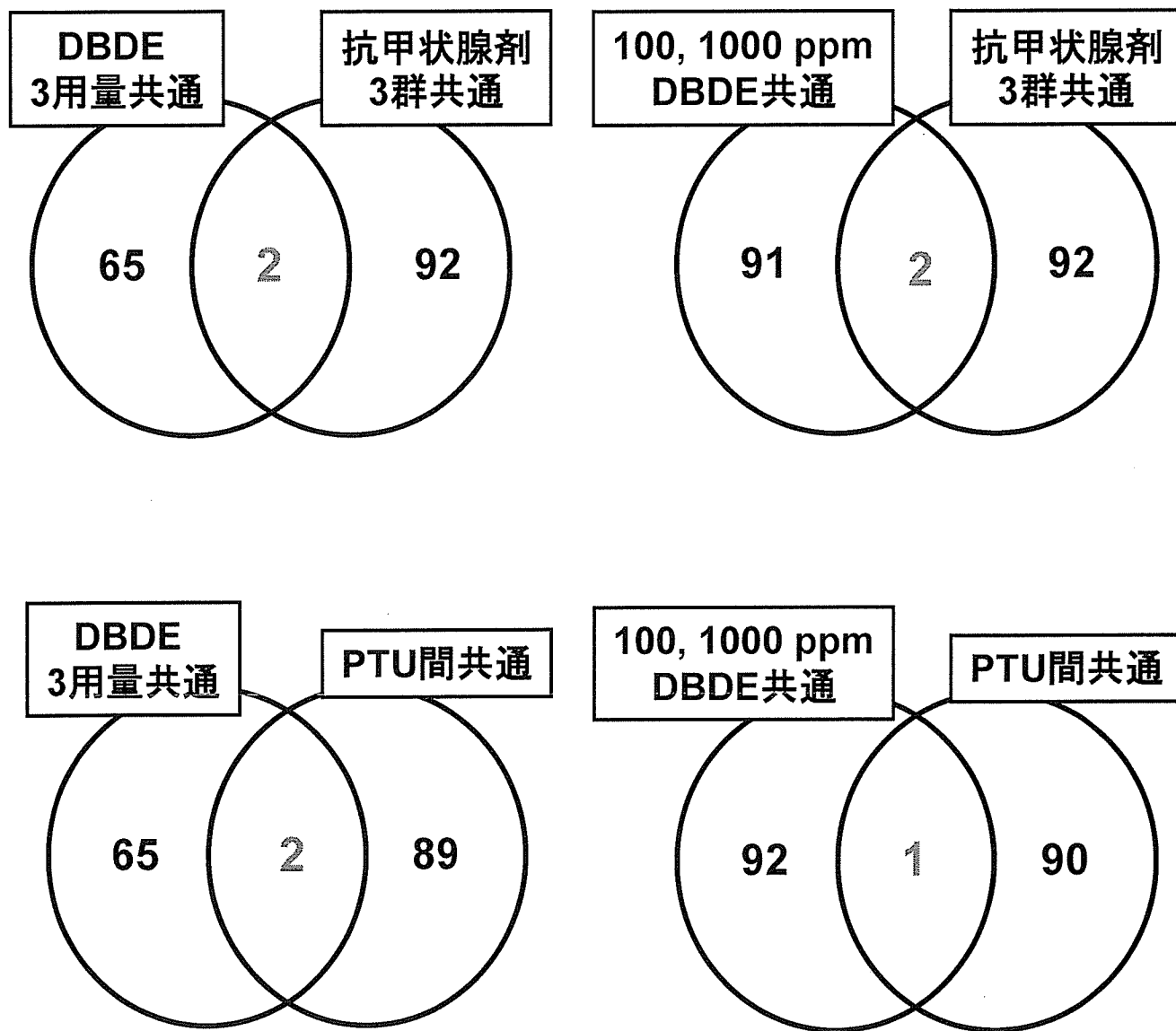


Fig. 32.
海馬CA1において抗甲状腺剤投与、DBDE投与に共通して発現減少した遺伝子数.

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）

分担研究名 神経機能・行動影響評価

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

研究要旨：甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の生体に対する影響の評価系の確立を目的として、hexabromocyclododecane (HBCD) の胎児期及び授乳期慢性曝露による中枢神経系に対する影響を検討した。一般行動観察の結果、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露では、特筆すべき異常行動は認められなかった。また、高架式十字迷路法に従い HBCD 曝露による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。さらに、条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤である methamphetamine 誘発報酬効果に対する HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した結果、変化は認められなかった。次に、側坐核における dopamine の遊離量について、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した結果、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露では、側坐核における dopamine の基礎遊離量及び、methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量に著明な変化は認められなかった。以上の結果から、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露は、特筆すべき異常行動を引き起こさないことが示唆された。なお、前年度の被検物質である DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露により側坐核 dopamine 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 dopamine 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。

A. 研究目的

近年、血液脳関門等の防御機構が未成熟である胎児期及び授乳期において環境化学物質を曝露されることにより、中枢神経系の発達異常及び成長後の行動異常が惹起されるといった概念が一般化されつつある。また、甲状腺ホルモンは中枢神経系の発達に重要な役割を担っていることから、甲状腺ホルモンかく乱作用を有する環境化学物質が中枢神経系の発達障害を引き起こす可能性が考えられる。そこで本研究では、臭素系難燃剤として広く使用されており、甲状腺ホルモンかく乱作用が懸念されている HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露による中枢神経系に及ぼす影響を行動薬理的に検討した。なお、dopamine 神経発達障害を惹起する可能性が示唆された前年度の被検物質である DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露による、側坐核 dopamine 遊離量に及ぼす影響について用量反応性を検討した。

B. 研究方法

全ての実験には SD 系雌/雄性ラットを用いた。

HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露は、薬物混入飼料法に従い、妊娠 10 日目より離乳（生後 21 日）に至るまで DBDE を 0、100、1000 及び 10000 ppm の濃度で粉末飼料に混入させた。

一般行動観察では open field にラットを入れ、馴化期間である 5 分間の行動を観察した。特に、水平

方向の運動量である horizontal activity と立ち上がり行動である vertical activity を測定した。また、dopamine 神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 及び circling ならびに serotonin syndrome の指標である head-twitch 行動等、モノアミン神経系の機能破綻に起因するとされる異常行動の発現の有無についても確認した。

不安感受性の検討は高架式十字迷路試験に従った。

脳内報酬系への影響は条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤である methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に及ぼす HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した。

脳内モノアミン濃度の測定は *in vivo* microdialysis 法に従い、脳内報酬系に関与する mesolimbic dopamine 神経の投射先である側坐核における dopamine とその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) 及び homovanillic acid (HVA) の細胞外遊離量を測定した。

(倫理面への配慮)

なお、本研究は関連法規及び星薬科大学動物実験指針に従い Refinement, Replacement, Reduction の 3R 原則に基づいて遂行した。

C. 研究結果

HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響を、出生時、離乳時 (3 週齢) 及び行動実験開始時 (7 週齢) の体重を指標として検討した。その結果、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝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 の慢性曝露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの曝露動物において、その他の特筆すべき異常行動は観察されなかった。

高架式十字迷路法に従い、HBCD 慢性曝露による不安感受性の変化について検討したところ、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、methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した。その結果、HBCD 慢性曝露は methamphetamine 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 dopamine 及びその主要代謝物の遊離量を、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、HBCD の慢性曝露により、側坐核における dopamine 基礎遊離量及び methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量、さらに、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曝露による側坐核 dopamine 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 dopamine 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。

D. 考察

甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の影響評価系の確立を目的として、本年度は本邦で最も使用量の多い臭素系難燃剤である HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響について行動薬理的検討を行った。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曝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曝露ラットでは、自発運動量の変化は認められなかった。また、dopamine 神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 及び circling ならびに serotonin syndrome の指標である head-twitch 行動等、モノアミン神経系の機能破綻に起因するとされる異常行動の発現の有無についても確認したが、特筆すべき異常行動は認

められなかった。さらに、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、研究者らは DBDE 及び PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露により dopamine 神経発達障害が引き起こされる可能性を報告した。本研究においても次に、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露による dopamine 神経機能に及ぼす影響を検討した。まず、methamphetamine 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 慢性曝露の影響は認められなかった。さらに、側坐核 dopamine 遊離について *in vivo* microdialysis 法に従い検討した結果、HBCD 慢性曝露の影響は認められなかった。以上のことから、HBDE は DBDE や PTU とは異なり、dopamine 神経の発達に影響を及ぼさないことが示唆された。

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曝露により、側坐核 dopamine 遊離量の減少が引き起こされることを明らかにした。本年度はさらに、側坐核 dopamine 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 dopamine 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、低用量の曝露であっても、DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露は dopamine 神経系の発達障害を引き起こす可能性が考えられる。また、現段階では dopamine 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。

E. 結論

周産期曝露影響評価として、本年度は HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露による神経機能・行動影響を検討した。その結果、十分用量の HBCD でも神経機能・行動には影響を及ぼさない可能性が示唆された。一方、低用量 DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露においても側坐核 dopamine 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、健康影響の少ない臭素系難燃剤であると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

宮川和也、成田 年、赤間久彦、鈴木 勉：甲状腺ホルモンかく乱環境化学物質の胎児期および授乳期慢性曝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，2006 年 7 月 3 日～5 日、名古屋

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

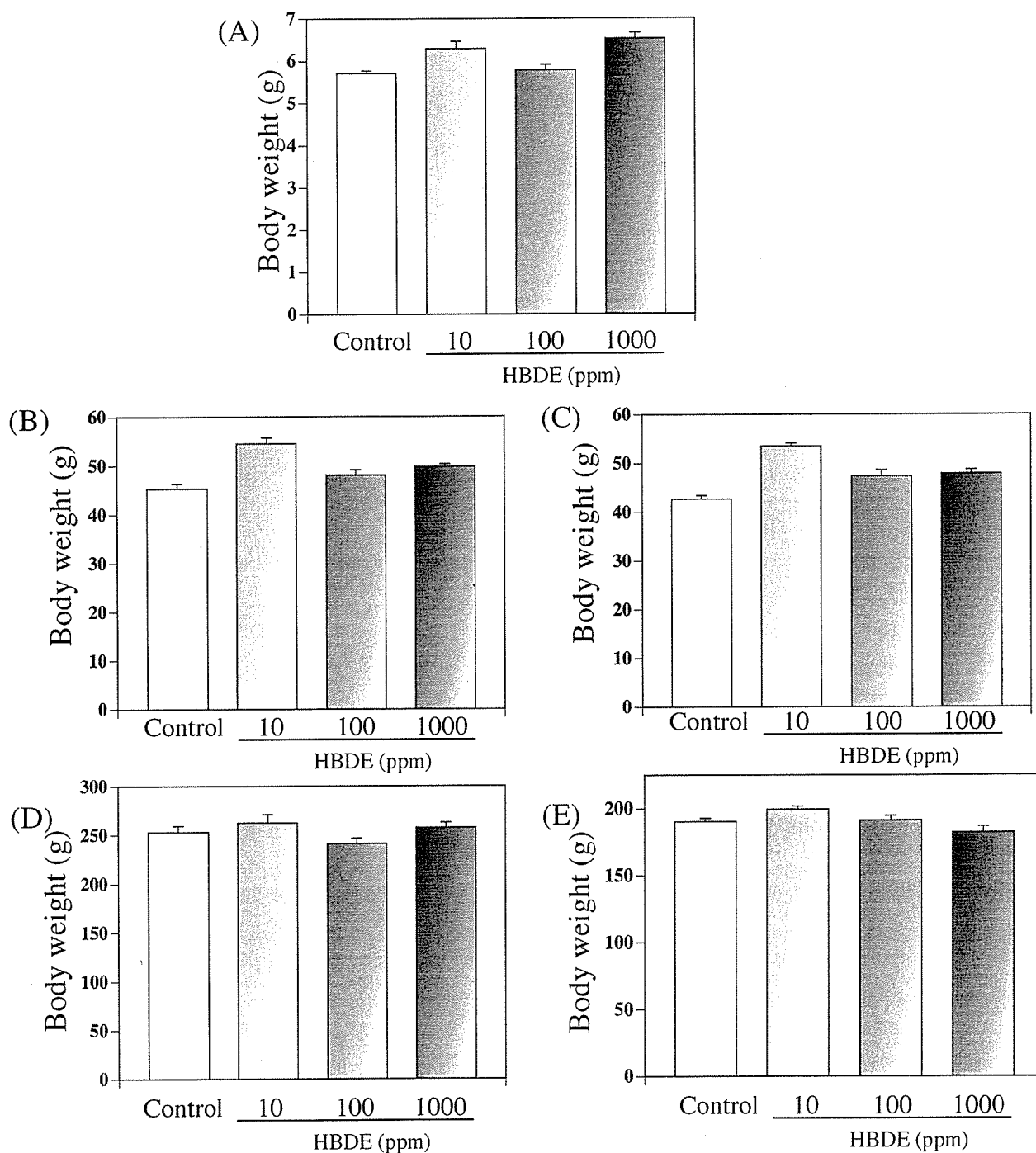


図1 Hexabromocyclododecane (HBCD) の胎児期および授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響

HBCD の胎児期および授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響を、出生時 (A)、離乳時 (3 週齢、B; 雄、C; 雌) および行動実験開始時 (7 週齢、D; 雄、E; 雌) の体重を指標として検討した。その結果、HBCD の胎児期および授乳期慢性曝露による体重変化は認められなかった。

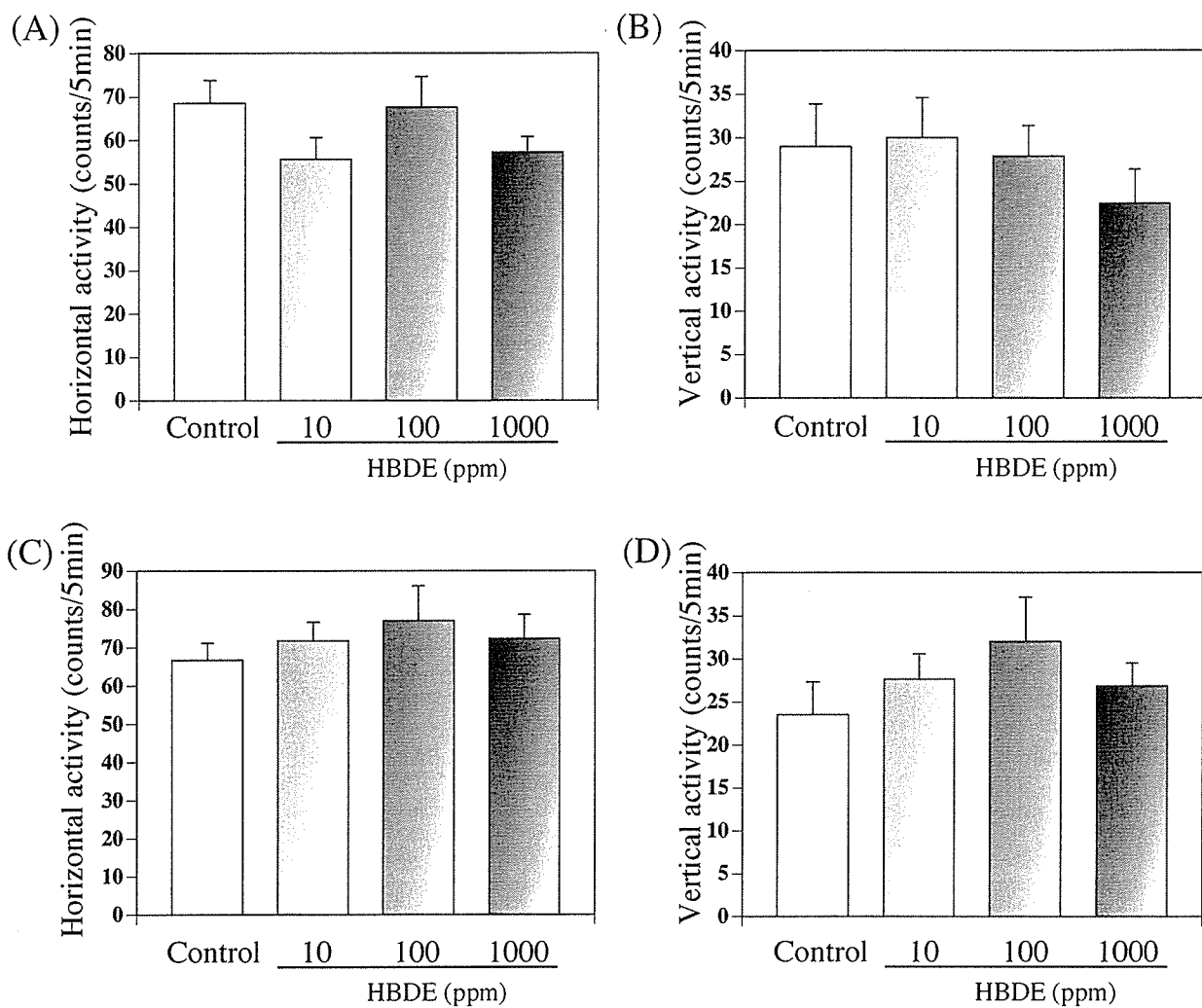


図2 HBCDの胎児期および授乳期慢性曝露による自発運動量に及ぼす影響

一般行動観察の結果、HBCDの胎児期および授乳期慢性曝露による自発運動量の変化は雄(A, B)、雌(C, D)共に認められなかった。

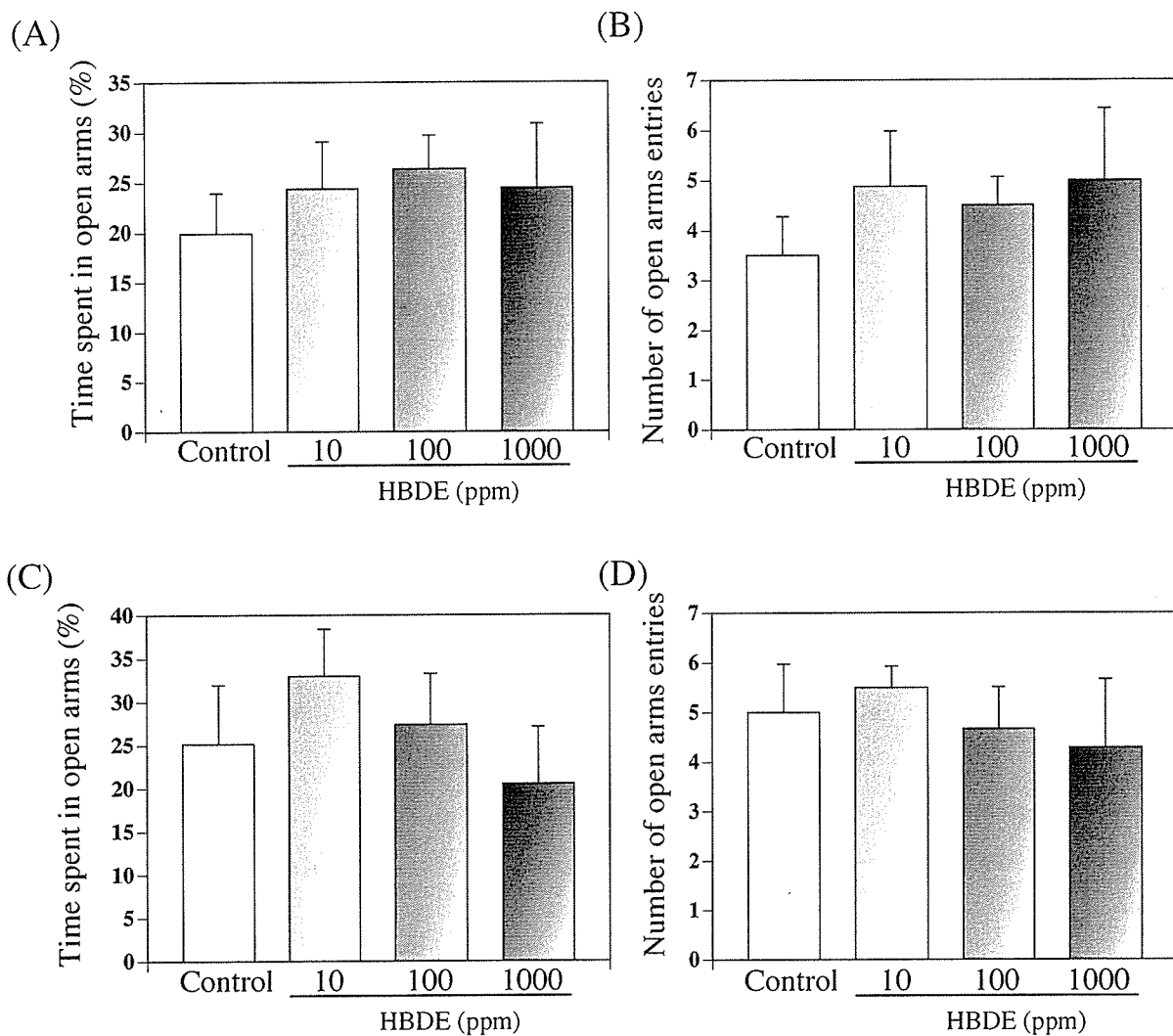


図3 HBCDの胎児期および授乳期慢性曝露による不安感受性に及ぼす影響

高架式十字迷路法に従い HBCD 慢性曝露による不安感受性の変化について検討したところ、雄 (A, B)、雌 (C, D) 共に有意な変化は認められなかった。

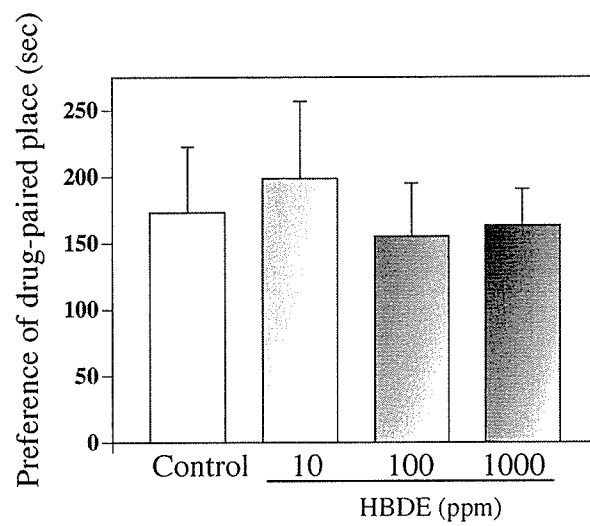


図 4 HBCDの胎児期および授乳期慢性曝露による methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす影響

条件づけ場所嗜好性試験に従い、methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効果に及ぼす HBCD の胎児期および授乳期慢性曝露の影響を雄性ラットにおいて検討した。その結果、DBDE 曝露による methamphetamine 誘発報酬効果に変化は認められなかった。

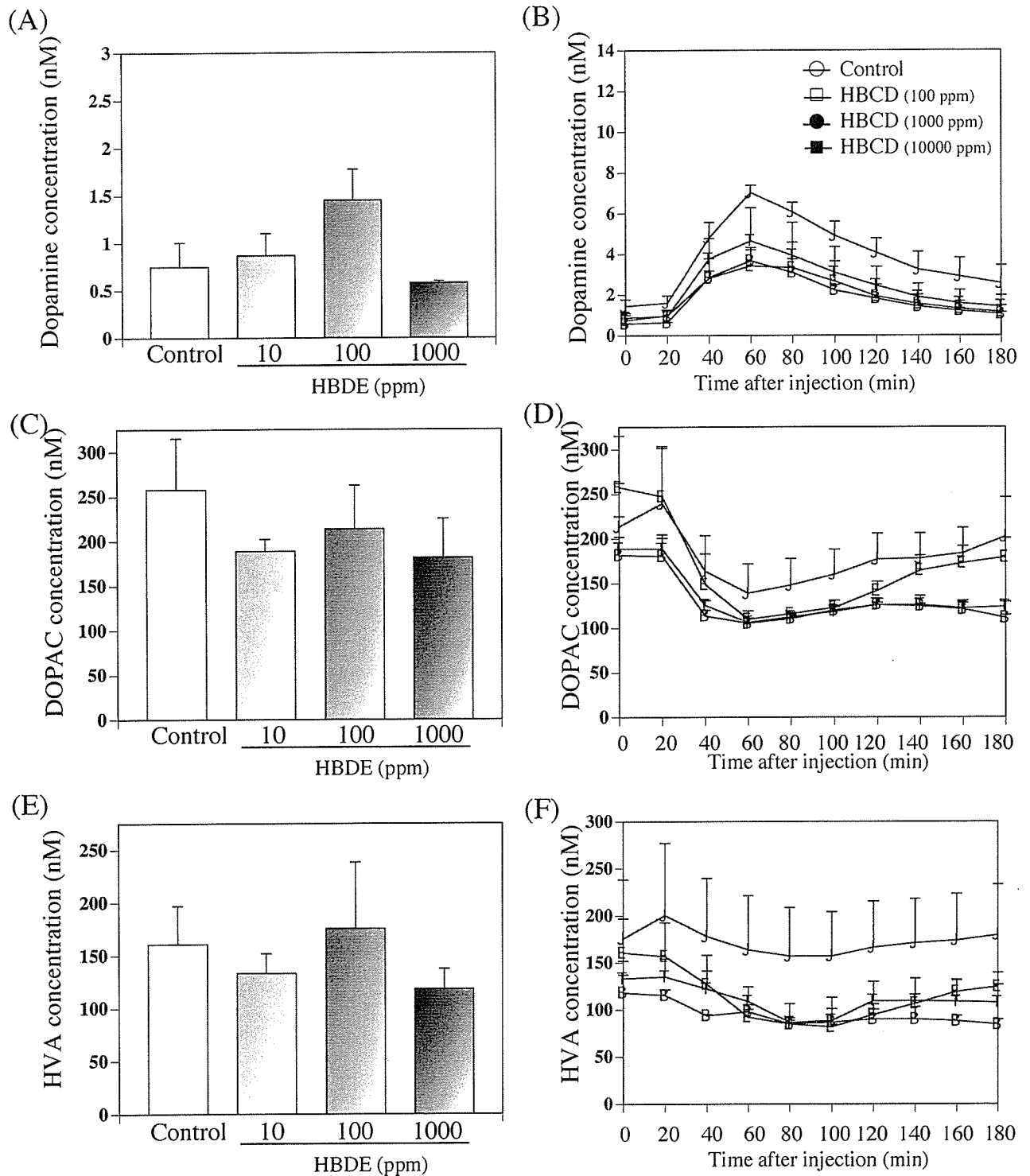


図 5 HBCD の胎児期および授乳期慢性曝露による methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量および dopamine 基礎遊離量に及ぼす影響

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、HBCD 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) に変化は認められなかった。さらに、DOPAC および HVA においても変化は認められなかった (C-F)。

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

乳幼児期免疫機能影響評価

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 本研究においては、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おこない、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18年度は、臭素化難燃剤HBCD(hexabromocyclododecane) 100, 1,000, 10,000ppm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。HBCD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、胸腺重量並びに脾臓、胸腺白血球数に对照群との差はなく、離乳後の11週令においても、両臓器重量並びに両臓器白血球数に差はみられなかった。血液細胞数、白血球の組成比に関しては、3週令で、赤血球容積、11週令では、血色素濃度の用量依存的な上昇が観察されたが、他は、用量依存性を示す変化は観察されなかった。また、血漿中の甲状腺ホルモンT3濃度の有意な低下、アルブミン濃度の上昇が、3週令、11週令ともにみられた。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では、对照群との間に大きな変化は観察されなかったが、3週令ラットの末梢血において、活性化T細胞の減少、非活性化B細胞の上昇、脾臓のNK細胞の減少が観察され、11週令において、回復傾向にあった。KLHに対する抗体産生に対する影響については、10,000ppmで、IgG抗体の産生を有意に抑えた。以上、HBCDの場合、平成17年度に免疫影響を検討したDBDEと同様、高濃度群で、甲状腺機能低下に起因すると考えられる活性化T細胞群低下、脾臓のNK細胞の減少が観察され、抗体産生の低下もみられ、弱い免疫影響のあることが示唆された。なお、成熟後の11週令では、肝機能への影響が示唆される血液中アルブミン濃度の上昇は有意であったが、他の免疫影響に有意差はみられず、回復傾向にあることが示唆された。

研究協力者

蜂須賀暁子、中村亮介、中村里香

(国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

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。

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

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、脾臓の機能を中心と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・機能が发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、甲状腺機能阻害を有することが示唆されている化学物質であるため¹⁾、明らかに甲状腺機能障害を有する薬物(PTU, Methimazole)を対照として用い²⁾³⁾、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。今年、HBCDの免疫影響を検討し、DBDE投与後の免疫影響との比較を行った。

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、被検物質であるHBCDを、100 ppm, 1,000 ppm, 10,000 ppmの濃度で餌 (大豆除去飼料 (西川食)) 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、ラット後大動脈より採血した血液20mlをあらかじめ80mlの0.5%EDTA-2K溶液が入った1.5ml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、1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) 50mgをalum 1mg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⁴⁾。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+CD25+)⁵⁾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(トランスフェリン受容体)抗体を併用して解析を行なった⁶⁾。

(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(CD161)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) HBCD の免疫担当細胞への影響

図1に、HBCD 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、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、有意差はみられなかった。なお、肝臓重量は、1,000, 10,000 ppm 投与群の3週令時において、有意な増加が認められたが、11週令時においては、有意差は認められなかった。

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が、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

照と比べて有意な変化はみられなかった。なお、3週令で、赤血球容積、11週令時で血色素濃度の用量依存的な上昇が観察され(表2)、また、3週令で、有核赤血球(Ebl)のわずかな上昇がみられた(表3)。

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作用薬 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4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示したものを示した。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、HBCD 100 ppm, 10,000 ppm 投与 11週令時で、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 10,000 ppm 投与 3週令時ラットでみられた。さらに、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 10,000 ppm 投与 3週令ラットで観察された。

HBCD 投与による血液生化学的検査結果については表5に示すが、3週令時において甲状腺ホルモン T3 の有意な減少が、10,000 ppm 投与群でみられ、TSH の有意な上昇も観察された。11週令時においても T3 の有意な低下が、1,000, 10,000 ppm 投与群でみられた。また、血清のアルブミン値の上昇が、11週令時の 10,000 ppm 投与群において観察された。

(2) HBCD の抗体産生への影響

次に、HBCD 投与ラットの KLH に対する抗