

体産生への影響を示した結果を図2に示す。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。図には、KLH 特異的 IgG 抗体価と HBCD の用量依存性を調べた結果を示しているが、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 10,000ppm 投与群で、対照群と比較して、有意な抗体価の減少が観察された。

#### D. 結論

臭素化難燃剤 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週令の脾臓において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 週令においては、リンパ球ポピュレーションに有意な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が示唆されるデータが得られ、甲状腺ホルモン T3 の低下と連動することから、これら影響は、甲状腺機能抑制と連関する可能性が考えられた。なお、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 の用量依存性の得られた免疫影響関連の結果をまとめたものを表 6-b)に示した。また、表 6-a)には、比較のために同じく用量依存性の免疫影響の得られた昨年度に行った DBDE の免疫影響の結果を示した。DBDE、

HBCD とともに、3 週令時で、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、抗体産生の低下がみられた。NK 細胞の割合の低下も、両化合物でみられたが、HBCD の場合 3 週令時での抑制が、11 週令で回復しているのに比べ、DBDE の場合、11 週令でも抑制が有意であるという違いがみられた。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。

#### 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

1) Teshima R., Nakamura R., Nakamura R., Hachisuka A., Sawada J., Shibutani M.,  
Developmental exposure effect of decabromodiphenyl ether on the immune system in rats (in preparation).

2) Nakamura R., Teshima R., Hachisuka A., Takagi K., Gye-Hyeong W., Shibutani M., Sawada J. Effects of developmental hypothyroidism by maternal administration of propylthiouracil on the immune system of rats (in preparation).

### 2. 学会発表

1) 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

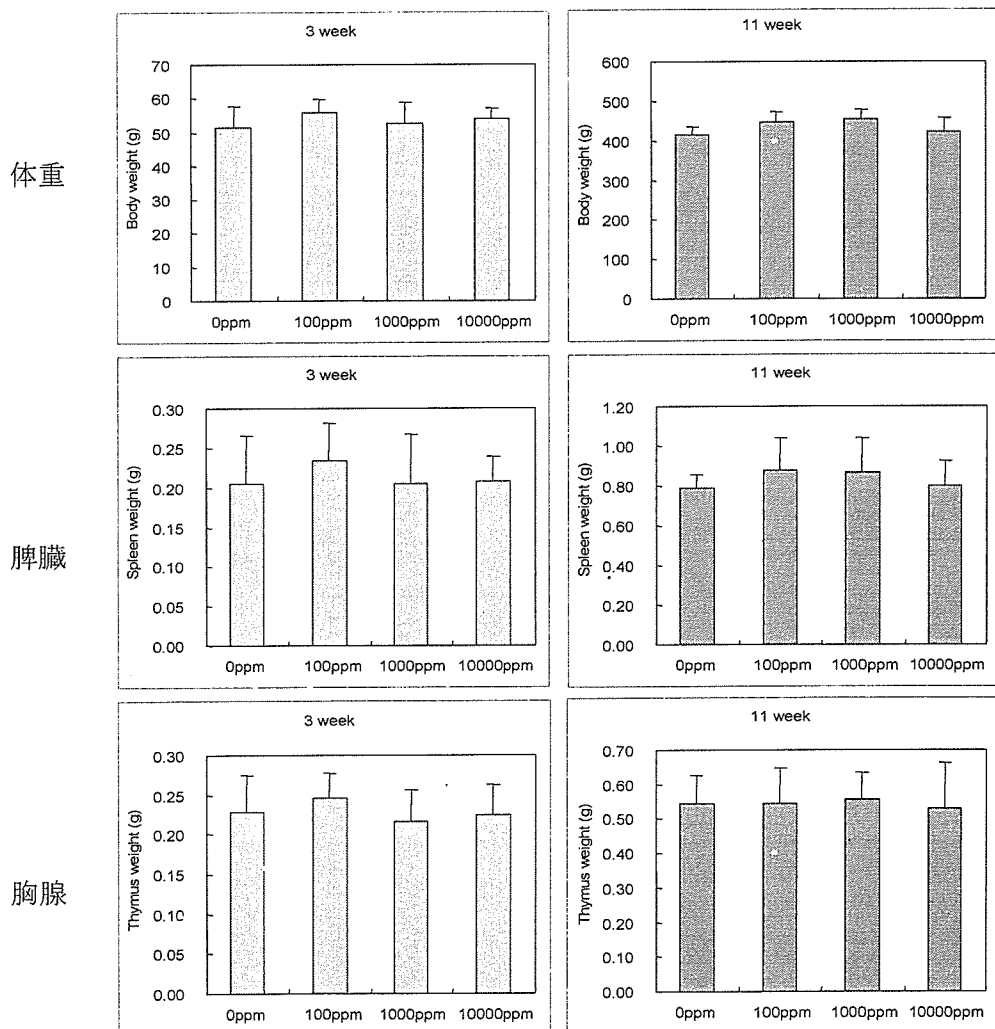
2) 中村亮介、手島玲子、蜂須賀暁子、高木加代子、禹桂炯、渋谷淳、澤田純一、胎児期・新生児期のラット免疫系に及ぼす抗甲状腺薬の影響；第13回日本免疫毒性学会学術大会 2006.9

3)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 (decabromo- diphenyl 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

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:  
 血中抗体レベル (IgG)  
 KLHに対するIgM, IgG抗体産生(ELISA)  
 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  
 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T細胞サブセット(CD4及びCD8a), 調節性T細胞(CD4+CD25+),  
 活性化T細胞 (CD3+CD71+)
- (6) 非特異的免疫  
 脾臓、末梢血のNK細胞数

図1 HBCD投与による体重・臓器重量変化



Mean ± SD (n=10)

表 2 - a

Hematological changes in 3-week old male rats exposed to HBCD during the fetus and neonatal period

group	WBC $\times 10^2/\text{ul}$	RBC $\times 10^4/\text{ul}$	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT $\times 10^4/\text{ul}$	n
M-1 (control)	35.3±11.3	327.7±22.7	5.19±0.69	20.00±1.81	61.05±4.23	15.85±1.90	25.92±1.93	118.92±19.50	10
M-2 (HBCD 100 ppm)	30.9±10.0	336.8±30.2	5.83±0.87	21.59±1.85	64.25±4.31	17.32±2.32	26.85±2.33	121.77±11.28	10
M-3 (HBCD 1000 ppm)	47.5±11.8*	328.1±24.0	5.76±0.73	21.16±2.07	64.50±4.27	17.55±1.77	27.17±1.19	128.38±11.06	10
M-4 (HBCD 10000 ppm)	39.6±7.9	322.3±23.7	5.98±1.18	21.57±3.24	66.71±6.26*	18.46±2.67*	27.55±1.94	123.99±22.54	10

表 2 - b

Hematological changes in 11-week old male rats exposed to brominated flame retardant

group	WBC $\times 10^2/\text{ul}$	RBC $\times 10^4/\text{ul}$	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	PLT $\times 10^4/\text{ul}$	n
M-1 (control)	82.1±17.8	758.6±63.6	14.27±1.93	46.74±3.79	61.64±1.63	18.78±2.01	30.49±3.29	108.85±9.88	10
M-2 (HBCD 100 ppm)	109.8±30.8 *	786.5±30.4	15.60±0.59	48.03±1.79	61.07±1.23	19.85±0.32	32.47±0.50	111.32±12.15	10
M-3 (HBCD 1000 ppm)	110.0±29.3 *	815.1±55.3 *	15.96±0.82 *	49.29±3.32	60.48±1.16	19.59±0.50	32.42±0.82	117.26±13.72	10
M-4 (HBCD 10000ppm)	103.4±34.1	766.4±39.6	15.27±0.56	46.42±2.16	60.61±1.30	19.94±0.60	32.90±0.46 *	123.97±19.1*	10

\*\*&lt;0.01, \*&lt;0.05 (t-test)

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

表 3

White blood cell classification in male rats exposed to HBCD during the fetus and neonatal period

group	n	Lymp %	Seg %	Eosi %	Mono %	Band %	Ebl n/100
3-week old rats							
M-1 (control)	9	78.88±4.74	19.73±4.77	0.61±0.74	0.61±0.49	0±0	0.06±0.17
M-2 (HBCD 100ppm)	10	79.02±3.18	19.63±3.26	0.6±0.46	0.75±0.63	0±0	0.48±0.66
M-3 (HBCD 1000ppm)	10	81.69±3.81	17.21±4.09	0.45±0.37	0.65±0.75	0±0	0.26±0.37
M-4 (HBCD 10000ppm)	10	81.41±4.06	17.42±4.5	0.36±0.5	0.81±0.9	0±0	1.00±1.45
11-week old rats							
M-1 (control)	10	84.64±5.46	13.51±5.15	0.9±0.94	0.95±0.69	0±0	0.05±0.16
M-2 (HBCD 100ppm)	10	84.27±4.88	13.33±4.67	1.5±1.15	0.9±0.7	0±0	0±0
M-3 (HBCD 1000ppm)	10	87.56±4.33	10.44±3.79	1.05±0.93	0.95±0.64	0±0	0.05±0.16
M-4 (HBCD 10000ppm)	10	86.44±3.36	11.86±3.34	0.75±0.68	0.95±0.5	0±0	0±0

\*\*&lt;0.01, \*&lt;0.05 (t-test)

Values are mean ± SD.

表 4 Effects of HB CD on subpopulations of immune cells

T cell subpopulations	Spleen 3w				Spleen 11w				Note
	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	
HB CD: 0 ppm									
CD3(+) CD8a(+)	6.84 ± 1.3	8.15 ± 1.88	7.22 ± 1.52	6.6 ± 1.44	13.42 ± 2.71	18 ± 4.21*	15.2 ± 3.54	18.4 ± 4.58*	CD8 T cell
CD8a(+) CD4(-)	6.86 ± 0.95	8.12 ± 2.16	6.99 ± 1.42	6.43 ± 1.44	14.42 ± 2.23	18.54 ± 4.34*	16.85 ± 4.31	18.87 ± 4.82*	CD8

Activation of T/B cells

	Thymus 3w				Thymus 11w				Note
	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	
HB CD: 0 ppm									
CD3(+) CD71(+)	2.67 ± 0.87	2.46 ± 0.8	1.82 ± 0.55*	1.87 ± 1.15	0.92 ± 0.97	0.74 ± 0.51	1.02 ± 0.84	1.04 ± 0.7	active T cell
HB CD: 0 ppm									
CD3(+) CD71(+)	13.51 ± 3.47	14.01 ± 2.16	11.81 ± 1.96	10.4 ± 2.02*	1.45 ± 0.54	1.35 ± 0.6	1.27 ± 0.47	1.32 ± 0.24	active T cell
CD71(-) CD45RA(+)	20.79 ± 4.03	20.24 ± 2.97	23.08 ± 1.77	25.81 ± 2.84**	20.91 ± 5.79	19.65 ± 7.81	22.94 ± 6.7	21.22 ± 5.22	Inactive B cell

Treg, NK, NKT(?) cells

	Spleen 3w				Spleen 11w				Note
	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	0 ppm	100 ppm	1000 ppm	10000 ppm	
HB CD: 0 ppm									
NKRP1A(+) CD25(-)	11.36 ± 0.79	11.55 ± 1.19	11.25 ± 1.67	9.99 ± 1.1**	21.47 ± 2.47	21.47 ± 3.9	23.28 ± 4.29	20.77 ± 2.33	NK cell
NKRP1A(+) CD4(+)	6.47 ± 0.61	6.28 ± 0.81	6.4 ± 1.31	5.63 ± 0.81*	12.53 ± 1.88	12.89 ± 1.85	13.78 ± 2.66	13.09 ± 1.72	CD4NKT(?)
NKRP1A(+) CD4(-)	5.75 ± 0.35	6.06 ± 1.09	5.65 ± 0.87	5.09 ± 0.76*	10.63 ± 1.63	9.97 ± 3.44	11.38 ± 2.47	9.44 ± 2.39	NK cell
HB CD: 0 ppm									
CD25(+) CD4(+)	7.7 ± 2.57	5.15 ± 0.94*	7.69 ± 1.27	7.85 ± 2.85	4.16 ± 1.09	3.98 ± 0.87	4.41 ± 0.76	4.32 ± 1.22	Treg
NKRP1A(+) CD4(-)	0.07 ± 0.03	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.05	0.2 ± 0.04	0.2 ± 0.05	0.25 ± 0.09	0.27 ± 0.08*	NK cell
HB CD: 0 ppm									
NKRP1A(+) CD25(+)	0.12 ± 0.03	0.1 ± 0.03	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.04*	0.27 ± 0.07	0.23 ± 0.08	0.27 ± 0.07	0.25 ± 0.09	CD25NK(?)

\*p<0.05, \*\*p<0.01

表 5

Serum levels of thyroid-related hormones of the offspring exposed to hexabromocyclododecane during the late gestation and lactation periods

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10000
PND 21				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	1.1 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.12	1.1 ± 0.1	0.93 ± 0.10 *
T4 (ug/dl)	4.4 ± 0.93	4.20 ± 0.77	4.8 ± 0.5	4.20 ± 0.52
TSH (ng/ml)	5.40 ± 0.62	6.66 ± 1.24	6.1 ± 1.4	7.00 ± 1.31 *
A/G ratio	2.17 ± 0.43	2.34 ± 0.59	2.1 ± 0.3	1.93 ± 0.70 <sup>b</sup>
albumin (g/dl)	3.55 ± 0.18	3.62 ± 0.25	3.6 ± 0.2	3.84 ± 0.15 <sup>b</sup>
PNW 11				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	1 ± 0.06	0.9 ± 0.07	0.9 ± 0.05 **	0.9 ± 0.06 *
T4 (ug/dl)	4.8 ± 0.70	4.8 ± 0.59	5.2 ± 0.65	5.20 ± 0.98
TSH (ng/ml)	4.7 ± 0.62	5.8 ± 1.72	5.4 ± 1.11	4.96 ± 0.80
A/G ratio	1.9 ± 0.24	1.9 ± 0.29	1.7 ± 0.16	1.70 ± 0.14
albumin (g/dl)	3.53 ± 0.32	3.63 ± 0.29	3.82 ± 0.34	4.00 ± 0.39 *

<sup>a</sup> Mean±SD.

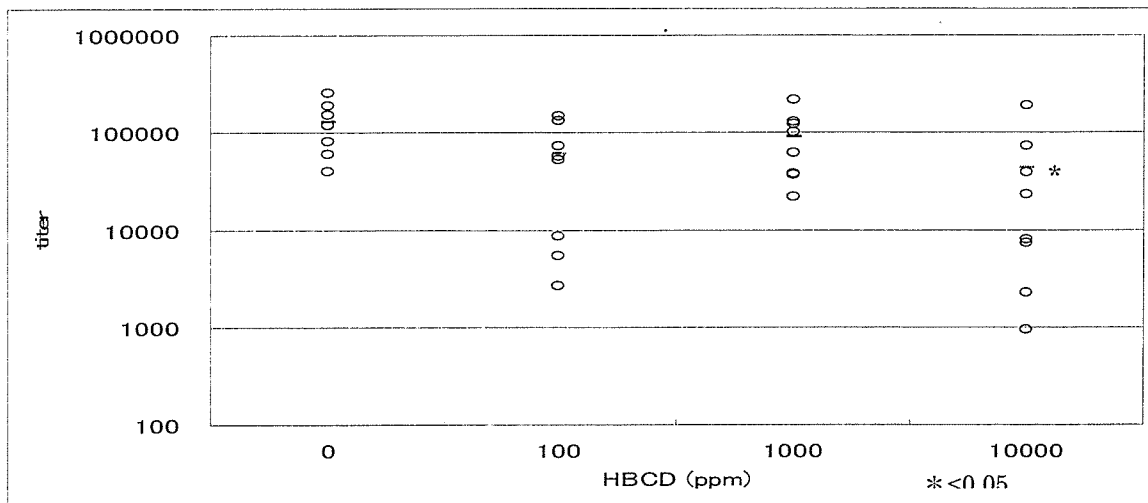
<sup>b</sup> n=9

Abbreviations: HBCD, hexabromocyclododecane; PND, postnatal day; PNW, postnatal week.

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

図 2 HBCD 処理ラットの KLH に対する IgG 抗体産生への影響

(a) KLH-IgG 抗体価と HBCD の濃度依存性



(b) 免疫方法

免疫原 50µg KLH with alum, 免疫回数 3 回 (at PND 23, 33,43)

投与方法 ip, 血清分取 at PND40, PND50

表 6 用量依存性の得られた免疫関連影響

a)

<b>DBDE</b>		
<b>PNW3</b>	100ppm	1000ppm
liver weight	↑	↑
spleen active T,B		↓
spleen CD4+ cell		↓
serum T3 level		↓
<b>PNW11</b>		
peripheral CD161+NK cell		↓
serum T4 level		↓

b)

<b>HBCD</b>		
	1000ppm	10000ppm
<b>PNW3</b>		
liver weight	↑	↑
spleen CD161+ NK cell		↓
peripheral active T cell		↓
peripheral inactive B cell		↑
serum T3 level		↓
serum TSH level, albumin		↑
<b>PNW11</b>		
serum T3 level	↓	↓
serum albumin		↑
<b>PNW 3-7</b>		
KLH-antibody production		↓



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：**本研究は、難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、RS ウイルス感染マウス実験モデルを用いて、用量反応性の高い感染影響評価系の構築を目的とした。今年度は、臭素化難燃物（BFRs）デカブロモジフェニルエーテル（DBDE）および1,2,5,6,9,10-ヘキサブプロモシクロドデカン（HBCD）を評価化合物に用いた。これらの化合物の周産期曝露を受けた親より生まれた仔マウスに、RS ウイルスを経鼻感染させ各種評価を実施した。その結果、DBDE 曝露マウスの肺組織中のRS ウイルス感染価は曝露量に依存して上昇した。さらにRS ウイルス感染病態の指標の1つであるIFN- $\gamma$ レベルが、1000 ppm 曝露マウスのBALF中で有意に上昇していた。また、RS ウイルス感染下気道炎において誘導されるケモカイン RANTES の肺組織における mRNA 量も、DBDE 曝露マウスで対照と比較して二倍程度高かった。一方、HBCD 1000 ppm 曝露による感染影響は全く認められず、曝露量を1000, 3000, 10000 ppm と高用量に設定して再評価を行っている。以上のように、DBDE 周産期曝露による仔マウスでのRS ウイルス感染影響を評価した結果、DBDE 曝露により感染病態の悪化が強く示唆され、さらに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が明らかとなった。今後、HBCD の再評価とともに、より簡便で用量反応性の高い感染影響評価系での指標を得るために、RANTES の定量評価などを視野に入れている。

**A. 研究目的**

難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、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、用量反応性の高い感染影響評価系の構築を目的としている。今年度は、臭素化難燃物（BFRs）デカブロモジフェニルエーテル（DBDE）および1,2,5,6,9,10-ヘキサブプロモシクロドデカン（HBCD）をRS ウイルス感染モデルで評価し、用量反応性のある感染影響の指標を探索した。

**B. 研究方法**

**BFRs の周産期曝露実験：**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 Soy-free 食に変更し、11日後（GD10）から Soy-free 食でDBDE（10, 100, 1000 ppm）およびHBCD（1000 ppm）を調製して混餌投与した。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。なお、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

**RS ウイルス感染実験：**Respiratory syncytial ウイルス（RS ウイルス）A2 株はヒト咽頭ガン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  $3 \times 10^5$  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（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℃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。-80℃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（1800 g, 4℃, 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0.2 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℃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（PFU/mL）を算出した。

**血清中 T4 (thyroxin) および BALF 中の IFN- $\gamma$  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 IFN- $\gamma$  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。

**Real-time RT-PCR 法による RANTES mRNA の定量：**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  $\beta$  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。なお、 $\beta$  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。

(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

### DBDE の感染影響評価

DBDE 周産期曝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および仔マウスの体重比較、ならびに親マウスの DBDE 曝露期間中の摂餌量を調べた (表 1)。親マウスでは、DBDE 曝露量に関わらず平均体重および摂餌量に对照群との有意な差が認められなかった。一方、仔マウスでは、1000 ppm 曝露群で有意に ( $P < 0.01$ ) 体重の増加抑制が見られた。なお、DBDE 曝露による血清中の T4 レベルの変化を検討したが、对照群における値の変動幅が大きく、判定が出来なかった (結果は示さず)。RS ウイルス感染仔マウスにおいて、肺組織中の RS ウイルス感染価が曝露量に依存して上昇し、1000 ppm では陽性对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 (図-1)。さらに RS ウイルス感染病態の指標の 1 つである IFN- $\gamma$  レベルが、1000 ppm 曝露群の BALF 中で有意に上昇していた (図-2)。RS ウイルス感染による下気道炎において、様々なケモカインが誘導されることが知られている。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、曝露量依存性は認められなかったが、DBDE 曝露群では何れも对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 (図-3)。これらの結果より、DBDE 曝露により、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、曝露用量設定のための予備試験的な目的で 1000 ppm 曝露のみを実施した。HBCD 1000 ppm 曝露では、親マウスおよび仔マウス

の体重は对照群と比較して有意な差が認められず、親マウスの摂餌量についても对照群と差がなかった (結果は示さず)。また、血清中の T4 レベルも HBCD 曝露群と对照群の間に差が認められなかった (結果は示さず)。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および BALF 中の IFN- $\gamma$  レベルを評価した (図-4)。その結果、HBCD 曝露群ではウイルス感染価および IFN- $\gamma$  レベルにおいて对照群との差が認められなかった。

## D. 考察

代表的な BFRs である DBDE と HBCD について周産期曝露による 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 ウイルス感染価が曝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 (図-1)。BALF 中の IFN- $\gamma$  レベルが 1000 ppm で有意に上昇していること (図-2) や肺組織で RANTES の遺伝子発現が亢進している (図-3) 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曝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が明らかとなった。

RS ウイルス感染実験における陽性对照として 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- $\gamma$  レベルは低下した (図-2)。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 曝露による感染影響は全く認められなかった。現在、HBCD の曝露量を 1000, 3000, 10000 ppm と高用量に設定して再評価を行っている。また、DBDE 曝露においても、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。

## E. 結論

難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、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とした。今回、感染影響が見られなかった HBCD については、

さらに高用量を設定して再評価を行っている。さらに、より簡便で用量反応性の高い感染影響評価系の指標を得る目的で、RANTESを標的とした評価を実施する予定である。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kishimoto, C., Hiraoka, Y., Takada, H., Kurokawa, M., Ochiai, H.: Effects of immunoglobulin on murine myocarditis caused by influenza A virus: experimental study. J Cardiol., 45, 247-255, 2005. (昨年度追加分)

### 2. 学会発表

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, プログラムおよび抄録 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, プログラムおよび抄録 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. and Kofi-Tsekpo, M.W.: Antiviral formulations from Kenyan medicinal plants; activity against herpes simplex virus infection in mice. The 27<sup>th</sup> 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.

## 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

黒川昌彦: ケニア感染症プロジェクトの足跡 The KEMRI/JICA Project (1979-2006), 独立行政法人 国際協力機構, pp 104-106, 4月, 2006.

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新規生物活性物質素材の検索, 浜辺のセミナー・研究交流会, 9月, 2006.

黒川昌彦, 清水寛美, 渡辺 渡: 神経変性疾患の遺伝子治療への弱毒単純ヘルペスウイルスベクターの応用のための基礎研究, 平成17年度九州保健福祉大学内共同研究報告書, pp 34-35, 2006.

黒川昌彦: 九州保健福祉大学 QOL 研究機構, 研究報告書 2, pp 132-138, pp 158-162, 2006.

薬日新聞, これまでにない機能性 日本で初めてのプロポリス, 2006年11月15日(8, 9面).

表一 1

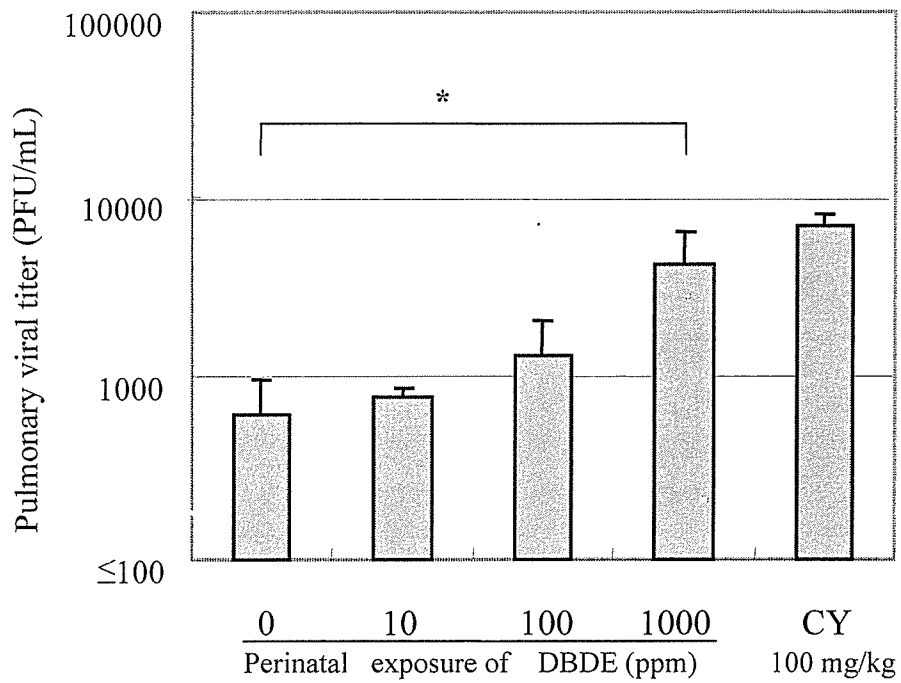
**Body weights and food consumption of mice exposed to DBDE perinatally (GD10-PND21)**

Mice	Body weight (g)	Food consumption (g/day)
<b>Dam</b>		
Control	30.9 ± 1.6	9.8 ± 1.9
DBDE 10 ppm	29.4 ± 1.4	9.8 ± 1.5
DBDE 100 ppm	32.7 ± 3.2	11.0 ± 0.6
DBDE 1000 ppm	31.5 ± 4.1	8.1 ± 0.5
<b>Offspring</b>		
Control	9.5 ± 1.4	-
DBDE 10 ppm	9.1 ± 2.3	-
DBDE 100 ppm	9.9 ± 1.0	-
DBDE 1000 ppm	8.1 ± 1.1*	-

\*P < 0.01 by Student's t-test (vs Control)

图-1

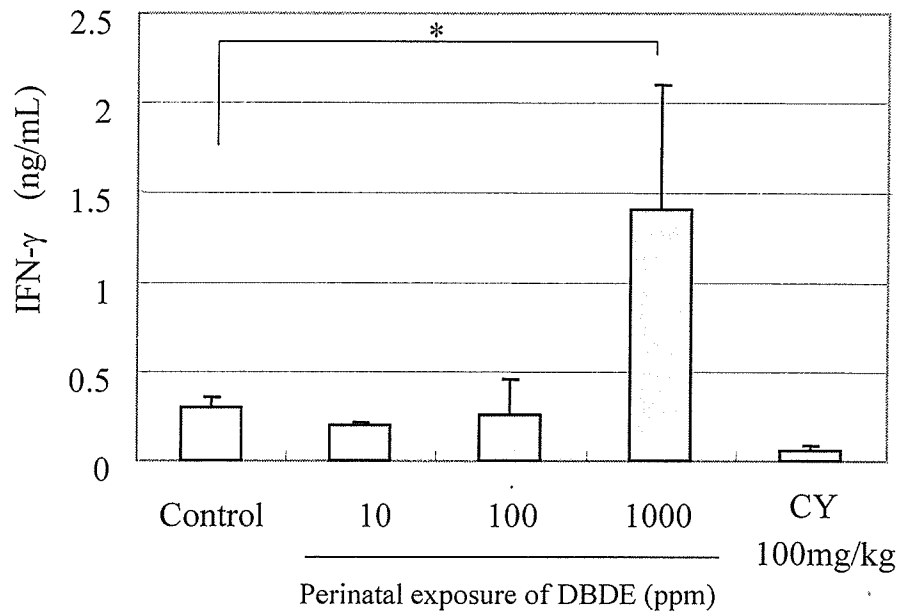
Effect of perinatal exposure to DBDE on pulmonary viral titers in RSV-infected offspring mice



\*P<0.01 (Student's t-test)

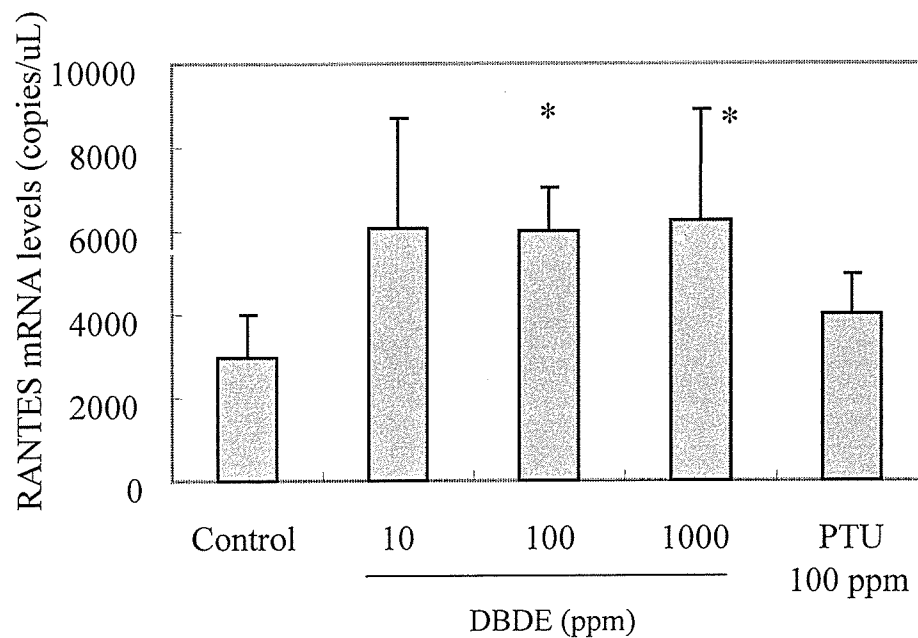
图-2

Effect of perinatal exposure to DBDE on IFN- $\gamma$  level in BALF in RSV-infected offspring mice



\*P<0.05 (Mann-Whitney U-test, vs Control)

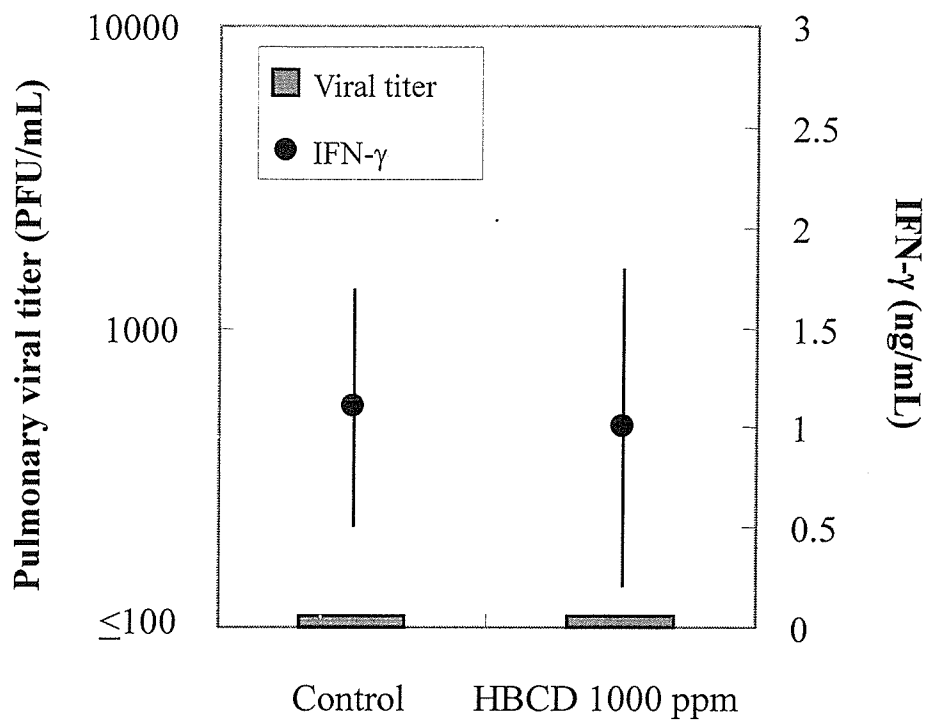
Effect of perinatal exposure to DBDE or PTU on the levels of RANTES mRNA in lung tissues in RSV-infected offspring mice



\*P<0.01 (Mann-Whitney U-test, vs Control)

图-4

Effect of perinatal exposure to HBCD on pulmonary viral titers or IFN- $\gamma$  level in BALF in RSV-infected offspring mice





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）

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  
(H17-化学-009)

幼若期暴露発がん性評価

分担研究者 今井 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：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、被験物質の幼若期投与とその後の化学発癌物質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。雌雄の F344 ラットの出生直後より 5 週間、decabromodiphenyl ether を 4 用量（0.001、0.01、0.25 及び 2.5%）にて混餌投与し、その 1 週間後より多臓器に発癌標的性を有する *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine と乳腺発癌物質である 7,12-dimethylbenz(a)anthracene による処置を行い、生後 40 週（雄）及び 46 週（雌）で剖検、病理組織学的検索を行った。2.5%群において雌の甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の発生頻度と雌雄の腎間葉性腫瘍の発生頻度/数が対照群に比し有意に（ $p < 0.05$ 、 $0.01$ ）減少した。現在、hexabromocyclododecane の 3 用量（0.01、0.1、1%）と propylthiouracil（0.0006%）について検討している。

A. 研究目的

化学物質の発がん性については、主にラットあるいはマウスを用いて生後 6~8 週齢時より 1.5~2 年間にわたる連続投与により評価する標準的な試験法が確立されている。一方、諸臓器組織における細胞増殖が活発で、内分泌、生殖器系をはじめとした臓器の発達に影響を受けやすい乳幼児期に化学物質を投与することにより、発がん感受性の上がる場合のあることが示されている

(EPA, 2005)。実際、遺伝毒性発がん物質は、成熟期投与により特定の標的臓器に腫瘍性病変を誘発するが、幼若期から成熟期を通して投与することにより、その発生頻度が増加し、非遺伝毒性物質である phenytoin (Chhabra RS et al, Fund Appl Toxicol, 21, 174, 1993) や polybrominated

biphenyl mixture (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993) についても同様の結果を示すことが報告されている。これらの背景より、米国 EPA は 2005 年、化学物質の幼弱期暴露による発がん性評価のガイダンスを公表した。しかし、長期試験を基本とした幼若期投与による発がん性評価は、多くの化学物質に対して広く実施されているとは言い難く、その背景として、試験に要する動物数、期間、経費などの問題がある。そこで本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を、比較的少ない動物数で短期間かつ鋭敏に検出する試験法の確立を目的とし、被験物質の幼若期投与とその後の化学発癌物質処置によるラット多臓器発がんモデルの有用性を検討する。被験物質として、長期試験で発がん性を示し (NTP、

1986)、幼若期投与による発がん感受性の増強が示唆されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993) 臭素化難燃剤を対象とする。17年度より decabromodiphenyl ether

(DBDE) の4用量に対する検討を開始、現在病理組織学的評価を継続している。また18年度 hexabromo- cyclododecane (HBCD) の3用量と propylthio- uracil (PTU) に対する検討を開始した。

## B. 研究方法

### (1) DBDE を用いた検討

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)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5% 濃度で大豆フリーの粉末基礎飼料 (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 2.5% 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 0.01 あるいは 0.001% は、渋谷らが実施した 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 週間後より、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。発癌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% 濃度で飲水に混ぜて投与し、更に生後 7 週時の雌には 50 mg/kg 体

重の 7,12- dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) を 1 回強制経口投与した (Figure 1)。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(たて×よこ×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。さらに肺、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作製、病理学的検索を行っている。なお、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。

$$\text{体積} = (\text{たて}) \times (\text{よこ}) \times (\text{高さ}) \times \pi / 6$$

統計方法：体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発生数、体積については Bertlett 検定の後、ANOVA あるいは Kruskal Wallis 検定を行い、群間差が認められた場合は Dunnett の多重比較で判定した。乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織所見の発生頻度については Fisher の直接確率検定法を用いた。

### (2) HBCD と PTU を用いた検討

DBDE を用いた検討と同じ方法により、HBCD を 0 (対照)、0.01、0.1 及び 1% 濃度で混餌投与、PTU を 0.0006% 濃度で飲水投与した実験を開始した (Figure 2)。

### (倫理面への配慮)

使用する動物は最小限に留めた。投与実験は混餌、飲水による経口投与が主体であり、また動物は全てエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、その他の実験手技についても動物の愛護に十分配慮して行っている。動物の飼育、管理に当っては、研究所の利用規定に従っている。

## C. 研究結果

### (1) DBDE を用いた検討

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、0.25 及び 2.5% 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 (Table 1)。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)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5% 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 (Figure 3)、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 0.25 及び 2.5% 群と雌の 2.5% 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 (Table 2)。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 2.5% 群で、発生数が雄の 2.5% 群で各々対照群に比して有意に ( $p < 0.05$ 、0.01) 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 (Table 3-1)。腎細胞腺腫/腎細胞癌の発生頻度が雄の 2.5% 群で対照群に比し有意に ( $p < 0.05$ ) 減少あるいは雌の 0.001% 群で有意に ( $p < 0.05$ ) 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 (Table 3-2)。腎盂の移

行上皮については雄の 0.01% 群で乳頭腫/癌の有意な ( $p < 0.05$ ) 増加がみられたが、他の群に関連した変化は認められなかった (Table 3-3)。また、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度が雌の 2.5% 群で有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した (Table 3-4)。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 (Table 3-5、3-6)。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。

### (2) HBCD と PTU を用いた検討

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 0.1 及び 1% 群で対照群に比して有意な ( $p < 0.05$ 、0.001) 増加、甲状腺重量は PTU 群で有意な ( $p < 0.001$ ) 増加を示した (Table 4)。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みられたが、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みられなかった。

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 0.01、0.1、1% 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 1% 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 (Figure 4)。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 (Figure 4)。摂餌量については、HBCD の 1% 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 1% 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 0.01% 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。

#### D. 考察

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癌物質である 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有意な増加がみられ、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・乳幼児期のみ暴露により肝腫瘍が有意に増加し、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 2.5% 群で、発生数は雄の 2.5% 群で対照群に比して有意に減少し、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度は雌の 2.5% 群で有意に減少した。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/腺癌の有意に増加したことが報告されている (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、(1)ニトロサミンの代謝活性化/排泄に対する影響 (2)視床下部-下垂体-甲状腺軸の変調 (3)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 (1)あるいは (3)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において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。

#### E. 結論

SD ラットに出生直後より 5 週間、0 (対照)、0.001、0.01、0.25 および 2.5% 濃度で DBDE を混餌投与し、その 1 週間後より多臓器に発癌標的性を有する