

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究  
—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—  
(H17-化学-一般-001)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 20 (2008) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究  
—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—  
(H17-化学-一般-001)

平成 19 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 20 (2008) 年 3 月

## 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	
研究の総括	
江馬 眞	..... 1
<b>II. 分担研究報告書</b>	
1. 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析	
江馬 眞	..... 13
2. 神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究	
中島 欽一	..... 43
3. 脳形成・発達過程における神経伝達物質シグナルの外因性かく乱による脳障害に関する研究 –モデル系開発とメカニズム解明	
種村 健太郎	..... 55
4. 自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤	
竹田 潔	..... 65
5. 子どもに対する化学物質暴露影響の内分泌的観点からの解明	
渡邊 肇	..... 73
6. 成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究	
菅野 純	..... 91
7. 細胞を用いた <i>in vitro</i> における化学物質・薬物の影響解析	
田上 昭人	..... 99
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	..... 103
<b>IV. 研究成果の刊行物・別刷</b>	..... 107

別添 3

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—

主任研究者 江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・総合評価研究室・室長

研究要旨

本研究は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で子どもが経験する高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえて、化学物質の有害作用発現の子どもとしての特異性を解明することにより、従来から盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とすることを目的とした。そのために、研究班を「恒常性維持機構発達解析」と「外挿問題解析」に分けて組織し、「恒常性維持機構発達解析」を更に、発生成長段階検討、神経系、免疫系、及び内分泌系に、「外挿問題解析」を、化学物質の大人への影響評価結果を子どもへの評価に外挿する研究と、実験動物とヒトとの間を結びつける研究とに分けて研究を進めた。

今年度、発生成長段階検討においては、紫外線吸収剤HDBBを用いた検討により、女性ホルモンによる毒性軽減が示唆される結果が得られ、これがホルモン産生が始まっていない離乳前の子どもに毒性が強くなる理由であることが解明された。神経系について、レチノイン酸が神経幹細胞の成熟を早め、バルプロ酸(Valproic acid: VPA)は分化に影響を与えること、バルプロ酸の抗てんかん作用も分化影響で説明できることが明らかになった。また、胎児期のグルタミン酸受容体過剰刺激である、成熟時の脳構造、行動に顕著な障害が生じることが分かり、サリドマイドによる広汎性発達障害のメカニズムもグルタミン酸シグナルのかく乱による可能性が示唆された。免疫系について、自然免疫系の細胞も獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性がある結果が得られ、これは化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる新知見として特に有用であると考えられた。内分泌について、新生児期エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発メカニズムに関わりうる遺伝子を同定した。

「外挿問題解析」に於いては、大人-子ども外挿問題について、網羅的遺伝子発現解析を駆使し、ドーモイ酸(DA)に対する感受性が幼若期の方が成体より高いことの影響を遺伝子レベルで解析した。その結果、幼若期投与では脳発達に関連する遺

伝子発現変化を起点に、グルタミン酸受容体シグナル系以外のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な影響が起きている可能性が示唆され、成体期投与では、直接的にグルタミン酸受容体シグナル系が一時的に刺激されるものの、それは収斂する傾向にあることが示唆された。実験動物—ヒト外挿問題について、マウス細胞を用い、VPAが神経細胞分化を促進する分子メカニズムの一端が明らかになり、個体レベルでのVPAの催奇形性の発症メカニズムの解明に有用な知見であると考えられた。

以上、今年度の成果の中で、若齢期マウスの自然免疫系細胞が、受容体 (Toll-like receptor) 刺激による炎症性サイトカインの一部 (IL-12など) の産生、食食能、大腸菌の殺菌能力において成獣マウスの細胞に比べ低いという知見は特筆すべきものと考えられる。これは、自然免疫系の細胞は獲得免疫系を担当するリンパ球とは異なり、子どもの成長に応じて発達することはないという従来の常識を覆す知見であり、化学物質の子どもへの健康影響を考察する際の重要な基盤となると考えられる。

#### 分担研究者

江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価室室長	A. 研究目的
中島欽一	奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・動物代謝調節学講座・分子神経分化制御学分野	本研究の目的は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で、子どもが経験する高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえた、化学物質の有害作用の発現の、子どもとしての特異性を解明することである。これにより、従来より盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とする。
種村健太郎	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部主任研究官	
竹田 潔	大阪大学・医学系研究科・感染免疫学講座・教授	B. 方法 研究班を【恒常性維持機構発達解析】と【外挿問題解析】に分けて組織した。 【恒常性維持機構発達解析】 <発生発育> 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析を目的として、紫外線吸収剤として使われている 2-(2'-hydroxy-di-t
渡邊 肇	自然科学研究機構・基礎生物学研究所・岡崎統合バイオサイエンスセンター・生命環境・助教授	
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部部長	
田上昭人	国立生育医療研究センター 薬剤治療研究部部長	

ert-butylphenyl)benzotriazole(HDBB)の去勢ラットを用いた反復投与毒性試験を実施した。これは、HDBB が 6 週齢ラットを用いた反復投与では雄にだけ毒性が発現するが、離乳前のラットに投与したときには雌雄のラットに同様な毒性を発現させる特徴を有することが昨年度までの研究で明らかになったことを受け、性ホルモンの関与を検討するために実施したものである。同時に、血中濃度測定及び肝薬物代謝酵素活性測定試験、代謝安定性試験、CYP 分子種特定試験を実施した(江馬)。

#### <神経>

発生過程において神経幹細胞はニューロンへの分化がアストロサイトへの分化に先行する。マウス ES 細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで上記現象を再現できる *in vitro* の系を確立し用いた。ES 細胞を血清非存在下に4日間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様細胞が誘導されるため、アストロサイト誘導性サイトカイン LIF で刺激してもアストロサイトへの分化は観察されない。しかしこの4日間の浮游培養中に Retinoc acid(RA)を添加することで、LIF に応答しアストロサイトへ分化するようになることが予備的実験において明らかになっている。これらの結果とこれまでの研究結果とから、このアストロサイト早期分化能獲得に DNA メチル化というエピジェネティックなゲノム修飾が関与することを想定し、DNA のメチル化状態が RA によって実際に変化を受けることを bisulfite シークエンスなどによって検討した。変化を受けている場合は分子生物学や細胞生物学の技術や知識を駆使しそのメカニズム解明を行うこととした。VPA に関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進

することが分かっているものの胎仔神経幹細胞に対する影響については不明であるので、胎仔神経幹細胞に対する影響を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みた。また VPA の脊髄損傷治療応用への可能性、抗てんかん作用の解明も検討した(中島)。

胎生 14.5 日齢のマウスに対して妊娠マウス母獣への強制経口投与(100mg/kg)により経胎盤的に、サリドマイド、フタルリグルタミン(サリドマイドのヒト型代謝産物)、及びフタルリグルタミン酸(フタルリグルタミン類似構造化学物質)を暴露し、産出した雄マウスについて生後 10-12 週齢時に、形態機能解析及び行動解析を行った。形態機能解析に関しては、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせた免疫組織化学により検討した。同時に、脳内の興奮-抑制バランスへの影響評価を目的として各種受容体および調節因子タンパクの発現を検討した。行動解析は、情動-認知系行動に焦点を合わせ、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、及びプレパルス驚愕抑制試験を組み合わせたバッテリー試験として実施した(種村)。

#### <免疫>

子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、2週齢と8週齢のマウスの腹腔に存在するマクロファージを用いて解析した。まず、両週齢のマウスの腹腔をHanks液で洗浄し、細胞を回収し、CD11b陽性細胞を単離し実験に用いた。TLR4リガンドであるLPSで刺激し、TNF-alpha、IL-6及びIL-12p40の産生をELISA法で解析した。

次に、これらマクロファージの貪食能を蛍光ラベルした非病原性大腸菌を用いてflowcytometryで比較解析した。また、貪食後の貪食胞の成熟について、貪食胞のpH測定、Lamp1の発現集積を指標に、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、各マクロファージにおける殺菌能を、非病原性大腸菌のCFUを測定し、解析した。さらに、貪食胞の成熟に関わる細胞内シグナルを伝達するMAPキナーゼp38の活性化をwestern blot法で、またp38の標的遺伝子の発現誘導をreal time PCR法で解析した(竹田)。

#### <内分泌>

周生期の化学物質曝露により通常ホルモン制御から逸脱する際の作用メカニズムについて、臍上皮への影響を中心に遺伝子レベルからの解明を行った。マウス新生仔期にエストロゲン暴露を行い、発達段階に応じたマウス臍における遺伝子発現プロファイルを取得した。発現レベルが異なっていた遺伝子について、遺伝子発現異常に至る要因の特定を図るため、遺伝子をコードしているDNA自体の解析(DNAメチル化)とそれに作用する因子(転写因子)の解析を行った(渡邊)。

#### 【外挿問題解析】

化学物質の毒性評価を進める過程で、成熟個体(成人)と未成熟個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、子ども期投与の方が成人期投与より強い影響が生じることが明らかになった domoic acid (DA)を例として取り上げ、その背景となる分子メカニズムを、網羅的遺伝子発現解析手法を用いて検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界について検討した。

C57BL/6CrSlc(日本エスエルシー)に2週齢または10週齢時にDA 0.3mg/kgを腹腔内投与した。投与後24時間目、及び、2週齢時投与については11週齢時、10週齢時投与については11週齢時に海馬、大脳皮質について、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法: Kanno et al. BMC Genomics 29;7:64.)を適用した網羅的遺伝子発現解析を行い、コピー数算出、統計解析を行った。得られた遺伝子リストの既知情報との照合には Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems)を用いた(菅野)。

マウスES細胞を用いたEST法に加えて、ヒト組織細胞を用いた毒性試験方法の開発を目指し、カルバマゼピン及びバルプロ酸の細胞に与える毒性のメカニズムの解析を行った。バルプロ酸については、マウス神経芽腫由来 N1E-115 細胞を用いて細胞分化増殖に及ぼす影響メカニズムの解析を行った(田上)。

#### C. 結果

##### 【恒常性維持機構発達解析】

発生成長段階検討に加え、脳神経系、免疫系、内分泌系の3つの高次生体機能について化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見を集積した。

#### <発生発育>

HDBBによる毒性発現様式と感受性変化をラットを用いて検討した。5-6週齢反復強制経口投与時、雄で毒性が強く発現し、去勢により性差が著しく軽減した。新生児投与では毒性に性差は見られなかった。5週齢でHDBB代謝を検討すると、血漿中HDBB濃度は投与5~8時間後に最高値に達し、投与24時間後には著しく低下し



た。雄では総 P450 量を含む代謝系変化が認められたが、雌では認められなかった。HDBB を代謝する CYP 群については、ミクロソームとのインキュベーションによる検討により、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C6、CYP2C11 及び CYP2D2 が候補であることが分かった(江馬)。

#### <神経>

神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明のために、レチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)の神経幹細胞に対する作用を検討した。その結果、まず、RAのES細胞早期アストロサイト分化誘導時に、アストロサイト特異的遺伝子であるGFAPのプロモーターのSTAT3結合配列のDNA脱メチル化が生じること、またそのメカニズムはDNAメチル基転移酵素Dnmt1の遊離であることが明らかになった。次に、RAがLIFと協調して胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することを見出し、その分子メカニズムとして、RA刺激によりアストロサイト特異的遺伝子プロモーター中のヒストンのアセチル化が亢進し、結果として転写因子STAT3の結合が促進されるためであることを明らかにした。更に、VPAがオリゴデンドロサイト分化を顕著に抑制し、ニューロン分化を促進することを見出し、マイクロアレイ解析によりニューロン軸索伸長阻害タンパク質遺伝子の発現抑制を認めた。これを受け、VPAのニューロン分化促進作用を*in vivo*で検討するため、VPA処理した神経幹細胞を脊髄損傷モデルマウスの脊髄に移植したところ、未処理細胞移植群と比較して、顕著な機能回復が見られた。最後に、齧歯類やヒトにおいて、てんかんにより海馬歯状回の異所的ニューロン新生が促進されることが及び長期認識障害が引き起こされることが

知られていることを受け、VPAの抗てんかん薬の作用について、VPAがこの異所的ニューロン新生を阻害し、認識障害を回復させることを明らかにした。この作用は主にVPAのヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によって発揮されることも明らかにした(中島)。

胎生期グルタミン酸シグナルの外因性かく乱による神経毒性発現の解明を目的として、マウスにドーモイ酸、サリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の経胎盤暴露を行った結果、胎生期サリドマイド暴露雄マウスでは情動・認知行動に関する逸脱は認められなかったが、胎生期フタルルグルタミン暴露雄マウスでは、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間増加と、プレパルス驚愕反応抑制試験での驚愕反応抑制度の低下が明らかとなった。また胎生期フタルルグルタミン酸暴露雄マウスでは、オープンフィールド試験での総移動量減少と、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間及びアーム選択回数の増加、また場所-連想記憶障害が確認された。一方、成熟期(生後10週齢)雄マウスへのサリドマイド、フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の強制経口投与からはこうした行動異常は認められなかった。行動異常を呈した胎生期暴露マウスについて、大脳皮質及び海馬における神経細胞軸索構成タンパクを解析した結果、神経細胞軸索突起の発達不全が確認された。さらに、神経細胞軸索構成タンパクのリン酸化修飾状態及び界面活性剤に対する溶解性が、暴露群マウスでは対照群と大きく異なることが示された(種村)。

#### <免疫>

2週齢と8週齢のマクロファージをLPS刺激し、

TNF-alpha, IL-6 産生を解析したところ、両週齢のマクロファージ間で差は認められなかった。しかし、IL-12p40 の産生は2週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。非病原性大腸菌の取り込み能をフローサイトメトリーで解析したところ、2週齢マウス由来のマクロファージで低下が認められた。貪食胞の成熟を、電子顕微鏡を用いた Lamp1 の免疫染色解析したところ、Lamp1 の貪食胞膜への集積が2週齢マウスのマクロファージでは不十分であった。また、貪食胞の pH 低下も2週齢マウス由来マクロファージでは障害されていた。このように、2週齢マウス由来マクロファージでは、細菌の取り込み、及びその後の貪食胞の成熟に障害を認めた。これらの障害に伴い、2週齢マウス由来のマクロファージでは、大腸菌の殺菌能も低下しており、大腸菌の感染後のマクロファージ内の大腸菌の生菌数は2週齢マウスのマクロファージで有意に増加していた。さらに、貪食胞の成熟に関与する細胞内シグナルを伝達する p38 の活性化を p38 のセリン残基のリン酸化を指標に解析したところ、2週齢マウス由来マクロファージでは、5分後のリン酸化誘導が8週齢マウス由来マクロファージに比較すると有意に低下していることが明らかになった。また、p38 の標的遺伝子でマクロファージの貪食に関わる SR-A や MARCO 遺伝子の大腸菌感染による発現誘導も、2週齢マウス由来マクロファージでは低下していた(竹田)。

#### <内分泌>

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン(DES)を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子について解

析を行った。その結果、新生仔期(0日、5日)と成熟期(70日)ではエストロゲン暴露による初期応答遺伝子が子宮や膣において大きく異なることが明らかになった。一方で、新生仔期のエストロゲン暴露を5日間行った場合、成熟期にエストロゲン非依存的な膣上皮の増殖を確認した。この場合、5日間暴露後のエストロゲン応答遺伝子は、初期応答遺伝子に比べてその応答遺伝子数が増加していることが明らかになった。さらに、これら新生仔期にエストロゲン応答した遺伝子の一部は、その活性化状態が成熟期まで続くことが明らかになった。こうした長期的な遺伝子発現変化に関する要因として、エピジェネティックな変化が考えられたため、発現変化が顕著な遺伝子の制御領域を中心として、ゲノムレベルでのメチル化、ヒストンの修飾状態の解析を進めた結果、膣で特異的にメチル化されている遺伝子を同定した(渡邊)。

#### 【外挿問題解析】

##### <大人-子ども外挿問題>

DAの幼若、成体の感受性差の原因を解明するため、網羅的遺伝子発現解析を進めた。幼若個体として2週齢、成体として10週齢を選び、2週齢についてはドーモイ酸投与後24時間及び9週間(11週齢)、10週齢については投与後24時間及び11週齢時点で、大脳、海馬を各々採取して得た Percellome 適用網羅的遺伝子発現データを用いた。まず、2週齢投与と10週齢投与の各々で発現差が生じた遺伝子群を抽出し比較したが、いずれも重なる遺伝子がほとんど無いという結果を得た。すなわち、幼若個体と成体とは遺伝子発現応答が異なっていることが確認された。また、各々の遺伝子リストを Ingenuity

Pathway Analysis(IPA)に投入し、既知情報から抽出される network の主要な機能カテゴリーを比較したが、共通性は見出されなかった。そこで、各々の実験条件における遺伝子発現変化と既知情報との照合を、IPA を用いて実施したところ、2週齢投与24時間後の変動遺伝子リストから、グルタミン酸受容体系が直接刺激された事に対応する pathway は報告されず、Axonal guidance や Wnt signal 系といった、脳発達関連の遺伝子カスケードが抽出された。2週齢投与11週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳での IL-4 シグナル活性化、海馬でのグルタミン酸受容体シグナル系低下に加え、グルココルチコイド受容体シグナルへの影響が示された。IL-4 は脳脊髄炎におけるミクログリア活性化に関わっていることが報告されており、幼若期投与により慢性的な炎症反応が惹起されていることが示唆され、表現型との関連が注目される。海馬で認められたグルココルチコイド受容体シグナルに関しては、受容体発現低下がストレス過敏を引き起こすとの報告があり、幼若期投与に伴う行動変化との関連が示唆される。10週齢投与24時間後の変動遺伝子リストでは、大脳で脂質代謝影響に加え、Fas-mitochondria 系を介したアポトーシス活性化が認められた。海馬では脂肪酸代謝低下と共に、グルタミン酸受容体シグナル系の低下が認められ、DA が直接グルタミン酸受容体系を叩いていることが確認された。また、Ephrin 受容体や軸索ガイダンス系シグナルの低下も認められた。10週齢投与11週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳で Ephrin 受容体シグナル影響が認められた。海馬では、p53系(DNA damage)への影響が認められたが、変化は小さいものであった(菅野)。

#### <実験動物—ヒト外挿問題>

EST 法によるカルバマゼピンの毒性評価及びバルプロ酸の細胞毒性、神経組織形成に及ぼす影響の解析を行った。カルバマゼピンについては、細胞増殖に対する IC50 が NIH3T3 細胞で、0.24mM、ES 細胞で 0.31mM、ID50 は、28.24  $\mu$ g/ml であり、毒性は弱毒性と評価された。また、内胚葉、中胚葉、外胚葉特異的マーカーを調べた結果、高濃度領域において内胚葉、中胚葉の初期の誘導に対しては、促進傾向がみられ、中後期発生に対しては抑制傾向がみられた。外胚葉系の神経細胞マーカーでは分化促進傾向がみられたが、その作用は軽度であった。バルプロ酸については、マウス神経芽腫由来細胞 N1E-115 細胞に対し、神経突起の伸長促進作用があることが分かった。マイクロアレイ解析を行った結果、Gadd45a、MEKK4 及び Paxillin の発現が亢進すること、さらには、MEKK4、Paxillin は Gadd45a によって活性化されることも明らかとなり、その神経突起伸長促進作用の分子メカニズムの一端が明らかになった(田上)。

#### D. 考察

本研究によって期待される成果は、子どもに対する化学物質の影響を、高次生体機能の恒常性維持機構発達メカニズムの成熟過程に基づいて考察し、リスク評価可能とすることにある。高次生体機能恒常性維持機構発達メカニズムは医学的、生理学的な観点から基礎研究が進められている分野であるが、それらにより得られる知見は、化学物質の影響評価に直接役立てることは難しいものがほとんどである。それに対し本研究では、化学物質影響の発現が強く予想される高次生体機能恒常性維持機構の発達

に焦点を絞って戦略的に基礎研究を進め、リスク評価に応用可能な基礎的知見の取得を目指した。

今年度の具体的成果として、まず【恒常性維持機構発達解析】に於いて、発生発育、神経系、免疫系、内分泌系のそれぞれについて次の知見を得た。

発生発育について、紫外線吸収剤 HDBB の雌感受性が低いことに対する女性ホルモンの関与を検討するため、去勢ラットを用いて調べ、確かに女性ホルモンの関与が疑われる結果が得られた。一方、血中 HDBB 濃度をに性差は認められず、ラット肝ミクロソーム及び S-9 を用いた代謝物安定試験においても性差は認められなかった。HDBB の肝毒性作用について、HDBB 投与によりラウリル酸 12-水酸化活性 (CYP4A) の増加がみられたことから、ペルオキシソーム誘導剤応答性受容体 (PPAR)  $\alpha$  を介したメカニズムが関与している可能性が示唆された。また、幼若ラットでは発現が見られず、4~5 週齢から雄ラットのみで急激に発現が増加することが報告されている CYP2C11 の発現が雄で低下していた。CYP2C11 は、性ホルモンによって発現が変化することも知られていることから、その活性低下が HDBB の毒性に見られる性差の発現に寄与している可能性も考えられた(江馬)。

神経系について、神経幹細胞分化制御にレチノイン酸とバルプロ酸が影響を与えることが分かった。レチノイン酸は ES 細胞からの神経幹細胞への分化を経た早期アストロサイト分化誘導を引き起こすが、その過程において、「Dnmt1 のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合減弱による脱メチル化促進」という分子メカニズムが生じていることが明らかになった。また、バルプロ酸は損傷脊髄において移植幹細胞のニューロン分化を誘導できると共に、軸索伸長も促進できることがわか

った。さらにバルプロ酸の抗てんかん作用が、てんかんにより促進される海馬歯状回の異所的ニューロン新生を抑制することによることが明らかになった。この作用はバルプロ酸のヒストン脱アセチル化阻害作用によることも明らかになった(中島)。

ヒトの広汎性発達障害の一因とされている胎生期サリドマイド暴露影響のメカニズムが不明であること、従来の妊娠ラットへのサリドマイド投与による産子解析が大量投与 (800-1200mg/kg) であることから、ストレス影響が混交要因として指摘されていることを受け、マウスを用い 100mg/kg 投与量にて検討したところ、サリドマイドの胎生期暴露から得られた産子解析からは行動異常が検出されず、混交要因影響が排除できたと判断された。これを踏まえると、サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルリルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルリルグルタミン酸のマウスへの経胎盤暴露により、成熟期に情動・認知行動の逸脱が認められたことから、外因性のグルタミン酸シグナルかく乱が、行動異常を伴う発達障害の起点となり得ることが示されたと考えられた(種村)。

免疫系について、2週齢、8週齢マウスの腹腔マクロファージを用いた解析から、子どものマクロファージでは、食食能、食食胞の成熟、殺菌能が有意に低下していることが明らかになった。この結果は、自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性があることを示すものであり、化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見として特に有用であると考えられた(竹田)。

内分泌系について、エストロゲン産生開始時期が思春期以降であることから思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかは不明であった

が、本研究の結果、新生仔期にエストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていること、さらに新生仔期の遺伝子発現状態の変化が成熟期まで続くことが示された。すなわち、臨界期(出生 5 日以内)においてエストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現制御において長期的な影響をうけ、これにより、最終的に不可逆的な影響が引き起こされる可能性が考えられた(渡邊)。

【外挿問題解析】に於いては、大人-子ども外挿問題について、今年度の解析結果から、DA の幼若、成体感受性差について、次のように説明することが可能であると考えられた。すなわち、幼若期投与では Wnt signaling を始めとする脳発達に関連する遺伝子発現に変化が生じ、それを起点に、グルタミン酸受容体シグナル系に加え、GR シグナル系等のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な不可逆的影響が誘発される。一方、成体期投与では、直接的にグルタミン酸受容体シグナル系が刺激され、脂肪代謝影響やアポトーシス影響が生じ、一過性の障害が現れるが、その後、収斂する傾向にある。これらの結果は、DA を用いたモデル解析を、Percellome 手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、成人、子どもの感受性差について、その分子背景を解明することが可能であることを示すものであると考えられた(菅野)。

カルバマゼピン及びバルプロ酸について、神経管欠損などの生殖発生毒性が知られている。今回マウス ES 細胞を用いた試験では、ともに弱毒性の評価であったが、マウス ES 細胞でのバルプロ酸の IC50 が治療濃度域内(0.3-0.7mM)の 0.56mMであり、また神経系の発生により強く影響を及ぼしている

ことなどよりカルバマゼピンよりもバルプロ酸の方が奇形発症率が高いものと推定された。バルプロ酸は、神経突起促進作用を有すること、それが Gadd45a 遺伝子等を介していることが明らかとなった。これは、バルプロ酸が神経細胞の分化に影響を及ぼすことが個体レベルで報告されていることに対応するものと考えられた。すなわち、この結果は、培養細胞系はそれを適切に用いることで化学物質作用を分子レベルで解明する良いツールとなることを裏付けるものと考えられた(田上)。

## E. 結論

本研究の目標は、子どもに対する化学物質の影響を、高次生体機能の恒常性維持機構発達メカニズムの成熟過程に基づいて考察し、正確なリスク評価を実施することを可能とすることにある。実際、本研究に於いて、化学物質による子どもへの健康影響リスク評価に役立つ基礎的知見を得るため、発生成長段階検討、脳神経系、免疫系、内分泌系、外挿問題解析の各テーマについて基礎研究を推進した結果、各々のテーマについて「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎となる知見が得られた。特に自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達するという、従来の常識を覆す知見は特筆すべき結果であった。「子どものリスク評価」を科学的に検討するためには、更に基礎研究を続け、その基礎となる知見を集積する必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 論文発表

Ema M, Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E. (in press) Repeated dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*.

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E (2008) Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats. *Reprod Toxicol*, 25, 21-38.

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M (in press) Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol*, 25 (3)

Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (in press) Lack of Gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem Toxicol*.

Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Ema M. (in press) Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. *Reprod Toxicol*.

Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C, Ema M. (in press) Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of the nitrophenolic herbicide dinoseb,

2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol, in rats. *Environ Toxicol*.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E. (2008) Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol* 25, 89-99.

Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (2008) A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 81-96.

Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (2008) Gonadal influence of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 115-126.

Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul Toxicol Pharmacol*, 50, 37-49.

Ema M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M. (2007) Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats. *Congenit Anom Kyoto*, 49, 149-155.

江馬 眞 (2007) 有機スズ化合物の生殖発生毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125, 35-50.

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2

007) OECD 化学物質対策の動向(第12報)  
—第20回、第21回 OECD 高生産量化学物  
質初期評価会議(2005年パリ、ワシントンDC)、  
化学生物総合管理学会雑誌、3、43-55.

高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、  
菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞(2  
007) OECD 化学物質対策の動向(第13報)  
—第22回 OECD 高生産量化学物質初期評  
価会議(2006年パリ)、国立医薬品食品衛生  
研究所報告、125、101-106.

松本真理子、大井恒宏、宮地繁樹、菅谷芳雄、  
江馬 眞(2007) OECD 高生産量化学物質  
点検プログラム—第23回初期評価会議概要、  
化学生物総合管理学会誌、3、56-65.

松本真理子、山本展裕、宮地繁樹、菅谷芳雄、  
江馬 眞(2007) OECD 高生産量化学物質  
点検プログラム—第24回初期評価会議概要、  
化学生物総合管理学会誌、3、180-189.

#### 学会発表

Ema M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirata-  
Koizumi M, Hirose A. and Kamata E. (2007).  
Toxicity of ultraviolet absorber 2-(2'-hydro  
xy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (H  
DBB) in pre-weaning rats. International Cong  
ress of Toxicology XI

Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto  
M, Hirose A. and Kamata E. (2007). Evalu  
ation of two-generation reproductive toxicity  
of a vulcanization accelerator N,N-dicyclohe  
xyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in rat  
s. 2007 EUROTOX

Ema M, Matsumoto M, Furuhashi T. and Ponc

ipe C. (2007). Screening study for repeated  
dose and reproductive and developmental tox  
icity of the nitrophenolic herbicide dinoseb i  
n rats. SETAC North America 28th Annual  
Meeting (11/11-15, Milwaukee)

Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto  
M. (2008) Evaluation of two-generation repr  
oductive toxicity of flame retardant hexabrom  
ocyclododecane (HBCD) in rats. The 47th A  
nnual Meeting of the Society of Toxicology.

Harada T, Kimura E, Hirose A, Kamata E. an  
d Ema M. (2007). Reproductive/development  
al screening toxicity of 4-aminophenol in rat  
s. 2007 EUROTOX

Hirata-Koizumi M, Hasegawa R, Hirose A, Em  
a M (2008) Proposal for safety exposure leve  
l of nitrobenzene through foods and drinking  
water. The 47th Annual Meeting of the Soc  
iety of Toxicology.

Hirose A, Kato H, Ise R, Oneda S, Hirata-Ko  
izumi M, Ihara T, Ema M. (2008) Early resp  
onse in gene expression profiles in monkey e  
mbryos following maternal exposure to thalid  
omide during the susceptible period for malfo  
rmations. The 47th Annual Meeting of the S  
ociety of Toxicology.

Matsuyama T, Hirata-Koizumi M, Imai T, Hiro  
se A, Kamata E. and Ema M. (2007). Toxici  
ty of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',  
5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)  
in castrated rats. International Congress of  
Toxicology XI

江馬 眞(2007) 神経発生毒性試験、平成19年

度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学  
10月28日

江馬 眞 (2007) 生殖発生毒性試験、平成19年度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学  
10月28日

江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一(2007)ポリソルベート80のラットにおける発生神経毒性、第34回日本トキシコロジー学会学術集会(6月27日、東京)

江馬 眞 (2007) OECD Developmental Neurotoxicity Studyガイドライン・ドラフトのその後、第47回日本先天異常学会学術集会(7月7日、名古屋)

江馬 眞、伊藤義彦、松本真理子、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2007) 加硫促進剤N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamideのラットにおける反復/生殖発生毒性併合試験、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)  
平田睦子、渡 修明、向井大輔、今井俊夫、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)の28日間反復投与毒性試験、第34回日本トキシコロジー学会学術集会(6月28日、東京)

平田睦子、松山隆史、今井俊夫、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) 紫外線吸収剤2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)を離乳前ラットに投与したときの影響、第47回日本先天異常学会学術集会(7月8日、名古屋)

#### H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得:  
特になし
2. 実用新案登録  
該当しない
3. その他(データベース等)  
該当しない



## Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

主任研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—

研究課題名: 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析

主任研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 鎌田栄一 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 広瀬明彦 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 松本真理子 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室  
研究協力者 平田睦子 国立医薬品食品衛生研究所・総合評価研究室

研究要旨

本研究は、児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析を目的としている。昨年度までは、若齢ラットを用いた反復投与試験において顕著な性差が認められる紫外線吸収剤、2-(2'-hydroxy-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole (HDBB)及び2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole について、離乳前ラットを用いた反復投与毒性試験を実施し、離乳前ラットでは性差が認められないことを明らかにした。本年度は、特に強い毒性が認められた HDBB に焦点をあてて、ベンゾトリアゾール系紫外線吸収剤の毒性に見られる週齢差及び性差のメカニズムの検討を行った。去勢ラットを用いた反復投与試験では、HDBB 毒性の性差が去勢により顕著に軽減することが明らかになり、HDBB の毒性発現には内分泌学的性差が関与していることが示唆された。性差の要因として血中濃度の違いが疑われたが、HDBB を投与した若齢ラットでは血中 HDBB 濃度に性差はみられず、ラットの肝ミクロソームおよび S-9 を用いた代謝安定性試験においても HDBB 代謝能に性差はみられなかった。肝薬物代謝酵素活性測定試験では、HDBB を投与した若齢ラットにおいてペルオキシゾーム増殖活性の指標であるラウリン酸 12-水酸化活性の増加が見られ、この変化には明確な性差(雄>雌)が認められた。さらに、成熟雄ラットに特異的な CYP2C11 活性の低下がみられており、HDBB 毒性の週齢差及び性差の発現に何らかの関連性がある可能性が示唆された。

A. 研究目的

胎児期を含めた所謂子ども期は各器官が未発達であり、とくに神経系の分化・成熟は胚/胎児期

のみならず出生後にも及ぶ。そのため、化学物質等の環境要因の影響に対する脆弱期が長く続き、有害影響が懸念される。近年、次世代の健康に対

して化学物質等の環境要因による健康影響の危惧が極めて高いことがようやく認識されてきた。ヒトでの調査の重要性は勿論のことであるが、有害物質を環境中に出さず、また環境から排除し、化学物質の有害影響から次世代を防御するために、動物実験の役割が益々大きくなっている。

化学物質等の外因性要因による出生前及び出生後の児への悪影響は着床阻害、胚死亡、奇形、生殖器の異常、行動異常等の様々な発現様式で観察される。児の発生発育段階により外因性要因に対する感受性が変化し、発現様式にしたがったwindowがあることが認識されており、また児における外因性要因に対する悪影響は成体における反応とも異なり、悪影響発現の感受性も大きく異なる場合のあることが認識されつつある。本研究においては、化学物質を児の発生発育の異なった段階に投与し、毒性発現、感受性の違いを明らかにし、各発生発育段階の児における毒性発現機序の解析を行うことを目的として実験を行った。

昨年度までは、5～6週齢ラットを用いた反復投与試験において顕著な性差が認められる紫外線吸収剤、2-(2'-hydroxy-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole (HDBB)及び2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB)について、離乳前ラットを用いた反復投与毒性試験を実施した。両物質ともに若齢ラットでは雄に顕著な毒性を示すが、このような性差は離乳前ラットでは認められないことが明らかとなり、DBHCBまたはHDBBの毒性発現には内分泌学的影響が関与していることが示唆された。

本年度は、これらの紫外線吸収剤の毒性に見られる週齢差および性差のメカニズムを解明することを目的として、特に強い毒性が認められたHDBBについて、去勢ラットを用いた反復投与毒性試験、若齢ラットを用いた血中濃度測定試験及び肝薬物代謝酵素活性測定試験、ラットの肝ミクロソーム及びS-9を用いた代謝安定性試験、CYP分子種特定試験を実施した。

## B. 研究方法

**被験物質:** 東京化成工業株式会社より入手した2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB, CAS No.: 3846-71-7)を使用した。用いたHDBB (Lot No.: AY11)の純度は100%であった。

### 《去勢ラットを用いた反復投与毒性試験》

**使用動物:** 雌雄の3週齢 Crl:CD(SD)ラットを購入した。5～8日後にエーテル麻酔下で去勢手術を実施し、13～14日間の馴化を行った後、6週齢で試験に使用した。

**投与経路および投与方法:** 被験物質をコーン油に懸濁し、28日間強制経口投与した。投与量は、昨年度までに実施した若齢ラットおよび離乳前ラットを用いた反復投与毒性試験結果を基に、0.5, 2.5及び12.5 mg/kg/dayに設定した。対照群にはコーン油のみを投与した。投与液量は10 mL/kgとし、個体別に最新の体重を基に算出した。

**試験および観察方法:** 投与期間中、一般状態の観察、体重及び摂餌量の測定を実施した。最終投与の翌日、エーテル麻酔下で採血後、放血屠殺し、血液生化学的検査、肝臓及び心臓の器官重量測定、肉眼的及び顕微鏡的検査を実施した。

### 《血中濃度測定及び肝薬物代謝酵素活性測定試験》

**使用動物:** 雌雄の Crl:CD(SD)ラット (4週齢)を購入し、1週間の検疫・馴化期間の後、5週齢で試験に使用した。動物数は、対照群は雌雄各5例、HDBB投与群は雌雄各9例とした。

**投与経路および投与方法:** 被験物質をコーン油に懸濁し、28日間強制経口投与した。投与量は、昨年度までに実施した若齢ラットを用いた反復投与毒性試験の結果を基に0.5, 2.5及び12.5 mg/kg/dayに設定した。対照群にはコーン油のみを投与した。投与液量は10 mL/kgとし、個体別に最新の体重を基に算出した。

**試験及び観察方法:** 投与期間中は一般状態の観

察及び体重測定を実施した。

HDBB 投与群の雌雄各 4 例については、初回投与の 1、2、5、8、24 時間後、投与 7 及び 14 日の投与前、投与 28 日の投与前及び投与 1、2、4、8、24 時間後に採血（頸静脈から約 0.2 mL/個体）を行い、LC/MS/MS を用いて、血漿中の HDBB 濃度を測定した。さらに、HPLC-PDA を用いて代謝物の検索を行った。採血後の動物は、エーテル吸入法で安楽死させた。

残りの各群雌雄 5 例については、最終投与の翌日に、体重を測定し、ペントバルビタールナトリウム麻酔下（腹腔内投与）で放血屠殺した後、外表、内臓および組織を肉眼的に観察した。その後、肝臓重量を測定し、肝マイクロソームの蛋白含量、P450 含量、アミノピリン *N*-脱メチル化活性、7-エトキシマリン *O*-脱エチル化 (ECOD) 活性、7-エトキシゾルフィン *O*-脱エチル化 (EROD) 活性、テストステロン 6 $\beta$  水酸化活性、テストステロン 2 $\alpha$  水酸化活性、テストステロン 16 $\alpha$  水酸化活性、ラウリン酸 12 水酸化活性を測定した。

#### 《代謝安定性試験》

雌雄ラットの肝マイクロソーム (BD GENTEST) 及び S-9 (SD, 雄: 200 匹, 雌: 100 匹) を用いて HDBB の代謝安定性の検討を行った。

HDBB をアセトニトリルに溶解し (4.5 mmol/L, 反応液中最終濃度: 45  $\cdot$ mol/L)、マイクロソーム又は S-9 (蛋白濃度: 20 mg/mL, 反応液中終濃度: 2 mg/mL) と、0.2 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) 及び 5 mmol/L EDTA 溶液の存在下で、約 5 分間プレインキュベート (37 $^{\circ}$ C) した。その後、NADPH 生成系又は超純水を加えて 37 $^{\circ}$ C で振盪しながら 60 分間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを加えて反応を停止させた後、冷却遠心機で遠心し (10000 x g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分間)、上清 0.05 mL を HPLC で分析した。

#### 《CYP 分子種特定試験》

14 種のラット CYP 発現系マイクロソーム [CYP1A1, 1A2, 2A1, 2A2, 2B1, 2C6, 2C11, 2C12, 2C13,

2D1, 2D2, 2E1, 3A1 及び 3A2 (BD GENEST)] を用い、HDBB 代謝に関与するラット CYP 分子種を推定した。

HDBB をアセトニトリルに溶解し (4.5 mmol/L, 反応液中最終濃度: 45  $\cdot$ mol/L)、各ラット CYP 発現系 (100 p mol P450) と、0.2 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)、5 mmol/L EDTA 溶液及びコントロールマイクロソームの存在下で、約 5 分間プレインキュベート (37 $^{\circ}$ C) した。その後、NADPH 生成系を加えて 37 $^{\circ}$ C で振盪しながら 60 分間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを加えて反応を停止させた後、冷却遠心機で遠心 (10000 x g, 4 $^{\circ}$ C, 15 分間) し、上清 0.05 mL を HPLC で分析した。

(倫理面への配慮)

動物実験は (株) 新日本科学の実験動物倫理委員会規則において定める倫理基準に従って行った。

### C. 研究結果

#### 《去勢ラットを用いた反復投与毒性試験》

一般状態、体重及び摂餌量に HDBB 投与によると考えられる影響は観察されなかった。血液生化学検査では、雄では 0.5 mg/kg 以上の投与群でアルブミンの増加、2.5 mg/kg 以上の投与群で LDH の増加、12.5 mg/kg 投与群では AST、ALT、ALP、グルコース、BUN の増加が認められた。さらに、すべての投与群で、絶対及び相対肝重量の増加がみられ (Fig. 1)、病理組織学検査では肝臓に、肝細胞肥大、肝細胞のグリコーゲン減少、核の大小不同及び核小体肥大等の変化が観察された (Table 1)。一方、雌ではすべての投与群で総タンパク及び LDH の増加、2.5 mg/kg 以上の投与群でアルブミンの増加、12.5 mg/kg 投与群で ALP 及び BUN の増加がみられ、さらに、12.5 mg/kg 投与群では絶対および相対肝重量の増加 (Fig. 1) が認められた。病理組織学検査では、2.5 mg/kg 以上の投与群の肝臓に、雄で観察された変化と同様な変化が観察された (Table 1)。いずれの投与群においても心臓の器官重量及び病理組織に変化はみられなかった。