

200736009A

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19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総括研究報告書	
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 -----	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. 脳発達のかく乱影響評価 -----	20
渋谷 淳	
(資料) 図 1-4、表 1-23	
2. 神経機能・行動影響評価 -----	29
鈴木 勉	
(資料) 図 1-5	
3. 免疫機能影響評価 -----	32
手島玲子	
(資料) 図 1-2、表 1-6	
4. 感染影響評価 -----	38
黒川昌彦	
(資料) 図 1-4、表 1	
5. 幼若期暴露発がん性評価 -----	42
今井俊夫	
(資料) 図 1-5、表 1-16	
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 ----	49
広瀬明彦	
(資料) 図 1-19、表 1	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	54
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	55

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19年度）

主任研究者 渋谷 淳
東京農工大学大学院 共生科学技術研究院 動物生命科学部門 准教授

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ディフェニルエーテル(DBDE)、ヘキサブロモシクロドデカン(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、ラット脳発達のかく乱影響評価モデルを用いて、19年度は18年度に実施したHBCD, TBBPAの評価を終了し、いずれも成熟後での海馬CA1領域でのニューロン分布の異常は認めなかった。また、抗甲状腺剤ないしDBDE暴露終了時(生後21日目)での脳部位特異的なマイクロアレイ解析と免疫組織化学的解析により、白質ではvimentin及びret, 海馬ニューロンではreelin及びEphA5を発達障害の指標候補として見出し、BFRsで発現変動を示した。更に、ニューロン分布異常の検出に関して、海馬歯状回での測定がCA1領域より感度が高いことを見出し、BFRsで影響を検出できた。以上、既に脳発達影響に関する報告のあるDBDEと共に、新たにHBCD, TBBPAによる脳影響を検出することができた。

神経機能・行動影響評価では、ラットでの評価系の確立を図り、19年度はTBBPAを評価し、一般行動観察では、一部新規環境への馴化に異常が認められたのみであった。一方、高架式十字迷路法に従った不安感受性、条件づけ場所嗜好性試験に従ったメタンフェタミン誘発報酬効果への影響、*in vivo* microdialysis法に従った側坐核でのドパミン遊離量に明らかな変化は認められなかった。

免疫機能影響評価では、ラット評価系の確立を図り、19年度はTBBPAを評価し、3週齢の脾臓でCD4⁺T細胞の減少、11週齢では脾臓CD4⁺T細胞とT細胞の割合の減少、脾臓の制御性T細胞、末梢血T細胞の割合の増加が観察され、軽度ではあるがTBBPAによる免疫担当細胞への影響が検出された。

感染影響評価では、RSウイルス・マウス感染モデルを用い、19年度はTBBPAを評価し、低・中用量で肺組織中のウイルス感染価と肺洗浄液中のIFN- γ レベルの用量依存的な上昇、高用量で重篤な肺炎が認められ、TBBPAによる感染病態の増悪化と、IFN- γ の評価指標としての有効性が見出された。

発がん性評価では、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、19年度はHBCD, TBBPA, 抗甲状腺剤のプロピルチオウラシル(PTU)を検討し、HBCDとPTUでは、甲状腺濾胞上皮腫瘍が減少・減少傾向を示した。また、18年度に甲状腺腫瘍の減少を見出したDBDEについて発達期暴露による甲状腺への影響を検討した結果、乳幼児期での抗甲状腺作用により、甲状腺発がん感受性の低下する可能性が示された。

もう一つの分担課題として、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、19年度は、17年度より収集してきた国際評価機関や米国における耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分、適用状況、エンドポイントおよび不確実性因子ごとに取扱状況に関する情報をデータベース化し、Webベースの検索ツールを作成した。また、本研究班の各分担研究から得られた各種の定量結果についてベンチマークドースの計算を行い、いくつかの指標で低用量域にベンチマークドースの設定されることが示された。

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 代謝生化学部
部長

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
室長

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。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ロモジフェニルエーテル(DBDE)、1,2,5,6,9,10-ヘキサブロモシクロドデカン(HBCD)、テトラブ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。19年度は TBBPA の評価を

終了した。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、19年度に終了した。また、DBDEで複数の臓器発がんに対する抑制作用を示したため、その原因の解析を行った。

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。19年度には、構築したデータベースを基に、Webベースの検索ツールを作成した。また、本研究班の各分担研究から得られた定量結果に関して、ベンチマークドースの計算を行い、定量的な指標としての妥当性について検証した。

B. 研究方法

①脳発達のかく乱影響評価：

19年度は、18年度実施したHBCD及びTBBPAの暴露実験による毒性及び脳発達影響に対する評価を実施・終了した。また、18年度に実施した抗甲状腺剤暴露例（PTU: 3, 12 ppm; MMI: 200 ppm 飲水）およびDBDE暴露例（10, 100, 1000 ppm 混餌）の網羅的遺伝子発現解析の結果から、代表的な標的候補遺伝子について、real-time RT-PCR法によるmRNA発現値の検証を実施した。更に、免疫組織化学的解析の可能な標的候補分子について、PTU, MMI ないし各BFR暴露例の暴露終了時（生後21日目）の脳組織内での発現局在変動の解析を行った。

<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、暴露終了時と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、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。離乳時には、母動物に対する被験物質暴露を終了し、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。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、精巣上部、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。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た。

また、生後11週目の脳を用い、脳のBregmaの後方約-3.5 mmの1カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面（2切面）が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm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）を用いて、DAB発色にてABC法（Vector Lab. Elite kit）による免疫染色を行った。海馬CA1領域でのニューロン分布の検討は、18年度と同様に、NeuN染色切片を用いて200倍の顕微鏡視野で左右1箇所（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、全ニューロンの錐体細胞層最下層からの平均距離を求めた。

<発達期脳障害指標探索>

18年度に同定した、抗甲状腺剤暴露動物におけ

る海馬 CA1 領域 (ニューロン) と白質 (オリゴデンドロサイト) の標的候補遺伝子について、発現変動を real-time RT-PCR により確認した。マイクロアレイ解析用に作製した、MessageAmp™ II aRNA kit (Ambion)により 1 回増幅した RNA から High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems)により cDNA を作製し、TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) および TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) を用いて検討した。対象とした分子は白質特異的な分子として、vimentin, ret, v-maf, tektin4, cld11, zfhx1b を、海馬 CA1 特異的な分子として tacr, slit2, mobp, edg8 を選抜した。続いて、甲状腺機能低下ないし DBDE 暴露例で選別された候補分子のうち、免疫組織化学的な発現局在解析が可能な分子について、暴露終了時での脳内での発現分布の変動を検討した。PTU, MMI, DBDE 暴露例の 21 日目の脳をブアン固定後に、Bregma の後方約 -3.4 mm の 1 カ所で冠状断面を作製し、その前後の対称面が切面となる様にパラフィン包埋した後、3 μm 厚の連続切片を作製した。マイクロアレイ解析で抗甲状腺剤に反応を示した白質のオリゴデンドロサイト及び海馬 CA1 領域ニューロンの標的候補分子に対して、免疫組織化学的検索が可能な抗体として、白質では抗マウス vimentin 抗体 (x200 倍, Millipore Corporation), 抗ウサギ ret 抗体 (x50 倍, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 抗マウス deleted in colorectal cancer protein 抗体 (DCC; x40 倍, Vision Systems), 抗ウサギ OSP 抗体 (Cld11 遺伝子に対応; x200 倍, Novus Biologicals, Inc., Co.) を、海馬 CA1 領域では抗マウス reelin 抗体 (x1000 倍, Novus Biologicals, Inc., Co.) 及び抗ウサギ Eph receptor A5 抗体 (EphA5, x50 倍, Abcam) を選択した。同様に、DBDE 暴露例でのマイクロアレイ解析により得られた m 白質のオリゴデンドロサイト及び海馬 CA1 領域でのニューロンの標的候補分子として、白質では抗マウス vimentin 抗体, 抗ウサギ ret 抗体, 抗ウサギ OSP 抗体, 抗マウス heregulin 抗体 (x40 倍, Exalpha Biologicals, Inc.), 抗マウス Crk 抗体 (x2000 倍, BD Biosciences), 抗マウス Smad 1/2/3 抗体 (x50 倍, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を、海馬 CA1 領域では抗マウス reelin 抗体及び抗ウサギ EphA5 抗体を用いて、ABC 法 (Vector Lab. Elite kit) にて DAB 発色による免疫染色を行った。また、PTU, MMI 暴露例については、抗ウサギ glial fibrillary acidic protein 抗体 (GFAP, x500 倍, DakoCytomation) を用いたアストロサイトの免疫染色も実施した。Vimentin, reelin, EphA5 に関しては、HBCD, TBBPA についても発現局在を検討し

た。抗原賦活化として、vimentin, DCC, heregulin, Smad 1/2/3 については、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) を行い、それ以外の分子については未処理で行った。PTU, MMI 暴露例の白質における vimentin 陽性細胞は、cingulum 直下に集積して存在しており、GFAP 陽性細胞も同様に同部位に集積を示した。Ret は白質に陽性細胞がびまん性の分布を示した。そこで、vimentin, ret, GFAP 陽性細胞については、対物レンズで 10 倍の視野における cingulum 下部の領域について 2 断面の左右の単位面積 (mm²) 当たりの平均値を求めた。その他の抗体については、白質領域における染色強度を 2 断面について測定した。海馬 CA1 領域における reelin 染色切片については、CA1 領域の全景が標本上に認められないものが多かったことから、PTU, MMI 暴露例で reelin 陽性ニューロンが散見された左右 1 箇所海馬歯状回を観察対象とし、歯状回の顆粒細胞層外 (海馬門) に存在している単位面積当たりの reelin 陽性細胞数を求めた。また、抗 NeuN 抗体を用いて ABC 法にて DAB 発色を行った免疫染色標本について、左右 1 対の海馬歯状回の顆粒細胞層外 (海馬門) に存在する単位面積当たりの reelin 陽性細胞を同様に求めた。EphA5 染色標本については、左右 1 箇所海馬 CA1 領域を観察対象とし、錐体細胞層の最下層を基準に、錐体細胞層外に存在している陽性細胞数を求めた。

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、TBBPA 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

TBBPA 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、脳内報酬系に關与する 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TBBPA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)、平均赤血球血色素量(MCH)、及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)の測定を行った。白血球百分比は、Wright染色した塗沫標本を作製し、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としてホルマリン固定し、残りを用いて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。

細胞性免疫に關与する検討として、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NKRP1A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TBBPA(100, 1000, 10000 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。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 $^{\circ}$ 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(-)0.8-1.0 mLを注入し、肺洗浄液(BALF)を取得した。BALFは使用時まで-80 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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(1800 g, 4 $^{\circ}$ 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0.2 mLずつ添加した。これらのプレートを5%CO₂存在下、37 $^{\circ}$ C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。

In vitro RS ウイルス増殖試験として、プラーク減少法により TBBPA のウイルス増殖への影響を検討した。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 RS ウイルスを 50 PFU ずつ 1 時間吸着・培養をした。未吸着ウイルスを除去した後、0.8% メチルセルロース含有維持培地で段階希釈した TBBPA もしくは抗ウイルス剤リバビリン (陽性対照化合物) を 1.0 mL ずつ添加して 5% CO₂ 存在下、37°C で 4 日間培養した。培養終了後、前出の方法で処理・染色後プラーク数をカウントし、化合物非添加でのプラーク数と比較した。

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。

肺の病理組織学的な検討として、摘出し、中性ホルマリンで固定した仔マウスの肺を、(株)札幌総合病理研究所に送付し、切片標本の作製ならびに病理学的な鑑定を委託した。なお、標本の情報は先方にはコード番号で知らせ、鑑定は盲検とした。

⑤幼若期暴露発がん性評価：

<HBCD 及び PTU の発がん性に関する検討>

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、各群雌雄合わせて 40 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、HBCD を 0 (対照)、0.01、0.1 及び 1% 濃度で SF 飼料 (NIH 変型、オリエンタル酵母工業) に混じ、あるいは PTU を 0.0006 % 濃度で飲料水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 HBCD あるいは PTU を母動物と同様の方法及び用量で 2 週間投与した。HBCD の短期及び長期投与毒性については、Wistar ラットに 0.3-200 mg/kg 体重/日の用量で 28 日間強制経口投与した結果、雌において肝臓の肥大、T4-GT の誘導、血中 T4 の低下、下垂体、甲状腺重量の増加がみられ (van der Ven et al., 2006)、マウスに 0.01、0.1、1 % 濃度で 18 ヶ月間混餌投与した結果、雄において肝臓の肥大、肝細胞の脂肪化、空胞化、変異細胞巣がみられたとされている (Kurokawa et al., 1999, unpublished data)。今回の実験における最高投与

量の 1.0% は、ラットの中・長期投与において概ね 500 mg/kg 体重/日の暴露が期待される用量であり、中・低用量として公比 10 にて 0.1 あるいは 0.01% を設定した。また、PTU の 0.0006% については、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、抗甲状腺作用が確認された用量である。HBCD あるいは PTU 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% 濃度で飲水に混じて投与し、更に生後 7 週時の雌には 50 mg/kg 体重/日の 7,12-di-methylbenz(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 15 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 47 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た。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 Burtlett 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。

<TBBPA の発がん性に関する検討>

HBCD/PTU の実験に準じた方法で、雌雄の F344 ラットの出生直後より 5 週間、TBBPA を 3 用量 (0.01、0.1 及び 1%) にて混餌投与した。TBBPA の毒性に関しては、動物 (げっ歯類) に 0.05-100 mg/kg 体重/日の用量で 30 あるいは 90 日間混餌投与した結果、一般状態、摂餌量及び体重には影響がなかったとされている (Goldenthal EI, unpublished; Quast JF, unpublished)。実験期間中および剖検後の検索についても、HBCD/PTU の実験に準じて実施した。

<DBDEの甲状腺に及ぼす影響に関する検討>

妊娠 F344 ラット 15 匹を日本チャールズリバーより購入し、各群 5 匹の 3 群に分けたが、うち 1 匹からは児動物が得られなかった。出生後の児動物は、原則的に母動物当たり雌雄各 4-5 匹に揃えた。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)、0.01 及び 2.5% 濃度で SF 飼料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、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。児動物については、原則的に 3 日齢で各群雌雄各 5 匹、3 週齢で各群雌雄各 5 匹、6 週齢で各群雌雄各 10 匹をエーテル麻酔下で屠殺した。屠殺 1 時間前に細胞増殖の指標として 100 mg/kg 体重のプロモデオキシウリジン (BrdU) を腹腔内投与した。また、6 週齢時には更に、屠殺前に腹大動脈より採血を行い、血清中 T4、T3 及び TSH 濃度を測定した。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な観察とともに、BrdU の免疫組織化学を行い、甲状腺濾胞上皮細胞の標識率を測定した。

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：

19 年度は、17 年度より収集してきた国際評価機関や米国における耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分、適用状況、エンドポイントおよび不確実性因子ごとに取扱状況に関する情報をデータベース化し、Web ベースの検索ツールを作成した。

また、本研究班の各分担研究から得られた定量結果に関して、ベンチマークドースの計算を行い、定量的な指標としての妥当性について検証した。ベンチマークの計算ソフトは、米国 EPA の NCEA (National Center for Environmental Assessment) により作成配付されている BMDS Ver.1.4.1. を使用した

(<http://www.epa.gov/NCEA/bmbs/index.html>)。

(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>

HBCD 暴露評価：

HBCD 試験の生後 11 週目の脳を用い、18 年度実施した発達期甲状腺機能低下に起因する白質に対する不可逆的影響の検出に続き、ニューロンの migration に与える影響を定量的に検討するため、海馬 CA1 領域における錐体細胞層外に分布する細胞数とその割合及び錐体細胞の最下層からの平均距離を形態計測したが、HBCD 暴露に起因する変動は認められなかった。

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、肝臓でのみ所見が認められ、びまん性肝細胞空胞変性の発生が雌雄共に 10,000 ppm で有意に増加し、その程度は雄で軽度、雌では中程度であった。肝臓におけるその他の所見としては、軽度かつびまん性の肝細胞好酸性変化、散在性の肝細胞巣状壊死が 10,000 ppm の雄各 1 例で認められた。生後 11 週目では、生後 21 日目に認められた肝臓に対する影響に回復性が認められた。副腎では皮質束状帯の空胞変性の発生が雄の 10,000 ppm で有意に増加した。腎臓では対照群を含めて慢性腎症の発生が認められたが、その程度は対照群に比べて暴露群で有意に強かった。なお、生後 21 日目、11 週目共に甲状腺には明らかな影響は認められなかった。また、母動物への暴露終了時に甲状腺相対重量の増加が 10,000 ppm でみられたが、病理組織学的には、びまん性濾胞上皮過形成を示す例が用量依存性に認められ、10,000 ppm では有意に増加した。

TBBPA 暴露評価：

TBBPA についても 11 週目の脳での海馬 CA1 領域における錐体細胞層外の細胞数とその割合及び錐体細胞の分布する最下層からの平均距離を形態計測したが、HBCD 試験と同様に、TBBPA 暴露に起因する変動は認められなかった。

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、11 週目共に有意差のある明らかな変

化は認められなかった。なお、母動物への暴露終了時における甲状腺では、1000 ppm 以上でびまん性濾胞上皮過形成の発生頻度に増加傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

<発達期脳障害指標探索>

マイクロアレイデータの検証：

PTU, MMI 暴露例における海馬 CA1 領域と大脳白質領域において選抜された各標的候補遺伝子について、real-time RT-PCR を実施したところ、一部で発現変動の程度が弱く統計学的有意差はつかないものの、検討したいずれの分子についてもマイクロアレイと同様の挙動を示し、マイクロアレイ解析の妥当性が確認された。

白質組織での免疫組織学的解析：

Real-time RT-PCR により白質でマイクロアレイ結果と同様の発現変動を確認した分子のうち、vimentin について、PTU, MMI 暴露例、DBDE 暴露例の生後3週目での脳を用い、免疫組織化学染色を行い、陽性細胞の定量的解析を実施したところ、12 ppm PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露により有意に vimentin 陽性細胞数が増加し、PTU の3 ppm においても増加傾向を認めた。DBDE 暴露例においても、100 ppm 以上の用量で有意に陽性細胞数が増加し、最低用量でも増加傾向が認められた。その他の BFRs 暴露例についても同様に検討したところ、HBCD 暴露例では1000 ppm 以上で有意に陽性細胞数が増加したが、TBBPA 暴露例では vimentin 陽性細胞数に影響は認められなかった。続いて、同様に real-time RT-PCR で発現変動を確認した ret についても免疫組織学的手法により定量的解析を実施したところ、PTU, MMI 暴露例では vimentin と同様に12 ppm PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露により有意に陽性細胞数が増加し、PTU の3 ppm においても増加傾向を認めた。DBDE 暴露例では用量依存的に全群で有意に陽性細胞数が増加した。

Vimentin 陽性細胞の増加についてより詳細に検討するため、アストロサイトのマーカーである GFAP の免疫組織学的検索を、PTU, MMI 暴露例について実施した。その結果、vimentin 陽性細胞数について検討した際と同様に、12 ppm PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露により有意に陽性細胞数が増加した。

続いて、マイクロアレイ解析により PTU, MMI 暴露例、DBDE 暴露例で発現変動が認められた分子のうち、神経発達への関連が示唆される分子について、それぞれの例について免疫組織学的検索を実施した。その結果、PTU, MMI

暴露例では、Cld11 が200 ppm MMI 暴露例で有意に染色強度が増強するという、マイクロアレイ解析結果と逆の結果となったが、DCC については、12 ppm PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露により有意に染色強度が増強し、マイクロアレイ解析と同様の挙動を示した。同様に、DBDE 暴露例についても Cld11, Heregulin, Crk, Smad1/2/3 について発現分布の変動を検討した結果、Cld11 では10 ppm で有意に染色強度が減少、Heregulin, Crk では1000 ppm で有意に染色強度が増強、Smad では1000 ppm で有意に染色強度が減少し、マイクロアレイ解析と同様の挙動を示した。

海馬領域での免疫組織学的解析：

海馬 CA1 領域のマイクロアレイ解析において発現変動を確認した分子のうち、reelin について、PTU, MMI, DBDE, HBCD 及び TBBPA の各暴露例の生後21日目での脳を用い、免疫組織学的手法により陽性細胞の定量的解析を実施したところ、左右海馬歯状回の顆粒細胞層外(海馬門)に存在する reelin 陽性細胞数は、12 ppm PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露により有意に増加した。さらに、DBDE 暴露例では陽性細胞数は用量依存性に増加し、1000 ppm で有意な増加が認められた。HBCD 暴露例では中間用量の1000 ppm のみで、TBBPA では1000 ppm 以上の用量で有意に陽性細胞が増加した。また、左右海馬歯状回の顆粒細胞層外(海馬門)に分布する NeuN 陽性細胞数は、3 ppm 以上の PTU 暴露、200 ppm MMI 暴露、1000 ppm DBDE 暴露、10,000 ppm HBCD 暴露、1000 ppm 以上の TBBPA 暴露により有意な増加が認められ、抗 reelin 抗体による免疫染色と同様の結果が得られた。一方、抗 EphA5 抗体による免疫染色では、PTU 暴露動物の3 ppm 以上で左右海馬 CA1 領域の錐体細胞層外に分布する陽性細胞数に用量依存性のある有意な増加が認められた。また、MMI 暴露動物では、陽性細胞数は無処置動物に比べて増加し、DBDE 暴露動物では用量依存性のある増加が認められたが、いずれも有意差は認められなかった。HBCD 及び TBBPA 暴露動物では、EphA5 陽性細胞数に有意差は認められなかった。

②神経機能・行動影響評価：

TBBPA の胎児期およ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、TBBPA の胎児期および授乳期慢性暴露により著明な体重変動は認められなかった。

一般行動観察の結果、TBBPA の慢性暴露により雄性ラットでは 1000 ppm 慢性暴露群、雌性ラットでは 1000 および 10,000 ppm 慢性暴露群において有意な自発運動量の増加および立ち上がり回数の増加が認められた。しかしながら、いずれの暴露動物においても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、TBBPA 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、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 TBBPA の胎児期および授乳期慢性暴露の影響を検討した。その結果、TBBPA 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。

側坐核におけるドパミンおよ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、TBBPA の慢性暴露により、メタンフェタミン誘発ドパミン遊離量、さらに、代謝物である DOPAC および HVA の細胞外遊離量に変化は認められなかった。

③免疫機能影響評価：

3 週齢時、11 週齢時共に、TBBPA 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、TBBPA 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。

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、白血球百分比とともに、3 週齢、11 週齢時ラットにおいて、対照と比べて有意な変化はみられなかった。なお、3 週齢で、10,000 ppm 投与群で血色素濃度の減少が、11 週齢時の 1,000 ppm 投与群で血色素濃度の有意な上昇が観察されたが、これらの変化は、わずかなものであると考えられた。

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、TBBPA 投与群と対照群との間に、17 年度に抗甲状腺作用の陽性対照として用いた 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。リンパ球サブポピュレーションの割合で、用量依存性が見られた変化としては、3 週齢の脾臓および末梢血における活性化 T 細胞の増加、胸腺における不活性 B 細胞の増加が、11 週齢の脾臓における CD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ細胞、Treg、NK 細胞、活性化 T および B 細胞、そして CD4 陽性の

NK 細胞 (CD4NK) の増加と、T 細胞 (特に CD4⁺T 細胞) の減少、胸腺における B 細胞 (特に不活性 B 細胞) の増加と CD4NK 細胞の減少、末梢血における T 細胞、活性化 B 細胞および Treg の増加が認められた。

TBBPA 投与による血液生化学的検査結果については、3 週齢時において、100 及び 1,000 ppm 暴露群で、甲状腺ホルモン T3 の有意な減少が観察された。しかし、10,000 ppm では有意な差は認められず、暴露停止後の 11 週齢においては全項目に有意な差がなかった。

胸腺および脾臓の組織病理学的解析の結果からは、100 ppm 暴露群においてごく弱い白脾髄の萎縮と髄外造血の増加が 1 例ずつ認められたのみで、それも統計的に有意な変化ではなかった。

次に、TBBPA 投与ラットの KLH に対する抗体産生への影響を検討した。2 回 KLH で免疫したラットから得た血清 (40 日齢) 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 TBBPA の用量依存性を調べた結果、TBBPA 10,000 ppm 投与群の中に、抗体価の減少する個体がみられたが、対照群との間に有意差は得られなかった。

④感染影響評価：

TBBPA 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および仔マウスの体重比較、ならびに親マウスの TBBPA 暴露期間中の摂餌量を調べたが何れも TBBPA の影響が見られなかった。一方、血清中の T4 レベルの変化は、1000 ppm 以上の暴露において親マウスでは著しく上昇したのに対し、仔マウスでは逆に有意に低下した。

仔マウスの肺組織中の RS ウイルス感染価は 100 ppm から 1000 ppm では暴露量に依存して有意に上昇した。その一方で、10,000 ppm では著しく低下し、対照群のそれらを有意に下回った。これらの結果を受けて、TBBPA の RS ウイルス増殖への影響を *in vitro* 増殖試験で検討した結果、陽性対照リバビリンがウイルス増殖を顕著に抑制したのに対して、TBBPA は細胞毒性が見られない最高濃度 30 μM までウイルス増殖に全く影響を与えなかった。RS ウイルス感染病態の指標である BALF 中の IFN-γ レベルは、100 ppm から 1000 ppm まで有意に上昇した。しかし、肺ウイルス感染価の結果と同様に 10000 ppm 暴露群では対照を有意に下回った。

肺ウイルス感染価および BALF 中の IFN-γ レベルの結果から、TBBPA 暴露による RS ウイルス感

染病態の増悪化が示唆されたため、病理組織学的な検証を行った。1000 ppm 暴露マウスでは明確でなかったが、10,000 ppm 暴露マウスでは水腫を伴った顕著な肺炎の増悪化が確認された。これらの結果より、TBBPA の周産期暴露により仔マウスにおけるRSウイルス感染病態が悪化することが判明した。そしてBALF中のIFN- γ が低用量のTBBPA暴露から反応する優れた評価指標であることも明らかとなった。

⑤幼若期暴露発がん性評価：

<HBCD及びPTUの発がん性に関する検討>

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態、摂餌量及び摂水量に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。体重は、対照群に比しHBCD 1%及びPTU群において有意に高値を示した。HBCDの平均摂取量は、0.01、0.1及び1%群で各14.6、149.3及び1390.1 mg/kg 体重/日、PTU群におけるPTUの平均摂取量は、1.3 mg/kg 体重/日であった。剖検時の肝重量は、対照群に比し0.1%群で有意な高値あるいは高値傾向を示し、1%群では有意な高値を示した。甲状腺重量に対するHBCD投与の影響はみられなかったが、PTU群では対照群に比し有意な高値を示した。肝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が、甲状腺においては1%群で軽度な、PTU群では著しいび慢性濾胞上皮細胞過形成が認められた。

児動物にHBCDあるいはPTU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)、0.01、0.1、1%及びPTU群の雄では21、21、25、25及び25匹、雌では24、23、23、17及び18匹となった。生存率、一般状態及びDHPN投与期間中の摂水量については、HBCD投与による明らかな影響は認められなかったが、体重については、1%群の雄ではHBCD投与期間中より23週齢時まで、雌では実験期間を通して対照群に比して有意に低値を示し、PTU群の雌雄においては高値傾向を示した。摂餌量については、1%群の雌雄でHBCD投与後の発癌物質処置期間中より13週齢まで、低値傾向を示した。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。HBCDの平均摂取量は、0.01、0.1及び1%群の雄で各14.9、122.4及び1395.1 mg/kg 体重/日、雌で14.2、140.5及び1291.4 mg/kg 体重/日であった。また、PTU群におけるPTUの平均摂取量は、雌雄とも1.0 mg/kg

体重/日であった。剖検時の臓器重量に関しては、1%群の雌とPTU群の雌雄において肝重量が対照群と比して低値を示したが、腎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。病理組織学的検索においては、肝、腎、甲状腺、肺、食道、膀胱及び乳腺に腫瘍を含む増殖性病変が認められた。

肝臓では、PTU群の雌で変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫の発生数が対照群に比し有意に増加したが、雌では有意に減少した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。腎臓では、PTU群の雄で腎細胞腺腫の発生頻度が対照群に比し有意に、雌では腎芽腫の発生頻度及び数が有意に増加した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。甲状腺では、PTU群の雌雄で濾胞上皮細胞の巣状過形成及び腺腫/癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に減少した。HBCD-1%群の雄では、巣状過形成の発生数が有意に減少し、癌の発生頻度及び数が減少傾向を示した。肺では、PTU群の雌で腺癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に減少した。また、HBCD-1%群の雄では、扁平上皮癌の発生が有意に減少した。食道では、PTU群の雄で乳頭腫/扁平上皮癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に増加した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。膀胱では、PTU群の雌で移行上皮過形成及び腺腫/癌の発生頻度が有意に増加したが、これらの病変の発生状況については群間のばらつきが大きく、PTU投与による影響であるか否かは明らかではなかった。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。乳腺では、HBCDあるいはPTU投与による明らかな変化は認められなかった。

<TBBPAの発がん性に関する検討>

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態、体重及び摂餌量にTBBPA投与による明らかな影響は認められなかった。TBBPAの平均摂取量は、0.01、0.1及び1%群で各11.8、124.6及び1249.0 mg/kg 体重/日であった。剖検時の甲状腺重量は、対照群に比し1%群で有意な高値を示し、0.1及び0.01%群においても高値傾向を示した。肝及び腎重量にTBBPA投与による影響はみられなかった。病理組織学的検索では、1%群の甲状腺に軽度なび慢性濾胞上皮細胞過形成が認められたが、肝及び腎にはTBBPA投与に起因すると考えられる変化はみられなかった。

児動物については、授乳時の各群に死亡例がみられたが、TBBPA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), 0.01, 0.1及び1%群の雄では16, 12, 16及び15匹, 雌では23, 13, 17及び15匹となった。生存率, 一般状態及びDHPN投与期間中の摂水量については, TBBPA投与による明らかな影響は認められなかったが, 体重については, 0.01及び0.1%群の雄では発癌物質処置を開始した6週齢時以降, 0.01, 0.1及び1%群の雌では15週齢時以降, 各々実験期間を通して, 対照群に比し有意な高値あるいは高値傾向を示した。摂餌量については, TBBPA投与による影響は認められなかった。TBBPAの平均摂取量は, 0.01, 0.1及び1%群の雄で各24.9, 215.6及び2358.9 mg/kg体重/日, 雌で25.9, 208.1及び1973.1 mg/kg体重/日であった。雌における触診による乳腺腫瘍を含む皮下結節/腫瘍の経時的観察において, 35週齢時以降, 0.1及び1%群でその発生頻度及び数の増加傾向がみられた。剖検時の臓器重量に関しては, 0.1及び1%群の雄において甲状腺重量が対照群と比して低値を示した。肝及び腎重量には群間の明らかな違いは認められなかった。

<DBDEの甲状腺に及ぼす影響に関する検討>

児動物の剖検時体重及び臓器重量に関して, 3日齢時にはDBDE投与による変化は認められなかった。3週齢時には, 体重及び腎, 甲状腺重量への影響はみられなかったが, 2.5%群の雌雄で肝重量の有意な増加がみられた。6週齢時には, 2.5%群の雄で体重が有意な低値を示し, 0.01%群の雄及び0.01, 2.5%群の雌では低値傾向を示した。臓器重量に関しては, 腎重量に対する明らかな影響はみられなかったが, 2.5%群の雌雄で肝及び甲状腺重量が有意な高値を示した。6週齢時に測定した血清中の甲状腺関連ホルモン値に関しては, 2.5%群の雌雄でT4値が有意な低値を示したが, T3及びTSHに関して明らかな変化はみられなかった。また, 甲状腺濾胞上皮細胞のBrdU陽性率は, 3及び6週齢時の2.5%群の雌で高値傾向を示したが, 雄において明らかな変化は認められなかった。

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年度までの国際機関や米国評価機関など約770の評価文書についての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整理結果をWebベースで検索を可能にするデータベース化した。検索画面では, 任意のキーワードによる検索の他, 化合物名, CAS番号, NO(A)ELまたはLO(A)ELの値(mg/kg), 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, TDIやの値($\mu\text{g}/\text{kg}$)などの項目毎に値やキーワードを限定して検索できるように作成した。また, 検索の結果得られた画面では, 化合物名やCAS番号などや評価文書の作成機関名に続いて, 根拠となった文献情報が表示される。詳細表示”さらに詳細”を選択すると, 調査に従って得られた詳細な情報の一覧が表示される様に設定した。また, この画面からは, ”編集”を選択することにより, 各情報の修正を行うことが可能になる。更に, ”エントリー追加”からは, 新規の評価文書の情報を追加できるように設定されている。

本データベースの中から, 発生毒性をTDI等の設定の指標としている評価書を22報抽出することができ, その中からメチル水銀とダイオキシン類の評価書を除いた20報について, UFの適用状況とそれぞれの係数の理由を分類した。催奇形性に伴う重篤性に対してのUFを適用した例は一例(UF:3)であったが, いくつかの例では, データベース不足を追加の理由としてUF:10を適用している例が6例, UF:3を適用している例が3例認められた。

今年度は, 定量的な有害性影響評価のために, 各分担研究から得られた定量結果に関して, ベンチマークドースの計算を試みた。計算に用いたエンドポイントとしては, 以下示すものを用いた。

- ラットへの胎生授乳期 HBCD 暴露による児動物 (11 週齢) の
 - 1). 血清 T3 値
 - 2). 甲状腺重量
- ラットへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物 (11 週齢) の脳の形態計測において
 - 3). 白質の脳梁面積 (mm^2)
 - 4). 白質の CNPase 陽性細胞 ($/\text{mm}^2$)
 - 5). 海馬: CA1 錐体細胞層最下層からの平均距離 (μm)
 - 6). 海馬: 移動が異常な神経細胞数 ($/\text{mm}$)
 - 7). 海馬: 移動が異常な神経細胞数/CA1 神経細胞数 (%)
- ラットへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物 (3 週齢) の脳の形態計測において
 - 8). 海馬左右歯状回の抗 reelin 抗体陽性細胞数 \div 左右歯状回の面積 (mm^2)
- ラットへの胎生授乳期 DBDE, HBCD, TBBPA 暴露による児動物 (11 週齢) の脳の形態計測において

- 9). DBDE 投与による Vimentin 陽性細胞 (/mm²)
- 10). HBCD 投与による Vimentin 陽性細胞 (/mm²)
- 11). TBBPA 投与による Vimentin 陽性細胞 (/mm²)
- ラットへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 12).メタンフェタミンによる報酬効果 (CPPscore)
- ラットへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 13). 3 週齢肝臓比重量(g/100gBW)
 - 14). 3 週齢脾臓活性化 B 細胞率 (%)
 - 15). 3 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 16). 11 週齢末梢 NK 細胞率 (%)
 - 17). 11 週齢血清 T4 値 (ng/ml)
- ラットへの胎生授乳期 HBCD 暴露による児動物の
 - 18). 3 週齢肝臓比重量(g/100gBW)
 - 19). 3 週齢脾臓活性化 T 細胞率 (%)
 - 20). 3 週齢脾臓 NK 細胞率 (%)
 - 21). 3 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 22). 3 週齢血清 TSH 値 (ng/ml)
 - 23). 3 週齢血清アルブミン値 (g/dl)
 - 24). 11 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 25). 11 週齢血清アルブミン値 (g/dl)
- ラットへの胎生授乳期 TBBPA 暴露による児動物の
 - 26). 11 週齢脾臓 CD4+T 細胞率 (%)
 - 27). 11 週齢脾臓不活化 T 細胞率(%)
- マウスへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 28). 肺組織中の Virus 感染価 (PFU/ml)
 - 29). 肺洗浄液中のインターフェロンγ (pg/ml)
- マウスへの胎生授乳期 HBCD 暴露による児動物の
 - 30). 肺洗浄液中のインターフェロンγ (pg/ml)
- マウスへの胎生授乳期 TBBPA 暴露による児動物の
 - 31). 肺組織中の Virus 感染価 (PFU/ml)
 - 32). 肺洗浄液中のインターフェロンγ (pg/ml)
- ラットへの胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 31). 雌の甲状腺ろ胞上皮 carcinoma 誘発率
 - 32). 雌の甲状腺ろ胞上皮 adenoma と carcinoma の合計誘発率
 - 33). 雄の腎細胞腺腫・腎細胞癌の合計誘発率
 - 34). 雌の腎芽腫誘発率

以上の用量反応データに基づき、ベンチマーク

ドースの算定を行った。エンドポイント番号 31-34 以外のデータについては、連続値データであり、Linear, Polynomial(Degree Poly: 2), Power, Hill の各モデルによるフィッティングを行い、Toxicology Excellence for Risk Assessment (TEAR) の基準

(<http://www.tera.org/Tools/TERA%20tools.pdf>) に従って、ベンチマークドースの選定を行った。エンドポイント 31-34 については、投与による影響が腫瘍発生の抑制作用であったため、対象とする腫瘍を発生しない動物数の増加数に対してフィッティングを行った。その結果、以下の表に示すエンドポイントについてベンチマークドース (BMDL) を設定することができた。

これらの計算結果を化合物に整理してみると、DBDE による影響では、低いところでは 1.76~2.87 ppm から 145 ppm という値が得られ、HBCD に関しては、13~121 ppm という値が得られた。

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>

18 年度に引き続き、19 年度は HBCD 及び TBBPA 暴露実験の病理組織学的検索及びニューロンの migration に対する影響検索を実施した。また、18 年度実施した抗甲状腺剤及び DBDE 暴露例におけるマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果から、白質および海馬 CA1 領域で発現変動のみられた標的候補分子について免疫組織学的な発現分布の変動解析を行った。

まず、BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立に関しては、18 年度実施した HBCD 試験では、21 日齢時での HBCD 試験の病理組織学的検索により、母動物の甲状腺重量の増加が 100 ppm からみられ、用量依存性はないものの 10,000 ppm では有意な増加を示した。病理組織学的に、びまん性濾胞上過形成を示す例が用量依存性に認められ、HBCD の母動物に対しては甲状腺機能低下の誘発は明らかであった。一方、児動物では、血清中の甲状腺関連ホルモンは 11 週齢の時点においても 1000 ppm 以上で軽度な変化を示し、甲状腺の相対重量の増加も認められたが、病理組織学的には生後 21 日、11 週目においても甲状腺に明らかな影響は認められず、HBCD の児動物に対する甲状腺機能低下は組織学的な影響を与えない程度の変動であることが示唆された。肝臓では、生後 21 日目に雌雄共に 10,000 ppm で相対重量の増加がみられ、病理組織学的にびまん性肝細胞空胞変性が認められた。また、その影響

は雄に比べて雌でより強い傾向が認められた。HBCD のラットを用いた 90 日間反復投与試験では病理組織学的変化はみられないものの肝臓重量の増加が認められている。また、雌は雄に比べて肝臓中の HBCD 濃度が高く（あるいは雄では排泄が速いため）、HBCD の暴露に対して雌は高感受性であるとされている。HBCD による肝細胞空胞変性のメカニズムは不明であるが、本試験でも HBCD の肝臓に対する影響は雄に比べて雌でより強いことが確認された。生後 11 週目には、雄で副腎皮質束状帯の空胞変性の発生増加が認められた。副腎皮質束状帯は glucocorticoid や androgen といったホルモン産生に関わる部位であるが、本所見は雌では認められなかったため、毒性学的意義は不明である。

18 年度の検索で、HBCD の 10,000 ppm 群で CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度減少が確認され、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。しかしながら、今年度実施した成熟後での海馬 CA1 ニューロンの migration に対する影響検索では、HBCD 暴露に起因する変動はいずれの検査項目にも認められなかった。このことから、HBCD の甲状腺機能低下を介する脳発達への影響は白質でのみ明らかとなった訳であるが、標的細胞であるニューロン、オリゴデンドロサイトの感受性の差を反映しているのか、検出法の感度の差を反映しているのかは不明である。後述するように、神経幹細胞の分布する歯状回で、HBCD を含む各化合物の暴露終了時における標的候補分子 reelin の発現局在の変動を認め、11 週齢時でもこの部位での顆粒細胞層からの逸脱ニューロンの増数を認めたことから、検索部位における検出感度の差を反映している可能性は否定できない。

TBBPA 試験では、18 年度までに、白質に対する明らかな影響は認められていないが、100 及び 1000 ppm で CNPase 陽性細胞密度の弱い低値が見出されており、暴露終了時での軽度な甲状腺機能低下との関連性が推測された。しかしながら、今年度実施した、成熟後での海馬 CA1 ニューロンの migration に対する影響検索では明らかな影響は認められず、海馬歯状回での顆粒細胞層からの逸脱ニューロンの増加を中間用量から認めたことと比較すると、HBCD と同様に TBBPA の甲状腺機能低下を反映した海馬 CA1 領域への影響は弱いか感度が低い可能性が示唆された。病理組織学的検索では、母動物甲状腺の重量及び濾胞上皮肥大の増加傾向が認められたが、有意差の認められる変化ではなかった。また、生後 21 日目の児動物では用量依存性のない T₃ の低値

が認められたが、病理組織学的に明らかな変化は認められなかった。その他、いずれの臓器・組織においても TBBPA 暴露による明らかな毒性影響は認められなかった。

<発達期脳障害指標探索>

PTU、MMI 暴露例における暴露終了時での各脳部位での real-time RT-PCR の結果及び免疫組織学的解析の結果が、マイクロアレイ解析とほぼ同様の傾向を示したことから、本手法（マイクロダイセクション法により特定部位を採取した後のマイクロアレイ解析）における解析の妥当性が確認された。

また、免疫組織学的解析の際に、白質において定量解析が可能であった vimentin (PTU、MMI 暴露例および全ての BFRs 暴露例で検討)、ret (PTU、MMI 暴露例および DBDE 暴露例で検討) の 2 分子の陽性細胞の分布の変動について検討した結果、PTU、MMI に関しては、11 週齢の児動物における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) とほぼ同様の挙動を示した。DBDE に関しては、vimentin と形態計測結果が同程度であったが、Ret は最低用量から変動を示し、感度の高い指標である可能性が指摘された。HBCD では vimentin は中間用量から発現変動を示し、検出感度が形態計測結果を上回る結果となった。TBBPA では vimentin の発現変動を認めず、明らかな白質影響は確認されなかったが、今後実施予定の Ret 等の発現挙動結果を待つ最終的な影響評価としたい。また、PTU、MMI 暴露例ないし DBDE 暴露例のマイクロアレイ解析により見いだされた他の分子 (Cld11, heregulin, Crk, Smad1/2/3) は、免疫組織化学的な発現強度がこれらの物質暴露により変動を示したものの、いずれも細胞質ないし核に陽性を示さないことから、陽性細胞の定量的な解析に向かず、関連分子の探索により、より有効な分子指標を見いだす可能性が高い。

また、reelin 及び EphA5 の 2 分子は、暴露終了時において海馬領域で陽性細胞の定量解析が可能であった。Reelin に関しては、PTU、MMI 暴露例で CA1 領域より歯状回における陽性ニューロンの発現変動が明らかであったことから、各 BFR についても歯状回で顆粒細胞層から逸脱する陽性ニューロンの検討を進めた。その結果、DBDE では最高用量で、HBCD では中間用量、TBBPA に至っては中間・高用量で陽性ニューロンのカウントが増加した。11 週目でこの領域における顆粒細胞層外に分布するニューロン (NeuN 陽性)

をカウントしたところ、DBDEとHBCDでは最高用量で、TBBPAにおいては中間用量以上で、逸脱ニューロン数の増加を見だし、HBCD以外で同等の結果となった。HBCDにおいても、最高用量で暴露終了時に reelin 陽性ニューロン数の増加傾向、11週目に中間用量での NeuN 陽性ニューロンが増加傾向を示し、用量反応性あるいは有意差は付かないものの中間用量以上での脳発達影響が示唆された。以上より、暴露終了時での歯状回顆粒細胞層外に逸脱して存在する reelin 陽性細胞の出現は、成熟後での不可逆影響を反映し、この領域での反応性は CA1 領域と同等ないしそれ以上の感度を有することが示された。特に HBCD とともに TBBPA で見いだされた脳影響は今までに報告がなく、微弱な甲状腺機能低下作用を介した、ないし、物質の直接影響による脳発達障害の存在を示唆する結果となった。

未成熟なグリア細胞の指標と考えられている vimentin の発現変動についてより詳細に検討するため、PTU, MMI 暴露例において、成熟したグリア細胞(アストロサイト)のマーカーである GFAP についても免疫組織学的検索を実施した。その結果、vimentin の発現増加と連動して、GFAP の発現も増加していたため、発達期の甲状腺機能低下により、未成熟グリア細胞の分化が抑制されると共に、分化の方向がオリゴデンドロサイトではなく、アストロサイトに誘導される可能性が考えられた。

免疫組織化学的解析を実施した分子群は、「神経幹細胞の移動」、「ニューロンおよびグリア細胞の前駆細胞への分化」、「未成熟グリア細胞からオリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化」、「オリゴデンドロサイトによるミエリン形成」、「神経細胞の軸索ガイダンス、シナプス形成」等の機能を担い、発達期甲状腺機能低下、或いは、化学物質の直接影響の結果として、これらの機能に変調を来し、不可逆的な白質の形成障害及びニューロンの migration 異常が生じたと考えられた。

②神経機能・行動影響評価：

TBBPA の胎児期および授乳期暴露例について、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、TBBPA の暴露により著明な変化は認められなかった。一方、一般行動観察の結果、TBBPA 暴露ラットにおいて新規環境への馴化に異常が認められた。しかしながら、ドパミン神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome および 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。

これまでに、分担研究者らは DBDE および PTU の胎児期およ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、TBBPA 暴露による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、TBBPA 暴露の影響は認められなかった。さらに、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、TBBPA による影響は認められなかった。以上のことから、TBBPA は DBDE や PTU とは異なり、ドパミン神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

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、TBBPA 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。

TBBPA の周産期母ラットへの経口暴露により、100 及び 1000 ppm 暴露群の仔ラット (3 週齢) において T3 ホルモンレベルの有意な低下を招いた。TBBPA には甲状腺ホルモン受容体と T3 ホルモンとの結合を阻害し、甲状腺ホルモン作用を攪乱する可能性が示されている。しかし、仔ラットの体重や免疫系臓器重量への影響は認められなかった。

免疫系への影響としては、胸腺・脾臓・末梢血における免疫細胞のサブポピュレーション変化を調べたが、17, 18 年度に用いた臭素化難燃剤 (DBDE, HBCD) とは異なり、暴露停止後の 11 週齢における変化が比較的大きいことが TBBPA の最大の特徴であった。TBBPA は難分解性ではあるものの、生物体内での濃縮性はそれほど高くはなく、変化が暴露終了後に多く現れたことの原因は不明であり、今後の研究が待たれる。

サブポピュレーション変化の多くは T 細胞に関するものであったが、脾臓および末梢血における T 細胞の存在比率は逆の挙動を示した。すなわち、脾臓では約半減し (40%→21%)、末梢血では顕著に増加した (44%→55%)。そのメカニズムは不明ながら、成熟 T 細胞の脾臓への遊走効率が低下している可能性などが考えられる。胸腺

で成熟した T 細胞は、ケモカイン CCL19/CCL21 とその受容体 CCR7 との相互作用により脾臓などの二次リンパ器官へと遊走するが⁸⁾、本研究期間内では上記のような候補分子の定量的解析を行なうことはできなかったため、今後の課題の一つと考えられる。

他の細胞集団としては、CD4 及び NK 細胞マーカー NCRP1A(CD161)陽性である特徴的な集団が高濃度 TBBPA 暴露により有意に増加した。この細胞集団はいわゆる NKT 細胞の亜集団である可能性があるが⁹⁾、本研究では個別細胞集団の機能解析は行なっていないため、その生物学的役割は不明である。また、存在比率としては微少なながら、免疫系を負に調節する制御性 T 細胞

(Treg) が脾臓および末梢血において増加していたことも特徴的であった。

Treg は細胞性免疫のみならず液性免疫をも抑制することができるということが知られているが、次に行なった抗 KLH 抗体産生能の測定からは、TBBPA への暴露は抗体産生能に有意な影響を及ぼしていなかった。先述した NKT 細胞は細胞性免疫を誘導するサイトカイン IFN- γ と液性免疫を誘導する IL-4 の両者を分泌することのできる唯一の細胞集団であるが、Treg と NKT 細胞との相互作用システムは極めて複雑であり、今後そのメカニズムの解析が重要な課題となると思われる。その際には、フローサイトメータを用いた細胞内サイトカイン発現解析技術などを適用することが有効であると思われる。

④感染影響評価：

代表的な BFRs である TBBPA 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。TBBPA 暴露により親・仔マウスとも体重減少などの毒性指標は動かなかった。TBBPA はウイルス増殖に対して影響を与えないにも関わらず、仔マウスでの肺ウイルス感染価の上昇、並びに BALF 中の IFN- γ レベルの上昇が低用量 (100 ppm) から認められた。これらは以前報告した PTU 暴露の免疫毒性効果と同様の結果であり (平成 17 年度報告済み)、TBBPA が発達期暴露において免疫毒性を示すことが強く示唆された。一方、最高用量 (10,000 ppm) 暴露では、ウイルス感染価と BALF 中の IFN- γ レベルが著しく低下したが、病理組織学的検討から重篤な肺炎が確認された。RS ウイルス感染において、重度の肺炎では却って IFN- γ レベルが低下することが知られている。この用量では炎症反応が異常亢進した為、IFN- γ の産生やウイルス増殖が抑制されたと考えられる。

TBBPA 暴露は論文報告などから甲状腺機能低下が予想され、仔マウスでは血清 T4 レベルが有意に低下していた。当初、この結果から発達期に TBBPA 暴露を受けたことで甲状腺の機能が低下し、これが免疫担当器官の成熟を不完全なものとして、結果的に免疫機能低下に結びついたと考えた。しかしながら、今回の実験で親マウスでは逆に T4 レベルが上昇したことから、別途、成体マウス (妊娠していない) を用いて TBBPA 暴露後に RS ウイルス感染実験を行った。TBBPA 暴露により血清 T4 レベルは上昇したが、BALF 中の IFN- γ レベルの上昇などの肺炎増悪化を示す結果が得られた。これらの結果から、発達期の TBBPA 暴露による免疫機能低下現象は、この化学物質の甲状腺への影響とは異なるメカニズムによることが強く示唆された。

今回の試験により、TBBPA の周産期暴露により 100 ppm から IFN- γ の応答が認められ、より低用量での評価が可能であることが予想された。さらに、この化学物質の免疫系への作用メカニズムを明らかとし、標的分子 (種) を同定することで、より簡便で用量反応性の高いリスク定量評価系の構築が可能になると考えている。

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きた。19 年度は、被験物質として臭素化難燃剤である HBCD の 3 用量と抗甲状腺剤である PTU の 1 用量を用いて 18 年度に開始した実験の評価を行うとともに、臭素化難燃剤である TBBPA の 3 用量を用いた実験を行った。

HBCD は、マウスの長期発がん性試験において肝細胞の変異細胞巣を誘発するが、発がん性は示さなかったとされている (Kurokawa et al., 1999, unpublished data)。今回の実験では、DHPN 及び DMBA で誘発した児動物の腫瘍性病変に関して、HBCD-1% 群の雄で甲状腺濾胞上皮の巣状過形成の発生数が減少し、癌の発生頻度及び数が減少傾向を示した。抗甲状腺作用を有する陽性対照物質として用いた PTU でも濾胞上皮腫瘍の発生頻度及び数の著明な減少がみられ、17、18 年度に検討した DBDE についても、甲状腺濾胞上皮の発がん感受性の低下を示す結果が得られている。今回、DBDE の幼若期投与による甲状腺に対する影響を検索する目的で行った実験では、甲状腺重量の増加、血清中 T4 値の低下及び甲状腺

濾胞上皮細胞の BrdU 陽性率の増加がみられ、DBDE が抗甲状腺作用を有することを示唆する結果が得られた。今回の HBCD を用いた発がん実験では、母動物及び児動物に HBCD の抗甲状腺作用を示唆するような変化は認められなかったが、文献的にはラットに 28 日間経口投与することにより、肝における T4-GT の誘導を伴う血中 T4 の低下と甲状腺重量の増加を示すことが報告されている (van der Ven et al., 2006)。従って、HBCD についても、PTU や DBDE と同様、幼若期に受けた抗甲状腺作用の関与により甲状腺の発がん感受性が低下した可能性が考えられる。

化学物質の胎児・乳幼児期暴露による腫瘍性病変の発生に及ぼす影響については報告として、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)。前述した DBDE, HBCD あるいは PTU の幼若期投与が、DHPN による甲状腺濾胞上皮の発がんに対する感受性を低下させた原因として、上述した (1)視床下部-下垂体-甲状腺軸の変調 以外に(2)ニトロサミンの代謝活性化/排泄に対する影響 (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が、その詳細を明らかにするためには、今後の更なる検討を要する。

HBCD を用いた発がん実験において甲状腺以外の臓器にみられた変化として、1%群の雄の肺では扁平上皮癌が減少したが、腺腫/腺癌の発生に対する影響はみられず、その意義は明らかではなかった。肝、腎、食道、膀胱及び乳腺の腫瘍性病変に対する HBCD 投与による影響は認められなかった。一方、PTU 群においては、雌で変異肝細胞巣及び肝細胞腺腫の発生数が増加、雄では減少した他、雄の腎細胞腺腫の発生頻度及び雌の腎芽腫の発生頻度及び数の増加、雌の肺腺癌の発生頻度及び数の減少、雄の食道乳頭腫/扁平上皮癌の発生頻度及び数の増加がみられたが、その原因あるいは機序については不明である。

TBBPA に関しては、発がん性を含む毒性に関する情報が乏しい。今回実施した TBBPA を用いた発がん実験では、母動物の甲状腺重量が 1%群で有意な高値、0.1 及び 0.01%群においては高値傾向を示したことから、HBCD など他の臭素化難燃剤と同様に抗甲状腺作用を有することが示唆された。また、児動物の剖検時に測定した甲状腺重量が低値を示し、腫瘍性病変の発生頻度あ

るいは発生数が減少している可能性が示された。

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：

19 年度作成したデータベースの中から、発生毒性を TDI 等の設定の指標としている評価書を 22 報抽出し、それぞれの係数の理由を分類した結果、催奇形性に伴う重篤性に対しての UF を適用した例は一例 (UF:3) であったが、いくつかの例では、データベース不足を追加の理由として UF:10 を適用している例が 6 例、UF:3 を適用している例が 3 例認められた。前者の場合の UF10 には、証拠はないが、理由を記した文章からは重篤性をいくらか加味した値であるように思われた。傾向としては、児動物の体重減少や出生率の低下のみに影響のみに対しては、追加の UF を適用していないと考えられた。少ない例からの解析ではあるが、催奇形性などを示唆するような発生毒性に関しては、追加の UF として”3”を適用している現状が示されたと考えられる。しかし、これらのデータベース不足による不確定係数に関して、明確な科学的根拠は示されており、さらなる解析が必要であると考えられた。

また、本研究班の定量結果から得られたデータを基に、近年 NOAEL/LOAEL の代替として使用されてきているベンチマークドースを求めたところ、DBDE では、感受性の高い影響として 1.76~2.87 ppm (ラットでは約 0.2-0.3 mg/kg 相当) から、HBCD に関しては、13~121 ppm (ラットでは約 1~12 mg/kg 相当) という値が得られた。BDE においては最近、Viberg et al. (2007) と Rice et al. (2007) らの報告において、新生児期での 6.7 あるいは 6 mg/kg 以上の投与により、70 日齢での行動異常が検出されている他、HBCD に関しても EC の FIRE project で実施された生殖毒性試験 (Lelienthal et al. 2006 ; Wistar ラットに、交配前より、妊娠、授乳期間を通して、さらに児動物には離乳後から混餌投与 (HBCD: 0.1-100 mg/kg bw/day))において、児動物の成熟後に聴覚性誘発電位検査異常による最も低い BMDL (0.2 mg/kg) と、Eriksson ら (2006)の生後 10 日での HBCD 単回経口投与による LOAEL 0.9 mg/kg (自発運動試験 (歩行運動および立ち上がり運動の低下))が報告されている。これらの最近の報告と当研究班における定量結果を比較すると、HBCD においては、ほぼ同レベルの感受性を示す指標を捉えているが、DBDE においては、さらに高感度な指標を捉えることができたと考えられる。今回は、いくつ

かの指標についてベンチマークドースの算定が不可能な例が認められたが、今後、最高高用量群を除外した解析や、各実験の用量設定を再考することにより、より多くの指標についてベンチマークドースを算定することが可能になり、定量評価におけるベンチマークドースの信頼性を増すことができると思われる。

E. 結論

神経発達かく乱影響評価では、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、19年度は18年度に実施したHBCD、TBBPAの評価を終了し、18年度にHBCDで白質影響を認めているものの、ニューロンのmigration異常に関する定量評価の結果、いずれにおいても海馬CA1領域でのニューロンの分布に変化は認められなかった。また、マイクロダイセクション法を利用した脳部位特異的なマイクロアレイ解析と免疫組織化学的解析により、抗甲状腺剤ないしDBDE暴露による脳発達障害の白質ないし海馬領域での標的候補分子を探索した結果、白質発達障害の指標としてvimentin及びretが、ニューロンの発達障害指標候補分子としてreelin及びEphA5が見出され、各BFRで反応性を示した。また、成熟後のニューロンのmigration異常の検出に関して、歯状回での顆粒細胞層からの逸脱ニューロンの測定がCA1領域でのニューロン分布の計測より感度が高いことを見出し、reelinの発現変動と相関していた。DBDEでの脳影響を示唆する報告は既にあるが、本研究でHBCDとともにTBBPAで見出された脳影響は今までに報告がなく、微弱な甲状腺機能低下作用を介した、ないし、物質の直接影響による脳発達障害の存在を示唆する結果となった。

神経機能・行動影響評価では、ラットを用いてTBBPAの胎児期および授乳期暴露による影響を検討し、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の確立を図った。その結果、TBBPAは神経機能・行動にさほど影響を及ぼさない可能性が示唆された。

免疫機能影響評価でもTBBPA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。TBBPAの胎児期および授乳期暴露により、3週齢の脾臓でCD4⁺T細胞の減少、回復期の11週齢でも脾臓CD4⁺T細胞、T細胞の割合の減少と脾臓

の制御性T細胞、末梢血T細胞の割合の増加が観察され、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た。17,18年度に行ったDBDE、HBCDの免疫影響の結果と比較した結果、作用メカニズムは、DBDE、HBCDの場合と多少異なる可能性がある。

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、TBBPAの感染影響を評価した。肺ウイルス感染価およびIFN- γ の生物マーカーの変動と病理組織学的検証から、TBBPAがRSウイルス感染病態を悪化させることが明らかとなった。この作用はTBBPAが直接ウイルス増殖に影響することではなく、発達期における免疫機能の低下を誘導することによると考えられる。そしてIFN- γ が用量反応性の高いTBBPAの感染影響に対する評価指標であることも判明した。TBBPAの作用メカニズムを解明することにより、今後、メカニズムに基づいた簡便で用量反応性のより高い化学物質のリスク定量評価系を作製できると考えている。

発がん性評価では、被験物質の乳幼児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を用いてHBCD、TBBPA及び抗甲状腺剤のPTUの影響を検討した。その結果、全ての物質において甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌の減少あるいは減少傾向が見いだされた。また、18年度に甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌の減少を報告したDBDEを乳幼児期に投与した際の甲状腺に及ぼす影響を検討した結果、血清T4値の低下、甲状腺濾胞上皮細胞の増殖率の増加を示した。以上より、抗甲状腺作用を有する物質の乳幼児期投与により、甲状腺における発がん感受性の低下する可能性が示された。

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、今後の定量的な有害性影響評価手法の開発に寄与することを目的とし、17年度より収集している国際的な評価機関や米国における耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分、適用状況、エンドポイントおよび不確実性因子ごとに取扱状況に関する情報をデータベース化し、Webベースの検索ツールを作成し、発生毒性における不確実係数について、更なる解析が必要であることが示された。また、本研究班の各分担研究から得られた定量結果に関して、ベンチマークドースの計算を行い、定量的な指標としての妥当性について検証した。その結果、いくつかのパラメータにおいて、低用量域にベンチマークドースを設定できることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

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.

Nakamura, R., Teshima, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Takagi, K., Gye-Hyeong, W., Shibutani, M., Sawada, J.: Effects of developmental hypothyroidism by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats. *Int. Immunopharmacol.*, 7, 1630-1638, 2007.

Watanabe, W., Shimizu, T., Hino, A., Kurokawa, M.: A new assay system for evaluation of developmental immunotoxicity of chemical compounds using respiratory syncytial virus infection to offspring mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 25, 69-74, 2008.

Shimizu, T., Hino, A., Tsutsumi, A., Park, Y. K., Watanabe, W., Kurokawa, M.: Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir. Chem. Chemother.*, 2008, in press.

Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y.M., Onose, J., Hirose, M.: Depression of T cell-mediated immunity reduces sulfadi- methoxine-induced capsular inflammation and inhibits associated development of invasive thyroid follicular cell carcinomas in rats. *Cancer Sci.*, 98, 294-298, 2007.

Cho, Y.M., Imai, T., Ota, Y., Hasumura, M., Takami, S., Hirose, M., Nishikawa, A.: A new medium-term rat colorectal bioassay applying neoplastic lesions as end points for detection of carcinogenesis modifier - Effects with weak or controversial modifiers. *Toxicol. Pathol.* in press.

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

Ema, M., Hara, H., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Kamata, E.: Evaluation of

developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod. Toxicol.*, 25, 89-99, 2008.

Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: Lack of Gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem. Toxicol.*, 31, 275-287, 2008.

Hirata-Koizumi, M., Noda, A., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M.: Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. *Reprod. Toxicol.*, 25, 231-238, 2008.

書籍

黒川昌彦(分担): ウイルス粒子構造, ウイルスの分類, RNA ウイルス, 抗ウイルス薬, 感染症治療に用いられる生物学的製剤と作用機序. 西島正弘, 後藤直正(編), 薬学領域の病原微生物・感染症学・化学療法学. 廣川書店, 東京, 2007, pp. 129-151, 351-354, 364-400, 534-536, 544-550.

黒川昌彦(分担): アレルギー. 植田 正, 前仲勝実(編), 薬系免疫学. 南江堂, 東京, 2007, pp. 85-99.

黒川昌彦(分担): 免疫疾患とその治療法. 市川厚, 田中智之(編), わかりやすい免疫学. 廣川書店, 東京, 2008, pp. 139-180.

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: 難燃剤 decabromodiphenyl ether (DBDE) のラット発達期暴露に起因する脳白質領域特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング, 第34回日本トキシコロジー学会, 東京, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: S141(P-70), 6月, 2007

三枝由紀恵, 渋谷 淳, 富士本仁, 禹 桂炯, 高橋美和, 井上 薫, 禹 麻美, 三森国敏, 広瀬雅雄: 難燃剤 decabromodiphenyl ether (DBDE) のラット発達期暴露に起因する脳海馬 CA1 領域特異的な発現変動遺伝子のプロファイリング, 第34回日本トキシコロジー学会, 東京, 第34回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: S140(P-68), 6月, 2007

Fujimoto, H., Shibutani, M., Woo, G-H., Inoue, K., U, M., Takahashi, M., Hirose, M., Nishikawa, A.: Gene expression profiling specific to the cerebral white