

matter of rats exposed developmentally to decabromodiphenyl ether with reference to brain retardation due to developmental hypothyroidism, 6th International Congress of Toxicologic Pathology, バーゼル, 9月, 2007

富士本仁, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 三枝由紀恵, 井上 薫, 禹 麻美, 高橋美和, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 臭素化難燃剤のラット発達期暴露による脳白質障害の標的分子の探索, 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 第24回日本毒性病理学会講演要旨集: p53(P-11), 2月, 2008

三枝由紀恵, 渋谷 淳, 富士本仁, 禹 桂炯, 高橋美和, 井上 薫, 三森国敏, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 臭素化難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン (HBCD)及びテトラブロモビスフェノール A (TBBPA)のラット発達期暴露による毒性影響—特に脳発達影響について—, 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 第24回日本毒性病理学会講演要旨集: p54(P-14), 2月, 2008

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HBCDの影響; 第14回日本免疫毒性学会学術大会 9月, 2007

手島玲子, 中村亮介, 中村里香, 蜂須賀暁子, 澤田純一, 渋谷淳, 臭素化難燃剤の発達期免疫影響について: 日本薬学会 128年会 3月, 2008

中村亮介, 手島玲子, 蜂須賀暁子, 佐藤雄嗣, 中村里香, 澤田純一, 渋谷淳, 臭素化難燃剤 TBBPA の周産期暴露の仔ラット免疫系への影響; 日本薬学会 128年会 3月, 2008

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: 臭素化難燃物の周産期暴露によるRSウイルス感染への影響, 第55回日本ウイルス学会, 札幌, 10月, 2007.

Watanabe W., Shimizu T., Hino A. and Kurokawa M.: RSV-infected mouse model for evaluation of health risk of brominated flame retardants. The 44th Congress of the European Societies of Toxicology, 2007. Oct., Amsterdam.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: 臭素化難燃物の周産期暴露によるRSウイルス感染への影響, 第24回日本薬学会九州支部大会, 福岡, 12月, 2007.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: 家庭用電化製品に含まれる化学物質の胎児・新生児に対する危険性, 第4回高梁学園学術カンファレンス, 岡山, 3月, 2008.

渡辺 渡, 清水寛美, 黒川昌彦: ウイルス感染モデルの薬学への応用, 薬学研究フォーラム in 東京 2008—九州からの情報発信—, 東京, 3月, 2008.

渡辺 渡, 清水寛美, 日野あかね, 黒川昌彦: 臭素化難燃物の周産期暴露によるRSウイルス感染への影響, 日本薬学会第128年会, 横浜, 3月, 2008.

高見成昭, 今井俊夫, 曹永晩, 広瀬雅雄, 西川秋佳: Decabromodiphenyl ether の乳幼児期投与によるラット多臓器発がん感受性に及ぼす影響. 第66回日本癌学会総会 10月, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得
なし

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

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19年度）
 脳発達のかく乱影響評価

分担研究者 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：神経発達影響評価系の確立を分担課題として、甲状腺機能低下による脳発達障害を陽性対照として、臭素化難燃剤(BFRs)を例としたラットを用いた用量反応性の定量評価を実施した。19年度は18年度に実施した1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD; 0, 100, 1000, 10,000 ppm 混餌)及びtetrabromobisphenol A (TBBPA; 0, 100, 1000, 10,000 ppm 混餌)の暴露実験における毒性評価および成熟後脳でのニューロンへの不可逆的变化（海馬 CA1 領域におけるニューロンの migration 異常）の検索を終了した。HBCD では既に生後 21 日目(離乳時)と成熟後(11 週目)では軽度の甲状腺機能低下と 11 週目での白質発達影響を確認しているが、19 年度の検索で、離乳時に肝細胞空胞変性、11 週目に慢性腎症の増強と副腎皮質の空胞変性を認めたのみで、海馬 CA1 領域ニューロンの分布には影響を認めなかった。TBBPA では、既に生後 21 日目の時点で用量依存性のない血清 T3 値の弱い低値を認めたものの、白質発達には影響を認めず、19 年度の検索においても、海馬 CA1 領域ニューロンの分布も含め明らかな影響を認めなかった。また、脳内での発達期脳障害指標の探索を目的として、18 年度までにマイクロアレイ解析により抗甲状腺剤ないし decabromodiphenyl ether (DBDE)暴露動物の暴露終了時(生後 21 日目)での白質ないし海馬 CA1 領域での部位特異的な発現変動を見いだした代表的な遺伝子について、real-time RT-PCR により mRNA 発現値を検証・確認した。更に、選別された白質ないし海馬 CA1 領域での標的候補分子（白質：vimentin, ret, DCC, OSP, heregulin, Crk, Samd 1/2/3, 海馬 CA1 領域：reelin, EphA5）について、抗甲状腺剤ないし BFR の各暴露例での暴露終了時の脳における免疫組織化学的な発現局在の変動を検討した。その結果、陽性細胞の定量解析可能な分子として、白質では vimentin, ret、海馬では reelin, EphA5 が見出され、それらの発現局在の変動は 11 週齢時の形態計測結果と同等かそれより低い用量から認められた。白質影響に関しては、BFR のうち、DBDE では ret が最低用量から発現変動を示し、HBCD では vimentin が中間用量から変動を示した。海馬においては、reelin は歯状回で反応し、DBDE では最高用量で、HBCD では中間用量、TBBPA でも中間・高用量で陽性ニューロンのカウントが増加した。また、11 週目の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 領域での計測より感度の高いことが見出された。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。vimentin, ret, reelin, EphA5 は脳発達障害の早期検出に有望な分子である可能性が示唆された。

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。その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、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。本研究では本邦で主に使用されている decabromodiphenyl ether (DBDE), 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD), tetrabromobisphenol A (TBBPA)を解析対象とする。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、発癌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。

本分担研究では、発達期での化学物質暴露によって生じる脳発達への影響について、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、暴露と関連して神経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、あるいは導入する必要がある。発達期に暴露された化学物質による中枢神経系への不可逆的影響は、標的細胞の発達過程に生じる現象 (programmed cell death、migration、細胞増殖・分化等) に対して生じ、脳発達後での標的細胞あるいはそれらの細胞の形成する構成要素 (軸索、髄鞘、ニューロピル等) の数や分布の変化、または異常構造の出現として表現される。以上より、本分担研究では、まず甲状腺機能低下症により誘発される中枢神経障害の定量的検出系を、神経組織の普遍的な構

成要素であるニューロンとオリゴデンドロサイトに区分して確立し、次いで BFRs による影響の用量反応性の有無と程度を検討する。その方法としては、暴露終了時でのニューロンあるいはオリゴデンドロサイト特異的なマイクロアレイ解析による標的遺伝子の探索とその評価系への活用、成熟後での各構成成分の形態計測からなる。また、発達期の甲状腺機能障害により、内分泌環境や恒常性への永続的な影響が想定され、TBBPA で指摘されている様な性分化障害の誘発される可能性があるため、既に確立してある各種性分化指標についても検討を加える。最終的には、本班研究で実施している別の分担課題である「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。

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、昨年度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。

B. 研究方法

<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 (Fig. 1, 2)。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、精巣上体、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、大脳の 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 μ m 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、昨年度と同様に、NeuN 染色切片を用いて 200 倍の顕微鏡視野で左右 1 箇所 (CA1 領域 (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、MessageAmpTM 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 μ m 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、Exalpa 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 割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 割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、錐体細胞層のベースラインを基準に、錐体細胞層外に存在している陽性細胞数を求めた。

C. 研究結果

<BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立>

HBCD 試験 :

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 (Table 1)。

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 (Table 2)。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 (Table 3)。

TBBPA 試験 :

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 (Table 4)。

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 (Table 5)。

<発達期脳障害指標探索>

Real-time RT-PCR :

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 (Fig. 3, 4)。

免疫組織学的解析 (白質) :

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 (Table 6)、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 (Table 7)。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 (Table 8, 9)。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 (Table 6, 7)。

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 (Table 6)。

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 (Table 10)。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 (Table 11)。

免疫組織学的解析 (海馬) :

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 (Table 12)。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 (Table 13)。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 (Table 14, 15)。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 (Table 16-19)。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 (Table 20)。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 (Table 20, 21)。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 (Table 22, 23)。

D. 考察

〈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、昨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、昨年度実施した 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。

昨年の検索で、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、昨年までに、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 T_3 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。

E. 結論

甲状腺機能低下症を軸に確立した脳発達のかく乱影響評価モデルを用いて、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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, 2007.

Shibutani, M., Woo, G-H., Fujimoto, H., Inoue, K., Takahashi, M., Saegusa, Y., Nishikawa, A., Hirose, M.: Evaluation of developmental toxicity by anti-thyroid agents in rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology.* (submitted).

Fujimoto, H., Shibutani, M., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Saegusa, Y., Nishikawa, A., Hirose, M.: Developmental toxicity of decabrominated diphenyl ether in rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology.* (submitted).

Saegusa, Y., Shibutani, M., Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Mitsumori, K., Hirose, M.,

Nishikawa, A.: Developmental toxicity of brominated flame retardants tetrabromobisphenol A (TBBPA) and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) in rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. (投稿予定)

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 matter of rats exposed developmentally to decabromodiphenyl ether with reference to brain retardation due to developmental hypothyroidism, 6th International Congress of Toxicologic Pathology, バーゼル, 9月, 2007

富士本仁, 渋谷 淳, 禹 桂炯, 三枝由紀恵, 井上 薫, 禹 麻美, 高橋美和, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 臭素化難燃剤のラット発達期暴露による脳白質障害の標的分子の探索, 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 第24回日本毒性病理学会講演要旨集: p53(P-11), 2月, 2008

三枝由紀恵, 渋谷 淳, 富士本仁, 禹 桂炯, 高

橋美和, 井上 薫, 三森国敏, 広瀬雅雄, 西川秋佳: 臭素化難燃剤ヘキサブロモシクロドデカン (HBCD)及びテトラブロモビスフェノール A (TBBPA)のラット発達期暴露による毒性影響—特に脳発達影響について—, 第24回日本毒性病理学会, 名古屋, 第24回日本毒性病理学会講演要旨集: p54(P-14), 2月, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許所得

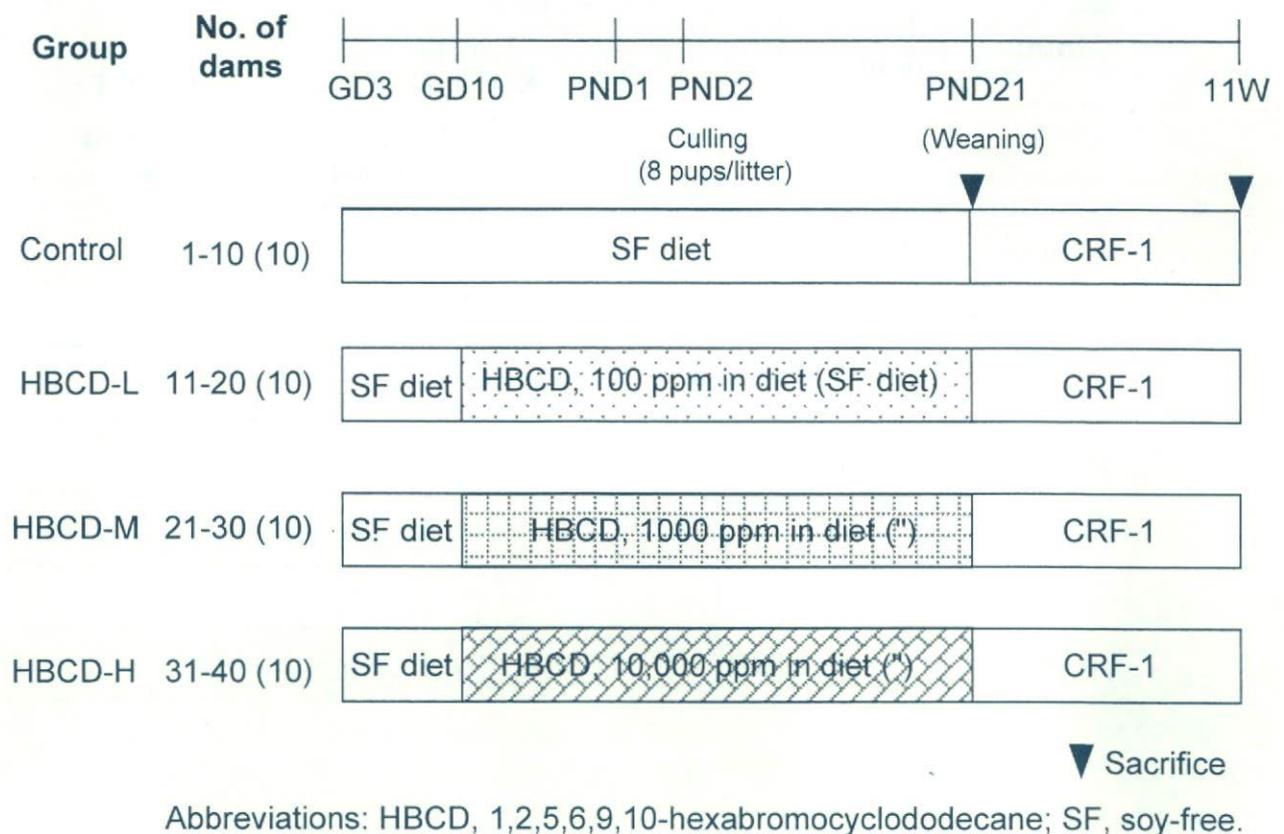
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

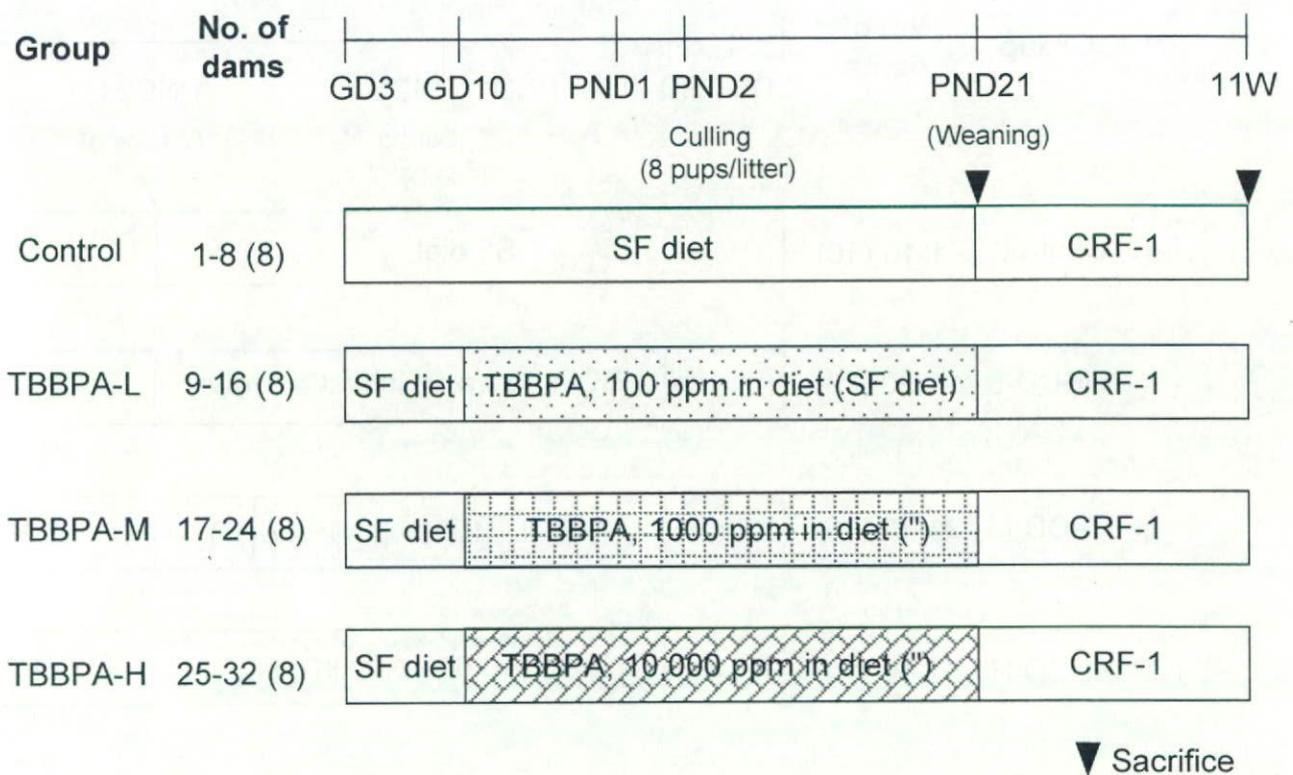
なし



Parameters examined during the year of 2007

- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Morphometric analysis (PNW11: white matter, hippocampal CA1 region)

Fig. 1.
Developmental exposure study of 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) using rats to establish an evaluation system of the brain retardation related to hypothyroidism.



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

Parameters examined during the year of 2007

- Histology and immunohistochemistry (PND21 & PNW11)
- Morphometric analysis (PNW11: white matter, hippocampal CA1 region)

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

Table 1.

Morphometry of the hippocampal CA1 region in male offspring exposed to 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PNW11.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
Mean distance of the location of neurons from the innermost margin of the pyramidal cell layer (μm) ^a	50.9 ± 11.8 ^b	49.3 ± 9.1	47.2 ± 11.9	48.2 ± 2.3
No. of neurons located outside of the pyramidal cell layer (/mm baseline)	4.5 ± 1.3	4.9 ± 0.9	3.3 ± 1.1	3.5 ± 1.1
Ratio of abnormally migrated neurons /total neurons (%)	2.9 ± 1.0	3.1 ± 0.6	2.3 ± 0.9	2.3 ± 0.7

^a NeuN (+) neurons were subjected to analysis.

^b Mean ± SD.

Abbreviations: HBCD, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane; PNW, postnatal week.

Table 2.

Histopathologic findings of male and female offspring exposed to 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
PND 21				
<i>Males</i>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Liver				
Vacuolar degeneration, hepatocytes, diffuse (+/++) ^a	0	0	0	6 ^b * (6/0) ^c
Increased eosinophilia, hepatocytes, diffuse (+)	0	0	0	1
Focal necrosis, hepatocytes	0	0	0	1
<i>Females</i>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Liver				
Vacuolar degeneration, hepatocytes, diffuse (+/++)	0	0	0	6 * (0/6)
PNW 11				
<i>Males</i>				
No. of animals examined	10	10	10	10
Adrenals				
Vacuolar degeneration, fasciculate zone, cortex (\pm /+)	0	0	0	4 * (2/2)
Kidneys				
Chronic nephropathy (+/++)	9 (9/0)	10 (5/5) [#]	10 (3/7) ^{##}	10 (5/5) [#]

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

^b Total No. of animals with each finding.

^c No. of animals with each grade.

* ** Significantly different from the 0 ppm control by Fisher's exact probability test (* p < 0.05, ** p < 0.01).

^{#, ##} Significantly different from the 0 ppm control by Mann-Whitney's U -test ([#] p < 0.05, ^{##} p < 0.01).

Abbreviations: HBCD, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane; PND, postnatal day; PNW, postnatal week.

Table 3.

Histopathologic findings of the thyroid of dams exposed to 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
PND 21				
No. of dams examined	10	10	10	10
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy (\pm / $+$ / $++$ / $+++$) ^a	3 ^b (0/3/0/0) ^c	5 (2/3/0/0)	6 (1/3/2/0)	9* (0/3/4/2)

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

^b Total No. of animals with each finding.

^c No. of animals with each grade.

* Significantly different from the 0 ppm control by Fisher's exact probability test ($p < 0.05$).

Abbreviations: HBCD, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane; PND, postnatal day.

Table 4.

Morphometry of the hippocampal CA1 region in male offspring exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PNW11.

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
Hippocampal CA1 neurons				
Mean distance of the location of neurons from the innermost margin of the pyramidal cell layer (μm) ^a	30.9 \pm 3.0 ^b	29.8 \pm 2.0	31.5 \pm 1.8	29.2 \pm 1.6
No. of neurons located outside of the pyramidal cell layer (/mm baseline)	5.1 \pm 1.4	4.7 \pm 1.5	4.0 \pm 1.6	4.6 \pm 1.7
Ratio of abnormally migrated neurons /total neurons (%)	2.3 \pm 0.6	1.9 \pm 0.5	1.7 \pm 0.6	1.9 \pm 0.7

^a NeuN (+) neurons were subjected to analysis.

^b Mean \pm SD.

Abbreviations: TBBPA, tetrabromobisphenol A; PNW, postnatal week.

Table 5.

Histopathologic findings of the thyroid of dams exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA) during the period from the mid-gestation to the end of lactation.

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
PND 21				
No. of dams examined	10	10	10	10
Thyroid				
Diffuse follicular cell hypertrophy (\pm / $+$ / $++$) ^a	3 ^b (1/1/1) ^c	3 (1/2/0)	7 (3/4/0)	7 (5/2/0)

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

^b Total No. of animals with each finding.

^c No. of animals with each grade.

Abbreviations: TBBPA, tetrabromobisphenol A; PND, postnatal day.

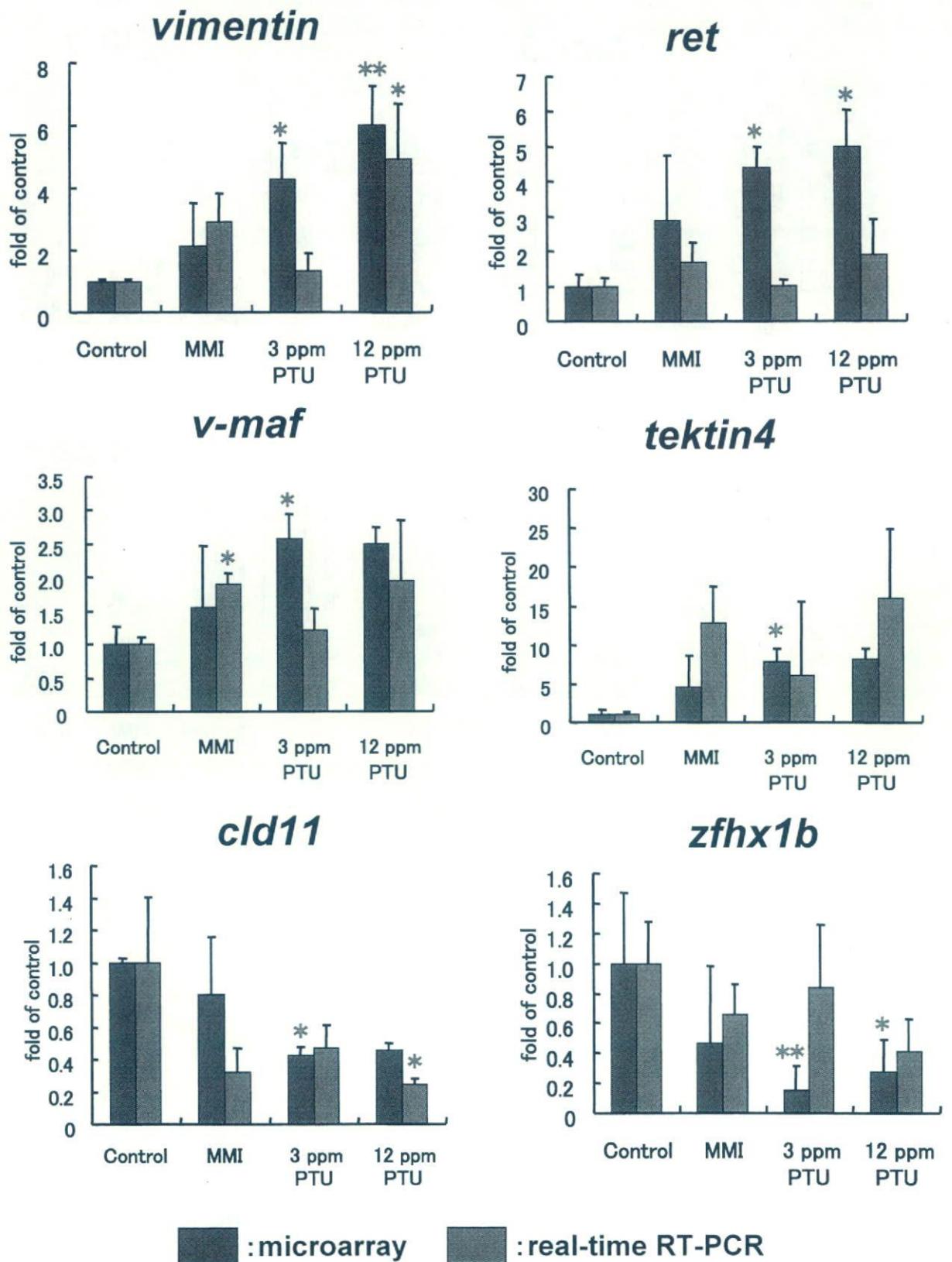
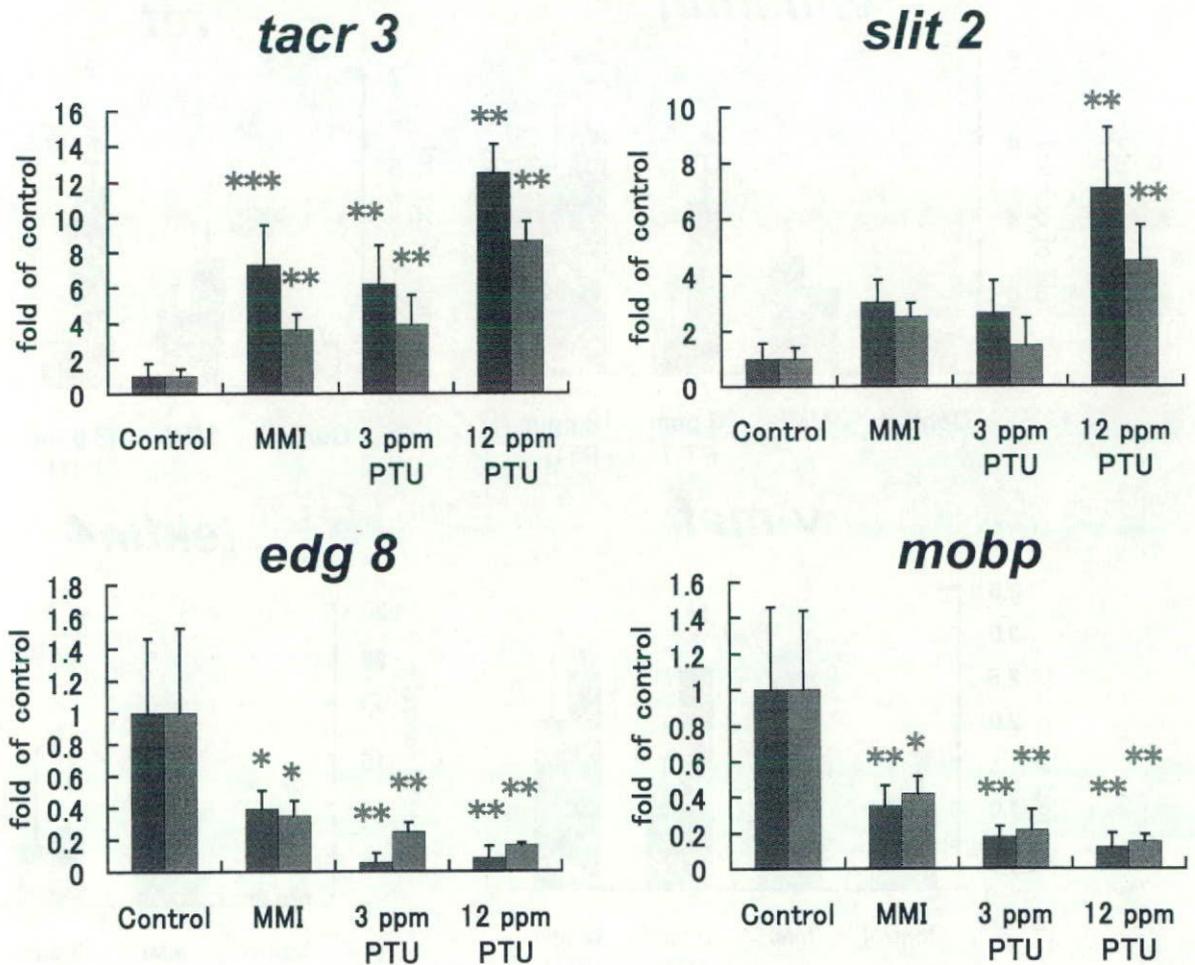


Fig. 3. Validation analysis of mRNA expression changes in the white matter of rat offspring exposed perinatally to anti-thyroid agents by real-time RT-PCR.



■ : microarray ■ : real-time RT-PCR

* : $p < 0.05$ vs. control, ** : $p < 0.01$ vs. control

Fig. 4.
Validation analysis of mRNA expression changes in the hippocampal CA1 region of rat offspring exposed perinatally to anti-thyroid agents by real-time RT-PCR.

Table 6.

Quantitative analysis of vimentin-, ret-, or GFAP-immunoreactive cells in the cerebral white matter of the offspring exposed to antithyroid agents during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	Control	MMI (ppm)		PTU (ppm)	
		200	3	12	
No. of offspring examined	6	10	10	10	10
Vimentin (+) cell count (/mm ²)	6.2±3.8 ^a	149.1±32.7**	62.0±36.7	118.7±34.6**	
Ret (+) cell count (/mm ²)	15.3±2.1	48.7±13.4**	26.4±8.4	33.9±9.1*	
GFAP (+) cell count (/mm ²)	92.8±4.7	203.2±59.7**	126.1±17.4	152.5±19.7*	

^a Mean ± SD.

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

Abbreviations: MMI, methimazole; PTU, propylthiouracil; PND, postnatal day; GFAP, glial fibrillary acidic protein.

Table 7.

Quantitative analysis of vimentin- or ret-immunoreactive cells in the cerebral white matter of the offspring exposed to decabromodiphenyl ether (DBDE) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of offspring examined	5	5	5	5
Vimentin (+) cell count (/mm ²)	12.7±8.9 ^a	38.1±18.1	55.9±22.3**	85.3±18.5**
Ret (+) cell count (/mm ²)	6.6±2.5	20.1±2.2**	29.3±5.1**	34.2±5.3**

^a Mean ± SD.

** Significantly different from the 0 ppm control by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test (*p*<0.01).

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PND, postnatal day.

Table 8.

Quantitative analysis of vimentin-immunoreactive cells in the cerebral white matter of the offspring exposed to 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
Vimentin (+) cell count (/mm ²)	20.9 ± 8.3 ^a	33.3 ± 10.2	54.9 ± 24.7**	40.0 ± 11.8**

^a Mean ± SD.

** Significantly different from the 0 ppm control by Dunnett's test or Dunnett-type rank-sum test ($p < 0.01$).

Abbreviations: HBCD, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane; PND, postnatal day.

Table 9.

Quantitative analysis of vimentin-immunoreactive cells in the cerebral white matter of the offspring exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	8	8	8	8
Vimentin (+) cell count (/mm ²)	15.1 ± 5.1 ^a	19.0 ± 5.8	19.6 ± 4.7	21.0 ± 8.6

^a Mean ± SD.

Abbreviations: TBBPA, tetrabromobisphenol A; PND, postnatal day.

Table 10.

Immunoexpression intensity of candidate molecules selected from microarray profiling in the white matter of the offspring exposed to antithyroid agents during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	Control	MMI (ppm)		PTU (ppm)	
		200	3	12	
No. of offspring examined	6	10	9	9	
DCC	1.7 ± 0.5 ^a	3.0 ± 0.8**	2.1 ± 0.6	3.0 ± 0.7**	
Cld11	1.5 ± 0.5	3.1 ± 0.6**	1.7 ± 0.8	2.3 ± 0.9	

^a Intensity scores of immunoreactivity: 0, none; 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; and 4, prominent. Values were expressed as mean ± SD.

** Significantly different from the control by Mann-Whitney's *U*-test ($p < 0.01$).

Abbreviations: MMI, methimazole; PTU, propylthiouracil; PND, postnatal day; DCC, deleted in colorectal cancer protein.

Table 11.

Immunoexpression intensity of candidate molecules selected from microarray profiling in the white matter of the offspring exposed to decabromodiphenyl ether (DBDE) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of offspring examined	5	5	5	5
Cld11	2.4 ± 0.5	1.4 ± 0.5*	1.6 ± 0.5	1.6 ± 0.5
Heregulin	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.7	2.4 ± 0.9	3.0 ± 0.7*
Crk	1.4 ± 0.9	2.2 ± 0.4	2.4 ± 1.1	3.4 ± 0.5**
Smad1/2/3	2.8 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.0 ± 1.0	1.4 ± 0.5*

^a Intensity scores of immunoreactivity: 0, none; 1, minimal; 2, slight; 3, moderate; and 4, prominent. Values were expressed as mean ± SD.

*** Significantly different from the 0 ppm control by Mann-Whitney's *U*-test (**p* < 0.05, ***p* < 0.01).

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PND, postnatal day.

Table 12.

Quantitative analysis of reelin-immunoreactive cells outside of the granule cell layer in the hippocampal dentate gyrus of the offspring exposed to antithyroid agents during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	Control	MMI (ppm)	PTU (ppm)
		200	12
No. of offspring examined	6	5	9
Reelin (+) cell count (/mm ²)	38.8 ± 14.2 ^a	73.8 ± 16.7*	70.4 ± 26.3*

^a Mean ± SD.

* Significantly different from the control by Dunnett's test (*p* < 0.05).

Abbreviations: MMI, methimazole; PTU, propylthiouracil; PND, postnatal day.

Table 13.

Quantitative analysis of reelin-immunoreactive cells outside of the granule cell layer in the hippocampal dentate gyrus of the offspring exposed to decabromodiphenyl ether (DBDE) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of offspring examined	6	5	5	5
Reelin (+) cell count (/mm ²)	38.8 ± 14.2 ^a	46.1 ± 7.2	56.4 ± 13.5	68.3 ± 15.3*

^a Mean ± SD.

* Significantly different from the control by Dunnett's test (*p* < 0.05).

Abbreviations: DBDE, decabromodiphenyl ether; PND, postnatal day.

Table 14.

Quantitative analysis of reelin-immunoreactive cells outside of the granule cell layer in the hippocampal dentate gyrus of the offspring exposed to 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane (HBCD) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
Reelin (+) cell count (/mm ²)	84.4 ± 26.6 ^a	97.5 ± 26.6	130.3 ± 37.8**	102.5 ± 15.7

^a Mean ± SD.

** Significantly different from the control by Dunnett's test ($p < 0.01$).

Abbreviations: HBCD, 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane; PND, postnatal day.

Table 15.

Quantitative analysis of reelin-immunoreactive cells outside of the granule cell layer in the hippocampal dentate gyrus of the offspring exposed to tetrabromobisphenol A (TBBPA) during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	8	8	7	7
Reelin (+) cell count (/mm ²)	98.5 ± 18.1 ^a	120.9 ± 19.6	144.8 ± 24.3**	143.4 ± 32.2**

^a Mean ± SD.

** Significantly different from the controls by Dunnett's test ($p < 0.01$).

Abbreviations: TBBPA, tetrabromobisphenol A; PND, postnatal day.

Table 16.

Quantitative analysis of NeuN-immunoreactive cells outside of the granule cell layer in the hippocampal dentate gyrus of the offspring exposed to antithyroid agents during the period from the mid-gestation to the end of lactation. Analysis at PND 21.

	Control	MMI (ppm)		PTU (ppm)	
		200	3	12	12
No. of offspring examined	10	10	10	6	6
NeuN (+) cell count (/mm ²)	73.7 ± 17.4 ^a	174.0 ± 29.8**	104.7 ± 13.6**	126.2 ± 13.0**	126.2 ± 13.0**

^a Mean ± SD.

** Significantly different from the control by Dunnett's test ($p < 0.01$).

Abbreviations: MMI, methimazole; PTU, propylthiouracil; PND, postnatal day.