

Table 17.

Quantitative analysis of NeuN-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 PNW 11.

	DBDE in diet (ppm)			
	0	10	100	1000
No. of offspring examined	10	10	10	9
NeuN (+) cell count (/mm ²)	62.7 ± 9.3 ^a	74.6 ± 17.0	68.3 ± 17.5	87.0 ± 16.4**

^a Mean ± SD.

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

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

Table 18.

Quantitative analysis of NeuN-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 PNW 11.

	HBCD in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
NeuN (+) cell count (/mm ²)	71.1 ± 16.6 ^a	88.0 ± 24.8	93.8 ± 21.4	104.3 ± 17.6**

^a Mean ± SD.

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

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

Table 19.

Quantitative analysis of NeuN-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 PNW 11.

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10,000
No. of offspring examined	10	10	10	10
NeuN (+) cell count (/mm ²)	58.0 ± 13.7 ^a	64.6 ± 14.0	74.7 ± 11.9*	82.3 ± 16.1**

^a Mean ± SD.

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

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

Table 20.

Quantitative analysis of Ephrin A5-immunoreactive cells in the hippocampal CA1 region 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	6	8	9	
Ephrin A5 (+) cell count (/mm ²)	4.7 ± 2.3 ^a	9.1 ± 6.6	16.3 ± 5.2**	17.5 ± 7.1**	

^a Mean ± SD.

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

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

Table 21.

Quantitative analysis of Ephrin A5-immunoreactive cells in the hippocampal CA1 region 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
Ephrin A5 (+) cell count (/mm ²)	3.7 ± 2.8 ^a	2.8 ± 2.6	4.7 ± 2.1	8.2 ± 2.3

^a Mean ± SD.

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

Table 22.

Quantitative analysis of Ephrin A5-immunoreactive cells in the hippocampal CA1 region 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
Ephrin A5 (+) cell count (/mm ²)	2.5 ± 3.3 ^a	3.1 ± 3.5	4.8 ± 3.5	3.6 ± 3.4

^a Mean ± SD.

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

Table 23.

Quantitative analysis of Ephrin A5-immunoreactive cells in the hippocampal CA1 region 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	10	10	10	10
Ephrin A5 (+) cell count (/mm ²)	3.7 ± 7.2 ^a	12.2 ± 15.5	8.6 ± 9.8	9.8 ± 11.9

^a Mean ± SD.

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

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）

分担研究名 神経機能・行動影響評価

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

研究要旨：甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の生体に対する影響の評価系の確立を目的として、tetrabromobisphenol-A (TBBPA) の胎児期および授乳期慢性曝露による中枢神経系に対する影響を検討した。一般行動観察の結果、TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露では、一部新規環境への馴化に異常が認められたものの、その他特筆すべき異常行動は認められなかった。また、高架式十字迷路法に従い TBBPA 曝露による不安感受性の変化について検討したところ、変化は認められなかった。さらに、条件づけ場所嗜好性試験に従い、覚せい剤である methamphetamine 誘発報酬効果に対する TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露の影響を検討した結果、変化は認められなかった。次に、側坐核における dopamine の遊離量について、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した結果、TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露では、側坐核における methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量に著明な変化は認められなかった。以上の結果から、TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露は、新規環境への馴化に一部異常が認められるものの、用量反応性は認められず、その他特筆すべき異常行動を引き起こさないことが示唆された。

A. 研究目的

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

B. 研究方法

全ての実験には SD 系雌/雄性ラットを用いた。

TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露は、薬物混入試料法に従い、妊娠 10 日目より離乳（生後 21 日）に至るまで TBBPA を 0、100、1000 および

10000 ppm の濃度で粉末飼料に混入させた。

一般行動観察では open field にラットを入れ、馴化期間である 5 分間の行動を観察した。特に、水平方向の運動量である horizontal activity と立ち上がり行動である vertical activity を測定した。また、dopamine 神経の過剰興奮状態を反映する spinning syndrome 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。

不安感受性の検討は高架式十字迷路試験に従った。

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

脳内モノアミン濃度の測定は *in vivo* microdialysis 法に従い、脳内報酬系に関与する mesolimbic dopamine 神経の投射先である側坐核における dopamine とその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) および

homovanillic acid (HVA) の細胞外遊離量を測定した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露による一般成長に及ぼす影響を、出生時、離乳時 (3 週齢) および行動実験開始時 (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曝露により著明な体重変動は認められなかった (図 1)。

一般行動観察の結果、TBBPA の慢性曝露により雄性ラットでは 1000ppm 慢性曝露群、雌性ラットでは 1000 および 10000ppm 慢性曝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、いずれの曝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 (図 2)。

高架式十字迷路法に従い、TBBPA 慢性曝露による不安感受性の変化について検討したところ、変化は認められなかった (図 3)。

条件づけ場所嗜好性試験に従い、methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露の影響を検討した。その結果、TBBPA 慢性曝露は methamphetamine 誘発報酬効果に何ら影響を及ぼさなかった (図 4)。

側坐核における dopamine 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 の慢性曝露により、methamphetamine 誘発 dopamine 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 (図 5)。

D. 考察

甲状腺機能低下症を基軸とした難分解・高蓄積性化学物質の影響評価系の確立を目的として、本年度

は本邦で最も使用量の多い臭素系難燃剤である TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露の影響について行動薬理的検討を行った。まず、一般的な成長に対する影響について体重を指標に検討したところ、TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝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 の胎児期および授乳期慢性曝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、dopamine 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、研究者らは DBDE および PTU の胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine 神経発達障害が引き起こされる可能性を報告した。本研究においても次に、TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露による dopamine 神経機能に及ぼす影響を検討した。まず、methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす影響を条件づけ場所嗜好性試験に従い検討した結果、TBBPA 慢性曝露の影響は認められなかった。さらに、側坐核 dopamine 遊離について *in vivo* microdialysis 法に従い検討した結果、TBBPA 慢性曝露の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、dopamine 神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

E. 結論

周産期曝露影響評価として、本年度は TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露による神経機能・行動影響を検討した。その結果、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

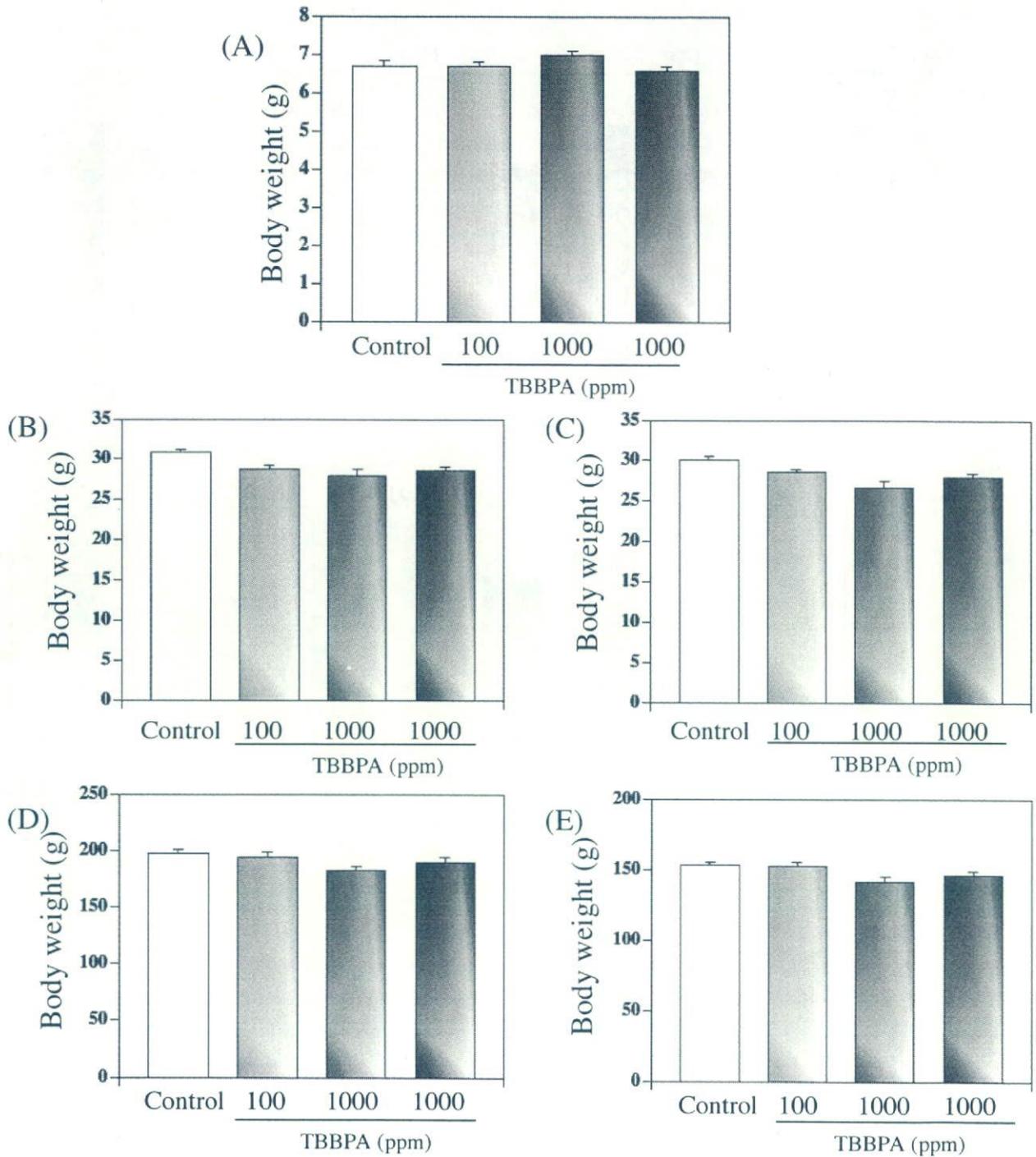


図 1 Tetrabromobisphenol-A (TBBPA) の胎児期および授乳期慢性曝露による発育 (体重増加) に及ぼす影響

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

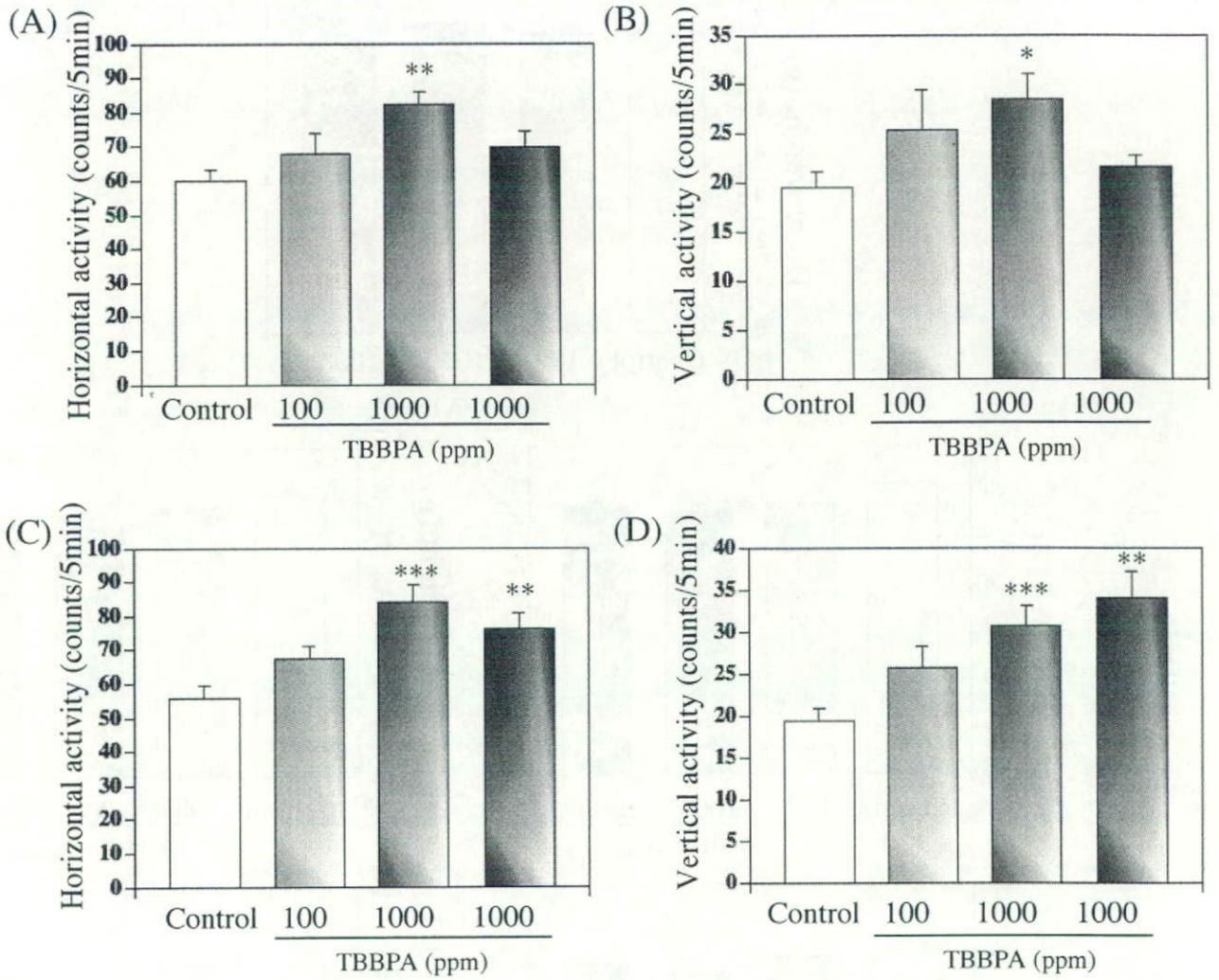


図2 TBBPAの胎児期および授乳期慢性曝露による自発運動量に及ぼす影響

一般行動観察の結果、TBBPAの胎児期および授乳期慢性曝露による自発運動量の変化は雄(A, B)、雌(C, D)共に一部運動量の増加が認められた。

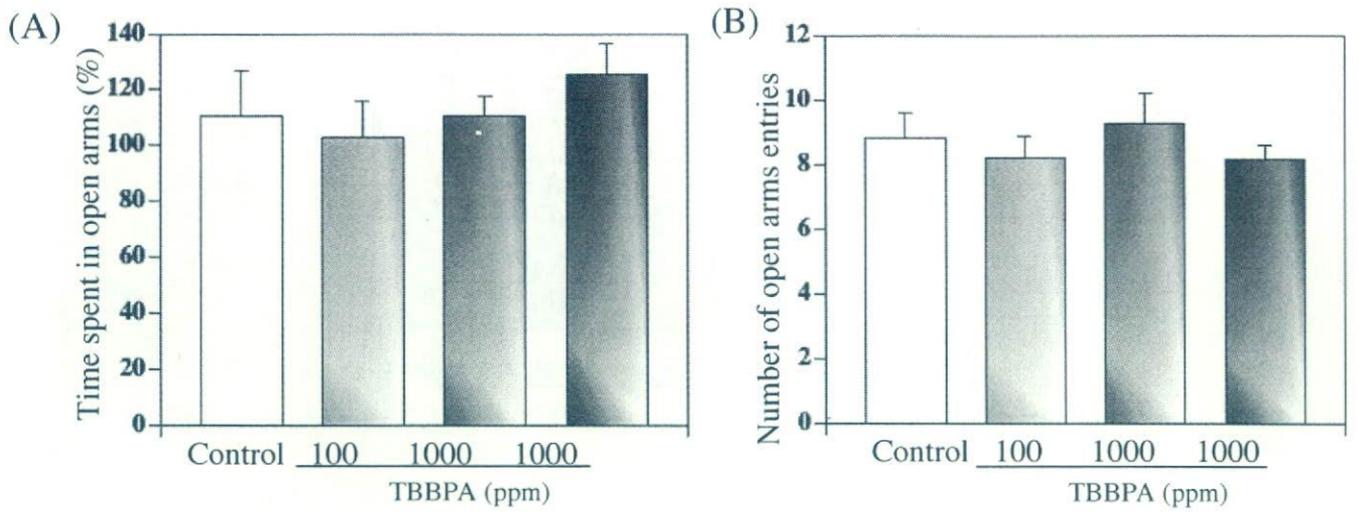


図3 TBBPAの胎児期および授乳期慢性曝露による不安感受性に及ぼす影響
 高架式十字迷路法に従いTBBPA慢性曝露による不安感受性の変化について検討したところ(雄A, B)、に有意な変化は認められなかった。

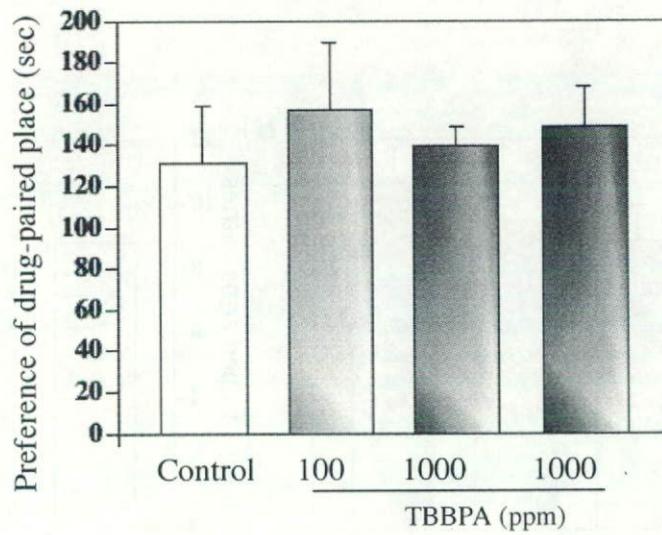


図 4 TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露による methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす影響

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

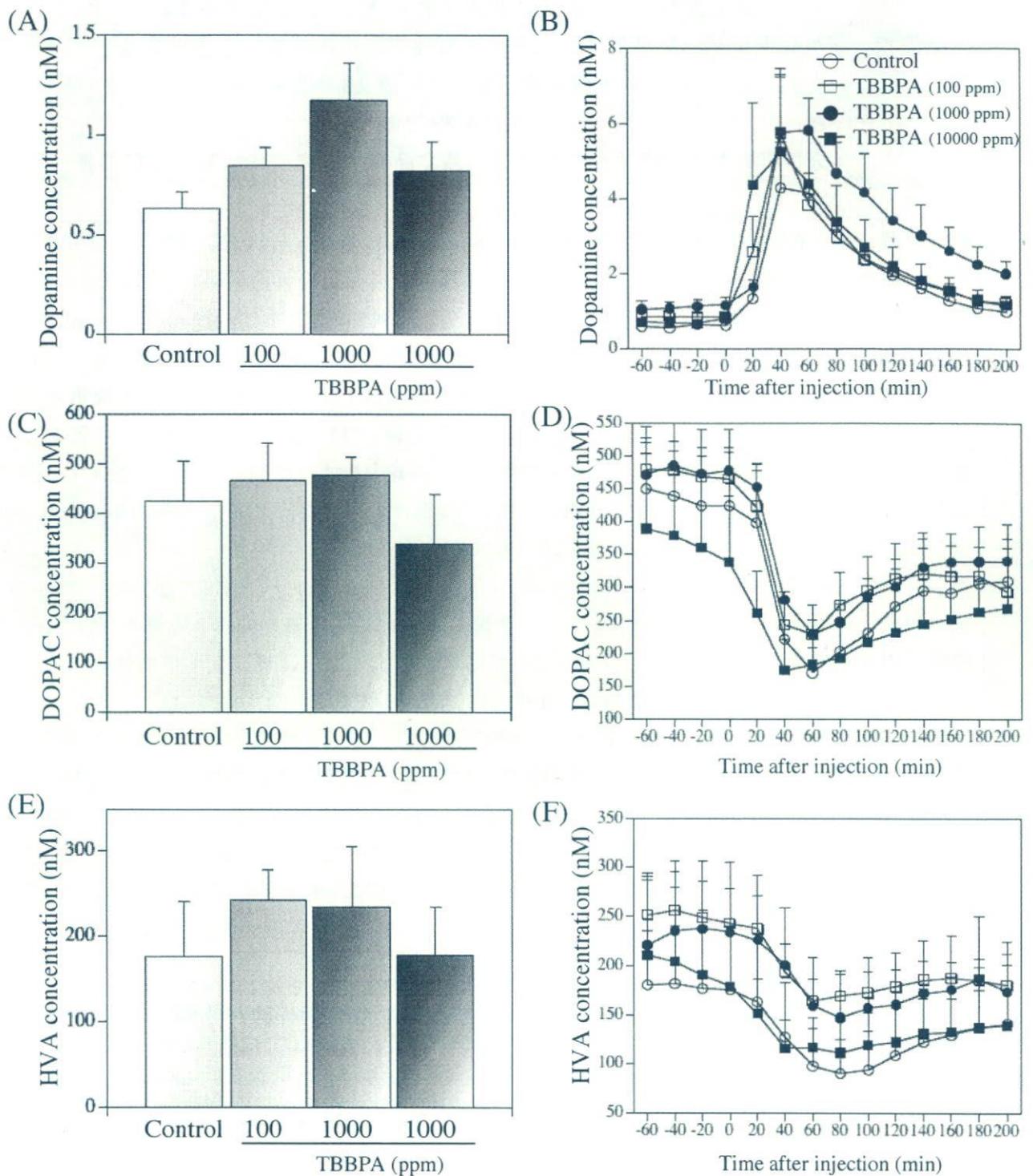


図 5 TBBPA の胎児期および授乳期慢性曝露による methamphetamine 誘発 dopamine 遊離量および dopamine 基礎遊離量に及ぼす影響

側坐核における dopamine およびその主要代謝物である dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、homovanillic acid (HVA) の細胞外遊離量を *in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、TBBPA の慢性曝露により、側坐核における dopamine 基礎遊離量 (A) および methamphetamine (1 mg/kg, s.c.) 誘発 dopamine 遊離量 (B) に大きな変化は認められなかった。さらに、DOPAC および HVA においても変化は認められなかった (C-F)。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

「胎児期・新生児期化学物質暴露による新たな毒性評価手法の確立とその高度化に関する研究」

分担研究報告書（平成 19 年度）

乳幼児期免疫機能影響評価

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所代謝生化学部部長

研究要旨 本研究においては、生体組織・機能が発育段階にある幼児期のラットを用いて、3種の臭素化難燃剤の暴露をおこない、胸腺、脾臓、血液細胞を中心に免疫機能影響評価を行い、甲状腺機能影響と免疫毒性の関連を調べる。平成 19 年度は、臭素化難燃剤 TBBPA(tetrabromobisphenol A) 100, 1,000, 10,000ppm を妊娠 10 日目から出産 3 週目まで SD 系親ラットに投与し、幼児期ラットの免疫系への影響を検討した。TBBPA 投与親から生まれた 3 週齢 SD ラットにおいては、脾臓重量、胸腺重量並びに脾臓、胸腺白血球数に対照群との差はなく、離乳後の 11 週齢においても、両臓器重量並びに両臓器白血球数に差はみられなかった。血液細胞数、白血球の組成比に関しても用量依存性を示す変化は観察されなかった。また、血漿中の甲状腺ホルモン T3 濃度の有意な低下が、3 週齢の 100ppm, 1000ppm 投与群でみられた。それぞれの臓器のリンパ球のポピュレーションのフローサイトメータによる解析では、対照群との間に大きな変化は観察されなかったが、3 週齢ラットの脾臓において、CD4+T 細胞の割合の減少が観察された。11 週齢において、脾臓 CD4+ T 細胞、T 細胞の割合の減少が観察され、一方、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た。KLH に対する抗体産生に対する影響については、10,000ppm で、IgG 抗体の産生の抑制傾向が観察された。

以上、TBBPA の場合、平成 17,18 年度に免疫影響を検討した DBDE、HBCD 投与の場合より、甲状腺ホルモン濃度の減少効果は弱く甲状腺機能低下に起因すると考えられる活性化 T 細胞群低下、脾臓の NK 細胞の減少は観察されなかった。なお、成熟後の 11 週齢では、脾臓 T 細胞の割合の減少と、末梢血 T リンパ球の割合の上昇が高濃度投与群で観察され、この現象は、他の難燃剤ではみられず、TBBPA に特徴的な現象と考えられた。なお、KLH に対する抗体産生は、高濃度投与群で抑制傾向がみられたが、有意な抑制ではなかった。以上、TBBPA に関しても、高濃度群で、弱い免疫系への影響が観察された。

研究協力者

蜂須賀暁子、中村亮介、中村里香

(国立医薬品食品衛生研究所機能生化学部)

A. 研究目的

胎児期から小児期にかけては生体組織・機能が発育段階にあり未熟であるために環境有害因子に対して感受性が高い時期 (critical window) と考えられており、胎児期から小児期に受けた影響は生涯にわたって続く障害となる場合が少なくない。免疫機構は外界からの影響に抵抗するための生体防御機構において極めて重要な機構であ

り、生体防御機構の要である免疫機構に対する毒性 (免疫毒性) 評価は重要なテーマである。

本研究においては、幼児期のラットを用いて、甲状腺機能障害を有する化学物質の暴露をおこない、胸腺、脾臓の機能を中心にした免疫毒性試験を行うことを目的とする。化学物質の発達期暴露による免疫影響についての検討は、一般毒性試験の中では行われておらず、免疫毒性試験評価手法の高度化、標準化が国際的にも望まれており、本研究は、その一助となると考えられる。

本研究においては、臭素系難燃剤のうち、本邦で最も使用頻度の高い tetrabromobisphenol A

(TBBPA), hexabromocyclododecane (HBCD), decabromodiphenyl ether (DBDE)の3化合物につき、発達期暴露を行った際の免疫機能影響に対する影響評価研究を行う。これら化合物は、甲状腺機能障害を有することが示唆されている化学物質であるため¹⁾、明らかに甲状腺機能障害を有する薬物(PTU, Methimazole)を対照として用い²⁾³⁾、その効果との比較から、免疫影響について考察することを目的とする。今年度は、TBBPAの免疫影響を検討し、DBDE, HBCD投与後の免疫影響との比較を行った。

B. 研究方法

動物は、SD:IGSラットを用い、妊娠10日目から出産3週目まで、被検物質であるTBBPAを、100ppm, 1,000ppm, 10,000 ppmの濃度で餌(大豆除去飼料(西川食))に混ぜ、親に投与を行った。出産3週目に離乳を行い、各群10匹ずつの雄子ラットの解剖を行なった。残りの雄ラットについては、3週目からは、通常のCRF-1飼料を与え、11週まで飼育し、回復の程度を見る実験に供した。3週目、11週目の解剖時の免疫影響評価のための項目は、平成17,18年度の評価項目と同じものを用いた。

(1)血液学的検査：末梢血白血球数は、ラット後大動脈より採血した血液20 μ lをあらかじめ80 μ lの0.5%EDTA-2K溶液が入った1.5mlチューブに入れて混和し、多項目自動血球計数装置(M-2000, Sysmex corp)に供した。赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、血小板数(PLT)、ヘモグロビン数(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、及び平均赤血球血色素濃度(MCHC)の測定を行なった。白血球百分比は、Wright染色した塗沫標本を作製し、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(Eb1)について血液細胞自動分析装置(Microx MEG50S, Sysmex)を用いて計測した。

(2)免疫系臓器の重量：胸腺、脾臓：採血終了後、動物を放血死させ、免疫系器官としては、胸腺、脾臓の重量を測定した。重量測定後、臓器を2つにわけ、1方を、病理組織学的検査用とし、残りをフローサイトメトリー用に供した。

(3)免疫関連組織の病理組織学的検査：上記(2)で記した胸腺、脾臓の1部を、中性緩衝ホルマリン液で固定を行い、常法に従って薄切切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した。

(4)体液性免疫：抗体産生への影響を調べるために、生後23日、33日、43日にKLH(keyhole limpet hemocyanin) 50 μ gをalum 1mgとともに腹腔内投与し、40日目及び50日目に採血し、KLH特異的IgM, IgG抗体産生をELISA法にて測定した⁴⁾。また、脾臓、末梢血、血液中Bリンパ球の割合をフローサイトメトリーを用いて解析を行なうためにPECy5標識抗CD45RA抗体を用いた。

(5)細胞性免疫：細胞性免疫に關与する胸腺、脾臓、末梢血中Tリンパ球の割合の解析のためフローサイトメトリーによる解析を行なった。全T細胞数は、FITC標識抗CD3抗体を用い、CD4, CD8 T細胞サブセットは、PECy5標識抗CD4抗体及びPE標識抗CD8a抗体を用い、制御性T細胞(CD4+CD25+)(Treg)⁵⁾については、PE標識抗CD25抗体を併用し、活性化T細胞(CD3+CD71+)については、PE標識抗CD71(トランスフェリン受容体)抗体を併用して解析を行なった⁶⁾。

(6)非特異的免疫：脾臓、末梢血中のNK細胞数の割合をフローサイトメトリーで解析した。抗体は、FITC標識抗NKRP1A(CD161)抗体を用いた。

(7)フローサイトメトリー：上記(4)-(6)で示したリンパ球サブ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。

C. 研究結果

(1) TBBPAの免疫担当細胞への影響

図 1 に、臭素化難燃剤 TBBPA 親ラット投与による子雄ラットの体重、臓器重量変化の結果を示す。3 週齢時、11 週齢時共に、TBBPA 100, 1,000, 10,000ppm 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。

次に表 1、表 2 に、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を示すが、末梢血白血球数 (表 1)、白血球百分比 (表 2) 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、10,000ppm 投与群で血色素濃度の減少が、11 週齢時の 1,000ppm 投与群で血色素濃度の有意な上昇が観察されたが (表 2)、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 年度に陽性対照として用いた抗甲状腺作用薬 PTU, MMI 投与の時にみられたような B 細胞の比率の低下等の大きなポピュレーションの変化を伴う現象は観察されなかったが、幾つかの項目で、リンパ球サブポピュレーションにおける変化が観察された。表 3 に、5%以上の有意差を持って変化のみられた項目につき解析した、リンパ球サブポピュレーションの割合を数値で表したものを示した。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 (CD4NKT) 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 CD4NKT 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、表 4 に示すが、3 週齢時において、100 及び 1,000 ppm 暴露群において、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 (表 5)。

次に、TBBPA 投与ラットの KLH に対する抗体産生への影響を示した結果を図 2 に示す。2 回 KLH で免疫したラットから得た血清 (at PND40) を、500, 5,000, 50,000, 500,000 倍希釈し、KLH を固相抗原とした ELISA にて、KLH 特異的 IgG 抗体価を測定した。図 2 には、KLH 特異的 IgG 抗体価と TBBPA の用量依存性を調べた結果を示しているが、TBBPA 10,000ppm 投与群の中に、抗体価の減少する個体がみられたが、TBBPA 10,000ppm 投与群と対照群との間に、有意差は得られなかった。

D. 考察

臭素化難燃剤 TBBPA の周産期母ラットへの経口暴露は、100 及び 1,000 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 (表 4)。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⁷⁾。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 (図 1)。

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 (表 3)。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

との理由は不明であり、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NKRP1A(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から、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¹⁰⁾、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(図2)。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⁹⁾、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¹¹⁾。

E. 結論

臭素化難燃剤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、小児期投与による仔ラットの、胸腺、脾臓重量に対照群との間に差は認められなかったが、3週齢の脾臓においてCD4+T細胞の減少が観察された。回復期の11週齢においては、リンパ球ポピュレーションにおいて、脾臓CD4+T細胞、T細胞の割合の減少が観察され、一方、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た。以上、TBBPAの場合は、軽度ではあるが、免疫担当細胞への影響が示唆されるデータが得られた。なお、TBBPAによる甲状腺ホルモンT3の低下への作用は軽微であった。

TBBPAの用量依存性の得られた免疫影響関連の結果をまとめたものを表6-c)に示した。また、表6-a),b)には、比較のために同じく用量依存性の免疫影響の得られた17年度並びに18年度に行なったDBDE, HBCDの免疫影響の結果を示した。DBDE, HBCDともに、3週齢時で、甲状腺機能抑制活性と連関すると思われる活性化T細胞群の低下がみられ、抗体産生の低下がみられた。NK細胞の割合の低下も、両化合物でみられたが、TBBPAの場合、DBDE, HBCDで得られた結果と趣を異にし、11週齢時の、脾臓T細胞の割合の減少と、末梢血Tリンパ球の割合の上昇が特徴的であった。

以上、TBBPAに関しても、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が、高濃度群で、弱い免疫系への影響が観察された。

<参考文献>

- 1) Birnbaum L.S. et al: Brominated flame retardants: Cause for concern? Environ. Health Perspect. 112, 9-17, 2004

2) Rooney A.A. et al.: Neonatal exposure to propylthiouracil induces a shift in lymphoid cell sub-populations in the developing postnatal male rat spleen and thymus., *Cell. Immunology* 223, 91-102, 2003

3) Volpe R: The immunomodulatory effects of anti-thyroid drugs are mediated via actions on thyroid cells, affecting thyrocyte-immunocyte signaling: review, *Curr. Pharm.Des.* 7(6),451-460, 2001

4)Ulrich P. et al: Validation of immune function testing during a 4-week oral toxicity study with FK506. *Toxicol. Lett.* 149, 123-131, 2004

5)Dieckmann D. et al: Activated CD4 CD25 T cells suppress antigen-specific CD4 and CD8 T cells but induce a suppressive phenotype only CD4 T cells., *Immunology* 15(3), 305-314, 2005

6)Ohashi H., Itoh M.: Effects of thyroid hormones on the lymphocyte phenotypes in rats: changes in lymphocyte subsets related to thyroid hormone. *Endocrine regulat.* 28, 117-123, 1994

7) Kitamura, S., et al.: Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 293:554-559 (2002).

8) Ueno, T., et al.: Role for CCR7 ligands in the emigration of newly generated T lymphocytes from the neonatal thymus *Immunity*,

16:205-218 (2002).

9) Ahmad, A. & Alvarez, F.: Role of NK and NKT cells in the immuno- pathogenesis of HCV-induced hepatitis. *J. Leukoc. Biol.*, 76:743-59 (2004).

10) Lin, W., et al.: Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 116:1106-15 (2005).

11) Picker, L.J., et al.: Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood*, 86:1408-1419 (1995).

F. 研究発表

1.論文発表

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

2)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)

2.学会発表

1) 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 2007.9

2) 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 2008.3

3) 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 2008.3

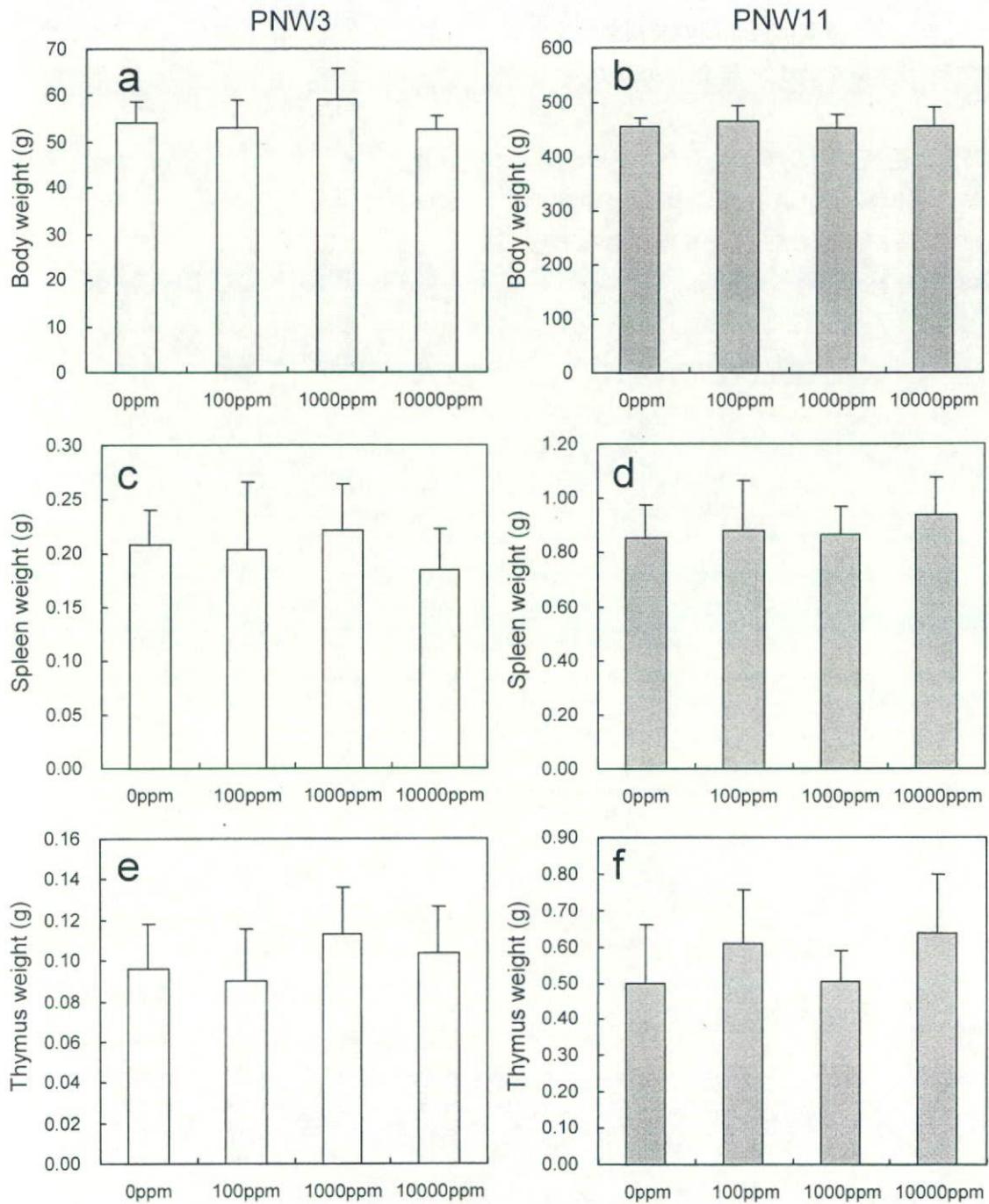


図 1. 母ラットの周産期TBBPA暴露が仔ラットの体重および免疫系臓器重量に及ぼす影響

母ラットの餌に表記の濃度のTBBPAを混ぜ、GD10からPNW3まで自由摂取させた。a, c, e, PNW3における仔ラットの体重、脾臓重量、胸腺重量。b, d, f, その後PNW11までTBBPAを含まない通常食により飼育した仔ラットの体重、脾臓重量、胸腺重量。

表1-a

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

group	WBC x 10 ² /ul	RBC x 10 ⁴ /ul	HGB g/dl	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dL	PLT x 10 ⁴ /ul	n
M-1 (control)	32.5±8.4	355.7±28.9	6.09±0.74	21.80±2.13	61.52±6.64	17.19±2.40	27.88±0.90	109.62±11.28	6
M-2 (TBBPA 100 ppm)	23.0±8.5	377.6±15.0	5.94±0.68	22.06±1.45	58.41±3.07	15.72±1.63	26.88±1.58	119.31±14.98	6
M-3 (TBBPA 1000 ppm)	33.4±9.6	357.9±20.9	6.47±0.56	22.87±1.66	63.88±2.69	18.07±0.89	28.28±0.58	114.12±8.68	9
M-4 (TBBPA 10000 ppm)	28.7±9.2	349.4±18.8	5.68±0.40	21.21±1.45	60.67±1.92	16.26±0.76	26.80±0.81*	16.12±10.12	10

表1-b

Hematological changes in 11-week old male rats exposed to TBBPA during the fetus and neonatal period

group	WBC x 10 ² /ul	RBC x 10 ⁴ /ul	HGB g/dL	HCT %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dL	PLT x 10 ⁴ /ul	n
M-1 (control)	105.5±23.9	699.5±29.0	13.96±0.39	42.72±1.42	61.09±1.08	19.97±0.45	32.70±0.44	106.00±9.88	10
M-2 (TBBPA 100 ppm)	105.2±34.1	712.0±31.7	14.10±0.56	43.06±1.68	60.52±1.78	19.82±0.71	32.75±0.69	98.35±7.44	10
M-3 (TBBPA 1000 ppm)	96.2±31.4	695.3±28.4	14.34±0.45	42.69±1.46	61.45±2.53	20.65±0.99	33.61±0.93*	09.51±8.13	10
M-4 (TBBPA 10000 ppm)	104.2±37.0	688.3±27.5	13.92±0.62	41.89±1.17	60.91±2.29	20.26±1.19	33.23±0.87	106.12±10.15	10

** <0.01, * <0.05 (t-test)

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

表 2

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

group	n	Lymp %	Seg %	Eosi %	Mono %	Band %	Ebl n/100
3-week old rats							
M-1 (control)	6	79.83±2.64	17.48±1.8	0.6±0.51	2.08±1.1	0±0	0±0
M-2 (TBBPA 100ppm)	6	79.28±5.44	18.47±5.99	0.25±0.42	2±0.91	0±0	0±0
M-3 (TBBPA 1000ppm)	9	81.1±2.22	16.69±2.41	0.39±0.42	1.82±0.91	0±0	0.17±0.37
M-4 (TBBPA 10000ppm)	10	76.54±4.07	21.16±4.58	0.36±0.49	1.94±0.73	0±0	0.10±0.33
11-week old rats							
M-1 (control)	10	86.96±4.39	10.61±3.73	0.96±0.56	1.47±0.81	0±0	0±0
M-2 (TBBPA 100ppm)	10	86.36±4.59	11.24±4.35	0.95±0.93	1.45±0.9	0±0	0.05±0.16
M-3 (TBBPA 1000ppm)	10	87.75±2.56	10.29±2.59	0.9±0.77	1.06±0.75	0±0	0.10±0.21
M-4 (TBBPA 10000ppm)	10	82.13±8.02	15.72±8	1±1.11	1.15±0.67	0±0	0.05±0.16

**<0.01, *<0.05 (t-test) Values are mean ± SD.