

表 3. TBBPA 暴露が仔ラットの脾臓・胸腺・末梢血における免疫系細胞のサブポピュレーション存在比率に及ぼす影響

T cell subpopulations												
	Spleen 3w			Spleen 11w			Note					
	0	100	1000	0	100	1000						
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD8a(+) CD4(+)	14.98 ± 2.43	12.25 ± 1.61*	12.59 ± 3.08	2.13 ± 0.32	3.26 ± 0.86	5.03 ± 1.11**	6.76 ± 2.66**	DP cell				
CD3(+) CD4(+)	6.28 ± 1.57	4.68 ± 0.86*	6.27 ± 2.53	20.26 ± 3.34	19.90 ± 4.67	9.23 ± 1.63**	11.54 ± 1.27**	CD4 T cell				
Activation of T/B cells												
	Spleen 3w			Spleen 11w			Note					
	0	100	1000	0	100	1000						
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD3(+) CD71(+)	0.20 ± 0.08	0.31 ± 0.16	0.23 ± 0.07	0.26 ± 0.07	0.34 ± 0.06	1.44 ± 0.71**	1.77 ± 0.51**	active T cell				
CD3(+) CD71(-)	15.48 ± 3.08	16.91 ± 3.99	14.43 ± 3.57	42.74 ± 3.91	42.41 ± 8.77	26.16 ± 6.13**	26.93 ± 2.40**	inactive T cell				
CD71(+) CD45RA(+)	0.94 ± 0.56	1.23 ± 0.56	1.14 ± 0.54	0.73 ± 0.31	0.88 ± 0.23	3.57 ± 1.39**	4.89 ± 0.79**	active B cell				
CD3(+) CD45RA(-)	14.79 ± 3.06	16.27 ± 3.83	13.67 ± 3.43	39.61 ± 3.97	37.94 ± 8.22	19.05 ± 5.64**	21.29 ± 1.87**	T cell				
Thymus 3w												
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD71(-) CD45RA(+)	0.07 ± 0.05	0.09 ± 0.04	0.11 ± 0.07	0.35 ± 0.14	0.38 ± 0.15	0.81 ± 0.26*	1.10 ± 0.72**	inactive B cell (?)				
CD3(-) CD45RA(+)	0.07 ± 0.05	0.09 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.28 ± 0.13	0.29 ± 0.11	0.74 ± 0.31*	0.94 ± 0.62**	B cell(?)				
Peripheral Blood 3w												
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD3(+) CD71(+)	9.55 ± 3.71	12.18 ± 4.46	11.69 ± 3.63	0.66 ± 0.19	0.50 ± 0.36	1.37 ± 0.29**	1.40 ± 0.23**	active T cell				
CD3(+) CD71(-)	26.28 ± 5.18	26.46 ± 5.65	26.62 ± 5.93	44.02 ± 2.49	44.29 ± 10.86	50.28 ± 5.97	53.97 ± 6.11**	inactive T cell				
CD71(+) CD45RA(+)	13.45 ± 3.58	14.81 ± 3.91	14.57 ± 4.22	0.66 ± 0.16	0.76 ± 0.15	1.24 ± 0.34**	1.11 ± 0.13**	active B cell				
CD3(+) CD45RA(-)	35.17 ± 7.77	37.94 ± 8.94	37.64 ± 8.04	43.92 ± 2.59	44.11 ± 11.14	50.68 ± 6.16	54.56 ± 6.17**	T cell				
Treg, NK, NKT(?) cells												
	Spleen 3w			Spleen 11w			Note					
	0	100	1000	0	100	1000						
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD4(+) CD25(+)	1.52 ± 0.23	1.56 ± 0.38	1.41 ± 0.30	3.70 ± 0.47	3.89 ± 0.49	6.18 ± 0.89**	6.70 ± 0.94**	Treg				
NKRP1A(+) CD4(+)	3.05 ± 0.73	3.18 ± 0.54	2.56 ± 0.82	5.48 ± 1.77	6.46 ± 1.25	12.44 ± 2.77**	13.89 ± 2.94**	CD4NKT(?)				
NKRP1A(+) CD4(-)	5.02 ± 0.62	5.34 ± 1.09	4.98 ± 0.90	5.53 ± 0.81	4.91 ± 1.19	11.78 ± 2.46**	13.22 ± 2.50**	NK				
Thymus 3w												
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
NKRP1A(+) CD4(+)	0.18 ± 0.07	0.17 ± 0.07	0.15 ± 0.06	1.91 ± 0.75	2.27 ± 0.46	0.48 ± 0.20**	0.65 ± 0.35**	CD4NKT(?)				
Peripheral Blood 3w												
TBBPA (ppm)	0	100	1000	0	100	1000	10000					
CD4(+) CD25(+)	1.28 ± 0.30	1.72 ± 0.42	1.98 ± 0.64*	1.83 ± 0.37	1.72 ± 0.28	2.47 ± 0.23**	2.43 ± 0.41**	Treg				
NKRP1A(+) CD4(+)	7.07 ± 1.87	6.53 ± 3.17	8.95 ± 4.51	13.55 ± 2.75	9.64 ± 1.92**	12.71 ± 2.26	12.99 ± 2.31	CD4NKT(?)				

Dunnett test, n=10. ■ p<0.01, increase □ p<0.01, decrease ■ p<0.05, increase □ p<0.05, decrease ■ p<0.01, decrease

表 4 TBBPA 暴露が仔ラットの血清学的パラメータに及ぼす影響

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10000
PNW 3				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	1.3 ± 0.12 ^a	1.1 ± 0.12 **	1.2 ± 0.1 **	1.20 ± 0.13
T4 (ug/dl)	4.9 ± 0.50	4.7 ± 0.64	4.9 ± 0.4	5.12 ± 0.5
TSH (ng/ml)	7.1 ± 1.32	6.7 ± 2.51	6.2 ± 1.8	5.45 ± 0.6
A/G ratio	2.6 ± 0.34	2.3 ± 0.56	2.2 ± 0.4	2.59 ± 0.4
albumin (g/dl)	3.5 ± 0.17	3.6 ± 0.25	3.6 ± 0.2	3.58 ± 0.1
PNW 11				
No. of offspring examined	10	10	10	10
T3 (ng/ml)	0.9 ± 0.08	0.9 ± 0.05	0.9 ± 0.08	0.9 ± 0.04
T4 (ug/dl)	4.8 ± 0.53	5.1 ± 0.93	5 ± 0.40	4.5 ± 0.80
TSH (ng/ml)	7.1 ± 2.06	7.2 ± 2.23	6.7 ± 1.90	6.2 ± 1.62
A/G ratio	2.1 ± 0.31	1.8 ± 0.23	1.9 ± 0.21	1.7 ± 0.35
albumin (g/dl)	4.18 ± 0.15	4.07 ± 0.14	4.10 ± 0.12	4.13 ± 0.29

^a Mean±SD.

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

表 5. TBBPA 暴露が仔ラットの胸腺及び脾臓に及ぼす組織病理学的影響

	TBBPA in diet (ppm)			
	0	100	1000	10000
PNW 3				
No. of animals examined (male/female)	10/10	10/10	10/10	10/10
Thymus				
No abnormalities detected	10/10	10/10	10/10	10/10
Spleen				
Atrophy of white pulp (±) ^a	0/0 ^c	1/0	0/0	0/0
Increased extramedullary hematopoiesis (±) ^b	0/0	1/0	0/0	0/0
PNW 11				
No. of animals examined (male/female)	10/10	10/10	10/10	10/10
Thymus				
No abnormalities detected	10/10	10/10	10/10	10/10
Spleen				
No abnormalities detected	10/10	10/10	10/10	10/10

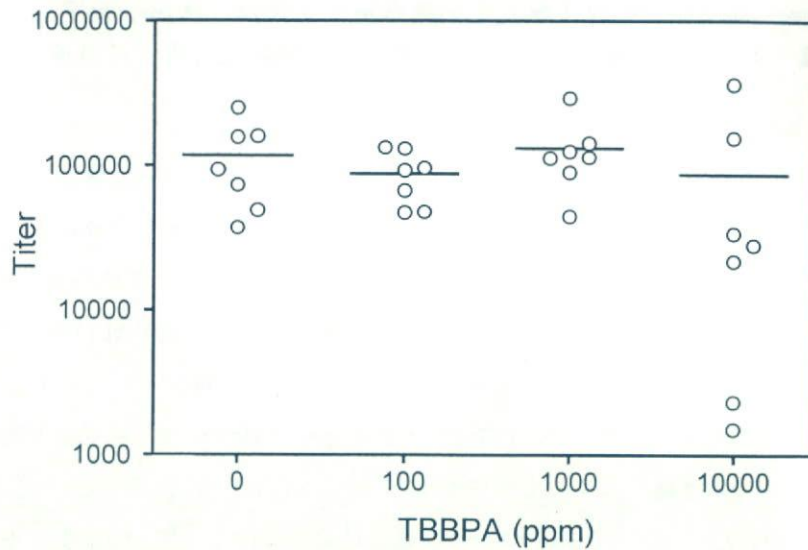
^a Grade of change; ±, minimal.

^b Increased myelocytes

^c Total No. of animals with each finding.

図 2 TBBPA 処理ラットの KLH に対する IgG 抗体産生への影響

(a) KLH-IgG 抗体価と TBBPA の濃度依存性



(b) 免疫方法

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

投与方法 ip, 血清分取 at PND40, PND50

表 6

用量依存性の得られた免疫関連影響

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

c)

TBBPA	1000ppm	10000ppm
PNW3		
spleen CD4+ T cell		↓
PNW11		
spleen CD4+ T cell	↓	↓
spleen T cell	↓	↓
spleen Treg	↑	↑
peripheral T cell	↑	↑

b)

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

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）

感染影響評価

分担研究者 黒川昌彦 九州保健福祉大学薬学部薬学科生化学第二講座 教授
協力研究者 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部薬学科生化学第二講座 准教授

研究要旨：本研究は、難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、RS ウイルス感染マウス実験モデルを用いて、用量反応性の高い感染影響評価系の構築を目的とした。今年度は、臭素化難燃物（BFRs）テトラプロモビスフェノール A（TBBPA）を評価化合物に用いた。この化合物の周産期曝露を受けた親より産まれた仔マウスに、RS ウイルスを経鼻感染させ各種評価を実施した。TBBPA100, 1000 ppm 曝露マウス群の肺組織中の RS ウイルス感染価および肺洗浄液(BALF)中の IFN- γ レベルは曝露量に依存して上昇した。一方、10,000 ppm 曝露群においては、これらの値は著しく低下し、対照群を下回った。肺の病理組織学的な検討を実施した結果、TBBPA 10,000 ppm 曝露マウスでは対照と比較して重篤な肺炎像が認められた。なお TBBPA 曝露により、血清中のチロキシン(T4)レベルが親マウスでは上昇し、仔マウスでは低下していた。以上のように、TBBPA の周産期曝露による仔マウスでの RS ウイルス感染影響を評価した結果、TBBPA 曝露により感染病態の増悪化が明らかとなり、さらに BALF 中の IFN- γ レベルが用量反応性の高い評価指標であることが判明した。今後、TBBPA の作用メカニズムを解明し、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成したい。

A. 研究目的

難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、乳幼児ウイルス感染症モデルである Respiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) 感染マウス実験モデルを用いて、用量反応性の高い感染影響評価系の構築を目的としている。今年度は、臭素化難燃物 (BFRs) テトラプロモビスフェノール A (TBBPA) を RS ウイルス感染モデルで評価し、用量反応性のある感染影響の指標を探索した。

B. 研究方法

BFRs の周産期曝露実験：九動(株)より購入した BALB/c マウス (雄；8,9 週齢、雌；6,7 週齢) を感染実験室内飼育ケージにて一週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より 4 日後 (GD3) から

餌を NIH 変型 Soy-free 食 (西川食) に変更し、11 日後 (GD10) から西川食で 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。なお、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

RS ウイルス感染実験：Respiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) A2 株はヒト咽頭ガン HEp-2 細胞で増殖・取得した。4 週齢の仔マウスにキシラジン・ケタミン混合麻酔液をマウス右大腿部に筋肉注射し、麻酔下で RS ウイルス 3×10^5 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 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°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°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 ウイルス感染価の測定: プラーク法により感染価を測定した。-80°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。ホモジネートの遠心上清 (1800 g, 4°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°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: 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) および BALF 中の IFN- γ の定量: それぞれ Endocrine 社製の Rodent T4 ELISA キットおよび eBioscience 社製の Mouse IFN- 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: 摘出した仔マウスの肺を中性ホルマリンで固定した。その後、(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。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

TBBPA 周産期曝露の動物個体への影響を検討するため、離乳時における親マウスおよび仔マウスの体重比較、ならびに親マウスの TBBPA 曝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 (結果は示さず)。一方、血清中の T4 レベルの変化は、1000 ppm 以上の曝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 (表-1)。

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 では曝露量に依存して有意に上昇した (図-1)。その一方で、10000 ppm 曝露群では著しく低下し、対照群のそれらを有意に下回った ($P < 0.01$)。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。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 μ M までウイルス増殖に全く影響を与えなかった (図-2)。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 ($P < 0.001$)。しかし、肺ウイルス感染価の結果と同様に 10000 ppm 曝露群では対照を有意に下回った (図-3)。

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 曝露による RS ウイルス感染病

態の増悪化が示唆された。そこで、病理組織学的な検証を行った(図-4)。1000 ppm 曝露マウスでは明確でなかったが、10000 ppm 曝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 の周産期曝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曝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。

D. 考察

代表的なBFRsであるTBBPAについて周産期曝露によるRSウイルスマウス感染モデルでの感染影響を評価した。TBBPA曝露により親・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

(図-2)、仔マウスでの肺ウイルス感染価の上昇(図-1)並びにBALF中のIFN- γ レベルの上昇(図-3)が低用量(100 ppm)から認められた。これらは以前報告したPTU曝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が発達期曝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(10000 ppm)曝露では、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(図-4)。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曝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(表-1)。当初、この結果から発達期にTBBPA曝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曝露後にRSウイルス感染実験を行った(結果は示さず)。TBBPA曝露により血清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曝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の周産期曝露により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。

E. 結論

難分解・高蓄積性の化学物質の周産期曝露における胎児・新生児へのリスク評価の一環として、RSウイルス感染マウス実験モデルを用いて、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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

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.

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

表-1

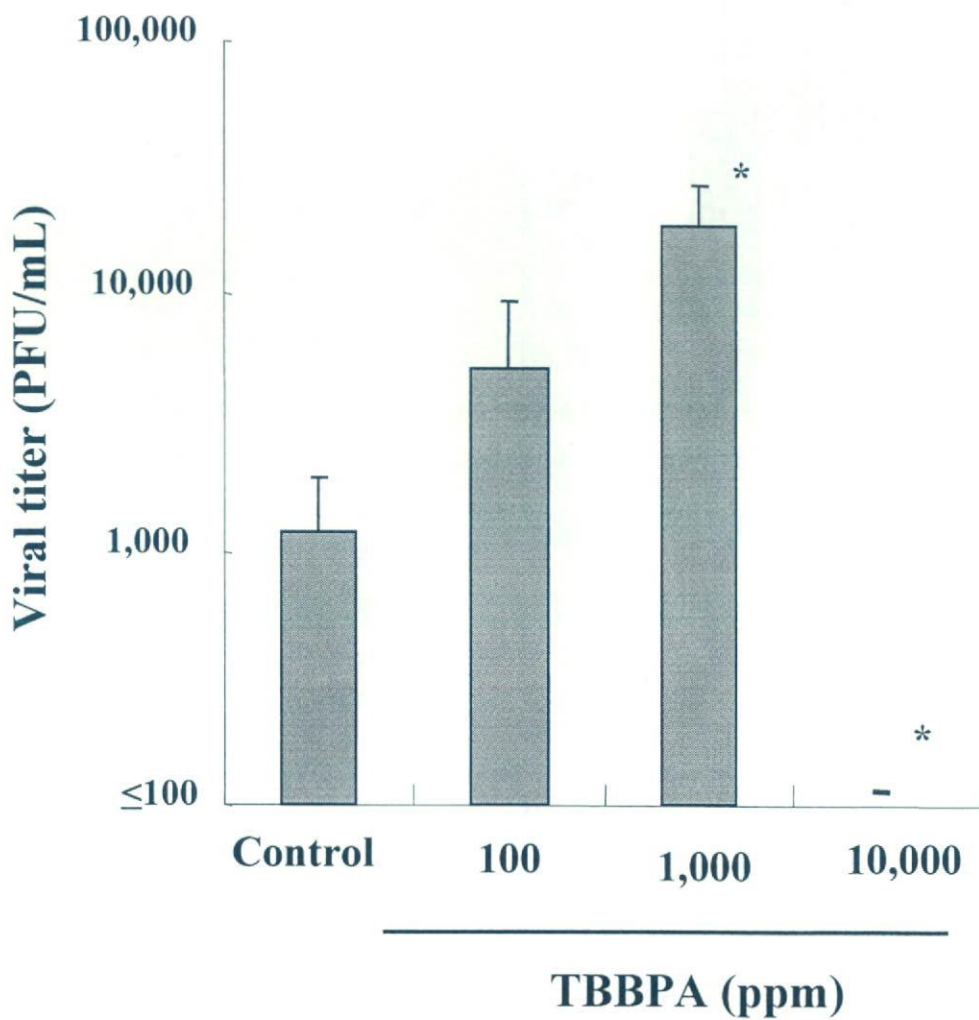
Serum T4 levels of dam and offspring mice exposed to TBBPA perinatally

Mice	T4 (ng/mL)	
	Dam	Offspring
Control	34.5 ± 25.5	92.5 ± 17.0
TBBPA		
100 ppm	31.5 ± 10.5	73.5 ± 18.5
1000 ppm	1195.5 ± 254.0*	64.0 ± 16.5*
10,000 ppm	708.0 ± 320.0*	55.8 ± 10.0*

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

图-1

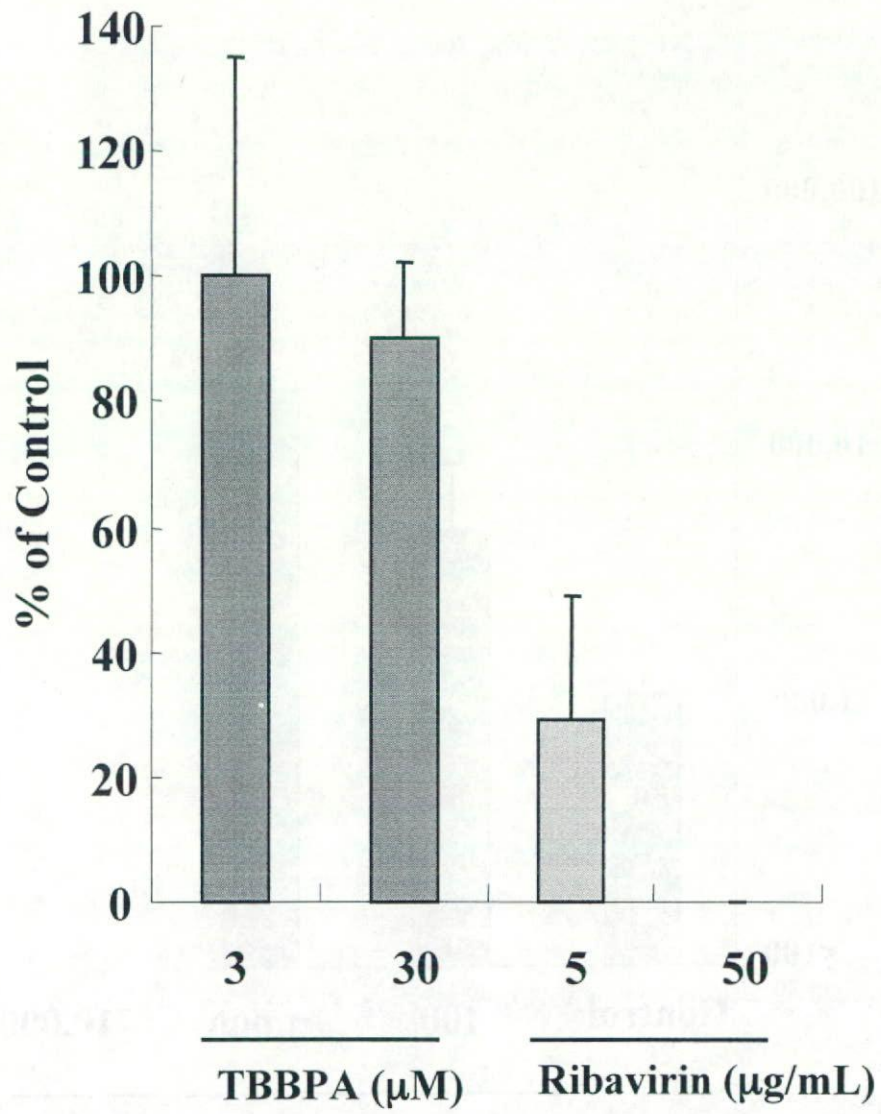
Effect of perinatal exposure to TBBPA on pulmonary viral titers in RSV-infected offspring mice



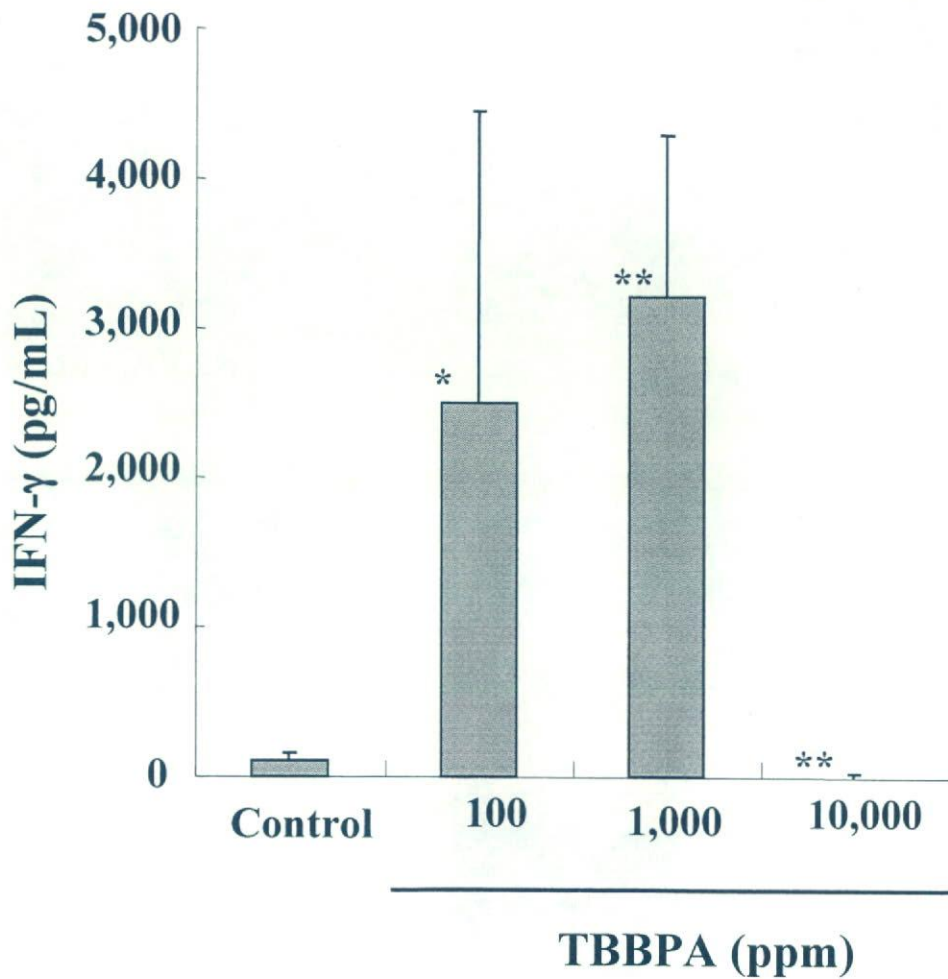
* $P < 0.01$ (vs Control, Mann-Whitney U -test)

图-2

Effect of TBBPA on RSV growth *in vitro*

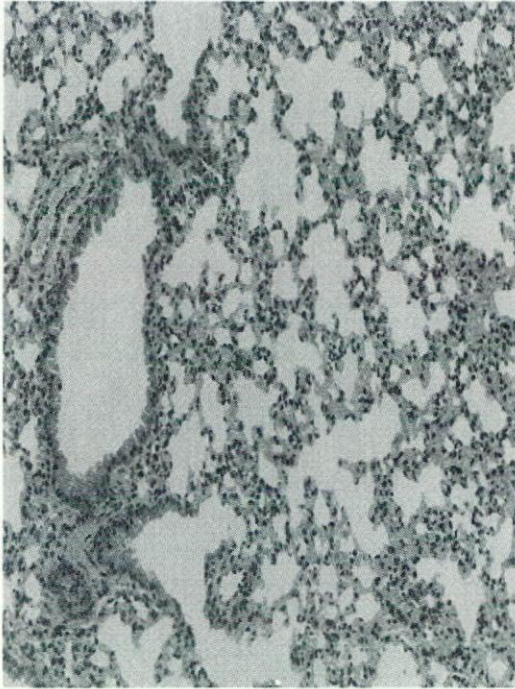


Effect of perinatal exposure to TBBPA on IFN- γ level in BALF in RSV-infected offspring mice

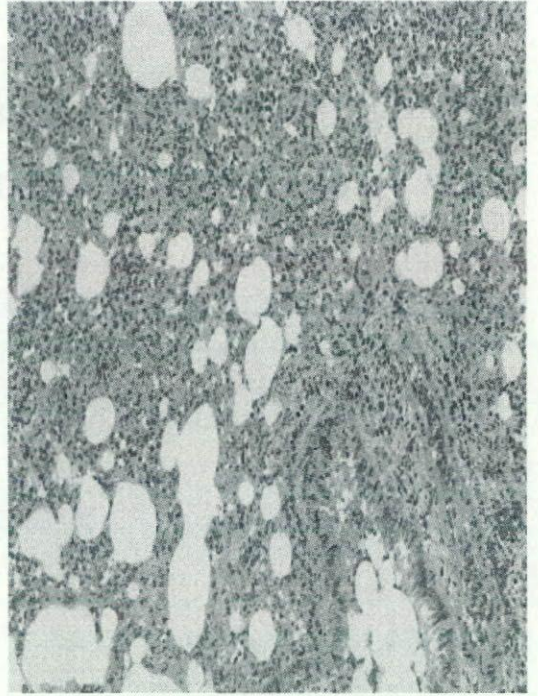


* $P < 0.05$ (vs Control, Mann-Whitney U -test)
** $P < 0.001$ (vs Control, Mann-Whitney U -test)

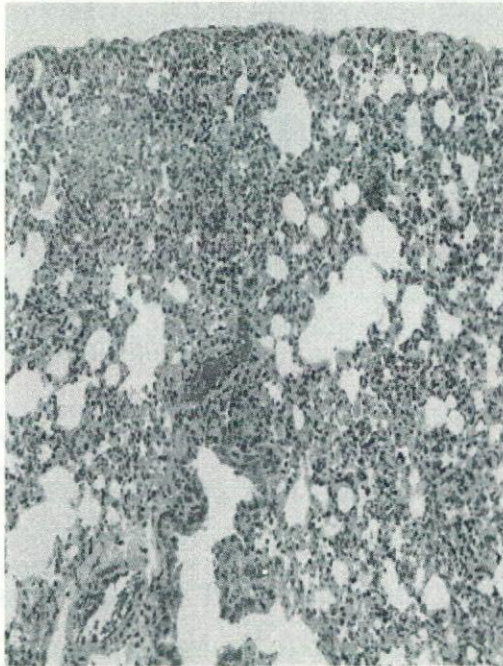
图-4



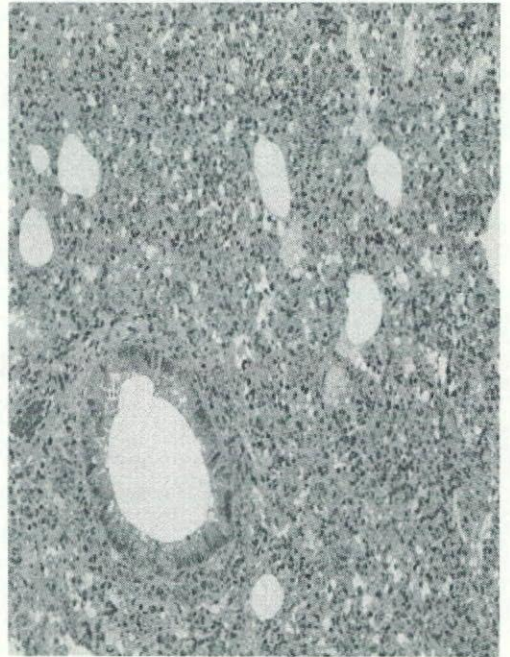
Mock



RSV/Control



RSV/TBBPA 1,000 ppm



RSV/TBBPA 10,000 ppm

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）

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

(H17-化学-009)

幼若期暴露発がん性評価

分担研究者 今井 俊夫 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的とし、被験物質の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の有用性を検討してきた。19年度は、hexabromocyclododecane (HBCD) 及び tetrabromobisphenol A (TBBPA) の各 3 用量あるいは抗甲状腺剤の propylthiouracil (PTU) の 1 用量について検討した。その結果、HBCD 及び PTU の投与により、甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌が減少あるいは減少傾向を示した。また、18年度に甲状腺腫瘍の減少が示された decabromodiphenyl ether 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がみられた。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。

A. 研究目的

化学物質の発がん性については、主にラットあるいはマウスを用いて生後 6～8 週齢時より 1.5～2 年間にわたる連続投与により評価する標準的な試験法が確立されている。一方、諸臓器組織における細胞増殖が活発で、内分泌、生殖器系をはじめとした臓器の発達に影響を受けやすい乳幼児期に化学物質を投与することにより、発がん感受性が上がる場合のあることが示されている (EPA, 2005)。実際、遺伝毒性発がん物質は、成熟期投与により特定の標的臓器に腫瘍性病変を誘発するが、幼若期から成熟期を通して投与することにより、その発生頻度が増加し、非遺伝毒性物質である phenytoin (Chhabra RS et al, Fund Appl Toxicol, 21, 174, 1993) や polybrominated biphenyl mixture (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993) についても同様の結果を示す

ことが報告されている。これらの背景より、米国 EPA は 2005 年、化学物質の幼弱期暴露による発がん性評価のガイダンスを公表した。しかし、長期試験を基本とした幼若期投与による発がん性評価は、多くの化学物質に対して広く実施されているとは言い難く、その背景として、試験に要する動物数、期間、経費などの問題がある。そこで本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を、比較的少ない動物数で短期間かつ鋭敏に検出する試験法の確立を目的とし、被験物質の幼若期投与とその後の化学発癌物質処置によるラット多臓器発がんモデルの有用性を検討した。被験物質として、長期試験で発がん性を示し (NTP, 1986)、幼若期投与による発がん感受性の増強が示唆されている (Chhabra RS et al., Fund Appl Toxicol, 21, 451, 1993) 臭素化難燃剤を対象にした。19年度は、18年度より検討を開始した hexabromo-

cyclododecane (HBCD) の3用量と陽性対照物質として用いた抗甲状腺剤の propylthiouracil (PTU) の1用量に対する実験について病理組織学的な最終評価を終了した。また、新たに開始した tetrabromobisphenol A (TBBPA) の3用量については、実験を終了して評価した。更に、17年度に評価し、甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌の減少することが示された decabromodiphenyl ether (DBDE) については、乳幼児期に投与した際の甲状腺に及ぼす影響を血清生化学、病理組織学及び細胞動態学的に評価した。

B. 研究方法

(1) 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%濃度で大豆フリーの粉末基礎飼料(NIH変型、オリエンタル酵母工業)に混じ、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(Fig. 1)。HBCDの短期及び長期投与毒性については、Wistarラットに0.3-200mg/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、渋谷らが実施したSD(IGS)ラットを用いた実験で妊娠10日から離乳時まで投与した際、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-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)を1回強制経口投与した(Figure 1)。実験期間中、体重及び摂餌量を週1回測定した。DHPN投与期間中は摂水量を週1回測定した。また生後15日目より週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(腫瘤)の大きさより、次の式により体積を計算した。

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

統計方法：体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発生数、体積についてはBertlett検定の後、ANOVAあるいはKruskal Wallis検定を行い、群間差が認められた場合はDunnnettの多重比較で判定した。乳腺腫瘍及び他臓器の病理組織

所見の発生頻度については Fisher の直接確率検定法を用いた。

(2) TBBPA の発がん性に関する検討

(1) 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 (Fig. 2)。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 (1) HBCD/PTU の実験に準じて実施した。

(3) 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% 濃度で大豆フリーの粉末基礎飼料 (NIH 変型、オリエンタル酵母工業) に混じて自由摂取させた。離乳後、母動物はエーテル麻酔下で屠殺し、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 (Fig. 3)。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に観察するとともに、

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。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 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 ($p < 0.05$) 高値を示した (Table 1)。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 ($p < 0.05$) 高値あるいは高値傾向を示し、1% 群では有意な ($p < 0.001$) 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 ($p < 0.001$) 高値を示した (Table 1)。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 ($p < 0.05, 0.01$) 低値を示し、PTU群の雌雄においては高値傾向を示した (Fig. 4)。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 (Table 2)。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 (Table 3) : 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 ($p < 0.05$) 増加したが、雌では有意に ($p < 0.05$) 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 (Table 4, 5) : 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 ($p < 0.01$)、雌では腎芽腫の発生頻度及び数が有意に ($p < 0.05$) 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 (Table 6, 7) : 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 ($p < 0.05, 0.01$) 減少した。HBCD-1%群の雄では、巣状過形成の発生数が有意に ($p < 0.05$) 減少し、癌の発生頻度及び数が減少傾向を示した。

肺 (Table 8) : 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 ($p < 0.05, 0.01$) 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 ($p < 0.05$) 減少した。

食道 (Table 9) : 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 ($p < 0.05, 0.01$) 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 (Table 10) : 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 ($p < 0.05$) 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 (Table 11) : 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。

(2) 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 (Table 12)。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 ($p < 0.01$) 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 (Table 13)。病理組織学的検索では、1%群の甲状腺に軽度及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 ($p < 0.05$, 0.01) 高値あるいは高値傾向を示した (Fig. 5)。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/腫瘤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みられなかった (Table 13)。

(3) 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 ($p < 0.01$) 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 ($p < 0.01$) 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 ($p < 0.05$, 0.01) 高値を示した (Table 14)。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 ($p < 0.05$, 0.01) 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 (Table 15)。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 (Table 16)。

D. 考察

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短時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。今年度は、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。

E. 結論

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 及び抗甲状腺剤である PTU の影響を検討した。その結果、HBCD、TBBPA 及び PTU 群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を示唆する結果が得られた。また、18 年度に甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌が減少することを報告した 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。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

(2) 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*-butyl-phenyl)-benzotriazole in preweaning rats. Drug Chem. Toxicol., 31, 275-287 (2008)

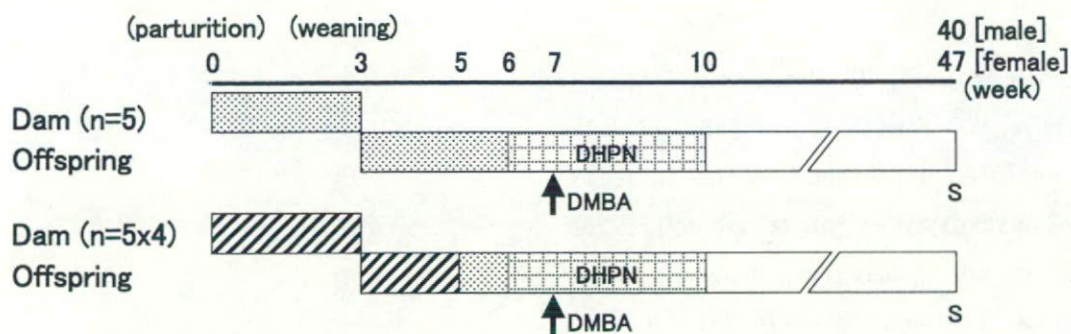
(3) Cho, Y.M., Imai, T., Ota, Y., Hasumura, M., Takami, S., Hirose, M., Nishikawa, A. : A new medium-term rat colorectal bioassay applying neoplastic lesions as end points for detection of carcinogenesis modifier - Effects with weak or controversial modifiers. Toxicol. Pathol. (In press)

2. 学会発表

(1) 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 (2007. 10)

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし。



Animals : F344/DuCrj rats






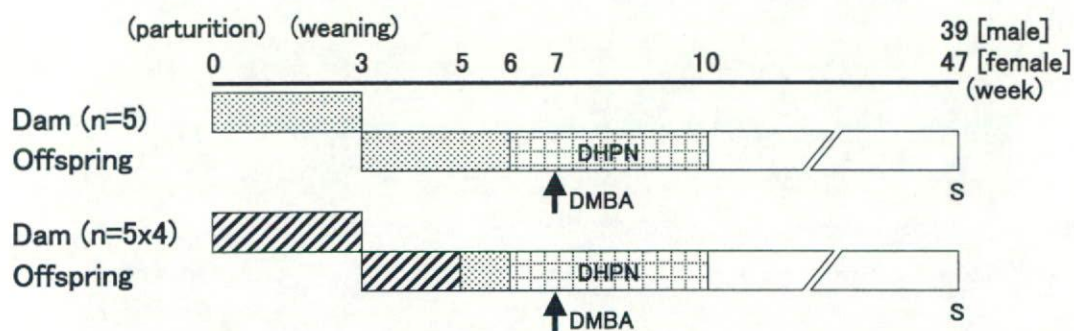
-  : no treatment (soybean-free diet and tap water)
-  : no treatment (basal diet and tap water)
-  : 0.01, 0.1 and 1 % hexabromocycl ododecane (HBCD) in soybean-free diet or 0.0006 % propyl thi ouraci l (PTU) i n dri nki ng water
-  : *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (males: 0.08%, females: 0.2% in drinking water)
-  : 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (females only, 50mg/kg b.w., i.g.)
- S** : sacrifice

Fig. 1. Experimental design (1)



Animals : F344/DuCrj rats






-  : no treatment (soybean-free diet and tap water)
-  : no treatment (basal diet and tap water)
-  : 0.01, 0.1 and 1 % tetrabromobisphenol A (TBBPA) in soybean-free diet
-  : *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (males: 0.08%, females: 0.2% in drinking water)
-  : 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (females only, 50mg/kg b.w., i.g.)
- S** : sacrifice

Fig. 2. Experimental design (2)