

200736009B

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 渋谷 淳

平成20(2008)年 4月

目 次

I. 総合研究報告書	
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	
(資料) 図1-125	
表1-93	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	44
III. 研究成果の刊行物・別刷	46

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
総合研究報告書（平成 17-19 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、プロピルチオウラシル(PTU)、メチマゾール(MMI)等の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ジフェニルエーテル(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、ラットを用いた抗甲状腺剤の発達期暴露による成熟後(11 週目)での海馬 CA1 ニューロン及び白質構成成分の不可逆的変化の定量的評価法を確立した。次いで、DBDE を評価し、低い用量から白質形成の低下が確認されたが、CA1 ニューロンに影響は認めなかった。HBCD、TBBPA の暴露評価では、HBCD のみで高用量で白質形成の低下を検出したが、共に海馬 CA1 ニューロン分布の異常は認めなかった。また、発達期脳障害指標探索として、抗甲状腺剤ないし DBDE 暴露終了時(生後 21 日目)での白質及び海馬 CA1 領域特異的なマイクロアレイ解析を行い、候補分子の免疫組織化学的解析により、白質、海馬ニューロンの発達障害の指標分子群を見出した。更に、成熟後のニューロン分布の評価法と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、DBDE のみならず、HBCD、TBBPA に於いて、暴露終了時での指標分子の発現変動と同等に影響を検出できた。

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、PTU と共に DBDE に於いてドパミン神経発達障害の誘発性が示唆され、条件づけ場所嗜好性試験と *in vivo* microdialysis 法の甲状腺機能低下作用を有する環境化学物質に対する評価法としての妥当性が示された。一方、HBCD はなんら影響を及ぼさず、TBBPA では新規環境の馴化に異常が認められたのみであった。

免疫機能影響評価では、ラットでの評価系の確立を図り、PTU、MMI の場合、3 週齢時に胸腺や脾臓重量の顕著な減少が観察され、強い免疫影響が見出された。一方、DBDE、HBCD、TBBPA では、3 週齢時の胸腺や脾臓重量影響は見られなかったものの、末梢血も含めて胸腺、脾臓のリンパ球のポピュレーションへの影響は観察され、いずれも高濃度群で、弱い免疫系への影響が観察された。

感染影響評価では、RS ウイルス・マウス感染モデルを用い、感染影響を表現型とした新たな免疫毒性評価系を構築した。そして DBDE、HBCD、TBBPA を評価し、肺ウイルス感染価及び BALF 中の IFN- γ レベルは定量評価が可能であり、用量反応性の高い指標であることを見出した。

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、DBDE、HBCD、PTU、TBBPA を評価した結果、DBDE、HBCD 及び PTU では、甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌が減少或いは減少傾向を示した。また、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、国際評価機関や米国に於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、エンドポイント及び不確実性因子ごとに取扱状況に関する情報を収集・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た。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、或いは導入し、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於いて、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於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プロモディフェニルエーテル(DBDE)、1,2,5,6,9,10-ヘキサプロモシクロドデカン(HBCD)、テトラプ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於いては、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 或いは更に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於いては、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、本邦に於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於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、欧米や国際機関に於いて、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（渋谷）：

発達期化学物質暴露モデルとして、妊娠・授乳期ラットを用い、被験物質を、想定されるヒトへの暴露形態を考慮して、飲水（抗甲状腺剤）、或いは飼料（BFRs）に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠10日から離乳時（生後21日目）まで経胎盤・経乳的に仔動物に暴露し、投与終了時と11週目に解剖を行った。使用する動物は妊娠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。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。離乳後は、通常の基礎飼料に切り替えて仔動物を飼育した。妊娠・授乳期の母動物について体重と摂餌量を測定し、仔動物については、生後2日目に出生仔数、体重、肛門・生殖突起間距離（AGD）を測定し、生後3日目に一匹の母動物あたり雌雄各4匹となるようにリッター・サイズを調整した。離乳（生後21日目）までの間、仔動物の体重を毎週測定した。離乳時には、母動物に対する被験物質投与を終了し、仔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。春期発動前の解剖は生後21日目の離乳時に行った。残りの動物に対して春期発動（包皮分離、膣開口）の日と体重を求め、生後11週目に解剖を行った。雌に於いては、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日の解剖時には、肝、腎、脳、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、乳腺を採材し、乳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匹の雄性仔動物について、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、精嚢（+凝固腺）、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。また、離乳時、11週目ともに血液を採取し、血清中のT3、T4、TSHレベルを測定した。21日目の解剖時、母動物については甲状腺を採取して病理組織学的検索を実施し、子宮の着床痕数を確認した。

17年度は、まず、PTU、MMIとDBDEに関して、予備的な用量設定試験を文献値を参考にして行った。即ち、MMIに関しては200及び250 ppm、PTUに関しては9及び12 ppm、DBDEに関しては文献によってデータは異なるものの60及び80 ppmを設定して、各群2匹の母動物を用いて行った（Fig. 1）。DBDEに関しては更に確認試験として、10、100、10,000 ppmを設定して、各群3匹の母動物を用いて投与実験を行った。次に、予備試験結果を基に、抗甲状腺剤として200 ppm MMI（1用量）、3ないし12 ppm PTU（2用量）の飲水投与実験を、各群8匹の母動物を用いて行った（Fig. 2）。更にDBDEに関しては、10、100、1000 ppmを設定

して、各群 8 匹の母動物を用いて本実験を行った (Fig. 3)。更に、18 年度以降の検索化合物である TBBPA, HBCD について各々 1000, 10,000 ppm の混餌用量で、各群 3 匹の母動物を用いて用量設定試験を実施した (Fig. 4)。

また、ニューロンとグリアを対象とした不可逆的な脳発達影響評価系を確立する目的で、成熟後の脳に対して、ニューロンないしオリゴデンドロサイト(或いは白質)の形態計測を実施した。即ち、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パラフィン包埋し、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにして 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), オリゴデンドロサイトを特異的に標識する抗体である抗マウス 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase; MAB326R, IgG1, clone 11-5B, x300 倍, Chemicon) を用いて、ABC 法 (Vector Lab. Elite kit), DAB 発色による免疫染色を行った。CNPase については、抗原賦活化として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) を行った。白質構成成分の測定に関しては、まず脳梁 (Corpus callosum: CC) の面積として、CNPase 染色切片を用いて、一頭体につき大脳の 2 つの冠状断面での面積を測定した。即ち、左右の大脳半球をまたぎ、cingulum と dorsal hippocampal commissure に挟まれた CC 領域のうち、上縁(外側縁)が頭頂部に最も近いところで区切った面積の和を求めた。次に、大脳皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの単位面積 (mm^2) 当たりの数を、対物レンズで 10 倍の視野の内側下端が cingulum の上端に重なるように視野を固定した状態で、拡大を 20 倍にした際の頭頂部大脳皮質中間層に於ける数とし、いずれも 2 断面の左右の平均値を求めた (Fig. 5)。また、海馬 CA1 領域でのニューロン分布の検討では、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、全ニューロンのベースラインからの平均距離を求めた (Fig. 6)。

18 年度は、17 年度行った予備試験結果を基に、動物実験として、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. 7, 8)。更に、生

後 21 日目、11 週目の小脳、脳幹、肝臓、腎臓、脂肪について、各臓器に於ける BFRs の蓄積量の検討を LC/MS/MS 法等を用いて開始した (Fig. 9-11)。

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。

< 発達期脳障害指標探索 >

発達期の甲状腺機能低下により、ニューロンの migration の異常やそれに伴う特定神経部位での成熟ニューロン数の減少、白質を構成するオリゴデンドロサイトの減数、或いはミエリン形成の阻害・抑制による白質の形成障害が報告されている。そこで、離乳時(生後 21 日目)の脳では、海馬 CA1 領域、CC での部位特異的な遺伝子発現プロファイルを求めて、甲状腺機能低下に起因するニューロンとオリゴデンドロサイトの標的遺伝子を同定する。

17 年度は、PTU, MMI の暴露実験で、大脳についてメタカーン固定した後、Bregma の前方 +1.2 mm と後方 -3.4 mm の 2 カ所で冠状断面を作製し、それぞれの尾側断面が薄切面になる様にパラフィン包埋して、20 μ m 厚の切片を 10-12 枚作製し、マイクロダイセクション用サンプルとした。切片は脱パラフィン後に Cresyl violet stain (Ambion) で染色し、Laser Microdissection System (Leica) を用いて、個体ごとに左右の CA1 と CC を採取した。DBDE 暴露実験の 21 日目の脳に関しては、Bregma の後方約 -3.4 mm の 1 カ所で冠状断面を作製し、その対称面が薄切面となるように前後の脳を包埋した (マイクロダイセクション以降の解析は未実施)。PTU, MMI の実験では、それぞれ各個体の CA1, CC のサンプルから total RNA 抽出を RNAqueous-Micro (Ambion) にて行い、回収量は RiboGreen RNA Quantitation kit (Molecular Probe) を用いて測定した。その結果、CA1 からは 100 ng 以上の RNA が採取できたが、MMI 群、12 ppm PTU 群に於いて CC からの RNA 回収量が 100 ng に及ばないものが多かったため、今回は CA1 のみの解析を進めた。即ち、100 ng の total RNA をマイクロアレイ解析用サンプルとし、MessageAmpTM II aRNA kit (Ambion) を用いて 2 回増幅した。マイクロアレイは GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) を用い、GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) にて発現データを取り込んで定量した。遺伝子発現データについて、MMI, 3 及び 12 ppm PTU 各群で無処置

動物に比較して有意に2倍以上または0.5倍以下の発現の増減している遺伝子群を選別した。方法としては、GeneSpring ver.7.2 (Silicon Genetics) を用いて、各データの per chip normalization を global normalization により行い、発現の信頼性を示す flag が比較する無処置対照と MMI、或いは PTU の各群の 10 サンプル全てに於いて absent であった遺伝子を除外し、更に、無処置対照に比べ 2 倍以上、或いは 0.5 倍以下の発現が見られる遺伝子については、MMI 或いは PTU の各群のサンプルの 5 サンプル中 4 サンプルの flag が present であったものを選択した。次いで、flag で選抜された MMI 或いは PTU の遺伝子について One-way ANOVA による比較を行い、無処置対照との間に有意差が認められた遺伝子群を選抜した。その中から PTU の用量に関連して変動した遺伝子、MMI と 12 ppm PTU との間で共通に変動した遺伝子を選別した。

18 年度は、17 年度動物実験を行った抗甲状腺剤試験 (PTU: 3, 12 ppm; MMI: 200 ppm 飲水)、DBDE 試験 (10, 100, 1000 ppm 混餌) それぞれについて投与終了時(離乳時: 生後 21 日目)の脳を用い、海馬 CA1 領域、白質領域(脳梁及び左右大脳白質)での部位特異的な遺伝子発現プロファイルを求めて、甲状腺機能低下及び DBDE 暴露に起因するニューロンとオリゴデンドロサイトの標的遺伝子を同定した(17 年度報告した抗甲状腺剤試験での海馬 CA1 のプロファイルは発現データのばらつきが大きかったため、17 年度、動物実験を再度行い、解析した。白質のプロファイルも新たな動物実験材料を用いて得た)。PTU, MMI 試験, DBDE 試験の 21 日目の脳を用い、Bregma の後方約-3.4 mm の 1 カ所で冠状断面を作製し、その対称面が薄切面となるようにパラフィン包埋して、20 μ m 厚の切片を 40 枚作製し、マイクロダイセクション用サンプルとした。切片は脱パラフィン後に Cresyl violet stain (Ambion) で染色し、Laser Microdissection System (Leica) を用いて、個体ごとに左右の CA1 と白質を各群 4 個体ずつ採取した。その後、それぞれの CA1, 白質のサンプルから total RNA 抽出を行い、回収量を測定した。100 ng の total RNA をマイクロアレイ解析用サンプルとして 2 回増幅後、マイクロアレイ解析を行った。遺伝子発現データについて、各被験物質投与群で無処置動物に比較して 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現の増減している遺伝子群を選別した。方法としては、各データの per chip normalization を global normalization により行い、抗甲状腺剤暴

露試験については、MMI, 3 ppm PTU, 12 ppm PTU の 3 群に共通して変動した遺伝子、PTU の用量に関連して変動した遺伝子を選別した。DBDE 試験については、全ての用量で共通して変動した遺伝子及び 100, 1000 ppm 暴露に共通して変動した遺伝子を選別した。

19 年度は、18 年度に同定した、抗甲状腺剤暴露動物に於ける海馬 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) 及び 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 暴露例の白質に於ける 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 倍の視野に於ける 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, 白質領域に於ける染色強度を 2 割面について測定した。海馬 CA1 領域に於ける 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 箇所の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 箇所の海馬 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 (鈴木):

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, 17年度は, まず抗甲状腺剤である PTU を 12 ppm の割合で飲水に混じて, 妊娠 10 日目から離乳時(生後 21 日目)まで投与した。次に, BFR のうち, DBDE について, 0, 10, 100, 1000 ppm の混餌投与を行った。18年度は, HBCD について 0, 100, 1000, 10,000 ppm の混餌投与を行った。19年度は TBBPA について 0, 100, 1000, 10,000 ppm

の混餌投与を行った。それぞれの実験で, 暴露を受けた児動物に対して, 一般行動観察, 不安感受性及び覚せい剤であるメタンフェタミンに対する感受性, 側坐核に於けるドパミンの遊離量を検討した。

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, 脳内報酬系に関与する mesolimbic ドパミン神経の投射先である側坐核に於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 (手島):

暴露実験として, 17年度は, 抗甲状腺剤である PTUと MMI, BFRである DBDE, 18年度は HBCD, 19年度は TBBPA を企画し, 動物は「①脳発達のかく乱影響評価」で実験に供したのを用い, 3週目(離乳時), 11週目(成熟時)に於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) の測定を行なった。白血球百分比は, Wright 染色した塗沫標本作製し, 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。

細胞性免疫に関する検討として、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NKRPIA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 (黒川):

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於いて、respiratory syncytial virus (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或いは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°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ウイルス感染価はプラーク法により測定した。即ち、-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。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°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。尚、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 (今井) :

DBDE の発がん性評価 :

17年度に、DBDEの評価実験のため、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、各群雌雄各 20 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)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5%濃度で SF 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。離乳後は、母動物はエーテル麻酔下で屠殺し、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、HE 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 DBDE を母動物と同様の方法及び用量で 2 週間投与した。最高投与量の 2.5% は、NTP の文献値を参考にしたラットの長期試験に於ける発がん用量であり、低用量の 0.01 或いは 0.001% は、本研究の主任研究者らが予備的に実施した SD(IGS)ラットに対し妊娠 10 日から離乳時まで投与した際に、甲状腺濾胞上皮細胞のびまん性過形成の認められた用量である。DBDE 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。発がん物質処置として、生後 6~10 週の 4 週間、肝、腎、肺、甲状腺等多臓器に発がん標的性を示す

N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を児動物の雄には 0.08%、雌には 0.2%濃度で飲水に混じて投与し、生後 7 週時の雌の児動物には更に 50 mg/kg 体重の 7,12-dimethylbenz(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。また生後 14 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(縦×横×高さ)を測定した。現在、生後 24 週間が経過した。実験期間終了後は、エーテル深麻酔下にて動物を放血屠殺し、剖検に於いては剥皮後、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する。更に肺、食道、乳腺、膀胱、卵巣或いは精巣、及び肉眼的異常部位を摘出し、病理組織学的検索を行う。尚、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する。

$$\text{体積}=(\text{縦})\times(\text{横})\times(\text{高さ})\times\pi/6$$

統計方法としては、体重、臓器重量及び乳腺腫瘍の発生数、体積については F 検定の後、Student 或いは Welch の t 検定を、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る。

HBCD 及び PTU の発がん性評価 :

18年度に、HBCD 及び PTU の評価実験のため、DBDE の実験に準じた方法で、妊娠 F344 ラット 25 匹を各群 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 飼料に混じ、或いは PTU を 0.0006 %濃度で飲料水に混じて自由摂取させた。離乳後の各群の児動物には HBCD 或いは 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、雌に於いて肝臓の肥大、T4-GT の誘導、血中 T4 の低下、下垂体、甲状腺重量の増加が見られ (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、雄に於いて肝臓の肥大、肝細胞の脂肪化、空胞化、変異細胞巣が見られたとされている

(Kurokawa et al., 1999, unpublished data)。今回の実験に於ける最高投与量の 1.0% は、ラットの中・長期投与に於いて概ね 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 或いは 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。実験期間中及び剖検後の検索についても、DBDE の実験に準じて実施した。

TBBPA の発がん性評価 :

19年度に、TBBPA の発がん性評価のため、DBDE 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 或いは 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)。実験期間中及び剖検後の検索についても、DBDE 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 :

19年度に、DBDE の幼若期甲状腺に対する影響

の検討のため、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於ける耐容量等の設定に関する調査研究 (広瀬) :

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於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、エンドポイント及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/bmds/index.html>)。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌或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或いはキシラジン・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ので、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 (渋谷) :

<BFRs を用いた発達期暴露評価系の確立>
17 年度 :

PTU, MMI, DBDE 予備実験 :

200 ないし 250 ppm の MMI, 9 ないし 12 ppm の PTU とともに、暴露終了時 (離乳時) の母動物の甲状腺重量を著明に増加させた (Table 1)。MMI 暴露例では暴露終了時の母動物体重は用量依存的に減少する傾向が認められ、250 ppm でその時点での仔動物数が子宮着床痕数に比較して減少を示し、この用量は母動物及び仔動物のいずれに対しても毒性量と考えられた。PTU 暴露例では、対照群に比較して母動物体重はいずれの用量でも差はなく、出生仔数にも明らかな差を認めなかった。DBDE に関しては、80 ppm で母動物の甲状腺重量を若干増加させたが、母動物体重、離乳時での生存仔動物数に対照群との間に明らかな差は認めなかった。出生後から離乳時までの仔動物の体重の推移を検討した結果、雌雄とも PTU, MMI のいずれの用量に於いても、対照群に比較して明らかな体重増加抑制を示した (Fig. 12)。また、甲状腺機能低下状態の誘発に関しては、PTU のいずれの濃度、MMI とともに母動物の投与終了時での甲状腺重量が明らかに増加し、びまん性濾胞上皮過形成が明らかであった (Fig. 13)。また、DBDE では 80 ppm で甲状腺相対重量が軽度増加したが、病理検索により 80 ppm のみならず 60 ppm 暴露例でもびまん性濾胞上皮過形成を認めたため、各群母動物数を 3 とし、10, 100, 10,000 ppm の用量で、再度追加実験を行ったところ、明らかな用量依存性はないものの、投与全群で母動物の甲状腺重量の軽度の増加を認めた (Table 2)。病理組織学的には、びまん性濾胞上皮過形成を示す例が 10 ppm 群から認められ、明らかな用量依存性はないものの、用量に伴いこの病変を示す例が明らかに増加した (Table 3)。

PTU, MMI の暴露評価 :

投与期間中の母動物の摂水量の推移として、投与初めの GD10-15 に 200 ppm MMI で低値を示し、生後 2 日目以降では、200 ppm MMI とともに 12

ppm PTU でも投与終了時まで低値を示した (Fig. 14)。摂餌量に関しては、200 ppm MMI 群では GD15-20 より、12 ppm PTU 群では PND2-7 より、実験期間を通じて対照群に比し低値を示した (Fig. 14)。

出生後の暴露期間中 (離乳時まで) の仔動物の体重は、雌雄とも 200 ppm MMI では生後 7 日目から、12 ppm PTU では生後 10 日目から低値を示し、3 ppm PTU では雌で生後 21 日目に若干の低値を示した (Fig. 15)。

離乳後は、PTU, MMI の各投与群とも摂餌量の低値、或いは低値傾向を認め、雄では 12 ppm PTU に於いて生後 6-7 週で、200 ppm MMI に於いて生後 10-11 週で、雌では、投与各群に於いて生後 3-4 週で、12 ppm PTU に於いて生後 6-8 週、200 ppm MMI に於いて生後 6-7 週に低値を示した (Fig. 16)。体重に関しては、12 ppm PTU, 200 ppm MMI の雌雄で離乳時から最終屠殺時まで、3 ppm PTU の雄では離乳時から 7 週齢時まで、雌では離乳時のみに低値を示した (Fig. 17)。

生後 21 日目の解剖時、母動物は 200 ppm MMI と 12 ppm PTU 投与群で、甲状腺重量の絶対、相対値の有意な増加を示し (Table 4)、病理組織学的検索の結果、濾胞上皮細胞のび慢性かつ高度の肥大、濾胞内の colloid の減少、消失を認めた。

母動物の子宮着床痕数、生存仔数とその性比、出生時仔動物体重、AGD に投与による明らかな差を認めなかった (Table 4)。21 日目解剖時、体重は 200 ppm MMI と 12 ppm PTU 群の雌雄で低下を示し、雌では 3 ppm PTU でも低値を示した。臓器重量は、投与各群で精巣の相対重量の減少の他、雌雄とも脳の相対重量の増加を認めた。

春期発動は 12 ppm PTU 群の雌雄、200 ppm MMI 群の雄で遅延したが、性周期の変化は認めなかった (Table 5)。11 週目の解剖時では、200 ppm MMI 群の雄で、脳、甲状腺、精巣、精巣上体の相対重量の増加、同群の雌では脳、子宮相対重量のそれぞれ増加、減少を認めた (Table 6)。12 ppm PTU 群の雄でも脳、甲状腺、精巣、精巣上体の相対重量の増加を認め、腎相対重量も増加を示したが、雌では体重以外に有意な変動を認めなかった。3 ppm PTU では雄で精巣重量の軽度増加を認めたのみであった。仔動物の血清甲状腺関連ホルモン検索の結果、21 日目の 200 ppm MMI 群と 12 ppm PTU 群で T3 と T4 値が無処置群に比べて減少し、TSH 値は増加を示した (Table 7)。TSH の増加は 3 ppm PTU 群でも認めた。11

週目では、200 ppm MMI 群と 12 ppm PTU 群の T3 値が軽度に減少したが、T4 と TSH 値の変動は認められなかった。

次に、PTU, MMI 発達期暴露例の生後 11 週目での CA1 領域での細胞変化の有無を病理組織学的に検討したところ、海馬台より前方の CA1 領域で錐体ニューロンが密にまとまらずにばらついて存在する傾向が認められた (Fig. 18)。一方、同一の脳で、甲状腺機能低下に起因する白質影響を検討した結果、CC 領域は PTU の用量に依存して小さくなっており、無処置対照に比べてその縮小は有意であった。200 ppm MMI でも面積の縮小が明らかであった (Table 8)。また、大脳頭頂部皮質での CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの数は PTU 暴露で明らかに減少し、3 ppm では有意ではないものの用量依存的な低下を示した。200 ppm MMI でも陽性細胞数は有意に減少した。

DBDE の暴露評価：

PTU, MMI と同様のプロトコールで、DBDE について 3 用量を設定して混餌暴露を行った結果、暴露期間中の母動物の摂餌量は群間で差が認められず (Fig. 19)、仔動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差を認めなかった (Fig. 20)。この期間での母動物の体重増加量にも群間での差を認めなかった (Table 9)。暴露終了時での母動物の甲状腺重量は、予備実験と同様に、用量依存的ではないものの、相対重量の増加が 10 及び 1000 ppm で認められた (Table 9)。出産及び出生仔のパラメータとして、着床痕数、出生仔数、雄の割合、生後 2 日目の体重と AGD には群間で差を認めなかった。暴露終了時での解剖に於いて臓器重量の変動を検討したところ、肝臓相対重量の増加が雄では 10 ppm 以上で、雌では最高用量のみで認められた (Table 9)。他の臓器重量には明らかな変動は認められなかった。暴露終了後での体重の推移については、雄の仔動物で、100 ppm 暴露により、観察期間を通じて無処置対照に比べて有意に高い値を推移した (Fig. 21)。雌でも同様の傾向を認めたものの、有意な変化ではなかった。

離乳後は、雌雄とも春期発動の時期に投与による影響を示唆する変動は認めず、雌に於いても性周期の異常所見は認めなかった (Table 10)。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時では、1000 ppm 群で T3 の弱い低値、生後 11 週目で T4 の弱い低値を認めたのみであった (Table 11)。TSH は群間で明らかな変動を示さなかったが、高用量群で高い傾向を示した。

生後 11 週目の解剖例では雄で 10 と 100 ppm 群の体重が高値を示し、雌でも有意ではないものの同様の傾向を示した (Table 12)。それに伴い、雄の 10, 100 ppm, 雌の 100 ppm で脳の相対重量が有意に低値を示した (Table 12)。次に、これらの動物 (雄を検索) で、CC 領域の面積を測定したところ、用量依存的ではないものの 100 ppm 以上で有意な縮小が見られた (Table 13)。大脳頭頂部皮質での CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの数も用量依存的ではないものの 100 ppm 以上で有意な減数が見られた (Table 13)。

HBCD, TBBPA 予備試験 :

HBCD, TBBPA とも 1000, 10,000 ppm の 2 用量で予備試験を実施した。母動物の投与終了時の体重に群間での差は認めなかったが、甲状腺の相対重量はいずれの物質も 10,000 ppm で弱い増加を示した (Table 14)。HBCD では肝臓重量も若干増加した。一方、妊娠期間、子宮着床痕の数、出生仔数等には投与による明らかな影響は認められなかった (Table 15)。また、暴露期間中の母動物の体重、摂餌量の推移に関しても明らかな投与による影響は認められなかった (Fig. 22)。暴露終了時の母動物の甲状腺の病理組織学的検索の結果、HBCD 暴露例ではびまん性濾胞上皮肥大が 1000 ppm から増強し (Fig. 23)、TBBPA でもまた 10,000 ppm で明らかであった (Fig. 23, Table 16)。しかし、いずれの物質も PTU, MMI に見られた様な強い変化は誘発しておらず、用量比に比較して反応性強度が弱いという結果となった。

出生仔の AGD, 出生後の暴露期間中の体重は、群間での差を認めなかった (Table 17, Fig. 24)。

18 年度 :

PTU, MMI の暴露評価 :

PTU, MMI 発達期暴露 (飲水) 例の生後 11 週目の脳を用い、17 年度実施した発達期甲状腺機能低下に起因する白質影響の検討に続き、ニューロンの migration に与える影響を定量的に検討するため、錐体ニューロンが密にまとまらずにばらついて存在する傾向が認められた海馬 CA1 領域に於ける形態計測を実施した。その結果、3, 12 ppm での用量依存性は認められないものの、錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離が PTU 投与により増加し、同様のニューロン分布のばらつきが 200 ppm MMI 投与によっても認められた (Table 18)。

DBDE 試験 :

PTU, MMI 発達期暴露例と同様に、DBDE 試験の生後 11 週目の脳を用い、海馬 CA1 領域に於ける錐体細胞層外の細胞数とその割合及びベースラインからの平均距離を形態計測したが、DBDE 暴露に起因する変動は認められなかった (Table 19)。

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、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雌雄共に 10 ppm 以上で認められ、雄の 1000 ppm で発生頻度・強度共に増加した。その他の所見としては、肝臓でび慢性肝細胞肥大の発生頻度・強度が雄の 10 ppm 以上、雌の 1000 ppm で有意に増加し、腎臓で皮質近位尿細管上皮の細胞質の好酸性増加の発生頻度・強度が雄の 100 ppm 以上、雌の 10 ppm 以上で有意に増加した (Table 20)。生後 11 週目では、甲状腺濾胞上皮細胞肥大が雄の 10 ppm 以上、雌の 100 ppm 以上で認められたが、いずれも対照群と比較して有意な増加ではなく用量との関連性もなかった。その他、雌雄全動物に肝臓で微小肉芽腫が認められた他、雄の全群で乳腺にび慢性小葉萎縮、雌の 10 ないし 1000 ppm の少数例で子宮腔水腫が認められたが、いずれも対照群と比較して有意な増加ではなかった (Table 20)。

HBCD 試験 :

抗甲状腺剤暴露試験、DBDE 試験と同様のプロトコールで、HBCD について 100, 1000, 10,000 ppm の 3 用量を設定して混餌暴露を行った結果、暴露期間中の母動物の摂餌量は群間で差が認められず (Fig. 25)、児動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差は認められなかった (Fig. 26)。この期間での母動物の体重増加量にも群間での差は認められなかったが、暴露終了時での母動物の甲状腺相対重量の増加が 10,000 ppm で認められた (Table 21)。出産及び出生児のパラメータとして、着床痕数、出生児数、雄の割合、生後 2 日目の体重と AGD には群間で差は認められなかった。暴露終了時での解剖に於いて臓器重量の変動を検討したところ、雌雄ともに肝臓相対重量が 10,000 ppm で増加し、雌では 100 ppm で腎臓相対重量が減少した (Table 21)。他の臓器重量には明らかな変動は認められなかった。暴露終了後での体重の推移については、雄の児動物で、10,000 ppm 暴露により、9, 11 週後を除いた観察期間を通じて対照群に比べて有意に低い値を推移した (Fig. 27)。雌でも同様の傾向が認められ、5, 10 週後で

は有意に低い値が認められた。暴露終了後の摂餌量については、雌の児動物が 10,000 ppm 暴露で 4 週齢時に低い値を認めた以外は、雌雄ともに観察期間を通じて対照群に比べて有意な変化は認められなかった (Fig. 28)。

離乳後は、雌雄とも春期発動の時期に投与による影響は認められず、雌に於いても性周期の異常所見は認められなかった (Table 22)。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時では、10,000 ppm 群で T3 の軽度の低値、TSH の軽度の高値が認められ、生後 11 週目では 1000, 10,000 ppm 群で T3 の軽度の低値が認められた (Table 23)。

生後 11 週目の解剖例では雄の 100 ppm 群で肝臓相対重量の増加、精巣上体相対重量の減少が認められ、1000, 10,000 ppm 群に於いては甲状腺相対重量の増加が認められた (Table 24)。

HBCD 試験に於いて、生後 11 週目の脳での白質領域の形態計測を行ったところ、CC 領域の面積に変化は認めないものの、大脳頭頂部皮質に分布する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの数の有意な減数が 10,000 ppm 群で認められた (Table 25)。

TBBPA 試験：

HBCD 試験と同様に、TBBPA についても 100, 1000, 10,000 ppm の 3 用量を設定して混餌暴露を行った結果、暴露期間中の母動物の摂餌量は群間で差が認められず (Fig. 29)、児動物の生後暴露期間での体重の推移にも群間では差は認められなかった (Fig. 30)。この期間での母動物の体重増加量については、生後 10 日目から離乳時の間で 10,000 ppm 群に於いて有意な増加が認められた (Table 26)。暴露終了時での母動物の体重、甲状腺重量は群間で変化が認められず、着床痕数、出生児数、雄の割合、生後 2 日目の体重、AGD に於いても群間で差は認められなかった (Table 26)。暴露終了時での解剖に於いては、採取したいずれの臓器についても雌雄ともに重量変化は認められなかった (Table 26)。

離乳後は、雌雄ともに体重、春期発動の時期について TBBPA 投与による変化は認められず、雌に於ける摂餌量の変化、性周期の異常所見も認められなかったが、雄の摂餌量の推移に於いて 1000, 10,000 ppm で有意ではないものの低値を示した (Fig. 31, 32, Table 27)。血清中の甲状腺関連ホルモンを測定した結果、暴露終了時に 100, 1000 ppm 群で T3 の弱い低値が認められたが、10,000 ppm

では変化が認められなかった。また、生後 11 週目では投与による変化は認められなかった (Table 28)。

生後 11 週目の解剖例では雄の臓器重量変化は認められなかったが、雌の 1000 ppm 群で腎臓相対重量の減少、10,000 ppm 群で子宮相対重量の減少が認められた (Table 29)。しかし、いずれに於いても絶対重量に変動はないことから、やや増加傾向であった体重の影響であると考えられた。

生後 21 日目、11 週目の小脳、脳幹、肝臓、腎臓、脂肪に於ける TBBPA の蓄積量を検討したところ、生後 21 日目では、脳幹を除き、投与量依存的な蓄積性が確認されたが、脳幹では 1000 ppm 群が最も高い TBBPA の蓄積量を示した (Fig. 33)。生後 11 週目の各臓器では、TBBPA は検出されず、蓄積量は検出限度である 0.02 pg/mg tissue 以下であることが確認された。

TBBPA 試験の生後 11 週目での脳を用い、白質領域の形態計測を行ったところ、CC 領域の面積には有意な変動は認められなかった。大脳頭頂部皮質に存在する CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの数も有意な変動は認められなかったが、100, 1000 ppm で低値傾向が認められた (Table 30)。

19 年度：

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 領域に於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 31)。

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。肝臓に於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。尚、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 32)。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 で見られたが、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 33)。

TBBPA 暴露評価：

TBBPA についても 11 週目の脳での海馬 CA1 領域に於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 34)。

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。尚、母動物への暴露終了時に於ける甲状腺では、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見られたが、有意差は認められなかった (Table 35)。

< 発達期脳障害指標探索 >

17 年度：

マイクロアレイ解析：

暴露終了時での雄性仔動物の海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果 (Fig. 34)、3 ppm PTU、12 ppm PTU、200 ppm MMI の各群で有意に発現変動した遺伝子 ($p < 0.05$, 2 倍以上、或いは 0.5 倍以下) のうち、発現増加遺伝子は 200 ppm MMI 群で 32 個、12 ppm PTU 群で 38 個が得られ、そのうち 16 個の遺伝子が両群で共通に増加を示した (Table 36)。発現減少遺伝子として 200 ppm MMI 群で 17 個、12 ppm PTU 群で 37 個が得られ、そのうち 7 遺伝子が共通に低下を示した。PTU、MMI に共通の発現増加遺伝子のうち、遺伝子名が同定されているものは、Purkinje cell protein 4 (Pcp4); Lysyl oxidase (Lox); FXFD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxyd6); integrin, beta-like 1; Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 (Ct1); STRA6; Degenerin (Accn1) の 7 つであった。発現減少遺伝子のうち、遺伝子名が同定されているものは、Wingless-related MMTV integration site 2 (Wnt2); Basic helix-loop-helix domain containing, class B3 (Bhlhb3); Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (Ptpn3); Kallikrein 8 (neuropsin/ovasin; Kik8); Histone deacetylase 11

(Hdac11) の 5 つであった。これらの発現増加・減少遺伝子について、脳発達との関連での報告の有無について文献検索したところ、7 発現増加遺伝子中 6 個、5 発現減少遺伝子の全てで、関連報告が認められた (Table 37)。一方、更に解析を進めて、12 ppm PTU と 3 ppm PTU、更に 200 ppm MMI に共通して発現変動を示した遺伝子を検索したところ、統計的有意差を持って変動したものは得られなかった。

18 年度：

マイクロアレイ解析：

17 年度実施した抗甲状腺剤暴露試験の暴露終了時での雄性仔動物を用いて白質及び海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、白質に於いて、3 ppm PTU、12 ppm PTU、200 ppm MMI の全群に共通して発現増加した遺伝子は 428 個、減少した遺伝子は 58 個であった (Fig. 35)。発現増加・減少した遺伝子のうち約 1 割が神経関連分子であり、その殆んどが神経発達に関連する分子であった (Fig. 36, 37)。海馬では、3 ppm PTU、12 ppm PTU、200 ppm MMI の全群で共通して発現増加した遺伝子は 119 個、減少した遺伝子は 97 個であった (Fig. 38)。海馬に於いて発現変動を示した遺伝子に関しても、神経発達に関連する分子が多く認められた (Fig. 39, 40)。

引き続き、DBDE 試験での暴露終了時での雄性仔動物の白質及び海馬 CA1 特異的なマイクロアレイ解析を行った結果、白質に於いて全ての用量に共通して発現増加した遺伝子は 129 個、減少した遺伝子は 16 個であった (Fig. 41)。発現減少した遺伝子で神経関連の分子は認められなかったが、発現増加した遺伝子では約 1 割が神経関連分子であり、その半数が神経発達に関連する分子であった (Fig. 42, 43)。海馬では、DBDE の全ての用量に共通して発現増加した遺伝子は 133 個、減少した遺伝子は 80 個であった (Fig. 44)。海馬に於いて発現変動を示した遺伝子でも、約 1 割が神経発達に関連する分子であった (Fig. 45, 46)。

抗甲状腺剤暴露試験、DBDE 試験のマイクロアレイ結果をまとめたところ、白質での発現増加遺伝子は、「DBDE 3 用量で共通して発現増加した遺伝子」、「DBDE 100、1000 ppm で共通して発現増加した遺伝子」いずれに於いても、約 1 割が「抗甲状腺剤投与 3 群で共通して発現増加した遺伝子」と共通しており、約 5% が「PTU 暴露の 2 群のみに共通して発現増加した遺伝子」と共通していた (Fig. 47)。一方、白質で発現減少した遺伝子

については、抗甲状腺剤暴露と DBDE 暴露で共通した分子は殆んど認められなかった (Fig. 48)。海馬では、発現増加・減少いずれに於いても、

「DBDE 3 用量で共通して発現増加した遺伝子」、
「DBDE 100, 1000 ppm で共通して発現増加した遺伝子」と「抗甲状腺剤投与 3 群で共通して発現増加した遺伝子」、「PTU 暴露の 2 群のみに共通して発現増加した遺伝子」の組み合わせで共通して変動している遺伝子数は 5% 以下であり、殆んど共通性が見出せなかった (Fig. 49, 50)。

19 年度 :

マイクロアレイデータの検証 :

PTU, MMI 暴露例に於ける海馬 CA1 領域と大脳白質領域に於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. 51, 52)。

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 (Table 38)、PTU の 3 ppm に於いても増加傾向を認めた。DBDE 暴露例に於いても、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 39)。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 40, 41)。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 に於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 38, 39)。

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 38)。

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 42)。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 43)。

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於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 44)。更に、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 45)。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 46, 47)。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 48-51)。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 52)。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 52, 53)。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 54, 55)。

②神経機能・行動影響評価 (鈴木) :

17 年度 :

DBDE (10, 100, 1000 ppm 混餌) ないし PTU (12 ppm 飲水) の胎児期及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) 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、離乳時 (3 週齢) 及び行動実験開始時 (7 週齢) に於いて、雌雄共に PTU 慢性曝露による著明な体重減少が認められた。一方、DBDE 慢性曝露ラットでは、むしろ体重の増加傾向が認められた (Fig. 53)。

一般行動観察の結果、PTU の慢性曝露により雌雄共に著しい自発運動量の増加が認められた。一方、DBDE の慢性曝露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの曝露動物に於いて、その他の特筆すべき異常行動は観察されなかった (Fig. 54)。

高架式十字迷路法に従い PTU ないし DBDE 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、雄性ラットではいずれの化学物質曝露による変化は認められなかった。一方、雌性ラットでは、PTU 慢性曝露に於いてのみ、open arms 滞在時間及び侵入回数に有意な増加が認められた (Fig. 55)。

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 DBDE ないし PTU の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した。その結果、DBDE 曝露群では、曝露量に依存した報酬効果の減弱が認められ、1000 ppm で有意を示した。また、PTU の慢性曝露に於いても著明かつ有意なメタンフェタミン誘発報酬効果の減弱が認められた (Fig. 56)。

側坐核に於けるドパミン及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、1000 ppm DBDE ないし 12 ppm PTU の慢性曝露により、側坐核に於けるドパミン基礎遊離量及びメタンフェタミン誘発ドパミン遊離量の著明な低下が認められた (PTU で無処置対照に比較して有意)。更に、DOPAC 及び HVA に於いてもその基礎遊離量の減少が認められた

(Fig. 57)。

18 年度 :

HBCD の胎児期及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) 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、HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露による体重変動は認められなかった (Fig. 58)。

一般行動観察の結果、HBCD の慢性曝露では自発運動量に影響を及ぼさなかった。また、いずれの曝露動物に於いて、その他の特筆すべき異常行動は観察されなかった (Fig. 59)。

高架式十字迷路法に従い、HBCD 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、雌雄共に変化は認められなかった (Fig. 60)。

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 HBCD の胎児期及び授乳期慢性曝露の影響を検討した。その結果、HBCD 慢性曝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 (Fig. 61)。

側坐核に於けるドパミン及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、HBCD の慢性曝露により、側坐核に於けるドパミン基礎遊離量及びメタンフェタミン誘発ドパミン遊離量、更に代謝物である DOPA 及び HVA の細胞外遊離量に変化は認められなかった (Fig. 62)。

17 年度の被検物質である DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露による側坐核ドパミン遊離量に及ぼす影響について用量反応性を検討したところ、一様にドパミン遊離量の低下が認められたものの、用量反応性は認められなかった。

19 年度 :

TBBPA の胎児期及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) 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 の胎児期及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 (Fig. 63)。

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 1000 ppm 慢性曝露群、雌性ラットでは 1000 及び 10,000 ppm 慢性曝露群に於いて有意な自発運動量の増加及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於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 (Fig. 64)。

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 (Fig. 65)。

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 の胎児期及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 (Fig. 66)。

側坐核に於けるドパミン及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、更に、代謝物である DOPAC 及び HVA の細胞外遊離量に変化は認められなかった (Fig. 67)。

③免疫機能影響評価 (手島) :

17 年度 :

PTU, MMI の免疫担当細胞への影響 :

MMI, PTU 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 (Fig. 68)。体重は、3 週齢ラットに於いて、PTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、対照群に比べて 70%程度に低下していた。11 週齢時に於いては、3 週齢時に比べ回復傾向は見られるが、PTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、対照群に比べて有意な体重減少が観察された。脾臓、胸腺重量については、特に、3 週齢時ラットの PTU 12 ppm, MMI 200 ppm 投与群で、減少が著しく、脾臓、胸腺ともに対照群に比べ 40%程度に低下していた。11 週齢に於いては、脾臓重量は対照の 80%程度にまで回復し、胸腺の重量低下は、対照群に比べ有意差は見られなかった。次いで、3 週齢時、及び 11 週齢時のラットの脾臓、胸腺細胞数の計測を行なった結果を Fig. 69 に示すが、3 週齢時ラットの脾臓細胞数の低下が顕著で、MMI 200 ppm で、対照の 30%程度、PTU 12 ppm で、20%程度にまで低下していた。11 週齢に於いては、対照の 70%にまで回復していた。胸腺細胞数は、ラット間でのばらつきが大きいこともあり、有意差は見られなかった。

次に Table 56, 57 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。末梢血白血球数 (Table 56)、白血球百分比 (Table 57) とともに、3 週齢、11 週齢時ラットに於いて、対照と比べて大きな変化は見られなかった。

次いで、フローサイトメトリーにて、リンパ球ポピュレーションの解析を行った結果を示す。Fig. 70 に、MMI 投与 3 週齢ラットの脾臓または

末梢血のリンパ球ポピュレーションを解析した結果を図で例示したものを示すが、MMI 200 ppm 投与により、まず、B 細胞の比率の低下、T 細胞の比率の上昇が観察される。一方、T 細胞のポピュレーションの中では、CD71 (トランスフェリン受容体) 抗原陽性の活性化 T 細胞の割合の減少、非活性化 T 細胞の割合の上昇が観察された。T 細胞 CD4, CD8 抗原陽性細胞の比率については、両方とも上昇する傾向が見られた。Table 58 には、MMI と PTU 投与ラットのリンパ球のフローサイトメーターによる解析のうち、5%以上の有意差を持って変化の見られた項目につき、解析したリンパ球の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。3 週齢時ラットに於いて、脾臓の B 細胞 (CD3⁺CD45RA⁺) の比率が、MMI 200 ppm, PTU 12 ppm 投与群で、対照群の 70%に低下し、末梢血に於いては、40%程度に低下していた。これに対して、T 細胞 (CD3⁺CD45RA⁻) の比率は、脾臓で 200%、末梢血で 150%程度まで上昇した。この B 細胞比率の低下、T 細胞比率の上昇の傾向は、11 週齢時のラットに於いては、殆ど見られず、11 週齢時に於いては、回復傾向にあることが示された。尚、活性化 T 細胞 (CD3⁺CD71⁺) の割合について、3 週齢時の末梢血に於いて、MMI 200 ppm, PTU 12 ppm 投与群で、対照群の 50%程度に減少し、一方で、非活性化 T 細胞 (CD3⁺CD71⁻) の割合が、170%程度に上昇した。この活性化 T 細胞の減少も、11 週齢時には、ほぼ回復する傾向が見られた。更に、制御 T 細胞、NK 細胞のフローサイトメーターによる解析結果も示しているが、MMI, PTU 投与群とも 3 週齢ラットの末梢血に於いて制御 T 細胞 (CD25⁺CD4⁺) の割合の上昇が見られた。また、NK 細胞については、NKR1A (NK 受容体) 陽性細胞の割合の上昇が、MMI, PTU 投与 3 週齢ラットに於いて見られ、11 週齢に於いては、むしろ抑制する傾向が見られた。尚、NKR1A (NK 受容体) 陽性細胞のうち、NKR1A⁺CD4⁺ の NK 細胞は、NKT 細胞と考えられるが、3 週齢時に於いて、この NKT 細胞と思われる細胞の比率の上昇の方が、NKR1A⁺CD4⁻ の NK 細胞に比べ大きい傾向にあった。

尚、MMI, PTU 投与による甲状腺機能への影響については、3 週齢時に於いて、甲状腺ホルモン T3, T4 の有意な減少、TSH の有意な上昇が見られ、甲状腺機能が顕著に抑制されていること、11 週齢時に甲状腺ホルモン T3 の経度の減少が見られるのみで、甲状腺機能はほぼ回復していること

が確認されている(主任研究者報告分)。従って、MMI, PTU による免疫細胞系への影響と甲状腺機能低下との間には、関連があると考えられ、特に、3週齢時ラットに於いて顕著に見られる免疫細胞系への影響(B細胞の比率の低下、活性化T細胞の低下等)は、この時期に顕著に見られる甲状腺機能低下と連動し、いわゆる thyroid-immune 連関によるものと考えられた。

DBDE の免疫担当細胞への影響：

Fig. 71 に、臭素化難燃剤 DBDE 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、DBDE 10, 100, 1000 ppm 投与群で対照群と比較して、体重、脾臓、胸腺重量に殆ど有意な差は見られず、DBDE 10 ppm, 100 ppm 投与 11週齢ラット群に於いて、体重の増加傾向が見られたのみであった。また、Fig. 72 には、DBDE 投与ラットの脾臓、胸腺細胞の細胞数について示しているが、3週齢ラットの脾臓細胞数が、100 ppm, 1000 ppm で、減少する傾向が見られた。胸腺細胞数については、有意差は見られなかった。

次に Table 59, 60 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 (Table 59)、白血球百分比 (Table 60) とともに、3週齢、11週齢時ラットに於いて、対照と比べて有意な変化は見られなかった。尚、3週齢ラットに於いて、DBDE 投与群で、有核赤血球(EbI)のわずかな上昇が見られた (Table 60)。

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、DBDE 投与群と対照群との間に、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於ける変化が観察された。Table 61 に、5%以上の有意差を持って変化の見られた項目につき、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。T細胞のサブポピュレーション解析では、脾臓リンパ球に於いて、DBDE 10 ppm, 1000 ppm 投与 3週齢時で、CD4⁺ T細胞の減少が認められた。また、脾臓に於ける活性化B細胞の割合の低下が、3週齢時ラット DBDE 100 ppm, 1000 ppm 投与群で見られた。更に、NK細胞については、NKRP1A (NK受容体)陽性細胞の割合の減少が、DBDE 投与 3週齢ラット、11週齢ラットのどちらに於いても観察され、その抑制効果は、1000 ppm で顕著であっ

た。Fig. 73 に、DBDE 投与 11週齢ラットの末梢血のNK細胞マーカーの出現をプロットした図を示すが、1000 ppm での抑制が顕著であることが示されている。尚、DBDE 投与による甲状腺機能への影響については、3週齢時に於いて、甲状腺ホルモン T3 の有意な減少が、1000 ppm DBDE 投与群で見られ、11週齢時に於ける T4 の有意な低下、1000 ppm DBDE 投与群で見られているが(主任研究者報告分)、上記NK細胞の比率の低下が高濃度 DBDE 投与群で見られている減少と、甲状腺機能低下には、何らかの連関がある可能性も考えられる。

次に、DBDE 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 Fig. 74 に示す。3回 KLH で免疫したラットから得た血清を、50,500,5000 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。Fig. 74 には、KLH 特異的 IgG の結合の程度を発色基質 (TMB) の 450 nm の吸光度 (Abs) で表した図を示しているが、投与した DBDE の濃度が上昇するにつれ、血清 50 倍希釈でも発色程度の低い個体が見られるようになった。各 DBDE 投与群の KLH-IgG 抗体価を対照群と比較しても、群内の個体差が大きい関係で、有意差は得られなかったが、左下図に示すように、IgG 抗体価 5000 以上、50-5000, 50 以下で分類すると、DBDE 10 ppm 投与群では、IgG 抗体価 5000 以上を示す個体が多いのに比べ、DBDE 1000 ppm 投与群では IgG 抗体価 50 以下の個体が多くなる傾向が得られた。

18年度：

HBCD の免疫担当細胞への影響：

Fig. 75 に、HBCD 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、HBCD 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見られなかった。また、HBCD 投与ラットの脾臓、胸腺細胞の白血球数についても、有意差は見られなかった。尚、肝臓重量は、1,000, 10,000 ppm 投与群の 3週齢時に於いて、有意な増加が認められたが、11週齢時に於いては、有意差は認められなかった。

次に Table 62, 63 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 (Table 62)、白血球百分比 (Table 63) とともに、3週齢、11週齢時ラットに於いて、対照と比べて有意な変化は見られなかった。尚、

3週齢で、赤血球容積、11週齢時で血色素濃度の用量依存的な上昇が観察され (Table 62), また、3週齢で、有核赤血球(Ebl)のわずかな上昇が見られた (Table 63).

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、HBCD投与群と対照群との間に、17年度の陽性対照として用いた抗甲状腺作用薬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於ける変化が観察された。Table 64に、5%以上の有意差を持って変化の見られた項目につき、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。T細胞のサブポピュレーション解析では、脾臓リンパ球に於いて、HBCD 100 ppm, 10,000 ppm投与11週齢時で、CD8⁺T細胞の上昇が認められた。また、末梢血に於ける活性化T細胞の割合の低下、並びに非活性化B細胞の割合の上昇が10,000 ppm投与3週齢時ラットで見られた。更に、NK細胞については、脾臓に於けるNKRP1A (NK受容体)陽性細胞の割合の減少が10,000 ppm投与3週齢ラットで観察された。

HBCD投与による血液生化学的検査結果については Table 65 に示すが、3週齢時に於いて甲状腺ホルモンT3の有意な減少が、10,000 ppm投与群で見られ、TSHの有意な上昇も観察された。11週齢時に於いてもT3の有意な低下が、1,000, 10,000 ppm投与群で見られた。また、血清のアルブミン値の上昇が、11週齢時の10,000 ppm投与群に於いて観察された。

次に、HBCD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 Fig. 76 に示す。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。図には、KLH特異的IgG抗体価とHBCDの用量依存性を調べた結果を示したが、HBCDの濃度が上昇するにつれ、抗体価の減少する傾向が得られ、HBCD 10,000ppm投与群で、対照群と比較して、有意な抗体価の減少が観察された。

19年度:

TBBPAの免疫担当細胞への影響:

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見られなかった (Fig. 77)。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、有意差は見られなかった。

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 (Table 66), 白血球百分比 (Table 67)ともに、3週齢、11週齢時ラットに於いて、対照と比べて有意な変化は見られなかった。尚、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於ける変化が観察された (Table 68)。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週齢の脾臓及び末梢血に於ける活性化T細胞の増加、胸腺に於ける不活性B細胞の増加が、11週齢の脾臓に於けるCD4⁺CD8⁺ダブルポジティブ細胞、Treg, NK細胞、活性化T及び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、胸腺に於けるB細胞 (特に不活性B細胞)の増加とCD4NKT細胞の減少、末梢血に於けるT細胞、活性化B細胞及び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週齢時に於いて、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 (Table 69)。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週齢に於いては全項目に有意な差がなかった。

胸腺及び脾臓の組織病理学的解析の結果からは、100 ppm暴露群に於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 (Table 70)。

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 (Fig. 78)。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