

定した。KLH 特異的 IgG 抗体価と TBBPA の用量依存性を調べた結果、TBBPA 10,000 ppm 投与群の中に、抗体価の減少する個体が見られたが、対照群との間に有意差は得られなかった。

④感染影響評価 (黒川) :

17 年度 :

成体マウスに於ける PTU 曝露の感染影響評価 :

PTU 曝露の RS ウイルス感染病態への明確な影響を検証するために、研究班で設定した投与濃度の 83 倍に相当する 0.1% を 6 週間飲料水として成体マウスに投与し、その後に RS ウイルスを感染させて各種検討を行った。対照群での血清中の平均 T4 レベルが 24.7 ng/mL であるのに対して、PTU 曝露群では 11.8 ng/mL と 50% 以下に低下していた (Table 71A)。これらの PTU 曝露マウスでは体重の抑制ならびに摂餌量低下も認められており、これらのマウスで甲状腺機能低下が誘導されていることが示唆された。RS ウイルス感染病態に関しては、肺組織中及び BALF 中の RS ウイルス感染価並びに肺組織中のウイルス RNA コピー数が PTU 曝露マウスで対照群のマウスより高い傾向が認められた (Table 71B)。これらの結果より、PTU 曝露マウス群では肺に於けるウイルスの増殖が対照群より盛んである可能性が示された。更に、肺組織中のウイルス RNA コピー数が感染影響の指標として有用であることが強く示唆された。

PTU の周産期曝露感染影響評価 :

研究班の統一プロトコールに則り、PTU (10 ppm) を親マウスの周産期 (GD10 - PND21) 飲水投与後、仔マウスに RS ウイルスを感染させ、感染 5, 6 日後に前述の実験と同様の検討を行った。今回の試験では、PTU 曝露により仔マウス血清中の T4 レベルの低下は認められなかったが、平均体重は対照群の仔マウスより明らかに下回った (Table 72A, B)。周産期に於ける PTU 曝露が 10 ppm と成体マウスでの試験用量と比較して低く、かつ曝露期間も約 1/2 と短い為、甲状腺機能については明らかでないが、仔マウスにネガティブな影響を与えることが確認された。Fig. 79 に PTU 曝露のウイルス感染価への影響を示した。本試験では、肺組織及び BALF 中のウイルス感染価の PTU 曝露による明確な変化は認められなかった。また、肺組織中のウイルス RNA コピー数に関しても PTU 曝露群と対照群との間に差は無かった (Fig. 80)。RS ウイルス感染モデルに於いて、ウ

イルス感染の進行に伴って気道や肺組織中に様々なサイトカインやケモカインが誘導されることが知られている。そこで、本試験では代表的な Th1 サイトカインとして IFN- γ と IL-2, Th2 サイトカインとして IL-4 と IL-10 について BALF 中のレベルを ELISA により定量した。BALF 中の IFN- γ は RS ウイルス感染により誘導され、感染 6 日後では PTU 曝露群に於いて有意に増加していた (Fig. 81)。一方、IL-2, IL-4 及び IL-10 の BALF 中量は全ての群で検出限界程度もしくは、それ以下であり、PTU 曝露による顕著な変化は認められなかった。

18 年度 :

DBDE の感染影響評価 :

DBDE 周産期曝露の動物個体への影響を検討するため、離乳時に於ける親マウス及び仔マウスの体重比較、ならびに親マウスの DBDE 曝露期間中の摂餌量を調べた (Table 73)。親マウスでは、DBDE 曝露量に関わらず平均体重及び摂餌量に対照群との有意な差が認められなかった。一方、仔マウスでは、1000 ppm 曝露群で有意に体重の増加抑制が見られた。尚、DBDE 曝露による血清中の T4 レベルの変化を検討したが、対照群に於ける値の変動幅が大きく、判定が出来なかった。RS ウイルス感染仔マウスに於いて、肺組織中の RS ウイルス感染価が曝露量に依存して上昇し、1000 ppm では陽性対照シクロフォスファミド (CY) 前投与群での感染価の約 70% に該当した (Fig. 82)。更に RS ウイルス感染病態の指標の 1 つである IFN- γ レベルが、1000 ppm 曝露群の BALF 中で有意に上昇していた (Fig. 83)。RS ウイルス感染による下気道炎に於いて、様々なケモカインが誘導されることが知られている。その 1 つである RANTES の肺組織に於ける mRNA 量を定量した。その結果、曝露量依存性は認められなかったが、DBDE 曝露群では何れも対照と比較して二倍程度 mRNA 量が高く、RANTES の遺伝子発現が亢進していることが明らかとなった (Fig. 84)。これらの結果より、DBDE 曝露により、RS ウイルス感染病態が悪化することが強く示唆された。特に肺ウイルス感染価は用量反応性が高く、感染影響の指標として有用であることが明らかとなった。

HBCD の感染影響評価 :

DBDE と同様のプロトコールで、HBCD の感染影響を評価した。本試験では、曝露用量設定のための予備試験的な目的で 1000 ppm 曝露のみを実

施した。HBCD 1000 ppm 曝露では、親マウス及び仔マウスの体重は対照群と比較して有意な差が認められず、親マウスの摂餌量についても対照群と差がなかった。また、血清中の T4 レベルも HBCD 曝露群と対照群の間に差が認められなかった（結果は示さず）。仔マウスに RS ウイルス感染させ、5 日後の肺組織中のウイルス感染価及び BALF 中の IFN- γ レベルを評価した (Fig. 85)。その結果、HBCD 曝露群ではウイルス感染価及び IFN- γ レベルに於いて対照群との差が認められなかった。

19 年度：

TBBPA の感染影響評価：

TBBPA 周産期曝露の動物個体への影響を検討するため、離乳時に於ける親マウス及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。一方、血清中の T4 レベルの変化は、1000 ppm 以上の曝露に於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 (Table 74)。

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 (Fig. 86)。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。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 (Fig. 87)。RS ウイルス感染病態の指標である BALF 中の IFN- γ レベルは、100 ppm から 1000 ppm まで有意に上昇した。しかし、肺ウイルス感染価の結果と同様に 10000 ppm 曝露群では対照を有意に下回った (Fig. 88)。

肺ウイルス感染価及び 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 (Fig. 89)。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於ける 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。

⑤幼若期曝露発がん性評価 (今井)：

17-18 年度：

DBDE の発がん性評価：

出産後から離乳後の屠殺まで、母動物の一般状態及び体重に DBDE 投与による明らかな影響は認められなかった。対照群の 1 例については、育児不良により全児動物が死亡したため、評価より除外した。剖検時の肝重量は、0.25 及び 2.5% 群で対照群に比して増加傾向を示したが、統計学的有意差はなかった。腎及び甲状腺重量に DBDE 投与による影響は見られなかった (Table 75)。肝、腎及び甲状腺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。

児動物に DBDE 投与によると考えられる死亡例は見られなかったが、出生後の保育不良或いは DMBA 投与時の投与過誤により、有効匹数は 0 (対照)、0.001、0.01、0.25 及び 2.5% 群の雄では 16、20、20、20、20 匹、雌では 15、18、17、20、19 匹となった。生存率、一般状態、体重 (Fig. 90)、摂餌量及び DHPN 投与期間中の摂水量については、DBDE 投与による影響は認められなかった。触診による乳腺腫瘍の経時的観察に於いても結節/腫瘤の発生状況に群間の明らかな違いは認められなかったが、病理組織学的診断結果を考慮した最終評価を要する。剖検時の臓器重量に関しては、雄の 0.25 及び 2.5% 群と雌の 2.5% 群に於いて腎重量が対照群と比して低値を示したが、肝及び甲状腺重量には群間の明らかな違いは見られなかった (Table 76)。病理組織学的評価は、肝、腎、甲状腺及び食道について終了した。腎間葉性腫瘍の発生頻度が雌雄の 2.5% 群で、発生数が雄の 2.5% 群で各々対照群に比して有意に減少した。腎芽腫については群間の差は認められなかった (Table 77-1)。腎細胞腺腫/腎細胞癌の発生頻度が雄の 2.5% 群で対照群に比し有意に減少或いは雌の 0.001% 群で有意に増加したが、同病変については群間の発生状況のばらつきが大きく、DBDE 投与との関連性は明らかではなかった (Table 77-2)。腎盂の移行上皮については雄の 0.01% 群で乳頭腫/癌の有意な増加が見られたが、他の群に関連した変化は認められなかった (Table 77-3)。また、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度が雌の 2.5% 群で有意に減少した (Table 77-4)。肝及び食道に於いては、増殖/腫瘍性病変の発生状況に群間の明らかな違いは認められなかった (Table 77-5, 77-6)。

18-19年度：

HBCD及びPTUの発がん性評価：

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或いは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群に於いて有意に高値を示した (Table 78)。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群に於けるPTUの平均摂取量は、1.3 mg/kg 体重/日であった。剖検時の肝重量は、対照群に比し0.1%群で有意な高値或いは高値傾向を示し、1%群では有意な高値を示した。甲状腺重量に対するHBCD投与の影響は見られなかったが、PTU群では対照群に比し有意な高値を示した (Table 78)。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、甲状腺に於いては1%群で軽度な、PTU群では著しいび慢性濾胞上皮細胞過形成が認められた。

児動物にHBCD或いはPTU投与によると思われる死亡例は見られなかったが、出生後の保育不良或いはDMBA投与時の投与過誤により、有効匹数は0 (対照)、0.01, 0.1, 1%及びPTU群の雄では21, 21, 25, 25及び25匹、雌では24, 23, 23, 17及び18匹となった。生存率、一般状態及びDHPN投与期間中の摂水量については、HBCD投与による明らかな影響は認められなかったが、体重については、1%群の雄ではHBCD投与期間中より23週齢時まで、雌では実験期間を通して対照群に比して有意に低値を示し、PTU群の雌雄に於いては高値傾向を示した (Fig. 91)。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於いても結節/腫瘤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群に於ける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群の雌雄に於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見られなかった (Table 79)。病理組織学的検索に於いては、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 80)：PTU群の雌で変異肝細胞巣及

び肝細胞腺腫の発生数が対照群に比し有意に増加したが、雌では有意に減少した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。

腎 (Table 81)：PTU群の雄で腎細胞腺腫の発生頻度が対照群に比し有意に、雌では腎芽腫の発生頻度及び数が有意に増加した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。

甲状腺 (Table 82)：PTU群の雌雄で濾胞上皮細胞の巣状過形成及び腺腫/癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に減少した。HBCD-1%群の雄では、巣状過形成の発生数が有意に減少し、癌の発生頻度及び数が減少傾向を示した。

肺 (Table 83)：PTU群の雌で腺癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に減少した。また、HBCD-1%群の雄では、扁平上皮癌の発生が有意に減少した。

食道 (Table 84)：PTU群の雄で乳頭腫/扁平上皮癌の発生頻度及び数が対照群に比し有意に増加した。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。

膀胱 (Table 85)：PTU群の雌で移行上皮過形成及び腺腫/癌の発生頻度が有意に増加したが、これらの病変の発生状況については群間のばらつきが大きく、PTU投与による影響であるか否かは明らかではなかった。HBCD投与群に用量反応性を伴う明らかな変化は認められなかった。

乳腺 (Table 86)：HBCD或いはPTU投与による明らかな変化は認められなかった。

19年度：

TBBPAの発がん性評価：

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 87)。TBBPAの平均摂取量は、0.01, 0.1及び1%群で各11.8, 124.6及び1249.0 mg/kg 体重/日であった。剖検時の甲状腺重量は、対照群に比し1%群で有意な高値を示し、0.1及び0.01%群に於いても高値傾向を示した。肝及び腎重量にTBBPA投与による影響は見られなかった (Table 87)。病理組織学的検索では、1%群の甲状腺に軽度なび慢性濾胞上皮細胞過形成が認められたが、肝及び腎にはTBBPA投与に起因すると考えられる変化は見られなかった。

児動物については、授乳時の各群に死亡例が見られたが、TBBPAの投与による影響は認められ

なかった。離乳時に於ける有効匹数は0(対照), 0.01, 0.1及び1%群の雄では16, 12, 16及び15匹, 雌では23, 13, 17及び15匹となった。生存率, 一般状態及びDHPN投与期間中の摂水量については, TBBPA投与による明らかな影響は認められなかったが, 体重については, 0.01及び0.1%群の雄では発癌物質処置を開始した6週齢時以降, 0.01, 0.1及び1%群の雌では15週齢時以降, 各々実験期間を通して, 対照群に比し有意な高値或いは高値傾向を示した(Fig. 92)。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。雌に於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於いて, 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見られた。剖検時の臓器重量に関しては, 0.1及び1%群の雄に於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見られなかった(Table 88)。

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見られなかったが, 2.5%群の雌雄で肝重量の有意な増加が見られた。6週齢時には, 2.5%群の雄で体重が有意な低値を示し, 0.01%群の雄及び0.01, 2.5%群の雌では低値傾向を示した。臓器重量に関しては, 腎重量に対する明らかな影響は見られなかったが, 2.5%群の雌雄で肝及び甲状腺重量が有意な高値を示した(Table 89)。6週齢時に測定した血清中の甲状腺関連ホルモン値に関しては, 2.5%群の雌雄でT4値が有意な低値を示したが, T3及びTSHに関して明らかな変化は見られなかった(Table 90)。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, 雄に於いて明らかな変化は認められなかった(Table 91)。

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):

17年度:

IRISについては, 544化合物(群)がエントリーされており, そのうち非発がん性のRfD値(TDI

に相当)が評価されている物質429化合物について, 情報を整理した。収集した項目は, 化合物数, CASRN, NO(A)EL, LO(A)EL, NOAELの根拠, 標的器官, その根拠文献, 総合不確実係数, 個人差の係数, 種差の係数, その他の係数

(Modifying Factor), 不確実係数の設定理由, RfD また RfC (Reference Concentration: 吸入暴露の場合), 最終評価年月, 用量換算等の補足情報に従って整理した。その概要として, RfD算定のために採用されたエンドポイントとしての標的器官の頻度分布をFig. 93に, 各不確実係数の分布をFig. 94-97に示した。

エンドポイントは, 一つのNOAEL(またはLOAEL)の設定に複数の所見を用いることもあり, 総数としては約550項目になり, Fig. 93に示すように25種類に分類した。その結果, 肝臓に対する所見が117件と最も多く, 次に40件を越えるものとして, 体重変化, 中枢・末梢の神経系への影響, 腎臓, 血液生化学的パラメータの変化が多く見受けられた。本研究の目的である発達期毒性との関連が比較的高いと思われる生殖発生毒性や甲状腺への影響については各々約20件であった。免疫系への影響をRfD算定のためのエンドポイントした例は2件しか見受けられないが, これは, 関連する論文数や標準的な試験法の整備状況等に依存している可能性も考えられる。

不確実係数(UF)の適用状況としては, 実験動物の慢性影響のNOAELから基本的に算用されるのは, "100"が最も多く, 429件中の4割近くの162件で使用されていた。その次に多いのは"UF: 1000"の約120件で, "UF: 300"と"UF: 3000"がこれに次ぎ, これら4種類のUFの使用が約90%を占めていた。

次に, これらの不確実係数の意義を解析するために, 使用された総合不確実係数を構成する因子についての解析を行った。尚, 評価時期が古い場合や使用説明がなく使用された"UF: 100"については, 個人差10及び種差10で構成されているものとし, また, 使用されていない場合は, 解析上便宜的に"UF: 1"とした。まず個人差に使用された不確実係数としては, 約95%がデフォルトの10を使用している。これは, 殆どが実験動物結果を用いてRfDが設定されていることや, ヒトに於ける定量的な解析が少ないことに依存しているものと考えられる。一方, 16件については"UF: 1"または"UF: 3"が用いられているが, これらの例では, NOAELの設定がヒトの

高感受性集団に於けるデータに基づいており、デフォルトの10は必要ないという判断がなされているためである。また、1件に“UF:6.32”という値が使用されているが、これはヒトに於けるPBPK解析を行ったデータに基づき算定されたものである。

種差に関しては、約4分の3に於いてで10が採用されている。約1割で“UF:1”になっているが、これは殆どがヒトに於けるNOAELをRfD設定のために採用していることによるものである。その他、53件で“UF:3”が採用されている。その殆どは、吸入実験による、実験動物からヒトへの外挿として用いられたものであるが。そのうち7件と“UF:10.428”としているケースでは、動物とヒトでの体内動態解析データに基づいた判断によって決定されていた。また、2件はサルを用いた実験のNOAELを用いたことによるものであった。

その他のUFとして追加されたものについては、137件が“UF:10”で最も多く、“UF:3”と“UF:30”が各約50件でこれに次いで多かった。ここで追加された理由の殆どが、短期試験の結果をNOAEL(またはLOAEL)として採用したことと、LOAELしか求められなかったことによるものである。各々のケースで、化合物の蓄積・排泄に関する情報を考慮した結果や、LOAELでの毒性所見の程度(NOAELに近いとか軽微な変化であるとか等)に応じて、UFとして10及び3を割り当てており、各々の組み合わせに従って、合計として3~100の追加のUFが使用されていた。

一方、LOAELしか求められない場合は、近年ベンチマークドースを用いたアプローチが有用であることが知られており、IRISの中でもNOAELが求められなかった53件のうち、29件でベンチマークドースを用いた解析が行われており、より科学的根拠に基づいたRfDの算定が行われていることが示された。

同様の情報整理及び解析をWHOの飲料水ガイドラインの設定根拠となった評価文書中の162物質について行った。その結果、TDIアプローチによる評価基準算定方法として、78件の情報を整理することができた。最終評価そのものが、JECFAやJMPR等の他のWHO関係の評価文書を引用している関係で、エンドポイント等の記載の明記がないものもあり、標的器官の整理はできていないが、使用した不確実係数については、Fig. 98-101に示した。総合のUFとしては、100または、1000が殆どであり、IRISで見られたよ

うな“UF:300”や“UF:3000”といった例は数件しか認められない。これらは、不確実係数の各構成因子の解析でも明らかなように、種差や個体差に関するUFも10以外を殆ど用いていないことや、追加のUFも必要な43件中30件に“UF:10”を用いていることに依存していることが示された。また、ベンチマークドースの適用もごく最近再評価された2件のみであった。

18年度:

17年度の米国EPAのIRISとWHOの水質ガイドライン評価文書の情報収集に18年度は、米国のATSDR、WHO/JMPRを加え、合計で約770の評価文書について情報整理を行った。収集した項目は、化合物数、CASRN、NO(A)EL、LO(A)EL、NOAELの根拠、標的器官、その根拠文献、総合不確実係数、個人差の係数、種差の係数、その他の係数、不確実係数の設定理由、RfDまたRfC(Reference Concentration:吸入暴露の場合)、最終評価年月、用量換算等の補足情報に従って整理した。また、18年度は、その他の係数を使用した理由を、その使用頻度から、LOAELの使用、短期試験の使用、発がん性の考慮、データベース不足に分類して整理を行った(Table 92)。

エンドポイントは、一つのNOAEL(またはLOAEL)の設定に複数の所見を用いることもあり、総数としては約900項目になり、Fig. 102に示すように37種類に分類した。その結果、肝臓に対する所見が約200件と最も多く、次に腎臓への影響と血液生化学的パラメータの変化がそれぞれ約100件となり、これらのエンドポイントで約半数を占める結果となった。これらについて多いものとして体重変化、中枢・末梢の神経系への影響、生殖発生影響、甲状腺への影響等がみとめられ、本研究の目的である発達期毒性との関連が比較的高いと思われる生殖発生毒性や甲状腺への影響については各々約40件であった。また、発達期での影響ではないが、関連あるエンドポイントとしての神経系への影響も約40件認められている。一方、免疫系への影響をエンドポイントとした例は4件しか見られなかった。

UFの適用状況としては、実験動物の慢性影響のNOAELから基本的に算用されるのは“100”が最も多く、約770件中の約半数の357件で使用されていた(Fig. 103)。その次に多いのは“UF:1000”の約170件で、“UF:300(70件)”と“UF:

3000 (45 件) ” がこれに次ぎ、約 30 の “UF: 10” と “UF: 30” を加え、これら 6 種類の UF の使用が 90% 以上を占めていた。

これらの不確実係数の意義を解析するために、使用された総合不確実係数を構成する因子についての解析を行った (Fig. 104)。尚、評価時期が古い場合や使用説明がなく使用された “UF: 100” については、個人差: 10 及び種差 10 で構成されているものとし、また、使用されていない場合は、解析上便宜的に “UF: 1” とした。まず個人差に使用された不確実係数としては、約 95% がデフォルトの 10 を使用している。これは、個人の感受性や代謝に関する定量的な解析が少ないことに依存しているものと考えられる。一方、10 以下の係数が採用された例では、NOAEL の設定がヒトの高感受性集団に於けるデータに基づいており、デフォルトの 10 は必要ないという判断がなされているためである。また、1 件 “UF: 6.32” という値が使用されているが、これはヒトに於ける PBPK 解析を行ったデータに基づき算定されたものである。

種差に関しては、約 4 分の 3 に於いてデフォルトの 10 が採用されている。約 90 件で “UF: 1” になっているが、これは殆どがヒトに於ける NOAEL を TDI 設定のために採用していることによるものである。その他、約 1 割の 77 件で “UF: 3” が採用されていた。それらの多くは、吸入実験による、実験動物からヒトへの摂取量換算による外挿として用いられたものであるが、そのうちの一部と “UF: 10.428” としているケースでは、動物とヒトでの体内動態解析データに基づいた判断によって決定されていた。

種差と個体差に加えて UF が追加された例として 443 件が認められ、その理由としては、約 3 分の 1 が “短期間試験結果の使用” によるもので、それに続く “データベース不足” と約 100 件の “LOAEL の使用” を合計すると約 90% を占めていた。また、26 件は “発がん性の考慮” に関して UF が追加されていた (Fig. 105)。

また、上記の各々の理由で、UF の使用状況を解析してみると (Fig. 106)、“短期間試験結果の使用” と “LOAEL の使用” では、殆どが “UF: 10” を使用していたが、約 2 割程度は “UF: 3” を使用していた。一方、“データベース不足” に関しては、主に生殖発生試験データの不足によるものであるが、上記理由とは、逆に殆どが “UF: 3” を使用し、約 4 分の 1 に於いて “UF: 10” を使用していた。また、“発がん性

の考慮” に関しては、殆どが “UF: 10” を使用していた。その他、これらの理由に分類できない UF が約 30 件認められるが、“UF: 3” または “UF: 10” がそれぞれ半数であったが、その多くは上記の理由に近いもの或いは、いくつかの理由の組み合わせで総合的に判断されたというものであった。

19 年度 :

18 年度までの国際機関や米国評価機関等約 770 の評価文書についての耐容摂取量の設定方法や、不確実係数の配分に関する情報整理結果を Web ベースで検索を可能にするデータベース化した。検索画面 (Fig. 107, 108) では、任意のキーワードによる検索の他、化合物名、CAS 番号、NO(A)EL または LO(A)EL の値 (mg/kg)、NOAEL の根拠、標的器官、その根拠文献、総合不確実係数、個人差の係数、種差の係数、その他の係数、不確実係数の設定理由、TDI の値 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 等の項目毎に値やキーワードを限定して検索できるように作成した。また、検索の結果得られた画面では (Fig. 109)、化合物名、CAS 番号等や評価文書の作成機関名に続いて、根拠となった文献情報が表示される。“詳細表示” “更に詳細” を選択すると、Fig. 110 に示すように、調査に従って得られた詳細な情報の一覧が表示される様に設定した。また、この画面からは、“編集” を選択することにより、各情報の修正を行うことが可能になる。更に、Fig. 107-109 の上部に示される “エントリー追加” からは、新規の評価文書の情報 (Fig. 111) を追加できるように設定されている。

本データベースの中から、発生毒性を TDI 等の設定の指標としている評価書を 22 報抽出することができ、その中からメチル水銀とダイオキシン類の評価書を除いた 20 報について、UF の適用状況とそれぞれの係数の理由を分類した (Table 93)。催奇形性に伴う重篤性に対する UF を適用した例は一例 (UF: 3) であったが、いくつかの例では、データベース不足を追加の理由として “UF: 10” を適用している場合が 6 例、“UF: 3” を適用している場合が 3 例認められた。

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

• ラットへの胎生授乳期 HBCD 暴露による児動

物 (11 週齢) の

- 1). 血清 T3 値
- 2). 甲状腺重量
- ラット胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物 (11 週齢) の脳の形態計測に於いて
 - 3). 白質の脳梁面積 (mm^2)
 - 4). 白質の CNPase 陽性細胞 ($/\text{mm}^2$)
 - 5). 海馬: CA1 錐体細胞層最下層からの平均距離 (μm)
 - 6). 海馬: 移動が異常な神経細胞数 ($/\text{mm}$)
 - 7). 海馬: 移動が異常な神経細胞数/CA1 神経細胞数 (%)
- ラット胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物 (3 週齢) の脳の形態計測に於いて
 - 8). 海馬左右歯状回の抗 reelin 抗体陽性細胞数 ÷ 左右歯状回の面積 (mm^2)
- ラット胎生授乳期 DBDE, HBCD, TBBPA 暴露による児動物 (11 週齢) の脳の形態計測に於いて
 - 9). DBDE 暴露による vimentin 陽性細胞 ($/\text{mm}^2$)
 - 10). HBCD 暴露による vimentin 陽性細胞 ($/\text{mm}^2$)
 - 11). TBBPA 暴露による vimentin 陽性細胞 ($/\text{mm}^2$)
- ラット胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 12). メタンフェタミンによる報酬効果 (CPPscore)
- ラット胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 13). 3 週齢肝臓比重量 ($\text{g}/100\text{g BW}$)
 - 14). 3 週齢脾臓活性化 B 細胞率 (%)
 - 15). 3 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 16). 11 週齢末梢 NK 細胞率 (%)
 - 17). 11 週齢血清 T4 値 (ng/ml)
- ラット胎生授乳期 HBCD 暴露による児動物の
 - 18). 3 週齢肝臓比重量 ($\text{g}/100\text{g BW}$)
 - 19). 3 週齢脾臓活性化 T 細胞率 (%)
 - 20). 3 週齢脾臓 NK 細胞率 (%)
 - 21). 3 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 22). 3 週齢血清 TSH 値 (ng/ml)
 - 23). 3 週齢血清アルブミン値 (g/dl)
 - 24). 11 週齢血清 T3 値 (ng/ml)
 - 25). 11 週齢血清アルブミン値 (g/dl)
- ラット胎生授乳期 TBBPA 暴露による児動物の
 - 26). 11 週齢脾臓 CD4+T 細胞率 (%)
 - 27). 11 週齢脾臓不活化 T 細胞率 (%)
- マウス胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 28). 肺組織中の virus 感染価 (PFU/ml)
 - 29). 肺洗浄液中の IFN- γ (pg/ml)

- マウス胎生授乳期 HBCD 暴露による児動物の
 - 30). 肺洗浄液中の IFN- γ (pg/ml)
- マウス胎生授乳期 TBBPA 暴露による児動物の
 - 31). 肺組織中の virus 感染価 (PFU/ml)
 - 32). 肺洗浄液中の IFN- γ (pg/ml)
- ラット胎生授乳期 DBDE 暴露による児動物の
 - 31). 雌の甲状腺濾胞上皮 carcinoma 誘発率
 - 32). 雌の甲状腺濾胞上皮 adenoma と carcinoma の合計誘発率
 - 33). 雄の腎細胞腺腫・腎細胞癌の合計誘発率
 - 34). 雌の腎芽腫誘発率

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

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

No	化合物	BMD (ppm)	BMDL (ppm)	参照グラフ
1	HBCD	119.98	51.83	Fig. 112
3	DBDE	9.37	2.05	Fig. 113
4	DBDE	10.37	2.87	Fig. 114
8	DBDE	12.88	2.66	Fig. 115
10	HBCD	107.21	37.64	Fig. 116
14	DBDE	13.10	1.76	Fig. 117
15	DBDE	408.56	83.96	Fig. 118
17	DBDE	889.62	145.02	Fig. 119
18	HBCD	91.47	44.02	Fig. 120
20	HBCD	718.80	121.44	Fig. 121
21	HBCD	223.95	84.62	Fig. 122
23	HBCD	768.19	130.73	Fig. 123
25	HBCD	135.38	12.97	Fig. 124
28	DBDE	177.81	57.38	Fig. 125

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

D. 考察

①脳発達のかく乱影響評価 (渋谷):

<BFRsを用いた発達期暴露評価系の確立>

17年度:

PTU, MMIの発達期暴露により、仔動物に対して強い甲状腺機能低下状態が誘発され、成熟後での海馬CA1ニューロン、白質構成成分に異常の出現することが明らかとなった。性分化指標関連では12 ppm PTU群の雌雄、200 ppm MMI群の雄で春期発動が遅延し、雌で化学物質による違いが見出され、雌での遅延に関しては、PTUそのものによる影響が示唆された。ただし、雄では成因为不明であるものの、甲状腺機能低下に関連した性成熟遅延が示唆されたが、その他の性分化指標には異常を認めなかったことから、重篤な性分化障害の生じている可能性は低いと考えられた。

DBDEの暴露実験では、予備実験に於ける母動物の甲状腺の病理組織学的解析で、母動物に対しては甲状腺機能低下の誘発が明らかであった。本実験に於いても、10 ppm用量から母動物の甲状腺重量の増加が見られたが、予備実験と同様に明らかな用量依存性は認められなかった。仔動物に於ける血清中の甲状腺関連ホルモンは、投与終了時、11週目の両時点で、最高用量に於いてのみごく軽度な変化を示した。以上より、DBDEによる甲状腺機能低下は程度がより弱い、低い濃度でも影響を及ぼしている可能性がある。実際、11週目で甲状腺機能低下と関連した不可逆的な脳白質変化(CC面積の減少、CNPase陽性オリゴデンドロサイトの密度の減少)が、100 ppm以上で見られており、また10 ppmでも統計的有意差はないものの同様の傾向が見られている。一方、1000 ppmでも有意に変化したものの、100 ppmでの反応に比較して、用量依存的な増強を認めていない。TBBPA, HBCDの予備的な検討でも、誘発される甲状腺病変の強さに投与用量に応じた用量反応性が認められていない。DBDEは他の臭素数の少ない臭素化ジフェニルエーテルに比較して、分解しやすく蓄積しにくい物質であるが、低用量から生じる用量依存性の乏しい反応性は、難分解・高蓄積性のカテゴリーに入る化合物の生体作用の特性かも知れない。一方、PTU, MMIに比較してDBDEでは甲状腺影響のレベルに対する中枢神経障害の程度が強く出現した。甲状腺機能低下影響に対しては、当然、発達期脳の感受性が重要な要因となるが、3 ppm PTUにより軽度の甲状腺

機能低下症を誘発した状態では、DBDEと同等の脳変化を認めなかったことから、DBDE自身が脳に対して甲状腺機能低下症と同等の影響を示すものと考えられた。その考えの一つとして、DBDEが甲状腺機能低下を介さず直接的に中枢神経系に分布する甲状腺ホルモン受容体アンタゴニストとして作用する可能性がある。

18年度:

抗甲状腺剤の発達期暴露による甲状腺機能低下に起因した白質形成障害に関連して、成熟後(11週)でのCCの領域測定、皮質に分布するCNPase陽性オリゴデンドロサイトの密度測定が有効であることは17年度示したが、ニューロンmigration障害に関連する測定項目としては、抗甲状腺剤暴露例で今回明らかになった様に、海馬CA1領域の錐体細胞層外に存在するニューロン数及びその割合、各ニューロンの錐体細胞層ベースラインからの距離の平均値の測定が有効であることが判明した。

DBDE発達期暴露例では、抗甲状腺剤暴露試験で構築した成熟後の白質形成障害指標に於いて100 ppm以上で対照群と有意な差異が認められる事を17年度示したが、ニューロンmigration障害指標では変化は認められなかった。このことから、DBDEに起因する甲状腺機能低下の程度ではニューロンのmigrationに影響を与えなかったか、与えたとしても可塑性により回復した可能性がある。いずれにしても、白質形成に対する影響との間に感受性の差を認め、甲状腺機能低下を介した影響とともにDBDEの脳(白質形成)に対する直接作用も考慮する必要がある。

DBDE暴露実験の病理組織学的検索を行ったところ、生後21日目では、雄の1000 ppm群で甲状腺濾胞上皮肥大が有意に増加した。また、雄のみでの計測であるが、1000 ppm群でT3の弱い低値のみを認めている。よって、弱いながらも雄では暴露終了時点で甲状腺機能低下が生じていたものと考えられた。一方、雌では、10, 1000 ppmで同様の病変を数例認めたものの、対照群と比較して有意な増加は示さなかったことから、DBDE投与による甲状腺機能低下は、雄でより高い感受性を示すことが示唆された。また、暴露終了時の甲状腺機能低下影響に比べて白質形成障害の出現した用量が1/10低かったことから、DBDEに関しては非可逆的な白質影響は甲状腺影響よりも感度の高い指標であることが示された。その他の病変としては、肝臓で重量増加とともにびまん性肝

細胞肥大を認めたが、同様の病変はマウスを用いた2年間癌原性試験でも認められている。また、同試験に於いては、肝臓で腺腫、腺がんの発生率の増加も認められており、ラットを用いた2年間癌原性試験でも肝臓で腫瘍性結節の発生率の増加が認められている。DBDEはAmes試験、マウスリンフォーマ試験、*in vitro*、*in vivo*に於ける姉妹染色分体交換試験いずれも陰性であり、遺伝毒性は示さず、投与によってCYP、UDP-GT、benzo[a]pyrene hydroxylase、p-nitroanisole demethylaseといった肝酵素誘導も示さないことが報告されている。しかし、ラット、マウスではDBDEは主に肝臓に蓄積するとの報告があり、蓄積性を反映した肝細胞肥大であると考えられた。今回見出された腎臓の所見（近位尿管上皮の細胞質の好酸性増加）については、ラットを用いた30日間反復投与試験でhyaline degenerationを認めているが、この試験では純度77%のDBDEが用いられていた。純度が94%以上のDBDEを用いた、ラット及びマウスに於ける14日、28日間反復投与試験、亜慢性毒性試験、癌原性試験いずれに於いても腎臓での病変は報告されていない。以上より、本研究で認められた腎臓病変の成因と毒性学的意義ははっきりしない。生後11週目で認めた病変はいずれも対照群と比較して有意な増加は示さないものの、甲状腺濾胞上皮肥大が雄で特に認められ、T4も低値を示したことから、部分的な甲状腺機能低下状態が弱いながらも持続していると考えられ、臓器蓄積性による影響の可能性が推察された。

HBCD試験では、100 ppmから母動物の甲状腺重量の増加が見られ、10,000 ppmでは有意な増加を示したが明らかな用量依存性は認めなかった。児動物に於ける血清中の甲状腺関連ホルモンは、投与終了時では10,000 ppmのみ、11週目の時点では1000、10,000 ppmで軽度な変化を示しており、11週目の解剖時には、雄の1000、10,000 ppm群で甲状腺の相対重量の増加も認めた。よって、HBCDによる甲状腺機能低下は程度が弱いながらも成熟後まで持続していたものと考えられた。しかし、甲状腺機能低下と関連した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）では、10,000 ppm群でCNPase陽性細胞の密度減少が確認されたものの、CC面積に関しては変化を認めなかった。このことは、CC面積よりもCNPase陽性細胞密度の方が感度の高い指標である可能性があるものの、HBCDに関しては暴露終了時での甲状腺機能低下

の出現（T3の低値、TSHの高値）用量と白質影響の用量は同等であり、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。

TBBPA暴露試験では、母動物の甲状腺重量の変化は認めず、児動物の血清中甲状腺関連ホルモンは、投与終了時でのみ100、1000 ppmで弱い変化（T3の低値）を示し、用量反応性は認めなかった。TBBPAは*in vitro*では甲状腺ホルモンアゴニストとして作用する報告があるが、*in vivo*では発達期暴露により胎児に甲状腺機能低下作用が生じるとの報告がある。今回、暴露終了時のTBBPAの臓器分布を検討したところ、肝臓に於いて用量依存的な蓄積性を認めたため、TBBPA発達期暴露による甲状腺機能低下作用はUDP-GT等の肝酵素によるものではないと推察されるが、用量反応性を示さない甲状腺機能低下の原因は不明である。また、暴露終了時の脳幹に於けるTBBPAは1000 ppmで10,000 ppmよりも高い蓄積性を示した。白質影響に関しては、有意差はないものの、100、1000 ppmでCNPase陽性細胞密度の弱い低値を見出しており、暴露終了時での甲状腺機能低下との関連性も推測される。

19年度：

18年度に引き続き、19年度はHBCD及びTBBPA暴露実験の病理組織学的検索及びニューロンのmigrationに対する影響検索を実施した。また、18年度実施した抗甲状腺剤及びDBDE暴露例に於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、白質及び海馬CA1領域で発現変動の見られた標的候補分子について免疫組織学的な発現分布の変動解析を行った。

まず、BFRsを用いた発達期暴露評価系の確立に関しては、18年度実施したHBCD試験では、21日齢時でのHBCD試験の病理組織学的検索により、母動物の甲状腺重量の増加が100 ppmから見られ、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週齢の時点に於いても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週目に於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見られ、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見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(或いは雄では排泄が速いため)、HBCD の暴露に対して雌は高感受性であるとされている。HBCD による肝細胞空胞変性のメカニズムは不明であるが、本試験でも HBCD の肝臓に対する影響は雄に比べて雌でより強いことが確認された。生後 11 週目には、雄で副腎皮質束状帯の空胞変性の発生増加が認められた。副腎皮質束状帯は glucocorticoid や androgen といったホルモン産生に関わる部位であるが、本所見は雌では認められなかったため、毒性学的意義は不明である。

18 年度の検索で、HBCD の 10,000 ppm 群で CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度減少が確認され、甲状腺機能低下を反映した白質影響の可能性が示唆された。しかしながら、19 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於ける標的候補分子 reelin の発現局内の変動を認め、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、検索部位に於ける検出感度の差を反映している可能性は否定できない。

TBBPA 試験では、18 年度までに、白質に対する明らかな影響は認められていないが、100 及び 1000 ppm で CNPase 陽性細胞密度の弱い低値が見出されており、暴露終了時での軽度な甲状腺機能低下との関連性が推測された。しかしながら、19 年度実施した、成熟後での海馬 CA1 ニューロンの migration に対する影響検索では明らかな影響は認められず、海馬歯状回での顆粒細胞層からの逸脱ニューロンの増加を中間用量から認めたことと比較すると、HBCD と同様に TBBPA の甲状腺機能低下を反映した海馬 CA1 領域への影

響は弱いか感度が低い可能性が示唆された。病理組織学的検索では、母動物甲状腺の重量及び濾胞上皮肥大の増加傾向が認められたが、有意差の認められる変化ではなかった。また、生後 21 日目の児動物では用量依存性のない T₃ の低値が認められたが、病理組織学的に明らかな変化は認められなかった。その他、いずれの臓器・組織に於いても 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>

17 年度 :

抗甲状腺剤曝露例で、暴露終了時での CA1 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の結果、PTU、MMI に共通の発現変動を示した遺伝子が見出された。発現増加遺伝子のうち、機能既知の遺伝子は、sodium channel protein である Purkinje cell protein 4 (Pcp4); 細胞外マトリックス蛋白質を架橋する Lysyl oxidase (Lox); イオン輸送調節遺伝子である FXYD domain-containing ion transport regulator 6 (Fxyd6); 細胞外マトリックス蛋白質である integrin, beta-like 1; 脂肪酸酸化に関与する Cytosolic acyl-CoA thioesterase 1 (Cte1); Wnt シグナルを介したレチノイン酸反応性遺伝子で、血液臓器閉門に機能することが知られている STRA6; amiloride-sensitive epithelial Na channel である Degenerin (Accn1) の 7 つであった。この中の Fxyd6 以外の遺伝子は脳の発達との関連での機能が報告されている。発現減少遺伝子のうち、機能既知のものは Wingless-related MMTV integration site 2 (Wnt2); 神経分化に関連する転写因子である Basic helix-loop-helix domain containing, class B3 (Bhlhb3); 細胞増殖シグナル因子である Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 3 (Ptpn3); Extracellular serine protease で neurite outgrowth や fasciculation に関与する Kallikrein 8 (neuropsin/ovasin; Kik8); 新生仔脳で甲状腺ホルモンによって機能調節される corepressor Hairless である Histone deacetylase 11 (Hdac11) の 5 つであり、これらの全ては脳の発達との関連での機能が報告されている。

甲状腺機能低下による白質に対する影響評価系として、暴露終了時での CC に於ける標的遺伝子の網羅的探索を行う予定であったが、抽出した RNA 量が必要量に足りず、再度、動物実験からやり直すこととなった。

18 年度 :

暴露終了時での白質特異的な網羅的遺伝子発現解析の結果、抗甲状腺剤暴露、DBDE 暴露いずれに於いても、発現増加遺伝子数が発現減少遺伝子数の約 8 倍という同様の変動を示した。また、発現増加遺伝子では抗甲状腺剤、DBDE に共通して変動した遺伝子も多く認められ、神経幹細胞の分化に関与する Hairy and enhancer of split, Nuclear receptor co-repressor 1, Gastrulation brain homeobox, ミエリン形成に関与する Claudin, 細胞移動に関与する Deleted in colorectal carcinoma 等が含まれていた。一方、海馬 CA1 領域特異的な網羅的遺伝子発現解析では、抗甲状腺剤暴露、DBDE 暴露いずれに於いても、発現増加・減少する遺伝子数がほぼ同数である傾向が認められた。抗甲状腺剤暴露、DBDE 暴露に共通して変動した遺伝子を検索したところ、増加・減少ともに共通して変動した遺伝子は殆んど認められず、白質での解析結果とは異なる結果となった。DBDE 暴露を行った性成熟後の雄児動物脳に於いて、白質では抗甲状腺剤暴露と同様の CC 面積の減少、CNPase 陽性オリゴデンドロサイトの密度の減少を認め、DBDE 暴露がオリゴデンドロサイトに不可逆的な影響を与えることが示されたが、海馬 CA1 領域では、抗甲状腺剤暴露例で観察されたニューロン migration 異常を DBDE 暴露例で認めなかったことがこの結果に反映されていると考えられた。

19 年度：

PTU, MMI 暴露例に於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）に於ける解析の妥当性が確認された。

また、免疫組織化学的解析の際に、白質に於いて定量解析が可能であった vimentin (PTU, MMI 暴露例及び全ての BFRs 暴露例で検討)、ret (PTU, MMI 暴露例及び 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 週齢の児動物に於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って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、暴露終了時に於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 領域より歯状回に於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 週目でこの領域に於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 に於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 に於いても、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、用量反応性或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 暴露例に於いて、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」、「ニューロン及びグリア細胞の前駆細胞への分化」、「未成熟グリア細胞からオリゴデンドロサイト、アストロサイトへの分化」、「オリゴデンドロサイトによるミエリン形成」、「神経細胞の軸索ガイダンス、シナプス形成」等の機能を担い、発達期甲状腺機能低下、或いは、化学物質の直接影響の結果として、これらの機能に変調を来し、不可逆的な白質の形成障害及びニューロンの migration 異常が生じたと考えられた。

②神経機能・行動影響評価 (鈴木):

17年度:

PTU の胎児期及び授乳期暴露により、3週齢及び7週齢に於ける著明な体重減少が認められた。一方、DBDE の胎児期及び授乳期暴露に於いては、むしろ増加傾向を示した。一般に、甲状腺機能低下症である橋本病やクレチン症患者では体重増加の認められることが知られている。このことから、DBDE を暴露されたラットでは、持続的な甲状腺機能の低下が引き起こされ、体重の増加傾向を示した可能性が考えられる。また、暴露を中止して4週後に於いても同様の傾向が認められたことは吸収されたDBDEの蓄積性を反映したものであり、暴露中止後も甲状腺機能低下作用が維持されている可能性を示唆している。一方、PTUの暴露では、著しい体重減少が認められ、これは暴露中止後、少なくとも4週間は維持されていたことから、本研究で用いたPTUの暴露量は毒性用量である可能性も考慮しなくてはならない。

一般行動観察の結果、PTUの胎児期及び授乳期暴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。PTUの周産期暴露は多動性を示し、注意欠陥多動性障害のモデル動物と考えられていることから、本研究で得られたPTUの胎児期及び授乳期暴露による自発運動亢進は、過去の報告と一致する。一方、DBDEの胎児期及び授乳期暴露ラットでは、PTUの暴露で認められるような著しい自発運動量の増加は認められなかった。これらのことから、DBDEはPTU程強度な甲状腺機能低下作用を有さない可能性が示唆された。

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、PTU暴露雌性ラットに於

いてのみ、open arms 滞在時間及び侵入回数の有意な増加が認められた。これらの結果から、DBDEの胎児期及び授乳期暴露は不安感受性に何ら変化を及ぼさず、PTUの暴露では抗不安効果が引き起こされることが明らかとなった。甲状腺機能低下症の治療初期に高濃度の甲状腺ホルモンを処方することにより、警戒を要する重症の気分障害が引き起こされることが臨床経験上明らかにされていることから、逆に、甲状腺機能の低下が、抗不安を示した可能性も否定できない。また、PTUの暴露ラットでは著しい自発運動量の増加が認められたこと、高架式十字迷路試験に於いても、open arms と enclosed arms への総侵入回数の増加が認められたことから、本研究で得られた結果は、抗不安効果というよりはむしろ、運動量の増加がもたらした結果である可能性も考えられる。

次に、条件づけ場所嗜好性試験に従い、METH誘発報酬効果に及ぼすDBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露の影響を検討した結果、DBDEの暴露量依存的なMETHによる報酬効果の減弱が認められ、PTUの胎児期及び授乳期暴露に於いても著明かつ有意なMETH誘発報酬効果の減弱が認められた。脳内報酬系には腹側被蓋野から側坐核に投射している中脳辺縁ドーパミン神経系が深く関与していることから、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、ドーパミン神経の機能異常が引き起こされている可能性が考えられる。そこで、側坐核に於けるドーパミン及びその主要代謝物であるDOPACならびにHVAの細胞外遊離量の変化について、*in vivo* microdialysis 法に従い検討した。その結果、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、側坐核ドーパミンの基礎遊離量の低下、これに伴うDOPAC及びHVA量の低下が認められた。更に、METH誘発ドーパミン遊離量について同様に検討を行ったところ、基礎遊離量と相関し、DBDEないしPTUの暴露ラットに於いてドーパミン遊離量の著明な低下が認められた。これらの結果から、DBDEないしPTUの胎児期及び授乳期暴露により、ドーパミン神経系の可塑的变化の引き起こされる可能性が示唆された。

以上、本研究の結果から、DBDEの胎児期及び授乳期暴露により、特に、ドーパミン神経の発達障害が引き起こされることが明らかとなった。また、PTUの胎児期及び授乳期暴露に於いても同様の結果が認められたことから、DBDE暴露によるドーパミン神経発達障害は、一部甲状腺機能低下作用が関与している可能性が考えられた。

注意欠陥多動性障害はドパミン神経の機能低下、ドパミン遊離量の低下が原因であると考えられており、PTUの周産期暴露動物が注意欠陥多動性障害のモデルになり得ると考えられている。本研究に於いても、PTUの胎児期及び授乳期暴露によりドパミン遊離量の減少に伴う、自発運動量の亢進が認められたことから、甲状腺機能低下がドパミン神経の発達障害を引き起こし、結果として「多動」になったと考えられる。一方、DBDEの胎児期及び授乳期暴露はドパミン神経の発達障害を惹起すると考えられるものの、本研究の結果に於いては「多動」という表現型としては現れなかった。このことは、DBDEがPTU程強度な甲状腺機能低下作用を有していないことを示唆するものである。

18年度：

18年度はHBCDの胎児期及び授乳期慢性暴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、HBCDの胎児期及び授乳期慢性暴露による変化は認められなかった。また、一般行動観察の結果、HBCDの胎児期及び授乳期慢性暴露ラットでは、自発運動量の変化は認められなかった。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が、特筆すべき異常行動は認められなかった。更に、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。

17年度、本分担研究者らはDBDE及びPTUの胎児期及び授乳期慢性暴露によりドパミン神経発達障害が引き起こされる可能性を報告した。本研究に於いてもHBCDのドパミン神経機能に及ぼす影響を検討した。まず、メタンフェタミン誘発報酬効果に及ぼす影響を条件づけ場所嗜好性試験に従い検討した結果、HBCD慢性暴露の影響は認められなかった。更に、側坐核ドパミン遊離について*in vivo* microdialysis法に従い検討した結果、HBCD慢性暴露の影響は認められなかった。以上のことから、HBCDはDBDEやPTUとは異なり、ドパミン神経の発達に影響を及ぼさない事が示唆された。

一方、17年度、研究者らは高用量DBDEの胎児期及び授乳期慢性暴露により、側坐核ドパミン遊離量の減少が引き起こされることを明らかに

した。18年度は更に、側坐核ドパミン遊離に及ぼすDBDEの用量反応性を検討した。その結果、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。以上のことから、低用量の暴露であっても、DBDEの胎児期及び授乳期慢性暴露はドパミン神経系の発達障害を引き起こす可能性が考えられた。また、現段階ではドパミン神経発達に及ぼすDBDE無作用量等を算出することは極めて困難である。

19年度：

TBBPAの胎児期及び授乳期暴露例について、まず、一般的な成長に対する影響について体重を指標に検討したところ、TBBPAの暴露により著明な変化は認められなかった。一方、一般行動観察の結果、TBBPA暴露ラットに於いて新規環境への馴化に異常が認められた。しかしながら、ドパミン神経の過剰興奮状態を反映するspinning syndrome及び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。更に、高架式十字迷路法に従い不安感受性の変化について検討したところ、変化は認められなかった。

これまでに、分担研究者らはDBDE及びPTUの胎児期及び授乳期慢性暴露によりドパミン神経発達障害が引き起こされる可能性を報告した。本研究に於いても、TBBPA暴露によるドパミン神経機能に及ぼす影響を検討した。まず、メタンフェタミン誘発報酬効果に及ぼす影響を条件づけ場所嗜好性試験に従い検討した結果、TBBPA暴露の影響は認められなかった。更に、側坐核ドパミン遊離について*in vivo* microdialysis法に従い検討した結果、TBBPAによる影響は認められなかった。以上のことから、TBBPAはDBDEやPTUとは異なり、ドパミン神経系に影響を及ぼさないことが示唆された。

③免疫機能影響評価(手島)：

17年度：

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と同一実験の動物を用いて検索を行い、PTU、MMIにより、暴露終了時に脾臓の重量・細胞数の顕著な減少、胸腺重量の減少、脾臓と末梢血に於けるTリンパ球並びにNK細胞の増加、Bリンパ球並びに活性型のT、Bリンパ球の減少を見出し、成熟後に於いては、脾重量の減少は継続

したが、末梢血に於いてNK細胞と活性化T細胞の減少のみが認められた。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が、11週齢時では甲状腺ホルモンT3の軽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た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、この時期の強い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では、脾臓、胸腺重量に変動はなかったが、1000 ppmに於いて、暴露終了時に脾臓でのCD4陽性T細胞と活性化T細胞の減少、成熟後は末梢血NK細胞の減少が観察され、免疫担当細胞への影響が示唆された。DBDE投与による甲状腺機能への影響については、1000 ppm群に於いて、3週齢時に強い甲状腺機能低下を示し、11週に於いてもT4値の低下が遷延していたことから、この群に於けるNK細胞の比率の低下に甲状腺機能低下による影響が示唆された。また、DBDE投与ラットのKLHに対する抗体産生への影響を性成熟後に検討した結果、10 ppm群ではIgG抗体価5000以上を示す個体が多いのに比べ、1000 ppm群ではIgG抗体価50以下の個体が多くなる傾向が得られ、このことは、DBDE暴露後の性成熟後に於いて、体液性免疫に対する影響が性成熟後も残る可能性を示唆した。

18年度：

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と同一実験の動物を用いて検索を行い、HBCD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。

HBCD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週齢の脾臓に於いてNK細胞の減少が観察され、末梢血の活性化T細胞の減少、非活性化B細胞の上昇も観察された。回復期の11週齢に於いては、リンパ球ポピュレーションに変化は観察されなかった。以上、HBCDの場合は、軽度ではあるが免疫担当細胞への影響を示唆す

るデータが得られ、甲状腺ホルモンT3の低下と連動することから、これらの影響は甲状腺機能抑制と連関する可能性が考えられた。尚、血清アルブミンの上昇、肝臓の臓器重量の増加も観察されたことにより、HBCDの甲状腺機能への影響は、HBCDの肝臓への影響に関連する二次的影響の可能性が考えられた。

HBCDと17年度行ったDBDE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細胞群の低下が見られ、抗体産生の低下が見られた。NK細胞の割合の低下も両化合物で見られたが、HBCDの場合3週齢時での抑制が11週齢で回復しているのに比べ、DBDEの場合、11週齢でも抑制が有意であるという違いが見られた。以上、HBCDとDBDEは、幼少期ラットに対し同様の免疫影響を示すが、DBDEの方が、抑制活性は持続する傾向のあることが示された。

19年度：

免疫機能影響評価では、神経発達かく乱影響評価と同一実験の動物を用いて検索を行い、TBBPAの幼児期ラットの免疫系への影響を検討し、各臓器中のリンパ球のポピュレーション、サブポピュレーションの解析、NK細胞の割合の解析法を確立した。

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

免疫系への影響としては、胸腺・脾臓・末梢血に於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週齢に於ける変化が比較的大きいことがTBBPAの最大の特徴であった。TBBPAは難分解性ではあるものの、生物体内での濃縮性はそれほど高くはなく、変化が暴露終了後に多く現れたことの原因は不明であり、今後の研究が待たれる。

サブポピュレーション変化の多くはT細胞に関するものであったが、脾臓及び末梢血に於ける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

下している可能性等が考えられる。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等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つたため、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 NKRPIA(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量ながら、免疫系を負に調節する制御性 T 細胞 (Treg) が脾臓及び末梢血に於いて増加していたことも特徴的であった。

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

④感染影響評価 (黒川):

17 年度:

RS ウイルスマウス感染モデルは、乳幼児・小児に於ける RS ウイルス感染症での臨床像を良く反映したモデルとして知られており、ワクチン開発や感染病態解明のための研究に利用されている。そして感染病態の進行は、肺を中心に呼吸器官でのウイルス増殖の進行と高い相関性を有していることも判っている。本試験では、成体マウスでの高用量の PTU 暴露の結果、RS ウイルス量が増加している傾向が認められたことにより、甲状腺機能低下と感染病態の進行に直接的或いは間接的な因果関係のある可能性が明らかとなった。一方、周産期暴露実験では仔マウスに於いて明確な甲状腺機能低下 (T4 レベル低下) が認められず、ウイルス量の増加も見られなかった。本試験に於ける PTU 投与量は成体マウ

ス実験での 1/100 であり、暴露期間も 1/2 程度であること、またラットと比較してマウスでは血中 T4 レベルが低いことが知られていること等から、甲状腺機能低下の評価は、T4 レベル測定のみでは困難である可能性が否定できない。BFRs の評価に際しては、TSH レベル測定等、他の方法の導入も視野に入れて甲状腺機能の評価していく必要が示された。本試験では、BALF 中の IFN- γ レベルが PTU 暴露により有意に上昇していることが判明した。乳幼児・小児に於いて、RS ウイルス感染病態が進行すると気道分泌液中の IFN- γ レベルが上昇し、これと軽度の気道障害 (airway obstruction) の進行が良く相関していることが報告されている。また、IFN- γ ノックアウトマウスでは RS ウイルス感染時に気道障害が生じないことも報告されている。これらのことより、化学物質暴露による感染影響の評価に於いて、BALF 中の IFN- γ が感染病態の評価に重要な指標になることが強く示唆された。

18 年度:

代表的な BFRs である DBDE と HBCD について周産期暴露による RS ウイルスマウス感染モデルでの感染影響を評価した。DBDE では、肺組織中の RS ウイルス感染価が暴露量に依存して上昇し、肺炎等の感染病態が悪化していることが強く示唆された。BALF 中の IFN- γ レベルが 1000 ppm で上昇していることや肺組織で RANTES の mRNA 発現が亢進していることも感染病態の悪化を強く支持している。一般に、ウイルス感染症に於いて、対象臓器・組織でのウイルス量と病態の重症度が正比例することが知られている。肺組織でのウイルス感染価が暴露用量依存性を示した結果は、これが感染影響評価に適した指標であることを示すものと考えられた。

RS ウイルス感染実験に於ける陽性対照として CY を利用した。この化合物は、非特異的な免疫抑制を引き起こし、易感染状態を誘導して本モデルに於いて肺組織でのウイルス感染価を上昇させることが知られている。CY 前投与マウスでは、その免疫抑制作用から BALF 中の IFN- γ レベルは低下した。これより、DBDE のウイルス感染病態を悪化させるメカニズムは、CY とは異なり非特異的な免疫抑制作用ではないと考えられる。

今回の試験では、HBCD 1000 ppm 暴露による感染影響は全く認められなかった。現在、HBCD の暴露量を 1000, 3000, 10,000 ppm と高用量に設定して再評価を行っている。また、DBDE 暴露に於

いても、より簡便で用量反応性の高い指標を得る目的で、BALF 中での RANTES の定量評価を視野に入れている。

19 年度 :

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

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

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

⑤ 幼若期暴露発がん性評価 (今井) :

17 年度 :

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的として、被験物質の幼若期投与とその後の化学発がん物質である 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た。17 年度は、被験物質としてラットに肝臓への発がん標的性を示すことが知られている DBDE の 4 用量による実験を開始した。BFRs のうち polybrominated biphenyl (PBB) 混合物は、F344 ラットの交配 60 日前から妊娠期間中、及び生後 8 週齢までを通した胎児・乳幼児期の投与のみでは肝腫瘍を誘発しないが、8 週齢以降 2 年間投与した際には肝腫瘍の有意な増加が見られ、交配前から生後 8 週、更にその後 2 年間通して投与した場合にはその発生頻度の増加することが報告されている (Chhabra RS et al., Fund. Appl. Toxicol., 21, 451, 1993)。このラットに於ける PBB の結果に関しては、発がん感受性の高い胎児・乳幼児期暴露により肝腫瘍の発生頻度が増加したのか、単に投与期間が長くなったことによるのかについては不明である。しかし、PBB のマウスを用いた実験では、胎児・乳幼児期暴露では肝に対する発がん感受性が高いことを示唆する結果が報告されている (Chhabra RS et al., Fund. Appl. Toxicol., 21, 451, 1993)。今回検討した DBDE についても、幼若期投与ではその発がん感受性が高いと仮定した場合、DHPN と DMBA 処理によるラット多臓器発がんモデルで肝腫瘍の発生を促進することが期待される。

18 年度 :

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的として、被験物質の幼若期投与とその後の化学発がん物質である 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た。17 年度は、被験物質として臭素化難燃剤である DBDE の 4 用量を用いた実験を開始した。DBDE は、マウスの長期発がん性試験では肝及び甲状腺に、ラットの長期試験では肝に発がん性を示す (NTP, 1986)。また、昨年考察したように、PBB は、F344 ラットの交配 60 日前から妊娠期間中、及び生後 8 週齢までを通した胎児・乳幼児期の投与のみでは肝腫瘍を誘発しないが、8 週齢以降 2 年間投与した際には肝腫瘍の増加が見られ、交配前から生後 8 週、更にその後 2 年間通して投与した場合にはその発生頻度の増加することが

報告されている (Chhabra RS et al., Fund. Appl. Toxicol., 21, 451, 1993)。このラットに於ける PBB の結果に関しては、胎児・乳幼児期の発がん感受性が高かったことにより肝腫瘍の発生頻度が増加したのか、単に投与期間が長くなったことにより増加したのかについては不明である。ところが PBB のマウスを用いた実験では、胎児・乳幼児期のみ暴露により肝腫瘍が増加し、胎児・乳幼児期の発がん感受性の高いことが示唆された (Chhabra RS et al., 1993)。従って、今回の実験に用いた DBDE についても幼若期投与により肝発がんを示す可能性は否定できないと予測された。しかし、DBDE の乳幼児期投与は、DHPN と DMBA 処理によるラット多臓器発がんモデルに於いて肝腫瘍の発生を促進しなかった。また、DBDE の投与は、食道発がんに対しても影響を示さなかった。

一方、腎間葉性腫瘍の発生頻度は雌雄の 25,000 ppm 群で、発生数は雄の 25,000 ppm 群で対照群に比して減少し、甲状腺濾胞上皮細胞の腺腫/腺癌の発生頻度は雌の 25,000 ppm 群で減少した。化学物質の胎児・乳幼児期暴露による腎腫瘍の発生に及ぼす影響については報告が見当たらないが、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/腺癌の増加が報告されている (Chhabra RS et al., Fund. Appl. Toxicol., 18, 405, 1992)。今回の実験に於いて DBDE の幼若期投与により、その後の DHPN 投与による甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の発生が抑制された原因として、i) ニトロサミンの代謝活性化/排泄に対する影響 ii) 視床下部-下垂体-甲状腺軸の変調 iii) 甲状腺に於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。腎間葉性腫瘍についても i) 或いは iii) の関与している可能性が考えられた。

19 年度：

本研究では、化学物質の幼若期暴露による発がん性を比較的短期間で検出する試験法の確立を目的として、被験物質の幼若期投与とその後の化学発癌物質である DHPN と DMBA 処置によるラット多臓器発がんモデルの有用性を検討してきた。19 年度は、被験物質として臭素化難燃剤である HBCD の 3 用量と抗甲状腺剤である PTU の 1 用量を用いて 18 年度に開始した実験の評価を行うとともに、臭素化難燃剤である TBBPA の

3 用量を用いた実験を行った。

HBCD は、マウスの長期発がん性試験に於いて肝細胞の変異細胞株を誘発するが、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見られ、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 陽性率の増加が見られ、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、肝に於ける 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 或いは 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) 甲状腺に於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於いて甲状腺以外の臓器に見られた変化として、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見られず、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 群に於いては、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見られたが、その原因或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% 群に於いては高値傾向を示したことから、HBCD 等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或いは発生数が減少している可能性が示された。

⑥各種毒性指標の用量反応評価手法に於ける耐容量等の設定に関する調査研究 (広瀬) :

17 年度 :

17 年度は、耐用摂取量等の評価された物質情報をまとめて入手しやすく、不確実係数の適用理由も比較的明確な情報源として、米国 EPA の IRIS と WHO の水質ガイドライン評価文書をもとに、定量的評価手法の入手と整理を試みた。WHO の水質ガイドラインに比べて、IRIS の方は、体内動態情報やベンチマークドース手法を積極的に取り入れている様であり、不確実係数をより科学的に論理だったものに置き換えようとしていると考えられた。WHO の方の評価は基本的には、各国で評価ドラフトを分担しているという経緯や各国の専門家との調整作業等が入ることにも依存しているかもしれないが、IRIS ほどの不確実係数の解釈にそれほど先進的な試みが見られていないようである。しかし、最近、IPCS のリスクアセスメントの評価手法のハーモナイゼーションプログラムに於いて、種差や個体差の不確実係数を化学物質特異的調整係数 (Chemical-Specific Adjustment Factors) に置き換えたものにするためのガイダンスが公表され、ベンチマークドース手法に関しても、その適用に関するガイダンスについても IPCS の EHC (Environmental Health Criteria) シリーズの中での刊行が予定されている。これらの動きは、WHO 各機関の評価の中でも次第に浸透していくもの

と思われる。

18 年度 :

18 年度は、17 年度の米国 EPA の IRIS と WHO の水質ガイドライン評価文書の情報収集に加え、米国の ATSDR、WHO/JMPR に対する評価文書の情報整理を行った。更に、個人差及び種差に対する不確実係数に追加されて適用されている不確実係数の理由とその適用状況について解析を行った。多くは、デフォルトの最大 10 が適用されているが、2-3 割のケースで UF:3 が適用されている。これらは、実際にはケースバイケースの判定で適用されているが、“短期間試験結果の適用”と“LOAEL の適用”に於いては、用量反応性や経験的知見が適用されていると考えられ、定量的評価手法による置き換えが可能な領域かもしれない。しかし、データベース不足による不確実係数に関して、特に何故 UF:3 が多く適用されているについては、どんな因子が寄与しているかを明らかにするために、更なる解析が必要であると考えられた。

19 年度 :

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

また、本研究班の定量結果から得られたデータを基に、近年 NOAEL/LOAEL の代替として使用されてきているベンチマークドースを求めたところ、DBDE では、感受性の高い影響として 1.76~2.87 ppm (ラットでは約 0.2-0.3 mg/kg 相当) から、HBCD に関しては、13~121 ppm (ラットで

は約 1~12 mg/kg 相当) という値が得られた。BDE に於いては最近、Viberg et al. (2007) と Rice et al. (2007) らの報告に於いて、新生児期での 6.7 或いは 6 mg/kg 以上の投与により、70 日齢での行動異常が検出されている他、HBCD に関しても EC の FIRE project で実施された生殖毒性試験 (Lelienthal et al. 2006; Wistar ラットに交配前より、妊娠、授乳期間を通して、更に児動物には離乳後から混餌投与 (HBCD: 0.1-100 mg/kg BW/day)) に於いて、児動物の成熟後に聴覚性誘発電位検査異常による最も低い BMDL (0.2 mg/kg) と、Eriksson ら (2006) の生後 10 日での HBCD 単回経口投与による LOAEL 0.9 mg/kg (自発運動試験: 歩行運動及び立ち上がり運動の低下) が報告されている。これらの最近の報告と当研究班に於ける定量結果を比較すると、HBCD に於いては、ほぼ同レベルの感受性を示す指標を捉えているが、DBDE に於いては、更に高感度な指標を捉えることができたと考えられる。今回は、いくつかの指標についてベンチマークドースの算定が不可能な例が認められたが、今後、最高高用量群を除外した解析や、各実験の用量設定を再考することにより、より多くの指標についてベンチマークドースを算定することが可能になり、定量評価に於けるベンチマークドースの信頼性を増すことができると考えられる。

E. 結論

神経発達かく乱影響評価では、17 年度は甲状腺機能低下症を基盤とした脳発達のかく乱影響評価モデルを検討し、PTU, MMI による中枢神経への不可逆的影響として、中枢ニューロンの migration の異常、白質構成成分の減少を確認した。また、発達期甲状腺機能低下症での中枢ニューロンの標的候補遺伝子を同定した。更に、抗甲状腺作用の弱い DBDE の比較的低濃度に於いて、脳に対する不可逆的影響を確認することができ、この物質による甲状腺機能低下と脳影響の反応性は、非直線的であることが見出された。18 年度では、HBCD 暴露に於いても白質構成成分の減少が確認されたが、TBBPA 暴露では白質構成成分への明らかな影響は認められなかった。PTU, MMI 暴露でのニューロンの migration 異常に関する定量評価を行ったところ、海馬 CA1 領域でのニューロンの分布のばらつきが確認できたが、DBDE 暴露では変化は認められなかった。また、発達期抗甲状腺剤暴露、DBDE 暴露に於ける中枢ニューロン、グリ

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

神経機能・行動影響評価では、17 年度は、PTU ないし DBDE の胎児期及び授乳期暴露により、ドパミン神経発達障害が引き起こされる可能性が示唆された。また、条件づけ場所嗜好性試験及び *in vivo* microdialysis 法が甲状腺機能低下作用を有する環境化学物質の評価系として妥当であることが示された。18 年度は、HBCD を評価した結果、十分用量の HBCD でも神経機能・行動には影響を及ぼさない可能性が示唆された。一方、低用量 DBDE の胎児期及び授乳期慢性曝露に於いても側坐核ドパミン遊離量の減少が認められたことから、神経機能・行動の観点からは、DBDE よりも HBCD の方が、毒性影響が少ないと考えられた。19 年度は、TBBPA を評価した結果、成熟後の一般行動や不安関連行動、中枢性薬物に対する反応性を検討し、出現する異常行動に関連する脳部位での *in vivo* microdialysis 法によるモノアミン評価系の確立を図った。その結果、TBBPA は神経機能・行動にさほど影響を及ぼさない可能性が示唆された。

免疫機能影響評価では、PTU, MMI を用いた評価系の確立を図り、暴露終了時に、胸腺、脾臓重量の減少が観察され、脾臓での B リンパ球並びに活性型の T, B リンパ球の減少等の免疫系影響を示唆するデータが得られた。また、成熟後に於

いては、末梢血に於いて、NK細胞や活性化T細胞の減少が確認された。DBDEでは、胸腺、脾臓重量の変動はなかったが、3週目で脾臓CD4⁺T細胞、活性化T細胞の減少が観察され、11週目で、末梢血NK細胞の減少が観察された。以上、陽性対照のPTU、MMIに比べ、DBDE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。特に、DBDEのNK細胞活性抑制を含めた免疫影響は、甲状腺機能抑制と連関する可能性が考えられた。

18年度は、HBCDを用いた評価系の確立を図り、甲状腺機能低下との関連が示唆される軽度の免疫担当細胞影響が見い出された。また、血清アルブミンの上昇、肝臓の臓器重量の増加も観察されたことから、HBCDの甲状腺機能への影響は、肝臓影響を介した二次的影響の可能性が考えられた。HBCDと17年度行ったDBDEによる影響を比較すると、HBCDとDBDEは、幼若期ラットに対し同様の免疫影響を示すが、DBDEの方が抑制活性の持続する傾向のあることが示された。

19年度は、TBBPAを用いた評価系の確立を図り、3週齢の脾臓でCD4⁺T細胞の減少、回復期の11週齢でも脾臓CD4⁺T細胞、T細胞の割合の減少と脾臓の制御性T細胞、末梢血T細胞の割合の増加が観察され、軽度ではあるが、免疫担当細胞への影響が示唆されるデータが得られた。17、18年度に行ったDBDE、HBCDの免疫影響の結果と比較した結果、作用メカニズムは、DBDE、HBCDの場合と多少異なる可能性がある。

感染影響評価では、RSウイルス感染マウス実験モデルを用いて、17年度は、PTUを用いて評価系の構築を行った。成体マウスでの評価に於いて、肺に於けるRSウイルス増殖を指標に、甲状腺機能低下と感染病態の進行に直接的或いは間接的な因果関係がある可能性が明らかとなった。更に周産期暴露実験から、仔マウスに於いてRSウイルス感染により誘導されるBALF中のIFN- γ レベルが感染病態修飾作用の評価への指標としての有用性が示唆された。18年度は、DBDEを用いて評価系の構築を図り、肺組織ウイルス感染価が用量反応性の高い評価指標であることを明らかにした。19年度は、TBBPAを用いた評価系の確立を図り、肺ウイルス感染価及び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、発達期に於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。

発がん性評価では、17年度は、DBDEを用いた評価系の確立を図り、ラットに出生直後より5週間、4用量を設定してDBDEを混餌投与し、その1週後より乳腺発がん物質であるDMBAと共に、多臓器に発がん標的性を有するDHPN処置を行い、実験を継続した。18年度は、DBDEの評価系で、高用量で腎間葉性腫瘍と甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/腺癌の発生が抑制された。19年度は、HBCD、TBBPA及び抗甲状腺剤のPTUを用いた評価系の確立を図り、その結果、全ての物質に於いて甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌の減少或いは減少傾向が見いだされた。また、18年度に甲状腺濾胞上皮細胞腺腫/癌の減少を報告したDBDEを乳幼児期に投与した際の甲状腺に及ぼす影響を検討した結果、血清T4値の低下、甲状腺濾胞上皮細胞の増殖率の増加を示した。以上より、抗甲状腺作用を有する物質の乳幼児期投与により、甲状腺の発がん感受性が低下する可能性が示された。

各種毒性指標の用量反応評価手法に於ける耐容量等の設定に関する調査研究では、17年度は、耐用摂取量設定としては、比較的情報のまとまった米国EPAのIRISと、WHOの水質ガイドライン第3版(2004)で評価された物質について情報収集と整理を行った。その結果、近年は種差・個体差の不確実係数やTDI算定の出発根拠とする値(NOEL等)の設定に関して、体内動態に関する情報やベンチマークドース法を用いた、より定量的な数値による置き換えが行われていることが示された。18年度では、米国EPAのIRISと、WHOの水質ガイドライン第3版に引き続き、米国のATSDR、WHO/JMPRの評価文書に於ける耐容摂取量の設定方法や、不確実性係数の配分に関する情報及び化学構造式について、情報収集整理を行った。その結果、約770評価事例のうち440で、種差・個体差に関わる不確実係数以外の係数を適用していることが明らかとなった。その採用理由の90%以上は、NOELが求められなかったことによるLOELの適用と、評価可能な慢性影響試験が無かったことによる短期試験結果の適用、及び評価試験データ不足(主に生殖発生試験データ)によるもので占められていることが示された。19年度は、今後の定量的な有害性影響評価手法の開発に寄与することを目的とし、17年度より収集している国際的な評価機関や米国に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