

200941022A

別添1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質暴露影響評価手法の
確立に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成22（2010）年 5月

目 次

I. 総括研究報告書	
有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質暴露影響評価手法の確立に関する研究 -----	1
渋谷 淳	
II. 分担研究報告書	
1. In vivo 神経発達評価 -----	13
渋谷 淳	
(資料) 図 1-17、表 1-16	
2. In vitro 神経発達評価 -----	19
鈴木 勉	
(資料) 図 1, 2	
3. 免疫機能評価 -----	22
手島玲子	
(資料) 図 1-3、表 1-5	
4. 感染感受性評価 -----	27
渡辺 渡	
(資料) 図 1-3、表 1-2	
5. 発がん感受性評価 -----	29
西川秋佳	
(資料) 図 1-5、表 1-2	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	31
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	32

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書（平成 21 年度）

有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質暴露影響評価手法の確立に関する研究

研究代表者 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：本研究では、発達期の神経毒性、免疫毒性、感染感受性、発がん性に関して、動物ないし培養細胞を用いた暴露実験を行い、有害作用を受ける標的細胞系譜の同定とその影響メカニズムの解明に基づいた評価系の構築を目指す。

In vivo 神経発達評価では、ラットやマウスを用いてマンガン(Mn: $MnCl_2 \cdot 4H_2O$)やアクリルアミド(ACR)の発達期暴露による、海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロンと顆粒細胞層下帯のニューロン新生に関する分子発現変化を検討した。Mn はラットでの解析を継続し、マウスでは歯状回門での成熟後まで持続する Reelin 陽性細胞数の増加を新たに見出し、同部位での GFAP 陽性細胞の増数も確認した。ACR はラットの予備実験で離乳時の Reelin 陽性介在ニューロンの増加を明らかとした。また、ラットの発達期低栄養モデルでの同様の検討を行い、変化の生じないことを確認した。

In vitro 神経発達評価では、 $MnCl_2$ は初代培養マイクログリアに活性化傾向を示した。また、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞では、 $MnCl_2$ によるアストロサイトへの分化誘導促進傾向を示したが、ES 細胞では生存率と増殖率を変化させなかった。一方、胚葉体形成時に $MnCl_2$ を処置した後に ES 細胞から神経幹細胞への誘導を行ったところ、ドパミン神経、セロトニン神経ならびにアセチルコリン神経分化に関与する因子の発現抑制が認められた。

免疫機能評価では、有機リン系農薬であるメタミドホスを BALB/c マウスを用いて親マウスに飲水投与し、3 週齢の子マウスの血液学・血液生化学的検査、胸腺、脾臓リンパ球のポピュレーション解析等を行った。その結果、50 ppm 以上では出生率の減少が認められ、仔の胸腺と脾臓重量の減少、血液中の白血球数の減少、脾臓リンパ球中の CD4 と CD8 陽性細胞、制御性 T 細胞の相対的な増加が観察された。

感染感受性評価では、BALB/c マウスへメタミドホスの飲水による周産期暴露を行い、離乳後仔マウスに RS ウイルスを経鼻感染させた。10 ppm 暴露により親・仔マウスの体重増加抑制が認められたが、仔マウスの肺洗浄液中の IFN- γ 量及び肺組織中のウイルス感染価は 1.0 ppm 暴露群で上昇を示したのみで、肺の病理組織学的な変化は確認できなかった。

発がん感受性評価では、ENU 経胎盤モデルを用いて Mn の発達期暴露による中枢神経系発がん修飾作用を検討するため、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ の 0.002、0.01 及び 0.05%濃度での混餌投与を、分娩直後は母動物に、離乳後は仔動物に行い、投与を継続している。母動物の体重、摂餌量、妊娠期間、分娩匹数及び性比、また仔動物の体重、摂餌量及び死亡率は変動していない。35 週に屠殺解剖し、病理組織学的に評価する。

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

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

渡辺 渡

九州保健福祉大学 薬学部 動物生命薬科学科 教授

西川秋佳

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター センター長 病理部長事務取扱

れるもののうち、神経毒性や免疫毒性、発がん性に関してはメカニズムを含めて検討が十分ではない。また、最近 EPA や OECD で制定された神経発生毒性試験ガイドラインや現在策定中の NTP の発達期発がん性試験は大規模で実施に長期間を要するため、多数の化学物質に対応するためには、短期スクリーニングを目的としたシステム構築が望まれる。実際 OECD において、一世代生殖毒性試験を骨格として小規模な動物数での神経毒性や免疫毒性の試験の実施が検討されている。

研究代表者らは、厚生労働科学研究事業の一つとして「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」を 19 年度まで実施してきた。即ち、げっ歯類を用いて甲状腺機能低下による発達遅延をモデルケースとして、普遍化し得るパラメーターを導入して、神経毒性、免疫毒性、発がん性に関する評価系の構築を図ってきた。その結果、神経発達影

A. 研究目的

化学物質による乳幼児の健康影響として懸念さ

響に関しては、ニューロン、グリアの移動現象に着目し、その不可逆的障害を検出する形態計測手法と、それらの発達障害の分子指標を見出した。神経機能・行動影響ではドパミン神経発達傷害性検出の有効性、免疫機能では細胞性免疫機能検出の有効性、感染影響ではRSウイルス感染モデルの有効性を見出した。発がん性では、被験物質発達期暴露後のイニシエーション処置ではおしなべて発がん抑制を示し、新規モデルの確立が必要となった。

本研究は、短期スクリーニングに適う化学物質の発達期暴露影響評価系の確立を目的として、神経毒性、免疫毒性、感染感受性、発がん性に関して、動物ないし培養細胞を用いた検討を行うが、その特色は、上記の班研究で得られた成果・反省点を基に、評価対象となる主要な細胞構成成分の分化制御機構に焦点を当て、発達障害の発現メカニズムの解明を通じた評価指標の探索・検証することにある。また新たな試みとして、化学物質による発達障害の遺伝子発現プログラムに与える影響を明らかにする目的で、ゲノムのメチル化も検討する。一方、発達期での発がん感受性に関しては、ラットないし遺伝子改変マウスを用いて、胎生期での発がんイニシエーション処置を取り入れた評価系の確立を図る。研究代表者は以前、ENU経胎盤投与によりF1ラットに誘発される脳腫瘍は小児PNETに類する分化能を示すことを見出しているので (Acta Neuropathol. 87: 293-301, 1994)、この系の利用の意義は高い。

本班研究では、発達期の神経毒性、免疫毒性、発がん性に関して動物を用いた暴露実験を行い、有害作用を受ける標的細胞系譜の同定とその影響メカニズムの解明に基づいた評価系の構築を目指す。21年度は、in vivo 神経発達評価ではラットやマウスを用いて、マンガン(MnCl₂)やアクリルアミド(ACR)の発達期暴露及び発達期低栄養に起因する脳発達遅延実験を行い、海馬歯状回での分子発現解析を実施した。In vitro 神経発達評価では、Mnを用いて各種初代培養やマウス神経幹細胞、ES細胞分化誘導による評価系の構築を図った。免疫機能評価及び感染感受性評価ではメタミドホスにつきBALB/cマウスの周産期暴露を実施し、それぞれフローサイトメーターによる細胞性免疫のサブセットの解析、仔マウスにRSウイルスを経鼻感染後の感染病態評価を行った。発がん感受性評価では、ラットENU経胎盤投与モデルを利用してMnの発がん促進実験を開始・継続した。

B. 研究方法

In vivo 神経発達評価

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低栄養動物モデルとして、低蛋白質食を妊娠10

日目から離乳時(生後21日目)まで母動物に摂取させることにより、発達遅延の児動物を作製し、離乳時(生後21日目)と11週目に解剖を行った。使用した動物は妊娠SD:IGSラットとし、低カゼイン(10%)飼料(低蛋白質食群)又は正常カゼイン(20%)飼料(正常蛋白質食群)を各群8匹の母動物に自由に摂取させた。離乳時には、児動物は通常の基礎飼料であるCRF-1に切り替えて飼育した。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。

生後21日目の解剖時には、脳及び肝臓の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。11週目には、脳及び肝臓に加え、更に、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、脳は同様にブアン固定を行った。

生後21日目及び11週目の脳を用いて、大脳のBregmaの後方約-3.5 mmの1カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面(2切面)が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 µm厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウスReelin抗体(x1000倍、Novus Biologicals, Inc., Co.)、抗マウスNeuN抗体(x100倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)、抗マウスCalb-D-28K抗体(Calbindin-D-28K; x500倍、IgG、Sigma Chemical Co.)、抗マウスGAD67抗体(glutamic acid decarboxylase 67; x50倍、IgG、Millipore Corporation)、抗ウサギFoxg1抗体(Forkhead Box G1; x800倍、IgG、LifeSpan Bioscience, Inc.)、抗マウスPCNA抗体(proliferating cell nuclear antigen; x200倍、IgG、Dako)を用いて、DAB発色にてABC法(Vector Lab. Elite kit)による免疫染色を行った。また、アポトーシスの評価のためにTUNEL染色(Apop Tag[®] in situ apoptosis detection kit、Millipore Corporation)を行った。GABA性介在ニューロンに発現する分子のReelin、Calb-D-28K、GAD67及びFoxg1並びに成熟ニューロンの指標であるNeuNについては、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。一方、生後もニューロン産生を継続するユニークな脳部位である海馬歯状回の顆粒細胞層下帯(増殖帯)において、増殖細胞の指標であるPCNA陽性細胞数とTUNEL染色によるアポトーシス細胞数の検索を行った。

<Mnを用いた発達期暴露影響評価>

発達期化学物質暴露モデルとして、MnCl₂·4H₂Oを飼料に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠10日目から離乳時(生後21日目)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と11週目に解剖を行った。動物はラットとマウスを用いて検討した。

まずラットの実験では、妊娠SD:IGSラット(日本チャールズリバー)を各群8匹使用し、予備試験結果を基に、公比5として、32、160、800 ppmの3用量を設定した。離乳時には、母動物に対する被験物質暴露を終了し、児動物は通常の基礎飼料であるCRF-1に切り替えて飼育した。母動物及び児動物は

実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。生後 21 日目及び 11 週目の解剖時には、脳、肝臓、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに 11 週目児動物の小脳を用いて、組織中の Mn 濃度を ICP-MS により測定した。

次にマウスの実験では、妊娠 ICR マウス（日本エスエルシー）を各群 10 匹使用し、ラットと同じく $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ について 32、160、800 ppm の 3 用量を設定した。離乳後、児動物は通常の基礎飼料である CRF-1 に切り替えて飼育した。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。生後 21 日目及び 11 週目の解剖時には、脳、肝臓、腎臓の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに 11 週目児動物の小脳を用いて、組織中の Mn 濃度を ICP-MS により測定した。生後 21 日目及び 11 週目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -1.0 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面（2 切面）が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Reelin 抗体（x1000 倍）、抗マウス NeuN 抗体（x1000 倍）、抗マウス GAD67 抗体（x50 倍）、抗マウス GFAP 抗体（glial fibrillary acidic protein; clone 6F2、x200 倍、Dako）、抗マウス PCNA 抗体（x200 倍）を用いて、DAB 発色にて ABC 法（Vector Lab. Elite kit）による免疫染色を行った。また、アポトーシスの評価のために TUNEL 染色を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin 及び GAD67 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。一方、増殖細胞の指標である PCNA 及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞については、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において、陽性細胞数の検索を行った。

<アクリルアミドを用いた発達期暴露影響評価>

予備実験として、妊娠 6 日目の雌性 SD:IGS ラットを、各群 4 匹ずつ 4 群に分け、ACR 0、25、50、100 ppm を離乳まで飲水投与した。ACR の飲水投与用量は、母動物に神経障害（中枢及び末梢の軸索遠位端障害）が確認された 100 ppm を最高用量として設定した（Takahashi et al., J Toxicol Sci. 2008; 33: 11-24）。また、2 匹は無処置のまま出産させ、生後 2 日から離乳までの間、新生児に ACR 50 mg/kg/day を週 3 回（全 9 回）腹腔内投与した。

児動物は生後 2 日目に出生児数、体重の測定および性別の判定を行い、生後 3 日目に母動物 1 匹あたり雌雄各 4 匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後 21 日の離乳時に、母動物とともに全例を解剖した。実験期間中は定期的に体重、摂餌量および摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、1=normal gait、2=slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)、3=moderately

abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)、4=severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) としてスコア化した。

離乳時の海馬歯状回における免疫染色として、Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA を行った。また、アポトーシスの評価として、Cresyl Violet 染色によって染色されるアポトーシス小体数の計測を行った。

In vitro 神経発達評価

全ての実験には C57BL/6j 系雄性マウスを使用した。

大脳皮質由来神経-アストロサイト共培養細胞の作製には、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、papain 酵素処理を行った。その後 1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて 1 週間ほど培養し、実験を行った。

大脳皮質由来初代培養アストロサイトの作製には、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、trypsin 酵素処理を行った。その後 1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて 1 週間ほど培養した。継代後再播種し、数日間培養して実験に用いた。

大脳皮質由来初代培養ミクログリアの作製には、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、trypsin 酵素処理を行った。その後、1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて 2 週間ほど培養した。常温で数分震盪することでミクログリアを選別し、再播種後数日間培養し、実験に用いた。

神経幹細胞の培養には、胎生 14 日齢マウス全脳より神経幹細胞を採取し、無血清培地、上皮増殖因子(EGF)存在下、浮遊状態で一週間培養した後、実験に用いた。

ES 細胞から神経幹細胞への誘導実験では、ES 細胞はマウス由来 EB3-1 を使用した。ES 細胞は血清培地、白血病阻害因子(LIF)存在下で数日間培養し、LIF を除去することにより、胚葉体形成を行った。継代後、線維芽細胞増殖因子(FGF)存在下 N2B27 培地にて培養することにより、神経幹細胞への誘導を行った。

各種細胞を用いて、免疫染色法、RT-PCR 法ならびに細胞生存試験である CellTiter-Glo ならびに CytoTox-Glo に従い検討を行った。

免疫機能評価

動物は、妊娠 2 日目（GD2）又は GD7 の BALB/c マウス（9~11 週齢）を日本エスエルシーより購入し、GD10 から飲水投与にてメタミドホスの暴露を開始した（1 群 7 匹）。メタミドホス濃度は、予試験では 0、1、10、100 ppm、本試験では 0、2、10、50 ppm とした。餌は通常の CRF-1 を用いた。出産後 3 週目（PNW3）まで暴露を継続し、その間一週おきに体重、摂餌量および摂水量を計測した。また、出産した仔

マウスの体重も同様に一週おきに計測した。仔マウスの数は1ケージあたり6~7匹となるように調節した。

PNW3の時点で全てのマウスを解剖し、肝臓・脾臓・胸腺の重量を測定した。また海馬を摘出し、RNAlater (Ambion) 中で保存し、後のmRNA解析のため4°Cで保存した。胸腺、脾臓、肝臓の一部試料は10%ホルマリンにより固定し、組織切片の作成並びに病理所見の観察を東京セントラルパソロジーラボラトリーに依頼した。

血液学的検査として、末梢血中の血球数は、マウス眼底より採血した血液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チューブに採取して混和し、多項目自動血球計数装置 (M-2000, Sysmex corp.) に供した。白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (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 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、および血小板数 (PLT) の測定を行なった。

血液生化学的検査として、母動物および仔動物について、末梢血より血清200 μ lを採取し、SRL社に委託して、肝機能としてA/G比、AST、ALT、および血清中コリンエステラーゼ活性 (ChE) の項目の検査を行なった。

ヘルパーT細胞 (Th)、細胞傷害性T細胞 (Tc)、ナチュラルキラー細胞 (NK) の免疫系臓器中の存在比率の解析においては、仔マウスの脾臓および胸腺を破碎して口径40 μ mのメッシュに通し、10 mlの10%FCSを添加したRPMI1640培地に懸濁した。トリパンブルー染色の後、Invitrogen Countessにより細胞数を計測し、チューブあたり 2×10^6 cellsを分注した。これを次の抗体により室温で30分間染色した。抗マウスCD3-PerCP、抗マウスCD4-FITC、抗マウスCD8a-APC、抗マウスNK1.1-PE。PBSで2回洗浄し、500 μ lのFACS stain bufferに懸濁し、フローサイトメータFACSAriaにより測定した。データはFlowJo (トミーデジタルバイオロジー) により解析した。

Thサブセットの解析として、細胞性免疫や炎症に関わるTh1、液性免疫やアレルギーに関わるTh2細胞外寄生性菌排除や自己免疫疾患に関わるTh17について、調製した細胞をLeukocyte Activation Cocktail with GolgiPlugにより37°Cで4時間刺激し、BioLegend 固定バッファーで一晩固定した。これをBioLegend 可溶化バッファーにより室温で15分間可溶化し、次の抗体により室温で1時間染色した。抗マウスCD4-FITC、抗マウスIFN- γ -PerCP-Cy5.5、抗マウスIL-4-PE、抗マウスIL-17A-APC。なお、これらの抗体のコントロールとして、非特異的ラットIgG1 κ にPerCP-Cy5.5、PE、APCをラベルしたアイソタイプコントロールによる染色を行ない、これによる染色レベルをカットオフポイントと設定した。測定および解析は、フローサイトメータFACSAria

により行った。

制御性T細胞の解析として、免疫抑制や腫瘍の増悪等に関わる制御性T細胞 (Treg) について、調製した細胞を、抗マウスCD4-FITCおよび抗マウスCD25-PEにより室温で30分間染色した後、細胞を固定・可溶化し、抗マウスFoxp3-APCにより室温で1時間染色した。測定および解析は、フローサイトメータFACSAriaにより行った。

データはMicrosoft Excelにより集計し、GraphPad Prism (GraphPad software Inc) を用いてDunnnettの検定を行なった。

感染感受性評価

メタミドホスの周産期暴露実験として、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11日後(GD10)からメタミドホス(0.01, 0.1, 1.0, 10 ppm)を溶解した飲料水を自由飲水により投与した。対照群には精製水を飲料水として与えた。また、餌(CRF-1)は自由摂取させた。出産後21日目(PND21)に離乳を行い、飲料水を精製水に切り替えて親・仔マウス共に通常飼育を行った。なお、摂餌量、摂水量、体重を週に一回測定した。

RSウイルス感染実験として、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 2×10^6 PFUを経鼻感染させた。感染実験対照マウスにはPBS(-)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として、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ウイルス増殖試験として、プラーク減少法によりメタミドホス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メタミドホス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。

肺洗浄液（BALF）中の IFN- γ の定量として、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、BALF 取得を行わなかった仔マウスより肺を摘出し、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。

発がん感受性評価

妊娠 17 日目の F344 雌ラットを各群 6 匹の 4 群に分け、ENU(20 mg/kg 体重)を 1 回尾静脈内投与し、分娩直後より離乳時まで、MnCl₂・4H₂O を 0.002、0.01 及び 0.05%濃度で混餌投与した。離乳後、各々の仔動物に母動物と同様の混餌投与を 35 週齢まで行う。この間基礎飼料のみを与えた群を対照とした。投与期間中、毎日神経症状の有無など一般状態を観察し、週 1 回体重および摂餌量を測定する。投与期間終了後、解剖時に脳及び脊髄を摘出し、肉眼的に見られる結節の大きさを測定した後、大脳 4 切片、小脳 2 切片、延髄 1 切片脊髄 6 切片(頸部、胸部及び腰部の各 2 切片)を切出し、パラフィン包埋切片、HE 標本を作製する。腫瘍性病変の種類、発生部位、サイズの測定を行う。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌ないし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、動物はすべてエーテルないしネンブタール深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、ウイルス感染実験、動物飼育、管理にあたっては、国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定、星薬科大学動物実験指針、国立医薬品食品衛生研究所動物実験及び組換え実験に関する指針、九州保健福祉大学動物実験に関する規則、米国国立保健研究所(NIH)が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

In vivo 神経発達評価

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低蛋白質食群の母動物については、体重は出産後 11 日から 21 日、摂餌量 (g/animal/day) は出産後 4 日から 21 日に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した。

低蛋白質食群の児動物については、体重は雌雄とも生後 0 日から 11 週までの実験期間を通じて正常蛋白質食群を有意に下回って推移した。低蛋白質食群の児動物の摂餌量 (g/animal/day) は雄で生後 5 週から 11 週、雌で出生後 8 週から 11 週に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した。

低蛋白質食群の児動物の臓器重量は、生後 21 日目の解剖時では、雌雄の脳及び肝臓の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雌雄の脳及び雄の肝臓の相対重量は正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した。生後 11 週目の解剖時では、雌雄の腎臓及び雄の肝臓並びに精巣の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雄の脳の相対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した。

GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin、Calb-D-28K、GAD67 及び Foxg1 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN の海馬歯状回門における陽性細胞数の検索では、生後 21 日及び 11 週のいずれにおいても低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった。

また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における、増殖細胞の指標である PCNA 及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検索においても、生後 21 日及び 11 週のいずれにおいても、低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった。

脳の病理組織学的検索を行ったところ、生後 21 日目において、小脳外顆粒細胞層の残存の程度が、低蛋白質食群の児動物において、正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示した。

<Mn を用いた発達期暴露影響評価> ラット :

各濃度の Mn 投与群の母動物の体重は妊娠 10 日から出産後 21 日までの投与期間を通じて、対照群との間に差はみられなかった。摂餌量 (g/animal/day) は出産後 11 日に 160、800 ppm で有意差がみられたものの、妊娠 10 日から出産後 21 日までの投与期間を通じて、対照群とほぼ同様に推移した。

各濃度の Mn 投与群の児動物の体重及び摂餌量 (g/animal/day) は、雌雄とも生後 0 日から 11 週までの実験期間を通じて、対照群との間に差はみられなかった。

各濃度の Mn 投与群の児動物の臓器重量は、生後 21 日目及び 11 週目のいずれの解剖時においても、対照群との間に差はみられなかった。

暴露終了時の母動物の小脳組織中 Mn 濃度では、各投与群と対照群との間に差はみられなかった。生後 21 日の児動物の小脳組織中 Mn 濃度は、対照群に比べ、32 ppm で高値傾向が、160 及び 800 ppm で有意な高値がみられた。しかし、生後 11 週の児動物の小脳組織中 Mn 濃度では、各投与群と対照群との間に差はみられなかった。

マウス：

母動物は、妊娠期間中には体重の変動を認めなかったが、出産後 8 日目以降に 160 ppm 以上で、統計的に有意ではないものの体重の低値傾向を認めた。摂餌量に関しては、妊娠 15 日目、出産後 8-21 日目までの間に 800 ppm で有意な低値を認めた。

出生後の児動物に関しては、体重は雄で 17 日目に 800 ppm で、21 日目に 160 ppm 以上で低値を示したが、雌では 21 日目でのみ 800 ppm で有意な低値を認めた。暴露終了後は雄のみの観察となるが、4-9 週の間は 160 ppm 以上で、10 週目では 800 ppm で有意な低値を示した。

臓器重量に関しては、離乳時では、脳、肝臓、腎臓とも絶対重量の低値を示し、肝臓では、雄で 32 ppm 以上で、雌で 800 ppm で有意に、腎臓では雄で 160 ppm 以上で、雌で 800 ppm で低値を示した。

小脳の Mn 濃度は、母動物では群間に差を認めなかった。児動物は離乳時ではなだらかなスロープではあるが用量依存的の増加を示し、160 ppm 以上で有意を示した。11 週目では、スロープは更になだらかであるが、32 ppm 以上で有意に増加した。

海馬歯状回での Reelin 陽性細胞数は、離乳時に 160 ppm 以上で用量依存的に増加し、11 週目では 800 ppm で増加を示した。NeuN 陽性細胞数は、離乳時、11 週目共に 800 ppm で有意に増加を示した。離乳時に検討した GAD67 陽性細胞数は 800 ppm 群で増加を示した。海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数は 800 ppm 群で有意に増加したが、PCNA 陽性細胞数は変動を示さなかった。一方、海馬歯状回門に観察された GFAP 陽性細胞は細胞質に乏しい小型の細胞で、その数は 160 ppm 以上で増加し、800 ppm で増加は有意であった。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

母動物と児動物の生殖発生毒性影響、軸索遠位端障害に関する病理組織学的検索の結果、HPLC による血漿中の ACR の測定結果については、既に報告してある(Takahashi et al., Arch Toxicol., 2009)。概略としては、母動物は、50 ppm 群以上で歩行異常が進行した。生殖発生毒性影響については群間で明らかな差を認めなかった。児動物は、飲水投与群では臨床症状の異常を認めなかったが、腹腔内投与を受けた児動物では、生後 15 日頃から成熟動物と類似した歩行異常が観察された。病理組織学的検索で、飲水投与群の児動物では、100 ppm 群で小脳外顆粒層細胞の残存と精上皮の発達遅延が認められたのみで、神経障害を示唆する所見は得られなかった。一方、腹腔内投与を受けた児動物では、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経の中心性色質融解が観察された。軸索遠位端障害に関しては、飲水投与群の児動物では、0 ppm 群と 100 ppm 群の間で、いずれのパラメーターも有意な差

は認められなかった。腹腔内投与児動物では、雌雄ともに坐骨神経における変性軸索および萎縮した有髄神経線維の増加が認められた。しかし、小脳分子層における synaptophysin 陽性の異常な点状染色像の増加は明らかではなかった。HPLC による血漿中の ACR の測定では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても ACR は検出されなかった(検出限界: 1 µg/ml)。同様に、100 ppm 群の児動物の胃内乳汁からも ACR は検出されなかった。GC/MS による血球中の ACR-Hb 付加体量は、母動物では ACR の投与用量に応じて増加傾向を示し、個体ごとの ACR 摂取量と高い相関性を示した。児動物においても用量に応じた増加傾向を示したが、その量は母動物の 1/10 以下であった。

今回新たに検索した項目では、離乳時の海馬歯状回門における Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA の免疫染色を行った結果、各群内における数値の雌雄間での明らかな差を認めなかったため、雌雄を併せて群間の比較を行った。その結果、ACR を投与した全群で Reelin 陽性細胞が増加を示したが、50 ppm と 100 ppm 群の間で増加数に明らかな差を認めなかった。腹腔内投与群でも、Reelin 陽性細胞は増加を示した。GAD67 陽性細胞は Reelin と同様の増加を示し、統計的有意差は 50 ppm 以上で認められた。腹腔内投与群でも、Reelin と共に GAD67 陽性細胞は増加を示した。海馬歯状回顆粒細胞層下帯における PCNA 陽性細胞数は群間で明らかな差を認めなかった。一方、アポトーシス小体の出現は少なかったものの、対照群に対して 100 ppm ACR 群と腹腔内投与群で有意な低値を示した。

In vitro 神経発達評価

初代培養神経-アストロサイト共培養細胞に MnCl₂ を処置しても、β III-tubulin 陽性神経細胞ならびに GFAP 陽性アストロサイトの免疫活性に変化は認められなかった。一方、初代培養マイクログリアへの MnCl₂ 処置 (100 nM-10 µM) により、マイクログリアの活性化傾向が認められた。更に、ES 細胞への MnCl₂ を処置 (10 µM, 100 µM) により、ES 細胞自身の生存率ならびに増殖率について CellTiter-Glo ならびに CytoTox-Glo に従い検討を行ったところ、ES 細胞の生存率ならびに増殖に変化は認められなかった。また、MnCl₂ の処置により、ES 細胞の形態に変化は認められなかった。一方、胚葉体形成時に MnCl₂ を処置し ES 細胞より誘導した神経幹細胞において、ドパミン神経の転写に関与する sonic hedgehog (Shh) ならびに LIM homeobox transcription factor 1 alpha (Lmx1a)、セロトニン神経の合成酵素である tryptophan hydroxylase 2 (Tph2) およびアセチルコリンの分解酵素である acetylcholin esterase (AChE) の発現抑制が認められた。更に、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞への MnCl₂ (100 nM) 処置により、アストロサイトへの分化誘導促進傾向が認められた。

免疫機能評価

予試験として0, 1, 10, 100 ppmのメタミドホスの飲水投与を行なったが、プラグが確認されたBALB/cマウス28匹中6匹しか出産をしなかったため、妊娠初期(GD2)における動物の運搬がストレスになった可能性が疑われた。このため本試験では、GD7で運搬することとしたが、この場合も28匹中7匹しか出産しなかった(うちControl群で3匹)。実験に用いたマウス系統はBALB/cであるが、免疫系に関する実験では一般的に用いられるこの系統は、ストレスに対して非常に敏感であることも知られており、本研究のように出産を伴う実験のためには、匹数を更に増やす等の更なる工夫が必要と考える。出産数としては当初予定していたよりも過少であったが、本試験0, 2, 10, 50 ppm暴露群のうち0, 2, 10 ppmまでは仔マウスが雌雄それぞれ4匹以上確保できたので、これを用いて解析することとした。

母マウスおよび成熟雌マウスにおけるメタミドホスの暴露は、50 ppmまでの濃度では体重や臓器重量に異常を来さないことが分かった。一方、仔マウスにおいては、脾臓および胸腺の絶対重量の有意な低値が雌雄ともに認められた他、相対重量についても一部低値が認められた。

次に、赤血球関係のパラメーターでは、母マウスの最高用量群(50 ppm)において若干の抑制が認められたがおおむね大差はなかった。一方、白血球数については、出産群を除いた成熟雌動物において10 ppm以上で有意な減少が認められた他、雄仔マウスにおいても10 ppmで有意な減少を示した。母動物および雌仔マウスで有意差が付かなかったのは、主に個体間のばらつきによるものと思われた。

次に、母マウス、成熟雌マウス、仔マウスにおけるメタミドホス暴露の肝機能への影響および血清中ChE活性への影響を調べた。なお、仔マウスについては雌雄複数匹分の血清を合わせて必要量を確保している。

血清中ChE活性は全ての動物で用量依存的に抑制されており、有機リン系農薬であるメタミドホスが親動物へ直接的に、そして仔動物へも間接的に作用していることが示された。仔マウスにおいては、10 ppm群において有意なASTの上昇が認められた。

次に、フローサイトメトリーにより、脾臓および胸腺リンパ球のサブセット解析を行なった。リンパ球フラクション中の各種表面抗原陽性集団の存在比率を計算した結果、総T細胞、CD4単独陽性細胞(SP)およびCD8a SPが雄仔マウス脾臓において有意に増加していた。

Th細胞のうち、Th1、Th2およびTh17を分離するため、核内抗原(転写因子T-bet, GATA-3, ROR γ t)または細胞内サイトカイン(IFN- γ , IL-4, IL-17A)の発現をフローサイトメトリーにより調べたが、いずれの場合も陽性集団が極めて少なく(<0.5%)、定量的な解析には不向きであった。

最後に、Tregの存在比率を解析したが、Tregのマーカーには複数種の抗原が知られており、CD4およびFoxp3陽性集団とした場合と、CD4およびCD25陽性集団とした場合のそれぞれについて調べた。この場合、CD4およびFoxp3陽性集団が最高用量群の雄仔マウスにおいて有意に増加していた。

0, 2, 10 ppm投与仔マウスの免疫系臓器(脾臓、胸腺、肝臓)の病理学的所見解析においては、肝臓には異常がみられなかったが、10 ppm投与仔マウスにおいて胸腺、脾臓の一部に萎縮がみられたものがあった。なお、海馬mRNAの炎症系マーカーの発現解析については、現在解析中である。

感染感受性評価

メタミドホス周産期暴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暴露期間中の摂餌量を調べた。最高用量である10 ppm暴露により親・仔マウスともに体重増加の抑制が認められた。しかし、異常行動や親マウスでの摂餌量の低下などは見られなかった。

まずメタミドホスのRSウイルス増殖への直接的な影響をin vitro増殖試験で検討した。陽性対照化合物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、メタミドホスは最高濃度100 μ Mまでウイルス増殖に全く影響を与えなかった。そこで、メタミドホス暴露仔マウスへRSウイルスを感染させ、以後の評価を実施した。RSウイルス感染進行の指標の一つである感染5日後のBALF中のIFN- γ レベルをELISAで測定した。メタミドホス1.0 ppm暴露群では、対照群と比較して有意に上昇したが($P<0.05$)、10 ppmではそのような結果が得られず、暴露影響の用量依存性が認められなかった。次に、仔マウスの感染5日後の肺組織中のRSウイルス感染価をプラーク法で測定した。感染価は、IFN- γ の結果と同様に1.0 ppm暴露群でのみ有意に($P<0.01$)上昇したが、その程度は1.5倍と小さく、かつ用量依存性が認められなかった。最後に、0.1および10 ppmのメタミドホスの周産期暴露を受けた仔マウスの肺組織について、病理組織学的な検証を行った。その結果、メタミドホス暴露を受け、ウイルスを感染させていないマウスにおいて、特に病的な所見は得られなかった。そしてRS感染マウスにおいても、明確な肺炎の増悪化は確認されなかった。

発がん感受性評価

ENUによる妊娠17日目のイニシエーション後、妊娠期間、分娩匹数及び性比において群間に明らかな差は認めなかった。授乳期間中、Mnの投与による母動物の神経症状の発生はみられず、体重及び摂餌量への影響も認められなかった。授乳期間を通した1日当たりのMnの平均摂取量は飼料中Mn濃度に応じて増加した。仔動物については35週間の実

験期間中、雌において21週目に右斜頸及び削瘦がみられた0.002%群1匹、25週目に前肢麻痺及び削瘦がみられた対照群1匹及び腹式呼吸及び削瘦がみられた0.002%群1匹、28週目に腹式呼吸及び削瘦がみられた対照群1匹を切迫屠殺した結果、いずれにも三叉神経又は脊髄等の中枢神経系に肉眼的病変が認められた。また、24週目に0.05%群1匹が死亡したが、切出し時、脳腫瘍が認められた。雄において、28週目に削瘦及び四肢麻痺がみられた0.002%群1匹を切迫屠殺し、延髄に肉眼的な病変が認められた。Mnの投与による雌雄の仔動物の体重、摂餌量及び死亡率への影響は認められていない。

D. 考察

In vivo 神経発達評価

<低栄養の脳発達に及ぼす影響の確認>

我々がこれまで行ってきた実験により、ラットに抗甲状腺剤を発達期暴露することにより、児動物の海馬歯状回門において成熟後まで持続するReelin陽性介在ニューロンの増数と共に、甲状腺機能低下に起因する体重及び脳重量の低値を認めている。しかし、今回明らかとなった低蛋白質食を用いた発達期低栄養実験では、持続する体重低値と共に、小脳外顆粒細胞の残存を認めて脳発達遅延を誘発したものの、介在ニューロンでのReelin、Calb-D-28K、GAD67及びFoxg1の発現は変動を示さなかった。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索においても、低栄養の影響は認められなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延においては、介在ニューロンは変動を示さないことから、海馬歯状回門における介在ニューロンの変動の検索は、投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

<Mnを用いた発達期暴露影響評価>

ラットを用いたMn暴露実験については、動物実験を終了し、組織中のMn濃度測定までを実施した。実験期間中の母動物及び児動物の体重並びに摂餌量には、Mn投与の影響はみられず、児動物の臓器重量についても、生後21日目及び11週目のいずれの解剖時においても、Mn投与の影響はみられなかった。小脳組織中Mn濃度については、母動物では変動はみられなかったが、児動物では暴露終了時の生後21日において、32 ppmから上昇が認められ、160及び800 ppmでは有意差もみられた。しかし、生後11週の児動物では、各濃度のMn投与群と対照群との間に差はみられなかった。今後の実験では、海馬歯状回のみならず、各脳領域でReelin、Calb-D-28K、GAD67、Foxg1を始めとする神経発達関連分子の発現変動を検討する予定である。

Mnは発達期暴露により、基底核のドパミン作動

性ニューロンの選択的障害を誘発することが報告されているが、マウスに於いて、今回初めて離乳時から海馬歯状回門でのReelin陽性細胞数の増加を確認し、最高用量では、成熟後でも増加が持続した。同様に、最高用量でNeuN陽性細胞が離乳時から増加を示した。Reelinは甲状腺ホルモン調節遺伝子であり、ニューロンの移動や位置情報を決定する分子である。Reelin陽性細胞はこの部位でGABA性介在ニューロンに発現することが知られており、Mn暴露によって、離乳時のみでの検索であるがGAD67陽性細胞も増加を示したことから、海馬歯状回での顆粒細胞の移動異常が成熟後まで引き続いて生じたものと考えられた。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索において、増殖細胞数には影響を認めなかったものの、最高用量でアポトーシス細胞数の増加を認めている。以上の結果から、Reelin陽性細胞数の歯状回門での増加は、ニューロンの移動異常のみならず、ニューロン新生障害も反映している可能性が示唆された。

また、Mnはグリオーシスを生じることが報告されているが、本研究に於いてもマウスの歯状回門における、小型で細胞質の乏しいGFAP陽性細胞の増加を認めた。ところが、グリオーシスに見られるような原形質性ないし線維性アストログリアの形態を示さないことから、これらの細胞の増加は単純にグリオーシスを反映したものであるかは、今後の検討が必要である。

<ACRを用いた発達期暴露影響評価>

ACRは従来、軸索遠位末端を傷害することが知られており、我々が既に報告したように、その軸索末端傷害性の感受性は発達期から存在し、ACRの児動物に対する直接投与により、成熟動物と同等の傷害性を有する。ただし、母動物を介したACRの暴露では、少なくとも経乳的暴露では母動物に対する神経障害を初めとする全身毒性により、児動物に乳汁を介したACRの移行が極端に少なく、赤血球中のHb-ACR付加体量で比較すると、母体血中の1/10以下の移行しか確認されない。そのことを反映して、母動物を介した暴露では末梢神経障害などの遠位軸索末端傷害性の生じないことが考えられる。ところが、今回の検索により、暴露量が少ないにもかかわらず、明らかな成長遅延を示さない低用量群(平均摂取量: 3.7 mg/kg/day)から歯状回門に於いて、Reelin陽性GABA性介在ニューロンが増加を示し、このことは、ACRの発達影響として、比較的低用量からのニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。また、顆粒細胞層下帯における高用量群および腹腔内投与群でのアポトーシスの減少は、Mnとは異なるACRによるニューロン発達障害に対する保護作用の可能性が示唆された。

In vitro 神経発達評価

得られた結果より、 $MnCl_2$ は中枢神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の発生過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。作用点等は未だ不明なため、次年度は引き続き、他の神経毒と平行し、 $MnCl_2$ についても同様に検討を行う。

免疫機能評価

メタミドホスの成熟マウスにおける免疫影響としては、1.2 および 6 mg/kg 体重/日において、顕著なリンパ球および単球の減少、好中球の増加、胸腺および脾臓の重量および細胞数の減少、胸腺細胞の増殖の減少、骨髄細胞の増殖の増加、および抗体産生の減少等が Tiefenbach らにより報告されている。しかし、発達期におけるメタミドホスの経胎盤・経授乳暴露が仔マウス免疫系に及ぼす影響はこれまで解析されていなかった。

別の有機リン系農薬クロルピリホスを新生児ラットに投与した実験では、T 細胞応答の減弱などが観察されている。

本年度の、メタミドホスの経胎盤・経授乳暴露による仔マウスの免疫機能影響に関する研究において、10 ppm 投与群において、胸腺、脾臓重量の減少がみられ、免疫毒性のあることが観察されたが、その作用メカニズムについては、まだ不明であるが、血中の ChE 活性が、仔マウスにおいても有意に減少していることから、メタミドホスの持つ ChE 抑制活性による以下の直接的、また間接的影響が考えられる。

直接的影響としては、神経伝達物質として知られるアセチルコリンは、リンパ球にも直接的に作用し、カルシウムシグナルなど様々な細胞応答を引き起こすことが知られている。リンパ球には、ムスカリニック受容体やニコチン受容体、アセチルコリン合成酵素等のコリン作動系の要素が機能的に発現しているため、アセチルコリンの末梢リンパ器官における直接作用がメタミドホスにより阻害された可能性も考えられる。一方、間接的影響としては、前述の Tiefenbach らにより、メタミドホス投与により、血中のコルチゾールの濃度上昇がみられること、副腎摘出ラットにおいてはメタミドホス投与による免疫抑制効果が観察されなくなることが報告されていることより、メタミドホスの ChE 阻害によるストレスにより刺激を受けた副腎から産生されるコルチゾールにより間接的な免疫系の抑制影響が引き起こされる可能性も考えられる。

今回のメタミドホスの免疫機能研究のリンパ球のポピュレーションに関する研究では、10 ppm 投与群の仔マウス脾臓における総 T 細胞、CD4 単独陽性細胞 (SP) および CD8a SP の有意な増加が観察されたが、CD4 陽性細胞の中では、制御性 T 細胞の有意な増加が観察されていること、抑制性の T 細胞である CD8-SP 陽性細胞の割合の上昇の方が CD4-SP 陽性細胞の割合の上昇より大きくみられることから、全体として抑制性の T リンパ球のポピュ

レーションの増加傾向が観察された。なお、血液中のアルブミン/グロブリン(A/G)比に農薬投与の影響はみられなかったため、抗体産生には影響を与えていないものと考えられた。

今後、発達期のマウスへの農薬の影響が成熟後のマウスに及ぼす影響についても検討を行ってゆきたいと考えている。また、有機リン系農薬の作用メカニズムを考えるうえでニコチン投与による免疫影響も興味ある検討課題であると考えられる。

感染感受性評価

メタミドホス (0.01~10 ppm) の周産期暴露により、仔マウスの RS ウイルス感染病態の明確な増悪化は見られなかった。この化合物の生物学的な影響に関しては、中枢系への報告が複数あるが、免疫系に関しては皆無である。しかしながら、1.0 ppm 暴露群でのみ二種類の感染影響指標 (IFN- γ レベルと感染価) が応答したが、用量依存性が得られなかった。今回の試験では、RS 感染対照群における肺組織感染価が余り高くなかつ病理組織学的な所見でも肺炎の程度が軽いため、1.0 ppm 暴露を中心に追試験を実施する必要がある。

今回の試験では、メタミドホスの水溶性が高いことから飲料水での暴露を実施した。実際、この方法でメタミドホスの暴露試験が複数報告されている。混餌投与にすることでこの化合物のリンパ系への移行が若干改善する可能性も考えられ、追試験時に併せて検討したい。

発がん感受性評価

ENU を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより、Mn の発達期暴露による発がん修飾作用について検討を行っている。3月19日現在35週中29週齢目である。

21 週目より切迫屠殺解剖例及び死亡例が認められた。同程度の濃度の ENU を経胎盤暴露したことにより同時期に死亡例を認めた報告 (Perantoni et al., *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 84, 6317-6321, 1987) と一致する結果となった。しかし、現在までの母動物と仔動物の体重、摂餌量及び仔動物の死亡率について、Mn の投与による明らかな影響は認められなかった。

最終屠殺時の腫瘍発生を比較し最終評価する。

E. 結論

In vivo 神経発達評価では、神経発達影響評価系の確立を分担課題として、本年度明らかになったこととして、マウスの Mn 暴露実験では、いわゆるマンガニズムの標的として従来言われてきた大脳基底核とは異なる脳部位である海馬歯状回門での、成熟後まで持続する Reelin 陽性細胞数の増加を見出し、それは顆粒細胞のニューロンの移動異常のみならず、増殖下帯でのニューロン新生障害も反映して生じている可能性が示唆された。また、GFAP 陽性細

胞も歯状回門で増数することが確認された。ACR に関しては、軸索遠位端障害を生じない、母動物を介した経胎盤・経乳暴露により、今回初めて Reelin 陽性 GABA 性介在ニューロンが増加を示すことが明らかとなった。このことは、ACR の発達影響として、ニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。低蛋白質食を用いた発達期低栄養に起因する脳発達遅延では、Reelin を含む GABA 性介在ニューロンのいずれの指標も発現変動を示さず、増殖下帯での細胞増殖とアポトーシスにも変動を認めなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延では、介在ニューロンは変動を示さないことから、海馬歯状回門における介在ニューロンの変動の検索は、投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

In vitro 神経発達評価では、神経毒の中樞神経系細胞ならびに発生過程に及ぼす影響として、今年度は $MnCl_2$ を用い検討を行った。今回の検討より、 $MnCl_2$ は中樞神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の発生過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。

免疫機能評価では、メタミドホスが発達期の免疫系に及ぼす影響を検討するために、BALB/c マウスを用いて、妊娠 10 日目から分娩後 3 週間の親マウスに飲水投与を行い、3 週齢の仔マウスの血液学及び血液生化学的解析、胸腺、脾臓リンパ球のポピュレーション解析等を行った。メタミドホスの用量設定の予試験として、公比 10 として 0, 1, 10, 100 ppm の濃度でメタミドホスを飲水投与したが、100 ppm 群においては母動物の顕著な体重減少などが認められたため、再試験においては公比を 5 とし、0, 2, 10, 50 ppm と設定したところ、最高用量においても体重減少のない暴露を実施できた。しかし、50 ppm では、出生率の低下が認められたため、仔マウスの免疫系への影響評価は、10 ppm 以下の投与群にて行った。その結果、10 ppm 群の仔マウスの胸腺および脾臓重量の減少、血液中の白血球数の減少、脾臓リンパ球中の CD4 および CD8 陽性細胞、制御性 T 細胞の相対的な増加等が観察された。

感染感受性評価では、今年度の試験では、メタミドホス (0.01~10 ppm) の周産期暴露により、仔マウスの RS ウイルスへの感染感受性の明らかな影響は見られなかった。

発がん感受性評価では、ENU を経胎盤暴露した中樞神経発がんモデルにより最高 0.05%濃度で $MnCl_2$ を混餌投与した際の発がん修飾作用を検討している。3 月 19 日現在 35 週中 29 週齢目である。最終屠殺時の腫瘍発生を比較し最終評価する。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibutani, M., Woo, G-H., Fujimoto, H., Saegusa, Y., Takahashi, M., Inoue, K., Hirose, M., Nishikawa, A.: Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. *Reprod. Toxicol.* 28(3): 297-307, 2009.

Saegusa, Y., Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Mitsumori, K., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani M.: Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod. Toxicol.* 28(4): 456-467, 2009.

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Igarashi, K., Kanno, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Gene expression profiling and cellular distribution of molecules with altered expression in the hippocampal CA1 region after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *J. Vet. Med. Sci.* 72(2): 187-195, 2010.

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Kemmochi, S., Shimamoto, K., Hirose, M., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reprod. Toxicol.* (in press).

Kuzumai, N., Iketami, D., Tamura, R., Hareyama, N., Sasaki, T., Niikura, K., Narita, M., Miyashita, K., Imai, S., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T., Suzuki, T., Narita, M.: Hippocampal epigenetic modification at the brain-derived neurotrophic factor gene induced by an enriched environment. *Hippocampus*, 2010, (in press).

Kuzumai, N., Iketami, D., Tamura, R., Sasaki, T., Niikura-Imai, S., Narita M., Torigoe, K., Niikura, K., Takeshima, H., Ando, T., Igarashi, K., Kanno, J., Ushijima, T., Suzuki, T. Narita, M. : Hippocampal epigenetic modification at the doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. *Synapse.*, 2010, (in press).

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Imai, S., Narita, M., Tamura, R., Yajima, M., Suzuki, A., Miyashita, K., Takeshima, K., Ando, T., Ushijima, T., Suzuki T., Narita, M.: Enhanced IL-1 β production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse.*, 2010, (in press).

Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Hirose, A., Kurokawa, M.: Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 10(4):

393-397, 2010.

2. 学会発表

三枝 由紀恵、富士本 仁、禹 桂炯、川合正臣、松本 明、西川秋佳、三森 国敏、渋谷 淳：

Reelinを指標とした不可逆的脳発達遅延評価法の確立、神経組織の成長・再生・移植研究会 第24回学術集会、伊香保（2009.6.21）（p.19）

三枝 由紀恵、富士本 仁、禹 桂炯、川合 正臣、松本 明、金 美蘭、広瀬 雅雄、西川 秋佳、三森 国敏、渋谷 淳：発達期神経毒性暴露に起因するニューロン分布異常に対する影響評価系の確立 - Calbindin 陽性小脳プルキンエ細胞の検討 - (Aberrant neuronal cell distribution for detection of developmental neuronal toxicants: analysis of the distribution of calbindin-expressing cerebellar Purkinje cells) 第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡（2009.7.6-8）（P-24）

小川文一郎、三枝由紀恵、大石 功、Wang Liyun、高橋美和、中東 淳、三森国敏、渋谷 淳：アクリルアミドの発達期暴露によるラット海馬歯状回でのGABA性介在ニューロンの反応。第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集、p. 56 (O-15)、2月3,4日、2010

三枝由紀恵、禹 桂炯、富士本仁、剣持 明、嶋本敬介、広瀬雅雄、三森国敏、西川秋佳、渋谷 淳：ラットの発達期甲状腺機能低下に起因して海馬歯状回に増加するReelin陽性細胞の特性。第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集、p. 102 (P-84)、2月3,4日、2010

渋谷 淳：発達期と化学物質、厚生労働省 化学物質リスク研究推進事業 シンポジウム「化学物質と環境・健康」2010年2月18日（於 仙台）、3月2日（於 東京）

池上大悟、成田 年、葛巻直子、今井哲司、新倉慶一、水尾圭祐、鶴川百合、鈴木 勉：環境ホルモンの胎児期および授乳期暴露によるエピジェネティックな脳神経機能発達の制御、第18回日本臨床精神神経薬理学会・第38回日本神経精神薬理学会合同年会、10月、東京、2008

葛巻直子、成田 年、成田道子、矢島真理絵、池上大悟、牛島俊和、安藤孝将、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：脳高次機能障害をきたす病態下におけるエピジェネティクス異常を伴った幹細胞からの神経/グリア細胞分化の均衡破綻、第18回神経行動薬理若手研究者の集い、横

浜、3月、2009

矢島真理絵、成田 年、葛巻直子、成田道子、武井大輔、鈴木 勉：幹細胞からの神経分化誘導に及ぼすdopamine D2 および D3 受容体の役割、第18回神経行動薬理若手研究者の集い、横浜、3月、2009

Naoko Kuzumaki, Minoru Narita, Marie Yajima, Michiko Narita, Satoshi Imai, Yohei. Okada, Hirota James Okano, Hideyuki Okano, Tsutomu Suzuki : Role of dopamine D3 receptor function in the neural differentiation from embryonic stem cells, The International Narcotics Research Conference (INRC), Portland, USA, July, 2009

葛巻直子、成田年、矢島真理絵、今井哲司、成田道子、古田貞由、築地こずえ、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：ES細胞からの神経分化誘導過程におけるmicroRNA発現変化に対するオピオイドの影響、Japanese Narcotic Research Conference 第30回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、8月、東京、2009

矢島真理絵、成田 年、葛巻直子、成田道子、今井哲司、古田貞由、築地こずえ、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：ES細胞から神経あるいはグリア細胞への分化における δ -オピオイド受容体刺激の影響、Japanese Narcotic Research Conference 第30回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、8月、東京、2009

葛巻直子、成田 年、矢島真理絵、築地こずえ、成田道子、古田貞由、今井哲司、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：オピオイドによる幹細胞分化制御、第44回日本アルコール・薬物医学会総会、9月、横浜、2009

葛巻直子、成田 年、矢島真理絵、成田道子、今井哲司、古田貞由、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：ES細胞からの神経分化における μ -オピオイド受容体の関与、第32回日本神経科学大会、9月、名古屋、2009

矢島真理絵、葛巻直子、成田 年、成田道子、今井哲司、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：Dopamine D3 受容体刺激によるES細胞からの神経分化の促進、第32回日本神経科学大会、9月、名古屋、2009

矢島真理絵、葛巻直子、成田 年、成田道子、今井哲司、古田貞由、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：発達期および老齢期における幹細胞機能の多角的解析、第121回日本薬理学会関東部会、10月、東京女子医、2009

葛巻直子、成田 年、矢島真理絵、成田道子、今井哲司、古田貞由、築地こずえ、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：発達期ならびに成体期の神経新生における δ -オピオイド受容体刺激の影響，第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会，11 月，京都，2009

矢島真理絵、成田年、葛巻直子、成田道子、今井哲司、古田貞由、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：ES 細胞から神経細胞への分化過程における dopamine の関与，第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会，11 月，京都，2009

Rie Tamura, Daigo Ikegami, Minoru Narita, Yuri Tsurukawa, Michiko Narita, Takayuki Ando, Hideyuki Takeshima, Satoshi Imai, Naoko Kuzumaki, Toshikazu Ushijima and Tsutomu Suzuki: Implication of epigenetic control in the abnormal glial differentiation induced by the prenatal and neonatal exposure to environmental endocrine disrupters, 第 19 回日本臨床精神神経薬理学会・第 39 回日本神経精神薬理学会 合同年会，11 月，京都，2009

葛巻直子、成田 年、矢島真理絵、成田道子、今井哲司、古田貞由、岡田洋平、岡野ジェイムス洋尚、岡野栄之、鈴木 勉：ドパミンおよびオピオイド受容体刺激による幹細胞分化への影響，第 32 回日本分子生物学会年会，12 月，横浜，2009

渡辺 渡、清水寛美、澤村理英、黒川昌彦：環境化学物質テトラブロモビスフェノール A の RS ウイルス感染初期免疫応答への作用，第 57 回日本ウイルス学会学術集会，東京，第 57 回日本ウイルス学会学術集会抄録集：2P161, p480, 10 月，2009

渡辺 渡、清水寛美、澤村理英、黒川昌彦：臭素化難燃物質テトラブロモビスフェノール A の RS ウイルス感染免疫応答への作用，日本薬学会第 130 年会，岡山，3 月，2010

Watanabe W., Shimizu T., Sawamura R., Hino A. Kurokawa M.: Effects of tetrabromobisphenol a (TBBPA) on the host immune response to respiratory syncytial virus (RSV) infection in mice., Society of Toxicology 49th Annual Meeting, Salt Lake City: #1542, March, 2010

松岡英樹、好村守生、穂山浩、坂田こずえ、天倉吉章、吉田隆志、手島玲子：培養ヒト樹細胞における Oenothien B の影響について，第 16 回日本免疫毒性学会学術大会 (2009.8)

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

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21年度）
 有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質暴露影響評価手法の確立に関する研究
 分担研究名 In vivo 神経発達評価

分担研究者 渋谷 淳 東京農工大学大学院共生科学技術研究院 動物生命科学部門 准教授

研究要旨：神経発達影響評価系の確立を分担課題として、ラットやマウスを用いて、マンガン（Mn）やアクリルアミド(ACR)の発達期暴露による、海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロンに発現する分子の発現変化及び歯状回顆粒細胞層下帯における細胞増殖性とアポトーシスの変動を検討した。また、ラットに低蛋白質食を与えて発達期低栄養での同様の検討を行い、高用量の化学物質暴露によって生じる様な非特異的な低栄養性の脳発達遅延における、介在ニューロンに与える影響の有無を検索した。ラットを用いた Mn 暴露の動物実験は終了し、解析を継続している。マウスに於いては、従来報告されている、いわゆるマンガニズムの標的である基底核とは異なる歯状回門での、成熟後まで持続する Reelin 陽性細胞数の増加を新たに見出し、それは顆粒細胞のニューロンの移動異常のみならず、増殖下帯でのニューロン新生障害も反映して生じている可能性が示唆された。また、GFAP 陽性細胞も歯状回門で増数することが確認された。ACR に関しては、以前報告してあるように、母動物を介した経胎盤・経乳暴露によっては、少なくとも経乳的には母動物の血中 ACR の 1/10 以下しか児動物への移行が生じないため、母動物に見られるような軸索遠位端障害は生じなかったものと考えられるが、今回の検索により初めて歯状回門で Reelin 陽性 GABA 性介在ニューロンが増加を示すことが明らかとなった。このことは、ACR の発達影響として、ニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。また、Mn とは異なる顆粒細胞層下帯でのアポトーシスの減少は、ACR によるニューロン発達障害に対する保護作用の可能性を示唆した。発達期低栄養に起因する脳発達遅延では Reelin を含む GABA 性介在ニューロンのいずれの指標も発現変動を示さず、増殖下帯での細胞増殖とアポトーシスにも変動を認めなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延では介在ニューロンは変動を示さないことから、このニューロンの検索は投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

A. 研究目的

化学物質の管理体制に関連して、将来計画に対応できる化学物質の評価手法の高度化が望まれており、その一つとして乳幼児期を含む発達期暴露による評価系の確立が挙げられる。その中でも特に神経毒性や免疫毒性、発がん性に関する高度な定量・定性的評価系の確立が急務である。

本分担研究では、発達期の神経毒性に関して、ラットやマウスなどのげっ歯類動物を用いた暴露実験を行い、有害作用を受ける標的細胞系譜の同定とその影響メカニズムの解明に基づいた評価系の構築を行う。モデルとなる神経発達毒として、マンガン

(Mn)、アクリルアミド(ACR)、クロルピリフォス、ニコチン等を年次毎に用い、ニューロン、グリアの分化・移動に関わる分子のラット脳部位での発現変化を検討し、成熟後でのニューロン・グリアの分化指標を定量解析して反応の不可逆性を検討する。また、化学物質暴露時にみられる非特異的な低栄養性の脳発達遅延影響を弁別するため、動物に低蛋白質食を与えて低栄養性の脳発達遅延を作出し、我々が検討を進めている介在ニューロンを中心とした脳発達影響指標に対する影響の有無を検討する。更に、暴露マウスのゲノムメチル化の網羅的解析による遺伝子制御プログラムへの影響を検討する。

21年度は、低蛋白質食を与えたラットに対する脳発達遅延誘発時での、各種脳発達影響指標の評価を実施した。また、ACR（ラット）及び Mn（マウス

及びラット）の暴露実験を行い、脳発達に対する影響の評価を実施した。

B. 研究方法

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低栄養動物モデルとして、低蛋白質食を妊娠 10 日目から離乳時(生後 21 日目)まで母動物に摂取させることにより、発達遅延の児動物を作製し、離乳時(生後 21 日目)と 11 週目に解剖を行った。使用した動物は妊娠 SD:IGS ラットとし、低カゼイン (10%) 飼料 (低蛋白質食群) 又は正常カゼイン (20%) 飼料 (正常蛋白質食群)を各群 8 匹の母動物に自由に摂取させた (Fig. 1)。離乳時には、児動物は通常の基礎飼料である CRF-1 に切り替えて飼育した。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。

生後 21 日目の解剖時には、脳及び肝臓の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。11 週目には、脳及び肝臓に加え、更に、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、脳は同様にブアン固定を行った。

生後 21 日目及び 11 週目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約-3.5 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μm 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍、Novus Biologicals, Inc., Co.)、抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)、

抗マウス Calbindin-D-28K 抗体 (Calb-D-28K, x500 倍、IgG、Sigma Chemical Co.)、抗マウス GAD67 抗体 (glutamic acid decarboxylase 67, x50 倍、IgG、Millipore Corporation)、抗ウサギ Forkhead Box G1 抗体 (Foxg1, x800 倍、IgG、LifeSpan Bioscience, Inc.)、抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体 (PCNA, x200 倍、IgG、Dako) を用いて、DAB 発色にて ABC 法 (Vector Lab. Elite kit) による免疫染色を行った。また、アポトーシスの評価のために TUNEL 染色 (Apop Tag[®] *in situ* apoptosis detection kit, Millipore Corporation) を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin、Calb-D-28K、GAD67 及び Foxg1 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。一方、生後もニューロン産生を継続するユニークな脳部位である海馬歯状回の顆粒細胞層下帯 (増殖帯) において、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数と TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数の検索を行った。

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

発達期化学物質暴露モデルとして、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を飼料に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠 10 日目から離乳時 (生後 21 日目) まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と 11 週目に解剖を行った。動物はラットとマウスを用いて検討した。

まずラットの実験では、妊娠 SD:IGS ラット (日本チャールズリバー) を各群 8 匹使用し、予備試験結果を基に、公比 5 として、32、160、800 ppm の 3 用量を設定した。離乳時には、母動物に対する被験物質暴露を終了し、児動物は通常の基礎飼料である CRF-1 に切り替えて飼育した (Fig. 2)。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。生後 21 日目及び 11 週目の解剖時には、脳、肝臓、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに 11 週目児動物の小脳を用いて、組織中の Mn 濃度を ICP-MS により測定した。

次にマウスの実験では、妊娠 ICR マウス (日本エスエルシー) を各群 10 匹使用し、ラットと同じく $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ について 32、160、800 ppm の 3 用量を設定した。離乳後、児動物は通常の基礎飼料である CRF-1 に切り替えて飼育した (Fig. 3)。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。生後 21 日目及び 11 週目の解剖時には、脳、肝臓、腎臓の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに 11 週目児動物の小脳を用いて、組織中の Mn 濃度を ICP-MS により測定した。生後 21 日目及び 11 週目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -1.0 mm の 1 カ所で冠状断面を作製して、その前後の対称面 (2 切面) が薄切面となるようにパラフィン包埋し、3 μ m 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Reelin 抗体

(x1000 倍)、抗マウス NeuN 抗体 (x1000 倍)、抗マウス GAD67 抗体 (x50 倍)、抗マウス GFAP 抗体 (Clone 6F2, x200 倍、Dako)、抗マウス PCNA 抗体 (x200 倍) を用いて、DAB 発色にて ABC 法 (Vector Lab. Elite kit) による免疫染色を行った。また、アポトーシスの評価のために TUNEL 染色を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin 及び GAD67 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。一方、増殖細胞の指標である PCNA 及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞については、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において、陽性細胞数の検索を行った。

< アクリルアミドを用いた発達期暴露影響評価 >

予備実験として、妊娠 6 日目の雌性 SD:IGS ラットを、各群 4 匹ずつ 4 群に分け、ACR 0、25、50、100 ppm を離乳まで飲水投与した。ACR の飲水投与用量は、母動物に神経障害 (中枢及び末梢の軸索遠位端障害) が確認された 100 ppm を最高用量として設定した (Takahashi et al., J Toxicol Sci. 2008; 33: 11-24)。また、2 匹は無処置のまま出産させ、生後 2 日から離乳までの間、新生児に ACR 50 mg/kg/day を週 3 回 (全 9 回) 腹腔内投与した (Fig. 4)。

児動物は生後 2 日目に出生児数、体重の測定および性別の判定を行い、生後 3 日目に母動物 1 匹あたり雌雄各 4 匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後 21 日の離乳時に、母動物とともに全例を解剖した。実験期間中は定期的に体重、摂餌量および摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、1=normal gait、2=slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)、3=moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)、4=severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) としてスコア化した。

離乳時の海馬歯状回における免疫染色として、Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA を行った。また、アポトーシスの評価として、Cresyl Violet 染色によって染色されるアポトーシス小体数の計測を行った。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌ないし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、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育・管理にあたっては、国立大学法人東京農工大学動物実験等に関する規定、米国国立保健研究所 (NIH) が推奨している動物倫理に関するガイドラインに従った。

C. 研究結果

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低蛋白質食群の母動物については、体重は出産後11日から21日、摂餌量 (g/animal/day) は出産後4日から21日に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 1、2)。

低蛋白質食群の児動物については、体重は雌雄とも生後0日から11週までの実験期間を通じて正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 3)。低蛋白質食群の児動物の摂餌量 (g/animal/day) は雄で生後5週から11週、雌で生後8週から11週に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 4)。

低蛋白質食群の児動物の臓器重量は、生後21日目の解剖時では、雌雄の脳及び肝臓の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雌雄の脳及び雄の肝臓の相対重量は正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した。生後11週目の解剖時では、雌雄の腎臓及び雄の肝臓並びに精巣の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雄の脳の相対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した (Table 5)。

GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin、Calb-D-28K、GAD67 及び Foxg1 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN の海馬歯状回門における陽性細胞数の検索では、生後21日及び11週のいずれにおいても低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった (Table 6、7)。

また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における、増殖細胞の指標である PCNA 及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞の検索においても、生後21日及び11週のいずれにおいても、低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった (Table 8)。

脳の病理組織学的検索を行ったところ、生後21日目において、小脳外顆粒細胞層の残存の程度が、低蛋白質食群の児動物において、正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示した (Table 9)。

<Mn を用いた発達期暴露影響評価>

ラット :

各濃度の Mn 投与群の母動物の体重は妊娠10日から出産後21日までの投与期間を通じて、対照群との間に差はみられなかった (Table 10)。摂餌量

(g/animal/day) は出産後11日に160、800 ppm で有意差がみられたものの、妊娠10日から出産後21日までの投与期間を通じて、対照群とほぼ同様に推移した (Table 11)。

各濃度の Mn 投与群の児動物の体重及び摂餌量 (g/animal/day) は、雌雄とも生後0日から11週までの実験期間を通じて、対照群との間に差はみられなかった (Table 12、13)。

各濃度の Mn 投与群の児動物の臓器重量は、生後21日目及び11週目のいずれの解剖時においても、対照群との間に差はみられなかった (Table 14)。

暴露終了時の母動物の小脳組織中 Mn 濃度では、

各投与群と対照群との間に差はみられなかった。生後21日の児動物の小脳組織中 Mn 濃度は、対照群に比べ、32 ppm で高値傾向が、160 及び 800 ppm で有意な高値がみられた。しかし、生後11週の児動物の小脳組織中 Mn 濃度では、各投与群と対照群との間に差はみられなかった (Table 15)。

マウス :

母動物は、妊娠期間中には体重の変動を認めなかったが、出産後8日目以降に160 ppm 以上で、統計的に有意ではないものの体重の低値傾向を認めた (Fig. 5)。摂餌量に関しては、妊娠15日目、出産後8-21日目までの間に800 ppm で有意な低値を認めた (Fig. 6)。

出生後の児動物に関しては、体重は雄で17日目に800 ppm で、21日目に160 ppm 以上で低値を示したが、雌では21日目でのみ800 ppm で有意な低値を認めた (Fig. 7)。暴露終了後は雄のみの観察となるが、4-9週の間は160 ppm 以上で、10週目では800 ppm で有意な低値を示した (Fig. 8)。

臓器重量に関しては、離乳時では、脳、肝臓、腎臓とも絶対重量の低値を示し、肝臓では、雄で32 ppm 以上で、雌で800 ppm で有意に、腎臓では雄で160 ppm 以上で、雌で800 ppm で低値を示した (Fig. 9)。

小脳の Mn 濃度は、母動物では群間に差を認めなかった。児動物は離乳時ではなだらかなスロープではあるが用量依存的の増加を示し、160 ppm 以上で有意を示した (Fig. 10)。11週目では、スロープは更になだらかであるが、32 ppm 以上で有意に増加した。

海馬歯状回での Reelin 陽性細胞数は、離乳時に160 ppm 以上で用量依的に増加し、11週目では800 ppm で増加を示した (Fig. 11)。NeuN 陽性細胞数は、離乳時、11週目共に800 ppm で有意に増加を示した (Fig. 12)。離乳時に検討した GAD67 陽性細胞数は800 ppm 群で増加を示した (Fig. 13)。海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数は800 ppm 群で有意に増加したが、PCNA 陽性細胞数は変動を示さなかった (Fig. 14)。一方、海馬歯状回門に観察された GFAP 陽性細胞は細胞質に乏しい小型の細胞で、その数は160 ppm 以上で増加し、800 ppm で増加は有意であった (Fig. 15)。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

母動物と児動物の生殖発生毒性影響、軸索遠位端障害に関する病理組織学的検索の結果、HPLC による血漿中の ACR の測定結果については、既に報告してある (Takahashi et al., Arch Toxicol., 2009)。概略としては、母動物は、50 ppm 群以上で歩行異常が進行した。生殖発生毒性影響については群間で明らかな差を認めなかった。児動物は、飲水投与群では臨床症状の異常を認めなかったが、腹腔内投与を受けた児動物では、生後15日頃から成熟動物と類似し

た歩行異常が観察された。病理組織学的検索で、飲水投与群の児動物では、100 ppm 群で小脳外顆粒層細胞の残存と精上皮の発達遅延が認められたのみで、神経障害を示唆する所見は得られなかった。一方、腹腔内投与を受けた児動物では、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経の中心性色質融解が観察された。軸索遠位端障害に関しては、飲水投与群の児動物では、0 ppm 群と 100 ppm 群の間で、いずれのパラメーターも有意な差は認められなかった。腹腔内投与児動物では、雌雄ともに坐骨神経における変性軸索および萎縮した有髄神経線維の増加が認められた。しかし、小脳分子層における synaptophysin 陽性の異常な点状染色像の増加は明らかではなかった。HPLCによる血漿中の ACR の測定では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても ACR は検出されなかった (検出限界: 1 µg/ml)。同様に、100 ppm 群の児動物の胃内乳汁からも ACR は検出されなかった。GC/MS による血球中の ACR-Hb 付加体量は、母動物では ACR の投与用量に応じて増加傾向を示し、個体ごとの ACR 摂取量と高い相関性を示した。児動物においても用量に応じた増加傾向を示したが、その量は母動物の 1/10 以下であった。

今回新たに検索した項目では、離乳時の海馬歯状回門における Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA の免疫染色を行った結果、各群内における数値の雌雄間での明らかな差を認めなかったため、雌雄を併せて群間の比較を行った (Fig. 16, 17, Table 16)。その結果、ACR を投与した全群で Reelin 陽性細胞が増加を示したが、50 ppm と 100 ppm 群の間で増加数に明らかな差を認めなかった。腹腔内投与群でも、Reelin 陽性細胞は増加を示した。GAD67 陽性細胞は Reelin と同様の増加を示し、統計的有意差は 50 ppm 以上で認められた。腹腔内投与群でも、Reelin と共に GAD67 陽性細胞は増加を示した。海馬歯状回顆粒細胞層下帯における PCNA 陽性細胞数は群間で明らかな差を認めなかった。一方、アポトーシス小体の出現は少なかったものの、対照群に対して 100 ppm ACR 群と腹腔内投与群で有意な低値を示した。

D. 考察

<低栄養の脳発達に及ぼす影響の確認>

我々がこれまで行ってきた実験により、ラットに抗甲状腺剤を発達期暴露することにより、児動物の海馬歯状回門において成熟後まで持続する Reelin 陽性介在ニューロンの増数と共に、甲状腺機能低下に起因する体重及び脳重量の低値を認めている。しかし、今回明らかとなった低蛋白質食を用いた発達期低栄養実験では、持続する体重低値と共に、小脳外顆粒細胞の残存を認めて脳発達遅延を誘発したものの、介在ニューロンでの Reelin, Calb-D-28K, GAD67 及び Foxg1 の発現は変動を示さなかった。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索においても、低栄養の影響は

認められなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延においては、介在ニューロンは変動を示さないことから、海馬歯状回門における介在ニューロンの変動の検索は、投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

<Mn を用いた発達期暴露影響評価>

ラットを用いた Mn 暴露実験については、動物実験を終了し、組織中の Mn 濃度測定までを実施した。実験期間中の母動物及び児動物の体重並びに摂餌量には、Mn 投与の影響はみられず、児動物の臓器重量についても、生後 21 日目及び 11 週目のいずれの解剖時においても、Mn 投与の影響はみられなかった。小脳組織中 Mn 濃度については、母動物では変動はみられなかったが、児動物では暴露終了時の生後 21 日において、32 ppm から上昇が認められ、160 及び 800 ppm では有意差もみられた。しかし、生後 11 週の児動物では、各濃度の Mn 投与群と対照群との間に差はみられなかった。今後の実験では、海馬歯状回のみならず、各脳領域で Reelin, Calb-D-28K, GAD67, Foxg1 を始めとする神経発達関連分子の発現変動を検討する予定である。

Mn は発達期暴露により、基底核のドーパミン作動性ニューロンの選択的障害を誘発することが報告されているが、マウスに於いて、今回初めて離乳時から海馬歯状回門での Reelin 陽性細胞数の増加を確認し、最高用量では、成熟後でも増加が持続した。同様に、最高用量で NeuN 陽性細胞が離乳時から増加を示した。Reelin は甲状腺ホルモン調節遺伝子であり、ニューロンの移動や位置情報を決定する分子である。Reelin 陽性細胞はこの部位で GABA 性介在ニューロンに発現することが知られており、Mn 暴露によって、離乳時のみでの検索であるが GAD67 陽性細胞も増加を示したことから、海馬歯状回での顆粒細胞の移動異常が成熟後まで引き続いて生じたものと考えられた。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索において、増殖細胞数には影響を認めなかったものの、最高用量でアポトーシス細胞数の増加を認めている。以上の結果から、Reelin 陽性細胞数の歯状回門での増加は、ニューロンの移動異常のみならず、ニューロン新生障害も反映している可能性が示唆された。

また、Mn はグリオーシスを生じることが報告されているが、本研究に於いてもマウスの歯状回門における、小型で細胞質の乏しい GFAP 陽性細胞の増加を認めた。ところが、グリオーシスに見られるような原形質性ないし線維性アストログリアの形態を示さないことから、これらの細胞の増加は単純にグリオーシスを反映したものであるかは、今後の検討が必要である。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

ACRは従来、軸索遠位末端を傷害することが知られており、我々が既に報告したように、その軸索末端傷害性の感受性は発達期から存在し、ACRの児動物に対する直接投与により、成熟動物と同等の傷害性を有する。ただし、母動物を介したACRの暴露では、少なくとも経乳的暴露では母動物に対する神経障害を初めとする全身毒性により、児動物に乳汁を介したACRの移行が極端に少なく、赤血球中のHb-ACR付加体量で比較すると、母体血中の1/10以下の移行しか確認されない。そのことを反映して、母動物を介した暴露では末梢神経障害などの遠位軸索末端傷害性の生じないことが考えられる。ところが、今回の検索により、暴露量が少ないにもかかわらず、明らかな成長遅延を示さない低用量群(平均摂取量:3.7 mg/kg/day)から歯状回門に於いて、Reelin陽性GABA性介在ニューロンが増加を示し、このことは、ACRの発達影響として、比較的低用量からのニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。また、顆粒細胞層下帯における高用量群および腹腔内投与群でのアポトーシスの減少は、Mnとは異なるACRによるニューロン発達障害に対する保護作用の可能性が示唆された。

E. 結論

神経発達影響評価系の確立を分担課題として、本年度明らかになったこととして、マウスのMn暴露実験では、いわゆるマンガニズムの標的として従来言われてきた大脳基底核とは異なる脳部位である海馬歯状回門での、成熟後まで持続するReelin陽性細胞数の増加を見出し、それは顆粒細胞のニューロンの移動異常のみならず、増殖下帯でのニューロン新生障害も反映して生じている可能性が示唆された。また、GFAP陽性細胞も歯状回門で増数することが確認された。ACRに関しては、軸索遠位端障害を生じない、母動物を介した経胎盤・経乳暴露により、今回初めてReelin陽性GABA性介在ニューロンが増加を示すことが明らかとなった。このことは、ACRの発達影響として、ニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。低蛋白質食を用いた発達期低栄養に起因する脳発達遅延では、Reelinを含むGABA性介在ニューロンのいずれの指標も発現変動を示さず、増殖下帯での細胞増殖とアポトーシスにも変動を認めなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延では、介在ニューロンは変動を示さないことから、海馬歯状回門における介在ニューロンの変動の検索は、投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibutani, M., Woo, G-H., Fujimoto, H., Saegusa, Y., Takahashi, M., Inoue, K., Hirose, M., Nishikawa, A.: Assessment of developmental effects of hypothyroidism in rats from in utero and lactation exposure to anti-thyroid agents. *Reprod. Toxicol.* 28(3): 297-307, 2009.

Saegusa, Y., Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Mitsumori, K., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani M.: Developmental toxicity of brominated flame retardants, tetrabromobisphenol A and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod. Toxicol.* 28(4): 456-467, 2009.

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Igarashi, K., Kanno, J., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Gene expression profiling and cellular distribution of molecules with altered expression in the hippocampal CA1 region after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *J.Vet. Med. Sci.* 72(2): 187-195, 2010.

Saegusa, Y., Woo, G-H., Fujimoto, H., Kemmochi, S., Shimamoto, K., Hirose, M., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reprod. Toxicol.* (in press).

2. 学会発表

三枝 由紀恵、富士本 仁、禹 桂炯、川合正臣、松本 明、西川秋佳、三森 国敏、渋谷 淳: Reelinを指標とした不可逆的脳発達遅延評価法の確立、神経組織の成長・再生・移植研究会 第24回学術集会、伊香保(2009.6.21) (p.19)

三枝 由紀恵、富士本 仁、禹 桂炯、川合 正臣、松本 明、金 美蘭、広瀬 雅雄、西川 秋佳、三森 国敏、渋谷 淳: 発達期神経毒性暴露に起因するニューロン分布異常に対する影響評価系の確立—Calbindin陽性小脳プルキンエ細胞の検討— (Aberrant neuronal cell distribution for detection of developmental neuronal toxicants: analysis of the distribution of calbindin-expressing cerebellar Purkinje cells) 第36回日本トキシコロジー学会学術年会、盛岡(2009.7.6-8) (P-24)

小川文一朗、三枝由紀恵、大石 功、Wang Liyun、高橋美和、中東 淳、三森国敏、渋谷 淳: アクリルアミドの発達期暴露によるラット海馬歯状回でのGABA性介在ニューロンの反応。第26回日本毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集, p. 56 (O-15), 2月3,4日, 2010

三枝由紀恵、禹 桂炯、富士本仁、剣持 明、嶋本
敬介、広瀬雅雄、三森国敏、西川秋佳、渋谷 淳：
ラットの発達期甲状腺機能低下に起因して海馬歯状
回に増加するReelin陽性細胞の特性．．第26回日本
毒性病理学会学術集会、金沢、第26回日本毒性病理
学会学術集会講演要旨集， p. 102 (P-84), 2月3,4日，
2010

渋谷 淳：発達期と化学物質．厚生労働省 化学物
質リスク研究推進事業 シンポジウム「化学物質と
環境・健康」2010年2月18日（於 仙台）、3月2
日（於 東京）

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