

**Table 16. Detailed immunohistochemical staining results of Reelin, GAD67 and PCNA, as well as data of apoptotic bodies in the acrylamide-exposure study.**

Antigen	ACR	Males		Females		Combined	
Reelin	0 ppm	19.50 ± 9.87	(3) <sup>a</sup>	21.65 ± 7.75	(7)	21.00 ± 7.92	(10)
	25 ppm	31.29 ± 10.91	(4)	27.54 ± 5.99	(6)	29.04 ± 7.96	(10) *
	50 ppm	39.80 ± 6.51	(8) **	33.01 ± 12.02	(6)	36.89 ± 9.52	(14) **
	100 ppm	33.52 ± 5.61	(5) *	37.73 ± 7.85	(3) *	35.10 ± 6.35	(8) **
	i.p.	33.57 ± 8.43	(4)	34.07 ± 8.02	(5) *	33.85 ± 7.67	(9) **
GAD67	0 ppm	20.02 ± 10.26	(3)	33.23 ± 4.75	(7) #	29.27 ± 8.90	(10)
	25 ppm	38.17 ± 3.24	(4)	36.04 ± 10.48	(6)	36.90 ± 8.11	(10)
	50 ppm	44.77 ± 9.96	(8) **	39.65 ± 8.12	(6)	42.58 ± 9.26	(14) **
	100 ppm	47.95 ± 7.75	(5) **	35.68 ± 12.38	(3)	43.35 ± 10.88	(8) **
	i.p.	41.77 ± 8.54	(4) *	38.96 ± 11.45	(5)	40.21 ± 9.75	(9) *
Calb-D-28K	0 ppm	39.80 ± 6.51	(3)	40.39 ± 13.05	(7)	40.21 ± 11.09	(10)
	25 ppm	62.35 ± 8.72	(4) *	38.10 ± 17.90	(6) #	47.80 ± 18.98	(10)
	50 ppm	49.33 ± 19.26	(8)	40.25 ± 13.53	(6)	45.44 ± 17.08	(14)
	100 ppm	58.61 ± 21.33	(5)	55.52 ± 14.62	(3)	57.45 ± 17.99	(8) *
	i.p.	46.40 ± 7.50	(4)	54.18 ± 18.18	(5)	50.72 ± 14.25	(9)
PCNA	0 ppm	1.06 ± 0.52	(3)	1.54 ± 0.82	(7)	1.39 ± 0.75	(10)
	25 ppm	1.27 ± 0.49	(4)	1.78 ± 0.58	(6)	1.58 ± 0.58	(10)
	50 ppm	1.59 ± 0.70	(8)	1.63 ± 0.33	(6)	1.61 ± 0.55	(14)
	100 ppm	1.44 ± 0.68	(5)	1.09 ± 0.58	(3)	1.31 ± 0.63	(8)
	i.p.	1.43 ± 0.68	(4)	1.12 ± 0.32	(5)	1.26 ± 0.50	(9)
Apoptotic bodies	0 ppm	0.67 ± 0.47	(3)	0.61 ± 0.51	(7)	0.63 ± 0.47	(10)
	25 ppm	0.28 ± 0.07	(4)	0.26 ± 0.32	(5)	0.27 ± 0.23	(9)
	50 ppm	0.23 ± 0.18	(8)	0.36 ± 0.17	(6)	0.28 ± 0.18	(14)
	100 ppm	0.22 ± 0.14	(5)	0.11 ± 0.09	(3) *	0.18 ± 0.13	(8) *
	i.p.	0.35 ± 0.32	(4)	0.09 ± 0.09	(5) *	0.21 ± 0.24	(9) *

<sup>a</sup> Mean ± SD.

\*P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm group.

# P < 0.05 vs. males in the same group.

() No. of the animals examined.

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)

分担研究名 *in vitro* 神経発達評価

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

研究要旨：発達期における神経毒性を検討する目的で、ドパミン障害が報告されている  $MnCl_2$  を用い、培養細胞を使用した評価系に従い検討を行った。初代培養マイクログリアへの  $MnCl_2$  処置により、マイクログリアの活性化傾向が認められた。また、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞への  $MnCl_2$  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。さらに、ES 細胞への  $MnCl_2$  を処置により、ES 細胞自身の生存率ならびに増殖率に変化は認められなかった。一方、ES 細胞から胚葉体形成時に  $MnCl_2$  を処置し、神経幹細胞への誘導を行ったところ、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關与する 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 acetylcholinesterase (AChE) の発現抑制が認められた。以上の結果より、 $MnCl_2$  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。

#### A. 研究目的

$MnCl_2$  の必要量は微量であり、植物性の食品を中心に広く含まれていることから、通常の食生活における欠乏の心配は殆どないと言われている。一方、過剰症は静脈栄養など特別な場合の報告に限られることから、過剰摂取の心配は殆ど無いが、慢性中毒では強い精神障害やパーキンソン病に似た中枢神経系障害が惹起されると言われている。

また、 $MnCl_2$  は中枢神経系を構成するアストロサイトやマイクログリアといったグリア細胞の活性化を介して、ドパミン神経をすることが報告されている。

本研究では、各種培養細胞系を駆使し、 $MnCl_2$  の中枢神経発生段階に及ぼす影響ならびに神経細胞あるいはグリア細胞に対する直接的な影響について検討を行った。

#### B. 研究方法

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

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

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、数日間培養後、実験に用いた。

##### 大脳皮質由来初代培養マイクログリアの作製

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マイ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

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

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。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

初代培養神経-アストロサイト共培養細胞に MnCl<sub>2</sub> を処置しても、β III-tubulin 陽性神経細胞ならびに Glial fibrillary acidic protein (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 MnCl<sub>2</sub> 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。さらに、ES 細胞への MnCl<sub>2</sub> 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 細胞の生存ならびに増殖に変化は認められなかった(図 1)。また、MnCl<sub>2</sub> 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 MnCl<sub>2</sub> 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参与する 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 acetylcholinesterase (AChE) の発現抑制が認められた(図 2)。さらに、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞への MnCl<sub>2</sub> (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。

### D. 考察

以上の結果より、MnCl<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> についても同様に検討を行う。

### E. 結論

神経毒の中枢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<sub>2</sub> を用い検討を行った。今回の検討より、MnCl<sub>2</sub> 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。

### F. 健康危険情報

妊娠時における MnCl<sub>2</sub> 慢性曝露には注意が必要である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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-1β production in response to the activation of hippocampal glial cells impairs neurogenesis in aged mice. *Synapse.*, 2010, (in press).

#### 2. 学会発表

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曝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, Hiroataka 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  $\delta$ -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  $\mu$ -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  $\delta$ -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


#### 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

MnCl<sub>2</sub>  
10 μM



自己複製能 ES cell

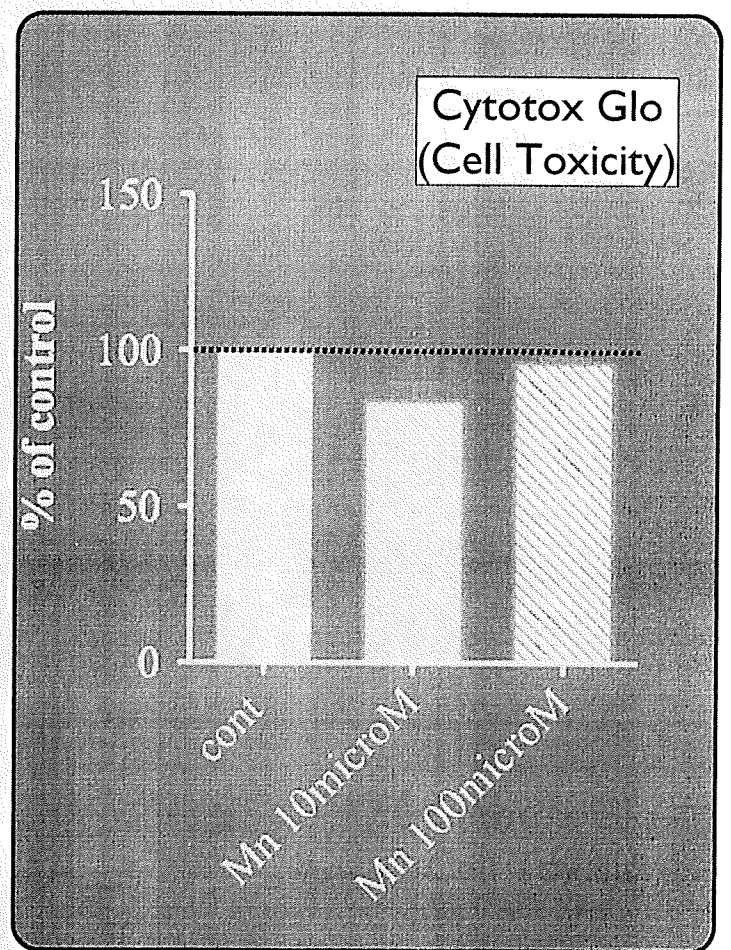
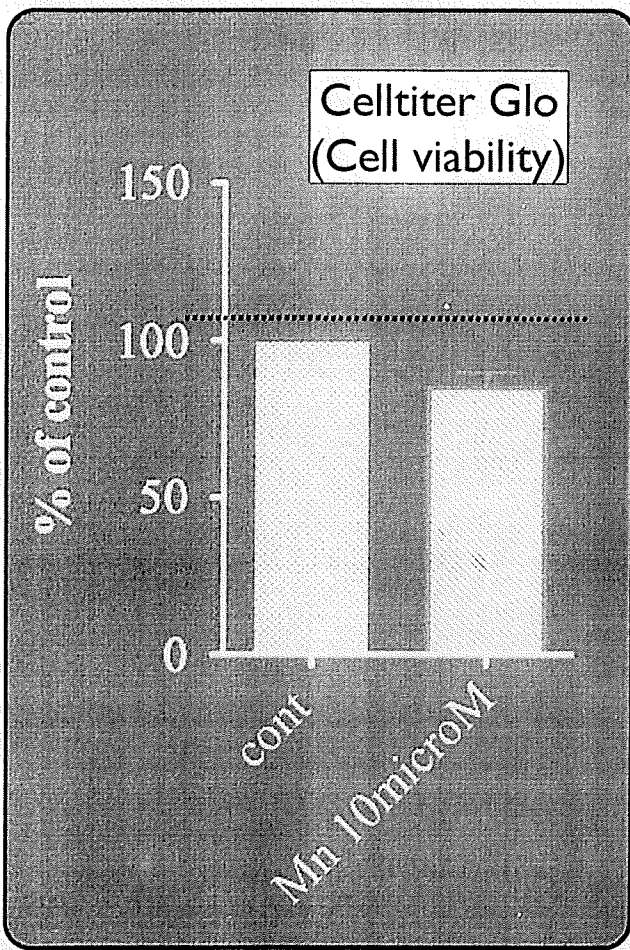
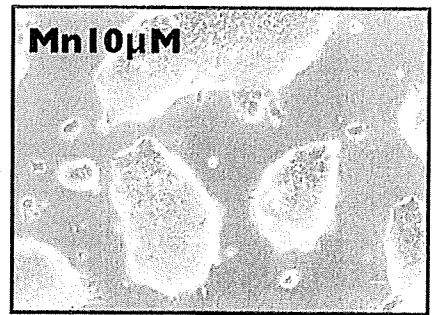
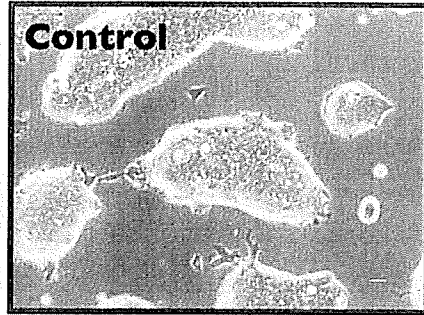
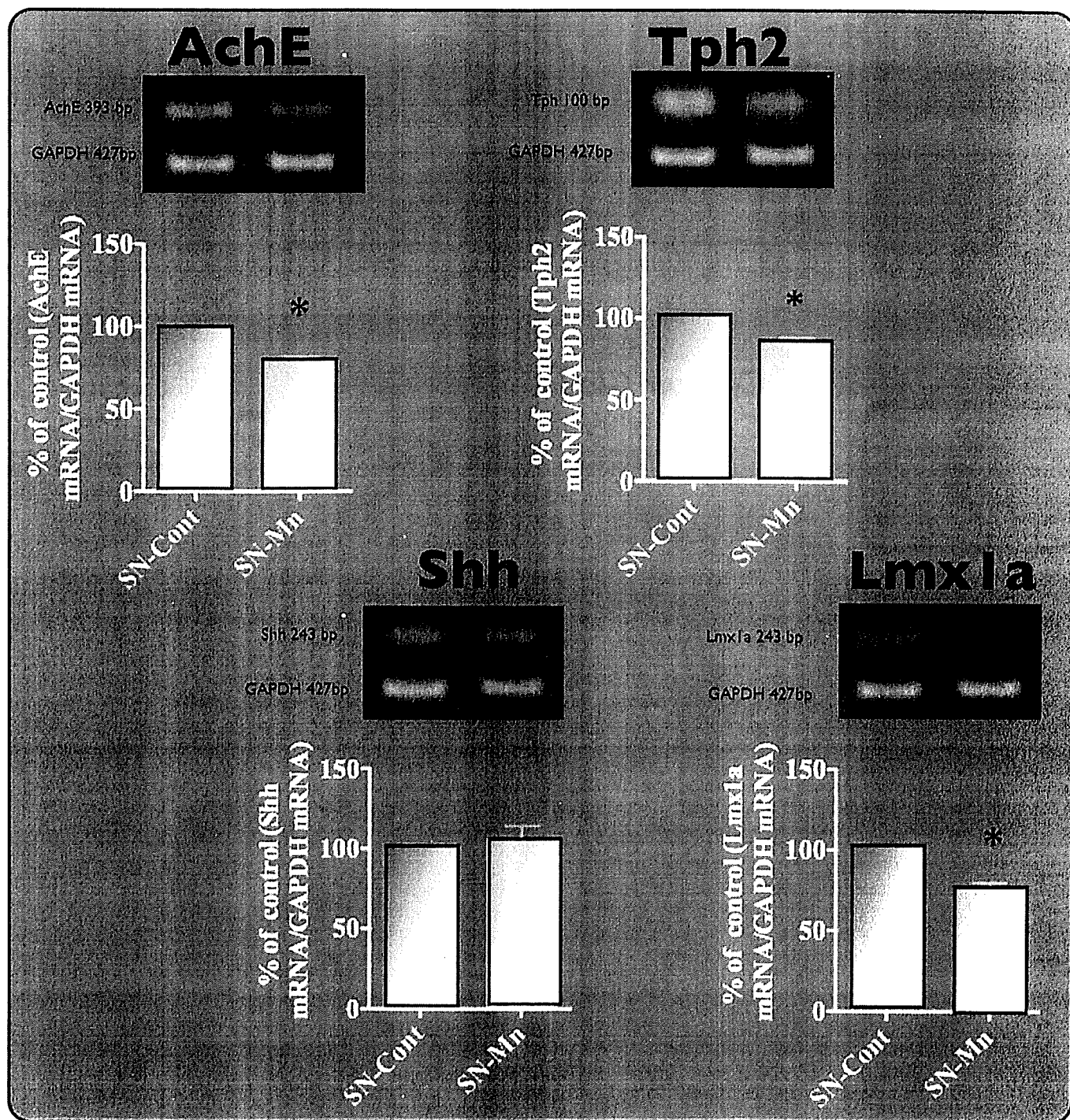
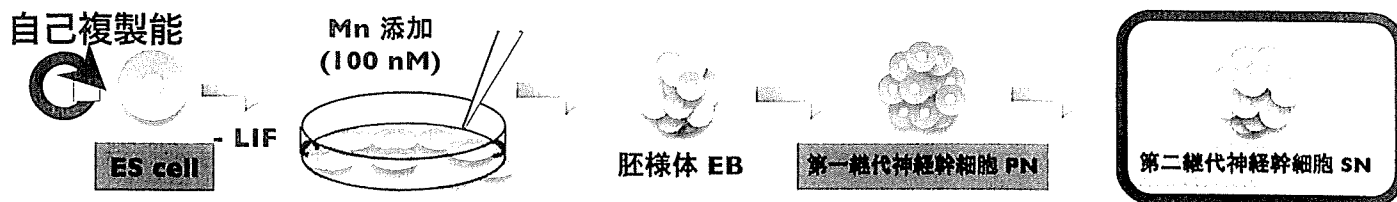


図1 ES細胞の形態ならびに増殖へのMnCl<sub>2</sub>処置の影響





▶▶▶ AchE、Tph2、Lmx1a mRNA 発現の低下が認められた。

図2 ES細胞へのMnCl<sub>2</sub>処置による神経分化誘導への影響

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）

分担研究名 免疫機能評価に関する研究

分担研究者 手島玲子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部長

研究要旨：有機リン系農薬（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週令の仔マウスの血液学的試験、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。

研究協力者

中村亮介，蜂須賀暁子，松岡英樹，中村里香，  
中村 厚（国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部）

A. 研究目的

胎児期から小児期にかけては生体組織・機能が发育段階にあり未熟であるために環境有害因子に対して感受性が高い時期（critical window）と考えられており、胎児期から小児期に受けた影響は生涯にわたって続く障害となる場合が少なくない<sup>1, 2)</sup>。免疫機構は外界からの影響に抵抗するための生体防御機構において極めて重要な機構であり、生体防御機構の要である免疫機構に対する毒性（免疫毒性）評価は重要なテーマである<sup>3-5)</sup>。

本研究においては、幼児期のマウスまたはラットを用いて、有機リン系農薬の暴露をおこない、二次リンパ器官である胸腺、脾臓の機能を中心にした免疫毒性試験を行うことを目的とする。化学物質の発達期暴露による免疫影響についての検討は、一般毒性試験の中では行われておらず、免疫毒性試験評価手法の高度化、標準化が国際的にも望まれており、本研究は、その一助になると考えられる<sup>6, 7)</sup>。

本年度は、有機リン系残留農薬として、メタミ

ドホスを被検物質とし、発達期免疫機能評価として、発達期暴露終了時でのマウスの血液学的及び血液生化学的検査、胸腺および脾臓の臓器重量の測定並びにT細胞、B細胞、NK細胞の各サブセットの解析、CD4 陽性T細胞のポピュレーション解析を行った。

B. 研究方法

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、摂餌量および飲水量を計測した。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。

（1）解剖および臓器重量測定：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℃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。

(2) 血液学的検査：末梢血中の血球数は、マウス眼底より採血した血液 20  $\mu$ l をあらかじめ 80  $\mu$ 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。

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

(4) 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：仔マウスの脾臓および胸腺を破砕して口径 40  $\mu$ 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  $2 \times 10^6$  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  $\mu$ l の FACS stain buffer に懸濁し、フローサイトメータ FACS Aria 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。

(5) Th サブセットの解析：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、(4) と同様の手法により調製した細胞を、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  $\gamma$ -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  $\kappa$  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 (4) と同様に行なった。

(6) 制御性 T 細胞の解析：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、(4) と同様の手法により調製した細胞を、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 (4) と同様に行なった。

(7) 統計計算：データは Microsoft Excel により集計し、GraphPad Prism (GraphPad software Inc.) を用いて Dunnett の検定を行なった。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による飲水投与が主体であり、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眼底からの大量採血および頸椎脱臼により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。本実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物倫理委員会の承認を得てから行った。

## C. 研究結果

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)。詳細をFig. 1に示す。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、匹数を更に増やすなどの更なる工夫が必要と考えられた。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。

Table 1に、暴露をした母マウスおよび仔マウスの体重・臓器重量・臓器比重量を示した。母マウスについては、実際に仔を出産したものとしなかったものを含めた7匹からなる群と、仔を出産しなかった個体のみをの群とに分けて表示し、仔については雌雄別に表示した。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、脾臓および胸腺の有意な絶対重量の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、母マウスおよび仔マウスの血球学的な解析の結果をTable 2に示す。赤血球関係のパラメータでは、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、概ね大差はなかった。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コリンエステラーゼ活性への影響を調べた(Table 3-5)。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。

表に示した通り、血清中コリンエステラーゼ活性はすべ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群で有意な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。Fig. 2は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示したものであるが、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 $\gamma$ t)または細胞内サイトカイン(IFN $\gamma$ , 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ものがFig. 3である。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つた。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。

#### D. 考察

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，骨髓細胞の増殖の増加，および抗体産生の減少等が Tiefenbach らにより報告されている<sup>9)</sup>。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<sup>9)</sup>。

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，血中のコリンエステラーゼ活性が，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コリンエステラーゼ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<sup>10)</sup>。リンパ球には，ムスカリニック受容体やニコチニック受容体，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，メタミドホスのコリンエステラーゼ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<sup>8)</sup>。

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。

## E. 結論

有機リン系農薬 (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 週令の仔マウスの血液学的試験，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。

(参考文献)

- 1) Dietert, R.R., Etzel, R.A., Chen, D., Halonen, M., Holladay, S.D., Jarabek, A.M., Landreth, K., Peden, D.B., Pinkerton, K., Smialowicz, R.J., and Zoetis, T. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: immune and respiratory systems work group summary. *Environ. Health Perspect.* **108** (Suppl. 3):483-490 (2000).
- 2) Adams, J., Barone, Jr, S., LaMantia, A., Philen, R., Rice, D.C., Spear, L., and Susser, E. Workshop to identify critical windows of exposure for children's health: neurobehavioral work group summary. *Environ. Health Perspect.* **108** (Suppl. 3):535-544 (2000).
- 3) Nakamura, R., Teshima, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Takagi, K., Nakamura, R., Woo, G.H., Shibutani, M., and Sawada, J. Effects of developmental hypothyroidism induced by maternal administration of methimazole or propylthiouracil on the immune system of rats. *Int. Immunopharmacol.* **7**:1630-1638 (2007).
- 4) Teshima, R., Nakamura, R., Nakamura, R., Hachisuka, A., Sawada, J., and Shibutani, M. Effect of exposure to decabromodiphenylether on the development of the immune system in rats. *J. Health Science* **54**:382-389 (2008).
- 5) Nakamura, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Nakamura, R., Shibutani, M., Sawada, J., and Teshima, R. Effect of perinatal exposure to the flame-retardant tetrabromobisphenol A on the developing immune system of rats. *Bull. Natl. Instit. Health Sci.*, **126**:65-70 (2008).
- 6) Cooper, R.L., Lamb-I.V., J.C., Barlow, S.M., Bentley, K., Brady, A.M., Doerrer, N.G., Eisenbrandt, D.L., Fenner-Crisp, P.A., Hines, R.N., Irvine, L.F., Kimmel, C.A., Koeter, H., Li, A.A., Makris, S.L., Sheets, L.P., Speijers, G., and Whitby, K.E. A tiered approach to life stages testing for agricultural chemical safety assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **36**:69-98 (2006).
- 7) Vogel, R., Seidle, T., and Spielmann, H. A modular one-generation reproduction study as a flexible testing system for regulatory safety assessment. *Reprod. Toxicol.* **29**:242-245 (2010).
- 8) Tiefenbach, B., and Wichner, S. Dose dependence and mechanism of the acute effect of methamidophos on the immune system of the mouse. *Z. Gesamte. Hyg.* **31**:228-231 (1985).
- 9) Navarro, H.A., Basta, P.V., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect? *Brain Res. Dev. Brain Res.* **130**:249-252 (2001).
- 10) Kawashima, K., and Fujii, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Ther.* **86**:29-48 (2000).

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 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

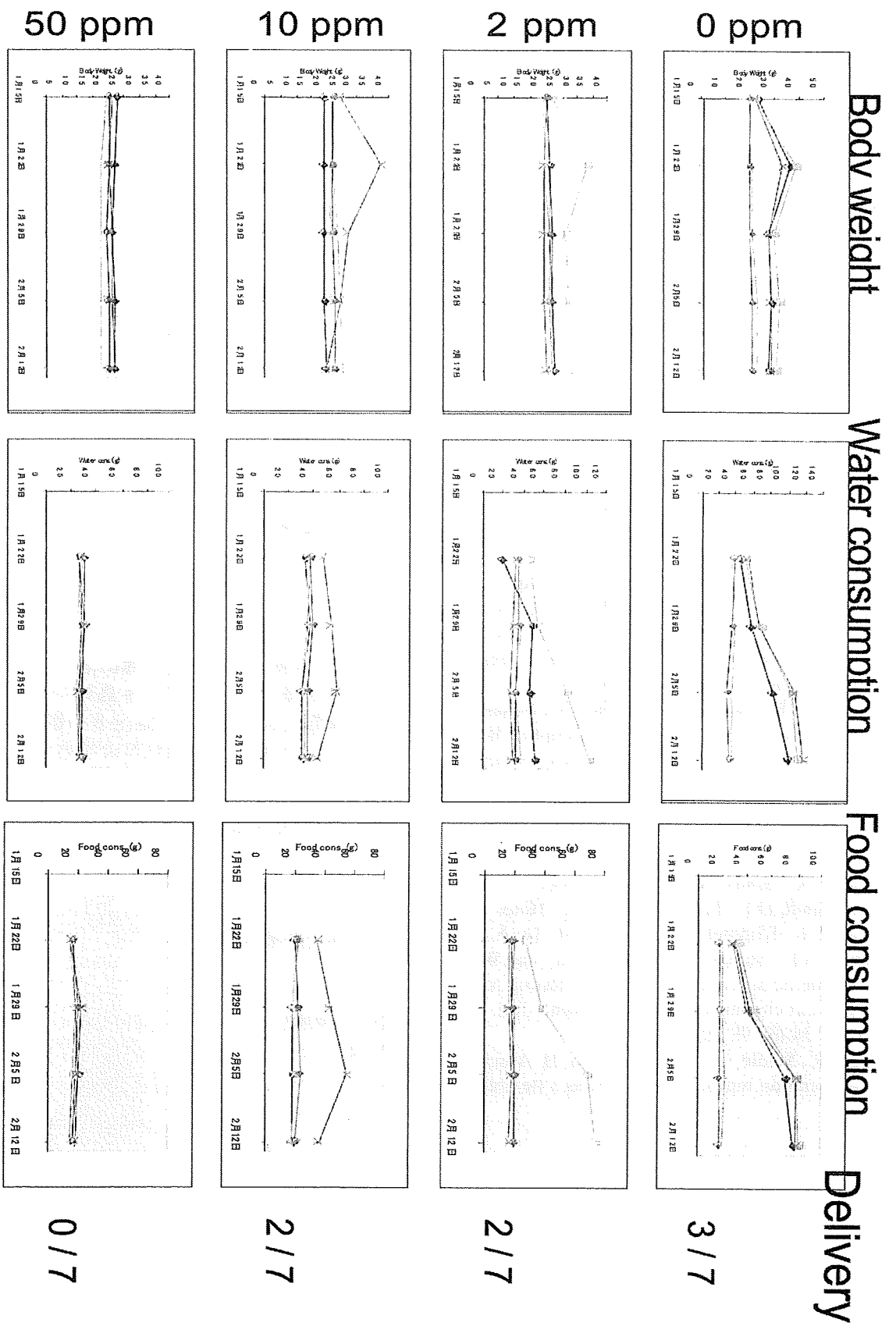


Fig. 1. Time -course of the body weight, water consumption, and food consumption of the dams exposed to methamidophos .

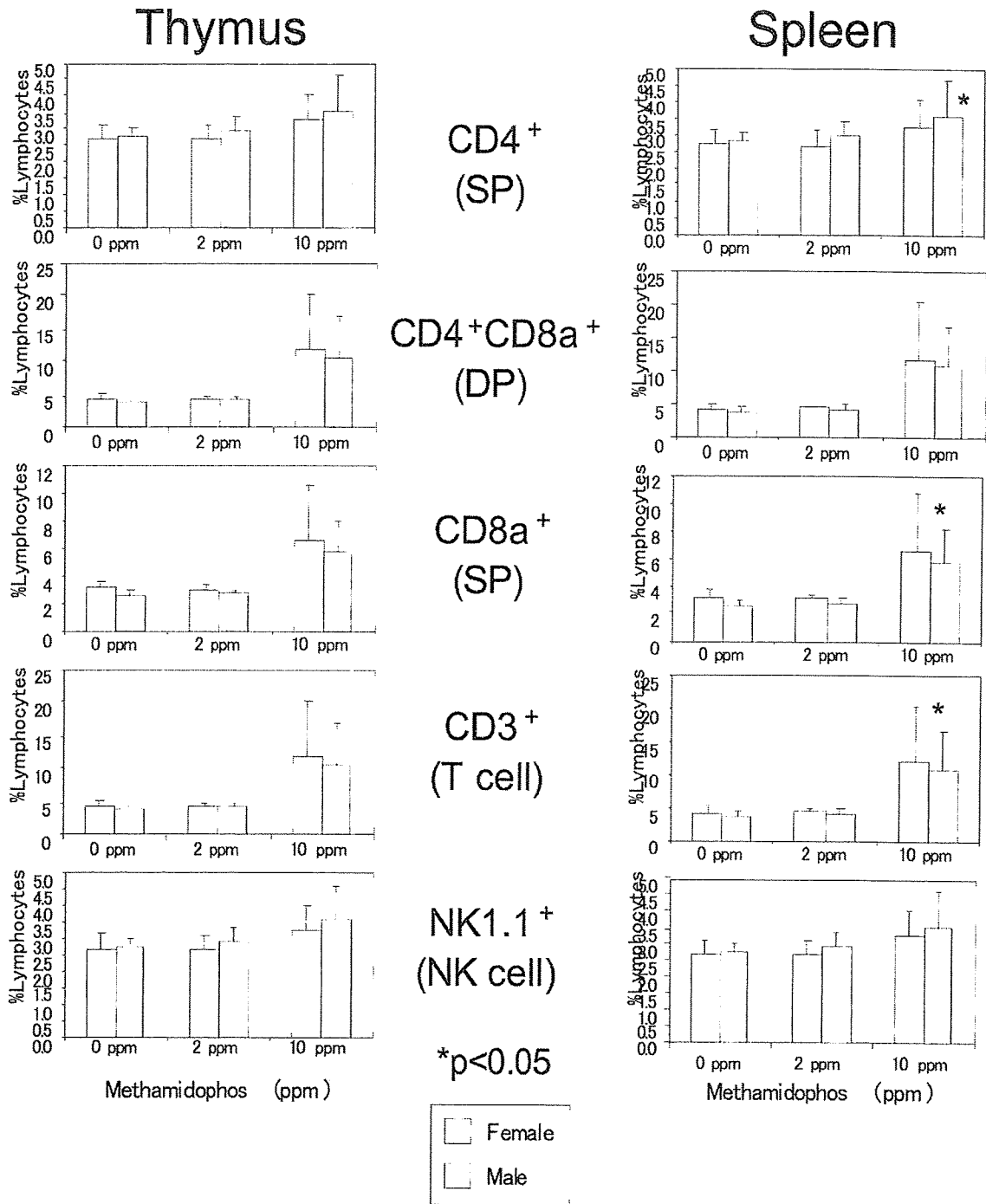


Fig. 2. Flowcytometric analysis of lymphocytes in the methamidophos -treated pups.

Thymus and spleen cells of the methamidophos (0, 2, 10ppm) -treated pups were stained with fluorochrome -labeled anti -CD3, anti -CD4, anti -CD8a, and anti -NK1.1, and measured with FACSaria . Data are mean + SD (n = 4). \*p<0.05, Dunnett 's test.



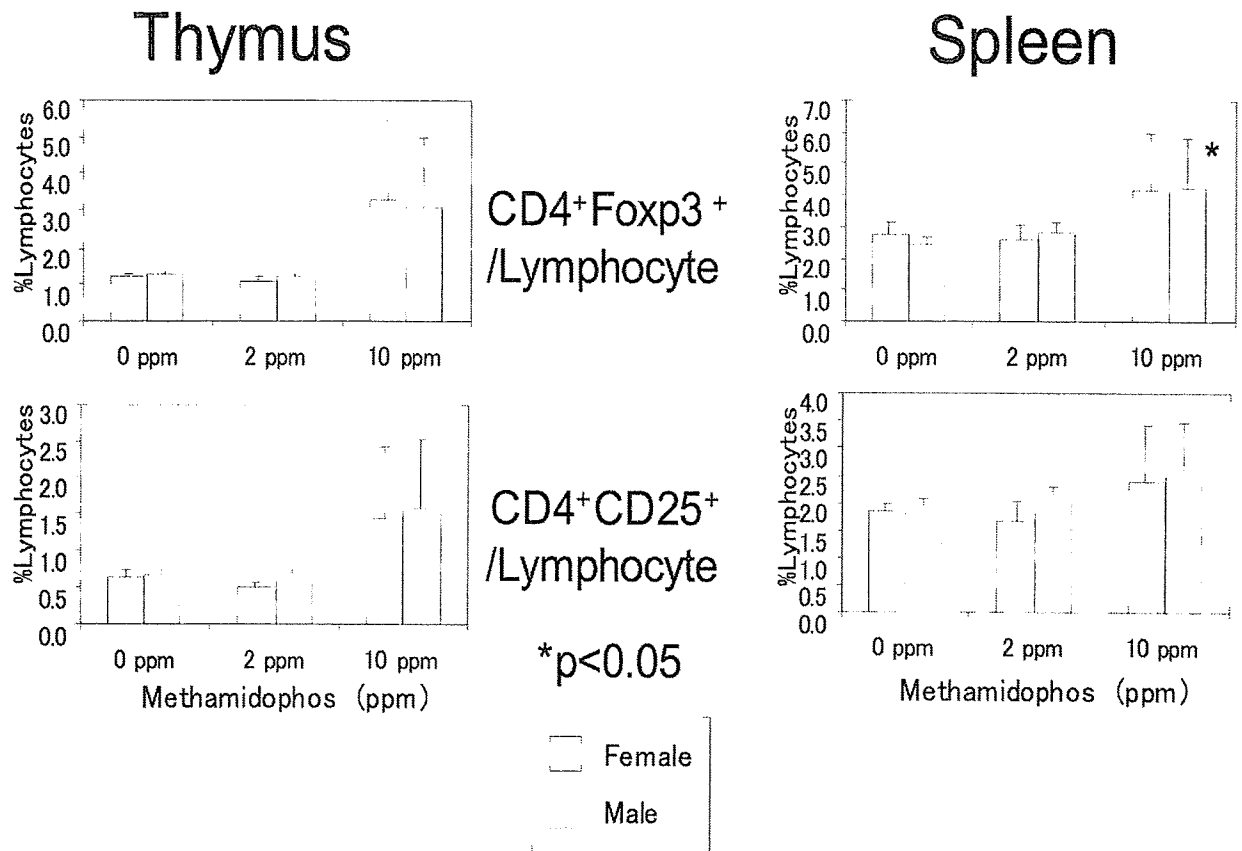


Fig. 3. Flowcytometric analysis of Tregs in the methamidophos -treated pups.

Thymus and spleen cells of the methamidophos (0, 2, 10ppm) -treated pups were fixed and stained with fluorochrome -labeled anti -CD4 and anti -CD25, followed by permeabilization . After staining with anti -Foxp3, the cells were measured with FACSARIA . Data are mean + SD (n = 4). \*p<0.05, Dunnett 's test.

**Table 1. Effect of methamidophos on the body and organ weights**

		Methamidophos (ppm)			
		0	2	10	50
<b>Dam</b>	n	7 (3) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (0) <sup>a</sup>
Body (g)		23.3 ± 2.8	22.6 ± 2.0	21.4 ± 2.4	19.6 ± 1.3
Liver (mg)		1392 ± 518	1212 ± 397	1063 ± 195	863 ± 86
Spleen (mg)		115.6 ± 16.0	112.0 ± 20.4	111.9 ± 26.3	92.0 ± 9.4
Thymus (mg)		53.0 ± 15.2	48.0 ± 7.0	93.3 ± 124.8	39.4 ± 8.3
Liver/Body		58.2 ± 15.2	52.8 ± 13.3	50.0 ± 8.9	44.0 ± 2.3
Spleen/Body		5.0 ± 0.5	5.0 ± 1.2	5.3 ± 1.7	4.7 ± 0.3
Thymus/Body		2.3 ± 0.5	2.1 ± 0.4	4.8 ± 7.0	2.0 ± 0.4
<b>Adult female</b> <sup>b</sup>	n	4	5	5	7
Body (g)		21.1 ± 0.9	21.7 ± 1.4	21.7 ± 2.3	19.6 ± 1.3
Liver (mg)		984 ± 103	981 ± 62	975 ± 69	863 ± 86
Spleen (mg)		105.3 ± 11.5	119.0 ± 19.5	101.8 ± 13.2	92.0 ± 9.4
Thymus (mg)		47.3 ± 6.2	49.4 ± 7.9	44.8 ± 7.2	39.4 ± 8.3
Liver/Body		46.6 ± 5.0	45.3 ± 3.1	45.0 ± 2.7	44.0 ± 2.3
Spleen/Body		5.0 ± 0.6	5.5 ± 1.0	4.7 ± 0.6	4.7 ± 0.3
Thymus/Body		2.2 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.4	2.0 ± 0.4
<b>Male pup</b>	n	16	9	6	0
Body (g)		10.6 ± 1.2	10.6 ± 0.6	7.3 ± 3.5**	—
Liver (mg)		602 ± 85	581 ± 73	422 ± 210	—
Spleen (mg)		104.4 ± 22.4	98.0 ± 11.7	59.2 ± 37.6*	—
Thymus (mg)		68.5 ± 8.2	69.7 ± 10.2	41.0 ± 31.4**	—
Liver/Body		57.1 ± 2.8	54.6 ± 4.4	49.8 ± 7.7**	—
Spleen/Body		9.9 ± 1.6	9.2 ± 0.7	6.6 ± 2.5**	—
Thymus/Body		6.6 ± 1.1	6.6 ± 0.8	4.4 ± 2.4**	—
<b>Female pup</b>	n	4	4	6	0
Body (g)		10.2 ± 0.7	9.3 ± 0.6	7.2 ± 2.8	—
Liver (mg)		530 ± 27	474 ± 50	348 ± 172	—
Spleen (mg)		95.0 ± 18.9	89.5 ± 7.0	44.5 ± 31.3*	—
Thymus (mg)		71.8 ± 3.1	66.0 ± 5.5	36.3 ± 30.4*	—
Liver/Body		52.1 ± 2.1	50.9 ± 3.0	46.5 ± 5.9	—
Spleen/Body		9.3 ± 1.6	9.7 ± 1.2	5.5 ± 2.5*	—
Thymus/Body		7.1 ± 0.8	7.1 ± 0.9	4.3 ± 2.5	—

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to methamidophos (0, 2, 10, and 50ppm) via drinking water from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the body and organ weights.<sup>a</sup> Numbers in parenthesis mean the number of dams who delivered pups.

<sup>b</sup>Dams who did not delivered any pups. Values are mean ± SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Dunnett's test).

**Table 2. Effect of methamidophos on the hemocytological parameters**

		Methamidophos (ppm)			
		0	2	10	50
Dam	n	7 (3) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (0) <sup>a</sup>
WBC (10 <sup>2</sup> /L)		76.1 ± 23.4	78.1 ± 11.6	101.7 ± 133.5	37.4 ± 20.7
RBC (10 <sup>4</sup> /L)		1003 ± 57	1030 ± 62	1062 ± 111	1022 ± 18
HGB (g/dL)		15.2 ± 1.2	15.3 ± 0.8	15.7 ± 1.8	15.0 ± 0.4
HCT (%)		52.9 ± 3.9	53.5 ± 2.7	55.2 ± 6.1	52.3 ± 1.1
MCV (fL)		52.8 ± 1.1	52.0 ± 1.1	51.9 ± 0.6	51.2 ± 0.5**
MCH (pg)		15.2 ± 0.4	14.9 ± 0.4	14.8 ± 0.2	14.7 ± 0.2*
MCHC (g/dL)		28.7 ± 0.4	28.6 ± 0.2	28.4 ± 0.2	25.8 ± 7.6
PLT (10 <sup>4</sup> /L)		147.3 ± 37.5	133.5 ± 34.0	138.4 ± 26.1	127.1 ± 11.8
<b>Adult female</b>	<b>n</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>7</b>
WBC (10 <sup>2</sup> /L)		84.0 ± 10.5	77.4 ± 11.2	45.8 ± 17.9**	37.4 ± 20.7**
RBC (10 <sup>4</sup> /L)		969 ± 47	1040 ± 72	1008 ± 74	1022 ± 18
HGB (g/dL)		14.4 ± 0.7	15.3 ± 0.9	14.8 ± 1.0	15.0 ± 0.4
HCT (%)		50.4 ± 2.9	53.5 ± 3.2	52.1 ± 3.4	52.3 ± 1.1
MCV (fL)		52.0 ± 0.8	51.4 ± 0.6	51.7 ± 0.5	51.2 ± 0.5
MCH (pg)		14.9 ± 0.1	14.7 ± 0.2	14.6 ± 0.1	14.7 ± 0.2
MCHC (g/dL)		28.6 ± 0.3	28.5 ± 0.2	28.3 ± 0.2	25.8 ± 7.6
PLT (10 <sup>4</sup> /L)		119.1 ± 14.5	117.2 ± 22.6	128.6 ± 11.3	127.1 ± 11.8
<b>Male pup</b>	<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
WBC (10 <sup>2</sup> /L)		96.5 ± 22.7	79.8 ± 11.5	47.8 ± 29.2*	—
RBC (10 <sup>4</sup> /L)		755 ± 46	824 ± 30	813 ± 156	—
HGB (g/dL)		10.7 ± 0.3	10.9 ± 0.2	11.4 ± 2.3	—
HCT (%)		39.6 ± 2.2	42.3 ± 1.8	42.8 ± 8.7	—
MCV (fL)		52.4 ± 0.5	51.3 ± 1.0	52.5 ± 0.9	—
MCH (pg)		14.2 ± 0.6	13.3 ± 0.3*	14.0 ± 0.1	—
MCHC (g/dL)		27.0 ± 1.1	25.9 ± 0.6	26.6 ± 0.3	—
PLT (10 <sup>4</sup> /L)		114.2 ± 12.8	121.4 ± 8.8	107.8 ± 32.0	—
<b>Female pup</b>	<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>0</b>
WBC (10 <sup>2</sup> /L)		75.0 ± 5.9	80.8 ± 14.8	45.0 ± 27.9	—
RBC (10 <sup>4</sup> /L)		777 ± 51	780 ± 30	815 ± 107	—
HGB (g/dL)		10.6 ± 0.8	10.4 ± 0.6	11.2 ± 1.7	—
HCT (%)		40.4 ± 2.6	40.9 ± 1.3	42.5 ± 5.3	—
MCV (fL)		51.9 ± 0.5	52.5 ± 1.5	52.1 ± 0.8	—
MCH (pg)		13.6 ± 0.3	13.7 ± 0.8	13.7 ± 0.5	—
MCHC (g/dL)		26.3 ± 0.5	26.0 ± 0.8	26.3 ± 1.2	—
PLT (10 <sup>4</sup> /L)		108.7 ± 25.0	95.1 ± 9.1	100.1 ± 16.2	—

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to methamidophos (0, 2, 10, and 50 ppm) via drinking water from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW 3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the hemocytological parameters. <sup>a</sup>Numbers in parenthesis mean the number of dams who delivered pups.

<sup>b</sup>Dams who did not deliver any pups. Values are mean ± SD. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 (Dunnett's test).

**Table 3. Effect of methamidophos on the serological parameters in dams**

Dam	n	Methamidophos (ppm)			
		0	2	10	50
		7 (3) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (2) <sup>a</sup>	7 (0) <sup>a</sup>
A/G ratio		1.54 ± 0.26	1.60 ± 0.16	1.53 ± 0.21	1.57 ± 0.15
AST (IU/L)		116.4 ± 40.7	142.6 ± 99.2	188.1 ± 146.4	111.4 ± 53.2
ALT (IU/L)		34.4 ± 20.2	50.1 ± 57.6	56.1 ± 58.3	64.7 ± 119.6
ChE (IU/L)		38.86 ± 7.86	31.86 ± 4.98*	17.57 ± 2.23**	7.33 ± 1.37**

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to methamidophos (0, 2, 10, and 50ppm) via drinking water from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the liver (A/G ratio, AST and ALT), and serum choline esterase (ChE) activities. Values are mean ± SD. \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Dunnett's test). <sup>a</sup>Numbers in parenthesis mean the number of dams who delivered pups.

**Table 4. Effect of methamidophos on the serological parameters in adult females**

Adult female	n	Methamidophos (ppm)			
		0	2	10	50
		4	5	5	7
A/G ratio		1.68 ± 0.13	1.54 ± 0.15	1.64 ± 0.11	1.57 ± 0.15
AST (IU/L)		98.0 ± 21.2	99.6 ± 20.6	110.2 ± 43.4	111.4 ± 53.2
ALT (IU/L)		19.0 ± 2.4	23.8 ± 3.3	25.2 ± 9.0	64.7 ± 119.6
ChE (IU/L)		33.00 ± 0.82	32.20 ± 6.02	17.60 ± 1.14**	7.00 ± 1.53**

Adult female BALB/c mice were exposed to methamidophos (0, 2, 10, and 50ppm) via drinking water for 31 days. At day 31, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the liver (A/G ratio, AST and ALT), and serum choline esterase (ChE) activities. Values are mean ± SD. \*\*p<0.01 (Dunnett's test).

**Table 5. Effect of methamidophos on the serological parameters in pups**

Pup	n	Methamidophos (ppm)			
		0	2	10	50
		3	3	3	0
A/G ratio		1.40 ± 0.17	1.23 ± 0.06	1.37 ± 0.06	—
AST (IU/L)		150.0 ± 16.8	179.7 ± 30.2	212.3 ± 29.7*	—
ALT (IU/L)		37.3 ± 8.0	41.0 ± 7.0	39.7 ± 6.0	—
ChE (IU/L)		30.67 ± 1.53	29.67 ± 2.31	22.00 ± 5.00*	—

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to methamidophos (0, 2, 10, and 50ppm) via drinking water from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the liver (A/G ratio, AST and ALT), and serum choline esterase (ChE) activities. Values are mean ± SD. \*p<0.05 (Dunnett's test).

分担研究名 感染感受性評価

分担研究者 渡辺 渡 所属機関 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究要旨：本研究は有害作用標的性に基づいた発達期の化学物質曝露影響評価系、特に感染感受性を指標にした評価系の確立を目的としている。実験動物には妊娠 BALB/c マウスを用い、妊娠及び哺乳期間中に親マウスへメタミドフォス（0.01~10 ppm）を飲料水に溶解して周産期曝露を行った。離乳した仔動物について、RS ウイルス A2 株  $1 \times 10^6$  PFU を経鼻感染させ、その感染病態についてウイルス学的及び生化学的な評価を行った。メタミドフォス 10 ppm 曝露により、親・仔マウスの体重増加抑制が認められた。しかし親マウスの摂餌量の低下や親・仔マウスの異常行動などは、全く見られなかった。肺洗浄液中のインターフェロン $\gamma$ 量は、RS ウイルス感染による肺炎の代表的な指標であるが、感染 5 日目の 1.0 ppm 曝露群でのみ上昇したが、用量依存性は無かった。同様に感染 5 日目の肺組織中のウイルス感染価は、1.0 ppm 曝露群でのみ 1.5 倍程度有意に上昇したが、用量依存性は無かった。また、肺の病理組織を検討したが、メタミドフォス投与による影響は感染および非感染マウスで確認されなかった。

以上の結果より、発達期でのメタミドフォス投与による RS ウイルス感染病態の明確な増悪化は認められず、本評価系での標的細胞は現時点で見いだせていない。現在、曝露方法の変更を含めて追試験を予定している。さらに、クロルピリフォスについての評価を準備している。

### A. 研究目的

化学物質の発達期曝露における胎児・新生児への有害作用を明らかにするため、乳幼児ウイルス感染症モデルである Respiratory syncytial ウイルス

（RS ウイルス）感染マウス実験モデルを用いて、感染病態の増悪化を引き起こす標的分子を明らかにすることを目的としている。今年度は、メタミドフォス評価化合物に用いて、ウイルス学および生化学的な検討を実施した。

### B. 研究方法

メタミドフォスの周産期曝露実験：九動(株)より購入した BALB/c マウス（雄；8,9 週齢、雌；6,7 週齢）を感染実験室内飼育ケージにて一週間馴化させ、交配を行った。雌マウスは交配日より 11 日後（GD10）からメタミドフォス（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：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  $2 \times 10^6$  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  $-30^{\circ}\text{C}$  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  $-80^{\circ}\text{C}$  に保管した。その後に肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

RS ウイルス感染価の測定：プラーク法により感染価を測定した。 $-80^{\circ}\text{C}$  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,  $4^{\circ}\text{C}$ , 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%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^{\circ}\text{C}$  で 1 時間インキュベート後、各穴を 1.0 mL ずつ維持培地で洗浄し、続いて 0.8% メチルセルロース含有維持培地を添加して同様に 4 日間培養した。培養終了後、2.5% ホルマリン溶液を添加・処理し、続いてクリスタルバイオレット染色後に、ウイルス由来のプラーク数をカウントして感染価（PFU/mL）を算出した。

In vitro RS ウイルス増殖試験：プラーク減少法によりメタミドフォ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フォ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%  $\text{CO}_2$  存在下、 $37^{\circ}\text{C}$  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- $\gamma$  の定量：eBioscience 社製の Mouse IFN- $\gamma$  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：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。



(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

メタミドフォス周産期曝露の動物個体への影響を検討するため、離乳時における親マウスおよび仔マウスの体重比較、ならびに親マウスの曝露期間中の摂餌量を調べた。最高用量である 10 ppm 曝露により親・仔マウスともに体重増加の抑制が認められた(表-1)。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。

まずメタミドフォスの 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、メタミドフォスは最高濃度 100  $\mu$ M までウイルス増殖に全く影響を与えなかった(図-1)。そこで、メタミドフォス曝露仔マウスへ 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- $\gamma$  レベルを ELISA で測定した。メタミドフォス 1.0 ppm 曝露群では、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、曝露影響の用量依存性が認められなかった(図-2)。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- $\gamma$  の結果と同様に 1.0 ppm 曝露群でのみ有意に ( $P < 0.01$ ) 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(図-3)。最後に、0.1 および 10 ppm のメタミドフォスの周産期曝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(表-2)。その結果、メタミドフォス曝露を受け、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。

### D. 考察

メタミドフォス (0.01~10 ppm) の周産期曝露により、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 曝露群でのみ二種類の感染影響指標 (IFN- $\gamma$  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く(図-3) かつ病理組織学的な所見でも肺炎の程度が軽いため(表-2)、1.0 ppm 曝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、メタミドフォスの水溶性が高い

ことから飲料水での曝露を実施した。実際、この方法でメタミドフォスの曝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。

### E. 結論

今年度の試験では、メタミドフォス (0.01~10 ppm) の周産期曝露により、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。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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

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 49<sup>th</sup> Annual Meeting*, Salt Lake City: #1542, March, 2010

### H. 知的所有権の取得状況

#### 1. 特許所得

なし

#### 2. 実用新案登録

なし

#### 3. その他

なし

**表-1 Body weights and food consumption of mice exposed to Methamidophos perinatally (GD10-PND21)**

<b>Treatment (ppm)</b>	<b>Body weight on PND21 (g)</b>	<b>Food consumption (g/day)</b>
<b>Dam</b>		
0	28.8 ± 2.8	7.8 ± 0.7
0.01	25.6 ± 2.5	7.3 ± 1.9
0.1	30.4 ± 1.3	6.6 ± 2.0
1.0	30.1 ± 1.3	8.2 ± 0.5
10.0	26.0 ± 1.7	8.8 ± 0.5
<b>Offspring</b>		
0	14.7 ± 1.7	0
0.01	14.7 ± 2.9	0
0.1	12.6 ± 2.8	0
1.0	14.2 ± 2.1	0
10.0	10.8 ± 1.8	0