

201035017A

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22年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成23（2011）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 -----	16
渋谷 淳	
(資料) 図 1-14、表 1-36	
2. In vitro 神経発達評価 -----	24
鈴木 勉	
(資料) 図 1, 2	
3. 免疫機能評価 -----	27
手島玲子	
(資料) 表 1-11	
4. 感染感受性評価 -----	33
渡辺 渡	
(資料) 図 1、表 1-6	
5. 発がん感受性評価 -----	36
西川秋佳	
(資料) 図 1-11、表 1-5	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	41

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22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、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。

In vivo 神経発達評価では、海馬歯状回をモデルとした神経発達影響評価系の確立を検討し、22年度はマウスでのマンガン (Mn) の評価で、ニューロン新生に関連するエピジェネティックな遺伝子発現修飾と、ニューロン新生の永続的な障害検出を可能とした。ラットでも Mn によるニューロン新生障害の可逆性を明らかにし、更に脳内免疫活性化の検出を可能とした。ラットでのクロロピリフォス (CPF) とアクリルアミド (ACR) の評価で観察されたニューロン新生障害とその標的細胞と可逆性の検出性は高いと判断された。

In vitro 神経発達評価では、各種培養細胞での標的メカニズムの評価系の確立を検討し、22年度はニコチン进行评估し、初代培養マイクログリアの活性化、胎生マウス由来神経幹細胞の神経細胞ならびにアストロサイトへの分化誘導に影響を与えないことを確認した。一方、ES 細胞から神経幹細胞への誘導実験では、各種分化指標の網羅的解析により AChE の発現増加を確認し、一連の評価により神経分化の際の運命決定に与える影響の検出を可能とした。

免疫機能評価では、マウスを用いた発達期免疫影響評価系の確立を検討し、CPF の評価により、脾臓での CD4 陽性 T 細胞の暴露終了時から成熟後に持続する増加を見出した。そのサブセット 4 種 (Th1, Th2, Th17, Treg) の存在比率の検索により、特に Treg の増加を認め、その標的検出性は高いと判断された。

感染感受性評価では、マウス RS ウイルス感染影響評価系の確立を検討した。メタミドフォス (MDP)、CPF 共に病態の増悪化を示さない用量で感染 1 日後の肺洗浄液中の IL-6 および TNF- α レベルの強い低下を見出し、感度の高い指標である可能性を見出した。MDP につき感染初期肺組織でのマイクロアレイ解析を実施した。

発がん感受性評価では、ENU 経胎盤モデルを用いて発達期暴露中枢神経系発がん評価系の確立を検討した。ENU の経胎盤投与により雌雄で安定した中枢神経腫瘍誘発性を確認したが、Mn の評価では影響は認めなかった。ENU で同時に誘発される末梢神経腫瘍及び非神経腫瘍も評価できることを確認した。

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

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

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、

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（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、21 年度から実施してきたマンガン (Mn) やアクリルアミド (ACR) の他、新たにクロルピリフォス (CPF) を評価し、海馬歯状回門での 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新生ニューロンの分化、細胞増殖性とアポトーシスの変動を検討し、ニューロン新生・移動異常の評価系の確立を進めた。Mn では、マウスで暴露終了時でのゲノムのメチル化解析により、歯状回でメチル化の程度と mRNA 発現変動、発現細胞分布がリンクしている分子群を選別した。ラットでは、脳内免疫評価系の確立も進めた。In vitro 神経発達評価では、21 年度は確立した各種の分化系譜で Mn 評価を実施し、22 年度はニコチンの評価を行った。即ち、ES 細胞から神経細胞への分化過程にある細胞、ならびに胎仔より採取・分化誘導した幹細胞、ニューロン、アストロサイトにニコチンを処置し、遺伝子発現変動の網羅的解析を行って、神経・グリア細胞への分化障害機構への影響を検討した。免疫機能評価では、22 年度は CPF のマウスへの混餌投与による発達期免疫影響について、胸腺、脾臓の T 細胞の分化に関するフローサイトメトリー解析を行い、次いで、CD4 陽性の T 細胞サブセットの存在比率を解析・検討した。感染感受性評価では、21 年度評価したメタミドフォス (MDP)、また CPF の周産期曝露を行い、感染病態評価と肺洗浄液中のサイトカインレベルの定量による感染影響評価を実施した。次いで MDP について、マイクロアレイによる肺組織でのウイルス感染初期応答に関わる遺伝子発現変動の網羅的解析を実施した。同様に CPF も評価を開始した。発がん感受性評価では、妊娠ラットに ENU を静脈内投与し、分娩直後は母動物に、離乳後は仔動物に Mn を混餌投与し、解析を終了した。

現在は同じモデルを用いてニコチン評価実験を継続している。

B. 研究方法

In vivo 神経発達評価

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

21 年度にラット及びマウスを用いた暴露実験を終了している。すなわち、発達期化学物質暴露モデルとして、ドパミンニューロン傷害性物質の $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を飼料に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠 10 日から離乳時(生後 21 日)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後 77 日目に解剖を行った。

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) 各群 8 匹使用し、予備試験結果を基に公比 5 で 32、160、800 ppm の 3 用量を設定し、対照群 (0 ppm) を含む 4 群構成とした。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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目の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 日目及び生後 77 日目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -3.0 mm 及び -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 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、Novus Biologicals, Inc., Co.)、抗マウス GAD67 抗体 (glutamic acid decarboxylase 67, x50 倍、Millipore Corporation)、抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)、抗マウス GFAP 抗体 (glial fibrillary acidic protein、Clone GA5、x200 倍、IgG、Millipore Corporation)、抗ウサギ DCX 抗体 (doublecortin、x100 倍、IgG、Abcam)、抗ウサギ Tbr2 抗体 (T box brain 2、x200 倍、IgG、Abcam)、抗ウサギ Iba1 抗体 (ionized calcium-binding adaptor molecule 1、x300 倍、Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、抗マウス Cox2 抗体 (cyclooxygenase-2、IgG1、1:200、BD Biosciences)、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 性介在ニューロンの指標である Reelin 及び GAD67、成熟ニューロンの指標である NeuN 並びにミクログリアの指標である Iba1 及び Cox2 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、新生ニューロンの分化指標である GFAP、Tbr2 及び DCX 陽性細胞数、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数並びに TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数の検索を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに生後 77 日目の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 日目の児動物の海馬を用いて、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、NOS2、TNF- α 、COX2、DCX、NeuroD1、Pax6、TUC4、Reelin、VLDLR、ApoER2 及び Dab1 の mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR 解析により行った。更に、MnCl₂·4H₂O の発達期暴露による甲状腺関連ホルモンへの影響を検討するため、妊娠 SD:IGS ラット（日本チャールズリバー、各群 6 匹）に 0、800、1600 ppm の用量で同様に暴露実験を行い、暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに生後 77 日目の児動物について、血清中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) を用いて測定した。

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 MnCl₂·4H₂O について 32、160、800 ppm の 3 用量を設定し、対照群（0 ppm）を含む 4 群構成とした。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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目の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 日目の児動物の 0 及び 800 ppm については TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) を用いて測定した。

生後 21 日目及び生後 77 日目の脳を用いて、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)、抗ウサギ Tbr2 抗体 (x200 倍)、抗マウス Pax6 抗体 (x500 倍、IgG、Abcam)、抗マウス NeuroD1 抗体 (x500 倍、IgG、Abcam)、抗ウサギ TUC4 抗体 (x1000 倍、Millipore Corporation)、抗ウサギ MID1 抗体 (Midline1, x150 倍、IgG、Abcam)、抗マウス Parvalbumin 抗体 (x1000 倍、IgG、Millipore Corporation)、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、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍) 及び抗マウス NeuN 抗体 (x1000 倍) を用いて、DAB 及び Vector red 発色にて ABC 法 (Vector Lab. Elite kit 及び ABC-AP kit) による二重染色を行った。更に、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、成熟ニューロ

ンの指標である NeuN、並びに後述するゲノムの網羅的メチレーション解析で見出された MID1 及び Parvalbumin については、海馬歯状回における陽性細胞数の検索を行った。一方、新生ニューロン分化指標の Pax6、Tbr2、NeuroD1 及び TUC4、増殖細胞指標の PCNA 並びに 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。生後 21 日目の児動物の 0 及び 800 ppm の海馬を用いて real-time RT-PCR 解析により Reelin、ApoER2、VLDLR、GAD67、Pax6、Tbr2 及び TUC4 の mRNA の発現レベルを検討した。ゲノムのメチレーション解析では、CpG アイランド (CGI) マイクロアレイによる網羅的な解析を行い、検出された 29 の過メチル化遺伝子のうち、7 遺伝子 (Pvalb、Actl6b、Hoxc8、Mid1、Atpla3、Cggbp1 及び Nr2f1) を選択し、メチレーション特異的 qPCR 解析により過メチル化の確認を行った。更に、これらの遺伝子について real-time RT-PCR 解析により mRNA の発現レベルを検討した。免疫染色による発現解析が可能な MID1 及び Parvalbumin に関しては海馬歯状回における陽性細胞の分布解析を進めた。

<CPF 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、コリン作動性ニューロン傷害性物質のクロルピリフォス (CPF) 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、暴露終了時と生後 77 日目に解剖を行った。動物はラットを用いて検討した。

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、文献資料 (Breslin WJ et al., Fundam Appl Toxicol., 1996, 29:119-30) を基に、公比 5 として、2.8、14、70 ppm の 3 用量を設定し、対照群 (0 ppm) を含む 4 群構成とした。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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目児動物の血漿、赤血球及び脳 (前頭葉) 中のコリンエステラーゼ (ChE) 活性を TBA-120FR (Toshiba Medical Systems) を用いて、血漿中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) を用いて測定した。

生後 21 日目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -3.0 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、抗マウス NeuN 抗体、抗ウサギ Tbr2 抗体、抗ウサギ DCX 抗体、抗マウス PCNA 抗体を用いて、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。Reelin 及び NeuN 陽性細胞数については海馬歯状回門において、Tbr2、DCX 及び PCNA 陽性細胞数並びに TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数については海馬歯状回顆粒細胞層下帯において検索を行った。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

ACR による歯状回ニューロン新生に対する影響の不可逆性とその標的細胞を検討するために、昨年度報告した予備検討とほぼ同様に、ACR を飲水に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠 10 日から離乳時（生後 21 日）まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時（生後 21 日）と生後 77 日に解剖を行った（Experiment 1）。更に、ACR の直接的な暴露による影響との比較・検討を行うために、生後 4 日から 21 日まで 3 回/週、ACR を新生児に腹腔内投与し、離乳時（生後 21 日）と生後 77 日に解剖を行った（Experiment 2）。

飲水投与による経胎盤・経乳的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット（日本エスエルシー）各群 6 匹使用し、これまでの実験結果（Takahashi M et al., Arch Toxicol., 2009, 83:785-793）を基に公比 5 とし、4、20、100 ppm の 3 用量を設定し、対照群（0 ppm）を含む 4 群構成とした。一方、腹腔内投与による直接的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット（日本エスエルシー）16 匹（各群 8 匹）を無処置のまま出産させ、生後 4 日から離乳時（生後 21 日）までの間、新生児に ACR 50 mg/kg BW を週 3 回腹腔内投与した。同様に生理食塩液を腹腔内投与する対照群を設け、2 群構成とした。児動物は生後 2 日に出生児数、体重の測定および性別の判定を行い、生後 4 日に母動物 1 匹あたり雄 8 匹（雄が不足する場合は雌を充当）となるように一腹児数を調整した。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。生後 21 日の離乳時に全母動物及び 3-4/母動物の雄児動物を解剖し、脳を摘出して免疫組織化学検査及び real-time RT-PCR 解析（児動物のみ）に供した。生後 77 日には残りの雄児動物を解剖し、脳を摘出して免疫組織化学検査に供した。摘出した脳は大脳の Bregma の後方 -3.1 mm 及び -3.6 mm の 1 カ所所て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、5 μm 厚の連続切片を作製した。なお、生後 4 日に除外した雌の児動物（9-10 例/群）についても切片を作製した。

切片は、抗マウス Reelin 抗体（x1000 倍）、抗マウス PCNA 抗体（x200 倍）、抗マウス NeuN 抗体（x100 倍）、抗ウサギ Dpysl3 抗体（TUC4、x1000 倍、

Millipore Corporation）、抗ウサギ DCX 抗体（x2000 倍）、抗マウス NeuroD1 抗体（x300 倍）、抗ウサギ Tbr2 抗体（x500 倍）、抗マウス Pax6 抗体（x500 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 Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色（Apop Tag[®] in situ apoptosis detection kit、Millipore Corporation）を行った。GABA 性介在ニューロン発現分子 Reelin 及び成熟ニューロン指標 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。新生ニューロン分化指標 Dpysl3（TUC4）、DCX、Tbr2、NeuroD1 及び Pax6 陽性細胞数、増殖細胞指標の PCNA 陽性細胞数並びに Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数については、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯（増殖帯）において検索を行った。なお、一部の抗体については各個体 3 切片（約 250 μm 間隔）を用いて評価した。生後 21 日目の児動物の海馬を用いて、Reln、Lyp8、Vldlr、Dab1、Pax6、NeuroD1、Dcx、Dpysl3、Pcna、Dnmt1、Hdac1、Hdac2 及び Hdac8 の mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR 解析により行った。

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、数日間培養後、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として、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 法に従い検討を行った。

免疫機能評価

動物は、妊娠2日目 (GD2) 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 から粉末 CRF-1 への混餌投与にて CPF の暴露を開始した (1 群 12 匹)。検体濃度は、0, 2.8, 14, 70 ppm とした。出産後 3 週目 (PNW3) まで暴露を継続し、その間体重および摂餌量を計測した。また、出産した仔マウスの体重も同様に計測した。仔マウスの数は 1 ケージあたり 8 匹となるように調節した。

解剖および臓器重量測定：PNW3 の時点で雌雄 4 匹ずつ仔マウスを解剖し、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、肝臓および大腿骨・胸骨の一部試料は 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当所病理部 (吉田 緑室長) に依頼した。母マウスについても同様の処置を行なった。

血球学的検査：末梢血中の血球数は、マウス眼底より採血した血液 20 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)、平均赤血球色素量

(MCV)、平均赤血球色素濃度 (MCHC)、および血小板数 (PLT) の測定を行なった。

血清学的検査：母動物および仔動物について、末梢血より血清 200 μ 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)。

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 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。これを抗マウス CD3-APC-Cy7、抗マウス CD4-FITC、抗マウス CD8a-APC、抗マウス CD49b-PE により氷上で 30 分間、反応させた。500 μ l の FACS stain buffer (FBS; BD) で 2 回洗浄し、フローサイトメータ FACS Aria (BD) 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：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、Th、Tc、NK と同様の手法により調製した細胞を 4×10^6 cells/1ml/well で 24well に播種し、Leukocyte Activation Cocktail with GolgiPlug (BD) により 37°C で 5 時間刺激し、BioLegend 固定バッファーで室温で 1 時間固定した。FBS で 2 回洗浄後、4°C で一晩保存した。抗マウス CD4-FITC で 30 分間染色後、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 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 Th、Tc、NK と同様に行なった。

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、Th、Tc、NK 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 により氷上で 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。

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。

感染感受性評価

化学物質の周産期曝露実験：MDP は、シグマアルドリッチより購入し、CPF はダウケミカル日本(株)より提供を受けた。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 MDP (10, 20, 30 ppm) を溶解した飲料水を自由飲水により投与した。同様に CPF は CRF-1 粉末餌で混餌 (2.8, 14, 70 ppm) として自由摂取させた。出産後 21 日目

(PND21) に離乳を行い、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 2×10^6 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 1、5 日後に、麻酔下で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。

肺洗浄液 (BALF) 中のサイトカインの定量：それぞれ eBioscience 社製の Mouse Reay-to-Go ELISA キットシリーズ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。

網羅的遺伝子発現解析：BALF 取得を行わなかった仔マウスより肺を摘出し、RNA 安定液中で保存した。その後、RNAeasy (キアゲン) を用いて RNA を

抽出し、北海道システムサイエンス(株)にてマイクロレイ解析を実施した。解析はソフト Gene Springにて行った。

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、塩化 Mn⁴⁺水和物(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 34 週齢まで行った。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した。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 標本を作製した。腫瘍性病変の種類、発生部位、サイズの測定を行った。発生した腫瘍性病変に関して病理組織学的に評価した。またニコチンに関しては親仔動物に酒石酸ニコチン二水和物を 0.002, 0.01 及び 0.05%濃度で 2%サッカリン水に混ぜ、飲水投与する実験を実施している。

(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

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

ラット :

昨年度に報告した結果の概要としては、母動物及び児動物の体重並びに摂餌量、児動物の臓器重量に影響は見られなかったこと、小脳組織中 Mn 濃度が母動物では変動は見られなかったが、児動物で暴露終了時(生後 21 日)に 32 ppm 以上で上昇が認められ、生後 77 日で対照群との差が消失したことである。

22 年度に得られた結果を以下に示す。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、Reelin 陽性細胞数は離乳時に 800 ppm で有意な増加を示したが、生後 77 日では差は見られなかった。GAD67 及び NeuN 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られ

なかった。

海馬歯状回門でのミクログリアの検索では、Iba1 陽性細胞数の有意な増加及び Cox2 陽性細胞数の有意な増加あるいは増加傾向が 32 ppm 以上で見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、DCX 陽性細胞数の有意な増加が生後 21 日目の 800 ppm に見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった。Tbr2 及び GFAP 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、TUNEL 陽性細胞数及び PCNA 陽性細胞数に変化は見られなかった。

生後 21 日目の児動物の海馬の real-time RT-PCR 解析では、IL-1 α 、IL-6、NOS2、TNF- α の mRNA の発現レベルの有意な増加が 800 ppm に見られた。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物では変動は見られなかったが、児動物では暴露終了時(生後 21 日)に 800 及び 1600 ppm で T3 及び T4 の有意な減少が見られ、800 ppm では TSH の有意な増加も認められた。生後 77 日目の児動物では対照群と差は見られなかった。

マウス :

昨年度に報告した結果の概要としては、母動物の体重の低値傾向(160 ppm 以上の分娩後 8 日以降)及び摂餌量の有意な低値(800 ppm の妊娠 15 日目及び分娩後 8-21 日)、児動物の体重の有意な低値(雄の 160 ppm 以上の生後 21 日目及び 4-9 週、800 ppm では加えて生後 17 日目と 10 週目、雌では 800 ppm の生後 21 日目)、離乳時の肝臓(雄の 32 ppm 以上、雌の 800 ppm)及び腎臓(雄の 160 ppm 以上、雌の 800 ppm)の絶対重量の有意な低値、児動物の小脳 Mn 濃度の離乳時(160 ppm 以上)及び生後 77 日(32 ppm 以上)の有意な増加、海馬歯状回門での Reelin 陽性細胞数(離乳時の 160 ppm 以上、生後 77 日目の 800 ppm)、NeuN 陽性細胞数(離乳時、生後 77 日目共に 800 ppm)及び GAD67 陽性細胞数(離乳時の 800 ppm)の有意な増加、海馬歯状回顆粒細胞層下帯での TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数の有意な増加(離乳時の 800 ppm)並びに海馬歯状回門での GFAP 陽性細胞数の有意な増加(離乳時の 800 ppm)である。

22 年度に得られた結果を以下に示す。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロンの検索では、新たに Reelin 及び NeuN の二重染色を行った結果、Reelin 陽性/NeuN 弱陽性~陰性細胞及び Reelin 陰性/NeuN 陽性細胞の増加が離乳時及び生後 77 日目の 800 ppm に見られた。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、800 ppm において TUC4 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目に見られたが、生後 77 日目では逆に有意な増加を示した。Pax6、

Tbr2 及び NeuroD1 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日目共に変化は見られなかった。

生後 21 日目の児動物の海馬における real-time RT-PCR 解析では、Reelin、ApoER2 及び GAD67 の mRNA の発現レベルの有意な増加並びに TUC4 の mRNA の発現レベルの有意な減少が 800 ppm で見られた。

ゲノムのメチレーション解析では、CGI アレイによる解析の結果、対照群に比べ 800 ppm において 1.5 倍以上高い変動を示した過メチル化遺伝子が 29 遺伝子検出された。このうち 7 遺伝子を選択してメチレーション特異的 qPCR 解析を行った結果、Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の過メチル化が確認された。また、この 7 遺伝子について real-time RT-PCR 解析により mRNA の発現レベルを検討した結果、Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の mRNA の発現レベルの有意な減少が認められた。更に、このうち 0 ppm と 800 ppm Mn 暴露児動物を用いて Parvalbumin 及び MID1 について行った免疫染色の結果では、海馬歯状回門における Parvalbumin 陽性介在ニューロン細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 800 ppm に、MID1 陽性顆粒細胞数の有意な減少が生後 21 及び 77 日目の 800 ppm に見られた。

甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppm で弱いながらも T4 の有意な減少が見られた。

<CPF を用いた発達期暴露影響評価>

母動物の体重は分娩後 11 日目に一過性の有意な高値が全ての投与群に認められた。摂餌量 (g/animal/day) では、妊娠 14 日及び 20 日目に 14 ppm のみにおいて、妊娠 17 日目は 14 ppm 及び 70 ppm において有意な高値が認められた。

児動物の体重では、14 ppm のみにおいて雄で生後 7 から 21 日目、雌で生後 4~17 日目に有意な高値が見られた。摂餌量 (g/animal/day) では変化は見られなかった。

児動物の臓器重量は、生後 21 日目では肝臓の相対重量の有意な低値が 70 ppm の雌雄に、卵巣の絶対及び相対重量の有意な低値が 70 ppm の雌に見られた。他に腎臓の相対重量の有意な低値が 2.8 ppm の雄に見られたが、用量に応じた変化ではなかった。生後 77 日目では脳の相対重量の有意な低値及び腎臓の絶対重量の有意な高値が 70 ppm の雌に見られた。

ChE 活性の測定では、暴露終了時の母動物では血漿及び赤血球中 ChE 活性の有意な低値が 2.8 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm に見られた。生後 21 日目の児動物では血漿中 ChE 活性の有意な低値が 14 ppm 以上に、赤血球中及び脳内 ChE 活性の有意な低値が 70 ppm に見られた。生後 77 日目の児動物では変化は見られなかった。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物の 14 ppm で T3 の有意な増加が見られた他は、変化は見られなかった。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、生後 21 日目の Reelin 及び NeuN 陽性細胞数には変化は見られなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、Tbr2 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。DCX 陽性細胞数には変化は見られなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、PCNA 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。TUNEL 陽性細胞数には変化は見られなかった。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

母動物では、分娩後 21 日目の体重及び肝臓重量において低値傾向及び有意な低値が 100 ppm に見られたが、実験期間中の歩行異常及び生殖発生毒性影響は見られず、摂餌量及び摂水量も対照群とほぼ同様に推移した。

児動物は、飲水投与 (Experiment 1) では歩行異常を含む一般状態に異常は見られなかったが、100 ppm において生後 21 及び 77 日目の体重及び脳の絶対重量が有意な低値を示した。腹腔内投与

(Experiment 2) では、生後 15 日目以降歩行異常のスコアに有意差が見られたが、生後 28 日目には回復に転じ、生後 63 日目にはその差は消失した。ACR 腹腔内投与群の生後 21 及び 77 日目の体重及び脳の絶対重量は対照群を有意に下回った。

海馬歯状回門での GABA 性介在ニューロン及び成熟ニューロンの検索では、飲水投与において Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の増加傾向及び有意な増加が生後 21 日目の 20 及び 100 ppm に見られた。生後 77 日目では Reelin 陽性細胞数に差は見られなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が 20 及び 100 ppm に見られた。腹腔内投与では、Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の有意な増加が ACR 投与群に見られ、生後 77 日目では Reelin 陽性細胞数に差はなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が見られた。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、飲水投与において PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少及び Cresyl Violet 染色によるアポトーシス小体の減少傾向が生後 21 日目の 20 ppm 以上に見られたが、生後 77 日目では差は見られなかった。なお、生後 21 日目のアポトーシスについては、更に TUNEL 染色により確認を行ったが、ほぼ同様な結果であった。腹腔内投与では、PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少が生後 21 日目の ACR 投与群に見られたが、アポトーシスに差は見られず、生後 77 日目ではいずれにおいても差は見られなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の検索では、飲水投与において DCX 及び Dpysl3 (TUC4) 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm に見られたが、生後 77 日目では差

は見られなかった。なお、生後 21 日目の NeuroD1、Tbr2 及び Pax6 陽性細胞数に変化は見られなかった。

なお、生後 4 日目の雌児動物について Reelin の免疫染色を、離乳時屠殺した母動物について Reelin 及び PCNA の免疫染色を行ったが、いずれも影響は認められなかった。

海馬歯状回門の面積及び歯状回顆粒細胞層下帯の長さについて解析を行った結果、飲水投与において歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さには明らかな影響は見られなかった。生後 77 日目ではいずれも差は見られなかった。腹腔内投与では、歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日目及び 77 日目に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さに影響は見られなかった。

生後 21 日目の児動物の海馬における real-time RT-PCR 解析では、有意差が散見されるものの飲水投与及び腹腔内投与のいずれにおいても、対照群の 1.5 倍を超える mRNA の発現レベルを示す遺伝子はなく、明らかな影響は見られなかった。

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 Nicotine (100 nM-10 μ M) 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 Nicotine 処置 (100 nM-10 μ M) により、マイクログリアの活性化に変化は認められなかった。また、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞に、Nicotine (100 nM) を処置しても、神経細胞ならびにアストロサイトへの分化誘導に変化は認められなかった。ES 細胞から神経幹細胞への誘導過程において、中枢神経系に発現の多い Nicotine 性アセチルコリン受容体のサブタイプである $\alpha 4\beta 2$ の発現を検討したところ、神経系細胞への誘導が進むにつれ、発現の増加が認められた。こうした条件下、ES 細胞から胚葉体形成時に Nicotine (100 nM) 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) の発現に変化は認められなかったものの、アセチルコリンの分解酵素である acetylcholinesterase (AChE) の発現増加が認められた。

免疫機能評価

昨年度の MDP の研究の結果、プラグを確認後 2 日目の時点で入荷した BALB/c マウスの妊娠率が非常に低いことが問題となっていた (コントロール群において 7 匹中 2~3 匹)。今回、改善を図るため、1

群あたりの匹数を前回の 7 匹から 12 匹に増やした。また、出産前後のストレスを可能な限り低減するため、床敷の交換も最小限度とし、出産後に新しいケージに移す際にも、出産時に用いていた床敷を一部新しいケージに持ち込むなど、一定の飼育環境確保に努めた。

その結果、出産は前回よりは改善したものの、コントロール群で出産率が 12 匹中 3 匹など、まだ課題が残っていることが示唆された。コントロール群は仔の雌雄も偏っており、仔雌が 20 匹に対し、仔雄は 5 匹であった。このため、暴露終了直後の 3 週齢における解析は可能であるものの、11 週齢時点での回復性試験については個体数が不足することになり、出産 37 日後に新たに 37 日齢の雄マウスを追加購入し、他のマウスと同様に 11 週齢まで飼育を続け、実験に供した。

3 週齢時点での解析実験：

暴露期間を通じて摂餌量の測定を行なったが、粉末飼料がケージ内で散乱し、信頼性の高い重量測定ができなかったため、解析は行なわないこととした。暴露をした母マウスおよび仔マウスの体重・臓器重量・臓器比重量を検討した結果、母マウスにおいては 14 ppm 暴露時に体重の増加が認められたが、用量依存性はなく、生理学的意義は低いと思われた。70 ppm 投与群において脾臓重量の有意な増加が認められたが、体重に対する比重量では変化がなく、軽微な変化と思われた。一方、仔マウスにおいては、唯一仔雄の胸腺比重量が最高用量群で有意に増加したが、やはり用量依存性はなく、体重で補正する前の値にも有意な変化は認められなかったことから、ごく軽微な変化であると思われた。

次に、母マウスおよび仔マウスの血球学的な解析の結果、70 ppm 投与群の母マウスにおいて、顕著な白血球の増加と赤血球および各種赤血球関連パラメータの減少が認められた。一方、仔マウスにおいては全ての項目について有意な変化は認められなかった。

次に、母および仔マウスにおける CPF 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。なお、仔マウスについては雌雄とも 2~3 匹分の血清を合わせて必要量を確保している。

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、14 ppm 以上で有意差が観察されることより、有機リン系農薬である CPF 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。

次に、フローサイトメトリーにより、仔マウスの脾臓および胸腺のリンパ球サブセット解析を行なった。

最初に、CD3 による成熟 T 細胞、CD49b による NK 細胞、および CD4/CD8a による T 細胞サブセットの解析を行なったところ、雄の 70 ppm 暴露群に

において脾臓における CD4 陽性リンパ球の存在比率が有意に増加し、また、同濃度の雌において脾臓の CD4 陽性成熟 (CD3 陽性) T 細胞が増加していた。しかし、後に述べる通り、70 ppm 暴露群の脾臓においては、Th1/Th2/Th17/Treg のいずれも有意な増加をしておらず、どのようなサブセットの CD4 T 細胞が増加したのかは不明である。

次に、採取した胸腺および脾臓細胞を *ex vivo* でタンパク質輸送阻害剤である Brefeldin A 存在下で PMA + Ionomycin により 5 時間刺激した CD4 陽性細胞の細胞内サイトカイン (IFN γ /IL-4/IL-17A) 染色により、エフェクター T 細胞のサブセット解析を行った。しかし、予試験で用いた成熟マウスの場合と異なり、生後 3 週の仔マウスにおいてはこれらのサブセットがリンパ球全体に占める割合は極めて低く、ほぼ全ての項目において暴露による有意な変化は認められなかった。唯一、雄の 14 ppm 暴露群の胸腺において CD4⁺IL17A⁺の減少が認められたが、用量依存性はなく、軽微な変化であると考えられた。なお、組織病理学的な異常所見はほぼ認められなかった。

最後に、免疫反応を負に制御する Treg を、CD4/CD25/Foxp3 により解析した。70 ppm 暴露群の雌の胸腺において CD4⁺Foxp3⁺の有意な増加が認められたが、Treg の別の指標である CD4⁺CD25⁺については増加傾向はあるものの有意な変化は見られず、軽微な変化であると考えられた。

以上の結果を総合すると、CPF の周産期暴露は、CD4 陽性細胞にわずかな影響を及ぼすものの、その意義は決して大きくないと思われた。

11 週齢時点での解析実験：

出産後 3 週まで暴露を続けた仔マウスを離乳させ、通常の固形 CRF-1 試料に変更する事により、暴露を停止して 11 週まで飼育を続けた。これにより、3 週齢時点で認められた変化が回復するかどうか、また、成長後に新たに発現する免疫毒性がないかどうかを確認した。

体重および臓器重量については、雌雄とも全ての暴露群でコントロールと有意差は認められなかった。また、血球学的な解析を行なったところ、雌については全ての群において有意差は認められなかったが、雄については 14 ppm 暴露群において白血球の占める割合が減少していた。また、70 ppm においては平均赤血球容積 (MCH) の増加が認められたが、他の赤血球関連パラメータに変化は見られないため、影響は軽微にとどまっていると考えられる。血清学的パラメータについては、3 週齢で観察されたコリンエステラーゼ活性の著明な低下が完全に回復していた。これは、8 週間の CPF 暴露停止により最も顕著に回復した項目の例である。なお、70 ppm 暴露群の雌において、わずかながら A/G 比の低下が認められた。肝機能が多少障害を受けている可能性がある。組織病理学的解析からは、目立った所見は認められ

なかった。唯一、単核球の軽度な凝集が雌雄とも肝臓で観察されたが、病理学的意義は不明である。

最後にフローサイトメトリーによる T 細胞分化への影響の解析であるが、雄の脾臓 CD4 陽性リンパ球および雌の胸腺における CD4 陽性 T 細胞の増加が観察された。このとき、雌の胸腺においては CD4⁺CD8⁺のダブルポジティブ細胞の減少が認められた。また、雄の脾臓 CD4⁺CD25⁺ Treg 細胞の増加が観察されたが、3 週齢雌脾臓の場合とは逆に、CD4⁺Foxp3⁺ Treg 細胞の増加は認められなかった。

感染感受性評価

<MDP の感染影響>

MDP 周産期暴露において、飼育出産が可能であった最高暴露用量は 30 ppm であった。しかし、この用量では親マウスが子マウスを捕殺する事が多く、BALF 中のサイトカインレベルについては 10 および 20 ppm で検討した。感染 1 日後では、感染初期のウイルス排除に関わる IL-6 レベルが用量に依存して有意に低下した一方で、TNF- α レベルはあまり影響を受けなかった。更に、感染 5 日後では RS ウイルス感染病態の代表的な指標である IFN- γ レベルも MDP 暴露により有意に低下した。この感染 5 日後の肺組織について病理組織学的な検討を実施したが、前年度報告 (~10 ppm) と同様に感染病態の増悪化は認められなかった。これらの結果から MDP が RS ウイルス感染初期の免疫応答に影響することが判ったため、マイクロアレイを用いて感染 1 日後の肺組織における遺伝子発現応答を網羅的に解析した。RS ウイルス感染時にのみ MDP 暴露で変動 (対照に対して 2 倍以上) する 2536 遺伝子を見出し、更に Gene ontology データベースから免疫あるいは炎症に関与する遺伝子群を絞り込んだ。遺伝子発現抑制群の上位に IL-6 や G-CSF など単球/マクロファージ系で産生するサイトカイン類や IFN- γ など T 細胞で発現する分子が見出された。一方、遺伝子発現上昇群の上位には目立った分子種が見出されなかった。

<CPF の感染影響>

CPF は 2.8~70 ppm の用量で周産期暴露を行い、MDP と同様に仔マウスについて感染影響評価を実施した。RS ウイルス感染 1 日後では BALF 中の TNF- α レベルが CPF 暴露により有意に低下したが、IL-6 レベルには殆ど影響しなかった。一方、感染 5 日後の IFN- γ レベルは上昇した。MDP と同様に感染 5 日後の肺組織の病理組織学的な検証を行ったが、CPF 暴露による明確なウイルス性肺炎の増悪化は確認されなかった。

発がん感受性評価

Mn の投与による親動物及び仔動物の一般状態、体重及び摂餌量に対する影響は認められなかった。また 34 週目までの生存率も Mn 投与による有意な変化はみられなかった。対照群では、ENU の経胎盤投

与により 34 週において、各々 62%(雄)及び 74%(雌)の動物に星状膠細胞腫、乏突起膠細胞腫、悪性星状膠細胞腫及び多形性膠芽腫等の中枢神経腫瘍が認められた。しかし、Mn による中枢神経腫瘍の種類、発生部位、発生率、発生数及び体積に対する影響は認められなかった。また、全群で三叉神経での神経鞘腫等の末梢神経腫瘍及び肺がん等の非神経腫瘍が認められたが、いずれも Mn による発生率の変化は認められなかった。

一方、ニコチンの発達期暴露による中枢神経系発がん修飾作用に関する実験では、授乳期間中、全ニコチン投与群で神経症状はなかったものの体重及び飲水量の著しい減少が認められた。0.05%ニコチンの投与群は生後一週より 0.025%に投与量を減らしたものの、その仔動物は 2 週目にて全例死亡した。0.002%及び 0.01%の仔動物の体重及び飲水量は明らかに減少又は減少傾向を示している。陽性対照群である 0.04%プロパンスルトン投与群では 3-5 週目に雄の有意な体重増が認められた。

D. 考察

In vivo 神経発達評価

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

ラットを用いた実験では、海馬歯状回顆粒細胞層下帯における DCX 陽性細胞数の増加が生後 21 日目の 800 ppm に見られた。DCX は type 2b、type 3 前駆細胞及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られるが、type 2a 及び 2b 前駆細胞に発現する分子である Tbr2 に変動は見られなかったことから、今回見られた DCX 陽性細胞の増加は type 3 前駆細胞あるいは幼若顆粒細胞の増加を示すものと考えられ、このステージにおける分化障害を示唆するものと考えられた。更に、同じ生後 21 日目の 800 ppm において海馬歯状回門における Reelin 陽性細胞数の増加も認められた。Reelin は同部位において GABA 性介在ニューロンが分泌することが知られており、顆粒細胞系譜の移動に関与することが報告されている。従って、Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加は、顆粒細胞層下帯における前駆細胞の分化障害に関連した変動であると推測された。一方、海馬歯状回門においてミクログリアの活性化を示唆する Iba1 及び Cox2 陽性細胞数の増加が生後 21 日目の 32 ppm 以上で見られた。Mn は in vitro でミクログリアを直接的に活性化することが報告されている。昨年度報告した通り、脳内の Mn 濃度は生後 21 日目の児動物のみにおいて 32 ppm 以上で上昇を示している。従って、今回見られたミクログリアの活性化は脳内 Mn 濃度の増加に伴う変化と考えられた。更に、生後 21 日目の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、IL-1 α 、IL-6、NOS2、TNF- α といった炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加が 800 ppm で認められている。ミクログリアはこれらの炎症誘発性サイトカインを放出することが知ら

れていることから、炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加は、脳内 Mn 濃度の増加に伴うミクログリアの活性化に関連するものと推測された。甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppm で生後 21 日目の児動物のみにおいて弱いながらも T3 及び T4 の減少ならびに TSH の増加が見られており、Mn 発達期暴露の影響が考えられた。

マウスを用いた実験では、Reelin 及び NeuN の二重染色の結果、海馬歯状回門において Reelin 陽性/NeuN 弱陽性～陰性細胞の増加が 800 ppm に認められた。前述の通り、Reelin 陽性細胞の増加は Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加を示すものであるが、成熟ニューロンのマーカーである NeuN に関して弱陽性～陰性を示していることから、未熟な Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加を示唆するものと考えられた。一方、歯状回顆粒細胞層下帯では TUC4 陽性細胞数の増加あるいは減少が生後 21 日目及び 77 日目の 800 ppm に見られた。TUC4 は幼若顆粒細胞に発現する分子として知られており、幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害を示唆するものと考えられた。生後 21 日目の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、TUC4 の mRNA の発現レベルの減少が 800 ppm に見られ、前述の免疫染色の結果を裏付ける結果が得られた。また、Reelin、GAD67 及び ApoER2 (Reelin 受容体) の mRNA の発現レベルの増加が見られたが、昨年報告した通り、免疫染色において Reelin 及び GAD67 陽性細胞の増加が見られており、同様に免疫染色結果を裏付ける内容であった。前駆細胞の分化障害及び Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加はラットでも見られたが、ラットと異なりマウスでは生後 77 日目でも見られており、不可逆的な永続性が示唆された。

ゲノムのメチレーション解析では、800 ppm で Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の過メチル化及び mRNA の発現レベルの減少が見られ、Mn 投与により過メチル化を受け、転写が抑制される 4 遺伝子が同定された。このうち、Parvalbumin 及び MID1 は免疫染色においても、それぞれ介在ニューロン、顆粒細胞層 (下帯を含む) に陽性細胞を認め、Mn 投与により陽性細胞数が減少を示し、後者は成熟後まで持続することが確認された。このことより、発達期の Mn 暴露によって、ニューロン新生に関連する遺伝子発現のエピジェネティックな発現制御による修飾が成熟後まで続く可能性が見出された。甲状腺関連ホルモン測定では、T4 の減少が見られたが T3 及び TSH では明らかな変動は見られず、限定的な変化であると判断され、ニューロン新生に対する Mn の影響に抗甲状腺作用を介した機序の関与は限局的であると判断された。

< CPF を用いた発達期暴露影響評価 >

本年度、ラットを用いた CPF の暴露実験を実施し、母動物については体重では一過性の変動が見られたものの明らかな変化は見られなかった。摂餌量では

14 ppm のみで高値が妊娠後期に見られたがその程度は軽度であった。児動物では 14 ppm のみにおいて体重の高値が生後 4~21 日目に見られた。同様の用量反応性を欠く児動物体重の高値は、過去に実施された試験でも報告されており、同様の変化と考えられた。ChE 活性の測定では、暴露終了時の血漿及び赤血球中 ChE 活性の低値が母動物では 2.8 ppm 以上に見られたが、児動物では 14 ppm 以上にあるいは 70 ppm のみであった。しかし、血漿及び赤血球中 ChE 活性は母動物よりも反応性は低かったにもかかわらず、脳内 ChE 活性は母動物及び児動物とも 70 ppm に変動が見られ、同等の反応性を示した。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での検索では、Tbr2 陽性細胞数の減少及び PCNA 陽性細胞数（細胞増殖）の減少が生後 21 日目の 70 ppm に見られた。前述の通り、Tbr2 は type 2 前駆細胞に発現する分子であるが、type 2 前駆細胞はニューロンの性質を部分的に保持しながら分裂を繰り返す細胞であることが報告されている。従って、今回得られた結果は、やがてニューロンとなるべき細胞増殖能を持った type 2 前駆細胞が影響を受けていることを示唆するものと考えられた。

< ACR を用いた発達期暴露影響評価 >

昨年の子備検討と同様に児動物の発達遅延を示唆する体重及び脳重量の低値が飲水投与の 100 ppm 及び腹腔内投与の生後 21 及び 77 日目に見られたが、歩行異常を示したのは腹腔内投与のみであった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖の検索では、生後 21 日目に PCNA 陽性細胞数（細胞増殖）の減少が発達遅延のない 20 ppm にも見られたが、生後 77 日目には消失し可逆性が示唆された。

一方、海馬歯状回門における検索では、生後 21 日目に Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の増加が 20 ppm 以上に見られ、更に NeuN の変化については生後 77 日目まで継続して見られており、Reelin の変化は可逆的であったが、NeuN の変化は不可逆的であった。前述の通り、Reelin は新生ニューロンの移動に関与する分子であることから、細胞増殖の減少に関連して Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加が生じているものと推測された。また、生後 77 日目では NeuN の変化のみ不可逆的であったことから、生後 21 日目において増加した GABA 性介在ニューロンが、生後 77 日目では細胞増殖の回復により Reelin は分泌しなくなり、そのまま残存しているものと推測された。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシスの検索では減少傾向が生後 21 日目の 20 ppm 以上に見られた。前述の通り、同群では細胞増殖の減少や後述するように顆粒細胞系譜の障害が見られていることから、ACR によるニューロン新生障害に対する神経保護作用の生じている可能性が考えられた。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での新生ニューロン分化指標の 100 ppm 投与群での検索では、DCX 及び

Dpysl3 (TUC4) 陽性細胞数の減少が生後 21 日目に見られた。これらは、type 2b、type 3 前駆細胞及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られているが、Pax6 (type 1- type 2a マーカー)、Tbr2 (type 2a 及び 2b マーカー)、NeuroD1 (type 2b、type 3 マーカー) に変動は見られなかったことから、今回見られた DCX 及び Dpysl3 (TUC4) 陽性細胞数の減少は幼若顆粒細胞の減少を示すものと考えられ、ACR は type 3 前駆細胞を標的として増殖抑制を生じ、その結果、幼若顆粒細胞が減少したのものと考えられた。

In vitro 神経発達評価

得られた結果より、Nicotine は中枢神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の分化誘導には大きな影響を与えないものの、神経分化過程において神経の運命決定に影響を与える可能性が示唆された。

免疫機能評価

本年度の、CPF 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は、胸腺の比重量などいくつかに軽微な変化が認められたが、用量依存性が認められず、昨年度の MDP の場合に比較してもその効果は弱かった。その作用メカニズムについては MDP の場合と同様にまだ不明であるが、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、有機リン系農薬の持つコリンエステラーゼ抑制活性による以下の影響が考えられる。

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 CPF により増強された可能性も考えられる。

一方、新生児ラットに出産後 4 日間 CPF を投与した場合、成熟後 (PND60) における T 細胞の Con A 刺激に対する増殖能が有意に低下するという報告があり、発達過程の神経系への影響を介した間接的な効果が寄与した可能性もあろう。しかし、本研究では、暴露終了時 (PNW3) も暴露停止 8 週間後 (PNW11) においても、雄の脾臓における CD4 陽性リンパ球の割合は逆に CPF の用量依存的に増加した。この相違は、*in vitro* でのマイトジェン刺激により誘導された細胞増殖と *in vivo* での生理的な分化・増殖の違いや、暴露期間の違いなどによるものと推察される。なお、11 週齢雌の胸腺においては CD4⁺CD8a⁺ の未分化 T 細胞が減少していることから、CD4 陽性 T 細胞への分化過程が CPF により促進された可能性が示唆された。

前述した通り、CD4 陽性 T 細胞は免疫系の中核機能を担っている。これらの細胞は少なくとも 4 種以

上の機能的に異なる亜集団からなっているが、特定のT細胞サブセットへの分化がCPFに感受性が高いのだとすれば、上記のような免疫系への影響をより詳細に理解することができると考えられた。

同様のエンドポイントを目指した研究としては、Duramadらによるヒト末梢血リンパ球をCPFの代謝産物（クロルピリホスオクソン；CPO）とリポ多糖で刺激した場合にIFN- γ を産生する細胞集団を解析した研究があるが、結果としてその応答細胞はCD4陽性T細胞ではないことが分かったのみであった。

本研究では、CPFの発達期免疫影響をTh1、Th2、Th17およびTregへの分化割合を指標として解析することを試みた。その結果、Tregの存在比率が一部条件で増加することが明らかになった。しかし、いずれにせよCPFによるリンパ球サブセット存在比率への影響は軽微であることが示された。

感染感受性評価

MDPとCPFは共に周産期曝露により、仔マウスのRSウイルス感染病態の明確な増悪化は示さなかった。しかし、両化合物はウイルス感染初期（感染1日後）にそれぞれ異なったproinflammatory cytokine（TNF- α 、IL-6）の産生を抑制することが確認されている。特にMDPについては、マイクロアレイ解析でもこの結果を支持するデータが得られており、今まで全く報告のない免疫系に関する作用が強く示唆された。更に、T細胞での発現が知られている分子種（IFN- γ 、CL1等）の発現抑制も見られており、この影響が本来感染進行と共に進展する炎症反応を抑制した可能性が示された。今後、*in vitro*実験系などで、MDPの発達期の細胞免疫を形成する細胞種に対する影響を検討していく予定である。なお、CPFについて、MDPと同様にマイクロアレイ解析により、RSウイルス感染1日後の肺組織における遺伝子発現変動を検討している。

発がん感受性評価

ENUを経胎盤曝露した中枢神経発がんモデルにより、Mnの発達期曝露による発がん修飾作用について検討を行った。

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を経胎盤曝露し、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、母動物と仔動物の体重、摂餌量及び仔動物の死亡率及び腫瘍性病変の発生率について、Mnの投与による明らかな影響は認めなかった。霊長類で認められるMn中毒のような症状が齧歯類では観察されにくいとの報告があり、脳内輸送に関わるtransferrinレベル及びMnとの強い親和性を示すneuromelaninレベルの種差の関与が考えられる（Haschek et al., *Handbook of Toxicologic Pathology*, 2nd edition, volume 2, 518-520, ACADEMIC PRESS, 2002）。

現在はMnの乳汁移行に関して検討を行っている。

またニコチンに関しては親仔動物に酒石酸ニコチン二水和物を0.002, 0.01及び0.05%濃度で飲水投与する実験を実施しているが、明らかな神経症状はなく2%サッカリン水に混ぜて投与したにも関わらず飲水量が著しく減少したのはニコチンの苦味等に対する忌避と考えられた。

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曝露実験では、ニューロン新生に関連する遺伝子のエピジェネティックな発現修飾が成熟後まで続く可能性を見出した。一方、顆粒細胞層下帯では、Mnは前駆細胞の永続的な分化障害を誘発し、これに伴ってニューロン移動に機能するReelinの持続的な分泌を生じるものと考えられた。ラットにおいても同様のtype3前駆細胞から幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害及びReelin分泌GABA性介在ニューロンの増加が見られたが、変化は可逆的であった。ラットでは更に脳内免疫の活性化を示唆するミクログリアやサイトカインmRNAの変化が見出された。CPFでは脳内ChE阻害作用の確認された用量でtype2前駆細胞が標的となる可能性が示唆された。ACRに関しては、可逆的な細胞増殖の減少及びこれに関連するReelin分泌GABA性介在ニューロンの増加が見出された。また、type3前駆細胞がACRの標的となって増殖抑制を受け、その結果、幼若顆粒細胞の減少することが示唆された。

*In vitro*神経発達評価では、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、本年度はNicotineを用い検討を行った。今回の検討より、Nicotineは中枢神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の分化誘導には大きな影響を与えないものの、神経分化過程において神経の運命決定に影響を与える可能性が示唆された。

免疫機能評価では、有機リン系農薬（CPF）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週間の親マウスに混餌投与（0, 2.8, 14, 70 ppm）を行い、3週齢の仔マウスの血液学的試験、胸腺、脾臓リンパ球のサブセット解析等を行った。3週齢仔マウスの血中コリンエステラーゼ活性が顕著に減少していたことから、CPFの経胎盤・経授乳曝露は成立していたことが示唆される。リンパ球サブセット解析の結果としては、CD4陽性細胞およびTreg細胞の相対的な増加等が観察された。曝露を停止して8週後の11週齢においては血中コリンエステラーゼ活性が復活しており、曝露の影響は消失したことが示唆されるが、上記CD4陽性T細胞やTreg細胞の増加傾向は依然として認められた。

感染感受性評価では、MDPとCPFは共に周産期

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示さなかったが、ウイルス感染初期の免疫応答に影響を示した。

発がん感受性評価では、ENU を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルは 34 週間という短期間で 60-70%の動物に中枢神経腫瘍を発生させることから中枢神経発がん修飾物質の検索に有用であると考えられた。しかし最高 0.05%濃度で塩化 Mn 4 水和物を混餌投与した際の中枢神経発がん修飾作用は認めなかった。現在は親仔動物に酒石酸ニコチン二水和物を最高 0.05%濃度で飲水投与する実験を実施している。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

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.* 29(4): 407-414, 2010.

Ohishi, T., Wang, L., Ogawa, B., Fujisawa, K., Tani, E., Hayashi, H., Mitsumori, K., Shibutani, M.: No effect of sustained systemic growth retardation on the distribution of Reelin-expressing interneurons in the neuron-producing hippocampal dentate gyrus in rats. *Reprod. Toxicol.* 30(4): 591-599, 2010.

Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Impaired oligodendroglial development by decabromodiphenyl ether in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation. *Reprod. Toxicol.* 31(1): 86-94, 2011.

Ogawa, B., Ohishi, T., Wang, L., Takahashi, M., Tani, E., Hayashi, H., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats. *Arch. Toxicol.* (in press).

Takahashi, M., Inoue, K., Koyama, N., Yoshida, M., Irie,

K., Morikawa, T., Shibutani, M., Honma, M., Nishikawa, A.: Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. *Arch. Toxicol.* (in press).

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., 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 doublecortin gene is involved in the impairment of neurogenesis with aging. *Synapse*, 64(8): 611-616, 2010.

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*, 64(9): 721-728, 2010.

Kuzumaki, N., Ikegami, D., Tamura, R., Hareyama, N., 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 brain-derived neurotrophic factor gene is involved in enriched environment-induced neurogenesis. *Hippocampus*, 21(2): 127-132, 2011.

Hachisuka, A., Nakamura, R., Sato, Y., Nakamura, R., Shibutani, M., Teshima, R. [Effects of perinatal exposure to the brominated flame-retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on the developing immune system in rats]. *Kokuritsu Iyakuin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku.* 128:58-64, 2010, Japanese.

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):393-7, 2010.

Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Kurokawa, M.: Functional disorder of primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in offspring mice exposed to a flame retardant, decabrominated diphenyl ether, perinatally. *J. Med. Virol.* 82(6): 1075-1082, 2010.

2. 学会発表

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

Masamitsu Honma, Naoki Koyama, Manabu Yasui, Shigeaki Takami, Miwa Takahashi, Kaori Inoue, Midori Yoshida, Kenichi Masumura, Takehiko Nohmi, Shuichi Masuda, Naohide Kinae, Takuya Suzuki, Tomonari Matsuda, Makoto Shibutani, Toshio Imai: Difference of acrylamide inducing genotoxicity and adduct formation between child and adult rats. 49th Annual Meeting of Society of Toxicology (SOT) 2010, Salt Lake City, March 7-11, 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)

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, 神経組織の成長・再生・移植研究会 第 25 回学術集会, 平成 22 年 5 月 22 日, 大阪

大石 巧, 三枝由紀恵, 小川文一朗, Wang Liyun, 藤沢賢一, 嶋本敬介, 剣持 明, 三森国敏, 渋谷 淳: 低栄養に起因する脳発達遅延は海馬歯状回のニューロン発達に影響を及ぼさない, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄, 2010 年 6 月 16-18 日, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, p. 212 (P-151)

三枝由紀恵, 富士本仁, 禹 桂炯, 剣持 明, 嶋本敬介, 広瀬雅雄, 西川秋佳, 三森国敏, 渋谷 淳: 発達期神経毒暴露に起因するニューロン分布異常に対する影響評価の確立- 小脳片葉小節葉の顆粒細胞層における Reelin 陽性細胞の検討- 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄, 2010 年 6 月 16-18 日, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, p. 213 (P-154)

Wang Liyun, 三枝由紀恵, 小川文一朗, 大石 巧, 嶋本敬介, 剣持 明, 三森国敏, 渋谷 淳: マウスの発達期マンガン暴露によりニューロン移動の異常とグリア増殖が誘発される, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄, 2010 年 6 月 16-18 日, 第 37 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, p. 215 (P-157)

Yukie Saegusa, Gye-Hyeong Woo, Hitoshi Fujimoto, Sayaka Kemmochi, Keisuke Shimamoto, Liyun Wang, Akiyoshi Nishikawa, Kunitoshi Mitsumori, Makoto

Shibutani: Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental hypothyroidism in rats. AETOX (Spanish Association of Toxicology) with the collaboration of EUROTOX (European Societies of Toxicology) in the name of IUOTOX (the International Union of Toxicology), Barcelona-Spain 19-23 July 2010 Abstracts of the XII International Congress of Toxicology, S227 (P207-034).

小川 文一朗, 大石 巧, Wang Liyun, 桑田 和倫, 盛田 怜子, 三森 国敏, 渋谷 淳: アクリルアミド (ACR) の発達期暴露によるラット海馬歯状回でのニューロン発達障害の回復性とその標的細胞について, 第 150 回日本獣医学術集会, 帯広, 日本獣医病理学会抄録: p. 175 (B-42), 9月16-18日, 2010

大石 巧, Wang Liyun, 小川文一朗, 井上彩子, 佐藤 彬, 五十嵐良明, 三森国敏, 渋谷 淳: マンガンの発達期暴露によるラット海馬歯状回におけるニューロン及びグリアへの影響, 第 27 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪, 第 27 回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-007, p.92, 1月27-28日, 2011

矢島真理絵, 葛巻直子, 成田 年, 成田道子, 今井哲司, 古田貞由, 鈴木敦郎, 宮下和彦, 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 細胞からの分化誘導におけるモノアミンおよび神経ペプチドの役割, 第 83 回日本薬理学会年会, 大阪, 3月, 2010

Minoru Narita, Naoko Kuzumaki, Satoshi Imai, Tsutomu Suzuki: Role of G-Protein-Coupled-Receptors in the differentiation from embryonic stem cells, The International Narcotics Research Conference (INRC), Malmo, Sweden, July, 2010

Naoko Kuzumaki, Atsuo Suzuki, Michiko Narita, Kohei Yamamizu, Sadayoshi Furuta, Satoshi Imai, Hideyuki Okano, Jun Yamashita, Tsutomu Suzuki, Minoru Narita: Opioid system regulates neural and endothelial cell differentiation from ES cells, The International Narcotics Research Conference (INRC), Malmo, Sweden, July, 2010

Atsuo Suzuki, Naoko Kuzumaki, Michiko Narita, Satoshi Imai, Yohei Okada, Hirota James Okano, Hideyuki Okano, Tsutomu Suzuki, Minoru Narita: Analysis of molecular mechanism underlying the control of neural stem cell differentiation by the stimulation of dopamine receptors located on embryonic stem cells, The International Narcotics Research Conference (INRC), Malmo, Sweden, July, 2010

葛巻直子, 成田 年, 成田道子, 今井哲司, 岡野栄之, 鈴木 勉: オピオイドによる幹細胞分化制御機構,

第 32 回日本疼痛学会, 京都, 7 月, 2010

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: ES 細胞からの神経分化における G タンパク共役型受容体の役割, 第 33 回日本神経科学大会, 兵庫, 9 月, 2010

鈴木敦郎, 葛巻直子, 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, 成田年: Dopamine 受容体刺激による ES 細胞分化制御機構の解析, 第 33 回日本神経科学大会, 兵庫, 9 月, 2010

手島玲子, 澤田純一: 発達期曝露による臭素化難燃剤等の免疫影響について, 第 17 回日本免疫毒性学会, 筑波, 第 17 回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集: S-5, p64, 9 月, 2010

渡辺 渡, 吉田裕樹, 紺野克彦, 広瀬明彦, 黒川昌彦: 環境化学物質テトラプロモビスフェノール A の周産期曝露による RS ウイルス感染病態への影響, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集: P2-009, p371, 11 月, 2010

吉田裕樹, 甲斐久博, 堤 重敏, 安川 憲, 渡辺 渡, 松野康二, 白木公康, 黒川 昌彦: 単純ヘルペスウイルス 1 型感染に対するプロポリスの病態改善効果の解析, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会, 徳島, 第 58 回日本ウイルス学会学術集会抄録集: P3-032, p426, 11 月, 2010

渡辺 渡, 吉田裕樹, 紺野克彦, 広瀬明彦, 黒川昌彦: 難燃剤テトラプロモビスフェノール A の発達期曝露による RS ウイルス感染病態への影響, 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 3 月, 2011.

吉田裕樹, 渡辺 渡, 黒川昌彦: 脂肪細胞における TLR2 発現制御に対する柑橘類フラボノイドの影響, 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 3 月, 2011

黒川昌彦, 甲斐久博, 吉田裕樹, 堤 重敏, 安川 憲, 渡辺 渡, 松野康二, 白木公康: 単純ヘルペス 1 型感染症に対するプロポリスの有用性の検討, 日本薬学会第 131 年会, 静岡, 3 月, 2011

Watanabe W., Shimizu T., Sawamura R., Hirose A., Kurokawa M.: Functional disorder of primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in offspring mice exposed perinatally to decabrominated diphenyl ether. XII International Congress of Toxicology, Barcelona: #205-039, July, 2010

曹 永晩, 高見 成昭, 豊田 武士, 小川 久美子, 西川 秋佳: マンガンの幼若期曝露による中

枢神経発がん修飾作用, 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 第 69 回日本癌学会学術総会講演要旨集: P-0152, p.141, 9 月, 2010

曹 永晩, 高見 成昭, 豊田 武士, 大波 冴子, 小川 久美子, 西川 秋佳: 中枢神経発がんモデルにおけるマンガンの幼若期曝露による発がん修飾の検索, 第 27 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 大阪, 第 27 回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-097, p.137, 1 月, 2011

大波 冴子, 曹 永晩, 豊田 武士, 小川 久美子, 西川 秋佳: N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) 誘発ラット中枢神経腫瘍の免疫組織学的検討, 第 27 回日本毒性病理学会総会および学術集会, 大阪, 第 27 回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-060, p.118, 1 月, 2011

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22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農学研究院 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)、クロルピリフォス (CPF) 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新生ニューロンの分化、細胞増殖性とアポトーシスの変動を検討した。Mn では、マウスで暴露終了時でのゲノムのメチレーション解析により、現在まで過メチル化及び mRNA の発現レベルの減少を示す 4 遺伝子 (Pvalb, Mid1, Atpla3, Nr2f1) を見出し、このうち、Parvalbumin は歯状回門の介在ニューロン、MID1 は顆粒細胞層で発現細胞の減少として確認され、MID1 の変化は成熟後まで持続したことから、発達期の Mn 暴露によってニューロン新生に関連する遺伝子のエピジェネティックな発現修飾が成熟後まで続く可能性が見出された。一方、顆粒細胞層下帯では幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害、及びこれに関連すると思われる海馬歯状回門における Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの不可逆的な増加が見られたことから、Mn は前駆細胞の永続的な分化障害を誘発し、これに伴ってニューロン移動に機能する Reelin の持続的な分泌を生じるものと考えられた。ラットにおいても同様の type 3 前駆細胞から幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害及び Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加が見られたが、変化は可逆的であった。ラットでは更に脳内 Mn 濃度依存的と推測されるミクログリアの活性化とそれに伴うと思われる炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加が見られた。CPF では脳内コリンエステラーゼ阻害作用の確認された用量で顆粒細胞層下帯での type 2 前駆細胞及び細胞増殖の減少が見られ、type 2 前駆細胞が CPF の標的となる可能性が示唆された。ACR に関しては、可逆的な細胞増殖の減少及びこれに関連する Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加が見られ、更に GABA 性介在ニューロンは細胞増殖が回復した後も Reelin 分泌をせずに残存している可能性が示唆された。また、type 3 前駆細胞が ACR の標的となって増殖抑制を受け、その結果、幼若顆粒細胞の減少することが示唆された。

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 (CPF)、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及びマウス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、化学物質暴露時に見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。

22年度は、21年度に発達期暴露実験を実施した ACR (ラット) 及び Mn (マウス及びラット) の各

種脳発達影響指標の評価を実施・終了した。また、CPF (ラット) の暴露実験を行った。

B. 研究方法

< Mn を用いた発達期暴露影響評価 >

21年度にラット及びマウスを用いた暴露実験を終了している。すなわち、発達期化学物質暴露モデルとして、ドパミンニューロン傷害性物質の $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ を飼料に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠 10 日から離乳時(生後 21 日)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時と生後 77 日目に解剖を行った。

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) 各群 8 匹使用し、予備試験結果を基に公比 5 で 32、160、800 ppm の 3 用量を設定し、対照群 (0 ppm) を含む 4 群構成とした。離乳時には、母動物に対する被験物質暴露を終了し、児動物は通常的基础飼料である CRF-1 に切り替えて飼育した (Fig. 1)。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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目の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 日目及び生後 77 日目の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -3.0 mm 及び -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、3μm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 GAD67 抗体（glutamic acid decarboxylase 67, x50倍、IgG、Millipore Corporation）、抗マウス NeuN 抗体（x100倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation）、抗マウス GFAP 抗体（glial fibrillary acidic protein、Clone GA5、x200倍、IgG、Millipore Corporation）、抗ウサギ DCX 抗体（doublecortin、x100倍、IgG、Abcam）、抗ウサギ Tbr2 抗体（T box brain 2、x200倍、IgG、Abcam）、抗ウサギ Iba1 抗体（ionized calcium-binding adaptor molecule 1、x300倍、Wako Pure Chemical Industries, Ltd.）、抗マウス Cox2 抗体（cyclooxygenase-2、IgG1、1:200、BD Biosciences）、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 性介在ニューロンの指標である Reelin 及び GAD67、成熟ニューロンの指標である NeuN 並びにミクログリアの指標である Iba1 及び Cox2 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、新生ニューロンの分化指標である GFAP、Tbr2 及び DCX 陽性細胞数、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数並びに TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数の検索を行った。暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに生後 77 日目の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 日目の児動物の海馬を用いて、IL-1α、IL-1β、IL-6、NOS2、TNF-α、COX2、DCX、NeuroD1、Pax6、TUC4、Reelin、VLDLR、ApoER2 及び Dab1 の mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR 解析により行った。更に、MnCl₂·4H₂O の発達期暴露による甲状腺関連ホルモンへの影響を検討するため、妊娠 SD:IGS ラット（日本チャールズリバー、各群 6 匹）に 0、800、1600 ppm の用量で同様に暴露実験を行い、暴露終了時の母動物及び生後 21 日目並びに生後 77 日目の児動物について、血清中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE（Siemens Healthcare Diagnostics Inc.）を用いて測定した。

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 MnCl₂·4H₂O について 32、160、800 ppm の 3 用量を設定し、対照群（0 ppm）を含む 4 群構成とした。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. 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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目の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 日目の児動物の 0 及び 800 ppm については TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE（Siemens Healthcare Diagnostics Inc.）を用いて測定した。

生後 21 日目及び生後 77 日目の脳を用いて、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、3μm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）、抗ウサギ Tbr2 抗体（x200倍）、抗マウス Pax6 抗体（x500倍、IgG、Abcam）、抗マウス NeuroD1 抗体（x500倍、IgG、Abcam）、抗ウサギ TUC4 抗体（x1000倍、Millipore Corporation）、抗ウサギ MID1 抗体（Midline1、x150倍、IgG、Abcam）、抗マウス Parvalbumin 抗体（x1000倍、IgG、Millipore Corporation）、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、抗マウス Reelin 抗体（x1000倍）及び抗マウス NeuN 抗体（x1000倍）を用いて、DAB 及び Vector red 発色にて ABC 法（Vector Lab. Elite kit 及び ABC-AP kit）による二重染色を行った。更に、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、成熟ニューロンの指標である NeuN、並びに後述するゲノムの網羅的メチレーション解析で見出された MID1 及び Parvalbumin については、海馬歯状回における陽性細胞数の検索を行った。一方、新生ニューロン分化指標の Pax6、Tbr2、NeuroD1 及び TUC4、増殖細胞指標の PCNA 並びに 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。生後 21 日目の児動物の 0 及び 800 ppm の海馬を用いて real-time RT-PCR 解析により Reelin、ApoER2、VLDLR、GAD67、Pax6、Tbr2 及び TUC4 の mRNA の発現レベルを検討した。ゲノムのメチレーション解析では、CpG アイランド（CGI）マイクロアレイによる網羅的な解析を行い、検出された 29 の過メチル化遺伝子のうち、7 遺伝子（Pvalb、Actl6b、Hoxc8、Mid1、Atpla3、Cggbp1 及び Nr2f1）を選択し、メチレーション特異的 qPCR 解析により過メチル化の確認を行った。更に、これらの遺伝子について real-time RT-PCR 解析により mRNA の発現レベルを検討した。免疫染色による発現解析が可能な MID1 及び Parvalbumin に関しては海馬歯状回における陽性細胞の分布解析を進めた（前述）。

< CPF 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、コリン作動性ニューロン傷害性物質のクロルピリフォス（CPF）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、暴露終了時と生後 77 日目に解剖を行った。動物はラットを用いて検討した。

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、文献資料(Breslin WJ et al., *Fundam Appl Toxicol.*, 1996, 29:119-30)を基に、公比 5 とし、2.8、14、70 ppm の 3 用量を設定し、対照群(0 ppm)を含む 4 群構成とした。離乳時には、母動物に対する被験物質暴露を終了し、児動物は通常的基础飼料である 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 日目及び生後 77 日目の解剖時には、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 日目並びに生後 77 日目児動物の血漿、赤血球及び脳(前頭葉)中のコリンエステラーゼ(ChE)活性を TBA-120FR(Toshiba Medical Systems)を用いて、血漿中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.)を用いて測定した。

生後 21 日の脳を用いて、大脳の Bregma の後方約 -3.0 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、抗マウス NeuN 抗体、抗ウサギ Tbr2 抗体、抗ウサギ DCX 抗体、抗マウス PCNA 抗体を用いて、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。Reelin 及び NeuN 陽性細胞数については海馬歯状回門において、Tbr2、DCX 及び PCNA 陽性細胞数並びに TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数については海馬歯状回顆粒細胞層下帯において検索を行った。

<ACR を用いた発達期暴露影響評価>

ACR による歯状回ニューロン新生に対する影響の不可逆性とその標的細胞を検討するために、昨年度報告した予備検討とほぼ同様に、ACR を飲水に混じて母動物に摂取させることにより、妊娠 10 日から離乳時(生後 21 日)まで経胎盤・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時(生後 21 日)と生後 77 日に解剖を行った(Experiment 1)。更に、ACR の直接的な暴露による影響との比較・検討を行うために、生後 4 日から 21 日まで 3 回/週、ACR を新生児に腹腔内投与し、離乳時(生後 21 日)と生後 77 日に解剖を行った(Experiment 2)。

飲水投与による経胎盤・経乳的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット(日本エスエルシー)各群 6 匹使用し、これまでの実験結果(Takahashi M et al., *Arch Toxicol.*, 2009, 83:785-793)を基に公比 5 とし、4、20、100 ppm の 3 用量を設定し、対照群(0 ppm)を含む 4 群構成とした。一方、腹腔内投与による直接的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット(日本エスエルシ

一) 16 匹(各群 8 匹)を無処置のまま出産させ、生後 4 日から離乳時(生後 21 日)までの間、新生児に ACR 50 mg/kg BW を週 3 回腹腔内投与した。同様に生理食塩液を腹腔内投与する対照群を設け、2 群構成とした。児動物は生後 2 日に出生児数、体重の測定および性別の判定を行い、生後 4 日に母動物 1 匹あたり雄 8 匹(雄が不足する場合は雌を充当)となるように一腹児数を調整した(Fig. 4)。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。生後 21 日の離乳時に全母動物及び 3-4/母動物の雄児動物を解剖し、脳を摘出して免疫組織化学検査及び real-time RT-PCR 解析(児動物のみ)に供した。生後 77 日には残りの雄児動物を解剖し、脳を摘出して免疫組織化学検査に供した。摘出した脳は大脳の Bregma の後方-3.1 mm 及び-3.6 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、5 µm 厚の連続切片を作製した。なお、生後 4 日に除外した雌の児動物(9-10 例/群)についても切片を作製した。

切片は、抗マウス Reelin 抗体(x1000 倍)、抗マウス PCNA 抗体(x200 倍)、抗マウス NeuN 抗体(x100 倍)、抗ウサギ Dpysl3 抗体(TUC4, x1000 倍, Millipore Corporation)、抗ウサギ DCX 抗体(x2000 倍)、抗マウス NeuroD1 抗体(x300 倍)、抗ウサギ Tbr2 抗体(x500 倍)、抗マウス Pax6 抗体(x500 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 Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色(Apop Tag[®] in situ apoptosis detection kit, Millipore Corporation)を行った。GABA 性介在ニューロン発現分子 Reelin 及び成熟ニューロン指標 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。新生ニューロン分化指標 Dpysl3(TUC4)、DCX、Tbr2、NeuroD1 及び Pax6 陽性細胞数、増殖細胞指標の PCNA 陽性細胞数並びに Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数については、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯(増殖帯)において検索を行った。なお、一部の抗体については各個体 3 切片(約 250 µm 間隔)を用いて評価した(Table 1 参照)。生後 21 日目の児動物の海馬を用いて、Rein、Lyp8、Vldlr、Dab1、Pax6、NeuroD1、Dcx、Dpysl3、Pcna、Dnmt1、Hdac1、Hdac2 及び Hdac8 の mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR 解析により行った。

(倫理面への配慮)