

**Table 15. Body weight of dams exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of dam examined	8	8	8	8
Body weight (g)				
GD 10	283.4 ± 24.3 <sup>a</sup>	289.4 ± 17.2	290.1 ± 17.0	289.6 ± 14.2
GD 11	291.5 ± 25.4	298.3 ± 17.0	298.4 ± 15.8	296.5 ± 12.9
GD 12	297.3 ± 24.3	305.3 ± 16.9	306.4 ± 17.5	303.1 ± 14.4
GD 13	301.3 ± 23.7	310.4 ± 17.2	311.4 ± 18.2	308.5 ± 15.2
GD 14	307.0 ± 23.8	315.6 ± 17.0	317.9 ± 18.1	316.3 ± 14.5
GD 15	314.5 ± 27.4	324.4 ± 19.2	326.9 ± 17.6	325.9 ± 16.0
GD 16	324.0 ± 26.8	335.0 ± 16.9	336.5 ± 16.7	335.3 ± 14.5
GD 17	337.9 ± 29.6	347.9 ± 18.2	349.9 ± 18.5	347.3 ± 15.3
GD 18	350.0 ± 29.2	361.9 ± 18.2	365.4 ± 16.5	360.9 ± 16.7
GD 19	368.1 ± 29.2	377.6 ± 17.7	382.6 ± 16.8	379.3 ± 16.7
GD 20	383.4 ± 33.8	392.8 ± 18.8	401.3 ± 17.8	393.5 ± 17.5
PND 0	291.8 ± 21.9	312.9 ± 25.2	309.3 ± 17.7	300.3 ± 14.2
PND 4	311.5 ± 26.0	330.6 ± 21.8	325.4 ± 17.1	324.3 ± 15.1
PND 7	319.8 ± 20.9	328.6 ± 22.0	330.4 ± 16.8	322.5 ± 8.3
PND 11	303.6 ± 13.9	327.9 ± 26.7*	325.4 ± 9.2*	326.0 ± 13.2*
PND 14	317.4 ± 18.8	328.6 ± 23.6	322.6 ± 8.2	315.9 ± 12.7
PND 17	322.0 ± 22.0	326.0 ± 22.8	331.8 ± 12.9	316.3 ± 18.5
PND 21	308.0 ± 24.0	315.5 ± 17.3	312.6 ± 10.7	303.9 ± 17.8

\* Significantly different from the control group (\**P*<0.05).

<sup>a</sup> Mean±SD.

Abbreviations: GD, gestation day; PND, postnatal day.

**Table 16. Food consumption of dams exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of dam examined	8	8	8	8
Food consumption (g/animal/day)				
GD 10	19.6±2.6 <sup>a</sup>	20.3 ± 2.6	20.0 ± 2.9	20.0 ± 1.3
GD 14	22.8±1.6	23.9 ± 1.6	24.6 ± 1.4*	24.1 ± 1.1
GD 17	23.4±1.3	24.6 ± 1.6	25.4 ± 1.6*	25.4 ± 1.8*
GD 20	24.5±1.1	24.9 ± 1.8	26.4 ± 1.3*	25.6 ± 1.4
PND 4	34.5±4.9	35.8 ± 2.4	36.9 ± 2.4	37.8 ± 2.8
PND 7	41.3±2.7	40.6 ± 2.6	43.3 ± 2.3	41.6 ± 1.9
PND 11	45.4±1.5	47.8 ± 2.9	48.4 ± 3.4	47.9 ± 3.1
PND 14	53.4±4.6	54.5 ± 4.0	54.5 ± 3.2	52.1 ± 2.7
PND 17	58.1±3.8	57.1 ± 5.3	59.6 ± 4.7	55.1 ± 4.7
PND 21	68.3±3.0	69.0 ± 3.5	71.4 ± 3.9	68.0 ± 4.5
Food consumption (g/kg body weight/day)				
GD 10	69.4±8.7	74.0 ± 13.7	73.0 ± 15.2	69.0 ± 2.8
GD 14	74.3±5.0	75.7 ± 4.0	77.5 ± 1.5	76.3 ± 1.7
GD 17	69.4±3.8	70.8 ± 3.9	72.6 ± 3.7	73.0 ± 2.8
GD 20	64.2±4.0	63.4 ± 3.7	65.8 ± 4.0	65.2 ± 3.2
PND 4	110.7±12.2	108.8 ± 13.1	113.6 ± 9.8	116.7 ± 11.1
PND 7	129.2±8.4	124.4 ± 12.9	131.3 ± 10.4	129.2 ± 8.7
PND 11	149.7±9.2	146.5 ± 15.1	148.6 ± 9.1	147.1 ± 11.4
PND 14	168.3±12.0	167.2 ± 22.9	169.0 ± 10.2	165.4 ± 12.9
PND 17	180.7±7.3	176.1 ± 21.9	179.7 ± 12.1	174.4 ± 11.9
PND 21	222.6±17.8	219.6 ± 20.4	228.4 ± 12.5	224.6 ± 22.3

\* Significantly different from the control group (\**P*<0.05).

<sup>a</sup> Mean±SD.

Abbreviations: GD, gestation day; PND, postnatal day.

**Table 17. Body weight of offspring exposed to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
Body weight (g)				
Males				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	16	16	16	16
PND 0	6.6 ± 0.3 <sup>b</sup>	6.9 ± 0.5	6.9 ± 0.4	6.7 ± 0.2
PND 4	10.7 ± 1.1	10.9 ± 0.9	11.4 ± 0.5	10.9 ± 0.7
PND 7	17.2 ± 1.6	17.6 ± 1.8	18.8 ± 0.5*	18.0 ± 0.6
PND 11	26.2 ± 1.3	27.4 ± 3.0	29.1 ± 1.1**	27.4 ± 1.2
PND 14	33.2 ± 2.1	34.8 ± 3.1	36.6 ± 1.4**	34.3 ± 1.5
PND 17	41.0 ± 2.7	42.5 ± 3.5	44.3 ± 2.1*	41.1 ± 1.9
PND 21	57.8 ± 3.1	60.5 ± 4.3	63.1 ± 2.8*	57.2 ± 3.1
PND 28	100.6 ± 4.4	103.9 ± 5.1	107.1 ± 7.4	99.4 ± 4.8
PND 35	171.1 ± 8.7	174.5 ± 6.3	179.3 ± 11.5	168.3 ± 8.4
PND 42	245.1 ± 14.7	251.3 ± 9.9	256.4 ± 17.5	243.1 ± 12.2
PND 49	315.6 ± 18.6	321.9 ± 13.1	327.3 ± 23.5	314.9 ± 16.8
PND 56	375.4 ± 21.2	384.7 ± 19.5	391.4 ± 28.3	380.6 ± 19.1
PND 63	422.4 ± 21.6	435.1 ± 26.8	440.3 ± 28.8	429.3 ± 21.1
PND 70	464.5 ± 23.5	477.3 ± 31.3	485.0 ± 33.0	474.1 ± 23.2
PND 77	496.6 ± 25.9	514.7 ± 34.6	520.5 ± 33.6	508.3 ± 25.9
Females				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	16	16	16	16
PND 0	6.2 ± 0.3	6.5 ± 0.7	6.6 ± 0.4	6.3 ± 0.2
PND 4	9.9 ± 1.2	10.4 ± 1.0	11.1 ± 0.8*	10.1 ± 0.9
PND 7	15.9 ± 1.8	16.8 ± 1.9	17.8 ± 1.2*	16.6 ± 0.9
PND 11	24.3 ± 2.0	26.1 ± 2.6	27.5 ± 1.8**	25.6 ± 1.5
PND 14	31.2 ± 2.9	33.3 ± 2.6	34.8 ± 2.0*	32.5 ± 1.7
PND 17	38.6 ± 3.1	40.4 ± 3.1	42.3 ± 2.5*	39.0 ± 2.4
PND 21	54.3 ± 4.0	57.1 ± 3.5	58.6 ± 3.6	54.2 ± 3.6
PND 28	88.0 ± 7.2	91.6 ± 3.3	95.3 ± 9.5	89.6 ± 5.0
PND 35	138.3 ± 8.9	141.8 ± 6.0	143.6 ± 11.9	142.8 ± 7.2
PND 42	176.6 ± 13.1	180.5 ± 7.6	183.4 ± 14.7	183.4 ± 6.6
PND 49	202.9 ± 13.7	208.9 ± 10.5	213.5 ± 15.3	215.4 ± 8.2
PND 56	226.4 ± 17.5	233.0 ± 14.3	239.3 ± 18.9	241.3 ± 10.0
PND 63	251.4 ± 20.3	255.8 ± 16.5	260.4 ± 22.5	265.8 ± 9.9
PND 70	268.9 ± 22.8	273.1 ± 16.8	281.4 ± 22.8	286.0 ± 10.1
PND 77	279.8 ± 23.8	287.3 ± 15.9	296.8 ± 22.6	300.6 ± 12.3

\*\*\* Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

Abbreviations: PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Identical two male and two female offspring per dam ( $n = 8$ /group) were used for body weight measurement throughout the experiment. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 18. Food consumption of offspring exposed to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
<b>Males</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	16	16	16	16
Food consumption (g/animal/day)				
PND 35	19.5±0.8 <sup>b</sup>	19.7 ± 1.1	20.3 ± 1.6	19.1 ± 1.3
PND 42	25.8±1.2	26.4 ± 1.3	27.1 ± 2.2	26.5 ± 2.1
PND 49	28.9±1.7	29.6 ± 1.8	30.3 ± 2.6	29.3 ± 2.1
PND 56	30.6±1.5	31.2 ± 2.3	31.9 ± 2.6	31.1 ± 1.8
PND 63	30.8±1.2	31.8 ± 2.4	32.6 ± 2.7	31.1 ± 2.2
PND 70	31.0±1.6	32.1 ± 2.4	32.6 ± 2.2	31.4 ± 1.8
PND 77	30.4±1.8	31.4 ± 2.5	32.3 ± 2.5	31.3 ± 1.6
Food consumption (g/kg body weight/day)				
PND 35	114.1±4.1	112.8 ± 3.8	113.2 ± 3.9	113.2 ± 4.3
PND 42	105.1±3.0	105.2 ± 3.2	105.5 ± 3.8	109.0 ± 6.4
PND 49	91.7±2.5	91.8 ± 3.4	92.4 ± 3.6	93.0 ± 2.1
PND 56	81.5±2.2	81.2 ± 7.0	81.6 ± 2.4	81.8 ± 1.9
PND 63	73.0±2.3	73.1 ± 2.5	74.0 ± 2.1	72.5 ± 3.0
PND 70	66.8±2.3	67.2 ± 1.7	67.3 ± 2.0	66.2 ± 1.5
PND 77	61.3±2.3	60.9 ± 2.2	61.9 ± 1.9	61.5 ± 1.6
<b>Females</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	16	16	16	16
Food consumption (g/animal/day)				
PND 35	16.3±0.7	16.4 ± 0.7	16.2 ± 1.9	16.8 ± 1.1
PND 42	19.3±1.3	19.5 ± 0.8	19.3 ± 1.6	20.1 ± 1.3
PND 49	19.4±1.1	19.9 ± 1.3	20.3 ± 2.0	21.3 ± 1.6
PND 56	20.2±1.4	21.1 ± 2.0	21.1 ± 2.0	21.5 ± 1.6
PND 63	20.5±1.9	21.2 ± 1.8	21.1 ± 2.5	21.4 ± 1.5
PND 70	21.1±1.6	21.4 ± 1.9	21.8 ± 1.9	22.1 ± 1.9
PND 77	19.6±1.6	20.5 ± 1.6	21.1 ± 1.6	21.1 ± 2.1
Food consumption (g/kg body weight/day)				
PND 35	117.7±3.1	116.0 ± 3.9	112.6 ± 5.7	117.8 ± 6.2
PND 42	109.5±4.1	108.1 ± 1.9	105.6 ± 8.7	109.8 ± 6.4
PND 49	95.9±3.1	95.4 ± 2.3	94.8 ± 5.3	98.6 ± 5.4
PND 56	89.3±4.7	90.5 ± 4.5	88.3 ± 4.2	89.1 ± 4.9
PND 63	81.5±2.3	82.7 ± 2.0	80.7 ± 3.7	80.6 ± 4.0
PND 70	78.4±2.8	78.2 ± 2.7	77.5 ± 2.8	77.3 ± 5.0
PND 77	70.2±2.4	71.3 ± 2.1	71.3 ± 3.4	70.2 ± 4.6

No significant difference in any treated group from the control group.

Abbreviations: PND, postnatal day.

<sup>a</sup>Identical two male and two female offspring per dam (n = 8/group) were used for food consumption measurement after weaning. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit.

<sup>b</sup>Mean±SD.

**Table 19. Organ weight of offspring exposed to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats**

		Chlorpyrifos in the diet			
		Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
<b>PND 21</b>					
<b>Males</b>					
No. of offspring examined <sup>a</sup>		16	16	16	16
Brain	(g)	1.50 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.53 ± 0.06	1.53 ± 0.07	1.50 ± 0.06
	(g/100g BW)	2.66 ± 0.12	2.60 ± 0.19	2.49 ± 0.18	2.70 ± 0.13
Liver	(g)	2.14 ± 0.22	2.21 ± 0.25	2.29 ± 0.20	1.96 ± 0.21
	(g/100g BW)	3.77 ± 0.21	3.72 ± 0.12	3.70 ± 0.21	3.50 ± 0.15*
Kidneys	(g)	0.66 ± 0.03	0.64 ± 0.08	0.69 ± 0.04	0.65 ± 0.06
	(g/100g BW)	1.14 ± 0.06	1.08 ± 0.03*	1.12 ± 0.03	1.14 ± 0.05
Testes	(g)	0.23 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.24 ± 0.05
	(g/100g BW)	0.40 ± 0.07	0.41 ± 0.05	0.39 ± 0.06	0.42 ± 0.07
Salivary glands	(g)	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02
	(g/100g BW)	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.31 ± 0.01	0.34 ± 0.02
<b>Females</b>					
No. of offspring examined <sup>a</sup>		16	16	16	16
Brain	(g)	1.44 ± 0.05	1.44 ± 0.04	1.47 ± 0.04	1.44 ± 0.05
	(g/100g BW)	2.76 ± 0.20	2.58 ± 0.21	2.60 ± 0.18	2.69 ± 0.18
Liver	(g)	2.01 ± 0.19	2.08 ± 0.17	2.06 ± 0.20	1.87 ± 0.22
	(g/100g BW)	3.81 ± 0.10	3.69 ± 0.07	3.64 ± 0.26	3.46 ± 0.19*
Kidneys	(g)	0.62 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.06
	(g/100g BW)	1.15 ± 0.05	1.13 ± 0.05	1.14 ± 0.04	1.20 ± 0.06
Ovaries	(mg)	19.44 ± 4.85	17.91 ± 2.68	17.39 ± 1.87	15.11 ± 3.53*
	(mg/100g BW)	36.20 ± 8.02	32.65 ± 5.34	30.23 ± 2.32	26.98 ± 5.49*
Salivary glands	(g)	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.01	0.19 ± 0.02
	(g/100g BW)	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.34 ± 0.02
<b>PND 77</b>					
<b>Males</b>					
No. of offspring examined <sup>a</sup>		16	16	16	16
Brain	(g)	2.02 ± 0.04	2.11 ± 0.06	2.05 ± 0.11	2.03 ± 0.09
	(g/100g BW)	0.41 ± 0.02	0.41 ± 0.03	0.39 ± 0.01	0.40 ± 0.02
Liver	(g)	17.63 ± 1.61	17.99 ± 2.05	19.12 ± 2.19	18.22 ± 2.41
	(g/100g BW)	3.54 ± 0.20	3.49 ± 0.26	3.66 ± 0.23	3.57 ± 0.33
Kidneys	(g)	3.12 ± 0.21	3.19 ± 0.26	3.37 ± 0.20	3.39 ± 0.34
	(g/100g BW)	0.63 ± 0.03	0.62 ± 0.05	0.65 ± 0.03	0.67 ± 0.05
Testes	(g)	3.37 ± 0.26	3.54 ± 0.25	3.54 ± 0.29	3.67 ± 0.26
	(g/100g BW)	0.68 ± 0.05	0.69 ± 0.06	0.68 ± 0.06	0.72 ± 0.06
Salivary glands	(g)	0.68 ± 0.06	0.73 ± 0.03	0.74 ± 0.08	0.70 ± 0.07
	(g/100g BW)	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01
<b>Females</b>					
No. of offspring examined <sup>a</sup>		16	16	16	16
Brain	(g)	1.88 ± 0.08	1.92 ± 0.04	1.92 ± 0.06	1.89 ± 0.04
	(g/100g BW)	0.68 ± 0.04	0.67 ± 0.03	0.65 ± 0.05	0.63 ± 0.02*
Liver	(g)	9.32 ± 1.05	9.49 ± 0.78	9.95 ± 1.06	10.13 ± 0.83
	(g/100g BW)	3.32 ± 0.14	3.29 ± 0.13	3.35 ± 0.15	3.37 ± 0.20
Kidneys	(g)	1.83 ± 0.17	1.90 ± 0.13	2.01 ± 0.15	2.04 ± 0.18*
	(g/100g BW)	0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.68 ± 0.04
Ovaries	(mg)	100.71 ± 17.41	92.26 ± 11.07	99.42 ± 12.40	100.99 ± 9.97
	(mg/100g BW)	36.05 ± 5.56	32.21 ± 3.68	33.58 ± 4.00	33.56 ± 2.62
Salivary glands	(g)	0.43 ± 0.04	0.47 ± 0.02	0.46 ± 0.05	0.47 ± 0.05
	(g/100g BW)	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.01

\* Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (\* $P < 0.05$ ).

Abbreviations: BW, body weight; PND, postnatal day.

<sup>a</sup> Two offspring of each sex per dam ( $n = 8$ /group) were subjected to autopsy and following organ weight measurement at each time point. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and mean values were estimated as a litter value when two offspring were examined from the same dam.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 20. Cholinesterase (ChE) activity male offspring and dams exposed to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
<b>Dams</b>				
No. of dams examined	8	8	8	8
plasma (IU/L)	826 ± 188 <sup>b</sup>	650 ± 103*	345 ± 50**	194 ± 34**
RBC (IU/L)	2475 ± 221	2175 ± 259*	848 ± 129**	540 ± 108**
frontal cortex (IU/g tissue)	19.2 ± 1.6	20.0 ± 1.3	18.4 ± 1.5	3.2 ± 0.7**
<b>Offspring</b>				
<b>PND 21</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
plasma (IU/L)	582 ± 104	624 ± 60	426 ± 73**	198 ± 28**
RBC (IU/L)	3311 ± 469	3139 ± 150	3011 ± 339	1184 ± 248**
frontal cortex (IU/g tissue)	13.4 ± 0.9	14.0 ± 0.5	12.8 ± 0.6	6.9 ± 2.1**
<b>PND 77</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
plasma (IU/L)	417 ± 121	484 ± 111	344 ± 54	414 ± 74
RBC (IU/L)	2553 ± 97	2635 ± 128	2558 ± 180	2584 ± 187
frontal cortex (IU/g tissue)	18.6 ± 2.2	17.3 ± 2.9	19.7 ± 0.9	18.5 ± 2.3

\*\*\* Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

Abbreviations: ChE, cholinesterase; PND, postnatal day; RBC, red blood cell

<sup>a</sup> One male offspring per dam (n = 6/group) was subjected to measurement.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 21. Plasma levels of thyroid-related hormones of male offspring and dams exposed to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in rats**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
<b>Dams</b>				
No. of dams examined	8	8	8	8
T <sub>3</sub> (ng/mL)	0.52 ± 0.23 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.09	0.72 ± 0.16*	0.64 ± 0.11
T <sub>4</sub> (µg/dL)	4.88 ± 0.87	5.04 ± 1.68	4.31 ± 0.78	3.96 ± 0.82
TSH (ng/mL)	4.95 ± 3.16	4.57 ± 0.89	2.74 ± 1.13	4.40 ± 1.80
<b>Offspring</b>				
<b>PND 21</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
T <sub>3</sub> (ng/mL)	0.91 ± 0.16	0.87 ± 0.17	0.77 ± 0.11	1.04 ± 0.17
T <sub>4</sub> (µg/dL)	5.42 ± 1.47	5.37 ± 1.00	4.32 ± 0.58	4.82 ± 0.58
TSH (ng/mL)	2.87 ± 0.56	2.53 ± 1.05	2.62 ± 0.89	2.81 ± 0.91
<b>PND 77</b>				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
T <sub>3</sub> (ng/mL)	0.72 ± 0.20	0.73 ± 0.12	0.78 ± 0.15	0.87 ± 0.14
T <sub>4</sub> (µg/dL)	6.27 ± 1.32	5.73 ± 1.39	5.88 ± 0.84	6.38 ± 0.94
TSH (ng/mL)	4.08 ± 1.42	5.24 ± 1.55	7.80 ± 3.58	11.24 ± 9.68

\*Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (\* $P < 0.01$ ).

Abbreviations: ChE, cholinesterase; PND, postnatal day; RBC, red blood cell

<sup>a</sup> One male offspring per dam (n = 6/group) was subjected to measurement.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 22. Quantitative analysis of reelin- or NeuN-immunoreactive cells in the hilus of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of offspring examined <sup>a</sup>	10	10	10	10
Reelin (+) cell count (/mm <sup>2</sup> )	44.5 ± 7.0 <sup>b</sup>	48.2 ± 7.2	46.1 ± 11.0	41.6 ± 10.1
NeuN (+) cell count (/mm <sup>2</sup> )	406.5 ± 59.8	381.3 ± 97.6	350.2 ± 63.6	352.6 ± 50.7

No significant difference in any treated group from the control group.

<sup>a</sup> All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 23. Quantitative analysis of Tbr2- or DCX-immunoreactive cells in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of offspring examined <sup>a</sup>	10	10	10	10
Tbr2 (+) cell count (/mm)	8.4 ± 2.5 <sup>b</sup>	9.6 ± 3.5	7.1 ± 2.2	5.5 ± 1.9*
DCX (+) cell count (/mm)	207.5 ± 42.4	213.6 ± 32.8	199.1 ± 40.7	196.3 ± 29.5

\* Significantly different from the control group by Dunnett's test (\**P*<0.05).

<sup>a</sup> All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 24. Quantitative analysis of proliferating cells as detected by nuclear immunoreactivity of PCNA in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of offspring examined <sup>a</sup>	10	10	10	10
PCNA (+) cell count (/mm)	4.1 ± 1.0 <sup>b</sup>	4.1 ± 1.0	4.0 ± 1.0	2.9 ± 0.7*

\* Significantly different from the control group by Dunnett's test or Steel's test (\**P*<0.05).

<sup>a</sup> All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 25. Quantitative analysis of apoptotic cells as detected by TUNEL method in the subgranular zone of the dentate gyrus of the male offspring at PND 21 exposed to chlorpyrifos during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Chlorpyrifos in the diet			
	Control	2.8 ppm	14 ppm	70 ppm
No. of offspring examined <sup>a</sup>	10	10	10	10
Apoptotic cell count (/mm)	0.47 ± 0.40 <sup>b</sup>	0.61 ± 0.36	0.48 ± 0.39	0.82 ± 0.61

No significant difference in any treated group from the control group.

<sup>a</sup> All identical 10 male offspring from 8 dams (one or two animals per dam) were subjected to immunohistochemical analyses in each group. Statistical analysis was performed using the litter as the experimental unit, and litter mean values were subjected to analysis on two offspring samples from the same dam.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 26. Effects on dams and reproductive parameters in Experiment 1 of the acrylamide study**

	AA in the drinking water (ppm)			
	0 (control)	4	20	100
No. of dams examined	6	6	6	5
Maternal parameters				
BW gain (g/day)				
GD 10- GD 20	10.05 ± 1.28 <sup>a</sup>	10.12 ± 1.86	8.62 ± 3.49	7.60 ± 3.92
Day 1–Day 10 after delivery	0.22 ± 0.66	1.19 ± 0.59	0.47 ± 1.13	-0.34 ± 0.61
Day 10–Day 21 after delivery	-2.74 ± 1.18	-3.34 ± 1.15	-3.13 ± 1.36	-1.66 ± 0.94
Food intake (g/day)				
GD 10–GD 20	19.72 ± 2.53	18.39 ± 2.01	17.33 ± 3.43	16.47 ± 1.09
Day 1–Day 10 after delivery	26.34 ± 2.54	26.30 ± 0.87	24.53 ± 5.74	22.64 ± 2.15
Day 10–Day 21 after delivery	38.94 ± 2.43	42.06 ± 2.50	38.60 ± 7.97	33.14 ± 3.47
Water consumption (ml/day)				
GD 10–GD 20	33.75 ± 3.94	30.33 ± 4.85	30.85 ± 6.24	28.79 ± 3.82
Day 1–Day 10 after delivery	35.38 ± 2.69	42.58 ± 5.75	36.44 ± 7.58	34.59 ± 5.31
Day 10–Day 21 after delivery	52.05 ± 2.60	55.32 ± 6.23	55.16 ± 14.56	44.13 ± 5.23
AA intake (mg/kg BW/day)				
GD 10–GD 20	0	0.36 ± 0.06	1.77 ± 0.27	8.26 ± 2.16
Day 1–Day 10 after delivery	0	0.51 ± 0.07	2.12 ± 0.37	11.78 ± 1.92
Day 10–Day 21 after delivery	0	0.89 ± 0.08	4.29 ± 0.95	18.74 ± 1.88
Necropsy at day 21 after delivery				
BW (g)	321.0 ± 31.4	312.6 ± 18.4	325.0 ± 35.1	280.4 ± 28.9
Brain weight				
(g)	1.96 ± 0.09	1.98 ± 0.04	1.95 ± 0.03	1.88 ± 0.08
(g/100 g BW)	0.61 ± 0.04	0.63 ± 0.04	0.61 ± 0.07	0.67 ± 0.06
Liver weight				
(g)	14.44 ± 1.78	12.16 ± 0.87	13.15 ± 1.88	10.90 ± 2.06**
(g/100 g BW)	4.50 ± 0.41	3.89 ± 0.22	4.04 ± 0.36	3.89 ± 0.61
Reproductive parameters				
Duration of pregnancy	21.17 ± 0.41	20.83 ± 0.41	21.17 ± 0.41	21.00 ± 0.00
No. of implantation sites	10.33 ± 2.60	12.75 ± 2.16	13.08 ± 3.44	10.33 ± 2.23
No. of live offspring	11.67 ± 3.14	11.83 ± 3.37	10.83 ± 5.78	10.67 ± 5.50
Male ratio (%)	47.2 ± 13.8	47.1 ± 17.8	41.3 ± 21.7	42.3 ± 14.2

\*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

<sup>a</sup> Mean ± SD.

**Table 27. Body and brain weights of male pups exposed to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats.**

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
<b>PND 21</b>						
No. of animals examined	12	11	11	10	12	12
BW (g)	38.05±1.59 <sup>a</sup>	39.26±1.03	39.59±3.39	30.80±2.16**	46.82±1.07	31.56±4.23 <sup>##</sup>
Brain weight						
(g)	1.44±0.04	1.39±0.06	1.41±0.04	1.35±0.03*	1.44±0.03	1.15±0.08 <sup>##</sup>
(g/100 g BW)	3.81±0.09	3.55±0.12	3.58±0.26	4.43±0.22**	3.10±0.10	3.74±0.35 <sup>##</sup>
<b>PND 77</b>						
No. of animals examined	12	12	12	11	12	12
BW (g)	391.5±16.3	383.1±24.8	380.6±23.6	358.2±20.5**	397.5±29.6	310.9±31.6 <sup>##</sup>
Brain weight						
(g)	1.99±0.08	1.98±0.06	1.96±0.06	1.91±0.05**	2.01±0.07	1.67±0.11 <sup>##</sup>
(g/100 g BW)	0.51±0.02	0.52±0.04	0.52±0.03	0.53±0.03	0.51±0.04	0.54±0.03

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

<sup>##</sup> P < 0.01 vs. saline control group (Student's or Aspin-Welch's *t*-test).

<sup>a</sup> Mean ± SD.

**Table 28. Density of reelin or NeuN-immunoreactive cells in the dentate hilus of male exposed to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats**

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
<b>PND 21</b>						
No. of animals examined	12	11	11	10	12	12
reelin (/mm <sup>2</sup> )	68.0±8.3 <sup>a</sup>	66.6±7.5	75.7±7.1	89.4±13.9**	67.0±8.9	88.5±13.0 <sup>##</sup>
NeuN (/mm <sup>2</sup> )	158.9±27.3	154.1±15.0	174.8±24.6	223.8±25.5**	149.8±18.6	183.0±41.1 <sup>#</sup>
<b>PND 77</b>						
No. of animals examined	12	12	12	11	12	12
reelin (/mm <sup>2</sup> )	47.0±5.5	46.5±4.5	49.3±6.6	51.8±5.6	49.2±11.3	55.3±8.1
NeuN (/mm <sup>2</sup> )	85.0±15.1	81.7±14.1	100.2±13.1*	105.5±13.4**	80.5±13.2	96.9±13.8 <sup>##</sup>

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

<sup>#</sup> P < 0.05, <sup>##</sup> P < 0.01 vs. saline control group (Student's or Aspin-Welch's *t*-test).

<sup>a</sup> Mean ± SD.



**Table 29. Distribution of PCNA-immunoreactive cells and apoptotic bodies in the SGZ of male exposed to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats <sup>a</sup>**

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
<b>PND 21</b>						
No. of animals examined	12	11	11	10	12	12
PCNA (/mm)	5.06±1.43 <sup>b</sup>	4.81±0.51	3.37±0.56**	2.90±0.60**	4.67±0.80	3.46±0.74 <sup>##</sup>
Apoptotic bodies (/mm)	0.34±0.27	0.28±0.13	0.16±0.09	0.17±0.10	0.21±0.15	0.14±0.12
<b>PND 77</b>						
No. of animals examined	12	12	12	11	12	12
PCNA (/mm)	0.73±0.24	0.76±0.39	0.69±0.33	0.78±0.25	0.81±0.22	0.71±0.23
Apoptotic bodies (/mm)	0.01±0.01	0.00±0.01	0.01±0.01	0.00±0.01	0.00±0.01	0.01±0.02

\*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

<sup>##</sup> P < 0.01 vs. saline control group (Student's or Aspin-Welch's *t*-test).

<sup>a</sup> Profile counting method was applied.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 30. Distribution of TUNEL-positive apoptotic cells in the SGZ of pups at PND 21 after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats <sup>a</sup>**

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
<b>PND 21</b>						
No. of animals examined	12	11	11	10	12	12
TUNEL (/mm)	0.15±0.18 <sup>b</sup>	0.15±0.17	0.05±0.10	0.10±0.16	0.17±0.13	0.09±0.11

<sup>a</sup> Number of positive cells was measured in one section in each brain.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 31. Distribution of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers in the SGZ of male pups at PND 21 after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats <sup>a</sup>**

	AA in the drinking water (ppm)	
	0 (control)	100
No. of animals examined	12	10
Dpysl3 (/mm)	5.26±4.64 <sup>b</sup>	1.94±1.30*
Dcx (/mm)	106.6±10.9	81.8±11.7**
NeuroD1 (/mm)	47.8±8.4	48.5±6.0
Tbr2 (/mm)	7.24±1.65	7.11±1.76
Pax6 (/mm)	18.3±3.8	16.6±4.2

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Student's or Aspin-Welch's *t*-test).

<sup>a</sup> Profile counting method was applied.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 32. Distribution of immunoreactive cells for neuronal stage-defining markers in the SGZ of pups at PND 77 after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats<sup>a</sup>**

	AA in the drinking water (ppm)	
	0 (control)	100
PND 77		
No. of animals examined	12	11
Dpysl3 (/mm)	0.64±0.64 <sup>b</sup>	0.65±0.29
Dcx (/mm)	17.17±2.24	17.12±2.28

<sup>a</sup> Number of immunoreactive cells for each antigen was measured in one section in each brain.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 33. Number of reelin-positive cells in the dentate gyrus of female pups at PND 4 after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats<sup>a</sup>**

	AA in the drinking water (ppm)			
	0 (control)	4	20	100
PND 4				
No. of animals examined	10	9	10	10
Molecular layer (/mm)	34.24±4.85 <sup>b</sup>	29.54±6.53	35.51±10.22	34.53±8.44
Hilus (/mm)	11.21±2.08	11.52±4.45	10.26±3.10	12.50±4.95

<sup>a</sup> Number of immunoreactive cells for each antigen was measured in one section in each brain.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 34. Density of reelin-immunoreactive cells in the hilus and PCNA-immunoreactive cells in the SGZ of dams in Experiment 1 of the acrylamide study<sup>a</sup>**

	AA in the drinking water (ppm)	
	0 (control)	100
PND 77		
No. of animals examined	6	5
reelin (/mm <sup>2</sup> )	52.98±5.86 <sup>b</sup>	49.85±6.28
PCNA (/mm)	0.25±0.13	0.23±0.06

<sup>a</sup> Profile counting method was applied.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 35. Mean area of the hilus and mean length of the SGZ of male pups after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats<sup>a</sup>**

	AA in the drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
PND 21						
No. of animals	12	11	11	10	12	12
Hilar area (mm <sup>2</sup> )	0.566±0.142 <sup>b</sup>	0.569±0.049	0.572±0.041	0.449±0.072**	0.554±0.054	0.483±0.090 <sup>#</sup>
SGZ-length (mm)	3.134±0.773	3.447±0.316*	3.466±0.174*	2.842±0.414	3.074±0.368	2.992±0.507
PND 77						
No. of animals	12	12	12	11	12	12
Hilar area (mm <sup>2</sup> )	0.722±0.062	0.728±0.080	0.693±0.075	0.659±0.053	0.621±0.092	0.541±0.081 <sup>#</sup>
SGZ-length (mm)	4.302±0.397	4.416±0.473	4.224±0.587	3.927±0.464	4.279±0.534	4.054±0.679

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

<sup>#</sup> P < 0.05 vs. saline control group (Student's or Aspin-Welch's t-test).

<sup>a</sup> The mean values of the hilar area and the length of the SGZ were measured in three different sections with approximately 250 µm interval using serial sections in each brain.

<sup>b</sup> Mean ± SD.

**Table 36. Transcript levels measured by real-time RT-PCR in the hippocampus of male pups at PND 21 after exposure to acrylamide during the 2<sup>nd</sup> half of gestation and lactation periods in rats**

	Experiment 1				Experiment 2	
	AA in drinking water (ppm)				Intraperitoneal injections	
	0 (control)	4	20	100	Saline (control)	AA
No. of animals examined	10	8	8	6	12	7
Real-time PCR normalized to <i>Actb</i>						
reelin and related molecules						
<i>Reln</i>	1.01±0.17 <sup>a</sup>	0.90±0.21	0.87±0.15	0.86±0.15	1.02±0.22	0.84±0.11
<i>Lrp8</i>	1.01±0.14	1.03±0.20	1.02±0.20	1.10±0.20	1.02±0.20	0.89±0.11
<i>Vldlr</i>	1.01±0.11	1.02±0.13	1.03±0.17	1.04±0.13	1.08±0.57	0.82±0.07
<i>Dab1</i>	1.01±0.11	0.98±0.08	0.99±0.13	1.00±0.16	1.00±0.08	1.08±0.21
Neuronal stage-defining marker molecules						
<i>Pax6</i>	1.01±0.18	0.93±0.21	0.94±0.12	0.86±0.10	1.03±0.26	1.09±0.16
<i>Neurod1</i>	1.03±0.25	0.79±0.21	0.89±0.24	0.88±0.17	1.03±0.23	1.32±0.25 <sup>#</sup>
<i>Dcx</i>	1.02±0.20	0.89±0.31	1.00±0.20	1.08±0.39	1.02±0.19	1.03±0.21
<i>Dpysl3</i>	1.02±0.21	0.95±0.23	0.91±0.17	1.08±0.14	1.01±0.14	0.85±0.11 <sup>#</sup>
Cell proliferation marker molecule						
<i>Pcna</i>	1.00±0.11	0.86±0.09*	0.86±0.14*	0.83±0.09**	1.02±0.23	0.93±0.10
Epigenetic event-related enzymes						
<i>Dnmt1</i>	1.02±0.20	0.95±0.12	0.86±0.11	0.92±0.17	1.01±0.16	0.98±0.07
<i>Hdac1</i>	1.01±0.13	0.92±0.14	1.08±0.17	0.87±0.11	1.02±0.22	0.96±0.13
<i>Hdac2</i>	1.01±0.13	0.87±0.09	0.97±0.17	0.99±0.16	1.01±0.13	1.02±0.11
<i>Hdac8</i>	1.03±0.29	0.85±0.15	0.97±0.18	0.89±0.10	1.06±0.28	1.11±0.15
Real-time PCR normalized to <i>Gapdh</i>						
reelin and related molecules						
<i>Reln</i>	1.01±0.15	0.92±0.19	0.91±0.10	0.95±0.15	1.01±0.15	0.98±0.12
<i>Lrp8</i>	1.01±0.14	1.05±0.12	1.06±0.09	1.22±0.17*	1.01±0.15	1.04±0.08
<i>Vldlr</i>	1.00±0.09	1.04±0.05	1.08±0.09	1.16±0.14**	1.11±0.70	0.96±0.10
<i>Dab1</i>	1.01±0.17	1.03±0.19	1.05±0.20	1.11±0.18	1.01±0.14	1.27±0.24 <sup>#</sup>
Neuronal stage-defining marker molecules						
<i>Pax6</i>	1.02±0.22	0.96±0.20	0.99±0.13	0.96±0.13	1.04±0.34	1.28±0.19
<i>Neurod1</i>	1.03±0.25	0.83±0.26	0.95±0.30	0.98±0.21	1.03±0.27	1.54±0.26 <sup>##</sup>
<i>Dcx</i>	1.01±0.17	0.91±0.28	1.08±0.34	1.19±0.42	1.01±0.16	1.21±0.26
<i>Dpysl3</i>	1.01±0.17	0.96±0.15	0.95±0.10	1.19±0.14	1.00±0.10	0.97±0.08
Cell proliferation marker molecule						
<i>Pcna</i>	1.01±0.14	0.89±0.07	0.90±0.15	0.92±0.13	1.01±0.16	1.09±0.07
Epigenetic event-related enzymes						
<i>Dnmt1</i>	1.01±0.17	0.96±0.09	0.91±0.10	1.01±0.21	1.01±0.14	1.15±0.13 <sup>#</sup>
<i>Hdac1</i>	1.00±0.07	0.95±0.15	1.13±0.09	0.98±0.19	1.03±0.28	1.12±0.12
<i>Hdac2</i>	1.01±0.11	0.91±0.19	1.02±0.13	1.11±0.25	1.03±0.28	1.12±0.12
<i>Hdac8</i>	1.02±0.27	0.88±0.18	1.02±0.18	1.00±0.16	1.05±0.26	1.30±0.15 <sup>#</sup>

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01 vs. 0 ppm control group (Dunnett's or Steel's test).

# P < 0.05, ## P < 0.01 vs. saline control group (Student's or Aspin-Welch's t-test).

<sup>a</sup> Mean ± SD.

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）

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 Nicotine 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に Nicotine を処置しても、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 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。一方、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 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。以上の結果より、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。

#### A. 研究目的

Nicotine は、末梢では各臓器および器官の機能維持に欠くことのできない自律神経系および運動神経系機能に、さらに中枢では意識維持および情動発現機構などに影響を及ぼす。その神経系の主な作用点は、自律神経系節、運動神経筋接合部、さらに交感神経-副腎髄質系における Nicotine 性アセチルコリン受容体 (nAChR) である。一方、Nicotine はアルカロイドの一種であり毒物および劇物取り締まり法に毒物として指定された物質である。主にタバコの葉に含まれるニコチンは天然由来の物質であり、即効性の非常に強い神経毒性を持つ。Nicotine の中枢神経系に関わる研究は数多く散見されるものの、ES 細胞を用いた発生初期段階からの詳細な検討については行われていないのが現状である。

そこで、本研究では、各種培養細胞系を駆使し、Nicotine 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 Nicotine (100 nM-10  $\mu$ M) を処置しても、 $\beta$  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  $\mu$ 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 (図 1)。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 (図 2-1)。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) 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 (図 2-2)。

### D. 考察

以上の結果より、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。

### 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 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。

### F. 健康危険情報

妊娠時における Nicotine 慢性曝露には神経発達に影響を与える可能性があるため、注意が必要である。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

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. and 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. and Narita M.: Enhanced IL-1 $\beta$  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. and 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.

#### 2. 学会発表

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) , Malmö, 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), Malmö, Sweden, July, 2010

Atsuo Suzuki, Naoko Kuzumaki, Michiko Narita, Satoshi Imai, Yohei Okada, Hiroataka 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), Malmö, 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

#### 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

図1: 神経あるいはグリア細胞への MnCl<sub>2</sub> ならびに Nicotine の影響

	Cortical Neuron (N/G)	Cortical Astrocyte (N/G)	Cortical Astrocyte	Cortical Microglia
MnCl <sub>2</sub>	影響なし	活性化傾向	影響なし	活性化傾向
Nicotine	影響なし	影響なし	影響なし	影響なし

図2-1: ES 細胞から神経幹細胞への誘導過程における Nicotine 性アセチルコリン受容体の変化

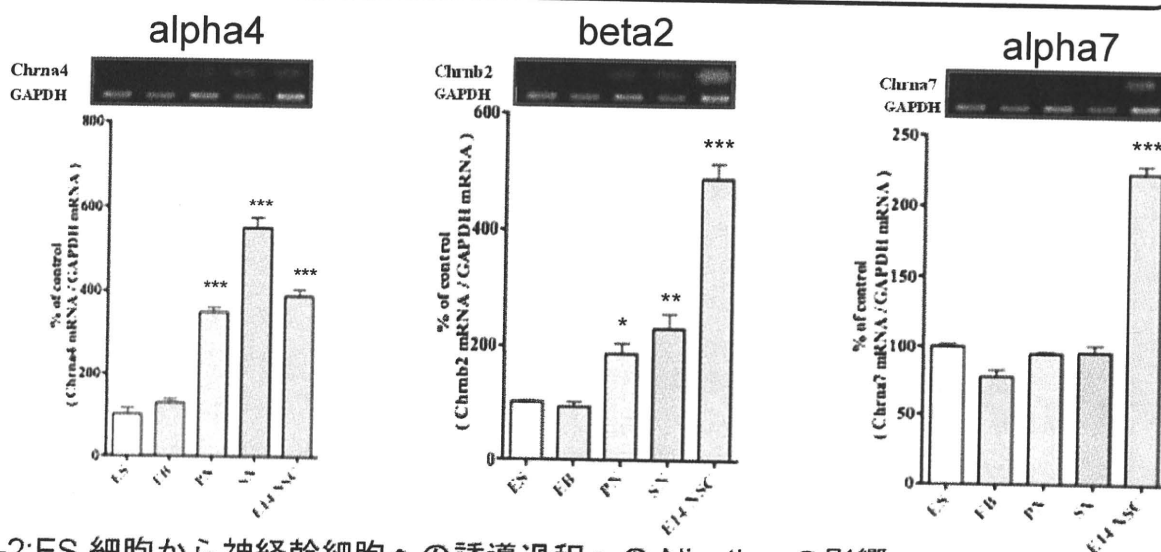
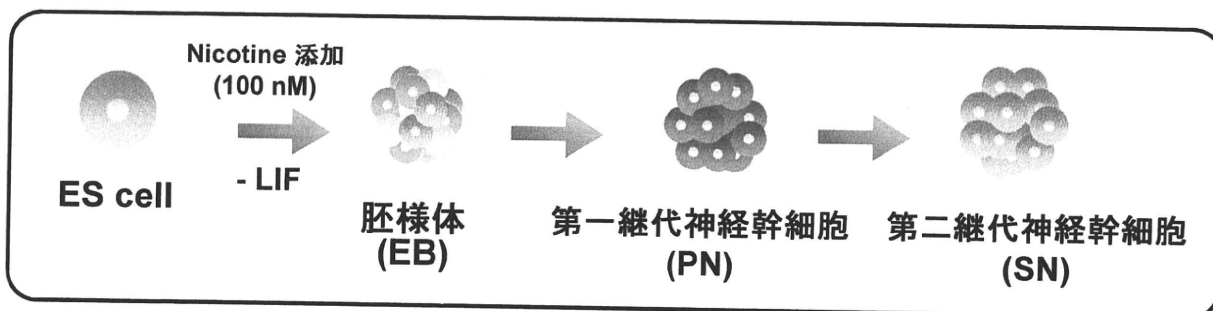
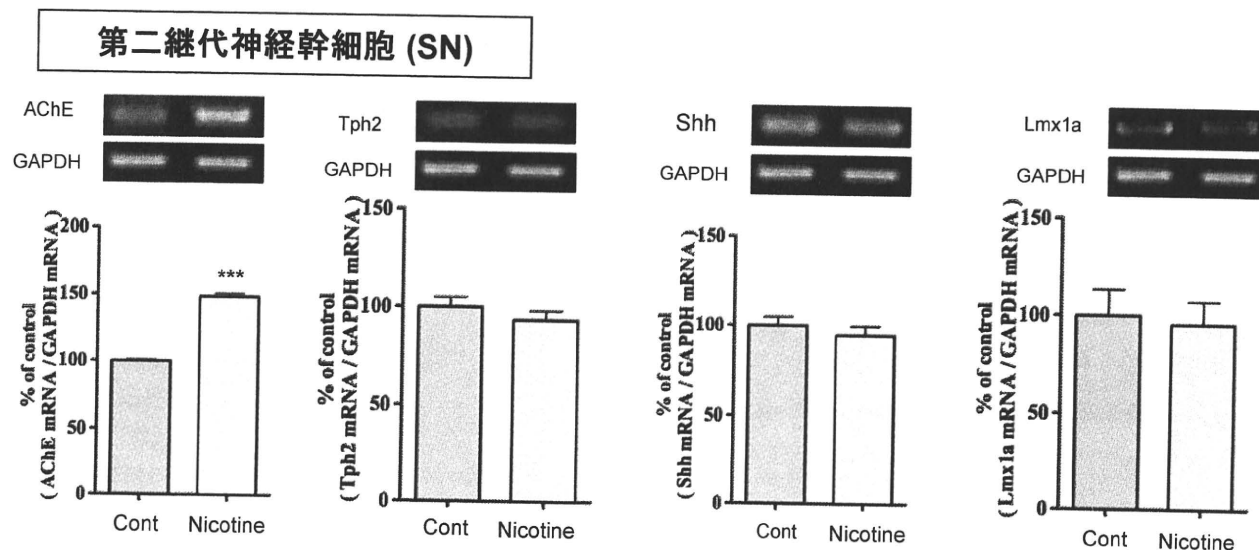


図2-2: ES 細胞から神経幹細胞への誘導過程への Nicotine の影響



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22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(クロルピリホス;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、脾臓リンパ球のポピュレーション解析等を行った。CPFの投与は公比を5とし、0, 2.8, 14, 70 ppmと設定した。また、離乳により暴露を停止して8週間飼育し、11週齢時点で3週齢時点の影響が持続しているかどうかを調べた。その結果、CD4陽性T細胞が3週齢の脾臓で増加し、その傾向は11週齢でも持続していることが分かった。CD4陽性のT細胞サブセット4種(Th1, Th2, Th17, Treg)の存在比率を調べたところ、特にTregの割合が有意に増加していることが分かった。

研究協力者

中村亮介, 木村美恵, 松岡英樹, 蜂須賀暁子, 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、幼児期のマウスを用いて、有機リン系農薬の暴露をおこない、一次リンパ器官である胸腺、および二次リンパ器官である脾臓の機能を中心と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、その一助となると考えられる<sup>6,7)</sup>。また、細胞表面マーカーCD4陽性T細胞は免疫応答の中核であるが、これは少なくとも4種(以上)の機能的に異なるサブセットからなることが知られている。すなわち、インターフェロン $\gamma$ (IFN

$\gamma$ )等を発現し、細胞性免疫に関与するTh1、インターロイキン(IL)4,5等を発現し、アレルギーや液性免疫に関与するTh2, IL-17を発現し、多くの自己免疫疾患に関与するTh17、そして免疫反応の抑制に中心的な役割を果たしている制御性T細胞(Treg)の4種である。T細胞の機能変化は全身の免疫応答に大きな影響を及ぼす可能性が考えられるため、本研究では、これら4種のCD4陽性T細胞サブセット解析を免疫機能評価に用いることを試みた。

有機リン系農薬としては、近年食品への混入が問題となった、メタミドホスおよびクロルピリホス(CPF)を検討することとした。前者は日本では使用が禁止されており、後者は農薬やシロアリ駆除剤として用いられている。昨年度は水溶性の高いメタミドホスを被検物質として様々な条件検討を行なったが、本年度は、脂溶性の高いCPFを被検物質とし、発達期免疫機能評価として、昨年度同様、発達期暴露終了時でのマウスの血液学的検査、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。また今回は、生後3週までの暴露終了後、11週齢まで通常飼料による飼育を行ない、3週齢の時点で認められた変化が11週齢で復帰するかどうかを調べた。

B. 研究方法

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。

(1)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℃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。

(2)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20μlをあらかじめ80μlの0.5%EDTA-2K溶液が入った1.5ml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。

(3)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200μl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碎して口径40μmのメッシュに通し、10ml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氷上で30分間染色した。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.500μl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。

(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 $4 \times 10^6$  cells/1ml/wellで24wellに播種し,Leukocyte Activation Cocktail with GolgiPlug(BD)により37℃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℃で一晩保存した。抗マウスCD4-FITCで30分間染色後,これをBioLegend可溶性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IFNγ-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IgG1κ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。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

昨年度のメタミドホスの研究の結果、プラグを確認後2日の時点で入荷した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、Table 1 に示した出産が認められた。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。

#### C-1) 3週齢時点での解析

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。Table 2 および3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つ

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をそれぞれ Table 4 および5 に示す。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（Table 6）。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。

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、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 $\gamma$ /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なった。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 (Table 10)。

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。

#### C-2) 11 週齢時点での解析

出産後 3 週まで暴露を続けた仔マウスを離乳させ、通常の高脂肪 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 (Table 7)。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 (Table 8)。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 (Table 9)。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

(Table 10)。唯一、単核球の軽微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。フローサイトメトリー解析については、有意差が認められた項目についてのみ、Table 11 にまとめた。

#### D. 考察

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、昨年度のメタミドホス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メタミドホス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<sup>9)</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 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<sup>10)</sup>、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 (Table 11)。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<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup> 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 細胞は免疫系の中樞機能を担っている。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 $\gamma$  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<sup>11)</sup>。

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 (Table 11)。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。

## E. 結論

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・経授乳暴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。暴露を停止して 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、暴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。

## (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.*