

31:228-231 (1985).

- 9) Kawashima, K., and Fujii, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacol. Ther.* **86**:29-48 (2000).
- 10) Navarro, H.A., Basta, P.V., Seidler, F.J., and Slotkin, T.A. Neonatal chlorpyrifos administration elicits deficits in immune function in adulthood: a neural effect? *Brain Res. Dev. Brain Res.* **130**:249-252 (2001).
- 11) Duramad, P., Tager, I.B., Leikauf, J., Eskenazi, B., and Holland, N.T. Expression of Th1/Th2 cytokines in human blood after *in vitro* treatment with chlorpyrifos, and its metabolites, in combination with endotoxin LPS and allergen Der p1 *J. App. Toxicol.* **26**:458-465 (2006).

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hachisuka A., Nakamura R., Sato Y., Nakamura R., Shibutani M., Teshima R. Effect of perinatal exposure to the brominated flame-retardant hexabromocyclodecane (HBCD) on the developing immune system in rats. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.* **128**; 58-64, 2010

2. 学会発表

1) 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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

Table 1. Number of delivery

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Dams	n	3/12	6/12	6/12	6*/12
Female pup		5	21	23	14
Male pup		20	17	13	19

Pregnant BALB/c mice were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day 10 to postnatal week 3 (n = 12). *One excluded by cannibalism.

Table 2. Effect of chlorpyrifos on the body and organ weights of dams

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Dams	n	3	4	4	4
Body (g)		23.8 ± 0.1	24.0 ± 0.9	26.4 ± 1.0 **	25.2 ± 0.7
Liver (mg)		1828 ± 86	1801 ± 96	2014 ± 165	2065 ± 104
Spleen (mg)		102.3 ± 11.0	112.0 ± 7.5	115.0 ± 6.1	126.5 ± 10.8 *
Thymus (mg)		39.7 ± 5.5	41.8 ± 9.7	38.3 ± 5.3	35.5 ± 8.5
Liver/Body		77.0 ± 3.6	75.0 ± 4.0	76.3 ± 6.3	82.1 ± 4.1
Spleen/Body		4.3 ± 0.5	4.7 ± 0.3	4.4 ± 0.2	5.0 ± 0.4
Thymus/Body		1.7 ± 0.2	1.7 ± 0.4	1.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3

Pregnant BALB/c mice were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the body and organ weights. Values are mean ± SD. *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

Table 3. Effect of chlorpyrifos on the body and organ weights of offsprings at PNW3

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4	4	4	4
Body (g)		9.9 ± 0.5	10.0 ± 0.8	11.0 ± 0.3	10.0 ± 0.8
Liver (mg)		552 ± 35	531 ± 69	580 ± 55	555 ± 73
Spleen (mg)		84.8 ± 13.9	85.8 ± 4.3	88.8 ± 12.1	70.8 ± 13.1
Thymus (mg)		70.3 ± 16.7	66.8 ± 7.4	78.8 ± 3.9	65.8 ± 11.1
Liver/Body		55.7 ± 3.5	53.2 ± 6.9	52.5 ± 4.9	55.6 ± 7.3
Spleen/Body		8.6 ± 1.4	8.6 ± 0.4	8.0 ± 1.1	7.1 ± 1.3
Thymus/Body		7.1 ± 1.7	6.7 ± 0.7	7.1 ± 0.4	6.6 ± 1.1
Male	n	4	4	4	4
Body (g)		11.0 ± 0.7	10.3 ± 0.7	11.4 ± 0.5	10.2 ± 0.6
Liver (mg)		634 ± 63	563 ± 53	620 ± 32	596 ± 76
Spleen (mg)		91.8 ± 8.3	86.5 ± 7.2	96.3 ± 9.6	78.3 ± 13.8
Thymus (mg)		59.5 ± 12.0	62.3 ± 4.1	64.8 ± 6.3	69.8 ± 5.9
Liver/Body		57.7 ± 5.7	54.5 ± 5.2	54.5 ± 2.8	58.3 ± 7.5
Spleen/Body		8.4 ± 0.8	8.4 ± 0.7	8.5 ± 0.8	7.7 ± 1.4
Thymus/Body		5.4 ± 1.1	6.0 ± 0.4	5.7 ± 0.6	6.8 ± 0.6 *

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the body and organ weights. Values are mean ± SD. *p<0.05 (Dunnett's test).

Table 4. Effect of chlorpyrifos on the hemocytological parameters of dams

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Dam	n	3	4	4	4
WBC (10 ² / _L)		70.0 ± 15.1	79.3 ± 13.4	94.8 ± 4.6	130.3 ± 16.0 **
RBC (10 ⁴ / _L)		1171 ± 43	1145 ± 34	1192 ± 33	1100 ± 13 *
HGB (g/dL)		18.5 ± 0.9	18.0 ± 0.7	18.6 ± 0.5	16.9 ± 0.4 *
HCT (%)		61.5 ± 2.0	60.3 ± 2.0	62.4 ± 1.9	56.6 ± 1.3 *
MCV (fL)		52.5 ± 0.3	52.6 ± 0.3	52.6 ± 0.2	51.5 ± 0.6 *
MCH (pg)		15.8 ± 0.2	15.7 ± 0.2	15.6 ± 0.1	15.4 ± 0.2 *
MCHC (g/dL)		30.1 ± 0.5	29.8 ± 0.2	29.8 ± 0.2	29.9 ± 0.1
PLT (10 ⁴ / _L)		175.2 ± 10.3	176.8 ± 9.8	175.7 ± 5.8	169.9 ± 18.0

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the hemocytological parameters. Values are mean ± SD. *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

Table 5. Effect of chlorpyrifos on the hemocytological parameters of offsprings at PNW3

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4	4	4	4
WBC ($10^2/_L$)		50.5 ± 9.9	61.3 ± 20.5	53.0 ± 9.1	52.3 ± 8.1
RBC ($10^4/_L$)		863 ± 19	873 ± 20	852 ± 51	836 ± 57
HGB (g/dL)		12.4 ± 0.3	12.4 ± 0.4	12.3 ± 0.9	12.1 ± 1.2
HCT (%)		45.1 ± 1.1	45.3 ± 1.4	44.2 ± 3.0	43.8 ± 4.0
MCV (fL)		52.3 ± 0.4	51.8 ± 0.6	51.9 ± 0.5	52.4 ± 1.4
MCH (pg)		14.4 ± 0.1	14.2 ± 0.4	14.5 ± 0.3	14.4 ± 0.7
MCHC (g/dL)		27.4 ± 0.5	27.5 ± 0.5	27.9 ± 0.5	27.5 ± 0.6
PLT ($10^4/_L$)		99.7 ± 23.8	105.6 ± 11.7	97.1 ± 13.7	106.8 ± 8.4
Male	n	4	4	4	4
WBC ($10^2/_L$)		55.8 ± 10.7	40.8 ± 3.1	56.5 ± 16.5	57.8 ± 11.7
RBC ($10^4/_L$)		845 ± 43	793 ± 91	834 ± 52	828 ± 37
HGB (g/dL)		12.1 ± 0.7	11.5 ± 0.8	11.5 ± 0.7	11.8 ± 1.0
HCT (%)		43.8 ± 2.7	41.6 ± 4.1	42.9 ± 2.7	43.1 ± 2.1
MCV (fL)		51.8 ± 0.6	52.5 ± 1.1	51.4 ± 0.7	52.0 ± 1.5
MCH (pg)		14.4 ± 0.5	14.5 ± 0.6	13.8 ± 0.4	14.2 ± 0.9
MCHC (g/dL)		27.7 ± 0.9	27.6 ± 0.7	26.8 ± 0.7	27.3 ± 1.1
PLT ($10^4/_L$)		118.3 ± 2.6	99.0 ± 16.8	98.8 ± 10.4	105.6 ± 8.8

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the hemocytological parameters. Values are mean ± SD. Nothing significantly different (Dunnett's test).

Table 6. Effect of chlorpyrifos on the serological parameters at PNW3

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Dams	n	3	4	4	4
A/G ratio		1.27 ± 0.06	1.33 ± 0.05	1.23 ± 0.10	1.38 ± 0.10
AST (IU/L)		235.0 ± 14.0	252.3 ± 62.9	210.0 ± 50.9	222.0 ± 44.5
ALT (IU/L)		117.3 ± 34.8	103.5 ± 34.1	100.5 ± 48.1	77.8 ± 21.9
ChE (IU/L)		52.33 ± 6.81	45.75 ± 3.77	31.50 ± 4.43 **	18.25 ± 1.50 **
Offsprings^a	n	5	6	6	6
A/G ratio		1.58 ± 0.04	1.63 ± 0.08	1.55 ± 0.10	1.63 ± 0.10
AST (IU/L)		176.0 ± 52.0	181.8 ± 30.8	167.8 ± 53.4	149.2 ± 18.5
ALT (IU/L)		28.4 ± 5.9	65.5 ± 76.8	29.3 ± 10.6	28.17 ± 11.44
ChE (IU/L)		31.00 ± 1.87	29.83 ± 2.71	19.17 ± 2.48 **	11.50 ± 2.35 **

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. At PNW3, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the liver (A/G ratio, AST and ALT), and serum choline esterase (ChE) activities. Values are mean ± SD. ^a Serum specimens were collected from 2 female and 3-4 male offsprings. **p<0.01 (Dunnett's test).

Table 7. Effect of chlorpyrifos on the body and organ weights of offsprings at PNW11

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4(1) ^a	4	4	4
Body (g)		20.3 ± 0.5	19.6 ± 0.1	20.3 ± 0.7	20.0 ± 1.0
Liver (mg)		1001 ± 63	947 ± 70	869 ± 88	862 ± 89
Spleen (mg)		104.3 ± 8.1	100.8 ± 2.6	98.8 ± 14.3	92.3 ± 11.1
Thymus (mg)		46.0 ± 2.8	39.8 ± 4.6	40.0 ± 6.3	39.3 ± 5.5
Liver/Body		49.2 ± 3.1	48.4 ± 3.6	42.8 ± 4.3	43.1 ± 4.5
Spleen/Body		5.1 ± 0.4	5.2 ± 0.1	4.9 ± 0.7	4.6 ± 0.6
Thymus/Body		2.3 ± 0.1	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.3	2.0 ± 0.3
Male	n	4	4	4	4
Body (g)		23.8 ± 0.2	24.1 ± 0.4	24.1 ± 1.9	24.9 ± 0.9
Liver (mg)		1121 ± 56	1126 ± 125	1040 ± 98	1120 ± 60
Spleen (mg)		89.8 ± 5.0	90.5 ± 8.6	89.5 ± 8.7	103.0 ± 8.0
Thymus (mg)		32.8 ± 3.9	30.8 ± 4.9	29.3 ± 3.9	34.8 ± 5.9
Liver/Body		47.0 ± 2.4	46.7 ± 5.2	43.2 ± 4.1	45.0 ± 2.4
Spleen/Body		3.8 ± 0.2	3.8 ± 0.4	3.7 ± 0.4	4.1 ± 0.3
Thymus/Body		1.4 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.4 ± 0.2

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased with weaning. At PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the body and organ weights. ^a Number of the offspring was one, three mice were newly purchased and added. Values are mean ± SD. Nothing significantly different (Dunnett's test).

Table 8. Effect of chlorpyrifos on the hemocytological parameters of offsprings at PNW11

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4(1) ^a	4	4	4
WBC (10 ² / _L)		83.8 ± 10.2	85.3 ± 22.1	65.5 ± 8.7	76.0 ± 20.9
RBC (10 ⁴ / _L)		1055 ± 31	1054 ± 12	1041 ± 12	1062 ± 40
HGB (g/dL)		16.0 ± 0.5	15.8 ± 0.3	15.7 ± 0.2	16.2 ± 0.7
HCT (%)		54.8 ± 1.9	53.8 ± 0.9	53.8 ± 1.1	55.1 ± 2.0
MCV (fL)		51.9 ± 0.5	51.1 ± 0.6	51.6 ± 0.6	51.9 ± 0.3
MCH (pg)		15.2 ± 0.1	15.0 ± 0.4	15.1 ± 0.1	15.3 ± 0.1
MCHC (g/dL)		29.3 ± 0.5	29.3 ± 0.7	29.2 ± 0.3	29.4 ± 0.3
PLT (10 ⁴ / _L)		125.9 ± 4.4	119.5 ± 13.2	123.9 ± 10.0	119.5 ± 2.6
Male	n	4	4	4	4
WBC (10 ² / _L)		87.3 ± 28.0	80.3 ± 5.6	51.8 ± 15.9*	78.8 ± 16.8
RBC (10 ⁴ / _L)		1095 ± 19	1049 ± 54	1073 ± 21	1058 ± 19
HGB (g/dL)		16.1 ± 0.2	15.5 ± 0.8	15.8 ± 0.2	16.0 ± 0.3
HCT (%)		56.1 ± 1.1	53.7 ± 2.8	55.1 ± 0.7	54.6 ± 1.1
MCV (fL)		51.2 ± 0.2	51.2 ± 0.4	51.3 ± 0.3	51.6 ± 0.2
MCH (pg)		14.7 ± 0.1	14.7 ± 0.2	14.7 ± 0.1	15.1 ± 0.2*
MCHC (g/dL)		28.6 ± 0.4	28.8 ± 0.5	28.7 ± 0.3	29.2 ± 0.5
PLT (10 ⁴ / _L)		134.9 ± 2.5	122.2 ± 10.6	130.4 ± 5.4	132.4 ± 6.3

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased with weaning. At PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the hemocytological parameters. ^a Number of the offspring was one, three mice were newly purchased and added. Values are mean ± SD. *p<0.05 (Dunnnett's test).

Table 9. Effect of chlorpyrifos on the serological parameters of offsprings at PNW11

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4(1) ^a	4	4	4
A/G ratio		1.55 ± 0.13	1.55 ± 0.10	1.55 ± 0.13	1.33 ± 0.05*
AST (IU/L)		244.5 ± 107.8	258.3 ± 38.4	213.8 ± 64.9	308.0 ± 53.5
ALT (IU/L)		82.3 ± 53.2	68.0 ± 17.7	53.0 ± 17.1	86.25 ± 38.29
ChE (IU/L)		40.50 ± 3.00	44.50 ± 4.43	44.75 ± 2.99	45.00 ± 3.56
Male	n	4	4	4	4
A/G ratio		1.33 ± 0.10	1.28 ± 0.13	1.28 ± 0.13	1.23 ± 0.10
AST (IU/L)		206.5 ± 37.6	198.3 ± 50.5	210.5 ± 75.6	213.3 ± 55.5
ALT (IU/L)		58.3 ± 19.3	35.8 ± 2.4	94.0 ± 103.9	59.25 ± 14.66
ChE (IU/L)		35.50 ± 2.08	36.00 ± 2.58	37.00 ± 2.16	34.75 ± 3.95

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased with weaning. At PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the liver (A/G ratio, AST and ALT), and serum choline esterase (ChE) activities. ^a Number of the offspring was one, three mice were newly purchased and added. Values are mean ± SD. *p<0.05 (Dunnnett's test).

Table 11. FACS analysis of effect of chlorpyrifos on the lymphocyte subpopulations

		Chlorpyrifos (ppm)			
		0	2.8	14	70
Female	n	4	4	4	4
PNW3					
^a Spl: CD4 ⁺ /CD3 ⁺		44.3 ± 1.0	45.8 ± 2.3	48.1 ± 2.9	49.9 ± 3.2 *
Thy: CD4 ⁺ Foxp3 ⁺		0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.30	0.85 ± 0.17 *
PNW11					
Thy: CD4 ⁺		9.5 ± 0.8	10.5 ± 0.7	12.3 ± 1.6 **	12.6 ± 1.0 **
Thy: CD4 ⁺ CD8a ⁺		86.4 ± 1.4	84.9 ± 1.7	83.4 ± 1.6	83.2 ± 1.2 *
Male	n	4	4	4	4
PNW3					
Spl: CD4 ⁺		4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.7	4.0 ± 0.9	5.8 ± 0.2 *
Thy: CD4 ⁺ IL17A ⁺		0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.02 *	0.10 ± 0.03
PNW11					
Spl: CD4 ⁺		16.3 ± 1.4	16.9 ± 1.8	17.8 ± 0.6	20.0 ± 1.3 **
Spl: CD4 ⁺ CD25 ⁺		1.9 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3 *	2.4 ± 0.2 *

Pregnant BALB/c mice (and their babies) were exposed to chlorpyrifos (0, 2.8, 14, and 70ppm) via food from gestational day (GD) 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased with weaning. At PNW3 and PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compound on the relative population of the lymphocyte subsets in the spleen (Spl) and thymus (Thy). Percent lymphocytes are shown (^a Percent CD3 positive cells). Values are mean ± SD. Only statistically significant changes are shown *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

分担研究名 感染感受性評価

分担研究者 渡辺 渡 所属機関 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究要旨：妊娠 BALB/c マウスを用いて、メタミドフォス（～30 ppm）とクロルピリフォス（～70 ppm）の周産期曝露を行い、その後仔マウスでの RS ウイルス感染影響評価を行った。両物質共に病態5日後の肺組織における肺炎の明確な増悪化現象は見られなかったが、それぞれ感染1日後の肺洗浄液（BALF）中の IL-6 および TNF- α レベルが顕著に低下していた。そこで、マイクロアレイを用いて感染初期の肺組織でのウイルス感染応答に関わる遺伝子発現の網羅的解析を実施した。解析が済んだメタミドフォスでは、IL-6、G-CSF など単球/マクロファージより産生されるサイトカインや IFN- γ など T 細胞での発現が知られている複数の遺伝子について、顕著な遺伝子発現の抑制が認められた。クロルピリフォスについては、現在評価を進めている。今後、BALF 中のサイトカインレベルとマイクロアレイ解析の結果と併せて、これらの化学物質の標的細胞や分子を探索し、それらの結果を受けて *in vitro* での実験系にて反応性を検証する。

A. 研究目的

メタミドフォスとクロルピリフォスを代表として化学物質の発達期曝露における胎児・新生児の免疫システムへの有害作用を感度良く評価するため、Respiratory syncytial ウイルス（RS ウイルス）感染マウス実験モデルを用いて、感染病態へ影響する標的分子を明らかにする。今年度は両物質の高用量曝露下でウイルス感染に应答して病原性に関与する標的細胞を見出し、さらに遺伝子発現の網羅的解析により、候補分子群を選抜することを目的とした。

B. 研究方法

化学物質の周産期曝露実験：メタミドフォスは、シグマアルドリッチより購入し、クロルピリフォス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）からメタミドフォス（10, 20, 30 ppm）を溶解した飲料水を自由飲水により投与した。同様にクロルピリフォスは 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℃ に保管した。その後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)にてマイクロアレイ解析を実施した。解析はソフト Gene Spring にて行った。

（倫理面への配慮）

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

C. 研究結果

メタミドフォスの感染影響

メタミドフォス周産期曝露において、飼育出産が可能であった最高曝露用量は 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（表 1）。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。さらに、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 レベルもメタミドフォス曝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（表 2）。これらの結果からメタミドフォスが 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(図1)。RSウイルス感染時にのみメタミドフォス暴露で変動(対照に対して2倍以上)する2536遺伝子を見出し、さらに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(表3、4)。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(表3)。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(表4)。

クロルピリフォスの感染影響

クロルピリフォスは2.8~70 ppmの用量で周産期暴露を行い、メタミドフォス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 レベルがクロルピリフォス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(表5)。一方、感染5日後のIFN- γ レベルは上昇した。メタミドフォスと同様に感染5日後の肺組織の病理組織学的な検証を行ったが、クロルピリフォス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(表6)。

D. 考察

メタミドフォスとクロルピリフォスは共に周産期暴露により、仔マウスのRSウイルス感染病態の明確な増悪化は示さなかった(表-2、6)。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(表-1、5)。特にメタミドフォスについては、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(表-3)。さらに、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、メタミドフォス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、クロルピリフォスについて、メタミドフォス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。

E. 結論

メタミドフォスとクロルピリフォスは共に周産期暴露により、仔マウスのRSウイルス感染病態の明確な増悪化は示さなかったが、ウイルス感染初期の免疫応答に影響を示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Watanabe, W., Shimizu, T., Sawamura, R., Hino, A., Konno, K., Hirose, A., Kurokawa, M.: Effects of tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant, on the immune response to respiratory syncytial virus infection in mice. *Int. Immunopharmacol.* 10(4):393-7, 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

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の周産期暴露による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の発達期暴露による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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表-1 Effects of Methamidophos on cytokine concentration in BALF from RSV-infected mice

Cytokine (pg/mL)	Day1			Day5		
	Control	Methamidophos10	Methamidophos20	Control	Methamidophos10	Methamidophos20
TNF- α	825 (237)	676 (284)	534 (182)	ND	ND	ND
IL-6	497 (96)	329* (22)	252** (74)	ND	ND	ND
IL-1 β	<39	<39	<39	ND	ND	ND
IL-12	<78	<78	<78	ND	ND	ND
IFN- γ	ND	ND	ND	1499 (470)	1327 (775)	805* (382)
IL-4	ND	ND	ND	<20	<20	<20
IL-10	ND	ND	ND	<78	<78	<78

Numbers in parentheses indicate SD of mean values.

ND: not determined

*p<0.05, **p<0.01

表-2 仔マウス肺の病理組織学的解析 (Day 5 pi)

臓器所見	No.	非感染	RSV感染								
		無処置	無処置					メタミドフォス投与			
								10 ppm		30 ppm	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9
出血	-	-	+	±	-	-	-	-	-	-	-
好中球漫潤	-	+	++	±	+	++	+	+	+	+	
リンパ球漫潤	-	++	+	+	+	+	+	+	++	+	
マクロファージ増生	-	++	++	+	+	++	+	+	++	+	
気管支上皮の変性	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
硝子膜の形成	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
細菌叢	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
気管支上皮の腫大	-	-	±	-	-	±	-	-	-	-	
肺水腫	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
気管支上皮の増生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

-: negative, ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked

図-1 マイクロアレイ解析の概略図

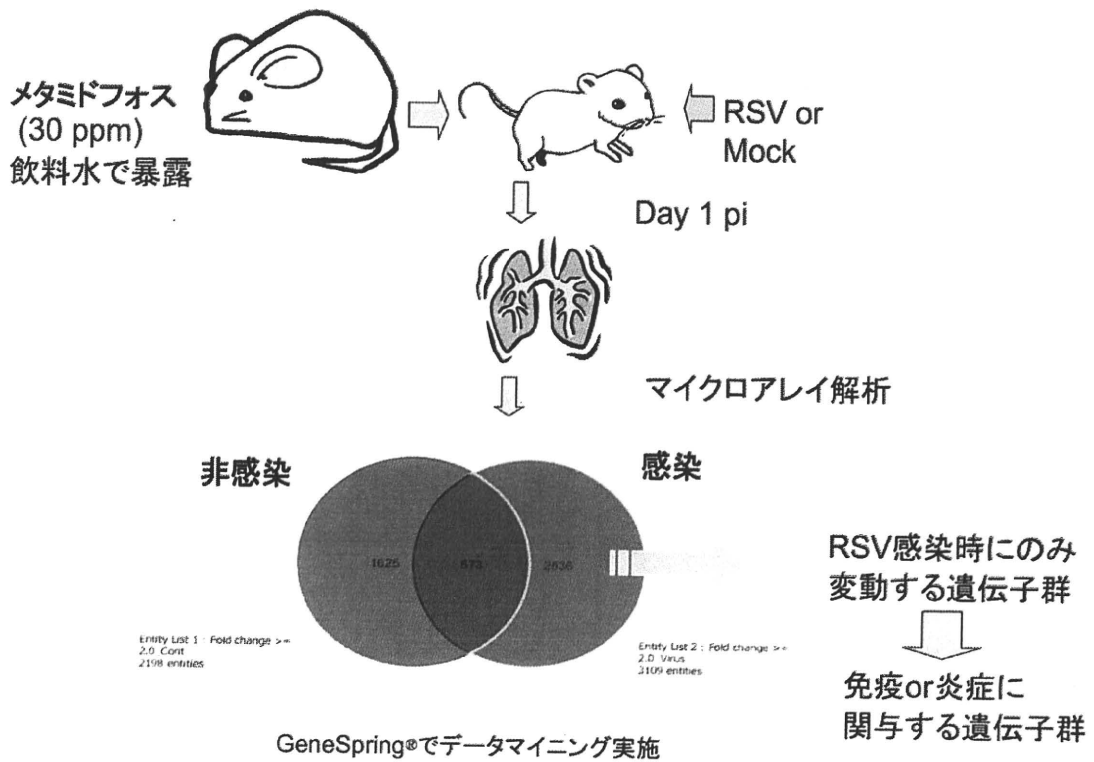


表-3 Effects of perinatal exposure to methamidophos (30 ppm) on the gene expression in the lung tissues of RSV-infected offspring mice by microarray analysis (Day 1pi)

Gene symbol	Fold change (down-regulated)	Gene Name
Reg3g	7.04	regenerating islet-derived 3 gamma
Xcl1	4.64	chemokine (C motif) ligand 1
Il6	4.21	interleukin 6
Il18rap	3.72	interleukin 18 receptor accessory protein
Cd1d2	3.64	CD1d2 antigen
Csf3	3.49	<u>colony stimulating factor 3 (granulocyte)</u>
Mylk3	3.08	myosin light chain kinase 3
Ifng	2.97	interferon gamma
Ido1	2.88	indoleamine 2,3-dioxygenase 1
Tbk1	2.69	TANK-binding kinase 1
Ccr5	2.61	<u>chemokine (C-C motif) receptor 5</u>
Mefv	2.53	Mediterranean fever
F3	2.40	coagulation factor III
Nfkbiz	2.31	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta
1200009O22Rik	2.23	RIKEN cDNA 1200009O22 gene
Thbs1	2.22	thrombospondin 1
Tlr3	2.22	<u>toll-like receptor 3</u>
Il1a	2.21	<u>interleukin 1 alpha</u>
Fcgr3	2.07	Fc receptor, IgG, low affinity III
Irgm1	2.01	immunity-related GTPase family M member 1

表-4 Effects of perinatal exposure to methamidophos (30 ppm) on the gene expression in the lung tissues of RSV-infected offspring mice by microarray analysis (Day 1pi)

Gene symbol	Fold change (up-regulated)	Gene Name
1-Mar	4.50	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1
Clec4a2	4.42	C-type lectin domain family 4, member a2
Lias	3.26	lipoic acid synthetase
Chst2	2.57	carbohydrate sulfotransferase 2
Nlrp3	2.04	NLR family, pyrin domain containing 3

表-5 Effects of Chlorpyrifos on cytokine concentration in BALF from RSV-infected offspring mice

Cytokine (pg/mL)	Day 1		Day 3		Day 5		
	Control	Chlorpyrifos14	Control	Chlorpyrifos14	Control	Chlorpyrifos14	Chlorpyrifos70
TNF- α	265 (134.5)	116* (25.5)	<35	<35	ND	ND	ND
IL-6	431.5 (173)	402 (104.5)	<19	<19	ND	ND	ND
IL-1 β	<39	<39	<39	<39	ND	ND	ND
IL-12	<78	<78	<78	<78	ND	ND	ND
IFN- γ	ND	ND	ND	ND	699 (265.5)	794 (381.5)	1547 (1060.7)
IL-4	ND	ND	<20	<20	<20	<20	<20
IL-10	ND	ND	<78	<78	109 (22.2)	77 (27.4)	81 (35.2)

Numbers in parentheses indicate SD of mean values.

ND: not determined

*P<0.05

表-6 仔マウス肺の病理組織学的解析 (Day 5 pi)

臓器所見	N o.	無処置							14 ppm 処置							70 ppm 処置						
		RSV 非 感染	RSV感染						RSV非 感染		RSV感染					RSV非 感染		RSV感染				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	1 0	1 1	1 2	1 3	1 4	1 5	1 6	1 7	1 8	1 9	2 0	2 1
出血		-	±	-	-	-	-	+	-	-	+	-	±	±	-	-	-	-	±	-	-	-
好中球浸潤		-	±	±	+	+	±	+	-	+	±	±	+	+	±	-	+	±	±	±	±	±
リンパ球浸潤		-	±	+	±	+	+	±	-	±	+	±	±	+	+	-	+	±	±	+	±	±
マクロファージ増生		-	±	±	±	+	+	±	+	+	±	±	±	+	±	-	+	±	-	±	±	±
気管支上皮の変性		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
硝子膜の形成		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
細菌叢		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
気管支上皮の腫大		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±
肺水腫		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±

-: negative, ±: minimal, +: mild, ++: moderate, +++: marked

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
（H21-化学-一般-006）

分担研究報告書（平成22年度）

発達期における発がん性評価手法に関する研究

研究分担者 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

研究協力者 小川 久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部部长
菅 永暁 国立医薬品食品衛生研究所 病理部室長

研究要旨：ヒトに対して必須微量元素であるマンガンは過剰に暴露されると慢性影響としては歩行障害、言語障害などパーキンソン病に類似したマンガン中毒の症状がみられる。またニコチンは強い神経毒性を示し、明らかな発癌性はないとされるものの発がん修飾作用が懸念される。本研究ではマンガン及び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ついて *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより解析する。妊娠 17 日目の F344 雌ラットに ENU (20 mg/kg 体重) を一回静脈内投与し、分娩直後より母動物に塩化マンガン 4 水和物 ($\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) を 0.002, 0.01 及び 0.05% 濃度で 3 週間混餌投与した。離乳後、仔動物にも各々同濃度の餌を投与した。34 週に屠殺解剖し、中枢神経系に発生した腫瘍性病変に関して病理組織学的に評価した。本モデルは 34 週間という短期間で 62% の動物に中枢神経がんを誘発した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。いずれの投与群においても星状膠細胞腫、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が、その発生率には群間の差がないことからマンガンの幼若期暴露による中枢神経発がん修飾作用は認められなかった。現在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、投与による体重及び飲水量の減少が認められている。

A. 研究目的

化学物質の発達期暴露は成熟期暴露に比べ発がん感受性が高いことが示唆されている (U.S. EPA, 1996)。しかし、それに関連して検討された物質の数は少なく、特に中枢神経発がんに関する情報は乏しいことから短期間で高感度に発がん修飾作用を示す化学物質をスクリーニング出来るモデルの開発が望まれている。中でも発達期に被験物質を暴露できる中枢神経系の発がんモデルはほとんど検討されていない。本研究では、ENU の経胎盤投与によるラット中枢神経発がんモデルを用いて、出生直後より神経標的性を持つ物質を中心として暴露しその発がん修飾作用を検討している。

マンガンは過剰に暴露されると急性影響としては記憶障害、精神症状などがみられ、慢性影響としては歩行障害、言語障害などパーキンソン病に類似したマンガン中毒の症状がみられる (Santamaria, Indian. J. Med. Res., 128, 484-500, 2008)。マンガンそのものはヒトでの発がん性がないと分類されており (U.S. EPA)、長期の動物実験でも発がん性を有するとのデータは知られていない (NTP)。マンガンは神経系を標的にしており、神経毒性のメカニズムが神経細胞に対する活性酸素による酸化的ストレス (Aschner, Manganese neurotoxicity and oxidative damage, 77-93, 1997, Galvani et al., Eur. J. Pharmacol., 377-383, 1995) とされることから感受性の高い発達期の暴露による神経系発がんへの影響が危惧される。実際、新生仔は成熟動物よりマンガ

ンの脳内濃度増加やドーパミン濃度の変動による神経毒性のリスクが高く (Kontur et al., Teratology, 32, 1-11, 1995, Pappas et al., Neurotoxicol. Teratol., 19, 17-25, 1997, Gianutsos et al., Neurotoxicology, 3, 75-81, 1982)、大脳皮質の菲薄化も報告されている (Pappas et al., Neurotoxicol. Teratol., 19, 17-25, 1997)。

また、ニコチンは主に煙草の葉に含まれているアルカロイドの一種で即効性の非常に強い神経毒性を持つ。おもに中枢神経及び末梢に存在するニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に作用することで心拍数上昇、毛細血管収縮、血圧上昇などの薬理作用を示す。中毒性があり、急性毒性で嘔吐、振戦、痙攣、死亡を起こす。ニコチンの変異原性及び発がん性は無いとされるが、近年、小核試験陽性 (Argentin, Toxicol. Sci., 79, 75-81, 2004)、活性酸素種の産生 (Argentin, Apoptosis, 11, 1887-97, 2006)、apoptosis の抑制 (Wright, FASEB J., 7, 1045-1051, 1993) などの報告もある。

今回、発達期に被験物質投与が可能なラット中枢神経系発がんモデルを用いて遺伝毒性と脳の奇形の報告のあるマンガン及び諸臓器に発がん促進作用の知られているニコチンを最高 0.05% 濃度でそれぞれ混餌及び飲水投与した際の発がん修飾作用を検討した。

B. 研究方法

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、塩化マンガン 4 水和物 ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 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)

投与実験は混餌又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、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

マンガンの投与による親動物及び仔動物の一般状態、体重 (Figure 1, 3) 及び摂餌量 (Figure 2-4, Table 1 and 2) 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マンガン投与による有意な変化はみられなかった (Figure 5)。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 (Figure 6)。しかし、マンガン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 (Figure 6, 7)。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、いずれもマンガンによる発生率の変化は認められなかった (Figure 7, Table 3, 4)。

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

(Figure 8) 及び飲水量 (Table 5) 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 (Figure 9, 10) 及び飲水量 (Figure 11) は明らかな減少又は減少傾向を示している。陽性対照群である 0.04%プロバ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。(Figure 9)

D. 考察

ENU を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより、マンガンの発達期暴露による発がん修飾作用について検討を行った。

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 を経胎盤暴露し、同時期に死亡例を認めた報告 (Perantoni et al., *Proc. 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、マンガン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マンガン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 レベル及びマンガン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)。現在はマンガン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

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%濃度で塩化マンガン 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
なし

2. 学会発表

曹 永晩、高見 成昭、豊田 武士、小川 久美子、
西川 秋佳：マンガンの幼若期暴露による中枢神経
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 冨子、
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 冨子、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

Table 1. Food consumption and manganese intake of dams treated with $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ for 3 weeks after ENU administration

Group	No. of dams	Food consumption (g/rat/day)	Manganese intake (mg/kg b.w./day)
0% MnCl_2	5	29.9	0
0.002% MnCl_2	6	29.0	0.8
0.01% MnCl_2	6	29.7	4.2
0.05% MnCl_2	6	28.2	19.6

Table 2. Food consumption and manganese intake in offspring treated with $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ for 34 weeks

Group	No. of offspring	Food consumption (g/rat/day)	Manganese intake (mg/kg b.w./day)
Male			
Control	21	14.3	0
0.002% MnCl_2	21	13.9	0.3
0.01% MnCl_2	20	13.9	1.6
0.05% MnCl_2	18	14.0	7.8
Female			
Control	19	9.3	0
0.002% MnCl_2	24	9.1	0.3
0.01% MnCl_2	26	9.4	1.7
0.05% MnCl_2	24	9.2	8.7

Each value represents the mean throughout the experiment period.