

201133006A

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23年度 総括研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成24（2012）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 -----	15
渋谷 淳	
(資料) 図 1-20、表 1-6	
2. In vitro 神経発達評価 -----	22
鈴木 勉	
(資料) 図 1-6	
3. 免疫機能評価 -----	24
手島 玲子	
(資料) 図 1、表 1-7	
4. 感染感受性評価 -----	31
渡辺 渡	
(資料) 図 1-5、表 1	
5. 発がん感受性評価 -----	34
西川秋佳	
(資料) 図 1-6、表 1-7	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	39

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 23 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 農学研究院 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、ラットやマウスを用いて海馬歯状回のニューロン新生をモデルとして、21、22 年度は、発達期低栄養影響の他、マンガン (Mn)、クロルピリフォス (CPF) やアクリルアミドの発達期暴露による、ニューロン新生とその移動に関わる分子発現変化を検討した。更にマウスではゲノムのメチレーション解析を実施した。23年度は、マウスでの CPF 評価、ラットのニコチン (NIC) 評価、マウスとラットでの Mn 評価では、顆粒細胞後期前駆細胞の傷害性を検出し、その可逆性を含めた検出性は高いと判断され、GABA 性介在ニューロンの反応性を含めた評価系を確立した。また、ニューロン新生に影響を与えるコリン作動性入力の評価系も確立した。更にマウスの Mn 評価で、ニューロン新生に関連してエピジェネティックな遺伝子発現制御を受ける分子群を見出した。その中で MID1 遺伝子の幹細胞での左右非対称の発現が Mn 暴露により永続的に消失することを見出し、不可逆的な障害検出を可能とした。

In vitro 神経発達評価では、21、22 年度は $MnCl_2$ 、NIC について、各種培養細胞系を用いたニューロンないしグリア細胞の分化に対する直接的な影響を検討した。23 年度は ES 細胞評価系確立を目的に、ES 細胞の各種の分化誘導に対する $MnCl_2$ 、NIC 暴露の影響を検討した結果、共にドパミン、セロトニン、及びアセチルコリン神経への分化影響を見出し、ES 細胞の神経発生への影響評価系としての有用性を確認した。

免疫機能評価では、21、22 年度はマウスを用いてメタミドフォス (MMP)、CPF をそれぞれ検討したが、MMP では検索に十分な出生児数が得られなかったため、23 年度に再度検討した。その結果、暴露終了時での抗体産生能の抑制作用と、成熟後での影響の回復性を見出し、影響評価系を確立した。MMP 暴露終了時での胸腺、脾臓のゲノムのメチル化の網羅的解析で、自然免疫系のパターン認識受容体遺伝子の CpG アイランドのメチル化減少を見出し、エピジェネティックな修飾を起点とした影響評価の道筋をつけた。

感染感受性評価では、RS ウイルス感染マウスモデルでの感染初期免疫系への影響を、21、22 年度は MMP について検討したが、23 年度は CPF を検討し、児動物肺組織での網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、MMP では肺洗浄液中の IL-6 変動等から、標的細胞がマクロファージ/単球系と絞れたが、CPF ではその様な結果が得られなかった。MMP では更に RS ウイルス培養マクロファージで直接作用を検証できたが、直接的な IL-6 の産生影響のないことを確認し、標的細胞とサイトカイン産生影響評価系を確立した。また、 $MnCl_2$ についても感染マウスモデルで検討したが、全く感染影響が認められなかった。

発がん感受性評価では、ENU 経胎盤投与モデルを用いて、21、22 年度は Mn の発達期暴露による中枢神経系発がん修飾作用を解析したが、23 年度は NIC を検討した結果、中枢神経腫瘍の発生率、発生数及び体積に対する影響は認めなかった。また、プロパンスルトンによる中枢神経系発がん修飾作用は認められなかったが、肺癌の発生率は有意に増加した。以上より、陽性結果は得られなかったが、ENU 経胎盤投与モデルを用いた中枢神経系発がん評価系を確立した。

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

鈴木 勉

星薬科大学薬品毒性学教室 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

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、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。23年度は、in vivo 神経発達評価では22年度に実施したMn暴露マウスのゲノムの網羅的メチレーション解析について解析を継続し、評価を終了した。また、22年度に発達期暴露実験を実施したラットを用いたクロルピリフォス(CPF)の各種脳発達影響指標の評価を実施・終了した。更に、CPF(マウス)及びニコチン(NIC; ラット)の暴露実験を行い、各種脳発達影響指標の評価を実施・終了した。In vitro 神経発達評価では、化学物質の発達期中枢神経系を構成する細胞の分化や機能に対する影響を、細胞を使った系で系統的に評価することを目的として、21、22年度はMnCl₂、NICについて、各種培養細胞系を用いたニューロンないしグリア細胞の分化に対する直接的な影響を検討した。23年度はES細胞評価系確立を目的に、MnCl₂ないしNIC暴露の神経発生への影響について検討を行った。免疫機能評価では、21、

22年度はマウスを用いてメタミドフォス(MMP)、CPFをそれぞれ検討したが、MMPでは検索に十分な出生児数が得られなかったため、23年度に再度検討した。更に、MMP周産期暴露が及ぼすエピジェネティックな影響を解析するため、脾臓CD4陽性細胞および胸腺細胞について、マイクロアレイを用いたCpGアイランドメチル化の網羅的解析を行った。これにより、MMP周産期暴露の指標となるマーカー遺伝子を探索することを試みた。併せて、一般的に免疫毒性試験で用いられる評価手法である胸腺依存性抗原(KLH)に対する抗体産生能を評価した。感染感受性評価では、MMPとCPFを代表として化学物質の発達期暴露における胎児・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、感染免疫へ影響する標的細胞分子を明らかにする。23年度はマイクロアレイ解析ならびに炎症性サイトカインの産生影響を基に、培養マクロファージを用いたin vitro 試験から標的分子を同定することを最終目的とした。発がん感受性評価では、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諸臓器に発がん促進作用の知られているNICを最高0.05%濃度で飲水投与した際の発がん修飾作用を検討した。また、中枢神経発がん作用を示すプロパンスルトンを用いて本モデルにおける発がん修飾作用を検討した。また、前年に本モデルにおいて影響を示さなかったMnCl₂について仔動物への暴露を確認する為、授乳期の仔動物の胃内容物中のMn濃度を分析した。

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>

マウスにおいて22年度に行ったゲノムのメチレーション解析を更に詳細に行った。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MnCl₂・4H₂OをMnとして0、32、160、800 ppmの用量で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・経乳的に暴露したマウス仔動物の暴露終了時と生後77日目に採取した脳を用いてゲノムのメチレーション解析を実施した。22年度の解析において、生後21及び77日目の800 ppm Mn暴露仔動物に、メチレーション特異的qPCR解析において過メチル化、real-time RT-PCR解析においてmRNAの発現レベルの有意な減少、免疫染色において陽性顆粒細胞数の有意な減少がみられたMID1について、海馬顆粒細胞層における陽性細胞の分布の左右の対称性について検索を実施した。

<CPFを用いた発達期暴露影響評価>

22年度にラットの暴露実験を終了し、本年度はマウスの暴露実験を実施した。すなわち、発達期化学物質暴露モデルとして、コリンエステラーゼ阻害剤

の 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。

ラットの実験では、妊娠 SD:IGS ラット(日本チャールズリバー)を各群 8 匹使用し、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 及び 77 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 μ m 厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス proliferating cell nuclear antigen 抗体(PCNA、x200 倍、IgG、Dako)、抗ウサギ Tbr2 抗体(T box brain 2、x500 倍、IgG、Abcam)、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)、抗マウス Reelin 抗体(x1000 倍、Novus Biologicals, Inc.)及び抗マウス NeuN 抗体(x100 倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)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。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については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)において検索を行った。GABA 性介在ニューロンの指標である Reelin 及び成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

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、予備試験の結果をもとに 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。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 日目児動物の血漿、全血液及び脳(前頭葉)中のコリンエステラーゼ(ChE)活性を TBA-120FR を用いて、血漿中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE 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、抗ウサギ DCX 抗体(x1000 倍)、抗マウス Pax6 抗体(x500 倍、IgG、Abcam)、抗ウサギ Tbr2 抗体(x200 倍)、抗マウス Reelin 抗体(x1000 倍)、抗マウス NeuN 抗体(x1000 倍)、抗マウス PCNA 抗体(x200 倍)を用いて、DAB 発色にて ABC 法による免疫染色を行った。GABA 性介在ニューロンに発現する分子の Reelin 及び成熟ニューロンの指標である NeuN 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 DCX、Pax6 及び Tbr2 並びに増殖細胞指標の PCNA 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。

<NIC 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(-)-ニコチン酒石酸水素塩を飲水(NIC の苦みをマスクするため 1% サッカリン水を使用)に溶解させて母動物に摂取させることにより、妊娠 6 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 Slc:SD ラット(日本エスエルシー)各群 8~12 匹(非妊娠動物除外後の匹数)使用し、予備試験結果を基に公比 5 として、2、10、50 ppm の 3 用量を設定し、対照群((-)-NIC 酒石酸水素塩=0 ppm、L(+)-酒石酸=50 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、児動物は通常の水道水に切り替えて飼育した。実験期間中、母動物は体重、摂餌量及び摂水量、児動物は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、脳重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了直前(分娩後 19 日)の母動物及び児動物の尿中コチニン濃度を cotinine direct ELISA kit(Calbiotech Inc.)を用いて、生後 21 及び 77 日目の血清中の 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、抗ウサギ DCX 抗体(x1000 倍)、抗ウサギ TUC4 抗体(x1000 倍、

Millipore Corporation)、抗マウス GFAP 抗体 (x200 倍)、抗ウサギ Tbr2 抗体 (x500 倍)、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)、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍) 抗マウス PCNA 抗体 (x200 倍) を用いて、DAB 発色にて ABC 法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。また、抗ウサギ DCX 抗体 (x100 倍) と抗ウサギ TUC4 抗体 (x1000 倍) 又は抗ウサギ Tbr2 抗体 (x500 倍) 及び抗ウサギ NACH α 7 抗体 (nicotinic acetylcholine receptor alpha 7, x100 倍、IgG、Abcam) と抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍) の 3 つの組み合わせについて、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。新生ニューロンの分化指標である DCX、TUC4、GFAP 及び Tbr2 陽性細胞数、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数並びに ACh 受容体の NACH α 7 については海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。GABA 性介在ニューロンの指標である GAD67 及び Reelin 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。更に NeuN については、成熟顆粒細胞数を評価するために顆粒細胞層を形成する全 NeuN 陽性顆粒細胞数を検索した。生後 21 日目の児動物の海馬を用いて、*Chrna7*、*Chrn2*、*Dcx*、*Dpsyl3*、*Reln* 及び *Pcna* 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

マウス胎仔 (E14) 全脳より神経幹細胞の作製を行った。更には、マウス ES 細胞より、神経幹細胞への誘導を行った。これら細胞に、目的の薬液を処置し、神経細胞あるいはグリア細胞の形態の変化を β III-tubulin、GFAP ならびに Iba1 の抗体を用いて、免疫染色法に従い検討を行った。また、標的の RNA の発現変動を RT-PCR 法に従い行った。

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 から飲水投与にて MMP の暴露を開始した (1 群 12 匹)。検体濃度は、0, 1, 5, 25 ppm とした。出産後 3 週目まで暴露を継続し、その間体重、飲水量および摂餌量を計測した。また、出産した児動物の体重も同様に計測した。児動物の数は 1 ケージあたり 8 匹となるように調節した。尚、エピジェネティクス解析及び抗 KLH 抗体産生能解析については、暴露用量を 0 及び 25 ppm の 2 点とし、雄児動物をエピジェネティクス解析に、雌児動物を抗体産生能の解析に用いた。

解剖及び臓器重量測定：生後 3 週の時点で雌雄 4 匹ずつ児動物を解剖し、肝臓・脾臓・胸腺の重量を

測定した。胸腺、脾臓、肝臓及び大腿骨・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組織学的観察を行った。母マウスについても同様の処置を行った。

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)、平均赤血球血色素量 (MCV)、平均赤血球血色素濃度 (MCHC)、及び血小板数 (PLT) の測定を行った。

血清学的検査：母動物及び仔動物について、末梢血より血清 200 μ l を採取し、SRL 社に委託して肝機能に関して、A/G 比、AST、ALT、及び血清中コリンエステラーゼ活性 (ChE) の検査を行った。

ヘルパー T 細胞 (Th)、細胞傷害性 T 細胞 (Tc)、ナチュラルキラー細胞 (NK) の免疫系臓器中の存在比率の解析：児動物の脾臓及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 抗体により氷上で 30 分間染色した。次いで 500 μ l の FACS stain buffer (FBS; BD) で 2 回洗浄し、フローサイトメータ FACSaria (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、脾臓及び胸腺より調製した細胞を 4×10^6 cells/1ml/well で 24 well 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にて 1 時間固定し、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、抗マウス IFN γ -PerCP-Cy5.5、抗マウス IL-4-PE、抗マウス IL-17A -APC 抗体により室温で 1 時間染色した。尚、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。

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、脾臓及び胸腺より調製した細胞を、抗マウス CD4-FITC 及び抗マウス 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。

エピジェネティクス解析：検体暴露が免疫系細胞に及ぼすエピジェネティックな変化を解析するため、胸腺細胞及びCD4陽性脾臓細胞についてCpGアイランドメチル化解析を行った。0及び25 ppmのMMP周産期暴露を行った雄児動物マウスより、胸腺及び脾臓を摘出した。胸腺細胞は定法通り破碎して口径40 μ mのメッシュに通したものを 2×10^8 個を用い、脾臓細胞は2匹分を同様に破碎してメッシュに通し、抗CD4抗体とMACSシステムによりCD4陽性細胞 $7 \sim 8 \times 10^6$ 個を解析に供した。ゲノムDNAはいずれもA280/A260 >1.8 の品質であることをチェックし、総量 $2 \sim 20 \mu$ gを得た。各500 ngを超音波で剪断し、Whole Genome Amplification Kit2 (Sigma)で増幅後、MBD2-His タンパク質+Nickel BeadsによりCpGアイランドメチル化DNAを濃縮、Whole Mouse CpG Island array $2 \times 105k$ アレイ (Agilent Technologies)によりCpGアイランドのメチル化を解析した。

抗KLH抗体産生能解析：MMP暴露0及び25 ppmの雌児動物3匹 \times 2群ずつを別ケージに分け、PBSまたは0.1 mg/1 ml KLH (Imject mcKLH, Thermo Fisher)で2回i.p.投与にて免疫した(生後22, 36日)。生後43日目に血清を採取し、定法により抗KLH IgM抗体及びIgG抗体を測定した。

統計計算：FACSによる細胞のポピュレーションに関するデータ、血球学的・血清学的解析、抗KLH抗体産生能解析では、Microsoft Excelにより集計し、GraphPad Prism (GraphPad Software Inc.)を用いてDunnnettの検定を行った。エピジェネティクス解析については、各臓器において0 ppmに比して25 ppm暴露時に4倍以上のメチレーション変化が認められた遺伝子を選択し、両臓器で共通して大きな変動が認められた遺伝子及び免疫・炎症に関連する遺伝子を抽出した。抗体産生能解析については、各希釈倍率において0 ppm群に対する25 ppm群の変化をStudentのt検定(両側)で調べた。

感染感受性評価

化学物質の周産期暴露実験：MMPとMnCl₂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(妊娠10日目)からCPF(14, 70 ppm)とMnCl₂(32-800 ppm)をCRF-1粉末餌で混餌により、MMP(30 ppm)は飲料水に溶解して自由飲水により出産後21日目まで暴露した。出産後21日目に離乳を行い、親・児動物共に通常飼育を行った。尚、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週齢の児動物にキシラジン・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。

マイクロアレイによる遺伝子発現解析：BALF取得を行わなかった児動物より肺を摘出し、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。

マクロファージ培養実験：RAW264.7, J774.1及びP388D1細胞を用い、予め化学物質と共に24時間培養後、RSウイルスA2株あるいはA型インフルエンザウイルスPR-8株を感染させ(MOI:1-5)、24-72時間培養した。尚、LPS刺激(0.1 mg/mL)を行った際は、24時間培養を実施した。

サイトカインの定量：BALF及び培養上清中のサイトカインレベルは、それぞれeBioscience社製のMouse Readysort-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ELISAによる定量を行った。

発がん感受性評価

分娩直後の3匹のF344雌ラットに塩化マンガン4水和物(MnCl₂·4H₂O)を0.5%濃度で混餌投与した。生後1, 7, 14日目に仔動物の解剖を行い、胃内容物を採取し、ICP-MSを用いてMn濃度を測定し、Mnの乳汁移行を検討した。この間基礎飼料のみを与えた4匹を対照とした。

妊娠17日目のF344雌ラットを各群6匹の5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、酒石酸NIC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、また、プロパンスルトンを0.04%濃度で脱イオン水に混ぜ、飲水投与した。投与開始1週間から0.05%を0.025%に濃度を変更して投与を行った。離乳後、各々の仔動物に母動物と同様の飲水投与を25週齢まで行った。この間、脱イオン水で作製した2%サッカリン水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回体重及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。

(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>

マウス：

昨年度に報告したゲノムのメチレーション解析結果の概要としては、CGI アレイによる解析で対照群に比べ 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 24 遺伝子検出され、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、real-time RT-PCR 解析により Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の mRNA の発現レベルの減少、免疫染色により海馬歯状回門における Parvalbumin 陽性介在ニューロン細胞数の減少が生後 21 日目の 800 ppm に、MID1 陽性顆粒細胞数の減少が生後 21 及び 77 日目の 800 ppm にみられた。

23 年度に得られた、海馬顆粒細胞層における MID1 陽性細胞の分布の左右の対称性に関する結果を以下に示す。

対照群では海馬顆粒細胞層における MID1 陽性細胞は左側に比べ右側で有意に多く分布していたが、800 ppm では右側の優勢性は認められなかった。これらの変化は、生後 21 及び 77 日目のいずれにも認められた。

<CPF 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、母動物の全投与群における一過性の体重高値と 14 及び 70 ppm における散発的な摂餌量の高値、児動物の 14 ppm のみにおける授乳期間中の体重高値、70 ppm の生後 21 日目の雌雄の肝臓の相対重量の低値、卵巣の絶対及び相対重量の低値、生後 77 日目の雌の脳の相対重量の低値と腎臓の絶対重量の高値、母動物の 2.8 ppm 以上の血漿及び赤血球中 ChE 活性の低値と 70 ppm の脳内 ChE 活性の低値並びに生後 21 日目の児動物の 14 ppm 以上の血漿中 ChE 活性の低値と 70 ppm の赤血球中及び脳内 ChE 活性の低値、生後 21 日目の 70 ppm の海馬歯状回顆粒細胞層下帯における Tbr2 及び PCNA 陽性細胞数の減少がみられた。

23 年度は、生後 77 日目の脳について海馬歯状回での免疫組織学的検討を行ったので、その結果を以下に示す。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯における Tbr2、DCX、GFAP、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞数並びに海馬歯状回門における Reelin 及び NeuN 陽性細胞数に変化はみられなかった。

マウス：

母動物の体重では、一過性の有意な低値が分娩後 4 日目の 100 ppm に、摂餌量の一過性の有意な低値が分娩後 19 日目の全ての投与群に認められた。

児動物の体重では、雄の有意な低値が全ての投与群で生後 49 から 77 日目にみられ、20 ppm では生後 21 日と 28 日目、100 ppm では生後 28 日目にもみられた。尚、雌に変化はみられなかった。

児動物の臓器重量では、生後 21 日目の 20 ppm の雄で腎臓の絶対及び相対重量の有意な高値並びに脳及び肝臓の相対重量の有意な高値がみられた。生後 77 日目では変化はみられなかった。

ChE 活性の測定では、暴露終了時の母動物では血漿及び全血中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 100 ppm にみられた。生後 21 日目の児動物では血漿及び全血中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 4 及び 100 ppm にみられた。生後 77 日目の児動物では血漿中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上にみられた。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後 21 日目の 4 ppm で T₃ 及び T₄ の有意な低値、生後 77 日目の 100 ppm で T₄ の有意な高値がみられた。

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、DCX 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 20 及び 100 ppm にみられた。Pax6 及び Tbr2 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日目では DCX、Pax6 及び Tbr2 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった。

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、NeuN 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm にみられた。Reelin 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日目では Reelin 及び NeuN 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖の検索では、PCNA 陽性細胞数は生後 21 及び 77 日目のいずれでも変化は見られなかった。

<NIC を用いた発達期暴露影響評価>

母動物の体重は 50 ppm で有意な低値が妊娠 19 日から分娩後 21 日までみられた。摂餌量は 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、殆どの測定時点で有意差を示した。摂水量では 10 及び 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、10 ppm では多くの測定時点で、50 ppm では殆どの測定時点で有意差を示した。

児動物の体重は 50 ppm の雌雄で生後 7 日以降低値を示し、殆どの測定時点で有意差がみられた。ま

た、2及び10 ppmの雄でも有意な低値が散見された。摂餌量は雄では2 ppm以上の投与群で有意な低値が多く、測定時点にみられた。雌では2 ppm以上の投与群で有意な低値が散見された。

児動物の脳重量は、50 ppmの雌雄において生後21日目では絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値、生後77日目では絶対重量の有意な低値がみられた。

尿中コチニン濃度(分娩後19日)は、母動物及び児動物ともに2 ppm以上の投与群において用量に応じた上昇がみられた。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後77日目の2 ppm以上の投与群でT₄の有意な高値と10 ppmでT₃有意な高値がみられた。

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、生後21日目でDCX陽性細胞数の有意な増加が10及び50 ppm、TUC4陽性細胞数の有意な減少が2 ppmにみられた。GFAP及びTbr2陽性細胞数に変化はみられなかった。生後77日目ではDCX、TUC4、GFAP及びTbr2陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった。これらの変化の詳細を検討するためのDCXとTUC4又はTbr2の二重染色では、TUC4+/DCX+及びTUC4+/DCX-細胞数の有意な減少とTUC4-/DCX+細胞数の有意な増加が2及び10 ppmに、Tbr2-/DCX+細胞数の有意な増加が50 ppmにみられた。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖及びアポトーシスの検索では、PCNA及びTUNEL陽性細胞数は生後21及び77日目のいずれでも変化はみられなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層での成熟顆粒細胞の検索では、NeuN陽性顆粒細胞数は生後21及び77日目のいずれでも変化はみられなかった。

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日目でGAD67陽性細胞数の有意な増加が10及び50 ppmに、NeuN陽性細胞数の有意な増加が50 ppmにみられた。

Reelin陽性細胞数に変化はみられなかった。生後77日目ではGAD67、NeuN及びReelin陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯のニューロン前駆細胞へのNICの直接的影響を評価するために、NeuN陰性のニューロン前駆細胞におけるNACH α 7の発現状況を二重染色により検索したが、NACH α 7+/NeuN-細胞数に変化はみられなかった。real-time RT-PCR解析による生後21日目の児動物の海馬の*Chrna7*、*Chrn2*、*Dcx*、*Dpsyl3*、*Reln*及び*Pcna*のmRNAの発現レベルの検索では変化はみられなかった。

In vitro 神経発達評価

昨年度までの研究により、MnCl₂の処置により、Iba1陽性マイクログリアの活性化ならびにE14神経幹細胞からGFAP陽性アストロサイトへの分化誘

導の促進傾向が認められ、一方、NICを処置しても、神経細胞ならびにグリア細胞の形態に変化は認められないことを明らかにした。本年度は、両薬物において、細胞障害性は認められないことを確認した上で、ES細胞を用いて、神経発生への影響について検討を行った。その結果、MnCl₂の処置により、ドパミン神経の転写に関与する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)、アセチルコリンの分解酵素であるacetylcholinesterase (AChE)の発現低下ならびにアセチルコリン神経への分化制御因子として知られるbone morphogenetic protein-9 (Bmp-9)の発現増加が認められた。一方、NICの処置により、AChEの発現増加ならびにcholine acetyltransferase (Chat)、Bmp-9の発現低下が認められた。これらは、MnCl₂ならびにNICの神経の分化誘導に、異なる影響を示す可能性を示唆するものである。

免疫機能評価

本研究課題では、以前より出産数の低さが課題となっていた。そのため、昨年度のCPF暴露の試験から1群あたりの匹数を12匹に増やしたが、今回も出産数は少なかった。特に、25 ppm群では雌児動物雄各4匹ずつしか得られなかったため、生後3週齢目での解剖を優先し、暴露停止後11週齢時点での解析は断念した。また、コントロールも12匹中2匹しか出産に至らなかったため、妊娠マウスを4匹追加し、個体を確保した。

臓器重量：MMP暴露をした母マウス及び児動物の体重・臓器重量・臓器比重量を測定した。尚、前述の通り、出産数が少なかったため、25 ppm暴露群の母マウスは1個体のみについて解析した。また、仔についても、11週齢時の解析は見送った。雌児動物において、1または5 ppm暴露群は3週齢時に体重や脾臓の臓器重量の有意な増加を示したが、用量依存性はなく、比重量では有意差はなかったことから、ごく軽微な影響と考えられた。

血球学的解析：次に、母マウス及び児動物の血球学的な解析を行った。3週齢時点では目立った変化は認められなかったが、11週齢では雄児動物において赤血球数・ヘモグロビン濃度・ヘマトクリット値の有意な減少が認められた。

血清学的解析：MMP暴露が成立しているかどうか、及び肝機能への影響を解析するため、母動物及び雌児動物雄の血清学的解析を行った。3週齢の時点では、母動物及び雌児動物雄ともに5 ppm以上のMMP暴露は有意な血中ChEの減少を示した。有機リン系農薬であるMMPの薬理学的機序を考えると、このことは、経胎盤・経授乳によるMMPの周産期暴露が成立していることを強く示唆している。一方、肝機能の指標として選択した血中A/G比、AST及びALTはいずれも有意な変化を示さなかった。

フローサイトメトリーによるT細胞サブセットの解析：次に、フローサイトメトリーにより、児動物

の脾臓及び胸腺のリンパ球サブセット解析を行った。

最初に、CD3 による成熟 T 細胞、CD49b による NK 細胞、及び CD4/CD8a による T 細胞サブセットの解析を行ったところ、3 週齢の雌児動物の胸腺において、CD3 陽性細胞、CD8 陽性細胞、及び CD3⁺/CD4⁺細胞において有意な変動が認められたが、用量依存性のあるものはなく、11 週齢ではいずれの変化も有意ではなかった。また、胸腺の Treg と思われる CD25⁺Foxp3⁺/CD4⁺細胞は用量依存的な存在比率の減少を示したが、減少が有意であったのは最高用量の 25 ppm のみで、本条件は 11 週齢の個体を確保できなかったため、3 週齢時点で認められた Treg の減少が成熟後も持続するかどうかは明らかにできなかった。

一方、雄児動物の場合、3 週齢時点で脾臓の CD4⁺/CD3⁺細胞の存在比率が有意かつ用量依存的な増加を示したが、これも雌児動物の Treg 同様に 11 週齢時点での影響は不明であった。その他、Treg と思われる CD4⁺CD25⁺や CD4⁺Foxp3⁺の集団、及び Th1 と思われる CD4⁺IFN γ ⁺の集団が有意な減少を示したが、いずれも用量依存性はなく、11 週齢時点では変化が持続していなかったことから、影響はごく軽微と考えられた。

エピジェネティクス解析：有機リン系農薬の周産期暴露の免疫影響の指標として CpG アイランドメチル化などのエピジェネティクス解析が利用できるかどうかを検討するため、0 及び 25 ppm の MMP 飲水暴露を行い、胸腺細胞及び CD4 陽性脾臓細胞について Whole Mouse CpG Island array 2 \times 105k アレイを用い、CpG アイランドメチル化解析を行った。

全部で 97,651 種類のプローブ中、メチル化が 10 倍以上亢進したものは、胸腺細胞及び CD4 陽性脾臓細胞において、それぞれ 542 種及び 1,673 種であった。逆に、10 倍以上減少したものは、それぞれ 279 種及び 292 種であった。これら顕著なメチル化変動遺伝子のうち、胸腺細胞と CD4 陽性脾臓細胞とで共通して変動したものは、メチル化亢進群で 106 種、減少群で 7 種あった。前者はまだ多数であるので、このうちいずれか一方の臓器で 40 倍以上のメチル化亢進が認められたものに限れば 15 種に絞ることができた。

これらの遺伝子の中には、MMP 周産期暴露の免疫影響の指標となりうるマーカーが含まれている可能性があるが、特に免疫系において重要な役割を果たしていると考えられている候補を探すことは困難であった。

そこで、4 倍以上の CpG アイランドメチル化変化が起こった遺伝子群のうち、Gene ontology の biological process に免疫に関連する用語が記載されているプローブのみを抽出した。多くの遺伝子で複数のプローブがヒットしたため、プローブの Region_info に「PROMOTER」の記述がある場合はそれを優先し、それ以外ではメチル化量の変化

(Normalized ratio) を優先した。その結果、菌体成分のパターン認識受容体として知られる

peptidoglycan recognition protein 2 (Pglyrp2) が両臓器で共通してメチル化が減少していることが分かった。逆に、Currarino 症候群の原因遺伝子として知られる homeobox gene HB9 (Hlxb9) 遺伝子のメチル化は、両臓器とともに亢進していた。一方、T 細胞抗原受容体 (TCR) のシグナル伝達で重要な役割を果たしている vav 1 oncogene (Vav1) は、両臓器で逆の挙動を示し、胸腺ではメチル化減少、脾臓では亢進していた。胸腺における Vav1 のメチル化変化率は 0.01545 倍 (約 65 分の 1) で、遺伝子リスト中最大であったことを考えると、本遺伝子のメチル化の挙動が両臓器で正反対であったことは非常に興味深い。

胸腺依存性抗原 (KLH) 特異的抗体産生能：医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン ICH S8 でも推奨されている通り、keyhole limpet hemocyanin (KLH) のような胸腺依存性抗原に対する抗体 (IgM 及び IgG) の産生能 (TDAR: T-cell dependent antibody production) は、免疫毒性を総合的に評価するための優れた評価手法として知られている。そこで最後に、周産期 MMP 暴露が KLH 特異的抗体産生に及ぼす影響を解析した。尚、個体数の関係で、絵婦ジェネティクス解析と同様に、0 及び 25ppm 暴露群間での比較のみを行った。

IgM については有意な差は認められなかったが、IgG では、 $\times 400, 1600, 6400$ において 25ppm 暴露群の有意な抗体産生量低下が認められ、MMP の周産期暴露は軽微な抗体産生能への抑制的影響があるものと考えられた。

感染感受性評価

< CPF の感染影響 (in vivo) >

CPF を周産期暴露 (70 ppm) した児動物に RS ウイルスを感染させ、感染 1 日後の肺組織における遺伝子発現変動をマイクロアレイにより網羅的に解析した。RS ウイルス感染時のみ CPF 暴露で変動 (対照に対して 2 倍以上) した 1174 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。TNF- α と IL-6 の誘導に関わる IL-17 及びそのレセプター遺伝子の発現上昇が認められたが、リアルタイム RT-PCR によりこれらの結果の確認が取れなかった。

< MMP の感染影響 (in vitro) >

MMP 周産期暴露児動物において、感染 1 日後では、感染初期のウイルス排除に関わる BALF 中の IL-6 レベルが用量に依存して有意に低下し、かつマイクロアレイ解析により肺組織での遺伝子発現抑制群の上位に IL-6 遺伝子を見出した (前年度報告済)。そこで、標的細胞としてマクロファージ/単球系への影響が示唆されたため、この化合物のマクロファージへの直接的な作用を確認するために、培養マクロファージ J774.1 細胞を用いて、in vitro での RS ウ

イルス感染応答への影響を検討した。100 μ M を最高濃度に設定して培養上清中の IL-6 量を測定したが、in vivo で認められた様な抑制効果は全くなかった。次に RS ウイルスのマクロファージ/単球系細胞でのレセプターとして知られている Toll like receptor-4 のリガンドである LPS 刺激に対する影響について、RAW264.7 細胞を用いて検討した。その結果、弱い IL-6 の産生抑制傾向が得られたが、濃度依存性がなく、in vitro での直接的な作用は確認できなかった。

<インフルエンザウイルス感染マクロファージに対する CPF・MMP の影響>

P388D1 細胞を用いて、CPF・MMP のインフルエンザウイルス感染への応答を検討した。CPF は難溶性のため、0.1% DMSO 存在下で感染培養を行った。両化合物ともに培養上清中の TNF- α レベルを有意 ($P<0.01$) に上昇させた。

<MnCl₂ の感染影響評価>

MnCl₂ を混餌投与により周産期暴露を行い、児動物の RS ウイルス感染への影響を検討した。感染病態の重要な指標である 5 日後の BALF 中の IFN- γ レベルは、800 ppm まで影響が認められなかった。同様に、1 日後の TNF- α レベルも明確な変化が見られなかった。

発がん感受性評価

Mn の乳汁移行を検討する実験について、親動物への投与開始 1 週後より乳汁中の Mn 濃度の有意な増加が認められた。

NIC の中枢神経発がん修飾作用を検討する実験について、0.05% 群の投与による親動物に飲水量及び体重減少、神経症状(緊張状態)等による育児放棄がみられ、投与開始 2 週目に仔動物が全例死亡した。全投与群で実験期間を通して仔動物の飲水量及び体重増加抑制が認められた。また 25 週目までの生存率は NIC 投与による有意な変化はみられなかったが、プロパンスルトンによって有意に減少した。臓器重量について、NIC 0.01% 群雌雄の脳、肺、脾臓、肝、腎の絶対重量、肝の相対重量の有意な減少及び脳の相対重量の増加が認められた。プロパンスルトン投与群では雌雄動物の脳及び肝の絶対重量の減少または減少傾向が認められた。

対照群では、ENU の経胎盤投与により 25 週において、各々 50%(雄)及び 57%(雌)の動物に星状膠細胞腫、乏突起膠細胞腫及び悪性星状膠細胞腫等の中枢神経腫瘍が認められた。しかし、NIC 及びプロパンスルト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。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一部の群で肺がん等の非神経腫瘍が認められたが、いずれも NIC による発生率の変化は認められなかった。一方、プロパンスルトン投与によ

って肺がん発生率の有意な増加が、神経鞘腫等の末梢神経腫瘍発生率の増加傾向が認められた。

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>

マウスの実験で実施したゲノムのメチレーション解析では、昨年度にメチレーション特異的 qPCR 解析による Mid1 の過メチル化、real-time RT-PCR 解析による Mid1 の mRNA の発現レベルの減少及び免疫染色による MID1 陽性顆粒細胞数の減少が 800 ppm にみられ、生後 21 日目だけでなく生後 77 日目まで継続してみられていたことを報告した。Mid1 は体の正中の形成に重要な役割を担う分子であることから、本年度はその発現の左右対称性について検討した。その結果、対照群でみられた MID1 の右側における優勢発現が 800 ppm では消失していることが確認された。ヒトの ADHD (注意欠陥/多動性障害) などでは、前頭葉などの容積の左右非対称性が減弱ないしは消失していることが報告されており、各種の神経疾患と脳の左右非対称性は密接な関係があることが認識されている。今回の結果により、我々が見出した MID1 の左右非対称性の検索が、発達神経毒性を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられた。

<CPF を用いた発達期暴露影響評価>

ラットの実験では、昨年度、生後 21 日目までの海馬歯状回の検索を実施し、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 70 ppm にみられたことを報告した。本年度は、生後 77 日目の標本を用いて検索を実施したが、上述の変化は消失し、いずれの変化も認められなかった。生後 21 日目にみられた変化は増殖能を持った type 2 前駆細胞の減少を意味するものであるが、本年度の結果から、この変化が可逆性の変化であることが確認された。

マウスでは本年度に新たに暴露実験を行い、検討を実施した。母動物の体重及び摂餌量では、一過性の変動はみられたものの明らかな影響はみられなかったが、児動物の雄の体重には影響が認められ、母動物に影響のない用量でも児動物に影響を及ぼすことが示された。臓器重量では、腎臓で絶対及び相対重量、脳及び肝臓の相対重量の変動がみられたが、20 ppm のみの用量に関連しない変化であり、明らかな影響はみられなかった。ChE 活性は母動物及び生後 21 日目の児動物ともに血漿及び全血は 4 ppm 以上に、脳は 100 ppm に明らかな変化を示し、同様の動きがみられた。一方、生後 77 日目の動物においても血漿中 ChE 活性の低値が 4 ppm 以上にみられたが、昨年度報告したラットでは、このような持続的変化はみられておらず、ラットと異なりマウスでは ChE 活性への影響が長期にわたって残存することが示された。甲状腺関連ホルモンでは、生後 21 日目で T₃ 及び T₄ の変動がみられたが 4 ppm のみの用量と関連

のない変化であり、生後 77 日目の 100 ppm で T₄ の高値がみられたが、T₃ 及び TSH に変化のない単独の変動であることから、甲状腺関連ホルモンに対する影響は明らかではなかった。海馬歯状回における検索では、生後 21 日目に顆粒細胞層下帯の DCX 陽性細胞数 (type2b、type 3 前駆細胞及び幼若顆粒細胞マーカー) の減少が 20 及び 100 ppm にみられたが、Tbr2 陽性細胞数 (type2a、2b 前駆細胞マーカー) に変化がみられなかったことから、type3 前駆細胞～幼若顆粒細胞の減少を示唆するものと考えられた。また、生後 21 日目に歯状回門の NeuN 陽性細胞数の減少が 100 ppm にみられ、成熟介在ニューロンの減少を示唆するものであった。昨年度報告したラットの実験では増殖性 type2 前駆細胞が標的となっており、マウスとラットで標的が異なっていた。尚、これらの変化は生後 77 日目には消失しており、ラットと同様に可逆的な変化であった。

<NIC を用いた発達期暴露影響評価>

本年度、ラットを用いた暴露実験を実施し、母動物については、10 ppm 以上で摂水量に、50 ppm で体重及び摂餌量に影響がみられたが、児動物では 2 ppm 以上で体重及び摂餌量に影響がみられており、母動物に影響のない用量でも児動物に影響がみられた。脳重量は 50 ppm で生後 21 及び 77 日目まで影響がみられ、不可逆的な影響が示唆された。尿中コチニン濃度は、各用量とも母動物に比べると濃度は低いものの用量に応じた上昇が児動物にみられており、NIC の母動物を介した児動物への移行が確認された。甲状腺関連ホルモンでは T₄ の高値が生後 77 日目の 2 ppm 以上の投与群にみられたものの、T₃ は 10 ppm のみの用量に関連しない変化であり、TSH にも変化はみられなかったことから、NIC の発達期暴露による甲状腺関連ホルモンへの影響は明らかではなかった。海馬歯状回の検索では、顆粒細胞層下帯の DCX 陽性細胞数の増加と TUC4 陽性細胞数の減少がみられたが、Tbr2 陽性細胞数に変化はなく、DCX と TUC4 及び Tbr2 の二重染色の結果から、type 3 前駆細胞の増加と幼若顆粒細胞の減少を示唆するものと考えられた。歯状回門では GAD67 陽性細胞数の及び NeuN 陽性細胞数の増加がみられ、GABA 性介在ニューロンの増加を示唆する変化と考えられた。一方、コリン性の刺激が顆粒細胞層下帯のニューロン新生・分化に関与することが報告されていることから、NIC の標的となるニコチン性アセチルコリン受容体のサブタイプ $\alpha 7$ の顆粒細胞層下帯神経前駆細胞における発現状況を検索したが、変化は認められなかった。したがって、顆粒細胞層下帯の type 3 前駆細胞の増加と幼若顆粒細胞の減少は NIC による直接的なコリン性の刺激による影響ではなく、GABA 性介在ニューロンの活性化など別の経路を介したものと考えられた。

In vitro 神経発達評価

得られた結果より、各種培養細胞系を駆使した評価系は、化学物質の神経発生に及ぼす影響を評価ならびに検討する一助となることが期待される。

免疫機能評価

昨年度の本研究では、同じ有機リン系農薬でも脂溶性の高い化合物 CPF を使用したが、本年は水溶性の高い MMP の影響を解析した。そこで昨年度の結果と比較すると、まず、両化合物とも、親及び仔の血清 ChE 活性を低下させたため、本研究で用いている簡便な周産期暴露手法は期待通り機能しているものと思われた。しかし、重量・血球・血清の解析では、MMP 暴露で赤血球パラメーターが生後 21 日目の雌児動物で増加、及び生後 77 日目の雄児動物で減少した他、目立った変化は認められなかった。リンパ球サブセットも変化はわずかであったが、CPF では CD4 陽性細胞や Treg の増加が認められた一方、MMP では Treg の減少傾向が観察された。CPF の周産期暴露は成熟後のラット胸腺細胞のレクチン刺激への応答性を減弱させるという既報があることから、免疫応答を負に制御する Treg が CPF 暴露でわずかとはいえ増加したことはこれと矛盾せず、興味深い。一方、MMP については CPF と逆に Treg の減少傾向が認められたが、免疫毒性を総合的に評価する胸腺依存性抗原 (KLH) を用いた抗体産生能解析においてはむしろ抑制的な影響が示唆された。この一見矛盾する結果を説明するには、今後のさらなる研究が必要と思われる。しかし、昨年も述べた通り、フローサイトメトリーを用いた CD4 陽性 T 細胞サブセット解析は、成熟後の免疫影響の解析手法としては有効だが、3 週齢時では分化した細胞の割合が少なく、困難であるという特徴があることと、出産数の低さのため 25 ppm 暴露群の十分な個体数が今回確保できなかったことから、免疫毒性試験の機能試験 (TDAR) の結果をあわせて weight of evidence の立場で評価し、薬物投与直後の 3 週齢時においては、軽微な免疫抑制作用がみられると判断した。但し、投与を終えて 8 週たった 11 週齢の回復期のマウスにおいては、成熟後の免疫影響の解析には有効なフローサイトメトリーを用いた CD4 陽性 T 細胞サブセット解析において、農薬投与による、有意な T 細胞ポピュレーションの変化がどの用量においてもみられないため、11 週齢時においては、3 週齢時にみられた免疫抑制作用は回復していると判断した。

一方、今年度実施したエピジェネティクス解析からは、いくつかの興味深い結果が認められた。全 97,651 種のプローブを用いてゲノム DNA の CpG アイランドメチル化を解析したところ、胸腺細胞及び脾臓 CD4 陽性細胞で共通して 10 倍以上メチル化が亢進したものが 106 種、減少したものが 7 種あることが分かった。ここに示した遺伝子群には、周産期 MMP 暴露の指標となるマーカー候補が含まれている可能性がある。今後、他の有機リン系農薬等を用いた解析を重ねることにより、マーカーとしての感

度及び特異度を調べる事が可能になるであろう。

特に免疫系に注目した解析からは、いくつかの興味深い遺伝子が見つかった。菌体成分のパターン認識受容体である Pglyrp2 が両臓器でメチル化の減少を示したほか、脾臓では CD14 も大幅にメチル化が減少した。CD14 もまた、Toll-like receptor 4 と協調して細菌成分 LPS の受容体として働くことから、MMP の周産期暴露は、これらのパターン認識受容体遺伝子の CpG アイランドメチル化抑制を通じ、エピジェネティックな転写活性化を誘導することで、自然免疫系に何らかの影響を及ぼしている可能性が推察される。

感染感受性評価

CPF の周産期暴露により、児動物での RS ウイルス感染初期 (感染 1 日後) に proinflammatory cytokine (TNF- α) の産生を抑制することを昨年度報告した。これを基に肺組織での網羅的な遺伝子発現影響を確認したが、結果は全く一致しなかった。一方で、MMP については、IL-6 への影響が BALF 中のレベルと肺組織での遺伝子発現の面で確認され、マクロファージ/単球系がこの化合物の標的細胞であることが強く示唆された。このように、二種類の有機リン系農薬を対象とした発達期暴露による RS ウイルス感染感受性への影響評価を行ったが、化合物間の感染免疫における標的細胞・分子が全く異なることが明らかとなった。

MMP のマクロファージ/単球系細胞への直接的な作用について培養マクロファージ細胞を用いて検討した。Toll like receptor-4 を共通のレセプターとする RS ウイルスと LPS を用いて IL-6 を誘導したが、MMP はそれらの産生を抑制しなかった。この化合物がマウス体内で代謝を受けて初めて免疫系へ作用する、あるいは気道上皮など他の組織/細胞を介して作用することが強く示唆された。しかし、インフルエンザウイルスを感染させた P388D1 細胞では TNF- α の産生増強が見られることから、直接的な作用を完全には否定できない。今後、マウス腹腔からマクロファージを調製して影響を検討する予定である。

MnCl₂ の周産期暴露による RS ウイルス感染免疫への影響は確認できなかった。インフルエンザウイルスのように、異なった感染病態を引き起こすウイルスでの影響については、実施を検討していきたい。

発がん感受性評価

ENU を経胎盤暴露した中枢神経発がんモデルにより、NIC 及びプロパンスルト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。また、Mn の乳汁移行についても確認を行った。

NIC に関しては親仔動物に酒石酸 NIC 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たが、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 NIC の苦味等による忌避と考えられた。0.05% NIC 投与群では NIC

に対する忌避に加えて緊張状態等の神経症状によって育児放棄に至ったと考えられる。0.01% NIC 投与群 (18.5 mg/kg/day) でも体重及び臓器重量の減少が認められた。NIC は経胎盤及び経乳汁移行することが知られている (Svensson CK, Clin. Pharmacokinetics, 12, 30-40, 1987) ことから仔動物にも NIC は暴露されていると考えられる。また、妊娠中のラットに 0.008% 飲水投与によっても飲水量及び体重の減少及び 0.004% 以上の投与によって体重増加抑制を含む発達障害の増加が報告されている (Schneider et al., Behavioural Pharmacology, 21, 206-216, 2010) ことから乳幼若期に NIC に暴露されると発達に影響を受ける可能性が考えられる。

18(雄)及び 22(雌)週目より切迫屠殺解剖例及び死亡例が認められ、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., Pro. Natl. Acad. Sci., 84, 6317-6321, 1987) と一致する結果となった。しかし、仔動物の死亡率及び腫瘍性病変の発生率について、NIC の投与による明らかな影響は認めなかった。体重増加抑制による影響は否定できないが、脳の相対重量は有意に増加し、体重変化の影響は少ないと推察される。プロパンスルトンによる体重相対抑制は同様に観察されるものの重量変化が殆どみられなかった肺において明らかな発癌促進作用が認められたことから体重増加抑制が必ずしも全ての臓器の発がん抑制的に作用するとは考えにくい。

プロパンスルトンによる中枢神経発癌促進作用が認められなかったことについて、飲水中の安定性を調べたところ飲水中には室温 4 日間の保管後には、測定限界以下だったことから安定性の不良が原因で、十分な投与量に至らなかったことが明らかとなった。週 2 回の飲水交換による低い暴露濃度でも肺がん促進及び神経鞘腫の発生率増加傾向が認められており、投与方法を改め検討を行うことで中枢神経発がん修飾陽性対照として活用が期待できる。

Mn を投与した母動物の授乳中の仔動物の胃内容物から有意な Mn 濃度の上昇が認められたことから Mn が乳汁移行することを明らかにした。

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 暴露実験では、海馬の MID1 陽性顆粒細胞の左右非対称性の発現が Mn 暴露により消失していることを見出した。したがって、MID1 の左右非対称性の検索が、発達神経毒性を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられた。CPF の実験では、ラットの海馬で増殖性の type 2 前駆細胞が標的であったのに対し、マウスの海馬では type 3 前駆細胞～幼若顆粒細胞が標的となっており、動物種によって標的性が異なることが示された。ラットの NIC 実験では、顆粒細胞層下帯における type 3 前駆細胞の増加及び幼若顆粒細胞の減少並びに GABA

性介在ニューロンの増加を検出するとともに、神経前駆細胞の持つ化学物質の標的となる受容体を検索することにより、顆粒細胞層下帯の神経前駆細胞の分化障害の機序をより詳細に検討することが可能となった。

In vitro 神経発達評価では、神経あるいはグリア細胞初代培養系ならびに、マウス ES 細胞を用いた神経発生段階に対する評価系は、化学物質の特性を検討するうえで、有用なツールであることが考えられる。更に、パラメーターをより詳細に検討することで、化学物質の神経発生に及ぼす影響を網羅的かつ多角的に解析を行うことが可能となると考えられる。

免疫機能評価では、有機リン系農薬 MMP の周産期暴露が及ぼす免疫影響を、以下の項目に基づき解析することを試みた。①体重や臓器重量、②血球学的・血液生化学的解析、③フローサイトメトリーによる 4 種の CD4 陽性 T 細胞サブセットの解析、④ CpG アイランドメチル化の網羅的解析、⑤抗 KLH 抗体産生能。このうち、①～③からは、MMP の影響はないかごく軽微であると考えられた。④では、自然免疫系のパターン認識受容体遺伝子 (Pglyrp2 及び CD14) の CpG アイランドメチル化が減少するという結果が得られ、MMP の自然免疫系への影響についてのさらなる解析が期待された。しかし、⑤からは 25ppm MMP 暴露によりわずかな抗 KLH IgG 抗体産生の抑制が認められ、(適応)免疫系全体への影響としては MMP は抑制的に作用する可能性が示唆された。本研究を通じ、3 週齢時点での分化済み T 細胞の割合が少ないことが、CD4 陽性 T 細胞サブセット解析を困難にさせているということが分かったが、MMP のような有機リン系農薬の免疫影響を考える場合、CD4 陽性 T 細胞が関与する適応免疫系だけでなく、自然免疫系への影響も考慮することが望ましいと思われる。

感染感受性評価では、MMP の周産期暴露は、児動物の RS ウイルス感染初期の免疫応答に間接的に作用し、マクロファージ/単球が標的細胞であることが示唆された。

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 25 週間という短期間で 50-60%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 0.01%濃度で酒石酸 NIC 二水和物を飲水投与した際の中枢神経発がん修飾作用は認めなかった。また、プロパンスルトンについて、安定性が不良であることから明らかな中枢神経発がん修飾作用は示さなかったが、投与方法を改めた検討が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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., Taniai, E., Hayashi, H., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Disruptive neuronal development by acrylamide in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure in rats. *Arch. Toxicol.* 85(8):987-994, 2011.

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.* 85(9):1109-1120, 2011.

Shibutani, M., Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Takahashi, M., Nishikawa, A. Reply to Comment on "Impaired oligodendroglial development by decabromodiphenyl ether in rat offspring after maternal exposure from mid-gestation through lactation" [*Reprod. Toxicol.* 31(1) (2011) 86-94]. *Reprod. Toxicol.* 32(3):375-378, 2011.

Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Sato, A., Uematsu, M., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Adolescent hyperactivity of offspring after maternal protein restriction during the second half of gestation and lactation periods in rats. *J. Toxicol. Sci.* 37(2):345-352, 2012.

Ogawa, B., Wang, L., Ohishi, T., Taniai, E., Akane, H., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Reversible aberration of neurogenesis targeting late-stage progenitor cells in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to acrylamide. *Arch. Toxicol.* 86(5):779-790, 2012.

Saegusa, Y., Fujimoto, H., Woo, G-H., Ohishi, T., Wang, L., Mitsumori, K., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Transient aberration of neuronal development in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to brominated flame retardants in rats. *Arch. Toxicol.* (in press).

Wang, L., Ohishi, T., Shiraki, A., Morita, R., Akane, H., Ikarashi, Y., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Developmental exposure to manganese chloride induces sustained aberration of neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of mice. *Toxicol. Sci.* (in press).

Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage

hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats. Arch. Toxicol. (in press).

Fujimoto, H., Woo, G-H., Inoue, K., Igarashi, K., Kanno, J., Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M.: Increased cellular distribution of vimentin and Ret in the cingulum induced by developmental hypothyroidism in rat offspring maternally exposed to anti-thyroid agents. Reprod. Toxicol. (in press).

Ohishi, T., Wang, L., Akane, H., Shiraki, A., Goto, K., Ikarashi, Y., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Reversible aberration of neurogenesis affecting late-stage differentiation in the hippocampal dentate gyrus of rat offspring after maternal exposure to manganese chloride. Reprod. Toxicol. (in press).

Nakamura, R., Kimura, Y., Matsuoka, H., Hachisuka, A., Nakamura, R., Nakamura, A., Shibutani, M., Teshima, R.: Effects of transplacental and trans-breast milk exposure to the organophosphate compound chlorpyrifos on the developing immune system of mice. Kokuritsu Iyakuhin Shokuhin Eisei Kenkyusho Hokoku. 129:105-110, 2011.

Konno, K., Sawamura, R., Sun, Y., Yasukawa, K., Shimizu, T., Watanabe, W., Kato, M., Yamamoto, R., Kurokawa, M. Antiviral activities of diarylheptanoids isolated from *Alpinia officinarum* against respiratory syncytial virus, poliovirus, measles virus and herpes simplex virus type 1 *in vitro*. Nat. Prod. Commun. 6(12): 1881-1884, 2011.

2. 学会発表

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

Wang Liyun, 大石 巧, 剣持 明, 谷合枝里子, 林仁美, 嶋本敬介, 鈴木和彦, 三森国敏, 渋谷 淳: マンガンの発達期暴露によるマウスの海馬歯状回におけるGABA性介在ニューロンの異常なエピジェネティック遺伝子制御, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会, 横浜, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会講演要旨集: p.114 (O-19), 7月11-13日, 2011

大石 巧, Wang Liyun, 植松正伸, 林 仁美, 谷合枝里子, 嶋本敬介, 剣持 明, 鈴木和彦, 三森国敏, 渋谷 淳: クロルピリホスの発達期暴露によるラット海馬歯状回顆粒細胞層下帯におけるニューロン新生への影響, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会, 横浜, 第38回日本トキシコロジー学会学術集会講演要旨集: p.148 (P-52), 7月11-13日, 2011

白木彩子, Wang Liyun, 大石 巧, 赤根弘敏, 土屋卓磨, 北条友理, 鈴木和彦, 三森国敏, 渋谷 淳: 発達期ないし成熟後での甲状腺機能低下によるラット海馬歯状回におけるニューロン新生への影響の比較, 第152回日本獣医学会学術集会, 大阪, 第152回日本獣医学会学術集会講演要旨集: p.37 (B-5), 9月19-21日, 2011

Liyun Wang, Takumi Oishi, Eriko Tani, Hitomi Hayashi, Kazuhiko Suzuki, Yoshiaki Ikarashi, Kunitoshi Mitsumori, Makoto Shibutani: Development exposure to manganese induces sustained aberration of neurogenesis and glial proliferation in mice. 9th European Congress of Toxicologic Pathology of the European Society of Toxicologic Pathology, Uppsala, Sweden, p.228 (TP14), September 7-10, 2011

大石 巧, Wang Liyun, 赤根弘敏, 白木彩子, 盛田怜子, 八舟宏典, 鈴木和彦, 三森国敏, 渋谷 淳: ニコチ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新生への影響. 第28回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 第28回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-059, p.97, 2月2-3日, 2012

Wang Liyun, 大石 巧, 赤根弘敏, 林 仁美, 剣持 明, 谷合枝里子, 鈴木和彦, 三森国敏, 渋谷 淳: クロルピリフォス発達期暴露によるマウス海馬歯状回の神経発生に及ぼす影響. 第28回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 第28回日本毒性病理学会学術集会講演要旨集: P-060, p.97, 2月2-3日, 2012

中村亮介, 木村美恵, 松岡英樹, 蜂須賀暁子, 中村里香, 中村 厚, 渋谷 淳, 手島玲子: T細胞サブポピュレーション変化を指標とした有機リン系農薬の発達期免疫影響解析, 京都, 第84回日本生化学会, 9月, 2011

渡辺 渡, 吉田裕樹, 紺野克彦, 広瀬明彦, 黒川昌彦: 難燃剤テトラブ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

渡辺 渡: RSウイルス感染マウスモデルを用いた臭素化難燃物質の発達期免疫毒性の評価, 試験法ワークショップ「発達期免疫毒性 (developmental immunotoxicity) の評価方法」, 第18回日本免疫毒性学会学術大会, 千葉, 9月, 2011

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暴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

Young-man Cho, Shigeaki Takami, Takeshi Toyoda, Saeko Onami, Kumiko Ogawa, Akiyoshi Nishikawa: Lack of modification of tumorigenesis in the central nervous system by early-life exposure to manganese(中枢神経発がんにおけるマンガンの幼若期暴露による発がん修飾の欠如)、第 47 回欧州毒性学会講演要旨集：P2256、p.193、8 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23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 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)、ニコチン (NIC) 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。更にマウスではゲノムのメチレーション解析を実施した。マウスの Mn 暴露実験では、海馬の MID1 陽性顆粒細胞の左右非対称性の発現がマンガン曝露により消失していることを見出し、MID1 の左右非対称性の検索が、発達神経毒性を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられた。CPF の実験では、マウスの海馬では type 3 前駆細胞～幼若顆粒細胞の減少がみられたが、ラットの海馬では増殖性の type 2 前駆細胞の減少がみられ、動物種によって標的性が異なることが示された。ラットのニコチン実験では、顆粒細胞層下帯における type 3 前駆細胞の増加及び幼若顆粒細胞の減少並びに GABA 性介在ニューロンの増加を検出するとともに、海馬歯状回顆粒細胞層下帯のニューロン前駆細胞へのニコチンの直接的影響を評価するために、ニューロン前駆細胞における NACHR $\alpha 7$ の発現状況を二重染色により検索し、神経前駆細胞における NACHR $\alpha 7$ の発現に変化はないことを確認し、神経前駆細胞の持つ化学物質の標的となる受容体を検索することにより、顆粒細胞層下帯の神経前駆細胞の分化障害の機序をより詳細に検討することが可能となった。

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(NIC)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。

23年度は、22年度に実施した Mn (マウス) のゲノムの網羅的メチレーション解析について継続して詳細な解析を行い評価を終了した。また、22年度に発達期暴露実験を実施した CPF (ラット) の各種脳発達影響指標の評価を実施・終了した。更に、CPF (マウス) 及び NIC (ラット) の暴露実験を行い、各種脳発達影響指標の評価を実施・終了した。

B. 研究方法

＜Mn を用いた発達期暴露影響評価＞

マウスにおいて 22 年度に行ったゲノムのメチレーション解析を更に詳細に行った。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 0、32、160、800 ppm の用量で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・経乳的に暴露したマウス児動物の暴露終了時と生後 77 日目に採取した脳を用いてゲノムのメチレーション解析を実施した (Fig. 1)。22 年度の解析において、生後 21 及び 77 日目の 800 ppm に、メチレーション特異的 qPCR 解析において過メチル化、real-time RT-PCR 解析において mRNA の発現レベルの有意な減少、免疫染色において陽性顆粒細胞数の有意な減少がみられた MID1 について、海馬顆粒細胞層における陽性細胞の分布の左右の対称性について検索を実施した。

＜CPF を用いた発達期暴露影響評価＞

22 年度にラットの暴露実験を終了し、本年度はマウスの暴露実験を実施した。すなわち、発達期化学物質暴露モデルとして、コリンエステラーゼ阻害剤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。

ラットの実験では、妊娠 SD:IGS ラット (日本チャールズリバー) を各群 8 匹使用し、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(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、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及び77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 proliferating cell nuclear antigen 抗体(PCNA、x200倍、IgG、Dako)、抗ウサギ Tbr2 抗体(T box brain 2、x500倍、IgG、Abcam)、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)、抗マウス Reelin 抗体(x1000倍、Novus Biologicals, Inc., Co.)及び抗マウス NeuN 抗体(x100倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)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。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については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)において検索を行った。GABA性介在ニューロンの指標であるReelin及び成熟ニューロンの指標であるNeuNについては、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。

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、予備試験の結果をもとに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。離乳後、児動物は通常の基礎飼料であるCRF-1に切り替えて飼育した(Fig. 3)。母動物及び児動物は実験期間中、体重及び摂餌量を測定した。生後21日目及び生後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日目児動物の血漿、全血液及び脳(前頭葉)中のコリンエステラーゼ(ChE)活性をTBA-120FRを用いて、血漿中のTSH、T3及びT4をIMMULYZE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 µm厚の連続切片を作製した。切片は、抗ウサギDCX抗体(x1000倍)、抗マウスPax6抗体(x500倍、IgG、Abcam)、抗ウサギTbr2抗体(x200倍)、抗マウスReelin抗体(x1000倍)、抗マウスNeuN抗体(x1000倍)、抗マウスPCNA抗体(x200倍)を用いて、DAB発色にてABC法による免疫染色を行った。GABA性介在ニューロンに発現する分子のReelin及び成熟ニューロンの指標であるNeuN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DCX、Pax6及びTbr2並びに増殖細胞指標のPCNA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。

<NIC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(-)-ニコチン酒石酸水素塩を飲水(ニコチンの苦みをマスクするため1%サッカリン水を使用)に溶解させて母動物に摂取させることにより、妊娠6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Slc:SDラット(日本エスエルシー)各群8~12匹(非妊娠動物除外後の匹数)使用し、予備試験結果を基に公比5として、2、10、50 ppmの3用量を設定し、対照群((-)-ニコチン酒石酸水素塩=0 ppm、L(+)-酒石酸=50 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、児動物は通常の水道水に切り替えて飼育した(Fig. 4)。実験期間中、母動物は体重、摂餌量及び摂水量、児動物は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、脳重量を測定し、脳はブアン固定を行った。暴露終了直前(分娩後19日)の母動物及び児動物の尿中コチニン濃度をcotinine direct ELISA kit(Calbiotech Inc.)を用いて、生後21及び77日目の血清中の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 µm厚の連続切片を作製した。切片は、抗ウサギDCX抗体(x1000倍)、抗ウサギTUC4抗体(x1000倍、Millipore Corporation)、抗マウスGFAP抗体(x200倍)、抗ウサギTbr2抗体(x500倍)、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)、抗マウスReelin抗体(x1000倍)抗マウスPCNA抗体(x200倍)を用いて、DAB発色にてABC法による免疫染色を行った。また、ア

ポトシスの評価のために TUNEL 染色を行った。また、抗ウサギ DCX 抗体 (x100 倍) と抗ウサギ TUC4 抗体 (x1000 倍) 又は抗ウサギ Tbr2 抗体 (x500 倍) 及び抗ウサギ NACHR α 7 抗体 (nicotinic acetylcholine receptor alpha 7, x100 倍, IgG, Abcam) と抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍) の 3 つの組み合わせについて、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。新生ニューロンの分化指標である DCX、TUC4、GFAP 及び Tbr2 陽性細胞数、増殖細胞の指標である PCNA 陽性細胞数、TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数並びに ACh 受容体の NACHR α 7 については海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。GABA 性介在ニューロンの指標である GAD67 及び Reelin 並びに成熟ニューロンの指標である NeuN については、海馬歯状回門における陽性細胞数の検索を行った。更に NeuN については、成熟顆粒細胞数を評価するために顆粒細胞層を形成する全 NeuN 陽性顆粒細胞数を検索した。生後 21 日目の児動物の海馬を用いて、*Chrna7*、*Chrnb2*、*Dcx*、*Dpsyl3*、*Reln* 及び *Pcna* 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)

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

C. 研究結果

<Mn を用いた発達期暴露影響評価>

マウス :

昨年度に報告したゲノムのメチレーション解析結果の概要としては、CGI アレイによる解析で対照群に比べ 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 24 遺伝子検出され、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、real-time RT-PCR 解析により *Pvalb*、*Mid1*、*Atpla3* 及び *Nr2f1* の mRNA の発現レベルの減少、免疫染色により海馬歯状回門における Parvalbumin 陽性介在ニューロン細胞数の減少が生後 21 日目の 800 ppm に、MID1 陽性顆粒細胞数の減少が生後 21 及び 77 日目の 800 ppm にみられた。

23 年度に得られた、海馬顆粒細胞層における MID1 陽性細胞の分布の左右の対称性に関する結果を以下に示す。

対照群では海馬顆粒細胞層における MID1 陽性細胞は左側に比べ右側で有意に多く分布していたが、

800 ppm では右側の優勢性は認められなかった。これらの変化は、生後 21 及び 77 日目のいずれにも認められた (Fig. 5)。

<CPF 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、母動物の全投与群における一過性の体重高値と 14 及び 70 ppm における散発的な摂餌量の高値、児動物の 14 ppm のみにおける授乳期間中の体重高値、70 ppm の生後 21 日目の雌雄の肝臓の相対重量の低値、卵巣の絶対及び相対重量の低値、生後 77 日目の雌の脳の相対重量の低値と腎臓の絶対重量の高値、母動物の 2.8 ppm 以上の血漿及び赤血球中 ChE 活性の低値と 70 ppm の脳内 ChE 活性の低値並びに生後 21 日目の児動物の 14 ppm 以上の血漿中 ChE 活性の低値と 70 ppm の赤血球中及び脳内 ChE 活性の低値、生後 21 日目の 70 ppm の海馬歯状回顆粒細胞層下帯における Tbr2 及び PCNA 陽性細胞数の減少がみられた。

23 年度は、生後 77 日目の脳について海馬歯状回での免疫組織学的検討を行ったので、その結果を以下に示す。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯における Tbr2、DCX、GFAP、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞数並びに海馬歯状回門における Reelin 及び NeuN 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 6)。

マウス :

母動物の体重では、一過性の有意な低値が分娩後 4 日目の 100 ppm に、摂餌量の一過性の有意な低値が分娩後 19 日目の全ての投与群に認められた (Fig. 7)。

児動物の体重では、雄の有意な低値が全ての投与群で生後 49 から 77 日目にみられ、20 ppm では生後 21 日と 28 日目、100 ppm では生後 28 日目にもみられた。なお、雌に変化はみられなかった (Fig. 8)。

児動物の臓器重量では、生後 21 日目の 20 ppm の雄で腎臓の絶対及び相対重量の有意な高値並びに脳及び肝臓の相対重量の有意な高値がみられた。生後 77 日目では変化はみられなかった (Table 1)。

ChE 活性の測定では、暴露終了時の母動物では血漿及び全血中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 100 ppm にみられた。生後 21 日目の児動物では血漿及び全血中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上に、脳内 ChE 活性の有意な低値が 4 及び 100 ppm にみられた。生後 77 日目の児動物では血漿中 ChE 活性の有意な低値が 4 ppm 以上にみられた (Table 2)。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後 21 日目の 4 ppm で T₃ 及び T₄ の有意な低値、生後 77 日目の 100 ppm で T₄ の有意な高値がみられた (Table 3)。

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減少が生後 21 日目の 20 及び 100 ppm にみられた。Pax6 及

び Tbr2 陽性細胞数に変化はみられなかった (Fig. 9)。生後 77 日目では DCX、Pax6 及び Tbr2 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった (Fig. 10)。

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、NeuN 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日目の 100 ppm にみられた。Reelin 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日目では Reelin 及び NeuN 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった (Fig. 11)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖の検索では、PCNA 陽性細胞数は生後 21 及び 77 日目のいずれでも変化は見られなかった (Fig. 12)。

<NIC を用いた発達期暴露影響評価>

母動物の体重は 50 ppm で有意な低値が妊娠 19 日から分娩後 21 日までみられた。摂餌量は 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、ほとんどの測定時点で有意差を示した。摂水量では 10 及び 50 ppm で妊娠 7 日から分娩後 21 日まで低値を示し、10 ppm では多くの測定時点で、50 ppm ではほとんどの測定時点で有意差を示した (Fig. 13)。

児動物の体重は 50 ppm の雌雄で生後 7 日以降低値を示し、ほとんどの測定時点で有意差がみられた。また、2 及び 10 ppm の雄でも有意な低値が散見された。摂餌量は雄では 2 ppm 以上の投与群で有意な低値が多く測定時点にみられた。雌では 2 ppm 以上の投与群で有意な低値が散見された (Fig. 14)。

児動物の脳重量は、50 ppm の雌雄において生後 21 日目では絶対重量の有意な低値と相対重量の有意な高値、生後 77 日目では絶対重量の有意な低値がみられた (Table 4)。

尿中コチニン濃度 (分娩後 19 日) は、母動物及び児動物ともに 2 ppm 以上の投与群において用量に応じた上昇がみられた (Table 5)。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後 77 日目の 2 ppm 以上の投与群で T₄ の有意な高値と 10 ppm で T₃ 有意な高値がみられた (Fig. 15)。

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、生後 21 日目では DCX 陽性細胞数の有意な増加が 10 及び 50 ppm、TUC4 陽性細胞数の有意な減少が 2 ppm にみられた。GFAP 及び Tbr2 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日目では DCX、TUC4、GFAP 及び Tbr2 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった (Fig. 16)。これらの変化の詳細を検討するための DCX と TUC4 又は Tbr2 の二重染色では、TUC4+/DCX+ 及び TUC4+/DCX- 細胞数の有意な減少と TUC4-/DCX+ 細胞数の有意な増加が 2 及び 10 ppm に、Tbr2-/DCX+ 細胞数の有意な増加が 50 ppm にみられた (Fig. 17)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖及びアポトーシスの検索では、PCNA 及び TUNEL 陽性細胞数は生後 21 及び 77 日目のいずれでも変化はみられなかった (Fig. 18)。

海馬歯状回顆粒細胞層での成熟顆粒細胞の検索で

は、NeuN 陽性顆粒細胞数は生後 21 及び 77 日目のいずれでも変化はみられなかった (Fig. 18)。

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 日目では GAD67 陽性細胞数の有意な増加が 10 及び 50 ppm に、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が 50 ppm にみられた。Reelin 陽性細胞数に変化はみられなかった。生後 77 日目では GAD67、NeuN 及び Reelin 陽性細胞数のいずれにも変化はみられなかった (Fig. 19)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯のニューロン前駆細胞へのニコチンの直接的影響を評価するために、NeuN 陰性のニューロン前駆細胞における NACHR α 7 の発現状況を二重染色により検索したが、NACHR α 7+/NeuN-細胞数に変化はみられなかった (Fig. 20)。

real-time RT-PCR 解析による生後 21 日目の児動物の海馬の *Chrna7*、*Chrn2*、*Dcx*、*Dpsyl3*、*Reln* 及び *Pcna* の mRNA の発現レベルの検索では変化はみられなかった (Table 6)。

D. 考察

<Mn を用いた発達期暴露影響評価>

マウスの実験で実施したゲノムのメチレーション解析では、昨年度にメチレーション特異的 qPCR 解析による Mid1 の過メチル化、real-time RT-PCR 解析による Mid1 の mRNA の発現レベルの減少及び免疫染色による MID1 陽性顆粒細胞数の減少が 800 ppm にみられ、生後 21 日目だけでなく生後 77 日目まで継続してみられていたことを報告した。Mid1 は体の正中の形成に重要な役割を担う分子であることから、本年度はその発現の左右対称性について検討した。その結果、対照群でみられた MID1 の右側における優勢発現が 800 ppm では消失していることが確認された。ヒトの ADHD (注意欠陥/多動性障害) などでは、前頭葉などの容積の左右非対称性が減弱ないしは消失していることが報告されており、各種の神経疾患と脳の左右非対称性は密接な関係があることが認識されている。今回の結果により、我々が見出した MID1 の左右非対称性の検索が、発達神経毒性を評価する上で重要な情報を与えるものと考えられた。

<CPF を用いた発達期暴露影響評価>

ラットの実験では、昨年度、生後 21 日目までの海馬歯状回の検索を実施し、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 70 ppm にみられたことを報告した。本年度は、生後 77 日目の標本を用いて検索を実施したが、上述の変化は消失し、いずれの変化も認められなかった。生後 21 日目にみられた変化は増殖能を持った type 2 前駆細胞の減少を意味するものであるが、本年度の結果から、この変化が可逆性の変化であることが確認された。

マウスでは本年度に新たに暴露実験を行い、検討を実施した。母動物の体重及び摂餌量では、一過性