

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、このような持続的な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 T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> 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 T<sub>4</sub> の高値がみられたが、T<sub>3</sub> 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。なお、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、ニコチン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 T<sub>4</sub> 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、T<sub>3</sub> 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、ニコチン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、ニコチン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ニコチン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。

#### E. 結論

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マンガン曝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、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。

#### 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.

Saegusa, Y., Hayashi, H., Taniai, E., Imaoka, M., Ohishi, T., Wang, L., Mitsumori, K., Shibutani, M.: Spermatocytic seminoma with neuroectodermal differentiation and Sertoli cell tumor in a dog. *Vet. Pathol.* 48(5):1024-8, 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):987-94, 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):1109-20, 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. (in press).

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. (in press).

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).

## 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 Taniai, 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

**H. 知的所有権の取得状況**

1. 特許所得

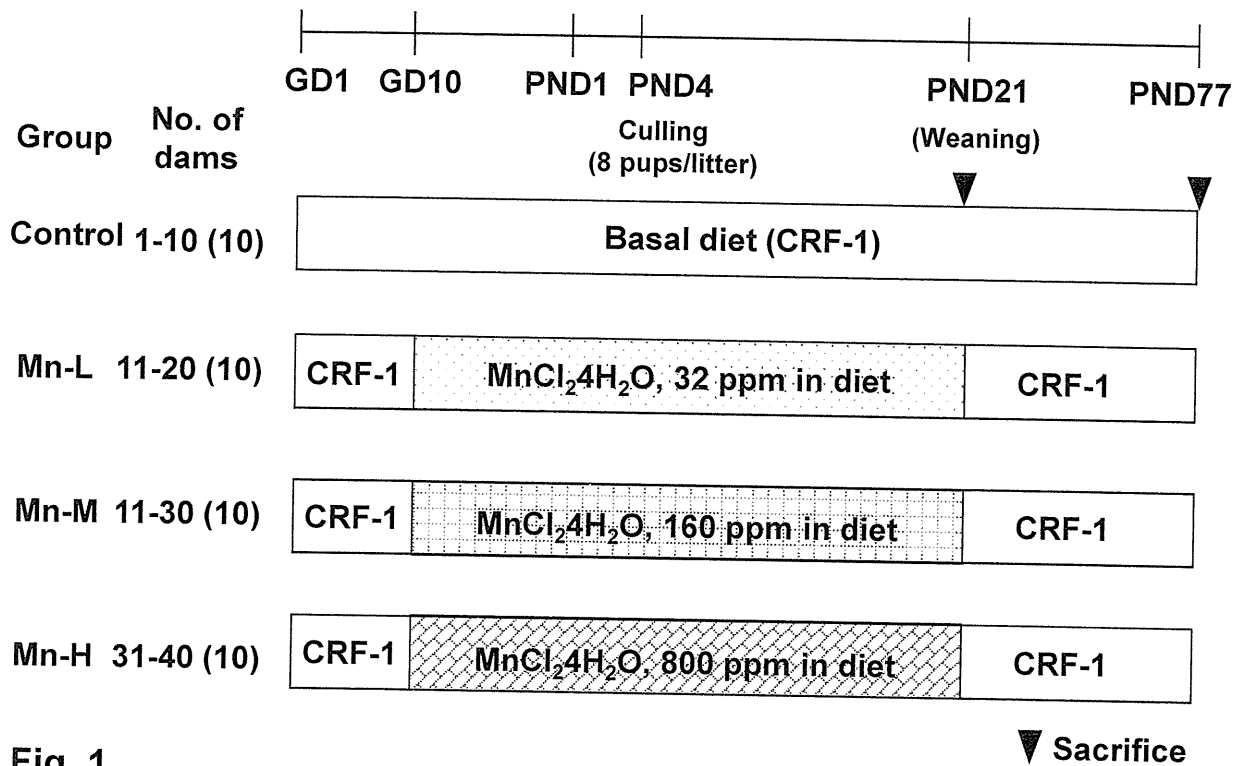
なし

2. 実用新案登録

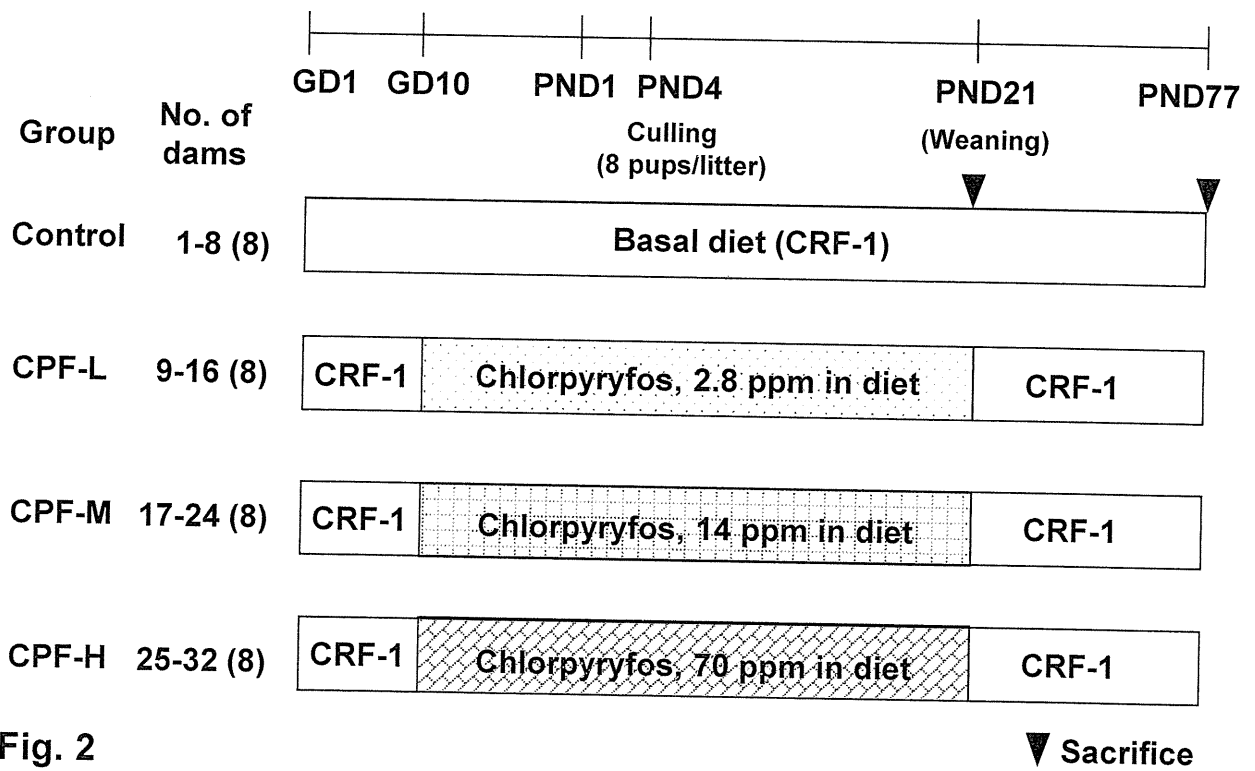
なし

3. その他

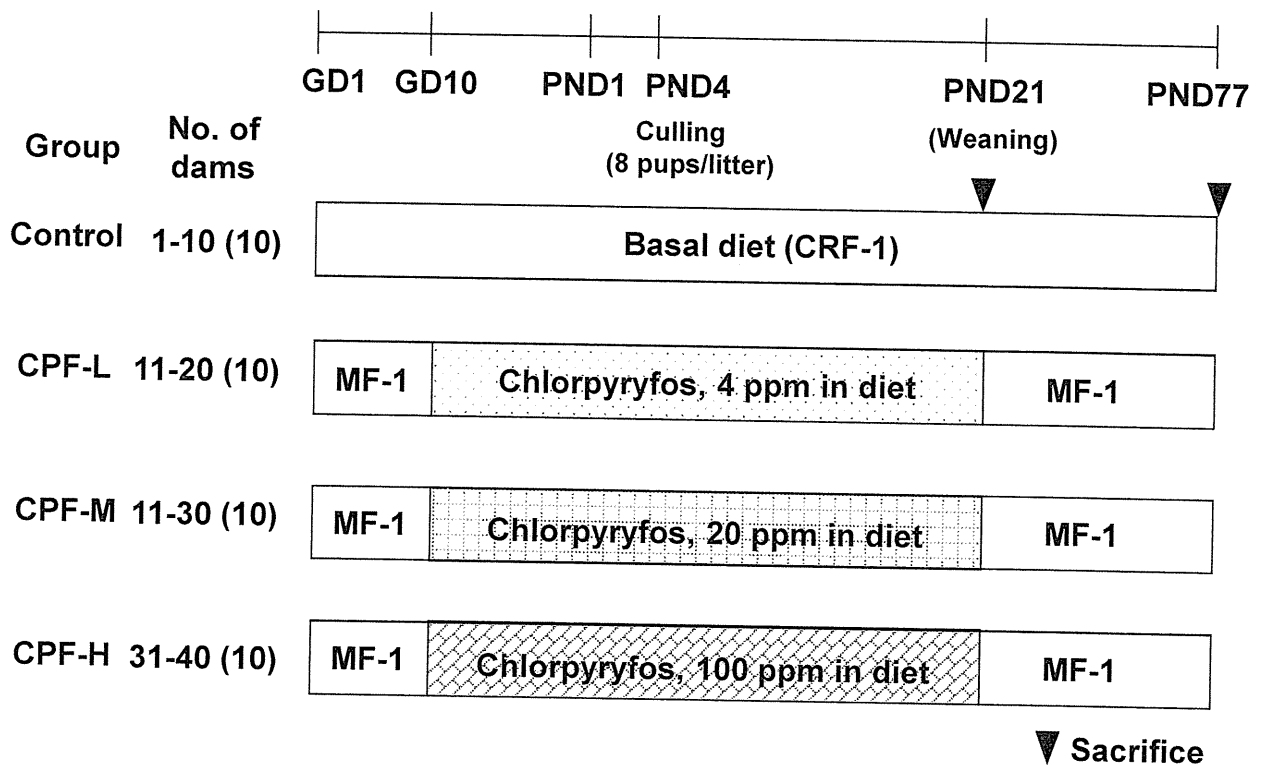
なし



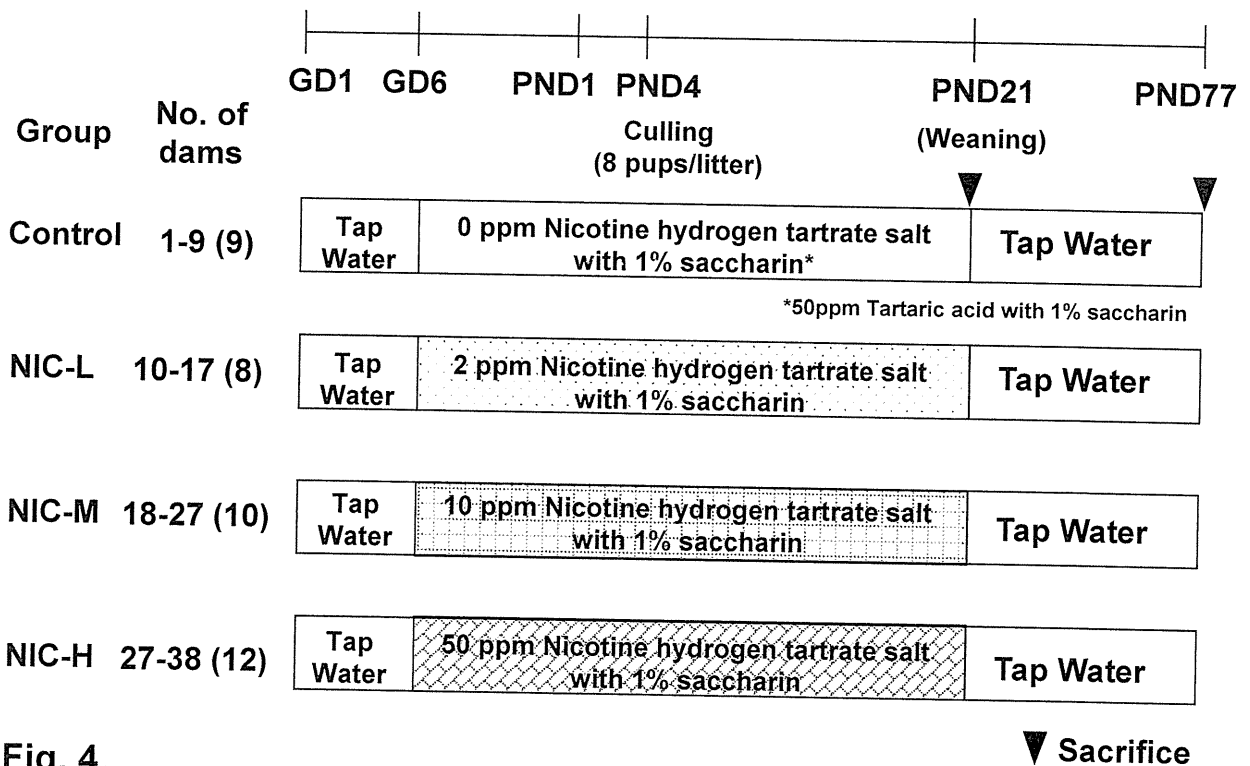
**Fig. 1**  
 Developmental exposure study of MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O in ICR mice to examine the effect on neuronal development.



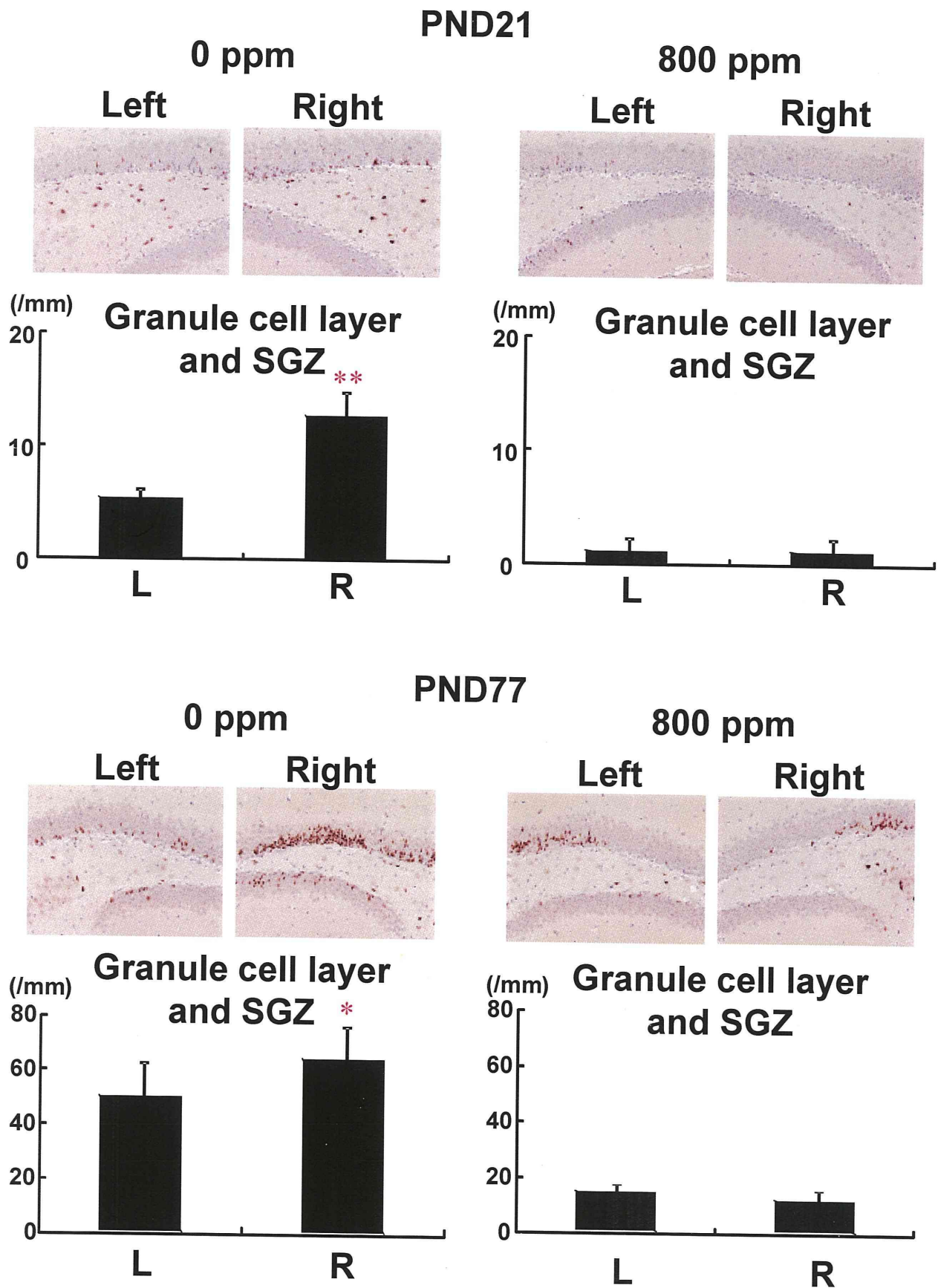
**Fig. 2**  
 Developmental exposure study of chlorpyrifos in SD:IGS rats to examine the effect on neuronal development.



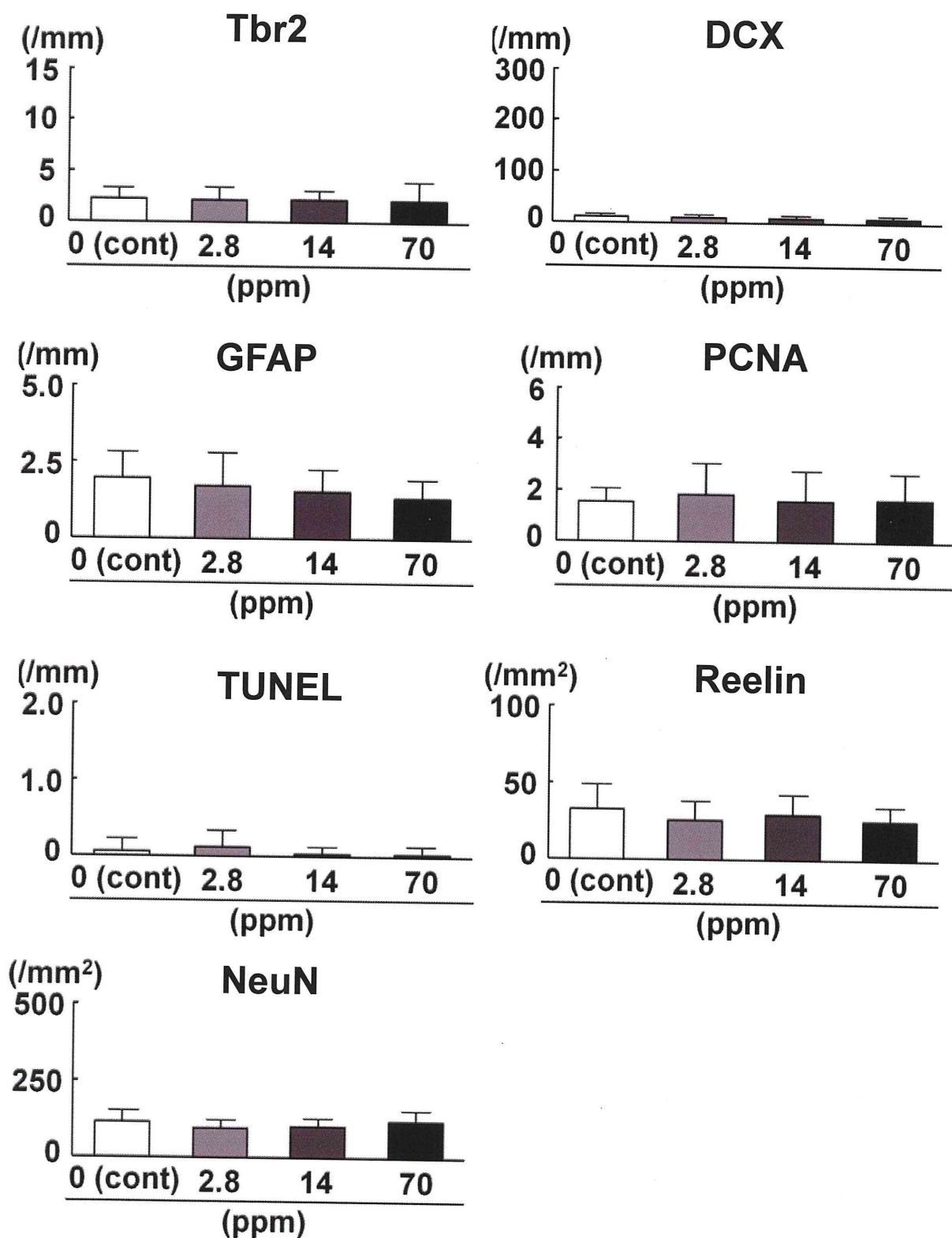
**Fig. 3**  
 Developmental exposure study of chlorpyrifos in ICR mice to examine the effect on neuronal development.



**Fig. 4.**  
 Developmental exposure study of nicotine hydrogen tartrate salt in Slc:SD rats to examine the effect on neuronal development.



**Fig. 5. Differences in the distribution of Midline 1-positive cells between right and left side in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  from GD 10 to PND 21 in mice.**



**Fig. 6.** Distribution of Tbr2, DCX, GFAP, PCNA and TUNEL-positive cells in the dentate subgranular zone and reelin and NeuN-positive cells in the dentate hilus of male offspring at PND 77 after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in rats.

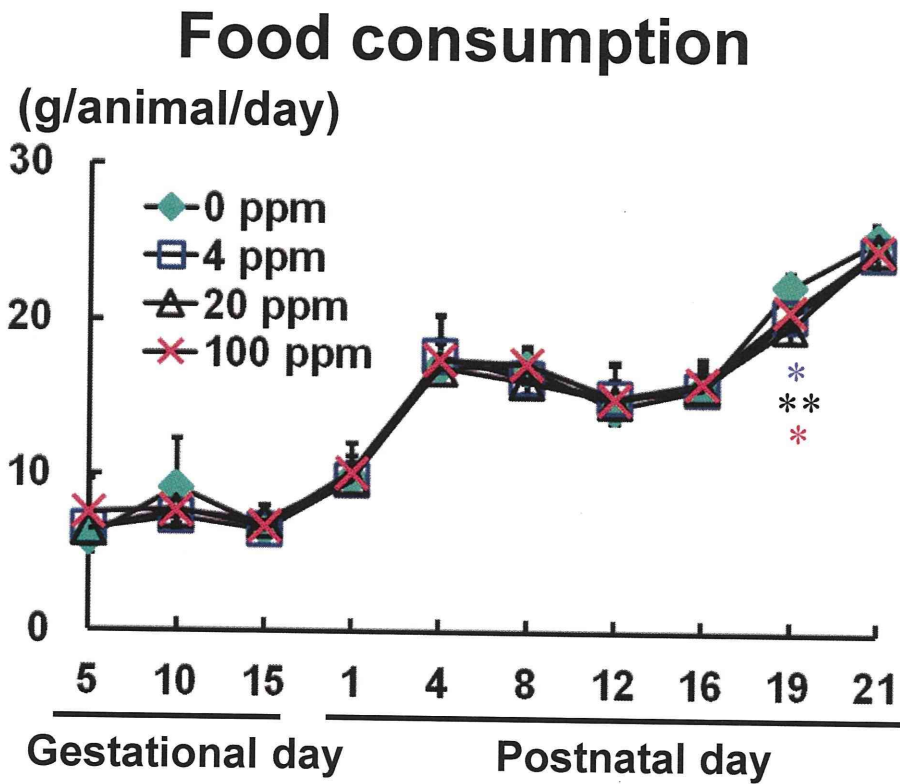
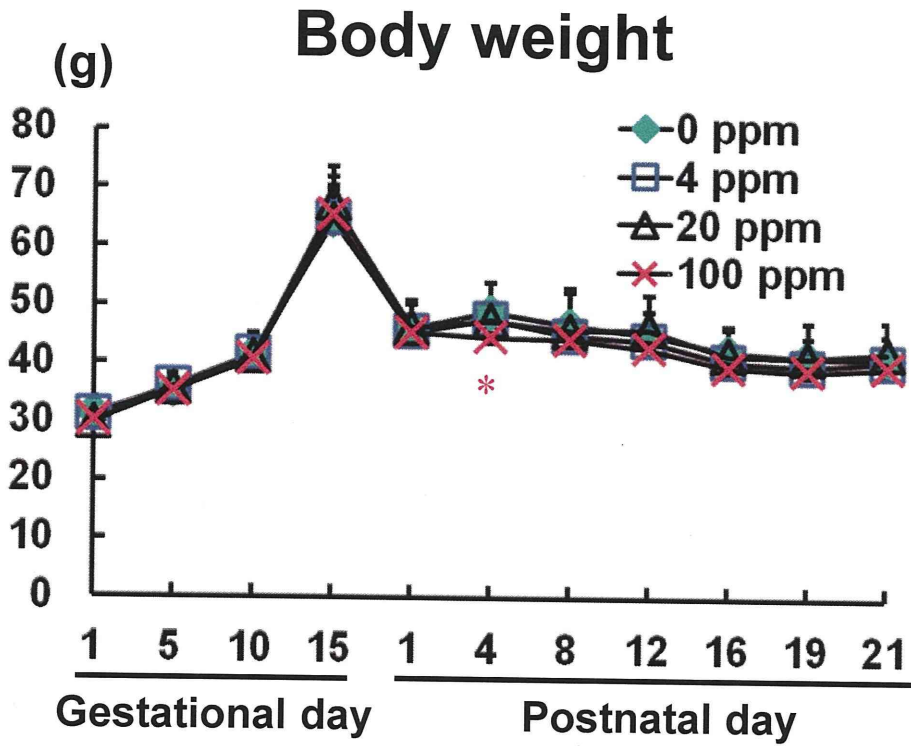


Fig. 7. Body weights and food consumption of dams exposed to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.



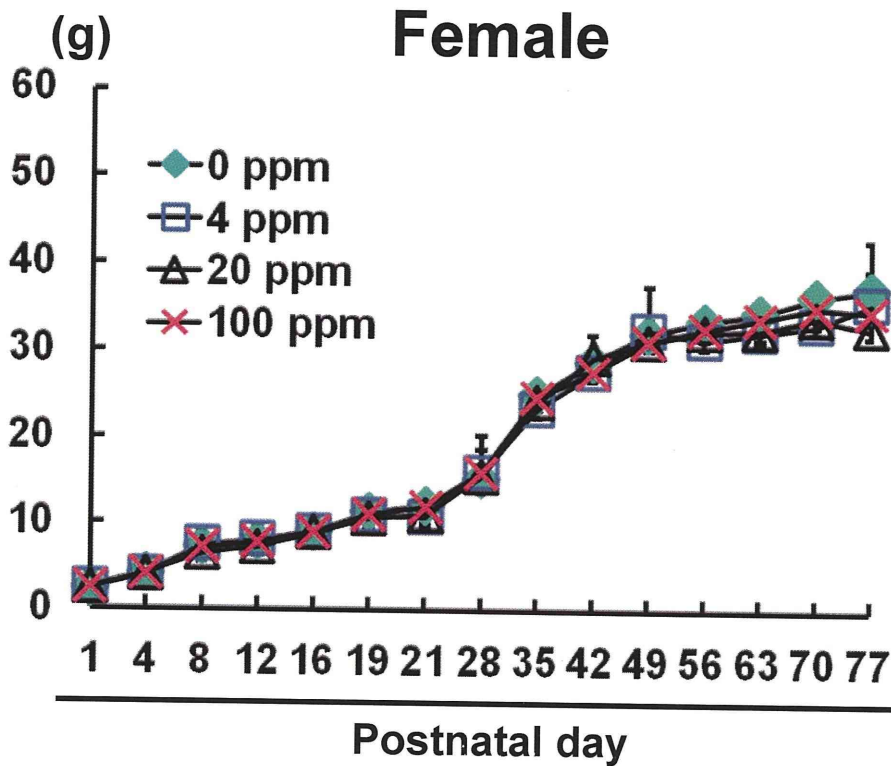
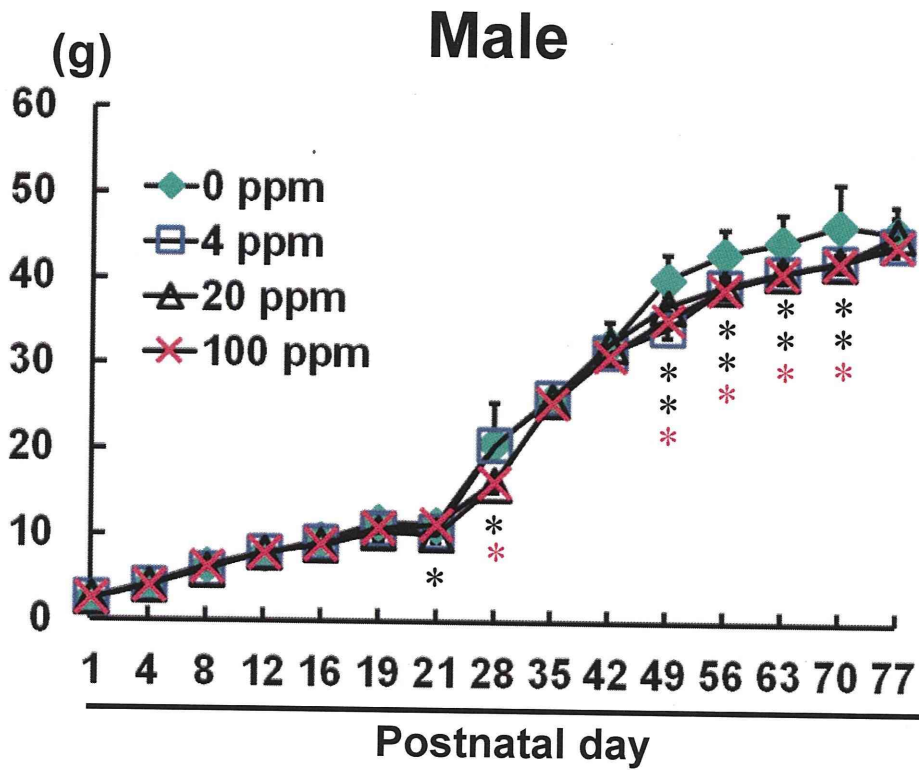


Fig. 8. Body weights of offspring after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.

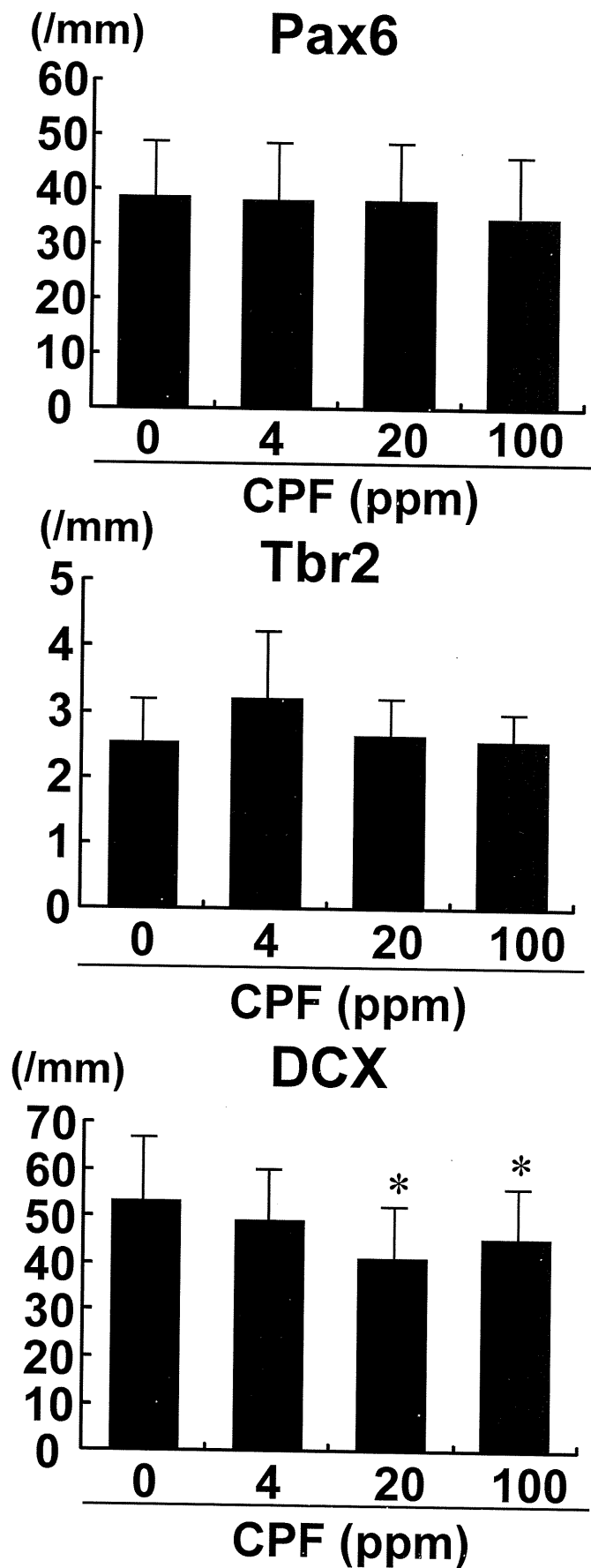


Fig. 9. Distribution of Pax6, Tbr2 and DCX-positive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.

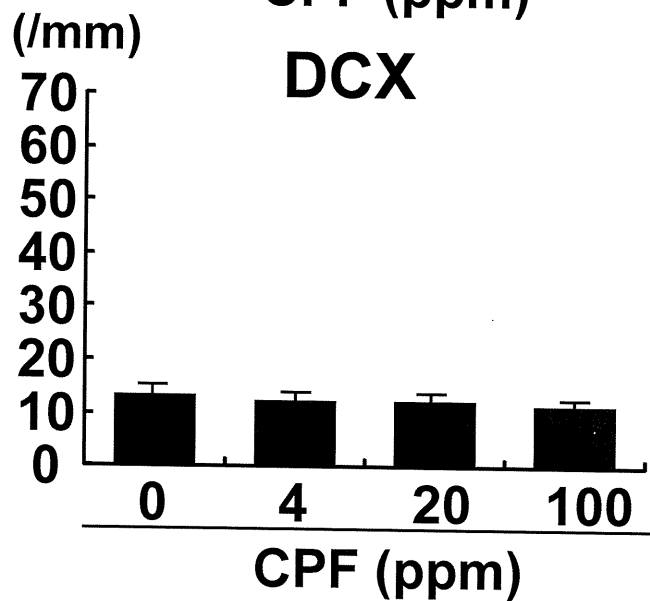
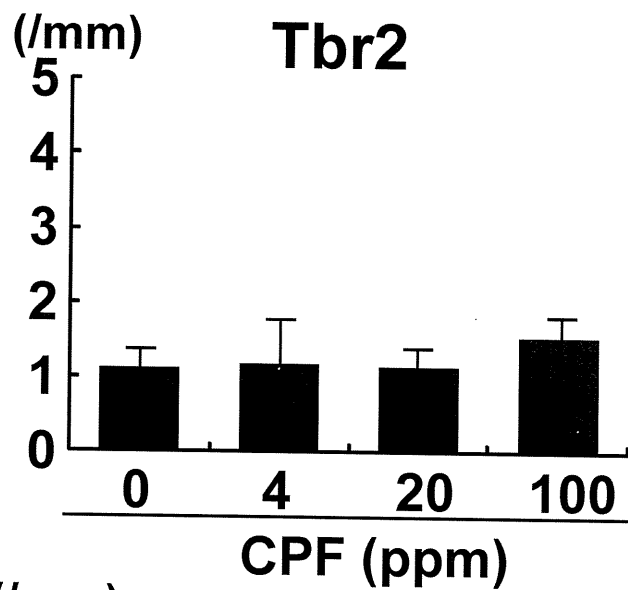
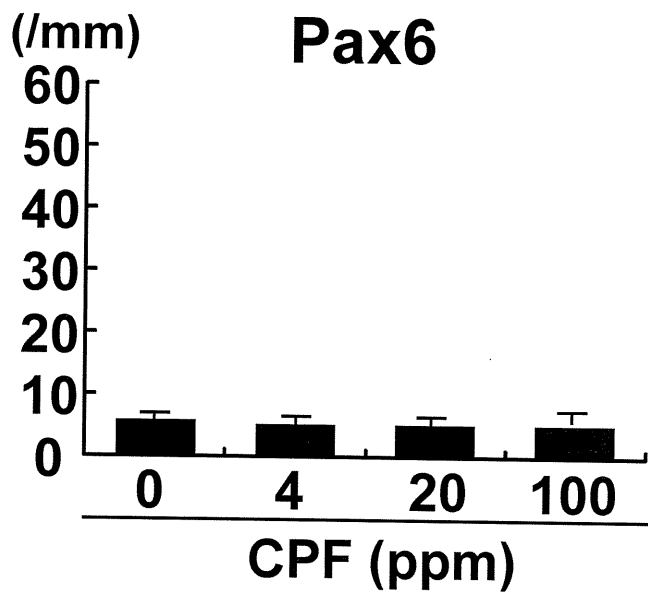
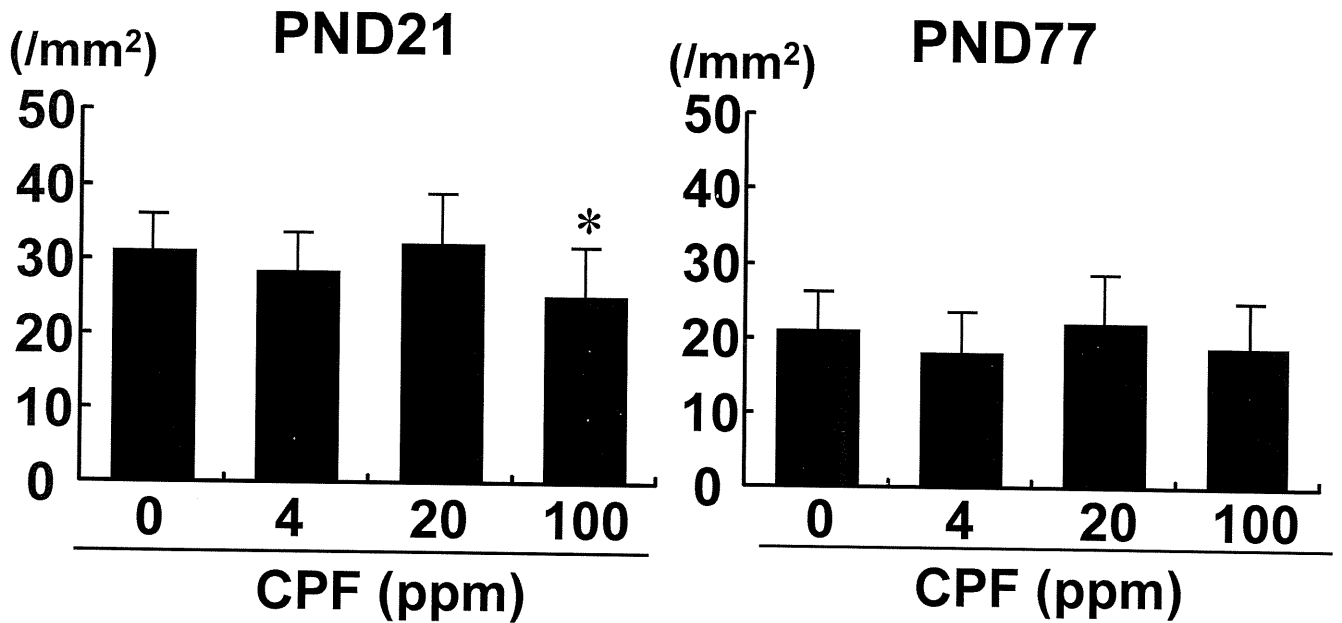


Fig. 10. Distribution of Pax6, Tbr2 and DCX-positive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 77 after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.

## NeuN



## Reelin

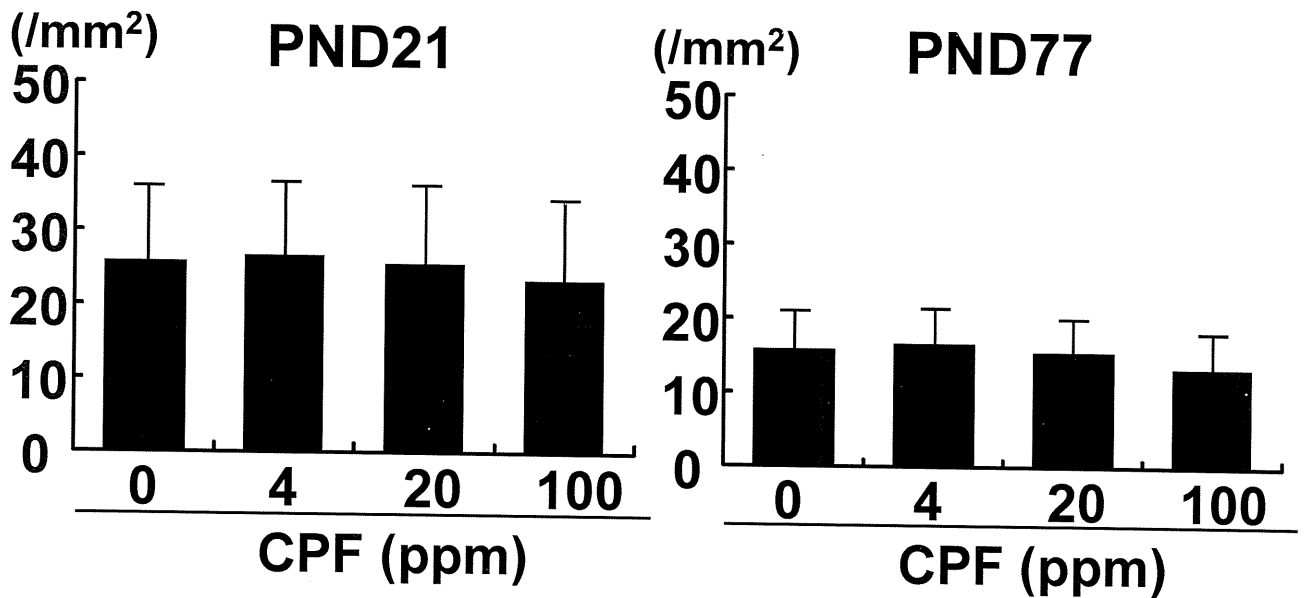


Fig. 11. Distribution of NeuN and Reelin-positive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.

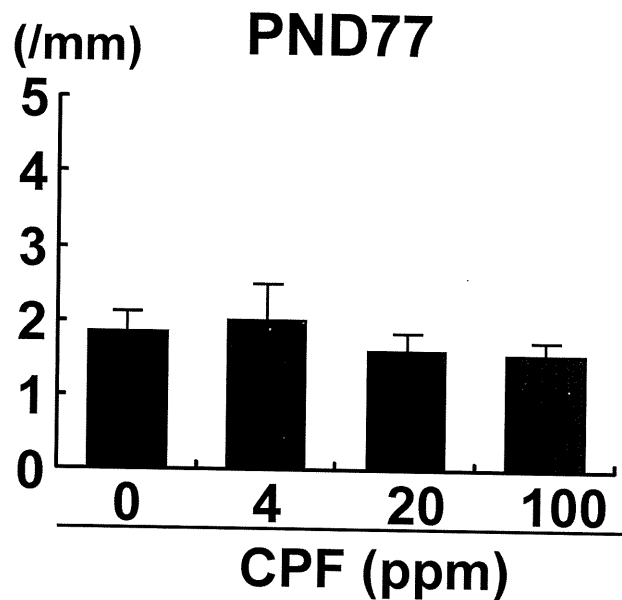
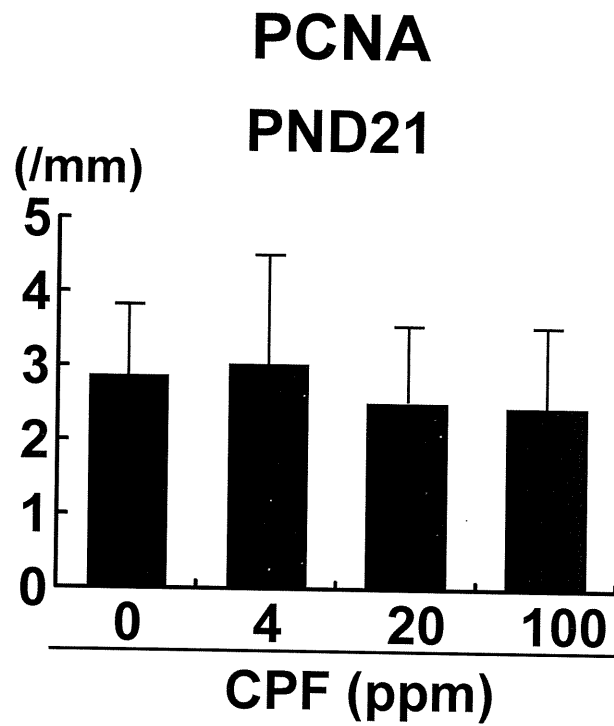
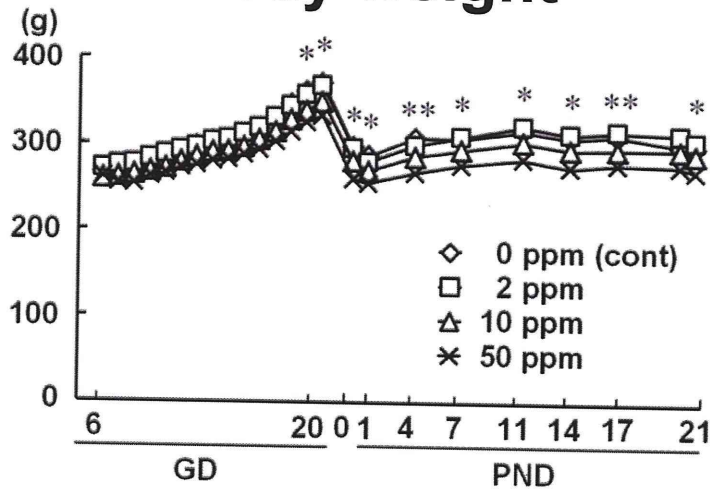
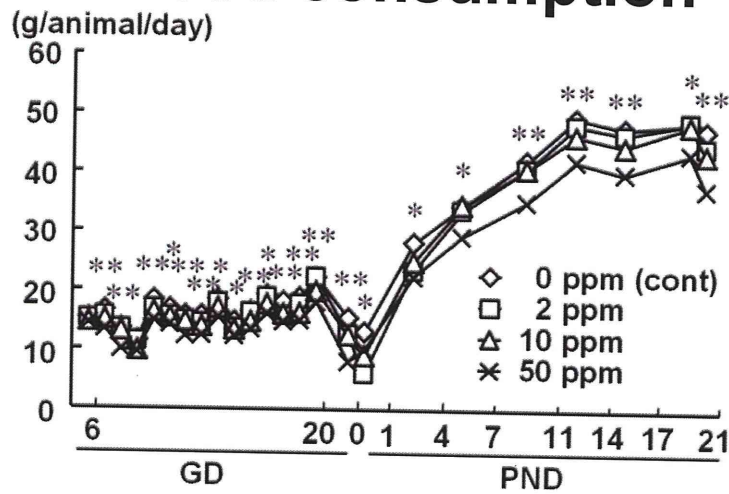


Fig. 12. Distribution of PCNA-positive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to chlorpyrifos from GD 10 to PND 21 in mice.

# Body weight



# Food consumption



# Water intake

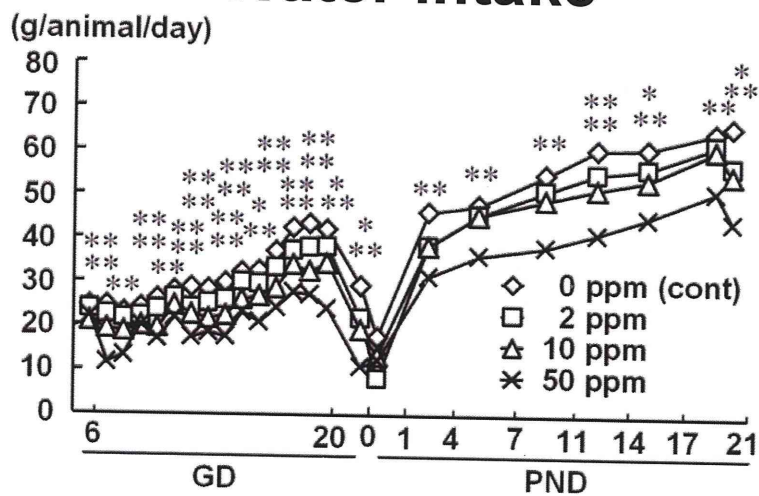
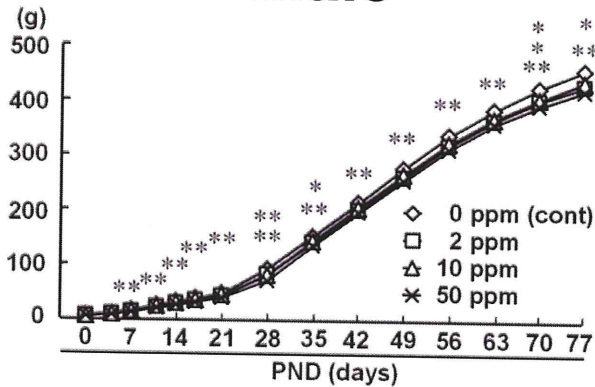


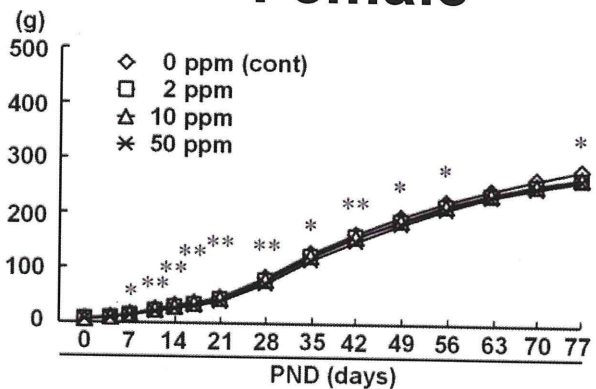
Fig. 13. Body weights, food consumption and water intake of dams exposed to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.

## Body weight

### Male

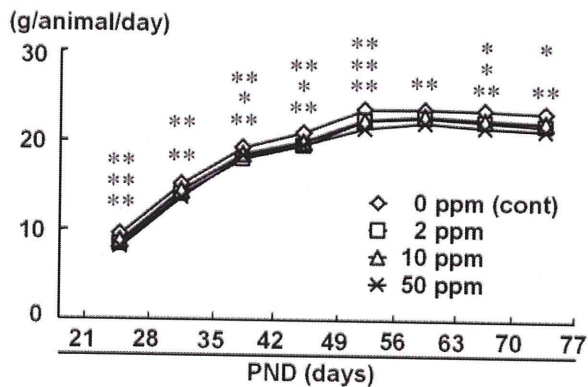


### Female



## Food consumption

### Male



### Female

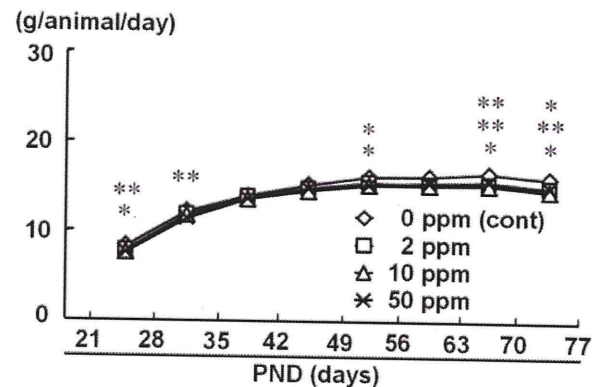
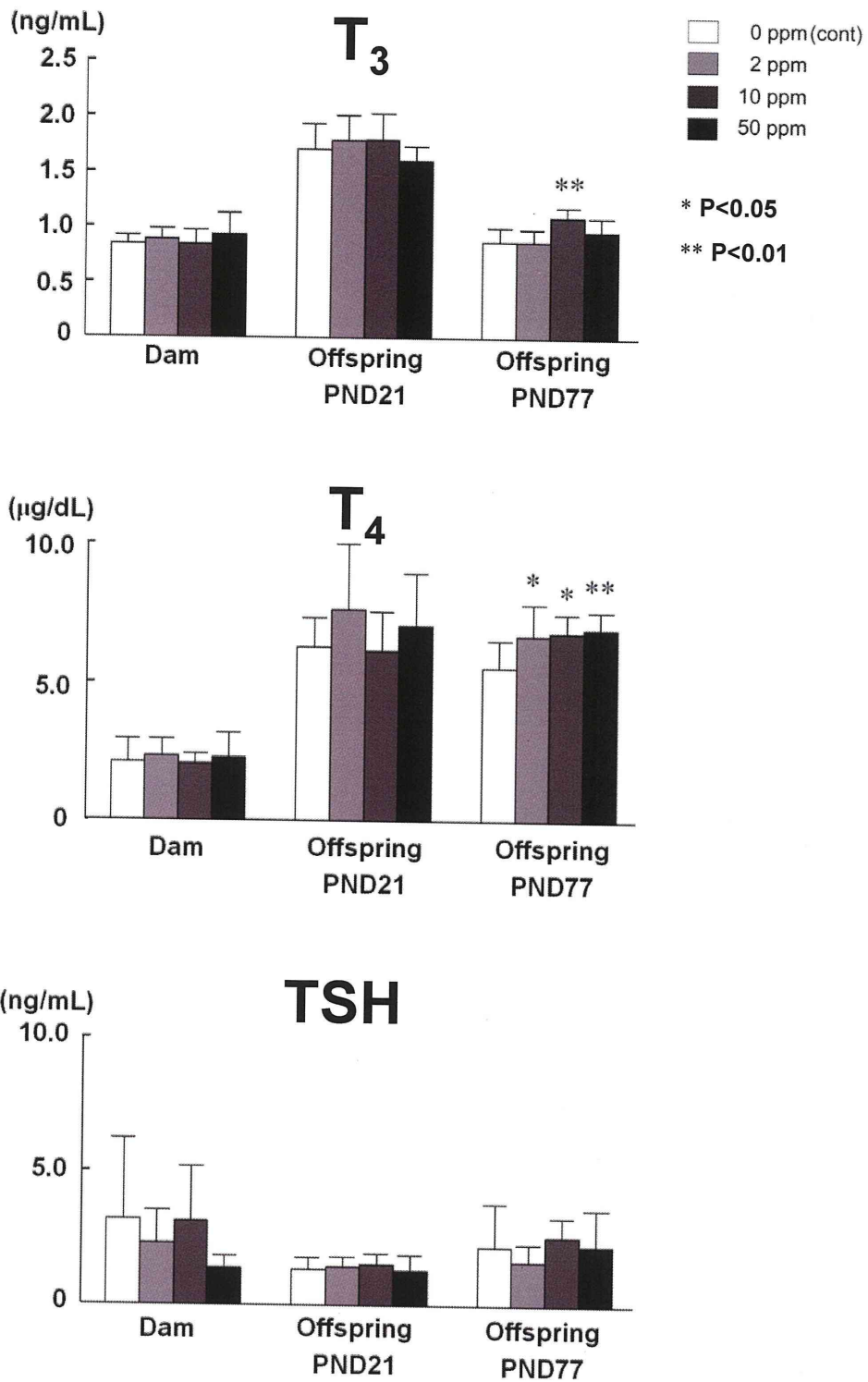
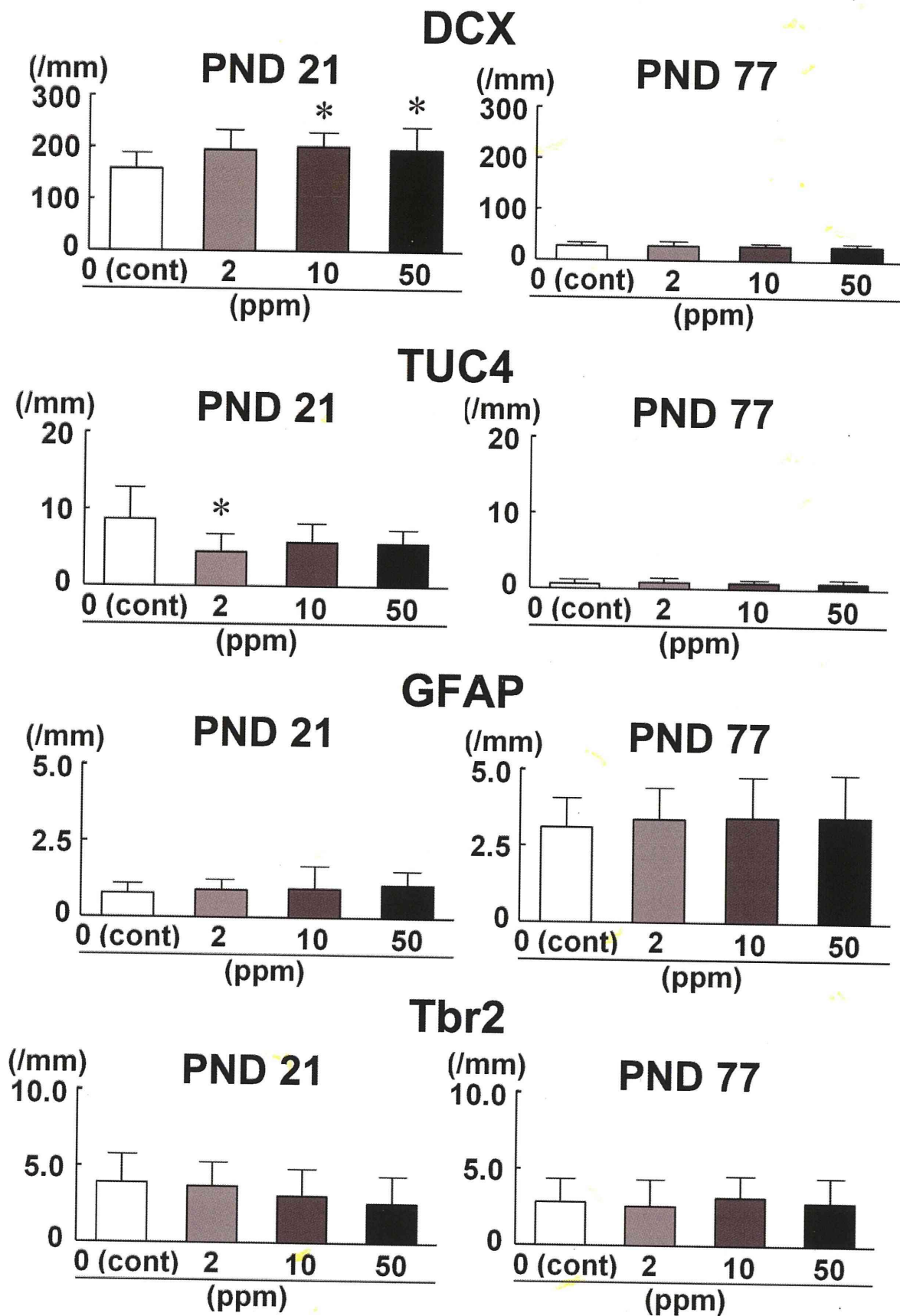


Fig. 14. Body weights and food consumption of offspring after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.



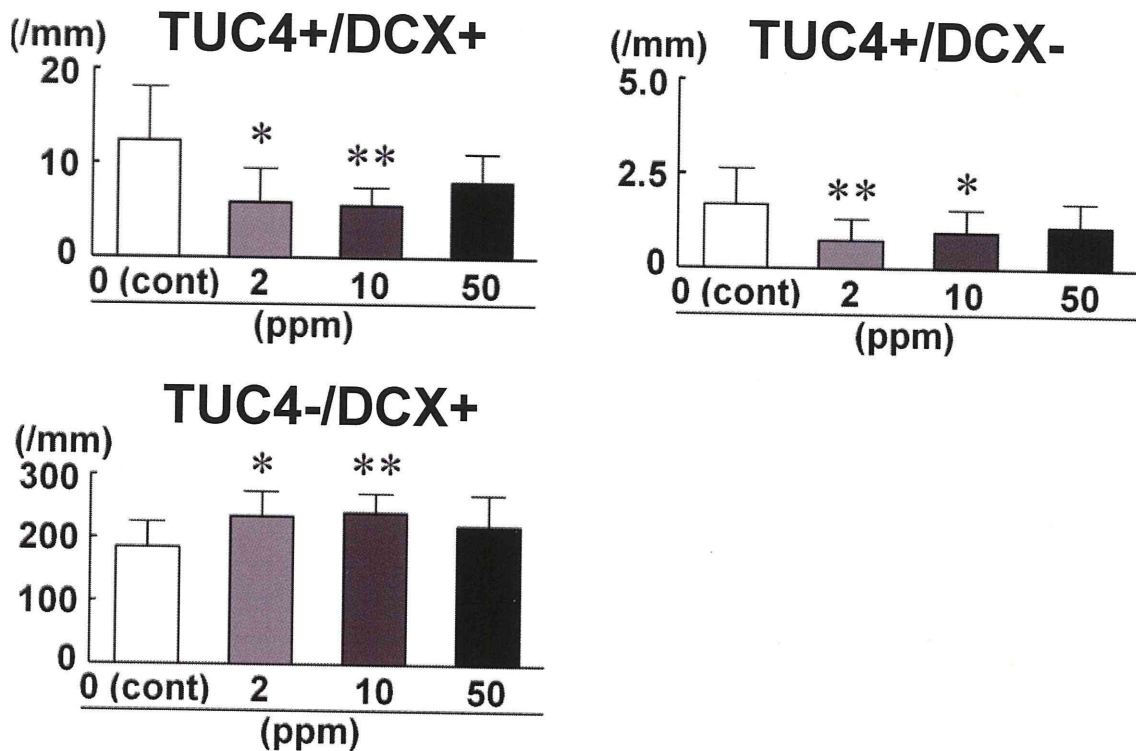
**Fig. 15. Thyroid related-hormones of male offspring and dams exposed to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.**





**Fig. 16.** Distribution of DCX, TUC4, GFAP and Tbr2 -positive cells in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.

## TUC4/DCX (PND 21)



## Tbr2/DCX (PND 21)

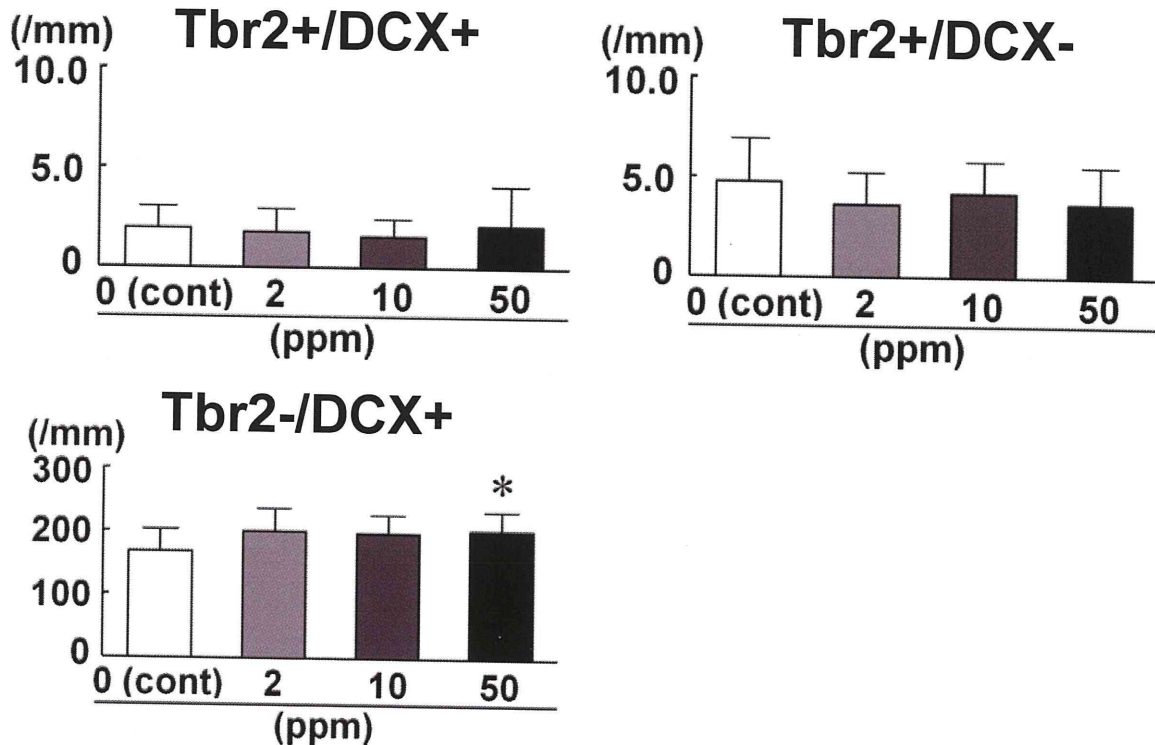
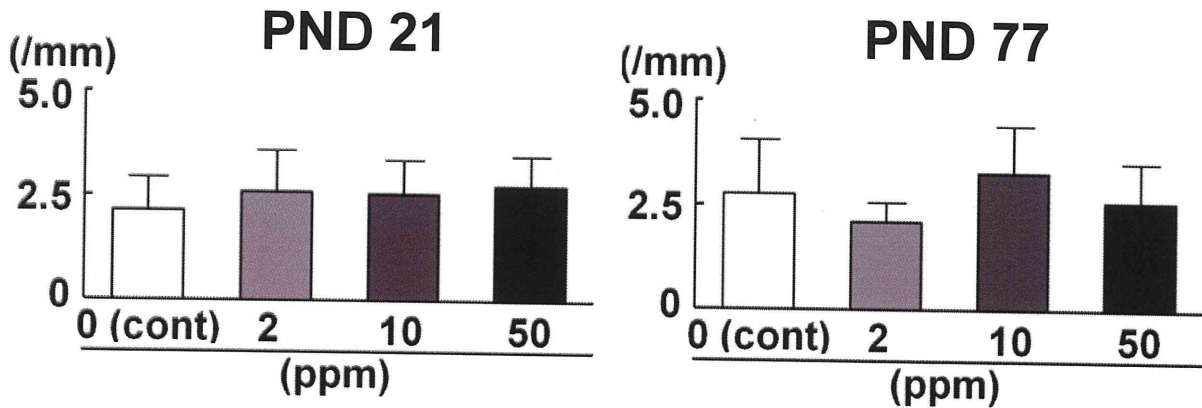
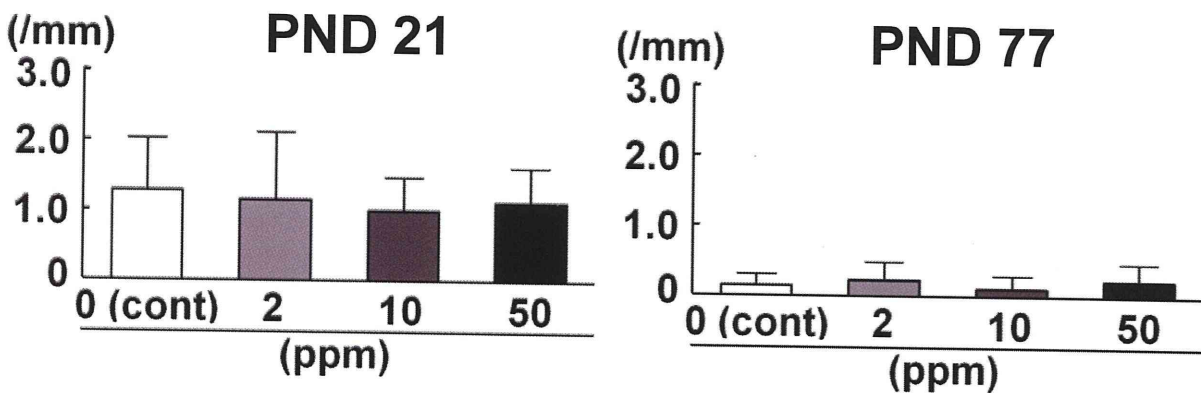


Fig. 17. Distribution of immunoreactive cells by double staining for DCX and TUC4 or Tbr2 in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.

## PCNA



## TUNEL



## NeuN

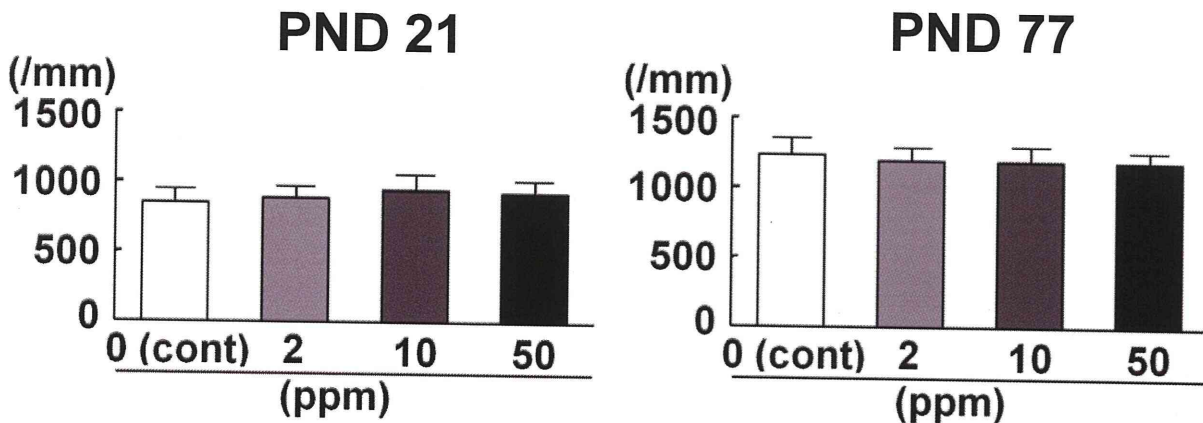
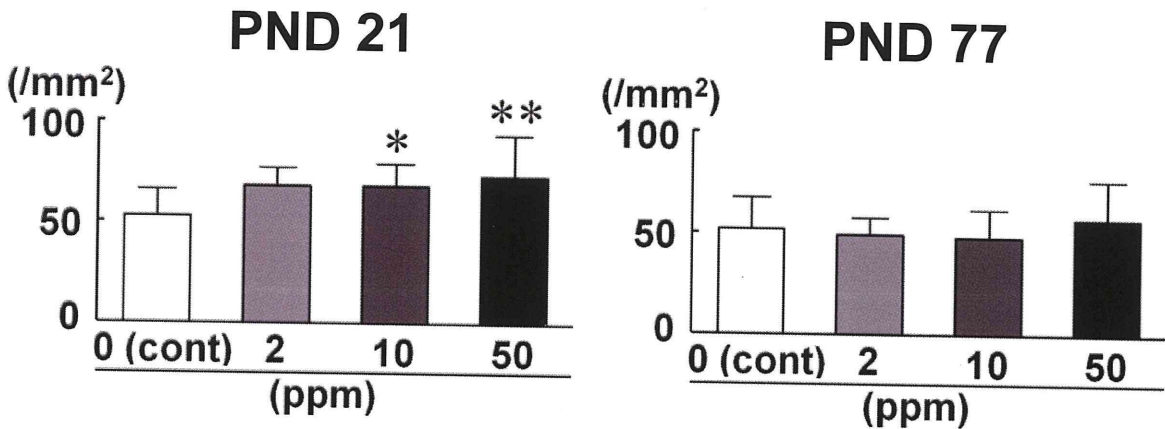
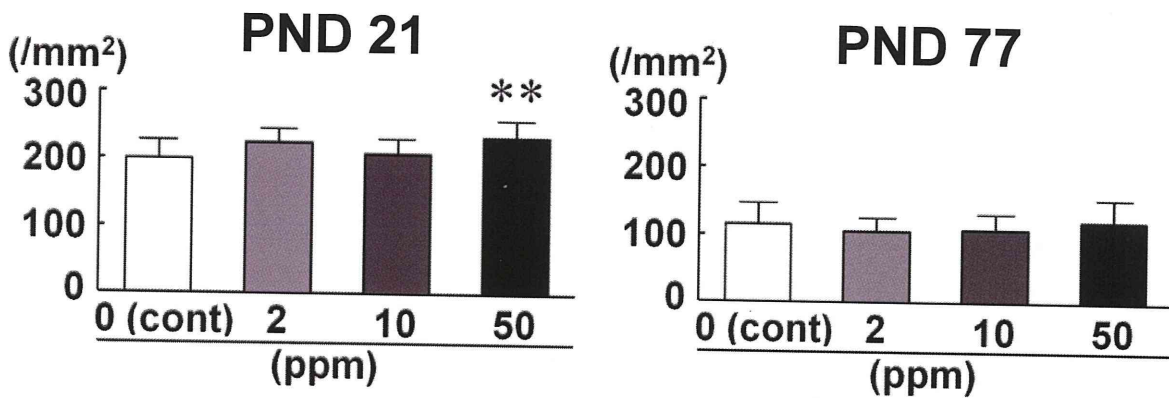


Fig. 18. Distribution of TUNEL-positive apoptotic cells and PCNA-positive proliferating cells in the dentate subgranular zone and NeuN-positive post mitotic granule cells in granular cell layer of male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.

## GAD67



## NeuN



## Reelin

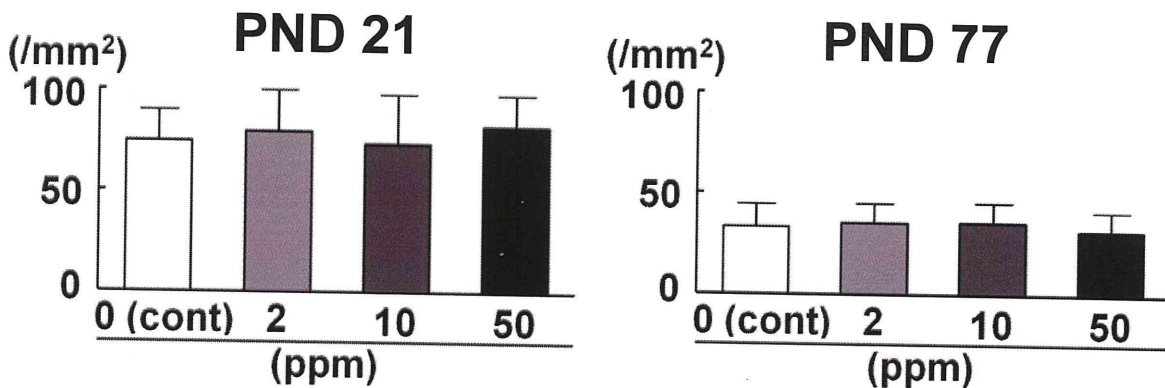


Fig. 19. Distribution of immunoreactive cells for GAD67, NeuN and reelin in the hilus of the hippocampal dentate gyrus in male offspring at PND 21 and 77 after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.