

## NACHR $\alpha$ 7/NeuN (PND 21)

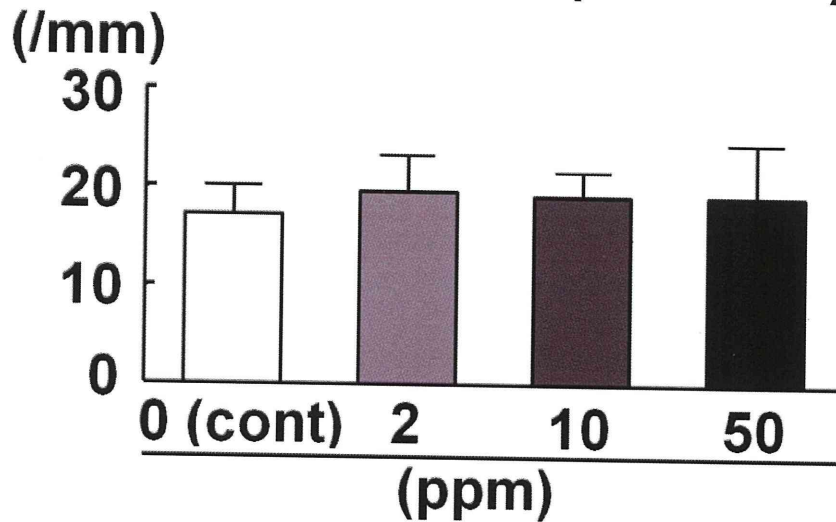


Fig. 20. Distribution of NACHR $\alpha$ 7-positive and NeuN-negative cells by double staining in the dentate subgranular zone of male offspring at PND 21 after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt from GD 6 to PND 21 in rats.

**Table 1. Organ weight of male offspring after maternal exposure to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in mice**

	Chlorpyrifos in the diet (ppm)			
	Control	4	20	100
PND 21				
Males				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Brain (g)	0.43 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.01	0.43 ± 0.04	0.44 ± 0.02
Brain (g/100g BW)	3.77 ± 0.27	3.87 ± 0.19	4.55 ± 0.32**	3.79 ± 0.44
Liver (g)	0.45 ± 0.04	0.41 ± 0.06	0.48 ± 0.09	0.45 ± 0.05
Liver (g/100g BW)	3.98 ± 0.25	3.91 ± 0.27	4.63 ± 0.54**	3.96 ± 0.12
Kidneys (g)	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.21 ± 0.06*	0.18 ± 0.02
Kidneys (g/100g BW)	1.53 ± 0.09	1.55 ± 0.11	2.06 ± 0.47**	1.54 ± 0.10
PND 77				
Males				
No. of offspring examined	10	10	10	10
Brain (g)	0.49 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02
Brain (g/100g BW)	1.06 ± 0.06	1.08 ± 0.08	1.07 ± 0.07	1.07 ± 0.11
Liver (g)	2.15 ± 0.26	2.03 ± 0.19	2.08 ± 0.21	2.06 ± 0.16
Liver (g/100g BW)	4.69 ± 0.46	4.56 ± 0.33	4.54 ± 0.22	4.66 ± 0.26
Kidneys (g)	0.62 ± 0.05	0.61 ± 0.07	0.66 ± 0.04	0.57 ± 0.04
Kidneys (g/100g BW)	1.34 ± 0.10	1.36 ± 0.16	1.44 ± 0.09	1.30 ± 0.12

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

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

<sup>a</sup>Mean±SD.

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

	Chlorpyrifos in the diet (ppm)			
	Control	4	20	100
Dams				
No. of dams examined	6	6	6	6
Total blood (IU/L)	4325 ± 173 <sup>b</sup>	3081 ± 577**	2734 ± 304**	1826 ± 307**
Plasma (IU/L)	8287 ± 1026	4461 ± 1395**	4167 ± 535**	2266 ± 711**
Forebrain (IU/g tissue)	20.7 ± 1.3	19.1 ± 1.8	20.1 ± 1.7	7.4 ± 0.9**
Offspring				
PND 21				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
Total blood (IU/L)	3398 ± 277	2428 ± 777**	2239 ± 189**	1377 ± 222**
Plasma (IU/L)	4196 ± 295	2503 ± 678**	2686 ± 309**	939 ± 240**
Forebrain (IU/g tissue)	16.0 ± 1.1	14.1 ± 0.9*	16.0 ± 0.8	11.0 ± 1.9**
PND 77				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	6
Total blood (IU/L)	2779 ± 741	3034 ± 509	2689 ± 391	2852 ± 248
Plasma (IU/L)	5091 ± 1614	3590 ± 740*	3719 ± 476*	3719 ± 476*
Forebrain (IU/g tissue)	22.9 ± 1.2	20.0 ± 5.9	23.3 ± 1.6	22.4 ± 1.8

\*\*\* 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

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

<sup>b</sup>Mean±SD.

**Table 3. Serum levels of thyroid-related hormones of male offspring after maternal exposure to chlorpyrifos during the 2nd half of gestation and lactation periods in mice**

	Chlorpyrifos in the diet (ppm)			
	Control	4	20	100
PND 21				
No. of dams examined	40 (10) <sup>a</sup>	40 (10)	40 (10)	40 (10)
T <sub>3</sub> (ng/dL)	35.60 ± 4.83 <sup>b</sup>	29.80 ± 3.11*	33.40 ± 2.51	33.40 ± 3.51
T <sub>4</sub> (µg/dL)	3.30 ± 0.33	2.46 ± 0.55**	2.88 ± 0.22	2.90 ± 0.26
TSH (ng/mL)	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
PND 77				
No. of dams examined	40 (10)	40 (10)	40 (10)	40 (10)
T <sub>3</sub> (ng/dL)	64.00 ± 4.90	61.80 ± 4.02	62.60 ± 5.27	65.80 ± 3.03
T <sub>4</sub> (µg/dL)	5.26 ± 0.70	5.74 ± 0.48	5.22 ± 0.38	6.62 ± 0.67**
TSH (ng/mL)	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01

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

Abbreviations: PND, postnatal day; T<sub>3</sub>, triiodothyronine; T<sub>4</sub>, thyroxine; TSH, thyroid-stimulating hormone.

<sup>a</sup>Number in parenthesis represents the numbers of the pooled samples for each 3-4 samples.

<sup>b</sup>Mean ± SD.

**Table 4. Brain weight of offspring after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt during the second half of gestation and lactation periods in rats**

	Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
	0 ppm (Control)	32 ppm	160 ppm	800 ppm
PND 21				
Males				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	18	16	20	24
Brain (g)	1.50 ± 0.03 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.04	1.50 ± 0.05	1.44 ± 0.06*
Brain (g/100g BW)	3.04 ± 0.07	3.42 ± 0.47	3.22 ± 0.18	3.55 ± 0.35**
Females				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	18	16	20	24
Brain (g)	1.44 ± 0.03	1.40 ± 0.04	1.45 ± 0.03	1.40 ± 0.05**
Brain (g/100g BW)	3.01 ± 0.11	3.45 ± 0.47	3.19 ± 0.21	3.52 ± 0.46**
PND 77				
Males				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	18	16	20	24
Brain (g)	2.08 ± 0.03	2.03 ± 0.06	2.08 ± 0.04	1.99 ± 0.04**
Brain (g/100g BW)	0.45 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.48 ± 0.02	0.47 ± 0.02
Females				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	18	16	20	24
Brain (g)	1.92 ± 0.05	1.89 ± 0.06	1.92 ± 0.04	1.84 ± 0.05**
Brain (g/100g BW)	0.68 ± 0.04	0.72 ± 0.03	0.72 ± 0.05	0.70 ± 0.04

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

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

<sup>a</sup>Two offspring of each sex per dam ( $n = 9$  for 0 ppm, 8 for 2 ppm, 10 for 10 ppm, 12 for 50ppm) were subjected to autopsy and 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 5. Urinary cotinine level on postnatal day 19 of male offspring and dams exposed to nicotine hydrogen tartrate salt during the second half of gestation and lactation periods in rats**

	Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
	0 ppm (Control)	2 ppm	10 ppm	50 ppm
Dams				
No. of dams examined	5	5	5	5
Cotinine (ng/mL)	0.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	72.7 ± 26.1*	919.1 ± 487.6*	5833.4 ± 1772.6*
Offspring				
No. of offspring examined <sup>a</sup>	5	5	5	5
Cotinine (ng/mL)	2.5 ± 0.8	41.7 ± 21.3*	233.8 ± 27.8*	1208.7 ± 1527.1*

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

<sup>a</sup>One male offspring per dam ( $n = 5$ /group) was subjected to analysis.

<sup>b</sup>Mean ± SD.

**Table 6. Real-time PCR analysis in the hippocampus of offspring after maternal exposure to nicotine hydrogen tartrate salt during the 2nd half of gestation and lactation periods.**

	Nicotine hydrogen tartrate salt in drinking water			
	0 ppm (Control)	2 ppm	10 ppm	50 ppm
No. of offspring examined <sup>a</sup>	6	6	6	5
<i>Chrna7</i>	0.93 ± 0.26 <sup>b</sup>	1.09 ± 0.36	1.07 ± 0.23	1.04 ± 0.15
<i>Chrn2</i>	0.99 ± 0.18	1.13 ± 0.28	1.05 ± 0.13	0.91 ± 0.18
<i>Dcx</i>	0.95 ± 0.39	0.96 ± 0.17	1.21 ± 0.14	1.04 ± 0.16
<i>Dpysl3</i>	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.14	1.09 ± 0.18	0.97 ± 0.15
<i>Reln</i>	0.97 ± 0.22	1.07 ± 0.38	1.10 ± 0.21	0.98 ± 0.15
<i>Pcna</i>	1.01 ± 0.19	1.02 ± 0.19	1.06 ± 0.20	0.96 ± 0.09

No statistically significant differences in any treatment group from the untreated controls.

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

<sup>b</sup> Mean ± SD.

Abbreviations: *Chrna7*, cholinergic receptor, nicotinic, alpha7; *Chrn2*, cholinergic receptor, nicotinic, beta 2; *Dcx*, doublecortin; *Dpysl3*, dihydropyrimidinase-like 3; *Reln*, reelin; *Pcna*, proliferating cell nuclear antigen;

## 研究要旨

本研究では、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  $MnCl_2$  と Nicotine 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 細胞を用いて、 $MnCl_2$  ないし Nicotine 暴露の神経発生への影響について検討を行った結果、両物質共にドパミン、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 細胞の分化誘導に対する影響の検討は神経発生に対する影響評価系として有用であると考えられた。

## A. 研究目的

$MnCl_2$  の必要量は微量であり、植物性の食品を中心に広く含まれていることから、通常の食生活における欠乏の心配は殆どないと言われている。一方、過剰症は静脈栄養など特別な場合の報告に限られることから、過剰摂取の心配は殆ど無いが、慢性中毒では強い精神障害やパーキンソン病に似た中枢神経系障害が惹起されると言われている。また、 $MnCl_2$  は中枢神経系を構成するアストロサイトやマイクログリアといったグリア細胞の活性化を介して、ドパミン神経をすることが報告されている。

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。その神経系の子な作用点は、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。

本研究では、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  $MnCl_2$  と Nicotine 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、 $MnCl_2$  ないし Nicotine 暴露の神経発生への影響について検討を行った。

## B. 研究方法

マウス胎仔 (E14) 全脳より神経幹細胞の作製を行った。さらには、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  $\beta$  III-tubulin、Glial fibrillary acidic protein (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。

### 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

昨年度までの研究により、 $MnCl_2$  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、Nicotine 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、両物質において、ES 細胞を用いて細胞障害性は認められないことを確認した上で (Fig. 1, 2)、神経発生への影響について検討を行った。その結果、 $MnCl_2$  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 (Fig. 3, 4)。一方、Nicotine 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 (Fig. 5, 6)。これらは、 $MnCl_2$ ならびに Nicotine 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。

#### D. 考察

以上の結果より、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。

#### E. 結論

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。

さらに、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。

#### F. 研究発表

1. 論文発表  
該当無し。
2. 学会発表  
該当無し。

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし



# ES 細胞由来神経幹細胞に対するMnCl<sub>2</sub>の影響

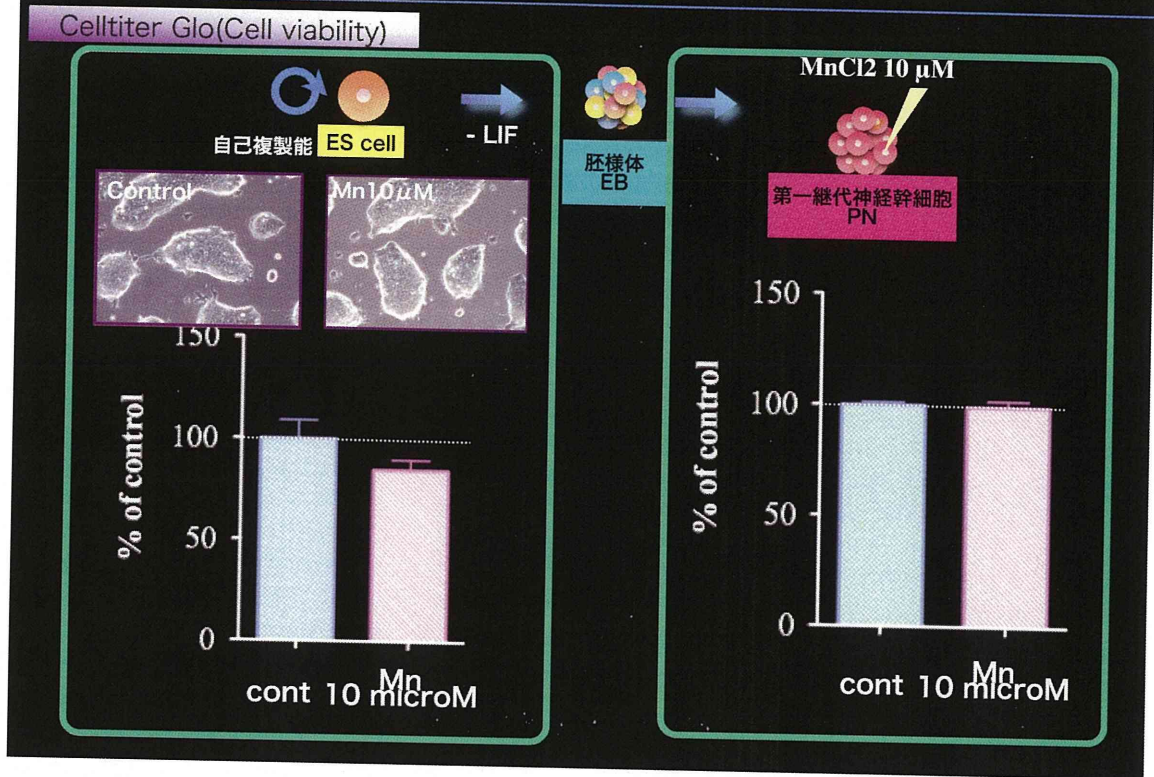


Fig. 1

# ES 細胞由来神経幹細胞に対する nicotine の影響

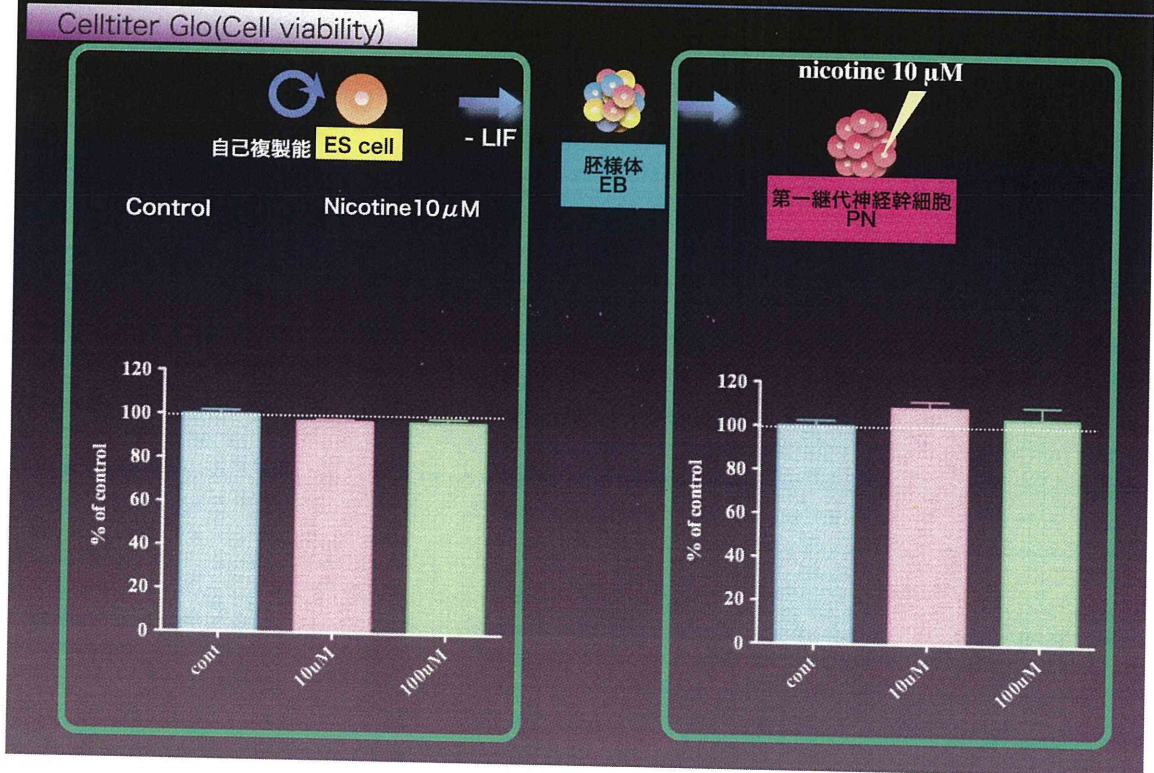


Fig. 2



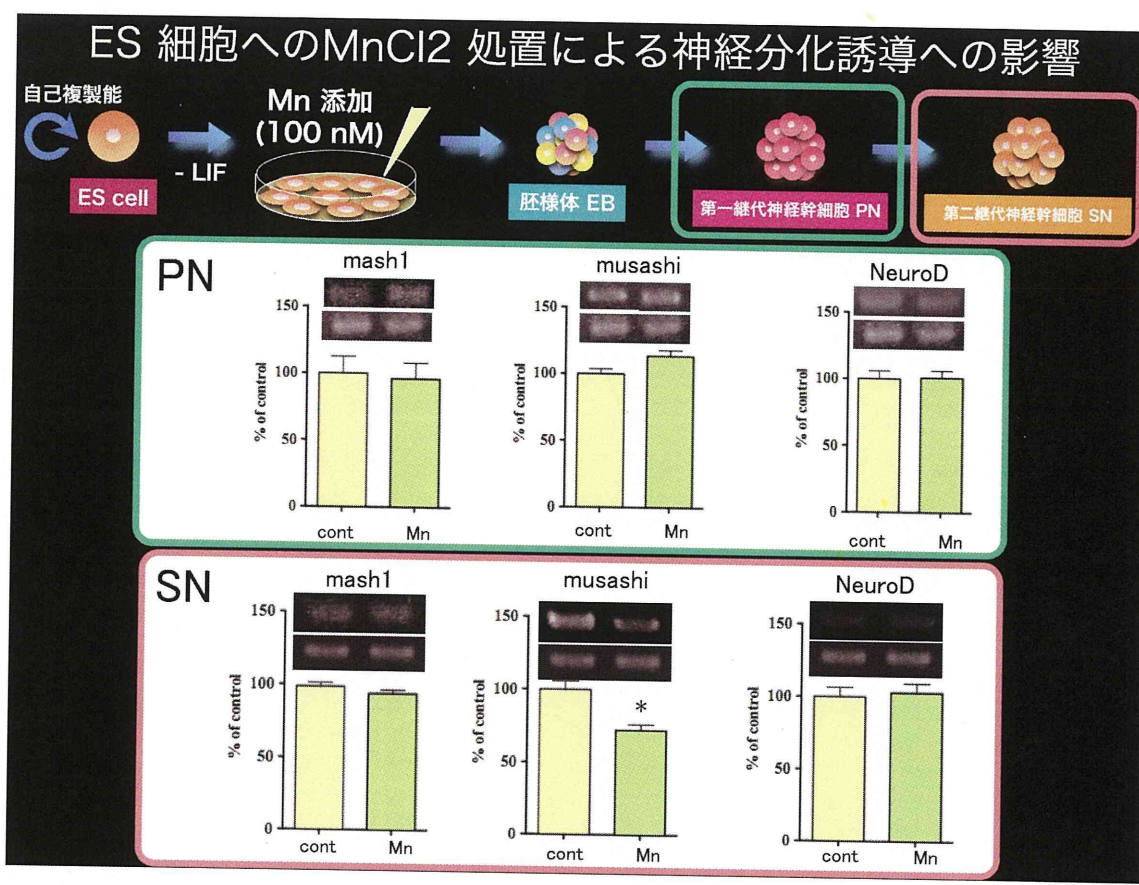


Fig. 3

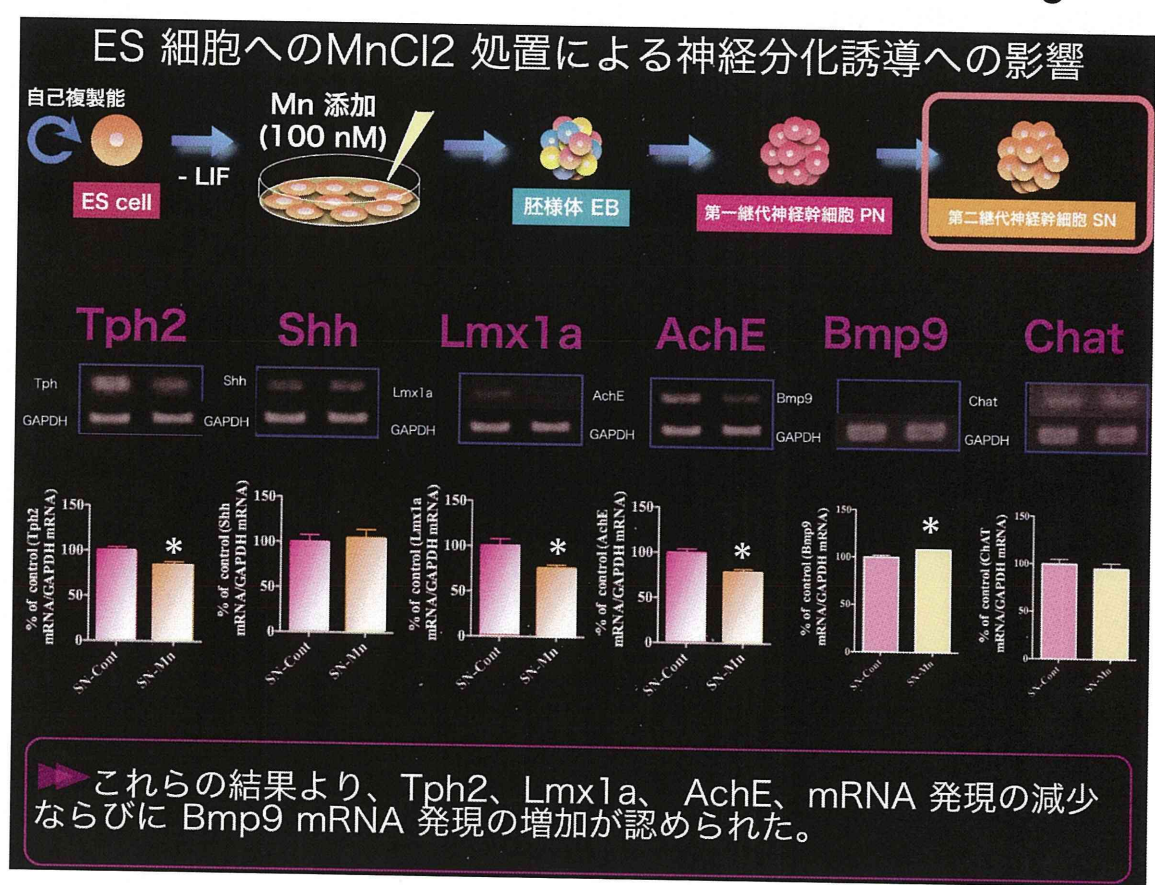


Fig. 4



## ES 細胞への nicotine 処置による神経分化誘導への影響

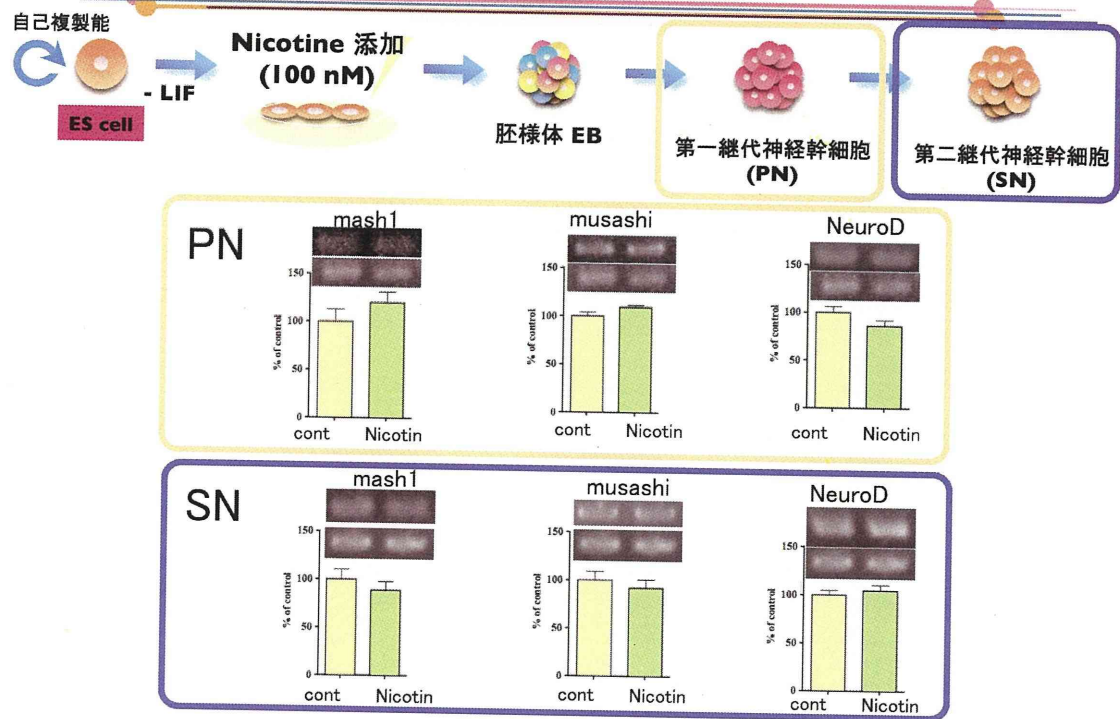
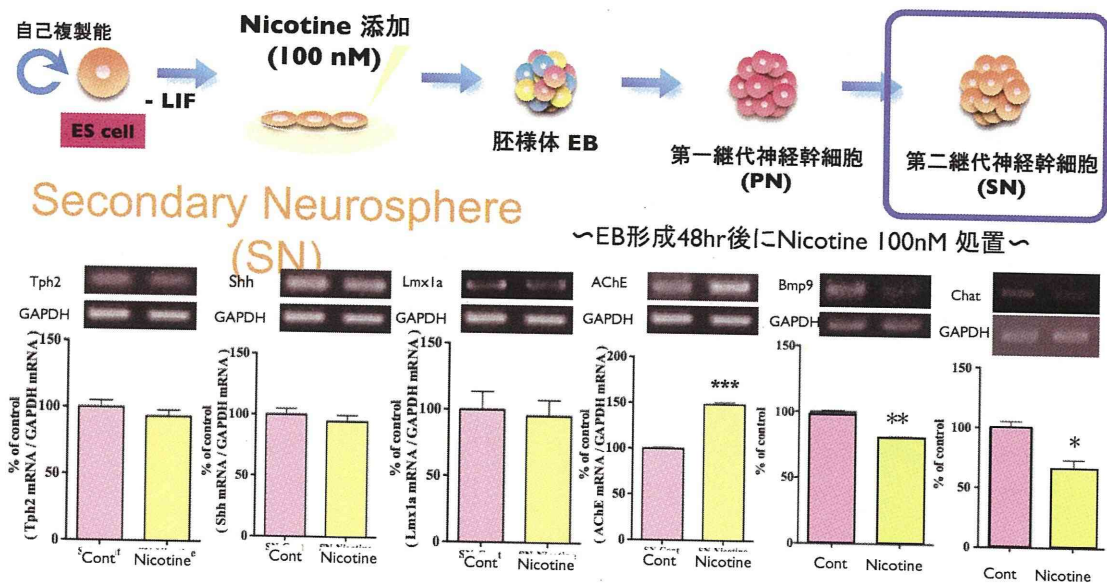


Fig. 5

## ES 細胞への nicotine 処置による神経分化誘導への影響



▶ これらの結果より、AChE mRNA 発現の増加ならびにBmp9、ChAT mRNA 発現の減少が認められた。

Fig. 6

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）

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（メタミドホス；MMP）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 週間の親マウスに飲水投与を行い、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。MMP の投与は公比を 5 とし、0, 1, 5, 25 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、用量依存性の変化はほとんどなく、CD3 陽性細胞中に占める CD4 陽性細胞の割合が増加するなどの軽微な影響が 3 週齢においてのみ観察された。さらに、0 および 25ppm については、雄仔マウスの脾臓 CD4 陽性 T 細胞および胸腺細胞の CpG メチル化状態を網羅的に解析し、多くのマーカー候補遺伝子を得たほか、自然免疫系のパターン認識受容体遺伝子（Pglyrp2 および CD14）の CpG メチル化が減少することを発見した。また、25ppm MMP 暴露後の雌仔マウスにおいて、KLH 腹腔投与による抗体（IgM および IgG）産生量を調べたところ、IgG のみが変わらずながら有意に減少していた。

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・機能が発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>。

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（昨年度はクロルピリホス、今年度はメタミドホス；MMP）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、そしてその試験評価法としての有用性を評価することを目的とする。

細胞表面マーカー CD4 陽性 T 細胞は適応免疫において中心的な役割を果たしているが、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 細胞の機能変化は各種の適応免疫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。

本研究課題では、有機リン系農薬として昨年度は脂溶性の高いクロルピリホス（CPF）を使用した<sup>3)</sup>。本年度は、水溶性の高い MMP 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、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。

さらに本年度は、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 メチル化の網羅的解析を行った<sup>4)</sup>。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<sup>5)</sup>。

## B. 研究方法

既報<sup>6-8)</sup>に従い、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, 25ppm とした。出産後 3 週目 (PNW3) 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。なお、エピジェネティクス解析および抗 KLH 抗体産生能解析については、暴露容量を 0 及び 25ppm の 2 点とし、仔雄をエピジェネティクス解析に、仔雌を抗体産生能の解析に用いた。

(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。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 20  $\mu$ l をあらかじめ 80  $\mu$ 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)、および血小板数 (PLT) の測定を行った。

(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 200  $\mu$ l を採取し、SRL 社に委託して次の項目の検査を行った。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砕して口径 40  $\mu$ 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  $2 \times 10^6$  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。500  $\mu$ 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。

(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/ml/well で 24well に播種し、Leukocyte Activation Cocktail with GolgiPlug (BD) により 37°C で 5 時間刺激し、BioLegend 固定バッファーで室温で 1 時間固定した。FBS で 2 回洗浄後、4°C で一晩保存した。抗マウス CD4-FITC で 30 分間染色後、これを BioLegend 可溶化バッファーにより室温で 15 分間可溶化し、次の抗体により室温で 1 時間染色した。抗マウス IFN  $\gamma$ -PerCP-Cy5.5、抗マウス IL-4-PE、抗マウス IL-17A-APC。なお、これらの抗体のコントロールとして、

非特異的ラット IgG1  $\kappa$  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。測定および解析は (4) と同様に行った。

(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) と同様に行った。

(7) 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、胸腺細胞および CD4 陽性脾臓細胞について CpG メチル化解析を行った。0 および 25ppm の MMP 周産期暴露を行った仔雄マウスより、胸腺および脾臓を摘出した。胸腺細胞は定法通り破碎して口径 40  $\mu$ m のメッシュに通したものの  $2 \times 10^8$  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 ~ 20  $\mu$ g を得た。各 500ng 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 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 メチル化を解析した<sup>4)</sup>。

(8) 抗 KLH 抗体産生能解析：MMP 暴露 0 および 25ppm の仔雌 3 匹  $\times$  2 群ずつを別ケージに分け、PBS または 0.1mg/1ml KLH (Imject mcKLH, Thermo Fisher) で 2 回 i. p. 投与にて免疫した (PND22, PND36)。PND43 に血清を採取し、定法により抗 KLH IgM 抗体および IgG 抗体を測定した<sup>5)</sup>。

(9) 統計計算：FACS による細胞の population 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 Dunnett 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 0ppm に比して 25ppm 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および免疫・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 0ppm 群に対する 25ppm 群の変化を Student の t 検定 (両側) で調べた。

(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

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く、Table 1 の通りであった。特に、25ppm 群では仔雌雄各 4 匹ずつしか得られなかったため、PND21 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。

### C-1) 臓器重量

Table 2 に、MMP 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。なお、前述の通り、出産数が少なかったため、25ppm 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。仔雌において、1または5ppm 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。

#### C-2) 血球学的解析

次に、母マウスおよび仔マウスの血球学的な解析を行った。結果を Table 3 に示す。3週齢時点では目立った変化は認められなかったが、11週齢では仔雄において赤血球数・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。

#### C-3) 血清学的解析

MMP 暴露が成立しているかどうか、および肝機能への影響を解析するため、母動物および仔雌雄の血清学的解析を行った (Table 4)。3週齢の時点では、母動物および仔雌雄ともに5ppm 以上の MMP 暴露は有意な血中コリンエステラーゼ活性

(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<sup>3)</sup>。一方、肝機能の指標として選択した血中 A/G 比、AST および ALT はいずれも有意な変化を示さなかった。

#### C-4) 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、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ったところ、3週齢の仔雌胸腺において、CD3 陽性細胞、CD8 陽性細胞、および CD3<sup>+</sup>/

CD4<sup>+</sup>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 (Table 5)。また、胸腺の Treg と思われる CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>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25ppm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、仔雄の場合、3週齢時点で脾臓の CD4<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup>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、これも仔雌の 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<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>や CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>の集団、および Th1 と思われる CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>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。

#### C-5) 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 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および25ppm の MMP 飲水暴露を行い、胸腺細胞および 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 メチル化解析を行った<sup>4)</sup>。

全部で97,651種類のプローブ中、メチル化が10倍以上昂進したものは、胸腺細胞および CD4 陽性脾臓細胞において、それぞれ542種および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種および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、メチル化昂進群で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倍以上のメチル化昂進が認められたもの

に限れば15種に絞ることができた。このように絞り込んだCpGメチル化昂進遺伝子15種と減少遺伝子7種をまとめたものがTable 6である。

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、Table 6のリストから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のがTable 7である。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 (H1xb9)遺伝子のメチル化は、両臓器でともに昂進していた。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、脾臓では昂進していた。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、Table 7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。

#### C-6) 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および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<sup>5)</sup>。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。なお、個体数の関係で、絵婦ジェネティクス解析と同様に、0および25ppm暴露群間での比較のみを行った。

Fig. 1に示す通り、IgMについては有意な差は認められなかったが、IgGでは、×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。

#### D. 考察

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クロルピリホス(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、親および仔の血清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がPND21の仔雌で増加、およびPND77の仔雄で減少した他、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(Table 5)。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<sup>9)</sup>、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(Fig. 1)。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 25ppm 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 週令時においては、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 週令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 週令時においては、3 週令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 メチル化を解析したところ、胸腺細胞および脾臓 CD4 陽性細胞で共通して 10 倍以上メチル化が昂進したものが 106 種、減少したものが 7 種あることが分かった (Table 6)。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および特異度を調べるの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 (Table 7)。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 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。

## E. 結論

本研究では、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、④CpG 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 および CD14) の CpG 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。

### (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, 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. *Bull. Natl. Instit. Health Sci.* **129**:105-110 (2011).
- 4) Rauch, T., Wang, Z., Zhang, X., Zhong, X., Wu, X., Lau, S.K., Kernstine, K.H., Riggs, A.D., Pfeifer, G.P. Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:5527-5532 (2007).
- 5) ICH Harmonized Tripartite Guideline (S8): Immunotoxicity studies for human pharmaceuticals.
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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).

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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).

### 2. 学会発表

- 1) 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

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許所得

なし

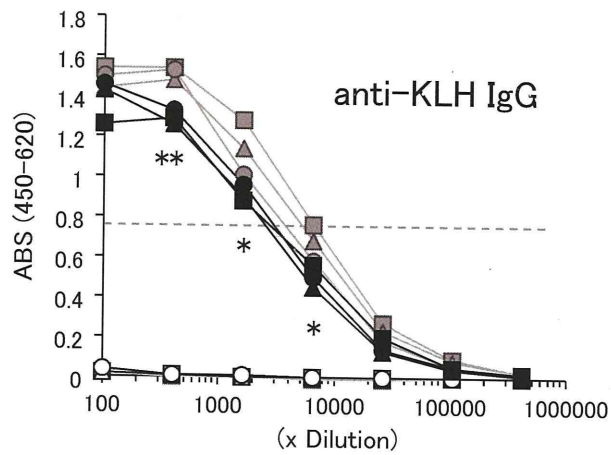
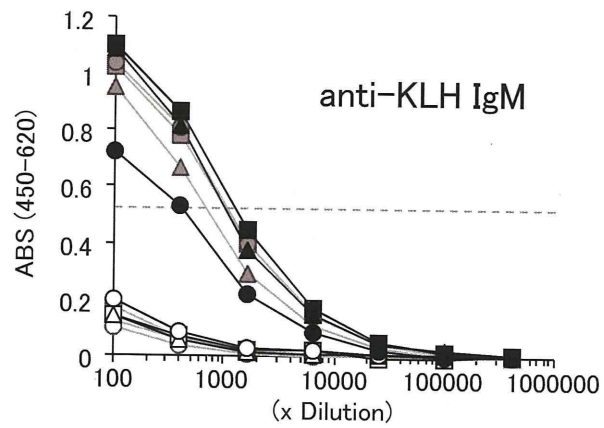
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし





		MMP (ppm)	
		0	25
Immunize	PBS		
	KLH		

**Fig. 1. Effect of MMP on the antibody generation to KLH.**

As thymus-dependent antigen, 1 mg/ml of keyhole limpet hemocyanin (KLH) was intraperitoneally injected to the female offspring at postnatal day (PND) 22 and PND 36. PBS was injected as a vehicle control. Serum KLH-specific IgM and IgG were measured with ELISA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  (Student's t-test,  $n=3$ ).

**Table 1. Number of delivery.**

<b>Methamidophos</b>	<b>(ppm)</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>25</b>
Dam					
Plugged		12	12	12	12
Delivery		2	5	6	1
(Supplementary) <sup>a</sup>		(4)			
Female offspring					
Birth		7	19	21	4
(Supplementary) <sup>a</sup>		(17)			
Male offspring					
Birth		9	21	19	4
(Supplementary) <sup>a</sup>		(8)			

Twelve female BALB/c mice were mated and the pregnancy was confirmed by vaginal plug formation (gestational day (GD) 0). The pregnant mice were exposed to MMP (0, 1, 5, and 25ppm) in drinking water from GD10 to postnatal day (PND) 21. <sup>a</sup> Control neonatal mice were added on PND2 together with their mother.

**Table 2. Effect of MMP on body and organ weights of dams and offspring.**

Methamidophos (ppm)	Body (g)	Liver (mg)	Spleen (mg)	Thymus (mg)	Liver/BW (%)	Spleen/BW (%)	Thymus/BW (%)
Dam	0	26.6 ± 1.2	2173 ± 222	108.8 ± 7.4	21.5 ± 5.3	8.15 ± 0.59	0.41 ± 0.03
	1	24.7 ± 1.5	1840 ± 175	95.3 ± 9.5	30.3 ± 5.1	7.45 ± 0.47	0.39 ± 0.03
	5	24.6 ± 1.5	1904 ± 231	101.3 ± 7.6	27.5 ± 7.2	7.74 ± 0.52	0.42 ± 0.03
	25	20.8	1345	75.0	28.0	6.47	0.37
Female (PNW3)	0	8.4 ± 0.9	407 ± 94	56.8 ± 10.9	57.5 ± 7.9	4.87 ± 1.13	0.68 ± 0.13
	1	9.6 ± 0.4 *	536 ± 17 *	82.0 ± 14.9 **	57.5 ± 7.0	5.60 ± 0.17	0.86 ± 0.16
	5	9.6 ± 0.5 *	522 ± 77	88.8 ± 6.8 **	58.0 ± 2.9	5.43 ± 0.80 *	0.92 ± 0.07
	25	7.5 ± 0.1	373 ± 23	53.8 ± 1.7	43.5 ± 3.1 *	4.96 ± 0.30	0.71 ± 0.02
Male (PNW3)	0	8.8 ± 0.6	443 ± 83	64.5 ± 14.8	53.8 ± 7.2	5.02 ± 0.94	0.73 ± 0.17
	1	9.9 ± 0.9	541 ± 67	93.8 ± 21.2 *	55.3 ± 3.8	5.45 ± 0.67	0.95 ± 0.21
	5	9.7 ± 0.7	527 ± 81	76.3 ± 12.4	56.3 ± 7.4	5.44 ± 0.84	0.79 ± 0.13
	25	7.9 ± 0.5	391 ± 29	60.3 ± 4.90	40.8 ± 2.5 *	4.96 ± 0.37	0.77 ± 0.06
Female (PNW11)	0	18.0 ± 0.4	860 ± 67	101.5 ± 18.4	42.3 ± 4.9	4.79 ± 0.37	0.57 ± 0.10
	1	18.3 ± 0.6	806 ± 33	96.5 ± 13.0	39.8 ± 6.4	4.39 ± 0.18 *	0.53 ± 0.07
	5	18.0 ± 0.4	847 ± 43	92.3 ± 4.8	40.0 ± 5.5	4.70 ± 0.24	0.51 ± 0.03
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Male (PNW11)	0	22.5 ± 1.0	1158 ± 129	86.5 ± 1.7	28.3 ± 5.4	5.15 ± 0.57	0.38 ± 0.01
	1	22.8 ± 0.6	1123 ± 70	89.0 ± 5.6	26.8 ± 2.9	4.93 ± 0.31	0.39 ± 0.02
	5	22.8 ± 0.3	1110 ± 83	84.3 ± 7.5	27.0 ± 5.9	4.87 ± 0.36	0.37 ± 0.03
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Pregnant BALB/c mice (and their offspring) were exposed to MMP (0, 1, 5, and 25ppm) in drinking water from gestational day 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased by weaning. At PNW3 and PNW11, mice were sacrificed to determine effects of the compounds on body and organ weights. Values are mean ± SD (n = 4, or 1 in a). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Dunnett's test).

**Table 3. Effect of MMP on hemocytological parameters of dams and offspring.**

Methamidophos (ppm)	WBC (10 <sup>2</sup> /μL)	RBC (10 <sup>4</sup> /μL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 <sup>4</sup> /μL)	
Dam	0	44.5 ± 8.2	1004 ± 57	15.8 ± 1.0	53.8 ± 3.2	53.6 ± 0.4	15.8 ± 0.2	29.5 ± 0.5	174 ± 7
	1	43.5 ± 3.9	1056 ± 56	16.5 ± 0.8	56.2 ± 2.8	53.2 ± 0.3	15.6 ± 0.2	29.4 ± 0.3	180 ± 16
	5	36.8 ± 3.0	1066 ± 27	16.5 ± 0.4	56.6 ± 1.8	53.1 ± 0.3	15.5 ± 0.1 *	29.2 ± 0.3	173 ± 18
	25	56.0	992	15.2	51.8	52.2	15.3	29.3	168
Female (PNW3)	0	43.5 ± 13.5	765 ± 45	10.8 ± 0.7	40.0 ± 3.1	52.3 ± 1.9	14.1 ± 0.4	27.0 ± 0.3	115 ± 35
	1	66.0 ± 19.6	809 ± 30	11.5 ± 0.8	42.4 ± 1.9	52.4 ± 1.1	14.2 ± 0.5	27.1 ± 0.7	105 ± 18
	5	78.5 ± 32.0	869 ± 42 *	12.3 ± 0.8 *	46.0 ± 3.1 *	52.9 ± 1.2	14.1 ± 0.4	26.7 ± 0.2	110 ± 22
	25	35.5 ± 11.0	825 ± 50	11.3 ± 0.7	43.1 ± 3.0	52.3 ± 0.7	13.7 ± 0.1	26.2 ± 0.5	95 ± 11
Male (PNW3)	0	45.0 ± 11.2	831 ± 34	11.5 ± 0.5	42.9 ± 2.0	13.9 ± 0.4	14.4 ± 0.5	26.9 ± 0.2	123 ± 9
	1	59.5 ± 12.8	819 ± 36	11.4 ± 0.5	43.1 ± 2.0	13.9 ± 0.1	14.5 ± 0.6	26.3 ± 0.4	107 ± 17
	5	59.3 ± 29.0	810 ± 40	11.5 ± 0.6	42.7 ± 2.3	14.3 ± 0.4	13.8 ± 0.4	27.0 ± 0.7	103 ± 18
	25	41.5 ± 6.9	850 ± 51	11.7 ± 0.5	45.0 ± 2.2	13.8 ± 0.2	14.2 ± 0.9	26.0 ± 0.3 *	97 ± 15
Female (PNW11)	0	71.0 ± 21.4	1013 ± 44	15.6 ± 0.3	53.7 ± 1.1	53.0 ± 1.3	15.5 ± 0.4	29.1 ± 0.4	103 ± 25
	1	60.0 ± 21.3	1042 ± 31	15.7 ± 0.4	54.2 ± 1.3	52.1 ± 0.5	15.0 ± 0.1	28.9 ± 0.1	121 ± 12
	5	51.8 ± 8.6	1048 ± 22	15.8 ± 0.2	55.0 ± 1.2	52.5 ± 0.2	15.1 ± 0.2	28.8 ± 0.4	119 ± 13
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Male (PNW11)	0	81.5 ± 25.3	1077 ± 49	16.2 ± 0.7	55.8 ± 1.9	52.1 ± 0.2	15.1 ± 0.1	29.0 ± 0.1	130 ± 10
	1	67.3 ± 25.8	1018 ± 5 *	15.4 ± 0.2 *	53.2 ± 0.3 *	52.2 ± 0.3	15.1 ± 0.2	28.9 ± 0.4	128 ± 10
	5	56.0 ± 15.7	1020 ± 13 *	15.3 ± 0.3 *	53.1 ± 0.7 *	52.1 ± 0.1	15.0 ± 0.1	28.8 ± 0.2	117 ± 3
	25	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

Pregnant BALB/c mice (and their offspring) were exposed to MMP (0, 1, 5, and 25ppm) in drinking water from gestational day 10 to postnatal week (PNW) 3. Exposure was ceased by weaning. At PNW3 and PNW11, mice were sacrificed to determine the effects of the compounds on hemocytological parameters. Values are mean ± SD (n = 4, or 1 in a). \*p<0.05, \*\*p<0.01 (Dunnett's test).