

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21年度～23年度 総合研究報告書

研究代表者 渋谷 淳

平成24（2012）年 5月

目 次

I.	総合研究報告書	
	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	
	(資料) 図 1- 7 6	
	表 1- 7 2	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表	_____ 25
III.	研究成果の刊行物・別刷	_____ 28

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  
総合研究報告書（平成 21-23 年度）

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対象とした評価を行い、ラットのクロロピリフォス(CPF) 評価では顆粒細胞前期前駆細胞の傷害性、マウスでの CPF 評価、ラットでのアクリルアミド(ACR) とニコチン (NIC) の評価、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。一方、発達期低栄養による脳発達遅延はニューロン新生に影響を与えないことが明らかとなり、母動物の全身毒性に影響を受けない評価系であることが判明した。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、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、MnCl<sub>2</sub> は Iba 1 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を認めたが、NIC では神経細胞ならびにグリア細胞の形態に変化は認めないことを見出した。次いで、ES 細胞を用いて MnCl<sub>2</sub>、NIC 暴露の神経発生へ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た。一連の評価により神経分化の際の運命決定に与える影響の検出を可能とした評価系を確立した。

免疫機能評価では、マウスを用いた発達期免疫影響評価系の確立を検討し、CPF の評価により、脾臓での CD4 陽性 T 細胞の暴露終了時から成熟後に持続する増加を見出した。そのサブセット 4 種 (Th1, Th2, Th17, Treg) の存在比率の検索により、特に Treg の増加を認め、その標的検出性は高いと判断された。メタミドフォス(MMP)の評価では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、MMP、CPF を用いてマウス RS ウイルス感染影響評価系の確立を検討し、MMP では感染初期肺組織でのマイクロアレイ解析を実施した。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<sub>2</sub> 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 経胎盤モデルを用いて発達期暴露中枢神経系発がん評価系の確立を検討した。ENU の経胎盤投与により雌雄で安定した中枢神経腫瘍誘発性を確認したが、Mn と NIC を検討した結果、いずれも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。ENU で同時に誘発される末梢神経腫瘍及び非神経腫瘍も評価できることを確認した。

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。In vivo 神経発達評価では、発達期の神経毒性に関して、ラットやマウス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った。モデルとなる神経発達毒として、マンガン (Mn)、クロロピリフォス (CPF)、ニコチン (NIC)、アクリルアミド (ACR) を用い、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した。また、化学物質暴露時にみ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ことを目的として、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した。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した。

In vitro 神経発達評価では、MnCl<sub>2</sub> と NIC を用いて、各種培養細胞系を駆使し、化学物質の中枢神経発生段階に及ぼす影響ならびに神経細胞あるいはグリア細胞に対する直接的な影響について検討を行った。更に、ES 細胞を用いた評価系確立を目的に、MnCl<sub>2</sub> ないし NIC 暴露の神経発生への影響についても検討を行った。

免疫機能評価では、幼児期のマウスを用いて、有機リン系農薬である CPF 及びメタミドフォス (MMP) の暴露を行い、一次リンパ器官である胸腺、及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した。細胞表面マーカー CD4 陽性 T 細胞は適応免疫の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。発達期免疫機能評価として、発達期暴露終了時でのマウスの血液学的検査、胸腺及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、回復性の検討を行った。更に最終年度は、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 陽性細胞及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に対する抗体応答(T cell-dependent antibody response, TDAR) をみるために、KLH(keyhole limpet hemocyanin)に対する抗体産生能を評価した。

感染感受性評価では、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系、特に感染感受性を指標にした評価系の確立を目的としている。化学物質として免疫機能評価と同様にMMP、CPFを対象として、乳幼児ウイルス感染症モデルであるRespiratory syncytial ウイルス (RS ウイルス) 感染マウス実験モデルを用いて感染病態・免疫応答へ影響をウイルス学的及び生化学的に検討した。

発がん感受性評価では、ENUの経胎盤投与によるラット中枢神経発がんモデルを用いて、出生直後より神経標的性を持つ物質を中心として暴露しその発がん修飾作用を検討している。今回、発達期に被験物質投与が可能なラット中枢神経系発がんモデルを用いて遺伝毒性と脳の奇形の報告のあるMn及び諸臓器に発がん促進作用の知られているNICを最高0.05%濃度でそれぞれ混餌及び飲水投与した際の発がん修飾作用を検討した。

## B. 研究方法

### In vivo 神経発達評価

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低栄養動物モデルとして、低蛋白質食を妊娠10日から離乳時(生後21日)まで母動物に摂取させることにより、発達遅延の児動物を作製し、離乳時(生後21日)と生後77日に解剖を行った。使用動物は妊娠SD:IGSラットとし、低カゼイン(10%)飼料(低蛋白食群)又は正常カゼイン(20%)飼料(正常蛋白食群)を各群8匹の母動物に自由に摂取させた(Fig. 1)。離乳時には、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日の解剖時には、脳及び肝臓の臓器重量を測定し、脳はブアン固定を行った。77日には、脳及び肝臓に加え、更に、腎臓、精巣及び卵巣の臓器重量を測定し、脳は同様にブアン固定を行った。

生後21及び77日の脳を用いて、大脳のBregmaの後方約-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、抗マウスReelin抗体(x1000倍、Novus Biologicals, Inc., Co.)、抗マウスNeuN抗体(x100倍、IgG、Clone A60、Millipore Corporation)、抗マウスCalbindin-D-28K抗体(Calb-D-28K、x500倍、IgG、Sigma Chemical Co.)、抗マウスGAD67抗体(glutamic acid decarboxylase 67、x50倍、IgG、Millipore Corporation)、抗ウサギForkhead Box G1抗体(Foxg1、x800倍、IgG、LifeSpan Bioscience, Inc.)、抗マウスproliferating cell nuclear antigen抗体(PCNA、x200倍、

IgG、Dako)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。増殖細胞の指標であるPCNA陽性細胞数と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。また、顆粒細胞層下帯のニューロン新生に関与することが知られているGABA性介在ニューロンにおいて発現する分子のReelin、Calb-D-28K、GAD67及びFoxg1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。

<Mn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、ドパミンニューロン傷害性物質のMnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O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)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日に解剖を行った。動物はラットとマウスを用いて検討した。

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)各群8匹使用し、予備試験結果を基に公比5で32、160、800 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(Experiment 1, 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日及び生後77日の解剖時には、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日並びに生後77日の児動物の小脳を用いて、組織中のMn濃度をICP-MS(Hewlett-Packard Co.)により測定した。生後21日及び生後77日の脳を用いて、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、抗マウスReelin抗体(x1000倍)、抗マウスGAD67抗体(x50倍)、抗マウスNeuN抗体(x100倍)、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)、抗ウサギTbr2抗体(T box brain 2、x200倍、IgG、Abcam)、抗ウサギIba1抗体(ionized calcium-binding adaptor molecule 1、x300倍、Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、抗マウスCox2抗体(cyclooxygenase-2、IgG1、1:200、BD Biosciences)、抗マウスPCNA抗体(x200倍)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海馬歯状回の顆粒細胞層下帯において検索を行った。一方、GABA 性介在ニューロンの指標である Reelin 及び GAD67、成熟ニューロンの指標である NeuN、アストロサイトの指標である GFAP 並びにミクログリアの指標である Iba1、Cox2、ED1 及び MT 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。生後 21 日の児動物の海馬を用いて、*IL-1 $\alpha$* 、*IL-1 $\beta$* 、*IL-6*、*NOS2*、*TNF- $\alpha$* 、*COX2*、*DCX*、*NeuroD1*、*Pax6*、*Dpysl3*、*Reelin*、*VLDLR*、*ApoER2* 及び *Dab1* の mRNA の発現レベルを real-time RT-PCR 解析により行った (ABI Prism 7000, Applied Biosystems Japan Ltd.)。更に、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  の発達期暴露による甲状腺関連ホルモンへの影響を検討するため、妊娠 SD:IGS ラット (日本チャールズリバー、各群 6 匹) に 0、800、1600 ppm の用量で同様に暴露実験を行い (Experiment 2, Fig. 2)、暴露終了時の母動物及び生後 21 日並びに生後 77 日の児動物について、血清中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.) を用いて測定した。

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、ラットと同じく  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  の 32、160、800 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 日及び 77 日の解剖時には、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 日並びに 77 日児動物の小脳を用いて、組織中の Mn 濃度を ICP-MS により測定した。生後 21 日の児動物の 0 及び 800 ppm については TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE を用いて測定した。生後 21 日及び 77 日の脳を用いて、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、 $3 \mu m$  厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍)、抗マウス NeuN 抗体 (x1000 倍)、抗マウス GAD67 抗体 (x50 倍)、抗ウサギ Tbr2 抗体 (x200 倍)、抗マウス Pax6 抗体 (x500 倍、IgG、Abcam)、抗マウス NeuroD1 抗体 (x500 倍、IgG、Abcam)、抗ウサギ TUC4 抗体 (x1000 倍、Millipore Corporation)、抗ウサギ MID1 抗体 (Midline1、x150 倍、IgG、Abcam)、抗マウス Parvalbumin 抗体 (x1000 倍、IgG、Millipore Corporation)、抗マウス PCNA 抗体 (x200 倍) 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、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍) 及び抗マウス NeuN 抗体 (x1000 倍) を用いて、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。更に、アポトーシスの評価のために TUNEL 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 GAD67、成熟ニューロンの指標である NeuN、並びに後述するゲノムの網羅的メチレーション解析で見出された MID1 及び Parvalbumin 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 Pax6、Tbr2、NeuroD1 及び TUC4、増殖細胞指標の PCNA 並びに TUNEL 染色によるアポトーシス細胞については、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。生後 21 日の児動物の 0 及び 800 ppm の海馬を用いて real-time RT-PCR 解析により Reelin、ApoER2、VLDLR、GAD67、Pax6、Tbr2 及び TUC4 の mRNA の発現レベルを検討した。ゲノムのメチレーション解析では、CpG アイランド (CGI) マイクロアレイによる網羅的な解析を行い、検出された 29 の過メチル化遺伝子のうち、7 遺伝子 (Pvalb、Actl6b、Hoxc8、Mid1、Atpla3、Cggbp1 及び Nr2f1) を選択し、メチレーション特異的 qPCR 解析により過メチル化の確認を行った。更に、これらの遺伝子について real-time RT-PCR 解析により mRNA の発現レベルを検討した。免疫染色による発現解析が可能な MID1 及び Parvalbumin に関しては海馬歯状回における陽性細胞の分布解析を行った。MID1 については、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も検索を実施した。

#### <CPF 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) 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 日に解剖を行った。動物はラットとマウスを用いて検討した。

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. 4)。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 日及び生後 77 日の解剖時には、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 日並びに生後 77 日児動物の血漿、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 を用いて測定した。

生後 21 日及び 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、 $3 \mu m$  厚の連続切片を作製した。切片は、抗マウス PCNA 抗体 (x200 倍)、抗ウサギ

Tbr2 抗体 (x500 倍)、抗マウス GFAP 抗体 (x200 倍)、抗ウサギ DCX 抗体 (x100 倍)、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍) 及び抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍) 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、増殖細胞指標の 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. 5)。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 日及び生後 77 日の解剖時には、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 日並びに生後 77 日児動物の血漿、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 日及び生後 77 日の脳を用いて、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  $\mu$ 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。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。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。

#### <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) 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. 6)。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 日及び生後 77 日の解剖時には、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 日及び 77 日の血清中の TSH、T3 及び T4 を IMMULYZE を用いて測定した。生後 21 日及び生後 77 日の脳を用いて、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  $\mu$ 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 (x50 倍)、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 NACHR $\alpha$ 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 $\alpha$ 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。

#### <ACR を用いた発達期暴露影響評価>

予備実験として、妊娠 6 日の雌性 SD:IGS ラットを、各群 4 匹ずつ 4 群に分け、ACR 0、25、50、100 ppm を離乳まで飲水投与した。ACR の飲水投与用量は、母動物に神経障害 (中枢及び末梢の軸索遠位端障害) が確認された 100 ppm を最高用量として設定した (Takahashi et al., J Toxicol Sci. 2008; 33: 11-24)。また、2 匹は無処置のまま出産させ、生後 2 日から

離乳までの間、新生児に ACR 50 mg/kg/day を週 3 回 (全 9 回) 腹腔内投与した (Fig. 7)。

児動物は生後 2 日に出生児数、体重の測定及び性別の判定を行い、生後 3 日に母動物 1 匹あたり雌雄各 4 匹となるように同腹匹数を調整した。生後 21 日の離乳時に、母動物とともに全例を解剖した。実験期間中は定期的に体重、摂餌量及び摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、1=normal gait、2=slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)、3=moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)、4=severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) としてスコア化した。

離乳時の海馬歯状回における免疫染色として、Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA を行った。また、アポトーシスの評価として、Cresyl Violet 染色によって染色されるアポトーシス小体数の計測を行った。

ACR による歯状回ニューロン新生に対する影響の不可逆性とその標的細胞を検討するために、ACR を飲水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・経乳的に児動物に暴露し、暴露終了時 (生後 21 日) と生後 77 日に解剖を行った (Experiment 1, Fig. 8)。更に、ACR の直接的な暴露による影響との比較・検討を行うために、生後 4 日から 21 日まで 3 回/週、ACR を新生児に腹腔内投与し、離乳時 (生後 21 日) と生後 77 日に解剖を行った (Experiment 2, Fig. 8)。

飲水投与による経胎盤・経乳的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット (日本エスエルシー) 各群 6 匹使用し、これまでの実験結果 (Takahashi M et al., Arch Toxicol., 2009, 83:785-793) を基に公比 5 として、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。一方、腹腔内投与による直接的暴露では、妊娠 Slc:SD ラット (日本エスエルシー) 16 匹 (各群 8 匹) を無処置のまま出産させ、生後 4 日から離乳時 (生後 21 日) までの間、新生児に ACR 50 mg/kg BW を週 3 回腹腔内投与した。同様に生理食塩液を腹腔内投与する対照群を設け、2 群構成とした。児動物は生後 2 日に出生児数、体重の測定及び性別の判定を行い、生後 4 日に母動物 1 匹あたり雄 8 匹 (雄が不足する場合は雌を充当) となるように一腹児数を調整した。実験期間中は定期的に体重、摂餌量及び摂水量を測定し、臨床症状の観察を行った。神経症状については、各個体について姿勢などを観察し、1=normal gait、2=slightly abnormal gait (slight ataxia, hopping gait, foot splay)、3=moderately abnormal gait (obvious ataxia, foot splay, limb abduction)、4=severely abnormal gait (inability to support body weight and foot splay) としてスコア化した。生後 21 日の離乳時に全母動物及び 3-4/母動物の雄児動物を解剖し、脳を摘出して免疫組織化学検査及び real-time RT-PCR 解析 (児動物のみ) に供した。生後 77 日には残りの雄児動物を解剖し、脳を摘

出して免疫組織化学検査に供した。摘出した脳は大脳の Bregma の後方 -3.1 mm 及び -3.6 mm の 1 カ所所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、5  $\mu$ m 厚の連続切片を作製した。尚、生後 4 日に除外した雌の児動物 (9-10 例/群) についても切片を作製した切片は、抗マウス PCNA 抗体 (x200 倍)、抗ウサギ TUC4 抗体 (x1000 倍)、抗ウサギ DCX 抗体 (x2000 倍)、抗マウス NeuroD1 抗体 (x300 倍)、抗ウサギ Tbr2 抗体 (x500 倍)、抗マウス Pax6 抗体 (x500 倍)、抗マウス Reelin 抗体 (x1000 倍)、抗マウス NeuN 抗体 (x100 倍) 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 Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色を行った。Reelin 及び 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。新生ニューロン分化指標 TUC4、DCX、Tbr2、NeuroD1 及び Pax6 陽性細胞数、増殖細胞指標の PCNA 陽性細胞数並びに Cresyl Violet 染色及び TUNEL 染色によるアポトーシス細胞数については、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。尚、一部の抗体については各個体 3 切片 (約 250  $\mu$ m 間隔) を用いて評価した (Table 1 参照)。生後 21 日の児動物の海馬を用いて、*Reelin*、*Lyp8*、*Vldlr*、*Dab1*、*Pax6*、*NeuroD1*、*Dcx*、*Dpysl3*、*Pcna*、*Dnmt1*、*Hdac1*、*Hdac2* 及び *Hdac8* 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

全ての実験には ICR 系雄性マウスを使用した。

大脳皮質由来神経-アストロサイト共培養細胞は、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、papain 酵素処理を行った後、1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて作製し、1 週間ほど培養し、実験を行った。

大脳皮質由来初代培養アストロサイトは、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、trypsin 酵素処理を行った後、1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて作製し、1 週間ほど培養した。継代後、再播種し、数日間培養後、実験に用いた。

大脳皮質由来初代培養ミクログリアは、1 日齢のマウスより大脳皮質領域を摘出し、trypsin 酵素処理を行った後、1000xg で遠心分離を行い、得られた沈査を分散させて作製し、2 週間ほど培養した。常温で数分震盪することでミクログリアを選別し、再播種後、数日間培養し、実験に用いた。

神経幹細胞の培養は、胎生 14 日齢マウス全脳より神経幹細胞を採取し、無血清培地、上皮増殖因子 (EGF) 存在下、浮遊状態で一週間培養した後、実験に用いた。

ES 細胞はマウス由来 EB3-1 を使用した。ES 細胞は血清培地、白血病阻害因子 (LIF) 存在下で数日間培



養し、LIFを除去することにより、胚葉体形成を行った。継代後、線維芽細胞増殖因子(FGF)存在下N2B27培地にて培養することにより、神経幹細胞への誘導を行った。

これらの細胞に、 $MnCl_2$  ないし NIC 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、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 日目の BALB/c マウス (9~11 週齢) を日本エスエルシーより購入し、CPF の場合は、GD10 から粉末 CRF-1 への混餌投与にて CPF の暴露を開始した (1 群 12 匹)。検体濃度は、0, 2.8, 14, 70 ppm とした。MMP の場合は、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、飲水量及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、MMP 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：出産後 3 週目の時点で雌雄 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、組織切片を作成後、病理組織学的に解析した。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  $\mu$ 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)、平均赤血球色素量

(MCV)、平均赤血球色素濃度 (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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

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  $4 \times 10^6$  cells/1ml/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 固定バッファーにて室温で 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 $\gamma$ -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 $\kappa$  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。

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砕して口径 40  $\mu$ m のメッシュに通したものを  $2 \times 10^8$  個を用い、脾臓細胞は 2 匹分を同様に破砕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 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 0.1mg/1ml 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 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 0ppm 群に対する 25ppm 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  $MnCl_2$  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) からそれぞれ CPF (14, 70 ppm) と  $MnCl_2$  (32 ~ 800 ppm) は CRF-1 粉末餌で混餌により、MMP (0.1 ~ 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  $2 \times 10^6$  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 5 日後に眼窩採血を実施し、常法により血清を調製した。血清は使用時まで  $-30^{\circ}C$  に保存した。採血後の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  $-80^{\circ}C$  に保管した。その後肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

RS ウイルス感染価の測定：プラーク法により感染価を測定した。 $-80^{\circ}C$  で凍結保存しておいた肺組織を冷乳鉢中でホモジナイズした。ホモジネートの遠心上清 (1800 g,  $4^{\circ}C$ , 15 分間) を維持培地で連続希釈し、24 穴マルチプレート中で予め単層培養しておいた HEP-2 細胞にそれぞれ各穴 0.2 mL ずつ添加した。これらのプレートを 5%  $CO_2$  存在下、 $37^{\circ}C$  で 1 時間インキュベート後、各穴を 1.0 mL ずつ維持培地で洗浄し、続いて 0.8% メチルセルロース含有維持培地を添加して同様に 4 日間培養した。培養終了後、2.5% ホルマリン溶液を添加・処理し、続いてクリスタルバイオレット染色後に、ウイルス由来のプラーク数をカウントして感染価 (PFU/mL) を算出した。

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 Readyset-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。

肺の病理組織学的な検討：BALF 取得を行わな

った児動物より肺を摘出し、中性ホルマリンで固定した。その後、(株)札幌総合病理研究所に送付し、切片標本の作製ならびに病理学的な鑑定を委託した。

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 (0.1mg/mL) を行った際は、24 時間培養を実施した。

#### 発がん感受性評価

< Mn の中枢神経発がん修飾作用 >

Mn の乳汁移行を検討するため分娩直後の 3 匹の F344 雌ラットに塩化マンガン 4 水和物 ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) 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。

Mn の中枢神経発がん修飾作用の検討において、妊娠 17 日目の F344 雌ラットを各群 6 匹の 4 群に分け、ENU (20 mg/kg 体重) を 1 回尾静脈内投与し、分娩直後より離乳時まで、塩化マンガン 4 水和物 ( $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ) を 0.002、0.01 及び 0.05% 濃度で混餌投与した。離乳後、各々の仔動物に母動物と同様の混餌投与を 34 週齢まで行った。この間基礎飼料のみを与えた群を対照とした。投与期間中、毎日神経症状の有無など一般状態を観察し、週 1 回体重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 標本を作製した。腫瘍性病変の種類、発生部位、サイズの測定を行った。発生した腫瘍性病変に関して病理組織学的に評価した。

< NIC の中枢神経発がん修飾作用 >

上記と同様にイニシエーションを行い、母動物に酒石酸ニコチン二水和物を 0.002、0.01 及び 0.05% 濃度で 2% サッカリン水に混ぜ、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 週間後から 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。一般状態観察、体重、飲水量測定及び病理組織学的評価は上記と同様に実施した。

(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プ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

<低栄養による脳発達遅延での脳発達影響指標の変動解析>

低蛋白質食群の母動物については、体重は分娩後11日から21日、摂餌量 (g/animal/day) は分娩後4日から21日に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 2、3)。

低蛋白質食群の児動物については、体重は雌雄とも生後0日から77日までの実験期間を通じて正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 4)。低蛋白質食群の児動物の摂餌量 (g/animal/day) は雄で生後35から77日、雌で出生後56から77日に正常蛋白質食群を有意に下回って推移した (Table 5)。低蛋白質食群の児動物の臓器重量は、生後21日の解剖時では、雌雄の脳及び肝臓の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雌雄の脳及び雄の肝臓の相対重量は正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した。生後77日の解剖時では、雌雄の腎臓及び雄の肝臓並びに精巣の絶対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示し、雄の脳の相対重量が正常蛋白質食群に比べ有意な高値を示した (Table 6)。

海馬歯状回門における GABA 性介在ニューロン発現分子の Reelin、Calb-D-28K 及び GAD67、ニューロン新生関連転写因子 Foxg1 並びに成熟ニューロン指標 NeuN の陽性細胞数の検索では、生後21及び77日のいずれにおいても低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった (Table 7、8)。

海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における、増殖細胞指標 PCNA 及び TUNEL 陽性アポトーシス細胞の検索においても、生後21及び77日のいずれも低蛋白質食群と正常蛋白質食群との間に差はみられなかった (Table 9)。

脳の病理組織学的検索では、生後21日において、小脳外顆粒細胞層の残存の程度が、低蛋白質食群の児動物において、正常蛋白質食群に比べ有意な低値を示した (Table 10)。

<Mn を用いた発達期暴露影響評価>

ラット：

各濃度の Mn 投与群の母動物の体重は妊娠10日から分娩後21日までの投与期間を通じて、対照群との

間に差はみられなかった (Table 11)。摂餌量

(g/animal/day) は分娩後11日に160、800 ppm で有意差がみられたものの、妊娠10日から分娩後21日までの投与期間を通じて、対照群とほぼ同様に推移した (Table 12)。

各濃度の Mn 投与群の児動物の体重及び摂餌量 (g/animal/day) は、雌雄とも生後0から77日までの実験期間を通じて、対照群との間に差はみられなかった (Table 13、14)。各濃度の Mn 投与群の児動物の臓器重量は、生後21及び77日のいずれの解剖時においても、対照群との間に差はみられなかった (Table 15)。

暴露終了時の母動物の小脳組織中 Mn 濃度では、各投与群と対照群との間に差はみられなかった。生後21日の児動物の小脳組織中 Mn 濃度は、対照群に比べ、32 ppm で高値傾向が、160 及び 800 ppm で有意な高値がみられた。しかし、生後77日の児動物の小脳組織中 Mn 濃度では、各投与群と対照群との間に差はみられなかった (Table 16)。

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増加が生後21日の800 ppm に見られたが、生後77日では差は見られなかった。Tbr2 及び GFAP 陽性細胞数は、離乳時、生後77日共に変化は見られなかった (Table 17)。海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、TUNEL 陽性細胞数及び PCNA 陽性細胞数に変化は見られなかった (Table 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、Reelin 陽性細胞数は離乳時に800 ppm で有意な増加を示したが、生後77日では差は見られなかった。GAD67 及び NeuN 陽性細胞数は、離乳時、生後77日共に変化は見られなかった (Table 19)。

海馬歯状回門でのミクログリアの検索では、Iba1 陽性細胞数の有意な増加及び Cox2 陽性細胞数の有意な増加あるいは増加傾向が32 ppm 以上で見られたが、生後77日では差は見られなかった (Table 19)。

生後21日の児動物の海馬の real-time RT-PCR 解析では、*IL-1 $\alpha$* 、*IL-6*、*NOS2*、*TNF- $\alpha$*  の mRNA の発現レベルの有意な増加が800 ppm に見られた (Table 20)。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物では変動は見られなかったが、児動物では暴露終了時 (生後21日) に800 及び1600 ppm で T3 及び T4 の有意な減少が見られ、800 ppm では TSH の有意な増加も認められた。生後77日の児動物では対照群と差は見られなかった (Table 21)。

マウス：

母動物は、妊娠期間中には体重の変動を認めなかったが、分娩後8日以降に160 ppm 以上で、統計的に有意ではないものの体重の低値傾向を認めた (Fig. 9)。摂餌量に関しては、妊娠15日、分娩後8-21日までの間に800 ppm で有意な低値を認めた (Fig.

10)。

出生後の児動物に関しては、体重は雄で17日に800 ppmで、21日に160 ppm以上で低値を示したが、雌では21日でのみ800 ppmで有意な低値を認めた (Fig. 11)。暴露終了後は雄のみの観察となるが、49週の間は160 ppm以上で、10週目では800 ppmで有意な低値を示した (Fig. 12)。

臓器重量は、離乳時では、脳、肝臓、腎臓とも絶対重量の低値を示し、肝臓では、雄で32 ppm以上で、雌で800 ppmで有意に、腎臓では雄で160 ppm以上で、雌で800 ppmで低値を示した (Fig. 13)。

小脳のMn濃度は、母動物では群間に差を認めなかった。児動物は離乳時ではなだらかなスロープではあるが用量依存的の増加を示し、160 ppm以上で有意を示した (Fig. 14)。11週目では、スロープは更になだらかであるが、32 ppm以上で有意に増加した。

海馬歯状回門でのGABA性介在ニューロンの検索では、Reelin陽性細胞数が離乳時に160 ppm以上で用量依存的に増加し、生後77日では800 ppmで増加を示した (Fig. 15)。海馬歯状回でのNeuN陽性細胞数は、離乳時、11週目共に800 ppmで有意に増加を示した (Fig. 16)。離乳時に検討したGAD67陽性細胞数は800 ppm群で増加を示した (Fig. 17)。Reelin及びNeuNの二重染色では、Reelin陽性/NeuN弱陽性～陰性細胞及びReelin陰性/NeuN陽性細胞の増加が離乳時及び生後77日の800 ppmに見られた (Fig. 18)。

海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における細胞増殖及びアポトーシスの検索では、TUNEL染色によるアポトーシス細胞数は800 ppm群で有意に増加したが、PCNA陽性細胞数は変動を示さなかった (Fig. 19)。

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、800 ppmにおいてTUC4陽性細胞数の有意な減少が生後21日に見られたが、生後77日では逆に有意な増加を示した。Pax6、Tbr2及びNeuroD1陽性細胞数は、離乳時、生後77日共に変化は見られなかった (Fig. 20、21)。

海馬歯状回門に観察されたGFAP陽性細胞は細胞質に乏しい小型の細胞で、その数は160 ppm以上で増加し、800 ppmで増加は有意であった (Fig. 22)。

生後21日の児動物の海馬におけるreal-time RT-PCR解析では、Reelin、ApoER2及びGAD67のmRNAの発現レベルの有意な増加並びにTUC4のmRNAの発現レベルの有意な減少が800 ppmで見られた (Table 22)。

ゲノムのメチレーション解析では、CGIアレイによる解析の結果、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29遺伝子検出された。このうち7遺伝子 (Table 23) 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 (Fig. 22)。また、この7遺伝子についてreal-time RT-PCR解析によりmRNAの発現レベ

ルを検討した結果、Pvalb、Mid1、Atpla3及びNr2f1のmRNAの発現レベルの有意な減少が認められた (Fig. 23)。更に、このうち0 ppmと800 ppm Mn暴露児動物を用いてParvalbumin及びMID1について行った免疫染色の結果では、海馬歯状回門におけるParvalbumin陽性介在ニューロン細胞数の有意な減少が生後21日の800 ppmに、MID1陽性顆粒細胞数の有意な減少が生後21及び77日の800 ppmに見られた (Fig. 24、25)。MID1陽性細胞の分布の左右の対称性について検索を行った結果、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日のいずれにも認められた (Fig. 26)。

甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppmで弱いながらもT4の有意な減少が見られた (Table 24)。<CPFを用いた発達期暴露影響評価>ラット：

母動物の体重は分娩後11日に一過性の有意な高値が全ての投与群に認められた (Table 25)。摂餌量 (g/animal/day) では、妊娠14日及び20日に14 ppmのみにおいて、妊娠17日は14 ppm及び70 ppmにおいて有意な高値が認められた (Table 26)。

児動物の体重では、14 ppmのみにおいて雄で生後7から21日、雌で生後4～17日に有意な高値が見られた (Table 27)。摂餌量 (g/animal/day) では変化は見られなかった (Table 28)。児動物の臓器重量は、生後21日では肝臓の相対重量の有意な低値が70 ppmの雌雄に、卵巣の絶対及び相対重量の有意な低値が70 ppmの雌に見られた。他に腎臓の相対重量の有意な低値が2.8 ppmの雄に見られたが、用量に応じた変化ではなかった。生後77日では脳の相対重量の有意な低値及び腎臓の絶対重量の有意な高値が70 ppmの雌に見られた (Table 29)。

ChE活性の測定では、暴露終了時の母動物では血漿及び赤血球中ChE活性の有意な低値が2.8 ppm以上に、脳内ChE活性の有意な低値が70 ppmに見られた。生後21日の児動物では血漿中ChE活性の有意な低値が14 ppm以上に、赤血球中及び脳内ChE活性の有意な低値が70 ppmに見られた。生後77日の児動物では変化は見られなかった (Table 30)。

甲状腺関連ホルモン測定では、母動物の14 ppmでT3の有意な増加が見られた他は、変化は見られなかった (Table 31)。

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、Tbr2陽性細胞数の有意な減少が生後21日の70 ppmに見られたが、生後77日では差は見られなかった。DCX及びGFAP陽性細胞数は、離乳時、生後77日共に変化は見られなかった (Table 32)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、PCNA陽性細胞数の有意な減少が生後21日の70 ppmに見られたが、生後77日

では差は見られなかった。TUNEL 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日共に変化は見られなかった (Table 33)。

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、Reelin 及び NeuN 陽性細胞数は、離乳時、生後 77 日共に変化は見られなかった (Table 34)。

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 日の 100 ppm に、摂餌量の一過性の有意な低値が分娩後 19 日の全ての投与群に認められた (Fig. 27)。

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 日にみられ、20 ppm では生後 21 日と 28 日、100 ppm では生後 28 日にもみられた。尚、雌に変化はみられなかった (Fig. 28)。

児動物の臓器重量では、生後 21 日の 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 日では変化はみられなかった (Table 35)。

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 36)。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後 21 日の 4 ppm で T<sub>3</sub> 及び T<sub>4</sub> の有意な低値、生後 77 日の 100 ppm で T<sub>4</sub> の有意な高値がみられた (Table 37)。

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. 29)。生後 77 日では 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. 30)。

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. 31)。

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 日のいずれでも変化は見られなかった (Fig. 32)。

<NIC を用いた発達期暴露影響評価>

ラット：

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. 33)。

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. 34)。

児動物の脳重量は、50 ppm の雌雄において生後 21 日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 日では絶対重量の有意な低値がみられた (Table 38)。

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 39)。

甲状腺関連ホルモン測定では、生後 77 日の 2 ppm 以上の投与群で T<sub>4</sub> の有意な高値と 10 ppm で T<sub>3</sub> 有意な高値がみられた (Fig. 35)。

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. 36)。こ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. 37)。

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 日のいずれでも変化はみられなかった (Fig. 38)。

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 日のいずれでも変化はみられなかった (Fig. 39)。

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. 39)。

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 NACHRa7 の発現状況を二重染色により検索したが、NACHRa7+/NeuN-細胞数に変化はみられなかった (Fig. 40)。

real-time RT-PCR 解析による生後 21 日の児動物の海馬の *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 40)。

### <ACR を用いた発達期暴露影響評価> ラット:

予備実験では、母動物は、50 ppm 群以上で歩行異常が進行した。生殖発生毒性影響については群間で明らかな差を認めなかった。児動物は、飲水投与群では臨床症状の異常を認めなかったが、腹腔内投与を受けた児動物では、生後 15 日頃から成熟動物と類似した歩行異常が観察された。病理組織学的検索で、飲水投与群の児動物では、100 ppm 群で小脳外顆粒層細胞の残存と精上皮の発達遅延が認められたのみで、神経障害を示唆する所見は得られなかった。一方、腹腔内投与を受けた児動物では、小脳外顆粒層細胞の残存に加えて三叉神経の中心性色質融解が観察された。軸索遠位端障害に関しては、飲水投与群の児動物では、0 ppm 群と 100 ppm 群の間で、いずれのパラメーターも有意な差は認められなかった。腹腔内投与児動物では、雌雄ともに坐骨神経における変性軸索及び萎縮した有髄神経線維の増加が認められた。しかし、小脳分子層における synaptophysin 陽性の異常な点状染色像の増加は明らかではなかった。HPLC による血漿中の ACR の測定では、母動物、児動物ともに、いずれの用量群においても ACR は検出されなかった (検出限界: 1 µg/ml)。同様に、100 ppm 群の児動物の胃内乳汁からも ACR は検出されなかった。GC/MS による血球中の ACR-Hb 付加体量は、母動物では ACR の投与用量に応じて増加傾向を示し、個体ごとの ACR 摂取量と高い相関性を示した。児動物においても用量に応じた増加傾向を示したが、その量は母動物の 1/10 以下であった。

今回新たに検索した項目では、離乳時の海馬歯状回門における Reelin, GAD67, Calb-D-28K, PCNA の免疫染色を行った結果、各群内における数値の雌雄間での明らかな差を認めなかったため、雌雄を併せて群間の比較を行った (Fig. 41, 42, Table 41)。その結果、ACR を投与した全群で Reelin 陽性細胞が増加を示したが、50 ppm と 100 ppm 群の間で増加数に明らかな差を認めなかった。腹腔内投与群でも、Reelin 陽性細胞は増加を示した。GAD67 陽性細胞は Reelin と同様の増加を示し、統計的有意差は 50 ppm 以上で認められた。腹腔内投与群でも、Reelin と共に GAD67 陽性細胞は増加を示した。海馬歯状回顆粒細胞層下帯における PCNA 陽性細胞数は群間で明らかな差を認めなかった。一方、アポトーシス小体の出現は少なかったものの、対照群に対して 100 ppm ACR 群と腹腔内投与群で有意な低値を示した。

不可逆性を検討する実験では、母動物は分娩後 21 日の体重及び肝臓重量において低値傾向及び有意な低値が 100 ppm に見られたが、実験期間中の歩行異常及び生殖発生毒性影響は見られず、摂餌量及び摂水量も対照群とほぼ同様に推移した (Table 42)。

児動物は、飲水投与 (Experiment 1) では歩行異常を含む一般状態に異常は見られなかったが、100 ppm において生後 21 及び 77 日の体重及び脳の絶対

重量が有意な低値を示した。腹腔内投与 (Experiment 2) では、生後 15 日以降歩行異常のスコアに有意差が見られたが、生後 28 日には回復に転じ、生後 63 日にはその差は消失した (Fig. 43)。ACR 腹腔内投与群の生後 21 及び 77 日の体重及び脳の絶対重量は対照群を有意に下回った (Table 43)。

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、飲水投与において Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の増加傾向及び有意な増加が生後 21 日の 20 及び 100 ppm に見られた。生後 77 日では Reelin 陽性細胞数に差は見られなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が 20 及び 100 ppm に見られた (Table 44, Fig. 44)。腹腔内投与では、Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の有意な増加が ACR 投与群に見られ、生後 77 日では Reelin 陽性細胞数に差はなかったものの、NeuN 陽性細胞数の有意な増加が見られた (Table 44)。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシス及び細胞増殖の検索では、飲水投与において PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少及び Cresyl Violet 染色によるアポトーシス小体の減少傾向が生後 21 日の 20 ppm 以上に見られたが、生後 77 日では差は見られなかった (Table 45, Fig. 45)。尚、生後 21 日のアポトーシスについては、更に TUNEL 染色により確認を行ったが、ほぼ同様な結果であった (Table 46)。腹腔内投与では、PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の有意な減少が生後 21 日の ACR 投与群に見られたが、アポトーシスに差は見られず、生後 77 日ではいずれにおいても差は見られなかった (Table 45)。

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、飲水投与において DCX 及び Dpysl3 (TUC4) 陽性細胞数の有意な減少が生後 21 日の 100 ppm に見られたが (Table 47, Fig. 46)、生後 77 日では差は見られなかった (Table 48)。尚、生後 21 日の NeuroD1, Tbr2 及び Pax6 陽性細胞数に変化は見られなかった (Table 47, Fig. 46)。尚、生後 4 日の雌児動物について Reelin の免疫染色を、離乳時屠殺した母動物について Reelin 及び PCNA の免疫染色を行ったが、いずれも影響は認められなかった (Table 49, 50)。

海馬歯状回門の面積及び歯状回顆粒細胞層下帯の長さについて解析を行った結果、飲水投与において歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日の 100 ppm に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さには明らかな影響は見られなかった。生後 77 日ではいずれも差は見られなかった。腹腔内投与では、歯状回門面積の有意な減少が生後 21 日及び 77 日に見られたが、顆粒細胞層下帯の長さに影響は見られなかった (Table 51)。

生後 21 日の児動物の海馬における real-time RT-PCR 解析では、有意差が散見されるものの飲水投与及び腹腔内投与のいずれにおいても、対照群の 1.5 倍を超える mRNA の発現レベルを示す遺伝子は

なく、明らかな影響は見られなかった (Table 52)。

#### In vitro 神経発達評価

初代培養神経-アストロサイト共培養細胞に  $MnCl_2$  ないし NIC を処置しても(いずれも 100 nM-10  $\mu$  M)、 $\beta$  III-tubulin 陽性神経細胞に変化は認められなかった(Fig. 47)。GFAP 陽性アストロサイトに関して、形態変化は認めなかった(Fig. 48)。一方、GFAP の発現強度は、NIC には変化は認められなかったものの、 $MnCl_2$  で増強傾向が認められた(Fig. 49, 50)。また、初代培養マイクログリアへの  $MnCl_2$  処置 (100 nM-10  $\mu$  M) により、Iba1 陽性マイクログリアの活性化傾向が認められたが(Fig. 51)、NIC (100 nM-10  $\mu$  M) では活性化は認められなかった(Fig. 52)。さらに、胎生 14 日齢マウス由来神経幹細胞への  $MnCl_2$  (100 nM) 処置により、アストロサイトへの分化誘導促進が認められたが(Fig. 53)、NIC ではニューロン、アストロサイトないしオリゴデンドロサイトへの分化誘導に変化を認めなかった(Fig. 54)。

ES 細胞への  $MnCl_2$  ないし NIC を処置(10  $\mu$  M、100  $\mu$  M)することにより、ES 細胞自身の生存率ならびに増殖率について CellTiter-Glo ならびに CytoTox-Glo に従い検討を行ったところ、ES 細胞の生存ならびに増殖に変化は認められなかった(Fig. 55, 56)。また、胚葉体形成時に  $MnCl_2$  (100 nM) を処置し ES 細胞より誘導した神経幹細胞に形態変化は認められなかったが、Musashi 遺伝子の発現低下を認め(Fig. 57)、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. 58)。NIC に関しては、ES 細胞から神経幹細胞への誘導過程において、中枢神経系に発現の多いニコチン性アセチルコリン受容体のサブタイプである  $\alpha 4\beta 2$  の発現を検討したところ、神経系細胞への誘導が進むにつれ、発現の増加が認められた。こうした条件下、ES 細胞から胚葉体形成時に NIC (100 nM) を処置し、神経幹細胞への誘導を行ったところ、ES 細胞より誘導した神経幹細胞において、ドパミン神経の転写に関与する Shh ならびに Lmx1a、セロトニン神経の合成酵素である Tph2 の発現に変化は認められなかったものの、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. 59, 60)。

#### 免疫機能評価

CPF の経胎盤・経授乳暴露による児動物の免疫機

能影響に関する研究においては、胸腺の比重量などいくつかに軽微な変化が認められたが、用量依存性が認められなかった。

暴露終了時(生後3週目)も暴露停止8週後(生後11週目)においても、雄の脾臓における CD4 陽性リンパ球の割合は CPF の用量依存的に増加した (Table 53)。11 週齢雌の胸腺において、CD4+CD8a+ の未分化 T 細胞が減少していた。

CPF の発達期免疫影響を Th1、Th2、Th17 及び Treg への分化割合の解析では、Treg の存在比率が一部条件で増加することが明らかになった (Table 53)。

MMP の経胎盤・経授乳暴露による児動物の免疫機能影響に関する研究においては、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 3 週齢時の雌児動物で増加、及び 11 週齢時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、MMP では Treg の減少傾向が観察された。尚、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 MMP 25 ppm 群で、むしろ抑制的な影響が示唆された (Fig. 61) ため、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。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。

MMP 25 ppm 投与群の胸腺及び脾臓を用いて実施したエピジェネティクス解析では、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 (Table 54)。

免疫系に注目した解析では、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 (Table 55)。

#### 感染感受性評価

##### <MMP 周産期暴露の感染影響>

MMP を周産期暴露した児動物の RS ウイルス感染 5 日後の肺組織中の感染価をプラーク法で測定した。ウイルス感染価は 1.0 ppm 暴露群でのみ有意に

( $P < 0.01$ ) 上昇したが、その程度は 1.5 倍と小さく、かつ用量依存性が認められなかった (Fig. 61)。RS ウイルス感染進行の指標の一つである感染 5 日後の BALF 中の IFN- $\gamma$  レベルを ELISA で測定した。

MMP20 ppm 暴露群では、対照群と比較して有意に低下した ( $P < 0.05$ ) (Table 56b)。次に、10 及び 30 ppm

の MMP の周産期暴露を受けた児動物の感染 5 日後の肺組織について、病理組織学的な検証を行った (Table 57)。その結果、MMP 暴露を受け、ウイルスを感染させていないマウスにおいて、特に病的な所見は得られなかった。そして RS 感染マウスにおいても、明確な肺炎の増悪化は確認されなかった。

ウイルス感染初期の免疫系への影響を見るため、感染 1 日後の BALF 中のサイトカイン変動を調べた (Table 56a)。感染初期のウイルス排除に関わる IL-6 レベルが用量に依存して有意に低下した一方で、TNF- $\alpha$  レベルはあまり影響を受けなかった。これらの結果から MMP が RS ウイルス感染初期の免疫応答に影響することが判ったため、マイクロアレイを用いて感染 1 日後の肺組織における遺伝子発現応答を網羅的に解析した (Fig. 62)。RS ウイルス感染時にのみ MMP 暴露で変動 (対照に対して 2 倍以上) する 2536 遺伝子を見出し、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。遺伝子発現抑制群の上位に IL-6 や G-CSF など単球/マクロファージ系で産生するサイトカイン類や IFN- $\gamma$  など T 細胞で発現する分子が見出された (Table 58)。一方、遺伝子発現上昇群の上位には目立った分子種が見出されなかった。

#### < CPF 周産期暴露の感染影響 >

CPF は 2.8~70 ppm の用量で周産期暴露を行い、MMP と同様に児動物について感染影響評価を実施した。RS ウイルス感染 1 日後では BALF 中の TNF- $\alpha$  レベルが CPF 暴露により有意に低下したが、IL-6 レベルには殆ど影響しなかった (Table 59a)。一方、感染 5 日後の IFN- $\gamma$  レベルは上昇した (Table 59b)。MMP と同様に感染 5 日後の肺組織の病理組織学的な検証を行ったが、CPF 暴露による明確なウイルス性肺炎の増悪化は確認されなかった (Table 60)。

MMP と同様に感染初期免疫系への影響を精査するために、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 (Fig. 62)。RS ウイルス感染時にのみ 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

(Table 61)。TNF- $\alpha$  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は認められたが、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。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  $\mu$  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 (Fig. 63)。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 (Fig. 64)。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 (Fig. 65)。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- $\alpha$  レベルを有意 ( $P < 0.01$ ) に上昇させた。

#### < MnCl<sub>2</sub> の感染影響評価 >

MnCl<sub>2</sub> 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- $\gamma$  レベルは、800 ppm まで影響が認められなかった (Fig. 66)。同様に、1 日後の TNF- $\alpha$  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 の中枢神経発がん修飾作用 >

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 週間より乳汁中の Mn 濃度の有意な増加が認められた (Fig. 67)。

Mn の中枢神経発がん修飾作用を検討する実験において、被験物質の投与による親動物及び仔動物の一般状態、体重 (Fig. 68, 69) 及び摂餌量 (Fig. 69, Table 62, 63) に対する影響は認められなかった。また 34 週目までの生存率も Mn 投与による有意な変化はみられなかった (Fig. 69)。対照群では、ENU の経胎盤投与により 34 週において、各々 62% (雄) 及び 74% (雌) の動物に星状膠細胞腫、乏突起膠細胞腫、悪性星状膠細胞腫及び多形性膠芽腫等の中枢神経腫瘍が認められた (Fig. 70, 71, Table 64)。しかし、Mn 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 (Fig. 70, 71, Table 64)。また、全群で三叉神経での神経鞘腫等の末梢神経腫瘍及び肺がん等の非神経腫瘍が認められたが、いずれも Mn による発生率の変化は認められなかった (Fig. 71, Table 64, 65)。

一方、NIC の発達期暴露による中枢神経系発がん修飾作用に関する実験では、授乳期間中、全 NIC 投与群で体重 (Fig. 72, Table 67) 及び飲水量 (Table 66) の著しい減少が認められた。0.05% NIC の投与群は生後一週より 0.025% に投与量を減らしたが、仔動物は 2 週目にて全例死亡した。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 (Fig. 73, Table 68-70)。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 (Fig. 74)。臓器重量について、NIC0.01%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 (Table 69, 70)。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 (Table 69, 70)。

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 (Fig. 75, 76, Table 71)。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 (Fig. 75, 76, Table 71)。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 (Fig. 76, Table 71, 72)。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と、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 (Table 72)。

#### D. 考察

##### In vivo 神経発達評価

##### <低栄養の脳発達に及ぼす影響の確認>

我々がこれまで行ってきた検討により、ラットに抗甲状腺剤を発達期暴露することにより、児動物の海馬歯状回門において成熟後まで持続する Reelin 陽性介在ニューロンの増数と共に、甲状腺機能低下に起因する体重及び脳重量の低値を認めている。しかし、今回明らかとなった低蛋白質食を用いた発達期低栄養実験では、持続する体重低値と共に、小脳外顆粒細胞の残存を伴う脳重量の低値を認めて脳発達遅延を誘発したものの、介在ニューロンでの Reelin、Calb-D-28K、GAD67、NeuN 及び Foxg1 の発現は変動を示さなかった。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索においても、低栄養の影響は認められなかった。従って、母体毒性に伴う児動物の低栄養による非特異的な脳発達遅延においては、介在ニューロンは変動を示さず、顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシスの変動もないことから、海馬歯状回門における介在ニューロン及び顆粒細胞層下帯における増殖細胞並びにアポトーシスの変動の検索は、投与した神経発達毒性物質に特異的なニューロン発達障害を検出する系として有用であると考えられた。

##### <Mn を用いた発達期暴露影響評価>

ラットを用いた実験では、実験期間中の母動物及び児動物の体重並びに摂餌量には、Mn 投与の影響はみられず、児動物の臓器重量についても、生後 21 及び 77 日のいずれの解剖時においても、Mn 投与の

影響はみられなかった。小脳組織中 Mn 濃度については、母動物では変動はみられなかったが、児動物では暴露終了時の生後 21 日において、32 ppm から上昇が認められ、160 及び 800 ppm では有意差もみられた。しかし、生後 77 日の児動物では、各濃度の Mn 投与群と対照群との間に差はみられなかった。すなわち、可逆性ではあるものの母動物に変動のない用量であっても、その児動物の小脳組織中 Mn 濃度には影響を与えることが明らかとなった。

海馬歯状回における検索では、顆粒細胞層下帯に DCX 陽性細胞数の増加が生後 21 日の 800 ppm に見られた。DCX は type 2b、type 3 前駆細胞 及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られるが、type 2a 及び 2b 前駆細胞に発現する分子である Tbr2 に変動は見られなかったことから、今回見られた DCX 陽性細胞の増加は type 3 前駆細胞あるいは幼若顆粒細胞の増加を示すものと考えられ、このステージにおける分化障害を示唆するものと考えられた。更に、同じ生後 21 日の 800 ppm において海馬歯状回門における Reelin 陽性細胞数の増加も認められた。Reelin は同部位において GABA 性介在ニューロンが分泌することが知られており、顆粒細胞系譜の移動に関与することが報告されている。従って、Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加は、顆粒細胞層下帯における前駆細胞の分化障害に関連した変動であると推測された。一方、海馬歯状回門においてミクログリアの活性化を示唆する Iba1 及び Cox2 陽性細胞数の増加が生後 21 日の 32 ppm 以上で見られた。Mn は in vitro でミクログリアを直接的に活性化することが報告されている。前述の通り、脳内の Mn 濃度は生後 21 日の児動物のみにおいて 32 ppm 以上で上昇を示している。従って、今回見られたミクログリアの活性化は脳内 Mn 濃度の増加に伴う変化と考えられた。更に、生後 21 日の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、IL-1 $\alpha$ 、IL-6、NOS2、TNF- $\alpha$  といった炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加が 800 ppm で認められている。ミクログリアはこれらの炎症誘発性サイトカインを放出することが知られていることから、炎症誘発性サイトカイン mRNA の発現レベルの増加は、脳内 Mn 濃度の増加に伴うミクログリアの活性化に関連するものと推測された。甲状腺関連ホルモン測定では、800 ppm で生後 21 日の児動物のみにおいて弱いながらも T3 及び T4 の減少ならびに TSH の増加が見られており、Mn 発達期暴露の影響が疑われた。

マウスを用いた実験では、今回マウスに於いて初めて離乳時から海馬歯状回門での Reelin 陽性細胞数の増加を確認し、最高用量では、成熟後でも増加が持続した。同様に、最高用量で NeuN 陽性細胞が離乳時から増加を示した。Reelin は甲状腺ホルモン調節遺伝子であり、ニューロンの移動や位置情報を決定する分子である。Reelin 陽性細胞はこの部位で GABA 性介在ニューロンに発現することが知られて

おり、Mn 暴露によって、離乳時のみでの検索であるが GAD67 陽性細胞も増加を示したことから、海馬歯状回での顆粒細胞の移動異常が成熟後まで引き続いて生じたものと考えられた。また、海馬歯状回の顆粒細胞層下帯における増殖細胞及びアポトーシス細胞の検索において、増殖細胞数には影響を認めなかったものの、最高用量でアポトーシス細胞数の増加を認めている。以上の結果から、Reelin 陽性細胞数の歯状回門での増加は、ニューロンの移動異常のみならず、ニューロン新生障害も反映している可能性が示唆された。Reelin 及び NeuN の二重染色では、海馬歯状回門において Reelin 陽性/NeuN 弱陽性～陰性細胞の増加が 800 ppm に認められ、成熟ニューロンのマーカーである NeuN に関して弱陽性～陰性を示していることから、未熟な Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加を示唆するものと考えられた。一方、歯状回顆粒細胞層下帯では TUC4 陽性細胞数の増加あるいは減少が生後 21 日及び 77 日の 800 ppm に見られた。TUC4 は幼若顆粒細胞に発現する分子として知られており、幼若顆粒細胞の減少を招く分化障害を示唆するものと考えられた。生後 21 日の児動物の海馬を用いた real-time RT-PCR 解析では、TUC4 の mRNA の発現レベルの減少が 800 ppm に見られ、前述の免疫染色の結果を裏付ける結果が得られた。また、Reelin、GAD67 及び ApoER2 (Reelin 受容体) の mRNA の発現レベルの増加が見られたが、免疫染色において Reelin 及び GAD67 陽性細胞の増加が見られており、同様に免疫染色結果を裏付ける内容であった。前駆細胞の分化障害及び Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加はラットでも見られたが、ラットと異なりマウスでは生後 77 日でも見られており、Mn 影響の不可逆的な永続性が示唆された。

また、Mn はグリオーシスを生じることが報告されているが、本研究に於いてもマウスの歯状回門における、小型で細胞質の乏しい GFAP 陽性細胞の増加を認めた。ところが、グリオーシスに見られるような原形質性ないし線維性アストログリアの形態を示さないことから、これらの細胞の増加は単純にグリオーシスを反映したものであるかは、今後の検討が必要である。

ゲノムのメチレーション解析では、800 ppm で Pvalb、Mid1、Atpla3 及び Nr2f1 の過メチル化及び mRNA の発現レベルの減少が見られ、Mn 投与により過メチル化を受け、転写が抑制される 4 遺伝子が同定された。このうち、Parvalbumin 及び MID1 は免疫染色においても、それぞれ介在ニューロン、顆粒細胞層（下帯を含む）に陽性細胞を認め、Mn 投与により陽性細胞数が減少を示し、後者は成熟後まで持続することが確認された。このことより、発達期の Mn 暴露によって、ニューロン新生に関連する遺伝子発現のエピジェネティックな発現制御による修飾が成熟後まで続く可能性が見出された。更に、体

の正中の形成に重要な役割を担う分子である Mid1 について、その発現の左右対称性について検討した結果、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。

甲状腺関連ホルモン測定では、T4 の減少が見られたが T3 及び TSH では明らかな変動は見られず、限定的な変化であると判断され、ニューロン新生に対する Mn の影響に抗甲状腺作用を介した機序の関与は限局的であると判断された。

<CPF を用いた発達期暴露影響評価>

ラットを用いた実験では、母動物の体重は一過性の変動が見られたものの明らかな変化は見られなかった。摂餌量では 14 ppm のみで高値が妊娠後期に見られたがその程度は軽度であった。児動物では 14 ppm のみにおいて体重の高値が生後 4～21 日に見られた。同様の用量反応性を欠く児動物体重の高値は、過去に実施された試験でも報告されており (Lassiter TL et al., Neurotoxicol Teratol. 2008; 30: 125-30)、CPF 特異的な変化と考えられた。ChE 活性の測定では、暴露終了時の血漿及び赤血球中 ChE 活性の低値が母動物では 2.8 ppm 以上に見られたが、児動物では 14 ppm 以上あるいは 70 ppm のみであった。しかし、血漿及び赤血球中 ChE 活性は母動物よりも反応性は低かったにもかかわらず、脳内 ChE 活性は母動物及び児動物とも 70 ppm に変動が見られ、同等の反応性を示した。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での検索では、Tbr2 陽性細胞数の減少及び PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の減少が生後 21 日の 70 ppm に見られた。前述の通り、Tbr2 は type 2 前駆細胞に発現する分子であるが、type 2 前駆細胞はニューロンの性質を部分的に保持しながら分裂を繰り返す細胞であることが報告されている。従って、今回得られた結果は、やがてニューロンとなるべき細胞増殖能を持った type 2 前駆細胞が影響を受けていることを示唆するものと考えられた。尚、これらの変化は生後 77 日には消失し、可逆的な変化であった。

マウスでは、母動物の体重及び摂餌量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 T<sub>4</sub> の高値が生後 77 日の 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、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 NIC 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。

#### <ACR を用いた発達期暴露影響評価>

ACR は遠位軸索傷害物質として知られ、我々のこれまでの検討により、その軸索末端傷害性の感受性は発達期から存在し、ACR の児動物に対する直接投与により、成熟動物と同等の傷害性を有する。ことが確認されている。ただし、母動物を介した ACR の経乳的暴露では母動物に対する神経障害を初めとする全身毒性の影響によって、児動物に乳汁を介した ACR の移行が極端に少なくなり、赤血球中の Hb-ACR 付加体量で比較すると、母体血中の 1/10 以下の移行しか確認されない。これを反映して、母動物を介した暴露では末梢神経障害などの遠位軸索末端傷害性の生じないことが考えられる。ところが、今回の検索により、暴露量が少ないにもかかわらず、明らかな成長遅延を示さない低用量群 (平均摂取量: 3.7 mg/kg/day) から、歯状回門の Reelin 陽性 GABA 性介在ニューロンが増加を示した。このことは、ACR の発達影響として、比較的低用量からのニューロンの移動に関わる分化障害の可能性を示唆した。また、顆粒細胞層下帯における高用量群及び腹腔内投与群でのアポトーシスの減少は、Mn とは異なる ACR によるニューロン発達障害に対する保護作用の可能性が示唆された。

不可逆性を検討する実験では、児動物の発達遅延を示唆する体重及び脳重量の低値が飲水投与の 100 ppm 及び腹腔内投与の生後 21 及び 77 日に見られたが、歩行異常を示したのは腹腔内投与のみであった。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯での細胞増殖の検索では、生後 21 日に PCNA 陽性細胞数 (細胞増殖) の減少が発達遅延のない 20 ppm にも見られたが、生後 77 日には消失し可逆性が示唆された。

一方、海馬歯状回門における検索では、生後 21 日に Reelin 及び NeuN 陽性細胞数の増加が 20 ppm 以上に見られ、更に NeuN の変化については生後 77 日まで継続して見られており、Reelin の変化は可逆的であったが、NeuN の変化は不可逆的であった。前述の通り、Reelin は新生ニューロンの移動に関与する分子であることから、細胞増殖の減少に関連して Reelin 分泌 GABA 性介在ニューロンの増加が生じているものと推測された。また、生後 77 日では NeuN の変化のみ不可逆的であったことから、生後 21 日において増加した GABA 性介在ニューロンが、生後 77 日では細胞増殖の回復により Reelin は分泌しなくなり、そのまま残存しているものと推測された。

海馬歯状回顆粒細胞層下帯でのアポトーシスの検索では減少傾向が生後 21 日の 20 ppm 以上に見られた。前述の通り、同群では細胞増殖の減少や後述す

るように顆粒細胞系譜の障害が見られていることから、ACRによるニューロン新生障害に対する神経保護作用の生じている可能性が考えられた。

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100 ppm投与群での検索では、DCX及びDpysl3 (TUC4)陽性細胞数の減少が生後21日に見られた。これらは、type 2b、type 3前駆細胞及び幼若顆粒細胞に発現する分子として知られているが、Pax6 (type 1-type 2aマーカー)、Tbr2 (type 2a及び2bマーカー)、NeuroD1 (type 2b、type 3マーカー)に変動は見られなかったことから、今回見られたDCX及びDpysl3 (TUC4)陽性細胞数の減少は幼若顆粒細胞の減少を示すものと考えられ、ACRはtype 3前駆細胞を標的として増殖抑制を生じ、その結果、幼若顆粒細胞が減少したものと考えられた。

### In vitro 神経発達評価

MnCl<sub>2</sub>は中枢神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の発生過程に影響を及ぼす可能性が示唆された。NICについては、中枢神経系を構成する神経あるいはグリア細胞の分化誘導には大きな影響を与えないものの、神経分化過程において神経の運命決定に影響を与える可能性が示唆された。以上、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

CPFの経胎盤・経授乳暴露による児動物の免疫機能影響に関する研究においてみられた、胸腺の比重量などの変化は、血中のコリンエステラーゼ活性が児動物においても有意に減少していることから、有機リン系農薬の持つコリンエステラーゼ抑制活性による以下の影響が考えられる。

直接的影響としては、神経伝達物質として知られるアセチルコリンは、リンパ球にも直接的に作用し、カルシウムシグナルなど様々な細胞応答を引き起こすことが知られている<sup>8)</sup>。リンパ球には、ムスカリニック受容体やニコチン受容体、アセチルコリン合成酵素等のコリン作動系の要素が機能的に発現しているため、アセチルコリンの末梢リンパ器官における直接作用がCPFにより増強された可能性も考えられる。

一方、新生児ラットに出産後4日間CPFを投与した場合、成熟後(生後60日目)におけるT細胞のCon A刺激に対する増殖能が有意に低下するという報告があり<sup>9)</sup>、発達過程の神経系への影響を介した間接的な効果が寄与した可能性もあろう。しかし、本研究では、暴露終了時(生後3週目)も暴露停止8週後(生後11週目)においても、雄の脾臓におけるCD4陽性リンパ球の割合は逆にCPFの用量依存的に増加した。この相違は、in vitroでのマイトジェン刺激により誘導された細胞増殖とin vivoでの生

理的な分化・増殖の違いや、暴露期間の違いなどによるものと推察される。尚、11週齢雌の胸腺においてはCD4<sup>+</sup>CD8a<sup>+</sup>の未分化T細胞が減少していることから、CD4陽性T細胞への分化過程がCPFにより促進された可能性が示唆された。

前述した通り、CD4陽性T細胞は免疫系の中樞機能を担っている。これらの細胞は少なくとも4種以上の機能的に異なる亜集団からなっているが、特定のT細胞サブセットへの分化がCPFに感受性が高いのだとすれば、上記のような免疫系への影響をより詳細に理解することができると考えられた。

同様のエンドポイントを目指した研究としては、Duramadらによるヒト末梢血リンパ球をCPFの代謝産物(クロロピリホスオクソン; CPO)とトリポ多糖で刺激した場合にIFN $\gamma$ を産生する細胞集団を解析した研究があるが、結果としてその応答細胞はCD4陽性T細胞ではないことが分かったのみであった。

本研究では、CPFの発達期免疫影響をTh1、Th2、Th17及びTregへの分化割合を指標として解析することを試みた。その結果、Tregの存在比率が一部条件で増加することが明らかになった。

MMPの経胎盤・経授乳暴露による児動物の免疫機能影響に関する研究においては、MMPではTregの減少傾向が観察されたが、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MMP 25 ppm群で、むしろ抑制的な影響が示唆されたため、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、MMP 25 ppm投与群の胸腺及び脾臓を用いて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。すなわち、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種あり、これらの遺伝子群には、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のが可能になるであろう。免疫系に注目すると、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