

有機リン系化合物クロルピリホスの経胎盤・経母乳暴露が発達期のマウス免疫系に及ぼす影響について

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

Effects of transplacental and trans-breast milk exposure to the organophosphate compound chlorpyrifos on the developing immune system of mice

Ryosuke Nakamura[#], Yoshie Kimura, Hideki Matsuoka, Akiko Hachisuka, Rika Nakamura, Atsushi Nakamura, Makoto Shibutani^{*} and Reiko Teshima

Navarro et al (2001) have reported that neonatal exposure of rat to the organophosphate compound chlorpyrifos (CPF) resulted in long-term deficits in T lymphocyte mitogenic response, although the mechanism has been unclear. In this study, pregnant BALB/c mice were exposed to 0, 2.8, 14, 70ppm CPF via diet from gestational day 10 to postnatal day (PND) 21, and subpopulational changes in T lymphocytes of offspring were analyzed at PND21. The irreversibility of the effects was also investigated at PND77 after ceasing exposure by weaning at PND21. Serum cholinesterase activity was significantly reduced after exposure to CPF at PND21. An increase in the proportion of CD4 positive splenocytes was observed after exposure to CPF, which remained until PND77. We found that regulatory T cells were the only one CD4 positive subset which increased in the spleen of CPF-exposed mice at PND77.

Keywords: organophosphates, chlorpyrifos, developing immune system, CD4 T cells

1. 緒言

免疫系は、神経系および内分泌系との密接な相互作用を通じ、生体防御に重要な役割を果たしている。これら3つのシステムは発達期における外部環境の影響を受けやすいことが知られており、この感受性の高い時期はしばしば「critical window」とよばれている^{1,2)}。しかし、従来の免疫毒性試験評価では発達期への影響を検討していない。

シロアリ駆除剤として居室を含有する建築物への使用は禁止されたものの、殺虫剤として使用されるクロルピリホス (CPF) は、有機リン系化合物の一種で、アセチルコリンエステラーゼを阻害して神経伝達物質のアセチルコリン濃度を高めることにより作用を発揮する (Fig. 1)。Navarroらは、新生児ラットに産後4日間

CPFを皮下投与すると、成熟後におけるT細胞のconcanavalin A刺激に対する増殖能が有意に低下したと報告しており³⁾、CPFの発達期免疫への影響が疑われているが、そのメカニズムの詳細は明らかになっていない。

細胞性免疫や液性免疫など、適応免疫の型を決定づける上で最も重要な役割を担っているのは細胞表面マーカーCD4を発現するT細胞集団 (ヘルパーT細胞; Th) であるが、これは少なくとも4種の機能的に異なるサブセットから構成されており、そのバランスにより免疫反応の型が制御されていることが知られている。すなわち、インターフェロン γ (IFN γ) 等を発現し、細胞性免疫に関与するTh1⁴⁾、インターロイキン (IL) 4, 5

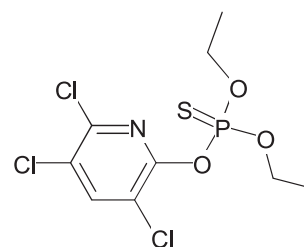


Fig. 1 Structure of chlorpyrifos (CAS#2921-88-2)

[#] To whom correspondence should be addressed:

Ryosuke Nakamura; Division of Novel Foods and Immunochemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501 Japan; Tel: +81-3-3700-9437; Fax: +81-3-3707-6950; E-mail: ryosnak@nihs.go.jp

^{*} Tokyo University of Agriculture and Technology

等を発現し、アレルギーや液性免疫に関与する Th2⁴⁾、IL-17を発現し、多くの自己免疫疾患に関与する Th17⁵⁾、そして IL-10等を発現し、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 (regulatory T cell; Treg)⁶⁾ の 4 種である。本研究では、Navarro らがラットにおいて発見した CPF の発達期免疫への影響をより詳細に解析するため、リンパ球のサブポピュレーション解析 (CD4⁺ T 細胞, CD8⁺ T 細胞, NK 細胞) およびこれら 4 種の CD4⁺ T 細胞サブセット解析を行い、特に免疫反応の抑制に関与する Treg の増加が誘導されている可能性について追究した。

暴露系としては、ラット⁷⁻¹¹⁾ およびマウス¹²⁾ を用いて抗甲状腺作用が疑われる化学物質への暴露が発達期の神経系および免疫系に及ぼす影響を簡便にスクリーニングすることに成功した先行研究が存在するため、このプロトコルに則った。具体的には、妊娠マウスを妊娠10日 (GD10) から出産後21日 (PND21) まで CPF に混餌 (0, 2.8, 14, 70ppm) 投与にて暴露し、暴露終了時での児マウスの解析を行った。また、PND21までの暴露終了後、PND77まで通常飼料による飼育を行い、PND21の時点で認められた変化が11週齢で回復するかどうかを調べた。

2. 実験方法

2.1. 被験物質

CPF の構造式を図1に示した。CPF (DURSBAN™ XP; M. W. 350.6, CAS No. 2921-88-2, 純度99.8%, 通常の保存条件下で安定。弱酸・弱アルカリで安定) は Dow AgroSciences 社の厚意により分与された。

2.2. 試薬

粉末 CRF-1 は日本チャールスリバー (株) より購入した。次の蛍光標識抗体は BioLegend 社より購入した: APC/Cy7 標識抗マウス CD3 抗体 (145-2C11), FITC 標識抗マウス CD4 抗体 (RM4-5), APC 標識抗マウス CD8a 抗体 (53-6.7), PerCP/Cy5.5 標識抗マウス IFN γ 抗体 (XMG1.2), PE 標識抗マウス IL-4 抗体 (11B11), APC 標識抗マウス IL-17A 抗体 (TC11-18H10.1), PerCP/Cy5.5 標識 (PE および APC も同様) ラット IgG1 κ アイソタイプコントロール抗体 (RTK2071), PE 標識抗マウス CD25 抗体 (PC61) は BD Pharmingen 社より購入した。PE 標識抗マウス CD49b 抗体 (DX5) および APC 標識抗マウス Foxp3 抗体 (FJK-16s) は eBioscience 社より購入した。Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug および BD GolgiPlug は BD Pharmingen 社より購入した。

2.3. 使用動物

9-11週齢の妊娠2日 (GD2; プラグがついた日を妊

娠1日と起算) の BALB/c マウスを日本チャールスリバー (株) より購入し、7日間予備飼育後、実験に供した。動物は、GD9までは群飼 (1ケージあたり3匹), GD10からは個別飼育とし、照明12時間、温度24 \pm 1 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 5%に保たれたバリアシステムの飼育室 (SPF) で飼育した。動物実験は国立医薬品食品衛生研究所の規定に準拠し、動物実験委員会の承認に基づき実施した。

2.4. CPF への暴露

CPF は、粉末 CRF-1 飼料に 0, 2.8, 14, 70ppm (公比5) にて乳鉢, ビニル袋, ポリプロピレン容器を用いて混合し、混餌飼料を調製した。検体は各段階で十分混合しつつ、3段階の段階希釈により得た。検体の濃度は、ラットにおける生殖毒性を検討した過去の報告¹³⁾ および血清中コリンエステラーゼ活性の抑制を指標とした用量設定試験により決定した。妊娠2日目 (GD2) の BALB/c マウス (9~11週齢) を購入し、1ケージあたり3匹で GD9まで飼育し、GD10より単独飼育にすると同時に粉末 CRF-1 への混餌投与にて CPF の暴露を開始した (1群12匹)。最終的に、12匹中コントロール群は3匹、暴露群はすべて6匹のマウスが出産に至った。出産後3週目 (PND21) まで暴露を継続し、その間体重および摂餌量を計測した。また、出産した児マウスの体重も同様に計測した。児マウスの飼育数は、栄養状態が均等となるよう、9匹以上生まれたケージからは1ケージあたり8匹となるように無作為に間引いて8匹未満の出産ケージに移動し、総数を8匹に揃えた。PND21に同腹から体重が中央値に近い児マウスを選び解剖 (雌雄それぞれ n=4) を行った。さらに、雄の児動物については、暴露終了後 PND77まで飼育し、被験物質による影響の回復性を調べた。一般状態および体重測定は7日ごとに行った。

2.5. 血液学的検査

エーテル深麻酔下のマウス眼底から末梢血30 μ l を採取し、120 μ l の0.5%EDTA/CELLPAK に懸濁し、多項目自動血球計数装置 (M-2000, Sysmex corp.) に供した。解析項目は次の通り: 赤血球数 (RBC), 白血球数 (WBC), ヘモグロビン濃度 (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 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), および血小板 (PLT)。

2.6. 血液生化学的検査

母動物および児動物について、末梢血より血清200 μ l を採取し、SRL 社に委託して次の項目の検査を行った: アルブミン/グロブリン (A/G) 比, アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT), および血清中コリンエス

テラーゼ活性 (ChE). ただし, PNW 3 の児動物から採取できる血清はわずかであったため, 2 匹分の血清試料を 1 検体にまとめて測定した. その際, PND21 群においては雌児の数が十分確保できなかったため, 雌 2 検体に 3 または 4 検体の雄を合わせて $n = 5$ または 6 とし検定を行った.

2.7. 病理組織学的解析

児マウスについては, 肝臓, 脾臓, 胸腺, および骨髄 (大腿骨) における病理組織学的解析を行った. 採取組織を定法に従って中性緩衝ホルマリン液で固定し, 薄切切片をヘマトキシリン・エオジン染色した.

2.8. フローサイトメトリー

リンパ球のポピュレーション解析を行うため, 児マウスの脾臓および胸腺を冷温下でシリンジにより破碎して口径 $70 \mu\text{m}$ のメッシュに通し, 10 ml の 10%FCS (Gibco) を添加した RPMI1640 培地に懸濁した. トリパブルー染色の後, 自動細胞数計測装置 (Countess; Invitrogen 社) により細胞数を計測し, 以下に述べる 3 種の条件により染色を行った. 測定には Becton Dickinson 社の FACS Aria を用い, データ解析には FlowJo (トミーデジタルバイオロジー社) を用いた. フローサイトメトリーでは total event 数として 10 万個の細胞を計測し, 各サブセットの存在比率は, 特に断らない限り, 定法通り前方散乱および側方散乱により定義したリンパ球ゲート内の総リンパ球数に対するパーセンテージとして表した^{7,8,10)}.

2.8.1. CD3/CD4/CD8a/CD49b を抗原とするリンパ球サブポピュレーション解析

T 細胞および NK 細胞のサブポピュレーションを解析するため, セルストレイナー付き丸底ポリスチレンチューブに細胞を 2×10^6 cells 分注し, 成熟 T 細胞マーカーである CD3, ヘルパー T 細胞のマーカーである CD4, 細胞傷害性 T 細胞のマーカーである CD8a, および NK 細胞のマーカーである CD49b を 2.1. に示した抗体により氷上で 30 分間染色した.

2.8.2. CD4/IFN γ /IL4/IL17A を抗原とする CD4 陽性 T 細胞サブセット解析

ヘルパー T 細胞のサブセットである Th1/Th2/Th17 を染色するため, 表面抗原である CD4 とともに, それぞれのマーカーとなる細胞内サイトカイン IFN γ /IL4/IL-17A を染色した. 採取後の細胞を 24well プレートに 4×10^6 cells / 1 ml / well ずつ分注し, PMA とイオノマイシンを含むリンパ球活性化試薬 (Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug) により CO₂ インキュベータ中で 37°C, 4 時間刺激し, セルストレイナー付きチューブに回収した. FOXP3Fix/Perm buffer (BioLegend) により室温で 30 分固定後, CD4 を染色, 洗浄後に FOXP

3Perm buffer で細胞を可溶化し, 細胞内サイトカイン抗体で染色した. アイソタイプコントロールとしては, 同じ蛍光色素で標識された非特異的ラット IgG1 κ を用いた. また, 未刺激のネガティブコントロールには, BD GolgiPlug のみを用いた.

2.8.3. CD4/CD25/Foxp3 を抗原とする Treg 解析

Treg は, CD4 とともに表面マーカーの CD25 または核内抗原である Foxp3 により同時染色し解析した. セルストレイナー付きチューブに細胞を 2×10^6 cells 分注し, 氷上で CD4/CD25 を染色後, FOXP3Fix/Perm buffer セットにより固定・可溶化し, Foxp3 を染色した.

2.9. 統計処理

有意差の有無に関する統計計算は, Dunnett の方法 ($n = 4$) により, $p < 0.05$ を有意とした. なお, 病理組織学的解析の判定には Fisher の直接確率検定によった.

3. 結果および考察

3.1. 一般毒性学的影響

母マウスおよび児マウスについて, 体重・臓器重量・血液学的検査・血液生化学的検査および病理組織学的解析を行った. なお, CPF 暴露群において摂餌量に有意な変化はなく, 性比への影響も認められなかった. CPF 暴露群においては, 一部の母マウスで体重または脾臓重量の増大が認められたが, 児については 70ppm 暴露群の雄において, PND21 の胸腺比重量の有意な増大が認められた (Table 1). しかし, PND77 には回復していたことから, その影響はごく軽微にとどまっているものと考えられた. 血液学的影響としては, 70ppm 暴露群の母マウスにおいて白血球の増加と赤血球および各種赤血球関連パラメータの減少が認められたが, 児マウスにおいては用量依存性のない軽微な変化のみが認められた (data not shown). 血液生化学的検査のうち, 肝機能関連のパラメータ (A/G 比, AST, ALT) には有意差は認められなかった (data not shown). 一方, 中用量以上の CPF 暴露は母親および児に対し, PND21 における顕著な血清中コリンエステラーゼ (ブチリルコリンエステラーゼ) 阻害を誘導した. このことは, CPF の経胎盤・経乳的暴露が正しく成立していたことを示している. しかし, 血清中のコリンエステラーゼ活性の多くはブチリルコリンエステラーゼによるものであり, CPF の神経作用の本態であるアセチルコリンエステラーゼ阻害とは必ずしも対応しないことには注意を要する. 実際, 立毛や痙攣, 運動失調などの所見は認められなかった. PND77 の児動物においては活性は回復している. また, 児動物の肝臓・脾臓・胸腺・骨髄の病理組織学的

Table 1 General toxicity of perinatal exposure of chlorpyrifos on dams and offspring.

Dam	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Number of delivery	3	6	6	6	
Body weight (g)	23.8±0.1	24.0±0.9	26.4±1.0**	25.2±0.7	
Liver/BW (%)	7.70±0.36	7.50±0.40	7.63±0.63	8.21±0.41	
Spleen/BW (%)	0.43±0.05	0.47±0.03	0.44±0.02	0.50±0.04	
Thymus/BW (%)	0.17±0.02	0.17±0.04	0.14±0.02	0.14±0.03	
ChE (IU/L)	52.33±6.81	45.75±3.77	31.50±4.43**	18.25±1.50**	
Female offspring (PND21)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Body weight (g)	9.9±0.5	10.0±0.8	11.0±0.3	10.0±0.8	
Liver/BW (%)	5.57±0.35	5.32±0.69	5.25±0.49	5.56±0.73	
Spleen/BW (%)	0.86±0.14	0.86±0.04	0.80±0.11	0.71±0.13	
Thymus/BW (%)	0.71±0.17	0.67±0.07	0.71±0.04	0.66±0.11	
^a ChE (IU/L)	31.00±1.87	29.83±2.71	19.17±2.48**	11.50±2.35**	
Male offspring (PND21)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Body weight (g)	11.0±0.7	10.3±0.7	11.4±0.5	10.2±0.6	
Liver/BW (%)	5.77±0.57	5.45±0.52	5.45±0.28	5.83±0.75	
Spleen/BW (%)	0.84±0.08	0.84±0.07	0.85±0.08	0.77±0.14	
Thymus/BW (%)	0.54±0.11	0.60±0.04	0.57±0.06	0.68±0.06*	
^a ChE (IU/L)	31.00±1.87	29.83±2.71	19.17±2.48**	11.50±2.35**	
Male offspring (PND77)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Body weight (g)	23.8±0.2	24.1±0.4	24.1±1.9	24.9±0.9	
Liver/BW (%)	4.70±0.24	4.67±0.52	4.32±0.41	4.50±0.24	
Spleen/BW (%)	0.38±0.02	0.38±0.04	0.37±0.04	0.41±0.03	
Thymus/BW (%)	0.14±0.02	0.13±0.02	0.12±0.02	0.14±0.02	
ChE (IU/L)	35.50±2.08	36.00±2.58	37.00±2.16	34.75±3.95	

Pregnant BALB/c mice (12per group) were exposed to chlorpyrifos (CPF; 0, 2.8, 14, and 70ppm) in diet, from gestational day 10 to postnatal day (PND) 21. Exposure was ceased by weaning. At PND21 and PND77, mice were sacrificed to determine effects of the compound on body weights (BW), organ weights, and cholinesterase (ChE) activities. ^a Specimens from 2 females and 3-4 males were lumped together for statistics (see Materials and Methods). Values are mean ± SD (n=4). *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

解析を行ったが、統計学的に有意な変化は認められなかった (data not shown).

3.2. フローサイトメトリー

前述のように、免疫系は各種のリンパ球サブポピュレーションや CD4陽性 T 細胞サブセットのバランスにより、反応の型が制御されている。そこで、フローサイトメトリーにより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における各種リンパ球サブセットの存在比率への影響を解析した。しかし、CPF 暴露は全般的に大きな影響は与えず、NK 細胞、CD8陽性 T 細胞の各サブポピュレーション比率、Th1、Th2の各サブセット比率については有意な影響が認められなかった (data not shown)。

Table 2 に、少なくとも PND21 または PND77 いずれかにおいて有意な変化を示したサブセットの存在比率を挙げた。なお、総細胞数に占めるリンパ球ゲート画分の細胞数には顕著な変化はなかった (data not shown)。

雌については、PND21の脾臓における CD3⁺CD4⁺細胞の増加および胸腺における CD4⁺Foxp3⁺細胞 (Treg) の増加が観察された。

雄については、PND21の脾臓における CD4⁺シングル

ポジティブ細胞が増加していた。この変化は、PND77でも回復せず持続していた。PND77の脾臓で増加していたのは、CD4⁺CD25⁺細胞 (Treg) のみであった。なお、PND21の胸腺で CD4⁺IL-17A⁺細胞 (Th17) の減少が認められたが、用量依存性はなく、軽微な影響と考えられた。

CPF の周産期暴露が成熟後の BALB/c マウス脾臓において免疫反応の抑制に関与する Treg の存在比率を増加させるという知見は本研究によって初めてもたらされたものである。Treg はほぼ全ての免疫反応に抑制的に働くため、Navarro ら³⁾ がラットにおいて発見した CPF の脾臓 T 細胞への抑制的影響と考え合わせると、腫瘍免疫などに代表される全身の免疫応答への影響の解析が今後望まれる。

なお、Treg には、胸腺内で分化する Foxp3陽性の内在性 Treg (nTreg) と、ナイーブ T 細胞が抗原提示を受け分化する過程で TGF-β 依存的に誘導される誘導性 Treg (iTreg) とが存在する¹⁴⁾。本研究では抗原特異的な iTreg の増加は調べていなかったため、現在胸腺依存性抗原 (KLH) の免疫実験を遂行中である。

Table 2 Flow cytometry analysis of the effect of chlorpyrifos on lymphocyte subpopulations

Female offspring (PND21)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Spl: CD4 ⁺ /Lymph	4.0 ± 0.9	4.0 ± 0.9	4.2 ± 1.1	5.1 ± 0.4	
Spl: CD4 ⁺ /CD3 ⁺	44.3 ± 1.0	45.8 ± 2.3	48.1 ± 2.9	49.9 ± 3.2	
Spl: CD4 ⁺ CD25 ⁺ /Lymph (Treg)	0.71 ± 0.02	0.69 ± 0.09	0.82 ± 0.08	0.84 ± 0.11	
Thy: CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /Lymph (Treg)	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.04	0.44 ± 0.30	0.85 ± 0.17*	
Thy: CD4 ⁺ IL17A ⁺ /Lymph (Th17)	0.14 ± 0.03	0.17 ± 0.05	0.14 ± 0.09	0.09 ± 0.03	
Male offspring (PND21)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Spl: CD4 ⁺ /Lymph	4.5 ± 0.4	4.2 ± 0.7	4.0 ± 0.9	5.8 ± 0.2*	
*Spl: CD4 ⁺ /CD3 ⁺	48.3 ± 2.0	49.4 ± 2.6	48.9 ± 1.0	52.2 ± 2.6	
Spl: CD4 ⁺ CD25 ⁺ /Lymph (Treg)	0.76 ± 0.08	0.79 ± 0.06	0.82 ± 0.05	0.79 ± 0.17	
Thy: CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /Lymph (Treg)	0.41 ± 0.07	0.71 ± 0.45	0.83 ± 0.26	0.63 ± 0.25	
Thy: CD4 ⁺ IL17A ⁺ /Lymph (Th17)	0.14 ± 0.05	0.10 ± 0.03	0.07 ± 0.02*	0.10 ± 0.03	
Male offspring (PND77)	0	2.8	14	70	CPF (ppm)
Spl: CD4 ⁺ /Lymph	16.3 ± 1.4	16.9 ± 1.8	17.8 ± 0.6	20.0 ± 1.3**	
*Spl: CD4 ⁺ /CD3 ⁺	57.4 ± 2.3	57.7 ± 0.9	58.2 ± 3.3	60.5 ± 1.0	
Spl: CD4 ⁺ CD25 ⁺ /Lymph (Treg)	1.93 ± 0.19	2.14 ± 0.21	2.39 ± 0.26*	2.41 ± 0.24*	
Thy: CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /Lymph (Treg)	0.60 ± 0.09	0.61 ± 0.08	0.66 ± 0.23	0.55 ± 0.09	
Thy: CD4 ⁺ IL17A ⁺ /Lymph (Th17)	0.38 ± 0.09	0.55 ± 0.19	0.38 ± 0.10	0.35 ± 0.10	

Pregnant BALB/c mice were exposed to chlorpyrifos (CPF; 0, 2.8, 14, and 70ppm) in diet from gestational day 10 to postnatal day (PND) 21. Exposure was ceased by weaning. At PND21 and PND77, mice were sacrificed to determine the effects of the compound on the relative proportions of lymphocyte subsets in the spleen (Spl) and thymus (Thy). The percentage of lymphocytes (Lymph) are shown (* percent CD3 positive cells). Values are mean ± SD (n=4). *p<0.05, **p<0.01 (Dunnett's test).

4. 結 語

本研究では、新生児期における CPF への暴露が成長後の胸腺細胞のレクチン刺激による細胞増殖応答の低下を招くという Navarro らの報告³⁾を受け、我々が以前より開発している化学物質の発達期影響の簡便なスクリーニング系^{7,8,10)}にフローサイトメトリーによる T 細胞のサブセット解析を追加し、CPF の潜在的な発達期免疫影響をより詳細に解析することを目指した。

その結果、CPF 暴露後の PND21 時点で児の血中コリンエステラーゼ活性の抑制が認められたが、PND77 には回復した。それにも関わらず、二次リンパ器官である脾臓における CD4 陽性 T 細胞の増加が PND21 および PND77 で観察され、その中でも PND77 の CPF 暴露群において増加していた唯一の CD4 陽性サブセットは制御性 T 細胞 (CD4⁺CD25⁺) であることを発見した。

なお、緒言で述べた通り免疫系と神経系・内分泌系との間には密接な相互作用があるため、今回観察された *in vivo* での免疫影響が免疫系への直接影響なのか、それとも神経系等を介する間接影響なのかについては明らかでなく、今後の研究が待たれる。

5. 謝 辞

本研究は厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業の補助を得て実施された。組織病理学的解析を実施していただいた当所病理部第 2 室 (吉田 緑室長) の皆様に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) WHO/IPCS: *Environ. Health Criteria*, **172**(1995)
- 2) Sellström, U., and Jansson, B.: *Chemosphere*, **31**, 3085-3092(1995)
- 3) Navarro, H. A., Basta, P. V., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A.: *Brain Res. Dev. Brain Res.*, **130**, 249-252(2001)
- 4) Mossman, T. R. and Coffman, R. L.: *Annu. Rev. Immunol.*, **7**, 145-173(1989)
- 5) Yao, Z., Fanslow, W. C., Seldin, M. F., Rousseau, A. M., Painter, S. L., Comeau, M. R., Cohen, J. I., and Spriggs, M. K.: *Immunity* **3**, 811-821(1995)
- 6) Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T.: *Immunol. Rev.*, **212**, 8-27(2006)
- 7) Nakamura, R., Teshima, R., Hachisuka, A., Sato, Y., Takagi, K., Nakamura, R., Woo, G. H., Shibutani, M., and Sawada, J.: *Int. Immunopharmacol.*, **13**, 1630-1638(2007)
- 8) Teshima, R., Nakamura, R., Nakamura, R., Hachisuka, A., Sawada, J., and Shibutani, M.: *J. Health Sci.*, **54**, 382-389(2008)
- 9) Shibutani, M., Woo, G. H., Fujimoto, H., Saegusa, Y., Takahashi, M., Inoue, K., Hirose, M., and Nishikawa, A.: *Reprod. Toxicol.*, **28**, 297-307(2009)
- 10) Hachisuka, A., Nakamura, R., Sato, Y., Nakamura, R., Shibutani, M., and Teshima, R.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **128**, 58-64(2010)

- 11) Fujimoto, H., Woo, G. H., Inoue, K., Takahashi, M., Hirose, M., Nishikawa, A., and Shibutani, M.: *Reprod. Toxicol.*, **31**, 86-94 (2011)
- 12) Watanabe, W., Shimizu, T., Hino, A., and Kurokawa, M.: *Environ Toxicol Pharmacol.*, **26**, 315-319 (2008)
- 13) Breslin, W. J., Liberacki, A. B., Dittenber, D. A., and Quast, J. F.: *Fundam. Appl. Toxicol.*, **29**, 119-130 (1996)
- 14) Murai, M., Krause, P., Cheroutre, H., and Kronenberg, M.: *Mucosal. Immunol.*, **3**, 443-449 (2010)