

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16567

研究課題名(和文) 低濃度フッ素摂取による記憶学習能力への影響

研究課題名(英文) An experimental study for the effects of fluoride on memory and learning ability of mice by the exposure from during stage from fetus and development

研究代表者

細川 まゆ子 (Hosokawa, Mayuko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70582013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：近年、アジアの地方部では骨フッ素症以外の健康被害として飲料水を介してフッ素を大量に摂取している児童のIQが低下した報告がある。そこで本研究では、児童のIQ低下が認められた濃度と同程度のフッ素(5、25、50 ppm)を飲料水に混ぜ妊娠期のICRマウスと離乳後の仔に自由摂取させ、記憶学習能力に影響を及ぼすかを検討した。胎児期のフッ素投与により、雌雄共にY-mazeとBarnes迷路の結果から認知機能の低下が示唆された。また、高架式十字迷路では、雄のみ対照群に比べ全ての群でオープンアームへの滞在時間が長かったことから不安感を示さなかった事が考えられ、交感神経系への影響が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Endemic fluorosis has been reported in many countries. Neurotoxic effects of fluoride on the ability of learning and memory have been focused lately. In this study, we evaluated the neurotoxic effects of fluoride on the learning ability of mice at low doses in the drinking water. Pregnant ICR mice were administered fluoride in the drinking water 0, 5, 25 or 50 ppm. After weaning, the female and male F1 mice were also administered fluoride in the drinking water 0, 5, 25 or 50 ppm until 6-months of age. The mean number of entries without repetition in the 5, 25 or 50 ppm group was significantly level than that in the control at the Y-maze test. The mean time spent in the escape box in the 5, 25 or 50 ppm group was significantly lower than that in the control at the Barnes maze. From the results of the Y-maze test and the Barnes maze, it was demonstrated that the exposure to fluoride drinking during stage from fetus and development induced cognitive deficit.

研究分野：衛生学

キーワード：フッ素 記憶学習能力 行動試験 IQ Barnes maze Y-maze 神経毒性

1. 研究開始当初の背景

フッ素は広く自然界に分布する元素である。フッ素を約 1 ppm 含む飲料水を摂取すると、う蝕予防に効果がある(安部、1985)とされ、日本では長年にわたり、水道水添加が議論されている。しかしながら、2-8 ppm のフッ素を慢性的に摂取すると斑状歯や骨フッ素症を発症する(Chobisa, 2001)。中国やインド、中東や中南米のなど高濃度のフッ素を含有する地域の井戸水を飲み水として摂取している国では、風土病である骨フッ素症の患者が数千万人にも及ぶ(Susheela, 1999)。近年、これらの症例以外に児童の IQ 低下が報告されている。Seraj et al (2012) の研究では、イランの 5 つの村で 6-11 歳の 314 人を対象にフッ素摂取による知能発達への影響について調査を行った。飲料水中フッ素が低濃度 (0.8 ± 0.3 ppm) の地域に比べ、中濃度 (3.1±0.9 ppm) および高濃度 (5.2±1.1 ppm) の地域に住む児童の IQ は有意に低かった (P=0.001)。また、Amador et al (2007) の研究では、メキシコの 3 つの農村で、6-10 歳の児童 132 人を対象に調査を行った。フッ素濃度は Moctezuma (0.8±1.4 ppm) 地域に比べ、Salitral (5.3±0.9 ppm) と 5 de Febereo (9.4±0.9 ppm) 地域に住む児童の IQ は有意に低かった (P=0.001)。2 つの報告共に、フッ素濃度が高いほど児童の IQ が低下していた。また Amador et al (2007) の報告では飲料水にヒ素や鉛が高濃度で含まれていたため、それらの元素が IQ 低下に関与した可能性もある。これらの報告から、成熟期の実験動物を用いて高濃度で短期間、飲料水フッ素を摂取させた後、記憶学習試験が行われた報告があるが、その結果は一様ではない (Basha et al 2011)。そこで、IQ 低下が認められた 10 ppm 程度の濃度フッ素と比較可能な濃度を飲料水に混ぜ水道水に混ぜ妊娠期のラットに自由摂取させ、仔が成熟期を迎えた時点で Y-maze (Y 迷路) Barnes

maze (バーンズ迷路) および Elevated plus maze (高架式十字迷路) 試験を行い、フッ素そのものが記憶学習能力に影響を及ぼすか試みる。実際に児童で IQ 低下が認められたフッ素濃度で胎児-成熟期に至るまで実験動物に長期間摂取させている研究は今までにない。

フッ素の毒性を評価するにあたっては、科学的知見の集積が必要であるが、現状では未だ十分とは言えない。特にフッ素に対する感受性の相違は環境的にせよ、人為的にせよフッ素に曝露される状況がある以上、解明しなければならない課題である。但し、フッ素での影響を確認しても現実の曝露は他の有害金属との混合曝露であるため、そのシミュレーションも必要である。

**飲料水中のフッ素濃度と身体への影響**

飲料水中フッ素濃度	身体への影響
1 ppm	う蝕予防効果
2 ppm	歯牙フッ素症
3-9 ppm	IQ 低下、骨フッ素症
10-20 ppm	最大の地下水汚染レベル(中国・インド)
100 ppm	腎障害(動物実験)

2. 研究の目的

中国やインドなど高濃度のフッ素を含む井戸水を飲料水として摂取している地域では、多くの児童に斑状歯が認められ、慢性的に摂取し続けることで、風土病である骨フッ素症を発症している。近年、これらの症例に加え、飲料水中フッ素の摂取による児童の IQ 低下が報告されている。この報告によりフッ素の神経毒性が懸念され、ラットやマウスを用いて記憶学習能力への影響が研究されている。しかしながら、成熟期に高濃度で短期間フッ素を摂取させた報告はあるが、妊娠期から仔の成熟期に至るまで低濃度で長期間

摂取させた報告はない。本研究により、妊娠期飲料水中フッ素摂取による仔の IQ 低下への影響を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

実験には、妊娠期（14 日目）の ICR 系マウス（三協ラボサービス株式会社）を用いた。フッ素入り飲料水を投与する群（5, 25, 50 ppm）と対照群（水道水を投与）を設定し仔が産まれるまでの間、観察を行った。観察期間中、健康状態（餌、水の摂取量、体重の測定および死亡の有無）を確認した。なお、餌と水は自由摂取とした。仔の生後 22 日目から雌雄に分け飼育を行った（雌雌各群 10 匹）。母マウスと同様の濃度に設定したフッ素入り飲料水を 6 カ月齢に至るまで自由摂取させた。曝露終了日の翌日、6 日間の行動試験を行った。各群のマウスに 1 日目に Y-maze、Elevated plus maze、および Barnes maze の順に行った。2 日目からは Barnes maze のみを行い、6 日目に Barnes maze の Probe test を行った。

全ての課題終了後、イソフルラン麻酔下で灌流固定を行い脳を摘出した。脳のパラフィン切片を作成後、ニッスル染色を行い海馬への影響を観察した。行動および病理の結果を総合的に評価し、低濃度フッ素の慢性曝露による記憶学習能力への影響が認められるかを明らかにした。

#### 行動試験について

Y 字型の装置（図 1）（走路幅 40 mm、壁面高さ 100 mm、天井部開口部 100mm、走路長 400 mm、中央エリア 40 mm（走路幅）の正三角形）にマウスを入れ 8 分間装置内を自由に探索させた。3 本の足がアームに入った状態をアーム進入と定義し、そのアーム進入の順序を記録した。連続して異なる 3 本のアームを選択した回数を交替行動回数とし、交替行動回数

/ (総移動回数 - 2) × 100 の計算式により交替行動率を求め、空間記憶の指標とした。

#### Elevated plus maze

十字型の装置（クローズドアーム：側壁高さ 150 mm、アーム長 300 mm、走路幅 60 mm、オープンアーム：縁 3 mm 各、アーム長 297 mm（縁を除く）、走路幅 54 mm）の中央にマウスを置き、DVTrack VIDEO SYSTEM COMP ACT VAS/DV で 8 分間の行動を記録し、オープンアームへのアクセス回数と滞在時間を測定した。迷路のオープンアームを避ける程度によって不安行動を評価した。

#### Barnes maze

Barnes maze（穴数 20、穴直径 50 mm、穴間隔 75 mm、プラットフォーム 920 mm、プラットフォーム高さ 920 mm、プラットフォームからの距離 20 mm、ターゲットボックス W20 × D90 × H90 mm）については、

(1) training trials（学習獲得テスト）:

装置に 1 匹ずつマウスを乗せ、1 日 1 分間 × 5 試行を 5 日間連続で実施し、逃避箱までの到達時間（潜時）を測定した。

(2) probe test :

6 日目に学習獲得テストを実施した。逃避箱がない状態で、設置していた位置の滞在時間から各群のマウスの記憶保持能力を評価した。

#### 統計方法

##### 餌・水

仔が離乳後から 6 カ月齢に至るまでの餌・水の摂取量の平均値を、群毎に比較した。

##### 体重

6 カ月齢の体重の平均値を群毎に比較した。

##### Y-maze

8 分間で 3 本のアームに入った回数を群毎

で平均し、比較した。

#### **Barnes maze**

1日1分間×5試行を5日間連続で行った測定値を群毎で平均し、比較した。Probe testについては、5日間のBarnes mazeの翌日、逃避箱がない状態で、設置していた位置の滞在時間から各群のマウスの記憶保持能力を評価した。

#### **Elevated plus maze**

8分間でオープンアームへのアクセス回数と滞在時間を測定したものを平均し、群毎に比較した。

全てのデータは平均値±標準誤差で示した。解析ソフトはSPSSを用いた。一元配置分散分析を用いて有意差検定を行い、Tukey-Kramer testにより群間の比較を行った( $p<0.05$ )。

#### **4. 研究成果**

##### **餌と水の摂取量について**

雄の餌摂取量については、25、50 ppm群で対照群、5 ppm群に比べ有意に低かった。雌では5 ppm群が対照群に比べ有意に低く、50 ppm群では対照群、5、25 ppm群に比べ有意に高かった。

雄の水の摂取量については、5 ppm群が対照群に比べ有意に低く、25 ppm群が対照群、5、50 ppm群に比べ有意に低く、50 ppm群では5、25 ppm群に比べ有意に高かった。雌では、対照群に比べ5、25、50 ppm群で有意に高かった。

##### **体重について**

雄の体重については、50 ppm群が25 ppm群に比べ有意に低かった。雌の体重については、50 ppm群で対照群、5および25 ppm群に比べ有意に高かった。

##### **Y-maze について**

雄では25 ppm群のみの空間作業記憶(3回連続して異なるアームに進入した回数)が対照群に比べ有意に低かった。雌では、5、25および50 ppm群で対照群に比べ有意に低かった。

##### **Elevated plus maze について**

雄では、全ての群で対照群に比べオープンアームの滞在時間が長かった。雌では25 ppm群で5 ppmに比べオープンアームの滞在時間が短かった。

##### **Barnes maze について**

雄では、滞在時間が5、25および50 ppm群で対照群に比べ有意に低くかった。雌では、25 ppm群で対照群に比べ有意に低く、50 ppm群で対照群と5 ppm群に比べ有意に低かった。

##### **考察**

妊娠期フッ素投与により、対照群に比べ全ての群の雌雄ともに仔のY-mazeとBarnes mazeの結果から認知機能の低下が示唆された。また、Elevated plus mazeの結果から、雄マウスでは、対照群に比べ全ての群でオープンアームの滞在時間が長かったことから、交感神経系への影響が示唆された。雌マウスについては、非常にバラつきが多かったことから、動物の個体差があったことが示唆された。現在、海馬等の病理観察と雌雄差についての検討中である。また、今回の研究では、フッ素単体のみの投与で認知機能の低下が示唆されているが、実際に井戸水を飲料水として摂取しているアジアの山間部では重金属の影響も考えられる。今後は、本研究で影響が見られたフッ素濃度と重金属の複合曝

露の影響についても検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

Hosokawa M, Matsumoto S, Tsunoda M, Yokoyama K. An experimental study for the effects of fluoride on memory and learning ability of mice by the exposure during stages from fetus and development. 56th Annual Meeting and ToxExpo, 2017.

細川まゆ子, 松本信英, 角田正史, 横山和仁: 胎児期からの発達期にかけてのフッ素曝露による学習記憶能力及び情動不安への影響. 第87回日本衛生学会学術総会, 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

細川まゆ子 (Hosokawa, Mayuko)

順天堂大学・医学部衛生学講座・助教

研究者番号：70582013

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )