

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10612

研究課題名(和文) フッ素曝露の神経系への影響：感受性を考慮した検討

研究課題名(英文) The effects of fluoride on central nervous system from the standpoints of difference of sensitivity

研究代表者

角田 正史 (Tsunoda, Masashi)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・衛生学公衆衛生学・教授)

研究者番号：00271221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：フッ素(F)の発達期曝露による神経毒性について明らかにするために、妊娠ラットに飲水を介しFを150ppmの濃度で投与し、生まれてきたF1ラットについて、引き続きFを投与する群(FF群)としない群(FC群)に分け、12週令まで飼育し、オープンフィールド試験、Prepulse inhibition (PPI) testで評価を行い対照群と比較した。雄のFF群について対照群と比べ、体重増の抑制が観察された。また雄のFF群ではPPI testにおいて、対照群に比べて、70dBのプレパルスがあったときの驚愕反応抑制の指標%PPIが有意に低かった。雄に関して発達期のF曝露で毒性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インドや中国において地下水の汚染が大きな問題になっているフッ素について、今まで明らかになっていなかった神経毒性を、胎児期～発達期の感受性の高い成長期に曝露があれば、動物において起こりうることを示唆した。顕著な成長抑制が観察されたことと併せて、フッ素の感受性の高い成長期における曝露にリスクが伴うことを示したことに学術的・社会的意義がある。今後、疫学研究との所見と併せて研究を進めるべき結果となった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the developmental neurotoxicity of rats, pregnant rats were exposed to fluoride (F) at the concentrations of 0 or 200 ppm in the drinking water. After weaning, F1 rats which exposed to F were divided to the two group which administered 0 or 150 ppm of F in their drinking water. The groups were composed of the control, perinatal exposure (FC) and repeated exposure (FF) groups. At the 12 weeks of age, the open field test and the prepulse inhibition (PPI) test were performed. The mean values of body weights in the male FF group were significantly lower than those in the other two groups. The mean % PPI at PP 70 as one of indexes of the PPI test in the male FF group was significantly lower than that of the control. The perinatal exposure to F exposure may have inhibitory effects on the development of F1 rats. The lower % PPI in the F1 rats exposed to F from fetus to the 12 weeks of age may be comparable to the ADHD-like syndrome observed in humans.

研究分野：衛生学

キーワード：フッ素 神経毒性 二世帯 行動学試験 ラット F1動物

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中国やインドではフッ素による地下水汚染が大きな問題となり、フッ素の健康影響で最も顕著なものは高濃度曝露による骨フッ素症と斑状歯であるが、腎臓をはじめとするその他の臓器への影響も指摘されるようになってきた。近年、疫学研究では神経系の影響が指摘されるようになり、フッ素曝露による若年層の認知機能への影響や周産期の母親へのフッ素曝露による子供のIQスコア低下、そして発達障害に類似した症候が小児に観察される等の報告がなされてきた。しかし一方では疫学研究による結果を慎重に判断すべきとの意見もあった。成体に対する毒性と、感受性の高いと想定される、発達期やフッ素を排出する腎臓に障害がある場合の毒性は異なる可能性もある。研究開始時点までに、感受性を加味したフッ素の神経毒性について動物実験の知見は未だ十分とは言えなかった。そこで、脳神経系への影響をスクリーニングする方法として確立されている行動学試験(オープンフィールド試験、聴性驚愕反応試験 Prepulse inhibition (PPI) test)を用いて、化学物質の影響を受けやすい、胎児期、発達期に、実際の汚染と比較可能なレベルでフッ素曝露があった場合にフッ素の脳神経系への影響が起こるか、腎臓障害がある場合に、フッ素の脳神経系への影響が起こるかどうかについて動物実験を用いて明らかにする意義があると考えた。

### 2. 研究の目的

(1) 成獣の雄、雌の Wistar ラットを用いて8週間、飲み水を介したフッ素曝露(曝露濃度、フッ素イオン濃度として0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm)を行い、オープンフィールド試験及びPPI test で評価を行った上で、妊娠ラットにフッ素濃度として0または150ppmを投与して、生まれてきたF1ラットを離乳後にフッ素を曝露する群としない群に分けて飲み水を介して曝露(曝露濃度150 ppm)を行い、12週令時にオープンフィールド試験及びPPI test で評価を行い、胎児期及び発達期におけるフッ素曝露による神経毒性について基本的資料を得ることを目的とした。

(2) 成獣の雄ラットを用いて、片腎に尿管結紮を行い、フッ素を飲み水を介して曝露(曝露濃度150 ppm)し、2週間後にオープンフィールド試験及びPPI test で評価を行い、腎機能に低下があった場合に、フッ素による神経毒性が現れるかどうかを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) まずは成獣の雄、雌の Wistar ラットを用いて、一群10匹として8週間、飲み水を介したフッ素曝露(曝露濃度、フッ素イオン濃度として0 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm)を行った。曝露期間を通じて、体重、餌及び水の摂取量を測定した。曝露期間終了後、先行研究を参考に一日目の午前中に高さ50 cmの壁に囲まれた100 cm × 100 cmのオープンフィールド内にラットを置き、30分間観察することでオープンフィールド試験を行い、翌日PPI test (Prepulse である比較的音量が小さい音を聞かせることにより、次にくる音刺激に対する驚愕反応が、単独に音を聞かせた場合よりも抑制されることを利用した試験)を行った。オープンフィールド試験において、行動距離、立ち上がり回数(wall rearing, center rearing)、グルーミングの回数、Center stay率(オープンフィールドを5 × 5の25区画に分割した際に、中央の9区画に滞在した時間の割合)を測定し、新環境下での自発運動性を評価し、PPI test においては San Diego Instruments 社製の SR-LAB-Startle Response System を用いて45分間に70dB、75dB、80dBのプレパルス(PP)があった場合の120dBの音響刺激への反応を、120dB単独の音響刺激に対する反応と比較し、驚愕反応の%PPIを算出して指標とした(それぞれのPP毎に%PPI at PP70dB、%PPI at PP75dB、%PPI at PP80dB)。

(2) 妊娠ラットに飲み水を介してフッ素を0または150ppm投与し、出産後も投与を継続した。生まれてきたF1ラットの離乳時に、フッ素150ppmに曝露されたF1群を2群に分け、フッ素を0または150ppm投与した。つまりF1ラットは対照群(CC群)、胎児期～授乳期のみ曝露群(FC群)、連続フッ素曝露群(FF群)の3群に分け、それぞれの群の匹数は、雄雌それぞれ10匹以上とした。離乳後は体重の測定、餌、水の摂取量を測定した。12週令時に、オープンフィールド試験及びPPI test で評価を行った。

(3) 成獣の雄ラットを用いて、麻酔下で片腎の尿管結紮を行った。1群10匹として、対照群にはフッ素を含まない水を、曝露群に対してはフッ素を飲み水を介して150ppmの濃度で2週間投与し、体重、餌及び水の摂取量を測定した。飼育期間終了後、オープンフィールド試験及びPPI test で評価を行い、両群を比較した。また試験終了後に、安楽死後、開腹して、結紮による水腎症の有無を確認し、水腎症を起こしていた個体のみデータを用了。

### 4. 研究成果

### (1)成獣ラット

雄、雌ともに体重増加に関して 100ppm 曝露群と比べて 150ppm 曝露群の平均値が有意に低い結果となった。但し対照群と比べては低い値ではあるが有意な違いはなかった。オープンフィールド試験の結果、雄、雌ともに有意な差は見られなかったが、雄の高濃度曝露群では Center stay 率や Center rearing 回数の平均値が対照群より多い傾向にあった(それぞれ  $p=0.073$ 、 $p=0.079$ )。なお PPI 試験では、有意な差は見られなかった。

以上の結果から、フッ素は飲み水を介した亜急性曝露によって体重に負の影響を与えることが示唆された。しかしフッ素イオン濃度が 150ppm までなら、行動学試験や聴覚を利用した驚愕反応試験に有意な差は見られず、この実験条件では成獣ラットへの神経系への影響は明らかではなかった。

### (2)F1 ラット：胎児期、発達期曝露

雄の実験群は CC 群  $n=17$ 、FC 群  $n=11$ 、FF 群  $n=11$  となった。雌の実験群は CC 群  $n=16$ 、FC 群  $n=11$ 、FF 群  $n=11$  となった。F1 ラットの体重に関して、離乳期から曝露終了時まで、雄の FF 群の平均値が、他の群に比べて、一貫して有意な低値を示した(図 1)。雌では群間で差が見られなかった。

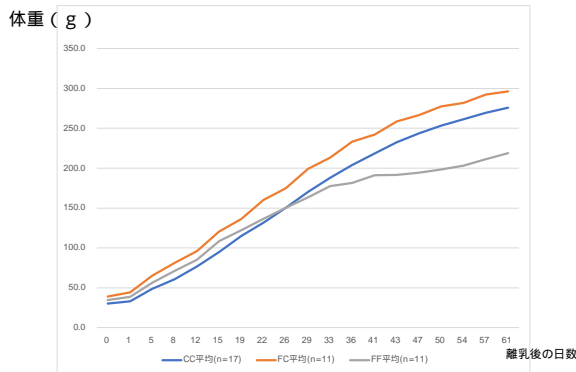


図 1 フッ素に胎児期～成長期に曝露された雄のF1ラットの体重推移  
注) CC群(対照群)、FC群(胎児期、授乳期のみ曝露)、FF群(胎児期より12週令まで曝露)

また PPI test に関して、雄では%PPI at 70dB について、FF 群、FC 群ともに対照群より平均値が有意に低かった(図 2)。%PPI at 75dB 及び 80dB については値は低かったが、群間の比較で有意性には至らなかった。雌では群間で差が見られなかった。

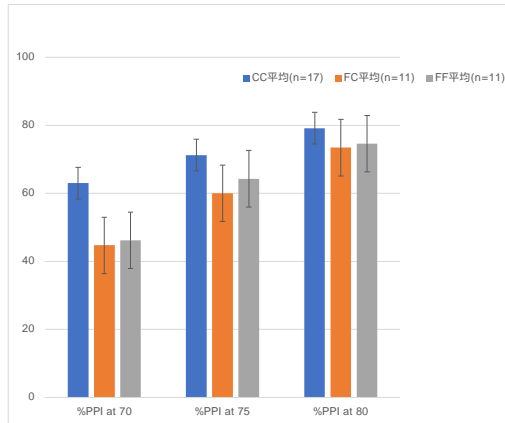


図 2 フッ素に胎児期～成長期に曝露された雄のF1ラットの%PPI  
注) CC群(対照群)、FC群(胎児期、授乳期のみ曝露)、FF群(胎児期より12週令まで曝露)  
%PPI at 70 (70dBのPPがあった場合)、%PPI at 75 (75dBのPPがあった場合)、%PPI at 80 (80dBのPPがあった場合)、

オープンフィールド試験に関しては、雄、雌ともに群間で有意な差は見られなかった。

以上の結果より、胎児期、発達期のフッ素曝露により雄では顕著な成長抑制が観察された。また神経系への影響も示唆された。性差がフッ素の影響に関してはあることが示唆され、また、成獣よりも胎児期、発達期の曝露により、特に成長に関しては影響が強く、特に連続的に曝露された場合の影響は強い。PPI test の雄での有意な結果は、発達障害等に関する疫学的結果と比較する必要があると考える。

### (3)尿管結紮ラット

尿管結紮ラットに関しては、フッ素曝露群の体重が対照群に比べ有意に低下した。オープンフィールド試験、PPI test に関しては群間で有意な差は見られず、尿管結紮ラットにおけるフッ素の毒性に関する影響は、成獣に関する限り、神経系については明らかではなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Housseini, S.S., Mahvi, A.H., Tsunoda, M.	4. 巻 52
2. 論文標題 Fluoride content of coconut water and its risk assessment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fluoride	6. 最初と最後の頁 553-561
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木聡子、菅谷ちえ美、吉岡範幸、三好優香、岩澤聡子、角田正史
2. 発表標題 行動学試験によるオスラットの中枢神経系への飲料水を介したフッ化物の影響評価
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takahiro Sakamoto, Satoko Suzuki, Yumiko Sugiura, Chiemi Sugaya, Noriyuki Yoshioka, Yuka Miyoshi, Satoko Iwasawa, Masashi Tsunoda
2. 発表標題 The evaluation of developmental neurotoxicity of fluoride in male F1 rats after the exposure via placenta, their dam's milk and/or drinking water
3. 学会等名 XXXVth Conference of the International Society for Flouride Researcg（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	坂元 崇洋  (Sakamoto Takahiro)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	鈴木 聡子  (Suzuki Satoko)		
研究協力者	杉浦 由美子  (Sugiura Yumiko)		
研究協力者	菅谷 ちえ美  (Sugaya Chiemi)		
研究協力者	吉岡 範幸  (Yoshioka Noriyuki)		
研究協力者	三好 優香  (Miyoshi Yuka)		
研究協力者	岩澤 聡子  (Iwasawa Satoko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------