

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：82406

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21100

研究課題名（和文）発達期のラットにおける高濃度フッ素曝露の脳神経系への影響

研究課題名（英文）The effects of fluoride on the central nervous system of the F1 rats by the exposures via placenta, dam's milk, and/or drinking water.

研究代表者

鈴木 聡子（Suzuki, Satoko）

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・助教

研究者番号：30821780

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）：環境汚染物質であるフッ素について、発達期の脳神経系への影響、特に記憶学習能力への影響を明らかにするため二世世代曝露を行った。飲み水を介して妊娠ラットにフッ素を150ppmで投与し、離乳後のF1ラットは引き続きフッ素を投与するFF群としないFC群に分け12週齢まで飼育し、受動的回避試験、Y字迷路試験を実施した。オスメス共に対照群（CC群）およびFC群と比較して、FF群は体重増加の抑制が観察された。またY字迷路試験では、オスの空間作業記憶に関してCC群よりFF群が有意に低い結果となった。以上より、胎児期からのフッ素の連続曝露は性差に関係なく成長を抑制し、オスの短期記憶に影響を及ぼすことが示唆された。

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となっているフッ素について、フッ素の連続曝露が、今まで明らかになっていなかった神経毒性を引き起こすことを示した。ラットでは顕著な成長抑制が観察されたことと併せて、感受性の高い胎児期～発達期のフッ素曝露は脳神経系へも影響を及ぼし、記憶学習能力にリスクがあると明らかにできたことは学術的・社会的意義がある。今回示唆された短期記憶への影響に限らず、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。汚染地域における胎児期～発達期のフッ素曝露は、ヒトに対しても成長抑制や神経毒性を示す可能性があり、今後の疫学研究の手掛かりとなり得る。

研究成果の概要（英文）：The objective of the study was to clarify the effects of fluoride on the central nervous system of the F1 rats from fetus to the developmental stage by evaluating learning and memory. Fluoride was administered to pregnant rats at 0 or 150 ppm through drinking water. After weaning, the F1 rats were divided into the FF group, which was administered fluoride continuously, and the FC group, which was administered water. F1 rats were maintained until 12 weeks of age and subjected to passive avoidance test and Y-maze test. The significant decrease of the final body weight was observed in the FF group compared to the control group (CC group) and FC group for males and females. In the Y-maze test, the FF group had significantly decreased alternation which related short-term memory than the CC group in males. These results suggest that the continuous exposure to fluoride from the fetal period suppresses growth in both males and females, and impairs short-term memory in males.

研究分野：衛生学

キーワード：フッ素 二世世代曝露 ラット 行動学試験 記憶学習能力 受動的回避試験 Y字迷路試験 脳神経系

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

フッ素は一般的にフッ素イオンとして普遍的に存在し、自然界でも土壌や降水、また食品など様々な物質に含まれている。体内に吸収されたフッ素は主に腎臓を通して尿として、一部は汗として排出される。しかし地域によっては高濃度のフッ素が含まれた地下水を飲用する事による健康被害が問題となっている。中国やインドでは高濃度フッ素の地下水汚染により、斑状歯(フッ素の過剰摂取によるエナメル質形成不全症)や骨フッ素症(2ppm以上のフッ素イオンを含む水を日常的に飲用する事で、骨硬化症を発症し、骨折の多発及び運動障害を呈する)を主な特徴とするフッ素症が発生し、数千万人の患者が存在するとされ、世界的にも大きな公衆衛生問題となっている。またフッ素の高濃度曝露による中枢神経系への影響も注目され、学習能力低下や統合失調症等が懸念されているが不明な点も多い。

その一方、1ppm程度のフッ素濃度であれば齲歯予防の効果があるとされ、アメリカやオーストラリア、ブラジル、ニュージーランド、イギリス等、多くの国で水道水への0.7~1.2ppm程度のフッ化物添加が行われている。日本でも導入の議論があるが、厚生労働省が定める水道水質基準(0.8mg/L以下)があり、また毒性学的観点からはフッ素の毒性と齲歯予防の有効性の線引きは難しく、安全域が極めて狭い。

### 2. 研究の目的

本研究では神経系が発達する胎児期~発達期のラットを用いて、飲み水を介した二世代フッ素曝露実験を行い、フッ素による神経毒性、特に記憶学習能力に関する基礎的資料を得ることを目的とした。そのために、記憶を評価する方法として確立されている行動学試験(短期記憶及び長期記憶を評価する受動的回避試験、短期記憶を評価するY字迷路試験)を行い、フッ素による神経毒性影響を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試験動物

まず妊娠ラットに飲み水を介したフッ素曝露を行った。曝露濃度は、先行研究を基に対照群0ppmに対して曝露群150ppmとした。母ラットへは出産後も引き続き曝露を行い、F1ラットへは母乳を介しての曝露となった。F1ラットは3週齢での離乳後、曝露群を2つに分け0ppm群と150ppm群を設定した。つまり対照群(Control-Control)CC、胎児期~発達期曝露群(Fluoride-Control)FC、連続曝露群(Fluoride-Fluoride)FFの3群に分け、オスの対照群CCM(n=19)、胎児期~発達期曝露群FCM(n=15)、連続曝露群FFM(n=14)、メスの対照群CCF(n=11)、胎児期~発達期曝露群FCF(n=15)、連続曝露群FFF(n=14)、オスメスそれぞれ3群を設定して12週齢まで飼育した(図1)。曝露期間中は週2回、ケージ毎(2~3匹/ケージ)の餌・水の摂取量及び個体体重を測定し、体重当たりの餌・水摂取量を算出した。



図1 F1ラットの群設定

#### (2) 記憶学習能力試験

##### 受動的回避試験

11週齢時には短期及び長期記憶を評価する受動的回避試験の訓練試行を、パッシブアボイダンスシステムを用いて実施した。これは暗いところを好むラットの習性を利用し、明室から暗室へ侵入した際に電気刺激を与えることにより、暗室への進入とショックの恐怖を関連付けて記憶させる実験である。訓練試行で300秒以上明室に留まるようになったら、1週間後に再び明室に入れて暗室への移動時間を測定した。移動までの反応時間が長いほど電気刺激を記憶していると考えられ、長期記憶の指標となる。

##### Y字迷路試験

W1000×D500×H250mmのY字迷路内を8分間自由に探索させ、真上からの映像をモニターで観察し、進入したアームを順に記録した。時間内にラットが各アームに進入した回数及び連続して異なる3本のアームに進入した組合せの数を記録し、交替行動率( )を算出した。異なる3本のアームを連続して選択するためには、少なくとも2回前までのアームを記憶している必要がある。またこの記憶は、3回目以降の選択時には次々と入れ替わっていく必要があることから、短期記憶と捉える。交替行動はすなわち空間作業記憶。

$$\text{交替行動率}(\%) = \text{交替行動数} \div (\text{総アーム進入回数} - 2) \times 100$$

交替行動数: 連続して異なる3本のアームに進入した組合せの数

総アーム進入回数:各アームに進入した総回数

### (3) データ解析

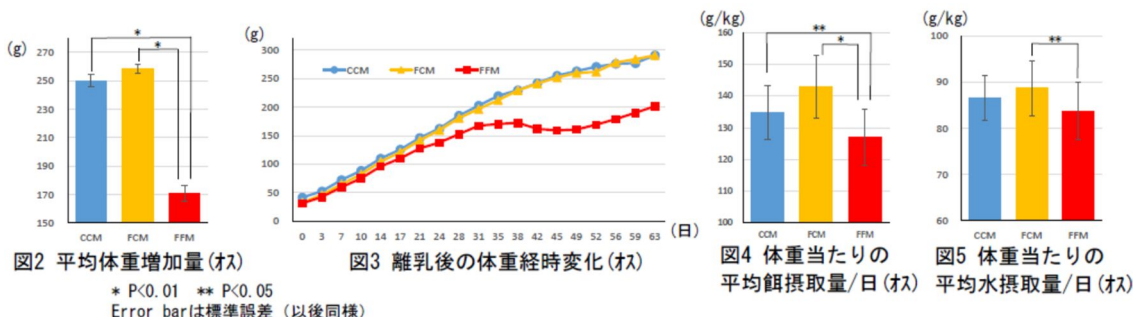
一元配置分散分析を行い、群間の差を多重比較法 Tukey-Kramer の方法で検定した。なお受動的回避試験に関しては、暗室へ移動しなかった場合は移動時間を 300sec として平均値を算出し、平均値 ± 標準誤差とした。

## 4. 研究成果

### (1) F1 オス (CCM、FCM、FFM) の結果

F1 ラットの体重は、離乳直後の 3 週齢では CCM 群と比べて FCM 群も FFM 群も有意に低かった (それぞれ、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ )。体重増加に関しては、FFM 群は CCM 群及び FCM 群に比べて平均値が有意に低い結果となった ( $p < 0.01$ ) (図 2)。また体重増加の経日変化は、9 週齢 (離乳後 42 日) 以降で FFM 群は CCM 群及び FCM 群に比べて有意に低い結果となった (9~10 週齢  $p < 0.05$ 、11~12 週齢  $p < 0.01$ ) (図 3)。

体重 1kg 当たりの餌平均摂取量は、FFM 群は CCM 群及び FCM 群に比べて有意に低く (それぞれ、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ) (図 4) 体重 1kg 当たりの水平平均摂取量は、FFM 群は FCM 群に比べて有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (図 5)。



受動的回避試験における記憶保持率と平均移動時間は、CCM 群では 89.5% (17/19 匹) で  $281.4 \pm 15.4$ sec、FCM 群では 60.0% (9/15 匹) で  $237.0 \pm 26.5$ sec、FFM 群では 64.3% (9/14 匹) で  $244.1 \pm 27.6$ sec となった。なお群間の移動時間に統計学的な有意差は検出されなかった。

Y 字迷路試験では、総アーム進入回数及び交替行動数に関して有意差はなかったが、空間作業記憶 (交替行動率) に関して FFM 群は CCM 群と比べて有意に低い結果となった ( $p < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 Y 字迷路の試験結果 (オス)

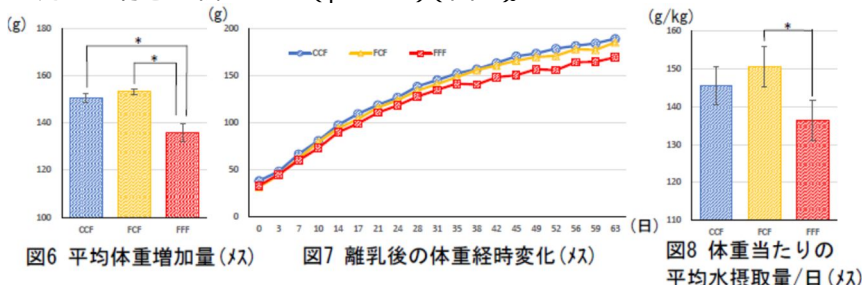
群	総アーム進入回数 (回)	交替行動数 (回)	交替行動率 (%)
CCM	$10.63 \pm 0.90$	$6.16 \pm 0.81$	$67.46 \pm 4.31$
FCM	$12.77 \pm 0.76$	$6.46 \pm 0.44$	$62.81 \pm 5.19$
FFM	$12.57 \pm 1.25$	$5.21 \pm 0.80$	$46.94 \pm 6.25$ **

CCM n=19  
FCM n=13 (※)  
FFM n=14  
※総進入回数が3回未満の個体を除く  
平均値 ± 標準誤差 \*\* CCM に対して  $p < 0.05$

### (2) F1 メス (CCF、FCF、FFF) の結果

体重増加はオス同様、FFF 群は CCF 群及び FCF 群に比べて平均値が有意に低い結果となった ( $p < 0.01$ ) (図 6)。体重は、離乳直後の 3 週齢から 4 週齢 (離乳後 0 日 ~ 7 日) までは CCF 群と比べて FCF 群も FFF 群も有意に低かった ( $p < 0.01$ )。また体重増加の経日変化は、FFF 群は飼育期間を通して CCF 群と比べて有意に低く (5~6 週齢  $p < 0.05$ 、7~12 週齢  $p < 0.01$ )、9 週齢 (離乳後 42 日) 以降は FCF 群と比べても有意に低かった ( $p < 0.05$ ) (図 7)。

体重 1kg 当たりの餌平均摂取量には群間の差がなかったが、水平平均摂取量は FFF 群は FCF 群に比べて有意に低かった ( $p < 0.01$ ) (図 8)。



受動的回避試験では CCF 群および FFF 群は記憶保持率が 100% (それぞれ 11/11 匹、14/14 匹)、移動時間  $300.0 \pm 0.0$ sec で、いずれの個体も暗室に入らなかった。FCF 群では記憶していた割合は 93.3% (14/15 匹)、平均移動時間  $281.8 \pm 18.2$ sec だった。オス同様、群間の移動時間に統計学的な有意差は検出されなかった。

Y字迷路試験でも群間に有意性は見られなかった(表2)

表2 Y字迷路の試験結果(メス)

群	総7-4進入回数(回)	交替行動数(回)	交替行動率(%)	
CCF	14.90±1.63	8.33±0.98	61.60±2.42	CCF n=10 (※)
FCF	15.53±0.75	8.20±0.51	62.32±3.74	FCF n=15
FFF	17.64±0.78	9.50±0.75	60.24±3.41	FFF n=14

※総進入回数が3回未満の個体を除く

平均値±標準誤差

### (3) まとめ

F1ラットはオスメス共に離乳直後のFC群とFF群の体重の平均がCC群より有意に低いことから、母ラットを介した経胎盤及び経母乳によるフッ素曝露の影響が考えられる。また発達期においても、飲み水を介したフッ素曝露による体重増加の抑制、すなわち成長抑制が明らかとなり、FF群はCC群に比べてメスでは飼育期間を通して、オスでは3週齢と9週齢以降で有意に低い結果となった。但しオスの方が平均値の差は大きかった。これは体重1kg当たりの餌水平均摂取量が有意に少ないことも関連している可能性がある。

またY字迷路試験では、オスの交替行動率がFF群はCC群と比較して有意に低かったことより、胎児期からの連続曝露がオスの短期記憶に影響を及ぼすことが示唆された。メスでは群間の差が見られなかったことから、神経系への影響はオスにより強くあらわれる可能性がある。

以上より、フッ素曝露は成長抑制及び神経毒性を引き起こすことが示された。ラットでは顕著な成長抑制と併せて、感受性の高い胎児期～発達期のフッ素曝露が脳神経系へも影響を及ぼし、記憶学習能力にリスクがあることを明らかにできた。今回示唆された短期記憶への影響に限らず、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。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木聡子、坂元崇洋、杉浦由美子、菅谷ちえ美、吉岡範幸、三好優香、中島宏、岩澤聡子、橋本逸美、星野賢人、角田正史
2. 発表標題 飲み水、胎盤、母乳を介したフッ素二世代曝露によるオスF1ラットの記憶学習能力への影響評価
3. 学会等名 第34回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鈴木聡子、坂元崇洋、杉浦由美子、菅谷ちえ美、吉岡範幸、三好優香、岩澤聡子、橋本逸美、星野賢人、角田正史
2. 発表標題 飲み水、胎盤、母乳を介したフッ素二世代曝露によるF1ラットの記憶学習能力への影響評価
3. 学会等名 第94回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鈴木聡子、坂元崇洋、杉浦由美子、菅谷ちえ美、吉岡範幸、三好優香、田中光信、岩澤聡子、橋本逸美、星野賢人、角田正史
2. 発表標題 フッ素二世代曝露によるF1ラットの記憶学習能力及び全身への影響評価
3. 学会等名 第35回日本微量元素学会学術集会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------