

胎仔期・授乳期・発達期における  
フッ素曝露によるラットの成長に関する  
影響及び発達神経毒性

さかもと たかひろ  
坂元 崇洋

(産科婦人科学専攻)

防衛医科大学校

令和5年度

## 目 次

第1章 緒言	3頁
第2章 対象と方法	8頁
第1節 曝露方法	8頁
第2節 評価方法	9頁
第1項 生殖毒性について	9頁
第2項 成長に関する影響について	9頁
第3項 胎仔期・授乳期・発達期の曝露による神経学的影響について	9頁
第3節 統計学的解析	12頁
第3章 結果	12頁
第1節 生殖毒性について	12頁
第2節 成長に関する影響について	12頁
第3節 胎仔期・授乳期・発達期の曝露による神経学的影響について	13頁
第4章 考察	15頁
第1節 フッ素の曝露方法と曝露濃度の妥当性について	15頁
第2節 生殖毒性について	16頁
第3節 成長に関する影響について	16頁
第4節 胎仔期・授乳期・発達期の曝露による神経学的影響について	19頁
第5章 結論	21頁
謝辞	23頁
引用文献	24頁
図表	28頁

## 第1章 緒言

フッ素（F）は、周期表においてハロゲンと呼ばれる第 17 族に属する元素で非金属元素の中で最も反応性が高い。そのため単体の状態で存在することはほとんどなく、水溶液中ではフッ素イオンとして、水溶液以外では他の元素と結合してフッ化物として存在することが多い。フッ素は鉱物中の蛍石、氷晶石、フルオロアパタイトとして地殻中に多く存在する[1]。それらの鉱物が豊富な地域での地下水はフッ素濃度が高い傾向にあり、最大数十 ppm まで達する。高濃度フッ素を含む地下水は、特にインド、中国、中央アフリカ、南米などで見られ飲用する場合に問題となる。ここまで高い濃度でなくとも、一定濃度のフッ素は水及び食べ物に含まれており、事実上我々の全ての食べ物はフッ素を含んでいるといえる。また、フッ素はう歯予防として歯磨き粉、局所塗布用のワニスやジェルなど歯科用製剤に広く使用されており、アメリカなどでは 0.7 から 1.0ppm のフッ素を水道水に添加するフルオリデーション（Fluoridation）が行われている。一方で飲み水がフルオリデーションで管理されていない地域でのヒトへの曝露量は、主にその地域の地下水もしくは飲み水に依存するため地域ごとに異なる。フッ素の健康影響は良く知られており、高濃度フッ素に汚染された井戸水を直接飲み水として用いる途上国において発生しており、代表的な疾患として歯のフッ素症や骨フッ素症がある。

歯のフッ素症は、特に発達期において飲み水中フッ素濃度 1.5ppm 以上の長期間曝露によって発生する慢性フッ素中毒症で、そのメカニズムはフルオロアパタイトと関連しているとされている。外的刺激に敏感な歯の発育時にフッ素に曝露されると、ハイドロキシアパタイトがフルオロアパタイトに置き換わる[2]。臨床的には過度のフッ素曝露により歯が変色したり、斑点が歯に形成される斑状歯が観察され、脆い歯となる。

骨フッ素症は、慢性フッ素中毒の最も重篤な形態であり、飲み水のフッ素濃度

4 ppm 以上の曝露で発生し中国やインドなどを中心に流行している[3]。骨フッ素症の根本的なメカニズムは歯のフッ素症と類似しており、骨がフッ素を取り込むと、骨ミネラルのハイドロキシアパタイトがフルオロアパタイトに変化し、骨が硬化して脆くなり全体の強度が低下する[4]。その結果、骨格の異常、運動の制限、骨折リスク増加につながる[5]。

このように、フッ素がもたらす影響は濃度依存的であり一般的に歯との予防効果と健康影響との兼ね合いで適切な飲み水濃度としては 1 ppm が目安とされており、世界保健機関（WHO）が飲み水中の安全なフッ素摂取の上限を 1.5ppm と定めている[1]。しかしながら高濃度フッ素に曝露されている集団は多く存在し、また上限以下であったとしても飲み水中のフッ素濃度が及ぼす様々な健康影響が懸念されている。神経学的影響もその一つであり、世界中で議論が続いている。神経学的影響の疫学研究として、妊娠中のフッ素量と出生後の認知機能との関連性が示唆された報告などがあり、産婦人科領域においても影響が懸念されている[6]。歯と骨以外の影響は先行研究に基づくと、産婦人科領域においては大きく三つに分けられる。一つ目は胎児期における影響、二つ目は成長・発達つまり児の体重増加に対する影響、三つ目は胎児期から授乳期の曝露による神経学的影響である。

生殖毒性については、イランで行われた疫学調査で、地下水のフッ素濃度が 3.0ppm 以上の地域は 1.5ppm 以下のフッ素濃度地域より流産率について統計学的に有意に高いと報告された（ハザード比=2.06, P=0.022）[7]。このことから著者らはフッ素と流産の関連性が示唆されるとしている。また、原因不明の流産の発生率について、地下水中のフッ素濃度が低い地域（平均 1.90ppm）よりもフッ素濃度が高い地下水地域（平均 8.10ppm）の方が統計学的に有意に高い（P=0.011）という報告もある。この著者らは原因不明の流産にフッ素が関連するとしている[8]。しかしながら、これらのフッ素と流産の関連性を示唆する論文は生態学的研究に

とどまり、この研究手法には限界がある。高濃度フッ素曝露によって集団の流産率が増加するかどうかのコホート研究や症例対照研究などの疫学研究は現実的には難しく、その報告もない。動物実験では有害物質に曝露されたことによる流産に関連する生殖毒性を評価するエンドポイントとして一般的に性比に加えて着床数や出生数のほか、着床数と出生数の差を流産数とし、流産数／着床数から算出される流産率が挙げられる[9]。

児の体重増加については、疫学的研究で出生後一定の時期まで継続的に体重増加とフッ素曝露との関連性について検討した報告はない。出生体重についての疫学的研究では飲み水の濃度 1.5ppm 以下で検討した報告があるが、関連性があると報告した論文[10]もあれば関連性がないと報告した論文[11]もあり、結論は様々である。一般に胎児期や発育期にある個体は、有害物質の影響を受けやすいことが報告されている。フッ素についても周産期から成長期にかけての影響が懸念される。そこで胎児期を含めた発達過程の体重増加への影響について疫学的研究による報告がない以上、動物実験で検証する必要性は高い。胎仔期からの曝露が授乳期、成長期の成長に影響を及ぼすかの評価は体重の推移を餌・水の摂取量と共に記録するのが一般的である。

神経学的影響については、特に認知機能や知能指数との関連性が報告されてきた。フルオリデーションが行われているメキシコにおける疫学研究では、妊婦の尿中のフッ素濃度が 0.5ppm 上がると 4 歳で行われた認知機能を評価する GCI (General Cognitive Index) スコアが 3.15 ポイント、6～12 歳で行われた IQ テストのスコアが 2.50 ポイントそれぞれ減少することが示された[12]。同様にフルオリデーションが行われているカナダにおける疫学研究で、妊婦の尿中のフッ素濃度が 1ppm 上昇すると、3～4 歳で測定された IQ スコアが 4.49 ポイント低下することが示された[6]。このことからどちらの研究でも著者らは比較的低レベルのフッ素曝露であっても、認知機能の低下[12]や知能指数の低下[6]と関連するとしてい

る。結論として Bashash らは、妊娠中のフッ素摂取の制限を推奨した[12]。

一方で、Broadbent らによる疫学的研究では、出生後の発達過程において、フッ素添加を行っている地域と行っていない地域とで知能指数について比較検討した結果、適切な濃度のフッ素摂取と知能指数との関連性について裏付ける証拠はないとしている[13]。Guth らは *in vitro* 実験について、フッ素曝露が神経細胞のアポトーシスを引き起こす濃度を複数の先行研究により評価した結果、アポトーシスを引き起こすには標準的なヒト血漿中のフッ素濃度の 300 倍高い濃度が必要であることを示した[14]。フッ素の神経毒性を調べるための動物実験は数多く行われているが、Guth らは、たとえフッ素の神経毒性が示されていても実験遂行上の様々な制約が実験結果の解釈を妨げ、ひいてはリスク評価への価値を低下させていると主張している[14]。以上のようにフッ素曝露による神経毒性への影響には否定的な意見もある。

一般的に胎仔期や発育期にある個体は神経系にも、有害物質の影響を受けやすいことが報告されている。つまり、胎仔期や発育期に曝露を行う 2 世代にわたる動物実験は当該化学物質の神経毒性の評価に有用と考えられるが、我々の知る限り、胎仔期から発育期までの曝露によるフッ素の神経学的影響を調べる動物実験の報告は少ない。実験の精度が高いと評価されている[14]、2 世代ラットを用いた動物実験では、飲み水中 20ppm まででは運動能力、感覚能力、学習能力、記憶能力にフッ素曝露と関連した有意差はなかった[15]。しかし、動物実験でフッ素の曝露濃度を設定する場合、WHO が定める化学物質に特異的な調整因子を考慮する必要がある。WHO によると、種差と個体差についてそれぞれ 10 倍ずつ考慮する必要があるとされている[16]。そこで、我々は 2 世代曝露実験を行う際にはヒトでの上限の 100 倍程度の実験が適切であると考えた。

活動・適応・情動に関する神経毒性の一般的なスクリーニングについては、オープンフィールドチャンバーを用いて探索行動を評価するオープンフィールド試

験が知られている。動物にとってオープンフィールドは新規環境であることから、そこで観察される行動は、動物の活動・適応・情動性を評価するための有用な指標とされている。また前述したように、フッ素曝露は疫学研究で認知機能の低下と関連が報告されている[12]が、認知機能の評価方法の一つに、プレパルス抑制 (Prepulse inhibition, PPI) 試験がある[17]。多くの生物は元来、突然の強い刺激に対する原始的保護的な身体反応として驚愕反射がある。PPI 試験は、驚愕反射を引き起こす刺激 (パルス) よりも先行してより弱い刺激 (プレパルス) を与えるとプレパルスがない時よりもあった時の方が驚愕反射が小さくなる性質を利用した試験である[18]。PPI 試験でいう認知機能とは、いわゆる高次的脳機能としての認知機能ではなく、その前提としての刺激を選別する認知機能である。動物は常時無数の刺激にさらされているが反射にいたるまで刺激の選別が行われている。PPI 試験は驚愕に対する反射を測定しているが、そこで測定される反射は刺激に対する選別の結果である。つまり、PPI 試験は反射を介して選別機能を測定しているといえる。選別機能は高次の脳機能としての認知機能の根幹をなすものであるから、PPI 試験で認知機能を測定しているとされている。PPI 試験は、ヒトやラットを含むすべての哺乳類で行うことができ、動物実験で得られた PPI 試験の結果をヒトで得られた結果と比較できることから、種を超えて研究を比較検討する場合に非常に適した評価手法とされている。また PPI 試験は、測定を実施するために必要な労力やコンプライアンスを比較的抑えることができ、神経毒性のスクリーニングや神経毒性の潜在的なメカニズムの解明にしばしば用いられる評価方法として、先行研究において、7つの脳の部位における神経伝達物質とその代謝物濃度を定量し指標とする報告がある[19-21]。

本研究の目的は、実際のヒトの曝露と比較可能なレベルで妊娠ラット及び胎仔期から発達期のラットに曝露させて、生殖毒性・発達・中枢神経系への影響を明らかにすることである。評価項目として F1 ラットの着床数と出生数のほか、その

差を流産数とした流産数／着床数を流産率、及び性比を生殖毒性として、体重の推移や餌・水の摂取量を発達過程の影響（児の体重増加）として、オープンフィールド試験と PPI 試験、脳各部位の神経伝達物質とその代謝物濃度を神経学的影響として用いることとした。以上を踏まえて、ラットに 150ppm のフッ素を曝露させ、2 世代曝露の動物試験を実施した。

## 第 2 章 対象と方法

### 第 1 節 曝露方法

実験はすべて防衛医科大学校動物実験倫理委員会の許可を受けた上で行い（承認番号：19067）、飼育は防衛医科大学校実験動物飼育指針に従って行った。妊娠 2 週の Wistar ラット（日本クレア、東京、日本）に、飲み水のフッ素濃度を 0 または 150ppm として自由に摂取させた。餌には市販の齧歯類飼料（CE-7、日本クレア）を用いて自由摂取させ、 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、14/10 時間明暗サイクルで飼育した。フッ素濃度 0 ppm で曝露させた妊娠ラットは 3 匹、フッ素濃度 150ppm で曝露させた妊娠ラットは 5 匹であった。妊娠ラットはフッ素曝露後 1 週間で出産した。妊娠ラットの投与は出産から 3 週間後の離乳まで継続した。離乳時（3 週齢）、フッ素濃度 150ppm に曝露された母から生まれた F1 ラットをオスとメス別に 4 群に分け、それぞれ 0 ppm、又は 150ppm のフッ素を、飲み水を介して 12 週齢まで曝露させた。図 1 に F1 ラットがどのようにフッ素に曝露されたかをまとめた。対照群（Control-Control：CC 群）、周産期曝露群（Fluoride-Control：FC 群）、継続曝露群（Fluoride-Fluoride：FF 群）から構成されることとなった。1 群あたり最低 10 匹のラットで構成することとしたため最終的に 1 群あたりの匹数は CC 群：オス=17、メス=16、FC 群：オス=11、メス=11、FF 群：オス=11、メス=11 となった。離乳後、2～3 匹の F1 ラットを 1 つのケージで管理した。FF 群は離乳後 9 週間継続してフッ素に曝露させたこととなった。



## 第2節 評価方法

### 第1項 生殖毒性について

F1ラットの離乳後、母親ラットを二酸化炭素で安楽死させた後で子宮を摘出した。双角子宮を展開し、各子宮に確認できる着床痕を肉眼的に数えてその合計を着床数とした。F1ラットの出生数をカウントし、また性別は離乳時に判別し、出生比を計算した。着床数と出生数の差を流産数とし、流産数/着床数を流産率とした。

### 第2項 成長に関する影響について

餌と水の量を、各ケージについて週に2回記録した。ケージごとの餌と水の消費量から、ラット1匹あたりの1日の餌と水の摂取量を計算した。各F1ラットの体重については1週間に2回記録した。体重の群毎の平均値を算出し、また測定値から1日毎の体重当たりの水および餌の摂取量を計算し、群間の平均値を算出した。

### 第3項 胎仔期・授乳期・発達期の曝露による神経学的影響について

#### (1) オープンフィールド試験とPPI試験

12週齢（離乳後9週）に、F1ラットに対してオープンフィールド試験とPPI試験を実施した。

オープンフィールド試験[22-24]は午前中に行った。オープンフィールド試験用の正方形の白い箱（幅：1.0m、高さ：0.5m）を用意してその中央にラットを配置した。30分間録画したラットの行動を、オープンフィールド試験用解析ソフトであるTime OFCR1B（O'hara, Tokyo, Japan）で解析し、総移動距離と中央エリアでの滞在時間を測定した。また、活動、適応、情動の指標として、壁立ち上がり、立

ち上がり、毛づくろい、排便、排尿の回数を記録した。

PPI試験は、オープンフィールド試験に続いて、先行研究に沿った方法で実施した[22-24]。Startle Response System SR-LAB ABS System (San Diego Instruments, San Diego, CA, USA) を用い、驚愕の程度を測定する検知器が搭載された床と、床上24cm に音響刺激を発するスピーカーで構成されるチャンバー内で実験を行った。ラットは音響刺激により驚愕反射を起こし驚愕反応を示す。ラットは、チャンバー内の円筒形のホルダーに入れ、テストセッションの前に5分間馴化させた。PPIテストセッションでは、70dB のバースト (PP70dB)、75dB のバースト (PP75dB)、80dB のバースト (PP80dB) の3種類のプレパルスと120dB のパルスを組み合わせて与えた。すなわち、プレパルスがない120dB のパルスのみ単独刺激 (P 単独)、PP70dB に続いて120dB のパルスを与える複合刺激 (PP70&P)、PP75dB に続いて120dB のパルスを与える複合刺激 (PP75&P)、PP80dB に続いて120dB を与える複合刺激 (PP80&P)、以上4種類の刺激をラットに対して擬似ランダムに与えて検知器により定量した。実際のPPI試験での音響刺激はP 単独、PP70&P、PP75&P が各11回、PP80&P は10回、音響刺激なしが10回であった。それぞれの刺激に対する反応の平均値を算出した。各驚愕反応のパーセントプレパルスインヒビション (%PPI)、PP70 の%PPI、PP75 の%PPI、PP80 の各%PPI は%PPI at PP70=(1-PP70&P/P 単独)×100、%PPI at PP75=(1-PP75&P/P 単独)×100、%PPI at PP80=(1-PP80&P/P 単独)×100 で計算した[24]。

## (2) 脳各部位の神経伝達物質及び代謝産物の定量

行動試験の翌日に各ラットを二酸化炭素で安楽死させた後、断頭し、脳を摘出した。各脳は氷上で Glowinski と Iversen の方法に従って大脳、小脳、延髄、中脳、線条体、視床下部、海馬の7つの部位に分割した[19]。神経伝達物質の日内変化の可能性を避けるため、すべての組織採取は午前中に行った[20]。脳サンプルは、

バイアルに入れた 0.1%システイン（和光、大阪、日本）を含む氷冷した 0.05M 過塩素酸（和光）に直ちに浸漬した上で、重量を測定した。組織重量と抽出液の比は約 1:4（組織重量/溶液(g)）であった。計量後、各サンプルをホモジナイズし、遠心分離し、0.22 $\mu$ m の孔径のフィルター（Ultrafree, Centrifugal Filter Units, Millipore, Bedford, MA, USA）で濾過した。ろ液は分析まで-80°Cで保存した。カテコールアミン（ノルエピネフリン [Norepinephrine, NE]、ドーパミン [Dopamine, DA]、DA 代謝物の 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 [3,4-Dihydroxyphenylacetic acid, DOPAC] およびホモバニリン酸 [Homovanillic Acid, HVA]）、インドールアミン（セロトニン [5-hydroxytryptamine, 5-HT]）と 5-HT 代謝物（5-ヒドロキシインドール酢酸[5-hydroxy indole acetic acid, 5-HIAA]）を、先行研究に従い、電気化学検出器（Electrochemical Detector）付き高速液体クロマトグラフィー（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）で同時に定量した[21]。分析装置は、GL Science ED743 Electrochemical Detector（GL サイエンス、東京、日本）、Hitachi Chromaster 5110 ポンプ（日立、東京、日本）、Hitachi Chromaster 5280 オートサンプラー（日立）、GL Science DG660 degasser（GL Science）、温度コントローラー付き GL Science CO 631C column heater（GL Science）から構成された。クロマトグラフィーのカラムとして Inertsil ODS-3（4.6 $\times$ 150 mm, particle size 5 $\mu$ m, GL Science）を使用した。9.6g/l クエン酸、100mg/l オクタン硫酸ナトリウム（和光）、40mg/l EDTA（エチレンジアミン四酢酸）（和光）、15%メタノール（和光）の濃度で HPLC の移動相を調製した。分析中のカラム温度は 40°C、検出器の測定時間は 20 分間とし移動相の流速は 1.0ml/分で測定した。標準試料として NE bitartrate、DA hydrochloric acid、DOPAC、HVA、5-HT creatinine sulfate、5-HIAA di-cyclohexyl ammonium（Sigma, Tokyo, Japan）を用いて 100ng/ml の濃度の標準溶液を 0.1%システインを含む 0.05M 過塩素酸中に調製し一点検量法を用い定量を行った。

### 第3節 統計学的解析

統計解析は、JMP 14.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。着床数、出生数、流産率 (%)、F1 ラットのオスの割合 (%) を Mann–Whitney の U 検定を用いフッ素曝露母親ラットと対照群の母親ラットの間で比較した。また F1 ラット各群について行動学試験の指標について平均値を算出した。7つの脳部位における神経伝達物質およびその代謝物の平均値 ( $\mu\text{g/g wet tissue}$ ) についても F1 ラット各群について平均値を算出した。さらに、DOPAC/DA、HVA/DA、5-HIAA/5-HT の比も算出した。平均値についてのデータは、F1 ラットの3群間では一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) に続いて、Student-Newman-Keuls test をポストホックテストとして比較した。有意水準は  $P < 0.05$  とした。

## 第3章 結果

### 第1節 生殖毒性について

着床数、出生数、流産率 (%)、F1 ラットのオスの割合 (%) の平均値 $\pm$ 標準誤差及び中央値を表1に示す。着床数の平均値は、対照群で  $11.0 \pm 1.5$ 、フッ素曝露群で  $10.4 \pm 1.4$  であった。F1 ラットの出生数の平均値は、対照群で  $11.0 \pm 1.5$ 、フッ素曝露群で  $8.8 \pm 1.7$  であった。流産率の平均値は、対照群で  $0.0\%$ 、フッ素曝露群で  $15.6 \pm 8.1\%$  であった。両群の間で着床数、分娩数、流産率、F1 ラットのオスの割合について有意差はなかった。

### 第2節 成長に関する影響について

オスのF1ラットの離乳後の平均体重の推移を図2Aに示す。FC群の平均体重は、離乳後0日目から49日目まで、CC群の平均体重より有意に高かった。FF群の平均体重は、28日目および33日目から63日目まで、CC群の平均体重よりも有意に低

かった。FC群の平均体重は、6日目から63日目まで、FF群より有意に高かった。メスのF1ラットの平均体重の推移を図2Bに示す。FC群の平均体重は0日目から15日目まで、CC群の平均体重よりも有意に高かった。FC群の平均体重は1日目から8日目、14日目、52日目から63日目まで、FF群の平均体重より有意に高かった。

オスのF1ラットの餌摂取量の平均値の推移を図3Aに示す。FF群は、44日目から48日目まで、餌の平均摂取量がCC群よりも有意に低かった。FC群の餌の平均摂取量は、44日目から46日目まで、FF群よりも有意に高かった。メスのF1ラットの餌摂取量の平均値を図3Bに示す。観察期間中に3群間で餌の摂取量に有意差はなかった。

オスのF1ラットの水摂取量の平均値の推移を図4Aに示す。オスのFF群における飲み水を介した1日の平均フッ素摂取量は、実験を通して18.7mg/kgであった。観察期間中に3群間で水摂取量に有意差はなかった。メスのF1ラットの水摂取量の平均値の推移を図4Bに示す。メスのFF群における飲み水を介した1日のフッ素摂取量の平均は、実験を通して19.3mg/kgであった。FC群の水摂取量の平均は、13日目から15日目、40日目から41日目、および43日目から63日目において、FF群よりも有意に高かった。FF群の水摂取量の平均値は、14日目から15日目、48日目から51日目、56日目から58日目、60日目から61日目にCC群よりも有意に低かった。

### 第3節 胎仔期・授乳期・発達期の曝露による神経学的影響について

#### (1) オープンフィールド試験

オープンフィールド試験の結果、総運動距離、中央エリアでの総滞在時間(%)、30分間の典型的な行動の回数について表2に示す。いずれの指標も3群間でオス、メス共に有意な差はなかった。

## (2) PPI試験

オスの F1 ラットの PPI 試験結果を図 5 A に示す。FC 群及び FF 群の PP70 における %PPI の平均値は、CC 群よりも有意に低かった。また、FC 群及び FF 群の PP75 及び PP80 における各群の %PPI の平均値は CC 群よりも低かったが、その差は統計的に有意ではなかった。メスの F1 ラットにおける PPI 試験結果を図 5 B に示す。各々の %PPI の平均値は、3 群間で有意な差はなかった。

## (3) 神経伝達物質及びその代謝産物

オスの F1 ラットの CC 群、FC 群、FF 群における各脳部位での DA 濃度の平均値を図 6 A に示す。FF 群における延髄の DA は、CC 群よりも有意に高かった。FC 群および FF 群での中脳 DA は、CC 群よりも有意に低かった。

オスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群での各脳部位の NE、DA の代謝産物である DOPAC、HVA 濃度を表 3 に示す。FC 群と FF 群の小脳における NE は、CC 群と比較して有意に高かった。FC 群と FF 群の中脳における NE は、CC 群よりも有意に低かった。他の脳部位では、3 群間で NE に有意差はなかった。DOPAC と HVA は、全ての脳部位で、3 群間で有意差はなかった。

オスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位での 5-HT、5-HT の代謝産物である 5-HIAA の濃度を表 4 に示す。FC 群の小脳での 5-HT は、CC 群よりも有意に高かった。同様に、FF 群の小脳の 5-HIAA は、CC 群よりも有意に高かった。

オスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位における DOPAC/DA、HVA/DA、および 5-HIAA/5-HT を表 5 に示す。FF 群の小脳での DOPAC/DA は、CC 群よりも有意に高かった。同様に、FF 群の視床下部における DOPAC/DA は、CC 群よりも有意に高かった。また、小脳の 5-HIAA/5-HT は、CC 群に比べて FF 群

で有意に高かった。

メスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位における DA 濃度を図 6 B に示す。全ての脳部位で、3 群間で DA に有意差はなかった。

メスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位における NE、DA の代謝物産物である DOPAC、HVA の濃度を表 6 に示す。FC 群および FF 群の脳の NE は、CC 群よりも有意に高かった。DOPAC および HVA は、3 群間の全ての脳部位で有意差はなかった。

メスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位における 5-HT とその代謝物である 5-HIAA 濃度を表 7 に示す。FC 群と FF 群の脳における 5-HT は、CC 群よりも有意に高かった。FC 群と FF 群での線条体の 5-HT は、CC 群よりも有意に低かった。FC 群での脳の 5-HIAA は、CC 群よりも有意に高かった。

メスの F1 ラットの CC 群、FC 群および FF 群の各脳部位における DOPAC/DA、HVA/DA、5-HIAA/5-HT 比を表 8 に示す。FC 群での脳の DOPAC/DA は、CC 群よりも有意に高かった。同様に、FC 群での脳の HVA/DA は、CC 群よりも有意に高かった。なお、5-HIAA/5-HT 比については、全ての各脳部位で、3 群間で有意差はなかった。

## 第 4 章 考察

### 第 1 節 フッ素の曝露方法と曝露濃度の妥当性について

ヒトの主なフッ素の摂取源は飲用水である[3]から、曝露方法を餌ではなく飲み水に設定した。設定した飲み水中のフッ素濃度150ppmは、WHOが定めた飲み水中のフッ素の上限値1.5ppmの100倍である。本研究の濃度は、種差で10倍、個体差で10倍の調整因子[16]を計算して設定したものである。世界の多くの汚染地域の飲み水は、フッ素濃度が10ppmを超えている[1]。したがって、本研究で設定した飲み水中のフッ素濃度は、現実的に摂取する濃度と比較可能と考えられる。

## 第2節 生殖毒性について

本研究では、対照群とフッ素曝露群の間で、着床数に有意差はなかった。また、フッ素曝露群の着床数は $10.4 \pm 1.4$ 、出生数は $8.8 \pm 1.7$ であり流産率は $15.6 \pm 8.1\%$ 、対照群の着床数は $11.0 \pm 1.5$ 、出生数は $11.0 \pm 1.5$ であり流産率は $0.0\%$ であったが、両群間の差は有意水準に達しなかった ( $P=0.1243$ )。有意水準に達しなかった理由は、妊娠ラットの数が対照群3頭、フッ素曝露群5頭と少なかったためと考えられる。今回の実験からは統計学的有意差には至らなかった流産率の平均が、対照群で $0\%$ に対してフッ素曝露群で $15.6\%$ であることから、フッ素曝露と流産との関連性は今後も検討の余地がある。また、フッ素濃度の高い飲み水の地域と低い飲み水の地域で流産率を比較した疫学調査において、飲み水中のフッ素濃度と流産の間に関連性が認められている[7]。過去の論文と今回の結果を合わせて考えると、安全限界上限の濃度でもフッ素による流産の可能性は否定できない。今後の課題として妊娠ラット数を増やして、流産に着目した実験を行う必要もあり、同時に様々な地域での疫学的研究も必要であると考え。ヒトにおいて不育症（2回以上の流産（妊娠22週未満）もしくは死産（妊娠22週以降）の既往がある場合）の原因は複雑であり、約半数は検査をしても特定できないといわれている[25]。妊婦の生活環境の中で、フッ素の摂取量が過剰である場合は、フッ素の過剰摂取に伴う流産を念頭に置くことが必要である。なおF1ラットの出生性比にフッ素曝露群と対照群に差がなかったことからフッ素は出生性比に影響を及ぼすほどの影響はなかった。

## 第3節 成長に関する影響について

オスのF1ラットの餌摂取量とフッ素曝露との関連性について、FF群はCC群に比べ、離乳後44日目から48日目の餌摂取量が有意に減少した。また、FF群はFC群に



比べ、44日目から46日目まで餌摂取量が有意に減少した。フッ素曝露群では食欲が低下した可能性があるが、フッ素曝露の影響は3～4日間程度と一時的である一方でフッ素曝露自体は継続的であることから、フッ素曝露による食欲への影響は大きくないと考える。以前の研究では、250ppmのフッ素曝露によって離乳後の餌摂取量に差がないことも報告されている[26]。また、メスではF1ラットの餌摂取量は観察期間を通して3群間で有意差はなかった。

水摂取量については、オスのF1ラットでは観察期間中を通して3群間で有意差はなかった。メスのF1ラットではFF群ではCC群に比べ水摂取量が有意に減少した期間が2日間から4日間続くことが観察された。FF群では、FC群に比べ水分摂取量が有意に減少した時期が43日目から63日目まで観察された。これらの有意差は全体として継続的ではなく断続的であるためフッ素曝露による重要な影響ではないと考えた。

オスのF1ラットではフッ素曝露と体重増加の関連については、離乳後33日目から観察終了まで、FF群がCC群によりも体重増加が減少した。この結果は、離乳後の飲み水中の150ppmのフッ素曝露が体重増加を減少させていることを示唆している。先行研究では、離乳後の250ppmのフッ素曝露とラットの体重増加の減少について関連性があることが報告されている[26]。一方、20ppmのフッ素曝露ではラットの体重増加に関連しないことが報告されている[27]。以上から離乳後のフッ素曝露と体重増加の関連性は濃度依存的であることが示唆された。フッ素曝露量と餌・水摂取量との間に有意な関連性はないことから、体重増加の減少は餌・水摂取量の減少によるものではなく、フッ素曝露によるものである可能性が高い。胎仔期から離乳期まで体重増加の差が認められなかったのは、F1ラットの親ラットの母乳を介してのフッ素曝露の程度が低かったためと考えられる。先行研究において臍帯血と母体血のフッ素濃度を比較したところ、臍帯血濃度は母体血の60%であった[28]。また母体血から母乳へのフッ素の移行は少ないという報告が

ある[29]。これらの報告から臍帯血のフッ素濃度は低下し母乳中のフッ素濃度は低いと考えられる。離乳後 33 日目以降は、飲み水を介したフッ素の直接曝露が行われたため、離乳前に顕在化しなかった体重増加への影響が明らかになったと考える。

0 日目から 5 日目にかけても、FC 群の体重は FF 群よりも高かったが、有意差はなかった。その後、6 日目から 63 日目にかけては有意な差が見られた。胎仔期から離乳期までのフッ素曝露量は FC 群、FF 群ともに同じであり、この曝露量が体重の差に及ぼす影響は軽微であることを考慮すると、離乳後初期にあった体重差はフッ素曝露の影響ではなく、個体差によるものと考えられる。この後に、飲み水を介した直接フッ素曝露によって体重差が拡大していったと考えられる。

FC 群の体重は 0 日目から 49 日目まで CC 群よりも有意に高かった。これは、フッ素曝露により流産が誘発された可能性があることと関連していると考えられる。フッ素曝露した妊娠ラットと対照群の妊娠ラットを比較したところ統計学的に有意差はなかったものの出生数は減少した。フッ素曝露により誘発された可能性のある流産が、胎仔 1 頭あたりに供給される栄養を増加させ、その結果、フッ素曝露された F1 ラットの出生体重が高くなり、それが離乳まで体重差として継続した可能性があると考えられる。

メスの F1 ラットでは、実験全期間中を通して CC 群と FF 群では体重増加に有意差がなかった。FF 群は FC 群に比べ、離乳後 1 日目から 8 日目、14 日目、52 日目から 63 日目まで断続的ではあるが有意に体重増加が少なかった。FF 群と FC 群は離乳期まで曝露条件が同じで、体重増加に対する流産の影響も同じであることを考慮すると、離乳後のフッ素曝露がメスの体重増加も低下させることが示唆された。有意差が確認された期間がオスよりもメスが短いことから、体重増加に対するフッ素曝露の感受性に性差があることが示唆された。FC 群が CC 群と比べて 0 日目から 15 日目までも体重増加が有意に高く、16 日目以降も統計学的有意差は

ないものの FC 群の方が CC 群よりも体重増加が高かった。胎仔期から離乳期までのフッ素曝露の影響は軽微であることから、FC 群の方が体重増加が高いのは、オスと同様にフッ素曝露によって流産が誘発された可能性があるためと考えられる。

本研究では出生体重を測定していないため、フッ素曝露による流産が出生体重を増加させるかどうかは不明である。また、体重を測定するために生まれたばかりの F1 ラットを触ると、親ラットが F1 ラットを殺してしまう可能性があり、出生体重を測定することは困難である。また、胎仔期までの限定的な曝露と出生後の継続的な曝露が組み合わさって初めて、離乳後の継続的な曝露による体重増加の減少が顕在化する可能性がある。

以上、性差はあるものの、フッ素曝露と体重増加の減少との関連性が示唆された。したがって、ヒトでもこの関連性を明らかにするために、今後の疫学研究が必要である。

#### 第4節 胎仔期から授乳期の曝露による神経学的影響について

フッ素曝露とオープンフィールド試験との関連性は、オスとメスともに3群間で測定した指標に有意差はなかった。このことは、過去に行われた飲み水を介した2世代曝露実験の結果と一致する[15]。

PPI 試験におけるフッ素曝露の影響は、オスの F1 ラットで PP70 における%PPI 値は CC 群よりも FF 群と FC 群で有意に低かった。また、統計的有意差には至らなかったが、PP75 や PP80 の%PPI 値でも FF 群と FC 群で CC 群よりも低かった。この結果は、フッ素曝露が認知機能を低下させることを示唆している。また、FF 群だけでなく FC 群でも%PPI 値が低かったことから、胎仔期から離乳期までの敏感な時期に限定的に曝露しても、認知機能が低下することが示唆された。これは、フッ素が血液脳関門を通過することで、フッ素が脳に移行して影響を与えるためと考える。胎盤、血液脳関門を経由してフッ素の濃度は低くなる[30]。そして低

くなったフッ素の濃度でも中枢神経系に影響を与えるとすれば、この時期の中枢神経系に対するフッ素の感受性は比較的高いと考える。但し PP70 における%PPI のみに有意差が観察されたという限界はあり留意が必要である。メスの F1 ラットでは、PPI 試験で 3 群間に有意差はなかった。これは、フッ素曝露に対する認知機能に関する脳の感受性に性差がある可能性を示唆している。

今回はオープンフィールド試験及び PPI 試験を行ったが、他の評価方法の検討の余地が残る。過去の疫学研究[6]では知能指数がフッ素曝露との関連性が示唆され、その点について動物実験で検証するには、学習能力とフッ素曝露の関連を調べ、フッ素の神経毒性を評価することが有用である可能性がある。

フッ素曝露が中枢神経系にどのような影響を与えるかはまだ不明である。仮説の一つは、フッ素が神経伝達物質や受容体と相互作用することである[31]。我々の知る限り、フッ素と神経伝達物質について過去の研究結果が様々なので、まだコンセンサスが得られていない[31]。本研究では、脳の各領域で神経伝達物質及び代謝産物を定量した。オスの F1 ラットでは、FC 群と FF 群で中脳の DA が CC 群よりも減少していた。先行研究でも、脳全体ではあるが DA がフッ素曝露により用量依存的に減少することは報告されている[32、33]。中間代謝産物と神経伝達物質の比、つまり DOPAC/DA および HVA/DA で評価した DA の代謝は 3 群間で変化がなかったことから、中脳の DA 減少は中脳での DA の産生の低下によるものと考えられる。DA は認知機能に重要な役割を果たす[34]。DA ニューロン細胞の大部分は、中脳の黒質、腹側被蓋野、後被蓋野に分布する[35、36]。フッ素曝露により中脳の DA が減少し、認知機能が低下する可能性がある。なお FF 群で延髄の DA が有意に増加した理由は不明である。

FC 群と FF 群で小脳の NE が CC 群よりも増加した。一方、FC 群と FF 群で中脳の NE が CC 群よりも減少した。小脳と中脳の結果は異なるが、フッ素曝露が NE の産生や代謝に影響を及ぼしている可能性がある。

今回の研究で DOPAC/DA の比において、3 群間で有意差が見られたのは、小脳において FF 群で CC 群よりも高く、視床下部において FF 群で CC 群よりも高いことであった。しかし、小脳と視床下部では DA ニューロンの分布が乏しいため、意義は低いと考えられる。

セロトニン及びその代謝産物に関しては、小脳で FC 群の 5-HT と FF 群の 5-HIAA が CC 群と比較してそれぞれ有意に高かった。小脳では、FF 群の 5-HIAA/5-HT が CC 群と比較して有意に高かった。しかし、小脳における 5-HT と 5-HIAA の濃度は他の脳部位と比較して低いため、小脳でみられた有意差の意義は小さいと考える。

メスの F1 ラットで有意差が見られたのは、大脳の NE が CC 群よりも FC 群と FF 群で高かった。大脳の 5-HT は、FC 群と FF 群で CC 群よりも高かったが、FC 群と FF 群で線条体の 5-HT は CC 群よりも低かった。一方、オスの F1 ラットと異なり、DA には影響がなかった。先行研究では、フッ素濃度依存的に NE と 5-HT の増加が観察され、本研究の結果と一致した[32、33]。しかし、メスの F1 ラットの結果は、オスの結果と一致しなかった。神経伝達物質とその代謝物産物に対するフッ素の全体的な影響はオスと異なりメスでは軽微なので、この点においても感受性に性差がある可能性がある。

## 第5章 結論

離乳後のフッ素曝露は体重増加の抑制を引き起こした。今後、フッ素曝露と体重増加の抑制に関する疫学調査など、更なる研究が必要である。本研究で明らかになったことは、胎仔期から 150ppm の飲み水を介したフッ素曝露は、オスの F1 ラットで %PPI の低下を引き起こしたので、フッ素曝露は認知機能低下と関連し、そのメカニズムに中脳の DA 減少が関与している可能性があることである。しかし、メスの F1 ラットではこれらの所見は認められず、フッ素曝露の影響が性別に

よって異なる可能性が示唆された。

以上より本研究で示された胎仔期、離乳期、発育期のフッ素曝露による成長及び神経学的影響は、飲み水へのフッ素添加について注意を喚起するものである。さらに、統計的に有意であることは示されなかったが、フッ素曝露と流産の間に関連性がある可能性があり、フッ素と流産の関係を評価する更なる研究が必要である。

## 謝 辞

論文の作成および本研究の遂行にあたり多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校衛生学・公衆衛生学講座教授 角田正史先生に深謝致します。

本論文を作成にするあたり、大変有用な助言を頂きました防衛医科大学校産科婦人科学講座教授 高野政志先生、精神科学講座教授 吉野相英先生に深謝致します。

## 引用文献

1. World Health Organization, Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first and second addenda. Geneva: World Health Organization; 2022.
2. DenBesten P, Li W. Chronic fluoride toxicity: dental fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22: 81-96.
3. European Food Safety Authority (EFSA), Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fluoride, EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA) *EFSA J* 2013; 11(8): 3332.
4. Grynpas MD. Fluoride effects on bone crystals. *J Bone Miner Res.* 1990; 5 Suppl 1: S169-75.
5. Nichole R. Johnston<sup>1</sup>, Scott A. Strobel. Principles of fluoride toxicity and the cellular response: a review. *Arch Toxicol.* 2020 April ; 94(4): 1051–1069.
6. Green R, Lanphear B, Hornung R, Flora D, Martinez-Mier EA, Neufeld R, Ayotte P, et al. Association between maternal fluoride exposure during pregnancy and IQ scores in offspring in Canada. *JAMA Pediatr* 2019; 173(10): 940-8.
7. Moghaddam VK, Yousefi M, Khosravi A, Yaseri M, Mahvi AH, Hadei M, Mohammadi AA, et al. High concentration of fluoride can be increased risk of abortion. *Biol Trace Elem Res* 2018; 185(2): 262-5.
8. Yousefi M, Mohammadi AA, Yaseri M, Mahvi AH. Epidemiology of drinking water fluoride and its contribution to fertility, infertility, and abortion: an ecological study in west azerbaijan province, poldasht county, iran. *Research report Fluoride* 2017; 50(3): 343–53
9. Curtis D. Klaassen. *Casarett and Doull's Toxicology: the Basic Science of Poisons.* 2013.
10. Arun AK, Rustveld L, Sunny A. Association between Water Fluoride Levels and Low



- Birth Weight: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2013–2016. *Int J Environ Res Public Health*. 2022; 19(15): 8956.
11. Goodman C, Hall M, Green R, Hornung R, Martinez-Mier EA, Lanphear B, Till C. Maternal fluoride exposure, fertility and birth outcomes: The MIREC cohort. *Environ Adv*. 2022; 7: 100135.
  12. Bashash M, Thomas D, Hu H, Martinez-Mier EA, Sanchez BN, Basu N, Peterson KE, et al. Prenatal fluoride exposure and cognitive outcomes in children at 4 and 6–12 years of age in Mexico. *Environ Health Perspect* 2017; 125(9): 097017.
  13. Broadbent JM, Thomson WM, Ramrakha S, Moffitt TE, Zeng J, Foster Page LA, Poulton R. Community water fluoridation and intelligence: prospective study in New Zealand. *Am J Public Health* 2015; 105(1): 72-6.
  14. Guth S, Hüser S, Roth A, Degen G, Diel P, Edlund K, Eisenbrand G, et al. Contribution to the ongoing discussion on fluoride toxicity. *Arch Toxicol* 2021; 95(7): 2571-87.
  15. McPherson CA, Zhang G, Gilliam R, Brar SS, Wilson R, Brix A, Picut C, et al. An evaluation of neurotoxicity following fluoride exposure from gestational through adult ages in Long-Evans hooded rats. *Neurotox Res* 2018; 34(4): 781-98.
  16. Guidance document on evaluating and expressing uncertainty in hazard characterization. 2nd ed. Geneva: World Health Organization; 2018: 76.
  17. Schell AM, Wynn JK, Dawson ME, Sinaii N, Niebala CB. Automatic and controlled attentional processes in startle eyeblink modification: effects of habituation of the prepulse. *Psychophysiology* 2000; 37(4): 409-17.
  18. Kohl S, Heekeren K, Klosterkötter J, Kuhn J. Prepulse inhibition in psychiatric disorders--apart from schizophrenia. *J Psychiatr Res* 2013; 47(4): 445-52.
  19. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of

- the brain. *J Neurochem* 1966; 13(8): 655-69.
20. Huie JM, Sharma RP, Coulombe RA Jr. Diurnal alterations of catecholamines, indoleamines and their metabolites in specific brain regions of the mouse. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol Toxicol* 1989; 94(2): 575-9.
21. Tsunoda M, Aizawa Y, Konno N, Kimura K, Sugita-Konishi Y. Subacute administration of tributyltin chloride modulates neurotransmitters and their metabolites in discrete brain regions of maternal mice and their F1 offspring. *Toxicol Ind Health* 2006; 22(1): 15-25.
22. Inada K, Ishigooka J, Anzai T, Suzuki E, Miyaoka H, Saji M. Antisense hippocampal knockdown of NMDA-NR1 by HVJ-liposome vector induces deficit of prepulse inhibition but not of spatial memory. *Neurosci Res* 2003; 45(4): 473-81.
23. Kobayashi R, Sekino Y, Shirao T, Tanaka S, Ogura T, Inada K, Saji M. Antisense knockdown of drebrin A, a dendritic spine protein, causes stronger preference, impaired prepulse inhibition, and an increased sensitivity to psychostimulant. *Neurosci Res* 2004; 49(2): 205-17.
24. Asakawa H, Tsunoda M, Kaido T, Hosokawa M, Sugaya C, Inoue Y, Kudo Y, et al. Enhanced inhibitory effects of TBT chloride on the development of F1 rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2010; 58(4): 1065-73.
25. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril.* 1996 ; 66(1): 24-9
26. Collins TF, Sprando RL, Black TN, Shackelford ME, Bryant MA, Olejnik N, Ames MJ, et al. Multigenerational evaluation of sodium fluoride in rats. *Food Chem Toxicol* 2001; 39(6): 601-13.
27. Perera T, Ranasinghe S, Alles N, Waduge R. Effect of fluoride on major organs with the different time of exposure in rats. *Environ Health Prev Med* 2018; 23(1): 17.

28. Gupta S, Seth AK, Gupta A, Gavane AG. Transplacental passage of fluorides. *J Pediatr* 1993; 123(1): 139-41.
29. Ekstrand J, Boreus LO, de Chateau P. No evidence of transfer of fluoride from plasma to breast milk. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1981; 283(6294): 761-2.
30. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci* 1996; 16 Rev 2: 1-153.
31. Ren C, Li HH, Zhang CY, Song XC. Effects of chronic fluorosis on the brain. *Ecotoxicol Environ Saf* 2022;244: 114021.
32. Reddy YP, Tiwari SK, Shaik AP, Alsaeed A, Sultana A, Reddy PK. Effect of sodium fluoride on neuroimmunological parameters, oxidative stress and antioxidative defenses. *Toxicol Mech Methods* 2014; 24(1): 31-6.
33. Reddy YP, Tiwari S, Tomar LK, Desai N, Sharma VK. Fluoride-induced expression of neuroinflammatory markers and neurophysiological regulation in the brain of Wistar rat model. *Biol Trace Elem Res* 2021; 199(7): 2621-6.
34. Paus T. Primate anterior cingulate cortex: where motor control, drive and cognition interface. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(6): 417-24.
35. Bjorklund A, Dunnett SB. Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci* 2007; 30: 194-202.
36. Dahlstroem A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* 1964; 232: 1-55.

図表

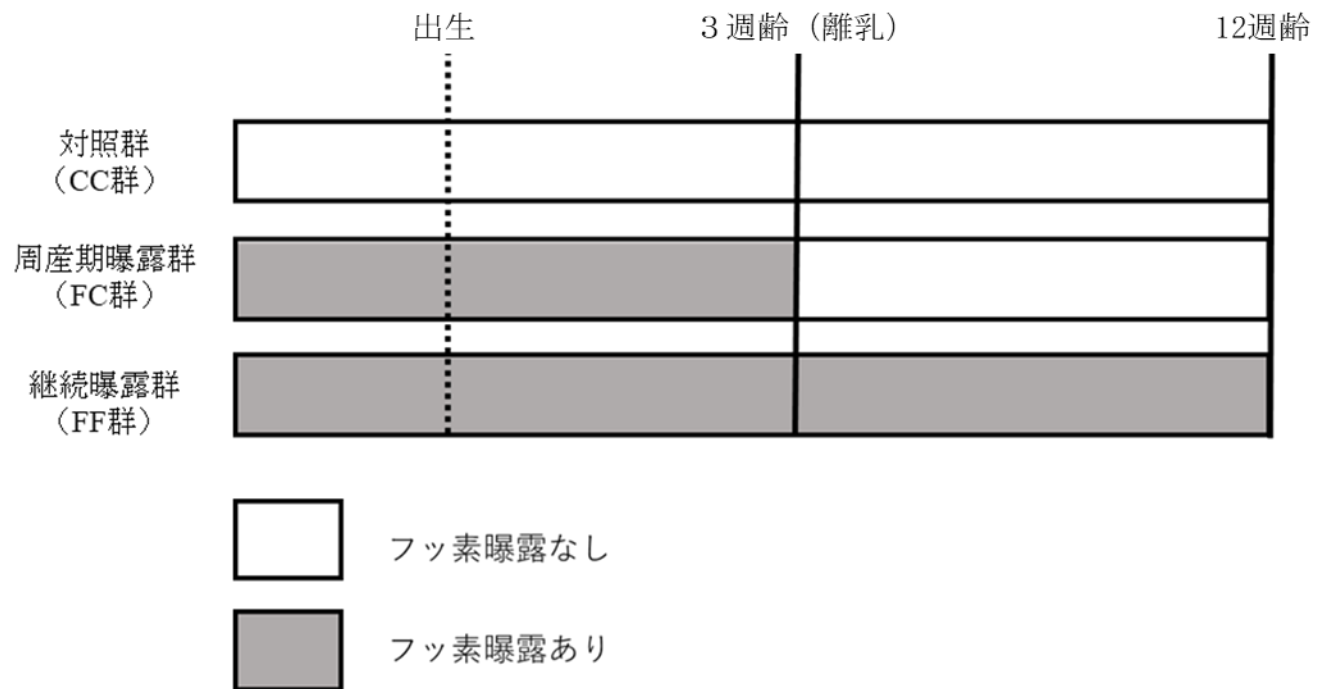


図1 各 F1 ラット群の胎仔期から発達期のフッ素曝露

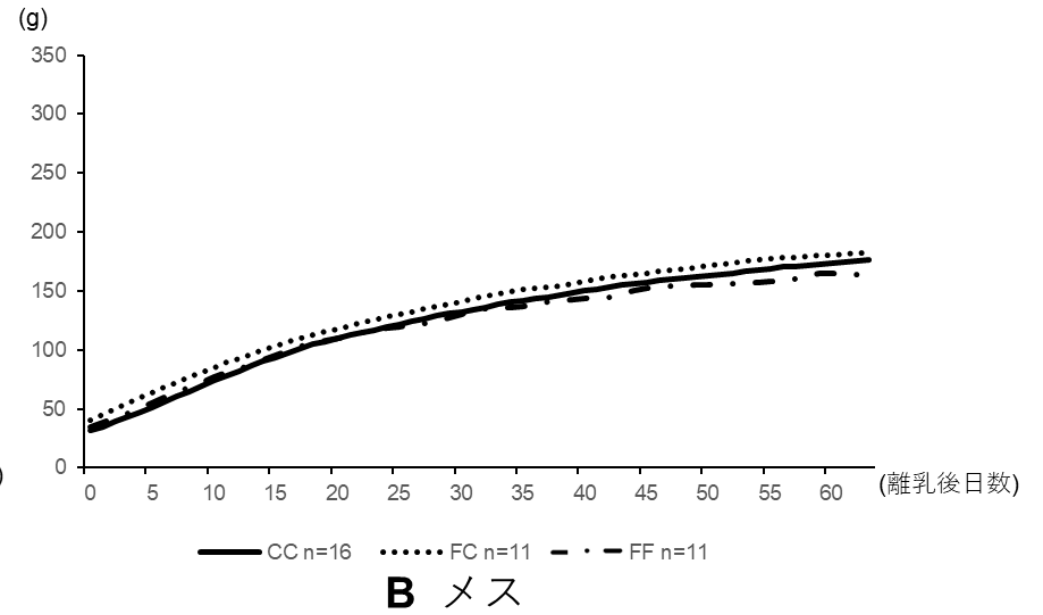
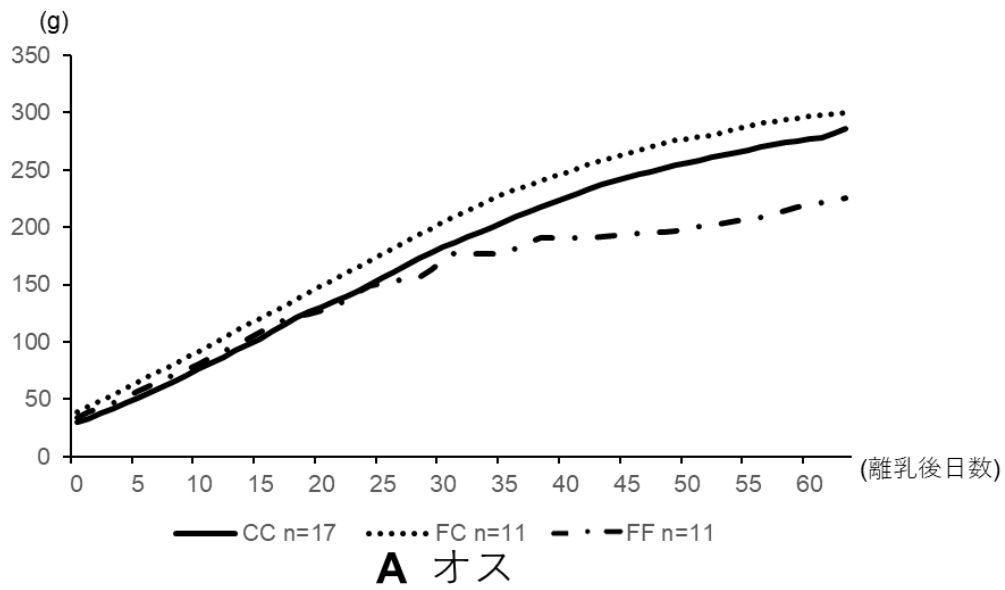
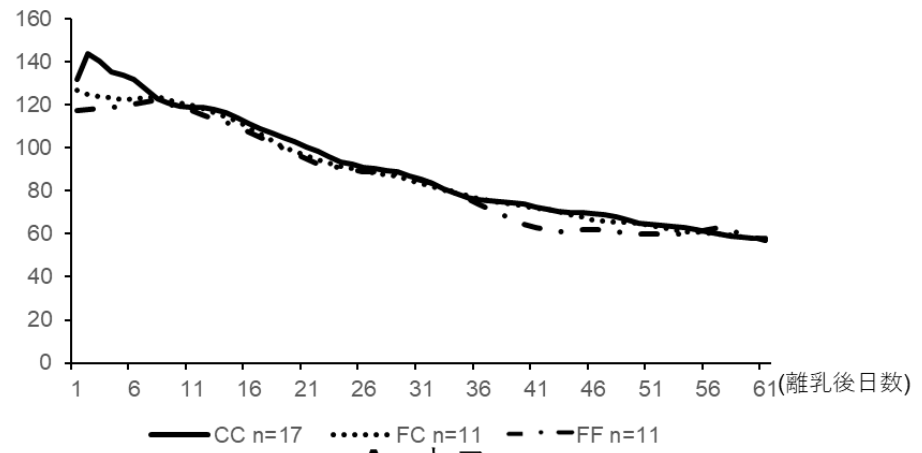


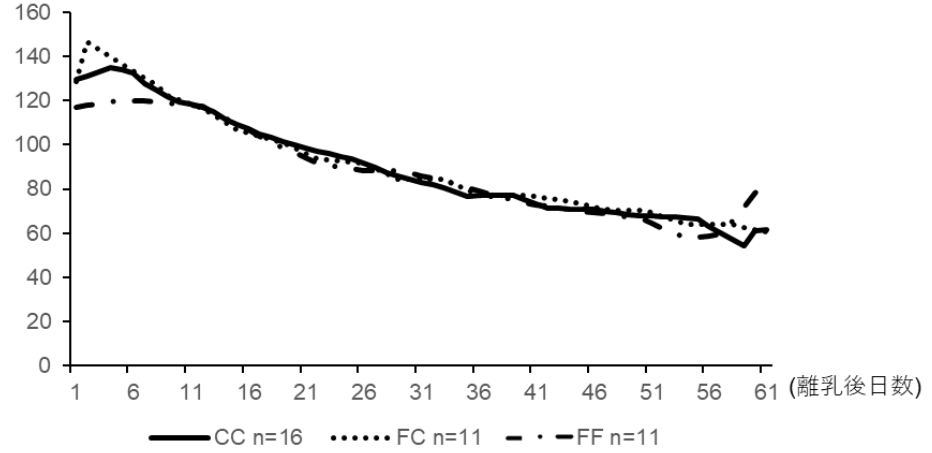
図2 胎仔期から発達期にフッ素曝露された離乳後のF1ラットの体重の平均値の推移

餌摂取量(g)/ラット体重(kg)/日/個体



**A** オス

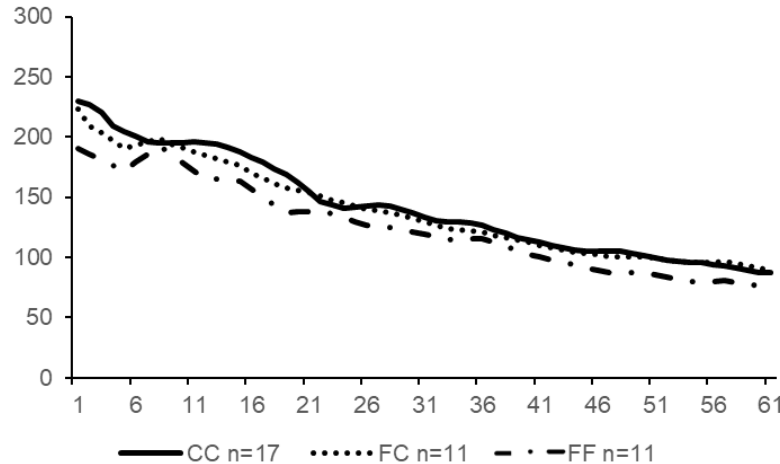
餌摂取量(g)/ラット体重(kg)/日/個体



**B** メス

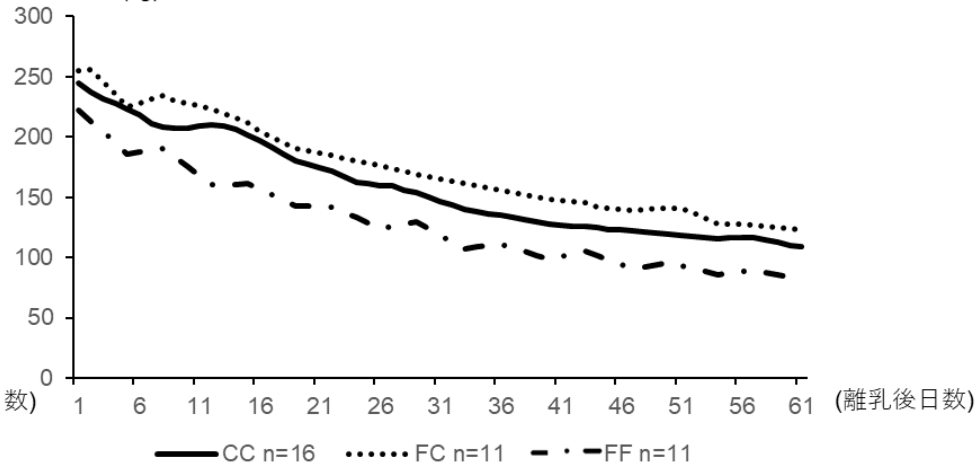
図3 胎仔期から発達期にフッ素曝露された離乳後のF1ラットの餌の摂取量の平均値の推移

水摂取量(g)/ラット体重(kg)/日/個体



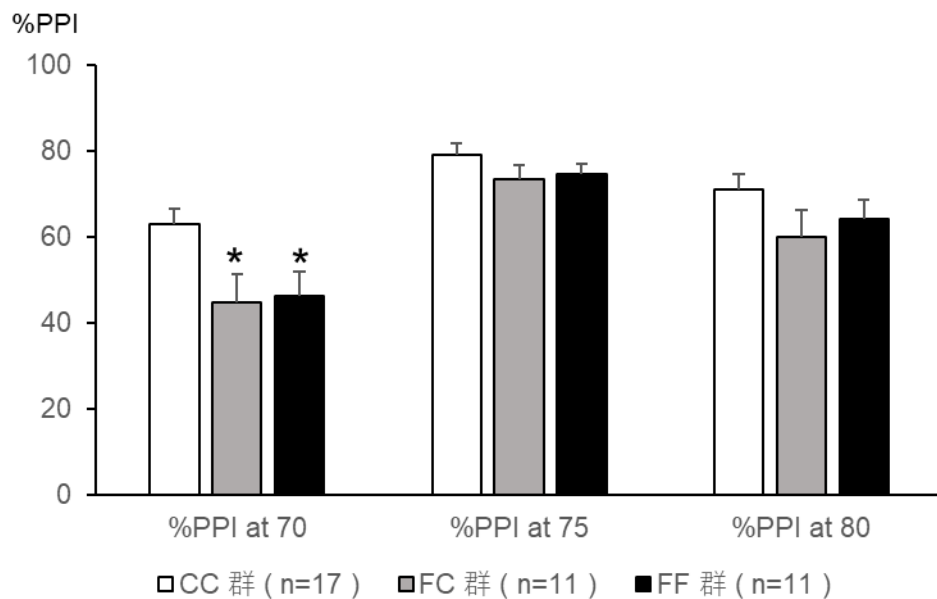
**A** オス

水摂取量(g)/ラット体重(kg)/日/個体

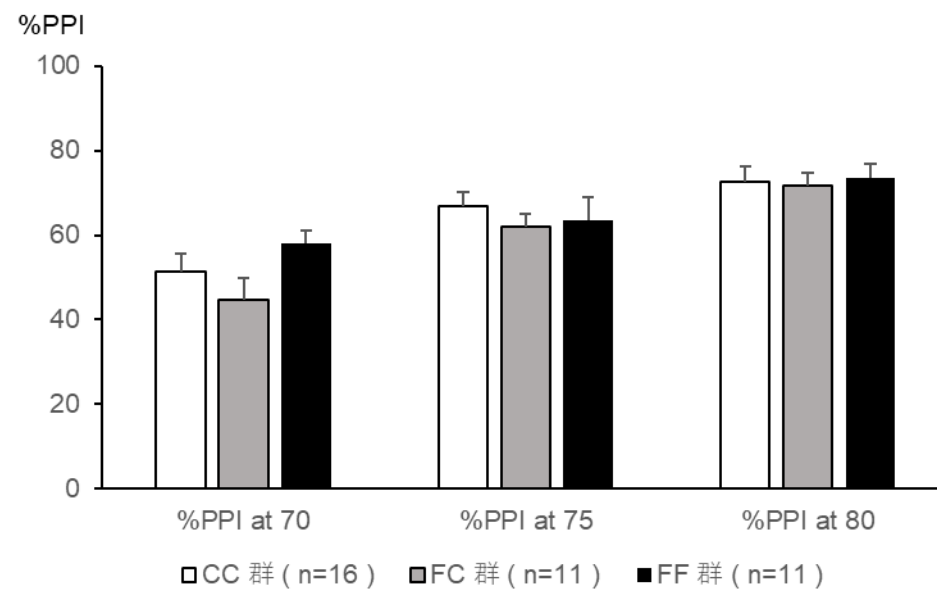


**B** メス

図4 胎仔期から発達期にフッ素曝露された離乳後のF1ラットの水の摂取量の平均値の推移



**A** オス



**B** メス

図5 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたF1ラットの%PPI

\* :  $P < 0.05$  (CC群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

各%PPIの計算式については下記の通りである。

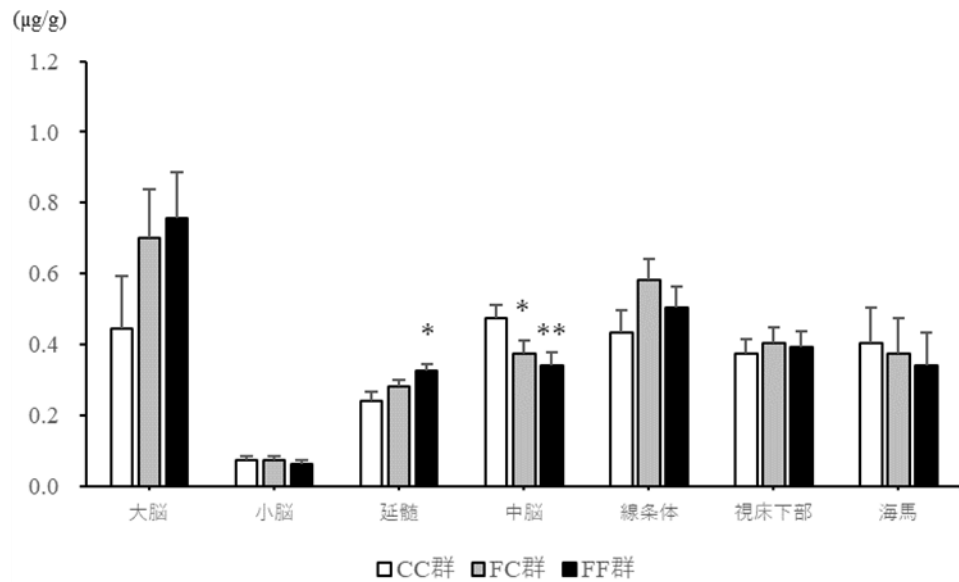
$$\%PPI \text{ at PP70} = (1 - PP70\&P/P \text{ 単独}) \times 100$$

$$\%PPI \text{ at PP75} = (1 - PP75\&P/P \text{ 単独}) \times 100$$

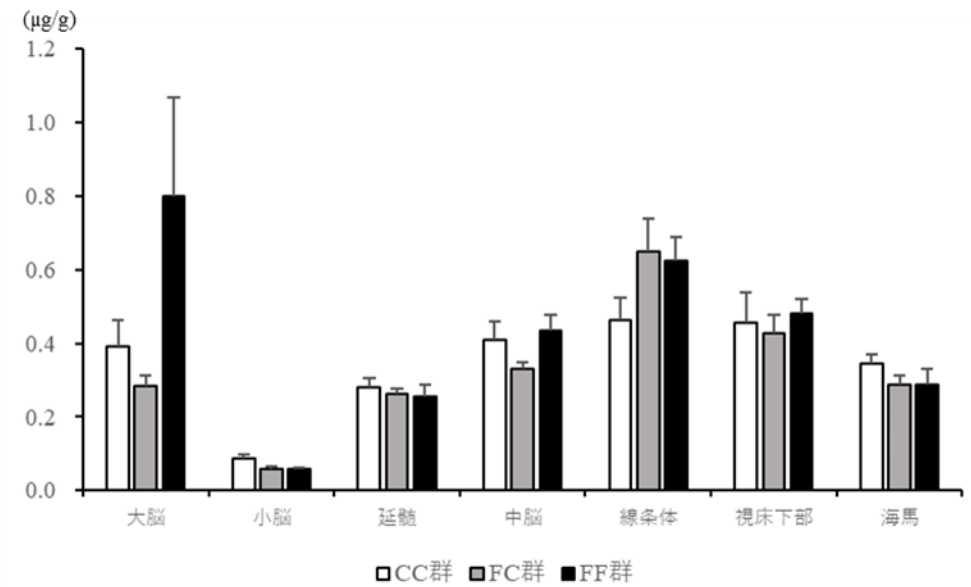
$$\%PPI \text{ at PP80} = (1 - PP80\&P/P \text{ 単独}) \times 100$$

バーは平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。





A オス



B メス

図6 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたF1ラットの各脳部位別のドーパミン濃度

\* :  $P < 0.05$  (CC群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

\*\* :  $P < 0.01$  (CC群との比較)

バーは平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

表 1 フッ素に曝露された妊娠ラットの着床数、出生数、流産率 (%) および F1 ラットのオスの割合 (%) の平均値及び中央値

	対照妊娠ラット (n=3)	フッ素曝露妊娠ラット (n=5)	P 値
着床数	11.0±1.5 (10)	10.4±1.4 (9)	0.7642
出生数	11.0±1.5 (10)	8.8±1.7 (11)	0.3682
流産率 (%)	0.0±0.0 (0.0%)	15.6±8.1 (15.4%)	0.1243
F1 ラットの オスの割合 (%)	49.2±8.9 (50.0%)	47.7±7.6 (41.7%)	0.8815

平均値±標準誤差で示す。

(中央値)

表2 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたF1ラットのオープンフィールド試験

	オス				メス			
	CC群	FC群	FF群	P値	CC群	FC群	FF群	P値
総移動距離 (cm)	2298.7±151.8	3101.9±343.3	2671.2±338.3	0.101	3509.0±278.6	4765.6±653.0	3766.9±409.3	0.120
中央エリアでの滞在時間 秒/30分間 (%)	1.88±0.74	2.01±0.64	2.76±1.86	0.842	1.29±0.46	2.44±0.49	4.72±1.93	0.078
典型的行動回数								
壁立ち上がり行動	24.9±3.9	41.3±6.3	41.6±9.8	0.101	41.3±5.2	68.9±13.6	49.6±8.6	0.099
立ち上がり行動	19.9±2.3	24.3±2.8	20.1±2.5	0.427	10.6±2.7	25.8±9.9	28.7±7.6	0.106
毛づくろい回数	10.8±2.3	19.8±4.6	18.3±9.4	0.426	24.6±3.6	27.2±4.2	23.0±3.6	0.770

30分間の総移動距離、中央エリア滞在時間、典型的行動回数を示す

CC:対照群 (オス n=17、メス n=16)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させたF1ラット (オス n=11、メス n=16)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後9週間飲み水を介して曝露させたF1ラット (オス n=11、メス n=16)

平均値±標準誤差で示す。

表 3 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたオスの F1 ラットの脳部位別の NE、DOPAC、HVA の濃度

神経伝達物質	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
NE	CC	0.167±0.011	0.172±0.015	0.407±0.037	0.435±0.023	0.359±0.033	1.904±0.178	0.414±0.028
	FC	0.179±0.009	0.213±0.008*	0.461±0.018	0.348±0.019*	0.399±0.025	2.079±0.351	0.576±0.061
	FF	0.204±0.010	0.227±0.013*	0.435±0.018	0.343±0.024*	0.418±0.031	1.934±0.277	0.654±0.197
DOPAC	CC	0.171±0.027	0.014±0.001	0.035±0.005	0.099±0.015	0.181±0.029	0.084±0.009	0.075±0.010
	FC	0.202±0.017	0.013±0.001	0.040±0.003	0.061±0.008	0.156±0.040	0.126±0.030	0.096±0.006
	FF	0.223±0.022	0.023±0.005	0.042±0.002	0.057±0.005	0.269±0.039	0.147±0.030	0.099±0.014
HVA	CC	0.083±0.013	0.006±0.001	0.012±0.001	0.045±0.009	0.523±0.151	0.029±0.005	0.054±0.010
	FC	0.112±0.011	0.009±0.001	0.013±0.001	0.026±0.003	0.868±0.239	0.018±0.004	0.039±0.006
	FF	0.106±0.014	0.008±0.001	0.017±0.002	0.024±0.002	1.050±0.445	0.248±0.222	0.073±0.024

CC:対照群 (n=17)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。\*; P<0.05 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

表 4 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたオスの F1 ラットの脳部位別の 5-HT、5-HIAA の濃度

神経伝達物質	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
5-HT	CC	0.282±0.027	0.039±0.004	0.381±0.037	0.482±0.025	0.602±0.077	0.693±0.065	0.360±0.038
	FC	0.289±0.014	0.055±0.003*	0.427±0.019	0.408±0.026	0.495±0.082	0.716±0.102	0.412±0.033
	FF	0.288±0.012	0.048±0.002	0.396±0.014	0.395±0.025	0.584±0.057	0.672±0.096	0.395±0.107
5-HIAA	CC	0.818±0.108	0.006±0.001	0.053±0.004	0.352±0.038	0.835±0.156	0.380±0.036	0.219±0.027
	FC	1.174±0.135	0.007±0.002	0.065±0.003	0.284±0.025	0.767±0.263	0.539±0.124	0.280±0.040
	FF	1.116±0.171	0.014±0.001†	0.066±0.004	0.280±0.028	1.417±0.318	0.472±0.096	0.250±0.064

CC:対照群 (n=17)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。\*; P<0.05 (CC 群との比較)、†; P<0.01 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

表 5 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたオスの F1 ラットの脳部位別の DOPAC/DA、HVA/DA、5-HIAA/5-HT の比

	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
DOPAC/DA	CC	0.512±0.058	0.210±0.011	0.140±0.008	0.190±0.035	0.891±0.313	0.230±0.014	0.237±0.033
	FC	0.587±0.073	0.182±0.014	0.145±0.011	0.166±0.025	0.310±0.084	0.290±0.016	0.262±0.014
	FF	0.565±0.090	0.376±0.087*	0.131±0.010	0.170±0.014	0.639±0.121	0.361±0.041 <sup>†</sup>	0.292±0.018
HVA/DA	CC	0.253±0.028	0.116±0.021	0.054±0.006	0.095±0.022	2.089±0.671	0.089±0.015	0.168±0.029
	FC	0.315±0.038	0.124±0.022	0.049±0.007	0.071±0.010	1.279±0.338	0.049±0.008	0.104±0.014
	FF	0.242±0.033	0.131±0.020	0.053±0.007	0.071±0.007	1.548±0.594	0.424±0.349	0.223±0.087
5-HIAA/5-HT	CC	2.987±0.354	0.187±0.037	0.138±0.007	0.696±0.080	1.323±0.197	0.569±0.043	0.645±0.069
	FC	4.265±0.523	0.138±0.039	0.153±0.006	0.728±0.091	1.277±0.270	0.699±0.092	0.663±0.047
	FF	3.972±0.625	0.313±0.045*	0.168±0.013	0.721±0.080	2.313±0.422	0.712±0.101	0.664±0.096

CC:対照群 (n=17)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。\*; P<0.05 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

表 6 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたメスの F1 ラットの脳部位別の NE、DOPAC、HVA の濃度

神経伝達物質	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
NE	CC	0.155±0.008	0.229±0.029	0.378±0.028	0.354±0.031	0.357±0.021	1.882±0.371	0.493±0.038
	FC	0.213±0.012 <sup>‡</sup>	0.163±0.020	0.402±0.018	0.329±0.020	0.397±0.036	2.165±0.232	0.449±0.033
	FF	0.205±0.007 <sup>‡</sup>	0.222±0.010	0.351±0.046	0.408±0.014	0.399±0.033	2.479±0.165	0.395±0.040
DOPAC	CC	0.185±0.016	0.017±0.003	0.040±0.004	0.115±0.020	0.262±0.028	0.165±0.035	0.101±0.009
	FC	0.236±0.015	0.010±0.001	0.033±0.002	0.137±0.074	0.205±0.036	0.112±0.014	0.085±0.014
	FF	0.221±0.015	0.014±0.002	0.030±0.003	0.059±0.007	0.209±0.048	0.178±0.031	0.078±0.016
HVA	CC	0.111±0.009	0.015±0.002	0.019±0.002	0.046±0.008	0.417±0.115	0.046±0.015	0.049±0.007
	FC	0.146±0.016	0.008±0.002	0.019±0.002	0.035±0.004	1.127±0.331	0.045±0.006	0.048±0.007
	FF	0.115±0.016	0.015±0.001	0.023±0.004	0.132±0.050	1.020±0.278	0.046±0.007	0.036±0.007

CC:対照群 (n=16)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。\*; P<0.05 (CC 群との比較)、<sup>‡</sup>; P<0.001 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。

表 7 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたメスの F1 ラットの脳部位別の 5-HT、5-HIAA の濃度

神経伝達物質	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
5-HT	CC	0.248±0.014	0.054±0.006	0.370±0.031	0.456±0.036	0.799±0.074	0.848±0.199	0.398±0.030
	FC	0.318±0.017 <sup>†</sup>	0.049±0.007	0.392±0.021	0.419±0.019	0.501±0.054 <sup>†</sup>	0.893±0.103	0.355±0.028
	FF	0.300±0.013*	0.073±0.026	0.365±0.051	0.492±0.026	0.524±0.056 <sup>†</sup>	0.894±0.064	0.300±0.034
5-HIAA	CC	1.198±0.168	0.012±0.001	0.057±0.004	0.460±0.099	1.350±0.173	0.530±0.146	0.261±0.031
	FC	1.887±0.202 <sup>†</sup>	0.011±0.002	0.057±0.003	0.299±0.036	1.007±0.279	0.481±0.063	0.274±0.035
	FF	1.044±0.165	0.012±0.002	0.050±0.007	0.247±0.034	0.967±0.266	0.600±0.090	0.200±0.034

CC:対照群 (n=16)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。\*; P<0.05 (CC 群との比較)、<sup>†</sup>; P<0.01 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。



表 8 胎仔期から発達期にフッ素曝露されたオスの F1 ラットの脳部位別の DOPAC/DA、HVA/DA、5-HIAA/5-HT の比

	群	大脳	小脳	延髄	中脳	線条体	視床下部	海馬
DOPAC/DA	CC	0.589±0.054	0.180±0.019	0.146±0.009	0.302±0.059	0.896±0.193	0.437±0.141	0.299±0.027
	FC	0.875±0.076 <sup>†</sup>	0.220±0.031	0.127±0.008	0.423±0.233	0.435±0.107	0.267±0.016	0.308±0.043
	FF	0.556±0.087	0.261±0.049	0.125±0.017	0.148±0.018	0.400±0.102	0.365±0.055	0.264±0.035
HVA/DA	CC	0.354±0.036	0.213±0.033	0.069±0.006	0.111±0.018	1.706±0.595	0.084±0.014	0.149±0.021
	FC	0.535±0.066 <sup>†</sup>	0.139±0.039	0.074±0.007	0.107±0.008	1.337±0.320	0.112±0.011	0.182±0.028
	FF	0.246±0.032	0.267±0.033	0.085±0.010	0.265±0.093	1.382±0.330	0.094±0.013	0.132±0.022
5-HIAA/5-HT	CC	4.863±0.627	0.247±0.037	0.160±0.006	0.957±0.173	1.658±0.194	0.611±0.039	0.653±0.062
	FC	5.883±0.511	0.305±0.080	0.147±0.008	0.706±0.071	1.712±0.305	0.544±0.039	0.758±0.085
	FF	3.412±0.504	0.268±0.052	0.135±0.010	0.511±0.071	1.587±0.309	0.676 ± 0.099	0.666 ± 0.097

CC:対照群 (n=16)

FC:フッ素を経胎盤及び経母乳曝露させた F1 ラット (n=11)

FF:フッ素を経胎盤、経母乳曝露及び離乳後 9 週間飲み水を介して曝露させた F1 ラット (n=11)

平均値 (µg/g) ±標準誤差で示す。†; P<0.01 (CC 群との比較)、Student-Newman-Keuls test を多重比較のためのポストホックテストとして実施。