

厚生労働科学研究費補助金

(化学物質リスク研究事業)

胎生期の水銀およびカドミウム曝露による神経行動毒性の
高感受性群におけるリスク評価に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者： 渡辺知保

東京大学大学院医学系研究科人類生態学

平成 16 年 (2004 年)4月 10 日

目 次

I. 総括研究報告

周生期低濃度のカドミウム曝露が出生仔の行動機能に及ぼす影響 渡辺知保	11
---	----

参考資料： Tanaka et al. Neurotoxicology and Teratology 別刷

II. 分担研究報告

1.

(1)胎生期のメチル水銀曝露による神経行動毒性に対する遺伝的要因の影響 吉田 稔	43
---	----

(2)胎生期の水銀蒸気曝露による神経行動毒性に対する遺伝的要因による影響 吉田 稔	61
--	----

参考資料： Yoshida et al. Toxicological Sciences (accepted manuscript)

2. 胎生期および授乳期カドミウム経口曝露によるカドミウムの体内動態並びに行動機能に及ぼすメタロチオネインの影響に関する研究 佐藤雅彦	105
--	-----

3. 低濃度長期水銀曝露マウス脳の分子病理学的変化に関する研究 島田章則	139
---	-----

4. 水銀あるいはカドミウムへの周生期曝露に対する生理的感受性要因(甲状腺ホルモン系)に関する研究 吉田克巳	191
---	-----

5. 水銀への周生期曝露に対する生理的感受性要因（視床下部—下垂体—副腎系）に関する研究：副腎摘出マウスを用いた検討の試み
..... 今井秀樹209

はじめに

本研究は、マウス胎生期におけるメチル水銀およびカドミウムへの曝露が生後の中枢神経機能に及ぼす影響を、特に感受性が高いと考えられる幼若期および老齢期に焦点をあて、高感度かつ多角的な行動機能試験を用いて検討し、現実のヒトにおける健康リスクの評価に資することを目的としている。遺伝的な管理が進んでいるマウスを用い、両金属について、金属への胎生期微量長期曝露を行ない、出生後(老齢期を含めて)に神経・行動毒性とそのメカニズムについて評価するとともに、遺伝的、生理的、環境的な感受性要因による毒性の修飾について検討するものである。本研究の結果は、日本人の食生活の安全性を考えるうえで重要なこれら2つの重金属への微量曝露の健康リスク評価について、その精度を高めると同時に、高感受性集団を同定することにより対策におけるプライオリティの決定にも貢献することを旨とする。

本年度は、メチル水銀、カドミウムの在胎期〜 0 日にかけての低用量曝露を行い、成長後の行動機能への影響、組織病理学的検索、甲状腺ホルモンとその代謝系への影響を中心に解析を行った。また、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析のシステムを立ち上げ、低用量カドミウム曝露新生仔脳について解析を実施した。さらに低グルココルチコイド状態におけるメチル水銀曝露の複合影響についての検討を開始した。

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告

周生期低濃度のカドミウム曝露が出生仔の行動機能に及ぼす影響

主任研究者 渡辺知保 東京大学大学院医学系研究科人類生態学助教授

研究要旨： 低用量カドミウムの毒性に関しては、従来ほとんどの研究が腎機能障害に集中している。カドミウムの周生期曝露の影響に関しては比較的情報が少ない。最近の JECFA などの文書でも、カドミウムの発達毒性に関しては、報告が散見されるが未解明であると指摘されている。そこで、MT-null マウスおよびその野生型である C57BL/6 を用い、妊娠期～出生後 10 日目にかけて 10ppm カドミウムを含む飲料水で飼育した後、8-9 週齢に達した仔動物を用いて、オープンフィールド試験、受動回避試験ならびに空間学習試験を実施した。その結果、オープンフィールド試験では雌雄・系統にかかわらず Cd 曝露の影響を認めなかったが、受動回避試験においては、メスのみで回避成績が Cd 曝露群において低下していた。この結果は、前年度、陽性対照として同一の試験を用いて評価したエストロゲン様作用物質 (DES) と全く異なっていたことから、Cd の行動影響がエストロゲン様作用には依存していない可能性が示唆された。さらにこの低下は、MT-null においてより強い傾向を認めた。この結果を踏まえ、26 週齢に達したメスのみを用いて放射状迷路を用いた空間学習機能を評価したところ、課題を難しくした試行において、MT-null の Cd 曝露群が他の群に比べて成績が劣る傾向が示唆さ

れた。通常課題での学習能力では差は顕著でなかったので、空間学習機能の障害は、あったとしても軽度のものと考えられた。以上より、周生期における低用量のCd曝露は出生仔に行動影響を及ぼすことが示された。

A. 研究目的：

カドミウムの毒性に関しては膨大な研究の蓄積があり、近年も比較的低用量のカドミウムによる慢性曝露が及ぼす影響についての研究が続けられている。これらの研究のほとんどは、成人あるいは加齢を経た後における腎機能をエンドポイントとして取り上げており、他の系に関する検討は少ない。化学物質の生体影響においては、多くの研究が示すように、胎児・新生児の時期は化学物質に対して非常に感受性が高い場合があり、毒性機序もしばしば成人と異なる。しかし、人の過去の事例において顕著な継世代的影響というものが知られていないこともあってか、発達毒性についての研究はそれほど多いとは言えない。Hastings と Miller (1998) はそれまでに行なわれたCdの発達毒性に関する報告を網羅的に紹介しているが、「多くの研究はあるものの、毒性の性質あるいはメカニズムに関してはほとんどわかっていない」としている(後述)。今年度にはいって、低用量のCdが *in vivo* においてエストロゲン様作用を発揮すること、*in utero* 曝露によってメス出生仔の性成熟が早まり、乳腺に組織学的な変化を生ずることが発表された (Johnson et al., 2003)。これは、Cdがいわゆる内分泌攪乱物質の作用を持つことを示唆しており、これまでにエストロゲン様作用を持つ内分泌攪乱物質のいくつかで知られているように、発達中の脳に影響を及ぼしえる可能性が考えられて良い。

このような背景を踏まえ、本研究では低用量Cdに周生期曝露したマウスの仔の行動機能を検

討することにより、人における現実的な曝露への外挿が可能なレベルの Cd 曝露が発達毒性を發揮し得るという仮説を検証することとした。行動機能としては、オープンフィールド (OPF) 行動、受動回避試験 (PA)、ならびに空間学習試験を用いた。OPF と PA については、昨年度ジェチルスチルベストロール (DES) を“陽性対照”として用い、試験系としての有効性を確認したものである。これらの試験の持つ意味については前年度の報告書に示したとおりであるが、前述したように、今年度にはいって *in vivo* の系で Cd にエストロゲン様作用が報告されたことにより、合成エストロゲンである DES についてこれらの試験系で positive な結果が得られていることは (偶然とはいえ) 非常に意味のあることといえる (参考資料を参照されたい)。また、これらの試験系は、吉田稔氏によるメチル水銀ならびに水銀蒸気の発達毒性の検討にも用いられている。空間学習試験については、放射状迷路を用いた。これは 1980 年代に Olton らによって考案され、それ以来非常に多用されている試験法であり、試験パラメータをいろいろと変化させて難易度を変えたり、試験プロトコルを変えて、いわゆる作業記憶 (working memory) と参照記憶 (reference memory) の両方を試験したりすることも可能である。

B. 実験方法

試験に供する動物は、班員である佐藤雅彦氏 (岐阜薬科大) の提供を受けたものであり、曝露条件などの詳しい情報は佐藤氏の章を参照していただきたい。曝露は生後 10 日目で終了し、21 日で離乳、8 週齢にて本学に輸送し、輸送後 1 週間経過してから行動試験を開始した。OPF ならびに PA は 9 週齢に、この順序で実施した。放射状迷路は 30 週齢から実施した。OPF と PA は共通の動物を用いている。すなわち同一個体が 2 つの試験を経験したことになる。

(1) [オープンフィールド試験 (OPF) と受動回避 (PA) 試験]

それぞれのプロトコルの詳細は、添付資料 (Tanaka et al., 2004) あるいは前年度報告書 (渡

辺の章)を参照していただきたい。簡単に説明すると、OPFは壁で周囲を区切られた50x50cmの明るい床面中央にマウスを置き、2分間にわたって行動を定量的に観察する。本研究では、観察はCCDカメラを通じてコンピュータに送られた画像を、画像解析ソフトで解析している。多くの指標をとることができるが、解析では2分間の移動距離(行動軌跡の全長)のみを用いている。PAは、まず、ドア付の仕切りで区切られた明暗2つのコンパートメントの明室側にマウスを置き、仕切りのドアを開く。マウスが暗室に移動してきたら(狭さと暗さを好むマウスは必ず暗室側に移動する性質を持っている)、床面のグリッドに微弱電流を通じてショックを与える。これによって、マウスに暗所=ショックという関連を学習させる(訓練試行 training trial)。24時間後、同一のプロトコルで試験を行なう。このとき、暗室に入るまでの時間(escape latencyなどと呼ぶ)を学習指標とする(保持試行 retention trial);すなわち、この時間が長いほど、学習した関連を保持しているものと見なす。

これらの試験は各群それぞれ7-8匹を用いている。また、他の試験と同様であるが、解析のユニットをリッターにするため、同一の試験には、各母体毎にメス1、オス1のみを使用している。OPF、PAともに10-16時の間に実施し、系統および曝露条件については試験順序をカウンターバランスした。雌雄についてはカウンターバランスせず、別の日に試験を実施した。

(2) [放射状迷路試験 (Radial Maze: RM)]

放射状迷路試験には、小原医科産業製の試験装置を用いた。中心の8角形のプラットホームから8方向にのびる細長いアームそれぞれの先端に小さなペレット餌1個を配置しておき、空腹状態としたマウスをおく。迷路上方に備え付けられたCCDカメラからコンピュータに送られた画像データをソフトウェアがリアルタイムに解析し、マウスの位置情報を判断するとともに、餌受けのセンサーによる餌の有無を判断し、アームへのマウスの進入(エントリー)および餌の取得(retrieval)を記録するとともに、プラットホームと各アームとの間に設けられた各ドアの開閉を制御する。マウスをプラットホームにおいてから、全ての餌を採り終

えるまでの時間を計測する。ただし、5分間を経過したら観察はうち切る。プロトコルの詳細は、前年度報告書を参照していただきたい。前年度よりや変更した点として、試験開始10日前から実施時を通じて、体重を（固形餌の量の調節により）free fedの状態の85%程度に維持するようにしたこと、“馴らし”の訓練を廃止したことが挙げられる。迷路への“馴れ”も一種の学習と考えられるからである。

前年度の検討に基づき、試験方法の感度を高める目的で、学習課題のパラメータを変えらることにより、課題の難易度を順次上げていくプロトコルを用いた。この装置では、プラットホームと各アームとの間のドア（計8個）は通常は開いていて、マウスがアームに進入できる状態になっている。初期の試行（セッション）においては、これらのドアは通常開いたままに設定した（実際は、マウスが一度アームに進入し、再びプラットホームに戻ってくると、餌の取得の有無にかかわらず、全てのドアが5秒間閉じてから、再び開くように設定されているが、このこと自体は今回のパラメータ変更とは直接関係がない）。マウスが学習課題を遂行し、学習曲線が漸近線になった状態で、Delay time と呼ぶパラメータの変更をおこなった。delay time は、マウスが8個ある餌のうち4個を獲得し終えた時点で、これらのドアを全て閉じ、アームを全て一時“進入禁止”にすることによって、作業記憶の保持を強制する時間（delay time と呼ぶ）である。Delay time は、初期のセッションでは0秒であったが、漸近線状態が得られた後、これを30、60、120秒と次第に長く設定することにより、学習課題の難易度を高くしていった。すなわち、最初の18試行ではdelay time を0秒、第19～26試行では30秒、27～28試行が60秒、29～30試行120秒と設定した。なお、観察時間（delay time は含めない：Cut-off 時間）は300秒とし、これまでに課題（8つの餌を獲得する）を遂行できなければ観察をうち切り、遂行に要した時間は300秒と記録した。セッションの課題は、前回の課題遂行の成否にかかわらず各群は4匹ずつで計16匹を用いた。セッションは午前10時から午後6時の間に行った。

なお、後に述べるように受動回避試験ではメスのみにて positive な結果を得たことから、放射状迷路試験はメスのみを用いて検討を行った。試験開始時における週齢は26週齢であつ

た。

C. 実験結果

(1) [オープンフィールド試験]

図 1 a, b はオープンフィールド試験の結果を示す。移動距離において、雌雄とも、系統・曝露条件にかかわらず群間に有意差を認めなかった。また、マウスの位置（中央区画と周辺区画とにいる割合；データは示していない）についても、群間には差を認めなかった。

(2) [受動回避試験]

図 2 a, b に受動回避試験の結果を示す。オス・メスともに、いずれの群においても訓練試行より保持試行の回避時間が延びており、回避学習の獲得能力を有していることがわかる。オス（2 a）では、系統・曝露ともに回避学習の成績には影響がなかった。メス（2b）では系統の効果はなかったが、Cd 曝露により学習成績が有意に低下した（escape latency が短縮された）。この低下は、MT-null においてより顕著な傾向を示した；ただし、交互作用（系統*曝露）は有意ではなかった。図 3 には、群間で有意差の認められたメスにおける、保持試行での回避時間を各個体毎に示した。300 秒で観察をうち切っているが、非曝露群で 15 匹中 5 匹が観察時間内に暗室に入らなかったのに対し、Cd 曝露群では、これが 15 匹中 1 匹にとどまった。

(3) [放射状迷路試験]

図 4

意味は、それぞれ図の脚注に示してある。

図 4 は、観察時間内のペレット獲得数の推移を示した。前述したように、迷路への“慣ら

し” 期間を設けなかったため、初期のセッションにおける獲得数は極めて低い。総移動距離（図6）を見ても、活動量自体が低かったことが示されている。15セッションあたりで各群とも6以上ではほぼ漸近線に達しており、この条件では全個体が課題を遂行できる状態には達しなかったことがわかる。総移動距離（図6）、アームへの総進入回数（図7）、最初の8選択における異なるアーム数（図10）、各進入あたりのアーム平均滞在時間（図11）など、他の指標もだいたい15セッション以降で成績が漸近線になっている。

19セッション以降で、方法の項に述べたとおり delay time を導入し、課題を難しいものにした。図4でみると、課題の変化の影響はそれほど顕著ではなかった。ただし、Cd曝露群で、獲得数がやや落ち込む傾向がうかがえた。図5は、初回のセッションから30回までを通じ、ペレット獲得数が8となった試行、すなわち課題遂行に成功した試行の延べ数（例えば2個体が4日間課題を遂行した場合、8となる）を累積数として示したものである。各群4個体が30セッションを経験したので、全試行数は120セッションとなり、各群の累積的な成功率は25%以下と高くはなかった。いずれの群でも10セッション目あたりから遂行する個体出始めるが、delay time を導入した19セッション以降、MT-nullのCd曝露群のみ、他の群に比べて伸びが悪かった。実際に個体毎のデータ（示さず）を見ると、同一個体に成功試行が集中しているわけではなく、この伸びの悪さは、群としての平均的な成績を反映した結果であると考えられた。

Working Memory Error は、文字通り作業記憶の意味であるが、既にペレットを獲得したアームを訪れるエラーを何回犯したかを示す。Frequency Of Working Memory Error は、Working

Memory Error を Total Arm Choice で割った値である。頻繁にアームを訪れるような個体では作業記憶のエラーが増える確率がたかくなるので、これをある程度標準化するものともいえる。しかし、本実験においては、総進入回数がたかだか 15 回程度であったため、これらの指標は変動が大きく、学習成績をよく反映していたとは言い難い。

(4) [試験時における体重]

行動試験の開始時（9 週齢）における体重は図 12 に示すとおりだった。各群間の差は小さいが、オスでは系統、曝露の効果がともに有意であり、両者の交互作用は有意に至らなかった。すなわち Cd 曝露群では、わずかに体重が軽く、MT-null は野生型よりも体重が大きかった。メスはこれと異なり曝露効果のみが有意であり、オスと同様に Cd 曝露により体重のわずかな減少が見られた。

D. 考察

本研究では、比較的低用量の Cd への曝露によって、発達毒性が生ずることを示すことを目的とした。本研究で用いた飲料水中 10ppm の Cd は、体重 25 g のマウスがこれを飲むと考えた場合、飲水量 3-7mL/day, 平均 5mL/day として、 $10\text{ppm} \times 5\text{mL}/25\text{gBW}/\text{day} = 2\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ （経口摂取）となり、吸収率を 0.5% とすると腹腔あるいは皮下投与での吸収が 100% とした場合、 $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ に相当する。太田らは、慢性経口投与モデルにおける腎への蓄積の経時変化より、 $1\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ を”ヒトの日常摂取レベル”としているが、本研究の曝露レベルはこれと大きな差はない。また、in utero 曝露でエストロゲン様作用を報告した実験（Johnson et

al., 2003)では, 0.5, 5 μ g/kg を腹腔投与しており, 高いほうの dose は, 本研究の腹腔換算値の 1/2 である. したがって, 本研究で用いた dose はこれまでに行なわれた in vivo の動物実験としては, 最も低いものに属すると考えられる. ただし, Johnson et al. の低用量は本実験の 1/20 の dose で positive な結果を得ている. なお, JECFA (2003 ; June) は週間耐容量として, 7 microg/kg/wk = 1 microg/kg/day を提唱している.

本研究で用いた行動試験は, DES で positive な結果を得たものである. DES についても, 体重などの gross toxicity が見られないような条件での行動変異を検索したものであるが, オープンフィールドでは雌雄ともに行動促進の傾向が, 受動回避ではオスのみで成績の低下が見られ, メスでは学習が成立しなかった. 空間学習については検討されていない. 本研究では, オープンフィールドでは影響がなく, 受動回避においては影響を検出したが, メスでのみ認められた. これらは, DES の場合とは全く異なる結果であった. DES を用いた検討では, 行動促進が受動回避の訓練試行時にも認められ, オープンフィールドにおける活動性亢進と受動回避の回避時間とが有意な負の相関を示したことから, 活動性の亢進が受動回避における成績の低下につながった可能性が考えられた (Tanaka et al., 2004). したがって, 同じ受動回避の成績低下でも, Cd とはメカニズムが異なると考えられる. 放射状迷路では, 課題を難しくした後に, MT-null (KO) +Cd 曝露群の相対的な成績の低下が顕著になったと言える. 初期の学習曲線では, KO-Cd 群と他の群とあまり大きな差は認められないので, この群の空間学習能力に障害があったとしても,それほど高度のものではないと想像される. 放射

状迷路に供した個体は、他の試験に供した個体とは（同じ親動物群に由来しているが）別個の動物であるので、異なるグループの個体を用いて、それぞれ K0-Cd 曝露群に行動異常が検出されたことになり、Cd 曝露による行動異常の発生と、MT-null におけるその増悪の可能性が強いことを示唆していると言える。放射状迷路に用いた個体数が少ないこと、また観察時間も5分間とやや短かったことは、試験の検出力を弱くしていると考えられ、数・観察時間をそれぞれ大きくとった実験が望ましい。また、オスについての検討も必要である。

体重についての結果も留意を要する。オス・メスともに、Cd 曝露によってわずかではあるが体重が減少した。減少の程度からは行動には影響の見られなかったオスに Cd の影響が強く現れた。これも DES の場合とは異なっていた。体重の減少は一般的な毒性を示唆しており、純水に脳神経特異的な発達毒性の有無を確認するために、さらに小さい用量域における検討が必要であるのかも知れない。特に、体重減少の程度は出生直後の方が顕著であったことから、子宮内の成長が阻害されている可能性があり、この場合、行動影響は成長阻害に 2 次的である可能性があるからである。

Cd による発達毒性については、今後さらにエンドポイントを増やすなどして、その確認が必要であると思われるが、同時にメカニズムについても検討し、両者のつながりを考えていくことが重要であると考え。以下に現時点で知見が得られていて可能性のあるメカニズムを列挙しておく。ただし、以下の各項は互いに必ずしも相容れないものではない。

*エストロゲン様作用. ラットで既に報告されている. ただし, 上述したように行動影響の点では, 合成エストロゲンである DES とは影響のプロファイルが異なっていた.

*甲状腺機能あるいは甲状腺ホルモン代謝への作用 (吉田 (克) 氏, 森氏の章参照). 少なくとも現象的には, MT-null において影響が強く現れた点で一致している. これよりも早い時期, 胎生期~生後 1 週間程度での T4 および脱ヨード酵素の検討が必要かと思われる.

*遺伝子発現の変化による: 例えば, Cd 曝露により野生型ではセロトニン受容体 5b の遺伝子発現の増加 (佐藤氏の章参照) を認めており, 過去の報告でセロトニン系伝達の異常を報告していることと照らし合わせると興味深い. ただし, 行動影響がやや強く現れた MT-null については受容体遺伝子発現に影響は認められていない.

これまでに Cd の発達神経毒性に関して報告がなかったわけではない. 冒頭に述べた Hastings と Miller (1998) の網羅的な review では神経行動毒性を検討したものとして, 胎生期曝露の影響 (胎生期+哺乳期のものを含む) をみたもの 7 件, 新生仔期曝露の影響をみたもの 12 件を紹介している. これらの多くの実験は 1980 年から 90 年代の初めに実施されているが, 投与量が大きいものが多い. Hastings Miller によれば, 出生前の曝露による影響は, Cd そのものによるというよりは, Cd により栄養素や必須微量元素の胎盤通過性が低くなることによるもので, 出生後の曝露による影響は神経系への Cd の蓄積によるものであろうとしている. ただし, 明確な神経毒性が得られる場合, 体重減少などの明確な毒性も出現しているので解釈が難しいとしている. 以下にこの review に取り上げられたものも含めて, Cd の発達毒性

に関連するいくつかの文献を挙げてみる：

※ prenatal で、一般毒性をおこさない低用量で行動毒性を見ているものは Baranski et al.

(1983) くらいである。これは交配前 5 週間から出生まで経口で 0.04, 0.4, 4.0 mg/kg/day

を与え、2 ヶ月齢で活動量 (5min を 5 日間連続) の低下、感覚-運動機能試験であるロタ

ロッド (回転軸上の歩行) 成績 (試行 6 日間) の低下を示している。しかし、n 数は不明。

※ prenatal で、行動評価はないが、神経毒性を見ているものはやや多く、Antonio et al.

(1998) は、ラット妊娠初日から生後 5 日目まで 10ppm の Cd を含む飲料水で飼育し、生後 5

日目の時点で 5-HT, 5-HIAA の高値を認めている。Andersson et al. (1997) は、新生仔期

のみの曝露で、生後 17 日目まで 5ppm の飲料水に曝露し、Antonio らとは逆に、7 週齢に

おいて 5-HT & 5-HIAA の低値を認めている。Yargicoglu et al. (1997) はラットで妊娠初

日から出生後 60 日まで 15ppm の飲料水で飼育し、視覚誘発電位への影響を報告している。

※高用量あるいは postnatal exposure で行動毒性を見ているもの

Rastogi ら (1977) はラット新生仔に経口で 0.1 or 1 mg/kgBW を出生後 30 日まで投与し、

最終日に活動量を 30min 記録し、対照群に比較して 30% 活動量が高かったと報告した。た

だし量には依存していない。1mg/kg 投与群では体重・脳重量が低下。モノアミンについて

5-HT, DA など脳の 4-6 部位で検索しているが、0.1mg/kg で有意の変化を認めたのは線条体

TH 活性 (34% 上昇) のみ。

E. 結論

低濃度の Cd (10ppm) を含む飲料水に周生期 (GD1-PNG10) に主として母体を通じて曝露されたマウスの行動機能について、3種類の試験を用いて評価したところ、8-9週齢におけるオープンフィールド行動には曝露の影響を認めなかったが、受動回避試験ではメスのみで成績の低下が認められた。成績の低下は MT-null 群でより顕著な傾向を示した。これらの結果は同じ試験系を用いて評価した DES の周生期曝露の結果とは全く異なっており、Cd 曝露の行動影響がエストロゲン作用とは異なるものであることが示唆された。さらに、メスについてのみ 26 週齢から放射状迷路試験による空間学習機能の評価を行った。MT-null の曝露群は、学習課題を難しくした場合に、他の群に比べて成績が劣る傾向が認められた。以上の結果より、用いた条件下で、Cd は発達毒性を示すことが示唆された。

F. 研究発表

Tanaka M, Ohtani-Kaneko, R., Yokosuka, M., and Watanabe, C (2004) Low-dose perinatal diethylstilbestrol exposure affected behaviors and hypothalamic estrogen receptor- α -positive cells in the mouse. *Neurotoxicology and Teratology*. 261-269.

(前年度の内容の刊行：添付資料とした)

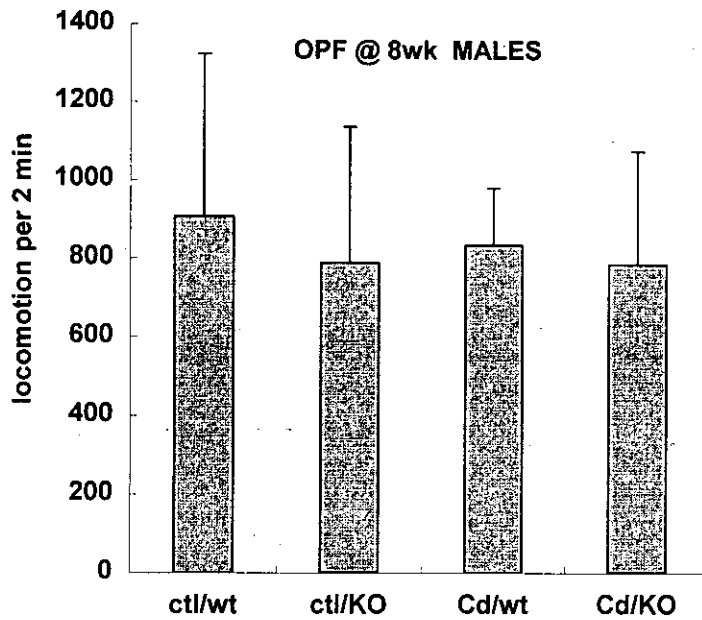


図1a. オープンフィールド試験(オス).
 Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型. KO=MT-nullを示す. 各群間に有意差は認められなかった.

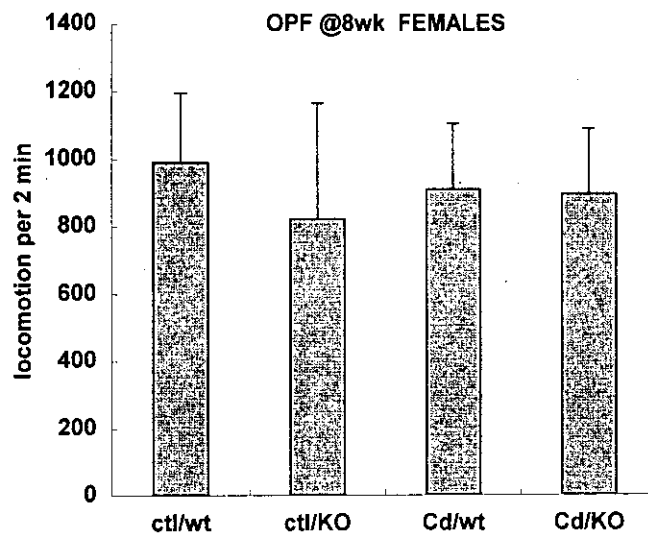


図1b . オープンフィールド試験(メス).
 Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型. KO=MT-nullを示す. 縦軸は2分間の移動距離(cm). 各群間に有意差は認められなかった.

passive avoidance @9wk MALES

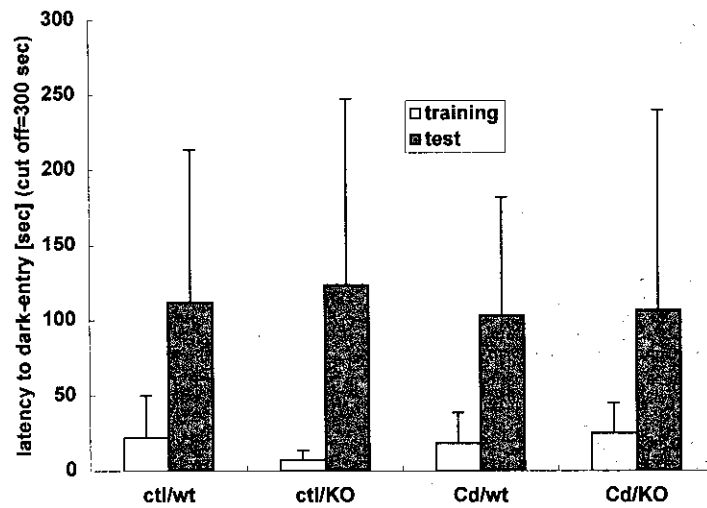


図2a. 受動回避試験(オス). Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型, KO=MT-nullを示す. 縦軸は, マウスを明室においてから, 暗室に入るまでの時間(escape latency (秒)). 各ブロックの左側(training)が訓練試行, 右側(test)がショックとの関連を学習したあとの保持試行であり, 保持試行のlatencyが長いほど, 学習成績が良いことになる. 各群間に有意差は認められなかった.

Passive Avoidance @9wk FEMALES

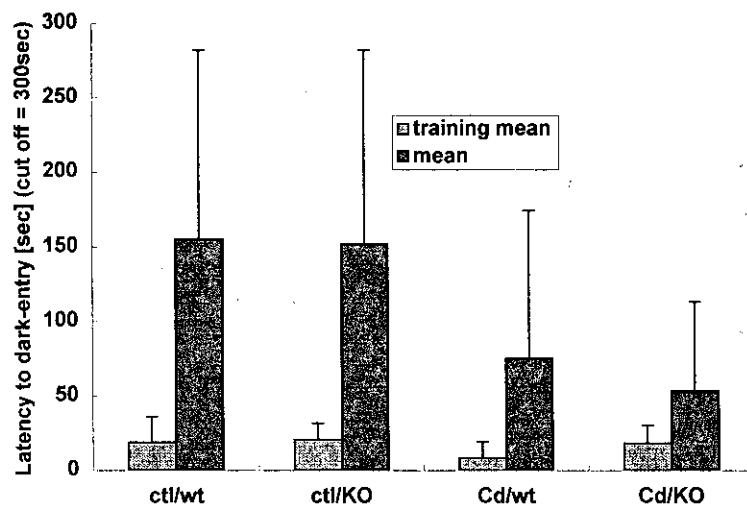


図2a. 受動回避試験(メス). Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型, KO=MT-nullを示す. 縦軸は, escape latency (秒). 2元配置では, Cdの効果は有意であった.

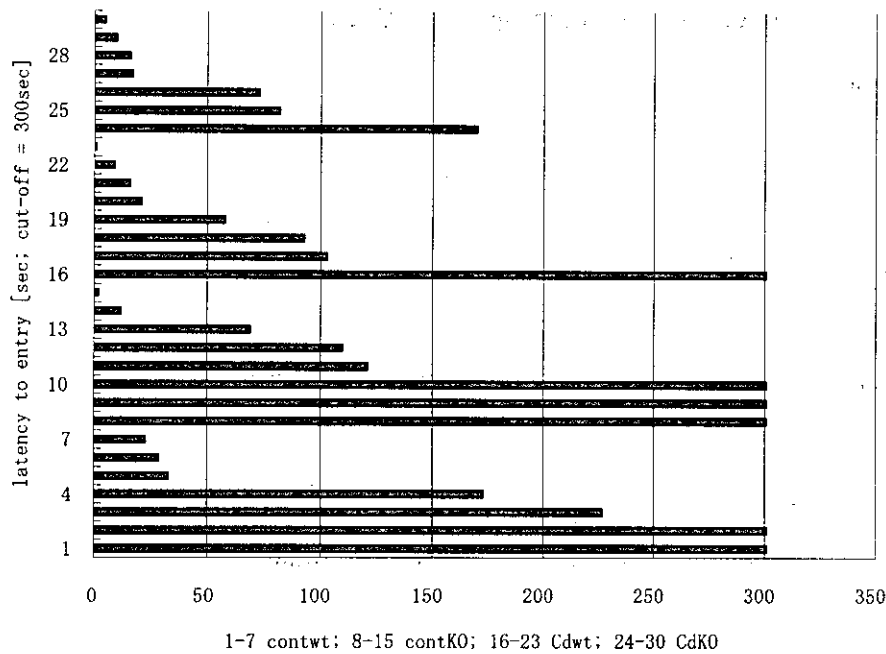


図3. 受動回避試験(メス)の個体別成績(保持試行). Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型, KO=MT-nullを示す. 300秒が観察のcut-off.

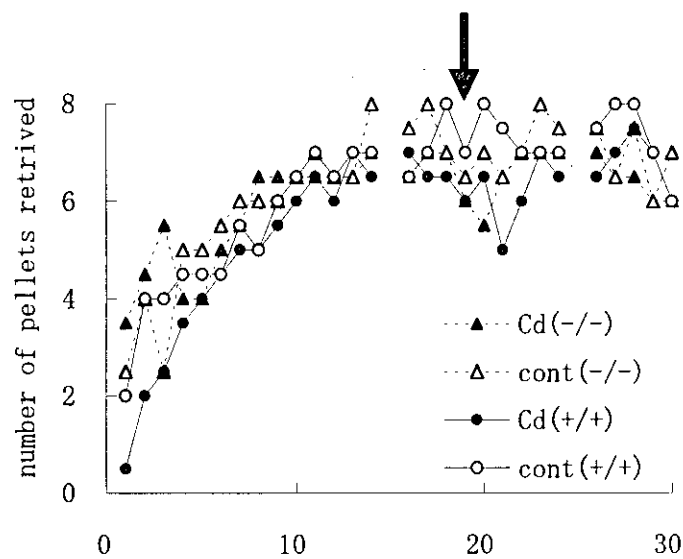


図4. 放射状迷路試験における, 獲得した報酬(餌ペレット)の数. 最大は8個(=課題完了). 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. Cd=曝露群, cont=非曝露群, (-/-)=MT-null, (+/+)=野生型. 各群n=4のmedian. 観察時間は原則として5min(delay timeを除く; 本文参照).