

表1 妊娠14日目 (GD14)あるいは17日目 (GD17)に TCDD または PCB153 に曝露した雄胎仔の泌尿生殖洞において遺伝子発現が2倍以上に変動した遺伝子数

		Compounds			
		TCDD (10 μ g/kg)		PCB153 (10 mg/kg)	
		up	down	up	down
GD14	6 h	17	9	30	8
	24 h	45	20	5	34
GD17	6 h	39	27	1	15
	24 h	31	11	8	16

a, GCOS 解析により Signal Log Ratio が1以上と判定されたもの (発現レベル2倍以上)。

b, GCOS 解析により Signal Log Ratio が-1以下と判定されたもの (発現レベル1/2以下)。

表2. 妊娠期 TCDD または PCB153 曝露による胎仔泌尿生殖洞における遺伝子発現変動のマイクロアレイ解析結果(いずれかの化合物または曝露後時間において発現上昇した遺伝子(プローブセット数))

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Compounds								
			TCDD (10 µg/kg)				PCB 153 (10 mg/kg)				
			GD14		GD17		GD14		GD17		
			6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	
99979_at	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	Cyp1b1	6.6	3.0	2.9	1.6	3.3				
94715_at	cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1	Cyp1a1	4.6	6.2	5.8	6.1					
101709_at	aryl-hydrocarbon receptor repressor	Ahrr	4.3	3.5	4.4	3.6					
93985_at	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	Tiparp	2.4	1.6	2.4	1.6					
100690_at	tyrosine hydroxylase	Th	1.2	1.0	1.0						
104165_at	vanin 1	Vnn1	1.0		1.6						
160088_at	flavin containing monooxygenase 5	Fmo5		5.1	2.9	1.7					
97926_s_at	peroxisome proliferator activated receptor gamma	Pparg		2.9	4.0	1.2					
92739_at	involucrin	Ivl		2.3	1.5	1.8					
102571_at	gap junction membrane channel protein B 6	Gjb6(Cx30)		2.2	3.6	2.2					
94391_at	gap junction membrane channel protein B 6	Gjb6(Cx30)		1.8		1.8					
160553_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	Ly6d		1.7	1.1	1.6					
101025_f_at	small proline-rich protein 2A	Sprr2a		1.4		1.3					
98370_at	uroplakin 2	Upk2		1.4		1.0					
101024_i_at	small proline-rich protein 2A	Sprr2a		1.3	1.1	1.4					
95706_at	lectin, galactose binding, soluble 3	Lgals3		1.3	1.0	1.0					
161046_at	cytokine receptor-like factor 1	Crlf1		1.3		1.4					
92562_at	nuclear factor, erythroid derived 2, like 2	Nfe2l2		1.1	1.2						
104370_s_at	keratin complex 2, basic, gene 6a	Krt2-6a		1.1		1.1					
97413_at	RIKEN cDNA 1600029D21 gene	1600029D21Rik		1.0	1.2						
103974_at	transmembrane protease, serine 2	Tmprss2		1.0	1.1						
99580_s_at	UDP-glucuronosyltransferase 1 family, member 2	Ugt1a2		1.0	1.0	1.2					
98423_at	gap junction membrane channel protein B 2	Gjb2			1.6	1.8					
93695_at	alcohol dehydrogenase 7 (class IV), mu or sigma polypeptide	Adh7			1.1	1.1					
99701_f_at	small proline-rich protein 2B	Sprr2b			1.0	1.3					
103499_at	Von Willebrand factor homolog	Vwf				1.0	1.2				
103887_at	S100 calcium binding protein A9 (calgranulin B)	S100a9				1.5	3.6				
103644_at	dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	3.7								
96533_at	torsin family 3, member A	Tor3a	3.5								
161225_r_at	cryptochrome 1 (photolyase-like)	Cry1	3.4								
101630_f_at	vomeronasal 2, receptor, 2	V2r2	2.6								
98394_at	distal-less homeobox 1	Dlx1	2.2								
103826_at	zinc finger and BTB domain containing 7	Zbtb7	1.8								
98903_at	RIKEN cDNA 1110006I11 gene	1110006I11Rik	1.7								
100450_r_at	activin A receptor, type II-like 1	Acvr1l	1.4								
95305_at	RIKEN cDNA A630098A13 gene	A630098A13Rik	1.3								
160413_at	neuron specific gene family member 2	Nsg2	1.1								
101742_at	tissue-type vomeronasal neurons putative pheromone	LOC56544						4.9			

92653_at	receptor V2R2 RIKEN cDNA D530037H12 gene	D530037 H12Rik	2.9
162095_f_at	growth arrest specific 7	Gas7	2.3
103967_at	midline 2	Mid2	1.9
100593_at	troponin T2, cardiac	Tnnt2	1.9
101162_at	myogenic factor 5	Myf5	1.8
103448_at	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100a8	1.2
100431_at	leptin receptor	Lepr	1.2
103812_at	chloride channel calcium activated 1	Clca1	1.2
160373_i_at	serum deprivation response	Sdpr	1.1
94834_at	cathepsin H	Ctsh	1.1
103053_at	myogenin	Myog	1.1
102986_at	myogenic differentiation 1	Myod1	1.0
92365_at	c-fos induced growth factor	Figf	1.0
97990_at	myosin heavy chain 11, smooth muscle	Myh11	1.0
97581_at	odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	Odz4	1.0
161361_s_at	troponin T1, skeletal, slow	Tnnt1	1.0
103215_g_at	heat shock protein 2	Hspb2	1.0
100468_g_at	lymphoblastomic leukemia	Lyl1	1.0

表内の数値は Signal Log Ratio を示す。

表2. つづき

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Compounds							
			TCDD (10 µg/kg)				PCB (10 mg/kg)			
			GD14		GD17		GD14		GD17	
			6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs
94355_at	transformation related protein 53 binding protein 1	Trp53bp1	2.4							
92673_at	SH3-domain GRB2-like 2	Sh3gl2	2.3							
101891_at	hydroxysteroid (17-β) dehydrogenase 2	Hsd17b2	1.9							
97379_at	fructose biphosphatase 2	Fbp2	1.8							
96770_at	deoxyribonuclease 1-like 2	Dnase1l2	1.7							
100685_at	keratin complex 2, basic, gene 1	Krt2-1	1.4							
160909_at	small proline-rich protein 1A	Spr1a	1.3							
97529_at	annexin A8	Anxa8	1.3							
103235_at	neuropeptide Y	Npy	1.3							
99089_at	myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	Mal	1.2							
101465_at	keratin complex 2, basic, gene 1	Krt2-1	1.2							
96122_at	RIKEN cDNA 2310016A09 gene	2310016A09Rik	1.2							
97825_at	PERP, TP53 apoptosis effector	Perp	1.2							
92770_at	S100 calcium binding protein A6 (calcyclin)	S100a6	1.1							
104512_at	uroplakin 3B	Upk3b	1.1							
96704_at	stratifin	Sfn	1.1							
94270_at	keratin complex 1, acidic, gene 18	Krt1-18	1.1							
161647_f_at	keratin complex 2, basic, gene 4	Krt2-4	1.1							
102243_at	ets homologous factor	Ehf	1.0							
103744_at	RIKEN cDNA A930014C21 gene	A930014C21Rik	1.0							
98988_at	expressed sequence AA408868	AA408868	1.0							
92275_at	transcription factor AP-2, gamma	Tcfap2c	1.0							
96085_at	glutathione S-transferase, alpha 4	Gsta4	1.0							
96180_at	regulator of G-protein signaling 5	Rgs5					1.2			
160634_at	Park2 co-regulated	Pacrg					1.1			
103294_at	regulator of G-protein signaling 5	Rgs5					1.0			
96764_at	expressed sequence AW111922	AW111922					1.0			
160946_at	ubiquitin specific protease 12	Usp12			3.8					
99915_at	amphiregulin	Areg			2.2					
160594_at	procollagen, type XVII, alpha 1	Col17a1			1.9					
100828_at	---	---			1.3					
100596_at	selenium binding protein 1	Selenbp1			1.2					
97206_at	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	Spint1			1.1					
94370_at	oncoprotein induced transcript 1	Oit1			1.1					
92558_at	vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1			1.1					
96672_at	homeobox only domain	Hod			1.0					
101903_at	SET and MYND domain containing 1	Smyd1			1.0					
161531_r_at	early growth response 2	Egr2					4.2			
98813_at	reticuloendotheliosis oncogene	Rel			2.8					
99126_at	inactive X specific transcripts	Xist			2.5					
93122_at	cysteine-rich secretory protein 1	Crisp1			1.8					
99349_at	interleukin 17	Il17			1.6					
96824_at	SRY-box containing gene 15	Sox15			1.6					
104369_at	keratin complex 2, basic,	Krt2-6a			1.0					

96549_at	gene 6a cholinergic receptor, nicotinic, delta polypeptide	Chrnd	1.7
162501_at	---	---	1.3
161421_r_at	glutamate-rich WD repeat containing 1	Grwd1	1.2
104001_at	replication factor C (activator 1) 5	Rfc5	1.1
96980_at	myosin heavy chain 10, non-muscle	Myh10	1.0
94720_at	E26 avian leukemia oncogene 1, 5' domain	Ets1	1.0
97508_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Mdh1	1.0
93704_at	forkhead box F1a	Foxf1a	1.0

表内の数値は Signal Log Ratio を示す。

表3. 妊娠期 TCDD または PCB153 曝露による胎仔泌尿生殖洞における遺伝子発現変動のマイクロアレイ解析結果 (いずれかの化合物または曝露後時間において発現減少した遺伝子(プローブセット数))

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Compounds							
			TCDD (10 µg/kg)				PCB 153 (10 mg/kg)			
			GD14		GD17		GD14		GD17	
			6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs
98480_s_at	renin 1 structural	Ren1	-1.0					-1.4		
100593_at	troponin T2, cardiac	Tnnt2		-1.8				-1.0		
102407_at	mast cell protease 5	Mcpt5		-1.8				-1.0		
101354_at	solute carrier family 18 (vesicular monoamine), member 3	Slc18a3			-4.2				-1.5	
92945_at	glutamate receptor, ionotropic, AMPA2 (alpha 2)	Gria2			-1.0				-1.3	
98315_at	tectorin alpha	Tecta			-1.1				-2.3	
102348_at	---	---				-1.1			-1.2	
101828_at	ret proto-oncogene	Ret					-1.5		-1.0	
161101_r_at	---	---						-2.5	-1.7	
95938_at	expressed sequence C80292	C80292	-2.9							
94939_at	CD53 antigen	Cd53	-1.4							
160956_r_at	expressed sequence AA407526	AA407526	-1.3							
96835_at	matrilin 4	Matn4	-1.1							
100481_at	procollagen, type XI, alpha 1	Coll11a1	-1.0							
102614_at	prospero-related homeobox 1	Prox1					-3.0			
97129_at	CDNA clone IMAGE:30046293, partial cds	---					-2.4			
93950_at	forkhead box A2	Foxa2					-1.5			
92988_i_at	Ca<2+>dependent activator protein for secretion	Cadps					-1.1			
104483_at	procollagen, type IX, alpha 1	Col9a1					-1.0			
101368_at	placentae and embryos oncofetal gene	Pem	-1.8							
96204_at	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	Sh3bgr	-1.5							
98458_at	RIKEN cDNA 1190007F08 gene	1190007F08Rik	-1.5							
96205_at	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein	Sh3bgr	-1.3							
101574_f_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A, member 1a	Serpina1a	-1.2							
102954_at	SRY-box containing gene 5	Sox5	-1.2							
102788_s_at	paired-like homeodomain transcription factor 2	Pitx2	-1.2							
92920_at	paired-like homeodomain transcription factor 1	Pitx1	-1.2							
92997_g_at	SRY-box containing gene 17	Sox17	-1.1							
101753_s_at	lysozyme	Lyzs	-1.1							
93522_at	RAD9 homolog (S. pombe)	Rad9	-1.1							
97717_at	transcription factor 15	Tcf15	-1.0							
100611_at	lysozyme	Lyzs	-1.0							
103394_at	FXFD domain-containing ion transport regulator 5	Fxyd5	-1.0							
102785_at	matrilin 1, cartilage matrix protein 1	Matn1						-4.3		
92407_at	myomesin 1	Myom1						-3.2		
102256_at	T-box 15	Tbx15						-2.9		
161205_at	cytochrome c oxidase, subunit VIIIb	Cox8b						-2.5		
102559_at	bone morphogenetic protein 2	Bmp2						-2.3		
92885_at	troponin T3, skeletal, fast	Tnnt3						-1.9		
92676_at	runt related transcription factor 2	Runx2						-1.7		
98561_at	troponin I, skeletal, slow 1	Tnni1						-1.4		
103214_at	heat shock protein 2	Hspb2						-1.3		
93136_at	dermatan sulphate proteoglycan 3	Dspg3						-1.2		
99667_at	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 2	Cox6a2						-1.2		
102105_f_at	prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds						-1.1		

92541_at	myosin, light polypeptide 1	Myl1	-1.1
98423_at	gap junction membrane channel protein β 2	Gjb2	-1.1
102351_at	carboxypeptidase A3, mast cell	Cpa3	-1.0
97155_at	growth differentiation factor 8	Gdf8	-1.0
99050_at	caveolin 3	Cav3	-1.0
92881_at	myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle	Mylpf	-1.0

表内の数値は Signal Log Ratio を示す。

表3. つづき

Probe Set ID	Gene Title	Gene Symbol	Compounds										
			TCDD (10 µg/kg)				PCB (10 mg/kg)						
			GD14		GD17		GD14		GD17				
			6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs	6 hrs	24 hrs			
97180_f_at	hemoglobin Y, B-like embryonic chain	Hbb-y			-2.3								
162007_i_at	signal-induced proliferation associated gene 1	Sipa1			-1.7								
160190_at	synaptotagmin 4	Syt4			-1.6								
92892_at	vesicular membrane protein p24	Vmp			-1.4								
100393_at	vasoactive intestinal polypeptide transmembrane protein with	Vip			-1.3								
103536_at	EGF-like and two follistatin-like domains 2	Tmeff2			-1.3								
104564_at	secretogranin III	Scg3			-1.2								
94564_at	sulfotransferase family 4A, member 1	Sult4a1			-1.2								
92346_at	neurofilament 3, medium	Nef3			-1.2								
104751_at	peripherin 1	Prph1			-1.1								
95436_at	somatostatin	Sst			-1.1								
98473_at	arginase type II	Arg2			-1.1								
161859_f_at	synuclein, gamma	Sncg			-1.1								
98967_at	fatty acid binding protein 7, brain	Fabp7			-1.1								
104280_at	synuclein, gamma	Sncg			-1.1								
160623_at	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	Cdkl2			-1.1								
161612_f_at	tubulin, B 3	Tubb3			-1.1								
161902_f_at	guanine nucleotide binding protein, alpha o	Gnao			-1.0								
103575_at	neurofilament, light polypeptide	Nefl			-1.0								
102677_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) gamma	Arhgdig			-1.0								
104523_at	RIKEN cDNA E430036I04 gene	E430036I04 Rik			-1.0								
92292_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	Slc2a3			-1.0								
95347_at	myelin transcription factor 1	Myt1			-1.0								
160899_at	Purkinje cell protein 4	Pcp4			-1.0								
161884_r_at	fragile X mental retardation gene 1, autosomal homolog	Fxr1h										-3.8	
102583_at	olfactory receptor 136	Olf136											-3.7
92193_r_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	Pcsk5											-3.1
101225_at	DNA segment, Chr 5, ERATO Doi 102, expressed	D5Erd102e											-2.3
92245_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 50	Ddx50											-2.0
98123_at	kynurenine aminotransferase II	Kat2											-1.8
92291_f_at	complement component factor h-like 1	Cfh1l											-1.4
103045_at	mature T-cell proliferation 1	Mtcp1											-1.4
162161_r_at	SAM domain and HD domain, 1	Samhd1											-1.4
101972_at	kidney-derived aspartic protease-like protein	Kdap											-1.1
95958_at	expressed sequence C76977	C76977											-1.0
102192_r_at	SA rat hypertension-associated homolog	Sah											-3.7
92977_s_at	H6 homeo box 3	Hmx3											-3.2
94104_at	telomerase reverse transcriptase	Tert											-2.3
100882_at	defensin B 1	Defb1											-2.0
103599_at	transformed mouse 3T3 cell double minute 1	Mdm1											-1.6
97519_at	secreted phosphoprotein 1	Spp1											-1.6
104577_at	mutL homolog 1 (E. coli)	Mlh1											-1.2
102577_at	potassium voltage-gated channel,	Kcnab3											-1.1

	shaker-related subfamily, β member 3		
96375_at	DNA segment, Chr 9, ERATO Doi 306, expressed	D9Ertid306e	-1.1
162379_r_at	vimentin	Vim	-1.0
96591_at	reelin	Reln	-1.9
95964_at	RIKEN cDNA A430103N23 gene	A430103N2 3Rik	-1.6
93372_at	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member A	Anp32a	-1.2
97157_at	NK-3 transcription factor, locus 1 (Drosophila)	Nkx3-1	-1.2
99937_at	mesenchyme homeobox 2	Meox2	-1.1
160108_at	nuclear protein 1	Nupr1	-1.1
92559_at	vascular cell adhesion molecule 1	Vcam1	-1.1

表内の数値はSignal Log Ratioを示す。

(資料 4)

コプラナーPCB と TCDD の学習行動への影響の比較解析

主任研究者 遠山 千春 主任研究者 遠山 千春
東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授
(前職： 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)

研究要旨

ダイオキシン類への曝露が発達中の高次脳機能の発達を障害する可能性が示唆されている。本研究では、Long-Evans ラットにおけるオペラント条件づけ行動試験を用い、2,3,7,8 四塩素化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) あるいは PCB126 それぞれの発達期曝露が成熟後の記憶・学習機能に及ぼす影響について、比較検討した。母ラットが妊娠 15 日目に 50、200、800ng/kg の TCDD と PCB126 (TEF0.1) を 500、2000、8000 ng/kg (それぞれ 50、200、800 ng TEQ/kg)、を経口的に単回曝露した。生まれた仔ラットが成熟後にオペラント行動試験を行った。オペラント行動試験では、2 種類の課題を交互に提示する多元強化スケジュールを 30 日間行った。その結果、TCDD のオペラント行動に対する毒性は曝露用量依存的ではなく、逆 U 字を示す曝露用量特異的な影響としてあらわれた。PCB126 の毒性も同様のパターンを示した。PCB126 の相対毒性強度は、TCDD と同様もしくは若干低めのであった。さらに最高用量曝露群では、PCB126 は TCDD よりも強い毒性も示したことから、PCB126 の「非 TCDD 毒性」の存在も示唆された。

研究協力者

北條理恵子、掛山正心 国立環境研究所環境健康研究領域

A 研究目的

2,3,7,8-*p*-四塩素化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) は、発癌性、免疫毒性、生殖毒性など人体に種々の毒性をもつことが懸念されている (Tohyama, 2000)。さらに TCDD は、高次脳機能に影響することも示唆されており、妊娠ラットへの投与が胎仔成長後の学習行動に影響することが報告されている (Hojo, et al., 2002)。PCB に関しても、ヒトにおける疫学調査で母親の血中 PCB 濃度と子供の IQ に高い相関関係があることが報告されているが (Stewart et al. 2000)、根拠となるデータが少なく、PCB の直接影響なのか断定できない状況にある。また、TCDD と PCB の毒性の異同も未だ解明されていない。そこで本研究では、妊娠期の TCDD あるいはコプラナーPCB である 3, 3', 4, 4', 5-五塩素化ビフェニル (PCB126) の母体曝露が発達中の胎子脳に及ぼす影響について、記憶学習行動に焦点を当て検討した。

B 研究方法

1. 試験材料

TCDD、PCB126 (N ノナン 0.5%) のコーンオイル溶液 (N ノナン 0.5%) を、ラット用胃ゾンデで経口投与した。コントロール群にはコーンオイル (N ノナン 0.5%) を同様に曝露した。

2. 実験動物および飼育条件

Long-Evans ラットは、チャールズブリバから購入した。飼育および処理はすべて国立環境研究所の動物実験手順に従い、特殊化学物質管理区域内にて行った。

3. 曝露方法

妊娠 15 日目の Long-Evans ラットに、TCDD を 50、200、800 ng/kg (それぞれ T50、T200、T800 群、各 8、7、8 匹) または PCB126 を 500、2000、8000 ng/kg (P500、P2000、P8000 群、各 8、8、9 匹)、コントロール群としてコーン油溶液 (8 匹) を単回経口曝露した。その後生まれた仔動物に対し、生後 80 日目以降実験終了まで給餌

制限を行い(1日あたり雄 10g、雌 8g)、体重を雄 290-330g、雌 200-255g に維持した。

4. オペラント行動試験用装置

実験にはラット用のレバーつきオペラント実験箱(室町機械、東京)を使用した。実験箱内前面のパネルに、反应用レバーが左右に二つ、その上に刺激提示用ランプ、ボックス中央上部にハウスライト、下部に給餌ボックスが組み込まれていた。ラットが課題に応じたレバー押し反応を行うことで報酬(実験用エサ 1 粒 45mg)が給餌ボックスの中に提示される。各実験箱を換気扇つきの防音箱の中に入れて実験を行った。レバー押し反応の記録、報酬の提示などは、コントロールボックス(室町機械と共同開発)にて管理し、10 ミリ秒単位で記録を行い、パーソナルコンピュータで制御した。

5. オペラント行動試験課題

各腹の雌雄 1-2 匹の仔動物を用い、オペラント行動試験を行った(コントロール群; 雄 9 匹・雌 9 匹、TCDD 曝露群; T50: 雌雄各 8 匹、T200: 雄雌各 8 匹、T800: 雄雌各 8 匹、PCB126 曝露群; P500: 雄 8 匹・雌 6 匹、P2000: 雄雌各 8 匹、P8000: 雄雌各 8 匹)。12 週齢以降、これらのラットに対し、二種類のレバー押し課題を訓練した。一つは定率強化(Fixed Ratio, FR)課題で、一定の回数レバー押し反応に対してエサ粒を一つ与える課題である。本研究では、FR20(20 回目のレバー押し反応にエサを提示、以下 FR20)課題を訓練した。もう一つの課題は、低率反応分化強化(differential reinforcement of low rates, DRL)で、直前のレバー押し反応から一定の時間経過後のレバー押し反応に対してエサを提示した。本研究では、DRL20 秒(レバー押しの反応間隔が 20 秒以上あった場合にエサを提示、以下 DRL20)課題を訓練した。訓練期間は、FR20 および DRL20 課題それぞれ 8 日間であった。その後、上記の 2 種類を組み合わせた、FR20DRL20 多元強化(Multiple reinforcement schedule, Mult)スケジュールを連続 30 日間(1 日 1 セッション、49 分間)行った。Mult スケジュールでは、1 セッション内で、FR20 と DRL20 課題をそれぞれ 2 分間と 5 分間交互に 7 回ずつ

提示した(計 49 分間)。FR20 の時には刺激提示油ランプを点灯し、DRL20 の時には消灯した。

6. 分析方法

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率は繰り返しのある二元配置の分散分析にて解析を行った。同腹から生まれた仔の雌雄の比率については、 $m \times n$ の比率検定を用いて解析を行った。Mult FR20DRL20 スケジュールにおける曝露影響は、それぞれの課題ごとに、1 分間あたりのエサの数(報酬獲得率)、1 分間あたりの反応数(反応率)を算出し、繰り返しのある二元配置の分散分析法にて解析した。

C 研究結果

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、雌雄仔の比率については、TCDD および PCB126 曝露全群とコントロール群との間に差はみられなかった。低用量 TCDD および TEQ 相当量の PCB126 の母体曝露により、成熟後の仔動物においてオペラント行動試験の成績に影響があらわれた。

(1) TCDD 曝露群について

FR20 の反応率においては、コントロール群に比べ T200 群が有意に高率の反応を示した。報酬獲得率は、コントロール群に比べ T50 群が有意に少なく($p < 0.01$)、T200 群が有意に多かった($p < 0.01$)(図 4)。T800 群では有意差は見られなかったものの、報酬獲得率が低下する傾向がみられた。DRL20 での反応率は、T200 群がコントロール群よりも有意に高かった($p < 0.01$)。DRL20 での報酬獲得率は、TCDD 曝露全群がコントロール群よりも有意に低かった(それぞれ $p < 0.01$)(図 5)。

(2) PCB126 曝露群について

FR20 の反応率は、P8000 群で有意に低下した($p < 0.01$)。報酬獲得率は、コントロール群に比べ P2000 群が有意に多く、P8000 群において有意に少なかった(それぞれ $p < 0.01$)。DRL20 の反応率については、曝露全群ともコントロール群との間に差はみられなかった。報酬獲得率において

は、P2000 群がコントロール群に比べて多くの報酬を獲得していた($p<0.01$)。

(3) TCDD と PCB126 曝露群との比較

TCDD 曝露群と、各 TCDD の曝露量の TEQ に相当する PCB126 曝露群をそれぞれ比較した。FR20 においては、T200 群と P2000 群との間に反応率と報酬獲得率に差が認められ(それぞれ $p<0.01$)、T200 群が有意に高率反応を示し、報酬もより多く獲得していた。また、T800 群と P8000 群との間にも反応率および報酬獲得率に差が認められた(それぞれ $p<0.01$)。T800 群が高率反応を示し、より多くの報酬を獲得していた。DRL20 においては、T200 ng/kg 群と P2000 群との間に反応率に差が認められ($p<0.01$)、T200 群が有意に高率反応を示した。報酬獲得率では、T50 群と P500 群との間に差が認められ($p<0.01$)、T50 群は、P500 群と比べると報酬獲得率が有意に低かった。

D 考察

母体に対する低用量の単回曝露が、仔動物における成熟後のオペラント行動に影響を及ぼし、その結果記憶・学習機能が部分的に障害されたことが強く示唆された。オペラント行動に対する影響は、TCDD および PCB126 とともに、曝露用量依存的ではなく、曝露用量特異的な影響としてあらわれた。また、本実験の結果から、TCDD と PCB126 がオペラント行動に対して異なる影響を及ぼした可能性も示唆された。

(1) TCDD の影響について

TCDD 曝露後、妊娠経過、母獣の体重増加率、仔獣の生育経過、体重増加に影響がなかったにもかかわらず、オペラント行動試験においては最低用量(50ng/kg)曝露群においても有意な影響が確認された。母体に対する低用量の TCDD 曝露により、仔動物における成熟後のオペラント行動に影響が見られたことは、記憶・学習機能がわずかな量の TCDD 曝露に対しても非常に敏感に反応したことを表している。T200 群では FR20 で高率反応をした結果報酬獲得数が亢進した。FR20 における反応率が逆 U 字型を示したことは、

TCDD の毒性がオペラント行動に対して用量特異的な作用を及ぼす可能性を示している。一方、T200 群では DRL20 でも同様に高率反応し、報酬獲得率は低くなった。この結果は、T200 の FR20 における学習能力が亢進されたわけではなく、反応が亢進したこと、そして二つの課題に対する弁別学習が成立しなかったことを示している。また、T50 および T800 群における DRL20 の反応率は、ほぼコントロール群と同率であったにもかかわらず、報酬獲得率は有意に低かった。T50 および T800 は、DRL20 でコントロール群とは異なる反応をした結果、少ない報酬しか獲得できなかったと考えられる。言い換えると、反応と報酬との関係、つまり DRL20 における最適反応を学習できなかった可能性がある。

(2) PCB126 の影響について

FR20 では、P2000 および P8000 群において、反応率および報酬獲得率ともにコントロール群と比較して有意差が見られた。しかしながら、反応は用量依存的ではなく、P2000 群は高率反応を示したが、P8000 群は低率反応を示した。DRL20 においては、反応率に有意差は見られなかったが、報酬獲得率では P2000 群がコントロール群よりも低率を示し、最適反応の学習が獲得できなかったことが示唆された。

(3) TCDD と PCB126 の毒性比較

TCDD と PCB126 曝露による影響は、FR20 において両者とも曝露用量依存的ではなく、本実験で用いた中間曝露用量(T200、P2000)群で反応が亢進し、最低用量(T50、P500)群および最高用量(T800、P8000)群で反応が減少する逆 U 字型となった。TCDD および PCB126 がレバー押し反応におよぼした毒性は、毒性等価係数と同等、もしくは若干低めの値が適当なことを示唆する結果と考えられる。

しかしながら、TCDD では最低曝露用量で影響が出ていた(FR20 の反応率と報酬獲得率)のに対し、低下傾向はみられたものの、PCB126 では有意差が見られなかった。また、TCDD では最高用量では影響が認められなかったが、PCB126 ではコ

ントロール群と比べ、反応率・報酬獲得率が有意に低下した。

E 結論

TCDD あるいは PCB126 それぞれの発達期曝露が、成熟後の記憶・学習機能に影響を及ぼした。TCDD のオペラント行動に対する毒性は曝露用量依存的ではなく、逆 U 字パターンの用量特異的な影響としてあらわれた。PCB126 の毒性にも用量依存関係は見られず、TEF と同様か若干低めの値を示唆する「TCDD 様毒性」を示した。さらに最高用量曝露群では、PCB126 は TCDD よりも強い毒性も示したことから、PCB126 の「非 TCDD 毒性」の存在も示唆された。

F 参考文献

Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B. (2002) Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect* **110**:247-54

Stewart P, Reihman J, Lonky E, Darvill T, Pagano J. (2000) Prenatal PCB exposure and neonatal behavioral assessment scale (NBAS) performance. *Neurotoxicol Teratol*. **22**:21-29.

Tohyama C. (2002) Low-dose exposure to dioxin, its toxicities and health risk assessment. *Environ Sci* **9**:37-50

Zareba G, Hojo R, Zareba KM, Watanabe C, Markowski VP, Baggs RB, Weiss, B. (2002) Sexually dimorphic alterations of brain cortical dominance in rats prenatally exposed to TCDD. *J Appl Toxicol* **22**:129-137

G. 健康危険情報 特に無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
特に無し
2. 実用新案取得
特に無し
3. その他
特に無し

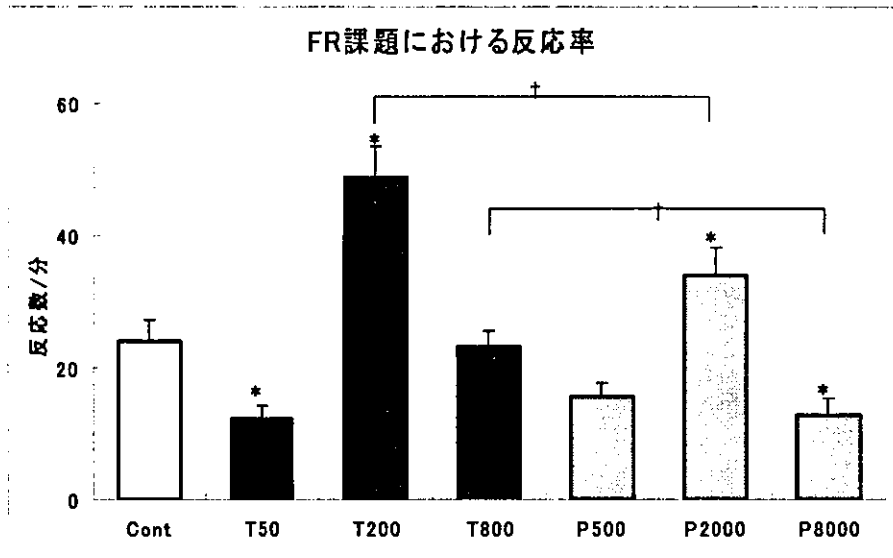
I. 図の説明

図 1. FR20 課題における反応率
FR20DRL20Mult スケジュールにおける
FR20 課題の 1 分間あたりの反応数
* <0.05 (vs. control)、† <0.05 。

図 2. FR20 課題における報酬獲得率
FR20DRL20Mult スケジュールにおける
FR20 課題の 1 分間あたりの報酬獲得数。
* <0.05 (vs. control)、† <0.05 。

図 3. DRL20 課題における反応率
FR20DRL20Mult スケジュールにおける
DRL20 課題の 1 分間あたりの反応数。
* <0.05 (vs. control)、† <0.05 。

図 4. DRL20 課題における反応率
FR20DRL20Mult スケジュールにおける
DRL20 課題の 1 分間あたりの報酬獲得数。
* <0.05 (vs. control)、† <0.05



☒ 1

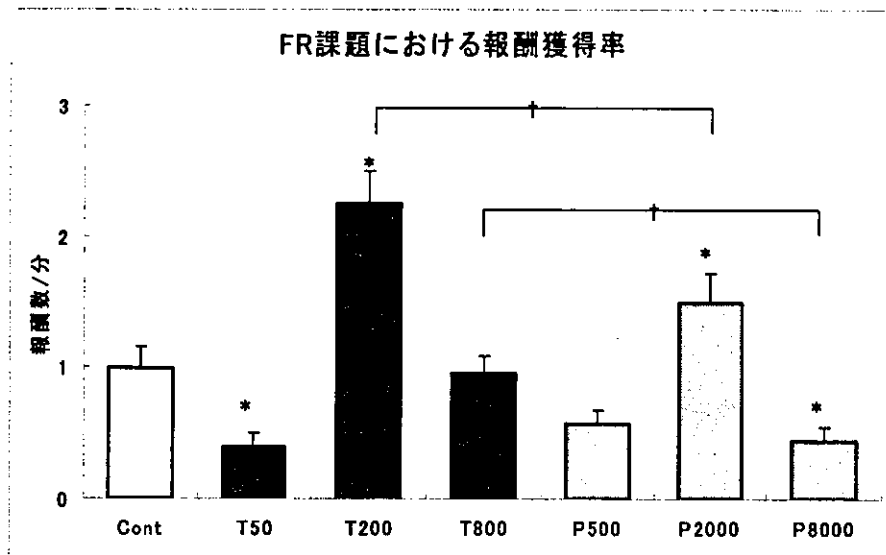


図 2

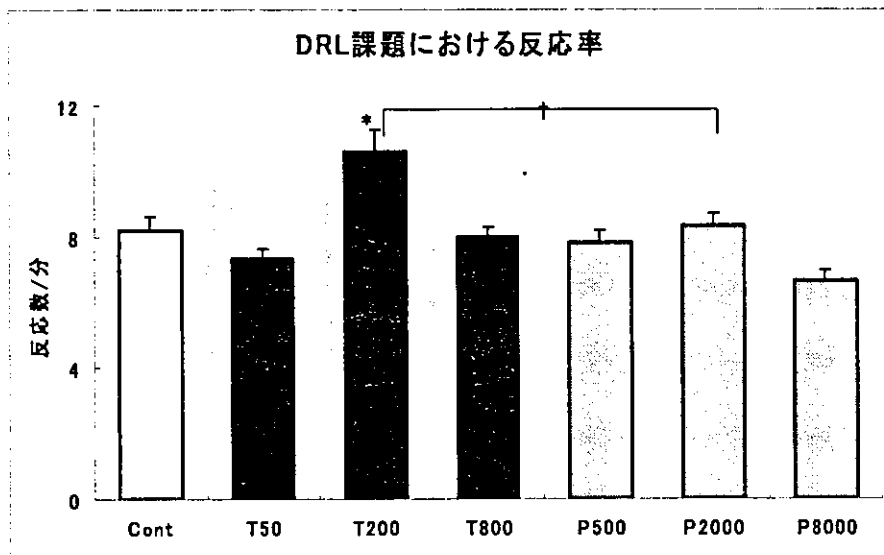


図3

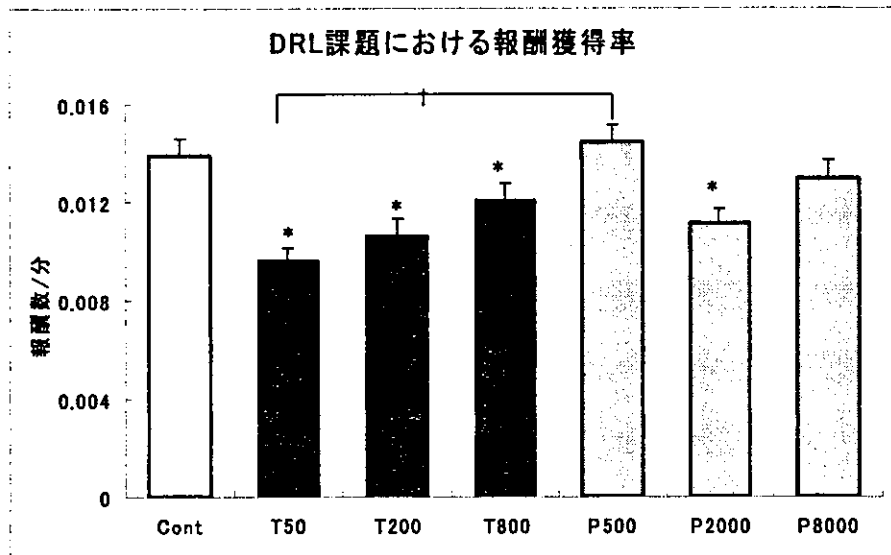


図4

(資料 5)

PCB153 を用いた学習行動における非ダイオキシン様毒性の解析

主任研究者 遠山 千春

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 教授

(前職： 国立環境研究所環境健康研究領域 領域長)

研究要旨

昨年度までに我々は、ラットの学習行動において、PCB126(TEF=0.1)は TCDD 様毒性にあわせて、非 TCDD 様毒性を示す可能性があることを見いだした。

そこで本年度は、TEF を付与されていない非コプラナーPCBである PCB153 を用い、この異性体の発達期のラットへの曝露が記憶・学習機能に及ぼす影響について検討した。実験群は、母ラットに PCB153 を 2 mg/kg の用量で妊娠 5、15 日目あるいは出産後 3 日目に単回経口投与した曝露群(GD5 群、GD15 群、PND3 群)、ならびに、各日 1 回で計 3 回、合計 6mg/kg を投与した反復曝露群(GD5+GD15+PND3 群)の 4 群からなる。その母ラットから生まれた仔ラットが成熟したあとに、レバー付きオペラント箱を使用し、学習行動試験を行った。オペラント学習行動試験では、固定比率(Fixed-Ratio ; FR)強化スケジュールを 15 日間行った。その結果、GD5+GD15+PND3 群、GD15 群、GD5 群で有意な学習低下が認められ、PND3 群では影響が観察されなかった。PCB153 の発達期曝露は学習遂行能力の顕著な低下を引き起こすこと、またその発達神経毒性は、胎内曝露によって生じることが示唆された。

研究協力者：

掛山正心、北條理恵子 国立環境研究所環境健康研究領域

A 研究目的

我々は昨年度までに、コプラナーPCBである 3,3',4,4',5-五塩素化ビフェニル (PCB126, TEF=0.1) の発達期曝露がラットの学習行動に影響を及ぼすことを明らかにした。PCB126 の発達神経毒性は、TEF の強度をほぼ反映して観察される TCDD 様毒性の他に、TCDD 曝露では検出されない影響が観察されたことから、PCB による非 TCDD 様毒性が存在する可能性も示唆された。

一方ヒトにおける疫学調査では、母親の臍帯血中の PCB 類濃度と子供の IQ に高い相関関係があることが報告されており(Stewart et al. 2000 など)、またサルを用いた曝露実験でも学習能力低下が確認されている(Rice 2000)。しかしこれらの研究では、コプラナーPCB と非コプラナーPCB の両者の影響を識別できない実験条件となっており、観察された影響が、現行のリスク評価で用いられている (TEF であらわされる) TCDD 様毒性な

のか、あるいはPCB独自の非TCDD様毒性なのかが不明なままである。

そこで本研究は、PCB独自の発達神経毒性について検証することでPCBによる非TCDD様毒性の存在を明らかにすることを試みた。TEFを付与されていない非コプラナーPCBである2,2',4,4',5,5'-六塩素化ビフェニル(PCB153)を母体曝露し、生まれた仔ラットに対してオペラント学習行動試験法を用いて記憶・学習機能を調べた。

B 研究方法

3. 試験材料

曝露群には純度99.5%以上のPCB153粉末をコーンオイル(ノナン0.5%)で溶解したものを、コントロール群にはコーンオイル液(ノナン0.5%)を、経口曝露した。

4. 実験動物および飼育条件

Long-Evansラットは、Charles River(Chicago)から購入した。飼育および処理はすべて国立環境研究所の動物実験手順に従い、特殊化学物質管理区域内にて行った。

3. 曝露方法

妊娠5、15日目あるいは出産後3日目(妊娠25日目に相当)の母ラットに対して、2 mg/kgのPCB153を、ラット用ディスポーザブル胃ゾンデを使用して経食道的に単回投与した(それぞれGD5群8匹、GD15群8匹、PND3群6匹)。また、妊娠5、15日目および出産後3日目の3回にわたり、PCB153をそれぞれ2 mg/kg、合計6 mg/kg投与した複合曝露

群も作成した(GD5+GD15+PND3群、8匹)。コントロール群には妊娠15日目に、コーンオイル(0.5%Nノナン含有)を同様の方法で投与した。これらの母ラットから生まれた仔ラットを学習行動試験に用いた。生後60日目以降実験終了まで給餌制限を行い(1日あたり雄10g、雌8g)、体重を雄290-330g、雌200-255gに維持した。

4. オペラント行動試験用装置

実験にはラット用のレバーつきオペラント実験箱(室町機械、東京)を使用した。実験箱内前面のパネルに、反作用レバーが左右に二つ、その上に刺激提示用ランプ、ボックス中央上部にハウスライト、下部に給餌ボックスが組み込まれていた。ラットが学習課題に応じたレバー押し反応を行うことで報酬(実験用エサ1粒45mg)が給餌ボックスの中に提示される。各実験箱を換気扇付きの防音箱の中に入れて実験を行った。レバー押し反応の記録、報酬の提示などは、コントロールボックス(室町機械と共同開発)にて管理し、10ミリ秒単位で記録を行い、パーソナルコンピュータで制御した。

5. オペラント行動試験課題

PCB153に曝露した母ラット、あるいはコーンオイル投与の母ラットから生まれた雄の仔ラットを各腹1匹ずつ用い、成熟後(9-11週齢)オペラント行動試験を行った(それぞれコントロール群;8、GD5群;6、GD15群;8、PND3群;8匹、GD5+GD15+PND3群;8匹)。試験に入る前にラットに対し、実験箱への馴化、

レバー押し反応を確立するための訓練を行った。その後、学習課題として、定率強化(Fixed Ratio, FR)課題を選択し、その課題に対する訓練を行った。この課題は、一定の回数のレバー押し反応に対して報酬(実験用エサ粒)を一つ与える課題である。本研究で用いた定率強化課題の値は、FR20(20回目のレバー押し反応に対しエサを提示する、以下FR20)で、1日1セッションを連続して15日間行った。最大報酬数50個獲得あるいは実験開始から30分経過した時点のどちらかで、セッションを終了した。

6.分析方法

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率は繰り返しのある二元配置の分散分析にて解析を行った。FR20学習課題における曝露影響は、学習基準(1セッションで報酬を43個(85%)以上獲得)に達した動物の数、および報酬獲得率を算出し、それぞれカイ二乗検定と分散分析により調べた。

C 研究結果

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、雌雄仔の比率については、PCB153曝露全群とコントロール群との間に差はみられなかった(表1)。

FR20課題における学習達成基準として、30分以内に43個以上(85%)の餌を報酬として獲得することとした。コントロール群では、FR20開始1日目では50.0%(8匹中4匹)のラットが学習基準に達しており、5日目には有意な上昇がみられ(75.0%、 $p<0.05, \chi^2$ 検定)、7日目

以降はすべての動物が学習基準に達した($p<0.05$) (図1(A))。

他方、胎仔期におけるPCB153の曝露により、成熟後の仔動物におけるオペラント行動試験の成績に影響が観察された。すなわち、GD5曝露群では5日目を過ぎてもスコアが低く、学習基準に達した動物数がコントロール群よりも有意に低い日が、後半のうち3日間、観察された(10, 11および13日目)($p<0.05, \chi^2$ 検定)(図1(B))。GD15群では後半で上昇傾向がみられたもののコントロール群よりは低く、7日目と13日目は有意に低かった

($p<0.05, \chi^2$ 検定) 図1(C))。PND3群では有意な違いは認められず、むしろ開始後4日間はコントロール群よりも高い傾向が見られた(図1(D))。反復曝露群であるGD5+GD15+PND3群では最も顕著な影響が観察され、後半のうち9日間(7-14日目)でコントロール群よりも有意な低下がみられた($p<0.05, \chi^2$ 検定)(図1(E))。

15日間中の報酬獲得率は、コントロール群と比較してGD5群、GD15群、GD5+GD15+PND3群が有意に低く($p<0.01$, two way ANOVA)、PND3群はコントロール群と変わらなかった($p=0.886$, two way ANOVA)(図2)。またGD15群およびGD5+GD15+PND3群は、GD5群と比較しても有意に低かった($p<0.01$, two way ANOVA)(図2)。

D 考察

本実験では、PCB153の母体曝露により、仔動物における成熟後のオペラント行動に影響が認められ、PCB153の発達