

200401259B

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14年度～16年度 総合研究報告書

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教室

平成17年(2005年)4月

目 次

はじめに i

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）

（1）陽性対照としてのジエチルスチルベストロールの周産期曝露がマウスの行動に及ぼす影響に関する研究 3

（2）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29

（3）周生期カドミウム曝露が出生後の神経行動機能におよぼす影響
—加齢後における評価—70

（4）低濃度の周生期カドミウム曝露がマウス新生仔組織の銅、亜鉛濃度ならびに性成熟に及ぼす影響75

（5）甲状腺機能阻害剤の周生期投与による新生仔マウス臓器中微量元素の変動88

II. 分担研究報告

1. 長期低濃度水銀曝露の行動影響に関する研究 (吉田稔)

- (1) 長期低濃度水銀曝露の行動影響に関する研究
.....105
- (2) 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
.....135
- (3) 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
.....156
- (4) 胎生期のメチル水銀曝露による神経行動毒性に対する加齢と遺伝的要因の影響
響181
- (5) 胎生期における水銀蒸気とメチル水銀の複合曝露が行動に及ぼす影響
.....208

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)

- (1) 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
.....241
- (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
.....254
- (3) 胎生期の水銀およびカドミウム曝露による新生仔脳中遺伝子発現への影響評価とメタロチオネインの関与に関する研究301

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)

- (1) 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
.....343
- (2) 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

	355
(3) 妊娠期および授乳期低用量メチル水銀曝露によるメタロチオネイン欠損および野生型マウスにおけるTIMP4(tissue inhibitor of metalloproteinase 4)の組織標本上での発現・局在	431
(4) 胎児期における低濃度水銀曝露(単独:蒸気水銀、メチル水銀)(複合曝露:蒸気+メチル水銀)の生後の影響(病理組織)	435
(5) 低濃度水銀蒸気曝露マウスにおける脊髄内の水銀顆粒沈着部位の経時的変化	440
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)		
(1) 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	465
(2) 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	475
(3) 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	497
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)		
(1) 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 (視床下部-下垂体-副腎系)に関する研究	509
(2) 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	519

(3) 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	526
--	-----

まとめと展望	535
--------	-----

参考資料	547
------	-----

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た。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をおこなった。本研究
では、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、現実の場面で問題と
なり得るような感受性要因候補に着目し、それが感受性を高くするかどうかを実験
レベルで検証することを試みた。高感受性要因を同定することが、現実場面での高
感受性集団の同定、さらには対策におけるプライオリティの決定にも貢献すること
を目指した。

初年度は、メチル水銀、カドミウム、およびメチル水銀毒性の“環境的“修飾要因
としての水銀蒸気への在胎期～生後10日にかけての低用量曝露ならびに、発達毒性

評価に用いるエンドポイントの解析条件の検討を中心に実施した。2～3年度目に、メチル水銀ならびにカドミウムの発達毒性を、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、DNA マイクロアレイおよびリアルタイム RT-PCR を用いた遺伝子発現プロファイルをそれぞれエンドポイントとして検討し、遺伝的要因（メタロチオネイン欠損）、生理的要因（加齢・副腎機能の低下・甲状腺機能の低下）、環境的要因（水銀蒸気への曝露）が、発達毒性をいかに修飾するかについて検討を行った。

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)

- (1) 陽性対照としてのジエチルスチルベストロールの周産期曝露がマウスの行動に及ぼす影響に関する研究
- (2) 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
- (3) 周生期カドミウム曝露が出生後の神経行動機能におよぼす影響
—加齢後における評価—
- (4) 低濃度の周生期カドミウム曝露がマウス新生仔組織の銅，亜鉛濃度ならびに性成熟に及ぼす影響
- (5) 甲状腺機能阻害剤の周生期投与による新生仔マウス臓器中微量元素の変動

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括研究報告

陽性対照としてのジエチルスチルベストロールの周産期曝露がマウスの行動
に及ぼす影響に関する研究

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：陽性対照物質としてのジエチルスチルベストロール（DES）については、上記実験での野生型にあたる C57BL/6J 系統のみを用い、妊娠～授乳期（妊娠 11～17 日目および出産 2～6 日後）における低レベル DES（0.3, 3 μ /kg 体重；op）の曝露を行なった後、行動影響を多角的に調べた。また各行動試験のパラメタ設定、問題点の検討などをあわせて行なった。その結果 DES 曝露により、受動的回避試験成績は用量依存的に抑制、オープンフィールドでは活動亢進を認めただほか、オスの性行動、攻撃行動についても亢進を認めた。個体レベルで検討したところ、オープンフィールドの活動亢進と性行動・攻撃行動の間には正の相関が見られた。また、DES 曝露で影響を受ける可能性のあるタンパク質として、 α 型女性ホルモン受容体（ER α ）の発現を免疫染色を用いて評価した。検索部位は、攻撃行動および性行動に影響が認められた点に着目して、これらの行動に関連する腹内側核、扁桃核、腹側被蓋野、中脳中心灰白質および青斑核とした。その結果、DES 曝露により、オスにおいて ER α の発現が腹内側核（視床下部）で増加するとの結果を得た。他の検索部位およびドパミン細胞の発現（チロシン水酸化酵素で評価）については変化を認めず、部位・タンパク質特異性がうかがわれた。

A. 研究目的

胎生期におけるメチル水銀およびカドミウムなど化学物質への曝露が生後の中枢神経機能に及

ばす影響を推定する場合、行動機能の評価は有力なエンドポイントとなり得る。行動機能による評価は、1970年代頃より化学物質の影響評価に導入されている。行動試験においての一つの問題点は、例えば臨床化学検査や多くの生化学的変数と異なり、“正常範囲”あるいは“基準範囲”というものが事前に定義され得ない点にある。全ての行動が、その行動の起こる“環境”（現実的には、行動試験を行なう実験室と動物を取りまく広い意味での環境や行動試験装置そのものに相当するだろう）を抜きにして考えられないことから、この問題は行動試験には常についてまわる問題といえる。この問題に対処するには、一般の実験と同様に对照群を設定するのみならず、用いる〔行動〕測定法が異常を検出し得ることを示す必要がある。このためには、すでに“行動異常”が生ずることが確認されている処理を行なった場合に、問題としている測定系でも異常が検出されることを示すことが求められる。本研究でいう陽性对照とは、このような処理をさす。

本研究では、水銀およびカドミウムの行動機能を高感度かつ多角的に検討することを目指している。そこで本実験では、強力な合成エストロゲンであるジエチルスチルベストロール（DES）の周産期曝露を、陽性对照として用い得るかどうかを検討した。DESは流産防止薬としてかつて妊婦に用いられた時期があり、その後、投与された妊婦から出生した子供に生殖器のがんをはじめとする異常が発見され、使用が禁止された代表的な内分泌攪乱物質である。その後の動物実験を中心とする研究により、母体を介してのDESへの曝露が生殖器のみならず発達中の脳にも影響を与え、行動影響についても報告が出始めている。DESを陽性对照としている利点としては、以下のことがあげられる；1）非常に低い用量で影響が現れるため、母体への毒性ならびに胎仔期・新生仔期への一般的毒性をほとんど考慮する必要がない、2）少なくとも作用機序の一つがエストロゲン様作用を介するものであるという点で明らかになっている、3）カドミウム・水銀ともに内分泌攪乱作用を持つ疑いがあるとされている。

本研究では、DESが胎生期水銀ならびにカドミウム曝露の影響評価で用いる行動試験において、“異常値”を示す可能性を検証するとともに、DESの陽性对照としての意義をより明確にするために、組織化学的な影響の検索を行なった。これらの結果をもとに、メチル水銀およびカドミウム曝露の行動影響における陽性対象として用いる場合の問題点について検討した。

周産期においてエストロゲンは脳の性分化と関連することが知られており、性行動や攻撃行動

など性差のある行動は、周産期のエストロゲンあるいはエストロゲン様物質への曝露によって変化する事が報告されている。この点および、一般的な行動毒性評価への適用という点を考慮して、評価対象には以下の行動試験を選んだ；1) オープンフィールド試験、2) 受動回避試験、3) 性行動観察、4) 攻撃行動観察、なお、これ以外にオープンフィールド試験ならびに放射状迷路試験の基礎的条件検討も行なったので、これらについても概略を報告する。

一方、DES 曝露の標的部位となりえる部位である脳内エストロゲン受容体 α (ER α) およびドパミンニューロンのマーカーであるチロシン水酸化酵素 (TH) の発現を、性行動・攻撃行動の発現に強く関わる脳内部位に焦点をあて、それぞれ免疫組織化学的方法で評価を行なった。

B. 研究方法

妊娠 7 日目にある C57BL/6J 系マウスを、ブリーダーから購入した。マウスは標準的なポリプロピレンのケージにて、エストロゲンおよび植物エストロゲン減量餌 (17 β -エストロゲン 0.05 μ g/kg, ゲニスタイン <0.05 μ g/100g, クメストロール <0.1 μ g/100g; NIH-07PDL オリエン酵母) を与え個別に飼育した。飼育環境は室温 23 \pm 2 $^{\circ}$ C, 明暗サイクルは 12 時間 (8:00-20:00 を明期とする) とした。

妊娠 11-17 日および出産後 2-6 日 (出産当日を 1 日とする) にコーンオイルに溶解した DES もしくはオイルを投与した。DES は 0.3 もしくは 3 μ g/kg 体重 (DES0.3, DES 3) を 1 μ l/g 体重のコーンオイルに溶解し、マイクロピペッターを用いて経口投与した。マウスはピペットのチップを口に入れると速やかにストレス無くオイルを飲み込む。これらの DES 投与量は、周生期曝露によってマウス前立腺重量を増加させる、いわゆる“低用量作用”を示した量である (Vom Saal 1990)。投与後、毎朝出産の有無を確認した。

出産後 2 日 (PND2) に、出生仔数、性比、体重を測定し、各腹、仔を 4 匹ずつ (オス・メス各 2 匹) に調整した。仔は PND21 に離乳し、以下の行動試験まで性別に群飼育した。なお、全ての実験動物に対する取り扱いは、東京大学医学系研究科における倫理規定に従った。

[全体の方法の流れ]

各腹オス・メス 2 匹を行動試験に供した。9 週齢にてオープンフィールド試験（オス 22 匹，メス 22 匹），12 週齢にて受動回避試験（オス 20 匹，メス 22 匹），19 週齢にて性行動観察（オス 22 匹），21 週齢にて攻撃行動観察を行った。各仔は複数の行動試験に使用した。複数の行動試験の交絡を最小限にするよう，行動試験の順番には配慮した。

マウスは性行動観察と攻撃行動観察の前に 5 週間以上個飼いにした。これは，群飼によって形成されるオスの順位の性行動への影響を排除するため，および攻撃行動を促進させる効果があることが知られている。全ての行動試験は明暗サイクルの暗期（消灯後 3-5 時間）に行った。

免疫組織学的分析には DES 3 群とコントロール群のオスの脳を使用した。

〔行動試験〕

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験には，高さ 50cm の壁面で囲まれた 50*50cm の床面を使用した（写真 1）。マウスをフィールドの中央に小さな箱をかぶせた状態で 20 秒間置いた後，箱を除いて試験開始とし，移動距離と立ち上がりおよび脱糞の回数を 2 分間測定した。行動の分析には NIH Image を用いた解析ソフト（XX2.xx，大原医科産業株式会社）を使用した。

受動回避試験（passive avoidance）

受動回避試験装置はギロチンドアによってしきられた明室と暗室からなるボックスで，床は金属製のグリットで暗室側には電流刺激が流れるようになっている（写真 2）。訓練試行（初回）においては，マウスを明室（約 500Lux）において 30 秒間慣らした後，ギロチンドアを開け，ドアを開いてから暗室に入るまでの時間（マウスの四肢が全て入った時間）を記録した。900 秒以内に暗室に入らなかったマウスは対象から除外した。マウスが暗室に入った直後にギロチンドアを閉じ，電流刺激（0.3mA，1 秒間）を与えた後，ただちにマウスをボックスより取り出してケージに戻した。24 時間後，同様の手順で試験試行を行った。ただし，試験試行においては電流刺激を与えなかった。訓練試行においてマウスが電流刺激と暗室の関連を学習していれば，試験

試行時に暗室に入るまでの時間が遅延する。

性行動観察

オスの性行動は赤色ライトのもと、膣スメアで自然発情にあることを確認したメスマウスをオスのホームケージに入れ 20 分間観察した。膣スメアは性行動観察の前日に発情前期であることを確認し、観察直後に発情前期もしくは発情期であることを確認した。性行動はビデオテープに記録し、後日分析した。社会的行動（メスの匂いをかいでいた、もしくは追いかけていた時間）と性行動（マウント企図とペニスの挿入の回数）を測定した。匂いをかぐ行動は鼻をメスの体に近づけ匂いをかいでいる行動、メスへの追従行動はメスの背後より後をつける行動と定義した。マウント企図はメスの背部に後ろから両手をかける行動と定義した。メスマウスは性行動観察に複数回使用し、各群均一に割り付けた。

攻撃行動観察

攻撃行動はレジデント-イントルーダー法により赤色ライトのもと、群飼した若いオス(n=8)をイントルーダーとして、対象マウスのケージに入れ観察した。攻撃行動はビデオに記録し、後日分析した。攻撃（Bite）の回数と種特異的な恐怖行動（Tail rattling と Digging）を測定した。Bite は、対象マウスが顔をイントルーダーに近づけるとともにイントルーダーが身を引いた場合と定義した。Tail rattling は尾をすばやく振るわせる行動、Digging は前足で床敷きを掘る行動と定義した。観察は最初の攻撃行動が起こってから 5 分間とし、対象マウスが 15 分間攻撃行動を示さなかった場合は観察終了とした。

[免疫組織学]

組織の収集と準備（36-37 週齢時）

マウスをペントバルビタール（60 mg/kg 体重、腹腔内投与）で麻酔し、左心室より、最初に 0.9% 生理食塩水、続いて 4%パラホルムアルデヒド(in PB)を灌流した。その後、脳を速やかに切除

し 4%パラホルムアルデヒドに 4℃で一晩浸透，翌日 PBS で洗浄し切片作成まで PBS 中にて保存した．切片作成前に 20%シュークロース (in PBS) に 4℃で 24 時間浸透したのち，凍結ミクローム (大和工機工業) を用いて 40 μ m の連続切片を作成した．

免疫組織染色

一次抗体として，エストロゲン α 受容体 (ER- α) に対してはウサギ抗ラットエストロゲン α ポリクロナール抗体を，チロシン水酸化酵素 (TH) に対してはウサギ抗ラットチロシン水酸化酵素ポリクロナール抗体を，それぞれ使用した．最終的には，アビジン-ビオチン法にて発色させた．操作による誤差を最小限にするため，DES 群とコントロール群の切片は同一プレートにて染色した．

エストロゲン α 陽性 (ER-IR) 細胞とチロシン水酸化酵素陽性 (TH-IR) 細胞の定量

ER-IR 細胞は画像解析装置 (KS-300, Zeiss) で計測した．ER-IR 細胞の計測には，Bregma より尾側に 1.46mm の位置からスタートして視床下部腹内側核 (VMH) を含む連続 7 切片，また Bregma より尾側に 1.46mm の位置を開始位置として扁桃体 (AM) を含む連続 3 切片を使用した．

TH-IR 細胞は顕微鏡下で肉眼にて計測した．計測に伴う誤差を最小にするため，計測は 3 回行い，その平均を計測値とした．TH-IR 細胞の計測には中脳中心灰白質 (PAG) を含む 6 切片 (Bregma より尾側に 4.24mm の位置より 4 枚毎)，腹側被蓋野 (VTA) を含む 2 切片 (Bregma より尾側に 3.28mm の位置より 2 枚毎)，青斑核 (LC) を含む 2 切片 (Bregma より尾側 5.34mm の位置より 4 枚毎) を使用した．各切片の ER-IR 細胞および TH-IR 細胞数の合計を分析に使用した．解剖学的な部位の決定は Franklin and Paxinos (1996) のアトラスを元に行った．

[生殖器の評価]

DES3 群のオスにおいて，肛門生殖突起間距離 (AGD) をノギスにて計測した．また，パラフォ

ルムアルデヒドにて灌流を行う前に、左側の精巣と包皮腺を切除し重量を測定した。

[統計分析]

受動回避試験とオープンフィールド試験は、2元配置の分散分析と多重比較 (Scheffe's test)、性行動と攻撃行動については1元配置の分散分析と多重比較 (Scheffe's test) を用い分析した。受動回避試験における移行時間とオープンフィールド試験における移動距離、および攻撃行動における Bite の回数と性行動におけるマウント企図の回数の相関は Pearson's correlation を用い示した。免疫組織化学のデータは Student's *t*-test を用いて分析した。特に記載のない場合、統計学的有意水準は5%とした。

C. 研究結果

生殖パフォーマンスと仔の生育

一腹あたりの出生仔の数、性比、出生体重はすべての群において差は認めなかった。オスにおいて、DES 曝露は体重、精巣および包皮腺重量に影響しなかった。メスでは、出生時体重における差は認めなかったが、3-12 週齢の体重は DES3 において、DES0.3 群およびコントロール群と比較して有意に大きかった。肛門生殖突起間距離は群間で差は無かった。

オープンフィールド試験

オープンフィールド試験における移動距離の平均を図 1 に示す。DES 群において移動距離の平均は量依存的に増加する傾向を認め、DES3 とコントロール群の間には有意な差を認めた。2元配置の分散分析では、DES 曝露の有意な効果は認めた ($F=3.79$, $df=2,42$, $p=0.032$) が、性の効果は有意ではなかった。また、曝露と性の交互作用も認めなかった。

受動回避試験

図 2 は受動回避試験の移行時間の各群における平均値を示している。2元配置分散分析では曝露 ($F=15.55$, $df=2,42$, $p=0.000$)、および性 ($F=4.92$, $df=1,42$, $p=0.013$) の有意な効果を

認めた。また、曝露と性の交互作用も有意であったのでオス・メス別々に 1 元配置分散分析を用いて解析した。その結果、オスにおいて、DES 群はコントロール群と比較して、移行時間が短く（すなわち、学習成績が悪く： $F=4.96$, $df=2,21$, $p=0.019$ ）、DES3 とコントロール群の間には有意な差を認めた ($p=0.029$)。メスにおいては、対照群においても学習が成立しておらず、本試行の移行時間は訓練試行と変わらなかった。そのため 2 週間後に電流を 0.4 mA として再度試験を行った (図 3,4)。その結果、若干移行時間は延びたもののオスと比較すると短く、群間の有意差には至らなかった。

攻撃行動観察

DES 群はコントロール群と比較して攻撃行動 (Bite) が多い傾向を示した ($F=2.75$, $df=2,19$, $p=0.089$) (図 5)。また、統計学的有意差は認めないが、DES 群では攻撃行動を示した個体の割合は高く、これらの個体において、最初の攻撃行動までの時間は短かった (表 1)。

性行動観察

DES 群において性行動は上昇する傾向を認めた ($F=3.49$, $df=2,19$, $p=0.051$)。統計的有意差には至らないが、DES3 群はコントロール群にくらべて性行動が促進される傾向を認めた ($p=0.053$) (図 6)。

個体内相関

オスにおいて、個体別に各試験成績の相関を見ると、受動回避試験の移行時間とオープンフィールド試験の移動距離は負の相関を示した ($r=-0.58$, $P=0.007$) (図 7-A)。また、攻撃行動 (かむ回数) と性行動 (マウント企図の回数) は正の相関を示し ($r=0.78$, $P=0.000$) (図 7-B) た。図で見る通り、この相関には DES 群のみが寄与しているように思われた。

ER-IR 細胞数および TH-IR 細胞数

視床下部腹内側核を含む領域における ER-IR 細胞数は DES3 群において有意に増加した。扁桃

体領域では ER-IR 細胞数は差を認めなかった (図 8)。TH-IR 細胞数については、中脳中心灰白質領域、腹側被蓋野領域、青斑核領域のいずれにおいても差を認めなかった(図 9)。

D. 考察

以上の様に、本研究で用いた DES の用量では母体にも、また再生産指標にも影響はなく、仔への影響は、これらの変数への影響を介する間接的なものではないことが示唆された。これらの毒性学的特徴は、次世代行動影響の陽性対照として DES の利点であるといえる。オス生殖器への影響は、vomSaal らの報告などにより、低い用量で出現する感度の高い影響指標であることが知られている。本研究でこれらに影響が見られなかった原因は明らかではないが、それにもかかわらず行動影響が観察されたことは、行動影響がさらに指標として感度が高いことを示唆しており、これも DES が陽性対照として優れていることを示しているといえる。

本研究において、周産期の DES 曝露により、オープンフィールド活動量の有意な促進、受動回避学習の有意な抑制 (オスにおいて)、オスにおける攻撃行動ならびに性行動の促進傾向が認められた。加えて、攻撃行動および性行動に関連するとされている腹内側核において、エストロゲンレセプター α 陽性細胞数の増加が観察され、行動変化との関連が示唆された。

げっ歯類のオスにおいては、脳内においてテストステロンから変換されたエストロゲンが、エストロゲンレセプターを介して性行動や攻撃行動を促進することが知られている。また、腹内側核を電気刺激することによって攻撃行動が促進される一方で、この部位の破壊によってオスのマウンティング行動が促進されるという報告がある。さらに、腹内側核の GABA 合成の阻害による活動量の増加も示されている。腹内側核におけるエストロゲンレセプターの役割は定かではないが、以上の報告をふまえると、今回観察されたエストロゲンレセプター陽性細胞数増加が観察された行動変化と関連している可能性がある。

今回観察された攻撃行動および性行動の増加とエストロゲンレセプターの増加は、高用量のエストロゲン様作用物質を用いた実験と反する結果である。高用量エストロゲン様作用物質を投与した実験では、本研究の結果とは逆に攻撃行動や性行動が減少することが報告されているほか、本研究の約 60 倍の DES を新生仔期に投与した実験では、腹内側核を含む領域のエストロゲンレ

セプター α 陽性細胞数が減少することが報告されている。これらの知見より、周産期のエストロゲン様作用物質は、行動学的にも神経化学的にも、高用量と低用量では異なる影響を及ぼす可能性が示唆される。

周産期のエストロゲンは、脳の性分化に対して重要な役割を持つため、エストロゲン様作用を持つ化学物質の毒性の評価には、これまで性差のある行動が指標として用いられることが多かった。今回、DES を投与したオスにおいて受動回避学習の成績が低下したことは、（コントロール群においても学習が認められなかった）メスの状態に近づいた、つまり脱雄性化したと考えることもできる。しかし、一方で、これらのオスの性行動と攻撃行動は促進もしくは促進傾向にあり、これらは脱雄性化とはいえない結果であった。従って、今回観察された行動影響を全て脱雄性化という観点のみで説明することはできない。これらは、低用量の DES が、脳の性差を形成する神経回路とは異なる部位にも影響する可能性を示している。

低濃度で長期におよぶ水銀、カドミウム曝露が次世代に及ぼす行動影響を考える際、どのような行動に影響が現れる可能性が高いのか、特にカドミウムについては不明であり、その意味ではできる限り広範囲の機能について影響を検出できるような試験群を用意する必要がある。今回用いたオープンフィールド試験は、活動性、情動性など多くの要因を加算したものを見ていると考えられている。オープンフィールドについては、多くの有害化学物質によって活動亢進が観察されており、何らかの共通した神経学的基盤を持つ可能性があるかも知れない。受動回避試験は記憶学習試験であるが、評価されるのは長期記憶であり、嫌悪学習（負の報酬）を用いるため情動性も反映している。水銀蒸気の曝露はヒトにおいて、作業記憶の障害、しかも可逆的な障害を起こすことが知られており、受動回避試験で試験されている記憶とはかなり性質が異なると思われる。このため、後述するように放射状迷路試験を導入し、正の報酬を用いた作業記憶の評価もあわせて実施する予定である。攻撃行動・性行動はさらにこれらとは独立した機能を反映する。

考察への補足：

a) 放射状迷路の基礎的条件検討； 放射状迷路は Olton によって開発された記憶学習の試験であり、プロトコルの工夫によって空間認識に関する作業記憶、参照記憶の両方を試験すること

が可能である。放射状迷路は、8方向にのびる細長いアームそれぞれの先端に小さな餌 1 個を配置しておき、空腹状態としたマウスをおいて全てのアームから餌をとるまでの時間を計時するものである（写真 3）。1 回の試行時間には制限を設けておき、既に餌を取ったアームを再訪した場合はエラーとなり、作業記憶の低下が示唆される。本方法は、これまでも多くの化学物質の神経毒性の評価にも用いられてきたが、本研究においては、処理効果の検出感度を高めるようにプロトコルを検討する。具体的には、餌を 4 個獲得した時点で全てのドアを閉じ、一定期間（“休止”）経過の後にドアを開いて、後半を開始するというプロトコルを検討した。この休止時間は通常 0 秒（動物がアームを出たあとに常に設定されている 5 秒は除く）であるが、これを 30, 60, 120 秒と漸増させ、その効果を検討した。その結果、十分に訓練試行を行なって学習課題を習得した動物に対し、この“漸増”課題を課したところ、休止時間の増大にともない、課題遂行（全ての餌を獲得すること）までの移動距離が増大することが確認され（図*）、こうした課題変化に動物が反応していることが示された。このように、学習課題の難度を順次高いものとしていく方法は、処理の効果を検出するうえで感度の高い方法であることが報告されている [Markowski et al.2002]。カドミウム曝露の行動影響を報告した研究 [Newland et al.]では、このような課題の変化において曝露の影響が明らかになっている。

げっ歯類、特にラットにおいては放射迷路課題に対して真の空間学習でなく、隣接するアームを連鎖的に訪れる戦略によって解決することがわかっており、評価上の問題となっていた。本研究でもちいた迷路装置では、各アームの入り口にドアが設けてあり、動物がアームを出た直後から 5 秒間、全てのドアが閉じるように設定されており、動物がそのまま隣接したアームに入ることを防いでいる。

このように放射状迷路はプロトコルに変化をつけることにより、周生期における曝露の効果を高感度で検出しえることが期待される。

b) 性周期がオープンフィールド行動に及ぼす影響：

オープンフィールド行動については、ラットでは性周期の影響を受けるとの報告があるため、マウスについてもこれを検証した。膣腔スメアにより性周期を確認し、発情期と発情間期にある個体を用いて、結果を比較したところ、ラットで報告されているのと同様、発情期が発情間期よ

り移動距離が有意に大きく、この点はメスにこの試験を適用する場合に考慮される必要があることを示唆した。

E. 結論

本研究の結果から、低用量の DES は、仔の神経に対して特異的な影響を及ぼすことが示唆され、逆にここで用いられた試験群が、こうした影響を検出することが可能であることが示された。これにより、水銀あるいはカドミウムの曝露による行動評価を行なう際には、今回用いたものと同じ試験パラメタを用いることにより、試験系の検出力そのものについては保証された形で実験を行なうことができる。また、オープンフィールドおよび受動回避試験において得られた性差、あるいは性行動・攻撃行動において見られた量依存性を手がかりとして、DES の影響との相対的な比較を行なうことが可能であり、その意味でも本実験系の陽性対照としての有効性がしめされたものといえよう。本実験で使用した各行動試験プロトコルはおおむね有効であるが、メスの受動回避試験については、初期値として用いた 0.3mA の電流刺激ではコントロール群においても学習が成立せず、検討の余地を残している。また、メスのオープンフィールド試験が性周期の影響を受けることが確認されたため、オープンフィールド試験の交絡要因として考慮しなければいけないことも示された。

G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表

田中美加, 渡辺知保, 大谷-金子律子, 横須賀誠. ジエチルスチルベストロールの周産期曝露による行動影響. 日本衛生学雑誌 2003, 3月 大分.

田中美加, 大谷-金子律子, 横須賀誠, 渡辺知保. ジエチルスチルベストロールの周産期曝露がマウスの行動に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第5回研究発表会 2002, 10 広島.

大谷-金子 律子, 横須賀誠, 村岡 *, 山下 苑*, 平田 *, 黒田 *, 渡辺知保. エストラジオール 17β が培養視床下部ニューロンのシナプス形成に及ぼす影響—MAP キナーゼの関与についての検討. 第108回日本解剖学会総会・全国学術集会 2002.