

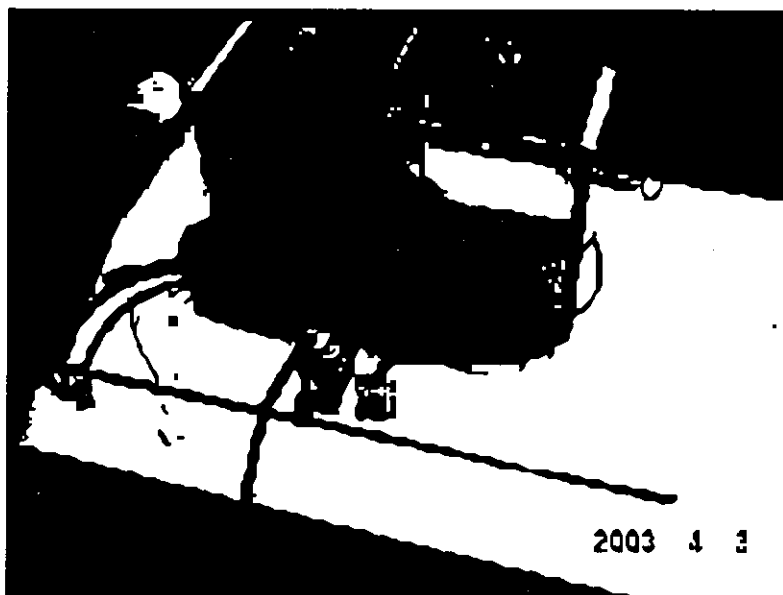
写真1 (上) : オープンフィールド行動試験装置
床面の広さは 50 x 50 cm.



DSC00060.JPG

写真2 (下) : 受動回避学習試験装置

左が暗室, 右が明室であり, 間を白いギロチンドアが隔てている. 床面がグリッドでできていて, 明室にいたマウスが暗室に移動した直後に, ギロチンドアを閉じ, 床面に弱い電流を短時間流してショックを与える.



DSC00056.JPG

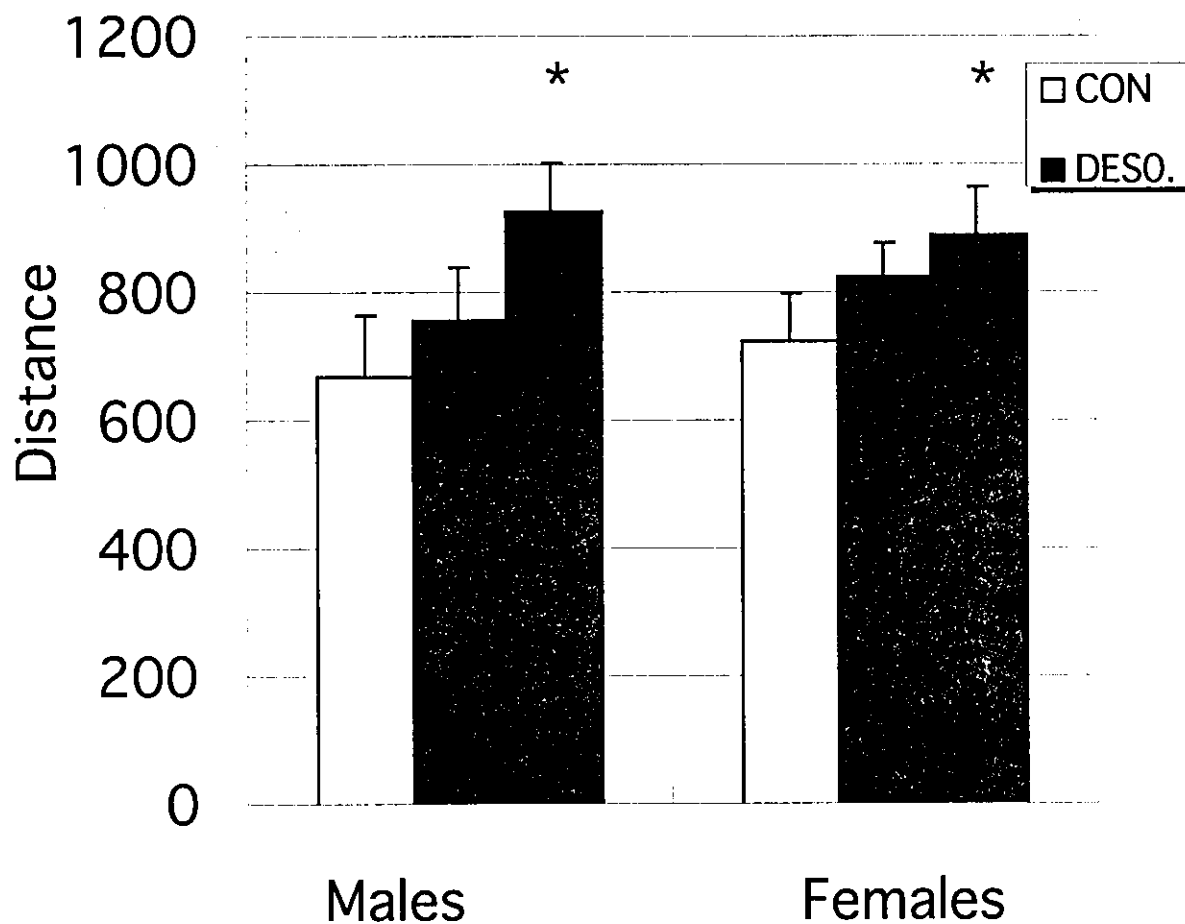


Figure 1. Effect of perinatal exposure to DES on mean distance of ambulation (mean \pm SE) for offspring of dams exposed to 0.3 μ g/kg/day DES (DESO.3), 3 μ g/kg/day DES (DES3), or corn oil (CON). In both sexes, n = 8 for CON and DES 0.3, n = 6 for DES 3. *p < 0.05, compared with the control group of the same sex (by Scheffe's test).

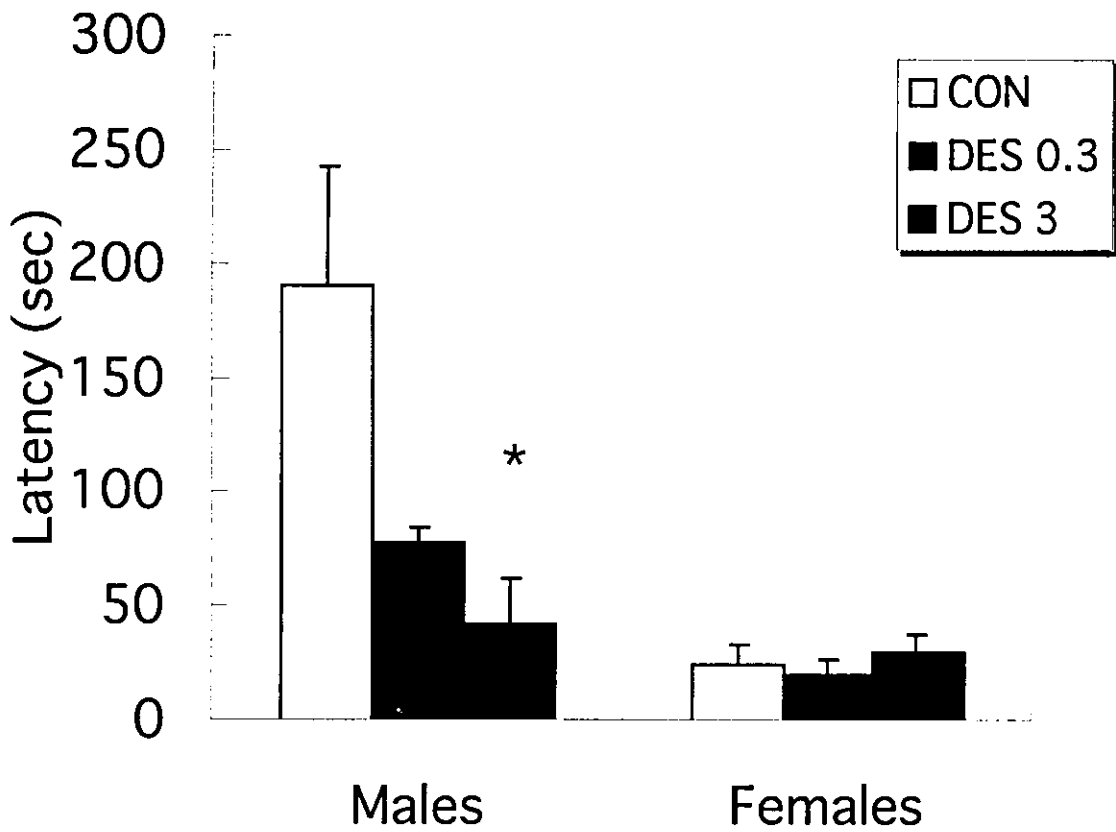


Figure 2. Effect of perinatal exposure to DES on mean step-through latencies (mean \pm SE) for offspring of dams exposed to $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ DES (DES0.3), $3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ DES (DES3), or corn oil (CON). In male, $n = 8$ for DES 0.3, $n = 6$ for CON and DES 3. In female, $n = 8$ for CON and DES 0.3, $n = 6$ for DES 3. * $p < 0.05$, compared with the control group of the same sex (by Scheffe's test).

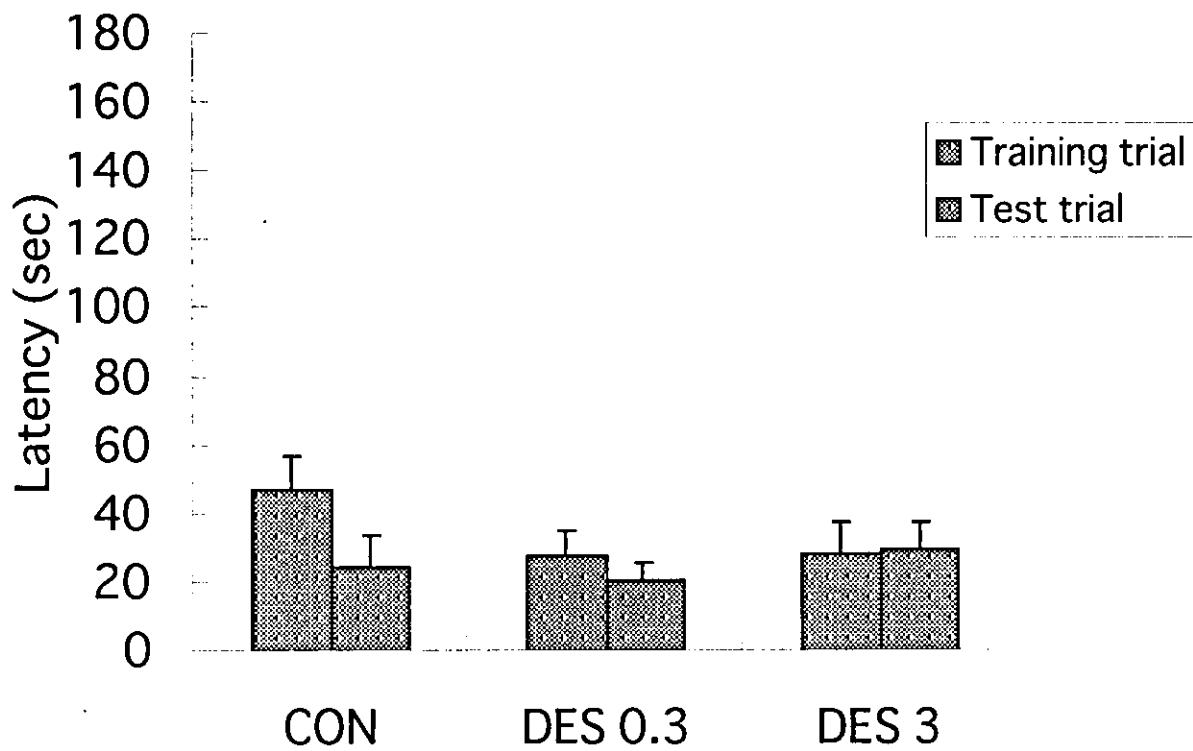


Figure 3. Effect of perinatal exposure to DES on mean step-through latencies (mean \pm SE) for female offspring of dams exposed to 0.3 μ g/kg/day DES (DES0.3), 3 μ g/kg/day DES (DES3), or corn oil (CON). The electric foot shock was 0.3 mA for 1 sec. n =8 for CON and DES 0.3, n = 6 for DES 3.

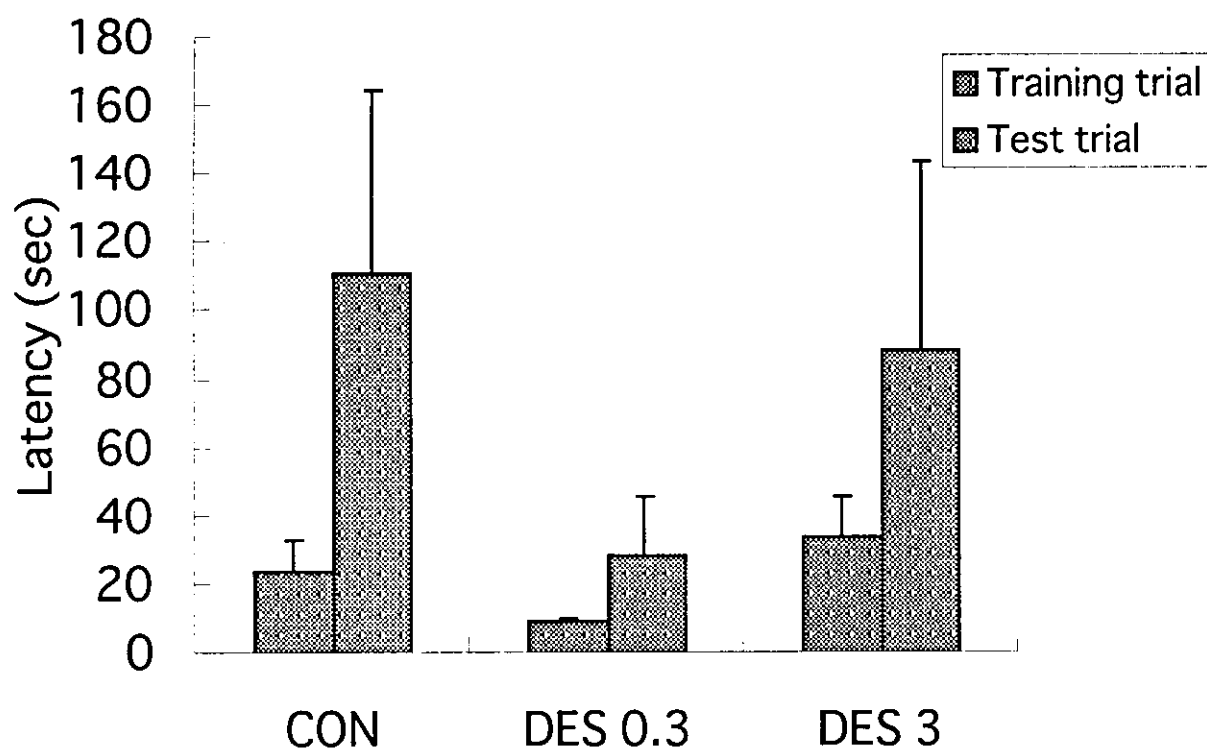


Figure 4. Effect of perinatal exposure to DES on mean step-through latencies (mean \pm SE) for female offspring of dams exposed to 0.3 μ g/kg/day DES (DES0.3), 3 μ g/kg/day DES (DES3), or corn oil (CON). The electric foot shock was 0.4 mA for 1 sec. n = 8 for CON and DES 0.3, n = 6 for DES 3.

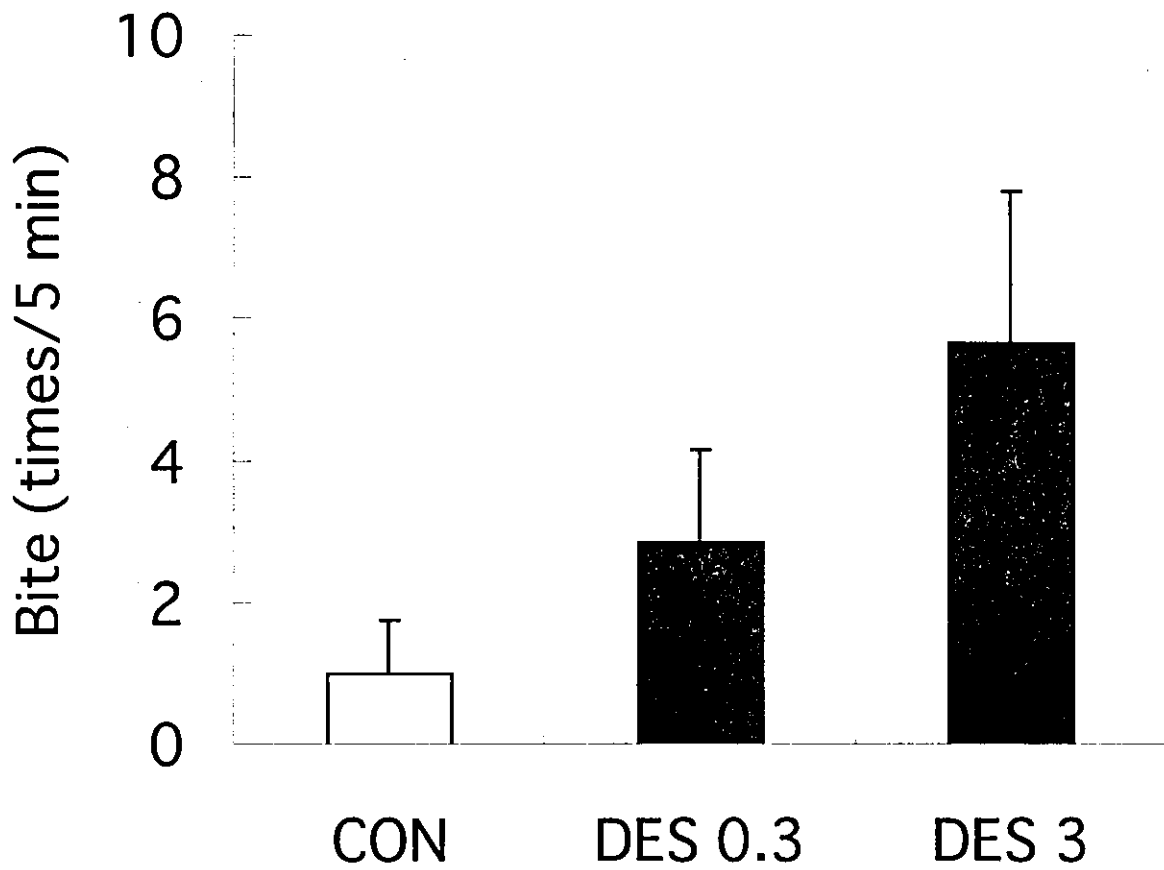


Figure 5. Effect of perinatal exposure to DES on mean number of bite (mean \pm SE) for offspring of dams exposed to 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ DES (DES0.3), 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ DES (DES3), or corn oil (CON). n = 8 for CON and DES 0.3, n = 6 for DES 3.

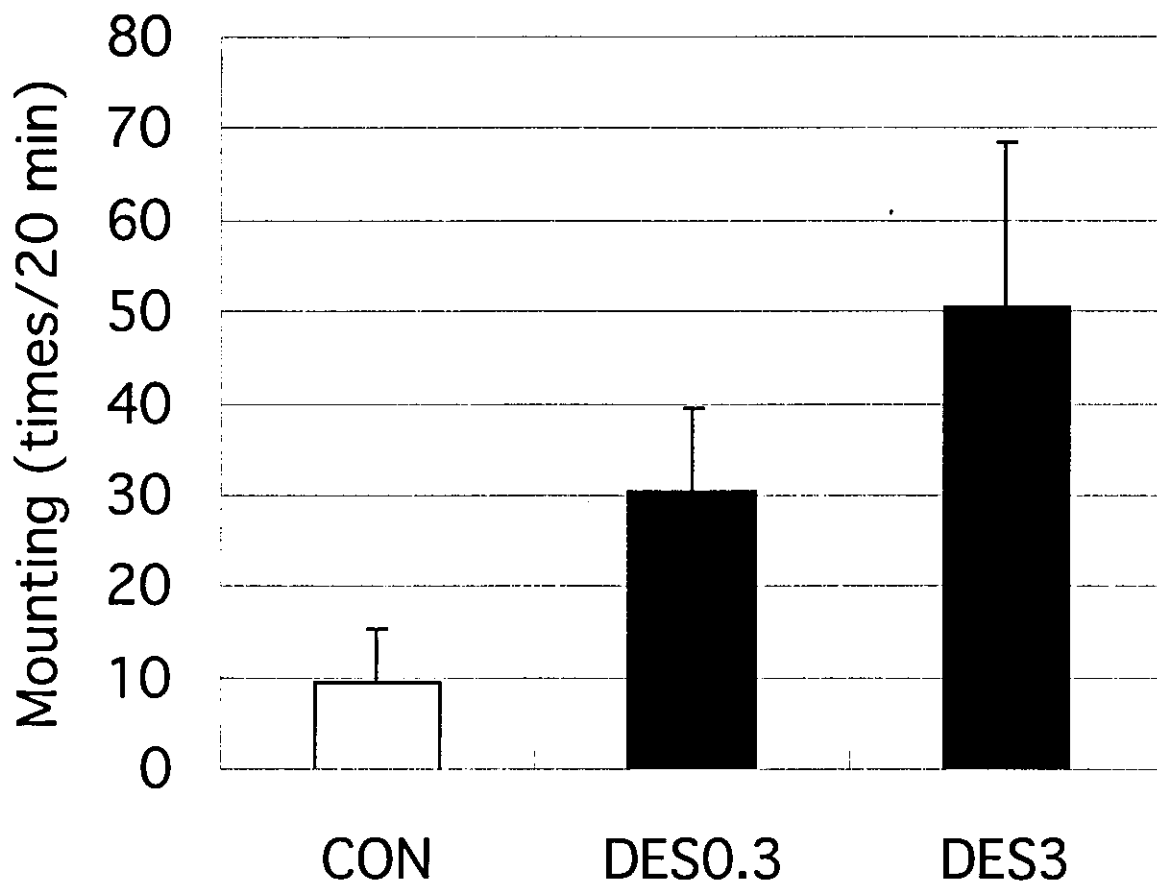


Figure 6. Effect of perinatal exposure to DES on mean number of mounting (mean \pm SE) for offspring of dams exposed to 0.3 μ g/kg/day DES (DES0.3), 3 μ g/kg/day DES (DES3), or corn oil (CON). n = 8 for CON and DES 0.3, n = 6 for DES 3.

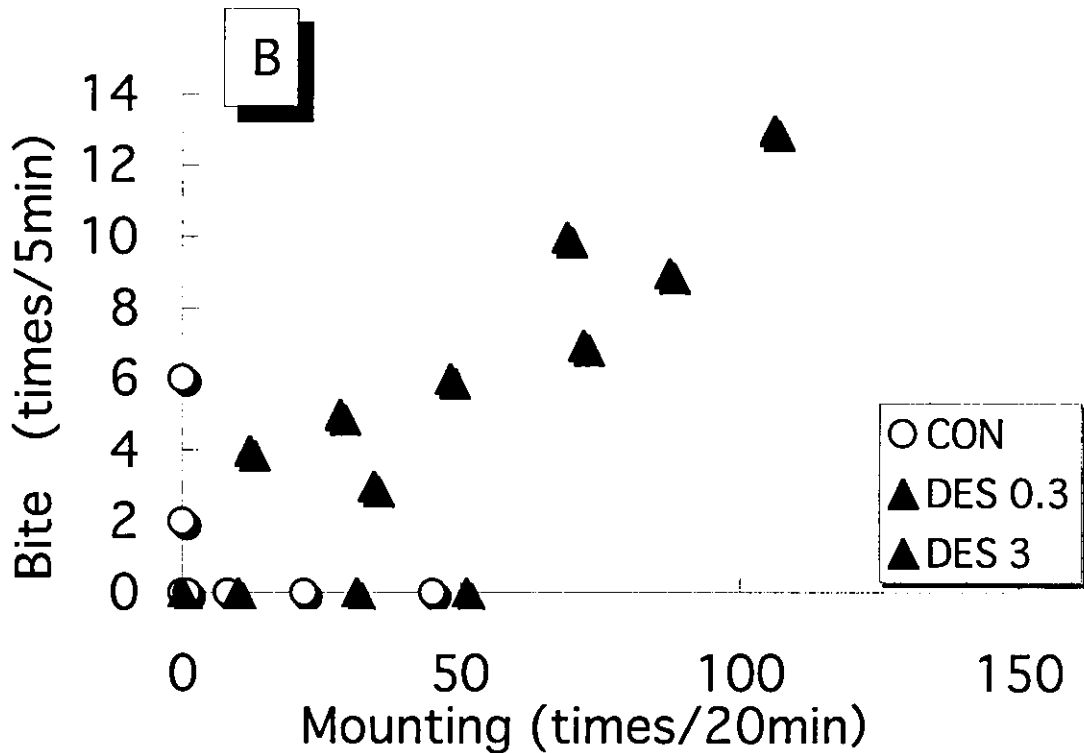
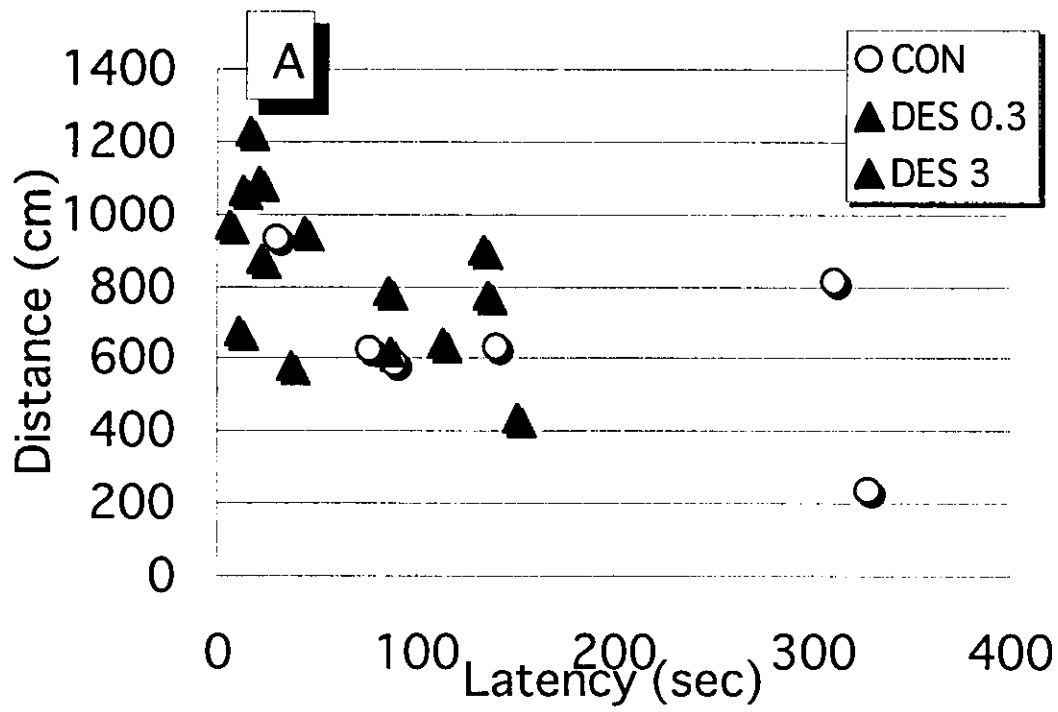


Figure 7. Correlations among behavioral tests within individuals. (A) shows step-through latencies in passive avoidance test and distance in open-field test ($r = -0.58$). (B) shows the number of bite in resident-intruder test and the number of mounting in sexual behavior test ($r = 0.78$). Both lines were statistically significant ($p < 0.05$).

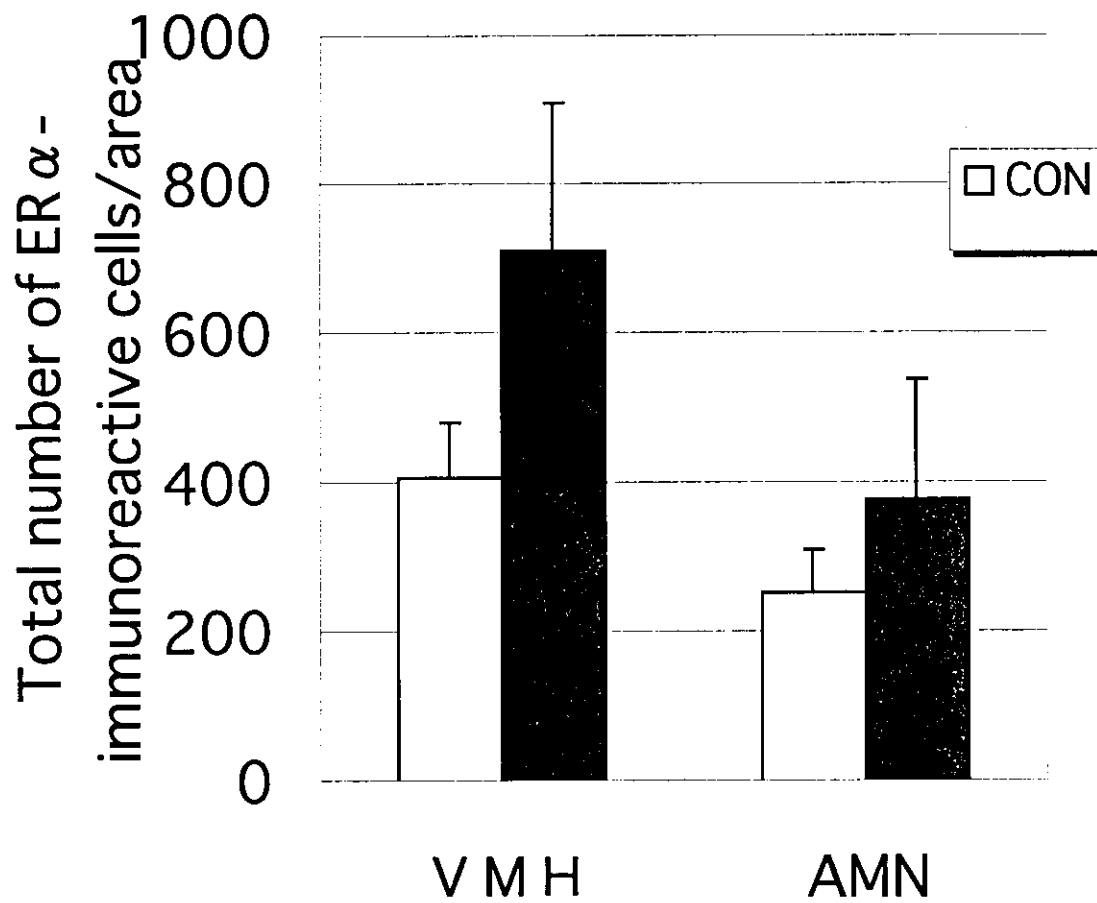


Figure 8. Effect of perinatal exposure to DES on the number of ER-IRs in area of ventromedial hypothalamic nucleus (VMH) and amygdaloid (AMN). $n = 3$ for CON and $n = 4$ for DES 3. $*p < 0.05$, compared with the control group.

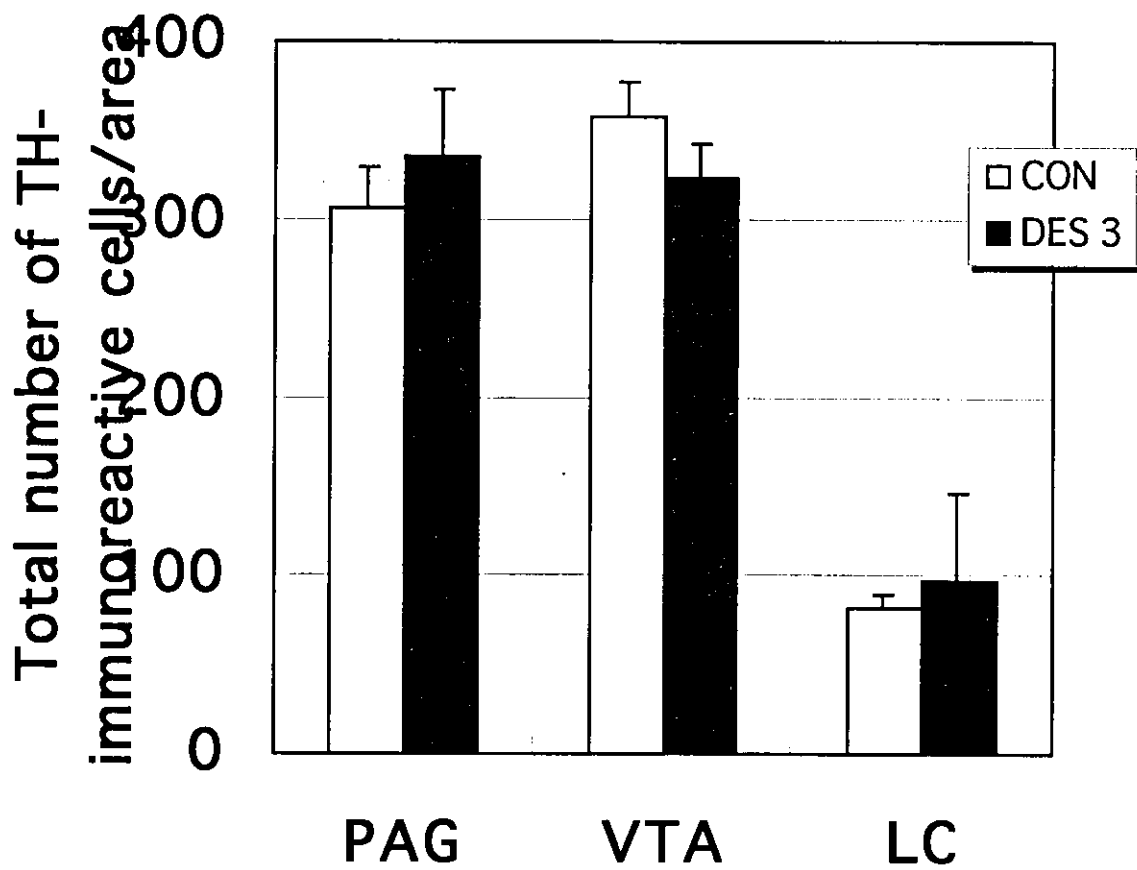


Figure 9. Effect of perinatal exposure to DES on the number of TH-IRs in area of periaqueductal gray (PAG), ventral tegmental area (VTA), and locus coeruleus (LC). n = 3 for CON and n = 4 for DES 3.

Table 1. Effect of perinatal exposure to DES on aggressive behavior

Treatment	Proportion of attacks (%)	Latency to first attack (sec)
Oil	25 (2/8)	863.3 ± 24.3
DES 0.3	50 (4/8)	565.6 ± 136.3
DES 3	67 (4/6)	571.2 ± 146.5

Aggression, defined with biting, by individually housed males perinatally exposed to 0.3 μ g/kg/day DES (DES0.3), 3 μ g/kg/day DES (DES3), or corn oil (CON) in resident intruder test.

写真3. 放射状迷路. 8本のアームと中央の部分との間は、透明な小さいドアで仕切られている. 各アームの先端には小さなくぼみがあり、ここに餌が置かれている. 各アームから餌をとることが学習課題であり、一定時間内に全ての餌をとり終えるか、またその場合の所要時間、移動した総距離、誤って既に餌を獲得したアームを再訪する回数、最初から数えて8回目までの間に何本の異なるアームにはいるか、といった指標が用いられる. 動物の行動は全て、迷路の上方に固定した（画面には写っていない）ビデオカメラによって迷路の画像を取り込み、これを解析している.

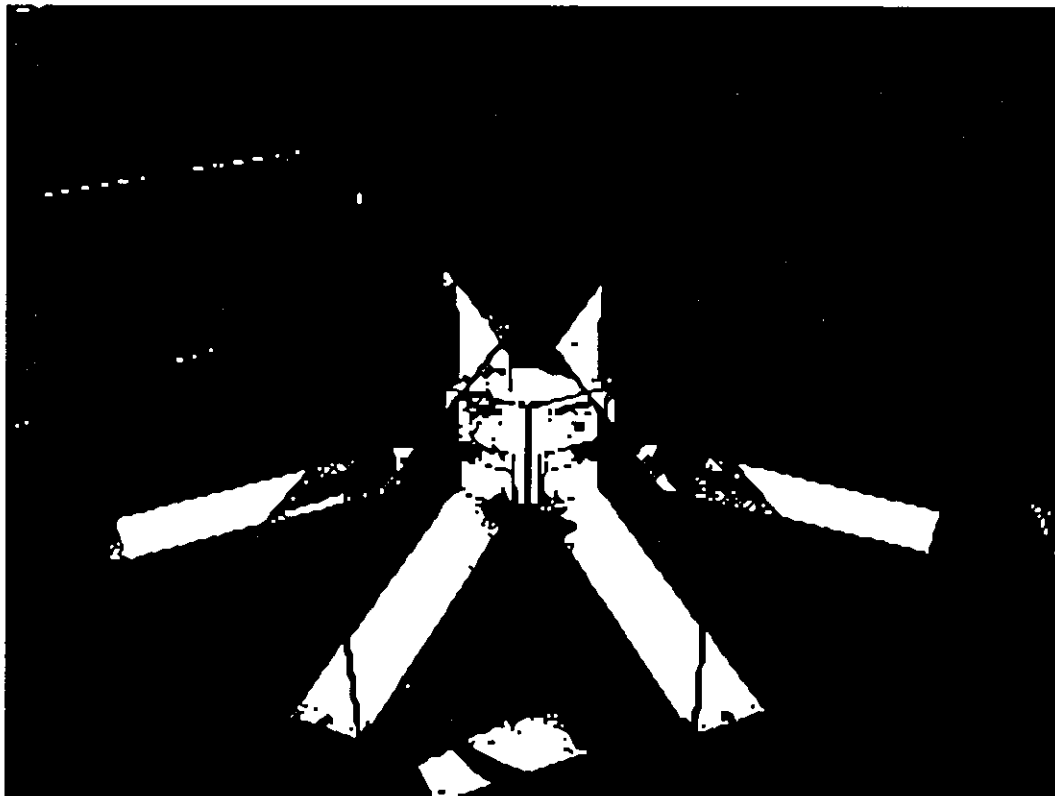
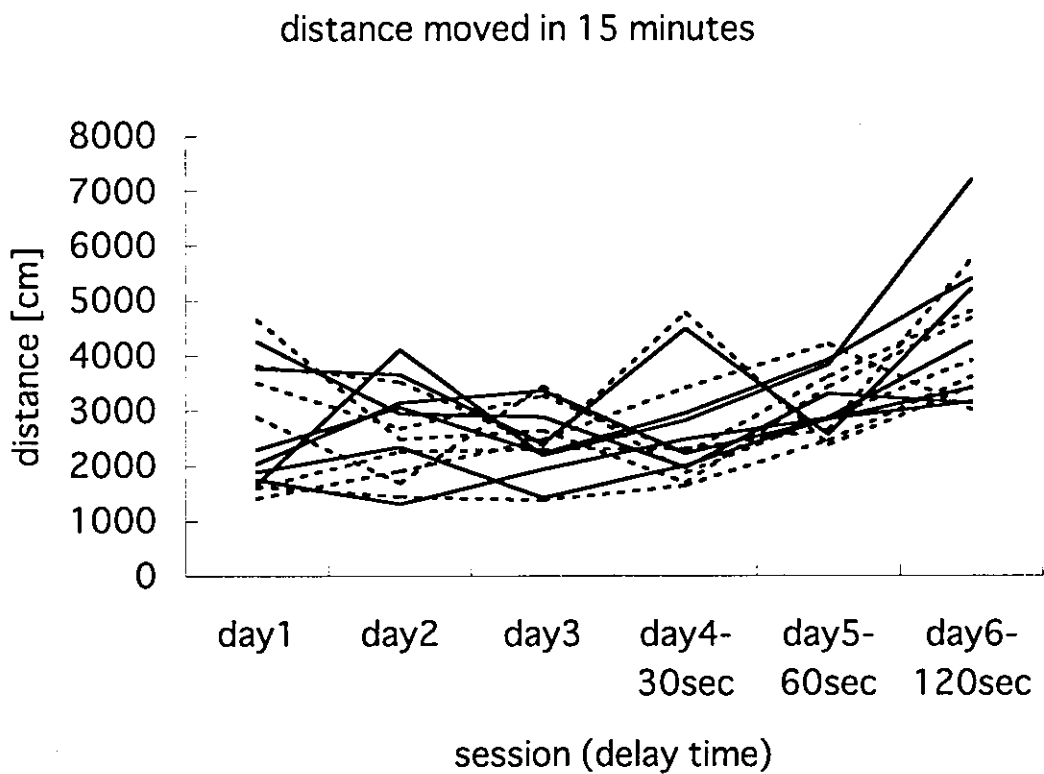


図 10. 放射状迷路における，休止時間を漸増するプロトコルがマウスの“移動距離”に及ぼす影響.

6日間のうち，最初の3日間は休止時間を設けず，4日目移行は横軸に示した休止時間（30～120秒）を設けている．縦軸は，課題遂行（8個の餌を全て獲得する）までにマウスが移動した距離であり，休止時間の導入に伴って移動距離が増加していることがわかる．個々の線が個体の成績をあらわす．



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 曝露が発達毒性を発揮し得るといふ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，昨年度ジエチルスチルベストール (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，今年度にはいつて *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。マウスをプラットフォームにおいてから、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、学習課題のパラメタ-を変えることにより、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、プラットフォ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、再びプラットフォ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 週齢であった。

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 ~ 1 1 は、放射状迷路試験の結果を異なる指標を用いてまとめたものである。各指標の意味は、それぞれ図の脚注に示してある。