

図1 a. 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.

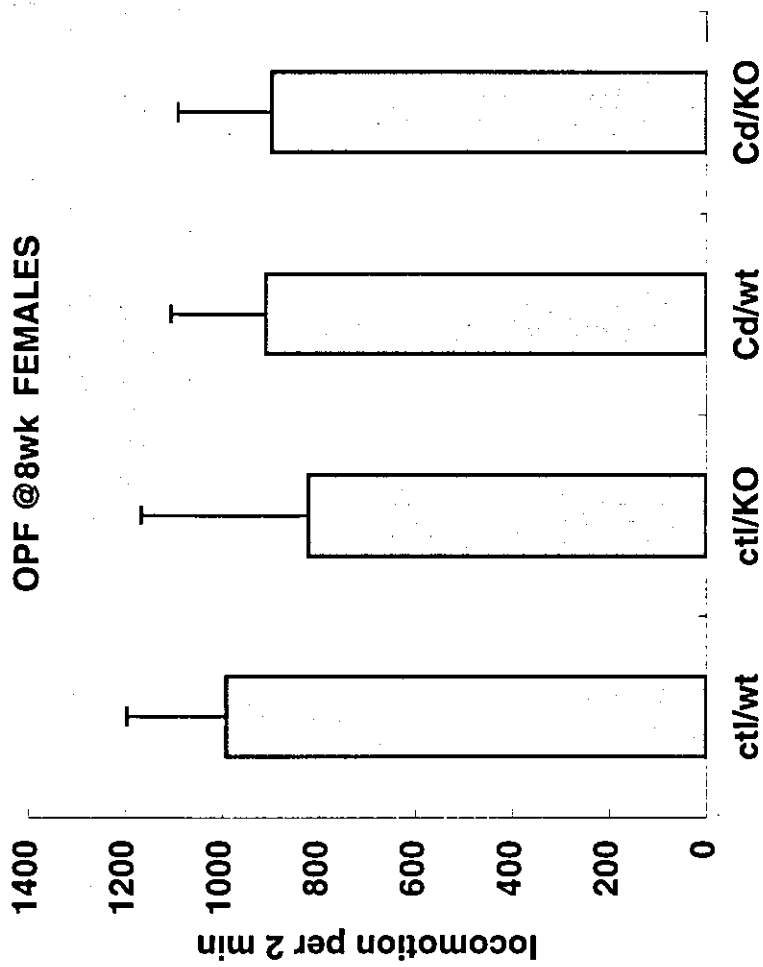


図1b . オープンフィールド試験 (メス) .
 Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型.
 KO=MT-nullを示す. 縦軸は2分間の移動距離
 (cm). 各群間に有意差は認められなかった.

passive avoidance @9wk MALES

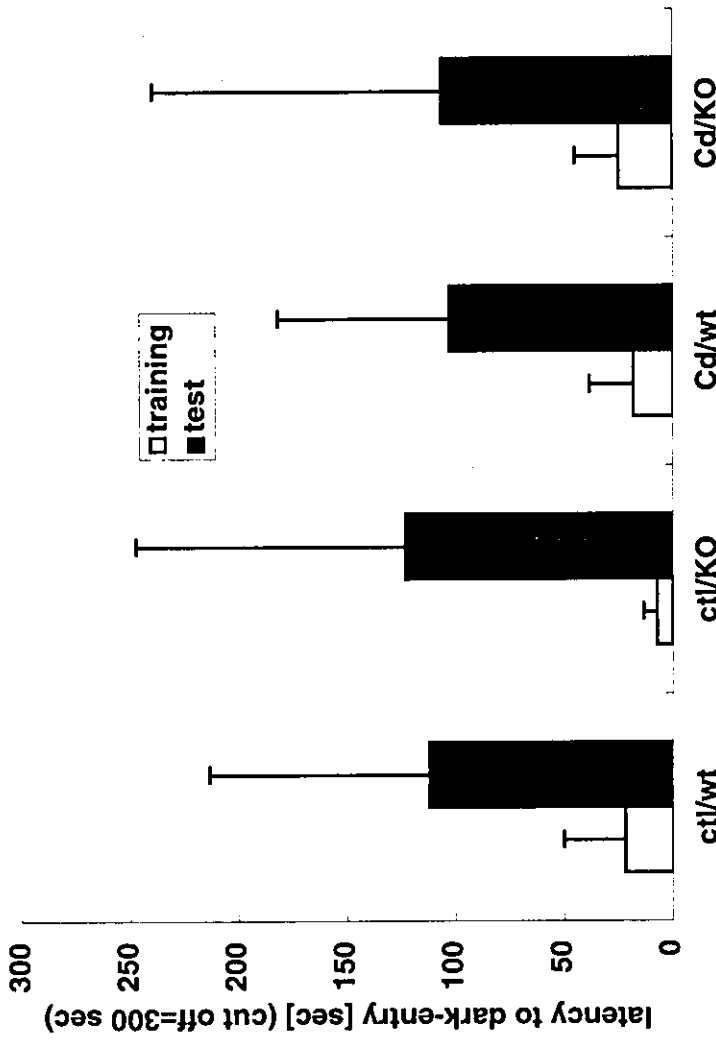


図2 a. 受動回避試験 (オス) . Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型. KO=MT-nullを示す. 縦軸は, マウスを明室においてから, 暗室に入るまでの時間 (escape latency (秒)). 各ブロックの左側(training)が訓練試行, 右側 (test) がシヨックとの関連を学習したあとの保持試行であり, 保持試行のlatencyが長いほど, 学習成績が良いことになる. 各群間に有意差は認められなかった.

Passive Avoidance @9wk FEMALES

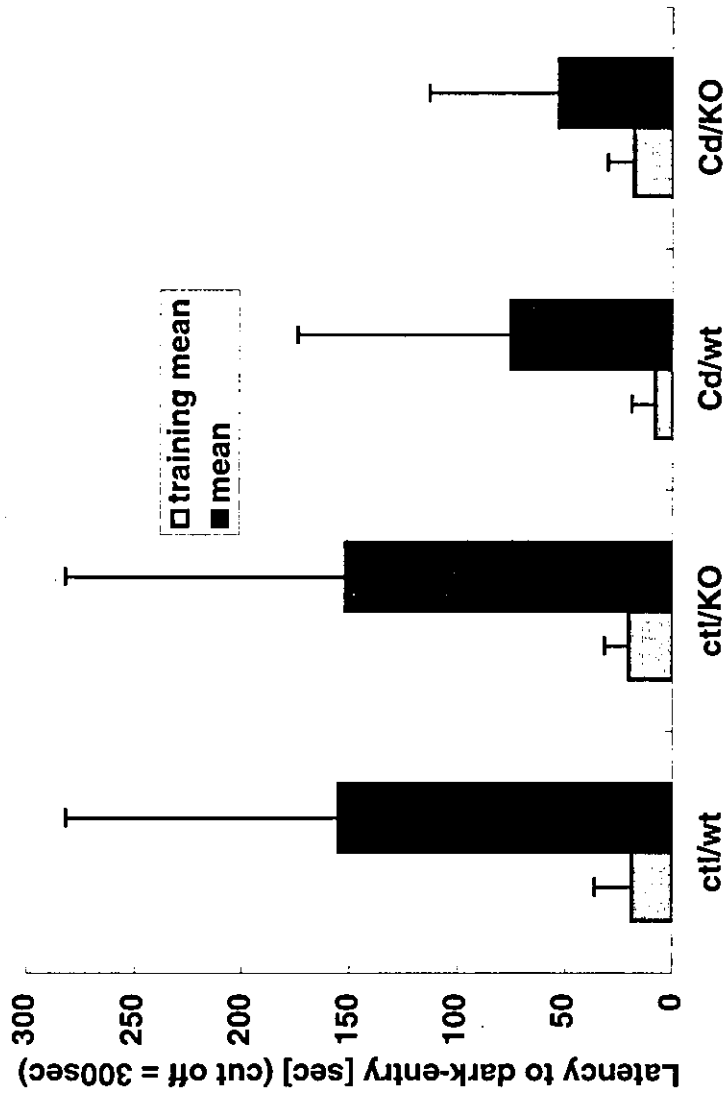


図2 a. 受動回避試験 (メス) . Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型. KO=MT-nullを示す. 縦軸は, escape latency (秒) . 2元配置では, Cdの効果有意であった.

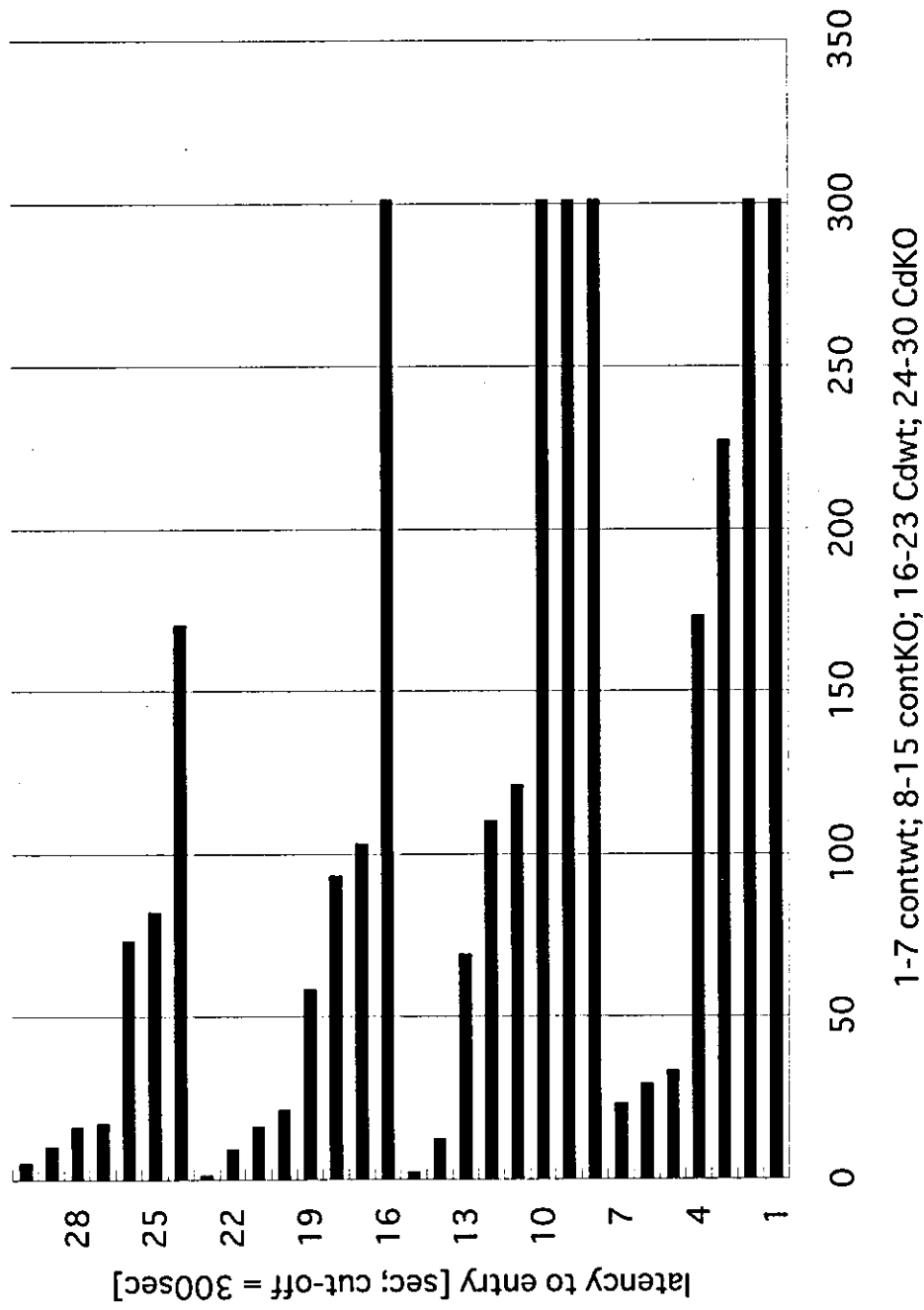


図3. 受動回避試験（メス）の個別成績（保持試行）。Ctl=非曝露, Cd=10ppm曝露. Wt=野生型. KO=MT-nullを示す. 300秒が観察のcut-off.

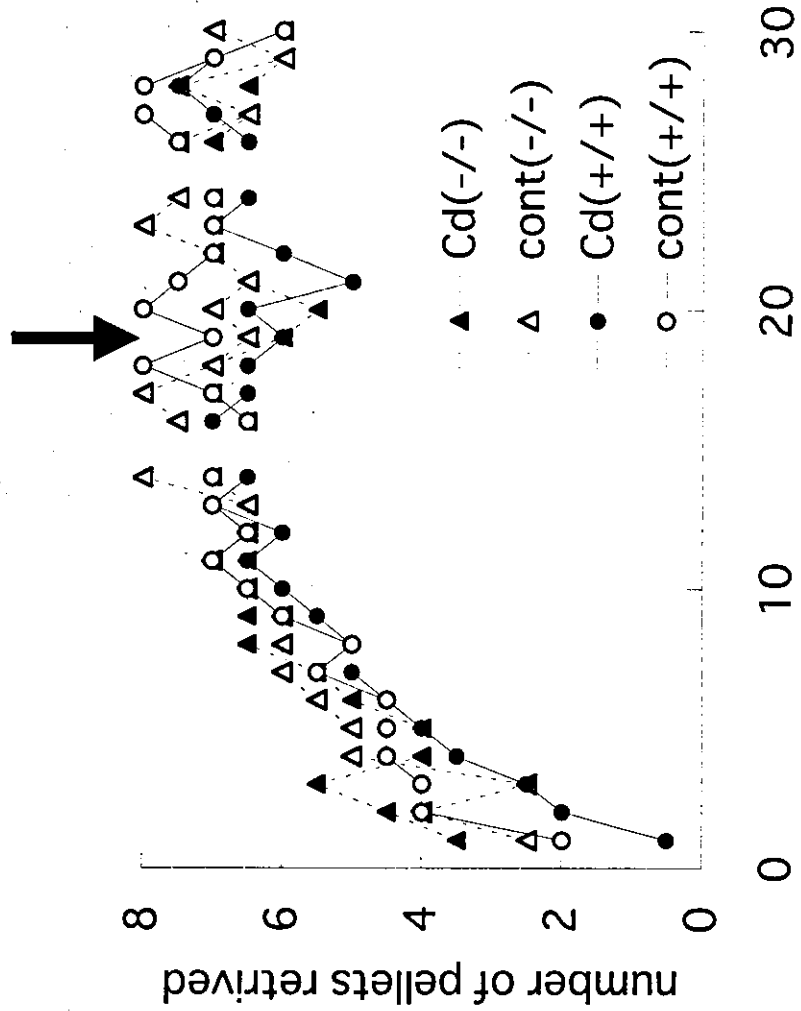


図4. 放射状迷路試験における，獲得した報酬（餌ペレット）の数．最大は8個（＝課題完了）．横軸はセッション数．マークしたセッションから，試験パラメタを変えて，課題を難しいものへと順次変化させた．Cd＝曝露群，cont＝非曝露群，(-/-)＝MT-null，(+/+)＝野生型．各群n=4のmedian．観察時間は原則として5 min (delay time を除く；本文参照)．

cumulative number of completers

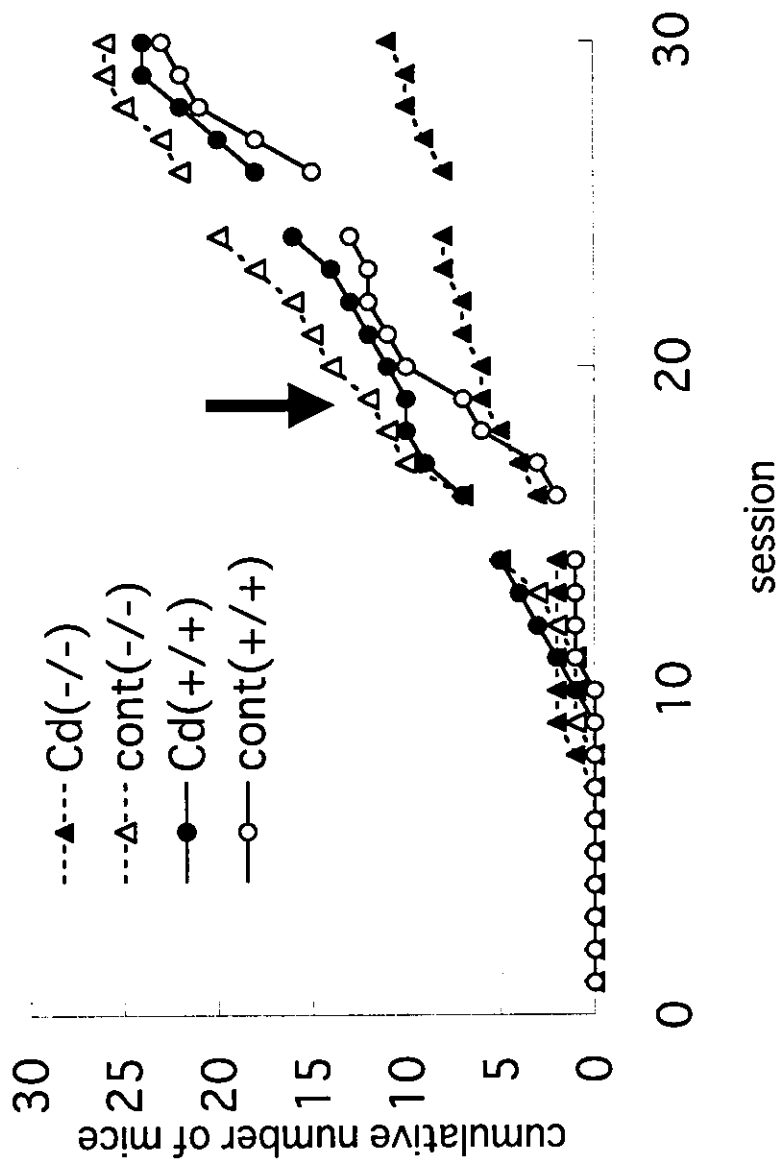


図5. 放射状迷路試験において, 時間内に課題を遂行できたマウスの述べ個体数(例えば2日遂行できたマウスは2として数えられる). 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. Cd=曝露群, cont=非曝露群, (-/-)=MT-null, (+/+)=野生型. 各群n=4のmedian. 観察時間は原則として5 min (delay timeを除く; 本文参照).

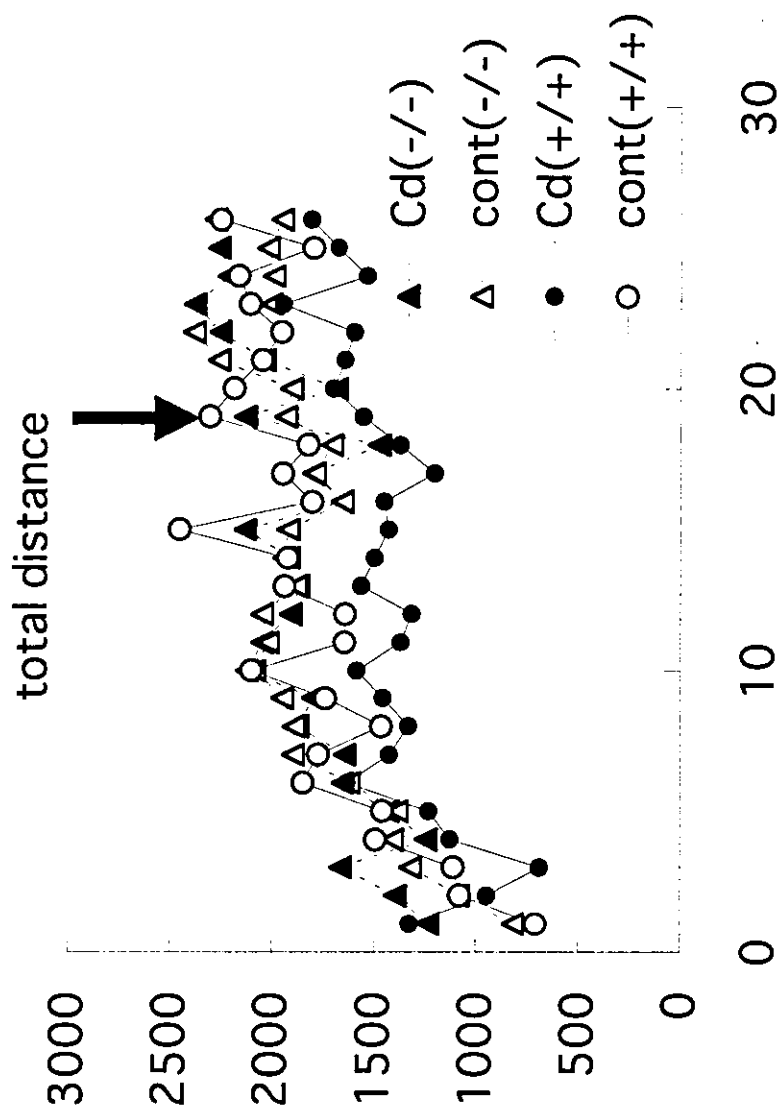


図6. 放射状迷路試験におけるtotal distance (観察時間 (300秒) 内の総移動距離 (cm) . 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. 各群n=4のmedianを用いている. 観察時間は原則として5 min (delay time を除く; 本文参照) .

total arm choice

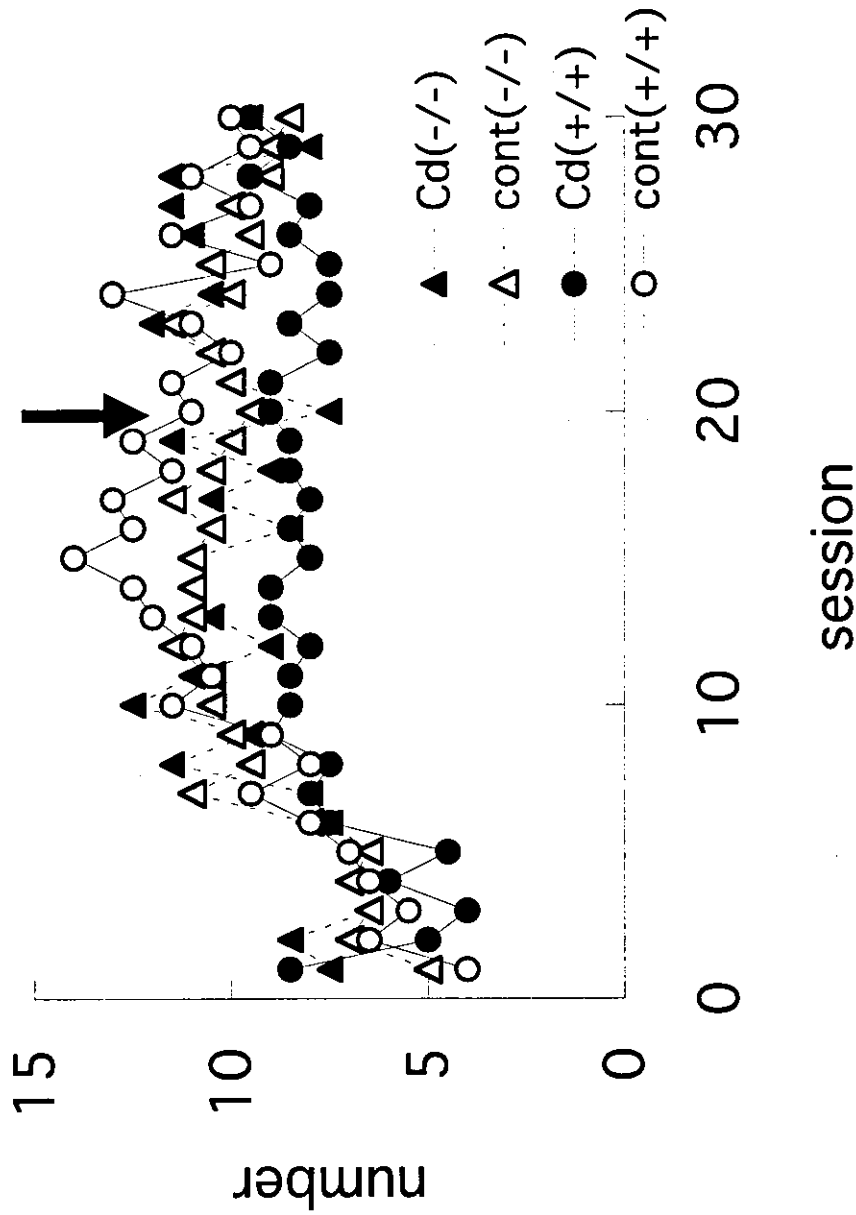


図7. 放射状迷路試験における述べ選択（進入）アーム数. 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. 各群n=4のmedianを用いている. 観察時間は原則として5 min (delay time を除く; 本文参照).

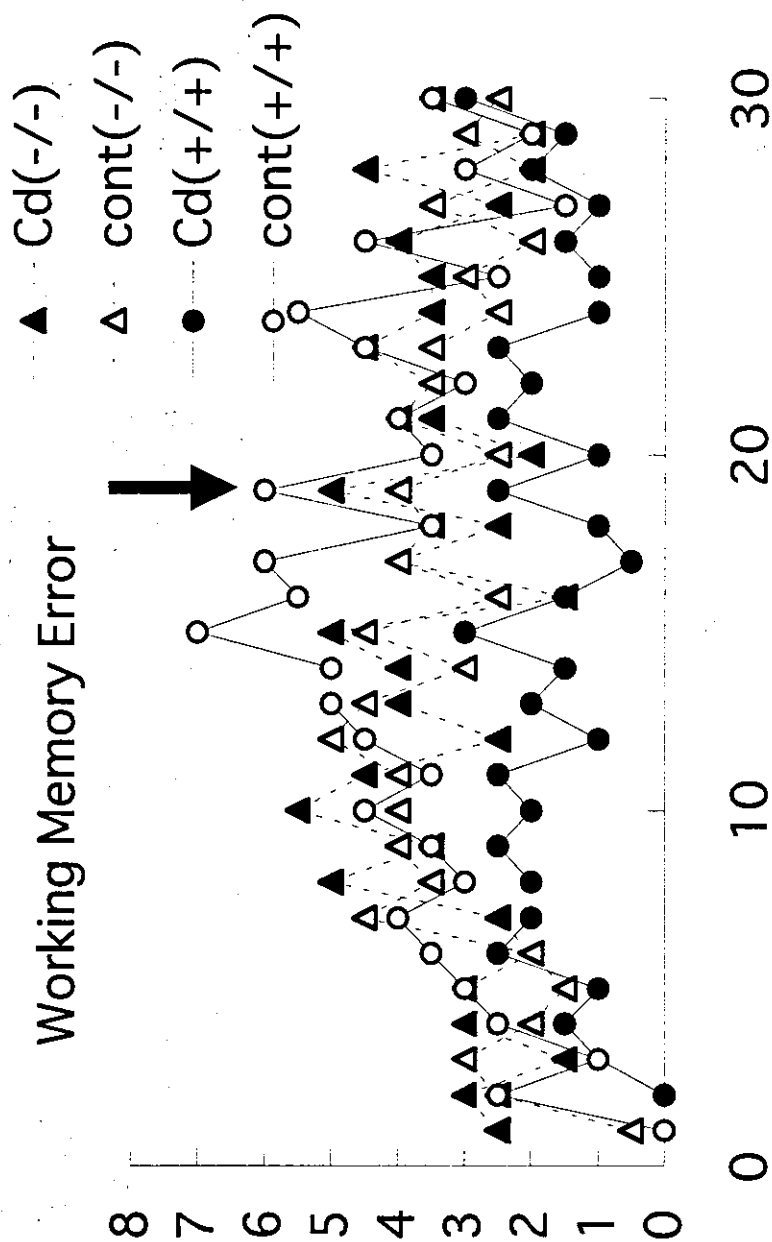


図8. 放射状迷路試験におけるWorking memory error. 既に餌ペレットを獲得したアームに再び進入した回数の総計. 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. 各群n=4のmedianを用いている. 観察時間は原則として5 min (delay timeを除く; 本文参照).

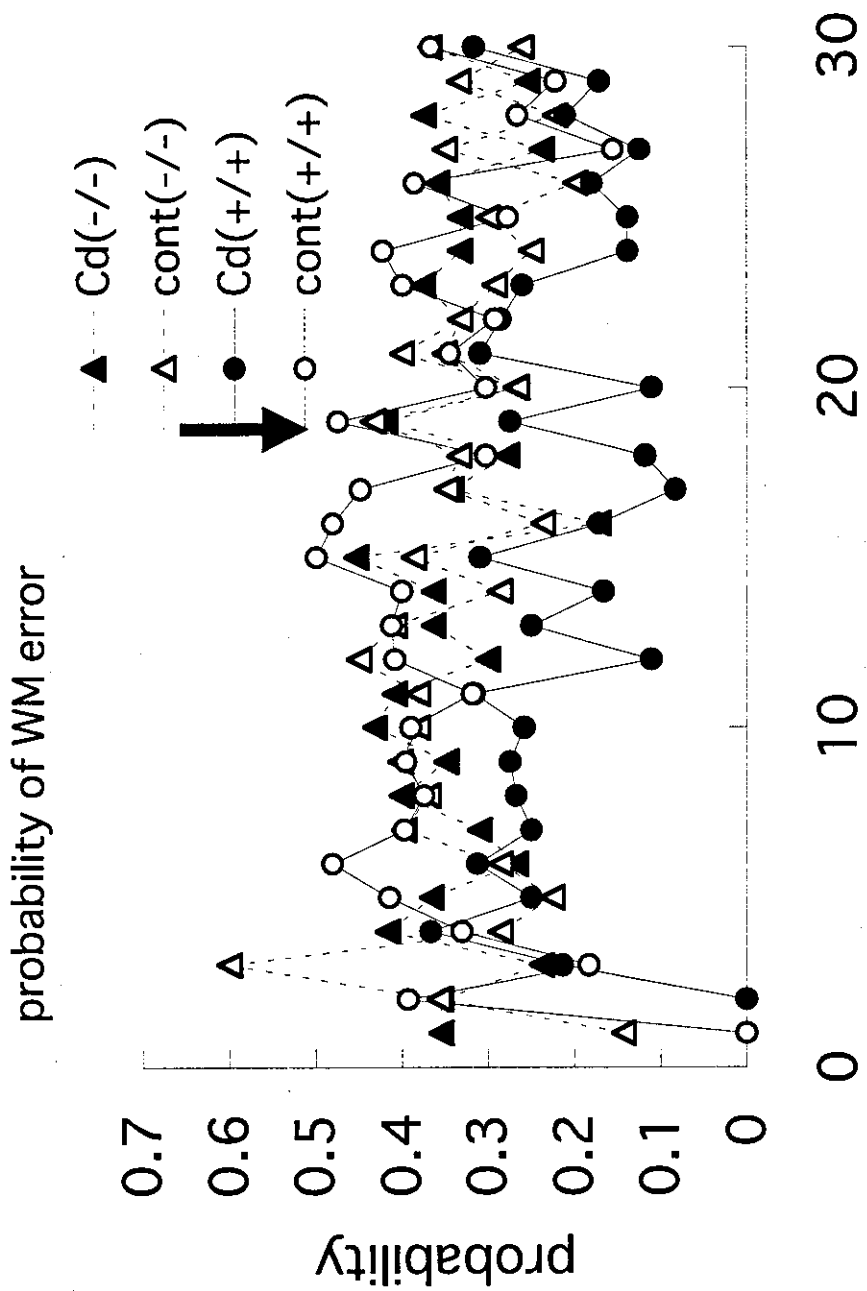


図9. 放射状迷路試験におけるWorking memory errorの確率. Working memory error数 (図8) の総選択アーム数 (図7) に対する割合. 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. 各群n=4のmedianを用いている. 観察時間は原則として5 min (delay time を除く; 本文参照) .

different arm choice in 1st8

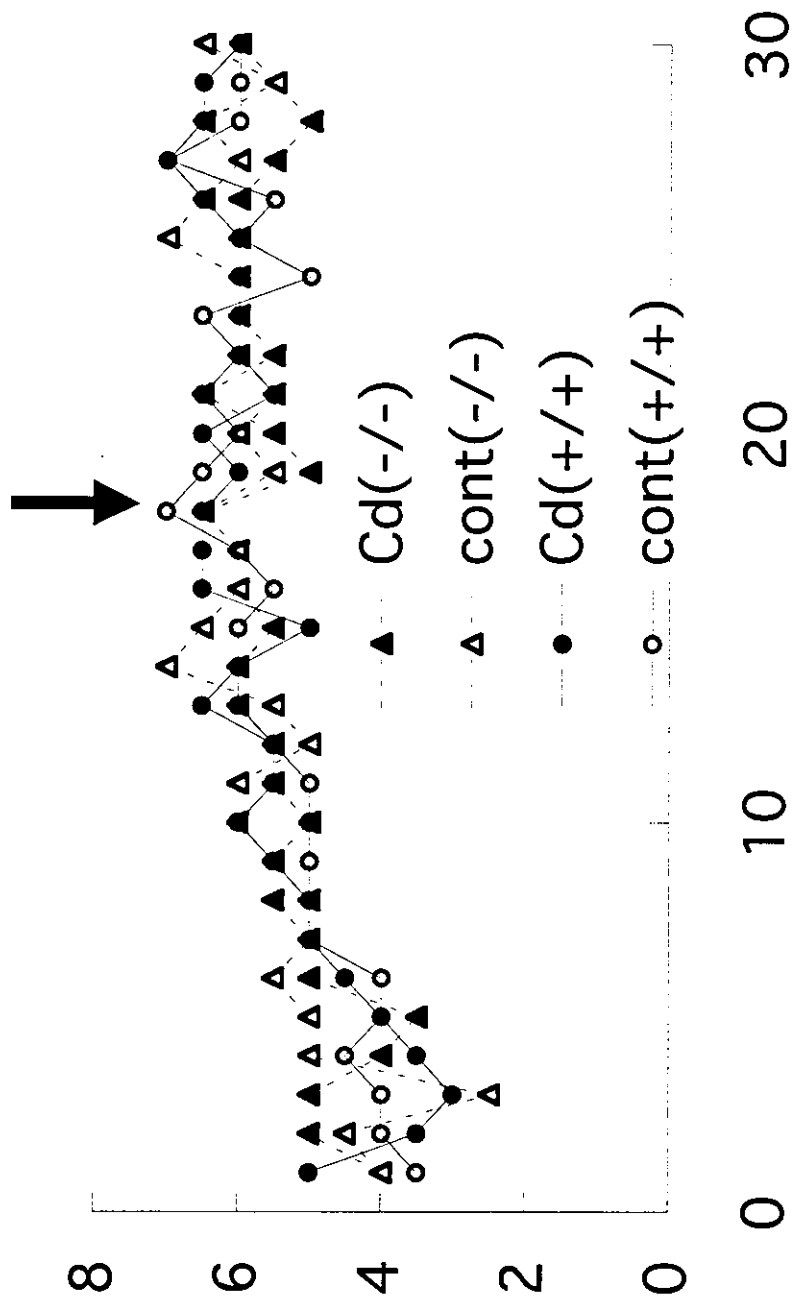


図10. 放射状迷路試験の最初の8選択分における異なるアーム数. 数が8であれば, 全く無駄なく課題を遂行したことを意味する. 横軸はセッション数. マークしたセッションから, 試験パラメタを変えて, 課題を難しいものへと順次変化させた. 各群 $n=4$ のmedianを用いている. 観察時間は原則として5 min (delay time を除く; 本文参照).

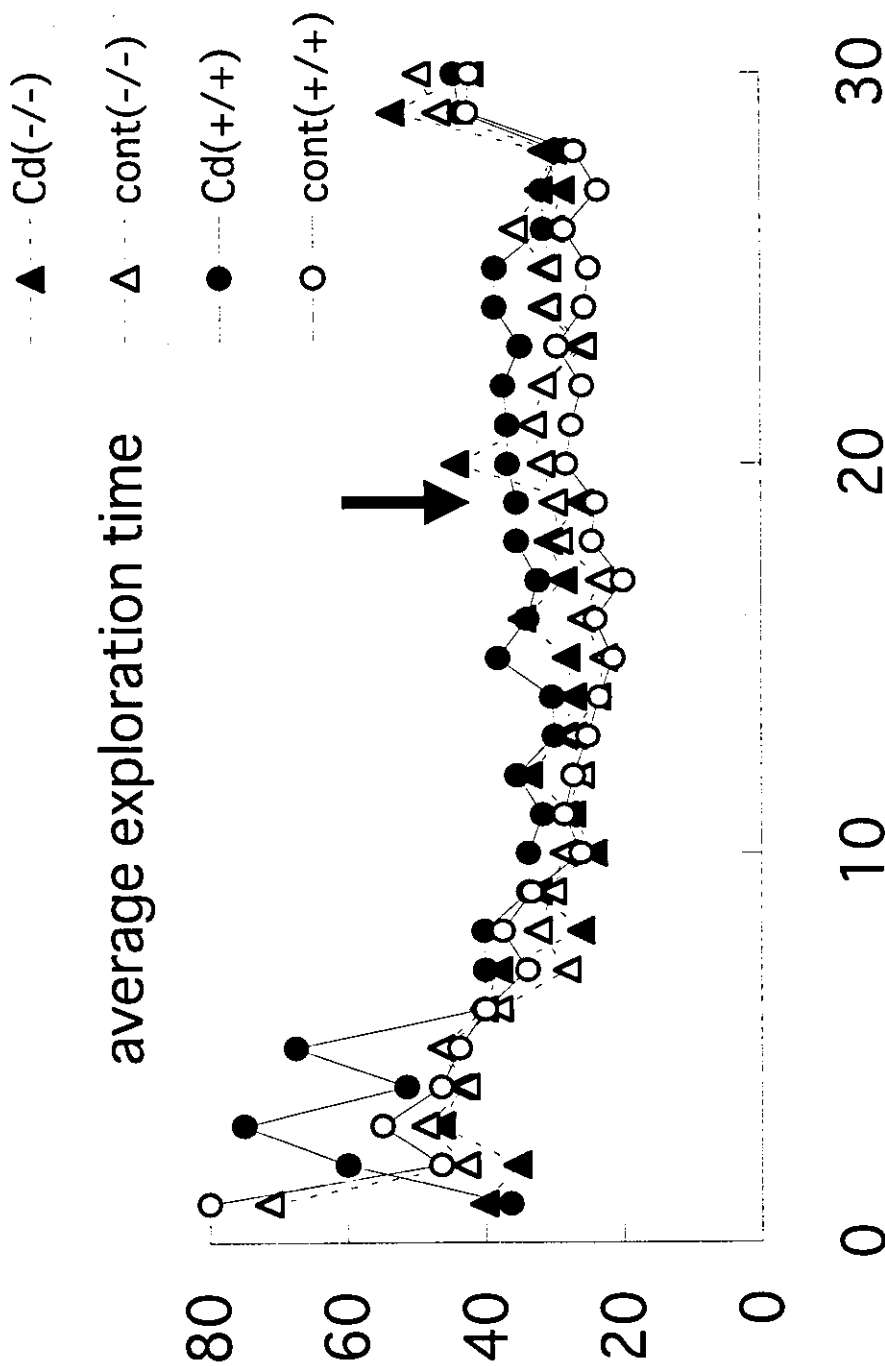


図11. 放射状迷路試験における探索時間 (アームに入ってから出てくるまでの時間を全ての arm entry について平均したもの)。横軸はセッション数。マークしたセッションから、試験パラメタを変えて、課題を難しいものへと順次変化させた。各群n=4のmedianを用いている。観察時間は原則として5 min (delay time を除く；本文参照)。

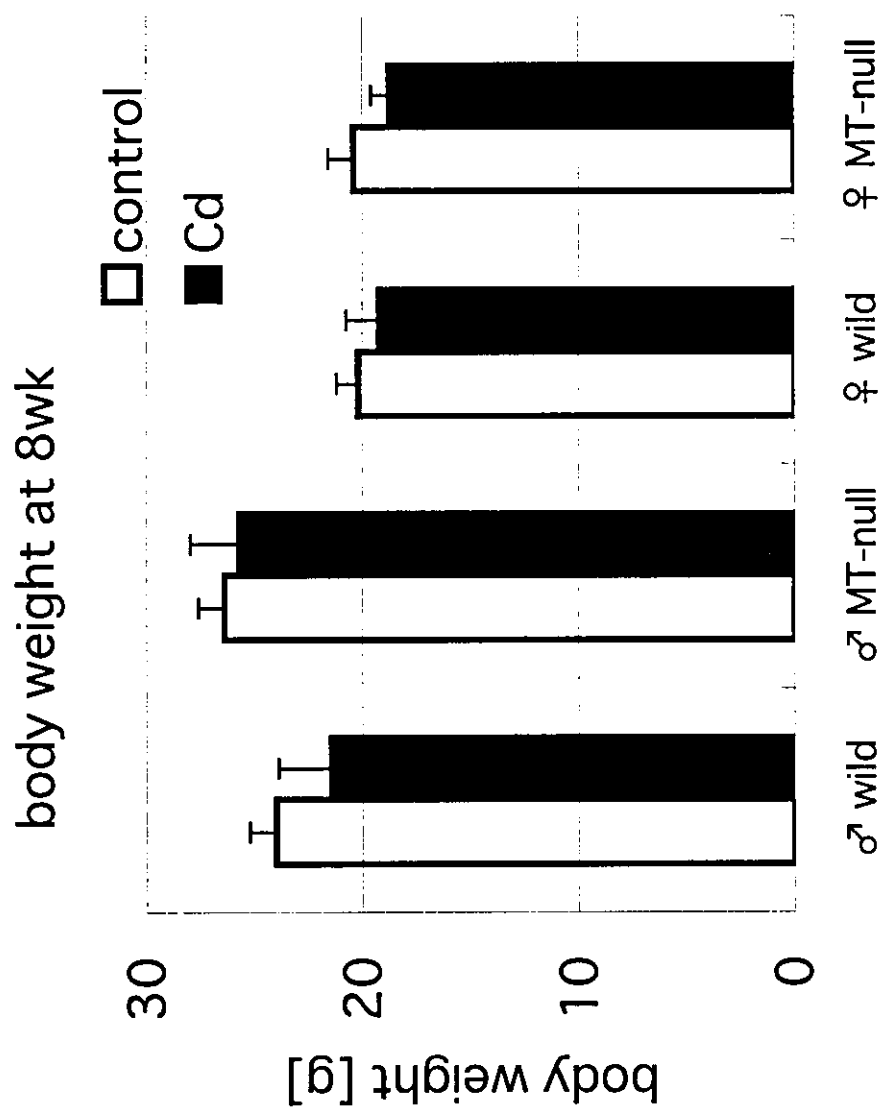


図12. 行動試験実施時における体重. ♂では系統・Cd曝露ともに, ♀では曝露のみに, 有意な効果がある. 各群n=7-8の平均±SD.

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—

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

要旨：周生期カドミウム（Cd）曝露が、出生後の神経行動機能に影響をおよぼすことを前年度報告した。本年度は、影響の見られたコホートをを用い、15ヶ月齢において行動試験を実施し、影響の可逆性について検討した。その結果、前年度と同様のパラメータを用いて行った受動回避試験において、オスでは系統にかかわらず、Cd曝露群のみに学習効果の認められた個体が存在した。オープンフィールド試験では、野生型オスにおいて、Cd曝露群が非曝露群に比較して移動量が大きい傾向があったが、有意差には至らなかった。

これらの結果は、前年度報告した行動影響は約1年後には統計的には認められなくなっていることを示したが、前年度影響が認められたメス（オスでは影響を認めなかった）についての検討ができなかったこと、オスでも有意差には至らないもののCdの影響をうかがわせる結果があったことなどを考慮すると、行動試験についてnaiveなマウスを用いて加齢後の試験を行う必要があるものと思われた。

はじめに

前年度報告において、周生期のCd曝露によって出生後の行動機能に影響が検出されることを示した。発達神経毒性はしばしば不可逆的であり、Cdによる毒性についてもその可逆性を検証することが重要である。そこで、昨年度生後9・10週齢において行動機能に供したマウスを用通常餌で飼育の後、14ヶ月に達した時点で再び行動試験に供し、周生期におけるCd曝露の影響の持続性を

検討した。

方法

使用動物、曝露方法、行動試験の方法などは前年度の報告と同様である。簡単に記すと、C57BL/6系（野生型；wt）およびそのメタロチオネインノックアウト（MT-null）系のマウスを交配、プラグ確認した妊娠個体に、プラグ確認日よりCd10ppmを添加したmilliQあるいは非添加milliQを与えた。出産後も授乳10日目（仔にとっての生後10日目；PND10。なお、出生を確認した日をPND0とした）までCd添加／非添加水による飼育を続け、PND11以降はすべて非添加のmilliQに切り替え、PND28に離乳、以降は雌雄別に飼育を続けた。なお、リッターサイズの影響を避けるため、PND2において、リッターサイズを6に揃えた。

行動試験は、各リッターより雌雄各1匹ずつをランダム選び、すべての行動試験において同一の個体を繰り返して用いた。

8-9週齢において情動性／活動性の評価法であるオープンフィールド（OPF）、学習評価法である受動回避試験（Passive Avoidance；PA）を、ここでメスのみに影響が認められたことを踏まえて、約4ヶ月齢においてメスのみを対象に、空間学習評価法である放射状迷路（Radial Maze）を実施した。これらの結果はすでに前年度の報告したとおりであり、PAにおいては、メスのみでCd曝露群の学習成績が非曝露群よりも劣っており、MT-null群でその差がより顕著であった。オスではこのような差を認めなかった。Radial Maze（前述のようにメスのみを用いて実施）においては、迷路学習の獲得（acquisition）においては、系統差・曝露効果ともに認めなかったが、学習を獲得した後、課題の難易度を上げるプロセスを導入したところ、MT-nullにおいて、Cd曝露群の成績が非曝露群に比べて劣る傾向を示した。OPFにおいては、Cdの影響を検出できなかった。

今年度は、同じOPF、PAの試験装置を用い、15ヶ月齢で試験を実施した結果を報告する。

結果

メスでは、Radial Mazeに供した際に、絶食をかける必要があった（オスではRadial Mazeは実施していない）が、予備的な検討に基づいて絶食を行ったにもかかわらず一部の動物が死亡し、結果としてwtの非曝露群が残らなかった。生存した個体でも絶食の影響が無視し得ない可能性があるため、メスについては加齢期のデータを用いないこととした。以下に述べる結果は、全てオス（n=4-8/群）についての結果である。

OPF：図1に結果を示した。wtにおいて、Cd曝露群が対照群の1.5倍の移動量を示したが、統計的に有意な差には至らなかった。MT-nullではこのような差を認めなかった。

OPF of aged Cd-exposed mice

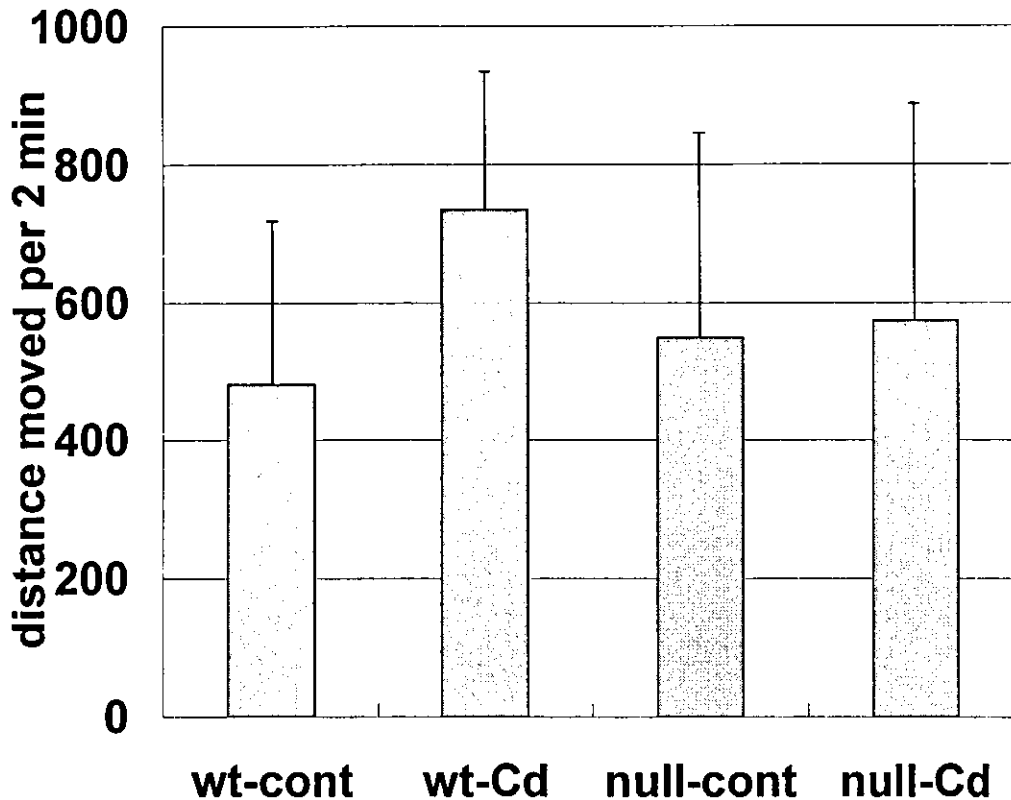


図1. 周生期 Cd 曝露♂マウスの加齢後 (15mos) におけるオープンフィールド試験での移動量 (縦軸: 2分間の移動量[cm])

PA: 図2に結果を示した. 図において, latency は明室におかれたマウスが暗室に移動するまでの時間を秒で表している. training (訓練試行) は第1日目 (学習成立前) の試行で Cd 曝露群で平均値がやや大きい傾向があるが, 有意差には至らなかった. 暗室にはいったマウスは, その直後に短い微弱電流でショックを受け, 嫌悪学習が成立する. Retention (保持試行) は Training の翌日に実施し, 学習が成立していれば暗室にはいるまでの時間が長くなることが想定されている. 実際には wt では学習が成立していない可能性が高い. 一方 MT-null では latency が伸びる (学習が成立していることに相当) 傾向が見られ, Cd 曝露群でその傾向が強かった. ただし, 個体間のバラツキは大きく, Cd・strain とともに統計的には有意な効果を検出できなかった.

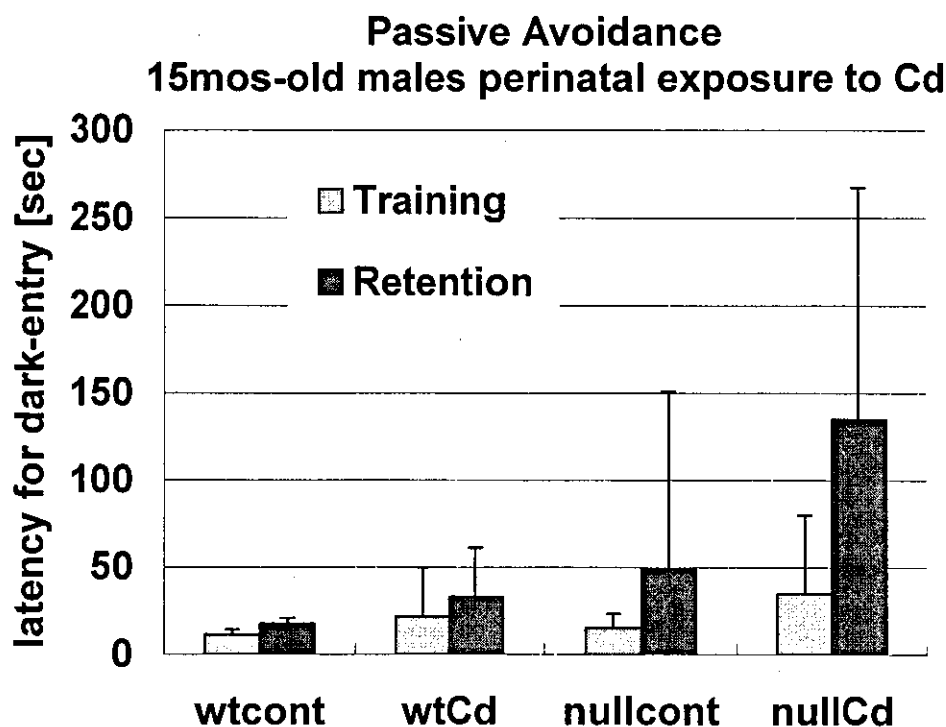


図2. 周生期 Cd 曝露♂マウスの加齢後（15mos）における受動回避試験（PA）（縦軸：暗所へ移動するまでの時間 [秒]）

考察

統計的には、周生期の Cd 曝露が出生後1年以上経過したマウスの行動に及ぼす影響を確認することができなかった。ただし、出生後3ヶ月齢（OPF, PA）あるいは6ヶ月齢（RM）で影響が認められたのはメスであったが、今回はメスについて検討を実施できていないことから、周生期 Cd の行動影響が可逆的であると結論するには、この結果は不十分である。本研究の期間終了後にはなるが、現在新たに Cd 曝露のコホートを維持しており、このコホートを用いて加齢後の再評価を実施する予定である。

オスについて、OPF では統計的な有意差を認めなかったが、wt では Cd 曝露による活動昂進の傾向が認められ、個体毎のデータ（本書には示さず）を見ても、両群の差が示唆される。現在維持中のさらにn数の多いコホートでこれらの結果を追試する予定である。

PA については野生群において学習が成立していない。本試験での実験パラメタは前年度と同一であり、前年度オスでは系統・処理とは関わりなく、学習が成立した（retention trial での latency が長かった）ことから考えると、今年度の結果は加齢による学習能の変化を示唆している。ただ

し、これが移動-刺激という関連を学習する能力、嫌悪刺激の記憶保持能力、あるいは電流刺激への感受性のいずれが低下したことによるものなのかは不明である。今後の検討課題であろう。

統計的には有意差に至らなかったが、wt と比較した場合、MT-null、特に Cd 曝露群では retention time が長い傾向が見られた。この点も現在維持中のコホートの加齢後に追試する予定であるが、PA における嫌悪学習能力が見かけ上、向上したことについては、上記にあげた以外にも不安のレベル、活動性のレベルなど、学習能以外の要素も影響を与えているものと思われる。本研究の範囲では、系統差を示す可能性があることと、MT-null において、Cd 曝露が何らかの影響を残している可能性があることの 2 点を指摘しておきたい。

なお、結果には示さなかったが、本年度は、周生期 Cd 曝露の新たなコホートを作製し、生後 3 ヶ月齢における行動影響の追試を行った。結果は、OPF において、メスで系統によらず Cd 曝露群の移動量が低下していた (2-way ANOVA)、オスでも曝露による活動抑制傾向はあったが、有意ではなかった。PA においても、メスのみにおいて training trial の latency が曝露群 > 非曝露群であった。これらの結果は、前年度で得られた結果とはやや異なっていたが、いずれも、メスのみで影響が認められた点は一致していた。

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

Effects of Low-dose Perinatal Cadmium Exposure on Tissue Zinc and Copper Concentrations of Neonates and on Reproductive Development of Female

Offspring in Mice （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）

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

研究協力者 石飛裕美 東京大学大学院医学系研究科人類生態学教室

研究要旨：昨年度までの結果により、周生期における低濃度のカドミウム曝露がマウスにおいて発達毒性を有する可能性が強く示唆された。カドミウムが母体-胎仔・新生仔系において毒性を発揮するメカニズムは不明であり、他の項でマイクロアレイなどを用いて検討を行っているが、良く知られているように、カドミウムが亜鉛・銅の代謝に影響を及ぼすことが毒性発現につながるという可能性がある。昨年度、この可能性については若干の検討をおこなっているが、本年度は検討時期を2点設け、より詳細に検討した。また、カドミウムがエストロゲン様作用を発現するという最近の報告も参考にして、性成熟への影響も検討した。

これまで多くの検討は、飲料水にCdを添加する方法を採用したが、添加濃度は50ppmを超えるものが多く、飲水量や体重抑制などの指標から判断すると、これは明らかな毒性を生ずる量であって、発達毒性の検討には向いていない。本研究では、添加濃度をこれまでの検討で用いてきた10ppmに加えて、1ppmの2段階として、在胎期～出生10日後まで母親を通じて曝露した。その結果、新生仔肝・腎において、高濃度の曝露で報告されているのとは逆に、Znの軽微な増加を認めた。一方で、肝におけるCu濃度の低下が認められた。これらの結果は、低濃度のCd曝露が微量元素の動態に影響を及ぼす可能性を示しているが、毒性との関連は明確ではない。性成熟については、Cd曝露が性成熟に影響する可能性を示唆するデータが得られたが、エストロゲン様作用を示した報告における性成熟への影響とは、影響の方向が異なっていた。

Introduction

In human pregnancy, maternal exposure to Cadmium (Cd) is associated with low birth weight (Kuhnert et al., 1988; Freryet al., 1993) and possibly with an increased incidence of spontaneous abortion (Shiverick and Salafia, 1999). Cd has also been shown to produce a variety of adverse reproductive outcomes in exposed animals. Cd administration to rodents impairs implantation (Balanski et al., 1982; Yu et al., 1985), decreases litter size (Balanski et