

別添資料 2

Overview of conference call with Jun Kanno Jan 26, 2006

(Compiled by Don, Jan 27, 2006)

On the call from 8:00 to 9:00 am ET: Gary Timm, Don Bergfelt, Ralph Cooper and Jun Kanno

Topic: To learn more of the Japanese effort to incorporate a one life span test into their endocrine screening and testing program.

Comment: Jun has provided us with three references (two have not been completely translated) and an email indicating his efforts as well as those of colleagues of MHLW EDC Research Groups, for example, one group lead by Dr. Hiroshi Ono (Food and Drug Safety Center).

Action: Distribute or redistribute to Gary, Don, Vicki and Ralph.

Comment: Jun had been sent a copy of the Life-Stages report in advance of the conference call and was initially confused by the ILSI-HESI Tiered approach and that of the EDSP.

I think I was not confused. The approach was totally opposite, so that I was not sure how our proposal could be of any help to ILSI-HESI approach. Especially it was not clear how you handle "low-dose effect", which is the reason why we are considering actual human exposure levels, but in your document, "human relevant exposure level" was used in very different ways. The last issue has not been clarified, for me, at this teleconference, I believe Ralph said it is still a point of discussion in ILSI-HESI.

Gary, clarified, if adopted by the EPA/OPPTS, the Life Stages F1-extended one-generation reproductive toxicity test would be used as a Tier-2 test in the EDSP and a Tier-1 base test in OPP. **Action:** Send Jun additional reports for ADME, systemic toxicity and the overall review to complete the picture of the ACSA initiative.

Gary: introduced the basis for our call was, in part, to ask Jun to clarify to the EPA the Japanese reason for considering a one-generation test so that the EPA could get an idea of the similarities and/or differences to the ILSI-HESI Life Stages F1-extended one-generation reproductive toxicity test of which the EPA is considering to adapt into its EDSP program. In addition, the EPA wanted to determine if Jun would be interested in presenting the Japanese effort at a mammalian VMG meeting of the OECD in Wash DC April 4 or 5.

Jun: indicated that the Japanese Ministry of Agriculture & Forestry currently uses a

two-generation test (OECD TG 416, 2001) similar to the OPPTS 970.3800, 1998 guideline used by OPP in FIFRA but, it is likely that the ministry believes the modified test is insensitive in detecting endocrine disruptors.

Jun: indicated his efforts are focused on "low-dose" effects using BPA (5 ug/kg) and other estrogenic chemicals plus dioxin and identifying alternative end points sensitive to low dose exposure to detect endocrine effects as well as neurological and immunological effects. He discussed specific end points that were indicated in an email sent in advance of the conference call (this email has since been distributed or redistributed to Gary, Don, Vicki and Ralph).

Ralph: indicated that a group at SOT 2005 suggested including endo-, neuro- and immunological test in one test. The ILSI-HESI ACSA initiative has done just this and, apparently, so has the Japanese.

Jun: indicated their interest is primarily on ER-mediated, AR mediated, TR mediated, and AhR mediated, and if necessary any other receptors especially of nuclear receptor groups, but may include membrane receptors as well in the future, but in practice, "low-dose effect" endpoints are monitored (believed to be monitored) by estrogenic chemicals and dioxin. Androgenic and thyroid receptor mediated low dose endpoints are not available yet for designing the one-life span test. Apparently, thyroidogenic responses are difficult to detect at low doses because of diffuse target tissue distribution; although, the brain may be a sensitive target organ. Thyroid peroxidase inhibitors are out of the scope for the time (we believe that TPO inhibitors have been effectively detected by current protocols)

Ralph and Jun: continued to engage in a technical discussion about the similarities and differences between the Life-Stages one-gen and the Japanese one-life span (please give me better name !) (e.g., time and length of dosing and number of animals/sex/ group at necropsy) including alternative end points to detect low-dose effects (e.g., multi-oocyte follicles, transgenic mouse model, estrogen and androgen receptors), dose selection, issues surrounding low-dose response curves (i.e., non-monotonic) and species extrapolation. Ralph also clarified to Jun that the ILSI-HESI ACSA initiative was more than the Life-Stages. Results from the ADME and systemic toxicity components of the paradigm help determine how the Life Stages one-generation test will be designed and run.

Gary and Ralph: emphasized the apparent common interest that the US and Japan have in developing a one-generation reproductive toxicity test tailored to detect endocrine activity as well as related neurological and immunological effects and, that a concerted effort to develop a test protocol by the US, Japan and OECD, is in the interest of

international collaboration and harmonization.

Gary: concluded the conference call by inviting Jun to do a presentation of his work with the one-generation reproductive toxicity test at the VMG meeting in early April.

Jun: agreed to attend the mammalian VMG meeting of the OECD in Wash DC on April 4 and 5, 2006 to do a 20 min presentation of the Japanese version of the one-generation (one life-span) test.

【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】
〈OECD Conceptual Frame Work Level 5 対応試験開発〉

1) 神経・行動

2. Bisphenol A をモデルとした妊娠期及び授乳期暴露による行動影響の評価とその機序解明

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学 薬品毒性学教室 教授
協力研究者 成田 年 星薬科大学 薬品毒性学教室 助教授

研究要旨： 研究者らはこれまでに、Bisphenol A (BPA) の胎生期および授乳期慢性暴露により、依存性薬物に対する反応性が著しく亢進すること、また、依存性薬物による精神依存形成時に中枢神経系におけるアストロサイトの活性化が引き起こされることを明らかにしている。そこで本研究では、BPA がアストロサイトの機能変化を引き起こすか否かについて検討した。その結果、BPA を培養細胞に処置することによりアストロサイトの形態変化が引き起こされ、この形態変化は各種性ホルモン受容体拮抗薬を併用しても抑制されなかった。さらに、BPA の胎生期慢性暴露による胎生期中枢神経発達における大脳皮質層形成に及ぼす影響を解剖学的に検討した結果、神経細胞の局在異常ならびに放射状グリアの形態異常が認められた。これらのことから、BPA の胎生期および授乳期慢性暴露による行動異常の発現には、発達期におけるグリア細胞の機能変化や神経局在の異常が一部関与している可能性が考えられる。

A. 研究目的

研究者らはこれまでに、EDCs の一つである BPA の胎生期及び授乳期慢性暴露により、依存性薬物に対する反応性が著しく亢進すること、また、依存性薬物による精神依存形成時に中枢神経系におけるアストロサイトの活性化が引き起こされることを明らかにしている。そこで本研究では、BPA が直接的にアストロサイトの形態変化を引き起こすか否かについて検討した。また、環境化学物質の胎生期および授乳期慢性暴露が、成長後の行動に異常を引き起こすという概念が一般化されつつあるものの、これらが発達期にどのような中枢神経系の変化を引き起こしているかについては、直接的な検討がなされていないのが現状である。そこで本研究では、BPA の胎生期慢性暴露による、中枢神経発達における大脳皮質層形成に及ぼす影響について解剖学的に検討した。

B. 研究方法

PND の ICR 系マウスの中脳由来初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞に BPA および E₂ を処置し、アストロサイトの形態変化について、免疫染色法に従い検討した。なお、各種性ホルモン受容体拮抗薬を BPA と同時に処置し、拮抗試験を行った。ま

た、BPA の処置が神経およびアストロサイトの機能的な変化を引き起こすか否かについて、Ca²⁺ イメージング法に従い検討した。更に、大脳皮質層形成に及ぼす BPA の影響については、薬物混入飼料法に従い BPA を胎生期に暴露し (0、3×10⁻²、2×10³ μg/g of food)、胎児脳を用いて免疫組織学的に検討した。なお、本研究を遂行するにあたり、星薬科大学動物実験指針に従い、動物に対する倫理面を十分に考慮してすべての実験を行った。

C. 研究結果

初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞に極めて低用量の BPA を処置することにより、アストロサイトの形態変化が引き起こされ、さらには、dopamine 誘発 Ca²⁺ 応答の亢進が認められた。この様な BPA の処置によるアストロサイトの活性化は、estrogen 受容体拮抗薬である ICI182,780、estrogen 受容体作動薬/拮抗薬である tamoxifen、progesterone 受容体拮抗薬である mifepristone および androgen 受容体拮抗薬である flutamide をそれぞれ BPA と同時に処置しても何ら影響を受けなかった。さらに、E₂ の処置ではアストロサイトの形態変化は認められなかった。

BPA の胎生期慢性暴露による大脳皮質神経

細胞の局在変化について検討したところ、BPAの胎生期慢性曝露により、通常では神経細胞が常在しない内層において、神経細胞のマーカである TuJ1 の陽性細胞が認められた。一方、大脳皮質層形成における神経細胞の移動には放射状グリアが重要な役割を担っており、神経細胞は放射状グリアに沿う形で内層を経由し、皮質表層へ移動することが知られている。そこで次に、BPAの胎生期慢性曝露による放射状グリアの形態変化について検討した。その結果、control群においては放射状グリアのマーカである RC2 の陽性細胞が脳室層の脳室側に並んで存在し、表層へ長い線維を伸長させる形態を有するのに対し、BPA胎生期慢性曝露動物においては、線維状構造の形態異常が認められた。

D. 考察

哺乳類の中樞神経系は神経細胞とグリア細胞により構成されている。グリア細胞の中でもアストロサイトは脳内で最も多量に存在している細胞である。長らく、アストロサイトは脳の空隙を埋めるための単なる支持組織として考えられてきた。しかしながら、近年の研究ではこのアストロサイトが積極的に神経細胞の機能、特にシナプス伝達を制御している可能性が多数報告されている。また、神経のみならず、アストロサイトにも dopamine 受容体が発現しており、dopamine 刺激によってアストロサイトの細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が誘発されることが報告されている。研究者らはこれまでに、依存性薬物による精神依存形成時に中樞神経系におけるアストロサイトの活性化が引き起こされること、また、内分泌かく乱化学物質の一つである BPA の胎生期および授乳期慢性曝露により、依存性薬物に対する反応性が著しく亢進することを明らかにしている。そこで本研究では、BPA が直接的にアストロサイトの活性化を引き起こすか否かについて検討した。その結果、極めて低用量の BPA を初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞に処置することにより、アストロサイトの肥大化、樹状突起の進展といった活性化の典型的な形態変化が引き起こされ、さらには、初代培養アストロサイトおよび神経/グリア共培養細胞共に、dopamine 誘発 Ca^{2+} 応答の亢進が認められた。これらの結果から、BPA が直接的にアストロサイトを活性化させること、また、少なくともグリア細胞共存下においては神経の機能亢進をも引き起こすことが明らかとなった。さらに、BPA

の胎生期および授乳期慢性曝露による依存性薬物に対する感受性の亢進は、アストロサイトの機能亢進に起因した dopamine 神経の可塑的变化が一部関与している可能性が示唆された。

BPA は estrogen 活性を有することが報告されている。さらに、アストロサイトには発達期からすでに estrogen 受容体が発現しており、内因性 estrogen 受容体リガンドである E_2 は、神経のみならず、アストロサイトにも作用することが知られている。そこで、研究者らは次に、BPA の処置により引き起こされるアストロサイトの形態変化が、estrogen 受容体をはじめとする各種性ホルモン受容体を介しているか否かについて検討した。その結果、BPA の処置により引き起こされるアストロサイトの活性化は、各種性ホルモン受容体の拮抗薬を併用処置しても何ら影響を受けなかった。これらのことから、BPA は各種性ホルモン受容体とは異なった経路を介してアストロサイトを活性化させる可能性が示唆された。そのため、BPA の胎生期および授乳期慢性曝露により引き起こされる dopamine 神経系の機能亢進に起因した依存性薬物に対する感受性の亢進は、BPA が有する内分泌系のかく乱作用とは異なる機序により引き起こされる可能性が考えられる。

一方、環境化学物質の胎生期および授乳期慢性曝露が、成長後の行動に変化をもたらすという概念が一般化されつつあるものの、これらが発達期にどのような中樞神経変性を引き起こすかについては、直接的な検討がなされていないのが現状である。近年、脳の発生と発達における研究は飛躍的な発展を遂げ、神経細胞の増殖、分化、移動の過程が明らかにされつつある。本研究では、神経細胞の移動に着目し、BPA の胎生期慢性曝露が大脳皮質層形成に影響を及ぼすか否かについて検討した。中樞神経の発生過程において、幼若な神経細胞は脳室面神経上皮から表層へ向かって放射状に移動する。その後、層状に配列して皮質層構造を形成するか、特定の集合形態をとって神経核を形成するようになる。一方、幼若な移動神経細胞が一定のパターンをとって配列するための位置情報として、神経細胞自体に内在する遺伝的制御機構と、グリアならびに細胞外基質によって形成される移動経路、層状配列の枠組み構造の両者が重要な役割を担うと考えられている。そして神経-グリア間ならびに神経-基質間の相互作用により神経系の各部位に特徴的な構造が形成される。

本研究の結果から、BPA の胎生期慢性曝露が大脳皮質神経細胞の移動および配列異常を引き起こすことが明らかとなり、これには放射状グリアの形態異常が一部関与する可能性が示唆された。皮質表層側の大脳皮質第 I 層に存在する Cajal-Reztius (CR) 細胞は、神経移動抑制因子でもある reelin を放出し、未分化な細胞を放射状グリアに分化誘導する作用と、放射状グリアの線維を伸長促進させる作用を有することが知られている。BPA の胎生期曝露により、reeler mutant マウスに認められるような皮質層の逆転は引き起こされていないものの、神経細胞の移動および配置に異常が認められた。このことから、BPA の胎生期慢性曝露により、reelin の分泌・CR 細胞の機能異常が引き起こされている可能性が考えられる。また、層構造は、海馬・小脳にも認められる構造であり、BPA の胎生期慢性曝露が、海馬や小脳の発達過程にも影響を及ぼす可能性が考えられる。

以上のことから、BPA の胎生期慢性曝露により神経細胞移動の異常が引き起こされることが明らかとなった。こうした一連の変化が BPA の胎生期慢性曝露による成長後の行動異常を誘導する一因である可能性が考えられる。

E. 結論

・BPA は各種性ホルモン受容体を介さず、直接的にアストロサイトの活性化ならびに神経の機能亢進を引き起こした。

・BPA の胎生期慢性曝露により、大脳皮質における神経細胞移動のかく乱ならびに放射状グリアの形態異常が引き起こされた。

F. 健康危惧情報

無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし

2) 雑誌

原著論文

・K. Mizuo, M. Narita, T. Yoshida, M. Narita, T. Suzuki: Functional changes in dopamine D₃ receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor BPA in mice. *Addiction Biol.* 9 19-25 (2004)

・K. Mizuo, M. Narita, K. Miyagawa, M. Narita, E. Okuno, T. Suzuki: Prenatal and neonatal exposure to BPA affects the morphine-induced

rewarding effect and hyperlocomotion in mice. *Neurosci. Lett.* 356 95-98 (2004)

総説

・鈴木 勉、水尾圭祐、宮川和也、成田 年: BPA の胎児期および授乳期曝露による脳内報酬系に及ぼす影響 *日本神経精神薬理学雑誌* 25, 125-128 (2005)

・成田 年、宮川和也、富田真理子、水尾圭祐、鈴木 勉: BPA の胎児期および授乳期慢性曝露による dopamine 神経行動毒性発現 *精神科* 6(3), 256-262 (2005)

2. 学会発表

・第 18 回神経行動毒性研究会

2005 年 12 月 9 日、東京

環境化学物質と神経行動毒性、宮川和也、成田 年、湯浅茂樹、武田 健、鈴木 勉

・第 35 回日本神経精神薬理学会

2005 年 7 月 6 日～8 日、大阪

薬物依存の研究 (第 410 報) 環境化学物質の胎児期および授乳期慢性曝露による dopamine 神経障害、宮川和也、成田 年、押尾 茂、富田真理子、宮竹真由美、水尾圭祐、武田 健、鈴木 勉

・CPDD 67th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING、2005 年 6 月 18 日～23 日、Orlando, Florida、Influence of an endocrine disruptor BPA in dopamine-dependent rewarding effect and astrocytic activation, Kazuya Miyagawa, Minoru Narita, Mayumi Miyatake, Keisuke Mizuo, Mariko Tomita, and Tsutomu Suzuki

・第 14 回神経行動薬理若手研究者の集い
宮川和也、成田 年、宮竹真由美、水尾圭祐、富田真理子、鈴木 勉

・第 34 回日本神経精神薬理学会

2004 年 7 月 21 日～23 日、東京

BPA の胎児期および授乳期曝露による脳内報酬系に及ぼす影響

鈴木 勉、水尾圭祐、宮川和也、成田 年

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

特許取得

該当なし

実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

3. マウスのオペラント条件付けを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価

分担研究者 宮川 宗之 独立行政法人産業医学総合研究所 研究企画官

研究協力者 小林 健一 独立行政法人産業医学総合研究所 健康障害予防研究部

研究要旨 個体発生初期における EDCs 曝露が神経系高次機能（認知機能＝学習・記憶・注意）に及ぼす影響を、マウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB； Schedule-Controlled Operant Behavior）を用いて検証するためのプロトコルを確立し、BPA の影響評価へ適用することを目的とする。学習習得、短期記憶の保持、および状況に応じた行動の適切な制御に及ぼす化学物質の影響評価を目的に考案した「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」を使用する。本年度は、マウス（C57BL/6J）を用いて同スケジュール下での SCOB 訓練を実施し、変動タイムアウト条件下で適切な反応パターンの習得が可能なことを示した。また、陽性対照物質の候補としてメチマゾールを投与し、仔マウスの成長後に SCOB 訓練を実施して影響を調べたが、メチマゾール投与による明確な影響は認められなかった。

A. 研究目的

EDCs の次世代影響として、知能や行動特性（衝動性等）への有害作用が懸念されているが、ヒトでのデータ及び生物試験データともに明確な証拠は乏しい。実験動物を用いた神経行動毒性・発達神経毒性の評価では、スクリーニング試験の標準化は進みつつあるが、認知機能影響を評価するための確認試験として確立され、国際的テストガイドラインで使用が推奨されるような標準的方法はない。また、神経行動毒性・発達神経毒性の評価ではラットを用いることが多いが、内分泌かく乱作用を検討対象として作用メカニズムの検討に解析を進めることを考慮すると、遺伝子改変動物の使用等が可能となるマウスを用いた試験が重要となる。

以上を背景として、本研究ではマウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB）を指標とした次世代認知機能影響試験の適否を検討した。餌を報酬（食

餌強化）とした「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」を使用し、オペラント反応の獲得過程から学習習得に対する影響を評価する。タイムアウト時間をセッション内で変化させつつ FR での反応と DRO での反応の切替えの正確さを測定することで、短期記憶の保持曲線に相当するデータが得られる。これまでラット用に開発・使用してきたプロトコルおよびコンピュータプログラムをマウスに適用するため再検討し、「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」下で、マウスが適切な反応パターンを習得することが可能なことを示した。

はじめに、昨年度 FR スケジュールまで訓練を進めたマウスを用いて、タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュールによる訓練を最終段階（セッション内でタイムアウト時間を変化させるとともに薬理的負荷試験を実施）まで行った（実験 1）。マウスの学習成績を考慮しつつ、段階的・探索的に測定条件を変え

て訓練を進め、最終スケジュール下で適切な反応が習得されることを確認するとともに、スコポラミン、メタンフェタミン、ハロペリドールによる薬理的負荷試験を実施した。

次いで、別のマウスを用意し、最終スケジュールに向けた訓練進行方法を確定するため、再実験を行なった(実験2)。この実験では、二通りの条件でタイムアウト付交替型混合FR DROスケジュールを導入し、訓練結果を比較した。同時に、陽性対照物質の候補として、妊娠後期から授乳期まで(もしくは成熟期まで)、母親及び仔マウスに抗甲状腺薬メチマゾールを与え、成長後の仔マウスで行動測定を行なうことで、メチマゾール曝露による認知機能影響を検討した。

更に、BPA曝露の影響をみるため、妊娠・授乳期に混餌投与(0.33~33 ppm)を行ない、行動試験に供す被験体の準備を行なった(実験3)。

B. 研究方法

被験動物：実験に用いたマウスは、すべて温度 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ の清浄環境下で飼育され、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施された。マウスの飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

SCOBの測定では、食餌を報酬とするための、個体別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となる。昨年度の結果に基づき、給餌制限開始前の体重の85%体重(維持目標体重)を維持するよう調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。

本研究では、C57BL/6Jマウス(実験1では日本チャールス・リバー、実験2および3では日本クレア)を使用した。

実験1では、昨年度雄48匹を10週齢で購入し、11週齢から給餌制限を開始して13週齢からSCOB測定実験に使用したが、今年度も引き続き同一の被験体で測定を行なった。

実験2では、妊娠動物(GD5またはGD6)を購入し、雄性産仔を使用した。PND7で1腹8匹に調整した。成長後の13週齢から給餌制限を開始し、16週齢からSCOBの測定を行なった。

実験3では、妊娠動物を購入し(GD2、GD3またはGD5)、仔を得た。雄性仔の成長後にSCOBの測定に使用する予定である。

SCOB測定装置：マウスのスケジュール制御オペラント行動(SCOB)の測定には8台のマウス用オペラントチャンバー(MED Associates製)を使用した。パーソナルコンピュータ用の行動実験プログラム作成システム(MED Associates製)上で、一連の条件付け訓練に必要な(各種のSCOBに対応した)プログラムを作成し、これらを用いてチャンバーを制御するとともに、反応を記録した。各オペラントチャンバー内部の前面パネル中央には、ペレットディスペンサー(粒餌提示装置)に接続された餌皿が設置され、その左右には反応レバーが1基ずつ備えられているが、今回は右側のレバーのみを使用した。餌皿と両反応レバーの上部には、cue lightが1つずつ合計3個設置され、反対側の後面パネル上部中央には

house light 1 基が設置された。各チャンバーを防音箱 (MED Associates 製、換気ファン付でファンから実験中一定レベルのノイズを発生し外部騒音の影響を低減) 内に置き、さらに外部からの騒音等を低減するため、全ての装置を動物舎内の専用室に設置して実験を行った。マウス用オペラントチャンバーは幅×奥行×高さが 160×134×127 mm で cue light は黄色の LED 製、報酬の呈示を知らせる音刺激は 4500 Hz (75–80 dB に調整、持続 1 秒) を使用した。レバー押し反応には 2900 Hz の短音 (“ピッ” という音: ピップ音) を随伴させた。

SCOB の測定手続き: 食餌を報酬とした SCOB 測定のため、給餌量の調整・制限を行い体重が目標値付近で安定した後、レバー押し反応の条件づけ訓練を開始した。訓練は、1 日 1 セッションで週 5 日行い、実験終了まで継続した。レバー押し反応に随伴させて報酬となる粒餌を提示する (反応の強化) が、反応回数や反応間隔など一定の条件を設定し、その条件を満たした反応のみ強化を行う。この条件を強化スケジュールと呼ぶ。強化スケジュールを、1) 自動反応形成 (auto-shaping) スケジュール (7 セッション)、2) 定率強化 (fixed rate: FR) スケジュール (FR2×2 セッション、FR5×1 セッション、FR10×10 セッション) と順次変更して基礎的な訓練を実施し、その後、タイムアウト付交替型混合定率強化他反応分化強化 (alternating mixed FR 10 DRO 10sec with TO) スケジュールを導入した。毎回のセッションは、あらかじめ

規定した回数まで報酬が与えられるか規定の時間が経過することで終了とした (規定時間は自動反応形成訓練では 60 分、他はすべて 50 分に設定)。なお、報酬にはマウスでは 20 mg の粒餌 (Bio-Serv 社製オペラント条件付け用ペレット) を使用した。

一連の SCOB 条件付け学習訓練の初めの段階となる自動反応形成スケジュールでは、セッション中、被験動物がレバーを押す反応を自発した場合には、“ピー” という報酬呈示を予告する刺激音に引き続いて粒餌が餌皿上に一つ供された。セッション中 100 秒間反応が生じない場合は、レバー上部に設けられた cue light が 20 秒間点滅し、その後予告音に続いて粒餌が与えられた。セッション中 house light は常時点灯とした。合計 100 回反応が生じるか 100 個の粒餌が提示された時点で、規定の時間経過をまたずにセッション終了とした。

定率強化スケジュールによるセッションでは、FR 率にしたがって粒餌が与えられた。すなわち、FR2 では 2 回の反応毎に、FR5 では 5 回の反応毎に、FR10 では 10 回の反応毎に、報酬が提示された。合計 100 個の粒餌が提示されるか、50 分経過した時点でセッション終了とした。

最後に使用した交替型混合スケジュールは、定率強化 (FR) と他反応分化強化 (Differential Reinforcement of Other Behavior: DRO) の 2 種類のコンポーネントスケジュールとタイムアウト (TO) を含むもので、Fig. 1 に概要を示した。このスケジュールでは、10 回の反応完了時に報酬が与えられる定率強化 (FR10) と

10 秒間無反応で待機することで報酬が与えられる他反応分化強化 (DRO 10 sec) の 2 種類のコンポーネントスケジュールを、遅延時間となるタイムアウト (TO) を挟んで報酬提示 (強化) 毎に交替させた。タイムアウトの長さであるが、訓練の第 1 段階 (固定長タイムアウト条件・TO4 または TO8) では、タイムアウト時間を 4 秒または 8 秒に固定した。第 2 段階 (上昇系列タイムアウト条件・TOA) では、4 秒、8 秒、12 秒、16 秒、20 秒と、セッション内でタイムアウト時間を徐々に延長した。第 3 段階 (上下系列タイムアウト条件・TOC) では、4 秒から 20 秒の間で、セッション内で上下させた。過去に行なったラットの測定では、通常固定長タイムアウト条件、上昇系列タイムアウト条件、上下系列タイムアウト条件とも各 25 セッションの訓練を実施し、その後に薬理的負荷試験などを実施してきた。今回は、各段階に必要なセッション数を検討することを実験の目的の一つとした (実験 1)。また、実験 2 では、固定長タイムアウト条件による訓練で、タイムアウト長を 4 秒とする場合と 8 秒とする場合で、学習の進行状況を比較した。

毎回の実験セッションでは、Fig. 1 に示した様に、初めに FR コンポーネントがスタートし、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light が点灯する。この状態で被験体が反応レバーを 10 回押すと、粒餌 1 粒が餌皿上に与えられる (報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなつて、cue light は消灯し暗転する。規定の長さのタイムアウト後、DRO コンポーネ

ントとなり、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light が再び点灯する。DRO では、10 秒間無反応で経過すれば自動的に粒餌が与えられるが、反応があった場合にはタイマーがリセットされ、さらに 10 秒間の無反応が要求される。報酬提示後は再び暗転しタイムアウトとなる。タイムアウト終了後は、再び FR が始まる。なお、タイムアウト中に反応が生じた場合には、タイムアウト時間がリセットされ、規定長のタイムアウトがその時点から計り直されることとなる。タイムアウト中の反応にはピップ音を随伴させなかった。

このように FR であるか DRO であるかを示す弁別刺激が提示されない (どちらも同様に cue light が点灯) ため、スケジュール制御オペラント条件づけの用語では混合スケジュールという分類となる。ただし、FR か DRO を示す弁別刺激は提示されないものの、両スケジュールが強化毎に交代するので、どちらのスケジュールにしたがって前回報酬が与えられたかが手がかりとなり、これにしたがって被験体は適切な反応パターンを選択することが可能である。一種の遅延交替反応課題となり、記憶の評価に使用可能と考えられる。ラットおよびマウスで実験した際の様子 (反応中及び待機中で、通常と異なり防音箱の扉をあけてストロボで撮影したもの) を Fig. 2 に示した。このスケジュールでは、FR-TO-DRO-TO を 1 サイクルとして合計 51 サイクル 102 回の報酬提示が行われるか、50 分間経過した時点でセッションを終了した。

SCOBにおける反応の指標：各スケジュール下での被験体の反応習得過程と、それに対して化学物質曝露が及ぼす影響を解析するための指標には、主として反応率（1分間当りのレバー押し反応頻度）を用いた。また、タイムアウト付交替型混合スケジュールに関しては、FRとDROで各タイムアウト後の初発反応の潜時を求め、これらの潜時から両コンポーネントにおける反応切替えの正確さを示す指標「Accuracy」と全般的な反応性の指標「Bias」も算出した。すなわち、FRではコンポーネント開始から10秒以内に反応があれば「HIT」とし、なければ「MISS」としてカウントし、「HIT」となる確率（P [HIT]）を計算するとともに、DROではコンポーネント開始から10秒経過する前に反応があった場合に「FA (false alarm)」とし、無反応で10秒経過すれば「CR (correct rejection)」とカウントして、「FA」となる確率（P [FA]）を計算した。その後、次式によって、「Accuracy」と「Bias」を求めた。

$$\text{Accuracy} = P [\text{HIT}] - P [\text{FA}]$$

$$\text{Bias} = P [\text{HIT}] + P [\text{FA}] - 1$$

両指標とも、-1から+1の範囲で変化する。両指標の計算は、被験体が反応を停止したり時間制限によりセッションが終了したりした場合以外は、各セッション最初の1サイクルを除き、原則として合計50サイクルの測定結果に基づいて行った。したがって、TO長毎に10回のFRとDROでの初発反応潜時が得られた。

ラットでは条件づけ訓練の進行によっ

て、FRでは各タイムアウト終了後数秒以内に高頻度でレバーを押し反応を示すようになり、またDROでは殆どレバー押し反応を抑制し10秒間待機するようになり、それぞれ高率で「HIT」あるいは「CR」に分類される反応パターンが得られるようになることを、これまでの研究で明らかにしている。このAccuracyは、FRとDROそれぞれに適応したパターンで適切な反応が生じたかどうかを示すものとなる。セッション内でタイムアウト時間を変化させ、タイムアウト時間に対してAccuracyをプロットすると、遅延時間（タイムアウト長）と反応切替えの正確さの関係を示す曲線が得られる。被験体には、タイムアウトを挟んで適切に反応パターンを交替させること、すなわち遅延時間後に前回と異なる反応パターンを選択することが求められており、遅延時間の間は前回FRであったかDROであったか（あるいは次にどちらの反応パターンを選択すれば良いか）を記憶しておくことが求められる。したがって、タイムアウト長に対してAccuracyをプロットしたものは、一種の短期記憶の保持曲線と考えられるものとなる。一方、BiasはFRとDROを通じて、各タイムアウト終了後10秒以内にレバー押し反応が生じた割合に対応するもので、「反応性」の全般的な指標となり、反応の適切な制御・抑制に対する影響を評価するための指標となる。マウスでも同様の反応パターンが得られることが今回示された。

実験デザイン：

実験1ではタイムアウト付交替型混合スケジュールによる訓練各段階をどの

程度実施すれば適切な反応パターンが得られるか、適宜訓練回数を修正し実験を進めるとともに、タイムアウト時の照明（house light は常時点灯としていたものを、完全な暗転に修正）を FR/DRO と TO の差を強調するよう修正し、その影響を検討した（被験体数 44 匹）。タイムアウト長を上下させる最終段階では薬理的負荷試験を行なった（被験体数 15 匹）。

実験 2 では、第 1 段階の訓練（固定長タイムアウト）におけるタイムアウト時間の違いによる 2 条件（4 秒とする TO4 条件と 8 秒とする TO8 条件）と、メチマゾールの飲水投与（濃度 0.05%）の違いによる 3 条件（投与なし、短期間飲水投与-GD15 から離乳まで-、長期間飲水投与-GD15 から 12 週齢まで-）の組み合わせで、6 条件のグループ（1 腹あたり雄性仔ラット 1 匹を使用、事故による死亡個体などあり各群 4-6 匹で構成）を設定し、学習訓練に対する影響を検討した。

実験 3 では、GD 6 から PND21 まで BPA の混餌投与を実施した。通常の飼料に BPA（測定用標準品・純度 99.8% を使用）を混入し、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm、33 ppm の濃度の 4 群を設けた。各群 12 匹の母ラットから各腹 1 匹の雄性仔を選び、次年度に行動測定に使用する予定である。

以上、全ての実験は「独立行政法人産業医学総合研究所動物実験に関する指針」にしたがって実施された。

C. 研究結果

実験 1（タイムアウト付交替型混合

FR DRO スケジュール下での反応の習得と薬理的負荷試験）：昨年度実施した FR スケジュールでの訓練に続いて、同一の被験体を使用し、タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュールで訓練を実施した。第 1 段階では固定長タイムアウトは 4 秒とした。

ラットでの経験から 25 セッションで第 2 段階の変動タイムアウト条件に進んだが、タイムアウト終了時の反応切替えが適切にできない個体が多くみられた。マウス用オペラントチャンバーでは、以前使用していたラット用のものに比べて、左右の反応レバーおよび粒餌呈示皿上部に設置された cue light が小さい。タイムアウト終了後の反応潜時の詳細分析から、cue light の特性からタイムアウト時と FR/DRO 時の区別がつきにくいのではないかと推定されたため、第 3 段階（タイムアウト長を上下に変動させる訓練最終段階）途中でタイムアウト時も点灯としていた house light を消灯し FR/DRO の開始を強調したところ成績が向上した。以後の実験はすべてこの条件で実施することとした。Fig. 3-1~3-3 に、薬理的負荷試験で得られた Delay-Accuracy および Delay-Bias 曲線を示した。横軸はタイムアウト長、縦軸は反応切替の正確さの指標（accuracy）または反応性（bias）の指標である。短期記憶の保持曲線に相当する Delay-Accuracy 曲線を見ると、ベースライン（生理食塩水）投与では遅延時間（タイムアウト時間）が短い場合は 0.8 近い accuracy 値となり、また遅延時間 20 秒で 0.3 程度まで低下する様子が示されている。一方、bias についてみると、4

秒では0近くであるのが20秒に向けて徐々に上昇しており、accuracyの低下がbiasの上昇に対応したものとなった。スコポラミン、メタンフェタミン、ハロペリドールの急性投与に対する応答をみるため、accuracy、bias、FR反応率、DRO反応率を、各薬物の投与用量に対してプロットした(Fig.4-1~4-3)。それぞれ、数回の生理食塩水投与時の値と、投与時(スコポラミンについては末梢影響のコントロールとしてメチルスコポラミン投与も実施)の結果である。FR反応率ではいずれの薬物でも用量依存的な減少が示された。一方、DRO反応率はスコポラミンのみ上昇が認められ、メタンフェタミンでは変化がなく、またハロペリドールでは減少が示された。biasの変化は、FRやDROでの反応率の変化に連動する場合としない場合があり、これらの指標の変化の組み合わせから、薬物効果を分類することが可能であることが示された。

実験2(タイムアウト付交替型混合スケジュール訓練初期の固定長タイムアウト時間の検討と抗甲状腺薬メチマゾールの影響):メチマゾール投与はGD15から開始した。SCOB測定では食餌を報酬とするため、給餌制限による体重統制を行なう。統制前の体重に差があつては学習成績の比較が困難となる。したがって、体重差のない範囲で投与条件を選び、短期投与群では離乳までの投与、長期投与群では12週齢時までの投与としたが、行動測定に使用したマウスの体重の推移はFig.5-1に示したように、長期投与群で若干の体重増加の遅延が認められたものの、最終的には概ね10%以内の

平均体重差となった。離乳前の母マウスおよび離乳後の仔マウスの飲水量はFig.5-2とFig.5-3に示したようになった。離乳後もメチマゾールを含む飲料水を与えられた長期投与群では飲水量が少ない時期があり、体重差が大きかった時期に一致している。行動測定に使用しないマウスで24週齢時に脳重量を測定したところ、対照群(n=5)では $0.511 \text{ g} \pm 0.005 \text{ g}$ 、短期投与群(n=6)では $0.509 \text{ g} \pm 0.010 \text{ g}$ 、長期投与群(n=10)では $0.511 \text{ g} \pm 0.015 \text{ g}$ となり差は認められなかった。

SCOB訓練開始時の自動反応形成スケジュールでの訓練の結果をFig.6に示した。また、次いで実施したFRスケジュールでの訓練(セッション1-2:FR2、セッション3:FR5、セッション4-13:FR10)の結果をFig.7に示した。FR10となつてからメチマゾール長期投与群で若干反応率が低くなったもののいずれの群もレバー押し反応の習得、FRスケジュールに応じた反応率の上昇が示された。

交替型混合FR10DRO10sスケジュール導入後の訓練の進行結果はFigs.8~10に示した。Fig.8はタイムアウト時間を固定した第1段階の訓練25セッションの結果、Fig.9はタイムアウト時間をセッション内で段階的に上昇させる第2段階の訓練40セッションの結果、Fig.10はタイムアウト時間をセッション内で上下に変動させる第3段階の訓練55セッションの結果である。主要な4行動指標(Accuracy、Bias、FR反応率、DRO反応率)の変化を、5訓練セッションを1ブロックとした横軸に対してプロットしてある。各図とも、左側は訓練第1段階の

タイムアウト時間を4秒とした4秒群、右側は同タイムアウト時間を8秒とした8秒群の結果である。全体に4秒群においてメチマゾール投与条件による群間の差が大きくなる傾向が認められた。しかし、メチマゾールによる明らかな反応習得の遅れは認められず（反復測定分散分析の結果、メチマゾールの影響は4秒群第3段階 Bias でのみ有意）、最終的には群間の差はなくなっている。

訓練第3段階 11 ブロック目における測定結果から、タイムアウト時間に対して Accuracy および Bias をプロットすると、Fig. 11 に示した Delay-Accuracy および Delay-Bias 曲線が得られた。短期記憶の保持曲線に相当する Delay-Accuracy 曲線についてみると、最も短い4秒の遅延（タイムアウト）時間では、Accuracy 値は約 0.8 程度となっており、遅延時間に応じて減少し、20 秒の遅延条件では約 0.2 程度となった。反対に、Bias 値は遅延時間に応じて上昇を示した。実験1で得られた結果と同様であった。

タイムアウト中の反応数を調べた結果は Fig. 12 に示した。訓練第1段階では固定長タイムアウト4秒条件では殆どタイムアウト中の反応は認められないが、8秒条件や、訓練第2段階、第3段階では、訓練の進行に伴いタイムアウト中の反応数が減少することが示されている。

実験3（妊娠・授乳期 BPA 曝露の影響評価）、GD6 から PND21 まで BPA の混餌投与を実施し、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm、33 ppm の濃度の4群で、各群12匹以上の母ラットから行動測定に使用する雄性仔を得た。行動測定は来年度実施

予定である。

D. 考察

実験1の結果はマウスがタイムアウト付交替型混合 FR10 DRO10s スケジュールで、基本的にラットと同様、それぞれのスケジュールコンポーネント（FR および DRO）で要求される適切な反応パターンを習得し得ることが示された。

当初は、ラットの場合と同様にタイムアウト時にも house light を常時点灯する条件で訓練を実施していたが、house light の使用をやめ、タイムアウトを完全な消灯とすることで成績の向上がみられた。ラットとマウスの行動を比較する場合は、cue light の明るさが異なるなど、使用する装置の特性も異なるため直接の比較は困難である。報酬として使用した粒餌のサイズ(体重比)も異なり、マウスにとっては短時間で摂取することが困難であることから、短いタイムアウト時の成績低下（タイムアウト終了後、反応開始までの潜時が延長し、Accuracy や Bias に影響するため）が心配された。測定された Delay-Accuracy 曲線からは、マウスの場合遅延時間が長い場合の成績（反応切替の正確さ）が悪く、短いタイムアウト時に心配された摂食時間による影響は認められなかった。ラットでは訓練が進行すると Delay-Accuracy 曲線はフラットとなる場合が多かった（系統にもよる）が、マウスでは遅延時間となるタイムアウト時間に応じて Accuracy が低下し、Bias が上昇する傾向が明確であった。

実験条件を適宜変更した探索的な測定であったが、交替型混合スケジュールで

の訓練各段階では、ラットと比較して3割程度多くの訓練セッション数を要することが示された。

また、薬理的負荷試験の結果、基本的にはラットと同様の量-影響曲線が得られることが示された。

実験2では、タイムアウト長を固定する交替型FR DROスケジュール訓練第1段階で、使用するタイムアウト時間を4秒と8秒として成績を比較したが、学習の進行に対する大きな差異は認められなかった。タイムアウト長を変動させる条件に訓練が進んだ際に、「8秒群」の方がDelay-Accuracy曲線において、もっとも短いタイムアウト4秒に対応したAccuracyの値が「4秒群」より高くなる傾向が認められたが、最終的には殆ど同様のDelay-Accuracy曲線となった。差は少ないが、タイムアウト中の反応数のデータなどから、今後は8秒条件で訓練するのが適切と考えられた。BPAの影響評価を行なう実験3では、8秒条件を採用する予定である。また、実験1の結果から実験2では交替型混合スケジュールでの各段階の訓練セッション数をラットの場合よりも増やしたが、今回の条件の訓練で適切な反応が習得されると考えられた。実験1と同様、Delay-Accuracy曲線は遅延時間に応じた低下を示す右下がりのものとなり、マウスでは長い遅延時間での適切な反応の切替えがラットと比較して困難であることが確認された。なお、タイムアウト中の反応は、訓練の進行とともに減少するものの、ラット（データ未掲載）と比較して多いことが今回の実験で判明した。

今回の実験では、抗甲状腺薬メチマゾールの影響は全体的に明確ではなかった。メチマゾールの影響はタイムアウト中の反応にも認められなかった。PCBなどの次世代影響のメカニズムとして、PCBが甲状腺ホルモン系に作用し、神経系の発生・発達や成長後の機能に影響するのではないかといった懸念が示されているが、陽性対照とすることを期待したメチマゾール投与によって今回明確な影響を示すことはできなかった。体重にほとんど変化の認められない範囲の用量で実験を実施したが、明確な陽性対照を得るためには、用量を増やすことが必要と考えられる。一方、用量を増やせば一般的な成長阻害・体重減が生じ、二次的影響に加えて、食餌強化のための給餌制限との関係等も考慮しなくてはならない。認知機能評価のための生物試験で適切な陽性対照を求めることに今後も取り組む必要がある。

E. 結論

本年度はマウスを使用してタイムアウト付交替型混合スケジュールを用いたSCOBの測定を行ない、タイムアウト時間を変化させて短期記憶の保持曲線の相当するDelay-Accuracy曲線を求めるまでマウスを訓練することが可能なことを示した。今回の測定方法は標準的なプロトコルとして使用可能と考えられ、次年度に実施予定のBPAの影響評価のための測定手続きを確立した。しかし、陽性対照物質の候補として用いたメチマゾールについては、明確な影響を示すことはできなかった。可能であれば、他の陽性対

照候補について実験を実施したい。
(謝辞：本研究遂行にあたって村瀬正、
日吉沙千代両氏から多大な技術的支援を
受けた。)

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Thyroid Status in F1 Rat Offspring. *Industrial Health*, 43:685-690. (2005)
- 2) Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa and Junzo Saegusa. Comparative Investigation of Several Sperm analysis Methods for Evaluation of Spermatotoxicity of Industrial Chemical: 2-Bromopropane as an Example. *Industrial Health* 42: 219-225. (2004)
- 3) Takeshi Honma, Megumi Suda, Muneyuki Miyagawa. Inhalation of 1-Bromopropane Causes Excitation in the Central Nervous System of Male F344 Rats. *Neurotoxicology* 2: 563-575. (2003)
- 4) Sumiko Watanabe, Rui-Sheng Wang, Muneyuki Miyagawa, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma.

Imbalance of Testosterone Level in Male Offspring Rats Perinatally Exposed to Bisphenol A. *Industrial Health* 41: 338-341. (2003)

2. 学会発表

- 1) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Postnatal development in rat offspring following in utero and lactational exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. 42th Congress of european societies of toxicology EUROTOX 2005, *Toxicol Letters* 158, S130. (2005)
- 2) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Somatic growth and physical development in rat offspring with gestational and lactational exposure to DEHP. 第52回日本実験動物学会 *Exp Anim* 54, 277. (2005)
- 3) 小林健一、宮川宗之、王 瑞生、須田 恵、本間健資. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の経母体曝露がラット産仔の成長発達におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、*産業衛生学雑誌* 47(Suppl) 605. (2005)
- 4) 王 瑞生、宮川宗之、小林健一、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出

- 生前曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 607. (2005)
- 5) 須田 恵、本間健資、宮川宗之、小林健一、王 瑞生. PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5' hexachlorobiphenyl) 出生前ばく露がラットの脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 685. (2005)
 - 6) 宮川宗之、小林健一、王 瑞生、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの学習行動に及ぼす影響 (2). 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 686. (2005)
 - 7) 本間健資、須田 恵、宮川宗之、小林健一、王 瑞生. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体ばく露 (妊娠期・授乳期) がラット脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 687. (2005)
 - 8) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Neurochemical Changes in the Brain of Offspring Rats following Maternal Exposure to PCB 153. Society of Toxicology (SOT), Toxicologist p.221. (2005)
 - 9) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) が成長後のラットの条件付け学習に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p343. (2004)
 - 10) 本間健資, 須田恵, 宮川宗之, 王瑞生, 小林健一, 関口総一郎. PCB 経母体ばく露とラット脳内神経伝達物質. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p356. (2004)
 - 11) 王瑞生、宮川宗之、小林健一、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシルの経母体曝露が成熟後の雄仔ラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集, p277. (2004)
 - 12) 宮川宗之. 化学品の分類・表示に関する世界調和システム(GHS); 健康影響及び環境影響に基づいた化学物質及び混合物の分類基準について. 免疫毒性・アレルギー学会シンポジウム1 (アレルギー性化学物質に抗する国際予防体系を構築する) 日本職業・環境アレルギー学会雑誌 12(1) : 31. (2004)
 - 13) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) がラットの発生内分泌系におよぼす影響. 日本内分泌攪乱

- 化学物質学会（環境ホルモン学会）会第7回研究発表会，要旨集 p281. (2004)
- 14) 小林健一，宮川宗之，王瑞生，須田恵，関口総一郎，本間健資. PCB153の母ラットへの曝露が産仔の脳下垂体-甲状腺軸におよぼす影響. 日本薬学会第124回年会，要旨集 p191. (2004)
- 15) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on postnatal development and thyroid status in rat offspring. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 465. (2004)
- 16) Rui-Sheng Wang, Muneyuki Miyagawa, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Takeshi Honma. Effect of prenatal and neonatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate on the metabolism of testosterone in rat. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 425. (2004)
- 17) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露（妊娠期・授乳期）がラットのスケジュール制御オペラント行動 (SCOB) に及ぼす影響. 第77回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 393. (2004)
- 18) 小林健一，宮川宗之，王瑞生，須田恵，本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露（妊娠期・授乳期）が仔ラットの発生におよぼす影響. 第77回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 393. (2004)
- 19) 王瑞生，宮川宗之、小林健一、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシルの経母体曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第77回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 394. (2004)
- 20) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi, Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to PCB 153 on the Brain Neurotransmitters of Offspring Rats. 43rd Annual Meeting & ToxexpoTM, Society of Toxicology (SOT), Baltimore, Program p175. (2004)
- 21) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of prenatal exposure to 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) on somatic growth and thyroid status in male rat offspring. International Congress of Toxicology (ICT 10), Toxicol Appl Pharmacol 197: 230. (2004)
- 22) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、関口総一郎、渡部すみ子、本間健資. PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-

- hexachlorobiphenyl) 出生前曝露が成長後のラットの認知・行動に及ぼす影響. 第76回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 45(Suppl.): 623. (2003)
- 23) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 渡部すみ子, 本間健資. PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl) 出生前曝露がラットの体成長及び甲状腺に及ぼす影響. 第76回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 45(Suppl.): 622. (2003)
- 24) 王瑞生, 渡部すみ子, 宮川宗之, 小林健一, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. 性ホルモン代謝に及ぼすノンプラナー型ポリ塩化ビフェニール曝露の影響. 第76回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 45(Suppl.): 624. (2003)
- 25) 本間健資, 須田恵, 王瑞生, 宮川宗之. 化学物質の複合曝露における影響評価. 第76回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 45(Suppl.): 653. (2003)
- 26) 城内博, 宮川宗之. 化学物質の分類と表示に関する国際調和 (GHS). 第76回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 45(Suppl.), 711. (2003)
- 27) 宮川宗之. 認知機能影響試験としての SCOB (Schedule-Controlled Operant Behavior); タイムアウト付交替型混合スケジュールによる短期記憶の測定と次世代影響測定への応用. 第15回産業神経・行動学研究会・神経行動毒性研究会研究交流会, 要旨集 p15-16. (2003)
- 28) 宮川宗之, 王瑞生, 小林健一, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. ラットの Schedule-Controlled Operant Behavior (SCOB)を用いた PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl) 出生前曝露の認知・行動影響評価. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, J Toxicol Sci 28(4), 317. (2003)
- 29) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 渡部すみ子, 本間健資. ラットにおけるノンプラナー型 PCB の出生前曝露が産仔の体成長および甲状腺におよぼす影響. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, J Toxicol Sci 28(4), 322. (2003)
- 30) 王瑞生, 渡部すみ子, 宮川宗之, 小林健一, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第30回日本トキシコロジー学会学術年会, J Toxicol Sci 28(4), 336. (2003)
- 31) 宮川宗之, 小林健一, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5'-Hexachlorobiphenyl) 出生前曝露がラットの Schedule-Controlled Operant Behavior (SCOB) に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第6回研究発表会, 要旨集 p317. (2003)
- 32) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須

- 田恵, 関口総一郎, 本間健資.
フタル酸ジ2-エチルヘキシル
(DEHP) の妊娠期および授乳期曝
露が仔ラットの発生におよぼす影
響. 日本内分泌攪乱化学物質学会
(環境ホルモン学会) 第6回研究
発表会, 要旨集 p 356. (2003)
- 33) 本間健資, 須田恵, 宮川宗之, 王
瑞生, 小林健一, 関口総一郎. 出
生前後におけるビスフェノール A
ばく露とラット脳内神経伝達物質.
日本内分泌攪乱化学物質学会(環
境ホルモン学会) 第6回研究発表
会, 要旨集 p357. (2003)
- 34) 王瑞生, 渡部すみ子, 宮川宗之,
小林健一, 須田恵, 関口総一郎,
本間健資. PCB153 出生前曝露に
よるラットの性ホルモン代謝への
影響とそのメカニズム. 日本内分
泌攪乱化学物質学会(環境ホルモ
ン学会) 第6回研究発表会, 要旨
集 p370. (2003)
- 35) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須
田恵, 関口総一郎, 本間健資. ビ
スフェノール A の母親ラットへの
投与が産仔の脳下垂体-甲状腺系に
およぼす影響. 第50回実験動物学
会, 要旨集 p170. (2003)
- 36) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa,
Megumi Suda, Rui-Sheng Wang,
Kenichi Kobayashi, Soichiro
Sekiguchi Effects of perinatal
exposure to bisphenol A on the brain
monoamine contents of rats. The 9th
Meeting of the International
Neurotoxicology Association (INA-9),
Book of Abstracts, p53. (2003)
- 37) Kenichi Kobayashi, Muneyuki
Miyagawa, Rui-Sheng Wang,
Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi,
Takeshi Honma Pituitary-thyroid axis
in the postnatal rat offspring
following gestational and lactational
exposure to bisphenol A. 41th
Congress of the European Sociences
of Toxicology, Toxicology Letters
144, s175-176. (2003)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし