

Table 3-2. -continued External differentiations of female offspring(F1) during growth period
 --- Opening of vagina ---

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg	Opening of vagina			(Unit:%)
	41	42	43	
00 control	N 10 Mean 96.7	N 10 Mean 100.0	N 10 Mean 100.0	10 100.0
01 DES 0.2	N 10 Mean 98.3	N 10 Mean 100.0	N 10 Mean 100.0	10 100.0
02 DES 2	N 10 Mean 95.0	N 10 Mean 95.0	N 10 Mean 100.0	10 100.0
03 DES 20	N 9 Mean 100.0	N 9 Mean 100.0	N 9 Mean 100.0	9 100.0

DES: Diethylstilbestrol

Table 4-1. Absolute and relative organ weight of male animals (F1)

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg		Body weight (g)	Brain (g)	Pituitary (mg)	Thyroid gland (mg)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)
00	N	25	26	25	25	26	26	26
	Mean	873.1	2.35	18	33	25.57	4.40	56
	S.D.	81.4	0.49	3	6	6.72	1.00	13
01	N	21	21	21	21	21	21	21
	Mean	854.7	2.40	18	31	25.31	4.45	59
	S.D.	113.0	0.12	6	6	4.46	0.48	11
02	N	21	21	21	21	21	21	21
	Mean	891.3	2.84	23	34	27.79	4.88	57
	S.D.	119.8	2.03	22	9	6.04	0.89	11
03	N	19	19	19	19	19	19	19
	Mean	879.7	2.99	17	36	26.28	4.75	63
	S.D.	95.1	2.71	4	8	3.20	0.52	15

DES: Diethylstilbestrol
 (%): (Organ weight/body weight) × 100

Table 4-1. -continued Absolute and relative organ weight of male animals (F1)

Exp.No. A411 (079-399)

Group-No. Dose ng/kg	N	Testes (g)	(g%)	Epididymides (mg)	(mg%)	Seminal vesicle (mg)	(mg%)	Prostate (mg)	(mg%)	Levator ani and bulbo cavernous muscles (g)	(g%)
00 control	25	3.86	0.44	1372	159	243	25	508	58	1.41	0.16
	Mean	0.37	0.04	138	22	48	214	23	0.16	0.03	
01 DES	21	3.83	0.45	1315	155	218	21	500	60	1.25	0.15
	Mean	0.46	0.05	123	17	34	125	19	0.18	0.03	
02 DES	21	3.87	0.44	1382	157	217	21	540	61	1.27	0.14
	Mean	0.37	0.06	124	21	41	223	22	0.22	0.03	
03 DES	19	3.71	0.43	1325	152	229	19	502	58	1.27	0.15
	Mean	0.32	0.05	138	21	42	179	22	0.14	0.03	

DES: Diethylstilbestrol significantly different from 00 group * P ≤ 0.05, ** P ≤ 0.01 (Dunnett) (%) : (Organ weight/body weight) × 100

Table 4-2. Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 3 months

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg		Body weight (g)	Brain (g)	(g%)	Pituitary (mg)	(mg%)	Thyroid gland (mg)	(mg%)	Liver (g)	(g%)	Kidneys (g)	(g%)	Adrenals (mg)	(mg%)
00 control	N	19	19		19		19		19		19		19	
	Mean	295.6	2.04	0.70	14	5	18	6	9.72	3.28	1.89	0.64	67	23
	S.D.	25.8	0.09	0.06	3	1	2	1	1.39	0.23	0.19	0.04	12	4
01 DES	N	17	17		17		17		17		17		17	
	Mean	303.0	2.03	0.68	14	5	19	6	10.27	3.38	1.91	0.64	65	22
	S.D.	42.0	0.09	0.07	3	1	3	1	2.23	0.54	0.30	0.09	16	5
02 DES	N	18	18		18		18		18		18		18	
	Mean	309.7	2.02	0.66	15	5	20	6	10.13	3.27	2.02	0.65	64	21
	S.D.	27.3	0.09	0.06	3	1	5	1	1.03	0.16	0.26	0.08	12	4
03 DES	N	17	17		17		17		17		17		17	
	Mean	302.8	2.00	0.67	15	5	20	7	10.23	3.38	2.03	0.67	62	21
	S.D.	27.2	0.10	0.05	2	1	5	1	1.04	0.17	0.18	0.03	9	3

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) × 100

Table 4-2. -continued Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 3 months Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg		Ovaries (mg)	(mg%)	Uterus (mg)	(blotted) (mg%)
00 control	N	19	25.8	19	192.1
	Mean	76.1	4.1	566.0	21.1
	S.D.	13.1		66.7	
01 DES	N	17	25.2	17	182.7
	Mean	76.0	3.4	544.7	31.7
	S.D.	12.1		65.0	
02 DES	N	18	25.2	18	192.1
	Mean	77.6	4.0	592.4	19.1
	S.D.	10.8		55.2	
03 DES	N	17	26.6	17	190.9
	Mean	80.1	6.0	576.9	21.7
	S.D.	17.6		73.7	

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) × 100

Table 4-3. Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 7 months

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg	N	Body weight (g)	Brain (g)	Pituitary (mg)	Thyroid gland (mg)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)
00 control	16	370.3	2.13	16	16	16	16	16
	Mean	26.2	0.08	20	26	10.81	2.92	65
				4	6	1.20	0.20	8
01 DES	16	365.3	2.14	16	16	16	16	16
	Mean	59.9	0.06	21	26	10.70	2.93	65
				6	6	1.73	0.20	11
02 DES	15	386.9	2.15	15	15	15	15	15
	Mean	51.9	0.05	22	26	11.73	3.03	67
				7	6	1.73	0.21	10
03 DES	12	355.2	2.09	12	12	12	12	12
	Mean	40.7	0.11	21	24	10.89	3.08	65
				5	6	1.39	0.27	9

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) × 100

Table 4-3. -continued Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 7 months

Group-No. Dose ng/kg		Ovaries (mg)	Ovaries (mg%)	Uterus (mg)	Uterus (blotted) (mg%)
00 control	N	16		16	
	Mean	80.9	21.9	605.8	164.8
	S.D.	9.6	2.4	120.8	36.8
01 DES	N	16		16	
	Mean	73.1	20.2	602.5	167.0
	S.D.	18.5	4.4	128.9	35.2
02 DES	N	15		15	
	Mean	75.5	19.7	610.2	159.4
	S.D.	20.7	5.7	133.1	33.2
03 DES	N	12		12	
	Mean	70.3	20.2	586.5	166.1
	S.D.	14.3	5.6	100.4	29.7

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) X 100

Table 4-4. Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 12 months

Exp.No. A411(079-399)

Group-No. Dose ng/kg		Body weight (g)	Brain (g)	Pituitary (mg)	Thyroid gland (mg)	Liver (g)	Kidneys (g)	Adrenals (mg)
00 control	N	19	19	19	19	19	19	19
	Mean	435.8	2.77	24	22	12.18	2.80	80
	S.D.	52.3	2.74	6	6	1.44	0.19	33
01 DES	N	19	19	19	19	19	19	19
	Mean	448.9	2.15	30	22	12.54	2.80	66
	S.D.	66.1	0.09	10	5	1.93	0.24	15
02 DES	N	19	19	19	19	19	19	19
	Mean	446.5	2.09	24	24	12.65	2.87	68
	S.D.	80.9	0.12	10	8	1.96	0.37	15
03 DES	N	18	18	18	18	18	18	18
	Mean	434.5	2.13	32	28	12.82	2.97	71
	S.D.	68.7	0.09	17	10	1.72	0.27	15

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) X 100

Table 4-4. -continued Absolute and relative organ weight of female animals(F1) at the age of 12 months

Group-No. Dose ng/kg	Ovaries (mg)	Ovaries (mg%)	Uterus (mg)	Uterus (blotted) (mg%)
00 control	N	19	19	
	Mean	55.4	795.4	186.1
	S.D.	23.3	195.9	51.6
01 DES	N	19	19	
	Mean	62.2	677.5	154.1
	S.D.	21.5	167.0	42.7
02 DES	N	19	19	
	Mean	64.3	660.9	158.0
	S.D.	28.2	214.3	81.3
03 DES	N	18	18	
	Mean	61.1	820.9	193.8
	S.D.	20.9	195.1	59.3

DES: Diethylstilbestrol
(%): (Organ weight/body weight) X 100

【恒常性維持メカニズムの揺らぎに着目した新評価手法開発研究】

1) 神経・行動

2. 胎児期および授乳期慢性の bisphenol-A 曝露による中枢神経系の発達に及ぼす影響

研究分担者 鈴木 勉 星薬科大学・薬品毒性学教室 教授

共同研究者 成田 年 星薬科大学・薬品毒性学教室 準教授

研究要旨

研究者らはこれまでの研究で、内分泌かく乱物質の一つである bisphenol-A (BPA)を胎児期および授乳期に曝露された次世代マウスにおいて、記憶保持能力の低下および choline 作動性神経系の機能低下が引き起こされることを明らかにしている。さらには極めて低用量の BPA が、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を引き起こし、グリア細胞共存下において神経の機能亢進をも引き起こすことを見いだしている。そこで、本研究では、BPA 曝露による、海馬領域におけるグリア細胞の発現ならびに神経新生に対する影響について検討を行った。その結果、胎児期および授乳期の BPA 慢性曝露により、海馬における glial fibrillary acidic protein (GFAP) 陽性アストロサイト免疫活性の著明な増強が認められた。また、高用量 BPA 慢性曝露により doublecortin (DCX) ならびに NeuroD 免疫活性の著明な減弱が認められた。さらに、BPA を神経幹細胞に処置することにより、アストロサイトへの分化誘導が促進されることを確認した。また近年、遺伝子の塩基配列の変化を伴わない遺伝子の発現異常、すなわちエピジェネティックな変化が注目を集めている。その中で、クロマチンの活性を調節するヒストンアセチル化は遺伝子発現の変化に重要な役割を果たすと考えられており、ヒストンアセチル化レベルを調節するヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) の発現変化は遺伝子発現異常の多くに関与すると考えられる。そこで BPA の胎児期および授乳期曝露による HDAC の発現に及ぼす影響について検討した。BPA の胎児期および授乳期曝露による成体期の HDAC mRNA 発現量の変化について検討を行った結果、BPA 曝露により HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 mRNA に大きな変化は認められなかった。一方、胎児期における遺伝子発現異常が引き起こされている可能性を考え、HDAC mRNA の胎児期における発現量を検討したところ、胎児期の BPA 曝露により、HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 mRNA 量の有意な減少が認められた。以上の結果から、BPA の慢性曝露により胎児期における HDAC 発現異常が成体期における変化を引き起こす可能性が示唆された。

A. 研究目的

BPA を始めとする内分泌かく乱化学物質は内分泌系のみならず、神経系にも作用することが懸念されており、様々な検討がなされている。生体は、内分泌系、神経系、免疫系が相互に作用することにより恒常性を保っており、BPA の慢性曝露による中枢神経系にも影響を及ぼしている可能性が考えられる。そこで本研究では、BPA の胎児期および授乳期曝露による次世代の中枢神経系に及ぼす影響を

検討する。さらには、神経細胞の保護作用だけでなく、神経細胞に対して積極的な機能制御を行っているグリア細胞にも着目し、その変化を形態学的に解析することで、神経-グリア間の相互作用に及ぼす BPA 慢性曝露の影響についても合わせて検討する。

B. 研究方法

使用動物および bisphenol-A の慢性曝露

実験には C57BL/6J 系雄性および雌性マウス

を使用した。BPA の慢性曝露は薬物混入飼料法に従い、BPA を胎児期および授乳期に曝露し、離乳後は通常飼料にて飼育した。なお、本研究は関連法規および星薬科大学動物実験指針に従い、Refinement、Replacement、Reduction の 3R 原則に基づいて遂行した。

免疫組織化学染色法

海馬領域を含む凍結脳切片をそれぞれ作成し、GFAP、DCX および NeuroD に対する特異的抗体を用いて免疫染色法に従い検討した。

神経幹細胞における免疫組織化学的染色法

神経幹細胞の分化誘導実験は、DMEM あるいは DMEM に BPA を添加した培地にて 7 日間培養することにより行った。アストロサイトへの分化誘導の同定は、GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的染色法に従い行った。

Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

マウスの全脳より抽出した total RNA を用い、RT-PCR 法に従って HDAC1,2,3,4,5,6,7,9 mRNA 発現レベルを検討した。

C. 研究結果

1. 胎児期および授乳期の BPA 慢性曝露により、海馬における GFAP 陽性アストロサイト免疫活性の著明な増強が認められた。また、高用量 BPA 慢性曝露により DCX ならびに NeuroD 免疫活性の著明な減弱が認められた。
2. BPA を神経幹細胞に処置することにより、アストロサイトへの分化誘導が促進された。
3. BPA 慢性曝露により、成体期における HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 mRNA 発現量に大きな変化は認められなかった。一方、胎児期における HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 mRNA 量に有意な減少が認められた。

D. 考察

近年中枢神経系において神経細胞が新生することはないと考えられていたが、海馬歯状回顆粒細胞層下部および側脳室下帯領域にお

いて神経幹細胞が存在していることが明らかとされ、絶えず神経が新生していることが報告されている。特に、海馬領域における神経幹細胞は、学習や豊かな環境下で、その増殖頻度が増加し、またストレスを受けることによって減少することが報告されている。

そこで本研究では BPA の胎児期および授乳期慢性曝露マウスの海馬領域における神経新生の影響を検討する目的で、神経芽細胞や移動前駆細胞に特異的に発現し、その発現量が神経新生レベルの変化を反映する doublecortin 陽性細胞の免疫活性の変化について免疫組織化学染色法に従い検討した。その結果、control 群と比較し BPA 慢性曝露群の海馬領域において doublecortin 陽性神経細胞数の減少が認められた。さらには海馬歯状回顆粒細胞層下層において、神経への分化に促進的に働き、かつ海馬顆粒細胞の成熟に重要な役割を果たす basic Helix-Loop-Helix 型転写因子である NeuroD 陽性細胞数の減少も認められた。

このように神経前駆細胞の減少が引き起こされていることから、神経幹細胞からグリア細胞への分化誘導が促進されている可能性が考えられる。そこで次に海馬領域における GFAP 陽性アストロサイト免疫活性の変化について免疫組織化学染色法に従い検討した。その結果、BPA 慢性曝露群の海馬領域において GFAP 陽性アストロサイト免疫活性の著明な増強が認められた。また、培養細胞を用いた検討から、神経幹細胞に BPA を処置することにより GFAP 陽性アストロサイト免疫活性の増強が引き起こされることも確認している。一方、これまでに当教室において、BPA を胎児期および授乳期に慢性曝露することにより、海馬 choline 作動性神経の発現異常に伴う記憶保持能力の低下が引き起こされることを明らかにしている。これらのことから海馬神経新生の効率低下が、bisphenol-A 慢性曝露マウスで認められた記憶保持能力の低下に一部関与している可能性が考えられる。

また、BPA の胎児期および授乳期曝露による成体期の HDAC mRNA 発現量の変化について検討を行った結果、BPA 曝露により HDAC1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 9 mRNA に大きな変化は認められなかったのに対し、胎児期の BPA 曝露により、HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 mRNA 量の有意な減少が認められた。このことは、BPA の慢性曝露により胎児期にのみ認められる隠れた遺伝子発現異常が引き起こされている可能性を示唆するものである。さらに胎児期における HDAC 発現低下による転写異常が成体期における変化を引き起こす可能性が考えられる。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌

1. MIYAGAWA K, NARITA M, NARITA M, NIKURA K, AKAMA H, TSURUKAWA Y AND SUZUKI T. Changes in central dopaminergic systems with the expression of Shh or GDNF in mice perinatally exposed to bisphenol-A. *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.* 27 69-75 (2007)
2. MIYAGAWA K, NARITA M, NARITA M, AKAMA H AND SUZUKI T. Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A. *Neurosci. Lett.* 418 236-241 (2007)
3. NARITA M, MIYAGAWA K, MIZUO K, YOSHIDA T, SUZUKI T. Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: evidence for the importance of exposure period. *Addict. Biol.* 12 167-172 (2007)
4. MIYATAKE M, MIYAGAWA K, MIZUO K, NARITA M AND SUZUKI T. Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *J. Neuroendocrinol.* 18, 434-444 (2006)
5. NARITA, M., MIYAGAWA, K., MIZUO, K., YOSHIDA, T. AND SUZUKI T.: Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. *Neurosci. Lett.* 402, 249-252 (2006)
6. 成田 年, 宮川和也, 富田真理子, 水尾圭祐, 鈴木 勉: Bisphenol-A 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, 256-262 (2005)
7. 鈴木 勉, 水尾圭祐, 宮川和也, 成田 年: Bisphenol-A 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)

2. 学会発表

1. 日本トキシコロジー学会

2007年6月27日-29日、船堀

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬 choline 作動性神経発達に及ぼす影響
鶴川百合、成田 年、成田道子、宮川和也、赤間久彦、新倉慶一、宮下和彦、鈴木 勉

2. 第80回日本薬理学会年会

2007年3月14日-16日、神奈川

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による Shh および GDNF 発現と中枢 dopamine 神経発達に及ぼす影響
宮川和也、成田 年、成田道子、新倉慶一、赤間久彦、鶴川百合、鈴木 勉

3. 第29回日本神経科学大会年会

2006年7月19日-21日、京都

Bisphenol-A 曝露により惹起される dopamine 神経障害におけるグリア細胞の役割
成田 年、宮川和也、宮竹真由美、赤間久彦、鈴木 勉

4. 第79回日本薬理学会年会

2006年3月8日-10日、神奈川

Bisphenol-A 曝露による dopamine 関連行動に及ぼす影響と astrocyte の活性化
宮川和也、成田 年、宮竹真由美、赤間久彦、富田真理子、鈴木 勉

5. 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

6. CPDD 67th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING

2005年6月18日-23日、Orlando, Florida

Influence of an endocrine disruptor bisphenol-A in dopamine-dependent rewarding effect and astrocytic activation, Kazuya Miyagawa, Minoru Narita, Mayumi Miyatake, Keisuke Mizuo, Mariko Tomita, and Tsutomu Suzuki

- 7 第14回神経行動薬理若手研究者の集い
2005年3月21日、神奈川
内分泌かく乱化学物質 (bisphenol-A) 曝露による dopamine 関連行動に及ぼす影響および astrocyte の活性化
宮川和也、成田 年、宮竹真由美、水尾圭祐、富田真理子、鈴木 勉
- 8 第34回日本神経精神薬理学会
2004年7月21日~23日、東京

Bisphenol-A 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(予定も含む)

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他
無し

3. 発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究

研究分担者 宮川 宗之

独立行政法人 労働安全衛生総合研究所 産業医学総合研究所 健康障害予防研究
グループ 上席研究員

研究協力者 小林 健一

独立行政法人 労働安全衛生総合研究所 産業医学総合研究所 健康障害予防研究
グループ 研究員

研究要旨

経胎盤・経母乳曝露による次世代影響、化学物質に対して高い感受性を示す個体発生初期の曝露による発達神経毒性は、子供の健康問題における焦点の一つであり、次世代認知機能への影響を実験的に把握するための生物試験法の高度化が求められている。本研究では、ラット及びマウスのスケジュール制御オペラント行動(SCOB)を用いて学習・記憶に及ぼす影響を情動面への影響と分離しつつ評価する手法の確立を目指す。適切な陽性対照の設定について検討し試験法の妥当性を調べるとともに、発達神経毒性が実際に問題となっている物質に本法を適用し有効性を示す。今年度は、ビスフェノール A (BPA) 低濃度曝露の影響を調べた。学習習得、短期記憶の保持、行動の適切な制御に及ぼす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」下での SCOB を使用し、ラットを被験体に BPA 妊娠・授乳期混餌曝露(0.33 - 33 ppm 混餌)の影響を検討したところ、学習習得の遅延と考えられる影響が認められたが、短期記憶過程への影響は認められなかった。

陽性対照の設定については予備的検討を継続中である。

A. 研究目的

化学物質に起因する子供の健康問題は世界的な重要課題として認識されているが、経胎盤・経母乳曝露による次世代影響、化学物質に対して高い感受性を示す個体発生初期の曝露による発達神経毒性は焦点の一つである。また、いわゆる内分泌かく乱化学物質や難分解性の環境汚染物質についても、神経系に関わるデータの収集は不十分である。知能のような神経系高次機能に対する影響が問題となる場合も多いが、そのような作用を適切に把握し評価する試験法の開発や標準化は進んでいない。実験動物を用いた行動試験では、いわゆる情動性への影響と学習・記憶といった認知機能への影響を分離して把握すべきであるが、現状は不十分である。実際、学習・記憶試験として迷路を用いた課題が使用されることが多いが、場面適応性やストレスナーへの

反応などの因子が大きく関与するものが多い。これらを排除もしくは分離し、長期にわたって学習による行動の変容を記録するとともに、短期記憶や弁別などの認知機能を基礎とした適応的行動の測定が可能な試験課題が必要である。また、発達神経毒性評価のための行動試験法自体の妥当性等を担保するためには陽性対照物質の使用が望ましいが、種々の困難さのため実施されることは少ない。したがって、認知機能(学習・記憶)に対する影響を評価するための齧歯類を用いた試験方法の確立と陽性対照となる物質についてのデータの収集・蓄積が重要と考えられる。

本研究では、オペラント条件付けを応用した手法により、齧歯類を用いて学習・記憶といった認知機能への影響を把握する行動試験法の高度化を目指す。我々は、ラット及びマウスを対象に、スケジュール制御オペラント

行動(SCOB) を指標に用いて、場面適応性など情動面への影響を極力分離しつつ学習習得への影響を測定するとともに、短期記憶の保持に対する影響を評価することが可能な行動試験法を確立しつつある。本研究ではラットとマウスを対象に、我々が開発した SCOB 試験を実施し、内分泌攪乱作用による影響が問題とされる物質やいくつかの陽性対照の候補となる物質について、次世代認知機能への影響を検討し、試験法としての有効性や妥当性の検討・確認を行なう。

平成 19 年度は、研究初年度として BPA 低濃度混餌曝露(妊娠期・授乳期) の影響についてラットを用いた確認試験を実施した(実験 1)。また、陽性対照候補の検討としては、インドール酢酸について妊娠期・授乳期投与の影響を見るための予備試験を実施した(実験 2)。また、おなじく陽性対照物質候補として抗甲状腺薬プロピルチオウラシル(PTU) の妊娠期・授乳期投与の影響を見るための予備試験を開始した(実験 3)。さらに老化及び老化による認知機能の変化が早期から認められるといわれる老化促進マウス(SAMP8 ・ SAMP10) を一種の陽性対照条件として用い、試験法の妥当性について検討するための測定を開始した(実験 4)。

実験 1 では BPA の認知機能に及ぼす影響が比較的 low 濃度観察されたこと、実験 2 及び実験 3 は予備試験であり継続中であること、実験 4 も実験継続中であることから、以下実験 1 「BPA の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とラットの次世代認知機能影響」について詳述し、他の実験については最後に概要を記すこととする。

B. 研究方法

被験動物: 9 週齢の妊娠ラット(IGS-SD) を購入し、妊娠第 6 日(GD6) から離乳日(PND21)

まで高純度の BPA を混餌投与(0、0.33、3.3 及び 33 ppm、各群 12 匹) した。出産 5 日後(PND5) に各腹の仔数を 8 匹(雌雄同数) に調整した。離乳時に、各腹から行動試験に使用するための個体雄 1 匹をランダムに選び、離乳後は通常飼料(日本クレア CE-2) を与えて 8 週齢まで集団飼育(各ケージ 4 匹) した。8 週齢で、食餌強化による SCOB 行動測定のため、個体別飼育と給餌制限を開始し、以後実験期間を通じての体重を 300g を目標に給餌量を調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。ラットの飼育室は、すべて温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境飼育施設内にあり、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施した。

BPA 混餌投与: 市販の粉末飼料(オリエンタル酵母 MF) に、BPA(和光純薬・測定用標準品・純度 >99.6% を使用) を、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm 及び 33 ppm の濃度となるよう混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを使用した。

SCOB 測定装置: スケジュール制御オペラント行動(SCOB) の測定には 8 台のオペラントチャンパー(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パ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パ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。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。タイムアウト 中以外の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、13 週齢から SCOB の測定を開始した。初めに、レバー押し反応の条件づけ訓練を行なった。SCOB 訓練・測定は、1 日 1 セッションで週 5 日行い、後述するすべての実験が終了まで続した。

SCOB の測定では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 45 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、セッション開始時に点灯するレバー上部の 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 は常時消灯とした。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。

タイムアウト付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 10s) 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・TO 4s) では、タイムアウト時間を 4 秒に固定し 25 セッション (5 週間) の訓練・測定を実施した。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、25 セッションの訓練・測定を実施した。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、タイムアウト時間をセッション内で上下させ、25 セッションの訓練・測定を実施した。その後、薬理的負荷試験として methamphetamine、(±) SKF38393(D1 系アゴニスト)、(-) quinpirole (D2 系アゴニスト) 投与による影響の測定を行なった。

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 及び house 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 粒が餌皿上に供される(報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなって、cue light は消灯し house light のみに暗転する。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(交替型) ので、

どちらのコンポーネント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、遅延時間となるタイムアウト時間を変化させることで、短期記憶過程の測定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($P[\text{HIT}]$) を計算した。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($P[\text{FA}]$) を計算した。その後、次式によって、「Accuracy」と「Bias」を求めた。

$$\begin{aligned} \text{Accuracy} &= P[\text{HIT}] - P[\text{FA}] \\ \text{Bias} &= P[\text{HIT}] + P[\text{FA}] - 1 \end{aligned}$$

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。変動タイムアウト 条件ではタイムアウト 時間を 5 段階の長さで変化させたので、TO 長毎に 10 回の FR と DRO の初発反応潜時が得られた。

被験体は、条件づけ訓練の進行によって、各タイムアウトが終了し FR が開始されると数秒以内に高頻度でレバーを押す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(Delay-Accuracy Curve)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 をプロットした曲線は、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。

薬理的負荷試験: 上述したようにタイムアウト 付交替型混合スケジュール第 3 段階の訓練 25 セッション終了後、薬理的負荷試験を実施した。負荷薬物としては、ドーパミン系に作用する 3 種類の薬物、methamphetamine、(-)-quinpirole(D2 系アゴニスト)、(±)SKF38393 (D1 系アゴニスト) を使用した。負荷試験開始に先立ち生理食塩水投与(i.p.) を毎日の SCOB 測定開始前に行ない、投与手技に順化させた後、週 1 回から 2 回の頻度で薬物負荷による測定を実施した。他の日は生理食塩水を投与した。投与はすべて腹腔内投与とし、行動測定開始の約 20 分前に実施した。当該薬物に関する測定期間中、生理食塩水投与で得られた値の中から、各用量での薬物投与の直前(通常前日)に得られた測定値をベースラインとした。数回の生理食塩水投与で得られた測定値を個体毎に平均して各個体のベースラインとし、FR 反応率と DRO 反応率についてはベースラインに対するパーセント 値を、また Accuracy と Bias についてはベースラインからの差の値を、それぞれ求めて、各薬物の量-影響曲線を描いた。

以上、全ての実験は労働安全衛生総合研究所の動物実験に関する指針にしたがって実施された。

統計解析: SCOB の学習過程については、各スケジュールでの訓練過程毎に反復測定分散分析を実施した。すなわち、SCOB の測定で得られる 4 つの行動指標(FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、Bias) について、群間 1 要因(BPA)、群内 1 要因(session または 5 session 毎にまとめた block) として解析した。曝露の影響が有意となった場合は、Dunnett 検定を行

ない対照群との差を解析した。また薬理的負荷試験については、負荷薬物用量の効果(群内要因)と BPA 曝露の効果(群間要因)について検定した。いずれも計算には SAS/GLM プロシージャーを使用した。

C. 研究結果

母ラットの摂餌量及び仔の体重: 妊娠第 2 週から離乳時までの母ラットの摂餌量を 7 日毎の推移として Fig.3 に示した。摂餌量は 7 日毎に測定したが、1 日 1 匹当たりで換算したものである。妊娠第 2 週-第 3 週では 1 日に 1 匹の母ラットが約 20 から 25g を摂取した。この間の母ラットの平均体重は約 300g である。これは BPA 量としてみると 0.33 群-33 ppm 群で 0.025-2.5 mg/kg/day 相当となる(混餌投与から体重当たりの摂取量への変換では、ラットの場合通常成体では ppm 濃度に 0.05 を乗じる換算が行なわれるが、その方法によれば 0.33 群-33 ppm 群で約 0.017 mg/kg-1.7mg/kg/day 相当となる)。米国 EPA による BPA の reference dose は 0.05 mg/kg であり LOAEL 値 50 mg/kg を基準としたものである。今回の実験では、reference dose の 1/2 から LOAEL 値の 1/20 の間で BPA 曝露が行なわれたこととなり、所謂低濃度影響として問題となるレベルに相当する範囲の実験である。母ラットの妊娠期の摂餌量に BPA の影響は認められなかった。

一方、仔ラットの体重変化は Fig.4 に示した。授乳期(雌雄仔)及び離乳後(雄性のみ)の体重では、それぞれ群間に有意差が認められたが、図からわかるように差は僅かであった。

反応形成及び定率強化スケジュールでの習得過程: 訓練初期の自動反応形成スケジュールでの訓練過程及び定率強化スケジュールでの訓練過程でのラットのアペラント反応の変化を Fig.5 に示した。自動反応形成過程では、

曝露群の方が反応率の上昇が早い傾向が示されたが、有意ではなかった。定率強化スケジュールも同様であった。

タイムアウト 付交替型混合スケジュールでの訓練過程: 訓練第 1 段階(固定長タイムアウト)から訓練第 3 段階(変動長タイムアウト 上下系列条件)における行動変化(すなわち学習習得過程)と BPA の影響を Fig.6 から Fig.11 にまとめた。SCOB の測定で得られる 4 つの行動指標 FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、Bias) について、1 block (5 session) 毎に各被験体の平均値を算出し、訓練進行にともなう各指標の変化を示している。図に示されたように、BPA の影響は主として DRO 反応率に認められた。検定結果は表 1 にまとめた。

セッション内でタイムアウト時間を上下させる訓練第 3 段階のデータについては、測定の結果得られた Accuracy 及び Bias 値を、各タイムアウト時間に対してプロットし、Delay-Accuracy 曲線及び Delay-Bias 曲線(Fig.12)を求めた。図の左側のグラフは Delay-Accuracy 曲線を、右側のグラフは Delay-Bias 曲線を示している。前者は短期記憶の保持曲線に相当するものとなるが、ラットの場合、この範囲の遅延時間(タイムアウト時間)では遅延時間に関わらず Accuracy の値は 0.6 から 0.8 程度となった。また Bias 値は遅延時間(タイムアウト時間)に応じて緩やかな上昇を示すものとなった。週毎の結果に対する検定では、BPA 曝露の影響について、いずれも有意とならなかった。

薬理的負荷試験: 第 3 段階の訓練終了後に実施した薬理的負荷試験の結果は、Fig.13 から Fig.15 に示した。各薬物の急性投与による量-影響曲線を、SCOB の測定で得られる 4 つの行動指標(FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、

Bias) を用いてプロットしてある。生理食塩水投与時の値をベースライン(図中 V で示した) として示した。FR 反応率と DRO 反応率についてはベースラインに対するパーセント値を、また Accuracy と Bias についてはベースラインからの差の値を用いている。ドーパミン系に作用する 3 種類の薬物を投与したが、methamphetamine、(-)quinpirole(D2 系アゴニスト)、(±)SKF38393(D1 系アゴニスト) いずれにおいても、明確な BPA 曝露の影響は認められなかった。検定の結果 BPA 曝露の影響は全て有意とならなかった。

D. 考察

本年度はタイムアウト付混合型 FR DRO スケジュール下でのラット(1 群 12 匹計 48 匹- 1 腹 1 匹雄性仔-) を使用) のオペラント行動を指標に、BPA 妊娠・授乳期の低濃度混餌曝露(0.33 - 33 ppm) が成長後の仔の認知機能(学習習得・短期記憶保持) に及ぼす影響を調べた。訓練に使用したすべてラットが上記強化スケジュール下での適切な反応パターンを習得した。

交替型混合スケジュールでの訓練では、最高用量の 33 ppm 群(2.5 mg/kg b.w./day に相当) で、DRO 反応率が高くなり、訓練進行の遅延と考えられる結果が得られた。統計的検定結果は 0.33 及び 3.3 ppm 群でも有意となる場合もみられたが、背景データを含め総合的に考察すると、明らかな影響は 33 ppm 群のみに生じたものと考えられる。訓練進行後の最終的なパフォーマンスには明確な差がなかったため、学習習得の遅延と考えられる結果となった。

訓練進行後に実施された、遅延時間(タイムアウト時間) の効果の測定及び薬理学的負荷試験では、群間の差、すなわち有意な BPA 曝露の影響は認められていない。これらは短期記憶の保持過程やドーパミン系に対する影

響が認められないことを示唆する。Fig.16 は methamphetamine 投与時の Delay-Accuracy 曲線を群毎に示したものであるが、methamphetamine の影響は遅延時間(タイムアウト時間) が長い場合に顕著となり、methamphetamine 投与量の増大とともに、まず曲線が右下がりとなり、ついで全般的に下方にシフトするものの、全体としては群間に差は生じていない。このデータは本試験によって短期記憶の保持過程に対するメタンフェタミンの効果が適切に把握されることを示すものであるが、同時に BPA 曝露による影響がなかったことを示している。

以上をまとめると、BPA の低濃度妊娠期・授乳期の曝露は、DRO のような反応の抑制が求められる状況において、反応抑制を妨害する方向に作用し、結果として DRO コンポーネントを含む SCOB の習得過程に影響を与えたものと考えられる。また短期記憶の保持やドーパミン系の感受性に影響を与えるとの証拠は得られなかった。

今回の実験では、各群 12 匹計 48 匹の動物を使用しており、行動を指標とした発達神経毒性試験としては比較的大規模の実験結果であって、この結果は重要である。BPA の低濃度効果についての最近レビュー論文(例えば vom Saal FS et al, Environ Health Perspect 113:926-933, 2005) をみると、行動を指標として影響を認めたとする研究が例示されているものの、場面適応への影響を排除しつつ(則ち走路を用いた試験課題を使用しないで) 認知機能(学習及び記憶) に焦点をあてて明確な影響を認めたとする研究は殆どない。したがって、本研究は BPA の低濃度影響に関して陽性の結果を示した貴重なデータを提供するものと考えられる。我々が以前マウスを用いて実施した同様の方法、同様の規模の実験では、SCOB の初期の訓練過程、タイムアウト付交替型混合スケジュールにおける訓練、訓練進行