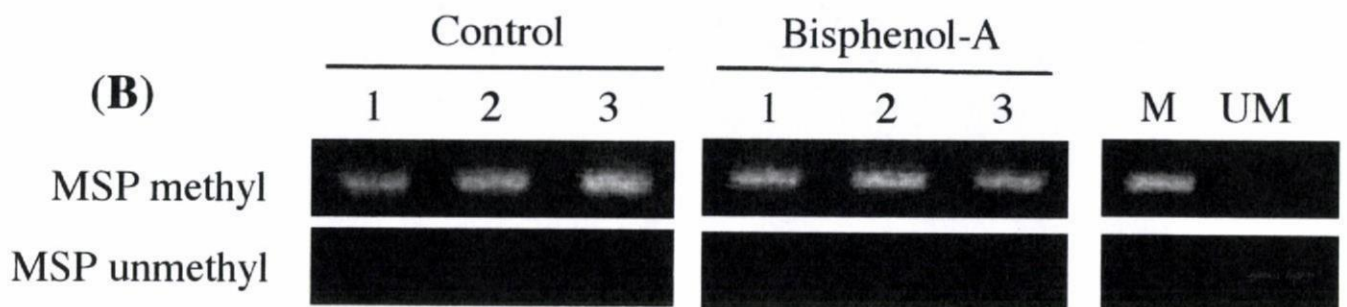
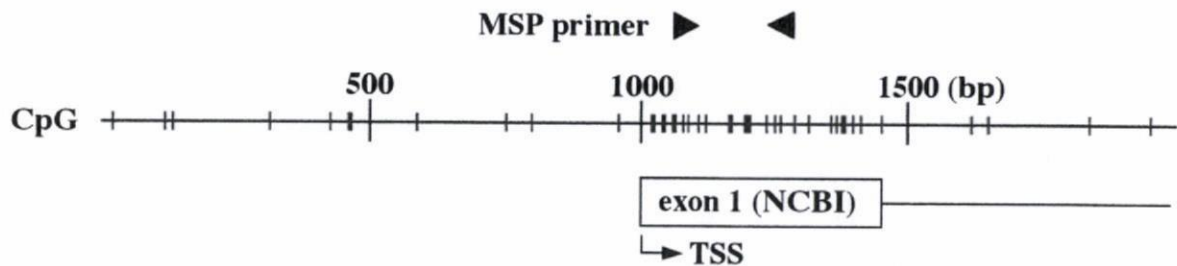


(A) *Mus musculus* chromosome 11 (completment)



M: methylstion control
UM: unmethylation control

Figure 1. Representative results of MSP of GFAP in the whole brain obtained from embryonic mice prenatally exposed to bisphenol-A. (A) Map of a promoter CpG, TSS and exon 1 of the mouse GFAP. Vertical lines: individual CpG sites. Open box: noncoding and coding exons. Arrows: TSS in the National Center for Biotechnology Information database (NC_000077), Arrowheads: positions of MSP primer. (B) GFAP methylation status in mice control or prenatally exposed bisphenol-A analyzed by MSP. GFAP methylation status were highly methylated in mice control and prenatally exposed bisphenol-A. M: methylated control, UM: unmethylated control.

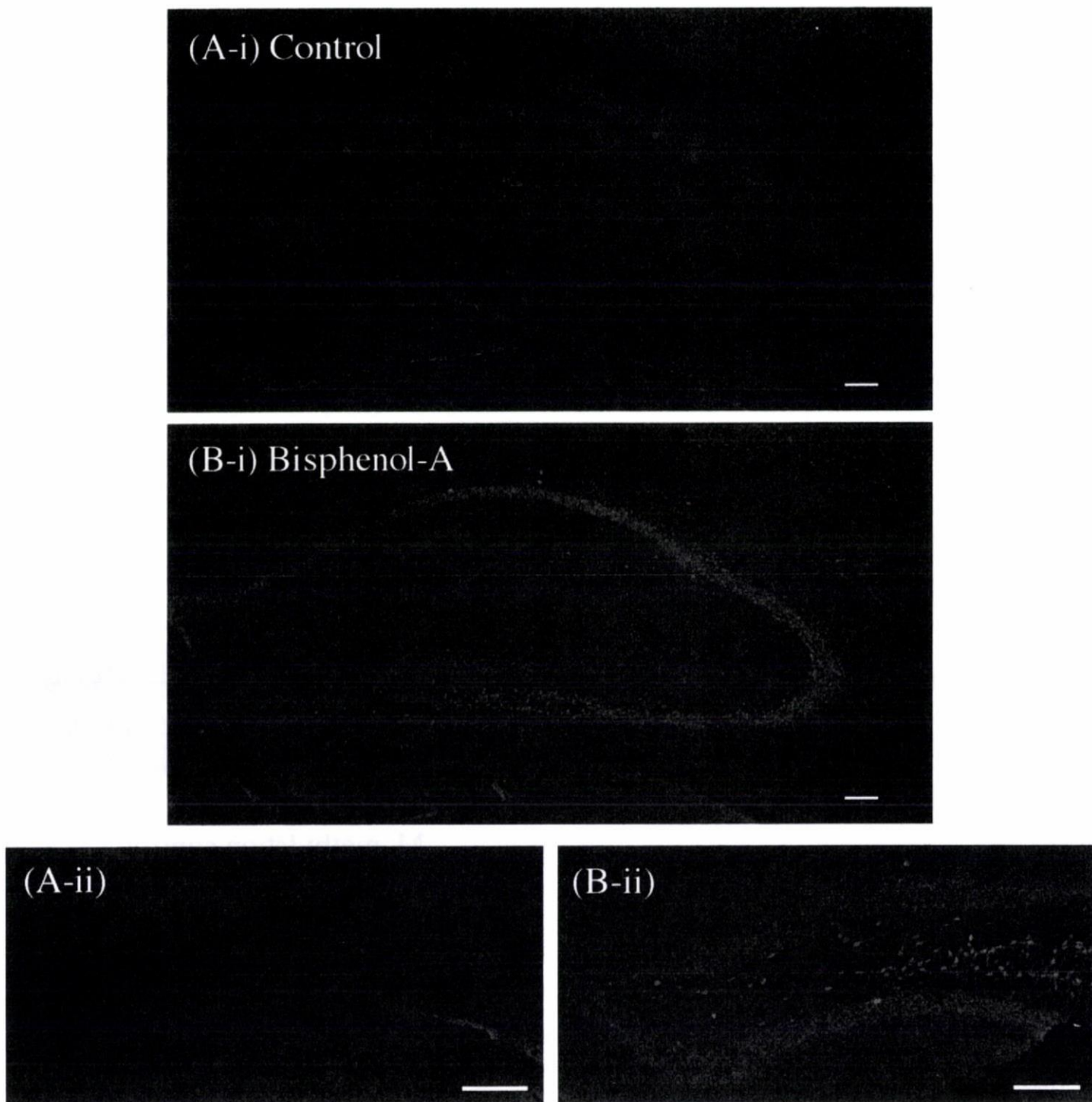


Figure 2. Immunofluorescent staining for phosphorylated-histone deacetylase 5 (p-HDAC5)-like immunoreactivities (IRs) in the hippocampus of mice prenatally and neonatally exposed to bisphenol-A. (A, B) p-HDAC5-like IR in the hippocampus was remarkably increased in mice prenatally and neonatally exposed to bisphenol-A (B-i, B-ii:high magnification of dentate gyrus) compared to control mice (A-i, A-ii:high magnification of dentate gyrus). Scale bars: 100 μ m

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

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。今年度はラット及びマウスを用いて陽性対照物質として抗甲状腺薬プロピルチオウラシル(PTU)投与の影響を測定した。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 を使用した。ラットでは妊娠・授乳期に母動物に強制経口投与(離乳時の仔動物の体重に明確な用量依存的影響が認められる用量)し、成長後の仔で影響を検討したところ、学習習得過程及び短期記憶の保持曲線に用量に依存した明確な変化が生じるとの結果を得た。PTU が我々の開発した試験方法において適切な陽性対照物質となり得ることが示された。試験方法の妥当性を示す結果でもある。マウスの実験は進行中である。また、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ている老化促進マウス(SAMP8 及び SAMP10)を用いて上述の SCOB 測定も実施した。老化促進マウスでは個体差が大きく、試験方法の妥当性を明確に示すモデルとしてはさらに検討が必要と考えられた。

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、いわゆる内分泌攪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、我々が開発したタイムアウト付交替型混合ス

スケジュールによる 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・確認を行なう計画である。

研究初年度である昨年は、交替型混合スケジュールを用いたラットの SCOB 試験について、BPA の妊娠・授乳期混餌投与の影響を報告した。従来報告されている LOAEL・NOAEL よりも低い用量で学習習得過程に対する影響を把握している。これを考慮して、2年目及び3年目においては、妊娠・授乳期の曝露により中枢神経系に影響を与えることが既に知られている物質(陽性対照候補物質)について同様の SCOB を用いた試験を実施し、我々の試験方法の妥当性を補強する資料とするとともに、ラット及びマウスについて BPA の実験を再度実施し、結果を確認することとした。

本年度(平成 20 年度)は、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実験を実施した。本報告書では終了したラットの実験(実験 1)について詳しく報告する。マウスを用いた実験は測定を継続中である(実験 2)。さらに老化及び老化による認知機能の変化(学習・記憶障害)が早期から認められるといわれる老化促進マウス(Senescence-Accelerated Mouse Prone : 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実験を実施した(実験 3)。

ラットを用いた実験 1 では PTU 投与により仔の学習習得過程及び短期記憶の保持曲線に用量に依存した明確な変化が生じるとの結果となり、PTU が我々の開発した試験方法において適切な陽性対照物質となり得ることが示された。マウスを使用した実験 2 は継続中であること、老化促進マウスを使用した実験 3 では個体差が多く明確な結果が得られなかったことから、本報告書では実験 1 について以下詳述する。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週齢の交配確認済みラット(IGS-SD、日

本チャールスリバー)を購入し、妊娠第 15 日(GD15)から生後 20 日(PND20)まで PTU を連日強制経口投与(0、0.5、1.0、2.0 mg/kg/day、各群 8 匹)した。出産 2 日後(PND2)に各腹の仔数を 8 匹に調整した(別の測定に使用する都合で、雄雌比を可能な限り 6:2 とした)。PTU 投与による仔の成長遅延を考慮し、対照群を含め全群で離乳を通常より 1 週間遅くし生後 28 日とした。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、離乳後は一般固形飼料(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。ただし、対照群では未妊娠動物が 2 匹含まれていたため、同群 6 腹中 2 腹では同腹から 2 匹の雄性仔を行動実験に使用した。但し、結果の解析には同腹仔を除外し 1 腹 1 匹のデータを使用した。図表に示した行動測定の結果は同腹仔を除いたものであり、対照群は 6 匹、他は各群 8 匹の結果である。8 週齢からは、食餌強化による SCOB 行動測定のための個体別飼育と給餌制限を開始した。以後、実験期間を通じての体重を 8 週齢時の 85% を目標に維持すべく給餌量を調整した。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。

PTU 投与: PTU(6-n-propyl-2-thiouracil, Sigma 社製, product # p3755, 純度 99%以上, Lot.99H2509)の用量(0、0.5、1.0、2.0 mg/kg/day)は、先行研究において学習に影響が報告されている用量を参考に予備実験を行ない、以下を考慮して決定した。最高用量は産仔体重に明確な減少が認められるものの産仔数は減少せず(今回の本実験では、産仔数は 0、0.5、1.0、2.0 mg/kg 投与の各群に対して平均 11.2、13.0、11.8、11.1 匹)離乳まで哺育が可能な最大量に近いレベルに設定した。また公比を 2 として他の 2 用量を決定した。離乳時の仔の体重に明確な用量依存的変化(減少)が認められる範囲である。コーン油に溶解し投与量は 10ml/kg とした。

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。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(“ピップ”)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、12 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継続した。

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 ratio : 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。

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、薬理学的負荷試験として 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回押し、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り、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)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[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。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で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(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、投与手技に順化した後、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(PTU)、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。また、PTU投与の影響が全体として有意かどうかに関わらずDunnett検定を行ない対照群と各群の差を解析した。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PTU投与の効果(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: 妊娠時の母ラットの体重変化をFig.3に示した。また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)の体重は、PTU投与により大きな影響を受け、対照群と比較して全投与群で有意な減少となった。生後28日の離乳時の体重には対照群と高用量群(2 mg/kg)で2倍近い差が生じており、中用量群(1 mg/kg)及び低用量群(0.5 mg/kg)を含めPTUの用量に依存した成長抑制効果が確認された。また、SCOB訓練における85%基準体重は群により異なり、各群の目標体重の平均値と標準偏差は、対照群 $328.4\text{g} \pm 18.8\text{g}$ 、低用量群 $291.4\text{g} \pm 22.1\text{g}$ 、中用量群 $268.6\text{g} \pm 22.1\text{g}$ 、高用量群 $216.2\text{g} \pm 23.2\text{g}$ となった。また、全ての実験が終了後に脳の重量を測定した。結果は、絶対重量では対照群 $2.26\text{g} \pm 0.03\text{g}$ 、低用量群 $2.18\text{g} \pm 0.12\text{g}$ 、中用量群 $2.10\text{g} \pm 0.06\text{g}$ 、高用量群 $2.10\text{g} \pm 0.06\text{g}$ となったが、体重比では対照群 $0.638\% \pm 0.026\%$ 、低用量群 $0.729\% \pm 0.045\%$ 、中用量群 $0.758\% \pm 0.059\%$ 、高用量群 $0.959\% \pm 0.126\%$ となった。

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オ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、高用量群の反応率に対照群と比較して有意な減少が認められた。定率強化スケジュールでは、投与群の方が全体として高い反応率を示し、全ての投与群で対照群との差が有意とな

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PTU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、いずれの訓練段階においてもPTUの影響が認められている。検定結果は表1にまとめた。AccuracyやDRO反応率では殆どの場合用量に依存した影響が認められ、対照群との比較において多くの場合有意な差が認められている。

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、対照群では遅延時間(タイムアウト時間)に関わらずAccuracyの値は0.6から0.8程度となり、これまでに我々が度々測定した背景データと同様の結果となった。一方、PTU投与群では、1)全体としてDelay-Accuracy曲線は下方にシフト(全体として群間差は有意、且つ、どの投与群も対照群と比較して有意)するとともに、2)遅延時間が長い場合程Accuracyが低値となる右下がりのもの(全体として遅延時間の効果は有意)となり、学習習得過程の最終段階における成績の全般的低下と短期記憶の保持曲線の傾きの増大傾向(投与と遅延時間の交互作用は有意ではない)を示す結果(形式的には短期記憶の忘却率の増大と理解される)が得られた。

またBias値は全ての群で遅延時間(タイムアウト時間)に応じて緩やかな上昇を示す曲線となった。対照群では中間のタイムアウト時間(12秒)では0に近い値であり、これまでの背景データと同様とな

ったものの、PTU投与群では投与量に応じて全体的に上方へのシフトがみと認められた。この効果は第3段階の最終2週においては全ての投与群が対照群と比較して有意となっており、投与によりBias値が増大することが示された。

薬理的負荷試験(表2):第3段階の訓練終了後、薬物投与による測定の開始前に高投与群のラットが1匹死亡したため(原因不明)、この群は7匹のみ測定結果となった。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、DRO反応率において明確な影響が認められた。すなわち、対照群ではどの薬物の投与によってもDRO反応率が上昇するという背景データと同様の結果が認められたものの、PTU投与を受けた群ではいずれの薬物負荷の影響も明確には認められなかった。検定の結果、DRO反応率では、PTU投与を受けたどの群も対照群との差が有意となっている。他の指標については薬物負荷とPTU投与の間の関係は明確なものではなかった。

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8匹計32匹を使用)のオペラント行動を指標に、抗甲状腺薬PTUの妊娠・授乳期(GD15~PND20)の投与(0.5~2 mg/kg/day)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。PTUは、これまでの一般的な知見から陽性対照の候補物質として選んだものであり、用量依存的な影響が検出されることが期待されるものである。PTUの投与により離乳時の体重は用

量依存的に減少したものの、すべての仔ラットは上記強化スケジュール下で適切な反応パターンを習得した。ただし、学習習得過程及び短期記憶の保持に関係する最終的な SCOB パフォーマンスには PTU 投与による用量依存的な差が明確に認められた。これらの結果は、PTU が SCOB を指標とした認知機能影響の評価において適切な陽性対照物質となること、逆に上記の SCOB が学習や短期記憶といった認知機能に対する影響を評価するための適切な試験方法となることを示すものと考えられる。

神経系の発生や、神経系高次機能の正常な発達には甲状腺ホルモンが不可欠であり、甲状腺機能低下による障害はヒトにおいてもよく知られている。また、甲状腺機能低下による学習や行動面の障害モデルとして、PTU 周産期投与ラットによる研究はこれまでも相当数行なわれているが、これらは単に甲状腺ホルモンに対する攪乱作用を有する化学物質の作用とそのメカニズムを検討するためのモデルとしてばかりではなく、認知機能に対する影響を評価するための学習や記憶に関わる実験動物を用いた行動試験方法自体を評価するとともに、陽性対象物質として試験方法が適切に実施されたことを担保するための資料提供という意味においても有効な手法を提供するものと考えられる。しかしながら、EPA や OECD の発達神経毒性テストガイドラインに示されたような適切な手法を用いて、PTU 周産期投与が仔の学習や記憶に及ぼす影響を評価した研究は十分ではない。

Axelstad ら (Toxicology and Applied Pharmacology, 232:1-13, 2008) は、OECD のガイドライン (TG426) に準拠し仔動物において発達神経毒性を調べる各種の測定を実施している。GD7 から PND17 まで PTU を母ラットに強制経口投与 (0, 0.8, 1.6, 2.4 mg/kg/day) し、学習・記憶についてはモーリス水迷路課題 (8~9 週齢) と放射状迷路課題 (5~6 月齢) が使用された。モーリス水迷路課題では有意な影響は認められなかったものの、放射状迷路課題では高用量及び中用量群において有意な誤反応数の増加が認められ、著者らは空間記憶に対する影響であると記載している。ただし、データをみると誤反応の増大に対応する隣接アーム選択数の減少が観

察されており、これが誤反応数の増加に寄与することを考慮すると、上述の結果は記憶への影響を正確に反映するものではない可能性がある。

Kobayashi ら (Toxicology, 212:135-147, 2005) は、EPA のテストガイドラインに準拠し、学習・記憶については E 字型水迷路を使用している。GD18 から PND21 まで PTU を母ラットに強制経口投与 (0, 0.4, 1.0, 2.5 mg/kg/day) し、3 週齢時及び 9 週齢時に迷路学習を実施したところ、高用量及び中用量群において対照群と比較して有意な誤反応の増加が認められている。

これら二つの先行研究結果を今回の結果と比較すると、投与開始時期には違いがあるものの、用量はほぼ同様の範囲である。学習・記憶課題に対する影響は、今回の研究の方が、個体数が少ない (1群 8 匹) にも関わらず、より低い用量 (0.5 mg/kg/day) で有意な影響がとらえられており、作用の検出感度に関しては優れた結果となった。学習課題評価のために使用した 4 種類の指標をみることにより、反応抑制が要求される事態 (DRO 反応率) において適切な行動の獲得が遅延する様子や短期記憶の保持過程に対する影響が Delay-Accuracy 曲線から把握されていることを考慮すると、認知機能に及ぼす影響評価手法として我々が使用した SCOB 試験 (タイムアウト付交替型混合 FRDRO スケジュール) の利点が明らかになったと考えられる。

また、薬理学的負荷試験の結果からは、DRO 反応率において対照群と PTU 投与群でドーパミン系作用薬に対する応答がことなることが示された。ただし、受容体タイプによる差異などは明確ではなく、何らかの影響が示唆されるものの作用メカニズムについては別途検討が必要である。

今回の実験結果は、タイムアウト付交替型混合 FRDRO スケジュールを用いた SCOB 課題が、学習の習得過程に対する影響や短期記憶の保持過程に対する影響を評価する上で適切に機能することを示すものと考えられる。このような実験動物を用いた学習や短期記憶の測定では、ヒトを対照とした同様の課題との類似性から「何を測定しているか」を仮定して議論すること、すなわち学習及び記憶について一定の操作的定義を与えた上で議論することが必要と

なる。このような仮定のもとでは、PTUは学習及び短期記憶に対する影響を示す物質であり、同物質が本課題を用いた行動試験における適切な陽性対照物質として使用し得るとの結果が得られたものと考えられよう。ただし、PTUは活動性を増加させること、聴覚に影響を与えること、等が過去の研究から知られており、また実験開始時の体重が大きくなる条件下で食餌を報酬として実施されたもので、これらの要因が本課題の遂行成績にどのような影響を持ったかについて、行動面での機序を考察することも重要である。

本実験の結果は、同様の試験方法を用いて実施したBPAの次世代認知機能影響に関わる研究結果を補強するものとも考えられる。

マウスを用いた検討(実験2)

マウスではPTUに対する感受性がラットと非常に大きく異なる。産仔数や産仔の体重に及ぼす影響を調べた予備的検討の結果、用量を0, 10, 20, 40, 80 mg/kgとして投与を行ない、成長した仔を用いた行動試験を実施している。ラットの比べ、投与量が多いにもかかわらず仔の体重への影響も少なく、行動変化もラットのように明確ではない。実験終了後、次年度の報告書で結果を詳述する予定である。

実験3 老化促進マウス

老化促進モデルマウスとして知られているSAMPマウス(Senescence-Accelerated Mouse Prone)の内、早期の加齢とともに脳の機能的障害等が生じるといわれるSAMP8(学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常)及びSAMP10(脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス)の2系統のマウス、及び対照となるSAMR1(Senescence-Accelerated Mouse Resistant)マウス、合計3系統を用いて、SCOBの測定を実施し、早期老化とともに行動指標にどのような影響が生じるかを測定した。BPAやPTUの影響測定と同様のスケジュールで訓練を実施した。訓練最終段階の結果を群別にみると、SAMP10系では、8月齢以降パフォーマンスの低下が生じているが、SAMP8系とSAMR系の間では明確な差は生じなかった。結果はFigs.17~22にまと

めて示してあり、高齢時の変化はFig. 21を参照されたい。個体別に成績をみると、どの系統においても訓練に応じた明確な成績上昇を示さないものがあったり、相当の成績で反応遂行がみられる状態であったにも関わらず急死する個体があったりと個体差が大きく、また形態的にはSAMP8系で脊柱の湾曲を生じる個体が多くみられた。薬物投与による陽性対照群の設定とは別の視点から、タイムアウト付交替型混合スケジュール下でのSCOB行動の意味を明らかにしたり、測定が適切に実施されていることを確認するための資料を得ることを目的に実施した実験であったが、個体差等を考慮すると老化促進マウスは使いづらいとの印象であった。

E. 結論

本年度の研究の結果を総括すると以下の結論が得られた。

1) ラット及びマウスを用いて陽性対照物質として抗甲状腺薬プロピルチオウランル(PTU)投与の影響を測定した。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を使用した。ラットでは妊娠・授乳期に母動物に強制経口投与(離乳時の仔動物の体重に明確な用量依存的影響が認められる用量)し、成長後の仔で影響を検討したところ、学習習得過程及び短期記憶の保持曲線に用量に依存した明確な変化が生じるとの結果を得た。PTUが我々の開発した試験方法において適切な陽性対照物質となり得ることが示された。マウスの実験は進行中である。

2) 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及びSAMP10)を用いて上述のSCOB測定も実施した。老化促進マウスでは個体差が大きく、試験方法の妥当性を明確に示すモデルとしてはさらに検討が必要と考えられた。

(謝辞:本研究遂行にあたって村瀬正、渡辺智子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(過去3年分)

1. 論文発表

- 1) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi, Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring. *Industrial Health* 44: 510-524, (2006).

2. 学会発表

- 1) Kenichi Kobayashi, Katsumi Ohtani, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa. Effects of dietary exposure to bisphenol A on development and reproduction in mice. 44th Congress of European Societies of Toxicology, *Toxicol Lett*, 180S, S187, 2008.
- 2) 宮川宗之、小林健一、須田恵、王瑞生、奥野勉、平田衛. ビスフェノール A 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. 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会 要旨集 p53、2007.
- 3) Kenichi Kobayashi, Katsumi Ohtani, Hisayo Kubota, and Muneyuki Miyagawa. Effects of Dietary Exposure to Bisphenol A on Development in C57BL/6J mice. 44th Congress of European Societies of Toxicology. *Toxicol Lett*. 172, S186, 2007.
- 4) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代生殖発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 47 回日本先天異常学会学術集会 要旨集 p66、2007.
- 5) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 プログラム・要旨集 pS116、2007.
- 6) 宮川宗之、小林健一. 低濃度ビスフェノール A への妊娠・授乳期曝露と次世代認知機能影響. 第 80 回日本産業衛生学会講演要旨集 p756、2007.

- 7) 小林健一、大谷勝己、宮川宗之. ビスフェノール A のマウス次世代発生毒性. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p202、2006.

- 8) 宮川宗之、小林健一. ビスフェノール A の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とマウスの次世代認知機能影響. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p50、2006.

- 9) 宮川宗之、小林健一. マウスのスケジュール制御オペラント行動による認知機能影響評価. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会. *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol.31 Supplement, S218, 2006.

- 10) Muneyuki MIYAGAWA. Behavioral Toxicity of Chemicals: Usefulness of Behavioral Test Methods in the Assessment of Neurotoxicity. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 企業セミナー(神経毒性試験における技術開発: In Vitro and In Vivo Approaches 共催シンポジウム CTL)、2006.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

なし

図表

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

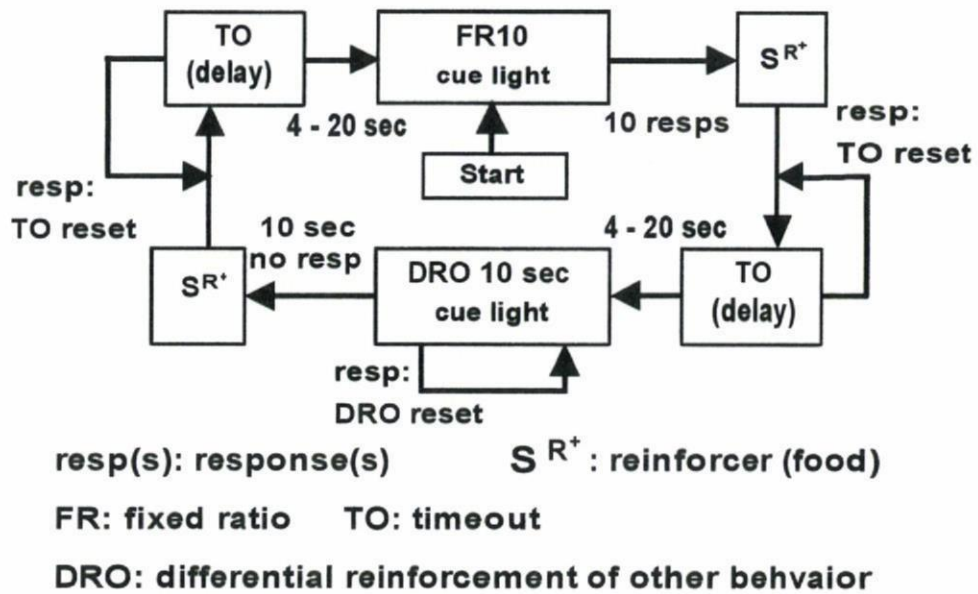


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

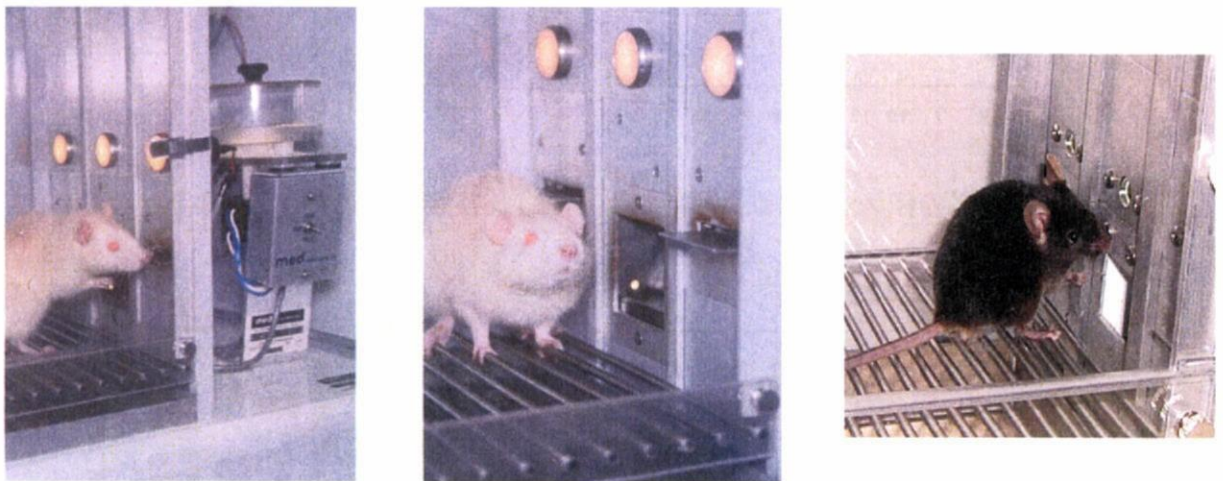


Fig. 2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 下でのSCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).

左:反応中のラット 中央:待機中のラット 右:待機中のマウス

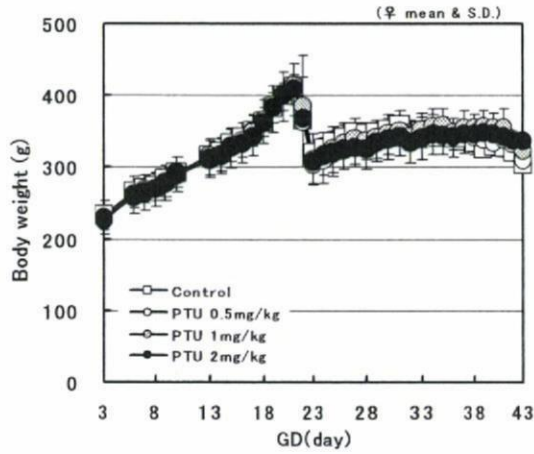


Fig. 3 妊娠期及び授乳期における母ラットの体重

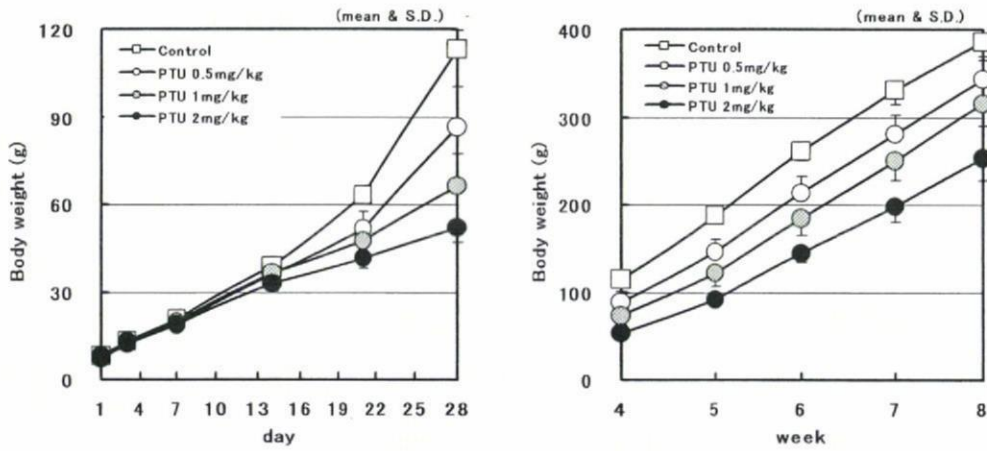


Fig. 4 授乳期の仔ラット(雌雄)の体重変化(左)及び離乳後の仔ラット(雄)の体重変化(右)

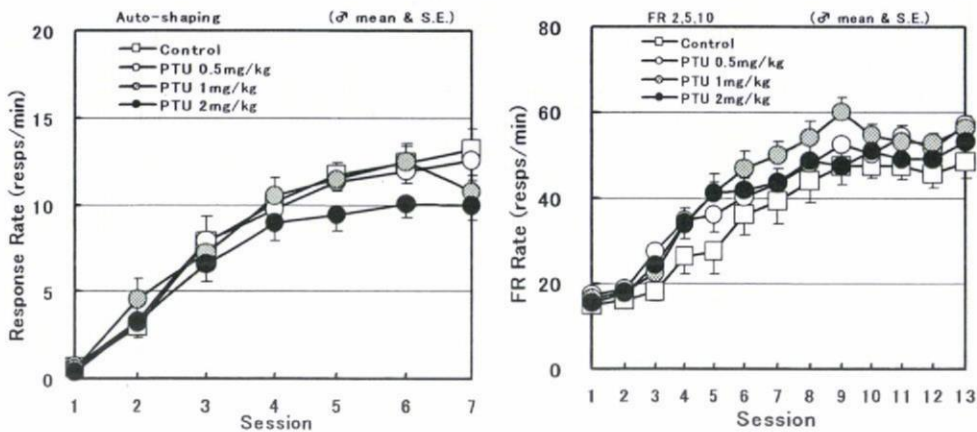


Fig. 5 自動反応形成スケジュール訓練時(左)及び定率強化スケジュール訓練時(右)の反応率の変化とPTUの影響(対照群6匹、他は1群8匹)

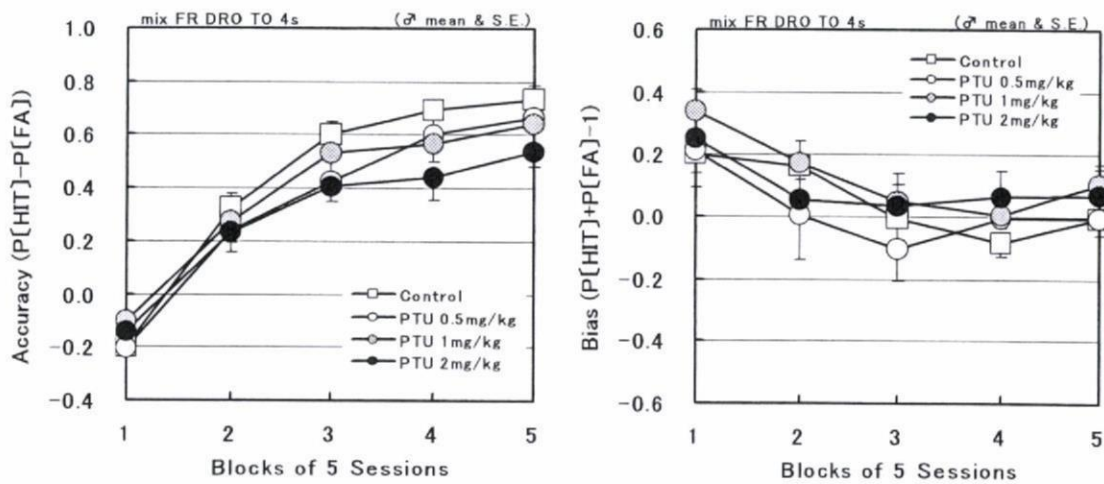


Fig. 6 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 4 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化と PTU の影響 (対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

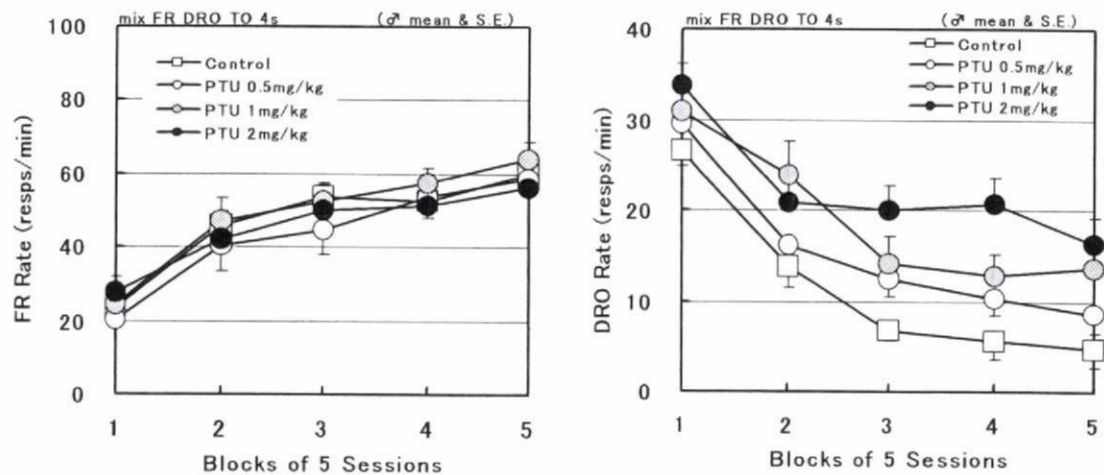


Fig. 7 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 4 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と PTU の影響 (対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

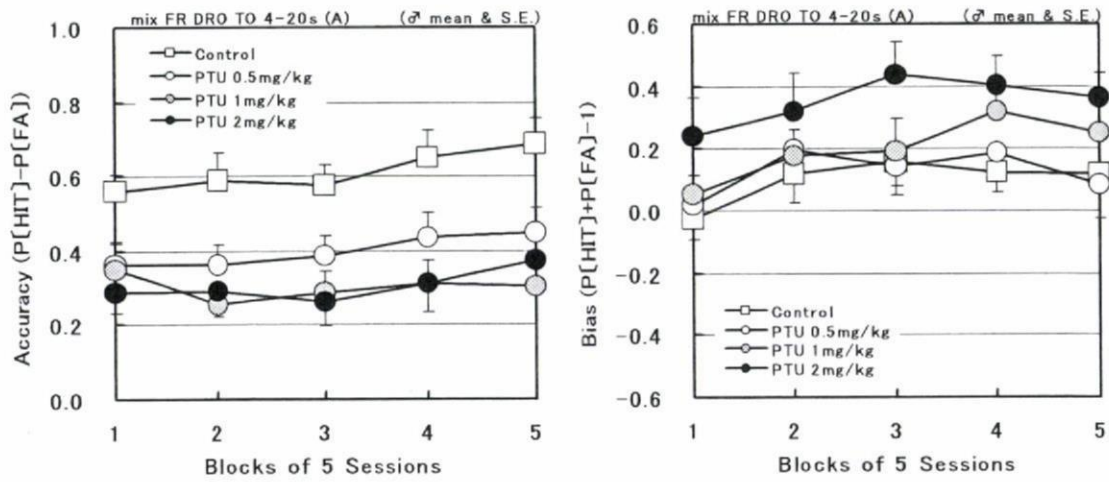


Fig. 8 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第2段階(変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化と PTU の影響(対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

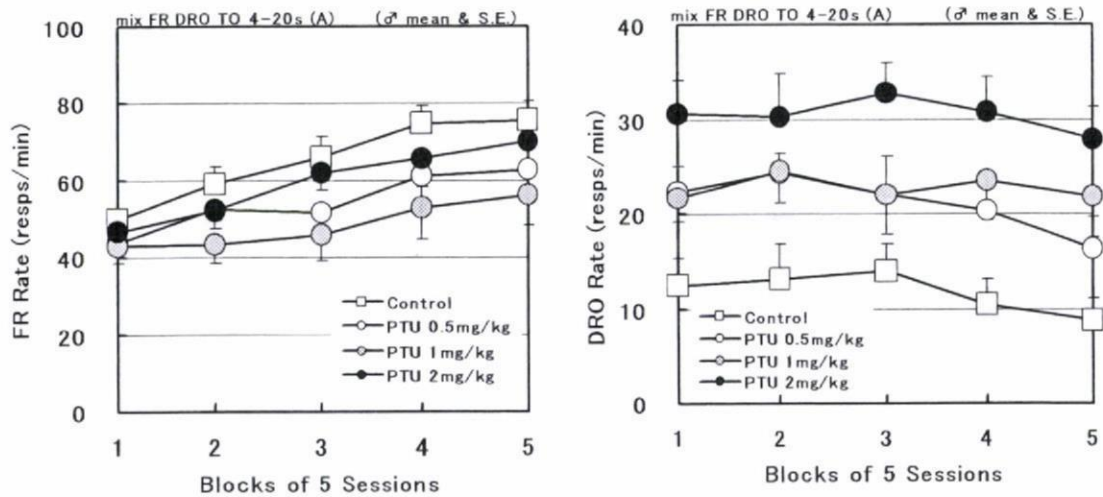


Fig. 9 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第2段階(変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と PTU の影響(対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

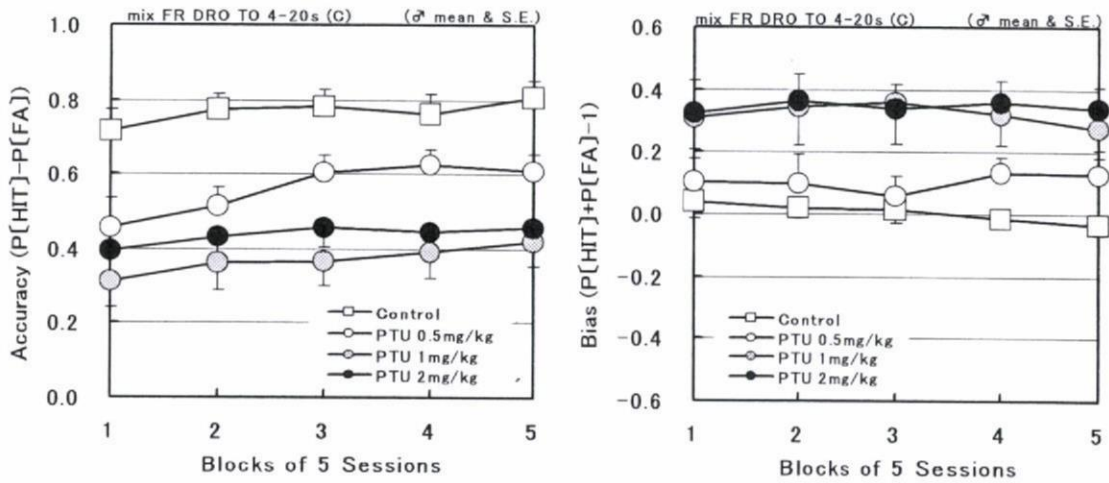


Fig. 10 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(変動タイムアウト上下系列4 - 20秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化とPTUの影響(対照群6匹、他は1群8匹)

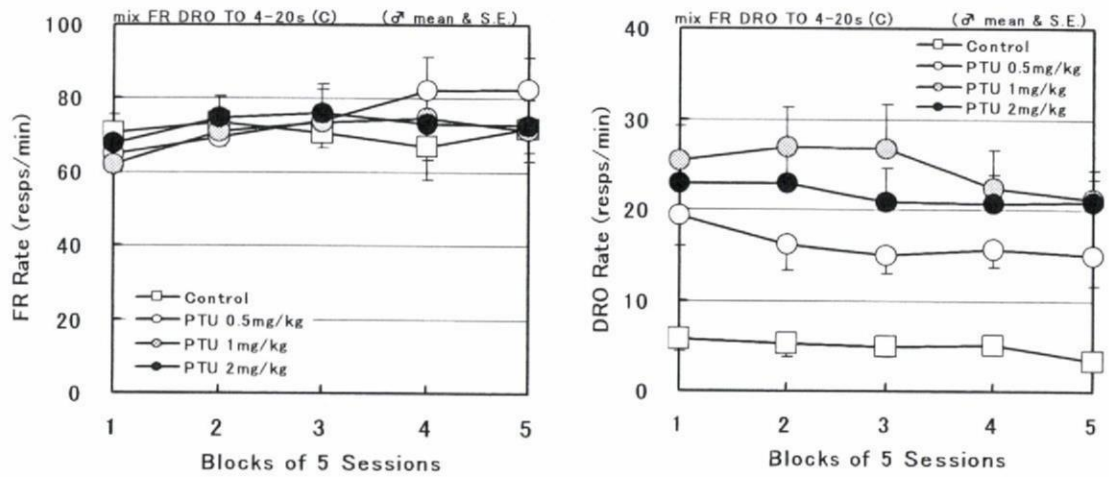


Fig. 11 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(変動タイムアウト上下系列4 - 20秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化とPTUの影響(対照群6匹、他は1群8匹)

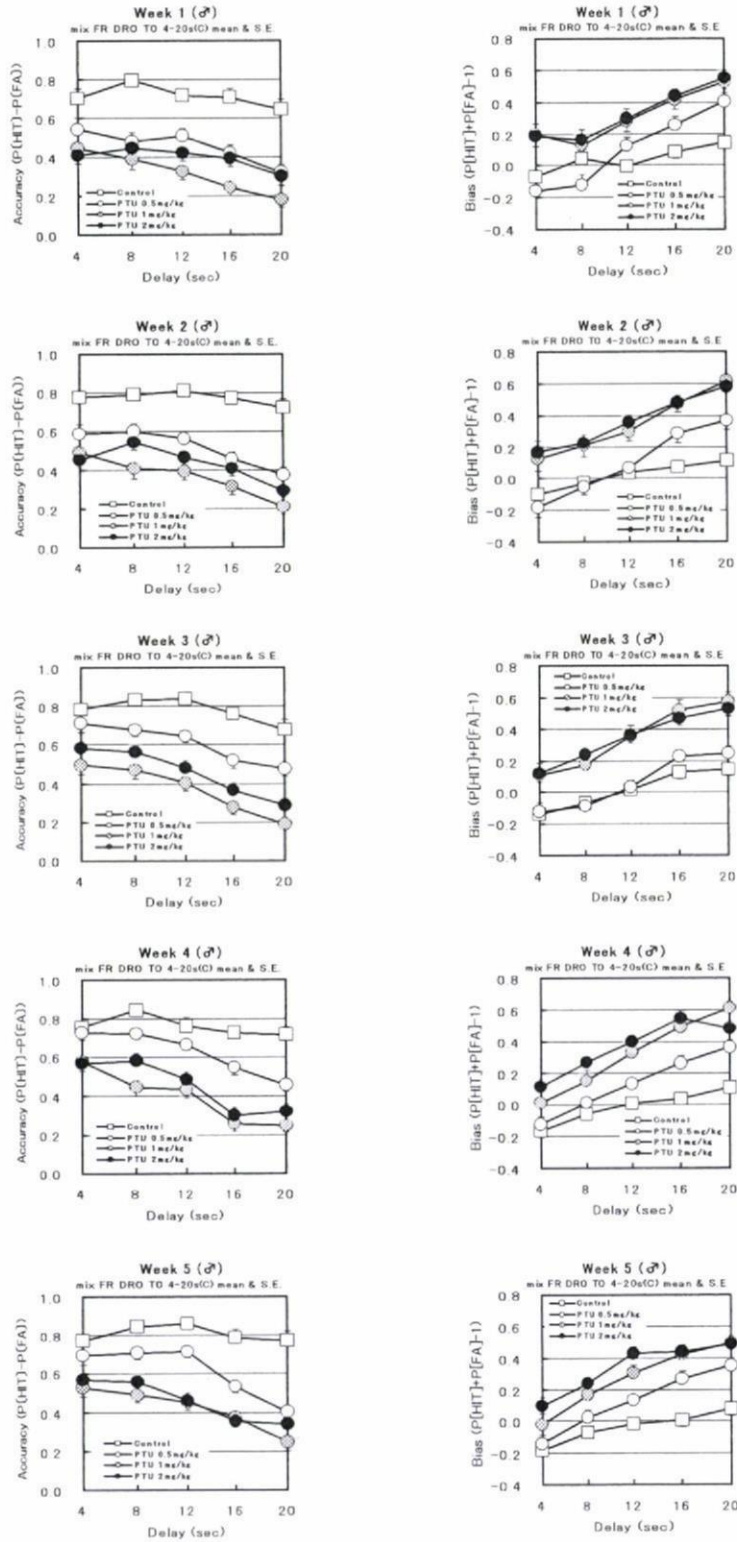


Fig. 12 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(タイムアウト長上下変動条件)訓練 1 週目(上)から 5 週目(下)における Delay-Accuracy 曲線(左)/Delay-Bias 曲線(右)と PTU の影響(対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

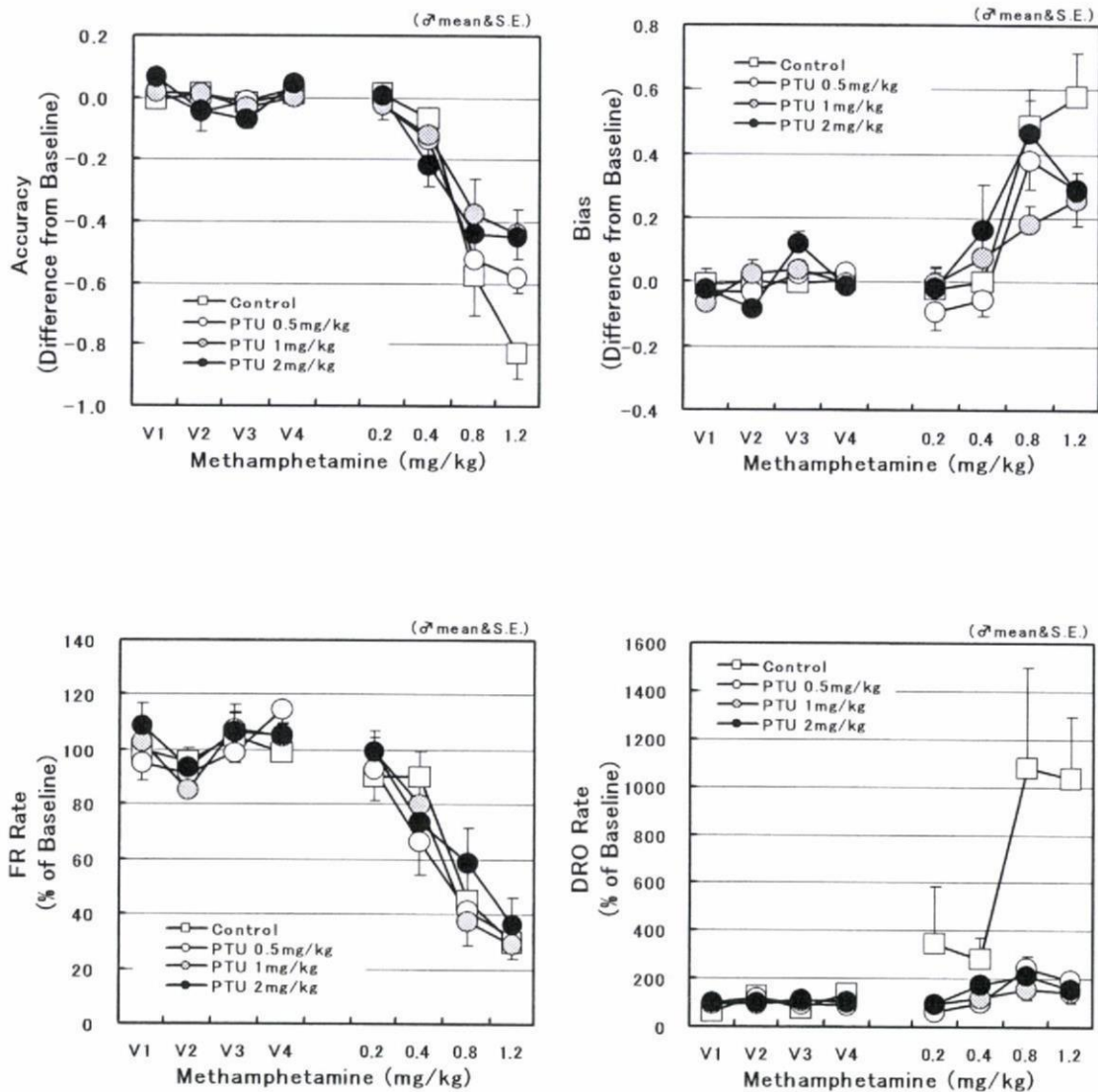


Fig. 13 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4-20s (C) スケジュール(タイムアウト長上下変動条件)下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果(1); Accuracy(左上)、Bias(右上)、FR 反応率(左下)、DRO 反応率(右下)を指標とした methamphetamine の量-影響曲線とPTUの影響 (AccuracyとBias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率とDRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を100とした%値を示した。)(対照群6匹、低用量群及び中用量群は1群8匹、高用量群は7匹)

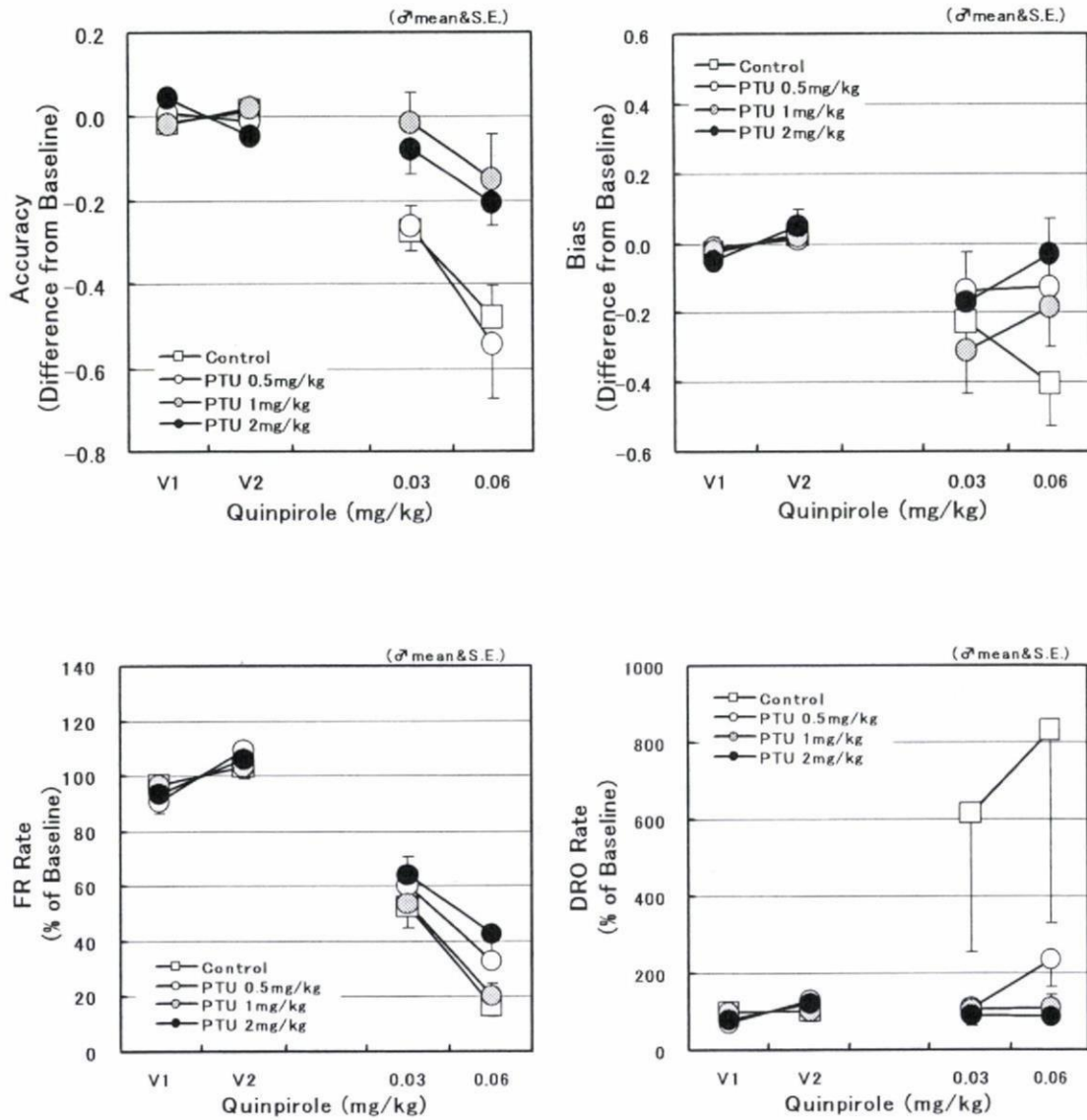


Fig. 14 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール(タイムアウト長上下変動条件)下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果(2); Accuracy(左上)、Bias(右上)、FR 反応率(左下)、DRO 反応率(右下)を指標とした quinpirole の量-影響曲線と PTU の影響(Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした%値を示した。)(対照群 6 匹、低用量群及び中用量群は 1 群 8 匹、高用量群は 7 匹)