

200839024A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試験の
構築に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 21 (2009) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試験の
構築に関する研究

平成 20 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 21 (2009) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試験の構築に関する研究 ----1 掛山正心	
II. 分担研究報告書	
1. 大脳皮質依存性の学習試験の構築に関する研究 -----10 掛山正心	
2. マウスの海馬および扁桃体の神経細胞に及ぼす 発達期ダイオキシン曝露の影響に関する研究 -----22 塚原伸治	
3. バレル皮質を用いた化学物質の神経系発達期に おける作用の評価に関する研究----- 32 船橋利也	
4. マウス集団型全自動行動解析システムを用いた 毒性試験に関する研究----- 37 掛山正心	
5. 情動行動試験バッテリーの構築に関する研究-----48 小川園子	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----57	
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----58	

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試験の構築に関する研究

研究代表者 掛山 正心

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 助教

研究要旨

われわれはこれまでに、イベント・アリーナ装置における Flavor Map 法を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で成立させることに成功した。本研究では、Flavor Map 試験時の神経活動依存的蛋白の発現を組織学的に解析し、Flavor Map 試験が確かに大脳新皮質依存性の学習課題であることを確認した。次に、ダイオキシン発達期曝露ラットをモデルとして、毒性試験への適用を行った。その結果、低用量ダイオキシン曝露特異的に対連合学習機能を阻害することが明らかとなった。

研究分担者

小川園子（筑波大学・教授）

船橋利也（横浜市立大学・准教授）

塚原伸治（独立行政法人国立環境研究所・主任研究員）

尾藤晴彦（東京大学・准教授）

A 研究目的

本研究では、発ガン性や致死性ではなく、より低用量の曝露でも生じうる認知・精神機能の発達への影響に焦点をあてる。事実、重金属やダイオキシンなど多くの物質で、母体にはなんら影響が顕われないレベルの曝露であっても、胎盤・母乳経由で移行した化学物質が子どもの脳の発達に影響を

及ぼすことが示されている。一方、これらの曝露量が比較的多い「先進」国においては、「じっとしてられない」など子どもの情動異常の増加、うつ病など精神疾患の増加、自殺率の増加などが社会的問題となっている(国内の自殺者数は、交通事故死者の5倍にあたる約3万人である)。このような「こころ」の発達の問題の原因の一つに、発達期の有害化学物質の曝露があることが、環境科学分野だけでなく精神医学分野の専門家からも指摘されている(Braun et al. EHP 114:1904-1909, 2006, Mill & Petronis J Child Psychol Psychiatry 49:1020-1030, 2008, Nigg et al. Biol Psychiatry 63:325-331, 2008 な

ど)。

子どもの「こころ」の健全な発達は万人の願いであり、化学物質曝露との因果関係の解明、影響の程度の科学的評価は、緊急かつ極めて重要な課題である。どのような影響がどの程度の曝露量であられるのかを説明するためには行動試験の存在が不可欠であるが、行動試験の結果は解釈が難しく、リスク評価では「学習成績が低下した」という一語に終止している。正確なリスク評価のためには、分子メカニズムに基づいた行動変化の科学的説明を行うことが今後の最重要課題であり、本研究の目標である。

分子レベルの物理的変動と個体レベルの変化(行動変化)を一致させるためには、定量性・再現性の高い行動試験法の存在が不可欠である。そこでわれわれは本研究の準備段階として、行動試験の開発を進めてきた。まず、ヒト認知機能の象徴といえる対連合学習機能の測定をラットで実現する“Flavor Map”試験を確立した。また、幼若ラットを用いた“KODOMO”試験を開発した。

一方、脳には数百億個の神経細胞が存在するが、特定の脳機能(≡行動変化)に関与する細胞(集団)は限定されている。すなわち特定の行動変化に対応した分子イベントは特定の細胞(集団)に限定されているはずである。このような脳の領域特異性、細胞(集団)特異性という空間的隔たりの存在が、行動と分子のリンクをさまたげて

いる。そこで我々は、Leica Microsystems とともに Immuno-LMD 法の開発を進め、これまでに、顕微鏡下で微量組織サンプルを回収し RNA 解析を行う際の定量性を劇的に向上させることに成功した。これにより特定の細胞集団や細胞、例えば行動試験に伴い活性化する神経細胞のみを回収し遺伝子発現解析を行うことが可能となった。行動変化に関わる細胞(集団)の同定、行動変化とパラレルに変動する分子イベントの解析、そしてそれらの曝露影響の解析を行うための有力なツールとなりうる。

そこで本研究では、情動機能並びに認知機能を測定する体系的行動試験バッテリーを確立する。試験バッテリーの中核として、申請者独自の二つの新たな試験法を置く。“Flavor Map”試験は、ヒト認知機能の象徴といえる対連合学習機能の測定をラットで実現しており、最高次の認知機能の影響を見逃さない。“KODOMO”試験により生後 20~30 日齢の幼若ラットの情動・認知機能の測定を実現する。これら新たな二つの試験に加えて、既存のテストの有効性を検証し試験バッテリーを構築する。

上記の研究成果を応用し、集団型全自動行動測定システムによる簡易行動試験を設計する。

行動試験の定量的データを科学的に裏づけるため、行動試験に用いた動物の脳を中心とした組織・細胞・分子レベルでの解析を行い、行動試験の定

量データと組織・分子レベルでの変化とを対応させる。以上の成果をまとめ、行動から分子レベルの包括的な行動試験手法を確立する。「影響をみのがさず」精密な測定を実現する確定試験版とともに、全自動行動測定システムを中心とした汎用性の高い簡易確定試験のプロトタイプを提示することを目的とする。

B 研究方法

ダイオキシン、メチル水銀の発達期低用量曝露動物を用い、Flavor Map 試験の試験プロトコールを作成する。PCB の発達期低用量曝露動物をモデルとして、KODOMO 試験の行動成績の定量的解析を行う。社会的認知や関心、社会的場面での不安・情動行動への化学物質の影響を評価するために、「社会的嗜好性・関心・恐怖の測定装置」および「社会的認知行動テスト」を新たに開発し、その有効性を検証する。

上記試験バッテリーの成果をもとに、ダイオキシンの発達期低用量曝露動物をモデルとして、集団型全自動行動測定システム IntelliCage の新たな試験タスクを作成し、簡易行動試験の設計を開始する。

Science 誌の行動実験に用いた動物の脳サンプル、ダイオキシン曝露動物の脳サンプルを用い、組織化学評価を行う。神経微細構造の構築に関わる分子と同時に蛍光物質を発現させるモデル培養細胞系を構築し、リアルタイ

ム解析により曝露影響を解析するシステムを構築する。Immuno-LMD の手法を確立する。ダイオキシン曝露による情動異常について、扁桃核と境界条床核に着目し電気生理学的解析を行う。

C 研究結果

(1) 大脳皮質依存性の学習試験の構築

われわれはこれまでに、イベント・アリーナ装置における Flavor Map 法を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で成立させることに成功した。本研究では、Flavor Map 試験時の神経活動依存的蛋白の発現を組織学的に解析し、Flavor Map 試験が確かに大脳新皮質依存性の学習課題であることを確認した。次に、ダイオキシン発達期曝露ラットをモデルとして、毒性試験への適用を行った。その結果、低用量ダイオキシン曝露特異的に対連合学習機能を阻害することが明らかとなった。

(2) マウスの海馬および扁桃核の神経細胞に及ぼす発達期ダイオキシン曝露の影響

TCDD の発達期曝露は成熟個体の記憶学習や情動に影響を及ぼすことが指摘されている。しかしながら、曝露によって変容するこれらの機能への影響の詳細については不明な点が多く残されている。本研究では、記憶

学習や情動に関与する海馬と扁桃体に着目し、これらの領域に存在する神経細胞とグリア細胞の細胞骨格タンパク質の発現に対する影響について検討した。TCDDあるいは臭素化ダイオキシンであるTBDDを妊娠12.5日目に単回経口投与した母ラットから生まれた仔ラットの海馬および扁桃体を成熟期に採取した。採取した組織中の神経細胞の微小管結合タンパク質(tauとMAP2)およびアストログリアの骨格タンパク質(GFAP)のmRNA発現レベルをリアルタイムPCR法により解析した。その結果、TCDD曝露群の雄マウスの扁桃体におけるtauおよびMAP2のmRNA発現レベルは対照群に比べて有意に増加したが、海馬のtauおよびMAP2に対する影響はみられなかった。一方、TBDDを曝露した雄ラットの海馬におけるtauおよびMAP2のmRNA発現レベルは対照群に比べて有意に高く、扁桃体ではTBDD曝露の影響はみられなかった。雄マウスの海馬および扁桃体におけるGFAPのmRNAレベルはTCDDおよびTBDDの影響をうけなかった。雌マウスにおけるtau、MAP2およびGFAPのmRNA発現レベルに対するTCDDおよびTBDD曝露の影響は有意ではなかった。以上の結果から、TCDDあるいはTBDDの発達期曝露は成熟した雄マウスの神経細胞の細胞骨格に影響を及ぼすことが示唆された。その影響はTCDDとTBDDとの間で異なり、また、TCDD

曝露による影響については雌雄差があることも明らかになった。

(3) バレル皮質を用いた化学物質の神経系発達期における作用の評価

本年度は、化学物質の中樞神経系への影響を見る目的でその指標を探索した。その中で、発達期においてラットのバレル皮質のシナプス形成がホルモン曝露の影響を受けることが明らかとなった。すなわち、IV層を電気刺激してII/III層で記録した場合、そのシナプスにおけるAMPA受容体GluR1のシナプスへの移行が雄性特異的にエストロゲン依存性であることがわかった。また、エストロゲンは局所で作用していることが示唆された。このことは、様々な精神疾患の罹患率に性差のあること、特に発達障害の性差の形成機序を考える上で大変興味深い知見がもたらされた。

(4) マウス集団型全自動行動解析システムを用いた毒性試験

われわれはこれまでに、イベント・アリーナ装置におけるFlavor Map法を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で成立させることに成功した。本研究では、Flavor Map試験時の神経活動依存的蛋白の発現を組織学的に解析し、Flavor Map試験が確かに大脳新皮質依存性の学習課題であることを確認した。次に、ダイオキシン発達期曝露ラットをモデルとして、毒性試験への適用を行った。その結果、

低用量ダイオキシン曝露特異的に対連合学習機能を阻害することが明らかとなった。

(4) 情動行動試験バッテリーの構築

自発的活動性、情動レベルや不安関連行動の計測に広く用いられているホームケージ回転車テスト、Y字型迷路テスト、オープンフィールド行動テスト、明暗往来箱テストに加えて、社会的場面での不安・情動行動や、社会的認知や関心といった行動形質への化学物質の影響の評価をも試みた。妊娠12.5日にTCDD0.6 μ g/kを経口投与された母親から得られたC57BL/6(ダイオキシン高感受性系統)の雌雄のマウス及びDBA/2(ダイオキシン低感受性系統)の雄マウス、計26匹を用いて行動解析を行った。その結果、出生前でのTCDDへの曝露は、成体になってからの自発的活動性には雌雄を問わずほとんど影響しないが、いくつかの情動性測度において、C57BL/6マウス特異的にその効果が検出された。また、同性の見知らぬ個体と出会わせるソーシャルインターアクションテストでは、TCDD曝露が雌マウスの社会的不安行動のレベルを亢進させることが見出された。

D 健康危険情報

特になし

E 研究発表

1. 論文発表

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106(1):316-21, 2009.

Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, J-Å., Pfaff, D.W., and Ogawa, S. 2009 Effect of ER- β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiology and Behavior*, 96, 300-306.

Cushing, B.S., Perry, A., Musatov, S., Ogawa, S. and Papademetriou E. 2008 Estrogen receptors in the medial amygdala inhibit the expression of male prosocial behavior. *Journal of Neuroscience*, 28, 10399-10403.

Kavaliers, M., Devidze, N., Choleris, E., Fudge, M., Gustafsson, J.-Å., Korach, K.S., Pfaff, D.W., and Ogawa, S. 2008 Estrogen receptors α and β mediate different aspects of the facilitatory effects of female cues on male risk taking. *Psychoneuroendocrinology*, 33, 634-642.

2. 学会発表

掛山正心. 発達期のダイオキシン類曝露による高次脳機能のかく乱. 第20回環境ホルモン学会講演会

〈BPA等の低用量影響の標的「中枢神経」〉 2009年2月、東京

掛山正心. ダイオキシンによる脳の発達異常～性行動、学習行動、情動行動. 第16回生殖・発生毒性学東京セミナー 2009年3月、東京

遠藤俊裕, 掛山正心, 遠山千春. 集団型全自動行動解析装置を用いた胎仔期授乳期の低用量ダイオキシン曝露マウスの行動影響評価. 環境ホルモン学会第11回研究発表会, 2008/12, 東京

Takeyama M, Hojo R, Tohyama C. Chemically-induced attention deficit hyperactivity disorder-like behavior in juvenile rats detected by a newly developed behavioral test. The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2008), 2008/11, Washington DC.

Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Development of novel behavioral tests for rodents to study the high-order brain function altered by in utero and lactational exposure to dioxins. 28th International Symposium on

Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2008), 2008/08, Birmingham, Oral presentation at Toxicology Session.

小川園子. 社会的絆の行動神経内分泌学: マウスの行動に学ぶ. 国立遺伝学研究所第5回行動遺伝学研究会 2009年3月 三島

Ogawa, S. Introduction to Behavioral Analysis of Genetically Modified Mice. Seminars on "Production and Management of Transgenic and SPF Rodents for Biomedical Research." Monash University, Malaysia, November, 2008.

Ogawa, S. Neuroendocrine Basis of Reproduction: What Can We Learn from the Mouse? Symposium on "Recent Advances in Reproduction." Monash University, Malaysia, October, 2008.

Ogawa, S. Behavioral Neuroendocrine Bases of KIZUNA Formation. Japan-China Symposium on "Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization" Tsukuba, Japan, October, 2008.

Ogawa, S. and Tsukahara, S. Neuroendocrine Bases of Sex

Differences in Emotional Behavior, International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation, Fukuoka, Japan, September, 2008.

Ogawa, S. Role of Two Types of Estrogen Receptors in the Regulation of Mouse, US-Japan Symposium on "Brain and Steroid", Gifu, Japan, September, 2008.

小川園子 性・社会行動の制御に及ぼすエストロゲン受容体の役割 中国男科学会年次大会・特別講演 2007年4月26日 上海

Lei, K., Kramer, K. M., Musatov, S., Ogawa, S., Cushing, B. S. 2008 Increased expression of ER α in the bed nucleus of the stria terminalis alters social behavior. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, Washington DC, USA.

Kavaliers, M., Choleris, E., Ogawa, S., Pfaff, D. W. 2008 "Trust" in mice: Oxytocin mediated mate choice copying by female mice. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, Washington DC, USA.

Tsuda, M.C., Xiao, K., Ogawa, S. 2008 Effect of neonatal estrogen administration on sexually dimorphic

behaviors in estrogen receptor β knockout female mice. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, Washington DC, USA.

Uchimura, T., Fukushi, A., Tsuda, M.C., Sano, K., Kashimura, M., Higo, S., Hood K. E., Tsukahara, S., Vasudevan, N., Ogawa, S. 2008 Anxiety and exploratory behaviors and social interactions in mice selectively bred for aggressiveness. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, Washington DC, USA.

Watai, K., Tsuda, M.C., Sano, K., Uchimura, T., Wintermantel, T. M., Elzer, J., Schutz, G., Vasudevan, N., Musatov, S., Ogawa, S. 2008 Neuronally expressed estrogen receptor- α (ER α) is required for the estrogen (E) -induced increase in running wheel activity in male mice. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, Washington DC, USA.

Ogawa, S., Sano, K., Tsuda, M.C., Uchimura, T., Watai, K., Wintermantel, T.M., Schutz, G., and Vasudevan, N. 2008 Neuronally expressed estrogen receptor- α (ER α) is critical for the estrogen (E) -induced rise in running

wheel activity in male mice. The 12th Annual Meeting of Society for Behavioral Neuroendocrinology, July, Groningen, The Netherlands.

Tsuda, M.C., Nagata, K., Watai, K., Sano, K., Nakata, M., Ogawa, S. Effects of maternal separation on social behaviors in mice. 第68回日本動物心理学会大会, 9月, 水戸

Vasudevan, N., Uchimura, T., Watai, K., Tsuda, M.C., Kashimura, M., Higo, S., Tsukahara, S., Ogawa, S. Analysis of protein expression in the amygdala of mice that are selectively bred for aggressive behaviors. 第68回日本動物心理学会大会, 9月, 水戸

Sano, K., Nakata, M., Sato, K., Watai, K., Uchimura, T., Nagata, K., Tsuda, M.C., Wintermantel, T.M., Elzer, J., Schutz, G., Xiao, K., Vasudevan, N., Ogawa, S. Deletion of ER α selectively in neurons alters sociosexual behavior in mice. 第68回日本動物心理学会大会, 9月, 水戸

Ogawa, S., Watai, K., Tsuda, M.C., Uchimura, T., Sano, K., Wintermantel, T.M., Elzer, J., Schutz, G., Toda, K., Vasudevan, N. Regulation of running wheel activity by estrogen in male mice. 第68回日本動物心理学会大会, 9月, 水戸

永田知代, 津田夢芽子, 田中麻衣, 塚原伸治, 中西剛, 小川園子 胎児期におけるエストロゲンの過剰産生が成体期の情動・社会行動に及ぼす影響 第68回日本動物心理学会大会, 9月, 水戸

Ogawa, S., Sano, K., Nakata, M., Nagata, K., Sato, K., Watai, K., Uchimura, T., Tsuda, M.C., Wintermantel, T. M., Schütz, G., Vasudevan, N. 2008 Deletion of ER α selectively in neurons abolishes sexual and aggressive behaviors in mice. The 31th Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, July, Tokyo.

Tanahara, Y., Tsuda, M. C., Nagata K., Higo S., and Ogawa S. 2008 Disrupted development of aggressive behaviors in maternally separated males. Japan/China Symposium on "Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization", October, Tsukuba.

Nagata, K., Tanaka, M., Tsuda, M. C., Nakanishi, T., and Ogawa, S. 2008 Effect of prenatal estrogen on emotional and aggressive behavior in female mice. Japan/China Symposium on "Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization", October, Tsukuba.

特に無し

Iwakura, T., Kato, T., Tsukahara, S., Tsuda, M.C., Watai, K., Uchimura, T., Kuroda, Y., Shiga, T., Ogawa, S., Ohtani-Kaneko, R. 2008 Proteomics analyses of changes in protein profiles in rat AVPV and SDN-POA during the critical period. International Symposium for Gonad and Brain Sex Differentiation, September, Fukuoka.

Tsuda, M.C., Nakata, M., Watai, K., Ogawa, S. 2008 Peri-pubertal expression of aggression in maternally separated estrogen receptor β knockout male mice. US/Japan Neurosteroid Symposium, September, Gifu.

Sano, K., Tsuda, MC., Watai, K., Uchimura, T., Wintermental, T.M., Elzer, J., Schutz, G, Vasudevan, N., Ogawa, S. 2008 Estrogenic regulation of home-cage running wheel activity in male mice. US/Japan Neurosteroid Symposium, September, Gifu.

F 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案取得

特に無し

3. その他

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

大脳皮質依存性の学習試験の構築に関する研究

研究代表者 掛山 正心

東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 助教

研究要旨

われわれはこれまでに、イベント・アリーナ装置における Flavor Map 法を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で成立させることに成功した。本研究では、Flavor Map 試験時の神経活動依存的蛋白の発現を組織学的に解析し、Flavor Map 試験が確かに大脳新皮質依存性の学習課題であることを確認した。次に、ダイオキシン発達期曝露ラットをモデルとして、毒性試験への適用を行った。その結果、低用量ダイオキシン曝露特異的に対連合学習機能を阻害することが明らかとなった。

研究協力者

尾藤晴彦（東京大学大学院医学系研究科脳神経医学専攻）、仲井沙織（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター）、宮崎航（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター）

A 研究目的

本研究では、発ガン性や致死性ではなく、より低用量の曝露でも生じうる認知・精神機能の発達への影響に焦点をあてる。事実、重金属やダイオキシンなど多くの物質で、母体にはなんら影響が顕われないレベルの曝露であっても、胎盤・母乳経由で移行した化

学物質が子どもの脳の発達に影響を及ぼすことが示されている。一方、これらの曝露量が比較的多い「先進」国においては、「じっとしてられない」など子どもの情動異常の増加、うつ病など精神疾患の増加、自殺率の増加などが社会的問題となっている(国内の自殺者数は、交通事故死者の5倍にあたる約3万人である)。このような「こころ」の発達の問題の原因の一つに、発達期の有害化学物質の曝露があることが、環境科学分野だけでなく精神医学分野の専門家からも指摘されている(Braun et al. EHP 114:1904-1909, 2006, Mill & Petronis J Child Psychol

Psychiatry 49:1020-1030, 2008, Nigg et al. Biol Psychiatry 63:325-331, 2008 など)。

子どもの「こころ」の健全な発達は万人の願いであり、化学物質曝露との因果関係の解明、影響の程度の科学的評価は、緊急かつ極めて重要な課題である。どのような影響がどの程度の曝露量であられるのかを説明するためには行動試験の存在が不可欠であるが、行動試験の結果は解釈が難しく、リスク評価では「学習成績が低下した」という一語に終止している。正確なリスク評価のためには、分子メカニズムに基づいた行動変化の科学的説明を行うことが今後の最重要課題であり、本研究の目標である。

分子レベルの物理的変動と個体レベルの変化(行動変化)を一致させるためには、定量性・再現性の高い行動試験法の存在が不可欠である。そこでわれわれは本研究の準備段階として、行動試験の開発を進めてきた。まず、ヒト認知機能の象徴といえる対連合学習機能の測定をラットで実現する“Flavor Map”試験を確立した。また、幼若ラットを用いた“KODOMO”試験を開発した。

一方、脳には数百億個の神経細胞が存在するが、特定の脳機能(≡行動変化)に関与する細胞(集団)は限定されている。すなわち特定の行動変化に対応した分子イベントは特定の細胞(集団)に限定されているはずである。このような脳の領域特異性、細胞(集

団)特異性という空間的隔たりの存在が、行動と分子のリンクをさまたげている。そこで我々は、Leica Microsystems とともに Immuno-LMD 法の開発を進め、これまでに、顕微鏡下で微量組織サンプルを回収し RNA 解析を行う際の定量性を劇的に向上させることに成功した。これにより特定の細胞集団や細胞、例えば行動試験に伴い活性化する神経細胞のみを回収し遺伝子発現解析を行うことが可能となった。行動変化に関わる細胞(集団)の同定、行動変化とパラレルに変動する分子イベントの解析、そしてそれらの曝露影響の解析を行うための有力なツールとなりうる。

そこで本研究では、情動機能並びに認知機能を測定する体系的行動試験バッテリーを確立する。試験バッテリーの中核として、申請者独自の二つの新たな試験法を置く。“Flavor Map”試験は、ヒト認知機能の象徴といえる対連合学習機能の測定をラットで実現しており、最高次の認知機能の影響を見逃さない。“KODOMO”試験により生後 20~30 日齢の幼若ラットの情動・認知機能の測定を実現する。これら新たな二つの試験に加えて、既存のテストの有効性を検証し試験バッテリーを構築する。

上記の研究成果を応用し、集団型全自動行動測定システムによる簡易行動試験を設計する。

行動試験の定量的データを科学的に裏づけるため、行動試験に用いた動

物の脳を中心とした組織・細胞・分子レベルでの解析を行い、行動試験の定量データと組織・分子レベルでの変化とを対応させる。以上の成果をまとめ、行動から分子レベルの包括的な行動試験手法を確立する。「影響をみのがさず」精密な測定を実現する確定試験版とともに、全自動行動測定システムを中心とした汎用性の高い簡易確定試験のプロトタイプを提示することを目的とする。

B 研究方法

1. ダイオキシンの発達期低用量曝露動物を用い、Flavor Map 試験の試験プロトコールを作成する。PCBの発達期低用量曝露動物をモデルとして、KODOMO 試験の行動成績の定量的解析を行う。社会的認知や関心、社会的場面での不安・情動行動への化学物質の影響を評価するために、「社会的嗜好性・関心・恐怖の測定装置」および「社会的認知行動テスト」を新たに開発し、その有効性を検証する。
2. 上記試験バッテリーの成果をもとに、ダイオキシンの発達期低用量曝露動物をモデルとして、集団型全自動行動測定システム IntelliCage の新たな試験タスクを作成し、簡易行動試験の設計を開始する。
3. Science 誌の行動実験に用いた動物の脳サンプル、ダイオキシン曝露動物の脳サンプルを用い、組織化学評価を行う。神経微細構造の構築に関わ

る分子と同時に蛍光物質を発現させるモデル培養細胞系を構築し、リアルタイム解析により曝露影響を解析するシステムを構築する。Immuno-LMD の手法を確立する。ダイオキシン曝露による情動異常について、扁桃核と分界条床核に着目し電気生理学的解析を行う。

C 研究結果

(1) 免疫組織学的検討

神経活動依存的に発現増強する Arc は、鋭敏な神経活動分子マーカーとして広く利用されており、また、その産物は長期記憶・長期可塑性に直接関与することから、近年特に注目を集めている。そこで、Arc 遺伝子プロモーターを解析し、転写開始部位より 7 kb 程上流に存在する約 100bp の短いゲノムエレメントが Arc の活動依存的発現制御において重要であることを見出した。Arc 蛋白が神経活動レポーターとして有用であることが強く示唆された。

そこで Arc 抗体を用い、Flavor Map 試験の学習成立前と後とで Arc 蛋白の発現を検証したところ、大脳新皮質において対連合学習特異的な発現増強があることを見出した (図 1)。

(2) 行動試験の毒性試験への適用

慣化プロトコールにおける、各曝露群の sand-well 到達時間の平均値を図 2 に示す。全体として、開始直後の sand-well への到達時間は 300~500 秒

程度であったが、日を迫うごとに到達時間は短くなり、10日後にはすべてのラットで60秒以下となった。しかし曝露群では、Control群に比して有意に到達時間の遅延がみとめられ、特に200 ng TCDD/kg群で顕著であった。ステージ進入時間を群間で比較すると、第一日目はすべてのラットが300～450秒を要し、有意差が認められなかった(図2)。しかし200 ng TCDD/kg群では、3日目以降18日目まで、Control群より有意に進入時間遅延が認められた(図2, $p < 0.05$)。800 ng TCDD/kg群では、7日目と9日目はControl群よりも有意に短く、18日目では逆に有意に長かった。

トライアル所要時間をみると、5日目から18日目まで(7日目と12日目の一部をのぞく)、すべての曝露群でControl群よりも有意に延長が認められた(図2、3, $p < 0.05$)。

以上、到達時間、ステージ進入時間、トライアル所要時間については、24日目に群間での差はみられなくなった(図2、3)。

Flavor map試験における試験成績(Performance Index)を図4、5に示す。対照群は日をおうごとに徐々に成績が上昇し、Session13で有意に高くなった。しかし曝露群では成績は安定せず、200 ng TCDD/kg群はChanceレベル(学習していないラットが偶然正解にたどりつく期待値)のままだった。800 ng TCDD/kg群は全体的に高い傾向を示した。

D 考察

ダイオキシン曝露による慣化時間の遅延は、学習性不安様行動を示すと考えることができる。今回用いた曝露量では、一般的な活動量等にはまったく影響があらわれないことが多くの先行研究で確認されていることもあり、ダイオキシン類が鬱的影響を引き起こすかどうかはこれまでまったく検討されていない。ヴェトナム戦争の退役軍人の調査では、血中ダイオキシン類濃度と鬱症状とに相関があることは報告されているが、発達期曝露の影響や動物実験による報告は皆無であり、ダイオキシンの発達神経毒性として今後さらに詳細な研究が必要である。

到達時間、ステージ進入時間、トライアル所要時間については、24日目に群間での差はみられなくなった(表1)。よって馴化を終了し、対連合学習試験へと移行し、低用量曝露による対連合学習の不成立を確認した。

発達期ダイオキシン曝露により、特に200 ng/kg(妊娠15日目の母動物に単回経口投与)という低用量曝露において、鬱的症状の惹起、ならびに対連合学習機能の障害があることが明らかとなった。学習行動試験における用量特異的な影響は、これまでにオペラント学習試験(レバー押し学習試験)についても、TCDDとPCB126の相当TEQ量曝露で同様の逆U字パターンがあることをわれわれは別途、報告し

ており (Hojo et al. 2008)、ダイオキシンによる毒性の特性を示すものである可能性が考えられた。

Flavor Map 試験では、個々の対連合記憶 (場所と味の対連合) をお互いに比較しながら自己の経験を整理 (体系化) することで、Flavor Map をシティ・マップとして習得することができるのだろう。故に、既知のマップの中で一部の刺激だけを変更した場合、ラットはわずか一試行で対応できる、すなわちスキーマを利用して記憶されたマップを書き換えることができる。しかし、すべての手がかりを変更してしまうと対応できず、新しいマップを学習するには最初と同じ時間を要することとなる。このスキーマは脳の中では大脳新皮質に存在すると考えられ、故に海馬を破壊しても、破壊前のマップには正しく対応できるのである。今回の研究成果である Arc 発現解析の結果は、スキーマが大脳新皮質にあることを強く示唆する結果だといえる。

E 参考文献

Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG Schemas and memory consolidation. *Science*, 316:76-82, 2007.

Hojo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohayama C. Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Env Health Prev Med.*,

13:162-168, 2008.

Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Kakeyama M, Sone H, Tohyama C, Tomita T. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 205:98-105, 2005.

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(1):316-21, 2009.

Aggleton JP and J. Pearce M, Neural systems underlying episodic memory: Insights from animal research, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 356:1467-1482, 2001.

Albasser MA, Poirier GL, Warburton EC and Aggleton JP, Hippocampal lesions halve immediate-early gene production counts in retrosplenial cortex: Distal dysfunctions in a spatial memory system, *European Journal of Neuroscience* 26: 1254-1266, 2007.

Aldinio C, French ED and Schwarcz R, The effects of intrahippocampal ibotenic acid and their blockade by (-)-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid: Morphological and electroencephalographical analysis, *Experimental Brain Research* 51:36–44, 1983.

Han X and Boyden ES., Multiple color optical activation, silencing and desynchronisation of neural activity with single-spike temporal resolution, *PLoS One* 2e299. 2007.

Jarrard LE, On the use of ibotenic acid to lesion selectively different components of the hippocampal formation, *Journal of Neuroscience Methods* 29 :251–259, 1989

Kelley MS and Steward O, Injury-induced physiological events may modulate gene expression in neurons and glia, *Reviews in the Neurosciences* 8:147–177, 1997

Miyashita Y. Cognitive memory: Cellular and network machineries and their top-down control, *Science* 306:435–440, 2004.

Morris R.G.M., Elements of a neurobiological theory of hippocampal function: The role of synaptic plasticity, synaptic tagging and schemas, *European*

Journal of Neuroscience 23 :2829–2846, 2006.

Moser EI, Forrest E, Andersen P and Morris RG Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 9697–9701, 1995.

Rudy JR and Sutherland RJ, Is it systems or cellular consolidation? Time will tell. An alternative interpretation of the Morris Group's recent Science Paper, *Neurobiology of Learning and Memory* 89 :366–369, 2008

Squire LR, Rapid consolidation, *Science* 316:57–58, 2007

Squire LR, Stark CE and Clark RE, The medial temporal lobe, *Annual Review of Neuroscience* 27: 279–306, 2004.

Whishaw IQ and Tomie JA, Piloting and dead-reckoning dissociated by fimbria-fornix lesions in a rat food-carrying task, *Behavioral Brain Research* 89 :87–97, 1997.

F. 図の説明

図 1. 対連合学習に伴う、大脳嗅内皮質近傍領域近傍領域における Arc 蛋白の発現増強. a; ラット脳の前額断模

式図。赤枠は解析した脳領域を示す。
b; 対連合学習が成立しているラット
で、試験1時間後。c; 未成立のラッ
ト。

200 ng TCDD/kg 曝露群では学習が成
立していないことが確認された。

* $p < 0.05$, above chance value; # $p < 0.05$,
lower than control

図2. Event Arena 慣化プロトコール
における各曝露群の sand-well 到達時
間の推移。*, $P < 0.05$.

図3. スタート箱からテストアリー
ナに出てくるまでの所要時間

図4. 経胎盤・経母乳ダイオキシン曝
露がラット対連合学習機能(Flavor
Map 試験)に及ぼす影響。図c、dの
Control のデータは共通。*, $p < 0.05$, vs
Chance level.

図5. 経胎盤・経母乳ダイオキシン曝
露がラット対連合学習機能(Flavor
Map 試験)に及ぼす影響の検証。46日
目 (Session 46) では、Non-Cued trial
を行った。すなわちスタート箱で手が
かりペレットを与えず試験を行った
ところ、すべての実験群で成績が低下
した。前日 (Session 45) と翌日
(Session 47) は通常通り手がかりペレ
ットを与えた試験であり、対照群と
800 ng TCDD/kg 曝露群では46日目に
比して有意に高い成績を示し、200 ng
TCDD/kg 曝露群では46日目とかわら
なかった。すなわち、対照群と800 ng
TCDD/kg 曝露群では手がかりペッ
トを手がかりとして正解に向かうとい
う対連合学習が成立しており、一方

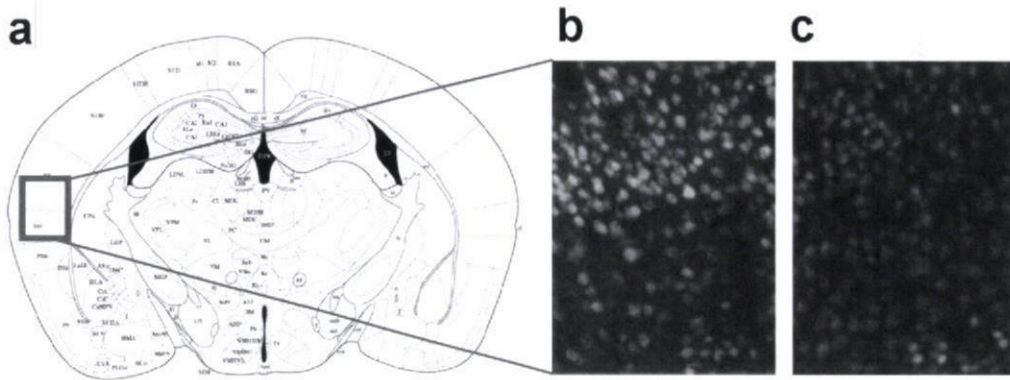


图 1