

第二に、情動機能の異常がダイオキシン曝露の影響として、新たに浮かび上がってきたことである。これまで、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うつ症状とに相関があることは報告されているが(Michalek et al. 2003)、発達期曝露の影響や動物実験による報告は皆無であった。先行研究において、学習行動試験の結果が錯綜していたのも、情動機能異常により行動パターンが変質し、その副次的結果として行動試験の成績に影響があらわれた可能性がある。そこで、学習機能影響と情動機能影響を区別して検出・解析し、影響の実態を明らかにする必要がある。

本研究では、マウスの集団型全自動行動解析システムを用いた試験を行い、ダイオキシンの情動認知機能への影響をマウスで再現することを目指した。

B 研究方法

(1) 試験動物

ダイオキシン高感受性系統であるC57BL/6マウス(LD50=0.182 mg/kg)を用いた(Chapman & Schiller 1985)。クリーン飼育室で室温 24±2°C、湿度 35.0~75.0%、人工照明(午前8時~午後8時点灯)で飼育した。滅菌したポリカーボネート製ケージ(280W×440D×180Hmm、東洋理工株式会社)を使用し、7日に1回以上の頻度で交換した。実験動物用固型飼料(ラボMRストック、日本農産工業製研究検定

飼育用)を自由摂取させ、滅菌した水道水をポリカーボネート製給水ボトル(700ml、トキワ科学器械株式会社)を用いて自由に飲ませた。1ケージあたり、F0動物の検疫・馴化期間は1~2匹(同性)で飼育した。14週齢で雄1雌1の交配対を単一のケージで設け、交配開始日の夕方から昼夜同居させた。交配開始日の翌日から雌の膣垢を毎日午前中に採取し、膣栓あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。妊娠15日目に下記披験物質を母体に投与した。一腹あたり一匹の雄仔マウスを各を学習行動試験に供した。別の仔動物は小川、塚原の研究に用いた。

(2) 投与液

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD、純度99.9%、n-ノナン溶媒、50 µg/ml)はCambridge Isotope Laboratories株式会社より購入した。これらは、最終濃度4%のn-ノナン(ナカライテスク社製)を含むコーンオイル(シグマアルドリッチ社製)を溶媒とする溶液中に0.06または0.3 µg/mLの投与溶液を作成した(体重1kgあたり1.0 mLの投与溶液を投与)。これらを妊娠12.5日目にマウス用胃ゾンデを装着したシリンジを用いて経口投与した(それぞれ、Control群(=対照群)、0.6 µg TCDD/kg 群、3.0 µg/kg 群)。

(3) 集団型行動解析システム

集団型全自動行動・学習測定システム IntelliCage (New Behavior 社、Zurich)(Galsworthy et al. 2005)を導入した。IntelliCage とは、チューリッヒ大学 Hans-Peter Lip 教授が開発したもので、ホームケージ内でマウスに外的ストレスを与えることなく運動量測定と学習行動試験を行うことのできる装置で、測定するマウスに対して ID チップを埋め込むことで、複数のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動測定することができる。報酬は飲水で、4つのコーナーに用意されている。4コーナーにはそれぞれ2つずつ、計8箇所の選択肢が用意されており、正解位置の指定(空間学習課題)や LED ランプを手がかりとして用いる(光弁別学習)、ノーズポーク(マウスが選択肢の穴に鼻をいれる)を用いたオペラント学習といった学習課題を組み合わせることができる。全てのマウスに対して個別のタスクを組み合わせることができ、外的ストレスもなく、より正確な運動量や学習課題の正答率・反応率を測定することができる。

まず最初に、使用するマウス全てに IC チップを皮下に埋め込んだ。チップを埋め込んだ 24 時間以上後から、行動試験を行った。

(2)新規環境における運動量測定と試験装置への馴化

10~12 匹の被験動物を IntelliCage に同時に搬入し、直後から IntelliCage

の四隅のコーナーへのアクセス回数を記録することにより、新規環境における運動量を測定した。アクセス回数は、コーナーにある IC チップ読取機により、個々の動物のコーナーへのアクセス回数を自動記録した。

新規環境における運動量測定とあわせて、5 日間の馴化を行った。最初の 5 日間は全ての選択肢をどの時間帯でも正解とした。次の 3 日間は 1 回ノーズポークをしなければ飲水できないようにした。最後の 3 日間では、0 時~3 時の間だけ正解へアクセス可能とした。

(4)空間学習試験 1 (単純空間学習)

4 つのコーナーの内、対角線上の 2 つを正解として飲水可、残りの 2 つは不正解として飲水不可とした。10 匹を 5 匹ずつの 2 グループに分け、2 つのグループは正解となる選択肢を別にした。0 時~3 時の間だけ選択可能とし、その時間はケージ内にランプを点灯させることで示した。IntelliCage における以降の実験も全て同様にして時間制限を設けた。この課題は 7 日間行った。

(5)空間学習試験 2 (反復逆転課題)

空間学習試験 1 に対する逆転課題を与えた。すなわち、今まで不正解だった選択肢を正解にし、正解と不正解を逆にした。正解位置以外は空間学習試験 1 と同様で、7 日間行った。その後

5日置に正解と不正解を交互に変更する反復逆転課題を行った。

(6)統計解析

体重に関するデータは、多重比較検定により統計学的有意性を解析した。すなわち、Bartlett法による等分散性の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合はKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnnett法またはDunnnett型の多重比較を行った。学習行動に関するデータは、多元配置分散分析により解析し、FisherのPLSD法で各系統間または用量間の有意検定を行った。有意水準は5%とした。

C 研究結果

空間学習試験のControl群、0.6 μ g/kg曝露群、3.0 μ g/kg曝露群における各日毎の誤答率(% Error Choice)の平均値を図1ならびに図2に示した。空間学習試験1 (Day 1からDay 11)では、Control群では、Day 1(試験開始日)における平均% Error Choiceは38.8 \pm 3.0%であったが、日を追うごとに徐々に低下し、Day 3以降ではDay 1の平均% Error Choiceと比較して有意に低い値を示した($p < 0.05$)。Day 8では17.0 \pm 2.5%にまで低下した。0.6 μ g/kg曝露群、3.0 μ g/kg曝露群もControl群とほぼ同じ値を示した。

空間学習試験1に対する反復逆転課

題を与えた。すなわち、今まで不正解だった選択肢を正解にし、正解と不正解を逆にした。% Error Choiceは、Day 12では全ての曝露群で、空間学習試験1の初日であるDay 1の値よりも有意に高い値を示した($p < 0.05$)。Control群ではDay 16以降逆転課題開始時(Day 12)と比べて% Error Choiceは有意に減少していた($p < 0.05$)。

二度目の逆転課題では、0.6 μ g/kg曝露群、3.0 μ g/kg曝露群ともに、Control群よりも有意に高い誤答率を示した。さらに0.6 μ g/kg曝露群では、Day 34, 36, 42, 44, 45, 46, 51, 55, 56においてもControl群よりも高い誤答率を示した。

コーナーへの訪問回数は群間に特に差はなく、1日あたり250回前後の訪問回数を示した。しかしコーナーへの一訪問あたりの滞在時間を見ると、0.6 μ g TCDD/kg曝露群で長い時間滞在する傾向がみられた(図3)。

D 考察

ダイオキシン類の次世代への脳機能影響は近年、現行の耐容摂取量(TDI)設定に用いられた体内負荷量と同等、もしくは低い負荷量で学習機能に影響が現れることが報告されている。しかし、用量依存性が見られない報告が多く、再現性がある試験データを得るために行動毒性試験の標準化が必要である。また、我々の研究チームにおけるラットを用いた予備検

討では、ダイオキシンの発達期低用量曝露により、うつ様症状が惹起されるとの実験結果を得た。一方、現行リスク評価ではダイオキシソ類には含まれていない臭素化化合物が、塩素化のものと同質の神経毒性をもつことが示唆されている(Kedderis et al. 1991, Birnbaum et al. 1991, Zacharewski et al. 1988, Weber & Greim 1997)。臭素化ダイオキシソをダイオキシソ類として取り扱い TEF を付与するのかどうかを明らかにする必要がある。そこで本研究では、学習行動影響を構成する2要素である学習機能影響と情動機能影響を識別する方法を取り入れたリスク評価手法の確立を試みることを目的とした。本年度は、第一に曝露動物の作成、第二に新たな行動試験法の構築を行った。曝露については、妊娠12.5日目の母動物に対してダイオキシソを単回経口投与することで、仔動物に対して経胎盤・経母乳曝露を行うこととした。曝露用量は母体重1 kgあたり0.6 μg または3.0 μg とした。これまでの研究では、ダイオキシソ高感受性母動物になんら影響が認められず、また仔動物においても一般的観察では影響が見られないという意味での低用量曝露として、母体重1 kgあたり5.0 μg の曝露により、仔動物の学習機能に影響があらわれたという報告がある(Mitsui et al. 2006)。本研究で用いた曝露量は、先行研究と比較しても低用量の曝露となる。

行動試験法の開発として最も大き

な成果は、非常に優れた空間学習試験プロトコールの確立に成功したことである。IntelliCage システムを用いて行われた先行研究では、未学習状態の動物の正解へのアクセス割合が20-25%であり、学習が成立した場合に30-40%になるというものであった(Galsworthy et al. 2005, Onishchenko et al. 2007)。

一方、本研究で確立した空間学習試験法では、学習が成立した場合の正解へのアクセス割合が85-90%にまで上昇した。また、課題開始から学習成立までの成績の変化をみても、個体差がほとんど認められない。我々が確立した空間学習試験法は、単に学習ができたかできないかを判断するだけではなく、部分的な学習機能低下をも捉えることができる、すなわち影響の程度を明確にできる、非常に優れた試験法であるといえよう。

TCDD 曝露の影響としては、反復逆転課題の開始後、2度目の逆転課題の初日において、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD 曝露群で誤答数が有意に高かった。これは、正解が変化していった際に対応していく認知能力の柔軟性が障害された可能性が考えられる。さらに反復課題を繰り返してゆくと、対照群では誤答率が徐々に低下し、約5%に達するのに対し、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TCDD 曝露群では繰り返しによる低下が認められず、対照群よりも有意に高い誤答率を示した。

情動行動異常に関しては、TCDD 曝露群では初期の運動量が Control 群

よりも低い傾向があり、また選択コーナーへの訪問一回あたりの滞在時間を見ると、0.6 μ g/kg TCDD 曝露群においてのみ、対照群よりも有意に長い滞在時間を示した。

我々は最近、低用量 TCDD の経胎盤・経母乳曝露がラットにおけるオペラント・レバー押し学習に影響を及ぼすことを明らかにした(Hojo et al. in press)。その際、200 ng TCDD/kg 曝露用量特異的に、レバー押し回数の増加が認められている。高頻度のレバー押しを要求する課題(Fixed Ratio スケジュール)では成績が良かったが、一定時間待ってからレバーを押さねばならない課題(Differential Reinforcement of Low Rate スケジュール)での成績はむしろ低い傾向にあったことから、学習能力が向上しているのではなく、高頻度にレバー押しを行う行動変化があると考えられた。レバー押し学習課題におけるレバー押し回数はラットの回答そのものなので、情動異常の結果によるのか学習機能の変化によるものなのか、はっきりしなかった。

しかし本研究においてノーズポーク回数が多かったことは、課題の本質とは無関係の行動であるため、情動異常と判断できる。すなわち、我々が以前ラットでみたレバー押し反応の増加も、同じく情動異常が原因であった可能性が考えられる。今後この点について、検証を行っていく必要があるだろう。

E 参考文献

Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B. (2002) Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect.* 110:247-254.

Seo BW, Powers BE, Widholm JJ, Schantz SL. (2000) Radial arm maze performance in rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol Teratol.* 22:511-519.

Michalek JE, Barrett DH, Morris RD, Jackson WG Jr. (2003) Serum dioxin and psychological functioning in U.S. Air Force veterans of the Vietnam War. *Mil Med.* 168:153-159.

Chapman DE, Schiller CM. (1985) Dose-related effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 78:147-157.

Galsworthy MJ, Amrein I, Kuptsov PA, Poletaeva II, Zinn P, Rau A, Vyssotski A, Lipp HP. (2005) A comparison of wild-caught wood mice and bank voles in the Intellicage: assessing exploration, daily activity patterns and place learning paradigms. *Behav Brain Res.*

157:211-217.

Kedderis, LB; Diliberto, JJ; Linko, P; et al. (1991) Disposition of TBDD and TCDD in the rat: biliary excretion and induction of cytochromes P4501A1 and P4501A2. *Toxicol Appl Pharmacol* 111:163-172.

Birnbaum, LS; Morrissey, RE; Harris, MW. (1991) Teratogenic effects of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin and three polybrominated dibenzofurans in C57BL/6N mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 107:141-152.

Zacharewski, T; Harris, M; Safe, S; et al. (1988) Applications of the in vitro aryl hydrocarbon hydroxylase induction assay for determining "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents": pyrolyzed brominated flame retardants. *Toxicology* 51(2-3):177-189.

Weber, LWD; Greim, H. (1997) The toxicity of brominated and mixed-halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: an overview. *J Toxicol Environ Health* 50:195-215.

Mitsui T, Sugiyama N, Maeda S, Tohyama C, Arita J. (2006) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin

suppresses contextual fear conditioning-accompanied activation of cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal CA1 region of male rats. *Neurosci Lett.* 398:206-210.

Onishchenko N, Tamm C, Vahter M, Hökfelt T, Johnson JA, Johnson DA, Ceccatelli S. (2007) Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci.* 97:428-437.

Hojjo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama 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.

G. 図の説明

図1. 集団型全自動行動解析システムの学習試験における Control 群と 0.6 μ g TCDD/kg 曝露群の誤答率.

図2 集団型全自動行動解析システムの学習試験における Control 群と 3.0 μ g TCDD/kg 曝露群の誤答率. Control 群のデータは図1と同じ。

図3. Control 群と 0.6 μ g TCDD/kg 曝露群の正解コーナーにおける一訪問

あたりの滞在時間

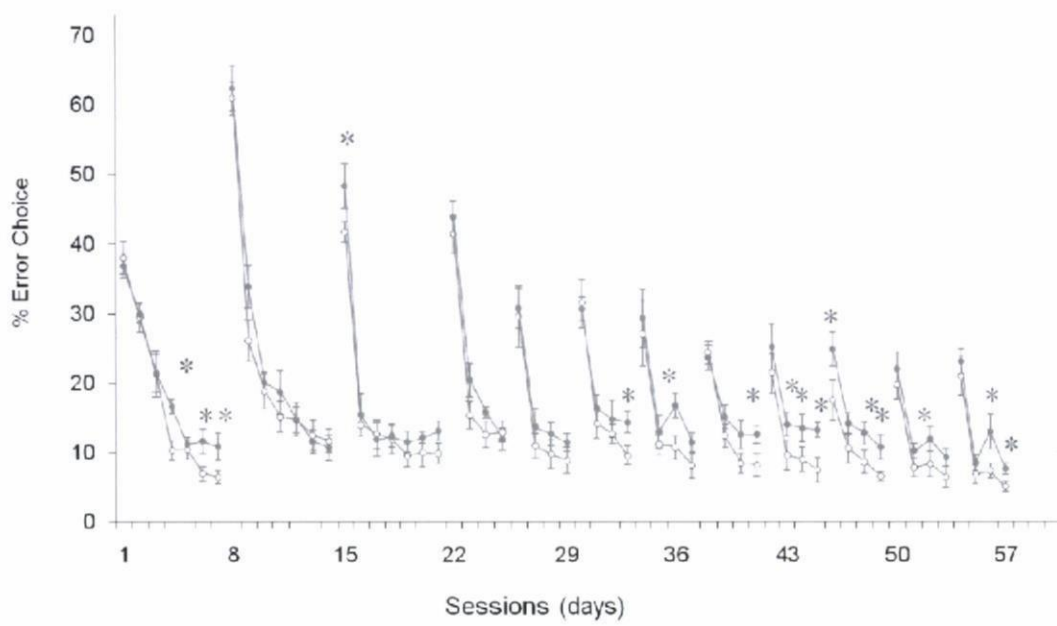
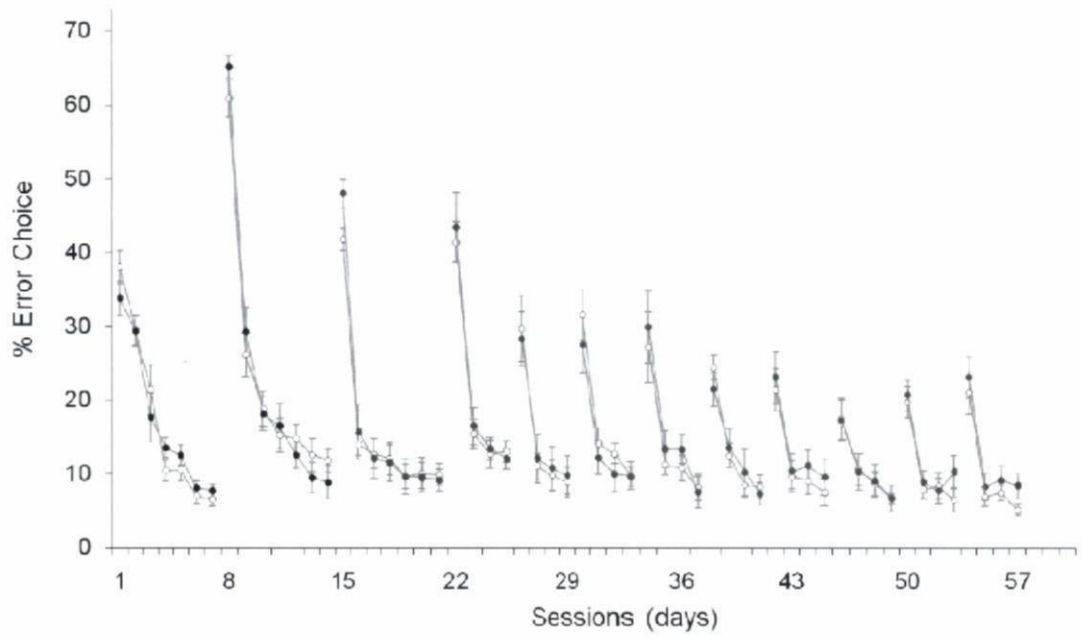


图 1



☒ 2

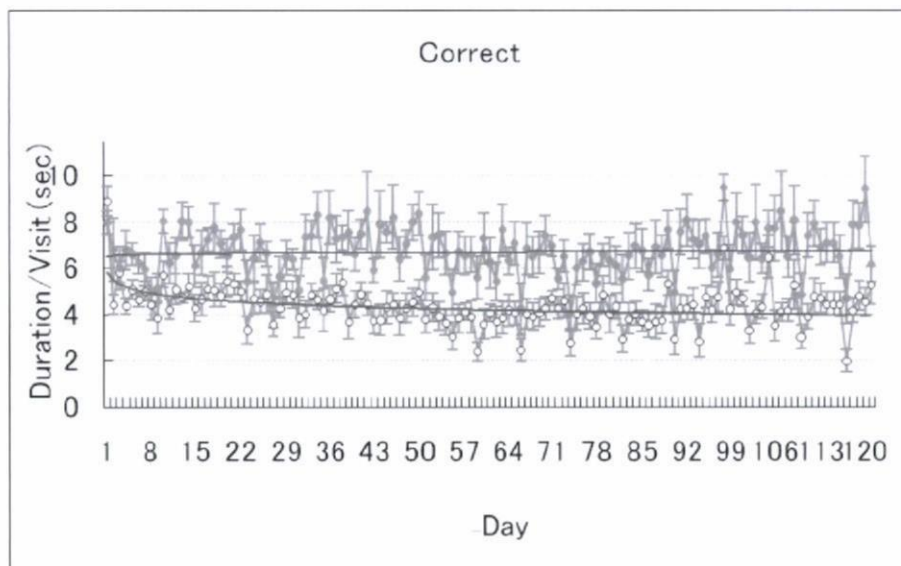


图 3

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

情動行動試験バッテリーの構築に関する研究

分担研究者 小川 園子
筑波大学大学院人間総合科学研究科 教授

研究要旨

我々は、情動を定量化する行動毒性試験の構築を目指した研究を担当した。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/kg 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。

研究協力者

肥後 明花（筑波大学大学院人間総合科学研究科）
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）

A 研究目的

われわれはこれまでに、ラット及びマウスにおいて、ダイオキシンの発達期曝露が情動機能の異常を引き起こすことを示唆する結果を得ている。

これまで、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うつ症状とに相関があることは報告されているが (Michalek et al. 2003)、発達期曝露の影響や動物実験による報告は皆無であった。先行研究において、学習行動試験のダイオキシン曝露の影響に関する結果が錯綜していたのも (Seo et al. 2000, Hojo et al. 2008)、情動機能異常により行動パターンが変質し、その副次的結果として行動試験の成績に影響があらわれた

可能性がある。そこで、学習機能影響と情動機能影響を区別して検出・解析し、塩素化ならびに臭素化ダイオキシンの影響の実態を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、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、明暗往來箱テストに加えて、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行うための行動試験バッテリーの構築を目指した。

B 研究方法

1. 試験動物

ダイオキシン高感受性系統である C57BL/6 マウス (LD50=0.182 mg/kg) と低感受系統である DBA/2 マウス (LD50 = 2.57 mg/kg) を用いた (Chapman & Schiller 1985)。東京大学クリーン飼育室で室温 24±2℃、湿度 35.0~75.0%、人工照明 (午前 8 時~午後 8 時点灯) で飼育した。滅菌したポリカーボネート製ケージ (280W×440D×180Hmm、東洋理工株式会社) を使用し、7日に1回以上の頻度で交換した。実験動物用固型飼料 (ラボM Rストック、日本農産工業製研究検定飼育用) を自由摂取させ、滅菌した水道水をポリカーボネート製給水ボトル (700ml、トキワ科学器械株式会社) を用いて自由に飲ませた。1 ケージあ

たり、F0 動物の検疫・馴化期間は1~2匹 (同性) で飼育した。

14週齢で雄1雌1の交配対を単一のケージで設け、交配開始日の夕方から昼夜同居させた。交配開始日の翌日から雌の膣垢を毎日午前中に採取し、膣栓あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし、その日を妊娠0日とした。妊娠12.5日目に下記披験物質を母体に投与した。一腹あたり一匹の雄および雌仔マウスを試験に供した。

約17週令に達した動物を東京大学から筑波大学人間総合科学研究科動物実験施設に移送した。この時点より、すべてのマウスは、正午に消灯の12:12の明暗サイクル、餌・水は自由摂取という条件下で、個別飼育された。

2. 投与液

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) 純度 99.9%、n-ノナン溶媒、50 µg/ml) は Cambridge Isotope Laboratories 株式会社より購入した。これらは、最終濃度 4%の n-ノナン (ナカライテスク社製) を含むコーンオイル (シグマアルドリッチ社製) を溶媒とする溶液中に 0.06 µg/mL の投与溶液を作成した (体重 1kg あたり 1.0 mL の投与溶液を投与)。これらを妊娠 12.5 日目にマウス用胃ゾンデを装着したシリンジを用いて経口投与した (それぞれ、Control 群 (= 対照群)、TCDD 群)。

3. 行動実験手続き

約3週間の馴化期間の後、以下の述べる順序で、5~8日の間隔で4種の行動実験を行った。すべてのテストを消灯の2時間後からの暗期に赤色光照明下で行った。更に社会的探索行動テスト終了後から連続2週間にわたって、ホームケージ回転車活動量の測定を行った。

a. Y字型迷路テスト

中央区画から27cmの長さのアームが120°の間隔で3方向にのびたY字型迷路内での活動量(総侵入アーム数)及び自発的交替反応(3本のアームに交替に侵入する割合)を10分間測定した。

b. オープンフィールドテスト

オープンフィールド装置(60x60x30cm)内での総移動活動距離と中央区画の滞在時間を5lxの照明下で、20分間、2日連続で測定した。

c. 明暗往来箱テスト

各々40x20x25cmから成る暗箱(黒色、0 lux)と明箱(白色、350 luxで照明)の間の往来回数、明箱滞在時間、明箱への侵入潜時、暗箱での単位時間当りの移動活動距離を、10分間測定した。

d. 社会的探索行動テスト

測定の1日前に、テストマウスを実験用ケージ(白色塩化ビニール製; 31x35x17cm)に移しテリトリーを確立させた。テスト当日には、空のシリンダー(底面直径7cm, 上端の開口部直径5cm, 高さ17cm, 底面から4cmの高さ

まで直径5mmの穴が28個あいている)をケージ中央に10分間提示して馴化させた後、刺激個体(同性の新奇個体)をシリンダーに入れて20分間提示した。刺激個体への探索行動の累積時間(シリンダーにあけられた穴を通に鼻を挿入すること)、社会的不安行動(シリンダーへの上半身のみでの接近・回避を繰り返す行動)に加え、ケージ内での移動軌跡を記録・測定した。

e. ホームケージ回転車テスト

ホームケージ(19x29x12cm)に取り付けられた回転車をまわした回数を、2週間連続で5分ごとに計測し、暗期、明期各々の総回転数を算出した。

4. 分析方法

すべての行動データを、1)雄マウスでの系統間比較のために、系統(C57BL/6とDBA/2)と処置(コントロールとTCDD処置群)の主効果とその交互作用についての2要因の分散分析、2)C57BL/6マウスでの雌雄間比較のために性(雄、雌)と処置(コントロールとTCDD処置群)の主効果とその交互作用についての2要因の分散分析の2通りで解析した。一部、反復計測を行った測度については、個体内要因を加えた3要因の分散分析により解析した。

C 研究結果

母獣の体重増加率、産仔数、仔獣の体重増加率、雌雄仔の比率については、C57BL/6、DBA/2の各々において、

TCDD 処置の影響は見られなかった。

a. Y 迷路テスト

総侵入アーム数：TCDD 処置の効果は、C57BL/6 の雄、雌及び DBA/2 の雄、の 3 群すべてにおいて、検出されなかった。C57BL/6 の雄に較べて DBA/2 マウスの総侵入アーム数が多いという傾向（系統の主効果 $p=0.06$ ）は見られたが、C57BL/6 マウスでの雌雄差は見られなかった。

自発的交替反応：TCDD 処置の効果は、3 群すべてにおいて、検出されなかった。すべての群で、平均 50~55% で自発的交替反応が見られ、全体としての系統間差、性差も見られなかった。

b. オープンフィールドテスト

連続 2 日間の繰り返しのテストの要因を含めた 3 要因の分散分析の結果、個体内要因（日間）と個体間要因（系統、性、TCDD 処置）との交互作用はすべて有意ではなかったため、個体ごとに 2 日間のデータの平均値を算出して以下の解析を行った。

総移動活動距離：TCDD 処置の効果は、C57BL/6 の雄、雌及び DBA/2 の雄、の 3 群すべてにおいて、検出されなかった。全体として C57BL/6 の雄マウスに較べて雌マウスの総移動活動距離が短かった（性の主効果： $p < 0.01$ ）が、C57BL/6 と DBA/2 の雄マウス間には違いは見られなかった。

中央区画の滞在時間：C57BL/6 マウスでは雌雄共に、TCDD 処置により中

中央区画の滞在時間が有意に低下した（TCDD 処置の主効果： $p < 0.001$ ；図 1）。一方、DBA/2 の雄マウスでは、TCDD 処置の効果は全く見られなかった。図 1 から明らかな様に、コントロール群の中央区画の滞在時間は、DBA/2 と C57BL/6 マウス間で大きく異なっていた。

c. 明暗往来箱テスト

明暗往来回数：全体として、DBA/2 マウスの明暗往来回数が極端に低かった他には、TCDD 処置の効果を含めて顕著な差は見られなかった。

明箱滞在時間：C57BL/6 の雄、雌及び DBA/2 の雄、の 3 群すべてにおいて、TCDD 処置により明箱滞在時間に増加が見られた。全体として、C57BL/6 の雌雄間には差が見られなかったが、DBA/2 マウスの明箱滞在時間は、極端に短かった。

明箱への侵入潜時：全体として、DBA/2 マウスの明箱への侵入潜時が C57BL/6 雄マウスのそれと較べて長かった以外は、TCDD 処置の効果を含めて顕著な差は見られなかった。

暗箱での単位時間当りの移動活動距離：この測度については、全体として DBA/2 と C57BL/6 の間に差は見られなかった。但し、雌雄の C57BL/6 マウスでは、TCDD 処置の効果が全くなかったのに対し、DBA/2 マウスでは、TCDD 処置によりやや低下する傾向が見られた。

d. 社会的探索行動テスト

探索行動累積時間：全体として、雌マウスの社会的探索行動時間が雄マウスに較べて短かった他は、TCDD処置の効果を含めて顕著な差は見られなかった。

社会的不安行動：全体として、雄マウスに較べて雌マウスの社会的不安行動の頻度が高かったことに加えて、雌マウスでは、TCDD処置によりその頻度が更に増加することがわかった(図2)。

移動軌跡：TCDD処置群の雌マウスでは、刺激個体の提示後に極めて特異的な移動活動軌跡を示す個体が見られた。

e. ホームケージ回転車テスト

暗期の総回転数：全体として、DBA/2マウスの活動量が雌雄のC57BL/6マウスに較べてかなり低かったが、TCDD処置の効果は3群すべてにおいて見られなかった。

D 考察

本研究では、1) Y字型迷路での総侵入アーム数、2) オープンフィールドテストでの総移動活動距離、3) 明暗往来箱テストでの明暗往来回数や暗箱での単位時間当りの移動活動距離、4) ホームケージ回転車テストでの暗期の総回転数等、主に自発的活動性を反映する行動測度においては、雄・雌、及びダイオキシン高・低感受性系統を問わず、胎仔期TCDD処置の効果はほとんど見られなかった。ホームケージ、比較的マイルドな新奇場面、

不安を惹起する新奇場面のすべてにおいて、自発的活動性に対する胎仔期TCDD曝露の影響が見られなかったのは興味深い。ラットを用いた先行研究においても、周生期TCDD処置

(Thiel et al., 1994) 及び成体での急性的なTCDD処置 (Sirrka et al., 1992) による移動活動性の変容はほとんど見られないことが報告されている。

一方、オープンフィールドテストでの中央区画の滞在時間といった、情動性を反映する行動測度においては、高感受性系統であるC57BL/6の雌雄のマウスで、TCDD処置による情動性の亢進効果が見られた。不安レベルの指標として広く用いられている明暗往来箱テストでの明箱滞在時間についても、TCDD処置の効果は検出されたが、オープンフィールドテストでの結果とは対象的に、明箱滞在時間の増加、すなわち不安レベルの低下が観察された。この不一致の理由については現在、検討中である。

コントロール群のDBA/2マウスは、情動性、不安レベルの両方共、C57BL/6マウスに較べてかなり高かったものの、TCDD処置の効果は、C57BL/6マウスでむしろ顕著に現れた。従って、LD50や糖・脂質代謝などの指標で報告されている (Chapman and Schiller, 1985) のと同様なダイオキシン感受性における系統差が、情動行動レベルにおいても検出されたと言える。

最後に、社会的探索行動テストにおいては、TCDD処置により、雌マウス

の社会的不安レベルが亢進していることが示された。我々の研究室で現在進行中の新生仔期での母親からの分離ストレスが後の社会的不安レベルに及ぼす影響も、雌マウスに特異的に検出されている。これらのことから、発達初期における環境要因が、性特異的に社会性の発達に影響する可能性が考えられる。今後、その神経基盤についての解析が望まれる。

E 結論

妊娠後期における TCDD 曝露は、成体になってからの自発的活動性にはほとんど影響しないが、高感受性動物で雌雄を問わず情動性に影響する可能性と、社会的場面で雌特異的に不安行動を亢進させることが示唆された。

F 参考文献

- Chapman D.E. and Schiller C.M. 1985
Dose-related effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in C57BL/6J and DBA/2J mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 78, 147-157.
- Sirkka U., Pohjanvirta R., Nieminen S.A., Tuomisto J., and Ylitalo P. 1992
Acute neurobehavioural effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Han/Wistar rats. *Pharmacol Toxicol*, 71, 284-288.
- Thiel R., Koch E., Ulbrich B., and Chahoud I. 1994
Peri- and postnatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: effects on physiological development, reflexes, locomotor activity and learning behaviour in Wistar rats. *Arch Toxicol*, 69, 79-86.
- Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B. (2002)
Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect.* 110:247-254.
- 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.
- Seo BW, Powers BE, Widholm JJ, Schantz SL. (2000)
Radial arm maze performance in rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol Teratol.*22:511-519.
- Michalek JE, Barrett DH, Morris RD, Jackson WG Jr. (2003)
Serum dioxin and psychological functioning in U.S. Air Force veterans of the Vietnam War. *Mil Med.* 168:153-159.

Birnbaum, LS; Morrissey, RE; Harris, MW. (1991) Teratogenic effects of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin and three polybrominated dibenzofurans in C57BL/6N mice. Toxicol Appl Pharmacol 107:141-152.

C57BL/6 の雄と雌マウス間での比較 :
性 $p < 0.01$, 処置 ns, 交互作用 $p < 0.05$.

Zacharewski, T; Harris, M; Safe, S; et al. (1988) Applications of the in vitro aryl hydrocarbon hydroxylase induction assay for determining "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents" : pyrolyzed brominated flame retardants. Toxicology 51(2-3):177-189.

G 図の説明

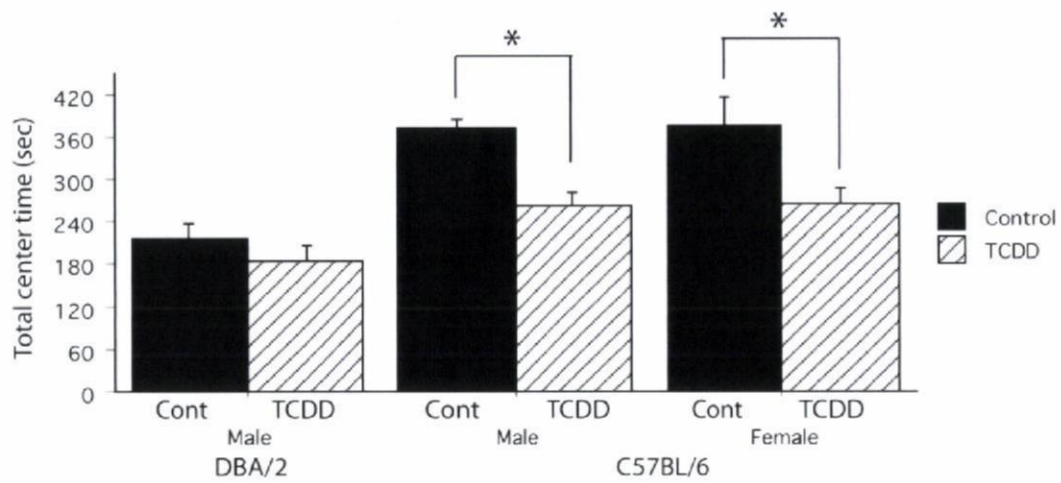
図 1. 20 分間のオープンフィールドテストにおける中央区画での累積滞在時間の平均 (bar) と標準誤差 (vertical line) を示す。

DBA/2 と C57BL/6 の雄マウス間での比較 : 系統 $p < 0.0001$, 処置 $p < 0.01$, 交互作用 $p < 0.05$.

C57BL/6 の雄と雌マウス間での比較 : 性 ns, 処置 $p < 0.001$, 交互作用 ns.

図 2. 20 分間の社会的探索行動テストにおける社会的不安行 (stretched approach) の頻度の平均 (bar) と標準誤差 (vertical line) を示す。

DBA/2 と C57BL/6 の雄マウス間での比較 : 系統, 処置, 交互作用すべて ns.



☒ 1

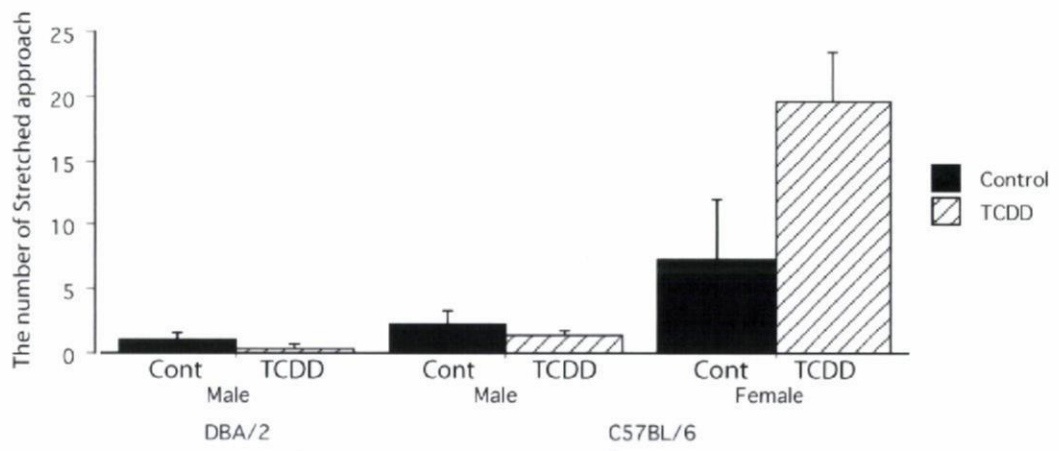


图 2

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, JA, Pfaff, D.W., and Ogawa, S.	Effect of ER- β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice.	Physiology and Behavior	96	300-306	2009
Cushing, B.S., Perry, A., Musatov, S., Ogawa, S. and Papademetriou E.	Estrogen receptors in the medial amygdala inhibit the expression of male prosocial behavior	Journal of Neuroscience	28	10399-10403	2008
Kavaliers, M., Devidze, N., Choleris, E., Fudge, M., Gustafsson, JA., Korach, K.S., Pfaff, D.W., and Ogawa, S.	Estrogen receptors α and β mediate different aspects of the facilitatory effects of female cues on male risk taking.	Psychoneuroendocrinology	150	1061-1068	2008
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	316-321	2009