

の高度化に関する研究

- 新生児脳性の分化への化学物質高感受性影響に関する研究

2) 免疫

- 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明
- 周産期化学物質暴露による免疫系への影響評価

3) 生殖器

- 胎生期暴露が雄性生殖器に及ぼす影響の発生生物学的解析研究
- 周産期・小児期の化学物質暴露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究
- 化学物質のげっ歯類周産期暴露による雌性生殖器等の遅発性障害の研究

【有害性発現分子メカニズムの解明研究】

- ES 細胞分化増殖試験系を用いた胎児毒性評価手法の開発研究、及び AhR を介する晩発影響の解析研究
- 新生児化学物質暴露の前立腺影響の解析研究
- 神経系形成・発達メカニズムに基づいた高感受性集団に対する化学物質脳神経系影響の分子毒性的解析
- AhR の生理機能とその周産期小児期個体における役割
- CYP 遺伝子発現を制御する SXR、CAR、AhR 等の薬物受容体と免疫系制御因子 NF κ B の相互作用の分子解明

【小児など高感受性集団の評価に関する国際動向調査研究】

- 子ども健康問題を中心とした OECD/WHO 関連等ハーモナイゼーション総括
- 高感受性集団に対する有害性検出手法に関する国際動向調査研究

(2) 子宮内・経乳汁暴露による晩発影響についての確認試験

平成 16 年度の研究において、Bisphenol A(BPA)の 5、50 μ g/kg/day 及び 40、400 mg/kg/day をラット妊娠 6 日から分娩後 20

日まで母ラットに経口投与し、低用量及び大量投与時の出生仔に於ける遅発性性周期異常の誘導について検討した結果、7 ヶ月齢時に於ける性周期検査で異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々4/16、13/19、9/19、13/24、12/17 匹で観察され、大量投与時のみならず、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によっても pre-middle age に於ける性周期異常が誘導される可能性が示唆された。

平成 17 年度は、更に、試験の再現性の有無を検討することを目的とし、0.5、5、50 μ g/kg/day の用量で BPA をラットの妊娠期から授乳期にかけて投与し、得られた雌出生仔の性周期を最長 12 ヶ月齢まで継続して検査した(委託研究:委託先:財団法人 化学物質評価研究機構)。その結果、低濃度 BPA の妊娠期・授乳期投与によって pre-middle age に於ける性周期異常が誘導されることが確認された。

平成 18 年度は、BPA と同様な晩発影響が陽性対象の DES の暴露によっても認められるかを確認する試験を行った。受容体結合試験やその他の内分泌かく乱作用に関する情報から DES は BPA の約 2,500~5,000 倍の作用を持つと考えられる。従って、20 ng/kg/day を高用量とし、以下 2 ng/kg/day を中用量、及び 0.2 ng/kg/day を低用量に設定した(飼料:MF, オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品農医薬品安全性評価センター)。その結果、12 ヶ月解剖時の器官重量では、雄の 0.2、2 および 20 ng/kg 群で肛門挙筋および球海綿体筋の絶対重量が低下した。相対重量では変化は認められないもののこれらの骨格筋はホルモンの蛋白質同化作用の指標であり、DES 投与の影響を示唆するものと考えられた。3 ヶ月齢時の雌の解剖で Cleft phallus が 0.2、

2 および 20 ng/kg 群でそれぞれ 2、1 および 2 例に認められ DES 投与の影響が示唆された。性周期の観察では、連続発情を示す性周期異常の発生が DES の 2 および 20 ng/kg 群の雌出生児で早まる傾向が認められ、特に 20 ng/kg 群で顕著であった。

平成 19 年度は、更に、低用量の DES (0.2、2 及び 20 ng/kg/day) をラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで強制経口投与し、得られた出生児の 6 ヶ月齢までの短期追加確認試験を実施した(飼料:MF, オリエンタル酵母工業)(委託先:バイオラボ株式会社)。

平成 20 年度は、Genistein の低用量影響の確認試験を行った。1000 µg/kg/day を高用量とし、以下 200 µg/kg/day を中用量、及び 40 µg/kg/day を低用量に設定した。DES 0.02µg/kg を陽性対照群に置いて実施した(飼料:Phytoestrogen-low diet (PLD)、オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。

本年度は、マウスを用いた低用量化学物質(BPA、DES 及び GEN)の子宮内・経乳汁曝露による免疫毒性試験を実施した(飼料:Phytoestrogen-low diet (PLD)、オリエンタル酵母工業)(委託研究:委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。群構成を示す。

群	投与物質	投与量 (µg/kg)	動物数
1	媒体 (オリブ)	0	24 匹
2	BPA	5	15 匹
3	BPA	50	15 匹
4	DES	0.002	26 匹
5	DES	0.02	26 匹
6	GEN	100	24 匹
7	GEN	1000	24 匹

C. 研究結果

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

については、所定の成果を各分担研究者から得て、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する会合への適切な反映を行った。

これに関連し、2009 年 9 月 22～24 日には OECD-EDTA Workshop on OECD Countries Activities Regarding Testing, Assessment and Management of Endocrine Disruptors (OECD 参加国による内分泌かく乱化学物質に関する試験と評価法開発に関するワークショップ)(デンマーク環境防護庁・コペンハーゲン・デンマーク)に招聘され、各国の内分泌かく乱化学物質問題に関する活動状況、テストガイドラインや他のツール/データ情報が内分泌かく乱化学物質の同定・評価・管理に関する政策決定にどのように反映されているかを分析することを目的として、内分泌かく乱化学物質の試験法に関する OECD 参加国間の適用及びテストガイドライン化について検討した。その際に、本研究の成果等を元にした内分泌かく乱の基本的な問題点の提示を行った。また、同 11 月 11～13 日には BfR-Workshop: Substances with endocrine disrupting properties under the new EU plant protection product regulation – establishment of assessment and decision criteria (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin)に招聘され、農薬補助剤の EU での規制に関わる内分泌かく乱作用の有無の判定基準に関する国際的エキスパート論議に参加し、分科会の座長を務めた。

(2) 子宮内・経乳汁曝露による晩発影響についての確認試験

(2-1)DES 短期追加確認試験(委託先:バイオラボ株式会社)。(H19 報告の追加最終報告)

性周期の観察では、5 ヶ月齢までの観察で対照群では異常性周期を示す動物が認められなかったのに対し、被験物質投与群では persistent diestrus あるいは constant estrus を示す動物が少数例ながら認められた。6ヶ月齢時では性周期異常を示す動物はさらに増加したが、対照群と比較し有意差はみられなかった。

また、剖検時に実施した雌外性器形態計測学的検査では、2 ng/kg 以上の群で、Size of urethral slit 及び Distance between tip of phallus and urethral orifice (Cleft phallus に関連) が有意に延長した。雌外性器の詳細な観察並びに雌外性器形態計測学的検査は、DES の低用量域の生体影響を評価する検出指標として有用である可能性があると考えられる。

(2-2) ラットを用いた Deihylstilbestrol および Genistein の子宮内・経乳汁暴露による晩発影響についての検討試験(委託先: 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。(H20 報告の追加最終報告)

母動物に対する影響

母動物には、全飼育期間を通して死亡例および一般状態の異常は観察されず、妊娠および哺育期間の体重推移、分娩・哺育状態、さらには妊娠日数にも GEN および DES 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。したがって、GEN の 40~1000 µg/kg/day および DES の 20ng/kg/day は、哺育期および授乳期投与によって、母動物に影響を与えないものと考えられる。

児動物に対する影響

児動物の離乳前の観察では、産児数、性比、生存率、形態および体重に GEN および

DES 投与の影響は認められなかった。また、哺育 4 日に計測した雌雄の肛門生殖突起間距離 (AGD) についても、GEN および DES 投与の影響は認められなかった。しかしながら、哺育 21 日に剖検した雄の器官重量については、1000 µg/kg GEN 投与群で前立腺腹葉が、DES 投与群で精嚢が対照群より減少した。

雌児動物の離乳後の観察では、200 µg/kg GEN 投与群で 2 例に途中死亡が認められたが、GEN 投与の影響ではないと判断した。生存例の一般状態および体重推移には GEN および DES 投与の影響を示唆する変化はみられなかった。

膣開口の完成日齢および完成日体重は、DES 投与群で早期化傾向がみられたが有意差はなかった。

性周期 : GEN 投与群及び DES 投与群は、溶媒対照群に比べて性周期異常を誘発する頻度が低い傾向が見られ、本実験においては、性周期異常の遅発性の増加は認められなかった。

Cleft Phallus : GEN 各投与群では、12~13 週齢時および 52~53 週齢時の観察で Cleft Phallus は認められなかった。DES 投与群においては、12~13 週齢時に 1 例、52~53 週齢時にこの 1 例を含む 2 例に Cleft Phallus が認められた。

剖検所見では、下垂体、卵巣および子宮にも、対照群を含む各投与群で異常が少数例みられたが、GEN あるいは DES 投与の影響を示唆する変化ではなかった。なお、副腎では、DES 投与群のみに両側あるいは片側の腫大が観察され、DES 投与の影響が示唆された。

(2-3) マウスを用いた低用量化学物質 (BPA、DES および GEN) の子宮内・経乳汁暴露に

よる免疫毒性試験(委託先:財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)。

親動物

対照群で 1 例、ケージ内で首が挟まる事故があり、哺育 17 日に死亡が確認された。その他、試験期間中の一般状態に、異常は観察されなかった。各測定時点における体重には対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。分娩・哺育状態に異常は観察されず、妊娠期間においても対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

児動物

産児数、性別、外表奇形、一般状態に異常は観察されなかった。また、哺育期間中の体重には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。死亡児および間引き児の剖検の結果、異常所見は観察されなかった。

育成期の観察において、試験期間中の一般状態に、異常は観察されなかった。体重測定の結果、雄では、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の生後 35 および 42 日に有意な低下がみられた。その他、各測定時点における体重には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の生後 42 日に有意な低下、DES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の生後 28 日に有意な増加がみられた。その他、各測定時点における体重には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

膈開口は、BPA 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の完成日数に有意な遅延がみられた。その他、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。包皮分離は、BPA 50 μ

g/kg 投与群の完成日体重に有意な低下がみられた。その他、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

免疫学検査(9 週齢時)

1) ヒツジ赤血球 (SRBC) に対する抗体価には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 胸腺および脾臓重量: 胸腺および脾臓重量には対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

免疫学検査(10 週齢時)

1) 胸腺および脾臓重量: 胸腺および脾臓重量には対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

2) イムノフェノタイピング: 雄では、DES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、脾臓では CD4 抗体陽性/CD8 抗体陰性細胞の有意な増加が認められた。その他、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。雌では、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

3) リンパ球幼若化反応試験: 細胞増殖の活性には、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 白血球数: 雄では、DES 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群および GEN 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、単球の有意な減少が認められた。その他、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

5) サイトカイン測定: 雄では、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。雌では、DES 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において、コンカナバリン A 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 添加時の胸腺で IL-4 濃度の有意な低下が認められた。その他、対照群と被験物質投与群との間に有意差は認められなかった。

D. 考察

Delclos ら¹⁾は、GEN の 1250 ppm (83~120 mg/kg/day 相当)を混餌投与した母ラットから生まれた雄児に、前立腺腹葉の重量低下と体重増加抑制を報告している。また、Casanova ら²⁾は、0.1% GEN を含む餌 (87 mg/kg/day 相当)で生後 56 日まで飼育した雄ラットの前立腺腹葉の重量が対照群と比較して減少したことを報告している。いずれの報告も、今回用いた GEN 濃度よりも高濃度での変化であるが、GEN が前立腺重量に及ぼす影響が示された。ラットを用いた幾つかの実験において、GEN 投与により開口時期が早期化することが報告されている^{1,2,3)}。

性周期について Jefferson ら⁴⁾は、生後 0 日から 5 日まで GEN を皮下投与した CD-1 マウスの 50 mg/kg/day 投与群で、連続発情を示す動物が対照群より増加することを 6 ヶ月齢の性周期観察で報告している。

Cleft Phallus は、Sawaki ら⁵⁾の Ethynylestradiol による報告がある。

(2-2)の結果から、Cleft Phallus は、再現性をもって、Ethynylestradiol 及び DES の周産期暴露によって誘発されることが確認された。

(2-2)の結果から、GEN の子宮内・経乳汁暴露は雌の性成熟ならびに老化過程における性周期に影響を及ぼさないものと推察された。陽性対照の DES については、性周期への影響は確認されなかったが、Cleft Phallus の誘発については、前年度までの試験結果の再現性が確認された。この DES の影響が前年度までと異なる要因の可能性として、用いた飼料中のエストロゲン活性の違いが挙げられる。また、性周期への遅発性影響と、Cleft phallus という形態形成異常影響の感受性の違いには、受容体特性を含む分子メ

カニズムの違いが関与している可能性が示唆される。

(2-3)の結果、先の SRBC に対する免疫グロブリンの産生低下は再現されなかったが、幾つかの項目について投与による変動が認められた。これらの意義付けについては、更なる検討が必要である。

¹⁾Reprod Toxicol. 15: 647-663. (2001)

²⁾Toxicol Sci. 51: 236-244. (1999)

³⁾Toxicol Sci. 66: 91-104. (2002)

⁴⁾Biol Reprod. 73: 798-806. (2005)

⁵⁾Toxicol Sci. 75:402-411. (2003)

E. 結論

少子高齢化社会が進む中、子供と老人が高感受性集団であるとの認識から、それらの保護の重要性の認識が今後更に増すものと考えられる。高感受性集団に対する配慮は厚生労働上のみならず経済上の重要な課題となる。本研究の目標とする高感受性有害性総合評価大綱の策定は、暴露を受ける側と日々生み出される新規物質を含む暴露する側の両面の近未来特性から、要求度の高いものと考えられ、今後の国民の安全性確保及び経済活動の健全な発展にも貢献するものと見込まれる。

内分泌かく乱化学物質問題の本質的問題である受容体原性毒性メカニズムに基づく考察されるところの低用量影響が、幾つかのエンドポイントに対して、明確に再現性を以って示されることが改めて確認された。このような影響が確認可能な *in vivo* 試験系を取り揃え、吟味の上、広範に実施可能な試験プロトコールとして一般化し、ガイドライン化することが可能であることと結論される。これについては、国際的な場において発信され、国際的なガイドライン化、評価法制定へ向けて

の活動に貢献した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsunaga N, Kanno J, Hamada C, Yoshimura I. An experimental design for judging synergism on consideration to endocrine disruptor animal experiments. *Environmetrics* 2009; 20:1-13.

Woo GH, Takahashi M, Inoue K, Fujimoto H, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A, Shibutani M., Cellular distributions of molecules with altered expression specific to thyroid proliferative lesions developing in a rat thyroid carcinogenesis model., *Cancer Sci.* 2009 Apr;100(4):617-25.

Myers JP, vom Saal FS, Akingbemi BT, Arizono K, Belcher S, Colborn T, Chahoud I, Crain DA, Farabollini F, Guillette LJ Jr, Hassold T, Ho SM, Hunt PA, Iguchi T, Jobling S, Kanno J, Laufer H, Marcus M, McLachlan JA, Nadal A, Oehlmann J, Olea N, Palanza P, Parmigiani S, Rubin BS, Schoenfelder G, Sonnenschein C, Soto AM, Talsness CE, Taylor JA, Vandenberg LN, Vandenberg JG, Vogel S, Watson CS, Welshons WV, Zoeller RT., Why public health agencies cannot depend on good laboratory practices as a criterion for selecting data: the case of bisphenol A., *Environ Health Perspect.* 2009 Mar;117(3):309-15

Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol.* 2009 May 15;182(10):6576-86.

Upham BL, Park JS, Babica P, Sovadinova I, Rummel AM, Trosko JE, Hirose A, Hasegawa R, Kanno J, Sai K. Structure-activity-dependent regulation of cell communication by perfluorinated fatty acids using in vivo and in vitro model systems. *Environ Health Perspect.* 2009 Apr;117(4):545-51. Epub 2008 Oct 23.

Kanno J., Overview: "Children's toxicology", a renovating study field of irreversible "early exposure-delayed effects". *J Toxicol Sci.* 2009;34 Suppl 2:SP199-200.

Sekine H, Mimura J, Oshima M, Okawa H, Kanno J, Igarashi K, Gonzalez FJ, Ikuta T, Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y., Hypersensitivity of aryl hydrocarbon receptor-deficient mice to lipopolysaccharide-induced septic shock. *Mol Cell Biol.* 2009 Dec;29(24):6391-400

Saegusa Y, Woo GH, Fujimoto H, Inoue K, Takahashi M, Hirose M, Igarashi K, Kanno J, Mitsumori K, Nishikawa A, Shibutani M., Gene Expression Profiling and Cellular Distribution of Molecules with Altered Expression in the Hippocampal CA1

Region after Developmental Exposure to Anti-Thyroid Agents in Rats. J Vet Med Sci. 2009,72(2),187-195

Suzuki A, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Saga Y., NANOS2 interacts with the CCR4-NOT deadenylation complex and leads to suppression of specific RNAs., Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 2.

2. 学会発表

菅野 純、BPA 等の低用量影響の標的「中枢神経」、第 20 回環境ホルモン学会講演会、2009 年 2 月 24 日、東京

Jun Kanno, Katsuhide Igarashi, Kentaro Tanemura, Hirotugu Asano, Kinichi

Nakashima, Glucocorticoid induces expression of astrocyte marker GFAP mRNA in mouse neural stem cells. 14th International Congress of Endocrinology, 2010.3.29, Kyoto

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

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働省
「内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する検討会」
試験スキーム（拡張版）

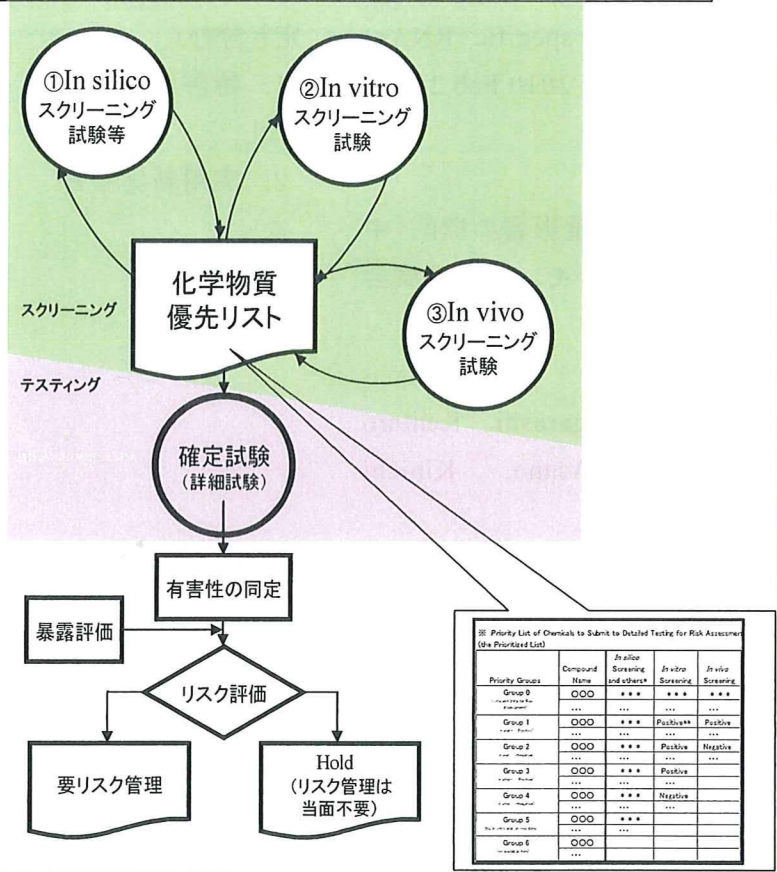


Fig. 1

【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 教授
研究協力者 成田 年 星薬科大学 准教授
研究協力者 葛巻直子 星薬科大学 助教

研究要旨

これまでにbisphenol-A の慢性曝露により海馬歯状回において、doublecortinならびに NeuroD 免疫活性の低下といった神経新生の低下が認められている。また、神経幹細胞に対してbisphenol-A処置することにより神経幹細胞から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ている。そこで、新生細胞を同定する目的で、BrdU 及び doublecortin (DCX)、NeuroD、grial fibrillary acidic protein (GFAP)、myelin associated glycoprotein (MAG)、Olig2に対する特異的抗体を用い免疫組織化学染色を行ったところ、異所性にBrdU 陽性細胞とOlig2陽性細胞との共局在が認められた。これらのことから、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により、異所性にオリゴデンドロサイトの新生が認められる可能性が明らかとなった。

A. 研究目的

本研究では、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による記憶保持能力を始めとした脳高次機能に及ぼす影響を、海馬神経新生および細胞分化決定、さらにはエピジェネティクス制御の関与も含め、多角的に検討した。

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。Bisphenol-A の慢性曝露は薬物混入試料法に従い、bisphenol-A(0、2 mg/g of food、約120-240mg/kg)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。また、胎児脳を用いた検討では、胎生14 日目の脳サンプルを採取した。

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。

免疫染色法

海馬領域を含む凍結脳切片をそれぞれ作成し、doublecortin (DCX)、NeuroD、grial fibrillary acidic protein (GFAP)、myelin associated glycoprotein (MAG)、Olig2 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。

また、BrdU を用いた検討では、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスに BrdU (50 mg/kg)を 2 時間おきに 6 回腹腔内投与し、BudU 最終投与 4 週間後に全身灌流固定した。

C. 研究結果

1. Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬新生細胞の同定

Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により、海馬においてDCX および NeuroD免

疫活性の減弱が海馬神経新生効率の低下によるものか否かを、BrdUを用い、さらに詳細に検討を行った。

新生細胞を検出する目的で、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露マウスにBrdUを投与した結果、異所性の BrdU 陽性細胞とオリゴデンドロサイトのマーカーである Olig2 陽性細胞との共局在が認められた。このことから、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、異所性にオリゴデンドロサイトの新生が認められる可能性が明らかとなった。

D. 考察

我が国において、bisphenol-A の発達期の曝露により、当該動物の子供に性周期異常などの遅発性影響が認められることが報告されている。これらの胎児や子供に対する影響の科学的根拠については国際的にも議論があり、未だに不明な点も多いため、今後の調査研究の進展が必要であると考えられるが、胎児や乳幼児では、体内に取り込まれた bisphenol-A を無毒化する代謝能力が大人に比べて低いと予想されることや、中枢神経系、内分泌系および免疫系の細胞や器官は、胎児や乳幼児では発達途上であることから、微量の曝露でも影響が残る可能性が懸念されている。事実、当教室においても、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、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や、dopamine D3 受容体機能低下に伴う依存性薬物への反応性の亢進といった中枢神経系の異常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、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による記憶保持能力を始めとした脳高次機能に及ぼす影響を、特に記憶の責任部位である海馬領域に焦点をあて、神経新生および細胞分化決定、さら

にはエピジェネティクス制御の関与も含め、多角的に検討した。

近年、成体中枢神経系においても、主に側脳室下帯と海馬歯状回の 2 カ所で神経が新生していることが明らかにされている。新生した神経は神経回路網に組み込まれて機能し、また学習や環境によって神経新生の効率に変化することが報告されている。そこで、成体期の神経新生が bisphenol-A 慢性曝露による記憶保持能力の低下に関連する可能性を考慮し、海馬領域における神経新生の変化について検討を行った。まず始めに、神経芽細胞や移動前駆細胞に特異的に発現することが知られており、神経新生の指標とされている doublecortin の変化について検討した。その結果、bisphenol-A の慢性曝露により、doublecortin 免疫活性の減弱が認められた。また、神経幹細胞から神経やグリア細胞への分化は basic Helix-Loop-Helix (bHLH) 型の転写因子によって制御されていることが知られている。そこで、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 bHLH 型転写因子の一つである NeuroD の変化について検討を行った。その結果、bisphenol-A の慢性曝露により、NeuroD 免疫活性の減弱ならびに NeuroD 陽性細胞数の有意な減少が認められた。

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、海馬において DCX および NeuroD 免疫活性の減弱が海馬神経新生効率の低下によるものか否かを、BrdU を用い、さらに詳細に検討を行った。新生細胞を検出する目的で、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスに BrdU を投与し検討した結果、異所性の BrdU 陽性細胞とオリゴデンドロサイトのマーカーである Olig2 陽性細胞との共局在が認められた。このことから、

bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、異所性にオリゴデンドロサイトの新生が認められる可能性が明らかとなった。これらの結果から、bisphenol-A の慢性曝露により、海馬神経新生の低下が引き起こされることが明らかになった。さらに、神経新生の低下に伴い、異所性にオリゴデンドロサイトの新生が引き起こされる可能性が示唆された。

E. 結論

- Bisphenol-A の慢性曝露により、海馬神経新生の低下が引き起こされる。
- Bisphenol-A の慢性曝露により、海馬領域において神経新生の低下に伴い、異所性にオリゴデンドロサイトの新生が引き起こされる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

生命発生以来存在しなかった何万種類もの化学物質が環境中に放出されている。本研究の結果から、発達期に bisphenol-A を含む環境化学物質を飲食物とともに摂取した母親から産まれた現代人が、正常な神経系の構築がなされていない可能性を示唆するものであり、bisphenol-A の発達期曝露は出来る限り避けることが望ましい。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

該当なし

2) 雑誌

1. 論文発表

Miyagawa K, Narita M, Narita M, Niikura 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)

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. *Neuroscience Letters* 418 236-241 (2007)

Narita M, Miyagawa K, Mizuo K, Yoshida T, and 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)

Narita M, Kuzumaki N, Miyatake M, Sato F, Wachi H, Seyama Y, and Suzuki T.: Role of d-opioid receptor function in neurogenesis and neuroprotection. *J. Neurochem.*, 97, 1494-1505 (2006)

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)

○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)

2. 学会発表

第 20 回 環境ホルモン学会

2009 年 2 月 24 日、両国

Bisphenol-Aの発達期摂取によるエピジェネティクス異常を伴った幹細胞からの神経/グリア細胞分化の均衡破綻と脳高次機能障害
葛巻直子、成田年、成田道子、池上大悟、鶴川百合、鈴木勉

第 18 回日本臨床精神神経薬理学会・第 38 回日本神経精神薬理学会合同年会

2008 年 10 月 1-3 日、品川

環境ホルモンの胎児期および授乳期曝露によるエピジェネティックな脳神経機能発達の制御

池上大悟、成田 年、葛巻直子、今井哲司、
新倉慶一、水尾圭祐、鶴川百合、鈴木 勉

第 31 回日本神経科学大会

2008 年 7 月 9-11 日、千代田区

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性暴
露による海馬におけるアストロサイトの活性化
水尾圭祐、成田 年、成田道子、鶴川百合、
宮川和也、宮竹真由美、鈴木 勉

第 31 回日本神経科学大会

2008 年 7 月 9-11 日、千代田区

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性暴
露による dopamine 神経発達に及ぼす影響
宮川和也^{1,2)}、成田 年¹⁾、鶴川百合¹⁾、水尾
圭祐¹⁾、今井哲司¹⁾、成田道子¹⁾、武田弘志²⁾、
鈴木 勉¹⁾

(¹ 星薬科大学・薬品毒性学教室、² 国際医療
福祉大学)

第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会

2008 年 6 月 26 - 28 日、代々木

Bisphenol-A 曝露によるヒストン脱アセチル化
酵素 (HDAC) の発現に及ぼす影響

Prenatal and neonatal exposure to
bisphenol-A affects histone deacetylase
(HDAC) expression

池上大悟、成田 年、鶴川百合、水尾圭輔、
今井哲司、新倉慶一、鈴木雅美、鈴木 勉

第34回日本トキシコロジー学会

2007 年 6 月 27 - 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

第 80 回日本薬理学会年会

2007 年 3 月 14 - 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

第 29 回日本神経科学大会年会

2006 年 7 月 19 - 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

第 79 回日本薬理学会年会

2006 年 3 月 8 - 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

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

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

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 健康障害予防研究グループ
研究協力者 小林 健一 同 健康障害予防研究グループ
研究協力者 北條 理恵子 同 国際情報・研究振興センター

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から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ことを目的とするものである。今年度(平成 21 年度)は、以前に実施したビスフェノール A (BPA) 低濃度曝露の次世代認知機能影響に関する実験を、ラット及びマウスを用いて同一の方法で再度実施し再現性を調べた。前回と同様、学習習得と短期記憶の保持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、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、前回ラットで示された学習過程への影響(反応抑制の遅延)は今回示されなかったが、マウスでは学習習得過程で有意に高い反応率(前回は有意とならなかったものと同様の傾向)が観察された。また陽性対照物質として PTU の影響をみる実験をマウスで実施し、学習習得過程での影響を把握したものの、昨年度ラットで認められたような短期記憶の保持過程に対する影響を示すことはできなかった。

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。中でも、中枢神経系の機能に関わる影響の把握は重要な課題であるが、認知機能(学習・記憶・注意)に対する影響を適切に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り、これらを分離し、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認知過程への影響を評価する方法をより高度なものとする必要がある。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、この

ような機能の評価においては、種々の困難さのため実施されることは少ない。認知機能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した。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実験を進めた。

研究初年度(平成19年度)には、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調べ、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た。2年目(平成20年度)に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、ラットを用いた実験では PTU 投与により児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、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。また PTU に対して感受性が低いとされているマウスを用いて、ラットと同様の測定に着手した。

本研究の最終年度にあたる平成21年度には、前年度に開始した PTU についてのマウスを用いた実験を継続実施するとともに、新たに BPA 低用量曝露による次世代認知機能影響について、ラット及びマウスで以前の試験結果を確認する再試験を実施した。

今年度の研究結果であるが、マウスを使用した PTU に関する実験では曝露影響をラットの時のように明確に把握することはできなかった。また BPA について行なった再試験では、ラットでは明確な BPA 曝露の影響は得られず、用量依存的な影響が認められた平成19年度の研究と異なる結果となった。マウスについては、学習習得過程に関わる行動指標で3段階に設定した用量の内の最低用量でのみ有意な変化が認められた。以前のマウスの実験で逆 U 字型の量-影響関係を示す傾向が示唆された行動指標であり、有意ではなかったために曝露影響なしとしていたものである。

B. 研究方法

B-1 BPA経胎盤・経母乳曝露がラットの次世代認知機能におよぼす影響について
被験動物: 9週齢の交配済み雌ラット(IGS-SD・日本チャールスリバー)を52匹購入し、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 13 匹)した。出産5日後(PND5)に各腹の児数を8匹(可能な範囲で雌雄同数)に調整した。離乳時に、行動試験に使用するための雄児を各腹から1匹ランダムに選び(行動試験には合計48匹を使用するが、各群1腹多く準備して雄児がとれない場合に備えるとともに、全腹から雄児がとれたときには13腹から1腹をランダムに除外して使用することとしている)、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。給餌制限下での食餌強化による SCOB 行動測定のため、8週齢で個別飼育を開始した。給餌制限では300gを目標に給餌量を調整し実験期間を通じて体重を維持した。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。

なお離乳時の雌雄判定において、対照群で誤判定が1例あり、集団飼育時に1ケージで雌が混入したため、このケージの4匹を行動解析に使用せず、対照群では8匹を用いることとなった。また、3.3 ppm 群では1匹が未妊娠、1匹が未出産の理由により使用できなくなったため、これらの個体を除く11個体から得た雄児11匹(各腹1匹)を実験に使用した。他の2群は予定どおり12匹を使用した。

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、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。なお、動物の入荷から混餌曝露開始までは、混餌飼料と同じ銘柄(オリエンタル酵母 MF)の固形飼料で飼育した。

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”という音:ピップ音)を随伴させた。

なお、特定の測定装置が特定の群に偏らないよう、各装置に各群の個体を割りつけて使用した。

SCOB の測定手続き:食餌を報酬とした SCOB 測定のための制限給餌で体重が安定した 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

が終了まで継続した。装置 8 台で 48 匹の測定を実施するため、1 日 6 回の測定が必要であり、日内の実施時刻にずれが生じるが、実施時刻が群によって偏らないようバランスをとり各時刻に各群を割り振った。

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。

自動反応形成スケジュールは一連の SCOB 条件付け学習訓練の初めの段階となるもので、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 10 s) 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げ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。

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 プロシージャを使用した。

B-2 BPA経胎盤・経母乳曝露がマウスの次世代認知機能におよぼす影響について

被験動物：13 週齢の交配済み雌マウス(C57BL/6J・日本クレア)を 64 匹購入し、1 群 16 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。出生した児マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日(PND1)に同腹児数を 8 匹に調整(可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生児数 8 匹未満の場合はそのまま)した。離乳時(PND22)に、各腹から雄性児 1 匹をランダムに選び、通常飼料(オリエンタル酵母 MF)を与えて 12 週齢まで集団飼育(4~5 匹)した。行動試験には、最終的に雄性児を 1 群(各曝露濃度)当たり 12 匹で計 48 匹を使用予定であったが、0.33 ppm 群では 9 匹しか雄児が取れなかった(未出産が 3 匹、出産後全児死亡が 3 腹、全児雌が 1 腹)ため、この群は 9 匹、他の群では 13 匹の合計 48 匹を測定に使用した。各腹から雄児 1 匹とするとともに、雄の産児が得られた母動物から測定対象とする腹がランダムに選ばれるようにした。

雄性児は 12 週齢で行動試験に使用する個体を確定し、食餌強化による SCOB 行動測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。SCOB の測定では、食餌を報酬とするため、個別別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となるが、これまでの結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85%体重(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。給水瓶にはガラス製を使用した。

実験に用いたマウスは、すべて温度 23 ± 1°C、湿度 55 ± 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。飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

BPA 曝露：購入した交配済上述したように、母マウスを各群 16 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。使用した混餌飼料は、ラット用と同時に調整したもので、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、33 ppm の濃度で混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを、それぞれの群に与えた。

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 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 x 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。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:基本的にラットと同様である。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 16 週齢で開始した。以後、1 日 1 セッションで週 5 日行い実験終了まで継続した。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ラットと同様とした。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もラットと同様で、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、これも Fig. 1 に示したラットと基本的に同様であるが、1) 訓練当初の固定長タイムアウト時間、2) 訓練第 2 段階のセッション数、3) 訓練第 3 段階のセッション数が異なる。以前の研究結果をベースにマウスで訓練が適切に進行するように設定したもので、再試験対象となる以前の実験と同じものとした。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 8s)では、タイムアウト時間を 8 秒に固定(ラットでは 4 秒に固定)し 25 セッションの訓練・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、40 セッションの訓練・測定を実施(ラットでは 25 セッション)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、50 セッションの訓練・測定を実施(ラットでは 25 セッション)した。その後、薬理的負荷試験を実施した。

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って、cue light は消灯し暗転する。ラットではハウスライトを暗転中も含め常時点灯としたが、マウスでは暗転時は完全に消灯した。他はラットと同様である。

SCOB における反応の指標:ラットと同様の指標を用いた。すなわち、FR 及び DRO 反応率(1 分間当りのレバー押し反応頻度)、「Accuracy」、「Bias」である。

薬理的負荷試験:方法はラットと同様とした。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 50 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 アゴニスト)、(±) SKF38393 (D1 アゴニスト) を使用するが、methamphetamine 以外については報告書作成段階で測定未終了である。

統計解析: ラットと同様の方法で行なった。母マウスの摂餌量、児マウスの体重については、群間 1 要因 (BPA) 群内 1 要因 (測定日) として反復測定分散分析を実施した。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。また、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。いずれも計算には SAS/GLM プロシージャーを使用した。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) について検定予定。

B-3 プロピルチオウラシル (PTU) 経胎盤・経母乳曝露がマウスの次世代認知機能におよぼす影響について

被験動物: 交配済み雌マウス (C57BL/6J・日本クレア) を 50 匹購入し、1 群 10 匹の 5 群に分け、GD13 から PND20 まで PTU の強制経口投与 (1 日 1 回・出産後も母動物にのみ投与) を行なった。出生した児マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日 (PND1) に同腹児数を 8 匹に調整 (可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生児数 8 匹未満の場合はそのまま) した。離乳 (PND21) 後は、通常飼料 (オリエンタル酵母 MF) を与えて 24 週齢まで集団飼育 (4 匹/ケージ) した。行動試験には、雄の産児が得られた母動物から、測定対象に各群 8 腹がランダムに選ばれるようにするとともに、各腹から雄性児 1 匹をラ

ンダムに選び用いたが、この条件では雄性児が得られない場合があり、対照群 6 匹、10 mg/kg 曝露群 6 匹、20 mg/kg 曝露群 6 匹、40 mg/kg 曝露群 8 匹、80 mg/kg 曝露群 7 匹、合計 33 匹の雄性児を最終的に解析に使用した (同腹児をいれて合計 40 匹を訓練したが、同腹児データは解析に使用しなかった)。

雄児は 24 週齢で行動試験に使用する個体を確定し、食餌強化による SCOB 行動測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。SCOB の測定では、食餌を報酬とするため、個別別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となるが、これまでの結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85% 体重 (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。給水瓶にはガラス製を使用した。

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。飼育にはポリカーボネート製ケージを使用した。

プロピルチオウラシル投与: PTU (6-n-propyl-2-thiouracil、Sigma 社、純度 99% 以上) の用量は 0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、40 mg/kg、80 mg/kg とした。用量は、予備実験により産児数が極端に少なくなる範囲の上限を最大用量とした。また公比を 2 として他の 2 用量を決定した。コーン油を溶媒とし、投与量は 10 ml/kg とした。

SCOB 測定装置: 上述の B-2 ビスフェノールに関するマウスの実験と同じ装置を使用した。

SCOB の測定手続き: 基本的に上述の B-2 ビスフェノールに関するマウスの実験と同じ手続きを使用した。タイムアウト付交替型混合スケジュールの訓練では、訓練第 3 段階のセッション数を合計 60 セッションとした。そ