

200941015A

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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 22 (2010) 年 5 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 21 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 22 (2010) 年 5 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（掛山正心） ----1

## II. 分担研究報告書

1. 簡易試験としての集団型全自動行動解析装置を用いた  
新たな学習試験法の確立に関する研究（掛山正心） -----15

2. 周産期ダイオキシン曝露動物を用いた  
IntelliCage 行動試験の検証（掛山正心） -----42

3. 周産期ダイオキシン曝露動物を用いた情動試験の検証（小川園子） ---- 71

4. 塩素化および臭素化ダイオキシンの胎仔期・授乳期曝露が  
恐怖記憶へ及ぼす影響に関する研究（掛山正心） ----- 84

5. ニューロンの細胞骨格関連分子群の発現を指標にした  
発達期ダイオキシン曝露の後発影響評価（塚原伸治） ----- 94

6. 大脳皮質依存性の学習試験の構築に関する研究（掛山正心） -----106

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----120

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----121

# 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

単なる行動パラメータの記述ではなく、高次脳機能である情動・認知機能に対する影響を定量化するために、行動から分子までの包括的評価手法を確立することが本研究の目的である。行動試験バッテリーとしては、中核となる Flavor Map 試験 と KODOMO 試験 を完成させた。さらに KODOMO は来年度中に二つ目の特許を出願する目処がたった。社会的嗜好性・関心・恐怖の測定装置 および 社会的認知行動試験 を新たに開発し、既存のオープン・フィールド、明暗箱、高架式十字迷路、輪回し、恐怖条件づけ、プレパルス抑制、強制水泳、物体再認等のテストについてダイオキシンを陽性条件としたデータをほぼすべて、収集した。これらの知見をもとにした簡易試験 (IntelliCage 試験) の開発も想定以上の収穫を得ている。学習効率・再現性・精度面で優れたプロトコルを独自開発、さらに社会的場面での情動試験の開発にも目処がたった。組織化学評価の精密手法と簡略手法、神経微細構造の構築に関わるタンパク・遺伝子群の定量解析系の整備・開発が完了した。微細構造解析の精密手法と簡略手法の開発も順調であり、2010 年度中に完了見込みである。またダイオキシン曝露影響に関して、恐怖記憶の障害、認知的柔軟性の低下、精神神経症状の惹起、前頭葉と扁桃体の神経活動（依存性蛋白発現）異常など、想定以上の重要な新知見を得た。さらにビスフェノールA曝露影響や遺伝子欠損マウスに関する解析も進めており、既にダイオキシン影響と共通するパターンと異なるパターンを複数見出した。今後は①各行動試験の結果を比較しながら、各試験の有効性と妥当範囲を検証し、②同時に行動レベル、組織レベル、分子レベルでの試験結果を比較検証し、行動試験の結果に科学的説明を付与し影響の定量化を目指す。

### 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（埼玉大学・准教授）  
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。本研究はこの immuno-LMD 法を実用化する最初の研究でもある。この immuno-LMD 法を中心に、形態・生理・化学的解析を行い行動変化を科学的に説明する。それらを統合し、単なる行動観察結果のリポートではなく、科学的かつ定量

的な包括的行動毒性試験法を確立、提示する。

## B 研究方法

### (1) 全体戦略

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の構築を進めている。

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の開発も行っている。

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 immuno-LMD を利用しながら行い、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ことを目指す。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し提示する。

### (2) 化学物質の選定と曝露量

試験手法の構築にあたり、ダイオキシン、ビスフェノールA、メチル水銀等の化学物質の「低用量の」発達期曝露を行い、それら化学物質の影響につ

いても検証を進めている。これらの化学物質は、(曝露量によるが)発達神経毒性があることが報告されており、なおかつ影響の内容や度合いが明らかでなく、リスク評価の再検討のための科学的知見の提供が求められている物質でもある。

ここで、本研究で曝露実験を行う「低用量」について、次のように定義する。

1. 母体ではなんら影響が観察されないレベルであり、仔動物においても致死性や催奇形性、運動障害といった重篤な影響が観察されない  
曝露量： 現在リスク評価において問題とされているのは、一見してそれとわからないが「より豊かな生活」を目指す上で問題となるような次世代影響である。
2. 既往報告における NOAEL/LOAEL に相当する曝露量：  
NOAEL/LOAEL 付近の曝露量、あるいはさらに低い曝露量によって影響が顕われるのか、顕われた場合、どのような影響が顕われるのかを明らかにすることが重要な課題である。
3. リスク評価を検討する際に科学的知見として活用可能な曝露量：  
リスク評価、すなわちヒトへの健康影響を検討するためには、ヒトが実際に曝露を受ける可能性のある曝露量に相当するレベルで検討をしなければならない。

ダイオキシンを例に、本研究で用いた曝露量について考察する。動物実験の曝露量をヒトにあてはめる際には、化学物質に対する感受性の種差（ラット・マウスとヒトの違い）や、体内動態の種差等を考慮に入れる必要がある。ダイオキシンの場合、ラット・マウスの半減期は数週間であるのに対してヒトでは数年以上と大きく異なるため、曝露量の比較は摂取量ではなく、体内負荷量で行わねばならない。日本人のダイオキシン体内負荷量は2～6 ng TEQ/kgとされている(Executive Summary Report of "Assessment of the health risks of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI) (1999))。

一方、本研究でラットに対する実験では、妊娠 15 日目の母ラットに対して 200～800 ng/kg のダイオキシンを単回経口投与している。本研究で問題としているのは仔動物に対する影響なので、母体から胎盤経由・母乳経由でダイオキシンが仔動物に移行するまでの期間（投与直後から離乳時点）の体内負荷量が問題となる。200 ng/kg 曝露によるこの期間の体内負荷量は 86 ng/kg であり、すなわち本研究で用いた体内負荷量はヒト体内負荷量の 10～数十倍程度となる。なお 1998 年のダイオキシンリスク評価の際には、この 200 ng/kg 曝露（体内負荷量 86 ng/kg）に基づき、一日耐容摂取量 4 pg TEQ/kg/day が求められた（不確実係数 10 を用い、ヒト体内負荷量に相当する

一日あたり摂取量）。以上、本研究で用いている曝露量は「低用量」と定義できる。

ただし、リスク評価の際には、感受性の種差について、これまで以上に考慮が必要であろう。様々な研究から、ダイオキシンに対するヒトの感受性は、ラットと比べてかなり低いと考えられるため、本研究の結果にもとづいて「一般的な摂取量の 10 倍程度で影響が顕われる」と解釈するのは、問題があるだろう。

そこで本研究では、ラットよりも感受性の低いマウスも用いた実験を行っている。LD50 で比較すると、ラット(Long-Evans) 25～50 μg/kg に対し、本研究の C57BL/6 マウスは 180 μg/kg 程度である。本研究では C57BL/6 マウスに対しては、妊娠 12.5 日目の母動物に 0.6～3.0 μg/kg の単回経口投与を行っている（分担研究報告書「周産期ダイオキシン曝露動物を用いた IntelliCage 行動試験の検証」、「周産期ダイオキシン曝露動物を用いた情動試験の検証」、「塩素化および臭素化ダイオキシンの胎仔期・授乳期曝露が恐怖記憶へ及ぼす影響に関する研究」、「ニューロンの細胞骨格関連分子群の発現を指標にした発達期ダイオキシン曝露の後発影響評価」を参照）。

さらに一部の研究では、ヒトの感受性に近いと推測されている DBA/2 系統のマウスも用いている（LD50=2570 μg/kg、分担研究報告書「周産期ダイオキシン曝露動物を用いた情動試験

の検証」にて成果の一部を報告)。

本研究はダイオキシンの影響評価が目的ではないので、部分的な検討にとどまるが、このような種や系統の比較を行うことで、ヒト健康影響評価のための、より有用な科学的知見を提供したいと考えている。

### (3) その他のモデル動物を用いた検討

本研究が目指すのは、影響が不明な化学物質の評価にも対応可能な包括的試験手法の構築である。そこで本研究では、手法の妥当性を検証するために、第一に、実際に、ダイオキシンやビスフェノール A など、リスク評価の再検討が要求される化学物質の曝露動物を用いて研究を進めている。これら化学物質の影響について、既存の試験法と独自の試験法についての結果を比較することで、独自の試験手法の妥当性・正当性について検証を行う。次に、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ことでも、行動変化の意味を科学的に検証する戦略をとっている。

一方、構築する手法が、単にダイオキシンやビスフェノール A といった特定の化学物質に特化した手法にならぬよう、注意が必要である。そこで化学物質曝露動物以外の視点から、そして遺伝子改変動物を用いた検証も進めている。例えば簡易試験としての IntelliCage 試験では、まず、未処置の動物を用いた新たな学習試験法の構

築として成果をまとめた(分担研究報告書「簡易試験としての集団型全自動行動解析装置を用いた新たな学習試験法の確立に関する研究」参照)。また、特に情動試験については、オスとメスの違いを見出すという視点からも研究を進めている(分担研究報告書「周産期ダイオキシン曝露動物を用いた情動試験の検証」参照)。いわゆる「環境ホルモン」のような、性ステロイド系に影響を及ぼす化学物質の影響を検出する上でも重要な視点であり、雌雄差を明確に記述できる行動試験の構築は価値が高いと自負する。

さらに本研究では、それらをサポートするために、いくつかの遺伝子改変動物を用いた手法の検証も進めている(性ステロイド系、あるいは学習機能に関わる遺伝子、情動機能に関わる遺伝子等)。

## C 研究結果

本研究の分担報告書については、個々の実験結果を科学論文に近い体裁でまとめている。よってこの総括研究報告書については、研究全体の目的を明確にするために、サブテーマごとに成果を融合して記述することとする。

### (1) 行動試験の独自開発 1

Flavor Map 試験は毒性学分野のみならず、神経科学分野においても注目されている斬新な試験法である。しかし現在実験に成功しているのは、エジン



バラ大学と東京大学の二拠点のみである。そこで最初に、両大学の方法や結果の詳細を比較することで、試験プロトコールの一般化を目指した。

その結果、特に高度な知識と技術がなくとも、一定の研修後には、実験従事者が Flavor Map 試験の実施を行うことが可能であることを確認した。さらに試験手法の改良により、ラットが学習成立をしたと判断されるまでに要するトライアル数を、これまでよりも20%削減できた。本研究の開始までに、ダイオキシン曝露影響の結果を得ており、今回の低用量曝露（妊娠15日目の母動物に200ng/kg単回経口投与）特異的な対連合学習機能の障害にあわせて、不安様行動の検出にも成功した。同800ng/kgでは影響がなくむしろ成績を向上させる作用があることがわかった。

KODOMO試験のプロトコール開発も予定どおり進行した。本研究事業開始前までに得たPCB曝露動物（妊娠15日目の母動物に2.0mg/kg単回経口投与）におけるビデオ・トラッキング画像を解析し、本研究において定量的解析を行った。その結果、まず対照動物において25日齢までにKODOMO試験の学習効果があることが明確になった。他方、PCB曝露動物は対照動物と比較して、ゴールまでの所要時間と総移動距離が長く、不正解ゲートへのアクセス数は減少しないことが明らかとなった。さらに、PCB曝露動物における試験中の活動時間割合は日

を追うごとに有意に増加することがわかった。

## (2)行動試験の独自開発2

「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ため、ダイオキシン曝露動物を用いて検討を開始した。現在までのところ、ダイオキシン曝露（妊娠12.5日目の母動物に0.6μg/kg単回経口投与）により、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、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の不安行動のレベルや他個体への反応性には大きな影響がみられることがわかった。

## (3)既存行動試験の整備・改良

試験バッテリー構築のデータ収集のため、既存の行動試験法を用いたダイオキシン曝露影響を調べたところ、ダイオキシンによる認知学習機能障害のほかに、情動機能異常があることを新たに確認した。既存試験を用いたダイオキシン影響の新たな知見として、恐怖記憶の障害、ストレス下での驚愕反応の増強、強制水泳試験における無動時間の増加、プレパルス抑制の障害があることを見出した。

## (4)簡易行動試験の独自開発

マウスの集団型行動評価システム IntelliCage はこれまで、極めて単純な

空間記憶の成立の有無を確認できるのみであった。われわれは上述の試験バッテリー構築のノウハウをもとに、空間弁別の反復的逆転課題の作成に成功した。最終的な正答率は対照動物で95%を超え、また極めて再現性が高く個体間のばらつきが少ないことを確認した。

ダイオキシン曝露影響について検討したところ、低用量特異的な部分的学習障害と情動異常を検出することに成功した(妊娠12.5日目の母動物に0.6 $\mu$ g/kg単回経口投与。より高用量の3.0 $\mu$ g/kg曝露では影響がほとんどみられなかった)。さらに情動行動異常に関して、曝露群を対照群と一緒に飼育している時にのみ顕れることが新たに明らかになった。そこで現在、より簡便に社会的場面での情動異常を検出する新プロトコールの開発を行っているところであり、22年度中の完成に目処がたった。

#### (5)組織・分子レベルでの検討

組織学レベルの試験では、まずFlavor Map試験の動物脳サンプルを用いて検討した。東大・医・神経生化学・奥野博士が作成したArc抗体を用いることで、市販品よりも高感度にArc蛋白発現を検出することができるようになり、帯状皮質近傍領域ならびに嗅内野近傍領域に対連合学習に特異的なArc蛋白の発現増強があることを見出した。

一方、これらの特定の細胞における

遺伝子発現解析を実現するため、Immuno-LMD法の毒性試験への適用を行った(同手法の基本部分は、掛山が研究代表を務めるLeica Microsystems-東京大学国際共同研究において開発)。そして本研究内において、一細胞からのRNA抽出について、収量を劇的に向上させる手法の開発を進めている。これまでに、海馬錐体細胞におけるグルタミン酸トランスポーター遺伝子EAAC1がメチル水銀(MeHg)胎仔期曝露により半減することを見出した(母動物に対して出産4週間前より0.5 ppmのMeHgを混水投与)。さらに対連合学習特異的なArc蛋白発現増強を見せた細胞を回収し遺伝子発現定量解析を行うことに成功した。結果、ダイオキシン曝露により対連合学習機能が低下していた動物の同細胞において、NMDA受容体関連遺伝子が50%以下に低下しているという予備知見を得た。

さらにIntelliCage試験を行った動物の脳サンプルを用い神経活動依存的蛋白の発現解析を行ったところ、ダイオキシン曝露により前頭皮質での発現低下と扁桃体での発現上昇を確認した。

#### (6)細胞レベルでの検討

神経細胞の微細構造に対する曝露影響を解析するための手法開発として、神経系のモデル細胞となるPC12細胞を用いてライブイメージングを実施中である。これまでの所、

SNAP25-GFP 融合タンパク質を発現した PC12 細胞を作製し、ライブイメージングにより同細胞の変化を観察することに成功した。また、神経微細構造の構築に関わるタンパク質・遺伝子群の定量解析系を構築した。ダイオキシン曝露の脳への影響については、扁桃体および海馬における神経細胞の骨格タンパク質 MAP2 の mRNA 発現に影響を及ぼすことを明らかにした。

#### (7)生理学的手法の検討

電気生理学的解析では、雌雄のラットのバレル皮質において性差なく、GluR1 はシナプスに移行すること、しかし、女性ホルモンの拮抗的阻害剤・タモキシフェンを大脳皮質に局所投与すると、シナプスへの GluR1 の移行は雄性ラットにおいてのみ阻害されることを見出した。そこで雄性ラットを用いて、選択的なエストロゲン受容体アンタゴニストを局所に投与したところ  $\beta$  受容体選択的なものは GluR1 のシナプスへの移行を阻止したが、 $\alpha$  受容体選択的なものは無効であった。従って、雄性ラットの場合、テストステロンは局所でエストロゲンに変換され、エストロゲン受容体  $\beta$  を介して大脳皮質の発達に重要な役割を担っていることが推測された。このことは、発達障害の性差と内分泌攪乱物質の影響を考える上で興味深い。

#### (8)有効性の検討

ビスフェノール A 曝露動物を作成した。現在、オープン・フィールド、明暗箱、IntelliCage 試験、蛋白・遺伝子の発現定量解析等を進めているところである。

#### D. 考察

本研究の目的は、認知・情動機能への化学物質曝露の影響を検証するため、(1) 影響を見逃さないための精緻な行動試験バッテリーを提示すること、(2) 行動変化の意味を科学的に説明するための組織・細胞・分子レベルの評価手法を提示すること、(3) その成果をもとに簡易試験のプロトタイプを提示することにある。

さらに、試験法の開発・整備にあたっては、ダイオキシンやビスフェノール A 等、影響が懸念される化学物質の低用量の曝露実験を行うので、曝露実験の結果としての (4) 低用量曝露影響に関する知見の提供と (5) 試験手法の妥当性の検証を行うことを目指している。

よって考察欄では、これら五項目にわけて議論を進める。

#### (1) 影響を見逃さないための精緻な行動試験バッテリーを提示

試験バッテリーの開発の第一の成果は、習熟した実験従事者でなくとも「Flavor Map 試験」を用いることができるプロトコルを開発したことである。第二に、KODOMO 試験の開発と検証を完了した。さらにより効率的

かつ応用性の高い装置の図面が完成し、本研究内でβ版を作成しKODOMO特許とは別に新特許を申請する予定である。第三に、「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」の開発に成功した。曝露動物を陽性条件とした検証も順調である。

また既存試験としてオープン・フィールド、明暗箱、高架式十字迷路、輪回し、恐怖条件づけ、プレパルス抑制、強制水泳、物体再認等のテストについて、ダイオキシン曝露を陽性条件としてデータを収集した（曝露影響については(4)にて考察）。21年度より開始したビスフェノールA曝露実験も順調であり、加えて遺伝子欠損動物のデータもあわせることで、最終年度に試験バッテリーとしての取捨選択・まとめを、しっかりと行いたい。

## **(2) 行動変化の意味を科学的に説明するための組織・細胞・分子レベルの評価手法を提示**

手法の提示としては、Immuno-LMD法、GluR1分子のシナプス移行の解析、SNAP25-GFP融合タンパク質を導入した神経系細胞のライブ・イメージングを新たに開発した。組織化学評価についても全自動顕微鏡を用いた効率的な解析を実現し、曝露影響の検証にも成功している（後述）。22年度には同様に微細形態解析も実現見込みである。

特に Immuno-LMD 法に関しては、

掛山が Leica Microsystems と共同開発したものだが、本研究内においてはじめて実験結果を得て（メチル水銀曝露影響）、さらに一細胞からの遺伝子発現解析の開発を進めているところである。

行動実験を行った動物の脳サンプルを用いて、一般的な遺伝子や蛋白の定量発現解析も順調に進んでおり、後述するような、行動変化に対応した、低用量特異的な変化と用量依存的変化を複数見出している。

## **(3) 簡易試験のプロトタイプを提示**

簡易試験の中心である「IntelliCage試験」の試験プロトコールに関して、従来とは比較にならないほどの学習効率と高い再現性、極めて小さな群内誤差を実現した学習行動試験を完成させた。IntelliCage 発明者の Hans-Peter Lipp 教授（チューリッヒ大学）にも海外研究協力者として本研究に参画いただき、チューリッヒでもプロトコールの検証を行い、成功している。

さらに、特に社会的場面における情動行動試験については新たなプロトコールの作成をすすめており、予備検討が終了した。22年度に最終的な検証を行い、新たな試験プロトコールとして提示できる目処がたった。

## **(4) 低用量曝露影響に関する知見の提供**

ビスフェノールAの影響については解析途中であるため、今回の見込み報

告では、ダイオキシンの低用量曝露影響（母体曝露による仔動物への影響）に関して考察する。

ダイオキシンにより、高次学習機能の低下、認知的柔軟性 (cognitive flexibility) の低下、恐怖記憶の低下（海馬依存性と非依存性ともに）を見出した。情動異常として、うつ症状（強制水泳試験）、社会的場面での不安様症状（新規開発の試験、IntelliCage 試験）ならびに固執性亢進 (IntelliCage 試験) があること、さらに、プレパルス抑制 (PPI) の障害があることも発見した。プレパルス抑制は統合失調症患者や双極性障害患者において障害があることが知られており、化学物質の曝露影響の報告として重大な意味をもつと思われる。そこで現在、精神疾患治療薬の投与効果をみながら影響の有無について再検証をすすめているところである。これまでに、著効の治療薬を一つ見出している。この治療薬の作用メカニズムに関する情報をもとに科学的検討をすすめ、22 年度に報告する。

このように、ダイオキシンに関しては、行動レベルで、低用量特異的な影響と用量依存的影響の双方が存在することも確認できた。前者は高次学習機能、認知的柔軟性の低下、うつ症状、社会的場面での不安様症状ならびに固執性亢進であり、後者は恐怖記憶の障害と精神疾患症状（PPI 障害など）である。

組織レベル、分子レベルでの解析で

も、同じく低用量特異的な変化と用量依存的変化の双方を見出すことができた。組織学レベルでの解析により、前頭葉と扁桃体における神経活動依存性の蛋白発現は、低用量特異的であることを明らかにした。一方、大脳皮質と海馬における NMDA 受容体分子の発現低下は用量依存的であることを確認した。

行動に伴う変化や曝露影響を確認した脳領域や分子はいずれも、学習機能や情動機能に関わるものがよく知られており、また精神疾患患者の脳で変化が報告されているものでもある。今後ビスフェノール A 等のダイオキシン以外の陽性条件の検討と比較解析により、個々の機能や脳領域、分子と影響とを対応できる可能性も十分に考えられる。22 年度はこのような「まとめ」をしっかりと進めたい。

## (5) 試験手法の妥当性の検証

上述のように、ダイオキシンに関しては想定以上に様々な種類の影響を見出すことができている。加えてビスフェノール A の影響についても試験を開始しており、すべてのデータを比較することで試験法の妥当性や有効範囲について考察することができるだろう。

また、今回行ったダイオキシン曝露実験の中で、ダイオキシン曝露により老年期に体重低下があること、耐糖能にも異常があるという新知見を得た。そこで耐糖能異常を持つ遺伝子欠損

マウスとダイオキシン曝露マウスの比較も行っている。予備検討では、情動異常に関してはダイオキシンと類似しており、学習機能に関しては異なる変化がある可能性を見出している。今後このような形で遺伝子改変動物の解析も適宜加え、試験法の検証を進めたい。

## E. 結論

考察で述べた5項目の目標について、すべて極めて順調に進んでおり、また想定以上の成果があがっている箇所も多くある。最終年度は個々の手法に関して周辺のデータを収集・整理して報告するとともに、ビスフェノールAの影響等の解析、そしてそれらの比較検討とまとめを行う。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.-Å., Pfaff, D.W., and Ogawa, S. Effect of ER- $\beta$  gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiology and Behavior*, 96, 300-306, 2009.
2. Helena, C., Gustafsson, J.-Å., Korach, K.S., Pfaff, D.W., Anselmo-Franci, J. and Ogawa, S. Effects of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  gene deletion on estrogenic induction of progesterone

receptors in the locus coeruleus in female mice. *Endocrine*, 36, 169-177, 2009.

3. Funabashi T., Hagiwara H, Mogi K, Mitsushima D, Shinohara K and Kimura F. Sex differences in the responses of orexin neurons in the lateral hypothalamic area and feeding behavior to fasting. *Neurosc Lett* 463: 31-34, 2009.
4. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. A synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* USA, 106:316-321, 2009
5. Crews D, Rushworth D, Gonzalez-Lima F, Ogawa S. Litter environment affects behavior and brain metabolic activity of adult knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3: Article 12, 2009.
6. 小川園子. 攻撃行動の性差 *Clinical Neuroscience*, 27, 1116-1117, 2009 (査読無)
7. Hagiwara H, Ishida M, Arita J, Mitsushima D, Takahashi T, Kimura F, Funabashi T. The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat. *Eur J*

- Neurosci. 2009, 30(12):2379-86.
8. Tsukahara S. Sex differences and roles of sex steroids in apoptosis of sexually dimorphic nuclei of preoptic area in postnatal rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 4, 370-376, 2009.
  9. Ageta-Ishihara N, Takemoto-Kimura S, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Suzuki K, Kamijo S, Fujii H, Mano T, Blaeser F, Chatila TA, Mizuno H, Hirano T, Tagawa Y, Okuno H, Bito H. Control of cortical axon elongation by a GABA-driven Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase cascade. *J. Neurosci.* 29:13720-13729, 2009.
  10. 奥野浩行、川島尚之、野中美応、尾藤晴彦. シナプスから核へのシグナリング:シナプス可塑性を長期化する分子機構. *細胞工学* 28: 894-899, 2009. 秀潤社
  11. 竹本一木村さやか、上田(石原)奈津実、布施俊光、上條諭志、尾藤晴彦. 神経疾患と細胞骨格. *分子細胞治療*. 8: 243-248, 2009. 先端医学社
  12. Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Agmo A: The role of the estrogen receptor alpha in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. *Behavioural Brain Research*, 210: 211-220, 2010
  13. Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Agmo A: Estrogen-induced sexual incentive motivation, proceptivity and receptivity depend on a functional estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of the hypothalamus but not in the amygdala. *Neuroendocrinology*, 91: 142-154, 2010
  14. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, 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. *Organohalogen Compounds*, in press.
  15. Hajjima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. *Neurotoxicology*, in press.
- ## 2.学会発表
1. 掛山正心、蛍光免疫染色標本からの遺伝子発現解析、第34回組織細胞化学講習会、2009/07、徳島
  2. 仲井沙織、掛山正心、遠山千春、Immuno-LMDによる遺伝子発現定量:胎仔期メチル水銀曝露によるラット海馬錐体細胞層におけるグルタミン酸トランスポーター遺伝子の発現低

- 下、第 36 回日本トキシコロジー学会、2009/07、盛岡
3. 遠藤 俊裕、掛山正心、遠山 千春、  
集団型全自動マウス行動特性評価法の構築:周産期低用量 TCDD 曝露マウスを用いた行動毒性試験への応用、第 36 回日本トキシコロジー学会、2009/07、盛岡
  4. Funabashi T and Takahashi T Role of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge generator. Proceedings of the X X X VI Internatinal Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009/07, Kyoto
  5. 柏村実生, 津田夢芽子, Hood, K.D., Sisk, C.L., 坂本敏郎, 小川園子. 思春期のステロイドホルモン環境が情動・社会行動に及ぼす影響. 第 69 回日本動物心理学会大会, 2009/09, 岐阜
  6. 塚原伸治、黒田淑子、藤巻秀和:ライブイメージング手法を用いた神経毒性試験法による PC12 細胞のアポトーシスに対する亜ヒ酸ナトリウムを曝露の影響解析. 第 32 回日本神経科学大会、2009/09、名古屋
  7. Tsuda MC, Tanahara Y, Nagata K, Ogawa S. Neonatal maternal separation (MS) disrupts the onset and maintenance of aggressive behavior in pubertal male mice. The 32nd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2009/09, Nagoya.
  8. Funabashi T and Takahashi T. Dynamic changes in the AMPA receptor subunits composition during the estrous cycle. The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009/09, Nagoya
  9. Endo T, Tohayama C, Takeyama M. Fully-automated analytic apparatus of rodent behaviors revealed low-dose specific effects of perinatal dioxin exposure on learning and affective function, 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
  10. Hajjima A, Endo T, Zhang Y, Kurita H, Takeyama M, Tohyama C. Effects of in utero and lactational exposure to dioxin on the performance of fear conditioning in adult male mouse offspring. 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
  11. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Maternal Exposure to Dioxins Perturbs the Schema-Dependent Paired Associative Learning in Rats. the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2009), 2009/10, Chicago.
  12. Fuse T, Bito H. Input-specific remodeling of postsynaptic density



- (PSD) proteins in Purkinje cell spines. the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2009), 2009/10, Chicago.
13. Redondo RL, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, Bito H, Morris RGM. Differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation. the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2009), 2009/10, Chicago.
14. Higo S, Endo T, Sakamoto T, Haijima A, Tohyama C, Takeyama M, Ogawa S. Effect of perinatal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on emotional and social behavior in mice, 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
15. Ogawa S. Neuroendocrine Bases of Socio-Sexual and Emotional Behavior. Special Lecture at the 2nd China Animal Behavior Conference and Advanced Training Course for the Integrative Study of Behavior, 2009/11, Hefei, China.
16. 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、第 12 回環境ホルモン学会、2009/12、東京
17. Ogawa S. Neuroendocrine Bases of Social and Emotional Behavior. In The 11th IBRO Associate School of Neuroscience, 2009/12, Malaysia.
18. Tsukahara S, Kuroda Y & Fujimaki H, Live imaging of sodium arsenite-induced apoptosis in PC12 cells. PPTOXII: Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, 2009/12, Miami.
19. Tsukahara S, Kuroda Y & Fujimaki H: Live imaging of sodium arsenite-induced apoptosis in PC12 cells. PPTOXII: Role of Environmental Stressors in the Developmental Origins of Disease, Miami, FL, USA, December 7-10, 2009.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得  
特に無し
  2. 実用新案取得  
特に無し
  3. その他  
特許出願準備中 1 件 (KODOMO 装置などの行動試験の自動化システム、手続中。  
第 37 回日本トキシコロジー学会 (2010 年 6 月) シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価手法の展開」にて、小川、尾藤、掛山がそれぞれ講演の予定。

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

簡易試験としての集団型全自動行動解析装置を用いた  
新たな学習試験法の確立に関する研究

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

行動データの再現性の獲得や研究室間の標準化を目的とした新しい行動解析の手法が強く必要とされている。この問題に対する最近の手法として、ホームケージで生活するマウスの行動を全自動で評価できる IntelliCage がある。これは、マウスを個別に制御できるケージの各コーナーに設置されたオペラント条件付けユニットを利用した方法である。本研究では、空間学習に基づいた反復逆転課題を用いた新たな学習行動試験プロトコルを開発した。この課題において、3系統（C57BL/6, DBA2 と ICR）のマウスは、数日間で rule-based spatial learning を獲得できることを確認した。逆転課題では、予め学習された行動と結果の随伴性（action-outcome contingency）は、セッション間やセッション内で消滅した。さらに、反復逆転課題の中で、適応反応は向上し続けた。我々の知る限り、本報告は、マウスにおける reversal learning-set の最初の証拠を示したものである。さらに、同様の結果が、東京、栃木、チューリッヒの研究室で観察された。このことは、新しく発展させたプロトコルの高い再現性を保証するものである。このプロトコルの重要な特徴は、マウスにおいて、空間パターンの学習を自動的かつ定量的に評価できることであり、さらにマウスの行動の cognitive flexibility と reversal learning-set の評価が可能なることにある。

研究協力者

遠藤 俊裕（東京大学）、前川文彦（自治医科大学）、Vootele Voikar（Zurich 大学）、上村夕香里（東京大学）、宮崎航（東京大学）、張艶（東京大学）、岩崎有作（自治医科大学）、矢田俊彦（自

治医科大学）、David P. Wolfer（Zurich 大学）、Hans-Peter Lipp（Zurich 大学）

A 研究目的

われわれは昨年度、IntelliCage を用いた行動試験について、ダイオキシン

影響とともにその一部を報告した。本年度さらに検討を進め、IntelliCage 行動試験法の開発に一定の目処がたった。ここでは、学習試験法の確立について報告する。

マウスを使った行動研究は、脳機能を個体レベルで検討するための重要なツールである。実際、行動の表現型検査は、遺伝子改変マウスを分析するための標準的な手法となった(Wolfer et al., 2002)。しかし行動テストでマウスを頻繁に使用するにもかかわらず、ラット、サル、人間と比べ、マウスを用いた行動試験はごく簡単なものしかなく、十分に確立されているとはいえない(Chudasama and Robbins, 2006)。さらに、マウスを用いた研究は、データの再現性の低さに悩まされており(Crabbe et al., 1999)、評価できる認知機能のタイプには限界がある(Gerlai 2002)。

特に、神経精神医学のメカニズム研究に必要とされるマウスの高次機能に焦点をあてた報告はほとんどない(e.g., Colacicco et al., 2002; Hill, 2004; Shad et al., 2006)。ラットでさえ、高次の認知テストを評価している研究室は限られている(eg., see Reid and Morris 1993 and Slotnick et al.1994)。さらに、行動試験は、しばしば大きな労働力と時間の消費を要することも大きな問題である。

過去 10 年間で、長時間自動的にラット・マウスの行動を記録する技術が入手できるようになった(Goulding et

al., 2008)。本研究で使用されている IntelliCage システムも、ホームケージで暮らすマウス集団の行動分析を全自動的で行う装置である。行動表現型検査に IntelliCage システムを導入する利点としては、このシステムが(1) 研究室特有の条件(状態)や実験者による違いから生じる人為的な影響を最小限にすることによって、精密かつ標準化された実験になりうること、(2) マウスにとって慣れた環境すなわちストレスのかからない環境で長時間行動をモニターできること、(3) 最大 16 匹のマウスを同時に解析することによって、ハイスループットテストを向上できること、(4) タイミングや報酬のような実験条件を柔軟に変更でき、実験目的に従った新しいテストパラダイムを構成できることにある(Knapska et al., 2006; Onishchenko et al., 2007; Mechan et. al. 2009)。

ここでわれわれは、IntelliCage を用い、rule-based splatial learning と、反復逆転課題パラダイムに基づいた新しいプロトコルを開発した。この IntelliCage を使った新プロトコルでは、空間学習だけでなく、behavioral flexibility や reversal-learning-set の形成も評価することができる。3つの研究室における異なる実験者が、異なる週齢の3系統(C57BL/6, DBA2 と ICR)のマウスを使って、プロトコルの再現性を検証した。

## B 研究方法

## (1) 実験場所と動物

本研究では、3つの違う場所にある研究室、日本の東京にある東京大学 (UT)、日本の栃木にある自治医科大学 (JMU)、スイスのチューリッヒにあるチューリッヒ大学 (UZH) で、全く同じ IntelliCage システムを使って実験を行った。全ての動物実験は、各大学のガイドラインに従って人道的なやり方で行われた。

UT では、雄 C57BL/6(B6-UT, 6 months, n=8)、DBA2 (D2-UT, 8months, n=8) が使われた。すべてのマウスを CLEA Japan (東京、日本) から購入した。飼育室の温度は  $22 \pm 1$  °C、湿度  $60 \pm 10\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明 8 : 00-20 : 00)。JMU では、雄 C57BL/6(B6-JMU, 3 month-old ,n=5)、ICR マウス (ICR-JMU, 2month-old,n=6) が使われた。全てのマウスを、CLEA Japan と Japan SLC, Inc (静岡、日本) から購入した。飼育室の温度は、 $22 \pm 1$  °C、湿度  $60 \pm 10\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明 7 : 00-19 : 00)。UZH では、若いマウス (3 month-old) と加齢マウス (12 month-old) の雄 C57BL/6 と DBA/2 マウスが使われた (young B6-UZH , aged B6-UZH, young D2-UZH and aged D2-UZH, 各 n=11,12,12 and 11)。全てのマウスを、Charles-River Laboratories (Sulzfeld, Germany)から購入した。飼育室の温度は、 $21 \pm 1$  °C、湿度  $50 \pm 5\%$ 、明暗 12 時間サイクル (明 20 : 00-8 : 00 as reversal cycle)。合計 8 集団の雄マウス

が下記のように IntelliCage システムを使って解析された。

実験開始日の前日までに、動物にジエチルエーテルもしくはイソフルレンで麻酔をかけ、無線自動識別タグによって個体識別するため、ID コードがついているガラスでカバーされたトランスポンダーを皮下に注入した。

## (2) 試験装置

IntelliCage はコンピューターベースのものであり、ホームケージの中にいる RFID タグのついたマウスの一時的な行動や学習行動を、全自動的でテストできる装置である (図 1)。大きなプラスチックケージ (55 x 37.5 x 20.5 cm) を使うので、同じケージで生活するトランスポンダータグをつけたマウスを 16 匹まで同時にモニターすることができる。このシステムには、図 1A と B に示したような、ケージの各コーナーにぴったりとはめ込まれた三角のオペラント学習チャンバーが装着されている。マウスは、1 匹ずつコーナーに入ることができるようになっている (coner visit, hereafter)。コーナーのチャンバー内で、マウスは 2 つの nosepoke 穴を見つけることができるようになっており、そこには赤外線 beam-brake response detector がついている。Nosepoke が ” 正解 (correct) ” すれば、水の入ったボトルニップルへの電動アクセスゲートが始動する。IntelliCage では、コーナーに入った時間と behavioral events の