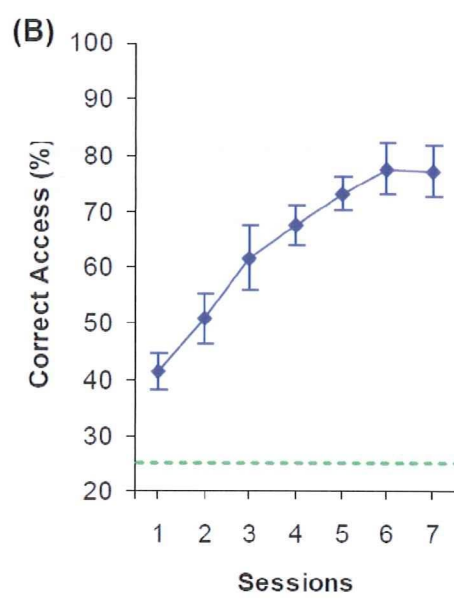
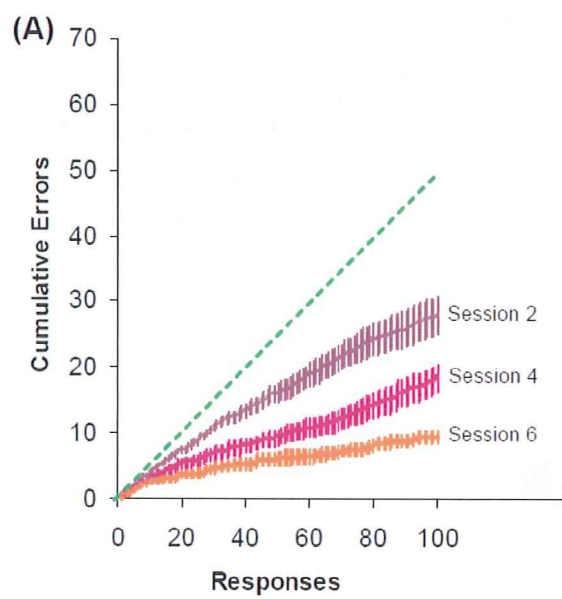
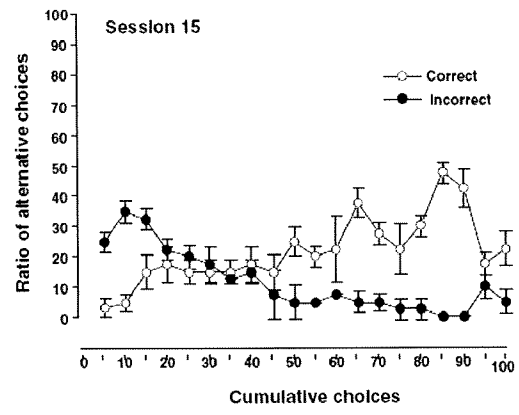
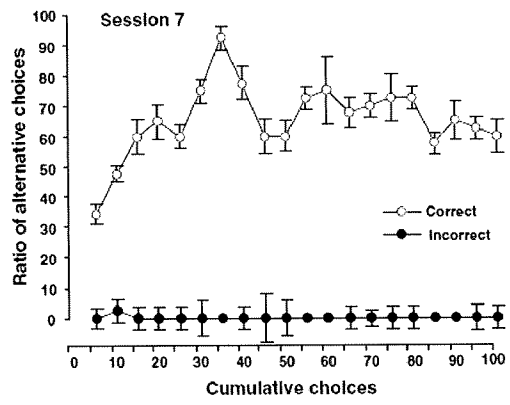
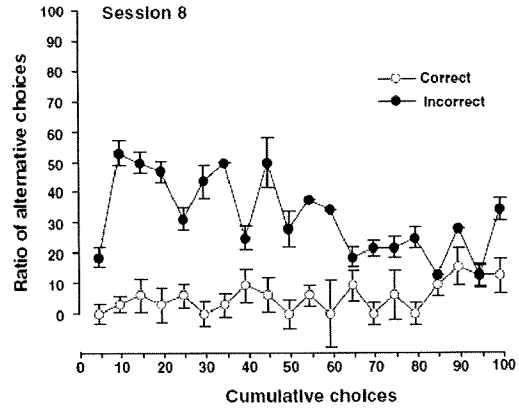
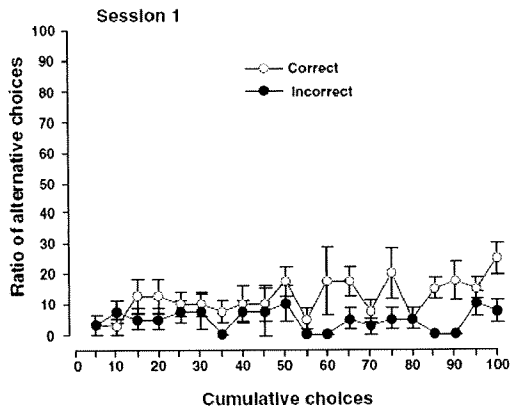


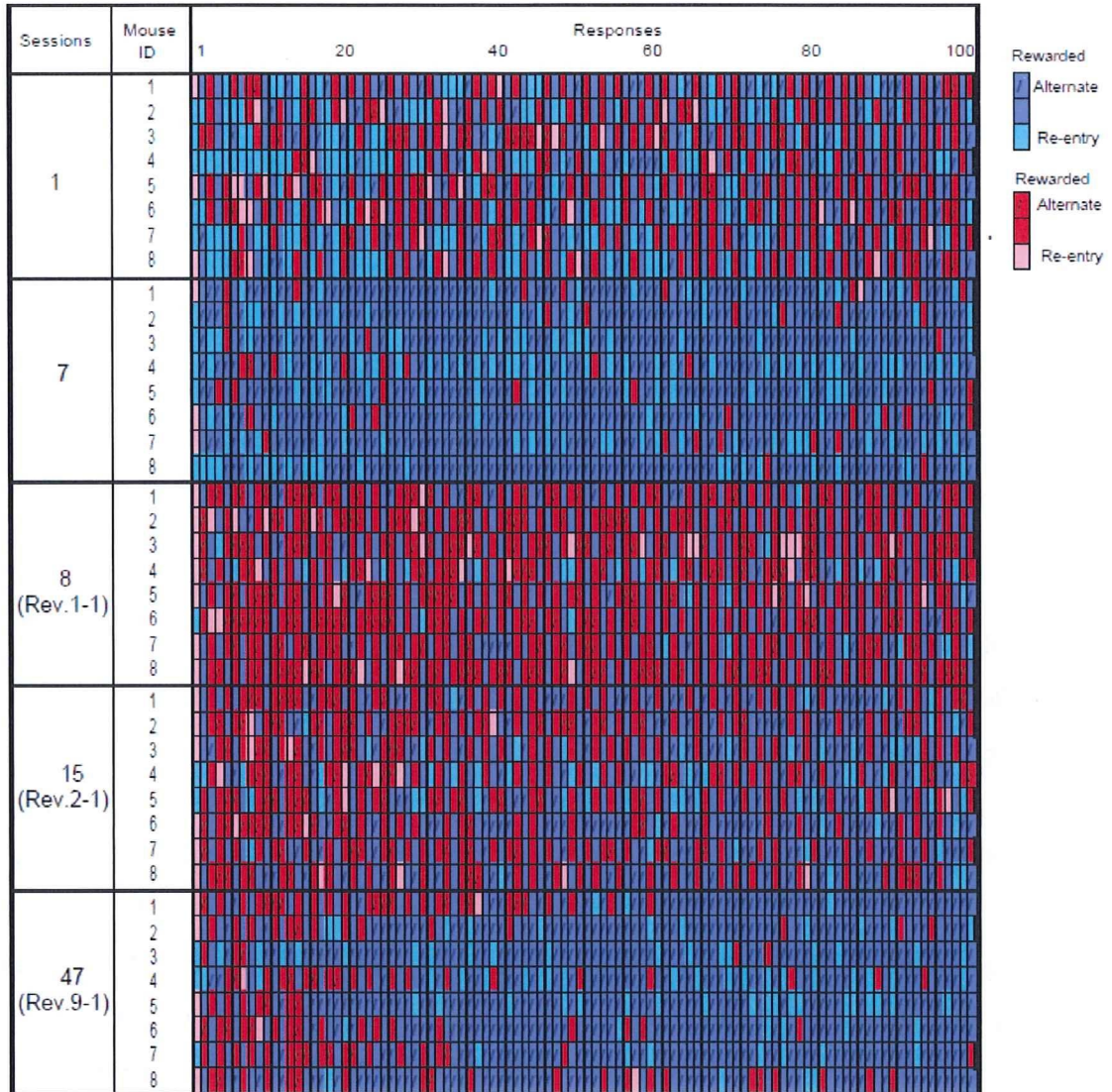
参照图1



参照图 2



参照图 3



参照图 4

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

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

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

これまで、環境化学物質曝露により引き起こされる認知・行動毒性を質的・量的に評価する事を目的とし、IntelliCage を用いた新しい行動試験プロトコルを開発した。本研究では、このプロトコルの有用性を検証するため、周産期低用量ダイオキシン曝露マウスを用いて行動試験を行った。結果、特に低用量（ $0.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ ）曝露群のマウスにおいて、顕著に学習機能低下が確認された。また、報酬に対する固執的行動（perseverative behavior）の有意な増加、および社会的競争環境下における有意な低活動性といった、精神神経症状様の情動行動異常も低用量特異的に顕れることを確認した。行動試験を行ったマウスの脳について免疫組織化学的解析を行ったところ、やはり低用量曝露群において特異的に、前頭前野球と扁桃体における神経活動マーカー（神経活動依存的に発現増強する Arc、c-Fos）の陽性細胞数の変化を見出した。これより、開発した IntelliCage 行動試験プロトコルを用いることで、初めて周産期ダイオキシン曝露の低用量特異性（学習行動の異常、および詳細な精神神経症状）を明らかにし、またその責任脳領域（前頭前皮質・扁桃体）候補を見出すことに成功した。

研究協力者

遠藤 俊裕（東京大学）、宮崎航（東京大学）、上村夕香里（東京大学）、Hans-Peter Lipp（Zurich 大学）、尾藤晴彦（東京大学）

A 研究目的

ダイオキシンをはじめとした周産期における環境化学物質への曝露が、ヒトや動物の高次脳機能の発達障害

や精神疾患の発症に関わっていることが、疫学研究や動物実験により示されている。

われわれは昨年度より、マウスにおける高次脳機能をより高効率・高精度に評価できる試験系として、IntelliCage を用いた新しい行動試験プロトコルの開発を進めている。その試験プロトコルは本年度報告書「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」を参照されたい。さらに我々は、ダイオキシン、ビスフェノールA等の化学物質曝露動物、遺伝子改変動物等を用い、試験法の検証を進めている。本研究では、昨年度一部報告した、周産期ダイオキシン曝露動物を用いた解析について、さらに解析をすすめ、多くの新たな発見をしたので報告する。

ダイオキシンは、主にゴミの燃焼過程において発生する難分解性の化合物のグループで、環境中に残留し、一部は食物連鎖を通じてヒトの体内に蓄積される。体内に取り込まれたダイオキシンは代謝が遅く、主に脂肪組織に蓄積する。周産期には、母体から子供へと経胎盤・経母乳で移行するため、外的因子に感受性の高い胎児・乳幼児への健康影響が懸念されている。

このダイオキシン毒性のひとつとして、次世代の「脳」への影響が懸念されている。実際にこれまで、ダイオキシンが母体（成体）には何ら健康影響がない程度の低用量の曝露であっても、子どもの高次の脳機能に影響を及ぼすという報告が山積している（Kakeyama and Tohyama, 2003; Darras, 2008）。しかしながら、その影響の詳細（用量-反応関係等）や、メカニズムは依然不明なままである。

これまでの動物を用いた先行研究では、単純な記憶・学習機能への影響のみに焦点をあてたものがほとんど

であり、行動異常を示す例も多く報告されてきた。しかし、その標的となる脳機能や影響の程度について、一貫した結論が得られていない。その原因は第一に、げっ歯類を用いた既存の行動試験系における再現性の低さや、実験効率性の低さに起因していると考えられる。また、ヒトの実社会で特に問題となるような「高次」の認知機能、そして情動機能への影響も含めた広範な脳機能への影響を明らかにする包括的な行動試験系が存在せず、より問題とされるべき影響の多くが見逃されてきた可能性がある。

こうした問題を受け、われわれは、世界中のどの研究者が行っても再現性が高く、より高次の認知機能評価を実現し得る行動試験系の確立を目標に、IntelliCage システム（集団飼育環境下のマウスの行動解析をRFID技術とコンピュータ制御により全自動的で行う装置）を用いたマウス高次認知・行動試験プロトコルを完成させた。

これまでの研究成果から、この行動試験プロトコルが、マウスの空間学習能力、および高次認知機能の象徴としてヒトやサルを中心に研究されてきた「認知的柔軟性」(cognitive flexibility)の評価、さらには、これまでマウスでは確認されていなかった"reversal learning-set"と呼ばれるルール学習のプロセスに至るまでを高効率・高精度に評価し得る画期的な試験課題であることが示されている。

本研究は、この IntelliCage システムをベースにわれわれが開発した行動試験プロトコールが、神経毒性学研究において有用であるかを、実際に周産期ダイオキシン曝露マウスを用いた行動解析を行うことで検証した。

## B 研究方法

### (1) 使用した化学物質・試薬類

純度 99 % 以上の 2, 3, 7, 8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (以下、TCDD) をケンブリッジアイソトープ研究所 (MA, USA) から購入した。行動試験後の免疫組織化学染色の為、Tyramide signal amplification を Perkin Elmer から購入した。c-Fos の抗体と neurotrace は、それぞれ Santa Cruz Biotechnology (CA, USA) と Invitrogen Japan (Tokyo) から購入した。他の試薬は Nakalai Tesque から購入した。

### (2) 動物と曝露方法

CLEA Japan (東京、日本) から購入した妊娠 12.5 日目の C57BL/6 系雌マウスに、体重 1kg あたり 0、0.6、3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量の TCDD (コーン油に溶解したものを) を単回経口投与した。生まれてきた仔マウスは生後 21 日目に離乳した。その後 20 週齢を過ぎた時点で各腹 1 匹ずつの雄マウスを集めて実験群を作成した (以下、コーン油のみを投与した母マウスから生まれたものを対照群、0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  濃度で曝露したものを TC-0.6 群、同様に 3.0

$\mu\text{g}/\text{kg}$  濃度で曝露したものを TC-3.0 群とする)。マウスはジエチルエーテルで麻酔し、RFID による無線自動識別のため、ID コードのついたグラスで覆われたトランスポンダーを皮下移植した。マウスは、22-24°C、湿度 40-60%、明暗 12 時間サイクルの動物実験室で飼育された。行動テストは、東京大学の動物実験室で行った。動物実験とハンドリングは東京大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

### (3) 実験装置

本試験に用いた IntelliCage システム (図 1A) は、ホームケージ内のマウスの行動を RFID 無線技術と各種センサーにより 24 時間記録するとともに、専用のソフトウェアで実験者によりプログラムされた学習試験課題をコンピュータ制御により全自動で行うことの出来る行動解析システムである。大型のプラスチックケージ (55 x 37.5 x 20.5 cm) を使用し、1 つのケージで最大 16 匹のマウスを同時にモニターすることができる。ケージの四隅には、小型のオペラント学習チャンバー (以下「コーナー」と表記) が設置されている (図 1C)。マウスは、1 匹ずつコーナーに入る (以下「アクセス」と表記) ことができるようになっており、コーナー内部には、ノーズポークセンサーが取り付けられている。マウスはコーナー内でノーズポークセンサーに鼻を近づける (以下「ノーズポーク」と表記) ことで、それが“正

解”の反応ならば、給水ボトルへのゲート（以下「ゲート」と表記）が開き、報酬として水を飲むことが出来る（図 1D）。尚、この IntelliCage システムは集団飼育環境下における個々のマウスについて、全てのコーナーにおける visit、ノーズポーク、飲水といった行動イベントについて、その時間と場所の情報を全て記録している。

#### (4) 行動実験手続き

IntelliCage は 2 台用い、それぞれのケージで対照群、TC-0.6 群、TC-3.0 群がバランスよく各 4 匹ずつ、計 12 匹の集団飼育環境下で行動解析を行った（2 ケージ合計で  $n=8$ /群となる）。初めの 3 日間は全てのコーナーのゲートを開放し、マウスは 24 時間、自由にコーナーにアクセスし水を飲むことが出来るようにした（馴化フェーズ 1）。

続く 6 日間では、全てのコーナーの飲水ゲートを閉じ、ゲートを開けて水を飲むためのノーズポーク行動を学習させた。マウスは、コーナーにアクセスし、ノーズポークをすることで 4 秒間（=ゲートの開放時間）水を飲むことが出来る。初めの 1 日は 24 時間ノーズポークをして水を飲むことが出来るが、残りの 5 日間は毎日 22:00～翌 1:00 の 3 時間しか水を飲むことが出来ない。これにより、マウスが一日の間で限られた時間に集中してコーナーにアクセスするよう、シェイピングした。尚、この 3 時間の間にはケ-

ジの外側に取り付けられた LED を点灯させ、またコーナーアクセス時にノーズポークセンサー上部に取り付けられている LED を点灯させることで、ノーズポークによるゲート開閉が可能な時間帯（22:00～1:00）とそれ以外の時間を区別させる手掛かりを与えた（馴化フェーズ 2）。

馴化フェーズ終了後、4 つのコーナーの位置を利用した空間学習課題（"reward-driven corridor shuttling task", 以下 RCST）を開始した（図 1B）。この課題では、馴化フェーズ 2 と同様、マウスは 22:00～1:00 の 3 時間だけノーズポークによりゲートを開け、報酬として 4 秒間だけ水を飲むことが出来る。但し、4 つのコーナーのうち、ノーズポークをすることで報酬を得られる 2 つのコーナー（正解コーナー）と、ノーズポークをしても（ゲートが開かずに）報酬の得られない 2 つのコーナー（不正解コーナー）があり、マウスは効率的に報酬を得るためにそれぞれの空間的配置を学習しなければならない。さらに、マウスは同じ正解コーナーで続けて水を飲み続けることは出来ない。2 つの正解コーナーはそれぞれ、常に一方が"active"で、もう一方が"inactive"な状態にある。マウスは"active"な正解コーナーにおいてのみ、ノーズポークしてゲートを開け、4 秒間だけ水を飲むことが出来る。一旦ゲートが閉じると、そのコーナーは"inactive"な状態になり、もう一方の正解コーナーが"active"になる。すなわち、



マウスは同じ正解コーナーで2度以上続けて水を飲む事が出来ない。このルールによって、マウスは離れた位置にある2つの正解コーナーを往復 (shuttling) しなければならない。これは、マウスが報酬を得るために1つのコーナー付近にとどまってさえいればよい、という戦略をたてるのを防ぐと同時に、ケージ内を頻繁に移動させることで空間学習を促進させるねらいがある。

この空間学習課題を7セッション (日) 続けた後、8セッション (日) 目に逆転課題を行った。すなわち、これまで正解であった2つのコーナーと、不正解であった2つのコーナーの位置を逆転させた。これにより、マウスはそれまでの行動系列 (2つの正解コーナーへのアクセス) を破棄し、逆転後の空間パターンに沿った新しい行動系列 (それまで不正解だった2つのコーナーへのアクセス) を習得しなければならない。以後、同様の RCST による空間学習とその逆転課題を繰り返し行った (反復的逆転課題)。初めは7日間ごと、その後4日間ごとに逆転課題を行い、合計 57 セッション (日) で11度の逆転課題を課した。

### (5)免疫組織化学的解析

行動試験を行っている最中のマウスの脳について免疫組織化学的解析を行うため、行動試験の最後の 57 セッション目において、試験開始1時間後から順に全てのマウスの脳をサン

プリングした。取り出した脳は直ちに粉末状のドライアイスに包埋した (未固定新鮮凍結法)。以後、脳サンプルは全て $-80^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーにて凍結保存され、順次、クライオスタットを用いて  $12\mu\text{m}$  の厚さで薄切した。次に、薄切した脳切片の脳領域ごとの神経活動のレベルを調べるため、活動依存的に発現増強する神経活動マーカー-c-Fos、Arc タンパクに対する抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。また、神経細胞数の定量のために、NeuroTrace (蛍光ニッスル染色用一次抗体) を用いた。以下の工程は、特に記述がない限り室温で行った。脳切片を貼付したスライドガラスを PBST (0.05% Triton X100) で5分間 wash し、続いて4%パラホルムアルデヒド (溶媒は PBS, pH7.4) で10分間固定した。PBST で wash した後、0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$  (溶媒は100%メタノール) 中で30分間インキュベートした (内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害)。続いて、ブロッキング溶液で室温30分、 $4^{\circ}\text{C}$ で30分インキュベートした後、一次抗体液 (c-Fos 抗体は1:1000、Arc 抗体は1:10000でPBSTに希釈) を切片にのせ、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩インキュベートした。その後、TSA Biotin System (Perkin Elmer) を用いたシグナル増幅工程を付属のプロトコールに沿って行った (二次抗体は1:200でPBSTに希釈)。最後にDABによりシグナルの可視化を行い、封入した。

免疫標識された細胞数は、ステレオ

ロジー解析 (Stereo Investigator software (Microbrightfield Williston, VT)による半自動 optical fractionator method) によって定量した。なお、細胞数の定量は、特に認知・学習、情動に関連の深い14領域: 縁前方皮質 (PrL)、腹側眼窩皮質と外側眼窩皮質 (VO/LO)、内側眼窩皮質(MO)、前帯状皮質(ACC; Cg1Cg2)、背外側線条体 (DLS)、側坐核(AcbC)、一次運動野 (M1)、一次体性感覚野(S1)、後部帯状回皮質(RSGc)、嗅周囲皮質(Ect)、海馬 CA1 領域(CA1)、海馬 CA3 領域 (CA3)、扁桃体基底外側核(BLA)、扁桃体中心核(CeA)に対して行った。各領域の境界は Stereo Investigator software を用いて低倍率で観察した各切片を Mouse Brain Atlas (Franklin and Paxinos, 3rd Ed., 2008)を参考に決定した。細胞は40倍対物レンズの観察下でカウントした。続いて、領域ごとの3次元細胞密度が Stereo Investigator software により各切片情報から推定された。各領域の c-fos、Arc、NeuroTrace 免疫陽性細胞の平均数はマウス5匹のそれぞれの脳から少なくとも各3連続切片を用い、計算した。

#### (6)統計解析

行動試験および免疫組織化学染色のデータは、R (<http://cran.r-project.org/>)ソフトウェア、もしくは Excel2003 (Microsoft) を用いて一要因ないし二要因の分散分析と Tukey の多重比較検

定により行った。

## C 研究結果

### (1) 馴化フェーズにおける探索行動・自発行動

対照群と両 TCDD 曝露群において、馴化フェーズにおける探索行動および自発行動量のパラメータを解析した(表1)。馴化フェーズ初日において、対照群は両 TCDD 曝露群よりも最初にコーナーを訪れるまでの時間が短く、また IntelliCage への導入後、始めの 2,4,6,8 時間のそれぞれの合計コーナーアクセス回数が高かったため、より探索行動のレベルが高い傾向が見られたが、群間に有意な差は見られなかった。その他、馴化フェーズ2日目からの一日の平均コーナーアクセス回数、暗期・明期の行動量のバランス (サーカディアンリズム) 等においても、いずれの群の間には差は見られなかった。尚、サーカディアンリズムの指標(Circadian index)は、各群の「明期のコーナーアクセス回数の平均-暗期のコーナーアクセス回数の平均 / 24 時間でのコーナーアクセス回数の平均」を計算し、コントロール群を100としてそれに対する曝露群の相対値を表している。また、特定のコーナーへの強い執着傾向も見られなかった。

### (2)TCDD 曝露マウスにおける部分的学習低下(partial learning deficit)

TC-0.6 マウスは、セッション全体を通して繰り返し、対照群よりも有意に

高い誤答率 (=学習機能の低下) を示した (セッションごとの一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による。  $p < 0.05$ ) (図 2A)。また、セッション 15 (2 度目の逆転課題初日) においては、TC-0.6 および TC-3.0 の両曝露群で、対照群と比較して有意に誤答率が高かった。これは、TCDD 曝露によりルール変更に伴う行動の柔軟性の障害を示している (一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による。  $p < 0.05$ )。

このセッション 15 の成績について、セッション内での誤答率の変遷を詳細に解析したところ (図 2B)、全ての群がセッションのはじまりの時点でチャンスレベル (点線) よりも高い誤答率を示していたが、対照群のみがより早く逆転課題後の新しいルールへと適応し、セッション後半において誤答率が減少し、結果としてセッション全体として有意な誤答率の差が顕れる事がわかった (二要因の繰り返しのある分散分析による。  $F(2,99) = 307.22$ )。

### (3) 社会的競争環境下における低活動性 (Social anxiety)

セッション中の活動量の指標として 3 時間 (22:00-1:00) の総コーナーアクセス回数を群間で比較したところ、TC-0.6 群のみが対照群に比較して有意に低活動性を示していることがわかった ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による) (図 3A,B)。一方で、総飲水回数に変化が見られなかった (図 3C,D) ことから、

この低活動性は報酬として飲水を得る動機の低下には起因しない、という事が示された。この低活動性の原因をより詳細に調べるため、セッション内の 5 分ごとのコーナーアクセス数の変動を調べた (図 3E)。結果、対照群と TC-3.0 群がセッション開始とともに、報酬を得るために集中的なコーナーアクセスを示す一方で、TC-0.6 は特に始めの 5 分間において極端にコーナーアクセス回数が極端に低い事がわかった。なお、このセッション開始後 5 分間の活動量を抜き出し 57 セッション分をプロットしたところ、この傾向が全セッションを通じて一貫していることがわかった (図 3F)。

また、この TC-0.6 群の低い活動性は、対照群と TC-3.0 群の集中的なコーナーアクセスが収まるにつれ、増加した。TC-0.6 群は飲水への動機が低下していない一方で、セッション開始時はそれまで飲水を制限されていた 12 匹のマウスがいっせいに 4 つのコーナーにアクセスを開始することから、このはじめの 5 分間において特に顕著な低活動性は、競争環境下における非積極性 (=社会的不安) を反映していると考えられた。

この TC-0.6 群における低活動性が確かに社会的要因に起因しているかどうか、別のコホート (対照群  $n=7$ 、TC-0.6 群  $n=7$  の計 14 匹) で追加実験を行って検証した。結果、TC-0.6 群におけるセッション開始時の極端な低活動が再現され、後にそれぞれの群を

わけて同じ実験を行ったところ、対照群と TC-0.6 群のセッション開始時のコーナーアクセス回数に差が無くなり、再度同じケージに戻すと、以前と同様にセッション開始時の極端な低活動性が顕れた(図 3G)。これにより、TC-0.6 群は社会的競争環境下における非積極性(=社会的不安)を示す、ということが強く示唆された。

#### (4)報酬に対する固執的行動

本行動試験プロトコールでは、マウスは"active"な正解コーナーを訪れたとき、1度ノーズポークをすると4秒間ゲートが開き、水を飲むことが出来る。ゲートが閉まると、同時にそのコーナーは"inactive"な状態となり、それ以上ノーズポークをしてもゲートを開くことが出来ない。すなわち、このことは、マウスは"active"な正解コーナーにアクセスした際、2回以上のノーズポークは報酬を得られない無意味な行動となる。しかしながら、"active"な正解コーナーにアクセスした時の平均ノーズポーク回数を個体ごとに解析したところ、TC-0.6 群では異常に高いノーズポーク回数を示すマウスがいることが全てのセッションにおいて認められた(図 4A)。

全セッションの総平均を群間で比較すると、TC-0.6 はこの値において対照群に対して有意に増加していた(図 4B) ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による)。一方、同様に不正解のコーナーアクセス時

のノーズポーク回数を解析したところ、TC-0.6 群における顕著なノーズポーク回数の増加は見られなかった(図 4C)。これは、TC-0.6 群は常にノーズポーク回数が多いわけではなく、報酬を得たコーナーアクセス時に限って増加していることから、報酬への固執的行動としてノーズポークを繰り返していると考えられる。

#### (5)行動試験遂行中の神経活動レベルの変化

行動試験遂行中のマウスの脳において、これまで観察してきた行動異常と関連のある脳領域があるかを検証するため、組織学的解析を行った。行動試験の最終日(セッション 57)において、セッション開始1時間経過後からマウスを順に取り出し、脳をサンプリングした。神経活動マーカーとして、神経活動に依存して細胞内で発現増強する Arc (/Arg3.1)、および c-Fos タンパクに対する抗体を用い、免疫組織化学染色を行った。

まず、Arc に関しては、特に認知・学習、情動に関連の深いとされる領域、およびその隣接領域(全 14 領域)、すなわち縁前方皮質(PrL)、腹側眼窩皮質と外側眼窩皮質(VO/LO)、内側眼窩皮質(MO)、前帯状皮質(ACC; Cg1Cg2)、背外側線条体(DLS)、側坐核(AcbC)、一次運動野(M1)、一次体性感覚野(S1)、後部帯状回皮質(RSGc)、嗅周囲皮質(Ect)、海馬 CA1 領域(CA1)、海馬 CA3 領域(CA3)、扁桃体基底外側

核(BLA)、扁桃体中心核(CeA)における陽性細胞数を定量した。

結果、TC-0.6 群において、対照群と比較して有意に ACC における Arc 陽性細胞数の減少、そして一方で扁桃体 BLA および CeA における増加を確認した (図 5A 写真、および 5B) ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による)。

続いて、Arc の解析から変化が見られた ACC を含む前頭前皮質、そして扁桃体について、その神経活動レベルの変化がもう 1 つの神経活動マーカーである c-Fos 陽性細胞数においても同様の傾向として見られるかを検証した。結果、やはり TC-0.6 群において、対照群と比較して ACC とその隣接領域である PrL において c-Fos 陽性細胞数が減少しており、一方で扁桃体 CeA における増加が確認された (図 5C) ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較検定による)。この結果は、行動異常が顕著に見られた TC-0.6 群の行動試験遂行中の脳において、やはり低用量特異的に、認知機能制御の中枢である前頭前皮質内側部における神経活動の低下、そして情動機能の中枢である扁桃体における神経活動の亢進が見られ、これらは責任脳領域候補として考えられた。

#### D 考察

本研究では、IntelliCage システムをベースに我々が新規に開発した行動試験プロトコルの有用性を検証す

るため、周産期 TCDD 曝露マウスを用いて行動解析を行った。注目すべきは、周産期 TCDD 曝露が、低用量特異的に、顕著な学習機能低下、そして社会的競争環境下における非積極性 (低活動性) や報酬に対する固執的行動といったヒト精神神経症状様の情動行動異常を示した点である。これらの行動異常は、行動試験遂行中のマウス脳における神経活動マーカーの免疫組織化学的解析によって、前頭前皮質および扁桃体の神経活動異常に起因することが示唆された。

本研究で用いたプロトコールは、マウスの認知・学習行動を、非常に小さいバラツキで評価する事が出来る。それゆえに、TC-0.6 群における学習機能の低下が、誤答率わずか数パーセントほどの差であっても検出する事が可能であったと言えるだろう。そのようなわずかな差は、長期的に観察することによって、一貫して繰り返し顕れた。これは、既存の試験課題では困難であった、同一試験課題内における再現性の確認を実現していることを示している。

また、セッション 15 において見られた認知的柔軟性の低下は、セッション内の時間経過に伴う誤答率の変化を解析することで、対照群が新しいルールに対してより迅速に行動を適応させており、TCDD 曝露群ではそれが出来ていない、という結論を得るに明かな証拠を見出すことが出来ている。これも、何より個体間の学習パフォー

マウスのバラツキが小さく、学習のプロセスを細かい時間感覚でより高い精度で評価出来ることに起因している。

IntelliCage システムは、標準化されたハードウェアにおいて、コンピュータ制御下で行動試験を行うことが出来るため、実験環境や実験者の違いによる人工的なアーチファクトを最小化出来、さらにマウスにとって従来の方法よりも低ストレス状態での試験が可能となった。このことは、本研究結果で得られたデータの精度・再現性の高さに大きく寄与しているだろう。この IntelliCage システムと、マウスの認知・学習行動、ならびに情動行動の特性を高精度・高効率に評価し得るわれわれの行動試験プロトコルを組み合わせた行動試験系は、これからの神経毒性学研究において大きな役割を果たしていくと期待される。

なお、今回行動異常の責任領域候補として挙げられた前頭前皮質および扁桃核は、それぞれ皮質辺縁系と呼ばれる回路を構成する脳領域であり、認知機能と情動機能の正常な制御に関わっている (Akirav et al., 2007; Holland et al., 2004; LeDoux, 2007)。この回路の機能的異常は、ヒトの社会性不安障害 (social anxiety disorder) や、強迫性障害 (obsessive compulsive disorder)、心的外傷後ストレス障害 (post-traumatic stress disorder) といった精神疾患患者の脳において共通して見られる。

以上から、周産期 TCDD 曝露によっ

て引き起こされる行動異常が、これらの脳領域の神経活動レベルの異常と関連していた、という本研究の結果はヒトの臨床学的観点から見ても非常に興味深い知見である。

## E 参考文献

Akirav I, Maroun M (2007). The role of the medial prefrontal cortex-amygdala circuit in stress effects on the extinction of fear. *Neural Plast* 2007: 30873.

Birnbaum L, Tuomisto J (2000). Non-carcinogenic effects of TCDD in animals. *Food Addit Contam* 17(4): 275-288.

Carli M, Baviera M, Invernizzi R, Balducci C (2006). Dissociable contribution of 5-HT1A and 5-HT2A receptors in the medial prefrontal cortex to different aspects of executive control such as impulsivity and compulsive perseveration in rats. *Neuropsychopharmacology* 31(4): 757-767.

Chudasama Y, Passetti F, Rhodes S, Lopian D, Desai A, Robbins T (2003). Dissociable aspects of performance on the 5-choice serial reaction time task following lesions of the dorsal anterior cingulate, infralimbic and orbitofrontal cortex in the rat: differential effects on selectivity, impulsivity and compulsivity. *Behav Brain Res* 146(1-2): 105-119.

Chudasama Y, Robbins T (2006). Functions of frontostriatal systems in cognition: comparative neuropsychopharmacological studies in rats, monkeys and humans. *Biol Psychol* 73(1): 19-38.

Churchwell J, Morris A, Heurtelou N, Kesner R (2009). Interactions between the prefrontal cortex and amygdala during delay discounting and reversal. *Behav Neurosci* 123(6): 1185-1196.

Crabbe J, Wahlsten D, Dudek B (1999). Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* 284(5420): 1670-1672.

Gerlai R (2002). Phenomics: fiction or the future? *Trends Neurosci* 25(10): 506-509.

Gonzalez F, Fernandez-Salguero P (1998). The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice. *Drug Metab Dispos* 26(12): 1194-1198.

Hojo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C (2008). Learning behavior in rat offspring after *in utero* and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environ Health Prev Med* 13(3): 169-180.

Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski V, Cox C, Kost J, et al (2002). Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environ Health Perspect* 110(3): 247-254.

Holland P, Gallagher M (2004). Amygdala-frontal interactions and reward expectancy. *Curr Opin Neurobiol* 14(2): 148-155.

Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Kakeyama M, Sone H, et al (2005). *In utero* and lactational exposure to

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicol Appl Pharmacol* 205(1): 98-105.

Kinoshita S, Yokoyama C, Masaki D, Yamashita T, Tsuchida H, Nakatomi Y, et al (2008). Effects of rat medial prefrontal cortex lesions on olfactory serial reversal and delayed alternation tasks. *Neurosci Res* 60(2): 213-218.

Kipp K (2005). A developmental perspective on the measurement of cognitive deficits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry* 57(11): 1256-1260.

Kolb B, Robbins T (2003). The rodent prefrontal cortex. *Behav Brain Res* 146(1-2): 1-2.

LeDoux J (2007). The amygdala. *Curr Biol* 17(20): R868-874.

Levine M, Levinson B, Harlow H (1959). Trials per problem as a variable in the acquisition of discrimination learning set. *J Comp Physiol Psychol* 52: 396-398.

Lu J, Zhang Y, Chou T, Gaus S, Elmquist J, Shiromani P, et al (2001). Contrasting effects of ibotenate lesions of the paraventricular nucleus and subparaventricular zone on sleep-wake cycle and temperature regulation. *J Neurosci* 21(13): 4864-4874.

Markowski V, Zareba G, Stern S, Cox C, Weiss B (2001). Altered operant responding for motor reinforcement and the determination of benchmark doses

- following perinatal exposure to low-level 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ Health Perspect* 109(6): 621-627.
- Matsuo K, Nicoletti M, Peluso M, Hatch J, Nemoto K, Watanabe Y, et al (2009). Anterior cingulate volumes associated with trait impulsivity in individuals with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 11(6): 628-636.
- McInnes L, Freimer N (1995). Mapping genes for psychiatric disorders and behavioral traits. *Curr Opin Genet Dev* 5(3): 376-381.
- Mimura J, Fujii-Kuriyama Y (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 1619(3): 263-268.
- Mukerjee D (1998). Health impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins: a critical review. *J Air Waste Manag Assoc* 48(2): 157-165.
- Nishijo M, Kuriwaki J, Hori E, Tawara K, Nakagawa H, Nishijo H (2007). Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicol Lett* 173(1): 41-47.
- Papazian O, Alfonso I, Luzondo R (2006). [Executive function disorders]. *Rev Neurol* 42 Suppl 3: S45-50.
- Richter S, Garner J, Würbel H (2009). Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nat Methods* 6(4): 257-261.
- Rodriguez-Jimenez R, Bagney A, Martinez-Gras I, Ponce G, Sanchez-Morla E, Aragües M, et al (2009). Executive function in schizophrenia: Influence of substance use disorder history. *Schizophr Res*.
- Skinner M (2007). Endocrine disruptors and epigenetic transgenerational disease etiology. *Pediatr Res* 61(5 Pt 2): 48R-50R.
- Stalnaker T, Franz T, Singh T, Schoenbaum G (2007). Basolateral amygdala lesions abolish orbitofrontal-dependent reversal impairments. *Neuron* 54(1): 51-58.
- Tecott L, Nestler E (2004). Neurobehavioral assessment in the information age. *Nat Neurosci* 7(5): 462-466.
- Tucci V, Lad H, Parker A, Polley S, Brown S, Nolan P (2006). Gene-environment interactions differentially affect mouse strain behavioral parameters. *Mamm Genome* 17(11): 1113-1120.
- Wahlsten D, Metten P, Phillips T, Boehm Sn, Burkhart-Kasch S, Dorow J, et al (2003). Different data from different labs: lessons from studies of gene-environment interaction. *J Neurobiol* 54(1): 283-311.

## F 図の説明

### 図 1

(A) IntelliCage 試験装置の概略



- (B) 本研究で用いた行動試験プロトコール("reward-driven corridor shuttling task") の模式図
- (C) コーナー内部。ノーズポークセンサーとゲート。
- (D) ノーズポーク行動(上)とゲートが開いて水を飲んでいる状態(下)。

## 図 2

- (A) 学習成績(誤答率=不正解コーナーへのアクセス)の変遷。エラーバーは SEM で示している。アスタリスクは対照群と有意な差を示す ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較による)。
- (B) セッション 15 における、セッション内の累積エラー数の変遷。横軸はセッション内での総コーナーアクセス数、縦軸は累積誤答数(不正解コーナーへのアクセス)。

## 図 3

- (A) セッションごと(22:00-1:00)の総コーナーアクセス数を、個体ごとに示した図。
- (B) (A)に関して全てのセッション分をまとめた総平均の群間比較。エラーバーは SEM。アスタリスクは対照群と有意な差を示す ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較による)。
- (C) セッションごと(22:00-1:00)の飲水時間の平均を、個体ごとに示した図。
- (D) (C) に関して全てのセッション分をまとめた総平均の群間比較。エラーバーは SEM。

- (E) セッション内の 5 分ごとのコーナーアクセス数。エラーバーは SEM。データは代表的なものとしてセッション 27 より。

- (F) セッション開始後 5 分間のコーナーアクセス数を全てのセッション分プロットした。エラーバーは SEM。

- (G) 追加実験より、対照群 7 匹、TC-0.6 群 7 匹を同じケージで試験しているときのセッション開始後 5 分間のコーナーアクセス数(左)。中および右のグラフはそれぞれ、群ごとに別のケージにわけて試験をしたとき、そして再度同じケージに戻して試験をしたときのセッション開始後 5 分間のコーナーアクセス数。エラーバーは SEM。アスタリスクは対照群との有意な差を示す ( $p < 0.05$ 、t 検定による)。

## 図 4

- (A) セッションごと(22:00-1:00)の"active"な正解コーナーアクセス時の平均ノーズポーク回数を、個体ごとに示した図。
- (B) (A)に関して全てのセッション分をまとめた総平均の群間比較。エラーバーは SEM。アスタリスクは図示した群間における有意な差を示す ( $p < 0.05$ 、一要因の分散分析と Tukey の多重比較による)。
- (C) セッションごと(22:00-1:00)の不正解コーナーアクセス時の平均ノーズポーク回数を、個体ごとに示した図。

## 図 5

**(A)** 対照群、TC-0.6 群、TC-3.0 群の ACC および CeA 領域における Arc 陽性シグナル。

**(B)** 対照群、TC-0.6 群、TC-3.0 群の PrL、ACC、BLA、CeA 領域における Arc、および c-Fos 陽性細胞数の定量データ。

Table 1

Index	Control	TC-0.6	TC-3.0
Latency to the first access (sec)	23.5 ± 7.80	61.2 ± 28.90	55.9 ± 19.70
Number of visits during the 1st 2hrs	16.0 ± 5.93	9.9 ± 3.53	6.1 ± 3.00
" 1st 4hrs	43.4 ± 19.54	24.8 ± 7.91	28.3 ± 8.77
" 1st 6hrs	78.6 ± 25.20	39.6 ± 17.87	59.7 ± 17.00
" 1st 8hrs (including the 2hrs of dar	131.6 ± 26.18	88.9 ± 24.69	92.1 ± 18.96
Total number of visits /day	192.6 ± 18.52	193.2 ± 17.09	177.9 ± 20.57
" during the light phase	74.7 ± 11.54	70.4 ± 9.34	64.6 ± 9.93
" during the dark phase	117.8 ± 13.31	122.7 ± 11.31	113.3 ± 15.84
Circadian index (Visit)	100.0 ± 32.96	121.3 ± 24.61	116.7 ± 33.75
Total number of visits /day	691.3 ± 84.69	529.3 ± 34.98	525.9 ± 62.64
" during the light phase	289.5 ± 49.39	222.1 ± 26.40	201.4 ± 29.35
" during the dark phase	477.9 ± 70.01	338.0 ± 32.76	329.8 ± 35.24
Circadian index (Licks)	100.0 ± 22.85	78.9 ± 28.92	96.9 ± 24.12
% access to the most preferred corner	30.8 ± 0.57	29.9 ± 0.81	31.2 ± 0.50
" 2nd preferred corner	25.7 ± 0.20	27.0 ± 0.58	26.1 ± 0.50
" 3rd preferred corner	23.5 ± 0.69	22.9 ± 0.82	23.2 ± 0.80
" 4th preferred corner	20.1 ± 0.92	20.3 ± 0.66	19.5 ± 0.70
% nosepoke to the preferred side	60.0 ± 1.54	55.8 ± 1.61	57.2 ± 1.78

The data are shown as means ± S. E. M.

表1

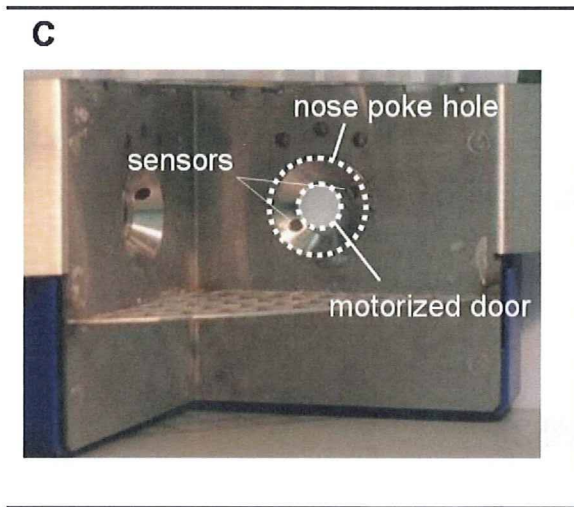
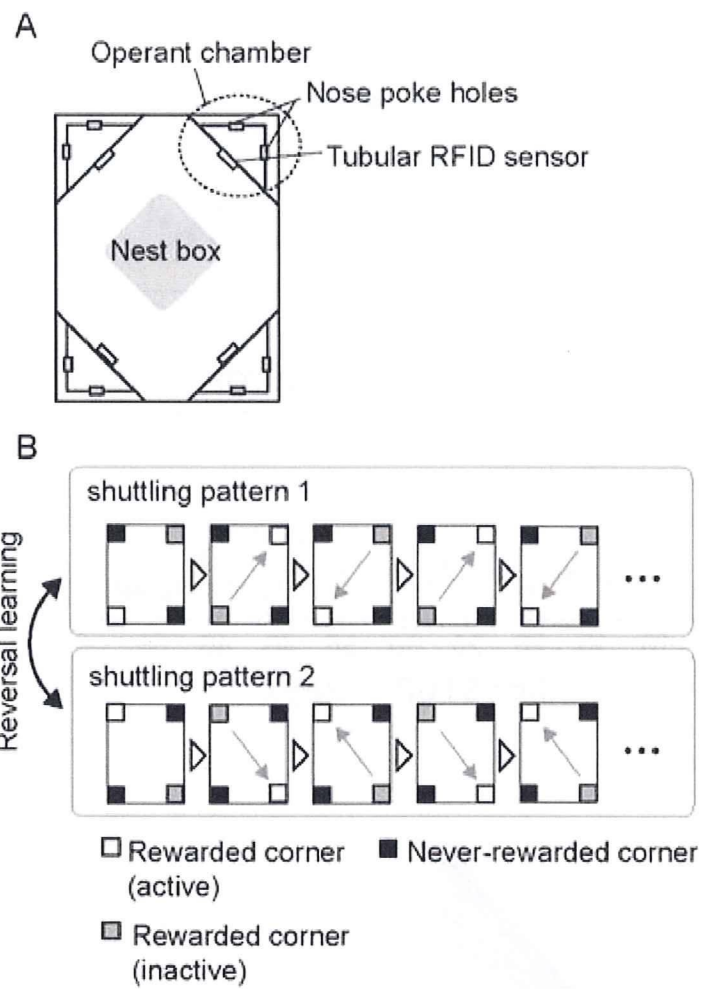


图 1