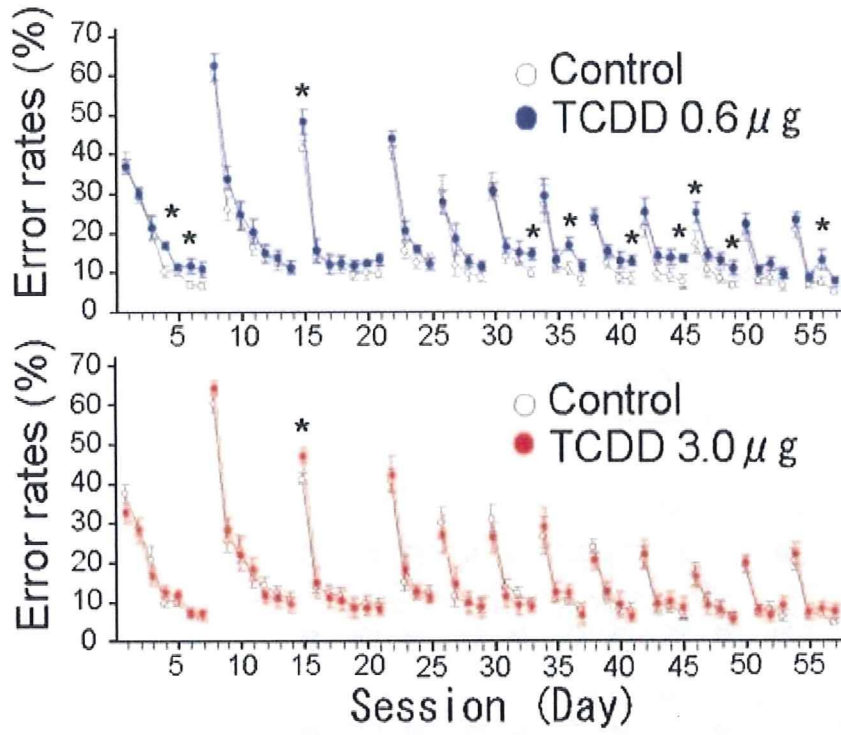


**A**



**B**

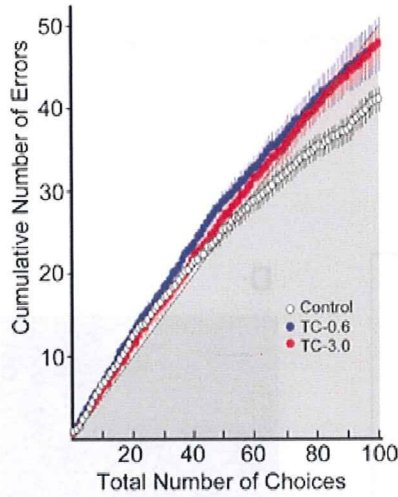
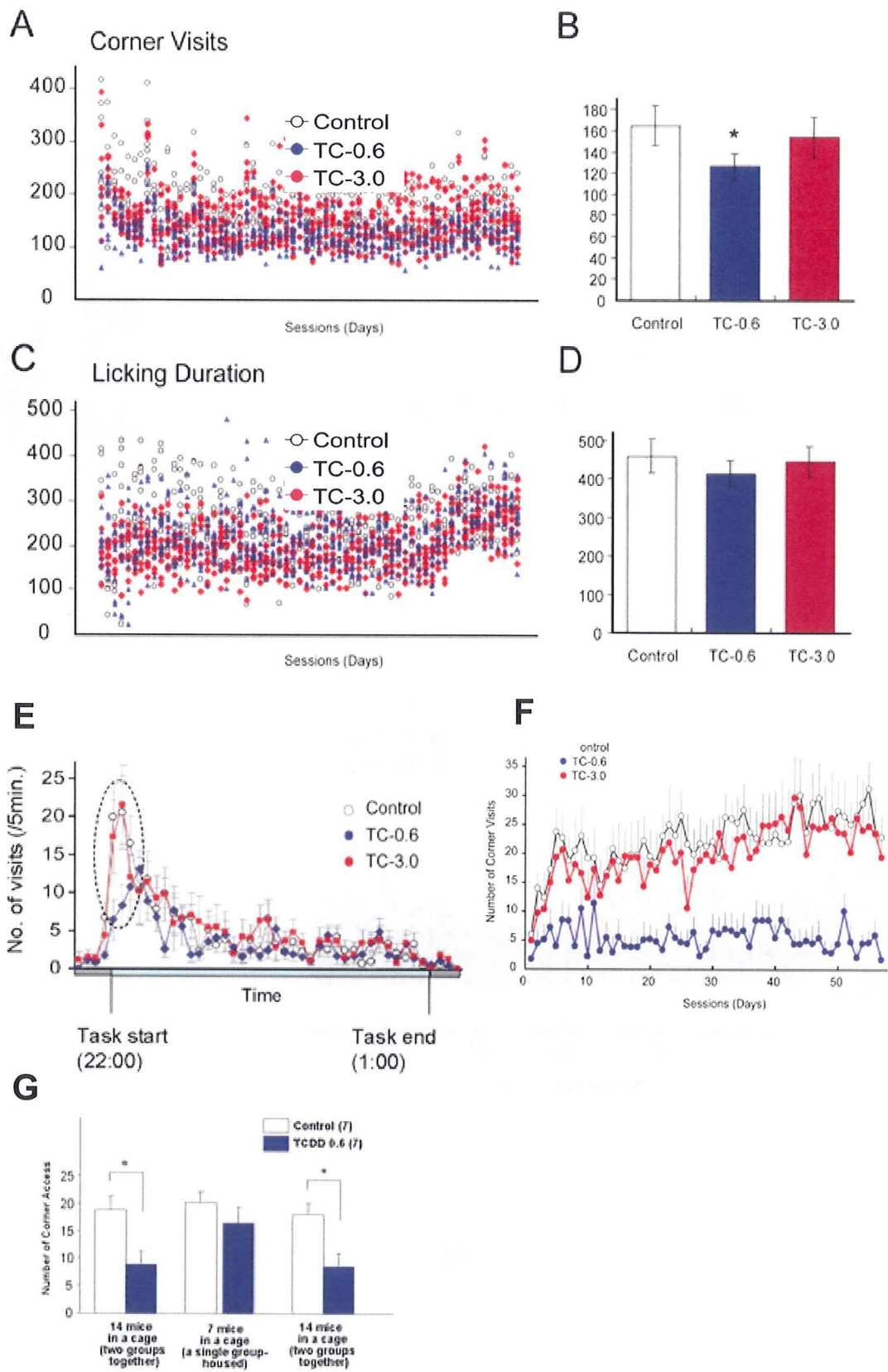
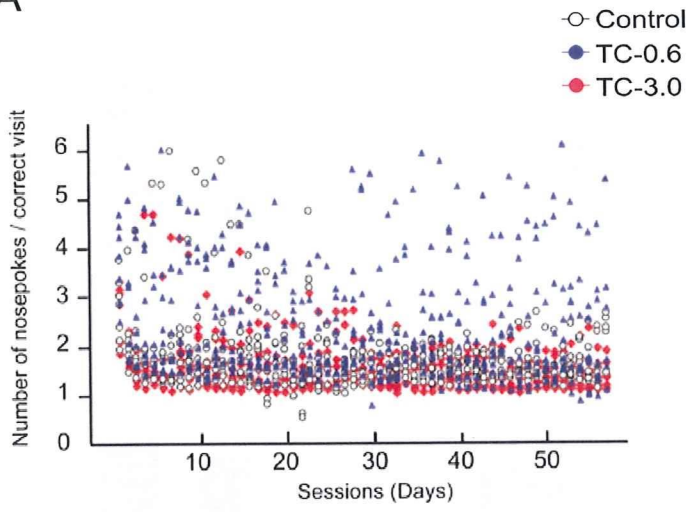


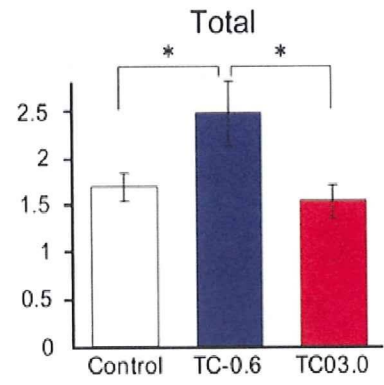
图 2



A



B



C

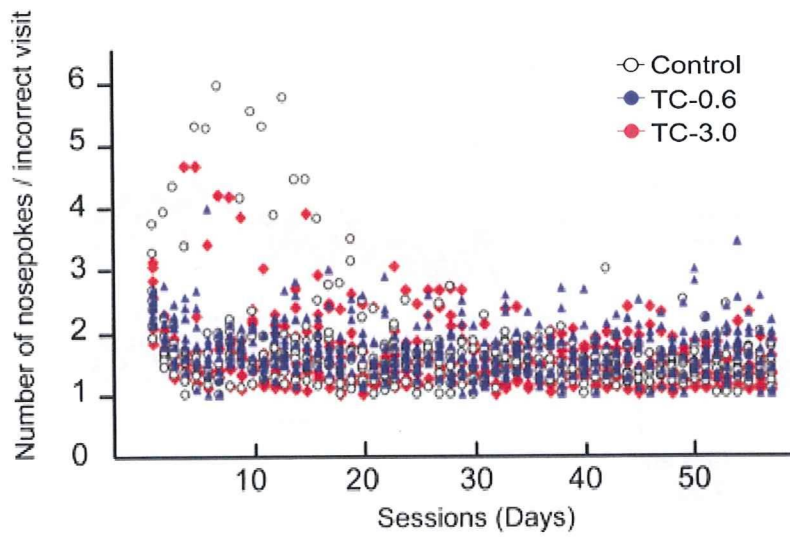


图 4

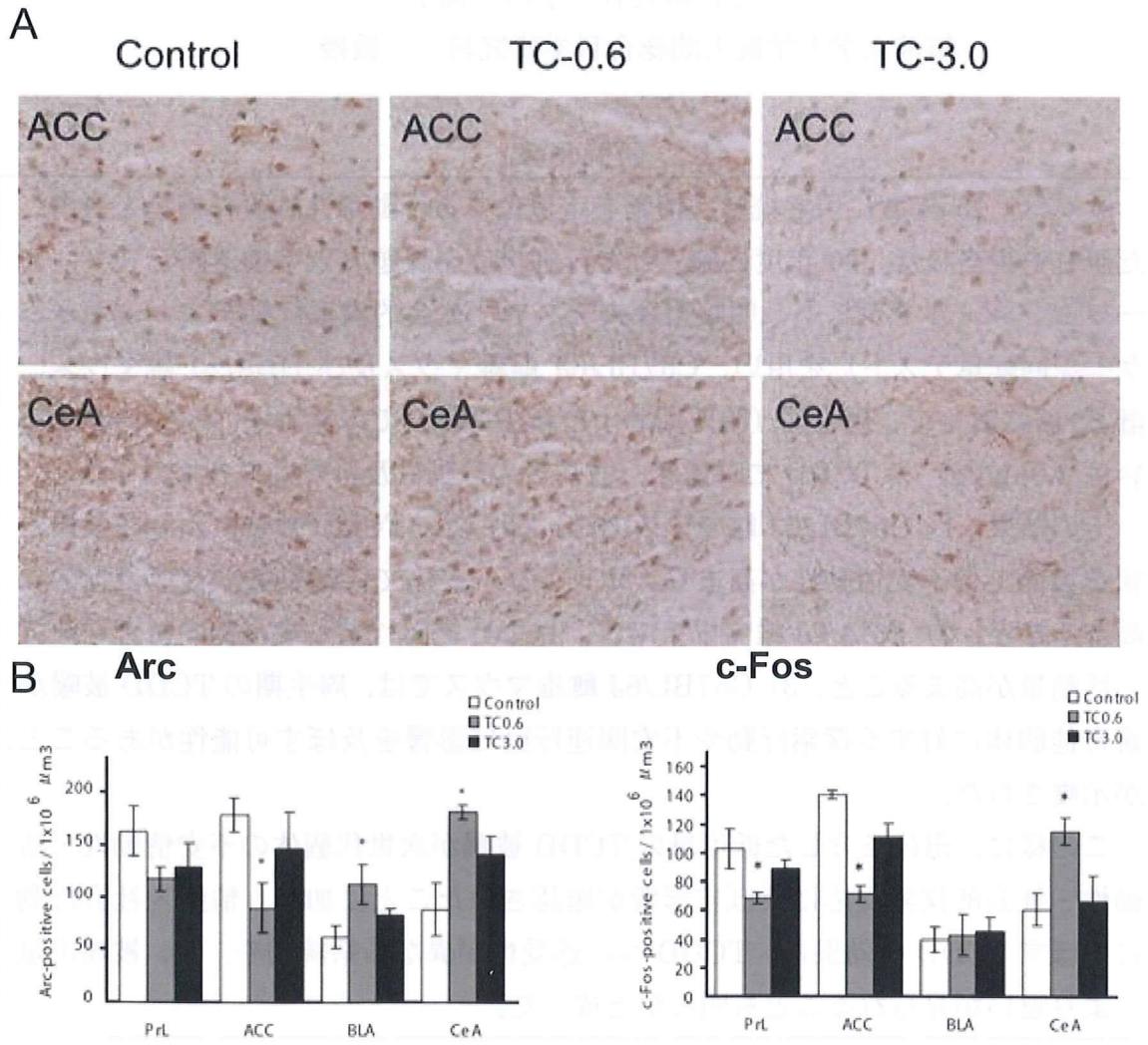


图 5

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情動試験の検証

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、20年度に引き続き、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。20年度に確立した行動テスト課題（Y字型迷路テスト、オープンフィールドテスト、明暗箱往来テスト、社会的探索行動テスト、ホームケージ回転車テスト）を用い、C57BL/6J 雌雄マウス及び DBA/2J 雄マウス、計 68 匹において、周産期（胎児期および新生児期）での低用量（0.6 $\mu$ g/kg あるいは 3.0 $\mu$ g/kg）の TCDD に曝露が、成長後の行動に及ぼす効果を検討した。

その結果、1) C57BL/6J 雌マウスでは、周産期の TCDD 被曝により成長後の新奇場面での不安情動性が高まり、ホームケージ内での活動量が用量依存的に高まること、2) DBA/2J 雄マウスでは、TCDD 被曝により成長後の新奇場面での活動量が高まること、3) C57BL/6J 雌雄マウスでは、周産期の TCDD 被曝が新奇他個体に対する探索行動や不安関連行動に影響を及ぼす可能性があること、が示唆された。

この様に、母体を介した低用量の TCDD 被曝が次世代個体の不安情動性・活動性・社会的探索反応に及ぼす影響が確認されたことに加え、情動・社会行動に及ぼす TCDD の効果は、TCDD への感受性が異なる系統間や、性、被曝用量により違いが見られることも明らかとなった。

研究協力者

坂本敏郎（筑波大学大学院人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻）、肥後明花（筑波大学大学院人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻）、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

情動・社会行動への化学物質の影響の評価法の構築のため、20年度に確立した行動テスト課題を用い、各処置群のテスト動物個体数を増やすと共に、C57BL/6J マウスにおいては、0.6  $\mu$ g/kg と 3.0  $\mu$ g/kg 用量での曝露効果

の違いの検討を行うことを目的とした。また、社会的認知や関心、社会的場面での不安行動の測定のために新たに開発した「社会的認知行動テスト」における測定の信頼性・妥当性を検証し、より汎用性の高い化学物質影響評価法の確立を目指した。

## B 研究方法

### 1. 実験動物、曝露方法及び飼育条件

DBA/2J および C57BL/6J の雌マウスを各々同系統の雄と交配し、妊娠 12.5 日目(妊娠確認日を妊娠 0 日)に、Corn oil または 0.6 µg/kg、3.0 µg/kg の 2,3,7,8- tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (ケンブリッジアイソトープ研究所 (MA, USA) から購入、以下、TCDD) を単回経口投与した。生後 21 日目の離乳時に、各母親から雌雄 1-2 匹ずつ選択された、計 68 匹のマウス (DBA/2J の雄マウス計 16 匹、C57BL/6J の雄マウス計 27 匹、雌マウス計 25 匹) を行動解析に用いた。これらのマウスは、曝露、行動テストの実施時期の異なる 2 つのグループに分けられる (表 1 参照)。

約 17-24 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。20-27 週齢での行動実験開始の 20 日前までは、同性、同処置群のマウス同士で集団飼育 (3-5 匹/ケージ) された。その後は一貫してコーンコブを敷いた透明のプラスチックケージ (18×29×12 cm) で、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。本研究は、東京大学及び筑波大学動物実験委員会の規則に従い、同委員会の承認を得た上で行なわれた。

### 2. 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 (図 1 参照)。

#### a. Y 字型迷路テスト (YMT)

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 (OFT)

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 5 lx 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 (LDT)

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 (SIT)

測定の前日に、テストマウスを実験用ケージ (白色塩化ビニール製 ; 31 × 35 × 17cm) 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 5 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 15 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り鼻を挿入すること)、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 (RWA)

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。

### 5. 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

#### a. Y 字型迷路テスト

Y 字型迷路テストでは、新奇場面での活動性、自発的交替反応を検討した。総侵入アーム数、3 つのアームを交替して選択した割合、2 つのアームだけを交替して選択した割合、同じアームを繰り返し選択した割合のいずれにおいても、DBA/2J 雄マウス、C57BL/6J 雌・雄マウスの各々において、TCDD 処置の効果は認められなかった。また、C57BL/6J マウスにおける雌雄差、雄マウスにおける C57BL/6J と DBA/2J の系統差の主効果も認められなかった。迷路内での脱糞数には系統差 (DBA/2J 雄 >> C57BL/6J 雄) が見られたが、TCDD 処置の効果はなかった。

#### b. オープンフィールドテスト

TCDD 被曝が、新奇場面での活動量、不安情動性、探索行動に及ぼす影響を検討した。テストは、Y 字型迷路テスト終了日から 1 週間後に開始した。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。

中央区画の滞在時間についての雄マウスでの系統間比較では、両系統のマウスともに、TCDD 処置の効果は認められなかったが、系統の主効果が認められ ( $F_{(1,34)} = 21.346, p < 0.001$ )、DBA/2J 雄マウスの中央区画滞在時間は全体として、C57BL/6J 雄マウスに比べて短いことが示された (図 2)。一方、C57BL/6 マウスでの雌雄間比較のために行った 2 要因の分散分析の結果、処置×性の交互作用が認められた ( $F_{(2,46)} = 3.446, p < 0.05$ ) ため、各々の性での TCDD 処置の効果を検討した。その結果、雌マウスでは、統制群に比べて TCDD 0.6 群および TCDD 3.0 群の中央区画滞在時間が短い ( $p < 0.05$ )、雄では TCDD 処置の効果がないことがわかった (図 2)。

総移動活動距離について、雄マウスでの系統間比較を分析したところ、TCDD 処置の主効果が認められ ( $F_{(1,34)} = 5.492, p < 0.05$ )、TCDD 0.6 群の総移動活動距離が統制群よりも長いことが示された。下位検定の結果、これは主に DBA/2J 雄マウスにおいて、TCDD 0.6 群の総移動活動距離が統制群に比べて長いことであった ( $p < 0.05$ )。C57BL/6J マウスの雌雄間差異の分析では、TCDD 処置の主効果は認められなかったが、性の主効果が認められ ( $F_{(1,46)} = 8.494, p < 0.01$ )、

全体として雄マウスの総移動活動距離が雌マウスに比べて長いことがわかった。

### c. 明暗往来箱テスト

オープンフィールドテスト終了後、1 週間の間隔をあけて、明暗往来箱テストを実施し、周生期の TCDD 被曝が不安関連行動に及ぼす影響を検討した。

DBA/2J と C57BL/6J の雄マウスの系統間比較においては、明箱滞在時間、明箱への侵入潜時、明暗往来回数、暗箱での単位時間当りの移動活動距離のすべてについて、TCDD 処置の効果は認められなかった。しかし、明箱滞在時間 ( $F_{(1,34)} = 74.689, p < 0.001$ )、明箱侵入潜時 ( $F_{(1,34)} = 17.055, p < 0.001$ ) には、有意な系統間差異が検出され、C57BL/6J 雄マウスに比べ DBA/2J 雄マウスの明箱での滞在時間および移動距離が少なく、明箱侵入までの潜時は長いことが示された。このことは、DBA/2J 雄マウスの不安レベルが高いことを示唆する。また、明暗往来回数 ( $F_{(1,34)} = 74.783, p < 0.001$ )、暗箱での単位時間当りの移動活動距離 ( $F_{(1,34)} = 7.462, p < 0.01$ ) についても、系統間での差異が見られ、DBA/2J 雄マウスの活動量が、C57BL/6J 雄マウスに比べて有意に低いことがわかった。

上記 4 つの測度について、C57BL/6J の雌雄マウス間での差異を分析した結果、全ての測度で TCDD



処置の効果、性差ともに認められなかった。

#### d. 社会的探索行動テスト

社会的探索行動テストでは、ホームケージ内に提示された同性他個体に対する反応を、累積探索行動時間、社会的不安行動、移動軌跡を測定することによって検討した。

これまで述べた3つの行動テストの結果とは違い、本テストの結果については、23週齢でテストを行ったグループ1と、31週齢でテストを行ったグループ2の間で、大きな違いが認められたため、グループ1 (C57BL/6Jの雌雄マウス20匹、DBA/2Jの雄マウス6匹)と、グループ2 (C57BL/6Jの雌雄マウス32匹、DBA/2Jの雄マウス10匹)について、別々に分析を行った (表1参照)。

探索行動累積時間:グループ1では、すべてのマウス群においてTCDD処置の効果が見られなかった。しかし、C57BL/6Jにおいて雌マウスの社会的探索時間が雄マウスに比べて有意に短かった ( $F_{(1,16)} = 7.556, p < 0.05$ )。一方、グループ2では、C57BL/6Jの雌雄マウスにおいて、TCDD処置の主効果が認められた ( $F_{(2,26)} = 10.629, p < 0.001$ )。雄雌マウス各々において、TCDD処置の効果を多重比較 (Tukey法) で検討したところ、雄ではTCDD 3.0群の社会的探索時間が統制群より長く ( $p < 0.05$ )、雌ではTCDD 0.6群

が統制群より長い ( $p < 0.05$ ) ことがわかった (図3)。

DBA/2JとC57BL/6Jの雄マウス間の差異についての分析では、グループ2において、系統の主効果 ( $F_{(1,18)} = 12.671, p < 0.01$ ) 及びTCDD処置×系統の交互作用 ( $F_{(1,18)} = 5.788, p < 0.05$ ) が有意であった。統制群では、DBA/2J雄マウスの社会的探索時間は、C57BL/6J雄マウスより有意に長い ( $p < 0.05$ ) が、TCDD 0.6処置により、DBA/2J雄マウスでは、社会的探索時間が低下し、C57BL/6J雄マウスでは、むしろ増加する傾向が見られた (図3)。

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いことに加えて、雌マウスでは、TCDD処置によりその頻度が影響されやすいことがわかった。しかし、TCDD処置の効果の方向が、グループ1と2では、大きく異なっていた。すなわち、グループ1では、刺激個体が提示されたシリンダーに対して遠くから体を伸ばして刺激個体を嗅ごうとする行動 (Stretched Approach) の回数が、雌マウスのTCDD 0.6群では、統制群よりも有意に多かった ( $p < 0.05$ )。それとは対照的に、グループ2では、TCDD処置された2群のStretched Approach数が、統制群に比べ少ないこと ( $p < 0.05$ ) がわかった (図4)。グループ2では、雄のC57BL/6Jマウスでも、有意では

ないものの、TCDD 処置により Stretched Approach 数の減少が見られた。一方、DBA/2J の雄マウスでは、Stretched Approach 数そのものが少なく、TCDD 処置の効果は検出されなかった。

移動軌跡：TCDD 処置群の雌雄のマウスでは、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

C57BL/6J の雌雄マウスにおいて、周生期の TCDD 被曝が、ホームケージ内での活動量に及ぼす影響を検討した。

暗期 12 時間あたりの回転車の総回転数について分析したところ、雌雄ともに、すべての群で日数の経過に伴い、活動量が上昇することがわかった。雌では、TCDD 処置と測定日との交互作用が認められたため ( $F_{(26,260)} = 1.588, p < 0.05$ )、14 日の測定期間を最初の 4 日間、中間の 5 日間、最後の 5 日間の 3 つに分けて、TCDD 処置の効果を検討した (図 5)。その結果、TCDD 0.6 群の活動量が、中間の 5 日間では統制群に比べて ( $p < 0.05$ )、更に、最後の 5 日間では統制群と TCDD 3.0 群の両方に比べて、有意に高かった ( $p < 0.05$ )。それに対し、雄では、全ての時期において統制群と TCDD 群の活動量に差が見られなかった。

#### D 考察

本研究では、0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  というマウスにおいては低用量に分類される範囲の周生期の TCDD 被曝が成長後の情動・社会行動に及ぼす影響を、5 つの行動テストで検討した。その結果、① C57BL/6J 雌マウスでは、周生期の TCDD 曝露により、成長後の新奇場面での不安情動性や、ホームケージ内での活動量が用量依存的に高まること、② DBA/2J 雄マウスでは、TCDD 曝露により、成長後の新奇場面での活動量が高まること、③ C57BL/6J 雌雄マウスでは、周生期の TCDD 曝露が新奇他個体に対する探索行動や不安関連行動に影響を及ぼす可能性があること、を示唆する結果が得られた。

本研究では、TCDD 曝露効果における系統差、性差、用量依存性についてもいくつかの新しい知見が得られた。例えば、新奇個体への社会的探索行動の累積時間は、TCDD 0.6 処置により、DBA/2J 雄マウスでは低下したのに対し、C57BL/6J 雄マウスでは、むしろ増加することがわかった。TCDD に対する感受性が異なるこの 2 系統を用いて、TCDD 被曝の効果を行動学的に検討した研究は未だ数少なく、特に、社会行動への TCDD 被曝の影響が系統によって異なるという本研究の結果は重要であると言える。

また、TCDD 被曝の効果における雌雄差も、オープンフィールド場面での不安レベル (中央区画滞在時間) やホ

ームケージ内での活動量において認められた。更に、社会的探索行動においても、TCDD 被曝の用量依存性に雌雄差が見られ、雌マウスでは雄マウスよりも低用量 (0.6 $\mu$ g/kg) で影響が見られた。記憶・学習機能に及ぼす TCDD 被曝効果の雌雄差については、比較的数量多く報告されているが、不安レベル、活動性、社会行動についても同様であるとする本研究の結果は、新しい知見であると言える。

個体の情動性、不安および活動性のレベルや社会行動の発現は、周生期のホルモン環境や、この時期の脳構造・機能の発達や性分化により大きく左右される。更に、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も考えられる。今後、本研究で明らかとなった行動変容の神経基盤についての解析が進むことが期待される。

## E 結論

母体を介した低用量の TCDD 被曝は、次世代個体の不安情動性、活動性、社会的探索反応に、性、系統、用量依存適に影響を及ぼすと結論される。

## F 健康危険情報

特に無し

## G 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特に無し

### 2. 実用新案取得

特に無し

### 3. その他

特に無し

## H 図表の説明

表 1. 本研究で用いた系統、性、処置群、テスト実施グループ別のマウスの匹数を示す。

図 1. 研究全体の流れ (TCDD 処置、飼育条件、行動テスト) を示す。

GD: 妊娠期間中の日

PND: 出生後の日

YMT: Y 字型迷路テスト

OFT: オープンフィールドテスト

LDT: 明暗往来箱テスト

SIT: 社会的探索行動テスト

RWA: ホームケージ回転車テスト

図 2. 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。Cont は統制群、TC 0.6 は、TCDD 0.6  $\mu$ g/kg 処置群、TC 3.0 は TCDD 3.0  $\mu$ g/kg 処置群を示す (図 3 以降についても同様)。図の右には、DBA/2J と C57BL/6J の雄マウス間での比較 (Strain Differences in Males)、C57BL/6J の雄と雌マウス間での比較 (Sex Differences in C57BL/6J) の 2 要因の分散分析の結果を示す。Treatment は TCDD 処置の主効果、Strain は系統の主効果、Sex は性の主効果、Treatment x Strain は系統と処置の交互作用、Treatment x Sex は性と処置の交

相互作用（図 3 以降についても同様）。

図 3. 15 分間の社会的探索行動テストにおける社会的探索行動 (Social Investigation) の累積時間の平均 (bar) と標準誤差 (vertical line) を示す。グループ 2 の結果のみ。

図 4. 15 分間の社会的探索行動テストにおける社会的不安行動 (stretched approach) の頻度の平均 (bar) と標準誤差 (vertical line) を示す。グループ 2 の結果のみ。

図 5. C57BL/6J 雌マウスのホームケージ回転車活動量測定における、暗期 12 時間あたりの総回転数の日間変化を示す (ライングラフ)。棒グラフは、14 日の測定期間を、最初の 4 日間, 中間の 5 日間, 最後の 5 日間の 3 つに分けて分析した場合の、1 日当りの暗期の総回転数の平均 (bar) と標準誤差 (vertical line) を示す。

Strain	Sex	Treatment		
DBA/2J	Male	Control G1:n=3 G2:n=5	TCDD 0.6 µg/kg G1:n=3 G2:n=5	
C57BL/6J	Male	Control G1:n=5 G2:n=6	TCDD 0.6 µg/kg G1:n=5 G2:n=6	TCDD 3.0 µg/kg G1:n=0 G2:n=5
	Female	Control G1:n=5 G2:n=5	TCDD 0.6 µg/kg G1:n=5 G2:n=5	TCDD 3.0 µg/kg G1:n=0 G2:n=5

G1:Group 1, G2:Group 2

表 1

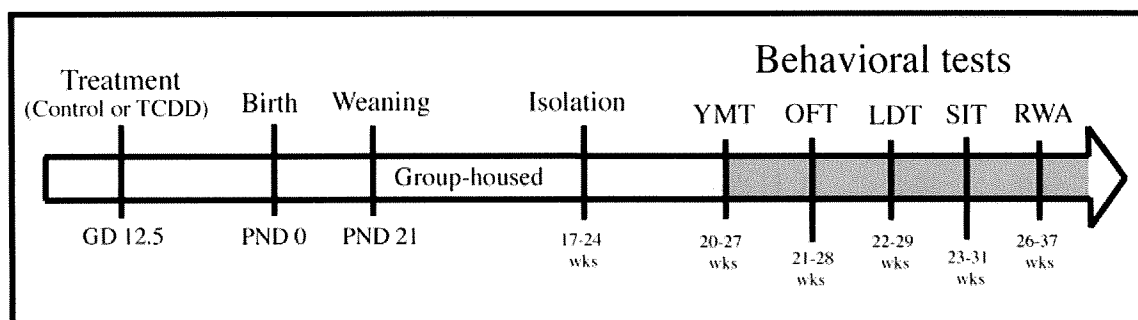
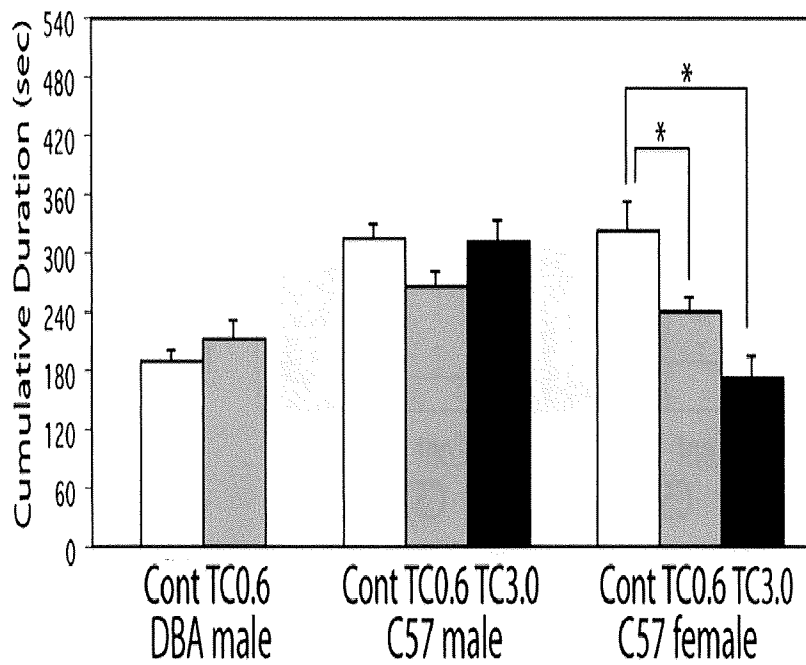


图 1

## Center Time



### Strain differences in males

Treatment ; n.s.

Strain ;  $p < 0.001$

Treatment  $\times$  Strain ; n.s.

### Sex differences in C57BL/6J

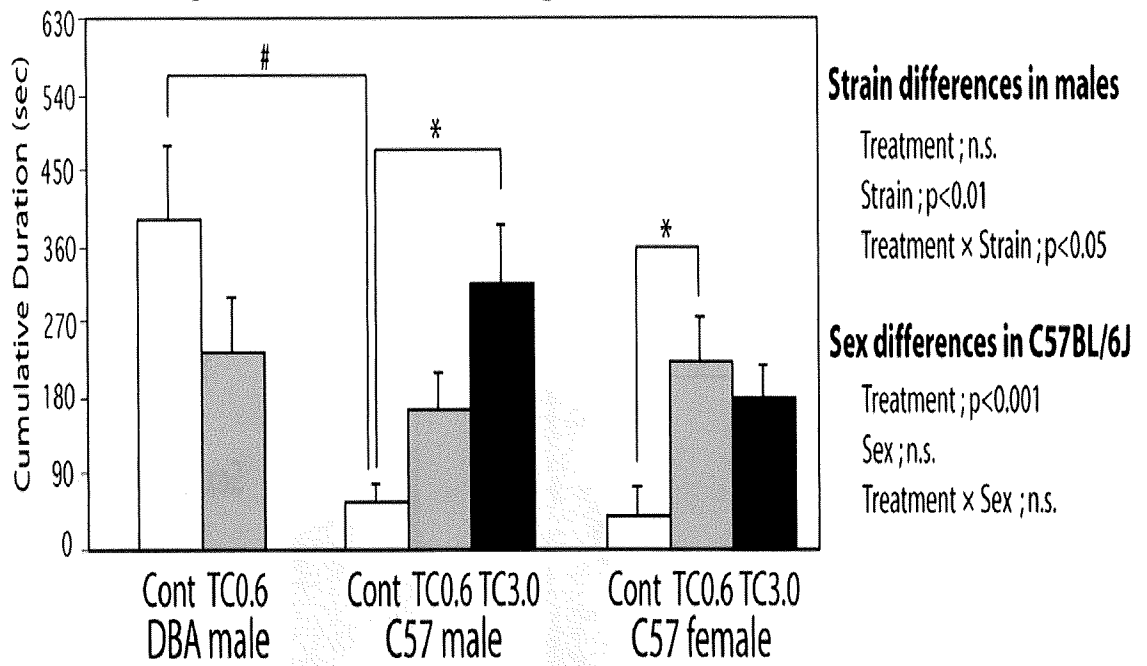
Treatment ;  $p < 0.01$

Sex ;  $p < 0.05$

Treatment  $\times$  Sex ;  $p < 0.05$

☒ 2

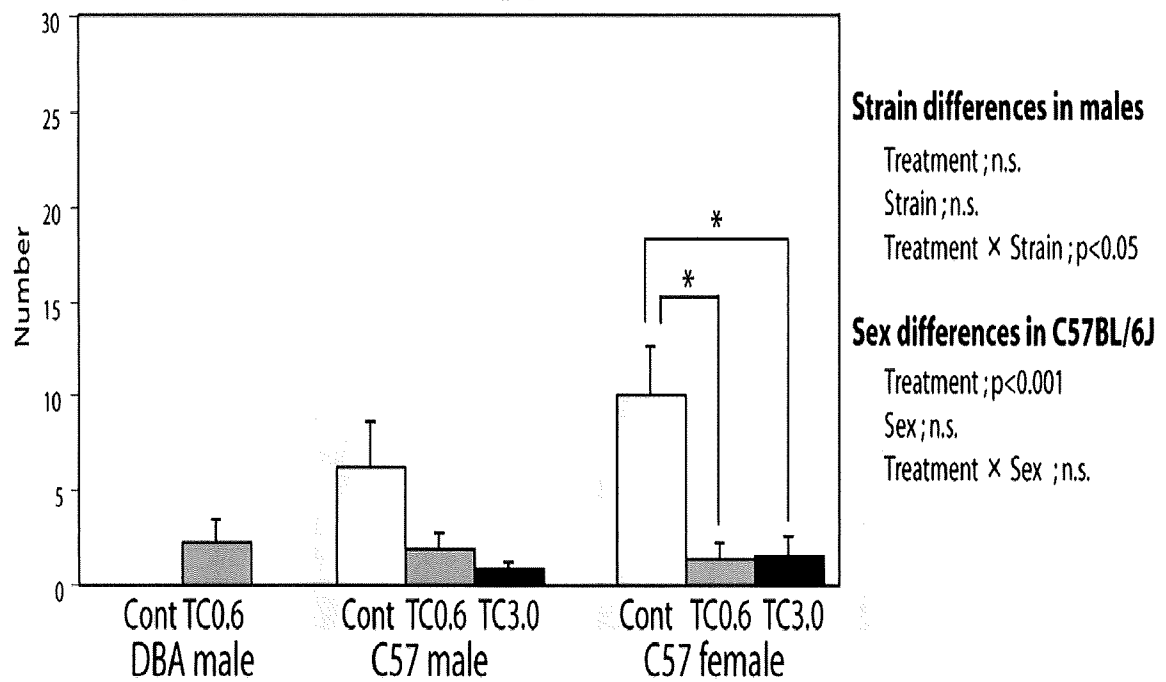
## Group-2 Social Investigation



☒ 3

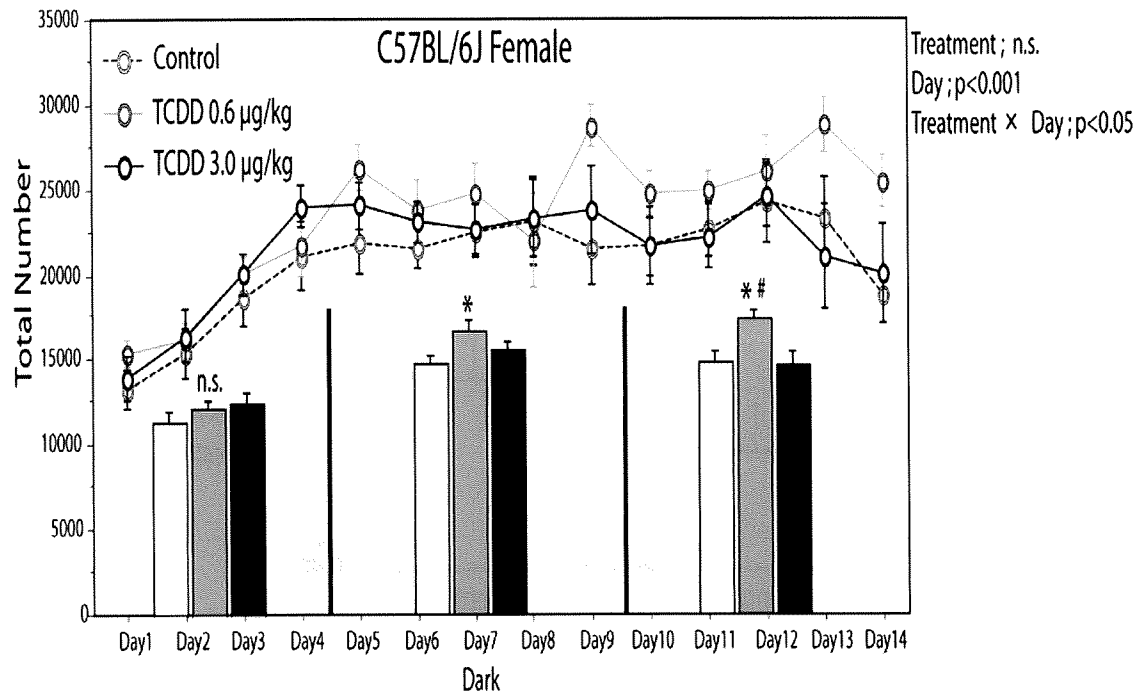


## Group-2 Stretched Approach



☒ 4

# Number of Wheel Revolutions



☒ 5

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

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

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

ダイオキシン類は、母体には影響が顕れない程度の非常に低用量の曝露であっても、胎盤や母乳経由で子供の脳の発達に影響を及ぼすことが示されている。本研究では、恐怖条件づけ試験を行なって、低用量の塩素化（TCDD）および臭素化ダイオキシン（TBDD）の胎仔期・授乳期曝露が子どもの恐怖記憶の形成や保持に影響を及ぼすかについて検討した。その結果、TCDD および TBDD の両曝露群で、文脈依存的、音依存的恐怖記憶テストにおいて対照群と比べて有意な Freezing 率の低下を引き起こすことが明らかとなった。このことから、低用量の TCDD および TBDD の胎仔期・授乳期曝露が情動・記憶機能へ影響を及ぼすことが示唆された。

研究協力者

藪島旭（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター）、宮崎航（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター）、遠藤 俊裕（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター）

A 研究目的

本研究では、低用量の塩素化（TCDD）および臭素化ダイオキシン（TBDD）の胎仔期・授乳期曝露が子どもの情動・記憶機能へ及ぼす影響について検

討した。

ダイオキシンは、胎盤や母乳を介して発達期の子供の脳へ移行するため、母体には影響がない程度の非常に低用量の曝露であっても、子どもの認知・情動機能に影響を及ぼすことがこれまで度々指摘されてきた（Kakeyama and Tohyama, 2003; Darras, 2008）。

しかしながら、これまでのげっ歯類を用いた低用量ダイオキシン曝露による発達神経毒性の研究は、学習・記憶機能のみに焦点を当てたものがほ

とんどであった。昨年度の我々の研究から、TCDDの胎仔期・授乳期曝露が情動機能へも影響を及ぼす可能性が示された。TCDDの発達神経毒性影響を包括的に理解するためには、記憶機能だけでなく情動機能への影響も明らかにする必要があると考えられる。

そこで本研究では、恐怖条件づけ試験を用いて、TCDDの胎仔期・授乳期曝露による情動・記憶機能への影響について検討した。恐怖条件づけ試験は、本来は何の反応も引き起こさない中性刺激（条件刺激；CS）である音や場面（環境）に、電撃のような嫌悪刺激（無条件刺激；US）を対提示することによって、CSのみを提示した場合でも、動物がUSを提示された時のような反応（すくみ反応）を引き起こすようになるという古典的条件づけを利用した行動試験パラダイムである。したがって本試験は、USに対する情動（恐怖）反応の表出、USを与えられた場面や刺激の認知・記憶形成など情動機能と記憶機能の両方が必要とされる試験であるといえる。

また本研究では、臭素化ダイオキシン（TBDD）の胎仔期・授乳期曝露影響について、塩素化ダイオキシン（TCDD）曝露の影響と比較・検討した。

臭素化ダイオキシンは、電化製品などのプラスチック製品や不燃性繊維に含まれる臭素系難燃剤の燃焼過程で発生する環境化学物質である（Diliberto et al., 1993; Ao et al.,

2009; Guruge et al., 2009）。臭素系難燃剤は現在広く用いられていることから、臭素化ダイオキシンの毒性影響が近年社会的な問題となってきた。しかしながら、TBDDはTCDDと同様の毒性を持つと考えられているものの（Ivens et al., 1992; Weber and Greim, 1997; Van den Berg et al., 2006; Ohbayashi et al., 2007; Samara et al., 2009）、脳機能への発達神経毒性影響については現在までほとんど分かっていない。

以上まとめると、本研究では、TCDDまたはTBDDの胎仔期・授乳期が恐怖記憶の形成や保持に影響を及ぼすかについて検討するとともに、TBDDの発達神経毒性影響についてTCDDと比較・検討することを目的とした。

## B 研究方法

### (1) 動物と曝露方法

妊娠12.5日目のC57/BL6系雌マウスに、 $3\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量のTCDDまたはTBDDを経口で投与した。対照群には溶媒であるコーン油を投与した。行動試験には、これらの母獣から生まれた25-28週齢の雄マウスを用いた。

### (2) 恐怖条件づけ試験手続き

本試験は、条件づけセッションと、1時間および24時間後のテストセッションで構成されていた。条件づけセッションでは、マウスを装置に入れた後、音刺激（条件刺激：CS）と電撃

(無条件刺激：US) の対提示を 3 回  
行なった。

条件づけセッションの後，1 時間お  
よび 24 時間あけてテストセッション  
を行なった。テストセッションでは，  
電撃を与えられた環境に対する恐怖  
記憶 (文脈依存的恐怖記憶テスト) と，  
音にする恐怖記憶 (音依存的恐怖記憶  
テスト) の保持テストを行なった。

各セッションにおけるマウスのす  
くみ反応 (Freezing) を指標として，  
各セッション中にすくみ反応を呈し  
ていた時間の割合 (Freezing 率) を分  
析した。

### C 研究結果

条件づけセッションにおける各群  
の Freezing 率を図 1 に示した。各群  
の動物は，電撃が繰り返されるにした  
がって，Freezing 率が増加した。両曝  
露群は対照群と比べて若干 Freezing  
率が低い傾向にあったが，どちらの群  
も対照群と比べて統計的に有意な差  
はなかった。

文脈依存的恐怖記憶テストにおけ  
る各群の Freezing 率を図 2 に示した。  
TCDD および TBDD 曝露群は，1 時  
間，24 時間どちらの保持時間でも対  
照群と比べて有意に Freezing 率が低  
下した ( $p < 0.05$ )。

音依存的恐怖記憶テストにおける  
各群の Freezing 率を図 3 に示した。  
TCDD および TBDD 曝露群は，1 時  
間，24 時間どちらの保持時間でも対  
照群と比べて有意に Freezing 率が低

下した ( $p < 0.05$ )。

### D 考察

条件づけセッションにおいては，  
Freezing 率に群間で有意な差がなか  
ったことから (図 1)，TCDD および  
TBDD 曝露群の動物は，恐怖反応の表  
出には異常がなかったと考えられる。  
それにもかかわらず，文脈依存的およ  
び音依存的恐怖記憶テストにおいて  
TCDD および TBDD 曝露群は対照群  
と比べて Freezing 率の有意な低下を  
示した (図 2, 3)。このことから，TCDD  
および TBDD 曝露群は恐怖記憶の形  
成や保持に異常が生じていたと考え  
られる。この結果は，TCDD を胎仔  
期・授乳期に曝露されたラットを用い  
た先行研究の知見と一致するもので  
あった (Mitsui et al., 2006)。

文脈依存的恐怖記憶の形成や保持  
には海馬が重要な役割を果たしてい  
ることが示唆されている (LeDoux,  
2000; Maren, 2001)。また，TCDD の  
曝露によって，海馬内の CREB や  
NR2B といった記憶機能に重要な役  
割を果たしていると考えられている  
分子 (Morris et al., 1990;  
Collingridge and Bliss, 1995; Cain,  
1997; Josselyn et al., 2004; Alberini,  
2009) の遺伝子発現が低下することが  
これまで報告されてきた (Kakeyama  
et al., 2001; Nayyar et al., 2003;  
Hood et al., 2006; Mitsui et al.,  
2006)。これらのことから，本研究に  
おける TCDD 曝露群の文脈依存的恐