

2005 米国神経科学学会にて発表)。さらに、これまで記憶の固定（記憶を定着させ、過去の記憶を利用し「判断」に利用できる状態になること）には数日から1週間程度必要とされてきたが (Squire and Alvarez 1995)、Flavor Map 試験の学習パラダイムを習得し「schema」を形成したラットは、1試行で新たな課題を習得し、48時間で固定されることを明らかにし、Science誌に報告した (Tse et al. 2007)。

さらに昨年度本研究において、Flavor Map 試験時の神経活動依存的蛋白の発現を組織学的に解析し、Flavor Map 試験が確かに大脳新皮質依存性の学習課題であることを確認した。次に、ダイオキシン発達期曝露ラットをモデルとして、毒性試験への適用を行った。その結果、低用量ダイオキシン曝露特異的に対連合学習機能を阻害することが明らかとなった。

本年度は、未処置（非曝露）の動物を用い、schema 依存性の記憶の符号化、固定、想起の各ステージにおける免疫組織学的解析を詳細に行い、各ステージにおける脳の責任領域の同定を行った。

B 研究方法

1. Lister-Hooded ラットを用い、通常の Flavor Map 試験により schema 形成（オリジナル・マップの習得）を行った (図 1)。
2. オリジナル・マップ習得後、次の3群にわけた (図 2)：Original

Paired-associate (OPA)群、7匹、オリジナル・マップの想起をさせる群。New paired-associate (NPA)群、7匹、オリジナル・マップの schema を利用して新しい課題を符号化させる群。New map (NM)群、7匹、オリジナル・マップの schema は持っているが、まったく新しい map を符号化させる群（オリジナル・マップの schema を持っていないが、新しいマップの固定には1ヶ月以上を要することがわかっている (Tse et al. 2007))。他に対照群として、通常の飼育ケージで同期間飼育した home caged (cc)群（6匹）を用意した。

3. OPA 群、NPA 群、NM 群、cc 群の各条件による試行を行った 85 分後に麻酔下でかん流固定を行い、脳サンプルを回収した (図 2)。神経活動依存的に発現増強する Zif268 ならびに Arc 蛋白の抗体を用い、前頭葉皮質 (Prelimbic cortex)、前帯状皮質 (anterior cingulate cortex)、脳梁膨大後部帯状皮質 (anterior retrosplenial cortex)、大脳皮質感覚野 (somatosensory cortex)、海馬 CA1 (hippocampus) 領域について、免疫組織化学的に発現細胞数を測定した。

C 研究結果

(1) schema 形成

オリジナル・マップ形成までのラットの学習成績を図 3 に示す（この時点では群わけをしておらず、計 21 匹の成績である）。正答率は日を追う毎に徐々に上昇し、主要トレーニング 6 日目からは有意に高い値を示した

($p < 0.05$)。2日目、9日目、16日目に probe trial を行い、確かに学習が成立していることを確認した (図4)。

(2) schema 依存性の想起と符号化、非依存性の符号化

脳サンプリング日 (主要トレーニング 18 日目) には、OPA 群では、習得済みのマップの中で任意の正解位置の課題を与えた (図5)。NPA 群では、オリジナルから2つだけを変更した。NM 群では、オリジナルとは異なる new map (F7-F12) を与えた。オリジナル・マップの想起をさせる課題での成績は高いままだが、schema 依存性 (NPA の 5~6 trial) ならびに非依存性 (NM の 1~6 trial) の符号化をさせる課題では、成績が低かった。この trial の3時間後に probe trial を行ったところ、schema 依存性の符号化が成立していることを確認した (図6)。

(3) schema 依存性の想起と符号化の免疫組織化学解析

主要トレーニング 18 日目のトレーニング終了 85 分後に脳サンプルを回収し、zif268 ならびに arc の免疫組織学的解析を行った。まず、schema の形成されていない対照群 (Control, cc 群) に比して、schema を形成している動物では (OPA 群、NPA 群、NM 群)、前頭葉皮質と前帯状皮において zif268 陽性細胞の増加が認められた (図7)。特に、schema を利用した符号化をさせた NPA 群では、他のすべての群よりも有

意な増強を認めた ($p < 0.05$)。脳梁膨大後部帯状皮質、大脳皮質感覚野、海馬 CA1 領域については、有意な差は認められなかった (海馬 CA1 領域については、NPA 群で増加傾向があった)。Arc 免疫組織化学による検討でも、同様の結果だった。

D 考察

本研究の成果として、第一に、行動試験について再現性があることを確認したことである。結果そのものは昨年度報告書とほぼ同じであるが、新たに購入した別個体で同じ結果が得られた点は成果としてあげられる。結果の概要としては、Flavor Map 試験により学習成績が徐々に高くなり、数週間でオリジナル・マップの習得ができる (図3,4)。一度オリジナル・マップを習得したラット (=schema が形成されたラット) では、schema を利用することで新しい課題を1トライアルで習得することができる (図5,6)。しかし schema を利用できない新たな地図上の課題の習得は、1トライアルでは成立しない (図5,6)。

我々はこれまでに、大脳海馬を破壊した動物は Flavor Map を習得することができないことから、Flavor Map 法による対連合学習習得には海馬が必須であることを明らかにした (Tse et al. 2007)。さらに Flavor Map を習得してから 48 時間後に海馬を破壊しても Flavor Map の記憶は残っていること、しかし習得3時間後の海馬破壊では

Flavor Map の記憶が消失することを明らかにした(Tse et al. 2007)。すなわち、対連合学習の形成にとって、少なくとも3時間以上は海馬が必須の脳領域であること、48時間後には海馬で形成された対連合記憶が脳の他の部位に移行することが示唆されていた。

Flavor Map 試験では、個々の対連合記憶(場所と味の対連合)をお互いに比較しながら自己の経験を整理(体系化)することで、Flavor Map をシティ・マップとして習得することができるのだろう。故に、既知のマップの中で一部の刺激だけを変更した場合、ラットはわずか一試行で対応できる、すなわち schema を利用して記憶されたマップを書き換えることができる。しかし、すべての手がかりを変更してしまうと対応できず、新しいマップを学習するには最初と同じ時間を要することとなる。

知識の枠組みとしての”mental schema”あるいは”mental models”の概念は、古くから研究が進んでおり(Bartlett 1932, Craik 1943)、物語の想起についての説明、演繹的推論(Bransford 1979)、教育(Johnson-Laird 1983)等で議論されてきたものである。例えば、ヒト(被験者)がその事柄に関連した、あるいは経験のある mental framework がある場合には、文法的に正しいが意味をなさないような事柄の記憶が、より正確である(Bransford and Johnson 1972)。この schema という概念は、動物実験ではあまり調べられ

ていなかったが(O’Keefe and Nadel 1978, McGonigle and Chalmers, 1977, Eichenbaum 2004)、記憶の固定についての脳内機構と直接的に結びつくものと考えられている(Squire 1992, Dudai and Morris 1995, McClelland et al. 1995)。

そして昨年度ならびに本年度の免疫組織学的検討の結果は、mental schema が前頭葉にあることを強く示唆するものである。前頭葉皮質と前帯状皮質では、対照群(caged control)に比して zif268 ならびに arc 陽性細胞の数が多く、中でも schema を利用した符号化を行った NPA 群で顕著に多かった。すなわち、schema の想起を伴う OPA, NPA, NM 群で活性化の度合いが高く、さらに想起に加えて符号化もあわさった NPA 群(schema に基づいた符号化を行っているのは NPA 群だけである)でより活性化されているのである。

われわれは現在、グルタミン酸受容体の脳内局所 inactivation 実験の準備を進めており、その結果は来年度報告予定である。この inactivation 実験により、schema が前頭葉にあることを確定できると考えている。

また昨年度報告したとおり、発達期ダイオキシン曝露により、特に低用量特異的に(妊娠15日目の母動物に200 ng/kg の 2,3,7,8-TCDD を単回経口投与)、Flavor Map 試験の成績低下すなわち schema 形成阻害があることを示した。

残念ながら、ダイオキシン曝露動物

の脳の解析についてはまだ報告の段階にはないが、マウスを用いた別の行動実験から、やはりダイオキシンは前頭葉機能に影響を及ぼすことが明らかになりつつある。すなわち、われわれはマウスの新たな行動試験でも、やはり低用量特異的な影響があること、行動レベルで異常のあった低用量曝露群においてのみ、前頭葉皮質の神経活動マーカー(c-fos, arc)の発現が低下していることを見出した(本年度分担研究報告書「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」を参照)。この結果も、間接的に、schema が前頭葉にあること、そしてダイオキシンが前頭葉機能に影響を及ぼすことを示すものである。

このように、Flavor Map 試験は、従来の古典的行動試験ではなしえなかった、前頭葉依存性の学習機能を評価できる、まったく新しい学習行動試験だと言える。そして本年度分担研究報告書「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」にあるように、ダイオキシンをはじめとした環境化学物質のターゲットとして前頭葉機能は、今後極めて重要なものとなると考えられ、すなわち Flavor Map 試験のような前頭葉依存性の学習試験の重要性も高まってゆくことになるだろう。

E 参考文献

Takeyama M, Tse D, Bast T, Morris RGM. Flavour maps: paired-associate

learning in an event arena as an animal model of associative recall. Soc. Neurosci, Abstr 31: 995.5, 2005

Suire LR, Alvarez P. Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective. Current Opinion in Neurobiology 5:169-177, 1995.

Tse D, Langston RF, Takeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG. Schemas and memory consolidation. Science, 316:76-82, 2007.

Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. Synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 106(1):316-21, 2009.

Bartlett FC. Remembering, Cambridge Univ Press, 1932.

Craik K. The Nature of Explanation. Cambridge Univ Press, 1943.

Bransford JD. Human Cognition: Learning, Understanding and Remembering. Wadsworth, Belmont, CA, 1979.

Johnson-Laird PN. Mental Models: Towards a Cognitive Science of Language, Interference, and Consciousness. Cambridge Univ Press. Cambridge, 1983.

Bransford JD, Johnson MK, Contextual prerequisites for understanding: Some investigations of comprehension and recall. *J. Verb. Learn. Verb. Behav.* 11:717-726, 1972.

O'Keefe J, Nadel L. The Hippocampus as a Cognitive Map (Clarendon, Oxford) 1978.

McGonigle BO, Chalmers M. Are monkeys logical. *Nature* 267:694-696, 1977.

Eichenbaum H. Hippocampus: Cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* 44:109-120, 2004.

Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99:195-231, 1992.

Dudai Y, Morris RGM. To consolidate or not to consolidate: what are the questions? In: *Brain, perception and memory: advances in cognitive sciences* (Bolhuis J, ed), pp 147-162. Oxford, UK:

Oxford University Press, 2001.

F. 図の説明

図 1.(A) イベント・アリーナ写真. 1.5 m × 1.5 m のアリーナとそれぞれの四方にスタート・ボックスを持つ。アリーナ上には、7 × 7 の配置で sand-well がセットできている。sand-well には報酬となる餌をセットするが、砂に隠されて見た目や匂いでは、報酬のありかはわからない。

(B) Flavor Map 配置図. 6 種類の味つきペレットをそれぞれ特定の位置に用いる (F1-L1: チョコレート味、及び F2-L2: チェリー味、F3-L3: アニス味、F4-L4: ベーコン味、F5-L5: ココナツ味、F6-L6: ストロベリー味)。試験では、上記 6 つの sand-well がセットされているが、報酬の入った sand-well はどれか一つだけとなる。ラットはスタート・ボックスで与えられる Flavor Cue (正解と同じ味ペレット) を手がかりに、正解の sand-well を選択しなければならない。

図 2. 行動実験の流れ. 通常の Flavor Map 試験により schema 形成後、Original Paired-associate (OPA) 群、New paired-associate (NPA) 群、New map (NM) 群 (各 7 匹) にわけた。他に対照群として、通常の飼育ケージで同期間飼育した home caged (cc) 群 (6 匹) を用意した。OPA 群、NPA 群、NM 群、

cc 群の各条件による試行を行った 85 分後に麻酔下でかん流固定を行い、脳サンプルを回収した。

図 3. オリジナルマップ形成までのラットの学習成績. OPA 群、NPA 群、NM 群計 21 匹の平均値と標準誤差を示す。正答率は日を追う毎に徐々に上昇し、主要トレーニング 6 日目からは有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

図 4. 主要トレーニングの 2, 9, 16 日目に Probe Trial (図中 PT) を行った。Probe trial では、Flavor Cue を与えるがどの sand-well にも報酬ペレットは入っていない。ラットが対連合記憶を形成している場合は、正解 sand-well で報酬を探す時間 (sand-well を掘っている時間 = Dig time) が、不正解の sand-well に比して、長くなる。

図 5. 脳サンプリング日 (主要トレーニング 18 日目) の OPA 群、NPA 群、NM 群の学習成績。OPA 群では、習得済みのマップの中で任意の正解位置の課題を与えた。NPA 群では、オリジナルから 2 つだけを変更し (F1, 6 を F7, 8 に変更)、1~4 trial では習得済みのもの、5~6 trial では、変更した F7 と F8 を行った。よって 5~6 trial の成績が chance level に低下している。NM 群では、オリジナルとは異なる new map (F7-F12) を与えた。よって、1~4 trial での成績、5~6 trial での成績ともに chance level に低下している。

図 6. 脳サンプリング日 (主要トレーニング 18 日目) の OPA 群、NPA 群、NM 群の probe trial 成績。図 5 の課題を行った 3 時間後に、各群の 5~6 trial に対する probe trial を行った。すなわち、OPA 群では schema 依存性の想起、NPA 群では schema 依存性の符号化、NM 群では schema 非依存性の符号化 (schema は各群同じように習得しているが、NM 群は schema を利用できない新たな符号化となる) についての成績を検証した。schema 依存性の想起 (OPA 群)、schema 依存性の符号化 (NPA 群) では学習が成立していたが、schema 非依存性の符号化 (NM 群) の成績は低いままで、学習が成立できていないことを確認した。

図 7. 行動試験に伴う zif268 蛋白発現の免疫組織学的解析。主要トレーニング 18 日目の行動試験の 85 分後に脳サンプルを回収し、組織切片を作成した。前頭葉皮質 (Prelimbic cortex)、前帯状皮質 (anterior cingulate cortex)、脳梁膨大後部帯状皮質 (anterior retrosplenial cortex)、大脳皮質感覚野 (somatosensory cortex)、海馬 CA1 (hippocampus) 領域について、zif268 陽性細胞数を測定した。*, $p < 0.05$ 。

A Apparatus



B Sandwell locations

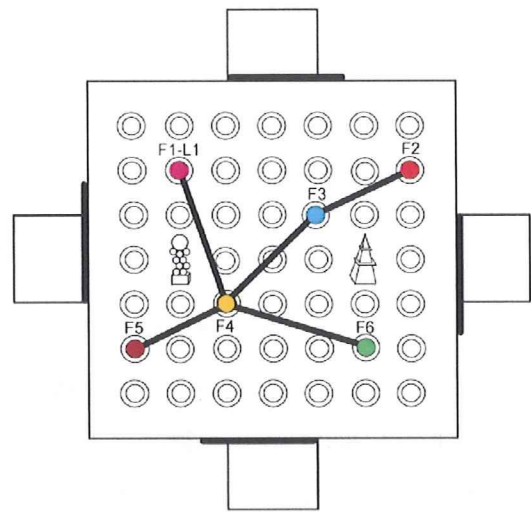


图 1.

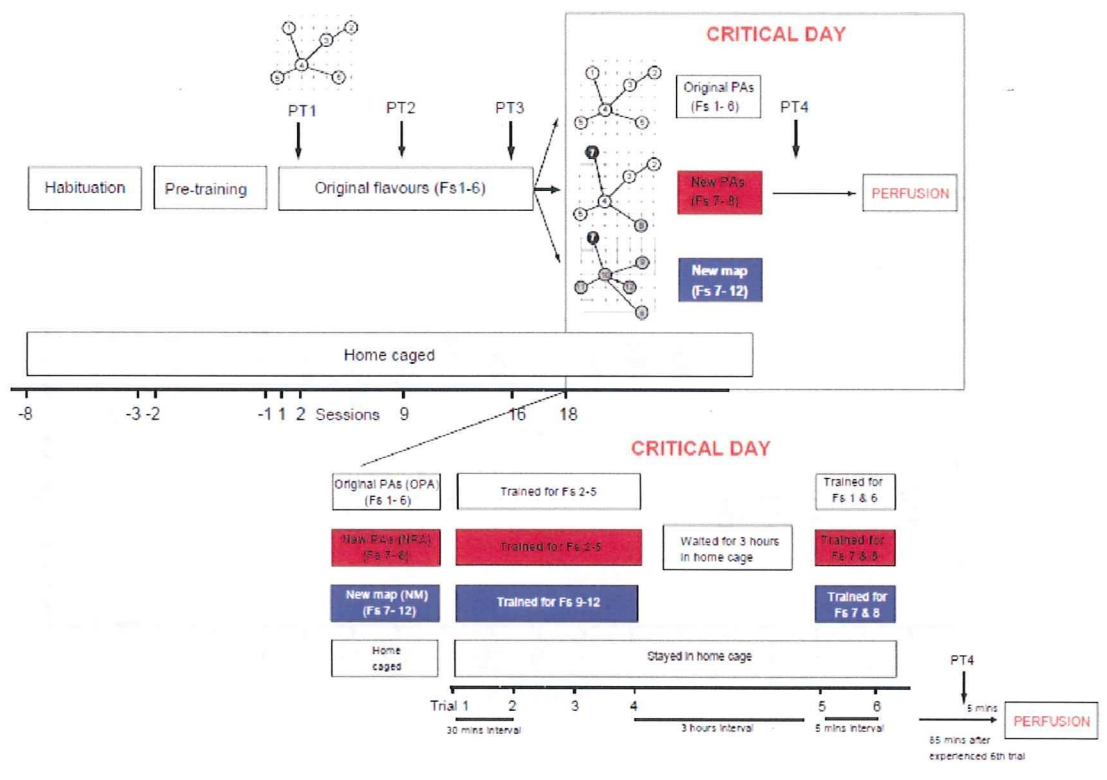


图 2

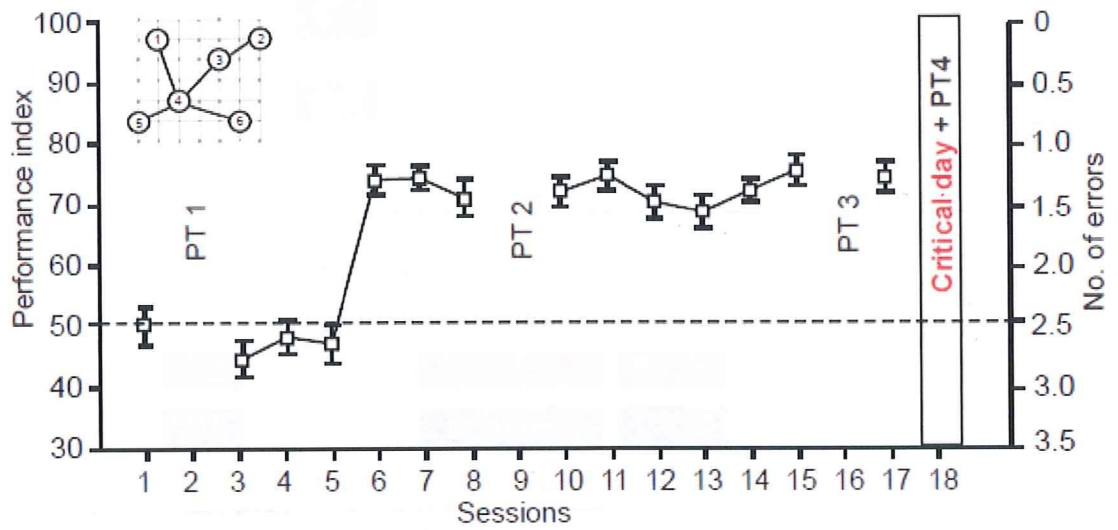


图 3

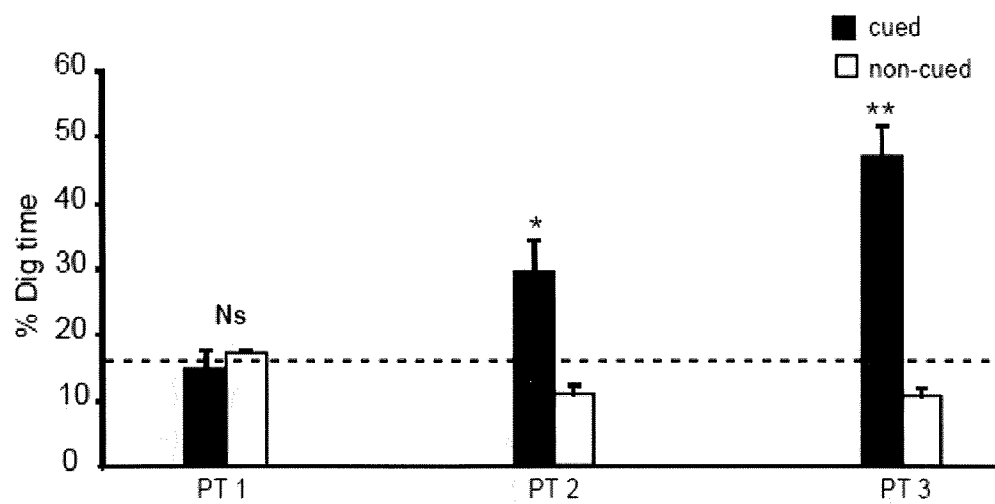


图 4

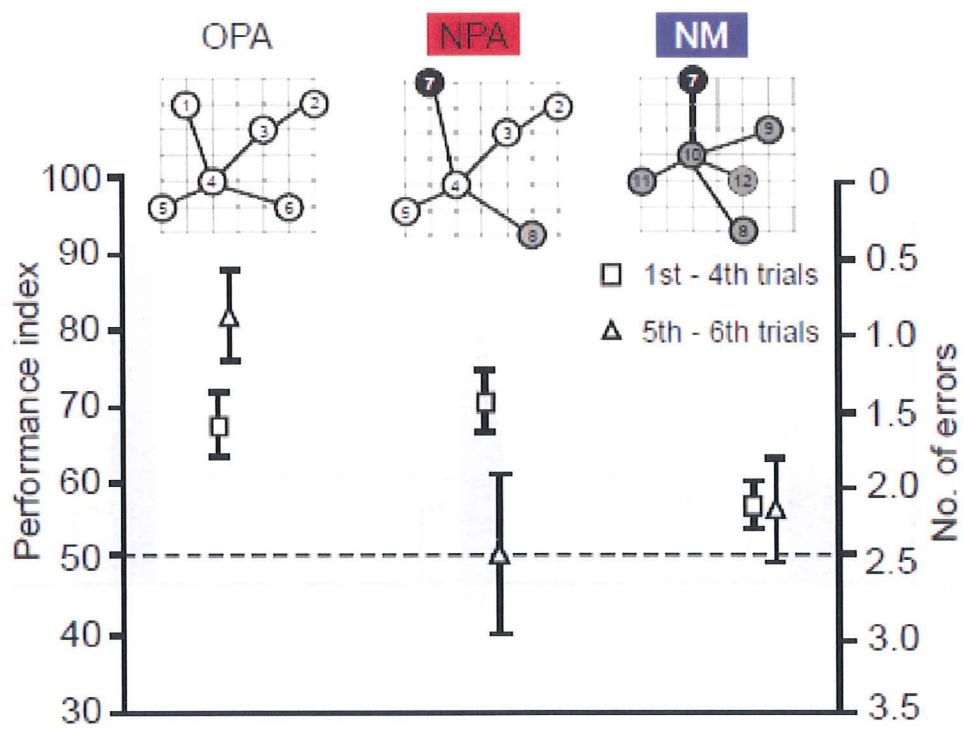


图 5

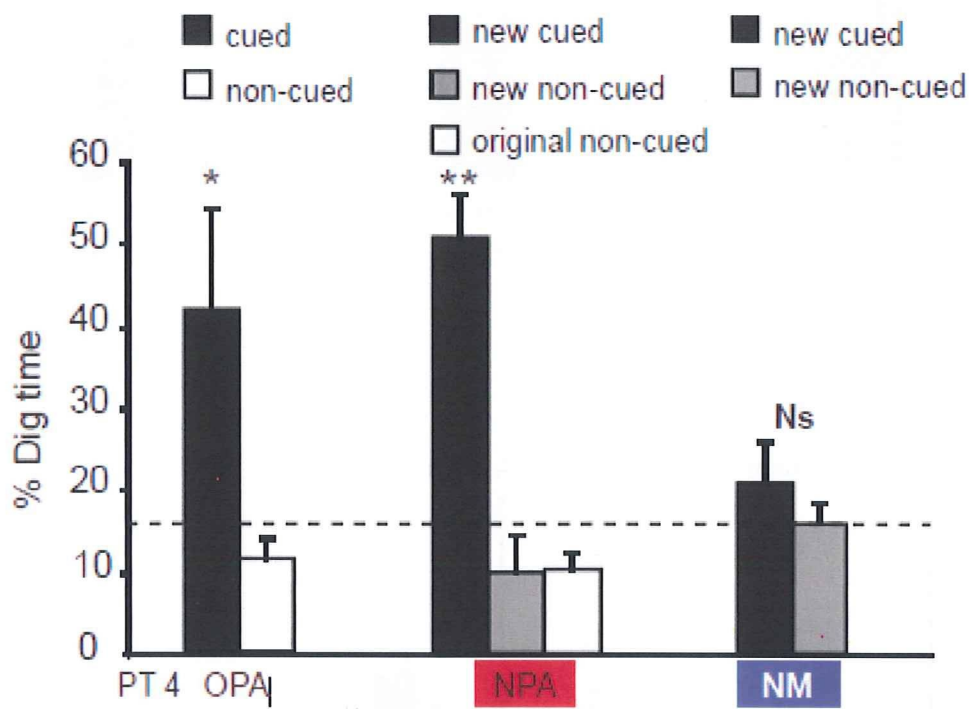


图 6

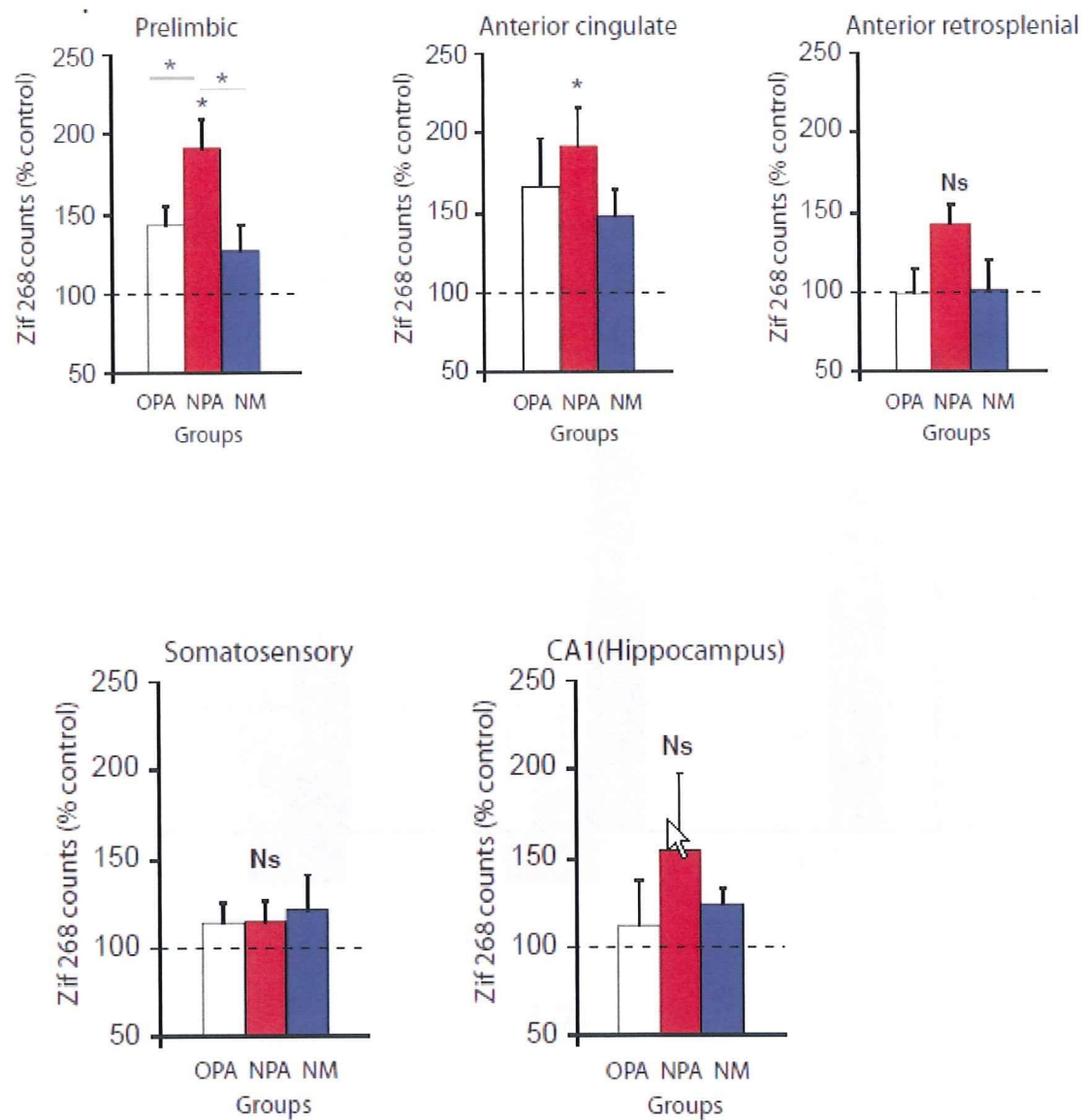


图 7

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hajima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Kakeyama 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	In press	2010
Spiteri T, Musatov S, Ogawa S, Ribeiro A, Pfaff DW, Agmo A	Estrogen receptor-alpha in the bed nucleus of the stria terminalis regulates social affiliation in male prairie voles (<i>Microtus ochrogaster</i>).	Behavioural Brain Research	210	211-220	2010
Redondo R, Okuno H, Spooner PA, Frenguelli BG, Bito H, Morris RGM.	Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium-calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation.	Journal of Neuroscience	30	4981-4989	2010
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^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase cascade.	Journal of Neuroscience	29	13720-13729	2009
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

研究成果の刊行物・別刷

***In utero* and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice**

Asahi Haijima, Toshihiro Endo, Yan Zhang, Wataru Miyazaki, Masaki Kakeyama*,
Chiharu Tohyama

Laboratory of Environmental Health Sciences, Center for Disease Biology and Integrative
Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0033, Japan

*Corresponding author:

Masaki Kakeyama, Ph.D.

Laboratory of Environmental Health Sciences, Center for Disease Biology and Integrative
Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 7-3-1 Bunkyo-ku,
Tokyo 113-0033, Japan

E-mail: kake@m.u-tokyo.ac.jp

Phone: +81 3 5841 1415

Fax: +81 3 5841 1434

Abstract

Environmental-level *in utero* and lactational exposures to dioxins have been considered to affect brain functions of offspring. Here, we determined whether *in utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and 2,3,7,8-tetrabromo-dibenzo-*p*-dioxin (TBDD), at the dose that does not harm the dams, affects the acquisition and retention of fear memory in mouse offspring. Pregnant C57BL/6J mice were administered by gavages TCDD or TBDD at a dose of 0 or 3.0 µg/kg body weight on gestation day 12.5, and their male offspring were examined for their behavior in adulthood. In the fear conditioning, a paired presentation of tone and foot shock was repeated three times, and retention tests for contextual and auditory fear memory were carried out 1 and 24 hr after the fear conditioning. Groups of mice that were exposed to TCDD and TBDD *in utero* and via lactation showed deficits in the contextual and auditory retention tests at 1 and 24 hr retention intervals. The present results suggest that maternal exposure to a low dose of TCDD or TBDD disrupts the functions of memory and emotion in male mouse offspring, and that the developmental toxicities of these chemicals are similar to each other.

Key words: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin, *in utero* and lactational exposure, fear conditioning, mice

1. Introduction

Dioxins are produced mainly by combustion, released into the environment and accumulated in human and wildlife populations largely via the food chain. Excessive exposure to dioxins relative to the current environmental level has been reported to increase the risk of cancer incidence and induce reproductive dysfunction in humans and wildlife (for reviews, see Mukerjee, 1998; Birnbaum and Tuomist, 2000; Petroff et al., 2001; Schecter and Gasiewicz, 2003). In addition, since dioxins can be transferred from a mother to the brain of developing-offspring (Kakeyama et al., 2003), developmental neurotoxicity may be induced even when a mother has been exposed to a relatively low level of dioxins (Kakeyama and Tohyama, 2003; Darras, 2008).

However, previous animal studies of dioxin neurotoxicity produced unexpected and still unexplained effects. Schantz and co-workers (Schantz et al., 1996; Seo et al., 1999, 2000; Widholm et al., 2003) reported that maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), the most toxic congener, does not affect spatial learning but induces a deficit in visual reversal task and apparently improves working memory in rats. *In utero* and lactational exposure to TCDD alters operant behavior depending on the task schedule in rats (Markowski et al., 2001, 2002; Hojo et al., 2002, 2008), and the performance of active avoidance task in rats, in terms of prolonged latency to avoidance but not of avoidance rate (Nishijo et al., 2007). Such effects of maternal exposure to dioxins on neurobehavior in animal experiments were often expressed as ‘altered’ neurobehavioral functions, but not as a dysfunction of the brain.

A possible reason why the developmental neurotoxic effects of dioxins have not been clarified is that previous studies mainly focused on the hippocampus despite the possible involvement of other brain regions in the neurotoxicity of dioxins. In other words, to obtain a complete picture of the neurotoxicity of dioxins, not only memory function, but also emotional function that is related to neurobehavioral changes, should be studied. In order to do so, we adopted the fear conditioning task to study the neurotoxic effects of dioxins on behavior, because the formation of conditioned fear requires both memory and emotional functions.

In the fear conditioning, laboratory animals are initially exposed to an innocuous

stimulus, typically an emotionally neutral stimulus such as tone (conditioned stimulus; CS) that is paired or followed by a noxious unconditioned stimulus (US), typically an electric shock on the foot (Davis, 1992; Maren, 2008). After one to several CS-US pairings, the CS elicits defensive behaviors such as freezing behavior in the animals. Conditioned fear is considered to be mediated mainly by *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) glutamate receptors in the hippocampus and amygdala (LeDoux, 2000; Maren, 2001). We and others also reported that maternal exposure to TCDD reduces the gene expression of NMDA receptor subunit in the forebrain (Kakeyama et al., 2001; Nayyar et al., 2003; Hood et al., 2006). In the present study, the conditioned fear was examined after *in utero* and lactational exposure to TCDD in mice.

In comparison with the neurotoxicity of TCDD, we studied the possible effects of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-p-dioxin (TBDD), a brominated analogue of TCDD. Brominated dioxins have attracted social concerns in recent years, since the combustion of plastics and textiles that contain brominated flame retardants produces polybrominated congeners of dibenzo-p-dioxins/furans (Diliberto et al., 1993; Ao et al., 2009; Guruge et al., 2009). TBDD has been suspected to have dioxin-like effects (Ivens et al., 1992; Weber and Greim, 1997; Van den Berg et al., 2006; Ohbayashi et al., 2007; Samara et al., 2009). Although TBDD toxicity has been studied for various endpoints, such as cleft palate, lethal dose 50 (LD₅₀), and thymic atrophy (for a review, see Birnbaum et al., 2003), it has not been clarified in the case of the developing brain .

In this study, we examined whether TCDD and TBDD affect neurobehavioral function, focusing on the formation and/or retention of fear memory, and compared the toxic potencies of TBDD relative to those of TCDD in adult male offspring exposed to TCDD or TBDD *in utero* and via lactation.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

TCDD and TBDD, the purities of which were higher than 99%, were purchased from Cambridge Isotope Laboratory (Andover, MA, USA). N-nonane and corn oil was obtained from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan).

2.2. Animals and exposure to chemicals

Time-mated pregnant C57BL/6J mice were obtained from CLEA Japan (Tokyo, Japan). They were housed in a temperature- and humidity-controlled room (22-24°C, 30-60% humidity), and were maintained on a 12 hr light-dark cycle (lights on at 8:00-20:00). Food and water were provided to the animals *ad libitum*. On gestation day 12.5, TCDD or TBDD dissolved in corn oil containing 0.4% N-nonane at a dose of 3.0 µg/kg body weight (9.32 mol/kg for TCDD, 6 mol/kg for TBDD) was administered by gavages to pregnant mice per group. Because the elimination half-lives of TCDD and TBDD in rats are between 2 and 3 weeks (Birnbaum et al., 2003), this form of exposure to rodent dams at late gestational periods results in *in utero* and lactational exposure to their offspring (Kakeyama et al., 2003; Fritz et al., 2005). Thus, offspring were exposed around the period of brain maturation (Dehay and Kennedy, 2007).

Pregnant mice that served as a control group were administered an equivalent volume of corn oil containing 0.4% N-nonane. Each group consisted of 8-9 pregnant mice. Pups were housed with their biological mothers until weaning at 21 days of age. At 25-28 weeks of age, one male offspring per litter was randomly selected for the behavioral experiment. Since *in utero* and lactational exposure to TCDD in rats affect contextual fear in male but not female offspring (Mitsui et al., 2006), only male offspring were used in this study. The number of animals for control and TCDD and TBDD exposures were 9, 8 and 9, respectively. At the start of the behavioral test, the average body weights (\pm SEM) of control, TCDD- and TBDD-exposed mice were 30.2 ± 0.4 , 29.3 ± 0.5 and 29.4 ± 0.6 , respectively. The animal experiments and handling of hazardous chemicals were performed in accordance with the guidelines for animal experiments and environmental safety, respectively, of the University of Tokyo.

2.3. Apparatus and stimulus

The experiments were conducted in a windowless room containing two conditioning chambers (320 (w) x 250 (h) x 250 (d) mm in size), equipped with a stainless-steel shock-grid floor having 36 rods (3 mm diameter, 6 mm apart) and a stainless-steel drop