

201035010A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 23 ( 2011 ) 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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 23 ( 2011 ) 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 -----1

### II. 分担研究報告書

1. IntelliCageを用いた周産期ビスフェノールA曝露動物の行動解析-----19

2. 周産期の化学物質曝露が加齢マウスの微細形態に及ぼす影響の解析-----32

3.胎仔期・授乳期におけるダ低用量イオキシシン曝露が  
成熟後仔マウスの脳モノアミン系に及ぼす影響に関する研究-----42

4. 神経細胞の形態構造変化を指標にしたin vitro試験法開発----- 62

5. まとめ1. 情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試-----74

6. まとめ2. ダイオキシシン、ビスフェノールAの発達神経毒性-----90

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----99

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----101

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**

ヒトにおいてどのような影響がどの程度顕れうるのかという有害性評価のために必要な毒性試験は、ある曝露量でマウスに何が起こるのかを科学的記述として明示し、その上で、メカニズム解析に基づいた科学的情報を踏まえ、種間の違いと共通性（実験結果の有効範囲）を考察する方向性が必要だろう。そこで本研究では、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。高次認知(Flavor Map)テスト、幼若期情動認知(KODOMO)テスト、社会性テストの3つの行動試験を独自開発し、有効性を検証した。11の既存試験のプロトコールを検証し、オープン・フィールド・テスト、恐怖条件づけテスト、強制水泳テスト、尾懸下テスト、物体再認テストについては、外れ値を示す個体数が5%程度になるよう、試験プロトコールを改良した。これらの成果をもとにして、集団型全自動試験装置 IntelliCage を用いた簡易試験の開発を行い、学習効率・再現性・精度面で優れたプロトコールを独自開発、さらに社会的場面での情動試験の開発も行った。固執性、衝動性といった一般的な情動指標とは別に、集団生活という従来にない試験条件ではじめてあらわれる、社会性が新たな影響指標として重要であることを示すことができた。ダイオキシンとビスフェノールA曝露動物を用い、各行動試験の結果を比較しながら、行動変化に対応する組織・分子レベルでの変化を同定、各試験の有効性と妥当範囲を検証した。

**研究分担者**

小川園子・筑波大学教授  
船橋利也・聖マリアンナ医科大学教授  
塚原伸治・埼玉大学准教授  
上村夕香理・東京大学特任助教  
前川文彦・国立環境研究所主任研究員  
尾藤晴彦・東京大学准教授

**A.研究目的**

化学物質による情動・認知行動に対する影響という新たな有害性の存在が示唆されており、その毒性学的評価手法の開発に資する研究を推進せねばならない。特に「化学物質の毒性学的観点からの化学物質の情動・認知行

動に対する影響評価手法の開発に資する研究。特に、子どもの発達に対する影響を対象とし、個体の情動・認知行動に生じる異常現象の評価に留まることなく、組織・細胞機能レベルの客観的評価を組み合わせ、化学物質の情動・認知行動に対する毒性を体系的に評価することを可能とする、汎用性のあるガイドライン又はシステムの開発に資する研究」(平成20年度公募要領より)が求められている。

そこで本課題では、情動・認知機能に対する「影響を定量化する」ことを目指し、行動から分子までの包括的評価手法を確立するための研究開発を平成20～22年度まで行った。

## B. 研究方法

### 1. 【精密行動試験の新規開発】

精密行動試験として、これまで評価法の整備が進んでいない、高次認知試験、幼若期情動認知試験、社会性試験の3つの行動試験を、開発・検証した。精密試験では、トレーニングを受けた専門家でなければ実行が難しい。しかしダイオキシンやビスフェノール A のように、多くの論文報告があるにも関わらず、未だに影響の有無すらも議論されるような化学物質について、最先端科学に基づいて精緻な知見を提

供することが必要と考える。

### 2. 【精密行動試験バッテリーの構築】

独自の3つの試験法の他に、既存試験であるオープン・フィールド試験、明暗箱試験、オープン・フィールド・テスト、明暗箱往来テスト、高架式十字迷路テスト、Y時型迷路テスト、ホームケージ回転車テスト、強制水泳テスト、尾懸垂テスト、ロータロッド・テスト、物体再認テスト、恐怖条件づけテスト、プレパルス抑制テストを用いた。

### 3. 【組織・細胞・分子レベルの試験法構築】

行動試験の結果に科学的信頼性を付与し、また実験動物とヒトとの共通性と違いを考察するために、組織化学評価法の整備、レーザー・マイクロダイクセクション法の確立、微細形態解析法の整備、培養細胞系のリアルタイム解析、グルタミン酸伝達系の電機理学的解析を採用した。

### 4. 【簡易行動試験の独自開発】

上記試験バッテリーの成果をもとに、集団型全自動行動測定システム IntelliCage を用いた行動試験プロトコールを新規開発した。IntelliCage では、12～14 匹のマウスを一つの装置で長

期飼育管理し、RFID チップ(IC チップ)により個体識別し、個々の動物毎に課題提示から試験遂行、記録までを自動で行うことができる。全自動による試験の汎用化を目指し、これを用いた空間学習、認知的柔軟性、ルール学習(learning-set)、固執性を一度の試験で測定できる反復逆転課題、オペラント条件づけに基づいて衝動性様行動を測定する試験、「集団生活での社会性変容」の試験を開発した。

#### 5. 【包括的試験法の毒性学的検証】

上記の行動—組織—細胞—分子レベルの試験法について、毒性学的観点からの評価手法の検証を行うため、ダイオキシン類、ビスフェノール A の発達期曝露を行った動物を用いた試験を行い、その妥当性、有効性について考察した。一部の試験については他に、エストロゲン受容体等のノックアウトマウス、母子分離を行ったモデルマウスも用いた。

#### 倫理面への配慮

すべての動物実験は、各研究機関の規則に則り、各動物実験委員会の承認のもとに行った。飼養条件の厳守、苦痛の軽減、動物数および動物へのストレスを最小限にすること、ならびに安楽死に配慮して実験を行った。

### C. 結果

#### 1. 【精密行動試験の新規開発】

##### 1-1. 高次認知試験

Flavor Map テストの原型は、2005 年に掛山と R. Morris 教授(Edinburgh)との共同研究により開発されたものである(化学物質リスク研究事業推進事業(日本人研究者の海外派遣))による成果)。本研究開始までに、Flavor Map 試験は、ラットが課題のルールを理解し、自己の経験と対連合記憶機能をもとに新たな課題に速やかに対応できることを示し(Tse *et al.* Science 2007 など)、「神経科学分野においても最先端かつ、最高次の脳機能を評価できる試験法」として注目されている。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。そこで本研究では、両大学の方法や結果の詳細を比較し、その成果として、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 テストの実施を行うことが可能であることを確認した。

また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。同試験において

新たに、「数秒前の記憶」「数時間前の記憶」「数日前の記憶」について定量的に示すことも実現した。

さらに本事業ならびに推進事業（海外委託研究事業）の成果として、Flavor Map テストが前頭葉依存性の試験であることを免疫組織化学的、神経薬理学的に証明した（修正論文投稿中）。

## 1-2. 幼若期情動認知テスト

KODOMO テストは、幼若ラットを対象とした試験であり、掛山らが開発した装置を用いる。本研究では、ビデオ・トラッキング画像を解析し、行動変化を定量的解析するとともに、同一個体での反復試行の半自動化を行った。対照動物において 25 日齢までに KODOMO テストの学習効果があることが明確になった。そして PCB 曝露動物（妊娠 15 日目の母動物に 2.0mg/kg 単回経口投与）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。以上により、KODOMO テストの有効性が明らかになり、特に衝動性を中心とした ADHD 症状の検出が可能であることがわかった。

## 1-3. 社会性テスト

“こころ”の問題は社会的場面で表

出ることが多いにも関わらず、社会性に関する有害性評価法は極めて乏しい。そこで本研究で新たに、「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」を開発した。被験マウスに対して刺激マウス（同居していた既知のマウス、あるいは初めて会った新規マウス）を提示し、両者への反応の違いを行動観察的に評価するもので、特徴的行動パラメータを見出し、ダイオキシン曝露動物において社会行動異常を検出した。

## 2. 【精密行動試験バッテリーの構築】

上記の 3 つの独自の行動試験に加え、11 試験について、再現性確保の観点から試験プロトコルの見直しを行い、オープン・フィールドテスト、恐怖条件づけテスト、プレパルス抑制テスト、強制水泳テスト、尾懸下テスト、物体再認テストの 6 試験については、外れ値を示す個体数が 5 % 程度になるよう、試験プロトコルをすべて見直した。

## 3. 【組織・細胞・分子レベルの試験法構築】

### 3-1. 特定領域・細胞の解析

組織レベルでの検証としては、まず行動発現により活性化する脳領域を特定し、化学物質曝露により行動が変

容した動物での活性が変化したかどうかを検証したい。そこで神経活動依存的に発現増強する最初期遺伝子 (IEG)産物 (蛋白) を免疫組織化学的に同定する手法についての改良を行った。本研究では、IEGの中でもシナプスの可塑的形態変化に直接関わる activity-regulated cytoskelton proten (arc)に着目した。独自の Arc 抗体を用いることで高感度に Arc 蛋白発現を検出することができるようになり、その免疫組織学プロトコールを整備した。Flavor Map テストの動物脳サンプルを用いて検証を行い、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。

さらに簡易行動試験を行った動物を用いた検討では、ダイオキシン曝露により社会性不安と固執性亢進を示したマウスでは、前頭葉の活性が低下し、扁桃体では逆に増加していることを見出した。行動影響の見られた低用量曝露群でのみ、免疫組織化学での変化も見られたことから、行動変化を科学的に説明する有効な指標であることがわかった。

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、Leica

Microsystems-東京大学国際共同研究において開発)。一細胞からの RNA 抽出に成功し、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。また対連合学習特異的な Arc 蛋白発現増強を見せた細胞において、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ことが明らかになった。

### 3-3. 微細形態解析

多くの精神疾患では、これまで脳形態の変化はないとされてきたが、近年、自閉症や統合失調症をはじめとした多くの精神疾患で、シナプス、スパインや神経突起といった微細形態に異常があることが相次いで報告されている。このような微細形態変化は有害性評価では断片的にしか取り上げられておらず、例えば Leranth らは BPA によるシナプス増加抑制を報告し (PNAS 2008) 新聞等をにぎわわせたものの、卵巣除去等の介入後あらわれる条件での知見であり、生理的反応なのか毒性現象なのかは議論が残る。そこで本研究では、微細形態半網羅解析技術を開発し毒性学への適用をおこ



なった。まず、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、BPA 低用量曝露 (40 $\mu$ g/kg/day) により、海馬における神経細胞の骨格タンパク質 MAP2 の発現が増強することを明らかにした。さらに、BPA、ダイオキシン曝露に共通して、老年期にあたる 1.5 歳齢においてスパイン密度の低下等の微細形態に異常があることを見出した。

また PC12 培養細胞を用いたライブイメージングを行うことにも成功した。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。In vitro 実験であるが、ライブイメージング解析により、より低用量曝露であっても神経突起形成異常がみられることがわかった。

電気生理学的解析では、グルタミン酸受容体構成蛋白 GluR1 を蛍光標識し細胞内移行を解析する技術を導入した。そしてエストロゲン  $\beta$  受容体阻害剤は、大脳新皮質 GluR1 のシナプス移行を阻止したが、 $\alpha$  受容体選択的なものは無効であることを見出した。従って、性ホルモンはエストロジェン受容体  $\beta$  を介して大脳皮質の発達に重要な役割を担っているという新たな知見が得られ、内分泌かく乱化学物質の新たな影響指標として有効であるこ

とを示唆することができた。

#### 4. 【簡易行動試験の独自開発】

集団型全自動行動測定システム IntelliCage を用いた行動試験プロトコールを新規開発した。

第一に反復逆転課題では、マウスは装置内の対角線を往復することで報酬が得られる空間学習を 7 日間で習得し誤答率が 1 割以下となること、その後正解行動パターンの変容に適応してゆく (認知的柔軟性) 様子をリアルタイムに測定できるようになった。また同試験において、マウスの固執性 (報酬に結びつかないにも関わらず同じ行動を繰り返す性質) を評価する指標を見出した。

さらに、正解が逆転するというルールを理解する能力 (learning-set)がマウスにありうることを、我々の知る限り世界で初めて、示すことができた。

そして以上の試験は、全自動で行われるために再現性が極めて高く、国内外の 5 か所で同一の学習曲線が得られることも確認した (通常のマウスにおいて。東京大、自治医科大、国立環境研、チューリッヒ大学の建物が異なる二学部)。

第二に、オペラント条件づけに基づいて衝動性を測定する試験を作成し、一つの装置で 12 匹のマウスを全自動

測定で行うことに成功した。

第三に、12匹以上の集団生活をさせるという IntelliCage の特徴をもとにして、「集団生活での社会性」の試験を開発した。十数匹のマウスが少数の“水飲み場”を競争しあうもので、社会的場面での他者との関係を評価できるようになった。

反復逆転課題では、ダイオキシン曝露動物において、認知的柔軟性の低下と固執性の亢進、社会性不安症状があることを確認した。一方 BPA 曝露ではこれらのパラメータには一切影響がなく、衝動性様症状が亢進する可能性があることを見出した。蛋白・遺伝子発現変化でも、BPA 曝露ではダイオキシン曝露とは全く異なるフェノタイプが見出されたことと共通しており、行動試験の信頼性があることが示された。

## 5. 【包括的試験法の毒性学的検証】

上記の行動－組織－細胞－分子レベルの個別試験、ならびにそれぞれの相関関係について考察するため、ダイオキシン類、ビスフェノール A の発達期曝露を行った動物を用いた試験を行い影響を比較検討した。

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、恐怖記憶の阻害、ストレス下での驚愕反応の増強、

強制水泳テストにおける無動時間の増加、プレパルス抑制の阻害があることを見出した。

また独自開発のテストでも（以下、一部の記載は上記項目と重複）、対連合学習機能（Flavor Map テスト）の障害、見知らぬ個体と出会わせ際の不安行動の増強が、低用量曝露特異的に顕れることを見出した。

IntelliCage による簡易試験でも、認知的柔軟性という高次認知機能の障害と集団生活での社会性不安亢進、固執性亢進が低用量特異的にあることを見出した。同じく低用量特異的に、前頭葉と扁桃体の活動異常があることを免疫組織化学的解析により見出した。

一方 BPA 曝露動物では、これらの指標に影響は一切認められなかったが、ダイオキシンとは異なり、衝動性が亢進していることを見出した。

## 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 テスト」を用いることができるプロトコールを開発したことである。さらに本研究では、Flavor Map テストが前頭葉依存的な認知機能であることを証明することができた。ラット・マウスにおける前頭葉依存的な認知試験は世界でも例がなく、ヒト脳機能に当てはめうる新たな有害性評価指標として有用である。

第二に、KODOMO テスト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こととな

った。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。

また既存試験の11テストについて、ダイオキシン曝露とBPA曝露を陽性条件としてデータを収集し解析した。オープン・フィールド・テスト、恐怖条件づけテスト、プレパルス抑制テスト、強制水泳テスト、尾懸下テスト、物体再認テストについては、外れ値を示す個体数が5%程度になるよう、試験プロトコールを改良した。

明暗箱テスト、高架式十字迷路テスト、ゼロ迷路テストはいずれも、その有効性は認める（これら試験でしか見られない表現型があり得る）ものの、再現性の問題について本研究内での解決は難しいと判断せざるをえなかった。水迷路テストは、一般に用いられる行動指標は発明者(R.Morris 教授)とは解離があり、誤った指標が用いられることが多いため、現時点では割愛せざるを得ないと判断する。

例えばうつ状態の指標として用いられる強制水泳テストでは、通常は室温以上の温度で行われるが、よりストレス応答性を明確にするため、また個体差を軽減させる効果があることを確認し、室温よりも低い温度で行う手法とした。オープン・フィールドテストでも、照明を明暗2パターンで行う

ことで、結果の考察が容易になるようにデザインした。

## **(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**

本項目は、行動→組織→細胞・分子レベルの解析という、遺伝子改変によるアプローチなど“genes to behavior”の通常法とは逆側のアプローチをとることになる。そのために、行動試験を行った動物の脳組織を用い、行動変化に対応した脳領域を同定し、その細胞（集団）に限定して解析を進めてゆく必要があるだろう。

そこで本研究では、arc 抗体を用いた組織化学評価、LMD 法など、独自の手法の開発を行った。また新たな毒性指標として微細形態に着目し、その組織（半）網羅的解析法の確立、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。GluR1 細胞内移動を指標としたシナプス機能解析も導入することができた。

実際に行動実験を行った動物の脳サンプルを用い、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すことができた。

最大の成果としては、行動試験の際に活性化する神経細胞に限定した

遺伝子発現解析を行うという、遺伝子改変による解析とは別のアプローチが必要な毒性試験にとって極めて有効な解析ツールを提示することができた。

## **(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 テスト」の試験プロトコルに関して、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）も含め、国内外5か所で再現性のあることを確認することができた。

さらに、固執性、衝動性といった一般的な情動指標とは別に、集団生活という従来にない試験条件ではじめてあらわれる、社会性が新たな影響指標として重要であることを示すことができた。

H17からの厚労省調べにより、自閉症や ADHD の増加、うつ病や自殺の増加と低年齢化、非行やひきこもりといった問題行動の増加が明らかにされた。これに対する化学物質の関与が懸念される中、「精神・神経の発達異常への化学物質曝露の影響の検証」は我が国政府の重要課題と位置づけられている。このような“こころ”の問題

は社会的場面で表出することが多く、我々の指摘する“社会性”指標は、現代社会の懸念に解答できるものとなるだろう。今後この指標について、さらに発展させてゆく必要があるだろう。

#### **(4)低用量曝露影響に関する知見の提供**

我々が本研究で用いた化学物質曝露は、既存の最小有害影響量(LOAEL)と同等～数十分の一であり、母体や仔動物の一般観察所見ではなんら影響が確認できないという意味で低用量曝露といえる。本研究では、ダイオキシンによる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(強制水泳試験による。坑うつ剤投与により回復したことから、うつ症状と同定)、固執性亢進、プレパルス抑制の障害、そして集団生活での社会性不安があることを見出した。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、社会的不安症状、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こと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。

一方、BPA 曝露ではこれらのパラメータは一切影響がみられなかったが、22年度開発の IntelliCage における衝動性試験において、衝動性の亢進があることが明らかとなった。また、発達期の脳における分子レベルの解析では、BPA 曝露動物は、MAP2 蛋白の変動など、むしろダイオキシン曝露動物よりも明確な影響がみられる部分もあった。これが単なる生体反応なのか毒性影響とみなされるのか、例数を増やす、再現性を確認する中で、さらに検討しなければならない課題といえる。

#### **(5)試験手法の妥当性の検証**

まず、ダイオキシン曝露動物を用いた検証では、低用量特異的な影響について、これまで行動試験でしかみられなかったものだが、組織レベルの解析（前頭葉と扁桃体の異常）、分子レベルの解析（arc positive 神経細胞における NR2B 遺伝子発現）において見出すことができた。これは、低用量曝露影響についての重要な知見であると同時に、個々の試験法の妥当性が正しいことを示すものでもある。

また、ダイオキシン曝露と BPA 曝露では異なる影響があることも、行動-分子レベルで整合性がとれた結果が得られた。

## E. 結論

毒性試験の結果を有害性評価に活かすためには、実験動物とヒトの種間の違いと共通性の問題を解決しなければならない。そして有害性評価の現場では、脳そのものの種差のほかに、体内動態や感受性の種差の問題をあわせて考慮する必要があり、現在の神経毒性学は、そのいずれにも解答が用意できず、すべてをひとまとめにして、リスク評価判断を任せているのが現状といえる。有害性評価のために必要な毒性試験は、ある曝露量でマウスに何が起こるのかを科学的記述として

明示し、その上で、メカニズム解析に基づいた科学的情報を踏まえ、影響と質と程度を示すことが必要だと思われる。

本研究で構築した一連の評価手法はこの観点からデザインされており、想定以上の成果をもたらしたと自己評価する。我々の IntelliCage テストプロトコールは国内外数十の研究チームで既に開始されており、国際的な試験法の標準化に込め得るである。

さらに、新たに見出した“社会性指標”は、今後有害性評価においてこそ、最も重要な指標の一つとなるだろう。ヒトとの比較も含め、“社会性”指標に関する研究のさらなる深化も重要課題であろう。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Cushing, B.S., Perry, A., Musatov, S., Ogawa, S. and Papademetriou E. Estrogen receptors in the medial amygdala inhibit the expression of male prosocial behavior. *Journal of Neuroscience*, 28, 10399-10403, 2008.
2. Mitsushima D, Takase K, Funabashi T. Kimura F. Gonadal steroid hormones maintain the

- stress-induced acetylcholine release in the hippocampus: simultaneous measurements of the extracellular acetylcholine and serum corticosterone levels in the same subjects. *Endocrinology*. 149:802-811, 2008.
3. Tsukahara S, Hojo R, Kuroda Y, Fujimaki H. Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. *Neurosci Lett*. 432:58-63, 2008.
  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* 106:316-321, 2009
  5. Crews, D., Rushworth, D., Gonzalez-Lima, F. and Ogawa, S. Litter environment affects behavior and brain metabolic activity of adult knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, Article 12, 2009.
  6. Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, J-Å, Pfaff, D.W., and Ogawa, S. Effect of ER-β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiology and Behavior*, 96, 300-306, 2009.
  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*. 30(12):2379-2386, 2009.
  8. Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F. Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. *J Neurosci*. 29:3808-3815, 2009.
  9. Tsukahara S, Nakajima D, Kuroda Y, Hojo R, Kageyama S, Fujimaki H. Effects of maternal toluene exposure on testosterone levels in fetal rats. *Toxicol Lett*. 185:79-84, 2009.
  10. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Takeyama M (Corresponding Author), 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*. 31:385-390, 2010.
11. Nakamura, N.H., Fukunaga, M., Akama, K.T., Soga, T., Ogawa, S., and Pavlides, C. Hippocampal cells encode places by forming small anatomical clusters. *Neuroscience*, 166, 994-1007, 2010.
  12. Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Ribeiro, A., Pfaff, D.W., and 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* 2010, in press
  13. Lei, K., Cusing, B.S., Musatov, S., Ogawa, S., and Kramer, K.M. Estrogen receptor-alpha in the bed nucleus of the stria terminalis regulates social affiliation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *PLoS One*, 5: e8931, Jan 27, 2010.
  14. Furuta M, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F, Funabashi T. Food availability affects orexin a/ hypocretin-1-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *Neuroendocrinology*. 91:41-47, 2010.
  15. Funabashi T., Furuta M, Fukushima A, Kimura F. Age- and sex-specific changes in naloxone-induced luteinizing hormone secretion and Fos expression in gonadotropin-releasing hormone neurons of gonadectomized rats. *Neurosci Lett*. 471:157-161, 2010.
  16. Hagiwara H, Kimura F, Mitsushima D, Funabashi T. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. *Physiol Behav*. 100:101-104, 2010.
  17. Bito, H. The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Chem.Biol*. 6:560-563, 2010.
  18. Win-Shwe TT, Tsukahara S., Yamamoto S, Fukushima A, Kunugita N, Arashidani K, Fujimaki H. Up-regulation of neurotrophin-related gene expression in mouse hippocampus following low-level toluene exposure. *Neurotoxicology*. 31:85-93, 2010.
  19. Koike-Kuroda Y, Takeyama M., Fujimaki H, Tsukahara S. Use of live imaging analysis for evaluation of



cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death. *Toxicol In Vitro*. 24:2012-2020, 2010.

20. Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp H-P, Kekeyama M (2011) Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research*, 221, 172-181.

## 2. 学会発表

1. 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、環境ホルモン学会第 11 回研究発表会、2008/12, 東京
2. Kekeyama M, Hojo R, Tohyama C. Chemically-induced attention deficit hyperactivity disorder-like behavior in juvenile rats detected by a newly developed behavioral test. the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2008), 2008/11, Washington DC.1.
3. Uchimura T, Fukushi A., Tsuda MC, Sano K, Kashimura M, Higo S, Hood KE, Tsukahara S, Vasudevan N, Ogawa S. Anxiety and exploratory behaviors and social interactions in mice selectively bred for aggressiveness. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, 2008/11, Washington DC.
4. Tsukahara S. Effects of developmental exposure to toluene on the sexual differentiation of the brain, Japan/China Symposium 2008 (KIZUNA2008): Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization, 2008/10, Tsukuba
5. 塚原伸治. 発達期の性的二型核におけるアポトーシスに関する研究, 日本神経内分泌学会第 35 回学術集会, 2008/08, 東京, (川上賞受賞講演) .
6. Tsukahara S. Sex difference in apoptosis and role of estrogen in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postnatal rats, US/JAPAN Neurosteroid Symposium 2008, 2008/09, 岐阜.
7. 船橋利也、萩原裕子、貴邑富久子、高橋琢哉. AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット 1 のドミナントネガティブ体を雌性ラット視索前野

- に発現させると思春期の発来が遅延する。第 31 回日本神経科学大会、2008/07、東京。
8. 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
9. Endo T, Tohyama 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. 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（招待）
13. 掛山正心、発達期のダイオキシン類曝露による高次脳機能のかく乱、第 20 回環境ホルモン学会講演会、2009/02、東京（招待）
14. Ogawa S. Neuroendocrine Bases of Social and Emotional Behavior. In The 11th IBRO Associate School of Neuroscience, 2009/12, Malaysia.
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. Higo S, Endo T, Sakamoto T, Hajjima 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.
17. 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
18. 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.
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, 2009/12, Miami.
20. 掛山正心. 新たな行動試験～ダイオキシンによる社会行動の異常. 第80回日本衛生学会学術総会, 生体応答研究会「毒性・リスク評価における新たなアプローチ」, 2010/05, 仙台.
21. 掛山正心. ヒトへの外挿を目指した行動毒性試験の開発: ダイオキシンによる高次機能の攪乱. 日本動物心理学会第70回大会シンポジウム「環境化学物質の発達神経毒性研究における動物心理学の役割」, 2010/08, 東京.(招待)
22. 掛山正心・遠山千春. 実験動物高次脳機能評価法の今後の展開. 環境ホルモン学会第13回研究発表会シンポジウム「環境ホルモン研究の今後の方向性」, 2010/12, 東京. (招待)
23. 遠山千春・掛山正心. 化学物質と行動・認知毒性学. 第28回日本医学会総会シンポジウム「環境毒性学の新たな展開」, 2011/05, web開催に変更.
24. 小川園子・坂本敏郎. 周生期環境化学物質曝露が情動・社会行動発達に及ぼす影響. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄. (招待)
26. 尾藤晴彦. 神経回路制御を司る神経活動依存的遺伝子発現と微細形態変化. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄. (招待)
27. 掛山正心. 認知学習試験, 簡易試験, 行動と分子をつなぐ試み. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄. (招待)

28. 小川園子・津田 夢芽子・佐野 一  
広・山口奈緒子・坂本敏郎・Sergei  
Mussatov エストロゲンによる社  
会行動制御の脳内機構：アデノ随伴  
ウイルスを用いた脳部位特異的な  
遺伝子発現操作による解析. 第 87  
回日本生理学会大会シンポジウム  
『情動・社会行動の神経内分泌生理  
学－新しいモデル動物を用いた挑  
戦－』2010/05, 盛岡
29. 佐越祥子・坂本敏郎・小川園子 社  
会的認知及び空間認知機能におけ  
るオキシトシン受容体の役割 第  
70 回日本動物心理学会大会,  
2010/08, 東京
30. 小川園子・津田夢芽子・山口奈緒  
子・坂本敏郎 社会行動、社会的認  
知、社会的絆形成を司る行動神経内  
分泌機. 第 33 回日本神経科学大会  
シンポジウム 2010/09, 神戸
31. Kobayashi, M., Kashimura, M.,  
Yamaguchi, N., Sakamoto, T., Ogawa  
S., 2010 Organizational effects of  
pubertal testosterone on socio-sexual  
and emotional behaviors in male mice.  
The 33rd Annual Meeting of The Japan  
Neuroscience Society, 2010/09, Kobe.
32. Nakata M, Takemoto – Kimura S,  
Akashi N, Sakamoto T, Takeyama M,  
Yamazaki M, Abe M, Natsume R,  
Sakimura K, Takeuchi T, Mori H5,  
Mishina M, Bito H, Ogawa S.  
Behavioral characteristics of CLICK-  
III/CaMKIgamma knockout male mice  
in social and non-social context. The  
33rd Annual Meeting of The Japan  
Neuroscience Society, 2010/09,, Kobe.
33. Takemoto-Kimura S, Kamijo S,  
Horigane S, Suzuki K, Okuno H,  
Haijima A, Endo T, Takeuchi T, Abe M,  
Natsume R, Yamazaki M, Mori H,  
Tohyama C, Sakimura K, Mishina M,  
Takeyama M, Bito H. Histological and  
behavioral analyses in  
CL3/CaMKIgamma-deficient mice  
The 33rd Annual Meeting of The Japan  
Neuroscience Society, 2010/09, Kobe.
34. Endo T, Maekawa F, Voikar V,  
Haijima A, Uemura Y, Zhang Y,  
Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K,  
Wofler DP, Yada T, Tohyama C, Lipp  
HP, Takeyama M. Corridor shuttling  
spatial learning task[1]: Automated  
analysis of behavioral flexibility and  
reversal learning-set in mice using  
IntelliCage system. 40<sup>th</sup> Annual  
meeting of Society for Neuroscience,  
2010/10, San Diego.
35. Takeyama M, Endo T, Tohyama C.  
Corridor shuttling spatial learning  
task[2]: Chemically-induced emotional  
dysfunctions in group-housed mice as