

an animal model of perseveration and social anxiety. 40<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience, 2010/10, San Diego.

**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.)

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

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

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、我々は IntelliCage を用いた新たな行動解析試験プロトコルを開発し、それを用いた周産期ダイオキシン曝露動物の行動解析より、新たな知見を見出した。本研究では、このプロトコルを用いて周産期ビスフェノール A(BPA)曝露動物の行動解析を行った。結果、周産期ダイオキシン曝露動物で認められた学習機能低下や社会行動変化などは周産期 BPA 曝露動物では認められなかった。そのため我々は情動機能に注目した新たな試験プロトコルを開発し、解析を行った。その結果、低用量(40 $\mu$ g/kg b.w./day)曝露群において行動の衝動性が亢進していることを示唆する結果が得られた。次いで、周産期 BPA 曝露動物の生後 14 日目および 21 日目に脳組織より海馬と皮質を採取し、微小管関連タンパクの発現量を測定したところ、低用量、高用量 BPA 曝露動物においてタンパク量の増加が認められた。以上の結果から周産期 BPA 曝露動物において、ダイオキシン曝露動物で見られた影響は表れなかったのに対し、情動機能、衝動性行動の亢進が認められた。また、BPA 曝露動物の乳幼児期における MAP2 の発現増加が、この行動解析でのダイオキシンと BPA の表現型の違いの一因である可能性が示唆された。

研究協力者

小川園子（筑波大学）、宮崎航（東京大学）、遠藤俊裕（東京大学）、齋島旭（東京大学）木村栄輝（東京大学）

A 研究目的

ダイオキシンなどの環境化学物質は化学的な安定性から容易に分解されず、体内に蓄積することが知られている。蓄積した化学物質は妊娠期・授乳

期に臍帯や母乳など母体を介して、胎児・乳児に移行すると考えられている。さらに胎児への曝露影響は母親には影響が出ないような非常に低用量の曝露によっておこされることを示唆する研究が報告されており、低用量での曝露影響が注目されている。特にダイオキシンの周産期曝露は記憶学習機能をはじめとする高次脳機能に影響を及ぼすことが疫学調査や実験動

物での研究で示されている。

我々は昨年度まで、集団型全自動行動解析装置 IntelliCage の新たな学習試験プロトコルを用いて、ダイオキシン周産期曝露動物における学習行動試験を行った。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、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。さらに、免疫組織化学的手法を用いた解析から、低用量特異的な神経活動の変化が前頭前野球および扁桃体で認められた。

本研究ではダイオキシンに続いてビスフェノール A を曝露化学物質とし、同じ IntelliCage の学習行動解析プロトコルを用いて周産期ビスフェノール A 曝露動物の行動解析を行った。合わせてダイオキシン曝露時との表現型の比較を行った。その結果を報告する。

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート製容器をはじめとするプラスチック製品や、歯科治療用シーラントなど多くの製品に原料や可塑剤として用いられている化学物質である。BPA は容易に内容物に溶出し、それらの飲食により体内に取り込まれることが知られている。BPA の毒性として、生殖毒性、内分泌毒性、神経

毒性などが報告されているが、特に胎児期・授乳期において従来の毒性試験では検出されなかった低用量の曝露により、生まれてくる子の中樞神経系に影響を及ぼすことを示唆する報告がなされている。

BPA の脳発達に及ぼす影響については、生殖毒性 (三世代試験) の LOAEL 5  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  に対して 0.005~0.05  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  の曝露で大脳皮質神経細胞の移動促進(Nakamura et al. 2007、グリア細胞増加(Miyatake et al. 2006)、性周期異常や学習習得成績の低下 (H17-H19 厚生労働科学研究小野研究班報告)、性ホルモンに反応して増加するシナプス形成の阻害(MacLusky et al. 2005, Leranth et al. 2008)が報告されている。しかし、神経細胞の移動促進やグリア細胞の増加が、それぞれ、大脳皮質の形成異常やアルツハイマー病(AD)発症リスク増加にむすびつくかどうかの毒性学的な位置づけは不明瞭で、リスク評価指標とするには疑問点が残る上、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。

本研究に用いる IntelliCage は単純な学習・記憶行動でなく、高次の認知機能、情動機能への影響も含めた広範な脳機能への影響解析が行うことができる。さらに我々が新たに開発した高

次認知・学習行動試験プロトコールは高い再現性を持つ。

ダイオキシンで認められた行動変化と同様に BPA 曝露動物における行動変化を本手法を用いて解析することにより、IntelliCage の学習行動試験プロトコールの妥当性を示すとともに、ダイオキシンと BPA との表現型や分子生物学的な違いを検証できるだろう。

## B 研究方法

### (1) 使用した化学物質・試薬類

純度 99%以上のビスフェノール A (BPA) をシグマアルドリッチ社から購入した。溶媒としてコーン油を用いた。発達期のタンパク発現測定のため、MAP2 抗体をシグマアルドリッチ社より購入した。

### (2) 動物と曝露方法

CLEA Japan (東京、日本) より妊娠 5 日齢の C57/BL6 系雌マウスを購入し、体重 1kg あたり 0、40、400  $\mu\text{g/kg}$  の用量の BPA (コーン油に溶解したもの) を妊娠 8 日目から妊娠 18 日までの 11 日間毎日単回経口投与した。生まれてきた仔マウスは生後 21 日目に離乳した。その後 10 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、40  $\mu\text{g/kg}$  濃度で曝露したものを BPA-L 群、同様に 400  $\mu\text{g/kg}$  濃度で曝露したものを BPA-H 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) 実験装置及び学習行動実験手続き

#### IntelliCage 反復逆転課題手続

本試験に用いた IntelliCage システムおよび学習行動試験 (反復逆転課題) 手続きの詳細は昨年度報告書を参照されたい。簡潔に示すと、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ようになる。その後 4 つのコ

コーナーの位置を利用した空間学習課題を開始した。この課題では、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）。

#### **IntelliCage オペラント学習試験手続**

学習行動試験終了後、通常のケージに一時的に戻し2週間飼育した。その後、IntelliCageを2台用い、それぞれのケージに対照群、BPA-40群、BPA-400群を各4匹ずつ、ケージあたり計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）。

まず、各個体が決められた時間にコーナーにアクセスし試験を行うため、各群1匹（各ケージで計3匹）がそれぞれ21:00~23:00, 23:30~1:30, 2:00~4:00, 4:30~6:30の時間にアクセスし、試験が行えるようにした。

初めの1週間は指定時間にコーナーに入り、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

とで飲水できるようにした。各個体が指定時間にアクセスし飲水できていることを確認してから、一度の飲水のために必要なノーズポーク回数を増加させた。増加させる際は飲水できていることおよびマウスが行うノーズポーク回数が増えていることを確認した (FR フェーズ、最大で 20 ノーズポーク/飲水)。FR フェーズで十分にノーズポーク回数が増えていることを確認した後、DRL フェーズに移行した。

DRL フェーズでは、マウスが飲水するために一度ノーズポークを行った後に指定時間待機したのち、再度ノーズポークすると飲水できるという手続きとした。DRL3 ではノーズポーク後に 3 秒間待機し、再度ノーズポークすると飲水できるプログラムであり、DRL6 は待機時間を 6 秒とした。DRL3 を 2 週間行った後、続けて DRL6 をさらに 2 週間行った。

DRL フェーズ終了後、各個体でのコーナーアクセス数、滞在時間、最初のノーズポークから最後のノーズポークまでで各ノーズポーク間の間隔を測定した。

#### (4)タンパク発現解析

周産期 BPA 曝露動物より、生後 14 日目、21 日目に海馬および皮質を回収した。回収した組織は即座に液体窒素

内にて凍結させ、使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ ディープフリーザー内に保存した。タンパク回収のため、凍結組織に冷 Lysis Buffer を添加し、即座にダウンスホモジェナイザーを使って氷上で破碎した。

各組織及び各群の抽出タンパクの濃度を測定し、それぞれ  $5\mu\text{g}$  ずつ使用し、SDS-PAGE 電気泳動でタンパクを大きさごとに分離した。SDS-PAGE ゲルからメンブレンに転写したのち、抗微小管関連タンパク (MAP2) 抗体もしくは抗 GAPDH 抗体を用いて、免疫反応を行った。HRP 標識された 2 次抗体を架橋したのち、HRP 反応基質を用いて化学発光で検出した。検出は ECL-advance Westernblot detection kit(GE ヘルスケア社)の添付プロトコルに沿って行った。

バイオラド社 Image Lab ソフトウェアにて、MAP2 のバンドの認識および強度の測定を行い、GAPDH のバンド強度を用いて標準化した。

#### (5)データ解析

行動試験およびウエスタンブロットのデータは、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により行った。

## C 研究結果

学習行動試験では、対照群、BPA 曝露群とも手続きに基づいて学習行動を行ったが、対照群と BPA 曝露群では有意な差異は認められなかった。つまり、IntelliCage を用いたダイオキシンの経胎盤・母乳曝露で影響が観察された、反復逆転課題学習・固執性・社会的場面での活動性といったパラメータについて BPA 曝露による影響は観察されなかった。(図 1)。

学習行動試験後、2 週間の記憶の消去を行った後、オペラント学習試験を開始した。各群とも指定時間にコーナーにアクセスし飲水できるようになり、FR フェーズが進むにつれ試験中のノーズポーク回数が十分に増加した。DRL3 では各群とも試験が進むにつれてノーズポーク間の時間間隔が長くなっていったが、特に BPA-L 群でノーズポーク間隔が対照群よりも短かった(図 2)。同様に DRL6 においても BPA-L 群のノーズポーク間隔が対照群よりも短かった。BPA-H 群では対照群との有意な差は認められなかった(図 3)。

生後 14 日目、21 日目に海馬および皮質を回収し、神経系細胞マーカーを用いて各タンパクの発現を測定したところ、両 BPA 曝露群において MAP2 の発現が増加していることが観察さ

れた(図 4)。

## D 考察

これまで、我々は IntelliCage を用いた学習行動試験(反復逆転課題)を用いて、ダイオキシン周産期曝露動物を用いた試験によって、特に低用量曝露群において学習機能低下や社会的行動、固執性などの曝露影響を明らかにし、この学習試験プロトコルの再現性・有用性を示してきた。今回我々はこの試験プロトコルの汎用性・妥当性を検証するため、周産期 BPA 曝露動物を用いて、学習行動試験(反復的逆転課題)を行った。今回も学習の獲得など前回の実験結果と同じく高い再現性が確認できたが、周産期 BPA 曝露群ではダイオキシン曝露群で認められた曝露影響は認められなかった。これまでの BPA 曝露影響、特に行動試験においては、再現性に乏しいものが多く、また用量依存性などを検証するための曝露群の作成が不十分であることが懸念されていたが、全自動試験プロトコルを用いることにより、精度の高い試験結果が得られたと考える。

さらに、反復逆転課題では影響が認められなかったことから、IntelliCage を用いた新たなオペラント学習試験プロトコルを作成し、試験を開始し

た。FR フェーズにて十分なノーズポークの増強、つまり報酬を得るために多くのノーズポークを行っている状態にしたのちに、DRL フェーズに移ることにより、プログラムの変化を学習できるかを検証することができる。結果、DRL3 および DRL6 において対照群に比べ BPA-L 群のノーズポーク間隔の短縮が観察された。このことからおそらく BPA-L 群は報酬を得るために指定時間待たなければいけないが、ノーズポークしてしまう「我慢ができない」状態、つまり衝動性が亢進している可能性が示唆された。

衝動性に関してはラットを用いた研究で衝動性の減少（オスの BPA 曝露動物においてメスのフェノタイプに似てくる）が報告されているが（Adriani et al. 2003）、曝露用量が 1 つの用量のみであり、毒性の評価として疑問が残る。一方、我々は再現性の高い IntelliCage の学習プロトコルを利用しているが、反復逆転課題ののちにオペラント学習試験を行っていること、また、低用量特異的な衝動性の亢進が認められたことから、今後、用量並びにオペラント試験プロトコルの再確認が必要だろう。

本研究では発達期の海馬・皮質において MAP2 のタンパク量の増加が認められた。これまで視床下部を用いた

初代神経培養細胞において、BPA 曝露により MAP2 の発現が増加することが報告されている(Yokosuka et al. 2008)。また岩倉博士らは BPA による MAP2 発現増加がエストロゲンを添加した時と同様のメカニズムであることを示唆するデータを発表している(Iwakura et al. 2010)。本研究結果が細胞レベルでの変化に即しているかは不明であるが、周産期 BPA 曝露による分子レベルでの変化が成熟後の行動に異常を起こしている可能性が考えられる。統合失調症患者の死後脳の解析で、前頭前野の MAP2 の発現減少（Jones LB et al. 2002）や海馬での発現増加（Cotter D et al. 2000）が報告されていることから、周産期 BPA 曝露による MAP2 の発現変化が神経変性疾患を引き起こす一つの因子と予想する。合わせて、今年度報告書の別項目にもあるように周産期 BPA 曝露を受けたマウスが成熟後（1.5 歳齢）に、シナプス密度の減少が認められることから、脳内微細形態（神経回路網の形態・システム）の構築や維持に周産期化学物質曝露が影響を及ぼすことが考えられる。

本研究で周産期 BPA 曝露特異的な行動変化が観察することができた。さらにその行動変化が発達期の神経突起などの微細形態の変化により引き



起こされる可能性も示唆された。ただし、本研究課題は評価手法の構築が第一義であり、曝露影響の評価は本来の目的ではないので、例数には限りがあることも申し添えておく。曝露量の検討や再現性の検証も含めて、さらに詳細に吟味し毒性影響を確定してゆくことは、今後の課題といえよう。

## E 参考文献

- Nakamura K, Itoh K, Sugimoto T, Fushiki S. (2007) Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett.*, 420(2):100-5.
- Miyatake M, Miyagawa K, Mizuo K, Narita M, Suzuki T. (2006) Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *J Neuroendocrinol.*, 18(6):434-44.
- MacLusky NJ, Hajszan T, Leranath C. (2005) The environmental estrogen bisphenol a inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environ Health Perspect.*, 113(6):675-9.
- Leranath C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ. (2008) Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(37):14187-91.
- Adriani W, Seta DD, Dessi-Fulgheri F, Farabollini F, Laviola G (2003) Altered profiles of spontaneous novelty seeking, impulsive behavior, and response to D-amphetamine in rats perinatally exposed to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 111(4):395-401.
- Yokosuka M, Ohtani-Kaneko R, Yamashita K, Muraoka D, Kuroda Y, Watanabe C. (2008) Estrogen and environmental estrogenic chemicals exert developmental effects on rat hypothalamic neurons and glias. *Toxicol In Vitro.* 22(1):1-9.
- Iwakura T, Iwafuchi M, Muraoka D, Yokosuka M, Shiga T, Watanabe C, Ohtani-Kaneko R. (2010) In vitro effects of bisphenol A on developing hypothalamic neurons. *Toxicology.* 272(1-3):52-8.

Cotter D, Wilson S, Roberts E, Kerwin R, Overall IP. (2000) Increased dendritic MAP2 expression in the hippocampus in schizophrenia. *Schizophr Res.* 41(2):313-23.

Jones LB, Johnson N, Byne W. (2002) Alterations in MAP2 immunocytochemistry in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *Psychiatry Res.* 114(3):137-48.

#### G. 健康危険情報

特に無し

#### H. 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

#### I. 図の説明

図1 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。

図2 オペラント学習試験 DRL3 における日にちごとのノーズポーク間隔。エラーバーはSEM。

図3 オペラント学習試験 DRL3 における日にちごとのノーズポーク間隔。エラーバーはSEM。

図4 生後14日目、21日目のMAP2発現量。グラフはMAP2バンド強度をbeta-actinのバンド強度で標準化した。

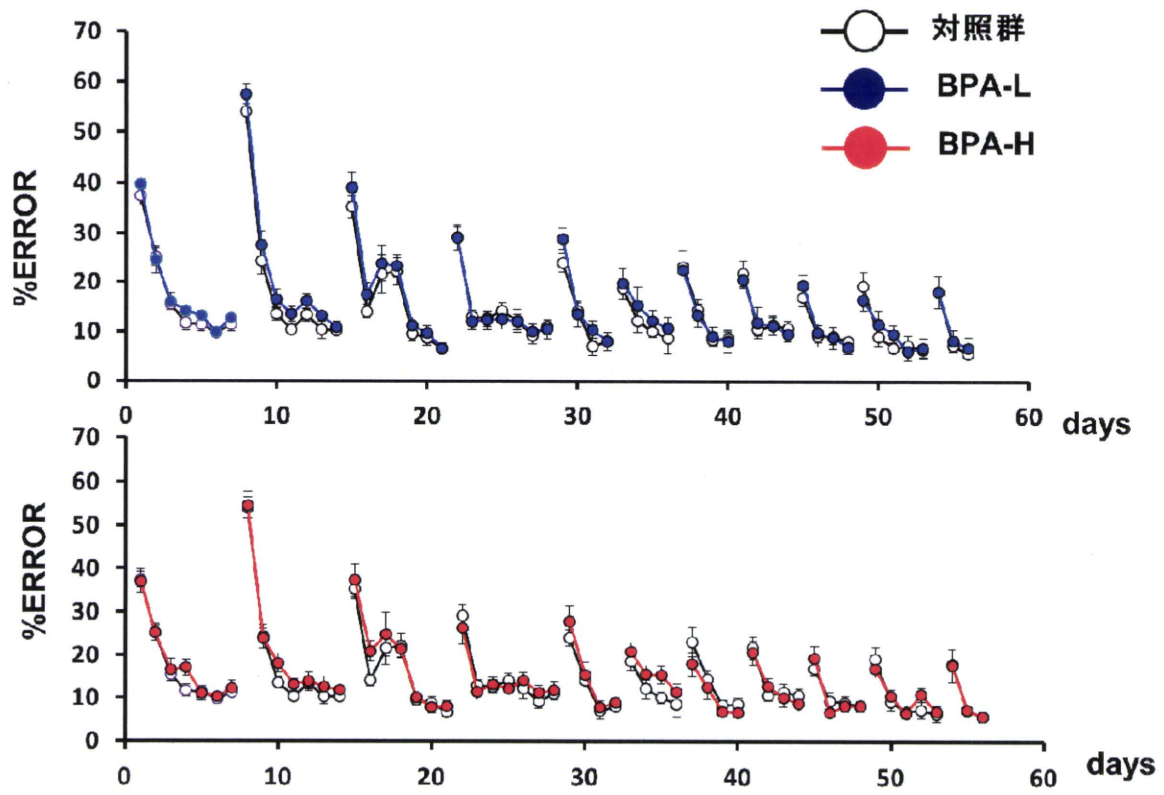


图 1

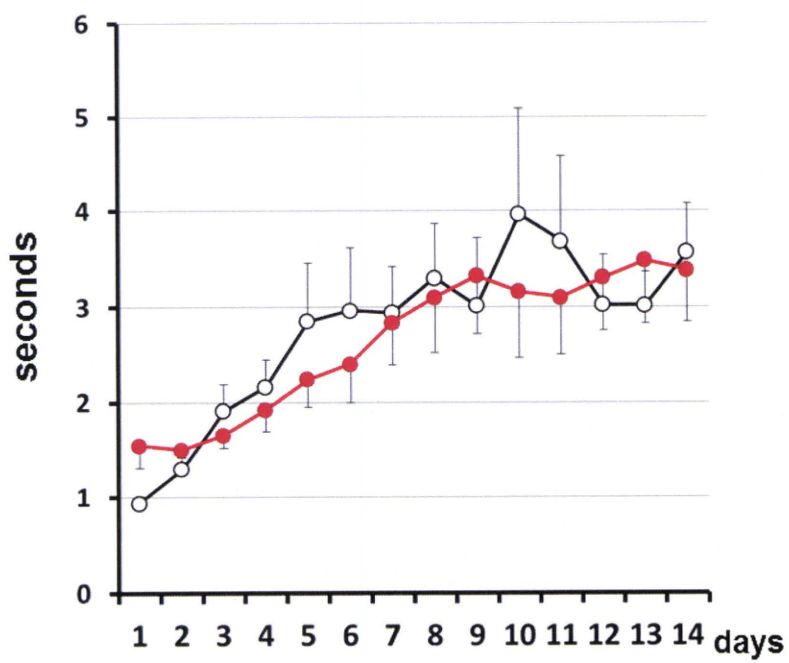
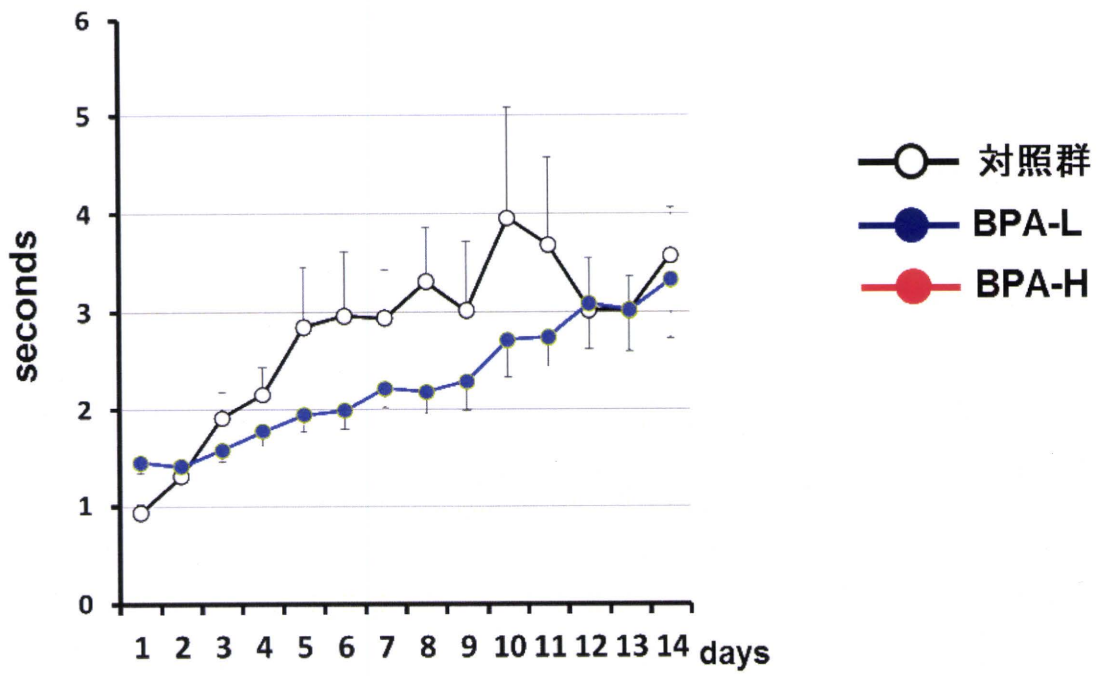


图 2

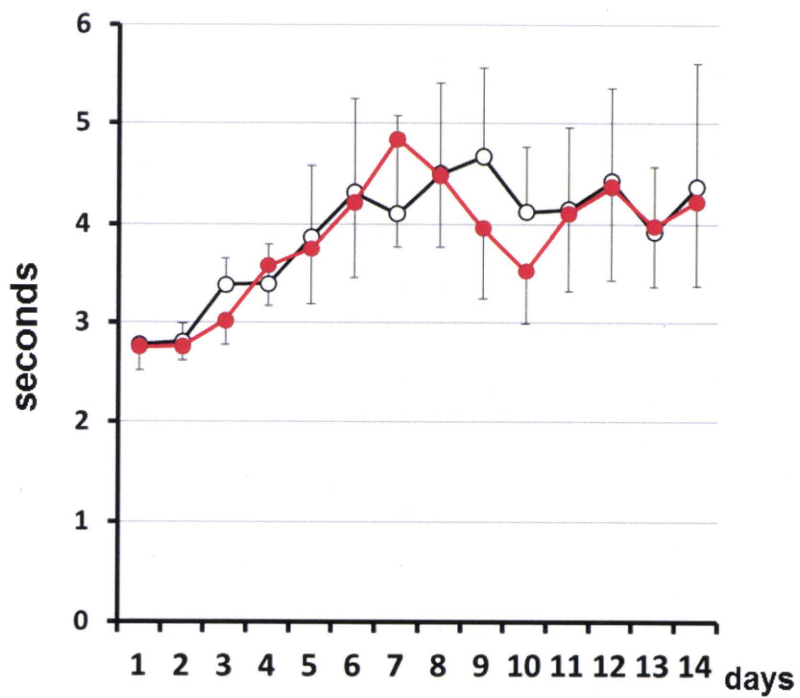
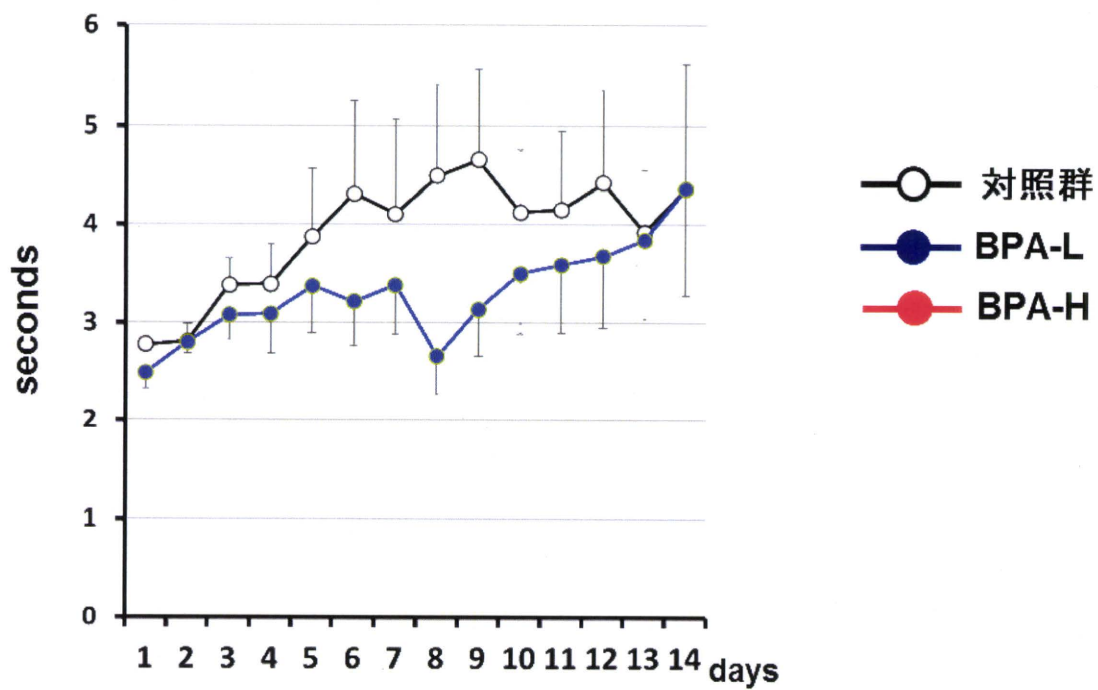


图 3

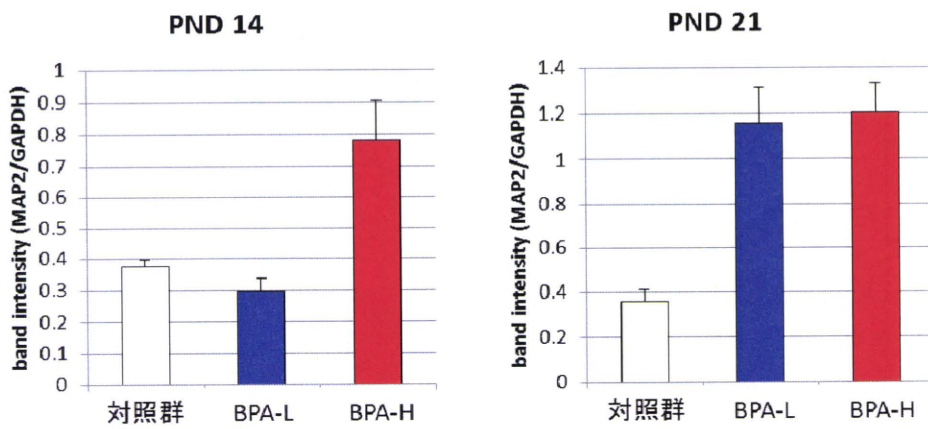


图 4

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

研究代表者 掛山 正心  
東京大学大学院医学系研究科 助教

研究要旨

我々はこれまでに、周産期における低用量ダイオキシン曝露による脳へに影響について、行動レベルでのフェノタイプを複数明らかにしてきた。また本年度、評価手法の妥当性を検証するためにビスフェノールAの曝露実験も行い、その行動影響も明らかにした。そこで本研究では、行動実験と同腹の曝露マウスを用いて、すなわち行動影響の見られた曝露条件において微細形態への影響について解析を行った。その結果、1.5歳齢の曝露マウスにおいて、特に海馬領域の微細形態に異常があることを見出した。1.5歳齢は老年期に差し掛かる時期といえ、すなわち周産期のダイオキシンやビスフェノールAの曝露が脳の早老化を引き起こす可能性があるという、新たな知見を見出した。

研究協力者

尾藤晴彦（東京大学大学院医学系研究科神経生化学）、塚原伸治（埼玉大学大学院理工学研究科）、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）、齋島旭（東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター）、木村栄輝（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

毒性試験における行動変化を科学的に裏付けるためには、解剖組織レベル、細胞分子レベルでの裏付けはある

ことが望ましく、本研究でも行動試験だけでなく、解剖組織から分子レベルまでの手法を包括的に用いて評価するための試験法を構築することを目的としている。しかし重篤な精神症状を来す疾患においても形態レベルでの異常は観察されておらず、一般的な解剖所見や組織学検査では検出できない異常が、精神疾患の重篤症状を引き起こすと考えられる。我々が曝露実験の陽性条件の中心に用いているダイオキシンについても、脳形態の変化に関する報告は皆無に等しい。

一方、脳科学の基礎研究分野では、

イメージング解析技術の進展により、これまで脳の形態学的変化はないとみなされてきた統合失調症やうつ病などの精神疾患において、大脳形成時の細胞形態異常や微細形態の変化が相次いで発見されている(Duan et al. 2007; Eskandari et al. 2007; Marchetto et al. 2010)。

そしてダイオキシンに関しては本研究班において、神経細胞骨格に関わる遺伝子の発現量がダイオキシン曝露動物で変化していたことを報告している(平成21年度化学物質リスク研究事業掛山班報告書)。さらにビスフェノールAに関しては、MacLusky博士研究グループが、卵巣を摘出し食物エストロゲン除去飼料での飼育した場合に、という条件つきであるが、霊長類において、曝露により微細形態の変化があることが米国科学アカデミー紀要(PNAS)に報告され、我が国の新聞でも取り上げられるほど話題となった(Leranth et al. 2008; 読売新聞2008年9月6日)。

脳の微細形態は情報伝達や記憶メカニズムの基本構造であり(Engert & Bonhoeffer 1999)、アルツハイマー病に伴う認知症にも関係すると考えられているが(Vickers et al., 1994)、毒性試験として微細形態変化に着目した研究は極めて乏しい。そこで本研究では、

マウスの微細形態変化に関する評価系を構築し、行動変化に伴う脳微細形態の有無、ならびに化学物質曝露が脳の老化に及ぼす影響について解析することを目的として、周産期のダイオキシンあるいはビスフェノール A 曝露による脳微細形態変化について、老齢マウスを用いて解析を行った。

## B 研究方法

### 1. 試験材料

純度 99.5%以上の TCDD を Cambridge Isotope Laboratory より購入した。ビスフェノール A (以下、BPA) はシグマアルドリッチ社より購入した。溶媒となるコーン油および N-ノナンはナカライテスク社製のものを用いた。

### 2. 実験動物および飼育条件

妊娠 5 日目の C57BL/6J 系メスマウス(クレアジャパン社)を、気温 22-24 度、湿度 30-60%，12 時間の明暗周期(8:00-20:00 が明期)の条件下で個別に飼育した。餌および水は自由摂取とした。

### 3. 曝露方法

ダイオキシン曝露実験に関しては、妊娠 12.5 日目に、0 または 0.6, 3.0  $\mu$ g/kg TCDD を経口で単回投与した。



BPA 曝露実験については、は妊娠 8 日目から妊娠 18 日目までの 11 日間、母マウスに対して 0 または 40, 400  $\mu$ g/kg/day の BPA を毎日経口投与した。

各群の子どもは生後 21 日目に離乳し、各腹から 1 匹ずつ取り出し、それぞれの群ごとに 4-5 匹で集団飼育した。

#### 4. 組織試料の採取と解析

曝露マウスが 1.5 歳齢になってから、Amateau & McCarthy (2004) に基づいて脳組織を回収、前頭葉、海馬、扁桃体についてゴルジ染色を行った。微細形態解析は Leica インテリジェント顕微鏡と Stereo Investigator 解析システムを用い、ステレオロジー解析を行った。

#### C 研究結果

TCDD 曝露動物に関する解析では、海馬 CA1 領域において曝露用量依存的なスパイン密度の減少があった (図 1)。前頭葉 (帯状皮質)、扁桃体、海馬歯状回では有意な影響は認められなかった。海馬 CA1 領域でさらに詳細な解析を行ったところ、スパイン面積、スパイン周囲長、真円度については変化を認めなかった (図 3)。スパイン長軸短軸比では減少傾向が観察された。BPA 曝露動物に関する解析では、海馬 CA1 領域において曝露によ

るスパイン密度減少影響を見出した (図 2)。前頭葉、扁桃体、海馬歯状回では影響は観察されず、樹状突起の長さ、スパイン面積、スパイン周囲長、スパインの真円度、スパイン長軸短軸比にも影響は認められなかった。

#### D 考察

今回我々は、老年期に差し掛かる時期といえる 1.5 歳齢において、ダイオキシンやビスフェノール A の経胎盤・経母乳曝露により海馬のスパイン密度が減少することを見出した。

スパインとは神経細胞の樹状突起から突き出ている小区画であり、脳のほとんどの興奮性シナプスの入力を受け取る部位である。よってスパイン密度の減少は、神経情報伝達機能の低下を意味すると考えられている。

医科学分野では、海馬 CA1 領域のスパイン密度減少は、うつ病や自閉症、統合失調症との関連があるとして注目されており (Duan et al. 2007; Eskandari et al. 2007; Marchetto et al. 2010)、今回の結果は、ダイオキシン曝露が精神神経症状を引き起こするという我々のこれまでの知見をサポートする新たな根拠データとなりうる。

さらに、海馬 CA1 領域でのスパイン密度低下により恐怖条件付けでの

恐怖記憶低下があることが報告されており(Rabenstein et al. 2005)、これは我々が報告した TCDD 曝露動物における同試験結果 (Hajjima et al. 2010, 平成 20 年度化学物質リスク研究事業掛山班報告書) と、量-反応関係も含めて一致している。すなわち行動変化を微細形態レベルで裏付ける一例となったと言える成果である。

さらに、ごく最近になって Ebert 博士研究チームは、複数のアルツハイマー病モデルマウスに共通して、海馬 CA1 領域のスパイン密度低下があることを見出し(Perez-Cruz et al. 2011)、話題となっている。すなわち、1.5 歳齢において、ダイオキシン、ビスフェノール A の経胎盤・経母乳曝露によってもたらされたスパイン密度減少影響は、発達期の化学物質曝露により脳の老化が促進されるという晩発性影響の可能性を示す結果でもある。

これらアルツハイマー病モデルマウスなどの神経変性疾患モデル動物を我々が開発した Arina、KODOMO、IntelliCage などの行動解析法を用い、同時に微細形態を検証していくことにより、化学物質の曝露影響をより明確にできるかもしれない。

発達期の化学物質曝露による曝露影響についてはこれまで、成熟期における影響をとりあげたものがほとん

どで、このような晩発性影響に関する取り組みは極めて乏しい。例えばビスフェノール A に関しては、微細形態への影響について先行研究がある (Lenerth et al. 2008)ものの、卵巣を摘出し特殊飼料により飼育することによってエストロゲン濃度を限界まで低下させた状態で観察されるもので、老化への影響として確認されたものではない。一方、我々は発達期 TCDD もしくは BPA 曝露による老齢期でのスパイン変化を見出したが、今回の主たる目的が試験法の構築であり、研究規模の関係から各群 3~4 個体の解析にとどまっている。BPA の影響については、曝露用量の検討も含めて、再度検証する必要があるだろう。

もともと発達期の曝露 (による認知・行動への) 影響は、曝露直後に影響が顕れるのではなく、脳や身体が機能的に成長してゆく中で、あるいは成熟してから顕在化することが多いのは当然である。新生児に大学入試問題が解けないように、また如何に聡明な幼稚園児であってもその時点では法学部なのか医学部なのか進路や適性がわからないように、成長の過程で新たな機能を獲得し成熟し、個性を発揮してゆくヒトの脳機能を、発達途中で見極めることはできないだろう。

そのため、今回のような老年期での

スパイン密度の減少に関して、発達時系列を追ってどの成長段階でシナプス密度の変化が起きているかをとらえることが一つの研究戦略と考えている。また、周産期化学物質曝露により老化の促進が考えられることから、シナプスのみならず、老化を示すマーカー等による検証が必要だろう。

今回見られたような、さらに加齢が進んでから顕れる晩発性影響は、原因（曝露）と結果（影響）との間に時間的な隔たりがあり、因果関係をつかみにくい。このような晩発性影響や、もともと因果関係の捉えにくい認知・行動影響については、個体レベルでの現象に着目した研究手法のさらなる開発とそれを用いた断定的評価を進める必要があるだろう。

## F 参考文献

Duan X, Chang JH, Ge S, Faulkner RL, Kim JY, Kitabatake Y, Liu XB, Yang CH, Jordan JD, Ma DK, Liu CY, Ganesan S, Cheng HJ, Ming GL, Lu B, Song H (2007) Disrupted-In-Schizophrenia 1 regulates integration of newly generated neurons in the adult brain. *Cell*. 130:1146-1158.

Eskandari F, Martinez PE, Torvik S, Phillips TM, Sternberg EM, Mistry S,

Ronsaville D, Wesley R, Toomey C, Sebring NG, Reynolds JC, Blackman MR, Calis KA, Gold PW, Cizza G (2007) Low bone mass in premenopausal women with depression. *Arch Intern Med*. 167:2329-2336.

Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 143:527-539.

Leranth C, Hajszan T, Szigeti-Buck K, Bober J, MacLusky NJ (2008) Bisphenol A prevents the synaptogenic response to estradiol in hippocampus and prefrontal cortex of ovariectomized nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:14187-14191.

Engert F, Bonhoeffer T. (1999) Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*. 1999 399:66-70.

Vickers JC, Riederer BM, Marugg RA, Buée-Scherrer V, Buée L, Delacourte A, Morrison JH (1994) Alterations in neurofilament protein immunoreactivity

in human hippocampal neurons related to normal aging and Alzheimer's disease. Neuroscience. 62, 1-13.

Amateau SK and McCarthy MM (2004) Induction of PGE2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. Nature Neuroscience 7:643-650.

Rabenstein RL, Addy NA, Caldarone BJ, Asaka Y, Gruenbaum LM, Peters LL, Gilligan DM, Fitzsimonds RM, Picciotto MR (2005) Impaired synaptic plasticity and learning in mice lacking beta-adducin, an actin-regulating protein. J Neurosci. 25:2138-2145.

Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Takeyama M\* (\*Corresponding Author), Tohyama C (2010) In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. Neurotoxicology. 31:385-90.

Perez-Cruz C, Nolte MW, van Gaalen MM, Rustay NR, Termont A, Tanghe A, Kirchhoff F, Ebert U (2011) Reduced spine density in specific regions of CA1 pyramidal neurons in two transgenic

mouse models of Alzheimer's disease. J Neurosci. 31:3926-3934.

G. 健康危険情報 特に無し

H. 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

I. 図の説明

図1. ダイオキシンの胎仔期・授乳期低用量曝露が加齢後のスパイン密度に及ぼす影響. 扁桃体、前頭葉（帯状皮質）、海馬（CA1, 歯状回）におけるスパイン密度の変化.

図2. ビスフェノールAの胎仔期・授乳期低用量曝露が加齢後のスパイン密度に及ぼす影響. 扁桃体、前頭葉（帯状皮質）、海馬（CA1, 歯状回）におけるスパイン密度の変化.