

図3. (A)ダイオキシン、(B)ビスフェノールAの胎仔期・授乳期低用量曝露マウスにおける加齢後のスパイン形態形態解析. 海馬 CA1 領域におけるスパイン形態解析.

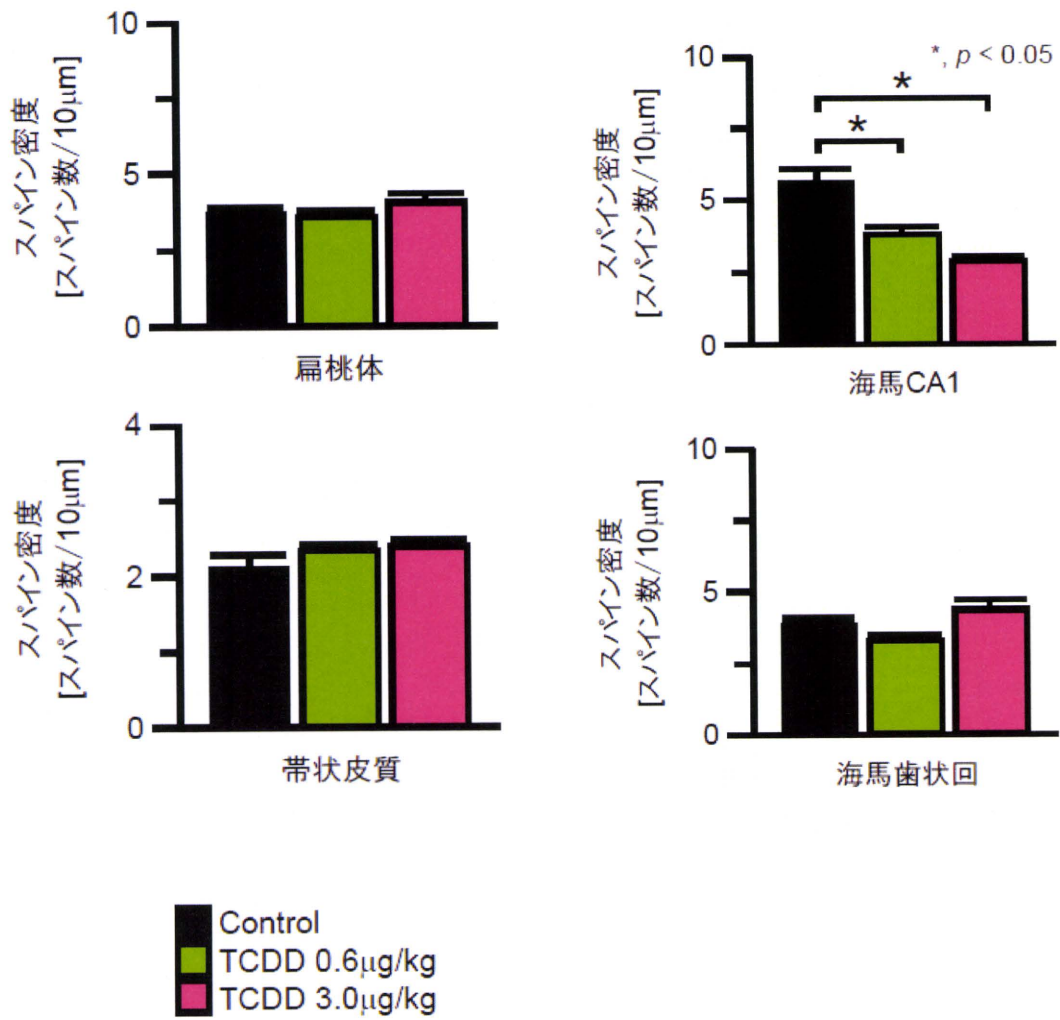


図 1.ダイオキシン発達期曝露が加齢後のスパイン密度に及ぼす影響

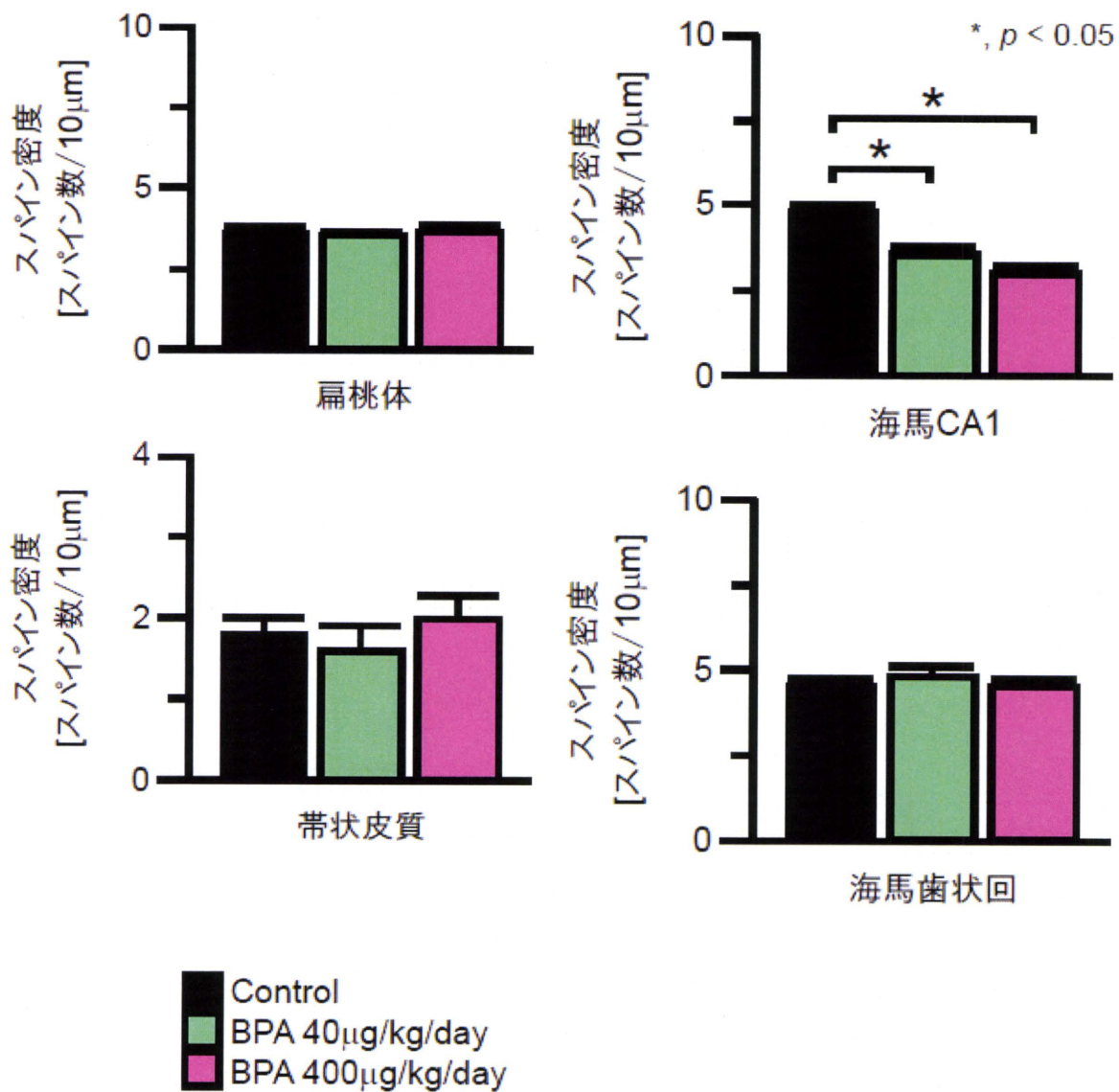


図2.ビスフェノールA発達期曝露が加齢後のスパイン密度に及ぼす影響

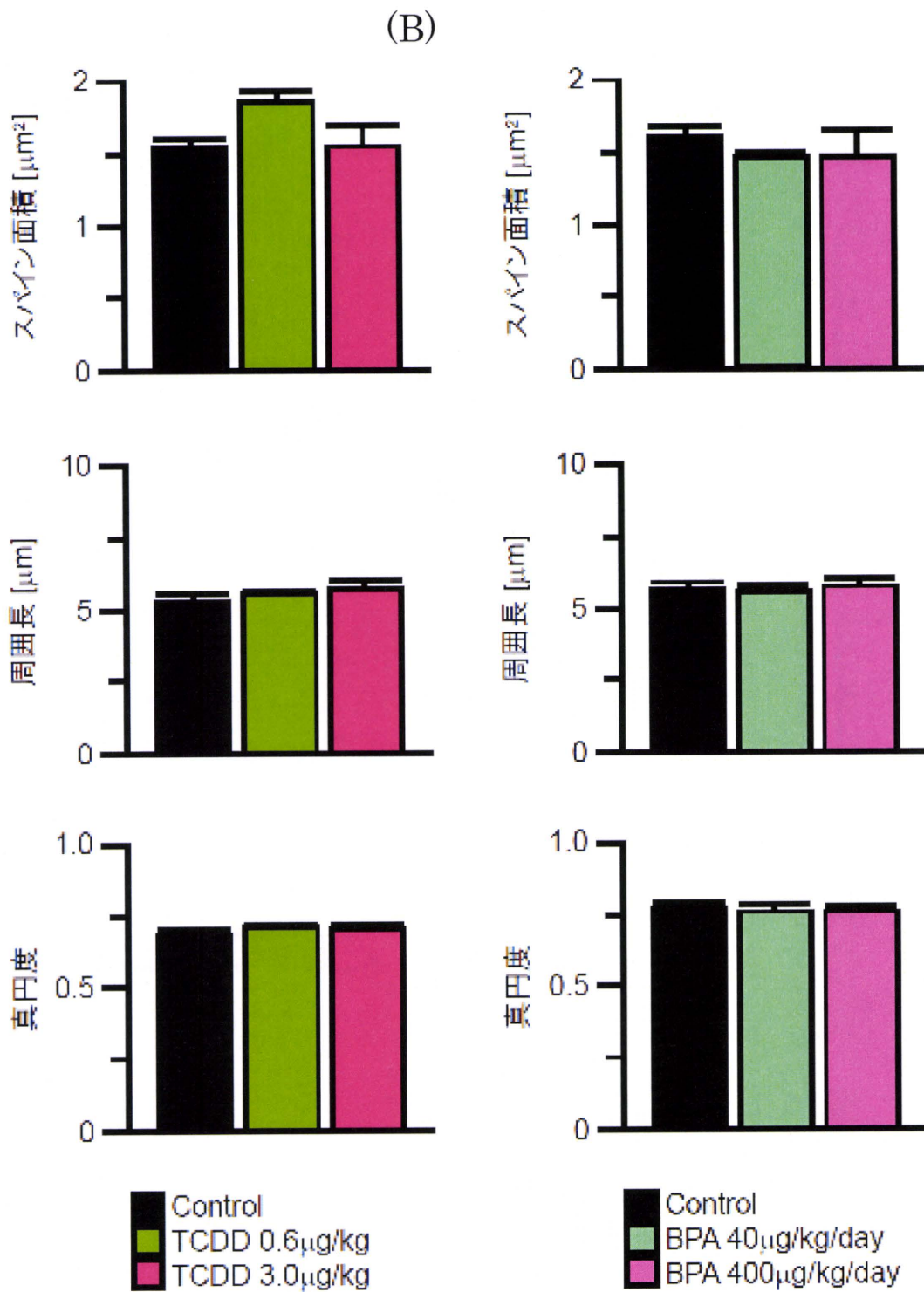


図3.ダイオキシン、ビスフェノールA発達期曝露マウスの加齢後におけるスパイン形態解析

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

胎仔期・授乳期におけるダ低用量イオキシシ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

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

我々のこれまでの研究から、胎仔期・授乳期の TCDD 曝露が、成熟後の子どもの情動行動に異常が生じることが明らかとなってきた。しかし、これらの動物の脳内で、情動機能に関わる領域や物質にどのような変化が生じているのかについてはよく分かっていない。そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィーを用いて、低用量の TCDD の胎仔期・授乳期曝露が成熟後の子どもの脳内モノアミン量に影響を及ぼすかについて検討した。その結果、TCDD 曝露群で、腹側被蓋野および腹側海馬のドーパミンとその代謝物質量が対照群と比べて有意に増加していた。腹側被蓋野から腹側海馬へ投射するドーパミン神経系は、認知・情動機能に重要な役割を果たしていると考えられていることから、TCDD 曝露によって生じる行動異常には、脳内モノアミン系への影響を介したものであることが示唆された。またこの結果は、これまで我々の得た知見と一致するものであった。

研究協力者

船橋利也（聖マリアンナ医科大学）、
齧島旭（東京大学大学院医学系研究科
疾患生命工学センター）、張艶（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 TCDD の胎
仔期・授乳期曝露が成熟後の子どもの
脳内モノアミン量へ及ぼす影響につ

いて検討した。ダイオキシシは、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)。

これまでの我々の研究から、TCDD
の胎仔期・授乳期曝露によって、学習
試験の遂行に異常が生じるだけでな

く、情動行動も変化することが明らかとなってきた (Haijima et al., 2010). しかし、脳内で情動機能に関わる領域あるいは物質にどのような変化が生じているかについてはいまだによく分かっていない. TCDD の発達神経毒性影響を包括的に理解するためには、行動への影響とそれに関連する脳への影響を結びつける必要がある.

セロトニン (Serotonin; 5-HT) やドパミン (Dopamine; DA) に代表される脳内モノアミン系は、情動機能に深く関係していることが知られており、これらの神経系の異常は、うつ病や統合失調症など精神疾患の原因の一つであると考えられている (Owens and Nemeroff, 1994; Guillin et al., 2007; Remington, 2008; Stein, 2008; Nemeroff and Owens, 2009). 成体期の動物への連続投与や *in vitro* といった実験系では、TCDD 曝露が 5-HT や DA 系に影響を及ぼすことが報告されていることから (Akahoshi et al., 2006; Byers et al., 2006; Akahoshi et al., 2009), 胎仔期・授乳期曝露によってもこれらの神経系に異常が生じている可能性が考えられる.

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて、TCDD の胎仔期・授乳期曝露による脳内モノアミン量への影響について検

討した.

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、0.6 または $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD を経口で投与した (それぞれ TC0.6, TC3.0 群とする). 対照群には溶媒であるコーン油を投与した. 脳内モノアミン量の測定には、これらの母獣から生まれた 30-36 週齢の雄マウスを用いた.

(2) 脳組織サンプリング

脳組織を摘出後、粉末ドライアイスにて凍結した. 低温冷却装置中 (-20°C) でステンレス製スライサとカミソリを用い、厚さ 1 mm の凍結切片を作成した. Mouse Brain Atlas (Franklin and Paxinos, 2007) に従い、各切片から黒質、線条体、腹側被蓋野、側坐核、正中縫線核、背側縫線核、前部帯状皮質、後部帯状皮質、扁桃核、背側海馬および腹側海馬の 11 領域を、ステンレス製パンチャーでパンチアウトした.

その後、2.0 mM 亜硫酸水素ナトリウムと 0.02 mM EDTA を含む 0.1 M 過塩素酸溶液中でホモジナイズを行ない、得られたホモジネートは 12,000G、 4°C の条件下で 5 分間遠心

分離を行った。遠心後、上清を孔径 0.45 μm のメンブランフィルターにて濾過し、得られた濾液を HPLC の検体とした。

(3) 脳内モノアミンとその代謝物質の測定

モノアミン (DA, 5-HT) 及びその代謝物質 (DOPAC, HVA, 5-HIAA) 含量の測定は、電気化学検出器付き高速液体クロマトグラフィ (HPLC-ECD) (Waters 社・Dionex 社) で測定した。電気化学検出器には、Model 5011 High sensitive analytical cell (ESA) と Model 5020 guard cell (ESA) を用いた。測定用カラムには逆相カラム (3.0 \times 75 mm ; Acclaim 120 C18, Dionex) を使用した。移動相はリン酸二ナトリウム、クエン酸、ヘプタンスルホン酸ナトリウム、エチレンジアミノ四酢酸二ナトリウム、リン酸、アセトニトリル、メタノールを使用し、流速 0.4 ml/min にて測定した。Isoproterenol を内部標準化合物として使用した。

C 研究結果

DA の主要な投射経路である黒質、線条体および腹側被蓋野、側坐核の各群のモノアミン関連物質含有量を図 1 から図 4 にそれぞれ示した。黒質 (図

1)、線条体 (図 2) および側坐核 (図 4) においては各物質の含有量に有意な違いはなかった。一方、腹側被蓋野では、TC0.6 群の、DA 含有量が対照群及び TC3.0 群より有意に高く (DA: $F_{(2,26)} = 4.228$, $p < 0.05$), DOPAC, HVA 含有量が TC3.0 群より有意に高かった (DOPAC: $F_{(2,26)} = 5.121$, $p < 0.05$; HVA: $F_{(2,26)} = 5.354$, $p < 0.05$) (図 3)。

図 5 および図 6 に、5-HT の起始核である正中縫線核と背側縫線核の結果を示した。いずれの物質に関しても群間で有意な違いはなかった。

認知・情動機能に重要であると考えられている前部および後部帯状皮質の結果を図 7 および図 8 に示した。これら的大脑新皮質領域ではいずれの物質においても有意な違いはなかった。

図 9 から図 11 に、大腦辺縁系の一部であり認知・情動機能に深く関与していることが知られている扁桃核と背側および腹側海馬の結果を示した。扁桃核においては、全ての物質において有意な違いはなかった (図 9)。海馬については、背側部と腹側部で機能が異なると考えられているため、これらの領域を分けて測定した。背側海馬では、全ての物質において有意な違いはなかった (図 10)。一方、腹側海馬で

は、TC0.6 と TC3.0 群の DA 含有量が対照群と比較して有意に増加していた ($F_{(2,26)} = 7.790, p < 0.05$) (図 11).

D 考察

本研究の結果から、TCDD の胎仔期・授乳期曝露は、低用量の曝露量であっても、仔マウスが成育した後、脳内のモノアミン神経系に影響を及ぼしていることが示された。その影響は脳部位によって異なり、曝露用量によっても異なる影響を与えることが明らかとなった。これまでに報告されている低用量 TCDD の胎仔期・授乳期曝露による情動異常との関連を示唆する結果が得られた。

TC0.6 群では腹側被蓋野および腹側海馬、TC3.0 群では腹側海馬の DA とその代謝物質の含有量が有意に増加していた。これまでの研究から、成体期のラットに数日から数週間連続的に TCDD を投与すると、DA や 5-HT など脳内モノアミン量が増加すること (Rozman et al., 1991; Byers et al., 2006) や、神経芽細胞腫の Neuro2a 細胞に TCDD を曝露すると、DA の合成酵素である TH 遺伝子の mRNA 量が増加することが報告されており (Akahoshi et al., 2006; Akahoshi et al., 2009)、TCDD は脳内モノアミン系、特に DA 神経系に影響を及ぼすことが示唆されている。本研究の結果は、胎仔期・授乳期の TCDD 曝露によっても DA 量を増加させるという影響を及ぼすことを示すとともに、これまでの知見と一致するものであったといえる。

腹側被蓋野を起始領域として、大脳新皮質・扁桃核・側坐核・海馬などの領域へ投射する DA 神経系は、情動・認知・記憶などの高次機能に重要な役割を果たしていると考えられている (Laviolette and Grace, 2006; Rossato et al., 2009)。上述の通り、本研究では腹側被蓋野と腹側海馬の DA 神経系が TCDD の胎仔期・授乳期曝露によって影響を受けることが示された。これらの領域には密接な関係があることが知られており、腹側被蓋野から海馬への投射は、背側部より腹側部の方が顕著であること (Gasbarri et al., 1997) や、腹側海馬が腹側被蓋野の DA ニューロンの働きを制御していること (Legault and Wise, 1999; Floresco et al., 2003; Lodge and Grace, 2006)、腹側海馬の機能異常が生じると、腹側被蓋野に存在する DA ニューロンが増えること (Lodge and Grace, 2010) などが報告されている。これらの先行研究の知見と本研究の結果を合わせて考えると、TCDD 曝露が腹側被蓋野に影響を及ぼしたこと

を及ぼすことが示唆されている。本研究の結果は、胎仔期・授乳期の TCDD 曝露によっても DA 量を増加させるという影響を及ぼすことを示すとともに、これまでの知見と一致するものであったといえる。

でDAニューロンまたはDA合成が増加し、それによって腹側海馬のDA含有量が増加した可能性と、腹側海馬がTCDD曝露によって機能異常を起こし、それによって腹側被蓋野のDA量が増加した可能性、あるいはその両方という三つが考えられる。しかしながら、本研究の結果からTCDD曝露の影響が上記いずれの可能性であるかを断定するのは難しい。この点については、今後さらに検討していく必要がある。

海馬が学習・記憶さらには情動機能に非常に重要な役割を果たしていることはよく知られているが、ラットやマウスでは背側部と腹側部で役割が異なることが、これまで様々な研究から報告されてきた。例えば、背側部と腹側部では求心性および遠心性の神経連絡が異なることが古くから知られている (Swanson and Cowan, 1977)。また、背側海馬を損傷すると水迷路や放射状迷路などの空間記憶課題の遂行に障害が生じるが、腹側海馬を損傷しても障害が現れないことが報告されてきた (Pothuizen et al., 2004)。一方で、高架式十字迷路などを用いた不安様行動、ストレス反応、恐怖条件づけなど情動機能も必要とされる行動試験においては、腹側海馬損傷によってより顕著な情動異常が

生じることが報告されている (Barkus et al., 2010; Henke, 1990; Kjelstrup et al., 2002)。これらのことから、腹側海馬は情動・記憶機能を統合するような役割を果たしていると考えられる。また、これまでは海馬のNMDA受容体がこれらの機能に中心的な役割を果たしていると考えられてきたが、DA受容体も関与していることが明らかになってきた (Rossato et al., 2009)。したがって、本研究において腹側海馬でのみ変化が見られたことは、投射様式の違いを反映しているのかもしれない。また我々は、本研究で用いたのと同用量のTCDDを胎仔期・授乳期曝露すると、雄において恐怖条件づけの遂行に異常が生じることを報告している (Haijima et al., 2010) が、本研究の結果は、腹側被蓋野-腹側海馬のDA系がTCDD曝露によって変容したことによってこのような異常が生じたことを示唆するものである。

E 引用文献

Akahoshi, E., Yoshimura, S., Ishihara-Sugano, M. Over-expression of AhR (aryl hydrocarbon receptor) induces neural differentiation of Neuro2a cells: neurotoxicology study. Environ

Health 2006;5:24.

Akahoshi, E., Yoshimura, S., Uruno, S., Ishihara-Sugano, M.. Effect of dioxins on regulation of tyrosine hydroxylase gene expression by aryl hydrocarbon receptor: a neurotoxicology study. Environ Health 2009;8:24.

Barkus, C., McHugh, S.B., Sprengel, R., Seeburg, P.H., Rawlins, J.N., Bannerman, D.M. Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion. Eur J Pharmacol 2010;626: 49-56.

Byers, J.P., Masters, K., Sarver, J.G., Hassoun, E.A. Association between the levels of biogenic amines and superoxide anion production in brain regions of rats after subchronic exposure to TCDD. Toxicology 2006;228:291-298.

Darras VM. Endocrine disrupting polyhalogenated organic pollutants interfere with thyroid hormone signalling in the developing brain. Cerebellum 2008;7:26-37.

Floresco, S.B., West, A.R., Ash, B., Moore, H., Grace, A.A. Afferent modulation of dopamine neuron firing differentially regulates tonic and phasic dopamine transmission. Nat Neurosci 2003;6:968-973.

Gasbarri, A., Sulli, A., Packard, M.G. The dopaminergic mesencephalic projections to the hippocampal formation in the rat. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 1997;21:1-22.

Guillin, O., Abi-Dargham, A., Laruelle, M. Neurobiology of dopamine in schizophrenia. Int Rev Neurobiol 2007;78:1-39.

Hajjima 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. 2010;31:385-90.

Henke, P.G. Hippocampal pathway to the amygdala and stress ulcer

development. *Brain Res Bull* 1990;25:691-695.

Takeyama M, Tohyama C. Developmental neurotoxicity of dioxin and its related compounds. *Ind Health* 2003;41:215-30.

Kjelstrup, K.G., Tuvnes, F.A., Steffenach, H.A., Murison, R., Moser, E.I., Moser, M.B. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:10825-10830.

Laviolette, S.R., Grace, A.A. The roles of cannabinoid and dopamine receptor systems in neural emotional learning circuits: implications for schizophrenia and addiction. *Cell Mol Life Sci* 2006;63:1597-1613.

Legault, M., Wise, R.A. Injections of N-methyl-D-aspartate into the ventral hippocampus increase extracellular dopamine in the ventral tegmental area and nucleus accumbens. *Synapse* 1999;31:241-249.

Lodge, D.J., Grace, A.A. Developmental pathology, dopamine, stress and schizophrenia. *Int J Dev Neurosci* 2010.

Lodge, D.J., Grace, A.A. The hippocampus modulates dopamine neuron responsivity by regulating the intensity of phasic neuron activation.

Neuropsychopharmacology 2006;31:1356-1361.

Nemeroff, C.B., and Owens, M.J. The role of serotonin in the pathophysiology of depression: as important as ever. *Clin Chem* 2009;55:1578-1579.

Owens, M.J., Nemeroff, C.B. Role of serotonin in the pathophysiology of depression: focus on the serotonin transporter. *Clin Chem* 1994;40:288-295.

Pothuizen, H.H., Zhang, W.N., Jongen-Relo, A.L., Feldon, J., and Yee, B.K. (2004). Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial

learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *Eur J Neurosci* 19, 705-712.

Remington, G. Alterations of dopamine and serotonin transmission in schizophrenia. *Prog Brain Res* 2008;172:117-140.

Rossato, J.I., Bevilacqua, L.R., Izquierdo, I., Medina, J.H., Cammarota, M. Dopamine controls persistence of long-term memory storage. *Science* 2009;325:1017-1020.

Rozman, K., Pfeifer, B., Kerecsen, L., and Alper, R.H. Is a serotonergic mechanism involved in 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)-induced appetite suppression in the Sprague-Dawley rat? *Arch Toxicol* 1991;65:124-128.

Stein, D.J. Depression, anhedonia, and psychomotor symptoms: the role of dopaminergic neurocircuitry. *CNS Spectr* 2008;13:561-565.

Swanson, L.W., Cowan, W.M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *J Comp Neurol* 1977;172:49-84.

F 図の説明

図 1 黒質における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 2 線条体における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 3 腹側被蓋野における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.
* $P < 0.05$, vs 対照群. # $P < 0.05$, vs TC3.0 群.

図 4 側坐核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 5 正中縫線核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 6 背側縫線核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 7 前部帯状皮質における各群の (A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 8 後部帯状皮質における各群の (A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 9 扁桃体における各群の(A) DA,

(B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 10 背側海馬における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

図 11 腹側海馬における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.
* $P < 0.05$, vs 対照群.

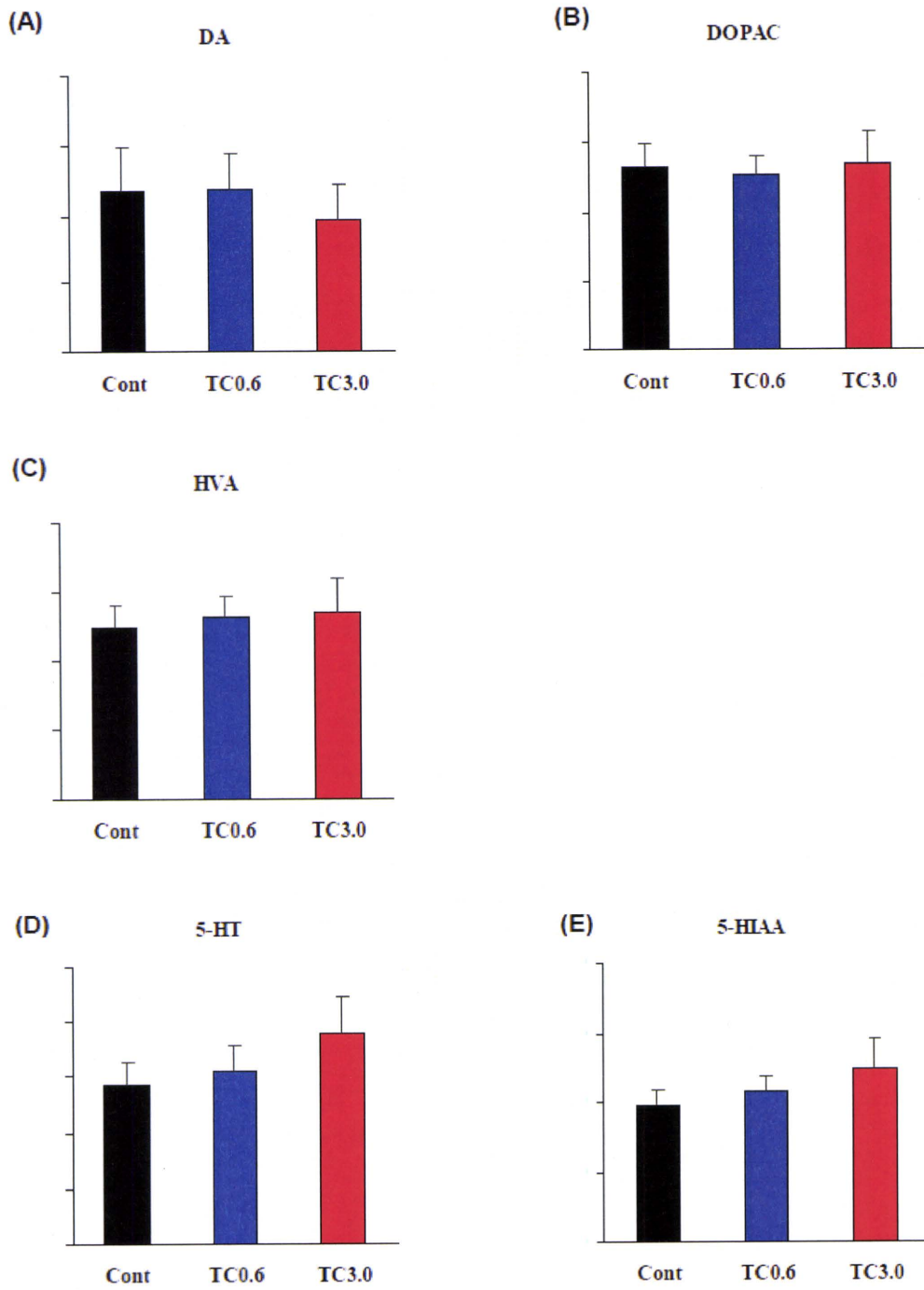


図1 黒質における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

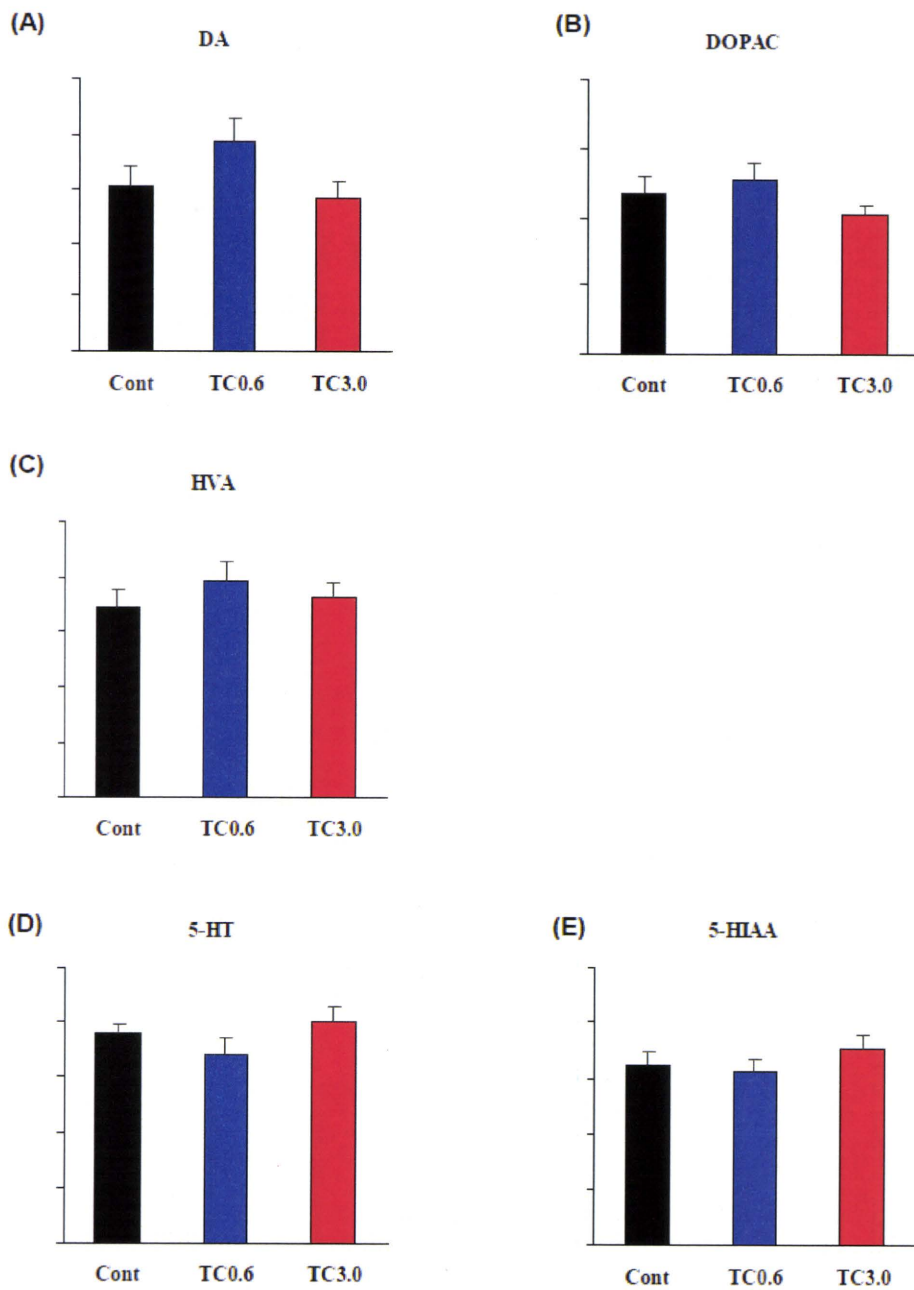


図2 線条体における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAAの含有量。

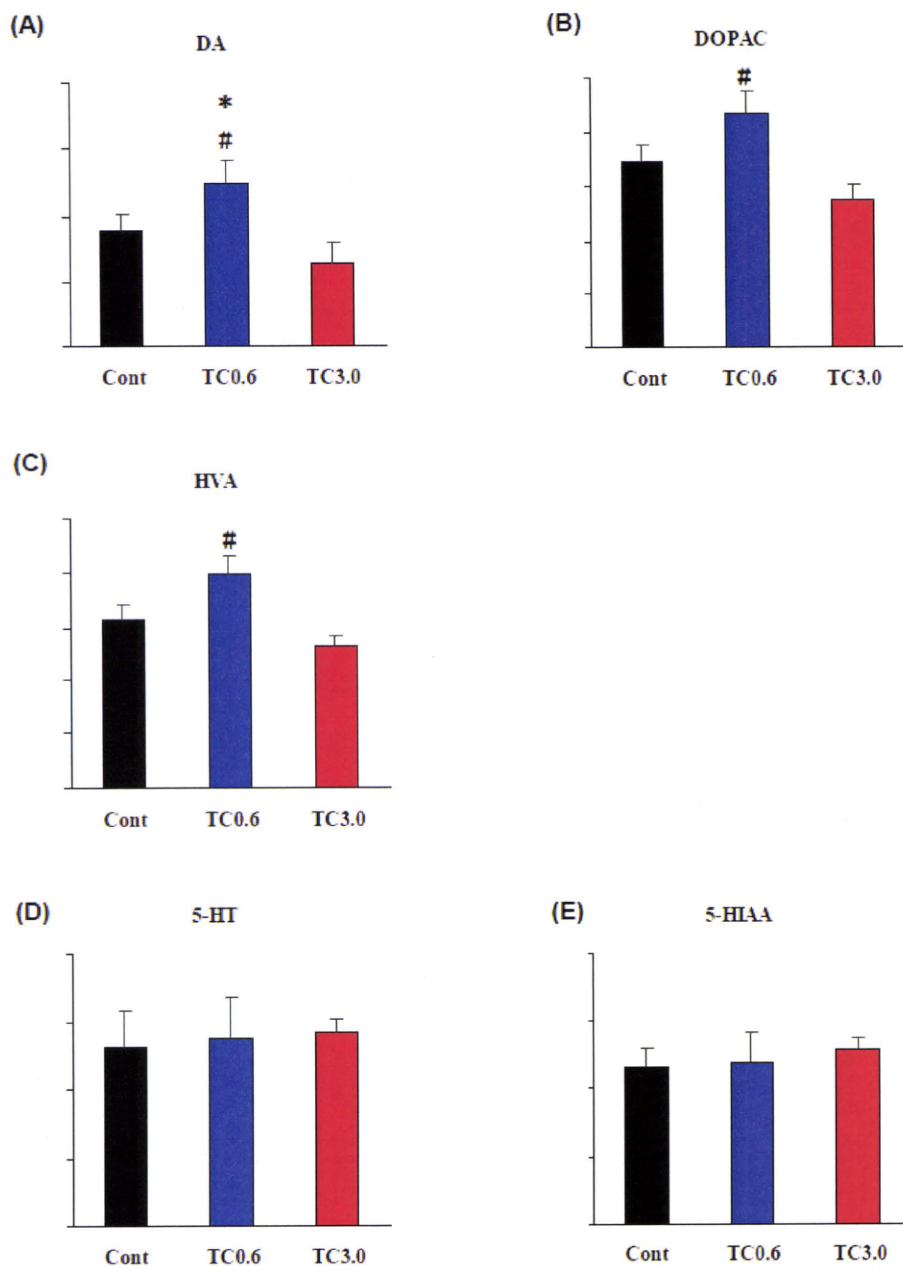


図3 腹側被蓋野における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量. * $P < 0.05$, vs 対照群. # $P < 0.05$, vs TC3.0 群.

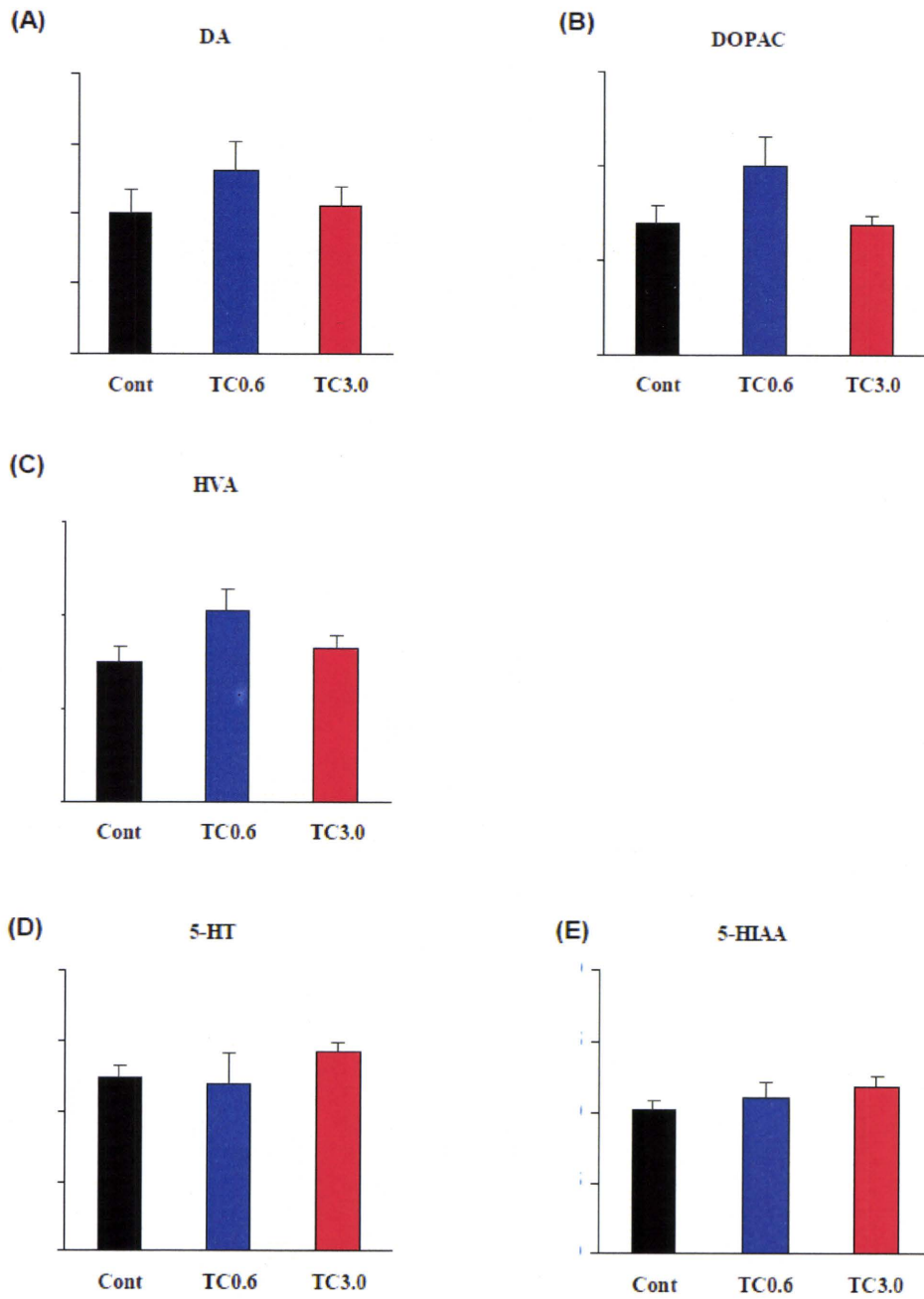


図4 側坐核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAAの含有量.

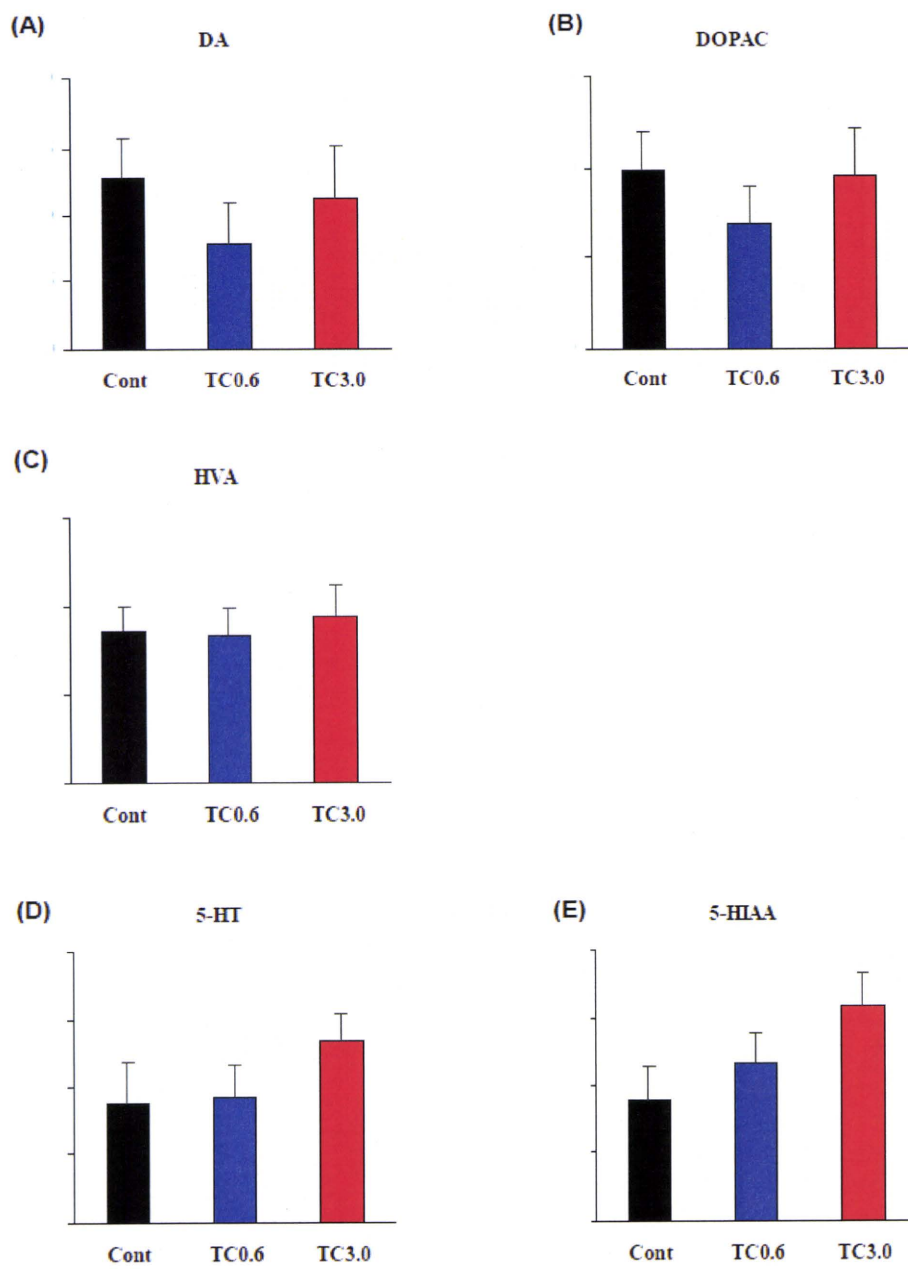


図5 正中縫線核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

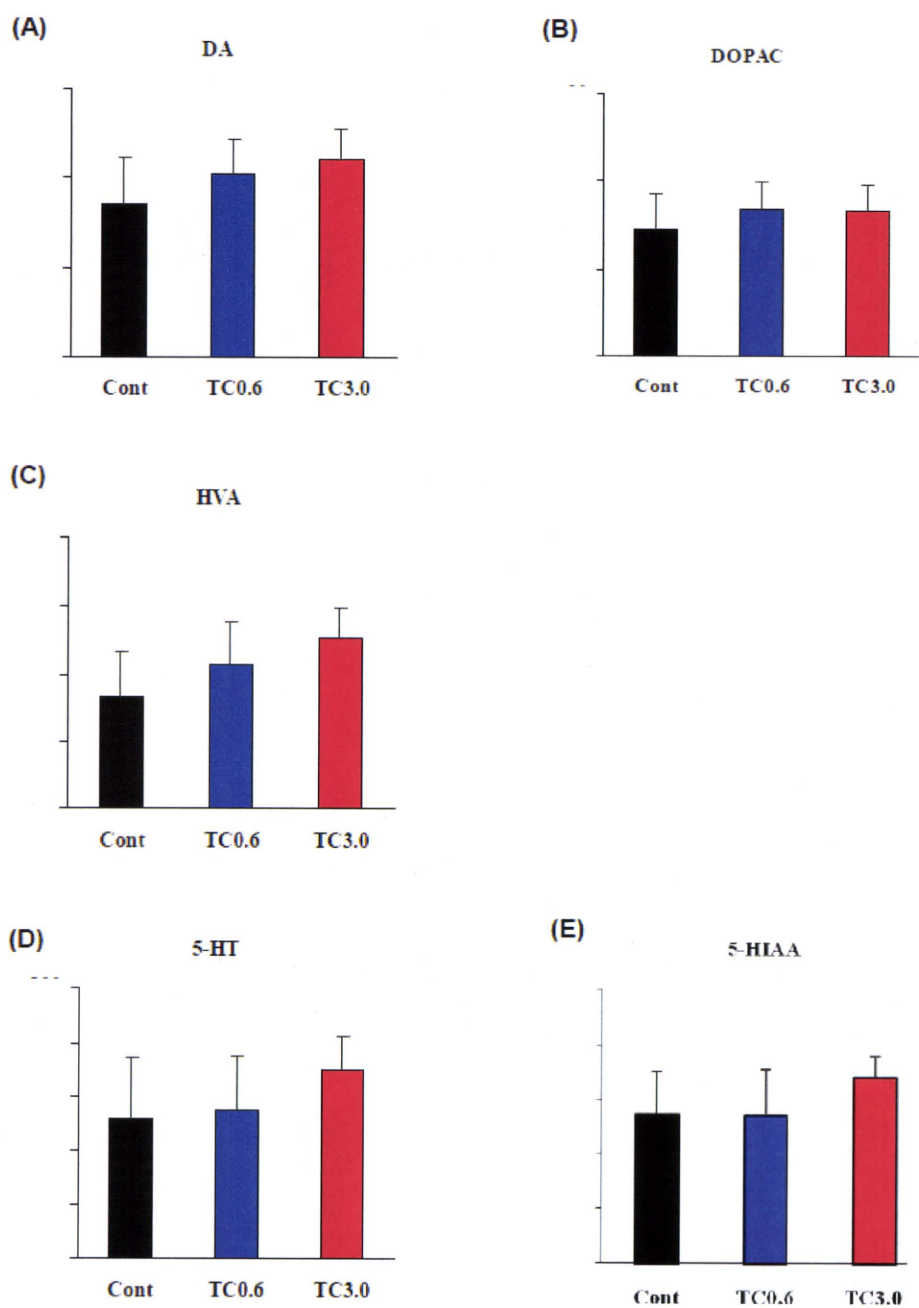


図 6 背側縫線核における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

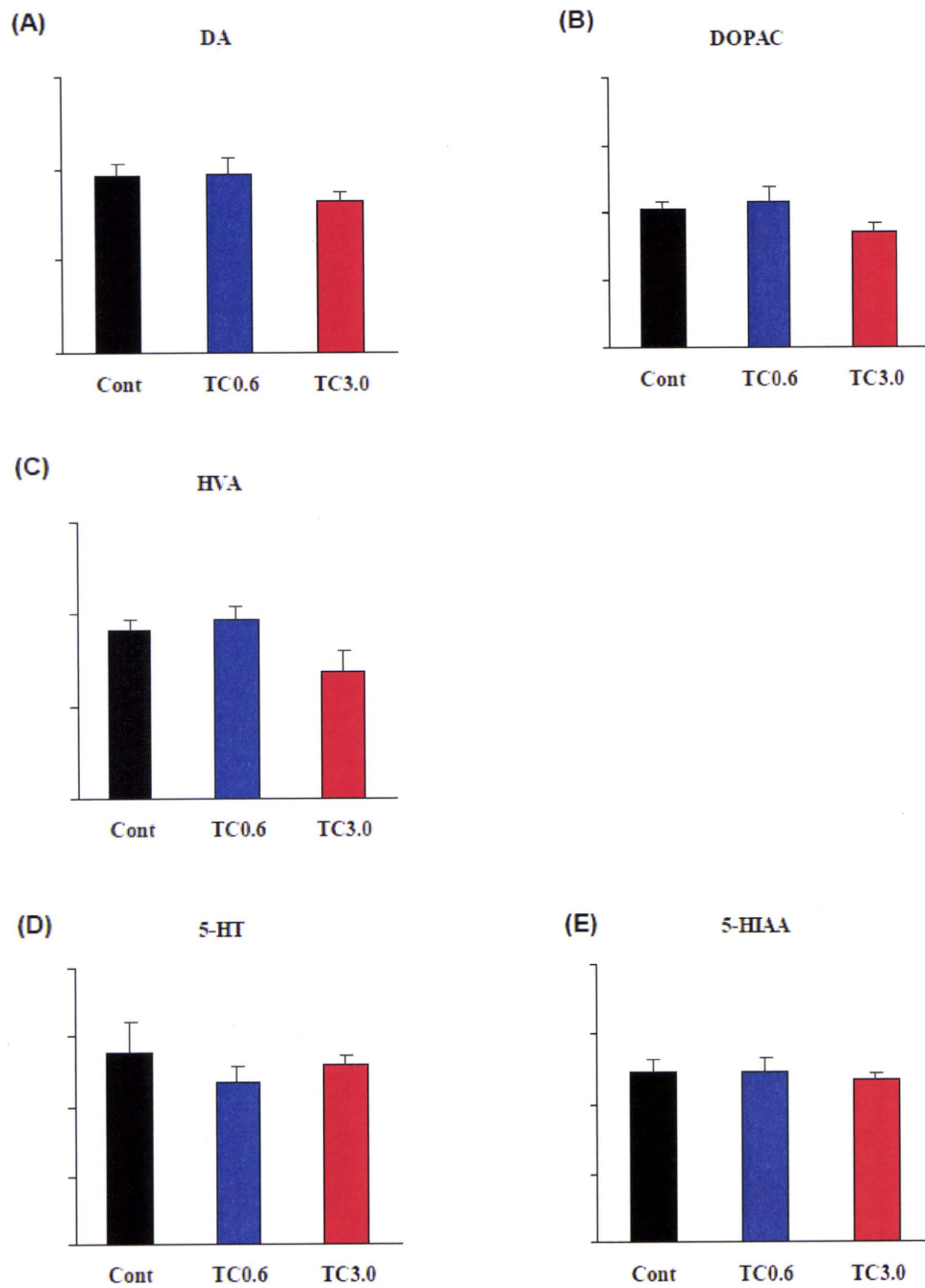


図7 前部帯状皮質における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.