

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.

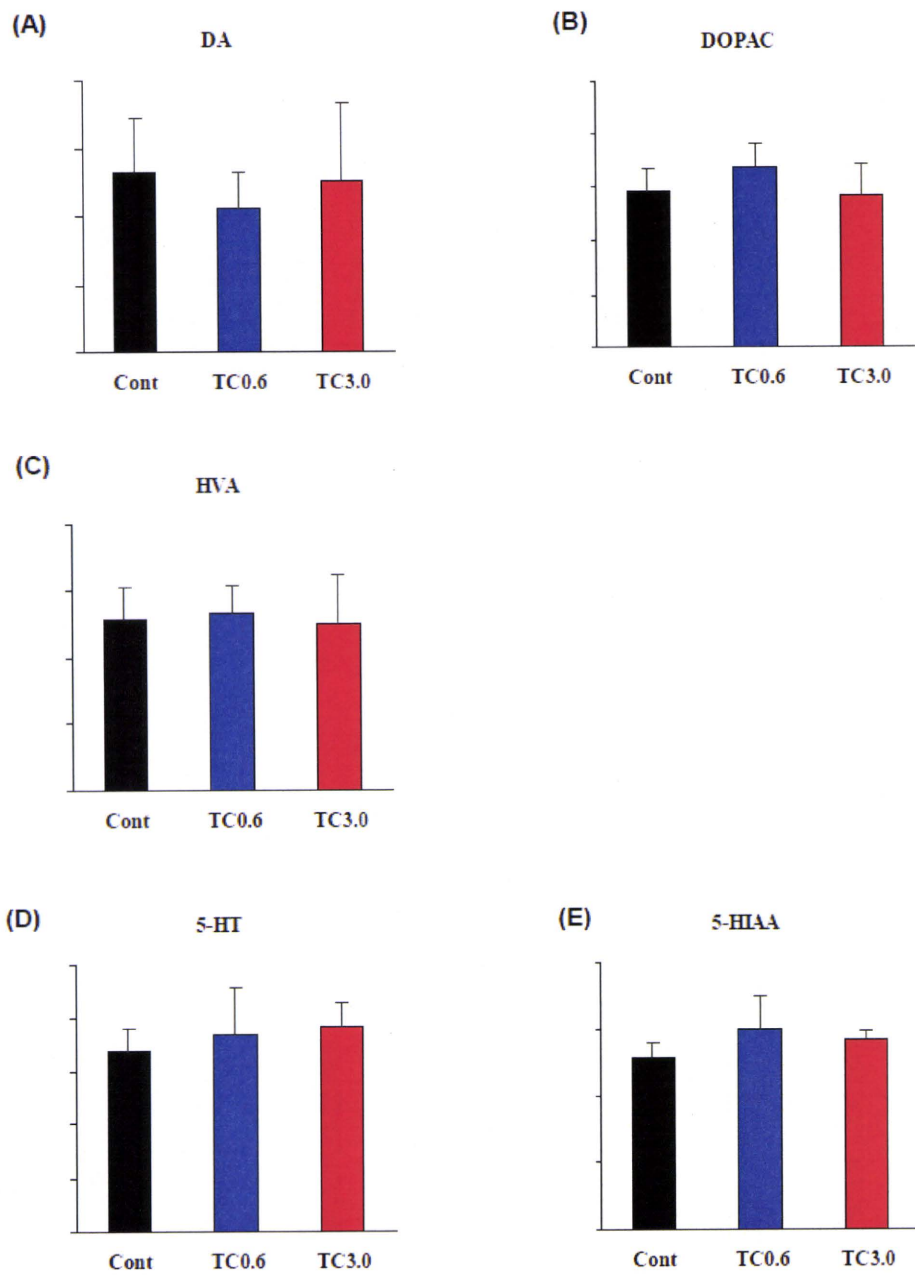


図9 扁桃体における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

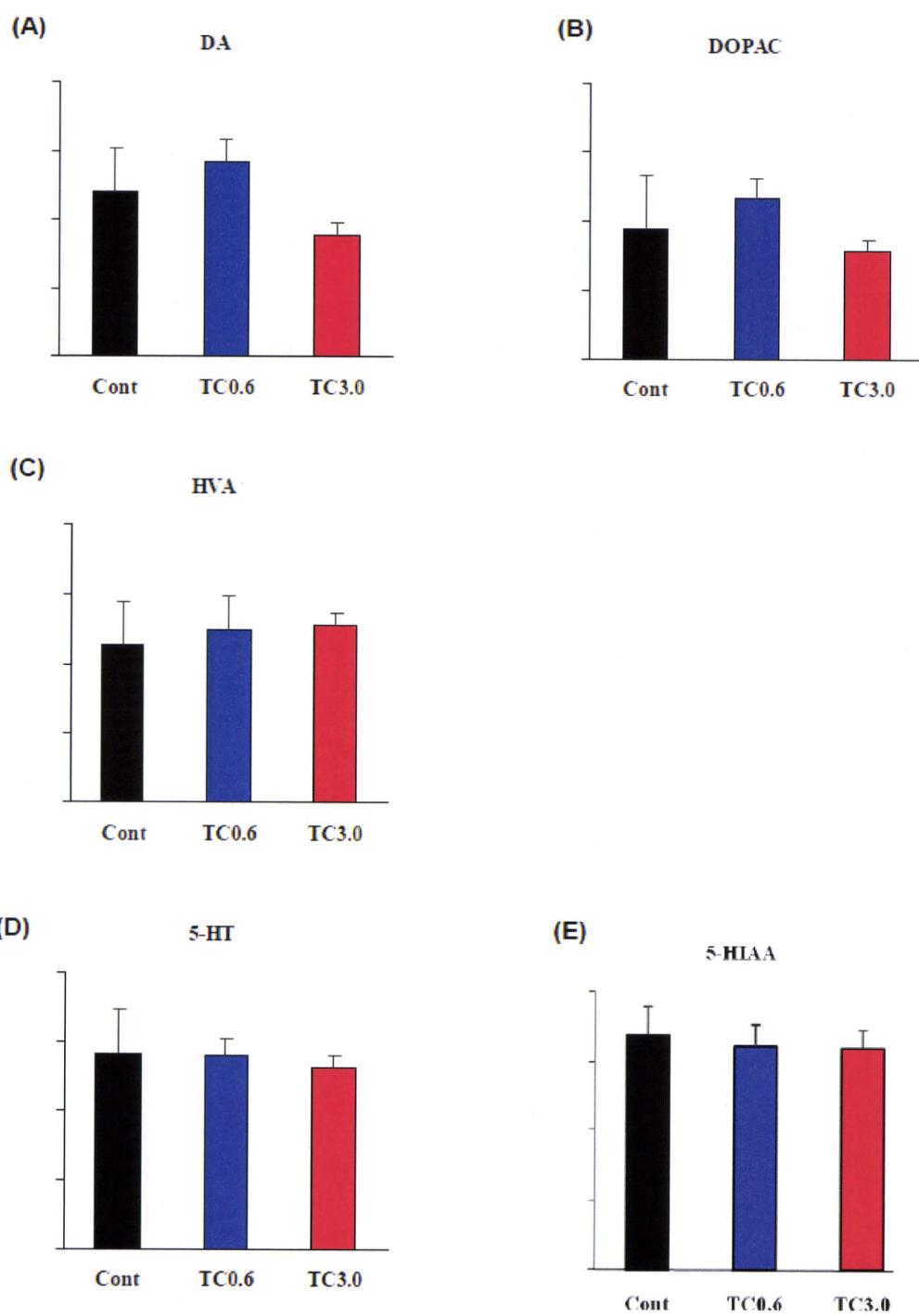


図 10 背側海馬における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量.

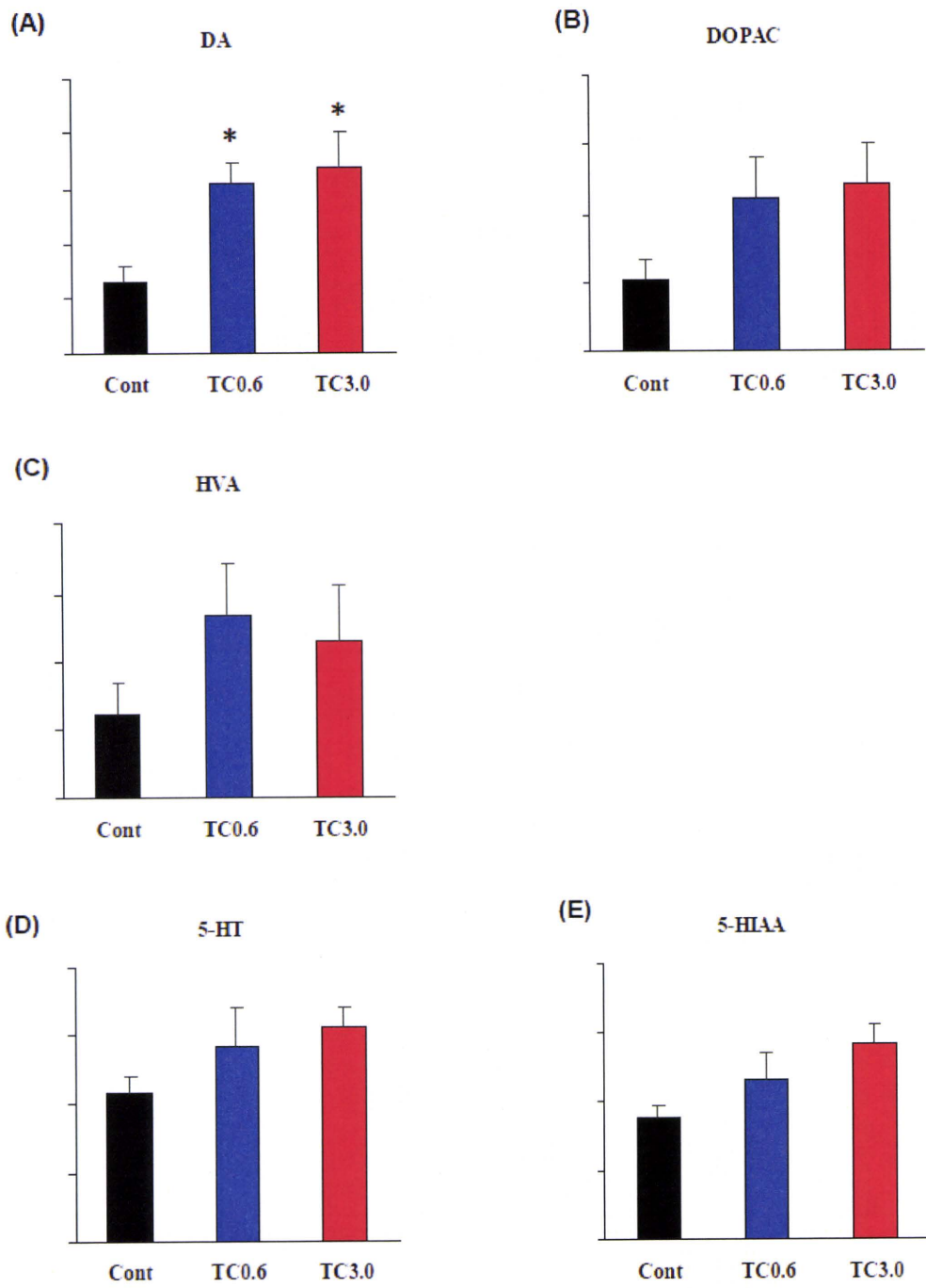


図 11 腹側海馬における各群の(A) DA, (B) DOPAC, (C) HVA, (D) 5-HT および (E) 5-HIAA の含有量. \*P<0.05, vs 対照群.

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

神経細胞の形態構造変化を指標にした in vitro 試験法開発

塚原 伸治

埼玉大学大学院 理工学研究科 准教授

研究要旨

化学物質の発達期曝露は、成熟期における脳機能に影響を及ぼすことがある。そして、成熟期にいたるまで持続し、脳機能に負の影響を及ぼす恐れのある化学物質の発達神経毒性は、神経細胞の機能に重要な形態構造の変性によって惹起されると推測される。本研究では、神経細胞のモデルになる培養細胞株のライブイメージングにより、細胞の生存状態や神経突起形成を指標にした試験手法を開発することを目標にした。ライブイメージングとは、生きた状態の細胞を観察し、画像化する技術である。ライブイメージングによって持続的に対象を観察することで細胞の形態構造変化を捉えることが可能になる。したがって、ライブイメージングを活用した毒性試験手法では、時間軸を加味して、化学物質の曝露影響を詳細に解析できるという利点がある。本研究では、アポトーシスの蛍光タンパク質マーカーである SCAT3 を発現する細胞と神経突起を蛍光可視化するため GFP を発現する細胞を作製し、蛍光タイムラプス顕微鏡を用いて、細胞のライブイメージングを実施した。その結果、画像データをもとに SCAT3 の蛍光シグナルを計測することで、細胞の生存状態を定量・数値化することが可能になった。さらに、GFP によって蛍光可視化された神経突起の長さを計測することで、伸縮する神経突起長の時間変化を示すことができた。以上のことから、本研究によって確立されたアポトーシスを指標にした細胞生存性や神経突起長を計測するライブイメージング手法は、化学物質の発達神経毒性を定量数値化するための有益な技術手法になると考える。

A 研究目的

脳を構成する組織構造の基本単位は神経細胞である。したがって、曝露した化学物質の神経毒性は神経細胞の変性や死を引き起こすことで顕れると考えられる。毒性の強い物質の曝露は神経細胞の死を誘導して、神経機能に影響を及ぼすと考えられる。他方、曝露により脳の機能に対して何らか

の影響があっても、病理組織学的には明確な影響が確認されない場合もある。この場合、神経機能への影響が神経細胞の死を伴う重度の組織変性にあるのではなく、神経細胞の微細構造の変化が原因であると推測される。神経細胞は他の細胞とは異なる特長として多数の神経突起と呼ばれる構造を有している。発生初期の神経系では

、神経管の神経上皮にある神経幹細胞が神経細胞に分化する。その後、分化した幼若な神経細胞は神経上皮から実質へ移動して最終定位置に辿り着くと、神経突起を伸長させて神経回路を構築する。発達期に発生して分化した神経細胞は神経系を構成するために必要な数よりも過剰に存在し、これらの一連の神経発生過程の中で半数以上の神経細胞がアポトーシスと呼ばれる細胞死の現象を起こして脱落することが知られている。以上のことから、神経細胞の死や神経突起の形成は、発達神経毒性の評価において重要なエンドポイントになる。

発達期に曝露した化学物質の神経系への影響はたとえ軽度であっても生活の質の低下に繋がる恐れがあり、化学物質の発達神経毒性についての評価は重要である。事実、発達期に曝露した TCDD は記憶学習や情動に関わる脳機能に影響を及ぼす (Schantz et al., 1989; Seo et al., 1999; Mitsui et al., 2006)。加えて、記憶学習や情動に関与する海馬や扁桃体におけるニューロン細胞骨格の遺伝子発現は発達期の TCDD 曝露によって影響を受けることも明らかになった。このことは、TCDD の曝露が神経突起の構造に影響を及ぼすことを示唆している。これまで、社会生活に影響する疾患である

自閉症や精神遅滞などの高次認知機能障害は脳の構造的変化はないとされてきたが、近年では、神経突起の形態など神経細胞の微細構造が健常者とは異なることが報告され注目を集めている (Persico and Bourgeron, 2006; Purpura, 1974)。

TCDD だけでなく、環境中には膨大な数の化学物質が存在しており、既存物質の毒性を網羅的に評価し、リスクを算出することは極めて困難な状況に置かれている。従って、環境化学物質に起因する健康リスクの低減に向けて、少なくとも、リスク評価に有用な科学データを蓄積するために毒性評価の作業効率の向上を図る必要があると考える。

以上のことから、本研究では、曝露した化学物質による影響の質と程度を精密に検出できるばかりでなく、毒性評価の作業効率が向上する新たな *in vitro* 毒性試験法を開発するため、ライブイメージングを活用して、細胞の生存状態や神経突起に対する化学物質の曝露影響を定量・数値化する解析手法を確立する。

ライブイメージングとは、生きた細胞を観察して、その様子を画像化する技術である (図 1)。動物実験よりも作業効率の向上が見込まれるモデル細胞の実験より、ライブイメージン

グを活用した毒性試験手法を開発することで、化学物質の曝露影響を定量数値化する解析手法を立ち上げる。

## B 研究方法

### 1. 試験材料

in vitro 試験法開発のため、本研究では、ニューロンのモデルになる株化細胞である PC12 細胞（資源番号：IFO50278）と Neuro2A 細胞（資源番号：IF050081）を使用した。これらの株化細胞は、(財) ヒューマンサイエンス振興財団・研究資源バンクより譲渡されたものである。PC12 細胞は、10%ウマ血清と 5%胎仔ウシ血清を含有する RPMI1640 培地にて、5% CO<sub>2</sub>-95% air の条件下で継代培養した。Neuro2A 細胞は、10%胎仔ウシ血清および非必須アミノ酸を含有する MEM 培地にて、5% CO<sub>2</sub>-95% air の条件下で継代培養した。

### 2. アポトーシスのライブイメージング

#### 2. 1. SCAT3 発現ベクターの遺伝子導入

蛍光顕微鏡下で細胞の生存状態を観察するため、PC12 細胞に SCAT3 を一過性に発現させて、開発試験法に

使用するモデル細胞を作製した。SCAT3 は、蛍光タンパク質である ECFP と Venus との間にアポトーシス実行分子であるカスパーゼ-3 によって切断されるアミノ酸配列を配置した融合タンパク質である (図 2)。カスパーゼが不活性状態にある生きた細胞に 435 nm の励起光を照射すると ECFP の励起エネルギーが Venus に移行する FRET 現象が発生し、Venus 由来の蛍光 (530 nm) が発せられる。一方、死のシグナルが伝達されてカスパーゼ-3 の酵素活性が上昇した細胞では、アポトーシス細胞死が誘導されるとともに、活性化したカスパーゼ-3 によって ECFP と Venus が解離するため 435 nm の励起光照射によって ECFP 由来の蛍光 (475 nm) が発せられる。この原理を利用して、SCAT3 を発現する PC12 細胞の生存状態を蛍光タイムラズ顕微鏡 (キーエンス BZ-8100、キーエンス株式会社) でモニタするために、ヌクレオフェクターII システム (Amaxa 社) を用いたエレクトロポレーション法 (電気穿孔法) により、SCAT3 発現ベクター (東京大学 三浦正幸教授より供与) を PC12 細胞に遺伝子導入した。

#### 2. 2. SCAT3 発現 PC12 細胞のライブイメージング

SCAT3 発現 PC12 細胞を 0.25% ポリエチレンイミンでコートした培養スライドチャンバーに播種し、神経成長因子 (50 ng/ml) を添加した 1% ウマ血清および 0.5% 胎仔ウシ血清を含有する RPMI1640 培地で 6 日間培養し、神経細胞への分化を促した。その後、SCAT3 発現 PC12 細胞は、腫瘍壊死因子  $\alpha$  (50 ng/ml) およびシクロヘキサミド (10  $\mu$ g/ml) を含有する神経成長因子添加血清培地 (50 ng/ml 神経成長因子、1% ウマ血清および 0.5% 胎仔ウシ血清を含む RPMI1640 培地) にて培養し、アポトーシスの誘導を促した。

腫瘍壊死因子  $\alpha$  とシクロヘキサミドを曝露した SCAT3 発現 PC12 細胞は、蛍光タイムラプス顕微鏡に内蔵された 5% CO<sub>2</sub>-95% air 培養チャンバーで培養し、腫瘍壊死因子  $\alpha$  とシクロヘキサミドを曝露した 50 分後から 10.5 時間後までライブセルイメージングをおこなった。蛍光タンパク質である Venus の蛍光シグナル (励起波長: 435 nm、蛍光波長: 530 nm) と ECFP の蛍光シグナル (励起波長: 435 nm、蛍光波長: 475 nm) を 30 分間隔で検出し、Venus および ECFP の蛍光シグナルを検出した画像を撮影した。

その後、腫瘍壊死因子  $\alpha$  とシクロヘキサミドを曝露によって誘導されたアポトーシスの過程における

SCAT3 発現 PC12 細胞の変化を定量・数値化するため、画像データから ECFP および Venus の蛍光強度を画像解析ソフトウェア (BZ-II 解析アプリケーション、キーエンス株式会社) を用いて計測し、ECFP/Venus の蛍光強度比を求めた。曝露 50 分後における ECFP/Venus 蛍光強度比を 1 とし、それ以降の ECFP/Venus 蛍光強度比の相対値を算出した。

### 3. 神経突起のライブイメージング

#### 3. 1. GFP 発現ベクターの遺伝子導入

蛍光タイムラプス顕微鏡下で細胞体より伸長する神経突起を観察するため、GFP 発現ベクターを Neuro2A 細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入はヌクレオフェクター II システム (Amaya 社) を用いたエレクトロポレーション法 (電気穿孔法) により実施した。遺伝子導入した Neuro2A 細胞は、0.25% ポリエチレンイミンでコートした培養スライドチャンバーに播種し、10% 胎仔ウシ血清および非必須アミノ酸を含有する MEM 培地にて 5% CO<sub>2</sub>-95% air の条件下で培養した。

#### 3. 2. GFP 発現 Neuro2A 細胞のライブイメージング



遺伝子導入の1から2日後、GFP発現 Neuro2A 細胞のライブイメージングを開始した。細胞の成熟分化を誘導するため、レチノイン酸 (5  $\mu$ M) および insulin-transferrin-selenium-X (ITS-X) サプリメントを添加した非必須アミノ酸含有 MEM 培地下での培養を開始した。

成熟ニューロンへの分化誘導処置を施した GFP 発現 Neuro2A 細胞は、蛍光タイムラプス顕微鏡 (キーエンス BZ-8100、キーエンス株式会社) に内蔵された 5% CO<sub>2</sub>-95% air 培養チャンバー内で培養し、ライブイメージングを実施した。GFP 発現 Neuro2A 細胞より発せられる GFP の蛍光シグナル(励起波長: 470/40 nm、蛍光波長: 535/50 nm) を検出して、GFP で蛍光可視化された細胞のイメージング画像を撮影した (撮影間隔: 30 分から 60 分)。その後、撮影した画像データと画像解析ソフトウェア (キーエンス BZ-II 解析アプリケーション、キーエンス株式会社) を用いて、GFP 発現 Neuro2A 細胞より伸長する神経突起の長さを計測した。

## C 研究結果

### 1. アポトーシスのライブイメージング

腫瘍壊死因子  $\alpha$  とシクロヘキサミドによってアポトーシスを誘導した SCAT3 発現 PC12 細胞では、アポトーシス実行分子であるカスパーゼ-3 の活性上昇を示す ECFP/Venus 蛍光強度比の増加がみられた。ECFP/Venus 蛍光強度比の増加は、腫瘍壊死因子  $\alpha$  とシクロヘキサミドによるアポトーシス誘導後およそ 8 から 10 時間の間にみとめられた (図 3)。そして、ECFP/Venus 蛍光強度比のピークは誘導後 9 時間にみられ、その値は 1.5 以上に達した。このことから、SCAT3 発現 PC12 細胞をライブセルイメージングして取得した画像データから ECFP および Venus の蛍光強度を測定し、その比を算出することで、細胞の生存状態をモニタすることが可能であることが判明した。

### 2. 神経突起のライブイメージング

レチノイン酸と ITS-X を添加した非必須アミノ酸含有 MEM 培地で培養した GFP 発現 Neuro2A 細胞では、良好な GFP の蛍光シグナルが検出された。GFP 発現 Neuro2A 細胞をライブイメージング (撮影間隔: 60 分、撮影時間: 24 時間) して取得した画像データを用いて、同細胞の細胞体より伸長する神経突起の長さを計測した結果、画像から選択した細胞では、ライブイ

イメージング開始5から8時間より神経突起の伸長が始まり、約10時間後には神経突起の伸長がピークに達した(図4)。選択細胞の神経突起の最大長は約20  $\mu\text{m}$ であった。その後、神経突起は徐々に短縮した。

## D 考察

本研究では、神経細胞のモデルとしてPC12細胞とNeruo2A細胞を使用して、ライブイメージングによる新たな*in vitro*試験法の開発をおこなった。その結果、アポトーシスの実行分子であるカスパーゼ-3の活性をモニターする蛍光タンパク質マーカーSCAT3のシグナル強度を指標にして、細胞の生存性に対する化学物質曝露の影響を定量・数値化する解析手法を確立することができた。加えて、GFPによって蛍光可視化された神経突起の長さを計測することで、神経突起形成に対する化学物質の影響を解析することも可能になった。

GFPを発現するNeuro2A細胞の神経突起は、時間経過に従い、伸長するばかりでなく、短縮することもあった。比較的長期間にわたり曝露した化学物質により、神経細胞のモデルになる株化細胞や初代培養された神経細胞の神経突起の長さが変化することが

報告されている(Shibano et al., 2002; Kimura-Kuroda et al., 2007)。しかしながら、本研究の結果から明らかになったように、短期間で神経突起が伸縮することが起こり得ることから、神経突起をはじめとする神経細胞の形態構造への曝露影響については慎重に評価する必要があると考えられた。少なくとも、神経細胞の形態構造に対する毒性評価は、構造の時空間変化を考慮することが可能な解析手法によって実施することが望ましいと言える。

## E 結論

本研究によって確立されたアポトーシスを指標にした細胞生存性や神経突起長を計測するライブイメージング解析手法は、化学物質の発達神経毒性評価のための有益なツールになる。

## F 参考文献

Persico AM and Bourgeron T (2006) Searching for ways out of the autism maze: genetic, epigenetic and environmental clues. *Trends Neurosci.*, 29: 349-358.

Purpura DP (1974) Dendritic spine dysgenesis and mental retardatio. Science, 186: 1126-1128.

Schantz SL and Bowman RE (1989) Learning in monkeys exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Neurotoxicol. Teratol., 11, 13-19.

Seo BW, Sparks AJ, Medora K, Amin S, Schantz SL (1999) Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). Neurotoxicol. Teratol., 21, 231-239.

Mitsui T, Sugiyama N, Maeda S, Tohyama C, Arita J (2006) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin suppresses contextual fear conditioning-accompanied activation of cyclic AMP response element-binding protein in the hippocampal CA1 region of male rats. Neurosci. Lett., 398, 206-210.

Shibano T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Shikama H, Hisano K, and Hua Y (2002) Effects of mild and moderate

hypothermia on apoptosis in neuronal PC12 cells. Br J Anaesth 89: 301-305.

Kimura-Kuroda J, Nagata I, and Kuroda Y (2007) Disrupting effects of hydroxy-polychlorinated biphenyl (PCB) congeners on neuronal development of cerebellar Purkinje cells: a possible causal factor for developmental brain disorders? Chemosphere. 67: S412-S420.

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. 培養細胞を用いたライブイメージング解析 (概略)

図2. SCAT3 を用いたアポトーシス細胞死の検出原理

図 3. ライブイメージングした SCAT3 発現 PC12 細胞における ECFP/Venus の蛍光強度比の時間変化

図 4 ライブイメージングした GFP 発現 Neuro2A 細胞における神経突起長の時間変化

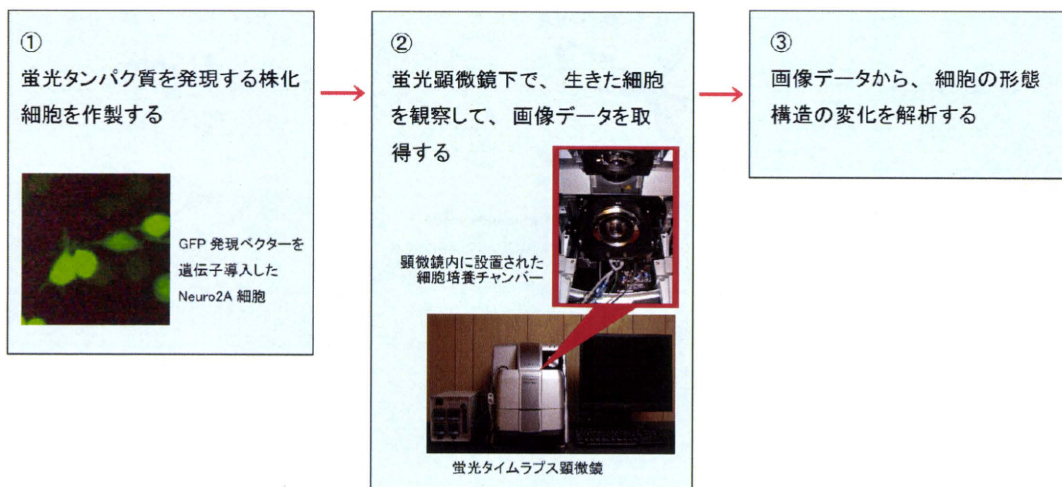


図 1

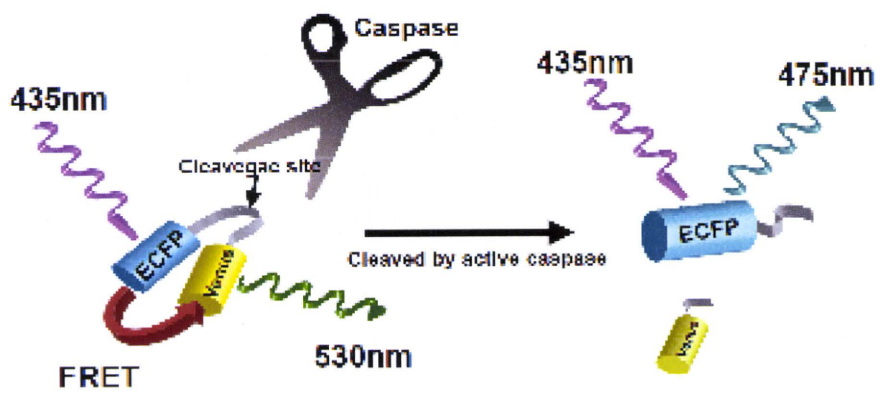


图 2

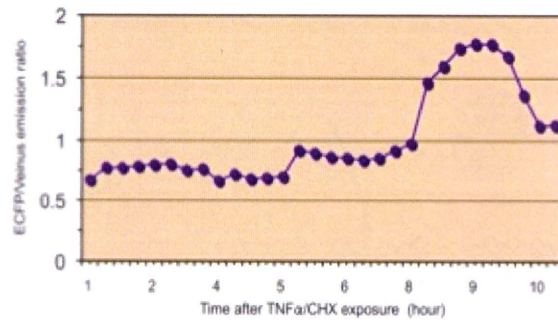


図 3

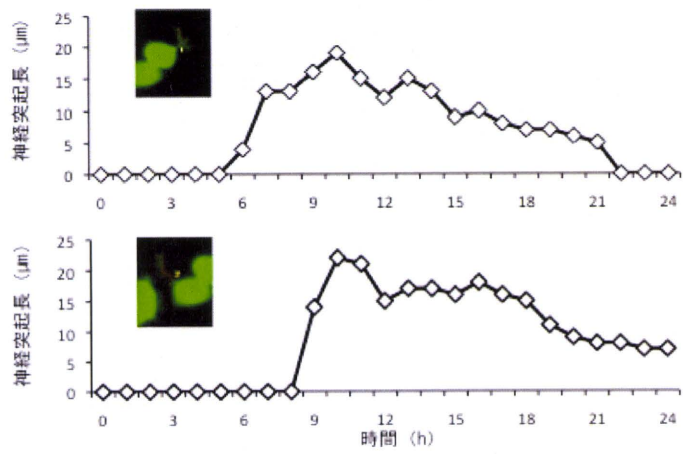


図 4



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

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験

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

本研究課題において取り組んできた評価手法構築について、実験研究の成果の中から重要なものを抽出し、さらに文献調査も加えてまとめを行った。すなわち、行動試験の国際的標準化の背景、本研究課題における既存行動試験を用いた取り組み、本研究課題における新規行動試験の開発（ラット対連合学習試験の開発、マウス認知的柔軟性試験の開発、幼若ラット情動学習行動試験の開発、行動変化を説明するための組織、細胞、分子レベルでの取り組み）の観点から検証し、包括的行動試験としてのまとめを行った。

研究分担者

小川園子（筑波大学大学院人間総合科学研究科）、船橋利也（聖マリアンナ医科大学医学部）、塚原伸治（埼玉大学大学院理工学研究科）、前川文彦（独立行政法人国立環境研究所）、上村夕香理（東京大学大学院医学系研究科公共健康医学専攻）、尾藤晴彦（東京大学大学院医学系研究科神経生化学）

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。

A 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

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。

試験法構築にあたっては陽性条件としてダイオキシン類を中心に用い、

実際に経胎盤・経母乳曝露実験を行って検証を進めた。さらにダイオキシンに特化した試験法とならないよう、平成21年度からはビスフェノールA曝露動物等も用いて検討を進めた。

よって本課題では、包括的評価手法の構築とともに、ダイオキシン類やビスフェノールAに関する発達神経毒性についての新たな知見も多く集積されることとなった。

本項では「まとめ1」として、評価手法構築について議論した。

## B 研究方法

本研究課題における実験研究の成果の中から重要なものを抽出し、さらに文献調査も加えて、ミニレビュー的なまとめを行った。

## C 研究結果

### 1. 行動試験の国際的標準化の背景

行動試験の国際的標準化の動きは毒性試験に限らない。マウスの持つ遺伝子の99%はヒトと相同であることが明らかとなり、また遺伝子改変技術の進展により、マウスの行動表現型の同定は神経科学のみならず、生命科学全般にとって極めて重要な課題と認識されるに至っている。

例えば2016年までに4000系統の遺伝子ノックアウトマウスすべてを網羅的に解析しようという国際コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC)も立ち上がっている。しかし当然のこととして、個々の施設や実験者によって結果が異なる、あるいは記載法が異なる等の問題があり、標準プロシージャ (Standard Operating Procedure, SOP) の整備が行われているところである (Mandillo et al. 2008)。

このような既存試験を用いた、いわゆる行動試験バッテリーの適用は、個々の被験体 (この場合は遺伝子ノックアウト系統) の表現型を比較検討するという「パターン」解析の発想に基づくものと言える。化学物質リスク研究にあてはめるなら、同様のプロジェクトを立ち上げれば、例えばダイオキシン型の毒性なのか、水銀型の毒性なのかといった分類分けが可能になると期待される。毒性が未知の化学物質に適用するなら、どのような毒性表現型を持つのかを予測する重要な手がかりとなるだろう。

### 2. 本研究課題における既存行動試験を用いた取り組み

本課題においては、単一の試験だけでは有害危険情報のような重大な発

信はできないという趣旨で、複数の行動試験を用いた試験バッテリー的な取り組みをい、既存の行動試験パラメータの再検討を行った。対象とした既存の行動試験は、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である。このうちオープン・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、試験プロトコルを改良した。また本研究班では、TCDDの発達神経毒性として、明暗箱往来テストでの異常、強制水泳テストにおける異常などを見出した。

例えば強制水泳テストは、マウスをプールの中に入れ、その動きを観察する試験である。マウスは最初は、プールから出ようと動き回るが、次第にあきらめて動かなくなる、と説明される。抗うつ剤や抗不安剤により「あきらめにくくなる」ことから、抑うつ症状の試験として用いられることが多い。

しかしこのテストの特性として、水温により試験成績が変化するのは当然なのだが(Bächli et al. 2008)、SOPな

どで水温を単一に限定してしまうことには、毒性試験としては大きな問題を伴う。なぜなら毒性試験の主題は表現型の比較ではなく、影響を見逃さずに捉えることにあり、異なる水温であれば影響が確認できる可能性を排除できないからである。

また、現在最も一般的に行われる解析では、試験開始後2分目から6分のデータのみを用いるというものだが、なぜ最初の2分のデータを用いてはならないのか明確な根拠はなく、抗うつ剤の効果が一番顕れやすいというのが、最も説得力のある理由とされている。しかし行動表現型を同定する上では、必ずしも抗うつ剤の効果の見やすい条件に限定することなく、その試験での行動パラメータの変化を記述し、その行動変化に科学的解釈を付与する作業が必要になるだろう。

よって我々は、行動試験に伴う血中コルチコステロン濃度の変化や脳組織中分子の変化を検証した。また我々は異なる2種類の水温を用いて再現性の確認を行った後に、報告していることも付け加えておく。

また本研究班では、TCDDの発達神経毒性として、文脈および音恐怖条件付けの双方が障害されることも報告した(Hajjima et al., 2010)。恐怖条件付けは一般の神経科学では、扁桃体、あ

るいは海馬依存性の（比較的単純な）符号化と想起に関するパラダイムとして捉えられる。しかしフリージングという行動自体は記憶とは独立した情動行動であるし、そもそも恐怖とは情動に属する機能である。恐怖記憶は、状況認知と恐怖とを連合させる機能を要する、つまり記憶と情動から成り立つ複雑な神経ネットワークが関与するはずである。実際に我々のデータでも、ここで用いられた TCDD 曝露用量では、空間学習試験の成績にはなんら影響を及ぼさないので、TCDD 曝露による恐怖条件付けにおけるフリージング行動の低下は、むしろ情動機能異常に起因する可能性のほうが高いと思われる。これまで発達神経毒性は「学習能力低下」に要約しやすいからか、記憶機能ばかりが着目されてきたが、情動機能も含めた「こころ」に対する影響こそが、これからの重要課題となるだろう。強制水泳テストにおける無動行動の増加、独自の行動試験における固執性亢進、社会行動異常なども確認しており、そのような「こころ」の問題に対する化学物質やその他環境要因との関連について積極的に研究を進める必要がある。

### 3.本研究課題における新規行動試験の開発

一方で、従来の行動試験の枠にとらわれることなく、より有用な行動試験を新たに作成してゆく試みも必要である。本研究課題では、毒性試験として特に重要でありながら従来調べられてこなかった、高次脳機能(executive function) ならびに幼若期の試験の開発を行った。

#### 3-1.ラット対連合学習試験の開発

はたしてラットは、過去の経験を自らの知識として利用し、新たな課題を解決するような、高次の学習機能を持つのだろうか？

我々は本研究開始までに Flavor Map 法と名付けた対連合学習試験を確立した。イベント・アリーナ装置は 1999 年に発表された行動試験装置で、水迷路とほぼ同サイズの乾いた平面状のフィールド（アリーナ）である（図 1, Biegler & Morris, 1999）。アリーナの任意の場所に、報酬ペレットを砂で隠した壺（sand-well）を埋めこむことができる。ラットはすぐに sand-well の砂を掘って隠されたペレットを獲得できるようになり、いずれペレットの位置を学習することができる。一度空間記憶の成立したラットでは、スタート地点を変えても正しくペレットの位置にたどりつくことができるようになる。Flavor Map テストでは、ペレッ