

トの味 (flavor) を位置によって変えて、言わばレストラン・マップとして学習させることで、ラットにおける (flavor-place pair の) 対連合学習を約 1 カ月で成立させることができる (図 1)。さらに、一度 Flavor Map を習得した動物は、新規の対連合刺激 new flavor-place pair を 1 回の試行で学習し、それを明らかにした。すなわちラットは flavor map の経験を整理して知識 (スキーマ) として獲得し、スキーマを利用することで新たな課題を迅速に解くことができるようになる (Kakeyama et al. 2005, Tse et al. 2007)。そして本研究課題では、スキーマ依存性学習は前頭葉依存性であることを明らかにした (平成 21 年度化学物質リスク研究事業掛山班報告書、論文投稿中)。

Flavor Map は我々の知る限り、ラットにおいて最も高次の学習課題を提示する行動試験である。そして低用量の TCDD 曝露を受けた仔ラットでは、Flavor Map 対連合学習の習得ができなくなることもわかった。数秒前、数時間前、数日前に経験した餌のある場所は曝露動物も正確に選択できることから、単純な空間記憶の機能は正常であるにも関わらず、対連合学習機能が阻害されているものと考えられる。

### 3-2. マウス認知的柔軟性試験の開発

マウスは、解剖・組織学的情報、遺伝学的情報の豊富さ、飼育コスト等の面からも優れており、その行動解析は健康リスク評価にとっても極めて重要な位置づけとなる。しかし従来のマウス行動試験は記憶・学習のなかでも比較的単純な要素を対象とした試験系がほとんどであり、ヒトの高次認知機能への外挿を目指した、より統合的な認知行動を評価する試験系は非常に少ない。また行動解析に特化した一部の研究室以外では、試験の再現性が十分確保されているとは言い難い。

そこで我々は、集団型全自動行動・学習測定システム IntelliCage を用いたマウス行動試験の開発を行った。IntelliCage とは、チューリッヒ大学 Hans-Peter Lipp 教授が開発したもので、ホームケージ内でマウスに実験者のハンドリング等によるストレスを与えることなく自発活動量の測定と学習行動試験を行うことのできる装置である (図 2)。測定するマウスの皮下に ID チップを埋め込むことで、最大 16 匹のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動測定することができる。ケージの 4 隅にはオペラント・チャンバー (コーナー・チャンバー) が設置され、ノーズ・ポーク反応により報酬となる飲

水が提示される仕組みである。

IntelliCage 装置のために我々が開発した新たな試験法は、2つのコーナー・チャンバー間を往復させる行動系列の獲得を伴う空間学習 (behavioral sequencing task) と、その後の反復逆転課題からなる (平成 21 年度化学物質リスク研究事業掛山班報告書、Endo et al. 2011) (図 2)。まず空間学習では、マウスの誤答率を、1 週間以内に 40% から 5% 程度まで低下させることができる。また、課題開始から学習成立までの成績の変化をみても、個体間のばらつきが非常に小さく、異なる研究室・研究者であっても同様の学習曲線が得られることを、東京大、自治医科大、チューリッヒ大学において確認した。この結果から、我々が確立した空間学習試験法は、単に学習ができたかできないかを判断するだけでなく、より定量性の高い学習機能評価法として期待される。

次に反復逆転課題でも、高次認知機能の一つである認知的柔軟性 (cognitive flexibility) を精密に評価できることがわかった。最初の逆転課題では、マウスは不正解コーナー (前回正解だったコーナー) へのアクセスが多いままである (図 2)。二度目の逆転課題では、試験の前半ではマウスは不正解コーナーでの往復行動を繰り返

し続けるが、後半では新たな正解行動系列にシフトすることができるようになる。個体差が小さく、かつ高い再現性をもつ試験により、図 2C に示したようなマウス行動の時間経過 (的) 解析が可能となり、マウスの認知的柔軟性における一連の過程を、精度の高い実験的指標として評価することができるようになった。

さらに反復逆転課題を繰り返してゆくと逆転直後の成績が徐々に上昇してゆき、遂には 10 試行程度で新たな正解にシフトできることがわかった (図 2E、F)。すなわちマウスは逆転課題のルールに順応してゆくことができる、言い換えるなら、マウスは逆転課題に対する「規則学習」(reversal learning-set) を持ちうるということが明らかとなった。learning-set の概念は Harry F. Harlow (1949) によって確立されたもので、サルにおいて、弁別課題を繰り返してゆくと誤答が激減することから、サルが弁別課題のルールや方略そのものを理解したことを示している、と解釈されるものである。Learning-set はサル以外にもアシカ、鳥やラットで報告されているが、マウスが繰り返しのトレーニングによって逆転課題に対する迅速な行動系列の転移、すなわち reversal learning-set を形成したことは、我々の報告が初めてのものと思わ

れる。

IntelliCage を用いて、恐怖条件付けで影響がみられた条件で経胎盤・経母乳のダイオキシン曝露を行ったところ、空間学習の成立には影響を及ぼさなかったが、認知的柔軟性が低下するという知見を得た。すなわちダイオキシン曝露動物では、2 回目の逆転課題開始時の成績が、試験後半になっても改善せず、前回の正解コーナーにアクセスする割合が高かった（化学物質リスク研究事業掛山班報告書）。比較的単純な記憶機能よりも、高次認知機能は化学物質の影響を受けやすい可能性が示唆された。

### 3-3. 幼若ラット情動学習行動試験の開発

近年の多くの毒性試験による化学物質の LOAEL は胎児期から幼若期にかけての曝露影響により求められており、ヒトの一生の中でも特に発達期が化学物質に対して感受性が高いことは議論の余地がない。中枢神経毒性に関しても同様であり、胎児期・授乳期の化学物質曝露による学習能力低下、注意欠陥多動性障害(ADHD)などの行動異常について精密な試験法を構築し影響評価を行っていくことが急務である。しかし従来の行動毒性試験法は、発達期の曝露を行った場合で

あっても、ほとんどすべてが成熟後に行動試験が行われている。曝露時期と試験の時期が離れると、発達に応じて影響がうすまり、あるいは変質し、見かけ上の個体差が大きくなるおそれがある。

そこで本研究提案開始前に、我々は幼若ラットで施行可能な学習行動試験法の確立を目的として、新たに開発した KODOMO システムの改良を進めた（図 3）。本研究では、KODOMO システムを用いた試験パラメータの定量解析の高度化、試験の半自動化を進め、PCB153 の胎仔期曝露による ADHD 様症状を明らかにした（図 3）。すなわち、PCB153 曝露動物では、ゴールまでの所要時間は有意に低下するものの対照群よりも長く、総移動距離には変化がなかった。正解へのアクセス割合は増加するものの、誤答数は低下しなかったことから、注意力散漫・衝動性上昇があることが示唆された。

### 3-4. 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

まず曝露動物における脳内での変化としては、行動変化に伴い顕在化する変化と、行動変化とは無関係に恒常的に曝露影響として顕在化している基底的な変化とがあるだろう。

後者の基底的变化については、本研究課題では、ダイオキシン曝露マウス、ビスフェノールA曝露マウスの両者において、海馬におけるスパイン密度の低下があることを新たに見出した。これは発達期化学物質曝露が脳の老化に影響しうることを示す新知見である。さらに脳組織のパンチアウト技術を洗練化させることで、ダイオキシン曝露マウスにおける脳内モノアミンの局所的な変化があることも見出した。

脳には数百億個の神経細胞が存在するが、特定の脳機能（≡行動変化）に関与する細胞（集団）は限定されているはずである。そこで本研究課題では、神経活動依存的に発現増強する分子を特異的に可視化することで、行動試験直後の脳組織を用いて行動変化に関わる脳領域や神経細胞の同定を行った。その結果、スキーマ依存性の学習には前頭葉が必須であることを見出した（投稿論文は修正後審査中）。さらにダイオキシン曝露マウスでは、Flavor Mapテストで活性化された神経細胞において、行動変化と同様に低用量曝露動物においてのみ、グルタミン酸受容体サブユニットNR2Bの遺伝子発現が極度に低下していることも分かった（図4）。

また IntelliCage テストにおいて高次

認知機能低下と社会行動異常、固執性亢進を認めたダイオキシン曝露マウスでは、前頭葉と扁桃体において神経活動異常があることを見出した。最近では、「こころ」の問題を抱えたヒトにおいても前頭葉と扁桃体の神経活動に問題があることが報告され注目を集めており(Meyer-Lindenberg et al, 2005; Inoue et al. 2010)、我々のマウス行動試験の結果をヒトに外挿する際の重要情報となるものだろう。

## D 考察

発達期の脳神経系に対する化学物質の影響（発達神経毒性）は、他の健康影響と比較してより低い曝露量で観察されることが多い一方で、ヒトにおいてそれを正しく評価するのは非常に難しいと言わざるを得ない。第一の理由として、脳機能のすべての側面を正しく測定できる尺度は存在しないからである。知能検査や心理検査の限界についてはいまさら議論するまでもなく、最先端とされる fMRI 検査や遺伝子解析においても、あらゆる検査というものには限界がある。第二の理由として、化学物質の曝露直後に影響が顕れるのではなく、成長してゆく中で、あるいは成熟してから認知・情動機能への毒性影響が顕在化することが多く、原因（曝露）と結果（影響）

との間に隔たりがあり、因果関係をつかみにくいことが挙げられる。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。

したがって、健康影響を未然に防ぐためにも、動物行動実験に基づいた信頼性の高い科学的知見の集積が非常に重要である。

本研究課題では、さまざまな既存試験を組み合わせ、さらに独自開発の Flavor Map テスト、IntelliCage テスト、KODMO テストを加えた行動試験バッテリーを完成させることができた。その詳細な SOP は各分担研究報告書や学術論文に記載しているのでここでは割愛する。

付け加えるならば、SOP は本来が網羅解析による比較を主眼とするものであり、影響を見逃さず、その質と程度を明らかにするためには、統一規格に限定したプロトコールはかえって妨げになりかねない。常にデータと向き合いながら、また常に最新の知見を取り入れながら臨機応変に試験プロトコールを改変してゆくような、ごく

限定された、経験を積んだ研究者が采配を振るって事にあたる必要があることも、厳然たる事実である。ダイオキシンやビスフェノールAのような、学術論文報告も極めて多い注目される化学物質であっても、未だに影響の有無そのものが問題となり、本研究課題において新たな毒性表現型が、(例数は不十分かもしれないが) 高く検出されたことから、毒性試験の規格化、標準化へのハードルは高いといわざるを得ない。

ただし、当初から本研究計画にあったように、我々は簡易型試験のプロトタイプというべきものを提示することができた。IntelliCage テストである。IntelliCage テストは全自動で行われるためにマウスに対して実験者のバイアスが入る余地が少なく、実際に本研究でも日本とスイスの3つの異なる研究機関で同一の結果が得られることを確認済みである。さらに我々がプログラムを提供しただけで国内外5施設で同様の学習曲線が得られることも確認している。新規場面や日常での活動量、「水飲み場」を覚えるという単純な記憶から、認知的柔軟性やルール学習、さらには固執性や社会行動も解析可能な我々の試験は、試験プログラムをインストールすれば誰でもどこでも再現が可能であり、行動試験

の規格化、標準化に加え、高度化にも対応できる新たな評価手法となった。

この全自動試験装置 IntelliCage を用いたプログラムは、本研究の最大の成果であると言ってよい。この論文は、行動分野で最も歴史のある

Behavioural Brain Research 誌に受理・掲載された。例えば自閉症モデルや統合失調症モデルマウスを用いた解析にも有効だろうが、本研究課題は毒性試験の構築にある。そのようなクリニカルな問題よりも、低用量曝露による毒性表現型は、ひきこもりやニート、「落ち着きがない」「ストーキング」や暴力といったサブクリニカルな事象も重要課題となる。そこで本研究課題としては、再現性と定量性、そして「行動科学の専門誌において行動表現型の意味を確定」させることを優先させた。

本研究課題ではこれに加えて、ステレオロジー理論に基づいた免疫染色切片の半網羅的解析、標識された細胞に特異的な遺伝子発現解析を実現した LMD 法のように、行動試験のための科学的解析基盤の開発・整備と毒性試験への適用も達成することができた。原因遺伝子の探索という方向ではなく、行動変化という現象に科学的根拠を付与し、実験動物の結果をヒトに当てはめるためには、このような取り

組みの普及が必要である。

以上をもって、「情動・認知機能を定量化する包括的な行動毒性試験」として提示することとしたい。

## F 参考文献

Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banachabouchi MA, Kallnik M, Lad HV, Nolan PM, Ouagazzal AM, Coghill EL, Gale K, Golini E, Jacquot S, Krezel W, Parker A, Riet F, Schneider I, Marazziti D, Auwerx J, Brown SDM, Chambon P, Rosenthal N, Tocchini-Valentini G, Wurst W (2008) Reliability, robustness, and reproducibility in mouse behavioral phenotyping: a cross-laboratory study. *Physiol Genomics*, 34: 243-255.

Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Kakeyama M, 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, 385-390.

Bächli H, Steiner MA, Habersetzer U, Wotjak CT. 2008 Increased water temperature renders single-housed C57BL/6J mice susceptible to antidepressant treatment in the forced swim test. *Behav Brain Res.* 187:67-71.

Biegler R, & Morris RG. (1999) Blocking in the spatial domain with arrays of discrete landmarks. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 25:334-351.

Takeyama M, Tse D, Bast T, Tohyama C, Morris RGM. (2005) Flavour maps: paired-associate learning in an event arena as an animal model of associative recall. *Society for Neuroscience Abstract*, 31:995.5.

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

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, Takeyama M (2011) Automated test of

behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research*, 221, 172-181.

Harlow H.1949 The formation of learning sets. *Psychol Rev*, 56, 51-65.

Meyer-Lindenberg A, Kohn PD, Kolachana B, Kippenhan S, McInery-Leo A, Nussbaum RL, Weinberger DR, Berman KF (2005) Midbrain dopamine and prefrontal function in humans: interaction and modulation by COMT genotype. *Nature Neuroscience*, 8:594-596.

Inoue H, Yamasue H, Tochigi M, Abe O, Liu X, Kawamura Y, Takei K, Suga M, Yamada H, Rogers MA, Aoki S., Sasaki T, Kasai K (2010) Association between the oxytocin receptor gene and amygdalar volume in healthy adults. *Biological Psychiatry*, 68:1066-1072.

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. Flavor Map テスト (A) イベントアリーナ装置と(B) Flavor Map. (C) トレーニングでは、定められた6か所に常に sand-well が設置されているのだが、報酬ペレットが隠されているのはチョコレート味 (Flavor 1) なら、チョコレートに定められた sand-well (Location 1) にだけ、ペレット (チョコレート味) が隠されていることになる。スタート地点で手がかりペレットを与えてから、ラットにアリーナでの自由探索の機会を与えて、自身で正解ペレットを探し当てるまで待つ。このトレーニングを1日6カ所 (6つの味、すなわち、6つの Flavor -Location pairs) で行ってゆくことで、ラットはこのシティ・マップを学習できるようになる。

図2. (A) IntelliCage 装置と(B) behavioral sequencing task. (C) マウスは対角線上の正解コーナーを往復し、報酬 (水) を得る。1週間以内

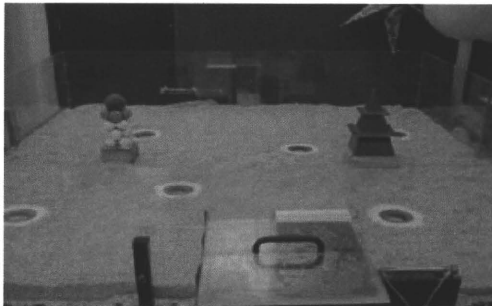
に誤答率は10%以下になる。(D) 反復逆転課題における正常マウスの学習曲線 (E) 認知的柔軟性、累計誤答数の各セッション内での変移。(F) マウスのルール学習。

図3. (A), (B) KODOMO 装置。(C) 対照群の行動軌跡 (白線) に比して、(D) PCB153 の胎仔曝露ラットでは、軌跡が厚いことがわかる。本研究課題ではこのモデルの定量解析を行い、ADHD 様症状であることを示唆する知見を得た。

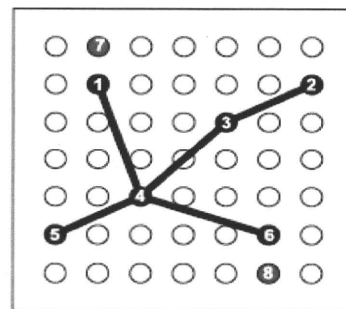
図4. LMD 法の開発と適用。(A) Flavor Map テスト直後の脳サンプルを回収し arc 免疫陽性細胞 (緑色) を特定した。陽性細胞のみを開発した LMD 法により回収し、遺伝子発現解析を行った。(B) 研究代表者らは以前、ダイオキシン曝露ラットの大脳皮質や海馬ではグルタミン酸受容体サブユニット NR2B mRNA の発現が用量依存的に低下していることを報告している。(C) しかし arc 陽性細胞のみでの遺伝子発現解析を行うと、低用量曝露群においてのみ、NR2B mRNA の発現量が激減していることを見出した。このような低用量特異的な変化は、行動試験成績と一致する。



**A** Event Arena



**B** Flavor Map



**C** Gradual Acquisition of Cued Recall

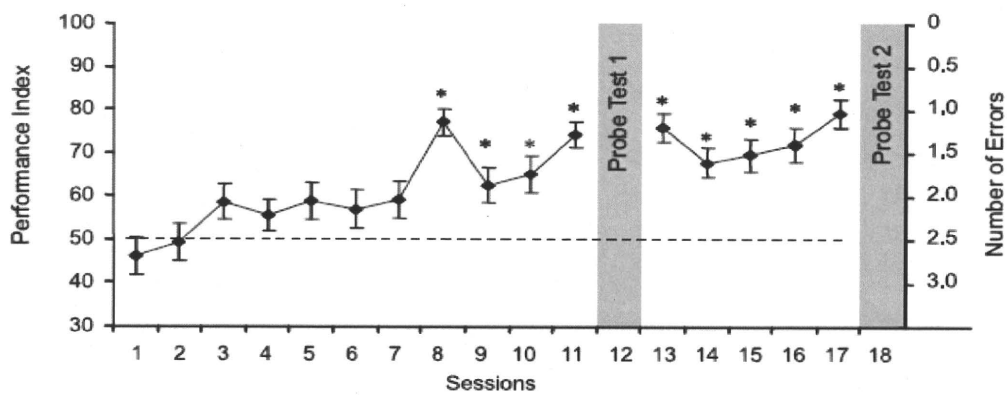
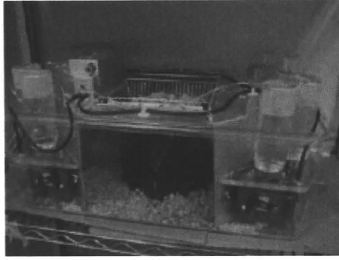
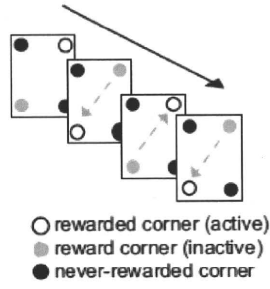


図 1. Flavor Map テスト

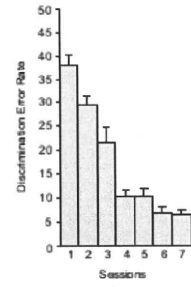
A IntelliCage



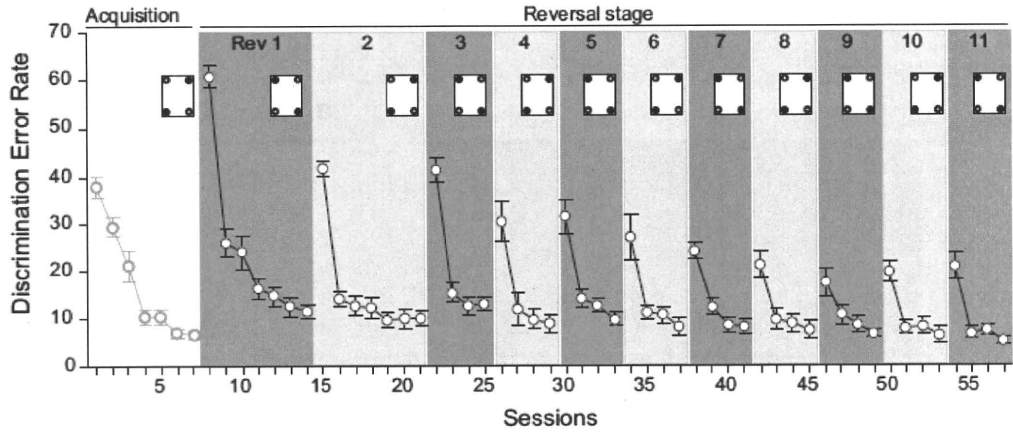
B Behavioral Sequencing Task



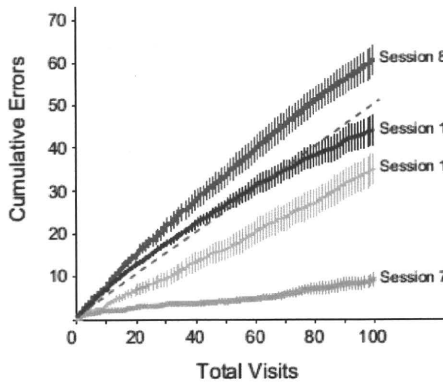
C Acquisition of Rewarded Corners



D Gradual Learning of Serial Reversals



E Cognitive Flexibility



F Reversal Learning-Set

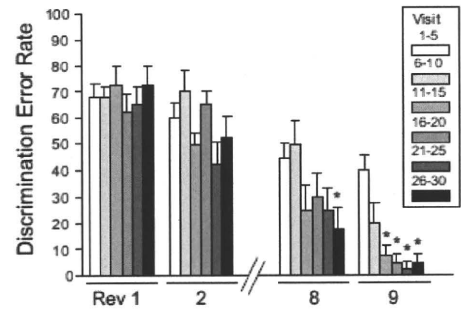


図 2. IntelliCage テスト

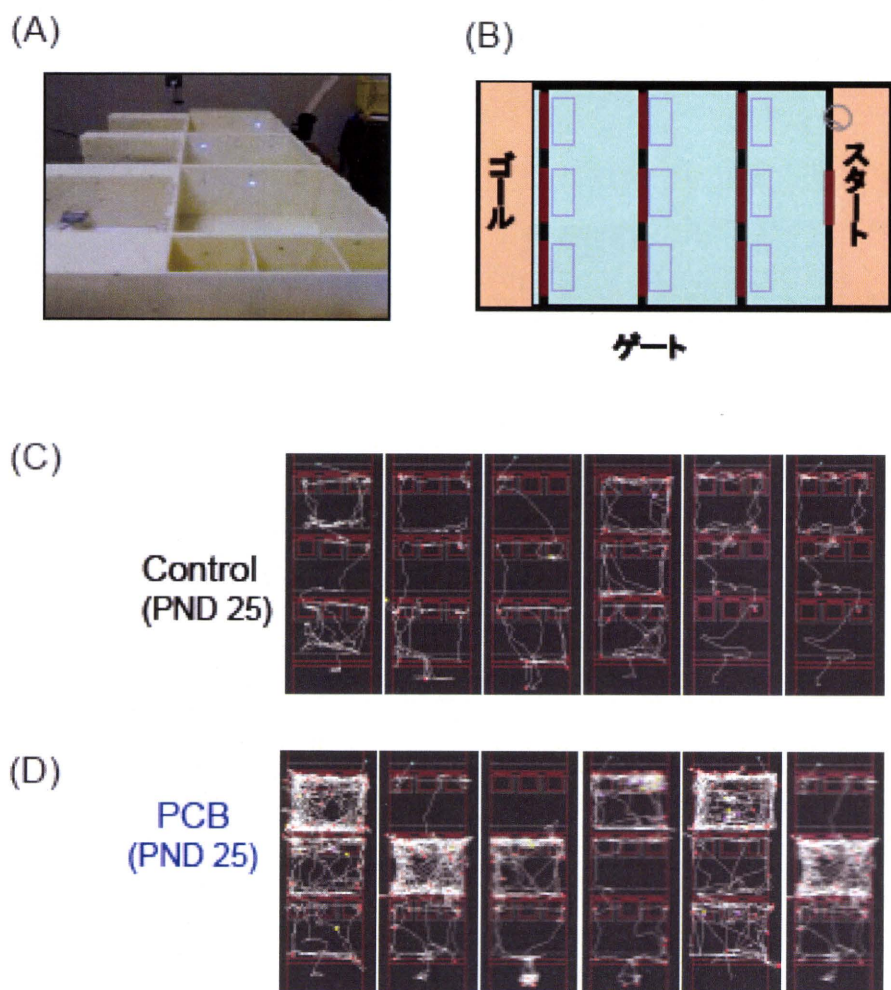
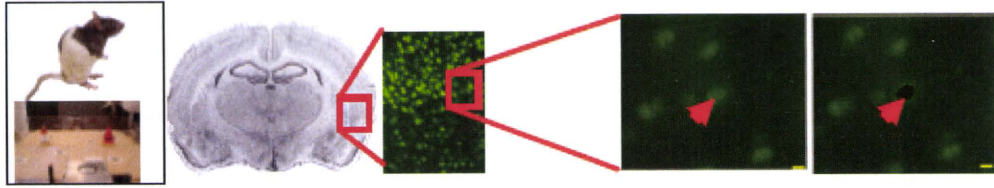
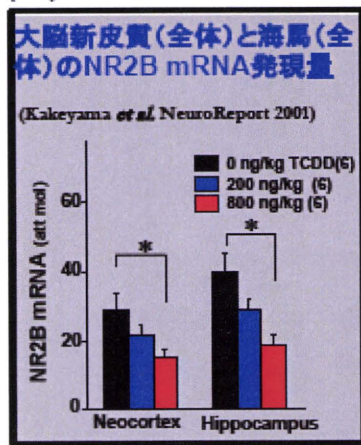


図 3. KODOMO テスト

(A)



(B)



(C)

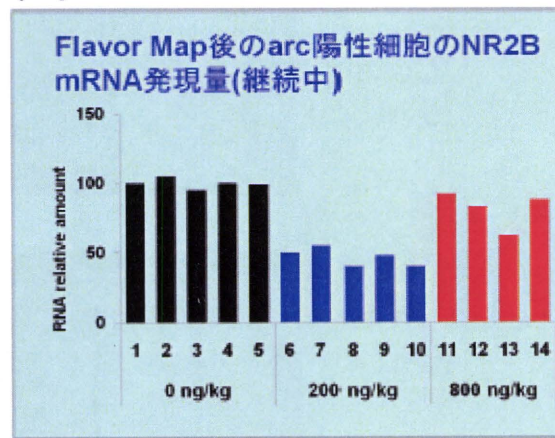


図4. LMD法の開発と適用

## 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2. ダイオキシン、ビスフェノールAの発達神経毒性

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

本研究課題で評価手法構築にあたって陽性条件として用いてきた、ダイオキシンならびにビスフェノールAの発達神経毒性に関して、多くの新知見を得ることができた。そこで本項では、それらの毒性影響知見に関するまとめを行った。

#### 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）

#### A 目的

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2」として、本研究で得られた発達神経毒性に関する知見について議論した。

#### 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.ダイオキシン、ビスフェノールA発達神経毒性に関する背景

ダイオキシンの発達期曝露による行動毒性としてはこれまで、生殖行動の「変化」(Mably et al. 1992; Kakeyama et al. 2003)、放射状迷路学習(Schantz et al. 1996; Seo et al. 1999, 2000)、オペラント学習(Widholm et al. 2003; Markowski et al. 2001, 2002; Hojo et al. 2002, 2008)、能動的回避学習(Nishijo et al. 2007)、文脈恐怖条件づけ(Mitsui et al. 2006)などが報告されている。

しかしこれらの報告のほとんどが、行動の変質・変容(behavioral alteration)といったものである。学習試験でも試験項目によっては、少なくとも見かけ上の試験成績が向上しているケースもある(Seo et al., 2000; Hojo et al., 2008)。

ビスフェノールAに関しても、発達神経毒性に関する多くの学術論文が報告されている(Negishi et al. 2004, Xu et al. 2011 etc.) 一方で、学習機能には影響がないとする報告(Ryan&Vandenbergh 2006 etc.)もあり、NOAELを再検討し更新するような根拠としては不十分だろうとの考えが

主流といえる。

要は、その行動変容が実験動物にとってどのような意味を持ち、さらにヒトに当てはめた場合にどのような機能的異常を反映しているのかについて十分に説明されてこなかったのである。毒性実験に限らずこれに近い現象は、遺伝子改変動物等を用いた多くのマウス実験でも、再現性の問題とあわせて発生しているように思われる(Gerlai, 2001; Tecott, 2003)。

健康リスク評価の際には、発達神経毒性以外にも生殖、免疫毒性など様々なエンドポイントをとりまとめ、種差の問題なども含め総合的に評価される。しかし、上述のように多くの場合、行動レベルでの影響に対する科学的な説明が不十分であったこともあり、発達神経毒性の実験結果は「行動変容(behavioral alteration)」や「学習成績低下(learning deficit)」という言葉に要約されてしまうことが多い。

低用量曝露影響に関するもう一つの問題は、低用量曝露においてのみ観察されるケースが複数報告されていることである。

ビスフェノールAでは、必ずしも神経毒性ではないが、低用量曝露においてのみ顕れる毒性がありうるという指摘(Howdeshell et al. 1999)に対しては再現性の問題も含めて議論が続い

ており(Gray et al. 2001 etc.)、ダイオキシンに関しては発達神経毒性として低用量曝露でのみ観察される影響が複数報告されている(Hojo et al. 2002, 2008, Ikeda et al. 2005 etc.)。

本項では、このような低用量影響やその再現性の問題を踏まえて、本研究課題での成果を中心にして、ダイオキシンならびにビスフェノールAの発達神経毒性についてまとめを行う。ただし本研究課題は評価手法構築が目的なので、毒性影響に関する知見の中には、今後例数を増やし、また再現性の確認も含めて詳細な統計学的解析が必要になるものも一部含まれることを付記しておく。

## 2.ダイオキシン、ビスフェノールAの発達神経毒性

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。

我々は以前、経胎盤・経母乳ダイオキシン曝露による基底レベルの大脳新皮質ならびに海馬の NR2B mRNA 発現が低下していること(Kakeyama et al. 2001)、性行動の変化と、性行動時

の前頭葉 BDNA mRNA の発現が低下することを報告しており(Kakeyama et al. 2003)、これらはいずれも、低用量域における用量依存的影響とってさしつかえない結果である(妊娠15日目の母ラットに200または800 ng/kgのTCDDを単回経口投与)。

さらに本研究では、マウスに対してダイオキシン曝露を行い、明暗箱往來試験や恐怖記憶の障害についても、比較的、量-反応関係がみられた影響として確認している。

一方低用量においてのみ確認された影響としては(ラットでは200 ng/kg、マウスでは0.6 μg/kg)、オペラント学習(FR課題)、対連合学習の阻害、不安様行動の惹起、強制水泳テストでの無動時間増加、オープン・フィールドテストでの活動性低下傾向(有意差はなし)、プレパルス抑制の低下、血中コルチコステロン増加、そしてIntelliCageテストにおいても、認知的柔軟性の低下、固執性亢進、社会的場面での不安様症状があることを見出した。

そしてIntelliCageテスト直後の脳において、神経活動依存的に発現増強する蛋白を免疫組織化学的に調べると、認知的柔軟性の低下、固執性亢進、社会的場面での不安様症状を示した低用量曝露群においてのみ、前頭葉なら

びに扁桃体において arc ならびに c-fos の発現が変動していることを見出した。

さらに、基底レベルでは用量依存的に発現低下を認めていた NR2B mRNA に関して、Flavor Map テスト時に活性化する神経細胞(arc 陽性細胞)のみを LMD 法により回収し解析したところ、行動変化と同様に低用量曝露群においてのみ激減していることがわかった。

以上のように、低用量特異的な行動変化は脳内 mRNA 発現や蛋白発現レベルでも検証され、また血中ホルモン濃度でも低用量特異的な変化を見出しており、少なくとも現象レベルでは低用量特異的な影響がありうることを示すことができたと言えよう。

一方ビスフェノール A に関しては、妊娠 6 日目から 18 日目までの母マウスに対して、0, 40, 400  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の BPA を経口投与することで曝露動物を作成した。IntelliCage テストでは、ダイオキシン曝露マウスで見られたような認知的柔軟性や固執性、社会行動の指標にはなんら影響がみられなかった。しかし IntelliCage を用いたオペラント学習を開発して解析を行ったところ、衝動性が亢進している可能性を示す結果を得た。IntelliCage では、マウスは指定された場所(窪み)に鼻

を入れる(ノーズポーク反応)ことで報酬(飲み水)を得ることができるが、衝動性タスクでは、最初のノーズポーク反応から一定時間(3~6秒)待ってから次のノーズポーク反応をしないと報酬が得られない。

BPA 低用量曝露群(40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )は、待機時間3秒の場合でも6秒の場合でも、反応間隔が長くなるのが対照群よりも遅かった。すなわち、「待つことが苦手」になるような傾向が観察された。行動影響に関しては低用量特異的であったが、組織、分子レベルでの解析では、低用量特異的な影響は観察されず、発達期の海馬 MAP2 蛋白の増加、成熟後の海馬スパイン密度の低下ともに用量依存的な影響であり、行動変化とは一致していない。MAP2 抗体は、神経細胞のマーカーとして用いられているように、神経細胞に特異的な発現を示すことから、その発現量増加は、BPA による神経回路形成の促進という既往報告(Tando et al. Brain Dev. 29:352-356)と一致するもののように見受けられる。しかし一方で、統合失調症患者の脳で MAP2 発現が高く、MAP2 は精神疾患治療薬のターゲット分子の一つという、全くことなる特徴も有する(Hirokawa et al., 2009 etc.)。ビスフェノール A の影響に関しては行動と分子レベルの変化の整合性も



含めて、今後の課題と言えよう。なお、MAP2 蛋白の増加はダイオキシン曝露動物にはないフェノタイプであった。

## D 考察

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。ラットに対する曝露量(200 ~800 ng/kg)は TDI 4 pg/kg/day の算出時の動物毒性実験で用いられたものと同様であり、マウスに対する曝露量(妊娠 12.5 目の母マウスに対して 0.6 または 3.0  $\mu$ g/kg)は、ラットよりも数倍高いとはいえ、実験で用いた C57/BL/6 マウスの半致死量はダイオキシン毒性実験で用いられる Long-Evans や Holtzman ラットよりも 5~10 倍高いことを考えると、やはりリスク評価にとって参考となりうる低用量域での曝露実験だといえる。我々以外のマウスを用いた実験では 5.0  $\mu$ g/kg~数十  $\mu$ g/kg の曝露量が用いられていることも申し添えておく。

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(強制水泳テストによる。抗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強制水泳テストで見られたような精神神経症状様のフェノタイプである。

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、海馬のスパン密度減少は用量依存的に観察された影響であった。

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 曝露ではダイオキシン毒

性とは異なり、衝動性の亢進があることを示唆する結果を得た。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ており、今後の毒性影響解析の大きな手がかりになるだろう。

## F 参考文献

- Mably TA, Moore RW, Goy RW, Peterson RE (1992) In utero and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 114:108-117
- Takeyama M, Sone H, Miyabara Y, Tohyama C (2003) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neurotoxicology*, 24:207-217
- Schantz SL, Seo BW, Moshtaghian J, Peterson RE, Moore RW (1996) Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicology and Teratology*, 18:305-313.
- 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). *Neurotoxicology and Teratology* 21:231-239.
- Seo BW, Powers BE, Widholm JJ, Schantz SL (2000) Radial arm maze performance in rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicology and Teratology*, 22:511-519.
- Widholm JJ, Seo BW, Strupp BJ, Seegal RF, Schantz SL. 2003 Effects of perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on spatial and visual reversal learning in rats. *Neurotoxicology and Teratology*, 25:459-471.

- Markowski VP, Zareba G, Stern S, Cox C, Weiss B (2001) Altered operant responding for motor reinforcement and the determination of benchmark doses following perinatal exposure to low-level 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environmental Health Perspective*, 109:621-627.
- Markowski VP, Cox C, Preston R, Weiss B (2002) Impaired cued delayed alternation behavior in adult rat offspring following exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on gestation day 15. *Neurotoxicology and Teratology*, 24:209-218.
- Hojo R, Stern S, Zareba G, Markowski VP, Cox C, Kost JT, Weiss B (2002) Sexually dimorphic behavioral responses to prenatal dioxin exposure. *Environmental Health Perspective*, 110:247-254.
- Hojo R, Kakeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohayama C (2008) Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 13:162-168.
- Nishijo M, Kuriwaki J, Hori E, Tawara K, Nakagawa H, Nishijo H (2007) Effects of maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on fetal brain growth and motor and behavioral development in offspring rats. *Toxicology Letters*, 173:41-47.
- 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. *Neuroscience Letters*, 398:206-210.
- Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y (2004) Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 112:1159-1164.
- Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L (2011) Sex-specific influence of exposure to bisphenol-A between adolescence and

young adulthood on mouse behaviors. *Neuropharmacology*. 2011 May 5. [Epub ahead of print]

Ryan BC, Vandenberg JG (2006) Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm Behav*. 50:85-93.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS (1999) Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764.

Gray LE, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni DN, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L (2001) Effect of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Hum Reprod Update* 7: 248-264.

Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Takeyama M, Sone H, Tohyama C, Tomita T. In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation.

*Toxicol Appl Pharmacol*. 205:98-105.

Takeyama M, Sone H, Tohyama C (2001) Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport*. 12:4009-12.

Takeyama M, Sone H, Miyabara Y, Tohyama C (2003) Perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neurotoxicology* 24:207-217.

Tando S, Itoh K, Yaoi T, Ikeda J, Fujiwara Y, Fushiki S (2007) Effects of pre- and neonatal exposure to bisphenol A on murine brain development. *Brain Dev* 29:352-6.

Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:682-96.

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