

201035010B

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

平成20～22年度

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

総合研究報告書

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

平成20～22年度

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

総合研究報告書

研究代表者 掛山 正心

平成 23 (2011) 年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

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総合研究報告	-----1
--	--------

II. 【資料】総括・分担研究報告書目次一覧

1. 資料 1 . 平成20年度総括・分担研究報告書目次	-----35
2. 資料 2 . 平成21年度総括・分担研究報告書目次	-----36
3. 資料 3 . 平成22年度総括・分担研究報告書目次	-----37

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----38

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----43

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総合研究報告書

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

平成20年度～平成22年度

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

有害性評価のために必要な毒性試験を開発するため、高次脳機能である情動・認知機能に対する影響を定量的に解析し、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・精度の優れたプロトコルを独自開発し、簡易型標準試験の原型としてふさわしいものを示すことができた。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、各試験の妥当性を検証した。

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教授
船橋利也・聖マリアンナ医科大学大学院医学研究科教授
塚原伸治・埼玉大学大学院理工学研究科准教授
上村夕香理・東京大学大学院医学系研究科特任助教
前川文彦・国立環境研究所主任研究員
尾藤晴彦・東京大学大学院医学系研究科准教授

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なためである。

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・マイクロダイゼクション法の確立、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性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 Ma 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す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・細胞での解析

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 cytoskeleton protein (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。

そして、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を構築し、BPA 低用量曝露 (40 μ 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 β 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、 α 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ゲン受容体 β 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) 経時的変化を定量的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性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

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となるはずである。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。

本研究課題での既存試験法を用いた取り組み

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行い、試験パラメータの再検討を行い、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。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。

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得なかった。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が残るためである。

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。

新たな行動試験の開発

そして新たな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ルを開発したことである。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回の試行で学習しうることを明らかにした。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。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版を作成した。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2)。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2)。

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。

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、後述のIntelliCage試験とあわせて、本研究班の大きな成果だと言えよう。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。

(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。

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。

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3）。

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。

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。

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 4)。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 (Endo et al. 2011) (図 4)。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はなく、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 4)。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 4C 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 4E、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。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。

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、再現性や定量性、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。標準化、高度化にともなえ得る簡易試験法の原型として、最先端のものを提示することができた。

(4) 低用量曝露影響に関する知見の提供

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だ

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.)。

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、明暗箱往来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 μ g/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)待つこと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