

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。これが単なる生体反応なのか毒性影響とみなされるのか、例数を増やす、再現性を確認する中で、さらに検討しなければならない課題といえる。

#### (5) 試験手法の妥当性の検証

まず、ダイオキシン曝露動物を用いた検証では、低用量特異的な影響について、これまで行動試験でしかみられなかったものだが、組織レベルの解析（前頭葉と扁桃体の異常）、分子レベルの解析（arc positive 神経細胞における NR2B 遺伝子発現）において見出すことができた。これは、低用量曝露影響についての重要な知見であると同時に、個々の試験法の妥当性が正しいことを示すものでもある。

また、ダイオキシン曝露と BPA 曝露では異なる影響があることも、行動-分子レベルで整合性がとれた結果が得られた。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。

#### E. 結論

毒性試験の結果を有害性評価に活かすためには、実験動物とヒトの種間の違いと共通性の問題を解決しなければならない。そして有害性評価の現場では、脳そのものの種差のほかに、体内動態や感受性の種差の問題をあわせて考慮する必要があり、現在の神経毒性学は、そのいずれにも解答が用意できず、すべてをひとまとめにして、

リスク評価のサイドに判断を任せているのが現状といえる。有害性評価のために必要な毒性試験は、記憶障害やうつ状態の「診断」ではなく、サブクリニカルな問題も含めた異常である。ある曝露量でマウスに何が起こるのかを科学的記述として明示し、その上で、メカニズム解析に基づいた科学的情報を踏まえ、種間の違いと共通性（実験結果の有効範囲）を考察し、その行動変化の意味をヒトにあてはめる手順が要求されているのではないだろうか。

本研究で構築した一連の評価手法はこの観点からデザインされている。IntelliCage テストプロトコールは簡易試験法の原型として極めて完成度の高いものが仕上がった。化学物質リスク研究から生み出されたこの手法が、生命科学全般に普及することを信ずる。

また新たに見出した“社会性指標”は、今後有害性評価においてこそ、最も重要な指標の一つとなるだろう。ヒトとの比較も含め、“社会性”指標も、今後の有害性評価において重要な位置づけになるだろう。

## F. 研究発表

### 1.論文発表

1. Cushing, B.S., Perry, A., Musatov, S., Ogawa, S. and Papademetriou E. Estrogen receptors in the medial amygdala inhibit the expression of male prosocial behavior. *Journal of Neuroscience*, 28, 10399-10403, 2008.
2. Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F. Gonadal steroid hormones maintain the stress-induced acetylcholine release in the hippocampus: simultaneous measurements of the extracellular acetylcholine and serum corticosterone levels in the same subjects. *Endocrinology*. 149:802-811, 2008.
3. Tsukahara S, Hojo R, Kuroda Y, Fujimaki H. Estrogen modulates Bcl-2 family protein expression in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of postnatal rats. *Neurosci Lett*. 432:58-63, 2008.
4. Kawashima T, Okuno H, Nonaka M, Adachi-Morishima A, Kyo N, Okamura M, Takemoto-Kimura S, Worley PF, Bito H. A synaptic activity-responsive element in the Arc/Arg3.1 promoter essential for synapse-to-nucleus signaling in activated neurons. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA USA*, 106:316-321, 2009
5. Crews, D., Rushworth, D., Gonzalez-Lima, F. and Ogawa, S. Litter environment affects behavior and brain metabolic activity of adult knockout mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3, Article 12, 2009.
  6. Tomihara, K., Soga, T., Nomura, M., Korach, K.S., Gustafsson, J-Å, Pfaff, D.W., and Ogawa, S. Effect of ER- $\beta$  gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiology and Behavior*, 96, 300-306, 2009.
  7. Hagiwara H, Ishida M, Arita J, Mitsushima D, Takahashi T, Kimura F, Funabashi T. The cAMP response element-binding protein in the bed nucleus of the stria terminalis modulates the formalin-induced pain behavior in the female rat. *Eur J Neurosci.* 30(12):2379-2386, 2009.
  8. Mitsushima D, Takase K, Funabashi T, Kimura F. Gonadal steroids maintain 24 h acetylcholine release in the hippocampus: organizational and activational effects in behaving rats. *J Neurosci.* 29:3808-3815, 2009.
  9. Tsukahara S, Nakajima D, Kuroda Y, Hojo R, Kageyama S, Fujimaki H. Effects of maternal toluene exposure on testosterone levels in fetal rats. *Toxicol Lett.* 185:79-84, 2009.
  10. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Kageyama M (Corresponding Author), 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.* 31:385-390, 2010.
  11. Nakamura, N.H., Fukunaga, M., Akama, K.T., Soga, T., Ogawa, S., and Pavlides, C. Hippocampal cells encode places by forming small anatomical clusters. *Neuroscience*, 166, 994-1007, 2010.
  12. Spiteri, T., Musatov, S., Ogawa, S., Ribeiro, A., Pfaff, D.W., and Agmo, A. The role of the estrogen receptor alpha in the medial amygdala and ventromedial nucleus of the hypothalamus in social recognition, anxiety and aggression. *Behavioural Brain Research* 2010, in press
  13. Lei, K., Cusing, B.S., Musatov, S., Ogawa, S., and Kramer, K.M. Estrogen receptor-alpha in the bed nucleus of the stria terminalis

- regulates social affiliation in male prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *PLoS One*, 5: e8931, Jan 27, 2010.
14. Furuta M, Mitsushima D, Shinohara K, Kimura F, Funabashi T. Food availability affects orexin a/ hypocretin-1-induced inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion in female rats. *Neuroendocrinology*. 91:41-47, 2010.
15. Funabashi T, Furuta M, Fukushima A, Kimura F. Age- and sex-specific changes in naloxone-induced luteinizing hormone secretion and Fos expression in gonadotropin-releasing hormone neurons of gonadectomized rats. *Neurosci Lett*. 471:157-161, 2010.
16. Hagiwara H, Kimura F, Mitsushima D, Funabashi T. Formalin-induced nociceptive behavior and c-Fos expression in middle-aged female rats. *Physiol Behav*. 100:101-104, 2010.
17. Bito, H. The chemical biology of synapses and neuronal circuits. *Nature Chem.Biol*. 6:560-563, 2010.
18. Win-Shwe TT, Tsukahara S, Yamamoto S, Fukushima A, Kunugita N, Arashidani K, Fujimaki H. Up-regulation of neurotrophin-related gene expression in mouse hippocampus following low-level toluene exposure. *Neurotoxicology*. 31:85-93, 2010.
19. Koike-Kuroda Y, Takeyama M, Fujimaki H, Tsukahara S. Use of live imaging analysis for evaluation of cytotoxic chemicals that induce apoptotic cell death. *Toxicol In Vitro*. 24:2012-2020, 2010.
20. Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Hajima 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.

## 2.学会発表

1. 遠藤俊裕、掛山正心、遠山千春、集団型全自動行動解析装置を用いた胎仔期授乳期の低用量ダイオキシン曝露マウスの行動影響評価、環境ホルモン学会第11回研究発表会、2008/12、東京

2. Takeyama M, Hojo R, Tohyama C. Chemically-induced attention deficit hyperactivity disorder-like behavior in juvenile rats detected by a newly developed behavioral test. the 38th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2008), 2008/11, Washington DC.1.
3. Uchimura T, Fukushi A., Tsuda MC, Sano K, Kashimura M, Higo S, Hood KE, Tsukahara S, Vasudevan N, Ogawa S. Anxiety and exploratory behaviors and social interactions in mice selectively bred for aggressiveness. The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, November, 2008/11, Washington DC.
4. Tsukahara S. Effects of developmental exposure to toluene on the sexual differentiation of the brain, Japan/China Symposium 2008 (KIZUNA2008): Strategies to Reduce Risks on the Brain Development Contingent to Urbanization, 2008/10, Tsukuba
5. 塚原伸治. 発達期の性的二型核におけるアポトーシスに関する研究, 日本神経内分泌学会第35回学術集会, 2008/08, 東京, (川上賞受賞講演) .
6. Tsukahara S. Sex difference in apoptosis and role of estrogen in the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area (SDN-POA) in postnatal rats, US/JAPAN Neurosteroid Symposium 2008, 2008/09, 岐阜.
7. 船橋利也、萩原裕子、貴邑富久子、高橋琢哉. AMPA 型グルタミン酸受容体サブユニット1のドミナントネガティブ体を雌性ラット視索前野に発現させると思春期の発来が遅延する. 第31回日本神経科学大会、2008/07, 東京.
8. 遠藤俊裕、掛山正心、遠山千春、集団型全自動行動解析装置を用いた胎仔期授乳期の低用量ダイオキシン曝露マウスの行動影響評価、第12回環境ホルモン学会、2009/12、東京
9. Endo T, Tohayama C, Takeyama M. Fully-automated analytic apparatus of rodent behaviors revealed low-dose specific effects of perinatal dioxin exposure on learning and affective function, 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
10. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Kurita H, Takeyama M, Tohyama C. Effects

- of in utero and lactational exposure to dioxin on the performance of fear conditioning in adult male mouse offspring. 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
11. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Maternal Exposure to Dioxins Perturbs the Schema-Dependent Paired Associative Learning in Rats. the 39th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2009), 2009/10, Chicago.
12. 掛山正心、蛍光免疫染色標本からの遺伝子発現解析、第 34 回組織細胞化学講習会、2009/07、徳島（招待）
13. 掛山正心、発達期のダイオキシン類曝露による高次脳機能のかく乱、第 20 回環境ホルモン学会講演会、2009/02、東京（招待）
14. Ogawa S. Neuroendocrine Bases of Social and Emotional Behavior. In The 11th IBRO Associate School of Neuroscience, 2009/12, Malaysia.
15. Ogawa S. Neuroendocrine Bases of Socio-Sexual and Emotional Behavior. Special Lecture at the 2nd China Animal Behavior Conference and Advanced Training Course for the Integrative Study of Behavior, 2009/11, Hefei, China.
16. Higo S, Endo T, Sakamoto T, Haijima A, Tohyama C, Takeyama M, Ogawa S. Effect of perinatal exposure to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on emotional and social behavior in mice, 21th Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, 2009/10, Tokyo.
17. 柏村実生, 津田夢芽子, Hood, K.D., Sisk, C.L., 坂本敏郎, 小川園子. 思春期のステロイドホルモン環境が情動・社会行動に及ぼす影響。第 69 回日本動物心理学会大会, 2009/09, 岐阜
18. Tsuda MC, Tanahara Y, Nagata K, Ogawa S. Neonatal maternal separation (MS) disrupts the onset and maintenance of aggressive behavior in pubertal male mice. The 32nd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2009/09, Nagoya.
19. Tsukahara S, Kuroda Y & Fujimaki H, Live imaging of sodium arsenite-induced apoptosis in PC12 cells. PPTOXII: Role of Environmental Stressors in the

- Developmental Origins of Disease, 2009/12, Miami.
20. 掛山正心. 新たな行動試験～ダイオキシンによる社会行動の異常. 第80回日本衛生学会学術総会, 生体応答研究会「毒性・リスク評価における新たなアプローチ」, 2010/05, 仙台.
21. 掛山正心. ヒトへの外挿を目指した行動毒性試験の開発: ダイオキシンによる高次機能の攪乱. 日本動物心理学会第70回大会シンポジウム「環境化学物質の発達神経毒性研究における動物心理学の役割」, 2010/08, 東京.(招待)
22. 掛山正心・遠山千春. 実験動物高次脳機能評価法の今後の展開. 環境ホルモン学会第13回研究発表会シンポジウム「環境ホルモン研究の今後の方向性」, 2010/12, 東京.(招待)
23. 遠山千春・掛山正心. 化学物質と行動・認知毒性学. 第28回日本医学会総会シンポジウム「環境毒性学の新たな展開」, 2011/05 (予定), 東京.
24. 小川園子・坂本敏郎. 周生期環境化学物質曝露が情動・社会行動発達に及ぼす影響. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄.(招待)
26. 尾藤晴彦. 神経回路制御を司る神経活動依存的遺伝子発現と微細形態変化. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄.(招待)
27. 掛山正心. 認知学習試験, 簡易試験, 行動と分子をつなぐ試み. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会シンポジウム「発達神経毒性の新たな評価方法の展開」, 2010/06, 沖縄.(招待)
28. 小川園子・津田 夢芽子・佐野 一広・山口奈緒子・坂本敏郎・Sergei Mussatov. エストロゲンによる社会行動制御の脳内機構: アデノ随伴ウイルスを用いた脳部位特異的な遺伝子発現操作による解析. 第87回日本生理学会大会シンポジウム『情動・社会行動の神経内分泌生理学 –新しいモデル動物を用いた挑戦–』2010/05, 盛岡
29. 佐越祥子・坂本敏郎・小川園子. 社会的認知及び空間認知機能におけるオキシトシン受容体の役割. 第70回日本動物心理学会大会, 2010/08, 東京
30. 小川園子・津田夢芽子・山口奈緒子・坂本敏郎. 社会行動、社会的認知、社会的絆形成を司る行動神経内

分泌機. 第 33 回日本神経科学大会  
シンポジウム 2010/09,神戸

31. Kobayashi, M., Kashimura, M., Yamaguchi, N., Sakamoto, T., Ogawa, S., 2010 Organizational effects of pubertal testosterone on socio-sexual and emotional behaviors in male mice. The 33rd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2010/09, Kobe.
32. Nakata M, Takemoto—Kimura S, Akashi N, Sakamoto T, Takeyama M, Yamazaki M, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Takeuchi T, Mori H5, Mishina M, Bito H, Ogawa S. Behavioral characteristics of CLICK-III/CaMKIgamma knockout male mice in social and non-social context. The 33rd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2010/09, Kobe.
33. Takemoto-Kimura S, Kamijo S, Horigane S, Suzuki K, Okuno H, Hajjima A, Endo T, Takeuchi T, Abe M, Natsume R, Yamazaki M, Mori H, Tohyama C, Sakimura K, Mishina M, Takeyama M, Bito H. Histological and behavioral analyses in CL3/CaMKIgamma-deficient mice The 33rd Annual Meeting of The Japan Neuroscience Society, 2010/09,

Kobe.

34. Endo T, Maekawa F, Voikar V, Hajjima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wofler DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Takeyama M. Corridor shuttling spatial learning task[1]: Automated analysis of behavioral flexibility and reversal learning-set in mice using IntelliCage system. 40<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience, 2010/10, San Diego.
35. Takeyama M, Endo T, Tohyama C. Corridor shuttling spatial learning task[2]: Chemically-induced emotional dysfunctions in group-housed mice as an animal model of perseveration and social anxiety. 40<sup>th</sup> Annual meeting of Society for Neuroscience, 2010/10, San Diego.

## G 参考文献

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.
- Endo T, Maekawa F, Võikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp H-P, Kakeyama M (2011) Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural Brain Research*, 221, 172-181.
- 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.
- 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.
- Harlow H.1949 The formation of learning sets. *Psychol Rev*, 56, 51-65.
- 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.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009) Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:682-96.
- 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.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS (1999) Environmental toxins: Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764.

- Ikeda M, Mitsui T, Setani K, Tamura M, Kakeyama 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.
- 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.
- Kakeyama M, Sone H, Tohyama C (2001) Changes in expression of NMDA receptor subunit mRNA by perinatal exposure to dioxin. *Neuroreport.* 12:4009-12.
- Kakeyama 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.
- Kakeyama 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.
- 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
- Mandillo S, Tucci V, Holter SM, Meziane H, Banhaabouchi 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.
- 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.

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.

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 tranylcypramine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 112:1159-1164.

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.

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.

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

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.

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.

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.

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]

**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。

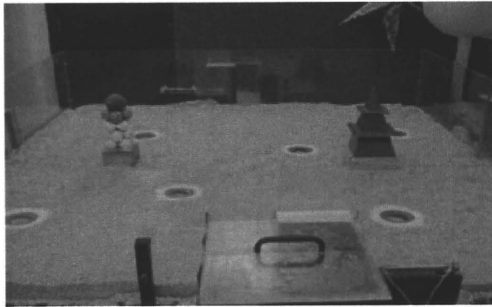
図 2. (A), (B) KODOMO 装置. (C) 対照群の行動軌跡 (白線) に比して、(D) PCB153 の胎仔曝露ラットでは、軌跡が厚いことがわかる。本研究課題ではこのモデルの定量解析を行い、ADHD 様症状であることを示唆する知見を得た。

図 3. LMD 法の開発と適用.  
(A) Flavor Map テスト直後の脳サン

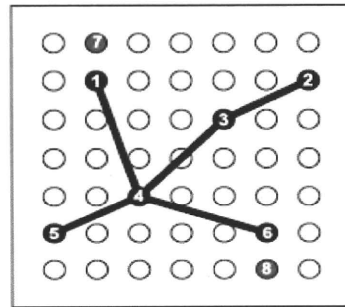
プルを回収し arc 免疫陽性細胞 (緑色) を特定した。陽性細胞のみを開発した LMD 法により回収し、遺伝子発現解析を行った。(B) 研究代表者らは以前、ダイオキシン曝露ラットの大脳皮質や海馬ではグルタミン酸受容体サブユニット NR2B mRNA の発現が用量依存的に低下していることを報告している。(C) しかし arc 陽性細胞のみでの遺伝子発現解析を行うと、低用量曝露群においてのみ、NR2B mRNA の発現量が激減していることを見出した。このような低用量特異的な変化は、行動試験成績と一致する。

図 4. (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。

**A** Event Arena



**B** Flavor Map



**C** Gradual Acquisition of Cued Recall

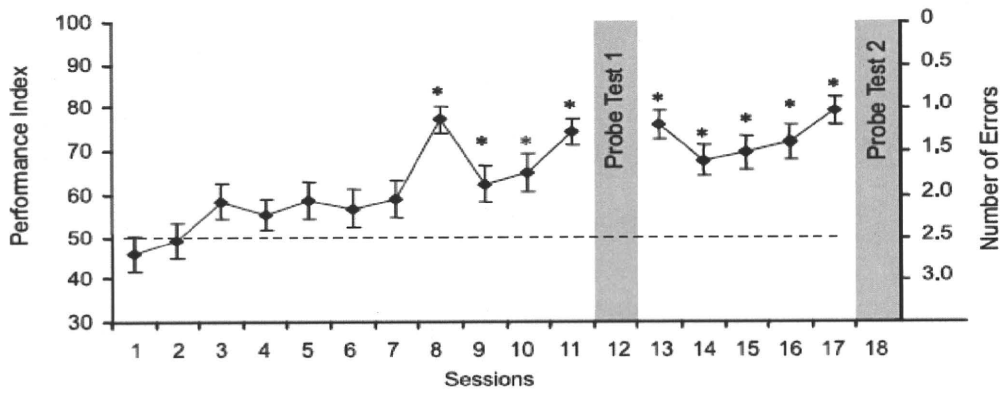
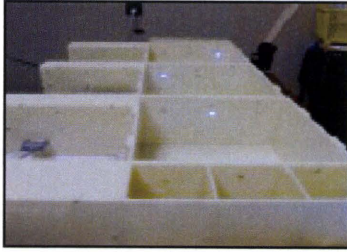
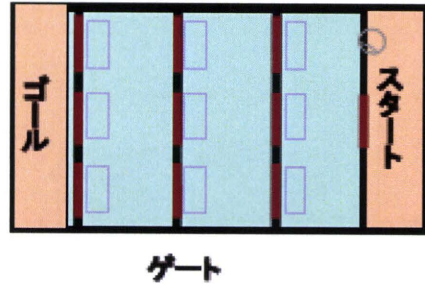


図 1. Flavor Map テスト

(A)

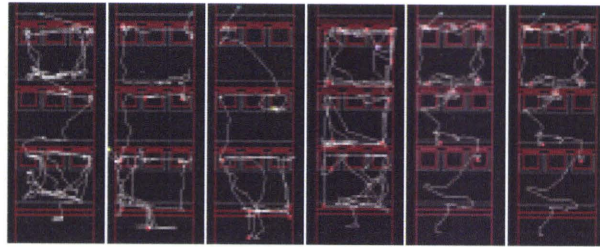


(B)



(C)

Control  
(PND 25)



(D)

PCB  
(PND 25)

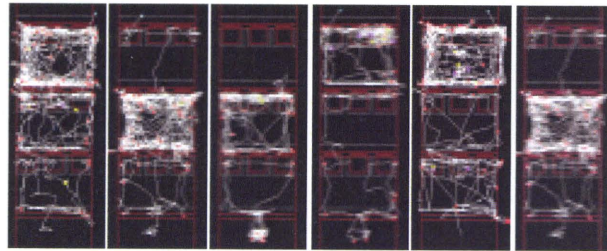
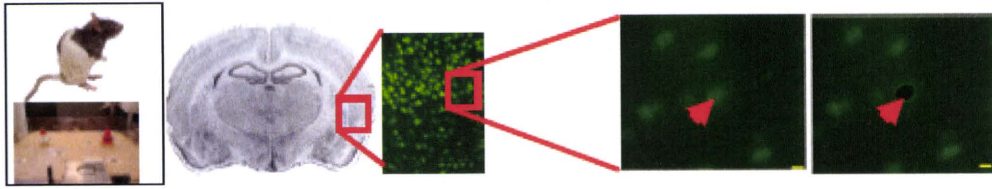
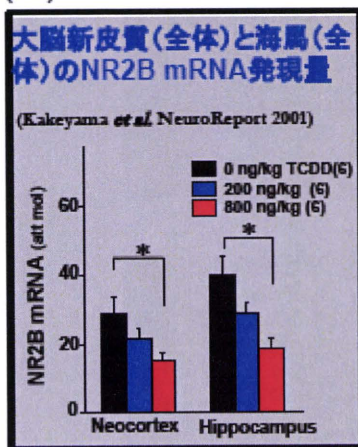


図 2. KODOMO テスト

(A)



(B)



(C)

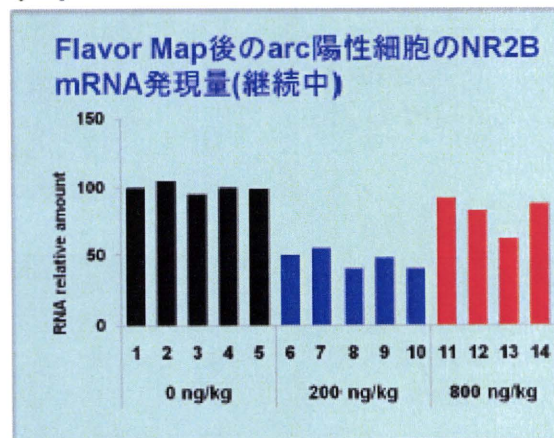
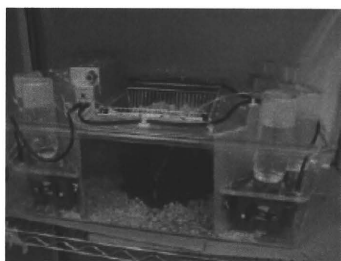


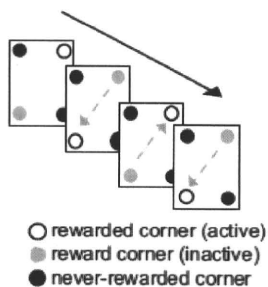
図3. LMD法の開発と適用



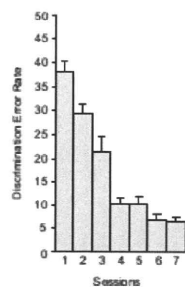
**A** IntelliCage



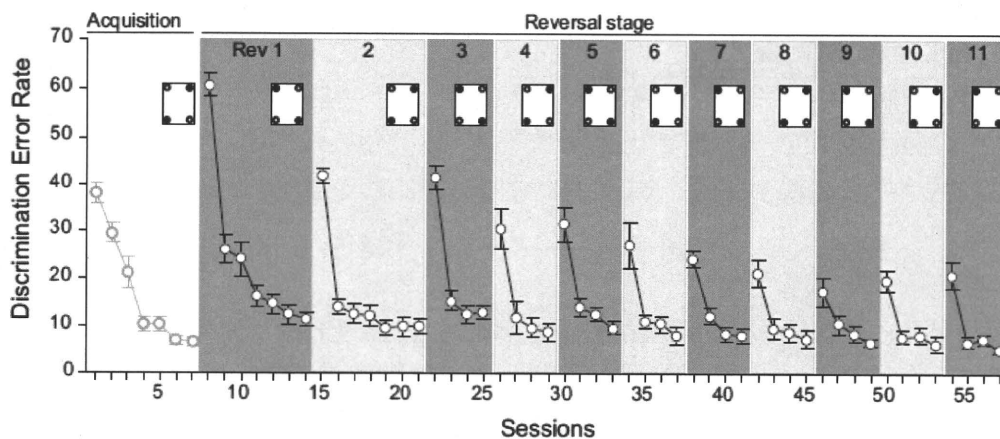
**B** Behavioral Sequencing Task



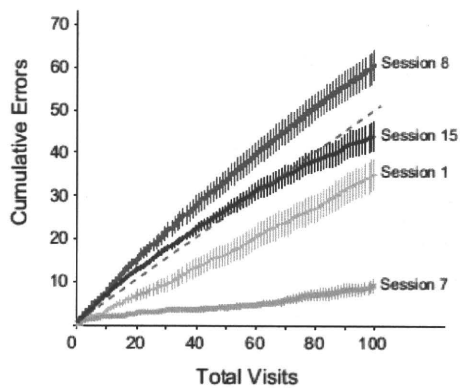
**C** Acquisition of Rewarded Corners



**D** Gradual Learning of Serial Reversals



**E** Cognitive Flexibility



**F** Reversal Learning-Set

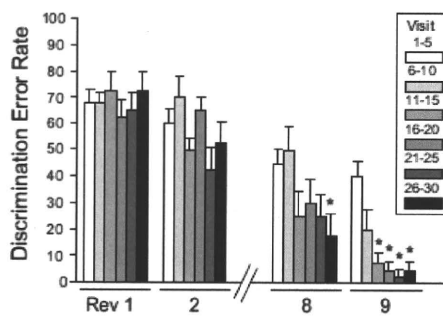


図 4. IntelliCage テスト

(資料 1)

平成 20 年度総括・分担研究報告書目次

I. 総括研究報告書	
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 ----1	
掛山正心	
II. 分担研究報告書	
1. 大脳皮質依存性の学習試験の構築に関する研究 -----10	
2. マウスの海馬および扁桃体の神経細胞に及ぼす	
発達期ダイオキシン曝露の影響に関する研究 -----22	
3. バレル皮質を用いた化学物質の神経系発達期に	
おける作用の評価に関する研究----- 32	
4. マウス集団型全自動行動解析システムを用いた	
毒性試験に関する研究----- 37	
5. 情動行動試験バッテリーの構築に関する研究-----48	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----57	
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----58	

(資料2)

平成21年度総括・分担研究報告書目次

V. 総括研究報告書

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-----1

VI. 分担研究報告書

1. 簡易試験としての集団型全自動行動解析装置を用いた  
新たな学習試験法の確立に関する研究 -----15

2. 周産期ダイオキシン曝露動物を用いた  
IntelliCage 行動試験の検証-----42

3. 周産期ダイオキシン曝露動物を用いた情動試験の検証----- 71

4. 塩素化および臭素化ダイオキシンの胎仔期・授乳期曝露が  
恐怖記憶へ及ぼす影響に関する研究----- 84

5. ニューロンの細胞骨格関連分子群の発現を指標にした  
発達期ダイオキシン曝露の後発影響評価----- 94

6. 大脳皮質依存性の学習試験の構築に関する研-----106

VII. 研究成果の刊行に関する一覧表-----120

VIII. 研究成果の刊行物・別刷 -----121

(資料3)

平成 22 年度総括・分担研究報告書目次

I. 総括研究報告書

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 -----1

II. 分担研究報告書

1. 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-----19

2. 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-----32

3.胎仔期・授乳期におけるダ低用量イオキシシン曝露が  
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-----42

4. 神経細胞の形態構造変化を指標にしたin vitro試験法開発----- 62

5. 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-----74

6. まとめ2. ダイオキシシン、ビスフェノールAの発達神経毒性-----90

III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----99

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----101