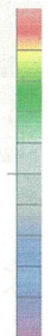
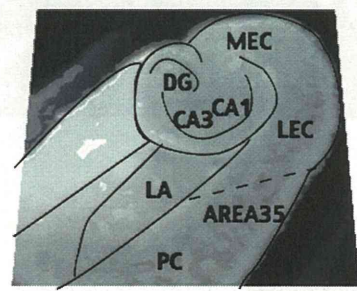
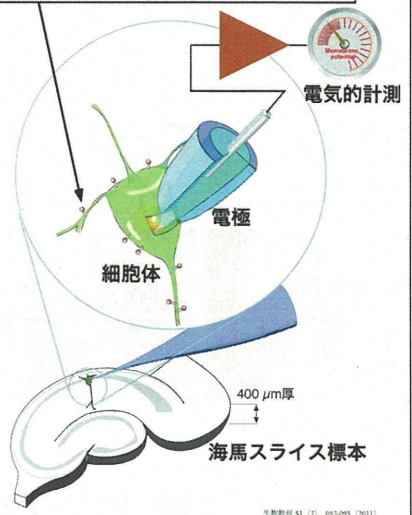
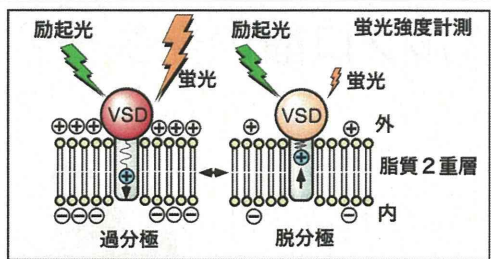


**Entorhinal-Hippocampal Interactions Revealed by Real-Time Imaging**

Toshio Iijima,\* Menno P. Witter, Michinori Ichikawa, Takashi Tominaga, Riichi Kajiwara, Gen Matsumoto  
SCIENCE • VOL. 272 • 24 MAY 1996



梶原と冨永 unpublished

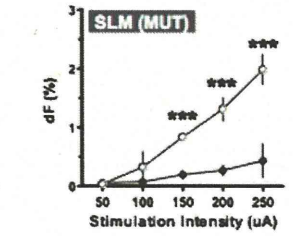
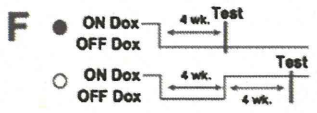
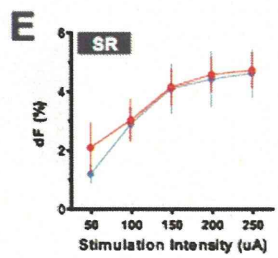
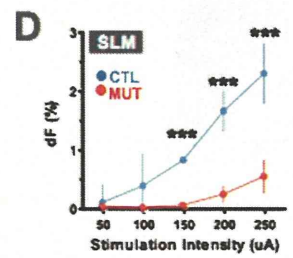
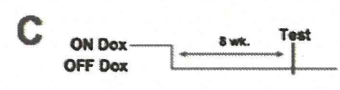
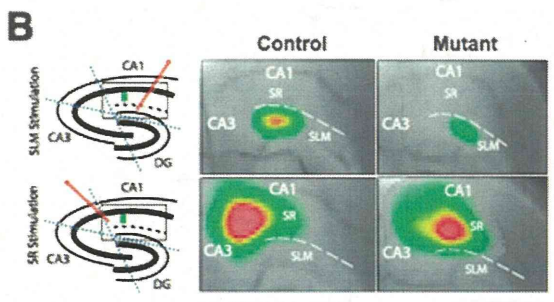
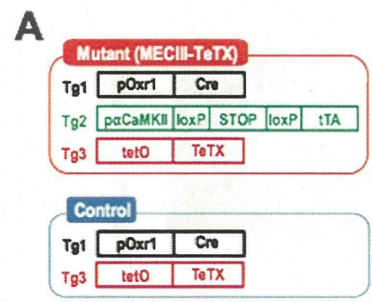


理論/実験技術

**実践! 膜電位感受性色素による神経回路解析**

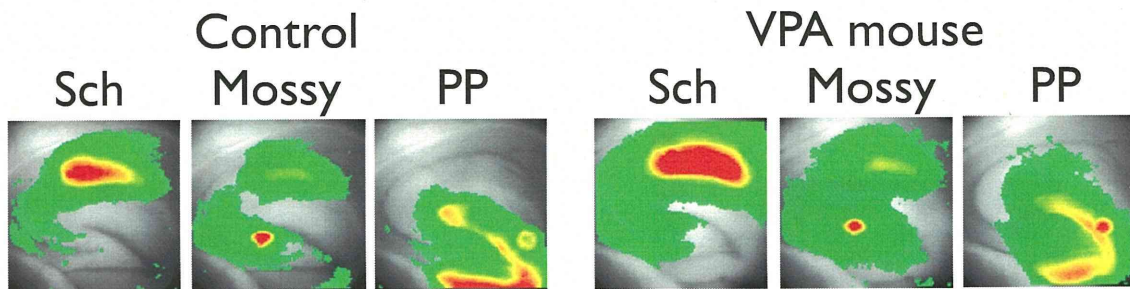
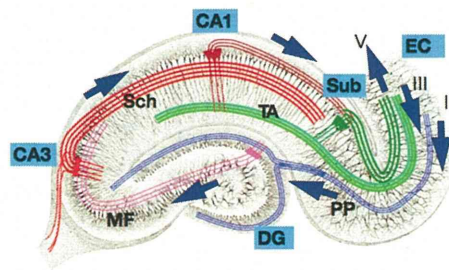
冨永貴志<sup>1,2</sup>, 冨永洋子<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>福島大学理学部  
<sup>2</sup>理化学研究所脳科学総合研究センター

**内側嗅内野第3層ニューロン(temporal anmnonic pathway;TA)の神経伝達を条件づきで制御**



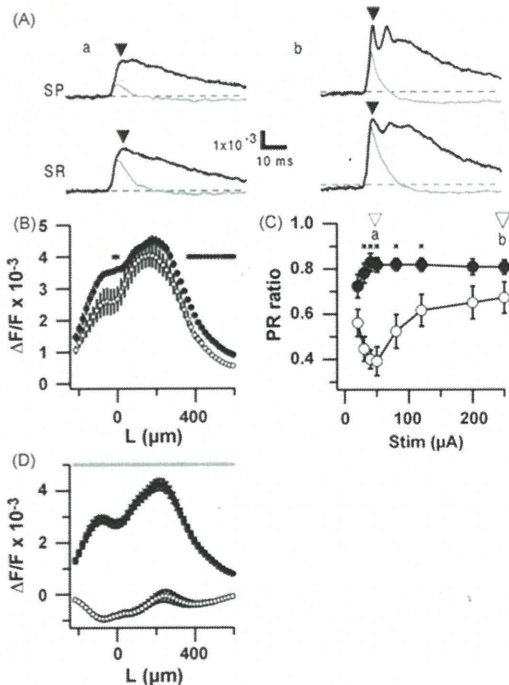
Suh, J., Rivest, A. J., Nakagishi, T., Tominaga, T., & Tonegawa, S. (2011). *Science*

# バルプロ酸の発生一発達期投与による神経回路変化



基本的な神経伝達には変化がない

## 抑制系への影響



normal solution



+ PITX

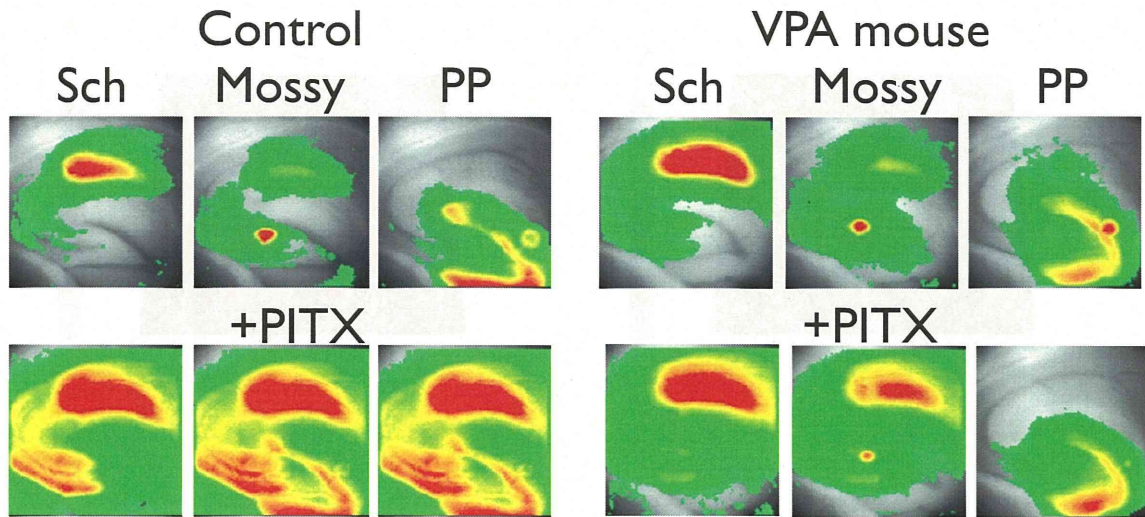
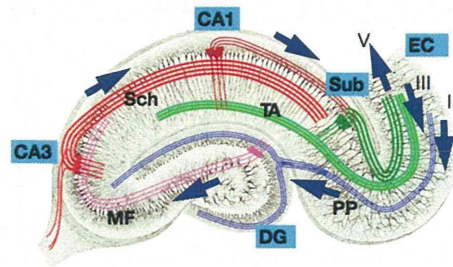


Membrane potential response profiles of CA1 pyramidal cells probed with voltage-sensitive dye optical imaging in rat hippocampal slices reveal the impact of GABA<sub>A</sub>-mediated feed-forward inhibition in signal propagation

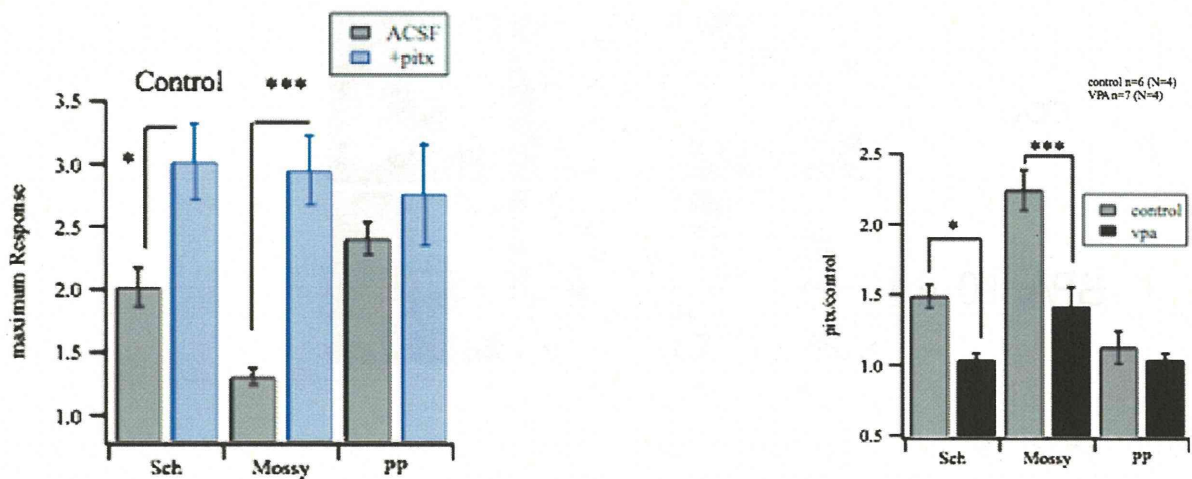
Yoko Tominaga<sup>\*,†</sup>, Michinori Ichikawa<sup>\*,†</sup>, Takashi Tominaga<sup>\*,†,‡,§</sup>

Neuroscience Research 64 (2009) 152-161

# バルプロ酸の発生-発達期投与による神経回路変化



## バルプロ酸-まとめ

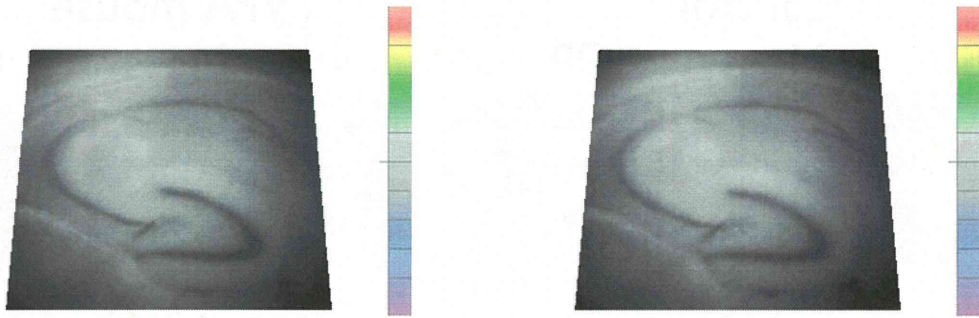


バルプロ酸の発生-発達期投与で抑制によって制御される余地が少なくなる

# 幼若動物(2週令)でのBPAの急性影響

Control

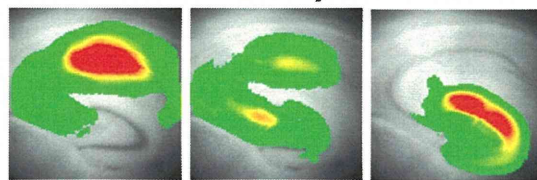
BPA 10 $\mu$ M 1hr



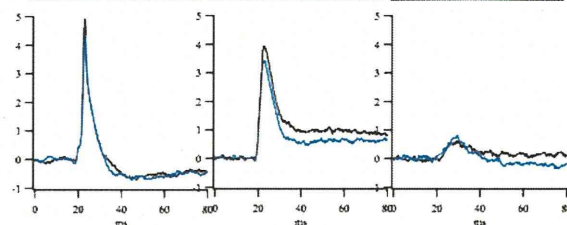
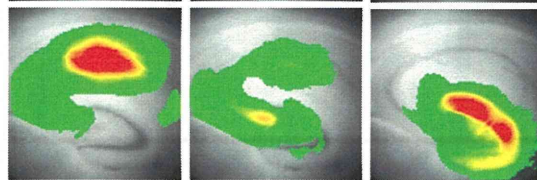
# 幼若動物(2週令)でのBPAの急性影響

Sch Mossy PP

control

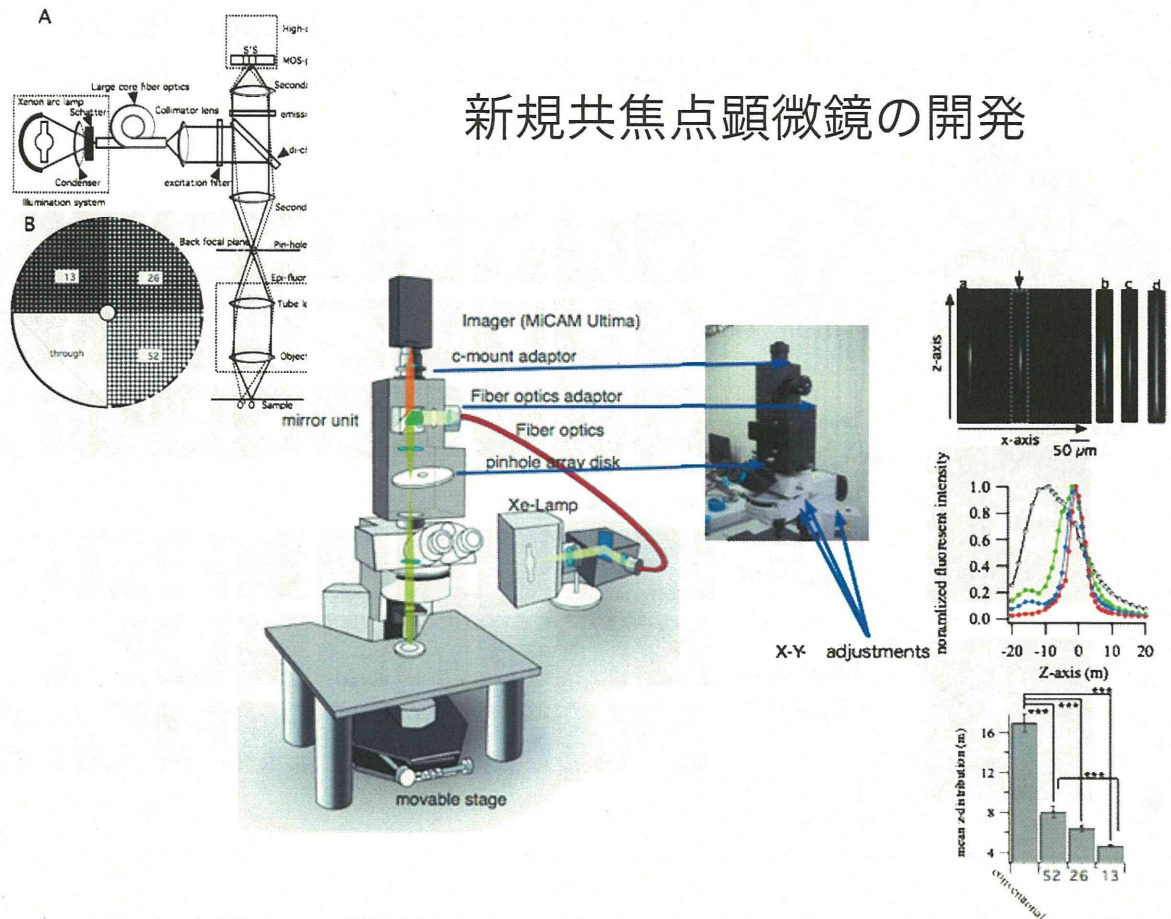


BPA 10 $\mu$ M

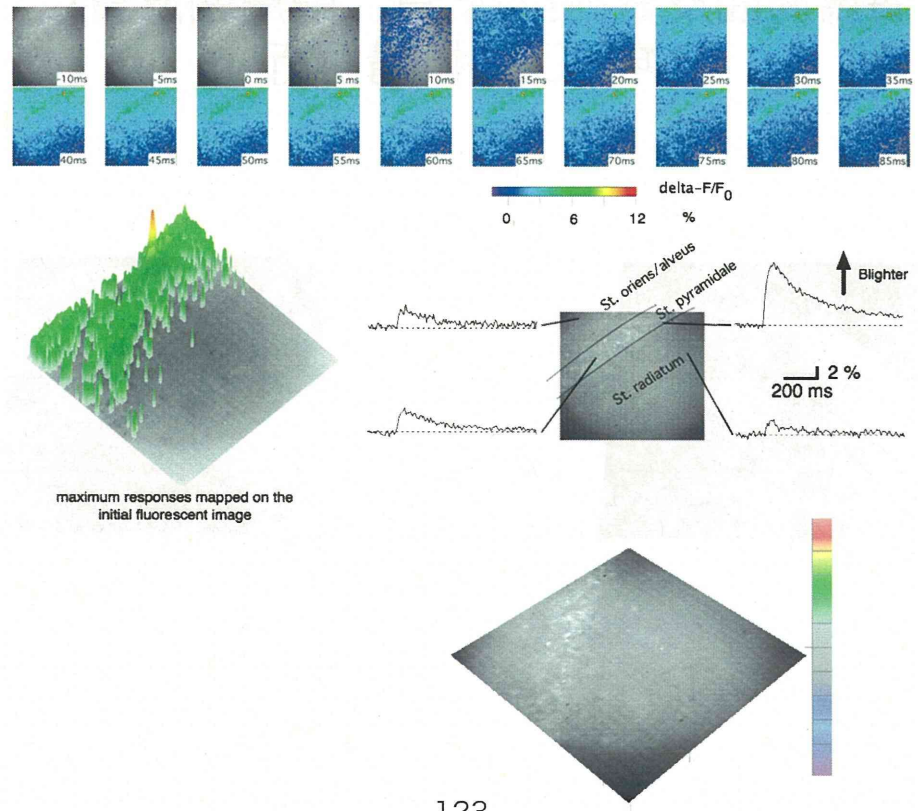


若干の減弱

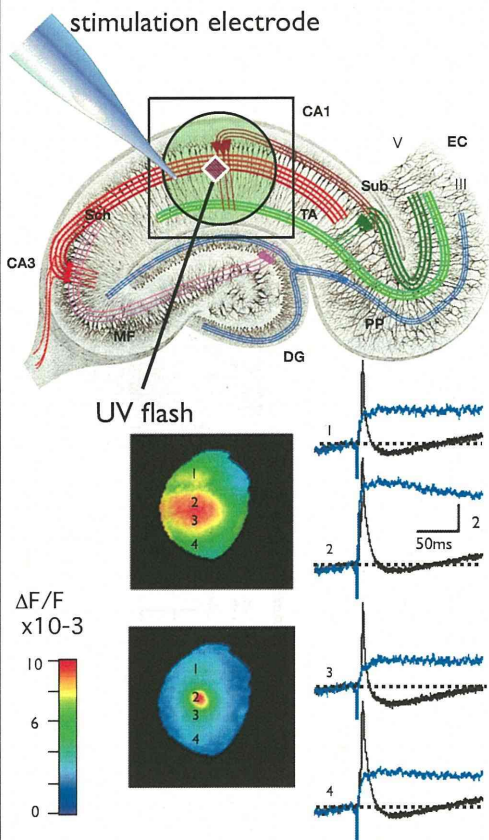
# 新規共焦点顕微鏡の開発



## 細胞レベル カルシウムイメージング 52 $\mu\text{m}$ -pinhole 5 ms/frame



# Imaging of neuronal response to electrical stimulation and photo-stimulation



Electrical stimulation

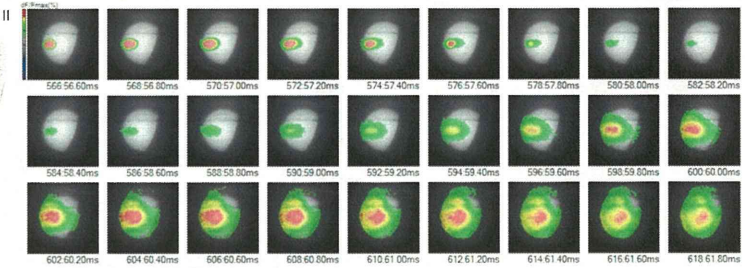
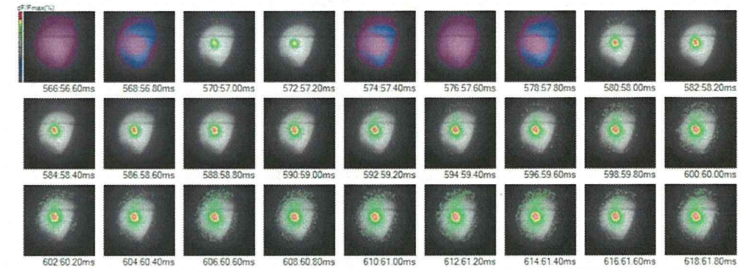
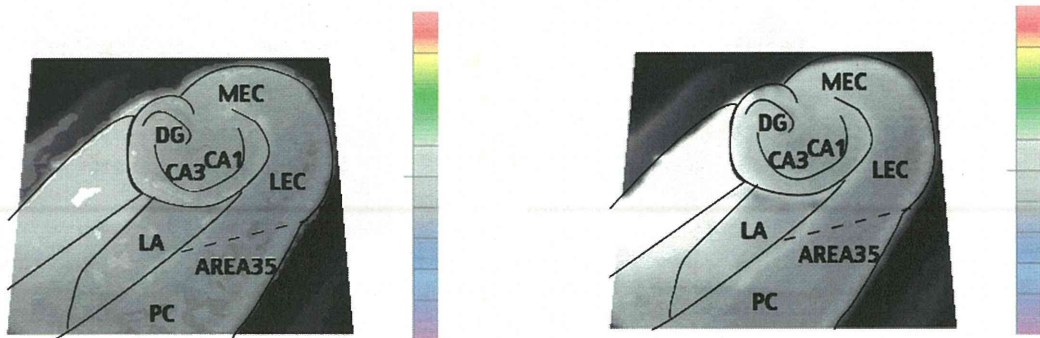


Photo-stimulation



## 海馬周圍皮質(嗅内皮質、嗅周圍皮質)の神経回路機構解析



Control

4AP 40 $\mu$ M

### Genetically encoded probes for optical imaging of brain electrical activity

Amélie Perron, Walther Akemann, Hiroki Mutoh and Thomas Knöpfel\*

RIKEN Brain Science Institute, Hiroosawa, Wako City, Saitama, Japan

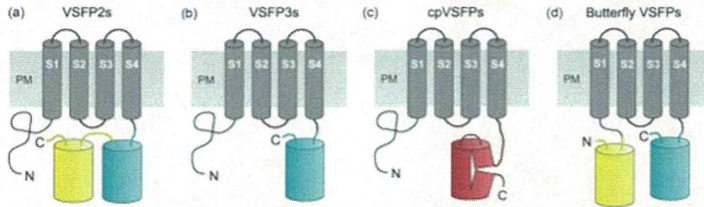
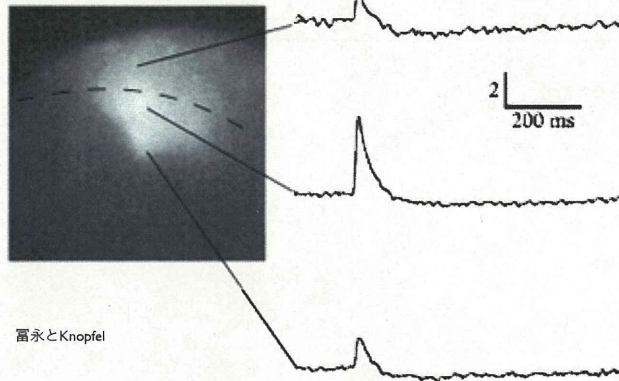


Fig. 1 Schematic design of VSFP probes derived from a combination of a voltage sensor domain and fluorescent proteins.

## 海馬錐体細胞 特異的VSFP



富永とKnöpfel

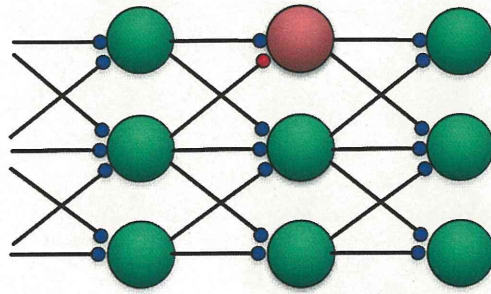
# 情動認知行動毒性評価系確立のための 神経回路異常の機能解析と光計測

1. 情動認知の神経回路
2. トランスジェニックマウスによる記憶—学習  
に関わる神経回路の改変
3. バルプロ酸の発生—発達期投与による神経回  
路改変
4. BPAの急性効果
5. 光計測の新規の試み

神経回路異常

検出された異常

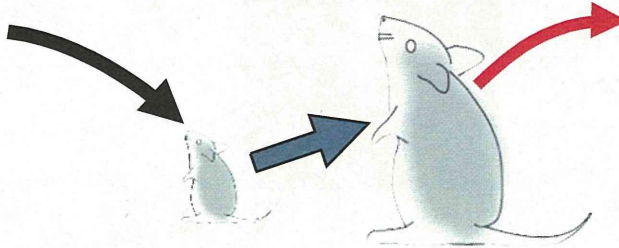
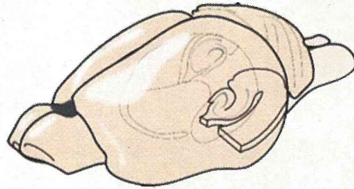
BPA



- MECIII knock-out
- TA pathway
- VPA application
- Sch
- Mossy

発生一発達期

化学物質



認知機能異常



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

発生-発達期ビスフェノールA暴露による脳構築異常解析

研究分担者 中島 欽一  
奈良先端科学技術大学院大学 教授

【研究要旨】

本年度の研究では、妊娠6日目から15日目にかけて、マウスにビスフェノールA (BPA) を飲料水により投与し、15日目胎仔脳切片の免疫組織染色による解析を行った。しかしこの条件では胎生期BPA暴露による神経幹細胞の増殖や分化、またその結果引き起こされるであろう脳構築異常は観察されなかった。

A. 研究目的

脳・神経系は主要な3つの細胞種、ニューロン、アストロサイト及びオリゴデンドロサイトによって構成されるが、これらは共通の神経幹細胞から産生され、互いに密接に連携しながら高度な情報処理機能を発揮する。そのためには胎児期から成体における神経幹細胞から各種細胞への分化・成熟が時空間的に精妙に制御される必要がある。これが破綻した場合、これまでも重度な神経疾患や機能障害に至ることが数多く示されているがその原因の詳細については不明な点が多い。本分担者はこれまで、遺伝子配列変換を伴わずに遺伝子発現を制御する「エピジェネティクス」機構が、神経幹細胞の運命決定に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。そこで本研究では、細胞に対しDNAメチル化変化などを誘導することが知られる環境化学物質ビスフェノールA (BPA) に着目し、発生-発達期ビスフェノールA暴露による脳構築異常の解析とその原因を幹細胞制御の観点から明らかにする。

B. 研究方法

本年度の研究では、妊娠6日目から15日目にかけて、

飲料水 (15 ppm) にてBPAをマウスへ与えた。また増殖性細胞をラベルするため、BrdU (100 mg/kg) を妊娠15日目マウスへ投与、その30分後に胎仔脳を取り出し固定した。15 mmの切片を作成後、神経幹細胞マーカー (Nestin, Pax6)、増殖細胞マーカー (Ki67, リン酸化ヒストン H3, BrdU)、ニューロンマーカー (Tuj1, DCX)、深層ニューロンマーカー (CTIP2)、に対する抗体を用いて免疫組織染色を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は奈良先端科学技術大学院大学の動物倫理委員会の規定に基づき行うものである。

C. 研究結果

免疫染色の結果、妊娠6日目から15日目までBPAに暴露されたマウス胎仔脳と、コントロールの胎仔脳には、明らかな差は認められなかった。

D. 考察

今回胎生期BPA暴露マウス脳において、コントロール脳と差が見られなかった原因として、以下のこ

とを考えている。まず、投与時期について。受精後～胎性3日に掛けて、ゲノムDNA全体に渡り脱メチル化が生じる。その後体細胞においては、急激な再メチル化が誘導される。今回胎性6日目からの投与を行ったが、この時期、体細胞ゲノムは既にメチル化パターンがほぼ確立されており、使用した15 ppmというBPA濃度ではメチル化変動を誘導するには不十分だったものと思われる。従って次回は妊娠のさらに初期である胎性1日目からのBPA投与を検討する。また今回は、性差や飲水量を考慮していなかったため、次回は妊娠マウスを個別に飼育し飲水量を計測しつつ、得られた胎子の雌雄を確認し、免疫染色結果を評価する。

#### E. 結論

これまで述べたように、今回採用した濃度・投与時期では、胎生期BPA曝露による脳構築異常は観察できなかった。今後は考察で述べた変更を加え、研究を展開する。

#### F. 健康危惧情報

特になし。

#### G. 研究発表 (今年度のものをご記入下さい。)

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

1. Namihira M. & Nakashima K. Fate specification of neural stem cells. in *Neurogenesis in the adult brain I* (eds. Seki, T., Sawamoto, K., Parent, J.M. & Alvarez-Buylla, A.) 87-107 (Springer, Tokyo, 2011).

###### 2) 雑誌

1. Fujimoto Y., Abematsu M., Falk A., Tsujimura K., Sanosaka T., Juliandi B., Semi K., Namihira M., Komiya S., Smith A. & Nakashima K. Treatment of a mouse model of spinal cord injury by transplantation of human iPS

cell-derived long-term self-renewing neuroepithelial-like stem cells. **Stem Cells** in press.

2. Mutoh T., Sanosaka T., Ito K. & Nakashima K. Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells via HIF1 $\alpha$ -Notch signal interaction in the developing brain. **Stem Cells** 30, 561-569 (2012).
  3. Juliandi B., Abematsu M., Sanosaka T., Tsujimura K., Smith A. & Nakashima K. Induction of superficial cortical layer neurons from mouse embryonic stem cells by valproic acid. **Neurosci Res** 72, 23-31 (2012).
  4. Nagao H., Ijiri K., Hirotsu M., Ishidou Y., Yamamoto T., Nagano S., Takizawa T., Nakashima K., Komiya S. & Setoguchi T. Role of GLI2 in the growth of human osteosarcoma. **J Pathol** 224, 169-179 (2011).
  5. Kuwabara T., Kagalwala M.N., Onuma Y., Ito Y., Warashina M., Terashima K., Sanosaka T., Nakashima K., Gage F.H. & Asashima M. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus and the olfactory bulb. **EMBO Mol Med** 3, 742-754 (2011).
2. 学会発表  
(国内学会)
1. 武藤哲司、佐野坂司、伊藤慧、中島欽一<sup>○</sup>: Epigenetically regulated fate switching of neural stem cells by oxygen levels through HIF1 $\alpha$ -Notch signal interaction in the developing brain、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日 (招待講演)
  2. 佐野坂司<sup>○</sup>、武藤哲司、伊藤慧、中島欽一: Oxygen levels play a critical role in fate switching of neural stem cells during brain development、

- 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
3. 蟬克憲<sup>○</sup>、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一：NFIA-induced DNA demethylation in *Olig1* promoter regulates the expression of the gene in late-gestational neural precursor cells、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
  4. 野口浩史<sup>○</sup>、波平昌一、田中友規、佐野坂司、中島欽一：DNMT1 inhibits the neuronal differentiation of late-gestational neural precursor cells、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
  5. 田中友規<sup>○</sup>、波平昌一、野口浩史、五十嵐勝秀、辻村啓太、中島欽一：Functional analysis of DNA-methyltransferase 1 in post-mitotic neurons、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2011年12月13-17日
  6. 中島欽一<sup>○</sup>：エピジェネティック因子による神経幹細胞制御とその再生医療への応用、第37回日本重症心身障害学会学術集会、ホテルクレメント徳島、2011年9月29日（招待講演）
  7. 波平昌一<sup>○</sup>、中島欽一：神経発生に置けるDNAメチル化とその酵素群の役割、第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月14-17日（口頭）
  8. 蟬克憲<sup>○</sup>、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一：転写因子が誘導する*Olig1*遺伝子プロモーターの脱メチル化、第34回日本神経科学大会、パシフィコ横浜、2011年9月14-17日
  9. 中島欽一<sup>○</sup>：抗てんかん薬バルプロ酸のエピジェネティック作用による神経幹細胞制御とその影響、第38回日本トキシコロジー学会学術年会、パシフィコ横浜、2011年7月11日（招待講演）
  10. 中島欽一<sup>○</sup>：抗てんかん薬と神経幹細胞移植による脊髄損傷治療の可能性、第10回京都鴨川脊椎手術研究会、京都リサーチパーク、2011年6月25日（招待講演）
  11. 中島欽一<sup>○</sup>：Epigenetic regulation of neural stem cells by surrounding environment、第576回生医研セミナー、九州大学生体防御医学研究所、2011年6月17日（招待講演）
  12. 中島欽一<sup>○</sup>：Intra-and extra-cellular factors regulating astrocyte differentiation of neural stem cells during development、Neurogenesis 2011、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、2011年6月2-4日（招待講演）
  13. Juliandi Berry<sup>○</sup>、種村健太郎、精松昌彦、五十嵐勝秀、菅野純、中島欽一：Adult hippocampal neurogenesis is impaired after prenatal histone deacetylase-inhibition、Neurogenesis 2011、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、2011年6月2-4日（口頭）
  14. 波平昌一<sup>○</sup>、Fan Guoping、中島欽一：DNAメチル化による神経発生制御機構、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、KKRホテル熊本、2011年5月19-20日（口頭）
  15. 蟬克憲<sup>○</sup>、佐野坂司、波平昌一、畑田出穂、中島欽一：転写因子NFIAによって誘導される*Olig1*遺伝子プロモーターの脱メチル化、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、KKRホテル熊本、2011年5月19-20日
- 〈国際学会〉
1. Noguchi, H., Namihira, M., Tanaka, T., Sanosaka, T., **Nakashima, K.** : DNMT1 regulates neuronal differentiation of neural precursor cell in late-gestational forebrain. 40<sup>th</sup> KEYSTONE SYMPOSIA, Keystone, Colorado, USA, January 17-22, 2012
  2. Sanosaka, T., Mutoh, T., Ito, K., **Nakashima, K.** : Oxygen levels epigenetically regulate fate switching of neural precursor cells during brain development. 40<sup>th</sup> KEYSTONE SYMPOSIA, Keystone, Colorado, USA, January

- 17-22, 2012
3. **Nakashima, K. :** Neurons derived from transplanted neural stem cells reconstruct disrupted neuronal circuits in the injured mouse spinal cord. StepAhead Australia Ltd' s 7<sup>th</sup> Annual Scientific Conference, Melbourne, November 29 -December 4, 2011(Invited)、
  4. **Nakashima, K. :** Effect of HDAC Inhibitor VPA on neural stem cell differentiation and its application to the treatment of spinal cord injury. Shanghai, October 22 -23, 2011(Invited)
  5. **Nakashima, K. :** BMP-INDUCED REST/NRSF REGULATES THE ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF ASTROCYTE IDENTITY. 10<sup>th</sup> European meeting on Glial Cells in Health and Disease, Prague, September 13-17, 2011(Invited)
  6. **Nakashima, K. :** Effect of Valproic Acid on Neural Stem Cell Differentiation and Its Therapeutic Application to Spinal Cord Injury. 2011 Seoul Symposium on Stem Cell Research, Seoul, August 31, 2011 (Invited)
  7. **Nakashima, K. :** Intra-and extra-cellular factors regulating neural stem cell differentiation during brain development. 8<sup>th</sup> IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18, 2011 (Invited)
  8. Juliandi, B., Abematsu, M., Sanosaka, T., **Nakashima, K. :** Induction of neurons for superficial cortical layers from mouse embryonic stem cells by valproic acid. 8<sup>th</sup> IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18, 2011
  9. Tsujimura, K., Fukao, Y., Fujiwara, M. & **Nakashima, K. :** Proteomic identification of co-factors for the Rett syndrome responsible gene product, MeCP2. 8<sup>th</sup> IBRO WORLD CONGRESS OF NEUROSCIENCE, Florence, July 14-18, 2011
  10. **Nakashima, K. :** Effect of a hdac inhibitor on neural stem cell regulation and its application to spinal cord injury. 11<sup>th</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON NEURAL TRANSPLANTATION AND REPAIR, Florida, May 4-8, 2011 (Invited)
  11. **Nakashima, K. :** Hdac inhibitor and neural stem cell transplantation(HINT)method for the treatment of spinal cord injury. Symposium of the Bavarian Research Network for Adult Neural Stem Cells ForNeuroCell, Munchen, April 7-8, 2011 (Invited)
- H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得  
該当なし。
  2. 実用新案登録  
該当ない。
  3. その他  
特になし

平成23年3月19日  
H23年度種村班班会議  
東京国際フォーラム

# 発生-発達期におけるビスフェノールA 暴露による脳構築異常解析

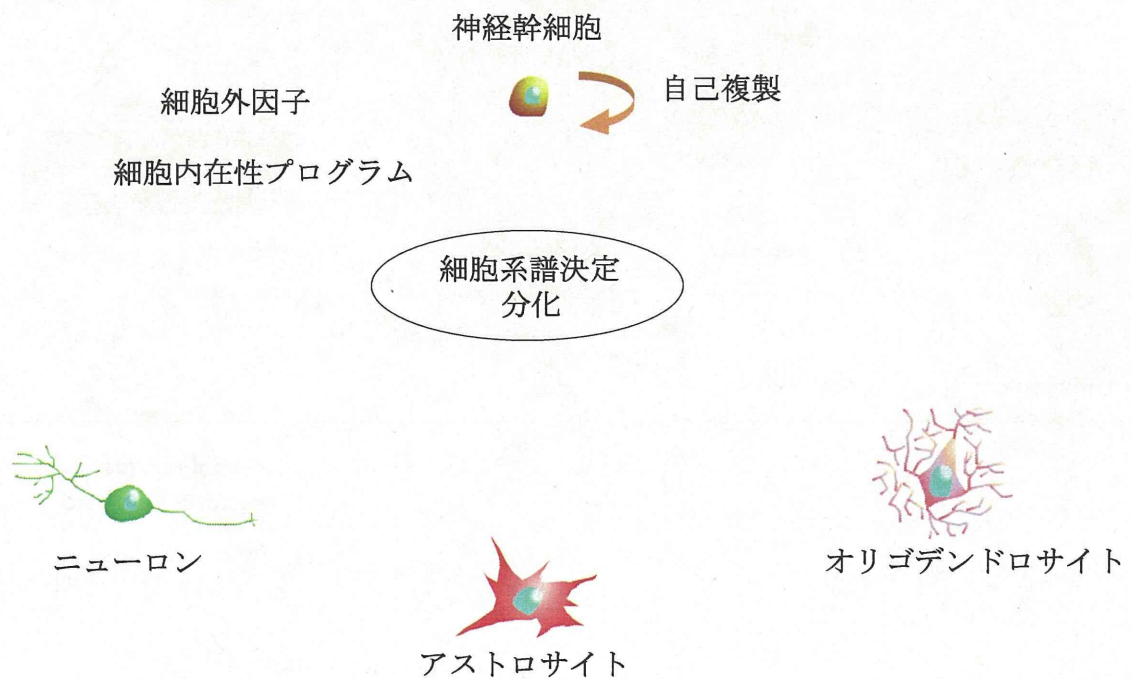
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科  
分子神経分化制御学講座

中島 欽一



1

## 神経幹細胞の性質と分化制御



2

## 発生-発達期にも様々なエピジェネティクス変動 誘導因子に曝される可能性がある

例えば、

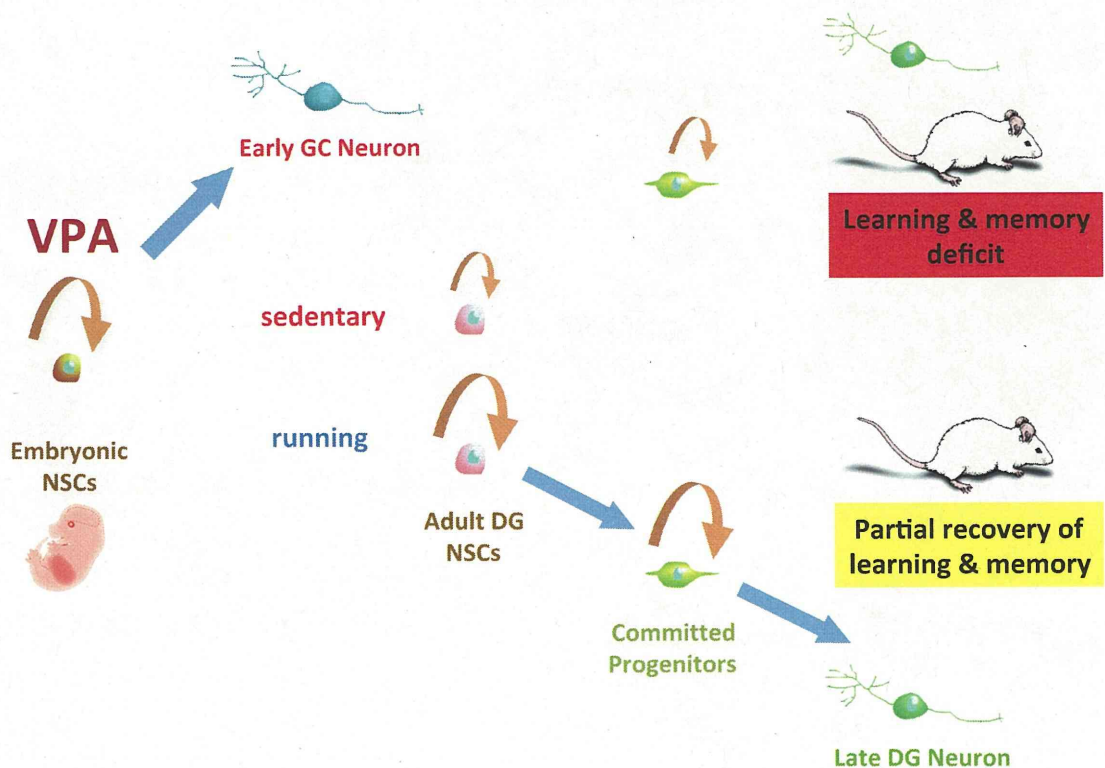
**ヒストンアセチル化**： バルプロ酸  
抗てんかん薬かつHDAC阻害剤  
ヒストンアセチル化の亢進

**DNAメチル化**： ビスフェノールA (BPA)  
プラスチック製剤、エポキシ樹脂  
DNA脱メチル化

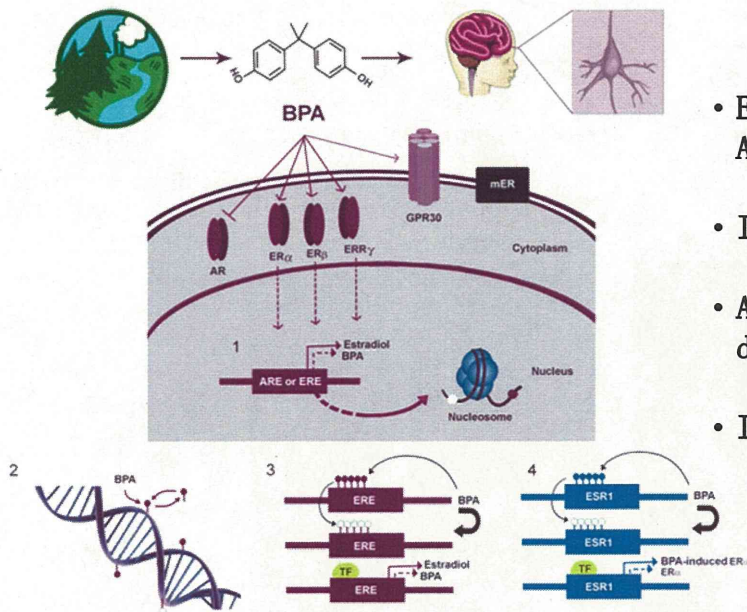
成体に比べ、脳構築が盛んなこの時期への影響は大きいと推察

3

### まとめ (バルプロ酸)



## ビスフェノールA (BPA)



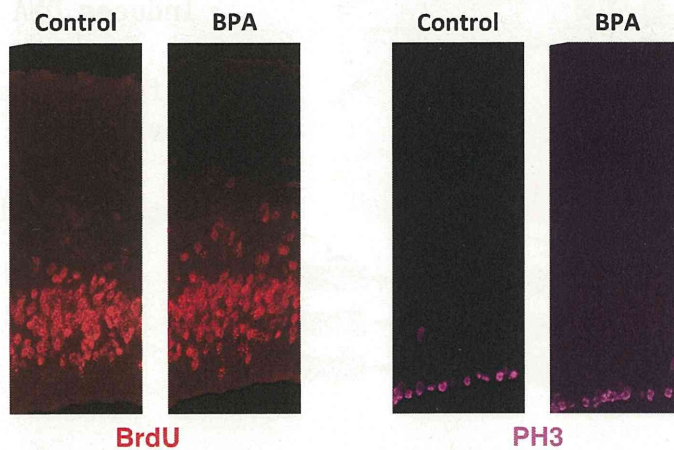
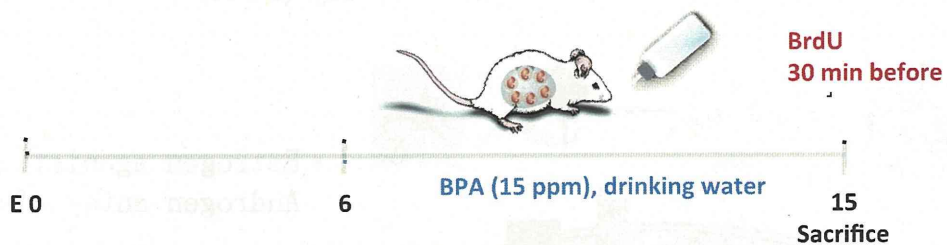
- Estrogen agonist  
Androgen antagonist
- Induces DNA demethylation
- Affects neocortical development
- Impairs brain functions

Wolstholme et al *Horm Behav* 2011

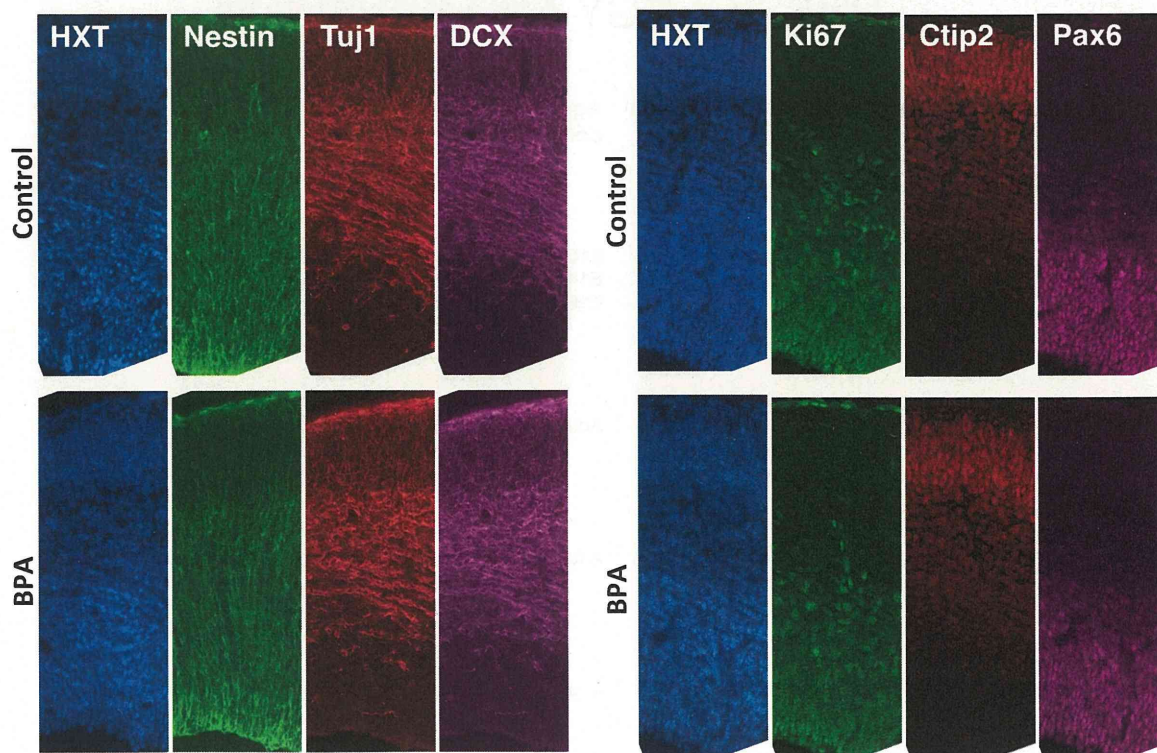
## EFFECTS OF BPA ON BRAIN STRUCTURE, PHYSIOLOGY AND BEHAVIOR

Animal	Dosage	Administration	Age of collection	In vivo effects
Mouse	20 $\mu$ g/kg	S.c. Injection, E0., daily	E10, E12.5, E14.5, E16.5	<b>Altered pattern of neuronal migration</b> during neocortex development, up-regulation of pro-neuronal genes and antagonizes the action of thyroid hormone (Nakamura <i>et al.</i> , 2006)
Rat	40 $\mu$ g/kg	S.c. Injection, single dose (adult)	Adult	<b>Inhibits</b> estradiol-induced <b>hippocampal synaptogenesis</b> (MacLusky <i>et al.</i> , 2005)
Mouse	0.5, 5, 50 mg/kg	Oral gavage (E7 - P21)	Adult	<b>Impaired learning-memory</b> accompanied by down-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors of hippocampus (Sex specific: male only) (Xu <i>et al.</i> , 2010)
Mouse	1, 5, 20 mg/kg	Oral gavage (P42 - P56)	Adult	<b>Impaired hippocampal neurogenesis</b> and impaired spatial learning and memory (Kim <i>et al.</i> , 2011)

## BPAの投与方法と結果①



## 結果②





## 考察

- ・ E6 BPA飲料水投与開始 - E15 免疫染色による解析  
→ 変化が見られなかった。

### その原因と対応

1. 摂取量：摂取量を計測する。
2. 雌雄差：オス、メスを区別して解析する。
3. 投与開始時期：E6では遅すぎた？
4. 解析時期：生後、成体期も解析する（影響の蓄積）

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

発生-発達期ビスフェノール A 暴露の行動発達に対する影響解析

研究分担者 山田一之

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・研究員

【研究要旨】

胎生期から離乳期にかけての母体へのビスフェノール A 暴露が、仔の乳幼児期および成長後の認知・情動行動に与える影響について解析した。その結果、乳幼児期においては体重増加および開眼の早期化傾向が見られたが、乳児反射および情動性に大きな変化は見いだされなかった。一方、成長後の行動試験においては、自発活動性や情動記憶などにおいて変化が生じる可能性が示唆された。行動変化から脳の構造変化が予測されたため、MRI による解析を行ったが、画像レベルでの変化は認められなかった。

A. 研究目的

プラスチック原料の一種であるビスフェノール A (以下 BPA) は、製品から溶出して生体内に取り込まれ、エストロゲン受容体と結合してホルモン類似作用を呈すると考えられている。そこで内分泌かく乱物質の代表的化合物として、基礎研究から大規模な疫学的調査に至る多くの研究が行われてきたが、その影響については未だに不明な点が多い。中でも薬理学的作用量を大幅に下回る低用量でも生体に影響を及ぼすという低容量効果説については、議論が分かれている。本研究では、近年急速に注目を集めつつある小児毒性学的視点を踏まえて、胎生期から離乳期における母体の BPA 低容量暴露が仔の発達と認知・情動機能に及ぼす影響について、マウスをモデル実験系として検討した。

B. 研究方法

被験体・処置：C57BL/6J 系統のマウス（日本クレア：8 週齢）を購入後、1 週間の馴致期間において、交配

を行った（10 日間）。交配はマウスをランダムに 2 群に分け、一方には飲用水中に BPA（和光純薬：1 ppm）、他方には溶媒として 0.01% エタノール（和光純薬：以下 Veh）を添加した。BPA および Veh の添加は離乳時（4 週齢）まで行った。妊娠確認後は毎朝妊娠マウスの状態を確認し、出産が認められた日を生後 0 日（PD 0）とした。

乳幼児期における発達検査：PD 5 から各種観察・評価を行った。乳児反射の測定項目として、正向反射（PD 5）・把握反射（PD 5）・クリック驚愕反射（PD 8）の 3 項目を用いた。これと平行して、切歯萌出および開眼のチェックを行った。また、乳児における認知機能の評価を目的として、オープンフィールド試験（PD 13）および新奇物体認識試験（PD 18）を行った。上記検査は自作の装置を用い、CCD カメラで画像をノート PC に取り込み、ANY-maze (Stoelting) による画像解析によって分析を行った。成体における行動解析：生後 8 週齢時から、行動テストバッテリーを用いた行動試験を行った。行動テ

トバッテリーは、自発活動性試験・オープンフィールド試験・明暗往来試験・高架式十字迷路試験・聴覚性驚愕反応およびそのプレパルス抑制試験・恐怖条件付け試験の6課題を採用した(装置および手続きの詳細はG.研究発表1-2)-2 Hatayama et al.を参照)。

脳構造の非侵襲的測定：恐怖条件付け後、小動物用MRI(ブルカーパイオスピン:9.4T)を用いて、全脳および海馬の構造的および量的変化について検討を行った(手続きの詳細はG.研究発表1-2)-2 Hatayama et al.を参照)。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、独立行政法人理化学研究所実験動物委員会の承認を得て、同研究所動物実験倫理規定を遵守して行われた。

### C. 研究結果

妊娠・出産への影響：本研究では、6回に分けて40ペアの交配を行った。C57BL/6J系統を用いたため、雌毎の出産数は少なめ(4-10仔)であったが、出産・育児行動とも異常は認められなかった。出産数および仔の性比について $\chi^2$ 乗検定を行ったところ、いずれについてもBPA群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。

乳幼児期における発達検査：体重は測定開始のPD5時点からBPA群で有意に高い傾向が見られた(PD5:F(1,49)=15.7,  $p<0.01$ , Two-way ANOVA)。一方、正向反射(PD5)・把握反射(PD5)・驚愕反射(PD8)の生起頻度についてはいずれも有意な差は認められなかった。同様に、切歯萌出の確認日齢にも差は認められなかったが、開眼確認日齢はBPA群で有意に早い傾向が見られた( $\chi^2=26.1$ ,  $p<0.01$ )。また、オープンフィールド試験(PD13)および新奇物体認識試験(PD18)においても、有意な差は認められなかった。

成体における行動解析：飼育ケージ内における自発活動性について、1週間の連続測定を行い、その結果を性別・BPA添加の有無・日の3要因を独立変数

とした3元配置の分散分析を行なった。その結果、性(F(1,6)=591.7,  $p<0.001$ )、BPA添加(F(1,6)=106.3,  $p<0.001$ )の主効果および性×BPA添加の交互作用(F(1,6)=20.1,  $p<0.01$ )が有意であった。これらの結果は、本研究において、BPA添加群の自発活動性が亢進していることを示唆している。しかし、続くオープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験においては、BPA添加群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。聴覚性驚愕反応試験については、性別・BPA添加の有無・音圧の3要因を独立変数とした3元配置の分散分析を行なったところ、性(F(1,87)=55.1,  $p<0.001$ )、BPA添加(F(1,87)=12.7,  $p<0.001$ )、音圧(100, 110および120dB)の結果について:F(2,87)=88.7,  $p<0.001$ )の主効果が有意であった。この結果は、本研究において、BPA添加群の聴覚性驚愕反応が亢進していることを示唆している。しかし、聴覚性驚愕反応のプレパルス抑制については、両群の間に差は認められなかった。実験箱と音を手がかりとした恐怖条件付け試験においては、実験箱・音の双方について、BPA添加群の恐怖反応(すくみ反応)率が亢進する傾向が見られた(実験箱:U=7,  $p<0.05$ ;音:U=6.5,  $p<0.05$ )。

脳構造の非侵襲的測定：恐怖条件付け後、小動物用高磁場MRIを用いて、脳全体および海馬の構造と容積について比較を行った。その結果、BPA群とVeh群の間に形態的・量的変化は認められなかった。

### D. 考察

本研究では、胎生期および授乳期における母体経由のBPA暴露が行動発達に及ぼす影響を解析するために、暴露が継続している乳幼児期および暴露が終了してから一定の時間を経過した成体期の2つの特徴的な時期に焦点を当てて検討を加えた。

乳幼児期については、行動変化は見いだせなかったが、体重の増加傾向や開眼時期の早期化といった発達加速的な傾向が見られた。本研究はマウスを用いたモデル研究であり、またサンプル集団もそれほ

ど大きくないので、結論を出すことはできないが、この結果がこれまでのBPAの発達影響に関する研究に新たな視点を付け加える可能性があると言える。更なるモデル研究に加えて、今一度これまでに蓄積されたヒトに関するデータについて再検討することも重要と考えられる。

乳幼児期に対して、成体においてはいくつかの行動指標において有意な差が認められた。BPA添加群では、飼育ケージにおける自発活動性・聴覚性驚愕反応・恐怖条件付け後の恐怖反応(すくみ反応)に有意な亢進が見られた。特に、驚愕刺激のような平常時に経験することのない非常に大きな刺激に対する過剰反応と恐怖反応の亢進は心的外傷後ストレス障害(PTSD)など精神疾患の発症とも関連する可能性があるため、この変化のメカニズムの解明は重要であろう。ヒトにおけるPTSDの臨床研究では、画像診断によって脳容積の減少などが報告されているので、本研究においても核磁気共鳴法による脳画像分析を試みた。今回は形態・容積ともに変化を見出すことはできなかったが、恐怖条件付けにおいて変化が見られたので、MRIによる画像解析は今後有用であると考えられる。いずれにしても、本研究の結果は極めて断片的な情報であると言わざるを得ないので、メカニズム検証の前提として、まず本研究で得られた結果の再現性と妥当性について慎重に検討する必要がある。

#### E. 結論

胎生期および授乳期に母体がBPA暴露を受けた場合、その子の身体的発達および成長後の行動に変化が見られた。これらの変化が胎児・乳児が母体経由のBPA暴露を受けたことによるものか、あるいはBPA暴露による母体の変化による副次的な影響なのか、現時点では判断できない。しかし、メカニズムが不明とはいえ、胎生期および授乳期における母体のBPA暴露が子の身体的発達および成長後の行動に影響を及ぼす危険性が示唆されるので、本研究で得られた結果の再現性と妥当性について更なる検討が必要で

ある。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

1. 論文発表(本研究に関わる主なもの3編に◎を付けてください)

##### 1) 書籍

◎改訂版 キーワードコレクション心理学

重野純(編・著)、安藤清志、高橋 晃、石口彰、浜村良久、藤井輝男、八木保樹、山田一之、渡辺正孝(著)、新曜社、in press

(古典的条件付け、高次学習、事象関連電位、失認症、心理療法、神経心理学、臨床心理学の各章担当)

##### 2) 雑誌

◎1. K. Yamada, C. Homma, K. Tanemura, T. Ikeda, S. Itohara, Y. Nagaoka: 2011 Analysis of fear memory in *Arc/Arg3.1*-deficient mice: intact short-term memory and impaired long-term and remote memory. *World Journal of Neuroscience*, 1, 1-8.

◎2. M. Hatayama, A. Ishiguro, Y. Iwayama, T. Takashima, K. Sakoori, T. Toyota, Y. Nozaki, Y-S. Okada, K. Yamada, T. Yoshikawa, J. Aruga: 2011 Characterization of *Zic2* hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and *Zic2* mutation identified in schizophrenia patients. *Scientific Reports*, 1, 1-11.

3. T. Saito, T. Suemoto, N. Mihira, Y. Matsuba, K. Yamada, P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C. V. Broeckhoven, T. C. Saido: 2011 Potent in vivo amyloidogenicity of A $\beta$ 43. *Nature Neuroscience*, 14, 1023-1032.

4. Y. Satoh, S. Endo, T. Nakata, Y. Kobayashi, K. Yamada, T. Ikeda, A. Takeuchi, T. Hiramoto,