

-17日(16日)(招待、口頭)、つくば国際会議
場

30.

<国際学会>

1. Chai, M., Juliandi, B., Sanosaka, T., Tanemura, K., Igarashi, K., Nakashima, K.: Brain-region specific developmental alterations in mouse prenatally and postnatally exposed to bisphenol A (BPA). NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
2. Murao, N., Matsuda, T., Koseki, H., Namihiro, M., Nakashima, K.: Analysis of mechanisms underlying neurogenesis in the adult hippocampus regulated by hemimethylated DNA recognition factor, Np95/Uhrf1. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
3. Nakashima, H., Tsujimura, K., Irie, K., Nakashima, K.: Functional analysis of MeCP2, the Rett syndrome responsible factor, in neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
4. Noguchi, H., Namihiro, M., Sanosaka, T., Tsujimura, K., Fukao, Y., Igarashi, K., Kimura, A., Nakashima, K.: Maintenance DNA methyltransferase DNMT1 controls neuronal differentiation of late-gestational neural stem cells. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013
5. Matsuda, T., Katano, Y., Adefuin, M., A., Murao, N., Juliandi, B., Kawai, T., Akira, S., Nakashima, K.: TLR9

signaling in microglia suppresses epilepsy-triggered aberrant neurogenesis in the adult hippocampus. NEUROSCIENCE 2013, San Diego, November 9-13, 2013

6. Nakashima, K.: Treatment of spinal cord injury by transplantation of neural stem cells. 2nd International spinal cord repair meeting, Barcelona, April 26-27, 2013 (oral)

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

①特許取得

なし。

②実用新案登録

なし。

③その他

特になし。

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 研究員

研究要旨 胎生期から離乳期にかけた母体へのビスフェノール A（以下 BPA）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。包括的行動試験の結果、BPA 暴露群では成長後の自発活動性や情動記憶などにおいて変化が生じている可能性が示唆された（平成 23 年度）。また、新規に構築した詳細な行動試験によって、乳児期における衝動性の低下および成体における環境刺激に対する反応性の鈍化傾向が示唆された（平成 24 年度）。これらの結果と先行研究の結果をもとに、発生発達期における化学物質の行動発達に及ぼす影響を効果的に解析するための行動テストバッテリーについて提案を行った（平成 25 年度）。

A. 研究目的

胎生期・乳児期に母体経由で暴露された BPA の影響については、様々な研究が行われてきたが、必ずしも一貫した結果が得られているわけではない。特に行動-精神機能に及ぼす影響については小児期から成熟期を対象とした断片的な知見が得られているに過ぎず、生涯発達の視野における研究は皆無と言える。そこで本研究では、マウスをモデル動物とした新規行動解析実験系を構築し、発生-発達期における BPA 暴露の行動発達に対する影響について横断的および縦断的な解析を可能とする方法論を確立し、またこれを元に、発生・発達期における化学物質の行動発達に及ぼす影響を効果的に解析するための行動テストバッテリーを考案することを目的とした。

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（1 ppm）、他方には溶媒として 0.01% エタノール（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。

手続き：平成 23 年度：乳幼児期における発達検査：

PD 5 から各種乳児反射、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。

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。行動テストバッテリーは、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。

脳構造の非侵襲的測定：恐怖条件付け後、小動物用 MRI（9.4T）を用いて、全脳および海馬の構造的小および量的変化について検討を行った。

平成 24 年度：乳幼児期における情動性評価（平成 24 年度）：新奇物体に対する衝動的逃避反応の評価を行った。生後 18 日齢のマウスを中央に新奇なフィギュア（直径 3 cm、高さ 5 cm）を配置したオープンフィールド（20 x 20 x 20 cm）に入れ、マウスの行動を 3 分間観察した。通常のオープンフィールド行動の指標（移動距離、不動時間）と同時に、フィギュアへの接触反応とフィギュアおよびオープンフィールドからの衝動的逃避反応（壁面に対するジャンピング反応）の回数を計測した。

成体における情動性評価：35 週齢以降の成体の抑制的情動性の変化について、自発的環境選好試験とトレッドミルにおける強制走行試験を用いて検討した。自発的環境選好試験では、オープン

フィールドの床面の半分に平坦なアクリル板、残りの半分に同素材のアクリル板に凹凸を施したものを敷き、その上にマウスを放置して各々の領域における滞在時間を測定した。また、トレッドミル強制走行試験では、マウスをトレッドミル(幅 5 cm、長さ 20 cm、秒速 15 cm)の走路内に入れ、20 秒間マウスを強制走行させ、走行を諦めた個体数および走行を諦めるまでの時間を測定した。

感覚受容器に関する組織学的検討：末梢の感覚受容器の変化を調べるために、実験後マウスを還流固定し左足肉球部(footpad)の凍結切片を作成し、組織染色を行った。

平成 25 年度：電気生理学測定用オペラント実験装置の開発：外科的手術によって金属製のヘッドプレート装着したマウスを用いて、オペラント条件付け訓練を行う装置を開発した。トレーニングは給水制限下で行い（1 日当たり体重の 5%程度）、マウスの体重は給水制限開始時の 88-90%になるように調整した。トレーニング開始時にレバー押しのアシストによるシェイピングを行い、2 あるいは 3 日目から連続強化によるトレーニングを行った。その後マウスの学習水準に合わせて間欠強化(FR)スケジュールに移行した。

乳幼児期における社会性評価：マウスを性別が確認出来るようになった時点(PD6-8)で一腹 6 匹に統一し、PD17 で実験を行った。プラスチック製オープンフィールド(30 x 30 x 30 (H) cm)に一腹のマウス（6 匹）を離して入れ、2 つ以内の集団にまとまるまでの行動を 2 分間観察・記録した。

BPA の行動影響評価系の選定：文献データベースとして PubMed を利用した。3 つの検索キーワード (bisphenol A・mouse・behavior) を指定し、1998 年～2013 年（12 月末時点）の間に出版された論文から基礎資料を作製した。60 本の文献から、1）上記文献から総説および英語以外の言語で執筆された論文を除外し、2）更に方法および結果が明瞭に記載されていない論文を除外し、最終的に 30 本の論文を分析対象とした。各論文から①用いられた行動課題と、②結果（有意差の有無）を抽

出し、データ系列を作製した。データはカテゴリ化し、採用項目（論文で用いられていたか否か：数量化 III 類のみ）と検出項目（有意差を得られたか否か：クラスター分析および数量化 III 類）に分けて分析を行った。統計ソフトはエクセル官能評価 ver. 1.0（エスミ）を用いた。

（倫理面への配慮）

動物実験における 3R の原則に従い、使用動物数を最小限に留めるよう努力した。なお、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、同動物実験倫理規定を遵守して行われた。

C. 研究結果

平成 23 年度：乳幼児期における発達検査：乳幼児反射に顕著な変化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った結果、BPA 暴露群の自発活動性が亢進していることが示唆された。しかし、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 暴露群と 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、BPA 暴露群の聴覚性驚愕反応が亢進していることが示唆されたが、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。また、恐怖条件付け試験においては、空間刺激・聴覚刺激の双方について、BPA 暴露群の恐怖反応（すくみ反応）率が亢進する傾向が見られた。

脳構造の非侵襲的測定：恐怖条件付け後の BPA 暴露群と Veh 群の脳全体および海馬において形態的・量的変化は認められなかった。

平成 24 年度：乳幼児期における情動性評価：BPA 暴露群において衝動的逃避行動（ジャンピング）が有意に減少していた。

成体における情動性評価：自発的環境選好試験において BPA 暴露群のマウスに環境選好性の変化が見られたが、トレッドミルによる強制走行試験においては有意な差は見られなかった。

感覚受容器に関する組織学的検討：情動性評価実験後にマウスを還流固定し左足肉球部(footpad)についてヘマトキシリン・エオジン染色を行ったが、BPA 暴露群と Veh 群の間に形態的变化は認められなかった。

平成 25 年度：電気生理学測定用オペラント実験装置の開発：可動式レバーに加えて、昇降式給水ノズルを採用することによって、マウスの反応と報酬提示のタイミングを正確に制御することを可能にした。BPA 暴露マウスの解析には至らなかったが、C57BL/6 マウスによる性能チェックを終了することができた。

乳幼児期における社会性評価：グループ化にかかる時間について、BPA 暴露群と統制群の間に有意な差は認められなかった。

BPA 暴露マウスの行動影響評価系の選定：先行研究においては、オープンフィールド試験、新奇性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が一般的な情動・認知行動課題として採用されていることが再確認された。続いて各文献において行動変化が報告されていた課題について分析したところ、採用項目と同様にオープンフィールド試験、新奇性試験、高架式十字迷路試験・明暗箱試験および空間記憶・学習試験が性衝動や動因水準に影響を受けにくい試験項目であることが確認された。

D. 考察

乳幼児期における認知情動変化：各種乳児反射および乳児の社会性については BPA 暴露の明瞭な影響は認められなかったが、衝動的逃避行動については減少傾向が見られた。本研究ではサンプル集団が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ものと言える。

成体における行動変化：乳幼児期に対して、成体においては様々な行動変化が見られた。BPA 暴露群では、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に亢進が見られた。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)に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、MRI による非侵襲的な画像解析は今後有用であると考えられる。

行動変化の内的メカニズムの解明に向けた技術開発：BPA 暴露マウスにおける認知-情動性変化がどのような神経メカニズムによって生じているか解明するために、オペラント条件付けの手法に電気生理学的な手法を合わせた実験系の構築を行った。B6 マウスにおいて実験システムの有効性を確認できたので、近い将来 BPA 暴露マウスにおける認知-情動性変化の生理学的メカニズムについて成果をあげられるものと考えられる。

BPA 暴露マウスの行動影響評価系の選定：本研究課題では、発生・発達期における BPA 等の各種化学物質に対する暴露経験が成長後の行動に及ぼす影響について、効果的・効率的に評価する行動試験系を構築することが最終目標の一つである。本分担研究においても様々な行動課題を用いて BPA 暴露の行動影響を明らかにしてきたが、これと併せて、先行研究において用いられてきた行動課題とその結果についても多変量解析を用いて分析することによって、その効果について検討を行った。その結果、オープンフィールド・明暗箱試験・高架式十字迷路試験・新奇性試験および空間記憶学習試験の 5 試験課題が BPA 暴露による認知情動行動影響を適正に評価し得る試験課題群であることが推測された。本研究班の研究においても、上記 5 課題で BPA 暴露の影響が認められていることから、化学物質暴露によ

る認知情動行動影響の評価には、少なくともこれらの試験課題を含めることが望ましいと考えられる。

E. 結論

本研究では、伝統的な行動解析試験法および新たに考案された行動試験法を用いて、発生・発達期における BPA 暴露が乳幼児期から成長後に及ぶ長期的な行動変化をもたらす可能性があることを示した。また、本研究および先行研究の結果から、化学物質暴露の認知情動行動影響の評価系には、オープンフィールド・明暗箱試験・高架式十字迷路試験・新奇性試験および空間記憶学習試験を含めることが望ましいことが示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

（発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入）

1. 論文発表

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 β 43. *Nature Neuroscience*, 14, 1023-1032.
4. Y. Satoh, S. Endo, T. Nakata, Y. Kobayashi, K. Yamada, T. Ikeda, A. Takeuchi, T. Hiramoto, Y. Watanabe, T. Kazama: 2011 ERK2 Contributes to the Control of Social Behaviors in Mice. *The Journal of Neuroscience*, 31, 11953-11967.
5. N. Takashima, Y. S. Odaka, K. Sakoori, T. Akagi, T. Hashikawa, N. Morimura, K. Yamada, J. Aruga: 2011 Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking *Lrrtm1*, a gene associated with schizophrenia. *PLoS ONE*, 6, e22716.
6. T. Sano, Y-J. Kim, E. Oshima, C. Shimizu, H. Kiyonari, T. Abe, H. Higashi, K. Yamada, Y. Hirabayashi: 2011 Comparative characterization of GPRC5B and GPRC5C LacZ knockin mice; Behavioral abnormalities in GPRC5B-deficient mice. *BBRC*, 412, 460-465.
7. S. Ito, I. Ogiwara, K. Yamada, H. Miyamoto, T. K. Hensch, M. Osawa, K. Yamakawa. Mouse with *Nal.1* haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment. *Neurobiol. Disease*, 49: 2013: 29-40.
8. M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornathanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga. Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. *J. Neurosci.* 33: 2013: 12940-12953.
9. K. Nose-Ishibashi, J. Watahiki, K. Yamada, M. Maekawa, A. Watanabe, G. Yamamoto, A. Enomoto, Y. Matsuba, T. Nampo, T. Taguchi, Y. Ichikawa, T. C. Saido, K. Mishima, Y. Yamaguchi, T. Yoshikawa, K. Maki. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience*, 263: 2014: 257-268.

2. 学会発表

国際学会：

1. N. H. Tomioka, K. Yamada, M. Ota, Y. S. Odaka, J. Aruga: 2011 Characterization of Elfn family in the central nervous system. Neuroscience 2011, the Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (Washington, DC, November 12-16, 2011)
2. I. Ogiwara, S. Tto, K. Yamada, K. Yamakawa: 2011 Nav1.1-haploinsufficient mice, a model for Dravet syndrome, exhibit learning impairment and autistic-like behaviors. Neuroscience 2011, the Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (Washington, DC, November 12-16, 2011)
3. J. Aruga, N. Takashima, Y. S. Odaka, K. Sakoori, T. Akagi, T. Hashikawa, N. Morimura, K. Yamada: 2011 Neuroscience 2011, the Society for Neuroscience 41th Annual Meeting, (Washington, DC, November 12-16, 2011)
4. N. Morimura, H. Yasuda, K. Kamaguchi, K.-I. Katayama, K. Yamada, N. Tomioka, M. Ota, J. Aruga: 2012 Lrnf2/-deficient mice show neuropsychiatric disorder-like behavior phenotypes and synaptic changes of hippocampus. Society for Neuroscience, Neuroscience 2012 (October 13-17, New Orleans)
5. T. Suzuki, A. Kamoshida, C. Homma, K. Yamada, M. Mizunaka, K. Arai, M. E. Larkum, A. Miyawaki, M. Murayama: 2012 Miniaturized wireless optical recording system for freely moving mice. Society for Neuroscience, Neuroscience 2012 (October 13-17, New Orleans)
6. M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornthanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga: 2013 Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses. Neuroscience 2013, the Society for Neuroscience 43th Annual Meeting (San Diego, CA, November 9-13)
1. 本間千尋、山田一之：2011 連続空間内でのマウス(*Mus musculus*)の行動と薬物作用評価の検討 Animal 2011（第71回日本動物心理学会大会、第30回日本動物行動学会、2011年度応用動物行動学会/日本家畜学会 合同大会）ポスター発表（9月8-11日 慶応大学）
2. N. Morimura, H. Yasuda, K. Yamada, N. H. Tomioka, K.-I. Katayama, K. Yamaguchi, M. Ota¹, A. Kamiya, J. Aruga: 2011 Lrnf2/SALM1 regulates excitatory synapse function in the hippocampus and its deficient mice display mental disorder-like behavioral abnormalities. 第34回日本神経科学大会 シンポジウム（9月14-17日 パシフィコ横浜）
3. M. Hatayama, A. Ishiguro, Y. Iwayama, N. Takashima, K. Sakoori, T. Toyota, Y. Nozaki, Y. S. Odaka, K. Yamada, T. Yoshikawa, J. Aruga: 2011 Zic2 hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and ZIC2 mutations identified in schizophrenia patients. 第34回日本神経科学大会 口頭発表（9月14-17日 パシフィコ横浜）
4. Y. Matsumoto, K-Ichi Katayama, T. Okamoto, K. Yamada, S. Nagao, M. Kudoh: 2011 Auditory and Vestibular Impairment of *Slitrk6*-Deficient Mice. 第34回日本神経科学大会 ポスター発表（9月14-17日 パシフィコ横浜）
5. N. Takashima, Y. Odaka, K. Sakoori, T. Akagi, T. Hashikawa, N. Morimura, K. Yamada, J. Aruga: 2011 Executive dysfunction in novel environment and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking Lrrtml. 第34回日本神経科学大会 ポスター発表（9月14-17日 パシフィコ横浜）
6. N. H. Tomioka, K. Yamada, M. Ota, Y. S. Okada, J. Aruga: 2011 Characterization of Elfn family in the central nervous system. 第34回日本分子生物学会年会（12月13-16日 パシフィコ横浜）
7. 畑山実、石黒亮、岩山佳美、高嶋紀子、佐郡和人、豊田倫子、野崎弥生、小高由梨、山田一

国内学会：

- 之、吉川武男、有賀純: 2011 第34回日本分子生物学会年会（12月13-16日 パシフィコ横浜）
8. 本間千尋、山田一之、鴨志田敦史、村山正宜 マウスの体性感覚情報を手がかりとした新規弁別学習課題の確立. 2012 日本動物心理学会第 72 回大会（5 月 12-13 日 関西学院大学）
9. C. Homma, A. Kamoshida, K. Yamada, S. Moizumi, M. Samejima, M. Oda, H. Yamakawa, M. Murayama: 2012 New experimental systems for a tactile discrimination task in real and virtual world. 第 35 回日本神経科学大会（9 月 18-21 日 名古屋国際会議場）
10. T. Suzuki, A. Kamoshida, C. Homma, K. Yamada, M. Mizunaka, K. Arai, M. Larkum, A. Miyawaki, M. Murayama: 2012 Wireless calcium recording system for freely moving mice. 第 35 回日本神経科学大会（9 月 18-21 日 名古屋国際会議場）
11. A. Kamoshida, T. Suzuki, C. Homma, K. Yamada, M. Murayama: 2012 Developing LabVIEW based experiment tool for neuroscience. 第 35 回日本神経科学大会（9 月 18-21 日 名古屋国際会議場）
12. K. Yamada, M. Murayama: 2012 Strain difference in the response to floor texture among three inbred mice strain -C57BL/6, C3H/He, BALB/c-. 第 35 回日本神経科学大会（9 月 18-21 日 名古屋国際会議場）
13. J. Watahiki, K. Nose, T. Taguchi, G. Yamamoto, A. Enomoto, K. Yamada, M. Maekawa, T. Nampo, Y. Ichikawa, M. Ono, K. Mishima, T. Yoshikawa, K. Maki: 2012 Soft-diet feeding immediately after weaning results in a deficit of prepulse inhibition and causes changes in the gene expression profile in the brain of mice. 第 35 回日本神経科学大会（9 月 18-21 日 名古屋国際会議場）
14. 野瀬佳奈、綿引淳一、山本剛、市川雄大、山田一之、前川素子、榎本明子、南保友樹、田口智博、小野美樹、美島健二、吉川武男、槇宏太郎: 2012 成長発育期の軟食と精神疾患発症との関連性について（第二報） 第71回日本矯正歯科学会大会（9月26-28日 岩手市民文化ホール）
15. 富岡直子、宮本浩行、小田川摩耶、小高由梨、畑山実、守村直子、松本圭史、山田一之、有賀純: 2012 Increased seizure susceptibility is caused by loss of *Elfn1*, an interneuron-specific LRR transmembrane protein. 第 35 回日本分子生物学会年会（12 月 11-14 日 福岡国際会議場、マリンメッセ福岡）
16. 山田一之: 2013 私論：マウス行動解析の昨今-何故、多くの心理学者達が去って行ったのか？- 薬物・精神・行動の会（招待）（4 月 26 日 慈恵医科大学）
17. N. Tomioka, H. Miyamoto, M. Hatayama, N. Morimura, Y. Matsumoto, T. Suzuki, M. Odagawa, Y. Odaka, Y. Iwayama, K. Yamada, T. Yoshikawa, K. Yamakawa, J. Aruga: 2013 Role of *Elfn1* in hippocampal inhibitory neural circuits containing somatostatin- positive neurons. 第 36 回日本神経科学大会（6 月 20-23 日 京都国際会議場）
18. M. Kinoshita, T. Sano, E. Ooshima, C. Shimizu, H. Hama, K. Tohyama, T. Tachikawa, D. T. Le, T. Suzuki, K. Yamada, A. Miyawaki, S. Sagao, Y. Hirabayashi: 2013 GPCR5B KO mice are induced axon degeneration in cerebellar Purkinje neurons, resulting in impaired motor coordination and learning. 第 36 回日本神経科学大会（6 月 20-23 日 京都国際会議場）
19. M. Kabayama, K. Sakoori, K. Yamada, V. G. Ornthanalai, M. Odagawa, N. Morimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga: 2013 Rines E3 ubiquitin ligase regulates emotional behaviors by altering the monoamine dynamics in prefrontal cortex. 第 36 回日本神経科学大会（6 月 20-23 日 京都国際会議場）
20. S. Manita, T. Suzuki, T. Matsumoto, C. Homma,

K. Yamada, K. Ota, M. Odagawa, C. Matsubara, M. Ohkura, M. Sato, J. Nakai, Y. Hayashi, M. E. Larkum, M. Murayama: 2013 Top-sown motor signals modulate sensory perception. 第 36 回日本神経科学大会 (6 月 20-23 日 京都国際会議場)

21. C. Homma, A. Kamoshida, K. Yamada, M. Oda, H. Yamakawa, M. Murayama: 2013 New behavior training system combined with tactile stimulation device in virtual world. 2013, 第 36 回日本神経科学大会 (6 月 20-23 日 京都国際会議場)

22. Y. Matsumoto, H. Miya, K. Katayama, K. Yamada, M. Odagawa, Y. Nozaki, Y. Yanagawa, J. Aruga: 2013 An essential role of Slitrk4 in the establishment of fear memory controlling neural circuit in amygdala. 第 36 回日本神経科学大会 (6 月 20-23 日 京都国際会議場)

23. 本間千尋、鴨志田敦史、山田一之、鈴木崇之、織田充、山川宏、村山正宜: 2013 体性感覚刺激の弁別学習が可能なマウス用行動トレーニングシステムの確立. 電気学会 電子・情報・システム部門大会 (9 月 4-7 日 北見工業大学)

24. 山田一之、種村健太郎: 2013 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 第 73 回日本動物心理学会大会 (9 月 14-16 日 筑波大学)

25. 山田一之: 2013 次世代の行動評定法の開発を目指して 第 73 回日本動物心理学会大会 ワークショップ (招待) (9 月 14-16 日 筑波大学)

26. 樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純: 2013 ユビキチンリカーゼ Rines によるモノアミンオキシターゼ(MAO-A)分解を介した情動行動制御機構. 第 156 回 日本獣医学会学術集会 (9 月 20-20 日 岐阜大学)

27. 樺山実幸、佐郡和人、山田一之、小田川摩耶、守村直子、片山圭一、NP Murphy、有賀純: 2013 ユビキチンリガーゼ Rines による、モノアミンオキシダーゼ(MAO-A)蛋白質分解制御を介した情動行動制御機構. 第 36 回日本分子生物学会 (12 月 3 日-6 日 神戸ポートアイランド)

H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

☐特許取得

なし

☐実用新案登録

なし

☐その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業 H23-化学一般-004）
総合研究報告書

別紙 4

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	臨床心理学 事象関連電位 古典的条件付け 高次学習 失認症と失行症 心理療法	重野純	改訂版 キーワードコレクション 心理学	新曜社	東京	2012	24-29 26-57 164-167 184-187 242-245 268-271

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Yamada, C. Homma, K. Tanemura, T. Ikeda, S. Itohara, Y. Nagaoka	Analysis of fear memory in <i>Arc/Arg3.1</i> -deficient mice: intact short-term memory and impaired long-term and remote memory.	World J. Neurosci.	1	1-8	2011
M. Hatayama, A. Ishiguro, Y. Iwayama, T. Takashima, K. Sakoori, T. Toyota, Y. Nozaki, Y-S. Okada, K. Yamada, T. Yoshikawa, J. Aruga	Characterization of <i>Zic2</i> hypomorphic mutant mice as a schizophrenia model and <i>Zic2</i> mutation identified in schizophrenia patients.	Scientific Reports	1	1-11	2011

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業 H23-化学—一般-004）
総合研究報告書

T. Saito, T. Suemoto, N. Mihira, Y. Matsuba, <u>K. Yamada</u> , P. Nilsson, J. Takano, M. Nishimura, N. Iwata, C. V. Broeckhoven, T. C. Saido	Potent in vivo amyloidogenicity of A β 43.	Nature Neurosci.	14	1023-1032	2011
Y. Satoh, S. Endo, T. Nakata, Y. Kobayashi, <u>K. Yamada</u> , T. Ikeda, A. Takeuchi, T. Hiramoto, Y. Watanabe, T. Kazama	ERK2 Contributes to the Control of Social Behaviors in Mice.	J. Neurosci.	31	11953-11967	2011
N.Takashima, Y. S. Odaka, K. Sakoori, T. Akagi, T. Hashikawa, N. Morimura, <u>K. Yamada</u> , J. Aruga	Impaired cognitive function and altered hippocampal synapse morphology in mice lacking <i>Lrrtm1</i> , a gene associated with schizophrenia.	PLoS ONE	6	e22716	2011
T. Sano, Y-J. Kim, E. Oshima, C. Shimizu, H. Kiyonari, T. Abe, H. Higashi, <u>K. Yamada</u> ,	Comparative characterization of GPRC5B and GPRC5C LacZ knockin mice; Behavioral abnormalities in GPRC5B-deficient mice.	BBRC	412	460-465	2011

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業 H23-化学―一般-004）
総合研究報告書

Y. Hirabayashi					
S. Ito, I. Ogiwara, <u>K. Yamada</u> , H. Miyamoto, T. K. Hensch, M. Osawa, K. Yamakawa.	Mouse with Nal.1 haploinsufficiency, a model for Dravet syndrome, exhibits lowered sociability and learning impairment.	Neurobiol. Disease	49	29-40	2013
M. Kabayama, K. Sakoori, <u>K. Yamada</u> , V. G. Ornathanalai, M. Ota, N. Norimura, K. Katayama, N. P. Murphy, J. Aruga	Rines E3 ubiquitin ligase regulates MAO-A levels and emotional responses.	J. Neurosci.	33	12940- 12953	2013
K. Nose-Ishibashi, J. Watahiki, <u>K. Yamada</u> , M. Maekawa, A. Watanabe, G. Yamamoto, A. Enomoto, Y. Matsuba, T. Nampo, T. Taguchi, Y. Ichikawa, T. C. Saido, K. Mishima, Y. Yamaguchi, T. Yoshikawa, K. Maki.	Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: potential increase in vulnerability to mental disorders.	Neuroscience	263	257-268	2014

平成23 年度厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
神経系発生-発達期の化学物質暴露による遅発中枢影響解析に基づく
統合的な情動認知行動毒性評価系確立に資する研究(H23-化学-一般-004)

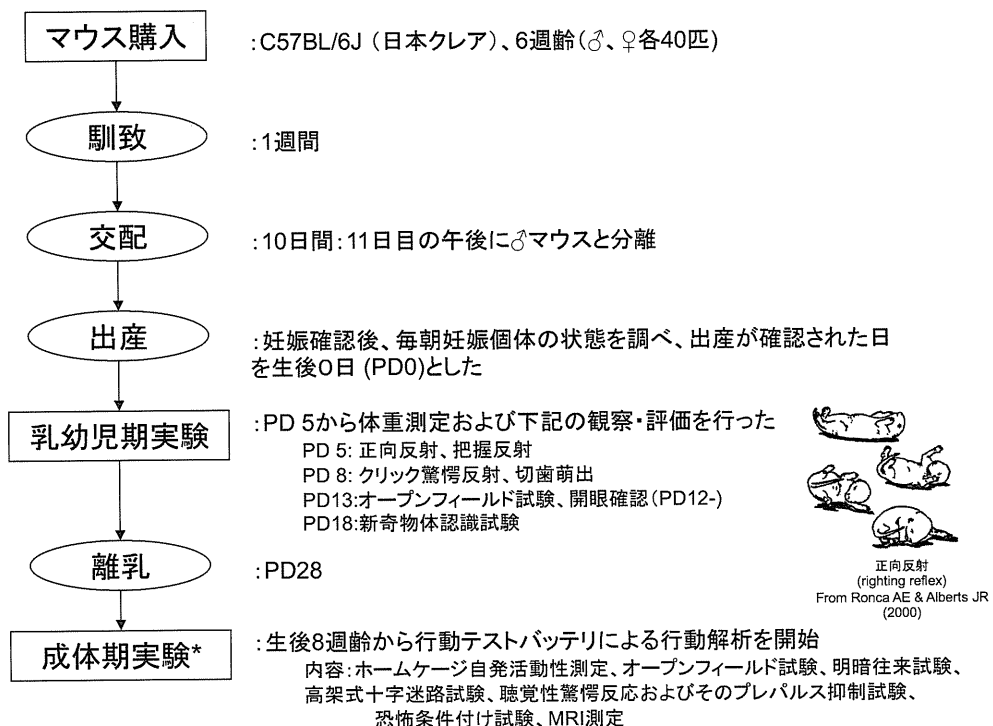
発生-発達期ビスフェノールA 暴露の 行動発達に対する影響解析

独立行政法人理化学研究所

脳科学総合研究センター

山田一之

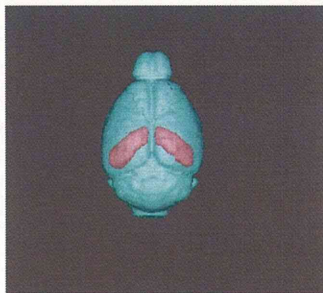
1. 方法概観



*平成24年度は35週齢から開始

2. 平成23年度結果のまとめ

category/task	vehicle	BPA
<i>infant (-PD18)</i>		
body weight		< (statistically significant)
righting reflex (PD5)	○	○
click startle response (PD8)	△	△
eye opening (PD13)		< (statistically significant)
open field (PD13)		n.s.
novelty/object test (PD18)		n.s.
category/task	vehicle	BPA
<i>adult (8 weeks-)</i>		
body weight		<
HC activity		<
open field		n.s.
L-D box		n.s.
elevated plus maze		n.s.
auditory startle &PPI		< (startle only)
fear conditioning	conditioning	n.s.
	context test	< (partially)
	cued test	< (partially)



vehicle群の1個体より得たデータより再構成した画像。赤い部分は海馬。

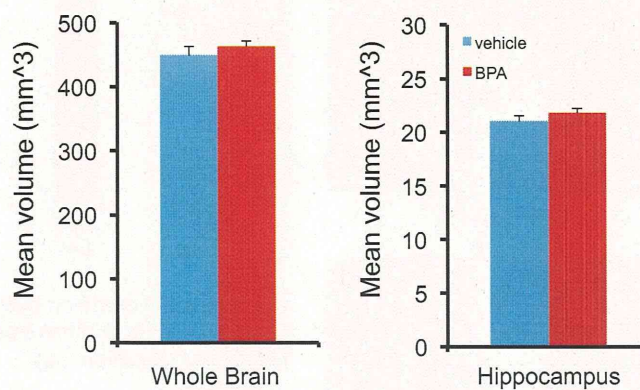


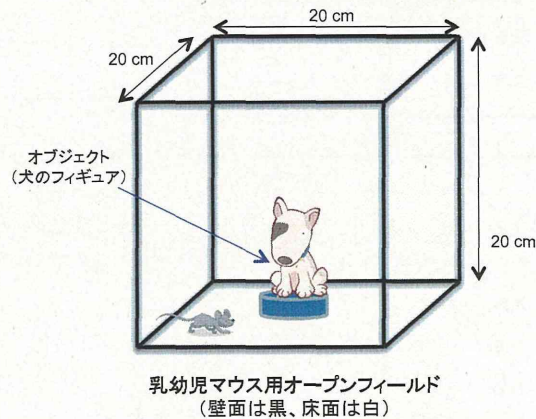
Fig. MRI測定の結果

データは平均と±標準誤差を示す。全脳容積および海馬容積について、vehicle群とBPA群に有意な差は認められなかった。

3. 平成24年度結果のまとめ

1) 幼児期における情動性評価

平成23年度に見られた恐怖条件付けの変化と比較し得る強度の高い情動反応として、新奇物体に対する衝動的逃避反応に焦点を当てた。



方法:

- ・マウスを中央に新奇なフィギュア(直径3 cm, 高さ5cm)を配置したオープンフィールド(20 x 20 x 20 cm)に入れ、マウスの行動を3分間観察

観察指標:

- ・通常のオープンフィールド行動の指標 (移動距離、不動時間)
- ・フィギュアへの接触反応とフィギュアおよびオープンフィールドからの衝動的逃避反応(壁面に対するジャンピング反応)の回数

分析:

- ・画像解析→ANY-maze (Stoelting)
- ・統計解析→Excel統計 (ver 6.0, エスミ)

☆結果



Impulsiveness: LOW



Impulsiveness: HIGH

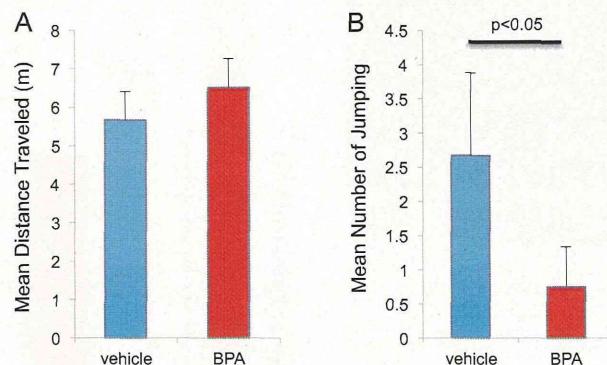


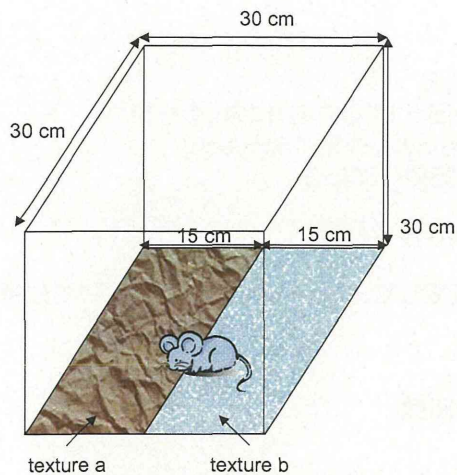
Fig. 1 Results of the emotional analysis in infants
A: mean distance of traveled (m), and B: mean number of jumping (impulsiveness)



胎生期・授乳期の母体経路のBPA暴露は、仔マウスの衝動性を低下させる可能性がある。

→「衝動性」と表現するとその低下は良い事のように思えるが、この場合好影響なのか悪影響なのか現時点では不明。

2-1) 自発的環境選好試験



成体マウス用オープンフィールド
(壁面は透明アクリルで下から15cm
まで灰色の目隠しがしてある。床面
はつや消しの白色塩化ビニル製)

方法:

- ・オープンフィールド(30 x 30 x 30 cm)の床面の半分に平坦なアクリル板、残りの半分に同素材のアクリル板に凹凸を施したものを敷き、マウスを入れて3分間マウスの行動を観察

観察指標:

- ・各テクスチャ領域におけるマウスの滞在時間

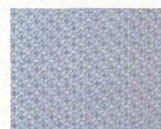
分析:

- ・画像解析→ANY-maze (Stoelting)
- ・統計解析→Excel統計 (ver 6.0, エスミ)

使用した床テクスチャー



アクリル板(平坦)



アクリル板
(凹凸:3 x 3 x 1 mm
の正四角すい)

☆結果



アクリル板
(凹凸:3 x 3 x 1 mm
の正四角すい模様)

アクリル板(平坦)

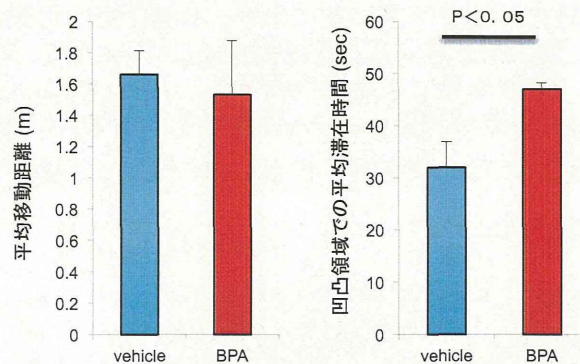


Fig. 2 Results of the spontaneous place preference test.

BPA暴露マウスでは、成体期において特定の床テクスチャに対する選好性が亢進している。
これは一体何を意味しているのだろうか？

2-2) トレッドミルにおける強制走行(歩行)試験



装置外観

方法:

- ・マウスを走路に入れる
- ・進行方向(ベルトの回ってくる方向)に向くのを待つ
- ・進行方向に向いたらベルト作動(15cm/sec)
- ・歩行反応を20秒間記録(100fps)
- ・inter trial intervalはおおよそ20~30秒
- ・試行数は5試行
- ・目視によって最も安定していると判断した試行について分析

観察指標:

- ・歩行パターン
- ・歩行/走行を諦めた回数

分析:

- ・画像解析→TreadScan (CleverSys)
- ・統計解析→Excel統計 (ver 6.0, エスミ)

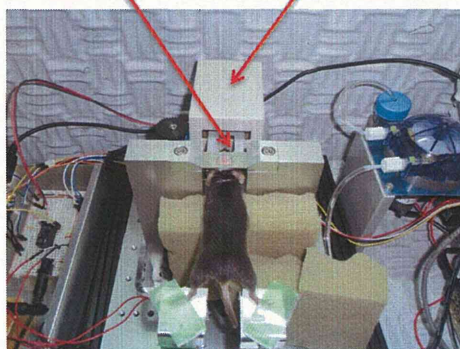
4. 平成25年度結果のまとめ

電気生理学測定用オペラント実験装置の開発:

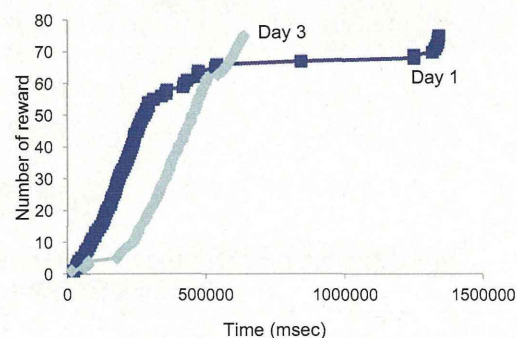
装置の外観を下図に左に示す。本装置では可動式レバー(retractable lever)に加えて、昇降式給水ノズルを採用することによって、マウスの反応と報酬提示のタイミングをミリ秒単位で正確に制御することを可能にした。諸般の事情によって当初の予定よりも開発が遅延し、BPA暴露マウスの解析には至らなかったが、C57BL/6マウスによる性能チェックを終了することができた(下図右に例を示す)。

昇降式給水ノズル

リトラクタブルレバー



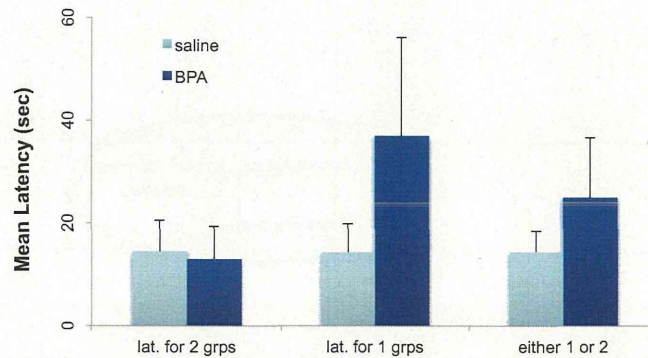
装置とオペラント実験の様子



訓練例(C57BL/6J male)

乳幼児期における社会性評価:

グループ化にかかる時間について、BPA暴露群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。また、他のマウスと著しく活動性の異なる個体数についても、BPA暴露群とVeh群の間に有意な差は認められなかった。



BPA群とVeh群(各5腹; 6匹/腹)のグループ化所要時間の比較

データ行列の作製(初期段階)

*key word: upper column = open field; lower column = bisphenol A, mouse, behavior

Authors	Year	Journal	Volume & page	behavioral indices	open field	water maze	step-down PA	novelty test	EPM	LD box
Wolstenholme JT, Goldsby JA, Rissman EF	2013	Horm Behav	65: 833-9	+ (activity)						
Xu X, Liu X, Zhang Q, Zhang G, Lu Y, Ruan Q, Dong F, Yang Y	2013	Horm Behav	63: 766-75	+ (rearing, center)						
Gioiosa L, Parmigiani S, Vom Saal FS, Palanza P	2013	Horm Behav	63: 598-605	anxiety +						
Xu X, Hong X, Li T, Yang Y, Zhang Q, Zhang G, Liu X	2012	Horm Behav	52: 480-90	anxiety +						
Matsuda S, Matsuda D, Ishii D, Tomizawa H, Sutoh C et al	2012	Biol Psychiatry	39: 273-9	anxiety + (center -)						
Xu X, Tian D, Hong X, Chen L, Xie L	2011	Neuropharmacology	61: 565-73	sexual diff: abolished+ (distance)						
Nakamura K, Itoh K, Dai H, Han L, Wang X, Kato S et al	2012	Brain Dev	34: 57-63	dist -						
Tian YH, Beak JH, Lee SY, Jang CG	2010	Synapse	64: 432-9	center +						
Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, Parmigiani S	2008	Environ Res	108: 150-7	affected						
Gioiosa L, Fazzari E, Ghisardelli G, Parmigiani S, Palanza P	2007	Horm Behav	52: 307-16	sexual diff abolished						
Rubin BS, Lenkowski JR, Schaeberle CM, Vandenberg LN, et al	2006	Endocrinology	147: 3581-91	sexual diff abolished						
Pillot M, Naule L, Marie-Luce G, Martini M et al	2013	Endocrinology	e-pub ahead							
Luo G, Wei R, Niu R, Wang C, Wang J	2013	Food Chem Toxicol	60: 177-80							
Ogi H, Itoh K, Fushiki S	2013	Brain Behav	3: 223-8							
Kundakovic M, Gudekuk K, Franks B, Madrid J et al	2013	PNAS	110: 9956-61	male: dist +, female dist -						
Dinakaran D, Berger RG, Guzzo AO, Thorpe JB, Khan A	2013	Food Chem Toxicol	58: 164-71							
Wolstenholme JT, Edwards M, Shetty SR et al	2012	Endocrinology	153: 3828-38							
Wolstenholme JT, Taylor JA, Shetty SR, et al	2011	Plos ONE	e25448							
Viberg H, Fredriksson A, Buratovic S, Eriksson P	2011	Toxicology	290: 187-94							
Yu C, Tai F, Wu R, Zhang X, He F	2011	Environ Toxicol Pharmacol	31: 88-99	altered						
Jasarevic E, Sisti PT, Twilman EE, Welsh TH Jr et al	2011	PNAS	108: 11715-20							
Cox KH, Gatewood JD, Howeth G, Rissman EF	2010	Horm Behav	58: 754-61							
Martini M, Miceli D, Gotti S et al	2010	J Neuroendocrinol	22: 1004-12							
Xu JH, Zhang J, Wang YM, Ye YP, Luo QQ	2010	Horm Behav	58: 326-33							
Miyagawa K, Narita M, Narita M, Akama H, Suzuki T	2007	Neurosci Lett	418: 236-41							
Ryan BG, Vandenberg JG	2006	Horm Behav	50: 85-93							
Laviola G, Gioiosa L, Adriani W, Palanza P	2005	Brain Res Bull	65: 235-40							
Mizuko K, Narita M, Miyagawa K, Narita M, Okuro E, Suzuki T	2004	Neurosci Lett	358: 95-98							
Kawai K, Nozaki T, Nishikata H, Aou S, Tajiri M, Kubo O	2003	Environ Health Perspect	111: 175-9							
Palanza PL, Howdeshell KL, Parmigiani S, vom Saal FS	2002	Environ Health Perspect	110: 415-22							
n = 30					13	5	4	3	15	4

注) 本研究ではBPA研究において有意差を得られた課題について検討しているため、詳細な実験条件・手続きの差異について区別していない。これらを厳密に分類するとカテゴリ化が不可能である。

検出項目の分析



軸No.	固有値	寄与率(%)	累積(%)	相関係数
1	0.7612	24.7%	24.7%	0.8725
2	0.6577	21.4%	46.1%	0.8110

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y.	Estrogen receptor α in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice.	<i>Bone.</i>	60	68-77	2013
Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H.	Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves.	Can J Vet Res.	77	120-125	2013
Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y.	Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver.	<i>J Toxicol Sci.</i> 2013;38(4):643-54.	38	643-654	2013
Tominaga T and Tominaga Y.	A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca ²⁺ imaging of neuronal circuit activity	Journal of Neurophysiology	110	553-561	2013
Terashita Y, Yamagata K, Tokoro M, Itoi F, Wakayama S, Li C, Sato E, Tanemura K, Wakayama T.	Latrunculin a treatment prevents abnormal chromosome segregation for successful development of cloned embryos.	PLoS One.	24;8 (10)	e78380.	2013
Kogasaka Y, Hoshino Y, Hiradate Y, Tanemura K, Sato E.	Distribution and association of mTOR with its cofactors, raptor and rictor, in cumulus cells and oocytes during meiotic maturation in mice.	Mol Reprod Dev.	80	334-348	2013

Hiraga K, Hoshino Y, Tanemura K, Sato E.	Selection of in vitro-matured porcine oocytes based on localization patterns of lipid droplets to evaluate developmental competence.	J Reprod Dev.	59	405-408	2013
Tominaga T and Tominaga Y.	A new non-scanning confocal microscopy module for functional voltage-sensitive dye and Ca ²⁺ imaging of neuronal circuit activity	Journal of Neurophysiology	110	553-561	2013
Takashi Tominaga, Riichi Kajiwara, and Yoko Tominaga	VSD imaging method of ex vivo brain preparation	Journal of Neuroscience and Neuroengineering	2	211-219	2013
Yi S.H., He X.B., Rhee Y.H., Park C.H., Takizawa T., Nakashima K. & Lee S.H.	Foxa2 acts as a co-activator potentiating expression of the Nurr1-induced DA phenotype via epigenetic regulation.	<i>Development</i>	141	761-772	2014
Uesaka M., Nishimura O., Go Y., Nakashima K., Agata K. & Imamura T.	Bidirectional promoters are the major source of gene activation-associated non-coding RNAs in mammals.	<i>BMC Genomics</i>	15	35	2014
Yuniarti N., Juliandi B., Muhchy C., Noguchi H., Sanosaka T. & Nakashima K.	Prenatal exposure to suberoylanilide hydroxamic acid perturbs corticogenesis.	<i>Neurosci Res</i>	77	42-49	2013
Urayama S., Semi K., Sanosaka T., Hori Y., Namihiro M., Kohyama J., Takizawa T. & Nakashima K.	Chromatin accessibility at a STAT3 target site is altered prior to astrocyte differentiation.	<i>Cell Struct Funct</i>	38	55-66	2013