

H19年度

発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究

分担研究者 宮川 宗之（独）労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

研究協力者 小林 健一

健康障害予防研究グループ

研究要旨 経母体曝露による次世代影響、化学物質に対して高い感受性を示す個体発生初期の曝露による発達神経毒性は、子供の健康問題における焦点の一つであり、次世代認知機能への影響を実験的に把握するための生物試験法の高度化が求められている。本研究では、ラット及びマウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB）を用いて学習・記憶に及ぼす影響を情動面への影響と分離しつつ評価する手法の確立を目指す。適切な陽性対照の設定について検討し試験法の妥当性を調べるとともに、発達神経毒性が実際に問題となっている物質に本法を適用し有効性を示す。今年度は、ビスフェノール A（BPA）低濃度曝露の影響を調べた。学習習得、短期記憶の保持、行動の適切な制御に及ぼす影響評価を目的に考案した「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」下での SCOB を使用し、ラットを被験体に BPA 妊娠・授乳期混餌曝露（0.33 ～ 33 ppm 混餌）の影響を検討したところ、学習習得の遅延と考えられる影響が認められたが、短期記憶過程への影響は認められなかった。陽性対照の設定については予備的検討を継続中である。

A. 研究目的

化学物質に起因する子供の健康問題は世界的な重要課題として認識されているが、経母体曝露による次世代影響、化学物質に対して高い感受性を示す個体発生初期の曝露による発達神経毒性は焦点の一つである。また、いわゆる内分泌かく乱化学物質や難分解性の環境汚染物質についても、神経系に関わるデータの収集は不十分である。知能のような神経系高次機能に対する影響が問題となる場合も多いが、そのような作用を適切に把握し

評価する試験法の開発や標準化は進んでいない。実験動物を用いた行動試験では、いわゆる情動性への影響と学習・記憶といった認知機能への影響を分離して把握すべきであるが、現状は不十分である。実際、学習・記憶試験として迷路を用いた課題が使用されることが多いが、場面適応性やストレスへの反応などの因子が大きく関与するものが多い。これらを排除もしくは分離し、長期にわたって学習による行動の変容を記録するとともに、短期記憶や弁別などの認知機能を基礎とした適応的行動の測定が可能な試験

課題が必要である。また、発達神経毒性評価のための行動試験法自体の妥当性等を担保するためには陽性対照物質の使用が望ましいが、種々の困難さのため実施されることは少ない。したがって、認知機能（学習・記憶）に対する影響を評価するための齧歯類を用いた試験方法の確立と陽性対照となる物質についてのデータの収集・蓄積が重要と考えられる。

本研究では、オペラント条件付けを応用した手法により、齧歯類を用いて学習・記憶といった認知機能への影響を把握する行動試験法の高度化を目指す。我々は、ラット及びマウスを対象に、スケジュール制御オペラント行動（SCOB）を指標に用いて、場面適応性など情動面への影響を極力分離しつつ学習習得への影響を測定するとともに、短期記憶の保持に対する影響を評価することが可能な行動試験法を確立しつつある。本研究ではラットとマウスを対象に、我々が開発した SCOB 試験を実施し、内分泌攪乱作用による影響が問題とされる物質やいくつかの陽性対照の候補となる物質について、次世代認知機能への影響を検討し、試験法としての有効性や妥当性の検討・確認を行なう。

平成 19 年度は、研究初年度としてビスフェノール A 低濃度混餌曝露（妊娠期・授乳期）の影響についてラットを用いた確認試験を実施した（実験 1）。また、陽性対照候補の検討としては、インドール酢酸について妊娠期・授乳期投与の影響を見るための予備試験を実施した（実験 2）。また、おなじく陽性対照物質候補として抗甲状腺薬プロピルチオウラシル

（PTU）の妊娠期・授乳期投与の影響を見るための予備試験を開始した（実験 3）。さらに老化及び老化による認知機能の変化が早期から認められるといわれる老化促進マウス（SAMP8・SAMP10）を一種の陽性対照条件として用い、試験法の妥当性について検討するための測定を開始した（実験 4）。

実験 1 ではビスフェノールの認知機能に及ぼす影響が比較的低濃度観察されたこと、実験 2 及び実験 3 は予備試験であり継続中であること、実験 4 も実験継続中であることから、以下実験 1「ビスフェノール A の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とラットの次世代認知機能影響」について詳述し、他の実験については最後に概要を記すこととする。

B. 研究方法

被験動物：9 週齢の妊娠ラット（IGS-SD）を購入し、妊娠第 6 日（GD6）から離乳日（PND21）まで高純度の BPA を混餌投与（0, 0.33, 3.3, 33 ppm、各群 12 匹）した。出産 5 日後（PND5）に各腹の仔数を 8 匹（雌雄同数）に調整した。離乳時に、各腹から行動試験に使用するための個体雄 1 匹をランダムに選び、離乳後は通常飼料（日本クレア CE-2）を与えて 8 週齢まで集団飼育（各ケージ 4 匹）した。8 週齢で、食餌強化による SCOB 行動測定のため、個体別飼育と給餌制限を開始し、以後実験期間を通じての体重を 300g を目標に給餌量を調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。ラットの飼育室は、すべて温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、

湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境飼育施設内にあり、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施した。

ビスフェノール A 混餌投与：市販の粉末飼料（オリエンタル酵母 MF）に、BPA（和光純薬・測定用標準品・純度 $>99.6\%$ を使用）を、0 ppm、0.33 ppm、3.3 ppm、33 ppm の濃度となるよう混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを使用した。

SCOB 測定装置：スケジュール制御オペラント行動（SCOB）の測定には 8 台のオペラントチャンバー（MED Associates 製）を使用した。パーソナルコンピュータ用の行動実験プログラム作成システム（MED Associates 製）上で、一連の条件付け訓練に必要な（各種の SCOB に対応した）プログラムを作成し、これらを用いてチャンバーを制御するとともに、反応を記録した。各オペラントチャンバー内部の前面パネル中央には、ペレットディスペンサー（粒餌提示装置）に接続された餌皿が設置され、その左右には反応レバーが 1 基ずつ備えられているが、今回は右側のレバーのみを使用した。餌皿と両反応レバーの上部には、cue light が 1 つずつ合計 3 個設置され、反対側の後面パネル上部中央には house light 1 基が設置された。各チャンバーを防音箱（MED Associates 製、換気ファン付でファンから実験中一定レベルのノイズを発生し外部騒音の影響を低減）内に置き、さらに外部からの騒音等を低減するため、全ての装置を動物舎内の専用室に設置し

て実験を行った。報酬の呈示を知らせる音刺激は 4500 Hz（75–80 dB に調整、持続 1 秒）を使用した。タイムアウト中以外のレバー押し反応には 2900 Hz の短音（“ピッ”という音：ピップ音）を随伴させた。

SCOB の測定手続き：食餌を報酬とした SCOB 測定のため、給餌量の調整・制限を行い体重が目標値付近で安定した後、13 週齢から SCOB の測定を開始した。初めに、レバー押し反応の条件づけ訓練を行なった。SCOB 訓練・測定は、1 日 1 セッションで週 5 日行い、後述するすべての実験が終了まで継続した。

SCOB の測定ではレバー押し反応に随伴させて報酬となる粒餌を提示する（反応の強化）が、反応回数や反応間隔など一定の条件を設定し、その条件を満たした反応のみ強化を行う。この条件を強化スケジュールと呼ぶ。強化スケジュールを、1) 自動反応形成（auto-shaping）スケジュール（7 セッション）、2) 定率強化（fixed rate: FR）スケジュール（FR2×2 セッション、FR5×1 セッション、FR10×10 セッション）と順次変更して基礎的な訓練を実施し、その後、タイムアウト付交替型混合定率強化他反応分化強化（alternating mixed FR 10 DRO 10sec with TO）スケジュールを導入した。毎回のセッションは、あらかじめ規定した回数まで報酬が与えられるか規定の時間が経過することで終了とした（規定時間は自動反応形成訓練では 60 分、他はすべて 50 分に設定）。なお、報酬には 45 mg の粒餌（Bio-Serv 社製オペラント条件付け用

ペレット)を使用した。

一連の SCOB 条件付け学習訓練の初めの段階となる自動反応形成スケジュールでは、セッション中、被験動物がレバーを押す反応を自発した場合には、“ピー”という報酬呈示を予告する刺激音に引き続いて粒餌が餌皿上に一つ供された。セッション中 100 秒間反応が生じない場合は、セッション開始時に点灯するレバー上部の cue light が 20 秒間点滅し、その後予告音に続いて粒餌が与えられた。セッション中 house light は常時消灯とした。合計 100 回反応が生じるか 100 個の粒餌が提示された時点で、規定の時間経過をまたずにセッション終了とした。

定率強化スケジュールによるセッションでは、FR 率にしたがって粒餌が与えられた。すなわち、FR2 では 2 回の反応毎に、FR5 では 5 回の反応毎に、FR10 では 10 回の反応毎に、報酬が提示された。合計 100 個の粒餌が提示されるか、50 分経過した時点でセッション終了とした。

タイムアウト付交替型混合スケジュールは、定率強化 (FR) と他反応分化強化 (Differential Reinforcement of Other Behavior: DRO) の 2 種類のコンポーネントスケジュールとタイムアウト (TO) を含むもので、Fig. 1 に概要を示した。このスケジュールでは、10 回の反応完了時に報酬が与えられる定率強化 (FR10) と 10 秒間無反応で待機することで報酬が与えられる他反応分化強化 (DRO 10 s) の 2 種類のコンポーネントスケジュールを、遅延時間となるタイムアウト (TO) を挟んで報酬提示 (強化) 毎に交替させた。タイムアウトの長さであるが、訓練

の第 1 段階 (固定長タイムアウト条件・TO 4s) では、タイムアウト時間を 4 秒に固定し 25 セッション (5 週間) の訓練・測定を実施した。第 2 段階 (上昇系列タイムアウト条件・TOA) では、4 秒、8 秒、12 秒、16 秒、20 秒と、セッション内でタイムアウト時間を徐々に延長し、25 セッションの訓練・測定を実施した。第 3 段階 (上下系列タイムアウト条件・TOC) では、4 秒から 20 秒の間で、タイムアウト時間をセッション内で上下させ、25 セッションの訓練・測定を実施した。その後、薬理学的負荷試験として methamphetamine、(±) SKF38393 (D1 系アゴニスト)、(-) quinpirole (D2 系アゴニスト) 投与による影響の測定を行なった。

毎回の実験セッションでは、Fig. 1 に示した様に、初めに FR コンポーネントがスタートし、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light 及び house light が点灯する。この状態で被験体が反応レバーを 10 回押すと、粒餌 1 粒が餌皿上に供される (報酬の提示・強化)。その後はタイムアウトとなって、cue light は消灯し house light のみに暗転する。規定の長さのタイムアウト後、DRO コンポーネントとなり、左右の反応レバー及び餌皿上部の cue light が再び点灯する。DRO では、10 秒間無反応で経過すれば自動的に粒餌が与えられるが、反応があった場合にはタイマーがリセットされ、さらに 10 秒間の無反応が要求される。報酬提示後は再び暗転しタイムアウトとなる。タイムアウト終了後は、再び FR が始まる。なお、タイムアウト中に反応が生じた場合には、タイムアウト時間がリセットされ、規定

長のタイムアウトがその時点から計り直されることとなる。タイムアウト中の反応にはピップ音を随伴させなかった。

このようにFRであるかDROであるかを示す弁別刺激が提示されない（どちらも同様に cue light が点灯）ため、スケジュール制御オペラント条件づけの用語では混合スケジュールという分類となる。ただし、FR か DRO を示す弁別刺激は提示されないものの、両スケジュールが強化毎に交代する（交替型）ので、どちらのコンポーネントスケジュールにしたがって前回報酬が与えられたかが手がかりとなり、これにしたがって被験体は適切な反応パターンを選択することが可能である。一種の遅延交替反応課題となり、遅延時間となるタイムアウト時間を変化させることで、短期記憶過程の測定に使用可能と考えられる。ラットおよびマウスで実験した際の様子（反応中及び待機中で、通常と異なり防音箱の扉をあけてストロボで撮影したもの）を Fig. 2 に示した。このスケジュールでは、FR-TO-DRO-TO-を 1 サイクルとして合計 51 サイクル 102 回の報酬提示が行われるか、50 分間経過した時点でセッションを終了した。

SCOB における反応の指標：各スケジュール下での被験体の反応習得過程と、それに対して化学物質曝露が及ぼす影響を解析するための指標には、主として反応率（1 分間当りのレバー押し反応頻度）を用いた。また、タイムアウト付交替型混合スケジュールに関しては、FR と DRO で各タイムアウト後の初発反応の

潜時を求め、これらの潜時から両コンポーネントにおける反応切替えの正確さを示す指標「Accuracy」と全般的な反応性の指標「Bias」も算出した。すなわち、FR ではコンポーネント開始から 10 秒以内に反応があれば「HIT」とし、なければ「MISS」としてカウントし、「HIT」となる確率（ $P[\text{HIT}]$ ）を計算した。DRO ではコンポーネント開始から 10 秒経過する前に反応があった場合に「FA (false alarm)」とし、無反応で 10 秒経過すれば「CR (correct rejection)」とカウントして、「FA」となる確率（ $P[\text{FA}]$ ）を計算した。その後、次式によって、「Accuracy」と「Bias」を求めた。

$$\text{Accuracy} = P[\text{HIT}] - P[\text{FA}]$$

$$\text{Bias} = P[\text{HIT}] + P[\text{FA}] - 1$$

両指標とも、-1 から +1 の範囲で変化する。両指標の計算は、被験体が反応を停止したり時間制限によりセッションが終了したりした場合以外は、各セッション最初の 1 サイクルを除き、原則として合計 50 サイクルの測定結果に基づいて行った。変動タイムアウト条件ではタイムアウト時間を 5 段階の長さで変化させたので、TO 長毎に 10 回の FR と DRO での初発反応潜時が得られた。

被験体は、条件づけ訓練の進行によって、各タイムアウトが終了し FR が開始されると数秒以内に高頻度でレバーを押す反応を示すようになり、また DRO では殆どレバー押し反応を抑制し 10 秒間待機するようになり、それぞれ高率で「HIT」あるいは「CR」に分類される反

応パターンが得られるようになることを、これまでの研究で明らかにしている。この Accuracy は、FR と DRO それぞれに適応したパターンで適切な反応が生じたかどうかを示すものとなる。セッション内でタイムアウト時間を変化させ、タイムアウト時間に対して Accuracy をプロットすると、遅延時間（タイムアウト長）と反応切替えの正確さの関係を示す曲線（Delay-Accuracy Curve）が得られる。被験体には、タイムアウトを挟んで適切に反応パターンを交替させること、すなわち遅延時間後に前回と異なる反応パターンを選択することが求められており、遅延時間の間は前回 FR であったか DRO であったか（あるいは次にどちらの反応パターンを選択すれば良いか）を記憶しておくことが求められる。したがって、タイムアウト長に対して Accuracy をプロットした曲線は、一種の短期記憶の保持曲線と考えられるものとなる。一方、Bias は FR と DRO を通じて、各タイムアウト終了後 10 秒以内にレバー押し反応が生じた割合に対応するもので、「反応性」の全般的な指標となり、反応の適切な制御・抑制に対する影響を評価するための指標となる。

薬理学的負荷試験： 上述したようにタイムアウト付交替型混合スケジュール第 3 段階の訓練 25 セッション終了後、薬理学的負荷試験を実施した。負荷薬物としては、ドーパミン系に作用する 3 種類の薬物、methamphetamine、(-)-quinpirole (D2 系アゴニスト)、(±)SKF38393 (D1 系アゴニスト) を使用した。負荷試験開始に

先立ち生理食塩水投与 (i.p.) を毎日の SCOB 測定開始前に行ない、投与手技に順化させた後、週 1 回から 2 回の頻度で薬物負荷による測定を実施した。他の日は生理食塩水を投与した。投与はすべて腹腔内投与とし、行動測定開始の約 20 分前に実施した。当該薬物に関する測定期間中、生理食塩水投与で得られた値の中から、各用量での薬物投与の直前（通常前日）に得られた測定値をベースラインとした。数回の生理食塩水投与で得られた測定値を個体毎に平均して各個体のベースラインとし、FR 反応率と DRO 反応率についてはベースラインに対するパーセント値を、また Accuracy と Bias についてはベースラインからの差の値を、それぞれ求めて、各薬物の量－影響曲線を描いた。

以上、全ての実験は労働安全衛生総合研究所の動物実験に関する指針にしたがって実施された。

統計解析： SCOB の学習過程については、各スケジュールでの訓練過程毎に反復測定分散分析を実施した。すなわち、SCOB の測定で得られる 4 つの行動指標（FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、Bias）について、群間 1 要因（BPA）、群内 1 要因（session または 5 session 毎にまとめた block）として解析した。曝露の影響が有意となった場合は、Dunnnett 検定を行ない対照群との差を解析した。また薬理学的負荷試験については、負荷薬物用量の効果（群内要因）と BPA 曝露の効果（群間要因）について検定した。いずれ

も計算には SAS/GLM プロシーチャーを使用した。

C. 研究結果

母ラットの摂餌量及び仔の体重： 妊娠第2週から離乳時までの母ラットの摂餌量を7日毎の推移として Fig.3 に示した。摂餌量は7日毎に測定したが、1日1匹あたりに換算したものである。妊娠第2週～第3週では1日に1匹の母ラットが約20から25gを摂取した。この間の母ラットの平均体重は約300gである。これはBPA量としてみると0.33群～33ppm群で0.025～2.5mg/kg/day相当となる(混餌投与から体重当たりの摂取量への変換では、ラットの場合通常成体ではppm濃度に0.05を乗じる換算が行なわれるが、その方法によれば0.33群～33ppm群で約0.017mg/kg～1.7mg/kg/day相当となる)。米国EPAによるBPAのreference doseは0.05mg/kgでありLOAEL値50mg/kgを基準としたものである。今回の実験では、reference doseの1/2からLOAEL値の1/20の間でBPA曝露が行なわれたこととなり、所謂低濃度影響として問題となるレベルに相当する範囲の実験である。母ラットの妊娠期の摂餌量にBPAの影響は認められなかった。

一方、仔ラットの体重変化は Fig.4 に示した。授乳期(雌雄仔)及び離乳後(雄性のみ)の体重では、それぞれ群間に有意差が認められたが、図からわかるように差は僅かであった。

反応形成及び定率強化スケジュールで

の習得過程： 訓練初期の自動反応形成スケジュールでの訓練過程及び定率強化スケジュールでの訓練過程でのラットのオペラント反応の変化を Fig.5 に示した。自動反応形成過程では、曝露群の方が反応率の上昇が早い傾向が示されたが、有意ではなかった。定率強化スケジュールも同様であった。

タイムアウト付交替型混合スケジュールでの訓練過程： 訓練第1段階(固定長タイムアウト)から訓練第3段階(変動長タイムアウト上下系列条件)における行動変化(すなわち学習習得過程)とBPAの影響を Fig.6 から Fig.11 にまとめた。SCOBの測定で得られる4つの行動指標(FR反応率、DRO反応率、Accuracy、Bias)について、1block(5session)毎に各被験体の平均値を算出し、訓練進行にともなう各指標の変化を示している。図に示されたように、BPAの影響は主としてDRO反応率に認められた。検定結果は表1にまとめた。

セッション内でタイムアウト時間を上下させる訓練第3段階のデータについては、測定の結果得られたAccuracy及びBias値を、各タイムアウト時間に対してプロットし、Delay-Accuracy曲線及びDelay-Bias曲線(Fig.12)を求めた。図の左側のグラフはDelay-Accuracy曲線を、右側のグラフはDelay-Bias曲線を示している。前者は短期記憶の保持曲線に相当するものとなるが、ラットの場合、この範囲の遅延時間(タイムアウト時間)では遅延時間に関わらずAccuracyの値は0.6から0.8程度となった。またBias値

は遅延時間（タイムアウト時間）に応じ
て緩やかな上昇を示すものとなった。週
毎の結果に対する検定では、BPA 曝露の
影響について、いずれも有意とならな
かった。

薬理学的負荷試験：第3段階の訓練終
了後に実施した薬理学的負荷試験の結果
は、Fig.13 から Fig.15 に示した。各薬物
の急性投与による量－影響曲線を、
SCOB の測定で得られる4つの行動指標
（FR 反応率、DRO 反応率、Accuracy、
Bias）を用いてプロットしてある。生理
食塩水投与時の値をベースライン（図中
Vで示した）として示した。FR 反応率と
DRO 反応率についてはベースラインに
対するパーセント値を、また Accuracy と
Bias についてはベースラインからの差の
値を用いている。ドーパミン系に作用す
る3種類の薬物を投与したが、
methamphetamine、(-)-quinpirole（D2系ア
ゴニスト）、(±)SKF38393（D1系アゴニ
スト）いずれにおいても、明確なBPA曝
露の影響は認められなかった。検定の結
果BPA曝露の影響は全て有意とならな
かった。

D. 考察

本年度はタイムアウト付混合型FR
DROスケジュール下でのラット（1群12
匹計48匹－1腹1匹雄性仔－を使用）の
オペラント行動を指標に、BPA妊娠・授
乳期の低濃度混餌曝露（0.33～33ppm）
が成長後の仔の認知機能（学習習得・短
期記憶保持）に及ぼす影響を調べた。訓

練に使用したすべてラットが上記強化ス
ケジュール下での適切な反応パターンを
習得した。

交替型混合スケジュールでの訓練では、
最高用量の33ppm群（2.5mg/kg b.w./day
に相当）で、DRO反応率が高くなり、訓
練進行の遅延と考えられる結果が得られ
た。統計的検定結果は0.33及び3.3ppm
群でも有意となる場合もみられたが、背
景データを含め総合的に考察すると、明
らかな影響は33ppm群のみに生じたも
のとする。訓練進行後の最終的なパフ
ォーマンスには明確な差がなかったため、
学習習得の遅延と考えられる結果となっ
た。

訓練進行後に実施された、遅延時間（タ
イムアウト時間）の効果の測定及び薬理
学的負荷試験では、群間の差、すなわち
有意なBPA曝露の影響は認められてい
ない。これらは短期記憶の保持過程やド
ーパミン系に対する影響が認められない
ことを示唆する。Fig.16は
methamphetamine投与時の
Delay-Accuracy曲線を群毎に示したもの
であるが、methamphetamineの影響は遅
延時間（タイムアウト時間）が長い場合
に顕著となり、methamphetamine投与量
の増大とともに、まず曲線が右下がり
となり、ついで全般的に下方にシフトす
るものの、全体としては群間に差は生じ
ていない。このデータは本試験によって短
期記憶の保持過程に対するメタンフェタ
ミンの効果が適切に把握されることを示
すものであるが、同時にBPA曝露による
影響がなかったことを示している。

以上をまとめると、BPAの低濃度妊娠

期・授乳期の曝露は、DROのような反応の抑制が求められる状況において、反応抑制を妨害する方向に作用し、結果としてDROコンポーネントを含むSCOBの習得過程に影響を与えたものと考えられる。また短期記憶の保持やドーパミン系の感受性に影響を与えるとの証拠は得られなかった。

今回の実験では、各群12匹計48匹の動物を使用しており、行動を指標とした発達神経毒性試験としては比較的大規模の実験結果であって、この結果は重要である。BPAの低濃度効果についての最近レビュー論文（例えば vom Saal FS et al, Environ Health Perspect 113:926-933, 2005）をみると、行動を指標として影響を認めたとする研究が例示されているものの、場面適応への影響を排除しつつ（則ち走路を用いた試験課題を使用しないで）認知機能（学習及び記憶）に焦点をあてて明確な影響を認めたとする研究は殆どない。したがって、本研究はBPAの低濃度影響に関して陽性の結果を示した貴重なデータを提供するものと考ええる。我々が以前マウスを用いて実施した同様の方法、同様の規模の実験では、SCOBの初期の訓練過程、タイムアウト付交替型混合スケジュールにおける訓練、訓練進行後のDelay-Accuracy曲線及びDelay-Bias曲線、ドーパミン系に作用する薬物を用いた薬理学的負荷試験、いずれにおいてもBPAの影響は示されなかった。両実験の結果を慎重に比較検討する必要がある。なお、マウスの実験と今回のラットの実験では、BPA混餌濃度は同一の設定であるが、体重当たりの曝露量としては一般に

マウスではラットの3倍とされる。

一方、BPA曝露がドーパミン系に及ぼす影響を示唆した研究は相当数存在する。我々の過去の実験でも、高用量投与ではあるがドーパミン系への影響を示唆するデータも得られている。しかし、今回の薬理学的負荷試験は陰性結果を示すものとなった。

今回の実験は認知機能(学習・記憶)に焦点をあてSCOBの習得遅延という結果を得たものではあるが、DROへの影響という点に注目すると、曝露群における反応の抑制の困難さを示唆しており、場合によっては「衝動性」との関連で興味を持たれるかもしれない。ただし、齧歯類を用いた行動試験により衝動性を評価するためには、ヒトにおいて衝動的ととらえられる行動様式を（いわゆるキレやすさや低コストで短期に得られる利益を愛好する傾向などが「衝動性」といった表現で一つにまとめられるものかどうかも含めて）整理し、これに対応する動物における行動モデルを確立することが前提となり、現在まで幾つかの試みがなされているものの十分な検討がなされているとは言えない状態である。したがって、本研究結果から安易に衝動性に言及することは控えたい。

陽性対照物質に関する予備的検討

上述したように、本年度はBPA曝露によって用量に依存的であり、また統計学的にも有意な次世代行動影響が把握されたが、以前実施したマウスの実験では、混餌によるBPA曝露レベルが今回と同様

(体重当たりの摂取量ではより曝露レベルが高い)にもかかわらず影響は認められていない。このような陰性データが得られる場合には、試験方法の感度や妥当性が問題となる。したがって陽性対照群の設定が重要となるが、次世代認知機能に焦点をあてると陽性対照群の設定には種々の困難が存在する。以下、今年度実施した陽性対照についての予備的検討結果(実験2~3)の概要を記載する。

(実験2 陽性対照物質としてのインドール酢酸)

インドール酢酸(IAA)は微量で植物細胞の伸長を促進する作用がある天然の植物ホルモン(オーキシン)であり、植物の芽頂で作られる。本物質については、ラットやマウスが妊娠中の一定の時期に比較的大量の投与(1000 mg/kg)を受けると胎児に奇形(小脳症)が発生するとの報告がなされている(Furukawa et al., 2004, Furuawa et al., 2007)。今年度は、このIAAによる小脳症動物を、次世代認知機能影響評価における陽性対照モデルとして用いることを検討した。マウス及びラットを用いて250~1000 mgを妊娠中期に1回(マウス、GD12)または3回(ラット、GD12-14)強制経口投与し、得られた仔を用いてSCOBの測定を実施した。高用量では小脳症が生じることが確認されたが、奇形が大きい場合は出生後の生存率がわるく、また用量を減らすと殆ど肉眼的に観察した形態や脳重量に影響がなく、そのような状況で実施したSCOB試験(実験1と基本的に同様のスケジュールを使用)でも明確な行動影響は認められなかった。ラットの実験時に、実験

実施者からは、ハンドリングに対する反応が通常とことなるとの報告を受けており、さらに検討の余地はあるが、脳の形態奇形をともしつづ仔を成長させ得る用量範囲の設定がむずかしいとの結論に達した。一般毒性が低いなど、実験実施上の利点も多いため、再検討も考えたい。

(実験3 陽性対照物質としてのプロピルチオウレア)

抗甲状腺ホルモン作用を示すプロピルチオウラシル(PTU)については、次世代行動影響に関してかなりの数の報告が存在する。現在、行動実験で陽性対照とする場合の適切な用量と投与方法について検討中である。

(実験4 老化促進マウスの利用)

老化促進モデルマウスとして知られているSAMPマウス(Senescence-Accelerated Mouse Prone)の内、早期の加齢とともに脳の機能的障害等が生じるといわれるSAMP8(学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常)及びSAMP10(脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス)の2系統のマウス、及び対照となるSAMR1(Senescence-Accelerated Mouse Resistant)マウス、合計3系統を用いて、SCOBの測定を実施し、早期老化とともに行動指標にどのような影響が生じるかを解析している。現在BPAの測定と同様のスケジュールの訓練が進行しつつあり、タイムアウト時間をセッション内で上昇させる条件での交替型タイムアウト付FR-DRO訓練後半を実施中である。3系統では今のところ成績に明確な

差は生じていない。8～10 カ月齢で老化が進むと考えられ、最終スケジュールでの適切な反応習得後、徐々にパフォーマンスの低下が SAM8 及び SAM10 マウスで生じることを期待し、実験を継続している。今後、薬物投与による陽性対照群の設定とは別の視点から、行動試験で得られる各種指標値の意味について考察するためのデータが収集されよう。それに基づいて、我々の開発した SCOB 試験について認知機能試験としての妥当性の検討を行なう予定である。

E. 結論

本年度の研究の結果を総括すると以下の結論が得られた。

1) ラットではビスフェノール A の経母体曝露 (33 ppm 混餌: 我々の同様の実験でマウスでは影響が認められず、また従来の LOAEL とされる量よりも低い用量) により、仔の学習進行の遅れが生じた。反応の抑制が必要な SCOB スケジュールの習得過程が主として影響を受けた。短期記憶の保持過程には影響が認められなかった。

2) 各種陽性対照の設定について検討中。陽性対照物質候補インドール酢酸についての予備試験では、行動試験実施が可能となるような用量設定に困難があった。甲状腺ホルモン拮抗剤 PTU についての検討を開始した。試験法の妥当性を別の面から検証するため、早期老化により認知機能に異常が生じるとされる

SAMP マウスを用いた実験を実施 (、SCOB 訓練) 中である。

(謝辞: 本研究遂行にあたって村瀬正、小野寺英美、松田由希各氏から多大な技術的支援を受けた。)

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表 (過去 3 年分)

1. 論文発表

- 1) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi, Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring. *Industrial Health* 44: 510-524, (2006).
- 2) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate on Somatic and Physical Development in Rats Offspring. *Industrial Health*, 44: 652-660. (2006).
- 3) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Thyroid Status in F1 Rat Offspring.

Industrial Health, 43: 685-690. (2005).

2. 学会発表

- 1) 宮川宗之、小林健一、須田恵、王瑞生、奥野勉、平田衛. ビスフェノール A の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とラットの次世代認知機能影響. 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会 要旨集 p53、(2007).
- 2) 須田 恵, 本間健資, 宮川宗之, 王 瑞生, 小林健一. 2-プロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響 その 2. 日本産業衛生学会第 19 回産業神経・行動学研究会, 産業衛生学雑誌(2007).
- 3) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代生殖発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 47 回日本先天異常学会学術集会 要旨集 p66、(2007).
- 4) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 プログラム・要旨集 pS116、(2007).
- 5) 宮川宗之、小林健一. 低濃度ビスフェノール A への妊娠・授乳期曝露と次世代認知機能影響. 第 80 回日本産業衛生学会講演要旨集 p756、(2007).
- 6) 須田恵、本間健資、宮川宗之、王瑞生. 2-プロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響. 第 80 回日本産業衛生学会講演要旨集 p747、(2007).
- 7) Kenichi Kobayashi, Katsumi Ohtani, Hisayo Kubota, and Muneyuki Miyagawa. Effects of Dietary Exposure to Bisphenol A on Development in C57BL/6J mice. 44th Congress of european societies of toxicology EUROTOX 2007. Toxicol Lett. 172, S186, (2007).
- 8) 宮川宗之、小林健一. ビスフェノール A の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とマウスの次世代認知機能影響. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p50、(2006).
- 9) 小林健一、大谷勝己、宮川宗之. ビスフェノール A のマウス次世代発生毒性. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p202、(2006).
- 10) Muneyuki Miyagawa Behavioral Toxicity of Chemicals: Usefulness of Behavioral Test Methods in the Assessment of Neurotoxicity. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 企業セミナー (神経毒性試験における技術開発: In Vitro and In Vivo Approaches 共催シンジェンタ CTL) (2006).
- 11) 宮川宗之、小林健一. マウスのスケジュール制御オペラント行動による認知機能影響評価. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会. The Journal of Toxicological Sciences, Vol.31 Supplement, S218, (2006).
- 12) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Takeshi Honma.

- Effects of gestational exposure to 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on postnatal development and thyroidal status in rat offspring. 43th EUROTOX, Toxicol Lett 164, S170. p13-06. (2006).
- 13) 小林健一、宮川宗之、王瑞生、須田 恵、本間健資 2,2',4,4',5,5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) のラット出生前曝露が次世代の発達および甲状腺におよぼす影響. 第33回日本トキシコロジー学会学術年会. The Journal of Toxicological Sciences 31 (Suppl) S221. (2006).
 - 14) 須田 恵、本間健資、宮川宗之、王 瑞生、小林健一. 1-ブロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響. 第79回日本産業衛生学会第79回日本産業衛生学会、産業衛生学雑誌 48(Suppl) 546. (2006).
 - 15) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to PCB 153 on the Brain Neurotransmitters of Maternal and Offspring Rats. 45rd Annual Meeting & Toxexpo, Society of Toxicology (SOT), San Diego. (2006).
 - 16) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Postnatal development in rat offspring following in utero and lactational exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. 42th Congress of european societies of toxicology EUROTOX 2005, Toxicol Letters 158, S130. (2005).
 - 17) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Somatic growth and physical development in rat offspring with gestational and lactational exposure to DEHP. 第52回日本実験動物学会 Exp Anim 54, 277. (2005).
 - 18) 宮川宗之. 神経行動毒性の評価とスケジュール制御オペラント行動. 薬物・精神・行動の会10月例会講演、(2005).
 - 19) 小林健一、宮川宗之、王 瑞生、須田 恵、本間健資. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の経母体曝露がラット産仔の成長発達におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 605. (2005).
 - 20) 王 瑞生、宮川宗之、小林健一、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 607. (2005).
 - 21) 須田 恵、本間健資、宮川宗之、小林健一、王 瑞生. PCB153 (2, 2', 4, 4', 5, 5' - hexachlorobiphenyl) 出生前ばく露がラットの脳内の神経

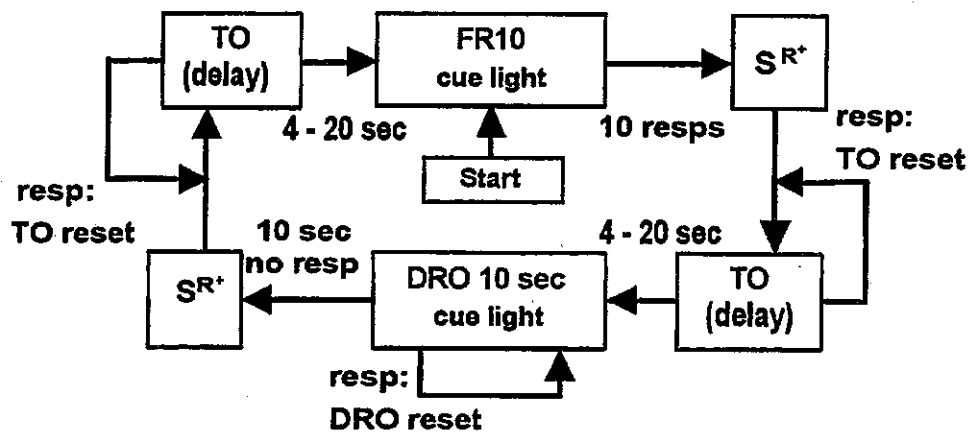
活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第 78 回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 685. (2005).

- 22) 宮川宗之、小林健一、王 瑞生、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの学習行動に及ぼす影響 (2). 第 78 回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 686. (2005).
- 23) 本間健資、須田 恵、宮川宗之、小林健一、王 瑞生. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体ばく露 (妊娠期・授乳期) がラット脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第 78 回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 687. (2005).
- 24) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Neurochemical Changes in the Brain of Offspring Rats following Maternal Exposure to PCB 153. Society of Toxicology (SOT), Toxicologist p.221. (2005).

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし

図表

発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした
行動試験法の高度化に関する研究



resp(s): response(s) S^{R+} : reinforcer (food)

FR: fixed ratio TO: timeout

DRO: differential reinforcement of other behavior

Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

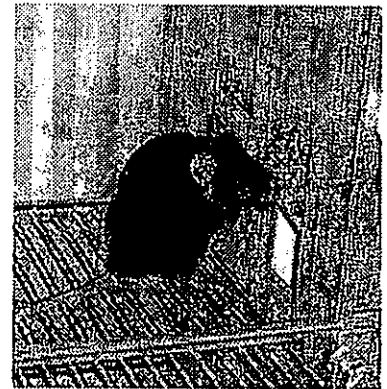
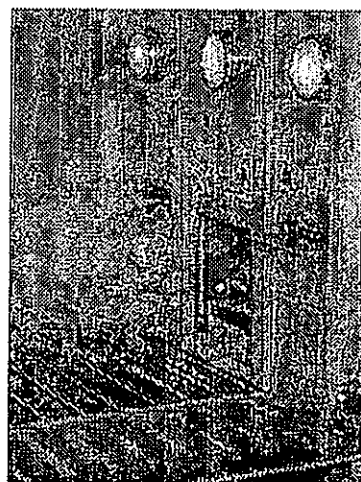
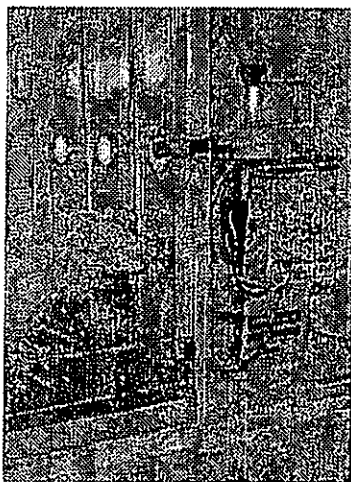


Fig. 2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 下でのSCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).

左: 反応中のラット 中央: 待機中のラット 右: 待機中のマウス

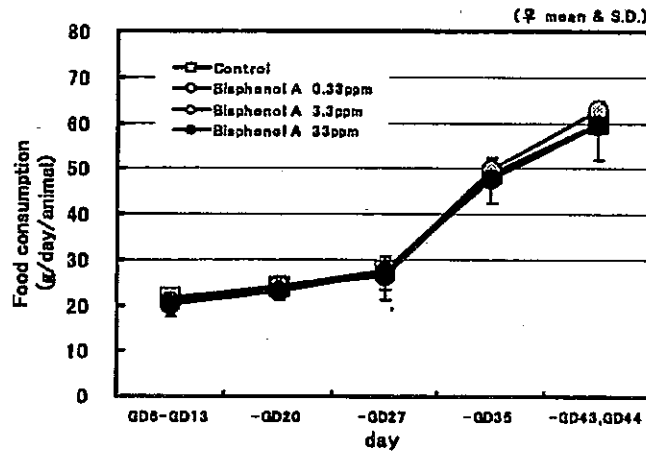


Fig. 3 妊娠期及び授乳期における母ラット摂餌量 (1匹1日あたりの値)

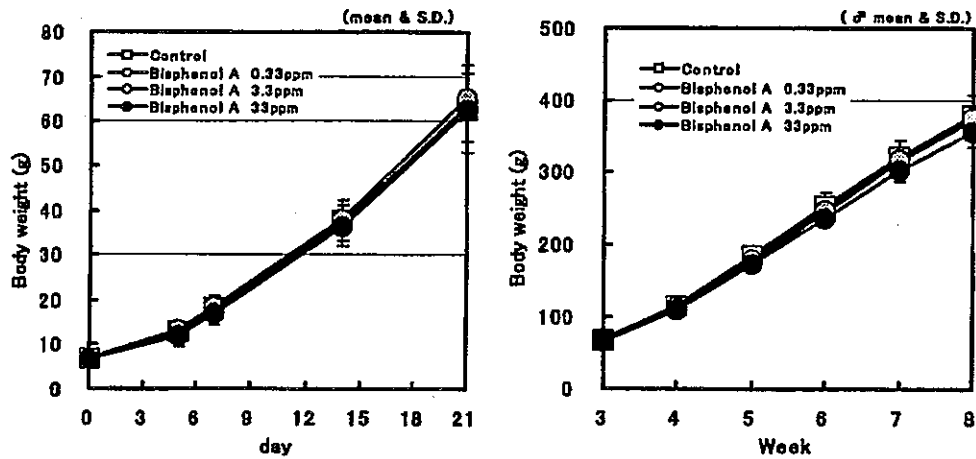


Fig. 4 授乳期の仔ラットの体重変化 (左) 及び離乳後の雄性仔ラットの体重変化 (右)

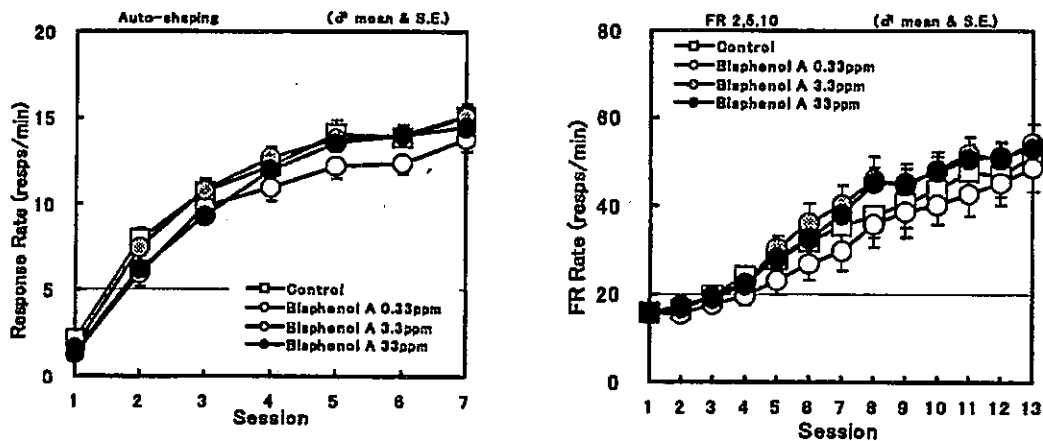


Fig. 5 自動反応形成スケジュール訓練時 (左) 及び定率強化スケジュール訓練時 (右) の反応率の変化

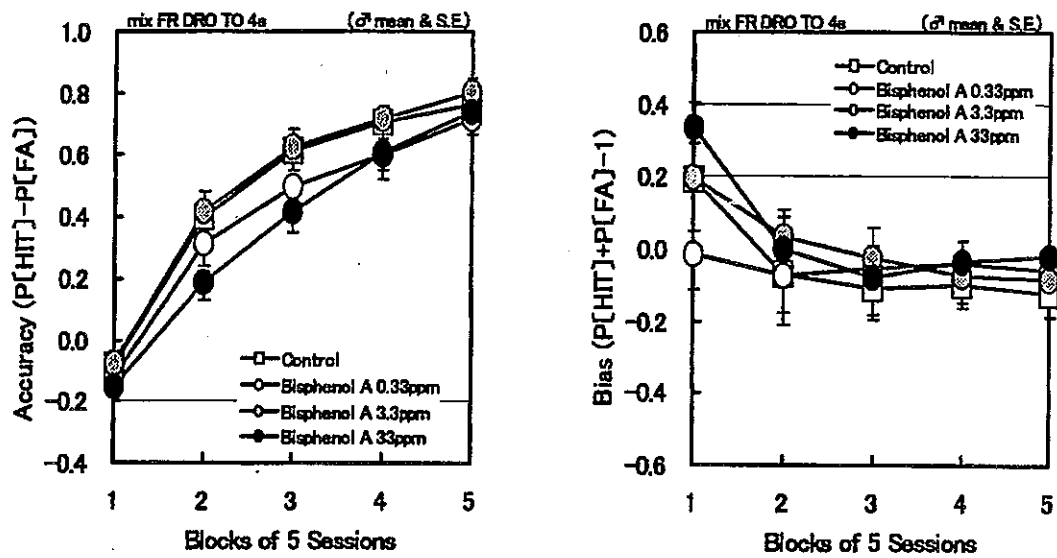


Fig. 6 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 4 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

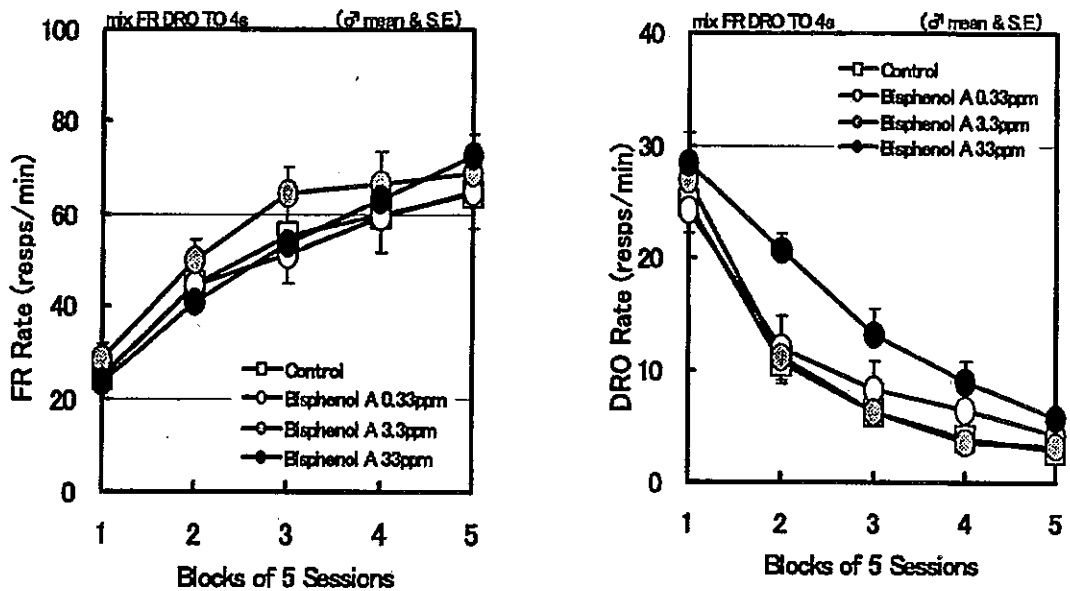


Fig. 7 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 4 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

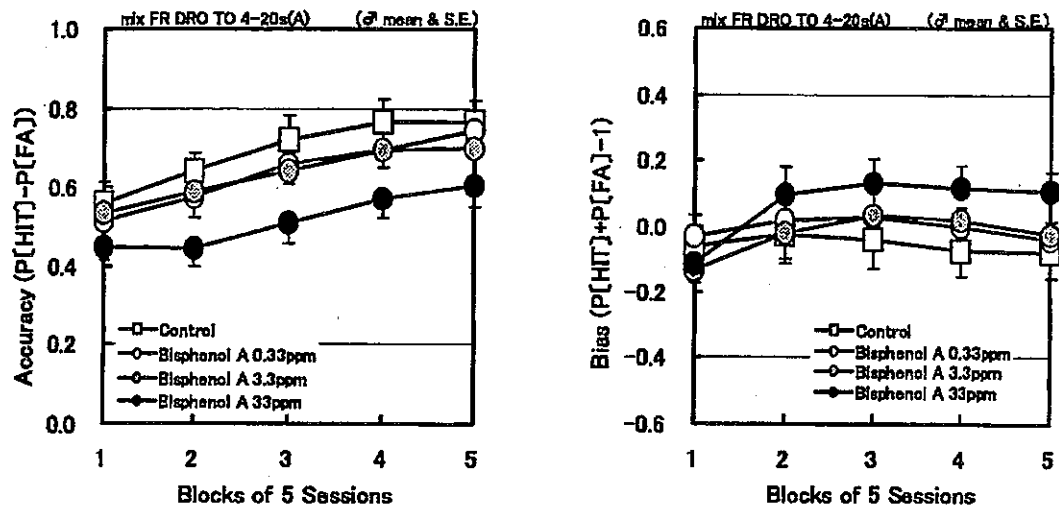


Fig. 8 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

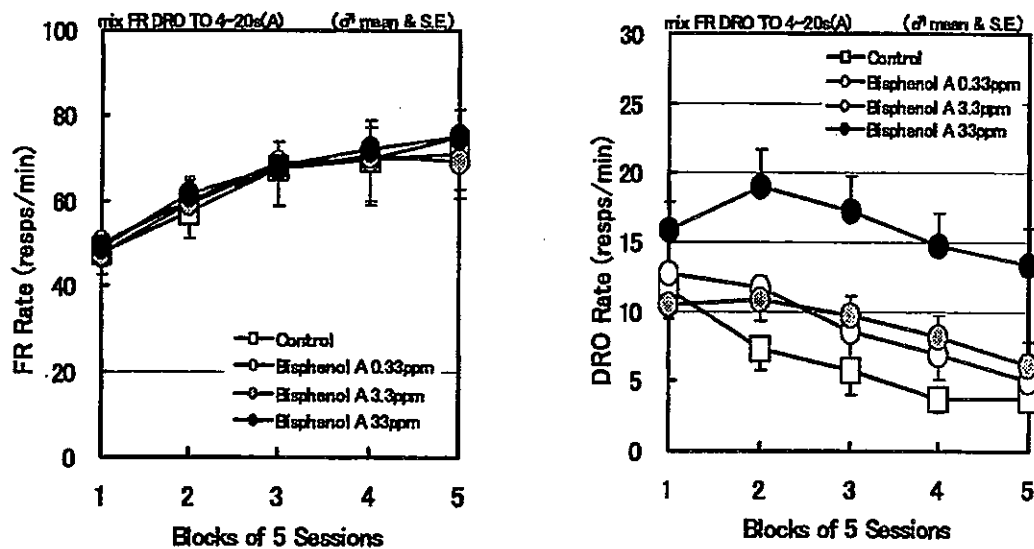


Fig. 9 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右) の変化と BPA の影響

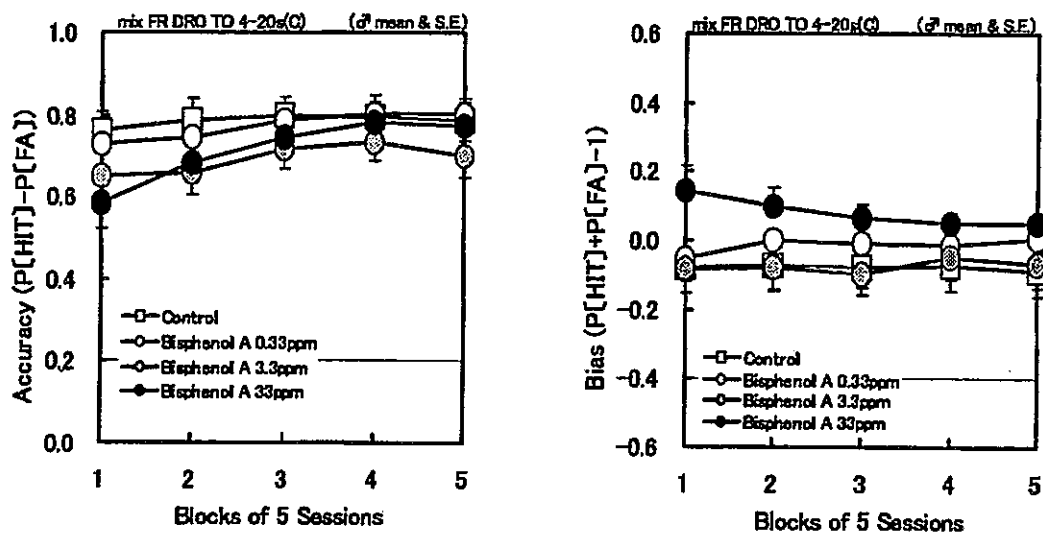


Fig. 10 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒)における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

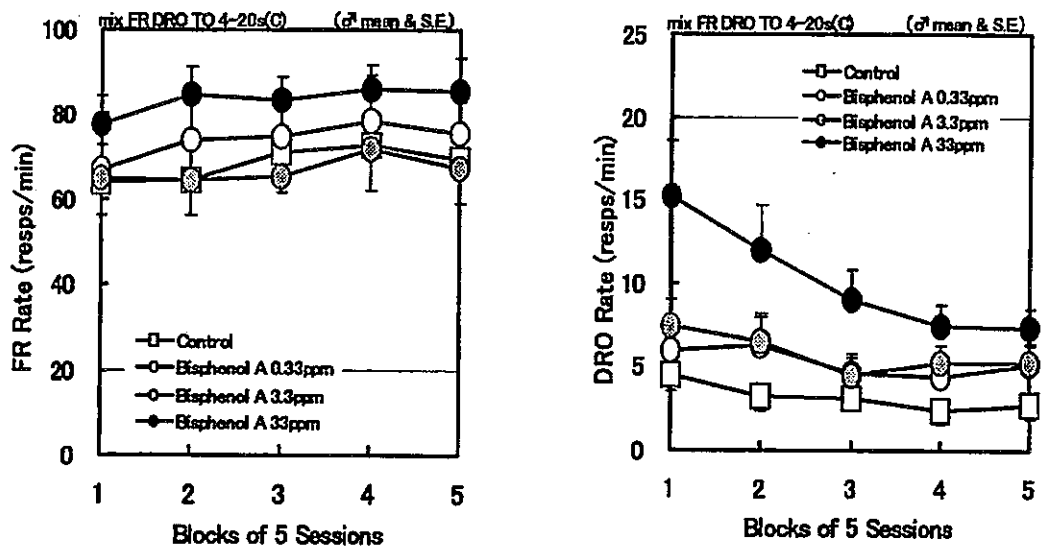


Fig. 11 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と BPA の影響

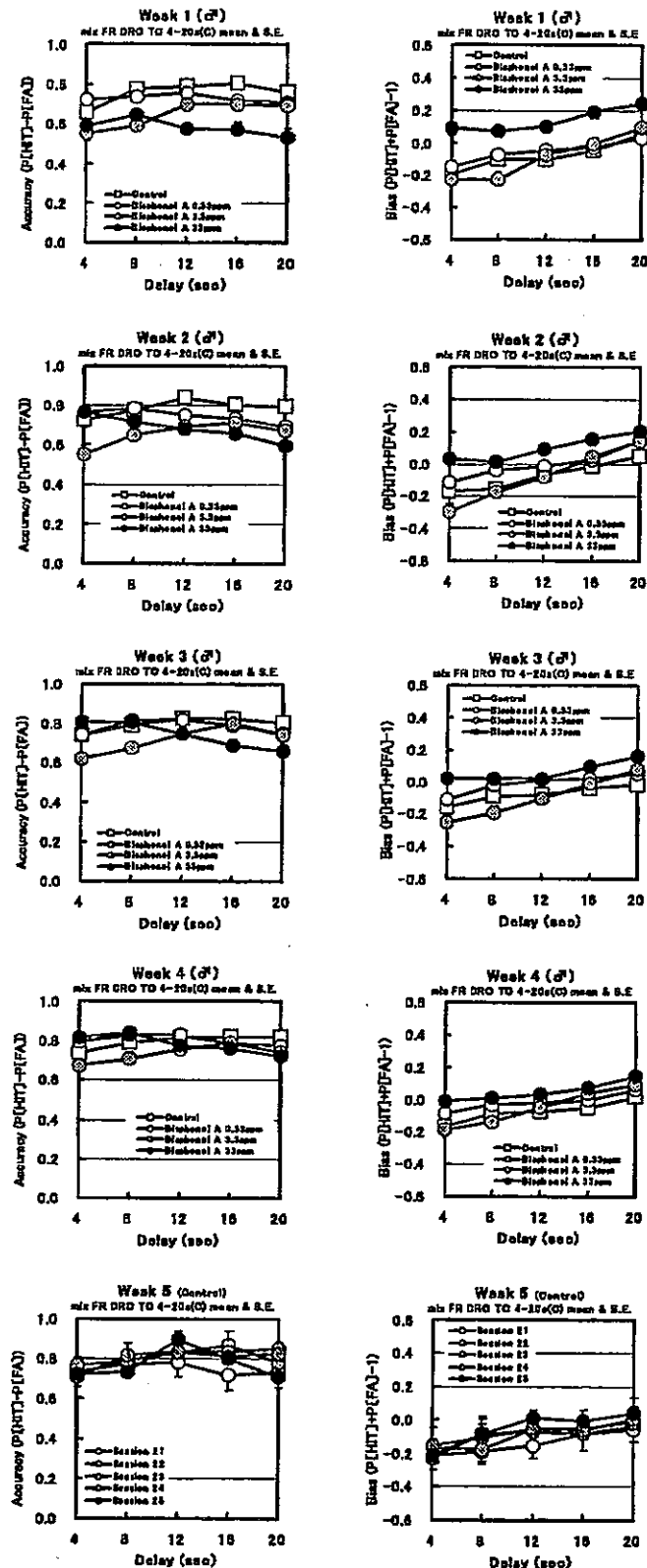


Fig. 12 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (タイムアウト長上下変動条件) 訓練 1 週目 (上) から 5 週目 (下) における Delay-Accuracy 曲線 (左) / Delay-Bias 曲線 (右) と BPA の影響

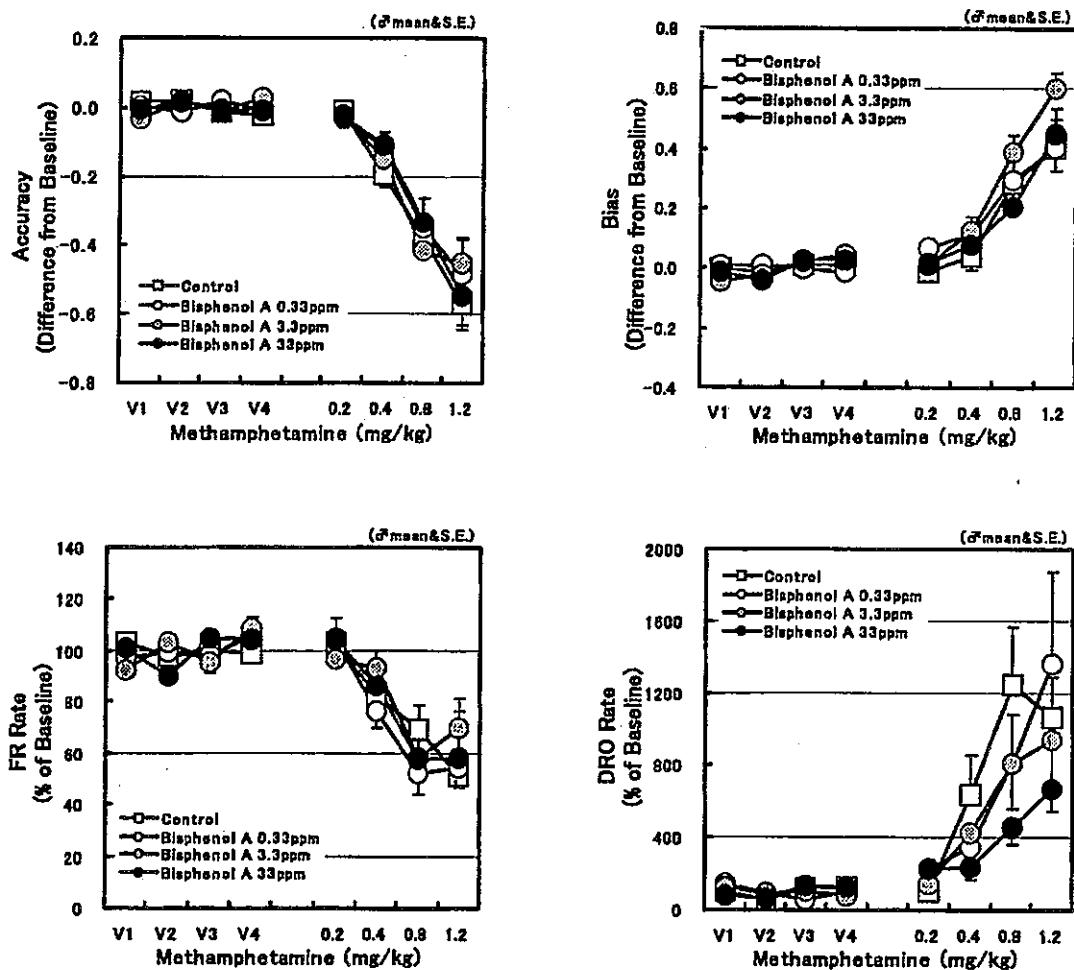


Fig. 13 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4-20s (C) スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (1) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした methamphetamine の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした%値を示した。)

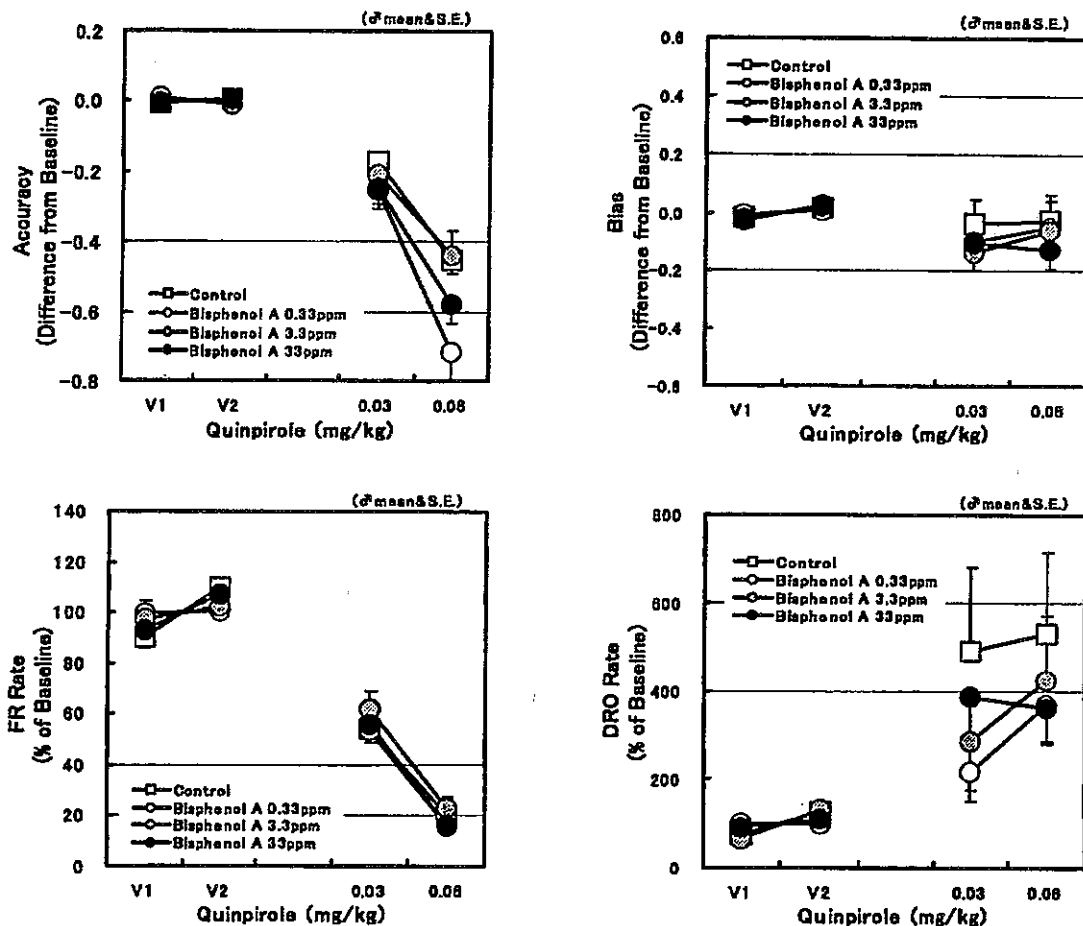


Fig. 14 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (2); Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした quinpirole の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

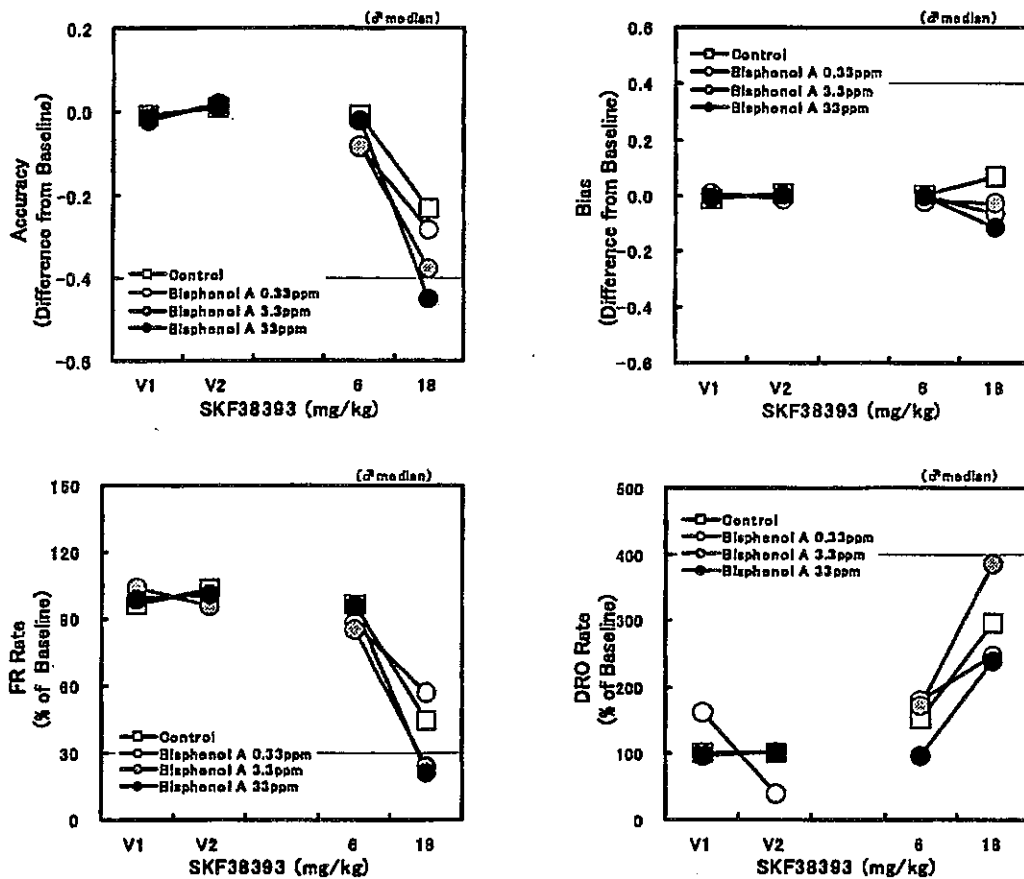


Fig. 15 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (3) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした (±)SKF38393 の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

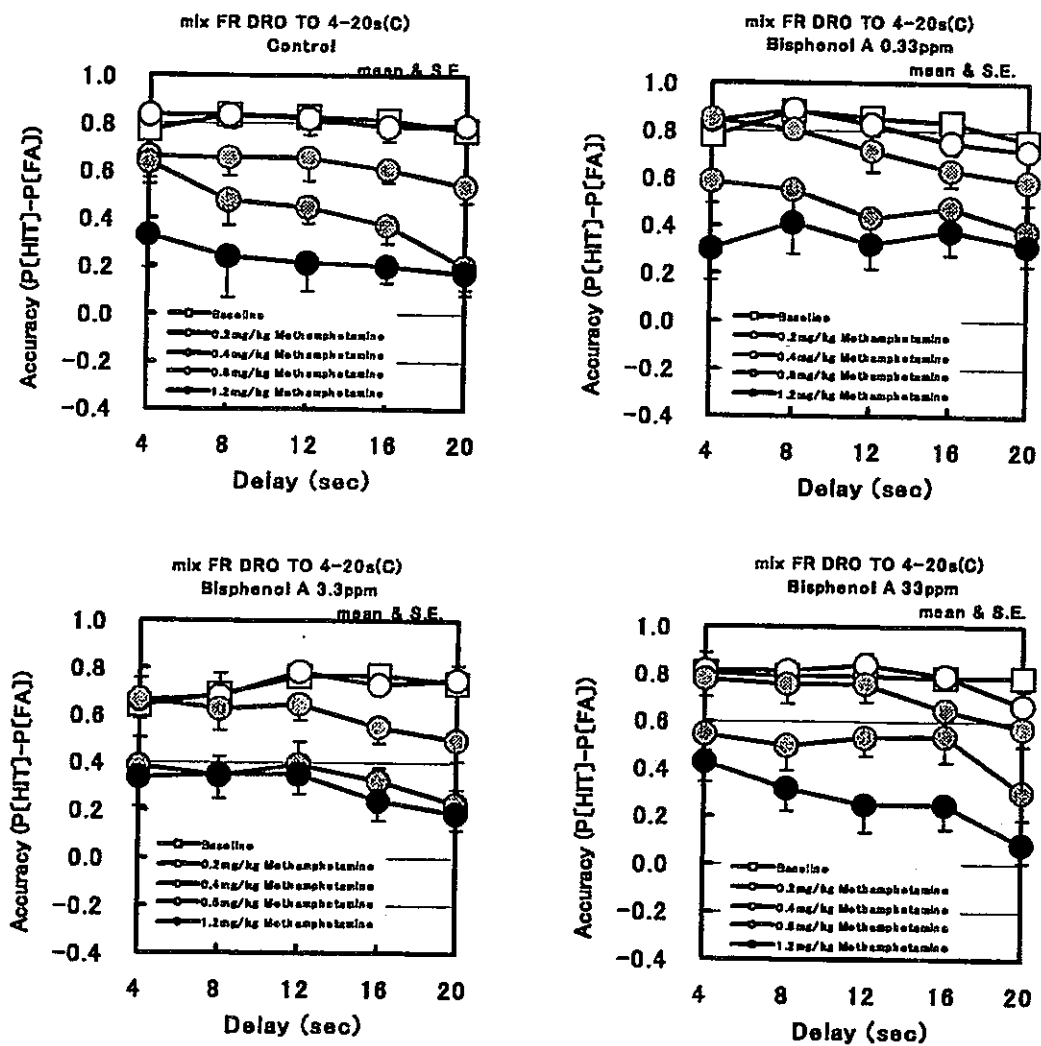


Fig. 16 ラットの Delay-Accuracy 曲線に及びす methamphetamine 負荷と BPA の影響

表 1. SCOB 訓練過程の統計検定結果

訓練過程	指標	ブロック	グループ	交互作用	Dunnett (5%)
Mix FR DRO TO 4sec	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	**	n.s	H
	Accuracy	***	n.s	n.s	
	Bias	***	n.s	*	
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	***	n.s	L, M, H
	Accuracy	***	*	n.s	L, M, H
	Bias	***	n.s	**	
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	**	***	L, M, H
	Accuracy	***	n.s	**	
	Bias	n.s	n.s	n.s	

*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$

L: 0.33 ppm 群、M: 3.3 ppm 群、H: 33 ppm 群