

H18 年度

マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の
神経系高次機能影響の評価

分担研究者 宮川 宗之

研究協力者 小林 健一

(独) 労働安全衛生総合研究所 産業医学総合研究所 健康障害予防研究グループ
研究企画調整部、上席研究員

研究要旨

個体発生初期における内分泌かく乱化学物質曝露が神経系高次機能（認知機能＝学習・記憶）に及ぼす影響を、マウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB）を用いて検証するためのプロトコルを確立するとともに、これを用いて BPA の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 を使用した。本年度は BPA 妊娠・授乳期曝露（0.33 - 33 ppm 混餌）の影響を調べたが、曝露による次世代認知機能への影響は認められなかった。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の次世代影響として、知能や行動特性（衝動性等）への影響が懸念されているが、ヒトでのデータ及び生物試験データともに明確な証拠が乏しい。様々な面から内分泌かく乱作用が検討されている BPA について、場面適応性が問題となる迷路課題を使用し次世代行動影響を示唆した研究が散見されるものの、低濃度曝露による発達神経毒性の有無についてはいまだ議論のあるところであって、記憶や学習といった認知機能影響については確定的な報告はない。ヒトを対象とした疫学研究は重要であるが、同時に曝露を受ける他の物質の影

響など交絡要因の問題があり、実験動物を用いた発達神経毒性試験による評価が必要である。

一方、一般に実験動物を用いた神経行動毒性・発達神経毒性の評価では、スクリーニング試験の標準化は進みつつあるが、認知機能影響を評価するための確認試験として確立され、国際的テストガイドラインで使用が推奨されるような標準的方法はない。また、神経行動毒性・発達神経毒性の評価ではラットを用いることが多いが、内分泌かく乱作用を検討対象として作用メカニズムの検討に解析を進めることを考慮すると、遺伝子改変動物の使用等が可能となるマウスを用いた試験が重要

となる。

以上を背景として、本研究ではマウスのスケジュール制御オペラント行動 (Schedule Controlled Operant Behavior : SCOB) を指標とした次世代認知機能影響試験法の確立と、それによる BPA 低濃度曝露影響の評価を目的とした検討を行なった。認知機能への影響評価としては学習と記憶を対象とする場合が多い。本研究では、食餌を報酬 (食餌強化) とした「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」を使用し、同スケジュール下でのオペラント反応の獲得過程から学習習得に対する影響を評価した。また、我々の作成した上記のスケジュールを使用すると、タイムアウト時間をセッション内で変化させつつ FR での反応と DRO での反応の切替えの正確さを測定することで、短期記憶の保持曲線に相当するデータが得られる。これによって短期記憶の保持過程への影響を評価した。

本研究開始以前に、ラット用に開発・使用してきた行動試験プロトコルを修正し、前年度までに「タイムアウト付交替型混合 FR DRO スケジュール」下でマウスが適切な反応パターンを習得することが可能なことを示すとともに、適切な試験実施プロトコルを決定した。今年度は、BPA 曝露によるいわゆる低濃度影響の有無をみることを目的とした。妊娠・授乳期に混餌投与 (0.33~33 ppm) を行ない、仔の成長後に以下の要領で行動試験を実施し、学習習得、短期記憶の保持、行動の適切な制御に及ぼす曝露影響を検討した。

B. 研究方法

被験動物: 交配済 9 週齢雌性 C57BL/6J マウス (日本クレア) 70 匹を購入し、1 群 17~18 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。出生した仔マウスの成長後に行動測定に使用した。出生翌日 (PND1) に同腹仔数を 8 匹に調整 (可能な範囲で雄 4 匹・雌 4 匹、総出生仔数 8 匹未満の場合はそのまま) した。離乳時 (PND22) に、原則として各腹から雄性仔 1 匹をランダムに選び、通常飼料 (オリエンタル酵母 MF) を与えて 12 週齢まで集団飼育 (4~5 匹) した (事故等による欠落を考慮して 1 群あたり 14 匹を確保)。行動試験には、最終的に雄性仔を 1 群 (各曝露濃度) 当たり 12 匹 (各腹から 1 匹、計 48 匹) 使用した。すなわち、12 週齢で行動試験に使用する個体を選び、食餌強化による SCOB 行動測定のため給餌制限と個別飼育を開始した。SCOB の測定では、食餌を報酬とするため、個別別に飼育して給餌量を制限・調整することが必要となるが、昨年度までの結果に基づき、給餌制限開始前の体重の 85% 体重 (目標体重) を維持するよう調整した。飲用水は実験セッション中をのぞき自由摂取とした。給水瓶にはガラス製を使用した。

実験に用いたマウスは、すべて温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の清浄環境下で飼育され、行動測定も同様の環境の飼育施設内別室にて実施された。飼育

にはポリカーボネート製ケージを使用した。

BPA 曝露：購入した交配済上述したように、母マウスを各群 17-18 匹の 4 群に分け、GD6 から PND22 まで BPA の混餌投与を行なった。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 の濃度で混入し、混入後に市販の固形飼料サイズに成形したものを、それぞれの群に与えた。なお、通常飼料について BPA の含有濃度測定を実施したところ、0.032 ppm という値となり、最低用量の約 1/10 となった。サンプル数が少なく参考値である。

SCOB 測定装置：マウスのスケジュール制御オペラント行動（SCOB）の測定には 8 台のマウス用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。マウス用オペラントチャンバーは幅×奥行×高さが 160 × 134 × 127 mm で cue light は黄色の LED 製、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、レバー押し反応の条件づけ訓練を開始した。訓練は、1 日 1 セッションで週 5 日行い、実験終了まで続けた。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 T0) 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、報酬にはマウスでは 20mg 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”という報酬提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、レバー上部に設けられた 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 (T0) 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 (T0) 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・T0 8s) では、タイムアウト時間を 8 秒に固定し 25 セッションの訓練・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、40 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、50 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、quinpirole 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 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 粒が餌皿上に与えられる (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明け

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。

ラットの場合もマウスの場合も、条件づけ訓練の進行によって、FRでは各タイムアウト終了後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、前年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： 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50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アゴニスト)、SKF38393 (D1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20～30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「産業医学総合研究所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：母マウスの摂餌量、仔マウスの体重については、群間 1 要因 (BPA) 群内 1 要因 (測定日) として反復測定分散分析を実施した。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。いずれも計算には SAS/GLM プロシージャーを使用した。

C. 研究結果

仔の体重への影響： 妊娠第 2 週から離乳時までの母マウスの摂餌量を 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 匹当たり換算したものである。妊娠第 2 週-第 3 週では 1 日に 1 匹の母マウスが約 4g を摂取した。これは BPA 量としてみると 0.33 群-33 ppm 群で約 0.05 mg/kg-5mg/kg 体重に相当する。米国 EPA による BPA の reference dose は 0.05 mg/kg であり、一般的な毒性試験で得られた LOAEL 値 50 mg/kg を基準としたものである。今回の実験では、対照群にあたえられた通常試料中に約 0.03 ppm の BPA が検出されたこ

とを考慮すると、対照群も含めて reference dose の 1/10 から LOAEL 値の 1/10 の間で実験が行なわれたこととなり、通常の試験で得られた NOAEL から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となった。母マウスの摂餌量には BPA の影響は認められなかった。

一方、仔マウスの体重変化は Fig. 4 に示した。授乳期の仔マウス (雌雄) の体重では、群間に有意差 ($p < 0.001$) が認められた。すなわち、BPA 曝露量に応じて体重が大きくなる傾向があったが、図からわかるように差は僅かであった。また、離乳後の体重 (雄性のみ) には BPA による有意な差は認められず、行動試験に使用した雄性仔マウスの体成長には、BPA 曝露の影響は認められなかった。

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マウス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、1 block (5 session) 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 の影響は殆ど認められなかった。固定長タイムアウトでの訓練となる第 1 段階の FR 反応率で交互作用が有意 ($p < 0.05$) となったが、群間差が有意となったものはなかった。

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 (Fig. 12) 及び Delay-Bias 曲線 (Fig. 13) を求めた。前者は短期記憶の保持曲線に相当するものとなる。各図の左側のグラフは第 3 段階第 1 週目の結果を、右側のグラフは第 10 週目の結果を示している。最終的に最も短いタイムアウト (4 秒) では Accuracy の値は 0.8 程度となったが、タイムアウト長に応じた低下を示し、最も長いタイムアウト (20 秒) では 0.2 程度となった。また、Bias 値は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。

薬理的負荷試験： 第 3 段階の訓練終了後に実施した薬理的負荷試験の結果は、Fig. 14 から Fig. 16 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。

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マウス (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 - 33 ppm) 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が、曝露による次世代認知機能への影響は認められなかった。

これまで 3 年間の研究結果は、マウスがタイムアウト付交替型混合 FR10 DRO10s スケジュール下で、基本的にラットと同様、それぞれのスケジュールコンポーネント (FR および DRO) で要求される適切な反応パターンを習得し得ること、これによってマウスの短期記憶の保持曲線の相当する資料が得られることを示している。本研究において測定された Delay-Accuracy 曲線からは、マウスの場合、遅延時間が長い時の成績 (反応切替の正確さ) が

ラットと比較して悪く、右下がりの曲線になることが示されたが、短いタイムアウト時に心配される摂食時間による影響（粒餌の摂食に時間を要し短いタイムアウトで成績がわるくなる）は認められなかった。過去のラットのデータでは訓練が進行すると Delay-Accuracy 曲線はフラットとなる場合が多かったが、マウスでは遅延時間となるタイムアウト時間に依じて Accuracy が低下し、Bias が上昇する傾向が明確であった。赤外線カメラによる観察の結果、マウスではタイムアウト中にケージ内を動き回る傾向が顕著であった。一方、ラットの場合は餌皿の前や反応レバーの前で待機する行動がしばしば認められている。タイムアウト中の行動パターンの差が Delay-Accuracy 曲線の傾きに影響している可能性が存在する。

今年度実施した BPA 曝露に関する実験の結果は、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 の影響を示していない。本実験は、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。本研究は、BPA の低濃度影響に関して明確に陰性の結果を示したもので、場面適応性などについては議論が残るが、認知機能に対する低濃度影響に関しては現状では懸念すべき証拠は乏しいと考えた方が適切かもしれない。

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では、この点についても陰性結果を示すものとなった。今回の薬物負荷による測定は、仔マウスが 11 カ月齢と相当高齢になった時に実施されたものであり、このような条件が他の研究と異なる結果を示した可能性も考えられる。

なお、対照群の飼料中に相当程度の BPA が検出されたことを考慮すると、既存の研究における対照群が、事実上どの程度の BPA に曝露されていたのかを考慮して結果を見る必要があると思われる。特に低濃度影響の結果を解釈する場合は重要な要因であろう。

ところで、前年度の実験では抗甲状腺薬メチマゾールを陽性対象物質として使用することを検討したが、明確な影響を示すことはできなかった。体重にほとんど変化の認められない範囲の用量で実験を実施したが、明確な陽性

対照を得るためには、用量を増やすことが必要と考えられた。しかし、用量を増やせば一般的な成長阻害が生じ、二次的影響に加えて、食餌強化のための給餌制限との関係等も考慮しなくてはならない。認知機能影響の評価を中心とした発達神経毒性試験でも適切な陽性対照群の設定が望ましいが、このような発達神経毒性試験では、一般に必ずしも陽性対照群の設定が行なわれておらず、急性行動影響を示す薬物投与や行動試験モデルの妥当性のみによって試験系の妥当性を間接的に示唆するといった便法が用いられる場合も多い (Crofton KM et al. Neurotoxicol Teratol 26:345-352, 2004 参照)。適切な陽性対照物質によるデータが十分存在しないことも事実である。今回得られたようなネガティブデータの信頼性を高めるためには、本格的な陽性対照群の設定が必要であり、今後検討すべき課題と考えられる。

E. 結論

本研究 3 年間の結果を総括すると以下の結論が得られた。

1) ラット用に開発したプロトコルを修正することで、マウスにタイムアウト付交替型混合スケジュール下でのオペラント反応を確実に習得させる条件を確立した。この SCOB を利用した方法によって、訓練回数はラットよりも多数必要ではあるものの、マウスを被験体として短期記憶の保持・忘却過程を Delay-Accuracy 曲線として測定可能なことを示した。マウスでは、ラ

ットに比較して Delay-Accuracy 曲線の傾きが大きく、delay 時間 (短期記憶の保持時間) の延長とともに Accuracy がより大きく低下することが示された。

2) 妊娠・授乳期の雌マウスに BPA 低濃度曝露を行ない、成長後の仔マウスを用いて、上記 SCOB を指標に学習習得過程及び短期記憶の保持曲線への影響を検討したが、曝露による影響は認められなかった。ドーパミン系アゴニストによる薬理的負荷試験も実施したが影響は認められなかった。

3) 今年度のように、陰性の結果が得られた場合を考慮すると、陽性対照物質による評価が重要であるが、今回の研究でも、この点の検討は不十分である。本格的な陽性対照群を設定するためには、適切な候補物質の検索と各種の発達神経毒性試験 (特に行動試験) を対象とした実験データの蓄積が必要であり、今後の課題である。

(謝辞: 本研究遂行にあたって村瀬正、日吉沙千代、窪田恵実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

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)
 - 4) Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa and Junzo Saegusa. Comparative Investigation of Several Sperm analysis Methods for Evaluation of Spermatotoxicity of Industrial Chemical: 2-Bromopropane as an Example. *Industrial Health* 42: 219-225. (2004)
- ## 2. 学会発表
- 1) 官川宗之、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).
 - 2) 小林健一、大谷勝己、官川宗之. 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).
 - 3) 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).
 - 4) 官川宗之、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).
 - 5) 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)
- 6) 小林健一、宮川宗之、王瑞生、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' -Hexachloro-biphenyl (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).
- 7) 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).
- 8) 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).
- 9) 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)
- 10) 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)
- 11) 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.
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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' - hexachloro-biphenyl) 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)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) が成長後のラットの条件付け学習に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p343. (2004)
- 19) 本間健資, 須田恵, 宮川宗之, 王瑞生, 小林健一, 関口総一郎. PCB 経母体ばく露とラット脳内神経伝達物質. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p356. (2004)
- 20) 王瑞生、宮川宗之、小林健一、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成熟後の雄仔ラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集, p277. (2004)
- 21) 宮川宗之. 化学品の分類・表示に関する世界調和システム (GHS): 健康影響及び環境影響に基づいた化学物質及び混合物の分類基準について. 免疫毒性・アレルギー学会シンポジウム 1 (アレルギー性化学物質に抗する国際予防体系を構築する) 日本職業・環境アレルギー学会雑誌 12(1): 31. (2004)
- 22) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・

授乳期) がラットの発生内分泌系におよぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 会第7回研究発表会, 要旨集 p281. (2004)

- 23) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. PCB153 の母ラットへの曝露が産仔の脳下垂体-甲状腺軸におよぼす影響. 日本薬学会第124回年会, 要旨集 p191. (2004)
- 24) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on postnatal development and thyroid status in rat offspring. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 465. (2004)
- 25) Rui-Sheng Wang, Muneyuki Miyagawa, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Takeshi Honma. Effect of prenatal and neonatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate on the metabolism of testosterone in rat. 第31回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 425. (2004)
- 26) 宮川宗之, 小林健一, 王瑞生, 須田恵, 本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) がラットのスケジュール制御オペラント行動 (SCOB) に及ぼす影響. 第77回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 393. (2004)
- 27) 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 (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) が仔ラットの発生におよぼす影響. 第77回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 393. (2004)
- 28) 王瑞生, 宮川宗之, 小林健一, 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の性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第77回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 394. (2004)
- 29) 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 Offspring Rats. 43rd Annual Meeting & Toxexpo™, Society of Toxicology (SOT), Baltimore, Program p175. (2004)
- 30) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of prenatal exposure to 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl

(PCB153) on somatic growth and thyroid status in male rat offspring. International Congress of Toxicology (ICT 10), Toxicol Appl Pharmacol 197: 230. (2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし

図表

(マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の
神経系高次機能影響の評価)

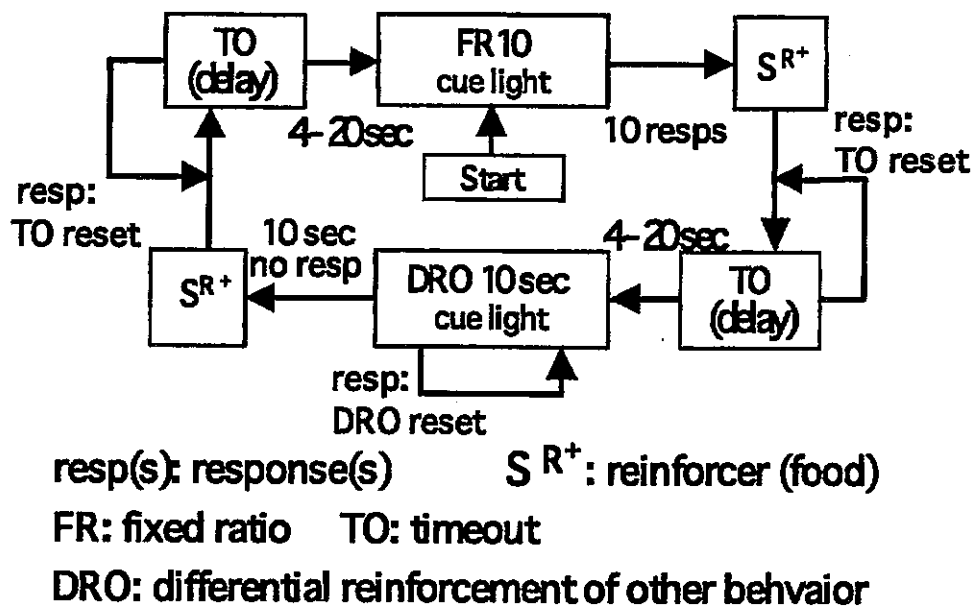


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

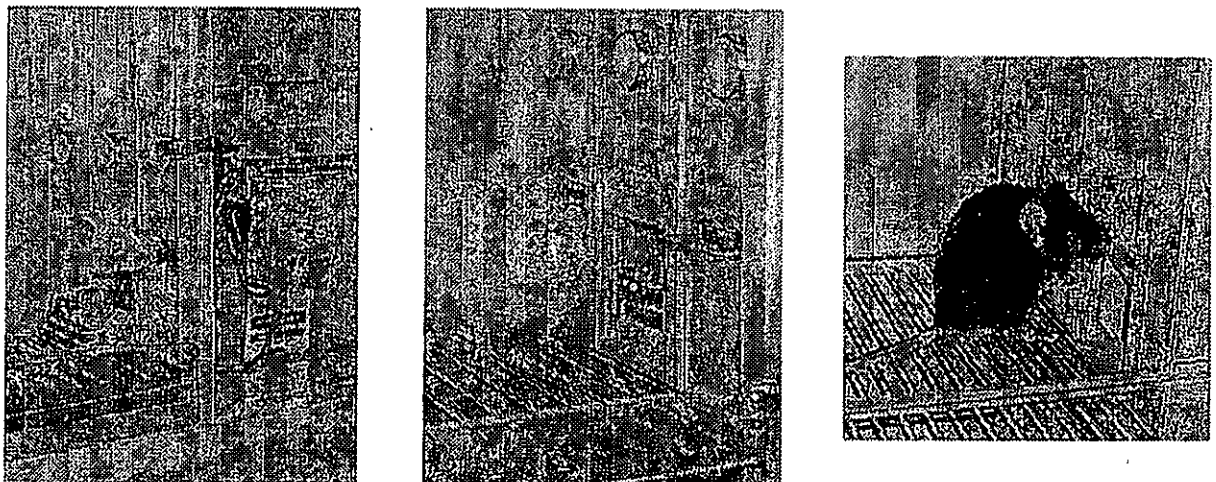


Fig. 2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 下での SCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).

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

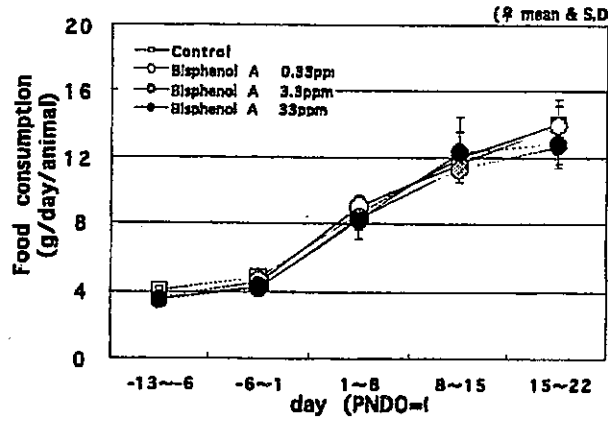


Fig. 3 妊娠期及び授乳期における母マウス1匹あたりの摂餌量

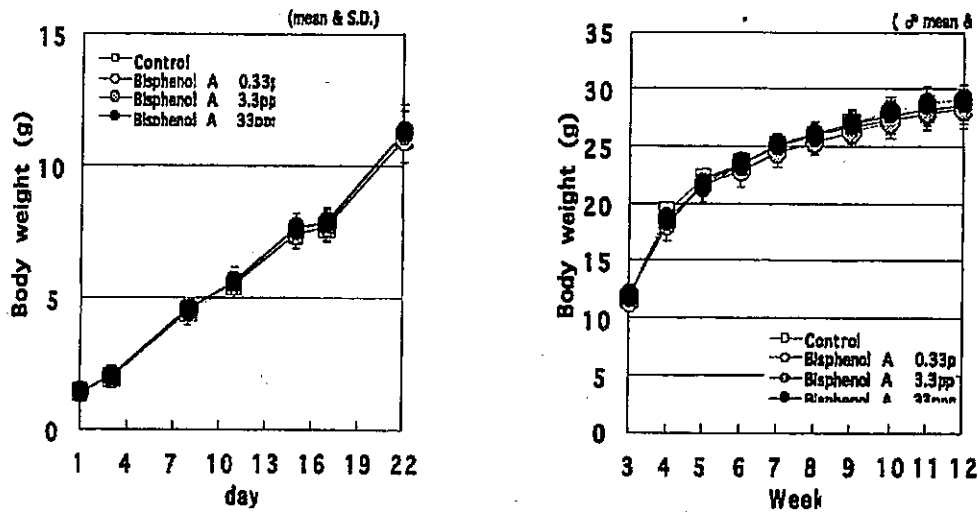


Fig. 4 授乳期の仔マウスの体重変化 (左) 及び離乳後の雄性仔マウスの体重変化 (右)

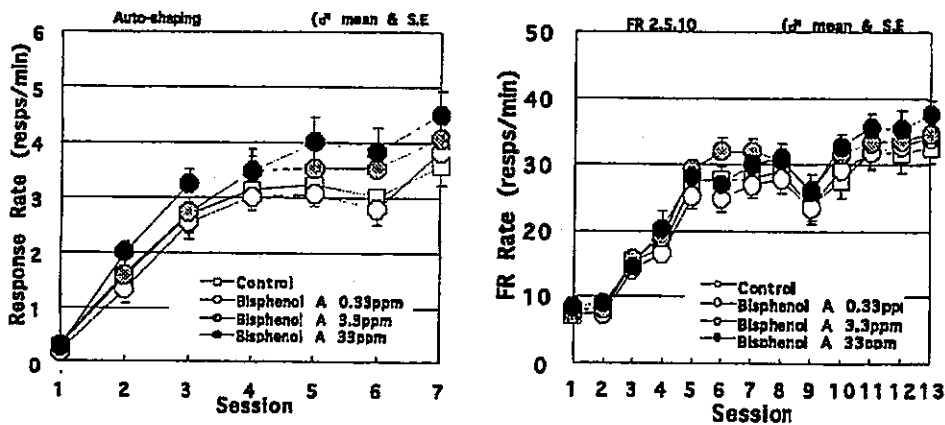


Fig. 5 自動反応形成スケジュール訓練時 (左) 及び定率強化スケジュール訓練

時（右）の反応率の変化

C

C

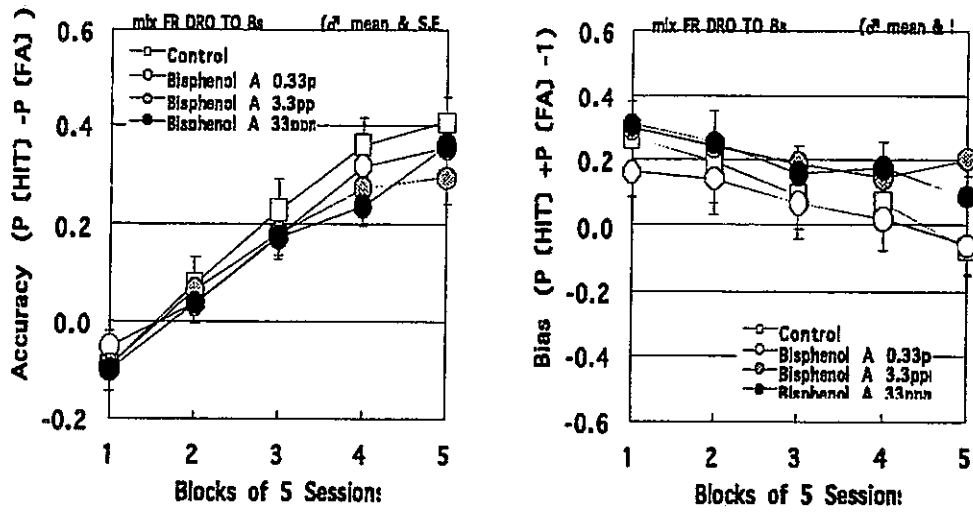


Fig. 6 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

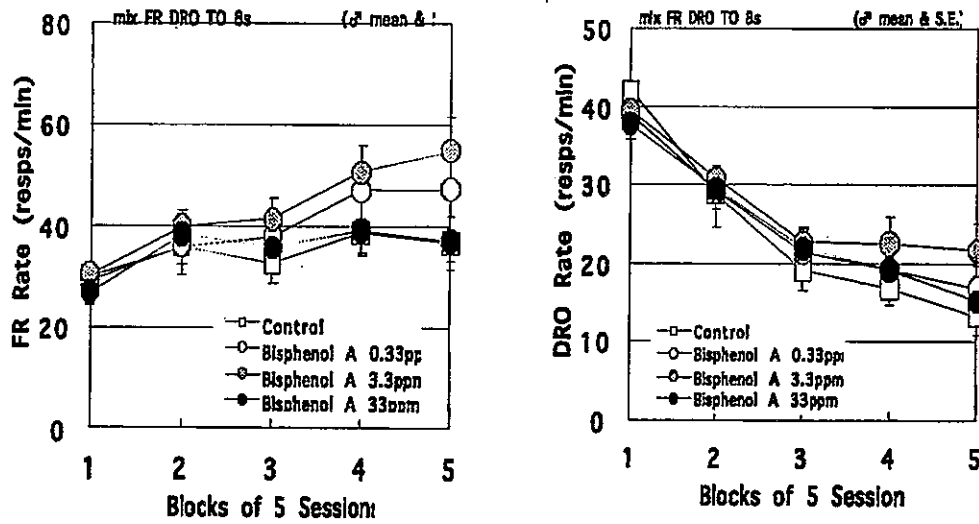


Fig. 7 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

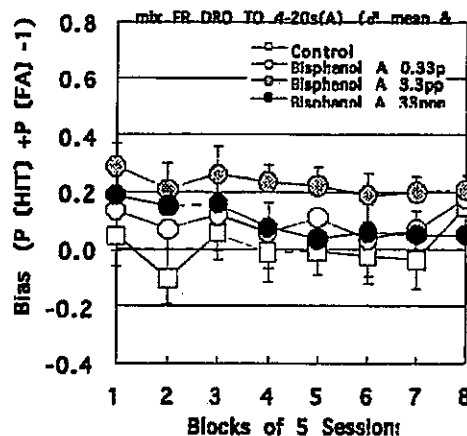
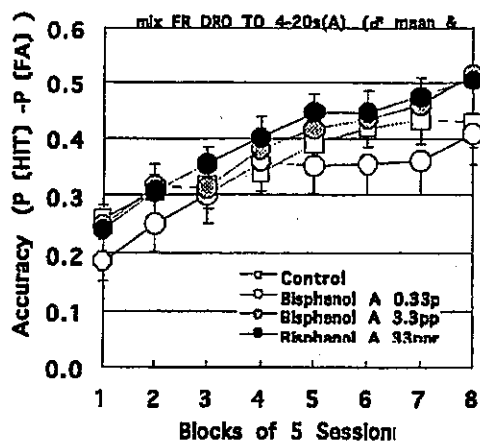


Fig. 8 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

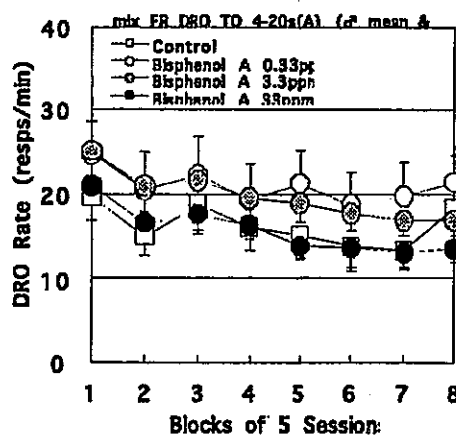
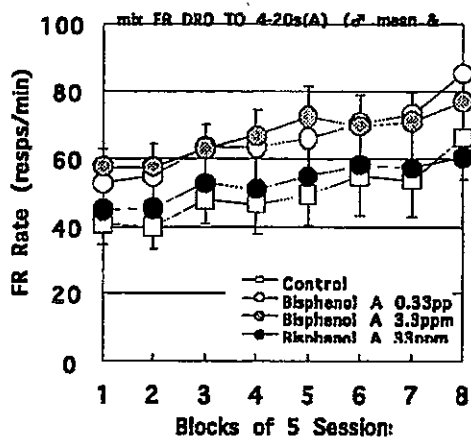


Fig. 9 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

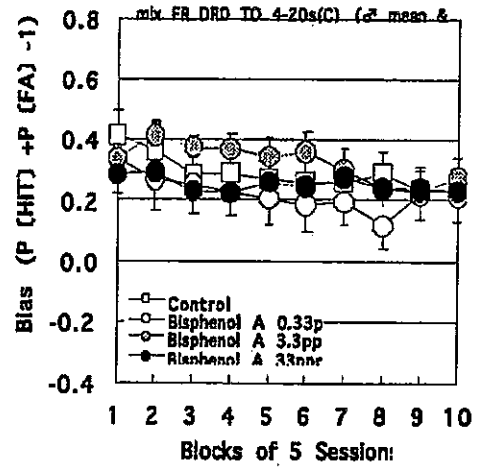
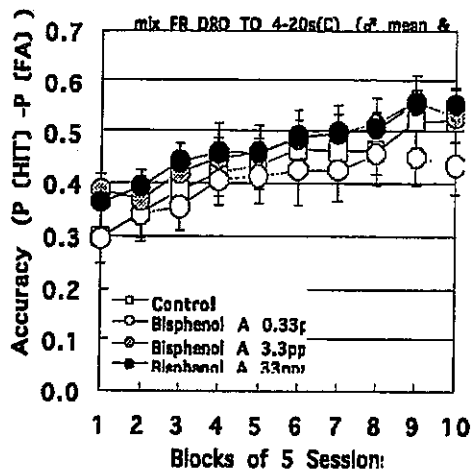


Fig. 10 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (変動タイムアウト上下系列 4-20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

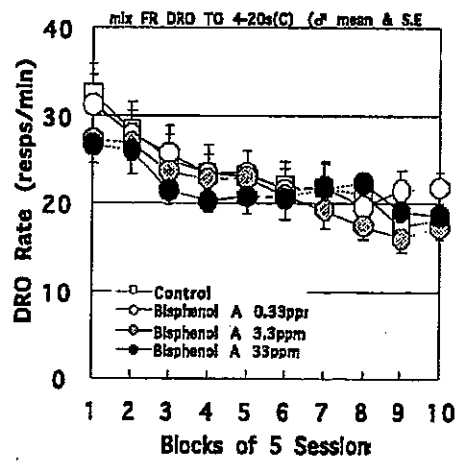
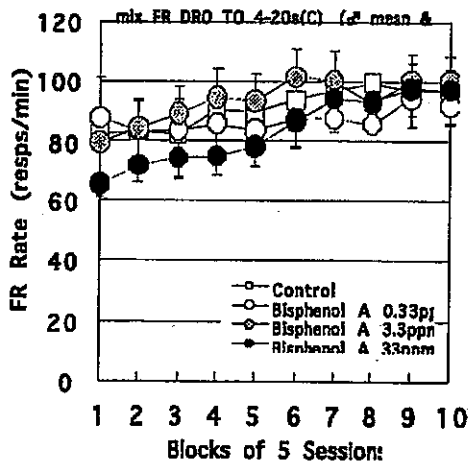


Fig. 11 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (変動タイムアウト上下系列 4-20 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

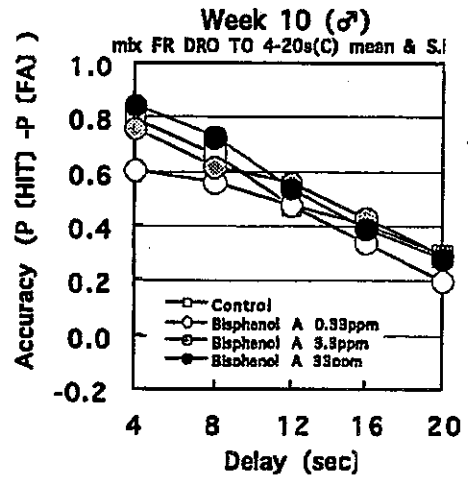
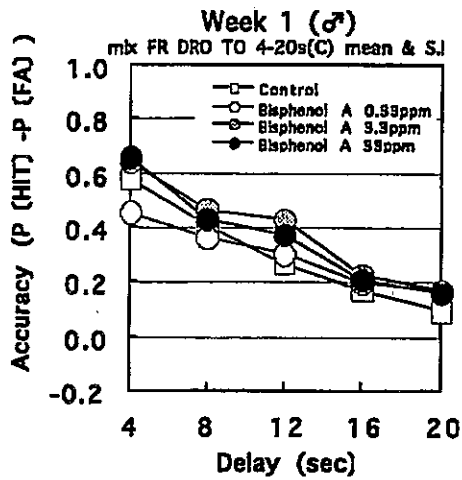


Fig. 12 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (タイムアウト長上下変動条件) 訓練 1 週目 (左) 及び 10 週目 (右) における Delay-Accuracy 曲線と BPA の影響

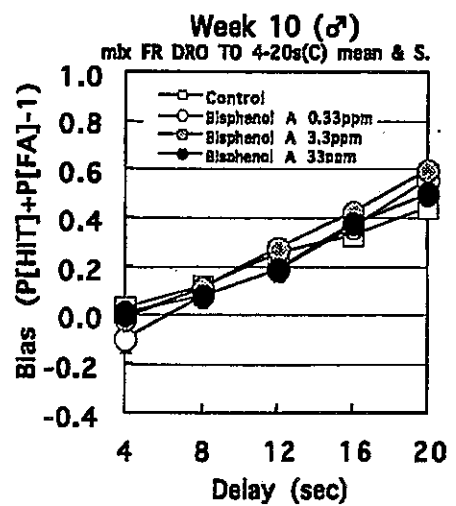
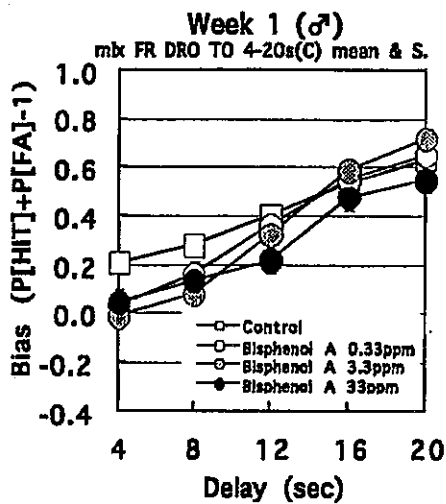


Fig. 13 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (タイムアウト長上下変動条件) 訓練 1 週目 (左) 及び 10 週目 (右) における Delay-Bias 曲線と BPA の影響

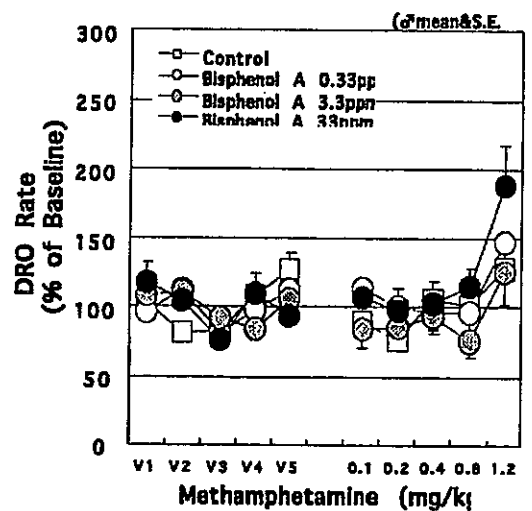
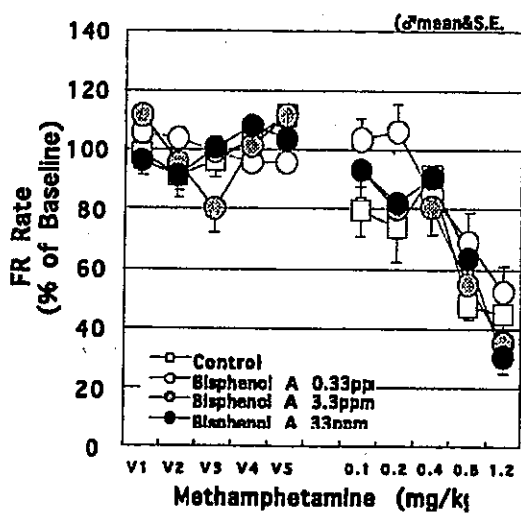
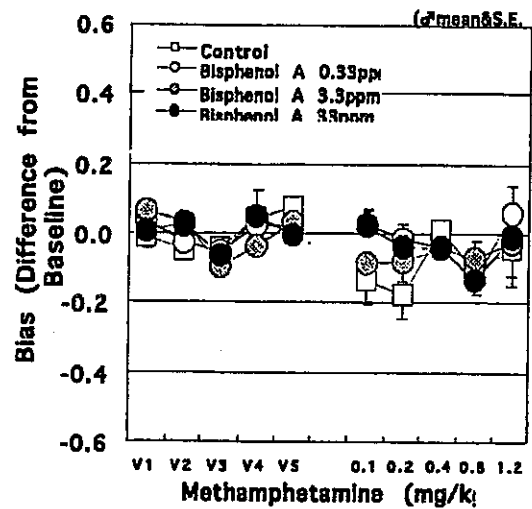
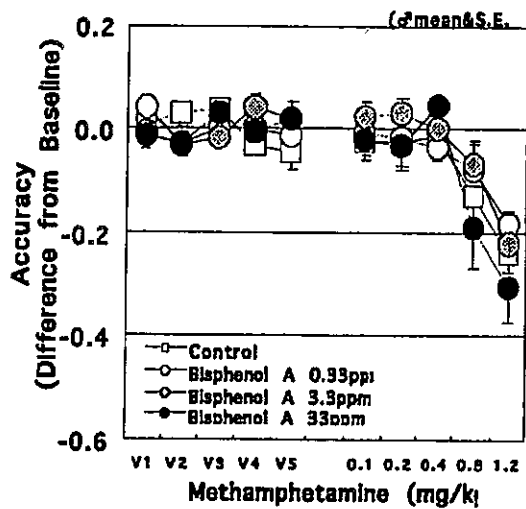


Fig. 14 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4-20s (C) スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (1); Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした methamphetamine の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

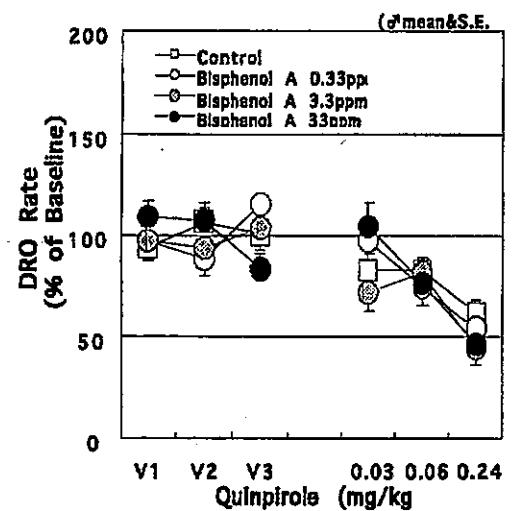
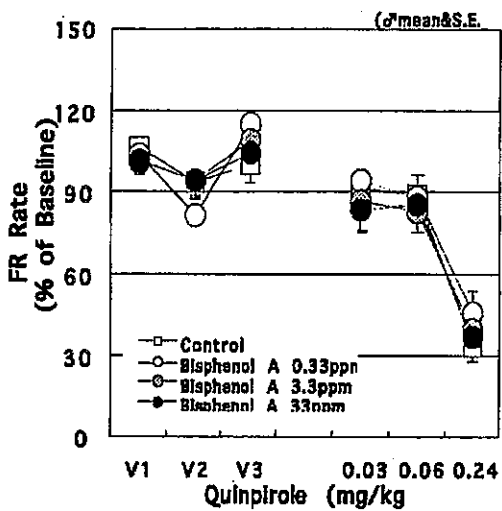
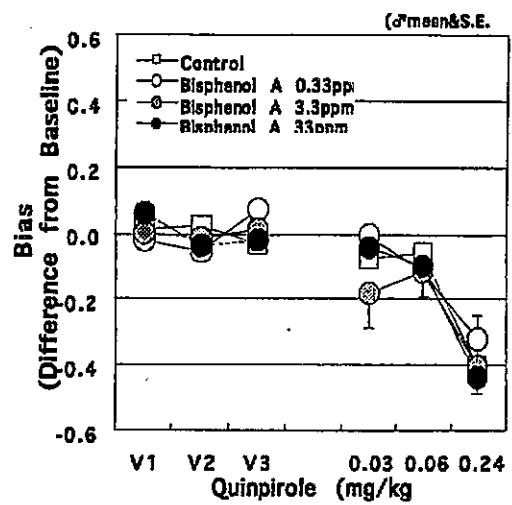
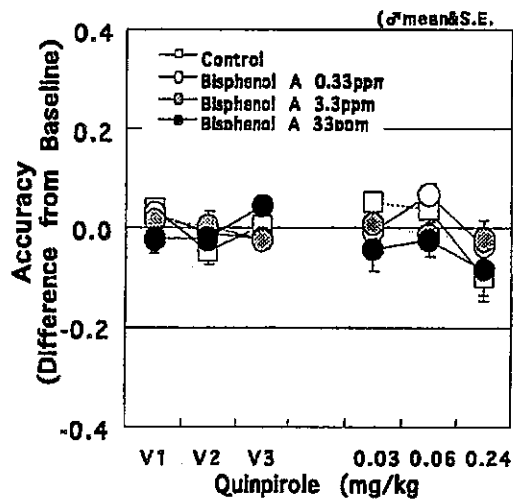


Fig. 15 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (2) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした quinpirole の量- 影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

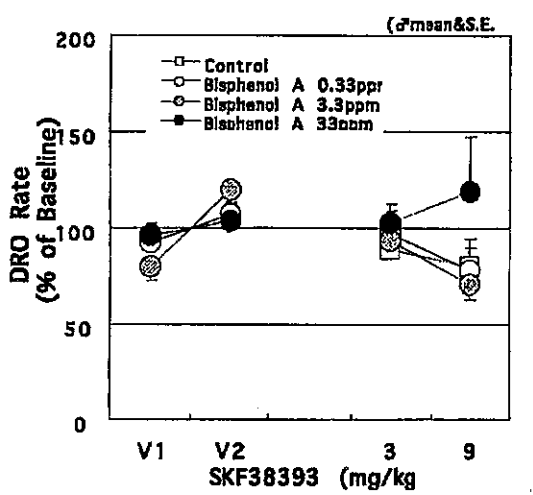
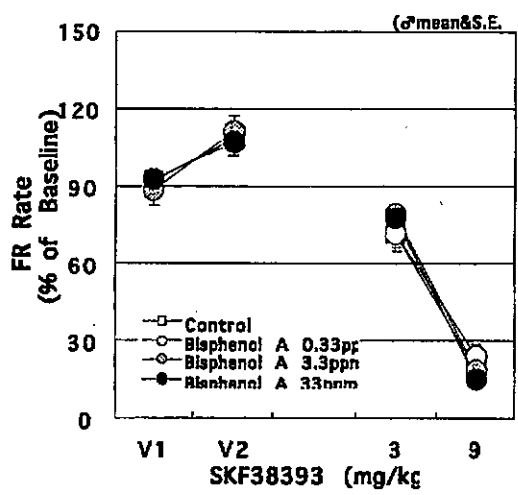
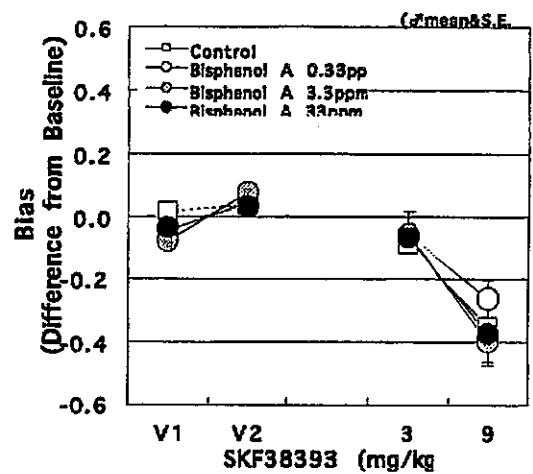
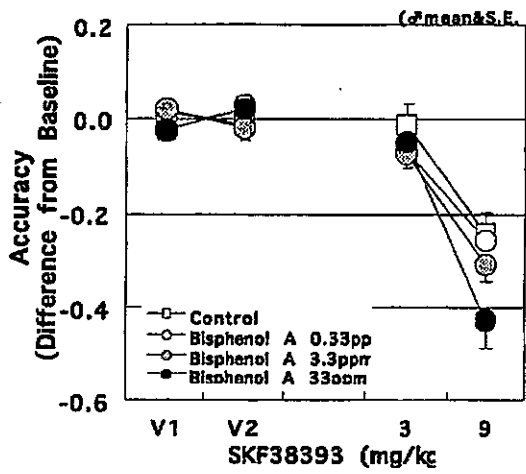


Fig. 16 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with T0 スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (3) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした SKF38393 の量- 影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)