

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18681008
 研究課題名 (和文) 新たな連合学習試験法による化学物質曝露と軽度発達障害の因果関係解析
 研究課題名 (英文) Relationship between chemical exposure and the minimal brain dysfunction examined by new associative learning behavioral tests in rodents.
 研究代表者
 掛山 正心 (KAKEYAMA MASAKI)
 東京大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：30353535

研究成果の概要：発達期の脳は脆弱であり、化学物質影響科学のターゲットとして極めて重要である。ラットにおいて連合学習と行動異常の両面を検出する新たな行動毒性試験法を確立し、ダイオキシン等環境化学物質の低用量曝露を陽性条件として、胎児期から出生直後にかけての環境中有害化学物質が高次脳機能の発達に及ぼす影響について解析した。ダイオキシン等化学物質の比較的低用量の曝露により、軽度発達障害を引き起こす可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 9,100,000 | 2,730,000 | 11,830,000 |
| 2007 年度 | 5,600,000 | 1,680,000 | 7,280,000 |
| 2008 年度 | 4,700,000 | 1,410,000 | 6,100,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 19,400,000 | 5,820,000 | 25,210,000 |

研究分野：神経毒性学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：有害化学物質、脳神経疾患、社会医学、環境、神経科学

1. 研究開始当初の背景

環境有害因子による健康影響対策における問題点は、環境中にはいまだ重篤な影響を引き起こす有害化学物質が現存し、発症までの時間が長いなど曝露と影響との関係が捕らえにくいものが見過ごされる可能性が高いことである。申請者がこれまでテーマとしてきた脳機能は、個体差が大きく、基礎科学としても未解明の点が多く、特に発達期は脆弱であり不可逆的变化を受けやすいことから、化学物質影響科学のターゲットとして極めて重要である。しかし健康リスク評価の際には、神経毒性試験のほとんどすべてが「学

習機能が低下する (可能性がある)」という一言に終止しているのが現状であり、影響の軽重が不明確である。

残留性有機汚染物質であるダイオキシン類やポリ塩素化ビフェニル類もこれまで、脳の性分化異常や学習機能低下が報告されてきた。しかしわれわれの研究成果から、これら化学物質の低用量曝露の影響は高次機能に特に顕著にあらわれること、学習障害だけでなく、「じっとしていられない」といったような情動行動異常も引き起こす、すなわち軽度発達障害を引き起こす可能性があることがわかってきた。

軽度発達障害は症状がとらえにくく、また個体差が大きいこともあり、医学的にも発症や病態の科学的解析が進んでいない。遺伝要因の寄与が想定されているが、近年では環境要因の寄与も多く指摘されるようになってきた。

2. 研究の目的

影響解析の出発点として(1)連合学習と行動異常の両面を検出する新たな行動毒性試験法を確立し、(2)ダイオキシン、ポリ塩素化ビフェニル類の発達神経毒性を解明し、同時にそれら曝露動物を(3)治療法開発のための疾患動物モデルとして提示することを目的とする。

3. 研究の方法

脳機能の中でもより高次の機能が化学物質に対する感受性が高いことが、これまでの研究から示唆されている。そこで本研究では、新たな行動試験法を作成し、行動レベルで現象を捉えることを目指した。

最初に作成したのは対連合学習試験である。対連合学習とはいわゆる連想ゲームの際に必要な学習機能であり、関連のない二つの事象を結びつけて記憶し、一方から他方を想起できるようにするものである。試験装置は、エジンバラ大学リチャード・モリス教授が開発したイベントアリーナ装置を用いた。

イベント・アリーナ装置は、1.5 m×1.5mのアリーナとそれぞれの四方にスタート・ボックスを持つ。アリーナ上には、7×7の配置で sand-well がセットできるようになっている。sand-well には報酬となる餌をセットするが、砂に隠されて見た目や匂いでは、報酬のありかはわからない(図 1A 参照)。対連合学習試験では、6種類の味つきペレットをそれぞれ特定の位置に用いる(F1-L1:チョコレート味、及び F2-L2:チェリー味、F3-L3:アニス味、F4-L4:ベーコン味、F5-L5:ココナツ味、F6-L6:ストロベリー味)(図 1B 参照)。上記6つの sand-well がセットされているが、報酬の入った sand-well はどれか一つだけとなる。ラットはスタート・ボックスで与えられる Flavor Cue (正解と同じ味ペレット)を手がかりに、正解の sand-well を選択しなければならない。

A Apparatus



B Sandwell locations

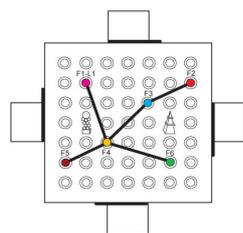


図 1. イベントアリーナ装置

次に、幼若動物における学習行動試験を新たに作成しともに毒性試験への適用を行った。この試験では、独自に開発した KODOMO 装置を用いた(図 2 参照)

さらに、実際に行動試験を行った被験動物の脳サンプルを用い、組織学的解析を行った。さらに組織切片中の特定領域のみを回収し遺伝子発現解析を行った。

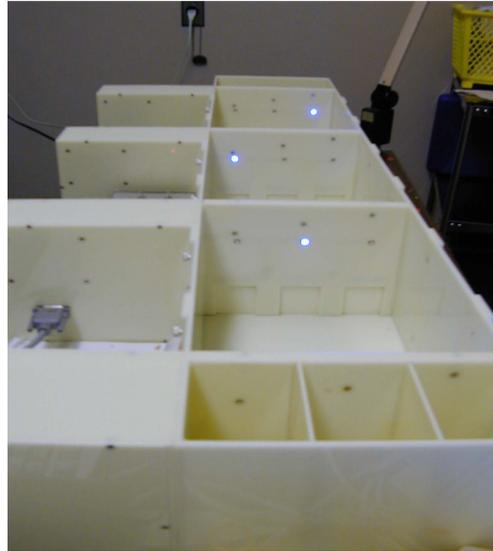


図 2. KODOMO 装置

4. 研究成果

ダイオキシン類は当初はいわゆる環境ホルモン様作用が注目され、脳に対する影響も脳の性分化に影響するとされてきた。それに対し申請者はこれまでに、視床下部よりも大脳新皮質前頭葉がダイオキシン感受性が高いことを行動と分子レベルで明らかにし、また記憶機能に重要な大脳新皮質・海馬の NMDA 受容体遺伝子発現が変化することを報告した。さらにダイオキシン、コプラナーPCB の影響はオペラント並列課題のような複雑な学習課題において顕著にあらわれること、非コプラナーPCB(PCB153)は単純学習においてもあらわれうることを報告した。以上の成果により、ダイオキシン・PCB類の発達期における低用量曝露は、軽度発達障害を引き起こす可能性が極めて高い可能性が示唆された。

そこで、イベント・アリーナ装置における対連合学習試験法を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で確立させることに世界で初めて成功した。そしてこの試験課題を1度習得した動物は、新規の対連合記憶を1回の試験で学習しうること、習得後48時間後に海馬を破壊しても Flavor Map の記憶は残っていること、しかし習得3時間後の海馬

破壊では記憶が消失することから、この対連合学習機能はスキーマを利用した高度な学習機能であることを明らかにした。

次にダイオキシンの経胎盤・経母乳曝露を行ったラットについて、対連合学習行動試験を行った。対照群の成績は日を迫うごとに上昇し、対連合学習が成立することを確認した。曝露群の成績をみると、800ng/kg 曝露群は対照群と同様に成績が上昇したが、200 ng/kg では成績の上昇がみられなかった。発達期の低用量ダイオキシン曝露により、特に 200 ng/kg という低用量曝露において、鬱的症状の惹起、ならびに対連合学習機能の障害があることが明らかとなった。また学習行動試験における用量特異的な影響は、オペラント学習試験（レバー押し学習試験）についても、同様の逆U字パターンがあることを明らかにした。

さらに、幼若動物を対象として独自製作したKODOMO装置（図2参照）を用い、PCB胎仔期曝露の影響について検討したところ、ADHD様行動異常が惹起されることを確認した。また、プレパルス抑制試験、恐怖条件づけ試験、マウス行動試験等の行動試験を行い影響を解析した。



図 3. レーザー・マイクロ・ダイセクション

次に、組織化学的・分子生物学的解析により、対連合学習に際して大脳新皮質の特定領域が活性化するというデータを得た。活性化した神経細胞を免疫組織化学的に同定し、レーザー・マイクロ・ダイセクション法（図3参照）により活性化神経細胞のみを回収し、遺伝子発現解析を行ったところ、ダイオキシン曝露により対連合学習が阻害された動物の大脳皮質活性化神経細胞においては、グルタミン酸受容体サブユニット遺伝子の発現量が顕著に低下していることがわかった（図4参照）。グルタミン酸受容体は、記憶学習機能に重要なだけでなく、双極性障害や統合失調症患者の海馬や大脳皮質において発現量が減少していることが近年明らかとなり注目されている分子である。

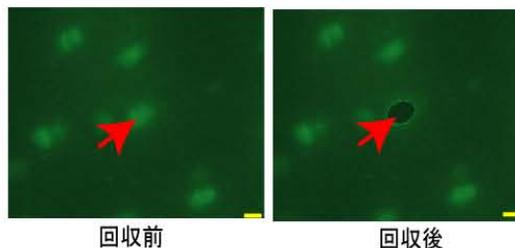


図 4. レーザー・マイクロ・ダイセクション法の例

以上の結果から、ダイオキシン類の発達期曝露は、比較的低用量の曝露により、軽度発達障害を引き起こす可能性が示唆された。今後、情動機能と認知機能の関わりについて脳機能を解析すると同時に、ダイオキシン以外の化学物質にもひろく適用できる毒性試験として発展させてゆく必要があると考えられた。

子どもの「こころ」の健全な発達は何人の願いであり、化学物質曝露との因果関係の解明、影響の程度の科学的評価は、緊急かつ極めて重要な課題である。どのような影響がどの程度の曝露量であられるのかを説明するためには行動試験の存在が不可欠である。しかし行動試験の結果は解釈が難しく、正しいリスク評価のためには、分子メカニズムに基づいた行動変化の科学的説明を行うことが今後の最重要課題である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 5 件）

1. Takeyama M, Sone H and Tohyama C. Perinatal Exposure of Female Rats to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Induces central precocious puberty in the offspring. *J Endocrinol.* 197: 351-358, 2008, 査読有.
2. Hojo R, Takeyama M, Kurokawa Y, Aoki Y, Yonemoto J, Tohyama C. Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environ. Health Prevent. Med.* 13: 169-180, 2008, 査読有.
3. Win-Shwe TT, Mitsushima D, Nakajima D, Ahmed S, Yamamoto S, Tsukahara S, Takeyama M, Goto S, Fujimaki H. Toluene induces rapid and reversible rise of hippocampal glutamate and taurine neurotransmitter levels in mice. *Toxicol Lett.* 168:75-82, 2007, 査読

- 有。
4. Win-Shwe TT, Tsukahara S, Ahmed S, Fukushima A, Yamamoto S, Takeyama M, Nakajima D, Goto S, Kobayashi T, Fujimaki H. Athymic nude mice are insensitive to low-level toluene-induced up-regulation of memory-related gene expressions in the hippocampus. *Neurotoxicology* 28:957-964, 2007, 査読有
 5. Tse D, Langston RF, Takeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood E, Morris RGM. Schemas and memory consolidation. *Science*. 316:76-82, 2007, 査読有.

[学会発表] (計 18 件)

1. 掛山正心. ダイオキシンによる脳の発達異常～性行動、学習行動、情動行動. 第 16 回生殖・発生毒性学東京セミナー, 2009/03/07, 東京、国立オリンピック記念青少年総合センター.
2. 掛山正心. 発達期のダイオキシン類曝露による高次脳機能のかく乱. 第 20 回環境ホルモン学会講演会, 2009/02/24, 東京、江戸東京博物館.
3. 遠藤俊裕, 掛山正心, 遠山千春. 集団型全自動行動解析装置を用いた胎仔期授乳期の低用量ダイオキシン曝露マウスの行動影響評価. 環境ホルモン学会第 11 回研究発表会, 2008/12/13, 東京, 星陵会館.
4. Takeyama M, Hojo R, Tohyama C. Chemically-induced attention deficit hyperactivity disorder-like behavior in juvenile rats detected by a newly developed behavioral test. The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience (SfN2008), 2008/11/19, Washington DC.
5. Takeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Development of novel behavioral tests for rodents to study the high-order brain function altered by in utero and lactational exposure to dioxins. 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2008), 2008/08/20, Birmingham, Oral presentation at Toxicology Session.
6. 掛山正心. 環境化学物質の発達期暴露によるラット脳高次機能への影響, 日本薬学会第 128 年会, 2008/03/26, 横浜, 若手が切り開く Molecular Toxicology 3～化学物質の脳神経毒性とその作用メカニズム～にて
7. Endo T, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational exposure to a low dose of TCDD and TBDD perturbs paired associative learning of male rat offspring. 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2008/03/18, Seattle.
8. 大迫誠一郎, 菅井恵津子, 水田保子, 松田佳奈, 阪田佳紀, 吉岡亘, 掛山正心, 遠山千春. マウス肝臓 CYP1A1 ゲノムのメチル化パターンは胎生期ダイオキシン曝露で変化する. 第 78 回日本衛生学会総会, 2008/03/30, 熊本, 熊本市市民会館 (日本衛生学雑誌 63(2) 437, 2007)
9. 大迫誠一郎, 菅井恵津子, 阪田佳紀, 松田佳奈, 吉岡亘, 掛山正心, 遠山千春. 胎生期ダイオキシン曝露による肝臓 CYP1A1 ゲノムメチル化の変化. 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会, 2008/12/10, 埼玉, 大宮ソニックシティビル, 要旨集 10:63.
10. Takeyama M, Endo T, Yamanouchi K, Tohyama C. Maternal Exposure to a low dose dioxin affects the paired associative learning behavior of offspring of Long-Evans rats. 27th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2007), 2007/09/04, 東京, ホテルオークラ, Oral presentation at Toxicology Session.
11. Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D, Nakajima D, Fukushima A, Yamamoto S, Tsukahara S, Takeyama M, Goto S, Fujimaki H. Analysis of toluene-induced extracellular amino acid neurotransmitter levels in the hippocampus using in vivo microdialysis in a freely moving mouse model. 11th International Congress of Toxicology, 2007/07/15, Montreal, Abstract, PM5.220-217.
12. 掛山正心, 北條理恵子, 大迫誠一郎, 鈴木純子, 黒河佳香, 米元純三, 遠山千春. 2,3,7,8-TCDD と PCB153 の妊娠ラットへの複合曝露によるオペラント学習行動と海馬遺伝子発現の変化. 第 77 回日本衛生学会総会, 2007/03/25, 大阪, 大阪国際交流センター (日本衛生学雑誌 62(2) 476, 2007)
13. 掛山正心, リチャード・モリス, 遠山千春. 高次脳機能への影響を検出するための新たな神経行動毒性試験法: イベント・アリーナ装置におけるラット対連合学習の構築. 第 77 回日本衛生学会総会, 2007/03/25, 大阪, 大阪国際交流センター (日本衛生学雑誌 62(2) 635, 2007)
14. 菅井恵津子, 吉岡亘, 掛山正心, 大迫誠

- 一郎, 遠山千春. 高脂肪食投与マウスにおけるメタボリックシンドロームへのダイオキシンの関与. 第 77 回日本衛生学会総会, 2007/03/25, 大阪, 大阪国際交流センター (日本衛生学雑誌 62(2) 678, 2007)
15. 掛山正心, 北條理恵子, 大迫誠一郎, 鈴木純子, 黒河佳香, 池田雅彦, 米元純三, 遠山千春. 2, 3, 7, 8-TCDD と PCB153 の妊娠ラットへの複合曝露による、学習行動、海馬遺伝子発現ならびに体内動態の変化. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会, 2006/11/11, 東京, 星薬科大学, セッション A:動物での影響にて口頭発表
16. Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S, Tsukahara S., Yamamoto S, Kekeyama M, Nakajima D, Goto S, Kobayashi T, Fujimaki H. T cell-mediated neuroprotective response in toxic chemical induced memory-related gene expressions in a mouse hippocampus. 23rd International Neurotoxicology Conference, 2006/09/17, Little Rock, Abstract 40-41.
17. 北條理恵子, 掛山正心, 黒河佳香, 中島大介, 塚原伸治, 後藤純雄, 藤巻秀和. オペラント条件づけによるマウスの VOC 臭気検出試験系の確立. 第 47 回大気環境学会年会, 2006/09/22, 東京, 東京大学, 要旨集 2G1124.
18. Tin-Tin-Win-Shwe, 福島篤, 美津島大, 中島大介, Sohel A, 山元昭二, 塚原伸治, 掛山正心, 後藤純雄, 藤巻秀和. マイクロダイアリシス法による有害化学物質曝露マウスにおける神経伝達物質の評価, 第 47 回大気環境学会年会, 2006/09/22, 東京, 東京大学, 要旨集 51.

(3)連携研究者
なし

[その他]

2007 日経バイオテク 2007/04/15 号に紹介記事「続報、英 Edinburgh 大、東大、対連合学習の能力を迅速に評価できるラット実験法を確立、ヒトが街の地図を覚えるのに類似」(<http://biotech.nikkeibp.co.jp/fsn/kiji.jsp?kiji=1155>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

掛山 正心 (KAKEYAMA MASAKI)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30353535

(2)研究分担者

なし