

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390186

研究課題名（和文） 多環芳香族炭化水素化合物のAh受容体を介した発達神経毒性メカニズムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of developmental neurotoxicity mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons via aryl hydrocarbon receptor

研究代表者

遠山 千春 (TOHYAMA CHIHARU)

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10150872

研究成果の概要（和文）：多環芳香族炭化水素（PAHs）は環境中に蓄積し、ヒトは食品や環境媒体を介して体内に取り込んでいる。本研究では、妊娠期のPAHsへの曝露が、成長後の子の学習・情動機能に及ぼす影響とその毒性発現メカニズムを、マウスを用いた in vivo 行動試験により解明することを目的とした。その結果、Ah受容体そのものが行動異常の責任分子である可能性が示された。脳機能におけるAh受容体の生物学的意義について、今後さらに研究を進める必要がある。

研究成果の概要（英文）：Polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are accumulated in the environment, and humans are exposed to them via food and environmental media. The objective of the present study is to elucidate possible effects and toxicity mechanisms of gestational exposure to PAHs in mice using behavioral tests. As a result, aryl hydrocarbon receptor itself was suggested to play a responsible role in the behavioral abnormality. The possible biological significance of this receptor in the brain function warrants future studies.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,600,000 | 1,680,000 | 7,280,000 |
| 2010年度 | 5,000,000 | 1,500,000 | 6,500,000 |
| 2011年度 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 14,000,000 | 4,200,000 | 18,200,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：発達神経毒性、芳香族炭化水素、行動毒性、マウス、リスク評価

1. 研究開始当初の背景

非意図的な生成物である多環芳香族炭化水素 (PAHs) は環境中に蓄積し、ヒトは食品、大気・水、及び喫煙を介して体内に取り込んでいる。これまで PAHs の健康影響として、成人における発ガン性に注目した研究が数

多くなされてきたが、近年、発ガン性に加え、これら化合物への妊娠時期における曝露が、胎児や生育後の子どもの健康に及ぼす影響の重要性が注目されている。

特に自閉症、注意欠陥多動性障害 (ADHD) などの精神神経疾患の増加などが大きな社

会的問題となっており、学習・記憶/情動機能に及ぼす化学物質の影響は、大きな関心をもたれている。

ヒトが体内に取り込んでいる PAHs のうち、単位重量当たり、もっとも毒性が強いダイオキシン異性体である 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾパラジオキシン (TCDD) は、核内受容体である AhR を介して毒性を発現する典型的な化学物質である。他の PAHs も、AhR を介した毒性を有することが想定されるが、ベンゾ[a]ピレン (B[a]P) による皮膚発ガンが AhR 欠損マウスにおいては発生しないという研究以外には、他のエンドポイントに関する研究はほとんどなされていない。

申請者はこれまで、ダイオキシン類を中心として AhR を介した発達毒性とそのメカニズムについて多岐にわたり研究を行ってきた。齧歯類 (ラットとマウス) において、母動物では顕著な影響が観察されない用量のダイオキシン曝露により、仔動物における脳の性分化 (Ikeda et al., 2005)、中枢性の性の早熟化 (Kakeyama et al., 2008)、学習機能低下 (Kakeyama et al. 2001, Mitsui et al. 2006, Hojo et al. 2008) が引き起こされることを見出した。ロチェスター大学や国立環境研究所では、In vitro 実験系では AhR を有する神経芽細胞の成熟やグリア細胞の分化にダイオキシンが影響を及ぼすことを報告している。他方、イリノイ大学の Schantz 教授らは、ダイオキシン類の学習記憶機能に及ぼす影響に関して研究を行っている。しかし、AhR 欠損マウスのみならず野生型でも影響が再現できていないため、AhR 依存性・非依存性の問題をはじめとして、ダイオキシン類による発達神経毒性の分子基盤は未解明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、PAHs として毒性を発現する代表的化合物であるダイオキシンの発達期曝露による発達神経毒性の有無を明らかにし、それが AhR を介した毒性かどうかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、野生型マウスならびに AhR 遺伝子欠損マウスを用いた。妊娠 12.5 日目の母マウスに対して、PAHs のうち環境中に存在し極めて毒性が強い TCDD を投与 (0 または

0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重を単回経口投与) することで、低用量の発達期曝露を受けた仔動物を得た。仔動物が成熟後、集団型全自動行動解析システム IntelliCage (New Behavior 社, Zurich) を用いた行動試験を行った。IntelliCage 行動試験では、学習成績と同時に、情動行動や社会行動について調べた。他に恐怖条件づけ試験、オープンフィールド試験、rota rod 試験、免疫組織学的検査等を行った。

4. 研究成果

(1) 行動試験

IntelliCage (図 1A) は海外協力研究者であるチューリッヒ大学 Hans-Peter Lipp 教授が開発したもので、マウスの皮下に ID チップを埋め込むことで、最大 16 匹のマウスを同じケージ内で飼育しながら、個々の動物の試験成績を自動測定することができる。我々はこの装置を用いた新たな行動課題を開発した (図 1B-F)。これにより、空間学習に基づいた行動系列課題 behavioral sequencing task (図 1B, C)、反復逆転課題 serial reversal task (図 1D) に基づいた認知的柔軟性 cognitive flexibility (図 1E)、逆転課題における学習の構え reversal learning-set (図 1F) を解析することができるようになった。

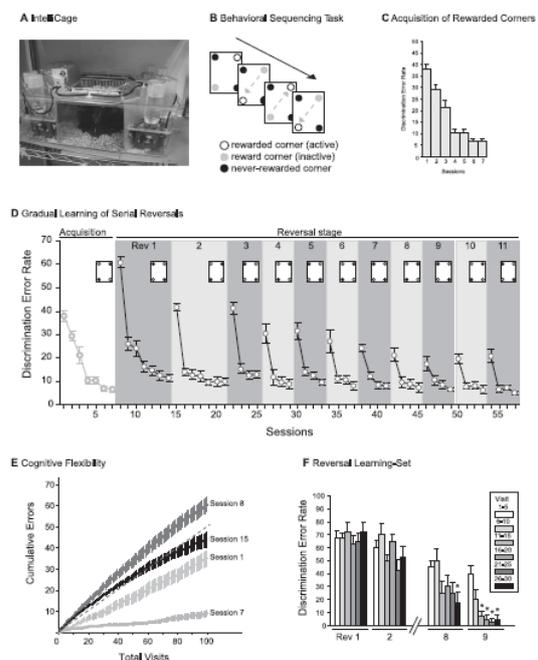


図 1. 本研究で用いた行動課題 (Endo et al.,

2011より改変)。なお、この課題の開発は2005年より開始しており、厚生労働科研費、環境省環境技術開発研究ならびに科研費等に基づいた成果として論文報告したものである。

(2) 野生型マウスにおけるダイオキシン曝露影響

野生型マウスを用いた行動試験では、低用量曝露マウスにおいてのみ、統合実行機能の低下を伴う社会的順位の低下があることを見出した。すなわち0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDDを曝露された母親から生まれたマウスは、認知的柔軟性の低下、固執的繰り返し行動の抑制能力の低下とともに、競争的条件下における順位低下を示した。3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露群では、そのような影響はみられなかった。

なぜ0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露においてのみ行動異常が見られたのかは、現時点では説明することは難しい。しかし行動課題に伴う最初期遺伝子産物の免疫組織学的検討の結果も、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露によってのみ異常が認められたこと、我々を含めた過去の報告でも低用量においてのみ行動変化を認めていることを考え合わせると、特に低用量域においては、用量依存性を伴わない影響発現が、現象レベルではあることが再確認されたことになる。

本研究では社会的順位の低下に注目し、検証実験を行った。まず、新たに社会的順位の検証課題を作成した。すなわち学習行動形成の要素を除外し、4つの水飲み場のうち、マウスは任意の場所で水を飲むことができるようにした。14匹のマウスで4つの水飲み場を取り合う場合には競争状態が激しくなり、マウス匹数を減らすと競争度は弱くなる。

この新たな場面場台において本研究では、新たに対照マウスと0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露マウスを用意して解析した。

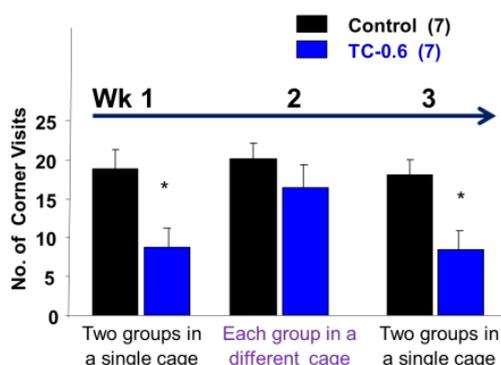


図 2. 低用量ダイオキシン曝露による社会的順位の低下。

対照群7匹と0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露群7匹を同時に実験装置に導入した場合、つまり競争状態が強い場合には、前回実験と同様、曝露マウスの社会的順位低下を確認した。その後、実験置を二つもちいて競争状態を低くすると、群間の差が消失した(図2)。

以上のことから、低用量ダイオキシン曝露はマウス社会的順位に影響を及ぼすことが明らかになった。

(3) AhR 遺伝子欠損マウスによる検討

AhR 遺伝子欠損マウスを用いた検討では、雌雄のAhR(+/-)マウスを交配し、妊娠マウスに0または0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のTCDDを曝露、生まれたAhR(+/+)マウスとAhR(-/-)マウスを用いて実験を行った。結果、TCDD曝露の有無に関わらず、AhR欠損マウスにおいては社会的順位が低くなることを示す知見を得た。

これはAhR分子そのものが社会性脳機能に関わっている可能性を示すものである。AhRはオーファン受容体であり、薬物代謝酵素を誘導する以外の機能はまだ明らかになっていない。

今後は、脳機能におけるAhRの役割、脳発達におけるAhRの役割、脳機能と薬物代謝酵素との関係、そしてダイオキシンがAhR分子の機能を攪乱する可能性について検討を進める必要がある。

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4件)

- Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Takeyama M. Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. Behav Brain Res 2011 221:172-181. DOI: 10.1016/j.bbr.2011.02.037. (査読有)
- Tohyama C, Uchiyama I, Hoshi S, Hijiya M, Miyata H, Nagai M, Nakai S, Yauchi M, Ohkubo S. Polychlorinated dioxins, furans and biphenyls in the blood of children and adults living in a dioxin-contaminated area in Tokyo. Environ Health Prev Med 2011 16:6-15.

DOI: 10.1007/s12199-010-0156-z.

(査読有)

3. 掛山正心、齧島旭、遠藤俊裕、遠山千春. ヒトの健康リスクへの適用を目指した齧歯類を用いる新たな行動毒性試験の開発. 動物心理学研究 2011 61:33-42.

DOI: 10.2502/janip.61.1.11. (査読有)

Haijima A, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. Neurotoxicology 2010 31:385-390. (査読有)

DOI: 10.1016/j.neuro.2010.04.004.

[学会発表] (計 13 件)

1. ベナー聖子、掛山正心、遠山千春. マウス行動試験法を用いた発達期ストレスの社会性影響評価. 第 82 回日本衛生学会学術総会 2012 年 3 月 25 日 京都大学(京都府)
2. Tohyama C, Takeyama M. Assessment of advanced cognitive behaviors in rodents: Maternal exposure to dioxin causes psychobehavioral abnormality and learning deficits. The 7th Congress of the Federations of Asian and Oceanian Physiological Societies 2011 年 9 月 13 日 台北、台湾
3. 齧島旭・張艶・遠藤俊裕・掛山正心・遠山千春. 胎仔期・授乳期の低用量ダイオキシン曝露が情動機能に及ぼす影響: 低用量特異的影響と用量依存的影響. 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会 2010 年 12 月 16 日 東京大学 (東京都)
4. 掛山正心・遠山千春. 実験動物高次脳機能評価法の今後の展開. 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会 2010 年 12 月 16 日 東京大学 (東京都)
5. Endo T, Maekawa F, Voikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wofler DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Takeyama M. Corridor shuttling spatial learning task[1]: Automated analysis of behavioral flexibility and reversal learning-set in mice using IntelliCage system. 40th Annual meeting of Society for Neuroscience 2010 年 10 月 17 日

San Diego, USA

6. Takeyama M, Endo T, Tohyama C. Corridor shuttling spatial learning task[2]: Chemically-induced emotional dysfunctions in group-housed mice as an animal model of perseveration and social anxiety. 40th Annual meeting of Society for Neuroscience 2010 年 10 月 17 日 San Diego. USA.
7. 遠山千春. 日本衛生学会賞受賞講演「環境と健康・・・衛生学徒の毒性学」第 80 回日本衛生学会学術総会 2010 年 5 月 10 日 仙台国際センター (宮城県)
8. Endo T, Tohyama C, Takeyama M. Perinatal TCDD exposure induce learning and affective behavioral deficits in adult male mice: Its low-dose specificity and the possible causal brain regions. 49th Annual meeting of Society of Toxicology (SOT) 2010 年 3 月 10 日 Salt Lake City, USA
9. 遠山千春. 『環境ホルモン』問題の現状と今後の課題. 松本大学特別講演会 2010 年 2 月 5 日 松本大学 (長野県)
10. 遠山千春. 内分泌かく乱化学物質のリスク研究と公衆衛生. 第 68 回日本公衆衛生学会総会 2009 年 10 月 22 日 奈良県文化会館(奈良県)
11. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational exposure to dioxins induces deficits in fear conditioning in mice. 5th International Congress of Asian Society of Toxicology 2009 年 9 月 10 日 台北、台湾
12. Haijima A, Endo T, Zhang Y, Takeyama M, Tohyama C. Perinatal exposure to a low-dose of dioxin induces deficits in fear conditioning in mice. 29th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants 2009 年 8 月 23 日北京、中国
13. 遠藤俊裕、掛山正心、遠山千春. 集団型全自動マウス行動特性評価法の構築: 周産期低用量 TCDD 曝露マウスを用いた行動毒性試験への応用. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009 年 7 月 7 日 盛岡市民文化ホール (岩手県)

[その他]
ホームページ等
<http://env-health.m.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠山 千春 (TOHYAMA CHIHARU)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10150872

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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