

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号： 12601  
研究種目： 挑戦的萌芽研究  
研究期間： 2012～2012  
課題番号： 24651059  
研究課題名（和文） 環境化学物質の神経内分泌ストレス応答系への発達毒性に関する研究

研究課題名（英文） Developmental toxicity of the neuroendocrine stress response system caused by environmental chemicals

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）：低用量の環境化学物質への周産期曝露により高次脳機能障害が生じるとの疫学的・実験的知見が集積している。高次脳機能のうち認知・情動には神経内分泌ストレス応答系が重要な役割をはたしているが、発達期における環境化学物質への曝露が個体の神経内分泌ストレス応答系に及ぼす毒性はほとんど解明されていない。そこで本研究では、新規の行動科学的アプローチや、伝統的ならびに最新の生化学・分子生物学的手法を用いた多角的検討により、環境化学物質の神経内分泌ストレス応答系への発達毒性を調べることを目的とした。環境化学物質の曝露モデルとして、ダイオキシン（2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン（TCDD））の周産期曝露によるモデルマウスを作成した。また、神経内分泌ストレス応答系の指標である視床下部－下垂体－副腎（HPA）軸の機能異常を引き起こす陽性コントロールとして、社会性隔離外的生育条件の負荷による神経内分泌ストレス障害モデルマウスを作成し、これとダイオキシン曝露マウスとを比較した。この陽性コントロールマウスは、ダイオキシン周産期曝露マウスが示す社会行動異常（Endo et al. PLOS ONE 2012）と同様の社会行動異常を示すことが判明した。また、これらとは逆向きの社会行動異常を示す外的生育条件として母子分離マウスを見出した。これらモデルマウスにおいて、ストレス応答に関わる遺伝子発現解析を行った結果、前頭葉と扁桃体の機能的結合の変化が関与する可能性を示す知見を得た。今後、外的生育条件とダイオキシン曝露影響のメカニズムの共通点と相違点について解析することにより新規性が高い知見が得られる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Epidemiological and experimental studies suggest that exposure to low levels of environmental chemicals induce disorders in higher brain functions including cognition and emotion. It is established that hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis, the neuroendocrinological stress response system, plays a pivotal role in the cognition and emotion. However, the effect of environmental chemical exposure on the developing the neuroendocrine system is largely unknown. Thus, we administered pregnant mice 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) to develop a chemically exposed rodent model. For a comparative purpose, we generated early-life stress mouse models, such as maternal separation and early deprivation, as positive control that manifests abnormal development of the HPA system. We adopted to use novel behavioral analysis as well as traditional biochemical- and molecular biology techniques. We discovered the early deprivation resulted in a behavioral phenotype similar to perinatal low-dose dioxin exposure whereas the maternal separation had an opposite behavioral consequence. The result of gene expression analysis suggested an alteration of the functional connectivity between the prefrontal cortex and the amygdala. To elucidate the underlying mechanism between the dioxin-induced developmental toxicity and the early life environmental conditions warrants further studies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：環境化学物質、神経内分泌、ストレス応答、周産期、母子行動、社会行動、高次脳機能、ストレス障害モデル

## 1. 研究開始当初の背景

環境保全への認識の国際的な高まりとともに、高濃度・局所的な環境汚染問題は少なくなってきたが、低濃度での世界的規模での汚染は進行している。近年、疫学的・実験的研究により、低用量での影響、特に感受性が高いとされる周産期曝露による次世代影響が示唆されている。とりわけ、高次脳機能への影響を齧歯類で調べ、それをヒトに外挿する試みが求められている。我々は次世代の発達毒性を検出・計測するための技術開発を進め、マウスを集団で同時に飼育して高次脳機能を指標とし、かつ再現性・定量性に優れた独自の動物行動解析法を確立した [Endo et al., 2011, Tse et al., 2011]。この方法を用いることで、ダイオキシンやビスフェノールAの周産期曝露をうけた仔動物が成熟後に、多様な行動異常が顕れることを見いだした。今日のヒト耐容量を導く根拠となった最小毒性量 (LOAEL) の相当量、もしくはそれを下回る用量で見出された重要な指標である。さらにその異常の脳内基盤として、認知と情動を司る前頭葉と大脳辺縁系における細胞レベルでの変化を確認している。

今回の申請研究においては、周産期曝露モデルマウスが示す脳神経異常が、「ストレス障害」、あるいは、ヒトの発達障害・精神疾患・神経変性疾患の臨床知見に共通点を有する点に着目した。生体のストレス応答と恒常性維持は、主として視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸が司る。HPA 軸の機能障害は成人期慢性疾患や神経精神疾患のリスク因子であることが知られており、この系のプログラミングは周産期環境に極めて脆弱である [Harris & Seckl, Horm. Behav., 2011] ことから、化学物質曝露による影響が顕れることが推測されるからである。

## 2. 研究の目的

環境化学物質への周産期曝露が成熟後の高次脳機能障害を引き起こすメカニズムとして HPA 軸の調節異常が介在するという作業仮説 (図 1) を出発点として提案を行うこととした。環境化学物質がヒトの「こころ」の発育に及ぼす影響を紐解くにあたり、個体レベルのストレス反応 (「神経内分泌ストレス応答系」) に焦点をあてる。これは、認知・情動に関わる主要な毒性指標でありながらほとんど解明されていないテーマである。低用量の環境化学物質への周産期曝露によって生じる齧歯類での高次脳機能異常は、ヒトにおけるストレス障害を伴う発達障害・神経疾患のモデルと共通点が多い。そこで、ストレス応答系の障害がこの毒性に深く関与するという仮説を立て、行動科学・生化学・分子生物学的アプローチにて多角的検討を行う。これにより、「システム毒性学」の観点から新たな毒性影響評価手法を確立することが本研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 環境化学物質曝露マウス、ならびに神経内分泌ストレス反応系障害モデル動物の作出

環境化学物質の曝露モデルとして、ダイオキシン (2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD)) を周産期曝露 (母獣に 0.6~3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重、単回経口投与) したマウス (C57BL/6) 作出した。この投与スキームは、LOAEL の 1/8 にほぼ相当し、周産期ダイオキシン曝露マウスが行動表現型・神経活動パターンの異常を示すことは、我々の研究室の別研究にて確認済みである。ちなみにこの毒性表現型は、ストレス障害を伴うヒト精神神経症状 (強迫性障害、社会性不安障害等) 様であることも確認済みである。

次に、発達期環境因子による神経内分泌ストレス反応系障害モデルとして、社会環境隔離 (ED) モデルを導入した [Stanton et al., Behav. Neurosci, 1988; 他]。本研究では ED 処置を行った動物を HPA 軸障害の陽性対照群として、その行動学的表現型を特徴づけ、周

産期ダイオキシン曝露マウスのHPA軸機能を評価する際の指標として用いた。さらに、授乳期の際に定期的に母マウスと引き離す母子分離(MS)マウスも作成した。

## (2) 行動科学方法論を用いた行動異常の検出

①嗅覚に基づく社会認知機能解析：周産期ダイオキシン曝露が嗅球に異常を呈することが示唆されており(未発表データ)、嗅覚に焦点をあてた行動解析を行った。独自にデザインした匂い実験装置にて、社会的嗅覚刺激(なじみ深い匂いである「母親の匂い」、新規の匂いである「未知の個体の匂い」など)を用いた嗅覚反応異常の検出・解析を行った。

②IntelliCage システムを用いた高次脳機能解析：効率・精度・再現性に優れた全自動マウス行動解析装置(IntelliCage システム)に我々が開発した独自の試験プロトコル[Endo et al., Behav Brain Res, 2011]を用い、HPA軸機能異常特異的な表現型の検出を主眼においた解析を行った。

## (3) 神経内分泌系の生化学的キャラクターゼーション

周産期曝露動物のコルチコステロン(げっ歯類のストレスホルモン)の分泌量・パターンについて調べた。HPA軸機能に関わるホルモンやペプチドの血中濃度を、ストレス負荷有無の条件下で検討することにより、社会認知機能異常を伴うHPA軸のかく乱がみられるか検証した。

## (4) 分子生物学的手法を用いたHPA軸の機能評価

個体のストレス応答性を分子レベルで評価するため、HPA軸の活性に関わる組織を亜領域ごとに、細胞(集団)特異的な定量的遺伝子発現解析を行った。我々が開発したレーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いた遺伝子発現定量法を用い[Yoshioka et al. Sci Rep 2012]、ストレス負荷状態下および行動試験に伴い活性化する脳領域(大脳皮質一辺縁系)を選択し解析した。

## 4. 研究成果

TCDDの周産期曝露による環境化学物質曝露モデルマウスの解析では、恐怖条件付け試

験において、周産期低用量(0.6 μg/kg)TCDD曝露マウスは条件刺激である音に対し、対照群同様の行動表現型を示したが、より高用量な(3.0 μg/kg)TCDD曝露を受けた動物では反応性の低下がみられることがわかった。一方、低用量曝露マウスにおいても、海馬依存的な状況設定(条件付けが行われた箱)への恐怖学習の成立には影響が顕れた。恐怖を覚える生得的な経路を刺激する「恐怖臭」に対し、低用量曝露マウスは経験依存的な異常反応を顕した。初提示の「恐怖臭」に対しては、曝露群と対照群との間に差は検出されなかった。ところが、再提示された「恐怖臭」に対して対照群が初回同様のすくみ行動を示したのに比し、曝露群ではすくみ行動の低下が観測された。また、別の試験法からも、曝露群が「恐怖臭」により頻繁にアプローチするなどの異常行動を呈することが確認された。以上の結果から、周産期における低用量のTCDD曝露の影響が、成熟後の恐怖情動に顕れる事が行動学的に示された。これはmesolimbic ドパミン系に異常があるという生化学的な報告と一致しており、周産期低用量曝露の情動性への影響指標のひとつとして新しい発見となった。さらに老齢の周産期ダイオキシン曝露動物における血中コルチコステロン値を調べたところ、対照群に比べて基底状態ならびにストレス負荷時のコルチコステロン分泌に異常な傾向があることが明らかとなった。

また我々は、集団型全自動行動試験装置IntelliCageを用いた競争行動試験において、ダイオキシン周産期曝露マウスにおける競争行動の異常を見出し、論文報告した[Endo et al. PLOS ONE 2012]。IntelliCageでは、集団飼育下(14~16匹)のマウスに摂水制限をしたうえで、水を報酬とした競争的環境を強いることにより、competitionに対する強弱を定量化することができる。そこで本研究では、社会環境隔離(ED)モデルマウスにおいて、競争行動試験を行ったところ、EDマウスはダイオキシン曝露マウスと同様に、競争度が高い状態では活動性が低下していることが明らかとなった。さらにEDマウスでは、衝動性の亢進を示唆するデータも得た(図1)。

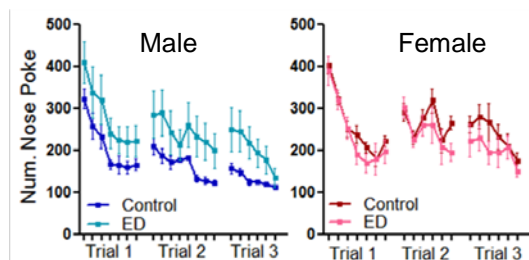


図 1. IntelliCage を用いた競争行動試験により検出された社会環境隔離 (ED) マウスの行動異常。特にオス (左) において異常が示唆された。

次に、授乳期間中の一定時期に母親と引き離す MS マウスについて競争行動試験を行ったところ、MS マウスは、ED マウスやダイオキシン曝露マウスとは反対に、競争度が高い状態では活動性が亢進するという、逆方向の社会行動異常を示す知見を得た。これらモデルマウスにおいて、ストレス応答に関わる遺伝子発現解析を行った結果、前頭葉と扁桃体の機能的結合の変化が関与する可能性を示す知見を得た。今後、外的生育条件とダイオキシン曝露影響のメカニズムの共通性と相違点について、さらに解析する必要性が示された。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

1. ベナー聖子、遠藤のぞみ、遠藤俊裕、遠山千春、掛山正心. IntelliCage による Social Dominance の評価、第 17 回日本行動神経内分泌研究会全国集会 2012 年 8 月 30 日 (京都市、関西セミナーハウス)。
2. ベナー聖子、齧島旭、小早川令子、小早川高、掛山正心、遠山千春. 周産期低用量 TCDD 曝露マウスにおける恐怖情動性の行動学的評価、環境ホルモン学会第 15 回研究発表会、2012 年 12 月 18 日 (東京、東京大学山上会館)
3. ベナー聖子、齧島旭、小早川令子、小早川高、掛山正心、遠山千春. 周産期低用量ダイオキシン曝露マウスの恐怖情動性評価、第 12 回分子予防環境医学研究会、2013 年 2 月 1 日 (茨城県つくば市、つくばインフォメーションプラザ)
4. S. Benner, A. Haijima, Y. Zhang, R. Kobayakawa, K. Kobayakawa, M. Kakeyama,

C. Tohyama . Abnormality in Fear-Related Emotional Function in Mice Perinatally Exposed to a Low Dose of TCDD, 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT) 2013 年 3 月 13 日 (Convention Center, San Antonio, Texas, USA)

5. ベナー聖子、齧島旭、小早川令子、小早川高、掛山正心、遠山千春. 発達期における低用量 TCDD 曝露がマウスの恐怖情動性に及ぼす影響、第 83 回日本衛生学会学術総会、2013 年 3 月 24 日 (金沢市、金沢美術工芸大学)

[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

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし

研究者番号：