

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12603

研究課題名(和文)ラットの超音波発声の音響学的変異を利用した生物汚染のモニタリング法

研究課題名(英文)The bio-monitoring systems by using acoustic alterations of ultrasonic vocalization of rats

研究代表者

和田 博美(WADA, HIROMI)

北海道大学・文学研究科・教授

研究者番号：90191832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠15日～出産21日までBDE-209を1000、500、0mg/kg、妊娠ラットに投与した(高投与、低投与、統制群)。投与群乳仔の発声が短縮し、周波数変調型発声も減少した。離乳後に同腹同性の3匹で闘争遊びを行った。高投与群雄のみ、周波数30kHz前後の長い発声(N型コール)を認めた。生後93～98日に異腹の雌雄をペアにした。統制群と低投与群にN型コールを認めたが、高投与群は皆無であった。生後100～102日に異腹の同性間で闘争行動を行った。統制群にN型コールを認めたが、高投与群と低投与群は減少または皆無であった。BDE-209が超音波コミュニケーションの発達を阻害することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：BDE-209 was administered to pregnant rats at dosages of 1000, 500, or 0mg/kg from gestational day 15 to postnatal day 21. The duration of ultrasonic vocalizations (USVs) was shortened and frequency-modulated USVs were reduced in the dosed pups. Only male high-dose groups of juvenile rats produced 30 kHz USVs with longer durations (type N call) in play fighting. Male adult rats of the low-dose and control groups produced type N calls in mating behavior whereas those of the high-dose group disappeared them. In fighting behavior, male rats of the control group produced type N call but those of the high- and low-dose groups reduced or disappeared them. These results suggest that BDE-209 disrupts communication behavior of rats.

研究分野：developmental neurotoxicology

キーワード：ultrasonic vocalization rat BDE-209 maternal separation play fighting mating behavior fighting behavior communication

1. 研究開始当初の背景

化学物質による生物汚染は、人間に起こる被害の前兆である。生物汚染をいち早く発見することが人間への被害を防ぐことになる。申請者は生物汚染指標としてラットの超音波発声を提案する。ラットは人間と生活圏を共有し人間と同様の食生活をしているため、人間への汚染を反映すると考えられる。またラットは超音波を発してコミュニケーションを行う。超音波に異常が起るとコミュニケーションが困難になり、母子関係、仲間関係、雌雄関係等の社会関係の形成に深刻なダメージが生じる。これまで一般的な生物汚染指標とされてきた個体数の減少や形態異常の発生より、早い段階で超音波発声の変異が出現すると予想される。

申請者はPCB、ダイオキシン、有機塩素系農薬に共通する甲状腺ホルモン阻害作用に着目し、乳児ラットの同ホルモンを阻害して超音波発声を解析する実験を行った。その結果、超音波発声回数と長さが増大し、発声強度も上昇することが明らかになった(Wada, 2014, 2015)。この成果から、ラットの超音波発声を生物汚染の指標にすれば、人間への脅威をいち早く発見して予防に生かせるという斬新なアイデアが生まれた。

2. 研究の目的

本研究の全体構想は、人間と生活圏を共有し人間と同様の食生活をしているラットの超音波発声を使って、斬新な生物汚染の評価指標を構築することである。具体的な目的は、野生生物や人間での蓄積が危惧されているポリ臭素化ジフェニルエーテル (Poly Brominated Diphenyl Ether, 以降PBDE) を有害化学物質のモデルとして取り上げ、ラットに投与して超音波発声の音響学的変異の有無を解析する。化学物質の影響にもっとも脆弱な胎児期をターゲットにするため、PBDEを妊娠ラットに投与す

る。出生したラットの超音波発声を、a)乳児期の母子分離場面、b)思春期の仲間遊び場面、成熟期のc)エサ提示・不提示場面とd)雌雄ペアリング場面で測定し、音響学的特徴を解析する。投与群と統制群を比較して音響学的特徴の変異を検出し、ラットの超音波発声が生物汚染の指標として利用できるかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BDE-209 投与

妊娠ラットを高投与群 3 匹、低投与群 2 匹、統制群 2 匹の 3 群に分け、BDE-209 を 1000 mg/kg、500 mg/kg、または 0 mg/kg、それぞれの群に投与した。BDE-209 はコンデンスミルク 10 mg/kg に混入し、自由摂取させた。投与期間は妊娠 15 日～出産 21 日目までである。

(2) 乳仔期の超音波測定 (母子分離)

出生した仔ラットを、生後 4、7、10、13、16 日に母子分離し、5 分間超音波発声を測定し解析した。超音波の測定には、同じ仔ラットを繰り返し用いた。

(3) 青年期の超音波測定 (闘争遊び)

生後 22 日に離乳した後、ラットは個別ケージで飼育した。生後 43～45 日目の 3 日間、BDE-209 投与量が同じ同腹同性の 3 匹を一緒にして闘争遊びを行い、10 分間超音波発声を測定し解析した。闘争遊びの組合せは 3 日間固定した。闘争遊びの後には個別ケージに戻した。

(4) 成熟期の超音波測定 (異性との同居)

生後 93～98 日の 6 日間、BDE-209 投与量が同じ異腹の雌雄をペアにして 10 分間超音波発声を測定し解析した。ペアの組合せは 6 日間固定した。同居の後には個別ケージに戻した。

(5) 成熟期の超音波測定 (同性との同居)

生後 100～102 日の 3 日間、BDE-209 投与量が同じ異腹の雄をペアにして 10 分間超音波発声を測定し解析した。ペアの組合

せは3日間固定した。同居の後は個別ケージに戻した。

4. 研究成果

(1) 乳仔期のコミュニケーション

BDE-209 投与群は1回当りの発声時間が短縮し、5kHz以上周波数を変調させる周波数変調型発声の頻度も低下した(図1)。周波数変調型の発声は周波数一定型の発声と比較して、母親の注意を強く引く。そのため、乳仔ラットの危機を訴える生物学的に重要なシグナルとなる。周波数変調型の発声頻度が低下したこと、発声自体の長さも減少したことにより、乳仔ラットの発声は母親にとって気づきにくくなったといえる。様々なノイズが存在する自然環境では、乳仔ラットの生存が脅かされる可能性がある。

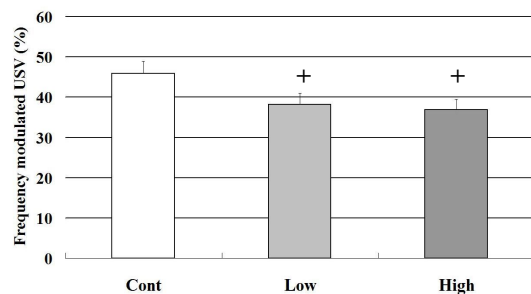


図1 周波数変調型の発声頻度
(+ p<0.10 vs Cont)

(2) 青年期のコミュニケーション

BDE-209 高投与群の雄にのみ、周波数30kHz前後で100~1200ミリ秒に達する長い発声を認めた(図2)。この発声は、ラットが不安、恐怖、苦痛など、不快な感情状態を示すシグナルである。我々はタイプNコール(negative affection call)と呼んでいる。同腹で育ったラット同士は、互いの臭いや超音波発声から、兄弟/姉妹であることを認識できると考えられる。そのため苦痛や恐怖を伴うような闘争がなく、タイプNコールも生じない(統制群)。しかし雄のBDE-209 高投与群にタイプNコールが生じたことは、互いを兄弟と認識できず、恐

怖や苦痛を感じるような激しい闘争行動が起こっていたことを示している。BDE-209が長期記憶を阻害することから、一緒に過ごした兄弟であるというエピソード記憶の障害を起こしている可能性もある。雌ラットはもともと激しい闘争を行わないため、BDE-209の影響が現れなかったと考えられる。

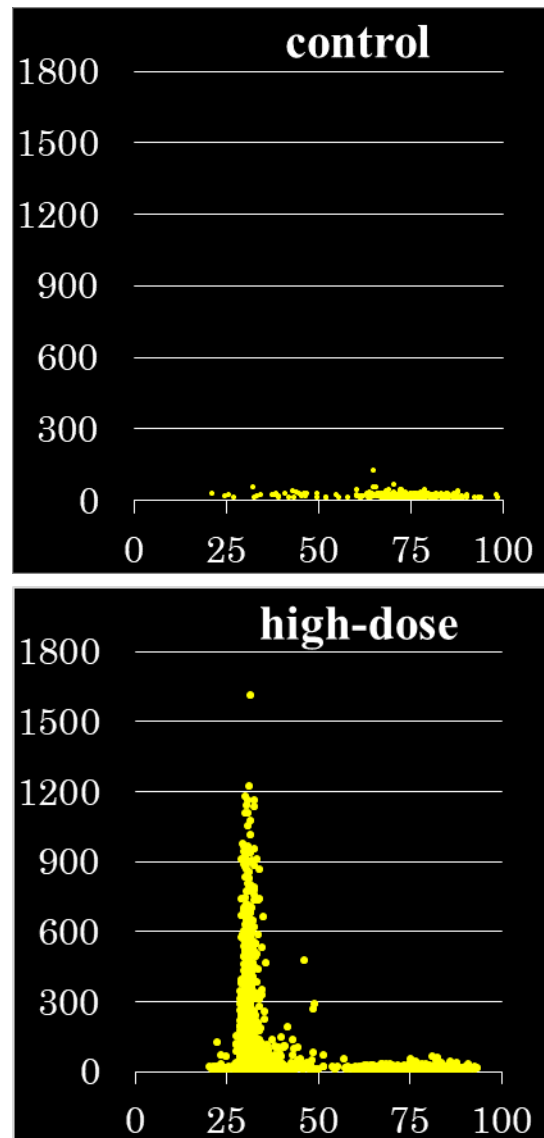


図2 闘争遊び中の超音波発声の散布図
X軸:周波数(kHz), Y軸:発声時間(ミリ秒)

(3) 成熟期の異性間コミュニケーション

統制群と BDE-209 低投与群に周波数30kHz前後で100~1500ミリ秒に達する長い発声(タイプNコール)を認めた。しかし高投与群にはタイプNコールを認めなかった(図3)。タイプNコールは、不快な感

情状態の際に発せられる。異性同士がペアになった場合には、雄ラットが雌と交尾をして射精し終えた後、タイプNコールを発する。これは雌ラットから受けた誘惑を拒絶するためのシグナルである。統制群とBDE-209 低投与群にタイプNコールが生じたことは、ペア間に交尾行動が起こったことを示している。一方、高投与群にタイプNコールが認められなかったことは、ペア間に交尾行動が起こらなかったことを示している。交尾行動のためのコミュニケーションが効果的に行われなかった可能性を示している。

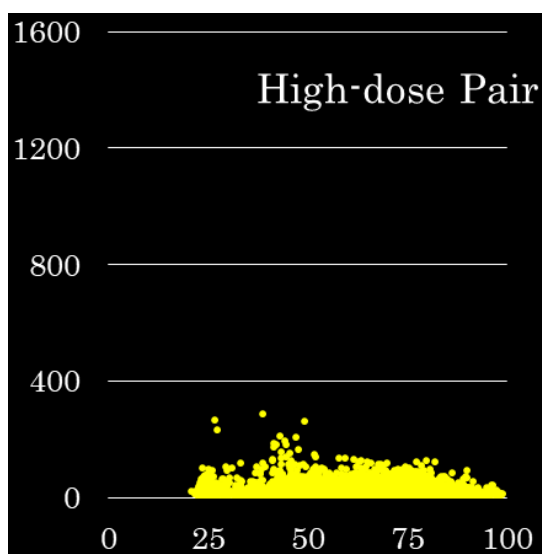
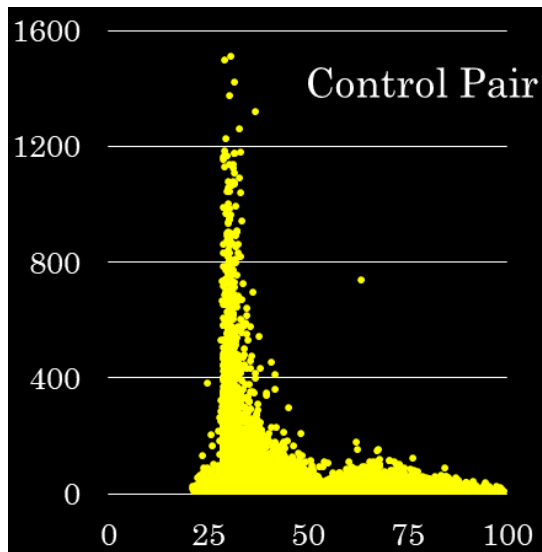


図3 異性と同居中の超音波発声の散布図
X軸:周波数(kHz), Y軸:発声時間(ミリ秒)
(4)成熟期の同性間コミュニケーション

統制群に周波数 30kHz 前後で 100~1200 ミリ秒に達する長い発声(タイプNコール)を認めた。しかし BDE-209 投与群のタイプNコールは 400 ミリ秒以下の短い発声であった(図4)。成熟した雄ラットは、縄張りや交尾相手の雌をめぐって闘争を行う。闘争に敗北した劣位のラットはタイプNコールを発する。これは敗北を認め、相手に服従することを示すシグナルである。

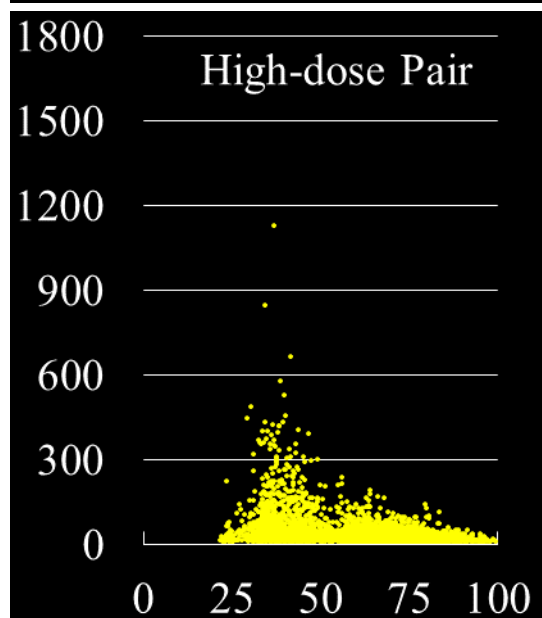
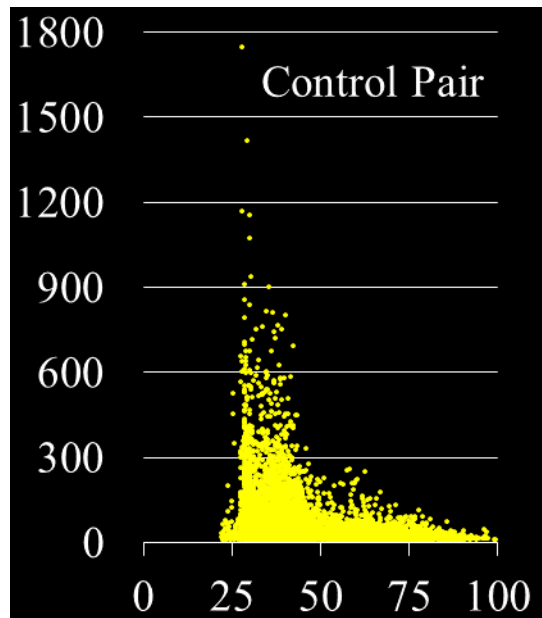


図4 同性と同居中の超音波発声の散布図
X軸:周波数(kHz), Y軸:発声時間(ミリ秒)

本実験では、同性のペアは非兄弟同士の初顔合わせであった。このため優劣をめぐって激しい闘争が行われ、敗北したラット

がタイプNコールを発したと考えられる。一方、高投与群にはタイプNコールがなかった。高投与群は闘争自体を行わない、あるいは敗北を認めて服従を示すシグナルを出さない可能性がある。後者であった場合、不要な闘争を避けるコミュニケーションができないことになり、怪我をして天敵に狙われやすくなるかもしれない。

(5) 総括

BDE-209 投与により超音波発声の音響学的な特徴に変異が生じることが明らかになった。乳仔ラットが母親に緊急事態を知らせる周波数変調型発声の頻度が減少したこと、不快な感情状態を知らせたり、敗北や服従を示したりするシグナルであるタイプNコールが認められなかったことから、BDE-209 がラットの超音波コミュニケーション発達を阻害することは明らかである。BDE-209 の生態系汚染が拡大すれば、ラットの生存が脅かされるだろう。

ストックホルム条約により、BDE-209 の使用は“検討中”とされている。しかし本研究の成果から、規制の必要性があるといえるだろう。

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 2 件)

Wada H. and Qi Y. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) and ultrasonic vocalization in rat pups. *Organohalogen Compounds*, 査読有, (in press), <http://www.dioxin20xx.org/>

Wada H. Acoustic alterations of ultrasonic vocalization in rat pups induced by perinatal hypothyroidism. *Neurotoxicology*, 査読有, 59, 2017, 175-182

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.neuro.2016.05.17>

[学会発表](計 3 件)

Wada H. and Qi Y. Decabromodiphenyl ether (BDE-209) and ultrasonic vocalization in

rat pups. *Dioxin 2017*, Vancouver, Canada, August 20-25, 2017

Wada H. and Qi Y. Effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on ultrasonic communication in play fighting of juvenile rats. 環境ホルモン学会第20回研究発表会, 神戸市, 12月11~12日, 2017

Qi Y and Wada H. Effects of decabromodiphenyl ether (BDE-209) on ultrasonic communication in maternal separation of rat pups. 環境ホルモン学会第20回研究発表会, 神戸市, 12月11~12日, 2017

[その他]

ホームページ等

<http://cogpsy.let.hokudai.ac.jp/~wada-lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 博美 (WADA, Hiromi)

北海道大学・大学院文学研究科・教授

研究者番号: 90191832