

ダイオキシンおよび他の環境由来の化学物質の毒性の標的としての 脳の発達と行動

バーナード ワイス (代理：北條理恵子)

米国 ロチェスター大学

最初に、バーナード・ワイス博士のことづけをお伝えします。本会議に参加できず皆様に申し訳なく思っておりますが、我々のデータを発表する機会をくださったことは非常な喜びであると申しておりました。スライドをお願いします。ありがとうございます。次のスライドをお願いします。

TCDD 類や PCB 類などの内分泌攪乱化学物質は、たちの悪い残留性環境汚染物質であり、強力な発生・生殖毒性物質でもあります。これらの物質は食物連鎖の中で蓄積し、身体組織に長期にわたって存在し続けるので、これらの物質、特に TCDD 類による発生への影響が公衆衛生上の強い懸念を引き起しました。次のスライドをお願いします。

もっとも重要なコンジナーである TCDD のヒトにおける半減期は 7 年から 10 年の範囲です。次のスライドをお願いします。

私たちはダイオキシンから学びました。ダイオキシンの成体へのリスクの情報は、胎児、乳幼児、小児へのリスクについてはほとんど何も語っていません。機能へ影響をもたらすのは、胎内で曝露した場合であることがほぼ断言されています。

そこで、行動学的測定には発生神経毒性物質による機能への影響を評価するのに有用な多様なエンドポイントが含まれていますので、我々は胎内で TCDD に曝露した子世代の行動について注目しました。脳発達の感受期においては、この複雑な変化の過程におけるちょっとした攪乱でも、行動に恒久的な変化をもたらすことがあります。次のスライドをお願いします。我々は、妊娠第 18 日 (GD18) と第 8 日 (GD8) にさまざまな濃度の TCDD に曝露させた子世代について調べることにしました。これは、今日までに我々の研究室が実施してきたプロジェクトの一覧です。次のスライドをお願いします。

ライス先生のチームは、ある実験条件下において、TCDD 関連物質がサルとラットの行動を変化させることを報告しました。複数の神経行動試験によって、TCDD に胎内曝露すると雄子個体の性行動が脱雄化することが示されています。これは、発生時の感受期において内分泌攪乱作用のある毒性物質に曝露することで中枢神経系の構造が変化するためです。次のスライドをお願いします。

行動奇形学においては、発達中の神経系と、毒性物質曝露に対するその感受性がもっとも重要視されます。TCDD へのその他の曝露による動物行動への影響を調べるために、我々はスケジュール制御オペラント行動という実験手法を用いました。

これは、実験心理学の一分野である行動分析を用いた手法です。特定の実験条件下で現われる行動に着目します。また、条件の変更の前と後での行動の変化にも着目します。この手法を用いると、行動パターンの理解や予測が可能になります。こうした行動変化の中には、性特異的であるものも少なくなく、思春期になるまで顕在化しないものもあります。次のスライドをお願いします。

性特異的な行動の一例として、雌ラットでの一日あたりの総自発運動量があります。回し車実験法においては、成体雌ラットによる車の回転速度に発情周期に応じて 4~5 日の周期があります。回し車は、化学物質による影響を調べる指標としてきわめて高感度であるとされています。これが回し車装置です。ここにレバーがあります。次のスライドをお願いします。

我々は妊娠ホルツマンラットを、妊娠 18 日において 0、20、60、180 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を単回経口投与で曝露させました。その子世代の雌が成体になってから、回し車実験の対象としました。この実験法はインクリメンタル FR 法と言い、我々の研究室で開発したものです。FR 値というのは、被験動物が報酬を得るのに反応を何回しなければならぬかを表わしています。

例えば、FR5 強化スケジュールでは、被験動物は 5 回反応すると、報酬として餌ペレットか飲水をある時間の間もらえます。我々の方法では動物はレバーを特定の回数押すと、短い時間だけ回し車を回す機会が与えられます。

FR1 強化スケジュールで反応がいったん開始されれば、レバー押しの FR 強化を 5 セッションごとに、FR2、3、5、10、20、そして FR30 にまで増やしていきます。この増強によって、実験条件の変化に反応して見られる一時的なパフォーマンスを調べることが可能になります。

一時的なパフォーマンスは、周囲環境の変化に対する被験動物の学習、順化、補正の能力を反映しているもので、特に興味深いものです。この試験では、発情周期を追跡するために、各行動セッション終了後に膣の細胞も調べました。次のスライドをお願いします。

それぞれの FR 値において、TCDD への胎内曝露によって有意な用量依存性の低下が起きました。その数字は、獲得できた走る機会数の相対比で、3 つの胎内曝露群のパフォーマンスを、対照群のパフォーマンスに対する百分率として表現しています。その他の変数も、同様の行動傾向を示しています。動物の回し車反応への発情周期による影響はありませんでした。次のスライドをお願いします。

すべての FR 値において一貫した用量反応関係がありましたので、我々はこの行動データを利用し、二次方程式近似による用量反応関数で求められた ED01 と ED10 のモデル上のゼロ用量パフォーマンスからの置換に基づいて、ベンチマーク用量を算出しました。獲得走行機会に対する ED10 の平均ベンチマーク用量は $10.13 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。ED01 では $0.98 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。次のスライドをお願いします。

もう一つの変数である総回転数の ED10 の平均値は、計算により $7.32 \mu\text{g}/\text{kg}$ となりました。同様に ED01 では $0.71 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。これらの値は、現在のヒトの体内量の観点で見する必要があります。その値は平均して、TCDD 毒性当量として $13 \mu\text{g}/\text{kg}$ だとされています。そして我々の得た値はそれに近いものです。次のスライドをお願いします。

次に、我々が行ったもう一つの行動試験である GD8 からの曝露試験を示します。これは、同腹仔の雄と雌のスケジュール制御オペラントパフォーマンスを調べたものです。ここでの実験タスクはレバー押しです。これが実験に用いたチャンバーです。ラットが特定の回数もしくは時間間隔でレバーを押すと、報償として給餌器から餌ペレットが貰えます。ラットがレバーを押すとここからペレットが出てきます。次のスライドをお願いします。

TCDD が 2、20、60、 $180 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量群を用いました。2 種類の異なるオペラント法で、子世代の雄と雌の行動を測定しました。生後 90 日に、1 つ目のオペラント法であるインクリメンタル FR スケジュールを開始しました。FR 値を、セッション 4 回ごとに 1 から 71 まで漸増させました。その後は、逐次変更する化学物質で、複数のスケジュールがあります。

この試験は「低反応率分化強化(DRL)10 秒」というスケジュールです。それに FR11 を組み合わせた複合スケジュールです。DRL10 秒スケジュールでは、反応と反応の間が 10 秒間以上あいていなければなりません。したがって、DRL スケジュールの下では、低反応率の反応の方が、ペレット供給を高率に受けることになります。

それに対して、FR スケジュールの下では、高反応率の反応の方がペレットの供給を高率に受けることになります。オペラント行動試験の数多くの報告によると、FR スケジュールの下では正常の雄ラットは雌よりも高い反応率を示す傾向があります。その反対に雌は、DRL スケジュールの下で雄よりも効率よく反応します。次のスライドをお願いします。

これらの数値は、複合スケジュールにおける FR 部分での雄と雌の平均反応率を表わしたものです。DRL 部分とインクリメンタルスケジュールでの行動傾向はこの数値と同じでした。左側が雄で、右側が雌です。白い点が対照群で、黒い点が曝露群です。

DRL 部分とインクリメンタル FR のどちらにおいても、TCDD によって性的二型性反応パターンが現われました。雄では、3 つの TCDD 曝露群すべてが、対照群よりも低反応率で反応しました。それに対して雌では、3 つの TCDD 曝露群すべてが、対照群よりも高反応率で反応しました。

複合強化スケジュールでは、雄と雌との反応率の差を用いて、二次元多項式近似による用量作用関数で求められた ED01 と ED10 のモデル上のゼロ用量パフォーマンスからの置換に基づいて、ベンチマーク用量を算出しました。次のスライドをお願いします。

これは、FR および DRL のパフォーマンスにおける雄と雌のスコア差のベンチマーク用量です。FR の反応率においては、ED10 平均値は $2.77 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。ED01 は $0.27 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。DRL においては、ED10 が $2.97 \mu\text{g}/\text{kg}$

で、ED01 は $0.30 \mu\text{g}/\text{kg}$ でした。これらの値は、ヒト体内量の TCDD 毒性当量としての現行の推定値である $13 \mu\text{g}/\text{kg}$ に近いものでしたが、それよりは下回っています。

次に、GD18 と GD8 に曝露させた 2 つの動物群の脳形態のデータを少しお見せします。この研究は、TCDD に胎内曝露した子ラットにおいて同様の変化が観察されるかどうかを調べたものです。次のスライドをお願いします。

ヒトや動物においては皮質の優位性に性的二型性のパターンがあることがよく知られています。雄は、雌よりも強い右優位性を示す傾向があり、雌は典型的には明らかな半側優位性を示さず、雄よりも左半球への偏りが大きくなっています。次のスライドをお願いします。

ステロイドホルモン、ストレス、環境複合要因などの数多くの要因も、正常脳の皮質優位性に影響を及ぼす可能性があります。環境汚染物質などの要因については、これまで十分に研究されてこなかったもので、我々は TCDD がラットの皮質の厚さに及ぼす影響について調べてみることにしました。次のスライドをお願いします。

野生の鳥類の研究では、TCDD および関連物質への曝露が、脳の非対称性発現の要因の一つである可能性が示されています。ニワトリ胎児を低用量の TCDD に卵内で曝露させると、発達中のニワトリにおける脳成長時の非対称性発現の頻度と程度の両方が、用量依存的に増加します。次のスライドをお願いします。

我々は、対照動物と $180 \mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露した動物の脳を調べました。データの採取は、GD18 については 10 ヶ月齢で、GD8 については生後 90 日で行いました。同腹仔あたり雄・雌 1 頭ずつから脳を摘出しました。Paxinos と Watson のアトラスに従って、前頭断 3 箇所を採用しました。これらの切片には、Craig の皮質領域に相当する部分が含まれています。これがその 8 つの領域で、1、2、3、4、5、6、7、8 となっています。これら 8 領域を、2 人の観察者によって測定しました。次のスライドをお願いします。

これがその脳の写真です。我々は、ここからここまでの厚さを、一領域につき 3 回測定し、右半球と左半球の差を算出しました。GD18 と GD8 の両方において、 $180 \mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD への胎内曝露によって脳の半側優位性にいくつかの変化が現われました。次のスライドをお願いします。

これは、GD18 で曝露した雄の結果です。右側が対照群で、左側が曝露群です。このように対照群と曝露群とで線の向きが違っているものは、半側優位性が逆転していることを意味しています。このデータでは右から左を引いて計算しているように、0 ポイントから見て右側が左側よりも大きくなっています。雄の GD18 では、8 領域のうち 6 領域が逆転していました。こうした変化パターンからは、脳の脱雄性化の過程のあったことが想定されます。

雌の脳では、特定の方向性を持たない皮質の半側優位性に明らかな変化は見られませんでした。次のスライドをお願いします。

これは、GD8 で曝露した雌のデータです。注意してご覧ください。対照群のデータがこれで、曝露群のデータがこれです。GD8 で曝露した雌には、8 領域中のほとんどである 7 領域で脳の半側優位性の逆転が見られました。雄もやはり半側優位性の逆転が見られましたが、雌ほど明白なものではありませんでした。次のスライドをお願いします。

スケジュール制御オペラント行動の結果として、我々はこのような結論を得ました。すなわち、回し車の実験からは、TCDD への GD18 における胎内曝露によって用量依存的にオペラント反応が有意に減少しました。レバー押し試験の結果は、性的二型性の反応パターンを示しました。次のスライドをお願いします。

脳の形態からは、TCDD への胎内曝露によって、ラットの皮質の非対称性に性特異的な変化が現われました。TCDD に GD18 で胎内曝露した雄は、分析対象とした領域のほとんどで皮質の優位性が逆転しました。GD8 曝露では、雄と雌の両方に皮質非対称性の変化が見られ、雌の方が逆転がはっきりしていました。

GD18 と GD8 と間に見られた違いは、いくつかの条件の差に由来する可能性があります。系統の違い、曝露期間の違い、標本採取の違いが、その条件の一つとして考えられます。まとめると、TCDD への胎内曝露はたとえ低用量であっても、動物の行動と、脳の非対称性パターンに影響を及ぼすということです。ご静聴ありがとうございました。

質疑応答

質問：この分野では素人なので非常に初歩的なご質問で申し訳ないのですが、特定の化学物質と脳、神経系の形成なり何なりとの関連についてです。通常生物由来のホルモンの投与によって、脳の構造がどのように変わるかという比較をしないと、特定の化学物質のホルモン攪乱作用による脳の発育の不全なのか、あるいはその化学物質が持っている特定の分子構造による脳の形成の異常なのか。そこはどうかたちで区別されるのでしょうか。

北條：今、私たちは脳のモルフォロジーのプロジェクトを始めただけで、大脳皮質の厚さと細胞の数を数えるということのスタートから始めて、そしてエクスポージャーの日にちやサンプリングのデートを変えることによって、もし一連の一貫したデータが出てきはじめたら、もっと細かいところにまで行こうと思っています。しかし、現在のところまだ始めたばかりなので、そこら辺は勉強中というか、準備中です。

ご指摘ありがとうございます。

回答：少し補足させていただきますが、性ホルモンによる脳の中のダイモルフィズムというのは大体確立されておりまして、ある時期に性ホルモンを投与すると脳の構造がこうになるというのは、大体わかっております。

質問：今言われたことと同じことなのですが、実験の方法論として、例えば特定の行動奇形の現象をとるとすれば、今言ったように、それが通常の性ホルモンによる影響だとどういふかたちが出てきて、特定の化学物質だとどういふ影響が出てきて、それがホルモンの攪乱作用によるものなのか、あるいは特定の分子構造によるものなのか。そここのところをやはり分けて議論しないとイケない。みんな内分泌攪乱物質問題ということでメディアの脚光は浴びますが、その辺はきちっとサイエンスとしては区別すべきではないかという気がします。

北條：ありがとうございます。

質問：皮質の厚さについては、どちらかと言えば、大人になったときの性ホルモンの分泌に依存する非不可逆的なものだと私は思っていたので、先程のデ

ータのときの生体内の性ホルモン濃度、特にエストロゲン濃度を測定されているかどうか興味があるので、教えていただければと思います。

北條：特別エストロゲンの濃度は、測っております。

質問：例えば、いわゆる性的二型核などは、胎生期・新生児期の特にラットにおいては、性ホルモンの不可逆的な影響というのは言われています。皮質についてはたくさん文献を出しておられ、私が知っているものでは、大人になってからの性ホルモン濃度の違いによるもので、性腺を摘除したときには、性差、雌における雄との違いがなくなってしまうと伺ったことがあったのです。ただ、私もその分野についてはそんなに文献を調べているわけではないので、もしかしたら私の偏った知識かもしれないのですが。

北條：すみません。もう少しゆっくり。

質問：ごめんなさい。私が前に脳の性分化についての本を読んだとき、いわゆる脳の性的二型性には何種類かあると。1 つには、胎生期から新生児期にかけての性ホルモンの、特に哺乳類においては精巣から出るテストステロンによる性分化が、不可逆的に子どもの脳を雄化する。専門家の先生は当然ご存じだと思いますが、雌において、もし胎生期や授乳期に性ステロイドを投与すると、雄化になってしまうというのが、環境ホルモン問題においても重要なわけです。皮質についての性分化は、そういった不可逆的なものというよりは、大人になったときのそれぞれの精巣や卵巣から出てくるステロイドホルモンの容量に依存すると伺ったことがあったのです。

北條：それはそう思いますが、私の実験で興味深い点は、エクスポージャーのデートによって、GD18とGD8とエクスポージャーを変えた場合、脳の偏向性が逆のパターンで出ているのです。それで大人になってから変わったのではないかと、変わるのではないかと推測をすると、そのGD8とGD18の逆のパターンの、どちらが雄と雌で、どちらに明らかかな差があるかということの違いが、説明できなくなってしまうのです。もしかしたら大人になってか

らのということではなくて、エクスポージャーするデータの違いによってもう少し明瞭に、もっと前に不可逆的な違いが起こっているのかもしれないです。

でも、まだはっきりそこら辺はわかっておりません。

質問：ありがとうございます。ついでにもう一つ質問なのですが、皮質ということで一括して取っていらっしゃる部位は特定しておられ、あれは海馬の少し上ですから、たぶんファリエタル・ローブだと思うのですが、ほかの部位についての検討は考えていらっしゃいますでしょうか。

北條：はい。視床下部。海馬と、あとSDN-POAという部位もやってみようと思って、実際にやったのですが、海馬 (*hippocampus*) の方はあまり差が出なくて、性的二型核の方に関しては、あのような染色でしたので場所を特定できないという問題が生じまして、同じスライドではまだやっておりません。

質問：ちなみにAVPVAのPOAについては見ていらっしゃいますか。

北條：いえ、まだです。

鯉淵：申し訳ありません。時間の方が押しておりますので、あとはフロアでお願いします。

質問：最後のエストロゲン・レセプターとの関係で、議論をどの程度なさっているか。そのデータがあるかないかを聞きたいです。

北條：脳のプロジェクトに関しては、本当にまだ始まったばかりで、今、私たちのラボの中でそれをどうするかを検討している最中です。

質問：ぜひとも、ERも一緒にそろえていただきたいと思います。

北條：ありがとうございます。

質問：すみません、一つだけ。ただいまの皮質の問題なのですが、北條先生が見ておられた一番脳の後ろの部分というのは、視角皮質 (*visual cortex*) に当たると思うのです。こちらの方は、エストロゲンよりも、むしろアンドロゲン・レセプターが関与し

ていると思いますので、エストロゲン・レセプターだけではなくて、そういうところも見られるという意味で非常に興味深いと思います。

北條：ありがとうございます。

鯉淵：それでは、時間になりましたので、次の講演者の方に進まなければなりません。

北條：ありがとうございました。

鯉淵：北條博士、ありがとうございました。