

内分泌攪乱化学物質ノニルフェノールの学習記憶を
主としたラット中枢神経機能に及ぼす影響についての研究

2014年12月

長崎大学大学院 生産科学研究科

川口 進一郎

目次

序論	1
第1章 低用量 NP 周産期曝露が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響	
1. 実験材料および実験方法	
1.1 実験動物	3
1.2 使用薬物	4
1.3 行動実験	
1.3.1 MAZE test	4
1.3.2 Step-through passive avoidance test	7
1.3.3 Open-field test	8
1.3.4 Elevated plus-maze test	9
1.4 統計学的処理	9
1.5 実験スケジュール	10
2. 実験結果	
2.1 MAZE test	11
2.2 Step-through passive avoidance test	13
2.3 Open-field test	14
2.4 Elevated plus-maze test	16
3. 考察	17
第2章 成獣期ラットへの NP 経口投与が学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響	
1. 実験材料および実験方法	
1.1 実験動物	20
1.2 使用薬物	21
1.3 行動実験	
1.3.1 MAZE test	21
1.3.2 Step-through passive avoidance test	23
1.3.3 Open-field test	23
1.3.4 Elevated plus-maze test	23
1.4 統計学的処理	23
1.5 実験スケジュール	24

2.	実験結果	
2.1	MAZE test	25
2.2	Step-through passive avoidance test	29
2.3	Open-field test	30
2.4	Elevated plus-maze test	34
3.	考察	35
第3章 NP海馬内微量注入が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響		
1.	実験材料および実験方法	
1.1	実験動物	37
1.2	使用薬物	37
1.3	ガイドカニューレ植え込み手術	38
1.4	薬物微量注入	38
1.5	行動実験	
1.5.1	MAZE test	38
1.5.2	Step-through passive avoidance test	40
1.5.3	Open-field test	40
1.5.4	Elevated plus-maze test	40
1.6	統計学的処理	40
1.7	実験スケジュール	41
2.	実験結果	
2.1	MAZE test	42
2.2	Step-through passive avoidance test	44
2.3	Open-field test	45
2.4	Elevated plus-maze test	47
3.	考察	48
	総括	50
	参考文献	52
	謝辞	57

序論

我々の身体はホメオスタシスにより内外の環境因子の変化に対応しながら、生体内環境を一定の状態に維持することが可能であり、ホメオスタシス維持するために神経系およびホルモンが重要な役割を担っている。環境中に存在する天然物、合成化学物質には内因性ホルモンの作用を模倣、または逆に阻害するような物質が存在し、内分泌攪乱化学物質と呼ばれている。

非イオン界面活性剤である nonylphenol ethoxylate (NPE)の原料および分解産物である nonylphenol (NP)はフェノールにノニル基が結合したもので、内分泌攪乱化学物質の1つである。NPEはゴム、プラスチック、機械・金属工業において洗浄剤、乳化剤、重合剤として使用されており、自然観環境中で微生物によりNPへ分解されることが報告されている¹⁻⁴⁾。

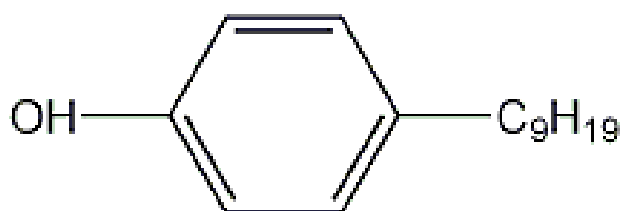


Fig. 1. Nonylphenol.

NPは弱いエストロゲン活性を有していることが報告されており^{5,6)}、生殖系、免疫系への影響に関する多くの研究が行われている。ラットにおけるNP多世代曝露が腎臓、肝臓構造の変化、膈開口の遅延、性周期異常、精子数減少を引き起こすことが報告されている^{7,8)}。また出生前NP曝露が仔ラットの精子数、1日精子生産数、精子活性、を減少すること⁹⁾、免疫細胞の発達および機能に影響を及ぼすこと¹⁰⁾、新生児期NP曝露が雄性ラットの生殖能力を低下させる¹¹⁾という報告がある。一方で、新生児期NP曝露がラットの生殖機能へ影響を及ぼさないという報告もある^{12,13)}。

報告例としてはまだ少ないがNPが中枢神経系に及ぼす影響について調査した研究もある。それらには、出生前NP曝露が雄性仔ラットの神経行動発達および学習記憶を阻害すること⁹⁾や、対照的にNP周産期曝露が雄性仔ラットの一般活動性、学習記憶へ影響を及ぼさないこと¹⁴⁾が報告されている。このため、NPの中枢神経系に及ぼす影響についてはまだ明解にされておらず、さらなる議論の余地がある。

我々は以前の研究で内分泌攪乱化学物質の1つであり、非常に弱いエストロゲン活性を有する bisphenol A (BPA)の周産期曝露が雄性仔ラットの中枢神経機能に及ぼす影響について調査し、低用量BPA (50 µg/kg)が雄性仔ラットの空間学習記憶を低下するが高用量BPA (500 µg/kg)は影響を及ぼさないこと¹⁵⁾、また成獣雄性ラットへの低用量BPA (50 µg/kg)経口投与は自発運動活性を低下させ、高用量BPA (10 mg/kg)経口投与は軽度の抗不安作用を示したが、成獣期のBPA経口投与は雄性ラットの空間学習記憶能および体験型学習記憶能にはほとんど影響を及ぼさないこと¹⁶⁾を報告した。しかしながら、NPについては、前述の齧歯類の生殖系^{7-9,17)}、中枢神経系^{7,13,14)}

に及ぼす影響を調査した研究ではほとんどが 10 mg/kg 以上の用量を用いており、低用量 NP 周産期曝露が及ぼす影響については明確になっていない。そこで本研究では、低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について結論を得るべく、各種行動実験を用いて詳細に評価し、その結果を本論文の第 1 章で述べた。

また、NP の中枢神経系への影響を調べた報告はほとんどが周産期曝露の影響を調べており、成獣動物へ直接 NP 曝露を行いその中枢神経系への影響を調べたものは少ない。慢性 NP 経口投与が雄性マウスの探索行動、学習記憶を低下させるという報告¹⁷⁾があるが、NP 経口投与が雌雄成獣ラットの中枢神経系へ及ぼす影響については報告されていない。そこで、本研究では、低用量 NP 経口投与が成獣ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について調査し、その結果を本論文の第 2 章で述べた。

脳卒中易発症高血圧自然発症ラット(SHRSP)への一過性脳虚血は、脳虚血後の興奮性アミノ酸の過剰放出とそれに伴う細胞内カルシウム濃度上昇に起因する神経細胞のアポトーシスによって、海馬の CA1 錐体細胞を破壊することが知られている^{18, 19)}。この一過性脳虚血処置により、SHRSP の場所学習記憶が低下することが報告されており²⁰⁾、海馬は学習記憶において重要な役割を担っている脳部位である。そのため、成獣雄性ラットの空間学習記憶能への NP の影響をより明確にするために、学習記憶に重要な役割を果たしている脳部位である海馬への NP 微量注入が学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について調査し、その結果を本論文の第 3 章で述べた。

第 1 章

低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの学習記憶を主とした 中枢神経機能に及ぼす影響

本章では、中枢神経機能の発達において重要な時期である胎児期および新生児期の胎盤経由および母乳経由での NP 曝露が、成長後の雄性ラットの中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。NP 周産期曝露が成長後の仔ラットの行動に様々な影響を及ぼす可能性が示唆されているが、報告の数も少なく、一貫性も乏しい。我々は以前の研究で、NP と同様に内分泌攪乱化学物質の 1 つであり、非常に弱いエストロゲン活性を有する BPA の周産期曝露の影響について調査し、低用量 BPA は雄性仔ラットの空間学習記憶能を低下するが高用量 BPA は影響を及ぼさないことを報告した¹⁵⁾。さらに、NP 周産期曝露による生殖系、中枢神経系への影響評価の研究では多くの場合 10 mg/kg 以上の用量が用いられており、低用量 NP 周産期曝露の影響は明確になっていない。一般的に中枢神経系は末梢器官よりも低用量で影響が現れることが多いため、本実験は低用量 NP 周産期曝露の学習記憶を主とした中枢神経系に及ぼす影響について結論を得るために行った。

本実験で使用した NP の用量は、次世代の生殖系において無毒性量 (NOAEL)⁸⁾である 10 mg/kg およびその 1/10 である 1 mg/kg を用いた。また、NP 曝露の主な経路は食品ならびにプラスチック・ゴム製品などからの経口摂取であるため、本研究では投与方法として経口投与を選択した。出生前の母ラットに NP を投与した場合に、胎児の血中および脳内で NP が検出されており²¹⁾、血液胎盤関門を NP が通過し、胎児へ移行することが明らかになっている。また、出産後の母ラットへの NP 経口投与が仔ラットへ影響を及ぼすため、母乳経路で新生児ラットへ NP が移行すると推察されると報告されている²²⁾。さらにヒトの母乳から NP が検出されており^{23,24)}、したがって、本実験では母ラットへ慢性的に NP 経口投与したため、仔ラットは胎盤および母乳経路で NP 曝露され、仔ラットの脳内へ NP が移行すると推測される。

そこで本章では、低用量 NP 周産期曝露の学習記憶を主とした中枢神経機能への影響を調査するために、MAZE test を用いて空間学習記憶能を、Step-through passive avoidance test を用いて体験型学習記憶能を、Open-field test を用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus maze test を用いて不安様行動を評価した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1 実験動物

実験には、妊娠 6 日目で購入した Sprague Dawley 系雌性ラット (SD ラット : 九動産) とその雄性仔ラットが使用された。動物は、温度 22±2 °C、湿度 50±10 % に調節された 12 時間明暗サイクル (午前 7 時点灯) の動物飼養保管実験室内で飼育管理し、プラスチック製ケージ (縦 : 42.0 cm × 横 : 25.0 cm × 高さ : 18.5 cm) で 1 ケージあたり 3 匹の群飼育を行った。母親には餌 (固形飼料 F2 :

株式会社 船橋農場)と水は自由摂取させ、妊娠 10 日目に体重差が無いように 3 群 (Control 群 2 匹、NP 群各 3 匹)に分け、妊娠 17 日目から個別飼育した。

仔ラットは出生後 3 日目に一腹あたり 10 匹になるように間引き調整され、出生後 20 日目に離乳、さらに 4 週齢時に雌雄分別され、1 ケージあたり 4 匹の群飼育が行われた。本実験では、雄性仔ラットを使用するため間引きの際は可能な限り雄性仔ラットを残し、雌性仔ラットの数を調整することによって一腹あたり 10 匹になるようにした。6 週齢時に各群の雄性仔ラットを無作為に選び、MAZE test に用いるラット (各群 6 匹)と他の行動実験に用いるラット (各群 6 匹)に分け、1 ケージあたり 3 匹の群飼育が行われた。このとき、各母親由来の仔ラットの数ができるだけ均等になるようにした。MAZE test で用いる雄性仔ラットは、報酬に対するモチベーションを高めるために、6 週齢時から給餌・給水制限 (餌 : 約 12 g/匹/日、水 : 約 33.3 ml/匹/日)が開始され、過度の体重制限を避けるため、週に 1 度給餌・給水制限を緩和した。MAZE test 以外の行動実験に使用した雄性仔ラットは実験測定期間を除き、餌と水は自由摂取させた。

なお、本実験はすべて長崎大学動物実験規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物はノニルフェノール (4-nonylphenol:NP:関東化学株式会社)を使用した。NP は corn oil に溶解させ、濃度 1 mg/kg、もしくは 10 mg/kg を経口ゾンデにて 1 ml/kg の割合で経口投与し、対照群 (Control 群)には corn oil のみを同様に 1 ml/kg の割合で経口投与した。なお、経口投与はストレス負荷を回避するために、ハロタンによる軽度の麻酔をかけた後に行ない、被験薬物は母ラットに対し、妊娠 10 日目より出産後 14 日目まで投与した。

1.3 行動実験

1.3.1 Appetite-motivated maze test (MAZE test)

空間学習記憶能の測定には、可変式迷路装置 (Fig. 1-1)を用いた。本装置は、90 cm×90 cm の正方形に 15 cm×15 cm の正方形が連結した底面で、高さは 50 cm、内面は白色である。縦×横 : 50 cm×15 cm、50 cm×30 cm、50 cm×45 cm、50 cm×60 cm の各種しきりを組み合わせて 3 段階の難易度の MAZE (MAZE (A)、MAZE (B)、MAZE (C))を作り上げた。

装置の底面上 1 m の高さに 100 W の白色光を 3 台置き、装置内はくまなく一定の照度が保たれるようにし、ゴールまでの道筋を記憶するための目印として装置壁面上部 4 箇所形異なるシールを貼った。ゴールには報酬としてミルク (20 g のコンデンスミルク (雪印乳業株式会社)に 100 ml の水道水を加えたもの)を置いた。

実験準備として、雄性仔ラットが 7 週齢時に、実験装置および報酬への「慣らし」を行った。MAZE test では、まず 1 日目に正解通路を学習させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたり空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。本実験では、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、報酬を置いたゴールにたどり着いた後、自由に報酬を摂取させ、ここまでする 1 trial とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。また、次の trial に影響を及ぼさないように各 trial 終了後に装置を雑巾できれい清掃した後で次の trial を行っている。雄性仔ラットが 8 週齢時に MAZE

(A) test を、10 週齢時に MAZE (B) test を、12 週齢時に MAZE (C) test を行った。

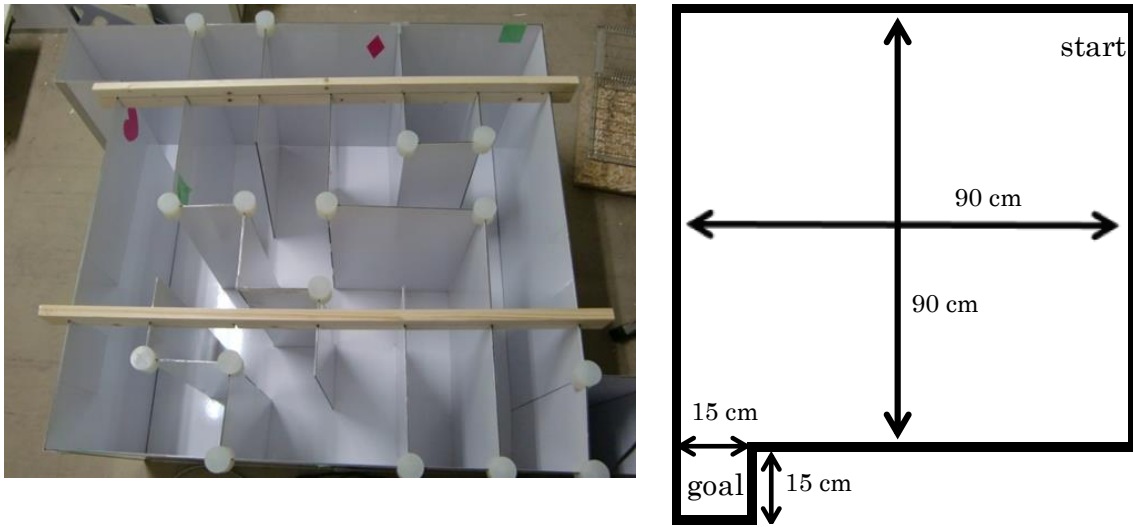


Fig. 1-1. 可変式迷路装置

① 慣らし

ゴールを塞いだ可変式迷路装置を 4 等分に仕切り、1 エリアに 1 匹のラットをスタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、装置及び報酬に慣れさせた (Fig. 1-2)。1 session あたり 3 trial を 1 日 2 session、3 日間連続して行い、session 間の間隔は 2 時間とした。1 trial の測定時間は 3 分とし、その間動物は自由に装置内を探索した。報酬はミルク 300 μ l とし、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

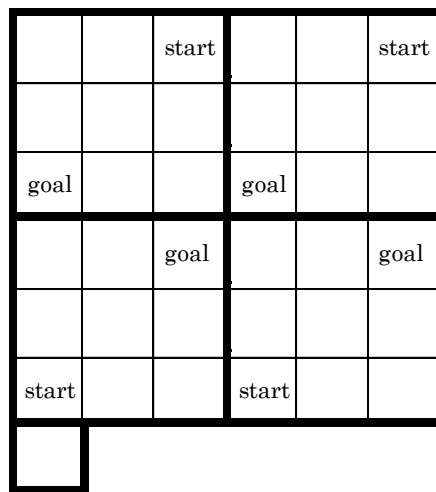


Fig. 1-2. 可変式迷路装置 (慣らし)

② トレーニング

各 MAZE test の正解通路以外の通路を塞いだ装置を用いて 3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導し、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃した。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

③ テスト

各 MAZE test の装置を用いて 1 日に 3 trial、トレーニングの翌日から 3 日間連続して行った (Fig. 1-3)。1 trial の最大測定時間は 5 分間、報酬はミルク 300 μ l とした。5 分経過してもゴールにたどり着けない場合はラットを棒でゴールまで誘導し、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃した。測定項目はスタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とエラーエリアへの進入回数 (Error) とし、Error はラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

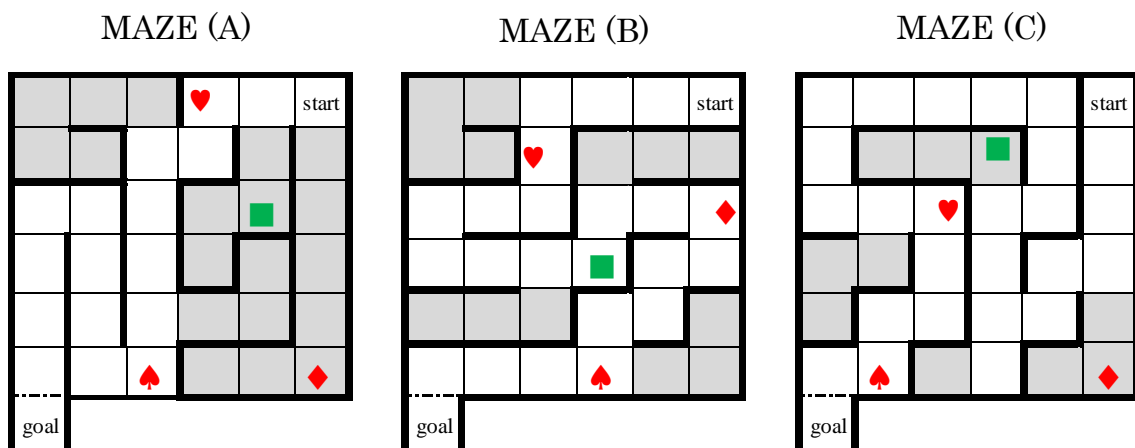


Fig. 1-3. MAZE test : 各々の MAZE におけるゴールまでの道のりはテストが進むにつれて複雑になっており、MAZE (A) → MAZE (B) → MAZE (C) の順で、ラットの空間学習記憶能を評価するために行われた。白い区画は正解通路を、グレーの区画はエラーエリアを表し、ゴールまでの道筋を記憶するための目印として、装置壁面上部 4 箇所形異なるシールが設置されている。

1.3.2 Step-through passive avoidance test

本実験では Step-through 装置を用いて、ラットの体験型学習記憶能を測定した (Fig. 1-4)。Step-through 装置は暗室 (30×30×30 cm)と明室 (10×20×12 cm)の2室で構成されており、その間には仕切りを上げ下げすることで開閉することができる通路 (8×8 cm)がある。床面には電気刺激を与えるグリッドが敷いており、フットショック (嫌悪刺激)を与えることが可能である。

本実験は連続した3日間で行われ、1日目に実験装置への慣らし、2日目に獲得試行、3日目に保持施行を行った。

1日目：慣らし

明室にラットを1匹ずつ入れ、10秒後に仕切りを開け、その後1分半の間明室と暗室を自由に探索させた。測定項目は、最初に明室から暗室へ移行するまでの時間 (Latency)とした。

2日目：獲得試行

明室にラットを1匹ずつ入れ、10秒後に仕切りを開けた。ラットは前日の慣らしの効果と暗い場所を好む性質のため、暗室に入ろうとする。ラットが暗室に入るとすぐ仕切りを閉めて、5秒間1 mAの電流を通し、フットショックを与えた。最大測定時間は5分とし、明室から暗室へ移行するまでの時間 (Latency)を測定した。

3日目：保持試行

明室にラットを1匹ずつ入れ、10秒後に仕切りを開ける。最大測定時間は5分とし、明室から暗室へ移行するまでの時間 (Latency)を測定した。

通常、電気刺激を不快に感じたラットは学習記憶するため、再び明室に入れても暗室に進入するまでの時間が長くなる。しかし体験型学習記憶能が低下していると、電気刺激を受けても明室から暗室に進入するまでの時間が短い。本実験は雄性仔ラットが11週齢時に行った。

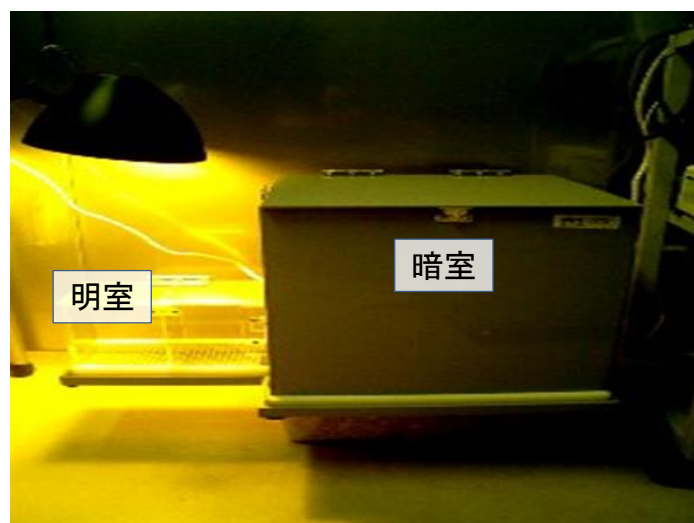


Fig. 1-4. Step-through 装置.

1.3.3 Open-field test

本実験では Hall²⁵⁾の Open-field 装置を用いて、ラットの一般活動性及び情動性を測定した (Fig. 1-5)。本装置は底面の直径 60 cm、壁の高さ 50 cm、壁の上縁の直径 80 cm のバケツ状のもので、内面は灰白色に塗ってあり、底面は黒ペンキで線を引き、ほぼ等面積の 19 区画に分けてある。装置の底面中央上 80 cm の高さに 100 W の白色光を置き、装置内はくまなく一定の照度が保たれるようにした。

本装置床面中央にラットを静かに置き、3 分間における Ambulation (locomotor activity : 自発運動量)、Inner、および Rearing (立ち上がり運動) および脱糞・放尿回数を測定した。Ambulation は装置底面の区画を横切る回数、Inner は内円の各区画を横切る回数をもって表した。ラットを Open-field 装置に入れると、装置の壁面に沿って注意深く行動をする習性を示すため、Inner よりも Ambulation から Inner を引いた回数の方が、通常状態では多くなるのが一般的である。しかしながら、情動性が低下すると Inner や Rearing 回数が多くなる。Ambulation は一般活動性、Inner は警戒行動、Rearing は探索行動の指標となる。本実験では、装置を置いてある部屋にラットを 30 分間馴化させた後、初回 (0 時間)、2 時間、4 時間の各時期にテストを施行した。本実験は雄性仔ラットが 7 週齢時に行った。

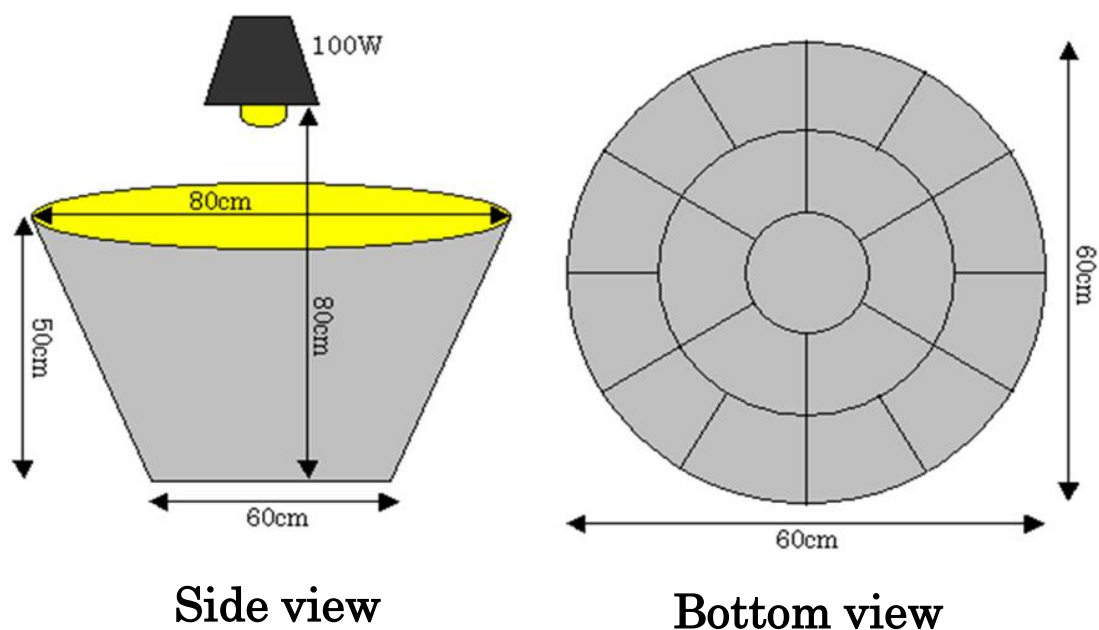


Fig. 1-5. Open-field 装置.

1.3.4 Elevated plus-maze test

本実験では高架式十字迷路装置を用いて、ラットの情動性（不安・恐れ）を測定した（Fig. 1-6）。高架式十字迷路は床から 60 cm の高さに設定している。中央部は正方形のニュートラルゾーン（14×14 cm）があり、各辺から歩行面（10×50 cm）が四方に延びている。歩行面のうち 2 本は壁面がなく（open arm）、残る 2 本は周囲を高さ 60 cm の壁面で囲まれている（closed arm）。

実験を行なう際に、ラットの頭が open arm の方向に向くようにしてニュートラルゾーンに乗せ、open arm と closed arm における進入回数と、滞在時間を 5 分間測定した。

通常であれば、ラットは高所で壁のない高架式十字迷路の open arm へ進入することは少ないが、情動性が低下し危険察知能力が低いラットは open arm への進入回数が増加し、滞在時間が長くなる。本実験は雄性仔ラットが 7 週齢時に行った。

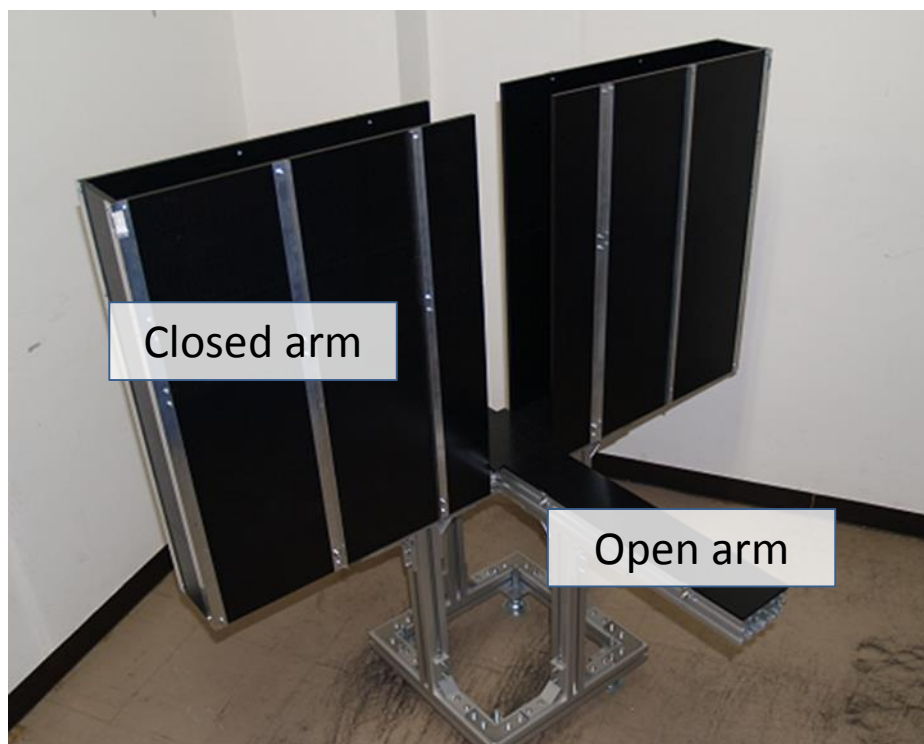


Fig. 1-6. 高架式十字迷路装置

1.4 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、一元もしくは二元分散分析（ANOVA）を行った後、Dunnett (Stat View 5.0, Microsoft) の多重比較検定を用いて解析し、危険度 5 % 以下を有意差ありとした。Elevated plus-maze test、Step-through passive avoidance test の結果は一元分散分析により解析され、MAZE test、Open-field test の結果は、二元分散分析により評価された。

1.5 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

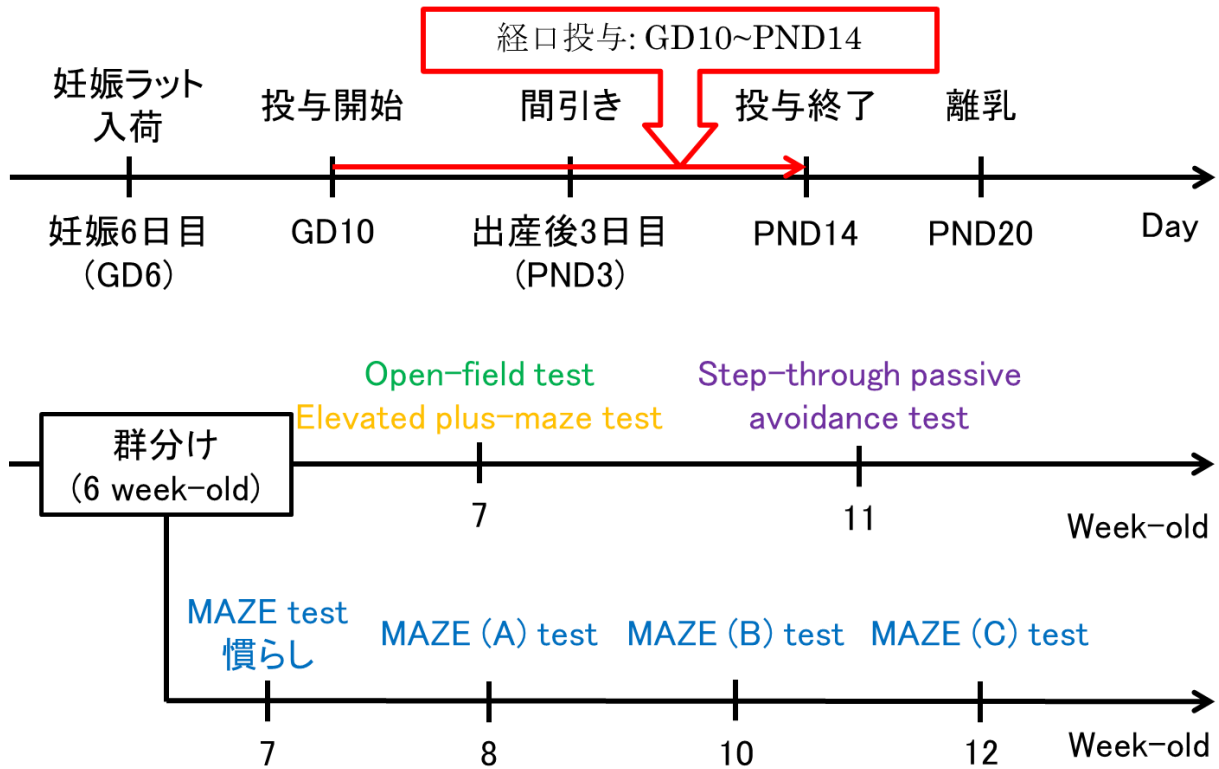


Fig. 1-7. 実験スケジュール

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 1-8, Fig. 1-9 は周産期に 1, 10 mg/kg NP、もしくは vehicle を曝露された雄性仔ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 1-8) および Error (Fig.1-9) をその平均値±標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールにある報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ は Control 群との間に有意差ありを、 $\dagger P < 0.01$ は 1 mg/kg NP 群との間に有意差ありを表す。

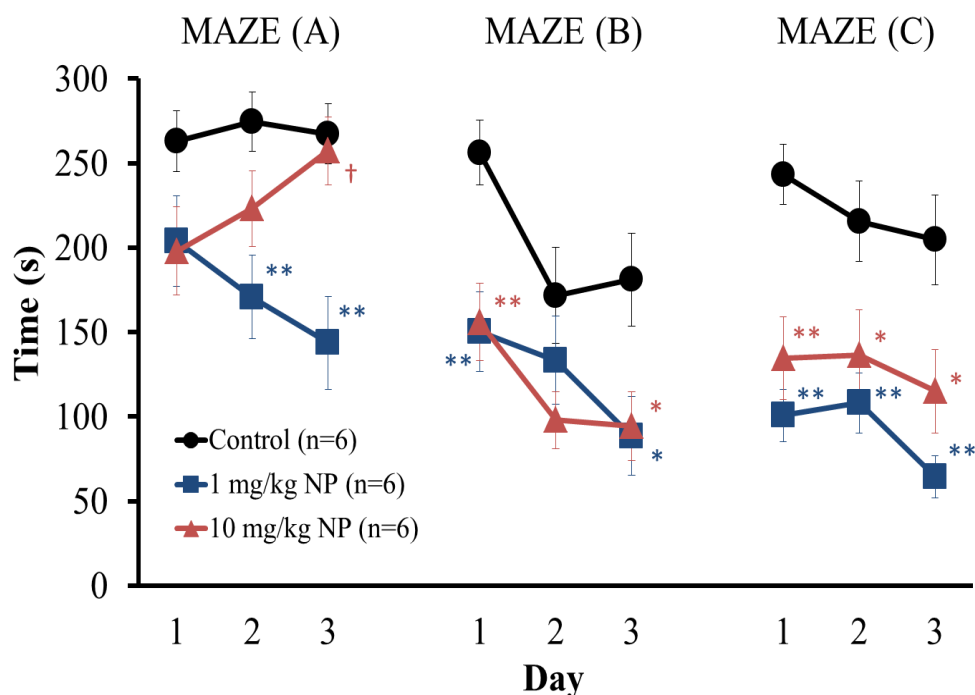


Fig. 1-8. MAZE test における日ごとの Time の推移

Control 群において、MAZE (A) test の Time は 3 日間とも大きな変化はなかったが、MAZE (B) test の Time は 1 日目に比べ 2, 3 日目では短縮し、MAZE (C) test では、日数の経過とともに Time が短縮した。

すべての難易度の MAZE test において、1 mg/kg NP 群の Time は、Control 群よりも短い Time を示し、MAZE (A) test の 2, 3 日目、MAZE (B) test の 1, 3 日目、MAZE (C) test の 3 日間で有意差が認められた ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。さらに、MAZE (A) test の 3 日目において、1 mg/kg NP 群は 10 mg/kg NP 群よりも有意に短い Time ($P < 0.05$)を示した。

MAZE (A) test において、10 mg/kg NP 群の Time は 1, 2 日目に Control 群よりも短い値を示したが有意差は認められなかった。MAZE (B) test および MAZE (C) test において、3 日間とも 10 mg/kg NP 群の Time は、Control 群よりも短い Time を示し、MAZE (B) test の 1, 3 日目、MAZE (C) test の 3 日間で有意差が認められた ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

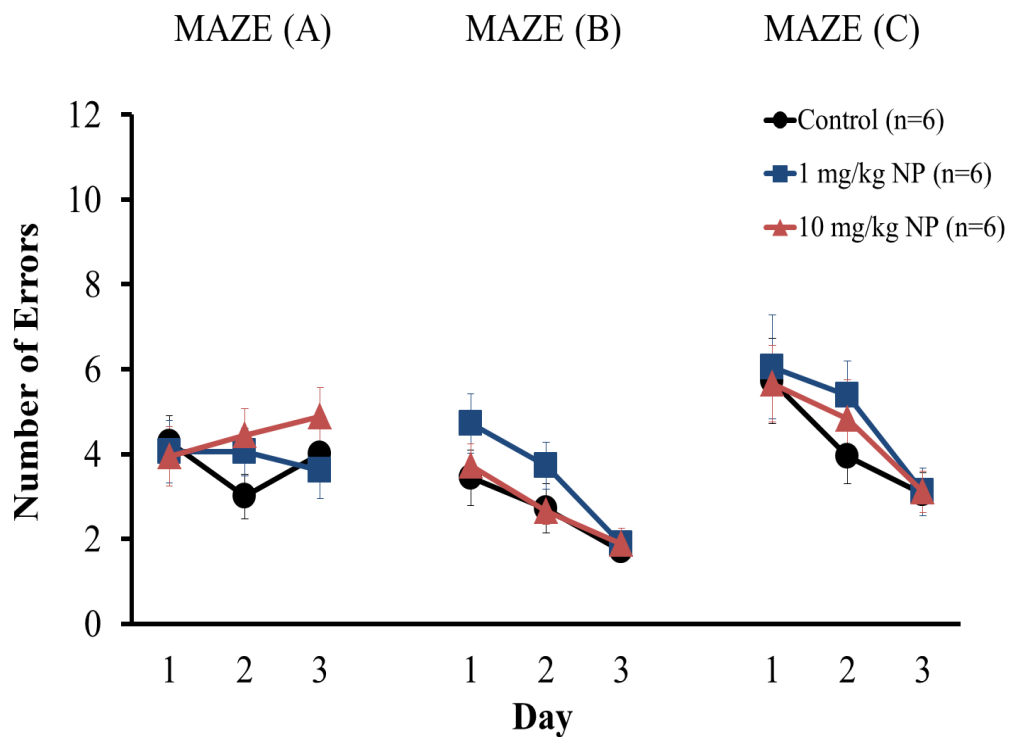


Fig. 1-9. MAZE test における日ごとの Error の推移

Control 群の Error において、MAZE (A) test の 2 日目に減少し、3 日目に増加したが、MAZE (B) test および MAZE (C) test では、日数を追うごとに徐々に Error は減少していった。

MAZE (A) test の 2 日目、MAZE (B) test の 1, 2 日目、MAZE (C) test の 2 日目において、1 mg/kg NP 群の Error は、Control 群よりも若干高い値を示したが有意差は認められなかった。

MAZE (A) test の 2, 3 日目において、10 mg/kg NP 群の Error は、若干高い値を示したが有意差は認められなかった。

2.2 Step-through passive avoidance test

Fig. 1-10 は、周産期に 1, 10 mg/kg NP、もしくは vehicle を曝露された雄性仔ラットの Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行の Latency をその平均値±標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。

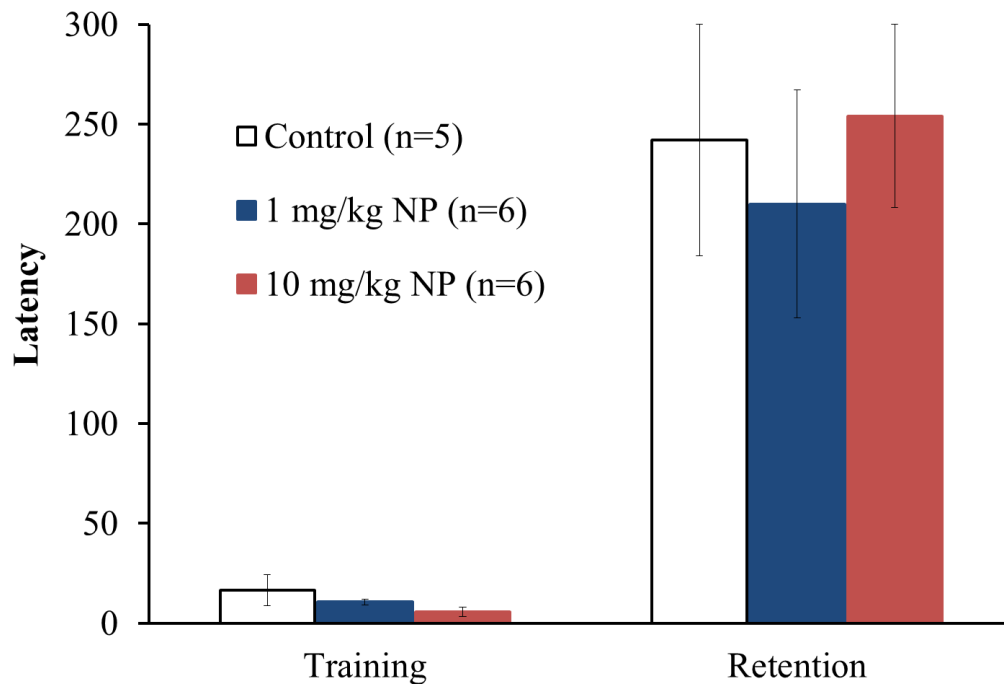


Fig. 1-10. Step-through passive avoidance test における Latency の推移

獲得試行において、NP 処置群の Latency は、Control 群よりも若干低い値を示したが有意差は認められなかった。保持試行において、1 mg/kg NP 群の Latency は、Control 群よりも若干低い値を示したが有意差は認められなかった。10 mg/kg NP 群は、Control 群とほぼ同様の Latency を示し、有意差は認められなかった。

2.3 Open-field test

Fig. 1-11, Fig. 1-12, Fig. 1-13 は、周産期に 1, 10 mg/kg NP、もしくは vehicle を曝露された雄性仔ラットの Open-field test における Ambulation (Fig. 1-11)、Inner (Fig. 1-12)、Rearing (Fig. 1-13) をその平均値±標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数、Rearing は立ち上がり行動の回数である。

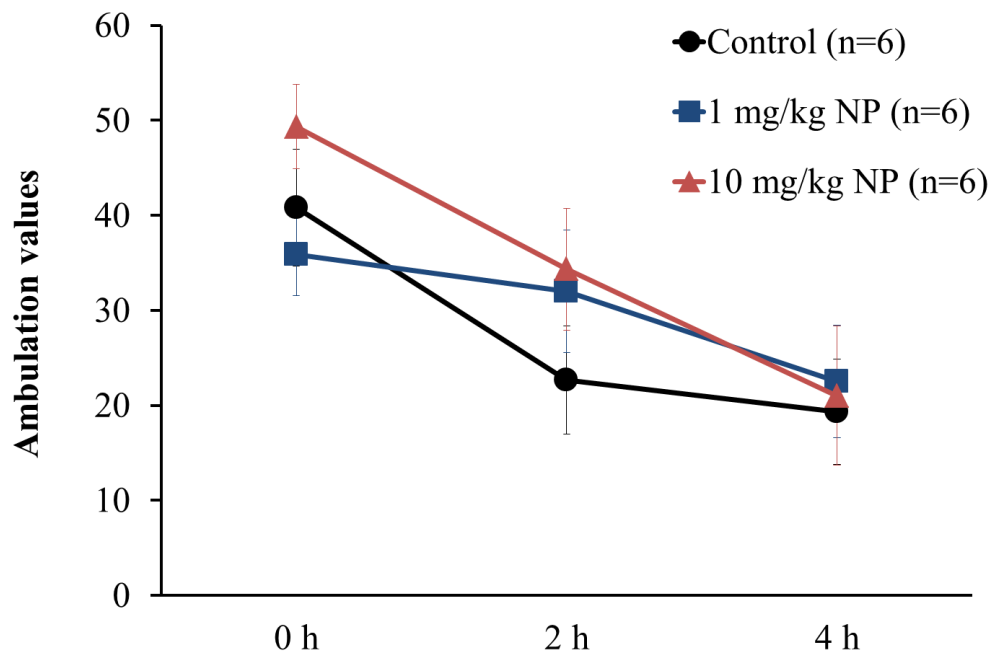


Fig. 1-11. Open-field test における Ambulation の推移

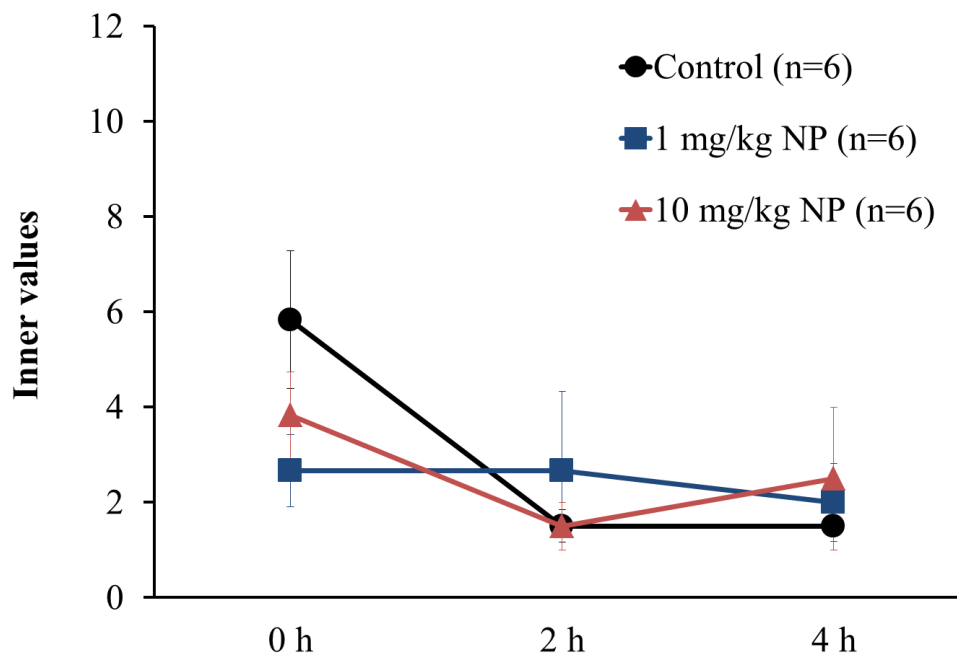


Fig. 1-12. Open-field test における Inner の推移

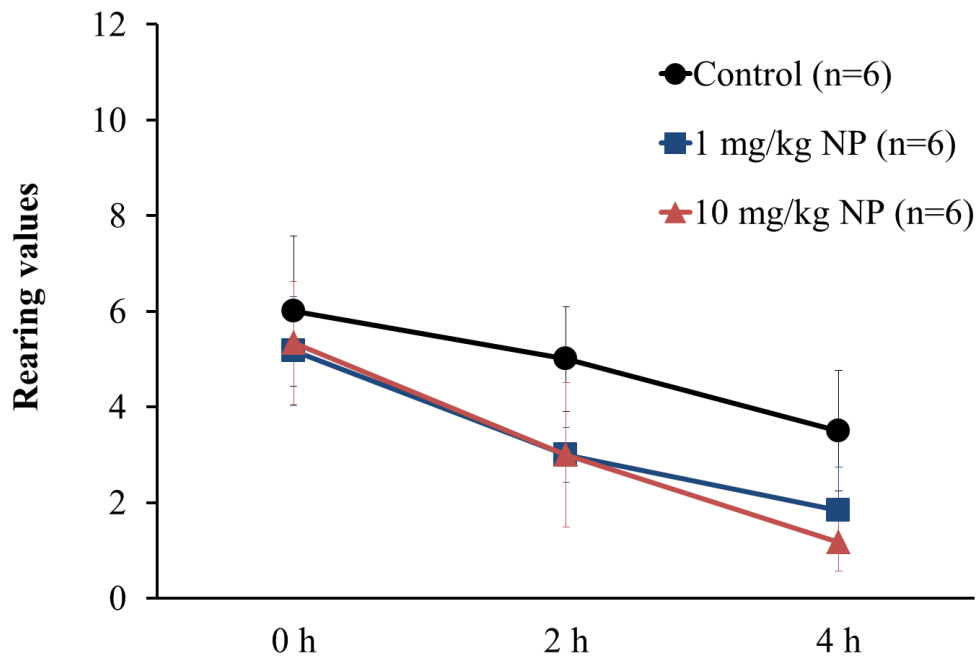


Fig. 1-13. Open-field test における Rearing の推移

Control 群において、Ambulation、Inner、Rearing の値は、時間の経過とともに徐々に減少していった。

Ambulation において、1 mg/kg NP 群は Control 群よりも 2 h 値で若干高い値を示し、10 mg/kg NP 群は、実験初期 (0, 2 h 値)において Control 群よりも若干高い値を示したが NP 処置群と Control 群との間で有意差は認められなかった。

Inner において、NP 処置群は Control 群よりも初回の実験 (0 時間値)において低い値を示したが、各群間で有意差は認められなかった。

Rearing において、NP 処置群は、Control 群よりも実験後期 (2, 4 時間)で低い値を示したが各群間で有意差は認められなかった。

2.4 Elevated plus-maze test

Fig. 1-14, Fig. 1-15 は、周産期に 1, 10 mg/kg NP、もしくは vehicle を曝露された雄性仔ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 (Fig. 1-14) および滞在時間 (Fig. 1-15) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。

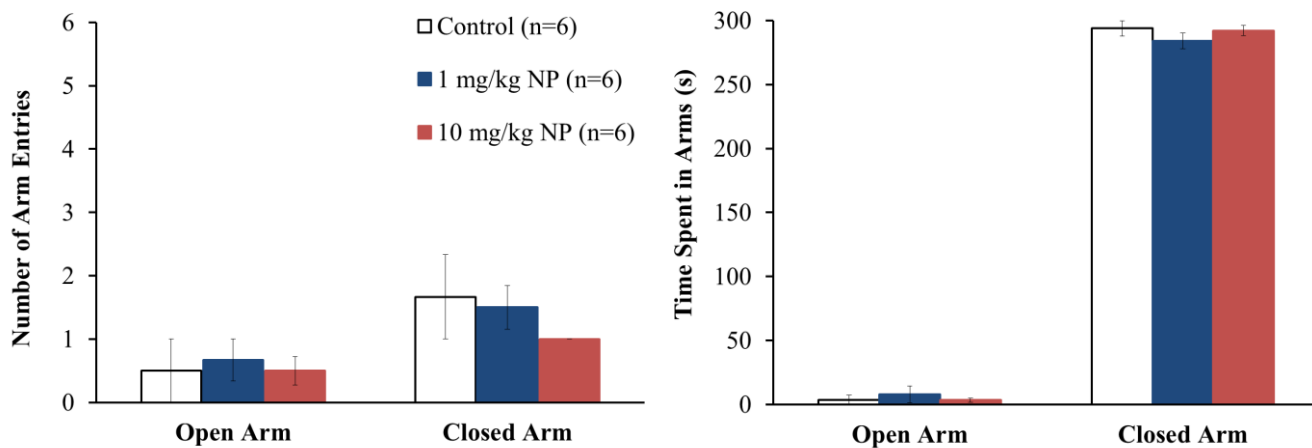


Fig. 1-14. Elevated plus-maze test における各 arm への進入回数および滞在時間

すべての項目において、1 mg/kg NP 群は Control 群とほぼ同様の値を示し、Control 群との間に有意差は認められなかった。10 mg/kg NP 群の closed arm への進入回数は、Control 群よりも若干低い値を示したが、有意差は認められなかった。また、他の項目においても、10 mg/kg NP 群は Control 群とほぼ同様の値を示し、Control 群との間に有意差は認められなかった。

3. 考察

本研究では、中枢神経系の発達に重要な時期である胎児期および新生児期の胎盤経由および母乳経由での NP 曝露が、成長後の雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を評価するために、空間学習記憶能を MAZE test、体験型学習記憶能を Step-through passive avoidance test、一般活動性および情動性を Open-field test、不安様行動を Elevated plus-maze test を用いて評価した。

MAZE test では、ラットはゴールにある報酬を獲得するために MAZE 内に設置されている目印を手掛かりにゴールまでの道筋を学習記憶することにより、実験を重ねるうちにスムーズにゴールできるようになるため、Time の短縮および Error の減少は空間学習記憶能の向上を示す。

Control 群の Time および Error において、MAZE (A) test では大きな変化は見られなかったが、MAZE (B) test および MAZE (C) test では日を追うごとに減少していき、特に MAZE (C) test では顕著であった (Fig. 1-8, Fig. 1-9)。このことから、MAZE (A) →MAZE (B) →MAZE (C) と難易度が上昇しても Control 群は MAZE test の進行とともに Time を短縮し、Error を減少させる右肩下がりの学習曲線を示した。

すべての MAZE test において、1 mg/kg NP 群の Time は Control 群よりも有意に短い値を示し ($P < 0.01$, $P < 0.05$; Fig. 1-8)、10 mg/kg NP 群は MAZE (B) test および MAZE (C) test において、Control 群よりも有意に短い Time を示した ($P < 0.01$, $P < 0.05$; Fig. 1-8)。このことから、低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を増強することが示唆された。また、MAZE (A) test の 3 日目において、1 mg/kg NP 群は 10 mg/kg NP 群よりも有意に短い Time を示し、さらに MAZE (C) test では 3 日間とも 10 mg/kg NP 群よりもさらに短い Time を示したことから (Fig. 1-8)、1 mg/kg NP 群は 10 mg/kg NP 群よりも空間学習記憶能においてより顕著な影響を現した。

我々は以前の研究において BPA 周産期曝露が空間学習記憶能に及ぼす影響が用量依存的ではないことについて議論した¹⁵⁾。ホルモンおよび内分泌攪乱化学物質のような化学物質は、U 字型や非 U 字型のような非単調な用量反応関係を示す傾向があることが分かっており²⁶⁻³⁰⁾、本研究における NP 周産期曝露が空間学習記憶能に及ぼす影響はこれらと一致する。また、胎児期における 200 mg/kg/day NP 曝露が雄性仔ラットの海馬超微細構造を変化させ、Morris Water Maze test における空間学習記憶能を低下させるが、50, 100 mg/kg/day NP 曝露では影響を及ぼさないことが報告されている⁹⁾。このことから、低用量 NP 周産期曝露による空間学習記憶能増強作用は、用量が増加するにつれてその効果が低下していき、200 mg/kg/day NP のような高用量曝露では空間学習記憶能を低下させるのではないかと考えられる。

本研究結果は、低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を増強することを示したが、我々の以前研究において、BPA 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を低下させることを示した¹⁵⁾。多くの研究がエストロゲンの学習記憶向上効果³¹⁻³³⁾、神経保護作用³⁴⁻³⁶⁾、スパイン形成および長期増強促進^{33, 37-39)}を示すこと、エストロゲンが学習記憶において重要な役割を担っていることが報告されている。NP は BPA よりも強いエストロゲン活性を有していることが知られており⁵⁾、two-hybrid 法において 17 β -estradiol (10^{-7} M) の 10 % 活性を示す濃度が NP は

$2 \times 10^{-7} \text{ M}$ であるのに対して BPA は $3 \times 10^{-6} \text{ M}$ であること⁶⁾、エストロゲン受容体 (ER) に対する親和性を調査した研究では、50 % 阻害濃度が NP は 2.40×10^{-6} であるのに対して BPA は 3×10^{-6} であること⁴⁰⁾が報告されている。さらに、10–100 nM BPA が海馬の CA1 および CA3 における長期抑圧 (LTD) を有意に増強するが歯状回 (DG) では LTD を低下させること、また 100 nM NP が CA1 では LTD を 10 % 低下させ、CA3 および DG では LTD を増強することが報告されている⁴¹⁾。空間学習記憶能のあらゆる面において重要な役割を担っている海馬⁴²⁾の CA1 および DG における LTD に対する NP と BPA の作用は相反している。このように、NP および BPA のエストロゲン活性および海馬における LTD に対する作用の違いにより雄性仔ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響が異なると考えられる。さらに、Corrieri et al.⁴³⁾は外因性エストロゲンである 17α -ethynylestradiol 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を向上することを報告している。このため、低用量 NP 周産期曝露による雄性仔ラットの空間学習記憶能増強効果は NP が有しているエストロゲン活性に起因することが示唆される。

ラットの暗所を好むという性質を利用して、Step-through passive avoidance test を用いて低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの体験型学習記憶能に及ぼす影響を評価した。保持試行において、NP 処置による Latency の変化は観察されず、低用量 NP 周産期曝露は雄性仔ラットの体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された。この本研究結果は、0.1, 10 mg/kg NP 周産期曝露が Step-through passive avoidance test における行動特性に影響を及ぼさなかったという報告と一致している⁴⁴⁾。

低用量 NP 周産期曝露は、雄性仔ラットの空間学習記憶能を増強したが、体験型学習記憶能には影響を及ぼさなかった。この要因の 1 つは関連する脳部位の違いが考えられる。我々が MAZE test を用いて評価した Spatial reference memory には海馬が関与していることが報告されている⁴⁵⁾。しかし、体験型学習記憶能を評価するのに使用した Step-through passive avoidance test では嫌悪刺激 (電気ショック) を学習記憶させているため、海馬だけではなく、情動行動において重要な役割を担っている扁桃体や線条体などの脳部位も関連している^{46, 47)}。このため、NP 周産期曝露は海馬依存的な Spatial reference memory に特異的に影響を及ぼす可能性がある。

Open-field test を用いて、NP 周産期曝露が新奇環境における雄性仔ラットの一般活動性および情動性に及ぼす影響を評価した。ラットを Open-field 装置に入れると装置の壁面に沿って注意深く行動する習性があり、装置中央部における探索行動は少ない。しかし、ラットの探索行動が増加し、情動行動が安定すると、Inner や Rearing の値が増加する。これは、動物の警戒心が薄れ、新規環境における不安や恐怖による行動抑制が緩和されることによるものである。また、NP 周産期曝露が雄性仔ラットの情動性に及ぼす影響の評価に関して、Elevated plus-maze test も使用した。Open arm における進入回数および滞在時間が高所に対する不安や恐怖などの情動性の指標となり、open arm への進入回数が多いほどあるいは滞在時間が長いほど不安感が低下していると考えられる。また closed arm への進入回数は活動性の指標として考えることができる。Open-field test および Elevated plus-maze test において、Control 群と NP 周産期曝露群の間に有意な違いは見られなかったことから、NP 周産期曝露は雄性仔ラットの一般活動性および情動性に影響を及ぼさないことを示唆した。この結果は、NP 周産期曝露が一般活動性および情動性に影響を及ぼさないことを報告している以前の研究を支持する^{14, 44)}。

したがって、低用量 NP 周産期曝露は雄性仔ラットの一般活動性、情動性および体験型学習記憶能に影響を及ぼすことなく、特異的に空間学習記憶能を増強することが示唆された。特に、NP の NOAEL である 10 mg/kg の 1/10 の用量である 1 mg/kg NP 周産期曝露の影響は顕著であり、生殖系に影響を及ぼさない低用量 NP が CNS に影響を及ぼした。このため雄性仔ラットにおいて、CNS の方が生殖系よりも NP 周産期曝露に対して感受性が高いことが推察される。

第2章 成獣期ラットへの低用量 NP 経口投与が学習記憶を 主とした中枢神経機能に及ぼす影響

本章では、NP 曝露が成長後の成獣期雌雄 SD ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。NP が中枢神経機能に及ぼす影響を調査した研究は発達期間の曝露のものがほとんどであり、成長後の動物に直接 NP 曝露を行い、中枢神経系への影響を調べた研究は少ない。第1章の実験結果は、低用量 NP 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を増強することを示唆した。よって、NP 経口投与が成長後の雌雄 SD ラットに及ぼす影響を調べるにより、NP による中枢神経機能に及ぼす影響をより詳細に把握することが可能である。

第1章の NP 周産期曝露の中枢神経機能に及ぼす影響を調べた実験において、NOAEL[®]と同等の用量である 10 mg/kg、その 1/10 である 1 mg/kg の NP 周産期曝露が雄性仔ラットの空間学習記憶能を向上させ、特に 1 mg/kg NP で顕著であった。このため、本実験では NOAEL の 1/2 である 5 mg/kg、1/20 である 0.5 mg/kg の用量を用いた。また、実験1と同様に、実験2でも投与方法として経口投与を選択した。4日間連続 0.1、10 mg/kg NP 経口投与を行い、最後の投与から 24 時間後にラット脳内で NP が検出され、脳内の最大の NP 濃度が 10 mg/kg で 1183 ppb、0.1 mg/kg で 0.12 ppb あることが報告されている⁴⁸⁾。さらに、NP が海馬ニューロンの樹状突起伸長を阻害することが報告されており⁴⁹⁾、経口摂取された NP は血液脳関門を通過し、中枢神経機能に影響を及ぼすと推測される。

低用量 NP 経口投与が成長後の雌雄 SD ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能への影響を調査するために、MAZE test を用いて空間学習記憶能を、Open-field test を用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus maze test を用いて不安様行動を、Step-through passive avoidance test を用いて体験型学習記憶能を評価した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1 実験動物

実験には、5週齢で購入した Sprague Dawley 系雌雄ラット (SD ラット：九動産)が使用された。動物は、温度 22±2 °C、湿度 50±10 %に調節された 12 時間明暗サイクル (午前 7 時点灯)の動物飼養保管実験室内で飼育管理し、プラスチック製ケージ (縦：42.0 cm×横：25.0 cm×高さ：18.5 cm)で 1 ケージあたり 2～3 匹の群飼育を行った。

入荷後 1 週間は餌 (固形飼料 F2：株式会社 船橋農場)と水を自由摂取させ、MAZE test の報酬に対するモチベーションを高めるために、7 週齢時から給餌・給水制限 (雄性ラット：餌 約 12 g/day、水 約 33.3 ml/day; 雌性ラット：餌 約 8.5 g/day、水 約 24 ml/day)が開始され、過度の体重制限を避けるため、週に 1 度給餌・給水制限を緩和した。各群間で MAZE test における走行能にできる限り差が生じないように、MAZE test の群分けトレーニングを用いて群分けを行った。

なお、本実験はすべて長崎大学動物実験規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物はノニルフェノール (4-nonylphenol:NP:関東化学株式会社) を使用した。NP は corn oil に溶解させ、濃度 0.5 mg/kg、5 mg/kg を経口ゾンデにて 1ml/kg の割合で経口投与し、対照群 (Control 群)には corn oil のみを同様に 1 ml/kg の割合で経口投与した。なお、経口投与はストレス負荷を回避するために、ハロタンによる軽度の麻酔をかけた後に行なった。

1.3 行動実験

1.3.1 MAZE test

空間学習記憶能の測定には、可変式迷路装置 (Fig. 1-1)を用いた。本装置は、90 cm×90 cm の正方形に 15 cm×15 cm の正方形が連結した底面で、高さは 50 cm、内面は白色である。縦×横：50 cm×15 cm、50 cm×30 cm、50 cm×45 cm、50 cm×60 cm の各種しきりを組み合わせて 3 段階の難易度の MAZE (MAZE (A)、MAZE (B)、MAZE (C))を作り上げた。

装置の底面上 1 m の高さに 100 W の白色光を 3 台置き、装置内はくまなく一定の照度が保たれるようにし、ゴールまでの道筋を記憶する目印として、装置壁面上部 4 箇所形異なるシールを貼った。ゴールには報酬としてミルク (20 g のコンデンスミルク (雪印乳業株式会社) に 100 ml の水道水を加えたもの)を置いた。

実験準備として、雌雄 SD ラットが 7 週齢時に、実験装置および報酬への「慣らし」と「群分けトレーニング」を行った。次に MAZE test では、まず 1 日目に正解通路を学習させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたり空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。本実験では、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、報酬を置いたゴールにたどり着いた後、自由に報酬を摂取させ、ここまでする 1 trial とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。また次の trial に影響を及ぼさないように各 trial 終了後に装置を雑巾できれいに清掃し、次の trial を行った。雌雄 SD ラットが 8 週齢時に MAZE (A) test を、10 週齢時に MAZE (B) test を、12 週齢時に MAZE (C) test を行った。NP 経口投与は、MAZE test のトレーニングおよびテスト終了後 30 分以内に行われた。

① 慣らし

ゴールを塞いだ MAZE 装置を 4 等分に仕切り、1 エリアに 1 匹のラットをスタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、装置及び報酬に慣れさせた (Fig. 1-2)。1 session あたり 3 trial を 1 日 2 session、3 日間連続して行い、session 間の間隔は 2 時間とした。1 trial の測定時間は 3 分とし、その間動物は自由に装置内を探索した。報酬はミルク 300 μ l とし、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃し、次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time)とした。

② 群分けトレーニング

エラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置 (Fig. 2-1)を用いて 3 trial を行った。1 trial の最大測定時間は 3 分間、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導した。また、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃し、次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time)とした。

この群分けトレーニングの結果を用いて、できる限り各投与群間で走行能に差が生じないように群分けを行った。

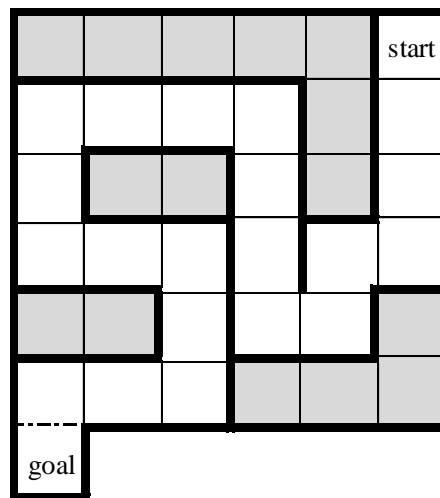


Fig. 2-1. 可変式迷路装置 (群分けトレーニング)

③ トレーニング

各 MAZE test の正解通路以外の通路を塞いだ装置を用いて 3 trial を行った。1 trial の最大測定時間は 3 分間、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導した。また、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃し、次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time)とした。

④ テスト

各 MAZE test の装置を用いて 1 日に 3 trial、トレーニングの翌日から 3 日間連続して行った (Fig. 1-3)。1 trial の最大測定時間は 5 分間、報酬はミルク 300 μ l とした。5 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導した。また、各 trial 終了後に装置を雑巾で清掃し、次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time)とエラーエリアへの進入回数 (Error)とした。Error は、ラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

1.3.2 Step-through passive avoidance test

体験型学習記憶能の測定には Step-through passive avoidance test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.2 Step-through passive avoidance test と同様である。本課題は SD 系雌雄ラットが 13 週齢時に実施し、NP 経口投与は獲得試行終了後 30 分以内に行った。

1.3.3 Open-field test

一般活動性および情動性の測定には Open-field test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.3 Open-field test と同様である。本課題は SD 系雌雄ラットが 8 週齢時に実施し、NP 経口投与は Open-field test の前日に行った。

1.3.4 Elevated plus-maze test

情動性の測定には Elevated plus-maze test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.4 Elevated plus-maze test と同様である。本課題は SD 系雌雄ラットが 10 週齢時に実施し、NP 経口投与は Elevated plus-maze test の前日に行った。

1.4 統計学的処理

結果は平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、一元もしくは二元分散分析 (ANOVA)を行った後、Dunnnett (Stat View 5.0,Microsoft)の多重比較検定を用いて解析し、危険度 5 %以下を有意差ありとした。Elevated plus-maze test、Step-through passive avoidance test の結果は一元分散分析により解析され、MAZE test、Open-field test の結果は、二元分散分析により評価された。

1.5 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

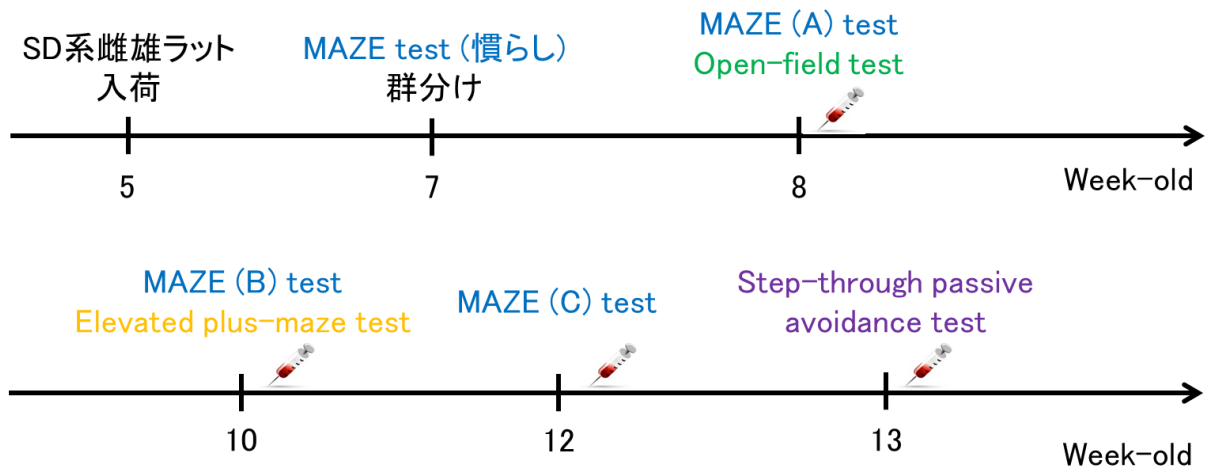


Fig. 2-2. 実験スケジュール

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 2-3, Fig. 2-4 は、0.5, 5 mg/kg NP、もしくは vehicle を経口投与された雄性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 2-3) および Error (Fig.2-4) をその平均値±標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールにある報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。* $P < 0.05$ は Control 群との間に有意差ありを表す。

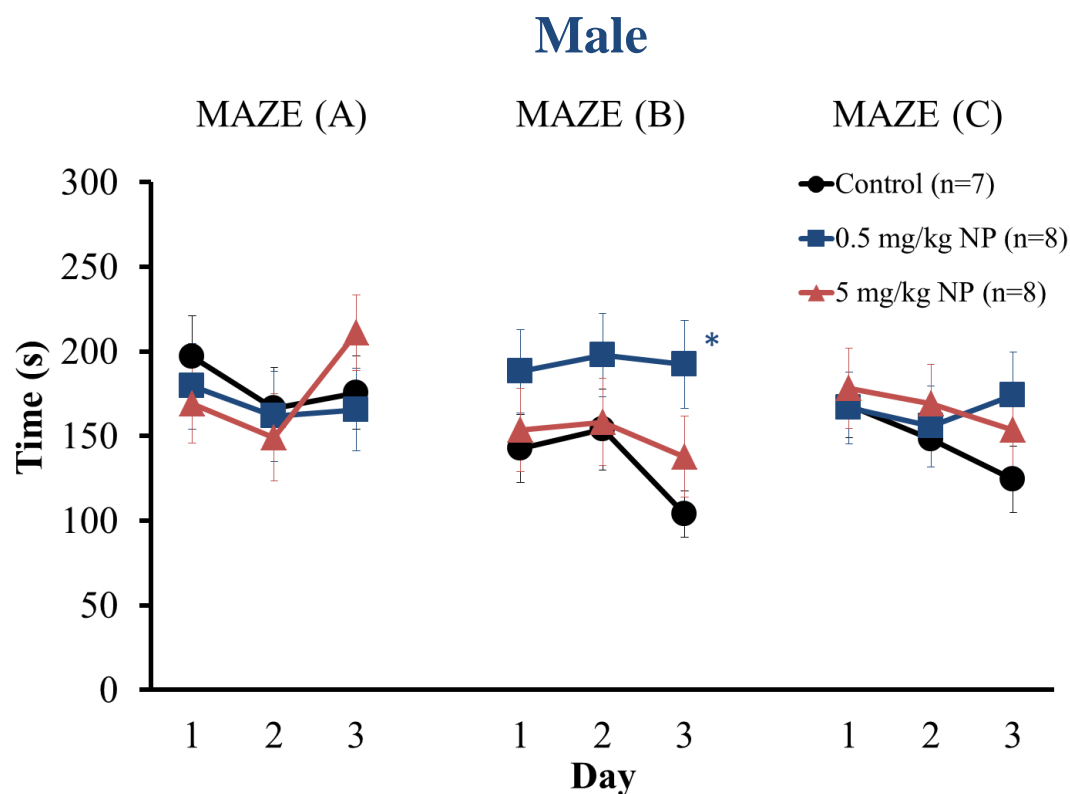


Fig. 2-3. MAZE test における雄性ラットの日ごとの Time の推移

すべての MAZE test において、雄性ラットの Control 群の Time は日数の経過とともに短縮する傾向にあり、特に MAZE (C) test で顕著であった。

雄性ラットの 0.5 mg/kg NP 群は、MAZE (B) test の 3 日間、MAZE (C) test の 3 日目に Control 群よりも長い Time を示し、MAZE (B) test の 3 日目に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

雄性ラットの 5 mg/kg NP 群は、すべての MAZE test の 3 日目に Control 群よりも長い Time を示したが、Control 群との間で有意差は認められなかった。

Male

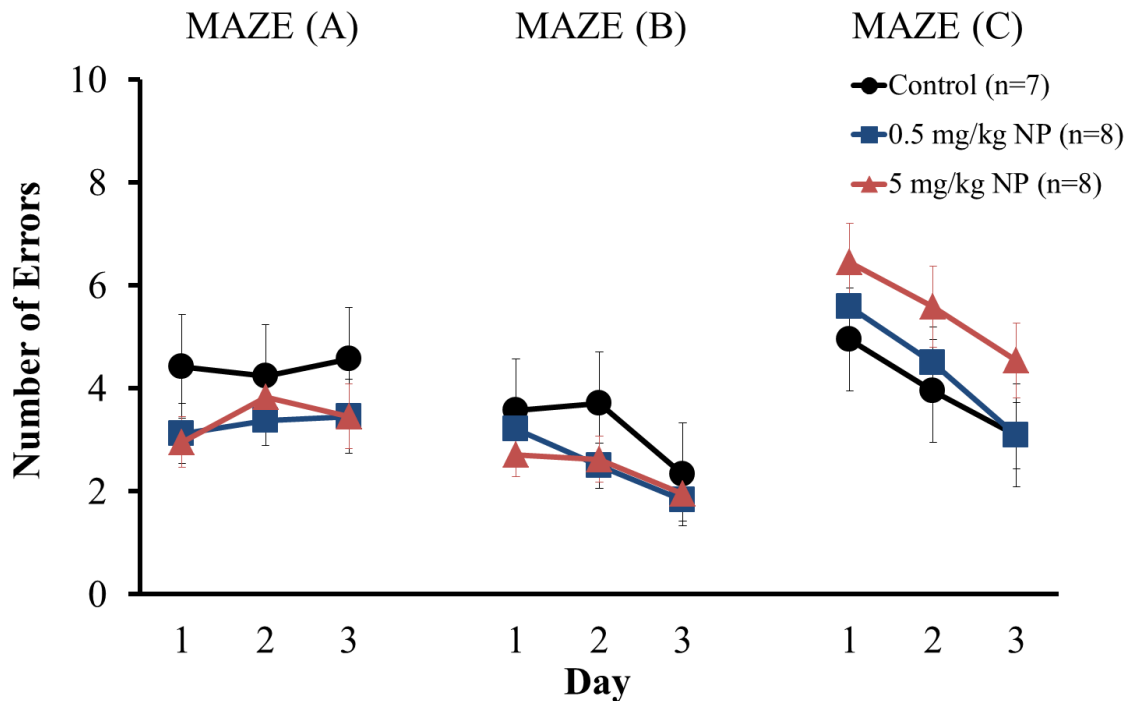


Fig. 2-4. MAZE test における雄性ラットの日ごとの Error の推移

雄性ラットの Control 群の Error において、MAZE (A) test では大きな変化は見られなかったが、MAZE (B)および(C) test では日数が経過するとともに減少した。

MAZE (A) test の 3 日間および MAZE (B) test の 2 日目において、雄性ラットの 0.5 mg/kg NP 群は Control 群よりも低い Error を示したが Control 群との間で有意差は認められなかった。

雄性ラットの 5 mg/kg NP 群において、MAZE (A) test の 1, 3 日目および MAZE (B) test の 1, 2 日目で Control 群よりも低い Error を示したが、MAZE (C) test の 3 日間では Control 群よりも高い Error を示した。しかし、雄性ラット 5 mg/kg NP 群と Control 群との間で有意差は認められなかった。

Fig. 2-5, Fig. 2-6 は、0.5, 5 mg/kg NP、もしくは vehicle を経口投与された雌性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 2-5) および Error (Fig.2-6) をその平均値±標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールにある報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。* $P < 0.05$ は Control 群との間に有意差ありを表す。

Female

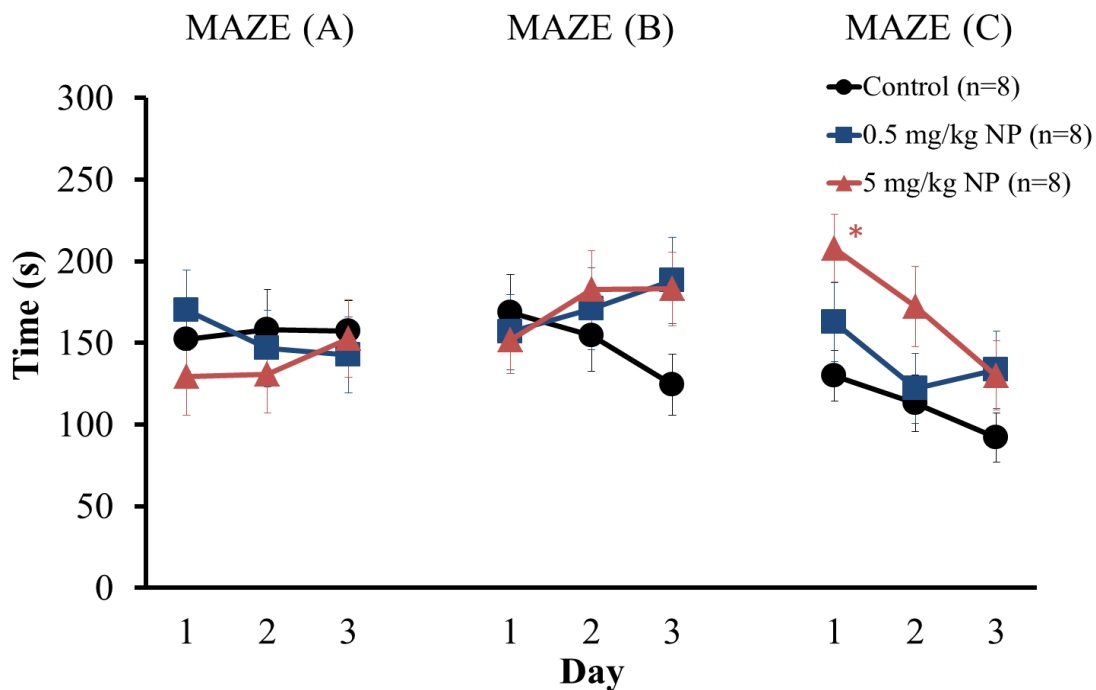


Fig. 2-5. MAZE test における雌性ラットの日ごとの Time の推移

MAZE (A) test において、雌性ラットの Control 群の Time に大きな変化は見られなかったが、MAZE (B) および (C) test では日数が経過するとともに減少した。

雌性ラットの 0.5 mg/kg NP 群において、MAZE (B) test の 3 日目および MAZE (C) test の 1, 3 日目で Control 群よりも長い Time を示したが有意差は認められなかった。

雌性ラットの 5 mg/kg NP 群において、MAZE (B) test の 3 日目および MAZE (C) test の 3 日間で Control 群よりも長い Time を示し、MAZE (C) test の 1 日目において有意差が認められた ($P < 0.05$)。

Female

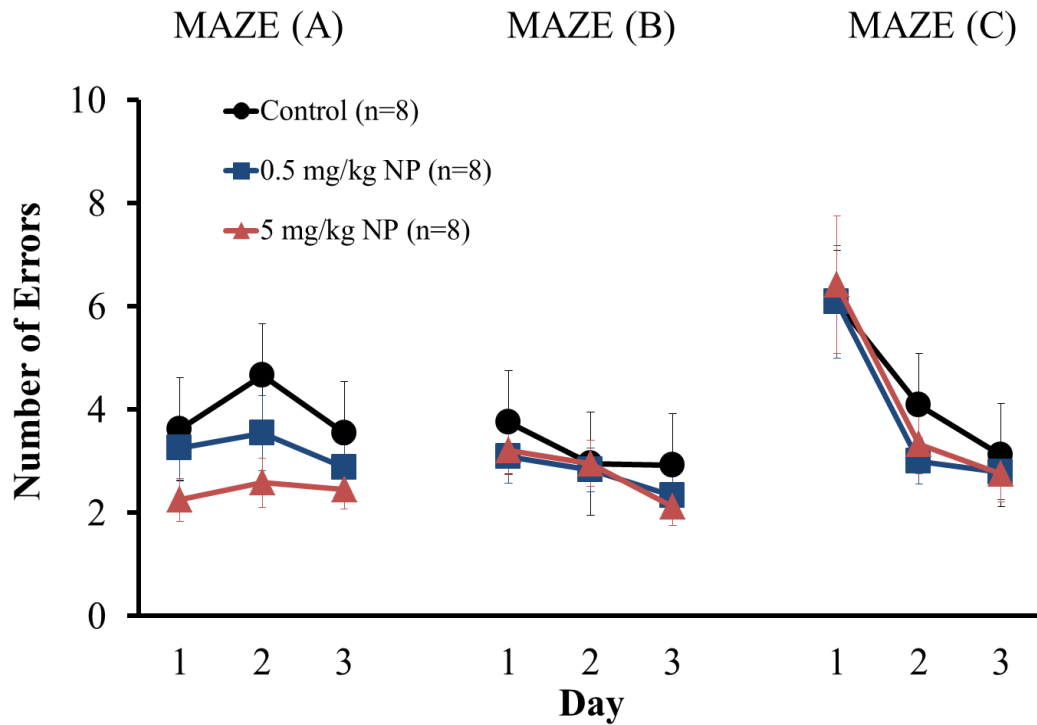


Fig. 2-6. MAZE test における雌性ラットの日ごとの Time の推移

雌性ラットの Control 群において、Error は MAZE (A) test の 2 日目に増加し、3 日目に減少したが、MAZE (B) および (C) test において、Control 群の Error は日数が経過するとともに減少した。

雌性ラットの 0.5 mg/kg NP 群において、MAZE (A) test および MAZE (C) test の 2 日目に Control 群よりも低い Error を示したが有意差は認められなかった。

雌性ラットの 5 mg/kg NP 群において、MAZE (A) test の 3 日間および MAZE (C) test の 2 日目で Control 群よりも低い Error を示したが有意差は認められなかった。

2.2 Step-through passive avoidance test

Fig. 2-7 は、0.5, 5 mg/kg NP、もしくは vehicle を経口投与された雌雄 SD ラットの Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行の Latency をその平均値±標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。 $*P < 0.05$ は Control 群との間に有意差ありを表す。

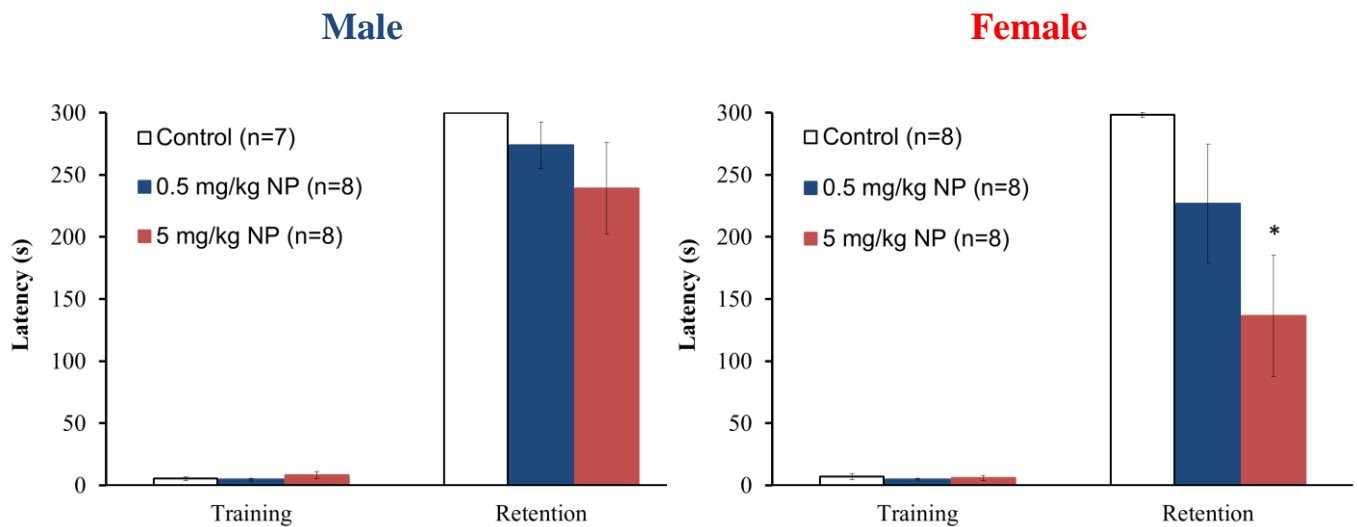


Fig. 2-7. Step-through passive avoidance test における Latency の推移

獲得試行において、雌雄ラットともに NP 処置による有意な影響は確認されなかった。保持試行において、雌雄ともに NP 処置群は Control 群よりも低い Latency を示し、用量が増加するにつれて Latency は減少し、雌性ラットの 5 mg/kg NP 群と Control 群との間に有意差が認められた ($P < 0.05$)。

2.3 Open-field test

Fig. 2-8～Fig. 2-13 は、0.5, 5 mg/kg NP、もしくは vehicle を経口投与された雌雄 SD ラットの Open-field test における Ambulation (Fig. 2-8, 2-11)、Inner (Fig. 2-9, 2-12)、Rearing (Fig. 2-10, 2-13) をその平均値±標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数、Rearing は立ち上がり行動の回数である。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ は Control 群との間に有意差ありを、 $\dagger P < 0.01$ は 0.5 mg/kg NP 群との間に有意差ありを表す。

Male

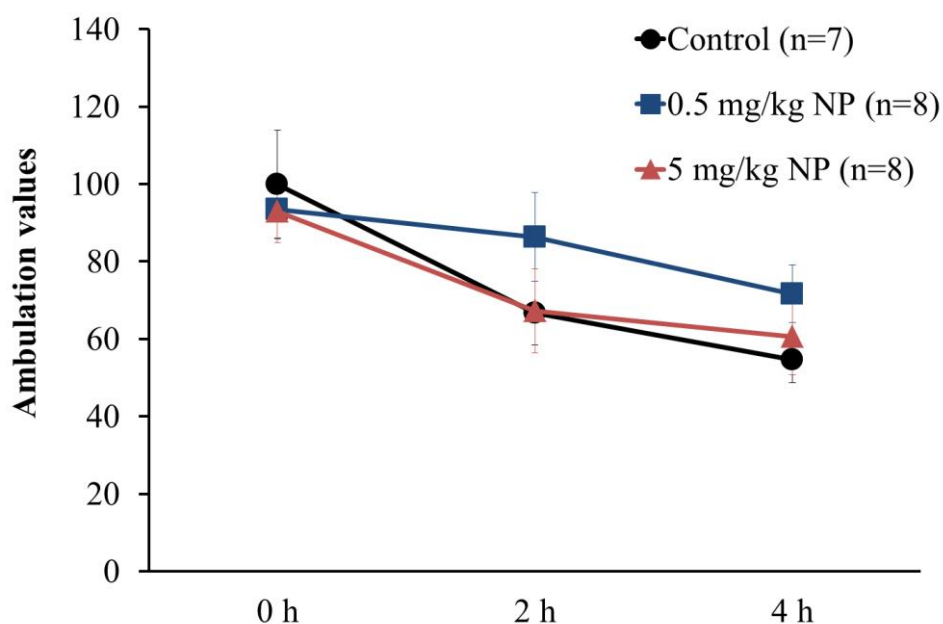


Fig. 2-8. Open-field test における雄性ラットの Ambulation の推移

雄性ラットの Control 群の Ambulation および Inner は時間の経過とともに次第に減少したが、Rearing は 2 h 値で減少し、4 h 値で若干増加した。

Ambulation および Inner において、0.5 mg/kg NP 群は実験後期 (2, 4 h) に Control 群よりも高い値を示したが、有意差は認められなかった。

5 mg/kg NP 群は Control 群とほぼ同様の Ambulation および Inner を示し、Control 群との間に有意差は認められなかった。

Rearing において、NP 処置群は Control 群よりも低い値を実験初期 (0 h) で示したが、NP 処置群と Control 群との間で有意差は認められなかった。

Male

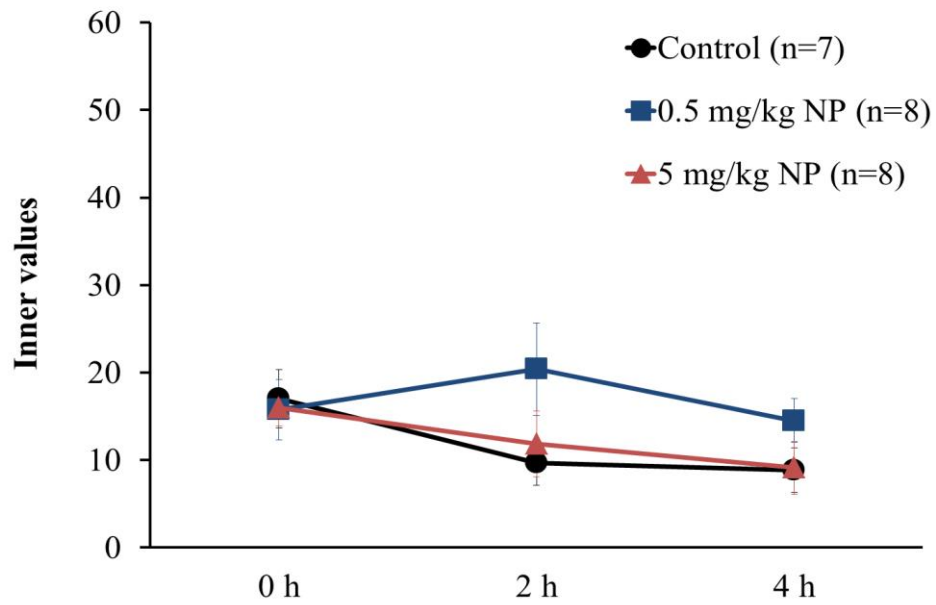


Fig. 2-9. Open-field test における雄性ラットの Inner の推移

Male

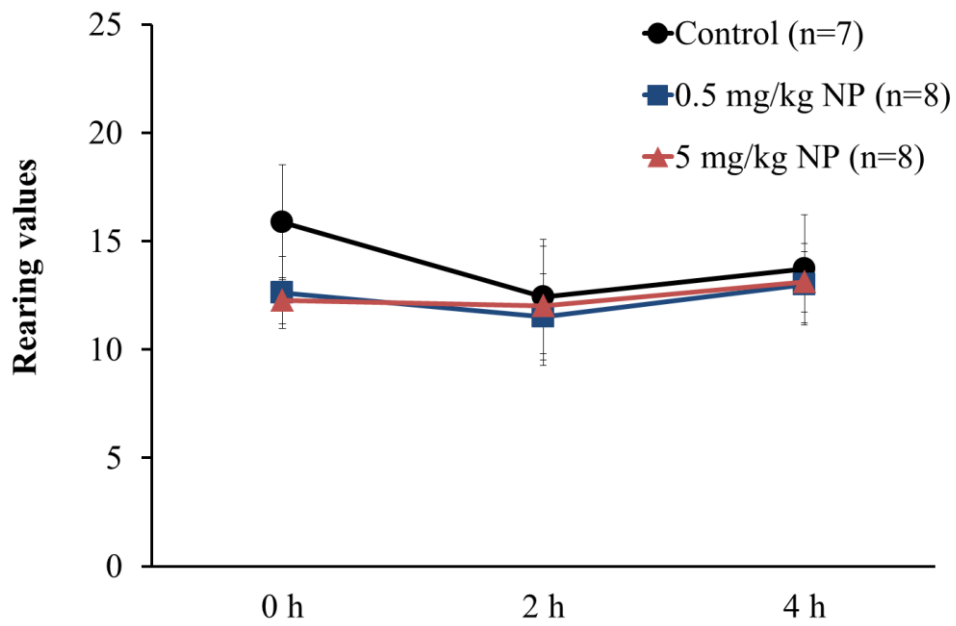


Fig. 2-10. Open-field test における雄性ラットの Rearing の推移

雌性ラットの Control 群において、Ambulation および Inner は 2 h 値で大きく減少し、4 h 値では 2 h 値とほぼ同様の値を示し、Rearing は時間の経過とともに徐々に増加していった。

0.5 mg/kg NP 群の Ambulation および Inner は、実験後期 (2, 4 h) に Control 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。さらに Inner において、0.5 mg/kg NP 群は実験後期で 5 mg/kg NP 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

5 mg/kg NP 群の Ambulation および Inner は、Control 群とほぼ同様の値を示し、Control 群との間で有意差は認められなかった。

また、雌性ラット NP 処置群の Rearing は Control 群とほぼ同様の値を示し、各群間で有意差は認められなかった。

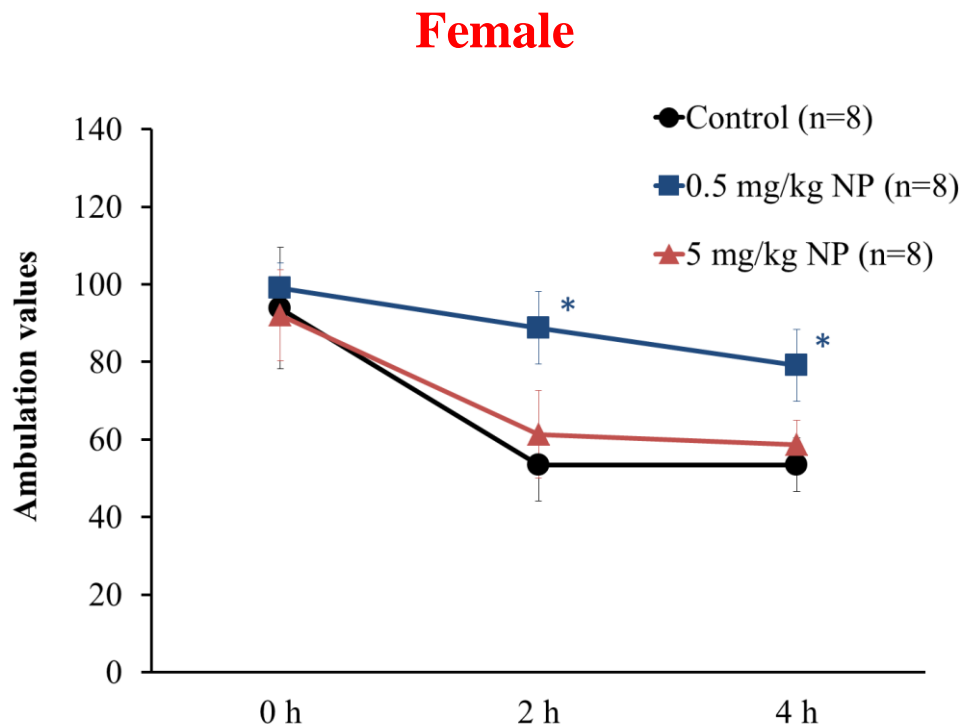


Fig. 2-11. Open-field test における雌性ラットの Ambulation の推移

Female

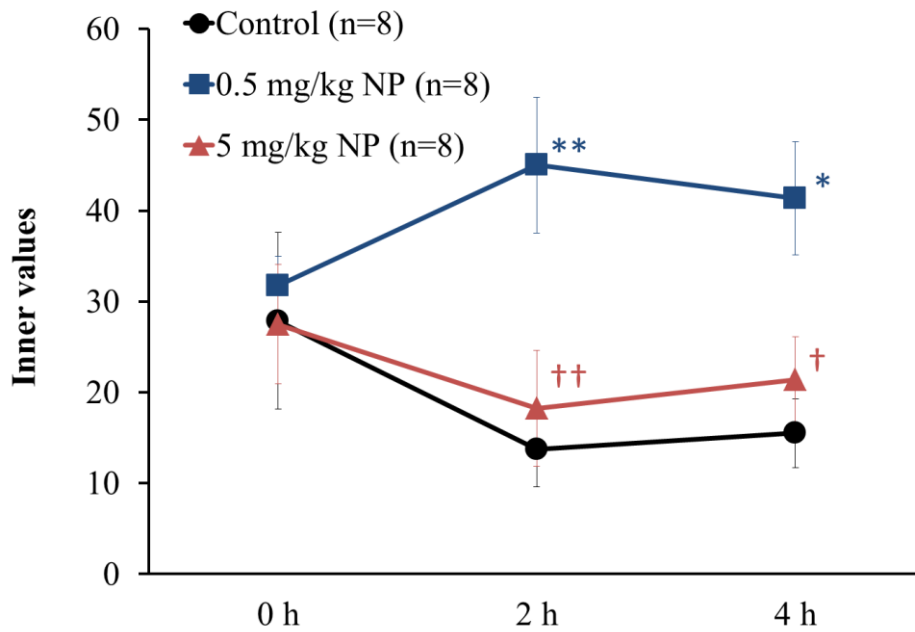


Fig. 2-12. Open-field test における雌性ラットの Inner の推移

Female

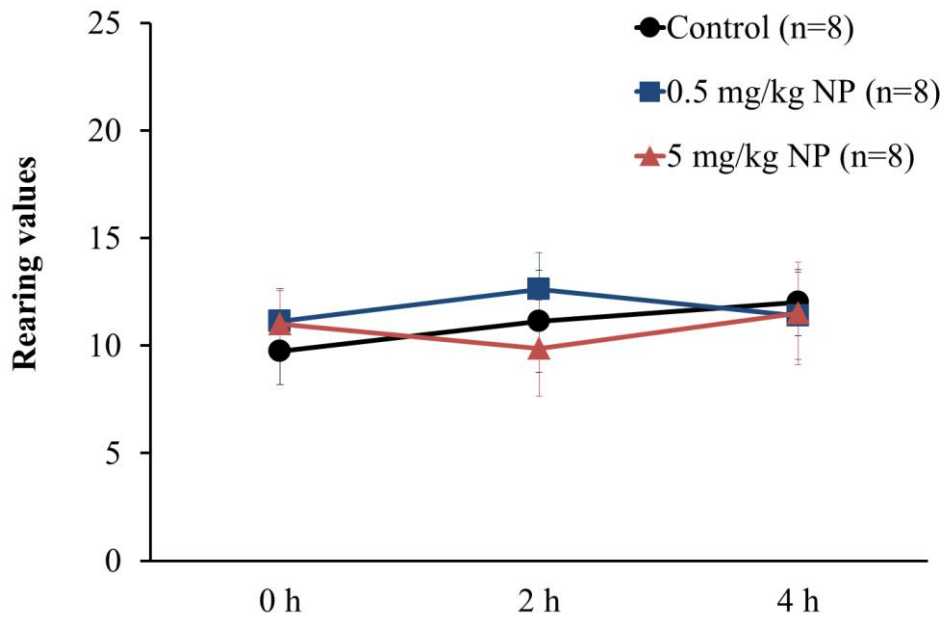


Fig. 2-13. Open-field test における雌性ラットの Rearing の推移

2.4 Elevated plus-maze test

Fig. 2-14, Fig. 2-15 は、0.5, 5 mg/kg NP、もしくは vehicle を経口投与された雌雄 SD ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 (Fig. 2-14, Fig. 2-15) および滞在時間 (Fig. 2-14, Fig. 2-15) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。

Male

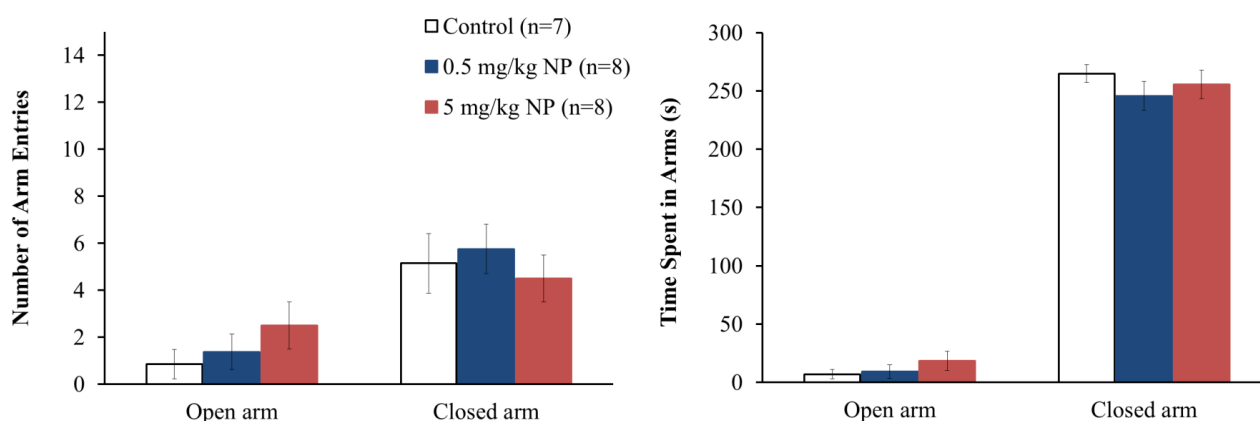


Fig. 2-14. Elevated plus-maze test における雄性ラットの各 arm への進入回数および滞在時間

雄性ラットの 5 mg/kg NP 群は、open arm への進入回数および滞在時間において Control 群よりも若干高い値を示したが有意差は認められなかった。その他の測定項目において、NP 処置群と Control 群はほぼ同様の値を示し、各群間で有意差は認められなかった。

Female

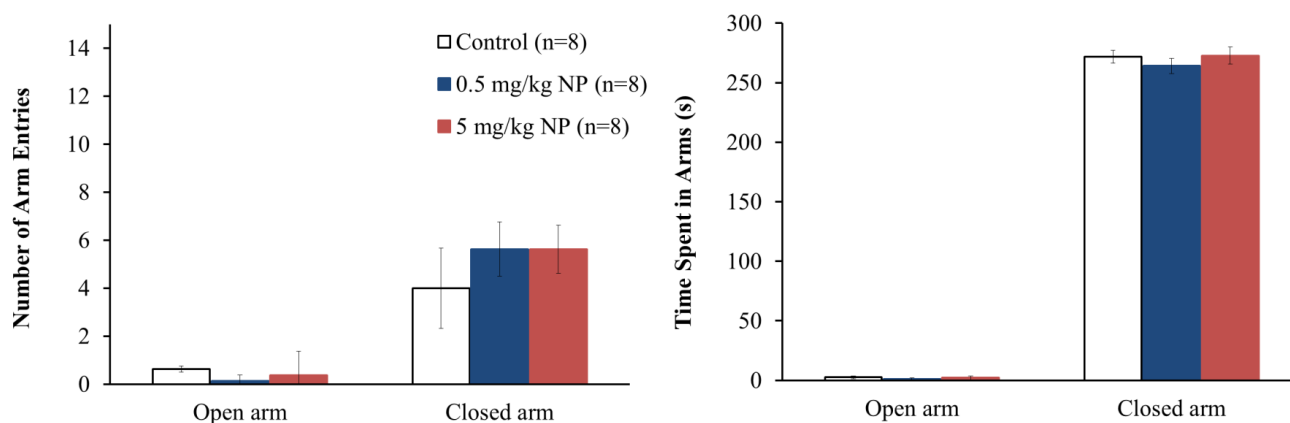


Fig. 2-15. Elevated plus-maze test における雌性ラットの各 arm への進入回数および滞在時間

雌性ラットにおいて、NP 処置は Control 群よりも closed arm への進入回数を若干増加したが NP 処置群と Control 群との間で有意差は認められなかった。Open arm への進入回数、open arm および closed arm における滞在時間は、Control 群とほぼ同様の値を示し、NP 処置群と Control 群との間で有意差は認められなかった。

3. 考察

本研究では低用量 NP 経口投与が成獣期雌雄 SD ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を評価するために、各種行動実験を用いて評価した。

低用量 NP 経口投与が雌雄ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響を評価するために、第 1 章と同様に MAZE test を用いた。雄性ラットにおいて、Control 群の Time および Error はすべての MAZE test で日数の経過とともに短縮する傾向にあり、特に MAZE (C) test で顕著だった (Fig. 2-3, 2-4)。雄性ラット 0.5 mg/kg NP 群の Time は、MAZE (B) test の 3 日目に Control 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$; Fig. 2-3)。しかし、5 mg/kg NP 群の Time, Error とともにすべての MAZE test で Control 群との間で有意差は認められなかった (Fig. 2-3)。この結果から、0.5 mg/kg NP 経口投与は成獣期雄性ラットの空間記憶能を若干低下させるが、5 mg/kg NP 経口投与は影響を及ぼさないことを示唆した (Fig. 2-3, 2-4)。

雌性ラットにおいて、Control 群の Time は MAZE (A) test では大きな変化は見られなかったが、MAZE (B) および (C) test では日数が経過するとともに減少した (Fig. 2-5, 2-6)。雌性ラット 0.5 mg/kg NP 群の Time および Error はすべての難易度の MAZE test において、Control 群との間で有意差は認められなかった (Fig. 2-5, 2-6)。しかし、5 mg/kg NP 群の Time は MAZE (C) test の 1 日目に Control 群よりも有意に高い値を示した ($P < 0.05$; Fig. 2-5)。このため、5 mg/kg NP 経口投与は成獣期雌性ラットの空間記憶能を若干低下させることを示した。これら MAZE test における結果から、低用量 NP 経口投与が成獣期雌雄ラットの空間記憶固定を若干阻害することが示唆された。

第 1 章でも記したように、NP が弱いエストロゲン活性を有していること^{5,6)}およびエストロゲンが学習記憶において重要な役割を担っていること³¹⁻³³⁾が報告されている。NP のような弱い部分作動薬は、エストロゲンのような完全作動薬に対して拮抗作用を示すため、成獣期雌雄ラットにおける低用量 NP 経口投与の空間記憶固定阻害作用は、NP が空間学習記憶におけるエストロゲンの役割を阻害することによって引き起こされると推察される。

前述のように、NP 経口投与の 24 時間後にラットの脳内で NP が検出されたという報告がある⁴⁸⁾。また、NP が学習記憶において重要な役割を担っている脳部位である海馬の樹状突起伸長を低下し、その NP による樹状突起伸長低下は ER アンタゴニストである ICI-182,786 によって阻害されないことが報告されている⁴⁹⁾。海馬は学習記憶において重要な役割を担っていることが報告⁴²⁾されており、このことから、NP がラットの脳内に到達し、海馬ニューロンの樹状突起伸長阻害することも NP 経口投与による成獣期雌雄ラットの空間学習記憶低下の要因の一つだと推察される。

本研究では、0.5 mg/kg NP 経口投与が雄性 SD ラットの空間学習記憶能を若干低下させたが、5 mg/kg NP 経口投与は雄性 SD ラットの空間学習記憶能に影響を及ぼさなかった。この結果は、雄性ラットの空間学習記憶能における NP 経口投与の影響が用量依存的でないことを示唆している。第 1 章でも記したように、ホルモンおよび内分泌攪乱化学物質のような化学物質は、U 字型や非 U 字型のような非単調な用量反応関係を示す傾向があることが分かっており²⁶⁻³⁰⁾、本研究における低用量 NP 経口投与が雄性ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響はこれらと一致する。

Step-through passive avoidance test の保持試行において、NP 処置雌雄ラットの Latency が Control 群よりも低い値を示し、特に雌性ラット 5 mg/kg NP 群は Control 群よりも有意に低い Latency を示した ($P < 0.05$; Fig. 2-7)。この結果は、5 mg/kg NP 経口投与が雌性ラットの体験型学習記憶能を低下することが示唆された。

Open-field test では、雄性ラットの Control 群と NP 処置群との間で有意な変化は観察されず、NP 経口投与が雄性ラットの一般活動性および情動性に影響を及ぼさないことが示唆された (Fig. 2-8~Fig. 2-10)。雌性ラットの 0.5 mg/kg NP 経口投与群の Ambulation および Inner は Control 群よりも有意に高い値 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)を示したが、5 mg/kg NP 経口投与群と Control 群との間で有意差は認められなかった (Fig. 2-11, Fig. 2-12)。この、0.5 mg/kg NP 経口投与群の Ambulation の増加は Inner の増加に伴ったものであると考えられるため、0.5 mg/kg NP 経口投与は雌性ラットの警戒行動を低下させるが、5 mg/kg NP 経口投与は雌性ラットの一般活動性および情動性に影響を及ぼさないことが示唆された。

本研究では、低用量 NP 経口投与が成獣期雌性ラットの体験型学習記憶能および情動性に影響を及ぼした。脳の線条体において、NP が活性酸素の一種であるヒドロキシラジカル濃度を上昇することが報告されている^{50, 51)}。線条体は体験型学習記憶能、情動性などに関与することが報告されており^{52, 53)}、線条体の尾状核にアセチルコリン受容体アンタゴニストを微量注入することにより体験型学習記憶能を低下させること⁵⁴⁾、線条体の側坐核にドパミン D1 および D2 受容体アンタゴニスト微量注入が自発運動量を増加することが報告されている⁵⁵⁾。脳は酸化ストレスに対して非常に脆弱であることが知られており、低用量 NP 経口投与による体験型学習記憶能および警戒行動の低下は、NP が引き起こす線条体内でのヒドロキシラジカル生成の増加が関与している可能性が考えられる。

本実験では、低用量 NP 経口投与は雌性ラットの体験型記憶能および警戒行動を低下させたが、雄性ラットの体験型記憶能および情動性に影響を及ぼさなかった。BPA によるエストロゲンの学習記憶向上の阻害作用が内在性エストロゲンに依存することが報告されている^{56, 57)}。また、NP 周産期曝露による仔ラットの神経発達および生殖系に及ぼす影響がエストロゲンを NP と同時に周産期曝露した場合の方が顕著な影響が観察されるという報告もある⁵⁸⁾。本研究では、低用量 NP 経口投与が無処置の成獣雌性ラットに及ぼす影響を評価するために卵巣切除手術や性周期による群分けを行っていない。このため、低用量 NP 経口投与の体験型記憶能および情動性に及ぼす影響は内在性エストロゲン濃度が関連している可能性がある。

本研究では、Open-field test において低用量 NP 経口投与が雌性ラットの警戒行動を低下させたが Elevated plus-maze test では不安様行動に影響を及ぼさなかった (Fig. 2-14, Fig. 2-15)。本研究で使用した Open-field test は新奇環境に対する情動性を評価しているのに対して、Elevated plus-maze test では高所に対する不安様行動を評価している。このため、Open-field test では低用量 NP 経口投与の影響が観察されたが、Elevated plus-maze test においては低用量 NP 経口投与による影響が観察されなかったと考えられる。

本研究では、低用量 NP 経口投与は成獣期雌雄 SD ラットの空間記憶能を若干低下させ、雌性ラットでのみ体験型学習記憶能および警戒行動を低下させた。このため、雄性ラットよりも雌性ラットの方が低用量 NP 経口投与による影響が多岐にわたって現れることが示唆された。

第3章

NP 海馬内微量注入が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響

第2章において、成獣期ラットへのNP経口投与が中枢神経機能に影響を及ぼすことを示した。その結果を踏まえ、本章ではNP曝露がSDラットにおける空間学習記憶能に及ぼす影響をより詳細に評価するために、学習記憶に重要な役割を担っている脳領域である背側海馬⁴²⁾へのNP微量注入が雄性SDラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。雌性ラットへのエストラジオール海馬内微量注入が空間学習能を向上させること⁵⁹⁾、ERアンタゴニストであるタモキシフェンおよびER α アンタゴニストであるプロピルピラゾールトリオールの海馬内微量注入が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させることが報告されている⁶⁰⁾。また前述したように、NPが海馬におけるLTDに影響を及ぼすこと⁴¹⁾、海馬におけるシナプスの樹状突起伸長を阻害すること⁴³⁾が報告されているため、海馬はNPが空間学習記憶能に影響を及ぼす際の主要な作用部位であると考えられる。よって、NP海馬内微量注入がNP経口投与と同様に雄性ラットの空間学習記憶能を低下した場合には、NP経口投与による空間学習記憶能の低下の主な作用部位は海馬であると考えられる。

NP海馬内微量注入の中枢神経機能に及ぼす影響を検証するために、MAZE testを用いて空間学習記憶能を、Step-through passive avoidance testを用いて体験型学習記憶能を、Open-field testを用いて一般活動性および情動性を、Elevated plus maze testを用いて不安様行動を評価した。

1. 実験材料ならびに実験方法

1.1 実験動物

実験には、5週齢で購入したSprague Dawley系雄性ラット(SDラット：九動産)が使用された。動物は、温度 22 ± 2 ℃、湿度 50 ± 10 %に調節された12時間明暗サイクル(午前7時点灯)の動物飼養保管実験室内で飼育管理し、プラスチック製ケージ(縦：42.0 cm×横：25.0 cm×高さ：18.5 cm)で1ケージあたり2～3匹の群飼育を行った。

入荷後1週間は餌(固形飼料F2：株式会社 船橋農場)と水を自由摂取させ、MAZE testの報酬に対するモチベーションを高めるために、7週齢時から給餌・給水制限(雄性ラット：餌 約12 g/day、水 約33.3 ml/day)が開始され、過度の体重制限を避けるため、週に1度給餌・給水制限を緩和した。

各群間でMAZE testにおける走行能に差ができる限り生じないように、ガイドカニューレ植え込み手術の前後にMAZE testの群分けトレーニングを用いて群分けを行った。

なお、本実験はすべて長崎大学動物実験規則に則り行った。

1.2 使用薬物

被験薬物はノニルフェノール(4-nonylphenol: NP: 関東化学株式会社)を使用した。NPは全

量の 30 % のジメチルスルホキシド標準液 (Dimethyl Sulfoxide: DMSO: 和光純薬工業株式会社) に溶解させ、さらに全量の 40 % のプロピレングリコール (Propylene Glycol: PG: 和光純薬工業株式会社) に溶解させ、その後さらに超純水を加え、10 μ g/2 μ l になるように調製した。対照群には、全量の 30 % DMSO、全量の 40 % PG、超純水の混合液を海馬内微量注入した (Vehicle 群)。また、vehicle の DMSO および PG 濃度が高濃度だったため、vehicle 海馬内微量注入による中枢神経機能への影響を排除するために、別に生理食塩水 (Saline: 0.9 % NaCl 溶液) 投与群 (Saline 群) を設けた。

1.3 ガイドカニューレ植え込み手術

ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg 腹腔内注射麻酔下において、ラット頭部をラット用脳固定装置に固定し、歯科用ドリルで頭蓋骨を穿孔した後、König&Klippel の脳図譜⁶¹⁾に従って、背側海馬 (脳部位 A: -2.6 mm、L: \pm 1.5 mm、H: 1.9 mm) の 1 mm 上方にガイドカニューレを両側性に植え込んだ。

ガイドカニューレ (外径 0.7 mm のステンレススチール製パイプで、長さ 10 mm) は頭蓋骨に立てた 1 本の小型ネジ釘と共に歯科用セメントで覆い固定した。植え込み手術後はガイドカニューレと同じ長さの疑似カニューレ (外径 0.35 mm) を挿入留意し、脳組織内へ異物が混入すること、ガイドカニューレ内部が詰まることを防止した。

ガイドカニューレ植え込み手術は 8 週齢時に行い、行動実験開始前に 1 週間以上の回復期間を設けた。

1.4 薬物微量注入

被験薬物の海馬内微量注入は、ポリエチレンチューブでマイクロシリンジ (Hamilton syringe) に接続した外径 0.35 mm のステンレススチール製インジェクションカニューレのガイドカニューレへの挿入により行った。インジェクションカニューレの先端はガイドカニューレよりも 1 mm 先に出るようにした。片側 2 μ l、両側 4 μ l の薬液を約 2 分かけて両側海馬に注入した。また、被験薬物注入を確実にするために、注入後 1 分間はインジェクションカニューレをそのまま留置した。

すべての行動実験終了後、クリオスタット (MICROM HM5000M, Carl Zeiss) を用いて厚さ 20 μ m の海馬凍結切片を作成し、ガイドカニューレ挿入部位を確認した。なお、背側海馬に投与できていなかったラットはデータ解析から除外した。

1.5 行動実験

1.5.1 MAZE test

空間学習記憶能の測定には、可変式迷路装置 (Fig. 1-1) を用いた。本装置は、90 cm \times 90 cm の正方形に 15 cm \times 15 cm の正方形が連結した底面で、高さは 50 cm、内面は白色である。縦 \times 横: 50 cm \times 15 cm、50 cm \times 30 cm、50 cm \times 45 cm、50 cm \times 60 cm の各種しきりを組み合わせて 3 段階の難易度の MAZE (MAZE (A)、MAZE (B)、MAZE (C)) を作り上げた。

装置の底面上 1 m の高さに 100 W の白色光を 3 台置き、装置内はくまなく一定の照度が保た

れるようにし、ゴールまでの道筋を記憶する目印として、装置壁面上部 4 箇所(4箇所)に形の異なるシールを貼った。ゴールには報酬としてミルク(ミルクは 20 g のコンデンスミルク(雪印乳業株式会社)に 100 ml の水道水を加えたもの)を置いた。

実験準備として、雄性 SD ラットが 7 週齢時に、実験装置および報酬への「慣らし」と「群分けトレーニング」を行い、10 週齢時に再度「群分けトレーニング」を行った。次に MAZE test では、まず 1 日目に正解通路を学習させる「トレーニング」を行い、その翌日から 3 日間にわたり空間学習記憶能を測定する「テスト」を行った。本実験では、スタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、報酬を置いたゴールにたどり着いた後、自由に報酬を摂取させ、ここまですを 1 trial とした。1 trial 終了後、直ちにラットを MAZE からケージに移し、1 分間の間隔をおいて次の trial を開始した。また、各 trial 終了後に装置を雑巾できれい清掃し、次の trial を行った。雄性 SD ラットが 10 週齢時に MAZE (A) test を、12 週齢時に MAZE (B) test を行い、NP 海馬内微量注入は、MAZE test のトレーニングおよびテスト終了後 30 分以内に行われた。

① 慣らし

ゴールを塞いだ MAZE 装置を 4 等分に仕切り、1 エリアに 1 匹のラットをスタート内壁面にラットの鼻部を向けて静かに置き、装置及び報酬に慣れさせた (Fig. 1-2)。1 session あたり 3 trial を 1 日 2 session、3 日間連続して行い、session 間の間隔は 2 時間とした。1 trial の測定時間は 3 分とし、その間動物は自由に装置内を探索した。報酬はミルク 300 μ l とし、各 trial 終了後、雑巾できれいに清掃した後で次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

② 群分けトレーニング

エラーエリアを塞いだ正解通路のみの装置 (Fig. 2-1) を用いて 3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、3 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導した。報酬はミルク 300 μ l、各 trial 終了後、雑巾できれいに清掃した後で次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

1 回目の群分けトレーニングの結果を行い、できる限り動物間で走行能に差が生じないように選別を行い、ガイドカニューレ埋め込み手術後の 2 回目の群分けトレーニングの結果を用いて、できる限り各投与群間で走行能に差が生じないように群分けを行った。

③ トレーニング

各 MAZE test の正解通路以外の通路を塞いだ装置を用いて 3 trial を行った。1 trial の最大測定時間を 3 分間とし、報酬はミルク 300 μ l とした。3 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導し、各 trial 終了後、雑巾できれいに清掃した後で次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とした。

④ テスト

各 MAZE test の装置を用いて 1 日に 3 trial、トレーニングの翌日から 3 日間連続して行った

(Fig. 1-3)。1 trial の最大測定時間は 5 分間とし、5 分経過してもゴールにたどり着けない場合は、ラットを棒でゴールまで誘導した。報酬はミルク 300 μ l、各 trial 終了後、雑巾できれいに清掃した後で次の trial を行った。測定項目は、スタートしてからゴールの報酬を摂取し始めるまでの時間 (Time) とエラーエリアへの進入回数 (Error) とした。Error は、ラットの腰の位置がエラーエリアに入った時点でカウントした。

1.3.2 Step-through passive avoidance test

体験型学習記憶能の測定には Step-through passive avoidance test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.2 Step-through passive avoidance test と同様である。本課題は雄性 SD ラットが 13 週齢時に実施し、NP 海馬内微量中は獲得試行終了後 30 分以内に行った。

1.3.3 Open-field test

一般活動性および情動性の測定には Open-field test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.3 Open-field test と同様である。本課題は雄性 SD ラットが 10 週齢時に実施し、NP 海馬内微量注入は Open-field test の前日に行った。

1.3.4 Elevated plus-maze test

情動性の測定には Elevated plus-maze test を用いた。実験装置および実験方法については、第 1 章の 1.3.4 Elevated plus-maze test と同様である。本課題は雄性 SD ラットが 12 週齢時に実施し、NP 海馬内微量注入は Elevated plus-maze test の前日に行った。

1.4 統計学的処理

結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。有意差検定は、一元もしくは二元分散分析 (ANOVA) を行った後、Dunnett (Stat View 5.0, Microsoft) の多重比較検定を用いて解析し、危険度 5 % 以下を有意差ありとした。Elevated plus-maze test、Step-through passive avoidance test の結果は一元分散分析により解析され、MAZE test、Open-field test の結果は、二元分散分析により評価された。

1.5 実験スケジュール

本実験は、以下のスケジュールに基づいて行った。

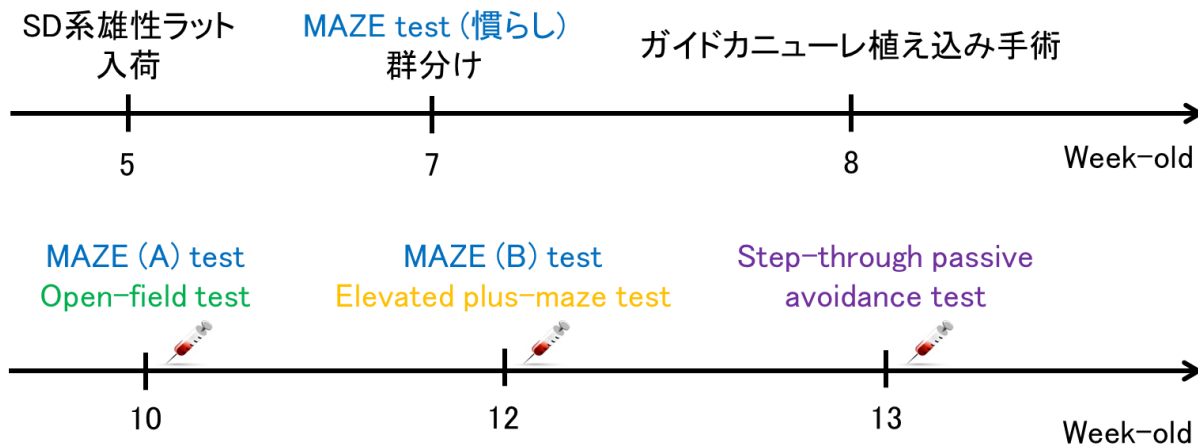


Fig. 3-1. 実験スケジュール

2. 実験結果

2.1 MAZE test

Fig. 3-2, Fig. 3-3 は NP (10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}/\text{side}$)、vehicle もしくは saline を海馬内微量注入された雄性ラットの MAZE test における日ごとの Time (Fig. 3-2) および Error (Fig.3-3) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Time はスタートしてからゴールにある報酬を摂取し始めるまでの時間、Error はゴールするまでのエラーエリアへの進入回数である。 $*P < 0.05$ は Vehicle 群との間に有意差ありを、 $\#P < 0.01$ は Saline 群との間に有意差ありを表す。

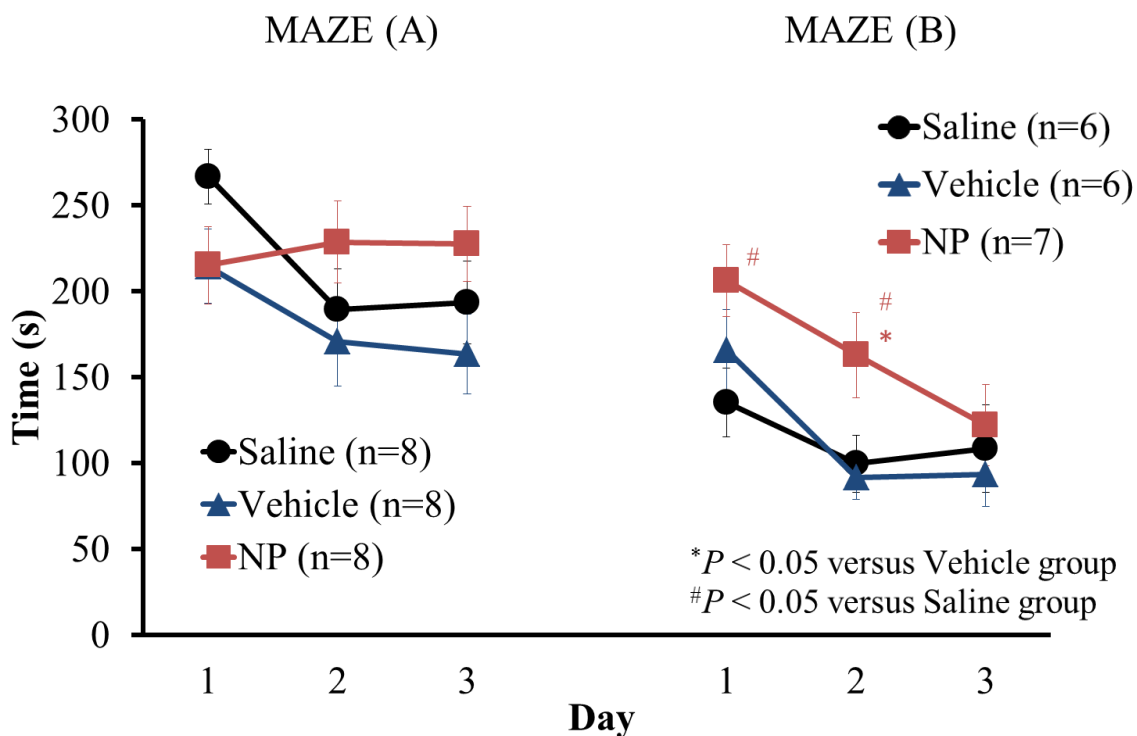


Fig. 3-2. MAZE test における雄性ラットの日ごとの Time の推移

MAZE (A) test および MAZE (B) test において、Saline 群の Time は 1 日目が最も長く、2 日目に短縮し、3 日目には 2 日目とほぼ同様の値を示した。

Vehicle 群の Time は、MAZE (A) test および MAZE (B) test で Saline 群とほぼ同様の Time を示し、Saline 群との間に有意差は認められなかった。

NP 群の Time は、MAZE (A) test の 1 日目よりも 2、3 日目の方が長かった。さらに、NP 群は、MAZE (A) test の 2、3 日目および MAZE (B) test の 1、2 日目に Saline 群および Vehicle 群よりも長い Time を示し、MAZE (B) test の 2 日目に Vehicle 群との間で、MAZE (B) test の 1、2 日目に Saline 群との間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。

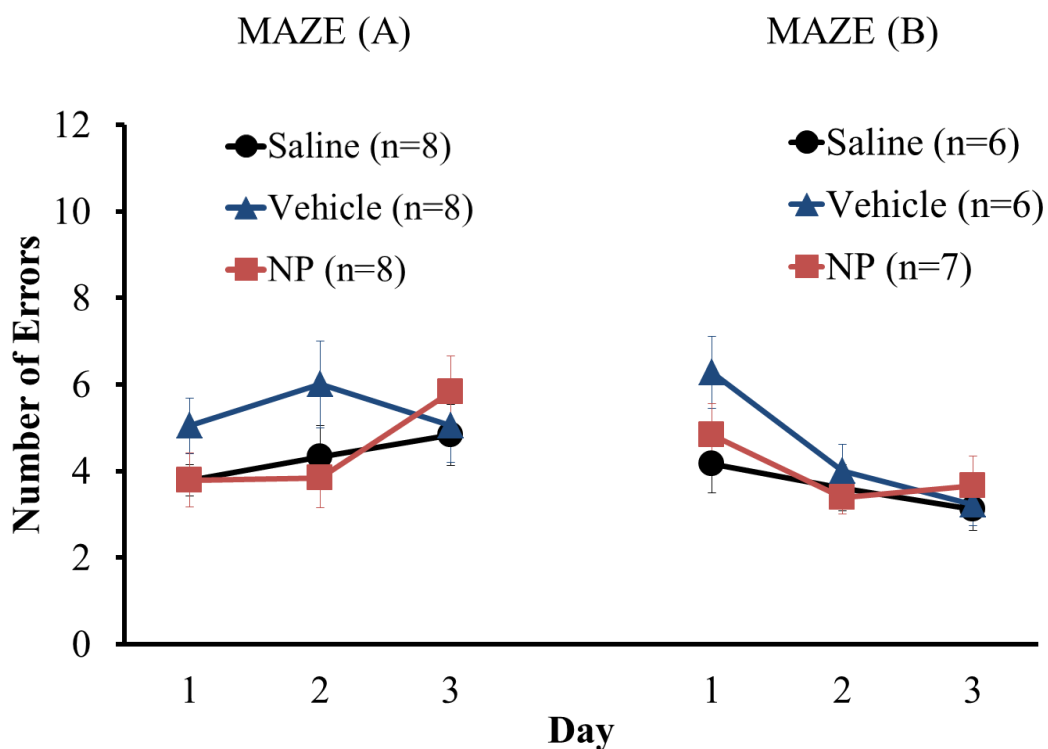


Fig. 3-3. MAZE test における雄性ラットの日ごとの Error の推移

Saline 群の Error は MAZE (A) test では日数の経過と共に徐々に増加していったが、MAZE (B) test では、日数の経過と共に徐々に減少していった。

Vehicle 群の Error は、MAZE (A) test の 1、2 日目および MAZE (B) test の 1 日目に Saline 群よりも高い値を示したが有意差は認められなかった。

NP 群の Error は、Saline 群とほぼ同様の値を示し、有意差は認められなかった。また、MAZE (A) test の 1、2 日目および MAZE (B) test の 1 日目に Vehicle 群よりも低い値を示したが有意差は認められなかった。

2.2 Step-through passive avoidance test

Fig. 3-4 は、NP (10 μ g/2 μ l/side)、vehicle もしくは saline を海馬内微量注入された雄性ラットの Step-through passive avoidance test の獲得試行および保持試行の Latency をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Latency は明室から暗室へ移行するまでの時間である。

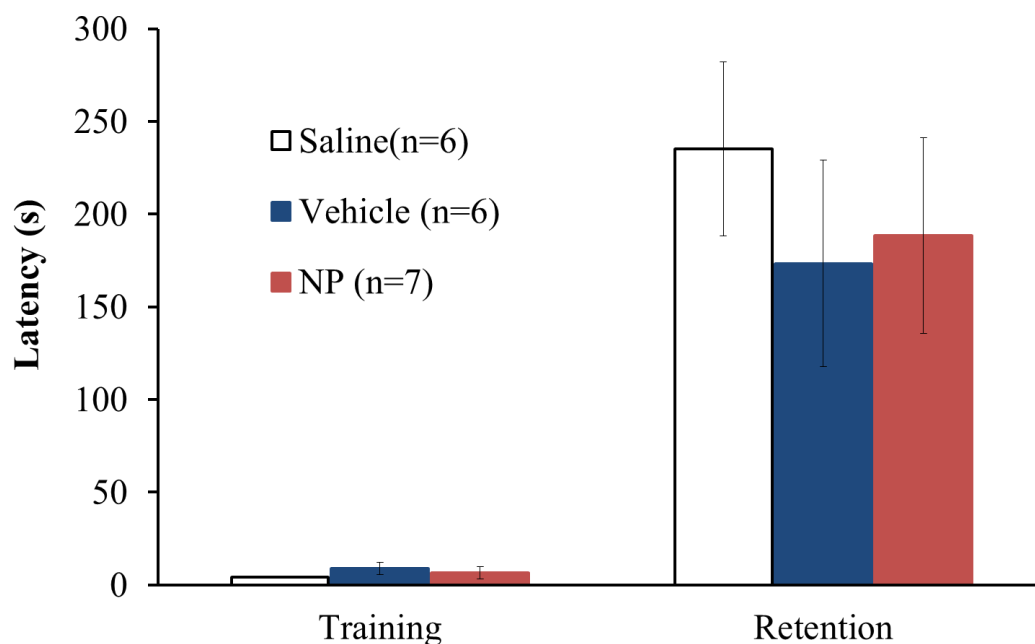


Fig. 3-4. Step-through passive avoidance test における Latency の推移

獲得試行において、すべての群の Latency はほぼ同様の値を示し、各群間で有意差は認められなかった。保持試行においては、Vehicle 群および NP 群は、Saline 群よりも低い Latency を示したが、Vehicle 群、NP 群ともには、Saline 群との間に有意差は認められなかった。また、Vehicle 群と NP 群の保持試行の Latency はほぼ同様の値を示し、Vehicle 群と NP 群の間に有意差は認められなかった。

2.3 Open-field test

Fig. 3-5, Fig. 3-6, Fig. 3-7 は、NP (10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}/\text{side}$)、vehicle もしくは saline を海馬内微量注入された雄性ラットの Open-field test における Ambulation (Fig. 3-5)、Rearing (Fig. 3-6)、Inner (Fig. 3-7) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。Ambulation は装置底面の区画を横切った総回数、Inner は装置底面の内円の各区画を横切った回数、Rearing は立ち上がり行動の回数である。

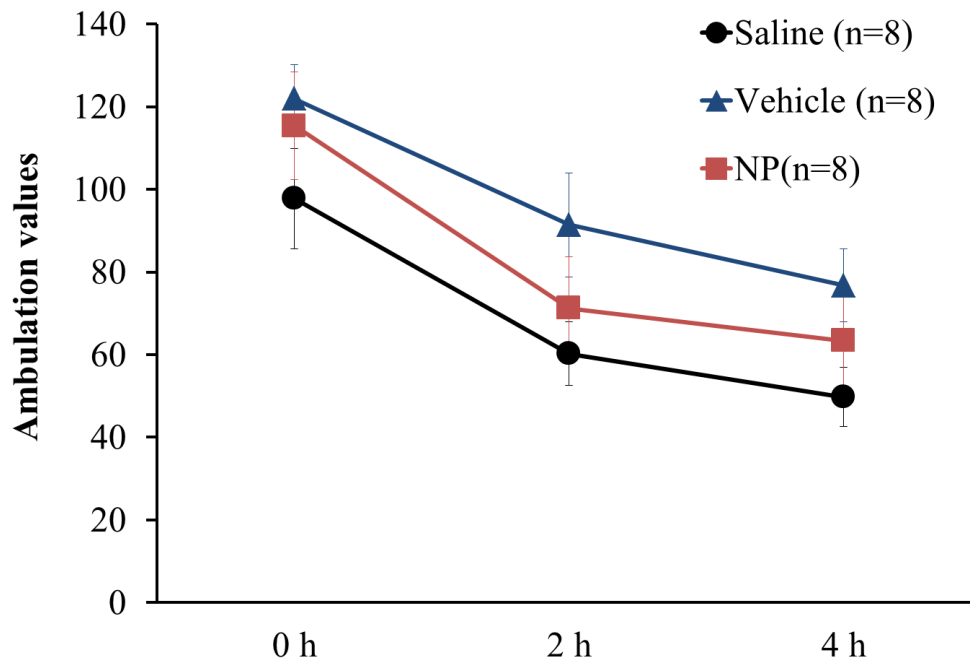


Fig. 3-5. Open-field test における雄性ラットの Ambulation の推移

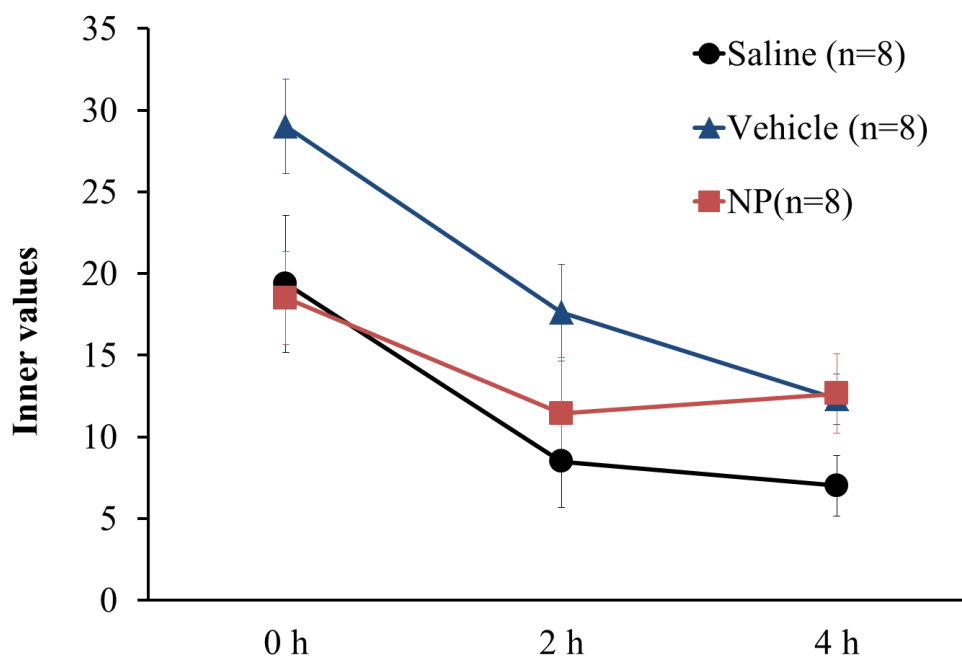


Fig. 3-6. Open-field test における雄性ラットの Inner の推移

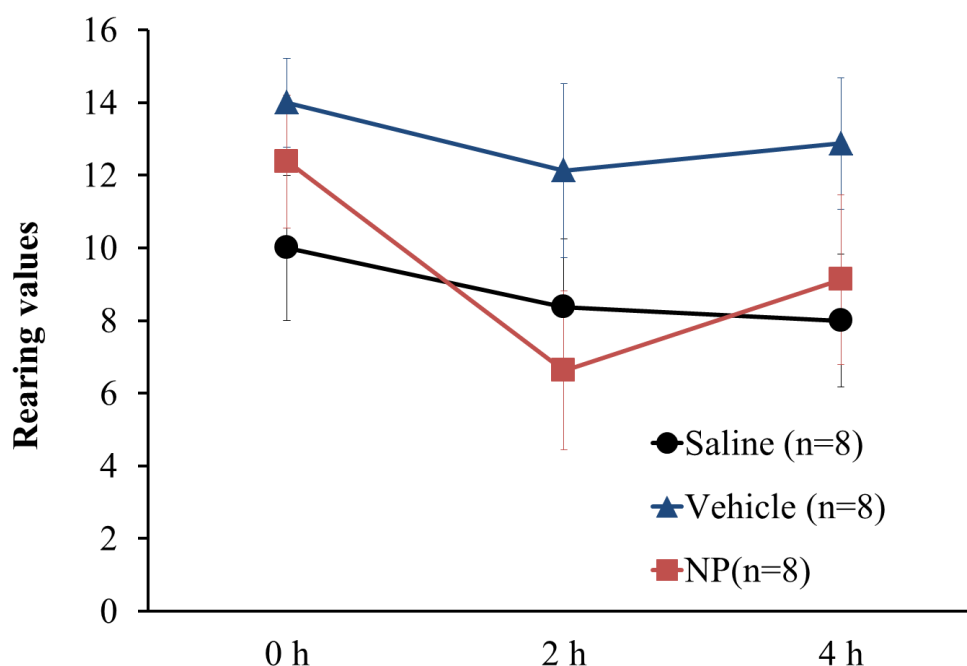


Fig. 3-7. Open-field test における雄性ラットの Rearing の推移

Saline 群の Ambulation、Inner および Rearing の値は時間経過とともに徐々に減少していった。

Vehicle 群の Ambulation および inner の値も時間経過とともに減少したが、Rearing は 2 h 値では若干減少し、4 h 値では若干増加した。すべての測定項目において、Vehicle 群は Saline 群よりも常に高い値で推移したが、Vehicle 群と Saline 群との間で有意差は認められなかった。

NP 群の Ambulation も時間の経過とともに減少したが、実験後期 (2, 4 h 値) で Vehicle 群よりも低い値を示したが有意差は認められなかった。NP 群の Inner は 2 h 値では減少し、4 h 値では若干増加し、実験初期 (0, 2 h 値) で Vehicle 群よりも低い Inner を示したが有意差は認められなかった。NP 群の Rearing は 2 h 値で減少し、4 h 値では増加し、実験後期 (2, 4 h 値) で Vehicle 群よりも低い値を示したが、NP 群と Vehicle 群との間で有意差は認められなかった。

2.4 Elevated plus-maze test

Fig. 3-8 は、NP (10 $\mu\text{g}/2 \mu\text{l}/\text{side}$)、vehicle もしくは saline を海馬内微量注入された雄性ラットの Elevated plus-maze test における open arm および closed arm への進入回数 および滞在時間 (Fig. 3-8) をその平均値 \pm 標準誤差で表したものである。# $P < 0.05$ は Saline 群との間に有意差ありを表す。

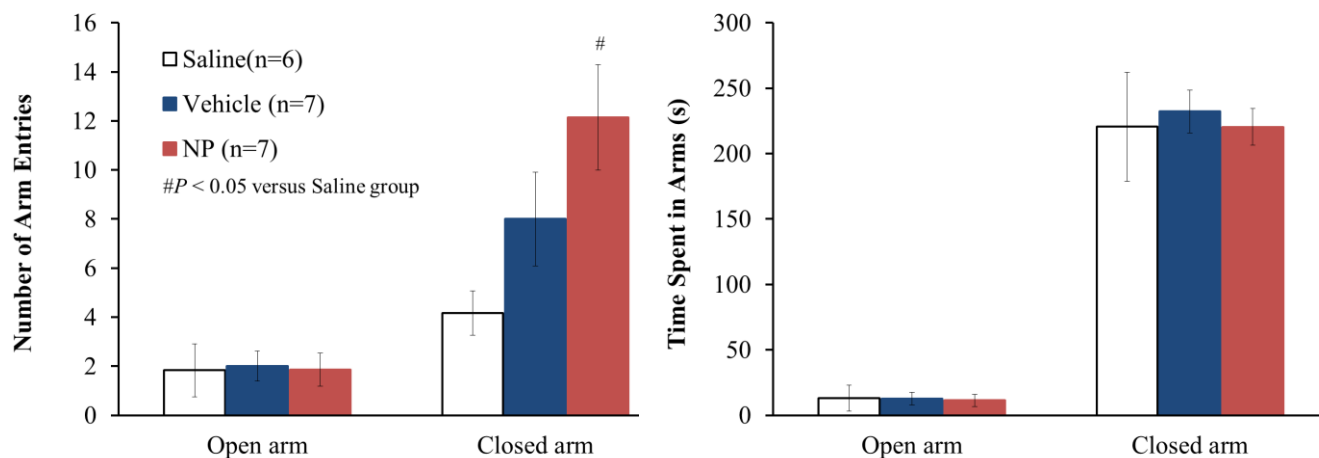


Fig. 3-8. Elevated plus-maze test における雄性ラットの各 arm への進入回数および滞在時間

すべての群の open arm への進入回数および滞在時間と closed arm における滞在時間は、ほぼ同様の値を示し、各群間で有意差は認められなかった。

Close arm への進入回数において、Vehicle 群は Saline 群よりも高い値を示したが有意差は認められなかった。また、NP 群の Close arm への進入回数は、Vehicle 群および Control 群の進入回数よりも高い値を示し、NP 群と Saline 群との間で有意差が認められた ($P < 0.05$)。

3. 考察

本研究では、低用量 NP 経口投与が成獣期雄性ラットの空間記憶能を低下させるという第 2 章の結果を基に、関連する脳部位をより明確にするために、空間学習記憶において重要な役割を担っている脳領域である背側海馬への NP 微量注入が雄性ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響について各種行動実験を用いて評価した。

第 1 章および第 2 章で使用した MAZE test を用いて、NP 海馬内微量注入が雄性ラットの空間学習記憶能に及ぼす影響を評価した。Saline 群および Vehicle 群の Time は MAZE (A) test、MAZE (B) test と共に 1 日目よりも 2、3 日目の方が低い値を示しており、さらに MAZE (A) → MAZE (B) と MAZE の難易度が上昇しても MAZE test が進むにつれて Time の短縮が観察された。MAZE test において、Saline 群と Vehicle 群との間で有意差は認められなかったが (Fig. 3-2, Fig. 3-3)、NP 群は MAZE (B) test の 2 日目に Vehicle 群よりも有意に長い Time を示し、MAZE (B) test の 1、2 日目に Saline 群との間でも有意差が認められた ($P < 0.05$; Fig. 3-2)。このため、NP 海馬内微量注入が成獣期雄性ラットの空間記憶能を低下させることが示唆された。この結果は、低用量 NP 経口投与の空間記憶能低下作用を示唆した第 2 章の結果と一致している。

第 1 章および第 2 章で使用した Step-through passive avoidance test を用いて NP 海馬内微量注入が雄性ラットの体験型記憶能に及ぼす影響を評価した。獲得試行および保持試行において、各群間で有意差は認められなかった。このため、NP 海馬内微量注入が成獣期雄性ラットの体験型記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された。この結果は、低用量 NP 経口投与が成獣期雄性ラットの体験型学習記憶能に影響を及ぼさないことを示した第 2 章の結果と一致している。

NP 海馬内微量注入が雄性ラットの一般活動性および情動性に及ぼす影響に関しては、第 1 章、第 2 章で使用した Open-field test、Elevated plus-maze test を用いて評価した。

Open-field test における、Saline 群の測定項目は時間の経過とともに減少していった。Vehicle 群の Ambulation および Inner も時間経過とともに減少し、常に Saline 群よりも高い値で推移したが、有意差は認められなかった。すべての項目において、NP 群は Vehicle 群よりも低い値で推移したが、Vehicle 群との間で有意差は認められなかった (Fig. 3-5, Fig. 3-6, Fig. 3-7)。

すべての群の open arm への進入回数および滞在時間と closed arm における滞在時間は、ほぼ同様の値を示し、各群間で有意差は認められなかったが、NP 群の Close arm への進入回数は Vehicle 群および Saline 群よりも多く、NP 群と Saline 群との間で有意差が認められた ($P < 0.05$; Fig. 3-8)が、Vehicle 群との間では有意差は認められなかった。Saline 群との間で有意差は認められたものの、Vehicle 群も Saline 群よりも大きな値を示し、NP 群の Close arm への進入回数の増加が NP の作用によるものであると断言することはできない。また、Open-field test において、NP 海馬内微量注入による行動変更は観察されなかったことから、NP 海馬内微量注入は雄性ラットの活動性を増加するとは断定できないが、活動性を若干増加する可能性が示唆された。しかし第 2 章では、NP 経口投与は雄性ラットの一般活動性および情動性には影響を及ぼさなかった。この違いは脳内に到達する NP の濃度の違いによる可能性が考えられる。50, 100, 200 mg/kg/day NP を 90 日間慢性経口投与された雄性マウスの Open-field test において、200 mg/kg/day NP 群のみ、マウスの自発運動量を変更することが報告されている¹⁷⁾。この結果から、NP 曝露の用量

が増加すると自発運動量に影響を及ぼすことが示唆されるため、NP 海馬内微量注入と低用量 NP 経口投与で雄性ラットの一般活動性および情動性に及ぼす影響が若干異なると考えられる。

エストラジオールの海馬内微量注入が、卵巣切除した雌性マウスの視覚的記憶固定を向上させることや⁶²⁾、雌性ラットの空間学習能を向上させるという報告がある⁵⁹⁾。また前述のように、ER アンタゴニストの海馬内微量注入が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させたという報告⁶⁰⁾もあり、エストロゲンおよび海馬は学習記憶と密接な関係にあると考えられる。NP が海馬における LTD に影響を及ぼす⁴¹⁾ことや、NP が ER を介さずに海馬樹状突起伸長を阻害することが報告されている⁴⁹⁾。また、NP が caspase-3 活性化を低下させることにより、ニューロンのアポトーシスを阻害し、脳の正常な発達を妨げることが報告されている⁶³⁾。これらのことから、NP が学習記憶に影響を及ぼす場合に、海馬がその主要な作用部位であると考えられる。

本研究では、空間学習記憶能において重要な役割を果たす脳領域である海馬へ NP を直接投与し、NP 海馬内微量注入が雄性ラットの空間記憶能を低下させることを示唆した。第 2 章における、成獣期雄性ラットへの低用量 NP 経口投与が空間記憶能を低下させた結果を踏まえ、NP による空間記憶能の低下作用は、海馬がその主な作用部位であると推察された。

総括

本研究は、内分泌攪乱化学物質の1つであるNPへの胎児期から新生児期にかけての周産期曝露、および成獣期曝露が雄性仔ラット、成獣期雌雄ラットの学習記憶を主とした中枢神経機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的として行い、以下の結果を得た。

1. 低用量 NP 周産期曝露は雄性仔ラットの体験型学習記憶能、一般活動性および情動性には影響を及ぼさなかったが、特異的に空間学習記憶能を向上した。この影響は 10 mg/kg/day NP 群よりも 1 mg/kg/day NP 群の方が顕著であり、NP 周産期曝露と空間学習記憶能増強の非単調用量反応関係が示唆された。
2. 低用量 NP 経口投与は、成獣期雌雄ラットの空間記憶能を若干低下させ、雌性ラットの体験型記憶能および警戒行動を低下させた。一方で、雄性ラットの体験型記憶能、情動性に影響を及ぼさなかった。また、低用量 NP 経口投与と雄性ラットの空間記憶能低下の非単調用量反応関係が示唆された。
3. 成獣期雄性ラットへの NP 海馬内微量注入は、空間記憶能を低下し、活動性を若干増加する可能性が示唆されたが、体験型記憶能および情動性に影響を及ぼさないことが示唆された。第2章における、NP 経口投与が雄性ラットの空間学習記憶能を低下させた結果を踏まえると、NP 曝露による雄性ラットの空間記憶能の低下は、学習記憶において重要な役割を担っている脳領域である海馬がその主要な作用部位であると推察された。

以上のことから、脳形成期である周産期と脳形成後である成獣期⁶⁴⁾における低用量 NP 曝露が及ぼす影響が異なることが示唆された。これは、脳および神経の発達期と発達後で NP による作用が異なるためと考えられる。また、低用量 NP 経口投与による体験型学習記憶能低下および警戒行動を低下は雌性ラットでのみ観察されたため、雄性ラットよりも雌性ラットの方が低用量 NP 曝露の影響が多岐にわたって発現すると推察される。NP や BPA のようなエストロゲン活性を有している内分泌攪乱化学物質による影響が内在性エストロゲンに依存することが報告⁵⁶⁻⁵⁸⁾されている。このため、BPA と同様に NP が中枢神経機能に及ぼす影響も内在性エストロゲン濃度が関連している可能性がある。

本研究では、周産期および成獣期 NP 曝露と雄性ラットの空間学習記憶能において、非単調用量反応関係が示唆された。低用量 NP がエストロゲン膜受容体を介してドパミン分泌に影響を及ぼすという作用も非単調用量反応曲線を示すことが報告されている⁶⁵⁾。ドパミン作動性神経が本研究で用いた MAZE test のような報酬学習や Step-through passive avoidance test のような忌避学習に関連していることが報告⁶⁶⁾されており、NP 曝露と雄性ラットの空間学習記憶能における非単調用量反応関係は、いくつかの非単調用量反応曲線を示す NP による影響が相互に作用することによって引き起こされたと考えられる。

NP の NOAEL は 10 mg/kg と報告されているが、本研究では NOAEL と同等もしくはそれ以

下の用量で、NP が中枢神経機能に影響を及ぼすこと認められた。このため、低用量 NP 曝露に対しても注意を払うべきである。

参考文献

- 1) Ying GG, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environ Int* 2002; 28: 215–226.
- 2) Bennie DT, Sullivan CA, Lee HB, Peart TE, Maguire RJ. Occurrence of alkylphenols and alkylphenol mono- and diethoxylates in natural waters of the Laurentian Great Lakes basin and the upper St. Lawrence River. *Sci Total Environ* 1997; 193: 263–275.
- 3) Blackburn MA, Kirby SJ, Waldock MJ. Concentrations of alkylphenol polyethoxylates entering UK estuaries. *Mar Pollut Bull* 1999; 38: 109–118.
- 4) Ferguson PL, Iden CR, Brownawell BJ. Distribution and fate of neutral alkylphenol ethoxylate metabolites in a sewage-impacted urban estuary. *Environ Sci Technol* 2001; 35: 2428–2435.
- 5) Laws SC, Carey SA, Ferrell JM, Bodman GJ, Cooper RL. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci* 2000; 54: 154–167.
- 6) Nishihara T, Nishikawa JI, Kanayama T, Dakeyama F, Saito K, Imagawa M, Takatori S, Kitagawa Y, Hori S, Utsumi H. Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Health Sci* 2000; 46: 282–298.
- 7) Chapin RE, Delaney J, Wang Y, Lanning L, Davis B, Collins B, Mintz N, Wolfe G. The effects of 4-nonylphenol in rats: A multigeneration reproduction study. *Toxicol Sci* 1999; 52: 80–91.
- 8) Nagao T, Wada K, Marumo H, Yoshimura S, Ono H. Reproductive effects of nonylphenol in rats after gavage administration: A two-generation study. *Reprod Toxicol* 2001; 15: 293–315.
- 9) Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, Yan L. Toxic effect of gestational exposure to nonylphenol on F1 male rats. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2010; 89: 418–428.
- 10) Jie X, Yang W, Jie Y, Hashim JH, Liu XY, Fan QY, Yan L. Immune effects of nonylphenol on offspring of rats exposed during pregnancy. *Hum Ecol Risk Assess* 2010; 16: 444–452.
- 11) Lee PC. Disruption of male reproductive tract development by administration of the xenoestrogen, nonylphenol, to male newborn rats. *Endocrine* 1998; 9: 105–111.
- 12) Noda S, Muroi T, Mitoma H, Takakura S, Sakamoto S, Minobe A, Yamasaki K. Reproductive toxicity study of bisphenol A, nonylphenol, and genistein in neonatally exposed rats. *J Toxicol Pathol* 2006; 18: 203–207.
- 13) Odum J, Ashby J. Neonatal exposure of male rats to nonylphenol has no effect on the reproductive tract. *Toxicol Sci* 2000; 56: 400–404.
- 14) Ferguson SA, Flynn KM, Delclos KB, Newbold RR. Maternal and offspring toxicity but few sexually dimorphic behavioral alterations result from nonylphenol exposure.

- Neurotoxicol Teratol 2000; 22: 583–591.
- 15) Kuwahara R, Kawaguchi S, Kohara Y, Cui H, Yamashita K. Perinatal exposure to low-dose bisphenol A impairs spatial learning and memory in male rats. *J Pharmacol Sci* 2013; 123: 132–139.
 - 16) Kuwahara R, Kawaguchi S, Kohara Y, Jojima T, Yamashita K. Bisphenol A Does Not Affect Memory Performance in Adult Male Rats. *Cell Mol Neurobiol* 2014; 34: 333–342
 - 17) Mao Z, Zheng YL, Zhang YQ. Behavioral impairment and oxidative damage induced by chronic application of nonylphenol. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 114–127.
 - 18) Fagg, GE. L-Glutamate, excitatory amino acid receptors and brain function. *Trends in Neurosciences* 1985; 8: 207–210.
 - 19) Mitani A, Yanase H, Sakai K, Wake Y, Kataoka K. Origin of intracellular Ca²⁺ elevation induced by in vitro ischemia-like condition in hippocampal slices. *Brain Res* 1993; 601: 103–110.
 - 20) Tamura R, Nakada Y, Nishijo H, Miyake N, Ono T. Ameliorative effects of tamolarizine on place learning impairment induced by transient forebrain ischemia in rats. *Brain Res* 2000; 853: 81–92.
 - 21) Doerge DR, Twaddle NC, Churchwell MI, Chang HC, Newbold RR, Delclos KB. Mass spectrometric determination of p-nonylphenol metabolism and disposition following oral administration to Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol* 2002; 16: 45–56.
 - 22) Hong EJ, Choi KC, Jung YW, Leung PC, Jeung EB. Transfer of maternally injected endocrine disruptors through breast milk during lactation induces neonatal Calbindin-D9k in the rat model. *Reprod Toxicol* 2004; 18: 661–668.
 - 23) Ademollo N, Ferrara F, Delise M, Fabietti F, Funari E. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ Int* 2008; 34: 984–987.
 - 24) Otaka H, Yasuhara A, Morita M. Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction. *Anal Sci* 2003; 19: 1663–1666.
 - 25) Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J Comp Psychol* 1934; 18: 385–403.
 - 26) vom Saal FS, Timms BG, Montano MM, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Dhar MD, Ganjam VK, Parmigiani S, Welshons WV. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 2056–2061.
 - 27) Conolly RB, Lutz WK. Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicol Sci* 2004; 77: 151–157.
 - 28) Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity.

- Toxicology 2006; 227: 185–192.
- 29) Vandenberg LN, Wadia PR, Schaeberle CM, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. The mammary gland response to estradiol: Monotonic at the cellular level, non-monotonic at the tissue-level of organization? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006; 101: 263–274.
 - 30) Weiss B. Endocrine disruptors as a threat to neurological function. *J Neurol Sci* 2011; 305: 11–21.
 - 31) Fader AJ, Hendricson AW, Dohanich GP. Estrogen improves performance of reinforced T-maze alternation and prevents the amnesic effects of scopolamine administered systemically or intrahippocampally. *Neurobiol Learn Mem* 1998; 69: 225–240.
 - 32) Daniel JM, Fader AJ, Spencer AL, Dohanich GP. Estrogen enhances performance of female rats during acquisition of a radial arm maze. *Horm Behav* 1997; 32: 217–225.
 - 33) Phan A, Gabor CS, Favaro KJ, Kaschack S, Armstrong JN, MacLusky NJ, Choleris E. Low doses of 17 β -estradiol rapidly improve learning and increase hippocampal dendritic spines. *Neuropsychopharmacology* 2012; 37: 2299–2309.
 - 34) Dubal DB, Kashon ML, Pettigrew LC, Ren JM, Finklestein SP, Rau SW, Wise PM. Estradiol protects against ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1253–1258.
 - 35) Goodman Y, Bruce AJ, Cheng B, Mattson MP. Estrogens attenuate and corticosterone exacerbates excitotoxicity, oxidative injury, and amyloid beta-peptide toxicity in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1996; 66: 1836–1844.
 - 36) McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; 20: 279–307.
 - 37) McEwen B, Akama K, Alves S, et al. Tracking the estrogen receptor in neurons: Implications for estrogen-induced synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 7093–7100.
 - 38) Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J Neurophysiol* 1999; 81: 1404–1411.
 - 39) Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 17 β -estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* 1999; 81: 925–929.
 - 40) Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicol Sci* 2000; 54: 138–153.
 - 41) Ogiue-Ikeda M, Tanabe N, Mukai H, Hojo Y, Murakami G, Tsurugizawa T, Takata N, Kimoto T, Kawato S. Rapid modulation of synaptic plasticity by estrogens as well as endocrine disruptors in hippocampal neurons. *Brain Res Rev* 2008; 57: 363–375.
 - 42) Morris RG, Schenk F, Tweedie F, Jarrard LE. Ibotenate lesions of hippocampus and/or

- subiculum: Dissociating components of allocentric spatial learning. *Eur J Neurosci* 1990; 2: 1016–1028.
- 43) Corrieri L, Della Seta D, Canoine V, Fusani L. Developmental exposure to xenoestrogen enhances spatial learning in male rats. *Horm Behav* 2007; 51: 620–625.
- 44) Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1159–1164.
- 45) Chang Q, Gold PE. Intra-hippocampal lidocaine injections impair acquisition of a place task and facilitate acquisition of a response task in rats. *Behav Brain Res* 2003; 144: 19–24.
- 46) Johansen JP, Cain CK, Ostroff LE, LeDoux JE. Molecular mechanisms of fear learning and memory. *Cell* 2011; 147: 509–24.
- 47) Zornetzer SF, Chronister RB. Neuroanatomical localization of memory disruption: relationship between brain structure and learning task. *Physiol Behav* 1973; 10: 747–50.
- 48) Zalko D, Costagliola R, Dorio C, Rathahao E, Cravedi JP. In vivo metabolic fate of the xeno-estrogen 4-n-nonylphenol in Wistar rats. *Drug Metab. Dispos* 2003; 31: 168–178.
- 49) Matsunaga H, Mizota K, Uchida H, Uchida T, Ueda H. Endocrine disrupting chemicals bind to a novel receptor, microtubule-associated protein 2, and positively and negatively regulate dendritic outgrowth in hippocampal neurons. *J. Neurochem* 2010; 114: 1333–1343.
- 50) Obata T, Kubota S. Formation of hydroxy radicals by environmental estrogen-like chemicals in rat striatum. *Neurosci. Lett* 2000; 296: 41–44.
- 51) Obata T, Kubota S, Yamanaka Y. Protective effect of histidine on para-nonylphenol enhanced hydroxyl free radical generation induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP+) in rat striatum. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1568: 171–175.
- 52) Stefański R, Pałejko W, Bidziński A, Kostowski W, Płaźnik A. Serotonergic innervation of the hippocampus and nucleus accumbens septi and the anxiolytic-like action of the 5-HT₃ receptor antagonists. *Neuropharmacology* 1993; 32: 987–993.
- 53) Gong W, Neill DB, Lynn M, Justice JB. Dopamine D1/D2 agonists injected into nucleus accumbens and ventral pallidum differentially affect locomotor activity depending on site. *Neurosci* 1999; 93: 1349–1358.
- 54) Prado-Alcalá, RA, Fernández-Samblancat M, Solodkin-Herrera M. Injections of atropine into the caudate nucleus impair the acquisition and the maintenance of passive avoidance. *Pharmacol. Biochem. Behav* 1985; 22: 243–247.
- 55) Swanson CJ, Heath S, Stratford TR, Kelley AE. Differential behavioral responses to dopaminergic stimulation of nucleus accumbens subregions in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav* 1997; 58: 933–945.

- 56) Xu X, Li T, Luo Q, Hong X, Xie L, Tian D. Bisphenol-A rapidly enhanced passive avoidance memory and phosphorylation of NMDA receptor subunits in hippocampus of young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 2011; 255: 221–228.
- 57) Inagaki T, Frankfurt M, Luine V. Estrogen-induced memory enhancements are blocked by acute bisphenol A in adult female rats: role of dendritic spines. *Endocrinology* 2012; 153: 3357–3367.
- 58) Jie Y, Fan QY, Binli H, et al. Joint neurodevelopmental and behavioral effects of nonylphenol and estradiol on F1 male rats. *Int J Environ Health Res* 2013; 23: 321–330.
- 59) Zurkovsky L, Brown SL, Boyd SE, Fell JA, Korol DL. Estrogen modulates learning in female rats by acting directly at distinct memory systems. *Neuroscience* 2007; 144: 26–37.
- 60) Talebia A, Naghdib N, Sepehria H, Rezayof A. The role of estrogen receptors on spatial learning and memory in CA1 region of adult male rat hippocampus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 9: 183–191.
- 61) König JFR, Klippel RA. *The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem.* New York: Krieger; 1967.
- 62) Fernandez SM, Lewis MC, Pechenino AS, Harburger LL, Orr PT, Gresack JE, Schafe GE, Frick KM. Estradiol-induced enhancement of object memory consolidation involves hippocampal extracellular signal-regulated kinase activation and membrane-bound estrogen receptors. *J Neurosci* 2008; 28: 8660–8667.
- 63) Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neurosci Letter* 2003; 353: 99–102.
- 64) Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol* 2013; 106-107: 1–16.
- 65) Alyea RA, Watson CS. Differential regulation of dopamine transporter function and location by low concentrations of environmental estrogens and 17beta-estradiol. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 778–83.
- 66) Hikida, T., Kimura, K., Wada, N., Funabiki, K. and Nakanishi, S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron* 2010; 66: 896–907.

謝辞

本論文は筆者が長崎大学大学院 生産科学研究科 環境科学専攻 博士後期課程に在籍中の研究結果をまとめたものである。同専攻教授 山下樹三裕先生には指導教官として本研究の遂行に関して終始暖かいご指導とご鞭撻を受け賜りました。ここに深謝の意を表します。

長崎大学 環境科学部教授 北村美江先生、岡田二郎先生には副査として本論文の細部にわたりご指導いただきました。ここに深謝の意を表します。また、実験の遂行にあたりご協力いただいた山下研究室の皆さんに深謝の意を表します。