

ダイオキシン胎盤・母乳暴露により若年期に発症する接触刺激に対する過敏な応答行動

—若年期うつ発症の可能性について—

Hyperactive behaviors elicited by mechanical soft stimulations in young adult mice: behavioral abnormalities in depressive-like symptoms induced by *in utero* and lactational exposures of dioxin

鹿児島純心女子大学国際人間学部こども学科

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座神経解剖学

鹿児島大学理学部生命化学科

鹿屋体育大学体育学部

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学講座神経解剖学

口 岩 俊 子

アブドアイニ・アブドラヒマン

口 岩 琢 哉

森 司 朗

口 岩 聡

要 約

内分泌かく乱化学物質の周産期暴露により現れる行動異常とうつ病の共通性を調べる目的で、以下の実験を行った。正常な雌雄のddY系マウス6組を交配し、妊娠させた。妊娠7日目と14日目に、オリーブオイルに溶解した2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を3匹の雌マウスに経口投与した。投与量は1回につき100 $\mu\text{g/kg}$ 、2回の合計で200 $\mu\text{g/kg}$ とした。対照群の雌マウス3匹には、同様の方法でオリーブオイルを同量投与した。各動物の出産後、産仔を母乳で飼育し、生後21日目に離乳した。離乳後は、同腹の同性産仔同士で集団飼育した。産仔は、生後2週目から目視による行動観察を行い、さらに生後5週目から30週目まで、接触刺激応答計測装置(リンビック・レスポンス・メータ)を用いて、機械的接触刺激に対する応答行動を計測した。

TCDDを胎盤・母乳を介して摂取した雄産仔の多くは、生後2週目に実験室内の日常的機械刺激に対して過敏な行動を示したが、この異常行動は3週目には消失した。生後7週末頃から、軽い接触刺激に対する過敏な応答行動が顕著に表れた。すなわち、刺激棒で身体に触れる刺激に対して、1) 刺激棒を後肢で激しく蹴る「払い除け行動」、2) 刺激を避けて逃避する「回避行動」、3) 刺激棒に噛みつく「対物攻撃行動」、4) 刺激を回避し床敷に潜って隠れる「潜隠行動」が見られた。

これらの行動異常をうつ動物における行動と比較するため、隔離飼育うつモデルマウスを作製し、両者の行動学的特徴を比較した。雄隔離飼育うつモデルマウスでは、軽い接触刺激に対して、潜隠行動は顕著ではなかったが、他の3つの行動、すなわち払い除け行動、回避行動、攻撃行動が顕著に現れ、その行動様式はTCDD胎盤・母乳経路摂取マウスと酷似していた。接触刺激に対する応答行動も、両者間でまったく差が認められなかった。以前の研究においてTCDD摂取動物とうつ動物の脳内物質の特徴に類似性が見られることが明らかになっているので、TCDDの周産期暴露により発症する若年期行動異常はうつ症状の一部である可能性が考えられた。

キーワード：ダイオキシン脳症、行動異常、精子形成期、うつ病、行動学的研究

緒言

内分泌かく乱化学物質を胎盤経由または/および母乳経由でマウス産仔に摂取させると、成長過渡期および成長後の若年期に行動異常が現れる。この行動異常は、接近する物体から逃げ去ろうとする「回避行動」、繰り返される物体の接触を嫌って床敷に潜って頭部を隠す「潜隠行動」、顔面付近に接近する物体に噛みつく「対物攻撃行動」、身体に接触する物体を後肢で激しく連続して蹴り払う「払い除け行動」から構成される（口岩ら、2006）。

これらの行動は、正常なマウスにはほとんど観察されないことから、内分泌かく乱化学物質を周産期に摂取することによって発症する行動異常であると考えられる。内分泌かく乱化学物質を胎盤・母乳経由で摂取した動物には、脳内神経伝達物質異常が現れることが分かっている（Kuchiiwa et al., 2002）、これらの行動異常は脳内物質の変調に起因することが推察される。

内分泌かく乱化学物質の周産期摂取により現れる脳内物質異常は、モノアミン系物質の変化が主であり、これらうつ病の病理機序に一部は共通する。したがって、内分泌かく乱化学物質の胎盤・母乳経由摂取は第二次性徴期から若年期に渡る時期におけるうつ発症のリスクの一つである可能性が推察できる。

そこで我々は、内分泌かく乱化学物質の一種であるダイオキシンを妊娠マウスに投与することにより、産仔に胎盤および母乳経由でダイオキシンの経口摂取させ、第二次性徴期から若年期に発症する行動異常を調査した。そして、隔離飼育により作製したうつモデルマウスの行動異常と比較し、ダイオキシン摂取動物の行動異常がうつ症状の一つである可能性について考察を行った。

材料と方法

1. 実験動物と実験環境

実験には、九動（福岡県鳥栖市）から購入した正常な雌雄のddY系成獣マウス12匹と、鹿児島大学フロンティアサイエンス研究推進センター内で繁殖した産仔16匹を使用した。購入したマウスは検疫の後、1週間の観察を行い実験に供した。実

験は鹿児島大学動物実験委員会の許可のもとに鹿児島大学動物実験指針および日本国の法律を遵守して行った。実験動物は、ダイオキシン実験専用室内に設置した日本クレア製のセーフティーラック内で飼育し、すべての実験を同室内で行った。実験室は一方向性の気流制御を行い、施設外への排気はすべて超微粒子濾過フィルターにて濾過しダイオキシンの環境への排出を防止した。室内照明は午前7時から午後7時の12時間、室温は 22 ± 2 ℃、湿度は $55 \pm 10\%$ に調節した。動物の摂食と飲水は自由に行わせた。

2. ダイオキシンまたはヴィークルの投与

検疫終了後の健全な雌雄のマウス6組を交配した。交尾の有無は、同居の翌日から早朝に膣内の精子の有無を調べることにより判断し、精子が検出された日を妊娠0日として起算した。ダイオキシンの投与は、妊娠7日目および14日目の2回、3匹の雌に対して行った。ダイオキシンは、ダイオキシン類中でもっとも毒性が強いとされる2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD: アキュースタANDARD社) を局方オリーブオイルに溶解して使用した。TCDDのマウスへの投与は、1 ml 注射器に接続したゾンデを胃内に直接挿入して行った。1回の投与量は $100 \mu\text{g/kg}$ であった。3匹の雌には同量のオリーブオイル（ヴィークル）を同様に胃内に直接投与した。ダイオキシン投与を受けた母マウスの総TCDD投与量は $200 \mu\text{g/kg}$ であり、対照群は $0 \mu\text{g/kg}$ であった。同腹産仔は間引いて10匹とし、母乳飼育して生後21日目に離乳した。離乳後は、雌雄に分離して同腹の個体同士を集団飼育した。行動学的実験にはダイオキシン摂取産仔マウスを6匹、対照群産仔マウスを5匹用いた。

3. うつモデルマウスの作製

対照群の3匹から生まれた産仔の中から、正常に生育したと判断された雄産仔を5匹選択し、生後21日目の離乳のあと、 $17\text{cm} \times 24\text{cm} \times 12\text{cm}$ のプロピレン製ケージ1個に1匹を収容する隔離飼育を行った。飲水瓶は他の内分泌かく乱化学物質の混入を防ぐ意図から、硝子製のものを使用した。

動物は隔離飼育4週目から7週（生後7週から10週）まで行動学的観察に供した。

4. 行動学的調査

TCDDを胎盤・母乳経路で摂取した雄産仔について、生後2週目から継続的に目視による行動学的観察を行った。動物にプラスチック棒を用いて体幹に弱い接触刺激を与え、その刺激に対する応答行動を観察し、ビデオ記録した。また生後5週目からは、ほぼ毎日、後述の接触刺激応答計測装置（リンビック・レスポンス・メータ：LRM）を用いて、応答行動の強さを定量的に計測した。

払い除け行動と対物攻撃行動の計測は以下の手順で行った。まず、動物を過剰に刺激しないように配慮しながらケージのチャンバー内に動物を導き、LRMにケージを装着した。他の研究における予備実験（口岩ら、2008）の結果にもとづき、センサー感度（アンプによる信号増幅設定）は7に設定し、刺激間隔は10秒、刺激棒上昇時間（各回の計測時間）は1000ミリ秒間、刺激棒の上昇速度は85mm/s、加速度センサーの計測記録回数は1000回/秒に設定した。1匹の動物につき、後肢レベルと顔面レベルを12回刺激し、刺激に対する動物の応答量を計測し、アナログ/デジタル変換後にコンピュータに入力し記録した。動物の刺激に対する慣れを回避するため、後肢レベル刺激12回と顔面レベル12回を1セットとし、1日に1回のみ計測実験を行った。また1日の時間帯による行動活性の差を最小にするために、各実験の時間帯を午後2時から5時に統一した。実験中は動物をビデオ録画し、後のデータ分析に使用した。この接触刺激に対する応答量の計測は、生後12週まで継続して、ほぼ毎日行った。実験者が変わることに伴う動物の精神的不安定を回避する目的で、実験者は1名に限定した。さらに、実験者の主観を排除する目的で、実験者は実験目的を熟知しない研究者が担当し、ブラインドで行うとことを原則とした。

5. リンビック・レスポンス・メータ（LRM）

粗大触圧覚に対する応答を他の触覚刺激と分離して計測するためには、識別性触圧覚や温痛覚の

神経路を興奮させない触覚刺激を用いる必要がある。そして、刺激に対する動物の応答行動を効率よく感受するセンサーも必要である。しかも、センサーには、身繕いや体位変換などの動物の自発的行動を感受しない仕組みが必要である。そのような観点から後述の装置を自作し、実験に供した（小原医科産業に製作依頼）。装置は、刺激装置、駆動装置コントローラー兼アナログ/デジタルコンバーター、およびコンピュータから構成される（口岩らの論文（2008年）の図1を参照）。

動物ケージは、動物を収容するためのチャンバーとチャンバーを刺激装置に固定するための天板から構成される。動物が常に装置の中央に位置するようにチャンバーは円筒形にした。チャンバーの床には、刺激棒を通過させるための2本の縦孔（幅5mm、長さ50mm）を開けた。また、シャッターを挿入する横孔を左右に各3孔開け、動物の大きさに合わせてチャンバーの広さを調節できるようにした（口岩らの論文（2008年）の図2を参照）。チャンバーは直径40mmの成獣マウス用と、直径30mmのyoung adult用の2サイズを用意した。チャンバーは、動物がチャンバー内でかろうじて向きを変えることができる広さのものを選択した。

刺激棒駆動装置は、装置の上部に取り付けた刺激棒を等速直線運動で動かす装置である（図1）。動物に接触する刺激棒は、チャンバーの長軸に対して垂直に2本、2つの縦孔を1本ずつ通過するように、上向きに15mm間隔で取り付けられた（図2）。刺激棒には、直径3mm、長さ50mmの太い金属棒を使用し、動物に痛覚を与えることがないように先端を球状に削った。刺激棒の駆動速度は、40mm/s、55mm/s、70mm/s、85mm/s、100mm/s、115mm/sの6段階可変式とし、コンピュータで速度を制御して、刺激棒を自動的にチャンバー底板の縦孔からチャンバー内に等速直線運動で上昇させるように設定した。刺激棒は動物の腹側からゆっくりと上昇し、動物の腹側面（後肢、腹部、前肢、頸部、下顎のいずれか）に接触するか、接触せずに接近して静止する。動物に過度の圧迫を与えないように、刺激棒は底板から10mm上の位置で停止するように設定した。刺激棒の上昇時間、

上昇（刺激）間隔，上昇回数はコンピュータソフトで自動制御した。刺激棒駆動装置はスライドレール上に載せ，手動で左右に自由に移動できる設計とした。これは，動物がチャンバー内で体位を変えることがあるため，動物の位置に合わせて刺激棒を移動させる必要があるためである。なお，実

験中の動物の排泄行動に対応し，駆動部の上方に汚物トレイを設置した。また動物の温冷覚を刺激しないように，実験室の室温を $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ に維持した。刺激装置は実験開始の1時間以上前に室内に設置し，刺激棒の温度を管理した。

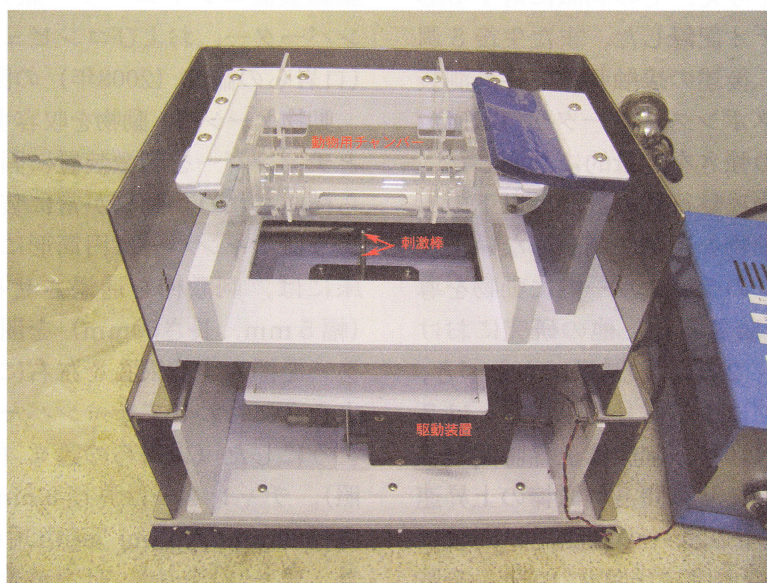


図1. LRMの全体像。先端が丸く太い刺激棒が動物チャンバーの縦溝を通り抜けて上昇する仕組みを示す。刺激棒の下部には，加速度センサーを設置し，A/Dコンバータに情報を送る。

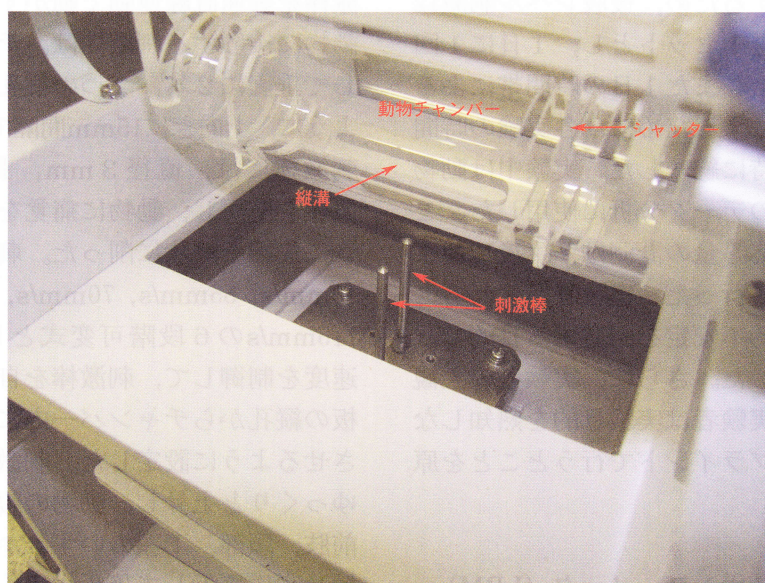


図2. LRMの動物チャンバーと刺激棒。動物用チャンバーにマウスを収容して，コンピュータ制御された刺激棒2本を下から駆動装置によって上昇させ，動物の足底や腹部に軽い接触刺激を与えたり，顔面付近に刺激棒を上昇させて動物の対物攻撃行動を誘発する。刺激棒には加速度センサーが付属していて，動物の行動を検出する。

刺激棒を下からゆっくり上昇させてマウスの腹部または後肢に接触させることにより、動物はその刺激を嫌がって刺激棒を後ろ足で払いのけようとする行動（払い除け行動）を起こすことがある。また、頭部近くに刺激棒を上昇させると刺激棒に攻撃を加える行動（対物攻撃行動または噛みつき行動）を取ることがある。正常なマウスではこのような刺激に対してほとんど応答を示すことがないが、うつモデルマウスやダイオキシン摂取マウスでは、激しく「払い除け行動」や「対物攻撃行動」を起こすことが多い。本機では、動物が刺激棒を蹴ることにより生じる振動を計測するために、また噛みついた時の振動を記録するために、加速度センサーを刺激棒に直接取り付け、加速度センサーからの信号（加速度センサーに生じる誘導電流）を、アナログ/デジタル変換ボードを経由してコンピュータに入力し、コンピュータソフトにより刺激棒に加えられた振動の大きさとその継続時間の積（電位差×時間：volt・ms）を求めた。信号は、縦軸に誘導電位差（V）、横軸に時間（ms）を取った波形に変換して画面表示し、刺激から応答までの時間（潜時）、応答時間、応答強度、払い除け行動または攻撃行動の回数の解析に用いた（図3と4を参照）。

結果

1. TCDD胎盤・母乳暴露動物の目視による行動学的観察

生後2週に入るまでは、TCDD摂取産仔群および対照群を比較して目立った行動学的差異は認められなかった。しかし、生後2週目に、TCDD摂取産仔群の一部に軽い接触刺激に対して過敏な応答行動を示す個体が出現した。さらに、この時期になるとケージ交換の床替えの際に、実験者による捕獲を嫌悪し激しく逃げ回ったり、ジャンプしてケージから逃げ出す個体が出現した。このTCDD摂取産仔群の行動過敏症状は雌雄に見られた。この症状は、1週間ほどで消失する個体が多く、その後は対照群との差が不明瞭となった。このような症状を示す個体はヴィークル摂取個体群には観察されなかったため、TCDDを胎盤・母乳経由で摂取した動物に特徴的な行動と思われた。

生後3週頃から6週頃にかけては、TCDD摂取個体群も非摂取群も行動学的に際だった異常は認められなかった。

生後7週以降、TCDD摂取個体群に機械的な刺激に対する過敏な応答行動が再出現した。通常の飼育ケージまたはオープンフィード内に放たれたTCDD摂取マウスの体幹をプラスチック棒で軽く接触すると、動物は接触を極端に嫌悪した。すなわち、棒の接近に対して素早くその場から逃げ去る「回避行動」、体幹に接触した刺激棒を後肢で激しく数回蹴って払い除ける「払い除け行動」、または反復される刺激を避け床敷（鉋屑）の中に潜って身体を隠す「潜隠行動」が観察された。動物が自由に動き回ることができない狭いスペースに收容して機械的刺激を与えた場合には、後肢レベルの刺激では前述の「払い除け行動」を起こし、頭部レベルの刺激では刺激棒に噛みつく「対物攻撃行動」が認められた。これに対し、TCDD非摂取産仔群（対照群）では、これらの行動はまったく観察されなかった。すなわち、これらの4つの行動は、TCDD胎盤・母乳暴露動物に特徴的な応答行動であると考えられた。

2. 隔離ストレスによるうつモデルマウスの目視による行動学的観察

離乳後に隔離飼育を行ったマウスは4週以上の隔離ストレスによりすべての個体に行動学的異常が現れた。すなわち、ホームケージまたはオープンフィールド用のケージ内で、プラスチック棒による接触刺激に対する応答行動を観察した実験において、隔離飼育マウスは接触するプラスチック棒を嫌がり、回避行動および払い除け行動を起こした。ケージの隅など、自由に動きにくい場所での顔面付近へのプラスチック棒の接近では、棒に噛みつく対物攻撃行動が観察された。TCDD胎盤・母乳暴露動物との唯一の相違は、再三の刺激棒による刺激によっても、潜隠行動を起こすことは希であったことであった。

3. LRMによる払い除け行動および対物攻撃行動の半定量

接触刺激に対する応答行動を定量的に計測する

ために、本研究では、前述したLRMを作製し研究に使用した。本計測機器では、後肢足底または下腹部を刺激する際に動物が起こす「払い除け行動」を含む応答行動、および顔面付近に接近する刺激棒に対して噛みついたり、前足で攻撃を加える「対物攻撃行動」を半定量的に測定することが可能である。

ケージ内に収容した対照群のTCDD非暴露動物の後肢レベル（後肢または腹部）を下から刺激棒で軽く接触刺激した時、動物は特に行動を起こさずにじっとしていることが多かった。時に、棒の接触を嫌悪し、チャンバー内で体位を変える行動が見られたが、後肢で激しく刺激棒を連続して蹴る払い除け行動はまったく観察されなかった。また顔面レベルに刺激棒を提示した実験では、正常の対照群動物はまったく刺激棒に興味を示さずにじっとして動かないか、または最初の数回の刺激において刺激棒に興味を示し、刺激棒の臭いを嗅いだり、または刺激棒を舐める行動がみられることもあった。しかし、これらの行動では、刺激棒に対する運動エネルギーの伝達は小さく、計測値は低値であった。正常動物が刺激に対して無関心であることは、成長のどの時期でも一貫しており、実験期間中に大きな変化は認められなかった。図5と図6は、TCDD非暴露マウスの生後5週から9週における後肢レベル刺激および顔面レベル刺激時の応答行動量の変化を示している。応答行動量を検知する加速度センサーは刺激棒に取り付けられているため、刺激棒の上昇に伴う振動が加速度センサーに感知されることは避けられない。図では、動物をチャンバーに収容しない状態で加速度センサーに感知されるノイズ量を除去した値である。正常動物は刺激棒による軽い刺激に無反応であることが多く、チャンバーの下方から上昇してくる刺激棒を身体で押さえつけてじっとしていることもあり、時にはLRMは、ノイズ以下のデータを示すこともあった。

これに対してTCDD胎盤・母乳摂取マウスでは、後肢レベルの刺激において、後肢で刺激棒を連続して数回蹴る「払い除け行動」を起こすことが多かった。刺激を繰り返すうちに、動物は予想される刺激を回避しようとして後肢を高く持ち上げる

こともあり、その場合は払い除け行動が起こらないことも多く認められた。また払い除け行動を起こした場合でも、蹴りが棒に当たらない空振りが起こることも多かった。また、刺激中に体位変換を行った場合は不適切な応答が記録された。したがって、毎回の刺激で必ずしも動物の応答行動を的確に捉えることはできなかった。そこで、ビデオを参考に、12回の刺激回数のうち10回以上を適切に刺激したと判断された実験のみを選択し、データ処理を行った。後肢レベルの刺激では、このような実験遂行上のトラブルが多かったが、正常動物と比較すると明らかな差があり、過敏症状を有する動物のスクリーニングは的確に行うことができた。

図3は後肢レベル刺激時における払い除け行動の1例を示したモニター画面である。刺激棒が上昇しチャンバー内のマウスに触れた瞬間から連続数回、マウスが刺激棒を後肢で激しく蹴ったことが推察される（図★印）。

また、TCDDを胎盤・母乳経由で摂取した動物に対する顔面レベルの刺激では、動物は顔面付近に接近する刺激棒に対して激しく噛みつき、刺激棒を揺さぶる動作を起こすことが多かった。この刺激に対する応答行動は、後肢レベル刺激における払い除け行動に比較するとさらに出現頻度が高く、全12回のすべての刺激において毎回噛みつき行動を示す個体が少なくはなかった。刺激棒に噛みつく対物攻撃行動には空振りがほとんど起こらないので、応答行動量を定量的に計測することができると判断された。したがって、刺激に対する動物の応答行動を定量するためには、顔面レベルの刺激によって起こる対物攻撃行動を使用することが適切であると考えられた。

図4は、TCDDを胎盤・母乳経由で摂取した動物における頭部レベル刺激に対する応答行動を、LRMで計測を行った1例である。動物が約0.5秒の間に6回にわたって刺激棒に噛みつき、噛みついた刺激棒を左右前後に揺さぶったことがグラフから読み取ることができる。

隔離飼育うつモデルマウスをLRMを用いて同様に調査した実験では、TCDD摂取マウスとまったく同じ応答を示した。隔離飼育うつモデルマウ

スは、後肢レベルの刺激棒上昇に対しては、刺激棒を後肢で連続して数回激しく蹴るか、刺激棒の

上昇を嫌って後ろ足を大きく上げてその接触を回避する行動をとった。

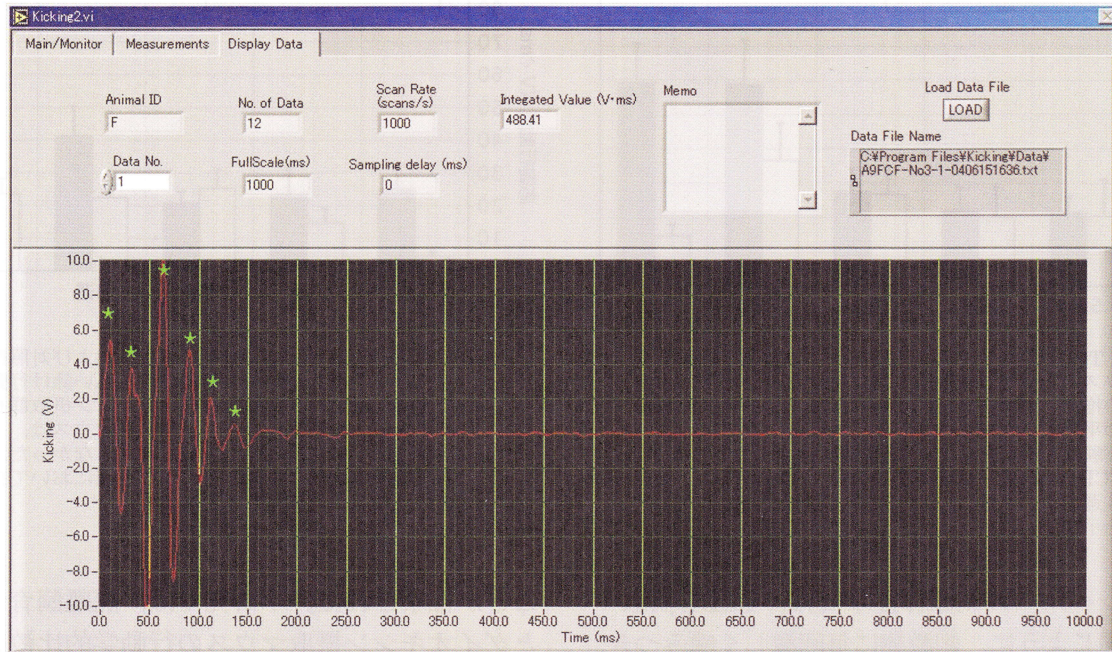


図 3. TCDD胎盤・暴露動物における後肢レベル刺激のモニター画面の一例。横軸は時間 (ms), 縦軸は誘導電圧 (V) を表示している。グラフには、刺激開始から0.15msの間にマウスが後肢で連続6回、刺激棒を蹴ったことが記録されている (★印)。また、この刺激例では、488.41V・msの計測値が得られたことが画面中央上のダイアログ内 (Integrated value) に表示されている。

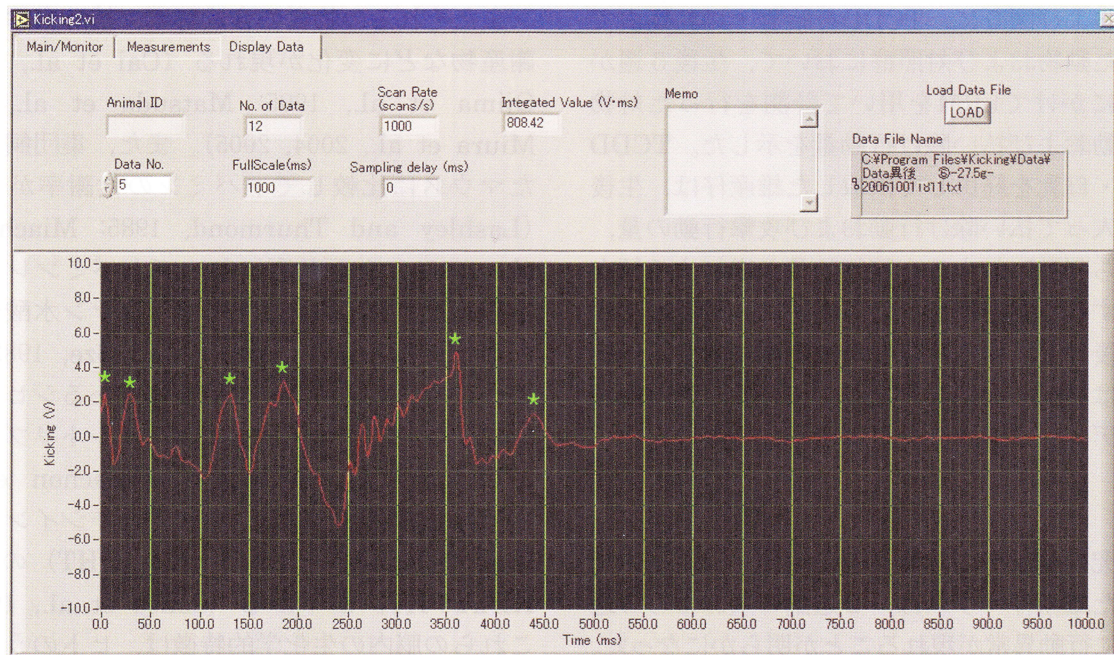


図 4. TCDD胎盤・暴露動物における顔面レベルへの刺激棒提示時の動物の応答行動を示したモニター画面の一例。横軸は時間 (ms), 縦軸は誘導電圧 (V) の値を表示している。グラフには、刺激開始から約0.5秒の間にマウスが連続6回、刺激棒に噛みつき、さらに刺激棒を前後左右に揺さぶったことが示されている (★印)。この刺激例では、808.42V・msの応答量が得られたことが画面中央上のダイアログ内 (Integrated value) に表示されている。

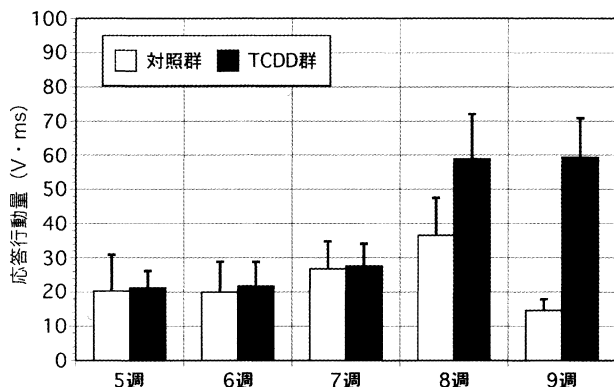


図5. TCDD胎盤・母乳経路で摂取マウスおよび対照群マウスの、生後5週から9週における対物攻撃行動量の推移。対照群5匹およびダイオキシン摂取群6匹の平均値±標準誤差を示す。対照群マウスは、この実験期間中に有意に攻撃行動量が増加しなかったが、TCDDを胎盤・母乳経路で摂取した雄産仔は、生後8週および9週において攻撃行動量が増加したことを示す。

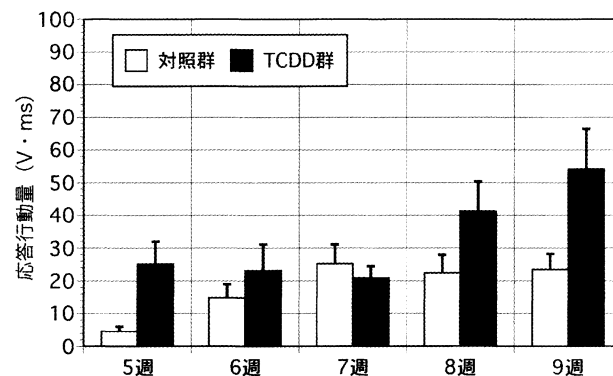


図6. TCDD胎盤・母乳経路で摂取マウスおよび対照群マウスの、生後5週から9週における払い除け行動量の推移。対照群5匹およびダイオキシン摂取群6匹の平均値±標準誤差を示す。対照群マウスは、この実験期間中に対物攻撃行動量が増加しなかったが、TCDD摂取群は、生後8週および9週において払い除け行動量が増加したことを示す。

顔面レベルへの刺激棒提示では、TCDD摂取マウスと同じように、刺激棒に毎回激しく噛みつき、刺激棒を前後左右に揺さぶる行動をとった。ビデオ記録画面で両動物の行動の違いを調査した結果、両者のチャンバー内での応答行動には、まったく差が認められないことが明らかとなった。

図5および図6に、TCDDを胎盤・母乳経路で摂取した動物および対照群において、生後5週から9週にかけてLRMを用いて計測を行った対物攻撃行動および払い除け行動量を示した。TCDDを胎盤・母乳を経由して摂取した雄産仔は、生後8週に入ってから払い除け行動および攻撃行動の量、すなわち刺激に対する応答行動量が増加する傾向が存在することを示している。逆に、対照群マウスは生後8週以後も明瞭な接触刺激に対する過敏な応答は発症しないことを示している（隔離飼育うつモデルマウスのデータは示していない）。

考察

本研究の結果から、TCDDを胎盤・母乳経路で摂取した雄産仔マウスは、2週齢の頃および8週齢以降に行動異常が現れることが明らかになった。その行動異常は、TCDDを摂取していない正常なマウスに出現することは無かったので、周産期にTCDDを摂取したことに起因する行動異常である

ことが推察された。本研究では、隔離飼育マウスとダイオキシン摂取マウスの行動学的比較を行ったが、一部の行動を除くほとんどの行動指標が両者で極めて一致した。

離乳後に長期間隔離飼育された動物は、中枢神経系内のセロトニン、ドパミン、ノルアドレナリンまたそれらの物質の合成酵素、補酵素および代謝産物などに変化が現れる（Cai et al., 1993: Ojima et al., 1995: Matsuda et al., 2001: Miura et al., 2004, 2005）。また、集団飼育されたマウスに比較してドパミンの代謝率が大きく（Lashley and Thurmond, 1985: Miachon et al., 1993）、前頭前野においてドパミンレベルが上昇し、中脳においてトリプトファン水酸化酵素の活性が落ち込む（Yanai and Sze, 1983）。その一方で、モノアミンの前駆体であるジヒドロキシフェニルアラニンや5-ヒドロキシトリプトファンは脳皮質で増加する（Miachon et al., 1993）。前頭前野では、5-ヒドロキシインドール酢酸（5-HIAA）とセロトニン（5-HT）の比（5-HIAA/5-HT）が下がる（Jones et al., 1992）。これらの脳内の生化学的特徴は、ヒトのうつ病における脳内変化と少なくとも一部は一致することから（Biver et al., 1997: Stockmeier et al., 1998）、長期隔離飼育マウスはうつ病のモデル動物

として認識されている (Miura et al., 2004, 2005)。長期隔離飼育動物では、脳内物質の変化に伴い攻撃行動、社会性障害、回避行動、払い除け行動などの異常が現れる (Valzelli, 1973; Frances and Lienard, 1989)。また、第二次性徴期頃から若年期にかけて他の動物に対する「攻撃行動」、無生物物体に対する「対物攻撃行動」、身体に接触する物体を嫌って後肢でそれを払い除ける「払い除け行動」、ケージの床敷に潜って頭を隠す「潜隠行動」、接近する動物や物体から逃れる「回避行動」が頻繁に発現する (口岩ら, 2006)。したがって、これらの行動学的変化はうつ様症状の一部であると判断することができる。今回の行動学的研究において、TCDD周産期暴露マウスと長期隔離うつモデルマウスの異常行動は、一部を除きほとんど一致することが明らかとなった。このことから、周産期にTCDDを摂取したマウスでは、第二次性徴期以降の若年期にうつを発症する可能性が示唆された。

他の内分泌かく乱化学物質であるビスフェノールAをラットの周産期に与えた研究において、うつの行動学的指標として採用されている強制水泳における不動時間の延長などのうつ様症状が発症することが報告されている (Fujimoto et al., 2006)。内分泌かく乱化学物質は、アрилハイドロカーボン受容体を介する共通の機序で生体に作用すると考えられていることを勘案すると (Unkila et al., 1995)、周産期における内分泌かく乱化学物質の暴露は、第二次性徴期またはそれ以降の若年期におけるうつ発症の重大なリスクファクターである可能性が推察される。

本研究では、ダイオキシンを胎盤・母乳経由で摂取したマウスは第二次性徴期から少し遅れて産後7週末ころから接触刺激に対する過敏応答行動が現れ始めた。ダイオキシンの周産期暴露を受けた動物では、脳内セロトニン、線条体ドパミン系、およびNMDA受容体の変調が報告されているので (Agrawal et al., 1981; Kuchiiwa et al., 2002; Kakeyama et al., 2003)、これらの脳内神経伝達物質系の変調がTCDD暴露動物の行動異常に関係している可能性がある。モノアミン系の変調は、隔離飼育動物にも共通し、またヒトの大

うつにも一部共通する脳内変化でもある。TCDDの胎盤・母乳経由暴露により、モノアミン系が変化を受け、第二次性徴期またはそれ以降の若年期にうつ様症状が発症するものと考えられる。我々の他の研究では、第二次性徴期にほぼ一致して探索行動が障害されることを示す実験結果が得られている。探索行動は主にドパミンが関係する行動であるので、ドパミン系の異常がセロトニン系の異常よりも先に起こる可能性も考えられるが、このことについては他の研究が必要である。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (基盤研究 (C) : 研究課題番号15510062および16510040) を使用して行った。

文献

- Agrawal, A. K., Tilson, H. A., Bondy, S. C. (1981) 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl given to mice prenatally produces long-term decreases in striatal dopamine and receptor binding sites in the caudate nucleus. *Toxicol. Lett.*, 7: 417-424.
- Biver, F., Wikler, D., Lotstra, F., Damhaut, P., Goldman, S., Mendlewicz, J. (1997) Serotonin 5-HT₂ receptor imaging in major depression: focal changes in orbito-insular cortex. *Br. J. Psychiatry*, 171: 444-448.
- Cai, B., Matsumoto, K., Ohta, H., Watanabe, H. (1993) Biphasic effects of typical antidepressants and mianserin, an atypical antidepressant, on aggressive behavior in socially isolated mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 44: 519-525.
- Frances, H., Lienard, C. (1989) Isolation-induced social behavioral deficit test: Effect of tranquilizing drugs. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 34:293-296.
- Fujimoto, T., Kubo, K., Aou, S. (2006) Prenatal exposure to bisphenol A sexual differentiation of exploratory behavior and increases depression-like behavior in rats. *Brain Res.*, 1068: 49-55.
- Jones, G. H., Hernandez, T. D., Kendall, D. A., Marsden, C. A., Robbins, T. W. (1992) Dopaminergic and serotonergic function following isolation rearing in rats: study of behavioural responses and postmortem and in vivo neurochemistry. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 43:17-35.
- Kakeyama, M., Sone, H., Miyabara, Y., Tohyama, C. (2003) perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neurotoxicol.*, 24: 207-217.
- Kuchiiwa, S., Cheng, S.-B., Nagatomo, I., Akasaki, Y., Uchida, M., Tominaga, M., Hashiguchi, W., Kuchiiwa, T. (2002) In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin decreases serotonin immunoreactive neurons in raphe nuclei of male mouse offspring. *Neurosci. Lett.*, 317: 73-76.
- 口岩俊子, 森司朗, 口岩 聡 (2006年) ダイオキシン母乳暴露によって引き起こされる産仔行動異常の成長過程における長期的推移. 日本解剖学会第62回九州支部学術集会. (九州大学)
- 口岩俊子, 口岩琢哉, 森 司朗, 口岩 聡 (2008年) 実験動物

- における機械的接触刺激に対する応答行動の定量的計測 — うつ動物の検出とうつ症状定量の試み —. 鹿児島純心女子大学大学院人間科学研究科紀要, 3: 1-15.
- Lashley, S. M., Thurmond, J. B. (1985) Interaction of dietary tryptophan and social isolation on territorial aggression, motor activity, and neurochemistry in mice. *Psychopharmacology*, 87: 313-321.
- Matsuda, T., Sakaue, M., Ago, Y., Sakamoto, Y., Koyama, Y., Baba, A. (2001) Functional alteration of brain dopaminergic system in isolated aggressive mice. *日本神経薬理学雑誌*, 21: 71-76.
- Miachon, S., Rochet, B., Mathian, B., Barbagli, B., Claustat, B. (1993) Long-term isolation of Wistar rats alters brain monoamine turnover, blood corticosterone, and ACTH. *Brain Res. Bull.*, 32: 611-614.
- Miura, H., Qiao, H., Kitagami, T., Ohta, T. (2004) Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin in the mouse hippocampus. *Neuropharmacol.*, 46: 340-348.
- Miura, H., Qian, H., Kitagami, T., Ohta, T., Ozaki, N. (2005) Fluvoxamine, a selective serotonin reuptake inhibitor, suppresses tetrahydrobiopterin levels and dopamine as well as serotonin turnover in the mesoprefrontal system of mice. *Psychopharmacol.*, 177: 307-314.
- Ojima, K., Matsumoto, K., Tohda, M., Watanabe, H. (1995) Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep. *Brain Res.*, 684: 87-94.
- Stockmeier, C. A., Shapiro, L. A., Dilley, G. E., Kolli, T. N., Friedman, L., Rajkowska, G. (1998) Increase in Serotonin-1A Autoreceptors in the Midbrain of Suicide Victims with Major Depression Postmortem Evidence for Decreased Serotonin Activity. *J. Neurosci.*, 18: 7394-7401.
- Unkila, M., Pohjanvirta, R., Tuomisto, J. (1995) Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int. Biochem. Cell Biol.*, 27: 443-455.
- Valzelli, L. (1973) The isolation syndrome in mice. *Psychopharmacol.*, 31: 305-320.
- Yanai, J., Sze, P. Y. (1983) Isolation reduces midbrain tryptophan hydroxylase activity in mice. *Psychopharmacol.*, 80: 284-285.

Abstract

In utero and/or lactational exposure of environmental endocrine disrupters such as dioxin is believed to be one of the risk factors of psychiatric disorders in young adult stage of laboratory animals. In this study we attempt to estimate whether the behavioral disorders observed in the dioxin exposed mice are the same as those induced by depression disease. Six female ddY mice were mated with male mice and made the female mice pregnant. In pregnant day 7 and 14, three pregnant mice were administered 0.1 mg/kg of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) dissolved in olive oil by gavage: total 0.2 mg/kg of TCDD was administered to one pregnant mouse. The same volume of vehicle was administered to the control three female mice on the same pregnant days. The offspring were breast-fed and weaned on postnatal day 21, and all offspring housed in same-sex and same-litter groups. The offspring were took TCDD via uterus and/or breast milk.

The dioxin-exposed offspring were observed to have hyperactive locomotion in postnatal week 2, but this hyperactivity was almost disappeared on postnatal week 3. Another types of hyperactivity against the mechanical soft stimulations were appeared in postnatal week 7 or 8. These hyperactive behavioral disorders were, for example, aggressiveness to moving objects and hyper-responsibilities to mechanical soft touch stimulations. These behavioral disorders were measured using the Limbic Response Meter (LRM) and results were compared with those of the protracted social isolated depressive mice. The behavioral disorders induced by perinatal dioxin exposures were quite similar to those of the social isolated depressive mice, indicating that the behavioral abnormalities observed in the dioxin exposed young adult mice might be behavioral symptoms of the depression disease.

KeyWords : dioxin, depressive disease, behavioral hyperactivity, response to mechanical stimulations