

博士論文

新規マウス認知行動試験系の開発と
その発達神経毒性研究への応用

遠藤 俊裕

要旨

本研究の目的は、精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究に広く応用可能な、新たなマウス認知行動試験系の確立にある。このため、ヒト遂行機能試験を応用し、マウスにおける高次脳機能指標としての「行動柔軟性」の解析を可能とする試験系「Spatial Anticipation Task」を作成した。これをセロトニン欠乏モデルマウス、2種類のAD/HD様発達障害モデルマウス、および周産期化学物質曝露マウスの解析に適用したところ、この試験では、マウスにおける行動柔軟性、さらには社会性を含む高次脳機能異常を、高い検出力と科学的信頼性・妥当性をもって解析できることが明らかとなった。

目次

略語一覧.....	1
図表タイトル一覧.....	3
1. 序文.....	5
1-1. はじめに	5
1-2. 精神・神経疾患研究におけるマウス行動学的実験観察法の意義と発展.....	6
1-3. 発達神経毒性研究におけるマウス行動学的実験観察法の意義と発展	15
1-4. マウス行動学的実験観察法における諸問題.....	19
1-5. ホームケージ内長期行動モニタリングによる新たな行動試験系の開発.....	30
1-6. 高次脳機能試験としての「行動柔軟性」試験の意義	33
1-7. IntelliCage を用いたマウス行動柔軟性試験の開発	37
2. 方法.....	41
2-1. 使用した試薬類	41
2-2. 動物と投与.....	42
2-2-1. C57BL/6J マウス	43
2-2-2. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウス	43
2-2-3. Grin1 (NMDAR1) 遺伝子変異 (Grin1 mut) マウス.....	44
2-2-4. Tuba1 遺伝子変異 (Tuba1 mut) マウス.....	44
2-2-5. 周産期低用量 TCDD 曝露モデルマウス	44
2-3. IntelliCage 試験装置の構成.....	45
2-4. IntelliCage を用いた行動実験	46

2-4-1. 装置馴化.....	46
2-4-2. 場所弁別学習課題とその逆転課題プロトコール.....	48
(1) Spatial Anticipation Task (SAT)	48
(2) 交替ルールの無い2コーナー場所弁別学習課題 (2c-PL)	50
(3) 1コーナー場所弁別学習課題 (1c-PL)	50
2-4-3. 行動柔軟性評価法としての信頼性・妥当性検証実験.....	51
2-4-4. SAT で使用するコーナー位置の条件検討	53
2-4-5. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルを用いた行動柔軟性試験	54
2-4-6. AD/HD 様発達障害モデルを用いた行動柔軟性試験	55
2-4-7. 周産期 TCDD 曝露モデルを用いた行動柔軟性試験	56
2-5. その他の行動実験.....	57
2-5-1. オープンフィールドを用いた新奇環境における探索行動試験	57
2-5-2. ロータロッドを用いた運動協調性試験	57
2-6. 免疫組織化学染色.....	58
2-7. 統計	60
3. 結果.....	61
3-1. 新たな行動柔軟性試験としての Spatial Anticipation Task の確立	61
3-1-1. 信頼性・妥当性の検証.....	61
3-1-2. Spatial Anticipation Task のプロトコール検討.....	63
3-2. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスにおける行動表現型解析	65
3.2.1 行動柔軟性指標	65
3.2.2 社会的行動表現型としての集団内競争優位性指標.....	66

3.2.3 固執性指標	68
3-3. Grin1 mut 群および Tuba1 mut 群における行動表現型解析	69
3.3.1 IntelliCage における新奇環境探索活動および自発活動指標	69
3.3.2 Grin1 mut 群における新奇環境での探索活動／自発活動指標	70
3.3.3 Tuba1 mut 群における新奇環境での探索活動／自発活動指標	71
3.3.4 Grin1 mut 群における行動柔軟性指標.....	72
3.3.5 Tuba1 mut 群における行動柔軟性指標	74
3.3.6 Grin1 mut 群および Tuba1 mut 群における集団内競争優位性指標	75
3.3.7 Grin1 mut 群および Tuba1 mut 群における固執性指標	76
3-4. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動表現型解析	77
3.4.1 新奇環境での探索活動／自発活動指標、運動協調性	77
3.4.2 行動柔軟性指標	78
3.4.3 集団内競争優位性指標.....	79
3.4.4 固執性指標	80
3.4.5 周産期 TCDD 曝露による行動異常の神経学的基盤.....	81
4. 考察.....	83
4-1. 行動柔軟性指標について	83
4-1-1. Spatial Anticipation Task による行動柔軟性試験の妥当性・信頼性の検証. 83	
4-1-2. マウスにおいて新規な行動柔軟性指標（reversal learning-set）の確立 90	
4-1-3. セロトニン欠乏モデルにおける行動柔軟性低下..... 91	
4-1-4. Grin1 遺伝子変異マウスおよび Tuba1 遺伝子変異マウスにおける行動柔軟性低下..... 93	

4-1-5.周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動柔軟性低下	95
4-2. 新奇環境における探索活動および基底状態における自発活動指標	98
4-3. 社会性行動指標としての競争優位性	101
4-4. 固執性指標について	104
4-5. 周産期 TCDD 曝露による非単調性毒性影響.....	107
4-6. 本研究により達成された成果.....	108
4-7. 結語	111
5. 表.....	113
6. 図.....	114
7. 謝辞	169
8. 引用文献	170
9. 補足資料	182

略語一覧

(アルファベット順)

AD/HD: Attention deficit/hyperactivity disorder

ANOVA: analysis of variance

AhR: aryl hydrocarbon receptor

ACC: anterior cingulate cortex

AcbC: nucleus accumbens core

BLA: basolateral nucleus of the amygdala

CA1: CA1 field of hippocampus

CA3: CA3 field of hippocampus

CeA: central nucleus of the amygdala

DAVID: The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ver. 6.7

DLS: dorsal lateral striatum

Ect: ectorhinal cortex

FDR: false discovery rate

GD: gestational day

IUE: in utero electroporation

MO: medial orbital cortex

mPFC: medial prefrontal cortex

M1: primary motor cortex

NMDAR1: N-Methyl-D-Aspartate Receptor 1

PBS: phosphate-buffered saline

PBST: phosphate-buffered saline with Triton

PCPA: 4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride

PND: postnatal day

PrL: prelimbic cortex

q RT-PCR: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Rev: reversal phase

RFID: radio frequency identification

RMA: Robust Multi-array Average

RSGc: retrosplenial granular cortex

SD: standard deviation

SEM: standard error of the mean

S1: primary somatosensory cortex

TCDD: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

VO/LO: ventral orbital cortex and lateral orbital cortex

WT: wild type

2ME: 2-mercaptoethanol

図表タイトル一覧

Table 1: 脳領域ごとの Arc 陽性細胞数

Figure 1. PubMed を用いた行動表現型に関するキーワードによる文献数調査

Figure 2. PubMed を用いた行動試験法に関するキーワードによる文献数調査

Figure 3. PubMed を用いた遺伝子解析法・疾患モデルに関するキーワードによる文献数調査

Figure 4. CAS 登録化学物質数と行動・毒性に関する文献数

Figure 5. IntelliCage 装置図

Figure 6. Spatial Anticipation Task (SAT)、1c-PL、2c-PL を用いた実験概要

Figure 7. SAT、1c-PL、2c-PL 初期学習フェーズおよび逆転課題セッションにおける誤反応率の変化

Figure 8. 初期学習フェーズ最後のセッションと逆転課題セッションでの誤反応率の比較

Figure 9. SAT における正解コーナー位置の違いによる成績への影響の確認実験概要

Figure 10. SAT における正解コーナー位置の違いによる成績への影響

Figure 11. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスを用いた行動柔軟性試験概要

Figure 12. PCPA 投与による行動柔軟性と社会性行動指標（集団内競争優位性）

Figure 13. PCPA 投与による固執性行動指標

Figure 14. AD/HD 様発達障害モデルマウスを用いた行動柔軟性試験概要

Figure 15. Grin1 変異マウスおよび Tuba1 変異マウスにおける新奇環境探索活動／自発的活動性指標

Figure 16. Grin1 変異マウスにおける行動柔軟性指標

Figure 17. Tuba1 変異マウスにおける行動柔軟性指標

Figure 18. Grin1 変異マウスおよび Tuba1 変異マウスにおける社会性行動指標（集団内競争優位性）

Figure 19. Grin1 変異マウスにおける固執性行動指標

Figure 20. Tuba1 変異マウスにおける固執性行動指標

Figure 21. 周産期環境化学物質 (TCDD) 曝露マウスを用いた行動柔軟性試験概要

Figure 22. 周産期 TCDD 曝露マウスの新奇環境探索活動／運動協調性／自発的活動性指標

Figure 23. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動柔軟性指標

Figure 24. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける社会性行動指標 (集団内競争優位性)

Figure 25. TCDD-0.6 群マウスにおける固執性行動指標

Figure 26. TCDD-3.0 群マウスにおける固執性行動指標

Figure 27. 免疫組織化学染色による神経活動マーカー陽性細胞数の比較

1. 序文

1-1. はじめに

今日の医学・生物学研究において、マウスを用いた行動学的実験観察法はヒトの精神・神経疾患発症メカニズム解明に向けた強力な研究ツールとなっている。例えば、パーキンソン病、アルツハイマー型認知症、自閉症スペクトラム障害（ASD）、統合失調症のように、主たる症状が行動変容として顕れる精神・神経疾患について、ヒト遺伝子解析研究から明らかになった疾患関連遺伝子の標的遺伝子変異マウスを用いることで、疾患の行動学的症状に関連する中間表現型や生物学的基盤を探索することができる。行動学的症状や中間表現型は、疾患のバイオマーカーや、創薬ターゲット、薬剤効果の前臨床段階における評価指標となり得る。疾患発症の生物学的基盤の理解は、根本治療を目指した創薬シーズ探索に不可欠だろう。

本研究の目的は、精神・神経疾患研究や発達神経毒性試験法等に広く応用可能な新規マウス認知行動試験系の確立にある。序文では、これまでの精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究において、マウス行動学的実験観察法がどのような意義をもち、発展をとげてきたか、従来のマウス行動学的実験観察法における問題点は何か、そしてこれからどのような方法論的革新が求められているかについてまとめた。それらを踏まえ、本研究において使用したコンピュータ制御による長期認知行動モニタリング手法を用いることで期待される成果と、その技術を応用した新規マウス認知行動試験系

として、本研究において「行動柔軟性」の試験課題の確立に重点を置いた背景について述べる。

1-2. 精神・神経疾患研究におけるマウス行動学的実験観察法の意義と発展

精神・神経疾患研究におけるマウス行動学的実験観察法の意義と発展について述べる端緒として、まずげっ歯類の行動学的実験観察法が医学・生物学研究においてどのように普及してきたかについて概観するため、出版文献数調査を行った（1950～2012年）。まず検索語として(Mouse OR Mice)、もしくは(Rat OR Rats)に、AND 条件で Behavior を加えて検索した (Figure 1A)。その結果、①マウス・ラットの行動指標を用いた医学・生物学研究は概ね 1960 年代半ばから広く普及し始めたこと、②歴史的にはマウスはラットよりも行動指標が用いられる機会が少なかったこと、③1990 年代初頭からはマウスの行動指標を用いられる文献が指数関数的に増加し、現在ではラットと差がないほどまでに普及したことが推察される結果が得られた。

次に、特に近年のげっ歯類モデルを用いた精神・神経疾患研究において取り上げられる高次脳機能に関連する行動表現型（記憶／学習、不安様行動、うつ様行動、社会性行動）が医学・生物学分野の文献にどのように登場してきたか、その推移を見た。先ほどと同様に(Mouse OR Mice)、もしくは(Rat OR Rats)に、AND 条件で(Learning OR

Memory)、Anxiety、Depressive、”Social behavior” (以下、ダブルクォーテーションはフレーズ検索を示す) のいずれかを加えて検索した (Figure 1B-E)。また、高次脳機能に関連する行動表現型に対する比較のため、本能行動の典型例として、”Sexual behavior”の検索も行った (Figure 1F)。その結果、高次脳機能に関連する行動表現型に関しては、概ね上記①～③の結論に一貫していた。一方、本能行動としての行動表現型である”Sexual behavior”に関しては、上記①および②の結論とは概ね一貫しているものの、1990年代初頭以降の(Mouse OR Mice) 条件で該当する文献数の指数関数的な増加は見られなかった。以上から、マウスの行動指標を用いた研究手法はおよそ半世紀前から医学・生物学研究分野に広く普及しはじめ、その後、特に高次脳機能に関連する行動指標に関しては1990年代初頭からその役割が増大したことが推察された。

1990年代初頭にマウスの行動指標を用いた研究手法が急速に普及した理由として、近年の分子遺伝学・遺伝子工学・遺伝子解析技術の発展が挙げられる。標的遺伝子に人工的に変異を導入する遺伝子改変技術は1980年代に始まったが、これはその後、標的遺伝子変異個体の表現型を脳機能の最終的な出力形態である行動に見出すことで、遺伝子(分子)と行動(システム)の因果関係を明らかにしようという手法に発展した¹。1990年代初頭には、標的遺伝子に人工的に変異を導入すること(=説明変数)により脳機能の最終的な出力形態である「行動」(=従属変数)がいかに修飾されるかという、マウスを用いた行動学的実験観察法が実現した。具体的には、1992

年には Tonegawa らの研究グループによって、海馬におけるシナプス機能（長期増強）に異常のある α -CaMKII 遺伝子欠損マウスに空間学習障害がおこることが見出された²。また同年、Kandel らの研究グループも同様に、海馬におけるシナプス機能（長期増強）に異常のある fyn 遺伝子欠損マウスにおいて空間学習障害がおこることを発見した³。これらの成果は、分子から複雑な行動を理解し得る可能性、そして行動の破綻としての精神・神経疾患症状について、その発症メカニズムを分子レベルから明らかにし得る可能性を追求する機運を飛躍的に高めた。以後、トランスジェニック（新しい遺伝子の挿入、遺伝子の過剰発現）や遺伝子の機能欠損（ノックアウト）、点変異の導入（ノックイン）に加え、条件的遺伝子変異（Cre-loxP 部位特異的組換え）、誘導可能な遺伝子変異（ドキシサイクリン存在下ないし非存在下で遺伝子発現の誘導が起きる Tet-On/Tet-Off システム）、光遺伝学（神経細胞に藻類由来の光感受性タンパク質であるチャネルロドプシン2やハロロドプシンを発現させることで、特定の波長の光照射によって神経細胞を選択的に興奮もしくは抑制させることができる手法）など、行動の変容につながる多様な生物学的要因（＝説明変数）の操作によるバイオアッセイ手法は多様化している^{4,8}。

また同時に、マウスを用いた全遺伝子の機能解析を目指す国際的なポスト・ゲノムプロジェクトも着実に成果を挙げている⁹。2002年にマウス全ゲノム概要が発表された後¹⁰、2006年から2011年にかけては、マウスのほぼ全ての遺伝子の一つずつノッ

クアウトさせた胚性幹細胞（ES 細胞）を作成するプロジェクトが北米・欧州を中心とした国際ノックアウトマウスコンソーシアム（International Knockout Mouse Consortium: IKMC）により実施された⁹。現在では IKMC により作成された ES 細胞からマウス個体を作成し、統一的な試験プロトコールによる表現型解析のプロジェクトが国際マウス表現型解析コンソーシアム（International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC）により進められている（www.mousephenotype.org/）。これらの出来事が、1990 年代初頭から現在までに、マウスの行動指標を用いた研究手法が急速に普及した大きな要因となっていると考えられる。

次に、この歴史の中で様々なマウスの行動試験法が医学・生物学研究ツールとしてきた経緯について概観したい。現在まで、主に行動薬理・毒性学的ないし心理学的研究手法として用いられてきた試験系の例を補足資料 1 にまとめた。以下では、その中でも特に普及している¹¹ 下記の 6 つの試験系について取り上げる：(1) オープンフィールド試験：マウスの新奇環境における自発的行動・情動的行動指標を評価することを目的とした試験；(2) モリス水迷路試験：水をはった円形プールの中を泳がせ、空間記憶・参照記憶機能を評価することを目的とした試験；(3) 恐怖条件付け試験：場所・音などの手がかりを電気ショック（嫌悪刺激）とともに提示し、両者を関連付ける記憶機能を評価することを目的とした試験；(4) オペラント条件付け学習試験：レバーやボタン、タッチパネル等の行動反応検知デバイスを用い、動物の行動に対して

報酬（または罰）を与えることで、その行動をより高い（または低い）頻度で選択するようになることを学習の客観的指標とした試験；(5) 強制水泳試験：水を入れたビーカーの中に動物を入れて強制的に泳がせ、脱出することをあきらめたかのように動かなくなる時間（無動時間）をうつ様行動の指標とする試験；(6) 高架式十字迷路試験：床から約 1 メートルの高所に水平に設置した十字型の通路に動物を置き、高所を恐れて両側が壁で囲われた安全な通路により多く侵入・滞在する行動を不安様行動として評価する試験。

これらの試験法が医学・生物学研究においてどのように普及したかについて、再び出版文献数調査の結果を踏まえつつ概観したい。上記 (1) ～ (6) に関連する検索語として、各々 (1) "Open field"、(2) "Water maze"、(3) "Fear conditioning"、(4) "Operant conditioning"、(5) "Forced swim"、(5) "Elevated plus maze"を選んだ。これらを(Mouse OR Mice)もしくは(Rat OR Rats)のいずれかと AND 条件で組み合わせ、検索を行った (Figure 2)。その結果、Figure 1 の結果と同様に、いずれの試験系についても(Mouse OR Mice) 条件に該当する文献数は、1990 年代初頭から (Rat OR Rats)条件の後を追うように増加していることがわかった。"Operant conditioning"に関しては、これまで歴史的にラットを用いた学習行動試験のとして圧倒的に主流であったが、2005 年前後から (Mouse OR Mice) 条件においても文献数が増加していた (Figure 2D)。

過去の文献を精査すると、上記の試験系は元来ラットを対象とした実験から確立し、

普及したことがわかる。オープンフィールド試験は 1930 年代に Calvin S. Hall¹²により発表され、初めはラットの新奇環境における排便・排尿行動が情動反応の指標として用いられた。1980 年代初頭に Richard G. M. Morris により考案された水迷路では hooded rat が用いられた^{13,14}。Fanselow は 1980 年代初頭、Long Evans rat を用い、空間的情報と電気ショックを呈示し、恐怖条件付けが成立することを見出した¹⁵。オペラント条件付けという概念は、1920 年代の終わりに Skinner によって定式化され、Skinner 自身が実験装置、データ記録装置を作成したラット実験により体系化された¹⁶。強制水泳試験は 1977 年に Porsolt らによりラットを用いたうつ様行動試験系として発表され、同年 Porsolt 自身によって、2 日間かかるラットの試験を 1 日で行う、より簡便でコストのかからない試験系としてマウスを用いた試験系の応用例が発表された¹⁷。高架式十字迷路は 1984 年、Handley and Mithani によって、Lister hooded rat を用いた恐怖反応評価試験として発表された¹⁸。

以上から、現在マウス行動学的実験観察法に用いられている試験法の多くが、ラットにおける試験系を起源としており、やがて 1990 年代以降の遺伝子改変マウスの登場に合わせてマウス試験系へと積極的に応用され、医学・生物学研究手法として急激に普及していった経緯が窺える。

一方、行動の変容につながる多様な生物学的要因の操作技術の進展は、ヒト遺伝学的解析による精神・神経疾患へのアプローチの進展と並行し、ともにその医学研究に

における意義を高め合ってきた。ヒト遺伝学的解析はこれまで、遺伝子連鎖解析、ゲノムワイドで全ての染色体領域を網羅する一塩基多型 (SNPs) 解析技術を用いた GWAS (genome-wide association study)、染色体の欠損や重複によるコピー数多型 (CNVs) 解析、次世代シーケンサーによる全ゲノム/エクソン解析を用いて精神・神経疾患の原因・関連遺伝子を同定してきた¹⁹。各々の遺伝子解析法が普及した経緯を確認するため、“Linkage analysis”、CNV、GWAS、“Next generation sequencing”の検索語を使い年代別の出版文献数調査を行った (Figure 3A-D)。その結果、まず遺伝子連鎖解析は 1990 年代より普及し、2000 年代後半には文献数が落ち込んできていることがわかる (Figure 3A)。コピー数多型が取り上げられる文献は 1990 年初頭からマウス行動試験の普及のタイミングと合わせて指数関数的に増加している (Figure 3B)。その後、GWAS (Figure 3C)、次世代シーケンサー (Figure 3D) といった新技術が導入されると同時に急激に普及した経緯が読み取れる。このようにヒト遺伝学的解析手法は技術革新が盛んであり、その成果はヒト疾患関連遺伝子の同定に大きく貢献してきた。

ヒト遺伝学的解析手法における技術革新によるヒト疾患関連遺伝子の同定は、現在まで標的遺伝子変異による多くの精神・神経疾患モデルマウスを生み出した。遺伝子連鎖解析は、まずパーキンソン病 (Parkin、PINK1、alpha-synuclein 等)²⁰、アルツハイマー型認知症 (APP、Presenillin1、Presenillin2 等)²¹、ハンチントン舞踏病 (Huntingtin)²² 等の神経疾患の責任遺伝子の同定につながり、その後の疾患発症分子経路の研究に

大きく貢献した。また脆弱 X 症候群 (FMR1) や ASD (Neurologin3, Shank3 等) 等の発達障害²³、統合失調症 (DISC1) のような精神疾患²⁴の関連する遺伝子が同定された。その後 GWAS、CNVs 解析、次世代シーケンサーを用いた疾患関連遺伝子の全ゲノム/エクソン探索により、新たな疾患関連遺伝子の同定、生物学的見地からの疾患概念の再定式化、新規な疾患発症危険因子の解明が進んでいる。例えば ASD や統合失調症に関しては父親の高齢化に伴う *de novo* 変異の発生率の増加が危険因子となること^{25,26}、ゲノム上の *de novo* 変異の起こりやすさはゲノム内において一様ではなく、これまで疾患関連遺伝子が多く発見されていたようなゲノム領域に特に頻繁に起こりやすい「ホットスポット」が存在する事などが報告されている²⁷。

これらの技術により実際にアルツハイマー型認知症、パーキンソン病、統合失調症、ASD 等の精神・疾患モデルマウスが普及した経緯を調べるため、出版文献数調査を行った (Figure 3E-H)。その結果、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病のモデルマウス²⁸は 1995 年頃から急激に普及し、統合失調症や ASD のモデルはやや遅れて 2000 年頃から急激に普及していることが示唆された^{29,30}。いずれも 90 年代以降の非常に短期間で急速な普及を示しており、やはりヒト遺伝子解析技術の技術革新が、精神・神経疾患基礎研究における動物モデルの出現に大きく寄与していることがわかる。

現在まで、精神・神経疾患モデルマウスの作出は、行動表現型解析、中間表現型解析へとつながり、病態発症メカニズム解明に向けた足がかりを提供している。例えば、

家族性の疾患から明らかにされた統合失調症の脆弱性因子として、**Disrupted-In-Schizophrenia 1 (DISC1)** 遺伝子が見つかったが、**DISC1** 機能欠損マウスにおいてプレパルス抑制や記憶・学習機能の障害などの精神・神経疾患症状様行動表現型³¹、脳発達時期における神経細胞移動、神経突起伸長、シナプス形成異常等の中間表現型が見られている^{32,33}。これらの情報は現在、統合失調症やその関連疾患の発症メカニズム解明や治療法開発研究の大きな土台となっている。

遺伝的要因に基づく精神・神経疾患モデルマウスは今後もさらに急速に増加していくとみられる。しかしながら、はじめにモデル「候補」であったマウスが本当に医学的研究において意義のあるツールになるか否かは、何よりも行動学的実験観察法により、期待される表現型が顕れるかどうか依存するところが大きい。行動表現型は、精神・神経疾患モデルとしての予測妥当性・表面的妥当性・構成概念的妥当性において必要不可欠な指標であり¹⁶、それらを満たさずしては、モデルから得られた情報を精神・神経疾患研究のメカニズム研究や、治療法の解明に向けたバイオマーカー、創薬ターゲット、薬剤効果の前臨床段階における評価指標への応用、根本治療に向けた研究戦略に適用することは難しい。精神・神経疾患研究におけるマウスを用いた行動学的実験観察法は、分子遺伝学・遺伝子工学・遺伝子解析技術の発展に伴ってその意義がますます大きくなっていると言える一方、今後もさらに増加していく精神・神経疾患モデルマウスの解析に対応できる効率性・多様性・精度を兼ね備えた試験方法

の開発が強く望まれる。

1-3. 発達神経毒性研究におけるマウス行動学的実験観察法の意義と発展

近年の疫学研究から、胎児期・乳幼児期の環境要因が、遺伝要因とともに精神・神経疾患の発症の引き金となっていることが示唆されている^{34,35}。精神・神経疾患の発症に係ることが示唆とされる環境要因は多様で、近年では、妊娠時の母体のインフルエンザ等への感染³⁶、各発達ステージにおける精神的ストレス等³⁷が危険因子として報告されている。妊娠期・授乳期における胎児や新生児への環境化学物質への曝露も、子どもの脳の発達を阻害し、精神・神経疾患の発症に寄与し得る因子の一つである³⁸。

ダイオキシン類、プラスチック樹脂・可塑剤、難燃剤、農薬等、母親に曝露・蓄積された多くの化学物質が、妊娠期・授乳期に胎盤・母乳を介して胎児や新生児へと移行することが知られている³⁹。現在、環境省主導により、このような子どもの健康と成長に悪影響を及ぼし得る環境要因を明らかにするため、10万組の親子を対象に大規模な疫学調査（「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」）が2011年より開始されている（www.env.go.jp/chemi/ceh/index.html）。このエコチル調査では、「胎児期から小児期にかけての化学物質曝露をはじめとする環境因子が、妊娠・生殖、先天奇形、精神神経発達、免疫・アレルギー、代謝・内分泌系等に影響を与え

ているのではないか」という中心仮説のもと、妊娠・生殖分野、先天奇形分野、精神神経発達分野、免疫・アレルギー分野、代謝・内分泌分野の計5分野においてさらに各々分野別作業仮説を設け、出生前後の環境要因と子どもの健康影響との因果関係を調査している。精神神経発達分野における作業仮説は、①胎児期および幼少期における化学物質の曝露が子どもの発達障害および精神障害に関与している、②胎児期および幼少期における化学物質の曝露が子どもの精神症状に関与している、の2つである。

胎児や新生児の脳は外因性の化学物質に対し特に脆弱な臓器である³⁸。多数の疫学研究は、実際に環境化学物質への曝露と、子どもの学習障害、ASD、注意欠陥／多動性障害（AD/HD）等の発達障害の増加との関連を示唆している³⁴。精神・神経疾患の発症の一因子として、疫学的研究だけでなく、どのような化学物質が脳の発達をかく乱し、疾患因子となるのか、その因果関係を明確にする上で動物を用いた行動学的実験観察法は必要不可欠である。

これまで公表されたすべての化学物質情報を収集・体系化している米国化学会（American Chemical Society）の情報部門 Chemical Abstracts Service (CAS)によれば、データが公表されている1965年以降、新たに合成・単離され登録された化学物質数は現在まで指数関数的に増加していることがわかる（Figure 4A）（CAS Statistical Summary 1907-2007による。塩基配列情報は除く）。このように今後もますます環境中に放出されていくと考えられる化学物質について、いち早くヒトの健康リスクを科学

的に評価し、適切な管理・規制を行う必要がある。化学物質の安全性をどのように評価し、適切な管理・規制を行っていくかについては、長年にわたり様々な取組がなされてきた。

身近な様々な化学物質の危険有害性分類や、取扱上の注意等の表示方法を国際的に統一することを定めた「化学品の分類および表示に関する世界調和システム (GHS: The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals)」は、このような化学物質管理・規制への国際的な取り組みの一つである。GHSにおいても推奨される化学物質の実験的安全性評価試験のガイドラインとして、現在、経済協力開発機構 (OECD) により作成された「OECD Test Guidelines」が国際的な基準となっている。

この OECD Test Guidelines は、国際的に認められた各種化学物質安全性試験の集合であり、下記の計 5 つのセクションから成る。セクション 1 では、化学物質の物理化学的性質 (Section 1: Physical Chemical Properties)、セクション 2 では、生態系への影響 (Section 2: Effects on Biotic Systems)、セクション 3 では、環境中での分解・蓄積性 (Section 3: Degradation and Accumulation)、セクション 4 では、健康への影響 (Section 4: Health Effects) セクション 5 では、その他の領域の安全性評価系 (Section 5: Other Test Guidelines) がまとめられている。先に述べた精神神経発達分野における問題に関する実験的化学品安全性評価のガイドラインは、セクション 4 中の「Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study」にまとめられている

(www.oecd.org/chemicalsafety/testing/37622194.pdf)。

この OECD Developmental Neurotoxicity Study では、試験動物の選定から、飼育条件、試験時期、試験内容、剖検法、組織標本作成法、神経病理学的検査法、用量反応関係の解析法、報告書の作成手順等、方法論の大まかなガイドラインが示されている。行動学的観察項目に関しては、初期行動発達（正向反射、背地走性、自発運動量等）、自発運動量、運動および感覚機能（立ち直り反射、誘発電位等）、学習および記憶の4点における推奨検査項目や実験条件の設定の注意等について述べられている。学習および記憶の項目に着目すると、離乳後および若齢期に1度ずつ、①複数回の連続した学習試行・セッションにおいて評価される学習指標、②何らかの記憶の獲得（original learning）とその保持に関する記憶指標（短期記憶・もしくは長期記憶）を評価することが推奨されている。また、これらを満たす試験法として、受動的回避試験やモリス水迷路等が紹介されている。

しかしながら、化学物質が及ぼし得る精神・神経疾患発症因子としての高次脳機能に対する毒性試験の必要性はまだ十分に認識されているとは言い難い。上記の OECD ガイドラインを見ても、高次脳機能に関しては学習および記憶のみについて言及されており、ヒトの重要な精神・神経疾患症状としての情動的障害や遂行機能の障害に関する検査項目については言及されていない。また、学習および記憶に関する試験方法の記述も曖昧な表現にとどまっている。

どのような化学物質が脳の発達をかく乱し、行動の変容や精神・神経疾患への脆弱性因子となるのか、その因果関係を明確にする上で、上記のような科学的見地に則った実験観察法は必要不可欠である。一般に毒性発現のエンドポイントとして行動に着目し、十分な標本数を確保できるげっ歯類（マウス・ラット）を用いた行動毒性試験を行っていると考えられる出版文献数自体は、CASに登録された化学物質数と同様に特に近年顕著に増加している（Figure 4B）。現在、毒性学研究における動物（特に十分な個体数を確保しやすいマウス）を用いた行動学的実験観察法は、環境中に放出される化学物質の増加・多様化に伴い、ますますその意義が大きくなっている。しかしその一方、遺伝的要因に基づく膨大な精神・神経疾患モデルマウスの解析と同様に、膨大な化学物質種や複雑な実験条件に対応できる効率性・多様性・精度を兼ね備えた新たな試験方法の開発が強く望まれる。

1-4. マウス行動学的実験観察法における諸問題

関連する出版論文数を客観的指標として見ると、今後さらにマウス行動学的実験観察法の医学・生物学研究における意義が大きくなっていくことが予想される。マウスは、その膨大な遺伝学・解剖学・生理／薬理学的情報が蓄積し、多くの実験技術（手術法、遺伝子操作法、*in vivo* イメージング法等）が確立していることから、疾患生物モデルとして今後も比類ない価値を保持し続けるだろう。しかしながら、マウス行動

学的実験観察法の今後の発展のためには、下記のように、データの信頼性 (reliability)、妥当性 (validity)、効率性 (efficiency) の面について各々問題提起がされている。

(1) 信頼性に関する指摘

科学的心理実験法において信頼性の高い試験法とは、被験体から繰り返し測定される数値が安定しており、一貫性のある結論を得ることができる方法をいう¹⁶。言い換えれば、偶然的な要因が測定データにあたえる影響がより少ない方法であるとも言える⁴⁰。この測定データの変化のしやすさは、マウス行動学的実験観察法にとって大きな課題となっている⁴¹⁻⁴³。行動は、本来の実験の意図とは関係のない環境条件 (温度、湿度、照明、騒音、実験時間帯等) の変化に影響されやすく、データの信頼性を損なわせる要因となる。このため、先に述べた OECD ガイドラインにも繰り返し述べられているよう、行動試験方法の標準的なテキストでは、行動実験の実験環境を可能な限り統制することで、このような潜在的な交絡要因を取り除くことが求められている¹¹。

Science 誌に発表された論文⁴¹では、実験環境条件を統制し、マウスの行動実験のデータの安定性・再現性を保証することの困難性が実験的に示されている。この研究では、異なる3つの研究室の行動遺伝学者 (Portland の John Crabbe、Edmonton の Douglas Wahlsten、Albany の Bruce Dudek) は、各々同じ日齢 (77 日齢) の同じ 8 系統のマウ

ス（計 128 匹）を用い、可能な限り厳密に均一化された実験環境条件（明暗スケジュール、餌等）の下、同じ日時から（1998 年 4 月 20 日、午前 8:30-9:00）、同じマウス行動試験バッテリーを実施した。その結果、オープンフィールドを用いた自発活動評価、高架式十字迷路を用いた不安様行動評価、コカイン投与後の活動性変化の評価の各々の試験結果から得られた行動指標に、いずれも研究室の違いによる主効果、およびマウス系統と研究室との間の有意な交互作用が検出された。すなわち、実験条件を研究室間で十分に統一したと考えられる状況においても、試験の内容によっては、その結果に大きく影響を及ぼし得る何らかの「研究室の違い」による要因が存在することが示された。このように、マウス行動学的実験観察法のデータの安定性・再現性は周囲のわずかな環境条件の変化に対して脆弱であるといえる。

さらに、実験を行う際にマウスに直接接触れることの多い行動試験では、実験者自身がデータの安定性・再現性にとっての脅威となる。例えば Hurst と West⁴³は、BALB/c、C57BL/6、ICR という広く普及している 3 種類の系統のマウスを用い、実験者が行動試験を行う際のマウスの触れ方・移動の仕方（尾をつかむ、手の平に乗せる、筒を使って直接接触れない、の 3 条件）の違いによって、マウスの不安様行動試験の観察変数に有意な影響が顕れることを報告した。Crabbe らの研究においても、このような実験者の違いが、研究室間でのデータの違いに影響したと言われている⁴⁴。

以上から、行動実験データの信頼性を改善するには、このような環境条件や実験者

自身による測定誤差をいかに最小化し、安定性・再現性のある実験を行えるか、という点が重要である。しかし、どのように安定性・再現性を高めるかについては未だ様々な議論があり、結論には至っていない⁴⁵。また、データの安定性・再現性の評価には二重測定、三重測定のような試験一再試験法が有効であるが、マウス行動学的実験観察法に用いられる多くの試験法は、被験体はその試験自体にナイーブであることを前提としており、しばしば試験一再試験法が適用できない点も留意すべき点である。一貫性の観点から、同じ行動学的表現型を評価しているとする異なる試験系を用い、その信頼性を評価する試みがなされることもあるが、複数の試験系を準備・実施することの労働的・時間的対価が大きくなってしまふ⁴⁵⁻⁴⁷。

(2) 妥当性に関する指摘

信頼性の高い試験法であっても、それが元来測定することを意図した概念を実際に測定できていることは保証されない。科学的心理実験法において妥当性の高い試験法とは、被験体から測定されたデータが元来意図された心理的概念を測定していることの確からしさをさす¹⁶。これまでマウス行動学的実験観察法における妥当性を損なう要因として、得られるデータの解釈におけるバイアス、そして試験系の選択に適切性が挙げられている⁴⁸。

マウス行動試験系には、一つの試験系から得られるデータの解釈にバイアスを生じさせる特有の交絡要因があることが指摘されている⁴⁸。その例として、ラットの空間記憶・参照記憶の評価系として確立されたモリス水迷路試験（補足資料 1 参照）について述べる。

モリス水迷路では、第一に、試験に用いるマウス実験群における身体的・心理的異常（視覚異常、運動（水泳）能力、水に対する心理的ストレスへの感受性差等）により、見かけ上の学習指標（泳行距離、泳行時間）の低下・向上につながる交絡要因となる可能性がある（身体的・心理的異常によるバイアス）。

第二に、元来湿地に生息し、生態学的に水泳行動に慣れているとされるラット用に開発された水迷路試験をマウスに適用していることで、行動指標の解釈にバイアスが生じていることが指摘されている⁴⁹。彼らは、マウスが水迷路においてはラットに劣る試験成績を示すものの、水を用いない空間記憶試験においてはラットと同様の試験成績を示すことを報告している。また、このような行動学的妥当性の低い手法で定量された行動指標が、本当にマウスの日常の認知機能を反映しているかという点（生態学的妥当性）にも疑問が呈されている⁵⁰。例えば、Vyssotski らは、水迷路試験において得られた結果が、自然環境下（屋外に設置した 10 m x 10 m の試験フィールド）においてテストされた認知機能の結果と一致しないことを報告している（行動学的・生態学的妥当性の低下によるバイアス）⁵¹。

第三に、モリス水迷路試験では、非認知的 (non-cognitive) 行動戦略も交絡要因となる。例えば、空間記憶を用いなくとも、初めは円形のプールの壁に沿ってプラットフォームを探し、そこから徐々にプール中央に向かってらせん状に泳いでいくことで効率的にプラットフォームにたどり着くことができる。これにより、見かけ上の学習指標 (泳行距離、泳行時間) が向上してしまうことがある (行動戦略・行動特性によるバイアス)。Lipp と Wolfer らは、過去にモリス水迷路試験を行った 1538 匹のマウスの行動指標からメタ分析 (因子分析) を行った⁵²。その結果、マウスの水迷路試験の行動を決定する第 1 因子 (寄与率 48%) では「Thigmotaxis (プールの壁に沿って泳ぐ行動)」および「Time spent floating (泳ぐことを放棄して浮かぶ行動)」という非認知的 (non-cognitive) 行動指標が高い正の因子負荷量を示した。すなわち、マウスは水迷路試験においてしばしば非認知性行動による戦略によってプラットフォームの位置を探索する傾向にあり、その実験結果の解釈には大きなバイアスが生じている可能性がある。

このような身体的・心理的異常によるバイアス、行動学的・生態学的妥当性の低下によるバイアス、行動戦略・行動特性によるバイアスは、例に挙げたモリス水迷路試験だけでなく、様々なマウスの行動試験系において広く指摘されている⁴⁸。これらのバイアスが生じている背景には、現在使われている行動試験系のほとんどがラットで確立されたものであり、マウスに応用する際にその特有な行動特性や生態的特徴が十

分に配慮されていなかったことも一因としてあげられる⁵³。一般に上記のようなバイアス排除するためには、異なる複数の試験系を組み合わせた表現型解析を行うことが望ましいとされているが、やはり複数の試験系を準備・実施することの労働的・時間的費用の問題も大きい¹¹。

一方、Fonioらは、多くのマウス行動学的実験観察法において、試験法の選択の適切性に問題があると主張している⁵⁴。例えば、長期に持続する病的な不安傾向（＝特性不安⁵⁵）をもつ全般性不安障害のモデルの評価試験系として、しばしばオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験などが用いられる。しかし、これらはマウスを試験装置に移してから各々5分～30分程度の行動を評価しているものであり、その限られた時間枠の試験結果からは、一過的な不安状態（＝状態不安⁵⁵）を評価していることになる。Fonioらは、全般性不安障害の研究におけるこのような適切なモデルの選択が、事実とは全く矛盾した結論に至ってしまう例を示している。長期に持続する病的な不安傾向（特性不安）の最適なモデルの1つと言われるBALB/c系マウス⁴⁸を用いてオープンフィールド試験を行ったところ、不安様行動を示したのは実際には試験開始後30分ほどの短い時間のみであり、その後40時間以上行動を観察すると反対に一貫して不安傾向が低いことがわかった。すなわち、試験開始後30分の行動からだけでは、そのマウスの日常的な不安傾向がわからないどころか、反対の結論を得る可能性があることが示された。

以上から、行動実験データの妥当性を向上させるためには、試験系から得られるデータの解釈に脅威となる様々なバイアスを取り除き、仮説検証のモデルとして最適な試験系が選択されることが重要である。

(3) 効率性に関する指摘

マウス行動学的実験観察法は、動物の維持、実験設備の導入、実験の実施・解析に至るまでマニュアルの単純労働作業への依存度が高く、労働集約型の研究手法といえる^{11,56}。コンベンショナルな行動試験系では、明らかにしたい行動表現型ごとに異なる試験を行わなければならない、試験ごとに実験者が1個体ずつ、手作業で実験を行わなければならない。特に記憶・学習試験課題のように試験装置への馴化や繰り返しのトレーニングを行わなければならない実験では、データが揃うまでに数週間から時に数ヶ月もの間、実験者はこの作業に従事し続けることになる。行動指標の定量化に関してはコンピューターベースの自動画像解析ソフト（例：TopScan software, Clever Sys, VA, USA）が普及しているが、このようなソフトを実際に使用してみると、解析条件の細かな設定の調整や、日常的な解析エラーへの対応など、マニュアル作業への依存度はまだまだ高いと言える。さらに、複数の行動試験系を組み合わせるとより信頼性・妥当性の高い実験を行おうとすれば、これらの作業量はさらに増える。また実施する試験系ごとにしばしば専用の実験スペースも確保しなければならない¹¹、特に大学

の一研究室など、規模の大きくない研究グループでは実際に実施可能な実験が限られてしまう。

Fonio らは、信頼性・妥当性の面から適切な行動試験が行われない背景として、そのような効率性の問題があると指摘している⁵⁴。すなわち、行動試験そのものに十分な労働力や時間をかけることができず、科学的信頼性や妥当性よりも、しばしば効率性を重視した簡易な試験系が選ばれてしまう。また、効率性を重視した試験系が選ばれることが常態化しており、そのことがデータの信頼性・妥当性を高め得る新たな試験系や行動指標の選択や開発の障害になっている。このことから、先に述べたマウス行動学的実験観察法における信頼性・妥当性の問題には、科学的な側面だけでなく、効率性に側面からも解決されなければならないことがわかる。また、これまでのような労働集約型の研究手法では、何より近年急速に増加している精神・神経疾患モデルマウスの表現型解析や、環境化学物質の発達神経毒性試験としてのマウス行動学的実験観察法のニーズに対応することが困難である。

以上、マウス行動学的実験観察法において信頼性・妥当性・実用性の面から議論されてきた主要な問題について述べた。これを踏まえ、これからのマウス行動学的実験観察法において克服されるべき課題を以下に列記した。

(1) 行動実験データの信頼性を改善するため、環境条件や実験者自身の差による測定誤差を最小化し、安定性・再現性のある実験を実現しなければならない。

(2) 行動実験データの妥当性を向上させるため、試験系から得られるデータの解釈に脅威となる様々なバイアスを取り除き、仮説検証のモデルとして最適な試験系を選択しなければならない。

(3) 試験の信頼性・妥当性の向上につながる形で、試験法の効率性を高めていかなければならない。

近年、マウス行動学的実験観察法における信頼性・妥当性・効率性の向上を目指した重要なアプローチとして、行動実験バッテリー法がある⁵⁷⁻⁵⁹。行動実験バッテリーは、神経学的評価、運動機能評価、鎮痛・感覚試験、認知機能試験等を標準化されたプロトコール (SHIRPA⁵⁸、Modified SHIRPA⁶⁰、PsychoGenics 社による PsychoScreen 等) の下に順次的に行い、個体表現型を多角的に評価する方法である。

行動実験バッテリー法の長所は、①既存の試験法をそのまま用いるため薬理実験等の妥当性検証試験データが豊富であること、②より少ない個体数で多くの実験を行えること、③実験プロトコールや実験条件の高度な標準化により測定誤差が軽減される

こと、④検査項目を増やすことで、表現型を異なる視点から評価できることが挙げられる⁵⁶。②は上述のマウス行動学的実験観察法における効率性、③は信頼性、④は表現型解釈における信頼性および妥当性の向上につながっている。我が国においても、現在まで精神・神経疾患や遺伝子機能解析などにおいて、新たな研究手法として非常に大きな成果を挙げている^{61,62}。

他方、行動実験バッテリーの短所は、①行動実験に適した実験環境、実験装置、実験の実施や解析に関する専門的知識・技術を有する人材を集約する必要があるため、実施できる環境が限られること、②個々の試験系の信頼性・妥当性・効率性を向上させるものとは限らないということ、③実験の順番によって個々の実験から得られる表現型が変容することを示す報告があること⁶³、④労働集約型である本質には変わり無く、数多くの動物を用いる行動実験へのニーズに対応しにくいこと、⑤既存の試験法に依存し、新たな行動試験法・行動指標の開発を促さないことが挙げられる。

以上から、マウス行動学的実験観察法における信頼性・妥当性・効率性の問題はまだ解決されておらず、新たなアプローチの開発がこれからの精神・神経疾患研究や、発達神経毒性研究の発展において不可避な課題と言える。

1-5. ホームケージ内長期行動モニタリングによる新たな行動試験系の開発

これまで概観してきたマウス行動学的実験観察法における諸問題の解決法として、比較的最近登場したコンピュータ制御によるホームケージ内長期行動モニタリング試験法（以下、ホームケージ試験法）がある。

ホームケージ試験法は、これまで専用の試験装置（プール、明暗箱、十字迷路等）で行ってきた行動実験と異なり、マウスが普段飼育されているホームケージ内の行動に焦点を当てた様々な行動表現型解析法である。行動観察・記録・解析方法としては、ホームケージ上部に設置したビデオカメラで撮影した画像を専用の個体トラッキング解析ソフトウェアで解析する方法（例：PhenoTyper および EthoVision, Noldus, Wageningen, the Netherlands）や、同様にビデオカメラで撮影した画像から独自の行動分類アルゴリズムを用いて、日々の活動性・非活動性や摂食・飲水行動のダイナミクスを解析する方法⁶⁴等がある。例えば、De Visser らは C57BL/6、DBA/2、C3H、129S2/Sv の 4 系統のマウスを用い、ホームケージ内（各ケージに 1 匹ずつ飼育した状態）における自発活動をビデオ解析から得られた様々な行動指標（ケージ内移動頻度・移動時間・移動距離、シェルター滞在頻度・滞在時間、移動速度、立ち止まり回数）から解析した⁶⁵。その結果、マウス系統ごとの新奇環境下探索行動、基底レベルの活動量、概日リズム等を反映する、長期モニタリングによる行動学的構造の時系列的变化のパターンが明らかにされた。

このような方法論に対する期待として、①ホームケージ内という、実験者による干渉の無い、より安定した状態でマウスの行動を評価することにより、データの安定性・再現性を改善すること、②長期的に行動指標をモニタリングすることにより、これまで見過ごされてきた持続的・習慣的・慢性的な行動表現型を評価できること、③複数の行動指標を同時に解析することで、これまで行っていた多くの試験系を集約でき、必要なマウス個体数や実験の時間的経費を削減できること、④試験系が集約され、かつ自動化されることで労働集約型の研究手法から脱却できることなどが挙げられる。

上記の①、②からは、マウスの生活環境下の行動を直接、長期間観察することで、これまで軽視されてきたマウス行動表現型解析における生態学的妥当性の向上につながることを期待される。

限られた時間で行われる、簡素化された心理・行動学的評価法では、しばしば被験者の実生活中において見られる行動学的異常を正確に捉えられていないこと、すなわち生態学的妥当性が問題視されてきた⁶⁶。近年、ヒトの神経心理学的検査法では、Behavioural Assessment of the Dysexecutive Syndrome (BADS) 試験をはじめとした、より日常的場面に即した問題解決能力を評価する、生態学的妥当性の高い試験法の開発とその臨床試験への応用が盛んである^{67,68}。

マウス行動試験においても、その試験系が生活環境から切り離され、過度に簡素化されることで表現型解釈に誤りが生じ得ることが指摘されている^{51,69}。Lippらによって最近開発され、本研究で用いられた IntelliCage⁷⁰は、マウスにとってより自然な環境に近い実験環境をつくることで、生態学的妥当性の高いマウス認知行動試験の実現を目指したホームケージ試験装置である。

この IntelliCage では、上記のホームケージ試験法のアドバンテージに加え、①集団飼育環境下（最大 16 匹）でのマウスの長期行動モニタリングによる、ホームケージ試験のハイスループット化、②集団飼育環境下での学習行動試験、③実験者が自由にデザインした学習行動試験プロトコルをコンピュータ制御の下全自動で実施することを可能とする新たな行動試験開発環境が実現されている。

具体的には、この IntelliCage (Figure 5A) は、大型の標準飼育ケージ (55 x 37.5 x 20.5 cm) に飼育している、ケージ 1 台につき最大 16 匹のマウス行動を、皮下に埋めた無線 RFID チップとそのセンサーやその他各種行動反応センサー（ノーズポークセンサー、リッキングセンサー等）を用いて、随時記録する。さらに、ホームケージ内の四隅に設置された 4 つの小型オペラントチャンバー（以下、コーナー）が設置されている。マウスはこのコーナーに一匹ずつ入ることができ、コーナー内でノーズポーク（鼻を突きだす行動）をすることによって、飲み水にアクセスするための小型のゲートを開け、限られた時間水を飲むことができる。このコーナーを用いた学習行動試験とは、

すなわち、マウスがどのコーナーに入り、またはどのような条件でノーズポークをした時に報酬（飲水）を与えるか、というルールを学習させる試験である。実験者はこのような学習行動試験を自らデザインし、それをコンピュータの全自動制御の下で実際に集団飼育環境下のマウスに対して実施することができる。

以上のようなホームケージ内長期行動モニタリング手法の出現とその技術的・方法論的進展と多様化は、将来的にマウス行動学的実験観察法における「網羅的表現型解析」（Phenomics）の実現につながる潮流として期待されている⁷¹。さらに試験系の集約と自動化は、実験者の労働的負担を軽減させ、今後ますます拡大することが予想されるマウス行動学的実験観察法のニーズに対応する上で必要不可欠である。しかしながら、既存の行動試験法と比較して歴史が浅く、得られる行動指標の解釈とその妥当性評価が十分でないこと、そして圧倒的に薬理試験データの不足していること等が問題である。また特に上記の IntelliCage のようなシステムにおいては、具体的にどのような学習行動試験がより精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究において有効か、研究道半ばである。

1-6. 高次脳機能試験としての「行動柔軟性」試験の意義

前頭前皮質機能・遂行機能と呼ばれる高次脳機能（注意機能、作業記憶、感情・行

動の制御、社会的認知、認知的柔軟性等)の障害は、認知症、ASD、AD/HD、気分障害、統合失調症等、非常に広範囲にわたる精神・神経疾患の中核症状であり、患者の日常生活に大きな支障をきたしている⁷²⁻⁸⁰。少子・高齢化や子どもの発達障害への関心の増大にともない、このような症状の治療・予防戦略の確立に向けた基礎研究を進めることは大きな社会的意義を持っていると言える。

行動柔軟性は、一度計画・習慣化された行動を、状況に応じて柔軟に転換し、より合理的に目的を達成するための能力である。例えば、日常生活において、全て習慣化・計画された行動をとるだけではうまくいかない。例えば、夕飯の支度(=目的)のために献立を考え、いつも車で通っている店に食材を買いに行く計画(=手段)をたてるとする。これに対し、車のカギが見つからない、いつも通る道が通行止めである、駐車場が満車で入れない、適切な量・値段の食材が見つからない、知り合いに会い買い物中断される等、多くの問題が発生し得る。この時、目的の達成のためには、交通手段を変える、献立・食材を変える、店を変える等、様々な柔軟な行動を取ることによって問題を解決することができる。

行動柔軟性は、行動と結果の関係(action-outcome contingency)の変化に対する気づき、以前に獲得した行動やこだわりの抑制、新しいルールの発見・適応など、様々な前頭前皮質機能・遂行機能の並列的処理が必要とされる^{81,82}。このことから、遺伝

要因・環境要因による、幅広い高次脳機能への未知の影響を検出する上では、行動柔軟性の評価が有効な手段となると考えられる^{81,83}。

以上から、行動柔軟性は、精神・神経疾患や、環境化学物質による発達神経毒性の結果としての認知機能異常を統合的に評価する上で有用な指標になると考えられる。またヒト精神・疾患症状に見られる高次脳機能障害を再現し得る試験法として、マウスにおいて行動柔軟性を安定的に、正確に評価し得る手法の開発は、ヒト疾患症状の治療・予防戦略を目指す基礎研究において大きな意義を持つだろう。

これまで、げっ歯類では、比較的単純な連合学習（パブロフ型条件付け、恐怖条件付け等）、海馬依存的な空間・場所学習（モリス水迷路、バーンズ迷路等）、物体再認記憶等の学習行動試験系が行われてきた¹¹。しかし昨今の最新の行動学的神経科学の知見からは、マウス・ラットにおいても前頭前皮質に依存した遂行機能（注意制御、認知的柔軟性、確率的推論、推移的推論）⁸⁴⁻⁸⁶や、同じく前頭前皮質に依存した対連合学習⁸⁷⁻⁸⁹、社会的階層関係の構築⁹⁰といった高次脳機能が備わっていることが続々と明らかになってきている。このことは、マウスがヒトへの外挿性の高い、前頭前皮質依存的な高次脳機能の症状モデルとして普及し得る証拠となる。

これまでマウスの行動柔軟性を評価する学習試験系としては、レバー押し行動⁹¹やノーズポーク行動⁹²、タッチパネルへの接触⁹³等の行動反応記録装置を用いたオペラント学習とその逆転課題がある。例えば、2つのレバーを用意し、まず片方のレバ

ーを押すことで報酬を与え、行動を強化する。この学習が成立した後、今度はそのレバーを押しても報酬を与えず、逆のレバーを押した時に報酬を与える。これにより、一度学習し、習慣となった行動を、状況の変化（行動と結果の関係の変化）に応じて行動を柔軟に転換させる能力を評価する。また、モリス水迷路を用いた行動柔軟性課題も試みられている⁹⁴。これは、一度プラットフォームの位置を学習させたのち、そのプラットフォームの位置を変え、新しい位置をどのくらい効率的に学習できるかを評価し、行動柔軟性指標とするものである。

学習行動試験は、繰り返しのトレーニングを要するため、必然的に試験日数が長くなる。行動柔軟性試験の場合、まず、この通常の初期学習が十分に達成されるまでトレーニングを行う。その後、新しいルールに直面した時、どのように行動を適応させていくかを評価するために追加の試験を行わなければならない（逆転課題）。また一度の逆転課題で得られた結果が、ヒトで観察される永続的表現型と同様の表現型であるかどうかを確かめるには、さらに逆転課題を繰り返すことが求められる（連続逆転課題）。上記のオペラント学習とその逆転課題や、モリス水迷路試験を用いた行動柔軟性課題は、各セッション1個体ずつ実験者が手作業で実験を行うため、マウスにとっては潜在的なストレス要因となり、実験者にとっては非常に労働的負担の大きい試験系になってしまう。実際のところ、マウスを用いた逆転課題にはそのような十分な時間はかけられず、一般に高インパクトと言われるジャーナルから出版されるような

論文でさえも、一度だけ逆転課題を行っただけで行動柔軟性のモデルとする文献がほとんどである^{30,95,96}。さらなる問題は、行動柔軟性を評価する試験系がまだ少なく、行動柔軟性そのものに対する理解が乏しいことである。よって、どのような指標を参考にして行動柔軟性を評価すべきかについては、十分なコンセンサスが得られていない。

以上、精神・神経疾患研究および発達毒性試験研究においてヒトへの外挿性の高い高次脳機能試験としての行動柔軟性の意義と、これまで実施されてきたマウス行動試験系とその課題について述べた。マウスを用いた行動柔軟性試験には、さらなる信頼性・妥当性・効率性の向上を目指す余地が大いにある。

1-7. IntelliCage を用いたマウス行動柔軟性試験の開発

本研究では、先に述べた IntelliCage を用い、精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究に広く応用可能な新規認知行動試験を確立することを目的とした。

まず、試験系のデザインにおいて、ヒト精神・疾患症状に見られる高次脳機能障害を再現し得る試験法の開発をめざし、実際にヒトに用いられている遂行機能試験を参考にした。ヒト遂行機能研究の大家である Paul W. Burgess および Tim Shallice らによって開発された遂行機能試験に、Brixton Spatial Anticipation Test (BSAT) が

ある⁹⁷。

BSAT（補足資料 2 参照）では、まず被験者は 56 ページのブックレットを渡される。それぞれのページには上段に 5 つ、下段に 5 つの計 10 個の円が横に並んで描かれており、それぞれの円の下には 1-10 の番号が書かれている。また、それぞれのページに描かれている 10 の円のうち、いずれか 1 つの円は青く塗りつぶされている。青い円の位置はブックレットのページをめくるたびに単純なルールで変わっていく。被験者はそのルールを読み取り、次のページで青い円がある位置を予想することを求められる。試験中、青い円の位置を決めるルールは予告なく変更され、被験者はその度に新たなルールを読み取り、適応することが求められる。この BSAT はこれまで、脳卒中、糖尿病による認知機能低下、コルサコフ症候群、軽度認知障害／早期認知症、精神疾患、加齢性認知機能低下等の患者・健常者を対象に試験が行われ、認知的柔軟性試験としての妥当性が高く、また高い精度でその障害を検出し得る試験であることが示されてきた⁹⁸。

そこで、この BSAT のアイデアを IntelliCage の行動試験に取り入れ、新たな行動試験系（Spatial Anticipation Task、以下 SAT）を考案した（Figure 6A）。この SAT では、マウスは IntelliCage 内の 4 つのコーナーのうち、ある 1 つのコーナーに入ると、限られた時間（4 秒間）だけ給水ボトルへのアクセスゲートが開き、報酬として水を飲むことができる。そこで水を飲み終わると、また別のあるコーナーで水を飲む

ことができるようになる。この水を飲むことのできるコーナーの位置は **BSAT** と同様に単純なルール (4 つのコーナーの内、2 つのコーナーの往復) に則っているため (例: **Figure 6A** における **Sequence 1**)、マウスはやがてより効率的に水を飲むことのできるコーナーにたどり着くことが予想される。このトレーニングを数日間行い、十分にルールを学習させる (=初期学習フェーズ)。その後、それまで水が飲めた 2 つのコーナーと、水が飲めなかった残り 2 つのコーナーを逆転させて同様のトレーニングを行う (=逆転学習フェーズ) (例: **Sequence 1** から **Sequence 2** へのルールの転換)。すなわち、マウスはそれまでのトレーニングで習慣化した行動の系列を消去し、あらたに 2 つのコーナーを往復する行動の系列を獲得しなければならない。

本研究では、この **IntelliCage** を用いた新たにデザインした行動柔軟性試験 (**SAT**) が、マウスの行動柔軟性を正確に評価できるかどうかを確かめるため、一連の信頼性・妥当性検証のための実験を行った。

第一に、野生型 **C57BL/6J** マウスを用い、**SAT** と、これまで先行研究においても一部報告されている **IntelliCage** を用いた場所学習試験の逆転課題から得られるデータの妥当性を比較・検証した。行動柔軟性試験としての妥当性は、どれほど「初期学習の獲得・習慣化が進めば進むほど、逆転学習時における行動の転換が困難になる」という理論的仮説を正確に実験的データで再現できるか、という観点から評価した (**Figures 6-8**)。さらに、**SAT** を行う際に用いる正解コーナー (水を飲むことのでき

るコーナー) の位置に関する条件検討を行い、プロトコルを確立させた (Figures 9-10)。

第二に、この SAT を用いた行動柔軟性試験を用い、先行研究から行動柔軟性が低下していることが予測される、パラクロロフェニルアラニン (PCPA) 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスの行動評価を行った (Figures 11-13)。

第三に、AD/HD 様の発達障害モデルとして既に報告されている *Grin1* (NMDAR1) および *Tuba1* 遺伝子に単一点変異をもつそれぞれのマウス系統に SAT を行い、ヒトと同様に行動柔軟性の低下が見られるかを解析した (Figures 14-20)。

第四に、これまで認知的行動に異常が報告されてきた周産期 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) 曝露マウスに SAT を行い、免疫組織化学染色の結果と合わせ、実際に環境化学物質によって誘発された発達神経毒性研究のツールとして応用できるかを検証した (Figures 21-27)。

2. 方法

2-1. 使用した試薬類

今回の研究において用いた試薬および購入先は以下の通りである（アルファベット順）。

Arc 一次抗体は、奥野浩行博士（東京大学神経生化学教室、現・京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター）より提供していただいた。

Biotinylated anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, CA, USA)

c-Fos 一次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)

Corn Oil (和光、大阪、日本)

4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (Sigma-Aldrich, MO, USA)

Diethyl Ether (和光、大阪、日本)

Hemo-De (ファルマ、東京、日本)

n-Nonane (ナカライテスク、京都、日本)

Paraformaldehyde, powder (ナカライテスク、京都、日本)

PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ、大津、日本)

RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Venlo, Netherlands)

Sucrose (和光、大阪、日本)

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (Cambridge Isotope Laboratory, MA, USA)

THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡、大阪、日本)

Tissue-Tek OCT compound (サクラファインテックジャパン、東京、日本)

Tyramide signal amplification (Perkin Elmer, MA, USA)

VECTASHIELD Mounting Medium (Vecter Laboratories, CA, USA)

2-2. 動物と投与

本研究で使用されたマウスは全て C57BL/6 J の遺伝的背景を有する。これらを温度 22-24°C、湿度 40-60%、明暗 12 時間サイクル（明期 8:00-20:00）の動物飼育室で飼育した。行動実験は、東京大学の動物実験室で行った。実験動物の飼育・管理、および実験は東京大学の動物実験ガイドラインに従って行った。いずれのマウスも、IntelliCage 装置を用いた行動試験に先んじて、装置馴化開始の少なくとも 10 日前に RFID による個体識別用小型トランスポンダー（2 mm x 12 mm, Peddymark）を Diethyl Ether 麻酔下で皮下に埋め込んだ。

2-2-1. C57BL/6J マウス

日本クレアから 10 週齢の C57BL/6J マウス雄を購入した。

2-2-2. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウス

10 週齢の C57BL/6J 雄マウスに体内のセロトニン量を減少させるため、トリプトファンヒドロキシラーゼ阻害剤である 4-Chloro-DL-phenylalanine methyl ester hydrochloride (以下、PCPA) を皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプ (アルゼット) により投与した。この浸透圧ポンプは、ポンプ内の浸透圧層と、ポンプが埋め込まれた組織環境の浸透圧の差によって動作し、ポンプから組織環境へと一定の流量でポンプ内部の溶液を持続的に排出する。IntelliCage 試験の試験装置馴化終了段階で、Diethyl Ether 麻酔下で浸透圧ポンプを皮下に埋め込んだ。埋め込み手術後、一日当たり 0 (生理食塩水のみ、対照群) もしくは 25mg/kg 体重の用量で試験終了時まで PCPA が持続投与した。

2-2-3. Grin1 (NMDAR1) 遺伝子変異 (Grin1 mut) マウス

Grin1 (NMDAR1) 遺伝子変異マウス (以下、Grin1 mut マウス) は、ENU 誘発突然変異に基づく Grin1 遺伝子の一塩基変異により Grin1 タンパクの細胞内C末端ドメインに R844C ミスセンス変異をもつ。AD/HD 様の多動性異常を示すモデルマウスとして同定された⁹⁹。独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析チーム若菜茂晴博士より供与していただいた。

2-2-4. Tuba1 遺伝子変異 (Tuba1 mut) マウス

Tuba1 遺伝子変異マウス (以下、Tuba1 mut マウス) は、ENU 誘発突然変異に基づく Tuba1 遺伝子の一塩基変異により Tuba1 タンパク N 末端の T1 ループと T2 ループ間に D47G ミスセンス変異をもつ。AD/HD 様の多動性異常を示すモデルマウスとして同定された¹⁰⁰。独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターマウス表現型解析チーム若菜茂晴博士より供与していただいた。

2-2-5. 周産期低用量 TCDD 曝露モデルマウス

日本クレアから購入した妊娠 C57/BL6J 系雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1 kg あ

たり 0、0.6、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD（コーン油に溶解したもの）を単回経口投与した。生まれてきた仔マウスは生後 21 日目に離乳した。その後 20 週齢を過ぎた時点で各腹 1 匹ずつの雄マウスを集めて実験群を作成した（以下、コーン油のみを投与した母マウスから生まれたものを対照群、0.6 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度で曝露した母マウスから生まれたものを TCDD-0.6 群、同様に 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 濃度で曝露した母マウスから生まれたものを TCDD-3.0 群とする）。行動試験は 6 ヶ月齢から行った。

2-3. IntelliCage 試験装置の構成

本試験に用いた IntelliCage 装置（Figure 5A）は、ホームケージ内集団飼育環境下のマウスの行動を RFID（Radio Frequency Identification）による個体認識と各種センサーにより 24 時間記録するとともに、専用のソフトウェアで実験者によりプログラムされた認知行動試験課題をコンピュータ制御により全自動で行うことのできる行動解析システムである。大型のプラスチックケージ（55 x 37.5 x 20.5 cm サイズ。以下、IntelliCage）を使用し、1 つのケージで最大 16 匹のマウスを同時にモニターすることができる。ケージの四隅には、小型のオペラントチャンバー（以下、コーナー）が設置されている（Figure 5B）。マウスは、1 匹ずつコーナーに入る（以下、アクセス）ことができるようになっている。コーナー内部には、ノーズポークセンサーが取り付けられている。マウスはコーナー内でノーズポークセンサーに鼻を近づける（以下、ノ

ノーズポーク) ことで、それをトリガーにして給水ボトルへのアクセスゲート (以下、飲水ゲート) を開け、報酬として水を飲むことができる (Figure 5C)。なお、この IntelliCage 装置は集団飼育環境下における個々のマウスについて、全てのコーナーにおけるアクセス、ノーズポーク、飲水といった行動イベントが行われた開始および終了時刻とその場所の情報が全て自動的に記録されている。また、本研究では新たに IntelliCage のケージ側面に赤色 LED (赤色、5 mm 径、1560 mcd、イーケイジャパン) を取り付け、デジタルタイマー (リーベックス) 制御により試験開始から終了時まで (22:00-1:00) の間、点灯させるようにした。IntelliCage 装置を用いた認知行動試験の制御プログラムは、付属のソフトウェアである Designer により作成した。

2-4. IntelliCage を用いた行動実験

2-4-1. 装置馴化

前馴化フェーズ : RFID 個体識別用トランスポンダーを埋め込まれたマウスは、IntelliCage 装置での飼育・試験を始めるまでの 7 日間、IntelliCage と同サイズのプラスチックケージの中で IntelliCage 試験実施時と同じケージ内グループ構成での集団飼育への馴化を行った (以下、前馴化フェーズ)。いずれのマウスも、前馴化フェーズの間に著しい体重減少や傷などが見られないことを確認した。

馴化フェーズ 1：このフェーズでは、マウスの IntelliCage への装置馴化を行った。マウスを午前 10:00 に前馴化フェーズ用ケージから IntelliCage へと移した。このフェーズでは全てのコーナーの飲水ゲートを常に開放し、マウスが 24 時間、自由にコーナーにアクセスし、水を飲むことができるようにした。

馴化フェーズ 2：このフェーズでは、ノーズポークにより飲水ゲートを開け、水を飲むまでの一連の行動の形成を行った。このフェーズでは、全てのコーナーの飲水ゲートを閉じた。ただし、マウスはノーズポークをすることで飲水ゲートが4秒間開き、水を飲むことができるように設定した。飲水ゲートが閉じた後も、ノーズポークをすることでゲートを開けることができ、いつでも自由に水を飲むことができるようにした。

馴化フェーズ 3：このフェーズでは、1日 21 時間の制限給水を行い、残りの 3 時間 (22:00-翌 1:00) の間に集中的にコーナーにアクセスし水を飲む習慣の形成を行った。なお、この 3 時間の間にはケージの側面に取り付けられた LED を点灯させ (Figure 5A)、またコーナーアクセス時にノーズポークセンサー上部に取り付けられている LED (Figure 5B) を点灯させることで、ノーズポークによるゲート開閉が可能な時間帯 (22:00-1:00) とそれ以外の時間を区別させる手掛かりを与えた (Figure 6B)。

2-4-2. 場所弁別学習課題とその逆転課題プロトコール

本研究での確立を目指す行動柔軟性評価法の基礎となる試験課題として、IntelliCage 内の 4 つのコーナーを利用した 3 種類の場所弁別学習課題とその逆転課題プロトコールを用意した。それぞれの課題では共通して、馴化フェーズ 3 と同様、マウスは 1 日のうち 22:00-1:00 の 3 時間（以下、セッションピリオド）だけノーズポークによりゲートを開け、報酬として 4 秒間だけ水を飲むことができるようにした。この 3 時間を 1 セッションとした。さらに、新たに以下のルールを加えた。まず、1 度のコーナーアクセスにつき、1 度しかゲートを開けることができないようにした。すなわち、同じコーナーに滞在したまま繰り返し報酬を得ることができないため、次の報酬を得るためには 1 度コーナーから外に出なければならない。また、報酬を得ることのできるコーナー（以下、正解コーナー）と、報酬を得ることのできないコーナー（以下、不正解コーナー）をマウスごとに割り当てた。よって、マウスは効率的に報酬を得るため、正解コーナーと不正解コーナーの位置を弁別し、不正解コーナーへのアクセスを避ける必要がある。以下に、各種場所弁別学習課題とその逆転課題の詳細なルールを示す。

(1) Spatial Anticipation Task (以下、SAT) : Figure 6A に課題の内容の模式図を示した。

試験中、マウスは IntelliCage 内の 4 つのコーナーのうち、ある 1 つのコーナーに入る

と、限られた時間（4 秒間）だけ給水ボトルへのアクセスゲートが開き、報酬として水を飲むことができる。ただし、そこで水を飲み終わると、そのコーナーに留まったまま続けて水を飲むことはできない。しかし、代わりにまた別のあるコーナーで、同様に水を飲むことができるようになる。このように、マウスがコーナーに入って水を飲むたび、次に水を飲むことのできるコーナー（以下、正解コーナー）の位置が変わる。この正解コーナーの位置の変更は、常に「4 つのコーナーのうち、決まった 2 つのコーナーの往復」のルール（以下、交替ルール）に則っている。例えば Figure 6A の Sequence 1 の場合、正解コーナーは 2 番→4 番→2 番→4 番→2 番→4 番・・・と交互に変更される。このルールを学習することで、次に水を飲むことのできる場所を予測し、より効率的に報酬を得ることができるようになる。このトレーニングを数日間行い、十分にルールを学習させる（＝初期学習フェーズ）。その後、それまで水を飲むことができた（正解コーナーになり得た）2 つのコーナーと、水が飲めなかった残り 2 つのコーナー（不正解コーナー）の位置を逆転させ、同様のトレーニングを行う（＝逆転学習フェーズ）（例：Sequence 1 から Sequence 2 へのルールの転換、もしくはその反対）（Figure 6D）。試験中、不正解コーナーへのアクセスを誤反応とする。また、同じコーナーに連続してアクセスした場合は「リエントリーアクセス」とし、正解コーナーアクセスおよび不正解コーナーアクセスとは別の指標として記録する。この交替ルールはマウスごとに独立して制御される。正解コーナーの割り当ては、常に

ケージ内でカウンターバランスがとれるようにした。すなわち、ケージ内に 16 匹のマウスがいた場合、「コーナー1 番もしくは3 番が正解」のマウスが 8 匹、「コーナー2 番もしくは4 番が正解」のマウスが 8 匹いた。

(2) 交替ルールの無い 2 コーナー場所弁別学習課題 (以下、2c-PL) : この課題では、単純に 4 つのコーナー (コーナー1-4 番) のうち 2 つのコーナー (例 : コーナー1 番および3 番) で水を飲むことができる。SAT と異なり、1 つのコーナーに連続してアクセスしても報酬を得ることができる。この時、不正解コーナーへのアクセスを誤反応とする。数セッションのトレーニングの後、正解コーナーと不正解コーナーの位置を逆転させたセッションを行うことで逆転課題とする (例 : 正解コーナーを「1 番および3 番」から「2 番および4 番」に変える) (Figure 6D)。正解コーナーの割り当ては、常にケージ内でカウンターバランスがとれるようにした。すなわち、ケージ内に 16 匹のマウスがいた場合、「コーナー1 番および3 番が正解」のマウスが 8 匹、「コーナー2 番および4 番が正解」のマウスが 8 匹いた。

(3) 1 コーナー場所弁別学習課題 (以下、1c-PL) : この課題では、単純に、4 つのコーナー (コーナー1-4 番) のうち 1 つのコーナー (例 : コーナー1 番) でのみ、報

酬として水を飲むことができる。この時、残りの 3 つのコーナー（不正解コーナー）へのアクセスを誤反応とする。数セッションのトレーニングの後、正解コーナーを対角線の位置にあるコーナーに変更させたセッションを行うことで逆転課題とする（例：コーナー1番からコーナー3番への正解位置の変更）（Figure 6D）。正解コーナーの割り当ては、常にケージ内でカウンターバランスがとれるようにした。すなわち、ケージ内に 16 匹のマウスがいた場合、コーナー1-4番が正解になるマウスがそれぞれ 4 匹ずついた。

2-4-3. 行動柔軟性評価法としての信頼性・妥当性検証実験

上記の SAT, 2c-PL, 1c-PL の 3 つの場所弁別課題を用いた逆転課題プロトコールのうち、どのプロトコールが最もマウスの行動柔軟性を評価する逆転課題として適切な評価方法であるかを実験的に検証した。このため、10 週齢の C57BL/6J 雄マウスを用い、SAT を用いた逆転課題を行う SAT 群（n=32）、2c-PL を用いた逆転課題を行う 2c-PL 群（n=32）、1c-PL を用いた逆転課題を行う 1c-PL 群（n=32）の 3 つの実験群を作成した。各群 2 ケージの IntelliCage を使用した（n=16/ケージ、2 ケージ/群）（Figure 6D）。RFID 個体識別用のトランスポンダーを Diethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入し、その 24 時間後から、同じ IntelliCage で試験する予定の 16 匹のマウスを通常のプラスチックケージで 7 日間飼育した（前馴化フェーズ）。この間、飼育環境の変化による顕著な

体重減少やケガが見られないことを確認した。前馴化フェーズが終了した翌日、午前10時にマウスを全て IntelliCage に移した後、馴化フェーズ 1、馴化フェーズ 2、馴化フェーズ 3 を各々3、1、5 日間ずつ行った (Figure 6C)。いずれの群も装置馴化を行った後、初めに割り当てられた場所弁別学習課題を数セッション行い (以下、初期学習フェーズ)、その後各自の正解コーナー位置と不正解コーナー位置を入れ替えた逆転課題を 1 セッション行った。

SAT, 2c-PL, 1c-PL の 3 つの場所弁別学習課題の逆転課題が各々行動柔軟性試験として適切な評価方法であるかを検証するため、「初期学習フェーズのルールに高度に順応している (=誤反応率が低い) 個体ほど、逆転課題に直面した時に行動を適応させることが困難である (=誤反応率が高くなる)」という理論的仮説に対する妥当性・信頼性の評価を行った。本論文では、妥当性については、初期学習フェーズ最後のセッションと、直後の逆転課題を行ったセッションの誤反応率の間に有意な逆相関が見られることと定義した。また信頼性については、初期学習フェーズ最後のセッションと、直後の逆転課題を行ったセッションの誤反応率の間の相関係数 (r) が 0.7 を超えることと定義した。

このため、各群 32 匹のマウスを、初期学習フェーズの長さ (1 セッション、2 セッション、3 セッション、4 セッション、5 セッション、6 セッション、7 セッション、14 セッション) によって計 8 条件に 4 匹ずつ振り分けた。各条件の 4 匹は、群ごとに

ケージ1から2匹、ケージ2から2匹になるよう割り当てた。各セッションにおいて、初めの100回のコーナーアクセスのうち不正解コーナーにアクセスした回数を誤反応率と定義した。

2-4-4. SAT で使用するコーナー位置の条件検討

SATにおいて使用する2つの正解コーナーの位置関係が成績に及ぼす影響を調べるため、10週齢のC57BL/6J雄マウスを用い、以下の方法で条件検討を行った。IntelliCageを4ケージ用い、各ケージで6匹ずつマウスを試験した。各ケージの6匹のうち、(1)対角線上の2つのコーナーを往復する対角線群、(2)長辺の2つのコーナーを往復する長辺群、(3)短辺の2つのコーナーを往復する短辺群に各々2匹ずつ（各群、4ケージ分で合計n=8となる）を割り当てた（Figure 9A）。ケージ内の6匹はいずれのマウスについても全て異なった位置の正解コーナーが割り当てられているため、他個体の動きを模倣して正解を選ぶことができない。RFID 個体識別用のトランスポンダーをDiethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入し、その24時間後から、同じIntelliCageで試験する予定の6匹のマウスを通常のプラスチックケージで7日間飼育した（前馴化フェーズ）。この間、飼育環境の変化による顕著な体重減少やケガが見られないことを確認した。前馴化フェーズが終了した翌日、午前10時にマウスを全てIntelliCageに移した後、馴化フェーズ1、馴化フェーズ2、馴化フェーズ3を各々3、1、5日間ずつ行った。

それぞれの正解コーナーの位置は7セッションの初期学習フェーズを終えたのち、セッション8で全て不正解コーナーの位置と入れ替え、逆転学習を行った。

2-4-5. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルを用いた行動柔軟性試験

10週齢のC57BL/6J雄を16匹、使用した。RFID 個体識別用のトランスポンダーをDiethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入した24時間後から、16匹全てのマウスを同一ケージで7日間飼育した（前馴化フェーズ）。この間、16匹のうち顕著な体重減少やケガが見られないことを確認した。IntelliCageに移した後（Figure 11A）、馴化フェーズ1、馴化フェーズ2、馴化フェーズ3を各々3、1、5日間行った（Figure 11B）。その後生理食塩水もしくはPCPAを投与するための浸透圧ポンプをDiethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入した。ポンプからの溶液抽出量が安定するまでさらに馴化フェーズ3を3日間行った後、SATの連続逆転課題を用いて行動柔軟性を評価した。まず、初期学習フェーズ（図中、I.L.と略す）を7セッション行った。セッション8で初めて正解・不正解コーナーの逆転し、同条件でセッション14までトレーニングを行った（以後、第1逆転学習フェーズ。図中、Rev.1と略す）。セッション21でさらに正解・不正解コーナーの逆転し（初期学習フェーズと同じ正解・不正解コーナー位置にあたる）、同条件でセッション21までトレーニングを行った（以後、第2逆転学習フェーズ。図中、Rev.2と略す）。セッション21でさらに正解・不正解コーナーの逆転し（初期学習フ

エーズと同じ正解・不正解コーナー位置にあたる)、同条件でセッション 29 までトレーニングを行った (以後、第 3 逆転学習フェーズ。図中、Rev.3 と略す)。セッション 27 では、PCPA 曝露群における低競争環境 (8 匹/ケージ) での競争優位性指標の変化を観察するため、試験開始 12 時間前から対照群の 8 匹のマウスを別の飼育ケージに移動させ、試験開始 15 分後に再び IntelliCage に戻した。

2-4-6. AD/HD 様発達障害モデルマウスを用いた行動柔軟性試験

AD/HD 様の多動性異常を示す発達障害モデルマウスとして同定された *Grin1* mut 群⁹⁹ および *Tuba1* mut 群¹⁰⁰、ならびにそれぞれの同腹仔の野生型 C57BL/6J マウス (以上、全て雄) を用いた。RFID 個体識別用のトランスポンダーを Diethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入した 24 時間後から、*Grin1* mut 群 8 匹およびその同腹仔の野生型 8 匹の計 16 匹を同一ケージで、また *Tuba1* mut 群 8 匹およびその同腹仔の野生型 8 匹の計 16 匹を同一ケージで各々 7 日間飼育した (前馴化フェーズ)。この間、全てのマウスに顕著な体重減少やケガが見られないことを確認した。それぞれ *Grin1* mut 解析用と *Tuba1* mut 解析用の IntelliCage に移した後 (Figures 14A-B)、馴化フェーズ 1、馴化フェーズ 2、馴化フェーズ 3 を各々 5、1、5 日間行った。全ての馴化フェーズが終了後、SAT の連続逆転課題を用いて行動柔軟性を評価した (Figures 14C)。試験は、初期学習フェーズ、第 1-第 4 逆転学習フェーズ (Rev.1-Rev.4) を 7 セッションずつ、第 5-

第 10 逆転学習フェーズ (Rev.5–Rev.10) を 4 セッションずつ行った。

2-4-7. 周産期低用量 TCDD 曝露モデルを用いた行動柔軟性試験

対照群、TCDD-0.6 群、TCDD-3.0 群が 6 ヶ月齢になった時点から行動柔軟性試験を行った (Figure 21A)。IntelliCage を 2 台使い、1 台につき対照群、TCDD-0.6 群、TCDD-3.0 群をそれぞれ 4 匹ずつ試験した (n=8/群) (Figure 21B)。RFID 個体識別用のトランスポンダーを Diethyl Ether 麻酔下で皮下に挿入し、その 24 時間後から、同じ IntelliCage で試験する予定の 12 匹のマウスを通常のプラスチックケージで 7 日間飼育した (前馴化フェーズ)。この間、飼育環境の変化による顕著な体重減少やケガが見られないことを確認した。前馴化フェーズが終了した翌日午前 10 時にマウスを全て IntelliCage に移した後、馴化フェーズ 1、馴化フェーズ 2、馴化フェーズ 3 を各々 3、1、5 日間ずつ行った。全ての馴化フェーズが終了後、SAT の連続逆転課題を用いて行動柔軟性を評価した (Figure 21C)。試験は、初期学習フェーズ、第 1–第 2 逆転学習フェーズ (Rev.1–Rev.2) を 7 セッションずつ、第 3–第 11 逆転学習フェーズ (Rev.3–Rev.11) を 4 セッションずつ行った。最後のセッション (Rev.11 の 4 日目。以下、Rev.11-4) において、試験開始 1 時間後 (23:00) から 30 分以内に順に全てのマウスの脳をサンプリングした。

2-5. その他の行動実験

2-5-1. オープンフィールドを用いた新奇環境における探索行動試験

15 lux の照明下、オープンフィールド（50 x 50 x 50 cm のアクリル製ボックス、室町機械、東京、日本）を用い、新奇環境における探索行動レベルの評価を行った。マウスを1匹ずつオープンフィールド入れ、60分間の行動の軌跡をオープンフィールド上部に設置したカメラで撮影した。撮影した動画について TopScan ソフトウェアで画像解析を行い、60分間のうち、10分間ごとの移動距離（cm）、また不安様行動の指標として10分間ごとのセンター領域（オープンフィールド中央部 25 x 25 cm）における滞在時間をそれぞれ定量した。

2-5-2. ロータロッドを用いた運動協調性試験

ロータロッドトレッドミル装置 MK-670（室町機械、東京、日本）を用い、運動協調性試験を行った。これは、30 mm 径の回転バーの上にマウスをのせ、落下するまでの時間を計測して運動協調性の指標とするものである。本実験の前に、1日4回の練習試行を4日間行った。この練習試行は1試行60秒、回転速度は各々3 rpm からスタートし、60秒の間に徐々に回転数を3, 10, または20 rpm まで上げた。本実験では、1

日4回の試行を4日間行った。試行は1試行60秒、回転速度は各々3 rpm からスタートし、60秒の間に徐々に回転数を10, 20, 30, または40 rpm まで上げ、マウスが落下するまでの時間を計測した。試行中に落下しなかったマウスの落下時間は60秒とした。

2-6. 免疫組織化学染色

周産期低用量 TCDD 曝露モデルを用いた行動柔軟性試験において、最後のセッションで課題を遂行中（セッション開始から1時間後）のマウスから脳を摘出し神経活動マーカーを指標とした解析を行った。取り出した脳は直ちに粉末状のドライアイスに包埋した（未固定新鮮凍結法）。以後、脳サンプルは全て -80°C のディープフリーザーにて凍結保存し、順次、クライオスタットを用いて $12\mu\text{m}$ の厚さで薄切した。次に、薄切した脳切片に神経活動マーカー c-Fos、Arc タンパクに対する抗体を反応させ免疫組織化学染色により、脳領域ごとの神経活動のレベルを調べた。以下の工程は、特に記述がない限り室温で行った。脳切片を貼付したスライドガラスを PBST (0.05% Triton X100) で5分間 wash し、続いて4%パラホルムアルデヒド(溶媒は PBS, pH7.4) で10分間固定した。PBST で wash した後、0.3% H_2O_2 (溶媒は100%メタノール) 中で30分間インキュベートした(内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害)。続いて、ブロッキング溶液で室温30分、 4°C で30分インキュベートした後、一次抗体液(c-Fos 抗

体は 1:1000、Arc 抗体は 1:10000 で PBST に希釈) を切片にのせ、4°Cで一晩インキュベートした。その後、TSA Biotin System (Perkin Elmer) を用いたシグナル増幅工程を付属のプロトコールに沿って行った(二次抗体は 1:200 で PBST に希釈)。最後に DAB によりシグナルの可視化を行い、封入した。

免疫標識された細胞数は、ステレオロジー解析 (Stereo Investigator software (Microbrightfield Williston, VT)による半自動 optical fractionator method) によって定量した。なお、Arc 陽性細胞についての定量は、特に認知・学習、情動に関連の深い 14 領域、すなわち縁前方皮質 (PrL)、腹側眼窩皮質と外側眼窩皮質 (VO/LO)、内側眼窩皮質 (MO)、前帯状皮質 (ACC; Cg1Cg2)、背外側線条体 (DLS)、側坐核 (AcbC)、一次運動野 (M1)、一次体性感覚野 (S1)、後部帯状回皮質 (RSGc)、嗅周囲皮質 (Ect)、海馬 CA1 領域 (CA1)、海馬 CA3 領域 (CA3)、扁桃体基底外側核 (BLA)、扁桃体中心核 (CeA)に対して行った。c-Fos 陽性細胞についての定量は、PrL, ACC, CeA, BLA の 4 領域に対して行った。各領域の境界は Stereo Investigator software を用いて低倍率で観察した各切片を Mouse Brain Atlas (Franklin and Paxinos, 3rd Ed., 2008)を参考に決定した。細胞は 40 倍対物レンズの観察下でカウントした。続いて、領域ごとの 3 次元細胞密度が Stereo Investigator software により各切片情報から推定された。各領域の c-fos、Arc 免疫陽性細胞の平均数は各群マウス 5 匹のそれぞれの脳から少なくとも各 3 連続切片を用い、計算した。

2-7. 統計

データは、GraphPad Prism5 ソフトウェア (MDF)、統計解析ツール R (<http://cran.r-project.org/>)、もしくは Excel 2010 ソフトウェア (Microsoft) を用いて、Student の t 検定、一要因ないし二要因の分散分析と Bonferroni の多重比較検定により行った。二要因の分散分析の交互作用については、有意であった場合のみ記述した。有意水準はいずれも 5%とした。

3. 結果

3-1. 新たな行動柔軟性試験としての Spatial Anticipation Task の確立

3-1-1. 信頼性・妥当性の検証

SAT および 2c-PL、1c-PL の計 3 つの場所弁別学習課題とその逆転課題を行った。

以下、逆転課題呈示前の学習フェーズを初期学習フェーズと表記する。SAT, 2c-PL, 1c-PL の 3 つの場所弁別学習課題の逆転課題が各々行動柔軟性試験として適切な評価方法であるかを検証するため、「初期学習フェーズのルールに高度に順応している（＝誤反応率が低い）個体ほど、逆転課題に直面した時に行動を適応させることが困難である（＝誤反応率が高くなる）」という理論的仮説に対する妥当性・信頼性の評価を行った。

まず SAT 群、2c-PL 群、1c-PL 群はいずれにおいても、初期学習フェーズにおける誤反応率は、初期学習フェーズが長くなるほど低下する傾向が一貫して見られた（Figures 7A-C、灰色の背景のセッション）。すなわち、SAT、2c-PL、1c-PL のいずれの試験課題においても、マウスが場所弁別学習を達成していく様子を安定して観察できることがわかった。次に、各群・各条件の初期学習フェーズの最後のセッションと逆転課題セッション（黄色の背景のセッション）を比較した。いずれの群においても、初期学習を 1 セッション行っただけでは 2 セッション目に逆転学習を行っても誤反応

率は有意に上昇しなかった ($P > 0.05$, t -test) (Figures 7A-C)。ただし、初期学習を2セッション以上行った条件では、SAT 群、2c-PL 群ともに全て逆転課題セッションにおいて有意な誤反応率の上昇が見られた ($P < 0.05$, t -test) (Figures 7A-B)。一方、1c-PL 群においても逆転課題セッションにおける誤反応率の上昇は見られたものの、分散が大きく、初期学習フェーズを4, 5, 14セッション行った条件でしか逆転課題セッションで有意な誤反応率の上昇は見られなかった ($P < 0.05$, t -test) (Figures 7C)。

次に各群において、初期学習フェーズ最後のセッションと逆転課題セッションの誤反応率の関係に着目した。まず、Figure 7から初期学習フェーズの最後のセッションと逆転課題セッションのデータを抜き出してグラフを作成した (Figure 8A)。SAT 群においては、初期学習フェーズの期間が長いほど誤反応率が低くなり、一方逆転学習に伴う誤反応率の上昇率が大きくなることがわかった。一方2c-PL 群および1c-PL 群では初期学習フェーズの期間が長いほど誤反応率が低くなるものの、逆転学習に伴う誤反応率の上昇率には一貫した変化が見られなかった。次に、群ごとに、全ての初期学習フェーズ条件のデータを用いて逆転学習前後の誤反応率の関係をプロットした (Figure 8B)。ピアソンの無相関検定を行った結果、SAT 群においてのみ P 値が 0.0001 以下 ($r = 0.84$) と、両変数間に非常に高い負の相関性が確認された。

以上から、SAT は、「初期学習フェーズのルールに高度に順応している (=誤反応率が低い) 個体ほど、逆転課題に直面した時に行動を適応させることが困難である (=

誤反応率が高い)」という行動柔軟性における理論的仮説に合致した認知的行動を、実験的に高い精度で評価できる試験系であることがわかった (Figure 8B)。以下、SATを用いて、IntelliCage における行動柔軟性試験法の確立を目指した。

3-1-2. Spatial Anticipation Task (SAT)のプロトコール検討

SAT において、往復する 2 つの正解コーナーの位置関係が成績に及ぼす影響を調べるため、以下の方法で条件検討を行った。ケージの対角線、長辺、ないし短辺に位置する 2 コーナーを往復するマウスのグループをそれぞれ対角線群、長辺群、短辺群 (各群 $n=8$) とし、7 セッションの初期学習フェーズに続いて逆転課題セッションを行った。(Figure 9)。その結果、対角線群、長辺群、短辺群はいずれの群においても同様に、初期学習フェーズの間に顕著な不正解アクセス (誤反応率) の減少と正解アクセスの増加が一貫して観察された (Figures 10A-B)。また、いずれの群においても、リエントリーアクセスはセッションを通じて 20% 前後であった。初期学習フェーズにおける学習の達成率 (セッション 1 からセッション 7 までの成績の変化率) には群間で有意な差は見られなかった ($P > 0.05$, one-way ANOVA)。続くセッション 8 の逆転学習では、いずれの群においても正解アクセス率の減少および不正解アクセス率 (誤反応率) の増加が見られた。ただし、セッション 7 においてはいずれの成績にも群間の差は見られなかったものの、セッション 8 では短辺群は他の対角線群・長辺群に対し

有意に正解アクセス率が高く ($P < 0.05$, one-way ANOVA; $a, b, P < 0.05$, Bonferroni test)、また不正解アクセス率(誤反応率)が低かった ($P < 0.05$, one-way ANOVA; $a, b, P < 0.05$, Bonferroni test) (Figure 10B)。このことから、短辺を往復させる SAT は、対角線や長辺を往復させる条件と比較して、初期学習の効率には差は無いものの、逆転学習に伴う認知的負荷が小さいことが示唆された。

次に、往復する 2 つの正解コーナーの位置関係が観察される行動指標の個体間誤差にどのような影響を及ぼすかに着目した。初期学習フェーズと逆転課題セッションの全 8 セッションで得られた群ごとの正解アクセス率、不正解アクセス率(誤反応率)、リエントリー率の標準偏差を調べた (Figure 10C)。その結果、まず正解アクセス率に関して、短辺群は長辺群よりも大きい標準偏差を示した ($P < 0.05$, one-way ANOVA; *, $P < 0.05$, Bonferroni test)。また、不正解アクセス率(誤反応率)に関して、短辺群は対角線群および長辺群よりも大きい標準偏差を示した ($P < 0.05$, one-way ANOVA; *, $P < 0.05$, Bonferroni test)。これらのことから、短辺を往復させる SAT は、対角線や長辺を往復させる条件と比較して、個体間誤差が大きくなりやすいプロトコルであることが示唆された。

以上の条件検討結果から、SAT を用いた行動柔軟性試験には、より逆転学習に伴う認知的負荷が高く、かつ個体間誤差の小さいデータの得られる、対角線ないし長辺に位置する 2 コーナーを往復させるプロトコルが適している事がわかった。以下の実

験では、対角線に位置する2コーナーを往復させるSATを用いて行動表現型を行った。

3-2. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスにおける行動表現型解析

C57BL/6J 雄マウス 16 匹の IntelliCage への馴化フェーズ 3 が終了した段階で、個体ごとの 1 日あたりのコーナーアクセス数および体重の平均が均等になるよう、8 匹ずつ 2 グループに分けた (Figure 11A)。生理食塩水ないし PCPA 溶液投与用浸透圧ポンプを皮下に挿入した後、ポンプからの溶液流出量が安定するまでさらに 3 日間、馴化フェーズ 3 を続けた (Figure 11B)。この間、ポンプ挿入時の皮膚切開痕のかい離・化膿等は見られなかった。また、ポンプ挿入前後で一日あたりのコーナーアクセス数に変化は見られなかった。以上から、浸透圧ポンプを挿入したマウスを行動試験に用いることが可能であることと判断した。試験では、SAT の初期学習フェーズの後、逆転学習を計 3 回行った (Rev.1-Rev.3, 連続逆転課題) (Figure 11B)。

3.2.1 行動柔軟性指標

SAT の連続逆転課題を用いた行動柔軟性試験では、PCPA 群は第 1 逆転フェーズの初日のセッション (Rev.1-1) において、対照群と比較して有意に高い誤反応率を示した (Figure 12A) (*, $P < 0.05$, Bonferroni test)。その他のセッションでは群間差は見ら

れなかった (Group, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM within all sessions/each learning phase, $P > 0.05$, Bonferroni test)。この Rev.1-1 のセッションについて、セッション内での累積誤反応数の推移をプロットした (Figure 12B)。セッションの初めの 100 アクセスを前後半の 50 アクセスずつに区切って群間差を解析したところ、前半は群間の差はないものの、後半において PCPA 群の誤反応率が高いことがわかった (Group, $F(1, 686) = 3.97$, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。すなわち、対照群はセッションの後半で PCPA 群よりも早く新しいルールに対応できていたことがわかった。各セッションのリエンタリー率は群間に差は無く、交替行動は同様に習得できていることがわかった (Figure 12C)。各セッションの総コーナーアクセス数においても群間に差は無く、PCPA によるセッション中の活動量に大きな影響は認められなかった (Figure 12D)。以上から、PCPA 25 mg/kg の持続投与は、初期学習や基本的な活動量には影響しないが、逆転学習を初めて経験したセッションにおいて、新しいルールへの行動柔軟性の低下を引き起こすことが認められた。

3.2.2 社会的行動表現型としての集団内競争優位性指標

次に、3 時間のセッションの中で、単位時間 (分) あたりのコーナー滞在時間 (全セッションの平均) を調べたところ、対照群および PCPA 群ともに、セッション開始時に一過的なコーナー滞在時間の増加が見られることがわかった (Figure 12E)。ビデ

オ観察したところ、セッション開始して間もない時間帯は、ケージ内の 16 匹のマウスが 4 つのコーナー（コーナー1 つにつき、1 度に 1 匹のみアクセス可能）に集中的にアクセスし、競争的状況になっていることがわかった（Figure 12G）。ここで、このセッション開始後 5 分間のコーナー滞在時間（以後、コーナー占有時間）を、他の個体と共通の目標（＝報酬の獲得）を競いながら達成する行動の優位性（＝競争優位性）の指標として解析に用いた。対照群と PCPA 群のコーナー占有時間をセッションごとに比較したところ、対照群が PCPA 群と比較してコーナー占有時間が長い傾向は、行動柔軟性試験開始時（セッション 1）には見られなかったものの、セッションを重ねるにつれて顕著になっていく様子が明らかになった（Figure 12F、セッション番号は行動柔軟性試験の全学習フェーズの通し番号）（Group, $F(1, 266) = 4.71, P < 0.05$, after Session 8 except 27; Group x Session, $P > 0.05$, after Session 8 except 27）。

セッション 27（Figure 12F, 黄色のバー）では、PCPA 群のコーナー占有時間の低下が、報酬への欲求が低い、またはセッション開始のシグナル（LED の点灯等）に気が付かない等、非社会的要因に起因する可能性を検討した。このため、セッション 27 を行う 12 時間前から、ケージから対照群のマウスを全て取り除き PCPA 群のマウスのみを残した。セッション 27 開始後、15 分経過した後に対照群をケージに戻した。すなわち、セッション開始後 15 分まではケージの中に PCPA 群の 8 匹しかおらず、4 つのコーナーを競う倍率がより低い競争条件となるように設定した。この時、PCPA

群のセッション 27 開始時のコーナー占有時間は顕著に、通常の対照群と同等のレベルまで高くなった。すなわち、本実験において見られた PCPA 群のコーナー占有時間の低下は、PCPA 群の報酬への欲求が低さや、セッション開始のシグナル (LED の点灯等) に気が付かない等の要因によるものではなく、競争優位性の低さという社会的要因に基づくものであることが示された。また、本研究で開発した行動柔軟性試験において、セッション開始後 5 分間のコーナー占有時間が集団内競争優位性に基づく社会的行動指標となり得ることがわかった。

3.2.3 固執性指標

本研究で開発した SAT を用いる行動柔軟性試験では、各々のマウスのコーナーアクセスは、正解アクセス (報酬の得られるコーナーへのアクセス)、不正解アクセス (その学習フェーズの間、決して報酬を得られない 2 コーナーへのアクセス)、リエントリーアクセス (報酬の得られたコーナーに連続してアクセスしたため、交替ルールにより報酬が得られないアクセス) の 3 つに分類できる。この時、正解アクセス時に選択的な滞在時間の延長やノーズポーク回数の増加は、報酬イベント (飲水) に対する固執性の指標と捉えられる。

各セッションの各々のコーナーアクセスあたりの平均コーナー滞在時間を群間で

比較したところ、有意な差は見られなかった (Figures 13A-C)。次に、各セッションの各々のコーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数を群間で比較した。PCPA 群は試験の後半において、正解アクセスあたりのノーズポーク回数が対照群よりも有意に高くなることがわかった (Group, $F(1,196) = 4.62, P < 0.05$; Group x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM within the last 2 weeks) (Figure 13D)。一方、不正解アクセス時やリエントリーアクセス時のノーズポーク数には影響は見られなかった (Figures 13E-F)。正解アクセス時には、一度のコーナーアクセスにおいて一度しか報酬を得ることができない。すなわち、PCPA 群マウスが正解アクセス時において選択的にノーズポーク数が増加しているという結果から、PCPA 群の報酬への固執的行動が亢進していることが示された。また、本研究で開発した行動柔軟性試験において、正解アクセスあたりのノーズポーク数は固執性行動の指標となり得ることがわかった。

3-3. Grin1 mut マウスおよび Tuba1 mut マウスにおける行動表現型解析

3.3.1 IntelliCage における新奇環境探索活動および自発活動指標

Grin1 mut 群および Tuba1 mut 群 (Figures 14A-B) のデータをもとに、前馴化フェーズ終了後、IntelliCage へ収容した直後の新奇環境における探索活動/自発活

動のレベルを以下に示す指標を基に解析した。まず、午前 10 時に前馴化フェーズを行っていた飼育ケージから IntelliCage に移した直後から、馴化フェーズ 1 における 30 分ごとのコーナーアクセス数を調べた (Figure 15)。各群の IntelliCage への収容直後のコーナーアクセス数をみると、概して初めの 30 分のアクセスは少なく、その後顕著に増加し、約 4 時間後に減少した。これは、マウスが初めて IntelliCage のケージ環境を経験した際の、新奇環境における探索活動を反映していると考えられる。また、初日の暗期以後は、暗期における活動量の上昇および明期における活動量の減少という、マウスの従来の概日リズムに沿った活動量の変化のパターンが一貫して観察された。また、暗期のコーナーアクセス頻度に二峰性リズム、すなわち暗期始まって間もなくの時点と、暗期の終わりの時点で、コーナーアクセスが大きく上昇するリズムが見られた。C57BL/6J 系統のマウスでは従来、暗期におけるホームケージ活動量に全く同様の二峰性のピークをもつリズムがあることが知られている⁶⁵。以上の点から、IntelliCage への収容後、初めの暗期からのコーナーアクセス数は基底状態におけるホームケージ内での自発的活動量の指標として確からしい。また、正常な行動リズムの質的な指標として、暗期における二峰性のピークの有無にも注目できる。

3.3.2 Grin1 mut マウスにおける新奇環境での探索活動／自発活動指標

Grin1 mut 群において上記の新奇環境の探索活動指標 (IntelliCage 収容直後 4 時間

での明期の活動量) をみると、対照群に対して有意な差は見られなかった。しかし、その後の 5 日間で、*Grin1 mut* 群では各暗期における総コーナーアクセス数が対照群に対して一貫して高いコーナーアクセス数を示した (Genotype, $F(1, 322) = 6.96, 3.56, 3.84, 5.74, \text{ and } 7.24$; $P = 0.02, 0.08, 0.07, 0.03, \text{ and } 0.02$ within the 1st to 5th dark phase, respectively, Two-way ANOVA with RM) (Figure 15A)。以上から、*Grin1 mut* 群は基底レベルにおける自発活動の亢進が見られること、*Tuba1 mut* 群は新規環境における探索活動および基底レベルにおける自発活動の抑制が見られることがわかった。

3.3.3 *Tuba1 mut* マウスにおける新奇環境での探索活動／自発活動指標

Tuba1 mut 群において新奇環境の探索活動指標 (IntelliCage 収容直後 4 時間での明期の活動量) をみると、野生型群よりも活動量が低いことがわかった (Group, $F(1, 98) = 13.85$, $P < 0.05$; Genotype x Time, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。さらに、*Tuba1 mut* 群ではその後の 5 回の暗期において対照群に対して一貫して低いコーナーアクセス数 (Genotype, $F(1, 322) = 6.82, 20.68, 30.1, 4.99, \text{ and } 11.59$; $P = 0.02, 0.0005, 0.0001, 0.04, \text{ and } 0.004$ within the 1st to 5th dark phase, respectively, Two-way ANOVA with RM) (Figure 15B) が観察された。これより、*Tuba1 mut* 群では基底状態におけるホームケージ内での自発的活動量が低いことが示された。さらに *Tuba1 mut* 群では活動性が抑制されているだけでなく、通常 C57BL/6J 系統で見られる暗期の二峰性の活動リズム

が消失していることがわかった。

3.3.4 Grin1 mut マウスにおける行動柔軟性指標

Grin1 mut 群は初期学習フェーズにおいて、野生型群よりも SAT を早く学習した (Genotype, $F(1, 84) = 9.13, P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM, Genotype x Session, $P < 0.05$; *, $P < 0.05$ in Session 2, 3, and 4 (初期学習フェーズ), Bonferroni test) (Figure 16A)。Rev.1 においては、野生型群、Grin1 mut 群は同様な成績を示したが、Rev.2 以降、新たな逆転学習フェーズに入るたびに对照群に対して高い誤反応率が顕れた (*, $P < 0.05$, Bonferroni test within all sessions) (Figures 16A)。また、Grin1 mut 群は高いリエントリー率を示した (Genotype, $F(1, 812) = 30.0, P < 0.05$; Genotype x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figures 16B)。これより、Grin1 mut 群は交替ルールの学習が十分に成立していない可能性が示唆された。また、Grin1 mut 群は各セッションで高い総コーナーアクセス数を示した (Genotype, $F(1, 812) = 24.6, P < 0.05$; Genotype x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figures 16C)。これは、馴化フェーズ 1 でみられた基底レベルでの高い自発活動性と一致していた。

次に、各逆転学習フェーズの誤反応率をより詳しく解析した。Rev.1 から Rev.10 までの各逆転学習フェーズの誤反応率について、それぞれのフェーズの初めのセッション

ン（正解・不正解を逆転した日）、2 番目のセッション、3 番目のセッション、4 番目のセッションにデータをわけてまとめた（Figure 16D）。その結果、各逆転学習フェーズの初めのセッションでは *Grin1 mut* 群の誤反応率が高いことがわかった（Genotype, $F(1, 126) = 33.49, P < 0.05$; Genotype x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM; *, $P < 0.05$, Bonferroni test）、各逆転課題フェーズの 2 番目のセッションにおいても、*Grin1 mut* 群の誤反応率が高いことがわかった（Genotype, $F(1, 126) = 7.889, P < 0.05$; Genotype x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM; *, $P < 0.05$, Bonferroni test）。各逆転学習フェーズの 3 番目、4 番目のセッションでは群間に差が見られなかったため、*Grin1 mut* 群の逆転学習がこの時点でようやく対照群と同様のレベルの適応を示していたことがわかる。

次に、各逆転学習フェーズの初めのセッションにおける *Grin1 mut* 群の誤反応率について、それぞれセッション内の累積誤反応率の変化を調べた（Figure 16E）。その結果、Rev.2 以降のいずれにおいてもセッションの初めの 50 アクセスでは群間の差がほとんど見られないものの、その後の 50 アクセスにおいて群間の差が開く（野生型群が *Grin1 mut* 群よりも早く逆転課題に適応している）傾向が一貫して見られた。以上から、*Grin1 mut* 群は、行動柔軟性の低下が見られることがわかった。

3.3.5 Tuba1 mut マウスにおける行動柔軟性指標

Tuba1 mut 群は初期学習フェーズにおいて、野生型群よりも SAT を早く学習した (Genotype, $F(1, 84) = 25.42$, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM, Genotype x Session, $P < 0.05$; *, $P < 0.05$ in Session 3, 4, 5, 6, and 7 (初期学習フェーズ), Bonferroni test) (Figure 17A)。Rev.1 以降は、新たな逆転学習フェーズに入るたびに对照群に対して高い誤反応率が顕れた (* $P < 0.05$, Bonferroni test within all sessions) (Figures 17A)。また、Tuba1 mut 群は初期学習フェーズにおいて高いリエントリー率を示した (Genotype, $F(1, 84) = 7.43$, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM, Genotype x Session, $P < 0.05$; *, $P < 0.05$ in Session 2 and 3 (初期学習フェーズ), Bonferroni test) (Figures 17B)。これより、Tuba1 mut 群は交替ルールの学習が遅れていた可能性が示唆された。各セッションの総コーナーアクセス数については一貫した群間差群は見られなかった (Figures 17C)。これより、馴化フェーズ1ではホームケージ内の自発活動性の低下が示されたものの、セッション時の報酬に対する欲求行動のレベルに変化はないことが示された。

次に、各逆転学習フェーズの誤反応率をより詳しく解析した。Figure 16D と同様に、Rev.1 から Rev.10 までの各逆転学習フェーズの誤反応率について、それぞれのフェーズの初めのセッション (正解・不正解を逆転した日)、2 番目のセッション、3 番目のセッション、4 番目のセッションにデータをわけてまとめた (Figure 17D)。その結果、各逆転学習フェーズの初めのセッションでは Tuba1 mut 群の誤反応率が高いことがわ

かった (Genotype, $F(1, 126) = 35.27, P < 0.05$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM; *, $P < 0.05$, Bonferroni test)。また、各逆転課題フェーズの 2 番目以降のセッションでは群間に差が見られなかったため、Tuba1 mut 群の逆転学習がこの時点では対照群と同様の逆転課題への適応を示していたことがわかる。

次に、各逆転学習フェーズの初めのセッションにおける Tuba1 mut 群の誤反応率について、それぞれセッション内の累積誤反応率の変化を調べた (Figure 17E)。その結果、Rev.6 を除いていずれにおいてもセッションの初めの 50 アクセスでは群間の差がほとんど見られないものの、その後の 50 アクセスにおいて群間の差が開く (野生型群が Tuba1 mut 群よりも早く逆転課題に適応している) 傾向が一貫して見られた。以上から、Tuba1 mut 群は、行動柔軟性の低下が見られることがわかった。

3.3.6 Grin1 mut マウスおよび Tuba1 mut マウスにおける集団内競争優位性指標

Grin1 mut 群および Tuba1 mut 群における競争優位性を評価するため、セッション中の毎分のコーナー占有時間 (全セッションの平均) およびセッション毎の最初の 5 分間のコーナー占有時間をそれぞれ群間で比較した (セッション番号は行動柔軟性試験の全学習フェーズの通し番号) (Figure 18)。その結果、Grin1 mut 群は野生型群と比較してセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間が長いことが明らかになった

(Genotype, $F(1, 840) = 15.08, P < 0.05$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。一方、Tuba1 mut 群は野生型群と比較してセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間が短い傾向が見られたが有意な差は見られなかった (Genotype, $F(1, 840) = 3.16, P = 0.097$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。

3.3.7 Grin1 mut マウスおよび Tuba1 mut マウスにおける固執性指標

Grin1 mut 群は、正解アクセス、不正解アクセス、リエントリーアクセスの各条件のコーナーアクセスの平均滞在時間がいずれも野生型群に対して短いことがわかった (Genotype, $F(1, 840) = 12.75, 11.86, \text{ and } 15.77$ for correct, incorrect, and re-entry condition, respectively, $P < 0.05$ for all conditions; Genotype x Session, $P < 0.05$ for all conditions, Two-way ANOVA with RM) (Figures 19A-C)。一方、コーナーアクセスあたりのノーズポーク数には群間で変化は見られなかった (Figure 19D-F)。野生型群において正解アクセスあたりの平均ノーズポーク数が試験後半で高くなる傾向が見られたが、統計的有意性は確認されなかった。一方、Grin1 mut 群は各条件のコーナーアクセスの平均滞在時間のもノーズポーク数にも野生型群との有意な差は見られなかった (Figure 20)。

3-4. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動表現型解析

3.4.1 新奇環境での探索活動／自発活動指標、運動協調性

経胎盤・経母乳による周産期 TCDD 曝露を受けたマウスが成熟した後、SAT による行動柔軟性試験を行った (Figure 21)。この実験で用いた TCDD 投与量による妊娠マウスの体重および産仔数に影響はなかったが、これは既報と同様の結果であった¹⁰¹。仔マウスが成長した後、試験開始時の体重には群間で有意な変化は無かった。また、IntelliCage 試験の馴化フェーズ 1 における新奇環境における探索活動性・自発活動性指標と比較するため、同一の母親から生まれたマウスをオープンフィールド試験のためにのみ用意して検討した。オープンフィールドにおける 60 分間の活動量は群間で差がなく、新奇環境における探索活動性には影響が見られなかった (Figure 22A 左)。また、不安様行動の指標として用いられるオープンフィールドのセンター領域滞在時間についても、群間で差は見られなかった (Figure 22A 右)。次に、ロータロッドを用いた運動協調性試験を行った。4 日間の連続試行で、最大回転数が 10, 20, 30, 40 rpm のいずれの試行においても群間で差は見られなかった (Figure 22B)。

次に、IntelliCage を用いて新奇環境における探索活動性および自発活動性への影響を評価した。TCDD-0.6 群、TCDD-3.0 群について、前馴化フェーズ終了後、IntelliCage へ収容した直後の新奇環境における探索活動／自発活動のレベルを解析した。前馴化フェーズを行っていた飼育ケージから IntelliCage に移した直後から、馴化フェーズ 1

における 30 分ごとのコーナーアクセス数を調べた。その結果、IntelliCage への収容直後のコーナーアクセス数（新奇環境における探索行動）、および初日の暗期以降のコーナーアクセス数（ホームケージ内の自発活動）のいずれにおいても、TCDD-0.6 群、TCDD-3.0 群はいずれも対照群に対して、有意な差は見られなかった（Figure 22C-D。以降、視認性を図るため、グラフは対照群と TCDD-0.6 群のものと、対照群と TCDD-3.0 群のものにわけて作成した。対照群のデータは共通である）。また、いずれの群においても暗期のコーナーアクセス頻度に二峰性のリズム、すなわち暗期始まって間もなくの時点と、暗期の終わりの時点に、コーナーアクセスが大きく上昇する正常なリズムが見られた。以上から、本実験で用いた TCDD 曝露用量は、新奇環境における探索活動および自発活動性には影響のないレベルであることが、オープンフィールド試験と、今回私が検討した IntelliCage を用いた行動指標の両方で示された。

3.4.2 行動柔軟性指標

TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群は初期学習フェーズ、Rev.1 において対象群と同様の成績を示した（Figure 23）。しかしながら、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群は Rev.2 の初日（Rev.2-1）において、ともに対照群に対して有意に高い誤反応率を示した（*、 $P < 0.05$, Bonferroni test）（Figures 23A and C）。

この Rev. 2-1 のセッションについて、セッション内での累積誤反応数の推移をプロットした (Figure 23B, D)。セッションの初めの 100 アクセスを前後半の 50 アクセスずつに区切って群間差を解析したところ、前半は群間の差はないものの、後半において TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の誤反応率が各々対照群に対して高いことがわかった (Group, $F(1, 686) = 5.47$ (TCDD-0.6) and 5.41 (TCDD-3.0), $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。

リエントリー率に関しては、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群と対照群との間に有意差は認められなかった (Figure 23E, G)。すなわち、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群は交替ルールを正常に学習していたことが示唆された。また、各セッションにおける総コーナーアクセス数を調べたところ、TCDD-0.6 群は対照群に対して減少していることがわかった (Group, $F(1, 784) = 7.90$, $P < 0.05$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figure 23F)。

3.4.3 集団内競争優位性指標

TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群における競争優位性を評価するため、セッション中の 1 分あたりのコーナー占有時間 (全セッションの平均) およびセッション毎の最初の 5 分間のコーナー占有時間をそれぞれ群間で比較した (セッション番号は行動柔

軟性試験の全学習フェーズの通し番号) (Figure 24)。その結果、TCDD-0.6 群は対照群と比較してセッション開始後5分間のコーナー占有時間が長いことが明らかになった (Group, $F(1, 784) = 20.38, P < 0.05$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figure 24A)。一方、TCDD-3.0 群では対照群と比較してセッション開始後5分間のコーナー占有時間に差は見られなかった (Figure 24B)。このことから、TCDD-0.6 群において用量特異的に、社会的行動異常としての競争優位性の低下が見られることがわかった。

3.4.4 固執性指標

TCDD-0.6 群は、各セッションの正解アクセスの平均滞在時間が対照群に対して長いことがわかった (Group, $F(1, 784) = 7.28, P < 0.05$; Genotype x Session, $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figure 25A)。不正解アクセスの平均滞在時間、およびリエントリーアクセスの平均滞在時間には群間で変化は見られなかった (Figure 25B-C)。また、TCDD-0.6 群は、各セッションの正解アクセスあたりの平均ノーズポーク数も対照群に対して多いことがわかった (Group, $F(1, 784) = 5.39, P < 0.05$; Genotype x Session, $P > 0.05$, Two-way ANOVA with RM) (Figure 25D)。不正解アクセスの平均ノーズポーク数、およびリエントリーアクセスの平均ノーズポーク数には群間で変化は見られなかった (Figure 25E-F)。一方、TCDD-3.0 群においては、各セッションの条件

別平均コーナー滞在時間、平均ノーズポーク数に変化は見られなかった (Figure 26)。

このことから、TCDD-0.6 群において用量特異的に、正解コーナーへの滞在時間、正解コーナーにおけるノーズポーク回数が高く、報酬イベントに対する固執性が見られることがわかった。

3.4.5 周産期 TCDD 曝露による行動異常の神経学的基盤

周産期 TCDD 曝露マウスで観察された行動異常とそれに関連する脳領域を同定するため、行動柔軟性試験遂行中のマウスから脳を採取して、免疫組織化学染色による神経活動マーカータンパク (Arc, c-Fos) 発現細胞数の定量的解析を行った。行動柔軟性試験最初のセッションの開始後、1 時間の時点でマウスの脳を採取し、新鮮凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。まず、Arc 陽性細胞数の解析を認知・学習、情動に関連の深い 14 領域 (Figure 27A および方法を参照。図は Elsevier より許可を得て使用) について行った。定量化した結果を Table 1 に示した。その結果、内側前頭前皮質の領域で、PrL における対照群に対する TCDD-0.6 群の Arc 陽性細胞数の減少傾向、ならびに ACC における対照群に対する TCDD-0.6 群の Arc 陽性細胞数の有意な減少が見られた (One-way ANOVA および Bonferroni test)。さらに、扁桃体領域の CeA および BLA で TCDD-0.6 群は対照群に比べて Arc 陽性細胞数の有意な減少が見られた (one-way ANOVA followed by Bonferroni test) (Figure 27B, C)。これらの領域の

神経活動マーカータンパクの変化の傾向について、別の神経活動マーカータンパクである c-Fos についても検討した。その結果、上記の 4 領域の c-Fos 陽性細胞数について、TCDD-0.6 群は対照群に対して PrL, ACC において有意に減少、また CeA において有意に増加する、という結果が得られた (one-way ANOVA followed by Bonferroni test) (Figure 27D)。BLA では群間の差は見られなかった。

以上の結果は、TCDD-0.6 群で観察された行動異常が、認知機能制御の中枢である内側前頭前皮質における神経活動の低下、そして情動機能の中枢である扁桃体における神経活動の亢進と相関があることを示している。直接の因果関係は不明だが、これらは周産期 TCDD 曝露に起因する行動異常の責任脳領域の候補と考えられる。

4. 考察

本研究では、ヒト認知的柔軟性試験をもとに新たに独自に開発したマウス行動柔軟性試験 (Spatial Anticipation Task: SAT) を用い、その信頼性・妥当性の検証試験、プロトコール最適化のための条件、そして複数の精神疾患・発達神経毒性モデルマウスの行動表現型解析を行った。その中で、SAT は行動柔軟性の精度の高い評価法としてだけでなく、下記に記すこれまでマウスでは知られていなかった高度な認知機能である逆転学習ルールそのものに対する適応 (reversal learning-set の確立)、そして学習機能以外にも、新奇環境における探索活動レベル、基底状態での活動レベル、競争的優位性を指標とした社会的行動特性の評価、固執性の評価が同時に実現できる試験系であることが示された。以下に、それぞれの指標について、先行研究と比較しながら、どのような面から今後の精神・神経疾患研究、発達神経毒性研究に適用できるかについて考察したい。

4-1. 行動柔軟性指標について

4-1-1. Spatial Anticipation Task (SAT) における選択反応の解釈、および行動柔軟性試験としての妥当性・信頼性の検証

SAT における選択反応の指標として、①正解アクセス率、②不正解アクセス率 (誤

反応率)、③リエントリーアクセス率の3つがある。

①の正解アクセス率は、報酬の得られる場所と得られない場所の弁別学習、及びSATのルール(2つのコーナーの往復)を学習し、そのルールにもとづいて行動を計画・実行できていることを示す指標となる。この正解アクセス率の低下は、単純に場所の弁別学習ができていないことによっても起こり得るが、コーナーの往復ルールの学習・計画・実行ができていないことによっても起こり得る。このように少なくとも2つの要因が含まれた行動指標になっている点に注意が必要である。場所の弁別学習の指標としては誤反応率の方が、一方でコーナーの往復ルールの学習・計画・実行の指標としてはリエントリー率の方が、より解釈の容易な指標である。このため、本研究で用いた各種のモデルマウスの解析においてはこの指標を使用しなかった。

②の不正解アクセス率(誤反応率)は、報酬の得られる場所と得られない場所の弁別学習の指標となる。正解アクセス率とは異なり、コーナーの往復ルールの学習・計画・実行という認知的要素が影響しないため、単純に4つのコーナーのうち2つのコーナーを選ぶという場所弁別学習の指標として適している。同様の理由で、逆転課題直後において正解・不正解コーナーが逆転した状況では、新しいルールに適応する行動柔軟性の指標として適している。このため、本研究ではこの誤反応率を行動柔軟性の指標として用いた。また、セッション内における累積誤反応数は、3時間というセッションの中で個体がどのように逆転課題に対して行動を適応させていくかを評価

する指標としても有用であることがわかった。

③のリエントリーアクセス率は、どの程度コーナーの往復ルールの学習・計画・実行ができてきているかの指標となる。リエントリーアクセス率の低下は、コーナーの往復ルールそのものが学習できていないこと（学習能力の低下）、もしくは、コーナーの往復ルールは理解できているものの、直前に報酬を得たコーナーに対する固執的なアクセスに対する抑制や作業記憶の異常などにより、適切にそれを計画・実行できないことによっても起こり得る。このように、リエントリー率は複数の要因を反映する行動指標になっている点に注意が必要である。本研究で得られたデータから、各種マウスのリエントリーアクセス率のデータをみると、総じて初期学習フェーズの7日間で30-35%から15-20%程度に下がっていることがわかる。これはコーナーの往復ルールが学習されている様子を反映していると言える。Tuba1変異マウスのように、この初期学習フェーズの初めの数日間のみでリエントリー率が低下している場合は、コーナーの往復ルールの学習が遅れていた、と解釈できる。一方、Grin1変異マウスのように、全セッションを通じてリエントリー率の高いマウスは、コーナーの往復ルールが学習できていないのか、もしくはコーナーの往復を計画・実行することができていないのかの解釈が難しい。しかしながら、Grin1変異マウスのリエントリー率は総じて20-30%の間を推移しており極端に高いわけではないこと、またセッションによっては野生型と差の見られないことから、学習そのものはできているが、学習したルール

にもとづく行動の計画・実行がうまくできていないことが推測される。これは不正解アクセス数を指標とした行動柔軟性とは異なる遂行機能の指標となり得ることが考えられるため、今後別の試験系のデータとの比較等を通じ、解釈の確からしさを高めていく必要がある。

本研究ではまず、誤反応率の指標を用いて、SAT、1c-PL および 2c-PL という 3 つの場所弁別学習課題の逆転課題が各々行動柔軟性試験として適切な評価方法であるかを検証するため、「初期学習フェーズのルールに高度に順応している（＝誤反応率が低い）個体ほど、逆転課題に直面した時に行動を適応させることが困難である（＝誤反応率が高くなる）」という理論的仮説に対する妥当性・信頼性の評価を行った。

その結果、SAT を用いることで上記の初期学習の達成度と逆転学習時の成績の相関性に関する理論的仮説に合致する結果を非常に正確に示すデータを得られることがわかった ($r = 0.84$, $P < 0.0001$)。これまで、行動柔軟性試験は上記の理論的仮説をもとにした信頼性および妥当性検証が十分に示されていない。また同様の行動柔軟性試験としての信頼性および妥当性は、同じ IntelliCage 装置を用いた単純な場所学習課題（2c-PL 課題、1c-PL 課題）では再現できなかった。IntelliCage を用いた行動柔軟性データに関するこれまでに発表された研究では、いずれも今回使用した 1c-PL 課題（4 つのコーナーの内の 1 つの正解コーナーの位置を変えることで逆転学習とする課題）と同じ課題を試験に用いている^{70,102-104}。しかしながら、今回の試験から得ら

れたデータからは、この 1c-PL 課題では初期学習の達成度と逆転学習時の成績に全く相関が無かった ($r = 0.19$, $P > 0.05$)。また、これは、2c-PL 課題においても同様であった ($r = 0.13$, $P > 0.05$)。すなわち、この 1c-PL 課題、2c-PL 課題では行動柔軟性を正確に評価できないと考えられる。

1c-PL 課題ではなぜ行動柔軟性を正確に評価できないのだろうか。この課題を用いた試験では、初期学習の達成は見られるものの、逆転課題時の成績に非常に大きな個体差が観察された。例えば、1c-PL 課題の 8 セッション目で逆転学習を行った群の 4 匹のマウス (A, B, C, D) の誤反応率はそれぞれ、逆転学習直前 (セッション 7) では A = 26%, B = 25%, C = 13%, D = 14%、逆転学習直後 (セッション 8) では A = 32%, B = 54%, C = 15%, D = 76%であった。C は逆転直後に誤反応率が 2%しか上昇していない一方、D の誤反応率は 62%も上昇していた。このあまりに大きな成績の差は、個々のマウス本来の認知機能の差を検出しているというより、個々のマウスの初期学習におけるルールの解釈や方略の違いを反映していると考えられる。1c-PL 課題では、「4 つのコーナーの内、特定の 1 つコーナーでのみ報酬が得られる」というルールだけを理解すればよく、その特定の 1 つコーナーを他の 3 つのコーナーと見分けるための様々な情報 (空間的情報等) を覚えることで大きな利益は得られない。例えば、より認知的負荷の少ない方略として、その日のセッション開始とともにまずは全てのコーナーにアクセスし、どのコーナーが正解コーナーかを見つけ、あとはその正解コーナ

一の位置をそのセッションの3時間の間だけ記憶しておくか、もしくは単純にそのコーナーの周辺に留まって繰り返しアクセスすればよい。このような方略をもつマウスについては、逆転学習によって正解コーナー位置が変更しても、過去の正解コーナー位置に固執せずに新しいコーナーを見つけ、アクセスすることができる。一方、そのような方略を持たず、初期学習フェーズにおける正解コーナーの空間的位置やその他の特徴を強く記憶しようとするほど、逆転課題時にそのコーナーから離れることが難しくなるだろう。先に述べた C, D のマウスは各々、前・後者に相当する典型例であると考えると上記の個体差の理由が矛盾なく解釈できる。

このように、学習課題を解く方略のマウスによる違いは、その試験から得られるデータの解釈を困難にする。序文に述べたモリス水迷路試験の例では、マウスがしばしばプールの壁に沿ってプラットフォームを探す方略をとり、見かけ上空間学習の成績が向上するという例を挙げた。空間学習能力を評価するモリス水迷路やバーンズ迷路では、このほかにもマウスがとり得る様々な方略の例が見つまっている^{105,106}。行動試験系では、このような方略の違いが大きな交絡要因となり得る。今回得られた結果からは、1c-PL 課題には方略の違いが出やすく、またそれ故に行動柔軟性試験には適切でないことが示唆された。

2c-PL 課題も 1c-PL と同様に、マウスによって初期学習のルールの解釈・方略が異なり、それが大きな個体差となり、行動柔軟性指標として不適切なものになっている

と考えられる。ただし、2c-PL は 1c-PL と比較して逆転課題直後の誤反応率の個体差が小さいことから、方略の違いによる交絡要因の影響が出にくいように見える。むしろ 2c-PL 課題における問題は、初期学習フェーズの長さによらず逆転課題直後の誤反応率が 40%前後から上昇しなかったことにある。この理由として、2c-PL 課題では SAT や 1c-PL 課題と比較して常に正解コーナーが二か所にあり、容易に報酬を得られるため、そもそも「強固な初期学習」が確立されなかったことが考えられる。

SAT で用いる正解コーナーの位置のパターンの検討の結果、ケージの対角線もしくは長辺に位置する 2 コーナーを往復させる条件の方が、ケージの短辺の 2 コーナーを往復させる条件よりも、逆転学習に伴う誤反応率の上昇が顕著であった。このことから、短辺の往復条件ではより逆転学習に伴う認知的負荷が小さいことが示唆された。本研究では、行動柔軟性試験として、より認知的負荷が大きく、かつ個体差の少ないデータの得られる試験系が適切であると判断し、対角線を往復させるプロトコルを採用した。今後は、対角線を往復させる SAT から、長辺を往復させる SAT への変更に対する行動の適応の評価を行動柔軟性試験として試験系に組み込むこともできるだろう。

4-1-2. マウスにおいて新規な行動柔軟性指標 (reversal learning-set) の確立

本研究では、SAT を用いた連続逆転課題形式の試験を行った。特に Grin1 変異マウスおよび Tuba1 変異マウスを用いた実験では計 10 回、周産期 TCDD 曝露マウスを用いた実験では計 11 回に及ぶ逆転学習を行った。この中で、非常に興味深い学習行動が観察できた。マウスが逆転課題を繰り返せば繰り返すほど、新たな逆転課題フェーズに入った直後のセッション (Rev.x-1) における誤反応率が小さくなっていく様子が見られた。特に Grin1 および Tuba1 mut マウスを用いた実験において用いた野生型群では、最後の逆転課題を呈示したセッション (Rev.10-1) では、逆転課題直前のセッション (Rev.9-4) の誤反応率とほとんど差が見られなかった。すなわち、このマウスは逆転課題を繰り返す中で、逆転課題そのものに対し徐々に適応していき、最終的にはセッション全体の成績に影響を及ぼさないほど迅速に行動を転換できるようになったと考えられる。

このようなルール転換に対する高度な順応性の獲得は、初めに Harry F. Harlow によってサルを用いた連続弁別課題実験で発見され、「learning-set の獲得」と表現されている¹⁰⁷。Learning-set の獲得は、ヒト以外の動物が試行錯誤型の学習よりもさらに抽象的なルールの学習をできる事を示唆している。特に逆転学習を繰り返すことでこのルールに高度に順応する「reversal learning-set」は、チンパンジーやアシカ、カラス等の高度な知性を持つことが知られている動物で確認されている¹⁰⁸⁻¹¹⁰。最近

では、洗練されたオペラント試験系を用いることでラットにおいても reversal learning-set が起こることが報告されている¹¹¹。本研究で見られたマウスの逆転学習に対する高度な順応は、まさにマウスにおいて reversal learning-set が獲得されることを示している。マウスにおける reversal learning-set に関する報告はこれまでに無く、今回の試験系はこれまで全く知られていなかったマウスの高度な認知的行動を評価し得る試験系であることが明らかとなった。

SAT では、連続逆転課題に伴いこの reversal learning-set が確立されていく様子を、各逆転フェーズ初日 (Rev.x-1: ここで x は、1 から x の任意の数字) の成績を抽出して比較することで評価できる。これはマウスにおいて全く新規かつ高度な行動柔軟性指標であり、これまで不可能であったよりヒトに近い高度な認知機能をマウスにおいて評価することが可能となったと言える。

4-1-3. セロトニン欠乏モデルにおける行動柔軟性低下

中枢セロトニンは遂行機能において重要な神経活動の調節因子であり⁸⁴、逆転学習は眼窩前頭前野 (OFC) へのセロトニン入力によって促進する¹¹²。セロトニン前駆体のトリプトファン欠乏ラットでは行動柔軟性が障害されることが知られていた¹¹¹。私のこの学位論文研究では、先行研究の知見に基づき「セロトニンの合成阻害は行動柔軟性を障害する」という仮説を立て、トリプトファンヒドロキシラーゼ阻害薬

(PCPA) 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスを用いて、SAT を用いた行動柔軟性試験で検証した。

その結果、PCPA 投与群は最初逆転フェーズ初日 (Rev.1-1) において対照群に比較して有意に高い誤反応率を示し、仮説の通り、セロトニンの合成阻害により行動柔軟性が障害されたことが示された。この結果は、今回新たに作成した試験系が従来の知見と一致した結果を示すことから、試験系としてのさらなる妥当性を支持するものである。

また二回目、三回目の逆転フェーズ (Rev. 2, Rev.3) では逆転学習成績の低下は見られなかったことから、セロトニン欠乏による行動柔軟性低下は、繰り返しの逆転学習のトレーニングによって何らかの機能的補完を受けること、そしてセロトニンは先に示した reversal-learning set の獲得には必須ではないことが示唆された。行動柔軟性に影響を及ぼす神経伝達物質には、セロトニン以外にも、ノルアドレナリンやドーパミンがある。今後、様々なモノアミンをはじめとした伝達物質の枯渇モデルや、機能亢進のための薬理試験などを組み合わせ、その行動柔軟性の修飾や reversal-learning set の獲得を支える神経基盤メカニズムを明らかにしていく必要があるだろう。

4-1-4. Grin1 mut マウスおよび Tuba1 mut マウスにおける行動柔軟性低下

Furuse らは、化学変異原の ENU を用いた大規模な「マウスミュータジェネシスプロジェクト」から、今回用いた Grin1^{Rgsc174} (Grin1 mut マウス) および Tuba1^{Rgsc1736} (Tuba1 mut マウス) という 2 つの変異体をもつマウスが行動異常を示すことを見出した^{99,100}。これらのマウスは高い自発活動性と、そのメチルフェニデートによる正常化を示しており、AD/HD 様の発達障害モデルのひとつと考えられている。これまで、ヒト AD/HD 症状としては、行動柔軟性低下を含む遂行機能障害が報告されている^{74,113,114}。そこで AD/HD 症状としての行動柔軟性障害が、これら AD/HD 様発達障害モデルマウスから検出されるかどうかを検証するため SAT 行動柔軟性試験を行った。その結果、Grin1 mut マウスと Tuba1 mut マウスのいずれにおいても、連続逆転課題において繰り返し顕著な行動柔軟性低下が見られた。これは、ヒト AD/HD 症状のモデルマウスから予測される表現型と一致した結果であることから、試験系としてのさらなる妥当性を支持するものである。

Grin1 mut マウスは実験を通して対照群に対して有意に高いリエントリー率が観察された。Tuba1 mut マウスにおいても、初期学習フェーズにおいて限定的ではあるが、対照群に対して有意に高いリエントリー率が見られた。これらは、SAT における正解コーナーの予測ルール（対角線に位置する 2 つのコーナーの往復）が十分に学習されていないことを示唆している。このことから、特に Grin1 mut マウスにおい

では、目的に沿った効率的な行動の組織化が見られないことがわかった。

この *Grin1 mut* マウスおよび *Tuba1 mut* マウスを用いた実験では、それぞれ計 10 回にも及ぶ逆転課題を行った。その結果、どちらの実験においても野生型マウス、変異マウスともに繰り返しの逆転学習によって、各逆転フェーズ初日における誤反応率の減少、すなわち reversal learning-set の獲得過程が観察された。しかしながら、*Grin1 mut* マウスおよび *Tuba1 mut* マウスはいずれも最後の逆転フェーズ初日 (Rev.10-1) における誤反応率は各々の野生型マウスほどは減少せず、reversal learning-set が十分に獲得されないことがわかった。

この実験から得られた興味深い知見として、*Grin1 mut* マウスおよび *Tuba1 mut* マウスがそれぞれ連続逆転課題において一貫した行動柔軟性の低下を示しているにも関わらず、初期学習フェーズにおいては野生型マウスよりも優れた成績を見せた点が注目できる。この理由はまだ明らかではないが、ある課題に対しては高度な熟達を見せるものの、ルールの転換に対する行動の転換が障害されているという点から、記憶能力が向上している一方でその記憶の消去が困難になっているという表現型であるとも考えられる。

4-1-5.周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動柔軟性低下

これまで、周産期 TCDD 曝露を受けた仔の逆転課題への影響について、3つの研究結果が報告されている¹¹⁵⁻¹¹⁷。

Schantz らは、5.0 ppm の TCDD を混ぜた餌を妊娠前後に食べたアカゲザルの母親から生まれた仔において、形を手掛かりとした逆転学習試験の成績低下が見られたことを報告している¹¹⁵。Seo らは、妊娠 10 日目から 16 日目まで毎日 0.1 µg/kg の TCDD を投与した SD 系ラットから生まれた仔において T 字迷路を使った逆転課題を行った結果、空間的手がかりではなく、視覚刺激を手がかりとした場合に成績低下が見られることを報告している¹¹⁶。Widholm らは、妊娠 10 日目から 16 日目まで毎日 0.1 µg/kg の TCDD を投与した SD 系ラットから生まれた仔において、2 レバーオペラント学習装置を用いて左右のレバー位置の違い、あるいは視覚的刺激を用いた逆転学習試験を行ったが、TCDD による逆転学習の成績に顕著な差は見られなかったことを報告した¹¹⁷。

これらの先行研究は、用いた動物や曝露方法統一されていないものの、TCDD への周産期曝露によって仔の逆転学習が障害され得ることを示唆しており、今回の結果と一致している。しかしながら、先行研究では、同じ動物・曝露方法で作製されたモデルの中でも、試験方法によって逆転学習の成績の低下が見られるものとそうでないものが見られる点にも注意が必要である。この原因として、試験系によって逆転学習能

力低下の検出力が低い可能性が挙げられる。上記の逆転課題試験系では、私の学位論文で行ったような行動柔軟性試験としての妥当性・信頼性検証が十分に行われたかどうかは、論文の記載からは判断できない。また、初期学習および逆転学習の指標として、正答率が一定の基準に達するまでにかかった試行数 (number of trials to reach criterion) が使われている。すなわち、学習の達成度が初期学習、各逆転フェーズの成績が各々単純な1つの数字から評価されている。このような試験系では、初期の軽微な高次脳機能への影響を見逃してしまうおそれがある。

本研究から得られた結果では、周産期 TCDD 曝露マウスは TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群ともに、二回目の逆転課題フェーズ初日 (Rev 2-1) において選択的に誤反応率の有意な上昇が見られた。最初ではなく二回目の逆転課題において差が生じることにはどのような意味があるのだろうか。逆転課題には、2つの異なる行動の選択枝が用意され、初期学習フェーズではそのうち1つの選択反応のみが強化され、最初の逆転課題においてはもう1つの選択反応のみが強化される。二回目の逆転学習フェーズでは、初期学習で経験した選択反応を初めて再学習するという点が特徴である。本研究で行った一連の実験から、SAT におけるマウスの最初の逆転学習フェーズ初日 (Rev.1-1) の誤反応率はおよそ 60%強であるのに対し、二回目の逆転学習フェーズ初日 (Rev.2-1) の誤反応率は 40%強と、大幅に改善していた。二回目の逆転課題において求められる選択反応は、初期学習で獲得した選択反応と同一であることから、

マウスは過去に獲得した知識を利用し、新たな逆転課題への適応が進行したできと考えられる。周産期 TCDD 曝露マウスでは、以前に学習した知識を利用して行動転換を促進することができなかったという点で行動柔軟性が低下していたと解釈できる。

行動柔軟性の変容は、初めの逆転学習フェーズ、二回目の逆転学習フェーズ、その後の逆転学習フェーズと、様々な段階で起こり得る。このため、一度の逆転学習試験だけでは、行動柔軟性の限られた側面のみを測定していることになる。先に述べた今回の *Grin1* 変異マウスはこの顕著な表現型の例で、初めの逆転課題直後のセッション (Rev.1-1) では野生型との差は見られなかったが、二回目の逆転課題以降は、逆転課題が呈示される度に一貫して行動柔軟性の低下を示した。これらの結果は、行動柔軟性には繰り返しの観察による評価が必要不可欠であることを示している。

免疫染色の結果からは、TCDD-0.6 群のみではあるが、対照群と比較して前頭前皮質の神経活動レベルの低下、および扁桃体神経核 (扁桃体中心核・扁桃体外側基底核) における神経活動レベルの亢進が起こっていることが示唆された。前頭前皮質および扁桃体の機能的異常は逆転学習の障害と関連付けられている¹¹⁸。Kinoshita らは、内側前頭前皮質損傷ラットにおける連続逆転課題で、今回の周産期 TCDD 曝露マウスと同様、二回目の逆転課題に特異的に行動柔軟性低下が見られることを報告している¹¹⁹。今回 TCDD-0.6 群のみではあるが、免疫染色の結果からは内側前頭前皮質の神経活動性の低下が示されているため、Kinoshita らの結果との関連が示唆される。

今回の実験と並行して行った共同研究からは、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の胎仔期大脳皮質において、対照群と比較して神経細胞の移動の遅れが見られることが明らかになっている（補足資料 3）。この結果は、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の成熟後における行動柔軟性低下に関与しているかもしれない。また、同様に共同研究において、この神経細胞の移動の遅れが見られた TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の胎仔脳遺伝子発現解析を行ったので、補足資料 4 に示す。

4-2. 新奇環境における探索活動および基底状態における自発活動指標

本研究では、マウスを IntelliCage に移した後の馴化フェーズにおけるコーナーアクセス数が、新奇環境における探索活動性および基底状態における自発的活動性の指標となることを見出した。

本研究で用いた対照群・野生型群のマウスを見ると、初めて IntelliCage に入った後、初めの 30 分はアクセスが少なかったが、その後約 4 時間もの間コーナーアクセスを続けることがわかった。これは、過去の IntelliCage を用いた実験¹²⁰の報告と一致しており、新奇な環境に対するマウスの探索行動を反映していると考えられる。またその後の暗期・明期周期に合わせた明確なコーナーアクセス数の増減が見られたことから、このコーナーアクセス数は基底状態でのマウスの自発活動のリズムを反映し

ていると考えられた。特に、C57BL/6J 系統のマウスでは暗期中でもさらに二峰性の活動量のピーク（暗期開始直後と明期開始前後）が見られることが知られている⁶⁵が、今回の IntelliCage における暗期のマウスのコーナーアクセス数についてもこの二峰性の活動量のピークが確認できた。以上、先行研究との一貫性から、IntelliCage におけるコーナーアクセス数を新奇環境における探索活動性および基底状態における自発的活動性の指標とすることが妥当であると考えられる。

Grin1 mut マウス、Tuba1 mut マウスを用いた実験では、対照群との比較から、それぞれの活動性の異常が検出された。Grin1 mut マウスは、新奇環境における探索活動性指標（初めの 4 時間のコーナーアクセス数）には野生型と差はなかったものの、その後の 4 日間の暗期では、一貫して野生型よりも高い自発活動性を示した。この Grin1 mut マウスは後の SAT の遂行中においてもセッションあたりのコーナーアクセス数も高く、一貫した多動性が観察された。これは、元来この Grin1 mut マウス (Grin1^{Rgsc174}) が行動試験バッテリーから多動性を示すモデルとして見出された経緯を考えると、過去の知見と一致していることがわかる。Furuse らはこの多動性がメチルフェニデートの投与により抑制されることを示しており、今回の IntelliCage において見られた多動性についても同様の効果を期待できる⁹⁹。

一方、Tuba1 mut マウスにおいては、新奇環境における探索活動性指標、基底状態での自発活動性指標の両方において、野生型よりも一貫して低くなる傾向が観察さ

れた。これは、もともこの **Tuba1 mut** マウス (**Tuba1^{Rgsc1736}**) が行動試験バッテリーから多動性を示すモデルとして見出された経緯とは逆の結果を示している。**Furuse** らの報告によれば、この **Tuba1 mut** マウスはオープンフィールド試験およびホームケージ内活動性試験の結果で、一貫して高い活動性を示している¹⁰⁰。なぜ、今回このような報告に矛盾する結果が生じたのだろうか。第一に、今回の **IntelliCage** を用いた試験系では、集団飼育環境下における活動性評価であり、マウスを単独で飼育・試験を行っていた **Furuse** らの試験系と異なる。これが双方の結果の差に影響していることが考えられる。すなわち、この **Tuba1 mut** マウスは単独で飼育・試験されている環境であれば多動性を示すが、集団内で飼育・試験されている環境では逆に活動性が低下する（もしくは環境への順応が遅れる）、という仮説が考えられる。他個体の存在による自発的活動の抑制という観点からみれば、ここの結果は **Tuba1 mut** マウスにおいて競争優位性が野生型に比べて低下する傾向にあったことと一致している。

周産期 TCDD 曝露マウスの実験からは、新奇環境における探索活動性指標および基底状態での自発活動性指標のいずれも群間で有意な差は見られなかった。今回用いた周産期 TCDD 曝露マウスで独自にオープンフィールド試験を行ったが、群間に差は見られなかった。このことから、周産期 TCDD 曝露マウスには一貫して新奇環境における探索活動性および基底状態での自発活動性指標には異常がないことが示唆

された。

以上、本研究から見出された新奇環境における探索活動性および基底状態における自発的活動性の指標は、先行研究の知見からもその妥当性が示されている。ただし、集団飼育環境下における試験であるということが、単独飼育・試験環境における他の試験系との結果と差異を生じる要因となり得ることが考えられる。ただし、ヒトの疾患モデルとして捉えるならば、他者のいる環境においても見られる多動性症状に関しては、今回の IntelliCage 試験の結果がより生態学的妥当性の高い結論であると考えられる。

4-3. 新たな社会性行動指標としての集団内競争優位性

本研究で行った PCPA 投与マウス、Grin1 mut マウスおよび Tuba1 mut マウス、周産期 TCDD 曝露マウスを用いた行動柔軟性試験からは、詳細な行動指標の解析により、社会的行動に係ると考えられる表現型が観察された。

PCPA 投与マウス、周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) は、試験開始直後のコーナー占有時間が対照群に対して有意に短く、一方で Grin1 mut マウスは野生型マウスに対して有意に長いことがわかった。この試験開始直後のコーナー占有時間が示す、行動学的な意味は何だろうか。まず、行動指標に差の見られる試験開始直後

5 分間では、ケージ内のマウスが各コーナーに集まり、競争的行動をとっている時間帯であることが観察された。PCPA 群では、同じ試験ケージから対照群を取り除き、競争環境を緩和させると、試験開始直後のコーナー占有時間は対照群と同様のレベルにまで正常化した。このことから、試験開始直後のコーナー占有時間は、社会的要因に基づく競争優位性を反映していることが考えられた。特筆すべき点は、このような群間の競争優位性の差が数週間にわたる試験期間中、全てのセッションにおいて一貫して観察されたことにある。すなわち、この指標は日々の測定によって変動しない、それぞれのマウスの永続的な社会的行動特性を反映した指標である。

このような集団内競争優位性／社会的優位性を示す行動特性を支える神経基盤として、セロトニン機能と内側前頭前皮質の神経活動が注目されている。

Raleigh らは、セロトニン機能と社会的階層性の因果関係について、サルを用いた実験を行って調べている^{121,122}。この研究では、まずベルベットモンキーの群れにおける社会的階層の高い雄個体 (alpha-male) は血小板および脳における高いセロトニン濃度を示していた。さらに、群れの中における社会的階層が低下すると、これらの濃度も同様に低下した¹²¹。セロトニン機能をトリプトファンやフルオキセチン投与によって促進させると、雄個体が高い社会的地位を獲得した¹²²。これらの結果は、全身性もしくは脳内セロトニン濃度と群の中での社会的階層に正の相関があることを示している。このような相関は、ヒトにおいても確認されている。Moskowitz らは、

ヒト健常者にセロトニンの前駆体であるトリプトファンを 1g TID で 12 日間投与したところ、社会的優位性を示す行動が増加したことを報告している¹²³。本研究で用いた PCPA は全身性にセロトニン合成を阻害する為、トリプトファン投与と逆の効果をもつ。PCPA 群のマウスでは競争的行動が低下したことから、この結果は、全身性もしくは脳内セロトニン濃度と集団での社会的階層が正に相関するという知見と一致していた。

一方、Wang らはマウスを用い、これまで競争優位性指標として用いられてきた様々な試験系 (Dominance tube test¹²⁴、Visible burrow system (VBS)¹²⁵、Barber assay¹²⁶、尿マーカーク試験¹²⁷、超音波発声測定¹²⁸) を組み合わせ、競争的行動の優位性が内側前頭前野の神経活動レベルによって決定されることを示した⁹⁰。これは、本研究における周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) における競争優位性指標の低下と、免疫染色から示唆された内側前頭前皮質神経活動レベルの低下と一貫している。Grin1 mut マウスで見られた競争優位性の亢進は、内側前頭前皮質の神経活動の亢進を反映しているかも知れない。また最近では、社会的階層に関連する認知は、ヒトの脳機能イメージングにおいても前頭前皮質が係っていることが報告されている^{129,130}。このことから、集団内における社会的階層の認知・決定・維持に係る行動は、前頭前皮質の機能によって支えられていることが考えられる。

以上から、本研究により見出された競争優位性の行動指標 (試験開始直後のコーナ

一占有時間)は、集団内における社会的階層の認知・決定・維持に係る社会的行動指標であると考えられる。集団の中において他人との関係性を正しく認知し、適切な振る舞いをするにはヒトやヒト以外の動物を問わず、社会の中で生きていくには特に重要である。動物モデルにおける競争優位性の低下や亢進は、社会性不安の特性や、社会的関係の構築における脳機能不全を反映しているかも知れない。このような神経基盤のさらなる解明は、ASD等の他者との社会的関係の構築に関する症状⁸⁰の治療に大きく貢献するだろう。本研究では、その基礎的研究の基盤となるマウスモデルの作出において長期モニタリングにおける高いハイスループット性と安定性のある行動指標を確立した。今後、この方法はヒトの社会性不安障害や、社会的関係性の構築に係る障害等に係る社会的行動異常の疾患メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

4-4. 固執性指標について

固執的行動の抑制機能不全もまた、高次脳機能の異常を反映している^{72,81}。本研究で行ったPCPA投与マウス、周産期TCDD曝露マウス(TCDD-0.6群)を用いた行動柔軟性試験からは、詳細な行動指標の解析により、固執的行動に係ると考えられる表現型が観察された。

本研究において使用された SAT では、各々のコーナーアクセスは①報酬の得られる正解コーナーへのアクセス、②正解コーナーに連続してアクセスしたため、報酬の得られなかったリエントリーアクセス、③その学習フェーズでは決して報酬の得られない不正解コーナーへのアクセスのいずれかに分類される。これにより、セッション毎の各々の平均コーナーアクセス回数、平均コーナー滞在時間、およびコーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数が、それぞれどのような目的による行動を反映しているかを解釈できる。

正解コーナーアクセス時には、1度のノーズポークで4秒間だけ給水ボトルへのアクセスゲートが開き、水を飲むことができる。しかしそのゲートが閉まったのちは、同じコーナーで何度ノーズポークをしてもゲートを開くことはできない。リエントリーや不正解コーナーアクセス時には、1度ノーズポークをすれば、ゲートの開かないコーナーであることがわかる。すなわち、それが正解コーナー、リエントリー、不正解コーナーのどのアクセスであれ、最も効率的なコーナーアクセスあたりのノーズポーク回数は1回である。

本研究で行った一連の実験から、通常マウスは実験開始後初めの数セッションはコーナーアクセスあたりのノーズポークは4-5回と多いが、すぐに減少し、以後は概ね2回弱に落ち着くことがわかった。このことは、マウスがコーナーアクセスあたり2度以上続けてノーズポークをすることが有用でないことを学習した結果であると考

えられる。

PCPA 投与マウスおよび周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) では、報酬の得られた正解コーナー滞在時のノーズポーク回数が対照群に対して有意に高かった。一方でリエントリーや不正解コーナーアクセス時のノーズポーク回数には差がなかったため、報酬イベント (4 秒間の飲水) の起こった正解コーナーにおいて特異的な現象であることがわかった。このことから、PCPA 投与マウスおよび周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) では、2 度以上のノーズポークは意味のない行動であるにも関わらず、報酬イベント終了後もそれに対し固執的な行動をとっている、と解釈できる。AD/HD 児の注意機能を評価する 5-Choice Serial Reaction Time Task (5-CSRTT) を開発した Trevor W. Robbins は、後にこの 5-CSRTT をげっ歯類に應用しているが、そこでは報酬イベント時の不要なノーズポーク回数という今回の試験系と全く同一の行動指標を固執性行動の指標として確立している^{131,132}。本研究ではさらに、周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) のデータから、ノーズポークの指標だけではなく正解コーナーにおける平均滞在時間からも報酬イベントに対する固執性を評価し得ることが示唆された。

固執的行動の抑制的制御は、遂行機能の重要な機能カテゴリーの一つである^{72,81}。事物に対する不必要な執着は行動柔軟性の障害になる。今回、PCPA 投与マウスと TCDD 周産期 TCDD 曝露マウス (TCDD-0.6 群) においては、SAT における誤反応

率と固執性指標という 2 つの異なる指標で行動柔軟性の障害が示された。一方、SAT における誤反応率からは顕著に行動柔軟性の低下が示されていた *Grin1 mut* マウス、*Tuba1 mut* マウスには、正解コーナーアクセス時の平均滞在時間、平均ノーズポーク回数は上昇していない。このことから、行動柔軟性の障害はさらに仔細に分類できる可能性がある。今後は、今回得られた固執性行動の指標について、その神経基盤や薬剤投与の効果など、さらなる情報の蓄積が待たれる。

4-5. 周産期 TCDD 曝露による非単調性毒性影響

周産期 TCDD 曝露マウスは、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群両群において行動柔軟性の低下が見られた。しかし、その他の行動指標（競争優位性指標、固執性指標）、免疫染色による神経活動マーカー発現の異常に関しては TCDD-0.6 群においてのみ見られ、用量非依存的な毒性表現型が顕れることがわかった。先行研究では、発達期における TCDD 曝露はしばしばこのような非単調性毒性影響を引き起こすことが知られている。例えば、Ikeda らはラットへの周産期 TCDD 曝露により、低用量曝露群特異的に甘味嗜好性の上昇および性的二型核（SDN-POA）の減少が見られ、脳の性分化が障害されていることが報告されている¹³³。同様に Hojo らはラットへの周産期 TCDD 曝露により、低用量曝露群特異的にレバー押しオペラント学習行動の変容が見られることを報告している¹³⁴。さらに最近、周産期に TCDD、さらには TCDD

の臭素化異性体である TBDD 曝露を行ったラットにおいても、低用量曝露群特異的に高次脳機能である対連合学習の形成が障害されること、そして不安様行動が亢進している事が示された⁸⁹。マウスにおける脳・行動への低用量特異的影響は、本研究における報告が初めてであり、周産期 TCDD 曝露がもたらす脳・行動への非単調毒性影響が動物種を超えて再現されたことになる。

このような TCDD の非単調毒性影響のメカニズムはまだ明らかでない。TCDD は細胞質内の AhR に結合し、核内に移行して CYP1A1 等の薬物代謝酵素をはじめとした様々な遺伝子発現を誘導ないし抑制することで毒性が発現されることが知られている。このことから、より高濃度の TCDD によって引き起こされる特有の遺伝子発現パターンにより、低用量の TCDD による毒性影響が代償されていると考えることもできる。

4-6. 本研究により達成された成果

本研究で行われた一連の実験結果から、今回開発された SAT が、①「初期学習フェーズのルールに高度に順応している（＝誤反応率が低い）個体ほど、逆転課題に直面した時に行動を適応させることが困難である（＝誤反応率が高くなる）」という理論的仮説に合致する実験データを精度高く示すことができること、②先行研究からの、

セロトニン機能が行動柔軟性を修飾するという知見を再現できる試験系であること、③ヒトAD/HD症状のモデルマウスから予測される表現型と一致した結果を示すことのできる試験系であること、④TCDDの発達神経毒性試験に応用し、従来知見（行動柔軟性の障害）を再現できること、⑤従来知見の行動柔軟性指標のみならず、マウスにおいて新規かつ高度な認知機能である reversal learning-set の獲得過程を評価できること、④新奇環境における探索行動、基底状態における自発活動性、社会的行動指標としての競争優位性、固執性行動等、従来様々な試験系を組み合わせることで行わなければならなかった複数の行動指標を、同一の試験系から同時に評価できる事が示された。以上から、SATを用いた行動柔軟性試験の高い科学的信頼性・妥当性が支持される結果を得ることができた。

SATを用いた行動柔軟性試験は下記の点からデータの再現性・安定性の高い試験系であるといえる。

まず、本研究の各実験で用いた対照群（野生型群）における初期学習フェーズ初日（Session 1）、初期学習フェーズ最終日（Session 8）、逆転学習フェーズ初日（Rev.1-1）の誤反応率は、いずれの実験においても一貫して各々約40%、10%、60%となっている（Figures 7（Session 8で逆転課題を行った群）、10（対角線群及び長辺群）、12, 16, 17, 23）。また、1ケージあたりの被験体数が6匹（Figure 10）、12匹（Figure 23）、16匹（Figure 7, 12, 16, 17）のいずれの条件の実験であっても、上記の対照群（野生

型群)の成績が安定して得られている。すなわち、SATを用いた行動柔軟性試験の成績は、実験中のケージ内の集団の大きさに依存せず、再現性の高い、安定した結果が得られていることがわかる。

また、セッションごとのコーナーアクセス数、集団内競争優位性、固執性に関する指標は、実験開始後数セッションを除いては、数週間にわたってほとんど変動がないため、再現性・安定性の高い指標であると言える。このように再現性・安定性の高い複数の行動表現型を数週間にわたって繰り返し観察できることは、薬剤投与や条件的遺伝子操作による行動への影響を評価する上で有利である。

なお、本論文では詳しく触れていないが、これまで自治医科大学および Zurich 大学においても SAT を用いた行動柔軟性試験が行われ、いずれの研究室で実験を行っても同様の結果が得られることが示されている¹³⁵。

SAT を用いた行動柔軟性試験における高い再現性・安定性の理由として、ヒトの手を介さず、ホームケージ環境下で実験を行うことで、実験時のストレスが緩和されていること、コーナーアクセスと鼻を近づけるだけの簡単なノーズポーク運動のみで選択反応を行うため、運動機能の差などが学習の進度に影響しないこと、活動期である暗期の決まった時間に実験を行うため、概日リズムの乱れによる成績への影響が少ないことなどが考えられる。

今日実験用に用いられているマウスの行動は、モリス水迷路に代表されるような明所における開放的な空間での学習行動よりも、元来は SAT のような、暗所における探索的行動の中で形成される食糧・水資源の確保に最適化された行動パターンの獲得と転換において、より高度に発達していると考えられている^{53,69,136}。

SAT プロトコルの確立に至るまでには、2c-PL や 1c-PL の逆転課題の他、コーナー内での左右のノーズポークホールの位置を利用した逆転課題、LED による視覚的手がかりを用いた逆転課題などの実施も試みたが、非常に単純な課題のように見えても、実際にはマウスの学習効率は低く、また個体ごとの学習進度のばらつきが大きい
ため、試験課題として成立させることが出来なかった。

SAT による行動柔軟性試験プロトコルは、よりマウスの生態学に即した方法での行動試験系であると考えられ、それによって初めてヒトのモデルとなるような高度な学習と行動制御の評価が可能となったのではないかと考えられる。

4-7. 結語

本研究で確立された SAT は、単にマウス表現型解析としての手法というだけでなく、ルール変更に対する行動の変化が数時間（セッション内）、数日間（セッション間）、数週間（学習フェーズ間）という様々な時間枠で解析可能であることを示し、

行動柔軟性という概念の理解を大きく前進させたといえる。SAT は IntelliCage というコンピュータ制御による全自動行動試験系で行われるため、実験者のハンドリングや、研究室ごとの試験装置・プロトコルの違い等による実験データの再現性に対する脅威を最小化できること、最小限の労働力で誰にでも同様にデータを収集できることが期待される。以上の点からも、今後 SAT は精神・神経疾患研究や発達神経毒性研究の進展に広く貢献することが期待される。また、今後さらなる IntelliCage を用いた認知機能試験が開発されることで、一連の行動試験課題を同一のホームケージで行うことのできる、全自動型ホームケージバッテリー行動試験が実現することに期待したい。

5. 表

Table 1: 脳領域ごとの Arc 陽性細胞数

Brain area	Control	TCDD-0.6	TCDD-3.0
PrL	163.4 ± 23.8	117.9 ± 11.7	129.4 ± 23.7
IL	151.2 ± 19.2	141.5 ± 7.2	142.6 ± 17.1
Orb	171.1 ± 15.7	132.7 ± 8.9	156.3 ± 23.6
ACC	179.4 ± 16.7	90.5 ± 23.7	147.2 ± 35.1
M1	140.6 ± 5.9	138.2 ± 15.1	158.1 ± 32.9
S1BF	172.9 ± 23.3	156.6 ± 29.4	177.3 ± 35.1
dlCPu	125.3 ± 14.7	132.9 ± 7.6	138.8 ± 13.9
AcbC	182.3 ± 22.0	174.2 ± 24.1	190.1 ± 27.6
RSGc	118.2 ± 29.2	99.3 ± 20.8	105.3 ± 18.1
CA1	529.1 ± 51.1	566.1 ± 37.5	558.8 ± 23.8
CA3	321.6 ± 51.5	256.3 ± 15.0	283.7 ± 36.3

データは平均値±標準誤差 (n=5) で示した。

6. ☒

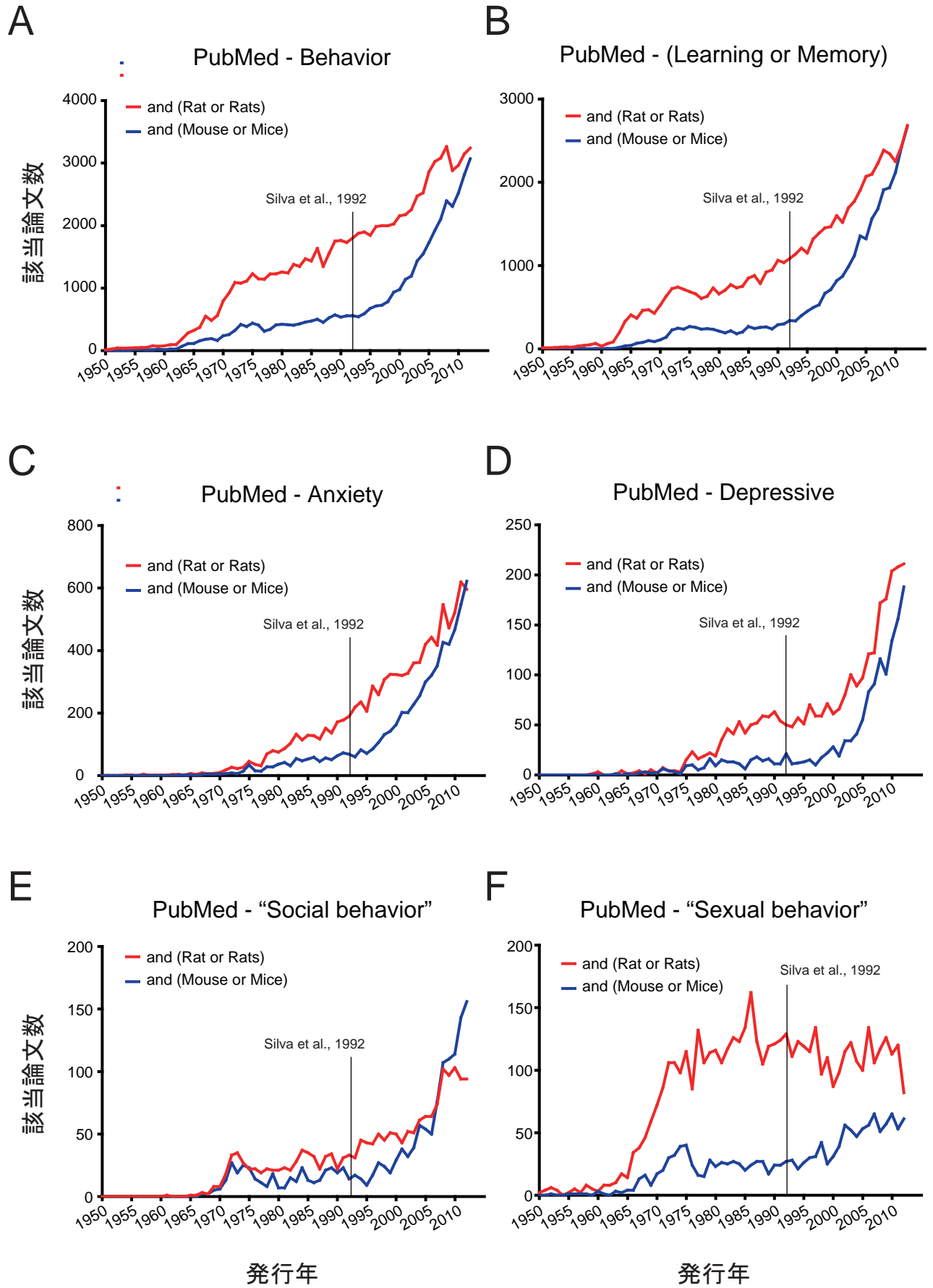


Figure 1

Figure 1. PubMed を用いた行動表現型に関するキーワードによる文献数調査。米国国立医学図書館・国立生物工学情報センター (NCBI) が運営する医学・生物学分野の学術文献検索サービス PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed) を用い、1950 年から 2012 年までの文献数調査を行った。入力する検索語は、(Mouse OR Mice) もしくは比較対象として (Rat OR Rats) のいずれかに、それぞれ AND 条件で下記の検索語を加えた。(A) Behavior、(B) (Learning OR Memory)、(C) Anxiety、(D) Depressive、(E) “Social behavior” (以下、ダブルクォーテーションはフレーズ検索を示す)、(F) “Sexual behavior”。赤線は (Rat OR Rats) AND 各検索語の条件でヒットした該当文献数、青線は (Rat OR Rats) AND 各検索語の条件でヒットした該当文献数を示す。

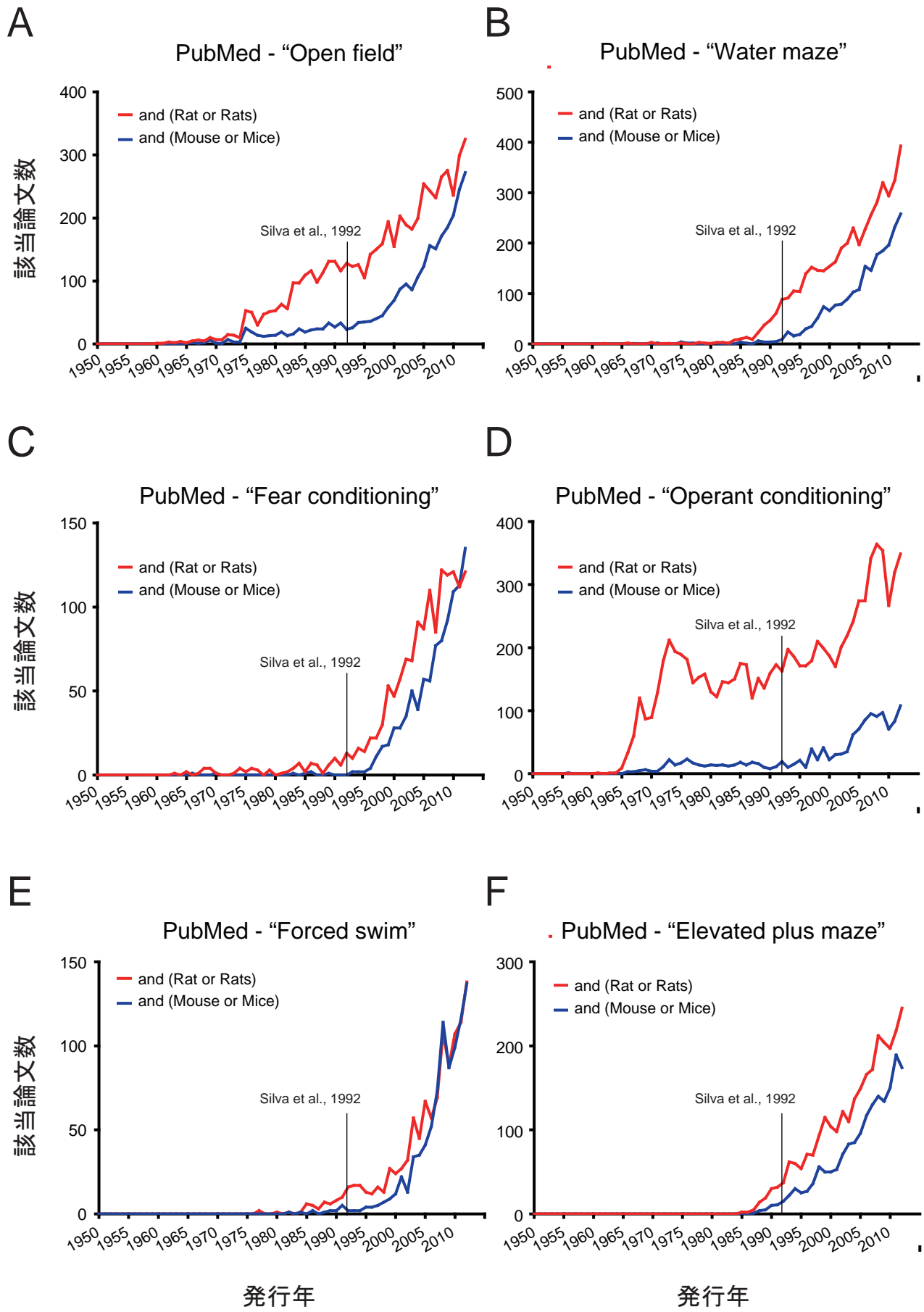


Figure 2

Figure 2. PubMed を用いた行動試験法に関するキーワードによる文献数調査。 PubMed を用い、1950 年から 2012 年までの文献数調査を行った。入力する検索語は、(Mouse OR Mice)もしくは比較対象として(Rat OR Rats)のいずれかに、それぞれ AND 条件で下記の検索語を加えた。(A) “Open field”、(B) “Water maze”、(C) “Fear conditioning”、(D) “Operant conditioning”、(E) “Forced swim”、(F) “Elevated plus maze”。赤線は(Rat OR Rats) AND 各検索語の条件でヒットした該当文献数、青線は(Rat OR Rats) AND 各検索語の条件でヒットした該当文献数を示す。

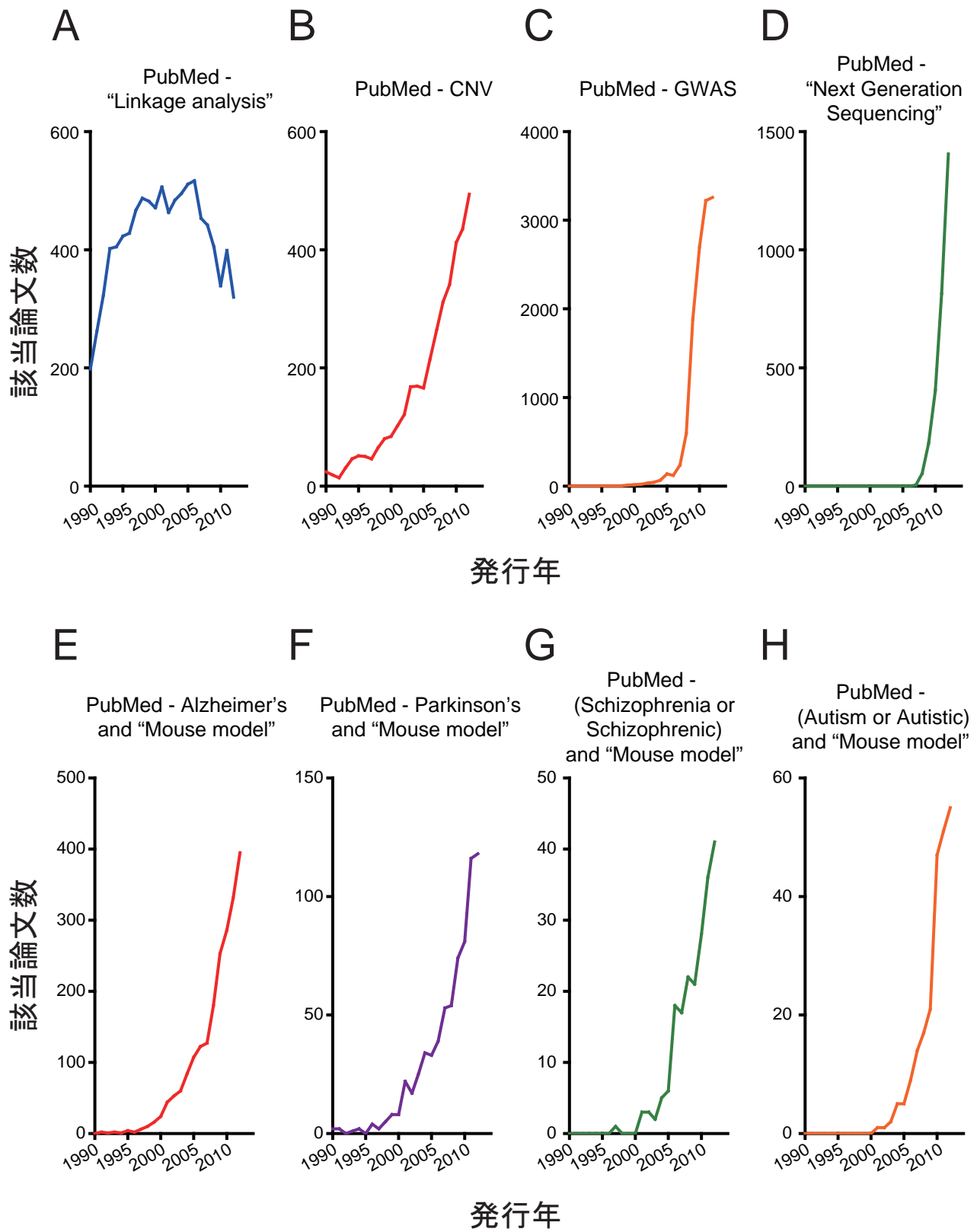
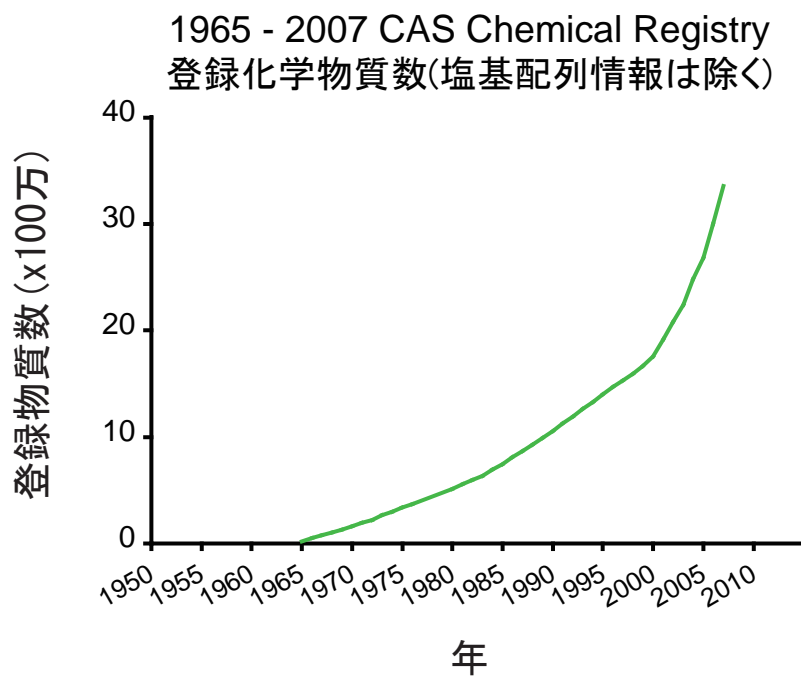


Figure 3

Figure 3. PubMed を用いた遺伝子解析法・疾患モデルに関するキーワードによる文献数調査。
PubMed を用い、1990 年から 2012 年までの文献数調査を行った。入力する検索語は、(A) "Linkage analysis"、(B) CNV、(C) GWAS、(D) "Next generation sequencing"、(E) "Mouse model" AND Alzheimer's、(F) "Mouse model" AND Parkinson's、(G) "Mouse model" AND (Schizophrenia OR Schizophrenic)、(H) "Mouse model" AND (Autism OR Autistic)。

A



B

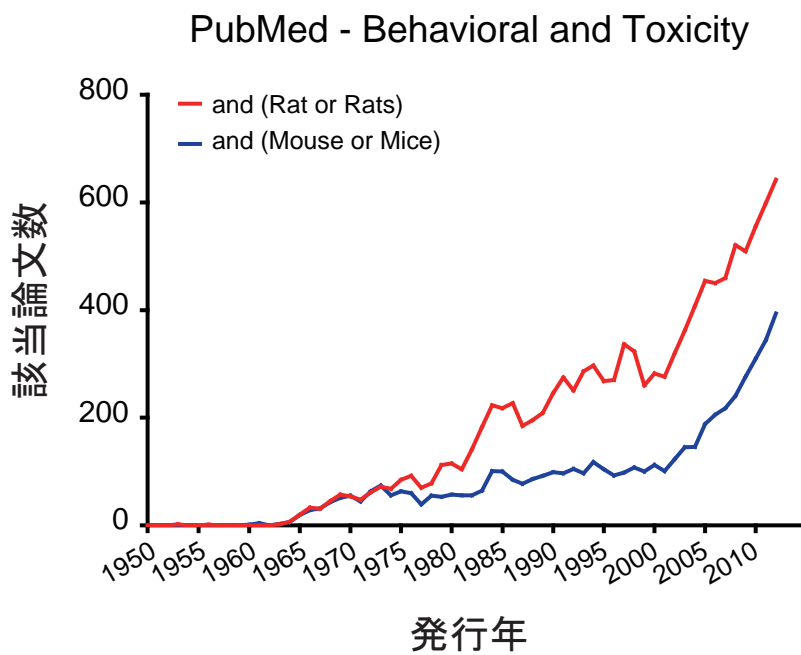


Figure 4

Figure 4. CAS 登録化学物質数と行動・毒性に関する文献数。 (A) CAS 登録化学物質数の推移。データは 1965-2007 年のもの (CAS Statistical Summary 1907-2007 による。塩基配列情報は除く)。(B) PubMed を用いた文献数調査 (1950-2012 年)。入力する検索語は、(Mouse OR Mice)もしくは比較対象として(Rat OR Rats)のいずれかに、それぞれ AND 条件で Behavioral and Toxicity を追加した。

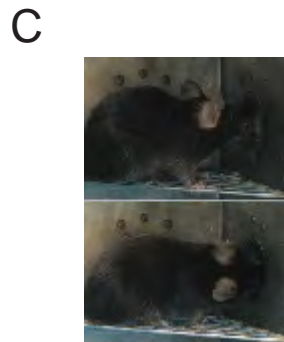
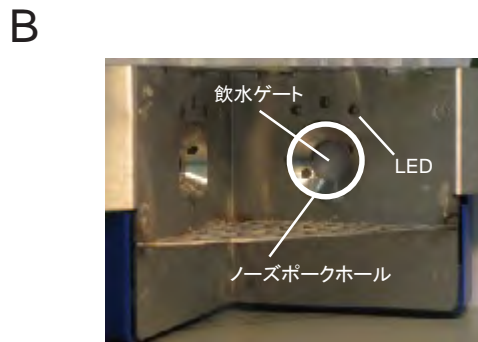
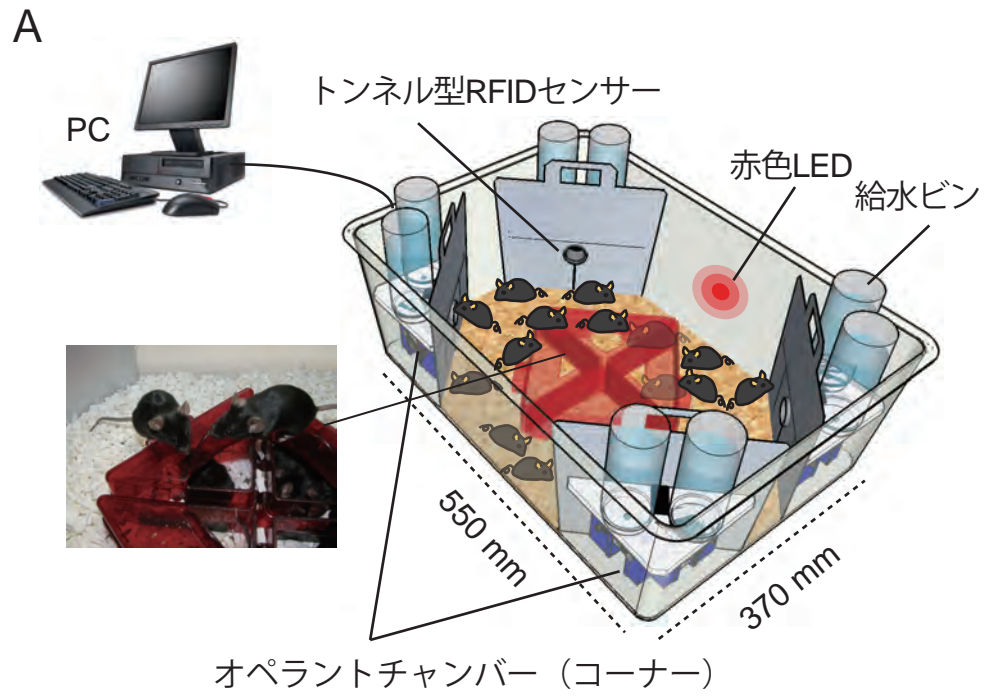


Figure 5

Figure 5. IntelliCage 装置図。 (A) IntelliCage 内には、四隅に飲み水を報酬とする小型のオペラントチャンバー（コーナー）、中央床にプラスチックの巣ボックス、中央天井部に餌を入れる籠を設置している。コーナー入口のトンネルは、マウスの皮下に埋め込まれた個体認識用の RFID チップを認識するセンサーとして働く。コーナー内部にはマウスの滞在を認識するプレゼンスセンサー、報酬へのアクセスゲートを開閉するためのノーズポーク反応を認識するノーズポークセンサー、報酬である水をなめている行動を認識するリッキングセンサーが取り付けられている。新たに IntelliCage の外側には赤色 LED を取り付け、試験開始から終了時まで点灯させるようにした。(B) 本体から取り外した状態のコーナー内部の写真。左右 1 対ずつのノーズポークホール、飲水ゲート、LED がある。(C) ノーズポークをし（上）、飲水ゲートを開けて水を飲んでいる様子（下）。

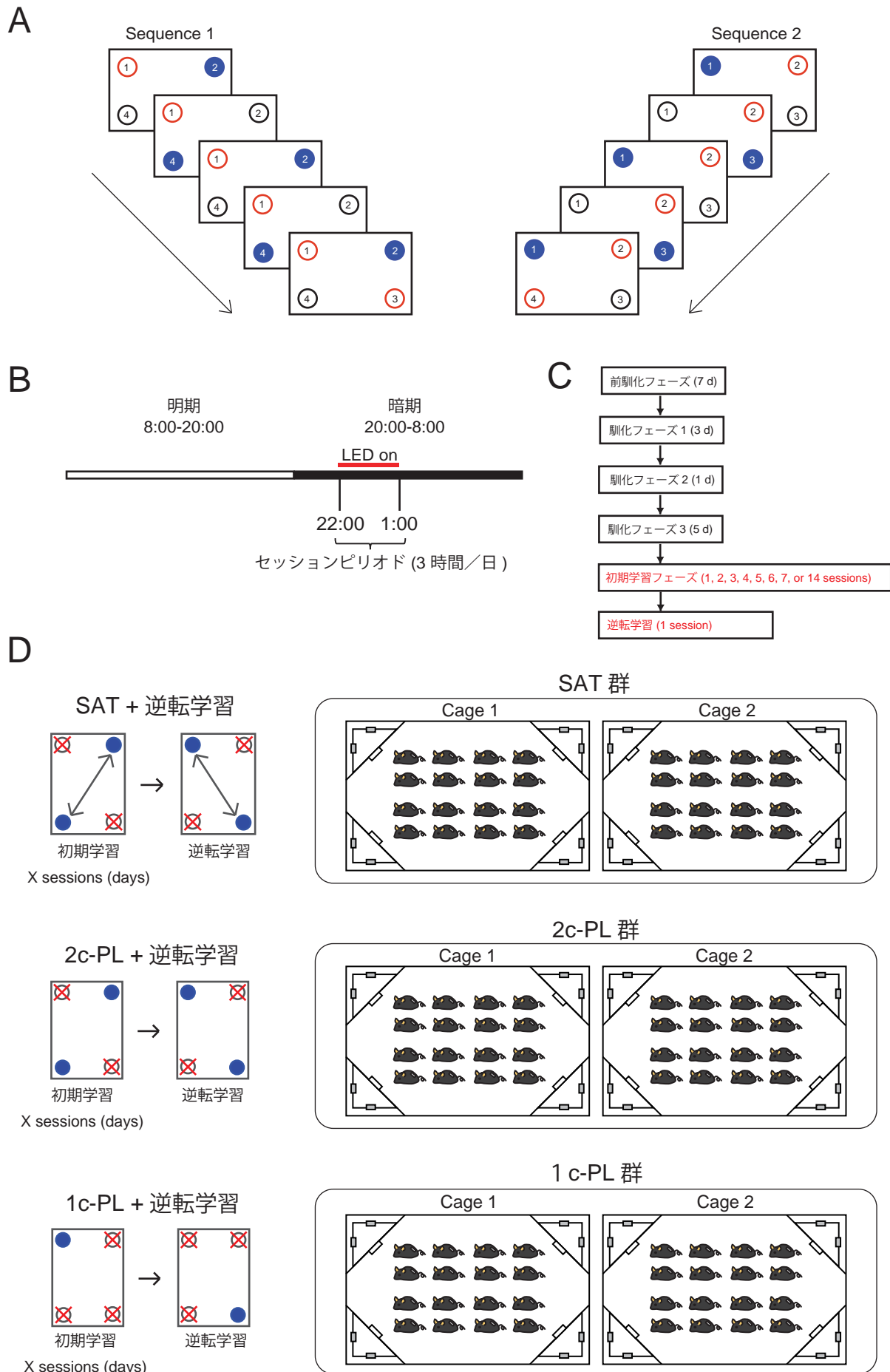


Figure 6

Figure 6. Spatial Anticipation Task (SAT)、1c-PL、2c-PL を用いた実験概要。 (A) 行動柔軟性試験に用いた新しい SAT。この試験では、マウスは IntelliCage 内の 4 つのコーナーのうち、ある 1 つのコーナー (図中、青丸) に入ると、限られた時間 (4 秒間) だけ給水ボトルへのアクセスゲートが開き、報酬として水を飲むことができる。そこで水を飲み終わると、そのコーナーで続けて水を飲むことはできず、代わりにまた別のあるコーナーで水を飲むことができるようになる。この水を飲むことのできるコーナーの位置の変更は「4 つのコーナーの内、2 つのコーナーの往復」(図中 Sequence 1 の場合、2, 4, 2, 4, 2, 4…の往復) という交替ルールに則っている。このトレーニングを数日間行い、十分にルールを学習させる (=初期学習フェーズ)。その後、それまで水が飲めた 2 つのコーナーと、水が飲めなかった残り 2 つのコーナー (図中、赤丸) を逆転させて同様のトレーニングを行う (=逆転課題セッション) (例: Sequence 1 から Sequence 2 へのルールの転換、もしくはその反対)。(B) 試験のタイムスケジュール。毎日 3 時間 (22:00 から翌 1:00 まで; 暗期)、PC 制御により自動的に試験が行われる(セッションピリオド)。セッションピリオド以外はいずれのコーナーにアクセスしても飲み水を得ることができない。(C) 試験スケジュール。(D) IntelliCage を用いた各種逆転課題プロトコルの比較実験。SAT 群は初めに SAT を習得させ、後に正解コーナーと不正解コーナーの位置を逆転させる。2c-PL 群は初めに交替ルールのない 2 つの正解コーナー位置の場所学習 (2c-PL) を習得させ、後に正解コーナーと不正解コーナーの位置を逆転させる。1c-PL 群は、初めに 1 つの正解コーナー位置の場所学習 (1c-PL) を習得させ、後に正解コーナーを対角にあるコーナーに変更させる。それぞれのグループについて IntelliCage を 2 台使い、各ケージ 16 匹、合計 32 匹を試験に用いる。グループの中ではさらに、初めの場所学習のトレーニング (初期学習フェーズ) を何セッション行うかによって条件が分けられる (セッション 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14 の 8 条件)。それぞれの条件には各ケージから 2 匹ずつ、合計 4 匹が割り当てられる。

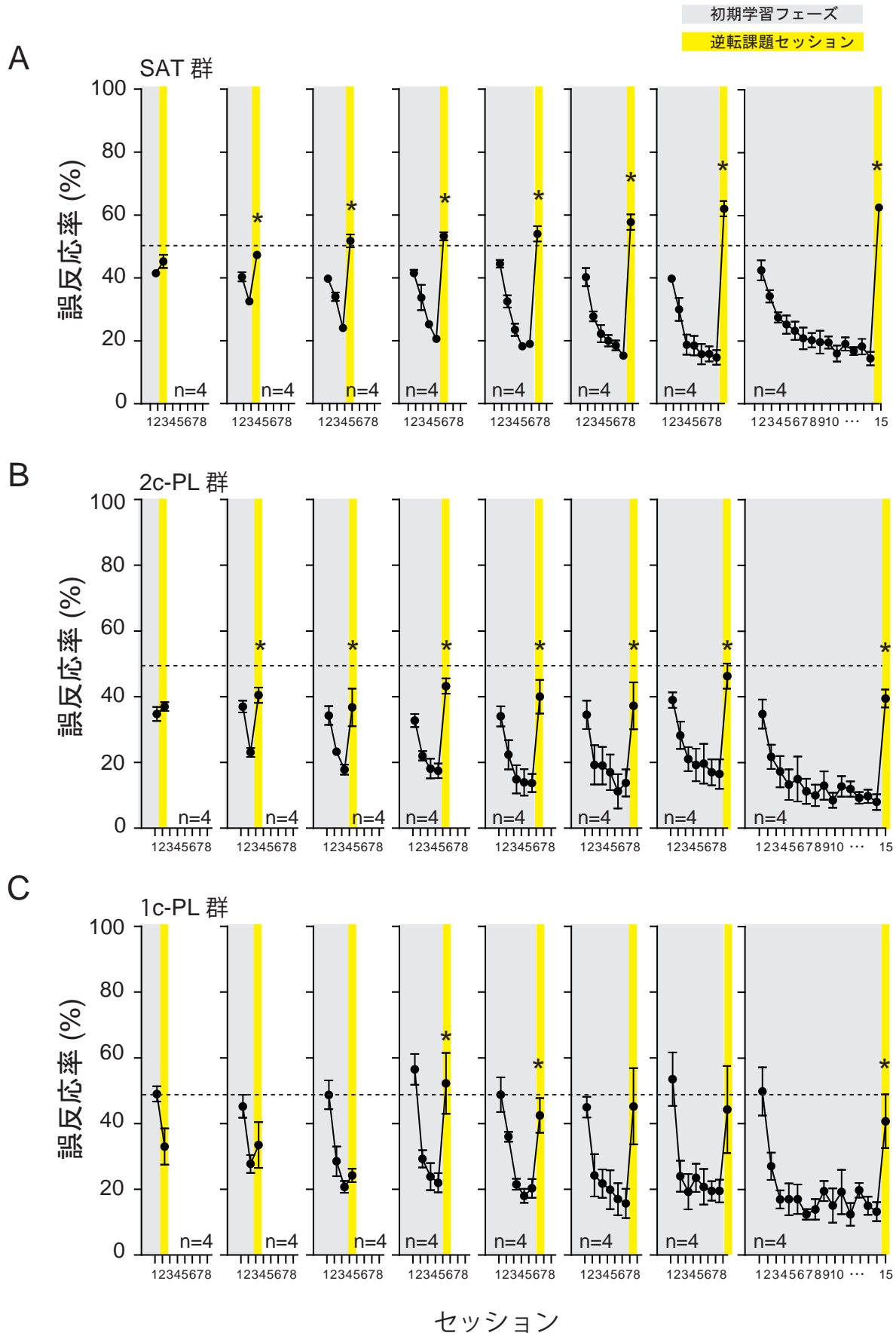


Figure 7

Figure 7. SAT、1c-PL、2c-PL 初期学習フェーズおよび逆転課題セッションにおける誤反応率の変化。 SAT 群 (A) , 2c-PL 群 (B) , 1c-PL 群 (C) のそれぞれについて4匹ずつ、2セッション目、3セッション目、4セッション目、5セッション目、6セッション目、7セッション目、8セッション目、15セッション目に逆転学習を行った。グラフの縦軸は各セッションの初めの100回の選択のうちの不正解コーナーアクセス数 (=誤反応率)、横軸はセッション数を示す。灰色の背景の領域は初期学習フェーズを示す。黄色の領域は逆転課題を提示したセッション (逆転課題セッション) を示す。点線はチャンスレベル (50%) を示す。エラーバーは標準誤差を示す (n=4)。アスタリスクは、各条件における初期学習フェーズ最後のセッションと逆転課題セッションの誤反応率の間の有意差を示す ($P < 0.05$, t test)。

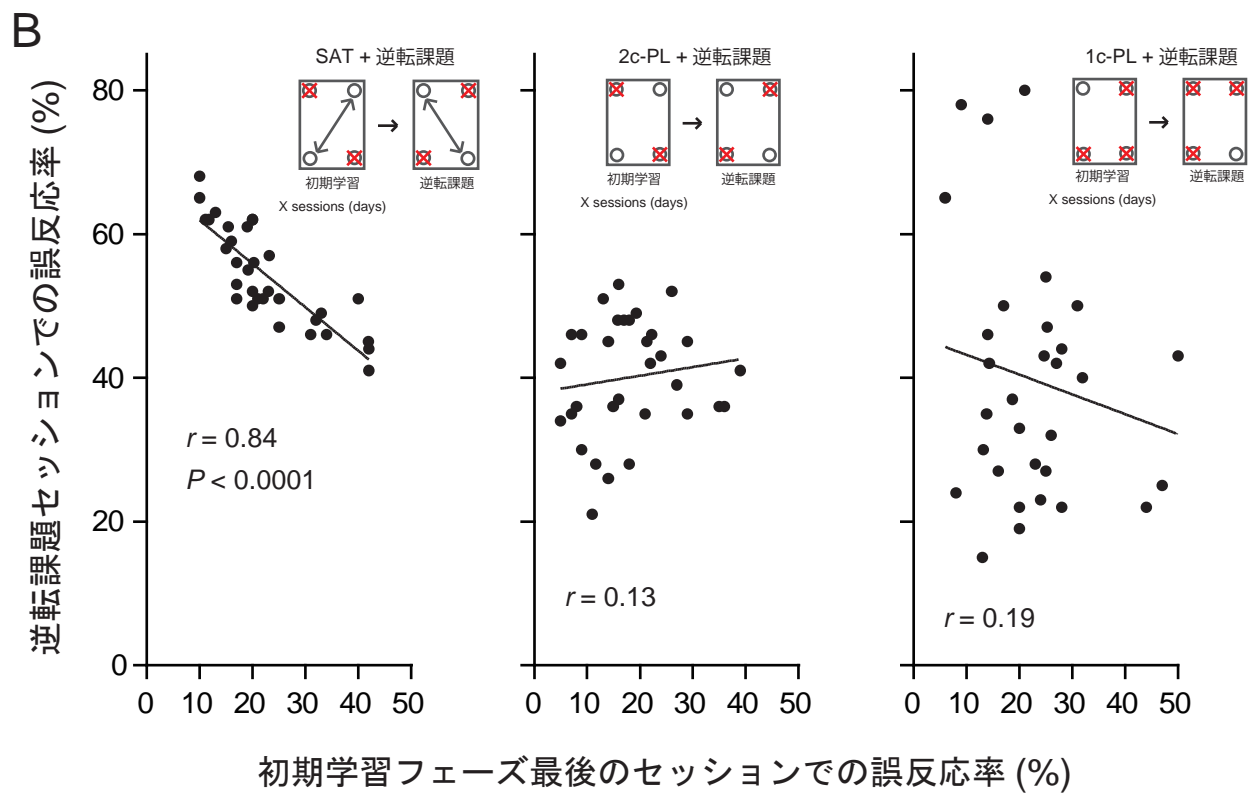
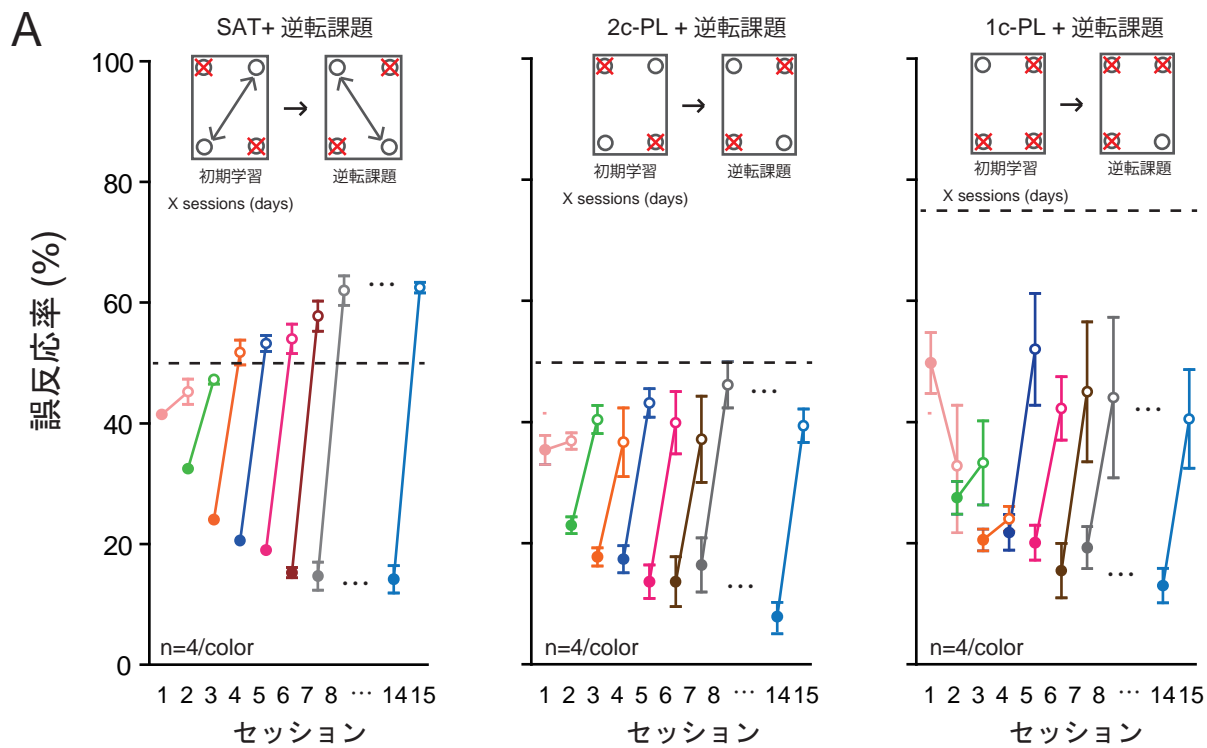
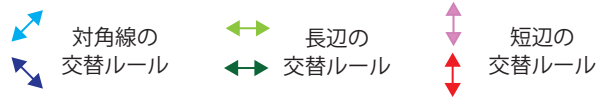
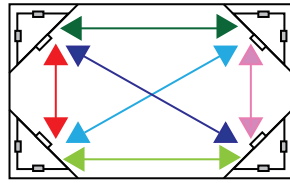


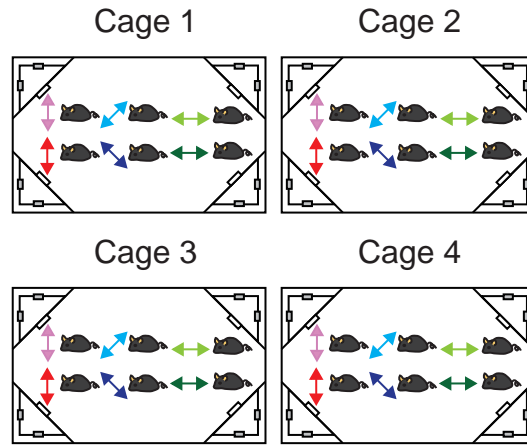
Figure 8

Figure 8. 初期学習フェーズ最後のセッションと逆転課題セッションでの誤反応率の比較。(A) SAT (左)、2c-PL (中央)、1c-PL (右) の初期学習フェーズ最後のセッションと、逆転課題を行ったセッションの誤反応率をグラフ化した。それぞれの色は、初期学習フェーズの長さの条件ごとの成績を示している。Filled circle は初期学習フェーズ最後のセッション、Open circle は逆転課題セッションの誤反応率を示している。(B) 異なる初期学習フェーズの長さの条件全ての初期学習フェーズ最後のセッションと逆転日のセッションの誤反応率の関係をプロットした。横軸は初期学習フェーズ最後のセッションの誤反応率、縦軸は逆転課題セッションの誤反応率を示す。相関係数(r)と、ピアソンの無相関検定の結果(有意差のあった SAT 群のみ)を図中に示している。エラーバーは標準誤差を示す (n=4)。

A



B



C

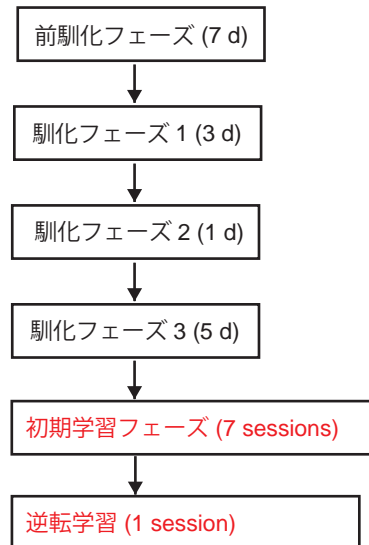
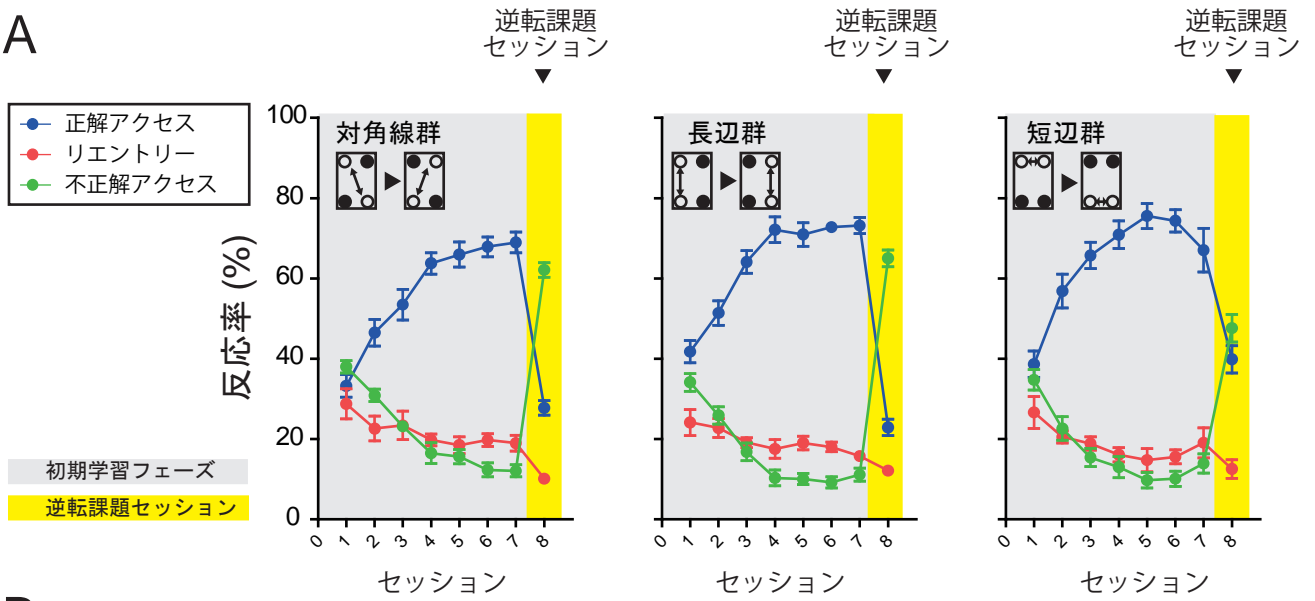


Figure 9

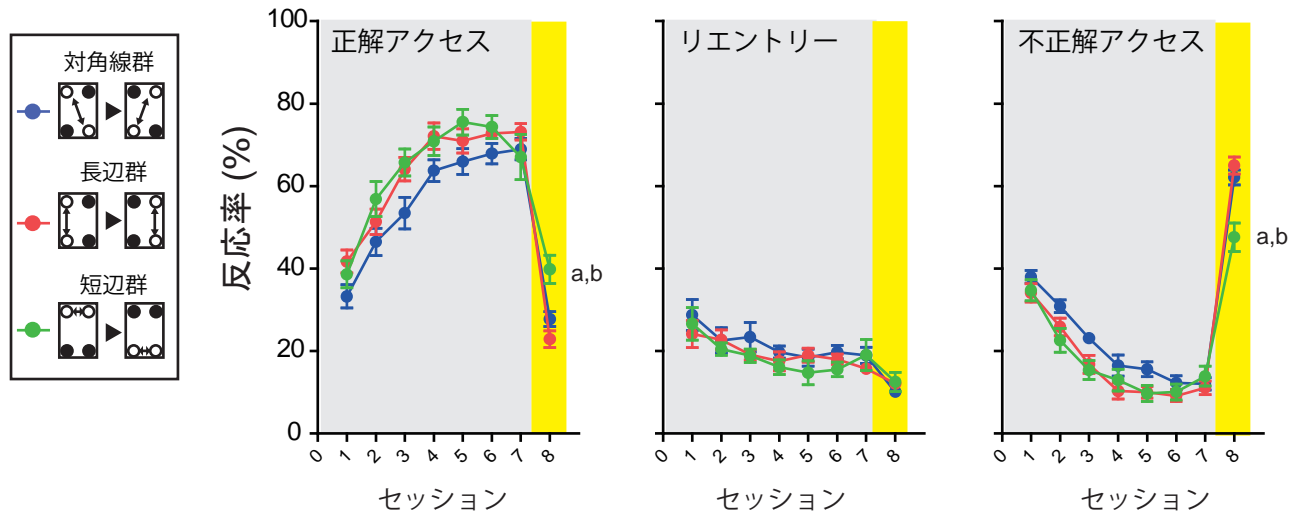
Figure 9. SAT における正解コーナー位置の違いによる成績への影響の確認実験概要。(A)

IntelliCage の対角線、長辺、短辺を使った SAT のパターン。(B) SAT の条件検討に用いたマウス。IntelliCage を 4 ケージ用い、各ケージに 6 匹ずつマウスを導入し、試験を行った。各ケージ内の 6 匹のうち、対角線、長辺、短辺の交替ルールに各々 2 匹ずつを割り当てた。ただし、いずれのマウスについても全て異なった位置の正解コーナーが割り当てられているため、他個体の動きを模倣して正解を選ぶことができない。それぞれの正解コーナーの位置はセッション 8 で全て不正解コーナーの位置と入れ替え、逆転課題を行った。(C) 試験スケジュール。馴化フェーズを黒字、試験開始後を赤字で示した。

A



B



C

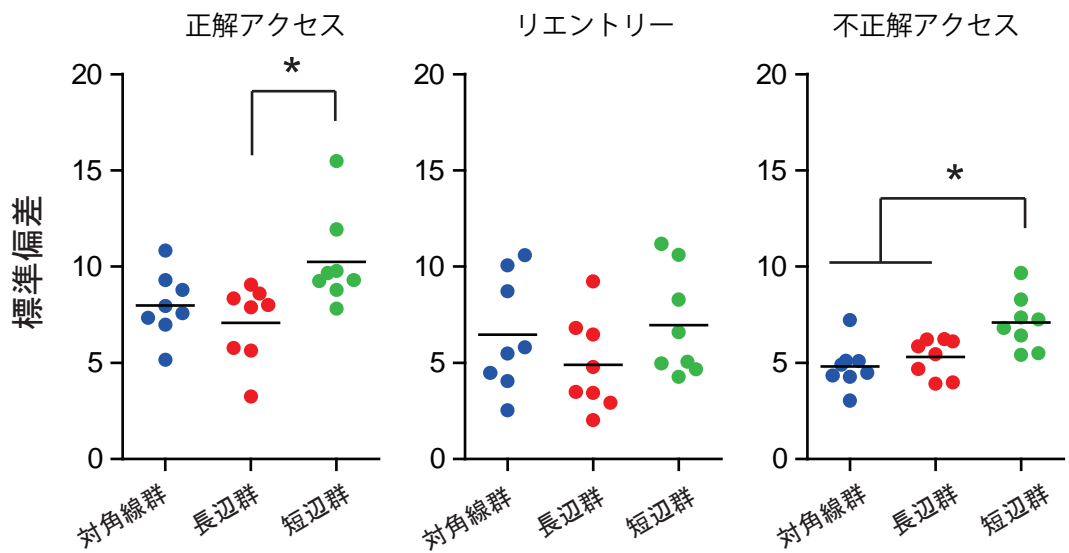


Figure 10

Figure 10. SATにおける正解コーナー位置の違いによる成績への影響。(A) 対角線群 (左)、長辺群 (中央)、短辺群 (右) について、それぞれセッション 1~8 における各セッションでの最初の 100 回の選択のうち、報酬の得られるコーナーに入った回数 (正解アクセス, 青)、直前に報酬を得られたコーナーに続いてに入った回数 (リエントリー, 赤)、不正解コーナーに入った回数 (不正解アクセス, 緑) を示す。灰色の背景の領域は初期学習フェーズ、黄色の背景の領域は逆転課題セッションを示す。(B) (A)のグラフを、正解アクセス (左)、リエントリー (中央)、不正解アクセス (右) の反応率ごとにわけてグラフ化した。青は対角線群、赤は長辺群、緑は短辺群を示す。図中の a は対角線群と短辺群、b は長辺群と短辺群の間の、Session 8 の成績の有意差を示す ($P < 0.05$, One-way ANOVA and Bonferroni test) (C) 正解アクセス (左)、リエントリー (中央)、不正解アクセス (右) の各反応率について、各群の Session1-8 の標準偏差を示した。アスタリスクは群間の有意な差を示す ($P < 0.05$, One-way ANOVA and Bonferroni test)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

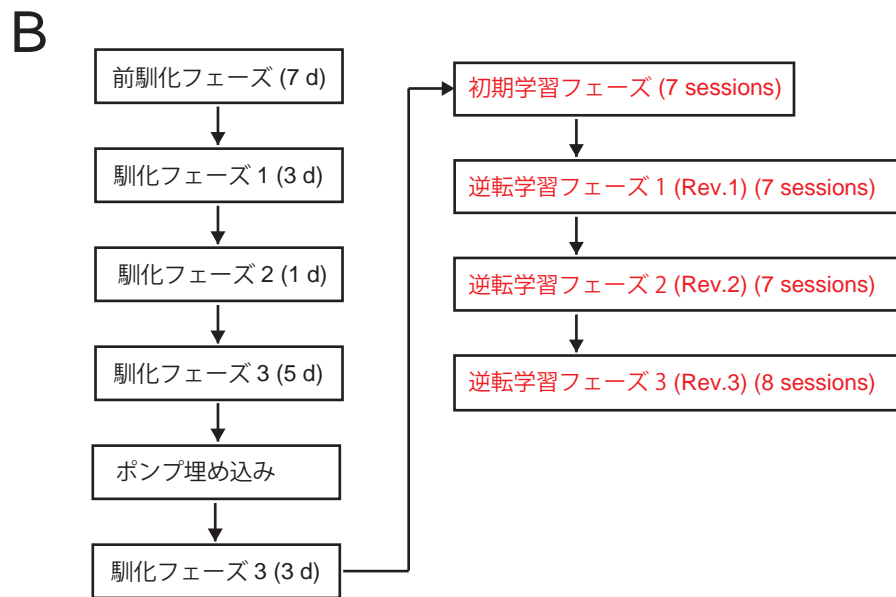
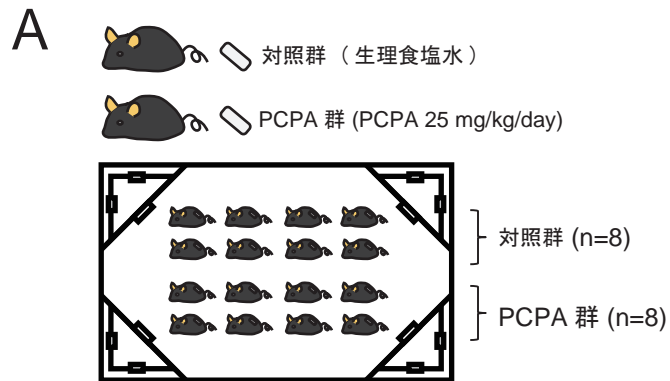


Figure 11

Figure 11. PCPA 投与によるセロトニン欠乏モデルマウスを用いた行動柔軟性試験概要。(A) 実験群の構成。IntelliCage 1 ケージの中に、対照群（生理食塩水投与）、PCPA 群（25 mg PCPA/kg 体重/日）を、各々 8 匹ずつ計 16 匹を用いた。装置馴化後、課題開始 3 日前に薬剤投与用浸透圧ポンプを皮下に挿入した。これにより、試験期間中、一定の用量で内部溶液が皮下組織に投与された。(B) 試験スケジュール。馴化フェーズを黒字、試験開始後を赤字で示した。

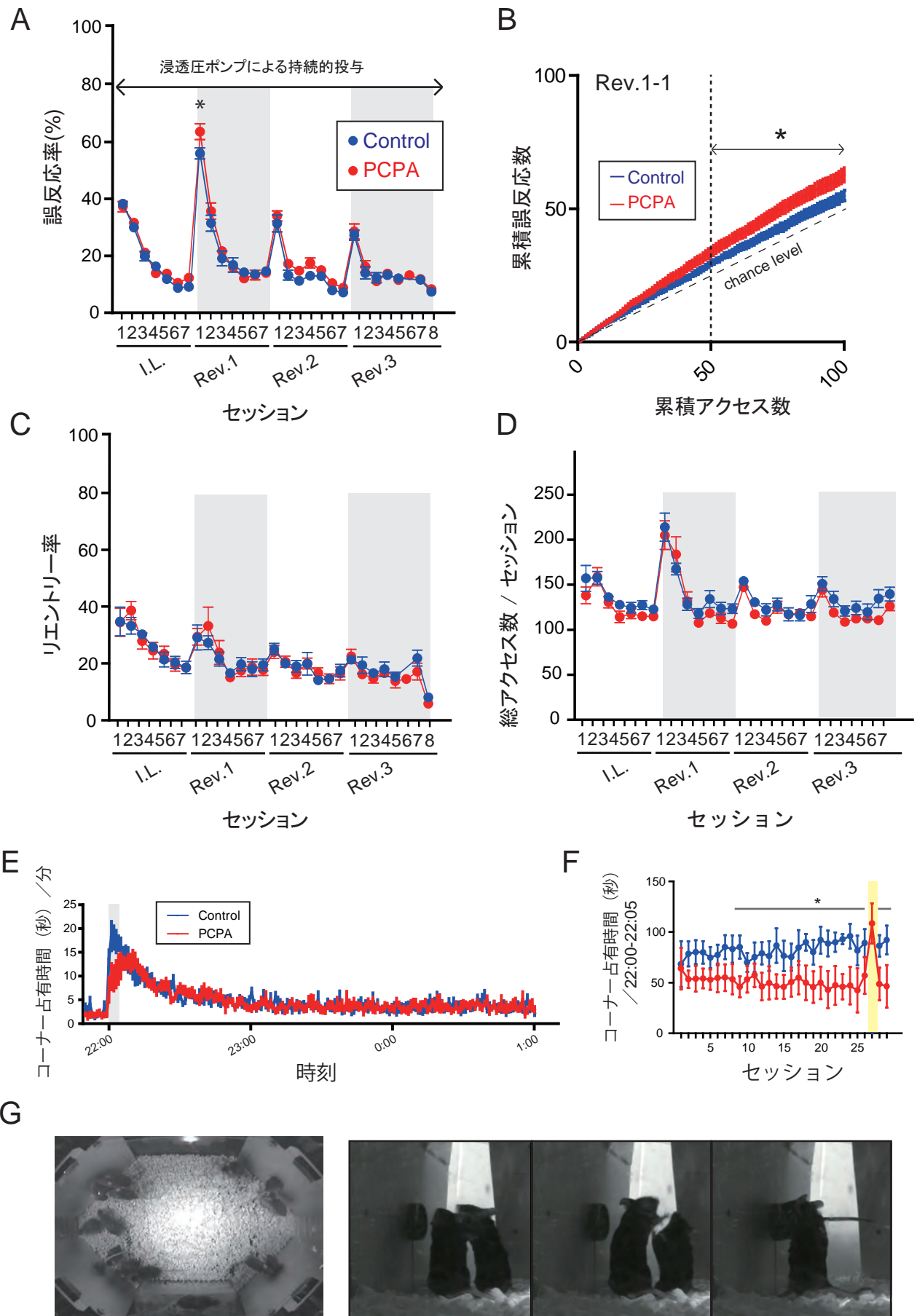


Figure 12

Figure 12. PCPA 投与による行動柔軟性と社会性行動指標（集団内競争優位性）。 (A) 全 29 セッションの誤反応率。アスタリスクは群間の有意差を示す ($P < 0.05$, Bonferroni test)。以後、対照群のデータを青、PCPA 群のデータを赤で示す。横軸の I.L. は初期学習フェーズ (initial learning)、Rev. x は x 回目の逆転学習フェーズ (reversal learning) を示す。数字は各学習フェーズにおける累積セッション数をしめす。(B) Rev.1-1 におけるセッション内累積誤反応数。横軸はセッション開始からの累積総コーナーアクセス数。縦軸は累積誤反応数。点線はチャンスレベルを示す。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。(C) 全 29 セッションのリエントリー率。(D) 全 29 セッションの各セッションの総コーナーアクセス数。(E) セッション内の毎分のコーナー占有時間 (全 29 セッションの平均)。(F) 各セッションの開始 5 分間 (22:00-22:05) におけるコーナー占有時間。セッション 27 (黄色バー) では、セッション開始前にケージから対照群のマウスを全て取出し、PCPA 群のみとし、セッション開始後 15 分後に再びケージに戻した。(G) セッション開始直後に見られる競争的行動。左の写真は IntelliCage 上部から撮影した (撮影のため中央のプラスチックシェルターは取り除いている)。ほとんどのマウスが各コーナーに集まっているのがわかった。右の写真は一つのコーナーをとり合う 2 匹のマウスの連続写真。

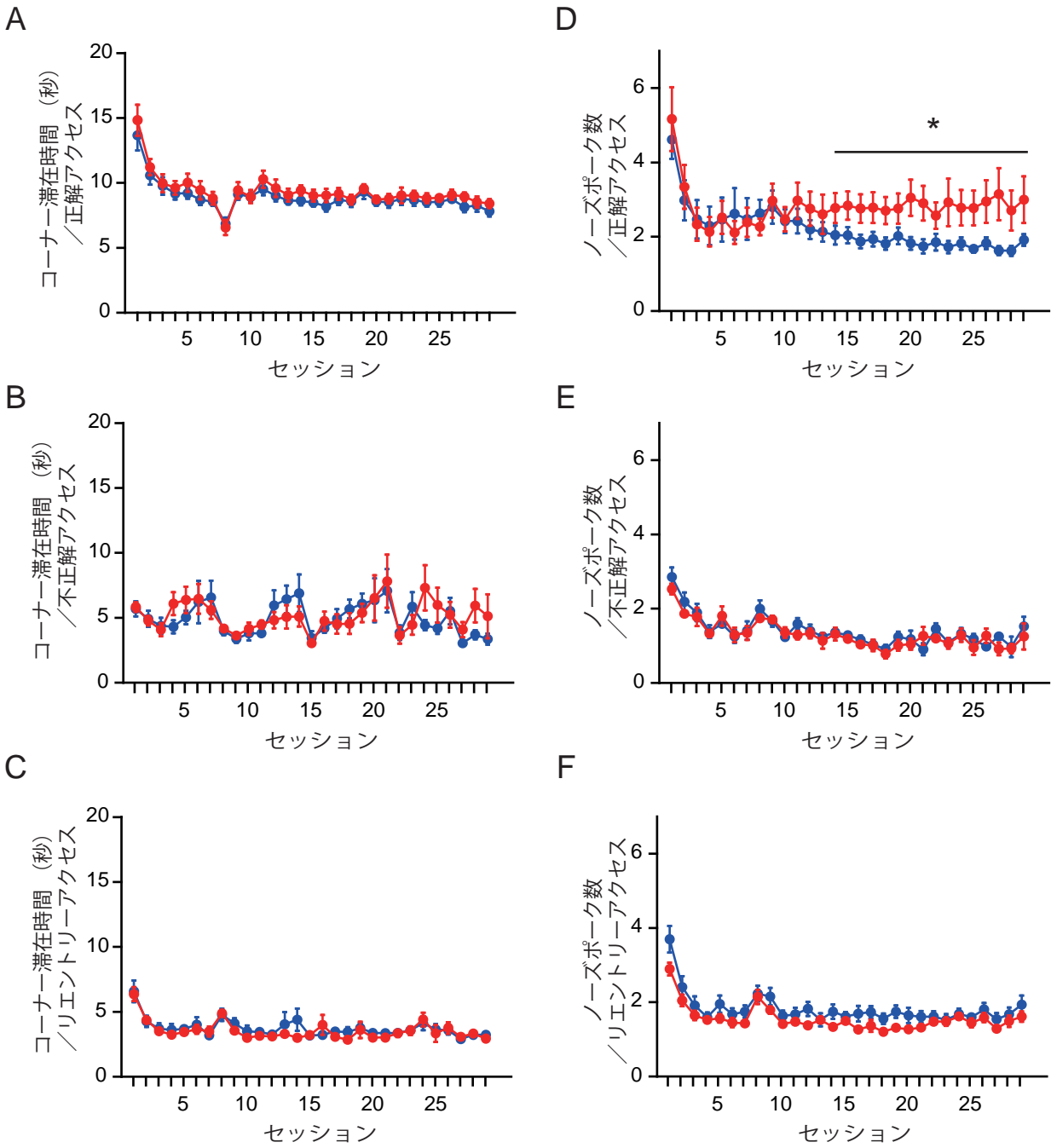


Figure 13

Figure 13. PCPA 投与による固執性行動指標。 対照群のデータを青、PCPA 群のデータを赤で示す。(A) 対照群と PCPA 群の各セッションにおける正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(B) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(C) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均滞在時間、(D) 各セッションの正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(E) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(F) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM による)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

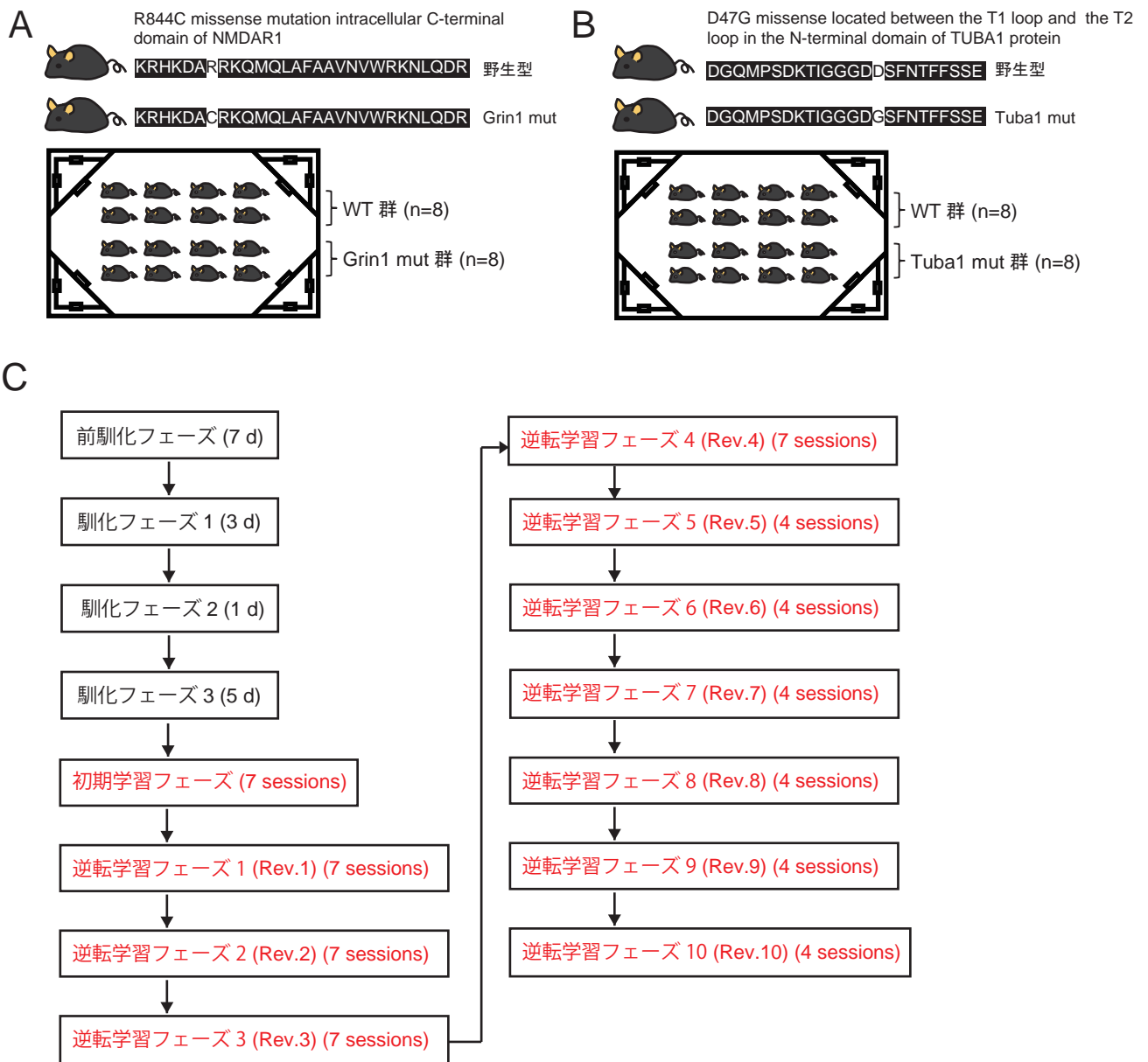


Figure 14

Figure 14. AD/HD 様発達障害モデルマウスを用いた行動柔軟性試験概要。(A) Grin1 mut 群を用いた試験の群構成。Grin1 mut 群は、Grin1 遺伝子の一塩基変異により Grin1 タンパクの細胞内 C 末端ドメインに R844C ミスセンス変異をもつ。(B) Tuba1 mut 群を用いた試験の群構成。Tuba1 mut 群は、Tuba1 遺伝子の一塩基変異により Tuba1 タンパク N 末端の T1 ループと T2 ループ間に D47G ミスセンス変異をもつ。(C) 試験スケジュール。馴化フェーズを黒字、試験開始後を赤字で示した。

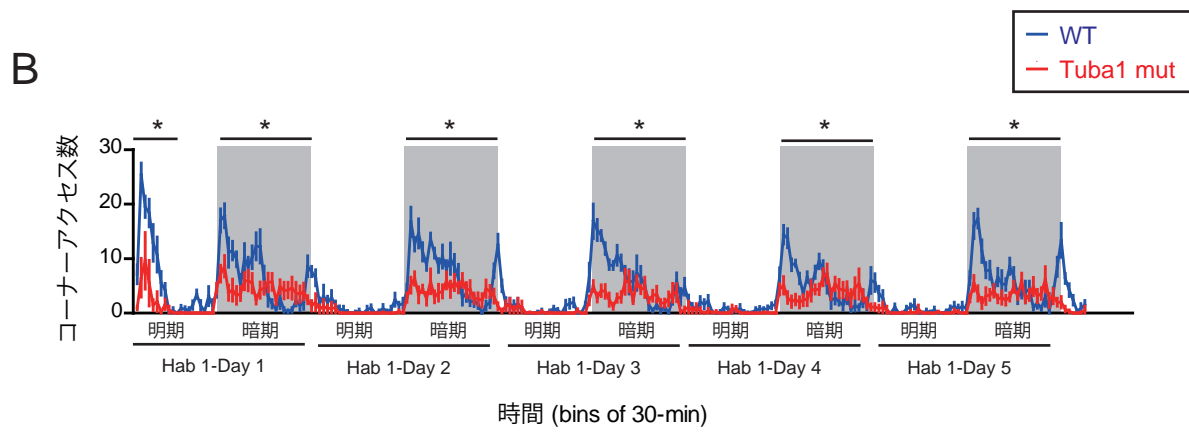
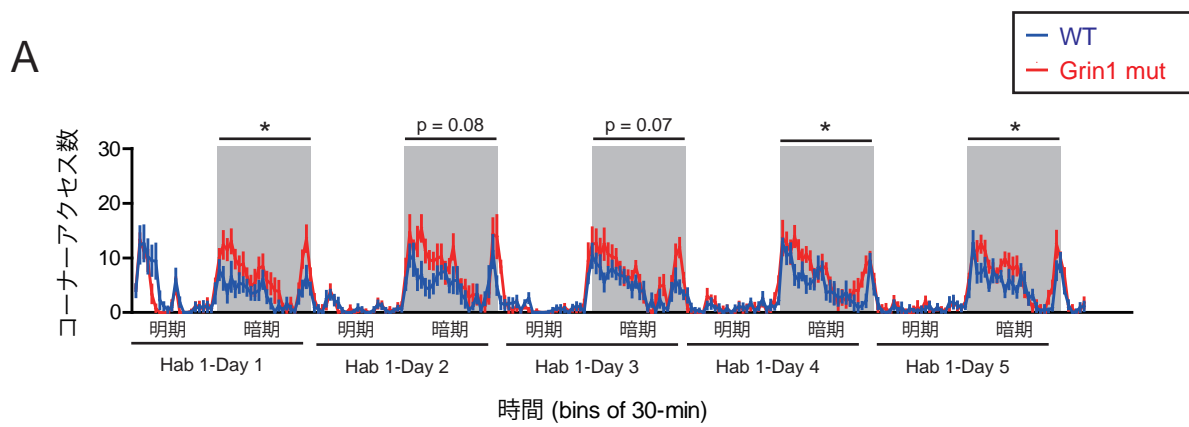


Figure 15

Figure 15. Grin1 変異マウスおよび Tuba1 変異マウスにおける新奇環境探索活動／自発的活動性指標。 (A) 野生型群 (青) と Grin1 mut 群 (赤) の IntelliCage への移動後 30 分間ごとのコーナーアクセス数。図中、馴化フェーズ 1 の 1 日目を Hab1-Day1、2 日目を Hab1-Day2 (以後同様) と記す。 (B) 野生型群 (青) と Tuba1 mut 群 (赤) の IntelliCage への移動後 30 分間ごとのコーナーアクセス数 (馴化フェーズ 1)。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM による)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

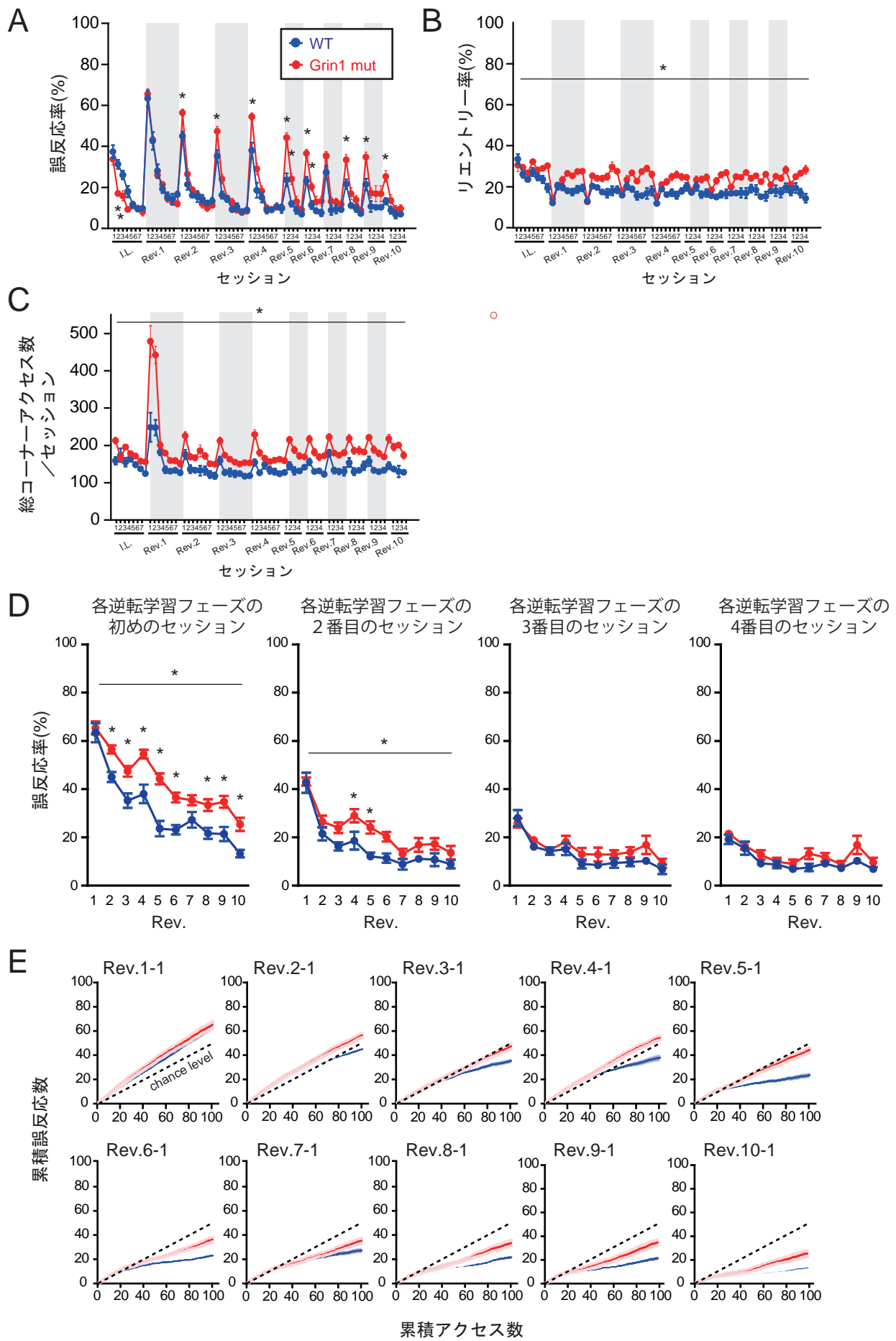


Figure 16

Figure 16. Grin1 変異マウスにおける行動柔軟性指標。 (A) 各セッションの誤反応率。以後、野生型群のデータを青、Grin1 mut 群のデータを赤で示す。(B) 各セッションのリエンタリー率。(C) 各セッションの総コーナーアクセス数。(D) 左から、各逆転学習フェーズ (以後、Rev) の 1 セッション目 (Rev.x-1) の誤反応率、2 セッション目 (Rev.x-2) の誤反応率、3 セッション目 (Rev.x-3) の誤反応率、4 セッション目 (Rev.x-4) の誤反応率を抜き出してグラフ化した (Rev.x の x には、何回目の逆転フェーズかを示す数字が入る)。アスタリスクは Rev.1 から Rev.10 までを通しての群の主効果による有意差、または Rev ごとの有意な群間差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM and Bonferroni test)。(E) 各 Rev の 1 セッション目 (Rev.x-1) におけるセッション内累積誤答数。横軸はセッション開始からの累積総コーナーアクセス数。縦軸は累積誤反応数。点線はチャンスレベルを示す。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

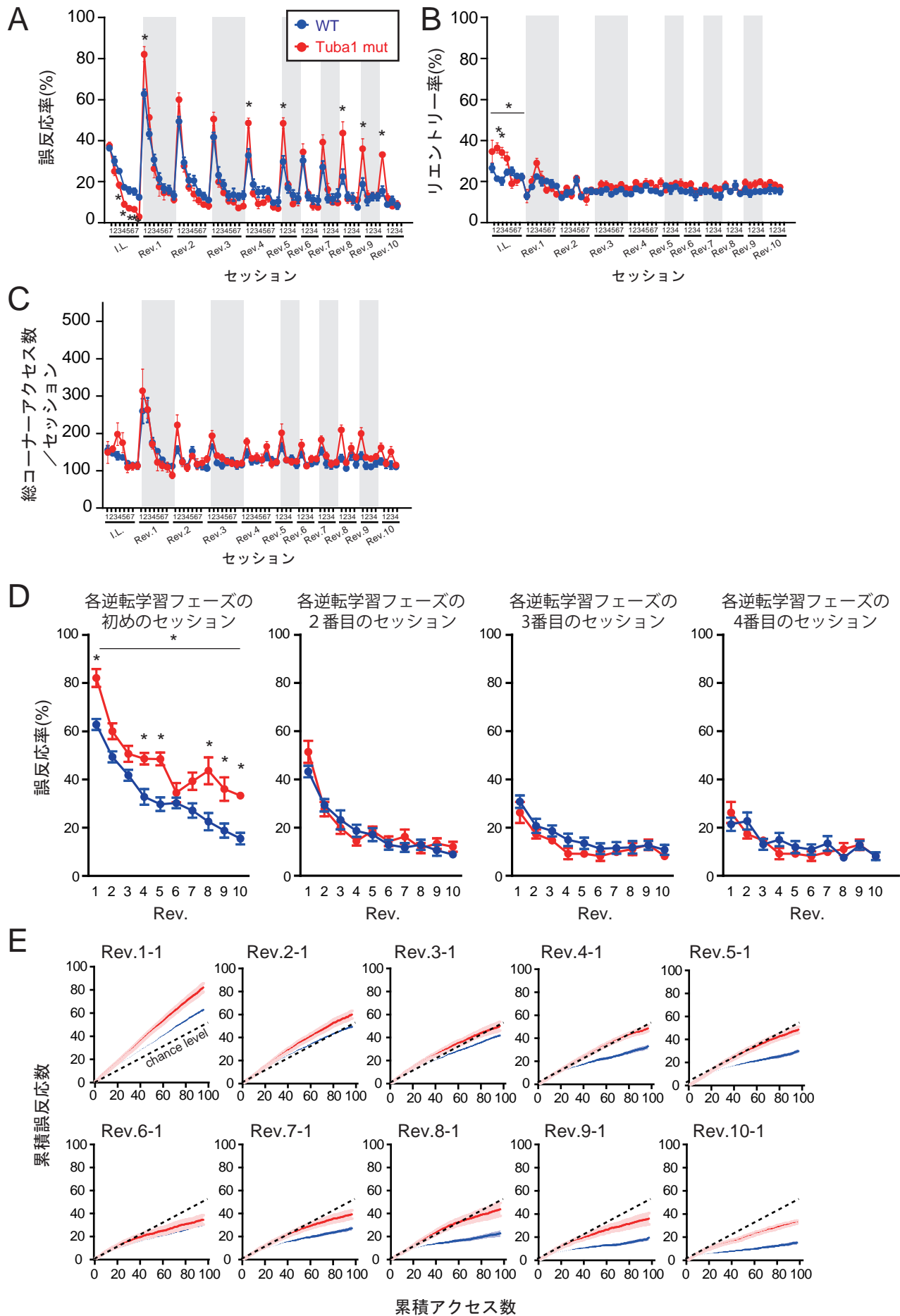
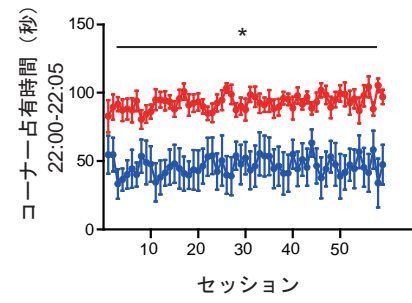
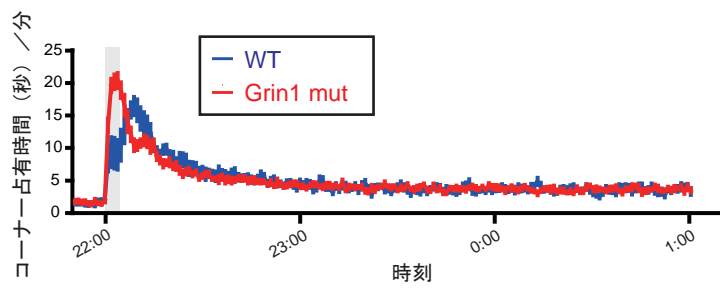


Figure 17

Figure 17. Tuba1 変異マウスにおける行動柔軟性指標。 (A) 各セッションの誤反応率。以後、野生型群のデータを青、Tuba1 mut 群のデータを赤で示す。(B) 各セッションのリエントリー率。(C) 各セッションの総コーナーアクセス数。(D) 左から、各逆転学習フェーズ (以後、Rev) の 1 セッション目 (Rev.x-1) の誤反応率、2 セッション目 (Rev.x-2) の誤反応率、3 セッション目 (Rev.x-3) の誤反応率、4 セッション目 (Rev.x-4) の誤反応率を抜き出してグラフ化した。アスタリスクは Rev.1 から Rev.10 までを通しての群の主効果による有意差、または Rev ごとの有意な群間差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM and Bonferroni test)。(E) 各 Rev の 1 セッション目 (Rev.x-1) におけるセッション内累積誤答数。横軸はセッション開始からの累積総コーナーアクセス数。縦軸は累積誤反応数。点線はチャンスレベルを示す。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

A



B

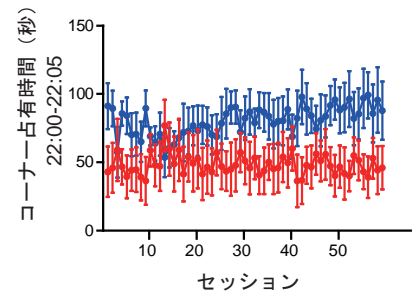
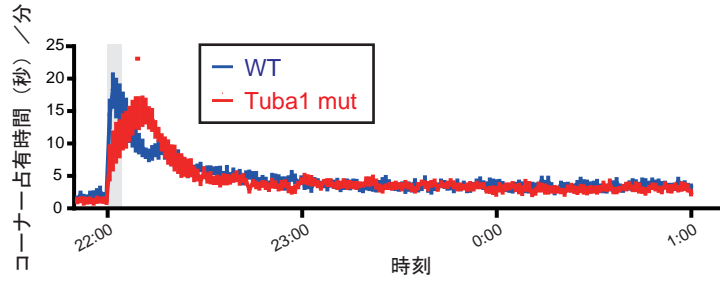


Figure 18

Figure 18. Grin1 mut マウスおよび **Tuba1 mut** マウスにおける社会性行動指標（集団内競争優位性）。(A) 野生型群（青）と **Grin1 mut** 群（赤）のセッション内の毎分のコーナー占有時間（全 59 セッションの平均）（左）、および各セッションにおけるセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間（右）。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す（ $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM）。(B) 野生型群（青）と **Tuba1 mut** 群（赤）のセッション内の毎分のコーナー占有時間（全 59 セッションの平均）（左）、および各セッションにおけるセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間（右）。エラーバーは標準誤差を示す（ $n=8$ ）。

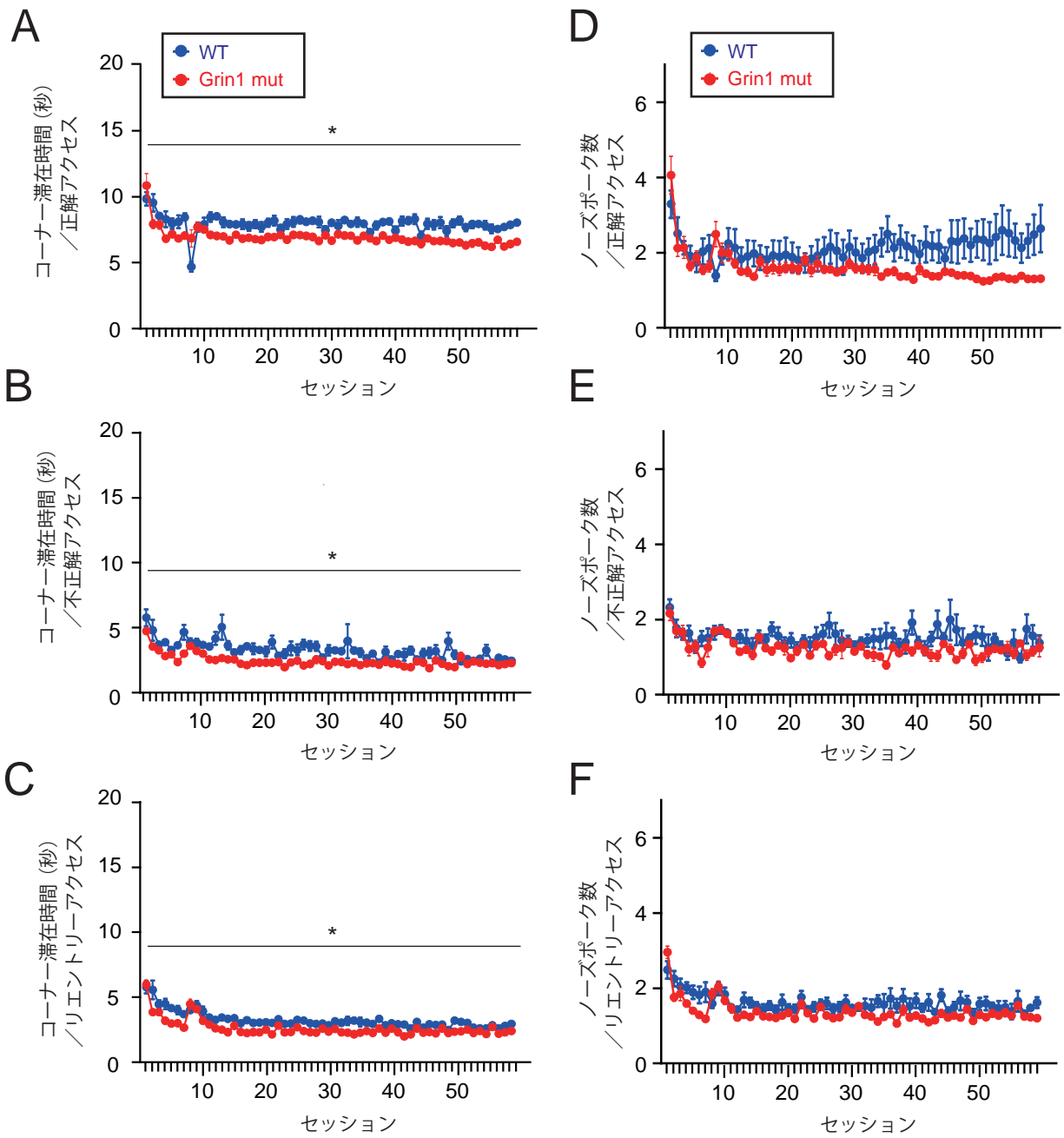


Figure 19

Figure 19. Grin1 mut マウスにおける固執性行動指標。(A) 野生型群 (青) と Grin1 mut 群 (赤) の各セッションにおける正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(B) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(C) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均滞在時間、(D) 各セッションの正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(E) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(F) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

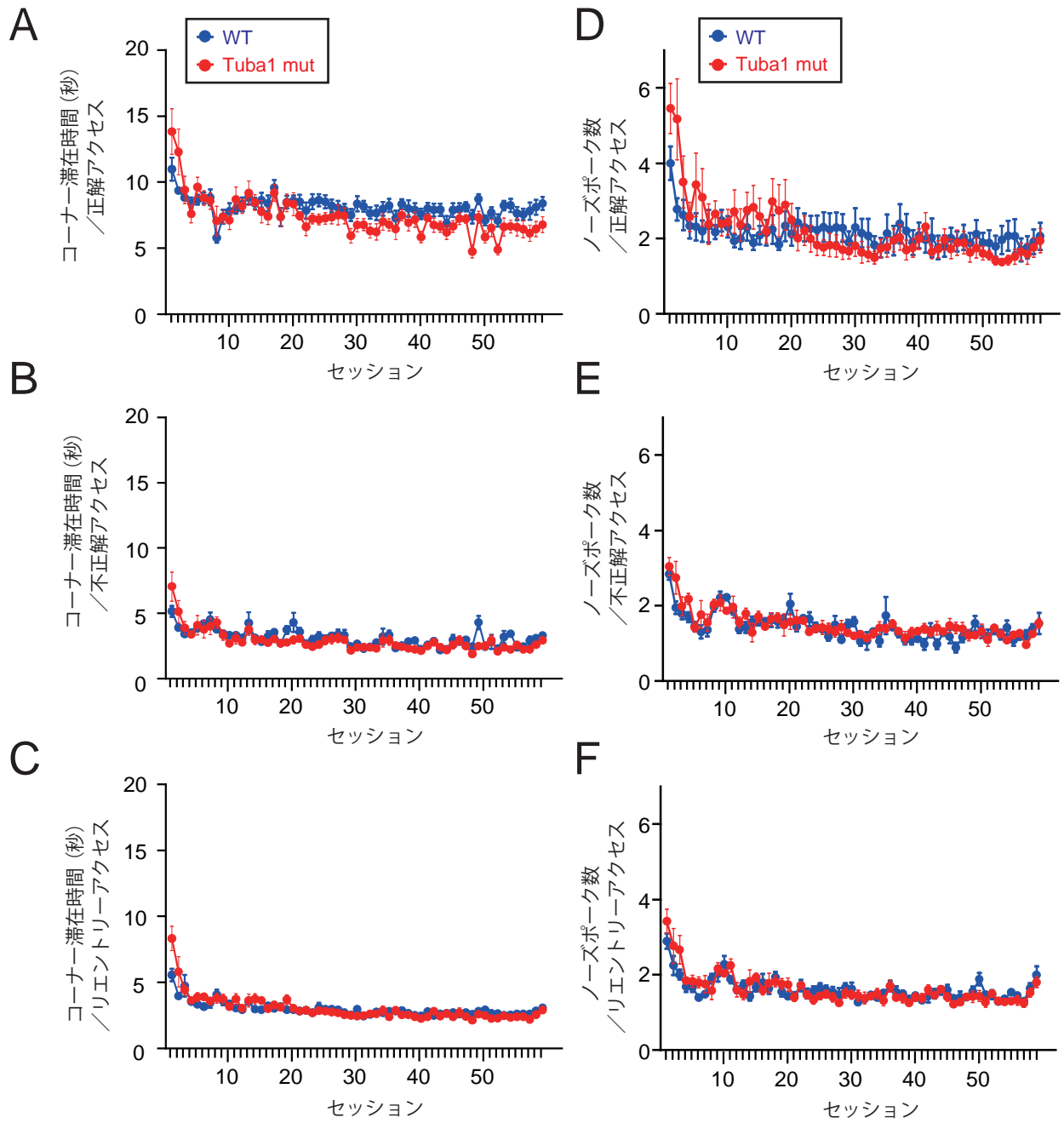


Figure 20

Figure 20. Tuba1 mut マウスにおける固執性行動指標。(A) 野生型群(青)と Tuba 1 mut 群(赤)の各セッションにおける正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(B) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(C) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均滞在時間、(D) 各セッションの正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(E) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(F) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

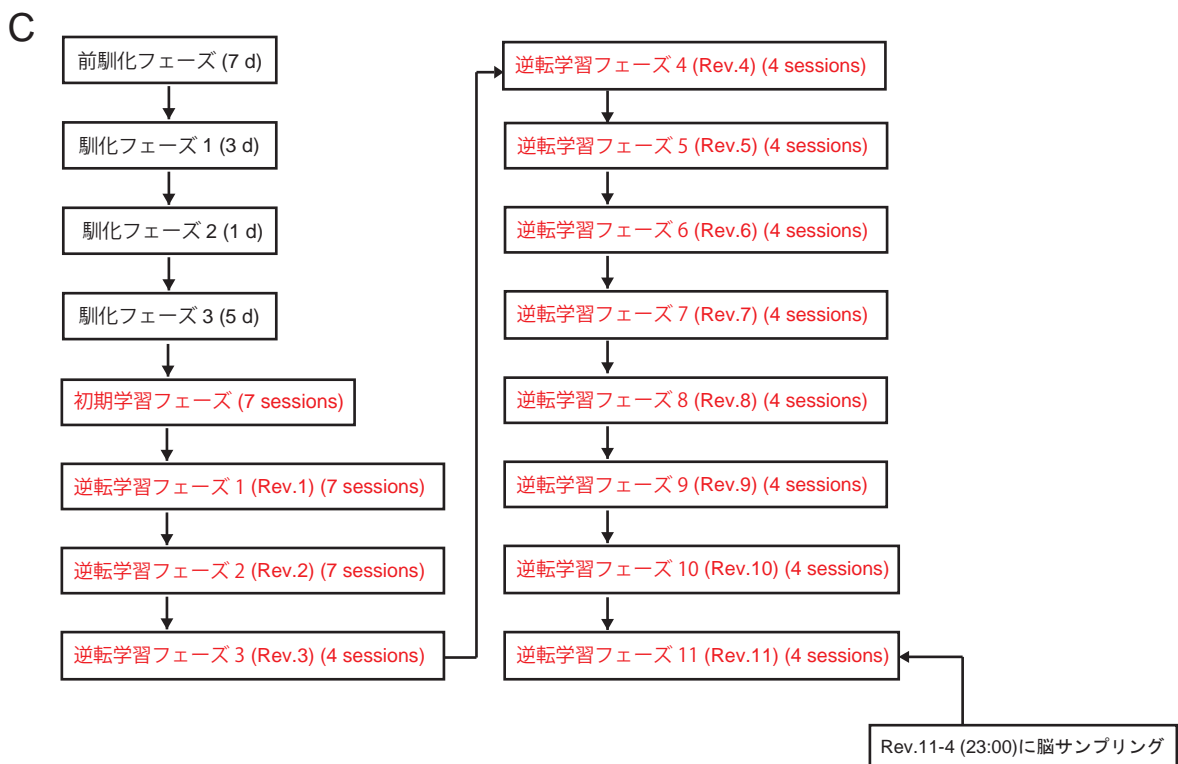
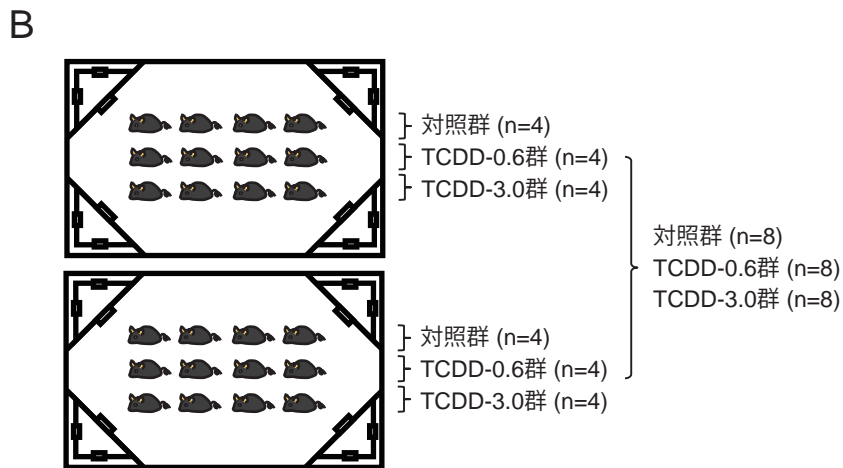
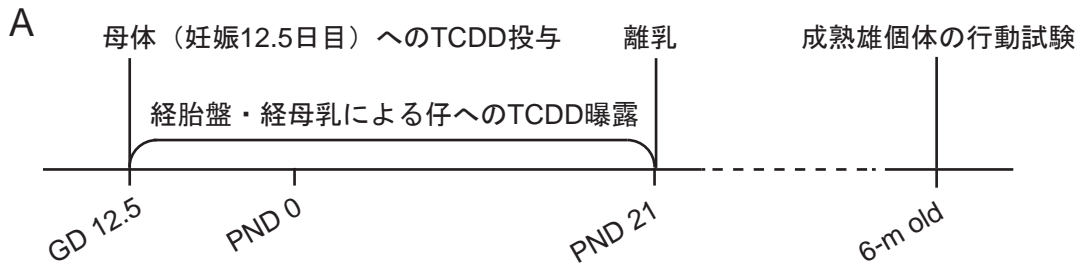
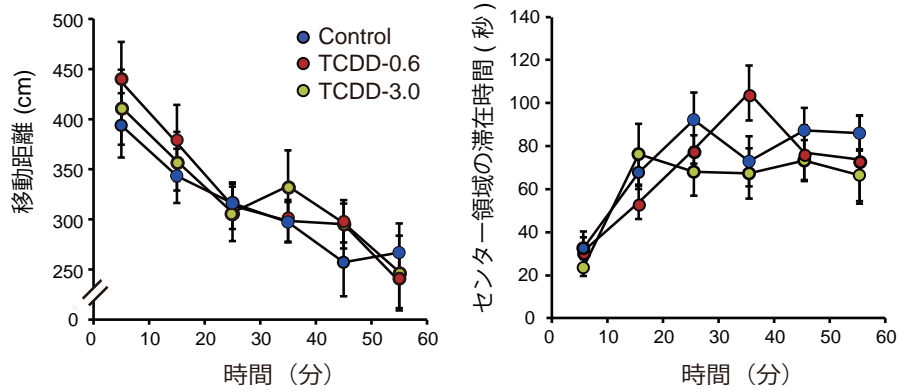


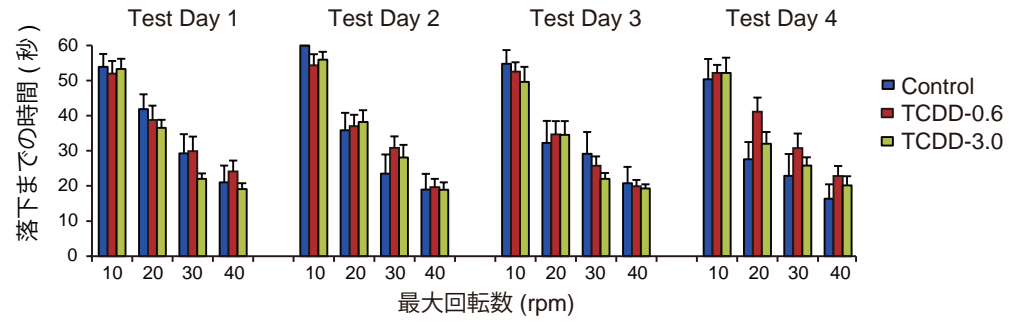
Figure 21

Figure 21. 周産期環境化学物質 (TCDD) 曝露マウスを用いた行動柔軟性試験概要。(A) 周産期低用量 TCDD 曝露マウスの作成方法と行動柔軟性試験開始までの実験スケジュール。妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに、0 (溶媒のみ)、0.6、ないし 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の TCDD を単回経口投与した。出産後 21 日目に仔マウスを離乳させ、その後各群、各腹 1 匹ずつの雄個体を無作為に選び、対照群、TCDD-0.6 群、TCDD-3.0 群 (各群 n=8) を作成した。各々が 6 か月齢に達した時点から、行動試験を行った。(B) IntelliCage 内の実験群の構成。各群 4 匹ずつ、計 12 匹をケージごとに導入し、2 ケージ分試験を行った。(C) 試験スケジュール。馴化フェーズを黒字、試験開始後を赤字で示した。

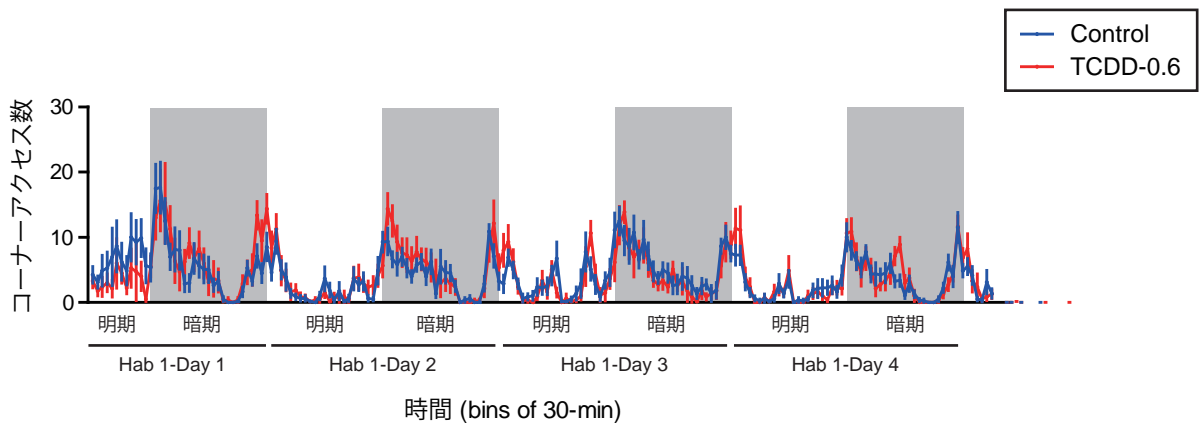
A



B



C



D

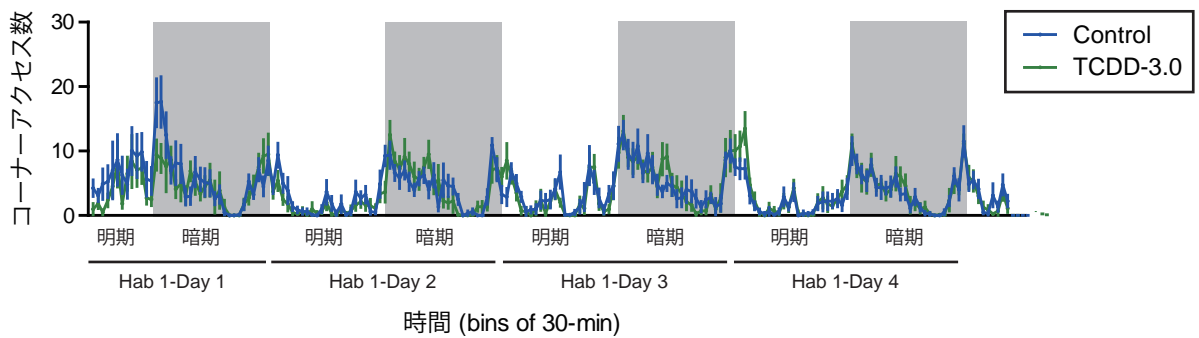


Figure 22

Figure 22. 周産期 TCDD 曝露マウスの新奇環境探索活動／運動協調性／自発的活動性指標。(A) オープンフィールド試験による新奇環境探索活動の評価。(B) ロータロッド試験による運動協調性の評価。(C) 対照群 (青)、TCDD-0.6 群 (赤) の Intellicage 収容後 30 分間ごとのコーナーアクセス数 (馴化フェーズ 1 時)。(D) 対照群 (青)、TCDD-3.0 群 (赤) の Intellicage 導入後 30 分間ごとのコーナーアクセス数 (馴化フェーズ 1 時)。

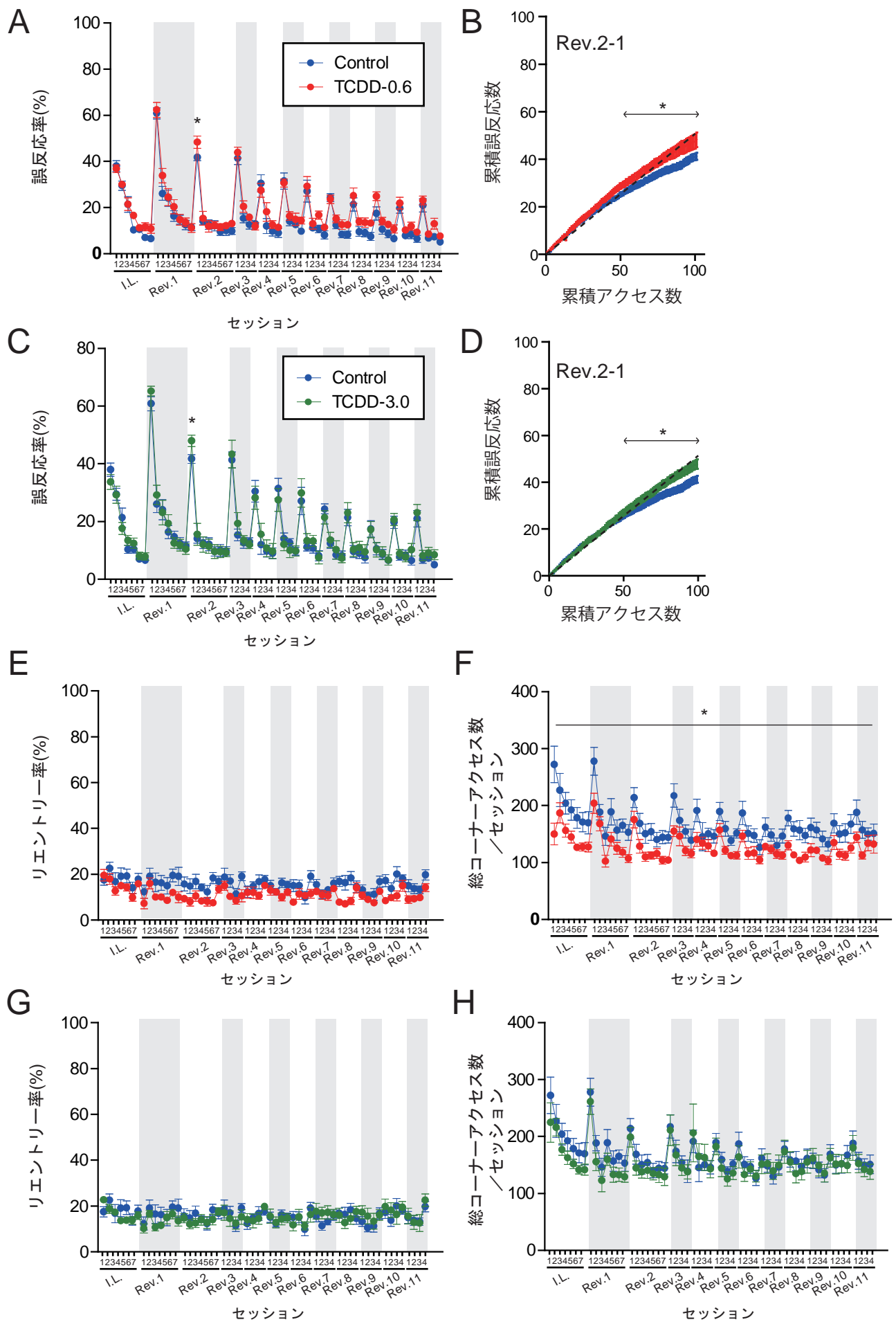
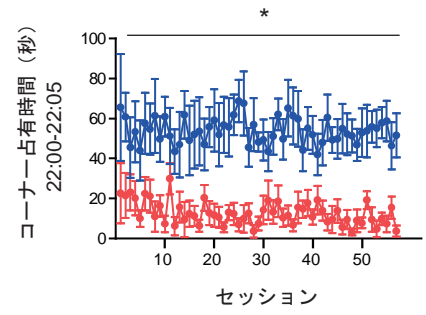
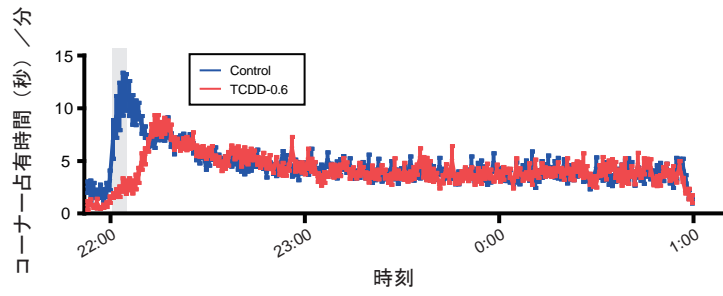


Figure 23

Figure 23. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける行動柔軟性指標。(A, C) 各セッションの誤反応率。アスタリスクは群間の有意差を示す ($P < 0.05$, Bonferroni test)。以後、対照群のデータを青、TCDD-0.6 群のデータを赤、TCDD-3.0 群を緑で示す。(B, D) Rev.2-1 におけるセッション内累積誤反応数。横軸はセッション開始からの累積コーナーアクセス数。縦軸は累積誤反応数。点線はチャンスレベルを示す。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す (累積アクセス数 50-100 の範囲、 $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。(E, G) 各セッションのリエントリー率。(F, H) 各セッションの総コーナーアクセス数。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。

A



B

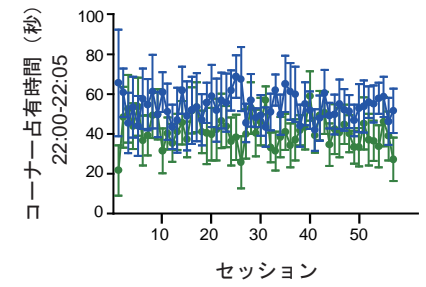
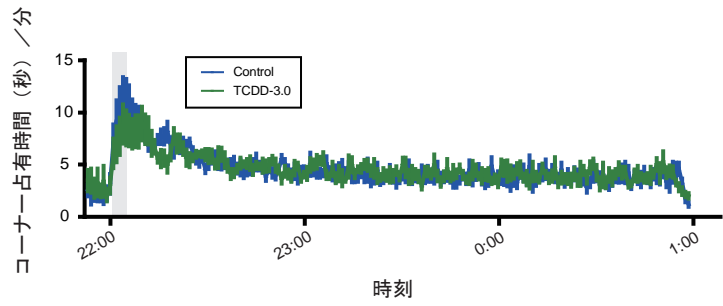


Figure 24

Figure 24. 周産期 TCDD 曝露マウスにおける社会性行動指標（集団内競争優位性）。(A) 対照群（青）と TCDD-0.6 群（赤）のセッション内の毎分のコーナー占有時間（全 57 セッションの平均）（左）、および各セッションにおけるセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間（右）。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す（ $P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM）。(B) 対照群（青）と TCDD-3.0 群（緑）のセッション内の毎分のコーナー占有時間（全 57 セッションの平均）（左）、および各セッションにおけるセッション開始後 5 分間のコーナー占有時間（右）。エラーバーは標準誤差を示す（ $n=8$ ）。

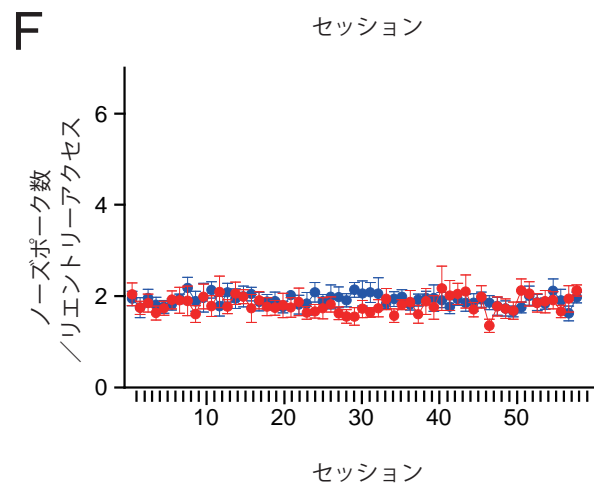
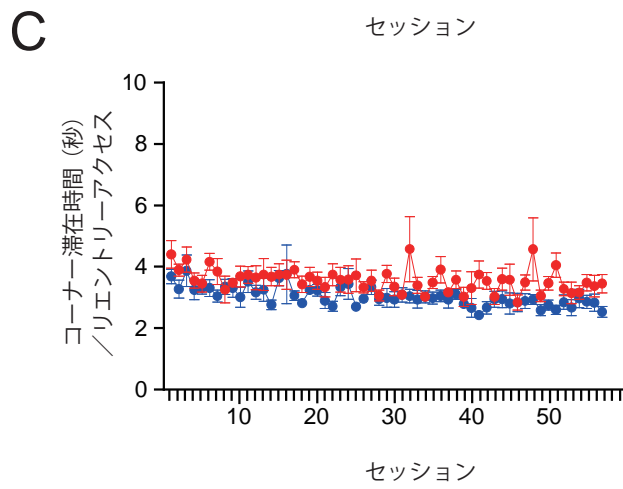
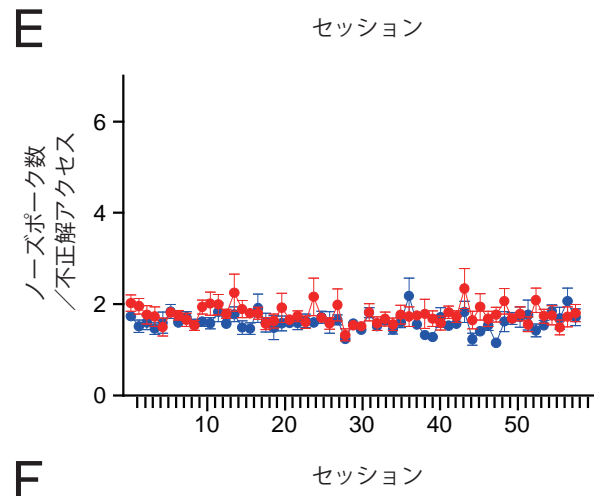
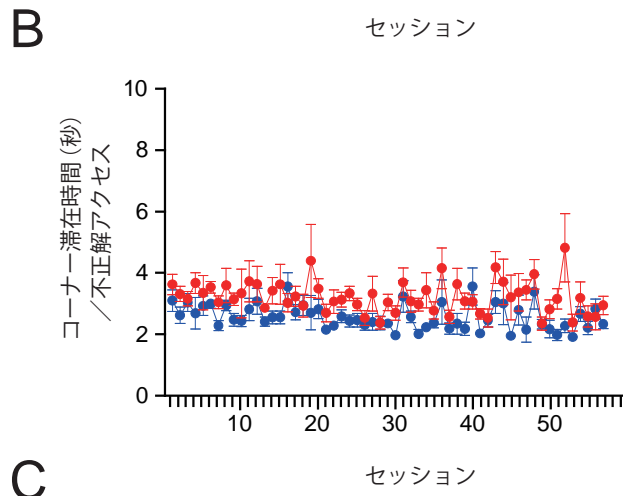
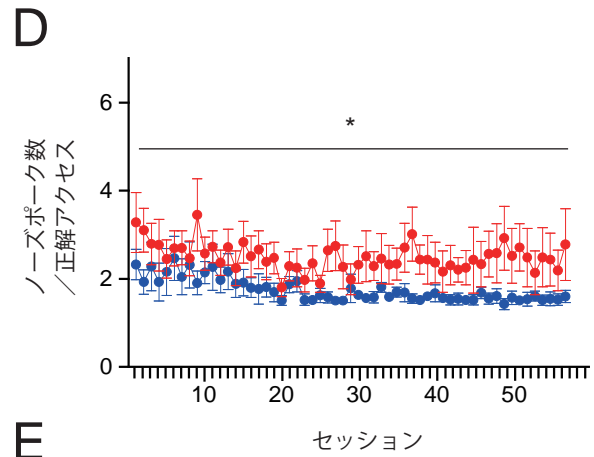
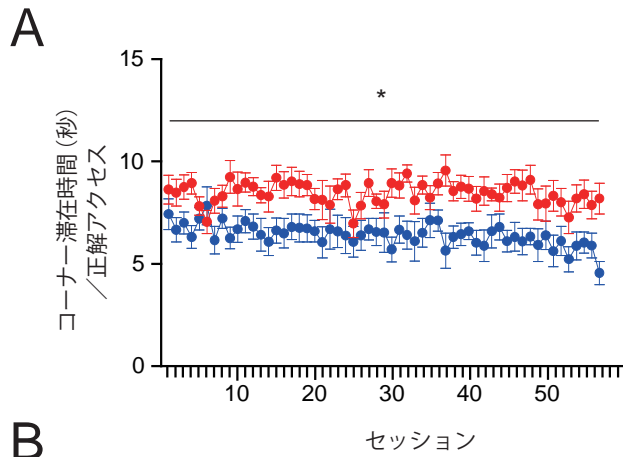


Figure 25

Figure 25. TCDD-0.6 群マウスにおける固執性行動指標。(A) 対照群 (青) と TCDD-0.6 群 (赤) の各セッションにおける正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(B) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(C) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均滞在時間、(D) 各セッションの正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(E) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(F) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数。アスタリスクは群の主効果による有意差を示す ($P < 0.05$, Two-way ANOVA with RM)。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

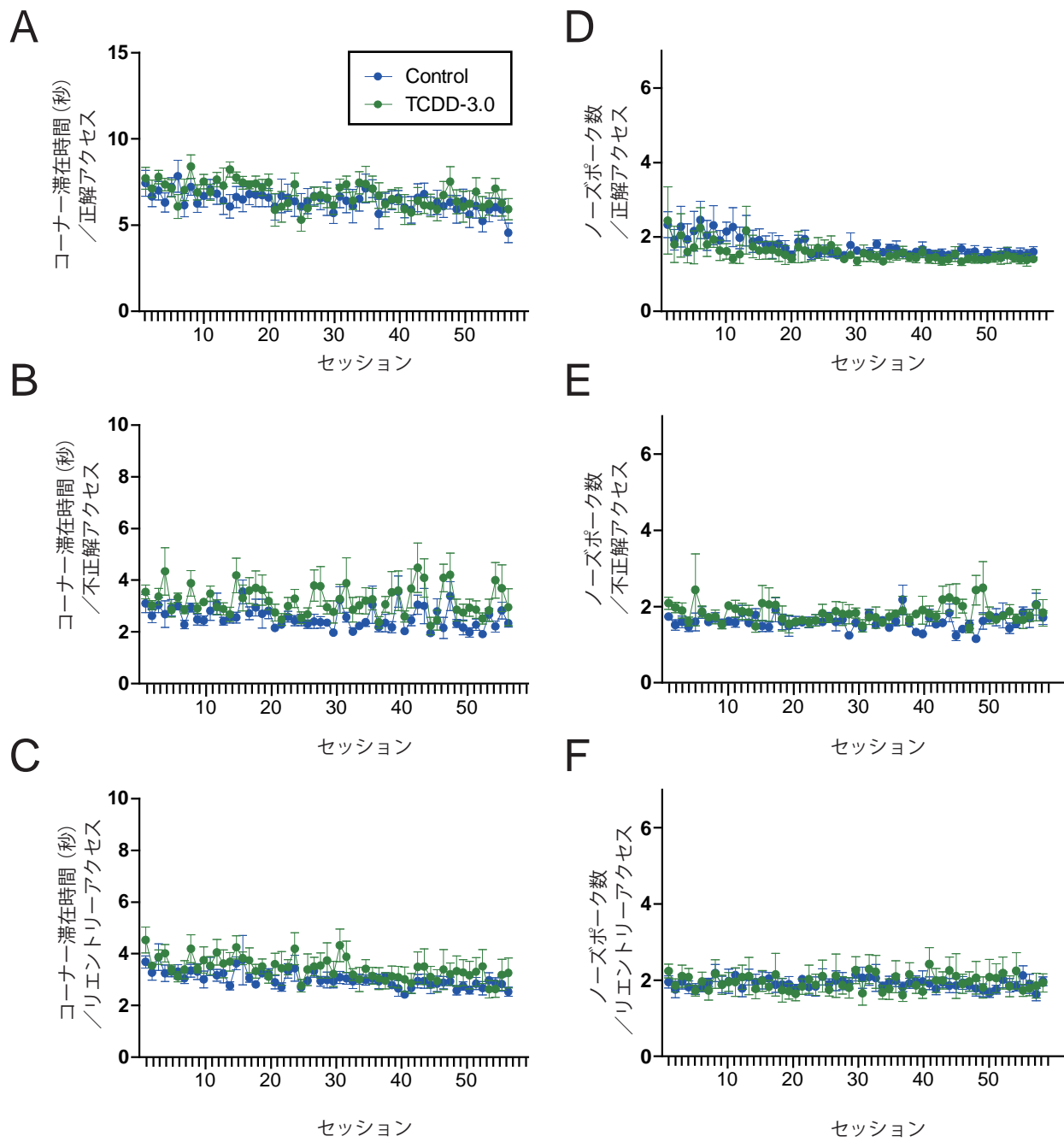


Figure 26

Figure 26. TCDD-3.0 群マウスにおける固執性行動指標。(A) 対照群 (青) と TCDD-3.0 群 (緑) の各セッションにおける正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(B) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均滞在時間、(C) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均滞在時間、(D) 各セッションの正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(E) 各セッションの不正解コーナーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数、(F) 各セッションのリエントリーアクセスあたりの平均ノーズポーク回数。エラーバーは標準誤差を示す (n=8)。

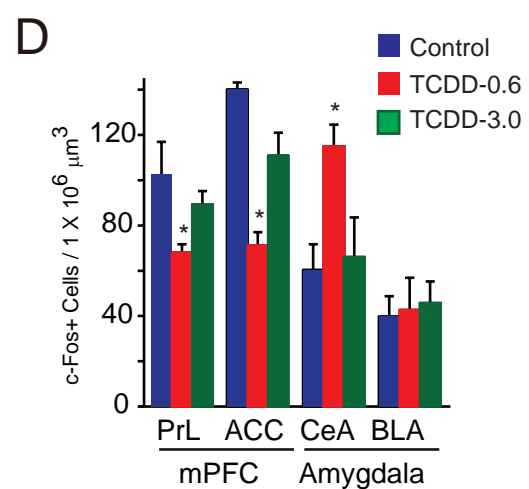
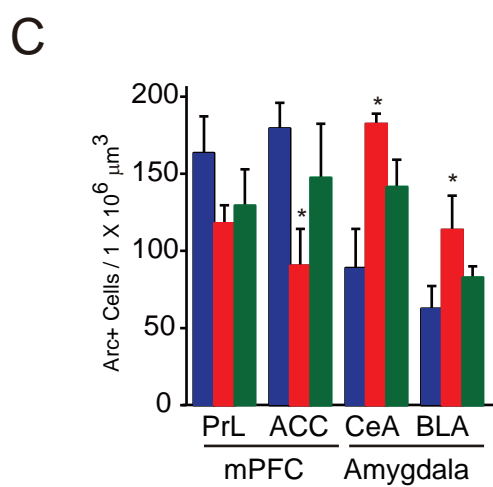
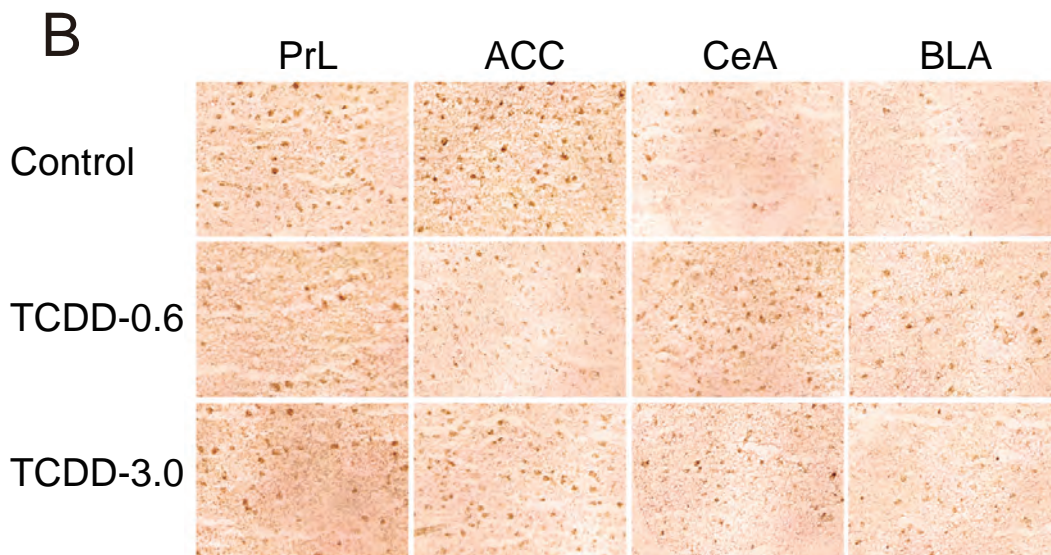
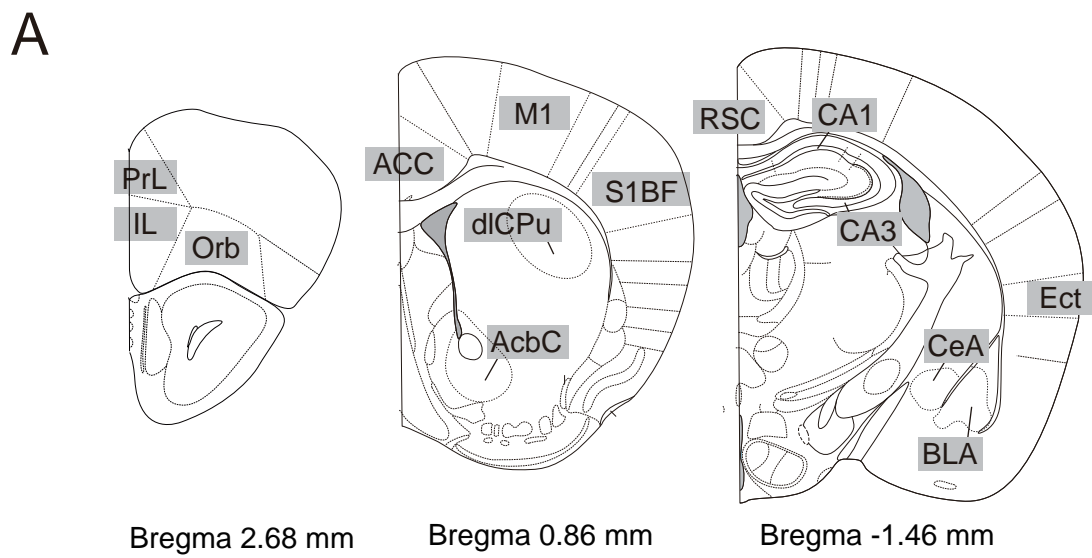


Figure 27

Figure 27. 免疫組織化学染色による神経活動マーカー陽性細胞数の比較。(A) 免疫組織化学染色により Arc および c-Fos タンパク陽性細胞数を定量した脳領域。(B) PrL、ACC、CeA、BLA における Arc 発現細胞の染色例。(C) 対照群 (白)、TCDD-0.6 群 (赤)、TCDD-3.0 群 (緑) における前頭前皮質および扁桃体での Arc 陽性細胞数、および(D) 同 c-Fos 陽性細胞数。アスタリスクは対照群との有意差を示す ($P < 0.05$, Bonferroni test)。エラーバーは標準誤差を示す (n=5)。

7. 謝辞

最先端のマウス行動試験装置である IntelliCage を駆使した研究の機会を与えていただいただけでなく、終始根気強く、熱心なご指導を頂いた健康環境医工学部門 遠山千春 教授、同 掛山正心 助教（現・長崎大学医学部生理学第二教室准教授）に、心より、厚く感謝の意を表します。行動試験系の確立、論文作成においては、Zurich 大学 Hans-Peter Lipp 教授、同 David P. Wolfer 教授、東京大学医学系研究科 尾藤晴彦 教授、同 奥野浩行 助教（現・京都大学大学院医学研究科特定准教授）から貴重なアドバイスをいただき、大きな励みになりました。博士研究員の立場から親身にご指導いただいた宮崎航 博士（現・熊本大学 助教）、齧島旭博士（現・群馬大学 助教）、IntelliCage 行動実験をサポートしていただいた遠藤のぞみさん、ベナー聖子さん、免疫組織化学染色実験をサポートしていただいた島崎亜希子さん、TCDD 曝露胎仔脳における遺伝子発現解析をサポートしていただいた Ling Wenting さん、木村栄輝さん、西村典子博士、慶應義塾大学医学部 解剖学教室の仲嶋一範 教授、田畑秀典博士（現・愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所）、久保健一郎 博士、東京大学総括プロジェクト機構 総括寄付講座「食と生命」の加藤久典 教授、高橋祥子さんに深く感謝いたします。最後に、研究生活を支えてくださった研究室の皆様に、心より御礼を申し上げます。

8. 引用文献

- 1 Tonegawa, S. Gene targeting: a new approach for the analysis of mammalian memory and learning. *Progress in clinical and biological research* **390**, 5-18 (1994).
- 2 Silva, A. J., Paylor, R., Wehner, J. M. & Tonegawa, S. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. *Science* **257**, 206-211 (1992).
- 3 Grant, S. G. *et al.* Impaired long-term potentiation, spatial learning, and hippocampal development in fyn mutant mice. *Science* **258**, 1903-1910 (1992).
- 4 Morozov, A., Kellendonk, C., Simpson, E. & Tronche, F. Using conditional mutagenesis to study the brain. *Biological psychiatry* **54**, 1125-1133 (2003).
- 5 Aronoff, R. & Petersen, C. C. Controlled and localized genetic manipulation in the brain. *Journal of cellular and molecular medicine* **10**, 333-352 (2006).
- 6 Imayoshi, I., Sakamoto, M. & Kageyama, R. Genetic methods to identify and manipulate newly born neurons in the adult brain. *Frontiers in neuroscience* **5**, 64, doi:10.3389/fnins.2011.00064 (2011).
- 7 Taniguchi, Y., Young-Pearse, T., Sawa, A. & Kamiya, A. In utero electroporation as a tool for genetic manipulation in vivo to study psychiatric disorders: from genes to circuits and behaviors. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **18**, 169-179, doi:10.1177/1073858411399925 (2012).
- 8 Williams, S. C. & Deisseroth, K. Optogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 16287, doi:10.1073/pnas.1317033110 (2013).
- 9 Bradley, A. *et al.* The mammalian gene function resource: the International Knockout Mouse Consortium. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **23**, 580-586, doi:10.1007/s00335-012-9422-2 (2012).
- 10 Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* **420**, 520-562, doi:10.1038/nature01262 (2002).
- 11 Crawley, J. N. *What's wrong with my mouse? : Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice*. 2nd edn, (Wiley-Interscience, 2007).
- 12 Hall, C. S. Emotional behavior in the rat I Defecation and urination as

- measures of individual differences in emotionality. *Journal of comparative psychology* **18**, 385-403, doi:10.1037/H0071444 (1934).
- 13 Morris, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. *Learning and Motivation* **12**, 239–260 (1981).
- 14 Morris, R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods* **11**, 47-60 (1984).
- 15 Fanselow, M. S. Conditioned and unconditional components of post-shock freezing. *The Pavlovian journal of biological science* **15**, 177-182 (1980).
- 16 Smith, E. E., Atkinson, R. L. & Hilgard, E. R. *Atkinson & Hilgard's introduction to psychology*. 14th edn, (Wadworth/Thomson Learning, 2003).
- 17 Porsolt, R. D., Bertin, A. & Jalfre, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* **229**, 327-336 (1977).
- 18 Handley, S. L. & Mithani, S. Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of 'fear'-motivated behaviour. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **327**, 1-5 (1984).
- 19 Londin, E., Yadav, P., Surrey, S., Kricka, L. J. & Fortina, P. Use of linkage analysis, genome-wide association studies, and next-generation sequencing in the identification of disease-causing mutations. *Methods in molecular biology* **1015**, 127-146, doi:10.1007/978-1-62703-435-7_8 (2013).
- 20 Houlden, H. & Singleton, A. B. The genetics and neuropathology of Parkinson's disease. *Acta neuropathologica* **124**, 325-338, doi:10.1007/s00401-012-1013-5 (2012).
- 21 De Strooper, B., Iwatsubo, T. & Wolfe, M. S. Presenilins and gamma-secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* **2**, a006304, doi:10.1101/cshperspect.a006304 (2012).
- 22 Bano, D., Zanetti, F., Mende, Y. & Nicotera, P. Neurodegenerative processes in Huntington's disease. *Cell death & disease* **2**, e228, doi:10.1038/cddis.2011.112 (2011).
- 23 Kumar, R. A. & Christian, S. L. Genetics of autism spectrum disorders. *Current neurology and neuroscience reports* **9**, 188-197 (2009).
- 24 Sawamura, N. & Sawa, A. Disrupted-in-schizophrenia-1 (DISC1): a key susceptibility factor for major mental illnesses. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1086**, 126-133, doi:10.1196/annals.1377.018 (2006).
- 25 Kong, A. *et al.* Rate of de novo mutations and the importance of father's age to disease risk. *Nature* **488**, 471-475, doi:10.1038/nature11396 (2012).

- 26 Gulsuner, S. *et al.* Spatial and temporal mapping of de novo mutations in schizophrenia to a fetal prefrontal cortical network. *Cell* **154**, 518-529, doi:10.1016/j.cell.2013.06.049 (2013).
- 27 Michaelson, J. J. *et al.* Whole-genome sequencing in autism identifies hot spots for de novo germline mutation. *Cell* **151**, 1431-1442, doi:10.1016/j.cell.2012.11.019 (2012).
- 28 Skaper, S. D. & Giusti, P. Transgenic mouse models of Parkinson's disease and Huntington's disease. *CNS & neurological disorders drug targets* **9**, 455-470 (2010).
- 29 Stachowiak, M. K. *et al.* Schizophrenia: a neurodevelopmental disorder--integrative genomic hypothesis and therapeutic implications from a transgenic mouse model. *Schizophrenia research* **143**, 367-376, doi:10.1016/j.schres.2012.11.004 (2013).
- 30 Nakatani, J. *et al.* Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* **137**, 1235-1246, doi:10.1016/j.cell.2009.04.024 (2009).
- 31 Niwa, M. *et al.* Knockdown of DISC1 by in utero gene transfer disturbs postnatal dopaminergic maturation in the frontal cortex and leads to adult behavioral deficits. *Neuron* **65**, 480-489, doi:10.1016/j.neuron.2010.01.019 (2010).
- 32 Kamiya, A. *et al.* A schizophrenia-associated mutation of DISC1 perturbs cerebral cortex development. *Nature cell biology* **7**, 1167-1178, doi:10.1038/ncb1328 (2005).
- 33 Hayashi-Takagi, A. *et al.* Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nature neuroscience* **13**, 327-332, doi:10.1038/nn.2487 (2010).
- 34 Szpir, M. New thinking on neurodevelopment. *Environmental health perspectives* **114**, A100-107 (2006).
- 35 Chaste, P. & Leboyer, M. Autism risk factors: genes, environment, and gene-environment interactions. *Dialogues in clinical neuroscience* **14**, 281-292 (2012).
- 36 Khandaker, G. M., Zimbron, J., Lewis, G. & Jones, P. B. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies. *Psychological medicine* **43**, 239-257, doi:10.1017/S0033291712000736 (2013).
- 37 Lederbogen, F., Haddad, L. & Meyer-Lindenberg, A. Urban social stress--risk factor for mental disorders. The case of schizophrenia.

- Environmental pollution* **183**, 2-6, doi:10.1016/j.envpol.2013.05.046 (2013).
- 38 Grandjean, P. & Landrigan, P. J. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet* **368**, 2167-2178, doi:10.1016/S0140-6736(06)69665-7 (2006).
- 39 Schecter, A. *Dioxins and health : including other persistent organic pollutants and endocrine disruptors*. 3rd edn, (John Wiley & Sons, 2012).
- 40 van der Worp, H. B. *et al.* Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS medicine* **7**, e1000245, doi:10.1371/journal.pmed.1000245 (2010).
- 41 Crabbe, J. C., Wahlsten, D. & Dudek, B. C. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science* **284**, 1670-1672 (1999).
- 42 Richter, S. H., Garner, J. P. & Wurbel, H. Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments? *Nature methods* **6**, 257-261, doi:10.1038/nmeth.1312 (2009).
- 43 Hurst, J. L. & West, R. S. Taming anxiety in laboratory mice. *Nature methods* **7**, 825-826, doi:10.1038/nmeth.1500 (2010).
- 44 Enserink, M. Behavioral genetics. Fickle mice highlight test problems. *Science* **284**, 1599-1600 (1999).
- 45 Wahlsten, D., Rustay, N. R., Metten, P. & Crabbe, J. C. In search of a better mouse test. *Trends in neurosciences* **26**, 132-136, doi:10.1016/S0166-2236(03)00033-X (2003).
- 46 Matzel, L. D. *et al.* Individual differences in the expression of a "general" learning ability in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 6423-6433 (2003).
- 47 Wahlsten, D., Cooper, S. F. & Crabbe, J. C. Different rankings of inbred mouse strains on the Morris maze and a refined 4-arm water escape task. *Behavioural brain research* **165**, 36-51, doi:10.1016/j.bbr.2005.06.047 (2005).
- 48 Belzung, C. & Griebel, G. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behavioural brain research* **125**, 141-149 (2001).
- 49 Wishaw, I. Q. & Tomie, J. Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiology & behavior* **60**, 1191-1197 (1996).
- 50 Abbott, A. Behavioural genetics: a question of survival. *Nature* **449**, 532-534, doi:10.1038/449532a (2007).
- 51 Vyssotski, A. L. *et al.* Long-term monitoring of hippocampus-dependent

- behavior in naturalistic settings: mutant mice lacking neurotrophin receptor TrkB in the forebrain show spatial learning but impaired behavioral flexibility. *Hippocampus* **12**, 27-38, doi:10.1002/hipo.10002 (2002).
- 52 Lipp, H. P. & Wolfer, D. P. Genetically modified mice and cognition. *Current opinion in neurobiology* **8**, 272-280 (1998).
- 53 Tecott, L. H. The genes and brains of mice and men. *The American journal of psychiatry* **160**, 646-656 (2003).
- 54 Fonio, E., Golani, I. & Benjamini, Y. Measuring behavior of animal models: faults and remedies. *Nature methods* **9**, 1167-1170, doi:10.1038/nmeth.2252 (2012).
- 55 Endler, N. S. & Kocovski, N. L. State and trait anxiety revisited. *Journal of anxiety disorders* **15**, 231-245 (2001).
- 56 Tecott, L. H. & Nestler, E. J. Neurobehavioral assessment in the information age. *Nature neuroscience* **7**, 462-466, doi:10.1038/nn1225 (2004).
- 57 Crawley, J. N. & Paylor, R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Hormones and behavior* **31**, 197-211, doi:10.1006/hbeh.1997.1382 (1997).
- 58 Rogers, D. C. *et al.* Use of SHIRPA and discriminant analysis to characterise marked differences in the behavioural phenotype of six inbred mouse strains. *Behavioural brain research* **105**, 207-217 (1999).
- 59 Tarantino, L. M., Gould, T. J., Druhan, J. P. & Bucan, M. Behavior and mutagenesis screens: the importance of baseline analysis of inbred strains. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **11**, 555-564 (2000).
- 60 Masuya, H. *et al.* Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* **16**, 829-837, doi:10.1007/s00335-005-2430-8 (2005).
- 61 Takao, K. & Miyakawa, T. Investigating gene-to-behavior pathways in psychiatric disorders: the use of a comprehensive behavioral test battery on genetically engineered mice. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1086**, 144-159, doi:10.1196/annals.1377.008 (2006).
- 62 Wakana, S. *et al.* Introduction to the Japan Mouse Clinic at the RIKEN

- BioResource Center. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science* **58**, 443-450 (2009).
- 63 Voikar, V., Vasar, E. & Rauvala, H. Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes, brain, and behavior* **3**, 27-38 (2004).
- 64 Goulding, E. H. *et al.* A robust automated system elucidates mouse home cage behavioral structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 20575-20582, doi:10.1073/pnas.0809053106 (2008).
- 65 de Visser, L., van den Bos, R., Kuurman, W. W., Kas, M. J. & Spruijt, B. M. Novel approach to the behavioural characterization of inbred mice: automated home cage observations. *Genes, brain, and behavior* **5**, 458-466, doi:10.1111/j.1601-183X.2005.00181.x (2006).
- 66 Spooner, D. M. & Pachana, N. A. Ecological validity in neuropsychological assessment: a case for greater consideration in research with neurologically intact populations. *Archives of clinical neuropsychology : the official journal of the National Academy of Neuropsychologists* **21**, 327-337, doi:10.1016/j.acn.2006.04.004 (2006).
- 67 Burgess, P. W., Alderman, N., Evans, J., Emslie, H. & Wilson, B. A. The ecological validity of tests of executive function. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* **4**, 547-558 (1998).
- 68 Alderman, N., Burgess, P. W., Knight, C. & Henman, C. Ecological validity of a simplified version of the multiple errands shopping test. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* **9**, 31-44 (2003).
- 69 Crusio, W. E., Sluyter, F., Gerlai, R. & Pietropaolo, S. *Behavioral Genetics of the Mouse, Volume 1. Genetics of Behavioral Phenotypes*. (Cambridge University Press, 2013).
- 70 Galsworthy, M. J. *et al.* A comparison of wild-caught wood mice and bank voles in the Intellicage: assessing exploration, daily activity patterns and place learning paradigms. *Behavioural brain research* **157**, 211-217, doi:10.1016/j.bbr.2004.06.021 (2005).
- 71 Houle, D., Govindaraju, D. R. & Omholt, S. Phenomics: the next challenge. *Nature reviews. Genetics* **11**, 855-866, doi:10.1038/nrg2897 (2010).
- 72 Royall, D. R. *et al.* Executive control function: a review of its promise and challenges for clinical research. A report from the Committee on Research of the American Neuropsychiatric Association. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* **14**, 377-405 (2002).

- 73 Hill, E. L. Executive dysfunction in autism. *Trends in cognitive sciences* **8**, 26-32 (2004).
- 74 Kipp, K. A developmental perspective on the measurement of cognitive deficits in attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biological psychiatry* **57**, 1256-1260, doi:10.1016/j.biopsych.2005.03.012 (2005).
- 75 Didden, R. *et al.* Behavioural flexibility in individuals with Angelman syndrome, Down syndrome, non-specific intellectual disability and Autism spectrum disorder. *Journal of intellectual disability research : JIDR* **52**, 503-509, doi:10.1111/j.1365-2788.2008.01055.x (2008).
- 76 Kerns, J. G., Nuechterlein, K. H., Braver, T. S. & Barch, D. M. Executive functioning component mechanisms and schizophrenia. *Biological psychiatry* **64**, 26-33, doi:10.1016/j.biopsych.2008.04.027 (2008).
- 77 Kawakubo, Y. *et al.* Impaired prefrontal hemodynamic maturation in autism and unaffected siblings. *PloS one* **4**, e6881, doi:10.1371/journal.pone.0006881 (2009).
- 78 Marazziti, D., Consoli, G., Picchetti, M., Carlini, M. & Faravelli, L. Cognitive impairment in major depression. *European journal of pharmacology* **626**, 83-86, doi:10.1016/j.ejphar.2009.08.046 (2010).
- 79 Sumiyoshi, C., Kawakubo, Y., Suga, M., Sumiyoshi, T. & Kasai, K. Impaired ability to organize information in individuals with autism spectrum disorders and their siblings. *Neuroscience research* **69**, 252-257, doi:10.1016/j.neures.2010.11.007 (2011).
- 80 Watanabe, T. *et al.* Diminished medial prefrontal activity behind autistic social judgments of incongruent information. *PloS one* **7**, e39561, doi:10.1371/journal.pone.0039561 (2012).
- 81 Roberts, A. C. Primate orbitofrontal cortex and adaptive behaviour. *Trends in cognitive sciences* **10**, 83-90, doi:10.1016/j.tics.2005.12.002 (2006).
- 82 Floresco, S. B., Zhang, Y. & Enomoto, T. Neural circuits subserving behavioral flexibility and their relevance to schizophrenia. *Behavioural brain research* **204**, 396-409, doi:10.1016/j.bbr.2008.12.001 (2009).
- 83 Thorpe, C., Floresco, S., Carr, J. & Wilkie, D. Alterations in time-place learning induced by lesions to the rat medial prefrontal cortex. *Behavioural processes* **59**, 87 (2002).
- 84 Robbins, T. W. & Arnsten, A. F. The neuropsychopharmacology of fronto-executive function: monoaminergic modulation. *Annual review of neuroscience* **32**, 267-287, doi:10.1146/annurev.neuro.051508.135535 (2009).

- 85 Kepecs, A., Uchida, N., Zariwala, H. A. & Mainen, Z. F. Neural correlates, computation and behavioural impact of decision confidence. *Nature* **455**, 227-231, doi:10.1038/nature07200 (2008).
- 86 DeVito, L. M., Lykken, C., Kanter, B. R. & Eichenbaum, H. Prefrontal cortex: role in acquisition of overlapping associations and transitive inference. *Learning & memory* **17**, 161-167, doi:10.1101/lm.1685710 (2010).
- 87 Tse, D. *et al.* Schemas and memory consolidation. *Science* **316**, 76-82, doi:10.1126/science.1135935 (2007).
- 88 Tse, D. *et al.* Schema-dependent gene activation and memory encoding in neocortex. *Science* **333**, 891-895, doi:10.1126/science.1205274 (2011).
- 89 Kakeyama, M., Endo, T., Zhang, Y., Miyazaki, W. & Tohyama, C. Disruption of paired-associate learning in rat offspring perinatally exposed to dioxins. *Archives of toxicology*, doi:10.1007/s00204-013-1161-y (2013).
- 90 Wang, F. *et al.* Bidirectional control of social hierarchy by synaptic efficacy in medial prefrontal cortex. *Science* **334**, 693-697, doi:10.1126/science.1209951 (2011).
- 91 Dickson, P. E. *et al.* Behavioral flexibility in a mouse model of developmental cerebellar Purkinje cell loss. *Neurobiology of learning and memory* **94**, 220-228, doi:10.1016/j.nlm.2010.05.010 (2010).
- 92 Laughlin, R. E., Grant, T. L., Williams, R. W. & Jentsch, J. D. Genetic dissection of behavioral flexibility: reversal learning in mice. *Biological psychiatry* **69**, 1109-1116, doi:10.1016/j.biopsych.2011.01.014 (2011).
- 93 Mar, A. C. *et al.* The touchscreen operant platform for assessing executive function in rats and mice. *Nature protocols* **8**, 1985-2005, doi:10.1038/nprot.2013.123 (2013).
- 94 Lobellova, V. *et al.* Two learning tasks provide evidence for disrupted behavioural flexibility in an animal model of schizophrenia-like behaviour induced by acute MK-801: a dose-response study. *Behavioural brain research* **246**, 55-62, doi:10.1016/j.bbr.2013.03.006 (2013).
- 95 Nicholls, R. E. *et al.* Transgenic mice lacking NMDAR-dependent LTD exhibit deficits in behavioral flexibility. *Neuron* **58**, 104-117, doi:10.1016/j.neuron.2008.01.039 (2008).
- 96 Brigman, J. L. *et al.* GluN2B in corticostriatal circuits governs choice learning and choice shifting. *Nature neuroscience* **16**, 1101-1110, doi:10.1038/nn.3457 (2013).
- 97 Burgess, P. & Shallice, T. *The Hayling and Brixton Tests*. (Thames Valley Test Company, 1997).

- 98 van den Berg, E. *et al.* The Brixton Spatial Anticipation Test as a test for executive function: validity in patient groups and norms for older adults. *Journal of the International Neuropsychological Society : JINS* **15**, 695-703, doi:10.1017/S1355617709990269 (2009).
- 99 Furuse, T. *et al.* Phenotypic characterization of a new Grin1 mutant mouse generated by ENU mutagenesis. *The European journal of neuroscience* **31**, 1281-1291, doi:10.1111/j.1460-9568.2010.07164.x (2010).
- 100 Furuse, T. *et al.* Behavioral and neuromorphological characterization of a novel Tuba1 mutant mouse. *Behavioural brain research* **227**, 167-174, doi:10.1016/j.bbr.2011.11.002 (2012).
- 101 Haijima, A. *et al.* In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. *Neurotoxicology* **31**, 385-390, doi:10.1016/j.neuro.2010.04.004 (2010).
- 102 Krackow, S. *et al.* Consistent behavioral phenotype differences between inbred mouse strains in the IntelliCage. *Genes, brain, and behavior* **9**, 722-731, doi:10.1111/j.1601-183X.2010.00606.x (2010).
- 103 Kalm, M., Karlsson, N., Nilsson, M. K. & Blomgren, K. Loss of hippocampal neurogenesis, increased novelty-induced activity, decreased home cage activity, and impaired reversal learning one year after irradiation of the young mouse brain. *Experimental neurology* **247**, 402-409, doi:10.1016/j.expneurol.2013.01.006 (2013).
- 104 Too, L. K., Ball, H. J., McGregor, I. S. & Hunt, N. H. A novel automated test battery reveals enduring behavioural alterations and cognitive impairments in survivors of murine pneumococcal meningitis. *Brain, behavior, and immunity*, doi:10.1016/j.bbi.2013.09.007 (2013).
- 105 Harrison, F. E., Reiserer, R. S., Tomarken, A. J. & McDonald, M. P. Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze. *Learning & memory* **13**, 809-819, doi:10.1101/lm.334306 (2006).
- 106 Sung, J. Y. *et al.* Learning strategy selection in the water maze and hippocampal CREB phosphorylation differ in two inbred strains of mice. *Learning & memory* **15**, 183-188, doi:10.1101/lm.783108 (2008).
- 107 Harlow, H. F. The formation of learning sets. *Psychological review* **56**, 51-65 (1949).
- 108 Schusterman, R. J. Successive Discrimination-Reversal Training and Multiple Discrimination Training in One-Trial Learning by Chimpanzees. *Journal of comparative and physiological psychology* **58**, 153-156 (1964).

- 109 Schusterman, R. J. Serial discrimination-reversal learning with and without errors by the California sea lion. *Journal of the experimental analysis of behavior* **9**, 593-600, doi:10.1901/jeab.1966.9-593 (1966).
- 110 Bond, A. B., Kamil, A. C. & Balda, R. P. Serial reversal learning and the evolution of behavioral flexibility in three species of North American corvids (*Gymnorhinus cyanocephalus*, *Nucifraga columbiana*, *Aphelocoma californica*). *Journal of comparative psychology* **121**, 372-379, doi:10.1037/0735-7036.121.4.372 (2007).
- 111 van der Plasse, G. & Feenstra, M. G. Serial reversal learning and acute tryptophan depletion. *Behavioural brain research* **186**, 23-31, doi:10.1016/j.bbr.2007.07.017 (2008).
- 112 Clarke, H. F., Dalley, J. W., Crofts, H. S., Robbins, T. W. & Roberts, A. C. Cognitive inflexibility after prefrontal serotonin depletion. *Science* **304**, 878-880, doi:10.1126/science.1094987 (2004).
- 113 Itami, S. & Uno, H. Orbitofrontal cortex dysfunction in attention-deficit hyperactivity disorder revealed by reversal and extinction tasks. *Neuroreport* **13**, 2453-2457, doi:10.1097/01.wnr.0000047687.08940.42 (2002).
- 114 Sonuga-Barke, E. J. The dual pathway model of AD/HD: an elaboration of neuro-developmental characteristics. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **27**, 593-604 (2003).
- 115 Schantz, S. L. & Bowman, R. E. Learning in monkeys exposed perinatally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicology and teratology* **11**, 13-19 (1989).
- 116 Seo, B. W., Sparks, A. J., Medora, K., Amin, S. & Schantz, S. L. Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicology and teratology* **21**, 231-239 (1999).
- 117 Widholm, J. J., Seo, B. W., Strupp, B. J., Seegal, R. F. & Schantz, S. L. Effects of perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on spatial and visual reversal learning in rats. *Neurotoxicology and teratology* **25**, 459-471 (2003).
- 118 Stalnaker, T. A., Franz, T. M., Singh, T. & Schoenbaum, G. Basolateral amygdala lesions abolish orbitofrontal-dependent reversal impairments. *Neuron* **54**, 51-58, doi:10.1016/j.neuron.2007.02.014 (2007).
- 119 Kinoshita, S. *et al.* Effects of rat medial prefrontal cortex lesions on olfactory serial reversal and delayed alternation tasks. *Neuroscience*

- research* **60**, 213-218, doi:10.1016/j.neures.2007.10.012 (2008).
- 120 Onishchenko, N. *et al.* Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **97**, 428-437, doi:10.1093/toxsci/kfl199 (2007).
- 121 Raleigh, M. J., McGuire, M. T., Brammer, G. L. & Yuwiler, A. Social and environmental influences on blood serotonin concentrations in monkeys. *Archives of general psychiatry* **41**, 405-410 (1984).
- 122 Raleigh, M. J. & McGuire, M. T. Bidirectional relationships between tryptophan and social behavior in vervet monkeys. *Advances in experimental medicine and biology* **294**, 289-298 (1991).
- 123 Moskowitz, D. S., Pinard, G., Zuroff, D. C., Annable, L. & Young, S. N. The effect of tryptophan on social interaction in everyday life: a placebo-controlled study. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **25**, 277-289, doi:10.1016/S0893-133X(01)00219-6 (2001).
- 124 Lindzey, G., Winston, H. & Manosevitz, M. Social dominance in inbred mouse strains. *Nature* **191**, 474-476 (1961).
- 125 Blanchard, R. J. & Blanchard, D. C. Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *Journal of comparative psychology* **103**, 70-82 (1989).
- 126 Long, S. Y. Hair-nibbling and whisker-trimming as indicators of social hierarchy in mice. *Animal behaviour* **20**, 10-12 (1972).
- 127 Drickamer, L. C. Urine marking and social dominance in male house mice (*Mus musculus domesticus*). *Behavioural processes* **53**, 113-120 (2001).
- 128 Nyby, J., Dizinno, G. A. & Whitney, G. Social status and ultrasonic vocalizations of male mice. *Behavioral biology* **18**, 285-289 (1976).
- 129 Zink, C. F. *et al.* Know your place: neural processing of social hierarchy in humans. *Neuron* **58**, 273-283, doi:10.1016/j.neuron.2008.01.025 (2008).
- 130 Farrow, T. F. *et al.* Higher or lower? The functional anatomy of perceived allocentric social hierarchies. *NeuroImage* **57**, 1552-1560, doi:10.1016/j.neuroimage.2011.05.069 (2011).
- 131 Robbins, T. W. The 5-choice serial reaction time task: behavioural pharmacology and functional neurochemistry. *Psychopharmacology* **163**, 362-380, doi:10.1007/s00213-002-1154-7 (2002).
- 132 Bari, A., Dalley, J. W. & Robbins, T. W. The application of the 5-choice serial reaction time task for the assessment of visual attentional processes and

- impulse control in rats. *Nature protocols* **3**, 759-767, doi:10.1038/nprot.2008.41 (2008).
- 133 Ikeda, M. *et al.* In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual differentiation. *Toxicology and applied pharmacology* **205**, 98-105, doi:10.1016/j.taap.2004.09.010 (2005).
- 134 Hojo, R. *et al.* Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environmental health and preventive medicine* **13**, 169-180, doi:10.1007/s12199-008-0026-0 (2008).
- 135 Endo, T. *et al.* Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behavioural brain research* **221**, 172-181, doi:10.1016/j.bbr.2011.02.037 (2011).
- 136 Gerlai, R. & Clayton, N. S. Analysing hippocampal function in transgenic mice: an ethological perspective. *Trends in neurosciences* **22**, 47-51 (1999).

9. 補足資料

補足資料 1: マウス行動表現型解析に用いられる主な行動試験系の例 (Crawley, 2007 他)

分類	試験名	内容
自発的行動	ホームケージ活動量試験	赤外線ビームセンサ等を用い、ホームケージ内における単位 定する。
	オープンフィールド試験	正方形のオープンフィールドにマウスを入れ、単位時間当 たりの移動距離や立ち上がり行動等を新奇環境における自 発的活動性・情動性の指標として測定する。
運動機能	ロータロッド試験	マウスを回転するロッド (筒) に乗せ、落下するまでの時 間を四肢の運動協調性の指標として計測する。
	歩行解析試験	透明なトレッドミル上を歩かせ、下から歩行の様子を画像 解析する。
感覚機能	ホットプレート試験	50-55°Cに設定したホットプレートにマウスを乗せ、熱さ に対するの行動 (手・足・尾を上げる等) までの潜時を痛覚 感受性の指標として計測する。
	テールフリック/ポーフリック試 験	尾部/足に熱刺激を加え、尾を振り上げる行動が引き起こ されるまでの潜時を痛覚感受性の指標として計測する。
	テールピンチ試験	尾部に一定の圧刺激を加え、痛みへの反応行動を計測する。
	プレパルスインヒビション試験	大きな音の直前に小さな音を聞かせることによる驚愕反応 の抑制 (プレパルスインヒビション) レベルを評価する。 統合失調症患者で抑制低下が見られる。
記憶・学習	物体再認試験	試験フィールド内で形・色等に特徴の異なるオブジェクト を呈示する。十分に馴化したオブジェクトと新奇なオブジ ェクトへの反応を比較し、物体再認記憶の指標とする。

モリス水迷路試験

円形のプール（マウスの場合、直径 1.2 m、深さ 30 cm 前後）の中を泳がせ、空間記憶・参照記憶を評価する。このプールではミルク等を混ぜて不透明にした水の中を泳ぐため、泳いでいる最中は水面下を見るができない。マウスは四方八方に泳いでいるうち、やがて水面下に隠された唯一足をついて休むことのできる小さなプラットフォームにたどり着く。プラットフォームの位置を常に固定した状態でこの試行を繰り返すと、通常、マウスはプールのどの場所から入れられても、容易にプラットフォームにたどりつくことができるようになる（泳行距離が短くなる）。これは、マウスが試行を繰り返す中で、プラットフォームの空間的位置をプールのまわりの風景（external cue）を頼りに記憶した結果である、と解釈される。さらにその後、プローブトライアルと言われる試行を追加的に行う。このプローブトライアルでは、プラットフォームを取り除いて同様の試行を行っても、マウスがそのプラットフォームのあった位置の付近を、他の位置に比べて長く泳ぐかどうかを指標とし、プラットフォームの空間的位置記憶の保持・想起を確認する。

放射状迷路試験

通常 8 本の放射状に伸びたアーム（通路）の先に置かれた餌を効率的に回収する行動を観察する。一度餌を回収した場所に再び入ると誤反応となる。空間学習、作業記憶試験に用いる。

バーンズ迷路試験

円形のテーブル（直径 120 cm 程度）に複数開けられた穴のうち、マウスの好む暗箱がテーブル下にセットされた穴を探る行動を観察する。空間学習、参照記憶の試験に用いる。

T 字迷路試験

T 字に分岐する 3 方向の迷路を用い、餌のある通路を選択させることで空間記憶、作業記憶、参照記憶試験に用いる。

Y 字迷路試験

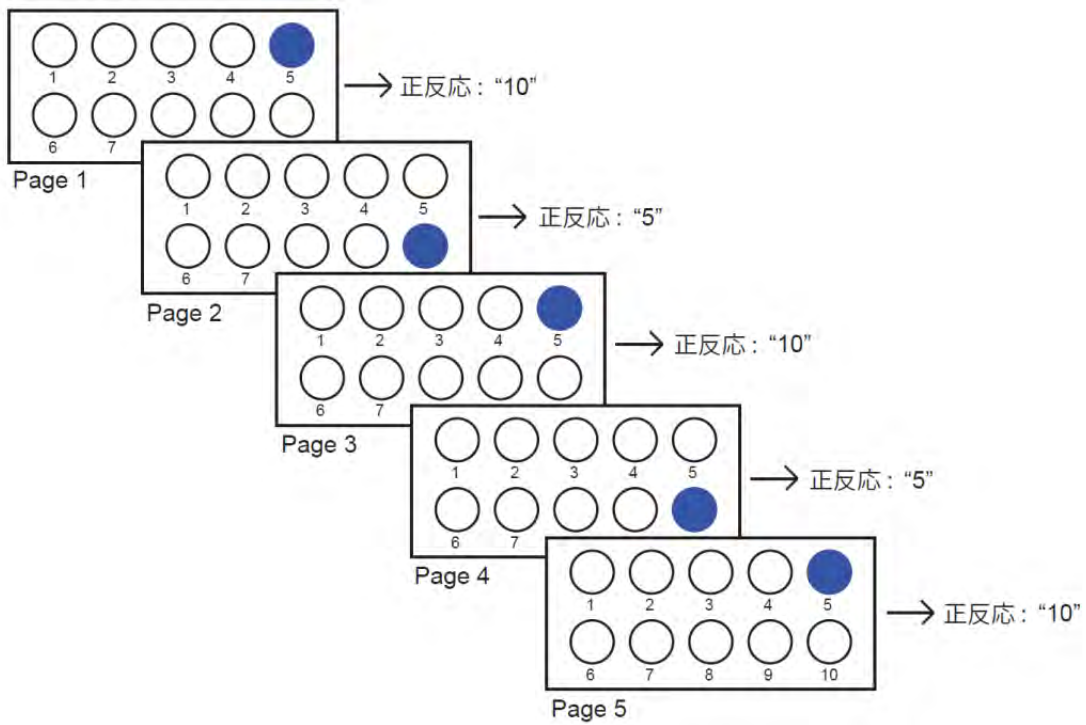
全てのアーム間の角度が等しい Y 字の 3 方向迷路を用い、マウスに探索させる。マウスの習性として異なるアームを

		順番に探索する自発的交替行動を評価し、作業記憶試験に用いる。
	恐怖条件付け試験	環境的文脈ないし音に電気ショックを合わせて呈示し、その後環境的文脈ないし音の呈示だけで恐怖反応が起こるかどうかを観察する。
	レバー押しによるオペラント条件付け課題	チャンバー内に備え付けられたレバーを押すことで報酬を得られるオペラント学習装置を利用した様々な学習試験課題。決められた回数や間隔でレバーを押す課題や、レバーの位置（空間情報）やブザー音、ライト等の感覚情報（条件刺激）とそれらに対する弁別／逆転課題等。
	タッチスクリーン装置を用いたオペラント条件付け課題	チャンバー内に備え付けられたタッチスクリーンを押すことで報酬を得られるオペラント学習装置を利用した様々な学習試験課題。視覚弁別／逆転課題や対連合学習等。
情動行動	高架式十字迷路試験	地上から約 1m 程の高さに設置された十字型の迷路にマウスを置き、4本のアームのうち通路の両側面が壁でおおわれている2本のアームと、覆われていない2本のアームへの単位時間当たりの侵入回数や滞在時間を比較して不安様行動の指標とする。
	明暗箱試験	天井からライトで照らした明るい部屋と、黒い壁で覆った明かりの無い暗い部屋を連結させ、自由に行き来できるチャンバーを用いる。単位時間当たりの明箱と暗箱の侵入回数や滞在時間を比較して不安様行動の指標とする。
	強制水泳試験	マウスの足がつかない深さまで水を入れた円筒状の容器に入れ、単位時間当たりの無動時間を測定し、うつ様行動の指標とする。
	尾懸垂試験	尾部を固定して体を吊るした状態で、単位時間当たりの無動時間を測定し、うつ様行動の指標とする。

社会性行動	3 チャンバー社会性相互作用試験	カゴの中に被験体とは別の個体を入れ、被験体はその個体に行うアプローチ行動や、そのカゴのある部屋（チャンバー）への滞在時間を計測し、他個体に対する興味（社会性）の指標とする。
-------	------------------	--

	居住者—侵入者試験	マウスが自身の縄張りに侵入する他個体に対し攻撃行動を見せる習性を使用した攻撃行動評価の試験。
--	-----------	--

補足資料 2: Brixton Spatial Anticipation Test (van den Berg et al, 2004 より改変)



補足資料 3: 胎仔期 TCDD 曝露による神経細胞移動への影響の評価

[方法: 子宮内胎仔脳電気穿孔法 (IUE) を用いた神経細胞移動アッセイ]

本実験は主に共同研究者の東京大学大学院 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門 西村典子博士、および慶應義塾大学医学部 解剖学教室 (仲嶋一範教授) の久保健一郎博士によって行われた。実験の計画、IUE 施術、組織の薄切、組織解析方法等について、慶應義塾大学医学部 解剖学教室の田畑秀典博士 (現・愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所)、久保健一郎博士から、遠藤俊裕および同研究室所属の Ling Wenting 大学院生、西村典子博士が指導を受けた。本実験には、慶應義塾大学医学部 解剖学教室の実験室・実験機器を利用させていただいた。

日本クレアから購入した妊娠 C57/BL6J 系雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1 kg あたり 0、0.6、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD (コーン油に溶解したもの) を単回経口投与した。2 日後、妊娠 14.5 日目のマウスをネブタール (1 ml/kg 体重) により麻酔、開腹し、取り出した子宮の外側より胎仔の側脳室 (LV) に強制発現 CAGGS プロモーター制御下に GFP 遺伝子配列を持つプラスミド溶液を注入した。その後、30 V、50 m 秒の電気パルス を 4 回与え、終脳背側の脳室帯に集中して限局する神経前駆細胞群に向かって GFP プラスミドを電気穿孔法により導入した (子宮内胎仔脳電気穿孔法、IUE)。その後子宮を体内に戻して閉腹後、体温を下げないよう母体をホットプレート上にて 1 時間程度おいて回復させた後、飼育ケージに戻した (IUE 施術は久保健一郎博士による)。E14.5 日目に GFP 遺伝子を導入された神経前駆細胞から分裂・分化した神経細胞は、やがて脳室帯から皮質板に入り、脳の第 II/III 層へと移動することが知られている。半数以上の GFP 陽性細胞の移動が完了したことが予想される IUE 施術 5 日後に、仔マウスの脳を摘出した。脳サンプルは 4% パラホルムアルデヒドに浸漬固定 (1 日) し、スクロース置換 (10% 溶液に 1 日、20% 溶液に 1 日) を行い、Tissue-Tek OCT compound 中で液体窒素により瞬間凍結し、解析に用いるまで -80°C 冷凍庫で保存した。冷凍した脳サンプルをクライオスタットにより 20 μm 厚の凍結切片をつくり、GFP 陽性細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。脳室帯から皮質板に入り、脳の第 II/III 層へと移動している一次体性感覚野 (S1) 付近の GFP 陽性細胞の分布を定量化するため、脳室から脳表面までの距離を 5 等分し、脳室側から脳表面に向かって bin1-5 と領域を定めた。全ての bin で観察された GFP 陽性細胞に対し、各 bin に発現している GFP 陽性細胞の割合を調べた。

[結果]

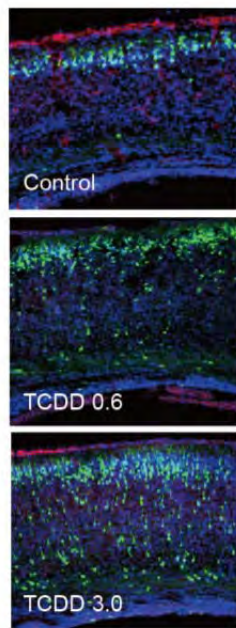
妊娠 C57/BL6J 雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1 kg あたり 0、0.6、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD (コーン油に溶解したもの) を単回経口投与し、2 日後に IUE 法により CAGGS-GFP プラスミドを胎仔脳室に導入した (Figure A)。PND0 の時点で胎仔の脳を固定し、切片を作成した。GFP プラスミドが導入された感覚皮質を解析した結果、対照群では GFP 陽性細胞がほぼ大脳皮質 II/III 層へ移動を終えているのに対し、TCDD-0.6、TCDD-3.0 群はどちらも GFP 陽性細胞がまだ脳室対

側にも広く分布しているようすが見られた (Figure B)。この GFP 陽性細胞の分布を定量するため、脳室から脳表面までの距離を 5 等分し、脳室側から脳表面に向かって bin1~5 と領域を定めた。その結果、bin 1 における対照群の GFP 陽性細胞分布は TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群よりも有意に多く、一方 bin 2 以下の領域では、逆に TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の GFP 陽性細胞分布が対照群よりも高いことがわかった (*, $P < 0.05$, Bonferroni test) (Figure C)。このことから、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群では、胎仔期の脳皮質新生神経細胞移動が遅れていることが示唆された。

A



B



C

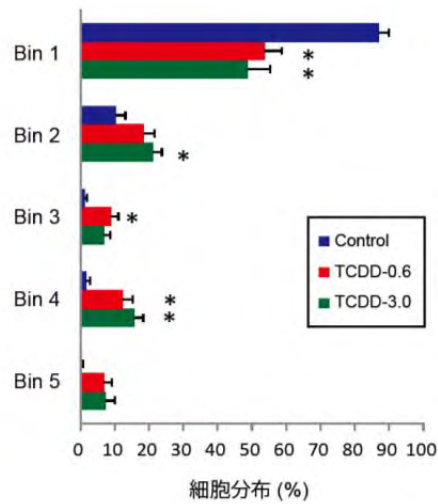


Figure. 胎仔期 TCDD 曝露による大脳皮質新生神経細胞移動への影響。(A) 実験スケジュール。妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに、0 (溶媒のみ)、0.6、ないし 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の TCDD を単回経口投与した。2 日後に IUE による胎仔脳神経前駆細胞群に GFP 遺伝子導入を行った。(B) 出産 0 日目産仔の第一次体性感覚野周辺にて観察された GFP 陽性神経細胞。(C) GFP 陽性神経細胞分布の定量解析結果。緑のシグナルは GFP 陽性細胞、青のシグナルは DAPI 染色された細胞を示す。アスタリスクは対照群からの有意差、エラーバーは標準誤差を示す (n=8)

補足資料 4: 胎仔期 TCDD 曝露による胎仔脳遺伝子発現への影響の評価

[方法 1: マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析]

本実験は東京大学総括プロジェクト機構 総括寄付講座「食と生命」(加藤久典教授)の大学院学生、高橋祥子さんのご指導を受けながら、東京大学大学院 疾患生命工学センター 健康環境医学部門の Ling Wenting 大学院生と共に行った。RNA 抽出以後の実験は「食と生命」の実験室・実験装置を利用させていただいた。データの解析は NutriomiX 株式会社(東京)の DNA マイクロアレイデータ解析コンサルティングサービスを利用して行った。

妊娠 C57/BL6J 系雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1 kg あたり 0、0.6、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD (コーン油に溶解したもの)を単回経口投与し、6 日後の妊娠 18.5 日目に開腹した。各腹の雄の同腹仔の中で体重が中央値になる個体を選び、全脳を摘出した。摘出した全脳サンプルは液体窒素により瞬間凍結し、解析に用いるまで -80°C 冷凍庫で保存した。この全脳サンプルを RNAeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。全脳から抽出した Total RNA を GeneChip® 3' IVT Express Kit (Affymetrix)を用いて、逆転写し第一鎖 cDNA を合成、DNA ポリメラーゼにより第二鎖 cDNA を合成。二本鎖 cDNA を鋳型としてビオチンで標識された cRNA を合成し、洗浄および断片化後、Affymetrix GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array にハイブリダイズした。Fluidics Station 450 (Affymetrix)で洗浄・染色し、レーザースキャナー (Affymetrix Gene Array Scanner 3000) でシグナルを検出し CEL ファイルを得た。ここで得られた CEL ファイルを本件の解析に用いた。CEL ファイルを用いて統計解析ツール R を用いて数値化し、RMA (Robust Multi-array Average) normalizing 4 でノーマライズした。RMA normalizing で正規化後、統計解析ツール R を用いて hclust (Hierarchical clustering, average linkage)でクラスター解析を行った。RMA normalizing で正規化後、統計解析ツール R を用いて RankProducts 2、5 を用いて二群間比較解析(permutation: 200)を行った。FDR (False Discovery Rate)の値が 0.05 未満と判定された発現変動を示すプローブセットを抽出した。上記の基準を満たすプローブセットを DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery ver. 6.7、<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>)へアップロードし、アノテーション解析を行った。上記の基準を満たすプローブセットを Nutrigenomics Database (<http://www.nutrigenomics.jp>) へアップロードし、比較解析を行った。

[結果 1]

経胎盤 TCDD 曝露による大脳皮質新生神経細胞移動の遅れの分子的基盤を探るため、TCDD 曝露胎仔脳の遺伝子発現解析を行った。妊娠 C57/BL6J 雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1 kg あたり 0、0.6、3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量の TCDD (コーン油に溶解したもの)を単回経口投与し、6 日後に胎仔脳(全脳)を摘出した (Figure A)。この全脳サンプルから RNA 抽出を行い、マイクロアレイに

よる網羅的遺伝子発現解析を行った。解析結果から得られた、全遺伝子の発現レベルをヒートマップで表示したグラフを Figure B に示す。FDR (false discovery rate) <0.05、Log ratio>0.2 の条件を満たした発現変動遺伝子数を調べたところ、発現上昇した遺伝子数は TCDD-0.6 群において 7 遺伝子、TCDD-3.0 群において 23 遺伝子見つかった。一方、発現上昇した遺伝子数は TCDD-0.6 群において 54 遺伝子、TCDD-3.0 群において 424 遺伝子見つかった (Figure C)。これらの結果から、周産期 TCDD 曝露により、脳全体においては発現誘導される遺伝子よりも発現抑制される遺伝子の数が多いことがわかった。

胎仔期経胎盤 TCDD 曝露による大脳皮質新生神経細胞移動の遅れは TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の両群で見られたため、対照群に対して FDR<0.05 の条件で TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群の両群において共通して発現変動が見られた遺伝子をリストアップした (Table 1)。その結果、発達障害原因遺伝子である syntaxin binding protein1 (stxbp1)、甲状腺受容体関連因子 thyroid hormone receptor interactor 11 (Trip11) 等が含まれた。

次に、FDR<0.05と判定されたプローブセットをDAVIDにアップロードし、DAVIDの機能アノテーションにより得られた、発現上昇あるいは発現減少を示す遺伝子群の機能カテゴリーを調べた。対照群に対してFDR<0.05の条件でTCDD-0.6群において発現上昇が見られた機能カテゴリーについては、発現上昇したプローブセット数は少なく、アノテーション解析に十分な数が得られなかった。対照群に対してFDR<0.05の条件においてTCDD-0.6群で発現減少が見られた機能カテゴリーでは、alternative splicing、splice variantなどスプライシングに関わるカテゴリーや、presynaptic membrane、synapse part、synaptic transmissionなどシナプス関連のカテゴリー、neuron projection、neuron differentiation、transmission of nerveimpulseなど神経細胞に関連するカテゴリーが上位にリストされた (Table 2)。対照群に対してFDR<0.05の条件においてTCDD-3.0群で発現上昇が見られた機能カテゴリーには、glycosylation site:O-linked (GalNAc...)、bone、immunoglobulin bindingがリストされた (Table 3)。対照群に対してFDR<0.05の条件においてTCDD-3.0群で発現減少が見られた機能カテゴリーには、transcription、transcription regulation、regulation of transcriptionなど転写調節に関わるものや、alternative splicing、splice variantなど転写後発現調節機構にタンパク質の多様性を生み出す選択的スプライシングや、転写後発現調節の鍵を握っているRNA-bindingなどがリストされた。また、bromodomain、bromoなどプロモドメイン関連のカテゴリーが多くリストされた (Table 4)。対照群に対してFDR<0.05の条件でTCDD-0.6群およびTCDD-3.0群に共通して発現上昇したプローブセット数は少なく、機能カテゴリーのアノテーション解析に十分な数が得られなかった。対照群に対してFDR<0.05の条件でTCDD-0.6群およびTCDD-3.0群に共通して発現上昇したプローブセット数は少なく、機能カテゴリーのアノテーション解析に十分な数が得られなかった。対照群に対してFDR<0.05の条件でTCDD-0.6群およびTCDD-3.0群に共通して発現減少した機能カテゴリーには、Neuron differentiationが上位にリストされた。

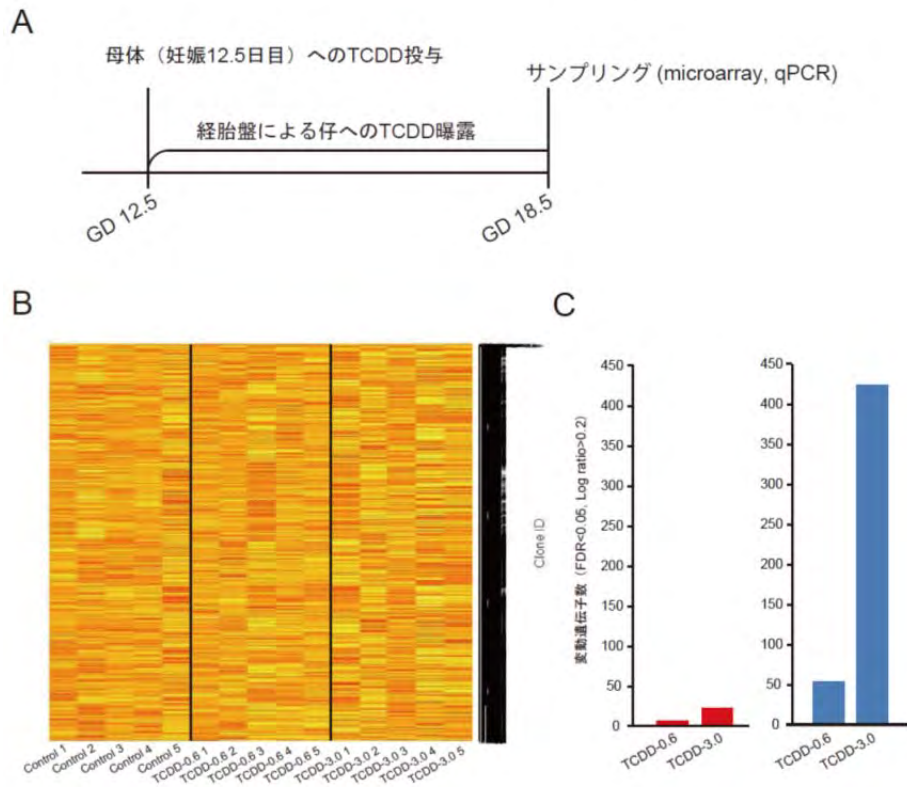


Figure. 胎仔期低用量 TCDD 曝露における胎仔脳の遺伝子発現パターンの変化 1 (マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析結果)。(A)実験スケジュール。妊娠 12.5 日目の C57BL/6J マウスに、0 (溶媒のみ)、0.6、ないし 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の TCDD を単回経口投与した。6 日後、妊娠マウスを開腹して胎仔の全脳を採取した。各群、各腹 1 匹の雄 (同腹の雄個体の中で体重が中央値となるもの) の全脳を 5 匹分集めた。(B) 個体ごとの遺伝子発現パターンのヒートマップ表示。(C)発現量に変動した遺伝子数の比較。対照群に対し、TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群において $\text{FDR} < 0.05$ の有意水準で発現増加が認められた遺伝子数 (左) と発現減少が認められた遺伝子数。

Table 1: TCDD-0.6 群および TCDD-3.0 群で共通して変動が見られた遺伝子

			TCDD-0.6		TCDD-3.0	
			vs 対照群		vs 対照群	
変化	遺伝子名	シンボル	Log ratio	FDR	Log ratio	FDR
Up	Reproductive homeobox 4B	Rhox4B	0.7	0.00	0.9	0.00
	erythroid differentiation regulator 1	Erdr1	0.6	0.00	0.8	0.00
	RIKEN cDNA G530011O06 gene	G530011O06Ri k	0.5	0.00	0.8	0.00
	---	--	0.2	0.02	0.7	0.00
	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	Slc15a2	0.4	0.00	0.3	
Down	---	--	-0.3	0.04	-0.8	0.00
	topoisomerase (DNA) II beta	Top2b	-0.5	0.01	-0.7	0.00
	cancer susceptibility candidate 4	Casc4	-0.4	0.03	-0.7	0.00
	Ral GTPase activating protein, alpha subunit 1	Ralgapa1	-0.4	0.01	-0.7	0.00
	syntaxin binding protein 1	Stxbp1	-0.4	0.05	-0.6	0.00
	zinc finger protein 451	Zfp451	-0.4	0.03	-0.6	0.00
	phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps3	-1.4	0.00	-0.6	0.00
	thyroid hormone receptor interactor 11	Trip11	-0.4	0.03	-0.6	0.00
	---	--	-0.4	0.03	-0.6	0.00
	adenomatosis polyposis coli	Apc	-0.3	0.03	-0.5	0.00

coatomer protein complex, subunit gamma 2, antisense 2	Copg2as2	-0.4	0.04	-0.5	0.00
Expressed sequence C77370	C77370	-0.3	0.03	-0.5	0.00
---	--	-0.4	0.02	-0.5	0.00
Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	Rapgef6	-0.4	0.03	-0.5	0.00
RIKEN cDNA 6330510M09 gene	6330510M09Ri k	-0.3	0.04	-0.5	0.00
phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps3	-1.1	0.00	-0.5	0.00
phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps3	-1.2	0.00	-0.5	0.00
---	--	-0.4	0.03	-0.5	0.00
CD2-associated protein	Cd2ap	-0.4	0.03	-0.4	0.00
pellino 1	Peli1	-0.3	0.04	-0.4	0.00
RIKEN cDNA 1810014B01 gene	1810014B01Rik	-0.3	0.03	-0.4	0.00
RIKEN cDNA A330076H08 gene	A330076H08Ri k	-0.4	0.02	-0.4	0.00
phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 1 /// phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps1///Pisd- ps3	-0.5	0.00	-0.3	0.01
phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps3	-0.5	0.00	-0.3	0.02
phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 1 /// phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd-ps1///Pisd- ps3	-0.6	0.00	-0.3	0.02
---	--	-0.4	0.02	-0.3	0.02
Transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	Tmed7	-0.3	0.04	-0.3	0.01

Zinc finger and SCAN domain containing 21	Zscan21	-0.4	0.04	-0.3	0.03
Ataxia telangiectasia and Rad3 related	Atr	-0.3	0.03	-0.3	0.02
cyclic AMP-regulated phosphoprotein, 21	Arpp21	-0.3	0.04	-0.3	0.04
---	--	-0.4	0.03	-0.3	0.02
phosphatidylserine decarboxylase /// phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 1 /// phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3	Pisd///Pisd-ps1// /Pisd-ps3	-0.4	0.01	-0.3	0.04
---	--	-0.3	0.03	-0.2	0.02
---	--	-0.4	0.04	-0.2	0.05
X-linked lymphocyte-regulated 3A /// X-linked lymphocyte-regulated 3B /// X-linked lymphocyte-regulated 3C	Xlr3a///Xlr3b/// Xlr3c	-0.2	0.03	-0.2	0.00

Table 2: TCDD-0.6 群で発現減少が見られた遺伝子群の機能カテゴリー

Term	Count	P-Value
alternative splicing	19	2.80E-04
presynaptic membrane	3	8.10E-04
splice variant	19	1.10E-03
phosphoprotein	21	2.70E-03
synapse part	4	3.80E-03
synaptic transmission	4	5.10E-03
neuron projection	4	5.70E-03
zinc finger	3	6.60E-03
PIRSF500608:homeotic protein Hox A5	2	7.40E-03
neuron differentiation	5	7.50E-03
cell projection	5	9.90E-03
transmission of nerve impulse	4	9.90E-03

Table 3: TCDD-3.0 群で発現上昇が見られた遺伝子群の機能カテゴリー

Term	Count	P-Value
glycosylation site: O-linked (GalNAc...)	3	1.00E-03
bone	2	3.00 E-03
immunoglobulin binding	2	9.10 E-03

Table 4: TCDD-3.0 群で発現減少が見られた遺伝子群の機能カテゴリー

Term	Count	P-Value
phosphoprotein	188	1.00E-24
alternative splicing	128	1.60E-12
splice variant	128	1.20E-11
nucleus	104	1.30E-08
bromodomain	9	5.40E-08
bromodomain	9	1.50E-07
bromodomain, conserved site	8	5.80E-07
activator	25	1.30E-06
rna-binding	25	1.30E-06
transcription	56	1.40E-06
bromo	9	1.60E-06
transcription	56	1.60E-06
RNA recognition motif, RNP-1	16	1.60E-06
transcription regulation	51	1.70E-06
HECT	7	3.50E-06
regulation of transcription	64	4.30E-06
acetylation	66	5.70E-06
domain:WW 2	7	6.10E-06
domain:WW 1	7	6.10E-06

nucleotide-binding, alpha-beta plait

15

8.50E-06

[方法 2: 定量 RT-PCR]

本実験は東京大学大学院 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門の Ling Wenting 大学院生と共にを行った。妊娠 C57/BL6J 系雌マウスに、妊娠 12.5 日目に体重 1kg あたり 0、0.6、3.0 µg/kg の用量の TCDD（コーン油に溶解したもの）を単回経口投与し、6 日後の妊娠 18.5 日目に開腹した。各腹の雄の同腹仔の中で体重が中央値になる個体を選び、全脳を摘出した。摘出した全脳サンプルは液体窒素により瞬間凍結し、解析に用いるまで -80°C 冷凍庫で保存した。この全脳サンプルを RNAeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 1 µg に対して PrimeScript RT reagent Kit を用いて 20 µl の反応系で逆転写を行った後、4 倍希釈した。定量 RT-PCR 解析は上記逆転写溶液 2 µl に対し 10 µl の Tunderbird SYBR qPCR Mix およびプライマーを 0.3 M となるように加え、20 µl の反応系において LightCycler rapid thermal cyclers system により PCR 反応を行った [Denature: 95°C, 30 秒 → Quantification: (95°C, 30 秒 → 60°C, 30 秒) × 40–45 サイクル]。蛍光の検出は 60°C の伸長反応の各サイクルの最終段階で行った。定量は $\Delta\Delta Ct$ 法で行い、補正にはハウスキーピング遺伝子として 18S もしくは GAPDH を用いた。定量 RT-PCR に使用したプライマーセットは下記 Table に示した。

[結果 2]

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析で得られた情報を下に、特に重要と考えられる遺伝子の発現変動レベルを個々に定量的 PCR 法により確かめた。その結果、群間で統計学的に有意な差が検出された遺伝子が 6 つ見つかった（下記 Figure）（*, $P < 0.05$, Bonferroni test）。まず、従来 TCDD 曝露により、核内受容体であるアリアルヒドロカーボン受容体（AhR）を介して発現誘導が起こることが知られている *cyp1a1*、*cyp1b1*、*Ahr* の 3 遺伝子の発現が、対照群と比較して TCDD-3.0 群で有意に上昇していた。また、先行研究により周産期 TCDD 曝露により胎仔脳で発現が上昇することが知られていた *Pf4* 遺伝子の発現が、対照群と比較して TCDD-3.0 群で有意に上昇していた。ドーパミン産生細胞の発生・分化に必要とされる *Pitx3* は、対照群と比較して TCDD-3.0 群で有意に減少していた。機能は未知だが、マイクロアレイ解析において TCDD-0.6 群において強く発現変動が確認されていた *Pisd-ps3* (phosphatidylserine decarboxylase, pseudogene 3) は、対照群と比較して TCDD-0.6 群で有意に減少していた。

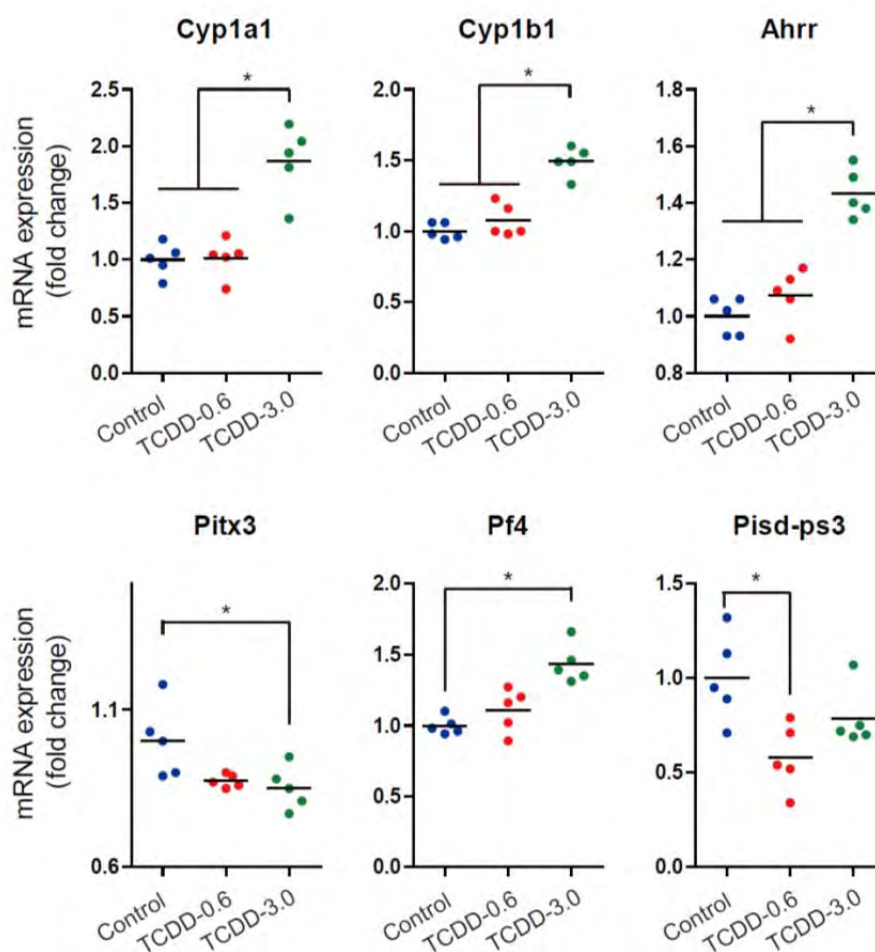


Figure. 胎仔期低用量 TCDD 曝露における胎仔脳の遺伝子発現パターンの変化 1 (定量 PCR 解析結果)。qPCR により、対照群に対して発現量の有意な変化が認められた遺伝子群。アスタリスクは群間の有意差を示す ($p < 0.05$, Bonferroni の多重比較検定による)。ハウスキーピング遺伝子として 18S を用いた。

Table: プライマー情報

Gene	Primer	Sequence (5'->3')	Length	Tm	Product length
Cyp1b1	Forward	GGAAGAAGGGTACAAGCCAGGAA	23	62.15	136
	Reverse	TCTGAGGAACATGGTGAGCAGCAAA	25	64.70	
Erdr1	Forward	TGATGTCACCCACGAAAGCA	20	59.89	135
	Reverse	GTGAGAATCGCTCCGTCCTG	20	60.53	
Stxbp1	Forward	GGAGCGGAAGGAGCGTATCA	20	61.74	130
	Reverse	GCGGGTAGAGATGTATGGGTAG	22	59.51	
Ahrr	Forward	GGAAGTCCCTATGTTCTCTGCC	22	60.16	146
	Reverse	AGTGTCCACAAAGCCTGACC	20	60.18	
Mid1	Forward	GTGGTGACAGAGGAGAATGCCG	22	63.18	96
	Reverse	CAAACAGCGACGAGCAGTCAA	21	61.72	
Top2b	Forward	ATGATGCTGGTGGCAAACATTC	22	60.09	117
	Reverse	AGACTCCATATCTGTCCCTACCAA	24	60.08	
Trip11	Forward	TGACAGAGATAAGTCGGCGGCA	22	63.73	103
	Reverse	ACCGTAACTCCTGAGCCACCTTG	23	64.31	
Apc	Forward	GGCAGAGTCCCTCACAGAATGAAA	24	62.62	109
	Reverse	GGATAACTGGTGTCTGGCTTCTTG	25	61.83	
Hoxa5	Forward	GACCCTGGAGCTGGAGAAAGAA	22	61.68	90
	Reverse	TCGGAGAGGCAAAGGGCATGAG	22	64.60	

Ralgapa1	Forward	GCTGCTAGTTTGGTTTCCAGAGAAGA	26	63.13	109
	Reverse	GCTCCGTGAGAGTGCTTGTG	20	61.29	
Malat1	Forward	CGGTGCGGTAACATTCCTTGA	21	60.94	116
	Reverse	CTTTACACAGAAGCCTACAACCTCCC	25	61.31	
Cdkn1b	Forward	GAAGAAGCGAGTCAGCGCAA	20	61.28	81
	Reverse	CACCTCCTGCCACTCGTATC	20	59.90	
Kif2a	Forward	GTCCACGAACCCAAACAGAAAG	22	59.97	121
	Reverse	GCCTAGCAGTAAACCTGTAAACCA	24	60.80	
Cdkl2	Forward	TGAGGTCAAAGATGCAGAAGCAG	23	61.12	146
	Reverse	GAAAGAAGTCATGGCGCAGAAG	22	60.16	
Slc15a2	Forward	GCTCTGGGAACAGGAGGTATCAAA	24	62.15	113
	Reverse	ATGGAGAGGTAGAAGACCGAGAA	23	60.05	
Mdga2	Forward	GCCTTTAATGAGCCCAATGACC	22	59.90	89
	Reverse	GCAAAGCATCAGTATCAAACGCA	23	60.67	
Rhox4	Forward	TCCAGCAGAATCACTTCATCCGT	23	61.95	80
	Reverse	CATAACTCTGGCTTCACTCACACC	24	61.39	
Trip12	Forward	ACGAGGGCCAAGAAGGCCAA	20	64.26	109
	Reverse	TGCCAGGAAGGAAGATTTAGGTGA	24	61.56	
Pf4	Forward	CTGGTCCCGAAGAAAGCGATG	21	61.34	116
	Reverse	ACAGTGGCGTCTGCCTTGA	20	64.20	
Pisd-ps3	Forward	GGTGGAACAGGTAAAGGGCGA	21	62.33	149

	Reverse	AGTGGTAGAGCGCATTCCCTTCTTG	25	64.82	
Ube3a	Forward	CGGAAAGTCAAACAGCACACA	21	59.60	113
	Reverse	TCTTCCATAGCAGCAGCAGAAC	22	60.68	
G530011O06Rik	Forward	TTAGGCACAGGCATCGGAAC	20	60.39	115
	Reverse	CAGCATTTCCGGTGAAGCAGG	20	59.83	
Gh	Forward	AAAGAGTTTCGAGCGTGCCTAC	21	60.67	140
	Reverse	AGCAATTCATGTTCGGTTCTCTG	23	61.18	
Vav3	Forward	GGAGTGGAGTCAGCCATCTC	20	59.54	134
	Reverse	ATTGGAACGACCAGCAAATC	20	56.70	
Atm	Forward	AGCTCCAGACAGAAGAAGATGCAAG	25	62.82	161
	Reverse	CAGTCAGCTCCATACGTTAGACC	23	60.49	
Xlr3b	Forward	CTAACAGAGAAGTCCTTGATGCTGG	25	61.14	105
	Reverse	CTTCGAATTCTTGACCAAGTCCTG	25	61.82	
Atrx	Forward	TATGAGTTTCCTGTCTCCTGGCAC	24	62.14	80
	Reverse	GCAACAGGATGAAGCACCAGCA	22	63.19	
Mbn1	Forward	CCCTCAGCCACAAGACATCC	20	60.39	121
	Reverse	ATCACCTCAGCACAAATACCAACT	24	60.51	
Mbn2	Forward	TCCAGCGAGGAAACTGTGCC	20	62.73	96
	Reverse	CGTTACGGTGTTCGTTTG	21	60.33	