

原 著

ラット脳発育期に母体を介して
スチレン曝露を受けた仔の行動への影響相川 浩幸¹⁾ 木ノ上 高章¹⁾ 吉田 貴彦²⁾
香山 不二雄³⁾ 坂部 貢⁴⁾

- 1) 東海大学医学部環境保健学部門
- 2) 旭川医科大学衛生学教室
- 3) 自治医科大学環境衛生学教室
- 4) 北里研究所病院臨床環境医学センター

Behavioural change in the pups produced by perinatal
styrene exposure during their brain development stageHiroyuki Aikawa¹⁾ Takaaki Kinoue¹⁾ Takahiko Yoshida²⁾
Fujio Kayama³⁾ Kou Sakabe⁴⁾

- 1) Department of Environmental Health, Tokai University School of Medicine
- 2) Department of Hygiene, Asahikawa Medical College
- 3) Department of Environmental Health, Jichi Medical School
- 4) Environmental Medical Center, Kitasato Institute Hospital

要約

産業職場を始め、一般家庭内における広範囲の製品材料に使用されているスチレンの中枢神経系への影響を検討した。

実験は THA ラットを用い、妊娠9日より出産後28日まで、母親に0.7mg/日および0.07mg/日のスチレンを投与した。

その結果、体重や一般発育分化にはスチレン投与の影響はみられなかったが、成長過程中的自発行動では明らかな行動量の増加が認められた。また、学習行動においても明らかな回避能力の低下が認められた。

ラットの脳発育期間のスチレン投与は、従来の研究報告の投与量以下でも、出生仔の成長過程の自発行動および成長後の学習行動に変化をきたす中枢神経系への影響を認めた。(臨床環境10:33~41, 2001)

Abstract

We investigated effects on CNS of styrene, which is used in goods and materials in industries as well as our houses.

Two doses (high: 0.7mg/day and low: 0.07mg/day) of styrene were administered to dams from gestational

受付: 平成13年3月26日 採用: 平成13年4月23日

別刷請求宛先: 相川浩幸

〒259-1193 伊勢原市望星台 東海大学医学部環境保健学部門

Received: March 26, 2001 Accepted: April 23, 2001

Reprint Requests to Hiroyuki Aikawa, Department of Environmental Health, Tokai University School of Medicine, Bohseidai, Isehara, Kanagawa 259-1193 Japan

Day 9 to postnatal Day 28. The results showed that there were no significant difference among three groups in pup growth and surface differentiation such as pinna detachment, incisor eruption, and eye opening, However behavioral observation showed that spontaneous motor activity was increased and Sidman avoidance ability was poorly impaired in pups from high concentration group dams. We clarified that the concentrations used in this study, which were more diluted than those in other reports, had effects on spontaneous moving and learning ability, both of which were governed by CNS. (Jpn J Clin Ecol 10 : 33~41, 2001)

《Key words》 CNS, styrene, spontaneous motor activity, open-field, Sidman avoidance

I. 緒言

スチレンは製造工場において、有機物質の溶剤、ガラス繊維とともにスチレンを重合させたバスユニットやグラスポートなどの FRP (繊維強化プラスチック) 製品、またカップラーメンの容器等に使用されているポリスチレン製品の材料、クッションや断熱剤として使用される発砲スチロール製品など広範囲に一般家庭内の製品材料に使用されている。このスチレンは環境庁 (現・環境省) によって、外因性の内分泌攪乱化学物質にとりあげられた化学物質の 1 つでもあった。

一般に内分泌攪乱化学物質に関する報告は内分泌系が研究の主体となるのは当然である。生体影響は単に内分泌系のみではなく、内分泌系-免疫系-中枢神経系との相互関係が強いことが知られているにもかかわらず、内分泌系や免疫系の研究に比較して中枢神経系に関する研究報告は少ないこと、さらに、内分泌攪乱化学物質の生体影響が曝露を受けた者だけに止まらず、特に細胞分化の盛んな妊娠時期での影響が大きい点も問題となっているにもかかわらず、この周産期の中枢神経系の研究報告は少ないことが挙げられる。

我々は、産業分野で取り扱われている化学物質の中枢神経系影響を学習行動を始めとする行動学的手法を用いて評価してきた⁵⁻¹²⁾。しかし、我々も以前の学習行動実験では一般市販の成熟動物を使用して評価していた^{5,6)}。この理由には、有害物質による生体影響の評価は曝露前後の行動変化の差より判定するため、曝露前値を得る必要があり、そのためには動物は成熟もしくは安定した状態でなければならぬ。また、より低濃度曝露の次世代への影響評価の研究においては、通常の動物を用いた行動学実験では動物の個体差が大きい

ので、有害化学物質による生体影響が隠蔽されるため、評価をするのは困難であることが挙げられる。これらが行動学を用いた中枢神経系の報告が今日まで少なかった理由であろう。そこで、東海大学医学部環境保健学部門では、Wistar 系ラットを母系とし、20年以上の育成によって、生得的に回避学習行動試験に対して高い回避能力を有し、かつ個体差の少ないラット (これを Tokai High Avoider : THA ラットと名付けた) を作成した¹³⁾。本実験研究ではこの THA ラットを用い、ラットの脳発育期間にスチレンを曝露し、出生した仔の成長過程の自発行動および成長後の学習行動からスチレンの中枢神経系への影響を検討した。

II. 方法

1. 実験動物

実験動物は東海大学医学部環境保健学教室において、JcL-ウィスター系ラットを母系とし、シドマン型電撃回避学習試験で電撃の回避率95%以上を得た兄妹間で交配する操作を繰り返して作成した48世代の THA ラットを使用した。本実験の交配は10週齢の雌雄ラットを1対1で昼夜同居させ、交配の確認をプラグにて行った。なお、妊娠日齢はプラグ確認日を妊娠0日とした。

動物の飼育は、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ の環境下で、8:00-20:00を明期、20:00-8:00を暗期の照明条件とした動物室内に、クリーンラック (日本クレア社; 東京) を設置し、この中で行った。餌は CE-2固形飼料 (日本クレア社; 東京)、水は水道水を open-field 試験および回避学習試験の実施時間を除き自由に与えた。

2. スチレン投与

スチレンの投与はオリーブ油で希釈した試薬スチレンをシリコンチューブに充填し、両端をシリコン樹脂で封入したチューブを妊娠確認した雌ラットの背部に、ハロセン麻酔下で埋め込む方法で行った。投与期間は外部環境の影響を受けやすいラットの脳発育時期である妊娠9日目から母体を介し胎児に、また出生後は母乳を介し生後28日の離乳までの計40日間行った。この時の母親への投与量はスチレン0.7mg/日(高容量群)相当とスチレン0.07mg/日(低容量群)相当であった。対照群にはオリーブ油のみを充填したシリコンチューブをスチレン投与群と同様にラットの背部に埋め込んだ。

3. 発育観察

一般発育の観察は、発育分化の指標としての耳介展開、歯牙萌出、眼瞼開裂を、それぞれの分化が確認するまで毎日2回、同時刻に行った。また、体重測定は生後1週齢から10週齢まで週1回、午前中に行った。

4. 自発行動試験

自発行動試験は生後28日齢に open-field 試験、生後35日齢以降に Animex 試験を行った。

open-field 試験は Petit ら¹⁴⁾の装置の一部を改良した自作装置を用いた。すなわち、不透明なアクリル板を用いて、フィールド面上を16分割に施した1m×1mのオープン・フィールドに25cm×17cmの部屋(start box)を設け、それらの周囲を高さ40cmの壁とした装置である。

試験はラットを start box に入れてから3分間の行動観察(潜時; start box からフィールドに出るまでの時間、歩行量; 分割線をまたいだ数、立ち上がった回数、洗顔した回数、毛繕いした回数、脱糞数、排尿数)を行った。

Animex (SE-type: 室町科学株式会社; 東京)装置は、電磁誘導を発生させ、ラットが磁力線を横切るとカウントされる機器である。

測定はラットを入れた飼育用プラスチックケージを Animex 装置の上部に設置し、36時間の行動量を計測した。なお、動物を装置に入れた時、日内変動に伴って生ずる行動以外の、新規環境に対

する探索行動等による行動量の増加が加わる可能性を除くため、安定した行動をするであろう後半24時間を行動量として評価した。

5. 学習行動試験

学習行動試験の装置はスキナー箱、ミニコンピュータおよび記録部から成るオペラント行動測定装置(BRS/LEV社製; 米国)を用いた。

スキナー箱は床に4本1組とした電撃刺激を発生するグリッドが、側壁には電撃を回避するためのレバーが設置してある。スキナー箱は外部環境の影響を防ぐため、蛍光灯と換気扇を備えた防音箱に入れた。

シドマン(Sidman)型電撃回避学習のスケジュールは反応-刺激間隔30秒、刺激-刺激間隔5秒、電撃刺激はDC100V, 0.2mAを0.5秒間とした条件で行った。実験は生後49日齢以降より1試行/1日、60分/1試行を10試行行った。なお、同一ラットは同時刻に学習試験を行うよう配慮した。

本実験のスケジュールを Fig 1 に示した。

III. 結果

1. 実験動物

妊娠から離乳期間までの母親の体重(Fig 2)および飲水量(Fig 3)、および出生から実験終了までの出生仔の体重(Fig 4)は、対照群、低容量群および高容量群のいずれの群間においても明らかな差がみられなかった。

2. 発育状態

発育分化(Table 1)は耳介展開、歯牙萌出および眼瞼開裂のいずれも、3群間に有意な差がみられなかった。なお、表中の仔ラットの匹数が耳介展開と歯牙萌出、眼瞼開裂の間で異なっているが、耳介展開の観察終了時に母親1腹当たりの仔数を最大8匹に揃えたためである。

3. 自発行動

授乳期間中の飼育において、対照群では仔同士が“身を寄せ合う”行動に対して、高容量群では“お互いに離れる”行動が観られた(Fig 5)。

open-field 試験では、潜時、歩行量、立上り回数、洗顔回数、毛繕い回数、脱糞数、排尿数のい

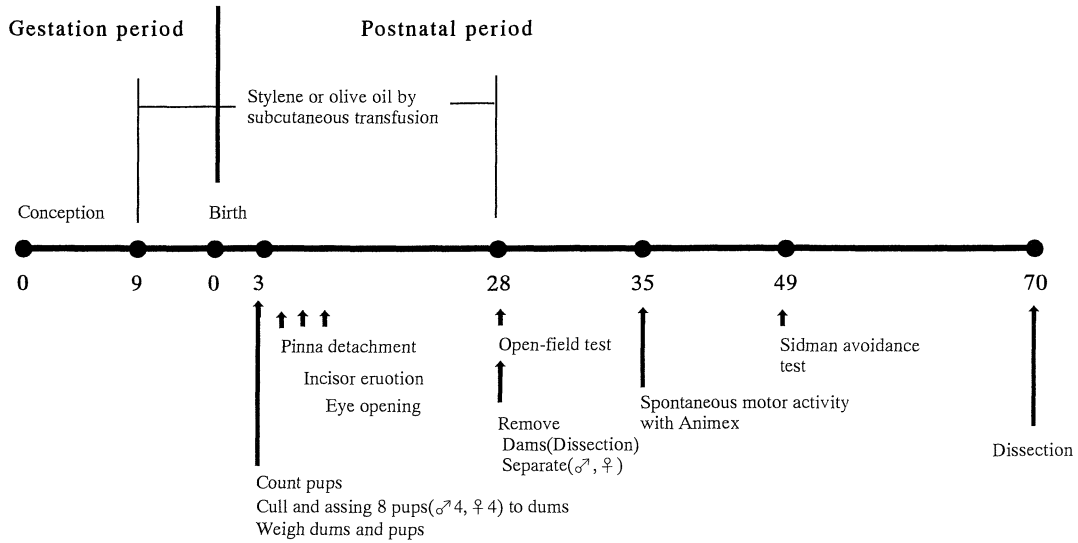


Fig 1 Protocol of experiment

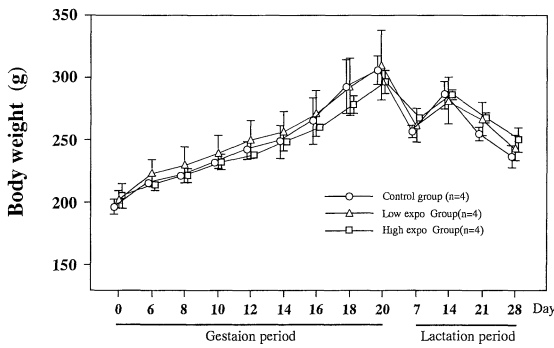


Fig 2 Body weight changes of control and styrene exposed dams during gestation and lactation stage. Values are mean with SDs.

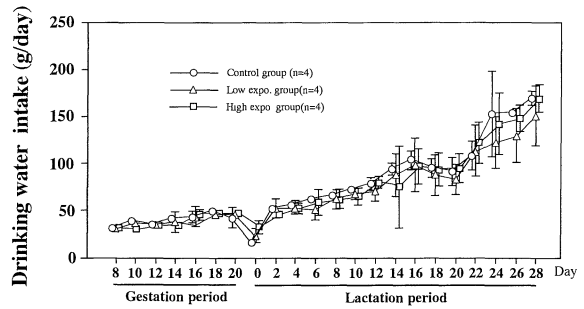


Fig 3 Drinking water intake of control and styrene exposer groups. Values are mean with SDs.

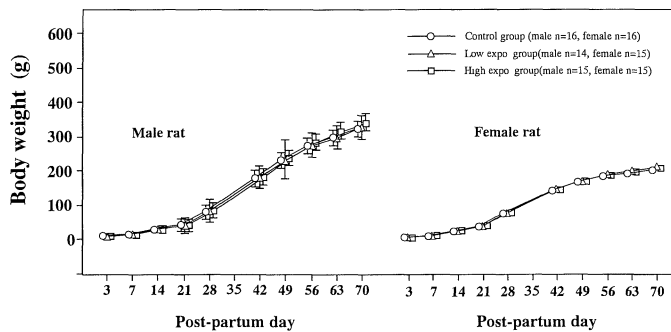
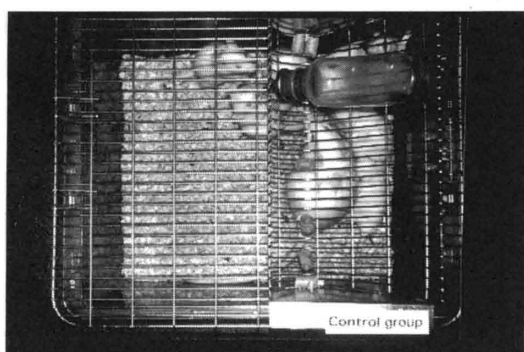


Fig 4 Body weight increase curves of control and styrene exposed male and female rats. Values are mean with SDs.

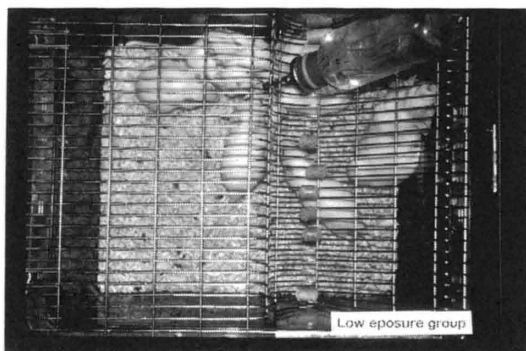
Table 1 Incidence time (day) of developmental signs in THA rats exposed to styrene and olive oil (control)

	Control group	Low exposure group	High exposure group
Pinna detachment	3.02±0.47(44)	2.98±0.48(41)	2.84±0.57(38)
Incisor eruption	10.28±2.05(32)	10.10±1.98(29)	10.30±2.78(30)
Eye opening	14.41±2.62(32)	14.55±2.16(29)	14.80±2.73(30)

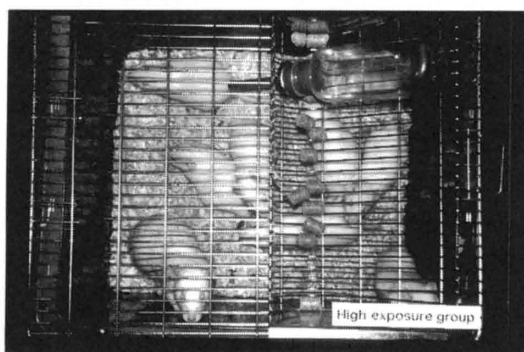
(): number of offspring.
Values are means with SDs.



5a



5b



5c

Fig 5 Views of the breeding cages of rats during lactation period from above. Notify the distance between the dam and pups.

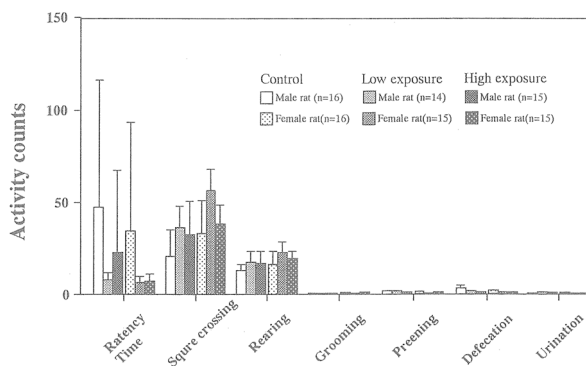


Fig 6 Activity counts of male and female rats of THA strain in the open-field for 3 min. Values are means with SDs.

ずれの観察項目とも、対照群とスチレン投与群の間には、明らかな差がみられなかった (Fig 6)。

Animex による24時間の行動量は、雄ラットでは、高容量群が他の2群と比して消灯時の行動量が多い傾向がみられるものの、明らかな差は3群間で認められなかった (Fig 7)。雄ラットでは、ラットの活動期に当たる消灯時において、高容量群が他の2群に比して行動量が有意に多かった (Fig 8)。

4. 学習行動

学習行動実験は各群とも無作為に半数の仔を抽出して行った。試行60分の成績を前後半30分毎に分けて評価した結果、雄ラットでは、後半30分の被ショック数には3群間に差がみられなかった (Fig 10)が、前半30分の被ショック数では、5、6、9、10試行目において、対照群に比して高容量群は明らかな増加がみられた。また、9試行目においては低容量群に比しても高容量群の明らかな増加がみられた (Fig 9)。雌ラットにおいても、

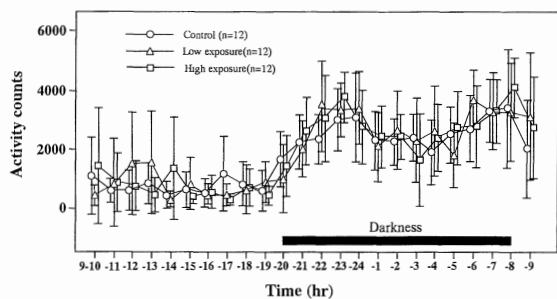


Fig 7 Hourly spontaneous motor activities in male rats of THA strain for 24 hr. Values are mean with SDs.

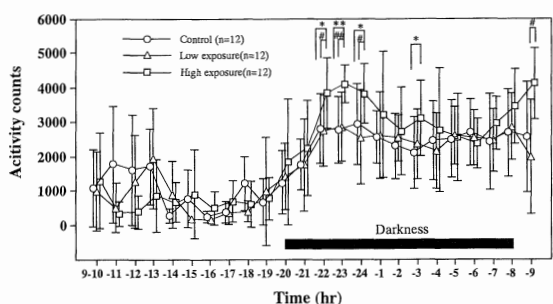


Fig 8 Hourly spontaneous motor activities in female rats of THA strain for 24 hr. Values are mean with SDs. Significant difference between control group and high styrene exposure group (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$) Significant difference between low styrene exposure group and high styrene exposure group (#: $p < 0.05$, ##: $p < 0.01$)

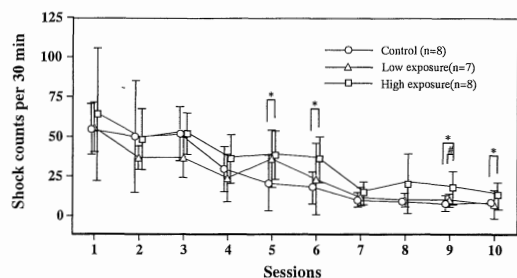


Fig 9 Shock counts of male THA rats exposed to styrene and olive oil (control) during brain development in the first 30 min of the one hour test. Values are mean with SDs. Significant difference between control group and high styrene exposure group (*: $p < 0.05$). Significant difference between low styrene exposure group and high styrene exposure group (#: $p < 0.05$).

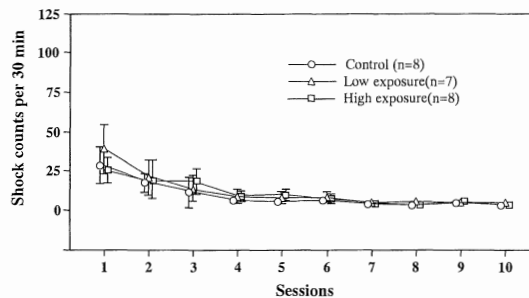


Fig 10 Shock counts of male THA rats exposed to styrene and olive oil (control) during brain development in the latter 30 min of the one hour test. Values are mean with SDs.

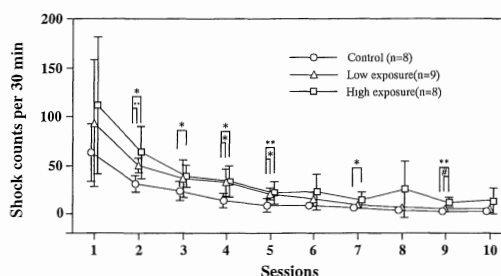


Fig 11 Shock counts of female THA rats exposed to styrene and olive oil (control) during brain development in the first 30 min of the one hour test. Values are mean with SDs. Significant difference between control group and styrene exposure groups (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). Significant difference between low styrene exposure group and high styrene exposure groups (#: $p < 0.05$).

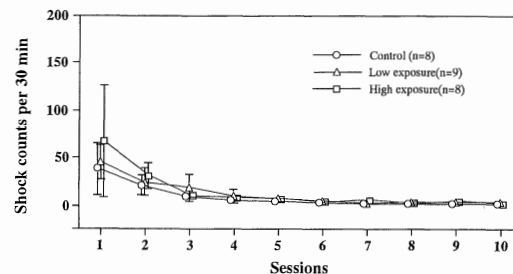


Fig 12 Shock counts of female THA rats exposed to styrene and olive oil (control) during brain development in the latter 30 min of the one hour test. Values are mean with SDs.

雄と同様、後半30分では3群間に差がみられなかった(Fig 12)が、前半30分では、高容量群の被ショック数は2、3、4、5、7、9試行目において対照群に比して明らかな増加がみられた。また、2、4、5、9試行目では低容量群と比しても高容量群のショック数は明らかな増加がみられた(Fig 11)。

IV. 考察

今回の実験で投与したスチレン量は産業職場で定められている許容濃度(50ppm)に7時間曝露を受けたとした1日当たりのスチレン摂取量の約13 mg/kgに対して、低容量群では1.7/100倍(0.23mg/kg)、高容量群では1.7/10倍(2.3mg/kg)に該当する。また、カップラーメン等のポリスチレン容器から溶出する量(煮沸水200ml 5分間放置中の量)の1日平均摂取量(1日1杯、全汁を飲むとする)は約0.18~0.03 μ g/kg¹⁵⁾に対しては、低容量群では1300~7000倍、高容量群では13000~70000倍に該当する比較的低投与量の実験を行った。この結果、

1. 発育について

親の体重変化、飲水量および出生日(妊娠期間)、出生時の体重に差異がみられなかった。また、出生仔の一般発育分化や体重増加においても3群間に明らかな差異はみられなかった。これらの結果は、妊娠7日から21日の期間に約300ppmのスチレンを6hr/日曝露したChen BQらの研究で妊娠期間には影響がなかった報告³⁾と同様であった。また、本研究の高容量群の約10倍に該当する50ppm曝露では明らかな差はみられないが、300ppm曝露では一時期体重増加の抑制や一般発育分化の遅延がみられた報告⁴⁾とも一致性がみられた。さらに、約100倍以上のスチレンを経口投与した仔の体重に影響がみられなかった報告²⁾などから、周産期における0.07mg/日あるいは0.7mg/日のスチレン投与量は、妊娠中の胎仔や出生後の仔の一般発育に対する影響はないものと推測される。

2. 自発行動について

飼育期間中の一時期において、齧歯目鼠科の集団飼育で一般に観察される授乳、摂食や摂水時以

外は“お互いの身を寄せあって休眠する”行動特性を示す(Fig 5a)が、高容量群では“身体が触れ合わないよう離れた状態での休眠”を示す行動をとっていた(Fig 5c)。また24時間の自発行動量においては、高容量群の雌が対照群や低容量群より多く、特に夜間では明らかであった(Fig 8)。スチレン曝露を受けた母親から出生した仔の行動量が増加する結果は、本研究の投与量より高濃度の実験²⁻⁴⁾ではあるが行動量が増加する同一性を得た。さらに、初めての環境に入れたとき、ラットが示す探索および情動行動が観察されるopen-field試験においても、自発行動に影響する外部環境等(照度^{16,17)}、騒音^{16,17)}、飼育中のhandling¹⁸⁾、性差¹⁹⁾、等)を同一に実験を行い、外部環境をできる限り除外した。この結果、本実験では対照群に比して曝露群の潜時の減少、行動量および立上り回数の増加傾向があるものの、明らかな差はみられなかった(Fig6)。

Kishiらの300ppm群の初回実験において歩行量、立上がり回数が有意に増加した結果⁴⁾とから勘案すると、0.07または0.7mg/日のスチレン投与量は新しい環境への探索行動や情動性への影響が少ないと思われる。しかしながら、本実験の高容量群の約50倍量のopen-field試験で活動量の増加が見られたり⁴⁾、情動行動に変化がみられた報告³⁾がある。さらに、約50倍量の実験では亢進する報告¹⁾のごとく、スチレンの自発行動への影響は行動を亢進する多動性を示し、投与量が高まればその傾向はより強くすることが推察される。

3. 学習行動について

スチレン投与中止21日後に実施した60分間の電撃回避学習試験において、試行が進むにつれ各群ともに被ショック数は減少していた。また、前半30分の回避成績では被ショック数が投与量に比例した増加傾向がみられ、その増加は高容量群では対照群に比して有意であった。この結果は、60分間の学習試験を繰り返し実施することにより電撃からの回避する方法を学習し、各群ともに被ショック数は試行数とともに減少してきている。しかし1日の試行成績を前後半に分けて検討すると、各群ともに被ショック数は後半に比して前半の方が

多く、また、その被ショック数はスチレンの投与量に比例して多かった。このような結果は前日に得た学習が翌日の学習試験開始時に完全に想起されず、何回か被ショックを受けた後に回避法を想起したため、後半30分の被ショック数は前半30分の被ショック数より低値を示したと考えられる。従って、各群ともに前半30分の被ショック数は前日の学習能力に応じた被ショック数である。一方、約10倍以上の投与した学習試験で明らかな影響がみられなかった報告⁴⁾もあるが、学習スケジュールの違いもあるものの、実験動物の学習成績の個体差の大ききことが大きな理由として考えられる。以上の結果から、妊娠および授乳期における0.07 mg/日、0.7mg/日のスチレン投与は回避学習への影響があることが明らかにされた。

V. 結論

比較的低容量のスチレン曝露を受けた母体は成長後の仔に対して、活動性を高める自発行動への影響および回避学習行動に影響を与えることが明らかになった。

本研究の一部は文部科学省科学研究費（基盤C）ならびに特定非営利活動法人日本子孫基金の研究助成によって行われた。

文献

- 1) Savolainen H, Helojoki M, et al: Behavioural and glial cell effects of inhalation exposure to styrene vapour with special reference to interactions of simultaneous peronal ethanol intake. *Acta Phamacol Toxicol* 46: 51-56, 1980
- 2) Zaidi NF, Agrawal AK, et al: Effect of gestational and neonatal styrene exposure on dopamine reseptors. *Neurobehav Toxicol Teratol* 7: 23-28,1985
- 3) Chen BQ: The effects of inhalation of styrene on the neurobehavior in the offsprings. *Chung Hua Yu Fang 1 Hsueh Tsa Chih* 23: 342-345, 1989
- 4) Kishi R, Chen BQ, et al: Effect of prenatal exposure to styrene on the neurobihavioral development, activity, motor coordination, and learning behavior of rats. *Neurotoxicol Teratol* 17: 121-130, 1995
- 5) Shigeta S, Misawa T, Aikawa H: Effect of lead on operant behavior in rats. *Tokai J Eep Clin Med* 2: 153-161, 1977
- 6) Shigeta S, Aikawa H, et al: Effect of single exposure to toluene on Sidman avoidance response in rats. *J Toxicol Sci* 3: 305-312, 1978
- 7) Shigeta S, Aikawa H, et al: Learning impairment in rats following low-leveltoluene exposure during brain development -A comparative study of high avoidance rats and wistar rats-. *Ind Health* 24: 203-211,1986
- 8) 相川浩幸、鈴木久美子他：高電撃回避ラットの周産期および出生後に投与した鉛の学習に及ぼす影響。産業医学28：428-437、1986
- 9) 鈴木久美子、三沢哲夫他：ラットの発育および学習行動に及ぼす出生前 Trimethyltin 暴露の影響。産業医学31：363-371、1989
- 10) Shigeta S, Miyake K et al: Effect of postnatal low-level of exposure to styrene on behavior and development in rat. *J Toxicol Sci* 14: 279-286,1989
- 11) 相川浩幸、三宅久美子他：一酸化炭素一回曝露の学習行動影響にみられる性差。産業医学32：26-32、1990
- 12) Furuya H, Aikawa H, et al: Effects of ethyl alcohol administration to rat dams during the gestation period on learning behavior and on levels of monoamines and metabolites in rat pup brain after biath. *Environm Health Prev Med* 1: 87-93,1996
- 13) Shigeta S, Miyake K, et al: A new inbred rat strain "THA". *Rat News Letter* 23: 9-11, 1990
- 14) Petit Ted, Alfano Dennis: Defferential experience following developmentallead exposure; Effects on brain and behavior. *Pharmacol Bioche Behav* 11: 165-171, 1978
- 15) 日本食品分析センター資料、スナックめん容

- 器温湯抽出液の揮発性成分 1998. 3
- 16) Archer J : Tests for emotionality in rats and mice; A review. *Anim. Behav*21: 205-235, 1973
- 17) Barlow SM Sullivan FM: *Behavioural teratologh • Teratorogy-Trends and Application*, Springer-Verlag, New York 103-120, 1975
- 18) Thompson WR: Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in youngrats. *Science* 125: 698-699, 1957
- 19) 藤田統 : 生得的行動、心理学研究法 5 - 動物実験 I、東大出版会 9-22、1975