

N-methyl-N-nitrosourea(MNU)により実験的に誘発した

ラット小頭症児の行動奇形学的研究

橋 本 豊

N-methyl-N-nitrosourea (MNU) により実験的に誘発した

ラット小頭症児の行動奇形学的研究

橋本 豊

指導	・ 中村 経紀	教授
	江口 保暢	教授
	赤堀 文昭	教授
	有嶋 和義	助教授

目 次

頁

緒言	1
実験行動奇形学的検査法の概説	3
第 1 章	ラット胎児に及ぼす M N U の影響	17
	— 致死、発育抑制および催奇形性作用 —	
第 1 節	実験方法	17
第 2 節	実験結果	19
第 3 節	考 察	21
第 4 節	要 約	25
第 2 章	ラット胎児の脳に及ぼす M N U の影響	27
	— M N U 投与時期と小頭症の発現 —	
第 1 節	実験方法	27
第 2 節	実験結果および考察	28
第 3 節	総 括	30
第 4 節	要 約	30
第 3 章	M N U によって誘発された小頭症ラットの行動異常	32
第 1 節	実験方法	32
第 2 節	実験結果	33
第 3 節	考 察	37
第 4 節	要 約	40
第 5 節	補 足	
	I. 遊泳・歩行異常	43
	II. 妊娠後期投与実験	46

第 4 章	各投与時期に誘発された小頭症ラットの初期行動発達の異常	49
第 1 節	実験方法	49
第 2 節	実験結果	50
第 3 節	考 察	54
第 4 節	要 約	55
第 5 章	小頭症の程度と小頭症ラットの高次行動の異常	57
第 1 節	実験方法	57
第 2 節	実験結果	58
第 3 節	考 察	59
第 4 節	要 約	61
第 6 章	各投与時期に誘発された小頭症ラットの高次行動の異常	63
第 1 節	実験方法	63
第 2 節	実験結果	64
第 3 節	考 察	66
第 4 節	要 約	70
第 5 節	補 足 I. 妊娠 1 2 日処理群	72
第 7 章	総合考察	76
第 8 章	全体の要約	82
引用文献		87
謝 辞		95

結 言

発生毒性は、今日では、生殖細胞の形成から、受精、胚・胎児期を経て出生までの限られた個体の発生過程に障害を与えるだけでなく、出生後における成長と発達、機能的成熟、老化あるいは個体の死に至る一連の発生の過程にも障害を及ぼすものとして捉えられている〔97〕。

このうち出生時に認められる奇形の発生に関しては、長い歴史的考究の蓄積があるが、広義の生理的機能における発生異常の検索が重要視されるようになったのは1970年代半ば以降のことである。このことには、環境因子の胎児への障害効果が、ヒトでは、出生時に奇形という明瞭な異常として現れることはむしろまれで、生後の発育や機能面での欠陥として現れる可能性が高いことをエタノール（アルコール）、喫煙、向精神薬、重金属、放射線などの実例群が明らかにしたことが大きく預かっている〔11〕。行動奇形という概念は、1963年にWerboff and Gottliebが、次世代児の行動の障害と環境への適応面での機能障害を指すものとして初めて提唱したものである〔104〕が、形態的発生異常と対比した場合のこの概念の特徴は、作因が巨視的な異常を誘発するよりもより低い量で行動・機能の発生異常を誘発するという仮定を包含していることである。しかし、中枢神経系の微視的（神経病理学的、組織化学的）な障害が、例えば、アルコール、コルチコステロイド、性腺ホルモン、クロルプロマジンなどで発生異常として存在することは確かめられている〔90〕にしても、その微視的形態異常がどのようなメカニズムでどのような機能異常を誘発しているかといった関連性について明確にされている催行動奇形因子はなにもないといっても過言ではない。このことには、主にヒトでも他の動物でもその「行動」を規定する要素が、あまりにも多岐にわたって相互に複雑に関連しあっていることが大きく関与している。すなわち、作因に対する反応の出現の様相あるいはその法則性が確定していないのである。したがって性質未知の作因について催行動奇形作用の有無を評価しようとした場合、この行動をみ

れば確実に変化が現れるはずであるといった指標が明瞭でないので甚だしい困難が生ずる。この意味で、行動奇形学の課題の一つに中枢神経系の巨視的ないし微視的異常にもとづく機能障害の発現様式を調べることがあげられている〔99〕。

中枢神経系の粗大障害を誘発する因子としては、X線照射がもっとも良く知られており、膨大な量の研究報告がある〔e.g., 8, 16, 30, 41, 51, 88〕。また、化合物としては、MAMと略称される methylazoxymethanol が有名であり、これについての実験報告も多い〔e.g., 27, 50, 77, 89〕。しかし、個々の実験は散発的であり、実験手法が相互に異なることもあって実験成績に一貫性がないことが最大の難点であるように思える。特に終脳の障害誘発時期の実験においては、中枢神経系組織における組織学的、生化学的研究が多いにもかかわらず、処理時期と機能障害を詳細に検討した例は少ない〔82〕。本研究は、この課題を意識して、実験的に中枢神経系の粗大障害、特に終脳の粗大障害を誘発し、処理時期と発現する機能障害との関連性について詳細に分析したものであり、言い換えれば、行動奇形学において陽性対照群となりえるデータを提供するものである。

処理時期に関しては、終脳の障害が特徴的である時期を選び1日単位でこれを分割して調べた。また、実験的に中枢神経系の粗大障害を誘発する材料としては、N-methyl-N-nitrosourea (MNU) を用いた。この化合物については、その細胞毒性の発現機序が、核酸レベルでよく調べられている〔72〕。

実験行動奇形学的検査法の概説

行動奇形学では、次世代児の行動・機能を検索することから、事前に親動物（妊娠動物）の用意と処理、分娩、哺育、離乳、育成など複雑な実験手順を必要とする。また、行動・機能の検査法も多様である。これらのことから以下に本研究における基本的な実験材料と実験方法を概説した。

1. 使用動物および飼育条件

(1) 使用動物

1) 動物種および系統

すべての実験には以下の動物を使用した。

動物種：ラット

系統：Sprague-Dawley系、Crj:CD（クローズドコロニー・SPF）

購入元：日本チャールス・リバー株式会社、厚木生産センター

2) 選択理由

1. 毒性学的実験において多用されている動物である。
2. 繁殖性が良好であり、自然発生奇形が少ない。
3. 行動特性に関する背景データが豊富である。

3) 使用系統の行動特性に関する若干の問題点

我が国では行動奇形学的実験において Sprague-Dawley 系, Wistar系および Fischer系ラットが多用されている〔57〕が、これらの系統間には特定の行動検査場面において行動にかなりの差がみられる。

本論文で扱う行動検査法のなかでは、Shuttle-box Avoidance Test（往復式回避学習試験）においてその差が大きい。本法におけるマウスの系統差に関しては Bovet, D.ら（1969）による詳細な研究があり、回避率につ

いて noninbred strain ではそもそも個体差が大きいこと、inbred strain では個体差が小さく、且つ明瞭に成績が良好な系、不良な系およびその中間の成績を示す系がみられることを報告している〔15〕。このことは、ある処置によって成績がどう変化したかを解釈する際に noninbred strain は inbred strain に比して不利であることを示している。ラットについては、上の3系統（Wistar, Sprague-Dawley 系は noninbred strain, Fischer系は inbred strain）において回避学習試験の成績に差があることが知られており、成績には Fischer > Wistar > Sprague-Dawley 系の関係が成立するといわれている〔60, 61, 73〕。この視点からすれば、本研究では少なくとも Shuttle-box Avoidance Test には不向きな系統を選択していることになるが、この問題は装置の構造を改良することで解決できる可能性があることを Wistar, Sprague-Dawley の両系を用いた研究により一部明らかにした（すなわちこれらの系統間の差は本質的な回避学習能力の差でなく、走ったり飛んだりといった行動上の特性に起因している可能性がある。）〔39〕。

(2) 飼育条件

すべての動物は、温度 24 ± 1 °C、相対湿度 55 ± 5 %、換気回数 10 ~ 15回/時、7:00~19:00 照明の12時間明暗周期に調節されたバリアーシステム飼育室において金属製金網床ケージ（22×27×19 cm）に、親動物は1匹/ケージ、離乳後の出生児は1~2匹/ケージの割合で収容し、市販固型飼料（CA-1, 日本クレア株式会社）および水道水（金属製ノズルによる自動給水）を自由に摂取させて飼育した。

飼育室における通常の照度は、床面で 300~350 Lux、騒音は、約40~60 フォンである。

購入した動物は、すべて馴化のため12日間以上、予備飼育し、一般状態に異が認められなかった動物を実験に供した。

母動物の分娩に際しては、妊娠末期（妊娠19日以後）から分娩後10日まで飼育ケージの床面に金属製床板を敷き、巣の材料として木屑（ホワイトフレーク®、日本チャールス・リバー株式会社）を適宜、供給して飼育した。

(3) 妊娠動物の作出法

妊娠ラットは、いずれの実験においても9週齢の未経産雌ラットを10週齢以上の雄ラットと1対1で終日同居させて交配し、作出した。同居開始後は、毎朝、膣垢を採取し、膣垢像に精子が観察された雌を交尾成立とみなして雄から分離し、その日を妊娠0日と起算して実験に供した。

(4) 分娩、哺育法

各妊娠ラットは、自然分娩させ、出生児は、出生日を生後0日と規定して生後21日まで養母交換することなく生母にそのまま哺育させた。分娩状態は可能な限り観察し、難産、分娩遅延等の分娩障害が発現していないことを確認した。分娩終了後は、母動物の哺育行動（巣造り行動、児あつめ行動、児なめ行動、授乳行動）に着目し、哺育行動に異常のみられた母動物の出生児は、実験から除外した。また、児の授乳状態については、児の腹壁を通してみえる胃の乳白色部分（ミルク・スポット）の大きさを観察し、正常に授乳していると推定される児のみを実験に使用した。

(5) 一腹児数の調整および離乳法

生後の哺育環境を各母ラットごとに一致させることを目的に、生後0日（または、生後4日）に一腹児数を原則として雄4匹、雌4匹（または雄5匹、雌5匹）となるよう調整し、残余の出生児は淘汰した。生後22日に

哺育児は、母ラットから分離し、原則として個別に飼育した。

(6) 出生児の体重測定

哺育期間中は、生後 0, 7, 14 日に一腹単位で、生後 21 日には個別に体重を測定した。離乳後は、生後 21 日の体重を 3 週齢時体重としてそれより 1 週間ごとに個別に体重を測定した。

2. 化合物

N-methyl-N-nitrosourea (MNU): $\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{CONH}_2$ (Nakalai Chemical Co.)

強力な発癌性アルキル化合物であり、同時に DNA 合成阻害作用にもとづく顕著な細胞増殖阻害作用を有する。本化合物については、経胎盤的に脳腫瘍を誘発する作用のあること、中枢神経系に選択的な催奇形性を示すことなどが知られている [5, 48, 58, 59, 102] が、その機序はまだ明らかではない。変異原性に関しては、本化合物の持つ核酸塩基のアルキル化機序としてグアニン O⁶ 位のメチル化が重要であるといわれている。

Methylazoxymethanol (MAM): $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_7$ (Aldrich Chemical Co.)

サイカシン：ソテツの実に含まれるサイカシンのアグリコンであり DNA 合成阻害作用にもとづく顕著な細胞増殖阻害作用および発癌性を有する。本化合物は、実験的に小頭症を誘発する手段として広範に使用されており陽性対照物質としての価値が高い [100]。DNA に対して強力なメチル化作用を示すといわれており [62]、その意味で作用は MNU に似ているといえる。実験 IV において陽性対照物質として使用した。

3. 行動検査法

1) 検査項目

次表に示す行動検査法を実施した。

行動検査法

I. 初期行動発達検査 (哺育期における行動検査)

A. 反射の発達検査

- a) 屈曲 (屈筋) 反射 (Flexion reflex)
- b) 交差性伸展 (伸筋) 反射 (Crossed extension reflex)
- c) 全身反応 (Mass reaction)
- d) 前および後肢の握り反射 (Grasping reflex)

B. 姿勢反応の発達検査

- a) 立ち直り反応 (Surface righting response)
- b) 空中立ち直り反応 (Mid-air righting response)
- c) 断崖落下回避反応 (Cliff-drop aversion response)
- d) 触覚性踏み直り反応 (Tactile placing response)
- e) ひげ踏み直り反応 (Vibrissa placing response)
- f) 姿勢性屈曲・伸展反応 (Postural flexion and extension)

C. 運動機能 (移動行動) の発達検査

- a) 歩行 (Gait):
 - ピボットイング (Pivoting)
 - 四足歩行 (Walking)
- b) 遊泳 (Swimming)
- c) 複合運動技能 (Complex locomotor skills):
 - 背地走性 (Negative geotaxis)
 - 棒つかみ (ぶら下がり) 行動 (Bar holding behavior)
 - ロープ降り行動 (Rope descent behavior)

II. 行動・機能検査 (離乳後の行動検査)

A. 情動性・探索運動検査

オープンフィールド試験 (Open-field Test)

B. 学習試験

Biel型多単位T型水迷路試験 (Biel's water multiple T-maze test)
往復式回避学習試験 (Shuttle-box avoidance test)

C. 運動量測定

回転かご運動試験 (Wheel cage activity test)

2) 検査法の実際

I. 初期行動発達検査 (哺育期における行動検査)

生後1日以降に隔日または連日観察した。各検査は、関口 (1978) の紹介している手順〔86〕を一部改定した手順にて行い、McClellan, et al. (1970)の行動項目得点法〔65〕を応用して行動の生起の程度を測定した。

A. 反射の発達検査

a) 屈曲 (屈筋) 反射 (Flexion reflex)

出生児をつまんでぶらさげ、一側の前肢あるいは後肢の先端をピンセットで軽くつまむ。被刺激肢の屈曲反射を指標とする。

0点 - 反応なし。

1点 - 緩慢な反応。

2点 - 急速な反応。

b) 交差性伸展 (伸筋) 反射 (Crossed extension reflex)

出生児をつまんでぶらさげ、一側の後肢の先端をピンセットで軽くつまむ。同側の屈曲反射と同時に出現する対側の伸展反射を指標とする。反応が出現したら次回以降、腹臥位での反応を調べる。

0点 - 反応なし。

1点 - 反応あり。

2点 - 腹臥位にて反応なし。

3点 - 腹臥位にて反応あり。

c) 全身反応 (Mass reaction)

腹臥位に置き、尾端に1cmの高さから1gの分銅を落とし、嫌悪反応の生起の程度を調べる。

0点 - 反応なし。

1点 - 尾部のみの反応。

2点 - 全身をよじる反応。

3点 - 発声をともしないころげまわる反応。

d) 前および後肢の握り反射 (Grasping reflex)

出生児をつまんでぶらさげ、一側の前肢掌または後肢掌の裏にピンセットの先端をつける。握る反応の生起の程度を調べる。

0点 - 反応なし。

1点 - 緩慢な反応。

2点 - 急速な反応。

B. 姿勢反応の発達検査

a) 立ち直り反応 (Surface righting response)

横臥位に置き、腹臥位にもどる反応の生起の程度を調べる。

0点 - 緩慢な反応。

1点 - 5秒以内に反応。

2点 - 2秒以内に反応し、かつ急速に立ち直る。

b) 空中立ち直り反応 (Mid-air righting response)

仰向けの状態で約10cmの高さからスポンジの上におとし、四肢で着地する行動の生起の程度を調べる。

0点 - 横臥位で着地

1点 - 後肢の正常位での着地を失敗する。

2点 - 完全な着地

c) 断崖落下回避反応 (Cliff-drop aversion response)

腹臥位の状態で頭と前肢を台の端からはみ出させた時、体の向きを変え後退する反応を指標とする。

0点 - 反応なし。

1点 - 緩慢な反応。

2点 - 急速な反応。

d) 触覚性踏み直り反応 (Tactile placing response)

前後肢ともに下垂させた状態で台の端に触れさせた時、支持位に踏み直る反応を指標とする。

0点－反応なし。

1点－緩慢な反応。

2点－急速な反応。

e) ひげ踏み直り反応 (Vibrissa placing response)

出生児をつまんでぶらさげ、ひげを台の端に触れさせた時、前肢を支持位に踏み直す反応を指標とする。

0点－反応なし。

1点－緩慢な反応。

2点－急速な反応。

f) 姿勢性屈曲・伸展反応 (Postural flexion and extension)

C. 運動機能 (移動行動) の発達検査

a) 歩行 (Gait):

ラットの平面上における移動運動の発達過程は、第1期；(生後5～6日まで) 頸筋の運動機能の発達に伴う頭部の上下・左右振転運動と前肢の非協調的運動を示す時期、第2期；(生後10日前後まで) 前肢の運動機能の発達に伴い、後肢・臀部を軸にして回旋運動を行う時期(定位置回旋運動期：ピボッティング期) および第3期；後肢の体保持・運動機能発達に伴い四肢で歩行様の前進運動を行う時期(この間に定位置回旋運動は衰退してゆく)の3期に大別される〔13〕。ここでは、McClellan et al. (1970)の方法〔65〕を準用して行動の生起の程度を測定した。

ピボッティング (Pivoting: 1分間観察する。)

0点－反応なし。

1点－回旋しようとするが、時間が短い。

2点－中等度の回旋運動。

3点－回旋運動を反復する。

四足歩行 (Walking: 1 分間観察する.)

0 点 - 反応なし.

1 点 - ほぼ体長分の距離を腹が床についた状態で匍匐前進する。

2 点 - 四肢で体を保持し、腹を床につけない状態で歩行する。

3 点 - 活発に歩行する.

b) 遊泳 (Swimming)

Schapiro, et al. (1970)の方法に準拠した〔85〕。ラット成体の遊泳行動は、1) 水面上に鼻孔を含む頭部の一部を保持し続けるための姿勢制御、2) 前肢を常に伸展または引き寄せた (tucked) 状態で、後肢のみの水掻き動作により前進する四肢の運動制御の二つの機能要素で統御されている。このため遊泳行動の発達段階は、次の二種類の観察測度により評価される。なお、この行動は、ビデオコーダで録画し、画面上に再生して詳細に観察した。

a. 水面における姿勢保持の形態

0 点 - 全身が水面下に没している。

1 点 - 鼻端を水面上に出したり引っ込めたりする。

2 点 - 鼻端と頭頂を水面上に出す。

3 点 - 耳介の一部を含め鼻孔を含む頭部の一部を水面上に保持し続ける

4 点 - 頭部だけでなく軀幹の一部を水面上に保持し続ける。

(成体では、この後、再度、頭部のみを水面上に出すようになるが、いずれにしてもこの形態が発現するのは、5～6週齢以降に達してからであり哺育期の観察では不要である。)

b. 前肢・後肢の水掻き運動

遊泳中の任意の2秒間における屈曲・伸展動作数 (一側肢ごと) で

評価した。

c) 複合運動技能 (Complex locomotor skills):

Altman and Sundarshan (1975)によって体系化された検査法群である〔7〕。多くの変法があるが、いずれも四肢を使用した体の移動運動形態を調べることによりラットの総合的な運動能力の発達過程を評価しようとするものである。

【背地走性】 (Negative geotaxis)

斜面に動物を逆様に置いた時、上方に方向転換して真上に移動する行動をさす。Crozier and Pincus (1926)によって初めて調べられた古典的な検査法であるが、今日に至っても行動変化の検出力について変動係数と感度の観点から優れているという評価を受けている〔22, 3〕。ここでは、Altman and Sundarshan (1975)の方法に準拠して次の3型の行動形態の発現と消失の過程を調べた。なお、斜面角度は45°とし、アクリル製の傾斜板にペーパータオルを張りその上に動物を逆様に置いた後の行動を調べた。

Type I : 真っ直ぐ下へずり落ちる反応。

Type II : 方向転換するが上方に登らない。

Type III : 方向転換し、体長分以上、上方に登る（この行動には、真横あるいは斜め上に移動するなどの亜型がある。もとの位置より上方への移動であれば全てこの型に含めた。）

【棒つかみ・ぶら下がり行動】(Bar holding behavior)

直径 1.5 mm の金属棒に前肢でぶら下げた後の行動を評価する。Altman and Sundarshan (1975)の方法に準拠して次の4型の行動形態を調べた。

Type 0 : 直ぐ落下する。

Type I : 後肢と尾を使用して棒によじのぼるが、直ぐ落下する。

Type II : 後肢と尾を使用して棒によじのぼり、棒上に30秒以上とどまることができる。

Type III : 後肢と尾を使用して棒によじのぼり、棒上を左右に移動する。

【ロープ降り行動】(Rope descent behavior)

Altman and Sundarshan (1975) および Tamaki et al. (1977)の方法〔93〕に準拠して、直径1.8 cm、長さ45cmのロープ中央に頭部を上にしてつかまらせた後の行動を次の4型に区別して評価した。

Type I : 頭を上にしたまま降り落ちる。

Type II : 頭を持ち上げ下方をのぞきながら滑り降りる。

Type III : 頭部と前肢を下方に向けるが、後肢はもとの状態で完全に逆さにならずに降りる。

Type IV : ロープ上で体を方向転換し、完全に逆さになって降りる。(この行動が、最も洗練された行動であるが、正常動物でもすべての個体がこの行動を行うわけではなく、離乳近くなっても約2割の個体はType IIIの行動を示す。また、成体ではType IIIまたはIVの途中で飛び下りる個体も多い。)

II. 行動・機能検査（離乳後の行動検査）

上述の哺育期観察を経験した個体は、以下の検査に用いなかった。個体の先行経験が、行動の重大な修飾因子となるからである。

A. 情動性・探索運動検査

【オープンフィールド試験】（Open-field Test）

Hull (1934) の方法〔45〕に準拠し、直径150cm、深さ40cmの丸型ボックス（写真1）の中央に被験動物を置き、紙箱で20秒間覆った後、静かに紙箱を除いて、その後3分間の動物の行動を3日間にわたり観察した。照明には天井灯を用い、ボックス床面で約500luxの照度となるように調節した。行動の観察測度は、出発潜時（ボックス中央に設定した半径15cmの円を出るまでの時間）、移動距離、立ち上がり回数、グルーミング（身づくろい）回数、排糞数および排尿数の6項目とした。（この装置での行動は通常、肉眼観察によることが多い。たとえば活動量を評価する場合、ボックス底面に同一面積の区画を線引きし、これを動物が横切った回数（区画移動数）を数える。しかしこの方法では客観性に乏しいことから（観察者の主観に拠る部分が多い）ここでは、画像解析法を応用したコンピュータシステムを用い、出発潜時および移動距離は自動計測した。その他の項目は、肉眼観察しつつ逐次、専用装置から入力した。）

なお、この観察事態は、動物の1) 新奇恐怖：したがって、この検査を始めるまで実験者はなるべく動物に触れない、2) 広場恐怖：したがって適当な大きさがあり、逃げ込める場所を作らない、3) 負の光走性：したがってホームケージより明るくする、の3要素をもとに新奇場面におかれた時の動物の反応（交感神経の活動亢進を反映）によって動物の情動性を測定しようとするものである。しかし、はたして情動という心的要素がこの実験事態において定量的に分離・測定しえるかという基本的な観点において、現在、この事態を情動性の検索に用いることは問題視されており、

実験者はこのことを踏まえてこの事態の特殊性に精通しておく必要があると指摘されている〔80〕。ただし、本研究においては、行動の様相から情動性の変化が推定される限り、「変化」ありと評価していることを断っておきたい。

B. 学習試験

【Biel型多単位T型水迷路試験】 (Biel's water multiple T-maze test)

6ヵ所にT型の袋路を持つ水迷路装置（縦横150cm、深さ40cm、迷路幅15cm、水深25cm；写真2）を用い、Biel（1940）の方法〔12〕に準拠して行った。すなわち、迷路試行に先立ち、直水路で連続5回訓練試行（第1日）させ、翌日から1日3回、3日間連続して迷路試行させて各試行毎に袋路に入った回数（エラー数）およびゴール到達までの所要時間を測定した。試行開始後、3分以内にゴールに到達しない場合は、動物を迷路より引き上げ、未到達として記録した。

この迷路事態は、米国の Cincinnati 大グループが、1970年より行動奇形学的検索に取り入れている方法であり〔2, 18, 19〕、我が国においても使用される頻度が非常に高い。ただし、実験心理学の分野からは、エラーがどのような機序によって引き起こされるかの検討がなされていないので観察測度の変動がどのような心的メカニズムの変化によって起きたかを分析しようとする場合、一定の限界があると指摘されている〔44〕。この点に関しては、現在、検討が進められており、迷路外視覚手掛かりが重要である（動物は、迷路の外の背景を手掛かりに何処にいるのかを識別—空間認知している）ことが判ってきたが、エラーパターンが複雑であり、個々のエラーの意味づけが行われるまでには至っていない〔74〕。

【往復式回避学習試験】 (Shuttle-box avoidance test)

シャトルボックス装置 (TK-407; ユニコム社製、写真3) を用いた。ボックスの片部屋に動物を入れ、馴致のため5分間放置した後、条件刺激 (ブザー音、50dB+光、200Lux; 警告刺激または電撃予告刺激ともいう) 3秒、条件刺激+無条件刺激 (電撃、150V, 2 mA) 3秒の延滞条件づけ手続きにより、試行間間隔14秒 (固定) で1日60連続試行させ、3日間にわたって回避反応 (条件刺激提示中に他方の部屋に移動する反応: この反応の生起によって電撃は回避される) 数の推移を観察した。

この学習事態は、行動薬理学の分野で最も汎用されている〔98〕代表的な嫌悪性学習事態であり、膨大な量の実験結果をもとにこの事態における学習の心的メカニズムに関する多くの理論が存在する〔14, 40, 69〕。

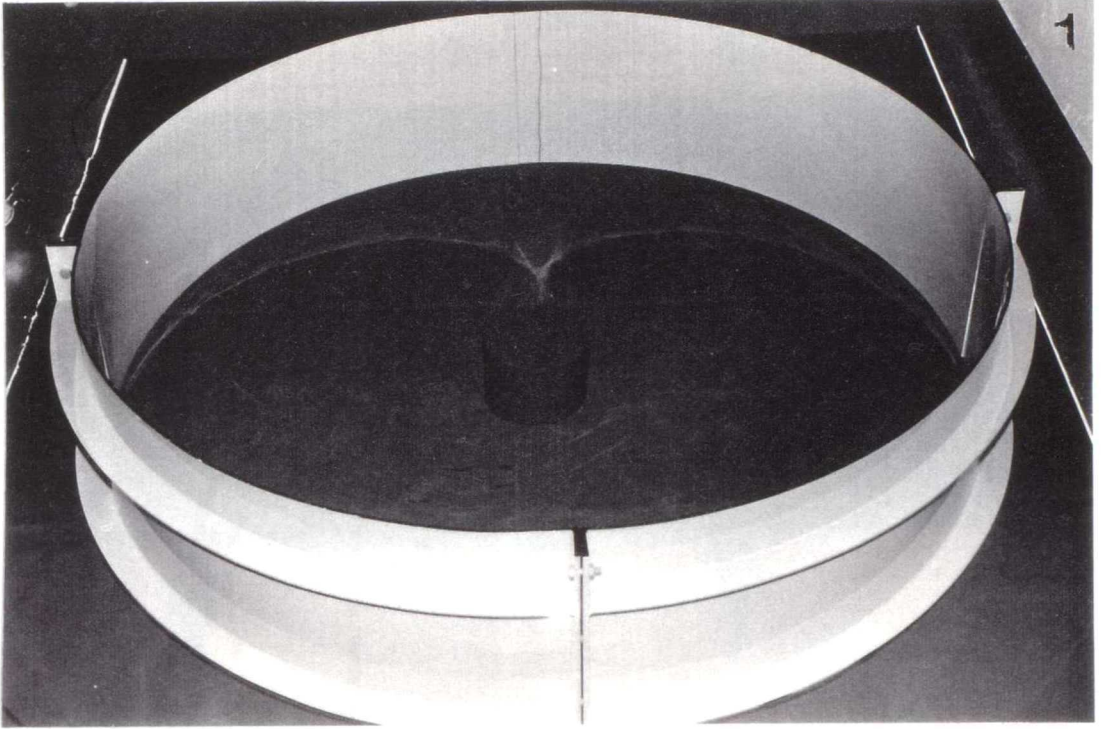
C. 運動量測定

【回転かご運動試験】 (Wheel cage activity test)

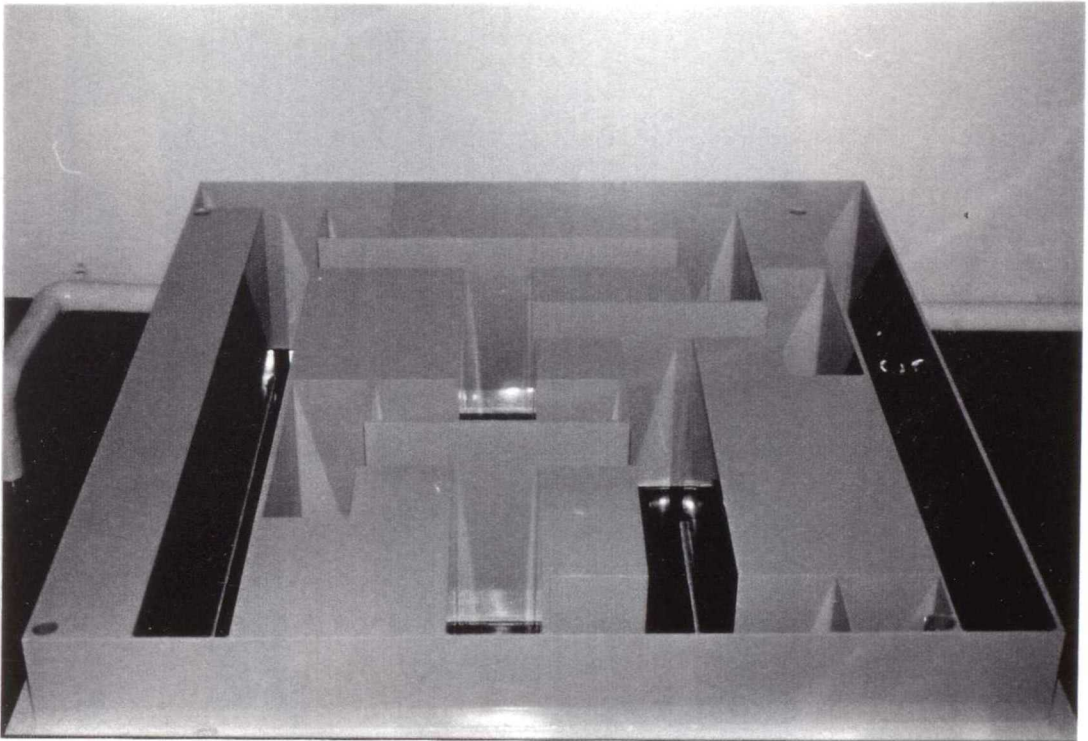
自発運動量測定用回転ケージ (日本ケージ製、写真4) に動物を入れ、給餌、給水条件下で7日間のケージ回転数をカウントデータ記録装置 (精工電機) により1時間ごとに記録した。

動物の活動量は、測定場面とそこで生起する活動の長さによって、1) 短時間活動量 (2~10分)、2) 長時間活動量および3) サーカディアン活動量の3種に区別することができる〔78〕。本法はこのうちの2) に該当するが、行動要素としては主に歩行運動量を測定している。原因は不明であるが、個体差が大きく反映されることがこの測定事態の特徴であり、使用目的に応じてこのことが長所ともなり、短所ともなる。上述のオープンフィールド試験における移動距離は1) に該当するが、動物が自ら新奇事態に馴致するための探索行動を反映しており、その点で2) 以降の自発的運動量とはやや意味合いが異なる。サーカディアン活動の測定には、最低1ヵ月以上の期間を要するといわれている〔55〕。

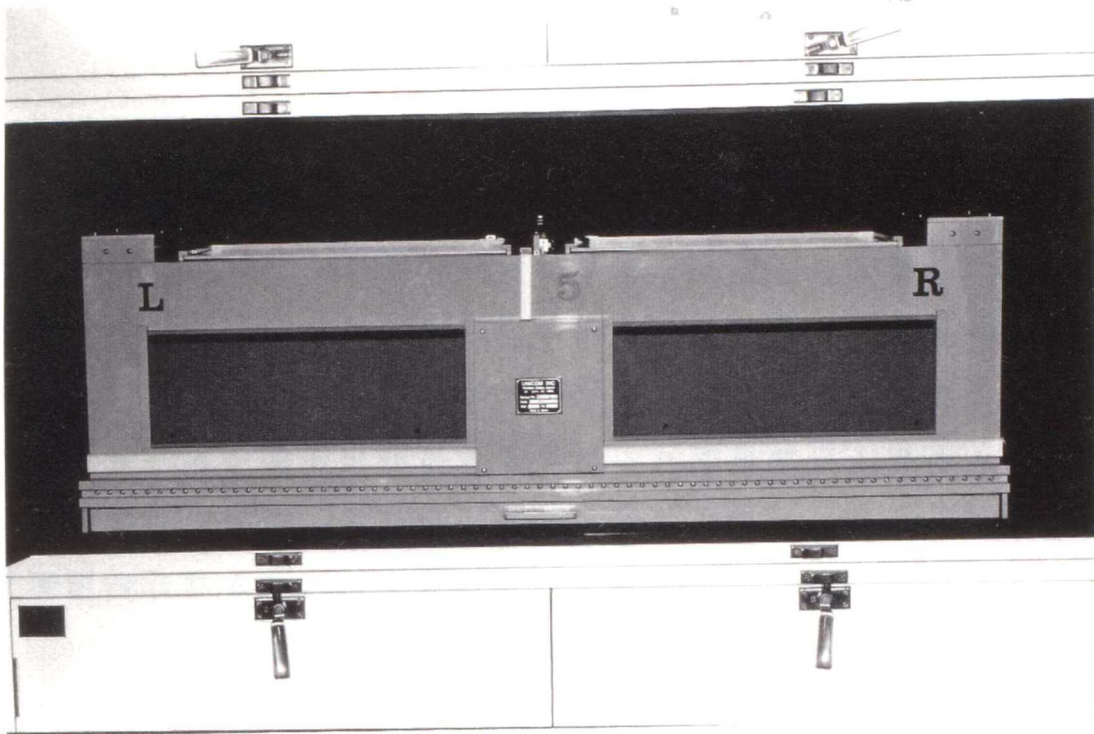
Phot. 1



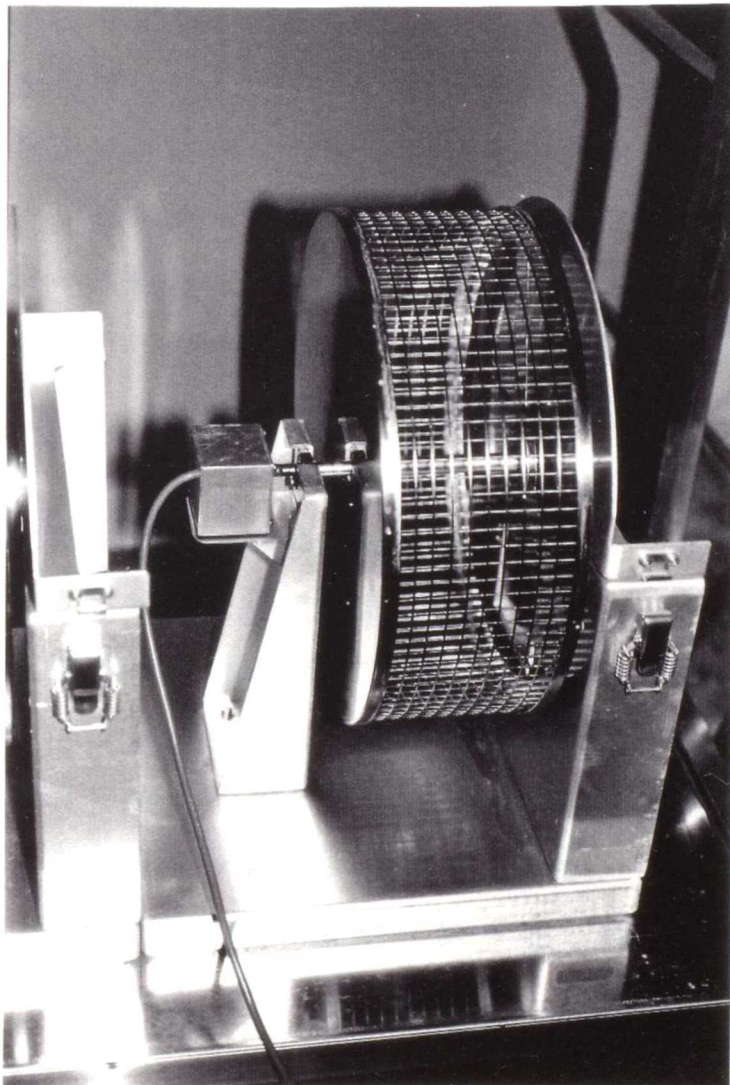
Phot. 2



Phot 3



Phot.4



第 1 章 ラット胎児に及ぼす M N U の影響—致死、発育抑制および催奇形性作用—

本実験では、ラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠 7～17日）に 3 用量の N-methyl-N-nitrosourea（以下 M N U と略記）を連続して母ラットに腹腔内投与し、胎児の発生に対する影響を予備的に検討した。妊娠 20 日の胎児の脳については各部の大きさを計測して胎児の脳の発生に対する M N U の影響を肉眼形態学的に検討した。また、1 部の母ラットは自然分娩させ、児の長期生存が可能であった用量群（1 群のみ）の出生児について離乳後に学習、情動性・探索行動等の検査を行い、小頭症児に行動の変容がみられるか否かを検討した。

第 1 節 実験方法

1. 投与量、投与方法

M N U の投与用量は、2.5, 5 および 10 mg/kg の 3 用量とした。各用量の M N U は、投与直前に注射用生理食塩液に溶解させ、5 ml/kg の割合で妊娠 7 日～17日に至る 11 日間、毎日 1 回、母ラットに腹腔内投与した。各ラットの投与液量は、妊娠 7 日の体重をもとに算出し、以後、体重変化に基づく調整は行わなかった。対照群には無処置の妊娠ラットを用いた。

2. 観察方法

1 群 8～11 匹の母ラットは、妊娠 20 日にエーテル深麻酔により致死させて帝王切開し、常法に従って胎児観察を行った。対照群および 2.5 mg/kg 投与群の胎児の脳は、後頭骨端で延髄を切断して摘出し、重量を測定した後 10%ホルマリンで約 1 週間固定した。固定脳については実体顕微鏡下で脳の各部の長さをマイクロメータにより計測した。

1 群 6～7 匹の母ラットは、自然分娩させ、分娩状態、哺育行動を調べた。生後 4 日に一腹児数を調整（雄 4 匹、雌 4 匹）し、出生児は、生

後22日に離乳（対照群のみ、後述）して5週齢時に多単位水迷路試験、6週齢時に往復式回避学習試験、7週齢時にオープンフィールド試験を実施した。これらの行動試験法は、材料および方法の項に記載した方法と若干異なるので以下、簡単に要約する。

多単位水迷路試験：第1日目に直水路で連続3回予備試行を行い、その翌日から4日間にわたり1日2回迷路試行させてゴール到達までの所要時間およびエラー数を記録した。1試行の制限時間は3分とし、ゴール未到達試行では動物を迷路より引き上げ、次の試行に移らせた。

往復式回避学習試験：第1日目は、Shuttle-box内に1匹ずつ動物を入れ、10分間放置して自発性両室間移動回数を調べた（試行日0）。第2日目は、10分間の自発性移動回数を調べた後、無条件刺激3秒—試行間間隔17秒のスケジュールで逃避条件づけを30試行行わせた（試行日1）。第3目以降は、10分間の自発性移動回数の測定の後、条件刺激3秒—無条件刺激3秒—試行間間隔17秒（固定）のスケジュールで3日間にわたり、1日30試行の回避獲得条件づけを行い、反応潜時および回避反応数を記録した（試行日2～4）。

オープンフィールド試験：150 x 150 x 40cmの角型ボックスの底を25の区画に区切り、500 luxの照度下で動物を中央区画に静かに置いた後の3分間の行動を3日間にわたり観察した。観察項目は、反応潜時（中央区画を出るまでの時間）、区画移動数、立ち上がり回数、グルーミング回数、排糞数、排尿区画数の6項目とした。

8週齢時には一般機能（後肢引き込み反射、立ち直り反応、痛覚反応、縮瞳反射、耳介反射、瞬目反射）を検査した。

第 2 節 実験結果

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられなかった。体重推移（妊娠期間）は図 1 に示した。各 M N U 投与群では、投与期間中の体重増加が抑制され、妊娠 20 日の体重は、各 M N U 投与群ともに対照群に比して有意 ($p < 0.01$, Student's t-test) に低値であった。

2. 胎児観察

胎児観察の結果を表 1 に要約した。

子宮内胚・胎児死亡率は、各 M N U 投与群において用量依存的に上昇し、特に 10 mg/kg の投与では全着床胚が死亡したため生存胎児は得られなかった。2.5 mg/kg および 5 mg/kg の投与では平均で 10 例以上の生存胎児が得られたが、その胎児重量、胎盤重量は対照群のそれと比較して用量依存的に、かつ有意に減少した。これらの生存胎児では、ほぼ全例に外表異常がみられ 2.5 mg/kg 投与群の胎児では偏平な頭頂部が特徴的であった。この頭部の外形的特徴は、剖検の結果、終脳の形成不全に基づく変化であることが確認された。5 mg/kg 投与群の胎児では、偏平な頭頂部、小耳、口蓋裂、下顎形成不全等の頭蓋・顔面異常の他に、指趾異常を含む複合的な外表異常が成立した。

3. 脳の形態観察

計測結果を表 2 に示した。

M N U 投与群 (2.5 mg/kg) の胎児では、嗅葉長を除く脳の各部位の長さおよび脳重量が、対照群に比し著しく低値を示し、特に終脳長および終脳幅において減少の程度が顕著であった。このことから M N U 投与群の胎児に生じた脳の変化は、小脳症 (Microencephaly=Micrencephaly) と診断さ

れる。全脳長に対する終脳、間脳、中脳および後脳長の比では、終脳長比がMNU投与群の脳において著しく低値であった。

4. 母動物の分娩・哺育状態

MNU 10 mg/kg 投与群では、帝王切開による胎児観察の結果からも明らかなように胎児は1例も娩出されなかった。5 mg/kg 投与群では、胎児は正常に分娩され、母動物の哺育行動（児集め行動、児なめ行動、営巣行動）も正常に生起したが、いずれの産児も出生後48時間以内に死亡した。2.5 mg/kg 投与群では、母動物の分娩・哺育状態に異常はみられず、産児の授乳状態も良好であった。同群の産児は、途中死亡することなく発育したが、体重は出生時から低かった。（生後0日平均体重、対照群；6.4g, 2.5 mg/kg 投与群；5.0g）また、生後21日の体重は、いずれの個体においても35gを下回っていたため対照群の出生児とは同様に離乳できず、生後29日に離乳した。

5. 行動検査

上述のごとく 5 mg/kg以上の投与群では、生存出生児が得られなかったため 2.5 mg/kg投与群および対照群の出生児について実施した。

1) 多単位水迷路試験（表 3, 4）

訓練試行（直水路）および迷路試行におけるゴール到達までの所要時間（表 3）ならびにエラー数（表 4）は、2.5 mg/kg 投与群において、全試行を通じ有意に増加した。

2) 往復式回避学習試験（表 5, 6）

2.5 mg/kg 投与群の反応潜時、回避反応数には、対照群と比較して著差はみられず、むしろ雄では試行日1、2において有意に高い回避反応数を示した（表 5）。

自発性両室間移動回数は、2.5 mg/kg 投与群において減少傾向を示し、試行日 0、1 の移動回数には対照群と比較して有意差がみられた（表 6）。

3) オープンフィールド試験（表 7）

2.5 mg/kg 投与群の雌では、3 日間の試行を通じて反応潜時の延長傾向、区画移動数、グルーミング回数の減少傾向および排糞数の増加傾向が明らかであった。雄においても反応潜時および区画移動数については、2、3 日目試行時に同様の傾向がみられたが、その他の項目については雌雄に共通した変化は認められなかった。

4) 一般機能検査

後肢引き込み反射、立ち直り反応、痛覚反応、縮瞳反射、耳介反射、瞬目反射は、いずれの出生児においても正常に生起した。

第 3 節 考 察

本実験では、ラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠 7～17日）に 3 用量（2.5, 5, 10 mg/kg）の MNU を連続して母ラットに腹腔内投与し、胎児の発生、出生児の発育・行動に及ぼす影響を検討した。上の実験成績から明らかのように、MNU の催奇形性を含む胎児毒性は、中枢神経系組織への特異的な催奇形作用を除いては、発生毒性の一般的な法則に則った性質を示すものである。10 mg/kg の連続投与では、胚に対する強力な致死作用が発現したが、死胚はすべてが着床後の早期死胚であった。母動物では体重の低下以外に顕著な毒性発現がみられなかったことから、胚の死亡はおそらく MNU の胚への直接作用にもとづく変化と推察される。Koyama, et al. (1970) は、MNU の胎児毒性について、大半の胚が死亡す

る強力な致死作用の発現時期は、40 mg/kg の単回処理において妊娠11.5 日以前に限定されることを報告〔59〕しているが、妊娠7日以降の10 mg/kgの連続投与では、これとほぼ同質の作用が発現するものと考えられる。5 mg/kg 以下の量の連続投与では、胚に対する致死作用は軽減し、子宮内発育抑制作用および催奇形作用が発現した。5 mg/kg の連続投与では、頭部奇形のみならず多様な複合奇形が発生したが、2.5 mg/kg の連続投与で発生した奇形は小脳症にほぼ限定されていた。このことから胎児の上位中枢神経系組織は、MNUの催奇形作用に対し、他の組織に比してはるかに高い感受性を示すことが十分に推察される。MNU投与群の胎児に生じた脳の変化は、小脳症と診断されるが、全脳長に対する終脳、間脳、中脳および後脳長の比では、終脳長比がMNU投与群の脳において著しく低値であった。したがってMNUの侵襲に対して終脳は、他の中枢神経系組織に比してさらに高い障害感受性を示すと思われる。中枢神経系の器官および組織発生は、時空間的なずれを示しながら進行するが故に、障害感受期が長く、かつその障害部位は外的作因の侵襲時期に応じて時期特異的に変化するといわれている〔52, 53, 54, 81〕が、MNUの連続的な侵襲に対して終脳が特異的な障害感受性を示したことは興味深い。すなわちMNUの短期処理では、終脳系の障害のみを細部に限定して誘発し得る可能性がある。

本実験では出生児の脳について形態学的観察を実施しなかったが、2.5 mg/kg 投与群の出生児の頭頂部はいずれも明瞭に扁平であった。胎児観察の結果を考慮すると、2.5 mg/kg 投与群の出生児は、ほぼすべてが小脳症であったと推定されるが、外形的な呼称としては「小頭症 (Microcephaly)」とするのが妥当と考えられる。2.5 mg/kg の連続投与で得られた小頭症の出生児では、迷路学習能力が明らかに障害されていた。すなわち迷路試行におけるゴール到達までの所要時間ならびにエラー数は2.5 mg/kg 投与群において全試行を通じて有意に高値であり、試行回数の累積に相応した行動の変容（この試験では、所要時間ならびにエラー数の

減少)を学習と定義するならば、2.5 mg/kgの連続投与で得られた小頭症の出生児では、ほとんど学習効果がみられなかったといえる。この学習障害が、どのような学習過程の変化に基づくものか(例えば空間認知機能の障害なのか、学習保持の障害なのか)を判別することは困難であるが、以下のこととの関連も考えられる。小頭症の出生児では、直水路での訓練試行(非迷路課題)においても試行回数の累積に相応した所要時間の短縮率がきわめて低かったが、これを行動要素からみると小頭症の出生児では入水後、遊泳動作が解発されるまでの潜時が延長したこと、さらに水路の途中でいったりきたりを繰り返す反復的遊泳行動が頻発したことがその原因であった。したがって小頭症の出生児では、動機づけの機能〔ここでは水から逃避しようとする動因のもとに誘因(ゴール台)に向かう行動を反復試行によって強化することと定義される。〕において始発機能(行動を生起させる機能)、選択機能(始発行動の維持・方向づけ・目標勾配性の規制)および強化機能(動因低減:成功によって行動の再現可能性を高める機能)そのものが障害されていることが、強く疑われる〔91〕。これでは迷路課題の遂行が困難であることは当然であり、むしろ動物がゴールに到達し得たことが不思議とさえいえる。事実、全試行を通じて一度でも規定の3分以内にゴール到達を果たせなかった動物数は、対照群の3例(雄1例:5%、雌3例:10%)に対して2.5 mg/kg投与群では27例(雄16例:70%、雌3例:50%)とはるかに高率であった。

一方、往復式回避事態における学習試験においては、2.5 mg/kg投与群の反応潜時、回避反応数は、対照群と比較して著差を示さなかった。しかし、このことは小頭症の出生児においてこの学習事態での学習能力が、迷路学習事態におけるそれのように障害されていないことを証明するものではないように思える。X線照射によって得られた小頭症ラットが、往復式回避事態で高水準の回避反応性を示すことの報告は多い〔25, 32, 33, 63〕。その理由としては照射ラットでは自発活動性が亢進しており自発室間移動数の増加が回避反応数を修飾するためとの考えがある〔31〕が、こ

れに対して田巻(1979)は、照射ラットで電撃予告刺激に対する予期的反応水準があがっている(過敏に反応する)ことがその理由であることを明らかにした〔92〕。前者の観点においては、2.5 mg/kg 投与群の自発室間移動数は低下しており(表6)、本実験結果にも一致しない点がある。後者のように、2.5 mg/kg の連続投与で得られた小頭症の出生児では嫌悪刺激に対する被刺激反応性が亢進していたと考えるべきであろう。このことについては、電激を受けている最中の小頭症児は、頻繁に啼鳴し、指向性の無い跳躍を頻発したことを付記しておきたい。

オープンフィールド試験では、2.5 mg/kg 投与群の雌において自発活動性の低下傾向がみられたが、雄では2、3日目試行時に同様の傾向がみられた点を除き明瞭な変化は認められなかった。しかし、往復式回避事態では、2.5 mg/kg 投与群において雌雄ともに自発室間移動数の低下が明らかであった点を考慮すると、小頭症の出生児では、自発活動性が低下していたと考えられる。

小頭症児の後肢引き込み反射、立ち直り反応、痛覚反応、縮瞳反射、耳介反射、瞬目反射は、いずれも正常に生起した。痛覚反応の検査では、小頭症の出生児に過剰な反応が生起している証拠は得られなかったが、被った刺激の質の差によるものと考えられる。

以上、2.5 mg/kg の連続投与で得られた小頭症の出生児では、自発活動性の低下および迷路学習能力の障害がみられたが、これらの行動の変化が、MNUの連続的な侵襲による中枢神経系の包括的な異常を反映したものであるかは不明である。これを述べるためには、発生毒性確認のための一般的な原則に則って行動異常の臨界期および用量反応性を確認し比較する必要があるであろう。

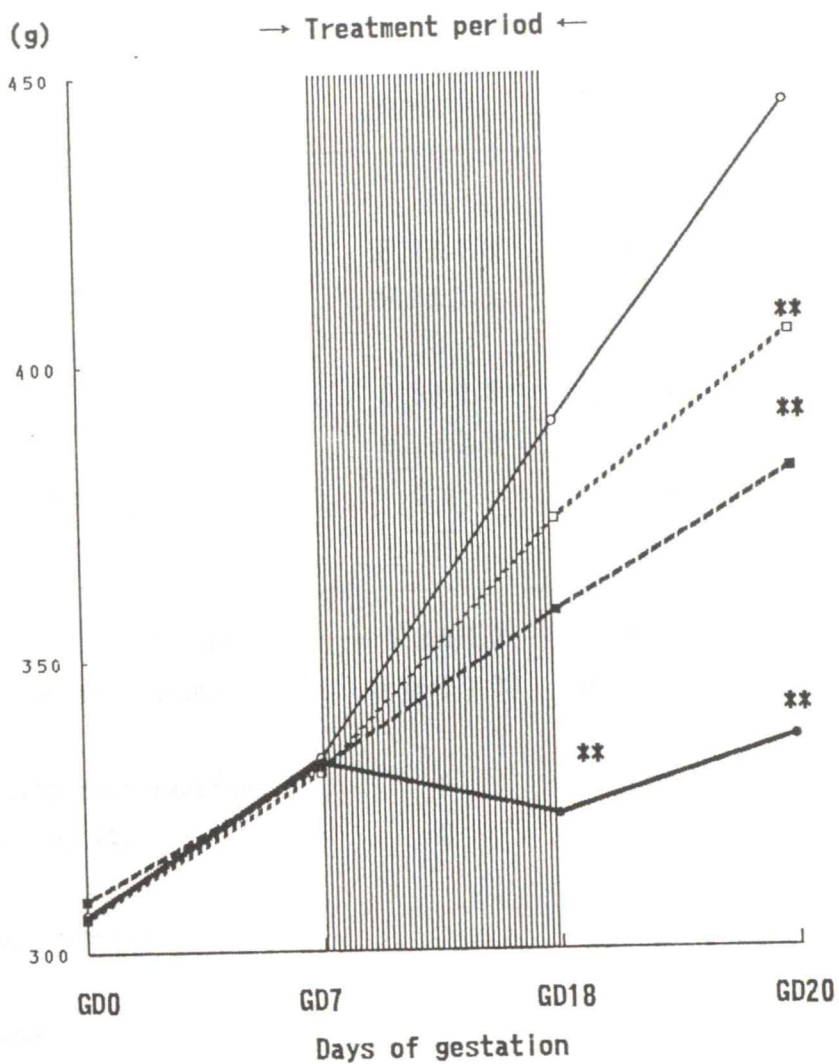


Fig. 1 Body weight of pregnant rats treated with MNU from day 7 through day 17 of gestation.

○: Un-treated control, □: 2.5 mg/kg, ■: 5 mg/kg, ●: 10 mg/kg
 **: Significant difference from control at $p < 0.01$.

Table 1. Effect of prenatal treatment with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) on fetal development in Crj:CD rats

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control	MNU 2.5	MNU 5	MNU 10
Pregnant rats	11	11	8	9
Corpora lutea	18.2±1.8 ^b	16.9±1.5	17.8±2.1	17.4±1.8
Implantations	16.8±1.1	15.1±2.7	15.8±3.0	16.6±0.9
Intrauterine death	8	20	38	149
Early;	0.6±0.8	1.6±1.3	4.4±2.1 **	16.6±0.9 **
Late ;	0.1±0.3	0.3±0.7	0.4±0.7	0
Intrauterine mortality ^a	4.4	12.4	30.8	100 **
Live fetuses	177	146	88 **	0 **
<hr/>				
Fetal body weight (grams)	3.2±0.2	2.4±0.2 **	1.3±0.1 **	
Placental weight (grams)	0.45±0.03	0.35±0.03 **	0.21±0.03 **	
<hr/>				
Fetuses with malformations	0	144	88	
Frequencies (%);	0	98.3 **	100 **	
<hr/>				
Types and numbers;				
Flat head	0	143	81	
Hydrocephaly	0	13	7	
Microtia	0	0	35	
Microphthalmia	0	0	7	
Hypognathia	0	0	30	
Cleft palate	0	0	40	
Palatal slit	0	0	35	
Omphalocele	0	1	0	
Tail anomalies	0	0	1	
Anasarca	0	1	18	
Digital anomalies	0	0	24	
Others	0	1	0	

a: (Number of deaths in each dam / Number of implants in each dam) × 100

b: Mean±S.D.

** : Significant difference from control at p<0.01.

Table 2. Effect of prenatal treatment with N-methyl-N-nitrosourea on the development of fetal brain in rats.

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control	MNU 2.5
Fetal body weight ^a	3.75 ^d	3.24
Brain weight ^b	169	99
Brain length ^c (B.L.)	10.49	7.88
Olfactory length (O.L.)	1.75	1.74
Telencephalon		
Length; (Te.L.)	6.12	3.24
Width;	7.81	5.00
Diencephalon		
Length; (Di.L.)	3.37	2.52
Width;	2.88	2.24
Mesencephalon (Ms.L.)		
Length;	4.34	3.24
Width;	4.19	3.07
Metencephalon (Mt.L.)		
Length;	1.17	0.94
Width;	5.09	3.83

Relative brain weight	4.50	3.03
O.L. / B.L.	16.68	22.17
Te.L. / B.L.	58.33	41.05
Di.L. / B.L.	32.06	32.04
Ms.L. / B.L.	41.34	41.09
Mt.L. / B.L.	48.43	48.69

a: grams, b: milligrams, c: millimeters, d: mean values

Table 3. Summary of water multiple T-maze test in the micrencephalic offspring prenatally exposed to MNU during the organogenic period; Elapsed time (seconds).

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control (Males)	Un-treated control (Females)	MNU 2.5 (Males)	MNU 2.5 (Females)
Number of offspring examined	20	20	22	20
Straight channel training				
1st trial	22.1±12.9 ^a	25.6±14.7	18.2± 7.9	17.7± 7.9
2nd trial	8.6± 3.7	9.0± 4.9	12.8± 5.1**	14.2± 7.6**
3rd trial	6.7± 2.9	6.3± 4.6	14.9± 9.9**	11.7± 6.7**

Maze tasks				
Day 1; 1st trial	72.1±43.2	68.4±31.4	121.0±58.3**	133.2±53.1**
2nd trial	58.7±32.7	49.1±22.4	117.0±57.3**	101.3±48.4**

Day 2; 3rd trial	48.6±26.0	57.9±40.1	111.4±52.4**	97.6±48.4**
4th trial	41.1±20.6	54.1±31.1	112.7±48.2**	86.6±57.0*

Day 3; 5th trial	41.9±19.8	38.1±20.9	85.3±52.8 *	82.7±44.7**
6th trial	29.8±11.8	46.1±26.6	79.9±49.1 *	73.2±48.7 *

Day 4; 7th trial	38.6±22.3	46.9±38.1	71.8±43.6 *	75.6±53.0 *
8th trial	33.9±26.6	38.8±28.2	73.7±45.4 *	75.4±46.8 *

a: Mean±S.D.

*: Significant difference from control at p<0.05.

** : Significant difference from control at p<0.01.

Table 4. Summary of water multiple T-maze test in the micrencephalic offspring prenatally exposed to MNU during the organogenic period; No. of errors in maze tasks

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control (Males)	Un-treated control (Females)	MNU 2.5 (Males)	MNU 2.5 (Females)
Number of offspring examined	20	20	22	20
Day 1; 1st trial	14.3± 9.8 ^a	14.2± 7.2	22.4± 15.9**	24.6± 13.2**
2nd trial	11.5± 7.7	8.7± 5.6	21.3± 12.6**	18.6± 11.4**
Day 2; 3rd trial	7.3± 6.3	10.9± 7.9	23.9± 14.2**	20.9± 13.7**
4th trial	6.9± 5.7	9.1± 6.4	25.5± 12.9**	17.4± 11.9**
Day 3; 5th trial	7.4± 6.1	7.7± 6.2	20.0± 14.3**	18.6± 13.4**
6th trial	3.4± 3.4	7.2± 5.7	18.5± 14.6**	14.3± 9.6**
Day 4; 7th trial	5.2± 6.5	9.2± 9.7	16.6± 12.2**	17.7± 15.3**
8th trial	2.8± 3.7	4.2± 3.8	15.6± 12.0**	16.9± 13.9**

a: Mean±S.D.

** : Significant difference from control at $p < 0.01$.

Table 5. Summary of shuttle-box avoidance test in the micrencephalic offspring prenatally exposed to MNU during the organogenic period; Waiting time and avoidance response:

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control (Males)	Un-treated control (Females)	MNU 2.5 (Males)	MNU 2.5 (Females)
Number of offspring examined	20	20	22	20
Waiting time (seconds x 12.5)	c			
Day 1 ^a	1657.9±339.5	1586.7±250.0	1624.8±215.5	1801.2±309.6
Day 2 ^b	1523.2±353.8	1332.6±323.5	1293.7±397.1	1427.7±355.0
Day 3 ^b	1256.5±458.7	1045.4±476.2	1121.8±293.1	1256.4±407.2
Day 4 ^b	1292.5±619.5	1095.2±493.4	906.4±223.0	1161.3±509.5

Number of avoidance response				
Day 1 ^a	0.5± 1.0	1.6± 2.0	2.2± 2.1 *	1.5± 1.9
Day 2 ^b	2.6± 2.8	5.2± 3.9	9.8± 7.4 *	8.1± 5.3
Day 3 ^b	8.8± 6.5	14.7± 9.5	13.2± 7.7	12.8± 8.4
Day 4 ^b	10.6± 9.6	13.7±10.8	17.7± 6.9	15.7± 9.3

a: Test without conditioned stimulus, 30 trials/animal/day.

b: Test with conditioned stimulus, 30 trials/animals/day.

c: Mean±S.D.

*: Significant difference from control at p<0.05.

Table 6. Summary of shuttle-box avoidance test in the micrencephalic offspring prenatally exposed to MNU during the organogenic period; Pre-trial responses

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control (Males)	Un-treated control (Females)	MNU 2.5 (Males)	MNU 2.5 (Females)
Number of offspring examined	20	20	22	20
Number of response				
Day 0 ^a	24.9± 2.9 ^d	21.3± 4.2	14.5± 6.2**	11.3± 4.3**
Day 1 ^b	20.6± 4.0	20.4± 8.5	14.8± 10.3	12.4± 5.8 *
Day 2 ^c	7.1± 8.4	8.5± 6.3	3.8± 4.2	4.6± 6.8
Day 3 ^c	8.1± 9.5	9.1± 7.0	5.9± 5.6	4.8± 8.2
Day 4 ^c	8.4± 8.2	10.8± 4.9	5.5± 5.9	4.8± 9.5

a: Test without conditioned or non-conditioned stimulus, 10 minutes/animal/day.

b: Test without conditioned stimulus, 30 trials/animal/day.

c: Test with conditioned stimulus, 30 trials/animals/day.

d: Mean±S.D.

*: Significant difference from control at p<0.05.

Table 7. Summary of open-field test scores in the micrencephalic offspring prenatally exposed to MNU during the organogenic period.

Dose groups (mg/kg)	Un-treated control (Males)	Un-treated control (Females)	MNU 2.5 (Males)	MNU 2.5 (Females)
Number of offspring examined	20	20	22	20
Day 1				
Latency time (seconds)	16.8± 7.6	12.8± 8.9	29.5±33.2	35.6± 33.4**
Ambulations	23.2±15.2	40.3±21.4	26.8±20.9	15.7±12.1**
Rearings	0.7± 1.3	1.9± 2.3	1.4± 1.9	2.9± 4.8
Groomings	1.5± 0.9	1.8± 0.9	1.0± 0.8	0.6± 0.8**
Defecations	2.2± 2.0	1.9± 2.1	3.2± 2.7	3.7± 1.5 *
Urinations	0.8± 1.1	1.2± 1.8	1.7± 1.4	1.3± 0.8
Day 2				
Latency time (seconds)	8.9± 4.7	9.3± 9.1	28.6±35.0 *	20.7±13.4 *
Ambulations	30.7±23.0	55.4±29.4	25.8±18.8	23.2±22.2**
Rearings	0.0± 0.0	1.3± 1.3	1.4± 2.3	1.0± 1.4
Groomings	1.8± 1.1	1.3± 0.7	1.0± 0.8	1.0± 0.8
Defecations	2.8± 2.7	0.7± 1.3	2.3± 2.2	3.1± 1.9 *
Urinations	0.4± 0.5	0.9± 1.3	1.0± 1.3	0.8± 0.8
Day 3				
Latency time (seconds)	6.8± 3.3	4.0± 1.9	21.6±16.9**	31.6±36.9**
Ambulations	33.1±27.3	64.1±34.4	21.9±23.0	25.0±22.9**
Rearings	0.8± 1.9	2.4± 3.2	0.6± 1.7	2.7± 2.5
Groomings	1.0± 0.8	1.3± 1.8	1.3± 1.2	1.0± 0.7
Defecations	2.1± 2.1	0.4± 1.0	2.3± 1.8	1.8± 1.7
Urinations	0.6± 0.8	1.2± 1.5	0.7± 1.0	1.2± 1.0

*: Significant difference from control at $p < 0.05$.

** : Significant difference from control at $p < 0.01$.

本実験では、ラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠 7～17日）に 3 用量（2.5, 5, 10 mg/kg）の M N U を連続して母ラットに腹腔内投与し、胎児の発生、出生児の発育・行動に及ぼす影響を検討した。

母動物では、各 M N U 投与群で投与期間中の体重増加が抑制されたが、一般状態に著変はみられなかった。

子宮内胚・胎児死亡率は、各 M N U 投与群において用量依存的に上昇し、特に 10 mg/kg の投与では全着床胚が死亡したため生存胎児は得られなかった。2.5 mg/kg および 5 mg/kg の投与では平均で 10 例以上の生存胎児が得られたが、その胎児重量、胎盤重量は対照群のそれと比較して用量依存的に、かつ有意に減少した。これらの生存胎児では、ほぼ全例に外表異常がみられ 2.5 mg/kg 投与群の胎児では扁平な頭頂部が特徴的であった。この頭部の外形的特徴は、剖検の結果、終脳の形成不全に基づく変化であることが確認された。また、脳の直接観察では、嗅葉長を除く脳の各部位の長さおよび脳重量が、対照群に比し著しく低値を示し、特に終脳長および終脳幅において減少の程度が顕著であった。5 mg/kg 投与群の胎児では扁平な頭頂部、小耳、口蓋裂、下顎形成不全等の頭蓋・顔面異常の他に、指趾異常を含む複合的な外表異常が成立した。

M N U 10 mg/kg 投与群では、胎児は 1 例も娩出されなかった。5 mg/kg 投与群では、胎児は正常に分娩され、母動物の哺育行動（児集め行動、児なめ行動、営巣行動）も正常に生起したが、いずれの産児も出生後 48 時間以内に死亡した。2.5 mg/kg 投与群では、母動物の分娩・哺育状態に異常はみられず、産児の授乳状態も良好であった。

行動検査は、2.5 mg/kg 投与群および対照群の出生児について実施した。多単位水迷路試験では、2.5 mg/kg 投与群において、訓練試行（直水路）および迷路試行におけるゴール到達までの所要時間ならびにエラー数が、全試行を通じ有意に増加した。往復式回避学習試験では、2.5 mg/kg 投与

群の反応潜時、回避反応数に对照群と比較して著差はみられなかった。自発性両室間移動回数は、2.5 mg/kg 投与群において減少傾向を示した。オープンフィールド試験では、2.5 mg/kg 投与群の雌で3日間の試行を通じ、反応潜時の延長傾向、区画移動数、グルーミング回数の減少傾向および排糞数の増加傾向が明らかであった。雄においても反応潜時および区画移動数については、2、3日目試行時に同様の傾向がみられた。小頭症児の後肢引き込み反射、立ち直り反応、痛覚反応、縮瞳反射、耳介反射、瞬目反射は、いずれも正常に生起した。

小頭症児におけるこれらの行動の変化は、MNUの連続的な侵襲による中枢神経系の包括的な異常を反映したものと考えられるが、なお不明である。発生毒性確認のための一般的な原則に則って行動異常の臨界期および用量反応性を確認し比較しなければならない。

第2章 ラット胎児の脳に及ぼすMNUの影響—MNU投与時期と小頭症の発現—

本実験では、脳障害を有する出生児の行動・機能検査を行うための前段実験としてラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠7～17日）のいずれか1日に1用量（5 mg/kg）の N-methyl-N-nitrosourea（MNU）を母ラットに腹腔内投与し、胎児とその脳の発生に対する発生時期依存的な影響の有無を検討した。また、文献的に最感受期と考えられた妊娠13日に低用量（2 mg/kg）のMNUを投与し用量反応関係のある変化がみられるか否かを調べた。

第1節 実験方法

1. 投与量、投与方法

MNUの投与用量は、第1章の結果を受けて単一投与であることを考慮し、5 mg/kgを選定した。MNUは、投与直前に注射用生理食塩液に溶解させ、5 ml/kgの割合で妊娠7日～17日のいずれか1日に母ラットに単回腹腔内投与した。また、低用量としては、連続投与したとしても胚への致死作用あるいは、子宮内発育抑制作用が発現しないであろうと推察された2 mg/kgを選定し、妊娠13日の母ラットに単回腹腔内投与した。各ラットの投与液量は、投与日の体重をもとに算出した。対照群には無処置の妊娠ラットを用いた。

2. 観察方法

母ラットは、妊娠20日にエーテル深麻酔により致死させて常法に従って帝王切開し、ただちに子宮を摘出して、生存胎児および死亡胚を数えた。生存胎児については、性別および口蓋裂を含む外表異常の有無を観察した後、体重を測定した。胎児の脳は、後頭骨端で延髄を切断して摘出し、重

量を測定した後に10%ホルマリンで約1週間固定し、固定脳について実体顕微鏡下で脳の各部の長さをマイクロメータにより計測した。測定部位は全脳長（嗅葉先端～切断端）、嗅葉長（嗅葉前端～終脳前端）、終脳長（終脳半球の最大長）、間脳長（視交叉起始部～間脳後端）、中脳長（松果体～後脳前端）、後脳長（小脳前端～後端）の6部位とした。

第2節 実験結果および考察

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にも変化はみられなかった。したがって器官形成期における5 mg/kg以下のMNU単回処理では、母動物に顕著な毒性は発現しないと推察される。

2. 胎児観察

胎児観察の結果を表1に要約した。

子宮内胚・胎児死亡率は、5 mg/kg 妊娠10日および14日処理群においてわずかに上昇したが有意な変化ではなかった。また、胎児重量は、2 mg/kg 妊娠13日処理群を除く全処理群で低値を示したがいずれも背景値の範囲内にあった（表なし）。これらのことから、連続投与との最大の差異として5 mg/kg以下のMNU単回処理では、致死作用および発育抑制作用は、発現しないことが明らかとなった。したがって、処理群の胎児は、出生させた場合でも十分に発育することが期待された。

外表異常としては、外形的呼称としての小頭症が、5 mg/kg 妊娠12日処理群で95.7%、13および14日処理群で100%、15日処理群で15.6%、2 mg/kg 妊娠13日処理群で58.9%の胎児にみられたが、これ以外の異常は5 mg/kg 妊娠9日処理群の1例を除いてはいずれの胎児にも認められなか

った。したがって粗大形態異常の観点からすれば、連続投与の結果と同様にMNUの選択的な標的器官は胎児の中樞神経系であり、その障害感受期は、ほぼ妊娠12～15日の間にあることが判明した。特に、妊娠13、14日における胎児脳の影響性は高く、2 mg/kg 妊娠13日の処理では障害の発生頻度において用量依存的な反応が成立することが示された。これらの結果はKoyama, et al. (1970)の報告とほぼ一致するものである〔59〕。次に脳の各部位において発生時期特異的な障害感受性を示す部位が存在するか否かを調べた結果について述べる。

3. 脳の形態観察

計測結果を表2に示した。

脳重/体重比は、5 mg/kg 妊娠12～15日処理群および2 mg/kg 妊娠13日処理群で、嗅葉長/全脳長比は、5 mg/kg 妊娠15、16日処理群で、終脳長/全脳長比は、5 mg/kg 妊娠12～15日処理群ならびに2 mg/kg 妊娠13日処理群で、間脳長/全脳長比は、5 mg/kg 妊娠10、11および13、14日処理群で、後脳長/全脳長比は、5 mg/kg 妊娠17日処理群で有意に低かった。中脳/全脳長比には各処理群とも対照群と比較して著差はみられなかった。これらの結果を通覧すると、胎児脳のMNUに対する障害感受部位は、妊娠10日以降、中脳—終脳—嗅葉—後脳の順に互いに交錯しながら移行することが明らかである。一方、量的な反応性の高さからいえば、脳重/体重比の変化からみて、最障害感受期は妊娠13日にあり、これは終脳の最障害感受期と一致した。したがって、連続投与実験から類推したように胎児脳においては、MNUの侵襲に対して終脳が、他の部位と比較してさらに特異的な障害感受性を示すと判断される。当然のことながら妊娠13日処理の終脳ではMNUの侵襲に対して用量依存的な反応も成立していたが、この反応性は、他の部位においても成立すると推察される。また、終脳長/全脳長比は、5 mg/kg 妊娠12～15日処理群で有意に低値であったことから、この時期の胎児にあっては、ほぼ全例に小脳症が成立しているとみなしう

る。これらの結果は、中枢神経系の器官および組織発生は、時空間的なずれを示しながら進行するが故に、障害感受期が長く、かつその障害部位は外的作因の侵襲時期に応じて時期特異的に変化するといわれている〔52, 53, 54, 81〕ことに一致するものと考えられる。

第3節 総括

本実験の結果から、妊娠13日のMNU単回処理では、胎児の終脳に用量依存的な障害（小脳症）が成立することが判明した。このことにより次の第3章においては、児の行動においてこの脳の障害に対応した行動の変容がみられるか否かを検討した。

第4節 要約

本実験では、脳障害を有する出生児の行動・機能検査を行うための前段実験としてラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠7～17日）のいずれか1日に1用量（5 mg/kg）のN-methyl-N-nitrosourea（MNU）を母ラットに腹腔内投与し、胎児とその脳の発生に対する発生時期依存的な影響の有無を検討した。

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にも変化はみられなかった。

子宮内胚・胎児死亡率は、妊娠10日および14日処理群においてわずかに上昇したが有意な変化ではなかった。また、胎児重量は、2 mg/kg 妊娠13日処理群を除く全処理群で低値を示したがいずれも背景値の範囲内にあった。外表異常としては、外形的呼称としての小頭症が、5 mg/kg 妊娠12日処理群で95.7%、13および14日処理群で100%、15日処理群で15.6%、2 mg/kg 妊娠13日処理群で58.9%の胎児にみられたが、これ以外の異常は5 mg/kg 妊娠9日処理群の1例を除いてはいずれの胎児にも認められなかった。

胎児脳の形態観察の結果、脳重／体重比は、5 mg/kg 妊娠12～15日処理群および2 mg/kg 妊娠13日処理群で、嗅葉長／全脳長比は、5 mg/kg 妊娠15、16日処理群で、終脳長／全脳長比は、5 mg/kg 妊娠12～16日処理群ならびに2 mg/kg 妊娠13日処理群で、間脳長／全脳長比は、5 mg/kg 妊娠11、12および14、15日処理群で、後脳長／全脳長比は、5 mg/kg 妊娠17日処理群で有意に低かった。中脳／全脳長比には各処理群とも対照群と比較して著差はみられなかった。これらの結果から、胎児脳のMNUに対する障害感受部位は、妊娠10日以降、中脳－終脳－嗅葉－後脳の順に互いに交錯しながら移行することが明らかであった。また、妊娠13日のMNU単回処理では、胎児の終脳に用量依存的な障害（小脳症）が成立することが判明した。

Table 1. Effects of MNU singly treated on various days of gestation on the development of embryos in rats

Day of treatment (mg/kg)	Dose (mg/kg)	No. of rats examined	Total no. of implants	Embryonic deaths (%)	Total no. of live fetuses	Malformations (%)		
						H.C. ^a	M.C. ^b	Others
Control	0	6	92	3 (3.5)	89	0	0	0
7	5	6	98	8 (8.9)	90	0	0	0
8	5	5	93	3 (3.6)	90	0	0	0
9	5	6	91	7 (8.7)	84	2(2.4)	0	1(2.4)
10	5	5	81	11 (13.1)	70	0	0	0
11	5	5	73	3 (4.0)	70	0	0	0
12	5	5	79	7 (9.0)	72	0	69(95.7)	0
13	5	5	75	6 (7.8)	69	0	69(100.0)	0
14	5	5	77	11 (16.2)	66	0	66(100.0)	0
15	5	5	82	5 (6.2)	77	0	11(15.6)	0
16	5	5	77	5 (6.7)	72	0	0	0
17	5	5	72	4 (4.9)	68	0	0	0
13	2	5	77	4 (5.3)	73	0	41(58.9)	0

a: Hydrocephaly, b: Micrencephaly

Table 2. Effect of prenatal treatment with N-methyl-N-nitrosourea on the development of fetal brain in rats.

Day of treatment	Number of fetuses	Brain weight/		Olf.L./	Tel.L./	Di.L. /	Ms.L./	Mt.L./
		Body weight	B.L.					
Control	89	4.66	16.0	51.6	20.4	33.2	7.7	
7	71	4.83	15.4	49.9	19.9	31.9	7.7	
8	90	5.05	15.4	50.0	19.6	32.3	7.7	
9	82	4.94	15.3	49.8	19.6	32.1	7.7	
10	70	4.94	15.4	49.8	19.1*	32.5	7.7	
11	70	4.39	16.0	50.1	19.4*	33.3	7.7	
12	72	3.31**	17.2	44.3**	19.6	34.7	7.9	
13	69	2.87**	16.3	37.1**	19.6*	33.8	7.7	
14	66	3.27**	14.9	38.3**	19.2*	33.5	7.9	
15	77	4.17**	14.9*	44.1**	20.2	32.5	7.9	
16	72	4.69	14.6**	48.0	20.0	32.2	6.9	
17	68	4.59	15.1	52.0	20.9	34.0	6.0**	
13	77	3.76**	15.4	47.4**	20.2	35.6	7.7	

B.L. : Brain length, Olf.L.: Olfactory lobe length, Tel.L.: Telencephalon length,
 Di.L.: Diencephalon length, Ms.L.: Mesencephalon length, Mt.L.: Metencephalon length.

第 2 章では、M N U の侵襲に対するラット胎児の脳の最障害感受期が、妊娠 13 日であること、この時期の処理では特に終脳に障害感受性があり、5 mg/kg および 2 mg/kg の単回処理では、他の肉眼形態学的な異常を伴わずに胎児に用量依存的な終脳の形成不全（小脳症）が生じることが明らかとなった。そこで本実験では、このような脳の障害を有した出生児において脳の障害に対応した行動の変容がみられるか否かを検討した。すなわち妊娠 13 日の母ラットに M N U の 5 mg/kg および 2 mg/kg を単回投与し、得られた小頭症の出生児について生後 1 日から 10 週齢までの間に神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を含む種々の行動観察を行った。

第 1 節 実験方法

1. 投与量、投与方法

M N U の投与用量は、2 および 5 mg/kg の 2 用量とし、各用量の M N U は、投与直前に注射用生理食塩液に溶解させ、5 ml/kg の割合で妊娠 13 日の母ラットに単回腹腔内投与した。各ラットの投与液量は、妊娠 7 日の体重をもとに算出した。対照群には無処置の妊娠ラットを用いた。

2. 観察方法（詳細は、材料および方法の項を参照。）

母ラットは、自然分娩させ、分娩状態、哺育行動を調べた。各群とも離乳前に出生児の行動観察を行う哺育期観察群と離乳後に行動観察を行う育成期観察群とを区別し、各々 5 匹以上の出産動物を用意した。各腹について出生日に一腹児数を調整（雄 4 匹、雌 4 匹）し、出生児は、生後 22 日に離乳した。

次表に示す行動検査を実施した。

I. 初期行動発達検査 (哺育期観察群)

A. 反射の発達検査

- a) 交叉性伸展 (伸筋) 反射 (Crossed extension reflex)
- b) 全身反応 (Mass reaction)
- c) 前および後肢の握り反射 (Grasping reflex)

B. 姿勢反応の発達検査

- a) 立ち直り反応 (Surface righting response)
- b) 空中立ち直り反応 (Mid-air righting response)
- c) 断崖落下回避反応 (Cliff-drop aversion response)
- d) 触覚性踏み直し反応 (Tactile placing response)
- e) 姿勢性屈曲・伸展反応 (Postural flexion and extension)
- f) 後肢引込み反応 (Pelvic limb withdrawal response) *

C. 運動機能 (移動行動) の発達検査

- a) 歩行 (Gait):
 - ピボットイング (Pivoting)
 - 四足歩行 (Walking)
- b) 遊泳 (Swimming)
- c) 複合運動技能 (Complex locomotor skills):
 - 背地走性 (Negative geotaxis)
 - 棒つかみ (ぶら下がり) 行動 (Bar holding behavior)
 - ロープ降り行動 (Rope descent behavior)

II. 行動機能検査 (育成期観察群)

A. 情動性・探索運動検査

オープンフィールド試験 (Open-field Test): 5 週齢時に実施

B. 学習試験

Biel型多単位T型水迷路試験 (Biel's water multiple T-maze test):
6 週齢時に実施

往復式回避学習試験 (Shuttle-box avoidance test): 7 週齢時に実施

*: 後肢引込み反応 - 立位で後肢を強制的に後方に伸展させた時、直ちに正常位に後肢を引き直す反応で固有受容性の位置きめ反応の検査である。後肢による体の保持機能が発現した段階から検査を開始し、急速な反応の生起を指標に発達段階を評価した。

第2節 実験結果

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にもなんら変化は認められなかった。また、各群ともに母動物の分娩状態に異常はみられず、哺育状態も良好であった。

2. 行動検査

検査結果の要約を表1に示した。

A. 哺育期観察群

1) 反射および姿勢反応の発達検査

5 mg/kg 処理群では、握り反射、前・後肢の触覚性踏み直し反応および後肢引込み反応の発達遅延がみられたが、生起した反応形態は正常であった。しかし、全身反応および姿勢性屈曲・伸展反応の検査では、この群の出生児で特異的な異常反応が発現した。全身反応は尾をつまんだ時に発現する、統制の無い全身運動であり、出生直後に最強の反応が成立した後、児の成長に伴って速やかに消失する。この群の出生児ではこの反応性が異常に亢進しており、過剰にころげまわる反応が出現するとともに一回の反応持続時間も対照群の出生児に比較して明らかに延長した（生後1日齢の強反応生起率、対照群；20%，5 mg/kg処理群；100%，生後3日齢の強反応生起率、対照群；0%，5 mg/kg処理群；80%）。また、反応消失の過程も明らかに遅延した。一方、姿勢性屈曲・伸展反応は、頭部の受動運動に対応した四肢の屈曲・伸展反応であり、正常児では自発性の反応が伸展優位の時期（頸部をつまんで持ち上げた時、前後肢の伸展姿勢を取る時期：生後7～11日）に高率に成立する。これに対し5 mg/kg処理群の出生児では生後1日齢より屈曲性の強反応が成立し、自発性の姿勢は伸展反応優位の時期においてもほぼ常に屈曲性であった。ただし、反応の消失過程に遅延はみられなかった。

2 mg/kg 処理群の出生児では、反射および姿勢反応の発達に対照群と比較して差は認められず、異常な反応形態もみられなかった。

2) 歩行の発達検査

ピボッティングの発現・消失過程ならびにそれと重複する四肢で体幹を

保持し前進する行動としての四足歩行の発達の過程には対照群と各MNU処理群との間で差はみられなかった。しかし、歩行時における肢の運行動作には、5 mg/kg 処理群の出生児において際立った異常が発現した。正常ラットの歩行は前後肢の左右交叉性に同調した屈曲・伸展運動によって実行される。すなわち歩行時の肢の運行動作は、左前肢と右後肢、右前肢と左後肢の対運動の反復によって構成される。これに対し、5 mg/kg 処理群の出生児では、歩行中時に後肢における左右交互の反復協調性に乱れが生じ、両側後肢が同期して屈曲・伸展するいわゆるホッピング様の特異な歩行動作が、通常の歩行形態に混在して発現した。各観察日齢における異常歩行を示した個体の出現頻度ならびに1分間の歩行観察中における両側後肢の同期屈曲・伸展運動の平均生起率を表2に示したが、この異常歩行は四足歩行の発達初期から離乳後長期にわたり継続して常に観察された。2 mg/kg 処理群の出生児にはこのような歩行運動の異常はみられなかった。

3) 遊泳行動の発達検査

体幹を水面に保持し、肢の水掻き運動によって前進する機能としてのいわゆる「遊泳行動」の発達に関しては、5 mg/kg および 2 mg/kg 処理群ともに対照群と比較して著差は認められなかった(図1)。一方、この検査においては、歩行において観察された変化と同質の両側肢の同期運動が、後肢だけでなく前肢にも生起していることが、5 mg/kg および 2 mg/kg の両処理群において確認された。

歩行および遊泳行動は、ビデオコーダーで撮影し、詳細に検討したのでその結果は別途、第5節 補足 I. 遊泳・歩行異常 の項において述べる。

4) 複合運動技能の発達検査

棒つかみ(ぶら下がり)行動：5 mg/kg 処理群の出生児では、正常児のごとく後肢と尾を巧みに使用して棒上によじのぼり30秒以上留まる行動形

態がついに成立しなかった。この群の出生児は、生後17日齢までは常に前肢で棒に垂下するのみであり、生後19日齢以後においても棒によじ登ると同時に前方にそのまま回転して落下する稚拙な行動しか示さなかった。これに対し2 mg/kg 処理群の出生児は、対照群の出生児とほぼ同様にこの行動を発達させた（図2）。

背地走性：図3に示す如く5 mg/kg 処理群の出生児では、倒立位から反転し、傾斜板を上方に登る完成した運動形態（TypeⅢ）は、生後21日齢に至っても十分に発達しなかった。この時期に大半の個体は、背地性は示しても上方への走性を示さず（TypeⅡ）、倒立位のまま落下する（TypeⅢ）個体も存在した。2 mg/kg 処理群の出生児は、対照群の出生児とほぼ同様にこの行動を発達させた（図3）。

ロープ降り行動：図4に示す如く5 mg/kg 処理群の出生児では、最初の保持姿勢のまま降り落ちる反応（TypeⅠ，Ⅱ）が生後21日に至っても消失せず、倒立して軽やかにロープを降りる行動（TypeⅣ）は、ほとんど生じなかった。2 mg/kg 処理群の出生児では、発達が遅延する傾向がみられ、特にTypeⅢ以降の行動形態の発達が未熟であった（図4）。

B. 育成期観察群

1) オープンフィールド試験（図5）

5 mg/kg 処理群の出生児では、出発潜時が2、3日目試行においても短縮されず、また、区画移動数は、対照群で試行の累積とともに増加したのに対し初期値が高く、以後減少するという相反する変化を示した。

2 mg/kg 処理群では、出発潜時に対照群と比較して著差はみられなかったが、区画移動数は、2日目試行以後、5 mg/kg 処理群と同様に減少する傾向を示し、3日目試行時の区画移動数は有意に低値を示した。

立ち上がり回数、グルーミング回数、排糞数および排尿区画数には各群間で差はみられなかった。

2) Biel型多単位T型水迷路試験 (図6)

5 mg/kg 処理群では、総錯誤数、所要時間が著明に増加した。2 mg/kg 処理群では、対照ラットと比較して明らかな差異は認められなかったが、最終日の錯誤数、所要時間が有意に増加し、若干の学習能力の低下が疑われた。

3) 往復式回避学習試験 (図7)

5 mg/kg 処理群では、すべての試行ブロック (60 trials/block/day)において、2 mg/kg 処理群では第1、第2試行ブロックにおいて対照群と比較し、有意に高い回避反応率を示した。

第3節 考 察

本実験では、妊娠13日の母ラットにMNUの5 mg/kg および 2 mg/kgを単回投与し、得られた小頭症の出生児について生後1日から10週齢までの間に神経行動学的発達検査 (初期行動発達検査) を含む種々の行動観察を行った。

哺育期における初期行動発達の検査結果を要約すると、5 mg/kg 処理群すなわち第2章の結果から終脳の重度の形成不全を有すると推定される小頭症の出生児では、一部の反射および姿勢反応の発達が遅延するとともに反応形態に正常動物と本質的な差はないが、反応が過剰に発現する型の異常が生起したといえる。この型の異常反応は、いずれも本来、出生児の生後日齢の進行とともに消失する反射および姿勢反応に発現し、言い換えれば、この群の出生児では、反射および姿勢反応を統御する調節機能が、不完全で、その機能構築が遅延したと考えられる。一方、2 mg/kg 処理群の出生児では、反射および姿勢反応の発達に対照群と比較して差は認められず、異常な反応形態もみられなかった。反射は中枢神経系における統合と

機能の基本的単位であり、すべてが上位中枢により抑制的統御を受ける。姿勢反応は、この反射を含む脊髄と上位中枢の上行・下行伝導路の統合機能による姿勢の自動調節機能を反映するが、この両者は随意運動の基礎を構成する機能群とみなせる〔26〕。5 mg/kg 処理群の出生児では、発達初期にこれらの機能が不完全であったものの、結局は統合がうまくとられるようになったことから、感覚・運動の統合に関する一次機能は、妊娠13日5 mg/kg 処理による重度小頭症の出生児においても一応、正常に機能するものと推察される。2 mg/kg 処理による出生児では、この機能群の発生は正常であったことがうかがわれる。しかし、歩行ならびに遊泳行動の発達検査では、両MNU投与群において前・後肢における異常な両側肢の同期運動が生起していることが確認された。ピボッティング、交叉性伸展反射、触覚性踏み直し反応あるいは後肢引込み反応の検査では、両MNU投与群の出生児において前・後肢の1側における独立した屈曲・伸展動作は、正常に生起していることが確認されたので、この前・後肢における異常な両側の同期運動は、随意的な四足運動が解発されるときに発現するものと解釈される。小頭症ラットの歩行様態におけるこのような変化は125-150radのX線照射によって誘発された小頭症のラットにおいても‘‘ホッピング歩行’’として発現することが知られている〔23, 43, 70, 71〕が、化学物質の処理によって誘発された小頭症についての報告は、殆ど無い。遊泳場面においては、異常を示す個体の発生頻度、個体内における異常歩様の生起頻度の双方において用量依存的な関係が、両MNU投与群において認められた(第5節補足I.参照)が、このことは、言い換えれば終脳の損傷の程度を反映しているとも考えられ、従って、感覚・運動の統合に関する一次機能が正常と推定されること(とりわけ2 mg/kg 処理群において)を前提に推論すれば、この小頭症児における異常歩様の原因障害部位は上位中枢にあると考えられる。

一方、四肢で体幹を保持し前進する行動としての四足歩行の発達過程あるいは体幹を水面に保持し、肢の水掻き運動によって前進する機能として

のいわゆる「遊泳行動」の発達に関しては、5 mg/kg および 2 mg/kg 処理群ともに対照群と比較して著差は認められなかった。したがって粗大運動としての体の移動能力は、障害されていないといえる。しかし、複合運動技能の発達検査では、棒つかみ（ぶら下がり）行動でみられたように 5 mg/kg 処理群の出生児では、運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられ、四肢の運動能力が障害されていたというよりも一定の負荷がかかった行動場面での移動運動では、計画性のある運動の組立が困難であったように思われる。

育成期観察においては、5 mg/kg 処理群の出生児において、2.5 mg/kg の連続投与実験において観察されたとほぼ同程度の迷路学習障害がみられた他、回避学習試験においても同様に著明な回避反応率の上昇がみられた。一方、2 mg/kg 処理群の出生児においても 5 mg/kg 処理群の変化に対応した軽度の変化が観察されたが、この変化は期待したほど明瞭なものではなかった。したがって、2 mg/kg 処理による程度の中樞神経系の障害では、迷路学習のような高次機能はさほど障害されないと推察されるが、1、2 の行動検査の結果のみから「学習能力」といった幅広い概念を包括する動物の機能が障害されていないとは、当然のことながらいえない。オープンフィールド試験では、5 mg/kg 処理群の出生児において、観察初期に活動性が増大し、以後減少しつつ反応潜時は減少しないという対照動物の反応性とは相反する変化がみられ、2 mg/kg 処理群では、出発潜時に対照群と比較して著差はみられなかったが、区画移動数は、2 日目試行以後減少する傾向がみられた。このことは、2 mg/kg 以上の処理群の出生児では、活動性の本態は寡動的であるが、5 mg/kg を処理した出生児では新奇刺激に対する反応性が過敏で、初期の探索活動性が亢進したことを示唆しているように思われる。

Rodier (1986) は、過去の報告と自身の実験結果を集約して、細胞増殖阻害作用のある agents (X 線照射、5-Azacytidine、Hydroxyurea、Methylazoxymethanol) の処理によって誘発された中樞神経系の障害を有す

るラットの活動性は、およそ妊娠13日以前の処理で寡動的であり、その後の処理では多動的となると報告している〔82〕が、本実験結果はこのことと良く一致すると考えられる。しかし、ラットの活動性は、観察事態の違いによって様々な様相を示すことが知られており〔20〕、探索活動とホームケージ内における本来の自発運動とは区別して評価すべきである。したがってオープンフィールド試験のように短時間の活動量の測定結果から、その動物の多動、寡動の区別を判断することには一定の限界があることを断っておきたい。

本実験結果から、妊娠13日の母ラットにMNUの5 mg/kg および 2 mg/kgを単回投与し、得られた小頭症の出生児では、随意的移動運動がおこなわれる時に四肢の運動形態に特異的異常が発現すること、生後初期に一部の反射・姿勢反応が亢進すること、迷路学習能力は、5 mg/kg の処理により顕著に障害されることが明らかとなった。2.5 mg/kg の連続投与実験においては本実験結果と重複する結果が得られていることから、この最障害感受期と考えられる妊娠13日のMNUによる中枢神経系の障害が、連続投与による出生児の行動の変容においても重要であったと推察される。

第4節 要 約

本実験では、妊娠13日の母ラットにMNUの5 mg/kg および 2 mg/kgを単回投与し、得られた小頭症の出生児について生後1日から10週齢までの間に神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を含む種々の行動観察を行った。

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にもなんら変化は認められなかった。また、各群ともに母動物の分娩状態に異常はみられず、哺育状態も良好であった。

出生児の反射および姿勢反応の発達検査では、5 mg/kg 処理群において

握り反射、前・後肢の触覚性踏み直し反応および後肢引込み反応の発達遅延がみられたが、生起した反応形態は正常であった。しかし、全身反応および姿勢性屈曲・伸展反応の検査では、反応性が異常に亢進していた。2 mg/kg 処理群の出生児では、反射および姿勢反応の発達に对照群と比較して差は認められず、異常な反応形態もみられなかった。

歩行の発達検査では、ピボットイングの発現・消失過程ならびにそれと重複する四肢で体幹を保持し前進する行動としての四足歩行の発達の過程には对照群と各 M N U 処理群との間で差はみられなかった。しかし、歩行時における肢の運行動作には、5 mg/kg 処理群の出生児においてホッピング様の特異な歩行動作が、通常の歩行形態に混在して発現した。2 mg/kg 処理群の出生児にはこのような歩行運動の異常はみられなかった。

遊泳行動の発達検査においても、遊泳行動の発達に関しては、5 mg/kg および 2 mg/kg 処理群ともに对照群と比較して著差は認められなかったが歩行において観察された変化と同質の両側肢の同期運動が、後肢だけでなく前肢にも生起していることが、5 mg/kg および 2 mg/kg の両処理群において確認された。この前・後肢における異常な両側の同期運動は、随意的な四足運動が解発されるときに発現するものと解釈され、この小頭症児における異常歩様の原因障害部位は上位中枢にあると考えられる。

複合運動技能の発達検査において棒つかみ（ぶら下がり）行動の検査では、5 mg/kg 処理群の出生児は、正常児のごとく後肢と尾を巧みに使用して棒上によじのぼり30秒以上留まる行動形態がついに成立しなかった。これに対し2 mg/kg 処理群の出生児は、对照群の出生児とほぼ同様にこの行動を発達させた。背地走性の検査では、5 mg/kg 処理群の出生児に倒立位から反転し、傾斜板を上方に登る完成した運動形態は、生後21日齢に至っても十分に発達しなかった。2 mg/kg 処理群の出生児は、对照群の出生児とほぼ同様にこの行動を発達させた。ロープ降り行動においても5 mg/kg 処理群の出生児では、最初の保持姿勢のまま降り落ちる反応が生後21日に至っても消失せず、倒立して軽やかにロープを降りる行動は、ほとんど生

起しなかった。2 mg/kg 処理群の出生児では、発達が遅延する傾向がみられた。5 mg/kg 処理群の出生児では、運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられ、一定の負荷がかかった行動場面での移動運動では、計画性のある運動の組立が困難であったように思われる。

育成期におけるオープンフィールド試験では、5 mg/kg 処理群において出発潜時が2、3日目試行においても短縮されず、また、区画移動数は、初期値が高く、以後減少した。2 mg/kg 処理群では、出発潜時に対照群と比較して著差はみられなかったが、区画移動数は、2日目試行以後、減少する傾向を示し、3日目試行時の区画移動数は有意に低値を示した。立ち上がり回数、グルーミング回数、排糞数および排尿区画数には各群間で差はみられなかった。

多単位T型水迷路試験では、5 mg/kg 処理群において総錯誤数、所要時間が著明に増加した。2 mg/kg 処理群では、対照ラットと比較して明らかな差異は認められなかったが、最終日の錯誤数、所要時間が有意に増加し、若干の学習能力の低下が疑われた。

往復式回避学習試験においては、5 mg/kg 処理群は、すべての試行ブロック (60 trials/block/day)において、2 mg/kg 処理群は第1、第2試行ブロックにおいて対照群に比較し、有意に高い回避反応率を示した。

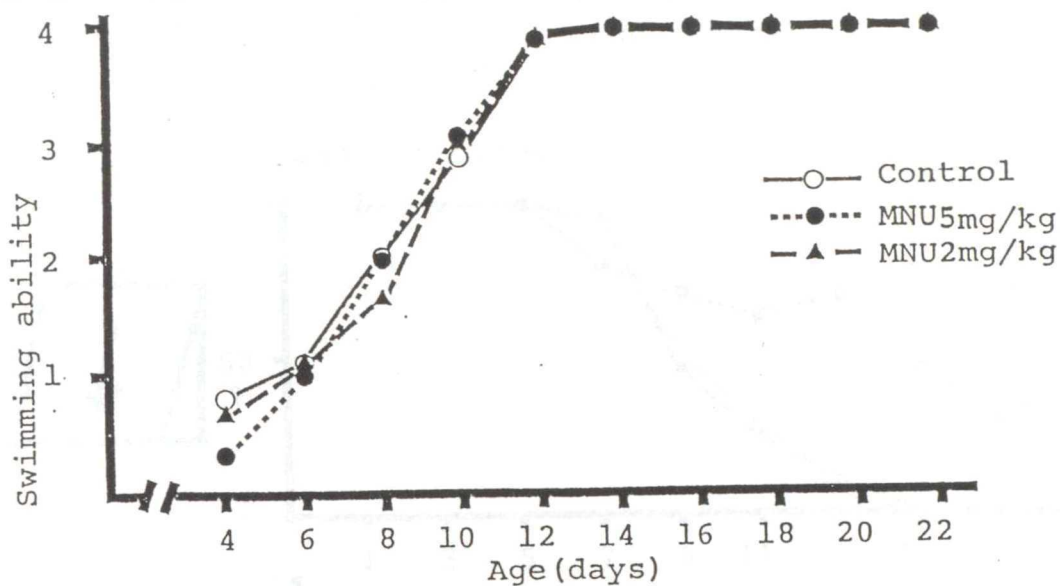
2.5 mg/kg の連続投与実験においては本実験結果と重複する結果が得られていることから、この最障害感受期と考えられる妊娠13日のMNUによる中枢神経系の障害が、連続投与による出生児の行動の変容においても重要であったと推察される。

Abnormal walking pattern in 13-day-old rats

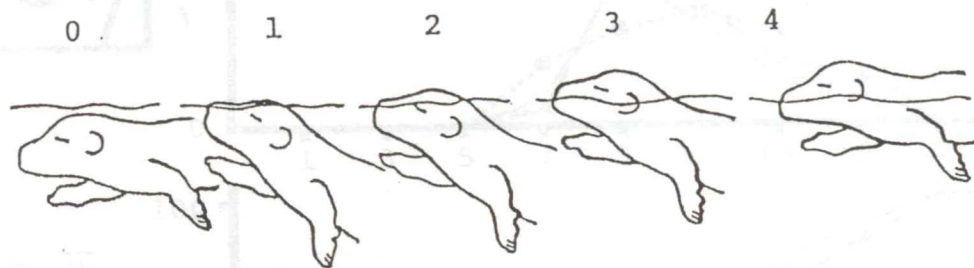
Group	Age (day)			
	11	13	15	17
Control	11	48	35	41
2 mg/kg	9	0	0	0
5 mg/kg	0	0	0	0

Fig. 1.

Maturation of swimming ability



The criteria used to ascribe ability rating units to swimming behavior



(Modified by Schapiro, et al., 1970)

Fig. 2

Development of bar holding response

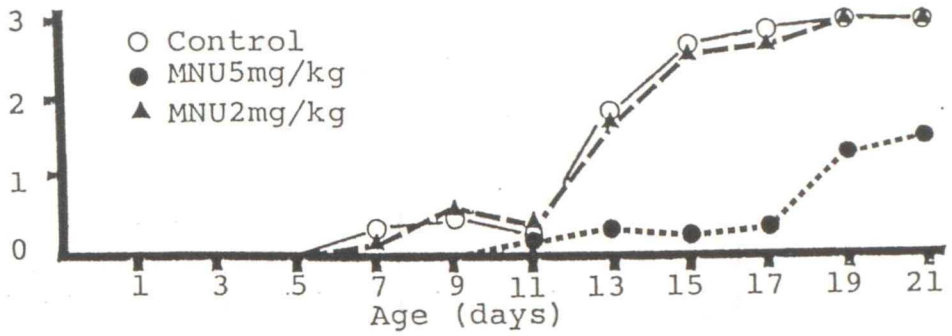


Fig. 3

Development of clined board behavior

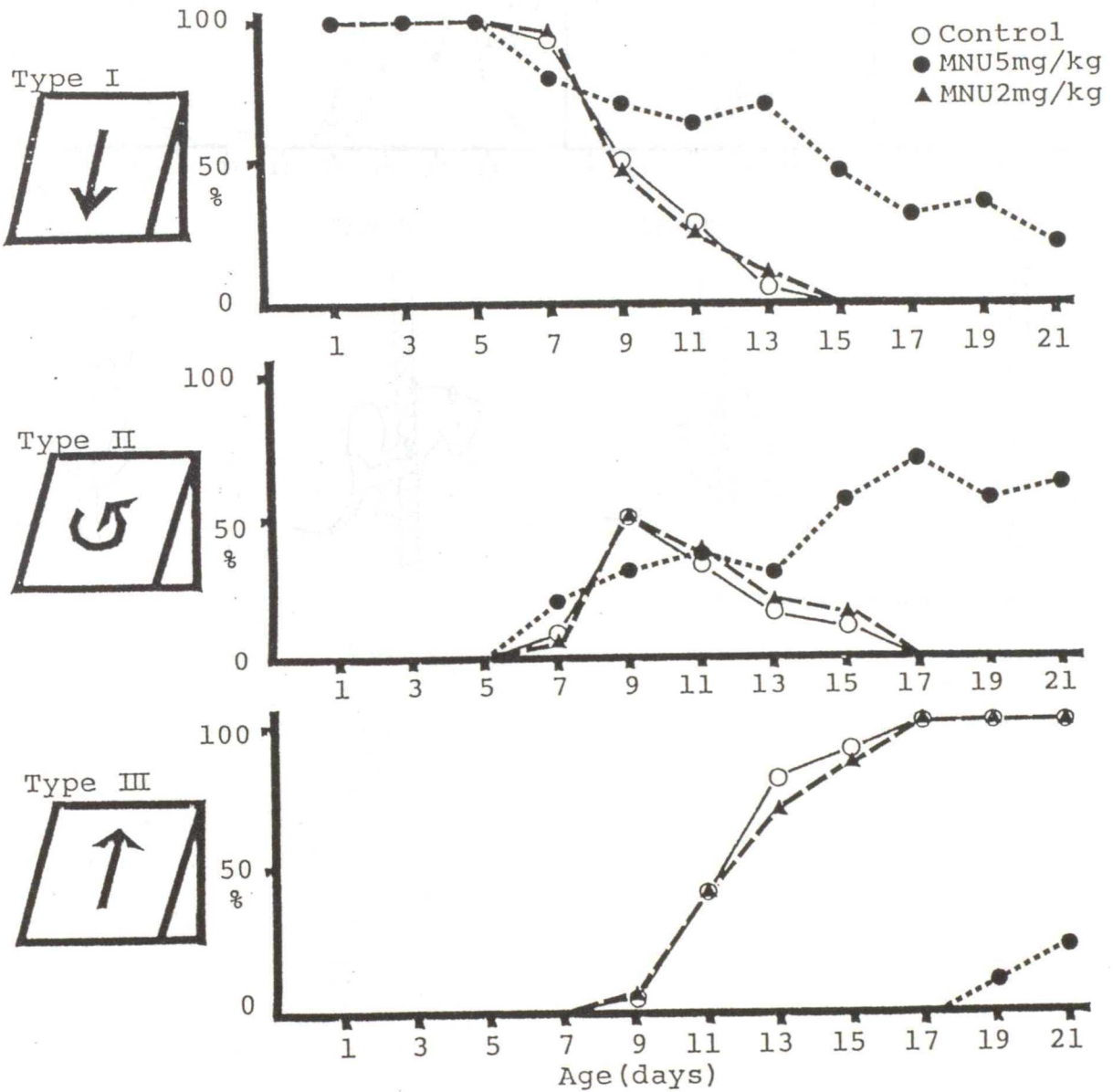
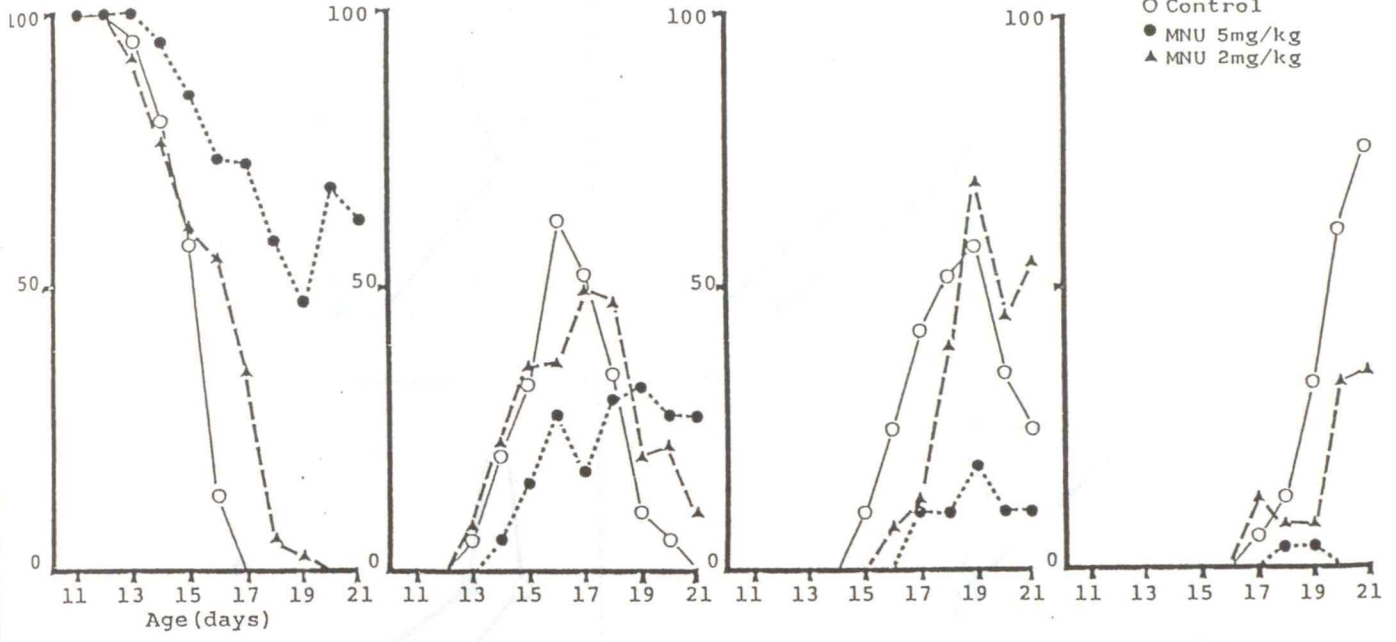


Fig. 4

Development of rope down response

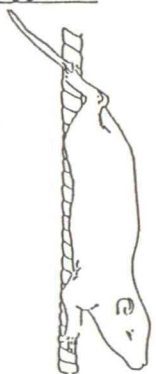
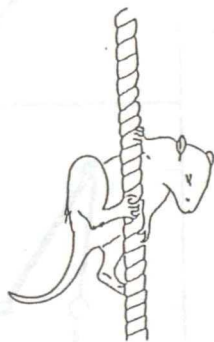


Type I

Type II

Type III

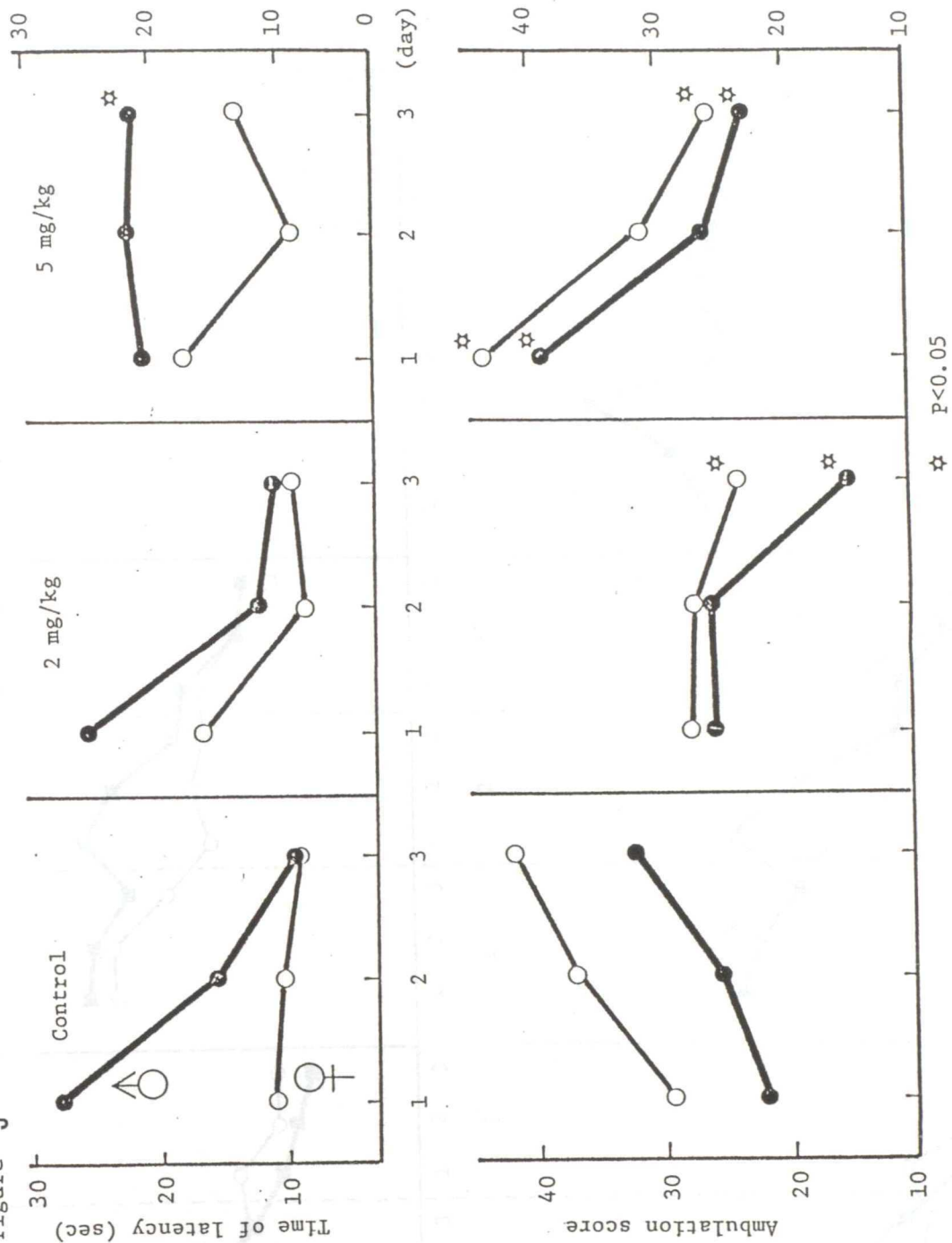
Type IV



(Altman & Sundarshan, 1975)

Figure- 5

OPEN-FIELD TEST



SHUTTLE-BOX AVOIDANCE TEST

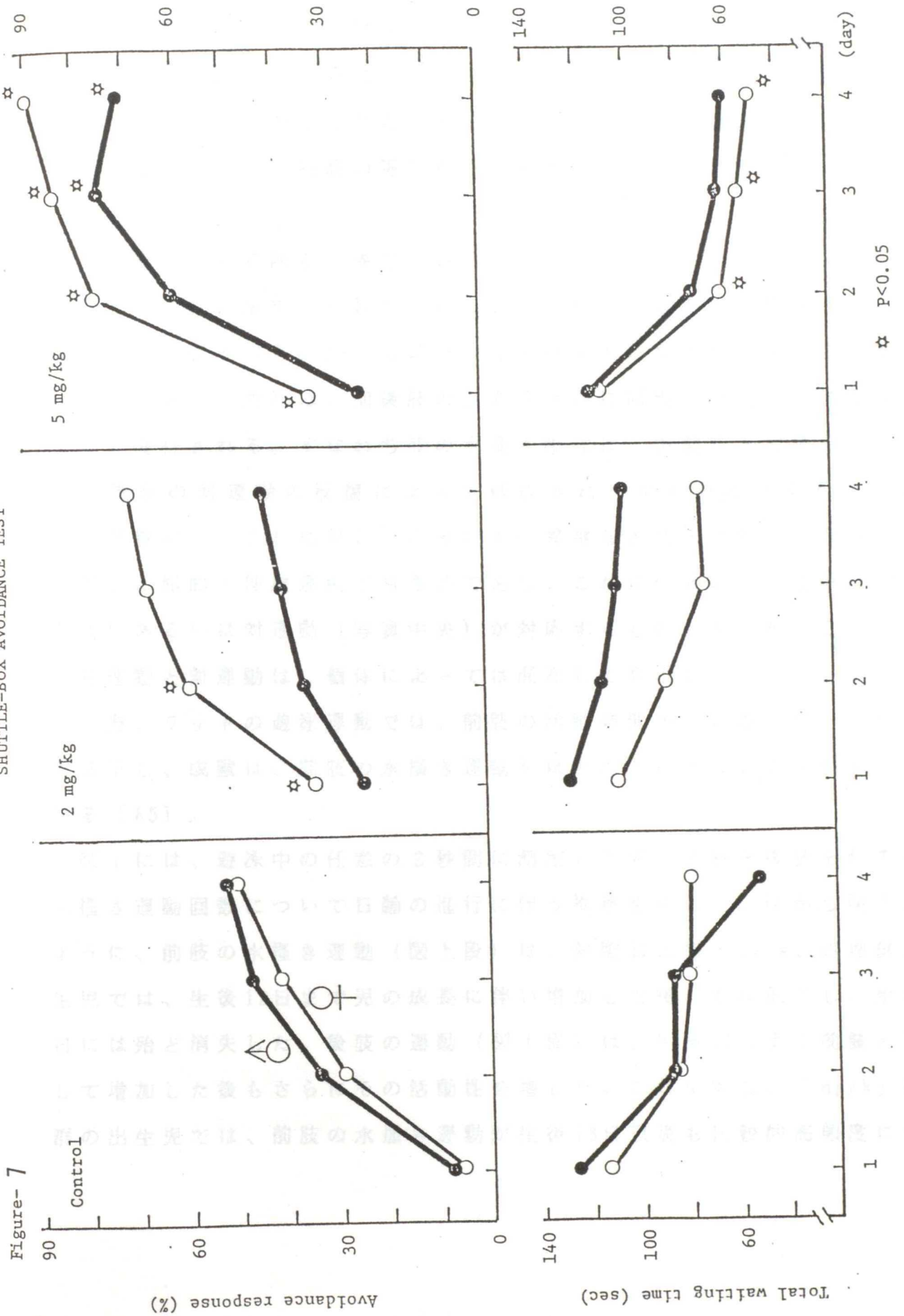


Figure-7

妊娠 13 日の母ラットに M N U の 5 mg/kg および 2 mg/kg を単回投与し、得られた小頭症の出生児について生後 1 日から神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を行ったところ、遊泳・歩行運動の発達検査において小頭症の出生児では、四肢の運行動作に異常が生ずることを認めた。

1. 遊泳における四肢の異常運動

写真 1 には、生後 12 日齢の児について左列に正常児の水掻き運動を、右 2 列に小頭症児（5 mg/kg 処理群）における異常な水掻き運動の 2 型を示した。正常児の遊泳は、前後肢の左右交叉性に同調した屈曲・伸展運動によって実行される。すなわち肢の水掻き動作は、左前肢と右後肢、右前肢と左後肢の対運動の反復によって構成され、左右両肢は交互に作動する（写真左）。これに対し、小頭症児の異常な水掻き運動は、両側後肢の同期した屈曲・伸展運動が特徴的であり、これに前肢の交互運動（写真最右列）あるいは対運動（写真中央）が対応するものであった。この前肢の交互運動と対運動は、個体によっては混在して発現した。

一方、ラットの遊泳運動では、前肢の活動頻度が日齢の進行とともに漸次低下し、成獣は、前肢の水掻き運動をほとんど示さないことが知られている〔85〕。

図 1 には、遊泳中の任意の 2 秒間に測定した児の前肢と後肢それぞれの水掻き運動回数について日齢の進行に伴う推移を示した。図から明らかなように、前肢の水掻き運動（図上段）は、対照および 2 mg/kg 処理群の出生児では、生後 12 日まで児の成長に伴い増加した後、漸次低下し、生後 22 日には殆ど消失した。後肢の運動（図下段）は、生後 12 日まで前肢と平行して増加した後もさらにその活動性を増した。これに対し、5 mg/kg 処理群の出生児では、前肢の水掻き運動が生後 18 日以後も比較的高頻度に発現

し、また後肢の運動は一貫して低い水準で推移したが、これは左右の同期運動を1回と数えたことによるものである。したがって、この群の出生児では、後肢の同期運動が全日齢を通じて高率に発現していたことがこの図からも認められる。そこで前肢と後肢とでこの左右をそろえた同期運動が小頭症の出生児でどのように発現していたかを次に示す。

図2に前、後肢それぞれについて、遊泳中の任意の2秒間に1回以上、左右の同期運動を示した個体の各日齢における発現頻度の推移を示した(図上段:前肢、下段:後肢)。

5 mg/kg 処理群では、後肢の同期運動が、全ての個体に一貫して生じた。しかし、前肢の同期運動を伴った個体数は、観察初期から50%以下と低く、かつ日齢の進行に伴い漸次減少した。一方、この観察においては、2 mg/kg 処理群においても異常を示す個体が、小数ながら生後4日から10日にかけて出現することが確認された。対照群の出生児では、水槽の壁面に接した時に、偶然、左右肢の運動が同期化した例が散見されたにすぎなかった。

図3には、上の異常運動を示す個体において、前、後肢の一連の水掻き運動中にしめた同期運動の発現率(群平均)の推移を示した(図上段:前肢、下段:後肢)。

5 mg/kg 処理群の出生児では、後肢の運動は、どの日例においてもほぼ全てが同期運動であった。これに対し、前肢では生後10日齢まで左右の同期運動が支配的であったが、漸次、異常運動の発現率は減少し、生後22日には、ほぼみられなくなった(ただし、この時期では前肢の水掻き運動そのものが殆ど生起しない。図1参照)。一方、2 mg/kg 処理群の出生児では、前、後肢ともに同期運動の混在率は低く、生後10日以降ではまったくみられなくなった。

II. 歩行における後肢の異常運動

実験Ⅲ・結果の項で示したように、5 mg/kg 処理群の出生児では、歩行

中時に後肢における左右交互の反復協調性に乱れが生じ、両側後肢が同期して屈曲・伸展するいわゆるホッピング様の特異な歩行動作が、通常の歩行形態に混在して発現した。しかし、遊泳時と異なり、前肢の運動には同期運動は、発現しなかった。また、観察した個体は、すべて遊泳運動をも観察した個体であるが、遊泳時と異なり、後肢の異常を示した個体の発現頻度ならびに歩行時の後肢の動作中にしめる同期運動の発現率は低率であった。このことは、同じ随意運動にあっても遊泳のように強制的に運動が解発され、かつ四肢の運動に対する固有受容性の束縛が減少するような事態においては、本態的異常が、他の運動制御機能の働きによる修飾をうけずに発現していることを示唆していると考えられる。

考察： 以上のように、妊娠13日、MNU 5 mg/kg および 2 mg/kgの処理により出生した小頭症児の遊泳・歩行運動には、用量依存的な発現性を示す四肢の異常運動がみられた。小頭症ラットの歩行様態におけるこのような変化は、X線の胎生期照射によって誘発された小頭症ラットにおいても生起することが報告されている〔23, 43, 70, 71〕。これらの実験では、胎生12~16日のいずれか1日に 125~150radのX線を照射して得られた出生児について検討しているが、この異常行動の感受期は妊娠13~15日にあり、最感受期は妊娠13日にあるようである。しかし、いずれも歩行のみを対象に観察しており、用量依存的な発現性を示す四肢の異常運動の報告は無い。したがって本実験において遊泳時に用量依存的な発現性を示す四肢の異常運動がみられたことは、新知見といえる。ただし、これらの実験では、歩行においても前肢に異常がみられることが報告されており、本実験結果には一致しない点もある。観察手技にはさほど違いがあるようには思えないことから、おそらく処理方法の差によるものと考えられる。この障害の中樞神経系における原因障害部位は、前交連の損傷〔71〕または脊髄後根の損傷〔43〕にあると考察されているが、四足歩行の神経支配機構は全貌が解明されているわけではなく、現状で結論づけることは困難である。

Abnormal swimming pattern in young with micrencephaly

Normal
(Control)

Abnormal
(MNU5mg/kg)

a

b

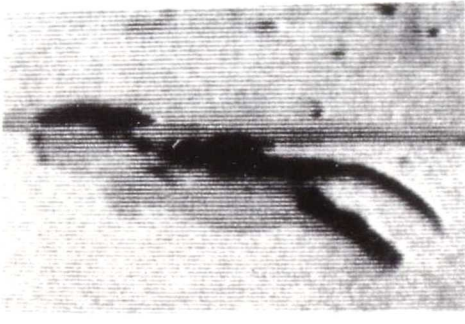
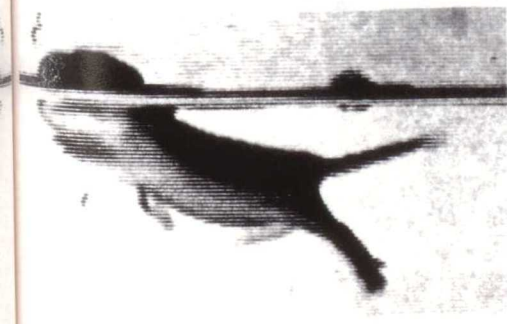
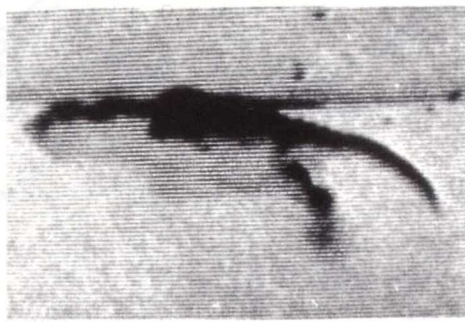
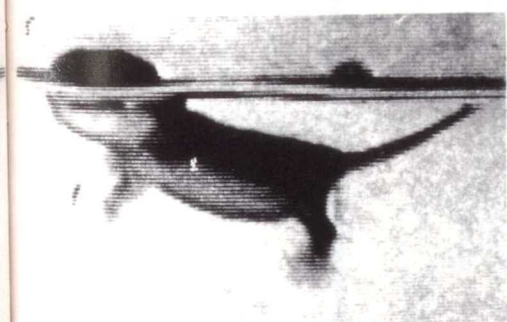
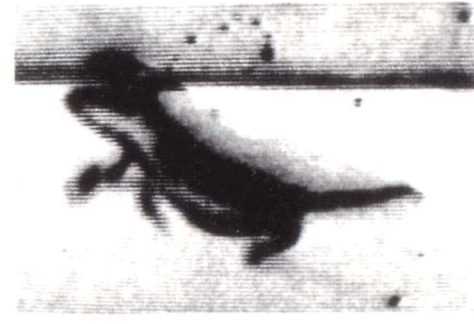
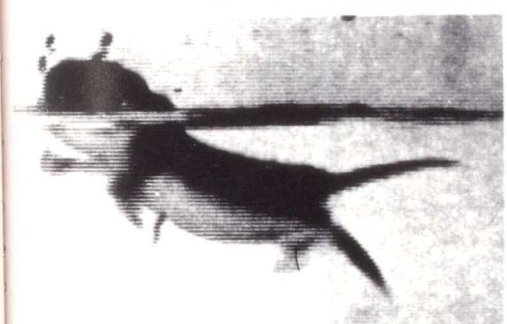
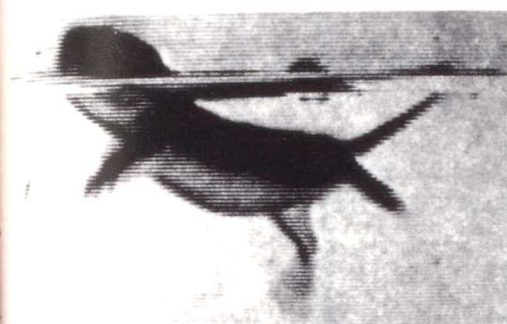
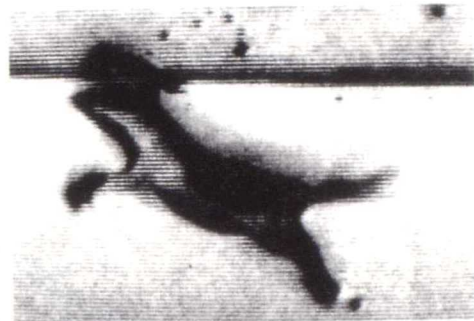
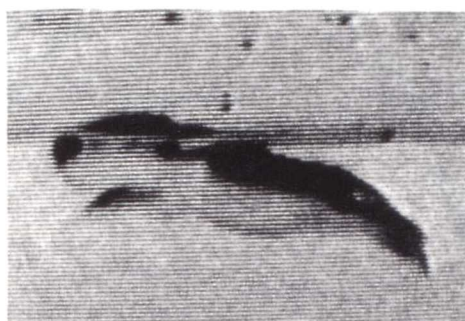
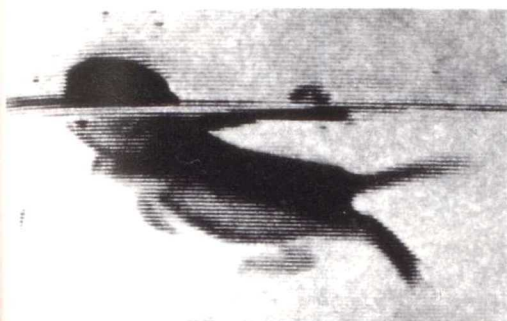
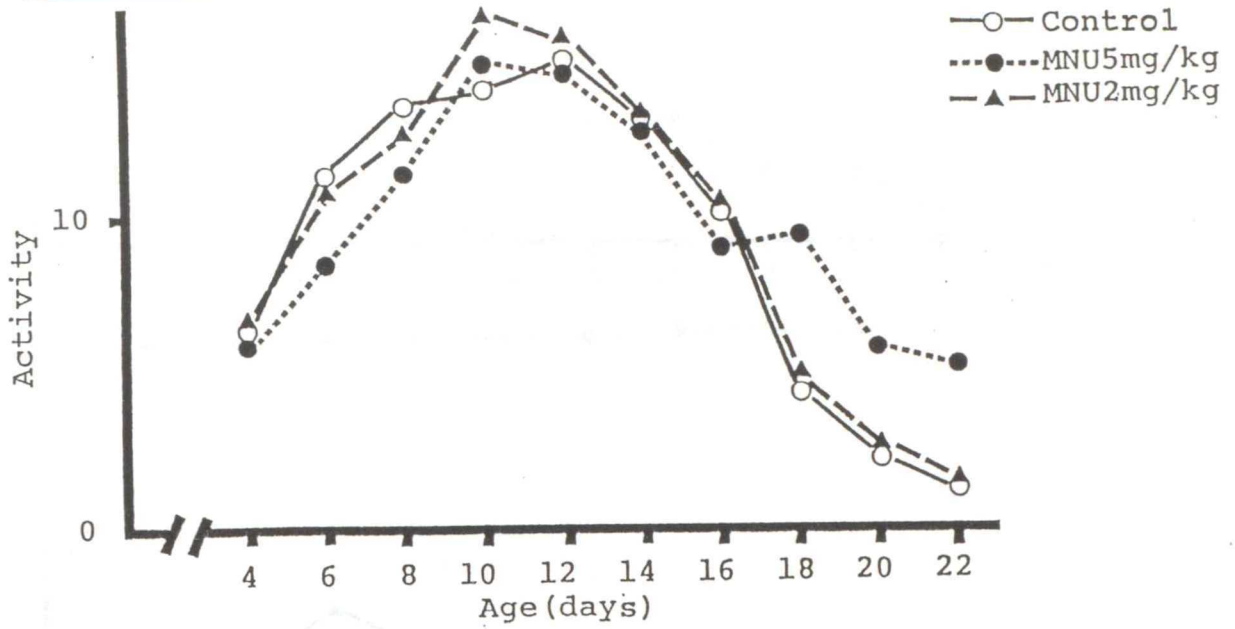


Fig.1 Changes of front and hind-leg activity

Front-leg



Hind-leg

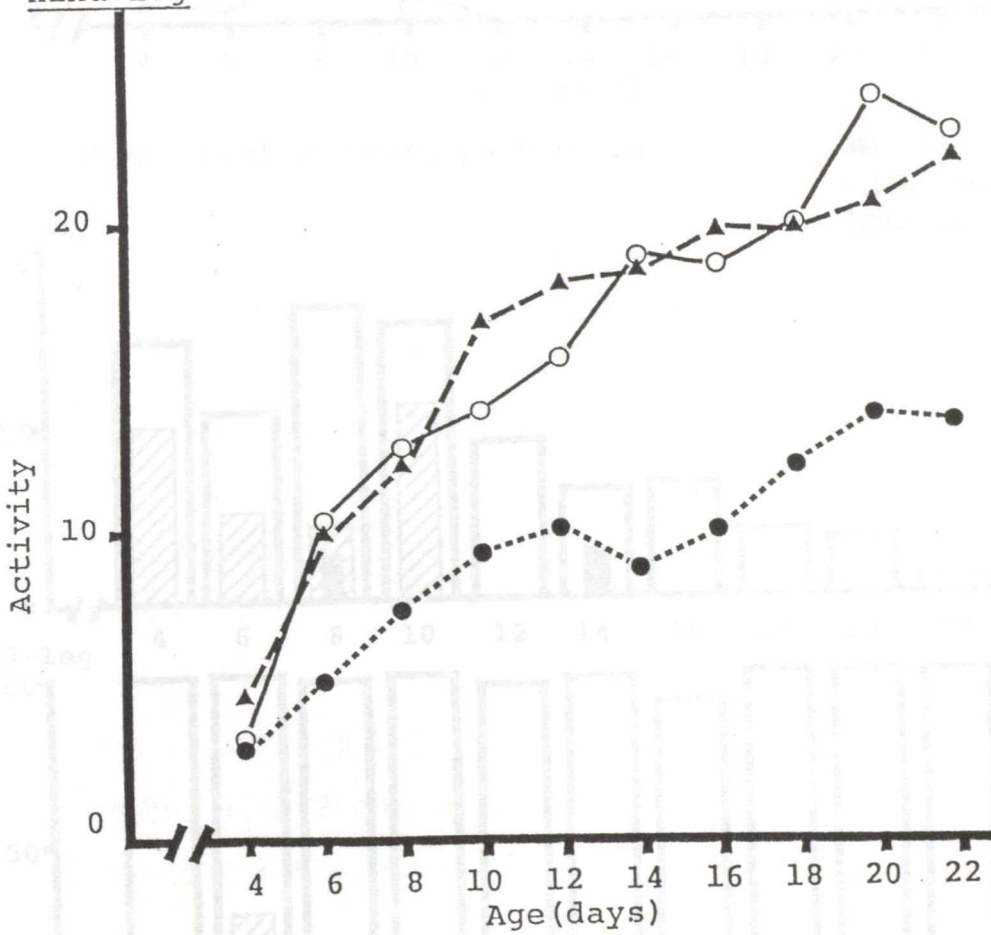


Fig. 2
Frequency of animals with abnormal swimming pattern

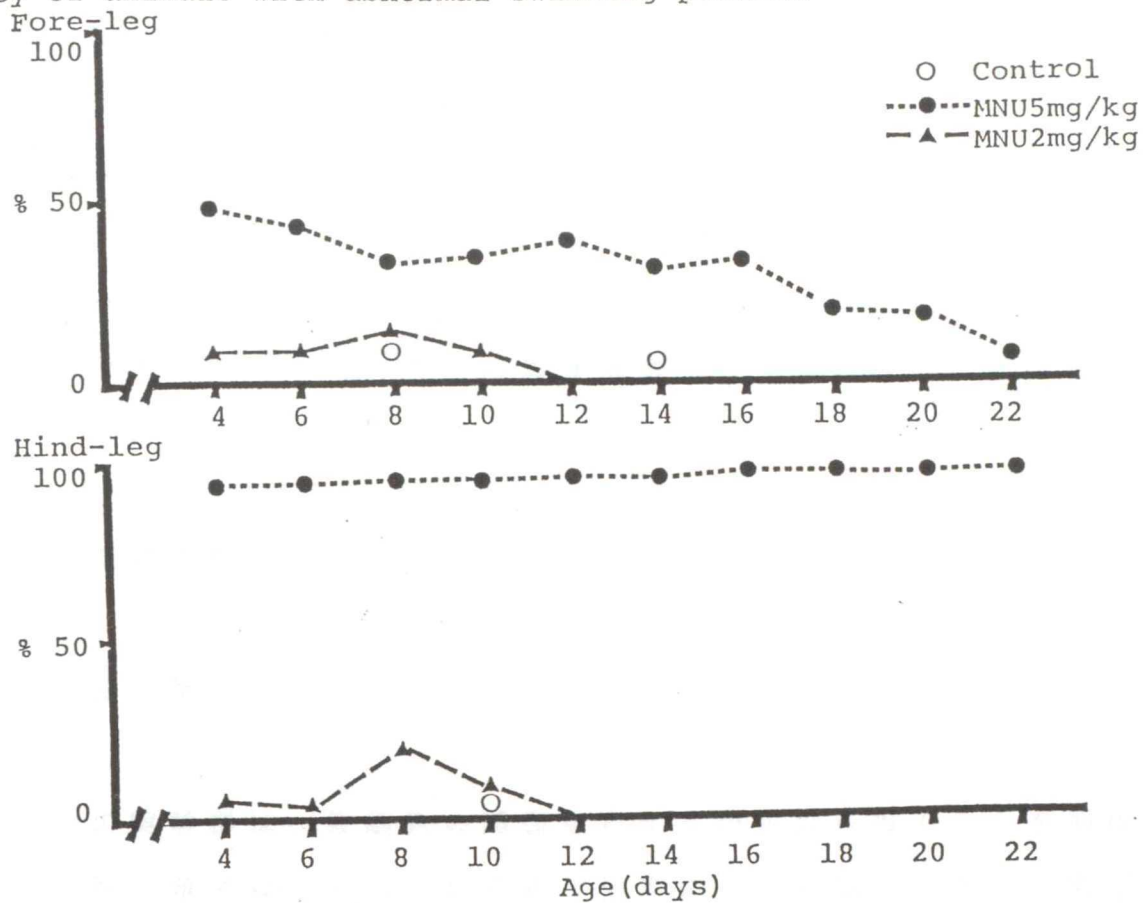
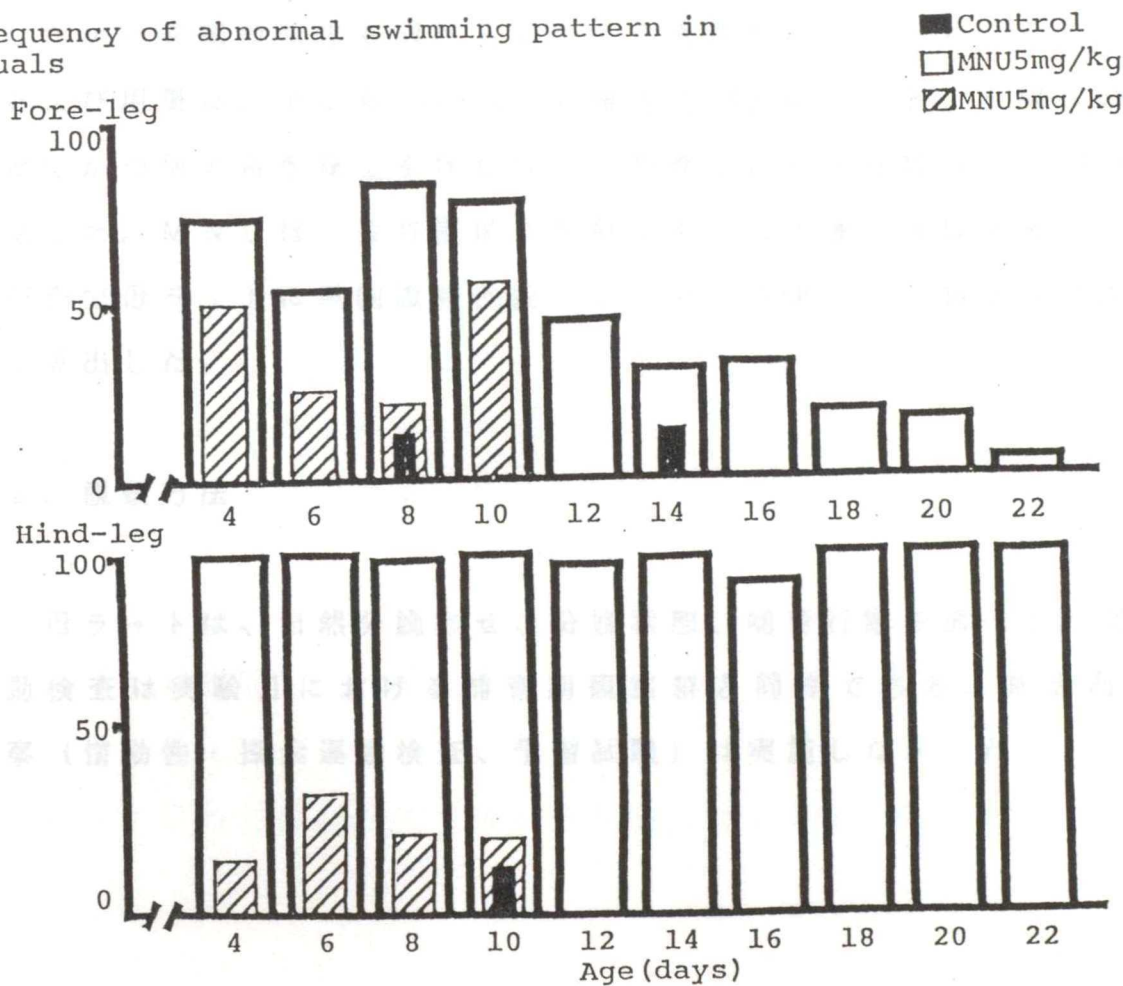


Fig. 3
Mean frequency of abnormal swimming pattern in individuals



第 3 章

第 5 節 補足Ⅱ. 妊娠後期投与実験

前節において M N U 妊娠 13 日処理により出生児の四肢の運動に特異的な異常がみられたが、これが終脳の障害に対応したものであるかどうかを確認する目的で、妊娠後期（妊娠 20 日）に M N U の 10 mg/kg を単回投与した群を追加し、神経行動学的発達検査を行って処理時期依存的な行動異常がみられるか否を検討した。

I. 実験方法

1. 投与量、投与方法

この実験群は、後脳系の障害を有する出生児を得ることを期待して設けた。第 2 章では、5 mg/kg 妊娠 17 日処理により後脳に軽度の形成不全が成立したが、終脳の変化も随伴している可能性が考えられた。そこで処理時期および用量は、小山ら（1970）の報告〔58〕に基づき、小脳への障害が明瞭でかつ他の奇形発生を伴わないと期待された、妊娠 20 日、10 mg/kg に設定した。M N U は、投与直前に注射用生理食塩液に溶解させ、5 ml/kg の割合で母ラットに単回腹腔内投与し、投与液量は、妊娠 7 日の体重をもとに算出した。

2. 観察方法

母ラットは、自然分娩させ、分娩状態、哺育行動を調べた。実施した行動検査は実験Ⅲにおける哺育期観察群と同様である。育成期の行動観察（情動性・探索運動検査、学習試験）は実施しなかった。

II. 実験結果

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態に異常はみられず、体重推移にもなんら変化は認められなかった。また、母動物の分娩状態および哺育状態も良好であった。

2. 行動検査

検査結果の要約を前節の結果とあわせて表1に示した。

1) 反射および姿勢反応の発達検査

空中立ち直り反応および握り反射の発達が顕著に遅延し、生後5週例に至るまで成熟した反応形態がみられなかった他は、いずれの反射および姿勢反応も正常に生起した。

2) 歩行の発達検査

ピボットィングの時期を含む歩行の発達過程が全般にわたり遅延した。しかし、後脳系の障害を期待したこの群の出生児の歩行動作には、運動失調性の変化を含めなんら障害は、認められなかった。

3) 遊泳行動の発達検査

呼吸を確保し、体幹を水面に保持し、肢の水掻き運動によって前進する機能としての「遊泳行動」の発達は、約2日ほど対照群に比較して遅延した。しかし、その運動形態は正常児と変わらなかった。

4) 複合運動技能の発達検査

棒つかみ行動および背地走性の検査では、発達過程が2ないし4日程度遅延した他に異常は認められなかった。

ロープ降り行動の検査では、やや特徴的な異常がみられた。すなわち、

この群の出生児では、前肢でロープを保持し、頭部を下方へ向け、倒立しようとする動作 (Type III) がうまくいかず、横向きになった時にロープから転落する個体が離乳直前まで多くみられた。

3. 出生児の剖検

生後49日に出生児を剖検した結果、この群の出生児の後脳 (小脳) は肉眼的に明らかに対照動物より小さかったが、終脳、間脳、および中脳部の大きさは対照動物と大差なかった (次表)。

Table Brain weight of offspring prenataly exposed to MNU at 10 mg/kg on day 20 of gestation, at 49 days of age.

Group	Brain weight (grams)		
	Whole Brain	Te.+Di.+Ms. ^{a)}	Metencephalon
Control (15)	1.82 ± 0.1 ^{b)}	1.24 ± 0.1	0.57 ± 0.0
MNU 10 mg/kg (15)	1.61 ± 0.1**	1.25 ± 0.0	0.36 ± 0.1**

(): Number of offspring examined.

a): Telencephalon + Diencephalon + Mesencephalon.

b): Mean ± S.D.

**): Significant difference from control, $p < 0.05$.

III. 総括

妊娠20日、MNU 10 mg/kg の処理による出生児では、明らかに後脳の形成不全が生じていたが、行動の発達遅延が顕著であった他は、運動形態に質的異常は認められなかった。ロープ降り行動の検査では軽度の運動機能障害が疑われたが、運動失調とは判断し難かった。このように妊娠後期のMNU処理に起因した中枢神経系の障害では、発現した行動の変化が明らかに妊娠13日処理群のそれとは異なっていた。Methylazoxymethanol 10ないし20 mg/kgの胎生後期処理では、出生児に運動失調性の行動異常が生起するといわれている [38, 50] が、この時期の処理は less effective であるとの見解もあり [84]、本実験結果は後者を支持するものと考えられる。

Table 1 Summary of the results of behavioral observations in offspring of rats treated with MNU

INDEX		MNU 5mg/kg	MNU 2mg/kg	MNU 10mg/kg
Neural reflex	Righting reflex	-	-	-
	Mid-air righting reflex	-	-	Delayed
	Cliff drop aversion	-	-	-
	Fore and hind-limb placing response	Delayed	-	-
	Grasp reflex	Delayed	-	Delayed
	Hind-limb withdraw reflex	Delayed	-	-
	Crossed extensor reflex	-	-	-
	Postural flexion and extension	Affected	-	-
	Mass reaction	Affected	-	-
	Pivoting	-	-	Delayed
Locomotion	Walking	-	-	Delayed
	Maturation Pattern	Impaired	-	-
	Swimming ability	Impaired	Subtly impaired	Delayed
Developmental behavior	Rope down	Impaired	Delayed	Subtly affected
	Bar holding	Impaired	-	Delayed
	Clined board	Impaired	-	Delayed
	Water multiple T-maze test	Impaired	Subtly impaired	-
Learning and emotional behavior	Open field test	Impaired	Subtly impaired	-
	Shuttle-box avoidance test	Affected	Subtly impaired	-

第4章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの初期行動発達の異常

第3章では、ラットの中枢神経系、特に終脳の最障害感受期と推定された妊娠13日にMNUの暴露を受けた出生児では、移動運動がおこなわれる時の四肢の運動形態に特異的な異常が発現すること、生後初期に一部の反射・姿勢反応が亢進することなどが判明した。そこで、本実験では、そのような行動の変化が、MNUにより特異的に、あるいは妊娠13日の処理に限って誘発される異常であるかどうかを調べる目的で、終脳の障害感受期間と推定される妊娠12日～15日のいずれか1日にMNUの5 mg/kg、あるいは胎生期処理でラットに小頭症を誘発することがよく知られている methylazoxymethanol (MAM) の40 mg/kg を単回投与し、得られた出生児について第3章、第1節とほぼ同様の神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を行い、その行動を比較した。

第1節 実験方法

1. 投与量、投与方法

MNUの投与用量は、5 mg/kg に、MAMの投与用量は、40 mg/kgに設定した。このMAMの用量は、前段実験において、脳重量、終脳長ともにMNUの5 mg/kg 投与にほぼ匹敵する小脳症を誘発することが確認されている。MNUあるいはMAMは、投与直前に注射用生理食塩液に溶解させ5 ml/kg の割合で妊娠12日～15日のいずれか1日に母ラットに単回腹腔内投与した。各ラットの投与液量は、妊娠7日の体重をもとに算出した。対照群には無処置の妊娠ラットを用いた。

2. 観察方法（詳細は、材料および方法の項を参照。）

母ラットは、自然分娩させ、分娩状態、哺育行動を調べた。各群とも5

匹以上の出産動物を用意し、出生日に一腹児数を雄 5 匹、雌 5 匹となるように調整した。この実験では雄出生児についてのみ生後 1 日から 22 日の間に次表に示す行動検査を実施した。

行動検査法

- A. 反射の発達検査
 - a) 交叉性伸展（伸筋）反射 (Crossed extension reflex)
 - b) 全身反応 (Mass reaction)
 - c) 前肢の握り反射 (Grasping reflex)
 - B. 姿勢反応の発達検査
 - a) 立ち直り反応 (Surface righting response)
 - b) 空中立ち直り反応 (Mid-air righting response)
 - c) 断崖落下回避反応 (Cliff-drop aversion response)
 - d) 触覚性踏み直し反応 (Tactile placing response)
 - e) ひげ踏み直し反応 (Vibrissa placing response)
 - f) 姿勢性屈曲・伸展反応 (Postural flexion and extension)
 - C. 運動機能（移動行動）の発達検査
 - a) 歩行 (Gait):
 - ピボットイング (Pivoting)
 - 四足歩行 (Walking)
 - b) 遊泳 (Swimming)
 - c) 複合運動技能 (Complex locomotor skills):
 - 背地走性 (Negative geotaxis)
 - 棒つかみ（ぶら下がり）行動 (Bar holding behavior)
 - ロープ降り行動 (Rope descent behavior)
-

第 2 節 実験結果

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、分娩状態および哺育状態も良好であった。体重増加は、各実験群ともに投与日から投与翌日にかけてわずかに低下傾向を示したが、有意な変化ではなく、また体重にも差はみられなかった。産児の生存性についても変化はみられず、観察期間中、各実験群ともに出生児の死亡は 1 例も認められなかった。

2. 行動検査

検査結果の要約を表 1 に示した。

A. 投与薬物間の比較

各検査の結果を総括すると、MNUおよびMAM処理との間で、生じた行動異常に差は認められなかった。

B. 投与時期による行動異常の比較

1) 遊泳行動の発達検査

妊娠12日、13日、14日あるいは15日処理群における小頭症個体には、投与化合物にかかわらず処理日に応じた著しい行動上の差が生じていた。特に特徴的な差は、遊泳運動時における前肢および後肢の運動形態の異常に認められた。すなわち左右両肢を同時に屈曲・伸展させる異常水掻き運動は、妊娠12日処理群では前肢の運動に著しく高頻度に発現し、後肢の異常運動の出現頻度は生後日齢の進行とともに減少した。これに対し妊娠13日処理群では、第3章の結果と同様に異常運動は、後肢に著しく高頻度に発現し、前肢では低率に生起した後、消失した。妊娠14日処理群では生後早期に後肢において低率に発現したのみであった。妊娠15日処理群ではこの種の異常は発現せず、正常児との間に差異は認められなかった（図1）。

2) 歩行の発達検査

ピボットリングの発現・消失過程は、処理時期に関係なく全処理群で1から2日遅延する傾向がみられた（図2）が、妊娠12日処理群の出生児では、前肢の動作が左右で同期し、先行する頭部の回転動作に続いて、元の位置にあった両前肢を一挙に頭部の脇に移動させる前肢の異常動作が生起した。

歩行における同種の異常運動形態は、妊娠13日処理群の後肢に認められたのみであった。歩行の完成時期には、各処理群と対照群との間で差は、みられなかった（図3）。

3) 複合運動技能の発達検査

背地走性、棒つかみ行動、ロープ降り行動についても妊娠12日および13

日処理群においては、行動障害がみられた。背地走性については、妊娠12日処理群では、背地性を示しながらも上方への走性を示さない個体が多数出現し、完成した行動形態は離乳時においても小数例に認められたのみであった。妊娠13日処理群では、群平均の得点でみると生後14日ごろまでの背地走性の発達には対照群と差はみられず、未熟な形態ながらも上方へ1、2歩登る行動は生起した（第3章，TypeⅡ）が、生後11日ごろから斜面に体を保持する能力が漸次低下し、生後14日以後は斜面より落下する個体が増加した（図4）。

棒つかみ行動については、妊娠12日処理群では、後肢や尾を使用して体を棒上に保持する行動形態は発現したが、正常動物のごとく棒上を左右に移動する行動形態は発現しなかった。妊娠13日処理群では、後肢の運動能力の発達が未熟でついに体を棒状にながく留めておく行動は、発現しなかった。さらには離乳前後の時期においては前肢で棒に垂下する能力も低下する傾向が認められた（図5）。

ロープ降り行動に関しては、妊娠12日、13日処理群ともに体を反転し、倒立してロープを保持しつつ降りる洗練された行動形態は、成体となっても発現せず、どれか1肢の保持動作を失敗するとしばしば最初の姿勢のまま飛び降りることが多かった。

妊娠14日および15日処理群では、これらの複合運動技能の検査場面における行動に異常は認められなかった。

5) 反射および姿勢反応の発達検査

反射および姿勢反応の発達検査では、処理時期と無関係に各処理群の出生児において生後早期に全身反応、姿勢性屈曲・伸展反応の亢進がみられ、前肢のにぎり反射の発達が遅延した。全身反応は、正常児に比較して著しく亢進し、反応消失の過程が遅延する（図6）とともに1回の刺激に対する反応持続時間も延長する傾向が認められた。

交叉性伸展（伸筋）反射については、妊娠12日、14日および15日処理群で生後早期に反射が亢進し、反射消失の過程が遅延した。妊娠13日処理群

では、時に両側性の屈曲反射が成立し、または刺激肢のみの屈曲反射を示したが、このような反射形態は最終的には消失した。

立ち直り反応は、妊娠13日、14日処理群で発達が遅延した。これに対し空中立ち直り反応の発達は、妊娠12日処理群においてのみ遅延する傾向がみられた。

断崖落下回避反応の発達は、妊娠12日および妊娠15日投与群において遅延する傾向がみられ（図7）、とくに妊娠12日処理群の出生児では前肢の動作が緩慢で敏捷な回避動作が形成されるまでの過程が遅延したが、妊娠15日処理群の出生児では静止した状態から回避動作が発現するまでの反応潜時が延長しており、急速な回避反応を示すに至るまでの発達過程が遅延した。

踏み直し反応については、ひげ踏み直し反応の発達が、妊娠12日および14日処理群において軽度遅延した他は、特に変化はみられなかった。

3. 脳重量

各処理群の出生児の体重は、対照群の出生児に比してわずかに低値であったが、統計学的に有意な差ではなかった。しかし、その脳重量は、いずれの処理群においても有意に低下していた（下表）。

Relative brain weights in 22-day-old offspring prenatally exposed to MNU or MAM at four different days of gestation (g/100g BW., Mean)

Day of treatment	Control	MNU 5 mg/kg	MAM 40 mg/kg
GD12	2.8 ^a	1.9 **	2.0 **
GD13		1.8 **	1.8 **
GD14		2.3 **	2.4 **
GD15		2.6 *	2.6 *

a: g/100g body weight, Mean value.

*: significant difference from control, $p < 0.05$.

** : significant difference from control, $p < 0.01$.

(Student's t-test)

以上のごとく M N U あるいは M A M の胎生期処理により出生した小頭症児には、処理時期に依存した行動の変容がみられた。上述の観察結果を集約すると処理時期に関連した変化は随意的要素の高い行動に発現したが、上位中枢からの投射により抑制的制御を受けるといわれる〔26, 75〕反射あるいは姿勢反応の一部は、処理時期と無関係に生後早期に亢進していたといえる。またその初期行動発達の多くは、遅延する傾向にあった。この行動面での処理時期による差あるいは行動要素の感受性の差が何に起因しているかは明らかではないが、誘発された小頭症は、いずれの処理時期においても終脳の形成不全を主変化とする点において一致しており、上位中枢における神経解剖学的変化が重要と考えられる。M N U と M A M 処理との間で生起した行動異常に本質的な差が認められなかったことも間接的にそのことを示唆していると思われる。ラット、マウスなど発生の早い段階で出生する動物では、中枢神経系の主要な組織発生は生後に完了するが、行動発達は、この過程を機能の発生として反映しているものである〔28, 37〕。小頭症の出生児で反射あるいは姿勢反応の一部が、処理時期と無関係に生後早期に亢進していたこと、その初期行動発達の多くが遅延する傾向にあったことは、言い換えれば、終脳の容積が小さいと感覚-運動統御機構の組織構築が、一般的に遅延することを示していると考えられる。しかし、このことには、組織学的証明が必要である。一方、妊娠 12 日および 13 日処理群の出生児でみられた四肢の運行動作異常に関する前肢または後肢優位の異常の差異は、重要である。第 3 章においても述べたが、小頭症ラットの歩行様態におけるこのような変化は、X 線照射によって誘発された小頭症のラットにおいても知られている〔23, 43, 70, 71〕が、妊娠 12 日処理では異常なしとされており、なおかつ、妊娠 12 日処理では前肢に優位な異常が生じること、したがって、異常は、前肢が早く、後肢が遅く発生するという器官発生の順に生起しているようにみえることの報告は、ま

だ無い。Rodier (1986) は、細胞増殖阻害作用のある agents の処理によって誘発された、中枢神経系の障害を有するラットの行動の変化には処理時期との関連が重要であり、胎生初期（妊娠 0 日～13 日）処理で寡動、歩行および粗大運動異常、妊娠中期（妊娠 14 日～17 日）の処理で痙攣発作の誘発、多動、歩行運動異常などがおこり得ると総括している〔82〕。しかし本実験のように終脳の障害感受期に対応して行動の変化を処理日別に比較した実験報告は殆ど無く、このことの原因障害部位を推定する手掛かりは乏しい。しかし、上述のようにこれらの小頭症の出生児においても下位機能群には際立った障害があるとはいえず、感覚・運動の統合に関する一次機能は最終的には正常に機能したと推定されることから、この異常歩様の差異をなす原因障害部位は上位中枢にあると考えられる。

本実験では、主に感覚-運動統合機能群の機能について観察したが、小頭症の出生児の下位機能群には、個体の生存に直接かかわるような際立った障害があるとはいえず（事実、長期生存が可能であり、四肢の異常運動がみられるとはいえず、歩けるし、泳ぐこともできる。）、終脳の形成不全は、単純な運動の遂行にさほど重要な意味をもたないとの解釈も成り立つ。したがって学習や記憶あるいは活動性といった、より総合的で高次の機能についての検索が重要であるように思われる。

第 4 節 要 約

本実験では、終脳の障害感受期間と推定される妊娠 12 日～15 日のいずれか 1 日に M N U の 5 mg/kg、あるいは methylazoxymethanol (M A M) の 40 mg/kg を単回投与し、得られた出生児について第 3 章とほぼ同様の神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を行い、その行動を比較した。

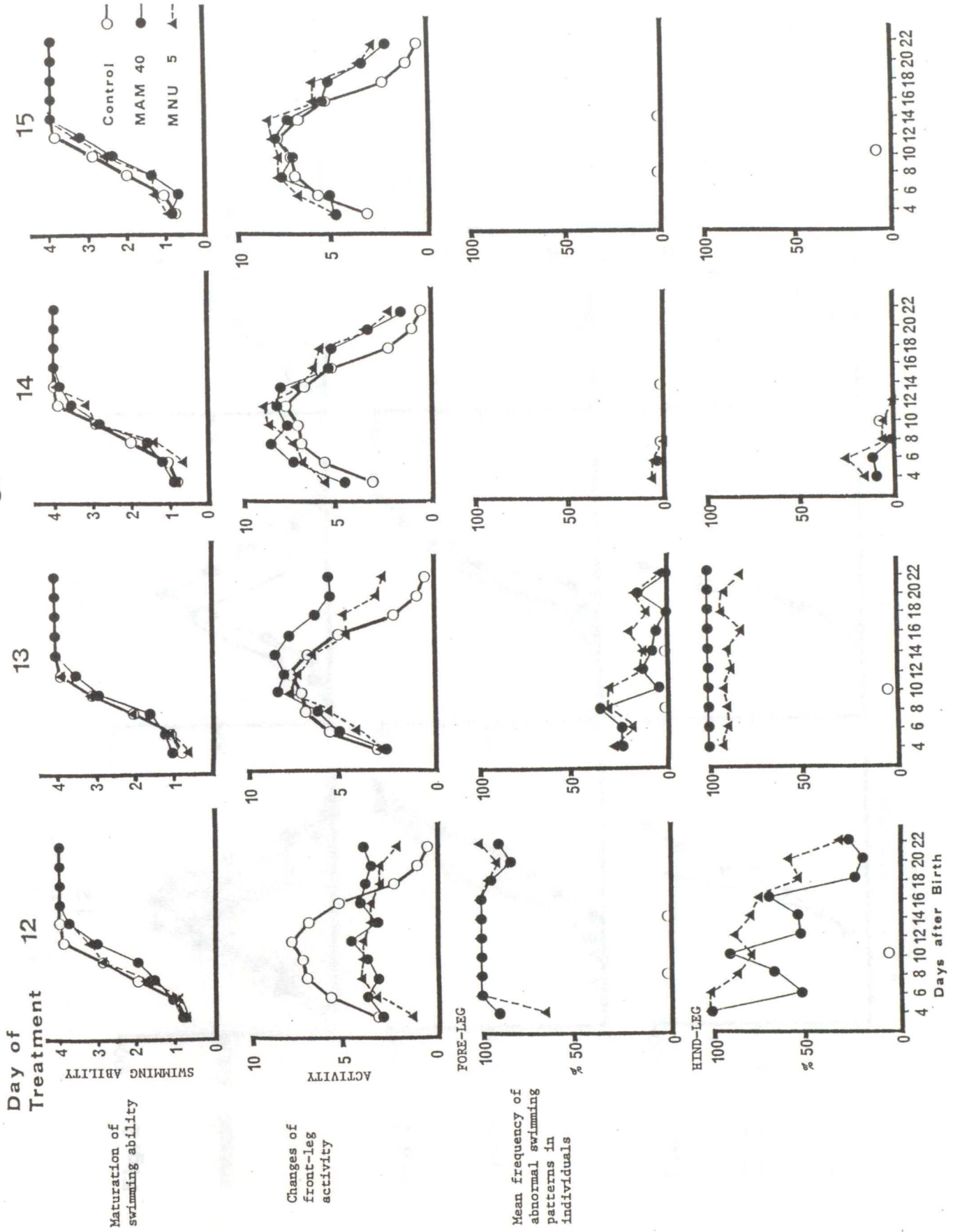
各検査の結果を総括すると、M N U および M A M 処理との間で、生起し

Table 1 Summary of the results of neurobehavioral examinations in micrencephalic offspring induced by prenatal treatment with N-methyl-N-nitrosourea (MNU) or methylazoxymethanol (MAM) on various gestational days (GD) in rats

Day of treatment	GD12		GD13		GD14		GD15	
	MNU	MAM	MNU	MAM	MNU	MAM	MNU	MAM
<u>Postural reactions</u>								
Surface righting	-	-	D	D	D	D	-	-
Mid-air righting	D	D	-	-	-	-	-	D
Cliff-drop aversion	-	-	-	-	-	-	-	-
Tactile placing	-	-	-	-	D	D	-	-
Vibrissa placing	D	D	-	-	H	H	H	H
Postural extension flexion	H	H	H	H	H	H	H	H
<u>Spinal reflexes</u>								
Crossed extensor	H	H	H	H	H	H	H	H
Mass reaction	H	H	H	H	H	H	H	H
Forelimb grasping	D	D	D	D	D	D	D	D
<u>Gait</u>								
Pivoting	D,I	D,I	D	D	D	D	D	D
Walking	-	-	I	I	D	D	-	-
<u>Swimming</u>	I	I	I	I	I	I	-	-
<u>Complex locomotor skills</u>								
Negative geotaxis	I	I	I	I	I	I	-	-
Bar holding	I	I	I	I	I	I	-	-
Rope descent	I	I	I	I	I	I	-	-

--:No alteration, D: Delay of ontogeny, H: Hyperreflexive reaction, I: Impaired performance

Fig. 1



Day of Treatment

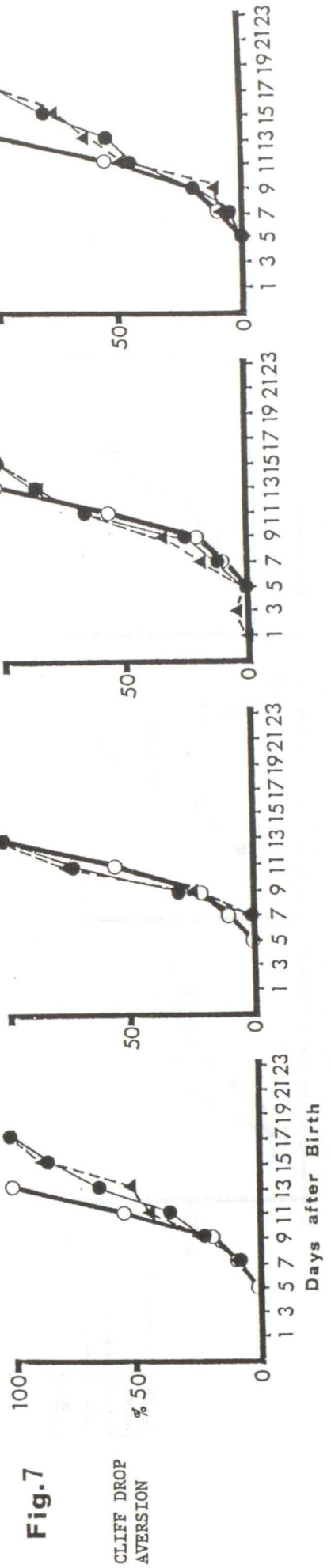
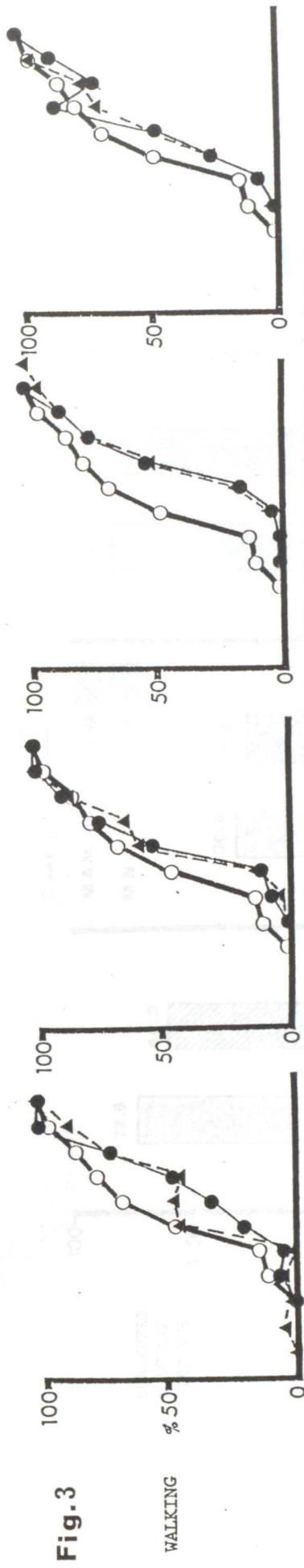
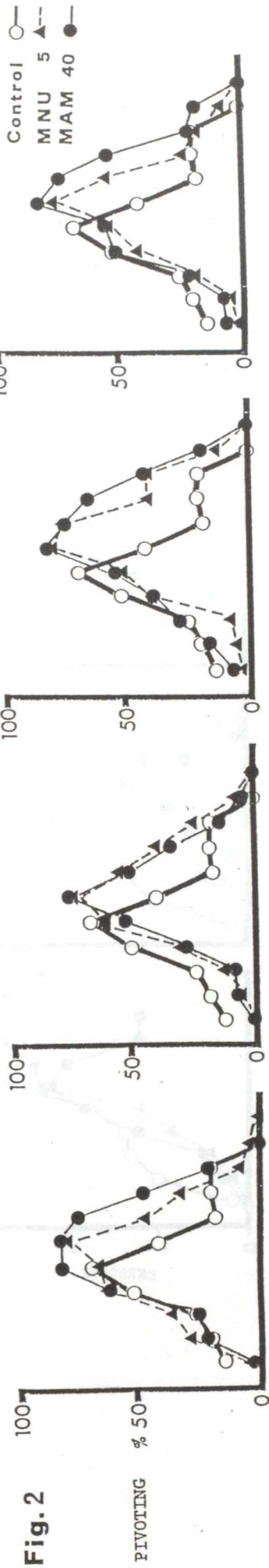


Fig. 5
Development of
bar holding
response

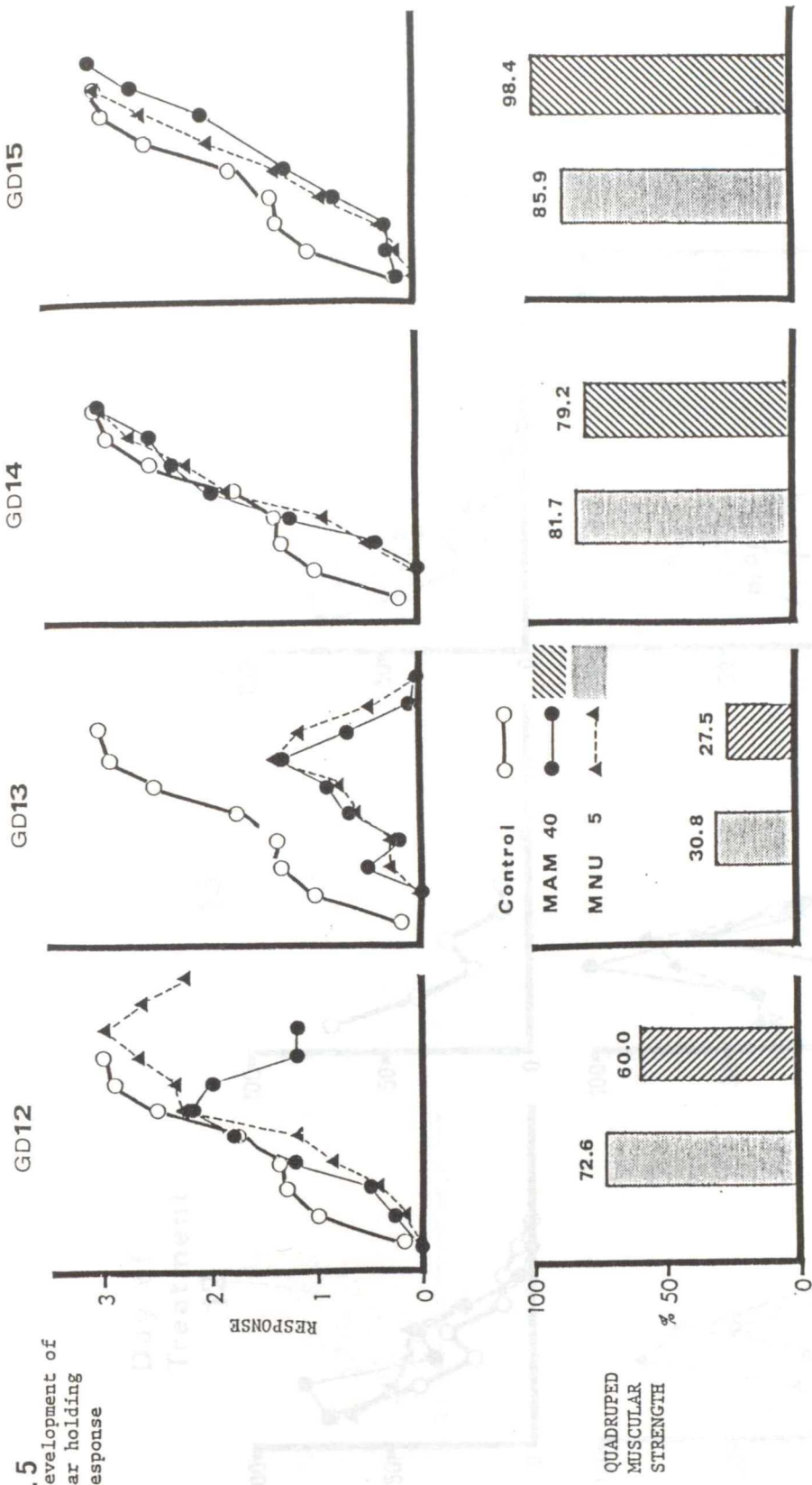
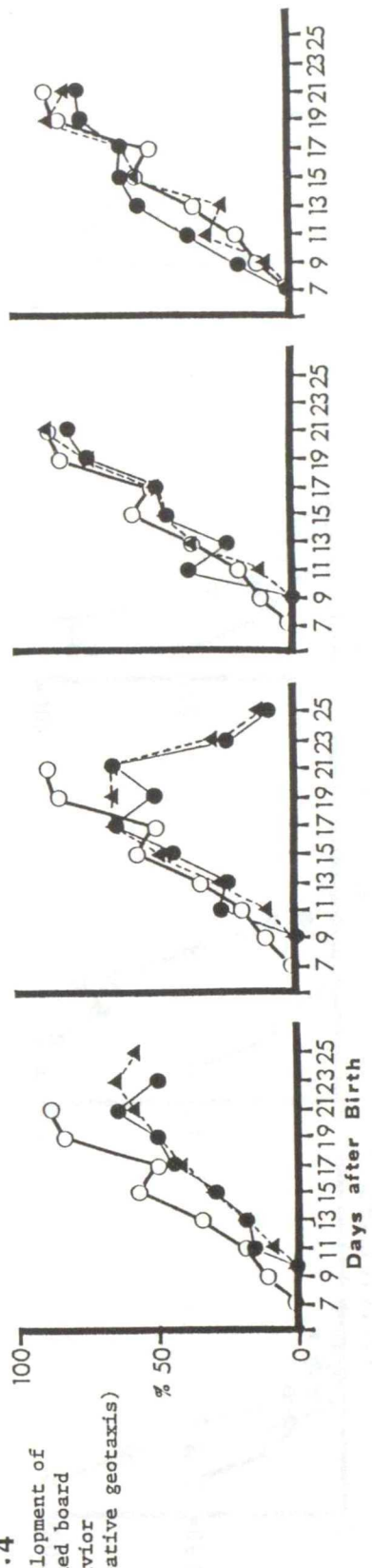


Fig. 4
Development of
clined board
behavior
(Negative geotaxis)



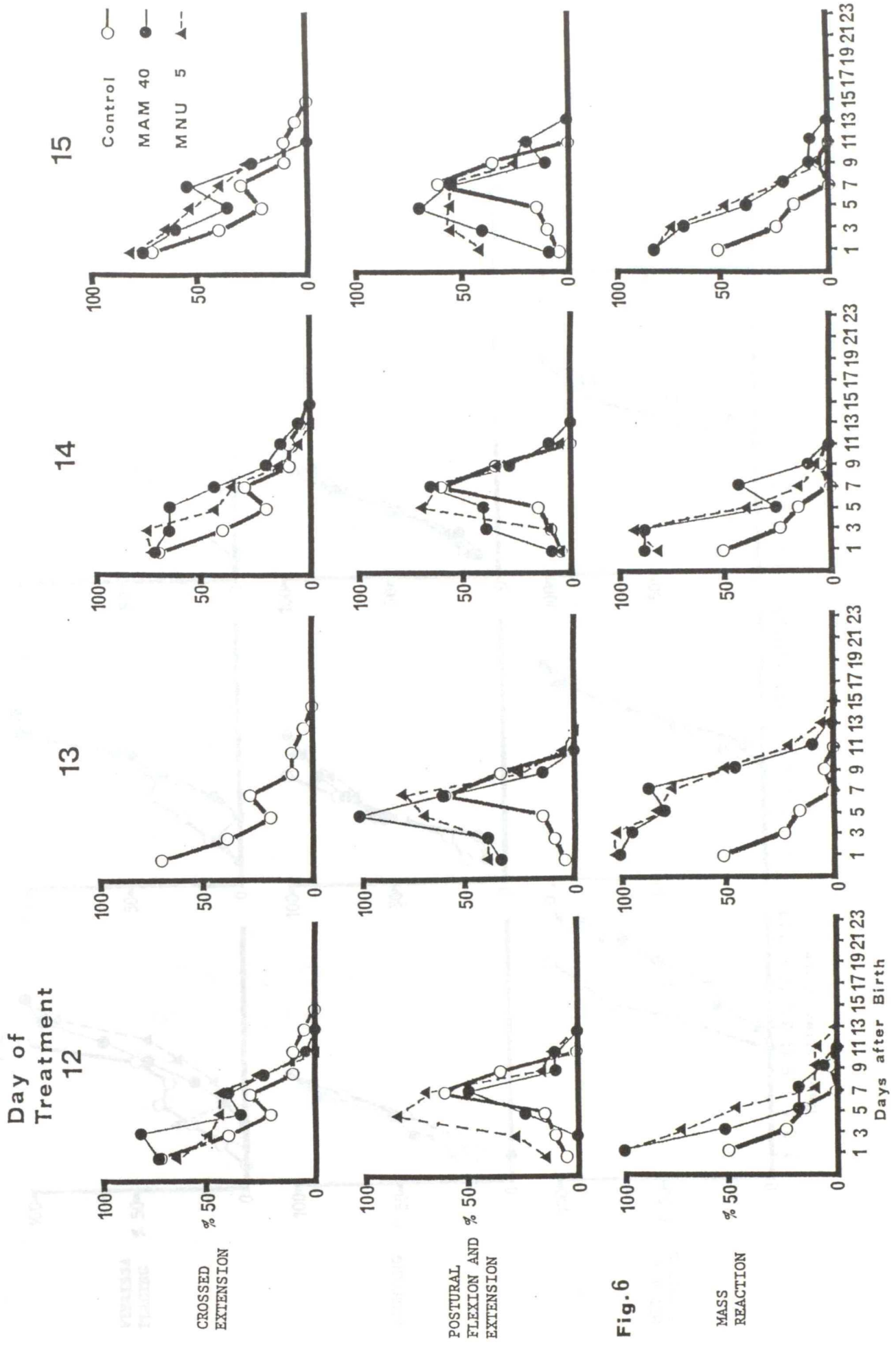


Fig. 6

第5章 小頭症の程度と小頭症ラットの高次行動の異常

妊娠12日～15日の母ラットに Methylazoxymethanole (MAM) あるいは N-methyl-N-nitroso-urea (MNU)を単回処理するとその児には終脳の低形成が高率に誘発される〔第2, 4章〕。このような小頭症(小脳症)の出生児では寡動, 迷路学習障害, 神経学的機能障害等の様々な行動異常がみられるが, これらの機能的障害は, 脳重量が対照ラットの50%程度まで減少した重度の小頭症例において初めてみいだされることが多い〔第3, 4章〕。一方、迷路学習試験、オープンフィールド試験などの高次機能の検査では、神経学的機能検査と比較して終脳の障害をより精度よく反映する可能性も推定された〔第4章〕。そこで本実験では、妊娠13日に5段階濃度のMNUを処理し、段階的に脳重量を減少させた小頭症ラットにおいてどの程度脳重量が減少すると行動の変化がみいだされるかを離乳後に行う行動検査法を用いて検討した。

第1節 実験方法

使用動物, 飼育条件, 投与条件および行動検査条件は表1に要約した。すなわち Crj:CD ラット (SD系) の妊娠13日 (腔栓 = 妊娠0日) にMNUの1, 2, 3, 4および5 mg/kg (投与直前に注射用生理食塩液に溶解) を単回腹腔内投与し (以下, 処理群と略), 得られた雄出生児について4週齢で Open-field test, 5～6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6～7週齢で Biel 型水迷路試験および7～8週齢で Shuttle-box avoidance testを行った。対照には無処置妊娠ラットから得られた出生児を用いた。

なお、Open-field test のボックスは、これまでの角型ボックス(150×150×45cm)から丸型ボックス(直径150cm, 高さ45cm)に変更した。

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にもなんら変化は認められなかった。また、各群ともに母動物の分娩状態に異常はみられず、哺育状態も良好であった。

2. 出生児観察

1) 脳重量，体重推移 (Fig. 1)

出生児の脳重量は，離乳時（生後22日，淘汰児）および行動検査終了後の9週齢時（生後63日）に測定した。その結果，いずれの測定時期においても各処理群の出生児の脳重量は，無処置対照群と比較して統計学的に有意に低く，対照群に対する脳重量の比は 1-5 mg/kgの順に略95，85，80，70および55%であった。出生児の体重は，5 mg/kg 処理群においてのみ生後4週齢以降，対照群と比較して有意に低く推移した。

2) Open-field test (Fig. 2)

出発潜時（中央の出発区画を出るまでの時間）は用量に応じて減少する傾向を示し，3 mg/kg 以上の処理群では対照群に比し有意に減少した。移動距離はすべての処理群において有意に増加し，立ち上がり回数については，用量相関的に有意な増加がみられた。身づくろい回数および排尿数については，5 mg/kg 処理群においてのみ前者で有意な減少および後者で有意な増加がみられたが，排糞数には各群間で顕著な差はみられなかった。神経学的機能障害としては後肢の歩行運動異常が，5 mg/kg 処理群において観察された。

3) 自発運動量 (Fig. 3)

暗期の運動量は、各処理群において顕著に増加した。明期の運動量には各群間で顕著な差はみられなかった。

4) Biel型水迷路試験 (Fig. 4)

エラー数の増加は 5 mg/kg処理群においてのみみられた。

5) Shuttle-box avoidance test (Fig. 4)

回避反応数は、5 mg/kg 処理群においてのみ増加した。

第 3 節 考 察

これらの結果から各処理群に共通してみられた行動上の変化を整理すると、Open-field test における出発潜時の減少、移動距離および立ち上がり回数の増加ならびに回転ケージにおける自発運動量の増加があげられる。これらの変化のうち出発潜時の減少および立ち上がり回数の増加には用量相関性がみられ、終脳形成障害の程度との関連が推察される。すなわち出発潜時の減少や立ち上がり回数の増加は、新奇刺激に対する注意集中の低下あるいは注意の転導性の増加を示していると考えられるが、これらの程度には中枢神経系の障害部位（局在は推論できないにしても）における障害の量的度合いが関連していると推察される。一方 Open-field における移動距離および回転ケージ運動量は、5 mg/kg 処理群において若干、変化の程度が増す傾向がみられた他は用量と相関した一定の傾向を示さず、各処理群とも顕著に増加した。Biel型水迷路試験および Shuttle-box avoidance test における変化は 5 mg/kg 処理群にのみ観察された。これらのことから MNU 1 ~ 5 mg/kg の妊娠13日投与により誘発された小頭症ラットにおける基本的な行動の変化は、活動性の増大であり、加えて終脳形成障害の程度に応じた変化が重複しているものと考えら

れる。なお、第3章の Open-field testでは、5 mg/kg 処理群の移動量に関し本実験の結果と正反対の結果がみられたが、この理由は使用した装置の形状に由来するものと判断される。角型ボックスの場合、動物はボックスの角に長時間留まる傾向を示し、その意味では動物の行動を修飾する因子が装置内に存在するといえるが、丸型ボックスでは依拠すべき特殊な部位が装置内にないため動物は、運動を停止しようとする内的衝動が発動するまで積極的に動くことがその理由と考えられる。しかし、第3章においても初発探索行動量は、5 mg/kg 処理群において著明に増加しており、その時の（試行初日の）出発潜時はやはり短かったことから本質的には本実験と同様の変化を捕らえていたものと推察される。

迷路学習あるいは回避学習事態における行動は、妊娠13日の処理では、正常動物のおよそ50%程度まで終脳の形成が障害されないと障害されなかった。この処理時期は、これまでの実験から終脳の最障害感受期と推定されるが、それにしても仮に学習をつかさどる中枢神経系の主要な責任部位が終脳にあるとすれば—主要な責任部位が終脳にあることは「常識」とさえいえるが—迷路学習あるいは回避学習事態における動物の行動はこの程度の精度でしかその変化を反映しないのであろうか。この疑問に対しては1)検査法の障害検出感度が低い、2)中枢神経系においてこの時期のMNUの侵襲による多少の障害では、動物の学習能力に影響しないの2つの理由が考えられる。しかし、5 mg/kg 処理群とそれ以下の処理群とでは、学習障害の発現に All or Non の関係が有るようにみえることを考慮すると、後者の理由がもっとも妥当と思われる。

第4章で陽性対照物質として使用したMAMについては、その処理によって得た小頭症ラットについて様々な学習実験が行われているが、なぜかその処理時期は、妊娠15日に集中している〔4, 9, 29, 36, 96〕。この理由ははっきりしないが、おそらく海馬の障害が成立すること〔21, 27, 49〕と関連があるように思える。【迷路学習の遂行には、動物の空間認知機能が重要である。海馬には、記憶と関連して空間認知地図が形成されるとい

う説があり、記憶の照合と誤りの検証を行っているとする説との間で論争が続いているが、前者を支持する見解が増えている〔68〕。】しかし、いずれにしてもこの時期の処理では、M A Mの 20 mg/kg ないしはそれ以下の処理で学習障害が検出されていることは注目に値する。すなわち、これらの濃度のM A M処理で誘発される小頭症は、妊娠13日・M N U 5 mg/kg処理と比較するとはるかに軽度でありこのことは学習障害の発現には、終脳の障害感受期においても処理時期が重要であることを示唆していると考えられる。

なお、第3章でみられた後肢の左右同期運動が、どの濃度まで発現するかを（雌出生児についてのみであるが）調べた結果を次表に示す。

Incidence of MNU-induced microcephalic offspring which showed abnormal paired limb-movement during swimming or walking test.

MNU (mg/kg)	Swimming ^a	Walking ^b
5	20/20 ^c	10/20
4	5/20	4/20
3	2/14	0/14
2	0/17	0/17
1	0/16	0/16

a: observed on day 12 after birth.

b: observed on day 20 after birth.

c: offspring showed abnormal limb-movement / numbers examined.

この表から明らかなように神経学的障害の発現は、用量との関連において確率的であり、終脳の障害の程度が神経学的障害の発現にも関係すると考えられる。

第4節 要 約

母ラットの妊娠13日にM N Uの1, 2, 3, 4 および 5 mg/kgを単回腹腔内投与して得られた出生児について、4週齢でOpen-field test, 5-6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6-7週齢でBiel型水迷路試験、7-8

週齡で Shuttle-box avoidance test を行った。各処置群の離乳児の脳重量は、無処置対照群と比較して統計学的に有意に低く、対照群に対する脳重量の比は 1-5 mg/kg の順に略 95%, 85%, 80%, 70% および 55% であった。これらの出生児において、Open-field test では、全処置群で総移動距離および立ち上がり回数の増加が、4, 5 mg/kg 群で出発潜時の減少が、5 mg/kg 群で排尿数の増加および後肢の歩行運動異常がみられた。自発運動量測定では、全処置群において運動量が明瞭に増加し、とくに 5 mg/kg 群で顕著であった。Biel 型水迷路試験では、5 mg/kg 群においてのみエラー数および所要時間の増加がみられた。また、Shuttle-box avoidance test において回避反応数の増加を示したのは、5 mg/kg 群のみであった。これらのことから MNU 1 ~ 5 mg/kg の妊娠 13 日投与により誘発された小頭症ラットにおける基本的な行動の変化は、活動性の増大であり、加えて終脳形成障害の程度に応じた変化が重複しているものと考えられる。



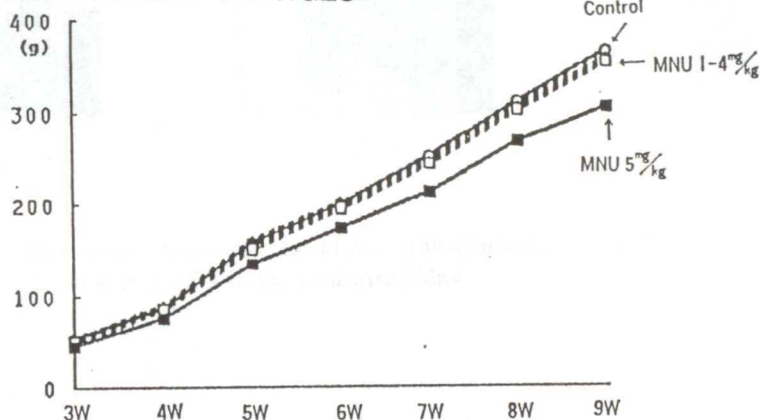
Fig. 1 Body weight and brain weight of the offspring.

Table Summary of materials and methods

Strain: Crj: CD (SD) rats
 Environment: Barrier system
 Temperature; $24 \pm 1^\circ\text{C}$
 Relative humidity; $55 \pm 5\%$
 12-hour light (7:00 ~ 19:00)/dark cycle
 Mating: 9 weeks of age, day obtained vaginal plug = day 0 of pregnancy
 Number of dams: 5 dams/dose group
 Compound: N-methyl-N-nitrosourea (MNU)
 Dose levels: 1, 2, 3, 4 or 5 mg/5 ml/kg
 Dosing procedure: On day 13 of pregnancy, single intraperitoneal injection
 Offspring: Pups were culled at day 4 after parturition (5 males, 5 females)
 Behavioral tests: 15 offspring/3 litters/group

Open field test: 3 min/trial/day \times 3 days, at 4 weeks of age.
 Wheel cage activity test: through 7 days, at 5-6 weeks of age.
 Biel type water T-maze test: 3 trials/day \times 3 days, at 6-7 weeks of age.
 Shuttle-box avoidance test: 60 trials/day \times 3 days, at 7-8 weeks of age.

BODY WEIGHT CHANGES



BRAIN WEIGHT

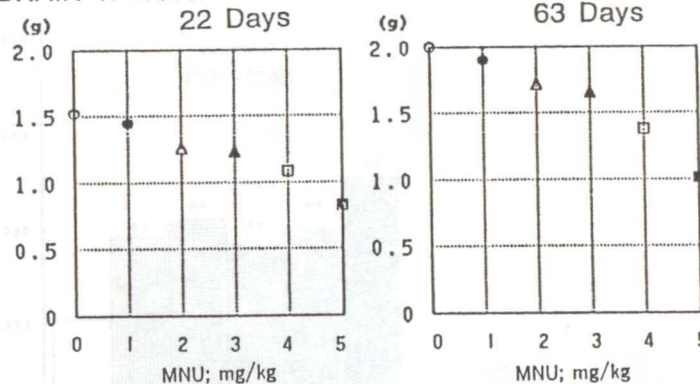


Fig. 1 Body weight and brain weight of rats transplacentally treated with MNU

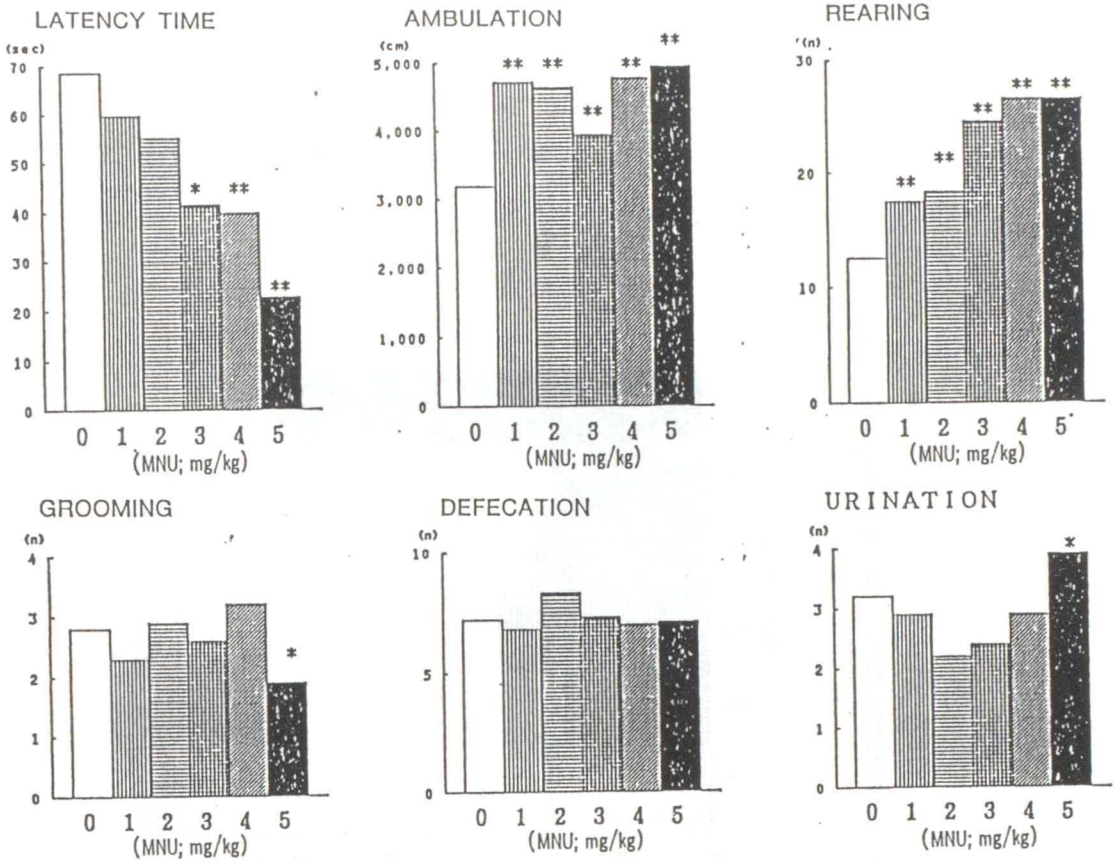


Fig. 2 Results in Open-field test of rats transplacentally treated with MNU
Total scores of 3 days, 3 min/trail/day

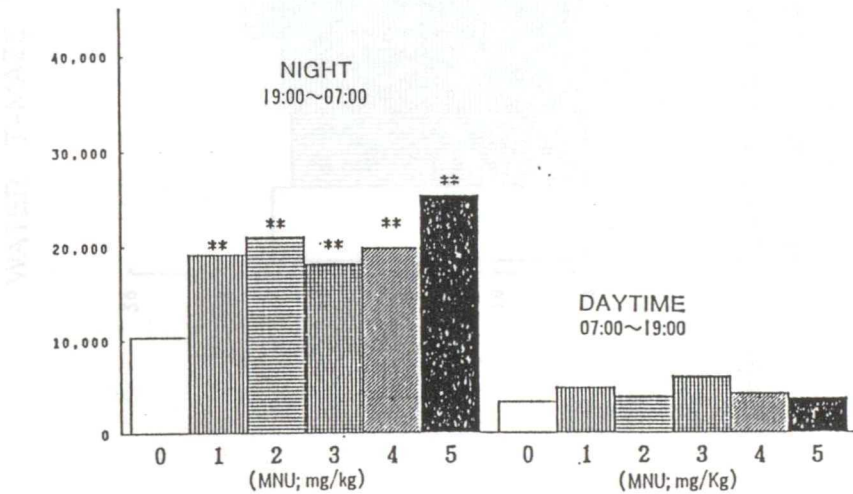


Fig. 3 Results in wheel cage activity test of rats transplacentally treated with MNU
Total revolutions during 7days

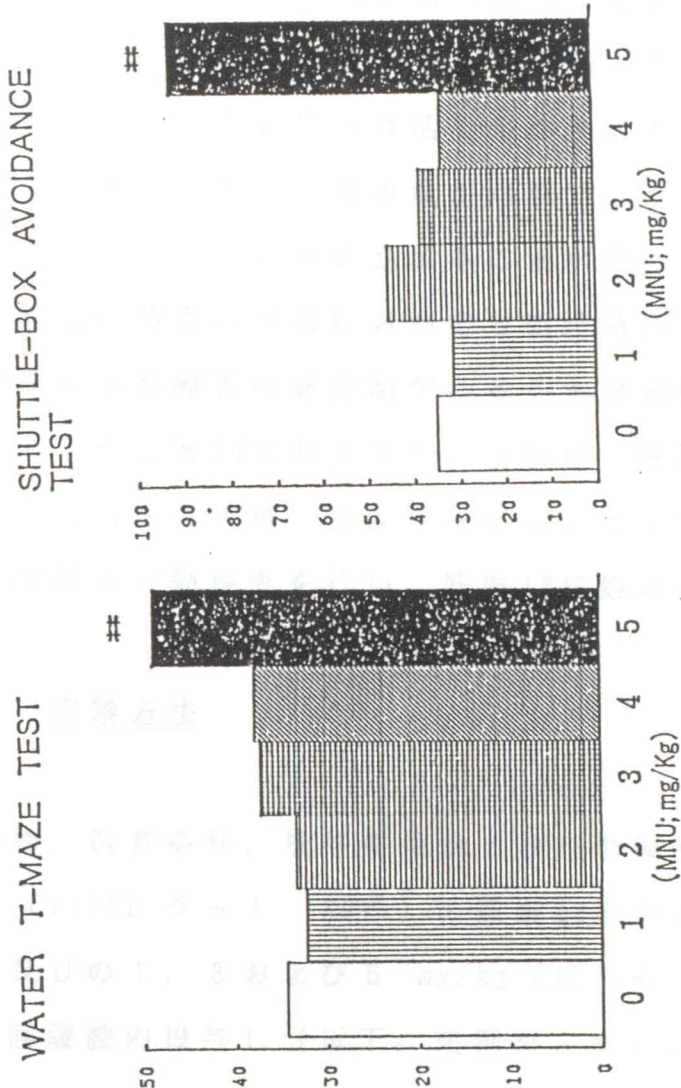


Fig. 4 Results in learning ability tests of rats transplacentally treated with MNU
 Maze test: total errors in 9 trials, Avoidance test: total avoidance responses in 180 trials

第 6 章 各投与時期に誘発された小頭症ラットの hoch 行動の異常

妊娠 12 日～15 日の母ラットに N-methyl-N-nitroso-urea (MNU) を単回処理するとその児には終脳の低形成が高率に誘発される〔第 2, 4 章〕。第 5 章では、この終脳の障害感受期において最障害感受期と推定される妊娠 13 日に 5 段階濃度の MNU を処理し、段階的に脳重量を減少させた小頭症ラットでは、どの程度脳重量が減少すると迷路学習試験、オープンフィールド試験などの hoch 機能の検査で行動の変化がみいだされるかを検討した。その結果、13 日処理では活動性の増大が主変化であり、迷路学習、回避学習の障害は、唯一、脳重量が対照ラットの 50% 程度まで減少した重度の小頭症例においてのみ成立することが判った。そこで、学習障害の発現には、終脳の障害感受期においても処理時期が重要であり、とくに後半の処理時期に学習障害の感受期があることが示唆されたことから、本実験では、ラットの妊娠 14 日および 15 日（産栓＝妊娠 0 日）に MNU の 1, 3 および 5 mg/kg を各々単回腹腔内投与し、得られた小頭症出生児について第 5 章と同様の行動検査を行い、妊娠 13 日処理との比較を試みた。

第 1 節 実験方法

使用動物、飼育条件、投与条件および行動検査条件は表 1 に要約した。すなわち Crj:CD ラット (SD 系) の妊娠 14 日あるいは 15 日（産栓＝妊娠 0 日）に MNU の 1, 3 および 5 mg/kg (投与直前に注射用生理食塩液に溶解) を単回腹腔内投与し (以下、処理群と略), 得られた雄出生児について 4 週齢で Open-field test, 5～6 週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6～7 週齢で Biel 型水迷路試験および 7～8 週齢で Shuttle-box avoidance test を行った。対照には無処置妊娠ラットから得られた出生児を用いた。

1. 母動物観察

観察期間中、母動物の外表および一般状態には、いずれの群においても異常はみられず、体重推移にも変化は認められなかった。また、各群ともに母動物の分娩状態に異常はみられず、哺育状態も良好であった。

2. 出生児観察

1) 脳重量 (Fig. 1), 体重推移

出生児の脳重量は、一連の行動検査終了後、8週齢時に測定した。その結果、いずれの処理日においても用量依存的な脳重量の低下が、確認された。しかし、脳重量は無処理対照との比で1, 3, 5 mg/kg の順に、14日処理群では約 95%, 90%, 74%, 15日処理群では約 96%, 86% および 77% であり、13日処理群 (95%, 80%, 55%) と比較していずれも脳重低下の程度は軽かった。出生児の体重は、妊娠13日 5 mg/kg 処理群において生後4週齢以降有意に低く推移したのに対し、14日および15日処理ではいずれの用量群においても対照ラットと差はみられず、むしろ有意に高い体重を示す時期もあった。

2) Open-field test (Fig. 2, 3)

a) 出発潜時 (Fig. 2 上段)

妊娠13日処理：用量依存的な減少を示した。

妊娠14日処理：各用量群ともに減少傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

妊娠15日処理：用量依存的な増加を示した。

b) 移動距離 (Fig. 2 中段)

妊娠13日処理：非用量依存的に増加した。

妊娠14日処理：各用量群ともに対照群と比較して著差を示さなかった。

妊娠15日処理：3 mg/kg, 5 mg/kg 処理群において用量依存的に減少した。

c) 立ち上がり回数 (Fig. 2 下段)

妊娠13日処理：用量依存的に増加した。

妊娠14日処理：各用量群ともに対照群と比較して著差を示さなかった。

妊娠15日処理：3 mg/kg, 5 mg/kg 処理群において用量依存的に減少した。

d) 身づくろい回数 (Fig. 3 上段)

妊娠13日処理：5 mg/kg 処理群において減少した。

妊娠14日処理：各用量群ともに対照群と比較して著差を示さなかった。

妊娠15日処理：3 mg/kg, 5 mg/kg 処理群において顕著に減少した。

e) 排糞数 (Fig. 3 中段)

妊娠13日処理：各用量群ともに対照群と比較して著差を示さなかった。

妊娠14日処理：1 mg/kg 処理群において有意に減少した。

妊娠15日処理：1 mg/kg, 3 mg/kg 処理群において有意に減少した。

e) 排尿数 (Fig. 3 下段)

妊娠13日処理：各用量群ともに対照群と比較して有意差を示さなかった。

妊娠14日処理：各用量群ともに対照群と比較して有意差を示さなかった。

妊娠15日処理：各用量群ともに有意に減少し、5 mg/kg 処理群において

特に少なかった。

3) 自発運動量 (Fig. 4)

妊娠13日処理：暗期の運動量は、各処理群において顕著に増加した。明

期の運動量には各群間で顕著な差はみられなかった。

妊娠14日処理：暗期、明期とも各群間で顕著な差はみられなかった。

妊娠15日処理：暗期、明期とも各群間で顕著な差はみられなかった。

4) Biel型水迷路試験 (Fig. 5)

総エラー数 (Fig. 5)

妊娠13日処理：エラー数は 5 mg/kg処理群においてのみ顕著に増加した。

妊娠14日処理：各用量群ともに学習障害を示唆する変化は示さなかった。

妊娠15日処理：エラー数は 3 mg/kg, 5 mg/kg 処理群において有意に増加し、特に 5 mg/kg 処理群の総エラー数は妊娠13日 5 mg/kg処理群のそれを凌駕した。

※妊娠15日処理群における試行の累積効果 (Fig. 6)

5 mg/kg 処理群では、試行の経過に伴うエラー数の減少がみられなかったといえる。これに対し、3 mg/kg 処理群では、総エラー数は有意に増加したものの試行の累積にともなって行動は変容し、学習効果はあったと推定される。すなわち 3 mg/kg 処理群では学習の遅延がみられる。

5) Shuttle-box avoidance test (Fig. 7)

妊娠13日処理：回避反応数は、5 mg/kg 処理群においてのみ増加した。

妊娠14日処理：各用量群ともに学習障害を示唆する変化は示さなかった。

妊娠15日処理：各用量群ともに学習障害を示唆する変化は示さなかった。

第3節 考 察

ラットの妊娠14日および15日に、MNUの1, 3 および 5 mg/kgを各々単回腹腔内投与し、得られた小頭症出生児について4週齢で Open-field test, 5～6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6～7週齢でBiel型水迷路試験および7～8週齢で Shuttle-box avoidance test を行い、妊娠13日処理との比較を試みた。対照には無処置妊娠ラットから得られた出生児を用いた。

試験成績の要約を次表に示す。

Tests	GD13			GD14			GD15		
	1 ^a	3	5	1	3	5	1	3	5
Brain weight (% to control)	95	80	55	95	90	74	96	86	77
Open-field test									
Latency	—	↓	↓	↓	↓	↓	↑	↑	↑
Ambulation	↑	↑	↑	—	—	—	—	↓	↓
Rearing	↑	↑	↑	—	—	—	—	↓	↓
Grooming	—	—	↓	—	—	—	—	↓	↓
Defecation	—	—	—	? ↓	—	—	? ↓	? ↓	—
Urination	—	—	—	—	—	—	↓	↓	↓
Wheel activity	↑	↑	↑	—	—	—	—	—	—
Biel maze test Errors	—	—	↑	—	—	—	—	↑	↑
Shuttle avoidance Avoidances	—	—	↑	—	—	—	—	—	—

a: mg/kg,

—: level of control

Increase in response: ↑ (marked)

Decrease in response: ↓ (tendency), ↓ (marked)

出生児（8週齢）の脳重量は、無処理対照との比で1-5 mg/kgの順に、14日処理群では約95%, 90%, 74%, 15日処理群では約96%, 86% および77%と、最障害感受期と想定される13日処理と比較していずれも脳重低下の程度は軽かった。脳重量を指標とした場合、処理日間における脳の障害程度には、13日 > 14日 > 15日の関係がみられるが、これは第2章の結果と一致する。したがって15日の処理による終脳形成不全が、他の処理日群と比較して最も軽度であったと推察されるが、この群の出生児は、Open-field事態において13日処理群とほぼ正反対の行動特性を示した。すなわちこの15日処理群における出生児の特性は、13日処理群のそれが多動であるのに対し極端な寡動であり、出発潜時の延長や身づくろい回数の減少は、新奇刺激に対する恐怖亢進を示唆する。これは一般に防御的反応としてのすくみ行動と理解されるが、この場合、発汗、動悸亢進、脱糞など交感神経系の活動亢進による生理的反応が随伴しているといわれる〔46〕。しかし、15

日処理群では排糞数、排尿数の増加はみられず、生理的な身体反応は逆に低下していたと考えられ、このことから出生児の寡動は受身的反応ではなく積極的な反応であったことが推察される。その内的動因が何であるかは不明である（オペラント的統制を行っている行動事態ではないので当然である。すなわちこのことは「動物に聞かなければ」判らない。）が、回転ケージにおける自発運動量が対照レベルにあったことから少なくとも自発活動性が本質的に低下していたことに起因するものではない。これは、13日処理群の小頭症児で自発活動性そのものが亢進していたことと比較すると、15日処理群では何か高次の神経活動に変化が生じていたことをうかがわせるものである。この変化は、おそらく1 mg/kg 処理においても軽度で成立していると考えられ、その本態は不明ながら15日処理による中枢神経系機能障害の本質的な部分をなすものではないかと考えられる。

一方、14日処理群の出生児では、Open-field 事態のみならず、いずれの観察事態においても顕著な行動の変化はみられず、その行動は質的にも量的にも正常ラットと同水準にあったと考えられる。その意味で、この群の小頭症児における行動の変容は、不明である。MNU 処理による小頭症児の行動観察は、報告が殆どないので、ここではMAM 処理による小頭症児の報告をもとに若干の考察を試みたい。（MAM 妊娠14日単回処理の報告は少なく、おそらく次の2報しかないであろう。それにしても処理日の選択理由について殆どの論文が沈黙していることは理解に苦しむ現象である）Seo et al. (1979) はMAM 25 mg/kg を妊娠14日に単回処理し、対照の約60%の脳重を示す小頭症児について8週齢時にOpen-field testを行ったが、全区画移動数、立ち上がり回数、排糞数に群間差はみられず、小頭症児では、中央区画移動数の最終試行（5日目）における増加、排尿数の増加、身づくろい回数の減少、出発潜時の延長がみられたことを報告している〔87〕。一方、Vorhees et al. (1984) は、MAM 30 mg/kg を妊娠14日に単回処理し、対照の約44%の脳重を示す小頭症児について7週齢時にOpen-field testを行い、移動数が2日間とも増加したことを報告

している（他の項目は測定していない）〔100〕。これらの実験において本実験との最大の相違は、誘発した小頭症の程度が重度であることおよび観察週齢が遅いことにある。生後7-8週齢時のラットは、おそらくその生涯で最も高い活動性を示す〔60〕が、この時期において、両者は、小頭症ラットの活動性に関し若干、相反する結果を報告していることになる。このことは、おそらく両者の誘発した小頭症の程度の差に起因すると考えられる。すなわち脳重の変化には、本実験の結果をふくめて3者の間で連続した関連があるが、Open-field 事態における活動性の増加に関する脳重低下の関与について考えると、そのしきい値が Seo et al. の示す対照の約60%前後の脳重にあると考えれば、相互の結果の差を比較的良く説明できるように思われる。しかし、本実験では、出発潜時について Seo et al. の結果と反する傾向がみられており、連続性がとぎれる点で上の考えとは矛盾する面もある。このことには、本実験で動物の観察週齢が若かったことが関与しているかもしれない。しかし、たしかに14日処理群の出生児では、出発潜時の短縮傾向がみられたが、統計学的に有意な変化ではなく、他の変化を伴わないことから意味のある所見ではないともいえる。（同様に、排糞数は、14日および15日処理群ともに低あるいは中用量群で有意に低値であったが、これは本実験における対照群の排糞数が若干多かったことによるものであり十分に背景値の範囲内に入る。）

迷路学習は、脳重量の低下の程度からみると15日処理群において相対的に高度に障害されていた。これは、MAM処理による実験報告から類推したとおりの変化であり、終脳における障害部位が重要であることを示唆していると考えられる〔4, 36〕。13日の処理では、5 mg/kg の処理により初めて終脳における原因部位が障害されるものと思われるが、組織学的な検索が必要である。妊娠14日処理については、Vorhees et al. (1984) が、上と同じ実験においてBiel型迷路による迷路学習障害がみられることを示しているが複数の用量を用いて実験していないので本実験との関連は類推し難い。

往復式回避学習試験の成績には、15日処理群において対照群との間に差はみられなかった。このことは、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なっていることを示唆しているように思われるが、妊娠13日5 mg/kgの処理では、双方に障害が生じておりそれほど簡単に理解できることではなさそうである。X線照射による実験では、胎生16日〔32〕および17日〔94〕の照射による小頭症児の双方にこの試験における回避反応の亢進がみられており、化学物質の処理とは様相が若干異なっているように思われる。

第4節 要 約

母ラットの妊娠14日および15日（膈栓＝妊娠0日）にMNUの1, 3および5 mg/kgを各々単回腹腔内投与し、得られた小頭症出生児について4週齢でOpen-field test, 5～6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6～7週齢でBiel型水迷路試験および7～8週齢でShuttle-box avoidance testを行い、妊娠13日処理との比較を試みた。対照には無処置妊娠ラットから得られた出生児を用いた。出生児（8週齢）の脳重量は無処理対照との比で1-5 mg/kgの順に、14日処理群では約95%, 90%, 74%, 15日処理群では約96%, 86% および77%であり、13日処理と比較していずれも脳重低下の程度は軽かった。これらの出生児において、14日処理群ではOpen-field testの出発潜時が減少傾向を示した他には各検査結果とも対照群と比較して用量依存的な差異を示す変化はみられなかった。これに対し15日処理群ではOpen-field testにおいて出発潜時および中央区画滞留時間の延長、グルーミング回数の減少が全用量群で、立ち上がり回数および総移動距離の減少が3, 5 mg/kg群でみられ、また、Biel型水迷路試験においては3, 5 mg/kg群で総エラー数が用量依存的に有意に増加した。自発運動量およびShuttle-box avoidance testの成績に変化はみられなか

った。13日処理では活動性の増大が主な変化であり、迷路試験では対照ラットの70%以上の脳重量を示す群（4 mg/kg 以下）で障害がみられなかったことを考慮すると実験的に誘発された小頭症ラットの行動には処理時期により差異のあることが示唆された。

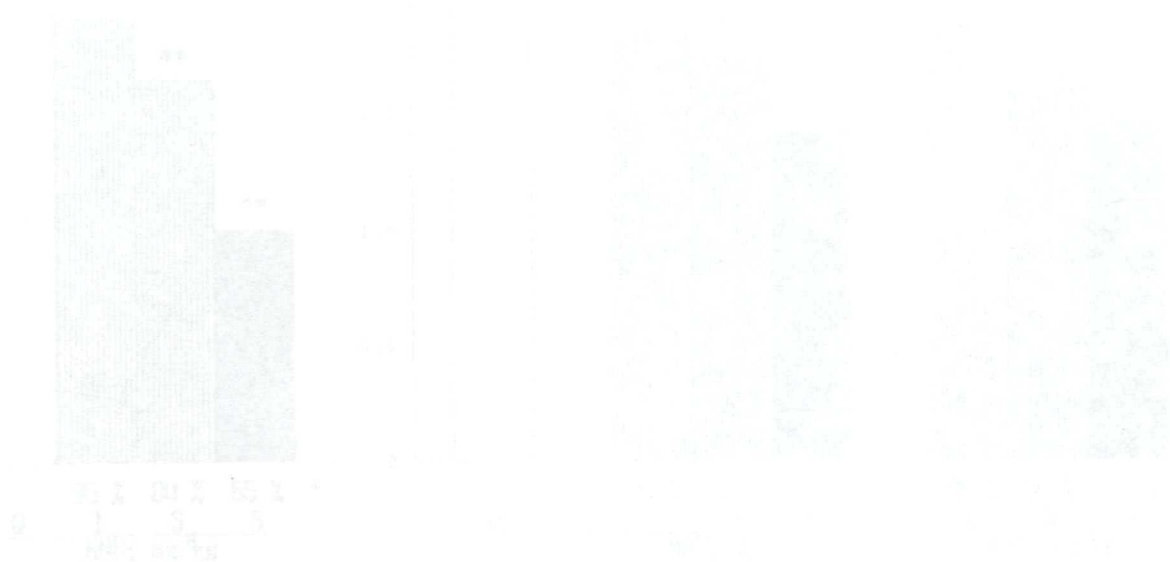


Fig. 1. Brain weight of rats (mg) at 1, 3, and 13 gestational days. * & ** Significant difference from control value.

Table 1. Summary of materials and methods

Strain: Crj:CD (SD) rats
 Environment: Barrier system
 Temperature; $24 \pm 1^\circ\text{C}$
 Relative humidity; $55 \pm 5\%$
 12-hour light (7:00~19:00)/dark cycle
 Mating: 9 weeks of age, Day obtained vaginal plug= Day 0 of pregnancy
 Number of dams: 6 dams/dose group
 Compound: N-methyl-N-nitrosourea (MNU)
 Dose levels: 1, 3 or 5 mg/5ml/kg
 Dosing procedure: On day 14 or 15 of pregnancy,
 single intraperitoneal injection.
 Offspring: Pups were culled at day 4 after parturition (5 males, 5 females)
 Behavioral tests: 12 offspring/6 litters/group

Open field test: 3 min/trial/day X 3 days, at 4 weeks of age.
Wheel cage activity test: through 7 days, at 5-6 weeks of age.
Biel type water T-maze test: 3 trials/day X 3 days, at 6-7 weeks of age.
Shuttle-box avoidance test: 60 trials/day X 3 days, at 7-8 weeks of age.

BRAIN WEIGHT
 (8 weeks of age, absolute wt.)

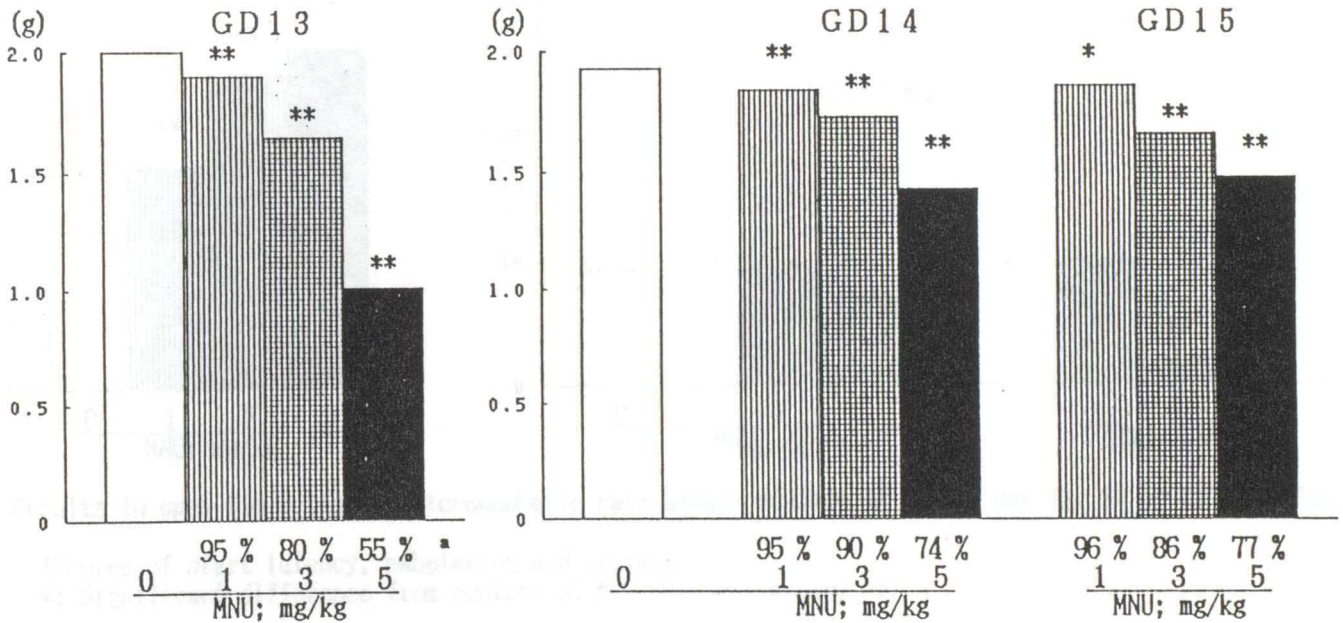
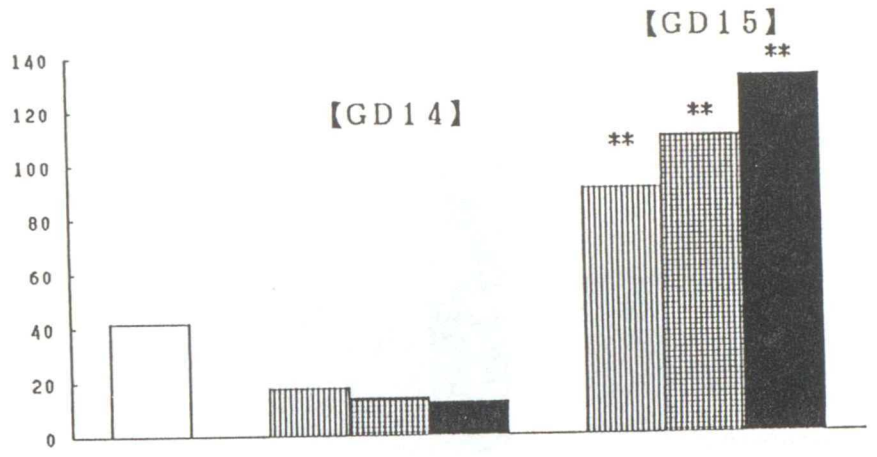
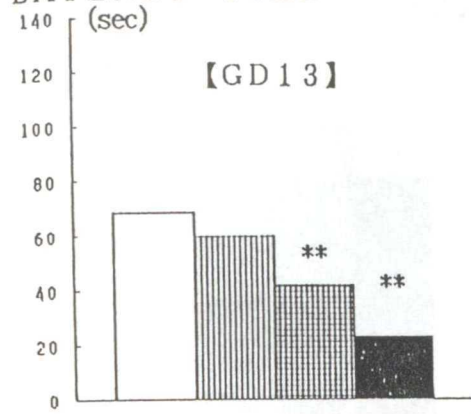


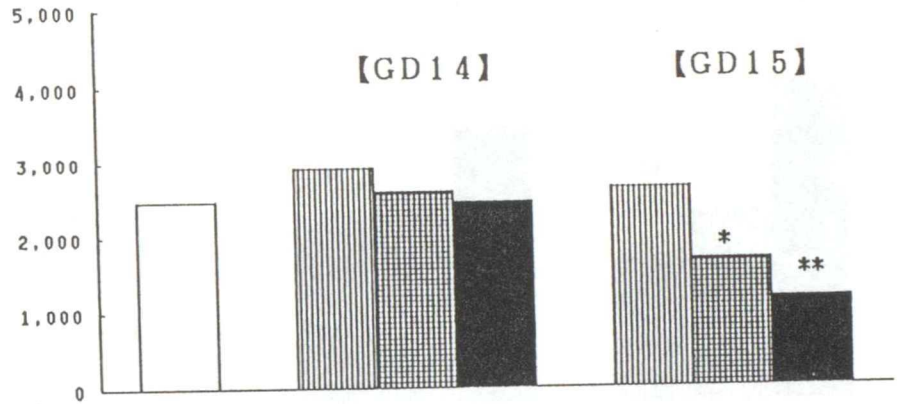
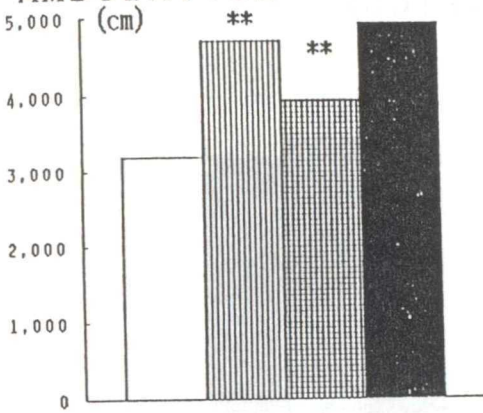
Fig. 1. Brain weight of rats prenatally exposed to MNU at a dose of 1, 3 or 5 mg/kg on various gestational days.
 a: % to control value.
 *: Significant difference from control at $p < 0.05$, **: at $p < 0.01$.

OPEN-FIELD TEST

LATENCY TIME



AMBULATION



REARING

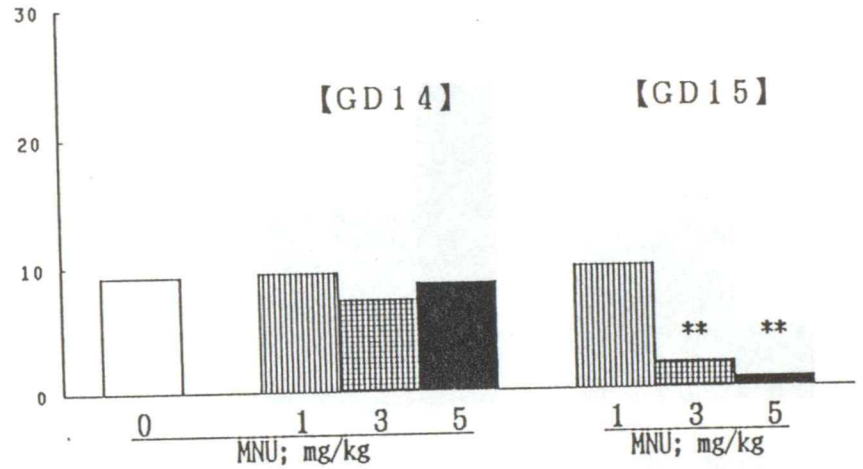
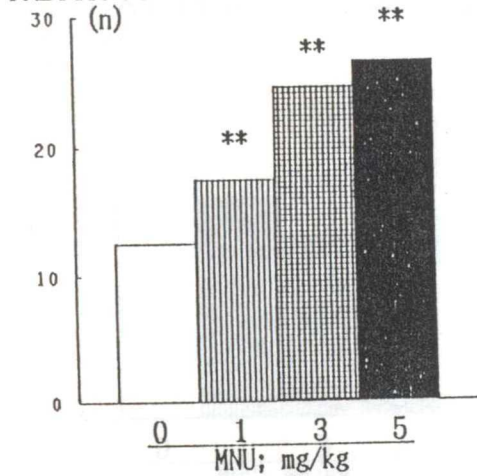


Fig. 2. Results in open-field test of microcephalic rats singly exposed to MNU on day 13, 14 or 15 of gestation

(Scores of start latency, ambulation and rearing)

*: Significant difference from control at $p < 0.05$, **: at $p < 0.01$.

OPEN-FIELD TEST

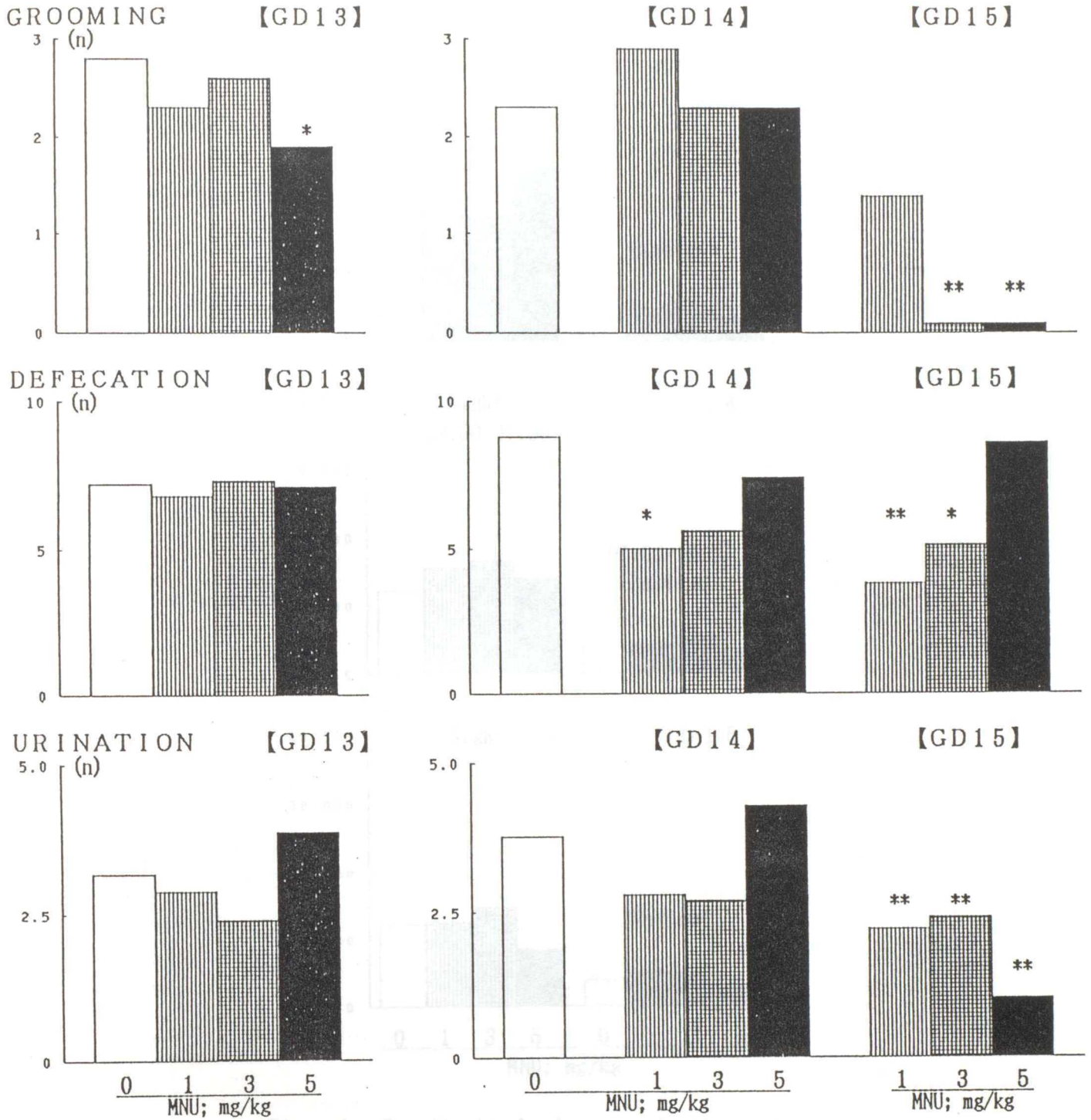


Fig. 3. Results in open-field test of microcephalic rats singly exposed to MNU on day 13, 14 or 15 of gestation (Scores of grooming, defecation and urination)
 *: Significant difference from control at $p < 0.05$, **: at $p < 0.01$.

WHEEL CAGE ACTIVITY
(Total revolutions during 7 days)

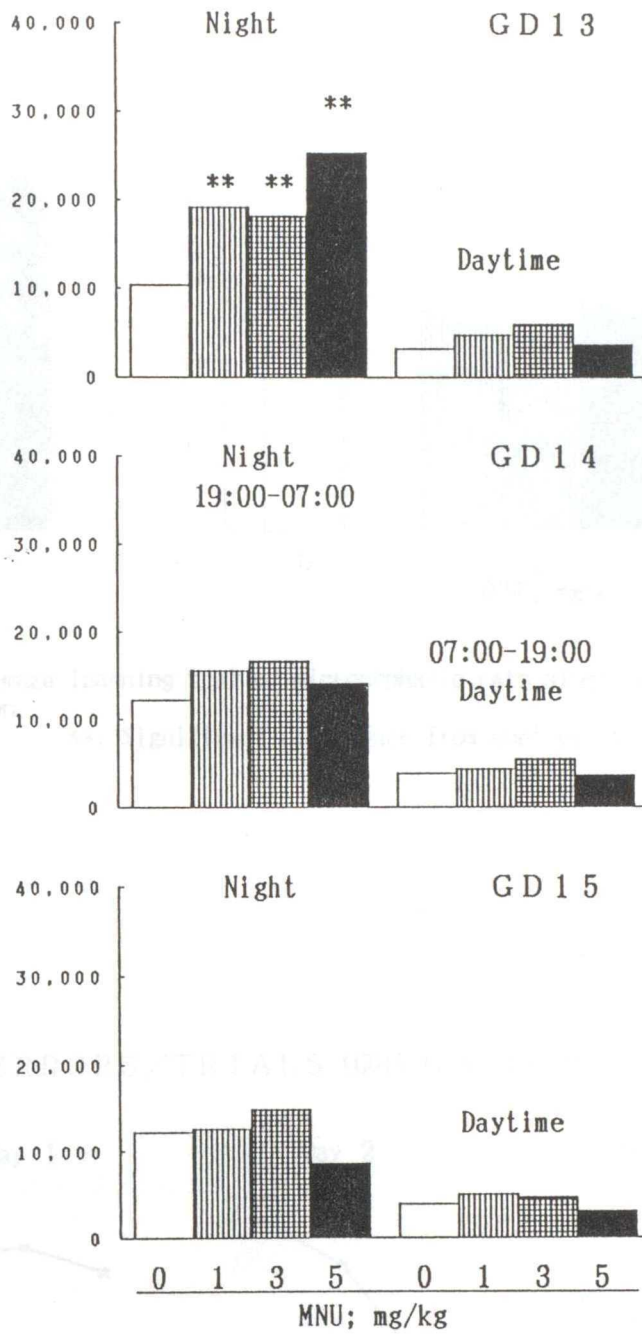


Fig. 4. Results in wheel cage activity test of microcephalic rats singly exposed to MNU on day 13, 14 or 15 of gestation.
**: Significant difference from control at $p < 0.01$.

WATER T-MAZE TEST
(Total errors in 9 trials)

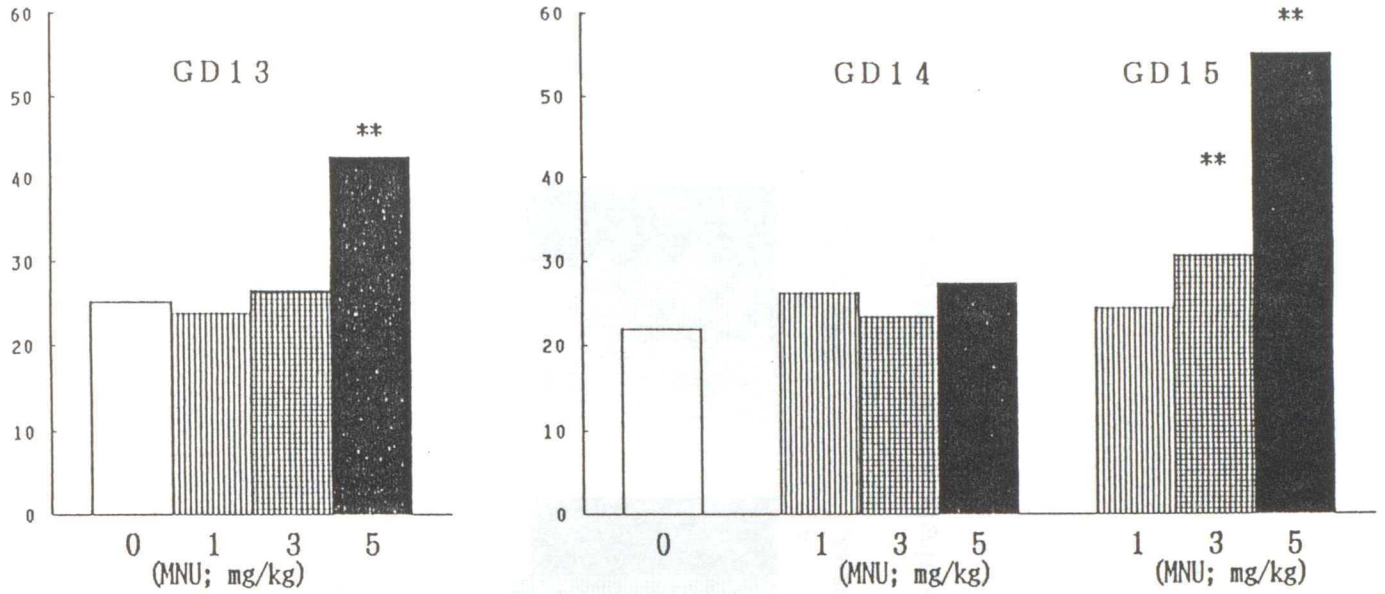


Fig. 5. Results in Biel-maze learning test of microcephalic rats singly exposed to MNU on day 13, 14 or 15 of gestation.
**: Significant difference from control at $p < 0.01$.

MAZE ERRORS/TRIALS (GD15 treated group)

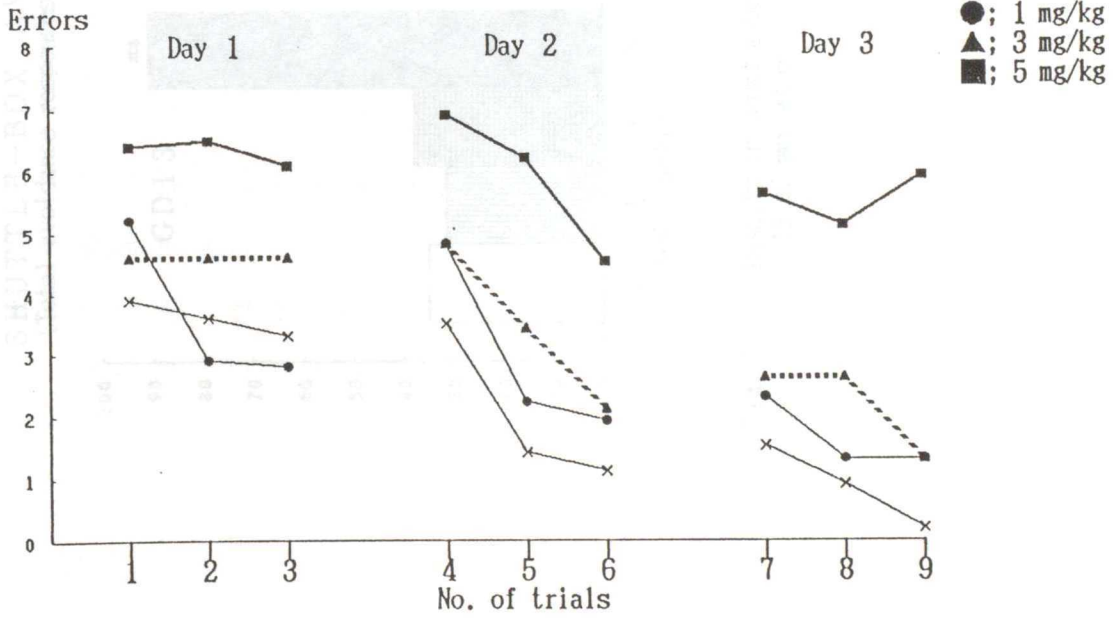


Fig. 6. Changes of maze errors in the group treated with MNU on day 15 of gestation.

SHUTTLE-BOX AVOIDANCE TEST
(Total avoidance responses in 180 trials)

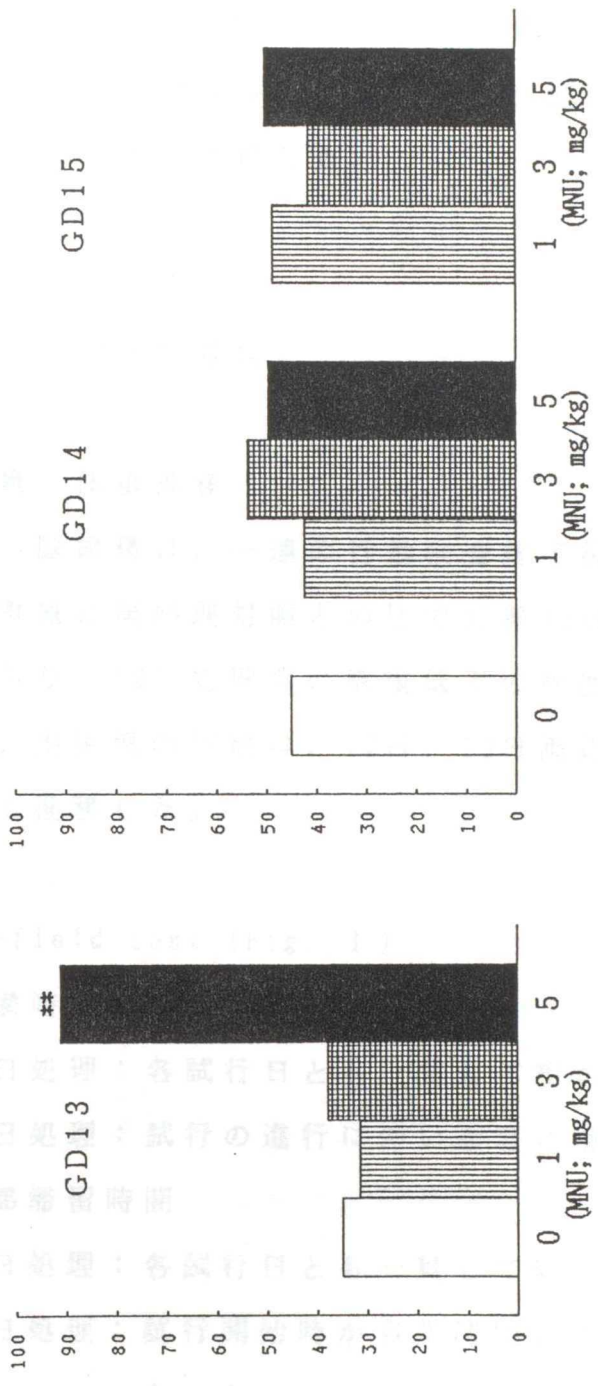


Fig. 7. Results in shuttle-box avoidance test of microcephalic rats singly exposed to MNU on day 13, 14 or 15 of gestation.

** : Significant difference from control at $p < 0.01$.

第 6 章

第 5 節 補足 I . 妊娠 12 日 処理 群

前節では、学習障害の発現には、終脳の障害感受期においても処理時期が重要であり、とくに後半の処理時期に学習障害の感受期があることが示唆された。本実験では、ラットの妊娠 12 日または 13 日に M N U の 5 mg/kg を単回腹腔内投与し、得られた小頭症出生児について前節と同様の観察を行い、結果を比較した。

I . 実験結果および考察

1 . 脳重量，体重推移

出生児の脳重量は、一連の行動検査終了後、8 週齢時に測定した。その結果、脳重量は無処理対照との比で妊娠 12 日処理群：66%、13 日処理群：約 58% であり、12 日処理群の脳重低下の程度は 13 日処理群と比較して軽度であった。出生児の体重は、12 日、13 日両処理群において生後 4 週齢以降有意に低く推移した。

2 . Open-field test (Fig. 1)

a) 出発潜時

妊娠 13 日処理：各試行日とも一貫して短かった。

妊娠 12 日処理：試行の進行に伴い顕著に増加した。

b) 中央部滞留時間

妊娠 13 日処理：各試行日とも一貫して短かった。

妊娠 12 日処理：試行開始時から長時間、中央部に居続ける傾向が顕著であった。

c) 移動距離

妊娠13日処理：試行第1、2日において顕著に増加。

妊娠12日処理：各試行日とも一貫して低値。

d) 立ち上がり回数

妊娠13日処理：各試行日とも一貫して増加。

妊娠12日処理：試行第1日のみ増加。

e) 身づくろい回数

妊娠13日処理：対照群と比較して著差なし。

妊娠12日処理：試行第1、2日において顕著に減少。

f) 排尿数

妊娠13日処理：総数で対照群と差なし。

妊娠12日処理：各試行日とも一貫して低下。

g) 排糞数

妊娠13日処理：総数で対照群と差なし。

妊娠12日処理：各試行日とも一貫して増加。

3. 自発運動量 (Fig. 2)

妊娠13日処理：暗期の運動量は、各日とも顕著に増加した。明期の運動量には対照群と比較して顕著な差はみられなかった。

妊娠12日処理：暗期、明期とも対照群と比較してわずかに運動量は低下した。

4. Biel型水迷路試験 (Fig. 3)

妊娠13日処理：エラー数、所要時間ともに顕著に増加していた。

妊娠12日処理：エラー数、所要時間ともに増加したが13日処理群に比して軽度な変化であった。

5. Shuttle-box avoidance test

妊娠13日処理：回避反応数が顕著に増加した。

妊娠12日処理：学習障害を示唆する変化は示さなかった。

以上のごとく脳重量を指標とした場合、処理日間における脳の障害程度は、13日 > 12日の関係を示し、これは第2章の結果と一致する。12日処理群の出生児は、Open-field事態において前の節における15日処理群と同様に寡動傾向を示した。しかし、15日処理群では排糞数、排尿数の増加はみられず、生理的な身体反応は逆に低下していたのに対し12日処理群では排糞数の増加、排尿数の減少がみられ生理的反応亢進が随伴していたと考えられる。したがってこの処理群における寡動傾向は、真正のすくみ行動と理解され、新奇刺激に対する恐怖亢進、すなわち情動性の変化を示唆していると考えられる。また、12日処理群では、自発活動性も軽度ながら低下していると推察される。迷路学習は、12日、13日の両処理群において障害されていたが、脳重量の低下の程度からみるとこの変化は反応依存的であり、終脳の障害量との関連が類推される。しかし、往復式回避学習試験の成績には、12日処理群においても14日、15日処理群と同様に対照群との間で差はみられず、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なっていることを示唆しているように思われる。

要 約

母ラットの妊娠12日および13日（膣栓＝妊娠0日）にMNUの5 mg/kgを単回腹腔内投与し、得られた小頭症出生児について4週齢でOpen-field test, 5～6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6～7週齢でBiel型水迷路試験および7～8週齢でShuttle-box avoidance testを行い、結果を比較した。対照には無処置妊娠ラットから得られた出生児

を用いた。出生児（8週齢）の脳重量は無処理対照との比で妊娠12日処理群：66%、13日処理群：約58%であり、12日処理群の脳重低下の程度は13日処理群と比較して軽度であった。これらの出生児において、12日処理群では Open-field testにおいて出発潜時および中央区画滞留時間の延長、総移動距離、グルーミング回数の減少がみられた。また、Biel型水迷路試験においては総エラー数が有意に増加した。自発運動量は、この処理日群の出生児が寡動的であることを示唆した。しかし Shuttle-box avoidance testの成績に変化はみられなかった。12日処理では情動性の変化が疑われる。



Figure 1. Open field test results in the neonatal rats of the 12 and 13 day treatment groups. The 12 day treatment group showed a significant increase in the total distance traveled (p < 0.05) and a significant decrease in the number of visits to the central zone (p < 0.05) compared to the 13 day treatment group.

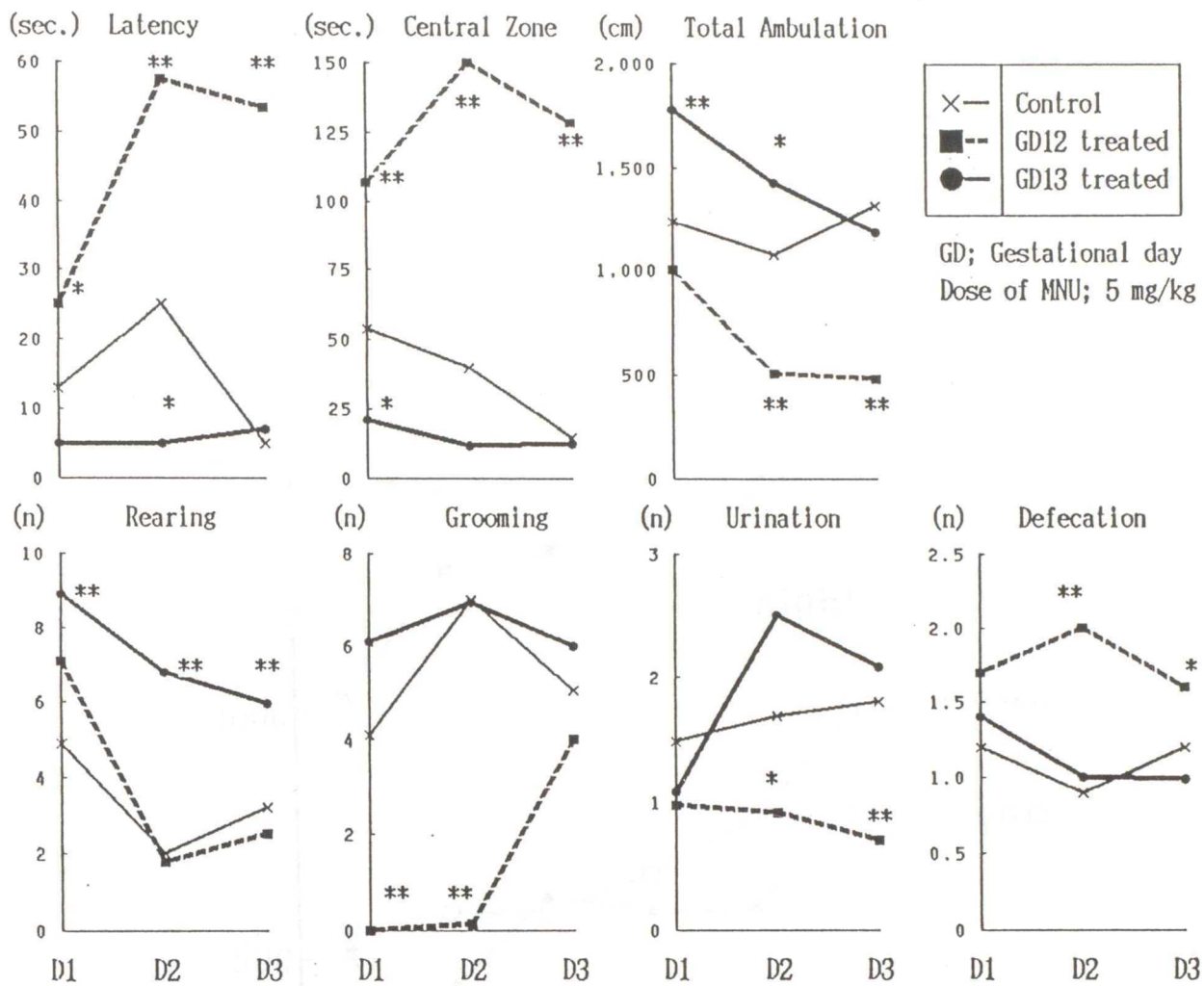


Fig. 1. Open field scores in the microcephalic offspring singly exposed to MNU at a dose of 5 mg/kg on day 12 or 13 of gestation.
 *: Significant difference from control at $p < 0.05$, **: at $p < 0.01$.

Fig. 2 Summary of open field scores

(spin times/day)

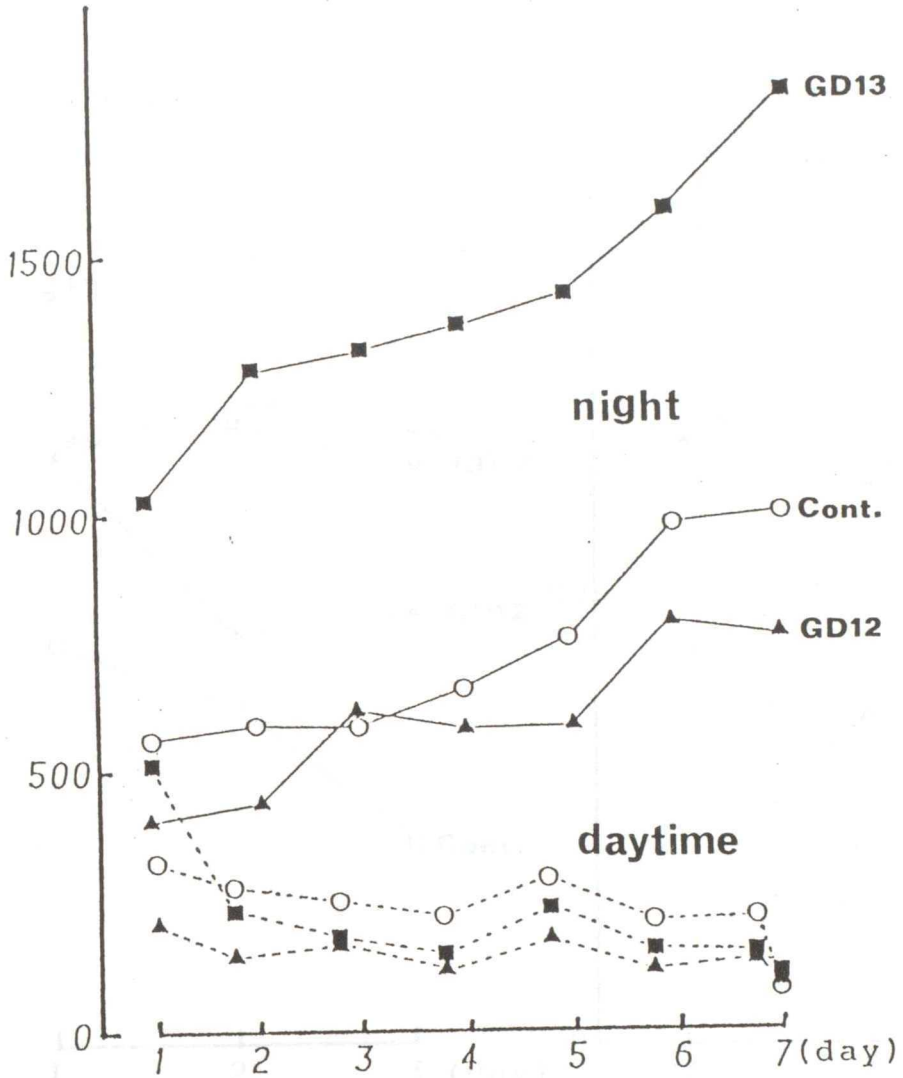


Fig. 2 Summary of wheel-cage activity test

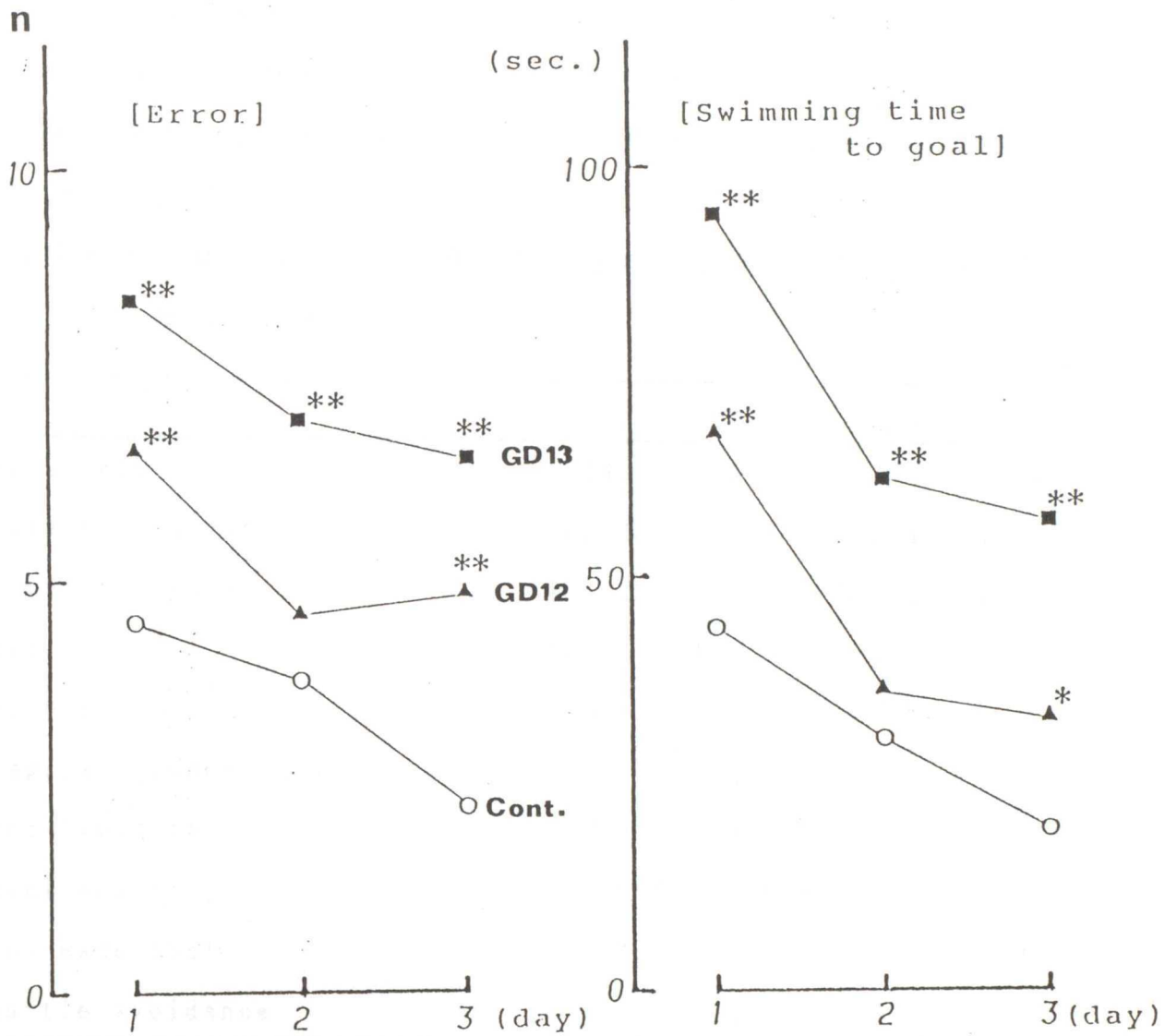


Fig. 3 Summary of the water multiple T-maze test.

*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$.

第 7 章 総合考察

本研究では、中枢神経系に選択的な催奇形作用を示すことで知られる N-methyl-N-nitroso-urea(MNU) をラット胎児の脳において特に終脳の障害感受期と推定された妊娠時期（妊娠 12 日～15 日、交尾確認日：妊娠 0 日）に分割投与し、誘発された小頭症（小脳症）の出生児についてその行動の変容を検索した。その主要な目的は、処理時期と機能障害の関連性について分析することである。

最高用量とした 5 mg/kg の処理で誘発された重度小頭症児の観察結果は次表のように要約される。

Tests	Cont.	GD12	GD13	GD14	GD15
Tel.L./B.L. ^a	52	44	37	38	44
Postural reactions		H, D	H, D	H, D	H, D
Spinal reflexes		H, D	H, D	H, D	H, D
Gait		D, I	D, I	D	D
Swimming		I	I	I ^b	—
Complex locomotor skills		I	I	—	—
Open-field test		I ^{HPO}	I ^{HPR}	—	I ^{HPO}
Wheel activity		I ^{HPO}	I ^{HPR}	—	—
Biel maze test		I ^b	I	—	I
Shuttle avoidance		—	I	—	—

a : Telencephalon/Brain length
 b : Slightly impaired
 — : level of control
 D : Delay of ontogeny
 H : Hyperreflexive reaction
 I : Impaired performance
 HPR: Hyperactive, HPO: Hypoactive

以上に示したごとく MNU の胎生期処理により出生した小頭症児には、

処理時期に依存した特異的な行動の変容がみられた。出生後早期の感覚-運動統合機能群の機能発達検査における結果を集約すると処理時期に関連した変化は随意的要素の高い行動に発現し、独立した下位機能群に対する上位中枢からの統御機能の発生は、処理時期と無関係に遅延する傾向にあったと考えられる。反射は中枢神経系における統合と機能の基本的単位であり、すべてが上位中枢により抑制的統御を受ける。一方、姿勢反応は、この反射を含む脊髄と上位中枢の上行・下行伝導路の統合機能による姿勢の自動調節機能を反映し、この両者は随意運動の基礎を構成する機能群とみなせる〔26〕。ラット、マウスなど発生の早い段階で出生する動物では中枢神経系の主要な組織発生は生後に完了するが、行動発達は、この過程を機能の発生として反映しているものと考えられている〔28, 37〕。小頭症の出生児では発達初期にこれらの下位機能が不完全であったものの、どの処理日群においても結局は統合がうまくとられるようになったことは、感覚・運動の統合に関する一次機能は、重度小頭症の出生児においても最終的に正常に発生することを示唆する。このことは、言い換えれば、生まれつき終脳の容積が小さいと感覚-運動統御機構の組織構築が、一般的に遅延することを示していると考えられる。X線照射、MAM, Hydorxyurea 等MNUと類似のAgentsの処理により誘発された小頭症児についての行動観察実験は多いが、初期行動発達を詳細に観察した報告は少ないように思われる。X線照射による実験報告では、40rad または60rad, 17日処理で air-righting の発達遅延〔47〕 100rad, 15日処理でrighting の発達遅延〔88, 103〕、Hydorxyurea では、500 mg/kg, 12日処理で air-righting の発達遅延〔18〕（以上ラット）、Cytosine arabinoside (Ara-C) では、30 mg/kg, 12.5+13.5日処理でcrossed extensor, pivoting, righting, placing, cliff drop の発達遅延〔1〕, Azacytidineでは、5 mg/kg, 12日処理で air-righting の発達遅延〔83〕（以上マウス）が報告されているが、これらの報告を通覧すると小頭症児の初期行動発達は処理日と無関係に遅延する傾向があることは間違いないように思われる。

なお、処理時期は本研究と大きく異なるが、Altman et al. は、新生児に対する生後の X 線照射による一連の実験（後脳の障害を高率に誘発する）において生後発達の障害の程度は、総照射線量に比例して重くなったが、照射時期の相違によって特定の行動発達だけが影響を受けることはないことを報告している〔6, 8, 76, 101〕。このことから、本実験結果を併せて考察すると児における感覚-運動統合機能群の分化は、胎生のかなり早い時期に基本的方向付けを終わらせていると考えられる。

一方、妊娠12日および13日処理群の出生児でみられた四肢の運行動作異常に関する前肢または後肢優位の異常の差異は、歩行の神経学的メカニズムを考察するうえで重要な知見を提供するともものと思える。小頭症ラットの歩行様態におけるこのような変化は、X線照射によって誘発された小頭症のラットにおいて‘‘Hopping gait’’として報告されている〔23, 43, 70, 71〕。Mullenix et al. (1974, 1975) は、胎生13~16日に125radを単回照射したラットにおいて13日照射群で100%、14日照射群で25%、15日照射群で8%の個体にHopping gaitがみられるが、14日および15日照射群のラットではよたよた歩行(waddling gait)が主体であることを明らかにし、脳の組織学的観察結果からHopping gaitの責任障害部位は前交連であろうと考察している〔70, 71〕。これに対しHicks and D'Amato (1980)は、胎生13日、14日および15日の150rad単回照射によって同様の変化が高率に生じることを明らかにしたが、前者と異なりHopping gaitの責任障害部位は脊髓灰質後柱(neuronal lossがあると述べている)と考察している〔43〕。ここで後者の見解には、臨床的な裏付けがあるように思える。犬の中樞神経系の先天異常の一つにワイマラナー種で比較的高率にみられる脊髓癒合不全症(spinal dysraphism)または脊髓空洞症(syringomyelia;これはspinal dysraphismに包含する考え方もあるようである〔26〕)があるが、この臨床症状は‘‘bunny hopping’’と形容されるように後肢の左右同期運動である〔34, 35, 66, 105〕。この責任障害がどのような組織学的異常にあるかについては、定説がないようであるが、脊髓灰質前柱における

neuronの異常配置が原因ではないかとの説がある〔105〕。交互歩行（正常歩行）の脊髄における調節器は、脊髄灰質前柱の一般運動神経群と前柱間の介在神経とで構成されると考えられており、この働きは後柱の求心性神経の修飾を受けることから〔26, 75〕、いずれにしても後肢の異常歩行にはこれらの脊髄における形態的異常が関連していると思われる。しかし以上はすべて後肢優位の障害に関連して考察されていることには注意を要するであろう。本研究においてみいだされた、妊娠12日処理群における前肢優位の異常は、まったくの新知見である。（X線照射による実験では、妊娠12日処理では異常なしとされているが、これはおそらく歩行事態の観察が中心であることによっている。第3章遊泳・歩行異常の項参照）上述のようにこれらの小頭症の出生児においては下位機能群には際立った障害があるとはいえず、妊娠12日、13日のどちらの処理においても感覚・運動の統合に関する一次機能は最終的には正常に機能したと推定される。このことから類推すると、この異常歩行の前肢、後肢の差異を決定している部位は、上位中枢にあると考えられる。仮に脊髄のみの障害がこの異常歩様の原因をなすものとするれば、脊髄の機能から類推して他の反射・姿勢調節機能に器質的異常がみられないことにはそれなりの説明があるであろう。歩行の上位中枢における調節メカニズムは、いまだに不明な部分が多い〔56〕。特に四足歩行の発生においては、前肢の運動能力の発達に遅れて後肢の機能が発達すること（pivoting→walking）の神経学的裏付けは無いように思えるが、歩行異常が早い時期の処理で前肢に、遅い時期の処理で後肢に発現するするというanalogyが何を意味しているかは興味深く、今後の課題と考える。

複合運動技能の発達検査では、12日、13日処理群の出生児で機能異常が認められたが、13日処理群の出生児では、運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられ、四肢の運動能力が障害されていたというよりも一定の負荷がかかった行動場面での移動運動では、計画性のある運動の組立が困難であったように思われる。

一方、感覚-運動統合機能群の機能については、小頭症の出生児に個体の生存に直接かかわるような際立った障害があるとはいえず、この意味で終脳の形成不全は、単純な運動の遂行にさほど重要な意味をもたないとの解釈も成り立つ。したがって学習や記憶あるいは活動性といった、より総合的で高次の機能についての検索が重要であるように思われた。

出生児の終脳の障害程度には、12日<13日>14日>15日の関係がみられるが、15日の処理による終脳形成不全が、他の処理日群と比較して最も軽度であったと推察される。この群の出生児は、Open-field事態において13日処理群とほぼ正反対の行動特性を示した。すなわちこの15日処理群における出生児の特性は、13日処理群のそれが多動であるのに対し極端に寡動であったが、積極的な反応であったことが推察される。これに対し12日処理群の出生児は、15日処理群と同様に寡動傾向を示したが、生理的反応亢進が随伴しており、この処理群における寡動傾向は情動性の変化を示唆していると考えられる。

自発活動性についても処理日による差は顕著であった。Rodier (1980) は、細胞増殖阻害作用のあるagentsの処理で誘発された小頭症ラットの活動性は妊娠13日以前および妊娠18日以後の処理で寡動的であり、妊娠14~17日の間の処理で多動的となり、このことにはagentsの差によらず処理時期依存的な法則性があると述べている〔81〕。しかし、反応相互の臨界期や反応発現の閾値については厳密な論議がなされている訳ではないので一般的な法則と考えたほうが良さそうである。事実、妊娠15日のMAM処理実験では、15 mg/kgの処理で無変化、25 mg/kgの処理で多動となるとの報告〔9〕があり、障害の発現には一定の閾値が存在する。Rodierの観点からすると本実験の妊娠14日、15日処理群の結果には法則性と一致しない点があるが、おそらく誘発された小頭症の程度が軽度であったことに起因するものであろう。13日処理と12日処理での差異は、両時期が臨界期の狭間に位置することからMNUの特性、すなわち代謝、吸収・排泄などに関する他の化合物との差異を反映している可能性がある。迷路学習は、脳重

量の低下の程度からみると15日処理群において相対的に高度に障害されていた。これは、M A M処理による実験報告から類推したとおりの変化であり、終脳における局所的障害部位が重要であることを示唆していると考えられる。一方、迷路学習は、12日、13日の両処理群においても障害されていたが、脳重量の低下の程度からみるとこの変化は反応依存的であり、終脳の障害量との関連が類推される。しかし、往復式回避学習試験の成績に異常がみられたのは、妊娠13日処理群のみであり、12日処理群においても14日、15日処理群と同様に対照群との間で差はみられず、このことは、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なっていることを示唆していると思われる。

14日処理群の出生児では、Open-field事態のみならず、いずれの観察事態においても顕著な行動の変化はみられず、その行動は質的にも量的にも正常ラットと同水準にあったと考えられる。その意味で、この群の小頭症児における行動の変容は、不明である。すなわちこの時期の処理でより重度の小頭症が誘発されればその前後の時期の処理と同様の異常が生じるかどうかは不明であり、このことも今後の課題である。しかし、妊娠13日処理と15日処理とでは、殆ど逆の反応が現出していることから、どちらかにより近い障害が発現する可能性を疑うよりは、本実験で調べた観察測度では検出できない行動に異常が発現している可能性が高いように思われる。例えば、社会行動などにその異常はみられるかもしれない。

結論：外的作因に起因する中枢神経系の障害は、その処理強度および処理時期の差異により異なる行動・機能異常を誘発する。したがってより微細な中枢神経系の障害に起因した遅発性の影響を検出しようとするならば、出現するであろう行動異常の性質と量に留意し適切な検査方法を選択せねばならない。

第 8 章 全体の要約

本研究では、中枢神経系に選択的な催奇形作用を示すことで知られる N-methyl-N-nitroso-urea (MNU) をラット胎児の脳において特に終脳の障害感受期と推定された妊娠時期（妊娠 12 日～15 日、交尾確認日：妊娠 0 日）に分割投与し、誘発された小頭症（小脳症）の出生児についてその行動の変容を検索した。その主要な目的は、処理時期と機能障害の関連性について分析することである。

第 1 章では、ラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠 7～17 日）に 3 用量（2.5, 5, 10 mg/kg）の MNU を母ラットに腹腔内投与し、胎児の発生、出生児の発育・行動に及ぼす影響を検討した。その結果、母動物に対する顕著な毒性発現はなかったが、10 mg/kg の投与では全着床胚が死亡すること、2.5 および 5 mg/kg の投与では胎児重量、胎盤重量が減少し、ほぼ全例に外表異常として扁平な頭頂部がみられることが判った。この頭部の外形的特徴は、脳の各部位の計測によって終脳の形成不全に基づくものであることが確認された。また、5 mg/kg の投与では頭蓋・顔面異常の他に、指趾異常を含む複合的な外表異常が成立した。行動検査は、出生児が生存しえた 2.5 mg/kg 投与群および対照群について実施したが、MNU 処理群の出生児は、多単位水迷路試験で顕著な学習障害、オープンフィールド試験で寡動傾向を示した。しかし、往復式回避学習試験ならびに各種反射機能（成体）に特徴的な変化は認められなかった。小頭症児におけるこれらの行動の変化は、MNU の連続的な侵襲による中枢神経系の包括的な異常を反映したものと考えられた。

第 2 章では、詳細な行動・機能検査を行うための前段実験としてラット胎児の器官形成期にあたる妊娠時期（妊娠 7～17 日）に 1 用量（5 mg/kg）の MNU を分割投与して胎児とその脳の発生に対する発生時期依存的な影響の有無を検討した。その結果、胎児脳の障害感受期は、妊娠 10 日以降に

あり、感受部位は、中脳－終脳－嗅葉－後脳の順に互いに交錯しながら移行すること、終脳の障害感受期は妊娠12～15日にあり、その最障害感受期は妊娠13日にあることが判った。また、この時期の5 mg/kg および2 mg/kg の単回処理では、他の肉眼形態学的な異常を伴わずに胎児に用量依存的な終脳の形成不全（小脳症）が生じることが明らかであった。

そこで第3章では、終脳の最障害感受期と推定された妊娠13日にMNUの5 mg/kg および2 mg/kg を単回投与し、得られた小頭症の出生児について生後1日から10週齢までの間に神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を含む種々の行動観察を行った。その結果、5 mg/kg 処理群の出生児では、脊髄反射・姿勢反応の発達遅延がみられ、その一部の反応は異常に亢進していた。2 mg/kg 処理群では、反射および姿勢反応の発達に異常は認められなかった。しかし、歩行および遊泳行動においては小頭症児の肢の運行動作に、通常ではみられない左右両側肢の同期運動が発現し、この変化は、5 mg/kg および2 mg/kg の両処理群において確認された。この前・後肢における異常な両側の同期運動は、随意的な四足運動が発現されるときに発現するものと考えられた。複合運動技能の発達検査では5 mg/kg 処理群の出生児に運動遂行中の四肢の位置きめ能力について測定障害を疑わせる異常がみられたが、2 mg/kg 処理群の出生児では、発達が遅延する傾向がみられたのみであった。オープンフィールド試験では、5 mg/kg 処理群において寡動傾向がみられたが、新奇刺激に対する反応性は亢進していると考えられた。多単位T型水迷路試験では、5 mg/kg 処理群において高度に、2 mg/kg 処理群では軽度に迷路学習が障害されていた。往復式回避学習試験においては、5 mg/kg 処理群は、すべての試行ブロックにおいて、2 mg/kg 処理群は第1、第2試行ブロックにおいて有意に高い回避反応率を示した。これらの結果から、2.5 mg/kg の連続投与実験においてみられた出生児の行動の変容には、妊娠13日のMNU処理による中枢神経系の障害が重要であったと推察される。

第3章では、ラットの中枢神経系、特に終脳の最障害感受期と推定され

た妊娠13日にMNUの暴露を受けた出生児では、移動運動がおこなわれる時の四肢の運動形態に特異的な異常が発現すること、生後初期に一部の反射・姿勢反応が亢進することなどが判明した。そこで、第4章では、そのような行動の変化が、MNUにより特異的に、あるいは妊娠13日の処理に限って誘発される異常であるかどうかを調べる目的で、終脳の障害感受期間と推定される妊娠12日～15日のいずれか1日にMNUの5 mg/kg、あるいは胎生期処理でラットに小頭症を誘発することがよく知られている methylazoxymethanol (MAM) の 40 mg/kg を単回投与し、得られた出生児について第3章とほぼ同様の神経行動学的発達検査（初期行動発達検査）を行い、その行動を比較した。その結果、MNUおよびMAM処理との間で、生起した行動異常に差は認められなかった。一方、妊娠12日、13日、14日あるいは15日処理群における小頭症個体には、投与化合物にかかわらず処理日に応じた著しい行動上の差が生じていた。観察結果を集約すると処理時期に関連した変化は随意的要素の高い行動に発現したが、上位中枢からの投射により抑制的制御を受けるといわれる反射あるいは姿勢反応の一部は、処理時期と無関係に生後早期に亢進していた。またその初期行動発達の多くは、遅延する傾向にあった。この行動面での処理時期による差あるいは行動要素の感受性の差が何に起因しているかは明らかではないが、誘発された小頭症は、いずれの処理時期においても終脳の形成不全を主変化とする点において一致しており、上位中枢における神経解剖学的変化が重要と考えられた。しかし、小頭症の出生児の下位機能群には、個体の生存に直接かかわるような際立った障害があるとはいえず、終脳の形成不全は、単純な運動の遂行にさほど重要な意味をもたないと推察される。したがって学習や記憶あるいは活動性といった、より総合的で高次の機能についての検索が重要と思われた。

第5章では、母ラットの妊娠13日に5段階濃度（1, 2, 3, 4 および 5 mg/kg）のMNUを処理して得た出生児について、4週齢でOpen-field test, 5-6週齢で回転ケージによる自発運動量測定, 6-7週齢でBiel型水

迷路試験、7-8週齢でShuttle-box avoidance testを行った。各処置群の離乳児の脳重量は、無処置対照群と比較して統計学的に有意に低く、対照群に対する脳重量の比は1-5 mg/kgの順に略95%、85%、80%、70%および55%であった。これらの出生児において、Open-field testでは、全処置群で総移動距離および立ち上がり回数の増加が、4, 5 mg/kg 群で出発潜時の減少が、5 mg/kg 群で排尿数の増加および後肢の歩行運動異常がみられた。自発運動量測定では、全処置群において運動量が明瞭に増加し、とくに5 mg/kg 群で顕著であった。Biel型水迷路試験では、5 mg/kg 群においてのみエラー数および所要時間の増加がみられた。Shuttle-box avoidance testにおいて回避反応数の増加を示したのは、5 mg/kg 群のみであった。これらのことからMNU 1~5 mg/kg の妊娠13日投与により誘発された小頭症ラットにおける基本的な行動の変化は、活動性の増大であり、加えて終脳形成障害の程度に応じた変化が重複しているものと考えられた。

第6章では、妊娠12日、14日および15日の各日にMNUを処理し、得られた小頭症出生児について第5章と同様の行動検査を行い、妊娠13日処理との比較を試みた。その結果、出生児の終脳の障害程度には、12日<13日>14日>15日の関係がみられ、15日の処理による終脳形成不全が、他の処理日群と比較して最も軽度であった。Open-field事態においては、13日処理群の行動特性が、多動であるのに対し、12日および15日処理群の特性はともに寡動であった。しかし、15日処理群ではこの反応が、動物の積極的な対応行動であることが推察されたのに対し、12日処理群の出生児では生理的反応亢進が随伴しており、寡動傾向は情動性の変化を示唆していると考えられた。自発活動性についても処理日による差は顕著であり、12日処理で寡動傾向、15 mg/kgの処理で無変化であった。迷路学習は、12日、13日および15日処理群において障害されていたが、脳重量の低下の程度からみて15日処理群が相対的にもっとも高度に障害されていた。したがって妊娠12日~15日の間に限って言えば、迷路学習に関する最障害感受期は、妊

娠15日にあると結論される。一方、往復式回避学習試験の成績に異常がみられたのは、妊娠13日処理群のみであり、この課題の遂行に係わる中枢神経系の責任部位が、迷路学習のそれとはかなり異なっていることを示唆していると考えられた。14日処理群の出生児では、Open-field事態のみならず、いずれの観察事態においても顕著な行動の変化はみられず、この群の小頭症児における行動の変容は、不明である。この処理日群の出生児では、本研究で用いた観察方法では検出できない行動異常が誘発されていた可能性が考えられる。

結論：外的作因に起因する中枢神経系の障害は、その処理強度および処理時期の差異により異なる行動・機能異常を誘発する。したがってより微細な中枢神経系の障害に起因した遅発性の影響を検出しようとするならば、出現するであろう行動異常の性質とその程度に留意し適切な検査方法を選択せねばならない。

REFERENCES

1. Abe, Y. (1981) Early postnatal development and long term prognosis of experimentally-induced microcephalic mice. *Cong. Anom.* 21: 65-74.
2. Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. pp. 67-97. In *Handbook of Behavioral Teratology* (Riley, E. P., and Vorhees, C. H., eds.) Plenum Press, New York.
3. Adams, J., and Buelke-Sam, J. (1981) Behavioral assessment of the postnatal animal: Testing and methods development. pp. 233-258. In *Developmental Toxicology* (Kimmel, C. A., and Buelke-Sam, J., eds.) Raven Press, New York.
4. Archer, T., and Teiling, A. (1988) Hyperactivity and instrumental learning deficits in methylazoxymethanol-treated rat offspring. *Neurotoxicol. Teratol.* 10: 341-347.
5. Aleksandrov, V. A. (1973) Comparative characterization of the embryotoxic and teratogenic action of N nitrosoalkylureas of rat embryos. *Dokl. Biochem.*, 208: 79-82.
6. Altman, J., Anderson, W. J., and Strop, M. (1971) Retardation of cerebellar and motor development by focal x-irradiation during infancy. *Physiol. Behav.*, 7: 143-150.
7. Altman, J., and Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rats. *Anim. Behav.*, 23: 896-920.
8. Anderson, W. J., and Altman, J. (1972) Retardation of cerebellar and motor development in rats by focal x-irradiation beginning at 4 days. *Physiol. Behav.*, 8: 57-67.
9. Balduini, W. G., Lombardelli, G., and Elsner, J. (1989) Nocturnal hyperactivity induced by prenatal methylazoxymethanol administration as measured in a computerized residential maze. *Neurotoxicol. Teratol.* 11: 339-343.
10. Banfi, S. and Dorigotti, L. (1986) Experimental behavioral studies with Oxracetam on different types of chronic cerebral impairment. *Clinical Neuropharmacol.*, 9: 19-26.
11. Beasley, D. M., Begab, M. J., Clarke, A. D., Stein, Z. A., Tizard, J., and Wald, I. (1977) Prevention of Mental Retardation. Reports of a Sub-Committee established by the joint commission of the international association for the scientific study of mental deficiency (IASSMD) and the international league of societies for the mentally handicapped (ILSMH).
12. Biel, W. C. (1940) Early age differences in maze performance in the albino rat. *J. Genet. Psychol.*, 56: 439-453.

13. Blanck, A., Hard, E., and Larsson, K. (1967) Ontogenetic development of orienting behavior in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 63: 327-328.
14. Bolles, R. C. (1970) Species-specific defense reactions and avoidance learning. *Psychol. Review*, 77: 32-48.
15. Bovet, D., Bovet-Nitti, F., and Oliverio, A. (1969) Genetic aspects of learning and memory in mice. *Science*, 163: 139-149.
16. Brent, R. L. (1980) Radiation teratogenesis. *Teratology*, 21: 281-298.
17. Butcher, R. E. (1976) Behavioral testing as method for assessing risk. *Env. Health Pers.*, 18: 75-78.
18. Butcher, R. E., Hawver, K., Kazmaier, K., and Scott, W. J. (1975) Postnatal behavioral effects from prenatal exposure to teratogen. In *Basic and therapeutic aspects of perinatal pharmacology* (Morselli, P. L., Garattini, S., and Sereni, F. eds.) Raven Press, New York.
19. Butcher, R. E., and Vorhees, C. V. (1980) A preliminary test battery for the investigation of the behavioral teratology of selected psychotropic drugs. *Neurobehav. Toxicol.*, 1: 207-212.
20. Capobianco, S., and Hamilton, L. W. (1976) Effects of interruption of limbic system pathways on different measures of activity. *Physiol. Behav.*, 17: 65-72.
21. Cheema, S. S., and Lauder, J. M. (1983) Infrapyramidal mossy fibers in the hippocampus of methylazoxymethanol acetate induced micrencephalic rats. *Develop. Brain Res.*, 9: 411-415.
22. Croizier, and Pincus, (1926) Phototropism in young rats. *J. Genet. Psychol.*, 10: 407-417.
23. D'Amato, C. J. and Hicks, S. P. (1980) Development of the motor system: Effects of radiation on developing corticospinal neurons and motor function. *Exp. Neurol.*, 70: 1-23.
24. Dambaska, M., Haddad, R., Kozlowski, P. B., Lee, M. H., and Shek, J. (1982) Telencephalic cytoarchitectons in the brains of rats with graded degrees of micrencephaly. *Acta Neuropathol. (Berl)*, 58: 203-209.
25. Deagle, J., and Furchtgott, E. (1968) Passive avoidance in prenatally x-irradiated rats. *Develop. Psychol.*, 1: 90-92.
26. de Lahunta, A. (1983) *Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology*, 2nd ed., B. W. Saunders, Philadelphia.
27. Fischer, M. H., Welker, C., and Waisman, H. A. (1971) Generalized growth retardation in rats induced by prenatal exposure to methylazoxymethanol acetate. *Teratology*, 5: 223-232.

28. Fox, M. W. (1964) Reflex ontogeny and behavioral development of the mouse. *Anim. Behav.* 12: 427-441.
29. Funahashi, A. (1989) Distribution of corticogeniculo-neurons and projection of geniculo-cortical fibers in methylazoxymethanol-induced microcephalic rats. *Cong. Anom.* 29: 125-137.
30. Furchtgott, E. (1963) Behavioral effects of ionizing radiations: 1955-61. *Psychol. Bull.*, 60: 157-199.
31. Furchtgott, E. (1975) Ionizing radiations and the nervous system. pp. 343-379. In *Biology of Brain Dysfunction: Vol. 3.* (Gaul, G. E., ed.) Plenum Press, New York.
32. Furchtgott, E., Jones, J. R., Tacker, S., and Deagle, J. (1970) Aversive conditioning in prenatally x-irradiated rats. *Physiol. Behav.*, 5: 571-576.
33. Furchtgott, E., and Wechkin, S. (1962) Avoidance conditioning as a function of prenatal x-irradiation and age. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 55: 69-72.
34. Furneaux, R. W., Doige, C. E., and Cybinski, D. H. (1973) Syringomyelia and spina bifida occulta in a Samoyed dog. *Can. Vet. J.*, 14: 317.
35. Geib, L. W., and Bistner, S. I. (1967) Spinal cord dysraphism in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 150: 618.
36. Giurgea, C., Greindl, M. G. Preat, S., and Puigdevall, J. (1982) Piracetam compensation of MAM-induced behavioral deficit in rats. pp. 281-286. In *Alzheimer's disease: A report of progress* (Corkin, S. et al. eds.) Raven Press, New York.
37. Gottlieb, G. (1974) *Aspects of neurogenesis.* Academic Press, New York.
38. Haddad, R. K., Rabe, A., Dumas, R., Shek, J., and Valsamis, M. P. (1977) Transplacental induction of cerebellar ataxia in ferrets. *Teratology*, 15:33.
39. 橋本 豊, 他 (1986) Shuttle Box Avoidance Testにおける基礎的条件の検討 -Boxの長さ と仕切りの問題について- 「第3回共同研究報告集」. Behavioral Teratology 懇話会.
40. Herrenstein, R. J. (1969) Method and theory in the study of avoidance. *Psychol. Review*, 76: 49-69.
41. Hicks, S. P. (1952) Some effects of ionizing radiation and metabolic inhibition on the developing mammalian nervous system. *J. Pediatrics*, 40: 489-513.
42. Hicks, S. P., D'Amato, C. J., and Low, M. J. 1959. The development of the mammalian nervous system. *J. Comp. Neurol.*, 113:435-469.

43. Hicks, S. P., D'Amato, C. J. 1980. Development of motor system: Hopping rats produced by prenatal irradiation. *Exp. Neurol.* 70: 24-39.
44. Hutchings, D. E. (1978) Behavioral teratology: Embryopathic and behavioral effects of drugs pregnancy. pp. 7-34. In *Studies on the development of behavior and the nervous System: Vol. 4. Early Influences* (Gottlieb, G., ed.) Academic Press, New York.
45. Hull, C. L. (1934) Emotional behavior in the rat: I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *J. Comp. Psychol.*, 18: 385-403.
46. Hull, C. L. (1941) Temperament: A survey of animal studies. *Psychol. Bull.*, 38: 909-946.
47. Jensch, R. P., Magaziner, A., and Vogel, W.H. (1981) Effects of maternal environment and postnatal multiple testing on adult rat offspring. *J. Toxicol. Env. Health*, 7: 655-663.
48. Jobst, K. (1967) Teratogenous changes and tumors in rats following treatment with methylnitroso-urea (MNU). *Neoplasma*, 14: 435-436.
49. Jonston, M. V. and Coyle, J. T. (1979) Histological and neurochemical effects of fetal treatment with methylazoxymethanol on rat neocortex in adulthood. *Brain Res.*, 170: 135-155.
50. Kabat, K., Buterbaugh, G. B. and Eccles, C. U. (1985) Methylazoxymethanol as a developmental model of neurotoxicity. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7: 519-525.
51. Kameyama, Y. (1982) Low-dose radiation as an environmental agent affecting intrauterine development. *Env. Med.*, 26: 1-15.
52. 亀山義郎 (1982) 環境要因による発生異常. *神経研究の進歩*, 26: 512-525.
53. 亀山義郎 (1983) 低線量 X 線被爆と先天異常. *先天異常*, 23: 87-93.
54. 亀山義郎 (1985) 中枢神経系の発達異常. *実験医学*, 3: 251-257.
55. 川村 浩 (1988) サーカディアンリズムと脳. pp. 293-305. *最新脳の科学*. 同文書院, 東京.
56. 木村 実 (1988) 運動のメカニズム. pp. 127-153. *最新脳の科学*. 同文書院, 東京.
57. 小佐妻恒夫, 小林洋四郎, 塩田尚三, 鈴木稔, 猪俣訓一, 赤堀昭. (1982) 我国の製薬企業における Behavioral Teratology試験の実態調査. *先天異常*, 22: 111-125.
58. 小山素麿 (1970) 向神経性発癌物質 methyl-nitroso-urea, ethyl-nitroso-ureaのSD-JCL ratの脳に対する催奇形効果. *Arch. Jap. Chir.*, 39: 233-254.

59. Koyama, T., Handa, J., Handa, H., and Matsumoto, S. 1970. Methylnitrosourea-induced malformations of brain in SD-JCL rat. *Arch. Neurol.* 22: 342-347.
60. 栗原 久 (1980) F344/DuCrj (Fischer)系ラットの行動特性; 自発運動および条件回避反応習得過程について. *実験動物*, 29: 327-333.
61. Kuribara, H., Ohashi, K., and Tadokoro, S. (1976) Rat strain differences in the acquisition of conditioned avoidance responses and in the effects of diazepam. *Jap. J. Pharmacol.*, 26: 725-735.
62. Lacquer, G. L. (1977) Oncogenicity of cycads and its implications. pp. 16-18. In *Advance in modern toxicology*, Vol. 3: Environmental cancer (Kraybill, H. F. and Mehlman, M. A., eds.) Wiley Press, New York.
63. Martin, J. C. (1970) Escape/avoidance and punishment behavior in the rat after fetal x-irradiation. *Radiation Research*, 41: 614-622.
64. Matsutani, T. 1979. Experimental models of microencephaly induced by prenatal chemical insult. *Adv. Neurol. Sci.*, 23: 872-884.
65. McClearn, G. E., Wilson, J. R., and Meredith, W. (1970) The use of isogenic and hetero genic mouse stocks in behavioral research. pp. 3-22, In *Contributions to Behavior-Genetic Analysis: The Mouse as a Prototype* (Lindzey, G., and Thiessen, D. D. eds.) Appleton-Century-Crofts, New York.
66. McGrath, J. T. (1976) Spinal Dysraphism. *Comp. Pathol. Bull.*, 8: 2.
67. Mizutani, M. (1982) Problems associated with the observation of sex differences in learning behavior in the rat. *Cong. Anomal.*, 22: 67-81.
68. Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., and O'Keef, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297: 681-683.
69. Mowrer, O. H. (1960) *Learning Theory and Behavior*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
70. Mullenix, P., and Norton, S. (1974) Hippocampal damage and behavior in old rats after exposure to x-irradiation in utero. *Pharmacologist*, 16: 252.
71. Mullenix, P., Norton, S., and Culver, B. (1975) Locomotor damage in rats after x-irradiation in utero. *Exp. Neurol.*, 48: 310-324.
72. 永田親義 (1983) 分子および電子レベルからみたガン発生の機構. サイエンス社, 東京.
73. 中川博司 (1981) シャトルボックス型装置による二系統ラットの条件回避反応の観察. *信州医誌*, 29: 98-105.
74. 大場光文, 他(1990) Biel 型水迷路学習における迷路内手がかりに関する検

討. 第9回 Behavioral Teratology懇話会 (要旨).

75. Oliver, J. E., Jr., and Lorenz, M. D. (1983) Handbook of Veterinary Neurologic Diagnosis, B. W. Saunders, Philadelphia.
76. Pellegrino, L. J., and Altman, J. (1979) Effects of differential interference with postnatal cerebellar neurogenesis on motor performance, activity level, and maze learning of rats: A developmental study. *J. Comp. Physiol. Psychol.*, 93: 1-32.
77. Rabe, A., and Haddad, R. K. (1972) Methylazoxymethanol-induced micrencephaly in rats: Behavioral studies. *Federation Proceedings*, 31: 1536-1539.
78. Reiter, L. W., Anderson, G. E., Ash, M. E., and Gray, L. E. (1977) Locomotor activity measurements in behavioral toxicology: Effects of lead administration on residential maze behavior. pp. 125-136. In *Behavioral toxicology: An emerging discipline.* (Zenick, H., and Reiter, L. W., eds.) Res. Tri. Park, U. S. Environmental Protection Agency.
79. Rodier, P. M. (1977) Correlations between prenatally-induced alterations in CNS cell populations and postnatal function. *Teratology*, 16: 235-246.
80. Rodier, P. M. (1978) Behavioral Teratology. pp. 397-428. In *Handbook of Teratology* (Wilson, J. G., and Fraser, E. C., eds.) Plenum Press, New York.
81. Rodier, P. M. (1980) Chronology of neuron development: Animal studies and their clinical implications. *Develop. Med. Child Neurol.*, 22: 525-545.
82. Rodier, P. M. (1986) Behavioral effects of antimitotic agents administered during neurogenesis. pp. 185-209. In: *Handbook of Behavioral Teratology* (Riley, E. P., and Vorhees, C. H. eds.) Plenum Press, New York.
83. Rodier, P. M., Reynolds, S. S., and Roberts, W. N. (1979) Behavioral consequences of interference with CNS development in the early fetal period. *Teratology*, 19: 327-336.
84. Rodier, P. M., Webster, W. S. and Langman, J. (1975) Morphological and behavioral consequences of chemically-induced lesions of the CNS. pp.256-272. In *Aberrant development of human infancy: Human and animal studies* (Ellis, N., ed.) Erlbaum Press, Hillsdale, NJ.
85. Schapiro, S., Salas, M., and Vukovich, K. (1970) Hormonal effects on ontogeny of swimming ability in the rat: Assessment of central nervous system development. *Science*, 168: 147-151.
86. 関口茂久 (1978) ラットとマウスを用いた行動発達研究法. 誠信書房, 東京
87. Seo, M., Kiyono, S., and Shibagaki, M. (1979) Open-field test in rats

with microcephaly induced by prenatal methylazoxymethanol application. *Cong. Anom.*, 19: 313-316.

88. Sikov, M. R., Resta, C. F., Lofstrom, J. E., and Meyer, J. S. (1962) Neurological deficits in the rat resulting from x-irradiation in utero. *Exp. Neurol.*, 5: 131-138.
89. Spatz, M., Daugherty, W. J., and Smith, D. W. E. (1967) Teratogenesis of methylazoxymethanol. *Proc. Society for Exp. Biol. and Med.*, 124: 476-478.
90. Swaab, D. F., and Mirmiran, M. (1984) Possible mechanisms underlying the teratogenic effects of medicines on the developing brain. pp. 55-71. In *Neurobehavioral Teratology*. (Yanai, J., ed.) Elsevier, Amsterdam.
91. 田巻義孝 (1986) 回避学習理論の概要, pp. 192-204. 行動奇形学の基礎と応用. エル・アイ・シー, 東京.
92. Tamaki, Y., and Inoue, M. (1979) Avoidance of and anticipatory responses to shock in prenatally x-irradiated rats. *Physiol. Behav.* 22: 701-705.
93. Tamaki, Y., Semba, R., and Tooyama, S. (1977) Cerebellar hypoplasia and motor development in congenitally jaundiced Gunn rats. *Physiol. Behav.* 18: 255-259.
94. Tamaki, Y., Shoji, R., Takeuchi, I. K., and Murakami, U. (1976) Facilitatory effect of prenatal x-irradiation on two-way avoidance behavior in rats. *Jap. Psychol. Res.*, 18: 142-146.
95. Tamaki, Y., Tooyama, S., and Semba, R. 1977. Cerebellar hypoplasia and motor development in congenitally jaundiced Gunn rats. *Physiol. Behav.*, 18: 255-259.
96. Tamaru, M., Hirata, Y. and Matsutani, T. (1988) Brain changes in rats induced by prenatal injection of methylazoxymethanol. *Teratology*, 37: 149-157.
97. 谷村孝 (1983) 先天異常の成因と発生過程. pp. 115-150. 「臨床人体発生学: 先天異常の理解のために」 (岡本直正, 編著) 南河堂, 東京.
98. Tilson, H. A., and Cabe, P. A. (1978) Strategy for the assessment of neurobehavioral consequences of environmental factors. *Env. Health Pers.* 26: 287-299.
99. Vorhees, C. H., (1986) Principles of Behavioral Teratology. pp.23-46. In: *Handbook of Behavioral Teratology* (Riley, E. P., and Vorhees, C. H. eds.) Plenum Press, New York.
100. Vorhees, C. H., Fernandez, K., Dumas, R. M., and Haddad, R. K. (1984) Pervasive hyperactivity and long-term learning impairments in rats with induced micrencephaly from prenatal exposure to methylazoxymethanol. *Develop. Brain Res.*, 15:1-10.
101. Wallace, R. B., and Altman, J. (1970) Behavioral effects of neonatal

irradiation on the cerebellum. I. Qualitative observations in infant and adolescent rats. *Develop. Psychobiol.*, 2: 257-265.

102. Warzok, V. R., Thust, R., Schneider, J., Rupperecht, E., and Rupperecht, U. 1977. Induction of malformations by N-methyl-N-nitrosourea (MNU). *Exp. Path. Bd.*, 13: 11-19.
103. Werboff, J., Broeder, J. E., Havlena, J., and Sikov, M. R. (1961) Effects of prenatal x-ray irradiation on audiogenic seizures in the rat. *Exp. Neurol.*, 4: 189-196.
104. Werboff, J., and Gottlieb, J. S. (1963) Drugs in pregnancy: Behavioral teratology. *Obst. Gynecol. Survey*, 18: 420-423.
105. Wilson, J. H., Kurtz, H. J., Leipold, H. W., and Lees, G. E. (1979) Spina bifida in the dog. *Vet. Pathol.*, 16: 165.

謝 辞

本論文をまとめるにあたり、終始、御指導御鞭撻を賜りました麻布大学実験動物学教室・中村経紀教授に深く感謝いたします。

また、御指導を賜りました麻布大学第2解剖学教室・江口保暢教授、薬理学教室・赤堀文昭教授、ならびに第2解剖学教室・有嶋和義助教授に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に多大の御後援をいただきました財団法人食品薬品安全センター秦野研究所・副所長 水谷正寛博士に深い感謝の念をささげます。