

水銀濃度は MT(+ / +)マウスでは腎臓が最も高く、次いで脳、肺、肝臓の順であった。これに対し MT(- / -)では、腎、脳、肝、肺の順に高い値を示した。MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスとの間の水銀濃度に脳と肺において有意差が認められた。しかし肝臓と腎臓に水銀濃度には有意差は認められなかった。水銀曝露群の臓器中水銀濃度は両マウスともに対照群に比べ有意に高い値であった。

5. 考 察

水銀については、メチル水銀毒性の評価が本来の目的であるが、その感受性要因として設定した水銀蒸気への離乳後曝露とその影響評価から実験を開始した。これは、曝露装置の条件設定（購入を含む）に時間を要することが予測されたためである。この実験においても MTKO を用い、行動影響、脳病理および免疫染色による毒性評価ならびに毒性機構の検討を行なった。今回用いた曝露装置では、従来の実験に比べ低濃度の水銀蒸気（40～200 $\mu\text{g}/\text{cu m}$ ）で長期間（8時間/日で5ヶ月）の曝露を実施することができた。その結果、Hg 曝露3あるいは5ヶ月の時点で、オープンフィールドでの活動量亢進や受動回避学習における成績の低下を認めた。MTKO 群では脳を含めて組織中 Hg 濃度が野生型より低いにもかかわらず、Hg による行動影響は対照群に比べて顕著であった（例えば5ヶ月の時点では空間学習の阻害は MTKO の曝露群のみに認められた）。これは水銀の神経毒性に対する MT の役割を考えるうえで重要な知見であると考えている。

生体内では重金属に対する共通の防御因子としてグルタチオンや栄養素セレンが知られているが、これらに加えて金属結合蛋白質であるメタロチオネイン（MT）もまた重金属解毒作用を示すことが動物実験などで証明されている^{3),4)}。とくにメタロチオネイン-I,-II(MT-I,-II)は重金属曝露によって誘導合成されることが多くの研究者によって報告されている。MT-I,-II は水銀蒸気曝露により、腎、肺、脳、肝などで誘導合成され、水銀毒性に大きな役割を果たしている^{8), 9)}。最

近、Michalska & Choo⁶⁾や Master et al.⁷⁾が MT-I,-II ノックアウト (MT(-/-)) マウスをつくり、多くの研究者はこの動物を用いて、MT の役割について解明を行っている。Sato et al.⁸⁾ や Yoshida et al.⁹⁾も MT(-/-)マウスに水銀を曝露した場合、野生型マウス(MT(+/+))に比べ、水銀による障害は強く、水銀毒性が増強されることを報告している。長期水銀蒸気曝露による標的臓器は脳である。しかしながら、脳の MT-I,-II が水銀毒性による神経系への影響に対し、どのような役割を果たしているかは全く不明である。

ヒトにおける慢性水銀中毒例では、最初に食欲不振、体重減少など消化症状に続き、振戦やエレチスムなどの神経症状が出現する¹⁾。動物での水銀蒸気曝露による神経系への影響は行動の変化で知ることができる。しかし、水銀蒸気曝露によって生じる行動変化を調べた研究はそれほど多くない。Beliles et al.¹⁰⁾ は高濃度の水銀蒸気 (17mg/m³, 2h/day) に曝露されたラットの刺激に対する遅延や一時的な闘争の増加が見られることを報告している。また Kishi et al.¹¹⁾ も水銀蒸気濃度 3 mg/m³, 3h/day、5 days/week で 15 から 42 週曝露をうけたラットの刺激に対する回避応答の遅れを報告している。Danielsson et al.¹²⁾ はラットを用い、妊娠中に比較的低濃度の水銀蒸気曝露をうけた新生児の発育期における行動について調べている。水銀蒸気曝露をうけた新生児では、自発行動は出生後 3 ヶ月齢では活動低下であるが、14 ヶ月齢では活動亢進となり、空間学習課題では、放射状迷路での学習の遅延、単純学習、新しい環境へ適応の遅滞などが認められている。動物モデルでも水銀による神経系への影響が起こることが確認されている。

長期低濃度水銀蒸気曝露後の Open field test の結果は、MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスともに 3 ヶ月、5 ヶ月後ともに総移動距離は対照群に比べ、曝露群では上昇しており、活動量の亢進が認められた。曝露群の活動量は対照群に比べ、MT(+/-)マウスの 3 ヶ月後では、観察初期から半ばにかけて亢進し、MT(-/-)マウスでは半ばから後半に亢進しており、活動時間帯に違いが見られた。5 ヶ月後では両マウスともに観察半ばから後半にかけて高まる傾向にあり、活動時間帯に差異はなかった。探索行動時間で示す中心にいる割合 (% of center) は、3 ヶ月後では、両マウスともに対照群に比べ曝露群で低い。これらの結果から、水銀曝露により探索行動が亢進し、活動量も高まったことを示唆している。その傾向は MT(+/-)マウスにより顕著に現

れていた。5ヵ月後の結果は3ヵ月後に比べ両マウス群ともに中心にいる割合は低下し、探索行動が高まっていた。しかし、MT(+/+)マウスの曝露群では3ヵ月後の中心にいる割合が変わらず、活動量が増加しているにもかかわらず、探索行動に変化は認められなかった。一般に同じ動物を繰り返し使うとOpen field装置への慣れにより探索行動は次第に減少するといわれている。曝露5ヵ月後の結果は、水銀曝露MT(+/+)マウスはほかのマウスに比べて環境へ馴化する傾向が見られた。

次に学習獲得を調べるpassive avoidance testの結果では、曝露3ヵ月後では訓練試行において両マウス群において曝露の有無に関わらず差異は認められない。しかし、翌日に行った保持試行の結果では水銀曝露群マウスは対照群と比較し回避反応時間の低下が見られた。この低下は、MT(-/-)マウスにおいて著明であった。曝露5ヵ月後に同一マウスに再び行った訓練試行において、MT(-/-)マウスでは対照群と曝露群の回避反応時間に有意な低下が認められた。この結果はMT(-/-)マウスでは水銀により学習記憶がMT(+/+)マウスより影響を受けやすいことを示唆していると思われる。

水銀曝露後のMT(-/-)マウスの体内水銀濃度は水銀の保持に関与しているMTが欠損しているためMT(+/+)マウスに比べ、脳を除いて低いことが知られている。脳にはMT-I、MT-IIに加えてMT-IIIが高濃度に存在する。Yoshida et al.¹⁴⁾は、水銀曝露後のMT(-/-)マウスの脳に取り込まれた水銀はMT-IIIに結合するため曝露後の両マウス間の脳内水銀濃度に差異が見られないと述べている。しかし、低濃度長期水銀蒸気曝露ではMT(-/-)マウスの脳内水銀濃度はMT(+/+)マウスと比較し、有意に低値であった。Yasutake et al.¹⁵⁾はラットに高濃度の水銀蒸気を繰り返し曝露すると脳内MT-I、MT-IIが誘導合成されると述べている。これに対し、脳内MT-IIIの水銀による誘導合成は確認されていない。MT(+/+)マウスとMT(-/-)マウスにおける脳内水銀濃度の違いはMT-I、-IIの有無に加えて、水銀によりMT-I、-IIが誘導合成されることにより、水銀が結合することに起因する。本研究において、MT(-/-)マウスの脳内水銀がMT(+/+)マウスより低値であるにもかかわらず学習獲得の低下が認められた。学習記憶は脳の海馬が重要な役割を果たす。また脳内水銀濃度が行動異常と関連することが報告されている。水銀曝露後のMT(-/-)マウスにおける学習記憶への影響は海馬における水銀蓄積量に加えて、

MT-I, -IIの有無も深く関与していると考えられる。

この実験に引き続き、24時間連続曝露に条件を切り替え、昨年11月より長期曝露実験を開始した。この連続曝露実験においては、行動試験のアイテムに、空間学習評価としてモリス水迷路試験を追加する。これによって、不安（情動）が交絡要因となることが指摘されている受動回避試験の結果と比較検討すること、および、モリス水迷路試験と放射状迷路試験（下記）という2種類の空間学習評価の結果を比較することにより、水銀の標的となっている行動機能を絞ることができると考える。

上記の実験は成熟動物について実施したものだが、妊娠期曝露も既に実施しており、出生した動物の成長を待って、行動試験を実施する予定である。また、分子病理学的検討としては、検出された行動影響と関連のある脳部位・形態変化（例えばそれぞれ、海馬、シナプス変性など）に焦点を絞る一方で、感受性要因に関連したホルモン（甲状腺ホルモン、グルココルチコイド）受容体を含め、検索対象を広げ、感受性要因実験と行動実験とをリンクする方向の検討を行なう予定である。

なお、メチル水銀に関しては餌に添加しての曝露を行なうが、最近になって一般の飼料業者がメチル水銀添加餌の作製・供給を行なわなくなったことが判明したため、餌の作製から行なうこととした。現在、作製のプロトコルを検討中であり、年度内に完成し、餌の供給を開始する予定である。

結論

以上のように、低レベルで長期にわたる水銀蒸気曝露により、特にMTKOにおいて顕著な影響が認められたことは、MTKOが感受性要因として重要であることを示唆しており、胎生期曝露、メチル水銀との混合曝露、老齢期における評価などを行なう際に、この要因を考慮して実験をデザインすることの妥当性が示されたと考える。

6. 引用文献

- 1) 吉田 稔：金属水銀中毒と健康障害（総説）、衛生化学、44：169-181、1998

- 2) 高橋 好文、吉田 稔：歯科用アマルガムに使用される水銀のヒト及び環境への影響（総説）、聖マリアンナ医科大学雑誌、30：1~10、2002
- 3) Cherian, M.G. and Goyer, R.A.: Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity. *Life Sci.* 23:1-10, 1978.
- 4) Webb, M. and Cain, K.: Function of metallothionein. *Biochem. Pharmacol.* 31:137-142., 1982
- 5) Yoshida M., H. Ohta, Y. Yamauchi, Y. Seki, M. Sagi, K. Yamazaki, S. Yawara.: Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese, *Biological Trace Element Reserch*,63:167-175, 1998
- 6) Michalska, A. and Choo, K.H.A.: Targeting and germ line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8088-8092, 1993
- 7) Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D.: Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 584-588, 1994.
- 8) Satoh, M., Nishimura, N., Kanayama, Y., Naganuma, A., Suzuki, T. and Tohyama, C.: Enhanced renal toxicity by inorganic mercury in metallothionein-null mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283: 1529-1533, 1997.
- 9) Yoshida M., Satoh M, Shimada A., Yasutake A., Sumi Y. and Tohyama C: Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice. *Life Sciences* 64:1864-1867, 1999
- 1 0) R.P. Beliles, R.S. Clark and C.L. Yuile: The effect of exposure to mercury vapor on behavior of rats, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 12:15-21, 1968
- 1 1) R. Kishi, K. Hashimoto, S. Shimizu and M. Kobayashi: Behavioral changes and mercury concentrations in tissues of rats exposed to mercury vapor, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 46:555-566, 1978

- 1 2) Danielsson BRG, Fredriksson A, Dahlgren L, Reling Gardlund A, Olsson L, Dencker L, Archer T, Neurotoxicol Teratol 15:391-396, 1993
- 1 3) 山田 勝士：オープンフィールドテスト、生体の科学、45:426-427, 1994
- 1 4) Yoshida M., Satoh M, Shimada A., Yasutake A., Sumi Y. and Tohyama C.: Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor. Toxicology 139:129-136, 1999
- 1 5) Yasutake, A., Nakano, A. and Hirayama, K.: Induction by mercury compounds of brain metallothionein in rats: Hg exposure induces long-lived brain metallothionein. Arch. Toxicol. 72:187-191,1998

研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

吉田稔, 大塚裕子, 佐藤雅彦, 渡辺知保, 遠山千春. 水銀蒸気曝露がメタロチオネイン (I, II 型) 欠損マウスの行動に及ぼす影響. 日本衛生学雑誌 2003, 4.26-29, 大分.

図1 曝露5ヶ月間の体重の推移

□; MT(+/+)control ●; MT(-/-)control ◇; MT(+/+)Exposed ▲; MT(-/-) Exposed
 **: p < 0.01 (MT(+/+)control vs MT(+/+)Exposed)、†; p < 0.05 (MT(-/-)control vs
 MT(+/+)Exposed)、††; p < 0.01 (MT(-/-)control vs MT(+/+)Exposed)

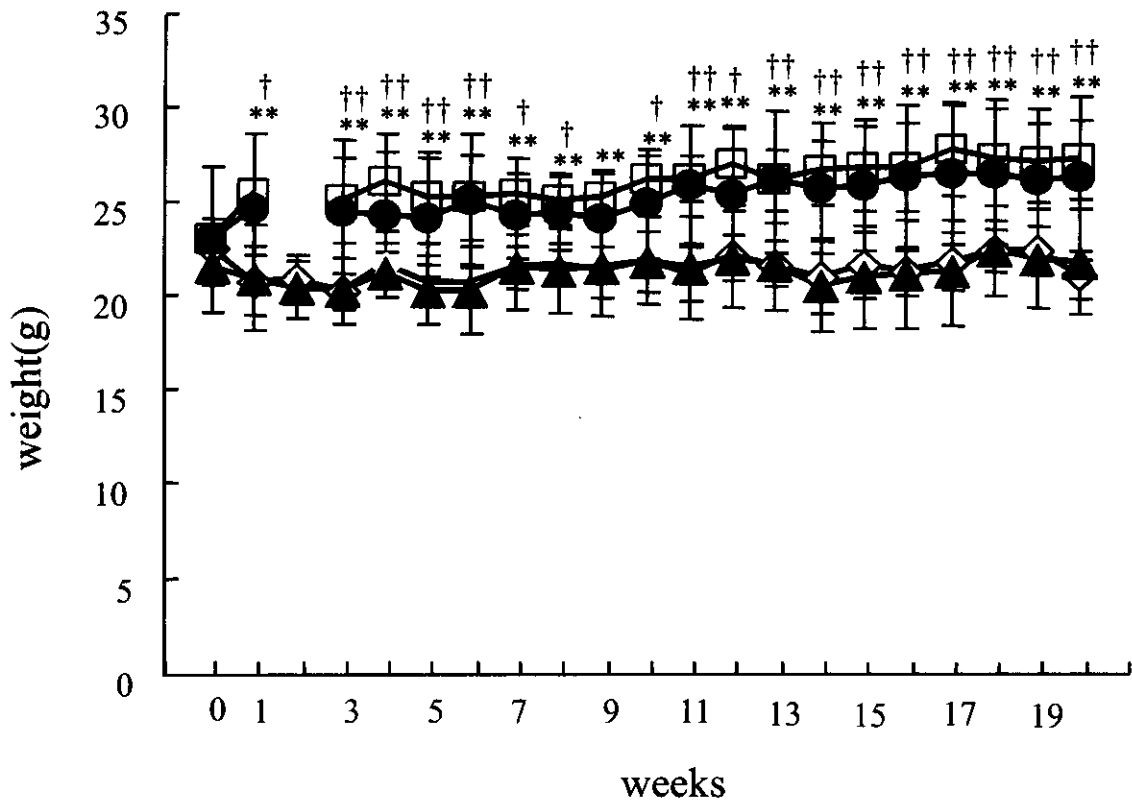


図2 曝露3ヶ月後の open field test の移動時間と総移動距離

左：移動時間、 右：総移動距離

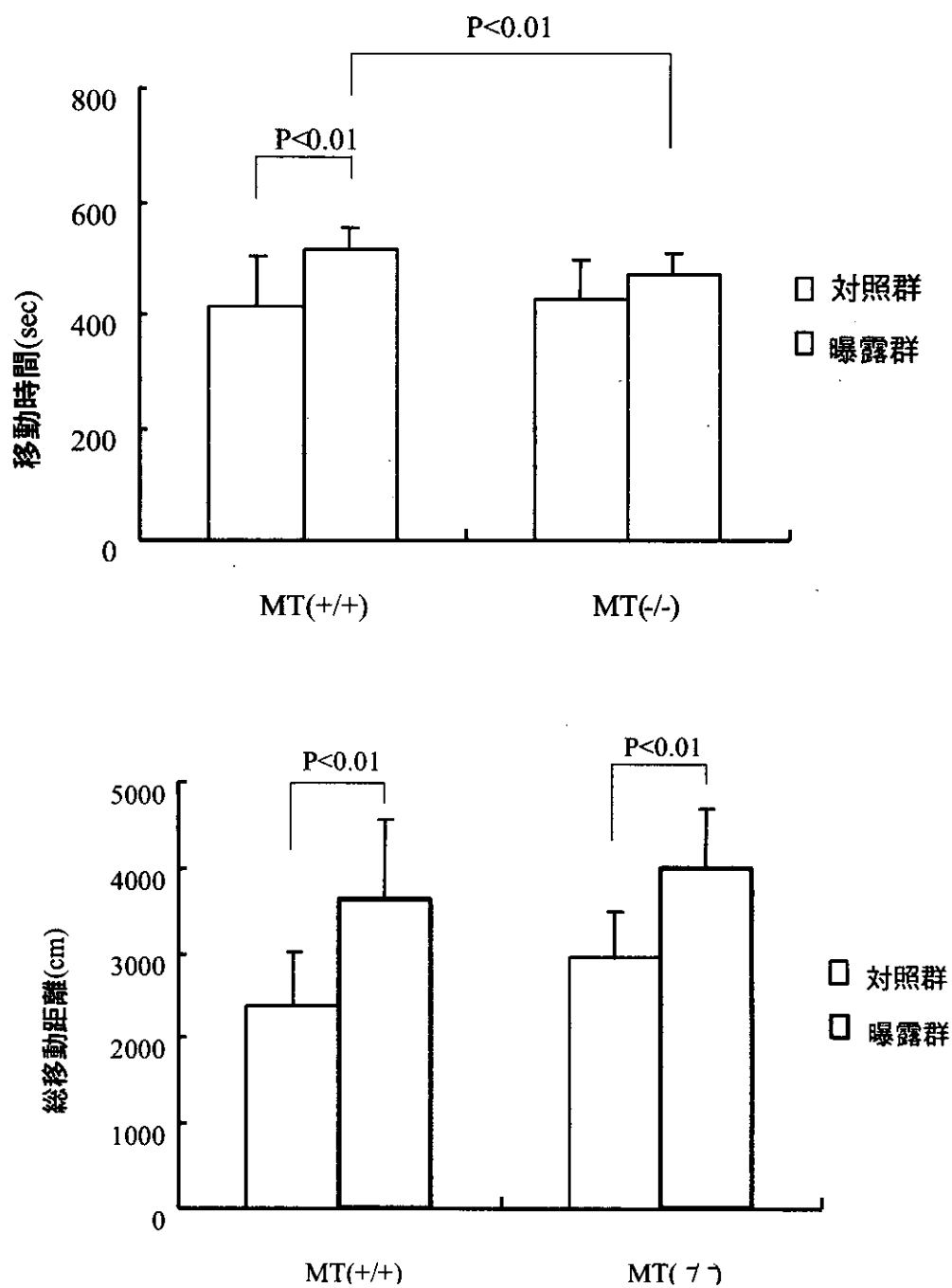


図3 曝露3ヶ月後の open field test の MT(+ / +)マウスの移動距離

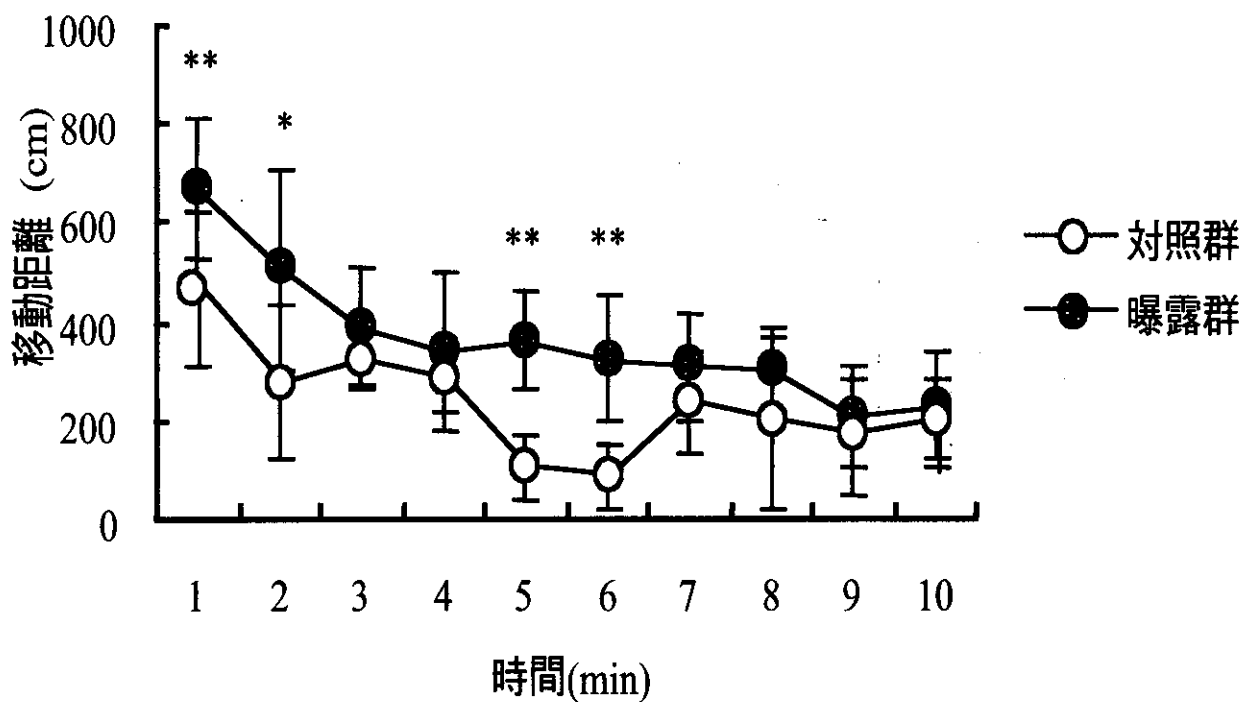


図4 曝露3ヶ月後の open field test の MT(—/—)マウスの移動距離

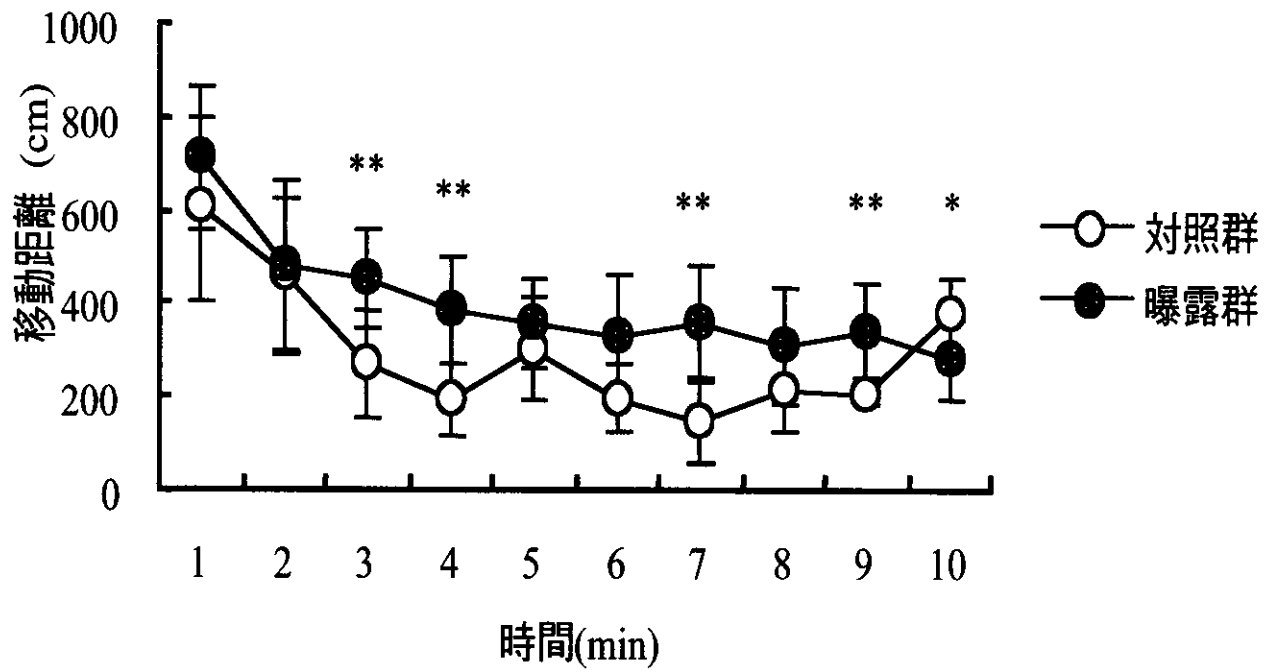


図5 曝露3ヵ月後における open-field test の探索行動時間

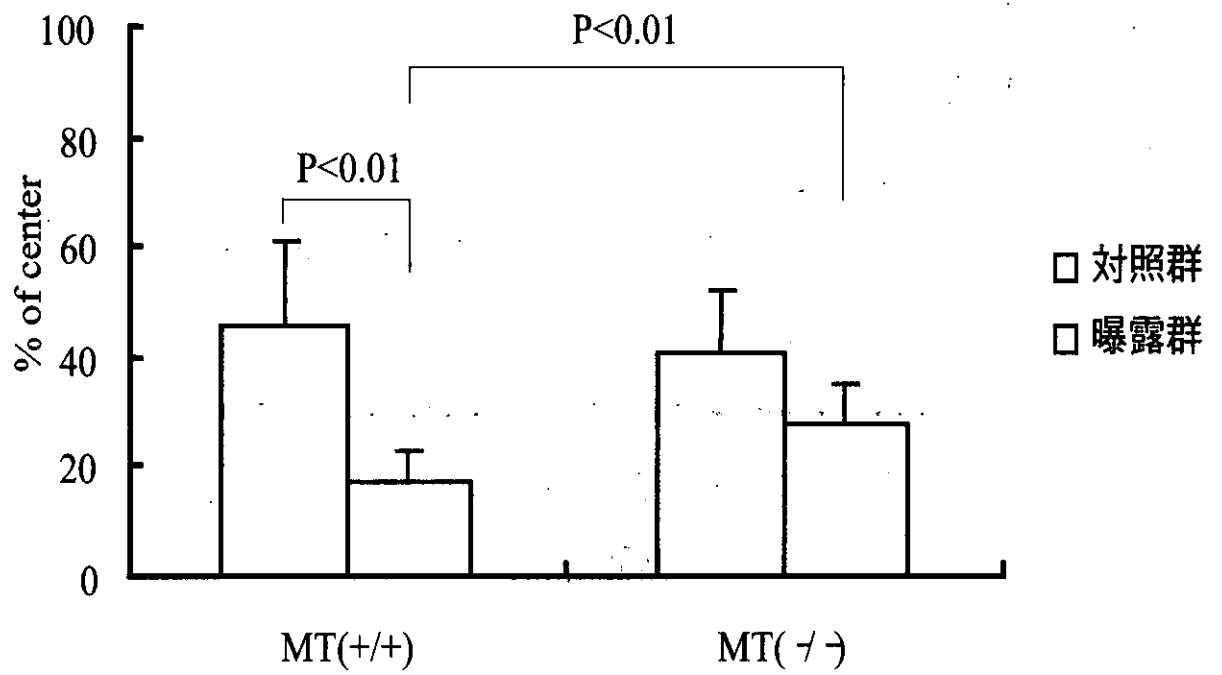


図6 曝露5ヶ月後の open field test の移動時間と総移動距離

(左：移動時間、右：総移動距離)

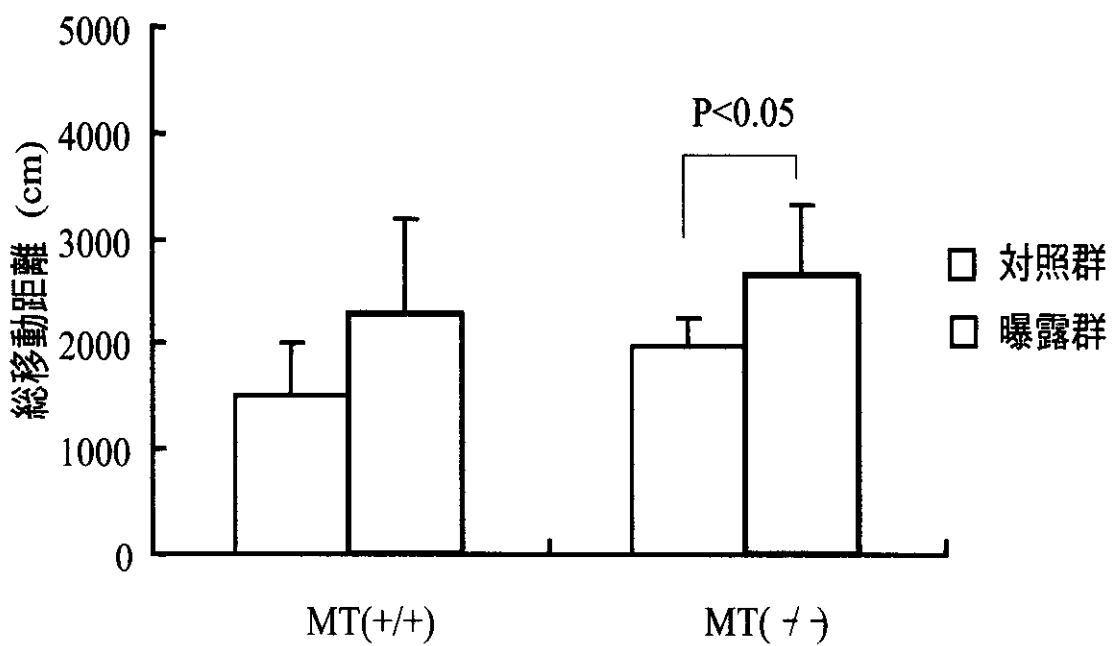
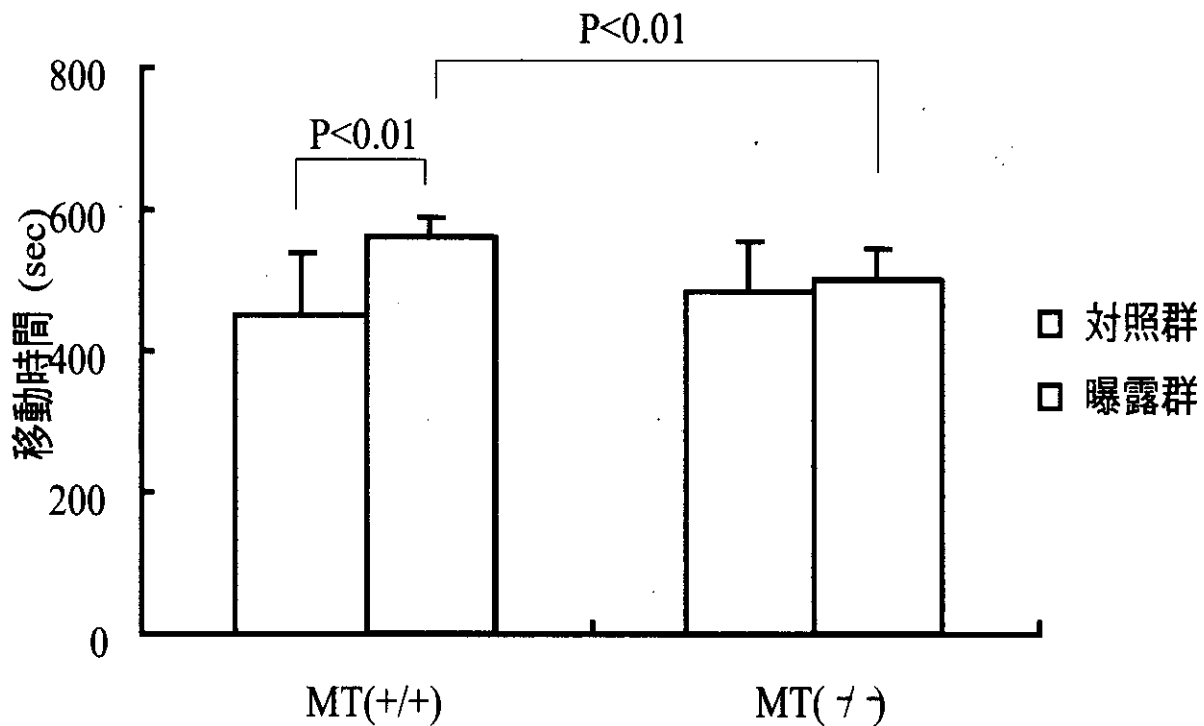


図7 曝露5ヶ月後の open field test の MT(+ / +)マウスの移動距離

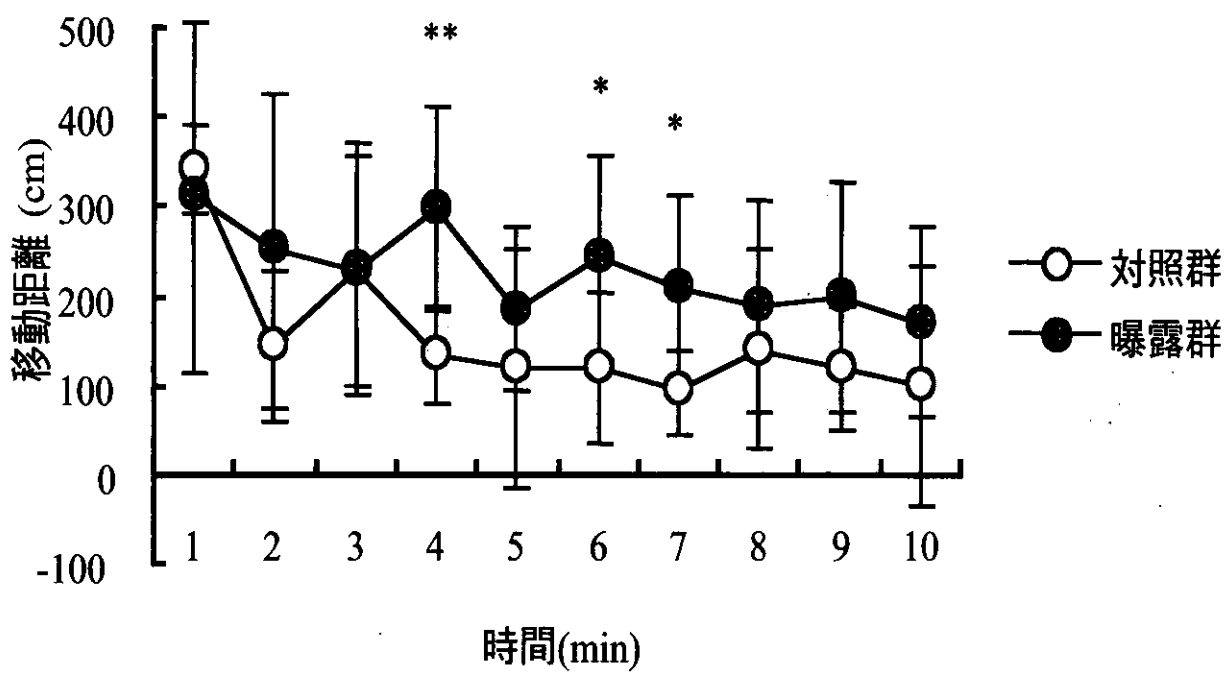


図8 曝露5ヶ月後の open field test : MT(—/—)マウスの移動距離

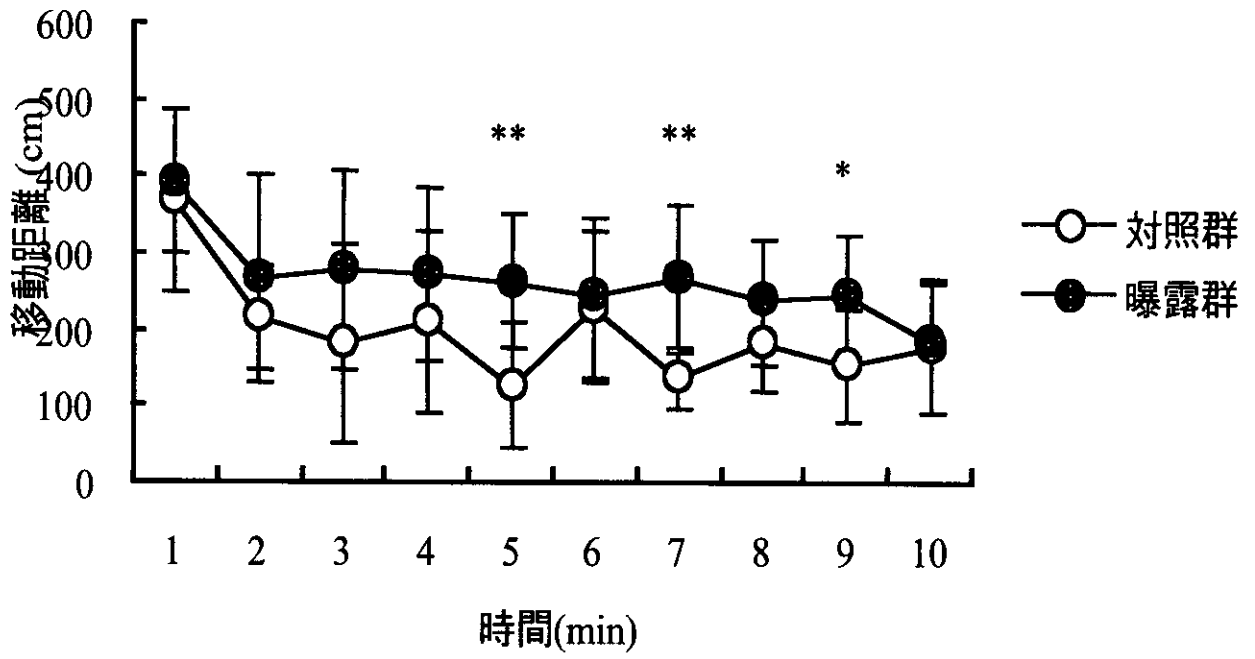


図9 曝露5ヵ月後における open field test の探索行動時間

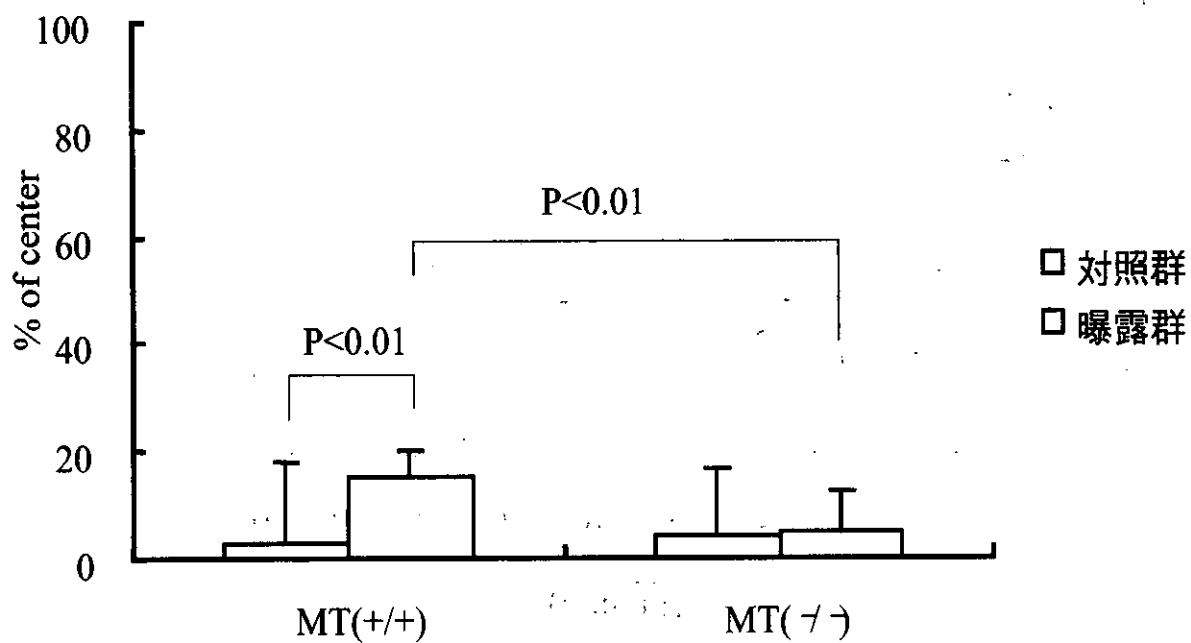


図 10 passive avoidance test における回避反応時間

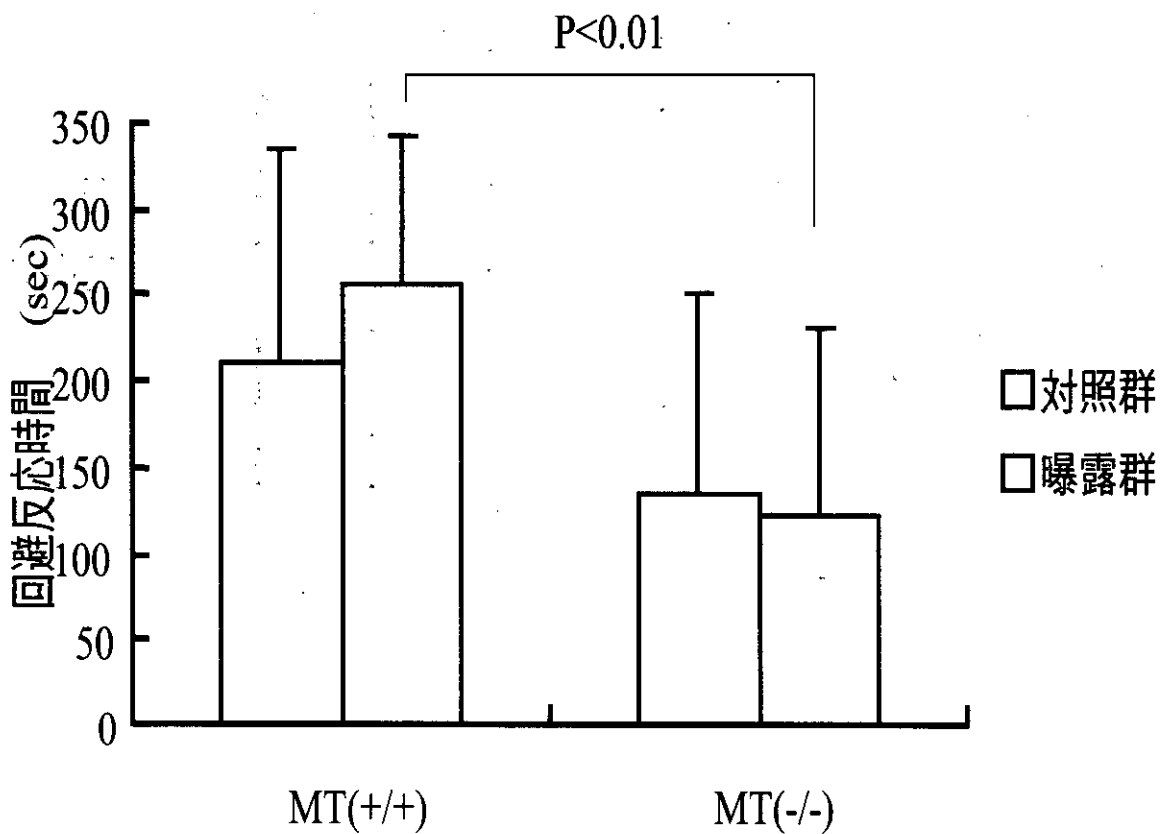
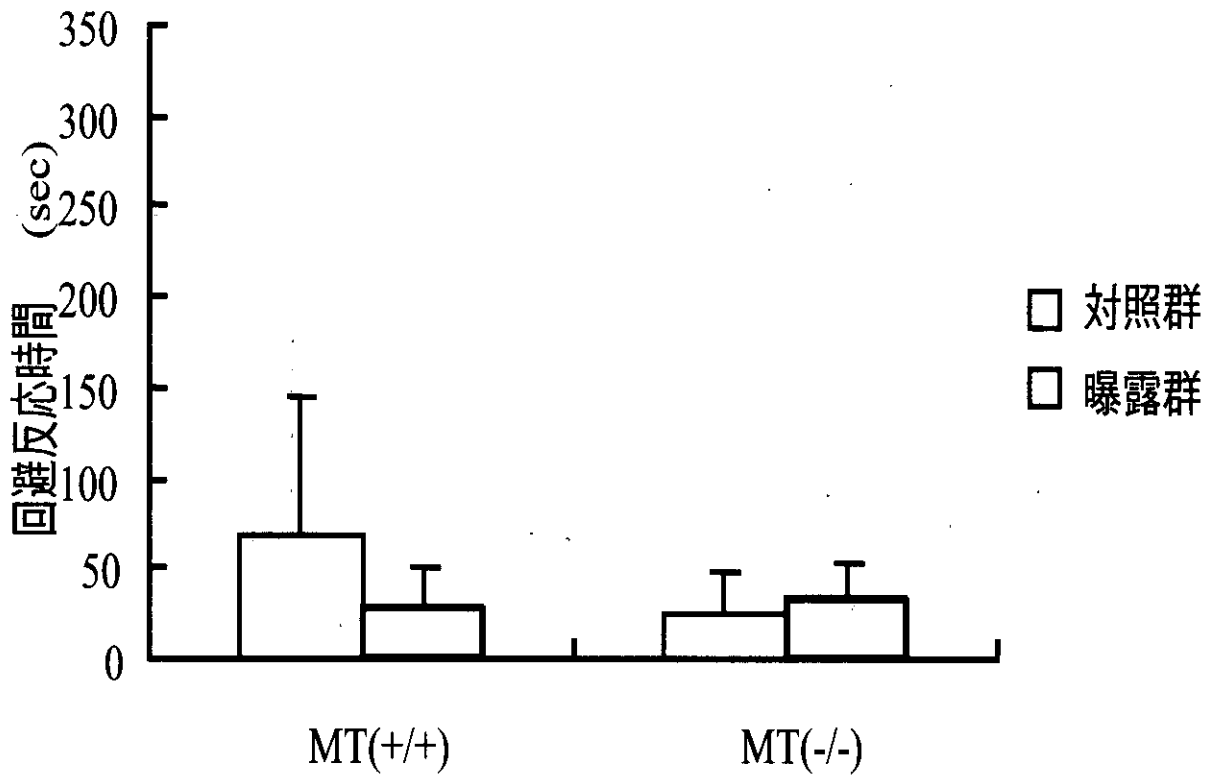


図 11 曝露後 5 ヶ月後の passive avoidance test における回避反応時間

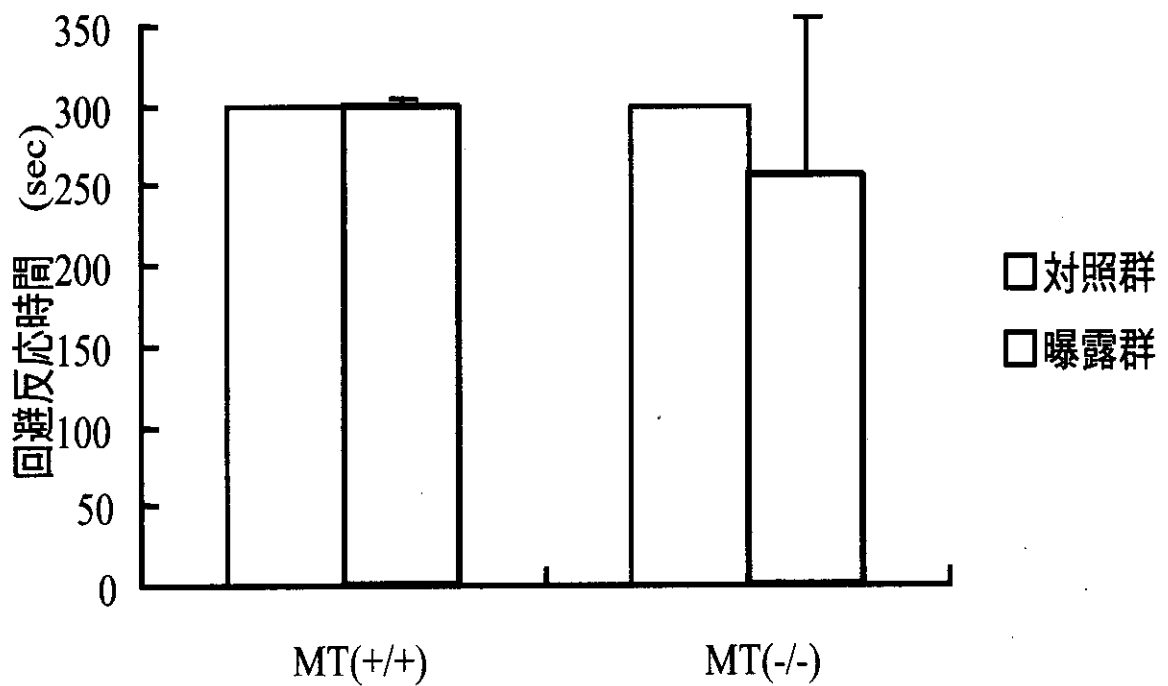
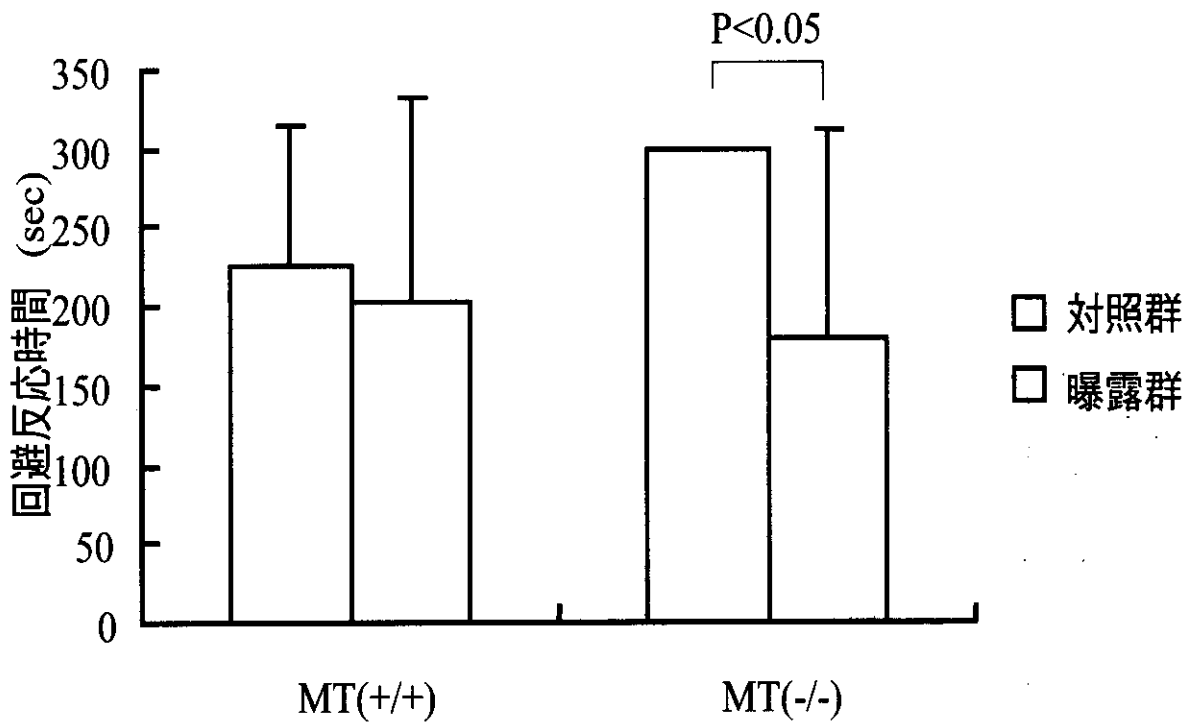


図 12 対照群の各種組織中の水銀濃度

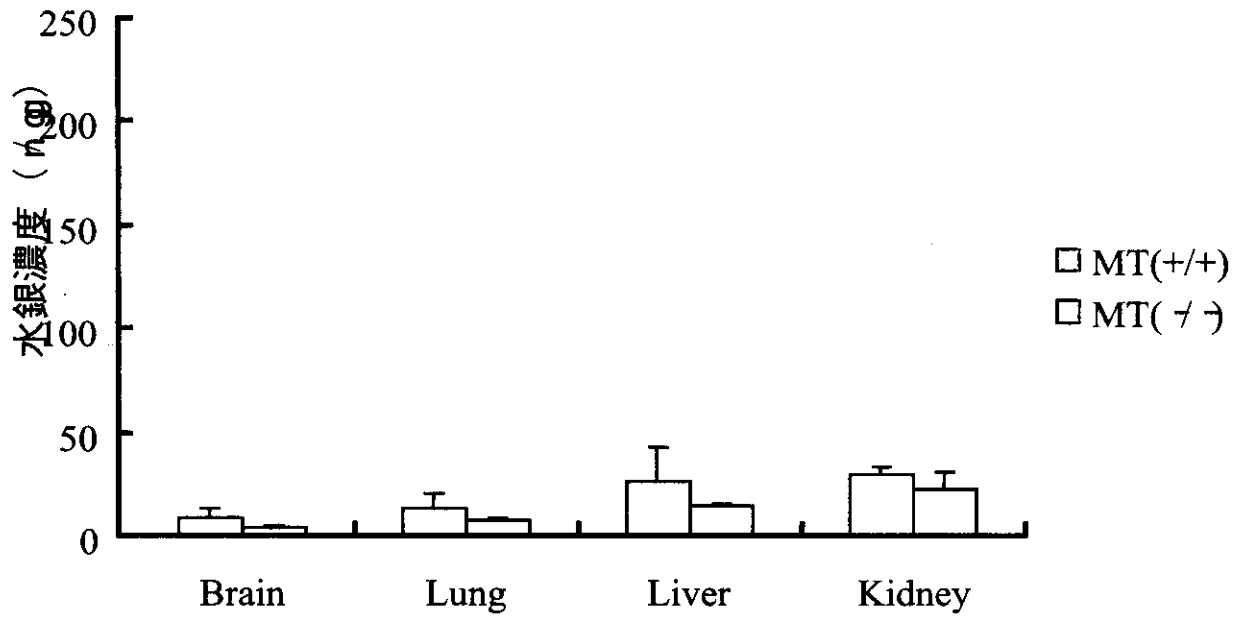
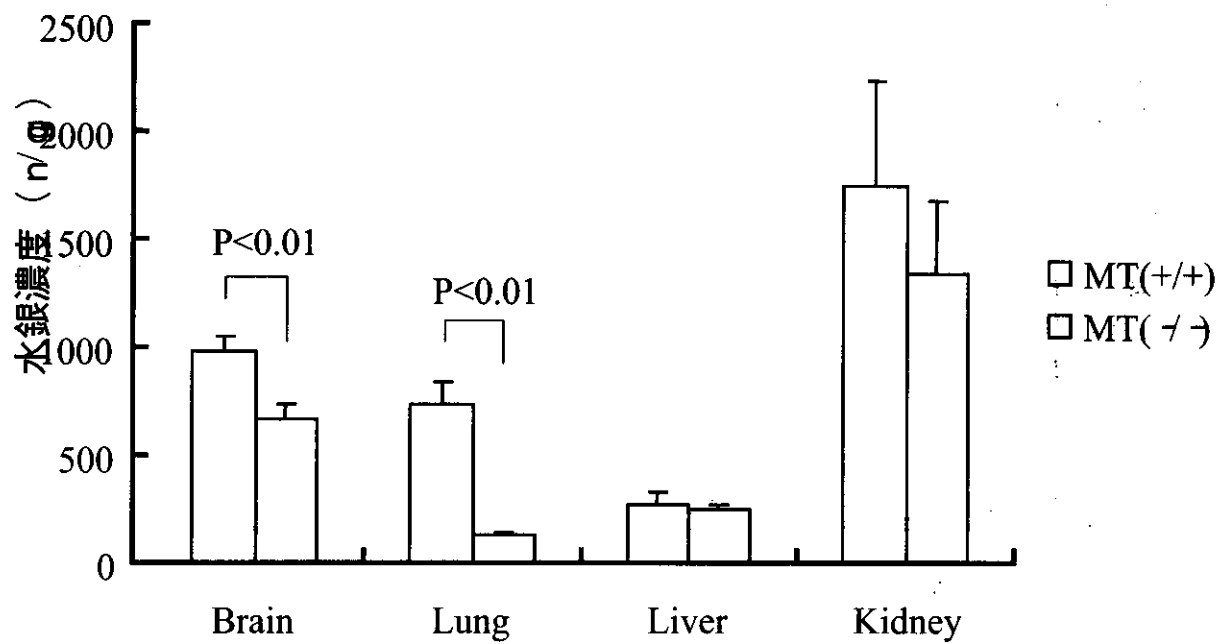


図 13 水銀曝露後の各種組織中の水銀濃度



厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告

胎生期および授乳期カドミウム経口曝露によるカドミウムの体内動態
並びに行動機能に及ぼすメタロチオネインの影響に関する研究

分担研究者 佐藤雅彦 岐阜薬科大学衛生助教授

研究要旨： カドミウム胎生期曝露が及ぼす影響については未解明な点が多い。基礎的情報を得るため、曝露レベル、胎仔移行などについて検討した。また、Cd 毒性への遺伝的感受性要因としてメタロチオネイン I/II 欠損マウス (MTKO) を用い、野生型 C57BL/6J と比較した。胎生期 (1~19 日目) 曝露実験をとして、Cd 10, 50ppm を含む水で妊娠マウスを飼育し、19 日目に解剖して、Cd の胎仔移行を調べた。その結果、胎生期曝露において Cd は胎仔に移行することが示された。MTKO では母体の肝・脳・胎盤における腎 Cd が野生型より高い一方で、腎 Cd 濃度が低下した。さらに、胎仔肝・脳でも Cd 濃度が上がったことより、母体の腎 MT が胎仔への Cd の移行の制御に重要な役割を示すことが判明した。Cd により出生後の体重の伸びが抑制されたが、MTKO マウスにおいて、抑制が著しく、MTKO が F1 世代への影響についても感受性要因となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでカドミウムによる健康影響としては、産業職場や環境汚染による比較的高用量のカドミウム曝露によって腎、骨、呼吸器および循環器などに障害が認められたが、今日のわが国においては、産業職場や環境汚染によるカドミウム中毒はほとんど認められていない。その一方で、カドミウムはコメなどの食品や喫煙を介して生涯にわたって身体に取込まれるため、最近ではカドミウムの微量長期曝露による健康影響が問題になっている。しかし、現状ではリスク評価の基準となっているのは依然、腎毒性である。

水俣病のような胎児性の事例が報告されていないことを考えると、カドミウムがメチル水銀のような顕著な発達毒性を有してはいないという可能性が考えられる。一方で、過去の動物実験