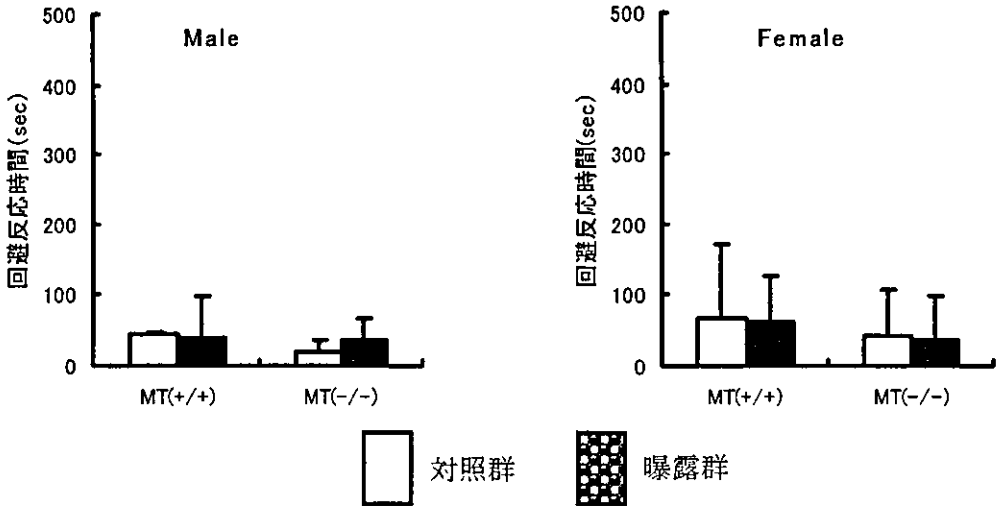

図 12. 加齢マウスの受動的回避反応試験における訓練試行での回避反応時間

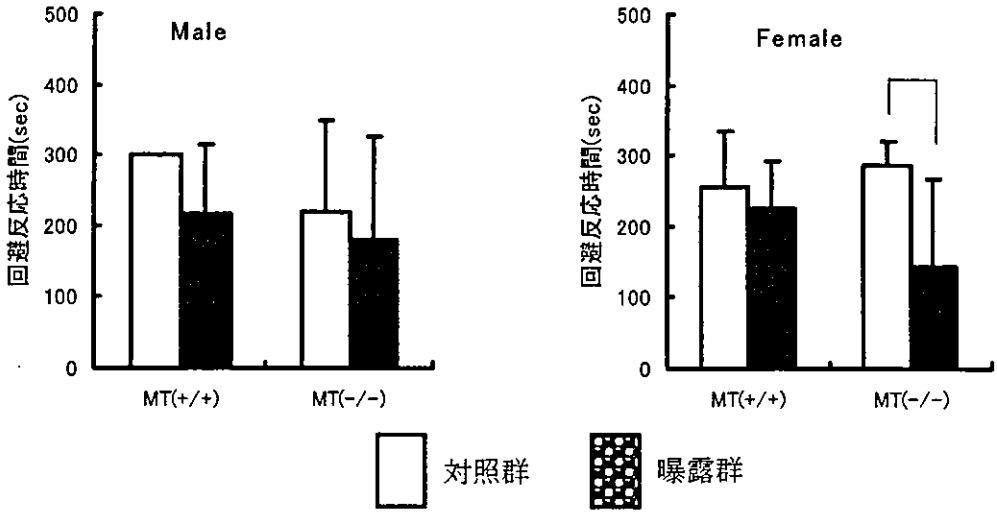

図 13. 加齢マウスの受動的回避反応試験における保持試行での回避反応時間

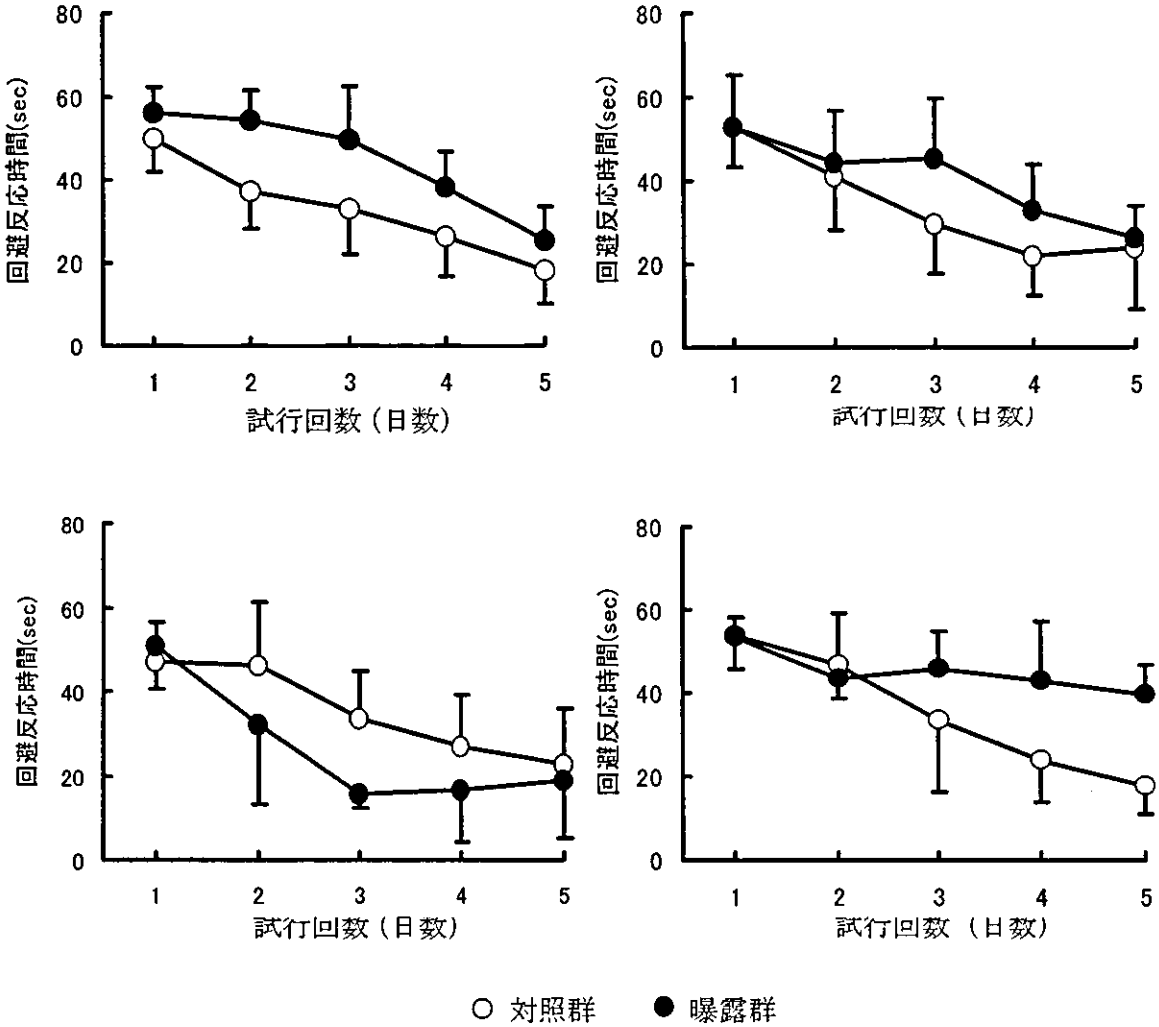

図 15. 加齢マウスの Morris 水迷路試験における回避反応時間

＊ *P<0.05* で対照群との間に有意差あり

表 1. 出産後 10 日目における曝露群の脳の水銀濃度(ng/g)

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8±1.2	348±176	4.9±1.4	486±120

表 2. 出産 3 ヶ月後における曝露群の脳の水銀濃度（ng/g）

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8±1.2	5.4±1.1	7.3±1.4	5.8±0.5

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告

胎生期における水銀蒸気とメチル水銀の複合曝露が行動に及ぼす影響

分担研究者　吉田　稔　聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野助教授

研究協力者　鈴木愛美　聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野

研究要旨

わが国では水俣病やイタイイタイ病が発生して以来、重金属による環境汚染が社会問題となっている。この問題はわが国のみに留まらず、地球規模的な環境汚染の拡大が国際的にも懸念されている。メチル水銀や水銀蒸気は他の重金属と異なり脂溶性であるため、脳血液関門や胎盤関門を容易に通過し、脳や胎児に水銀が蓄積することが知られている。水銀に対する高感受性集団である胎児に対するメチル水銀や水銀蒸気曝露による影響を調べた研究は多いが、これらの水銀の複合曝露による影響に関する知見はほとんどない。一方、重金属の生体防御因子であるメタロチオネインの欠損は、胎生期におけるメチル水銀あるいは水銀蒸気に中枢神経毒性に対しさらに感受性を亢進させる要因となる。遺伝的要因をもち、しかも胎生期において低濃度のメチル水銀（MeHg）と水銀蒸気（Hg^0）の複合曝露された場合に胎児の発育・発達に及ぼす影響、とくに神経行動毒性については知られていない。本研究では、メタロチオネイン遺伝子

欠損マウス(以下、MT(-/-)マウスと略す)や野生型マウス(以下、MT(+/+)と略す)を用いて、胎生期における低濃度の Hg^0、MeHg、そして Hg^0 と MeHg の複合曝露(Hg^0+MeHg 曝露)が、神経行動機能に及ぼす影響について検討した。

Hg^0曝露群は、マウスを水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均0.030mg/m^3(範囲0.017～0.038 mg/m^3)で1日6時間、妊娠0日目より妊娠18日目まで連日曝露を行った。その後、曝露を中止した。MeHg 曝露群は、妊娠0日目より MeHg 5ppm 含有飼料を出産10日目まで与え、その後は MeHg 無添加飼料で飼育した。Hg^0+MeHg 複合曝露群は、妊娠0日より、Hg^0 と MeHg を同時に曝露し、Hg^0 曝露は妊娠18日目で中止し、MeHg 含有飼料は出産10日目まで与えた。いずれのマウスも出産28日目に離乳させ、仔が8週齢に達したときにオープンフィールド(OPF)試験、受動的回避反応(PA)試験、モリス水迷路試験を用いて行動解析を行った。また出産10日目において、対照群および Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群の新生児を屠殺し、脳・腎臓・肝臓中の水銀濃度を測定した。そのときに、出産10日目における新生児の体重も測定した。

OPF 試験では、MT(+/+)マウスにおいて、Hg^0 曝露群では雌雄ともに自発行動量や探索行動に変化は認められなかった。 しかし、MeHg 曝露群では、雄マウスで自発行動量の亢進し、雌マウスでは、自発行動量の低下しており、雄マウスの結果と異なった。探索行動は雄マウスで低下が認められたが、雌マウスで探索行動に変化は見られなかった。Hg^0+MeHg 複合曝露群では MeHg 曝露群と同様、雄マウスで自発行動量の亢進が見られ、雌マウスでは、自発行動量は低下していた。また探索行動は雄マウスで低下し、雌マウスでは変化は認められなかった。これに対し、MT(-/-)マウスの雄では、Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群の総移動距離、中心に滞在する割合ともに、対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし、雌マウスでは Hg^0 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群の自発行動量の亢進が認められたが MeHg 曝露群では変化は認められなかった。また探索行動について、Hg^0 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群に低下が認められたが MeHg 曝露群では変化は認められなかった。

嫌悪体験に対する学習獲得能力を評価する PA 試験において MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに、訓練試行および保持試行の回避反応時間は雌雄マウスともに Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群と対照群との間に有意な差異は認められなかった。

空間認識に対する学習能力を評価するモリス水迷路試験では MT(+/+)マウスの雄マウスで MeHg 曝露群と Hg^0+MeHg 複合曝露群に学習獲得能力に遅延が認められた。しかし、雌マウスの Hg^0、MeHg、

Hg^0+MeHg 各曝露群や雄マウスの Hg^0 曝露群では学習獲得能力に対照群との間に差異はなかった。MT(-/-)マウスでは、Hg^0 曝露群や Hg^0+MeHg 複合曝露群の雌マウスで、学習獲得能力に遅延がみられたが、Hg^0+MeHg 複合曝露群の空間学習に対する影響は必ずしも Hg^0 曝露群より強くはなかった。雄マウスの Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群や雌マウスの MeHg 曝露群では空間学習に対する影響は認められなかった。

出産 10 日目に測定した新生児の脳の水銀濃度は、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに対照群に比べ、Hg^0 曝露群では雌雄マウスともに僅かに高い値を示したが、MeHg 曝露群と Hg^0+MeHg 曝露群は雌雄マウスとも 100 から 400 倍高値であった。しかし、MeHg 曝露群と Hg^0+MeHg 曝露群の脳の水銀濃度はほぼ同じレベルにあった。

以上の結果より、胎生期に WHO が推奨した NOAEL(無影響量)0.025 mg/m^3 に近い Hg^0 曝露(0.03 mg/m^3)を受けた場合、MT(+/+)マウスでは、神経行動に対する影響は少ないが、MT(-/-)では行動影響が認められ、無機水銀に対し、MT(-/-)マウスは高感受性であることが明らかとなった。しかしながら、胎生期に 5ppm MeHg の曝露を受けた場合、MT(+/+)マウスでは OPF 試験やモリス水迷路試験で行動影響が見られ、特に雄マウスで MeHg に対する感受性が高いことが判明した。また今回、Hg^0 と MeHg による複合曝露の影響を見たが、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに Hg^0 曝露群や MeHg 曝露群より Hg^0+MeHg 複合曝露群により強い行動影響は認められず、本実験条件下では胎生期における水銀曝露の影響は Hg^0 曝露や MeHg 曝露による影響が出現していた。

緒 言

水銀、カドミウム、鉛、ヒ素などは極めて毒性が強く、このような重金属を取り扱う産業現場ではしばしば中毒が発生し、職業病として古くから知られている。わが国では水俣病やイタイイタイ病が発生して以来、重金属による環境汚染が社会問題として大きな関心事となったが、この問題はわが国のみに留まらず、地球規模的な環境汚染の拡大が国際的にも懸念されている。特にメチル水銀による健康被害は水俣病やイラクのメチル水銀中毒事件に端を発し、今日では、金採掘鉱山周辺のメチル水銀禍、多量の魚介類摂取によるメチル水銀による健康問題が世界各国で論議されている。水銀蒸気に関しても、歯科用アマ

ルガムから発生する水銀蒸気による健康影響もメチル水銀と同様に国際的に関心が高まっている[1)-2)]。

メチル水銀や水銀蒸気は他の重金属と異なり脂溶性であるため、脳血液関門や胎盤関門を容易に通過し、脳や胎児に水銀が蓄積することが知られている[3)]。胎生期における水銀曝露は、胎児性水俣病に代表されるように、母親より胎児に対する水銀毒性の影響が大きいことが明らかとなった[4)]。最近、米国環境保護庁(EPA)はメチル水銀による妊娠中に曝露を受ける胎児の健康影響を防止する目的で、メチル水銀の基準摂取量(RFD)が引き下げられた。わが国でも魚介類を多食する日本人の摂取レベル付近での安全性が問題になり、厚生労働省は妊婦に対し、一部の魚種の大量連続摂取を控える勧告を出している。

妊婦の水銀曝露は魚介類からのメチル水銀曝露に加えて、歯科用アマルガムからの水銀蒸気曝露も存在する。妊娠動物を用いた実験で、母体の歯科水銀アマルガムの充填本数に依存して胎児組織中の水銀濃度が上昇することが報告されている[5)-6)]。水銀に対する高感受性集団である胎児に対するメチル水銀や水銀蒸気曝露による影響を調べた研究は多いが、これら水銀の複合曝露による影響に関する知見はほとんどない。しかも、一般環境、とくに食物を介しての胎生期において低濃度のメチル水銀と水銀蒸気の複合曝露された場合に胎児の発育・発達に及ぼす影響、とくに神経行動毒性については知られていない。

水銀毒性に対する生体の防御機構の一つにメタロチオネイン(金属結合蛋白質)の誘導合成がある。我々はヒト組織中のメタロチオネインを調べたところ、重金属に対しメタロチオネインの合成能力の低い集団がいることを見出した[7)]。このような集団は遺伝的に重金属毒性に対して感受性が高く、一般環境から長期にわたり水銀の曝露を受けた場合に中枢神経機能への影響が危惧され、特に胎児・新生児期には水銀に対する感受性が極めて高いと思われる。

最近、Michalska & Choo[8)] や Master et al.[9)] によってメタロチオネインーⅠおよびーⅡ遺伝子欠損マウスが制作された。本研究は、メタロチオネインーⅠおよびーⅡの発現を抑えたメタロチオネイン遺伝子欠損マウスを用い、胎生期における低濃度の水銀蒸気(Hg^0)、メチル水銀(MeHg)そして水銀蒸気とメチル水銀(Hg^0+MeHg)の複合曝露を受けた胎児の発育・発達における水銀が及ぼす影響、特に神経行動機能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

実験材料

動物・飼育飼料

OLA129/C57/BL6 系の野生型マウス(MT(+/+))と MT 遺伝子欠損マウス(MT(-/-))は Dr. Choo (オーストラリア)より供与された。メチル水銀無添加(コントロール)飼料 と メチル水銀 5ppm 含有飼料は日本クレア株式会社より購入した。

実験方法

1) 水銀蒸気(Hg^0)曝露 [10)]

交配は、マウスが 10 週齢に達したとき雄と雌を一対一で同居させて行い、翌朝にプラグの確認をもって妊娠 0 日目とした。餌はメチル水銀無添加飼料を与え、飼育した。妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m^3 (範囲 0.017～0.038 mg/m^3)で1日 6 時間、妊娠 18 日目まで連日曝露を行った。曝露装置内中の水銀蒸気濃度は、作業環境用水銀ガスモニター マーキュリー/EMP-1A(日本インスツルメンツ株式会社)を用いて測定した。曝露終了後、動物施設内(室温 22.5±0.5℃、湿度 55±5%)で出産させた。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80℃で冷凍保存した後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1～2 匹を用い、実験群は一群 5～6 匹とした(図 1)。

2) メチル水銀(MeHg)曝露

交配は、マウスが 10 週齢に達したとき雄と雌を一対一で同居させて行い、翌朝にプラグの確認をもって妊娠 0 日目とした。妊娠したマウスは直ちにメチル水銀 5ppm 含有飼料を与え、飼育した。メチル水銀含有飼料は出産 10 日目まで与え、その後は、メチル水銀を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80℃で冷凍保存した後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各1～2 匹を用い、実験群は一群 5～6 匹とした(図 2)。

3) 水銀蒸気とメチル水銀(Hg^0+MeHg)複合曝露

交配は、マウスが 10 週齢に達したとき雄と雌を一対一で同居させて行い、翌朝にプラグの確認をもって妊娠 0 日目とした。妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m^3 (範囲 0.017～0.038 mg/m^3)で1日 6 時間、妊娠 18 日目まで連日曝露を行った。曝露装置内中の Hg^0 濃度は、作業環境用水銀ガスモニター マーキュリー/EMP-1A(日本インスツルメンツ株式会社)を用いて測定した。また、メチル水銀 5ppm 含有飼料を出産 10 日目まで与え飼育し、その後は MeHg を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。曝露終了後、動物施設内(室温 22.5±0.5℃、湿度 55±5%)で出産させた。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80℃で冷凍保存し後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各1～2 匹を用い、実験群は一群 5～6 匹とした (図 3)。

4) 行動試験

1. オープンフィールド(Open field)試験 [11]

オープンフィールド(Open field) 試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。マウスを全く経験したことのない新しい環境(Open field)に置いた時の自発運動は、固体の運動活動性、探索行動および種々の情動反応を反映するものといわれている。行動薬理学においても種々の薬物の行動への影響を見る上で、最も基本的な指標として応用されている。

実験は室内の照明を消し、80 ルクスの照明のみで行った。最初に 70%エタノールで装置内(60×60×60cm)をきれいに拭いた。その後、装置の中央に筒(直径 10×10cm)を置き、30 秒間マウスを放置した。30 秒後筒を取り、コンピューターを作動させた。CCD カメラでマウスの行動を 5 分間観察し、その結果をコンピューターに取り込んだ。試験終了後、脱糞・排尿の有無を確認した。マウスの臭いが残らないよう、装置内を 70%エタノールで拭いた。次のマウスの実験を行った。

2. 受動的回避反応(Passive avoidance)試験 [12]

受動的回避反応(Passive avoidance)試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。この試験はマウスやラットなどの小動物が暗い場所を好む習性を利用したもので、暗室へ進入することによって負

荷された電気ショックによる嫌悪体験を記憶した動物が、再び同じ環境下に置かれると、もはや暗室に入ろうとしないことを利用する。

実験は電撃ショック持続時間99秒、電撃ショック発来遅延時間3秒、電流計0.3mAの条件下で行った。実験は室内の照明は消し、400ルクスの照明を明箱の上にあて、実験を行った。最初に70%エタノールで明箱、暗箱をきれいに拭き、明箱の下に脱糞・尿のシートを置いた。ギロチンドアをした状態で、明箱にギロチンドアと反対の方向に向けてマウスを入れ、30秒間放置した。30秒後、ギロチンドアをとり、スタートボタンを押した。マウスが暗箱に入り、電気ショックを受けて明箱に戻ってきたらギロチンドアを閉めた。試験終了後、マウスの臭いが残らないよう、装置内を 70%エタノールで拭き、シートを 交換して次のマウスの試験を開始した。翌日、保持試行として、同様な実験を行い、マウスが嫌悪体験を記憶しているか調べた。但し、1日目を訓練試行とし、2日目を保持試行として試験を行った。1日目(訓練試行)で暗箱にマウスが300秒過ぎても入らない場合は、その時点で試験中止とした。

3. モリス水迷路試験[13)]

モリス水迷路試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。この試験は空間認知による学習能力を調べる方法である。マウスは水難を逃避するために周りの環境条件を手がかりにして自分の存在場所を認識し、回避できる目的地を探しだす認知地図を脳内に形成する能力を知ることができる。直径1m、深さ30cmの円筒の水槽に水を張り、入水されたマウスが回避できるためのプラットホームを設置した。 プラットホームを隠す目的で水面下1cmになるように23℃前後の白濁させた水を張った。装置の真上にCCDカメラを設置し、マウスの映像信号をモニターすると同時に、コンピューターによりその軌跡と所要時間が解析できるようにシステム化した。それぞれのマウスに3箇所のスタート地点と、決められたプラットホームを設け、プール内壁面にマウスの鼻部を向けて静かに水中に入れた。水槽内のマウスがプラットホームに辿り着くまでの軌跡と時間を測定した。最大観察時間は60秒で1日4試行を5日間行った。実験開始6日目にプローブテストを行った。

プローブテスト(Transfer Test)とは、プラットホームを取り除くことにより、マウスが偶然的にプラットホームに辿り着く確立を低くし、プラットホームの置いてあった位置を何回横切るかを測定する実験法である。

5) 組織中の水銀濃度測定[10)]

水銀濃度測定には、高感度還元気化水銀測定装置 マーキュリー/RA-1(日本インスツルメンツ株式会社)を用いた。各種組織中の総水銀を酸化し、2 価のイオン状態にする。これに還元剤として塩化第一スズを加え、通気バブリングすると還元された水銀が気化する。同時に水蒸気、酸ミストも発生するので、電子冷却ユニットで洗気・除湿してから吸収セルに導入し、水銀の吸収線 253.7nm の波長における吸収を測定した。 組織(脳・腎臓・肝臓:0.04～0.3g)0.04～0.3g を秤量したのち、ユニシール分解ルツボ(イスラエル製)に入れ、濃硝酸を3ml加えた。140℃に加熱したオーブン内で90分間、加熱湿式灰化した。その後、分解ルツボを冷蔵庫に入れて約 90 分冷却した。冷却後、試験管に移し、さらに H_2O を加えて、20ml に調整した。その後、水銀濃度を還元気化-原子吸光光度法で測定した。

6) 統計処理

各群間の平均値の有意差検定は分散分析を、一次元配置を行ったのちに Student's-t 検定、あるいは Mann-Whitney's U-検定で処理した。

結果

(1) 出産時の体重の比較

妊娠期間中の Hg^0 曝露、MeHg 曝露、Hg^0+MeHg 複合曝露による胎児への影響の指標として、出産時の体重について調べた。 図 4・5 には、出産 10 日目における雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg^0 曝露群、MeHg 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群の体重を測定した結果を示した。

MT(+/+)マウスでは、雌雄マウスともに、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間で、体重に有意な差異は認められなかった(図 4)。またMT(-/-)マウスでは、Hg^0 曝露群と Hg^0+MeHg 複合曝露群の雌マウスで対照群に比べ体重は有意に増加していた。しかし、雄マウスの対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に体重差はなかった(図 5)。

(2) オープンフィールド(OPF)試験

図6と図7には、出産8週齢における雌雄のMT(+/+)マウスとMT(-/-)マウスの対照群とHg^0曝露群、MeHg曝露群、Hg^0+MeHg複合曝露群のOPF試験における自発行動量を表す総移動距離を示した。

MT(+/+)マウスでは Hg^0 曝露群で雌雄ともに対照群との間に有意な差異は認められなかった。MeHg曝露群では、雄マウスの総移動距離は対照群より有意に高値($p<0.05$)を示し、自発行動量の亢進が認められた。一方雌マウスでは総移動距離は対照群より有意に低値($p<0.01$)を示し、雄マウスとは異なり逆に自発行動量の低下が認められた。Hg^0+MeHg 複合曝露群では、MeHg 曝露群と同様、雄マウスにおいて対照群より有意に高値($p<0.05$)を示し、自発行動量の亢進が認められたが、雌マウスでは対照群より低値($p<0.01$)を示し、自発行動量の低下が認められた(図6)。

MT(-/-)マウスでは Hg^0 曝露群では、雄マウスは対照群との間に有意な差異は認められなかったが、雌マウスにおいて対照群に比べ有意に高値($p<0.05$)を示し、自発行動量の亢進が認められた。MeHg曝露群では、雌雄ともに対照群との間に有意な差異は認められなかったが、Hg^0+MeHg 複合曝露群では、Hg^0 曝露群と同様に雌マウスにおいて対照群に比べ有意に高値($p<0.05$)を示し、自発行動量の亢進が認められた(図7)。

図8と図9には、出産8週齢における雌雄のMT(+/+)マウスとMT(-/-)マウスの対照群とHg^0曝露群、MeHg曝露群、Hg^0+MeHg複合曝露群のOPF試験での探索行動の活動度を表す中心に滞在していた割合を示した。

MT(+/+)マウスでは、Hg^0 曝露群で、雌雄マウスともに対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし、MeHg 曝露群では、雄マウスにおいて対照群より有意に高値($p<0.01$)を示したが、雌マウスでは対照群との間に有意な差異は認められなかった。Hg^0+MeHg 複合曝露群では、MeHg 曝露群と同様、雄マウスにおいてのみ対照群より有意に高値($p<0.01$)を示した(図8)。

MT(-/-)マウスではHg^0曝露群で、雌マウスにおいて対照群より有意に高値($p<0.05$)を示した。しかし、雄マウスでは対照群との間に有意な差異は認められなかった。MeHg 曝露群では、雌雄マウスともに対照群との間に有意な差異は認められなかったが、Hg^0+MeHg 複合曝露群では、Hg^0 曝露群と同様、雌マウスのみに対照群より有意に高値($p<0.05$)を示した(図9)。

図10～図13には、雌雄の野生型マウス(MT(+/+))とMT欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control群)、Hg^0曝露群、MeHg曝露群、Hg^0+MeHg複合曝露群 OPF 試験での 5 分間の観察中に排便した糞の数、排尿した回数すなわち情動反応を表す指標を示した。

MT(+/+)マウスでは、雌雄マウスともに、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に糞の個数、排尿の回数に有意な差異は認められなかった(図 12・13)。これに対し、MT(-/-)マウスでは、雌雄マウスともに対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に糞の個数に有意な差異は認められなかった(図 14)が、排尿回数は、MeHg 曝露群の雄マウスのみが対照群より有意に高値($p<0.05$)を示し、情動面の影響が認められた(図 15)。

(3) 受動的回避反応(PA)試験

図 16～図 19 には、雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg^0 曝露群、MeHg 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群の PA 試験による訓練試行と保持試行における電気ショックから回避するための反応時間を示した。 この値は、嫌悪体験に対する学習能力を表す指標である。

MT(+/+)マウスでは、初日に行った訓練試行の回避反応時間には、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に有意な差異は認められなかった(図 16)。翌日に行った嫌悪体験が記憶されているかを調べる保持試行の回避反応試験でも、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間で回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 17)。

MT(-/-)マウスでも MT(+/+)マウスと同様、1 日目に行った訓練試行の回避反応時間には、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に有意な差異は認められなかった(図 18)。また翌日に行った嫌悪体験が記憶されているかを調べる保持試行の回避反応試験でも、対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間で回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 19)。

(4) モリス水迷路試験

図 20～図 25 には、雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg^0 曝露群、MeHg 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群のモリス水迷路試験での 5 日間の訓練試行における回避反応時間を示した。 この値は、空間認知の能力を示す指標である。

MT(+/+)マウスでは、 Hg^0 曝露群では、訓練試行において、雌雄マウスともに 5 日間ともに対照群と Hg^0 曝露群との間に回避反応時間に有意な差異は認められなかった。しかしながら、雌雄マウスともに対照群では訓練を重ねることにより回避反応時間は短縮したが、Hg^0 曝露群の雌マウスでは回避反応時間

の短縮は認められなかった(図 20)。MeHg 曝露群の雄マウスでは、5 日間に回避反応時間は短縮せず、訓練 4 日目と 5 日目に対照群との間に回避反応時間の間に有意な差があり($p<0.05$)、空間学習の獲得に遅延が認められた。これに対し、雌マウスは対照群との間に 5 日間ともに回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 21)。Hg^0+MeHg 複合曝露群では、MeHg 曝露群と同様、雌雄マウスでは訓練を重ねても回避反応時間の短縮は認められなかった。しかも、訓練 4 日目では対照群と Hg^0+MeHg 複合曝露群との間に回避反応時間に有意な差が認められ($p<0.05$)、空間学習の獲得遅延が観察された。雌マウスでは対照群と Hg^0+MeHg 複合曝露群との間で回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 22)。

MT(-/-)マウスでは、対照群では雌雄マウスともに 5 日間の訓練試行の間に回避反応時間は短縮した。しかし Hg^0 曝露群の雌マウスは、5 日間に回避反応時間は短縮せず、訓練 4 日目と 5 日目に対照群との間に回避反応時間に有意な差異が認められた($p<0.05$)。これに対し雄マウスは 5 日間の訓練試行において回避反応時間は短縮し、対照群との間にも回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 23)。MeHg 曝露群では、雌雄マウスともに 5 日間ともに対照群と Hg^0 曝露群との間に回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 24)。Hg^0+MeHg 複合曝露群では、Hg^0 曝露群と同様雌マウスは、5 日間の訓練試行の間に回避反応時間は短縮せず、訓練 4 日目には対照群との間に回避反応時間に有意な差があり($p<0.05$)、空間学習獲得において遅延が認められた。これに対し雄マウスは、5 日間の訓練試行の間に回避反応時間は短縮しており、対照群との間にも回避反応時間に有意な差異は認められなかった(図 25)。

図 26 と図 27 には、雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg^0 曝露群、MeHg 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群のモリス水迷路試験での 5 日間の訓練試行終了後、プラットホームを取り除いたとき、その位置を通過した回数(プローブテスト)の結果を示した。

MT(+/+)マウスでは雌雄マウスともに対照群と Hg^0、MeHg、Hg^0+MeHg 各曝露群との間に有意な差異は認められなかった(図 26)。これに対し、MT(-/-)マウスでは、雄マウスでは対照群と各曝露群との間にプラットホームを横切る回数に有意差は認められなかった。しかし、雌マウスでは Hg^0 曝露群のみが対照群に比べ、プラットホームを横切る回数が少なく有意な差($p<0.05$)が認められた(図 27)。

(5) 組織中の水銀濃度測定

表 1・～表・4 には、出産 10 日目における雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg^0 曝露群、MeHg 曝露群、Hg^0+MeHg 複合曝露群の脳・腎臓・肝臓中の水銀濃度を示した。

MT(+/+)マウスでは、Hg^0 曝露群では、雌雄マウスともに脳中では対照群に比べ約 2 倍高値を示し、有意差($p<0.05$)が認められた。しかし、腎臓・肝臓では有意な差異は認められなかった。MeHg 曝露群は、雌雄マウスともに脳で約 180 倍高値($p<0.01$)を示した。また腎臓では約 20 倍高値($p<0.01$)を示し、肝臓では 60 倍高値($p<0.01$)を示した。Hg^0+MeHg 複合曝露群は、雄マウスの脳で約 380 倍、雌マウスで約 170 倍高値($p<0.01$)を示した。また腎臓では MeHg 曝露群と同様、雌雄マウスで約 20 倍高値($p<0.01$)を示し、肝臓では雌雄マウスともに約 80 倍高値($p<0.01$)を示した(表 1・2)。

MT(-/-)マウスでは、Hg^0 曝露群の雄マウスは脳・腎臓・肝臓で対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし雌マウスでは対照群に比べ、脳・肝臓中では約 2 倍、腎臓中では約 3 倍高値($p<0.05$)を示し、有意な差異が認められた。MeHg 曝露群は、雌雄マウスともに脳で約 200 倍高値($p<0.01$)を示した。また腎臓中では約 40 倍高値($p<0.01$)を示し、肝臓中では約 60 倍高値($p<0.01$)を示した。Hg^0+MeHg 複合曝露群は、雄マウスの脳中で約 250 倍、雌マウスで約 300 倍高値($p<0.01$)を示した。また腎臓では MeHg 曝露群と同様、雌雄マウスで約 40 倍高値($p<0.01$)を示し、肝臓では雌雄マウスともに約 80 倍高値($p<0.01$)を示した(表 3・4)。

考察

メチル水銀(MeHg)や水銀蒸気(Hg^0)は容易に胎盤関門を通過し、胎児に移行する。とくに、胎児に移行した MeHg は主に脳に蓄積し、その濃度は母親より高値を示すことが動物実験で証明された[14]。また、胎盤を通過した Hg^0 は胎児の肝臓に主に蓄積し、脳の濃度はさほど高くはないが、出産後、脳の水銀濃度が上昇することが報告されている[15]。いずれの水銀化合物も胎生期において水銀曝露を受けると、その後の発育・発達に大きな影響を与えることが示唆されている。本研究では Hg^0 曝露群は、曝露濃度 0.030 mg/m^3 で 1 日 6 時間、妊娠 0 日目より妊娠 18 日目まで連日曝露を行った。MeHg 曝露群は、妊娠 0 日目より MeHg 5ppm 含有飼料を出産 10 日目まで与え、その後は MeHg を含まないコントロール飼料で

飼育した。Hg^0+MeHg 複合曝露群は、妊娠 0 日目より Hg^0 と MeHg を同時に曝露した。各曝露群の雌雄マウスが出産後、8 週齢に達したとき、行動解析を行った。

胎生期における MeHg 曝露による神経行動毒性に関する研究では、Goulet ら[16]は、本研究に用いたマウスと同種の C57/BL6 マウスに胎生期から授乳期に 0、4、6、8ppm の MeHg を含む飲料水を与えた実験で、OPF 試験での雌雄マウスの自発行動量に変化は認められなかったと報告している。本研究結果では MT(+/+)マウスの雄で自発行動量の亢進が認められ、雌で活動量の低下が認められた。MT(-/-)マウスでは雌雄ともに自発行動量に変化が見られず、MeHg 曝露による自発行動に対する感受性は低いことが明らかとなった。また、MeHg 曝露による学習記憶に対する影響について、Goulet ら[16]は、6ppm と 8ppm の MeHg 曝露群の雌マウスは雄マウスに比べ短期(作業)記憶への影響が認められたと報告している。しかし、長期記憶に関する実験では雌雄マウスにおいて MeHg の影響はなかったが、記憶に対する MeHg の影響は雄マウスに比べて雌マウスは受けやすいと述べている。本研究では PA 試験を用い、嫌悪体験に対する学習記憶を見たが、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 曝露群の間で回避反応時間に有意な差異は認められず、MeHg による嫌悪体験に対する学習記憶の低下は認められなかった。しかしながら、モリス水迷路試験での空間認識に対する学習能力では、MeHg 曝露群の MT(+/+)マウスの雄は 5 日間の訓練を重ねても対照群と比べ、回避反応時間の短縮は認められず、空間認識に対する学習に対し、MeHg による遅延が認められた。しかしながら、MT(+/+)マウスの雌では MeHg 曝露群と対照群との間に空間学習能力の獲得に差異は認められず、MeHg の記憶に対する影響は Goulet ら[16]の結果とは異なるものであった。 これに対し、MT(-/-)マウスでは雌雄ともに空間認知による学習能力に対し影響は見られなかった。これらの事実は胎生期における MeHg 曝露は MT(-/-)マウスより MT(+/+)マウスの神経行動に大きな影響を与えるものと思われる。

胎生期における Hg^0 曝露による行動影響をみた実験では、Danielsson ら[17]はラットを用い、妊娠 11～14 日目と 15～16 日目に 1.8 mg/m^3 濃度の Hg^0を 1 日 3 時間、胎生期に曝露された仔の発育期における行動について調べている。Hg^0曝露を受けた新生児の自発行動は、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、空間学習では、放射状迷路での学習の遅延、単純学習、新しい環境への適応の遅延などが認められていると報告している。また、産業現場で曝露を受ける水銀濃度(0.5 または 1.0 mg/m^3)を 1 日 4 時間または 7 時間で週 5 日間妊娠リスサルに曝露を行った実験[18]では、出生後 0.8～4 年齢の強化因子刺激条件下でのレバー押し持続時間や、同一個体による変動性は対照群に比べ、

曝露群では多いことを報告している。最近、Yoshidaら[19]はMT(+/+)およびMT(-/-)妊娠マウスにHg^0濃度0.6 mg/m^{3}で1日6時間、妊娠0～18日目まで連日曝露を行った実験では、出産12週齢のMT(+/+)マウスのOPF試験、PA試験、モリス水迷路試験で、対照群と曝露群との間に成績に差は無いと報告している。しかしながら、MT(-/-)マウスでは、雄で自発行動量の低下、雌では嫌悪体験に対する学習劣化やモリス水迷路での空間学習の遅延などが観察されている。本研究ではYoshidaら[19]の実験条件よりさらに低い濃度、すなわちWHOの職業性水銀蒸気曝露の勧告限界値 0.025mg/m^{3}に近い濃度で曝露を行った。Yoshidaらの報告[19]と同様にMT(+/+)マウスでは雌雄にOPF試験による自発行動量や探索行動、PA試験による学習記憶、モリス水迷路試験による空間学習に対する影響は認められなかった。これに対し、MT(-/-)マウスでは、雌においてOPF試験での自発行動量の亢進、モリス水迷路試験での空間認知に対する学習能力の遅延が認められ、Yoshida et al.[19]の結果と一致していた。しかしながら、本実験の結果は水銀蒸気曝露のNOAEL(無影響量)0.025mg/m^{3}でもMT遺伝子欠損している場合、水銀蒸気の影響を受けることが示唆された。

胎生期にHg^0とMeHgの複合曝露を受けたのちの行動影響に関する報告は少ない。Fredriksson ら[20]は胎生期に曝露された雄ラットの行動影響について調べている。妊娠6～9日目に1日2 mg/m^{3}のMeHgを経口投与し、さらに妊娠14～19日目に1.8 mg/m^{3}濃度のHg^0蒸気を1日90分間曝露し、出産16～20週齢に行動試験を行った結果では、自発行動量は、対照群に比べHg^0曝露群では亢進し、Hg^0+MeHg複合曝露群ではHg^0曝露群よりもさらに亢進していたと述べている。またモリス水迷路試験によるプラットホームまでの回避反応時間は対照群に比べ、Hg^0曝露群では明らかな遅延が認められ、Hg^0+MeHg複合曝露群ではさらに遅延がみられたと報告している。Fredriksson ら[20]は胎生期に複合曝露を受けた場合、神経行動への影響は水銀単独よりも複合曝露により強い影響が現れることを述べている。本研究では、Hg^0+MeHg複合曝露による神経行動への影響はMT(+/+)マウスではOPF試験、PA試験そしてモリス水迷路試験の成績がMeHg曝露群とほぼ一致しており、複合曝露に自発行動量、探索行動量そして空間学習能力などに対し、より強い影響は認めらなかった。Hg^0やMeHgの標的器官である脳の水銀濃度はHg^0曝露に比べ、非常に高値を示したが、MeHg曝露群と比べるとほぼ同じレベルであった。これらの結果より、Hg^0+MeHg複合曝露群における神経行動毒性はHg^0の毒性よりMeHgの毒性によることを示唆していると思われる。これに対して、MT(-/-)マウスではMeHg曝露群に比べ、Hg^0曝露群やHg^0+MeHg複合曝露群に行動影響が見られた。しかし、Hg^0+MeHg複合曝露群における行動毒性はHg^0曝露群よりも必

ずしも顕著ではなく、複合曝露による相加的あるいは相乗的な行動影響は認められなかった。Hg^0 曝露群の脳の水銀濃度は MeHg 曝露群や Hg^0+MeHg 複合曝露群に比べて、極めて低値であるにも関わらず、神経行動への影響が出現しているから、MT(-/-)マウスでは Hg^0 毒性に対して極めて感受性が高いものと思われる。

以上の結果より、MT(+/+)マウスでは胎生期に WHO が推奨した NOAEL(無影響量)0.025 mg/m^3 に近い Hg^0 曝露(0.03 mg/m^3)を受けても、その後の神経行動に対する影響は少ないことが明らかとなった。しかしながら、胎生期に 5ppm MeHg の曝露を受けた場合、OPF 試験の探索行動量や探索行動、モリス水迷路の回避反応時間に影響が見られ、特に雄マウスで MeHg に対する感受性が高いことが判明した。また今回、Hg^0 と MeHg により複合曝露の影響を見たが、MeHg 曝露群より Hg^0+MeHg 曝露群により強い行動影響は認められず、本実験条件下では、胎生期における水銀曝露の影響は Hg^0 曝露より MeHg 曝露による影響が強く現れるものと思われる。これに対し、MT(-/-)マウスでは、神経行動毒性は MeHg 曝露よりもむしろ Hg^0 曝露においてより顕著に現れていることから、無機水銀に対し高感受性であることが示唆された。

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) Yoshida, M.: Placental to fetal transfer of mercury and fetotoxicity. Tohoku J.Exp.Med., 196:79-88, (2002)

4) Clarkson, T.W.: The three modern faces of mercury, Environ. Health Perspectives, 110:11-23, (2002)

5) Mackert, J.R. and Berglund, A.: Mercury exposure from dental amalgam filling: Absorbed dose and the potential for adverse health effects. Crit Rev. Oral Biol. Med., 8:410-436, (1997)

6) Takahashi, S., Tsuruta S., Hasegawa, J., Kameyama, Y. and Yoshida, M.: Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues.

Toxicology 163:115-126, (2001)

7) Yoshida.M, Ohta, H., Yamauchi, Y., Seki Y., Sagi, M., Yamazaki, K. and Yawar, S. : Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese, Biological Trace Element Reserch,63 : 167-175,(1998)

8) 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)

9) 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. USA91, 584-588, (1994)

10) Yoshida, M., Yamamura, Y. and Satoh, H.: Distribution of mercury in guinea pig offspring after in utero exposure to mercury vapor during late gestation. Archives Toxicology, 58:225-228, (1986)

11) 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)

12) 岩崎 克典:受動的回避実験、生体の科学、45:496-497, (1994)

13) 藤原 道弘、三島 健一:モリス水迷路、生体の科学、45:500-501, (1994)

14) World Health Organization (WHO). Methylmercury Environ. Health Criteria, vol.101. World Health Organization, Geneva. (1990)

15) Yoshida, M., Satoh, H., Kojima, S., Yamamura, Y.: Retention and distribution of mercury in the organs of neonatal guinea pugs after in utero exposure to mercury vapor. J. Trace Elem. Exp. Med., 3:216-226, (2000)

16) Goulet, S., Dore, F.Y. and Mirault, M.E..: Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. Neurotoxicol .Teratol., 25:335-47, (2003)

17) Danielsson, BRG., Fredriksson , A., Dahlgren, L.., Reling Gardlund, A., Olsson, L., Dencker, L., Archer, T.: Neurotoxicol Teratol 15:391-396, (1993)

18) Christopher Newland M, Warfvinge K, Berlin M Behavioral consequences of in utero exposure to mercury vapor: Alterations in lever-press durations and leaning in squirrel monkeys. Toxicol app Pharmacol 139:374-386, (1996)

19) Yoshida, M., Watanabe, C., Horie, K., Satoh, M., Sawada, M., Shimada, A.: Neurobehavioral changes in metallothionein-null mice prenatally exposed to mercury vapor, Toxicology Letters: 155:361-368, (2005)

20) Fredriksson, A, Dencker, L, Archer, T. and BRG Danielsson.: Prenatal co-exposure to metallic mercury vapor and methylmercury Produce Interactive behavioral changes in adult rats. Neurotoxicology and Teratology, 18: 129-134, (1996)