

図4は、観察時間内のペレット獲得数の推移を示した。前述したように、迷路への“慣らし”期間を設けなかったため、初期のセッションにおける獲得数は極めて低い。総移動距離（図6）を見ても、活動量自体が低かったことが示されている。15セッションあたりで各群とも6以上でほぼ漸近線に達しており、この条件では全個体が課題を遂行できる状態には達しなかったことがわかる。総移動距離（図6）、アームへの総進入回数（図7）、最初の8選択における異なるアーム数（図10）、各進入あたりのアーム平均滞在時間（図11）など、他の指標もだいたい15セッション以降で成績が漸近線になっている。

19セッション以降で、方法の項に述べたとおり delay time を導入し、課題を難しいものにした。図4でみると、課題の変化の影響はそれほど顕著ではなかった。ただし、Cd曝露群で、獲得数がやや落ち込む傾向がうかがえた。図5は、初回のセッションから30回までを通じ、ペレット獲得数が8となった試行、すなわち課題遂行に成功した試行の延べ数（例えば2個体が4日間課題を遂行した場合、8となる）を累積数として示したものである。各群4個体が30セッションを経験したので、全試行数は120セッションとなり、各群の累積的な成功率は25%以下と高くはなかった。いずれの群でも10セッション目あたりから遂行する個体出始めるが、delay time を導入した19セッション以降、MT-nullのCd曝露群のみ、他の群に比べて伸びが悪かった。実際に個体毎のデータ（示さず）を見ると、同一個体に成功試行が集中しているわけではなく、この伸びの悪さは、群としての平均的な成績を反映した結果であると考えられた。

Working Memory Error は、文字通り作業記憶の意味であるが、既にペレットを獲得したア

ームを訪れるエラーを何回犯したかを示す。Frequency Of Working Memory Error は、Working Memory Error を Total Arm Choice で割った値である。頻繁にアームを訪れるような個体では作業記憶のエラーが増える確率がたかくなるので、これをある程度標準化するものともいえる。しかし、本実験においては、総進入回数がたかだか 15 回程度であったため、これらの指標は変動が大きく、学習成績をよく反映していたとは言い難い。

#### (4) [試験時における体重]

行動試験の開始時（9週齢）における体重は図 12 に示すとおりだった。各群間の差は小さいが、オスでは系統、曝露の効果がともに有意であり、両者の交互作用は有意に至らなかった。すなわち Cd 曝露群では、わずかに体重が軽く、MT-null は野生型よりも体重が大きかった。メスはこれと異なり曝露効果のみが有意であり、オスと同様に Cd 曝露により体重のわずかな減少が見られた。

#### D. 考察

本研究では、比較的低用量の Cd への曝露によって、発達毒性が生ずることを示すことを目的とした。本研究で用いた飲料水中 10ppm の Cd は、体重 25 g のマウスがこれを飲むと考えた場合、飲水量 3-7mL/day、平均 5mL/day として、 $10\text{ppm} * 5\text{mL}/25\text{gBW}/\text{day} = 2\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ （経口摂取）となり、吸収率を 0.5% とすると腹腔あるいは皮下投与での吸収が 100% とした場合、 $0.01\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  に相当する。太田らは、慢性経口投与モデルにおける腎への蓄積の経時変化より、 $1\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$  を”ヒトの日常摂取レベル”としているが、本研究の曝露レベル

はこれと大きな差はない。また、in utero 曝露でエストロゲン様作用を報告した実験 (Johnson et al., 2003)では、0.5, 5  $\mu$ g/kg を腹腔投与しており、高いほうの dose は、本研究の腹腔換算値の 1/2 である。したがって、本研究で用いた dose はこれまでに行なわれた in vivo の動物実験としては、最も低いものに属すると考えられる。ただし、Johnson et al. の低用量は本実験の 1/20 の dose で positive な結果を得ている。なお、JECFA (2003 ; June) は週間耐容量として、7 microg/kg/wk = 1 microg/kg/day を提唱している。

本研究で用いた行動試験は、DES で positive な結果を得たものである。DES についても、体重などの gross toxicity が見られないような条件での行動変異を検索したものであるが、オープンフィールドでは雌雄ともに行動促進の傾向が、受動回避ではオスのみで成績の低下が見られ、メスでは学習が成立しなかった。空間学習については検討されていない。本研究では、オープンフィールドでは影響がなく、受動回避においては影響を検出したが、メスでのみ認められた。これらは、DES の場合とは全く異なる結果であった。DES を用いた検討では、行動促進が受動回避の訓練試行時にも認められ、オープンフィールドにおける活動性亢進と受動回避の回避時間とが有意な負の相関を示したことから、活動性の亢進が受動回避における成績の低下につながった可能性が考えられた (Tanaka et al., 2004)。したがって、同じ受動回避の成績低下でも、Cd とはメカニズムが異なると考えられる。放射状迷路では、課題を難しくした後に、MT-null (KO) +Cd 曝露群の相対的な成績の低下が顕著になったと言える。初期の学習曲線では、KO-Cd 群と他の群とあまり大きな差は認められないので、この群の空

間学習能力に障害があったとしても、それほど高度のものではないと想像される。放射状迷路に供した個体は、他の試験に供した個体とは（同じ親動物群に由来しているが）別個の動物であるので、異なるグループの個体を用いて、それぞれ KO-Cd 曝露群に行動異常が検出されたことになり、Cd 曝露による行動異常の発生と、MT-null におけるその増悪の可能性が強いことを示唆していると言える。放射状迷路に用いた個体数が少ないこと、また観察時間も5分間とやや短かったことは、試験の検出力を弱くしていると考えられ、数・観察時間をそれぞれ大きくとった実験が望ましい。また、オスについての検討も必要である。

体重についての結果も留意を要する。オス・メスともに、Cd 曝露によってわずかではあるが体重が減少した。減少の程度からは行動には影響の見られなかったオスに Cd の影響が強く現れた。これも DES の場合とは異なっていた。体重の減少は一般的な毒性を示唆しており、純水に脳神経特異的な発達毒性の有無を確認するために、さらに小さい用量域における検討が必要であるのかも知れない。特に、体重減少の程度は出生直後の方が顕著であったことから、子宮内の成長が阻害されている可能性があり、この場合、行動影響は成長阻害に2次的である可能性があるからである。

Cd による発達毒性については、今後さらにエンドポイントを増やすなどして、その確認が必要であると思われるが、同時にメカニズムについても検討し、両者のつながりを考えていくことが重要であると考えられる。以下に現時点で知見が得られていて可能性のあるメカニズ

ムを列挙しておく。ただし、以下の各項目は互いに必ずしも相容れないものではない。

\*エストロゲン様作用。ラットで既に報告されている。ただし、上述したように行動影響の点では、合成エストロゲンである DES とは影響のプロファイルが異なっていた。

\*甲状腺機能あるいは甲状腺ホルモン代謝への作用（吉田（克）氏，森氏の章参照）。少なくとも現象的には，MT-null において影響が強く現れた点で一致している。これよりも早い時期，胎生期～生後1週間程度での T4 および脱ヨード酵素の検討が必要かと思われる。

\*遺伝子発現の変化による：例えば，Cd 曝露により野生型ではセロトニン受容体 5b の遺伝子発現の増加（佐藤氏の章参照）を認めており，過去の報告でセロトニン系伝達の異常を報告していることと照らし合わせると興味深い。ただし，行動影響がやや強く現れた MT-null については受容体遺伝子発現に影響は認められていない。

これまでに Cd の発達神経毒性に関して報告がなかったわけではない。冒頭に述べた Hastings と Miller (1998) の網羅的な review では神経行動毒性を検討したものとして，胎生期曝露の影響（胎生期+哺乳期のものを含む）をみたもの7件，新生仔期曝露の影響をみたもの12件を紹介している。これらの多くの実験は1980年から90年代の初めに実施されているが，投与量が多いものが多い。Hastings Miller によれば，出生前の曝露による影響は，Cd そのものによるというよりは，Cd により栄養素や必須微量元素の胎盤通過性が低くなることによるもので，出生後の曝露による影響は神経系への Cd の蓄積によるものであろうとしている。ただし，明確な神経毒性が得られる場合，体重減少などの明確な毒性も出現しているの

で解釈が難しいとしている。以下にこの review に取り上げられたものも含めて、Cd の発達毒性に関連するいくつかの文献を挙げてみる：

※ prenatal で、一般毒性をおこさない低用量で行動毒性を見ているものは Baranski et al. (1983)くらいである。これは交配前5週間から出生まで経口で 0.04, 0.4, 4.0 mg/kg/day を与え、2ヶ月齢で活動量（5min を5日間連続）の低下、感覚-運動機能試験であるロタロッド（回転軸上の歩行）成績（試行6日間）の低下を示している。しかし、n数は不明。

※ prenatal で、行動評価はないが、神経毒性を見ているものはやや多く、Antonio et al. (1998) は、ラット妊娠初日から生後5日目まで 10ppm の Cd を含む飲料水で飼育し、生後5日目の時点で 5-HT, 5-HIAA の高値を認めている。Andersson et al. (1997)は、新生仔期のみ曝露で、生後17日目まで 5ppm の飲料水に曝露し、Antonio らとは逆に、7週齢において 5-HT & 5-HIAA の低値を認めている。Yargicoglu et al. (1997)はラットで妊娠初日から出生後60日まで 15ppm の飲料水で飼育し、視覚誘発電位への影響を報告している。

※高用量あるいは postnatal exposure で行動毒性を見ているもの

Rastogi ら(1977) はラット新生仔に経口で 0.1 or 1 mg/kgBW を出生後30日まで投与し、最終日に活動量を 30min 記録し、対照群に比較して 30%活動量が高かったと報告した。ただし量には依存していない。1mg/kg 投与群では体重・脳重量が低下。モノアミンについて 5-HT, DA など脳の 4-6 部位で検索しているが、0.1mg/kg で有意の変化を認めたのは線条体 TH 活性（34%上昇）のみ。

## E. 結論

低濃度の Cd (10ppm) を含む飲料水に周生期 (GD 1 ~PNG10) に主として母体を通じて曝露されたマウスの行動機能について、3種類の試験を用いて評価したところ、8-9 週齢におけるオープンフィールド行動には曝露の影響を認めなかったが、受動回避試験ではメスのみで成績の低下が認められた。成績の低下は MT-null 群でより顕著な傾向を示した。これらの結果は同じ試験系を用いて評価した DES の周生期曝露の結果とは全く異なっており、Cd 曝露の行動影響がエストロゲン作用とは異なるものであることが示唆された。さらに、メスについてのみ 26 週齢から放射状迷路試験による空間学習機能の評価を行った。MT-null の曝露群は、学習課題を難しくした場合に、他の群に比べて成績が劣る傾向が認められた。以上の結果より、用いた条件下で、Cd は発達毒性を示すことが示唆された。

## F. 研究発表

Tanaka M, Ohtani-Kaneko, R., Yokosuka, M., and Watanabe, C (2004) Low<sup>^</sup>-dose perinataln diethylstilbestrol exposure affected behaviors and hypothalamic estrogen receptor-alpha-positive cells in the mouse. *Neurotoxicology and Teratology*. 261-269.

(前年度の内容の刊行：添付資料とした)

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

胎生期のメチル水銀曝露による神経行動毒性に対する遺伝的要因の影響

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

研究要旨

胎生期に低濃度メチル水銀曝露をうけた場合のその後の発育・発達の影響が危惧されている。加えて、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に中枢神経毒性に対しさらに感受性を亢進にさせる要因となりうる。本研究はメタロチオネイン-I および-II の発現を抑えたメタロチオネイン遺伝子欠損マウス（以下、MT(-/-)）を用いて、胎生期における低濃度メチル水銀曝露が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。メチル水銀曝露は 5ppm のメチル水銀を含む餌を妊娠 0 日目から出産 10 日まで与え、その後、コントロール飼料で仔を飼育した。仔が 12 週齢に達した時点で、オープンフィールド、受動回避反応、モリス水迷路を用いて行動解析を行った。オープンフィールドによる自発行動量は雌雄の MT(+/+)、MT(-/-)マウスともに曝露群と対照群との間に差異は見られなかったが、探索行動は雌の MT(-/-)マウスの曝露群において対照群に比べ低下が認められた。情動性の指標である脱糞数は曝露群の雄の MT(+/+)マウスにおいて対照群より多く、情動面に影響が認められた。嫌悪体験に対する学習獲得能力を評価する受動的回避反応試験では雌雄の MT(+/+)、MT(-/-)マウスともに曝露

群と対照群との間に回避反応時間に差異は見られなかった。空間学習能力を評価するモリス水迷路テストでは、5 日間の訓練試行でプラットホームまでの到達時間に雌雄の MT(+/+)、MT(-/-)マウスともに曝露群と対照群との間に差異は見られなかった。しかし、その後に行ったプローブテストでは曝露群の雄の MT(+/+)マウスの成績が対照群に比べ有意に低下していた。

以上のことより、胎生期にメチル水銀曝露うけた仔は、探索行動、情動面、空間学習に神経行動影響が生じることが明らかとなった。しかしながら、メチル水銀に対し性や MT 欠損による感受性の相違に関しては確証は得られなかった。

## A. 研究目的

水俣病やイラクにおけるメチル水銀中毒事件以来、環境汚染に対し社会的に関心が高まった。メチル水銀の標的器官は中枢神経系であり、胎生期におけるメチル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メチル水銀の影響が大きいことが明らかとなった<sup>1),2)</sup>。今日、高濃度のメチル水銀の曝露をうけるような環境は減少し、むしろ、低濃度のメチル水銀を長期間にわたる曝露による中枢神経機能への影響が危惧されている。しかしながら、一般環境、とくに食物を介しての胎生期を含む発育・発達期における低濃度メチル水銀曝露による神経行動影響についての知見は殆ど無い。

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、これらに加えてメタロチオネイン（金属結合蛋白質）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<sup>3),4)</sup>。日本人には、メタロチオネインの合成能力の低い集団がいることを知られており<sup>5)</sup>、このよう集団は遺伝的に重金属毒性に対し感受性が高く、一般環境から長期にわたりメチル水銀曝露を受けた場合の健康影響とくに中枢神経機能への影響については知られていない。とくに胎生期にはメチル水銀に対する感受性は極めて高く、胎生期に遺伝的要因（メタロチオネイン-I/II 遺伝子欠損）をもつ高感受性集団が一般環境よりの低濃度のメチル水銀曝露をうけた場合に神経行動学的にどのような影響をもたらすか社会的に関心もたれている。

本研究は遺伝的要因モデルとして近年、ジーンターゲット法<sup>6),7)</sup>によりメタロチオネイン-I および-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て、胎生期における低濃度メチル水銀曝露が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。

## B. 実験方法

### 1) 動物とメチル水銀の曝露

OLA129/C57BL/6J 系の MT 遺伝子欠損マウス (MT(-/-)) と野生型マウス(MT(+/+))は Dr.Choo より供与を受けた。交配は両種のマウスが 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第 0 日とした。妊娠したマウスに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 日まで与え、その後はメチル水銀を含まないコントロール飼料で飼育した。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃え、10 日目に雌雄各 2 匹をと屠殺した。離乳は出産 28 日目に行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1 匹を供す、実験群は一群 5~6 匹とし、12 週齢のとき実施した (図 1)。その後、エーテル麻酔下で屠殺し、脳、腎臓、肝臓を摘出した。

### 2) 行動試験

#### 1. オープンフィールド試験

マウスの自発運動量は Open field 装置 (小原医科産業株式会社製、東京) を用いて評価した。マウスを全く経験したことのない新しい環境 (Open field) におき、自発運動を調べた。この運動量は、固体の運動活動性、探索行動及び種々の情動反応を反映するものといわれている。装置 (60 x 60 x 60 cm) を 25 区画に分けた。室内の照明は消し、80 ルクスの照明のみで実験を行なった。マウスを中央においた筒 (直径 10 x 10cm) に置き、20 秒間放置した。その後、筒を取り CCD カメラでマウスの行動を 10 分間観察し、その結果をコンピューターに取り込んだ。試験中止後、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のち、

新たな実験を行った。

## 2. 受動的回避反応 (Passive avoidance) 試験

受動的回避反応 (passive avoidance) 試験は小原医科産業株式会社製 (東京) の装置を用いて行った。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、暗室に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。室内の照明を消し、400 ルクスの照明を明箱の上にあて、明暗箱を仕切っているギロチンドアと反対の方向に向けてマウスを入れ、30 秒間放置する。その後、ギロチンドアをとり、スタートボタンを押す。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る。試験中止後、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、次の試験を開始する。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する(訓練試行)。翌日も実験を行い (保持試行)、マウスが嫌悪体験を記憶しているが調べる。

## 3. Morris 水迷路試験

Morris 水迷路試験は小原医科産業株式会社製 (東京) の装置を用いて行った。この試験は空間認知を測定するための方法で、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。装置内 (直径 120cm 前後の円筒の水槽) に水を入れ、回避できるためのプラット

ホームを設置する。プラットホームはその位置を隠すため白色カラーペイントで水を白濁色にし、その高さより 8mm 高くなるように 23℃前後の水を入れる。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、水槽内壁面にマウスの鼻部を向けて静かに水中に入れる。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する(最大観察時間は 60 秒)。測定は装置の真上に 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されている。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) 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交差 (Crossing) する回数を測定し、空間認知する学習能力を調べる方法である。

### 3) 組織中水銀濃度の測定

臓器 0.15~0.50g を秤量したのち、ユニシール分解ルツボに入れ、硝酸 5ml 試験管を加えた後に、140℃のオープン内で 90 分間、加熱湿式灰化を行った。その後、分解ルツボを室温まで冷却し、H<sub>2</sub>O で 20ml に調整した。この試料を還元気化-原子吸光光度法で測定した。

### 4) 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 Mann-Whitney's U-検定あるいは Student's-t 検定で処理した。

## C. 結果

図 2 には胎生期にメチル水銀曝露をうけた MT 欠損マウス(MT(-/-))と野生型マウス(MT(+/+))のオープンフィールド試験における総移動距離を示す。MT(+/)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と曝露群との間に総移動距離に差異は認められなかった。オープンフィールド試験において中心で活動している割合を図 3 に示した。MT(+/)マウスでは雌雄ともに対照群と曝露群との間に有意な差異は認められなかった。これに対し、MT(-/-)マウスでは雄では両群の間に差異は見られなかったが、雌では対照群に比べ、曝露群で有意に中心に滞在している割合が高く、探索行動の低下が認められた。Open field test における 10 分間の観察中に排便した糞の数を図 4 に示した。MT(+/)マウスは雌雄ともに曝露群と対照群との間に糞の数に有意な差は認められなかったが、MT(-/-)マウスは、曝露群の雄の糞の数が対照群より、有意に高い値を示した。しかしながら、MT(-/-)マウスの雌では、両群の間に差異は無かった。

学習能力に関する行動試験では、受動的回避反応装置を用いた嫌悪体験に対する記憶は、MT(+/)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と曝露群との間に回避反応時間に差異は認められず、学習能力の獲得に差はなかった (図 4)。次にモリス水迷路試験による空間認識に対する学習能力に調べた結果を図 5 と図 6 に示す。MT(+/)マウスは 5 日間に訓練試行で雌雄ともに対照群、曝露群ともに訓練試行を重ねるとともに回避反応時間が短縮した (図 5)。しかしながら、訓練過程において両群の間に回避反応時間に差異は認められなかった。MT(-/-)マウスは訓練課程において対照群と曝露群の間に回避反応時間に差異はなかったが、雄では訓練試行を繰り返すことにより回避反応時間は両群ともに短縮したが、雌では回避反応時間は必ずしも短縮しなかった。5 日間の訓練試行終了後に行ったプローブテストでは、MT(+/)マウスの雄で、曝露群が対照群に比べ、プラットフォームを横切る回数が有意に低下していた。これに対し、MT(+/)の雌マウスや MT(-/-)の

雌雄マウスでは曝露群と対照群との間に差異は認められなかった。

図 7 には出産後、10 日目と 3 ヶ月目における曝露群の脳の水銀濃度を示す。MT(+/+)マウスでは、10 日後に比べ、3 ヶ月後には雌雄ともに約 1/70 までに低下していた。MT(-/-)マウスでは、雄は約 1/140 に、雌は約 1/180 まで低下した。10 日目において、MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスとの間に、雄で水銀濃度に有意な差は認められなかったが、雌では MT(-/-)マウスが MT(+/+)より約 1.3 倍高値を示し、その差は有意であった。3 ヶ月後の水銀濃度は MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスとも対照群の値まで低下しており、両群の雌雄ともに曝露群と対照群との間に差異は認められなかった(Data not shown)。

#### D. 考 察

本研究は妊娠マウスに妊娠第 1 日目よりメチル水銀 5ppm を含む餌の投与を開始し、出産後 10 日目まで行った。その後、メチル水銀を含まない餌で 12 週間飼育し、MT(+/+)および MT(-/-)の雌雄マウスの行動解析を行った。自発行動量や探索行動の評価に使用した Open field test では、メチル水銀曝露を受けた雌の MT(-/-)マウスのみ探索行動の著しい低下が認められた。自発行動量に関しては、MT(+/+)、MT(-/-)両マウスともに胎生期におけるメチル水銀曝露の影響は観察されなかった。Goulet ら<sup>8)</sup>は我々の実験に用いたマウスと同種の C57BL/6 マウスに胎生期から授乳期に 0、4、6、8ppm のメチル水銀を含む飲料水を与えた実験でも、Open field test での雌雄の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。Open field test で情動反応を糞尿の変化で知ることができる。Kim ら<sup>9)</sup>は妊娠 12-14 日目にメチル水銀 3mg/kg 体重を連日経口投与うけた C57BL/6J 系マウスの 6 週間後の Open field test では、自発行動量、探索行動、脱糞数に曝露群と対照群との

間に差異は見られなかったと述べている。しかしながら、MT(+/+)マウスでは脱糞数には雌雄共に両群間に差は認められないものの、MT(-/-)マウスの雄で曝露群の脱糞数が有意に増加しており、情動面への影響が認められた。

胎生期にメチル水銀曝露を受けたマウスの学習能力に関する研究では、前述の Qoulet ら<sup>8)</sup>は、T型迷路試験による学習能力や学習過程を調べた実験で、6ppm と 8ppm メチル水銀曝露群の雌マウスで雄マウスより短期（作業）記憶への影響が認めている。しかし、長期記憶に関する実験では雌雄マウスにおいてメチル水銀の影響はなかったとが、記憶に対するメチル水銀の影響は雄に比べて雌は受けやすいと述べている。本研究では、学習能力の評価を受動的回避反応試験とモリス水迷路試験を用いて行った。受動回避反応試験による嫌悪体験に対する学習は MT(+/+)、MT(-/-)マウスの雌雄ともに曝露群と対照群に回避反応時間に差異は認められず、メチル水銀による学習獲得の低下は認められなかった。学習を空間認知で測定するモリス水迷路試験では、雌雄の MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスは 5 日間の訓練試行期間中、曝露群と対照群にプラットフォームに到達時間に統計的に差は無く、空間認識による学習習得過程に影響は認められなかった。しかしながら、5 日間の訓練試行終了後に行ったプローブテストでは、遊泳時間や距離は雌雄の MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに曝露群と対照群に差は認められず、Open field test と同様に運動量に変化は認められなかった (Data not shown)。これに対し、プラットフォームを取り除くことにより、その位置を空間認知により習得を確認する測度では、雌の MT(+/+)マウス、雌雄の MT(-/-)マウスは曝露群と対照群に違いは見られない。しかし、雄の MT(+/+)マウスの曝露群はプラットフォームのあった位置を横切る回数が著しく低く、メチル水銀曝露による空間認知の習得に対する影響が示唆された。

水俣やイラクでのメチル水銀中毒事件で、神経病理学的な変化は脳内水銀濃度が 12ppm 以上で発現することが明らかとなった<sup>10)</sup>。しかも臨床症状の発現の閾値は母親の毛髪 20ppm<sup>10)</sup>で、胎児の脳では 1ppm と推定されている<sup>11)</sup>。本研究では出産 10 日目におけるメチル水銀曝露新生児の脳内水銀濃度は 0.4~0.6  $\mu\text{g/g}$  と 1  $\mu\text{g/g}$  を下回る値であった。Sakamoto ら<sup>12)</sup>は妊娠ラットへのメチル投与実験（メチル水銀として 5ppm）で、胎児脳内水銀濃度は出産後 4.5  $\mu\text{g/g}$  が出産 10 日目には約 1/4 にまで低下し、授乳期間中に発育に伴う脳体積が増加により低下することを見出している。今回、胎児および出産直後の脳内水銀濃度の測定を行わなかったが、メチル水銀に曝露された MT(+/+)と MT(-/-)の両マウス群に行動影響が認められたことから、胎児期の脳内水銀濃度は 0.4~0.6  $\mu\text{g/g}$  より高値であったことが推測できる。とくに雌の MT(-/-)マウスの脳内水銀は雌 MT(+/+)マウスや雄 MT(+/+)や MT(-/-)マウスに比べ高値であるが、メチル水銀による神経行動毒性に対し感受性は決して高くはなかった。

最近、MT-I,-II は水銀蒸気曝露による急性毒性に対し軽減効果に示すのみならず、中枢神経行動毒性の軽減に重要な役割を果たすことが見出されている<sup>13)</sup>。本実験では MT(-/-)マウスは雌雄ともに MT(+/+)マウスよりメチル水銀による神経行動毒性に対し感受性が亢進しているというか確証は得られなかった。メチル水銀は無機水銀に比べ MT との親和性は弱く、加えてメチル水銀曝露による MT-I,-II の誘導合成は起りにくいことが知られている<sup>14)</sup>。今回、両マウス間に明確な神経行動毒性に対し顕著な感受性に違いが見られなかった理由に MT-I,-II に対するメチル水銀の親和性や誘導合成能力が考えられる。しかしメチル水銀曝露は脳において酸化ストレスを引き起こすことが *in vivo* や *in vitro* の実験で報告されている<sup>15),16)</sup>。これに対し、MT の生理的機能の一つに抗酸化作用がある。脳内には MT は、I,II 型のほかに III 型の存在が知られており<sup>17)</sup>、MT(-/-)マウス

の脳 の 総 MT 量 は MT(+/+) に 比 べ 低 値 で あ る 。 胎 生 期 の メ チ ル 水 銀 曝 露 は MT(-/-) マ ウ ス の 探 索 行 動 や 情 動 性 に MT(+/+) マ ウ ス よ り も 行 動 影 響 が 見 ら れ 、 空 間 学 習 能 力 は む し ろ MT(+/+) マ ウ ス に 影 響 が 認 め ら れ た 。 こ れ ら の 両 マ ウ ス 間 の メ チ ル 水 銀 に よ る 行 動 性 の 違 い は 脳 の 各 部 位 に よ る 水 銀 蓄 積 や MT 濃 度 が 関 係 し て い る か も 知 れ ない 。

#### E. 引用文献

- 1) Harada, Y. (1968) Congenital (or fetal) Minamata disease. In: Kusuna M (ed) Minamata disease. Kumamoto University, Japan pp 93-117.
- 2) Bakir, F., Damluji, S.F., Amin-Zaki, L., Murtadha, M., Khalidi, A., Al-Raw, N.Y., Tikkriti, S., Dhahir, H.I., Smith, J.C., Clarkson, T.W. & Doheety, R.A. (1973) Methylmercury poisoning in Iraq. Science 181, 230-241.
- 3) Cherian, M.G. and Goyer, R.A.(1978) Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity. Life Sci. 23, 1-10.
- 4) Webb, M. and Cain, K. (1982) Function of metallothionein. Biochem. Pharmacol. 31, 137-142
- 5) Yoshida, M., Ohta, H., Yamauchi, Y., Seki, Y., Sagi, M., Yamazaki, K., Sumi, Y., 1998. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. Biological Trace Element Research. 63, 167-175.
- 6) Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D.(1994) Targeted disruption of metallothionein I and II genes increases sensitivity to cadmium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 584-588.

- 7) Michalska, A. and Choo, K.H.A. (1993) 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.
- 8) Goulet S, Dore FY, and Mirault ME. (2003) Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol Teratol.* 25:335-47.
- 9) Kim CY, Nakai K, Kasanuma Y, and Satoh H.(2000) Comparison of neurobehavioral changes in three inbred strains of mice prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol.* 22:397-403.
- 10) Cox C., Clarkson T.W., Marsh D.O., S. Amin-Zaki., Tikriti, S. and Myers G.G. (1989) Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methylmercury: an application of single compartment model to single-strand hair analysis. *Environ. Res.* 49:318-332.
- 11) Burbacher T.M, Rodier P.M. and Weiss B. (1990) Methylmercury developmental neurotoxicity: a comparison of effects in humans and animals, *Neurotoxicol Teratol.* 12:191-202.
- 12) Skamoto M., Kakita A., Wakabayashi K., Takahasi H., Nakano A. and Akagi H. (2002) Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res.* 949:51-59.
- 13) Yoshida M., Watanabe C., Satoh M., Yasutake A., Sawada M., Ohtsuka Y., Akama Y. and Tohyama C. (2004) Susceptibility of metallothionein-null mice to the behavioural alteration

caused by exposure to mercury vapor at human-relevant concentration. *Toxicol. Sci.* (in submit)

- 14) Yasutake, A., Nakano, A. and Hirayama, K. (1998) Induction by mercury compounds of brain metallothionein in rats: Hg exposure induces long-lived brain metallothionein. *Arch. Toxicol.* 72, 187-191.
- 15) Yee S, and Choi BH. (1994) Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp Mol Pathol.* 60:188-96.
- 16) Shanker G, and Aschner M. (2003) Methylmercury-induced reactive oxygen species formation in neonatal cerebral astrocytic cultures is attenuated by antioxidants. *Brain Res Mol Brain Res.* 110:85-91.
- 17) Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y. and Tomonaga, Y. (1991) The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein like protein. *Neuron* 7, 337-347.