

測定微量元素を増やし、PND10以降の臓器中微量元素の変動も調べ、臓器中の微量元素の変動を修飾する因子を同定していくことが今後の課題として挙げられる。

#### 引用文献

1. Olivares M, Uauy R. 1996. Copper as an essential nutrient. *Am J Clin Nutr* 63:791-796.
2. Vallee BL, Falchuk KH. 1983. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118.
3. Smeyers-Verbeke J, May C, Drochmans P, Massart DL. 1977. The determination of Cu, Zn, and Mn in subcellular rat fraction. *Anal Biochem.* 83:746-753.
4. Vallee BL, Coleman JE, Auld DS. 1991. Zinc fingers, zinc clusters, and zinc twists in DNA-binding protein domains. *Proc Natl Acad Sci.* 88:999-1003.
5. Keen CL, Lonnerdahl B, Hurley LS. Teratogenic effects of copper deficiency and excess. In: Sorenson JRJ (ed), *Inflammatory Diseases and Copper*, Human Press, Clifton, New Jersey. Pp 106-121.
6. Morgan RF, O'Dell BL. 1977. Effect of copper deficiency on the concentrations of catecholamines and related enzyme activities in the rat brain. *J Neurochem* 28:207-213.
7. Feller DL, O'Dell BL. 1980. Dopamine and norepinephrine in discrete areas of the copper-deficient rat brain. *J Neurochem* 34: 1259-1263.
8. Dipaola RV, Kanfer JN, Newberne PM. 1974. Copper deficiency and central nervous system myelination in the rat: Morphological and biochemical studies. *J Neuropathol Exp Neurol* 33:226-236.
9. Zimmerman AW, Matthieu J-M, Quarles RM, Brady RO, Hsu JM. 1976. Hypomyelination in copper-deficient rats. *Arch Neurol* 33:111-119.
10. Hurley LS, Swenerton H. 1966. Congenital malformations resulting from zinc deficiency in

- rats. Proc Soc Exp Biol Med 123:692-697.
11. Sandsted HH, Gillespie DD, Brady RN. 1972. Effect on brain of the suckling rats. *Pediatr Res* 6:119-125.
  12. Beach RS, Gershwin ME, Hurley LS. 1980. Growth and development in postnatally zinc-deprived rats. *J Nutr* 110:201-211.
  13. Hassan MA, al-Awqati MA, Issac D, Yadav GK, Bahman MA. 1990. Free amino acids, copper, iron and zinc composition in sera of patients with thyrometabolic diseases. *Horm Metab Res* 22:117-120
  14. Saner G, Savasan S, Saka N. 1992. Zinc metabolism in hypothyroidism. *Lancet* 340:432-433.
  15. Sharper RE, Keen CL, Hurley LS, Zeman FJ. Hematologic and trace element alterations following chronic maternal ingestion of propylthiourea. *Exp Hematol* 10:44-55.
  16. Prasad R, Kumar V, Kumar R, Singh KP. 1999. Thyroid hormones modulate zinc transport activity of rat intestinal and renal brush-border membrane. *Am J Physiol* 276:774-782.
  17. McNabb FMA. 1992. *Thyroid Hormones*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ.
  18. Oppenheimer JH, Schwartz HL. 1997. Molecular basis of thyroid hormone-dependant brain development. *Endocr Rev* 18:462-475.
  19. Nagasaka A, Hidaka H. 1976. Effect of antithyroid agents 6-propyl-2thiouracil and 1-methyl-2-mercaptoimidazole on human thyroid iodine peroxidase. *J Clin Endocrinol Metb.* 43:152-158.
  20. Cooper DS, Kieffer JD, Saxe V, Mover H, Ridgway EC. 1984. Methimazole pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *Endocrinology* 114:786-793.
  21. Marchant B, Brownlie BE, McKay-Hart D, Horton PW, Alexander WD. 1997 The placental transfer of propylthiouracil, methimazole and carbimazole. *J Clin Endocrinol*

- Metab 45:1187-1193.
22. Kampmann JP, Johansen K, Hansen JM, Helweg J. 1980 Propylthiouracil in human milk: Revision of Dogma. *Lancet* 1:736-738.
  23. Tegler L, Lindström B. 1980 Antithyroid drugs in milk. *Lancet* 2:591.
  24. Johansen K., Andersen AN, Kampmann JP, Hansen JM, Mortensen HB. 1982. Excretion of methimazole in human milk. *Eur J Clin Pharmacol* 23:339-341.
  25. Cooper DS, Bode HH, Nath B, Saxe V, Maloof F, Ridgway EC. 1984. Methimazole pharmacology in man: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *J Clin Endocr Metabo* 58:473-479.
  26. Hanlon DP, Shuman S. 1975. Copper ion binding and enzyme inhibitory properties of the antithyroid drug methimazole. *Experientia* 31:1005-1006.
  27. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V. 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35:35-70.
  28. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Gasparini N, Orlando F, Stecconi R, Muzzioli M, Isani G, Carpena E. 2002. Metallothioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mech Ageing Dev* 123:675-94.

表 1. マウスの出産日、一腹あたりの産子数、食殺数

dose [% (w/v)]	n <sub>1</sub>	delivery date			litter size	n <sub>2</sub>	killings
		19	20	21			
0.000	5	0	5	0	7.6±2.1	0	0.0±0.0
0.008	4	3	1	0	10.0±2.0	0	0.0±0.0
0.025	4	2	2	0	8.5±1.0	1	0.3±0.5
0.080	4	0	2	2	5.8±3.0	3	2.5±2.1*

n<sub>1</sub> 各群の匹数

n<sub>2</sub> 食殺を起こした匹数

Mean±SD

\* 対照群 (0.000%) との有意差 (p<0.01 (Dunnett) )

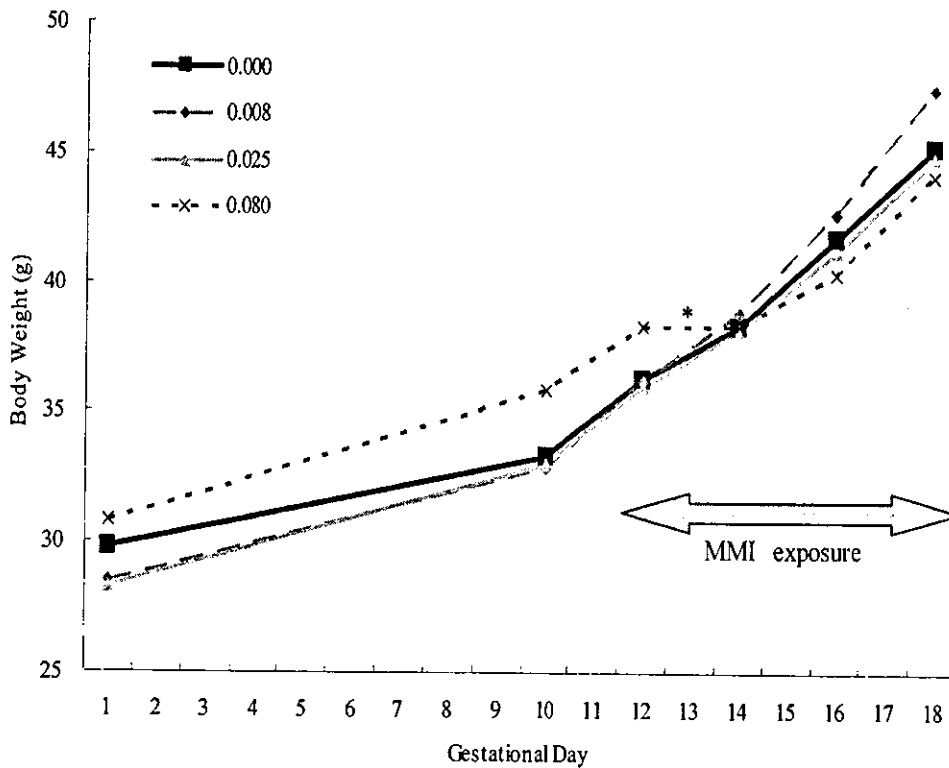


図 1. 妊娠マウスの体重変化

GD12 から GD18 までの体重増加量で群間に有意差 (p<0.05) があった。

MMI 投与後 2 日間の体重増加の群間差 (p<0.01) があった。

\* 対照群 (0.000%) との有意差 (p<0.05 ; Dunnett)

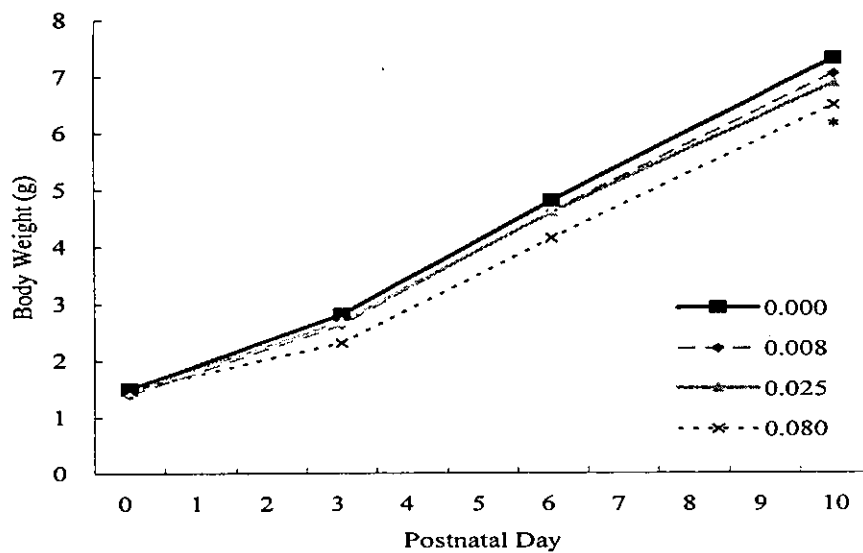


図2. 新生仔の体重変化

ANOVA (PND10) :  $p < 0.05$

\* 対照群 (0.000%) との有意差 ( $p < 0.05$ ; Dunnett)

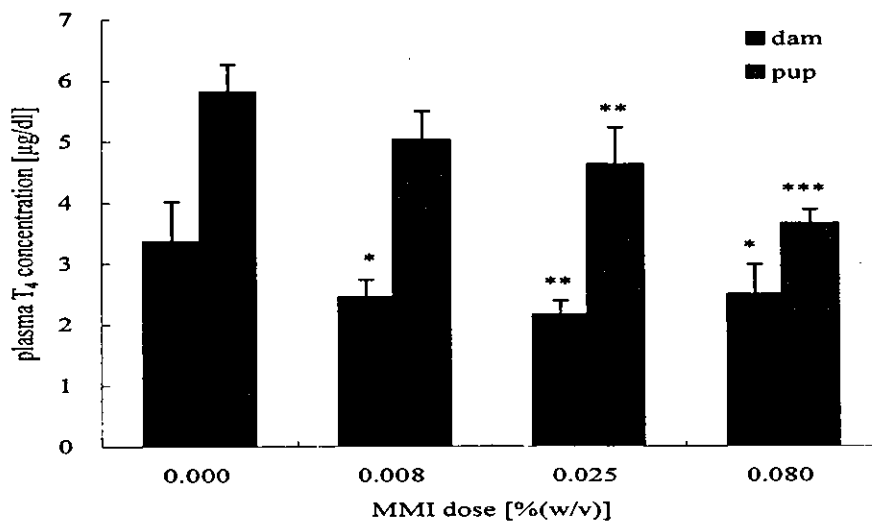


図3. 血漿中 T<sub>4</sub> 濃度

ANOVA: dam:  $p < 0.01$ , pup  $p < 0.001$

\* 対照群 (0.000%) との有意差 ( $p < 0.05$ ; Dunnett)

\*\* 対照群 (0.000%) との有意差 ( $p < 0.01$ ; Dunnett)

\*\*\* 対照群 (0.000%) との有意差 ( $p < 0.001$ ; Dunnett)

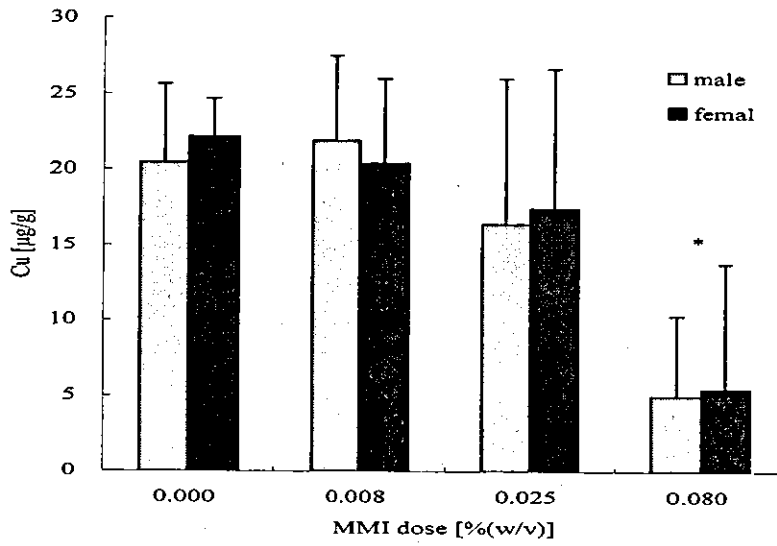


図4 仔マウスの肝の組織中銅濃度

ANOVA dose;  $p < 0.0001$ , sex; n.s., dose\*sex; n.s.

\* 対照群 (0.000%) との有意差 ( $p < 0.000001$ ; Dunnett)

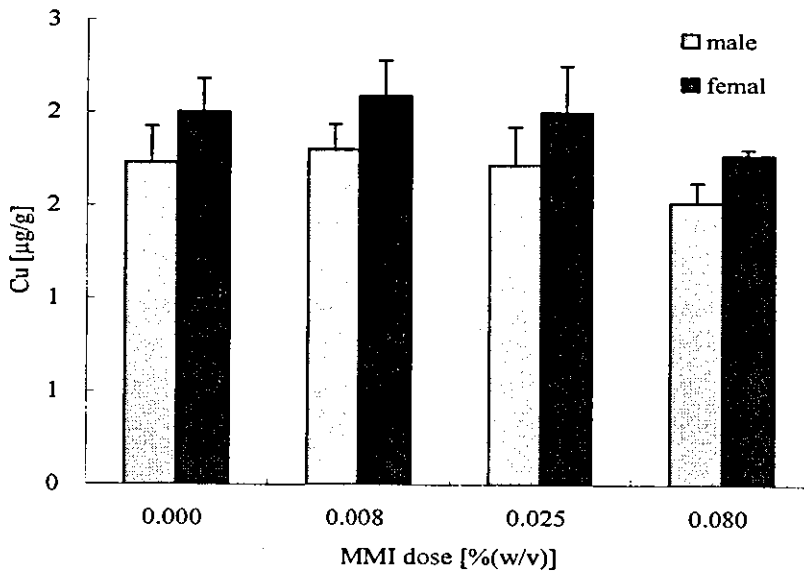


図5 仔マウスの腎の組織中銅濃度

ANOVA dose;  $p < 0.05$ , sex;  $p < 0.05$ , dose\*sex; n.s.

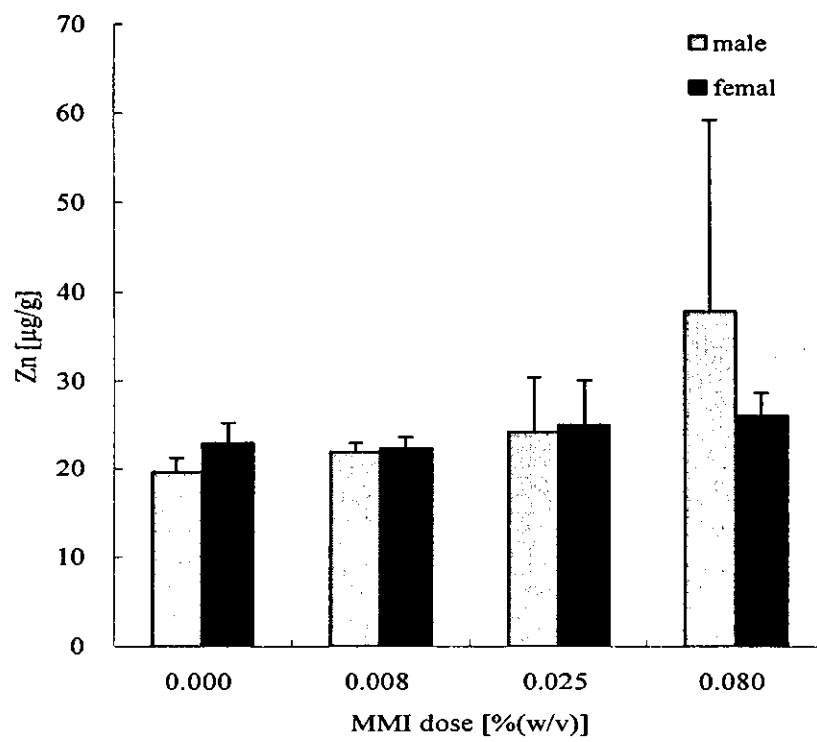


図6 仔マウスの腎の組織中亜鉛濃度

ANOVA dose;  $p < 0.05$ , sex; n.s., dose\*sex; n.s.

## II. 分担研究報告

### 1. 長期低濃度水銀曝露の行動影響に関する研究 (吉田稔)

- (1) 長期低濃度水銀曝露の行動影響に関する研究
- (2) 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
- (3) 胎生期の水銀蒸気曝露による神経行動毒性に対する遺伝的要因による影響
- (4) 胎生期のメチル水銀曝露による神経行動毒性に対する  
加齢と遺伝的要因の影響
- (5) 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



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

長期低濃度水銀曝露の行動影響に関する研究

分担研究者 吉田稔 聖マリアンナ医科大学化学助教授

**研究要旨** 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。メタロチオネイン I / II 欠損マウス (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障害は 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られた。

**研究目的**

水俣病やイタイイタイ病などが国の公害病には重金属がその原因とされているものが多く、最近では水銀 (Hg)、ヒ素、カドミウムおよび鉛などの金属汚染が地球規模的な環境問題となっている<sup>1)</sup>。特に歯科用アマルガムから発生する水銀蒸気<sup>2)</sup>、アマゾン川の金採掘に伴う水銀汚染並びに中国における有機化学工業内での水銀曝露やその周辺地域の水銀汚染による水銀中毒が大きな問題となっている。しかも、水銀は環境ホルモン様作用 (内分泌かく乱作用) を有することが知られており、長期間の低濃度水銀蒸気曝露による生殖器や胎児への影響が懸念されている。

本研究では、微量長期にわたるメチル水銀曝露のリスク評価において、特に感受性の高い時期を考慮すること、感受性を高めると考えられる諸要因の影響を推定すること、の2つによって、

リスク評価の精度をあげることが最終的な目的である。メチル水銀曝露のリスク評価において攪乱要因となり得る環境因子は数多いが、ある意味では最も直接的に関連するのが無機水銀との相互作用である。メチル水銀は体内に取り込まれたあとで、その一部が非常にゆっくりながら脱メチル化されて無機水銀を生ずることがわかっている。このため、無機水銀の曝露があれば、両者は相加的に作用することが考えられる。ヒトにおける無機水銀への曝露源としては、水銀蒸気への曝露がほとんどであり、非職業的には喫煙、歯へのアマルガム充填、呼吸による大気中水銀の吸入によって曝露され、このほかに水銀鉱山作業員、歯科医、蛍光灯あるいは水銀体温計などの工場作業員に曝露の可能性がある。このような経路で取り込まれた水銀蒸気は、体内で速やかに酸化されて無機水銀イオンの形となるが、これはメチル水銀が脱メチル化された形でもある。また、メチル水銀と無機水銀イオンとは、生体分子との相互作用という分子レベルでは類似した点が多く、両者が相加的に作用するものと思われる。現在の日本において、職業的曝露のない人における水銀蒸気への曝露はそれほど大きいものではないが、毒性が問題となるメチル水銀のレベルも極めて低いことを考えると、水銀蒸気の影響も無視し得ない。

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>。我々はヒト組織中のメタロチオネインを調べたところ、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<sup>5)</sup>。このような集団が一般環境から長期にわたり水銀やカドミウムなどの曝露を受けた場合の生理的レベルでのメタロチオネインの生体防御機構としての役割については不明である。このことを解明するには、人の健康リスクを考える上で重要であると考えられる。

最近、Michalska & Choo<sup>6)</sup>や Master et al.<sup>7)</sup>によってメタロチオネイン-Iおよび-II遺伝子欠損マウスが制作された。本研究は、低濃度の長期の水銀蒸気に対する生理的レベルのメタロチオネインの役割について、メタロチオネイン遺伝子欠損マウスを用いて解明することにある。とくに水銀蒸気の標的臓器である脳にはメタロチオネイン-Iおよび-II以外にメタロチオネイン-IIIの存在が確認されているが、その生理的役割については全く不明である。そこで今回はメタロチオネイン遺伝子欠損マウスを用いて、水銀蒸気曝露後の水銀の脳への影響、及び水銀の影響を

行動学そして病理学の立場から検索し、メタロチオネインの生理的な役割について検討した。

### 3. 実験方法と材料

#### I 試薬

- Potassium Permanganate 過マンガン酸カリウム  $\text{KMnO}_4=158.03$ .....和光純薬工業株式会社
- Sulfuric Acid 硫酸  $\text{H}_2\text{SO}_4=98.08$ ..... 和光純薬工業株式会社
- Hydroxyl ammonium Chloride 塩化ヒドロキシルアンモニア  $\text{HONH}_3\text{Cl}=69.49$ .....和光純薬工業株式会社
- Tin(II) Chloride Dihydrate 塩化第一スズ  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}=225.65$ .....和光純薬工業株式会社
- Mercury(II) Chloride 塩化水銀(II)  $\text{HgCl}_2=271.50$ .....和光純薬工業株式会社
- 0.1mol/l Sodium Hydroxide Solution 0.1mol/l 水酸化ナトリウム  $\text{NaOH} = 40.00$  ..... 和光純薬工業株式会社
- Ethanol エタノール  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}=46.07$ .....和光純薬工業株式会社
- Diethyl ether ジエチルエーテル  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OC}_2\text{H}_5=74.12$ .....和光純薬工業株式会社
- 10% Formalin Neutral Buffer Solution 10% 中性緩衝ホルマリン液 (pH7.4)..... 和光純薬工業株式会社
- Perchloric Acid(60%) 過塩素酸(60%)  $\text{HClO}_4=100.46$ .....和光純薬工業株式会社
- Nitric Acid(1.38) 硝酸(1.38)  $\text{HNO}_3=63.01$ .....和光純薬工業株式会社
- 2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール(トリスアミノメタン)  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3=121.14$ ..... 和光純薬工業株式会社
- Hydrochloric Acid 塩酸  $\text{HCl}=36.46$ .....和光純薬工業株式会社
- Diethyl Maleate(DEM) マレイン酸ジエチル  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OCOCH}:\text{CHCOOC}_2\text{H}_5=172.18$ .....和光純薬工業株式会社

- ・ Cadmium Chloride 塩化カドミウム  $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  = 228.34.....和光純薬工業株式会社
- ・ ALBUMIN, CHIKEN EGG (Ovalbumin).....シグマ株式会社
- ・ Trichloroacetic Acid (TCA) トリクロロ酢酸  $\text{CCl}_3\text{COOH}$  = 163.39.....和光純薬工業株式会社

## II 実験方法

### (1) 動物

OLA129/C57/BL6 系雌マウスの 8 週齢を実験に供した。

水銀曝露群には野生型 (MT(+/+)) マウス 14 匹そして MT 欠損型 (MT(-/-)) マウス 16 匹を使用した。対照群には野生型マウス 5 匹そして MT 欠損マウス 5 匹を使用した。

### (2) 水銀曝露

野生型 (MT(+/+)) マウス 14 匹そして MT 欠損型 (MT(-/-)) マウス 16 匹を水銀曝露装置内入れ、水銀蒸気濃度  $0.03 \sim 0.2 \text{mg/m}^3$  で、1 日 8 時間、5 ヶ月間連日曝露を行った。曝露装置内の水銀濃度は過マンガン酸カリ-硫酸溶液によって水銀蒸気を捕集し、その後還元気化-原子吸光法で測定した。図 1 には曝露期間中の水銀濃度の変化を示す。

## 装置および操作方法

### 1. 水銀蒸気濃度の測定の原理

高感度還元気化水銀測定装置にはマーキュリー/RA-1 (日本インスツルメンツ株式会社) を用いて、水銀濃度を測定する。曝露装置内の水銀濃度は試料中の水銀蒸気を硫酸酸性、過マンガン酸溶液の酸化剤により酸化し、水銀を 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、電気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  $253.7 \text{nm}$  の波長における吸収を測定する。

### 2. Open field 試験の原理

Open field 装置は小原医科産業株式会社製を用いた（渡辺氏研究報告の写真1を参照のこと）。実験はネズミ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、個体の運動活動性、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みる上で、最も基本的な指標として応用されている。

### 3. 受動的回避（Passive avoidance）試験の原理

受動的回避（Passive avoidance）実験は小原医科産業株式会社製の装置を用いて行った（渡辺氏研究報告—写真2参照）。実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。

### 操作方法

#### ① 水銀蒸気曝露装置内の水銀濃度測定

・水銀蒸気捕集について

- 1) 水銀捕集溶液（0.6%  $\text{KMnO}_4$  10ml+3N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ）10ml をインピンジャーに入れ、流量計で 1l/min に合わせる。
- 2) 水銀蒸気曝露装置内の空気を 5min 捕集する。
- 3) 水銀を捕集した溶液に 25% 塩酸ヒドロキシアミン 2ml で無色透明にし、ミリポア水で 50ml に調製した。

・Hg 濃度測定について

- 1) ブランク測定：インピンジャーに硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バ

ブリングする。

- 2) 検量線作成：硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml+水銀 0.2ml or 0.4ml を入れ、通気バブリングする。
- 3) 水銀蒸気曝露装置内 Sample 測定：高感度還元気化水銀測定装置の感度を 1000ng にし、Sample 5ml+H<sub>2</sub>O 15ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングする。

## ② Open field test の操作方法

- 1) 室内の照明は消し、80 ルクスの照明のみで実験を行った。70%エタノールで装置内をきれいに拭く。
- 2) 装置の中央に筒を置き、20 秒間マウスを入れておく。
- 3) 20 秒後筒を取り、コンピューターを作動させる。
- 4) 10 分間行動を観察。
- 5) 試験終了後、マウスの臭いが残らないよう、装置内を 70%エタノールで拭く。

## ③ 受動的回避試験の操作方法

- 1) 室内の照明は消し、400 ルクスの照明を明箱の上にあてて実験を行った。  
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・尿のシートを置く。
- 2) 1 日目を訓練試行として実験を行い、2 日目を保持試行として
  - ① ギロチンドアをした状態で明箱にマウスを入れ(ギロチンドアと反対に向かせる)、ストップウォッチで 30 秒はかる。
  - ② ギロチンドアをとり、スタートボタンを押す。
  - ③ 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。
  - ④ conditioning データをとる。
  - ⑤ 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試験を開始する。

〈注意〉 1日目で conditioning データが 300 秒以上のマウスは試験に向いていない。

入った時点で試験を終了とする。

#### ④ 各種組織中 Hg 濃度測定方法

組織の灰化方法（腎臓：0.5~1.0g 肝臓・肺・脳：1.0~5.0g 摘出）

①各種臓器を 10ml 試験管に入れ、1:3(過塩素酸:硝酸)の混酸を 1ml 加える。

②試験管にセラミックボールで蓋を行ったのち、ヒーティングブロックで 100℃、1 時間加熱する。

③氷水で冷却した後、H<sub>2</sub>O で 10 ml に調製する。

#### Hg 濃度測定方法

①ブランク測定：インピンジャーに硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングする。

②検量線作成：硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml+水銀 0.25ml or 0.50ml を入れ、通気バブリングする。

③水銀蒸気曝露装置内 Sample 測定：高感度還元気化水銀測定装置の感度を 1000ng にし、Sample 5ml~10ml+H<sub>2</sub>O 15ml~10ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングする。

#### ⑤各種組織中 MT 濃度測定方法

##### 試料の調製

① 5%(w/v)Homogenate(各種臓器 0.12~0.28g 摘出)。

各種臓器+その 19 倍量の 0.1M Tris-HCl Buffer を 30 秒ずつ Homogenate(speed6)する。

② diethylmale(DEM)10 μl を加え、室温で約 20 分間放置する。

③ 10mM CdCl<sub>2</sub> 50 μl を加え、室温で約 5 分間放置する。

④ 3 分間、100℃の熱湯で加熱する。

⑤ 軽く mixing した後、水道水で冷却する。

- ⑥ 3000rpm,800G で 10 分間遠心分離する。
- ⑦ 上清
- ⑧ 1mM HgCl<sub>2</sub> を 100 μl 加え、室温で約 10 分間放置する。
- ⑨ 1mM Ovalbumin 1.0ml を加え、25% TCA 0.5ml(w/v)を加えた後、冷水で約 20 分間放置する。
- ⑩ 3500rpm,800G で 10 分間遠心分離する。
- ⑪ 上清を採取する
- ⑫ 上清 1ml を 10ml 試験管に入れ、1:3(過塩素酸:硝酸)の混酸を 1ml 加える。
- ⑬ 試験管にセラミックボールでふたをし、ヒーティングブロックで 100℃,1h 加熱する。
- ⑭ 氷水で冷却した後、H<sub>2</sub>O で 10ml に調製したのち、水銀を測定する。

#### Hg 濃度測定方法

- ① ブランク測定：インピンジャーに硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングする。
- ② 検量線作成：硫酸(1+20) 20ml+塩化第一スズ溶液 1ml+水銀 0.25ml or 0.50ml を入れ、通気バブリングする。
- ③ 水銀蒸気曝露装置内 Sample 測定：高感度還元気化水銀測定装置の感度を 1000ng にし、Sample 5ml~10ml+H<sub>2</sub>O 15ml~10ml+塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングする。

#### 4. 実験結果

図 1 には水銀蒸気曝露 5 ヶ月間における対照群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウス 及び 曝露群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスの体重の推移を示した。

体重は観察期間中、対照群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間には差異は認められなかった。曝露群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間には差異は認められなかった。しかし対照群と曝露群とを比較したとき、水銀蒸気曝露 1 週目より MT(+ / +)マウス及び MT(- / -)マウスの体重に有意差が認められた。



## (1) Open field test の結果について

### 「水銀曝露後 3 ヶ月後の結果」

図 2 には、水銀蒸気曝露 3 ヶ月後における対照群の MT(+ / +)マウス、MT(- / -)マウス 及び 曝露群の MT(+ / +)マウス、MT(- / -)マウスの open field test での移動時間と総移動距離を示した。

移動時間は対照群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)の間には差異は認められなかった。しかし、曝露群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間に有意な差異が認められた。また対照群と曝露群とを比較したとき、両者の移動時間に有意差が認められた。しかしながら、MT(- / -)マウスでは対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。これに対し、総移動距離は MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスともに対照群に比べ、曝露群で高まっていた。

図 3 には、水銀蒸気曝露 3 ヶ月後における MT(+ / +)マウスの対照群と曝露群の open field test での毎分の移動距離を示した。そして図 4 には MT(- / -)マウスの対照群と曝露群の open field test での毎分の移動距離を示した。MT(+ / +)マウスでは、いずれの時間帯でも対照群に比べ、曝露群の値は高く、特に 1、2、5、6 分目の移動距離に有意差が認められた (図 3)。

MT(- / -)マウスにおいても 10 分目を除き、いずれも曝露群の移動距離の値は高く、しかも対照群と曝露群の間に 3、4、7 そして 9 分目に有意差が認められた。しかし、10 分目は逆に対照群が曝露群に比べ、有意に高い値を示した。

図 5 には、水銀蒸気曝露 3 ヶ月後における対照群と曝露群の MT(+ / +)マウスおよび MT(- / -)マウスの open field test における中心にいる割合を示した(% of center)。この値は探索行動時間を示すものである。

探索行動時間は対照群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)の間には差異は認められなかった。しかし、曝露群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間に有意な差異が認められた。また対照群と曝露群とを比較したとき、MT(+ / +)マウスの探索行動量に有意差が認められたが、MT(- / -)マウスでは対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。

## 「水銀曝露後 5 ヶ月後の結果」

図 6 には、水銀蒸気曝露 5 ヶ月後における対照群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウス 及び曝露群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスの open field test での移動時間と総移動距離を示した。移動時間は対照群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間には差異は認められなかった。しかし、曝露群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの方に有意な差異が認められた。また対照群と曝露群とを比較したとき、MT(+ / +)マウスの移動時間に有意差が認められた。しかしながら、MT(- / -)マウスでは対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。これに対し、総移動距離は MT(+ / +)マウスでは曝露群と対照群との間に有意差は認められなかったが、MT(- / -)マウスでは、対照群に比べ曝露群が曝露 3 ヶ月後同様に有意に高まっていた。

図 7 には、水銀蒸気曝露 5 ヶ月後における MT(+ / +)マウスの対照群と曝露群の open field test での毎分の移動距離を示した。そして図 8 には MT(- / -)マウスの対照群と曝露群の open field test での毎分の移動距離を示した。

MT(+ / +)マウスの対照群と曝露群の間では 4、6 そして 7 分目の移動距離に有意差が認められた。

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

MT(- / -)マウスの対照群と曝露群の間で 5、7 そして 9 分目の移動距離に有意差が認められた。

図 9 には、水銀蒸気曝露 5 ヶ月後における対照群と曝露群の MT(+ / +)マウスおよび MT(- / -)マウスの open field test における中心にいる割合を示した。

対照群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間には差異は認められなかった。しかし、曝露群では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの方に有意な差異が認められた。また対照群と曝露群とを比較したとき、MT(+ / +)マウスでは探索行動時間に有意差が認められた。しかしながら、MT(- / -)マウスでは対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。

## (2) Passive avoidance test の結果について

### 「水銀曝露後 3 ヶ月後の結果」

図 10 には、水銀蒸気曝露 3 ヶ月後における対照群と曝露群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスの passive avoidance test の訓練試行と翌日に行った保持時間の回避反応時間を示した。

訓練試行においては MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスともに対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。また MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスとの間に回避時間に差異は見られなかった。しかし、翌日行った保持試行では MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの対照群および曝露群ともに回避反応時間は有意に上昇した。しかし、曝露群において、MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの間に有意な差が認められた。

図 11 には、水銀蒸気曝露 5 ヶ月後における MT(+ / +)マウスおよび MT(- / -)マウスの対照群と曝露群での passive avoidance test の訓練試行の回避反応時間を示した。

曝露 5 ヶ月後の訓練試行において、MT(+ / +)マウスでは対照群と曝露群には差異は認められなかった。しかしながら、MT(- / -)マウスでは対照群と曝露群との間に差異は認められた。翌日に行った回避反応時間では、MT(+ / +)マウスでは対照群は全て観察時間 300 秒を超えた。曝露群でもほとんどのマウスが観察時間を越えた。MT(- / -)マウスにおいても対照群は全て観察時間 300 秒を超えた。曝露群でもほとんどのマウスが観察時間を越えており、両マウス共に対照群と曝露群との間に差異は認められなかった。

図 12 には、対照群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスにおける各種臓器中の水銀濃度を示した。

対照群の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスの間に臓器中水銀には有意差は認められなかった。

対照群の水銀濃度は両マウスともに腎臓が最も高く、次いで肝臓、肺、脳の順であった。

図 13 には、水銀曝露 5 ヶ月後の MT(+ / +)マウス, MT(- / -)マウスにおける各種臓器中の水銀濃度を示した。

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<sup>3),4)</sup>。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<sup>8), 9)</sup>。最