近、Michalska & Choo [6]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。Satoh 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/m^3, 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/m^3、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 ヵ月、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 ヶ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 ヶ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暴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 ヶ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関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 metallotionein 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

１０） 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

１１） 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

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

13) 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

14) 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

15) 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)

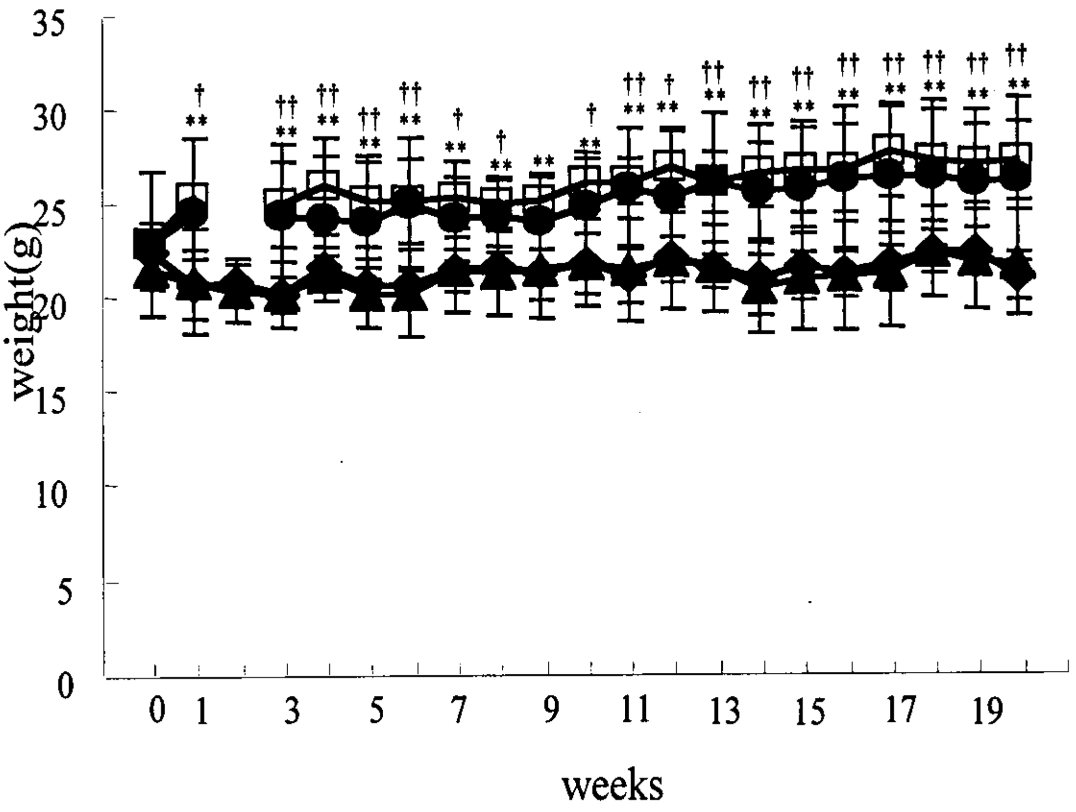
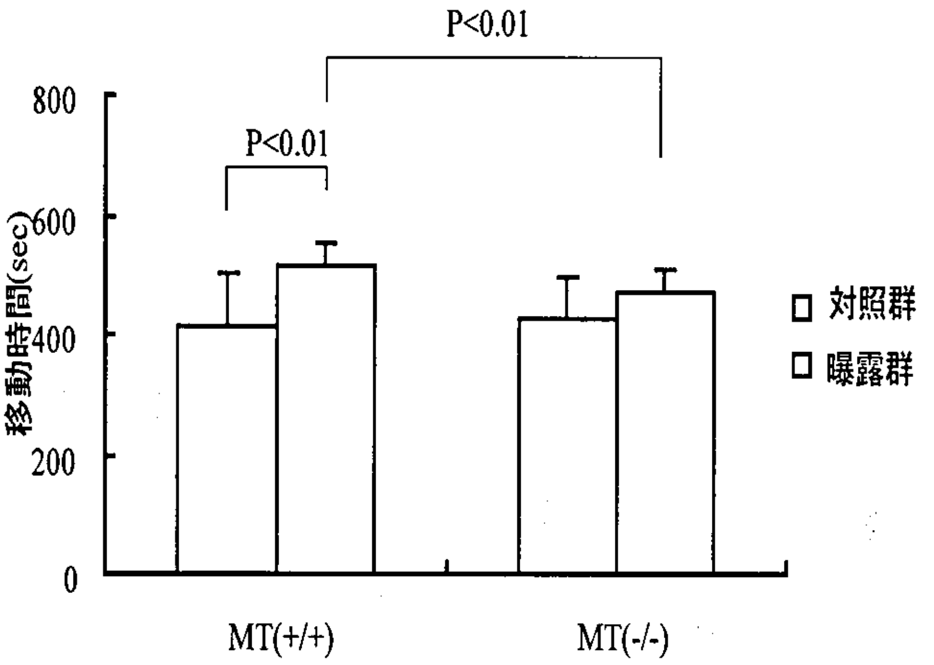


図２　曝露３ヶ月後の open field test の移動時間と総移動距離

左：移動時間、　右：総移動距離



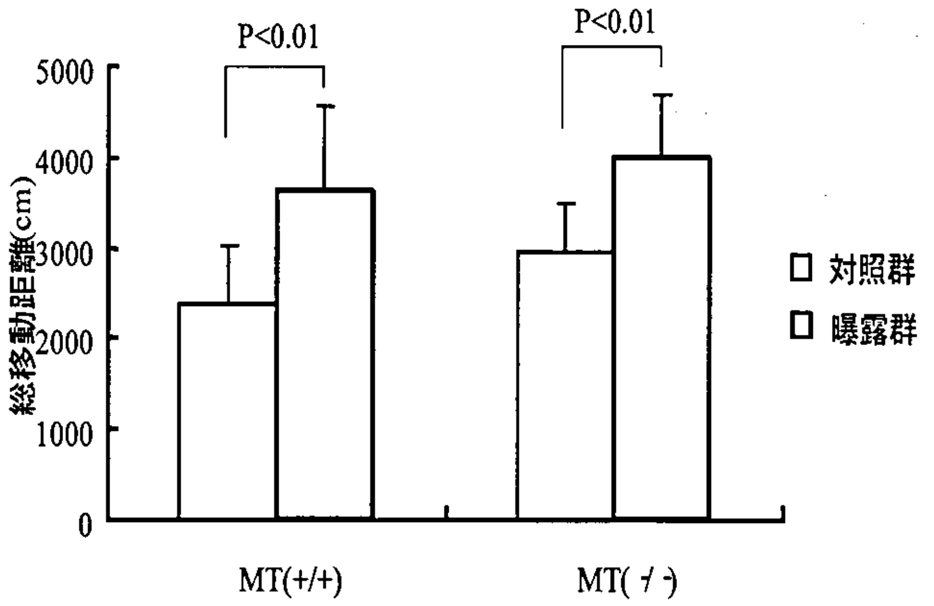


図３　曝露３ヶ月後の open field test の MT(+/+)マウスの移動距離

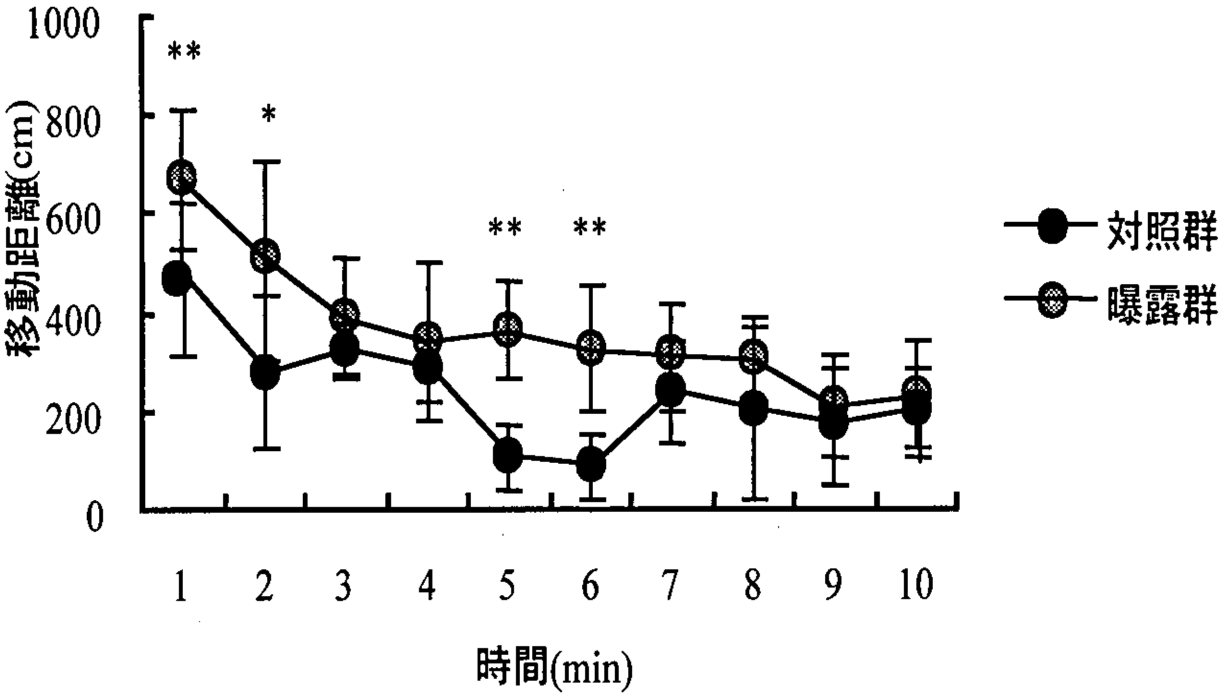


図４　曝露３ヶ月後の open field test の MT(−/−)マウスの移動距離

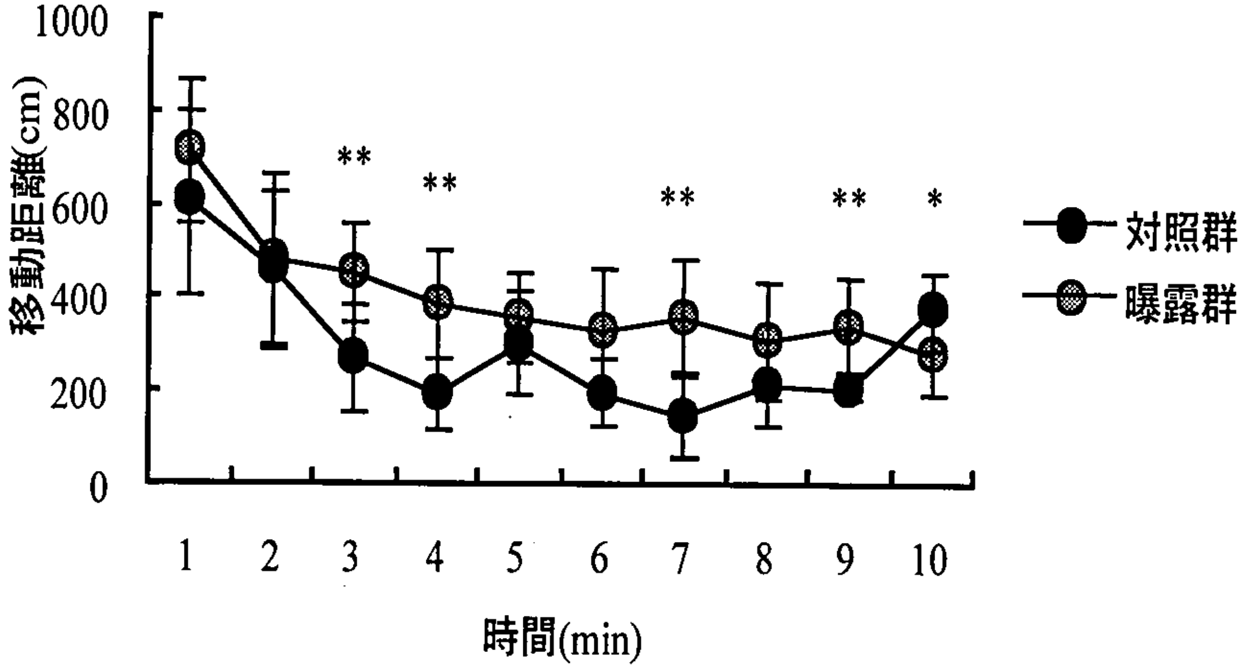


図５　曝露３ヵ月後における open field test の探索行動時間

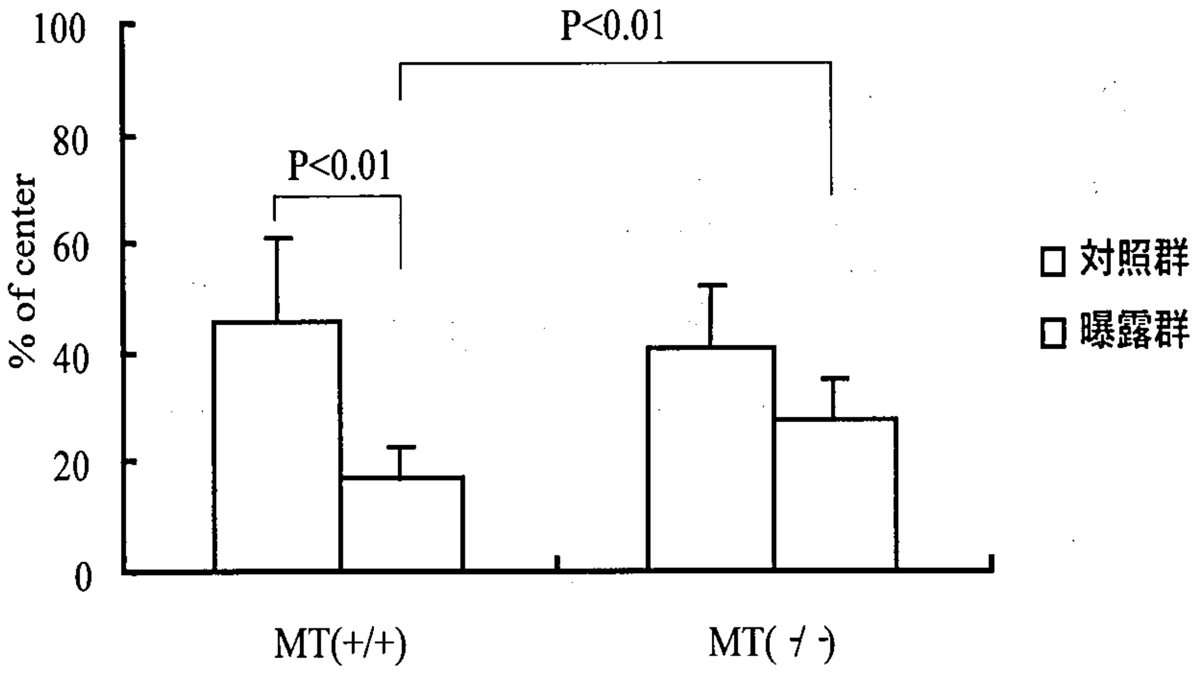
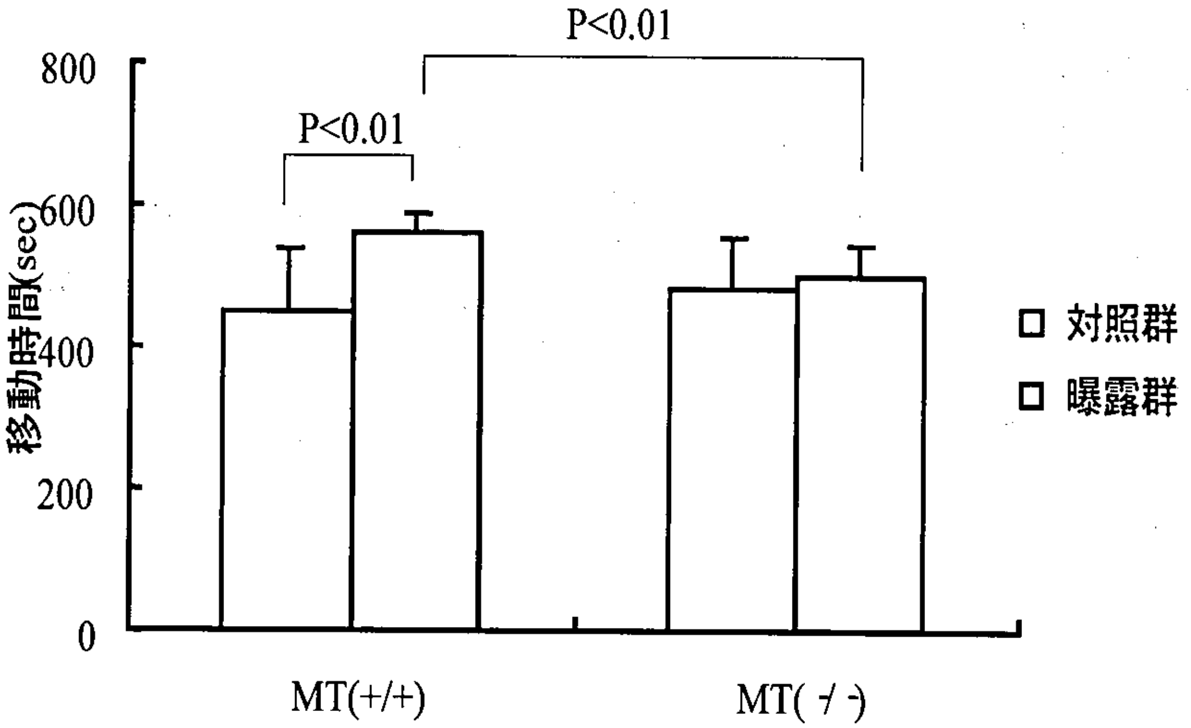


図６　曝露５ヶ月後の open field test の移動時間と総移動距離

（左：移動時間、右：総移動距離）



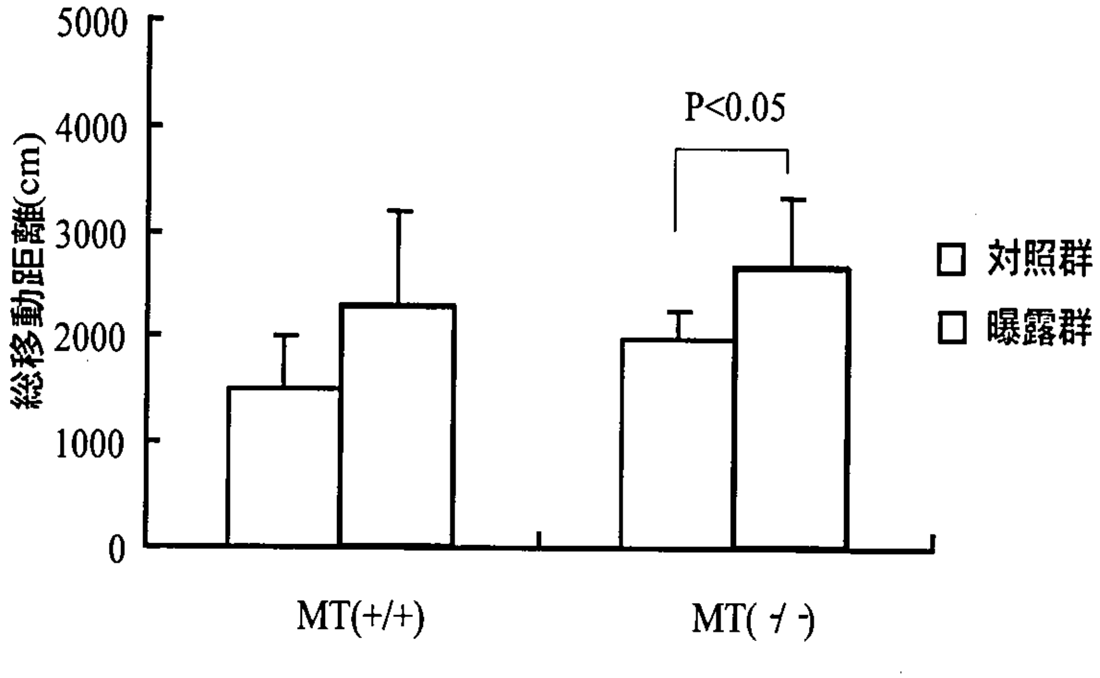


図７　曝露５ヶ月後の open field test の MT(＋/＋)マウスの移動距離

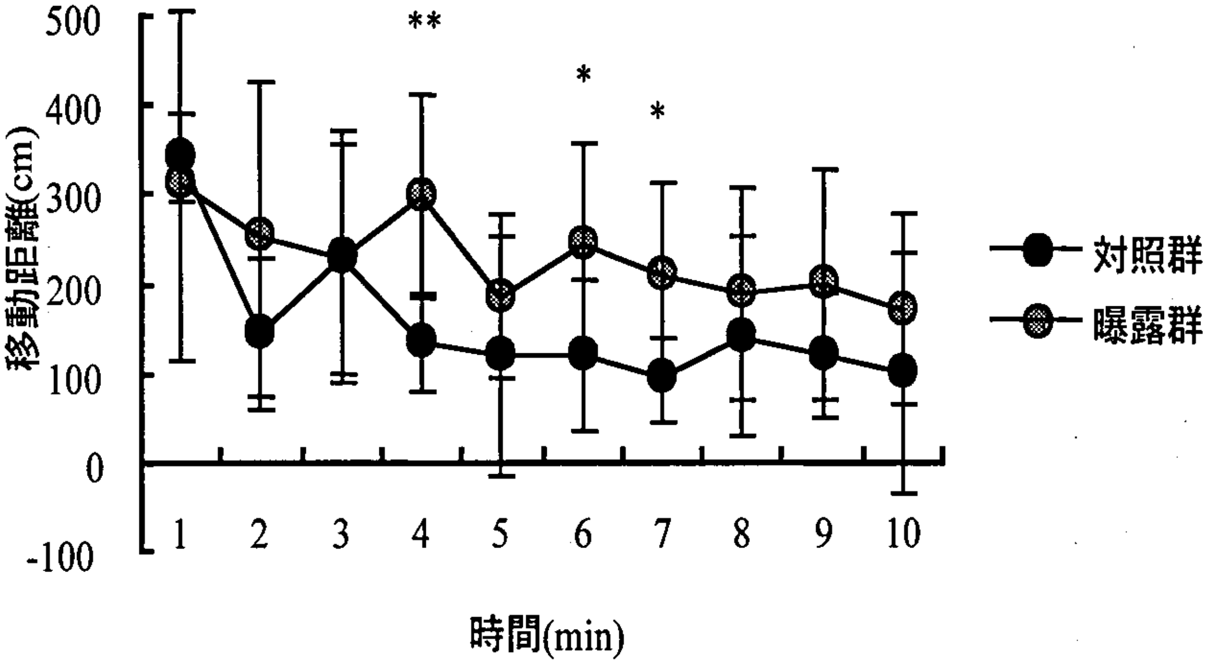


図８　曝露５ヶ月後の open field test：MT(−/−)マウスの移動距離

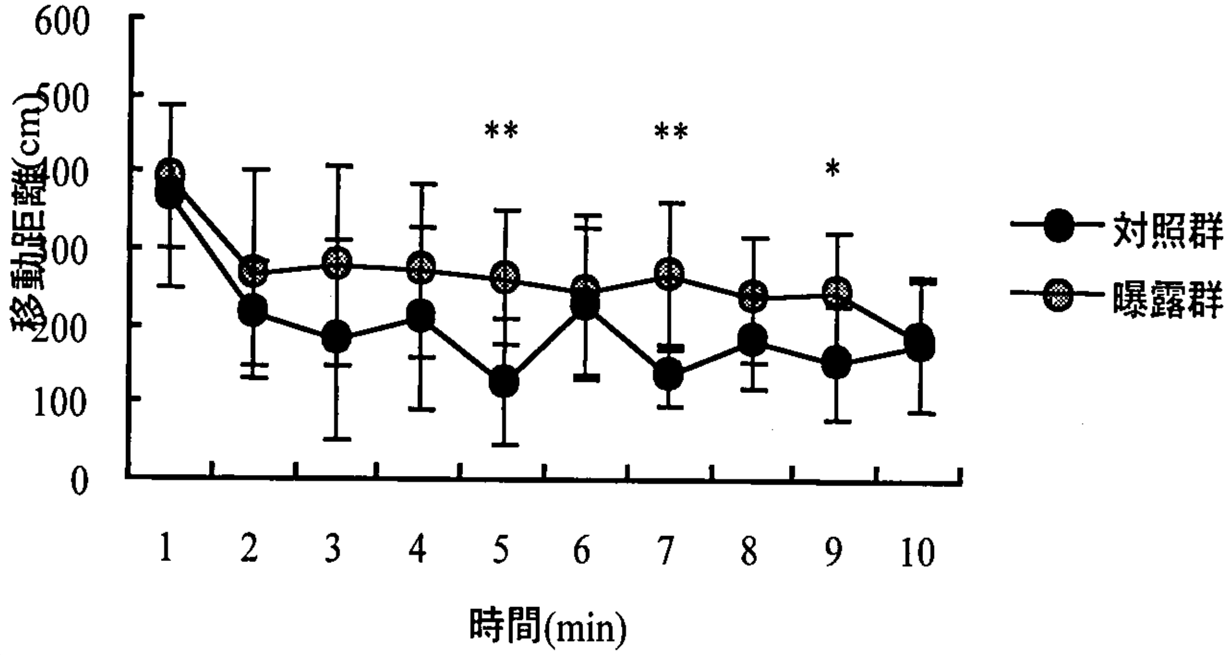


図９　曝露５ヵ月後における open field test の探索行動時間

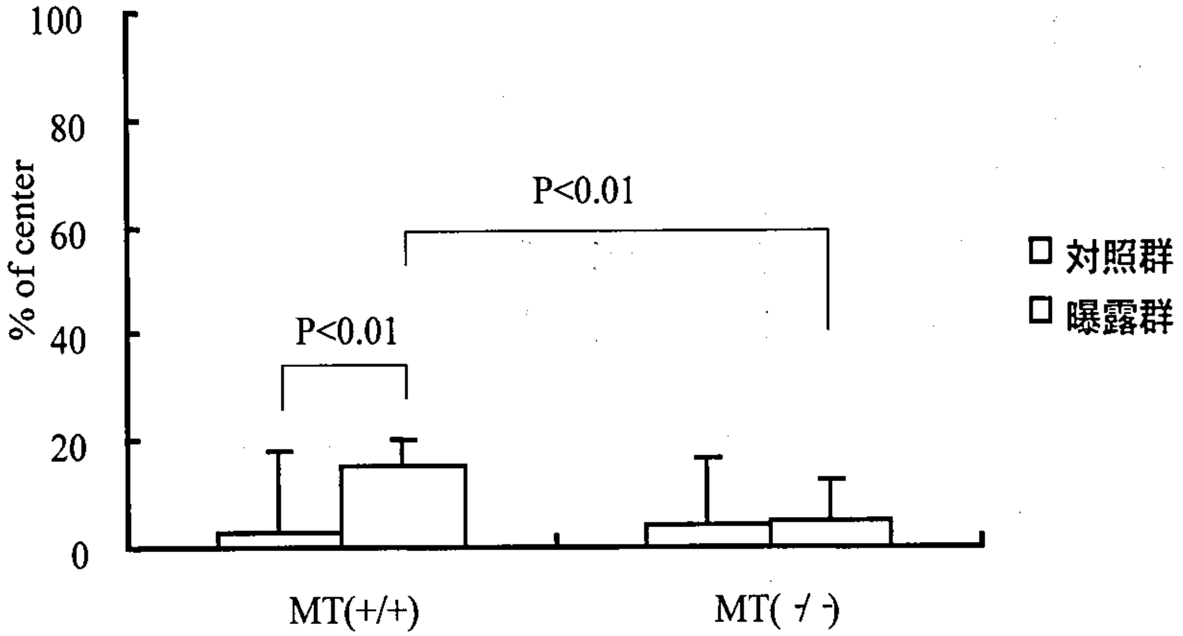
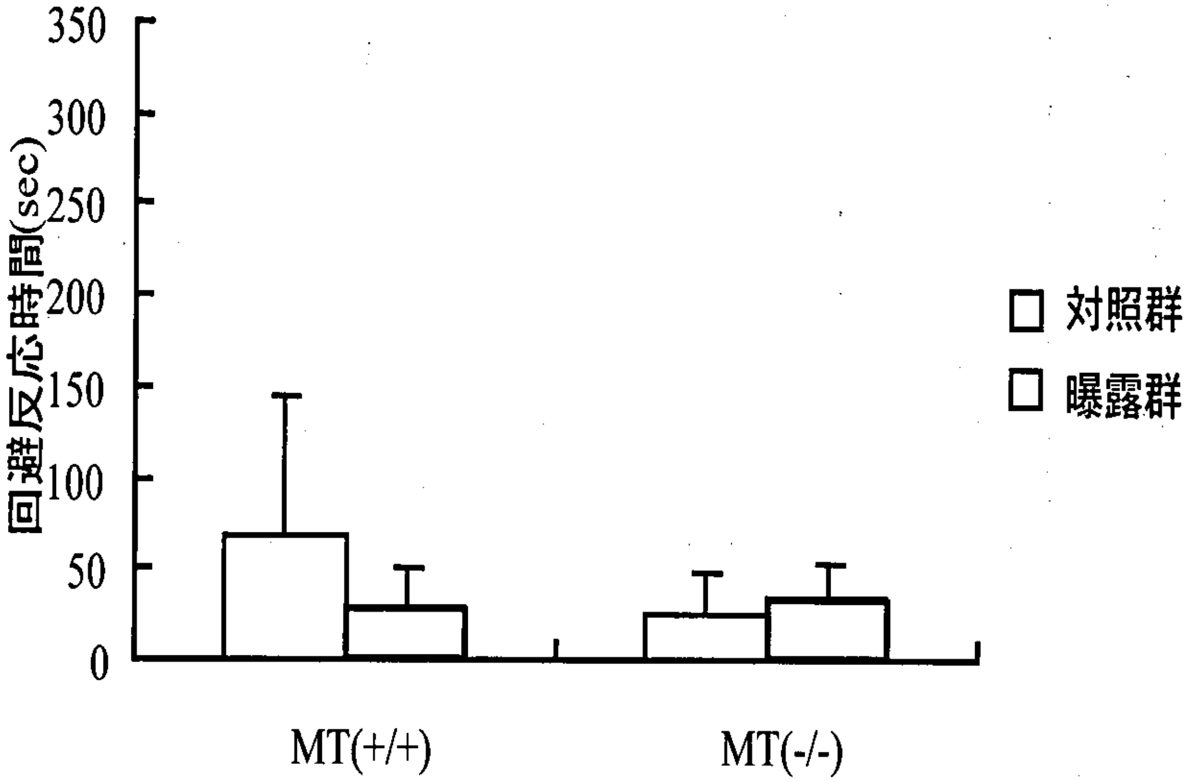


図 10　passive avoidance test　における回避反応時間



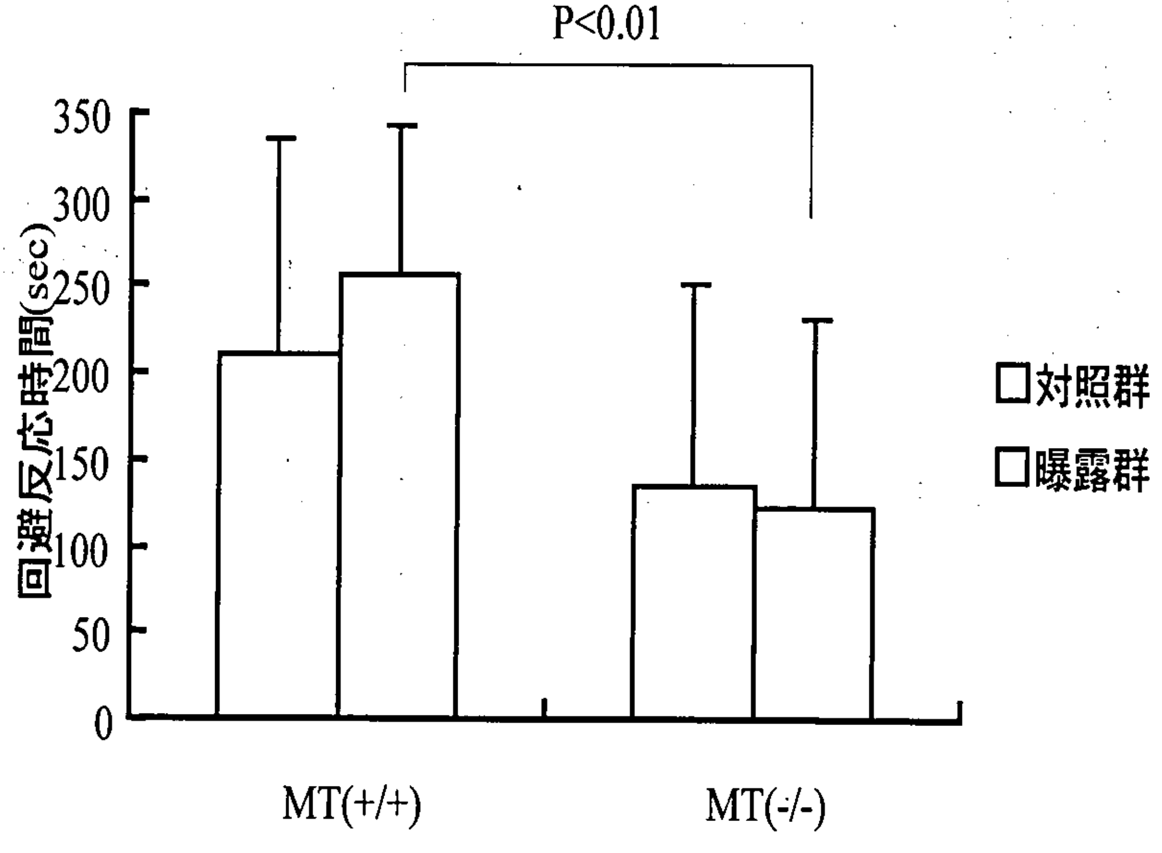


図 11　曝露後 5 ヵ月後の passive avoidance test　における回避反応時間

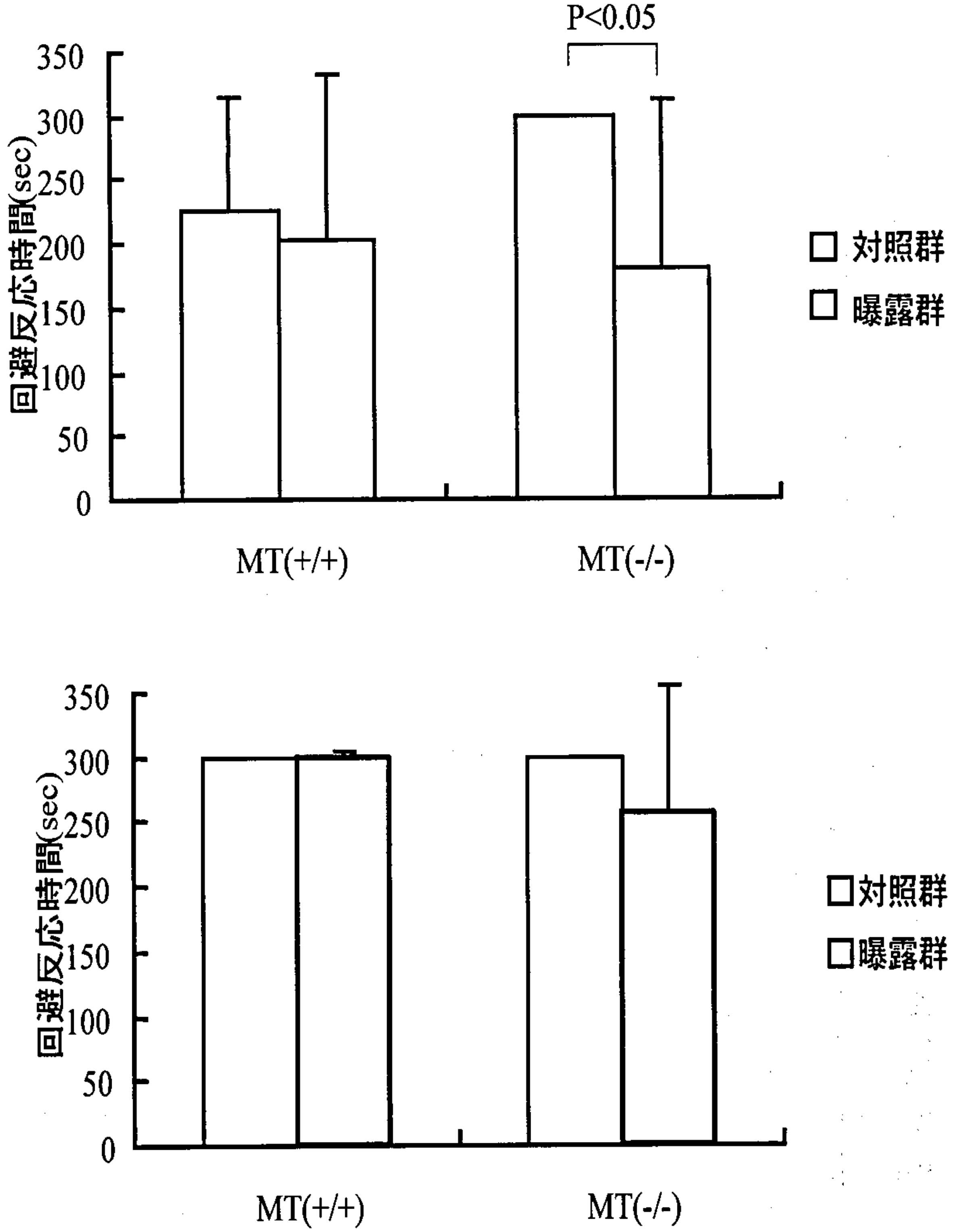


図 12　対照群の各種組織中の水銀濃度

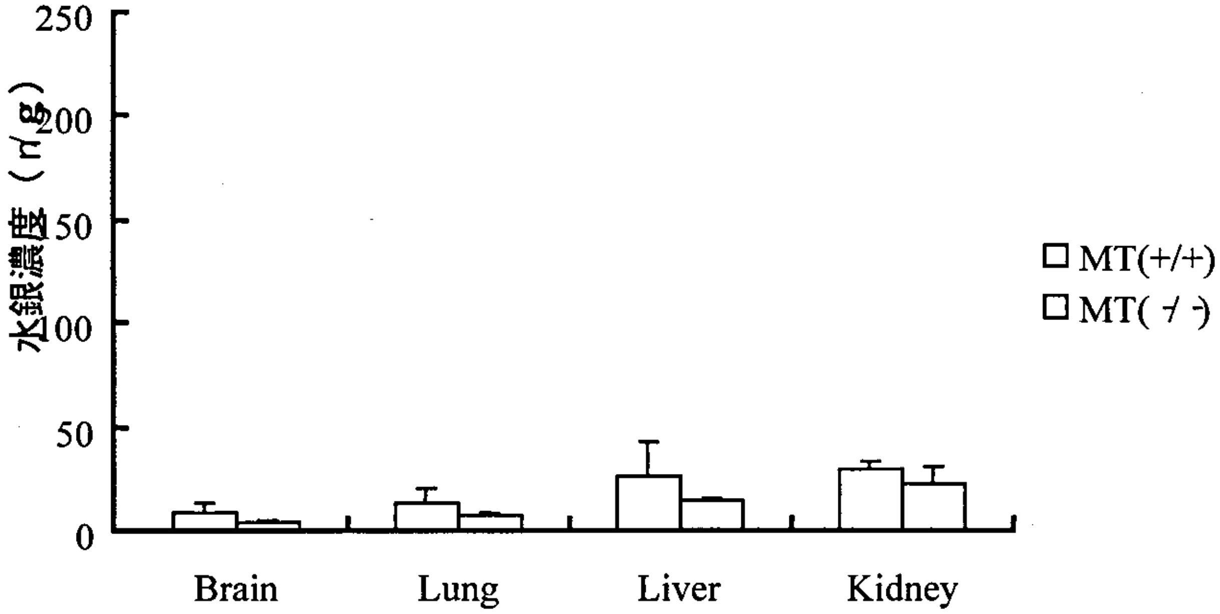
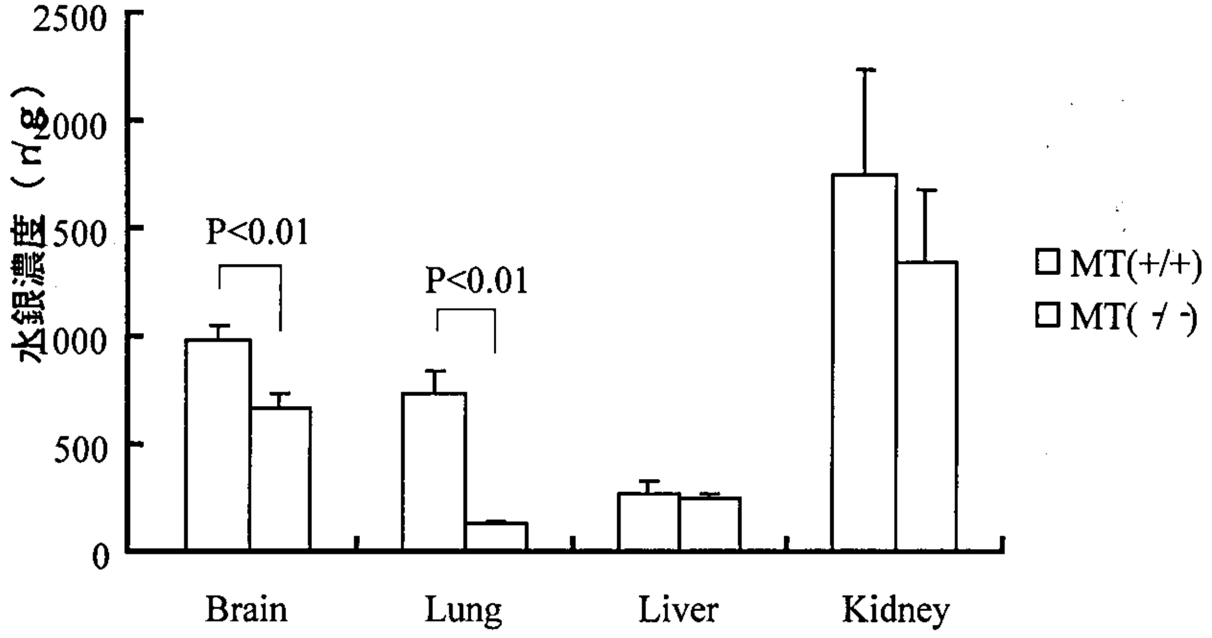


図 13　水銀曝露後の各種組織中の水銀濃度



厚生労働科学研究費補助金（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ッラ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。