

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^{1),2)}。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^{3),4)}。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⁵⁾、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^{6),7)}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、H₂O 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 5)。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 6)。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 (図 7)。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8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⁸⁾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⁹⁾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⁸⁾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、空間認知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¹⁰⁾。しかも臨床症状の発現の閾値は母親の毛髪 20ppm¹⁰⁾で、胎児の脳では 1ppm と推定されている¹¹⁾。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 μ g/g と 1 μ g/g を下回る値であった。Sakamoto ら¹²⁾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 μ g/g が出産 10 日目は約 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 μ 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¹³⁾。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¹⁴⁾。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^{15),16)}。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¹⁷⁾、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.

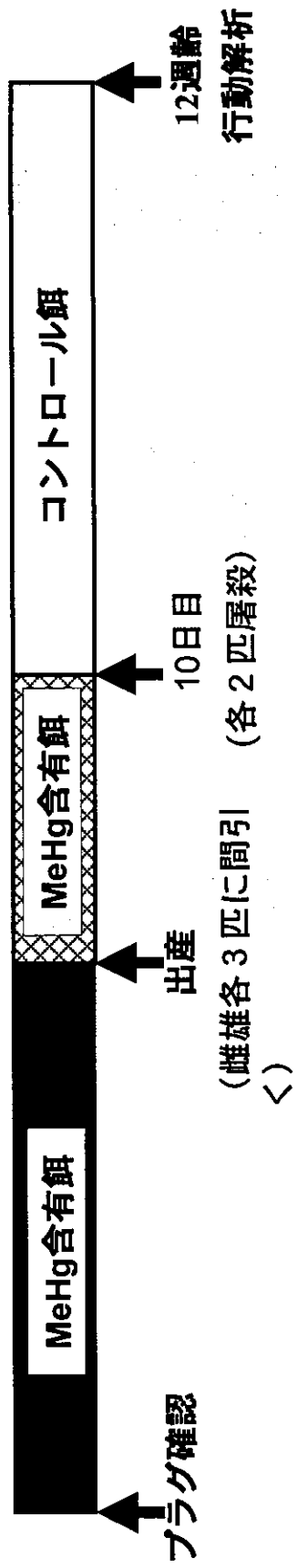


図1 実験デザイン

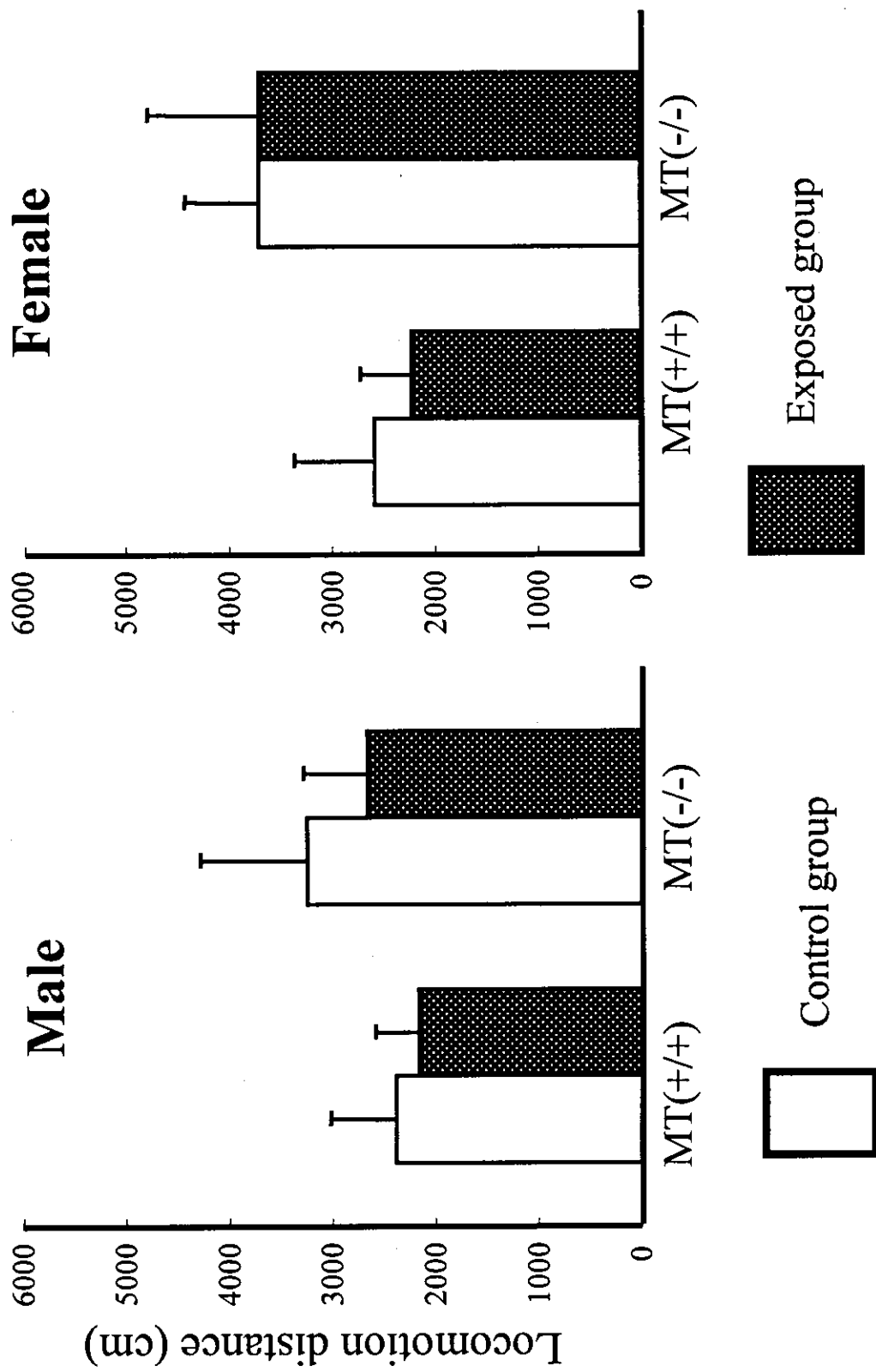


Figure 2. Effects of prenatal methylmercury exposure on the locomotor activity in the open field test

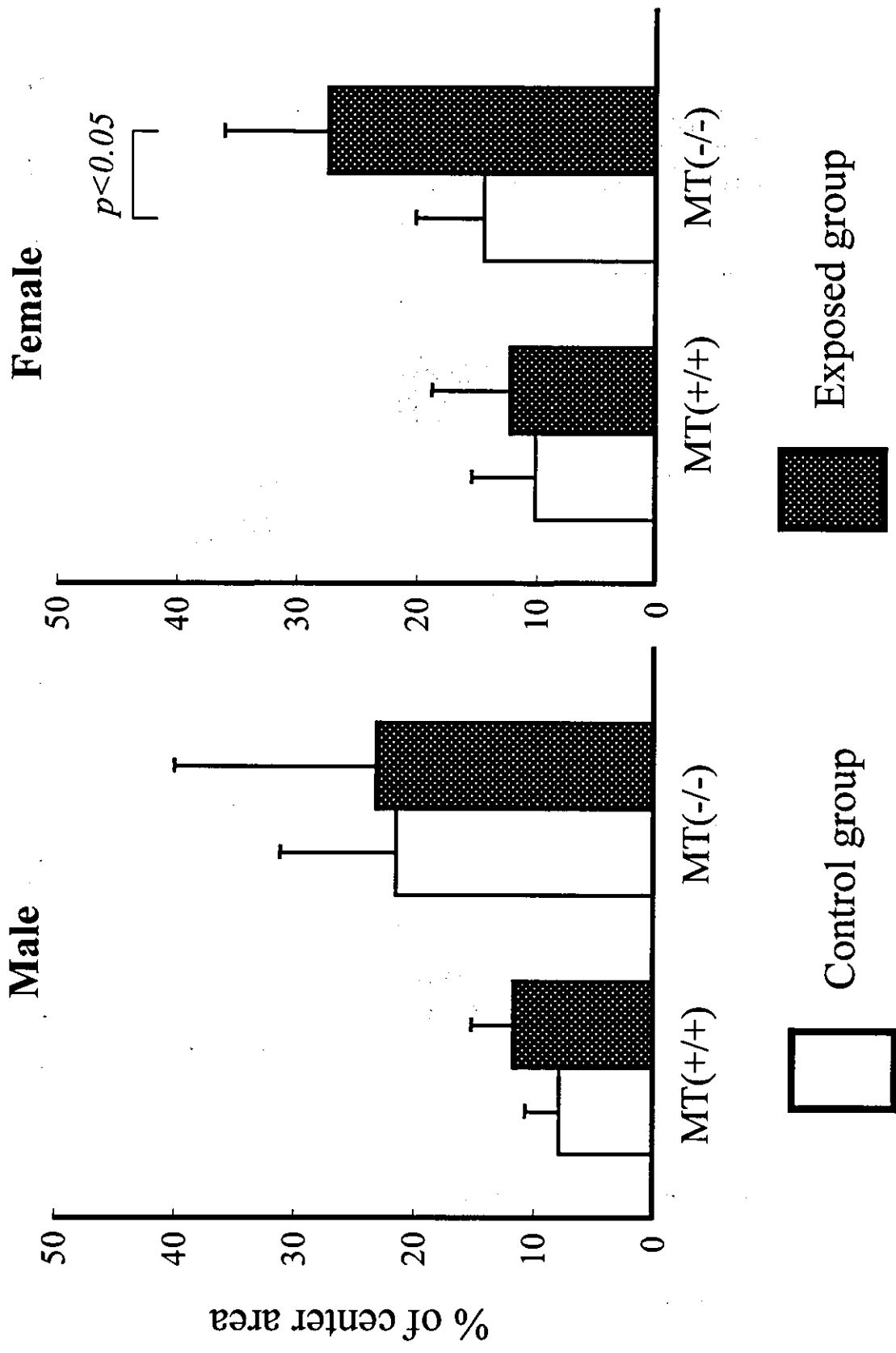


Figure 3. Effect of prenatal methylmercury exposure on the percentage of central entry in the open field test

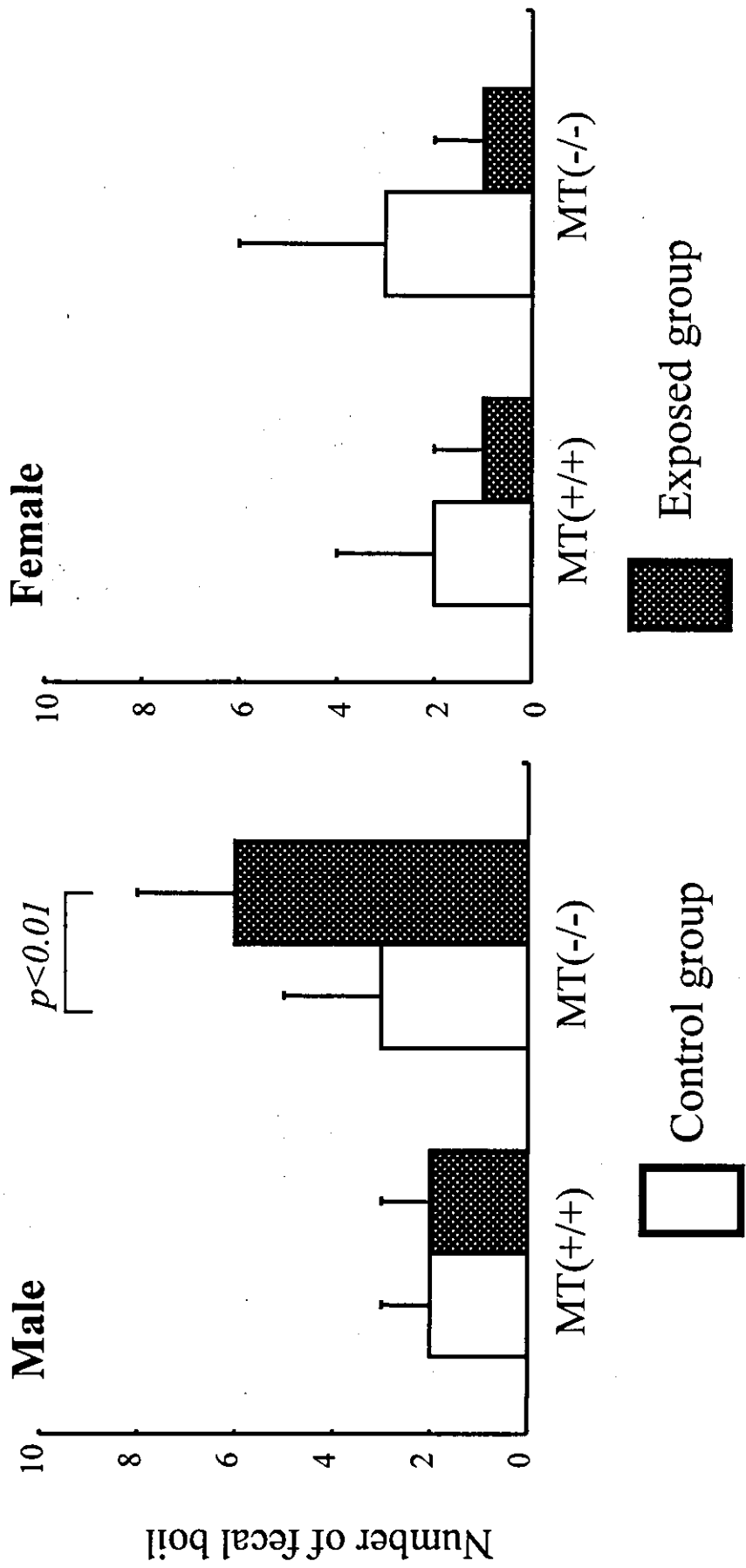


Figure 4. Effect of prenatal methylmercury exposure on defecation in the open field test

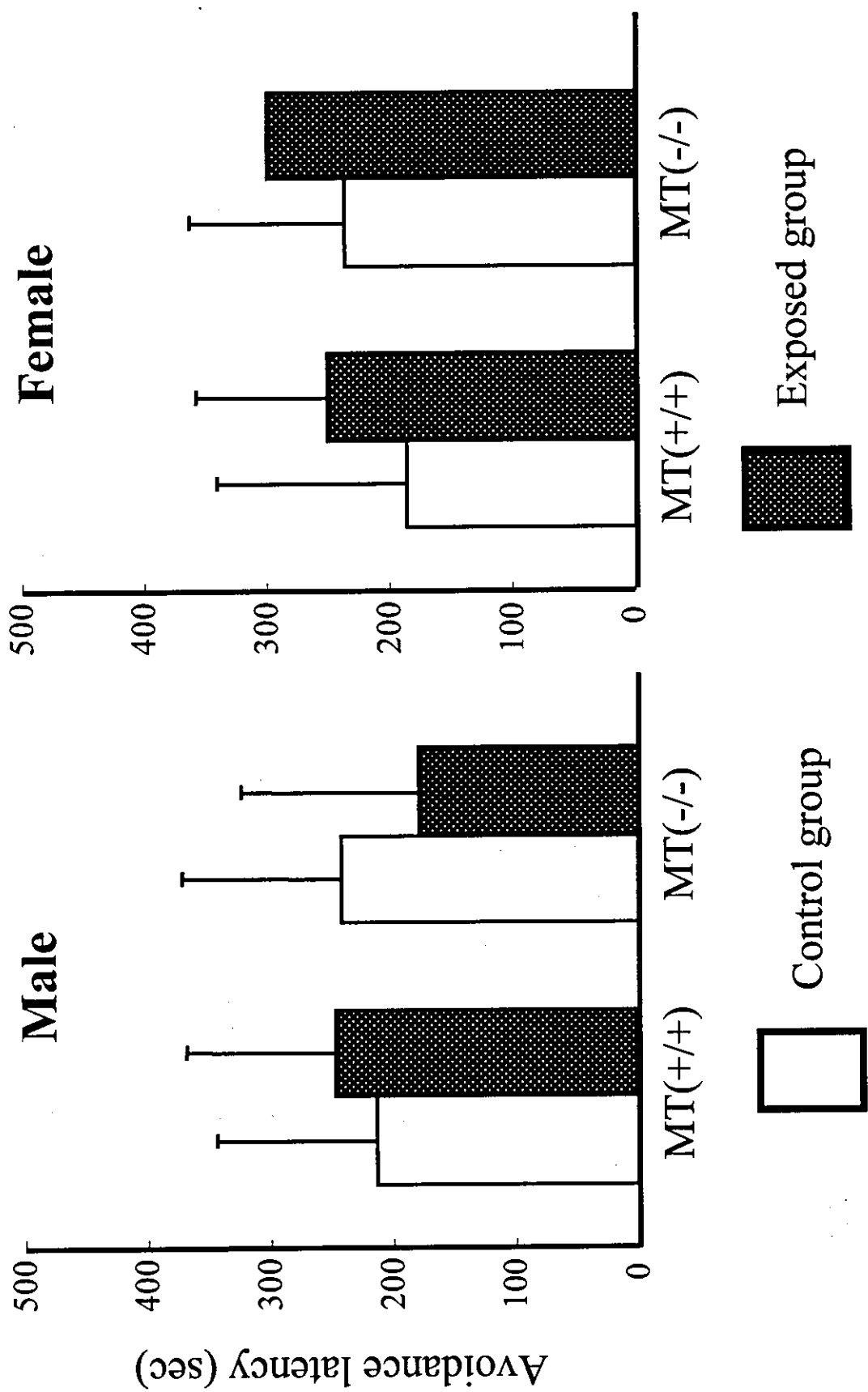


Figure 5. Avoidance latency in the memory retention trails with the passive avoidance test

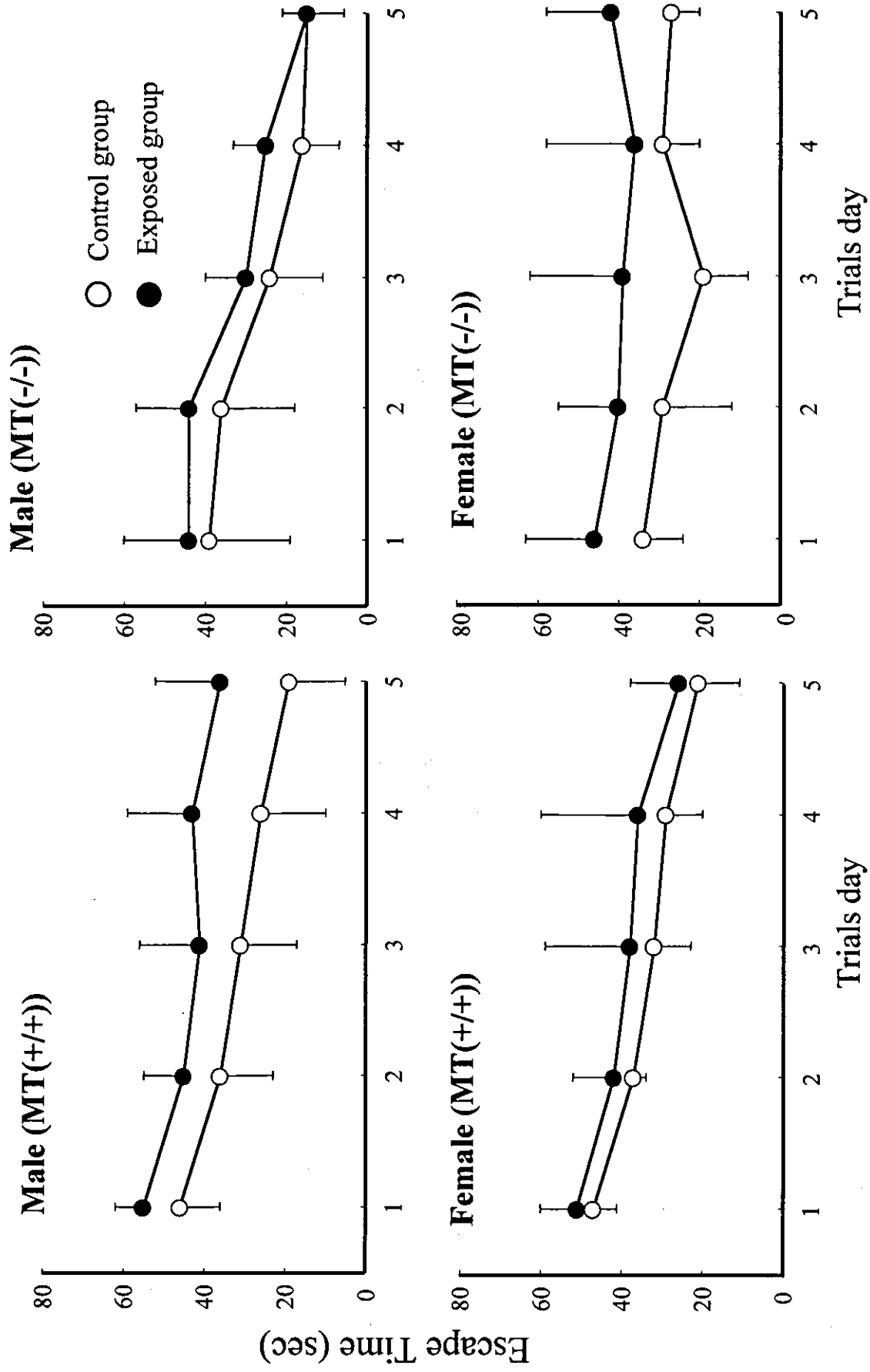


Figure 6. Effect of prenatal methylmercury exposure on latency in reacting the platform with Morris water maze for MT-null and wild type mice.

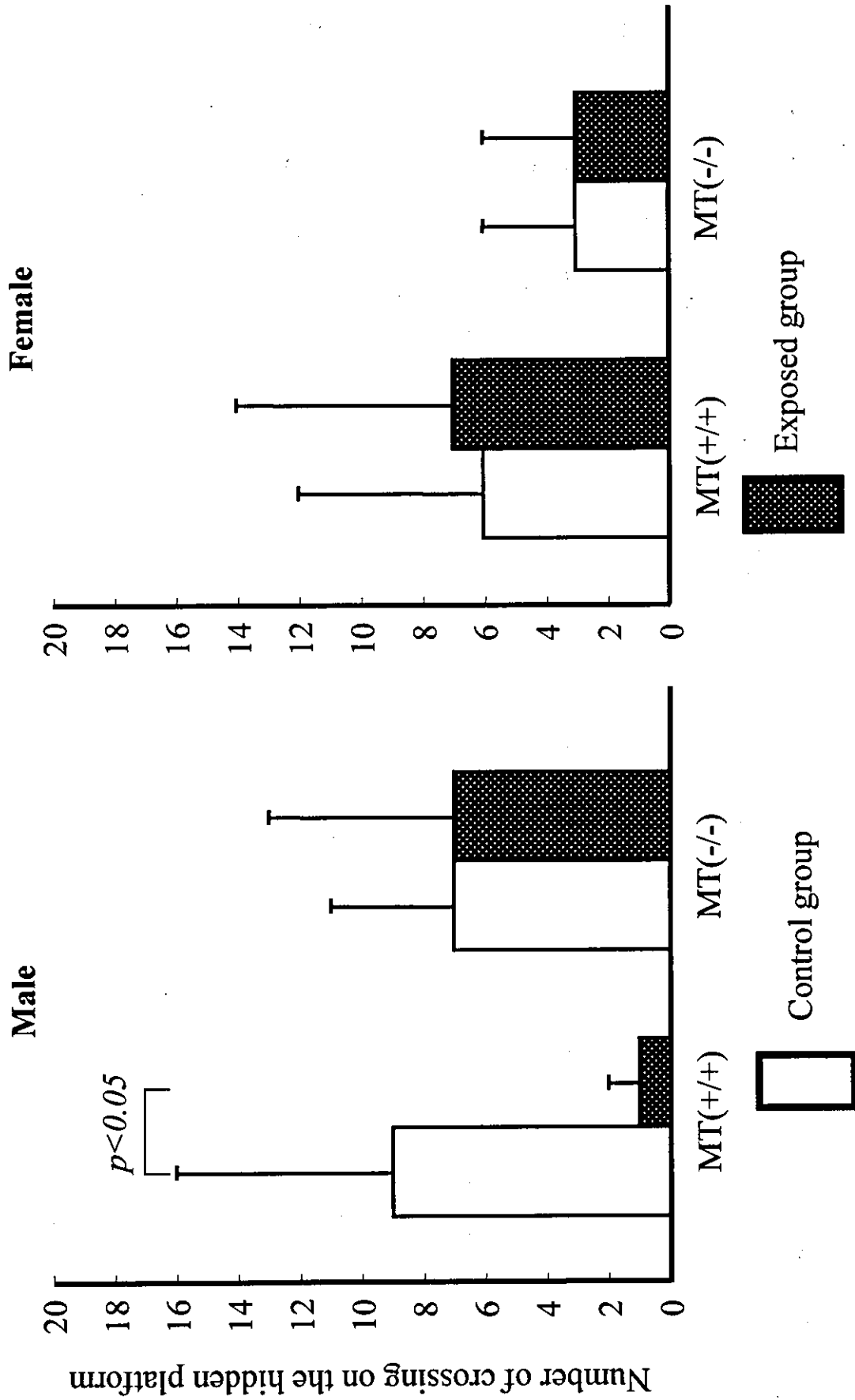


Figure 7. Effect of prenatal methylmercury exposure on spatial learning with Morris water maze.

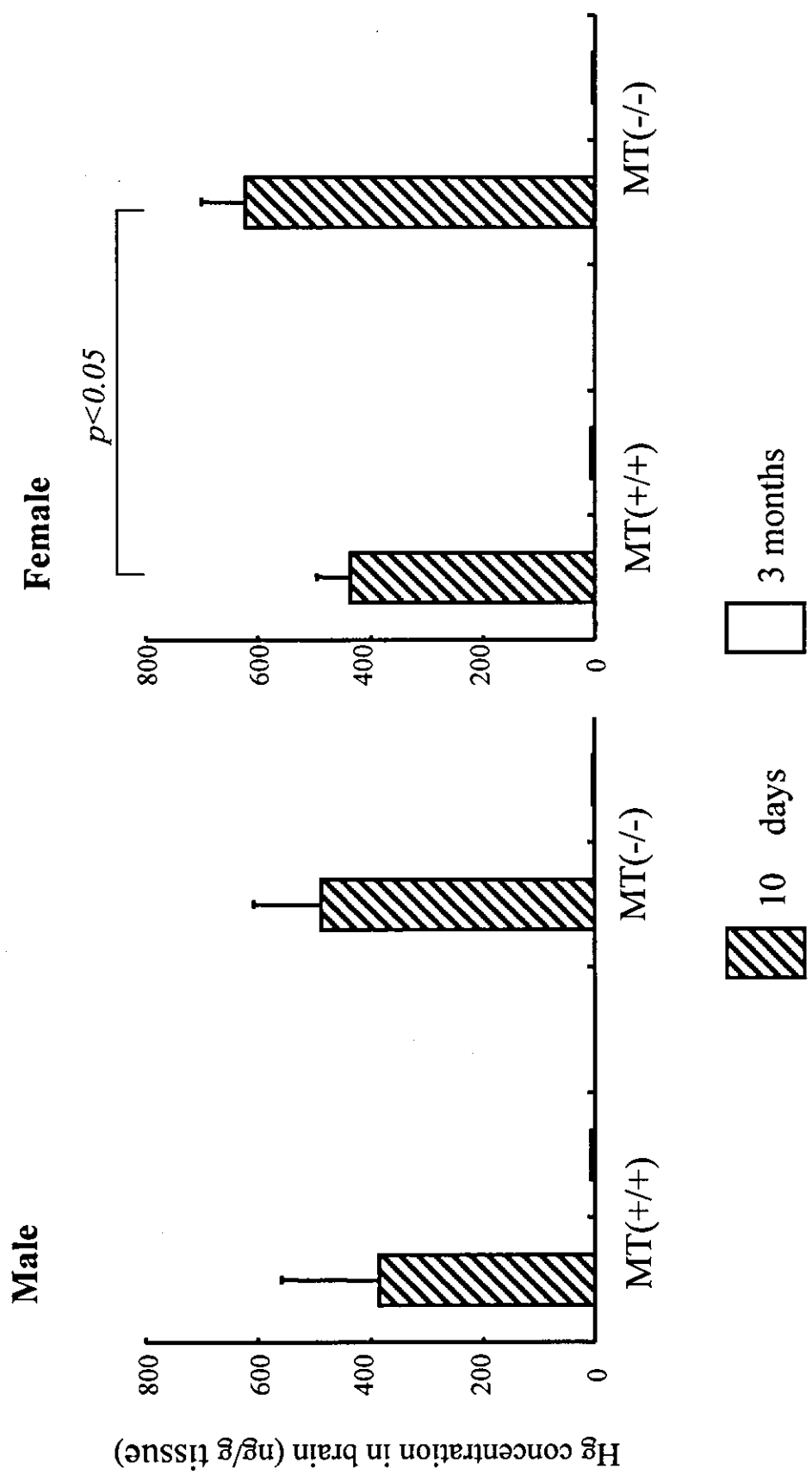


Figure 8. Mercury concentration in brain of neonatal mice at 10 days and 3 months after birth

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

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

本研究は胎生期に水銀蒸気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、特に神経行動毒性に対するメタロチオネインの役割について検討した。MT(LII 型)欠損マウス(MT(-/-))およびその対照（野生型）マウス(MT(+/+))を水銀曝露装置に入れ、水銀蒸気 0.50~0.56mg/m³の濃度で1日6時間、妊娠 0 日目から 18 日目まで曝露を行った。その後、曝露を中止し、出産したのち 3 週目に離乳させ、3 ヶ月後にオープンフィールドにより移動時間・総移動距離と探索行動時間と、受動的回避実験装置・モリス水迷路より学習獲得について検討した。オープンフィールドでの活動量については、雄性 MT(-/-) マウス群に低下が認められた。中心に滞在する割合も雄性 MT(-/-) マウスで、水銀曝露群は対照群に比べ有意に低かった。受動的回避反応試験での受動回避学習における成績については、雌性 T(-/-)マウス群に学習獲得の低下を認めた。モリス水迷路での空間学習については、水銀曝露をうけた雌性 MT(-/-)マウスに空間学習の獲得過程で、遅延が認められた。胎生期に水銀蒸気曝露をうけた MT (+/+), MT(-/-)マウスは雄・雌に係わらず対照群に比