

べ、脳および腎臓の水銀濃度は高値であった。

以上の結果より、胎生期における水銀蒸気曝露にうけた MT(-/-)マウス群に、MT (+/+) マウス群に比べ活動量の低下、空間学習および学習獲得の低下が認められた。このことは MT-<sub>1</sub> および -<sub>2</sub> は水銀による神経行動毒性の軽減に何らかの役割を果たしているものと思われる。また、MT(-/-)マウス群では雌は雄より学習能力に関係している海馬への影響が大きいことが示唆された。

## A. 研究目的

水俣病やイタイイタイ病などわ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、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>、ワクチンの保存剤に利用されているチメロサルによる水銀曝露、アマゾン川やビクトリア湖周辺の金採掘に伴う水銀汚染による水銀中毒が大きな問題となっている。水銀蒸気は胎盤関門を容易に通過し、胎児に蓄積することが知られている。しかしながら、胎生期において低濃度水銀蒸気曝露された場合に胎児の発育・発達に及ぼす影響については余り知られていない。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<sup>3)</sup>。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。しかしながら、胎生期に低濃度水銀蒸気曝露を受けた場合の胎児・新生児の影響に対する生理的レベルのメタロチオネインが果たしている役割は不明である。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。

最近、Michalska & Choo<sup>4)</sup> や Master et al.<sup>5)</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。そこで、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、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ついて検討した。

## B. 実験方法

### 1) 動物と水銀蒸気曝露

OLA129/C57/BL6 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 週令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。妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度 0.50~0.56 mg/m<sup>3</sup> で、1 日 6 時間、妊娠第 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 21 日目に離乳を行い、3 ヶ月後に行動試験を行った (図 1)。その後、すべての動物は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

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フォームを設置する。プラットフォ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°C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フォームを設け、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。マウスがプラットフォ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。プローブテストはプラットフォームを取り除くことによりマウスが偶然的にプラットフォームに辿り着く確立を低くし、プラットフォ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

組織中の水銀濃度は Satoh らの方法に従って測定した。臓器 0.15~0.25g を秤量したのち、25ml 試験管に入れ、1 : 3(過塩素酸 : 硝酸)の混酸を 1ml 加えた。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 時間加熱した。その後、試験管を氷水中で十分冷却したのち 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 Student's-t 検定で処理した。

## C. 実験結果

図 1 には、出産 3 ヶ月後における対照群の雄雌 MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウス 及び 曝露群の雄雌 MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの open field テストでの総移動距離を示した。総移動距離は、雄性 MT (- / -) マウスにおいて曝露群が対照群に比べ、有意に高値を示した。しかしながら、雄性 MT(+ / +)マウス、雌性 MT(+ / +)マウスそして雌性 MT(- / -)マウスでは

対照群と曝露群との間で活動量に有意な差は認められなかった。

図 2 には、出産 3 ヶ月後における open field テストでの中心にいる割合を示した。中心にいる割合は、雄性 MT(-/-)マウスにおいて曝露群が対照群に比べ、有意に低い値を示した。しかしながら、雄性 MT(+/+)マウス、雌性 MT(+/+)マウスや雌性 MT(-/-)マウスでは対照群と曝露群との間で探索行動を表す中心にいる割合に有意な差は認められなかった。

図 3 には、出産 3 ヶ月後における雄雌 MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスの対照群と曝露群の受動的回避反応テストの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。

1 日目に行った訓練試行においては雄雌の MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスにおいて対照群と曝露群との間に有意な差は認められなかった(Data not shown)。しかしながら、翌日に行った保持試行においては雌性 MT(-/-)マウスで曝露群が対照群より、回避反応時間が有意な差が認められた。これに対して、雄性 MT(+/+)マウス、雄性 MT(-/-)マウスや雌性 MT(+/+)マウスでは対照群と曝露群との間で回避反応時間に有意な差は認められなかった。

図 5 には、出産 3 ヶ月後における雄雌の MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスの対照群と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時間を示した。雄では MT(+/+)マウスおよび MT(-/-)マウスともに対照群、曝露群ともに訓練試行を重ねるごとに回避時間は短縮した。しかも、訓練過程において、対照群と曝露群との間で回避時間に差異はなかった。雌では MT(+/+)マウスにおいては対照群、曝露群ともに訓練試行を重ねるごとに回避時間は短縮した。しかも、

訓練過程において、対照群と曝露群との間で回避時間に差異はなかった。しかしながら、MT(-/-)マウスでは、MT(+/-)マウスと同様に対照群、曝露群ともに訓練試行を重ねるごとに回避時間は短縮したが、しかし、訓練過程において対照群よりも曝露群で回避時間に遅延が認められた。

図 5 には、出産 3 ヶ月後における対照群と曝露群の雌雄の MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスの対照群と曝露群におけるモリス水迷路試験でのプラットホーム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。雄性MT(+/-)マウス、雄性 MT(-/-)マウスともに対照群と曝露群の間に横切った回数に差異は認められなかった。また雌性 MT(+/-)マウスでも対照群と曝露群との間に有意な差は認められなかった。これに対し、雌性 MT(-/-)マウスでは対照群より曝露群の横切った回数はかなり少なかったけれどもその差は統計的に有意ではなかった。

表 1 には、出産 3 ヶ月後における雄雌の MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスの対照群と曝露群の脳と腎臓中水銀濃度を示した。雄の MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスでは両マウスとも脳中水銀濃度は対照群に比べ、曝露群は高く、両者の間に有意な差が認められた。雌の MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスでも脳中水銀濃度は対照群より曝露群が高値を示し、両者の間に有意な差が認められた。雄では MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスの間の水銀濃度に差は認められなかったが、雌では MT(+/-)マウスに比べ、MT(-/-)マウスの脳中水銀濃度は有意( $p < 0.05$ )に高値であった。これに対し、雌雄の MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスの腎臓中水銀濃度はいずれも対照群に比べ、曝露群は高く、両者の間に有意な差が認められた。



## C. 考察

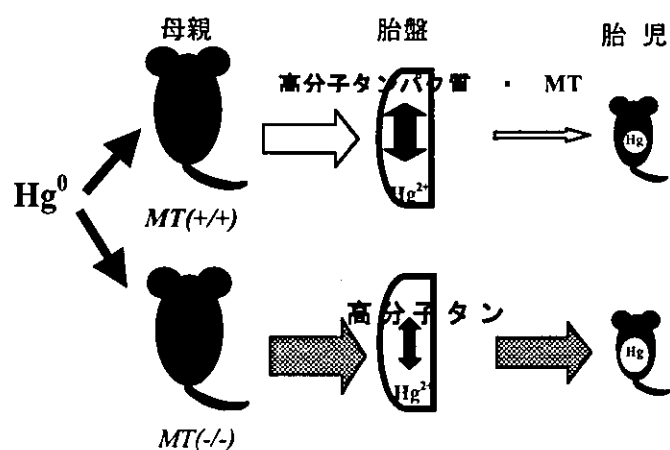
妊婦がメチル水銀に曝露された場合、メチル水銀が胎盤を通過し、胎児へ移行することが知られている。しかも、胎児の脳の水銀濃度は母親の濃度より高くなり、その結果、胎児のその域に発育・発達に重篤な影響を及ぼすことが報告されている。水銀蒸気を吸収した場合、肺胞から約 80% が吸収され血液中に取り込まれる。水銀蒸気( $\text{Hg}^0$ )は体内に取り込まれたのち、素早く無機水銀イオン( $\text{Hg}^{2+}$ )に酸化され血中を介して各臓器に運ばれる<sup>6)-7)</sup>。しかし、水銀蒸気曝露の短い時間、吸収された水銀蒸気の一部は酸化されることなく、そのままの形で循環血中に存在し、この未酸化の水銀蒸気が血液-脳関門を通過し、脳細胞内に取り込まれることが知られている<sup>8)-9)</sup>。また水銀蒸気は血液-脳関門のみならず胎盤関門も通過して胎児に移行する<sup>10)-13)</sup>。

妊娠中に水銀曝露をうけた新生児の発育・発達に関する影響はヒトについてもほとんど報告されていないが、動物実験で水銀蒸気曝露による胎児への影響がいくつか報告されている。Steffek ら<sup>14)</sup>は、妊娠期間中そして期間形成期にラットへ水銀蒸気曝露を行った後の胎児への影響について、 $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ では急性、慢性曝露ともに先天性奇形頻度の増加は認められないが、 $0.5\text{mg}/\text{m}^3$ の慢性曝露では 84 匹中 2 匹に先天性奇形(頭蓋の異常)が発現していると報告した。本実験に用いた水銀蒸気の曝露濃度は  $0.50\sim 0.56\text{ mg}/\text{m}^3$  と Steffek ら曝露濃度と同じであるが、MT(+/-)マウスと MT(-/-)マウスともに出産時の新生仔に先天奇形は認められなかった。Danielsson ら<sup>15)</sup>は

ラットを用い、妊娠 11-14 日目と 15-16 日目に  $1.8 \text{ mg/m}^3$  濃度の水銀蒸気を 1 日 3 時間胎生期に曝露され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、放図 8 には、出産 3 ヶ月後における雄雌の MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの対照群と曝露群の腎臓中水銀濃度を示した。雌雄の MT(+ / +)マウスと MT(- / -)マウスの腎臓中水銀濃度はいずれも対照群に比べ、曝露群は高く、両者の間に有意な差が認められた。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。また産業現場で曝露をうける水銀濃度 ( $0.5$  または  $1.0 \text{ mg/m}^3$ ) を 1 日 4 時間また 7 時間で週 5 日間妊娠リスサルに曝露を行った実験では、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<sup>16)</sup>。本研究では胎生期に  $0.50 \sim 0.56 \text{ mg/m}^3$  の水銀蒸気濃度を 1 日 6 時間曝露うけた 3 ヶ月後 MT(+ / +)マウスでは雌雄ともに自発行動量や受動的回避反応試験による学習記憶への影響は認められなかった。これに対し、MT(- / -)マウスでは、雄のマウスで曝露群の自発行動量の低下、探索行動の亢進が認められた。また雌の MT(- / -)マウスでは、嫌悪体験に対する学習記憶の低下やモリス水迷路での空間学習獲得の遅延が見られた。最近、Goulet ら(2003)<sup>17)</sup>は妊娠中にメチル水銀曝露をうけたマウスの行動影響を調べた結果、T 迷路試験で雌は雄に比べ、短期記憶への影響が認められることを報告している。また Yasutake ら(1988)<sup>18)</sup>はメチル水銀の毒性に対する感受性が雄マウスより雌マウスで高いと述

べている。胎生期の水銀蒸気を受けた場合、中枢神経行動への影響はMT(+/+ )マウスに比べ、MT(-/-)マウスに顕著に現れ、とくに MT(-/-)の雄では自発行動量に、そして雌では学習能力への影響が認められた。

最近、Yamamoto ら<sup>19)</sup>は胎盤中の水銀は主にメタロチオネインと結合していることを見出し、このメタロチオネインが水銀の胎児への移行のバリアーとして何らかの役割を果たしていることを示唆している。また Yoshida ら<sup>20)</sup>は妊娠 MT(-/-)マウスへの曝露実験で、妊娠 MT(+/+ )マウスに比べ、より多くの水銀が胎盤を通過し、胎児へ水銀が蓄積することを報告した。そして、図に示すようにメカニズムで胎児へ水銀は移行するが、そのとき胎盤のメタロチオネインが大きく関与していることを明らかにした。



注：矢印は水銀の移行する量を表わす

胎生期に水銀蒸気曝露をうけた雄雌の MT (+/+ )マウスと MT (-/-)マウスの脳および腎臓中の水銀濃度は対照群より高値である。さらに、MT (+/+ )マウスと MT (-/-)マウスの脳中水銀濃度を比較した

場合、雌において脳では水銀濃度は MT (+

+/+)マウスより MT (-/-)マウスで高値を示した。Yoshida ら<sup>21)</sup>は水銀蒸気曝露後の水銀の代謝は MT (+/+ )マウスでは、水銀が MT-I&-II と結合するため MT (-/-)マウスに比べ、脳を

除き、MT (+/+) マウスより遅いと述べている。そして脳では両マウスとも MT-III が存在するため<sup>20)</sup>、脳-血液関門を通過した水銀が MT-III と結合するため水銀消失には差異はないことを報告している<sup>19)</sup>。

これらの結果より、MT(+/+)-マウスに比べ MT(-/-)-マウスが胎生期の水銀蒸気に対する中枢神経行動の影響が大きかった理由の 1 つに MT(+/-)-マウスより多くの水銀が MT(-/-)-マウスでは移行したためと考えられる。しかし、学習記憶・空間学習記憶は脳内の海馬が重要な役割を果たす。また海馬における水銀濃度が行動異常と関連することが報告されている。水銀曝露後の雄性 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。

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

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Norgberg GF, Skerfving S.(1972) Metabolism In : Friberg L, Vostal J(eds) Mercury in the Environment. CRC Press, Cleveland, OH pp. 29-44.
- 7) Berlin M. (1986) Mercury In : Friberg L, Nordberg GF, Voulk VB(eds) Handbook on the toxicology of metals, 2nd edition, Elsevier Science Publishers B.V., pp.387-445.
- 8) Warffvinge K, Hua J Berlin M (1992) Mercury distribution in the rat brain after mercury vapor exposure. Toxicol Appl pharmacol 117 : 46-52.
- 9) Berlin M, Nordberg FG (1969) The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercury salts. Arch Environ Health 18 : 719-729.
- 10) Clarkson TW, Magos L, Greenwood MR. (1972) The transport of elemental mercury into fetal tissue. Biol. Neonate. 21 : 239-244.
- 11) Grenwood MR, Clarkson TW, Magos L. (1972) Transfer of metallic into fetus. Experientis. 28 : 1455-1456.

- 12) Khayat A, Dencker L. (1982) Fetal uptake and distribution of metallic mercury vapor in the mouse : Influence of ethanol and aminotriazole. *Biol. Res. Pregnancy.* 3 : 38-46.1.
- 13) Yoshida M, Yamamura Y, Satoh H. (1986) Distribution of mercury in guinea pig offspring after in utero exposure to mercury vapor during late gestation. *Arch Toxicol* 58 : 225-228.
- 14) Steffek AJ, Clayton R, Siew C, Verrusio AC (1987) Effects of elemental mercury vapor exposure on pregnant Sprague-Dawley rats. *J Den Res* 66 : 239.
- 15) Danielsson BRG, Fredriksson A, Dahlgren L, Relling Gardlund A, Olsson L, Dencker L, Archer T (1993) *Neurotoxicol Teratol* 15:391-396
- 16) Christopher Newland M, Warfvinge K, Berlin M (1996) 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.
- 17) Goulet, S., Dore, F.Y. , Mirault, M.-E.( 2003) Neurobehavioral changes in mice chronically exposed to methylmercury during fetal and early postnatal development. *Neurotoxicol. Teratol.* 25, 335-347.
- 18) Yasutake, A., Hirayama, K. (1988) Sex and strain differences of susceptibility to methylmercury toxicity in mice, *Toxicology.* 51, 47-55.
- 19) Yamamoto E, Shimada A, Morita A, Yasutake A, Yoshida M, Nishimura N, Suzuki JS, Satoh M, Tohyama C. (2001) Localization and role of placental metallothioneins as a barrier against

maternal to fetal transfer of mercury. Toxicologist supp. 60 : 357

- 20) Yoshida.M,Satoh.M,Shimada.A,Yamamoto.E,Yasutake.A,Tohyama.C (2002) Maternal-to fetus of mercury in metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor. Toxicology 175:215-222.
- 21) Yoshida, M., Satoh, M., Yasutake, A., Shimada, A., Sumi, Y., Tohyama, C., 1999b. Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor. Toxicology. 139, 129-136.
- 22) Uchida, Y., Takio, K., Titani, K., Ihara, Y., 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.

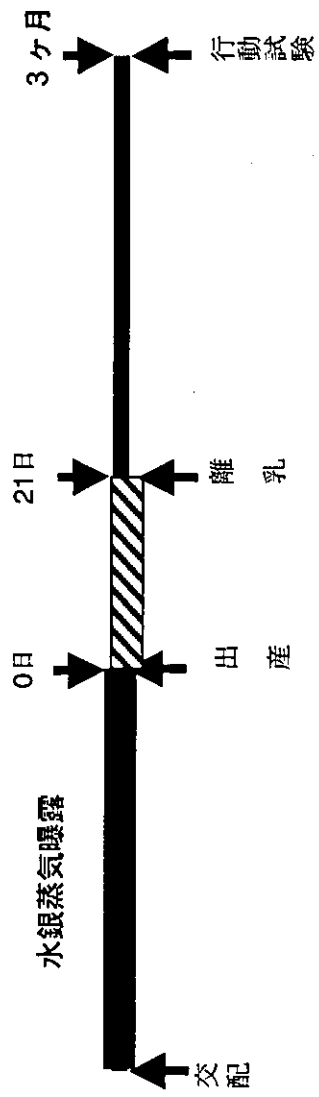


図1 実験スケジュール



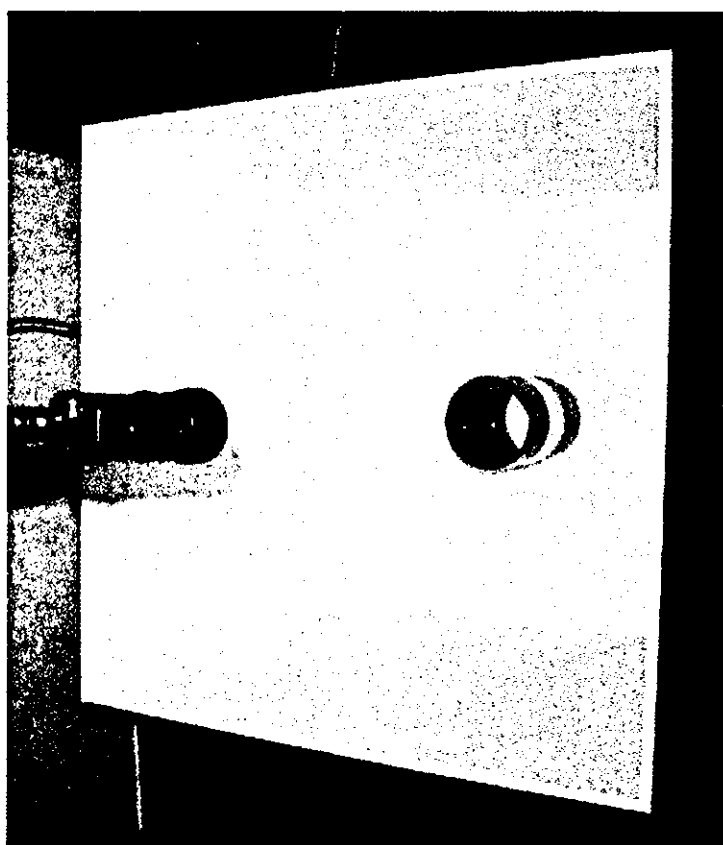


写真1 オープンフィールドテストの装置



写真2 受動的回避反応試験の装置

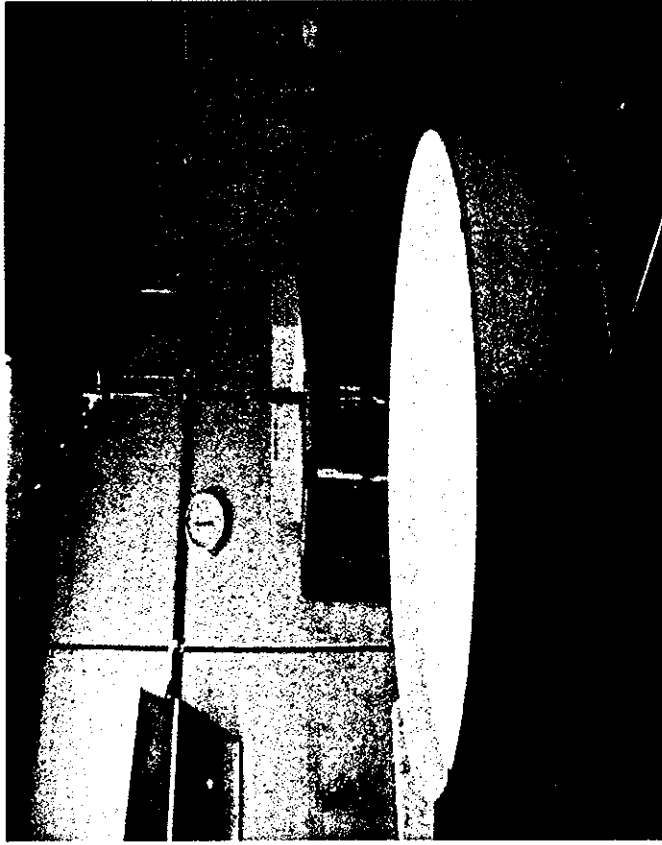


写真3 モリス水迷路試験の装置

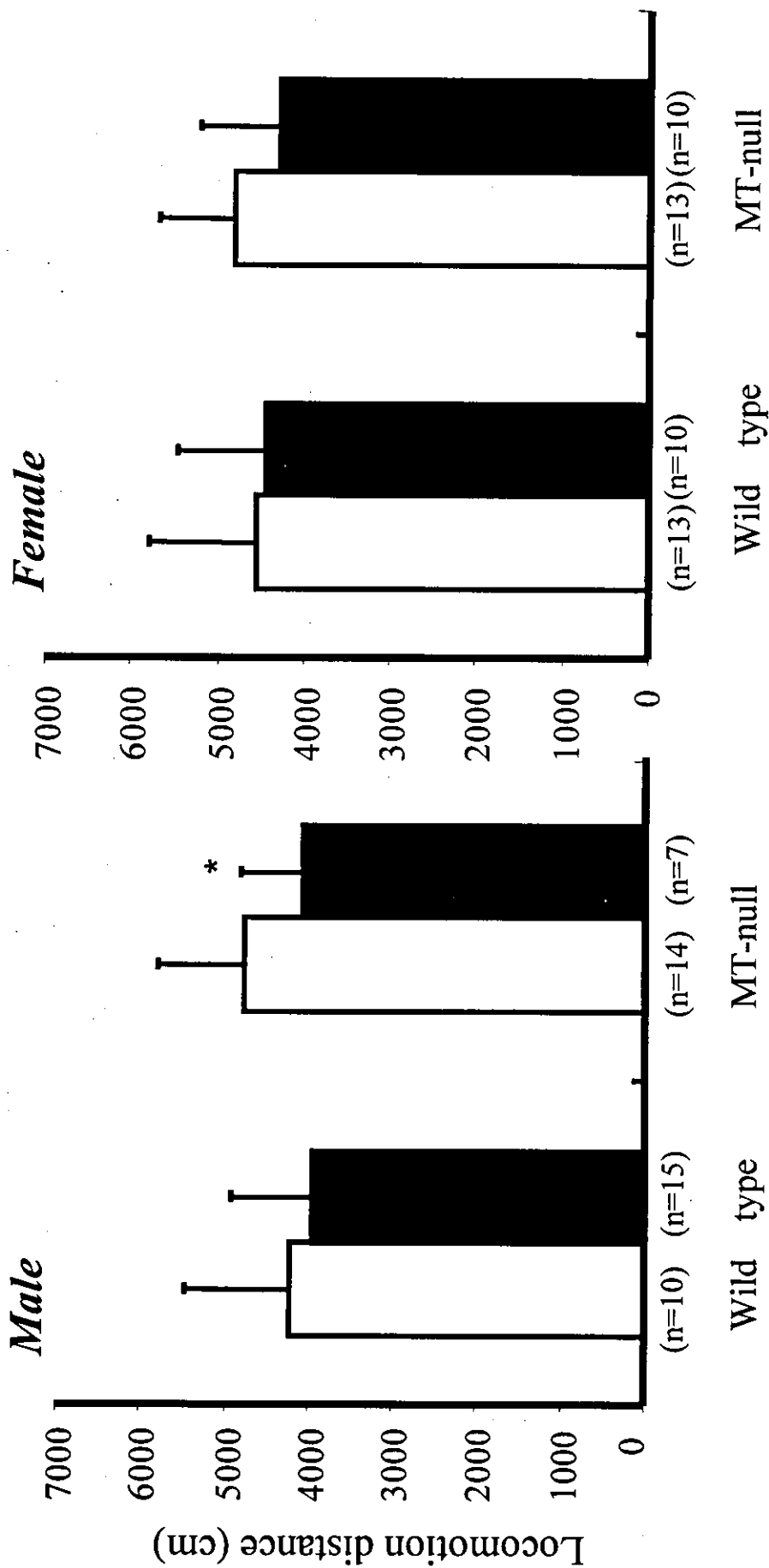


Figure 2: Total locomotor activity of MT-null and wild type received exposure in utero to mercury vapor in the open field task. Data shown are mean  $\pm$  standard deviation for exposed (■) and control (□) mice. The number of animals is shown in parentheses. \*\*Significant difference from control animals at  $p < 0.01$ .

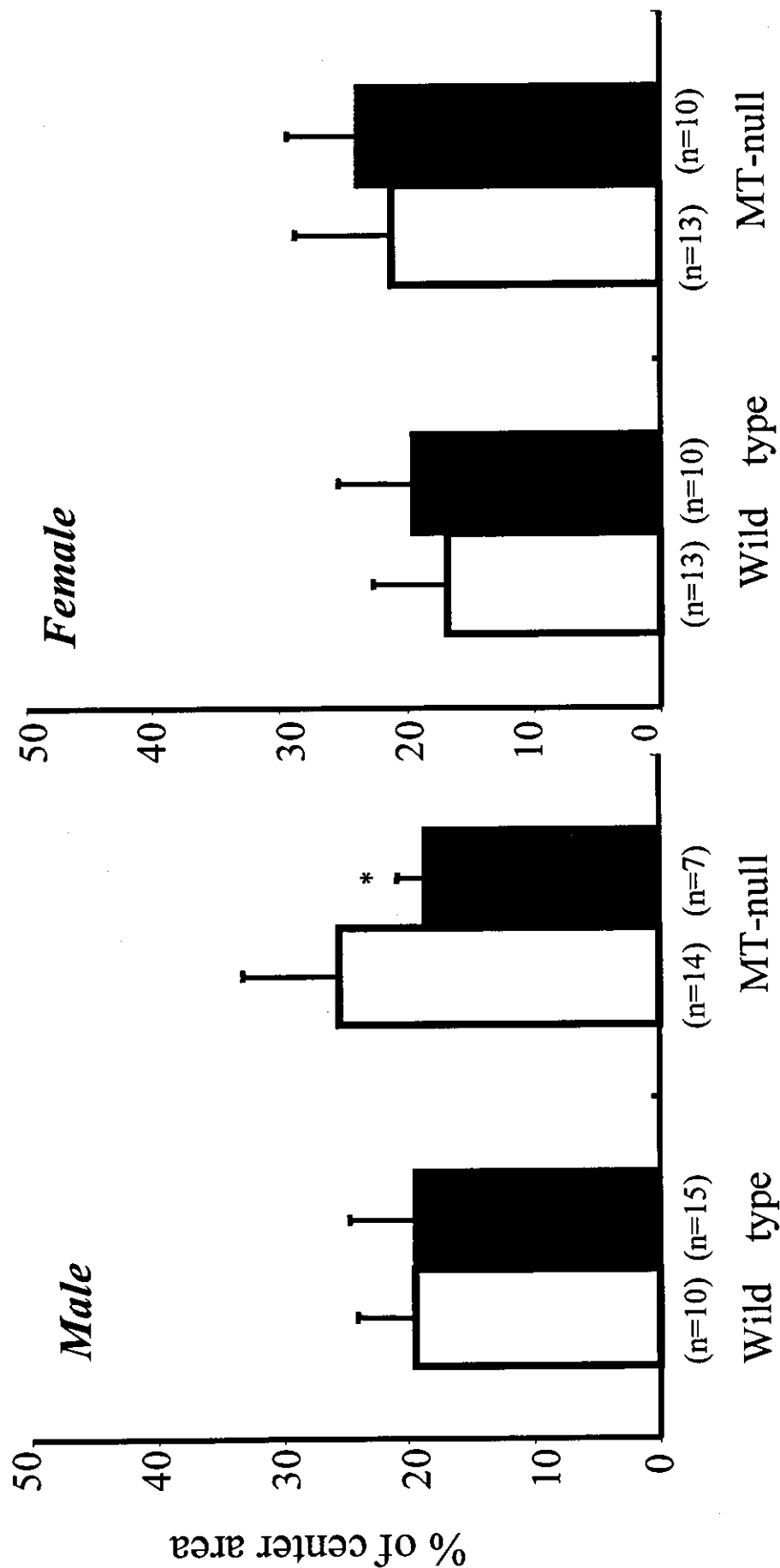


Figure 4: The percentage of central entry of MT-null and wild type received exposure in utero to mercury vapor in the open field task. Data shown are mean  $\pm$  standard deviation for exposed (■) and control (□) mice. The number of animals is shown in parentheses. \*Significant difference from control animals at  $p < 0.05$ .