

Figure4: Avoidance latency of MT-null and wild type received exposure in utero to mercury vapor in the passive avoidance 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 $p < 0.05$.

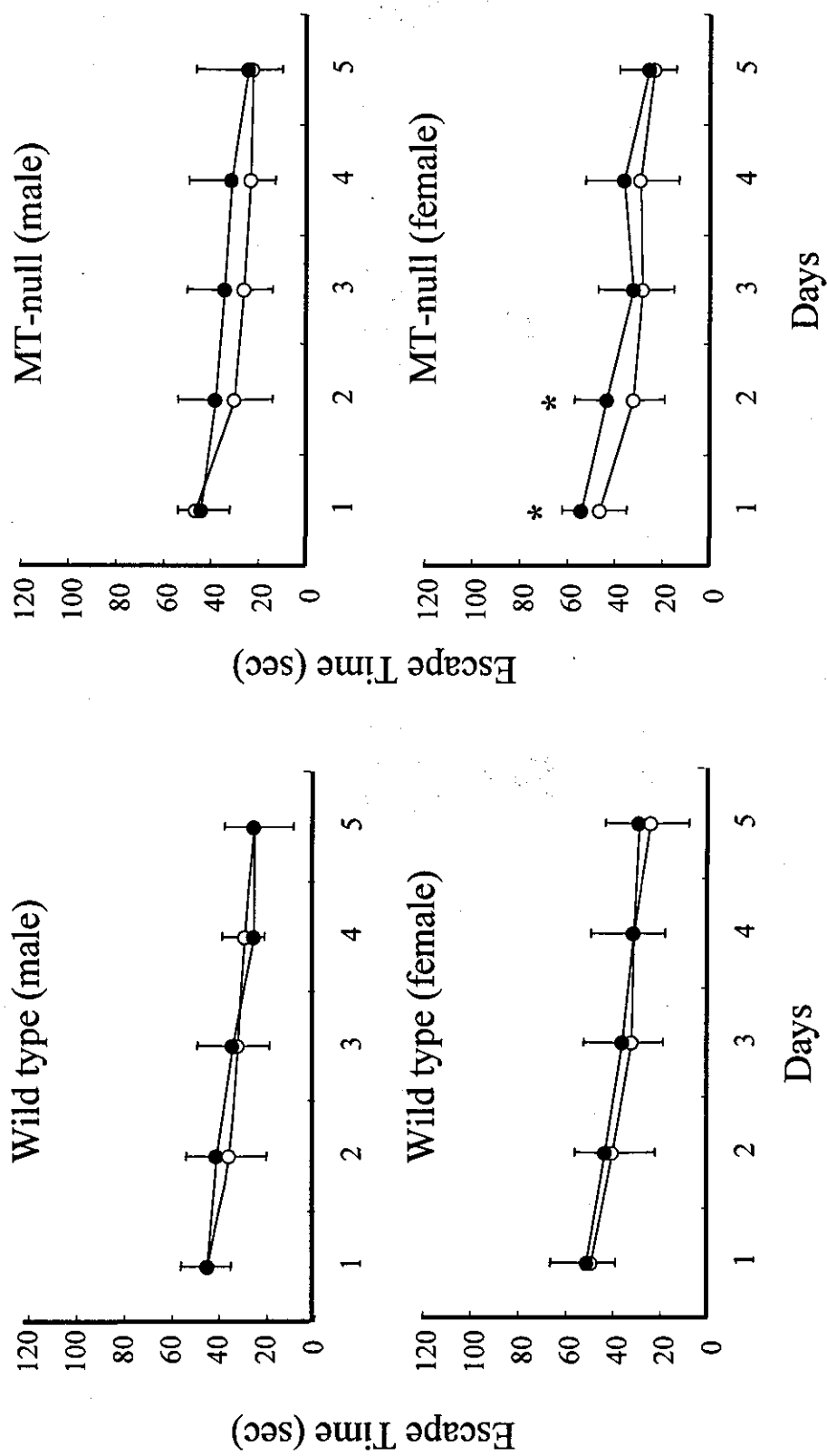


Figure 5: The Latency to reach the platform with Morris water maze for MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (●) and control (○) mice. *Significant difference from control animals at $p < 0.05$.

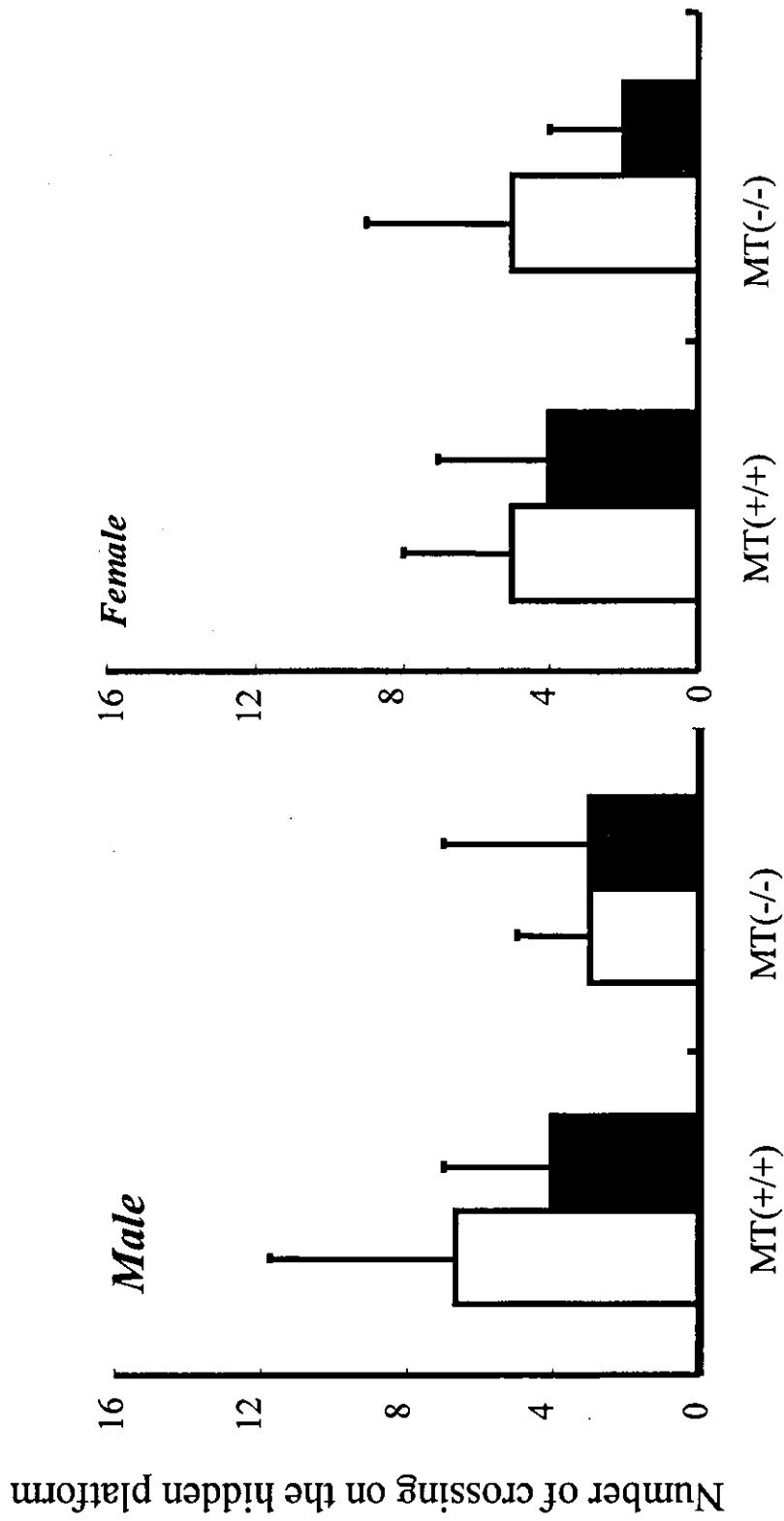


Figure 6: Results of probe test with Morris water maze for MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor. Data shown are mean \pm standard deviation for exposed (■) and control (□) mice.

Table 1. Mercury concentration in the brain and kidneys of MT-null and wild type mice received exposure in utero to mercury vapor.

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8±1.2	8.2±0.7*	4.9±1.4	8.5±0.9**
	Kidney	32.3±5.2	43.0±5.0**	29.2±5.3	42.4±5.4**
Female	Brain	7.3±1.4	9.3±1.1*	7.5±0.9	11.3±1.1**
	Kidney	20.2±6.9	30.9±4.0**	21.2±6.3	42.6±17.4*

Mercury concentration is expressed as ng Hg/g tissue. Values are means ±standard deviations.
 *Significant difference from control animals at $p < 0.05$. **Significant difference from control animals at $p < 0.01$.

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加齢と
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

研究協力者 清水夏紀 聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野

研究要旨

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少なく、とくに胎生期にメチル水銀曝露を受けた場合の老年期における神経行動影響については殆ど知られていない。一方、生体内における重金属に対する共通の防御因子としてメタロチオネイン（金属結合蛋白質）が知られている。日本人には、メタロチオネインの合成能力の低い集団があり、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、特に中枢神経機能への影響については知られていない。本研究は遺伝的要因モデルとして近年、ジーンターゲットイング法^{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（以下、MeHgとする）が神経行動機能に対し、遺伝的要因や若年期そして老齢期においてどのような影響を及ぼすかについて検討した。

MeHg曝露は5ppmのMeHg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（以下、若年マウスとする）と52週齢に達した時点（以下、加齢マウスとする）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試験による自発行動量は、若年マウスではMT(+/+), MT(-/-)マウスの雌雄ともにMeHg曝露群による影響は認められなかったが、加齢マウスではMT(+/)マウスで雌雄ともに自発行動量は低下していた。加齢MT(-/-)マウスは雌雄ともにMeHg曝露群で、自発行動量の亢進が認められた。探索行動は、若年MT(-/-)マウスではMeHgによる探索行動の低下が認められた。加齢マウスでは雌雄ともにMT(-/-)マウスの探索行動の低下しており、MeHgの影響が認められた。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(-/-)マウスともに訓練試行と保持試行の両方でMeHg曝露群と対照群との間に回避反応時間に差異はなく、学習行動への影響は認められなかった。加齢マウスでは雌性MT(-/-)マウスにおいてMeHg曝露群が対照群に比べ回避反応時間は低下し、学習獲得能力の低下が認められた。空間学習能力を評価するモリス水迷路テストでは、若年マウスは、5日間の訓練試行過程で雌雄のMT(+/+), MT(-/-)マウスともにMeHg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。これに対して加齢マウスでは、5日間の訓練試行過程で雄性MT(+/)マウスそして雌性MT(-/-)マウスが対照群に比べ、MeHg曝露群で回避反応時間の遅延が認められた。その後に行ったプローブテストでは、雌性MT(-/-)マウスでは対照群に比べMeHg曝露群の成績が低下していた。

脳内の水銀濃度は神経行動毒性に密接に関連している。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、出産10日目の脳内水銀濃度の結果から推測すると、胎児期の脳内水銀濃度は0.4~0.6 μ g/gより高値であったと思われる。またMT(+/)マウス、MT(-/-)マウスともに脳内水銀濃度は雄性マウスに比べ、雌性マウスにおいて高値であり、とくにMT(-/-)マウスにおいては約1.3倍雌性マウスの脳の濃度が高かった。雌性マウスのMeHgに対する神経行動毒性に対し高い感受性は雌性マウスの高い脳内水銀濃度が関与しているかもしれない。

以上の結果より、若年マウスでは見られなかったMeHgの神経行動毒性が加齢にともない出現す

ることが明らかとなった。とくに MT 欠損マウスに行動影響が顕著に現れており、遺伝的要因や加齢が MeHg の神経行動毒性の増強に大きな影響を及ぼしていることが明らかになった。

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。MeHg の標的器官は中枢神経系であり、胎生期における MeHg 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 MeHg 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 MeHg の曝露をうけるような環境は減少し、むしろ、低濃度の MeHg 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。フェロー諸島における疫学調査では、妊婦が多量の魚介類を摂取した場合、胎生期に食事由来の低濃度 MeHg 曝露を受け、その後児の発育・発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。アメリカ環境保護庁 (EPA) は、胎生期における MeHg 曝露の影響を危惧して、2001 年に、妊娠中または妊娠する可能性のある女性は大型魚類を摂取するべきではないと勧告し、MeHg の基準摂取量を 0.1 μ g/kg と定めた。日本では環境庁は魚肉に含まれる水銀の安全基準は総水銀値で 0.4ppm 以下と定められている。しかしながら、MeHg に対し、高感受性集団である胎児、新生児そして高齢者に健康リスクを考えた場合、食品中とくに魚介類に含まれる MeHg 濃度の安全基準について現在でも論議がなされている。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 MeHg 曝露による神経行動影響についての知見は少なく、とくに胎生期に MeHg 曝露を受けた場合の老年期における神経行動影響については殆ど知られていない。

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^{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いる⁵⁾。しかし、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 MeHg 曝露を受けた場合の健康影響、特に中枢神経機能への影響については知られていない。

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 MeHg 曝露が神経行動機能に対し、遺伝的要因や若年期そして老齢期においてどのような影響を及

ばすかについて検討した。

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 週齢及び 52 週齢で実施した (図 1)。2 週間ごとに体重測定を行い、行動実験終了後に、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。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 10×10cm) に入れ、30 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、装置 (60×60×60 cm) を 25 区画に分けて 10 分間観察し、その結果をコンピューターに取り込み解析した。試験終了後、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、次の試験を開始した。

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した。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、次の試験を開始した。

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た。

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した。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°C前後の水を入れた。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た。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、最大観察時間を 60 秒とし測定した。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発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

1. 組織の灰化方法

臓器（腎臓・肝臓・肺・心臓・脳）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°C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 90 分間冷却し、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。

2. 水銀濃度測定法

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、通気バブリングし、ブランクを測定した。次に、硫酸(1+20)20ml+塩化第一スズ溶液 1ml+水銀標準溶液(1 ppm) 0.2, 0.4, 0.6ml を入れ、通気バブリングし、検量線を作成した。そして、高感度還元気化水銀測定装置の感度を 1000ng にし、灰化した試料に塩化第一スズ溶液 1ml を入れ、通気バブリングした水銀濃度測定した。

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。

結 果

1) 体重の変化

図 2 と図 3 には、出産 20 週齢から 52 週齢までのマウスの体重の変化を示した。雌雄 MT (+/+) そして MT(-/-)マウスの対照群、MeHg 曝露ともに 20 週齢まで両群の間に体重に差異は認められなかった。しかし、28 週齢過ぎてからから雄性 MT(+/-)マウスと雌雄 MT(-/-)マウスで、対照群に比べ、MeHg 曝露群の体重が低値で、その差は有意であった。それに対し、雌性 MT(+/-)マウスは、MeHg 曝露群と対照群との間に体重の差は見られなかった。

2) オープンフィールド試験について

「若年マウス」

図 4 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた若年マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/-)マ

ウス及び、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験における 10 分間の観察中に排便した糞の数を示した。この値は情動反応を示すものである。情動性は MT(+/+)マウスは雌雄ともに MeHg 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、雄性 MeHg 曝露群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、雌性 MT(-/-)マウスでは、両群の間に差異は無かった。

図 6 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた若年マウスにおける対照群の野生型マウス(MT(+/+))、MT 欠損マウス(MT(-/-))及び MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験での総移動距離を示した。この値は自発行動量を示すものである。

自発行動量は MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 曝露群との間に自発行動量の差異は認められなかった。図 7 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた若年マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験における中心で活動している割合を示した。この値は探索行動を示すものである。探索行動は MT(+/+)マウスでは雌雄ともに対照群と MeHg 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、雄性 MT(-/-)マウスでは両群の間に差異は見られなかったが、雌性では対照群に比べ、MeHg 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。

「加齢マウス」

図 5 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた加齢マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験における 10 分間の観察中に排便した糞の数を示した。情動性は MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 曝露群との間に差異は認められなかった。

図 8 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた加齢マウスにおける対照群の MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウス及び MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験での総移動距離を示した。自発行動量は MT(+/+)マウスは雌雄ともに対照群が MeHg 曝露群に比べて高く、MT(-/-)マウスは雌雄ともに MeHg 曝露群が対照群に比べて高く、両者の間の自発行動量に有意差が認められた。図 9 には、胎生期に MeHg 曝露をうけた加齢マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスのオープンフィールド試験における中心で活動している割合を示した。

探索行動は MT(+/+)マウスでは雌雄ともに対照群と MeHg 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(-/-)マウスでは雌雄ともに対照群に比べ、MeHg 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。

3) 受動的回避反応試験について

「若年マウス」

図 10 及び図 11 には、胎生期に MeHg 曝露を受けた若年マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスの受動的回避反応試験における訓練試行と翌日に行った保持試行の回避反応時間を示した。この値は、嫌悪体験に対する学習能力を示すものである。訓練試行において、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 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。また、翌日に行った保持試行でも MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 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。

「加齢マウス」

図 12 及び図 13 には、胎生期にメチル水銀曝露を受けた加齢マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスの受動的回避反応試験における訓練試行と翌日に行った保持試行の回避反応時間を示した。訓練試行において、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスの雌雄ともに対照群と MeHg 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。また、翌日に行った保持試行では MT(+/+)マウスの雌雄ともに対照群では回避反応時間が多くのマウスが観察時間の 300 秒を超えた。MeHg 曝露群でも多くのマウスが観察時間の 300 秒を超えており、対照群と MeHg 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。また、MT(-/-)マウスの雄では、対照群と MeHg 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。これに対し、MT(-/-)マウスの雌では対照群の回避反応時間

が MeHg 曝露群に比べ、著しい上昇を示し、回避反応時間に対照群と MeHg 曝露群との間に有意な差が認められ、学習獲得能力に差があった。

3) Morris 水迷路試験

「若年マウス」

図 14 には、胎生期にメチル水銀曝露を受けた若年マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスの Morris 水迷路試験、訓練試行の回避反応時間を示した。この値は、空間認識に対する学習能力を示すものである。5 日間の訓練試行において MT(+/+)マウスでは雌雄ともに対照群、MeHg 曝露群に訓練試行を重ねるとともに回避反応時間が短縮した。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(-/-)マウスは訓練過程において対照群と MeHg 曝露群の間に回避反応時間に差異はなかったが、雄性マウス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、雌性マウスでは回避反応時間は必ずしも短縮しなかった。

「加齢マウス」

図 15 には、胎生期にメチル水銀曝露を受けた加齢マウスにおける対照群と MeHg 曝露群の MT(+/+)マウス及び、MT(-/-)マウスの Morris 水迷路試験、訓練試行の回避反応時間を示した。5 日間の訓練試行において MT(+/+)マウスでは、雌雄ともに対照群、MeHg 曝露群に訓練試行を重ねるとともに回避反応時間が短縮した。しかし、訓練過程において、雄性マウスでは対照群と MeHg 曝露群との間に 2 日目、3 日目、4 日目で回避反応時間の有意差が認められた。それに対し、雌では両群に回避反応時間に差異はなかった。MT(-/-)マウスは訓練過程において、雄性マウスでは対照群と MeHg 曝露群の間に 3 日目で回避反応時間の有意差が認められたのに対し、雌性マウスでは両群の間に 4 日目、5 日目で回避反応時間の有意差が認められた。

4) 組織中水銀濃度の測定

表 1 及び表 2 には、出産後 10 日目と 3 ヶ月後における MeHg 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(-/-)マウスともに対照群の値まで低下しており、両群の雌雄ともに MeHg 曝露群と対照群との間に差異は認められなかった。

考 察

本研究は妊娠マウスに妊娠第 0 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飼育し、12 週目（以下、若年マウス）または 52 週目（以下、加齢マウス）に、MT(+/+)および MT(-/-)の雌雄マウスの行動解析を行い比較した。Open field test による探索行動については、若年マウスは、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。これに対して加齢マウスでは、メチル水銀曝露を受けた雌雄の MT(-/-)マウスに探索行動の著しい低下が認められ、加齢によって MT 欠損マウスに MeHg 影響が顕著になった。自発行動量に関しては、若年マウスでは MT(+/+)と MT(-/-)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。本研究結果と一致していた。しかし、加齢マウスの自発行動量は雌雄 MT(+/+)マウスともに対照群に比べ、MeHg 曝露群は低下していた。それに対して、MT(-/-)マウスは雌雄マウスともに MeHg 曝露群が対照群に比べて高値を示し、MT(+/+)マウスとは逆に自発行動量は亢進していた。情動反応の指標の一つである糞尿の変化で知ることができる。Kim ら⁹⁾は妊娠 12-14 日目にメチル水銀を 3mg/kg で連日経口投与を受けた 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 MeHg 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。本研究では、若年マウス、加齢マウスともに MT(+/+)マウスでは脱糞数には雌雄共に MeHg 曝露群と対照群間に差は認められなかった。しかしながら、MT(-/-)若年マウスの雄で MeHg 曝露群の脱糞数が有意に増加しており、MeHg 曝露による情動面に対する影響が認められた。

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、Goulet 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）記憶への影響を認めている。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報告している。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若年マウスでは MT(+/+)、MT(-/-)マウスの雌雄ともに MeHg 曝露群と対照群では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。しかし、加齢マウスでは雌性 MT(-/-)マウスで対照群に比べ、MeHg 曝露群の回避反応時間は低下しており、胎生期における MeHg 曝露による学習能力の獲得に対する影響が認められた。一方、空間認知で学習を測定するモリス水迷路試験では、若年マウスでは雌雄の MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスは 5 日間の訓練試行期間中、MeHg 曝露群と対照群との間にプラットホームに到達する回避反応時間に統計的に有意差は無く、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。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 MeHg 曝露群と対照群に差は認められず (data not shown)、Open field test と同様に運動量に変化は認められなかった。しかしながら、空間認知により学習習得しているか確認する試験では、雌の MT(+/+)マウス、雌雄の MT(-/-)マウスは MeHg 曝露群と対照群との間に差異はなかったが、MeHg 曝露をうけた雄性 MT(+/+)マウスでは空間学習に対する影響が認められた。胎生期の MeHg 曝露に対する加齢要因による行動影響について、Christophor ら¹⁰⁾は、胎生期に MeHg 曝露をうけた 1.7 年齢と 2.3 年齢の雄性ラットを用いて、オペラン試験を行った実験で、1.7 年齢のラットでは対照群と MeHg 曝露群との間に学習行動に差異は認められないが、2.3 年齢のラットに学習獲得に影響が見られたと述べている。本実験における加齢マウスでは、雌性 MT(+/+)マウスは学習習得過程において空間認識への影響は認められなかったが、雄性 MT(+/+)マウスは明らかに学習修得過程において遅延が認められた。これに対し、MT(-/-)マウスでは MT(+/+)マウスとは反対に、雌性 MT(-/-)マウスで学習習得過程の遅延が認められた。プローブテストでは、MT(+/+)マウスは雌雄マウスともに MeHg 曝露群と対照群との間に記憶に対する影響は認められなかった。胎生期における MeHg 曝露の学習行動に対する影響は、若年マウスよりも加齢マウスで見られ、しかも MT(-/-)マウスで雄性マウスより雌性マウスに顕著に現れ、加齢が MeHg の神経行動毒性を増強させるものと思われる。また受動回避反応試験やモリス水迷路試験の結果から、Goulet らの報告⁸⁾しているように学習行動に対する MeHg の影響は雄性マウスより雌性マウスにおいて感受性が高いことが判明した。

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¹¹⁾。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¹²⁾。今回、若年マウスにおける MT(+/+)マウスと MT(-/-)マウスにおける神経行動毒性に対する感受

性に顕著な違いが見られなかった理由として、無機水銀と MeHg の MT 誘導合成能力や MT に対する親和性の相違によるものと思われる。MeHg は in vivo や in vitro の実験で酸化ストレスを引き起こすことが報告されている^{13),14)}。また加齢とともに酸化ストレスに対する抗酸化機能や抗酸化物質が低下することが知られている。加齢マウスにおいて見られた MT(-/-)マウスに見られた神経行動毒性の増強は、遺伝的要因や加齢にともなう酸化ストレスに対する消去機能の低下に起因しているのではないかと思われる。

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¹⁵⁾。しかも臨床症状の発現の閾値は母親の毛髪 20ppm¹⁵⁾で、胎児の脳では 1ppm と推定されている¹⁶⁾。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¹⁷⁾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、出産 10 日目の脳内水銀濃度の結果から推測すると、胎児期の脳内水銀濃度は 0.4~0.6 $\mu\text{g/g}$ より高値であったと思われる。また MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに脳内水銀濃度は雄性マウスに比べ、雌性マウスにおいて高値であり、とくに MT(-/-)マウスにおいては約 1.3 倍雌性マウスの脳の濃度が高かった。雌性マウスのメチル水銀に対する神経行動毒性に対し高い感受性は雌性マウスの高い脳内水銀濃度が関与しているかもしれない。

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., Tikkrity, 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) Christopher M., Newland, Phyllis A. Reile, Jeffrey L. Langston. (2004) Gestational exposure to methylmercury retards choice in transition in aging rats. *Neurotoxicology and Teratology* 26:176-194
- 11) 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.* 80:69-73.
- 12) 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.
- 13) Yee S, and Choi BH. (1994) Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp Mol Pathol.* 60:188-96.
- 14) 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
- 15) 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.
- 16) 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.

- 17) 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.