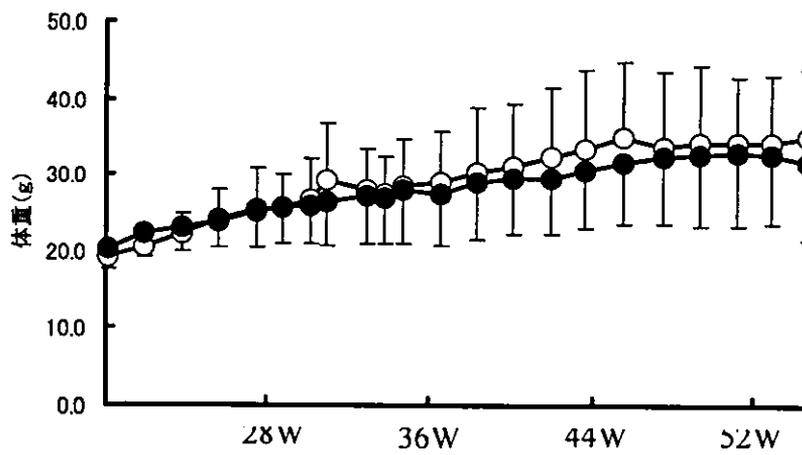
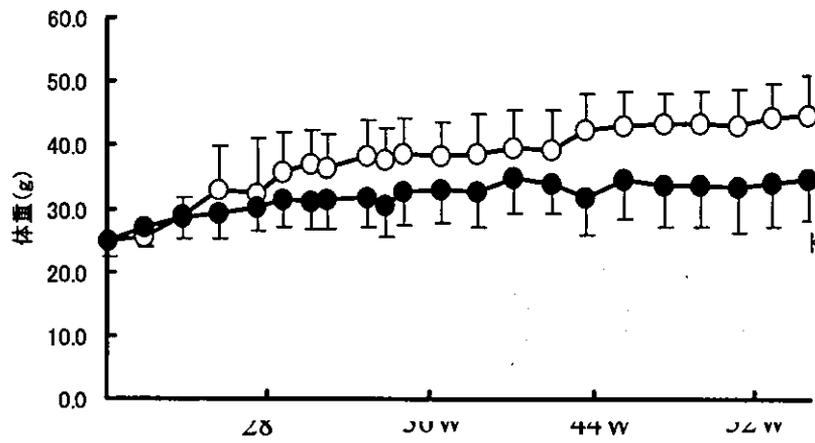
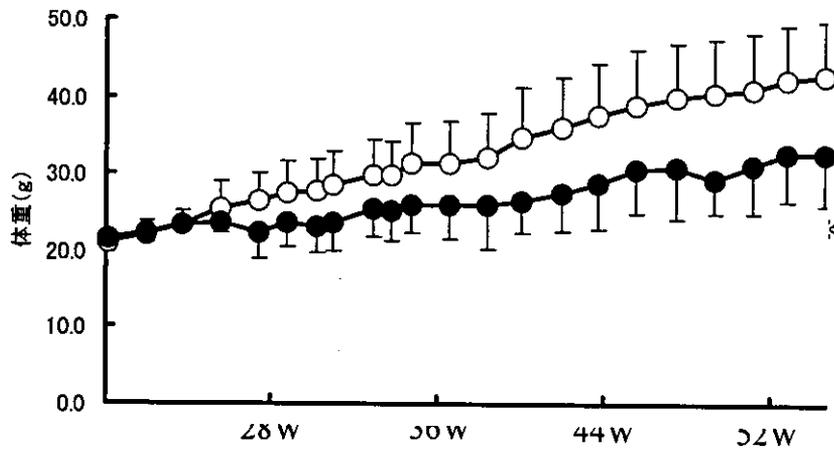
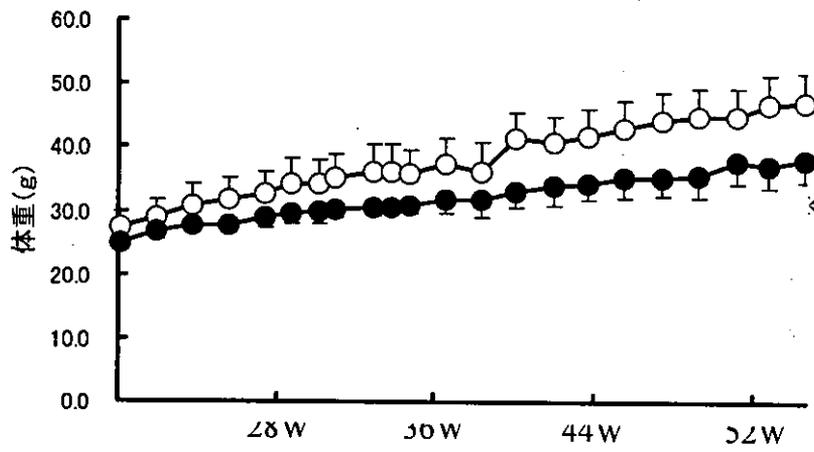


図 1. 実験デザイン



○ 対照群 ● 曝露群

図 2. MT(++)マウスの体重の変化
 * $P < 0.05$ で対照群との間に有意差あり



○ 対照群 ● 曝露群

図3. MT(-/-)マウスの体重の変化

* $P < 0.05$ で対照群との間に有意差あり

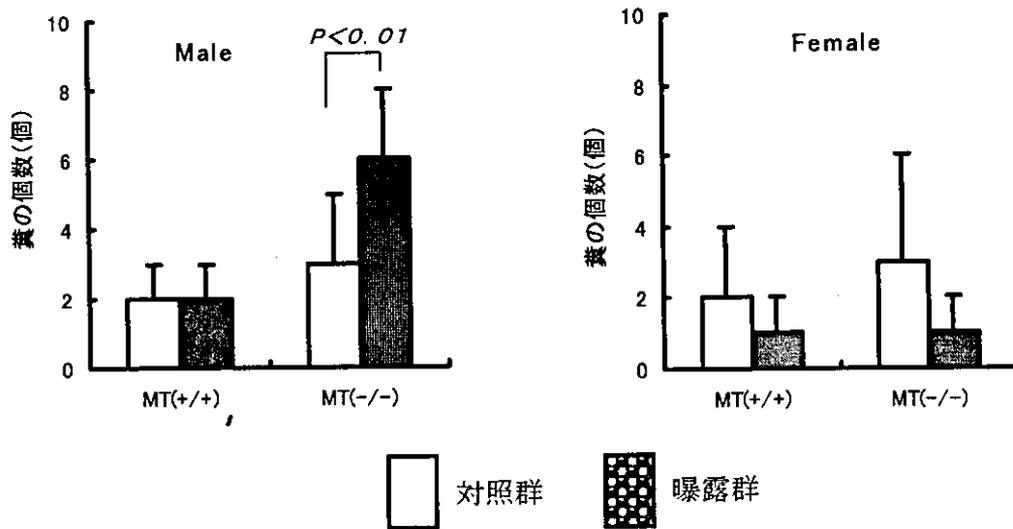


図 4. 若年マウスにおけるオープンフィールド試験中の排便した糞の個数

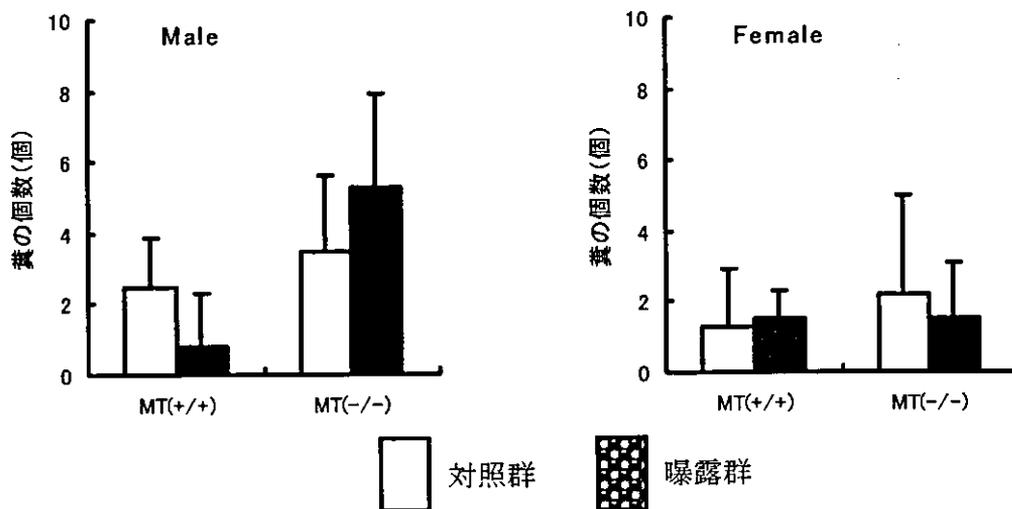


図 5. 加齢マウスにおけるオープンフィールド試験中の排便した糞の個数

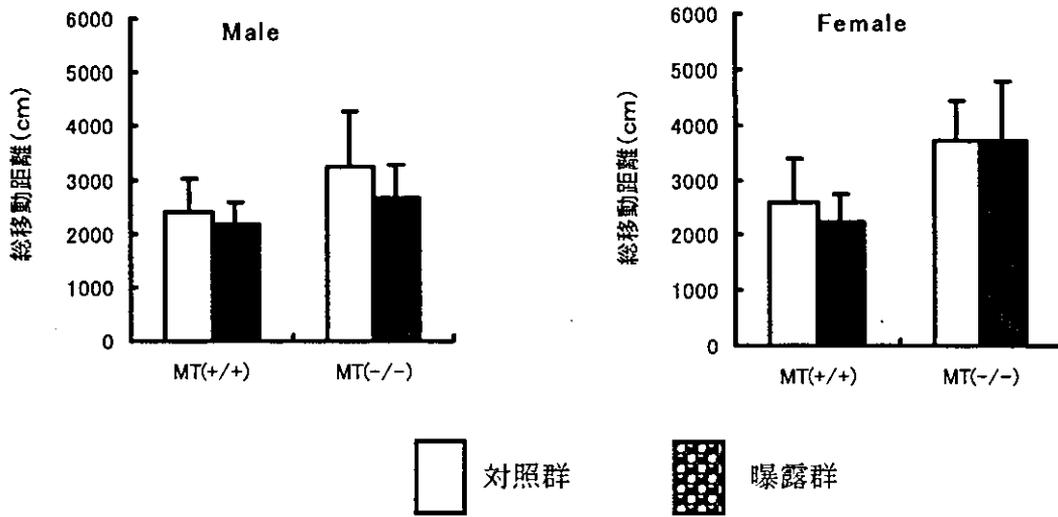


図 6. 若年マウスにおけるオープンフィールド試験の総移動距離

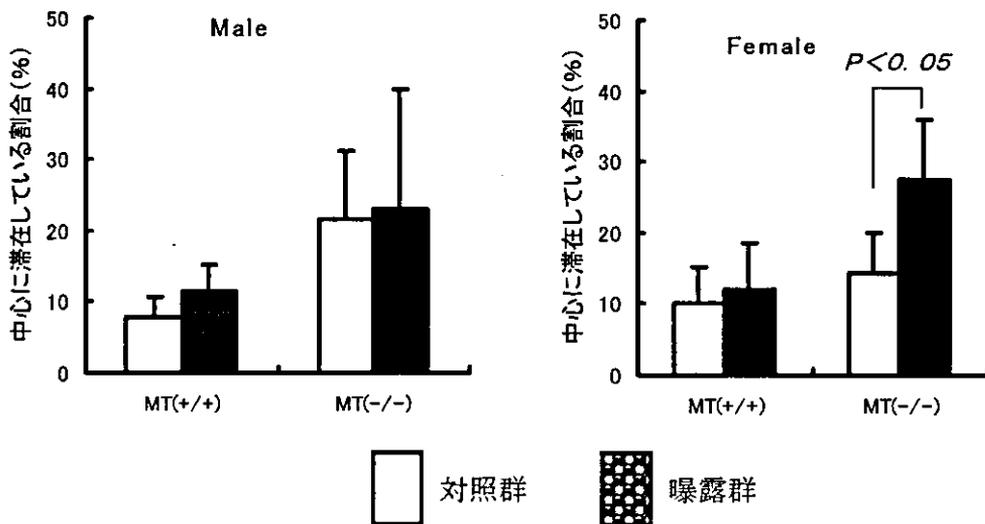


図 7. 若年マウスにおけるオープンフィールド試験の中心に滞在している割合

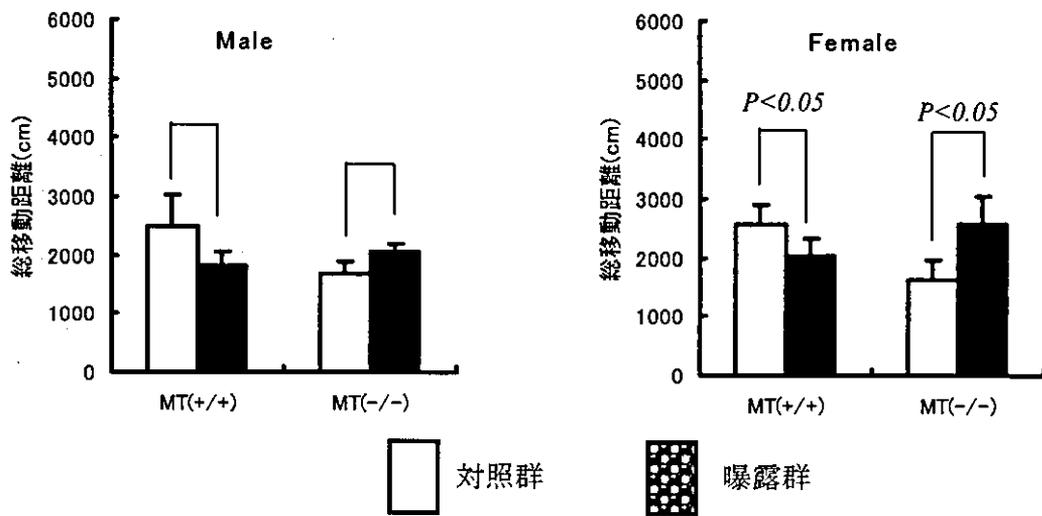


図 8. 加齢マウスにおけるオープンフィールド試験の総移動距離

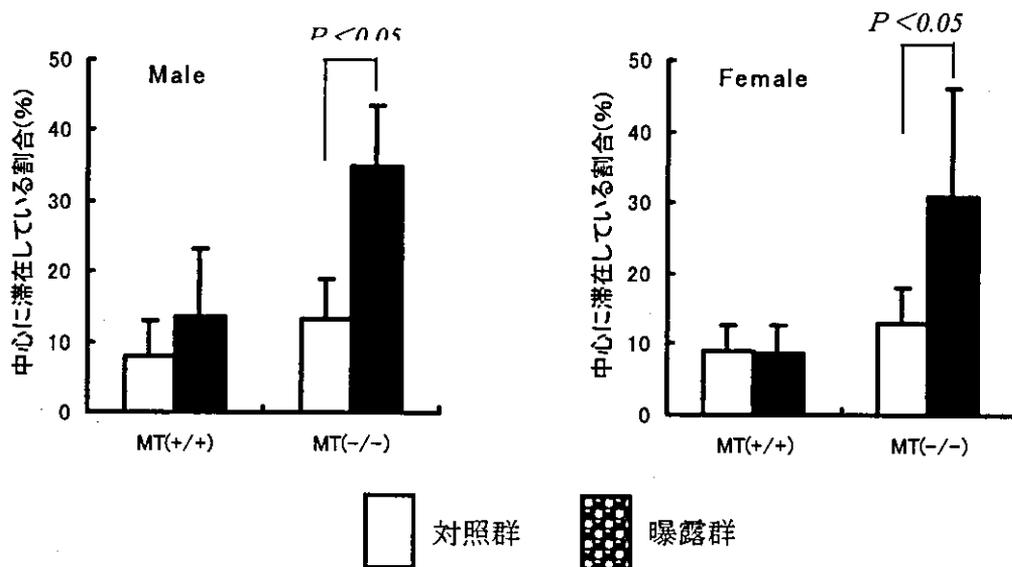


図 9. 加齢マウスにおけるオープンフィールド試験の中心に滞在している割合

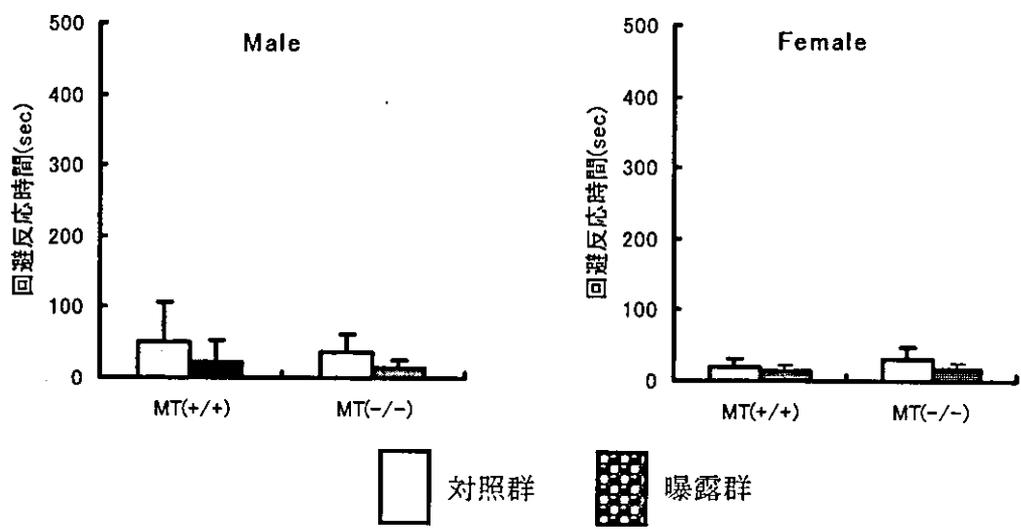


図 10. 若年マウスの受動的回避反応試験における訓練試行での回避反応時間

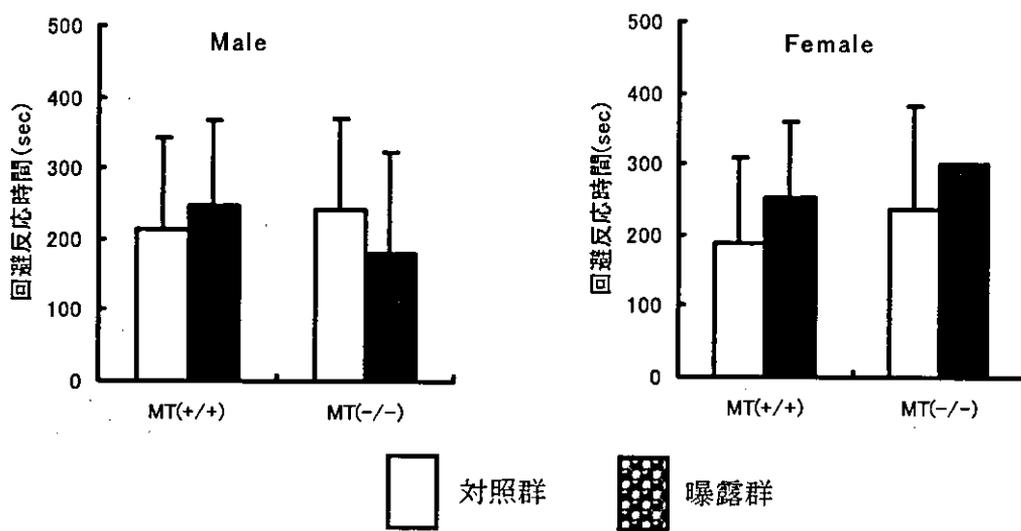


図 11. 若年マウスの受動的回避反応試験における保持試行での回避反応時間

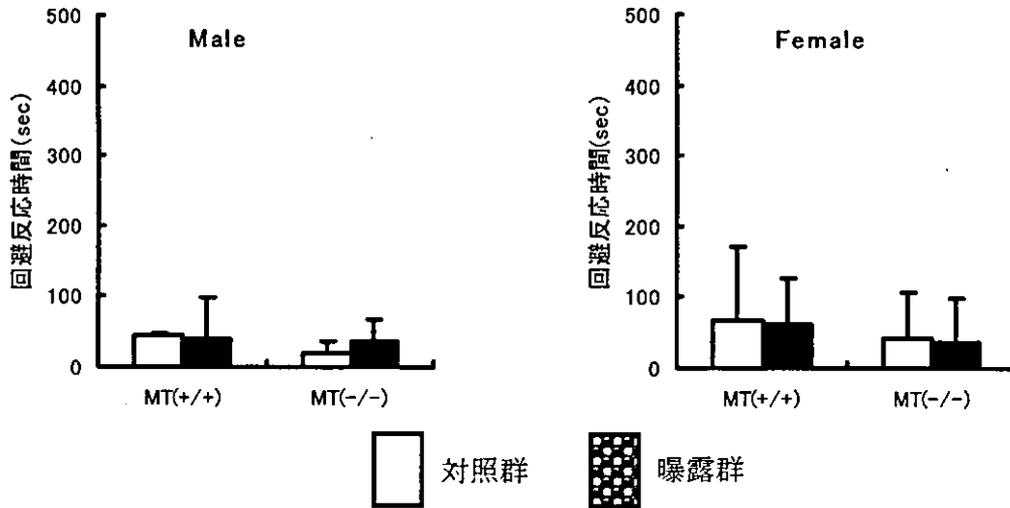


図 12. 加齢マウスの受動的回避反応試験における訓練試行での回避反応時間

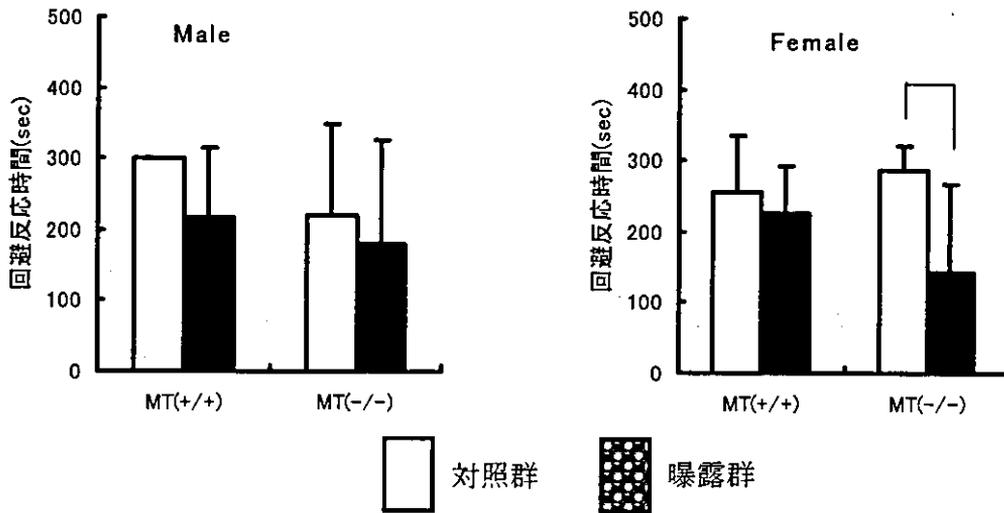


図 13. 加齢マウスの受動的回避反応試験における保持試行での回避反応時間

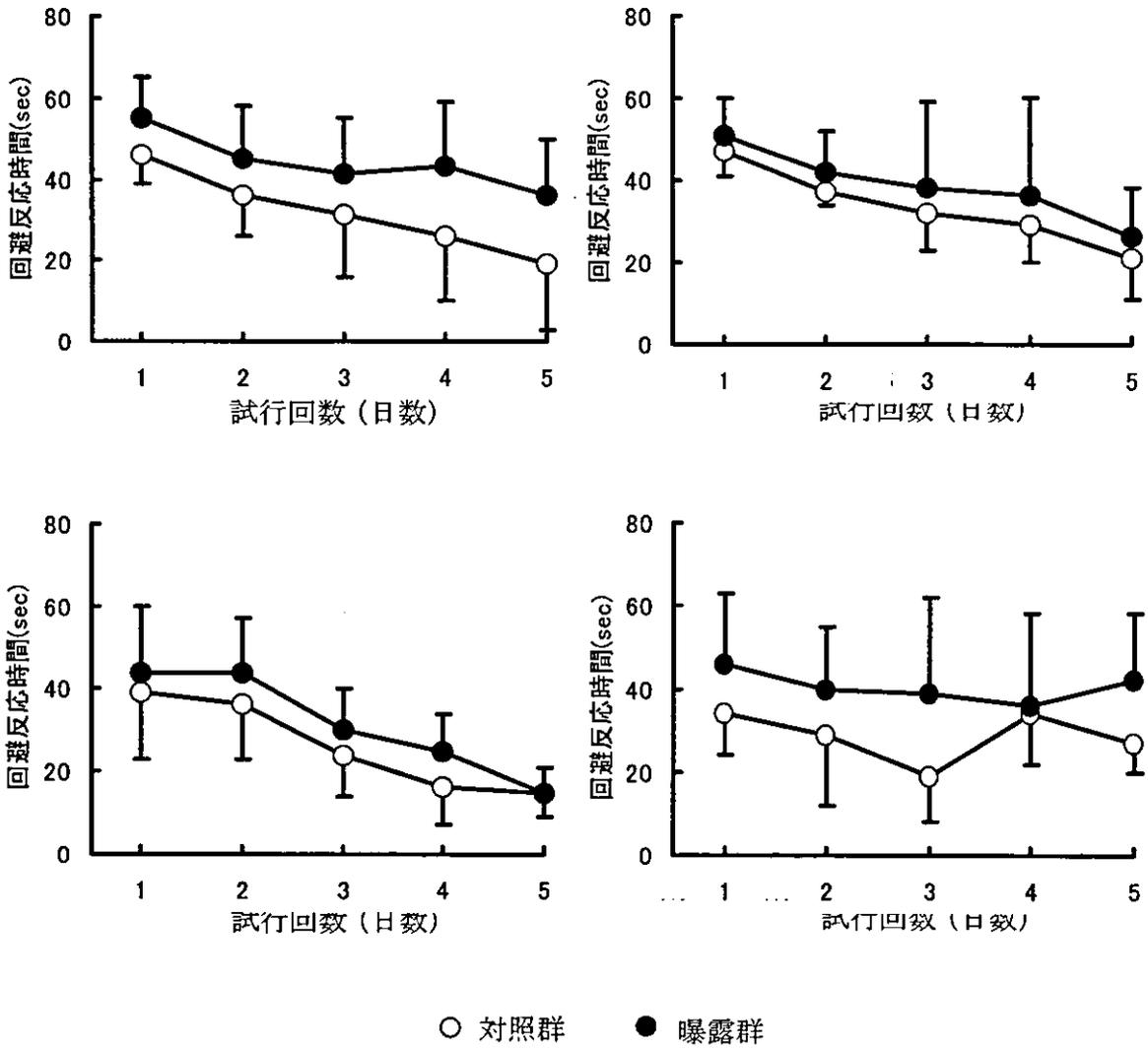


図 14. 若年マウスの Morris 水迷路試験における回避反応時間

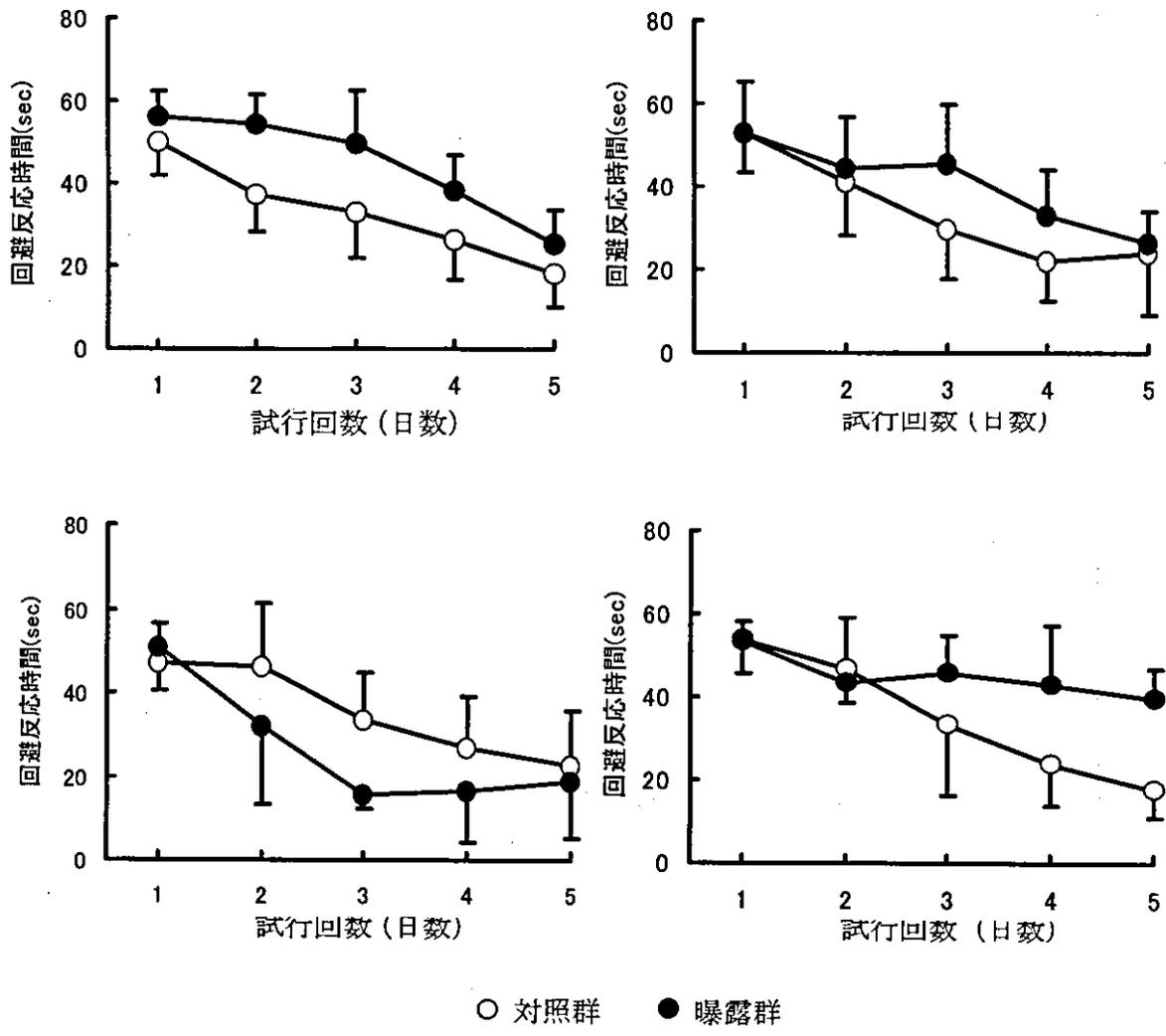


図 15. 加齢マウスの Morris 水迷路試験における回避反応時間

* $P < 0.05$ で対照群との間に有意差あり

表 1. 出産後 10 日目における曝露群の脳の水銀濃度 (ng/g)

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8±1.2	348±176	4.9±1.4	486±120

表 2. 出産 3 ヶ月後における曝露群の脳の水銀濃度 (ng/g)

		Wild type		MT-null	
		Control	Exposed	Control	Exposed
Male	Brain	6.8±1.2	5.4±1.1	7.3±1.4	5.8±0.5

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

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 鈴木愛美 聖マリアンナ医科大学・生化学教室化学分野

研究要旨

わが国では水俣病やイタイイタイ病が発生して以来、重金属による環境汚染が社会問題となっている。この問題はわが国のみに留まらず、地球規模的な環境汚染の拡大が国際的にも懸念されている。メチル水銀や水銀蒸気は他の重金属と異なり脂溶性であるため、脳血液関門や胎盤関門を容易に通過し、脳や胎児に水銀が蓄積することが知られている。水銀に対する高感受性集団である胎児に対するメチル水銀や水銀蒸気曝露による影響を調べた研究は多いが、これらの水銀の複合曝露による影響に関する知見はほとんどない。一方、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あるいは水銀蒸気に中枢神経毒性に対しさらに感受性を亢進させる要因となる。遺伝的要因をもち、しかも胎生期において低濃度のメチル水銀(MeHg)と水銀蒸気(Hg⁰)の複合曝露された場合に胎児の発育・発達に及ぼす影響、とくに神経行動毒性については知られていない。本研究では、メタロチオネイン遺伝子

欠損マウス(以下、MT(-/-)マウスと略す)や野生型マウス(以下、MT(+/+)と略す)を用いて、胎生期における低濃度の Hg^0 、MeHg、そして Hg^0 と MeHg の複合曝露(Hg^0 +MeHg 曝露)が、神経行動機能に及ぼす影響について検討した。

Hg^0 曝露群は、マウスを水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 $0.030\text{mg}/\text{m}^3$ (範囲 $0.017\sim 0.038\text{mg}/\text{m}^3$) で 1 日 6 時間、妊娠 0 日目より妊娠 18 日目まで連日曝露を行った。その後、曝露を中止した。MeHg 曝露群は、妊娠 0 日目より MeHg 5ppm 含有飼料を出産 10 日目まで与え、その後は MeHg 無添加飼料で飼育した。 Hg^0 +MeHg 複合曝露群は、妊娠 0 日より、 Hg^0 と MeHg を同時に曝露し、 Hg^0 曝露は妊娠 18 日目で中止し、MeHg 含有飼料は出産 10 日目まで与えた。いずれのマウスも出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したときにオープンフィールド(OPF)試験、受動的回避反応(PA)試験、モリス水迷路試験を用いて行動解析を行った。また出産 10 日目において、対照群および Hg^0 、MeHg、 Hg^0 +MeHg 各曝露群の新生児を屠殺し、脳・腎臓・肝臓中の水銀濃度を測定した。そのときに、出産 10 日目における新生児の体重も測定した。

OPF 試験では、MT(+/+)マウスにおいて、 Hg^0 曝露群では雌雄ともに自発行動量や探索行動に変化は認められなかった。しかし、MeHg 曝露群では、雄マウスで自発行動量の亢進し、雌マウスでは、自発行動量の低下しており、雄マウスの結果と異なった。探索行動は雄マウスで低下が認められたが、雌マウスで探索行動に変化は見られなかった。 Hg^0 +MeHg 複合曝露群では MeHg 曝露群と同様、雄マウスで自発行動量の亢進が見られ、雌マウスでは、自発行動量は低下していた。また探索行動は雄マウスで低下し、雌マウスでは変化は認められなかった。これに対し、MT(-/-)マウスの雄では、 Hg^0 、MeHg、 Hg^0 +MeHg 各曝露群の総移動距離、中心に滞在する割合ともに、対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし、雌マウスでは Hg^0 曝露群、 Hg^0 +MeHg 複合曝露群の自発行動量の亢進が認められたが MeHg 曝露群では変化は認められなかった。また探索行動について、 Hg^0 曝露群、 Hg^0 +MeHg 複合曝露群に低下が認められたが MeHg 曝露群では変化は認められなかった。

嫌悪体験に対する学習獲得能力を評価する PA 試験において MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに、訓練試行および保持試行の回避反応時間は雌雄マウスともに Hg^0 、MeHg、 Hg^0 +MeHg 各曝露群と対照群との間に有意な差異は認められなかった。

空間認識に対する学習能力を評価するモリス水迷路試験では MT(+/+)マウスの雄マウスで MeHg 曝露群と Hg^0 +MeHg 複合曝露群に学習獲得能力に遅延が認められた。しかし、雌マウスの Hg^0 、MeHg、

Hg⁰+MeHg 各曝露群や雄マウスの Hg⁰ 曝露群では学習獲得能力に対照群との間に差異はなかった。MT(-/-)マウスでは、Hg⁰ 曝露群や Hg⁰+MeHg 複合曝露群の雌マウスで、学習獲得能力に遅延がみられたが、Hg⁰+MeHg 複合曝露群の空間学習に対する影響は必ずしもHg⁰曝露群より強くはなかった。雄マウスの Hg⁰、MeHg、Hg⁰+MeHg 各曝露群や雌マウスの MeHg 曝露群では空間学習に対する影響は認められなかった。

出産 10 日目に測定した新生児の脳の水銀濃度は、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに対照群に比べ、Hg⁰ 曝露群では雌雄マウスともに僅かに高い値を示したが、MeHg 曝露群と Hg⁰+MeHg 曝露群は雌雄マウスとも 100 から 400 倍高値であった。しかし、MeHg 曝露群と Hg⁰+MeHg 曝露群の脳の水銀濃度はほぼ同じレベルにあった。

以上の結果より、胎生期に WHO が推奨した NOAEL(無影響量)0.025 mg/m³ に近い Hg⁰ 曝露(0.03 mg/m³)を受けた場合、MT(+/+)マウスでは、神経行動に対する影響は少ないが、MT(-/-)では行動影響が認められ、無機水銀に対し、MT(-/-)マウスは高感受性であることが明らかとなった。しかしながら、胎生期に 5ppm MeHg の曝露を受けた場合、MT(+/+)マウスでは OPF 試験やモリス水迷路試験で行動影響が見られ、特に雄マウスで MeHg に対する感受性が高いことが判明した。また今回、Hg⁰ と MeHg による複合曝露の影響を見たが、MT(+/+)マウス、MT(-/-)マウスともに Hg⁰ 曝露群や MeHg 曝露群より Hg⁰+MeHg 複合曝露群により強い行動影響は認められず、本実験条件下では胎生期における水銀曝露の影響は Hg⁰ 曝露や MeHg 曝露による影響が出現していた。

緒言

水銀、カドミウム、鉛、ヒ素などは極めて毒性が強く、このような重金属を取り扱う産業現場ではしばしば中毒が発生し、職業病として古くから知られている。わが国では水俣病やイタイイタイ病が発生して以来、重金属による環境汚染が社会問題として大きな関心事となったが、この問題はわが国のみに留まらず、地球規模的な環境汚染の拡大が国際的にも懸念されている。特にメチル水銀による健康被害は水俣病やイラクのメチル水銀中毒事件に端を発し、今日では、金採掘鉱山周辺の水銀汚染、多量の魚介類摂取によるメチル水銀による健康問題が世界各国で論議されている。水銀蒸気に関しても、歯科用アマ

ルガムから発生する水銀蒸気による健康影響もメチル水銀と同様に国際的に関心が高まっている¹⁾²⁾。

メチル水銀や水銀蒸気は他の重金属と異なり脂溶性であるため、脳血液関門や胎盤関門を容易に通過し、脳や胎児に水銀が蓄積することが知られている³⁾。胎生期における水銀曝露は、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水銀毒性の影響が大きいことが明らかとなった⁴⁾。最近、米国環境保護庁(EPA)はメチル水銀による妊娠中に曝露を受ける胎児の健康影響を防止する目的で、メチル水銀の基準摂取量(RFD)が引き下げられた。わが国でも魚介類を多食する日本人の摂取レベル付近での安全性が問題になり、厚生労働省は妊婦に対し、一部の魚種の大量連続摂取を控える勧告を出している。

妊婦の水銀曝露は魚介類からのメチル水銀曝露に加えて、歯科用アマルガムからの水銀蒸気曝露も存在する。妊娠動物を用いた実験で、母体の歯科水銀アマルガムの充填本数に依存して胎児組織中の水銀濃度が上昇することが報告されている⁵⁾⁶⁾。水銀に対する高感受性集団である胎児に対するメチル水銀や水銀蒸気曝露による影響を調べた研究は多いが、これら水銀の複合曝露による影響に関する知見はほとんどない。しかも、一般環境、とくに食物を介しての胎生期において低濃度のメチル水銀と水銀蒸気の複合曝露された場合に胎児の発育・発達に及ぼす影響、とくに神経行動毒性については知られていない。

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⁷⁾。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と思われる。

最近、Michalska & Choo⁸⁾ や Master et al.⁹⁾ 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、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、胎生期における低濃度の水銀蒸気(Hg⁰)、メチル水銀(MeHg)そして水銀蒸気とメチル水銀(Hg⁰+MeHg)の複合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、特に神経行動機能にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

実験材料

動物・飼育飼料

OLA129/C57/BL6 系の野生型マウス(MT(+/+))とMT 遺伝子欠損マウス(MT(-/-))は Dr. Choo (オーストラリア)より供与された。メチル水銀無添加(コントロール)飼料 と メチル水銀 5ppm 含有飼料は日本クレア株式会社より購入した。

実験方法

1) 水銀蒸気(Hg⁰)曝露¹⁰⁾

交配は、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 0 日目とした。餌はメチル水銀無添加飼料を与え、飼育した。妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m³ (範囲 0.017~0.038 mg/m³)で1日 6 時間、妊娠 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°C、湿度 55±5%)で出産させた。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80°Cで冷凍保存した後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1~2 匹を用い、実験群は一群 5~6 匹とした(図 1)。

2) メチル水銀(MeHg)曝露

交配は、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 0 日目とした。妊娠したマウス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 日目まで与え、その後は、メチル水銀を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80°Cで冷凍保存した後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1~2 匹を用い、実験群は一群 5~6 匹とした(図 2)。

3) 水銀蒸気とメチル水銀(Hg⁰+MeHg)複合曝露

交配は、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 0 日目とした。妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m³ (範囲 0.017~0.038 mg/m³) で 1 日 6 時間、妊娠 18 日目まで連日曝露を行った。曝露装置内中の Hg⁰ 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。また、メチル水銀 5ppm 含有飼料を出産 10 日目まで与え飼育し、その後は MeHg を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。曝露終了後、動物施設内(室温 22.5±0.5°C、湿度 55±5%) で出産させた。出産後、仔の数を雌雄 3 匹に揃えた。出産 10 日目に新生児雌雄各 2 匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、-80°C で冷凍保存した後、臓器中の水銀濃度を還元気化原子吸光光度法で測定した。出産 28 日目に離乳させ、仔が 8 週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各 1~2 匹を用い、実験群は一群 5~6 匹とした (図 3)。

4) 行動試験

1. オープンフィールド(Open field)試験¹¹⁾

オープンフィールド(Open field) 試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。マウスを全く経験したことのない新しい環境(Open field)に置いた時の自発運動は、固体の運動活動性、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見る上で、最も基本的な指標として応用されている。

実験は室内の照明を消し、80 ルクスの照明のみで行った。最初に 70%エタノールで装置内(60×60×60cm)をきれいに拭いた。その後、装置の中央に筒(直径 10×10cm)を置き、30 秒間マウスを放置した。30 秒後筒を取り、コンピューターを作動させた。CCD カメラでマウスの行動を 5 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。次のマウスの実験を行った。

2. 受動的回避反応(Passive avoidance)試験¹²⁾

受動的回避反応(Passive avoidance)試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。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。実験は室内の照明は消し、400 ルクス of 照明を明箱の上にあて、実験を行った。最初に 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・尿のシートを置いた。ギロチンピアをした状態で、明箱にギロチンピアと反対の方向に向けてマウスを入れ、30 秒間放置した。30 秒後、ギロチンピアをとり、スタートボタンを押した。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ピアを閉めた。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マウスの試験を開始した。翌日、保持試行として、同様な実験を行い、マウスが嫌悪体験を記憶しているか調べた。但し、1 日目を訓練試行とし、2 日目を保持試行として試験を行った。1 日目(訓練試行)で暗箱にマウスが 300 秒過ぎても入らない場合は、その時点で試験中止とした。

3. モリス水迷路試験¹³⁾

モリス水迷路試験装置は小原医科産業株式会社製(東京)を用いた。この試験は空間認知による学習能力を調べる方法である。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。直径 1m、深さ 30cm の円筒の水槽に水を張り、入水されたマウスが回避できるためのプラットフォームを設置した。プラットフォームを隠す目的で水面下 1cm になるように 23°C 前後の白濁させた水を張った。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した。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フォームを設け、プール内壁面にマウスの鼻部を向けて静かに水中に入れた。水槽内の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した。最大観察時間は 60 秒で 1 日 4 試行を 5 日間行った。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)とは、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何回横切るかを測定する実験法である。

5) 組織中の水銀濃度測定¹⁰⁾

水銀濃度測定には、高感度還元気化水銀測定装置 マーキュリー/RA-1(日本インスツルメンツ株式会社)を用いた。各種組織中の総水銀を酸化し、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、電子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 253.7nm の波長における吸収を測定した。組織(脳・腎臓・肝臓:0.04~0.3g)0.04~0.3g を秤量したのち、ユニシール分解ルツボ(イスラエル製)に入れ、濃硝酸を 3ml 加えた。140°C に加熱したオープン内で 90 分間、加熱湿式灰化した。その後、分解ルツボを冷蔵庫に入れて約 90 分冷却した。冷却後、試験管に移し、さらに H₂O を加えて、20ml に調整した。その後、水銀濃度を還元気化-原子吸光光度法で測定した。

6) 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、あるいは Mann-Whitney's U-検定で処理した。

結果

(1) 出産時の体重の比較

妊娠期間中の Hg⁰ 曝露、MeHg 曝露、Hg⁰+MeHg 複合曝露による胎児への影響の指標として、出産時の体重について調べた。図 4・5 には、出産 10 日目における雌雄の野生型マウス(MT(+/+))と MT 欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control 群)、Hg⁰ 曝露群、MeHg 曝露群、Hg⁰+MeHg 複合曝露群の体重を測定した結果を示した。

MT(+/)マウスでは、雌雄マウスともに、対照群と Hg⁰、MeHg、Hg⁰+MeHg 各曝露群との間で、体重に有意な差異は認められなかった(図 4)。また MT(-/-)マウスでは、Hg⁰ 曝露群と Hg⁰+MeHg 複合曝露群の雌マウスで対照群に比べ体重は有意に増加していた。しかし、雄マウスの対照群と Hg⁰、MeHg、Hg⁰+MeHg 各曝露群との間に体重差はなかった(図 5)。

(2) オープンフィールド(OPF)試験

図6と図7には、出産8週齢における雌雄のMT(+/+)マウスとMT(-/-)マウスの対照群とHg⁰曝露群、MeHg曝露群、Hg⁰+MeHg複合曝露群のOPF試験における自発行動量を表す総移動距離を示した。

MT(+/+)マウスではHg⁰曝露群で雌雄ともに対照群との間に有意な差異は認められなかった。MeHg曝露群では、雄マウスの総移動距離は対照群より有意に高値(p<0.05)を示し、自発行動量の亢進が認められた。一方雌マウスでは総移動距離は対照群より有意に低値(p<0.01)を示し、雄マウスとは異なり逆に自発行動量の低下が認められた。Hg⁰+MeHg複合曝露群では、MeHg曝露群と同様、雄マウスにおいて対照群より有意に高値(p<0.05)を示し、自発行動量の亢進が認められたが、雌マウスでは対照群より低値(p<0.01)を示し、自発行動量の低下が認められた(図6)。

MT(-/-)マウスではHg⁰曝露群では、雄マウスは対照群との間に有意な差異は認められなかったが、雌マウスにおいて対照群に比べ有意に高値(p<0.05)を示し、自発行動量の亢進が認められた。MeHg曝露群では、雌雄ともに対照群との間に有意な差異は認められなかったが、Hg⁰+MeHg複合曝露群では、Hg⁰曝露群と同様に雌マウスにおいて対照群に比べ有意に高値(p<0.05)を示し、自発行動量の亢進が認められた(図7)。

図8と図9には、出産8週齢における雌雄のMT(+/+)マウスとMT(-/-)マウスの対照群とHg⁰曝露群、MeHg曝露群、Hg⁰+MeHg複合曝露群のOPF試験での探索行動の活動度を表す中心に滞在していた割合を示した。

MT(+/+)マウスでは、Hg⁰曝露群で、雌雄マウスともに対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし、MeHg曝露群では、雄マウスにおいて対照群より有意に高値(p<0.01)を示したが、雌マウスでは対照群との間に有意な差異は認められなかった。Hg⁰+MeHg複合曝露群では、MeHg曝露群と同様、雄マウスにおいてのみ対照群より有意に高値(p<0.01)を示した(図8)。

MT(-/-)マウスではHg⁰曝露群で、雌マウスにおいて対照群より有意に高値(p<0.05)を示した。しかし、雄マウスでは対照群との間に有意な差異は認められなかった。MeHg曝露群では、雌雄マウスともに対照群との間に有意な差異は認められなかったが、Hg⁰+MeHg複合曝露群では、Hg⁰曝露群と同様、雌マウスのみに対照群より有意に高値(p<0.05)を示した(図9)。

図10～図13には、雌雄の野生型マウス(MT(+/+))とMT欠損マウス(MT(-/-))の対照群(Control群)、Hg⁰曝露群、MeHg曝露群、Hg⁰+MeHg複合曝露群OPF試験での5分間の観察中に排便した糞の数、排尿した回数すなわち情動反応を表す指標を示した。