

機関番号：31105

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590611

研究課題名 (和文)

発育・発達期の低濃度水銀蒸気曝露による神経行動毒性と遺伝的要因の影響

研究課題名 (英文)

Neurobehavioral changes in metallothionein-null mice postnatal exposed to low levels mercury vapor.

研究代表者

吉田 稔 (YOSHIDA MINORU)

八戸大学・人間健康学部・教授

研究者番号：80081660

研究成果の概要 (和文) : 発育・発達期に WHO が推奨した NOAEL (無影響量) に近い水銀蒸気 (Hg^0) で曝露 ($0.057\text{mg}/\text{m}^3$) を受けても、野生型 (MT(+/+)) および MT(-/-) 雌雄マウスともその後の神経行動に対する影響は少ないことが判明した。しかしながら、脳組織の DNA マイクロアレイ解析では変動した遺伝子数は MT(+/+) マウスに比べ MT(-/-) マウスに多かった。さらに高濃度の Hg^0 曝露濃度 ($0.178\text{mg}/\text{m}^3$) ではオープンフィールド試験で自発的運動量に変化が認められるとともに、変動した遺伝子数も増加していた。このことから Hg^0 曝露濃度の上昇による神経行動異常とともに変動遺伝子数の増加することが明らかとなり、DNA マイクロアレイ解析は発育・発達期における低濃度 Hg^0 曝露による神経行動毒性解明に有用な情報を提供すると思われる。

研究成果の概要 (英文) : Metallothionein MT-null and wild-type mice were repeatedly exposed to Hg^0 at $0.057\text{mg}/\text{m}^3$, which were similar to the current threshold value (TLV), until the 20th of postpartum. Hg^0 -exposed mice of both strains did not show behavioral changes such as total locomotor activity, learning ability and spatial learning ability. However, Hg^0 exposure resulted in significant alterations in gene expression in the brain of both strains using DNA microarray analysis. A number of altered genes in MT-null mice were more than those in wild-type mice. When the exposure levels elevated to $0.198\text{mg}/\text{m}^3$, MT-null mice showed a significant decrease in total locomotor activity in female, though learning ability and spatial learning ability were not affected. A number of altered genes were further increased by elevation of Hg^0 exposure levels. DNA microarray analysis may provide useful information to elucidate development of behavioral toxicity following a low-level exposure to Hg^0 .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：環境中毒学

科研費の分科・細目：衛生

キーワード：神経行動毒性、水銀蒸気曝露、新生児、メタロチオネイン、マイクロアレイ

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

水俣病が発生して以来、水銀による環境汚染に伴う健康被害は世界各国の大きな関心事になった。とくに、アマゾン川流域における金採掘に伴う水銀汚染はブラジルのみならず、アフリカ、アジア、東欧の金産出国でも同様な問題を抱えている。今日、小規模金鉱山における金採掘は中南米、東南アジア、アフリカなどの 50 カ国以上の発展途上国で行われ、国際労働機関(ILO)は小規模金鉱山で働く鉱夫は 1,100~1,300 万人で、うち女性が 250 万人、子供が 25 万人含まれていると推定している。多くの子供は家族の家計と助けるため両親と共に働いていることから水銀蒸気(Hg⁰)曝露による健康影響が危惧されている。

我々は、慢性的な Hg⁰ 曝露によって引き起こされた中毒症状は成人の場合、その曝露から離れることにより中毒症状が回復することを報告した (Yamamura et al.)。その一方、小児期に水銀曝露を受けた場合、成人に比べ水銀に対する感受性が高く、水銀中毒に罹患すると成人と異なり、その後遺症が残ることが報告されている(Counter et al, 2004; Yoshida et al. 2006)。動物実験では胎児期における Hg⁰ 曝露はその後の神経行動に影響を与えることが証明された (Yoshida et al., 2005, Yoshida et al., 2006)。しかしながら、発育期・発達期 (小児期) に低濃度の Hg⁰ (TLV 25µg/m³ 以下) に長期間にわたり曝露を受けた場合、神経行動にどのような影響を示すかについては余り知られていない。

水銀毒性を修飾する因子の一つにメタロチオネイン (金属結合蛋白質) が報告されている。我々はヒト組織中のメタチオネインを調べたところ、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 (Yoshida et

al., 1997; Kita et al. 2001 : Kita et al. 2006)。最近、ジーンターゲット法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が作成され、ヒトにおける化学物質の健康リスクの遺伝的要因モデルとして利用されている。すでに我々はこのメタロチオネイン- / 遺伝子欠損マウスを用いて動物実験では、水銀による神経行動毒性に対し、より感受性が高いことが判明した。このよう集団は遺伝的に重金属毒性に対し適応力が低く、一般環境から長期にわたり低濃度の Hg⁰ の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が危惧される。胎児と同様に小児や遺伝的要因 (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水銀曝露を受けた場合の中枢神経系、とくに神経行動機能に及ぼす影響を解明することは、発育・発達期の健康問題を考える上で重要であると考えられる。

2. 研究の目的

Hg⁰ 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。発育期・発達期 (小児期) に低濃度の Hg⁰ (TLV 25µg/m³ 以下) に長期間にわたり曝露を受けた場合、神経行動にどのような影響を示すかについては余り知られていない。

本研究は、世界的に問題となっている小児の水銀曝露を取り上げると共に、遺伝的要因を重金属毒性の防御因子であるメタロチオネイン-I/II 型欠損に焦点をあて、低濃度の Hg⁰ 曝露が小児の中枢神経機能に及ぼす影響を多角的な行動機能試験を用いて検討することにある。そして小児への低濃度水銀曝露がもたらす神経行動機能への影響に加えて、メタロチオネイン-I/II 型欠損による遺伝的要因

がもたらす水銀の神経毒性への修飾の解明を行う。加えて、低濃度 Hg^0 曝露による小児の神経行動機能への影響を DNA マイクロアレイによる脳の遺伝子発現のスクリーニングなどから、神経行動毒性メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) 新生児期における Hg^0 曝露による行動機能への影響

実験動物に C57BL/6 系マウスを用いた。メタロチオネイン-I/II 欠損マウス(MT(-/-))と野生型マウス(MT(+/+))をそれぞれ雄と雌を 1 対 1 で交配させ、プラグを確認し、飼育室内で出産させる。出産(出産 0 日とする)を確認後、出産 1 日目に雄 2 匹、雌 2 匹になるように仔を間引く。その後、母子とともに水銀曝露装置内に入れ、曝露を開始した。水銀曝露は職業性曝露の勧告限界値(TLV) $0.025\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、24 時間連日行った。曝露は離乳時出産 21 日目まで行った。その後、仔は出産 3 ヶ月後に行動試験をした。行動異常はオープンフィールドによる個体の運動活動性や情動反応、受動的回避実験装置による嫌悪体験記憶に基づく回避学習、そしてモリス水迷路および放射状迷路による空間学習などで評価した。行動実験終了後に屠殺し、水銀曝露群および対照群のマウスを組織中の水銀濃度は還元気化原子吸光法で測定した。水銀による遺伝子発現への影響を調べるために、脳をターゲットとしマイクロアレイ法により解析した。

(2) 水銀曝露による神経行動機能の影響を解明するための Hg^0 曝露モデルマウスでの検討

Hg^0 による中枢神経毒性の発症メカニズムは神経組織内での酸化反応で生成したイオ

ン性無機水銀が Hg^0 による神経症状の発現に起因していることが考えられている。銀蒸気曝露モデルマウスとして、脳室内より直接無機水銀を投与したマウスを用いることによって、脳内水銀濃度と神経行動機能への影響に対する量-影響関係の解明ができるか否かを検討した。実験は C57BL/6N マウス脳室内に $0.1\sim 10\text{mM}$ の HgCl_2 を注入 ($5\ \mu\text{l}$) し、その後 1 週間の生存率から LD_{50} 値(あるいは最小致死量)を求めた。求められた最小致死量の $1/5$ から $1/10$ の濃度を注入し、 Hg^0 曝露モデルマウスを得へ、その後、量-反応あるいは量-影響関係を脳の部位別水銀濃度や行動観察(オープンフィールド試験、受動回避試験および水迷路試験、遺伝子変動(DNA マイクロアレイ)を調べた。

4. 研究成果

(1) 新生児期における Hg^0 曝露による行動機能への影響

(1-1) 新生仔への Hg^0 曝露濃度を平均 $0.057\text{mg}/\text{m}^3(0.030\sim 0.108)$ で 1 日 24 時間、21 日間行った実験では、オープンフィールド試験による自発運動量、受動的回避試験による嫌悪学習そして水迷路試験による空間学習の試験結果に MT(-/-)および MT(+/-) 雌雄マウスとも水銀曝露群と対照群との間に差異は認められなかった。しかしながら、脳の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変

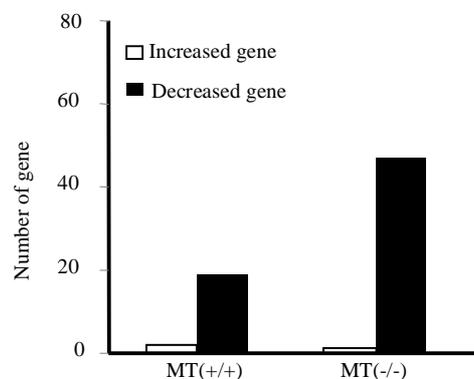


Fig. 1 Hg^0 曝露後の変動した遺伝子数

動の解析を行った結果、対照群の遺伝子に比

べ、2倍以上の遺伝子の変動を示した遺伝子数は明らかに MT (+/+) マウスに比べ、MT (-/-) マウスに多く見られた。MT (+/+) マウス、MT (-/-) マウスともに水銀曝露により増加した遺伝子より、減少した遺伝子の方が多かった (Fig. 1)。

(1-2) Hg⁰曝露濃度を平均 0.19mg/m³ (0.030~0.108)に上げて行った実験ではオープンフィールド試験による自発運動量に MT(+/-) 雌雄マウスと MT(-/-)の雌性に水銀曝露群と対照群との間に有意な差が認められた(Fig.2)。

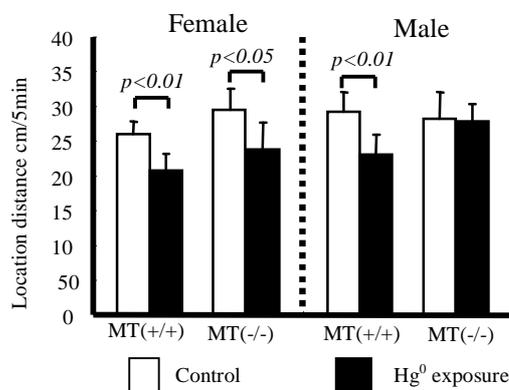


Fig.2 Hg⁰曝露後の9週後オープンフィールド試験

しかながら、受動回避試験や水迷路試験では MT(-/-)および MT(+/-) 雌雄マウスとも水銀曝露群と対照群との間に差異は認められなかった。表 1 には水銀曝露後の脳内水銀濃度の平均値を示す。

Table 1: Mercury concentration in brain (μg/g)

	Male		Female	
	MT(+/-)	MT(-/-)	MT(+/-)	MT(-/-)
Cerebrum	1.87±0.33	2.04±0.29	1.95±0.33	1.98±0.21
Cerebellum	1.85±0.29	2.05±0.28	1.93±0.25	1.96±0.25

雌雄マウス的大脑、小脳ともに MT(-/-)および MT(+/-)の間に有意な差は認められなかった。

Hg⁰曝露後の雄性 MT(+/-)マウス的大脑組織中の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の変動の解析を行った結果、水銀曝露濃度の上昇に伴い、変動遺伝子数の増加が見られた。しかも増加した遺伝子より、減少した遺伝子

の方が多かった(Fig.3)。

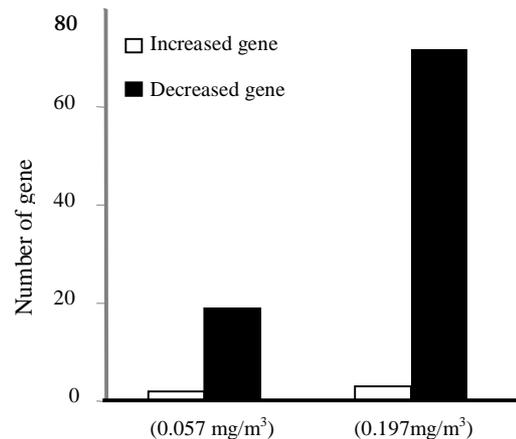


Fig.3 Hg⁰曝露後の変動した遺伝子数

以上の結果から、新生仔期に WHO が推奨した NOAEL (無影響量)に近い Hg⁰曝露を受けても、雌雄 MT(+/-)および MT(-/-)マウスともその後の神経行動に対する影響は少ないことが判明した。しかしながら、脳組織の DNA マイクロアレイ解析では変動した遺伝子数は MT(+/-)マウスに比べ MT(-/-)マウスに多く、しかも Hg⁰曝露濃度が上昇することにより変動した遺伝子数も増加していた。このことから Hg⁰曝露濃度の上昇による神経行動異常とともに変動遺伝子数の増加することが明らかとなった。

(2) 水銀曝露による神経行動機能の影響を解明するための Hg⁰曝露モデルマウスでの検討

8週齢マウスを用い、無機水銀 (1 mM および 2.5 mM) 脳室内投与と同じ週齢のマウスへ Hg⁰曝露 (7.5~8.3 mg Hg/m³ x 45 min) を行い、脳内水銀濃度を測定した。Hg⁰曝露マウスの3週間後の脳内水銀濃度は、1 mM 無機水銀を脳室内に投与したマウスとほぼ同レベルであった (Fig. 4)。

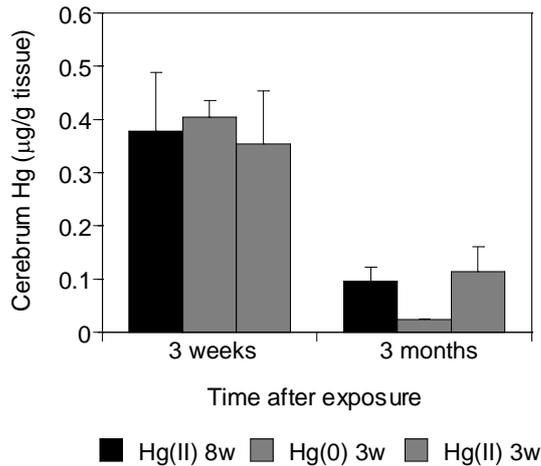


Fig. 4 無機水銀(Hg(II))脳室内投与マウス(8および3週齢)および水銀蒸気曝露マウス(8週齢)における曝露3週間後の脳内水銀濃度。

水銀毒性を鑑み、Hg⁰曝露モデルマウス作成に1 mM 無機水銀投与で実験を行った。3ヶ月経過するとHg⁰曝露モデルの脳内濃度の方が顕著に低く(Fig.4)、両モデルで脳からの水銀の排出速度の異なることが示唆される。また脳室内投与によりHg⁰曝露モデルをある程度再現できるものと考えられた。

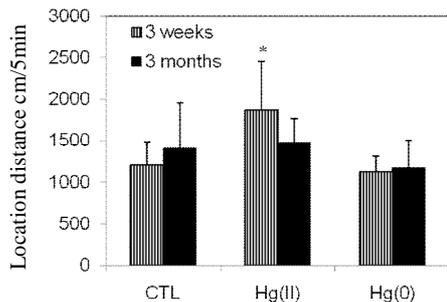


Fig.5 無機水銀(Hg(II))脳室内投与群とHg⁰曝露群のオープンフィールド試験

オープンフィールド試験においては、脳室内投与モデルで曝露3週間後に総移動距離の延長が認められるが、3ヵ月後には消失

した(Fig.5)。しかし、Hg⁰曝露モデルでは影響が認められないことから、脳室内に投与された無機水銀の方が強く作用することが明らかとなった。

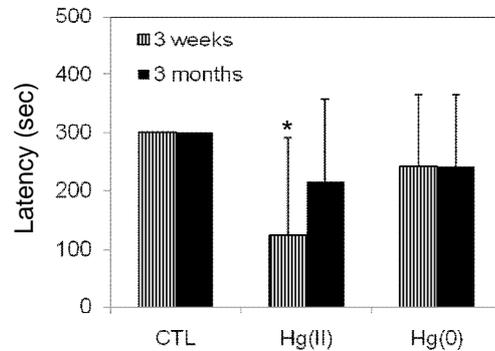


Fig. 6 無機水銀(Hg(II))脳室内投与群とHg⁰曝露群の受動的回避反応試験

受動的回避反応試験では無機水銀脳室内投与群の3週間において、嫌悪学習能力の低下が認められた(Fig. 6)。

以上の結果より、無機水銀の脳室内投与は、水銀蒸気曝露モデルをある程度再現するが、その作用の強さに差のあることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Yoshida M, Shimizu N, Suzuki M, Watanabe C, Satoh M, Mori K, Yasutake A.; Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice. 査読有, Environ Health Perspect. 16(6), 2008, 746-51

Ohtani-Kaneko R, Tazawa H, Yokosuka M, Yoshida M, Satoh M, Watanabe C; Suppressive effects of cadmium on neurons and affected

proteins in cultured developing cortical cells. 査読有, *Toxicology*. 20;253(1-3), 2008, 110-6.

Yasutake A, Marumoto M, Yoshida M.; Neurotoxic action of inorganic mercury injected in the intraventricular space of mouse cerebrum. 査読有, *J Toxicol Sci*. 35(5), 2010, 767-771

Yoshida M, Suzuki M, Satoh M, Yasutake A, Watanabe C.; Neurobehavioral effects of combined prenatal exposure to low-level mercury vapor and methylmercury. 査読有, *J Toxicol Sci*. 36(1), 2011, 73-80.

[学会発表] (計 8 件)

Yoshida M, Watanabe C, Satoh M, Mori K, Yasutake A.; Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice, Society of Toxicology 2008 Annual Meeting, March 16-20, Seattle, USA

吉田稔、安武 章：マウスにおける無機水銀の神経毒性作用：無機水銀脳室内投与モデルを用いた検討、第 79 回日本衛生学会総会、平成 21 年 3 月 29 日～4 月 1 日、北里大学白金キャンパス、東京都

Mineshi Sakamoto, Xinbin Feng, Minoru Yoshida, Katsuyuki Murata, Akira Yasutake: Contribution of NIMD to Mercury Research in Guizhou, China, II. Human Exposure Research: High Exposure of Chinese Mercury Mine Workers to Mercury Vapor and Increased Methylmercury Levels in the Hair, 9th International Conference on Mercury as Global Pollutant, 平成 21 年 6 月 8 日～12 日, 貴州省貴陽, 中国

Minoru Yoshida, Chiho Watanabe, Masahiko Satoh, Akira Yasutake: Neurobehavioral changes in metallothionein-null mice prenatally exposed to low level methylmercury,

9th International Conference on Mercury as Global Pollutant, 平成 21 年 6 月 8 日～12 日, 貴州省貴陽, 中国
吉田稔、村田勝敬、佐藤洋：小規模金鉱山における水銀による作用業者の健康状況について～文献検索から～：第 68 回日本産業衛生学会東北地方会、平成 21 年 7 月 24 日～25 日、秋田県医師会館会議室、秋田市

吉田 稔：新生仔 MT ノックアウトマウスの水銀蒸気に対する感受性について、第 12 回メタロチオネインノックアウトマウス研究会、平成 21 年 12 月 14 日～15 日、「南明ホテル」、熱海市、静岡県
吉田 稔、佐藤雅彦、安武 章、渡辺知保：発育・発達期における水銀蒸気曝露の神経行動毒性について、第 80 回日本衛生学会総会、平成 22 年度 5 月 9 日～11 日、仙台国際センター、宮城県
吉田 稔：新生仔 MT ノックアウトマウスの水銀蒸気に対する感受性について、第 13 回 MT ノックアウトマウス研究会、平成 22 年 11 月 18 日～19 日、湖のホテル、河口湖町、山梨県

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 稔 (YOSHIDA MINORU)

八戸大学・人間健康学部・教授

研究者番号：80081660

(2) 研究分担者

佐藤 雅彦 (SATO MASAHIKO)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：20256390

(3) 連携研究者

渡辺 知保 (WATANABE CHIHO)

東京大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70220902

安武 章 (YASUTAKE AKIRA)

国立水俣病総合研究センター・生化学室長

研究者番号：20344418