

平成 30 年 9 月 4 日現在

機関番号：31105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08784

研究課題名(和文) 発達期の低濃度複合水銀曝露が加齢時における神経行動毒性に及ぼす影響と遺伝的修飾

研究課題名(英文) Neurobehavioral effects of combined mercury compounds in postnatal exposure mice

研究代表者

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)

八戸学院大学・健康医療学部・教授

研究者番号：80081660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：授乳期マウスへの水銀蒸気(Hg0)、メチル水銀(MeHg)そしてHg0+MeHg複合曝露の結果、オープンフィールド(OPF)試験の自発行動量はMeHg曝露群、Hg0曝露群、MeHg+Hg0曝露群ともに対照群より亢進し、探索行動は、MeHg+Hg0曝露群に影響が認められた。神経行動異常を解明するため、遺伝子の発現レベルについて検討を行った結果、大脳においては、Ppp3cbのmRNAレベルのみが、MeHg曝露によって有意に上昇し、小脳ではDef8、Hsf2、Tcf20およびFucaのmRNAレベルがMeHg曝露のみが、有意に上昇を示した。今後、行動異常と遺伝子発現との関係を解明する必要がある。

研究成果の概要(英文)：Neurobehavioral toxicity of exposure to low-level mercury vapor (Hg0), methylmercury (MeHg) and the combination of Hg0 and MeHg in female mice during postnatal development were examined. Total locomotive activity in the open field (OPF) significantly decreased in the MeHg and combined exposure groups compared with the control group. The proportion of entries to central area in the OPF was significantly higher in the combined exposure group than in other groups. The brain Hg concentration of offspring was highest in the combined exposure group, followed by the MeHg and Hg0 exposure groups. To clarify the mechanism of behavioral abnormalities by MeHg or combined exposure, we investigated gene expression changes in the brain using real-time RT-PCR method. The exposure to MeHg showed increased the mRNA level of PPP3CB in the cerebrum and def8, HSF2, Tcf20 and Fuca in the cerebellum. It is necessary to clarify the relationship between behavioral abnormalities and gene expression.

研究分野：環境中毒学

キーワード：水銀蒸気 メチル水銀 複合曝露 行動異常 授乳期 マウス 遺伝子発現

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。最近、金や水銀採掘に伴う水銀土壌汚染は穀類の水銀汚染を引起し、穀物中に高濃度のメチル水銀 (MeHg) が検出されたことから、魚介類摂取以外にも米食からの MeHg 曝露が問題視されている (Qiu et al., 2008)。しかしながら、発育・発達期に低濃度の水銀蒸気や MeHg に複合曝露うけた場合、行動機能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。

2. 研究の目的

小規模金採掘鉱山周辺に居住する住民は大気からの低濃度の水銀蒸気 (Hg^0) と食事からの MeHg による複合曝露をうけており、その健康影響が国際的に注目されている。本研究は水銀に対する感受性の高い発達期において環境からの水銀蒸気と食事からの MeHg による複合水銀曝露がその後の健康影響とくに神経行動機能へどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

「実験動物」

動物は生後 1 日齢の C57BL/6J 系雌性マウスを中部科学資材 (株) (名古屋) より購入し、対照群、MeHg 曝露群、 Hg^0 曝露群そして MeHg+ Hg^0 曝露群に分け、1 群 12 匹とし、実験に供した。

「曝露方法」

MeHg 曝露はオリエンタル特注天然 FM 粉末飼料に塩化 MeHg (和光純薬工業 (株)、東京) を混入し、3.85ppmMeHg 含有固形飼料を作成し、餌として母仔に供与した。 Hg^0 曝露は水銀曝露チャンバー内で、母仔に Hg^0 濃度は平均 0.188 (0.125 ~ 0.252) mg/m^3 で、24 時間行った。曝露は生後 2 日齢から 28 日齢までの 27

日間連日おこなった。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。

「行動試験」

行動試験は 12 週齢に達した時に実施した。個体の運動活動性や情動反応はオープンフィールド (OPF) 試験、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、そして放射状迷路による空間学習などで評価した。

「遺伝子発現測定」

大脳および小脳組織から、TRIzol® Reagent (Ambion, Grand Island, NY, USA) を用いて total RNA を抽出した。その後、抽出した total RNA から PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara Bio, Shiga, Japan) を用いて cDNA を作製した。次いで、作製した cDNA をテンプレートにして、Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio) および SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa Bio) で 60°C、30 秒、40 サイクルの反応条件でリアルタイム RT-PCR を行った。

「水銀測定」

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。

「統計処理」

行動試験の有意差検定は各群間の分散分析を行ったのちに Student's-t 検定で処理した。遺伝子発現の統計解析には、分散分析 (ANOVA) と Bonferroni 補正法による多重比較 t 検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意のある差とした。

4. 研究成果

神経行動機能に対する影響について

図 1 には出生 11 週目におけるオープンフィールド試験による自発行動量を示す。総移動距離は対照群と MeHg 曝露群、 Hg^0 曝露群、MeHg+ Hg^0 曝露群との間に統計的に有意差が認められた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。

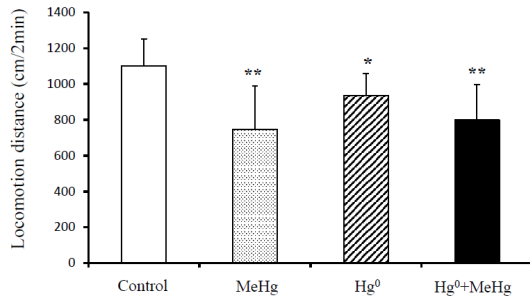


図1 12週齢雌性マウスにおけるオープンフィールド試験の移動距離
対照群との間に有意差あり; ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

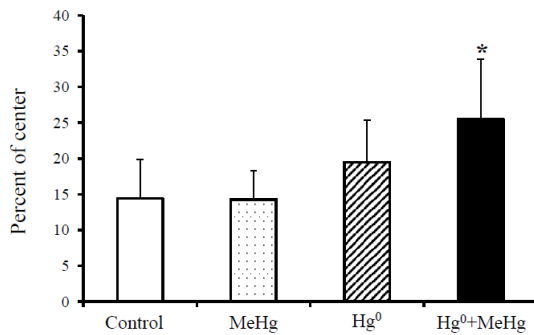


図2 12週齢雌性マウスにおけるオープンフィールド試験の中心に滞在している時間
対照群との間に有意差あり; * $p < 0.05$.

図2には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す。中心滞在割合は対照群とMeHg曝露群、Hg⁰曝露群との間には統計的に有意な差は認められなかったが、MeHg+Hg⁰曝露群との間に統計的に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

図3には受動的回避試験の訓練試行と保持試行の結果を示す。訓練試行そして24時間後の保持試行はいずれも対照群と曝露群間に有意な差異は認められなかった。

図4には放射状迷路試験での1試行中に「既に獲得したアームを訪れるエラー数」の結果を示す。各試行において、対照群と各曝露群の間に「既に獲得したアームを訪れるエラー数」に有意差は認められなかった。

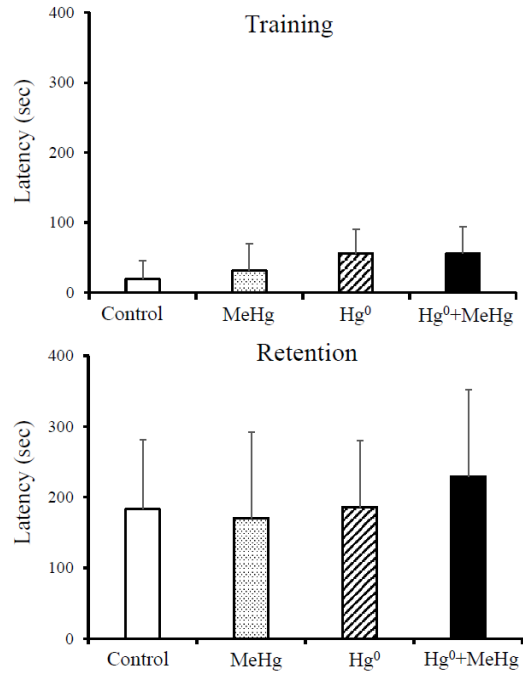


図3 12週齢雌性マウスにおける受動回避反応時間

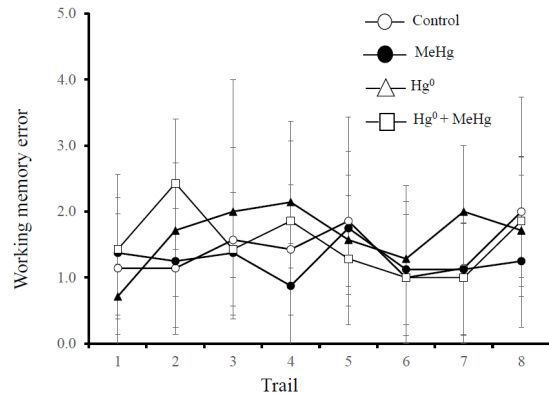


図4 放射状迷路試験における「既に獲得したアームを訪れるエラー数」

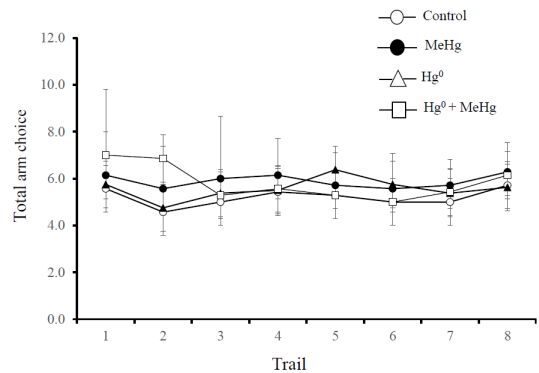


図5 放射状迷路試験における「アームを訪れた回数」

図5には1試行中に「アームを訪れた回数」を示す。各試行において、対照群と各曝露群の間に「アームを訪れた回数」に有意差は認められなかった。

表1 曝露終了後の組織中の水銀濃度 (ng Hg/g wet tissue)

	Cerebrum	Cerebellum	Liver	Kidney
Control (n=5)	7.6±2.3	2.3±6	21.0±5.1	35.1±11.7
MeHg (n=5)	1,630±361 ^{***}	1,110±107 ^{**}	1,340±1660 ^{##}	4,680±1,010 ^{##**}
Hg ⁰ (n=3)	758±63 ^{##**}	763±180 ^{##*}	679±359 ^{##**}	8,510±1,680 ^{##**}
Hg ⁰ +MeHg (n=5)	2,130±188 ^{##}	1,340±328 ^{##}	5,720±1,160 ^{##}	22,800±5,730 ^{##}

対照群との間に有意差あり: ^{##}p<0.01, [#]p<0.05,

MeHg+Hg⁰ 曝露群との間に有意差あり:

^{**}p<0.01, ^{*}p<0.05

表1には曝露終了後の各組織中の水銀濃度を示す。大脳の水銀濃度は対照群と比較し、MeHg群で、約210倍、Hg⁰群で約10倍そしてMeHg+Hg⁰群で約280倍高値であった。小脳の水銀濃度は対照群と比較し、MeHg群で、約480倍、Hg⁰群で約330倍そしてMeHg+Hg⁰群で約580倍高値であった。MeHg群とMeHg+Hg⁰群は大脳と小脳の水銀濃度は1μg/g以上であり、Hg⁰群でも0.71μg/g以上の濃度であった。

授乳期の水銀曝露による脳内の遺伝子発現変動について

水銀曝露による神経行動毒性を解明するために遺伝子発現との関係をリアルタイムRT-PCRで検討を行った。

遺伝子はDef8、Hsf2、Ppp3cb、Hmg20b、Rusc2、Tcf20、Slc8a1、Fuca、Zfp51およびPcdhga5を対象にmRNAレベルを検討した。これらの遺伝子のうち、Zfp1およびPcdhga5は、低濃度Hg⁰曝露によって2倍以上発現上昇を示した遺伝子であり、それら以外は、6割以下の発現低下を示した遺伝子である。

大脳における遺伝子発現は、MeHg曝露群のみがPpp3cbのmRNAレベルが有意に上昇し、他の遺伝子のmRNAレベルは各種水銀曝露による有意な変動は認められなかった(Fig. 6)。

大脳における遺伝子発現は、MeHg曝露群のみがPpp3cbのmRNAレベルが有意に上昇し、他の遺伝子のmRNAレベルは各種水銀曝露による有意な変動は認められなかった(Fig. 6)。小脳ではDef8、Hsf2、Tcf20およびFucaのmRNAレベルがMeHg曝露のみによって、有意に上昇した(Fig. 7)。一方、他の曝露群ではこいづれの遺伝子のmRNAレベルに変動は認められなかった(Fig. 7)。

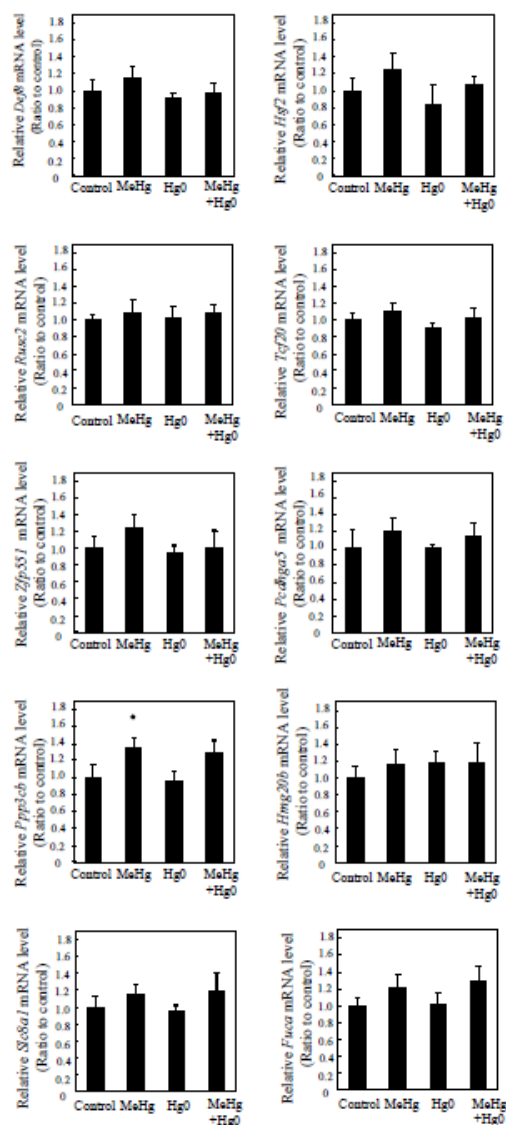


図6 大脳におけるmRNA発現量
対照群との間に有意差あり; ^{*}p<0.05

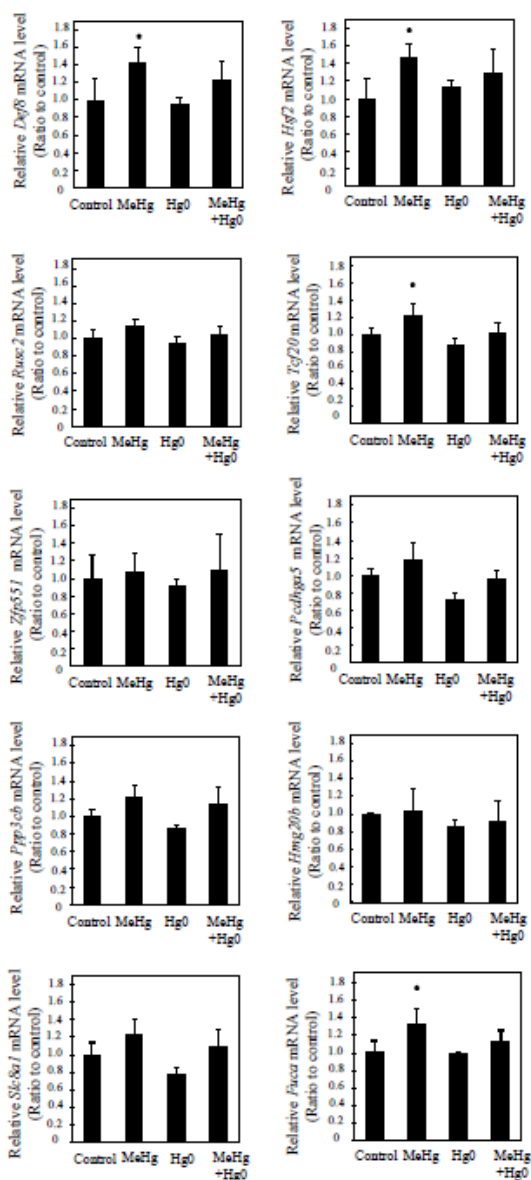


図7 小脳における mRNA 発現量
対照群との間に有意差あり; * $p < 0.05$

5. 考察

12 週齢で行った OPF 試験の自発行動量は MeHg 曝露群、Hg⁰ 曝露群、MeHg+Hg⁰ 曝露群ともに対照群より亢進していた。また OPF 試験の中心滞在割合は、MeHg+Hg⁰ 曝露群のみ、対照群との間に有意差が認められた。一方、嫌悪体験に対する学習獲得能力を評価する PA 試験、また学習能力を評価する 8 方向放射状迷路試験では「アームを訪れた回数」、「既に獲得したアームを訪れるエラー数」ともに対照群と各曝露群の間に差異は認められなかった。Yoshida et al. (2011) は胎生期における Hg⁰、MeHg、Hg⁰+MeHg 曝露群の OPF 試験

では MeHg と Hg⁰+MeHg 曝露群の雄性マウスに自発行動量の亢進そして雌性マウスでは自発行動量の低下を認めている。また Morris 水迷路試験でも、雄性マウスでは MeHg 曝露群と Hg⁰+MeHg 曝露群で対照群との間にプラットフォームまでの回避反応時間に遅延を認められた。しかも脳内水銀濃度は Hg⁰+MeHg 曝露群の雄マウスは単独曝露群に比べ高値であった。Fredriksson et al., (1992) も Hg⁰+MeHg 曝露群の脳内水銀濃度は単独曝露に比べ、高値であると述べている。しかし、授乳期における Hg⁰+MeHg 曝露後の脳内水銀と行動異常の関係を調べた論文は少なく、多くは Hg⁰ または MeHg 単独曝露に関するデータである。

Yoshida et al., (2014) は、授乳期に Hg⁰ に曝露されたマウスの OPF 試験では、自発行動量の低下と中心に滞在している割合の低下が認められ、その時の脳内水銀濃度は 1.9 $\mu\text{g/g}$ であったと述べている。また MeHg 曝露では脳内水銀濃度は 1.6 $\mu\text{g/g}$ であり、成獣マウスで行動異常が認められる脳内水銀濃度 4~9 $\mu\text{g/g}$ より低い濃度で OPF 試験での行動異常が生じている。今回の実験結果は授乳期における Hg⁰ または MeHg 曝露で行動異常を引き起こすとされる成獣の脳内水銀濃度より低い濃度で発現しており(表 1)、発育・発達期における水銀曝露のリスクを示唆するものである。とくに Hg⁰+MeHg 曝露は単独曝露に比べ、曝露終了後の脳内水銀は高く、OPF 試験で自発行動量の低下と探索行動の低下が認められ、神経行動毒性への影響が大きいことが明らかである。

さらに行動異常と遺伝子発現の関係を明らかにするために脳内の遺伝子発現量について調べた。MeHg 曝露群、Hg⁰ 曝露群、MeHg+Hg⁰ 曝露群のうち MeHg 曝露群のみが脳、小脳で一部の遺伝子に変動が認められた。とくに脳内水銀濃度が最も高値を示した MeHg+Hg⁰ 曝露群が認められたことは、今回検討した遺伝子の発現レベルは水銀蓄積量に依存

しないことが示唆された。

MeHg 曝露により、大脳で発現上昇を示した Ppp3cb は、神経機能に重要な役割を果たしている Calcineurin タンパク質の触媒サブユニットをコードする遺伝子であり、脳内で多く発現していることが知られている (Cottrell et al., 2016)。また、MeHg 曝露によって小脳で発現上昇した Hsf2 および Tcf20 は転写因子の一種であり、様々な外来ストレスが与えられた際に転写調節を行う遺伝子である (Mustafa et al., 2010; Yamanaka et al., 2014)。これら遺伝子は神経細胞をはじめ、様々な組織で重要な役割を果たしていることから、MeHg による発現上昇は、毒性発現あるいは防御メカニズムに関わる可能性が考えられる。本研究における発現変動が認められた遺伝子と MeHg 神経毒性との詳細な検討が今後の課題である。

6. 文献

- Cottrell, J.R., Li, B., Kyung, J.W., Ashford, C.J., Mann, J.J., Horvath, T.L., Ryan, T.A., Kim, S.H., Gerber, D.J.(2016): Calcineurin A γ is a functional phosphatase that modulates synaptic vesicle endocytosis. *J. Biol. Chem.* 291, 1948-1956.
- Fredriksson, A., Dahlgren, L., Danielsson, B., Eriksson, O., Dencker, L. and Archer, T. (1992): Behavioral effect of neonatal metallic mercury exposure in rats. *Toxicology*, 74, 151-160.
- Mustafa, D.A., Sieuwerts, A.M., Zheng, P.P., Kros, J.M. (2010): Overexpression of Colligin 2 in glioma vasculature is associated with overexpression of heat shock factor 2. *Gene Regul. Syst. Bio.* 4, 103-107.
- Qiu, G, Feng, X, Li, P, Wang, S., Li, G, Shang, L. and Fu, X. (2008): Methylmercury accumulation rice grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China, *J. Agr. Food Chem.* 7, 2465-2468.
- Yamanaka, T., Wong, H.K., Tosaki, A., Bauer, P.O., Wada, K., Kurosawa, M., Shimogori, T., Hattori, N., Nukina, N. (2014): Large-scale RNA interference screening in mammalian cells identifies novel regulators of mutant huntingtin aggregation. *PLoS One.* 9, e93891.
- Yoshida, M., Suzuki, M., Satoh, M., Yasutake, A. and Watanabe, C. (2011): Neurobehavioral effects of combined prenatal exposure to low-level mercury vapor and methylmercury. *J Toxicol Sci.*, 36(1):73-80. 2011

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Minoru Yoshida, Jin-Yong Lee, Hana Shimizu-Furusawa, Masahiko Satoh, Chiho Watanabe.: Neurobehavioral toxicity related to the exposure of weaning mice to low-level mercury vapor and methylmercury and influence of aging. *Fundam. Toxicol. Sci.* 3(4):185-193, 2017
2. Minoru YOSHIDA, Jin-Yong LEE, Masahiko SATOH, Chiho WATANABE. Neurobehavioral effects of postnatal exposure to low-level mercury vapor and/or methylmercury in mice. *J Toxicol Sci.* 43(1):11-17, 2018

〔学会発表〕(計5件)

1. Minoru YOSHIDA, Akiko HONDA, Chiho WATANABE, Masahiko SATOH, Akira YASUTAKE: The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology (Asiattox2015), Jun 23 ~ 26, 2015
2. 吉田 稔, 李 辰竜, 佐藤雅彦, 古澤 華, 渡辺知保: 発育・発達期における低濃度複合水銀曝露による神経行動機能に対する加齢の影響, 第86回日本衛生学会学術総会, 2016年05月11日~13日
3. 吉田 稔, 李 辰竜, 清水 華, 渡辺知保, 佐藤雅彦: 発育・発達期における低濃度水銀蒸気曝露後の神経行動毒性に対する加齢の影響について, 2016年6月29日~7月1日
4. Minoru YOSHIDA, Jin-Yong Lee, Maki Tokumoto, Masahiko SATOH, Chiho WATANABE: Neurobehavioral effects of combined mercury compounds in postnatal exposure mice, 57th Society of Toxicology, March 11-15, 2018
5. 吉田稔, 李辰竜, 佐藤雅彦, 渡辺知保: 授乳期における水銀蒸気/MeHg複合曝露による神経行動機能への影響, 第88回日本衛生学会学術総会, 2018年3月22日~24日

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者: 吉田 稔 (YOSHIDA MINORU)

研究者番号: 80081660

所属研究機関: 八戸学院大学・健康医療学部・教授

(2)研究分担者: 佐藤雅彦 (SATO MASAHIKO)

研究者番号: 20256390

所属研究機関: 愛知学院大学・薬学部・教授

(3)連携研究者: 渡辺 知保 (WATANABE CHIHO)

研究者番号: 70220902

所属研究機関: 国立研究開発法人国立環境研究所・理事長

(4)研究協力者: なし