

令和 4 年 9 月 1 日現在

機関番号：32698

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K10029

研究課題名(和文) 成長期における水銀蒸気/メチル水銀複合曝露が神経行動機能に及ぼす影響と修飾因子

研究課題名(英文) Neurobehavioral changes in mice exposed to low-level mercury vapor and/or methylmercury during postnatal development.

研究代表者

吉田 稔 (Minoru, Yoshida)

東京純心大学・看護学部・教授

研究者番号：80081660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：C57BL/6J系雌性マウスに0.094mg/m³水銀蒸気(Hg₀)と5 ppmメチル水銀(MeHg)の複合曝露を出生後から12週齢まで行い、17週齢に達したときに行動試験(オープンフィールド試験、受動回避反応試験)を実施した。複合曝露群に神経行動毒性が認められ、発育期における複合曝露はHg₀やMeHgの単独曝露に比べ、脳内水銀濃度は高く、神経行動機能に影響を与えることが判明した。複合曝露群の脳内発現変動遺伝子の解析ではAno2およびSgk1遺伝子の発現が1/2以下に低下しており、これらの遺伝子は神経疾患との関りが知られていることから、神経行動異常と関連性があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

発展途上国における小規模金鉱山周辺の住民は大気からの水銀蒸気(Hg₀)曝露に加えて、魚介類や穀物からのメチル水銀(MeHg)曝露が深刻な問題となっている。とくに高い感受性をもつ小児の健康影響が国際的に問題視されている。本研究結果は発育・発達期における低濃度のHg₀とMeHgによる複合曝露がそれぞれの単独曝露に比べ、神経行動機能に及ぼす影響が大きいことが明らかとなった。しかも脳内発現変動遺伝子の解析から神経疾患関連遺伝子の変動が確認された。研究結果は小規模金採掘鉱山周辺に居住する幼児・小児に対する環境からのHg₀と食事からのMeHgによる複合水銀曝露に対し警鐘を鳴らすものである。

研究成果の概要(英文)：This study examined the neurobehavioral changes and alterations in gene expression in the brains of female mice exposed to low-level mercury vapor and/or methylmercury during postnatal development. The mice were exposed to Hg₀ at a mean concentration of 0.094 mg/m³ supplied with tap water containing 5 ppm MeHg from day 11 to 12-week delivery. When their offspring reached the age of 17 weeks, behavioral analyses were performed. Total locomotive activity in the open field test and the retention trail in the passive avoidance test only in the combined exposure group was significantly changed than in the control group. In microarray analysis in the brain of the combined exposure group, the gene expressions of Ano2 and Sgk1 were decreased. They play crucial roles in the brain as calcium activated chloride channel and the kinase responding to cellular stress, respectively. These results provide useful information to elucidate the neurobehavioral changes in the combined exposure group.

研究分野：環境中毒学

キーワード：水銀蒸気 メチル水銀 複合水銀曝露 神経行動機能 マウス マイクロアレイ 遺伝子発現 成長期

1. 研究開始当初の背景

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を助けるため両親とともに働いていることから水銀蒸気曝露による健康影響が危惧されている。小児期に水銀曝露を受けた場合、成人に比べ水銀による中枢神経への影響は、大き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知られている(Counter et al, 2004)。最近、金や水銀採掘に伴う河川や土壌の水銀汚染は魚介類や穀類中に高濃度のメチル水銀が検出され、小規模金鉱山周辺では水銀蒸気曝露に加えて食事からのメチル水銀との複合水銀曝露が問題視されている(Li et al, 2008)しかしながら、発育発達期に低濃度の水銀蒸気やメチル水銀に複合曝露を受けた場合、神経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

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メチル水銀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。加えて、低濃度の複合水銀曝露による発育・発達期における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を行うことで神経行動毒性メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

「実験動物」

動物は生後7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、水銀蒸気(Hg^0)曝露群、メチル水銀(MeHg)曝露群、そして Hg^0+MeHg 複合曝露群に分け、1群23~30匹とし、実験に供した。

「曝露方法」

MeHg曝露は、水道水に純度98%塩化メチル水銀(和光純薬工業(株)、東京)を混入し、5ppm MeHg含有飲料水として供与した。 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0.094(0.023~0.206)mg/m³で、週5日間毎日8時間行った。曝露は生後11日齢から12週齢までの11週間おこなった。

「行動試験」

行動試験は17週齢と45週齢に達した時に各曝露群6~7匹とし実験に供した。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(PA)実験装置による嫌悪体験記憶に基づく回避学習などで評価した。

「遺伝子発現測定」

水銀曝露終了後に対照群、 Hg^0 曝露群、MeHg曝露群、そして Hg^0+MeHg 複合曝露群のマウス各3匹の脳よりtotal RNAをプールし、それぞれ50ngのtotal RNAを用いてラベル化cDNAを合成した。アジレント社のSurePrint G3 Mouse 8x60K ver.2.0スライドにハイブリダイゼーションを行い、対照群に比べて2倍以上発現上昇した遺伝子および1/2以下低下した遺伝子を検索した。

「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加熱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

(1) 神経行動機能に対する影響

「17 週齢の行動試験」

図 1 には生後 12 週齢まで曝露を受けた 17 週齢雌性マウスの OPF 試験による自発行動量を示す。総移動距離は対照群に比べ、MeHg+Hg⁰ 曝露群において統計的に有意に上昇していた ($p < 0.05$)。しかし、対照群と Hg⁰ 曝露群、MeHg 群との間に差異は認められなかった。図 2 には OPF 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 Hg⁰ 曝露群、Hg⁰+MeHg 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。MeHg 曝露群は対照群に比べ高値を示したが、統計的には有意差はなかった。

図 3 には PA 試験の訓練試行と保持試行の結果を示す。訓練試行では対照群と Hg⁰ 曝露群、Hg⁰+MeHg 曝露群との間に有意な差異は認められなかった。保持試行では回避反応時間に対照群と Hg⁰+MeHg 曝露群との間に統計的に有意差が認められた ($p < 0.05$)。一方、Hg⁰ 曝露群、MeHg 曝露群では対照群との間に回避反応時間に差異はなかった。

表 1 は曝露終了後の臓器中の総水銀濃度を示した。Hg⁰+MeHg 曝露群の脳内水銀濃度は Hg⁰ 曝露群や MeHg 曝露群に比べ高値を示し、大脳では Hg⁰ 曝露群の約 2.2 倍、MeHg 曝露群の約 1.5 倍高値を示した。また、小脳でも Hg⁰+MeHg 曝露群の水銀濃度は Hg⁰ 曝露群の約 1.6 倍、MeHg 曝露群の約 2.6 倍といずれも統計的に有意な高い値であった。

「44 週齢の行動試験」

加齢による代償機能の低下に伴う神経行動機能への影響を明らかにするため曝露中止後、生後 45 週齢に達したとき行動試験を実施した。OPF 試験では総移動距離や中心滞在割合は対照群と Hg⁰ 曝露群、MeHg 曝露群、Hg⁰+MeHg 曝露群ともに統計的な差異は認められなかった ($p > 0.1$)。PA 試験では訓練試行、保持試行ともに対照群と各曝露群との間に回避反応時間に差異は認められなかった ($p > 0.1$)。脳内の水銀濃度は Hg⁰+MeHg 曝露群は曝露終了 24 時間後の濃度に比べ、大脳では約 1/30 そして小脳では約 1/50 に低下した。

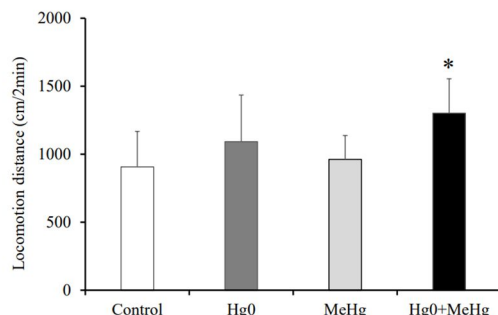


図1 17週齢雌性マウスにおけるオープンフィールド試験の移動距離
対照群との間に有意差あり；* $p < 0.05$

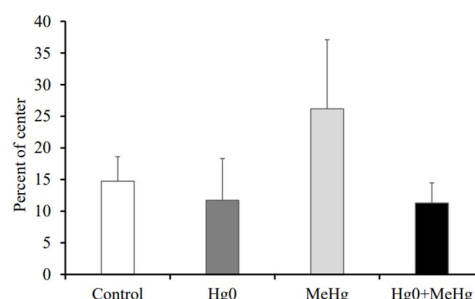


図2 17週齢雌性マウスにおけるオープンフィールド試験の中心に滞在している時間

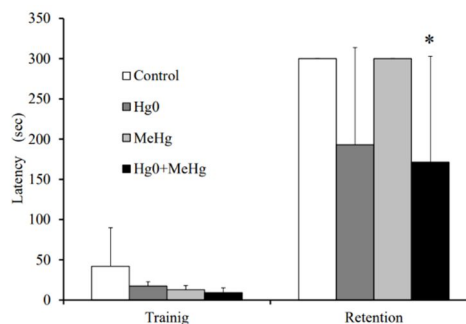


図3 17週齢雌性マウスにおける受動回避試験
対照群との間に有意差あり；* $p < 0.05$

Table 1. Mercury concentration(ng/g) in the organs of mice at 24 hours after the cessation of Hg⁰, MeHg and Hg⁰+MeHg exposure.

	Control	Hg ⁰	MeHg	Hg ⁰ +MeHg
Cerebrum	3.2±0.8**	147±23*	212±111	320±144
Cerebellum	2.0±1.4**	311±28**	187±84**	491±121
Lung	7.1±2.5**	50±21	279±187	241±220
Liver	20±1.9**	32±4.4	628±356	391±419
Kidney	39±22**	416±137*	1230±1052	1018±596

**Significant difference from the Hg⁰+MeHg at p<0.01

*Significant difference from the Hg⁰+MeHg at p<0.05

胎生期や発育期における MeHg や Hg⁰ 曝露による神経行動機能に及ぼす影響や加齢による影響に関して動物実験などで明らかにされている。しかしながら、この時期における Hg⁰ と MeHg による複合曝露の神経行動毒性に関する研究は少ない。胎生期における複合曝露の影響について、*Fredriksson et al. (1996)*は妊娠ラットへの複合曝露実験で、出生後の雄性ラットの OPF 試験やモリス水迷路試験において複合曝露群の神経行動毒性は Hg⁰ 曝露群により影響が大きいことを報告している。また *Yoshida et al. (2011)* はマウスによる胎生期における複合曝露では OPF 試験やモリス水迷路試験の結果から、Hg⁰ 曝露群や MeHg 曝露群に比べ、複合曝露による神経行動機能への影響が大きいと述べている。新生児期における雌性マウスの複合曝露実験でも *Yoshida et al. (2018)*は神経行動機能への影響は、単独曝露より大きいと述べている。本研究における授乳期から成熟期までの雌性マウスへの低濃度複合曝露の実験でも、複合曝露群が Hg⁰ や MeHg 曝露群に比べ、OPF 試験や PA 試験から神経行動機能への影響が大きいことが明らかとなった。また加齢による代償機能の低下による神経行動機能に及ぼす影響について、*Yoshida et al. (2008)*は胎生期におけるメタロチオネン(MT)-1/11 型欠損マウスへの MeHg 曝露は 12 週齢により 52 週齢において神経行動毒性が発現したことを報告した。また *Yoshida et al. (2013)*は授乳期における雌性マウスに対する低濃度 Hg⁰ 曝露では 3 か月齢での行動試験では異常は認められなかったが、15 か月齢における行動試験で異常が認められたと述べている。しかしながら、本研究では複合曝露群の 17 週齢における行動異常が認められたものの、45 週齢における行動試験では異常が認められず、加齢による影響を確認出来なかった。

(2) 水銀曝露による脳内の遺伝子発現変動

神経行動毒性と脳内変動遺伝子発現の関係について、*Yoshida et al. (2014)*は授乳期に低濃度 Hg⁰ 曝露による神経行動毒性がみられた MT-1/11 型欠損マウスの脳内変動遺伝子数は野生型マウスより多いこと報告した。変動した遺伝子にはカルシウムの結合に関与する Camk2a や Ppp3cd そして神経伝達物質に関係した Htr5b などの遺伝子の発現量の減少を見出した。

本研究では Hg⁰ 曝露群では 24 遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇し、27 遺伝子の発現が 1/2 以下に減少した。MeHg 曝露群では 29 遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇し、29 遺伝子の発現が 1/2 以下に減少した。そして Hg⁰+MeHg 複合曝露群では 41 遺伝子の発現が 2 倍以上に上昇し、19 遺伝子の発現が 1/2 以下に減少した。

曝露直後の DNA マイクロアレイ解析による大脳の発現変動遺伝子を同定したところ Hg⁰、MeHg そして Hg⁰+MeHg 曝露により *Pibdf1* 遺伝子の発現が上昇し、*Arhgap22* 遺伝子の発現が減少した。

これらの遺伝子の変動は、Hg⁰やMeHgに対し特異性がないことから、大脳における水銀応答遺伝子である可能性が示唆された。一方、17週齢で神経行動機能への影響が認められたHg⁰+MeHg複合曝露群のDNAマイクロアレイ解析では、*Ano2*および*Sgk1*遺伝子の発現が1/2以下に低下していた。*Ano2*遺伝子は、大脳のPurkinje細胞のカルシウム濃度調節に関与することが知られており、また*Sgk1*は、糖質コルチコイドによって誘導されるキナーゼタンパク質をコードしており、近年パーキンソン病などの神経疾患との関わりが注目されている。これら両遺伝子は、Hg⁰+MeHg曝露群のみで発現変動したことから、Hg⁰+MeHg複合曝露によって生じた行動異常と何らかの関連性があると考えられる。今後、水銀曝露による発現変動遺伝子の脳内での機能を詳細に解析することで、水銀曝露による行動異常の詳細な分子機構が明らかになると期待される。

引用文献

- Counter S.A. and Buchanan, L.H. (2004): Mercury exposure in children: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **198**, 209-230.
- Fredriksson, A. et al. (1996): Prenatal coexposure to metallic vapor and methylmercury produce interactive behavioral changes in adult rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, **18**:129-134.
- Li P. et al. (2008): Mercury exposure in the population from Wuchuan mercury mining area, Guizhou, China. *Science Total Environment* **395**: 72-79,
- Yoshida M. et al. (2006) :Behavioral changes in metallothionein-null mice after the cessation of long-term, low-level exposure to mercury vapor. *Toxicol Lett.* Mar 1;161(3):210-218
- Yoshida M. et al. (2008): Emergence of delayed methylmercury toxicity after perinatal exposure in metallothionein-null and wild-type C57BL mice. *Environ Health Perspect.* 2008 Jun;116(6):746-51.
- Yoshida, M. et al. (2011): Neurobehavioral effects of combined prenatal exposure to low-level mercury vapor and methylmercury. *J Toxicol Sci.*, 36(1):73-80.
- Yoshida M. et al. (2013): Emergence of delayed behavioral effects in offspring mice exposed to low levels of mercury vapor during the lactation period. *J Toxicol Sci.* 2013;38(1):1-6.
- Yoshida M. et al. (2014): Neurobehavioral changes in response to alterations in gene expression profiles in the brains of mice exposed to low and high levels of mercury vapor during postnatal development. *J Toxicol Sci.* 2014;39(4):561-570.
- Yoshida. M. et al. (2018): Neurobehavioral effects of postnatal exposure to low-level mercury vapor and/or methylmercury in mice. *J Toxicol Sci.* 43(1):11-17.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lee JY, Tokumoto M, Hwang GW, Kim MS, Takahashi T, Naganuma A, Yoshida M, Satoh M	4. 巻 12;6(3).
2. 論文標題 Effect of Metallothionein-III on Mercury-Induced Chemokine Gene Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Toxics.	6. 最初と最後の頁 E48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxics6030048	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田 稔
2. 発表標題 水銀研究の軌跡-疫学調査から動物実験まで-
3. 学会等名 生命金属に関する合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minoru Yoshida, Jin-Yong Lee, Maki Tokumoto, Masahiko Satoh
2. 発表標題 Involvement of metallothionein-III in mercury-induced chemokine gene expression
3. 学会等名 IUTOX 15th International Congress Toxicology（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 稔、李 辰竜、佐藤 雅彦、渡辺 知保
2. 発表標題 授乳期における水銀蒸気/メチル水銀複合曝露による神経行動機能への影響
3. 学会等名 第88回日本衛生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田 稔
2. 発表標題 水銀毒性に対するメタロチオネインの生理的な役割
3. 学会等名 メタルバイオサイエンス研究会2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 雅彦 (Sato Masahiko) (20256390)	愛知学院大学・薬学部・教授 (33902)	
研究分担者	李 辰竜 (Lee Jin-Yong) (80581280)	愛知学院大学・薬学部・准教授 (33902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------