

平成 22 年 5 月 13 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007～2009
課題番号：19390159
研究課題名（和文） 中枢神経系におけるメチル水銀耐性獲得の新奇メカニズム
研究課題名（英文） A novel mechanism of resistance to methylmercury toxicity in central nerves systems
研究代表者 仲井 邦彦（NAKAI KUNIHICO） 東北大学・大学院医学系研究科・准教授 研究者番号：00291336

## 研究成果の概要（和文）：

神経毒として知られるメチル水銀に対して、胎児期に低濃度の曝露を受けた神経系は、成長後の再曝露に対して、これまで知られていないメカニズムで耐性を示すことが期待される。その機序を明らかにするため、動物実験による検討を行った。まず、メチル水銀曝露の急性毒性における遺伝子発現を検討したところ、曝露 24 時間後に炎症、細胞死、発達に関連する遺伝子群の発現が顕著に観察された。胎児期および成長後の 2 回曝露実験を実施し、炎症応答を中心にさらに検討を進めている。

## 研究成果の概要（英文）：

A novel mechanism of resistance to methylmercury (MeHg) toxicity in central nerve system has been examined using mice exposed to MeHg prenatally. As a preliminary examination, acute and chronic gene expression after MeHg exposure has been examined, and revealed that the altered genes were related to the functional categories of development, inflammation, and cell death. The next examination had performed by the combined exposures during prenatal and adulthood periods, and gene expression profiling had been examined.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会科学・衛生学

キーワード：環境保健

## 1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は神経系に対して高い親和性

を有しており、さらに胎盤、血液-脳関門を容易に通過するため、胎児の脳の発達への影

響が懸念される。メチル水銀は水俣病の原因物質としてよく知られた環境汚染物質であるが、現在ではそのような高濃度曝露は少なくとも国内ではない。しかし、水銀は海底火山などから海水に放出され、生態系でメチル化され、食物連鎖により生物濃縮される。このため、水俣病のような公害がなくても、魚介類を多食する食習慣を有する民族では、低濃度ながらメチル水銀による曝露を受けることとなる。その一方で、魚介類由来の栄養素としてDHAやEPAなどの不飽和脂肪酸が児の脳の発達に有用であることが知られており、妊娠中の女性には適量の魚介類の摂取が推奨されている。このため、妊娠女性は魚介類を介して栄養素に加えメチル水銀も同時に摂取することとなり、低濃度曝露のリスクとベネフィットの解析が求められている。本研究では、胎児期におけるメチル水銀曝露の影響に焦点を当て、生体の有する防御系について検討を行った実験研究である。

## 2. 研究の目的

メチル水銀など重金属曝露に対して、生体は重金属結合タンパク質であるメタロチオネイン、酸化ストレスに応答するヘムオキシゲナーゼなど様々な酵素群を誘導して防御する重金属応答システムを有することがわかっている。しかし、これらの系は曝露に対して比較的短期間の応答を担うものであり、曝露の消失とともに防御系のレベルも沈静化する。その一方で、神経細胞は胎児期に分化した後、多くの場合は生涯に渡って存続し、自己複製しない。このような特性を有する神経細胞では、曝露とその応答の記憶が保持され、2回目の曝露に対して効率よく応答し障害を軽減できる可能性を持つのではないかと仮定した。そこで、動物実験による予備的な検討を行い、胎児期にメチル水銀による曝露を受けた

仔とそうではない仔に対して、再び成長後に曝露を実施し、毒性影響を観察した。その結果、細胞障害を示唆するグリア線維性酸性タンパク質陽性細胞の数および神経行動学的指標から、胎児期曝露を行っておくと成長後曝露の影響を軽減しうることを見いだした。メチル水銀曝露に対する未知の防御システムとして、fetal programmingとでも表現することが可能な防御システムがあるものと考え、そのメカニズムについて、主に分子生物学的な手法による解析を試みた。

## 3. 研究の方法

実験動物として近交系マウス C57BL/6Cr (日本エスエルシー) 用い、2つの実験プロトコルを組み実施した。第1実験では、メチル水銀曝露で発現する遺伝子をまず探索するため、成長後のマウスを用いて、曝露後の超急性反応から慢性反応までについて、時系列での解析を実施した。8週齢の雄を実験群で2群に分類し、対照群には1%DMSOを投与し、曝露群には経口単回投与 12 mg/kgbw/day (as Hg) した。時系列の設定は、投与直後(0分)、超急性(160分)、急性(8, 24時間)、慢性反応(3, 9日)として解剖を行った。時間ごとにセットで曝露群と対照群の脳、肝臓および腎臓をサンプリングした(n=4-7)。脳は断頭後、脳分割を行い RNAlater 処理(QIAgen 社)ののち-80°Cで冷凍保存した。大脳皮質についてRNA抽出(QIAgen 社)ののち、マイクロアレイ実験(Agilent 社)を行った。アレイ実験の解析には GeneSpringGX を使用した。各臓器の水銀蓄積については、還元気化-原子吸光光度法により測定を行った。

第2実験として、胎児期のメチル水銀曝露の有無が成獣期での再曝露にもたらす感受性の違いについて検討した。実験群は胎児期と成長後のメチル水銀曝露の有無から4群設

定した。妊娠マウス(C57BL/6Cr)を在胎4日目に導入し、在胎12日目-14日目の3日間に渡り3 mg/kg/day (as Hg) を経口投与した。出産を確認した日を生後0日目(PND0)とし、出生仔は生後3日目に1腹あたり雄を中心に6匹に揃え飼育し、離乳後は雄のみを1ケージ当たり2-3匹として継続して飼育した。仔マウスが8週齢に成長した時点でメチル水銀を12 mg/kgbw/day (as Hg) で単回経口投与を実施した。第1実験の結果に基づき、投与直後(0分)、超急性(120分)、急性(24時間)で解剖を実施した。餌は自由摂取とした。マウスの飼育は室温23 ± 2 °Cで12時間の明暗周期(明期0800-2000)とした。実験を始めるにあたり、東北大学大学院医学系研究科動物実験委員会の承認を受け、東北大学における動物実験等に関する規定に従い実施した。

#### 4. 研究成果

第1実験では解剖時の体重(平均±標準偏差)は対照群23.3±1.1g、曝露群23.1±0.8gであった(p=0.36)。各群n=4でアレイを実施した。Quality Controlレポートで問題がなくなるまで繰り返し実験を行った(40アレイ)。Normalizeの際、コントロールの中央値で補正を行った。品質確認工程では、Expression levelのrawシグナル値を全てのアレイで最小値>10とした。Flag情報は、全てのアレイでMarginal or Presentを示すものとした。これらの工程を通過した遺伝子数は、41,252個中23,662個であった。時間系列と曝露による二元配置分散分析を行い、有意水準5%で異なる遺伝子を解析に使用した。時間によって有意に異なる発現を示した遺伝子数は21,664個、曝露によって有意に異なる発現を示した遺伝子数は547個(A)、時間と曝露の交互作用が確認された遺伝子

数は597個(B)であった。Aのうち、同じ時間の対照群と比較して2倍以上発現が異なった遺伝子数は、160分で1個、8時間で4個、24時間で52個、3日で5個、および9日で5個であった。またBのうち、同じ時間の対照群と比較して2倍以上発現が異なった遺伝子数は、160分で0個、8時間で2個、24時間で38個、3日で2個、および9日で8個であった(Fig. 1)。

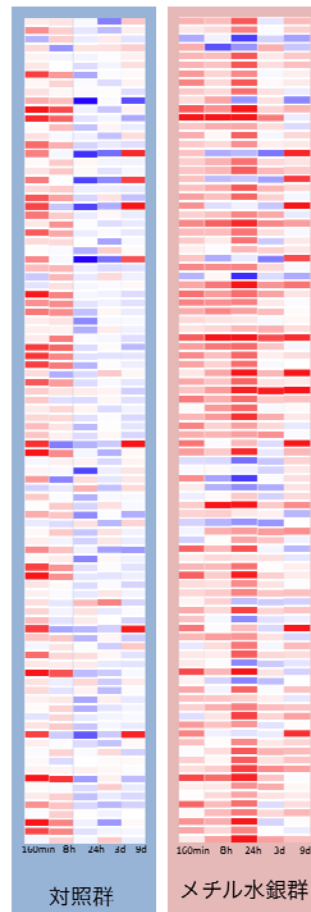


Fig. 1. メチル水銀曝露から24時間後に2倍以上変化した遺伝子のヒートマップ(赤が発現上昇、青が発現低下)。

以上の結果から、曝露後24時間後にもっとも多くの変動が観察され、それらの遺伝子がメチル水銀曝露によって直接あるいは間接的に応答する遺伝子と考えられた。これらの遺伝子がどういった機能をもつ遺伝子か検討したところ、関連のみられたネットワークは炎症、細胞死、発達などの因子であり、そのうち炎症反応のスコアが特に高値を示した。メチル水銀曝露の急性期の遺伝子応答を見た先行研究はほとんどないが、炎

症、細胞死、発達因子との関連性が強いことは、ヒトでメチル水銀曝露に伴う神経行動学的な偏倚があったことが知られており、興味ある知見であった。

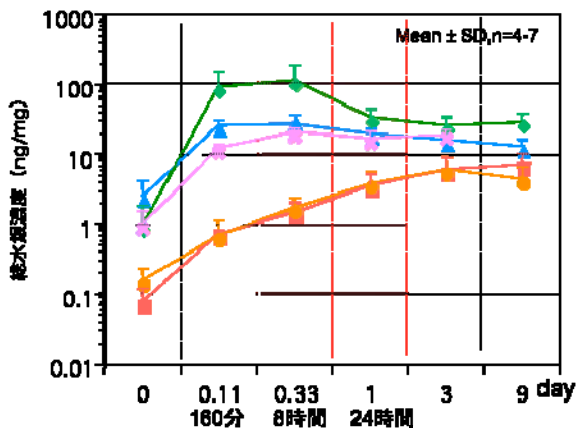


Fig. 2. 腎臓(◆)、肝臓(▲)、心臓(×)、小脳(●)、大脳皮質(■)中の総水銀濃度の推移。

解剖時の時系列における総水銀濃度を Fig. 2 に示した。総水銀の蓄積経過は、腎臓、肝臓ならびに心臓が8時間でもっとも高い濃度を示し、各々の平均が119、27ならびに21 ng/mgであった。小脳は3日目、大脳皮質は9日目にもっとも高くなり、それぞれ平均6.1 ng/mg、7.1 ng/mgであった。

第2実験では、117匹の妊娠マウスを在胎4日目で購入し、そのうち出産したマウスは63匹であった(妊娠率54%)。在胎10日目で1.5g以上の体重増加を確認できたマウスをランダムに2群に分けた。対照群の在胎10日目の平均体重は $24.0 \pm 2.0$  g (31匹)、メチル水銀曝露群 $23.9 \pm 2.2$  g (32匹)となった( $p=0.91$ )。出生仔数は両群に有意な差は観察されず、ともに平均7.3匹であった。生後3日目の体重を比較すると、対照群 $2.3 \pm 0.2$  g、メチル水銀曝露群 $2.1 \pm 0.2$  gとなり曝露群で有意低くなった( $p < 0.05$ )。離乳時でもメチル水銀曝露群の体重の方が有意に小さかったが、8週齢に到達した時点では有意差は観察されなかった(対照群 $25.1 \pm 1.2$  g、メチル水銀曝露群 $24.6 \pm 1.8$  g)。胎児期にメ

チル水銀曝露を受けた群と、受けなかった群について、さらに8週齢時にメチル水銀を投与し、時間経過ごとに解剖した。曝露24時間後の肝臓重量が胎児期と成長後曝露した群で有意に小さくなった。遺伝子発現については、Quality Control レポート、Normalize 作業、品質確認工程などを実施中であり、胎児期曝露の有無による比較を、炎症の応答を中心に解析を進めているところである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Kameo S, Shimada M, Sugawara N, Murata-Mizukami S, Ohba T, Nakai K, Iwahashi H, Satoh H. Effects of perinatal exposure to methylmercury and/or polychlorinated biphenyls on mouse neurobehavioral development and analysis of gene expression in the brain. *Organohalogen Compounds* 69:1813-1816, 2007. (査読なし)
- ② Sugawara N, Ohba T, Nakai K, Kakita A, Nakamura T, Suzuki K, Kameo S, Shimada M, Kurokawa N, Satoh C, Satoh H. Effects of perinatal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls on neurobehavioral development in mice. *Arch Toxicol.* 82: 387-397, 2008. (査読あり)
- ③ Shimada M, Kameo S, Sugawara N, Yaginuma-Sakurai K, Kurokawa N, Mizukami-Murata S, Nakai K, Iwahashi H, Satoh H. Gene expression profiles in the brain of the neonate mouse perinatally exposed to methylmercury and/or polychlorinated biphenyls. *Ach Toxicol* 84:271-286, 2010. (査読あり)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲井 邦彦 (NAKAI KUNIHICO)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：00291336

### (2) 研究分担者

佐藤 洋 (SATOHI HIROSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：40125571

黒川 修行 (KUROKAWA NAUYUKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：30431505

### (3) 連携研究者

該当なし。

### (4) 研究協力者

柳沼 梢 (YAGINUMA KOZUE)  
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生

島田 美幸 (SHIMADA MIYUKI)  
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生