

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：31105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590755

研究課題名(和文) 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毒性に対する遺伝的要因の影響

研究課題名(英文) Neurobehavioral effects in mice exposed to low-level mercury vapor and methylmercury during developing stage.

研究代表者

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)

戸学院大学・公私立大学の部局等・教授

研究者番号：80081660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：発育期に低濃度の0.10 mg/m³水銀蒸気(Hg⁰)と5ppmメチル水銀(MeHg)の複合曝露後の神経行動機能に及ぼす影響について検討した。動物への曝露は3週齢から7週齢までの4週間行い、10週齢に達したときオープンフィールド試験、受動回避反応試験、放射状迷路試験を実施した。曝露終了後10週齢と加齢による影響を評価するために79週齢で行った行動試験ではHg⁰曝露群、MeHg曝露群、Hg⁰+MeHg複合曝露群とも対照群と比較し、統計的な差異はなかった。以上の結果より、発育期において低濃度のHg⁰やMeHgの複合曝露をうけても神経行動毒性に影響は認められず、また加齢の影響も認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the effects of combined exposure to low-level mercury vapor (Hg⁰) and methylmercury (MeHg) on the neurobehavioral function of mice during developing stage. The Hg⁰ exposure group was exposed to Hg⁰ at a mean concentration of 0.10 mg/m³ for 8 hr/day from 3 weeks of age to 7 weeks of age. The MeHg exposure was supplied with tap water containing 5 ppm of MeHg. The combined exposure group was exposed to both Hg⁰ and MeHg. When the animals reached at age of 10 and 79 weeks, behavioral analysis was performed. The behavioral effects were with locomotor activity in the open field, learning activity in the passive avoidance response and spatial learning activity in the eight-arm radial maze test. The Hg⁰, MeHg and Hg⁰+MeHg exposure groups did not differ from controls in the three behavioral measurement at age of 10 and 79 weeks. Neurobehavioral effects in mice exposed to low-level Hg⁰ and MeHg during developing stage indicate that may not cause under the conditions in this study.

研究分野：環境毒性学

キーワード：神経行動毒性 水銀蒸気 メチル水銀 複合曝露 マウス 発育・発達期

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。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。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が検出されたことから、魚介類摂取に依存しない米食によるメチル水銀曝露が問題視されている。しかしながら、発育期・発達期 (小児期) に低濃度の水銀蒸気やメチル水銀に長期間にわたり複合曝露を受けた場合、神経行動にどのような影響を与えるかについては余り知られていない。

2. 研究の目的

最近、鉱山地域の土壌中から無機水銀に加えて、メチル水銀が検出され、この地区で採取された穀類のメチル水銀濃度が高いことが報告されている。小規模金採掘鉱山周辺の小児は水銀蒸気曝露に加えてメチル水銀曝露を受けることとなる。小児の水銀蒸気とメチル水銀による複合曝露による健康影響に関する論文は殆ど報告されていない。本研究は低濃度の複合水銀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。

3. 研究の方法

「動物・飼育飼料」

出産2週齢のC57BLマウスを日本クレア (株)より60匹を購入し、動物飼育室内で実験開始まで飼育した。出産21日目に対照群、水銀蒸気 (Hg⁰) 曝露、メチル水銀曝露 (MeHg) 群、Hg⁰+MeHg 曝露に分け、母親から出産した2~3匹の雌性マウスを用い、一群22匹として実験に供した。

「曝露方法」

水銀曝露は3週齢 (出産21日) から7週齢までの4週間間行った。Hg⁰ 曝露はマウスを水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均0.096 (範囲0.055~0.143) mg/m³で1日8時間の連日曝露を行った。MeHg 曝露は塩化メチル水銀を蒸留水で5ppm水溶液に調整し、飲水させた。曝露終了後、直ちに臓器中水銀分析のため各群から4匹を屠殺した。残りの実験動物は一般飼料と水道水に戻し、行動試験開始まで飼育した。

「行動試験」

行動試験は10週齢に達した時に実施した。オープンフィールド (OPF) 試験による運動活動性や情動反応、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、そして放射状迷路 (RM) による空間学習などで評価した。行動試験終了後に屠殺し、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。

「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。

4. 研究成果

(1) 発育・発達期における複合水銀曝露による行動機能への影響

10週齢で測定した OPF 試験の2分間における自発行動量は対照群を各曝露群間との間に各時間における移動距離と総移動距離に統計的な有意差は認められなかった (図1)。中心で活動している時間も各曝露群間に統計的な有意差はなかった (図2)。

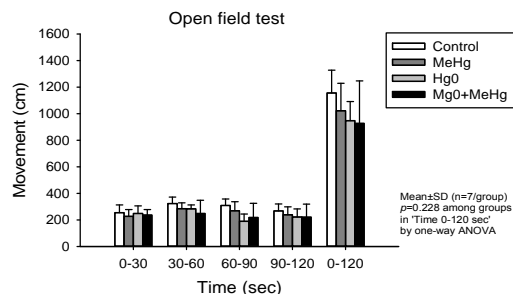


図1 OPF 試験の移動距離 (10週齢)

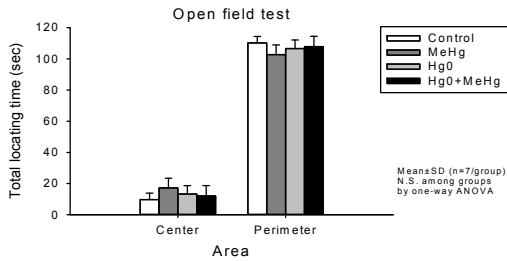


図2 OPF試験の中心に滞在している時間
PA試験では、1日目の訓練試行、2日目の保持試行とも回避反応時間に対照群と各曝露群との間に差異はなかった(図3)。

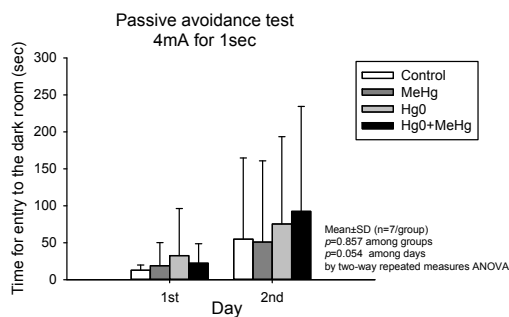
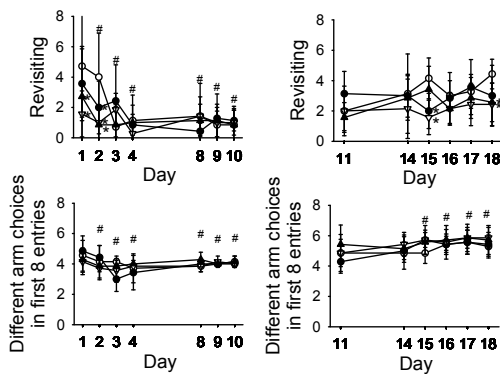


図3 PA反応時間(10週齢)

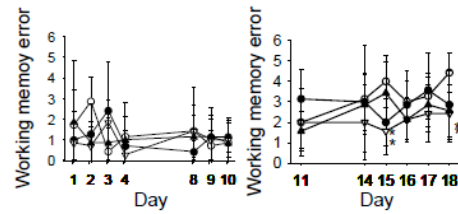


- - : Control, - - : MeHg, - - : Hg⁰, - - : Hg⁰+MeHg

図4 RM試験(獲得したアームを訪れるエラー数)(10週齢)

12~13週齢で行ったRM試験の「獲得したアームを訪れるエラー数」は、餌の獲得数に制限がなくなった後半Trial8-13で、MeHg/Hg⁰+MeHg群が対照群より少なかったが各群間の差異は認められなかった(図4)。またアーム再訪数、餌を取らずに出るエラー数、アーム選択数では「アーム再訪数」は、

前半Trial1-7で試行間差があり、後半Trial8-13で対照群より曝露群で少なかったが、有意ではなかった(図5)。



- - : Control, - - : MeHg, - - : Hg⁰, - - : Hg⁰+MeHg

図5 RM試験(アーム再訪数、餌を取らずに出るエラー数、アーム選択数)

曝露終了後の脳中水銀濃度は大脳の水銀濃度は対照群に比べ、MeHg曝露群は約80倍、Hg⁰曝露群は約15倍、Hg⁰+MeHg複合曝露群は約90倍で高値あった。小脳ではMeHg曝露群は約140倍、Hg⁰曝露群は約75倍、Hg⁰+MeHg複合曝露群は約200倍、対照群より高値を示した(表1)。

表1 曝露終了後の脳内の水銀濃度

| ng Hg/g | 対照 | Hg ⁰ | MeHg | Hg ⁰ +MeHg |
|-------------|----------|-----------------|--------------|-----------------------|
| 大脳 (n=3) | 26 ±7 | 352 ±32 | 2080 ±85 | 2322 ±210 |
| 小脳 (n=3) | 8 ±6 | 599 ±102 | 1155 ±186 | 1619 ±256 |

Values are expressed as mean±SD.
Number of animals is shown in parentheses.

(2) 加齢による影響

加齢による代償機能の低下による影響を検討するため、水銀曝露1年以上経過後(79週齢)に再び行動試験を行った。79週齢でのOPF試験の自発行動量は各測定時間帯における移動距離と総移動距離は対照群と各曝露群間との間に統計的に有意差は認められなかった(図6)。

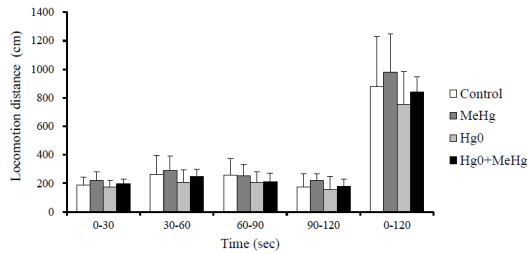


図6 OPF 試験による移動距離 (79 週齢)

また中心に滞在している時間の割合 (%) も対照群と各曝露群との間に統計的に有意ではなかった (図7)。

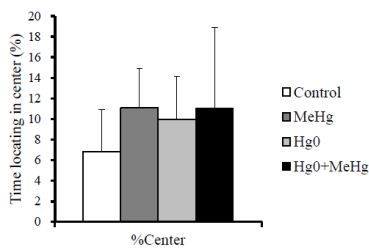


図7 OPF 試験による中心に滞在している割合 (79 週齢)

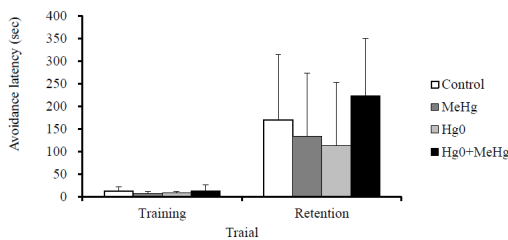


図8 受動回避試験 (79 週齢)

79 週齢で行った PA 試験も 10 週齢と同様に訓練および保持時間に対照群と各曝露群との間に有意な差異は認められなかった (図8)。

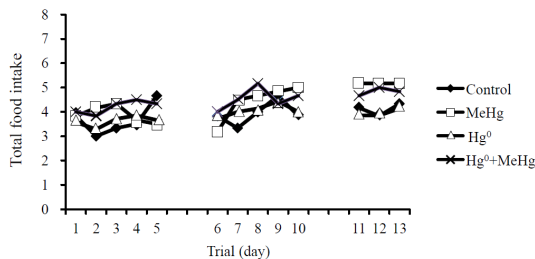


図9 放射状迷路試験における「既に獲得したアームを訪れるエラー数」(79 週齢)

80~81 週齢に実施した RM 試験では 1 試行中に「既に獲得したアームを訪れるエラー数」は対照群と各曝露群との間に有意な差は認められなかった (図9)。

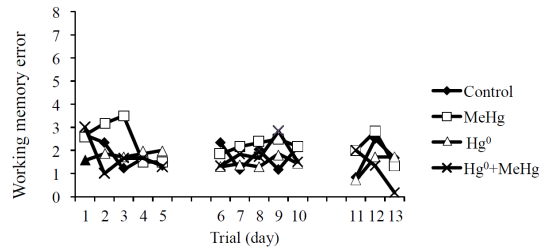


図10 放射状迷路試験における「獲得したペレット数」(79 週齢)

また放射状迷路試験の「獲得したペレット数」では 1 試行中に「試行中に獲得したペレット数」は対照群と各曝露群との間に有意な差は認められなかった (図10)。

「結論」

離乳後の成長期に複合水銀曝露を受けた動物の 10 週齢と水銀曝露 1 年以上経過後 (79 週齢) の行動機能を OPF 試験、PA 試験、RM 試験を用いて検討を行った。

離乳 3 週齢から 7 週齢までの成長期に低濃度の Hg⁰、MeHg の単独曝露そして Hg⁰+MeHg の複合曝露を行ったが神経行動への影響は認められなかった。脳内水銀濃度は曝露直後、複合曝露群は単独曝露群より高値であり、対照群の約 90 倍であった。また加齢による代償機能の低下に対する Hg⁰、MeHg、Hg⁰+MeHg 複合曝露の神経行動機能への影響に関して、その影響は認められなかった。以上のことから、成長期における複合水銀曝露は胎生期や授乳期に比べ、水銀に対する感受性は低いことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yasutake A, Yoshida M, Honda A, Watanabe C, Satoh M.: Distribution of mercury in metallothionein-null mice

after exposure to mercury vapor:
amount of metallothionein isoform does
not affect accumulation of mercury in
the brain. 査読有, J Toxicol Sci. 2012;
37(4):765-71.

Yoshida M, Watanabe C, Honda A, Satoh M, Yasutake A. ; Emergence of delayed behavioral effects in offspring mice exposed to low levels of mercury vapor during the lactation period. 査読有, J Toxicol Sci. 2013; 38(1):1-6.

吉田 稔、久保涼子、三迫智佳子、鈴木志乃舞、工藤綾香、蜂谷紀之、安武章：八戸市民の毛髪中水銀濃度と魚介類摂取について、査読有, Biomed. Res. Trace Elements 24(3):170-175.

Yoshida M, Honda M, Watanabe C, Satoh M, Yasutake A. ; 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. 査読有, J Toxicol Sci. 2014;39(4):561-570.

[学会発表](計4件)

吉田稔、佐藤雅彦、渡辺知保、安武 彰、
発達期の低濃度水銀蒸気曝露による神経
行動毒性と脳内遺伝子の変動、第 82 回日
本衛生学会学術総会、平成 24 年 3 月 25
日～26 日、京都大学吉田キャンパス、京
都市

吉田 稔、佐藤 雅彦、渡辺知保、安武
章：発育・発達期に低濃度水銀蒸気に曝
露されたマウスの加齢の影響について、
第 83 会日本衛生学会総会、平成 25 年 3
月 24 日～26 日、金沢市

吉田 稔、佐藤雅彦、渡辺知保、清水 華、
李 辰竜：胎生期および発育・発達期に
おける低濃度複合水銀曝露による神経行

動毒性について、環境省「重金属等によ
る健康影響に関する総合研究」メチル
水銀研究ミーティング -、平成 25 年 12
月 11 日、東京都

Minoru Yoshida: Emergence of delayed behavioral effects in offspring mice exposed to low levels of mercury vapor during the lactation period, Canada/USA/Japan Joint Meeting on Biometals, January 20-22, 2014, Honolulu, Hawaii, USA

[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)

八戸学院大学・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) 研究分担者

清水 華 (SHIMIZU HANA)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・
助教

研究者番号：80401032