

複数機関・統一試験法で取り組むメチル水銀の脳高次機能への影響

評価

研究項目 1: 動物モデルへのメチル水銀曝露と総合評価

研究項目 2: 動物モデルの行動評価とデータ解析

研究項目 3: 動物モデルの行動評価

主任研究者 前川文彦（国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員）

分担研究者 遠藤俊裕（フェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社・代表社員）

分担研究者 掛山正心（早稲田大学・人間科学部・予防医科学・応用生理学研究室・教授）

研究要旨

フェロー諸島の疫学研究等からヒトにおいてメチル水銀への低濃度曝露が神経生理学的影響を誘導する可能性が強く示されている。その結果を受け、動物モデルを用いてメチル水銀による脳・神経系への低濃度曝露影響の詳細を明らかにする研究報告が多数なされてきたものの、環境基準値の根拠としては活用されていない。背景としては、これまでの動物実験が各々の研究機関で、各々の実験者により、各々の試験機器・プロトコルを用いて行われていることから、その成果を一般化するに至る十分な信頼が得られていないという現状がある。申請者はこれらの問題を解決する「複数機関・統一試験法」による毒性研究が、信頼性の高い、環境基準値を生み出す研究の第一歩と考えている。本研究では特に脆弱性が高いと考えられる胎仔期のマウスにメチル水銀を曝露し、成長後の行動異常を 3 機関で、完全コンピュータ制御による同一装置（集団型全自動行動測定システム IntelliCage）・同一プロトコルを用いて共同で検出する。その中で一貫性の高い、研究環境に依存しない行動影響を見つけ出すとともに、将来さらに多数の機関を含めた形で毒性試験を行ってより確定的な影響評価基準を作成するための嚆矢とする。

キーワード: 複数機関、統一試験法、集団型全自動行動測定システムIntelliCage、発達神経毒性

I 研究目的

最も脆弱性が高いと考えられる脳の発達期にメチル水銀を曝露されたマウスを用い、統一規格で脳高次機能影響に着目した行動試験を複数機関で同時に行うことで、研究環境に依存しない行動評価指標を探索し、その指標を用いて信頼性の高い毒性値を提示する。現在ほとんどの化学物質が疫学調査と動物実験の結果の両者の成果に基づいて環境基準値設定がなされているが、メチル水銀に関しては現状では疫学調査の結果にのみに依拠して環境基準値が設定されており、その根拠に毒性研究の成果が十分反映されていないため、毒性研究の結果もふまえて総合的に基準値設定の根拠を説明できる体制を構築する必要がある。

II 研究方法

マウスモデルで統一した行動試験法を複数機関で行うことで、メチル水銀が高次脳機能に影響を与える毒性値を検討する。曝露時期に関しては特に脆弱性の高い胎仔期に焦点を絞り、1年次の試験後陽性反応・陰性反応を示した行動指標の総合的評価を行う。

曝露方法: 本研究では胎仔期単回曝露の検討を行う。マウスではメチル水銀の影響を最も受けやすい期間に相当する妊娠7日目の胎仔を標的として (Bisen-Hersh et al., 2014)、母体經由で塩化メチル水銀(II) (アルファー・エイサー) を3用量 (0、0.5、5 mg/kg 体重、以下それぞれ対照群、低用量群、高用量群と記載) で経口曝露する。産仔から各群♂16匹程度になるように調整し、曝露後の行動試験までの飼育は国立環境研究所で行う。曝露された個体が成長した後、今年度は分担者研究機関であるフェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社と国立環境研究所に各群 8~12 匹ずつ分配し、集団型全自動行動測定システム IntelliCage を用いた検討を2地点で行った。出生直後に体重を測定した上、一部のマウスは屠殺して、脳を摘出し、脳内総水銀量を ICP-質量分析法 (7700x、アジレント、島津テクノロジー) により計測した。

行動影響評価: 評価装置として集団型全自動行動測定システム IntelliCage を用いた。IntelliCage は RFID と呼ばれるタグをマウス皮下に麻酔下で予め移植しておくことで、同一ケージで飼育しながら個々の行動を追跡できる装置で1ケージにつき16匹までのマウスの行動を評価可能である (図1)。



図1.IntelliCage の外観および内部

IntelliCage には4隅にコーナーと呼ばれる三角柱型の小部屋が配置されており、マウスはコーナーに入り、鼻でスイッチを押すこと (以下ノーズポークと称する) で給水瓶から飲水が可能となる。コーナーの出入口にセンサーがついており、RFIDを検出することで、どの個体がどのコーナーを探索したか全自動で記録できる。IntelliCage は各機関2台のケージを使用し、マウス導入後1ヶ月程度を目安に各機関で並行してデータを取得し、その結果をフェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社において一括解析した。今年度は①新奇環境での探索行動、②基底活動量 (13日間)、③場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課

題、④競争環境課題、について検討を行った。③に関しては、対角線上コーナーを往復することで報酬が与えられる空間学習を施した上で、一定の正解比率の基準を越えると課題が反転する課題を施すことで行動柔軟性を評価した（図2、Endo et al., 2012）。

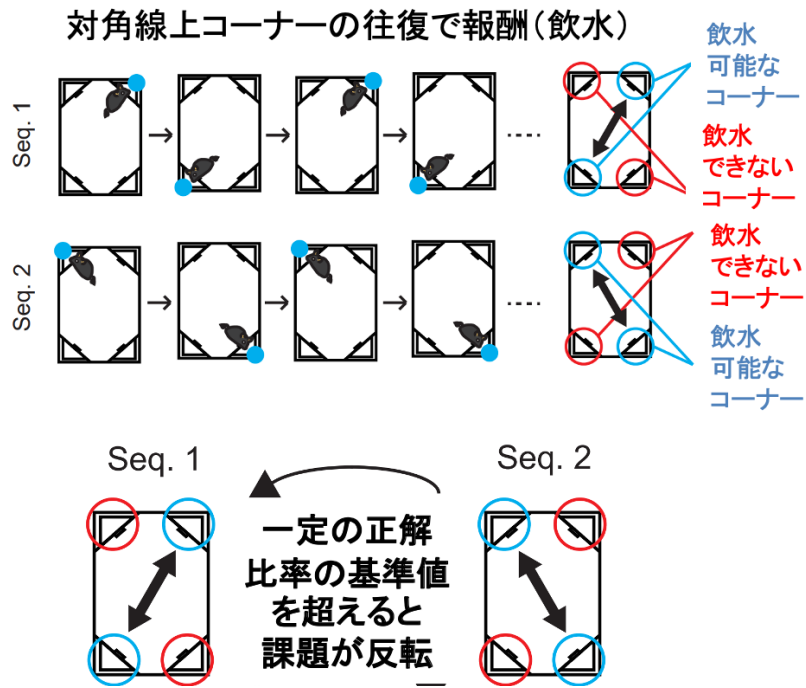


図2. 場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題のスキーム

④に関しては、夜間の一定時間にのみ飲水可能な条件に設定し、競合状態でコーナーの占有率を計測した（図3、Benner et al., 2014）。

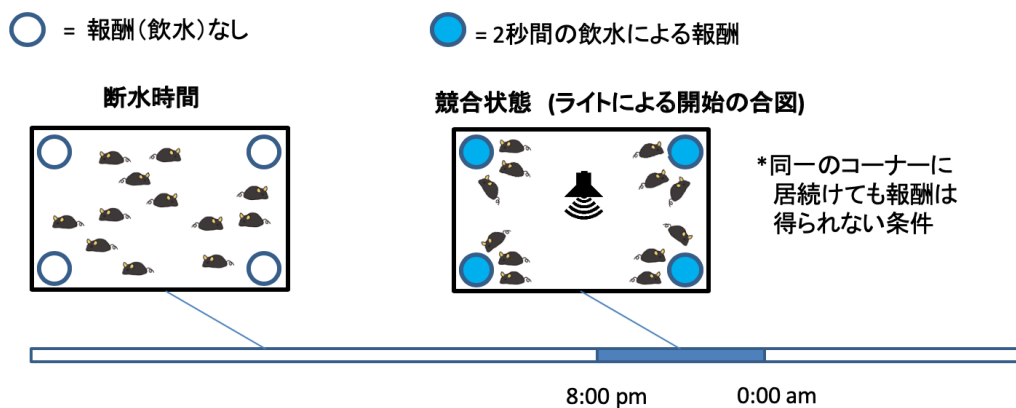


図3. 競争環境課題のスキーム

倫理面への配慮: それぞれの分担機関に存在する動物実験委員会に動物実験申請を行い、審査を受けた後に3Rの原則に基づき実験を行なった。

III 研究結果

胎仔期脳内水銀蓄積量: 出生仔の一部を利用し、生後1日齢の脳における総水銀量を国立環境研究所において測定したところ、対照群(検出限界以下、n=4)、低用量群(0.07±0.00 µg/g、n=4)、高用量群(0.79 µg/g、n=2)であり、用量に対応した脳での水銀の蓄積が認められた(図4)。

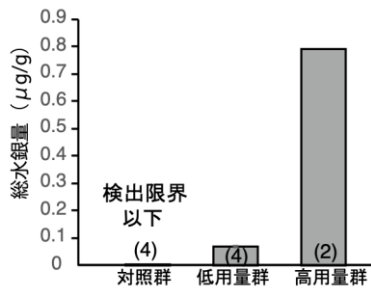


図4. 生後1日齢における脳内総水銀量

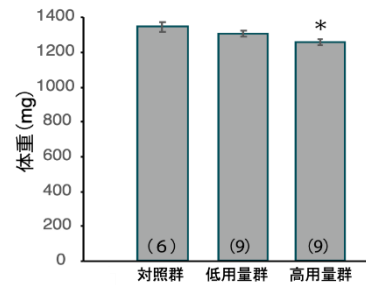


図5. 生後1日齢の体重

(*p<0.05, ANOVA with holm post hoc test)

出生仔の体重変化: 出生時(生後1日齢)の体重を比較したところ対照群(1348±28 mg、n=6(平均値±標準誤差、母体毎に補正))と比較して、低用量群(1307±17 mg、n=9)、高用量群(1260±17 mg、n=8)で、高用量群で有意に体重が低下していた(図5、*p<0.05, ANOVA with holm post hoc test)。

行動影響評価: 8週齢の雄マウスを用いて IntelliCage を用いた行動試験を行った。国立環境研究所およびフェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社(以下フェノバンスと略)における解析の結果、以下の4つの検討項目で結果を得た。

- ① 新規環境での探索行動：IntelliCage にマウスを導入した直後の最初の 4 時間、24 時間での行動量を検討したが、国立環境研究所、フェノバンスにおいて群間での有意差は認められなかった (図 6)。

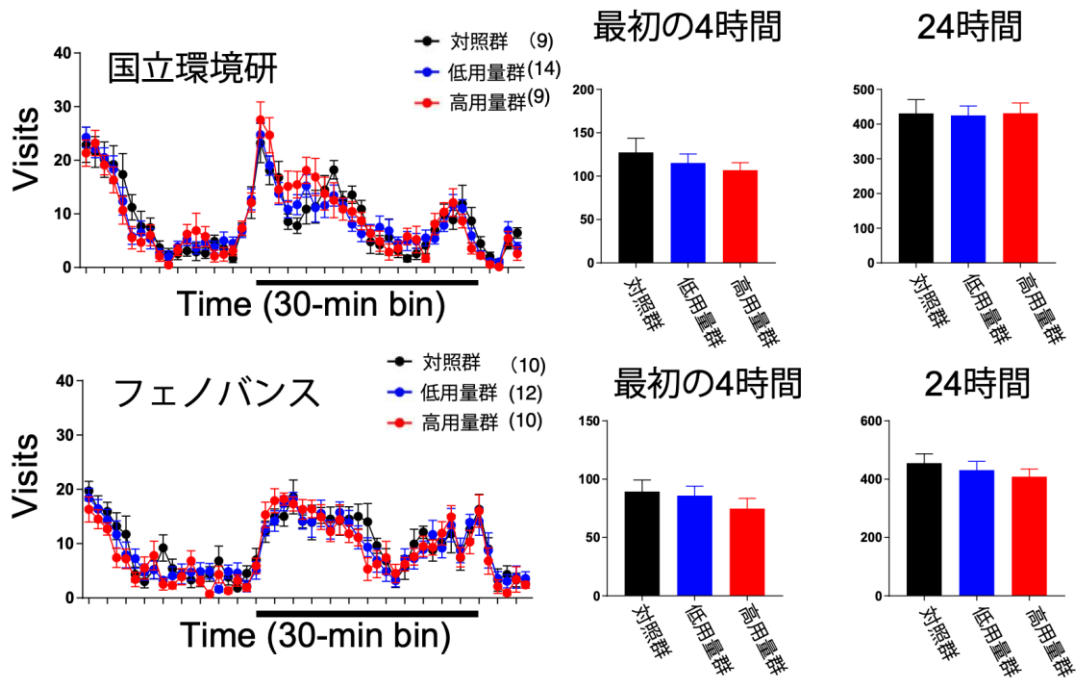


図 6. 新奇環境 (IntelliCage に導入してから 24 時間) での探索行動

② 基底活動量 : IntelliCage に導入した後の 13 日間のマウスの活動量を検討したところ、全活動量に関しては高用量群において対照群と比較して低い傾向があったものの有意差はなかった。一方、明期と暗期を分けて検討した結果、明期において対照群に対し高用量群で、フェノバンスにおいて有意な活動量の減少が認められ ($\dagger p < 0.05$, Holm-Sidak's multiple comparisons test)、国立環境研究所においても活動量の減少傾向が認められた(図 7)。

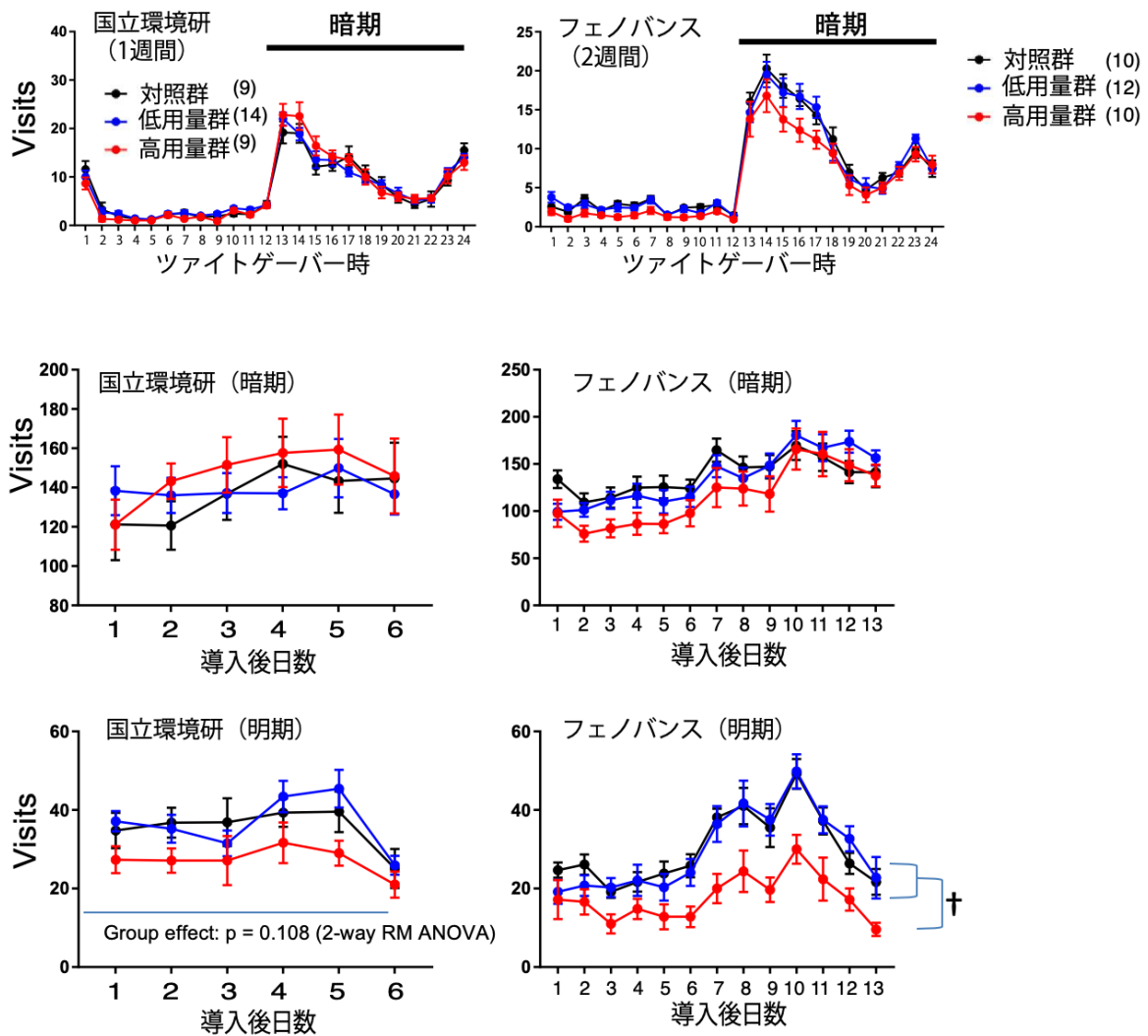


図 7. 基底活動量

($\dagger p < 0.05$, Holm-Sidak's multiple comparisons test)

③ 場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題：

一定の正解基準に達するまでのコーナーへの侵入回数を比較した。国立環境研究所ではデータの取得ができなかったのでフェノバンスにおいて検討を行ったが、群間での行動柔軟性指標の差は認められなかった(図 8)。また、行動柔軟性課題において 1 回のコーナー進入時に何回ノーズポークしたか調べることで、報酬に対する固執性指標を算出できるが、この指標に関しても群間で違いは認められなかった (図 8)。

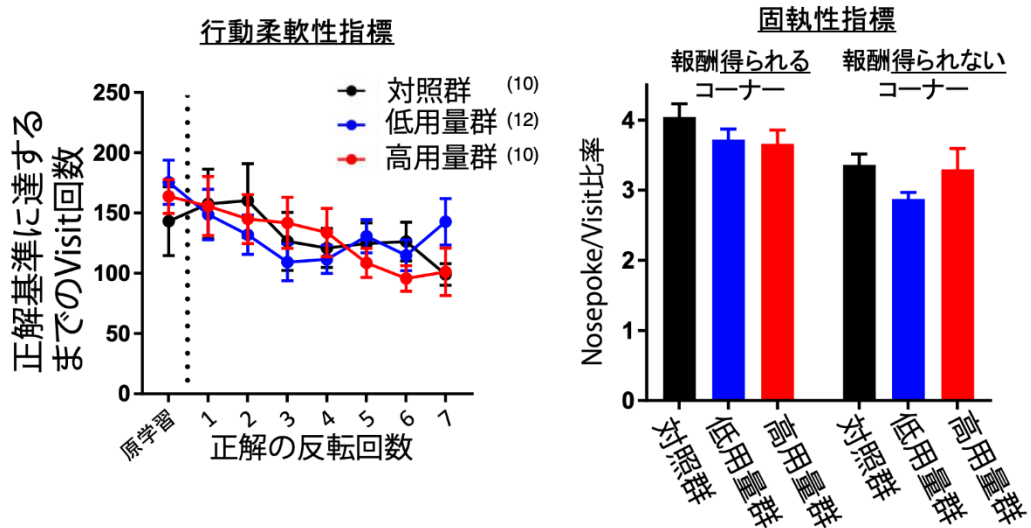


図 8. 行動柔軟性および行動柔軟性課題における固執性

④ 競争環境課題：

競争環境課題においては国立環境研究所、フェノバンスともに有意な群間の差は認められなかった (図 9)

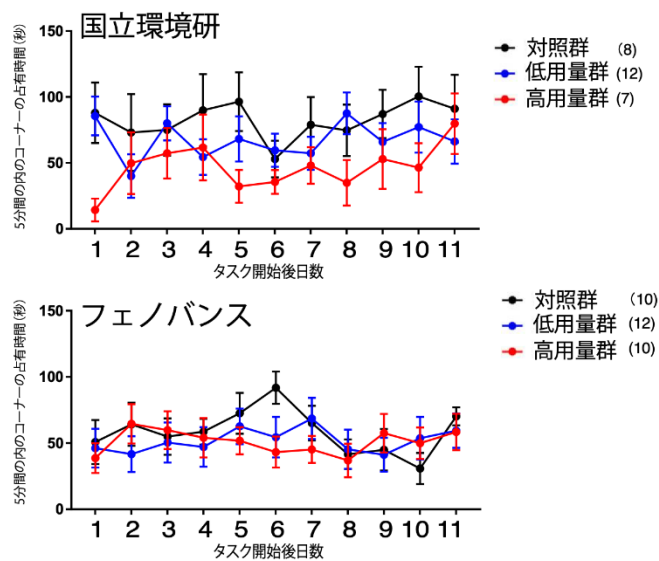


図 9. 競争環境課題

IV 考察

出生仔の脳の解析から投与量に比例して、高用量群では低用量群の約 10 倍の総水銀量の蓄積が認められた。低用量群の総水銀量 $0.07\mu\text{g/g}$ という値は、セーシェル諸島の調査で顕著な神経影響が認められなかった子供を対象とした脳内水銀量調査の結果 ($0.026\sim 0.295\mu\text{g/g}$) に相当する値であり (Lapham et al., 1995)、高用量群の総水銀量 $0.79\mu\text{g/g}$ はそれを超過する値であった。現在のところ、出生仔の体重変化、IntelliCage による行動影響評価においては高用量群でのみで影響が認められ、低用量群では影響が認められなかったが引き続き詳細な解析を続けており、更なる検討により低用量群においても影響がみられる評価項目があるか検討を進めている。IntelliCage で影響が認められた基底活動量の変化に関しては、全活動量において低下傾向が認められた。この結果は、胎仔～新生仔期にメチル水銀を投与して成長してから IntelliCage を用いて行動を解析した先行研究の結果と一致している (Onischenko et al., 2007)。しかしながら、特に明期と暗期を分けて検討したところ、先行研究とは異なり明期における活動量が有意に低下するとの結果となった。先行研究では 0.5 mg/kg 体重/日の用量で妊娠 7 日～出生後 7 日まで連日曝露するといった曝露方法をとっており、曝露期間や曝露濃度の違いが活動量の低下のパターンの違いに影響を及ぼしている可能性はあるが、詳細は更に今後検討していく必要がある。また、行動柔軟性課題や競争環境課題といった高次脳機能に関わる行動課題に関しては 1 年次では有効なエンドポイントを見つけることができなかった。2 年次以降は行動柔軟性課題、競争環境課題に加えて、高次脳機能異常に起因すると考えられる同じコーナーに繰り返し入る①常同行動や、他個体が入ったコーナーとの相関関係を見ることで行動の類似性を判別する②社会構造分析を行うことで、高次脳機能への影響を検討する。さらに、③衝動性・注意欠如・動機付けへの影響検出を行う。手法としては、IntelliCage で独自に開発した選択反応時間課題、遅延報酬選択などの新規タスクを施す。これらの成果を総合的に評価して 2 機関 (国立環境研究所、フェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社) で同一影響が現れる行動指標を見出した上で早稲田大学を加えた 3 機関で同一指標で影響が確認できるか検討する。

V 結論

妊娠 7 日目の母体への塩化メチル水銀(II)曝露によって、水銀が胎児の脳に移行し、高用量群では出生仔の体重や成長後の行動影響を誘導することが国立環境研究所とフェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社における解析で明らかとなった。高次脳機能に関わるエンドポイントについては次年度にさらに掘り下げて検討を加える。

引用文献

- 1) Bisen-Hersh EB, Farina M, Barbosa Jr F, Rocha JB, Aschner M. Behavioral effects of developmental methylmercury drinking water exposure in rodents. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2014; 28(2): 117-124.

- 2) Benner S, Endo T, Endo N, Kakeyama M, Tohyama C. Early deprivation induces competitive subordination in C57BL/6 male mice. *Physiol Behav.* 2014;137:42–52.
- 3) Endo T, Maekawa F, Võikar V, et al. Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behav Brain Res.* 2011;221(1):172–181.
- 4) Lapham LW Cernichiari E Cox C Myers GJ Baggs RB Brewer R Shamlaye CF Davidson PW Clarkson TW. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury, *Neurotoxicology* 1995; 16(4): 689-704.
- 5) Onishchenko N Tamm C Vahter M Hökfelt T Johnson JA Johnson DA Ceccatelli S. Developmental exposure to methylmercury alters learning and induces depression-like behavior in male mice. *Toxicol Sci.* 2007;97(2):428-37.

Evaluation of the effect of methylmercury on higher brain functions by a multi-institution, unified test method

Fumihiko Maekawa

Center for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies, 16-2 Onogawa, Tsukuba 305-8506, Japan

Toshihiro Endo

Phenovance Research & Technology, Kashiwanoha 5-4-19, Chiba 277-0882, Japan

Masaki Kakeyama

Faculty of Human Sciences, Waseda University, 2-579-15 Mikajima, Tokorozawa, 359-1192, Japan

Key words: Multiple institutional and unified test, IntelliCage, Developmental neurotoxicity

Abstract:

Epidemiological studies in the Faroe Islands have shown that low concentrations of methylmercury in humans may induce neurophysiological effects in humans. On the other hand, since there have been many research reports using animal models to clarify the effects of low-level exposure of methylmercury on the brain and nervous system, they have not been used as a basis for environmental standard values. At present, most behavioral experiments have been performed by different experimenters using their own test equipment and protocol, thus it is hard to generalize the results. We believe that research using a multi-institutional and unified test method that solves these problems is the key to produce reliable toxic values. In this study, fetal mice, which are considered to be particularly susceptible to environmental chemicals, were exposed to methylmercury, and behavioral abnormalities after growth were analyzed by multiple institutes using the same analysis apparatus (IntelliCage, a group-type fully automatic behavior measurement system) and same protocol. Among them, we are trying to identify behavioral endpoints that are highly consistent and independent of the research environment. We hope these trials will be the first step to create more definitive impact assessment endpoints useful for conducting toxicity tests in more organizations in the future.