

## 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、1-2年次に行動試験を行い、陽性反応・陰性反応を示した行動指標の総合的評価を行った上で、3年次に追試を行うとともに、影響が特に顕著であった行動指標の原因となる脳の異常について検討する。

**曝露方法:**1年次の研究において胎仔期単回曝露の検討を行ったが、研究報告会において妊娠7日目の単回投与では妊娠期全体に渉る曝露としては不十分であるとの指摘を受けたため、2年次の研究においては妊娠7日目に加えて、妊娠14日目にも同用量の投与を行った。母体経路で塩化メチル水銀(II) (アルファ・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) で経口曝露した。産仔から曝露後の IntelliCage の行動試験までの飼育は国立環境研究所で行った。曝露された個体が成長した後、2年次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 (以下フェノバンスと略) と国立環境研究所に各群4~12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 (早稲田大学においては新型コロナ禍の影響で教員・学生を含む関係者の学内への入校が大幅に制限されたこともあり、現時点ではメチル水銀曝露動物を用いた研究は未だ検討できていないが、今後行う予定の行動実験課題の予備的検討を遂行しているところである)。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、島津テクノリサーチ) により計測した。

**新生仔における超音波発声解析:** 母親から隔離されると新生仔マウスは超音波領域の音を高頻度で発声する。超音波発声を感知した母親では養育行動が惹起されることが報告されており、超音波発声は仔から母親への社会的コミュニケーションに関わる脳機能を反映した行動指標と考えられている。そこで2年次には、IntelliCage による行動試験の補足的な試験としてメチル水銀曝露の新生仔期の超音波発声に対する影響を検討した。新生仔の超音波発声の記録及び分析は、高周波マイクロホン (7116型、Aco株式会社)、増幅器 (4116型) 及びソフトウェア (URS-9100ソフトウェア) から構成されるげっ歯類 USV 分析システム (USV-01、小原医科産業株式会社) を用いて行った。具体的な手順としては、生後3日目から9日目にかけて、全ての同腹仔を母体から離し、37°Cのホットプレートに集めた上で、防音箱内に30°Cにセットしたホットプレート上に一匹ずつ置いた条件で、高周波マイクロホンにより1分間超音波を記録した (図1)。全同腹仔の測定が完了次第、仔を母体に戻した。記録データはUWA-9100ソフトウェア (小原医科産業株式会社) を用いて解析し、各個体の60~100kHzの超音波の周波数の合計持続時間を算出して、対照群と曝露群との間で比較した。結果は各母体当たりの平均値を算出して、さらにその平均値及び標準誤差として表示した。

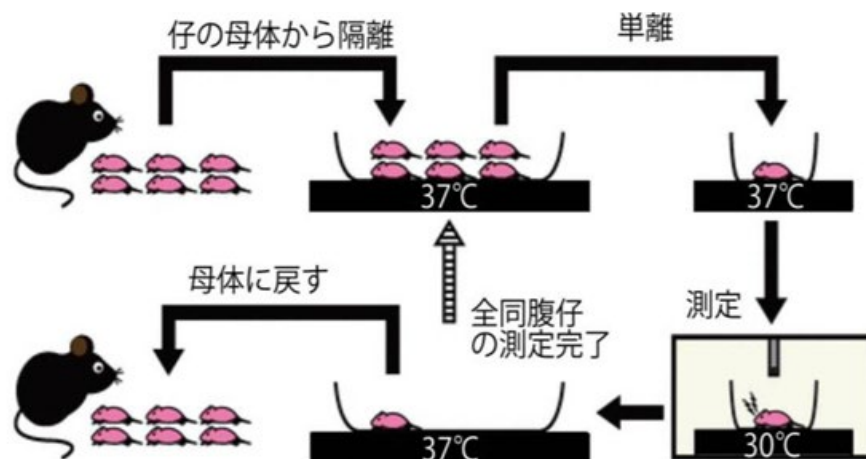


図1. 新生仔における超音波発声の測定方法

IntelliCage を用いた行動影響評価：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 2)。



図 2. 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において一括解析した。2 年次には、1 年次に行った①基底活動量、②場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題を再検討するとともに、③衝動性・注意欠陥に関する課題である選択反応時間課題について検討を行った。②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指標を評価したが (図 3、Endo et al., 2012)、それに加えてコーナー内で報酬が得られないにも関わらずノーズポークを繰り返す固執性指標に関して特に注目して検討を加えた。

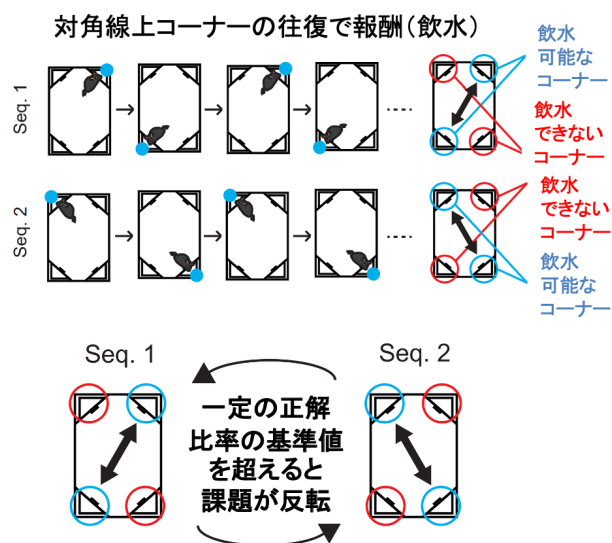


図 3. 場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題のスキーム

③に関しては、衝動性・注意欠陥の異常を検出可能な選択反応時間課題を施した（図4）。この課題ではコーナーの内部でノーズポークを行なうことで課題が開始し、ランプが一度点灯する。その後、消灯時間に待機し、再度点灯時にノーズポークを行なうことで初めて報酬である水を飲むことができる。消灯時間は一定時間の範囲内でランダムに変動するが、消灯時間に次の点灯が待ちきれずにノーズポークを行なうと、水を飲むことはできない。本課題では待ちきれずにノーズポークを行った割合（%）を指標として、衝動性や注意の持続への影響を検出した。

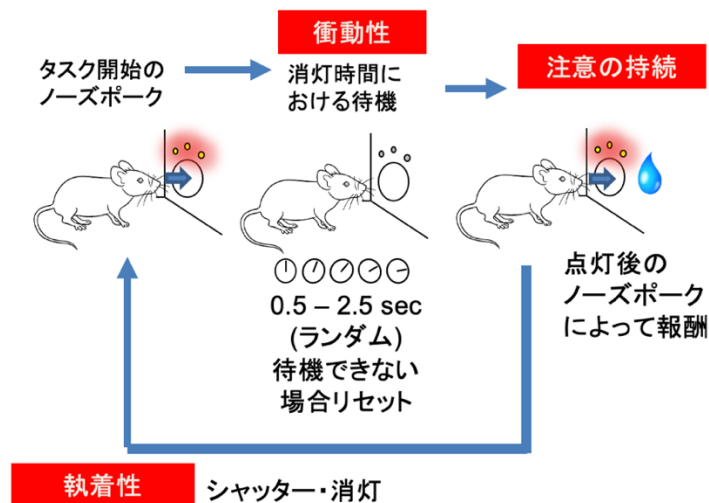


図4. 選択反応時間課題のスキーム

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=2）、低用量群（ $0.40 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ 、n=3）、高用量群（ $4.73 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$ 、n=3）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5）。

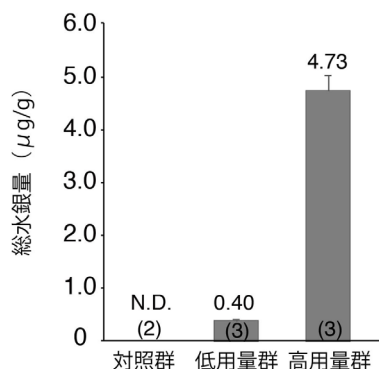


図5. 生後1日齢における脳内総水銀量

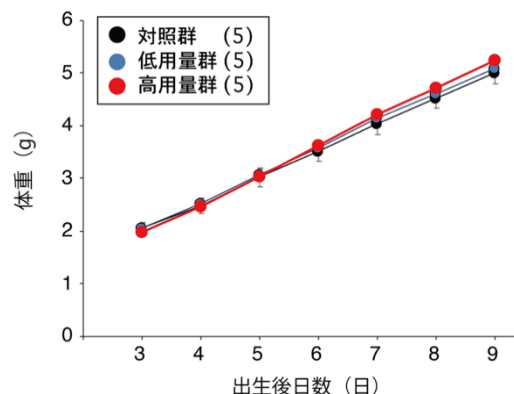


図6. 生後3～9日齢の体重

出生仔の体重変化：新生仔期（生後3～9日齢）の体重を比較したが、対照群、低用量群、高用量群の群間での違いは認められなかった（図6）。

新生仔期の超音波発声に対する影響：母親から分離された新生仔の、1分間当たりの超音波発声時間を出産後3～9日令にかけて毎日計測したが、群間で有意差は認められなかった（図7）。

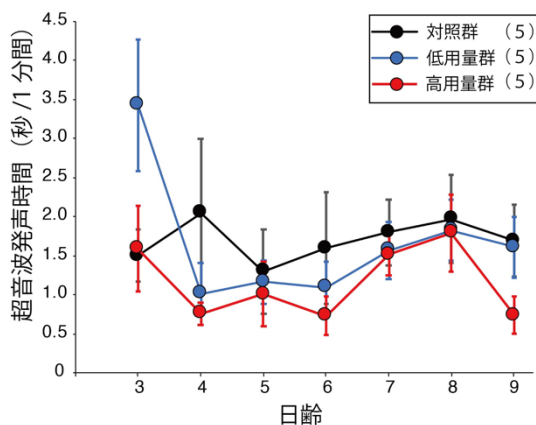


図7. 新生仔期の超音波発声時間

IntelliCage を用いた行動影響評価：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に関しては、別途フェノバンスにおいて3週齢のマウスを用いて対照群と高用量群を比較する追試も行なった）。

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、フェノバンスにおいては群間での有意差は認められなかったが、国立環境研究所において、高用量群、低用量群ともに有意な低下が認められた（図8）。

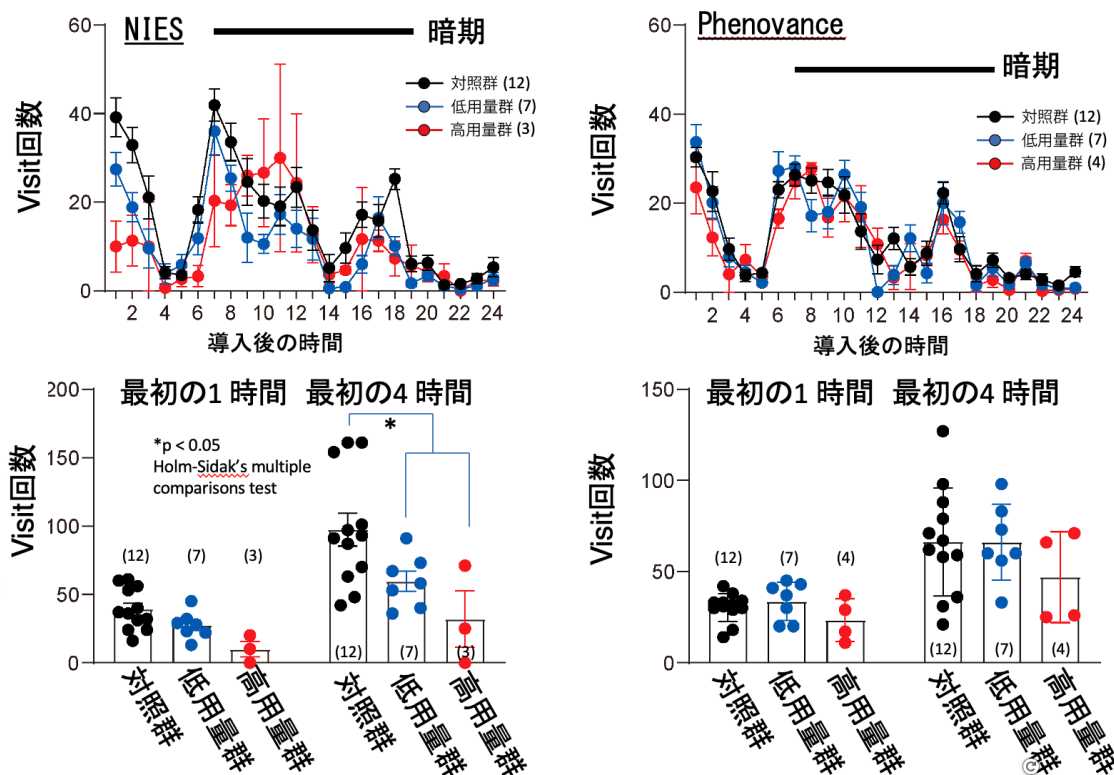


図8. 新奇環境（IntelliCage に導入してから24時間）での探索行動



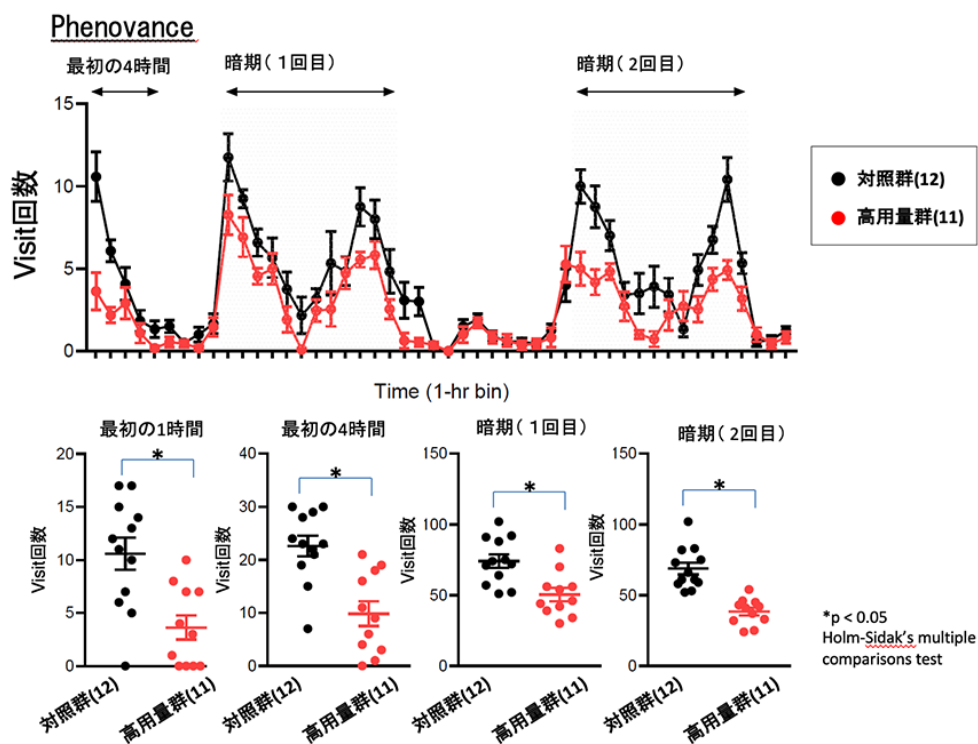


図 9.3 8週齢時点での新奇環境における活動量

加えて、3週齢で追試を行なったところ、8週齢と同様に高用量群において最初の4時間での有意な行動量の低下が観察された(図9)。

- ② 基底活動量 : IntelliCage に導入した後の2週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・暗期とも有意な低下は認められなかった(図10)。

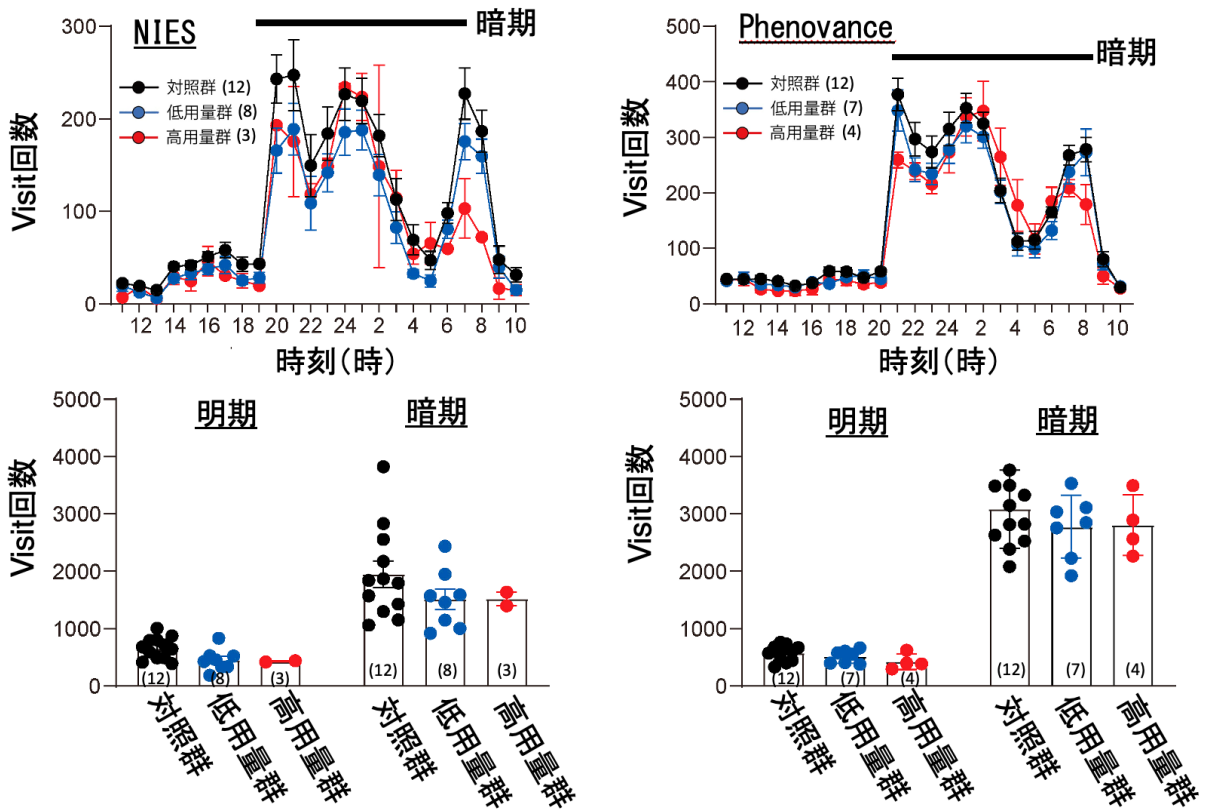


図 10.14 日間に渉る基底活動量解析

- 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。本課題に関しては、実験に供することができる高用量群のマウスの匹数が十分でなかったため、対照群と低用量群の2群間の比較を行った。国立環境研究所と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 11)。さらに、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した。その結果、2機関で共通して有意な群の主効果がみとめられ、低用量群の報酬に対する不必要な固執的行動が増加していることがわかった (Two-way ANOVA 及び Holm-Sidak's multiple comparisons test) (図 12)。特にもともと報酬が得ることができないコーナーにおける不必要なノーズポークの回数については、2機関で各々効果量 (Hedge's  $g$ ) の値が1に近く、効果量が類似していることが確認された。

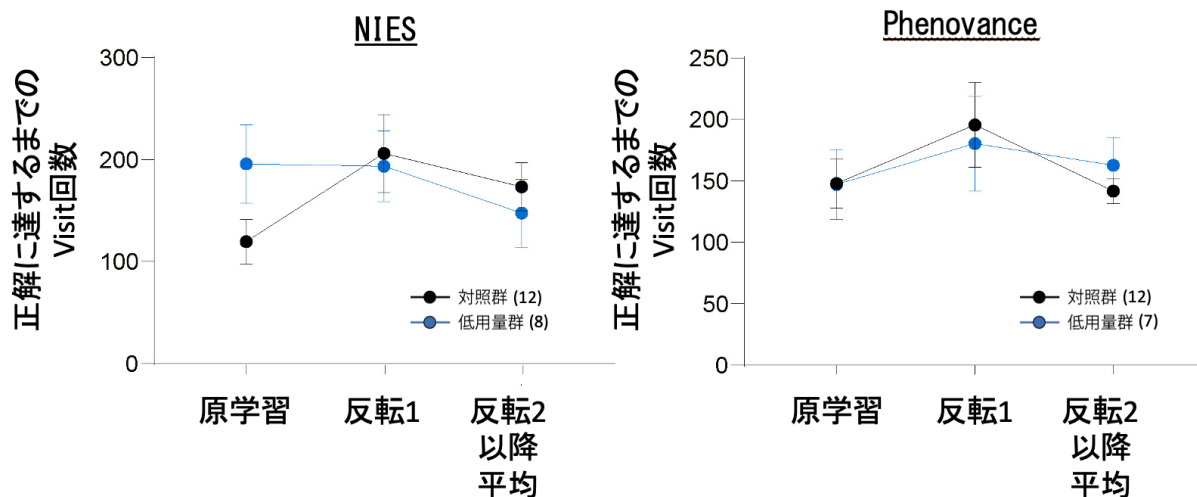


図 11.行動柔軟性課題における行動柔軟性指標の結果

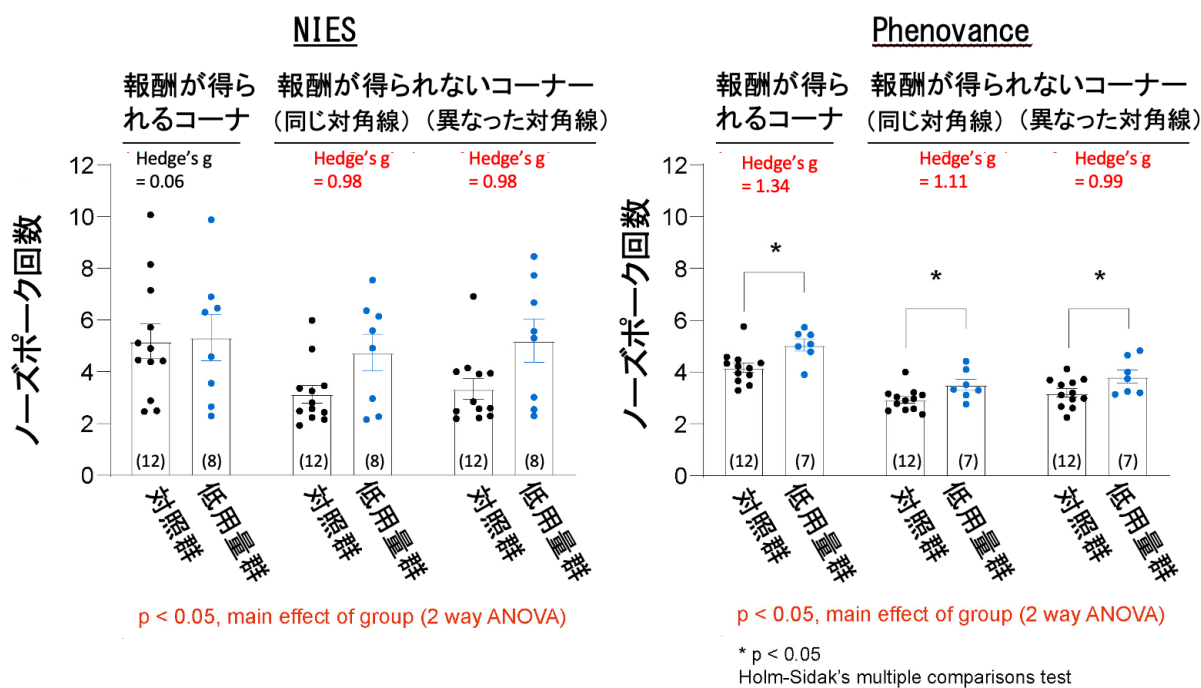


図 12.行動柔軟性課題における固執性解析

- ④ 選択反応時間課題:一定の待機時間を待たないと報酬を得ることができない条件で、待機できずに反応した割合 (%) を検出し衝動性指標とする、選択反応時間課題を行なった。待機時間としては 0.5/1.0/1.5 秒、1.0/1.5/2.0 秒、1.5/2.0/2.5 秒がランダムに出現する 3 パターンで検討を行った。本課題に関しても、実験に供することが可能な高用量群のマウスの匹数が十分でなかったため、対照群と低用量群の 2 群間の比較を行った。国立環境研究所と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 13)。



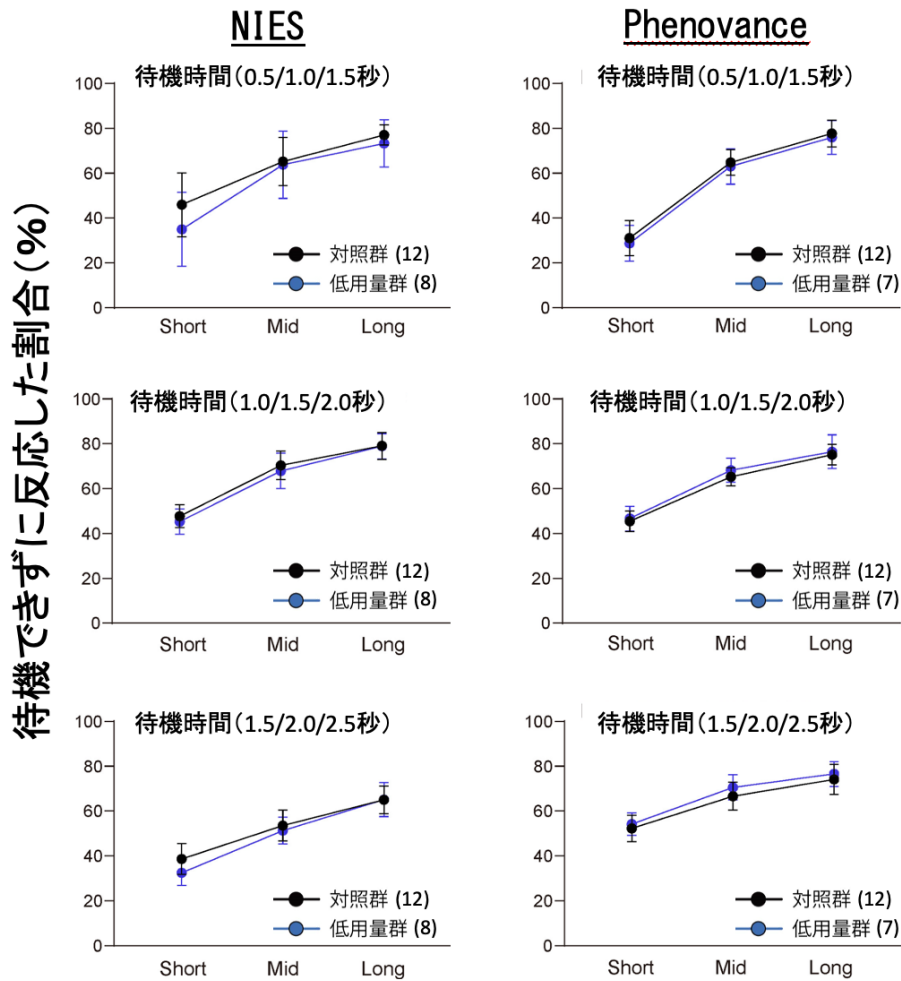


図 13. 選択反応時間課題における衝動性指標

#### IV 考察

2年次の解析では、1年次の報告会時に、妊娠7日目の単回投与では妊娠期全体に渉る曝露としては不十分であるとの指摘を受けたため、2年次の研究においては妊娠7日目に加えて、妊娠14日目にもメチル水銀曝露を行った。2年次の低用量群（0.5 mg/kg 体重） $0.40 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ の値は、低用量群の総水銀量  $0.07 \mu\text{g/g}$ の6倍程度であり、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（ $0.026 \sim 0.295 \mu\text{g/g}$ ）の上限に相当する値であり（Lapham et al., 1995）、また高用量群（5 mg/kg 体重）では低用量群の約10倍の総水銀量の蓄積が認められた。2年次に新たに行った行動試験として新生仔期の超音波発声試験と IntelliCage を用いた選択反応時間課題があるが、どちらの試験でも群間で有意な違いは認められなかった（表1）。IntelliCageで影響が認められた基底活動量の変化に関しては、2年次の曝露条件では、新奇環境における活動量に関して国立環境研究所で行った結果について低・高用量群において有意な活動量の減少が認められた。また、フェノバンスで3週齢マウスを用いて高用量群に関してのみ追試を行なった結果、有意な活動量減少が認められた。一方、1年次の曝露条件でフェノバンスにおいて認められた高用量群における基底活動量の低下は2年次には観察されなかった。活動量に関する指標に関しては、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でも認められているが（Onischenko et al., 2007）、活動量の影響パ

ターンを更に細分化していくと、先行研究、1年次、2年次の研究を総合して考えると、曝露条件や IntelliCage を設置する実験環境の違いによって活動量が低下するパターンに違いが生じた可能性が考えられる。IntelliCage における活動量はメチル水銀曝露に感受性が高い行動指標であるとは考えられるが、活動量の中でも様々なパラメータを精査しないとメチル水銀曝露影響を捉えきれない可能性があるといえる。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年次の研究では、複数機関で共通の有効なエンドポイントを見つけることができなかったが、2年次には行動柔軟性課題における固執性指標において、国立環境研究所とフェノバンスの2機関で同一影響が現れる行動指標が明らかとなり、機関間の一致率の指標となる効果量 Hedge's g の値も双方で同程度に高かった。固執性に関しては中脳被蓋野から大脳皮質前頭前野へのドーパミン神経系が重要な働きを示す可能性が報告されている (Macpherson T et al., 2017)。3年次には、3機関で研究を行うことで、固執性がメチル水銀曝露影響を的確に捉えることができる実験環境に依存しない有効な行動指標であるか追試を行うとともに、ドーパミン神経系に着目してメチル水銀の作用機序の解明を行なう予定である。

表 1. 1年次と2年次に行った行動影響評価のまとめ

		1年次	2年次
曝露方法		妊娠7日目単回	妊娠7,14日目2回
活動量	新奇環境	—	低・高用量群↓ (NIES)
	基底活動量	高用量群↓ (Phenovance)	—
フットプリント解析		—	検討せず
行動柔軟性指標		—	—
固執性指標		低・高用量群↓傾向	低用量群↑ (2機関)
競争環境課題		—	検討せず
超音波発声		検討せず	—
選択反応時間課題		検討せず	—

※ — は有意差なかった行動指標を表す。

## V 結論

妊娠7日目と14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、成長後の行動影響としては、特に複数機関でのIntelliCageでの行動柔軟性課題における固執性指標に共通して影響を与えることが明らかとなった。次年度はこの指標が早稲田大学でも検討できるか追試を行うとともに、メチル水銀が行動異常を引き起こす作用機序の解明を行う。

## VI 次年度以降の計画

本年度は胎仔期曝露が後発的に行動異常を誘導する影響の評価をIntelliCageを使用して3機関(国立環境研、フェノバンス、早稲田大)で行うとともに、その検出された行動異常の裏付けとなる脳内分子標的の解析を行う。行動異常が検出されたマウスの脳を摘出し分子生物学的・生化学的解析を行うことで行動実験の結果の蓋然性を証明する。2年次の計画から、母体経由で有機

水銀を3用量（0、0.5、5 mg/kg bw）で妊娠7日目と14日目に2度経口曝露することで行動異常の検出が容易に行えることが明らかとなったため、3年次の計画においても同じ用量を活用する。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、分担者研究機関である①フェノバンスリサーチアンドテクノロジー合同会社および②早稲田大学に各群8匹ずつ（計32匹）を輸送し、集団型全自動行動測定システムIntelliCageを用いた検討を行う。行動指標に関しては、2年度で明らかになった固執性への影響を中心として再検討を行い、行動影響指標としての有効性を確実なものとする。脳への影響に関しては、特に影響が大きいと考えられる大脳皮質・辺縁系に焦点を絞り、メチル水銀投与後の新生仔の脳を摘出して、遺伝子発現解析・組織学的解析を行う。特に、固執性に関わる分子としてモノアミンとモノアミン受容体の関与が知られており、中でもドーパミン神経系に特に着目して神経伝達に関わる分子の遺伝子発現・組織学的解析を行う。行動解析に関しては、機関間の結果の同一性の判断基準として、各エンドポイントの効果量（Hedge's g）を指標とし、各エンドポイントの効果量が機関間で共通して-0.7以下のもの、もしくは0.7以上となったものについて、機関間で一定の再現性が認められる、より信頼性の高い毒性エンドポイントと判断する。

#### 本研究に関する現在までの研究状況、業績

##### **【学会やシンポジウムにおける成果発表】**

1. 掛山正心 「環境ホルモン作用と発達神経毒性評価法の確立」 日本学術会議公開シンポジウム/環境ホルモン学会講演会 「食の安全と環境ホルモン」 Web 開催 2020/12/5
2. 遠藤俊裕 「認知・行動毒性評価に係る諸問題と新手法」 第37回生殖・発生毒性学東京セミナー 2021/4/10 独立行政法人 国立オリンピック記念青少年総合センター
3. 前川文彦、遠藤俊裕、掛山正心 「実験環境に依存しない発達期メチル水銀曝露の行動影響評価指標」 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会 第98回日本生理学会大会 合同大会 Web 開催 2021/3/28～30

#### 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) Endo T, Maekawa F, Vöikar 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.
- 3) 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.
- 4) Macpherson T, Morita M, Wang Y, Sasaoka T, Sawa A, Hikida T. Nucleus accumbens dopamine D2-receptor expressing neurons control behavioral flexibility in a place discrimination task in the IntelliCage. *Learn Mem.* 2016;23(7):359-364.
- 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-institutional and unified test method

Fumihiko Maekawa<sup>\*1</sup>, Toshihiro Endo<sup>\*2</sup>, Masaki Kakeyama<sup>\*3</sup>

*\*1 Center for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies*

*\*2 Phenovance Research & Technology*

*\*3 Faculty of Human Sciences, Waseda University*

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

## **Abstract**

Epidemiological studies have shown that low concentrations of methylmercury in humans may induce neurophysiological effects. On the other hand, since there have been many empirical reports using animals to clarify the effects of low-level exposure of methylmercury, the reports have not been utilized as a basis for environmental standard values. Most behavioral experiments so far have been performed by different experimenters using their own test equipments and protocols, thus it is hard to generalize the results and it caused the lack of reliability. To solve these problems, we believe that the research using unified test method between organizations is the key to derive reliable toxic values. In this study, fetal mice, which are considered to be particularly susceptible to environmental chemicals, were exposed to methylmercury at pregnant day 7 and 14, and behavioral abnormalities after being adults were analyzed in multiple organizations using the identical analysis apparatus called IntelliCage, a fully automatic behavior measurement system. We identified that a reliable behavioral endpoint related to perseverative behavior is sensitive to developmental exposure to methylmercury. We hope this trial will be the first step to create assessment endpoints useful for conducting toxicity test.