

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

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・健康研究領域

生体影響評価研究室 主幹研究員

分担研究者 遠藤俊裕 (フェノバンス合同会社・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、耐容(許容)一日摂取量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対して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動物実験の結果のみから耐容(許容)一日摂取量が定められている一方で、メチル水銀に関しては現状では疫学調査の結果のみに依拠し摂取量が設定されており、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 材料と方法

マウスを動物モデルとして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した。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。3年次にその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も検討した。

実験概要および曝露方法：1年次の研究において妊娠7日目の母体に対して単回曝露の検討を行った。研究報告会においてその結果を報告した際、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年次以降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。塩化メチル水銀(II) (アルファ・エイサー) を4用量 (0、0.5、2.5、5.0 mg/kg 体重、以下それぞれ対照群、低用量群、中用量群、高用量群と記載) 設定し、実験毎に必要な用量を選択した。塩化メチル水銀(II) は経口で投与した。

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、1～2年次は分担者研究機関であるフェノバンス合同会社 (以下フェノバンスと略) と国立環境研究所に各群雄マウス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。また、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、島津テクノリサーチ) により計測した。

1年次の研究としては、妊娠7日目の母体に対して単回曝露を行って、IntelliCage を用いて産仔への影響を2機関で検討した。まず【実験 1-1】として、生後1日齢における脳内の総水銀量と体重を測定した。その後、産仔が成長した後 IntelliCage を用いて、【実験 1-2】新奇環境での探索行動、【実験 1-3】基底活動量、【実験 1-4】場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題、【実験 1-5】競争環境課題の検討を行った。

2年次の研究としては、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2回投与の影響を検出した。まず、【実験 2-1】として、生後1日齢における脳内総水銀量と生後3～9日齢の体重を測定した。次に、【実験 2-2】として、社会的コミュニケーション指標の一つである新生仔期の超音波発声時間に関する検討を行った。更に、産仔が成長した後 IntelliCage を用いて、【実験 2-3】新奇環境での探索行動、【実験 2-4】基底活動量、【実験 2-5】場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題、【実験 2-6】選択反応時間課題に関して検討を行った。

3年次の研究としては、まず2年次までに雄マウスを用いて検出された新奇環境における活動量低下と行動柔軟性課題における固執性の変化に関して、2年次とは異なった条件のマウスの評価にも適用できるか検討するため【実験 3-1】として、3～6週齢の性成熟前の雌マウスを用いて新奇環境での探索行動と検討を行った。この検討には対照群と高用量群の2群

間での比較を行った。また、2年次までは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、メチル水銀曝露動物を用いた研究は実施できなかったが、3年次においては入校も一部緩和された。そのため【実験 3-2】として、対照群、低用量群、中用量群の3群を用いて、2年次までに行った基底活動量・新奇環境での探索行動の解析に関して、性成熟後の雄マウスを用いて国立環境研究所・フェノバンス・早稲田大学の3機関にて検討を行った。【実験 3-3】では、対照群、低用量群、中用量群の3群を用いて、4~6週齢の性成熟前の雌マウスの基底活動量・新奇環境での探索行動および行動柔軟性課題への影響評価をフェノバンスにおいて実施した。最後に【実験 3-4】として、生後1日齢の雌マウスの対照群、低用量群、中用量群の3群4例ずつによる全脳から抽出した Total RNA を用いた RNA-Seq を実施し、網羅的遺伝子発現解析により胎仔期水銀曝露で発現が変化する遺伝子の探索を行った。

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）で給水瓶からの飲水が可能となる。コーナーの出入口には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1~2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。1年次には①基底活動量、②新奇環境での活動量、③場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題、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場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題に関しては、4つのコーナーのうち報酬が得られる2つのコーナー（正解コーナー）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変化する課題を施すことで、変化に対応できる行動柔軟性指標を評価したが（図2、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も注目して検討を加えた。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）。

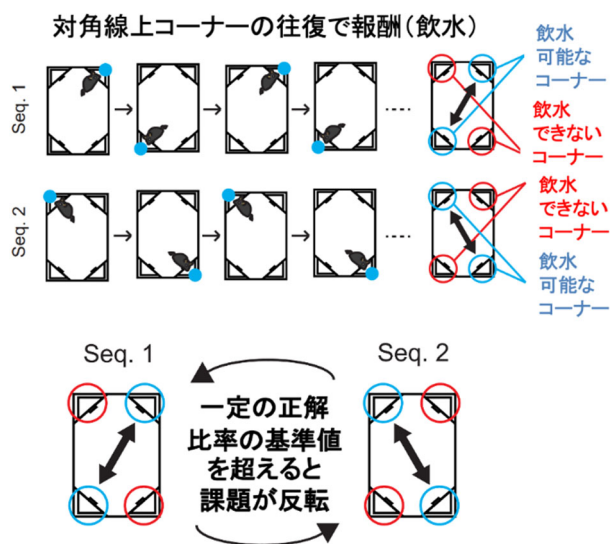


図2. 場所及び行動系列に基づく行動柔軟性課題のスキーム

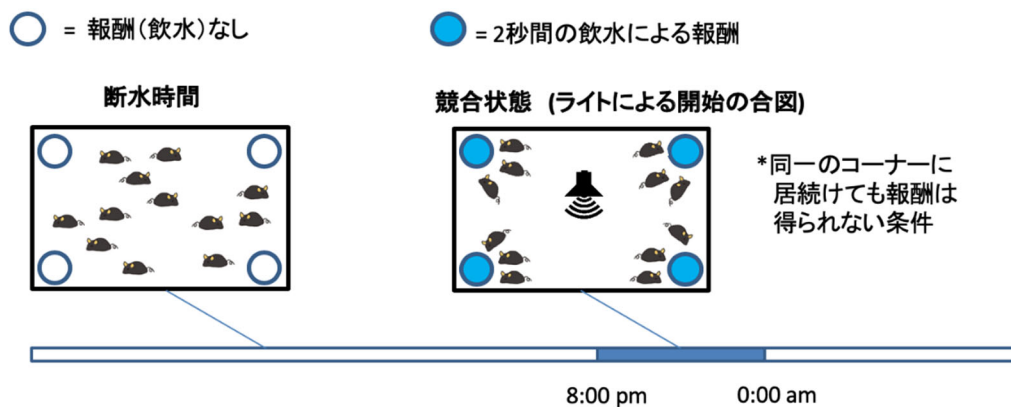


図3. 競争環境課題のスキーム

2年次には投与用量を見直した上で、1年次に行った①～③に加えて、⑤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。

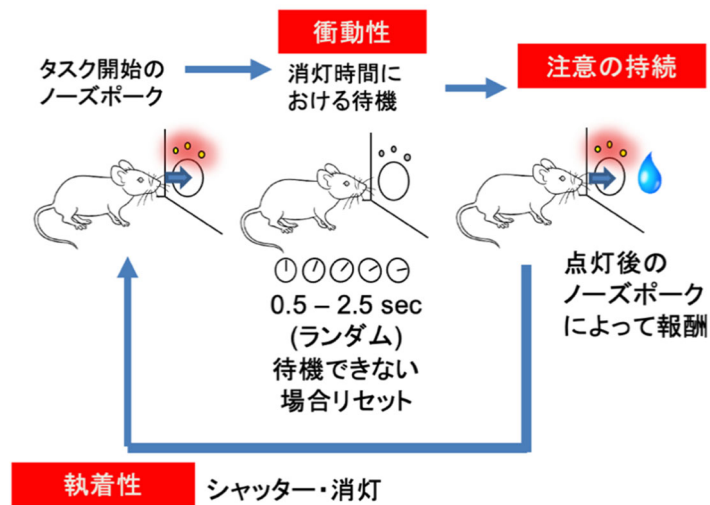


図 4. 選択反応時間課題のスキーム

2年次で群間の有意差を検出することができなかったため、3年次においては⑤選択反応時間課題の検討は行わなかった。

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。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。

RNA-Seqによる胎仔期水銀曝露に伴い発現が変化する遺伝子の検討：

3年次において、1週齢の新生仔雌マウスの脳を摘出した後、生後1日齢の対照群、低用量群、中用量群の3群4例ずつからRNeasy Plus Universal kitを使用してTotal RNAを抽出した。その後Quantus FluorometerとQuantiFluor RNA system (Promega)を用いてRNAの濃度測定を行い、5200 Fragment Analyzer SystemとAgilent HS RNA Kit (Agilent Technologies)を

用いて品質の確認を行った。RNA-Seq のためのライブラリーの作製には MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI Tech Co., Ltd.)を用いた。ライブラリーの品質確認に関しては Synergy H1 (Bio Tek) と QuantiFluor dsDNA System (Promega)を用いて濃度測定を行い、Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies)を用いて品質の確認を行った。

ライブラリーのシーケンシング解析に関しては、DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit (MGI Tech Co., Ltd.)を用いて DNB を作製し、DNBSEQ-G400 を用いて 2x100 bp の条件で、作製された DNB をシーケンシング解析した。

(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、審査を受けた後動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第七十一号「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」）を参照しつつ、3R の原則に基づき実験を行なった。

① 倫理審査委員会設置研究機関：

国立環境研究所、フェノバンス合同会社、早稲田大学

② 委員会等の名称：国立環境研究所動物実験委員会

フェノバンス動物実験委員会

早稲田大学生物実験管理委員会／動物実験審査委員会

③ 承認（予定）時期：全機関で承認済み

III 研究結果

1 年次の研究結果

【実験 1-1】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（ $0.07 \pm 0.00 \mu\text{g/g}$ 、n=4）、高用量群（ $0.79 \mu\text{g/g}$ 、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 5）。

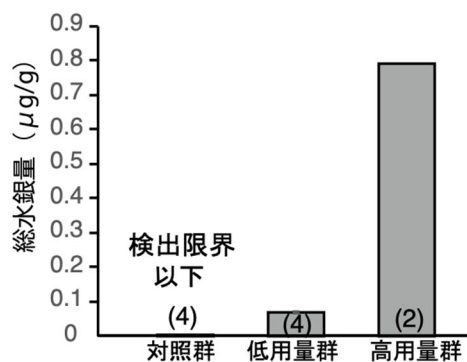


図 5. 生後 1 日齢における脳内総水銀量

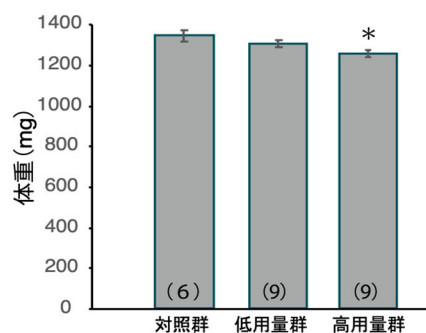


図 6. 生後 1 日齢の体重

(*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）の体重を測定したところ、対照群（1348±28 mg、n=6（平均値±標準誤差、母体毎に補正）、低用量群（1307±17 mg、n=9）、高用量群（1260±17 mg、n=8）であり、高用量群で有意に体重が低下していた（図6、*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。

【実験 1-2】新奇環境での探索行動：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7）。

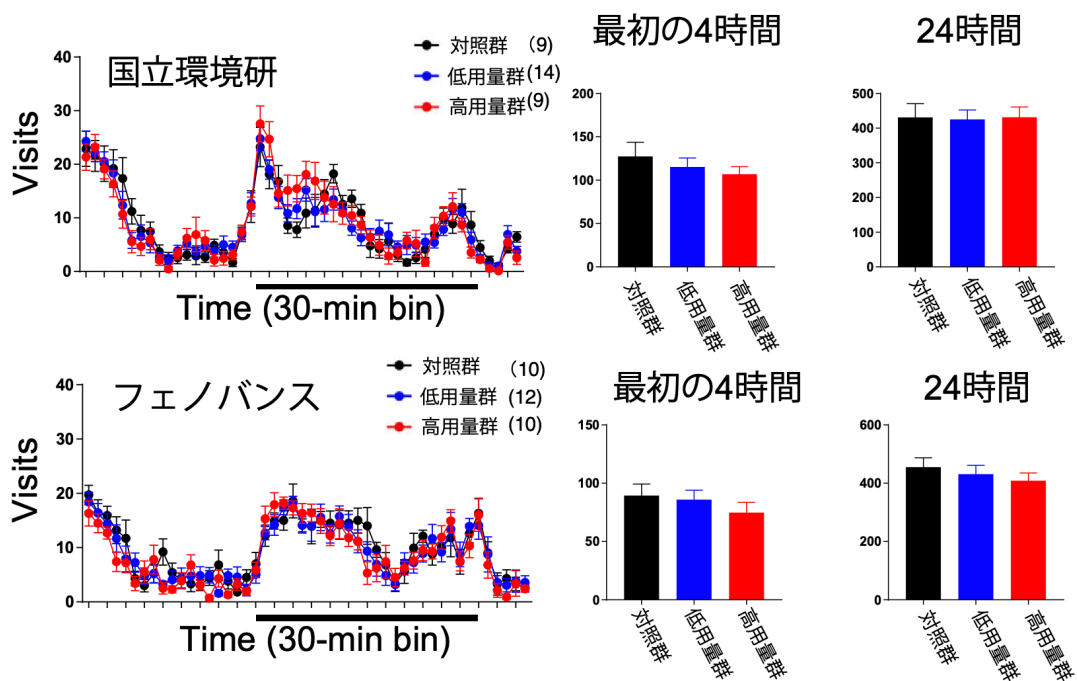


図7. 新奇環境（IntelliCage に導入してから24時間）での探索行動

【実験 1-3】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認められなかった。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（†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8）。

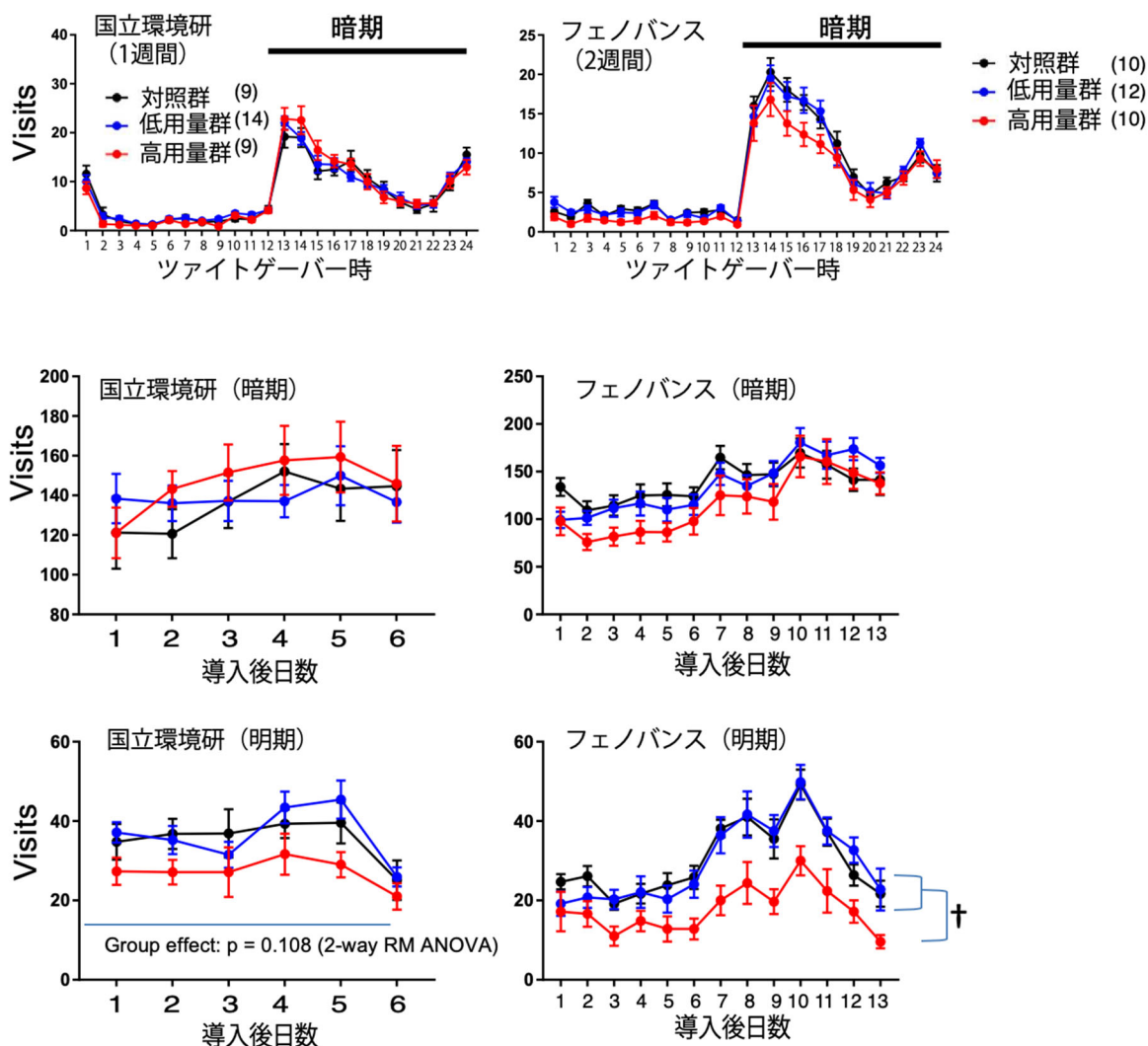


図 8. 基底活動量

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

【実験 1-4】 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ため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 9)。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 9)。

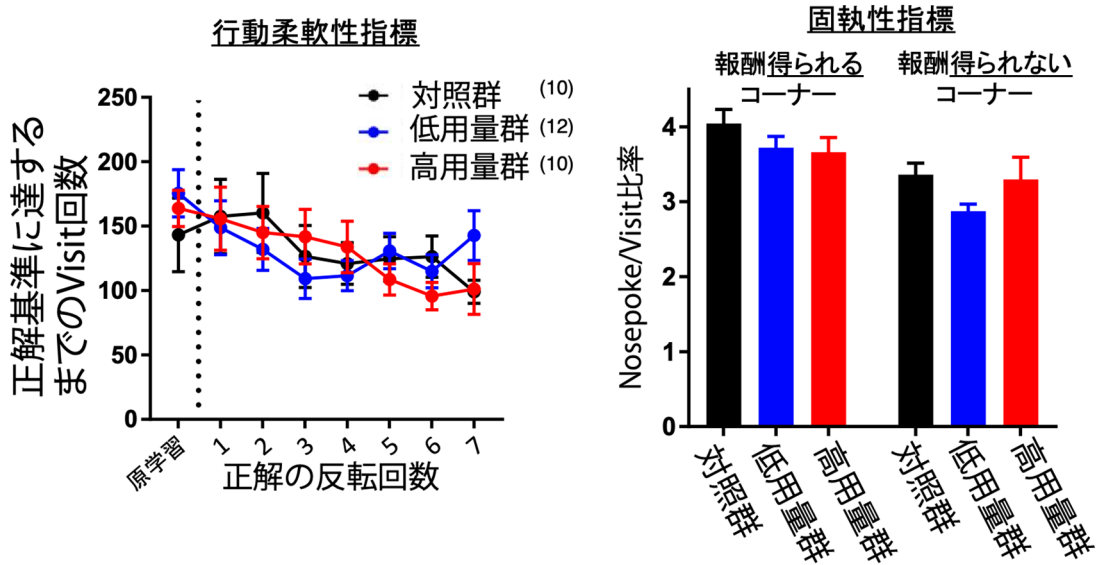


図 9. 行動柔軟性および行動柔軟性課題における固執性

【実験 1-5】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 10）

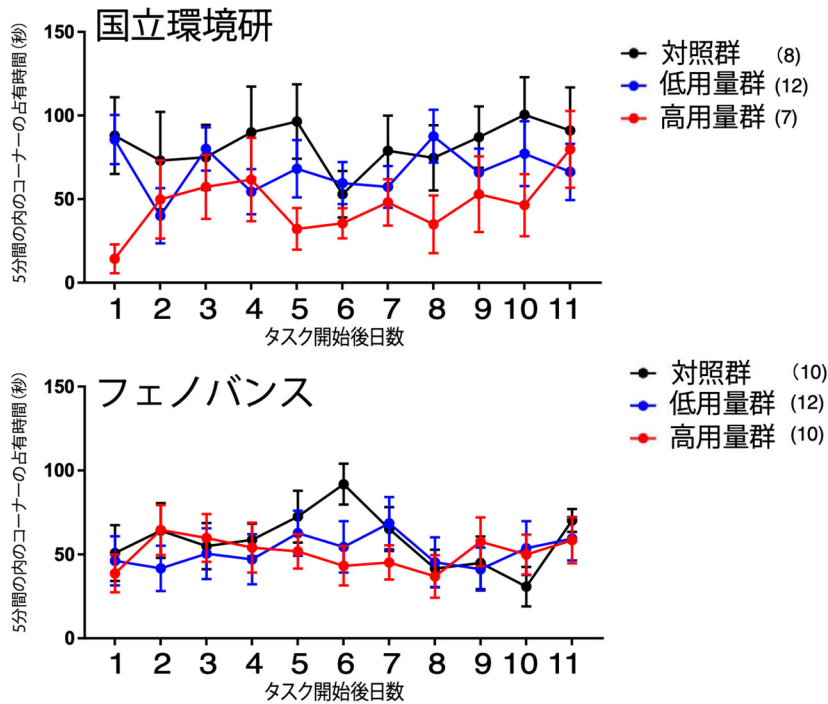


図 10. 競争環境課題

2 年次の研究結果

【実験 2-1】妊娠 7 日目・14 日目 2 回投与による生後 1 日齢における脳内総水銀量と生後 3～9 日齢の体重への影響

新生仔期脳内水銀蓄積量: 出生仔の一部を利用し、母体に2回投与を受けた新生仔の生後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11）。

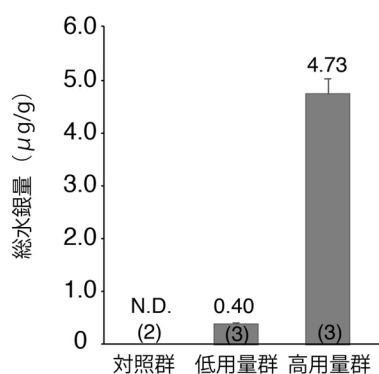


図 11. 生後 1 日齢における脳内総水銀量

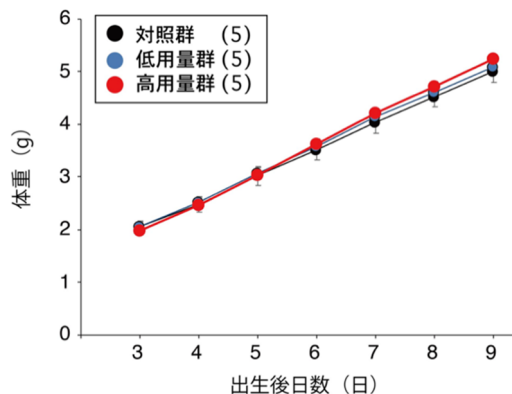


図 12. 生後 3～9 日齢の体重

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12）。

【実験 2-2】新生仔期の超音波発声に対する影響:

母親から隔離した状態で新生仔の 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 13）。

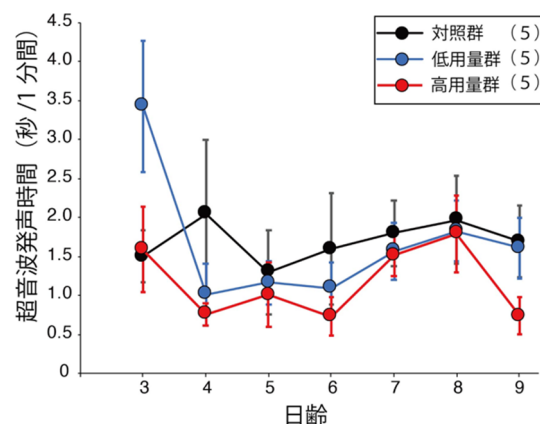


図 13. 新生仔期の超音波発声時間

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 (NIES) およびフェノバンス (Phenovance) における解析の結果、以下の検討項目で結果を得た。

【実験 2-3】新奇環境での探索行動: *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 14）。

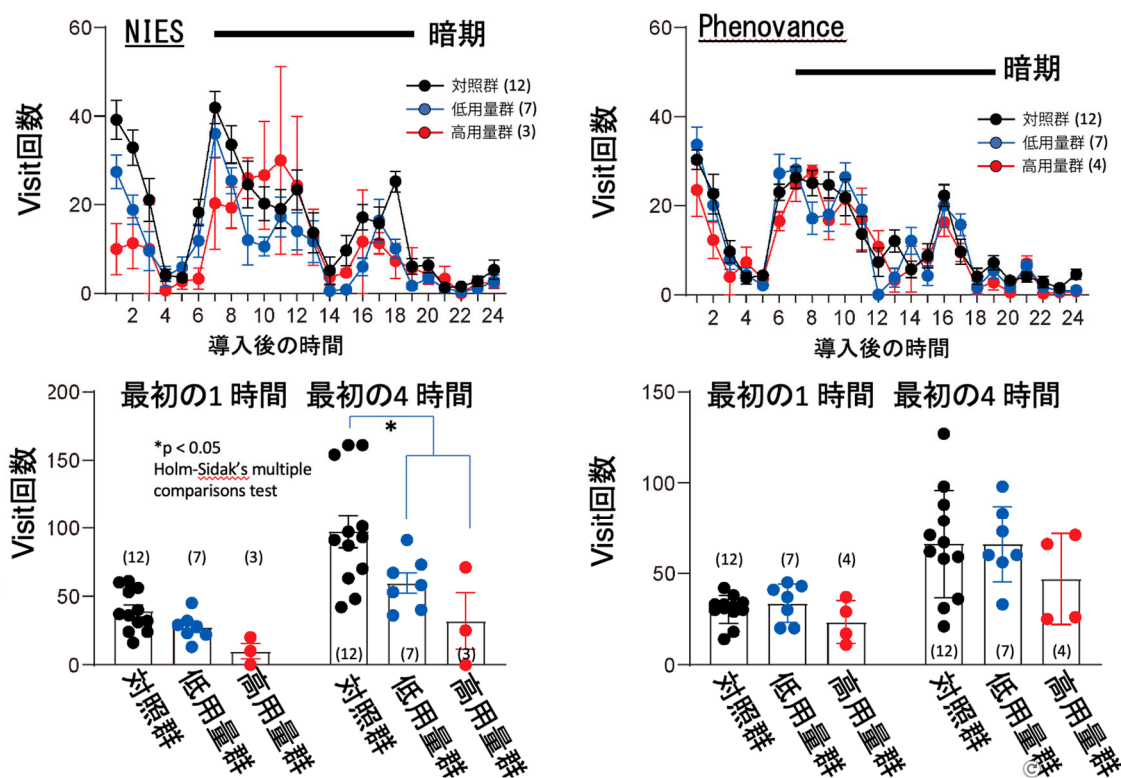


図 14. 新奇環境 (IntelliCage に導入してから 24 時間) での探索行動

【実験 2-4】 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認められなかった。また、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 15)。

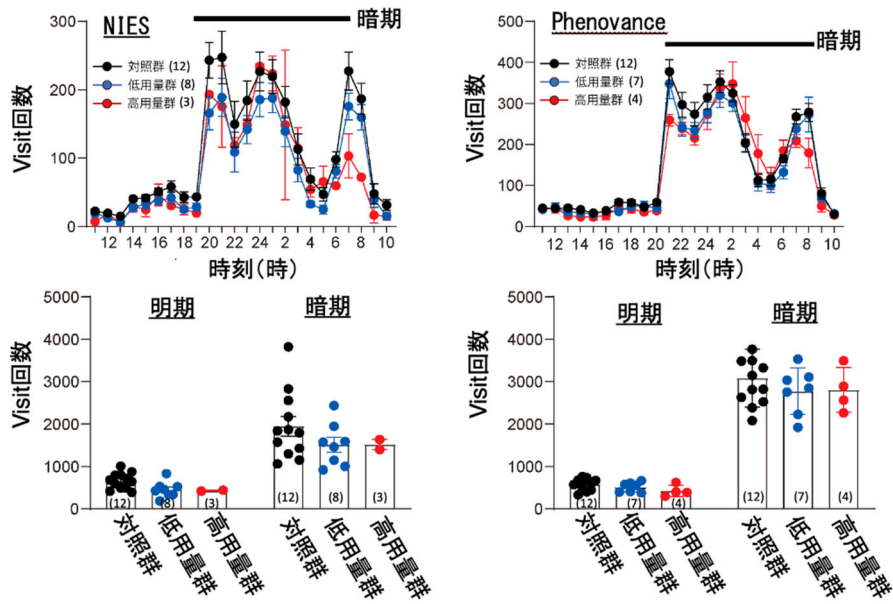


図 15. 14 日間に渉る基底活動量解析

【実験 2-5】 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 16)。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、低用量群において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明らかになった (Two-way ANOVA 及び Holm-Sidak's multiple comparisons test) (図 17)。特に報酬を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関して、2 機関で効果量 (Bias corrected Hedge's g) を算出したところ、どちらも値が 1 に近く、効果量が十分高くかつ類似した値であることが確認された。

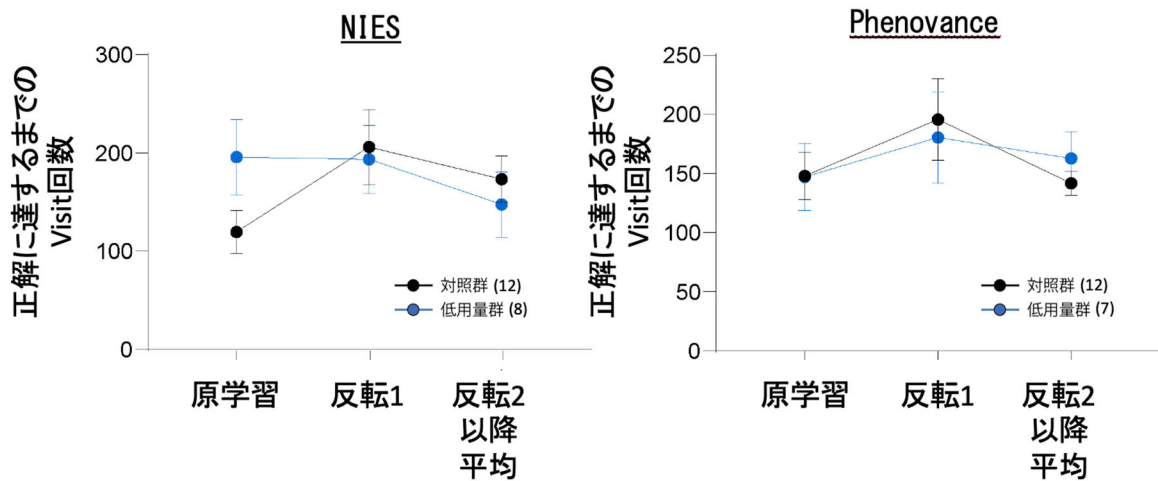


図 16.行動柔軟性課題における行動柔軟性指標の結果

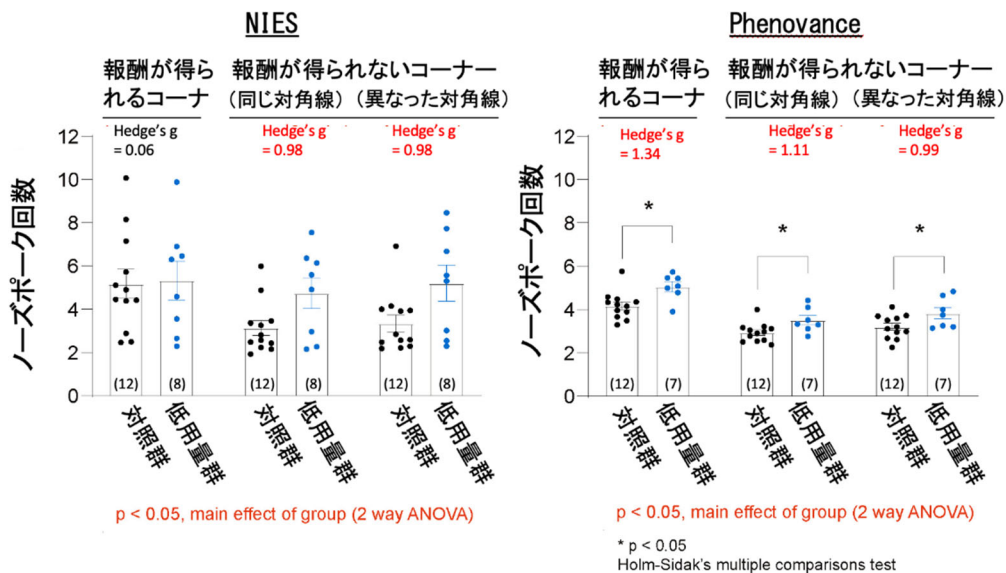


図 17.行動柔軟性課題における固執性解析

【実験 2-6】選択反応時間課題:ライトが点灯後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 18)。

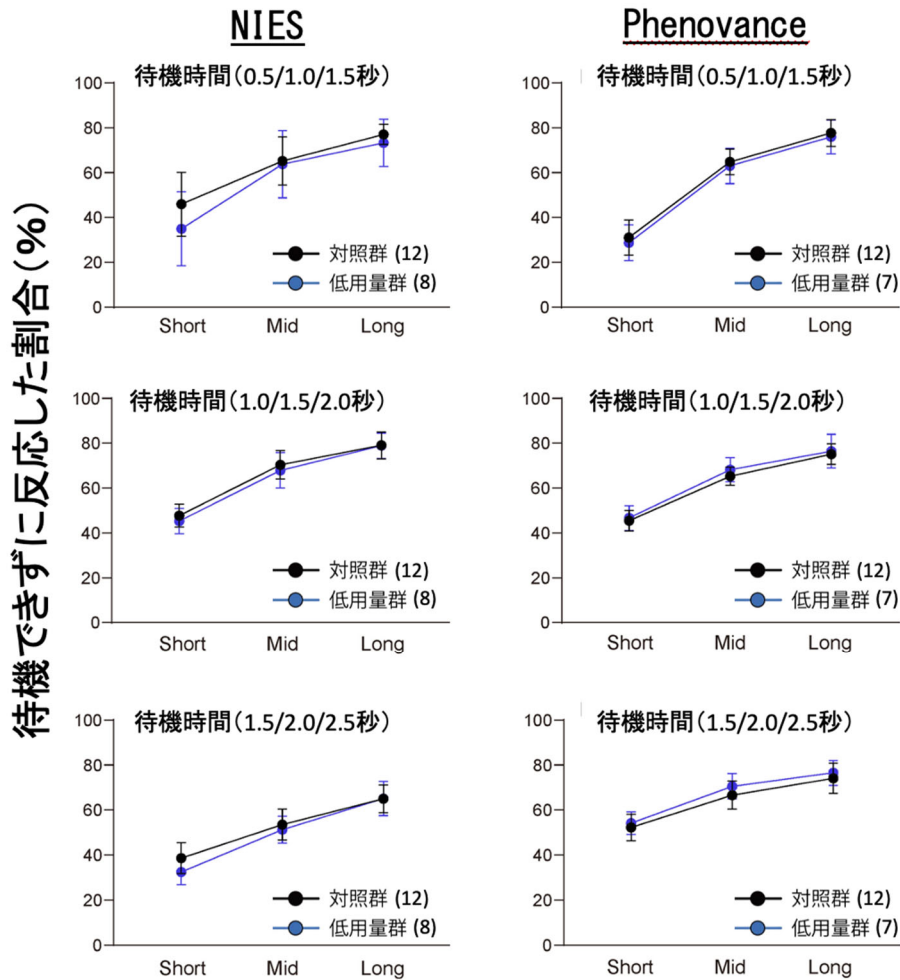


図 18. 選択反応時間課題における衝動性指標

3 年次の研究結果

【実験 3-1】性成熟前の雌マウス（対照群・高用量群）を用いた胎仔期メチル水銀曝露影響評価の解析（フェノバンス）：性成熟前の雌マウスの対照群と高用量群（5 mg/kg 体重）を用いて、2 年次に行った雄マウスを用いて行った実験条件とは異なる条件で影響を評価し、2 年次に検出された行動評価エンドポイントが汎用性を持つか検討を行った。妊娠 7 日目および 14 日目に 5 mg/kg 体重を経口投与した高用量群では、基底活動量に関しては対照群と差は認められなかったが、新奇環境でのコーナー進入回数が有意に低下することが明らかとなった（図 19）。

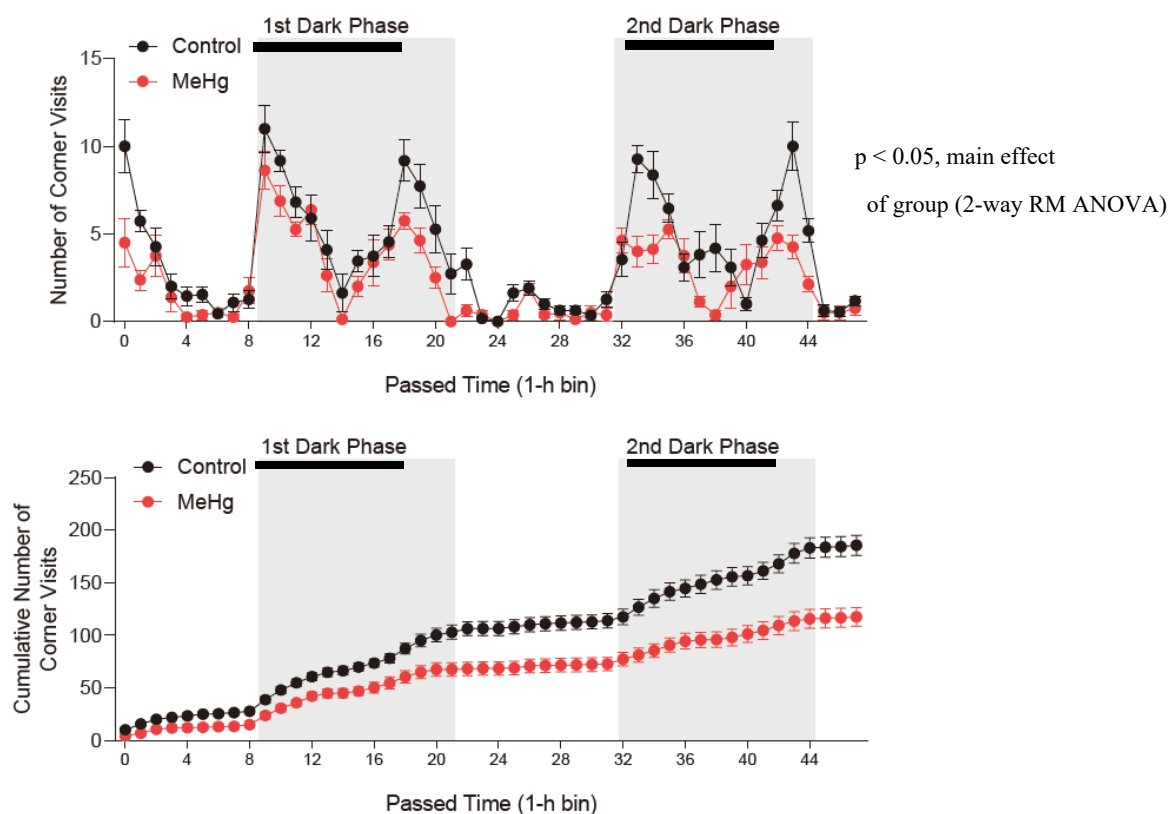


図 19. 性成熟前の雌マウス（3 週齢）における新奇環境条件（IntelliCage に導入後 48 時間）の対照群、高用量群の活動量 上：1 時間毎のコーナー進入回数、下：48 時間の累積コーナー進入回数。黒：対照群、赤：高用量群。統計：反復測定分散分析（1 時間毎のデータのみ）。エラーバー：標準誤差

さらに 3~6 週齢の間に毎週、行動柔軟性課題を検討した結果、行動柔軟性自体には顕著な影響は認められなかったが、4 週齢時の課題遂行中に不必要な固執的ノーズパークが有意に上昇した（図 20）。よって 2 年次に実施した性成熟後の雄マウス高用量群で認められた①新奇環境における探索行動異常、と、②行動柔軟性課題における固執性の増加、という 2 つのエンドポイントは、性や週齢が異なっても活用できる可能性が明らかになった。

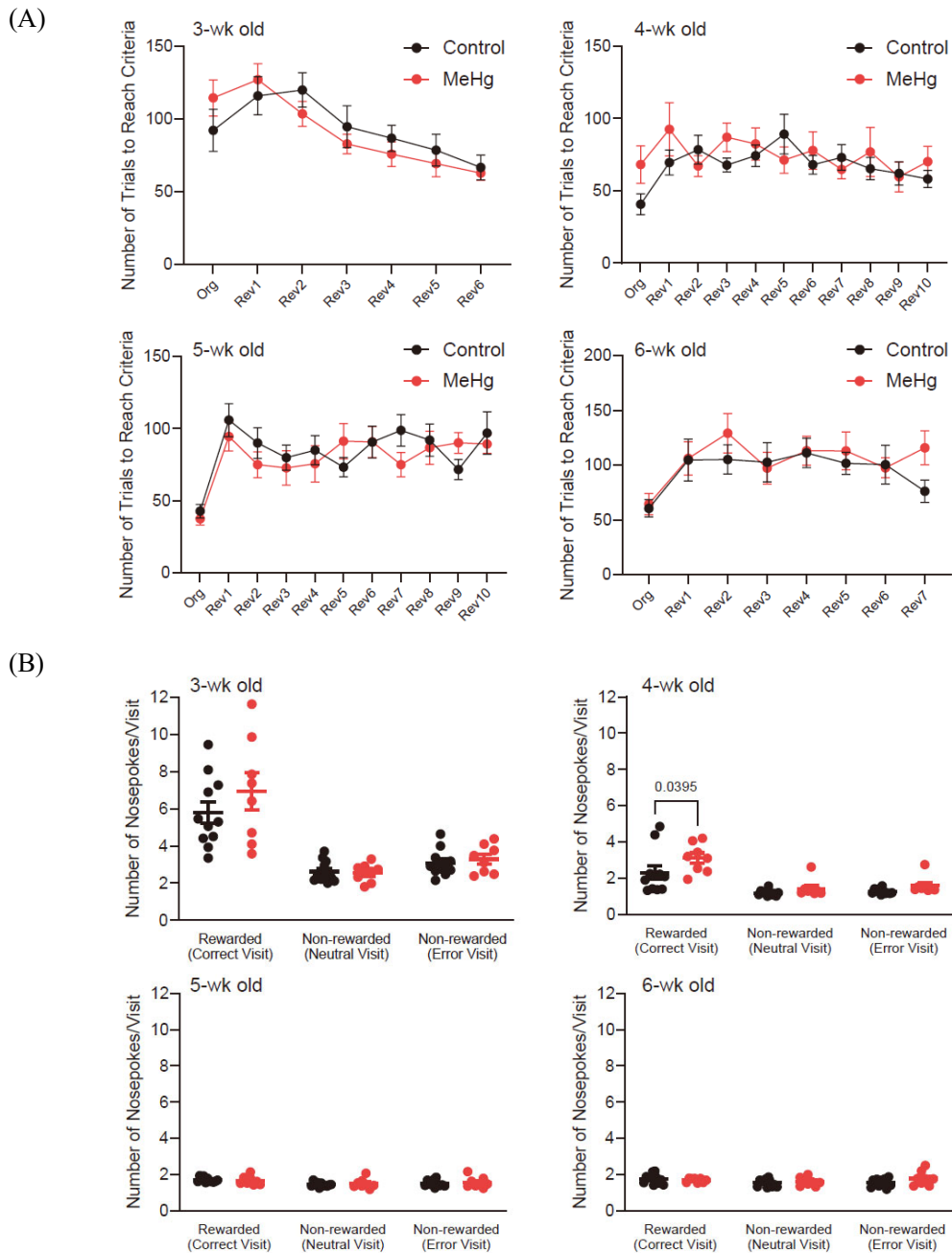


図 20. 性成熟前の雌マウス（3～6 週齢）における行動柔軟性課題成績 (A) および行動柔軟性課題における固執性指標の結果 (B)。(A) 行動柔軟性課題：有意差は認められなかったが、(B) 固執性指標：4 週齢時に、報酬がもらえるコーナーにおける不必要なノーゼポークが有意に増加していた ($p < 0.05$, main effect of group (2-way ANOVA))。黒：対照群、赤：高用量群。エラーバー：標準誤差。

【実験 3-2】 3 機関での雄マウス (対照群、低用量群、中用量群) の基底活動量と新奇環境における探索行動の解析：高用量群よりも低い用量でも、高用量群で認められた行動影響エ

ンドポイントが検出できるか調べるため、3機関で雄マウスを用いて解析を行った。対照群、低用量群 (0.5 mg/kg 体重)、中用量群 (2.5 mg/kg 体重) の3群で、各機関、各群 5~13 匹の性成熟後の雄マウスの評価を行った。基底活動量 (1週間) (図 21)、および新奇環境 (24 時間) での探索行動 (図 22) の解析を行ったが、いずれの機関でも有意差を見出すことはできなかった。

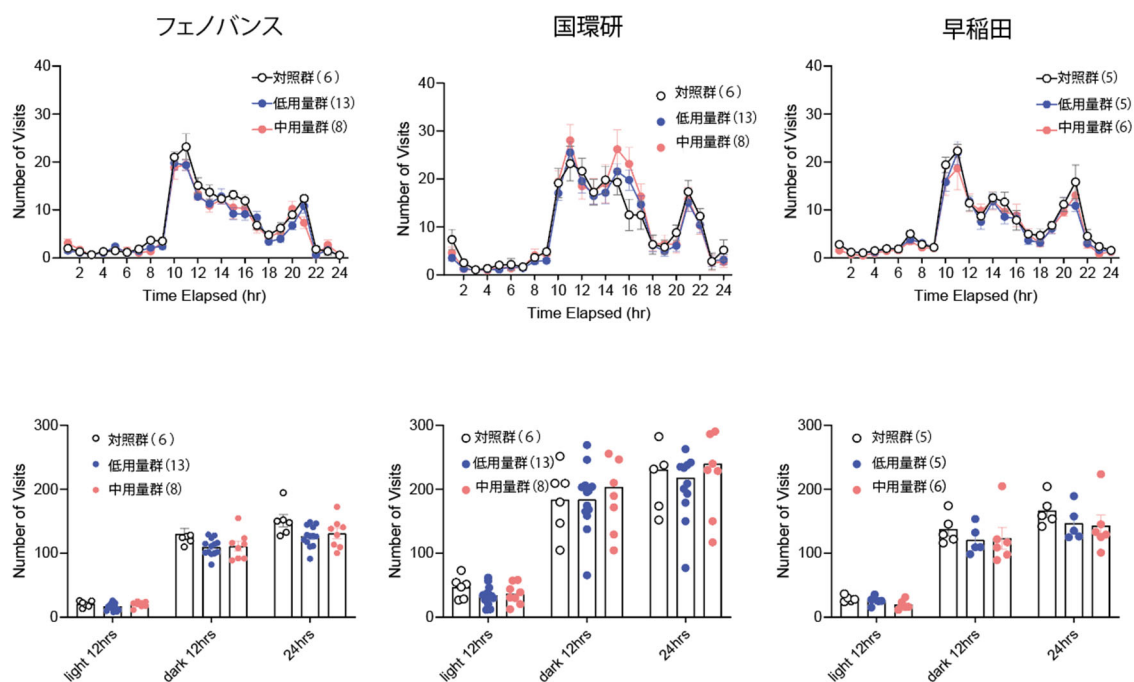


図 21. 3 機関での性成熟後の雄マウス(対照群、低用量群、中用量群)における基底活動量 (1週間)。上段：1 時間毎の平均コーナー進入回数、下段：明期、暗期、24 時間の平均コーナー進入回数。左からフェノバンス、国立環境研究所、早稲田大学のデータ。エラーバー：標準誤差。

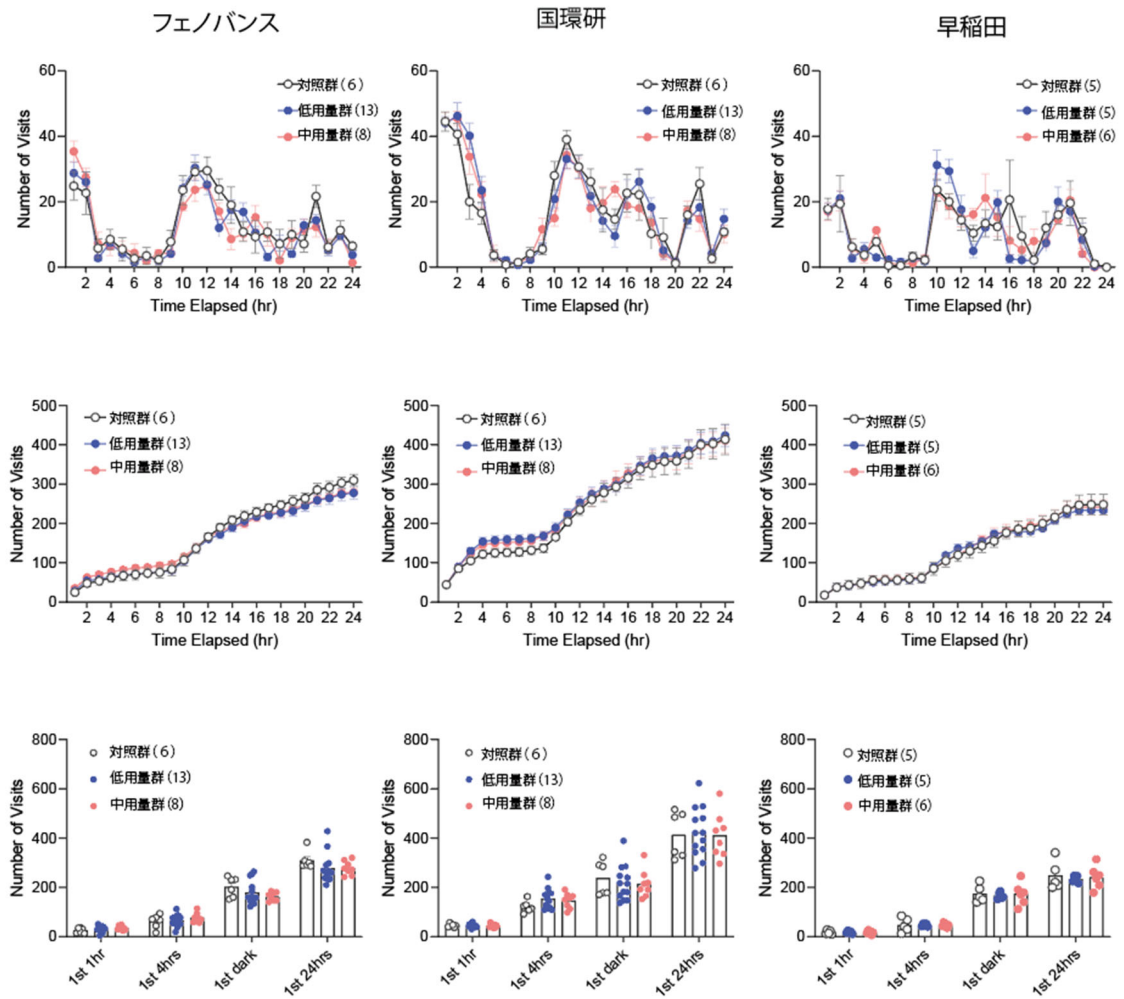


図 22. 3 機関での性成熟後の雄マウス(対照群、低用量群、中用量群)における新奇環境での探索行動 (1 日間)。上段：1 時間毎のコーナー進入回数、中段：24 時間の累積侵入回数、下段：最初の 1 時間、4 時間、暗期中、24 時間のコーナー侵入回数。左からフェノバンス、国立環境研究所、早稲田大学のデータ。エラーバー：標準誤差。

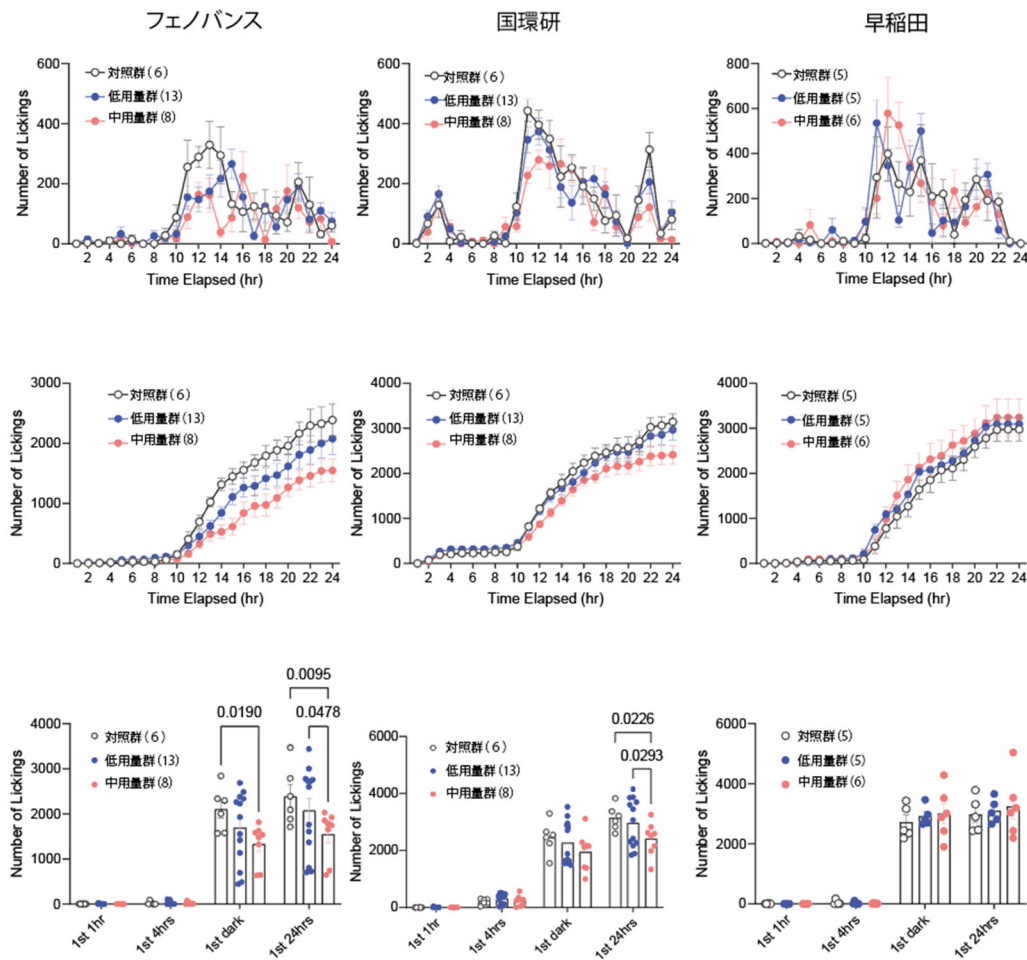


図 23. 3 機関での新奇環境条件下での性成熟後の雄マウス(対照群、低用量群、中用量群)の飲水回数 (1 日間)。上段：1 時間毎の飲水回数、中段：24 時間の累積飲水回数、下段：最初の 1 時間、4 時間、暗期中、24 時間の飲水回数。左からフェノバンス、国立環境研究所、早稲田大学のデータ。フェノバンスと国立環境研究所において暗期中および 24 時間の累積飲水回数に有意差が認められた。有意差検定：Holm-Sidak's multiple comparisons test。エラーバー：標準誤差

一方で、3 機関のうち、フェノバンスと国立環境研究所の 2 機関においては、中用量群で新奇環境条件下での飲水回数の有意な低下が検出できた (図 23)。フェノバンスと国立環境研究所でそれぞれ効果量 (Bias corrected Hedge's g) を検討した結果、暗期のみのデータに関してはフェノバンス 1.54 (vs 対照群) と国立環境研究所 0.75 (vs 対照群)、24 時間のデータに関してはフェノバンス 1.33 (vs 対照群) と国立環境研究所 1.30 (vs 対照群)、となり、特に 24 時間の g 値に関しては 2 機関間でともに高く、また類似した値が認められた。この飲水回数低下は環境に馴化した後では認められなかったことから、新奇環境における探索行動意欲の低下あるいは不安の亢進が、新奇環境条件下での飲水回数低下という形で顕在化

した可能性がある。【実験 3-2】を小括すると、高用量群における新奇環境におけるコーナー進入回数を指標とした探索回数低下自体は 5 mg/kg 体重未満の用量では検出できなかったものの、2.5 mg/kg 体重の中用量群においては 2 機関で新奇環境条件下での飲水回数低下が検出された。

【実験 3-3】性成熟前の雌マウス (対照群、低用量群、中用量群) を用いた胎仔期メチル水銀曝露影響評価の解析 (フェノバンス) : 【実験 3-1】の高用量群で有意差が認められた新奇環境における探索行動低下と行動柔軟性課題における固執的ノーズポークに関して、より低い用量で影響が認められるか明らかにするため、フェノバンスにおいて 4~6 週齢の雌マウスを用いて対照群、低用量群、中用量群の 3 群間での比較を行った。その結果、新奇環境でのコーナー進入回数やノーズポーク回数には違いが認められなかったが、実験 2 の中用量群で検出された新奇環境条件下での飲水回数低下を再確認することができた (図 24)。

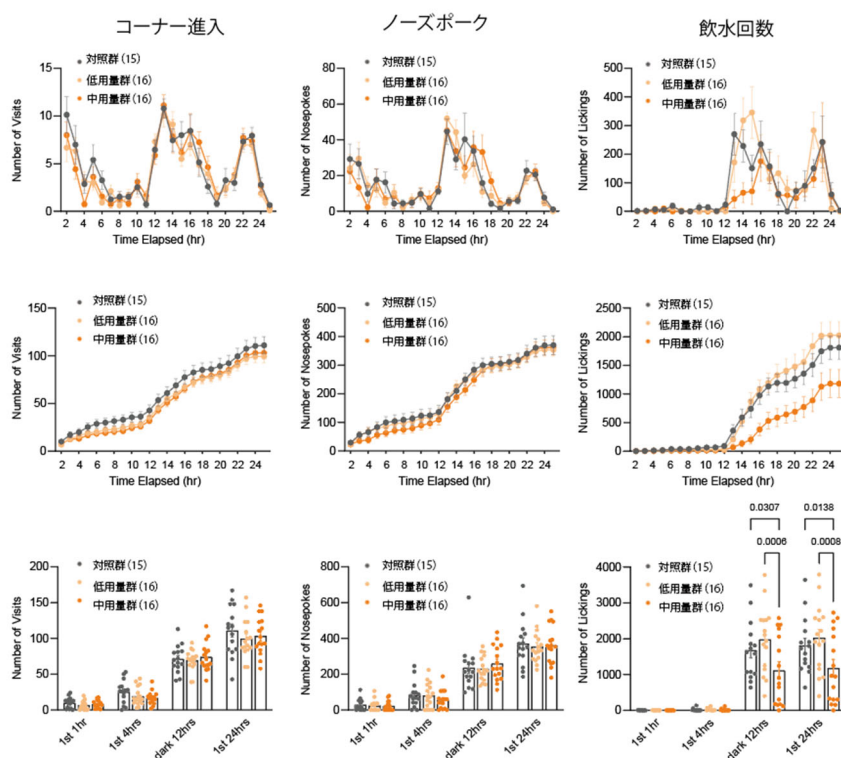


図 24. 性成熟前の雌マウス(対照群、低用量群、中用量群)を用いた新奇環境でのコーナー進入回数、ノーズポーク回数、飲水回数の解析 (1 日間)。上段：1 時間毎のデータ、中段：各指標の 24 時間の累積データ、下段：最初の 1 時間、4 時間、暗期中、24 時間のデータ。左からコーナー進入回数、ノーズポーク回数、飲水回数のデータ。暗期中および 24 時間の累積飲水回数に有意差が認められた。検定： Holm-Sidak's multiple comparisons test。エラーバー：標準誤差

また、行動柔軟性課題においては、行動柔軟性自体には影響は見られなかったものの、4週齢において特異的に低用量群、中用量群で正解コーナーにおける固執的ノーズポークの上昇傾向が認められ、特に低用量群で有意にノーズポークの上昇が検出された(図25)。この結果は、固執的ノーズポークに関しては、性成熟前に解析を行うと5 mg/kg 体重の1/10以下の用量でも異常が検出できる可能性を示唆するものである。

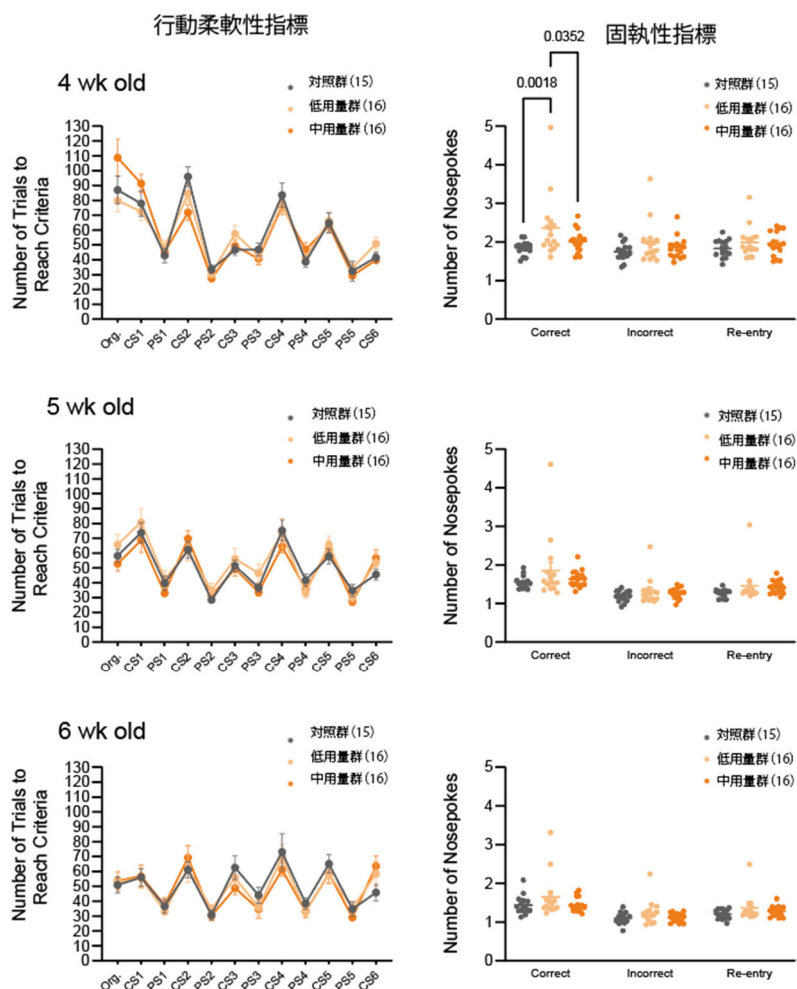


図 25. 性成熟前(4~6 週齢)の雌マウス(対照群、低用量群、中用量群)を用いた行動柔軟性課題における行動柔軟性指標(左)、固執性指標(右)。図中のCSは2つの正解コーナーが両者とも同時に変化することを意味し、PSは正解コーナーの1つのみが変化することを意味する。検定: Holm-Sidak's multiple comparisons test。エラーバー: 標準誤差

【実験 3-4】新生仔マウス脳を用いた胎仔期メチル水銀曝露による遺伝子発現変化の網羅解析:【実験 3-3】と同様に対照群、低用量群、中用量群の3群で、各4匹ずつの雌新生仔から全脳を摘出し、Total RNAを抽出してRNA-Seqを行い、発現遺伝子の網羅解析を行った。これまでに見つかった最も顕著な変化として、視床下部ホルモンであるメラニン凝集ホルモン(MCH)遺伝子(pro-melanin-concentrating hormone, Genbank ID: NM_029971.2)のRNA発現が対照群と比較して中用量群で有意に低下していることが明らかになった(図26)。

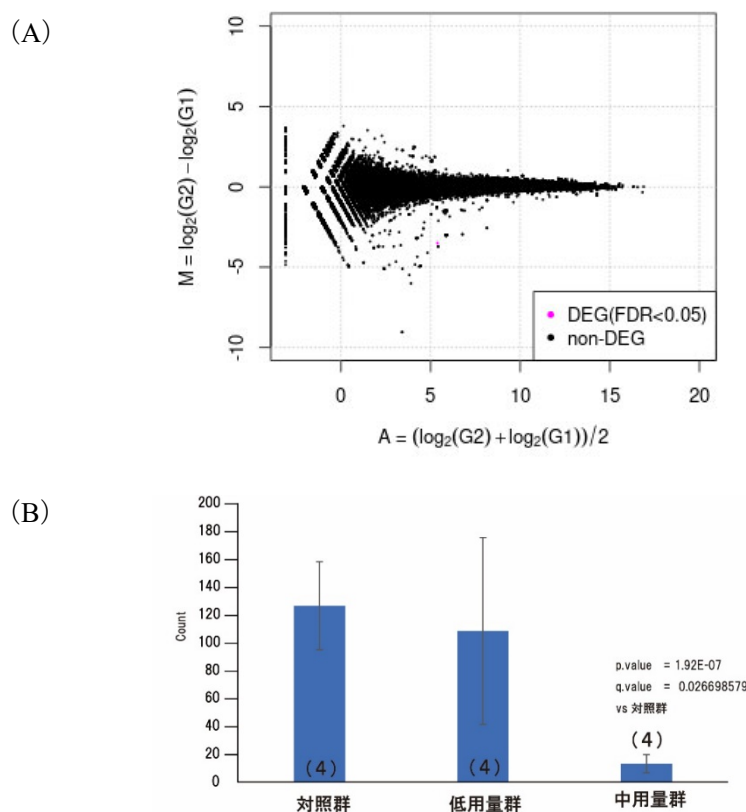


図 26. RNA-Seq による遺伝子発現網羅解析: (A) 対照群と中用量群の MA プロット。ピンクドットがメラニン凝集ホルモン遺伝子を意味する。(B) 中用量群におけるメラニン凝集ホルモン遺伝子の RNA カウントの統計的に有意な低下。エラーバー: 標準誤差。

IV 考察

1 年次の母体単回投与による出生仔の脳の解析から、投与量に比例して総水銀量は上昇し、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 μ 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(0.026~0.295 μ 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。母体単回投与による影響としては、高用量群で出生仔の体重変化、IntelliCage での行動影響が認められ、低用量群では影響が認められなかった。IntelliCage で影響が認められた基底活動量の変化に関しては、総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 を用いて行動解析した先行研究の結果と一致していた (Onischchenko et al., 2007)。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、詳細は今後検討していく必要がある。一方、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 年次から行った解析では、1 年次で高次脳機能に関わる有効なエンドポイントが見つけれなかったことや、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、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 2 回投与の低用量群 (0.5 mg/kg 体重) $0.40 \pm 0.02 \mu\text{g/g}$ の値は、単回投与した場合の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 ($4.73 \pm 0.30 \mu\text{g/g}$) の総水銀量の蓄積が認められた。2 年次に 1 年次の行動課題に追加して行った試験として、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。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、国立環境研究所で行った結果について新奇環境における活動量が低・高用量群において有意な活動量の減少が認められた。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。新奇環境における活動量に関しても、前述の先行研究 (Onischchenko et al., 2007) において報告されている。活動量の影響パターンを更に細分化して先行研究、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。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

った。また機関間の一致率の指標となる効果量 Hedge's g の値も双方で高かった。これらの結果は、行動柔軟性課題における固執性指標がメチル水銀の胎児期曝露影響を評価する上で優れたエンドポイントである可能性を示唆している。

3年次の検討では、【実験 3-1】において、2年次に性成熟後の雄マウスの高用量群で検出された、新奇環境における探索行動異常と行動柔軟性課題における固執性の増加という 2 つのエンドポイントが、性や週齢が異なった条件（性成熟前の雌マウス）でも活用できるエンドポイントであることが明らかにした。【実験 3-2】では、高用量群で検出された新奇環境における探索行動回数低下は、3機関の解析で 5 mg/kg 体重未満の用量では検出できなかったものの、2.5 mg/kg 体重の中用量群において、新奇環境条件下での飲水回数低下が 3機関のうち 2機関で検出された。2機関のデータに関しては効果量 Hedge's g を算出して比較したが、いずれも 1.3 以上と高く、かつ類似した値を示した。【実験 3-3】では、固執性指標である行動柔軟性試験中のノーズポークに関して、雌マウスで性成熟前に解析を行うと、0.5 mg/kg 体重で曝露した低用量群でも異常が検出できることが明らかになった。【実験 3-4】では、中用量群の脳において特異的に発現が低下した遺伝子としてメラニン凝集ホルモン MCH を見いだした。以上 3年次の結果を 1~2年次の結果と合わせて、表 1 にまとめて表示した。

表 1. 年次毎の行動解析のまとめ

		1年次	2年次	3年次
曝露方法		妊娠 7 日目単回	妊娠 7,14 日目 2 回	妊娠 7,14 日目 2 回
活動量	新奇環境	—	低・高用量群 (♂) ↓ (NIES)	中・高用量群 (♂・♀) ↓ (Phenovance・NIES)
	基底活動量	高用量群 (♂) ↓ (Phenovance)	—	—
フットプリント解析		—	検討せず	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 (♂) ↑ (Phenovance・NIES)	低・高用量群 (♀) ↑ (Phenovance)
競争環境課題		—	検討せず	検討せず
超音波発声		検討せず	—	検討せず
選択反応時間課題		検討せず	—	検討せず

赤字：有意差が検出された行動影響評価エンドポイント

—：検討をおこなったが対照群との有意差が見いだせなかった指標

活動量の指標に関しては、先行研究や 1~3 年次の今回の研究結果を総合して考えると、特に新奇環境中における探索行動回数や飲水回数は、高用量群 (5 mg/kg 体重) では雌雄を

問わず安定的に行動影響を捉えられることができる重要な影響評価指標だと考えられる。一方で、3年次に中用量群(2.5 mg/kg 体重)を3機関で検討したところ、フェノバンスと国立環境研究所では新奇環境中の飲水回数に有意な低下が認められたものの、早稲田大学では有意な低下は認められなかった。その理由としては、フェノバンスと国立環境研究所との間では1~2年次の実験を通じて飼育環境条件の統一化をすすめることができたのに対して、早稲田大学とはコロナ禍の影響で統一化が十分できなかったことが一因として挙げられる。今後フェノバンス・国立環境研究所と早稲田大学間の飼育環境の相違点を明らかにすることで、複数機関で共通した結果を出すための環境統御手法に関して更に深化・拡充させていきたいと考えている。

高次脳機能に関わる行動課題に関しては、2年次の研究において、低用量群の行動柔軟性課題中の固執性指標が国立環境研究所とフェノバンスの2機関で有意に上昇することが明らかになった。また、機関間の一致率の指標となる Hedge's g の値も双方で高かった。3年次は行動柔軟性課題に関しては性成熟前の雌マウスを用いた研究をフェノバンスのみで実施して2年次と同様に固執的なノーズポークが誘導されることを明らかにした。2・3年次の研究でいずれも固執性の上昇が認められたことから、固執性指標はメチル水銀の異常を安定して検出できる行動評価エンドポイントであると考えられる。3年次に行った性成熟前の雌マウスの解析では、高用量群および低用量群ともに4週齢で選択的に固執性上昇が認められた。行動柔軟性課題における対照群の結果を経時的に観察すると、週齢が進むにつれノーズポーク回数の低下が認められる。この現象はヒトで起こる幼児期の自己制御(自己抑制)の発達と関連している可能性がある。特に対照群で3~4週齢にかけてノーズポーク回数が急激に低下することから、マウスの自己抑制の発達がこの時期に起こっていると考えられ、中枢神経系の発達の遅れを観察するには最適な時期である可能性が考えられる。性成熟前の雌マウスの研究をフェノバンスのみで実施したのは、成体と比較して性成熟前のマウスは体躯が小さく、製品規格の IntelliCage をそのまま使用した場合 RFID タグの検出ができないため、フェノバンスが独自に開発したアタッチメントを実験に使用する必要があったからである。性成熟前のマウスでもメチル水銀曝露影響の評価が可能であることが明らかになったことから、今後はこのアタッチメントを他機関でも使用して、性成熟前の発達段階早期に行動評価が可能であることの実証実験を行いたいと考えている。

3年次の遺伝子発現網羅解析の結果からは、中用量群でメラニン凝集ホルモン MCH の遺伝子発現低下が明らかになった。MCH を産生するニューロンは視床下部外側野に細胞体が存在し、脳内に広範囲に線維を投射している。哺乳類では摂食調節因子の機能が広く知られているが、近年記憶等の高次機能や、飲水を含む本能行動のモチベーションの維持に強い影響力を持つことが報告されている (Clegg et al., 2003, Diniz et al., 2017, Izawa et al., 2019)。実験 2・3 で認められた中用量群における新奇環境条件下での飲水回数の低下と MCH の遺伝子発現変化の関連を探ることが今後の検討課題といえる。

最後に今回用いた曝露用量についてであるが、2年次に実施した総水銀量測定では、生後

1日齢の低用量群（0.5 mg/kg 体重）の脳内蓄積量は 0.40±0.02 µg/g であり、この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どもを対象とした脳内水銀量調査の結果（0.026～0.295 µg/g）の上限に相当する値である（Lapham et al., 1995）。今回の我々の研究では、固執性指標に関して低用量群での影響が何度も再現されており、脳内蓄積量 0.40 µg/g 程度の曝露でも一定の行動影響が起り得ると言える。今後は我々の研究で得られた値の妥当性に関して更に検討を加えていきたいと考えている。

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)曝露による仔の行動に関しては、複数機関でのIntelliCageを用いた解析から、①新奇環境における探索行動・飲水行動、と②行動柔軟性課題における固執性指標に共通して影響が現れることが明らかとなった。本研究で得られた最小毒性量としては、0.5 mg/kg母体体重（新生仔の脳内蓄積量0.40 µg/g）と見做すのが妥当であると考えている。

VI 今後の課題

- ① 複数機関で共通した結果を出すための環境統御
- ② 性成熟前の発達段階早期に行動評価が可能な体制の構築
- ③ MCHの遺伝子発現変化との関連を中心とした影響メカニズム解明
- ④ 脳内蓄積量 0.40 µg/g 程度の曝露でも行動影響が起り得ることの妥当性の4点を課題として更なる検討を実施していきたいと考えている。

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」 日本学会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・発生毒理学東京セミナー 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
4. Endo T., Maekawa F., Tohyama C 2021 Development of an automated cognitive behavioral testing method for juvenile mice in a group-housed environment and its application to developmental neurotoxicological study. EUROTOX 2021 Abstract #473, 2021/4/30, 10:41:35

5. 遠藤俊裕、ベナー聖子、前川文彦「マウスの生涯発達的な認知行動変化の理解と精神医学研究の新たなアプローチ」日仏生物学会第 194 回例会 2021/6/5 オンライン開催 **最優秀プレゼンテーション賞受賞**
6. 遠藤俊裕、前川文彦、遠山千春 「幼若期マウスの全自動認知行動毒性試験法の確立」 第 48 回日本毒性学会学術年会 2021/7/9 オンライン開催
7. 前川文彦、遠藤俊裕、掛山正心 「統一試験法を用いた複数機関での発達期化学物質曝露の行動影響解析」 日本動物学会 第 92 回 オンライン米子大会 2021/9/3

【論文発表】

1. 前川文彦・掛山正心 2022 「胎生期・発達期の環境要因と成人期・老年期の脳」日仏生物学会誌 (Bulletin de la Societe Franco-Japonaise de Biologie) Tome 61 (印刷中)

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) Clegg DJ, Air EL, Benoit SC, Sakai RS, Seeley RJ, Woods SC. Intraventricular melanin-concentrating hormone stimulates water intake independent of food intake. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003 Feb;284(2):R494-9. doi: 10.1152/ajpregu.00399.2002. PMID: 12557891.
- 4) Diniz GB, Bittencourt JC. The Melanin-Concentrating Hormone as an Integrative Peptide Driving Motivated Behaviors. *Front Syst Neurosci.* 2017;11:32. Published 2017 May 29. doi:10.3389/fnsys.2017.00032
- 5) 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.
- 6) Izawa S, Chowdhury S, Miyazaki T, et al. REM sleep-active MCH neurons are involved in forgetting hippocampus-dependent memories. *Science.* 2019;365(6459):1308-1313. doi:10.1126/science.aax9238
- 7) 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.
- 8) 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 LLC, 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 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 food standard values. Most behavioral experiments so far have been performed by different experimenters using their own test equipment 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 impulsivity 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.