

発達期メチル水銀曝露による行動学的影響の生涯にわたる経時的追跡

主任研究者 ベナー 聖子

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域 主任研究員

分担研究者 遠藤 俊裕

フェノバンス合同会社 代表社員

研究参加者 前川 文彦

国立研究開発法人国立環境研究所 環境リスク・健康領域 主幹研究員

研究要旨

メチル水銀の発達期の曝露影響については、これまでも疫学的・実験的な手法による研究が進められ、運動や認知機能に及ぼす影響が明らかになっている。しかし、どのような影響が、個体の生涯のいつからあらわれ、加齢にともなって増強ないし減弱していくかなど、生涯発達軸に沿った長期的な時系列的变化に関する知見は少ない。本研究では、マウスを動物モデルとして、ホームケージ環境下での長期全自動行動観察手法や高精度なキネマティクス解析手法を用い、若年～高齢期に至るまでの行動学的・運動学的毒性影響を長期間、経時追跡できる研究手法を複数確立する。これらの手法を運用し、発達期メチル水銀曝露マウスにおいて、若年～高齢期まで経時的な行動・神経生理情報を収集し、各ライフステージにおける毒性影響を評価する。また、各ライフステージにおいて採取した血液サンプルから、行動の特徴と関連するバイオマーカーを探索する。一連の研究を通して、メチル水銀の発達期曝露影響と加齢の関係についての基礎的知見を得るとともに、特にこれまでに知見の少ない高齢期における詳細な影響の有無を明らかにする。

キーワード： 発達期メチル水銀曝露、加齢影響、精神・神経症状、長期観察、全自動ホームケージモニタリング（AHCM）、キネマティクス運動学的解析

I 研究目的

胎児期曝露から高齢期に至るまでの全生涯を観察可能な新たな動物モデル研究手法を確立し、胎児期メチル水銀曝露の精神・神経症状への影響に関して検討を行い、特にこれまで疫学研究では正確な評価が困難であった高齢期影響に関する詳細情報を得る。

II 材料と方法

1. 動物

1 年次の研究において自然加齢の基礎データ収集のため、7 週齢～30 カ月齢の雄の

C57BL/6J 系統マウス（ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン）を用いた。2 年次以降の解析に用いる発達期メチル水銀曝露モデルマウス作製のため、雌の C57BL/6J 系統マウス（日本クレアより妊娠 6 日目に導入）に、塩化メチル水銀（II）（アルファ・エイサー）を 3 用量（0 mg/kg bw 13 匹、0.5 mg/kg bw 15 匹、5 mg/kg bw 25 匹、以下それぞれ Control 群、Low 群、High 群）で、妊娠 7 日目と 14 日目の 2 回にわたり経口投与した。投与は、国立環境研究所にて行った。出生直後、一部の産仔は屠殺し、脳を摘出して脳内総水銀（T-Hg）量を ICP-MS 法（7700x、アジレント、島津テクノリサーチ）により計測した。残りの産仔は生後 21 日目に離乳し、行動実験までの飼育は、国立環境研究所およびフェノバンス合同会社で行った。行動試験に用いるマウスは、イソフルラン吸入麻酔下において、マウスの皮下に RFID マイクロチップを埋め込んだ。

2. 非接触通信技術（RFID）を用いた全自動ホームケージ内自発行動解析

マウスの生活空間内に RFID アンテナを多数配置した独自の解析プラットフォームを構築し、集団飼育下における各マウスの位置情報や特定の場所へのアクセス情報（アクセスした個体、アクセス開始・終了時間）を取得した。連日にわたる個々のマウス個体の時系列的な位置情報から、活動量、活動リズム、場所等嗜好性、場所間の移動パターン、飲水頻度などの自発行動指標のほか、個体間距離や近接頻度といった社会的行動指標を算出した。データ解析プログラムは分担研究者（遠藤）が開発した。

並行して、全自動集団飼育型マウス行動試験装置 IntelliCage（TSE 社）^{1,2}を用い、活動量や場所嗜好性、場所間の移動パターンなどの自発行動がマウスの月齢によって異なる特徴があるかを検討した。IntelliCage は、ケージの 4 隅にオペラントチャンバー式の水飲み場が設置された装置で、チャンバーの出入り口にある RFID アンテナにより、チャンバーに出入りするマウスの個体識別を行い、探索行動および飲水行動の指標としてのチャンバーへのアクセス（アクセス開始・終了時間）を記録できるほか、液体を報酬とした認知試験が任意に設計できるものである。1 年次の実験では、認知課題は実施せず、ケージ内における自発行動の解析に用いた。

3. キネマティクス運動学的解析

キネマティクス解析装置 MotoRater（TSE 社）と TSE Motion 8.5.11 ソフトウェア（TSE 社）を用いてマウスの運動機能を評価した。装置はマウスが歩行できる軌道を透明なプレキシグラスで囲んだもので、標準仕様で実施できる 4 種類の運動モダリティ（通常歩行、水平はしご上歩行、水中歩行、水泳運動）をそれぞれ実行中の動物を装置付属の高速カラーカメラにより 3 方向（腹側、左側、右側）から同時に撮影した。これらの動作に関連するすべての身体部位（前足、足首、関節、尾、頭、股関節、腸骨稜など）の空間情報と時間情報（例えば、股関節と膝関節の最大角度と最小角度、腸骨稜の床からの高さ、前足や後足の伸展と収縮の距離・速度、尾の根本から後足の距離、一歩にかかる時間、尾の振幅速度

など) に基づいてパラメータを設定した。

4. 統計と作図

自然加齢モデルの行動表現型比較検討は、IntelliCage で取得したケージ内自発行動指標を用いて主成分分析と重判別分析を行った。MotoRater を用いて行った若齢マウスと高齢期マウスの 2 群比較は t 検定を用いた。発達期メチル水銀曝露の出産・産仔への影響は、3 群比較を母獣体重、産仔体重、産仔数、雌雄比率、産仔脳内総水銀量については一元配置分散分析および Sidak 多重比較、出生後の生存率については繰り返しのある二元配置分散分析および Sidak 多重比較で検定した。Sidak 多重比較で群間に有意差が検出されたものは、図中にアスタリスクで示した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$)。統計解析ならびに作図は GraphPad Prism9 を使用した。

(倫理面への配慮)

本研究は、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に申請を行い、承認後に実施した。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）、3R の原則を遵守した。

III 研究結果

1. ホームケージ環境下での長期・全自動解析手法の確立：

集団飼育下マウスの行動を長期的に、全自動で観察可能な飼育・実験環境を構築した。複数のバリエーションのプロトタイプを構築したが、その基本形として、合計 112 アンテナを用いた仕様を標準とした。4 つのケージを用い、各ケージ内に餌場、各ケージの短辺の壁には外付けの水飲み場を設けた。ケージ同士は長辺の壁に 2 本ずつアクリル製トンネルによって直列に繋げ、マウスは全てのケージを自由に行き来できるようにした。トンネルの出入り口および各ケージの水飲み場の出入り口にリング状アンテナを設置した。まず 8 匹の 8~10 週齢の C57BL/6J マウスを導入し、1 週間連続して各マウスの位置情報・アクセス情報を毎秒記録したパイロットデータを取得し、撮影動画の映像と比較して集団飼育下における個々のマウスの追跡が高精度で行えることを確認した。また、このパイロットデータを用いて、基底活動量の指標として（任意のタイムウィンドウにおける）総移動距離、活動リズムの指標として活動量の経時的変化、社会性の指標として個体間距離の平均ならびに近接頻度、その他の指標として水飲み場や餌場へのアクセス頻度、ケージ間の行き来の頻度、場所嗜好性（どのケージのどの場所に最も頻繁に滞在するか）をマウスごとに算出するプログラムを開発した（フェノバンス社）。次に、28 匹の C57BL/6J マウスを導入して 2 週間連続して全てのマウスの行動追跡を行い、28 個体でも上記指標が取得できることを確認した。

全自動マウス行動試験装置 IntelliCage を用いたケージ内自発行動解析では、8 週齢から 30

カ月齢までの C57BL/6J マウスを同じ IntelliCage 内で飼育し、4 隅のオペラントチャンバー型水飲み場へのアクセス情報（アクセス開始・終了時間、一日あたりのアクセス頻度、オペラントチャンバー内に設置されている給水瓶に口をつけた時間・回数、全 4 カ所の水飲み場を訪れた順番など）を取得した。これら指標をもとに主成分分析と重判別分析を行った結果、複数の加齢影響指標を同定した。

2. キネマティクス運動学的解析手法の確立：

機械学習を用いて、マウスの関節・頭・尾・足などの身体部位を MotoRater による撮影画像から自動で検出し、各種運動時における身体部位の動きの速度、動きに要した時間、身体部位同士もしくは床から特定の身体部位の距離、身体部位同士の角度の情報に基づき、通常歩行運動、水中歩行運動、梯子上歩行運動、水泳運動を合わせて 2 百以上の評価パラメータを確立した。7 週齢のマウスと 24 カ月齢のマウスのデータを比較し、水泳運動時におけるパラメータで加齢影響を高感度で検出できることをみいだした。具体的には、水泳運動時において後足で水中を漕ぐ動きは、若齢マウスでは規則正しいリズムで、かつ尾を軸とした場合に左右の後足の位置は対称的であるのに対し、高齢期のマウスでは、リズムが不均一で、左右の足の位置にも偏りがあるといった特徴があった。

3. 発達期メチル水銀曝露の出産・産仔への影響：

母獣の曝露時平均体重は、群間で差がなかった ($23.07 \pm 0.90\text{g}$ 、 $23.17 \pm 0.93\text{g}$ 、 $23.18 \pm 0.95\text{g}$) が、Control 群では 13 匹中 1 匹 (8%)、Low 群では 15 匹中 0 匹 (0%)、High 群では 25 匹中 9 匹 (36%) が出産に至らなかった。High 群母獣のうち 2 匹が出産中に死亡した。出産に至った個体については、High 群は Control 群および Low 群より産仔数が少なかった（産仔数平均 Control 群 6.33 ± 2.46 匹、Low 群 7.33 ± 1.50 匹、High 群 4.14 ± 1.35 匹; Sidak's multiple comparisons test $p < 0.05$ ）。産仔の雌雄の比率は群間で差はなかった（雄仔の割合 Control 群 $55 \pm 23\%$ 、Low 群 $51 \pm 16\%$ 、High 群 $54 \pm 31\%$ ）。出生時における High 群の脳内水銀量は他 2 群よりも高かった（Control 群はいずれも検出限界以下、Low 群平均 $0.37 \pm 0.05 \text{ mg/kg}$ 、High 群平均 $5.13 \pm 0.53 \text{ mg/kg T-Hg}$; Sidak 多重比較 $p < 0.0001$ ）。High 群の出生後 7 週目までの生存率は他 2 群よりも低かった（Control 群 $92 \pm 29\%$ 、Low 群 $93 \pm 26\%$ 、High 群 $49 \pm 34\%$ の個体が生存; Sidak 多重比較 6wks $p < 0.05$; 7wks $p < 0.01$ ）。離乳までに生存した産仔の離乳時における体重は群間で差はなかった（Control 群 7.9 ± 0.7 、Low 群 $8.1 \pm 1.3\text{g}$ 、High 群 $7.1 \pm 0.7\text{g}$ ）が、6 週目における High 群の体重は、他 2 群よりも軽かった（Control 群 $17.7 \pm 1.2\text{g}$ 、Low 群 $18.2 \pm 1.3\text{g}$ 、High 群 $16.2 \pm 1.2\text{g}$; Sidak 多重比較 6wks $p < 0.05$ ）。

IV 考察

発達期にうけた曝露影響が成長過程を経て高齢期にかけてより顕在化する可能性が指摘

されている³⁻⁵。水俣病において胎児性患者世代は高齢期を迎えているが、メチル水銀の影響を高齢期まで継続的に追跡し、脳機能との関連を詳細に検討した疫学研究は少ない。一方、動物モデルにおいても、精神・神経症状を長期に渉って観察するための行動解析ツールは不十分であり、従来の研究では予算・時間的制約からも若年個体を用いることが多く、中年期以降の精神神経疾患の発症頻度・機序については情報が少ない^{2,4,5}。この問題を解決するため、本研究ではマウスの行動・神経生理機能を長期的かつ多面的に解析するための新規毒性研究手法を確立した。

第一に、RFID をベースとした全自動解析手法については、集団飼育環境下のホームケージ内における個々のマウスの行動を全自動で取得し、データ・ドリブンな表現型解析を実現するもので、これまでの行動毒性評価で標準とされてきた従来型の試験法とは、下記の点において大きく異なる。従来型の試験法では、普段の飼育環境とは異なる特殊な実験環境に実験者の手で対象動物を移動させ、予め設定された限られた評価項目についてのみ、特定の時点（通常は若年期）で単発的に（通常は1回）短時間（数分～数十分）、一匹ずつ評価を行う。その問題点として、一回あたりの実験から得られる情報量が少ないこと、実験者の介入や環境変化が動物にストレスを与えるため結果の再現性が損われること⁶⁻⁸が指摘されており、したがって、ホームケージ内で飼育をしながら、無人（すなわち自動）で長期にわたり行動データを取得する方法の有用性が近年注目されている⁹⁻¹¹。長時間の連続的なデータ取得は、ヒト研究との対応性を高め^{12,13}、生涯のどの時点において毒性影響が出現するかを同定するために必要な実験条件である。また、日常的な生活のなかで表出する自発行動を繰り返し測定することによって、一回の実験では検出が難しい、再現性の高い現象を発見できることが期待される。さらに、本研究で確立した手法は、集団飼育下マウスの解析に適したものである点においても特徴的である。げっ歯類の定型的な脳発達や行動の表出のために「エンリッチメント」の必要性が認識されているが¹⁴、生態学的・動物福祉的観点から、社会的なエンリッチメントは特に重要である。すなわち、マウスのような社会的動物は、本来社会的な環境（集団）で飼育・実験するべきであり（EU 指令 2020/63）、ヒトのモデルとしての妥当性を満たすという意味でも集団飼育は適切な条件である。

第二に、MotoRater 装置を用いたキネマティクス解析手法では、運動時の身体の動きを 229 ものパラメータに基づき詳細に定量評価することに成功した。これにより、加齢の影響を反映する運動能力変化の客観的な表現型評価が可能となった。ヒトの運動学的歩行分析は、被験者の関節に取り付けた光反射型マーカーの位置を記録する多数のデジタルモーションキャプチャカメラによって行われるため、MotoRater で実施できる微細な運動学的歩行分析は、マウスとヒト間で対応性の高い解析手法である。

これらの手法により取得した自然加齢の基礎データにより、C57BL/6J 系統マウスにおいては、加齢影響の表現型を見出すことが出来た。したがって、本研究成果により、集団飼育下マウスにおける自発行動パターンや社会的関係性、微細な運動能力の測定、およびこ

れら表現型の経時的変化を追跡することが可能となったため、従来型の解析手法では検出することが難しかった発達期メチル水銀曝露影響と加齢影響の相互作用を評価できる可能性がある。

V 結論

1 年次は、発達期メチル水銀曝露と高齢期特有に生じる精神・神経症状との関連性をマウスで検討するための解析手法を確立した。具体的には、RFID 技術をベースとした新規システムを開発し、ケージ内自発行動情報を全自動で長期記録できる手法を確立した。また、MotoRater を用いた微細運動学的歩行分析手法を確立した。今後これらの手法を使用して発達期メチル水銀曝露影響と加齢影響の相互作用の検出を試みる予定である。発達期メチル水銀曝露モデルマウスも作出済みであり、2 年次以降の研究体制も整っている。

VI 次年度以降の計画

今後は、本年度に確立した手法を組み合わせる運用し、発達期メチル水銀曝露モデルマウスにおいて、若年期～高齢期に渉る行動・神経生理機能を記録する。長期観察による日常生活行動記録の他、老化と関連のある精神神経疾患の検出に対応可能な認知行動課題を実施する。一連のデータから、仮説に依存しない未知の表現型探索を効率的に行うための解析フローを確立し、メチル水銀曝露による行動特徴を抽出する。さらに、その毒性影響に関連する中間表現型の探索を行うため、各ライフステージにおいて血液サンプルを採取し、血中分子のマルチプレックス解析を行い、毒性バイオマーカーを探索する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1. 前川文彦、遠藤俊裕、掛山正心 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 環境省令和 3 年度水俣病に関する総合的研究（重金属等による健康影響に関する総合的研究）263p. 分担箇所 159-188 p 株式会社オーエムシー, 2022
2. Balan S, Iwayama Y, Ohnishi T, Fukuda M, Shirai A, Yamada A, Weirich S, Schuhmacher MK, Dileep KV, Endo T, Hisano Y, Kotoshiba K, Toyota T, Otowa T, Kuwabara H, Tochigi M, Watanabe A, Ohba H, Maekawa M, Toyoshima M, Sasaki T, Nakamura K, Tsujii M, Matsuzaki H, Zhang KYJ, Jeltsch A, Shinkai Y, Yoshikawa T: A loss-of-function variant in SUV39H2 identified in autism-spectrum disorder causes altered H3K9 trimethylation and dysregulation of protocadherin β -cluster genes in the developing brain. *Mol Psychiatry* 26(12):7550-7559, 2021.
3. Benner S, Aoki Y, Watanabe T, Endo N, Abe O, Kuroda M, Kuwabara H, Kawakubo Y, Takao H, Kunitatsu A, Kasai K, Bito H, Takeyama M, Yamasue H: Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Mol Psychiatry* 26(2):710-720, 2021.
4. ベナー聖子、掛山正心：社会的隔離の動物モデル 精神科（診療内科）39(1): 11-16, 2021
5. Kimura E, Suzuki G, Uramaru N, Endo T, Maekawa F: Behavioral impairments in infant and

adult mouse offspring exposed to 2,3,7,8-tetrabromodibenzofuran in utero and via lactation. *Environment International* 142:105833, 2020

6. Oizumi H, Miyazaki S, Tabuchi M, Endo T, Omiya Y, Mizoguchi K: Kamikihito Enhances Cognitive Functions and Reward-Related Behaviors of Aged C57BL/6J Mice in an Automated Behavioral Assay System. *Front Pharmacol.* 17;11:1037, 2020
7. Benner S, Yamasue H: Clinical potential of oxytocin in autism spectrum disorder: current issues and future perspectives. *Behav Pharmacol* 29: 1-12, 2018
8. 掛山正心、ベナー聖子、藤原昌也：マウスにおける自閉スペクトラム発現の行動指標 日本生物学的精神医学会誌 29(3) 113:103-108, 2018
9. Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K: Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight* 2(10):e88609, 2017
10. Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W, Benner S, Hosokawa M, Yokoyama K, Kakeyama M, Tohyama C: Prenatal exposure to bisphenol A impacts neuronal morphology in the hippocampal CA1 region in developing and aged mice. *Arch Toxicol* 90(3):691-700, 2016
11. ベナー聖子、山末英典：オキシトシン受容体——その社会性の障害と関連 医のあゆみ 256(5):599-602, 2016.
12. Benner S, Endo T, Kakeyama M, Tohyama C: Environmental insults in early life and submissiveness later in life in mouse models. *Front Neurosci* 9:91, 2015
13. Ishii K, Kubo K, Endo T, Yoshida K, Benner S, Ito Y, Aizawa H, Aramaki M, Yamanaka A, Tanaka K, Takata N, Tanaka KF, Mimura M, Tohyama C, Kakeyama M, Nakajima K: Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead to Behavioral Deficits. *J Neurosci* 35 (36) 12432-12445, 2015
14. Benner S, Endo T, Endo N, Kakeyama M, Tohyama C: Early deprivation induces competitive subordination in C57BL/6 male mice. *Physiol Behav* 137:42-52, 2014
15. Endo T, Kakeyama M, Uemura Y, Haijima A, Okuno H, Bito H, Tohyama C: Executive function deficits and social-behavioral abnormality in mice exposed to a low dose of dioxin in utero and via lactation. *PLoS One* 7(12):e50741, 2012
16. Endo T, Maekawa F, Vöikar V, Haijima A, Uemura Y, Zhang Y, Miyazaki W, Suyama S, Shimazaki K, Wolfer DP, Yada T, Tohyama C, Lipp HP, Kakeyama M: Automated test of behavioral flexibility in mice using a behavioral sequencing task in IntelliCage. *Behav Brain Res* 1;221(1):172-81, 2011

引用文献

1. Kiryk A, Janusz A, Zglinicki B, Turkes E, Knapska E, Konopka W, Lipp HP, Kaczmarek L. IntelliCage as a tool for measuring mouse behavior - 20 years perspective. *Behav Brain Res* 18;388:112620. 2020
2. 前川文彦、遠藤俊裕、掛山正心 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 環境省令和 3 年度水俣病に関する総合的研究（重金属等による健康影響に関する総合的研究）263p. 分担箇所 159-188 p 株式会社オーエムシー. 2022
3. Kinjo Y, Higashi H, Nakano A, Sakamoto M, Sakai R. Profile of subjective complains and

activities of daily living among current patients with Minamata disease after 3 decades. *Environ Res* 63, 241-251. 1993

4. Harada M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Cri. Rev. Toxicol* 25, 1-24. 1995
5. Rice DC. Age-Related Increase in Auditory Impairment in Monkeys Exposed in Utero plus Postnatally to Methylmercury. *Toxicol Sci* 44, 2:191–196. 1998
6. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci* 5(11):1101-2. 2002.
7. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods* 7:825–826. 2010
8. Neely C, Lane C, Torres J, Flinn J. The Effect of Gentle Handling on Depressive-Like Behavior in Adult Male Mice: Considerations for Human and Rodent Interactions in the Laboratory. *Behav Neurology* 2018:2976014. 2018
9. Voikar V, Gaburro S. Three Pillars of Automated Home-Cage Phenotyping of Mice: Novel Findings, Refinement, and Reproducibility Based on Literature and Experience. *Front Behav Neurosci* 2020:575434. 2020
10. Mingrone A, Kaffman A, Kaffman A. The Promise of Automated Home-Cage Monitoring in Improving Translational Utility of Psychiatric Research in Rodents. *Front Neurosci* 2020:618593. 2020
11. Grieco F, Bernstein BJ, Biemans B, Bikovski L, Burnett CJ, Cushman JD, van Dam EA, Fry SA, Richmand-Hacham B, Homberg JR, Kas MJH, Kessels HW, Koopmans B, Krashes MJ, Krishnan V, Logan S, Loos M, McCann KE, Parduzi Q, Pick CG, Prevot TD, Riedel G, Robinson L, Sadighi M, Smit AB, Sonntag W, Roelofs RF, Tegelenbosch RAJ, Noldus LPJJ. Measuring Behavior in the Home Cage: Study Design, Applications, Challenges, and Perspectives. *Front. Behav Neurosci* 2021:735387. 2021
12. Richardson A, Fischer KE, Speakman JR, de Cabo R, Mitchell SJ, Peterson CA, Rabinovitch P, Chiao YA, Taffet G, Miller RA, Rentería RC, Bower J, Ingram DK, Ladiges WC, Ikeno Y, Sierra F, Austad SN. Measures of Healthspan as Indices of Aging in Mice-A Recommendation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71(4):427-30 2016
13. Kaffman, A., White, J. D., Wei, L., Johnson, F. K., Krystal, J. H. et al., Enhancing the Utility of Preclinical Research in Neuropsychiatry Drug Development. *Methods Mol Biol.* 2019;2011:3-22. 2019
14. Cait, J., Cait, A., Scott, R. W., Winder, C. B., and Mason, G. J. Conventional laboratory housing increases morbidity and mortality in research rodents: results of a meta-analysis. *BMC Biology* 20: 15. 2022

英文要約 (Abstract)

Lifetime Longitudinal Tracking of Behavioral Effects of Developmental Methylmercury Exposure

Seico Benner (Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies)

Toshihiro Endo (Phenovance LLC)

Fumihiko Maekawa (Health and Environmental Risk Division, National Institute for Environmental Studies)

Epidemiological and animal studies have previously revealed the effects of developmental exposure to methylmercury on motor and cognitive functions. However, little is known about long-term chronological changes; when effects begin to appear during an individual's life span, and whether the symptoms are enhanced or attenuated as the individual ages. In epidemiological studies, it had been difficult to follow the effects of methylmercury until old age and to examine the relationship with brain function in detail. In animal model studies, young animals are commonly used due to budget and time constraints, thus it had been difficult to obtain information on the psychiatric and neurological phenotypes after middle age. Moreover, conventional behavioral analysis tools for animals are insufficient for long-term behavioral observation, and the low reproducibility due to the stresses associated with the intervention of the experimenter and the transfer to the experimental apparatus have been recognized.

Here, we aimed to establish novel methods for analyzing mice behavior that can characterize the psychiatric and neurological effects of developmental methylmercury exposure throughout the lifespan, from young to old age and obtain detailed information on the effects on aging. This year, we developed a system based on RFID technology that enables a fully automated, long-term recording of spontaneous behavior of group-housed mice in home-cages. We also established a micro-kinematic gait analysis method with more than 100 kinematic gait parameters using MotoRater. We obtained a basic information on natural aging using these methods and confirmed a several aging-dependent phenotypes useful for the later studies.

In the future, we will apply the methods established this year to characterize psychiatric and neurological functions that span from youth to old age in a mouse model of developmental methylmercury exposure. In addition to recording daily activities through long-term observation, we will conduct cognitive-behavioral tasks that can be used to evaluate neuropsychiatric alterations associated with aging. Blood samples will be collected at each life stage for searching biomarkers associated with behavioral phenotypes. Together, this study will provide basic knowledge of the effects of developmental exposure to methylmercury and aging.