

# 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、生涯のいつから出現し、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変化に関する知見は少ない。動物実験による発達期メチル水銀曝露による脳機能への影響評価は、これまでその生涯におけるごく限られたタイムポイントでのみ行われており、加齢／ライフステージ依存的な毒性発現が見逃されていることが懸念される。

本研究では、生涯にわたる毒性影響を観察可能な、多角的・効率的な動物モデル研究手法を確立し、発達期メチル水銀曝露の脳機能への影響に関して、特に中年期から高齢期にかけての毒性影響の有無や特徴、および毒性発現の加齢依存性に関する知見とそのメカニズム解明に迫る。具体的には、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(運動学的)解析手法を用い、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を用いた毒性影響評価を行う。さらに、採取した血漿サンプルから、行動の特徴と関連する毒性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毒性影響の有無や特徴を明らかにする。

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

胎仔期曝露から高齢期に至るまでの生涯にわたる毒性影響を観察可能な新たな動物モデル研究手法を確立し、発達期メチル水銀曝露の精神・神経症状への影響に関して、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での毒性影響の有無や特徴に関する知見を得る。一年次において、方法論の確立と自然加齢モデルを用いた基礎データ収集を開始し、2年次では、ひきつづき方法論の確立を行うとともに、中年期にあたる9カ月齢から14カ月齢<sup>1,2</sup>の発達期メチル水銀モデルマウスを用い、基底活動、認知機能、および運動機能の評価を実施した。

## II 材料と方法

### 1. 動物

発達期メチル水銀曝露モデルマウスは、下記の手順で作製した。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)(アルファー・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、腹あたり6匹以下になるよう間引きをした。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。行動試験実施前に、国立環境研究所で飼育していた雄マウスをフェノバンス合同会社に輸送し、同時に行動実験を行った。両施設からのマウスは、各投与群それぞれ2つのバッチに配分した。バッチ1はControl群 n=11、Low群 n=12、High群 n=11匹で構成され、9~13カ月齢にわたり、全自動マウス行動試験装置IntelliCageを用いた基底活動・認知機能評価のために用いた。バッチ2は、Control群 n=10、Low群 n=10で構成され、12~13カ月齢にわたり、運動機能評価のために用いた。各バッチとも、各施設で飼育されたマウスが均等に割り当てられ、またControl群とLow群は各腹1匹ずつになるよう構成した。High群については出生率や出生後生存率が低かったため、各群2匹までで構成した(図1)。

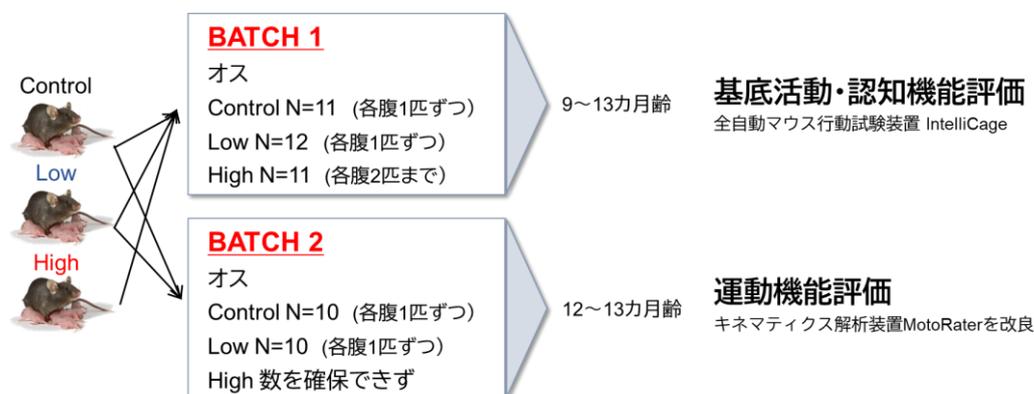


図1 実験デザイン

自然加齢の基礎データ収集のための個体は、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 (各群 n=10~14)。行動試験に用いたマウスはすべて、イソフルラン吸入麻酔下において、皮下に非接触個体識別 (RFID) マイクロチップを埋め込んだ。RFID マイクロチップは動物個体識別用途において一般的な ISO-15693 に準拠したものをを用いた。すべての実験は、12 時間明暗周期 (8:00/20:00) の条件下で行われ、自由摂餌、および水を報酬とした認知課題においても給水制限は行わず、課題に正解すれば自由に飲水できる条件にて実施した。

## 2. 脳内総水銀 (T-Hg) 量の計測

胎仔期において母体経由で曝露されたメチル水銀の仔の脳への移行量を調べるため、出生直後に間引きをした個体 (各群 n=4) より全脳を摘出し、マイクロウェーブ試料分解装置 ETHOS-UP (マイルストーンゼネラル) および ICP 質量分析装置 (7700x、アジレント・テクノロジー) を用いたマイクロウェーブ酸分解—ICP 質量分析法 (ICP-MS 法、島津テクニカ) により脳内総水銀 (T-Hg) 量を計測した。

## 3. 非接触通信技術 (RFID) を用いた全自動ホームケージ内行動解析

### 3-1 IntelliCage 装置を用いた実験

IntelliCage 装置を用いて自発活動・認知機能解析を行った。1 年次は自然加齢モデルマウスを用い、基礎データを収集した。2 年次は、中年期の発達期メチル水銀曝露モデルマウスの解析を行うため IntelliCage 装置 2 台を用いて、各ケージとも 3 群を同居させた状態で実験を実施した (ケージ1では Control 群 5 匹、Low 群 6 匹、High 群 6 匹、ケージ2では Control 群 6 匹、Low 群 6 匹、High 群 5 匹)。本研究の研究分担・参加者ら (遠藤・前川) による先行研究において、同システムを用いた幼若期および若齢期の発達期メチル水銀曝露モデルマウスの解析を実施済みである<sup>3</sup>。

装置: ケージ内における自発行動および認知機能の評価のため、全自動集団飼育型マウス行動試験装置 IntelliCage (TSE 社、ドイツ)<sup>4,5</sup> を用いた。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 (図2A) で、チャンバーの出入り口にある RFID アンテナが出入りするマウスの個体識別を行い (図2B)、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) を全自動で記録できるほか、液体を報酬としたオペラント課題も全自動で実施できるものである。具体的には、チャンバー内の左右の壁にはそれぞれ給水瓶のノズルにつながるドアが設置されており (図2C)、その開閉ルールを実験者が自在に設計できる。ドアについた赤外線センサによりマウスがドアを鼻をつつく動作 (Nosepoke) (図2D) が検知されるため、たとえば Nosepoke が適切に行われた場合にのみドアが特定の時間だけ開き、報酬として液体を飲むことができる、といった課題が成立する (図2E)。また、各ドアの上部には

LED ライトが3つ設置されており(図2C, D)、その点灯および配色(青、黄、赤、緑の4色)ルールも実験者が自由に設計できる。計4つのチャンバー、ドア開閉、LED ライト点灯の条件を組み合わせ、多様な認知課題を設計することが可能である。

指標: 各個体につき、各チャンバーの出入り(visit)、チャンバー内の各ドアでの Nosepoke、および給水瓶ノズルを舐める行為(Lick)を行った日時がミリ秒単位で記録される。これに基づき、どの個体が、いつ、どのチャンバーに入り、どちらのドアで、何度・何秒 Nosepoke を行い、何度・何秒ノズルを舐め、いつチャンバーを出て行ったかを連日記録し続けられる。これを用いて、本研究では、(1)特定の認知課題を行っていない期間のチャンバーアクセスデータから、基底活動量、活動リズム、行動の単調性、場所嗜好性の指標を抽出した。また、(2)水を報酬とした認知課題を実行し、空間ルール学習、行動柔軟性、固執性、注意・行動抑制の指標を抽出した。

実験プロトコル: 自発行動解析ならびに認知機能評価のためのプロトコル設計は、すべて先行研究にて発表したとおり行った<sup>4,6,7</sup>。概要は下記のとおりである。まず、集団飼育環境(ケージメイト、および4隅にチャンバーの無い大型ケージ)に馴化したマウスを、チャンバー付きの IntelliCage に導入し、その際に新規な場所となるチャンバーへのアクセス頻度を探索行動の指標とし、導入直後から72時間にわたる経時変化を追った。以後、IntelliCage 環境に馴化してから2週間にわたり、何も課題を設定しない状態で、各個体が日常的にどの程度チャンバーを出入りするか(基底活動量)、一日の間でチャンバーに出入りするタイミング(活動リズム)、チャンバー間の移動パターンに単調性はあるか(決まった順番でチャンバーを訪れているか、ランダムか)、特定のチャンバーもしくは左右のドアに嗜好性があるかを評価した。空間ルール学習の課題では、計4箇所のチャンバーのうち、2カ所を不正解チャンバーとして設定した(マウスにより、不正解チャンバーのペアは異なった)。不正解チャンバーでは、中に入っていずれのドアにいくら Nosepoke をしても、決してドアが開くことはなく、マウスは報酬である水を飲むことはできない。残り2カ所の正解チャンバーのペアについては、まず、片方に入っていずれかのドアに Nosepoke をするとドアが200ミリ秒だけ開き、水を飲むことができるが、その後は同チャンバーで続けていずれのドアに Nosepoke をしても報酬を繰り返す得ることができない。そのため、また水を獲得するためには、もう片方の正解チャンバーに行って、Nosepoke をする必要がある。すなわち、マウスが効率よく水を飲み続けるためには、正解チャンバー2カ所の場所を学習し、それを行き来するという行動系列を獲得しなければならない。マウスが正解もしくは不正解のチャンバーに入り、Nosepoke をして、チャンバーから出てくるまでを1トライアルと定義した。効率的に正解チャンバーのペアに行き来できるようになるまでに要したトライアル数を学習の指標とした。この学習が十分に成立し次第、正解チャンバーのペアと不正解チャンバーのペアを入れ替える逆転課題を行った。この新しいルールに順応するまでに要したトライアル数を指標に行動柔軟性を評価した。上記空間ルール学習・逆転課題の際、正解チャンバーで報酬獲得後は、同じチャンバー内でいくら Nosepoke をしても続けて報酬を得ることはできないため、「報酬獲得後に同チャンバーで Nosepoke をした回数」を固執性の指標として抽出した。注意・行動抑制を評価する課題は、LED ライトをキューとして用い、Nosepoke を抑制し

なければならない時間(待ち時間)に Nosepoke をしてしまった割合を尚早反応率として、また、待ち時間が終了し、Nosepokeをしなければならない時間にどのくらい早くNosepokeしたかを平均正反応潜時として指標化した。光刺激に対する反応性を評価する課題では、マウス活動期である暗期の中に、チャンバー内のLEDライトをすべて点灯する時間を1時間×2回設け、その間のチャンバーアクセス頻度に基づき評価した。

ソフトウェア：データ取得のための基本設定および課題設計には IntelliCage Designer ソフト (TSE 社)、データ取得および課題実施には IntelliCage Controllerソフト(TSE 社)、データ解析には IntelliCage Analyzer(TSE 社)および Excel を用いた<sup>3,4</sup>。

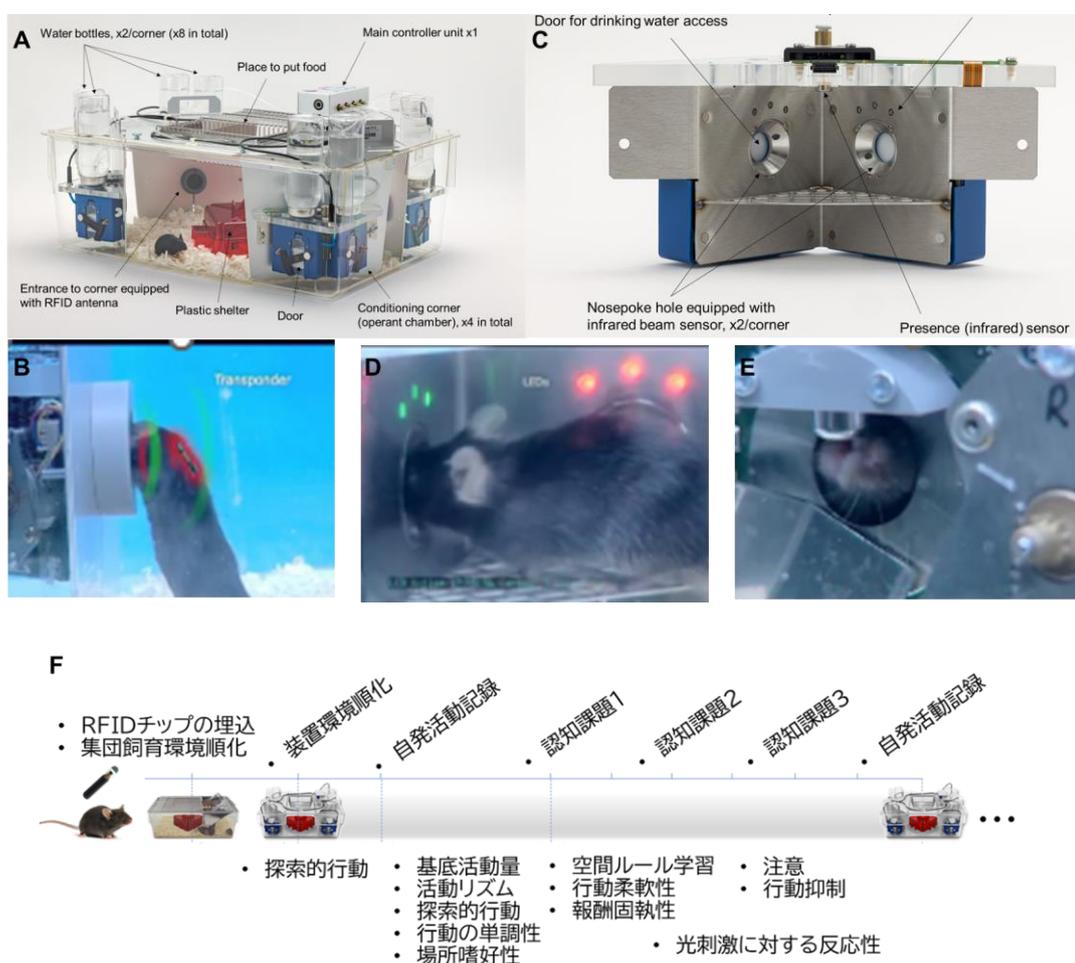


図2 IntelliCage の構造および課題内容と実験スケジュール (A,C の写真はフェノバンス合同会社、B, D, E は TSE systems 社ウェブサイトより)

### 3-2 独自開発システムを用いた実験

ケージ内における自発行動および社会性行動評価のため、マウスの生活空間内に RFID アンテナを多数配置し、集団飼育下マウスの位置情報を経時的に追跡するシステムを開発した。本シス

テムは複数個体の同時検出ができるため、集団飼育下動物に適用可能な仕様となっている。まず、ケージ内のマウスの位置情報を 2 次元的に追跡するものとして、碁盤目状に 50mm×50mm サイズの RFID アンテナを敷き詰めたボード型のものを用いた。これをホームケージの下に敷くことで、ケージ内のマウスの位置情報を個別に検出できる(仮称 GRID-ID System)。さらに空間拡張性をもたせたシステムでは、リング状のアンテナをベースとし、これを実験動物の生活空間内に自在に多数配置することで、設置場所への動物のアクセスを検出できる(仮称 FLEX-ID System)。本研究では、これらハードウェアを組み込んだ新たな実験プラットフォームを構築し、連日にわたる個々のマウス個体の時系列的な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)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、改良版の開発を進めている。

#### 4. 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)をベースとして用い、これを改良した。ベース装置は長さ 150cm, 高さ 40cm, 幅 13cm の軌道を透明なプレキシガラスで囲んだもので、両壁には鏡が設置されている。この中を移動するマウスの動きを、本体床下に設置されている高速度カラーカメラにより 3 方向(腹側、左側、右側)から同時に撮影する仕様である。ランウェイの床をはしごに変更したり、ランウェイに水を張るなどのバリエーションにより 4 種類以上の運動パターンを取得できる(標準仕様では、通常歩行、水平はしご上歩行、水中歩行、水泳運動に対応)。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。この装置をもとに、本研究において開発を行った新規装置の構造および解析手法については、III 研究結果に詳細を記載した。データ解析には TSE Motion 8.5.11 ソフトウェア(TSE 社)および Excel を用いた。

#### 5. 統計と作図

作図および統計解析は Excel および GraphPad Prism10 を用いた。発達期メチル水銀曝露の出産・産仔への影響評価では、Control 群、Low 群、High 群の 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。IntelliCage を用いた自発行動および認知機能の評価は一元配置分散分析および Sidak 多重比較、および Holm-Sidak 多重比較検定を用いた。運動機能解析(自然加齢モデルを用いた基礎データについては、若齢マウスと高齢期マウスの 2 群比較、発達期メチル水銀曝露マウスは Control 群と

Low 群の 2 群比較)は Hege's  $g$  の効果量判定、および Multiple Mann-Whitney 検定を用いた。検定の結果、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 (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ )。その他詳細については結果の図の legend に記載した。

## 6. 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 の原則を遵守して行われた。

## III 研究結果

### 1. 技術開発と自然加齢モデルを用いた基礎データ収集

#### 1-1. ホームケージ環境下での長期・全自動解析手法の確立

IntelliCage を用いた基礎データ収集では、8 週齢、12 週齢、24 カ月齢、30 カ月齢のマウスを用い、得られたデータをもとに主成分分析と重判別分析を行い、加齢影響指標を同定した。独自開発システムを用いた基礎データ収集では、GRID-ID、FLEX-ID を組み合わせ、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・実験プラットフォームのプロトタイプを構築した。基礎データ収集では、基本形として計 112 アンテナを用いて、4 台のケージがトンネルによる直列に繋がった飼育環境を構築した。8 匹の 8~10 週齢の雄の C57BL/6J マウスを用い、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成功したことを確認した。このデータを用い、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变化、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した。

#### 1-2. キネマティクス(運動学的)解析手法の確立、およびシステム改良

本研究課題では、1 年次において、機械学習を用いたマウスの関節・頭・尾・足などの身体部位を MotoRater による撮影画像からの自動検出を行い、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、通常歩行運動と水中歩行運動ではそれぞれ百を超える指標、梯子上歩行運動、水泳運動でもそれぞれ 5 以上の指標を確立した。これを用い、7 週齢のマウスと 24 カ月齢のマウスのデータから加齢影響を高感度に検出できる指標を探索した。

しかし、従来の装置では、実験者が手動でマウスを一匹ずつランウェイに導入して歩行させる必

要があった。このため、実験の効率性が低いばかりでなく、実験者による接触や環境変化が動物にストレス・恐怖反応を引き起こすことが問題となっていた。特に高齢マウスにおいては、不規則な運動、無動化等が生じやすく、解析に適した正常な歩行画像を収集するのが困難であった。そこで、2年次では、この解析手法を改良し、老齢動物にも適用可能なキネマティクス解析手法の確立と基礎データ収集に成功した。ホームケージ連結型のキネマティクス解析装置を開発し、実験者の介在なしにマウスの自由な歩行運動を撮影できるようにした。ホームケージでは集団飼育を行っているため、マウスの個体識別、および各個体の識別 ID に紐づけた歩行運動の撮影と動画の分類をすべて自動化した。以上より、従来型の手法ではデータ収集が困難であった老齢マウスにおいても短時間で大量の歩行運動画像を収集することに成功した。これを用いて C57BL/6J の雄の若齢マウスと老齢マウスの歩行運動の比較を行い、効果量の絶対値が 1 を超える顕著な老齢影響指標を見いだすことに成功した。

## 2. 発達期メチル水銀曝露の出産への影響、出生時脳内水銀量、産仔の生存率

母獣の曝露時平均体重は、群間で差がないよう群編成した ( $23.07 \pm 0.90\text{g}$ 、 $23.17 \pm 0.93\text{g}$ 、 $23.18 \pm 0.95\text{g}$ ) 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  $6.33 \pm 2.46$  匹、Low 群  $7.33 \pm 1.50$  匹、High 群  $4.14 \pm 1.35$  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  $54 \pm 31\%$ ) (表1)。

表1

	0 mg/kg 投与群	0.5 mg/kg 投与	5.0 mg/kg 投与
不妊・流産率	1 / 13 8%	0 / 15 0%	9 / 25 36%
出産中母獣死亡	0 / 13 0%	0 / 15 0%	2 / 25 8%
産仔数	$6.33 \pm 2.46$	$7.33 \pm 1.50$	$4.14 \pm 1.35$ ****
産仔雄比(♂/産仔)	$55\% \pm 23\%$	$51\% \pm 16\%$	$54\% \pm 31\%$

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 群は検出限界以下、Low 群平均  $0.37 \pm 0.05$  mg/kg、High 群平均  $5.13 \pm 0.53$  mg/kg の水銀 (T-Hg) が妊娠中の母親への曝露により、曝露量依存的に仔の脳にメチル水銀が移行することが確認された (Sidak 多重比較  $p < 0.0001$ ) (図3A)。出生後生存率については、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  $7.9 \pm 0.7$ 、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  $16.2 \pm$

1.2g; Sidak 多重比較 6wks  $p < 0.05$ ) (図3B)。

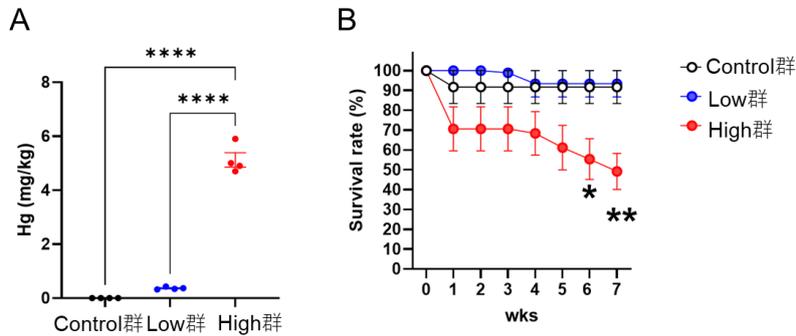
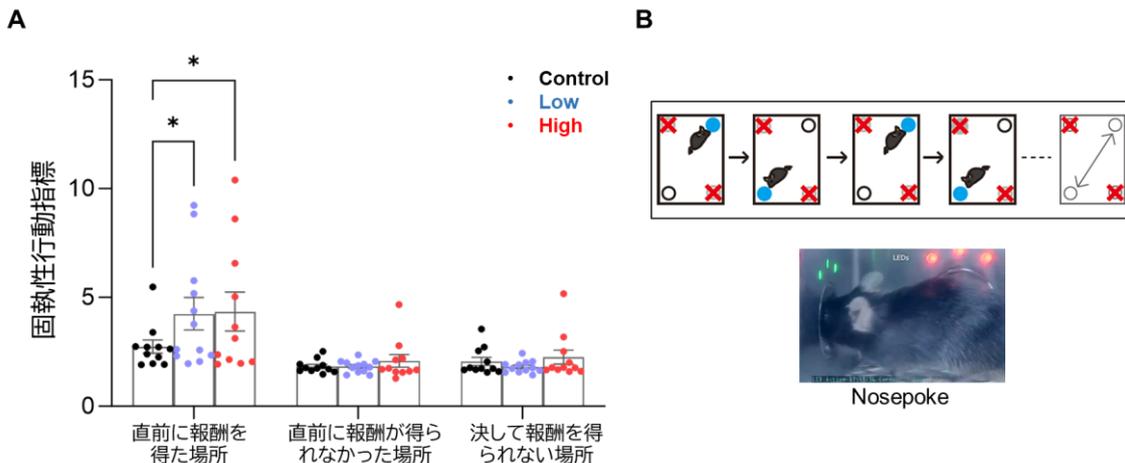


図3 発達期メチル水銀曝露マウスにおける出生時の脳中水銀量、および出生後の生存率

### 3. 発達期メチル水銀曝露マウスの自発行動・認知機能評価(中年期)

中年期の発達期メチル水銀曝露マウス Low 群、High 群の両群において、有意な固執性行動の亢進(報酬に強く固執し、不要な行動を抑制できない状態)がみとめられた(図4A、エラーバー: 標準誤差、アスタリスク: Holm-Sidakによる多重比較検定において  $P < 0.05$ )。この課題では、正解の場所(チャンバー)で一度 Nosepoke をすると報酬が得られるが、報酬獲得後は同チャンバーで続けて Nosepoke をしても報酬を繰り返し得ることができない(図4B)にもかかわらず、多くの発達期メチル水銀曝露マウスは、直前に報酬を得た場所での執拗な Nosepoke を繰り返した。このような行動は、直前に報酬が得られなかった場所および決して報酬を得ることができない場所では発現しなかった(図8B)ため、発達期メチル水銀曝露マウスの行動特徴は、報酬に強く固執し、不要な行動を抑制できない状態を反映していると解釈される。その他の各種認知的行動指標・自発行動指標では、中年期においては顕著な影響はみとめられなかった(図4C)。



C

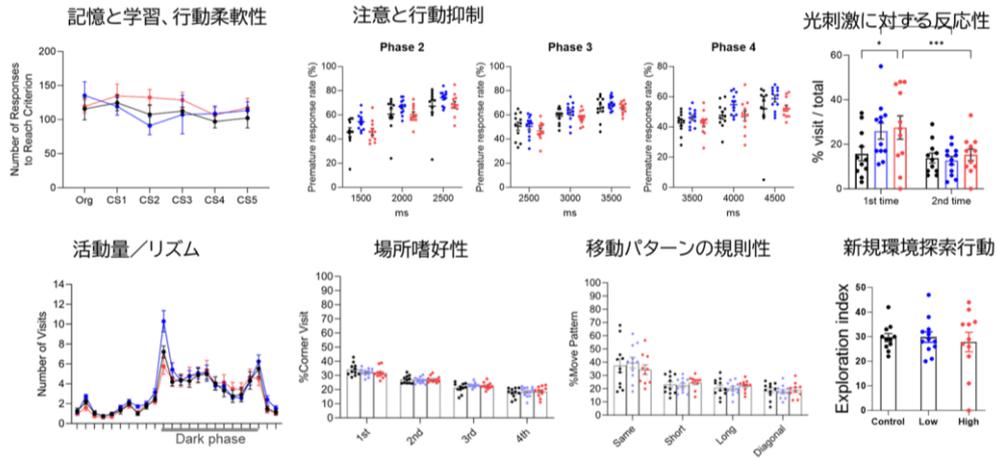
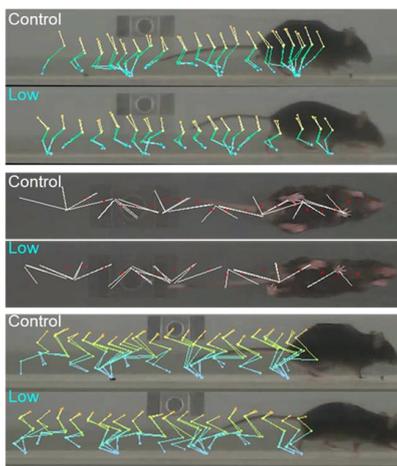


図4 中年期の発達期メチル水銀曝露マウスの行動学的特徴: 認知課題遂行中における固執性

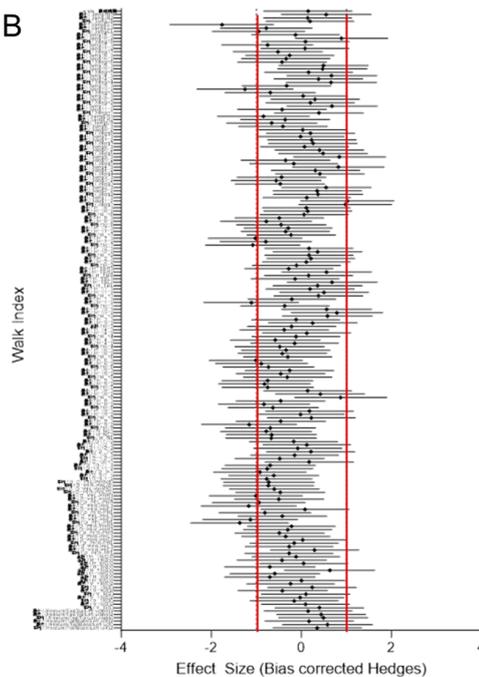
#### 4. 発達期メチル水銀曝露モデルマウスの運動機能評価(中年期)

中年期の発達期メチル水銀曝露マウス Low 群において、目視では顕著な運動機能障害はみとめられないように見えたものの(図5A)、計 315 の歩行運動指標(通常歩行 183 指標、はしご上を歩行させる“Skilled 歩行”132 指標)のうち、Control 群に対する効果量の絶対値が 1 を超える顕著な評価指標が 14 個検出された(図5B)。これらのうち、Mann-Whitney 検定で群間の差がみとめられた指標は、通常歩行の際の歩幅や肢の屈曲の度合いを示す指標(図5C)、および Skilled 歩行の際の後肢の動きを現す指標であった(図5D)。

A



B



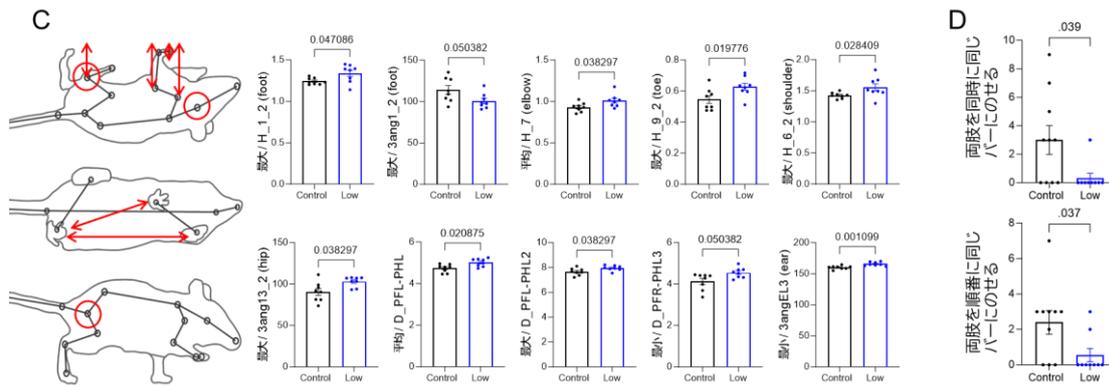


図5 中年期の発達期メチル水銀曝露マウスの運動機能評価

#### 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<sup>8-11</sup>。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かった<sup>10</sup>。この問題を解決するため、本研究ではマウスの行動・神経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、それを用いて発達期メチル水銀曝露モデルマウスの行動解析を行った。

まず、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、データ駆動型行動解析を実現する試験系を確立した。これは、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方式がスタンダードとなっている。その問題は、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<sup>12-14</sup>である。このため、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期待されている<sup>15-17</sup>。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<sup>18,19</sup>、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、我々が独自開発した手法は、集団飼育下マウスの解析に適したもので

ある点において大きな意義がある。げっ歯類の定型的な脳発達や行動の表出のための「エンリッチメント」<sup>20</sup>に加え、生態学的・動物福祉的観点からも、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からである。

次に、運動機能の評価については、運動時の身体の動きを数百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。最新のヒト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ーカメラによって行われている<sup>21</sup>ため、本手法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。さらに、我々は世界発のホームページ連結型・全自動運動データ収集システムと AI 解析フローを確立し、無人状態で各個体の自発的な歩行運動を効率的に取得することに成功した。これにより、既存のシステムで問題となっていた、実験者の接触や環境変化などに起因すると考えられる高齢マウスの不規則な運動や無動化を回避し、解析に適した正常な歩行画像を短時間で大量に収集することができるようになった。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。

このようにして確立した評価手法を用い、中年期における発達期メチル水銀曝露マウスの行動解析を実施した結果、発達期メチル水銀曝露の毒性影響については、下記の知見を新たに得ることができた。

第一に、中年期の発達期メチル水銀曝露マウス(Low 群、High 群の両群)において、固執性の亢進(無益な反復的ノーズポーク行動の増加)がみとめられた。固執性(Perseveration)とは、認知科学一般に、以前に意味のあった行動や思考を、その意味がなくなった後もやめることが出来ずに継続・反復してしまう特性をさす。注目すべきは、発達期メチル水銀曝露動物における固執性の亢進は、本研究だけでなく、①本研究の研究分担・参加者(遠藤・前川)が以前に行った若齢期の発達期メチル水銀曝露マウスの行動毒性研究<sup>3</sup>、および②Newland らによる発達期メチル水銀曝露ラットを用いた行動毒性研究でも繰り返し一貫して報告されている毒性影響であり<sup>22</sup>、再現性が高い。

精神医学においては、このように、無益で不適切な固執的行動を自ら抑制できず、その程度が深刻化することで生活に大きな支障をきたすことは高次脳機能障害の典型症状の1つとされている<sup>23,24</sup>。高次脳機能の障害は、その程度が比較的軽度であっても、周囲の人々とのかかわりや、日常生活に必要な作業の遂行に不便が生じる。一方で、しばしば当事者においては病識が欠如しており、第三者的にとっては当事者の人格的問題ととらえられやすい<sup>24,25</sup>。このため、当事者の問題がありのままに表面化しづらいという問題がある。先行研究ではヒトの発達期メチル水銀曝露と固執性亢進との関連ははまだ見出されていないが、疫学的調査ではそのような高次脳機能への詳細な影響評価は容易ではないため、これまでメチル水銀の毒性影響として十分に評価されてこなかった可能性がある。

第二に、運動機能評価の結果から、中年期の発達期メチル水銀曝露マウス(Low 群)において、通常歩行の際の歩幅や肢の屈曲の度合い、Skilled 歩行の際の後ろ肢の動きに、有意な運動機能の変化が確認された。これらは、観察者による目視では判定できるものではなく、300 を超える微細な定量的運動機能評価指標により、はじめて明らかになった。このため、一見正常な運動機能を保持しているようにみえた発達期メチル水銀曝露(Low 群)では、中年期の時点で有意な運動機能の変化が起こっていたことがわかった。今後、これら運動機能の変化がヒトのどのような運動機能に対応するかについて詳細な検討を行ってゆく。

## V 結論

本研究課題では、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に有用な、全自動解析手法を確立した。具体的には、RFID 技術をベースとしたシステムの運用ならびに新規システムの開発により、これまで評価が困難であった高齢期マウスにおいても自発行動、認知機能および運動機能を安定して長期記録できる手法を確立した。これらの手法を用い、発達期に母獣経由でメチル水銀の曝露をうけたマウスでは、中年期において、幼若期から継続的に観察される固執性の亢進、および運動機能変化がみとめられることを見出した。中年期で見出された行動学的な変化が、高齢期においてより増幅するか、また他の指標で新たに影響が認められるようになるかを 3 年次において明らかにする。臨床において老化現象とメチル水銀曝露との関連が議論されるなか、動物モデルを用いた高齢期までの行動学的影響の経時的追跡は、これまで見逃されてきた可能のある毒性影響についても新たな知見を提供できると期待される。

## VI 次年度以降の計画

来年度は、高齢期の発達期メチル水銀曝露マウスにおける自発活動行動、認知機能解析、運動機能解析を実施し、加齢依存的な毒性影響の評価を行う。また、血漿サンプルを採取し、Bio-Plex マルチプレックスアッセイを用いた血漿中の毒性バイオマーカー探索を行う。以上により、メチル水銀の発達期曝露により生涯にわたり継続して観察される毒性影響、およびライフステージ特異的な現象(とくに高齢期影響)、関連するバイオマーカーの同定をめざす。

## 本研究に関する現在までの研究状況、業績

1. ベナー聖子, 遠藤俊裕, 山末英典: 大規模行動表現型データ収集に基づく精神神経疾患モデル動物研究の転換. 日本生物学的精神医学会誌, 34 (4), 179, 2023
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. Balan S, Iwayama Y, Ohnishi T, et al.: A loss-of-function variant in SUV39H2 identified in autism-spectrum disorder causes altered H3K9 trimethylation and dysregulation of protocadherin  $\beta$ -cluster genes in the developing brain. *Mol Psychiatry* 26(12):7550-7559, 2021.
  4. Benner S, Aoki Y, Watanabe T., et al.: Neurochemical evidence for differential effects of acute and repeated oxytocin administration. *Mol Psychiatry* 26(2):710-720, 2021.
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. Benner S, Yamasue H: Clinical potential of oxytocin in autism spectrum disorder: current issues and future perspectives. *Behav Pharmacol* 29: 1-12, 2018
  9. 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
  10. Kubo KI, Deguchi K, Nagai T., et al.: Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight* 2(10):e88609, 2017
  11. Kimura E, Matsuyoshi C, Miyazaki W., et al.: 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
  12. 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.
  13. 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
  14. Ishii K, Kubo K, Endo T., et al.: Neuronal Heterotopias Affect the Activities of Distant Brain Areas and Lead to Behavioral Deficits. *J Neurosci* 35 (36) 12432-12445, 2015
  15. 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
  16. 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
  17. 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* 1;221(1):172-81, 2011

#### 引用文献

1. Radulescu C., Cerar V., Haslehurst P., Kopanitsa M., Barnes SJ. The aging mouse brain: cognition, connectivity and calcium *Cell Calcium*. Mar; 94:102358. 2021
2. Flurkey K., Curren JM., Harrison DE. Chapter 20 - Mouse Models in Aging Research. In American College of Laboratory Animal Medicine, The Mouse in Biomedical Research (Second Edition), Academic Press, Volume III, 2007, Pages 637-672. 2007
3. 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
4. Lipp H., Krackow S., Turks E., Benner S., Endo T., Holger R., IntelliCage: the development and perspectives of a mouse- and user-friendly automated behavioral test system, *Front. Behav. Neurosci.*, 2024
5. 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
6. Balan S, Iwayama Y, Ohnishi T, et al.: A loss-of-function variant in SUV39H2 identified in autism-spectrum disorder causes altered H3K9 trimethylation and dysregulation of protocadherin  $\beta$ -cluster genes in the developing brain. *Mol Psychiatry* 26(12):7550-7559, 2021.
  7. 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
  8. 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
  9. Harada M. Minamata disease: Methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Cri. Rev. Toxicol* 25, 1-24. 1995
  10. Rice DC. Age-Related Increase in Auditory Impairment in Monkeys Exposed in Utero plus Postnatally to Methylmercury. *Toxicol Sci* 44, 2:191-196. 1998
  11. 高岡滋、水俣病診断総論 2006
  12. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci* 5(11):1101-2. 2002.
  13. Hurst JL, West RS. Taming anxiety in laboratory mice. *Nat Methods* 7:825-826. 2010
  14. 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* :2976014. 2018
  15. 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
  16. 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
  17. Grieco F, Bernstein BJ, Biemans B, et al.: Measuring Behavior in the Home Cage: Study Design, Applications, Challenges, and Perspectives. *Front. Behav Neurosci*:735387. 2021
  18. Richardson A, Fischer KE, Speakman J et al.: Measures of Healthspan as Indices of Aging in Mice-A Recommendation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 71(4):427-30 2016
  19. 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
  20. 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
  21. Roggio F., Ravalli S., Maugeri G., et al.: Technological advancements in the analysis of human motion and posture management through digital devices. *World J Orthop.* 12(7): 467-484. 2021
  22. Newland MC., Paletz EM., Reed MN.: Methylmercury and nutrition: adult effects of fetal exposure in experimental models. *Neurotoxicology.* 29(5): 783-801. 2008
  23. Helm-Estabrooks "The problem of perseveration". *Semin Speech Lang.* 25 (4): 289-90. 2004.
  24. 村井俊哉、生方志浦 精神科の立場からみた高次脳機能障害:アパシー、脱抑制、追行機能障害 *Japanese Journal of Cognitive Neuroscience* Vol 19: No.3/4 164-169 2017
  25. 高次脳機能障害.net 一般社会法人 市民福祉ネット

## 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)

It has been suggested that the effects of developmental exposure to methylmercury may manifest more prominently as individuals age. However, limited information is available from both epidemiological and animal model studies, especially regarding the progression or emergence of neuropsychiatric symptoms with aging. Traditional behavioral assessment methods used in animal studies prove inadequate for comprehensive, long-term monitoring to evaluate neuropsychiatric symptoms in model animals. Also, most studies have focused on younger animals, likely due to economic and time constraints. We therefore aimed to develop methodologies suitable for such analysis in mice, and analyze mice models exposed to methylmercury in utero. Specifically, we focused on assessing neuropsychiatric symptoms in middle-aged and beyond.

We established a fully automated method for acquiring behavioral data of mice in a group-housed setting, within a home cage, that enables mining of a variety of basal activity and cognitive functions. We also established a fully automated, homecage kinematic analysis method. Together, we addressed concerns about experimenter contact and environmental changes eliciting stress responses in the subject animals, especially in aged animals. We validated the utility of our systems using C57BL/6J mice of various ages and confirmed that the indices reflective of aging effect can stably be detected. We then conducted spontaneous behavior, cognitive and motor function analysis in middle aged C57BL/6J mice exposed to methylmercury in utero. Mice models were created by orally administering methylmercury(II) chloride to pregnant mice at three doses (0 mg/kg, 0.5 mg/kg, 5 mg/kg bw, referred hereafter as Control, Low, and High groups, respectively) on days 7 and 14 of gestation. The impact of developmental methylmercury exposure on birth outcomes, brain mercury levels at birth, and offspring survival rates showed particularly robust effects at high doses, while no effects were observed in the Low dose group.

Mice exposed to methylmercury in utero exhibited perseverative behavior in middle age, characterized by heightened insistence on rewards and an inability to inhibit unnecessary actions, which had also been observed during younger ages. Additionally, we discovered changes in motor function had emerged in middle age. These characteristics identified from our study should be given special attention in clinical and epidemiological investigations. In our final year of this project, we aim to determine whether the behavioral changes observed in middle age will still be present or be amplified in older age or if new effects will emerge. In addition, blood samples will be collected to explore biomarkers. Through these methods, we aim to reveal the lifelong effects stemming from developmental methylmercury exposure, along with life stage-specific phenomena (particularly effects in older ages) with relevant biomarkers.