

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 上級主幹研究員

研究要旨

既存研究では、発達期メチル水銀曝露による脳機能への影響評価は、主に若齢動物に限られていた。そのため、発達期の毒性影響が加齢に伴いどのように変化するかといった長期的な知見が不足しており、ライフステージ特異的な毒性影響が見逃されてきた可能性がある。そこで、本研究ではマウスを用いて発達期メチル水銀曝露の生涯影響を多角的に評価する手法を確立し、特にこれまで評価が手薄であった中年期から高齢期に着目して解析を行った。妊娠マウスに対し、7日目と14日目にメチル水銀(0、0.5、5 mg/kg 体重)を投与して、その産仔を解析に用いた。中年期と高齢期における行動試験では、集団飼育環境下で個々のマウスの位置情報の追跡と多様な運動機能の指標を全自動で取得できる独自のシステムを構築し、既存の全自動集団飼育型行動試験装置 IntelliCage と組み合わせて、自発的行動、認知機能、運動機能を評価した。まず、高用量群については、出生率や生存率に有意な毒性影響が認められた。一方、出生時に明らかな影響がみられなかった低用量曝露群においても、中年期には以下の行動異常が観察された。第一に、発達期メチル水銀曝露モデルは、曝露用量に関わらず、報酬に固執し、不要な行動を抑制できない行動異常を示した。第二に、中年期以降、顕著な運動機能障害が明らかとなった。本研究は、発達期におけるメチル水銀曝露の影響と加齢の関係に関する基礎的知見を提供し、長期モニタリングの重要性と高齢期における潜在的な毒性影響の可能性を示唆した。

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中年期と高齢期での毒性影響の有無や特徴に関する知見を得ることを目的とした。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収集し、二年次において中年期(9 カ月齢から 14 カ月齢)、三年次において高齢期(18~26 カ月齢^{1,2)})にあたる発達期メチル水銀モデルマウスの自発的活動、認知機能、および運動機能を評価した。また、血漿サンプルを用いて毒性バイオマーカーを探索した。

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・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。メチル水銀曝露は、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、両施設からのマウスを2つのバッチに配分して行動試験を実施した。バッチ1は Control 群、Low 群、High 群で構成され、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(Control 群 n=11、Low 群 n=12、High 群 n=11 匹)、18 カ月齢において基底活動評価(Control 群 n=8、Low 群 n=8、High 群 n=8 匹)、24~26 カ月齢にわたり運動機能評価(Control 群 n=8、Low 群 n=8、High 群 n=6 匹)を実施した。バッチ2は、Control 群と Low 群で構成され、12~13 カ月齢にわたり運動機能評価(Control 群 n=10、Low 群 n=10)、20~23 カ月齢にわたり(Control 群 n=15、Low 群 n=16)を実施した。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、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。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、皮下に動物個体識別用 RFID タグを埋め込んだ。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、課題に正解すれば飲水できる条件にて実施した。また、すべての行動試験は、Control 群とメチル水銀曝露群を同一の居住空間内で同居させた集団飼育環境下で実施した。

2. 脳内総水銀量の計測

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. 自発的行動・認知機能評価

マウスの自発的行動と認知機能を解析するため、非接触型個体識別・自動追跡システムを使用した。(1)自発的行動解析では、IntelliCage システムと独自開発のマウス位置追跡システムを併用し、各マウスの位置情報を時刻とともに継続的に記録した。このデータを基に、活動量、活動リズム、移動パターン、滞在場所の選好性などの指標を抽出した。(2)認知機能解析には、IntelliCage システムを使用した。このシステムには個体識別ができる 4 つのオペラント学習チャンバーが設置されており、各種センサーがマウスの動きを検知し、チャンバーへの出入りや、報酬を得るために鼻先でつつく行動(ノーズポーク)を記録する。このオペラント学習チャンバーにおいて、報酬や罰を与える条件を適切に設計することで、記憶・学習(特定の場所での報酬学習)、行動柔軟性(報酬位置の変更への適応)、注意力や反応性(LED ライト点灯パターンの変化への反応)などを評価できる。これらシステムの詳細について、以下に記載する。

独自開発のマウス位置追跡システム：(論文発表予定のため装置の仕様および解析ソフトの説明は控えさせていただきます)。18 カ月齢のメチル水銀曝露マウス(Control 群 n=8、Low 群 n=8、High 群 n=8 匹)を用いて行動データを取得し、うち 2 週間分のデータを用いて解析を行った。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。

IntelliCage システム：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における発達期メチル水銀曝露モデルマウスの行動解析を実施済みである³。IntelliCage(TSE 社、ドイツ)^{4,5}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マウス集団飼育型試験装置で、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、チャンバーへのアクセスやチャンバー内の行動を記録するものである。ここから、マウスの活動パターンや飲水行動を記録できるほか、液体報酬を用いたオペラント課題を自在に設計できる。本研究では、一年次に自然加齢モデルマウスを用い、基礎データを収集した。二年次以降に中年期および高齢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 台用いて、各ケージとも Control 群とメチル水銀曝露群を均等な割合で同居させた状態で実験を実施した(中年期: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、高齢期:ケージ1では Control 群 7 匹、Low 群 8 匹、ケージ2では Control 群 8 匹、Low 群 8 匹)。具体的な手順と各指標の算出法は以下の通りである。まず、IntelliCage 導入直後のチャンバーへのアクセス頻度を探索行動として 24 時間追跡した。その後、2 週間にわたって基底活動量や活動リズム、活動パターン、場所嗜好性などを評価した。光刺激への反応性は、夜間(活動期)におけるチャンバー内 LED ライト点灯中と消灯中のチャンバーアクセス頻度を比較して評価した。空間ルール学習では、「正解チャンバー」でノーズポークをすると報酬が得られる課題を実施し、学習効率をトライアル数で評価した。学習後は「正解チャンバー」の位置を変える逆転課題を実施し、行動柔軟性を評価した。固執性は、報酬獲得後に同じチャンバーでノーズポークを繰り返す回数を指標化した。注意・行動抑制は、LED ライトをキューとして条件に応じたノーズポークの抑制・反応の速さで評価した。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^{3,4}。

4. 運動機能評価

(論文発表予定のため、装置の仕様および解析ソフトの説明は控えさせていただきます)。装置中を移動するマウス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、股関節と膝関節の角度、一步にかかる時間など)に基づいてパラメータを設定した。中年期の解析では Control 群 n=10、Low 群 n=10、高齢期の解析では、Control 群 n=8、Low 群 n=8、High 群 n=6 匹を用いた。

5. 生体試料の採取

行動試験完了後、心採血ならびに脳と後脚の筋肉の剖出を行った。処置はイソフルラン麻酔下で実施した。採血時には血液凝固防止剤として EDTA を使用し、採血後は速やかに遠心分離を行い、血漿を得た。脳は、大脳皮質、海馬、小脳に分け、それぞれの重量を測定した。後脚の筋肉は、大腿四頭筋、前脛骨筋、長趾伸筋、足底筋、腓腹筋、ヒラメ筋に分け、それぞれの重量を測定した。剖出した各部位はヒスト・テック ピノ(サクラファインテックジャパン株式会社)を用いて-75℃に急速冷凍したうえで-20℃で保存した。血漿は血中分子の解析まで-20℃で保管した。

6. 血中分子の解析

有望な発達神経毒性のバイオマーカーの候補として、発達神経毒性の進行や行動異常に関与

する主要なメカニズムの一つとして広く認識されている神経炎症に着目し、血中サイトカインの測定を行った。Bio-Plex Pro マウス サイトカイン GI 23-Plex パネル(BioRad 社)を用い、血漿サンプル(Control 群 n=14、Low 群 n=15、High 群 n=6)を製造元のプロトコルの通りにアッセイを実施、Bio-Plex 200 機器にて 23 種類のサイトカインの同時測定した。

7. 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影響評価では、Control 群、Low 群、High 群の 3 群比較を一元配置分散分析および Sidak 多重比較、または繰り返しのある二元配置分散分析および Sidak 多重比較、もしくは Holm-Sidak 多重比較検定を用いた。運動機能解析の 2 群比較は Hedges' g の効果量判定、および Multiple Mann-Whitney 検定を用いた。

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. 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

発達期メチル水銀曝露の出産への影響として、High 群において、出産に至らない母獣の割合が高く、出産に至った場合でも産仔数が有意に少なかった。また、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。産仔の雌雄の比率は群間で差はなかった。出生時における仔の脳内水銀量は、High 群において他 2 群よりも有意に高く、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。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。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が、6 週目における High 群の体重は、他 2 群よりも軽かった。

3. 発達期メチル水銀曝露の行動への影響：固執性行動

固執性行動は、学習課題において直前に報酬が得られた場所において、さらに報酬を得るために行う行動(ノーズボーク行動)の頻度を解析して評価した。この課題では、直前に報酬を得た場所では再度ノーズボーク行動を行っても、それ以上の報酬は得られないため、この行動は、報酬

に固執し、不要な行動を抑制できない特徴を示すと解釈される。中年期において、発達期メチル水銀曝露マウス (Low 群、High 群) では、Control 群と比較して固執性行動の増加が認められた。(論文発表予定のため、結果の詳細についての記載は控えさせていただきます)。

4. 発達期メチル水銀曝露の運動機能への影響

運動機能解析の結果、発達期メチル水銀曝露による影響は、加齢とともに悪化することが明らかになった。(論文発表予定のため、結果の詳細についての記載は控えさせていただきます)。

5. その他の行動指標

上記の他の行動指標については、Low 群においては発達期メチル水銀曝露の影響はみとめられなかった。(論文発表予定のため、結果の詳細についての記載は控えさせていただきます)。

6. 高齢期における体重、脳重量、筋肉重量変化

発達期メチル水銀曝露が、高齢期における体重、脳重量、および筋肉重量に及ぼす影響を評価した。(論文発表予定のため、結果の詳細についての記載は控えさせていただきます)。

7. 血中分子解析

高齢期マウスの血漿中サイトカインの解析をマルチプレックスアッセイにて行った。Th1 型免疫応答(免疫活性化)系サイトカイン、Th2 型免疫応答(調節)系サイトカイン、免疫抑制系サイトカイン、炎症誘導・免疫細胞誘因系サイトカイン、免疫細胞活性・増殖促進系サイトカインを対象物質とした。(論文発表予定のため、結果の詳細についての記載は控えさせていただきます)。

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⁸⁻¹¹。ヒトにおいて、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・神経症状を長期に涉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¹⁰。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。

具体的には、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¹²⁻¹⁴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¹⁵⁻¹⁷。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^{18,19}、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も大きな意義がある。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」²⁰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。

このようにして確立した評価手法を用い、主に中年期から高齢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、加齢／ライフステージ依存的な毒性発現について、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において、固執性の亢進がみとめられた。固執性とは、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³、および Newland 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²²、再現性が高い。精神医学においては、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一つである^{23,24}。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^{24,25}。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い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、中年期の時点において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、数百もの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。

この他、発達期メチル水銀曝露高用量曝露特異的な行動変化が、複数検出され、一部は先行研究³において若齢期のマウスでも認められた現象と一貫していた。ただし、High 群は死産や出生後の死亡が多く、生存した個体における解析には注意を払う必要がある。さらに、幼若・若齢期から中年期を経て高齢期に至るまで一貫して影響が認められなかった指標を見出した。(指標の詳細、およびその臨床対応性についての議論は、論文発表予定のため詳細は控えさせていただきます)。

最後に、バイオマーカー探索の結果として、血中サイトカインの解析からは、発達期メチル水銀曝露群特有の単一のバイオマーカーを特定することはできなかったが、複数の分子で発現増加傾向が認められ、炎症誘導に関わる変化が示唆された(論文発表予定のため詳細は控えさせていただきます)。今後この全体像を明らかにすることで、発達期メチル水銀曝露の生涯にわたる毒性影響の分子基盤を解明するための有望なバイオマーカーが特定できると確信している。

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、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受けたマウスでは、幼若期から中年期まで継続的に観察される毒性影響を同定した。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、本研究は動物モデルを用いて発達期メチル水銀曝露の毒性影響が成長／加齢とともにどのように変化していくのかを点を示すことにも成功した。

VI 今後の課題と発展性

マウスモデルにおけるメチル水銀曝露の経年的影響が、ヒトの変化とどの程度相同するかを客観的に評価することは、本研究の重要な課題である。例えば、以下のアプローチでヒト研究との対応性を検討できると考えている。まず、本研究で用いた行動指標(例:固執性行動、活動量、学習能力)に対応するヒトの神経心理検査(例:WCST、MoCA)の結果と比較し、症状の進行パターンや重症度の相関を分析することができる。次に、マウスで有望な血中バイオマーカー(サイトカイン、RNA 等)が同定できれば、それをヒト患者サンプルで検証し、一致性を評価することができる。本研究でも着手した毒性バイオマーカーの探索を血中分子の中に見出したいという意図は、ヒトへの外装性、および連続的な測定が可能であることにある。とりわけ、サイトカインは免疫系と神経系の架け橋として機能し、神経発達や認知機能に影響を与えることが知られている。メチル水銀のような神経毒性物質が脳に慢性的な炎症反応を引き起こし、その影響が末梢血中のサイトカイン

ンプロファイルに現れることが想定される²⁶。したがって血中サイトカインの測定は、神経毒性による神経炎症の程度を反映する有用な指標となると見込める。

また、今後の研究では、容量反応関係をより適切に評価するため、本研究で用いられた High 群と Low 群の間となる投与量群や Low 群よりもさらに低用量群の設定が有用である。また、さらに、投与期間・時期を調整し、数週間の継続投与を行い、出生後の投与も考慮し、投与方法もメチル水銀含有水の自由摂取方式を採用するなど、より現実的な曝露条件の再現を検討したい。そのうえで、本研究で得られた知見を基に、以下の発展的研究を検討する。(1)エピジェネティック変化の解析。発達期メチル水銀曝露による脳組織におけるエピジェネティックな変化と、長期的な固執性行動や運動機能障害との関連性を解析する。(2)遺伝的背景の影響評価。異なる系統のマウスを用いて遺伝的背景がメチル水銀感受性(固執性行動、運動機能障害、脳内水銀蓄積など)に与える影響を比較検討する。(3)介入研究。メチル水銀曝露による固執性行動や運動機能障害を軽減する可能性のある栄養介入や薬物療法の効果を行動学的指標を用いて検証する。これらの研究を通して、発達期メチル水銀曝露による長期的な影響のメカニズム解明、ヒトにおけるリスク評価の精度向上への貢献、効果的な予防・治療法の開発を目指す。

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 β -cluster genes in the developing brain. *Mol Psychiatry* 26(12):7550-7559, 2021.
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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 β -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 complaints 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
26. Nascimento TS, Pinto DV, Dias RP, Raposo RS, Nunes PIG, Roque CR, Santos FA, Andrade GM, Viana JL, Fostier AH, Sussulini A, Alvarez-Leite JI, Fontes-Ribeiro C, Malva JO, Oriá RB. Chronic Methylmercury Intoxication Induces Systemic Inflammation, Behavioral, and Hippocampal Amino Acid Changes in C57BL6J Adult Mice. *Int J Mol Sci.* 2022 Nov 10;23(22):13837.

英文要約(Abstract)

Lifetime Longitudinal Tracking of Behavioral Effects of Developmental Methylmercury Exposure

Seico Benner (National Institute for Environmental Studies),

Toshihiro Endo (Phenovance LLC)

Fumihiko Maekawa (National Institute for Environmental Studies)

Developmental exposure to methylmercury (MeHg) has been shown to impact cognitive and motor functions. However, the long-term, age-related trajectory of these effects remains poorly understood. Animal studies often assess effects at limited time points, potentially overlooking age/life-stage dependent toxicity. This study aimed to establish methodologies for long-term observation of MeHg effects in mice, with special focus on middle-aged and older animals.

We established fully automated methods for behavioral analysis in group-housed mice, minimizing experimenter-induced stress, especially in aged animals. These systems enabled long-term monitoring of basal activity, cognitive functions, and motor skills. We validated our systems using C57BL/6J mice of various ages, confirming stable detection of aging-related indices. Pregnant C57BL/6J mice were orally administered MeHg chloride (0, 0.5, or 5 mg/kg bw; Control, Low, High groups) on gestational days 7 and 14. We assessed birth outcomes, offspring brain mercury levels, survival rates, and behavioral changes in middle-aged and older offspring.

High-dose MeHg exposure during development significantly impacted birth outcomes and offspring survival. In middle-aged mice, both Low and High MeHg groups exhibited perseverative behavior, a finding that was highly reproducible across experiments. Additionally, significant motor function impairments emerged in MeHg-exposed animals from middle age onwards. Further analysis of blood-based biomarkers, is underway to further elucidate the mechanisms underlying these long-term effects. These findings provide critical insights into the lifelong consequences of developmental MeHg exposure, highlighting the importance of long-term monitoring and the potential for previously overlooked toxic effects in older age.

Keywords: Developmental neurotoxicity, Methylmercury, Automated behavioral phenotyping, Aging, Cognitive flexibility