

研究課題の概要

研究課題名	メチル水銀とダイオキシンの複合曝露による次世代の高次脳機能のリスク評価手法
主任研究者	遠山 千春
所属機関	東京大学医学部
研究成果の概要	<p>本研究では、食品安全の観点からメチル水銀とダイオキシンを代表的物質として取り上げ、複合曝露による次世代への高次脳機能に及ぼす影響について、そのリスクを検出・評価するための新たな試験法の開発を行った。第一に、我々が構築したラットにおける対連合学習試験法を用いて、胎盤・母乳経由でダイオキシンの曝露したラットは成熟後に対連合学習機能が阻害されることが判明した。第二に、レーザー・マイクロダイセクションにより、ダイオキシン単独曝露、メチル水銀単独曝露動物の海馬錐体細胞層では、記憶機能に重要な分子であるグルタミン酸受容体もしくはグルタミン酸トランスポーター遺伝子の遺伝子発現レベルが半分以下に低下していることが判明した。第三に、ダイオキシンとメチル水銀の複合曝露によって、対連合学習機能が阻害されただけでなく、情動行動異常が顕れること、上記の遺伝子双方の発現が低下していることがわかった。</p>

食品安全委員会 の本研究課題に 対する事後評価・ 総合コメント	目標以上の成果が得られた。メチル水銀とダイオキシンの複合影響に着目した新しい評価手法が開発された。食品健康影響評価に活用が期待される。
--	---

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	メチル水銀とダイオキシンの複合曝露による次世代の高次脳機能のリスク評価手法（研究期間：平成18～20年度）
主任研究者名	所属： 東京大学大学院医学系研究科 氏名： 遠山 千春（研究課題番号0601）

○研究要旨

化学物質のリスク評価が行われる際には、該当の個別物質あるいは類似の毒性メカニズムを示す同族群ごとにリスク評価がなされ耐容摂取量が設定されている。しかし現実には、ヒトは食品に含まれる複数の汚染物質に同時に曝露している。各国でリスク評価がなされてきたメチル水銀とダイオキシン類は、魚介類からの摂取量が曝露総量の多くを占めている。いずれも子供の学習機能が最も影響を受けやすいとされており、最も感受性が高い妊娠期・新生児期に、低用量・低濃度曝露が毒性学的に意味のある影響を引き起こしているかが、今日のリスク評価の重要な課題である。そこで本研究においては、メチル水銀とダイオキシン類を複合曝露の代表例として取り上げ、次世代の高次脳機能への影響に焦点を当て、そのリスクの定量的影響評価法を構築し、その成果に基づき、食品中汚染化学物質への複合曝露リスク評価法を提言することを目標とした。

本研究では最初に、新たな学習行動試験法について検討し、ラットにおける対連合学習試験法を構築した。対連合学習とはいわゆる連想ゲームの際に必要な学習機能であり、関連のない二つの事象を結びつけて記憶し、一方から他方を想起できるようにするものである。我々は、この対連合学習には海馬だけでなく大脳皮質も重要な働きをすることを脳破壊実験ならびに神経活動依存性蛋白の発現解析により示した。さらに試験法の簡略化について検討し、一定の訓練の後には誰もが安定して行える技術としても確立させることができた。この対連合学習試験法を毒性試験に適用し、ダイオキシンの単独曝露実験を行った。妊娠後期の母動物に対してダイオキシンを経口投与することで、仔動物に対して胎盤経由・母乳経由で曝露を行い、低用量ダイオキシン曝露により仔動物の対連合学習機能が阻害されることを見出した。

次に行動レベルの変化を科学的に説明することを目指し、レーザー・マイクロダイゼクション(LMD)の実験技術を飛躍的に発展させることに成功した。すなわち脳組織切片上で免疫組織染色により同定した特定の細胞群のみをLMDにより回収し、遺伝子発現の定量解析を行う技術を開発した。LMD法により、ダイオキシン曝露により対連合学習が阻害された動物の海馬錐体細胞層では、記憶機能に重要な分子であるグルタミン酸受容体の遺伝子発現が半分以下に低下していることを見出した。一方、メチル水銀を胎仔期に曝露された動物では、グルタミン酸トランスポーター遺伝子の発現が低下していることもわかった。

そしてダイオキシンとメチル水銀の発達期複合曝露について検討したところ、ダイオキシン単独曝露と同様に対連合学習機能が阻害されただけではなく、複合曝露により新たに情動行動異常が顕れることが判明した。また複合曝露により行動異常が顕れた動物において、グルタミン酸の受容体遺伝子とトランスポーター遺伝子の双方の発現が低下していることがわかった。二つの化学物質の複合曝露により単独曝露とは異なる影響があったことは、リスク評価において単一化学物質のみではなく複数の化学物質の複合要因を考慮せねばならないことを強く示唆する結果だといえる。

影響評価技術開発として行った本研究では、行動レベルと分子レベルの試験法について、基礎サイエンスとしての神経科学分野においても最新・最先端と言えるものを提示することができた。複合曝露影響のみならず単一化学物質の影響評価手法として、また脳の科学的解明のための手法として有効利用されるよう、今後も努めたい。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	メチル水銀とダイオキシンの複合曝露による次世代の高次脳機能のリスク評価手法（研究期間：平成18～20年度）
主任研究者名	所属： 東京大学大学院医学系研究科 氏名： 遠山 千春（研究課題番号0601）

1. 研究の概要

化学物質のリスク評価が行われる際には、該当の個別物質ごとにリスク評価がなされ耐容摂取量が設定されている。しかし現実には、ヒトは食品に含まれる複数の汚染物質に同時に曝露しており、現実には体内に取り込む物質群を想定し、複合曝露評価を行うことが望ましい。メチル水銀とダイオキシン類は、食品安全委員会やJECFA（WHO/FAO 食品添加物および汚染物質に関する合同専門家会合）をはじめ欧米諸国の環境・食品基準担当部局により、リスク評価がなされてきた。これらの物質は、魚介類からの摂取量が曝露総量の多くを占めており、いずれも子供の学習機能が最も影響を受けやすいとされている。最も感受性が高い妊娠期・新生児期に、低用量・低濃度曝露が毒性学的に意味のある影響を引き起こしているかが、今日のリスク評価の重要な課題である。

そこで本研究においては、メチル水銀とダイオキシン類を複合曝露の代表例として取り上げ、次世代の高次脳機能への影響に焦点を当てた。これらの物質への単独及び複合曝露により、次世代の高次脳機能へのリスクの定量的影響評価法を確立することを目的とし、その成果に基づき、食品中汚染化学物質への複合曝露リスク評価法を提言することを目標とした。

ダイオキシン類のリスク評価は、98年に厚生労働省・環境省合同の審議会において行われ、ダイオキシン類特別措置法の制定がなされた。安全基準値を引き出す際に重要な検討対象となった影響指標の一つが、学習機能の低下であった。他方、メチル水銀のリスク評価については、食品安全委員会（05年）およびJECFA（04年）において耐容摂取量が設定された。いずれのリスク評価の際にも、魚介類を多食するフェロー諸島とセイシエルの住民を対象とした疫学調査データが用いられた。メチル水銀曝露の影響は、前者で認められ、後者では検出されなかったが、前者においては、メチル水銀に加えてダイオキシン/PCBへの曝露量も無視できないことが指摘された。これらの知見は、これまでのリスク評価で立ち後れている以下の2つの問題点を提起している。

第一に、今日の化学物質リスク評価においては、個々の物質ごとに耐容摂取量が設定されていることである。どのように複合曝露の影響評価を行うかが、リスク評価における重要な課題である。食品安全行政の観点から科学的根拠に基づき現実的に対処するために、曝露によって悪影響の発生が想定され、食品等から同時に曝露する化学物質群について、それらの種類と量に基づいた曝露シナリオに基づき、感受性の高い時期における健康リスクを評価する手法の確立が有効であろう。

第二に、脳機能の中でもヒトをヒトたらしめる認知・学習といった高次脳機能については毒性試験法の開発が進んでいないことである。定評あるOECD毒性ガイドラインでも高次脳機能の毒性試験方法論に関する具体的記述はない。高次脳機能を評価でき、その現象を客観化するためのメカニズムを解析し得る新たな実験手法の導入が不可欠である。

3年間の全体計画として計3回の学習機能試験を計画し（それぞれ、非曝露動物、ダイオキシン単独曝露動物、ダイオキシン・メチル水銀複合曝露動物を用いた実験とする）、各手法の検証・修正を3回行うことで、最終的に評価手法を確立することを目指した。

達成すべき目標として、第一にメチル水銀とダイオキシン類への複合曝露に伴う健康影響に関して、実験動物を用い高次脳機能を endpoint としたリスク評価手法の原型を作成すること、第二に汚染化学物質への複合曝露に伴うリスク評価手法の基本情報を提示すること、第三に高次脳機能のテストガイドラインの策定に資する基本情報を提示することを設定した。

次のサブテーマを設定し、研究を進めた。

(a)曝露シナリオに基づいた曝露動物の作成（遠山）

妊娠ラットにメチル水銀（MeHg）及びダイオキシン類の単独あるいは複合曝露を行い、生まれた仔動物を試験に用いた。ダイオキシン類として代表的異性体の 2,3,7,8-TCDD（以下、TCDD）を用いた。ヒトにおける曝露量を反映する 2 用量（低用量、高用量）を選び、用量群の組み合わせを設けた。ここで低用量とは成獣では影響が観察されず仔動物にも明らかな毒性を示さない用量で、MeHg（混餌）は妊娠期を通じ 400 μ g/kg/日、TCDD は現行 TDI 設定の根拠となった 200 ng/kg（妊娠 15 日単回経口投与）とした。

(b)学習機能試験法の確立とこれを用いた影響評価（遠山）

連合学習機能は学習機能の中でも最も高次の機能であり、曝露影響の最も鋭敏な指標となりうるが、これまで齧歯類における適切な試験手法は無かった。本研究では R.Morris 博士と共同開発した試験装置（Event Arena）を用い、短期記憶・長期記憶・連合記憶の解析を行った。イベント・アリーナは、報酬となる餌の位置（空間記憶）、餌の味（味嗅覚記憶）、両者の連合学習を定量化できる。連合学習をげっ歯類において分析できる世界初のツールであり、かつ単純記憶（短期記憶と長期記憶）も従来の水迷路等よりも容易に解析できる。

(c)毒性発現メカニズムの検討（遠山・渡辺）

神経細胞の興奮に伴い発現増強する蛋白の発現解析を行い、神経細胞を同定した。レーザー・マイクロダイセクション顕微鏡を用い、特定の神経細胞群のみを回収し、リアルタイム PCR を用いた定量的検証を行った。

(d)量－反応関係の解析（渡辺・遠山）

(a)から(c)の実験結果について、研究では、TCDD と MeHg の複合曝露によって単独曝露にはない新たな影響が顕われるのか、あるいは単独曝露の影響が変化するのかを検証した。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

① 学習行動試験法の構築

イベント・アリーナ装置における Flavor Map 法（図 1）を確立し、ラットにおける対連合学習を数週間で確立させることに世界で初めて成功した（図 2）。さらに、餌の味とその位置の連合学習である Flavor Map を一度形成した動物は、新規の場所と味のペアを 1 回の試験で学習しうること、大脳海馬を破壊した動物は Flavor Map を習得することができないことから、Flavor Map 法による対連合学習習得には海馬が必須であることを明らかにした。次に、Flavor Map を習得してから 48 時間後に海馬を破壊しても Flavor Map の記憶は残っていること、しかし習得 3 時間後の海馬破壊では Flavor Map の記憶が消失することを明らかにした（図 3）。すなわち、対連合学習の形成にとって、少なくとも 3 時間以上は海馬が必須の脳領域であること、48 時間後には海馬で形成された対連合記憶が脳の他の部位に移行することが明らかとなった。本研究の海馬破壊動物は、アルツハイマー病などにみられる

逆行性健忘症の典型的なパターンであり、ラットにおける逆行性健忘症モデルとして世界で初めてのものとなる（英国 Edinburgh 大学 Richard Morris 教授との共同研究, Tse et al.2007）。

A Apparatus



B Sandwell locations

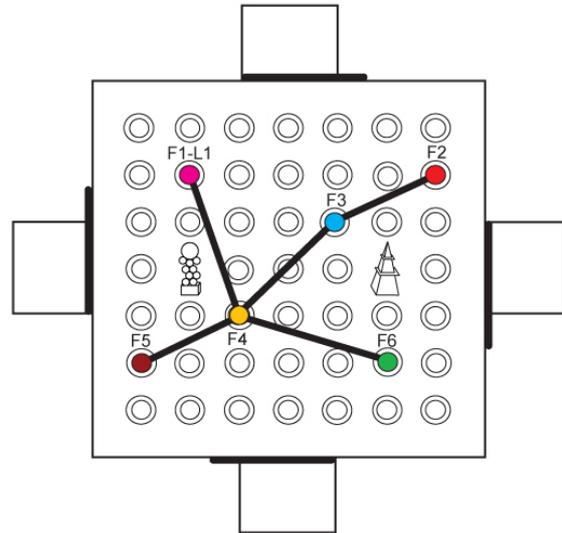


図 1. (A) イベント・アリーナ写真. 1.5 m×1.5m のアリーナとそれぞれの四方にスタート・ボックスを持つ。アリーナ上には、7×7の配置で sand-well がセットできるようになっている。sand-well には報酬となる餌をセットするが、砂に隠されて見た目や匂いでは、報酬のありかはわからない。(B) Flavor Map 配置図. 6 種類の味つきペレットをそれぞれ特定の位置に用いる (F1-L1:チョコレート味 (F は味すなわち Flavor を、L は位置すなわち Location を示す)、及び F2-L2 (図中表記はハイフン以下を省略。以下同) :チェリー味、F3-L3:アニス味、F4-L4:ベーコン味、F5-L5:ココナツ味、F6-L6:ストロベリー味)。試験では、上記6つの sand-well がセットされているが、報酬の入った sand-well はどれか一つだけとなる。ラットはスタート・ボックスで与えられる Flavor Cue (正解と同じ味ペレット) を手がかりに、正解の sand-well を選択しなければならない。

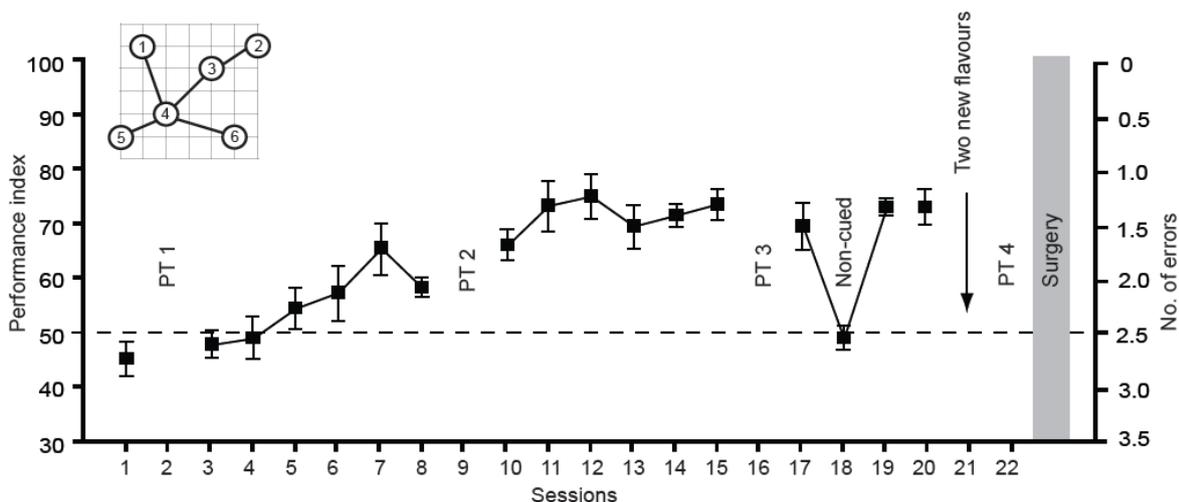


図 2. Flavor Map 法における学習成績 (非曝露動物における)。正答率は日を追う毎に徐々に上昇し、主要トレーニング 8 日目からは有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。18 日目に行った non-cued 試験 (スタートボックスで Flavor Cue を与えない) では、正答率は有意に低くなった。翌日、Flavor Cue を用いた通常の試験を行うと、正答率は高い値に戻った。PT1 から PT4 は検証試験(Probe Trial)の 1 回目から 4 回目をそれぞれ示す (Probe Trial については図 3 参照)。

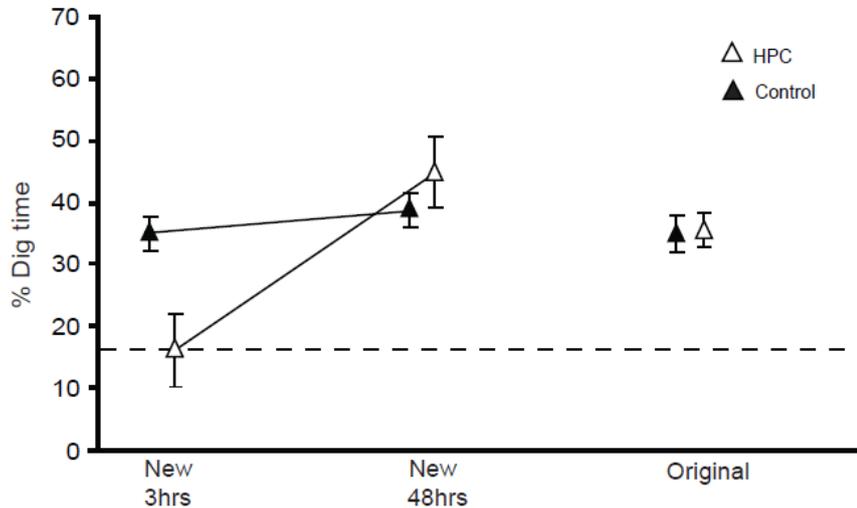


図 3. Flavor Map 対連合記憶形成に対する海馬破壊効果(Probe Trial) (非曝露動物における) . Probe Trial では、Flavor Cue を与えるが、どの sand-well にも報酬ペレットは入っていない。ラットが対連合記憶を形成している場合は、正解 sand-well で報酬を探す時間 (sand-well を掘っている時間=Dig time) が、不正解の sand-well に比して、長くなる。Flavor Map 対連合記憶を形成したラットに対して新規の場所と味のペアを与えた試験を行い、その 3 時間後に海馬破壊を行うと(New 3hrs)、新規のペアの記憶は形成されず、正解 sand-well での Dig Time は非破壊群に比して低いままである。しかし 48 時間後の破壊では(New 48hrs)、対照群と同じく Dig time が長くなる。なおこの時、本来の Flavor Map 配置 (Original) は、海馬破壊動物でも記憶している。

②ダイオキシン単独曝露動物を用いた学習行動試験法の検証

ダイオキシン単独曝露動物を用いた学習行動試験を行い、“Flavor Map”試験法の検証と毒性試験への適用を試みた。仔動物へのダイオキシンの経胎盤・経母乳曝露は、妊娠 15 日目の母ラットに対して、2,3,7,8-TCDD を 0、200、または 800 ng/kg 体重の用量で単回経口投与することにより行った (各曝露群 6 腹、1 腹あたり 1 匹の雄仔動物を行動試験に供した)。

慣化プロトコールにおける、各曝露群のステージ進入時間を表 1 に示す。第 1 日目はすべてのラットが 300~450 秒を要し、有意差が認められなかった (表 1)。しかし 200 ng TCDD/kg 群では、3 日目以降 18 日目まで、Control 群より有意に進入時間遅延が認められた (表 1, $p < 0.05$)。馴化時間の遅延は、学習性不安様行動すなわち鬱的影響を示すと考えることができる。今回用いた曝露量では、一般的な活動量等にはまったく影響が顕れないことが多くの先行研究で確認されていることもあり、ダイオキシン類が鬱的影響を引き起こすかどうかはこれまでまったく検討されていない。ヴェトナム戦争の退役軍人の調査では、血中ダイオキシン類濃度と鬱症状とに相関があることは報告されているが、発達期曝露の影響や動物実験による報告は皆無であり、ダイオキシンの発達神経毒性として今後さらに詳細な研究が必要である。到達時間、ステージ進入時間、トライアル所要時間については、24 日目に群間での差はみられなくなった (表 1)。よって馴化を終了し、対連合学習試験へと移行した。対連合学習の成績は対照群の成績は日を迫うごとに上昇し、対連合学習が成立することを確認した (図

4)。曝露群の成績をみると、800ng/kg 曝露群は対照群と同様に成績が上昇したが、200 ng/kg では成績の上昇がみられなかった(図4)。以上、発達期ダイオキシン曝露により、特に200 ng/kg (妊娠15日目の母動物に単回経口投与) という低用量曝露において、鬱的症状の惹起、ならびに対連合学習機能の障害があることが明らかとなった。学習行動試験における用量特異的な影響は、これまでにオペラント学習試験(レバー押し学習試験)についても、TCDDとPCB126の相当TEQ量曝露で同様の逆U字パターンがあることをわれわれは別途、報告している(Hojo *et al.* 2008)。以上、学習行動試験法としては、Flavor Map試験の毒性試験への適用を達成したと評価できる。

表1. ダイオキシンまたはメチル水銀単独曝露動物におけるスタート・ボックスからテストアリーナに出てくるまでの所要時間

	0	TCDD (ng/kg)		MeHg (ppm)	
		200	800	0.5	5.0
Day 5	9.5±1.74	36.5±5.03*	15.0±3.59	13.3±1.53	11.8±1.48
Day 10	12.0±2.18	30.5±2.85*	14.8±0.73	14.0±2.67	12.3±1.20
Day 15	10.0±3.60	45.3±7.94*	7.3±1.45	8.2±2.42	10.7±2.13
Day 20	3.3±0.93	6.8±2.26	3.8±0.84	5.7±2.41	6.5±1.93

0; vehicle-exposed controls, *indicates $p < 0.05$, v.s. control group (n=6 in each group).

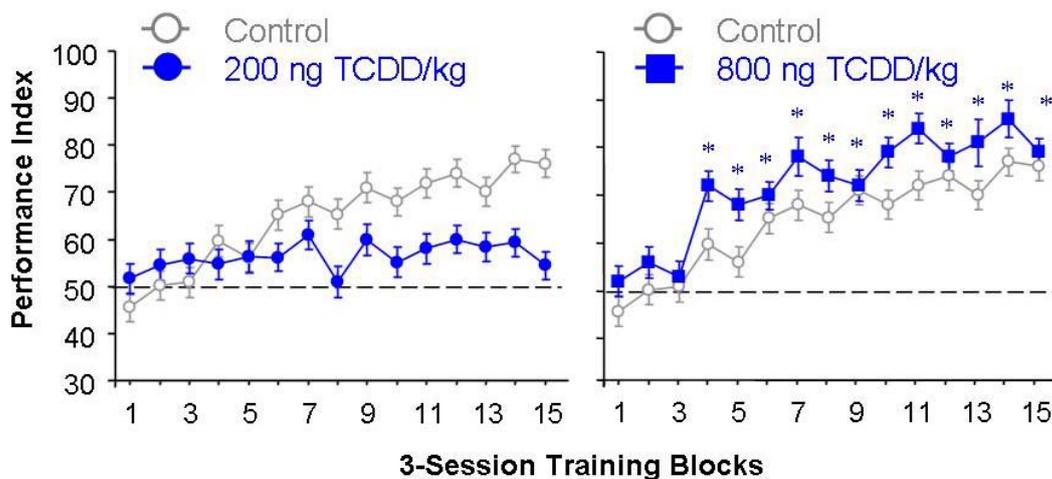


図4.ダイオキシン単独曝露がラット対連合学習機能(Flavor Map試験)に及ぼす影響。図のControlのデータは共通。対照群の学習成績は日を迫うごとに上昇し、最終的に対連合学習が成立したが、200 ng TCDD/kg 曝露群では成立しなかった。800 ng TCDD/kg 曝露群の成績は、対照群よりもむしろ高い傾向を示した。
*, $p < 0.05$, vs Chance level.

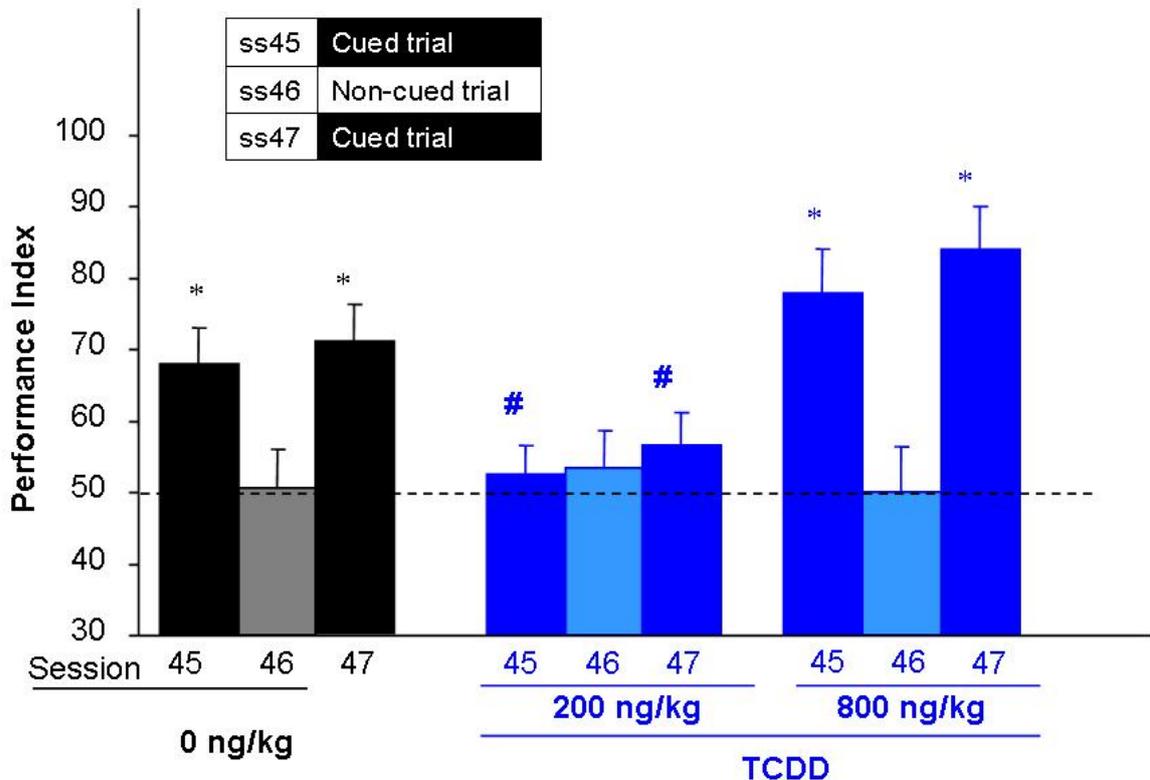


図5.ダイオキシン単独曝露がラット対連合学習機能(Flavor Map試験)に及ぼす影響の検証。46日目 (Session 46) では、Non-Cued trialを行った。すなわちスタート・ボックスで手がかりペレットを与えず試験を行ったところ、すべての実験群で成績が低下した。前日(Session45)と翌日(Session47)は通常通り手がかりペレットを与えた試験であり、対照群と800 ng TCDD/kg曝露群では46日目に比して有意に高い成績を示し、200 ng TCDD/kg曝露群では46日目とかわらなかった。すなわち、対照群と800 ng TCDD/kg曝露群では手がかりペレットを手がかりとして正解に向かうという対連合学習が成立しており、一方200 ng TCDD/kg曝露群では学習が成立していないことが確認された。* $p < 0.05$, above chance value; # $p < 0.05$, lower than control

③学習行動試験法の簡略化

上記のように Flavor Map 試験を確立し、毒性試験への適用も世界ではじめて行うことができた。本研究ではさらに、Flavor Map 試験の簡略化について検討した。従来法ではアリーナ内で6つの場所(正確には、6つの対連合記憶)を学習させている。その数を減らした時の学習成立に要する時間(トライアル数)について調べたところ、5つに減らした場合には問題なく学習が成立するが、4つに減らした場合は学習そのものが成立しないことがわかった(図6)。ごく小数の手がかりよりも、6ないし5つの手がかりをまとめて与えたほうが、場所の違いと味(Flavor)の違いを弁別し、それぞれを対連合するという課題を把握しやすく学習が成立しやすと考えられる。このことは、Flavor Map 試験が「スキーマ」(知識の体系化)を利用した学習であることを裏付ける結果と考えられる(Tse et al., 2007)。すなわち Flavor Map 試験では、個々の対連合記憶(場所と味の対連合)をお互いに比較しながら自己の経験を整理(体系化)することで、Flavor Map をシティ・マップとして習得することができるだろう。故に、既知のマップの中で一部の刺激だけを変更した場合、ラットはわずかに一試行で対応できる、すなわちスキーマを利用して記憶されたマップを書き換えることができる。しかし、すべての手

がかりを変更してしまうと対応できず、新しいマップを学習するには最初と同じ時間を要することとなる。このスキーマは脳の中では大脳新皮質に存在すると考えられ、故に海馬を破壊しても、破壊前のマップには正しく対応できるのである（後述するように、我々は免疫組織化学によりスキーマが大脳皮質嗅内皮質近傍領域にある可能性を見出している）。

試験法の簡略化としては、手がかりを一つ減らすことで労力は従来のもものと比べて約 20%程度下げることができた。わずかではあるが、10 時間/日の試験時間が 8 時間/日となった。また、本行動試験の遂行には専門の助教、ポスドクのほか、医学系研究科大学院生から技術補佐員（文系大卒、バイオ系専門学校卒）まで幅広く参画しており、全員問題なく実験を行うことができた。すなわち、この行動試験は、一定の訓練の後には誰もが安定して行える技術としても確立し、評価手法の一般化が進展したと言えよう。

また複合曝露による相加的・相乗的影響が存在する可能性を考慮すると、対連合学習だけでなく、より単純な学習機能や情動機能についても検証してゆく必要がある。そこで Flavor Map 試験の初期段階において、新規環境における情動行動の評価、単純な空間学習機能の評価として一試行前の正解の場所を記憶できているか（短期記憶）、前日の正解を記憶できているか（長期記憶）も測定する試験プロトコールと解析法を確立した。

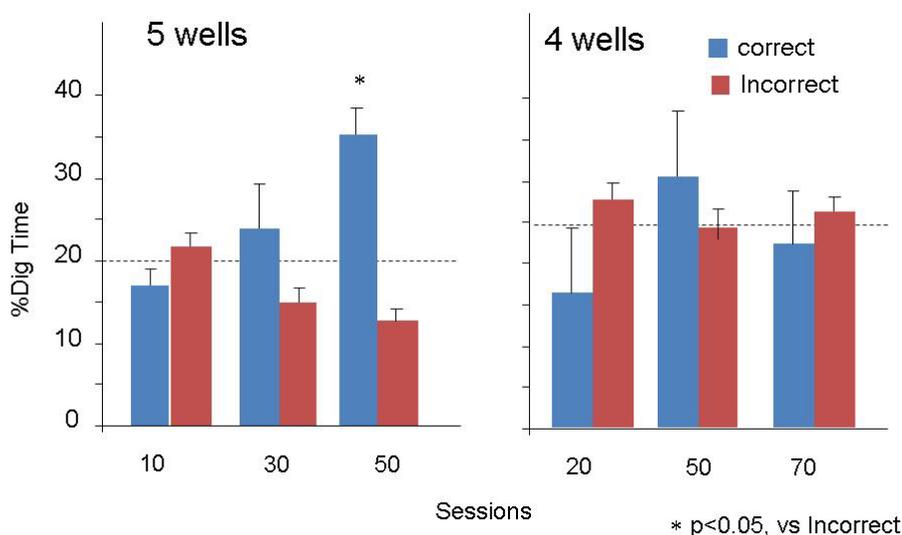


図6. 非曝露動物における Flavor Map 対連合記憶形成における対連合記憶の数（5または4）と学習成績 (Probe Trial). 5つの対連合記憶を用いた試験では、50日目 (Session 50) において正解での Dig Time が有意に上昇し、対連合学習が成立したことがわかる。しかし4つの対連合記憶を用いた試験では、70日目になっても対連合学習が成立しなかった。Probe Trialについては図3を参照。

④毒性発現メカニズム検討のための評価手法の確立

対連合学習機能に関わる神経細胞を同定するため、神経細胞の活性化に伴い発現増強する Arc (activity-regulated cytoskeletal-associated protein) 蛋白の免疫組織化学の実験系を立ち上げた。Arc 蛋白は大脳皮質や海馬などの、特に情報処理や記憶形成維持に重要な働きをしていると考えられている脳内部位で多く発現しており、刺激に対して極めて高い発現誘導性を示す。対連合学習が成立した動物から得た脳を用い、試験 1 時間後の発現について調べたところ、大脳嗅内皮質近傍領域において対連合学習特異的な発現増強があることを見出した (図 7)。ラットにおいて対連合学習に関わる神経細胞を同定したのは、われわれの知る限り世界初である。

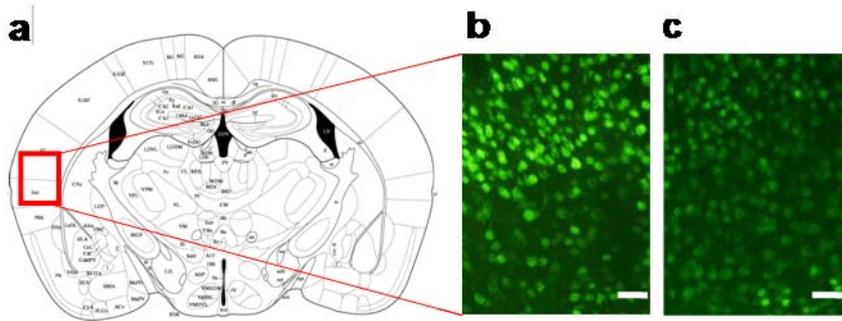


図7. 対連合学習に伴う、大脳嗅内皮質近傍領域近傍領域におけるArc蛋白の発現増強. a;ラット脳の前額断模式図. 赤枠は解析した脳領域を示す. b; 対連合学習が成立しているラットで、試験1時間後. c; 未成立のラット. 対連合学習が成立しているラットでは、Arc蛋白（緑色）の発現が顕著に増えている。スケールバーは100 μ mを示す。

次にわれわれは、本研究において、レーザー・マイクロ・ダイゼクション(LMD)法の実験技術の方法論を飛躍的に発展させた。すなわち、免疫組織染色により同定した細胞群、脳の特定領域のみをLMDにより回収し、遺伝子発現の定量解析を行うことに世界で初めて成功した（図8）。われわれが開発したこの手法は、LMD製造元であるLeica-Microsystems社の推奨プロトコールとして採用され、同社発行のアプリケーション・ノートに資料提供を行った。図9に示すように、神経細胞を染色し脳領域を特定し、特定の細胞集団のみを回収することが可能となった。

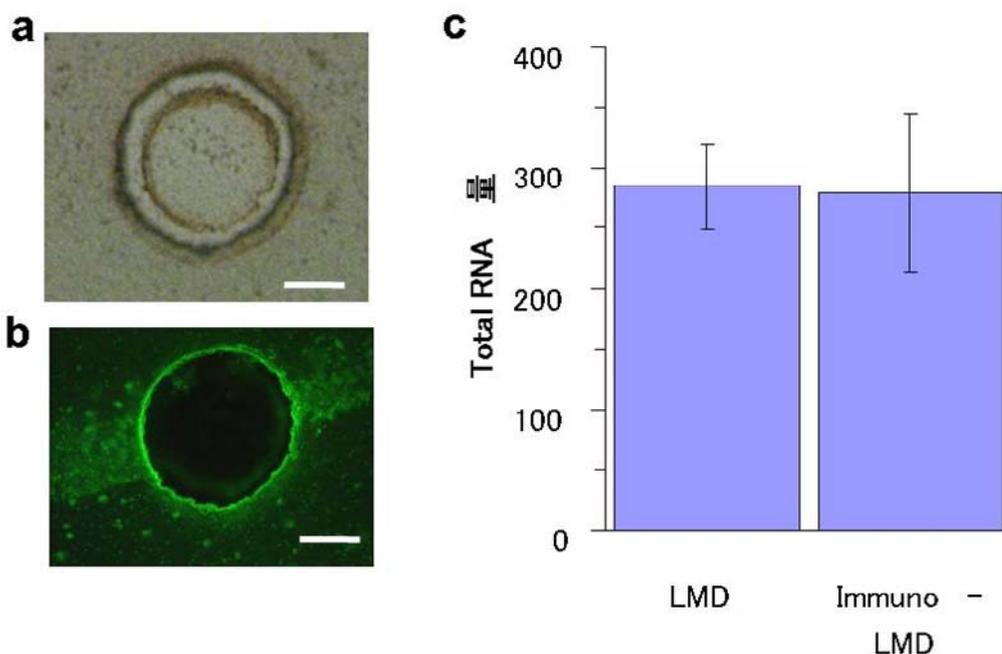


図8. LMD法で回収したサンプルのRNA量. a;新鮮凍結切片からの回収例. 中央の丸部分がLMDで回収された跡. b; 免疫組織染色切片からのLMD回収例. c; 新鮮凍結切片からのサンプル（LMD）と、本研究で開発した免疫染色切片からのサンプル（immuno-LMD）より抽出したRNA量. 免疫組織染色切片のサンプルから、新鮮凍結切片と変わらないレベルでRNAを回収することに成功した。スケールバーは500 μ mを示す。

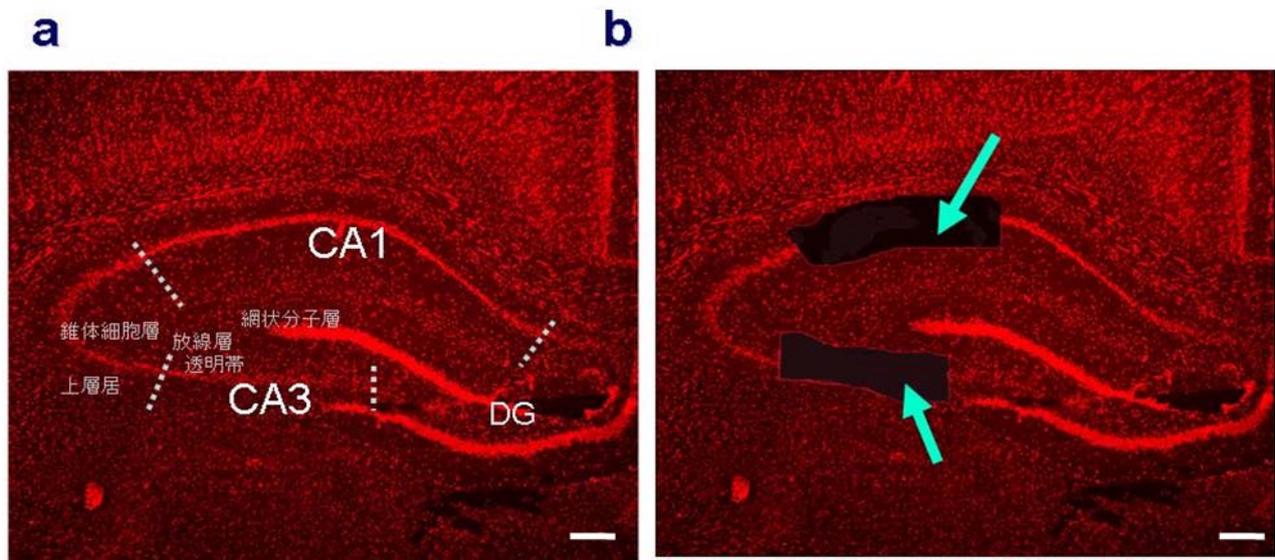


図9. ImmunolMD法の免疫染色像。 a;神経細胞特異的な染色により、海馬領域、さらにその細部の亜領域、細胞層の同定が可能となった。 b ; 海馬錐体細胞層のみを回収した例。矢印部分がLMDにより回収され、組織が抜けている。スケールバーは500 μ mを示す。

⑤複合曝露による量—反応関係を明らかにするための解析手法についての検討

TCDD と MeHg 複合曝露の方法と用量は、それぞれの単独曝露により観察された、我々自身や他の研究者の結果を参考に、次のように設定した。TCDD は、200 ng/kg を妊娠 15 日目に単回経口投与した。MeHg は、0.5 または 5.0 ppm (Hg として) の MeHg を飲み水に混入させ、妊娠 2 週間前から出産まで母動物に投与した(それぞれ、40 または 400 μ g/kg/day 相当)。ちなみに、MeHg に関しては、0.5 ppm 曝露量では明確な神経毒性の報告はなく、5.0 ppm 曝露では、オペラント学習課題(固定比率強化スケジュール(FR)課題)における成績の変化が報告されている (Reed and Newland, 2007, Newland et al., 2008 など)。FR 課題における反応数の上昇が学習成績の上昇を意味するのか、あるいは薬物依存のような精神依存性が亢進されているのか行動毒性学上、結論が出ていないが、何らかの作用を示す用量であることは明確な用量である。

本研究では、TCDD と MeHg の複合曝露によって単独曝露にはない新たな影響が顕われるのか、あるいは単独曝露の影響が変化するのかを検証することを目指した。その結果、第一に、単純な空間学習のパラメータについては(一試行前の正解の場所を記憶できているか、前日の正解の場所を記憶できているか)影響が見られなかったことから、今回用いた MeHg の曝露量では、重篤な学習機能障害はないことが示唆された。

第二に、複合曝露においても TCDD 単独曝露と同じく、対連合学習機能が障害されたことから、少なくとも対連合学習機能に対しては複合曝露において TCDD と MeHg が互いに拮抗する作用はないことが示唆された(図 10)。

第三に、複合曝露により新たに発現した影響として、新規環境における情動機能異常(多動性行動)があることが明らかとなった(図 11-14)。これが複合曝露に起因するまったく新しい影響なのか、単独曝露による影響が変質したものなのかは今後詳細な検討が必要である。また、今回 MeHg 単独曝露では学習機能にも情動機能にも影響は認められなかった(図 15-18)が、複合曝露により多動性行動が見られた。なお、対連合学習試験は予算と時間の制約上行っていない。上記の影響は MeHg 曝露による影響だとしても、学習機能よりもむしろ精神依存性に関わるような情動機能に影響が顕われる可能性を示唆するものとして興味深く、また 0.5 ppm という極めて低用量の MeHg 曝露(ならびに TCDD の複合曝露)により影響が顕れた点で重要な知見である。

第四に、毒性メカニズムの検証のために LMD 法を用いることによって、複合曝露特有の毒性メカニズムが存在することを示唆された。すなわち、TCDD 単独曝露と MeHg 単独曝露では、それぞれ、NR2B と EAAC1 遺伝子の発現量が低下し、複合曝露ではその両者が低下していた(図 19,20)。特に EAAC1 遺伝子の発現量低下は海馬錐体細胞層に限局しており、LMD 法を用いることで初めて明らかにできた。LMD 法を用いた細胞集団を限定した遺伝子発現解析により、単独曝露により変化する分子を同定し、それらが複合曝露によりどう変動するのか、詳細かつ精密な解析を行うことができるものと期待される。

EAAC1 などグルタミン酸トランスポーターの遺伝子欠損マウスは自閉症や躁鬱病様の症状を示すことが近年次々と明らかになっており、精神疾患に深く関わる分子として注目を集めている (Xu et al. 2007 など)。また NR2B 分子も、記憶学習機能に重要なだけでなく、鬱病や統合失調症患者の海馬や大脳皮質において発現量が減少していることが近年明らかとなり注目されている (Beneyto et al. 2007, Woo et al. 2008)。ダイオキシンとメチル水銀複合曝露による影響の解明という観点からは、NR2B と EAAC1 双方の発現低下により引き起こされたかどうかの科学的検証が今後の重要課題といえよう。

以上のように、二つの化学物質の複合曝露により行動レベル並びに分子レベルで単独曝露とは異なる影響があったことは、リスク評価において Margin of exposure (MOE)を検討する際に、単一化学物質のみではなく複数の化学物質の複合要因を考慮せねばならないことを強く示唆する結果だといえる。

特に脳の機能は、それ自体がもともと捉えにくく、正常と異常の境界さえもが曖昧であり、化学物質の影響を評価することが難しい。影響が個体差に埋もれて顕在化しにくいことも容易に想像される。科学的な評価と正しい対策により影響を未然に防ぐことを求められる一方で、化学物質の脳健康リスク評価は、宇宙と並んで人類の最期のフロンティアといわれる脳の完全な科学的解明を待つことはできない。複合曝露影響の評価も同様に、単一物質による影響の解明を待っているのでは済まされない重要かつ緊急の課題と考え、本研究に取り組んできた。そしてその重要性を科学的に示す成果と、今後複合曝露の評価手法を検討してゆく上で礎となりうる知見を出すことができた。また、影響評価技術開発として行った本研究では、行動レベルと分子レベルの試験法について、基礎サイエンスとしての神経科学分野においても最新・最先端と言えるものを提示することができた。複合曝露影響のみならず単一化学物質の影響評価手法として、また脳の科学的解明のための手法として今回開発した手法が有効利用されるよう努めたい。

以上

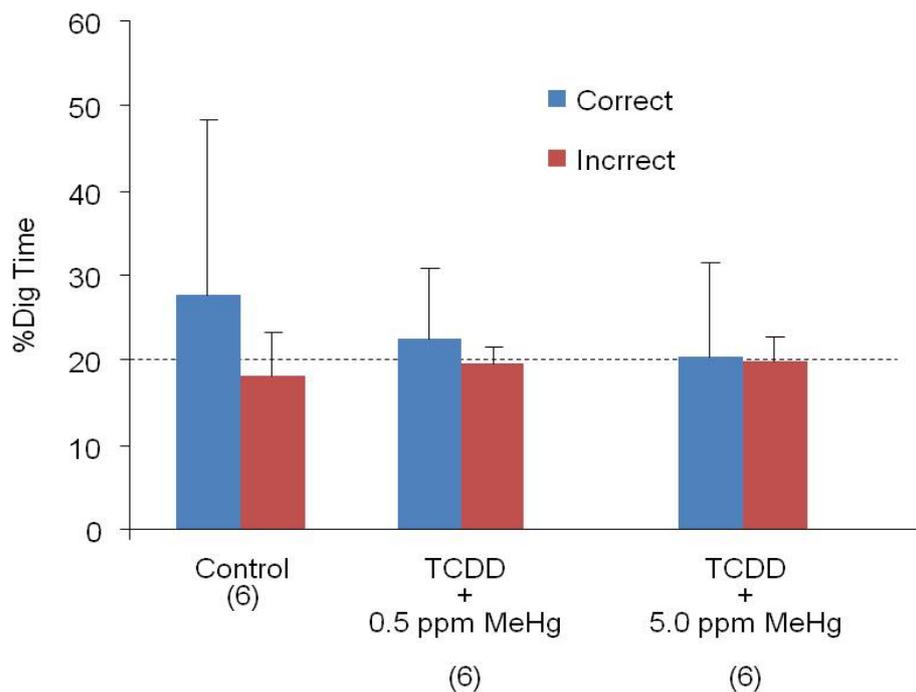


図10. ダイオキシンとメチル水銀複合曝露動物におけるFlavor Map 対連合学習成績 (Probe Trial). Probe Trial については図3を参照。複合曝露群ではダイオキシン単独曝露と同様に対連合学習が成立しなかつた。

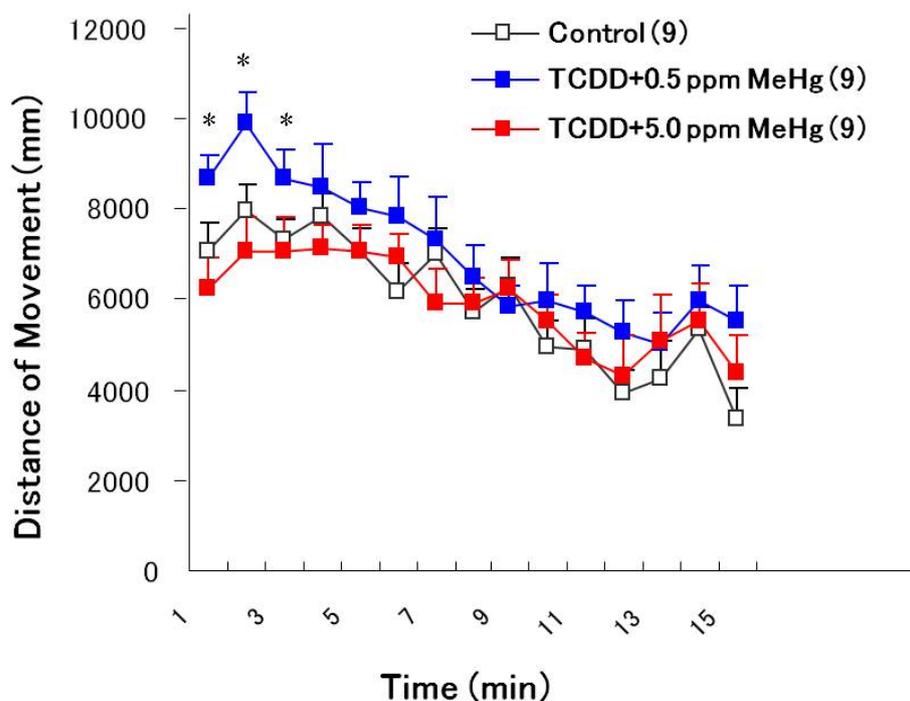


図11. ダイオキシンとメチル水銀複合曝露動物における新規環境における活動性 (オープンフィールド試験における移動距離). TCDD+0.5 ppm MeHg 曝露群において、試験開始直後の移動量が有意に高く、典型的な多動性のパターンを示した。*, p<0.05, vs. Control)

**B03 OpenField
Control**

Rat No.

1	4	7
10	13	16
19	22	25

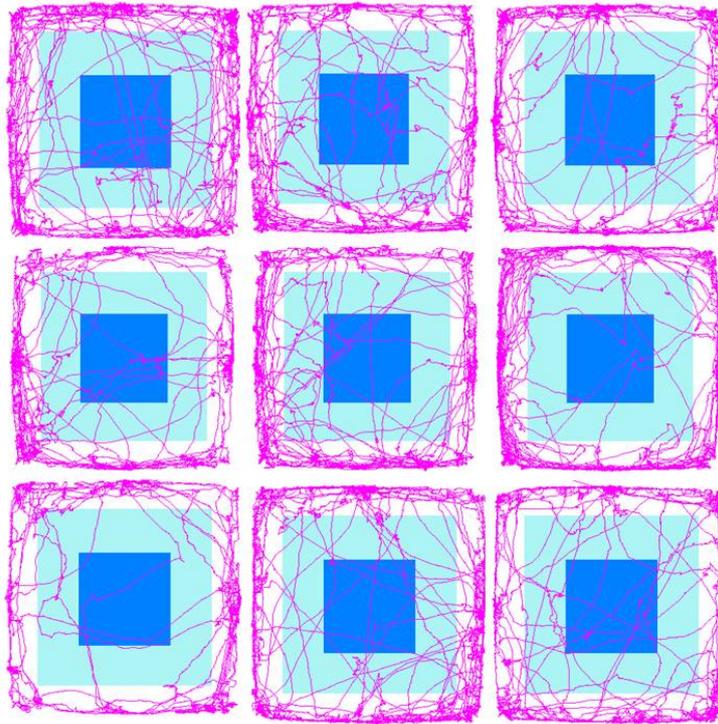


図12. ダイオキシンとメチル水銀複合曝露実験のオープンフィールド試験におけるControl 群の各個体の行動軌跡（9匹）. ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。ラットは壁の傍（図中の薄い青エリア）を歩き回ることが多く、空間に慣れてくるとフィールドの中心部分（濃青のエリア）も横切るようになる。

**B03 OpenField
TC200 +
MeHg 0.5**

Rat No.

2	5	8
11	14	17
20	23	26

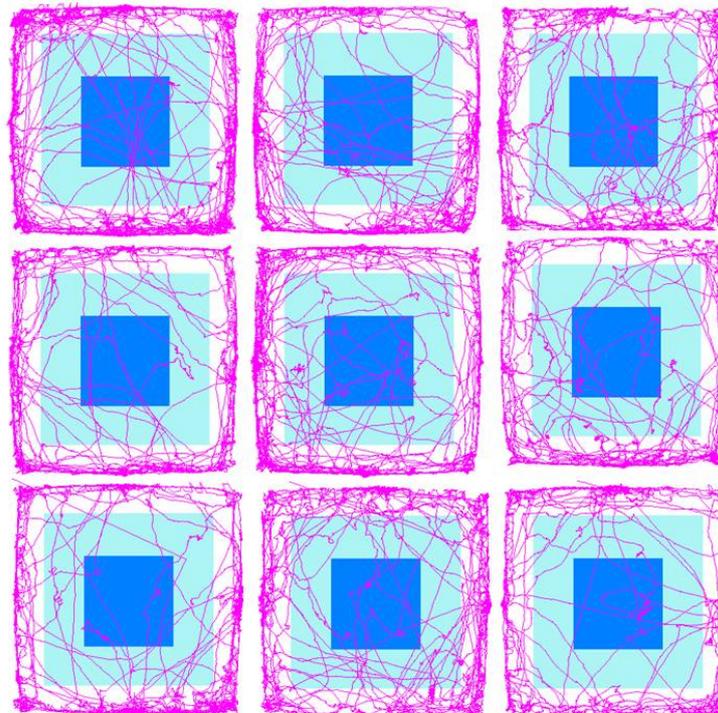


図13. ダイオキシンとメチル水銀複合曝露実験のオープンフィールド試験におけるTCDD+0.5 ppm MeHg 曝露群の各個体の行動軌跡（9匹）. ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。図11にも示したとおり、TCDD+0.5 ppm MeHg 曝露群のラットは移動距離が長いために軌跡が濃くなっている。一方、中心エリアを横切る頻度や滞在時間には変化がなかった。

B03 OpenField

TC200 +

MeHg 5.0

Rat No.

3	6	9
12	15	18
30	24	27

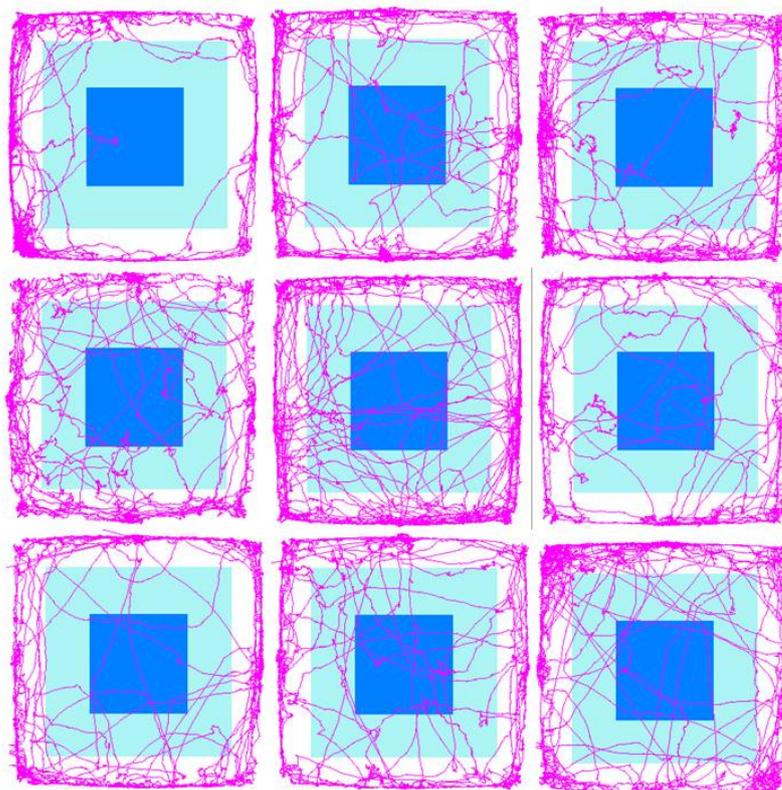


図14. ダイオキシンとメチル水銀複合曝露実験のオープンフィールド試験におけるTCDD+5.0 ppm MeHg 曝露群の各個体の行動軌跡（9匹）。ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。個体差が広がる傾向があるが、全体として対照群との違いはみられなかった。

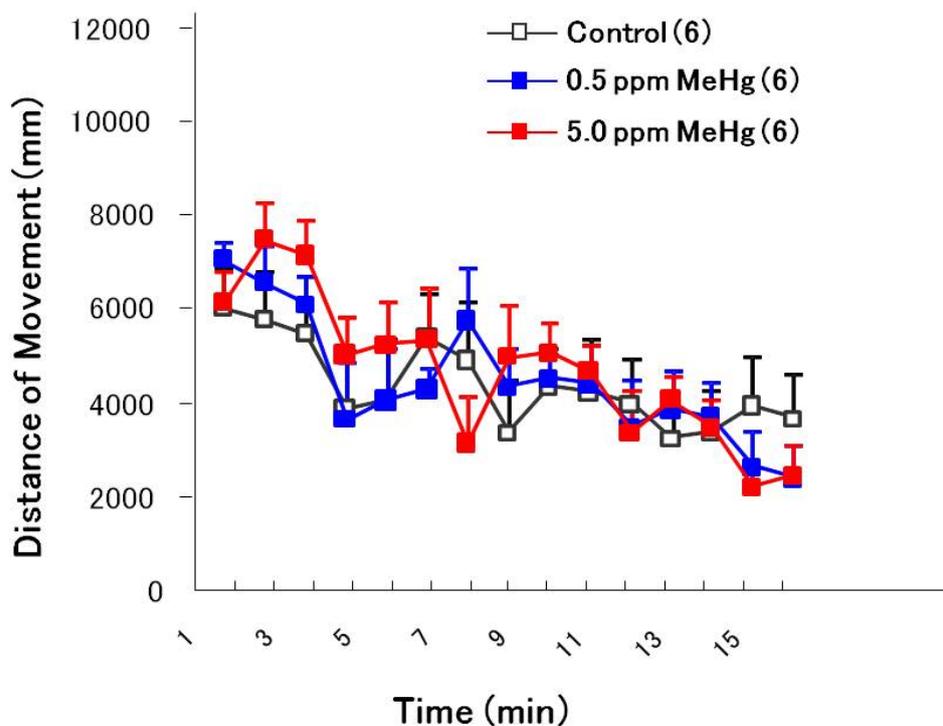


図15.メチル水銀単独曝露動物における新規環境における活動性（オープンフィールド試験における移動距離）。メチル水銀単独曝露の影響はみられず、すなわち多動性行動変化は複合曝露特有の影響であることが示唆された。

B02 OpenField**Control**

Rat No.

1	4	7
10	13	16

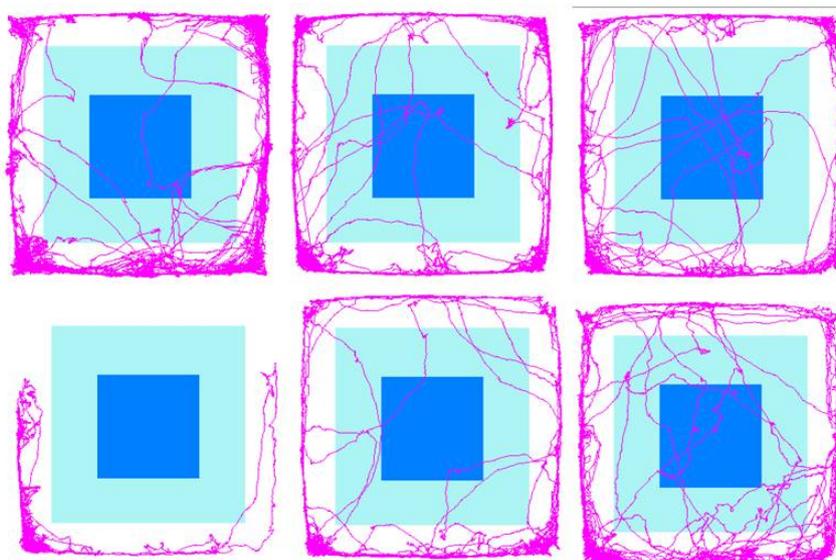


図16.メチル水銀単独曝露実験のオープンフィールド試験におけるControl 群の各個体の行動軌跡(6匹). ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。複合曝露実験の対照群と共通して、ラットは壁の傍(図中の薄い青エリア)を歩き回ることが多く、空間に慣れてくるとフィールドの中心部分(濃青のエリア)も横切るようになる。

B02 OpenField**MeHg 0.5**

Rat No.

2	5	8
11	14	17

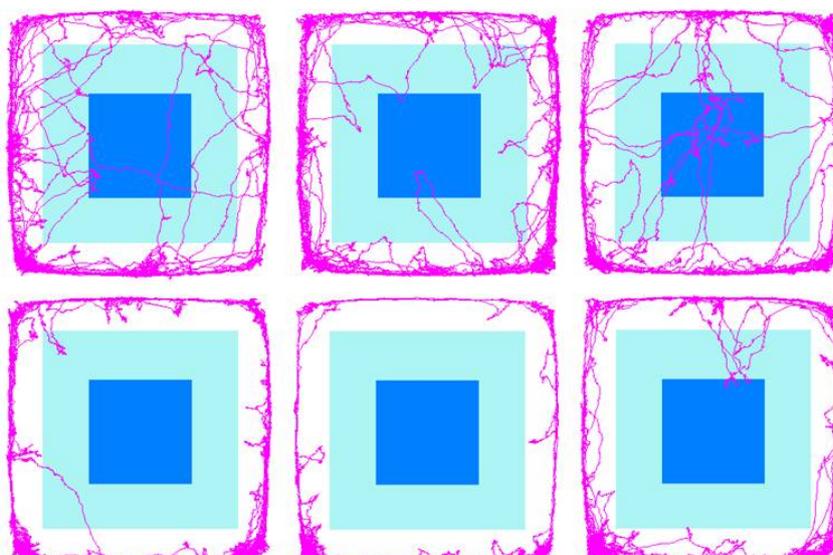


図17.メチル水銀単独曝露実験のオープンフィールド試験における0.5 ppm MeHg 曝露群の各個体の行動軌跡(6匹). ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。対照群との違いはみられなかった。

Rat No.

3	6	9
12	15	18

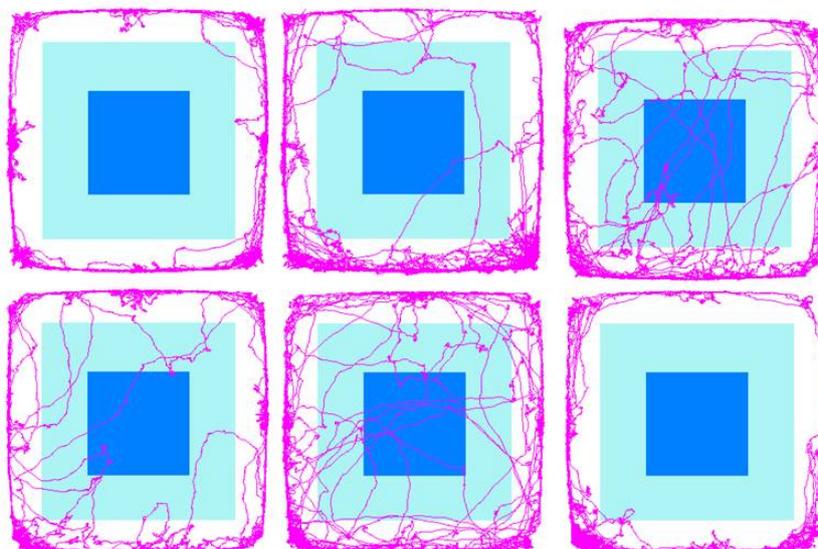


図18.メチル水銀単独曝露実験のオープンフィールド試験における5.0 ppm MeHg 曝露群の各個体の行動軌跡 (6匹). ピンクの実線がそれぞれの移動の軌跡を示す。対照群との違いはみられなかった。

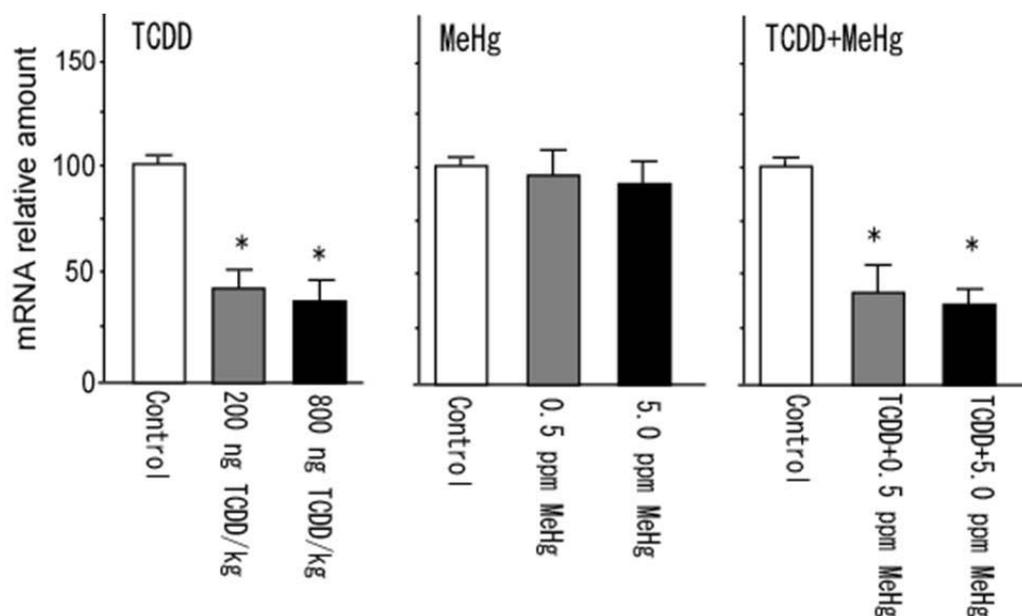


図19. ダイオキシンとメチル水銀の単独または複合曝露が海馬錐体細胞層のNR2B遺伝子の発現に及ぼす影響。TCDD単独曝露によりNR2B mRNAは低下しているが、MeHg単独曝露動物では対照群と変わらない。複合曝露群では、TCDD単独曝露と同様の低下がみられた。*, $p < 0.05$, vs, Control.

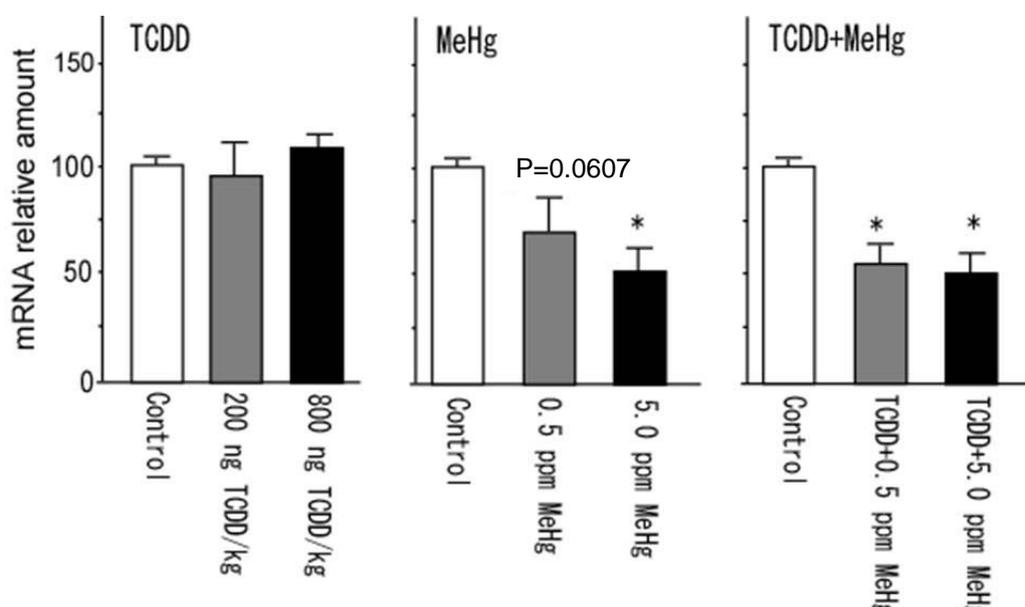


図20. ダイオキシンとメチル水銀の単独または複合曝露が海馬錐体細胞層のEAAC1遺伝子の発現に及ぼす影響。EAAC1 mRNAは、TCDD単独曝露では対照群と違いが見られず、MeHg単独曝露により低下が見られた。複合曝露群では、MeHg単独曝露と同様に低下がみられた。図19のNR2B mRNAの結果と考えると、複合曝露群では、TCDD単独曝露とMeHg単独曝露の双方の影響が重複して顕れることが示唆された。*, $p < 0.05$, vs, Control.

引用文献

- 1) Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood ER, Witter MP, Morris RG. Schemas and memory consolidation. *Science*. 316:76-82, 2007.
- 2) Hojo, R, Kakeyama, M, Kurokawa, Y, Aoki, Y, Yonemoto, J and Tohyama, C. Learning behavior in rat offspring after in utero and lactational exposure to either TCDD or PCB126. *Environ. Health Prevent. Med.*13: 169-180, 2008
- 3) Reed MN, Newland MC. Prenatal methylmercury exposure increases responding under clocked and unclocked fixed interval schedules of reinforcement. *Neurotoxicol Teratol*. 29:492-502, 2007.
- 4) Newland MC, Paletz EM, Reed MN. Methylmercury and nutrition: adult effects of fetal exposure in experimental models. *Neurotoxicology*. 29:783-801, 2008.
- 5) Xu S, Han JC, Morales A, Menzie CM, Williams K, Fan YS. Characterization of 11p14-p12 deletion in WAGR syndrome by array CGH for identifying genes contributing to mental retardation and autism. *Cytogenet Genome Res*. 122:181-187, 2007.

- 6) Beneyto M, Kristiansen LV, Oni-Orisan A, McCullumsmith RE, Meador-Woodruff JH. Abnormal glutamate receptor expression in the medial temporal lobe in schizophrenia and mood disorders. *Neuropsychopharmacology*. 32:1888-1902, 2007
- 7) Woo TU, Kim AM, Viscidi E. Disease-specific alterations in glutamatergic neurotransmission on inhibitory interneurons in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Brain Res*. 7;1218:267-77. 2008.

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト (論文は、添付すること。)

Tse D, Langston RF, Kakeyama M, Bethus I, Spooner PA, Wood E, Morris RGM. Schemas and memory consolidation. *Science*, 316:76-82, 2007.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他 (各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等)

- ・ 日本リスク研究学会 学術賞 (2008年度)
- ・ 日経バイオテク 2007年4月16日号、「対連合学習の能力を迅速に評価できるラット実験法を確立、ヒトが街の地図を覚えるのに類似」(日経バイオテク・オンライン、同「食の機能と安全」にも掲載)。
- ・ 朝日新聞 2007年8月6日朝刊、「今日の予習」欄にて「ダイオキシンと環境ホルモン」
- ・ 国際学会：Kakeyama M, Endo T, Zhang Y, Miyazaki W, Tohyama C. Development of novel behavioral tests for rodents to study the high-order brain function altered by in utero and lactational exposure to dioxins. 28th International Symposium on Halogenated Persistent Organic Pollutants (DIOXIN2008), 2008/08, Birmingham, Oral presentation at Toxicology Session.
- ・ 招待口演：遠山：フォーラム 2008：衛生薬学・環境トキシコロジー (熊本、08.10.18)；平成 20 年度 化学物質の環境リスクに関する国際シンポジウム (第 11 回化学物質の内分泌かく乱作用に関する国際シンポジウム (東京、08.12.15)；第 48 回胎生エピジェネティクス制御研究所会議 (東京、09.02.25)
- ・ 資料提供：アプリケーション・ノート「LMD を用いた蛍光免疫染色切片からの RNA 回収」ライカマイクロシステムズ株式会社

3 今後の問題点等

本研究の最終目的は複合曝露による高次脳機能をエンドポイントとしたリスク評価手法の構築にあり、新たな行動試験法ならびに LMD 法を確立すること、またダイオキシンとメチル水銀の複合曝露影響の新たな知見を得ることができた。一方、その過程で得た知見について、複合曝露影響の評価に直接結びつきにくいものは、本研究計画内での解析を断念せざるを得なかった。

今後新たな研究として、それら(後述)の知見について解析することで個々の化学物質の毒性を明らかにすると同時に影響評価手法の一層の発展を進めてゆく必要があるだろう。

第一に、ダイオキシン単独曝露の 200 ng/kg 曝露において対連合学習機能がほぼ完全に消失し、これよりも低用量と高用量では影響が出ないという非線形パターンを示す影響の科学的検証である。対連合学習に関わる神経細胞の同定とその細胞群の遺伝子発現解析、それらに対する曝露影響を解析していくことで、その理由が明らかになるかもしれない。第二に、MeHg 低用量曝露影響としては、学習機能よりも情動機能に顕れる可能性が示唆された。単独曝露の影響としてさらに詳細に検討すること、そして今回複合曝露により変動した EAAC1 と NR2B 遺伝子との関係等について解析を進めてゆく必要があるだろう。