

平成 23 年度環境省委託業務報告書

平成 23 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)

平成 24 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社



はじめに

本報告書は、環境省 総合環境政策局 環境保健部委託業務「平成 23 年度水俣病に関する総合的研究委託業務」の結果を取りまとめたものである。

平成 24 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社



# 平成 23 年度 水俣病に関する総合的研究

## 目 次

1	業務の背景及び目的	1
2	業務の実施内容	1
2.1	研究班の設置	1
2.2	「重金属等による健康影響に関する総合的研究」評価委員会及び推進 委員会の設置	2
2.3	新規研究に関する公募の事務	3
2.4	「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」の開催	3
2.5	「重金属等による健康影響に関する総合研究総会」	4
2.5.1	「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の 開催	4
2.5.2	環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀 研究ミーティングの開催	4
2.6	推進・評価合同委員会の開催	4
2.7	研究計画書の作成の依頼	5
2.8	推進委員会の開催	5
2.9	研究報告書の作成	5
2.10	研究成果還元業務の実施	5
3	各研究班の報告	6
	○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域(社会的課題に関する研究)	7
	.....	7
I	神経症状・感覚器障害に関する研究	9
	研究項目：高齢者の二点識別覚に関する研究	11
	中村 昭範（国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部脳機能再生研 究室 室長）	
II	メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究	25
	研究項目：メチル水銀曝露による健康障害に関する国際的レビューに関する 研究	27
	村田 勝敬（秋田大学医学部社会環境医学講座環境保健学分野 教授）	
	○メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する研究領域（水俣病 に関する基盤的研究）	51
III	メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究	53

研究項目：メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究 .....	55
永沼 章（東北大学大学院薬学部研究科生体防御薬学分野 教授）	
IV 水俣病の病態生理と治療に関する研究 .....	63
研究項目：低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究 .....	65
小泉 修一（山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学 教授）	
V  メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究 .....	75
研究項目：メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究 .....	77
西澤 正豊（新潟大学脳研究所・神経内科学分野 教授）	

#### 参考資料

「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング 講演要旨集 .....	81
--	----

## 1 業務の背景及び目的

水俣病については公害健康被害の補償等に関する法律第2条の規定に基づく指定疾病であり、疾病の認定は地方自治体の認定審査会において、法定受託事務で行われているほか、平成21年7月に「水俣病被害者の救済及び水俣病問題の解決に関する特別措置法」（平成21年法律第81号。以下「特措法」という。）が成立した。同法第37条には、指定地域及びその周辺の地域に居住していた者の健康に係る調査研究等を積極的かつ速やかに行い、その結果を公表することとされている。

水俣病は、昭和31年の公式確認後50年余りが経過した今なお、水俣病の認定患者の症候の推移や地域住民の健康問題等についての課題が残されている。また、水俣病に関する科学的知見を集積することは行政事務を円滑に進めていくためにも必要であり、これらは、社会的課題に関する研究というべきものである。

水俣病の発生機序やメチル水銀毒性等も完全に解明されたわけではなく、これらについての研究を水俣病に関する基盤的研究と位置付け、メチル水銀による神経毒性の発現機構の解明及び急性メチル水銀中毒の治療方法の開発、環境汚染への対策方法を開発することが望まれる。

本業務は、このような状況を踏まえ、水俣病について「社会的課題に関する研究」及び「水俣病に関する基盤的研究」の両分野における基盤的研究及び応用的研究を行うことを目的とする。

## 2 業務の実施内容

### 2.1 研究班の設置

本業務は、研究内容に応じて4つの個別の研究班を設置し、調査研究を進めた。研究は、「水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域」（社会的課題に関する研究）、「メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する研究領域」（水俣病に関する基盤的研究）の2つの領域において、以下のⅠ～Ⅳの研究班を組織し、個々の研究ごとに研究項目を設定して実施した。

なお、すべての研究班に係る研究の実施にあたっては、「平成23年度水俣病に関する総合的研究委託業務仕様書」の仕様書別紙「再委任等に関する内容」により再委任した。

研究に関する経費については、受託者と研究班の間で事務委任契約を締結し、その契約内容に基づいて、「再委任等に関する内容」において定められた金額の範囲内において、研究班の請求に応じて概算払いを行った。

○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域  
（社会的課題に関する研究）

#### Ⅰ 神経症状・感覚器障害に関する研究

研究項目：高齢者の二点識別覚に関する研究

主任研究者：中村 昭範（国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部脳機能再生研究室 室長）

## II メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究

研究項目：メチル水銀による健康障害に関する国際的レビュー

主任研究者：村田 勝敬（秋田大学医学部社会環境医学講座環境保健学分野 教授）

○メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する研究領域  
（水俣病に関する基盤的研究）

## III メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究

研究項目：メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究

主任研究者：永沼 章（東北大学大学院薬学部研究科生体防御薬学分野 教授）

## IV 水俣病の病態生理と治療に関する研究

研究項目：低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究

主任研究者：小泉 修一（山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学 教授）

## 2.2 「重金属等による健康影響に関する総合的研究」評価委員会及び推進委員会の設置

調査研究を進めるに当たって、本研究と、環境省からの委託業務である「イタイイタイ病及び慢性カドミウム中毒に関する総合的研究」の2つの研究（あわせて「重金属等による健康影響に関する総合的研究」）について、以下の委員会を設置した。

### ①評価委員会の設置

第三者（委託者、主任研究者又は研究者以外の有識者）10名で構成される評価委員会を設置した。なお、評価委員会委員の構成は以下の通りである。

委員	所属・役職
衛藤 光明	医療法人信和会 介護老人保健施設 樹心台 施設長
遠藤 仁	杏林大学 名誉教授（北里大学医学部客員教授）
小椋 陽介	昭和大学医学部 客員教授
北川 正信	重症心身障害児（者）施設 あゆみの郷 施設長
○櫻井 治彦	中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター 技術顧問
中村 好一	自治医科大学 保健科学 教授
濱田 陸三	独立行政法人国立病院機構 鹿児島医療センター脳血管内科 部長
林 泰史	東京都リハビリテーション病院 院長

委員	所属・役職
二塚 信	九州看護福祉大学 学長
渡辺 知保	東京大学大学院 医学系研究科 教授

○：委員長

## ②推進委員会の設置

第三者（委託者、主任研究者または研究者以外の有識者）7名で構成される推進委員会を設置した。なお、推進委員会委員の構成は以下の通りである。

委員	所属・役職
赤木 洋勝	有限会社国際水銀ラボ 取締役所長
石本 二見男	介護老人保健施設ミレニアムマッシーランド 施設長
井村 伸正	財団法人日本薬剤師研修センター 会長
佐藤 洋	独立行政法人国立環境研究所 理事
○鈴木 庄亮	国際エコヘルス研究会 理事長・群馬大学名誉教授
遠山 千春	東京大学大学院 医学系研究科附属疾患生命工学センター 健康・環境医工学部門 教授
中川 正法	京都府立医科大学大学院 教授

○：委員長

## 2.3 新規研究に関する公募の事務

平成22年度に実施された推進委員会において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、新規研究に関する公募の事務を行った。公募時に提出された申請書を受け取り、記載事項を確認するとともに、必要に応じて申請者に修正を依頼した。

## 2.4 「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」の開催

平成23年8月12日に環境省共用第9会議室にて、「推進委員会」を「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。推進委員は、2.3で公募された研究課題について、今年度新規で実施される研究班を1班採択した。なお、採択された研究に関する経費については、受託者と研究班の間で事務委任契約を締結し、その契約内容に基づいて、研究班の請求に応じて概算払いを行った。出席した評価委員会委員及び推進委員会委員は以下の通りである。

<推進委員会への出席委員>

推進委員：石本二見男、佐藤洋、鈴木庄亮、遠山千春、中川正法（敬称略、五十音順）

## V メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究

研究項目：メチル水銀の曝露による健康障害の治療方法に関する研究

主任研究者：西澤 正豊（新潟大学脳研究所・神経内科学分野 教授）

### 2.5 「重金属等による健康影響に関する総合研究総会」

#### 2.5.1 「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の開催

平成 23 年 12 月 20 日に LMJ 東京研修センターにて、「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」を「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。研究発表会では、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班の主任研究者等が前年度及び年度途中までの研究成果を発表した。評価委員会委員及び推進委員会委員はこの発表に参加するとともに、評価委員会委員は各研究成果を評価した。出席した評価委員会委員及び推進委員会委員は以下の通りである。

<研究発表会への出席委員>

評価委員：衛藤光明、遠藤仁、小椋陽介、北川正信、櫻井治彦、中村好一、濱田陸三、  
林泰史、二塚信、渡辺知保（敬称略、五十音順）

推進委員：石本二見男、井村伸正、佐藤洋、鈴木庄亮、遠山千春（敬称略、五十音順）

#### 2.5.2 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティングの開催

平成 23 年 12 月 20 日、21 日に LMJ 東京研修センターにて、2.5.1 「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」に併せて、「環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング」を開催した。毒物学や疫学、神経内科学等の分野の研究者を招き、重金属等による健康影響に関する研究状況を演題発表ないしポスターの形で共有した。またそれらの成果を各主任研究者等が次年度の研究計画へ反映させた。「環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング」のプログラム及び講演要旨集は参考資料の通りである。

### 2.6 推進・評価合同委員会の開催

平成 23 年 12 月 20 日に LMJ 東京研修センターにて、推進・評価合同委員会を「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。研究発表会における「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班の発表内容を受けて、個々の研究班の研究成果についての評価を評価委員会から推進・評価合同委員会に報告した。推進・評価合同委員会の出席者は以下の通りである。

<推進・評価合同委員会への出席委員>

評価委員：衛藤光明、遠藤仁、小椋陽介、北川正信、櫻井治彦（委員長）、濱田陸三、林泰史、二塚信、渡辺知保（敬称略、五十音順）

推進委員：石本二見男、井村伸正、佐藤洋、遠山千春（敬称略、五十音順）

## 2.7 研究計画書の作成の依頼

推進・評価合同委員会において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、各研究班及び推進・評価合同委員会から指示のあった研究者に、平成 23 年度の研究計画書の作成を依頼した。

## 2.8 推進委員会の開催

平成 24 年 2 月 24 日、日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して推進委員会を開催し、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班から提出された平成 24 年度の研究計画書について評価を行った。また、全ての研究班に対し研究計画書の提出を求め、すべての研究班から回収した研究計画書を受け、「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して推進委員会を開催した。推進委員会の出席者は以下の通りである。

<推進委員会への出席委員>

推進委員：赤木洋勝、石本二見男、井村伸正、佐藤洋、鈴木庄亮、遠山千春、中川正法（敬称略、五十音順）

## 2.9 研究報告書の作成

推進・評価合同委員会の意見を受け、各研究班に対して研究報告書の作成と電子媒体による提出を求め、すべての研究班から研究報告書（英文サマリーを含む）を受取った。

## 2.10 研究成果還元業務の実施

環境省が定めた事務連絡「研究成果還元業務について」に基づいて、2.1 で設置した研究班が本研究で得られた成果を学会発表や論文掲載を実施する場合、その経費（宿泊費、交通費、学会参加費、論文掲載料、英文翻訳料等を想定）について研究班の申請に応じて、環境省担当官と協議の上、1 研究につき 200,000 円を上限として支払うこととした。

本年度は、2.1 で設置した小泉班より、平成 23 年 3 月 14 日～16 日に開催予定の第 85 回日本薬理学会年會において本研究で得られた成果を発表するため、宿泊費、交通費、学会参加費、発表要旨掲載料について研究成果還元業務申請があった。

また、村田班より、日本衛生学雑誌へ本研究で得られた成果を発表するため、論文投稿料について研究成果還元業務申請があった。

### **3 各研究班の報告**

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域

(社会的課題に関する研究)



## I 神経症状・感覚器障害に関する研究



## 高齢者の二点識別覚に関する研究

中村昭範（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 脳機能診断研究室長）

### [研究要旨]

我々はこれまでの研究で、まず「二点識別覚自動検査システム（自動二点識別覚検査装置、検査プロトコル、及びデータ分析法）」を開発し、科学的に信頼のおける方法で二点識別覚検査が行える土台を固めた上で、20～80才までの健常成人210名を対象に、示指先端、下口唇、及び舌尖で二点識別覚検査を行って正常データベースを構築し、各年齢層の正常範囲や、二点識別覚に加齢が与える影響を明らかにしてきた。今年度は、これらの研究成果と脳機能画像による客観的評価をカップリングさせることを目的にして研究を進めている。まず、二点識別覚自動検査システムによる刺激と同等の刺激を皮膚に与えることができ、脳磁図測定にも対応した二点識別刺激装置と、それを正確にコントロールすることが可能なソフトウェアを開発して、その性能や精度や検証しながら、実用レベルにまで高めた。次に、それを実際の脳磁図測定に応用し、6人の健康成人を対象に触覚 Oddball 刺激に対する体性感覚誘発脳磁場を測定を行った結果、1点/2点刺激を脳が自動的に弁別するプロセスを反映していると考えられる誘発反応が得られた。更に、この誘発反応は2点間距離によって大きさが変化し、二点識別覚自動検査システムによって得られた二点識別覚の関連閾値とよく一致した。これらの結果から、脳磁図を用いて客観的に二点識別覚閾値の推定ができる可能性が示され、また昨年度までの研究成果をこういった脳機能画像検査に有効にカップリングしていくことができることが明らかとなった。

### [分担研究者]

根本 哲也（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 診療関連機器開発研究室長）

松浦 弘幸（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部長）

### [研究協力者]

加藤 公子（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

久保田 怜（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 研究員）

野田 信雄（栄商金属株式会社）

岩田 香織（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

牛鼻 健二（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

## I. 研究目的

人は皮膚で物体に触れることにより、その詳細な立体的形状、重さや温度、表面の質感といった、視覚だけでは得ることが困難な情報を繊細に捉えて対象物を認知することができるが、これは皮膚に分布する触圧覚や温痛覚関連の多くの末梢受容体からの情報が中枢で統合処理されることによってなされており、二点識別覚はこの統合皮膚感覚の空間分解能の指標となる基本的な認知能力のひとつである。この二点識別覚は、メチル水銀中毒で低下することが知られているため、メチル水銀中毒のバイオマーカーのひとつとして利用することが期待されているが、現在のところ二点識別覚の閾値からその病的意義の程度を類推することは困難である。それは、二点識別覚閾値の正常値の範囲といったものが信頼できるレベルで確立されておらず、加齢の影響も明確にされていないこと等に起因する。従って本研究の目的は、高齢者の二点識別覚の正常値の範囲やその特徴を、可能な限り科学的に妥当な方法で、高い信頼性をもって明らかにしていくことである。

これまでの研究で我々は、まず、従来の二点識別覚検査法の問題点（刺激の物理的パラメーターの客観的制御が困難でプローブの当て方によって閾値が変わりうる、そもそも測定プロトコルや閾値分析法自体が曖昧でその定義によっても閾値が変わりうる）を克服するような「二点識別覚自動検査システム」を開発した。これは、a)刺激の物理的パラメータを客観的に制御できる自動二点識別覚検査装置、b)人の二点識別覚の認知特性にかなった検査プロトコル、及び、c)客観的なデータ分析法、を統合して、科学的に信頼のおける二点識別覚検査を可能にするシステムである。次に実際にこのシステムを利用して、20～80才までの健常成人210名を対象に、示指先端、下口唇、及び舌尖で二点識別覚検査を行って正常データベースを構築し、各年齢層の正常範囲や、二点識別覚に加齢が与える影響を明らかにしてきた。

これらの研究成果を土台にして更に発展させていく目的で、今年度は主に、脳機能画像の立場から客観的な二点識別覚測定に関する研究・開発に取り組んでいる。

これまでに我々が開発した二点識別覚自動検査システムは、科学的で信頼性の高い測定を可能にしたが、あくまで被験者本人の主観的感覚に基づくボタン押しフィードバックをデータ計測の拠り所としているため、客観性にはやや難点が残る（全ての感覚検査はそういうものではあるが、）。この難点を克服し、本人の主観的フィードバックを一切必要とせず、感覚弁別機能を客観的に評価できる方法として、電気生理学的脳機能計測によって得られるミスマッチ反応（MMR）を利用できる可能性がある。MMRはNäätänen [1] によって発見された脳の誘発反応であり、Oddball課題のように二種類の異なる刺激をそれぞれ高頻度（standard）、及び低頻度（deviant）で呈示して脳波や脳磁図を記録した場合、Primary responseよりもやや遅い潜時で低頻度刺激は高頻度刺激よりも大きな反応を誘発し、両者に対する反応の差をMMRと呼ぶ（脳波の場合はMismatch Negativity: MMN、脳磁図の場合はMismatch Field: MMFとも言う）。MMRは、刺激に注意を向けずに無視した状態でも誘発されるため、一次感覚野近傍に短期間貯蔵された記憶痕跡のテンプレートと、新たな異なる入力を自動的に照合している過程を反映する反応と考えられている。従って、MMRを分析することにより、二種類の異なる感覚刺激に対する前注意段階の自動的弁別過程を客観的に評価することができると期待される。MMRは当初聴覚刺激に対する反応として発見されたが、柿木班の研究では、これを体性感覚刺激に応用し、脳磁図による体性感覚のMMR計測が、二点識別覚の客観的検査法として利用できる可能性を明らかにした [2]。この柿木班の優れた研究成果と我々のこれまでの研究成果をカップリングさせることは非常に意義深いと思われるが、残念なが

ら現状では以下のような多くの問題があり、実現困難である。

1) 刺激方法の違い：柿木班の研究では刺激に電気刺激を用いており、これは皮膚の神経終末を直接電氣的に刺激するものである。一方、我々の方法は、本来の二点識別覚検査と同等の機械的触覚刺激であり、皮膚のメカノレセプターを刺激するものである。刺激部位も、我々が示指手掌側先端部を刺激しているのに対し、柿木班では手背部を刺激している。これらの理由から、両者の脳内の認知プロセスが同じであるという保証もない。

2) データの非互換性：上記の理由から、二点識別覚の閾値も全く異なる。我々の研究では 20 才台の二点弁別閾値（明らかに二点とわかる閾値）は、平均  $2.0 \pm 0.9$  mm であったが、柿木班の方法では平均  $30 \pm 4$  mm と、10 倍以上の開きがある。従って我々がこれまでに蓄積した正常値のデータベースが全く利用できない。

3) 刺激部位や応用性の問題：電気刺激では湿気によるリーク電流のため、舌や口唇刺激がほぼ不可能であり、また、検診のような場での大人数に対する測定にも適していない。

これらの問題を克服するために、二点識別覚自動測定システムと同等の刺激を与えながら脳磁図を測定できる刺激装置及び、それをコントロールするためのソフトウェアを開発し、様々な検証を経た上で実際に健常成人を対象に脳磁場計測を行った。

## II. 研究方法

### 1) 脳磁図対応二点識別覚刺激装置、及びコントロールソフトウェアの開発

前年度試作した刺激装置の基本部分を元に、実際の測定応用に関わる諸問題（刺激タイミングの正確性、超微弱磁場ノイズ等）を検証しながら改良を重ねた。更に、触覚の Oddball 刺激を可能にし、刺激の種類やタイミングを正確にコントロールできるようなソフトウェアの開発も行った。

### 2) 健常成人を対象にした脳磁場計測

健常成人 6 人（30-40 才台）を対象に、開発した 2 点識別覚刺激装置を用いて体性感覚誘発脳磁場を計測した。個々の触覚刺激は被験者の右示指先端で行い、プローブが皮膚に対して約 1.5 mm、200 ms 押出し、その後 400~600 ms の間でランダムに設定された時間は皮膚から離れて元に戻る設定にした。課題は 1 点刺激（standard 刺激：80%）と 2 点刺激（deviant 刺激：20%）をランダムに与える触覚 Oddball 課題で、二点間距離を、2mm ~ 6mm の間で変化させて、それぞれの 2 点間距離に対する誘発脳磁場を別々のセッションで 2~4 回測定した。脳磁計は、Elekta 社製 Neuromag (306 ch system) を用い、1kHz のサンプリングレートで連続データ収集を行い、アーチファクトを除去した後、1 点刺激（standard 刺激）と 2 点刺激（deviant 刺激）に対するエポックを個別に加算平均した（deviant 刺激に対する加算回数が 120 回以上になるようにデータ収集を行った）後、1 - 50 Hz のオフラインフィルタ処理を行った。MMR は deviant 刺激に対する誘発反応から、standard 刺激に対する誘発反応を差し引くことによって求めた。これらの得られた波形は ASA (ANT software) を用いて分析した。また、被験者は脳磁計測とは別の日に右示指先端において二点識別覚自動検査システムを用いた二点識別覚閾値測定も行い、脳磁図のデータと照合した。

### <倫理面への配慮>

本研究は、厚生労働省の「臨床研究に関する倫理指針」を遵守して計画され、国立長寿医療研究センター倫理委員会の正式承認の元に行われた。研究協力の被験者は、知的機能が正常で、本研究グループと利害関係及びパワー関係がなく、本人の自由意思によって参加意思の決定ができる健常成人から選択し、インフォームドコンセントのもとに書面による同意が得られた者のみに行われた。

### III. 研究結果及び考察

#### 1) 脳磁図対応二点識別覚刺激装置、及びコントロールソフトウェアの開発

二点識別覚刺激装置の概観は昨年の試作段階とほぼ同様である（図1）。磁場を乱すようなモーター類は一切使えないため、刺激プローブ部分は Air tube を介してポンプから送られる空気によって駆動される。刺激生成本体は USB を介して PC に接続し、PC から二点・一点刺激をコントロールする。プローブの駆動と同時に側面の BNC から TTL シグナルが出され、脳磁計にトリガーシグナルとして送ることができる。



図1：二点識別覚刺激装置の概観

刺激プローブ部は、二点識別覚自動検査システムと同じ形状にすることにより皮膚のメカノレセプターに同等の刺激を与えることができ、ait tube を介して送られたきた air puff によって稼動する (図2)。この部分は全て非磁性体で設計されており、当初のオンラインモニター上では、超高感度の脳磁計でも駆動によるノイズが混入しないと思われた。しかし、刺激を 100 回程度連続して脳磁シグナルを加算平均したところ、脳磁図センサーが本来持っている内部ノイズに隠れていた刺激装置由来のノイズが僅かながら存在することが明らかとなった。そこで、各部品を詳細に検討し直したところ、ネジ (図2:下) のメッキに僅かながら磁性成分が混入していることが判明したので、プラスチックネジに変更することによって、刺激装置由来のノイズは完全に除去された。また、トリガーシグナルと実際のプローブ駆動タイミングも計測したところ、刺激トリガー後、約 70 ms 後に皮膚に接触し、jittering も SD 1 ms 以下の正確なタイミングでできることも確認された (図3)。

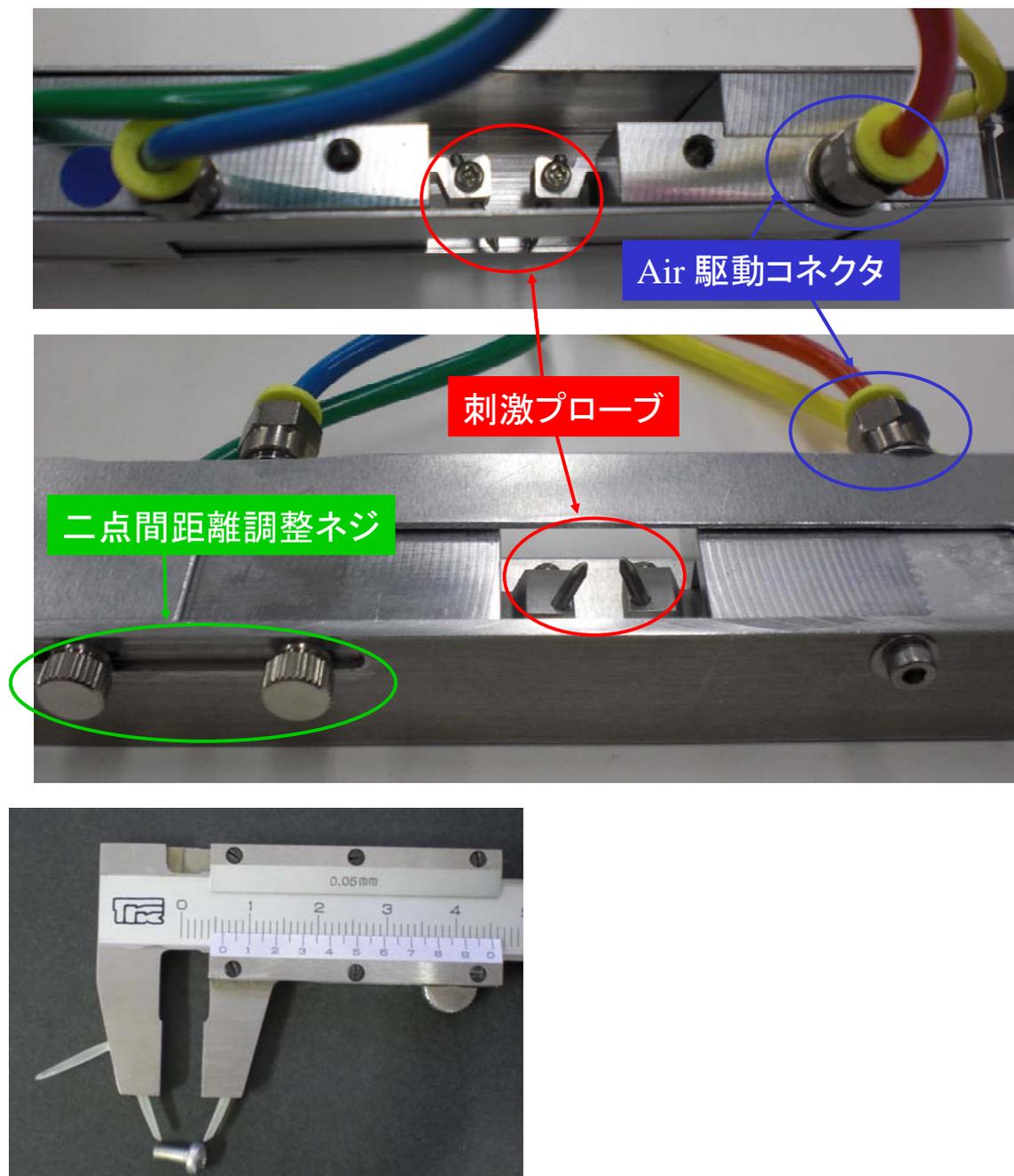


図2：刺激プローブ部分の拡大と、ノイズ源となっていたネジ

## 刺激間隔 500ms, 押出時間 200ms で制御した場合の動作精度

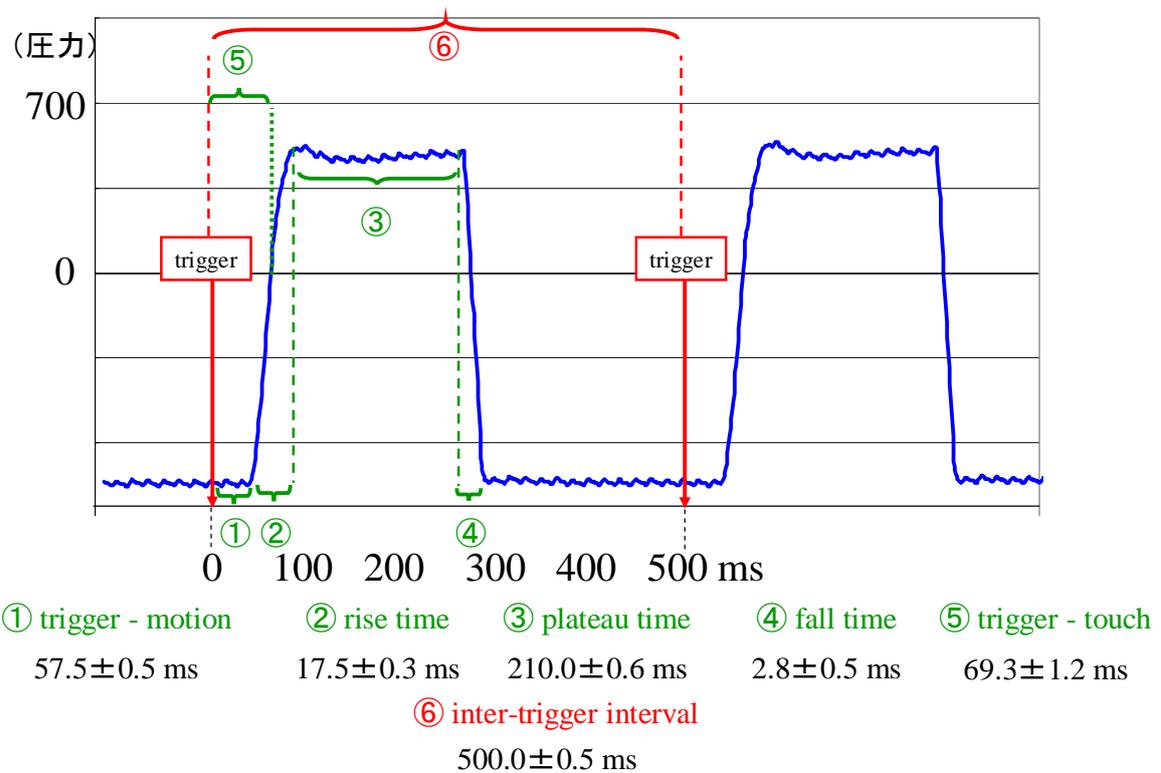


図3：プローブ動作精度の検証

一方、触覚の Oddball 課題を正確にコントロールするために、刺激装置を PC から簡単にコントロールすることが可能なソフトウェアも開発した (図4)。これは定型的な刺激を一定の周波数で与えることができる。更に、エクセル等を用いて CSV ファイルを作成すれば、1点/2点刺激の種類、押し出しタイミング、持続時間、刺激間隔等をミリ秒以下の単位で正確に規定した非常に複雑な刺激のシーケンスを読み込んで、刺激装置を駆動することも可能である。



図4：刺激ソフトウェア画面



図5：脳磁図測定風景

## 2) 健常成人を対象にした脳磁場計測

本刺激装置を用いた誘発脳磁場測定風景を図5に示す。座位のリラックスした姿勢で測定可能で、刺激に伴う不快感は一切ない。1回のセッションあたりの測定時間は約6分である。検査を行った6例全員で、刺激トリガー後、約130-140msをピークとして対側頭頂部センサーを中心に誘発磁場反応が得られた。図6に代表例における誘発反応を示す。この反応の電源推定を行うと、刺激対側の一次体性感覚野近傍に電源が推定された(図7)。この推定電源部位は、我々が以前 air-puff を用いた体性感覚誘発磁場測定で明らかにした示指の受容野ともよく一致する(図8)[3]ことから、本装置を用いた触覚刺激により、体性感覚誘発反応がしっかりと記録されていることが確認された。

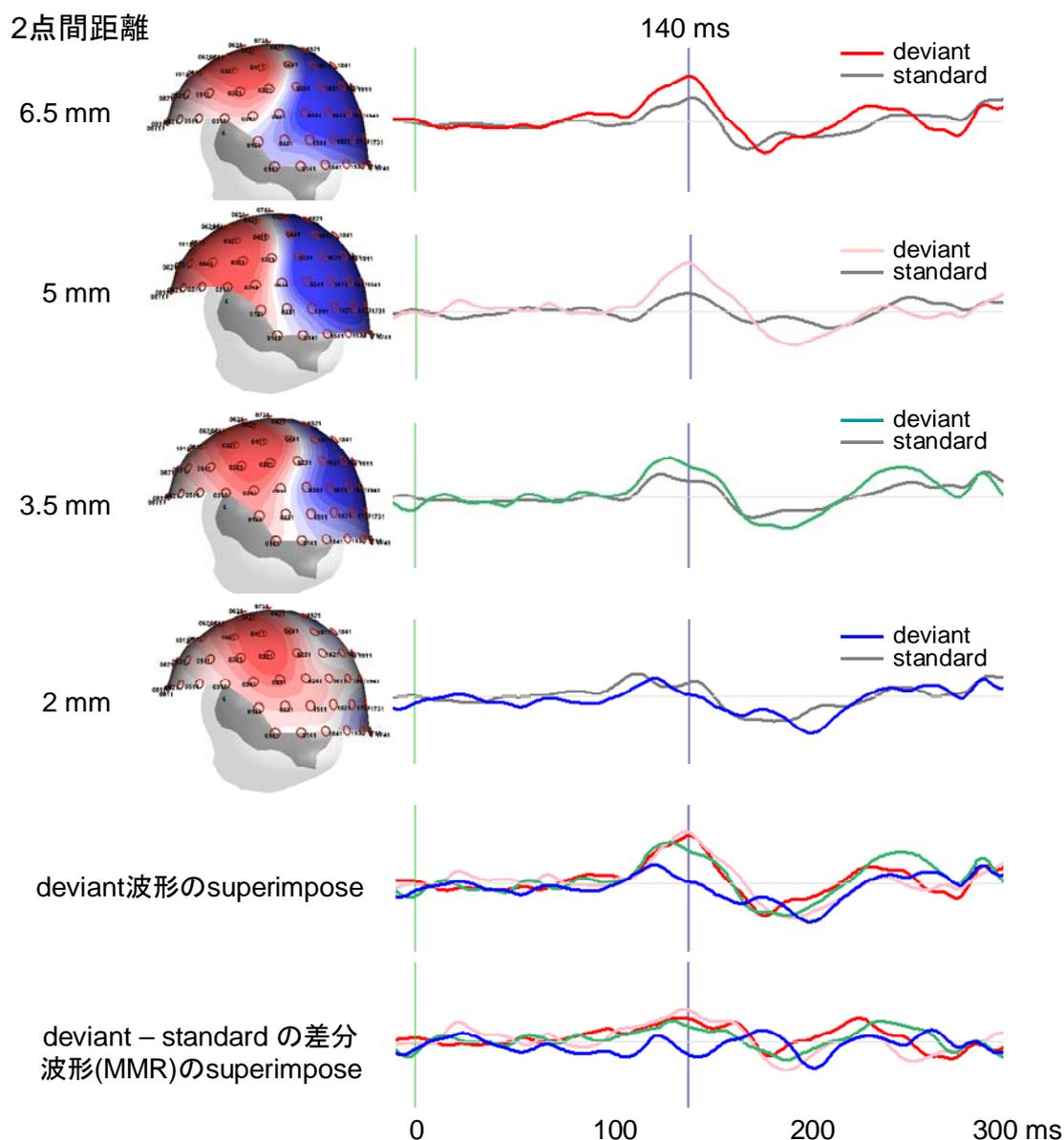
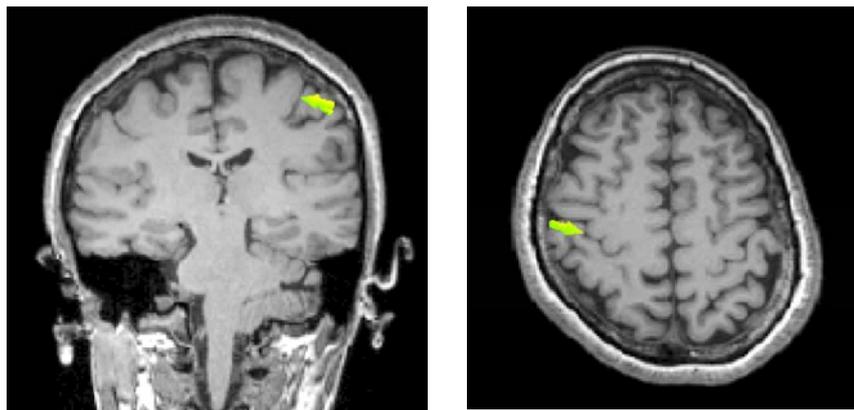


図6: 各2点間距離(6.5, 5, 3.5, 2 mm)における、1点刺激(standard)及び2点刺激(deviant)に対する反応波形。波形は最も振幅の高いチャンネルにおける波形であり、左の等磁場曲線は、潜時140msにおける磁場分布を示す

Dipole model  
による電源推定



Loreta  
による電源推定

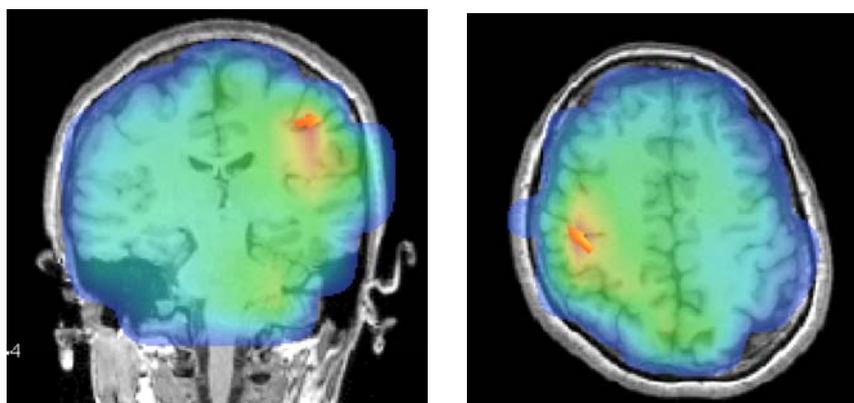


図7：2点間距離5 mmにおける、2点刺激（deviant）に対する140 msの反応の電源推定結果。上はDipole modelを用いて推定した結果、下は、Loreta法（Distributed source model）を用いた推定結果

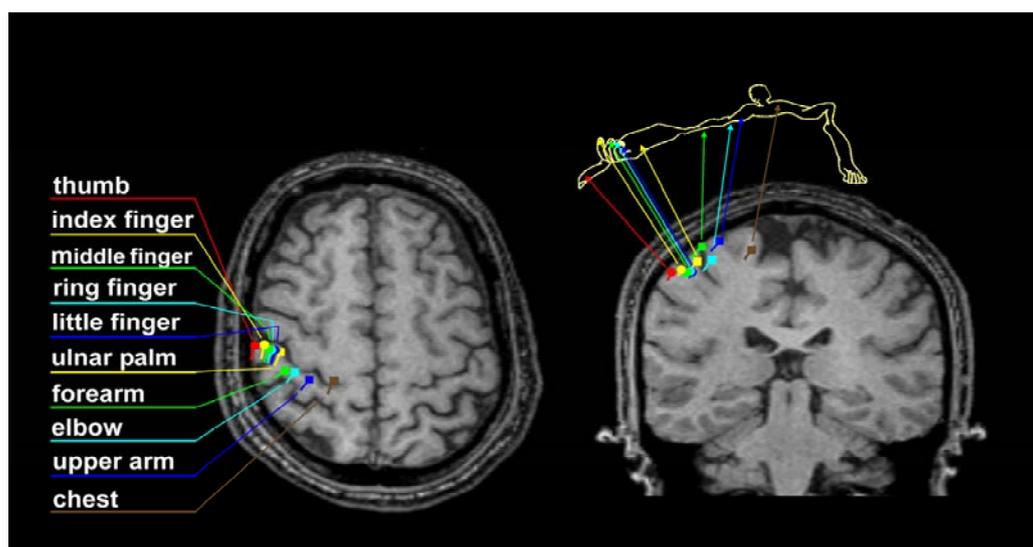


図8：脳磁図で描いた人の触覚の体性感覚マップ，Nakamura et al 1998, [3]

個々の誘発反応波形を詳細に見ていくと、2点間距離が6.5 mm, 5 mm の場合は、standard 刺激（1点刺激）よりも deviant 刺激（2点刺激）の方が明瞭に大きな反応を誘発しているが、2点間距離が3.5 mm の場合には deviant 刺激に対する反応はやや小さくなり、これが2 mm になると、deviant 刺激に対する反応は更に小さくなり standard 刺激との差がほとんど差が認められなかった（図6）。この2点間距離に対する反応波形の違いは、deviant に対する波形の superimpose（図6、下から2番目）や、deviant と standard の差分から得られる MMR 波形の superimpose（図6、最下段）を見ることによって、より明らかとなった。これらの結果から、この被験者では2点間距離が5 mm 以上の場合は1点刺激と2点刺激を脳が自動的に弁別しているが、3.5 mm になるとこれがやや弱まり、2mm になるとほとんど自動弁別ができなくなっていることが推察された。脳磁図測定後に被験者に口答で行ったアンケートでは、2点間距離が5 mm 以上は「はっきりわかる」、3.5 mm では「大体わかる」、2 mm は「何となくわかる気がするが難しい」との回答であり、脳磁図波形からの推察とよく一致した。更に、この被験者に対して別の日に行った二点識別覚自動検査システムを用いた二点識別覚閾値測定結果（図9）との比較検討も行った。二点識別覚自動検査システムによる二点識別覚の関連閾値は、clear-min 値（明らかに2点とわかる最小2点間距離）が4 mm、unable-max 値（1点としか感じる事ができない）が1 mm、sigmoid-50%値（S字カーブフィッティングから計算上求めた50%弁別閾値）が2.3 mm であり、脳磁図の測定結果から推定された二点弁別能と非常によく一致することが明らかとなり、また他の5人の測定結果も同様の傾向を示した。

## 二点識別覚関連閾値と誘発反応の関係

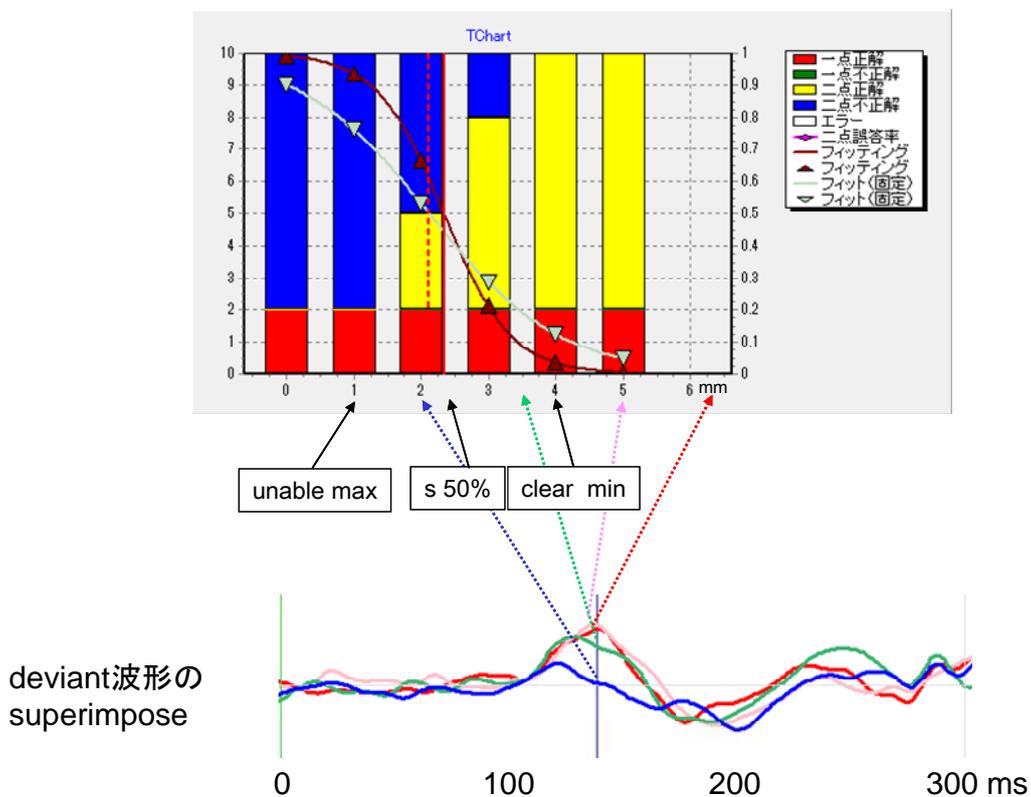


図9：二点識別覚自動検査システムによる測定結果と脳磁図波形との対比

#### IV. 結論

- 1) 二点識別覚自動検査システムによる刺激と同等の刺激を皮膚に与えることができ、脳磁図測定にも対応した二点識別刺激装置と、それを正確にコントロールすることが可能なソフトウェアを開発して、その性能や精度や検証しながら、実用レベルにまで高めた。
- 2) それを実際の脳磁図測定に応用し、6人の健康成人を対象に触覚 Oddball 刺激に対する体性感覚誘発脳磁場を測定したところ、1点2点刺激を脳が自動的に弁別するプロセスを反映していると考えられる誘発反応が得られた。
- 3) この誘発反応は、2点間距離によって大きさが変化し、二点識別覚自動検査システムによって得られた二点識別覚の関連閾値とよく一致した。
- 4) 以上の結果は、脳磁図を用いて客観的に二点識別覚閾値を判定できる可能性を示すものであり、昨年度までの成果と、脳機能画像による評価をカップリングさせることに繋がる。

#### V. 今後の計画

- 1) 刺激条件を最適化した上で更に脳磁図の測定数を増やし、データ解析を進める。脳の誘発反応と、自覚的な二点識別覚関連閾値との関連をより明らかにしていく。現状では、誘発反応の絶対的な振幅はそれほど高くないため、被験者によっては S/N 比があまりよくない場合が認められる。最も S/N 比の高い反応を得るために、刺激条件（プローブの押し出し距離、押し出し時間、刺激間隔等）を最適化していく必要がある。
- 2) 加齢が触覚二点弁別に関連した MMR に与える影響を検討し、高齢者の MMR の特徴を明らかにする。
- 3) MMR が誘発される条件の正常範囲を、これまでの研究で得られた二点識別覚閾値データベースと照らし合わせながら明らかにする。
- 4) 今後メチル水銀汚染地区での測定に応用可能なように、二点識別覚検査マニュアル及び判定アルゴリズムを完成していく。

#### 参考文献

1. Näätänen, R.. The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear* 1995; 16: 6-18.
2. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Kida T, Hoshiyama M, Tamura Y, Kakigi R. Objective examination for two-point stimulation using a somatosensory oddball paradigm: an MEG study. *Clin Neurophysiol.* 2007; 118 (2): 403-11.
3. Nakamura, A., Yamada, T., et al. (1998). Somatosensory homunculus as drawn by MEG. *Neuroimage* 7: 377-386.

# Cutaneous two-point discrimination in elderly people

Akinori Nakamura<sup>\*1</sup>, Tetsuya Nemoto<sup>\*2</sup>, Kimiko Kato<sup>\*1</sup>, Ryo Kubota<sup>\*2</sup>,  
Nobuo Noda<sup>\*3</sup>, Kaori Iwata<sup>\*1</sup>, Kenji Ushibana<sup>\*1</sup>, Hiroyuki Matsuura<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>*Department of Clinical and Experimental Neuroimaging, National Center for Geriatrics and Gerontology*

<sup>\*2</sup>*Department of Gerontechnology, National Center for Geriatrics and Gerontology*

<sup>\*3</sup>*Eisho Kinzoku corporation*

*Keywords:* two-point discrimination, automated examination, objective measurements, somatosensory evoked field, mismatch response, Magnetoencephalography

## Abstract

Cutaneous two-point discrimination is known to be impaired in patients with Minamata disease and therefore is expected to be useful as one of the biological markers for methyl-mercury intoxication. Previously, we have established an *automatic two-point discrimination measurement system* which consisted of: 1) automated examination machines, which can control physical features of the stimuli, 2) a measurement protocol which enables subjective and reliable measurements, and 3) analytic methods that can automatically estimates the reliable two-point thresholds. Using this system, we measured two-point thresholds at the index finger, lower lip and tongue in 210 healthy volunteers aged 20 to 80 yrs. and determined normal ranges in elderly people.

From this year, we are trying to couple these results with functional brain imaging in order to establish further objective measurements. At first, we developed a new tactile two-point stimulator which is applicable for magnetoencephalography (MEG) measurements. The probes were made of non-magnetic parts only and were driven by air pressure via air tubes connected to the controller outside the magnetic shield room. We also developed a software which can control the probes to give either one- or two-point tactile stimulation to the skin at designed timing. We confirmed that the probe motion is controlled with very accurate timing (less than 1 ms of jittering). Using this stimulator, we then measured somatosensory evoked magnetic fields to tactile Oddball paradigm (standard: 80% one-point stimuli, deviant: 20% two-point stimuli) in 6 healthy volunteers. The MEG data demonstrated that the tactile mismatch responses (MMR), which are though to reflect the brain processes for automatic discrimination between one- and two-point stimuli, were elicited in all 6 subjects. We also found that the magnitudes of MMR were changed in association with the two-point distances. If a two-point

distance was larger than the individual two-point discrimination threshold, the MMN amplitude was the largest. On the other hand, if a two-point distance was smaller than the individual two-point threshold, the MMN amplitudes become smaller or vanished. These results suggested that MEG is useful for objective measurements of two-point discrimination and that our new challenge to couple functional brain imaging with previously established automatic two-point discrimination measurement system should be promising.



## II メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究



# メチル水銀曝露による健康障害に関する国際的レビューに関する研究

村田勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学教授）  
吉田 稔（八戸大学人間健康学部教授）  
坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学部長）  
荻田香苗（杏林大学医学部衛生学公衆衛生学准教授）  
岩田豊人（秋田大学医学部社会環境医学環境保健学助教）  
柳沼 梢（東北大学大学院医学系研究科環境保健医学）  
岩井美幸（東北大学大学院医学系研究科環境保健医学）  
龍田 希（東北大学大学院医学系研究科発達環境医学助手）  
仲井邦彦（東北大学大学院医学系研究科発達環境医学教授）

## 研究要旨

水俣病が発生してから 50 年以上が経過し、日本でのメチル水銀汚染はもはやないものの、自然界から水銀は発生しており、小児における低濃度水銀曝露の健康影響に関する問題は必ずしも全て解決している訳でない。また、ブラジル、東南アジア、アフリカなどの発展途上国における、特に金採掘による水銀汚染は世界的な問題になっている。このような観点から、低濃度曝露を含むメチル水銀由来の健康障害に関する文献レビューを行った。

今年度のレビューにより、以下のことが示された。メチル水銀および水銀を扱った PubMed 掲載論文の中で、2008 年以降ヒト研究の報告数が減少傾向にある。海外の出生コホート研究を概観すると、メチル水銀の神経発達影響の他に、同時に曝露された低濃度鉛や *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸も小児神経発達に影響することが示され、低濃度曝露評価の際にメチル水銀単独の測定ではリスク評価が難しいことが示唆された。魚摂取頻度調査（FFQ）からメチル水銀の曝露を評価する際、推定メチル水銀摂取量は生体試料中のメチル水銀曝露量を 30% 程度しか説明できず、むしろ過大評価してしまう可能性がある。メチル水銀毒性をセレン化合物が修飾することが古くより言われてきたが、冠動脈疾患への発症にセレンの修飾作用は観察されないように思われた。

近年の国際市場における金価格の高騰が発展途上国の小規模鉱山の採掘活動の活発化や採掘地区の拡大を招いている。金回収には依然として水銀アマルガム法が主に用いられており、大量の水銀が使用される。これにより、森林破壊とともに、作業従事者に慢性水銀中毒症状が散見されるようになっている。

キーワード：メチル水銀、低濃度曝露、小児発達影響、セレン、冠動脈疾患、発展途上国

## ．研究目的

日本はメチル水銀汚染による広汎な健康被害を水俣病として経験し、これまでに様々な情報を発信してきた。しかし、近年発展途上国における金採掘に伴うメチル水銀汚染が問題となっている。このような状況を鑑み、本稿では、胎児期および成人期の低濃度メチル水銀曝露や途上国での水銀汚染の実態などを文献的に概観し、日本での健康被害との比較や、日本が行うべき情報の発信、国際協力のあり方について検討することを目的としている。また、わが国ではメチル水銀による健康被害を熟知する専門家の数が年々減少している。したがって、若い研究者にメチル水銀の問題を再認識してもらい、同時に学会やインターネットサイトに発表・掲載することにより、この種の研究の重要性を広く理解してもらうために情報発信する。

本年度は、メチル水銀の疫学研究のここ 10 年間の推移を示すとともに、2011 年に発表された海外の疫学研究論文の概要、メチル水銀とセレンの相互作用に関する論文の概要、発展途上国での水銀汚染の実態やメチル水銀（および水銀）曝露による健康影響の実態を文献レビューし、その影響や地域の特徴、並びに研究動向を探った。

## ．研究方法

文献データベース Medline (PubMed) を用いて、2011 年末までに報告されたメチル水銀に関連する論文数の推移、世界における疫学研究の概要、途上国での水銀汚染の実態など、メチル水銀曝露に関連する健康影響に関する文献レビューを行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、公開された文献調査であるので、倫理的配慮は必要としない。

## ．研究結果

### 1) メチル水銀（および水銀）のヒト研究の推移

メチル水銀 (methylmercury) がキーワードとなっている総論文数を 2001 年から 2011 年までを PubMed を用いて検索すると、124 編～298 編（全言語）であり、このうちヒトを対象とした論文数は 1 年当たり 55 編から 109 編であった（表 1）。2001～2004 年までヒトを対象とした研究が 4 割以上を維持していたが、2005 年以降 PubMed での登録雑誌数の増加とともに幾分低率になり、特に 2008 年以降メチル水銀関連論文に占めるヒト研究は総数および率ともに減少の一途を辿っている。同様に、水銀 (mercury) をキーワードとする論文も、2005 年以降ヒトを対象とした論文数の割合が減少傾向にある。2011 年はメチル水銀および水銀の全論文数に占めるヒト研究は最低水準になった。

1998～2000 年にメチル水銀を巡るフェロー諸島出生コホート研究とセイシェル小児発達研究の一大論争があり<sup>1-6)</sup>、それに伴いメチル水銀のヒト（特に小児）健康影響に関する論文が発表され始めた。また、機を同じくして 2002 年の New England Journal of Medicine 誌でのメチル水銀の冠

動脈疾患リスクに関連する論争があり<sup>7-9)</sup>、メチル水銀の問題が世間を騒がせた時期と呼応する。一方、2008年にセイシェル小児発達栄養研究の成果が発表され<sup>10,11)</sup>、フェロー諸島とセイシエルのメチル水銀論争が終焉を迎えるにつれメチル水銀に関する関心が薄れてきたかに思える<sup>12)</sup>。これは疫学研究で検証できる仮説が少なくなり、メチル水銀・水銀の細胞・遺伝子毒性機序などの解明に研究者の関心が移行していることを示唆するのかもしれない。実際、メチル水銀および水銀に関する論文の総数は2009年以後増加する傾向にある。

表1 「メチル水銀」関連のPubMed上の論文数の推移

	西 暦 年										
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
“ methylmercury ” の 入った論文数	145	124	143	159	201	227	298	294	249	267	276
ヒトを対象とした 論文数	59	55	60	74	67	75	106	109	82	75	52
割合 (%)	40.7	44.4	42.0	46.5	33.3	33.0	35.6	37.1	32.9	28.0	18.8
“ mercury ” の入った 論文数	834	931	897	980	1227	1320	1414	1479	1403	1464	1497
ヒトを対象とした 論文数	351	366	361	374	398	440	453	493	422	349	251
割合 (%)	42.1	39.3	40.2	38.2	32.4	33.3	32.0	33.3	30.1	23.8	16.8

## 2) メチル水銀のヒト影響に関するコホート研究の動向

メチル水銀の小児発達影響に関する先行研究はフェロー諸島とセイシェルで行われ、その後の両研究における異なる結論を巡る論争の歴史、さらに最終的な低濃度メチル水銀曝露による影響の解釈について前年度の報告書に記した。この結末後はメチル水銀の小児神経発達に関する論文発表は極めて低調であり、メチル水銀が小児神経発達に負の影響を及ぼすことに異を唱える論文は殆どない。このような中、フェロー諸島およびセイシェルからの研究が2011年にも発信された<sup>13, 14)</sup>。但し、メチル水銀の主作用を研究したものではなく、魚摂取に伴う長鎖不飽和脂肪酸や鉛の影響である。今後、低濃度曝露の胎児期影響に関する研究を行う場合には、メチル水銀のみならず、ポリ塩化ビフェニール (PCB) や鉛、セレンや不飽和脂肪酸を同時に測定しておかねば科学論文としての妥当性が確保できていない論文とみなされる可能性が大いにある。

### フェロー諸島出生コホート研究からの発信

Grandjean らの研究グループは小児神経発達に及ぼすメチル水銀および PCB 曝露の影響についてこれまで報告しているが、2011年になって臍帯血中で測定された鉛濃度について検討した<sup>13)</sup>。1986~1987年にフェロー諸島で集められた母子コホート1,022組のうち、神経発達検査の行われた7歳児896名と14歳児808名で臍帯血鉛と認知機能の関係を重回帰分析で解析した。臍帯血中鉛濃度は集団平均1.6 μg/dl、最大値11 μg/dlであり、鉛自身は明らかな関連を示さないものの、低濃度メチル水銀曝露を受けた子供において鉛の認知機能への悪影響を観察した。特に、認知機能の短期記憶 (digit span) は臍帯血鉛濃度が高くなるにつれて低下することが7歳児および14歳児で認められた。鉛とメチル水銀の相互作用を解析すると、これらの混合曝露には相加作用や相乗作用があるように思えず、各々が独立して神経系に影響を及ぼすと考えられた。本論文で強調

されたことは、集団としての臍帯血鉛濃度（中央値）が 1.6  $\mu\text{g}/\text{dl}$  と極めて低いにも拘わらず、知能・認知機能に対して鉛の有害影響があることであり、小児神経発達影響を研究する場合には、低濃度であってもメチル水銀だけでなく鉛の影響も軽視すべきでない。

#### セイシェル小児発達栄養研究からの発信

セイシエルの Mahe 島に住む母子 300 組が小児発達栄養研究（Seychelles Child Development and Nutrition Study）として 2001 年から始まっている。既に Rochester 大学グループはこの結果を報告しており<sup>10,11</sup>、30 ヶ月児の小児発達は、出産時母体血の *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸を統計的に調整すると、メチル水銀と有意な負の関連を示し、結果として *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸は 9 ヶ月児の時のみ小児発達と有意な正の関係を持った。このように、メチル水銀と *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸の小児発達影響は加齢により変わりうると考えられる。そこで今回、追跡している対象児が 9 ヶ月と 30 ヶ月になったときに実施した Bayley Scales of Infant Development の Psychomotor Developmental Index（BSID-II PDI）を用いて評価した<sup>14</sup>。*n*-3 長鎖不飽和脂肪酸は PDI 指標に対し有益な影響を示したのに対し、出産時母親毛髪メチル水銀濃度は PDI 指標に悪影響を及ぼす結果であった。すなわち、この影響は 9 ヶ月から 30 ヶ月の間に有意に変化することはなかった。著者らは、胎児期のメチル水銀曝露を研究するとき、母体影響をきちんと調整することを強調した。

#### 有名誌に掲載された一般集団を惑わす研究

毒性研究を解釈するにあたり、過去に示された臨界濃度域を含まない集団を用いてリスク評価（特に、量-反応評価）した研究には注意が必要である。この種の論文はデータ信頼性の指標として大きな標本数を強調する。例えば、魚摂取に由来する水銀曝露が冠動脈疾患や心筋梗塞発作の発症に影響を及ぼす証拠はないと結論した Mozaffarian らが解析に用いた米合衆国男性は 51,529 名、女性 121,700 名（実際の nested case-control study では 3,427 名）であるが、最も高い 5 分位集団の毛髪換算水銀の中央値は 2.70  $\mu\text{g}/\text{g}$  であった<sup>15</sup>。National Academy of Science はメチル水銀の臨界濃度を毛髪水銀で 12  $\mu\text{g}/\text{g}$  としている<sup>16</sup>。また、血中鉛濃度 3.63 ~ 9.99  $\mu\text{g}/\text{dl}$  群は 1.94  $\mu\text{g}/\text{dl}$  未満群に比べて心血管系死亡リスクが 1.55 倍（95% 信頼区間 1.08 ~ 2.24）であると報告した Menke らの対象者数は 13,946 名であった<sup>17,18</sup>。これら論文の統計解析に問題があるとは思わないが、著名雑誌である New England Journal of Medicine (NEJM) に掲載された有料でない Abstract の結論を読んだ一般人がメチル水銀を多く含む魚を多食するようになるかもしれない。すなわち、毒性物質の量-反応評価は過去に提示された臨界濃度を含む曝露データの中で検討されるべきであり、そうでないリスク評価は一般人に「百害あって一利なし」となる恐れもある（なお、この論文は現在無料で見られるようになっている）。

### 3) 魚摂取頻度調査（FFQ）と生体試料メチル水銀濃度の関係

魚摂取はヒトの健康にとって非常に有益であると考えられている。これは魚介類が *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸を、またビタミンやミネラルを含むからである。一方で、魚介類はヒトの健康を害するメチル水銀や PCB などを含む。そのような中、魚摂取頻度調査（FFQ）がメチル水銀の曝露指標として使用されている論文に遭遇ことが時折ある。このような魚摂取頻度調査で推定されるメチル水銀（あるいは総水銀）曝露量が、実際の生体試料で測定されるメチル水銀濃度をどのくらい反映するのか疑わしい。そこで今回は、魚摂取頻度調査と生体試料の両者が測定され、両者の

関係性を評価している論文を集めて検討した。該当する論文は幾つかあったが、推定魚摂取量と生体試料中濃度との相関係数が算出されていないものは除いた<sup>19-21)</sup>。

#### 秋田・鳥取の7歳児を持つ母親の魚介類摂取と水銀濃度の研究

Iwasaki ら<sup>22)</sup>は、Date ら<sup>23)</sup>が作成した食事摂取頻度調査票に魚をさらに加え、わが国で食される25種類の魚介類を用いて秋田県内の7歳児を持つ母親154名(25~48歳)で検討した。その食事摂取頻度調査票から推定される日々の水銀摂取量は幾何平均15.3 μg(範囲2.65~48.4 μg)であり、同時に測定された毛髪水銀濃度は1.73 μg/g(範囲0.49~5.82 μg)であった。両者のSpearman順位相関係数は $r_s=0.335$  ( $p<0.001$ )と算出された。米国環境保護庁(US EPA, 1997)は1日当たりのメチル水銀摂取上限値を0.1 μg/kg体重/dayと定めており、これに照らすと91.6%の女性が過剰摂取していたことになる。次に、Dakeishi らはこの調査にさらに鳥取および秋田の7歳児をもつ母親を加え、計327名(24~49歳)で解析した<sup>24)</sup>。1日当たりの推定水銀摂取量は0.77~144.9 μg(中央値15.0 μg)、毛髪水銀濃度は0.11~6.86 μg(中央値1.63 μg)であり、これらの相関係数は $r_s=0.245$ であった。但し、筆者らは、パーマをかけている女性とそうでない女性の間で推定水銀摂取量は有意な差を認めないにもかかわらず、毛髪水銀濃度はパーマをかけると30%低下すると報告した。すなわち、パーマの有無は毛髪水銀濃度と水銀摂取量の線形関係を大いに攪乱するので、毛髪を生体試料として用いる場合の曝露評価においては注意を要する。

#### 女子短大生の魚介類摂取と毛髪、爪、尿中水銀濃度の関係

食事由来のメチル水銀と毛髪、爪、尿の生体試料の関係をOhno らは短大食物関連学科学学生59名(19~20歳)で検討した<sup>25)</sup>。魚摂取頻度調査票から推定された水銀摂取量の平均値は9.15 μg/day(5および95パーセンタイル値、0.67~25.5 μg/day)、体重当たりで0.175 μg/kg/day(0.011~0.431 μg/day)であった。同様に、毛髪水銀濃度、爪水銀濃度、尿中水銀濃度は集団平均で1.51(0.49~3.60 μg)、0.59(0.22~1.08 μg)、0.86(0.28~2.06 μg)であり、これらの推定水銀摂取量との相関係数は各々 $r=0.551$ 、 $r=0.537$ 、 $r=0.604$ であった( $p<0.001$ )。性・年齢が均一な集団においては生体試料中の水銀濃度を推定水銀摂取量で30%程度説明でき、しかも異なる生体試料(毛髪、爪、尿)であっても似通った結果であることが示された。注目すべきは、毛髪水銀の大半はメチル水銀であり、一方尿中水銀の大半は無機水銀であるにも拘わらず、両者の相関は $r=0.790$ とかなり強い。低濃度メチル水銀/水銀曝露下での結果と考えられる。

#### 妊娠後期女性とその臍帯血の研究

ポーランドで胎児性メチル水銀曝露の小児神経影響を検討する目的で妊娠女性が募集され、単胎出産時に臍帯血が採取された<sup>26)</sup>。参加した女性374名(18~35歳)は全て非喫煙者で、糖尿病や高血圧などの臨床疾患はなかった。臍帯血水銀濃度が0.90 μg/L以上の子供は177名、0.90 μg/L以下は197名であったが、集団のレンジあるいは平均値の記載はなかった。妊娠後期(2/3)の自記式週間魚摂取量と臍帯血水銀濃度との相関係数は $r_s=0.22$  ( $p<0.0001$ )であったが、詳細な調査方法の記載は一切なく、かつ魚摂取量からメチル水銀摂取量の推定も行われていない。

#### 米国健康栄養調査データからの食餌性水銀摂取に関する研究

Mahaffey らは1999~2000年および1999~2002年の米国健康影響調査(NHANES)データを用いて、妊娠可能年齢女性の食餌性水銀摂取量と血中メチル水銀濃度を調べた。1999~2000年のデータは1,709名(16~49歳)であり、中央値は血中水銀濃度で0.94 μg/L(95パーセンタイル値

7.13 µg/L)、血中メチル水銀濃度で 0.60 µg/L (95 パーセンタイル値 6.73 µg) を示した<sup>27)</sup>。摂食魚介類から推定される水銀摂取量は幾何平均 1.22 µg/day (95%信頼区間 1.15 ~ 1.29 µg/day) で、血中水銀および血中メチル水銀と総魚介類由来水銀摂取量との相関 (人種・年齢で調整した標準回帰係数) は各々 0.452 と 0.508 であった。1999 ~ 2002 年のデータは上と同じ年齢の女性 3,614 名であった<sup>28)</sup>。魚介類からの食餌性メチル水銀量と魚介類摂取量の相関係数は  $r=0.68$  であり、マグロも鮭も摂取量 (g/kg 体重/day) が増えると水銀摂取量 (µg/g 体重) は増加するが、マグロ摂取は鮭摂取量と比べ水銀摂取量の増加度 (傾き) が約 3 倍近く高くなる。これに対し、水銀摂取量 (µg/g 体重/day) が増えると、*n-3* 長鎖不飽和脂肪酸 (論文では、EPA + DHA) も増加し、特にマグロと比べ鮭の摂取量が多い人ほど *n-3* 長鎖不飽和脂肪酸の増加が著しくなった。すなわち、魚種を考慮することにより、低メチル水銀かつ高 *n-3* 長鎖不飽和脂肪酸を摂取できることが示された。なお、30 日間の食事を思い出して推定した水銀摂取量と血中メチル水銀濃度との単相関係数は  $r=0.41$  であった。

#### スウェーデン女性の魚摂取に関する研究

スウェーデン女性 (15 ~ 45 歳) を対象として日々のメチル水銀摂取量と *n-3* 長鎖不飽和脂肪酸摂取量を食事摂取頻度調査によって推定した<sup>29)</sup>。これによると、メチル水銀の 1 日当たり基準摂取量 (RfD、0.1 µg/kg 体重/day) 以下でかつ推奨される *n-3* 長鎖不飽和脂肪酸量 (4 mg/kg 体重/day) を摂取している割合は全体の 36% であり、いずれも満たさないのが 3.7%、RfD 以下であるが *n-3* 長鎖不飽和脂肪酸量も十分でない人の割合が 52% であった。これらの対象者のうち 130 名が毛髪水銀濃度も測定され、その濃度と食事摂取頻度調査から推定される水銀摂取量の相関係数を計算すると、 $r_s=0.75$  ( $p<0.001$ ) であった。この研究によると、食事摂取頻度調査は総魚摂食量を過大評価する傾向にあると結論している。

以上より、魚介類の食事摂取調査 (FFQ) から推定されるメチル水銀摂取量と生体試料中のメチル水銀濃度との相関  $r$  は 0.245 ~ 0.75 の範囲にあり、生体指標の水銀量の 10% から 50% 程度 (約 30%) を魚介類摂取量から説明できると考えられる。また、食べる魚の種類が豊富な国ほど相関係数が低くなるように思われる。但し、Dakeishi らの報告にあるように、特に女性の場合パーマをかけると毛髪水銀量が 30% 近く低下することから<sup>24)</sup>、毛髪水銀濃度を曝露指標として使用する場合には細心の注意が必要となる。

#### 4) 水銀とセレンの関係

メチル水銀毒性へのセレン及びセレン化合物による修飾影響に関する研究は 1970 年代から報告されており、近年においても水銀曝露による各種疾患の発症に共存するセレンが影響を及ぼすか検討を行った報告が散見される。

##### 冠動脈疾患への影響

水銀毒性に対しセレンが防御的に働くという仮説のもとで、水銀曝露と冠動脈疾患に関する 2 つの nested case-control study (コホート研究後のデータを用いて行った症例対照研究) が 2011 年に報告されており、いずれも生体指標中の水銀濃度とともにセレン濃度を修飾因子として分析・検討している。Wennberg らは、北スウェーデン地方のコホートにおいて nested case-control study

を実施し、血液サンプル採取後に心筋梗塞 (MI) を発症した 431 人 (81 人の循環器疾患による突然死 SCD を含む) とマッチングした対照群 499 人について血球中のセレンと水銀濃度、および血漿リン脂質中の *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸 (EPA + DHA) 濃度を分析した<sup>30)</sup>。発症リスクを各濃度分布の 3 分位で比較すると、高レベル群と低レベル群の Odds 比は水銀で 0.65 (95%信頼区間、0.46 ~ 0.91)、セレンで 0.75 (0.53 ~ 1.06)、EPA + DHA では 0.75 (0.54 ~ 1.11) であり、また、個人間の水銀濃度との相関係数は EPA + DHA で  $r=0.34$ 、セレンで  $r=0.15$  といずれも統計的に有意であった。食事摂取頻度調査票から推定した魚の摂取量と各濃度との間にはいずれも関連はみられず、多変量モデルで交絡因子を調整しても結果は変わらなかった。一方、SCD のリスクは、血球セレンが高濃度の者で上昇することが示された。スウェーデン人コホートのような血中水銀濃度が比較的 low、血中水銀と EPA + DHA レベルに正相関がみられる集団では、魚肉の不飽和脂肪酸等の栄養素が水銀毒性に対し保護的に働くため、食事からの水銀摂取による心筋梗塞のリスク上昇が認められないのではないかと著者らは考察している。

Mozaffarian らは、米国大規模コホートで収集した対象者の足の爪を保存し、冠動脈疾患や心筋梗塞を発症した 3,427 人と年齢、性、人種、喫煙習慣をマッチさせた対照群の足爪中水銀とセレン濃度を分析した<sup>15)</sup>。多変量解析の結果、高濃度水銀が循環器疾患のリスク増加には関与しておらず、爪中水銀濃度分布を 5 分位に分割し、最も高い集団を最も低い集団と比較したところ、相対リスクは冠動脈疾患で 0.85 (95%信頼区間、0.69 ~ 1.04)、心筋梗塞発作で 0.85 (0.62 ~ 1.14)、全循環器疾患で 0.85 (0.72 ~ 1.01) となった。爪中セレン濃度および食事質問票から推定した魚の摂取量についても同様の解析を行ったが、有意なリスク上昇は見られず、さらにセレン濃度が低い集団に限定して水銀の影響を検討したが、いずれの循環器疾患も発症との関連性は認められなかった。なお、爪/毛髪濃度比 0.37 を用いた毛髪換算水銀濃度の中央値は患者群で 0.62  $\mu\text{g/g}$  (最も高い 5 分位集団の中央値は 2.70  $\mu\text{g/g}$ )、対照群で 0.68  $\mu\text{g/g}$  であり、このような水銀低曝露集団では、魚摂取由来の水銀が冠動脈疾患や心筋梗塞発作の発症に影響を及ぼす証拠は得られないと結論している。

これより、スウェーデン、米国の 2 つの水銀低曝露コホート集団では、循環器疾患発症に対する交絡因子調整済みリスク比は 1 以下 (95%信頼区間は 1 を含む) となっており、アウトカムを臨床症状とした場合には心血管系へのメチル水銀毒性作用やセレンの修飾作用は顕在化しないことがわかった。

#### 白内障への影響

循環器系以外の疾患では、白内障への水銀曝露影響に関する報告があり、魚由来で摂取したメチル水銀が眼内レンズに蓄積されて白内障発症リスクを高めるのではないかとという仮説を検証している<sup>31, 32)</sup>。加齢性白内障は、アマゾン川流域のような緯度が高く紫外線曝露量の多い地域では特に発症しやすくなり、これらの地域では外科的治療を行える病院へのアクセスも悪いため、高齢者の失明原因として問題視されている。Lemire らは、森林伐採により土壌中の無機水銀が川へ流れ込むため、世界でも有数の高濃度水銀流域となっているアマゾン川支流の Tapajos 川の魚を食べる 40 歳以上の住民について調査した<sup>31)</sup>。流域 12 地区の 211 人を診察したところ、白内障は 69 人 (32.7%) にみられ、対象者の血中水銀と血漿中セレン濃度を分析した結果、血漿中セレン濃度が 25 パーセンタイル値より低値 (<110  $\mu\text{g/L}$ ) であると 2.69 倍、血中水銀が 25 パーセンタイル値

より高い ( $\geq 25 \mu\text{g/L}$ ) と 4.45 倍白内障の発症率が高まることが示された (95%信頼区間、セレン 1.11 ~ 6.56、水銀 1.43 ~ 13.83)。25 パーセントイル値よりセレン濃度が低かつ水銀が高い住民では、至適条件集団とされる高セレンかつ低水銀集団に比べると 16.4 倍 (95%信頼区間、3.0 ~ 87.9) 白内障を発生しやすくなることがわかった。白内障発症をエンドポイントした場合、体内に共存するセレンにより水銀毒性が弱められている可能性が示されたが、抗酸化物質やビタミン類摂取量などその他の交絡要因が考慮されていないため、さらなる調査・研究が必要である。

#### 総説論文からみたセレンの影響

職業上の曝露がない場合、食事からの魚肉摂取がヒトの主な水銀曝露源となるが、魚に含有されるセレンやほかの栄養素が水銀毒性を軽減するかをテーマとした総説が新たに 2 報出された。Ralston らの総説では<sup>33)</sup>、ヒトの体内にあるセレン含有酵素は 10 種類以上知られており、その多くが生体内、特に脳・神経組織における酸化障害を防ぎ、セレン豊富な食事が魚由来のメチル水銀毒性を弱める論拠を提示している。母親がサメやクジラのようなセレンより水銀の含有モル濃度が高い魚肉を多く食べると、生まれた子どもに健康悪影響が観察され、セレン豊富な魚類を多く食べると逆に子の IQ が高くなることが報告されているため、子どもの健康を守る上で摂取する魚の種類も問題となると論じている。Park らの総説では<sup>34)</sup>、適度な量の魚摂取が体内の不飽和脂肪酸やセレンレベルを高めて、循環器疾患のリスクを低下させることを文献引用して解説している。循環器疾患死亡リスクの増減に關与するセレンと水銀の相互作用については、臨床試験による観察疫学研究で相反する結果が出されている上、魚の種類によって含有する不飽和脂肪酸、セレン、水銀量が様々であるため、魚摂取の量的なリクス・ベネフィット分析は現段階では実施できないと述べている。

#### 上記以外のセレンの作用

水銀毒性とセレンに関する最近の報告には、遺伝子解析や *in vivo* での実験、分析法を検討したものなどが見られる<sup>35-39)</sup>。哺乳動物の高比重リポ蛋白質 (HDL) に分布するパラオキシナーゼ (PON1) は、リポ蛋白の酸化防御作用を有する酵素であるが、*in vitro* 実験でメチル水銀により阻害されることが報告されている。これまで PON1 に関する疫学調査がなされていなかったため、Ayotte らはカナダ北部の魚介類多食地域に在住する成人 896 名について、血漿 PON1 活性、血中水銀、セレン濃度および PON1 の遺伝子多型 (rs705379, rs662, rs854560) を分析した<sup>35)</sup>。その結果、血中水銀濃度は交絡因子 (年齢、HDL コレステロール値、赤血球膜内 *n*-3 系脂肪酸濃度および PON1 遺伝子多型) で調整後、PON1 活性値と有意な負の相関を示し、血中セレン濃度は有意な正の相関関係を示した。PON1 遺伝子多型と血中水銀濃度の間に交互作用は認められなかった。魚介類からのメチル水銀の摂取により PON1 活性が抑制される一方、セレンの同時摂取でその影響が相殺される可能性を著者らは考察している。Engström らは、メチル水銀毒性への耐性に抗酸化作用を有するグルタチオン関連遺伝子多型が係わるか調べるため、北スウェーデン地域の心筋梗塞発症者 458 患者とマッチング対照群 569 人の遺伝子解析を行ったが<sup>36)</sup>、心筋梗塞の発症リスクは遺伝子多型によって変わらず、血清不飽和脂肪酸、血球セレン、血球水銀濃度を同時に考慮しても修飾影響はみられなかった。なお、血清不飽和脂肪酸や血球水銀濃度を 3 分位に分割して検討した場合、GCLM-588TT 型は CC 型に比べリスクを下げる傾向が見られたが、TT 型キャリアーが少数であったため統計的有意性はみられなかったと考察している。

Usuki らは、メチル水銀に感受性の高いセルラインを用いて、メチル水銀曝露が抗酸化セレン酵素に及ぼす影響を *in vivo* で調べた<sup>37)</sup>。その結果、メチル水銀による酸化ストレスはセレン欠乏を引き起こし、セレノシステインの UGA コードンのリーコードが障害され、GSHPx1-mRNA を阻害した。有機セレン化合物での前処理はセレン欠乏や細胞毒性に対し防御的に働き、メチル水銀曝露による酸化反応を効果的に抑えられることを示した。また Carvalho らは、セレン含有酵素であるチオレドキシシン・レダクターゼ(TrxR)が無機および有機水銀により阻害されることに着目し、実験的に塩化水銀で不活性化した HEK293 セル中の NAPPH TrxR が、亜セレン酸の処置により活性が回復されることを明らかにした<sup>38)</sup>。TrxR の阻害は GSH などの抗酸化物質の産生抑制につながるため、水銀毒性の緩和に亜セレン酸が有用といわれるメカニズムの傍証となる。この他、水銀とセレン化合物の迅速な分析法として、Moreno らは新たに ICP-MS に HPLC カラムを入れ替え連結させる方法を提案し、30 分程度で尿、血清、臍帯血中の水銀とセレンが同定可能となることを報告した<sup>39)</sup>。

以上のように、メチル水銀とセレンをキーワードに最近の文献を概観すると、これまでの研究を踏襲・進展させ、疫学また実験的観点からも方向性に広がりのある種々の研究が進められているように思われた。

## 5) 発展途上国における水銀の健康問題

発展途上国における小規模金鉱山での金抽出に使用される水銀は、回収されないまま環境中に放出されるため水銀による環境汚染が生じる。また金採掘に携わる作業員やその周辺住民の水銀による健康影響が社会的な問題となっている。これまで各国の政府や国連工業開発機構(UNIDO)が水銀の危険性を啓発してきたが、金採掘に伴う作業員への健康影響や環境汚染に関する問題はより深刻になりつつあることが最近の論文により明らかである。加えて、最近の国際市場の金価格の高騰により小規模金鉱山における金採掘活動の活発化が森林破壊という新たな問題を引き起こしている。ここでは 2011 年度に発表された論文をもとに最近の小規模金鉱山や水銀鉱山における採掘に伴う水銀による健康および環境影響について紹介する。

### 小規模金鉱山における水銀による作業員および周辺住民の健康影響

アフリカの多くの国に小規模金鉱山が存在するが、水銀に関わっている作業員や周辺の住民への健康影響や環境汚染に関する報告は限られていた。しかしながら、最近では各国の小規模金鉱山における水銀曝露評価が行われ、水銀汚染の実態が明らかになりつつある。

ガーナ共和国には全国に小規模金鉱山が点在している。Kwaansa-Ansah らはガーナ西部の中心に位置する小規模金鉱山の作業員 40 名と農業従事者 54 名を対象に水銀曝露の実態調査を行った<sup>40)</sup>。毛髪水銀濃度は、農業従事者では平均  $2.35 \pm 1.58 \mu\text{g/g}$  ( $0.63 \sim 7.19 \mu\text{g/g}$ ) で、鉱山作業員では  $2.14 \pm 1.53 \mu\text{g/g}$  ( $0.57 \sim 6.07 \mu\text{g/g}$ ) であり、平均魚介摂取量と毛髪水銀濃度との間に有意な相関は認められていない。鉱山作業員の尿中水銀濃度は平均  $1.23 \pm 0.86 \mu\text{g/L}$  ( $0.32 \sim 3.62 \mu\text{g/L}$ ) であり、農業従事者の平均  $0.69 \pm 0.39 \mu\text{g/L}$  ( $0.075 \sim 2.31 \mu\text{g/L}$ ) よりわずかに高い値であった。現時点では、水銀曝露が人々に重大な健康影響を及ぼしている状況でなかった。一方、ジンバブエ共和国のブルキナ・ファソ地区には多くの小規模金鉱山があり、金の抽出に水銀を使用している。Tomicic らはこの地

区の 8 つ金鉱山従事者 93 名を対象に健康調査を実施した<sup>41)</sup>。尿中水銀濃度は高値であり、作業者の 69% が ACGIH の生物学許容濃度 35  $\mu\text{g/g Cr}$  を超えており、しかも 16% の作業者が 350  $\mu\text{g/g Cr}$  以上 (最高値 1,707  $\mu\text{g/g Cr}$ ) の値を示した。これらの作業者で医学的調査を行うと、水銀曝露に関連した頭痛 (53.3%)、眩暈 (53.8%)、胸痛 (34.1%)、易労感 (33.0%)、振戦 (31.9%) などの自覚症状の有病率が高く、ジンバブエ共和国の作業者は高濃度の水銀蒸気に曝露されていると考えられる。

南アフリカ共和国では北東部に位置する Mpumalanga 州の金鉱山周辺の住民の水銀曝露の実態調査が行われた。Oosthuizen らは 18 歳以上の住民 30 名を対象に、尿 (28 名) および血液 (20 名) の水銀濃度測定に加えて、アンケート調査 (飲食物の摂取量、エネルギー使用、神経症状とその攪乱因子であるアルコール消費量や脳挫傷の既往歴など) を実施した<sup>42)</sup>。血液中水銀濃度の中央値は 2.35 ( $<0.5 \sim 24.0$ )  $\mu\text{g/L}$  で、3 名 (15%) が国の指針値 10  $\mu\text{g/L}$  以上であった。尿中水銀濃度の中央値は 6.2 (0.5  $\sim$  63.5)  $\mu\text{g/g Cr}$  であり、うち 14 名 (50%) の住民が国の指針値 35  $\mu\text{g/g Cr}$  を超えていた。一部の住民は明らかに周辺の小規模金鉱山活動にともなう環境からの水銀曝露の可能性を示唆する者もいた。

モンゴルでも小規模金鉱山における水銀使用による健康影響が危惧されている。Steckling らは 200 人の女性作業者 (曝露者 157 名、非曝露者 43 名) の血液、尿、毛髪中水銀濃度を測定した<sup>43)</sup>。職業的に曝露される作業者 64 名 (高濃度曝露群) の尿中水銀は中央値 4.36  $\mu\text{g/L}$  (7.18  $\mu\text{g/g Cr}$ ) であり、非曝露者の 0.10  $\mu\text{g/L}$  と比べて有意に高く、しかも生物学的許容値を超える作業者が 12 名もいた。環境からの水銀曝露を受けている 92 名 (低濃度曝露群) の尿中水銀の中央値は 2.88  $\mu\text{g/L}$  (2.98  $\mu\text{g/g Cr}$ ) であり、このうち 10 名が生物学的許容値を超えていた。小規模金鉱山における水銀の使用は鉱山作業者のみならず地域住民にも水銀被害を及ぼす危険性があり、特に出産時期の妊婦を水銀曝露から保護する必要がある。

南米コロンビアの金採掘活動が行われているカウカ川とマグダレナ川周辺の住民 1,328 人を対象に水銀曝露評価を毛髪中総水銀濃度で行われた<sup>44)</sup>。最も高い値は金鉱山に近い La Raya 地区で  $5.25 \pm 0.32$   $\mu\text{g/g}$ 、Achi 地区では  $2.44 \pm 0.22$   $\mu\text{g/g}$ 、Montecristo 地区では  $2.20 \pm 0.20$   $\mu\text{g/g}$  であり、鉱山から離れることにより住民の毛髪水銀濃度は低下した。調査対象の 0.75% の住民が 10  $\mu\text{g/g}$  を超える水銀濃度を示した。また男性が女性より高値を示した。毛髪総水銀濃度は身長や年齢と弱い相関を示したが、魚介類摂取量との有意な相関は認められなかった。健康調査で水銀曝露による自覚症状はなかったものの、住民の健康を守るために、水銀を使用しない技術の導入、環境モニタリングや健康教育が必要であると著者らは記した。

#### 小規模金鉱山および水銀鉱山周辺の環境影響

エクアドルの El Oro 州にある最も古い Portovelo 金鉱山周辺の大気中水銀濃度は金採掘を行っている El Pache 地区で最も高い値が検出され、雨季では  $2,357 \pm 1,808$   $\text{ng/m}^3$  で、乾季では  $3,700 \pm 1,225$   $\text{ng/m}^3$  であった。一方、Portovelo 市街地でも雨季に  $215 \pm 44$   $\text{ng/m}^3$ 、乾季に  $574 \pm 73$   $\text{ng/m}^3$  であり、いずれも米国有害物質疾病登録局 (ATSDR) の最小危険レベル (MRL, 200  $\text{ng/m}^3$ ) を超えていた<sup>45)</sup>。また作業者のアマルガム燃焼前後の呼気中水銀濃度を測定すると、燃焼後 2,007  $\sim$  3,389  $\text{ng/m}^3$  の水銀が検出され、燃焼前の 179  $\sim$  1,352  $\text{ng/m}^3$  に比べて高値を示した。このことからアマルガム燃焼により高濃度の水銀蒸気が大気中に大量飛散しており、金回収方法の早急な改善を含む健康

保護と環境保全の必要性を説いている。

金採掘は水銀による環境汚染に加えて、森林破壊という新たな環境問題を生み出す。Schuelerらは1986-2002年までのランドサットによって撮影された衛星画像を解析し、西ガーナでは金の露天掘りにより森林破壊が58%進み、金採掘地区の農地が45%減少しており、住民の生活基盤が侵食されていると報告した<sup>46)</sup>。また、ペルーのMadre de Dios地方でも、採鉱による森林破壊が2003年に発見されて以来、最近の国際市場の金価格の上昇により、2006-2009年に年間1,915 haの割合で森林破壊が進んでいるとSwensonらは報告している<sup>47)</sup>。

水銀鉱山閉山後の廃鉱からの水銀漏出による環境汚染が危惧されている。トルコの南中部アナトリア地区には多数の水銀鉱山が存在し、1976年に閉山した。Karahalilらは、環境汚染の生物学的マーカーとして、水銀鉱山の近くのKursunlu-KonyaのLadikdamuダムに棲息する魚介類の水銀濃度を測定した<sup>48)</sup>。魚介類の水銀濃度は $0.504 \pm 0.475$  mg/kgであり、一方非汚染地区の魚介類では $0.04 \pm 0.054$  mg/kgであった。閉山後、長い年月が経ているにも拘わらず環境汚染は継続している。

近年の国際市場における金価格の高騰は発展途上国の小規模金鉱山の採掘活動の活発化や採掘地区の拡大を招いている(図1)。金回収の方法として依然として水銀アマルガム法が主流であり、水銀が大量に使用される。近年は金鉱山周辺での水銀汚染に加え、森林破壊による生態系の影響も危惧されている。一方、金回収作業者に慢性水銀中毒症状が散見され、小規模金鉱山従事者の水銀曝露状況は深刻である。

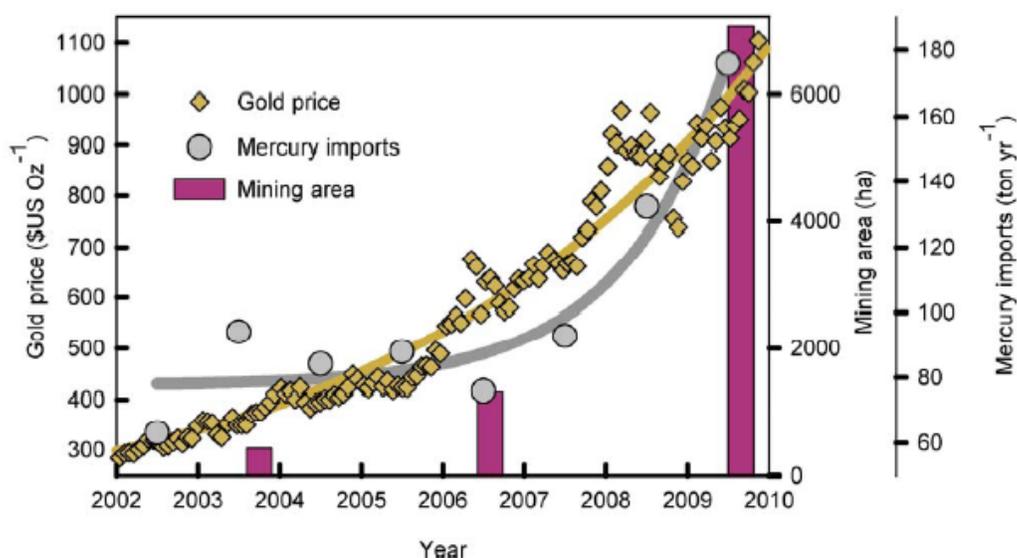


図1 ペルーにおける金価格、水銀輸入量、鉱山地域の変動<sup>47)</sup>

## 6) 水俣病の歴史的評価

水俣病は、化学工場から排出されたメチル水銀を高濃度に蓄積する魚介類の摂食によって起きたメチル水銀中毒であり、環境への配慮を欠いた産業活動がもたらした公害の原点である<sup>49-51)</sup>。水俣病の歴史を描いた和書は多数あるが、英文で記した書は必ずしも多くない<sup>52-60)</sup>。これらの文献によると、水俣病が発生していた当時の生体試料中の水銀測定法は十分に確立されていなかっ

た。このため、メチル水銀の量-反応関係の評価する際に、世界の研究者はイラクで発生したメチル水銀中毒禍のデータ<sup>61-63)</sup>を利用するものの、曝露データを持たない水俣病の研究成果は殆ど引用されなかった。政府は、わが国の公害の原点と言える水俣病とその原因となったメチル水銀に関する総合的な調査・研究を行うことを目的として、国立水俣病研究センターを設置した。その後、同センターは国立水俣病総合研究センターに改組され、国際的な水銀汚染に関する研究とともに、情報の提供や被害地域の福祉への貢献も視野に入れて活動を行っている。

表2 メチル水銀毒性に関する早期警告と認知<sup>58)</sup>

事象発生年	出来事	文献(著者、発行年)
1865	職業性の胎児性メチル水銀中毒の最初に報告された記録	Edwards 1865 <sup>64)</sup>
1887	メチル水銀毒性に関する最初の実験的研究	Hepp 1887 <sup>65)</sup>
1930	アセトアルデヒド製造業者における有機水銀中毒の報告	Koelsch 1937 <sup>66)</sup>
1940-1954	メチル水銀殺菌剤製造工場における労働者の中毒症例	Franke & Lundgren 1956 <sup>67)</sup> ; Hunter & Russell 1954 <sup>68)</sup>
1952	2 幼児のメチル水銀による発達神経毒性に関する最初の報告	Engleson & Herner 1952 <sup>69)</sup>
1956	水俣における魚介類に関連する原因不明の疾患の発見	水俣病に関する社会科学的 研究会 1999 <sup>51)</sup>
1959	猫におけるメチル水銀毒性に関する研究	Eto et al. 2001 <sup>70)</sup>
1967	汚泥における水銀のメチル化実験	Jensen & Jernelev 1967 <sup>71)</sup>
1968	水俣病の原因としてのメチル水銀の公式承認	水俣病に関する社会科学的 研究会 1999 <sup>51)</sup>
1955-1972	メチル水銀処理された小麦種子を調理したことによる中毒禍の発生	Bakir et al. 1973 <sup>61)</sup> ; Borg 1969 <sup>72)</sup>
1972	発達神経毒性による遷延影響の実験的研究	Spyker et al. 1972 <sup>73)</sup>
1973	イラクデータからの大人の量-反応関係に関する報告	Bakir et al. 1973 <sup>61)</sup>
1986	ニュージーランドにおける妊娠女性の魚摂食による子供への影響に関する初の疫学的研究	Kjellström et al. 1986 <sup>74)</sup>
1997	妊娠女性の魚摂食由来のメチル水銀によるフェロー諸島7歳児神経影響に関する前向き研究	Grandjean et al. 1997 <sup>1)</sup>

水俣病の原因究明に関する史的研究をしている石原は、2002年に「水俣病の原因究明における反省点を今後の教訓とするための一考察」と題する論文を書いたが、第2弾となる「有機水銀化合物の毒性はいつ頃から明らかになったのか?」を2011年に発表した<sup>75,76)</sup>。この中で過去の論文に基づき、アセトアルデヒド製造で無機水銀は有機水銀に変化して真の触媒になること、有機水銀化合物の中毒症例(職業性中毒と経口摂取による中毒)はHunterらの論文以前にも多数あること、水俣病原因究明の過程における文献の検索可能性について述べ、もっと早期に水俣病の原因究明がなされるべきだったと言及した。

水俣病患者に神経障害が見られることは周知の事実であるが、メチル水銀が精神医学的症状を引き起こすか否かについての証拠は、Haradaの胎児性水俣病患者の症例研究を除いて<sup>77)</sup>、殆どない。3年以上の臨床経験を持ち、特別の訓練を受けた医師36名が1971年8~9月に水俣とその近隣地域住民を対象に行った精神医学的症状の調査結果をYorifujiらが2011年に報告した<sup>78)</sup>。曝露指標は居住地とし、1964年の毛髪試料中水銀濃度の中央値が30.0 µg/gであった水俣を高曝露地域とみなし、904名の住民が参加した。毛髪試料の中央値が21.5 µg/gであった御所浦は中等度曝露地域とみなし、参加者数は1,700名であった。有明地域からは913名が参加したが、毛髪試料データはなかったものの熊本市(中央値2.1 µg/g)と同等レベルと考えられた(低曝露地域)。有明

地域での知能障害の有所見率を1とし、性・年齢、職業（漁業専従、パートタイム漁業者、非漁業者）を調整した Odds 比を算出すると、御所浦と水俣地区の Odds 比は各々0.6（95%信頼区間0.4～0.9）と5.2（3.7～7.3）であり、気分行動障害（当時は「性格障害」と呼称）の発症は、同様に、0.6（0.4～1.0）と4.4（2.9～6.7）であった。痴呆については、御所浦地区の Odds 比は0.3（0.2～0.7）、水俣地区は0.5（0.2～1.2）であった。全地域における精神医学的症状の有所見割合のピークは20歳と高齢者に見られた。これらの所見は、その当時の認定水俣病患者を除いても、変わらなかった。以上を纏めると、胎児性あるいは後天性のメチル水銀曝露は精神医学的症状と関連するよう思われるが、中等度曝露地域（御所浦）の有所見率が低濃度曝露地域（有明）よりも低率であり、36名の医師による診断誤差がなかったと仮定するならば、量-反応関係が認められたとは考え難い。

## ・考察

重化学工業化政策期に排出された水銀、鉛、カドミウム、ヒ素などの重金属の環境汚染により、人類は様々な健康問題に遭遇した。今日、先進諸国ではこれらの化学物質に対して厳しい規制を行い、また2009年にナイロビで開催された第25回国連環境計画（UNEP）管理理事会では水銀によるリスク削減のための法的拘束力のある「水銀条約」制定に向けた議論が交わされ、2013年にその条約の採択・署名を目指している。にもかかわらず、水銀は自然界からの地殻ガスや化石燃料の燃焼を通して発生するので、汚染が皆無になるということはない。その結果、先進諸国では魚介類摂取による低濃度メチル水銀曝露の小児発達影響が危惧されているのである。一方の発展途上国では、小規模金鉱山や水銀鉱山から放出される水銀問題<sup>40-48)</sup>の他に、昭和30年代のわが国のように高度経済成長という国家が掲げる政策下で大規模な環境汚染が発生する可能性も否定できない<sup>60)</sup>。中国の液晶ディスプレイ製造工場労働者で神経障害が発生したとNHKニュースが2011年2月に報道し、これを聞いて液晶ディスプレイ背面に使用している水銀蒸気吸入による中毒ではないかと疑ったが、その続報は途絶えている。発展途上の国において胎児性水俣病のような惨禍を避けるために、かかる危険性を早期に認知するとともに、その予防対策を講じることに注意が向けられるべきである。

出産時に採取した母体血は原則的には母親の曝露指標用であり、出生児の曝露状況を反映するかどうかは別問題である<sup>79)</sup>。母体血と臍帯血の胎盤経由の各種重金属の移行を調べた研究が最近 Sakamoto らによって報告された<sup>80)</sup>。九州のある産婦人科医院に通院している出産前1週間の妊婦の血液と臍帯血（81組）が収集され、赤血球中の水銀、鉛、カドミウム、ヒ素、セレン濃度が測定された。それらの母子間の値はいずれも正の相関が見られ、母体赤血球濃度が高いほど臍帯血赤血球濃度も高くなることが示された。また、いずれの重金属も母子間で有意な濃度差が認められ、水銀とセレンは臍帯血赤血球濃度の方が母体血赤血球濃度より高かった。このため、臍帯と母体の赤血球濃度比は水銀とセレンで1より大きくなり、これら2金属の胎児への胎盤移行度は高いと推定された。メチル水銀は必須アミノ酸と結合した形で胎児に選択的に移行するものの<sup>81, 82)</sup>、母親から児へのメチル水銀の移行度は母子ペアで大きく異なっていた<sup>83)</sup>。セレンは Sakamoto らの報告<sup>80)</sup>と同様の結果もあるが<sup>84)</sup>、逆に臍帯血セレンが母体血セレンよりも低いとする結果

<sup>85,86)</sup> もあり、人種や食習慣の相違によって異なるかもしれない。一方、カドミウムの胎盤経由の移行はこれら金属の中で最も低く、同様の報告は多数ある<sup>85, 87-92)</sup>。胎盤でのカドミウム蓄積量が母体血や臍帯血よりも高いことはよく知られており<sup>87, 91, 93)</sup>、これは胎盤で発現するメタロチオネインがカドミウムを捕捉することによる<sup>94-96)</sup>。以上より、臍帯血の代わりに母体血を採取し、その濃度を胎児期の曝露指標として使用することの可否は検討する有害化学物質と影響指標によって異なるようである。すなわち、胎盤血流に起因すると考えられる影響指標（出生体重など）に対しては母体血の曝露指標が有用であるが<sup>97)</sup>、発達段階にある神経系などの影響指標に対しては臍帯由来の曝露指標の方が推奨されよう<sup>83)</sup>。実際、小児の心臓性自律神経機能に及ぼすメチル水銀影響は臍帯血水銀濃度や臍帯組織メチル水銀濃度で有意な関連を示したが、母親毛髪水銀濃度では有意とならなかった<sup>98, 99)</sup>。

今後のメチル水銀の疫学研究として、耐容週間摂取量 (TWI) を算出する際の one compartment pharmacokinetic model に使われる生物学的半減期や毛髪/血液濃度比などの仮説を再検討することが挙げられるかもしれない。メチル水銀の生物学的半減期は、これまで 2 つの論文で算出された  $52 \pm 4$  (標準誤差) 日<sup>100)</sup> と  $50 \pm 1$  日<sup>101)</sup> の値から 50 日とされ、上のモデルの排出定数として  $0.014 (= \ln 2 / 50)$  が使われている。実際には、イラクで高濃度メチル水銀曝露を受けた患者で算出した生物学的半減期 72 日や<sup>102)</sup>、魚摂取を介して高濃度メチル水銀に曝露したボランティアから算出された半減期 80 日も存在する<sup>103)</sup>。また、メチル水銀の毛髪/血液濃度比は、過去に報告された値は 140~370 であり、250 が一般に用いられている。しかしながら、フェロー諸島出生コホートの 7 歳および 14 歳児における濃度比は中央値で 370 と 264 であった<sup>104)</sup>。さらに、スウェーデン成人の中央値は 373<sup>105)</sup>、日本人妊婦の平均値は約 350 であった<sup>106)</sup>。このように、最近報告された毛髪/血液濃度比は過去に算出された値と大きく乖離している可能性があるが、メチル水銀の暫定的耐容週間摂取量や TWI 算出に際して保守的な値が使われている。したがって、どの値が薬物動態学的に最適であるのか吟味する研究は将来のリスク管理に不可欠であろう。

## ・ 結論

今年度の文献レビューにより、以下のことが示された。メチル水銀および水銀を扱った PubMed 掲載論文の中で、2008 年以降ヒト研究の報告数が減少傾向にある。海外の出生コホート研究を概観すると、メチル水銀の神経発達影響の他に、同時に曝露される低濃度鉛や *n*-3 長鎖不飽和脂肪酸も影響することが示されており、低濃度曝露評価の際にはメチル水銀単独の測定ではリスク評価が難しいことが示唆されている。魚摂取頻度調査 (FFQ) からメチル水銀の曝露を評価するには、推定メチル水銀摂取量は生体試料中のメチル水銀曝露量を 30% 程度しか説明できず、むしろ過大評価してしまう可能性がある。メチル水銀毒性をセレン化合物が修飾することが古くより言われてきたが、冠動脈疾患への発症にセレンの修飾作用は観察されないように思われた。近年の国際市場における金価格の上昇が発展途上国の小規模鉱山の採掘活動の活発化や採掘地区の拡大を招いている。金回収は依然として水銀アマルガム法が主流であり、水銀が大量に使用される。これにより、森林破壊とともに、作業従事者に慢性水銀中毒症状が散見されるようになっている。

なお、「若い研究者にメチル水銀の問題を再認識してもらい、同時に学会やインターネットサイトに発表・掲載することにより、この種の研究の重要性を広く理解してもらうために情報発信する」目的で、日本衛生学雑誌 2011 年発行の 66 巻 682～695 頁に「メチル水銀毒性に関する疫学的研究の動向」と題する総説を掲載した（引用文献 12）。これは PubMed にも “Recent evidence from epidemiological studies on methylmercury toxicity” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21996768>) として掲載され、また日本の研究者は、J-Stage を介して、PDF ファイルとしてこの総説を入手できる。

## ．次年度以降の計画

メチル水銀曝露は低濃度でも小児の神経発達に影響することが多くの論文で示されている。一方で鉛や PCB などの化学物質も神経毒性があることが知られており、これらのメチル水銀との同時曝露による神経発達影響に関する研究が今後なされていくと考えられる。したがって、2012 年に発表される論文の中で、このような内容を含む論文を選択的に収集し、その中でメチル水銀がどのように評価されているのか検討したい。また、メチル水銀の TWI を算出する際の one compartment pharmacokinetic model に使われる生物学的半減期や毛髪/血液濃度比などの仮説を再検討したい。

## 引用文献

1. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19: 417-428.
2. Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Needham L, Choi A, Wang Y, Berlin M, Clarkson TW. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. *JAMA* 1998; 280: 701-707.
3. Murata K, Weihe P, Araki S, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 471-472.
4. Sørensen N, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology* 1999; 10: 370-375.
5. Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, Debes F, Murata K, Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23: 305-317.
6. Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption

- in the Seychelles child development study. *Lancet* 2003; 361: 1686-1692.
7. Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer HH, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 645-655.
  8. Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer PV, Bode P, Aro A, Gomez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martin-Moreno JM, Kok FJ. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 347: 1747-1754.
  9. Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2002; 347: 1755-1760.
  10. Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JM, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Clarkson TW. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 2008; 29: 767-775.
  11. Strain JJ, Davidson PW, Bonham MP, Duffy EM, Stokes-Riner A, Thurston SW, Wallace JM, Robson PJ, Shamlaye CF, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Myers GJ, Clarkson TW. Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles child development nutrition study. *Neurotoxicology* 2008; 29: 776-782.
  12. 村田勝敬, 吉田 稔, 坂本峰至, 岩井美幸, 柳沼 梢, 龍田 希, 岩田豊人, 苅田香苗, 仲井邦彦. メチル水銀毒性に関する疫学的研究の動向. *日衛誌* 2011; 66: 682-695.
  13. Yorifuji T, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Prenatal exposure to lead and cognitive deficit in 7- and 14-year-old children in the presence of concomitant exposure to similar molar concentration of methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 205-211.
  14. Stokes-Riner A, Thurston SW, Myers GJ, Duffy EM, Wallace J, Bonham M, Robson P, Shamlaye CF, Strain JJ, Watson G, Davidson PW. A longitudinal analysis of prenatal exposure to methylmercury and fatty acids in the Seychelles. *Neurotoxicol Teratol* 2011; 33: 325-328.
  15. Mozaffarian D, Shi P, Morris JS, Spiegelman D, Grandjean P, Siscovick D, Willett WC, Rimm EB. Mercury exposure and risk of cardiovascular disease in two U.S. cohorts. *N Engl J Med* 2011; 364: 1116-1125.
  16. National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
  17. Menke A, Muntner P, Batuman V, Silbergeld EK, Guallar E. Blood lead below 0.48  $\mu\text{mol/L}$  (10  $\mu\text{g/dL}$ ) and mortality among US adults. *Circulation* 2006; 114: 1388-1394.
  18. 村田勝敬, 苅田香苗, 堀口兵剛, 岩田豊人, 広瀬明彦. ベンチマークドース法の臨床的基準をもつ健康影響指標への適用. *産衛誌* 2011; 53: 67-77.
  19. Sirot V, Cuerin T, Mauras Y, Garraud H, Volatier J-L, Leblanc J-C. Methylmercury exposure assessment using dietary and biomarker data among frequent seafood consumers in France CALIPSO study.

- Environ Res 2008; 107: 30-38.
20. Suzuki K, Nakai K, Sugawara T, Nakamura T, Ohba T, Shimada M, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Kurokawa N, Murata K, Satoh C, Satoh H. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs and seafood intake: neonatal behavioral assessment scale results of Tohoku study of child development. *Environ Res* 2010; 110: 699-704.
  21. Lincoln RA, Shine JP, Chesney EJ, Vorhees DJ, Grandjean P, Senn DB. Fish consumption and mercury exposure among Louisiana recreational anglers. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 245-251.
  22. Iwasaki Y, Sakamoto M, Nakai K, Oka T, Dakeishi M, Iwata T, Satoh H, Murata K. Estimation of daily mercury intake from seafood in Japanese women: Akita cross-sectional study. *Tohoku J Exp Med* 2003; 200: 67-73.
  23. Date C, Yamaguchi M, Tanaka H. Development of a food frequency questionnaire in Japan. *J Epidemiol* 1996; 6: S131-S136.
  24. Dakeishi M, Nakai K, Sakamoto M, Iwata T, Suzuki K, Liu X-J, Ohno T, Kurosawa T, Satoh H, Murata K. Effects of hair treatment on hair mercury – the best biomarker of methylmercury exposure? *Environ Health Prev Med* 2005; 10: 208-212.
  25. Ohno T, Sakamoto M, Kurosawa T, Dakeishi M, Iwata T, Murata K. Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environ Res* 2007; 103: 191-197.
  26. Jedrychowski W, Perera F, Jankowski J, Rauh V, Flak E, Caldwell KL, Jones RL, Pac A, Lisowska-Miszczyk I. Fish consumption in pregnancy, cord blood mercury level and cognitive and psychomotor development of infants followed over the first three years of life: Krakow epidemiologic study. *Environ Int* 2007; 33: 1057-1062.
  27. Mahaffey KR, Clickner RP, Bodurow CC. Blood organic mercury and dietary mercury intake: National Health and Nutrition Examination Survey, 1999 and 2000. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 562-570.
  28. Mahaffey KR, Clickner RP, Jeffries RA. Methylmercury and omega-3 fatty acids: co-occurrence of dietary sources with emphasis on fish and shellfish. *Environ Res* 2008; 107: 20-29.
  29. Ström S, Helmfrid I, Glynn A, Berglund M. Nutritional and toxicological aspects of seafood consumption – an integrated exposure and risk assessment of methylmercury and polyunsaturated fatty acids. *Environ Res* 2011; 111: 274-280.
  30. Wennberg M, Bergdahl IA, Hallmans G, Norberg M, Lundh T, Skerfving S, Strömberg U, Vessby B, Jansson JH. Fish consumption and myocardial infarction: a second prospective biomarker study from northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 27-36.
  31. Lemire M, Fillion M, Frenette B, Mayer A, Philibert A, Passos CJ, Guimarães JR, Barbosa FJ, Mergler D. Selenium and mercury in the Brazilian Amazon: opposing influences on age-related cataracts. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1584-1589.
  32. Lubick N. A balanced diet? - Selenium may offset the effects of methylmercury on cataract development. *Environ Health Perspect* 2010; 118: A491.

33. Ralston NV, Raymond LJ. Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology* 2010; 278: 112-123.
34. Park K, Mozaffarian D. Omega-3 fatty acids, mercury, and selenium in fish and the risk of cardiovascular diseases. *Curr Atheroscler Rep* 2010; 12: 414-422.
35. Ayotte P, Carrier A, Ouellet N, Boiteau V, Abdous B, Sidi EA, Château-Degat M-L, Dewailly É. Relation between methylmercury exposure and plasma paraoxonase activity in Inuit adults from Nunavik. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1077-1083.
36. Engström KS, Wennberg M, Strömberg U, Bergdahl IA, Hallmans G, Jansson J-H, Lundh T, Norberg M, Rentschler G, Vessby B, Skerfving S, Broberg K. Evaluation of the impact of genetic polymorphisms in glutathione-related genes on the association between methylmercury or n-3 polyunsaturated long chain fatty acids and risk of myocardial infarction: a case-control study. *Environ Health* 2011; 10: 33.
37. Usuki F, Yamashita A, Fujimura M. Post-transcriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. *J Biol Chem* 2011; 286: 6641-6649.
38. Carvalho CM, Lu J, Zhang X, Arnér ES, Holmgren A. Effects of selenite and chelating agents on mammalian thioredoxin reductase inhibited by mercury: implications for treatment of mercury poisoning. *FASEB J* 2011; 25: 370-381.
39. Moreno F, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Simultaneous analysis of mercury and selenium species including chiral forms of selenomethionine in human urine and serum by HPLC column-switching coupled to ICP-MS. *Analyst* 2010; 135: 2700-2705.
40. Kwaansa-Ansah EE, Basu N, Nriagu JO. Environmental and occupational exposures to mercury among indigenous people in Dunkwa-On-Offin, a small scale gold mining area in the South-West of Ghana. *Bull Environ Contam Toxicol* 2010; 85: 476-480.
41. Tomicic C, Vernez D, Belem T, Berode M. Human mercury exposure associated with small-scale gold mining in Burkina Faso. *Int Arch Occup Environ Health* 2011; 84: 539-546.
42. Oosthuizen MA, John J, Somerset V. Mercury exposure in a low-income community in South Africa. *S Afr Med J* 2010; 100: 366-371.
43. Steckling N, Boese-O'Reilly S, Gradel C, Gutschmidt K, Shinee E, Altangerel E, Badrakh B, Bonduush I, Surenjav U, Ferstl P, Roider G, Sakamoto M, Sepai O, Drasch G, Lettmeier B, Morton J, Jones K, Siebert U, Hornberg C. Mercury exposure in female artisanal small-scale gold miners (ASGM) in Mongolia: An analysis of human biomonitoring (HBM) data from 2008. *Sci Total Environ* 2011; 409: 994-1000.
44. Olivero-Verbel J, Caballero-Gallardo K, Negrete-Marrugo J. Relationship between localization of gold mining areas and hair mercury levels in people from Bolivar, north of Colombia. *Biol Trace Elem Res* 2011; 144: 118-132.
45. González-Carrasco V, Velasquez-Lopez PC, Olivero-Verbel J, Pájaro-Castro N. Air mercury contamination in the gold mining town of Portovelo, Ecuador. *Bull Environ Contam Toxicol* 2011; 87: 250-253.

46. Schueler V, Kuemmerle T, Schröder H. Impacts of surface gold mining on land use systems in western Ghana. *Ambio* 2011; 40: 528-539.
47. Swenson JJ, Carter CE, Domec JC, Delgado CI. Gold mining in the Peruvian Amazon: global prices, deforestation, and mercury imports. *PLoS One* 2011; 6: e18875.
48. Karahalil B, Ulukaya M, Alp O. Pilot study of environmental monitoring of Konya region near abandoned mercury mine in Turkey. *Bull Environ Contam Toxicol.* 2012; 88: 150-153.
49. 原田正純. 水俣病. 東京: 岩波書店, 1972.
50. 有馬澄雄(編). 水俣病 - 20年の研究と今日の課題. 東京: 青林舎, 1979.
51. 水俣病に関する社会科学的研究会. 水俣病の悲劇を繰り返さないために - 水俣病の経験から学ぶもの -. 水俣: 国立水俣病総合研究センター, 1999.
52. Kurland LT, Faro SN, Siedler H. Minamata disease: The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compounds. *World Neurology* 1960; 1: 370-395.
53. Nishigaki S, Harada M. Methylmercury and selenium in umbilical cords of inhabitants of the Minamata area. *Nature* 1975; 258: 324-325.
54. Igata A. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. *Environ Res* 1993; 63: 157-169.
55. Watanabe C, Satoh H. Evolution of our understanding of methylmercury as a health threat. *Environ Health Perspect* 1996; 104(suppl 2): 367-379.
56. Satoh H. Occupational and environmental toxicology of mercury and its compounds. *Ind Health* 2000; 38: 153-164.
57. Tsuda T, Yorifuji T, Takao S, Miyai M, Babazono A. Minamata disease: catastrophic poisoning due to a failed public health response. *J Public Health Policy* 2009; 30: 54-67.
58. Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1137-1145.
59. Grandjean P, Choi AL, Weihe P, Murata K. Methylmercury neurotoxicology: from rare poisonings to silent pandemic. In: Wang C, Slikker W Jr (eds). *Developmental Neurotoxicology Research: Principles, Models, Techniques, Strategies, and Mechanisms*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc, 2011: 335-356.
60. Murata K, Sakamoto M. Minamata disease. In: Nriagu JO (ed). *Encyclopedia of Environmental Health*, vol 3. Burlington: Elsevier, 2011: 774-780.
61. Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 1973; 181: 230-241.
62. Marsh DO, Clarkson TW, Cox C, Myers GJ, Amin-Zaki L, Al-Tikriti S. Fetal methylmercury poisoning. Relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Arch Neurol* 1987; 44: 1017-1022.
63. Cox C, Clarkson TW, Marsh DO, Amin-Zaki L, Tikriti S, Myers GG. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environ Res* 1989; 49: 318-332.

64. Edwards GN. Two cases of poisoning by mercuric methide. Saint Bartholomew's Hosp Rep 1865; 1: 141-150.
65. Hepp P. Über Quecksilberäthylverbindungen und über das Verhältniss der Quecksilberäthyl- zur Quecksilbervergiftung. Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol 1887; 23: 91-128.
66. Koelsch F. Gesundheitsschädigungen durch organische Quecksilberverbindungen. Arch Gewerbepathol Gewerbehyg 1937; 8: 113-116.
67. Franke E, Lundgren KD. Gewerbehygienische Kontrolle bei Herstellung von Alkylquecksilberverbindungen. Arch Gewerbepathol Gewerbehyg 1956; 15: 186-202.
68. Hunter D, Russell DS. Focal cerebellar and cerebellar atrophy in a human subject due to organic mercury compounds. J Neurol Neurosurg Psychiatr 1954; 17: 235-241.
69. Engleson G, Herner T. Alkyl mercury poisoning. Acta Paediatr 1952; 41: 289-294.
70. Eto K, Yasutake A, Korogi Y, Akima M, Shimozeiki T, Tokunaga H, Kuwana T, Kaneko Y. Methylmercury poisoning in common marmosets – MRI findings and peripheral nerve lesions. Toxicol Pathol 2002; 30: 723-734.
71. Jensen S, Jernelöv A. Biosynthesis of methylmercury. Nordforsk Biocidinformatio 1967; 10: 4-5.
72. Borg K. Kviksilverproblematikken inom vår terrestriske fauna, dess upptäckt och vidareutveckling. Nord Hyg Tidskr 1969; 50: 9-13.
73. Spyker JM, Sparber SB, Goldberg AM. Subtle consequences of methylmercury exposure: behavioral deviations in offspring of treated mothers. Science 1972; 177: 621-623.
74. Kjellström T, Kennedy P, Wallis S, Mantell C. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage 1: Preliminary Tests at Age 4. Report 3080. Solna: National Swedish Environmental Protection Board, 1986.
75. 石原信夫. 水俣病の原因究明における反省点を今後の教訓とするための一考察. 日衛誌 2002; 56: 649-654.
76. 石原信夫. 有機水銀化合物の毒性はいつ頃から明らかになったのか? - 水俣病原因確定の遅れと文献検索 -. 日衛誌 2011; 66: 746-749.
77. Harada M. Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. Teratology 1978; 18: 285-288.
78. Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Tako S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. Environ Int 2011; 37: 907-913.
79. Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Patterson DG Jr, Sjödin A, Turner WE, Weihe P. Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. Environ Sci Technol 2011; 45: 1121-1126.
80. Sakamoto M, Murata K, Kubota M, Nakai K, Satoh H. Mercury and heavy metal profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. Ecotoxicol Environ Saf 2010; 73: 1-6.
81. Aschner M, Clarkson TW. Distribution of mercury 203 in pregnant rats and their fetuses following systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. Teratology 1988; 38: 145-155.

82. Kajiwara Y, Yasutake A, Adachi T, Hirayama K. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch Toxicol* 1996; 70: 310-314.
83. Murata K, Dakeishi M, Shimada M, Satoh H. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child development: messages from the new born. *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 187-202.
84. Kantola M, Purkunen R, Kröger P, Tooming A, Juravskaja J, Pasanen M, Seppanen K, Saarikoski S, Vartiainen T. Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress? *Environ Res* 2004; 96: 51-61.
85. Osman K, Åkesson A, Berglund M, Bremme K, Schütz A, Ask K, Vahter M. Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin Biochem* 2000; 33: 131-138.
86. Al-Saleh E, Nandakumaran M, Al-Shammari M, Al-Harouny A. Assessment of maternal-fetal status of some essential trace elements in pregnant women in late gestation: relationship with birth weight and placental weight. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16: 9-14.
87. Tsuchiya H, Mitani K, Kodama K, Nakata T. Placental transfer of heavy metals in normal pregnant Japanese women. *Arch Environ Health* 1984; 39: 11-17.
88. Korpela H, Loueniva R, Yrjanheikki E, Kauppila A. Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1086-1089.
89. Soong YK, Tseng R, Liu C, Lin PW. Lead, cadmium, arsenic, and mercury levels in maternal and fetal cord blood. *J Formos Med Assoc* 1991; 90: 59-65.
90. Plöckinger B, Dadak C, Meisinger V. Lead, mercury and cadmium in newborn infants and their mothers. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1993; 197: 104-107.
91. Baranowska I. Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Occup Environ Med* 1995; 52: 229-232.
92. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 3: toxic trace elements in placenta and placenta as a biomarker for these elements. *Sci Total Environ* 2001; 280: 221-238.
93. Breen JG, Eisenmann C, Horowitz S, Miller RK. Cell-specific increases in metallothionein expression in the human placenta perfused with cadmium. *Reprod Toxicol* 1994; 8: 297-306.
94. Itoh N, Fujita Y, Nakanishi H, Kawai Y, Mayumi T, Hwang GS, Min K, Onosaka S, Muto N, Tanaka K. Binding of Cd to metallothionein in the placenta of Cd-treated mouse. *J Toxicol Sci* 1996; 21: 19-27.
95. Ronco AM, Arguello G, Suazo M, Llanos MN. Increased levels of metallothionein in placenta of smokers. *Toxicology* 2005; 208: 133-139.
96. Kippler M, Hoque AMW, Raqib R, Öhrvik H, Ekström EC, Vahter M. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus. *Toxicol Lett* 2010; 192: 162-168.
97. Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Yasutake D, Kishi R. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ*

- Res 2009; 109: 906-913.
98. Grandjean P, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr* 2004; 144: 169-176.
  99. Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Dakishi M, Iwata T, Liu XJ, Satoh H. Subclinical effects of prenatal methylmercury exposure on cardiac autonomic function in Japanese children. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 379-386.
  100. Kershaw TG, Clarkson TW, Dhahir PH. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Arch Environ health* 1980; 35: 28-36.
  101. Sherlock J, Hislop J, Newton D, Topping G, Whittle K. Elevation of mercury in human blood from controlled chronic ingestion of methylmercury in fish. *Hum Toxicol* 1984; 3: 117-131.
  102. Al-Shahristani H, Shihab KM. Variation of biological half-life of methylmercury in man. *Arch Environ Health* 1974; 28: 342-344.
  103. Birke G, Johnels AG, Plantin LO, Sjöstrand B, Skerfving S, Westermark T. Studies on humans exposed to methyl mercury through fish consumption. *Arch Environ Health* 1972; 25: 77-91.
  104. Budtz-Jørgensen E, Grandjean P, Jørgensen PJ, Weihe P, Keiding N. Association between mercury concentrations in blood and hair in methylmercury-exposed subjects at different ages. *Environ Res* 2004; 95: 385-393.
  105. Berglund M, Lind B, Björberg KA, Palm B, Einarsson Ö, Vahter M. Inter-individual variations of human mercury exposure biomarkers: a cross-sectional assessment. *Environ Health* 2005; 4: 20.
  106. Sakamoto M, Kaneoka T, Murata K, Nakai K, Satoh H, Akagi H. Correlations between mercury concentrations in umbilical cord tissue and other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. *Environ Res* 2007; 103: 106-111.

## **A review of health effects of methylmercury exposure in humans**

Katsuyuki Murata<sup>1</sup>, Minoru Yoshida<sup>2</sup>, Mineshi Sakamoto<sup>3</sup>, Kanae Karita<sup>4</sup>, Toyoto Iwata<sup>1</sup>,  
Kozue Yaginuma-Sakurai<sup>5</sup>, Miyuki Iwai-Shimada<sup>5</sup>, Nozomi Tatsuta<sup>5</sup>, Kunihiko Nakai<sup>5</sup>

<sup>1</sup> *Department of Environmental Health Sciences, Akita University Graduate School of Medicine*

<sup>2</sup> *Hachinohe University Faculty of Human Health*

<sup>3</sup> *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

<sup>4</sup> *Department of Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine*

<sup>5</sup> *Department of Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine*

### *Abstract*

More than fifty years have passed since the outbreak of Minamata disease and methylmercury poisoning disasters like the Minamata disease due to industrial effluents or methylmercury-containing fungicide intoxication have scarcely happened in developed countries. Nevertheless, health issues of low-level exposure to methylmercury in humans can exist and environmental and health issues of widespread mercury contamination have occurred in gold and mercury mining areas of developing countries. In this article, we provide an overview of studies addressing these health effects of methylmercury and mercury, by using the PubMed of the US National Library of Medicine.

The following suggestions were obtained concerning low-level methylmercury exposure: (1) In recent years, the proportion of human studies among methylmercury- or mercury-related reports tends to decrease. (2) In reviewing birth cohort studies in the world, low-level exposure to lead and *n*-3 polyunsaturated fatty acids, as well as methylmercury exposure, seem to affect child development. Therefore, a research model with concomitant exposures is necessary for the risk assessment of methylmercury. (3) Daily mercury intake estimated using a food frequency questionnaire can explain approximately 30% of the exposure level determined from hair/blood samples and seems to overestimate the actual level. (4) Selenium has been suggested to modify the adverse effect of methylmercury since 1970s, but such protective effects of selenium on coronary heart diseases were not observed in recent studies. (5) Recent mining is converting primary forest at a non-linear rate alongside increasing gold prices. As the result, there seem to be both environmental impacts such as deforestation and many small-scale gold miners with signs/symptoms involved in chronic mercury poisoning in developing countries.

*Keywords:* Methylmercury; Selenium; Child development; Gold and mercury mining



○メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する

研究領域

(水俣病に関する基盤的研究)



### Ⅲ メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究



# メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究

研究者 永沼 章（東北大学大学院薬学研究科教授）

## 研究要旨

これまでに我々は、酵母においてゴルジ体から multivesicular body (MVB) ソーティングシステムを経由して液胞に蛋白質を輸送する経路がメチル水銀毒性増強に深く関与していることを見出し、この輸送系によって液胞に運ばれることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質の候補として Sis1 および Rsp3 を同定した。本年度における検討により、両蛋白質は共にごく一部しか MVB ソーティングシステムによって液胞に運ばれない可能性が示唆された。また、Ubi4 による Sis1 のモノユビキチン化には Ubi4 がポリユビキチンの形態をとっている必要のあることも判明した。一方、ヒト由来細胞のメチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子を siRNA を利用したスクリーニング法を開発して検索したところ、3 種の転写因子が同定された。その 1 つである HSF1 は、遺伝子ノックダウンにより HEK293 細胞をメチル水銀に対して高感受性にした。メチル水銀は HSF1 の細胞内レベルに影響を与えることなく核内レベルを増加させ、それに伴って HSF1 の標的遺伝子の転写を促進させた。25 種の HSF1 標的遺伝子について調べたところ、HSP90 と HSC70 がノックダウンによって細胞をメチル水銀に対して高感受性にすることが判明した。HSF1 は変性蛋白質のリフォールディングに関わる蛋白質を発現誘導することによって細胞内ストレスを軽減していると考えられている。変性蛋白質は凝集しやすく、凝集した蛋白質の多くはユビキチン化されていることも知られている。そこで、界面活性剤 (NP-40) に不溶性でユビキチンを含む凝集蛋白質のレベルを検討したところ、正常細胞ではメチル水銀の影響はほとんど認められなかったが、HSF1 ノックダウン細胞ではメチル水銀の濃度依存的にユビキチン化凝集蛋白質のレベル上昇が観察された。以上の結果から、メチル水銀は蛋白質凝集を促進させることによって細胞毒性の一部を発揮し、HSF1 はメチル水銀によって核に移行して HSP90 や HSC70 の発現を促進させ凝集蛋白質のリフォールディングを促すことによってメチル水銀の細胞毒性に対して防御的に作用しているという可能性が考えられる。また、同定された HSF1 以外の 2 種の転写因子 (TEX27 および HOXB13) もメチル水銀によって活性化される可能性が示唆された。これら 3 種の転写因子は共にメチル水銀に対する細胞応答に関与していると考えられ、メチル水銀感受性決定機構として興味深い知見である。

キーワード：メチル水銀、感受性決定遺伝子、蛋白質液胞輸送、MVB ソーティングシステム、酵母

## 研究協力者

黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科講師）

高橋 勉（東北大学大学院薬学研究科助教）

## I 研究目的

メチル水銀毒性に対する感受性には遺伝的な個体差があると考えられるが、感受性決定の分子機構はほとんど解明されていない。我々はこれまで、酵母をヒトと同じ真核生物のモデルとして用いた網羅的遺伝子スクリーニングを行い、酵母の全遺伝子の中から高発現によって酵母のメチ

ル水銀感受性に影響を与える遺伝子をいくつか同定してきた。酵母は扱いが容易であり倍加時間が2時間と短いことから短時間で結果を得ることができ、また、哺乳類細胞よりも遺伝学的解析が簡単に確実にできるなど多くの利点を有している。さらに、酵母遺伝子の多くはヒト遺伝子と機能的な相同性が高く、これまでも酵母を用いた基礎的研究がヒト細胞内機能の解明に大きく貢献してきた。最近我々は、より精度の高い方法として、高発現ではなく、各遺伝子をそれぞれ欠損した酵母のライブラリーを用いた機能的遺伝子スクリーニング法を確立した。この方法を用いた検索で、欠損によって酵母にメチル水銀耐性を与える遺伝子群が数多く同定され、しかもそれら遺伝子のほとんどはメチル水銀毒性に関与することが初めて示されたものであった。そこで本研究では、これら遺伝子群の作用機構を解析することによって、メチル水銀に対する感受性決定機構解明を目指す。

上述のスクリーニングで同定された遺伝子群の機能は様々であったが、multivesicular body (MVB) ソーティングシステムに関わる複数の蛋白質の遺伝子が含まれており、それらがメチル水銀の細胞毒性を増強する作用を有することが明らかとなった。MVB ソーティングシステムは、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた膜蛋白質(受容体やトランスポーター)などを、液胞(リソソーム)に運んで分解するか細胞膜に戻して再利用するかを選別する重要な細胞内機構の一つと考えられている。MVB ソーティングシステムとメチル水銀との関係について検討された例はなく、我々が見出した「エンドソーム・液胞蛋白質分解系に関わる因子がメチル水銀の細胞毒性を増強する」という知見は、これまでに知られていない蛋白質分解を介した全く新しいメチル水銀毒性発現機構の存在を示唆するものである。

これまでに我々は、MVB ソーティングシステムに関わる全てが知られている全ての蛋白質(13種)とメチル水銀毒性との関係を検討し、これら蛋白質が一つでも欠けるとメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにし、さらに、様々な蛋白質輸送経路の内、ゴルジ体からMVB ソーティングシステムを介して液胞に輸送する経路がメチル水銀毒性の増強に関与することも明らかにしてきた。また、本システムによって認識される基質蛋白質はモノユビキチン化されていることが判明しているが、我々はこの基質蛋白質のモノユビキチン化に関わると予想される蛋白質としてポリユビキチン蛋白質である Ubi4 を同定している。Ubi4 はメチル水銀の毒性を増強させる作用を有しており、MVB ソーティングシステムは Ubi4 に依存してメチル水銀毒性を増強させることも判明している。本研究では平成 22 年度～24 年度の 3 年間で、Ubi4 に依存し、かつ、MVB ソーティングシステムを介してメチル水銀毒性を増強させる酵母蛋白質(X-蛋白質)を明らかにすると共に、その蛋白質の作用機構とMVB ソーティングシステムとの関係を解明することを第一の目的とする。

また、我々は酵母を用いたスクリーニングに加えてヒト培養細胞を用いたヒト遺伝子のスクリーニングも実施している。そこで、このスクリーニングによってメチル水銀毒性の発現に影響を与えることが判明した遺伝子についても、その作用機構をヒト培養細胞を用いて検討する。

本研究で得られる成果は、メチル水銀に対して遺伝的に高感受性を示す人々の特定を可能にすると共に、メチル水銀毒性発現機構の解明にも大きく貢献すると考えられ、その社会的意義も大きい。

## II 研究方法

### 1. 酵母のメチル水銀に対する感受性

酵母の single colony を SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を SD 培地で  $1 \times 10^4$  cells/ $180 \mu\text{l}$  になるように希釈した。96-well plate に分注した本希釈培養液  $180 \mu\text{l}$  に塩化メチル水銀溶液(最終濃度 0–140 nM)  $20 \mu\text{l}$  を添加して  $30^\circ\text{C}$  で 48 時間培養後、620 nm の吸光度を測定して酵母の増殖を調べた。なお、vector のみを導入した酵母を対照として用いた。

## 2. 酵母細胞からの蛋白質の抽出

酵母の single colony を SD 培地 2 mL 中に加えて  $30^\circ\text{C}$  で一晩振盪培養した後に、 $1 \times 10^8$  cells または  $5 \times 10^8$  cells を 10 mL または 50 mL の SD 培地に懸濁して  $30^\circ\text{C}$  でさらに培養した。3 時間培養後に  $8 \mu\text{M}$  となるように塩化メチル水銀を添加し、再び 1.5 時間振盪培養した。この酵母を脱イオン水で 2 回洗浄後、1 mL の 10% TCA を加え氷上に 30 min 放置した。TBS で中性になるまで洗浄後、ガラスビーズと  $150 \mu\text{L}$  の TBS を加えて 4000 rpm、5 min で酵母を破碎した。その懸濁液  $150 \mu\text{L}$  を別のチューブに移し、そこに  $50 \mu\text{L}$  の lysis buffer (4% SDS、180 mM Na-HEPES ; pH7.5) を加えて  $100^\circ\text{C}$ 、5 min 加熱した後に、 $20,000 \times g$ 、5 min で遠心し、上澄を総蛋白質サンプルとした。総蛋白質サンプル中の総蛋白質量は DC protein assay kit を用いて定量した。また本上澄を総蛋白質量  $20 \mu\text{g}$ 、総容量  $20 \mu\text{L}$  となるように sample buffer および脱イオン水で希釈した後に  $100^\circ\text{C}$ 、5 min 処理し、 $5,000 \times g$ 、5 min で遠心して SDS-PAGE 用サンプルを得た。

(倫理面への配慮)

酵母および培養細胞の遺伝子組み換え体を用いた研究は「組み替え DNA 実験委員会」の承認を得た研究の一環として実施したものであり、遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、P2 指定実験室で作業を行った。

## III 研究結果と考察

### (1) MVB ソーティングシステムによるメチル水銀毒性増強機構の解析

上述したように、酵母細胞内には、Ubi4 に依存し、かつ、MVB ソーティングシステムを介してメチル水銀毒性を増強させる酵母蛋白質 (X-蛋白質) が存在すると考えられる。我々は平成 22 年度に、X-蛋白質の候補として Rps3 および Sis1 を同定することに成功した。興味深いことに、Rps3 はメチル水銀毒性を増強させる作用を有し、逆に Sis1 はメチル水銀毒性の軽減に関与することが判明している。Rps3 は MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれることによって初めてメチル水銀毒性増強作用を発揮するようになり、Sis1 は通常はメチル水銀毒性軽減因子として機能しているが Sis1 の一部は MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれてその機能を失う(分解される?) ため、MVB ソーティングシステムが抑制されると Rps3 はメチル水銀毒性増強作用を発揮できず、また、Sis1 はメチル水銀毒性軽減機能を維持するようになるため、結果としてメチル水銀毒性が軽減されると予想することができる。

MVB システムによって認識される基質蛋白質はモノユビキチン化されており、我々はこの基質蛋白質のモノユビキチン化に関わると予想される蛋白質としてポリユビキチン蛋白質である Ubi4 を同定していることから、本年度は Rps3 および Sis1 のモノユビキチン化とそれにおける Ubi4 の役割およびポリユビキチンとしての Ubi4 の意義について検討した。

#### (1-1) Rps3 および Sis1 のモノユビキチン化と Ubi4 の役割:

昨年度、Rps3 および Sis1 がモノユビキチン化されること、そしてそれを Ubi4 の欠損が抑制す

ること、を示唆する実験結果が得られていたが、それらのことが本年度の詳細な検討により再確認された。なお、Rps3は212番目のリジンがユビキチン化されるとの報告があるので、このリジンをアラニンに置換した変異体を酵母内に発現させたところ、少なくともモノユビキチン化 Rps3と考えられる35 kDa (RPS3 = 26.5 kDa, ユビキチン = 8.5 kDa) のバンド濃度は影響を受けなかった。したがって、Rps3は212番目以外のリジンがモノユビキチン化を受ける可能性が考えられる。また、MVBソーティングシステムの阻害がRps3およびSis1の細胞内分布に与える影響を検討したが、ほとんど影響は認められなかった。MVBソーティングシステムを阻害した際においても細胞内に認められるモノユビキチン化されたRps3およびSis1はごく微量であることから、Rps3およびSis1はごく一部しかMVBソーティングシステムによって液胞に運ばれない可能性が考えられる。

#### (1-2) ポリユビキチンとしてのUbi4の意義：

Ubi4は細胞内でプロセシングされて単体のユビキチンとして機能すると考えられている。しかし、Ubi4欠損酵母が示すメチル水銀耐性は単体のユビキチンを高発現させても影響されないことから、Ubi4がポリユビキチンとして何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。そこで、Sis1のモノユビキチン化におけるポリユビキチンとしてのUbi4の役割を検討した。その結果、Ubi4欠損により低下したモノユビキチン化Sis1量は、Ubi4遺伝子を酵母に導入することによって増加したが、Ubi4の代わりに単体のユビキチンを高発現させても影響は認められなかった。このことから、Ubi4によってSis1がモノユビキチン化される際に、Ubi4はポリユビキチンとして存在する必要があると考えられる。なお、N末端にFLAGを融合させたUbi4を酵母内に発現させて検討した結果、少なくともUbi4のN末端のユビキチンはSis1のモノユビキチン化に使われないことが判明した。

#### (2) ヒト培養細胞のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子群の検索とその作用機構解析

メチル水銀毒性の発現に影響を与えるヒト遺伝子を明らかにするために、siRNAを利用した遺伝子検索法を開発した。本法はヒト由来HEK293細胞を用い、約22,000とされるヒト遺伝子の中で機能の判明している約17,000の遺伝子をsiRNAによって1つずつノックダウンしたのちに、それら細胞(約17,000種)のメチル水銀に対する感受性を調べるものである。この方法を用いたスクリーニングによって数多くのヒト遺伝子が同定されたが、その中に転写因子がいくつか含まれていた。そこで、それら転写因子についてその作用機構を検討した。

#### (2-1) HSF1によるメチル水銀毒性軽減：

HSF1のノックダウンが、HEK293細胞をメチル水銀に対して高感受性にすることが判明した。HSF1は、熱ショック蛋白質などの発現誘導に関わるストレス応答性転写因子であり、熱ショック等のストレス負荷によって三量体を形成して核内に移行することが知られている。そこで、メチル水銀がHSF1の細胞内分布に与える影響を検討したところ、メチル水銀はHSF1の細胞内レベルに影響を与えることなく核内レベルを増加させることが明らかとなった。また、細胞をメチル水銀処理することによって、熱処理の場合と同様に、高分子量のHSF1複合体の形成が確認された。なお、HSF1はカドミウムやヒ素によっても核移行が促進されることが知られているが、HSF1のノックダウンはカドミウムおよびヒ素に対する細胞の感受性には影響を与えなかった。核内に移行したHSF1は、多くの遺伝子の転写を促進させる。HSF1によって転写が促進されることが知られている遺伝子の1つであるHSP70のmRNAレベルは実際にメチル水銀によって上昇し、HSF1をノックダウンすることによってその効果は顕著に抑制された。HSF1によって転写が促進されることが

知られている 25 種の遺伝子の中では、HSP90 と HSC70 がノックダウンによって細胞をメチル水銀に対して高感受性にした。両遺伝子の mRNA レベルがメチル水銀によって上昇し、HSF1 ノックダウンによってその効果が抑制されることも確認された。HSF1 は細胞内で変性蛋白質生成の抑制や変性蛋白質のリフォールディング等に関わる蛋白質を発現誘導することによって細胞内ストレスを軽減していると考えられている。蛋白質の変性を引き起こす要因の 1 つに活性酸素濃度の増加があり、メチル水銀が活性酸素濃度を上昇させるとの報告もある。しかし、HEK293 細胞をメチル水銀で処理した際に認められた活性酸素濃度上昇の程度は HSF1 ノックダウンによる影響を受けなかった。一方、変性蛋白質は凝集しやすく、凝集した蛋白質の多くはユビキチン化されていることも知られている。そこで、界面活性剤 (NP-40) に不溶性でユビキチンを含む凝集蛋白質のレベルを検討したところ、正常細胞ではメチル水銀の影響はほとんど認められなかったが、HSF1 ノックダウン細胞ではメチル水銀の濃度依存的にユビキチン化凝集蛋白質のレベル上昇が観察された。以上の結果から、メチル水銀は蛋白質凝集を促進させることによって細胞毒性の一部を発揮し、HSF1 はメチル水銀によって核に移行して HSP90 や HSC70 の発現を促進させ凝集蛋白質のリフォールディングを促すことによってメチル水銀の細胞毒性に対して防御的に作用しているという可能性が考えられる。

#### (2-2) その他の転写因子が細胞のメチル水銀感受性に与える影響：

HSF1 と同様にノックダウンされることによって HEK293 細胞をメチル水銀に対して高感受性にすることが判明した蛋白質に TEX27 がある。TEX27 はその機能についてほとんど検討されていないが、構造中に zinc-finger ドメインを有することから転写因子であると考えられる。そこで、メチル水銀が TEX27 の細胞内分布に与える影響を検討したところ、メチル水銀が TEX27 の核移行を促進させることが明らかとなった。このことから、TEX27 は HSF1 と同様に細胞のメチル水銀暴露に応答して作用する防御因子である可能性が考えられる。

TEX27 や HSF1 とは逆に、ノックダウンされることによって HEK293 細胞をメチル水銀耐性にする転写因子として HOXB13 が同定された。HOXB13 は TNF- $\alpha$  の合成誘導に関わることが知られているが、本研究によりメチル水銀が TNF- $\alpha$  の mRNA レベルを顕著に上昇させることが判明した (HOXB13 をノックダウンすることによってその効果は抑制された)。TNF- $\alpha$  阻害剤である WP9QY の培地への添加がメチル水銀毒性を軽減したことから、メチル水銀が HOXB13 を活性化して TNF- $\alpha$  の合成を促進することによって細胞毒性の一部を発揮している可能性を考えることもできる。

## IV 結論

MVB ソーティングシステムを経由して液胞に輸送されることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質の候補として Sis1 および Rsp3 が同定されたが、両蛋白質は共にごく一部しか MVB ソーティングシステムによって液胞に運ばれない可能性が示唆された。また、Ubi4 による Sis1 のモノユビキチン化には Ubi4 がポリユビキチンの形態をとっている必要のあることも示唆された。今後、両蛋白質の機能及び細胞内挙動とメチル水銀毒性との関係を詳細に検討することによって、MVB ソーティングシステムから液胞への蛋白質輸送経路のメチル水銀毒性発現における役割が解明されると期待される。

一方、ヒト由来細胞のメチル水銀感受性に影響を与えるヒト遺伝子を siRNA を利用したスクリーニング法を開発して検索したところ、3 種の転写因子が同定された。これら転写因子はメチル水銀によって活性化される可能性があることから、ヒト細胞のメチル水銀毒性に対する応答

機構を解明する上での突破口ともなる、興味深い知見である。このような転写因子が 3 種も同定されることは希であり、今後の研究の発展が大いに期待できる。

#### V 次年度以降の計画

Sis1 および Rsp3 の機能及び細胞内挙動とメチル水銀毒性との関係を詳細に検討することによって、新しいメチル水銀の毒性発現機構が明らかになるものと期待される。また、新たに同定されたメチル水銀応答性のヒト転写因子についても、その応答・活性化機構および下流因子の同定などを行うことによって、その意義を明確にする予定である。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Hwang GW Ryoke K Lee JY Takahashi T Naganuma A: siRNA-mediated silencing of the gene for heat shock transcription factor 1 causes hypersensitivity to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:851-853.
- 2) Hwang GW Du K Takahashi T Naganuma A: Inhibition of F-box protein FBXO6 gene expression by RNA interference enhances cadmium toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:847-849.
- 3) Hwang GW Lee JY Ryoke K Matsuyama F Kim JM Takahashi T Naganuma A: Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:389-391.
- 4) Hwang GW Tobita M Takahashi T Kuge S Kita K Naganuma A: siRNA-mediated AMPK1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35:601-604.
- 5) Hwang GW Ryoke K Takahashi T Naganuma A: Silencing of the gene for homeobox protein HOXB13 by siRNA confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35:941-944.
- 6) Hwang GW Oh SE Takahashi T Lee JY Naganuma A: siRNA-mediated knockdown of the melanocortin 2 receptor accessory protein 2 (MRAP2) gene confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35:947-950.
- 7) Watanabe J Nakamachi T Ogawa T Naganuma A Nakamura M Shioda S Nakajo S, Characterization of antioxidant protection of cultured neural progenitor cells (NPC) against methylmercury (MeHg) toxicity. *J Toxicol Sci* 2009;34, 315-325.
- 8) Lee JY Hwang GW Naganuma A, Rip1 enhances methylmercury toxicity through production of reactive oxygen species (ROS) in budding yeast. *J Toxicol Sci* 2009;34:715-717.
- 9) Hwang GW Wada N Kuge S Naganuma A, Overexpression of the novel F-box protein Ymr258c confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Toxicol Sci* 2009; 34: 413-416.
- 10) Kanda H Kikushima M Homma-Takeda S Sumi D Endo A Toyama T Miura N Naganuma Kumagai Y, Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis. *Arch. Toxicol* 2008;82:67-73.
- 11) Hwang G W Furuchi T Naganuma A, The ubiquitin-conjugating enzymes, Ubc4 and Cdc34, mediate cadmium resistance in budding yeast through different mechanisms. *Life Sci* 2008;82: 1182-1185.

- 12) Hwang GW Hayashi T Kita K Takahashi T Kuge S Naganuma A, siRNA-mediated inhibition of phosphatidylinositol glycan class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells, *J Toxicol Sci* 2007; 32: 581-583.
- 13) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, Overexpression of Cdc34 confers cadmium resistance in *Saccharomyces cerevisiae* through decreased cellular utilization of sulfid, *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 873-878.
- 11) Hwang GW Ishida Y Naganuma A, Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2006;580: 6813-6818.
- 12) Hwang GW Sasaki D Naganuma A, Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins, *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1074-1078.
- 13) Hwang GW Furuoya Y Naganuma A et al., Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2, *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 378-385.
- 14) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury, *FASEB J* 2002; 16: 709-711.
- 15) Furuchi T Hwang GW Naganuma A, Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Pharmacol* 2002; 61: 738-741.
- 16) Naganuma A Miura N Kaneko S et al., GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *FASEB J* 2000; 14: 968-972.

# **Molecular mechanism for toxicity of methylmercury and its biological protection**

Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang and Tsutomu Takahashi

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Tohoku University, Sendai 982-8578, Japan*

*Keywords:* Methylmercury; Sensitivity; Protein transport to vacuole; MVB sorting pathway; Yeast

## Abstract

We have searched the genes that affected sensitivity of yeast cells to methylmercury to elucidate the mechanism of methylmercury toxicity. We have found that the protein transport pathway into vacuole through MVB sorting pathway from Golgi strongly involved in mechanism of enhancement of methylmercury toxicity. Proteins (X-proteins) that are transported from Golgi to vacuole and enhance methyl mercury toxicity might be included in yeast cells. We identified Sis1 and Rsp3 as candidates for X-proteins. In the present study, we found that Sis1 and Rsp3 were transported into vacuole through MVB sorting pathway, but the amounts of both protein transported were very limited. On the other hand, we also found that Sis1 and Rsp3 might be monoubiquitinated by Ubi4, a polyprotein containing 5 repeats of ubiquitin. In this reaction, Ubi4 might monoubiquitinate Sis1 as polyubiquitin without conversion to monoubiquitin.

#### IV 水俣病の病態生理と治療に関する研究



# 低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究

小泉修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

## 研究要旨

脳機能・脳疾患に果たすグリア細胞の役割が注目されている。これまで、メチル水銀（MeHg）がアストロサイトに直接作用して、IL-6 を産生・放出に起因する神経保護作用を呈すること、さらにもう一種類のグリア細胞「ミクログリア」がより低濃度の MeHg を感知するセンサーとして機能することを見いだした。本年は、ミクログリアが低濃度メチル水銀を感知する様式、その後のアストロサイトとのコミュニケーションメカニズム、さらに神経保護との関連性について検討をした。ミクログリアは、低濃度 MeHg を感知して ATP を放出した。この ATP は、ミクログリア-アストロサイト間情報伝達物質として機能し、アストロサイトの P2Y1 受容体活性化、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度上昇、開口放出による ATP のさらなる放出を惹起し、これによりアストロサイトの IL-6 産生が引き起こされることが明らかとなった。このように、ミクログリアは MeHg の高感度センサーとして機能し、ATP を介して脳の危機情報をアストロサイト、さらには神経細胞に伝えていることにより、脳機能を保護している可能性が示唆された。

キーワード: メチル水銀 (MeHg)、ミクログリア、アストロサイト、ATP、インターロイキン 6 (IL-6)

研究者協力者氏名・篠崎陽一（山梨大学医学部薬理学）、佐藤陽治（国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬）

## I 研究目的

グリア細胞は様々な脳機能の制御に重要な役割を果たすが<sup>1)</sup>、種々の脳疾患、例えば外傷性、炎症性、神経障害性疼痛、さらに神経変性疾患等<sup>2)</sup>では、これらの発症や慢性化に関与したり、逆に保護作用を呈したりすることが明らかとされつつある。このように、脳の生理・病態生理機能と密接に関係するグリア細胞であるが、その機能に対し種々の医薬品、化学物質、環境汚染物質等がどの様に影響するかに関してはほとんど知られていない。本研究は、メチル水銀（MeHg）により惹起される脳機能障害における、グリア細胞の役割を明らかとすることを目的とするものである。前年度までのトランスクリプトーム解析により、MeHg に暴露されたアストロサイトはインターロイキン 6（IL-6）を非常に強く発現すること、そのメカニズムの細胞外 ATP が重要であること、さこの IL-6 が MeHg による神経細胞傷害に対して保護効果を呈していることを見出した。さらに、ミクログリアがアストロサイトよりも低濃度の MeHg を感知し、その情報をアストロサイト、さらには神経細胞に伝えている可能性を見いだした。本年度の到達目標は、(1) 低濃度 MeHg を感知したミクログリアの応答様式の解明、(2) アストロサイトへの情報伝達メカニズムの解明、さらに (3) ミクログリアの化学情報を受容したアストロサイトの応答様式を、それぞれ分子レベルで詳細に明らかとすること、である。

## II 研究方法

初代アストロサイト、ミクログリア及び神経細胞の培養は、既報<sup>3)</sup>に従った。各種生化学的手法、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  濃度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 測定方法、さらに免疫細胞染色方法も既報<sup>4)</sup>に従った。Cell viability

は、WST-1 アッセイにより定量した。細胞外 ATP の測定方法には、luciferin-luciferase 法を用いた。細胞外 ATP 分解酵素阻害剤 ARL6739 存在下でメチル水銀刺激を行い、細胞外液を回収した後、luciferin-luciferase 法による ATP 化学発光反応をルミノメーターで定量解析した。

(倫理面への配慮)

本研究計画はヒト組織及び遺伝子を取り扱わない。また、すべての動物実験は、山梨大学実験動物委員会に計画書を提出し、山梨大学学長の承認を得てから遂行した。

### III 及び IV 研究結果及び考察

これまでアストロサイト及びアストロサイト-神経細胞関連に注目して MeHg の作用を検討してきた。昨年度の研究で、アストロサイトが感知出来ない  $\mu\text{M}$  未満の MeHg を他のグリア細胞「ミクログリア」が感知し、その情報をアストロサイトに伝達する可能性を見出した。本年は、以下の評価委員のコメントに沿い、ミクログリア-アストロサイト間のコミュニケーションの詳細及びその分子メカニズムの解析を行った。

#### 評価委員のコメント：

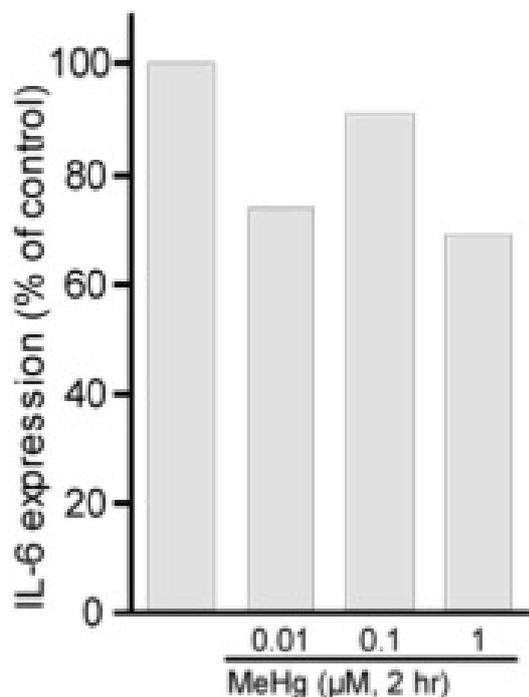
- ・ メチル水銀によるグリア細胞の応答性（抵抗性）を他の方法で模倣することで、抵抗性のある脳を作り上げるとするのは、論理が飛躍しすぎている。むしろ、ミクログリアによる低用量メチル水銀の感知、アストロサイトへの伝達、について「感知の詳細の把握とそのメカニズム」さらに「その感知シグナルのアストロサイトへの伝達現象の実験的証拠とそのメカニズム」解明をすることに焦点をおくべき。
- ・ 三細胞系を用いた、低濃度メチル水銀の影響を明らかとすること。
- ・ 研究前のシナリオが詳細すぎる。

#### (1) ミクログリア細胞が MeHg を感知する様式の解明

本年は先ず、ミクログリア-アストロサイトコミュニケーションの分子実態を解明した。ミクログリアは脳内免疫担当細胞であり、脳内を常に監視し<sup>5)</sup>、環境変化をいち早く感知して応答する。ミクログリアは、低濃度 MeHg をいち早く感知するシステムを有しているものと考えられる。低濃度 MeHg ( $0.1\mu\text{M}$ ) は、ミクログリア及びアストロサイトが単独で存在している場合には IL-6 の産生に影響しないが (図 1)、ミクログリア+アストロサイトが共存 (共培養系) している場合には、顕著な IL-6 産生を誘発した (昨年度の報告)。ミクログリア-アストロサイト間のコミュニケーションが影響する可能性を明らかとするために、先ずはグリア細胞間の代表的な情報伝達物質である、ATP 産生に対する影響を検討した。低濃度 MeHg ( $0.01\text{--}0.5\mu\text{M}$ ) は、アストロサイト単独に対しては ATP 放出に対して影響しないが、ミクログリアからは用量依存的な ATP の放出を惹起した (図 2 左)。昨年度の報告のように、MeHg 濃度を高くした場合には ( $3\mu\text{M}$ )、アストロサイトからもその放出は観察された (図 2 右)。低濃度 MeHg は、ミクログリア+アストロサイト共培養系では、さらに大きな ATP 放出を引き起こした (図 3)。P2 受容体拮抗薬の suramin ( $30\mu\text{M}$ ) は、ミクログリア単独時の ATP 放出には影響しないが、ミクログリア+アストロサイト共培養系における ATP 放出を減弱させた。また、低濃度 MeHg はミクログリアの  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を惹起したが、アストロサイト単独のそれには影響しなかった。しかし、共培養系では低濃度 MeHg はミクログリア

図1 低濃度 MeHg がミクログリアの IL-6 mRNA の変化に与える影響

低濃度 MeHg (0.01-1  $\mu$ M) はミクログリア単独培養系では IL-6 mRNA の発現を亢進させない。

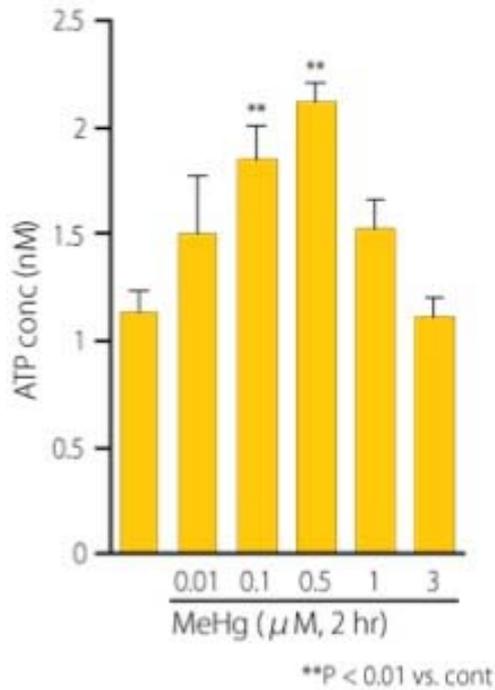


及びアストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を惹起し、後者のみ suramin で抑制された。MeHg により惹起されるミクログリアの ATP 放出は、 $Ca^{2+}$ キレート剤である BAPTA を細胞内に処置することにより抑制された (BAPTA-AM として投与)。また、MeHg により惹起される $[Ca^{2+}]_i$ 上昇及び ATP 放出は、細胞外 $Ca^{2+}$ 除去により消失したことから、細胞外からの $Ca^{2+}$ 流入がこれらの応答を惹起していることが明らかとなった。以上、低濃度 MeHg を感知したミクログリアは細胞外から $Ca^{2+}$ を流入させ、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇させ、ATP 放出を惹起すること、さらにこの ATP がパラクラインシグナルとしてアストロサイトに伝わり、これがアストロサイトからのさらなる

ATP 放出を引き起こすことが明らかとなった。

低濃度 MeHg により惹起されるミクログリアからの ATP 放出は細胞外 $Ca^{2+}$ 流入が引き金となっていたが、それ以降のメカニズムが不明であった。このメカニズムを明らかにする目的から、種々の薬物の作用を検討した。その中で、p38MAP キナーゼ阻害薬 SB2033580 (20  $\mu$ M) が、MeHg (0.1  $\mu$ M) により惹起されるミクログリアからの ATP 放出を抑制した (図4)。さらに MeHg はミクログリアの p38MAP キナーゼの活性化 (リン酸化) を誘発した。ATP がミクログリアの p38MAP キナーゼを活性化することがよく知られていることから、今回認められた p38MAP キナーゼの活性化が、MeHg による直接作用なのか、放出された ATP による二次的な作用なのかが不明であった。P2 受容体阻害薬 (suramin, PPADS, Brilliant Blue G (BBG)) は MeHg (0.1  $\mu$ M) により惹起される p38MAP キナーゼリン酸化に殆ど影響しなかった。脳内免疫担当細胞であるミクログリアは、活性化により各種 reactive oxygen species (ROS) を産生する。ROS 阻害薬である NAC (100  $\mu$ M) は、MeHg により惹起される p38MAP キナーゼ活性化及び ATP 放出を抑制した (12.2 $\pm$ 6.1% of MeHg alone, n=4)。今回の実験では、MeHg を感知する機構は明らかに出来なかったが、低濃度 MeHg を感知したミクログリアは、 $Ca^{2+}$ 流入、ROS 産生、p38MAP キナーゼの活性化を介して、ATP 放出という形で情報を発信することが明らかとなった。

## Microglia



## Astrocyte

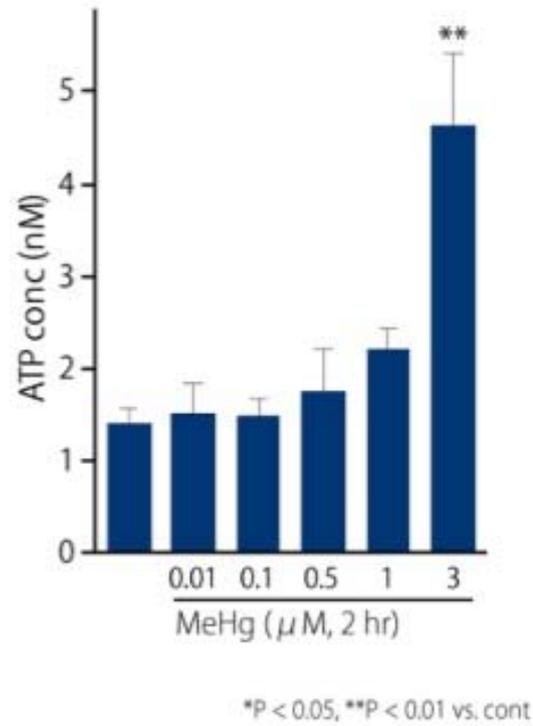


図2 低濃度 MeHg がミクログリア及びアストロサイトそれぞれの ATP 放出に与える影響  
低濃度 MeHg (0.01-0.5 μM) はミクログリア単独培養系では ATP の放出を惹起するが、アストロサイトの単独培養系には影響しなかった。

## Astrocyte + Microglia

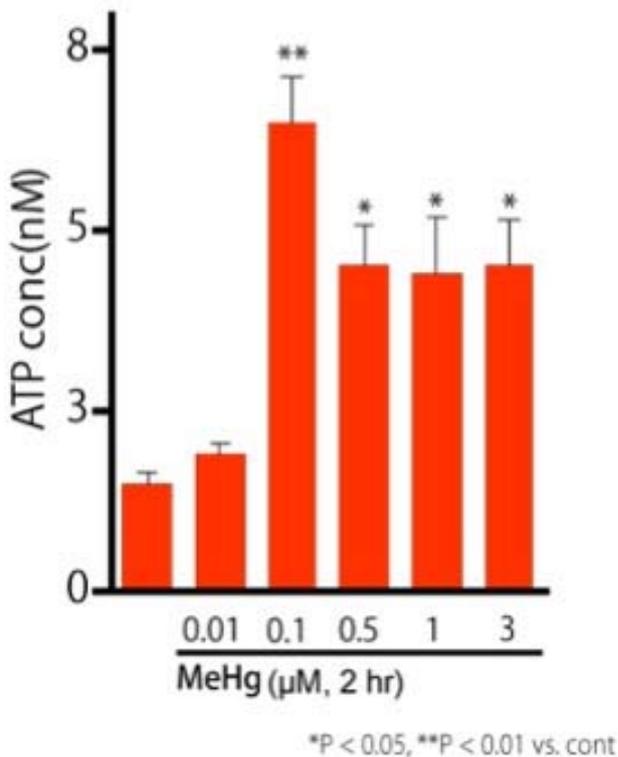


図3 低濃度 MeHg がミクログリア+アストロサイト共培養系の ATP 放出に与える影響

アストロサイト単独培養系には影響を与えない濃度の MeHg (0.01-0.5 μM) は、ミクログリア+アストロサイト共培養系で顕著な ATP 放出を惹起し、これはミクログリア単独時の ATP 放出よりも大きかった。

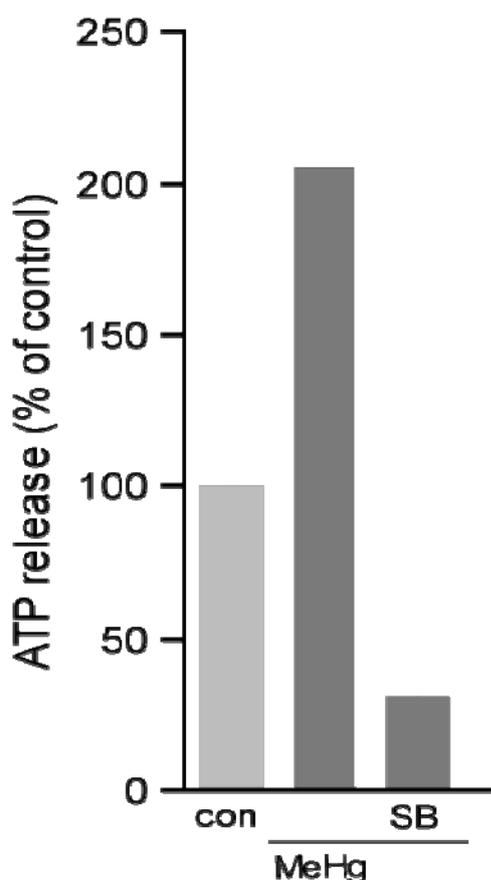


図4 低濃度 MeHg 刺激によるミクログリアからの ATP 放出に対する p38MAP キナーゼ阻害薬の作用  
MeHg (0.1 μM) による ATP 放出は、p38MAP キナーゼ阻害薬 SB2033580 (20 μM)(SB) によりほぼ消失した。

トでは消失した (5.1±0.2 % of normal astrocytes, n=7)。そこで、通常ミクログリア+P2Y1-K0 アストロサイト共培養系を用い、MeHg により惹起される応答を解析した。まず [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化の解析を行った。低濃度 MeHg (0.1 μM) は、ミクログリアの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を惹起するものの、それに引き続き惹起される ATP 依存的なアストロサイトの [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> はこの P2Y1-K0 アストロサイトを用いた共培養系では認められなかった。さらに、低濃度 MeHg により惹起される IL-6 の産生・放出は、このミクログリア-P2Y1-K0 アストロサイト共培養系ではほぼ認められなかった (3.7±0.2 % of normal astrocytes, n=5)。以上、アストロサイトの P2Y1 受容体は、低濃度 MeHg を感知したミクログリアの化学情報を感知する責任受容体であることが明らかとなった。

### (3) アストロサイトの応答様式の解析

アストロサイトは、ミクログリアが発信した化学情報を P2Y1 受容体で感知し、ATP を放出し、そのオートクラインメカニズムにより IL-6 産生・放出し、また代謝されて adenosine となること

(2) アストロサイトへの情報伝達メカニズムの解明  
次にミクログリアが感知した情報を、ATP の化学情報として感知するアストロサイトの分子メカニズムを解析した。ミクログリア+アストロサイト共培養系において、低濃度 MeHg 刺激により惹起された IL-6 の放出は、P2 受容体拮抗薬 suramin により抑制されることから、ミクログリアが放出した ATP は、アストロサイトの P2 受容体活性化を介して惹起されると考えられる。アストロサイトには種々の受容体が発現している。そこで、各種 P2 受容体阻害薬の作用を検討した。共培養系において低濃度 MeHg により惹起された IL-6 は、P2Y1 受容体選択的阻害薬 MRS2179 により強く抑制された (12.6±3.5 % of normal astrocytes, n=6)。従って、P2Y1 受容体が、ミクログリアからの化学情報を感知する責任受容体であることが強く示唆された。

そこで、P2Y1 受容体欠損動物 (P2Y1-K0) を用い、アストロサイトの P2Y1 受容体とこれら一連の応答との関連性をさらに詳細に検討した。P2Y1-K0 脳より調

整したアストロサイトでは、ATP により惹起される [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇は顕著に抑制され (42.8±7.7 % of normal astrocytes, n=112)、さらに選択的 P2Y1 受容体作用薬 ADPβS により惹起されるそれはほぼ消失した (12.8±6.6 % of normal astrocytes, n=72)。ATP により惹起される IL-6 産生は、P2Y1-K0 アストロサイ

で神経細胞を保護する。しかし、これまで MeHg により惹起される ATP 放出のメカニズムは不明のままであった。アストロサイトのような、非興奮性細胞からの ATP 放出メカニズムは、現在よく分かっておらず、少なくとも 5 種類の生理的な経路が報告されていた。細胞内には mM 程度の ATP が存在するため、その多くは自由拡散による放出されると考えられている、つまり pannexin/connexin が形成するヘミチャネル、P2X7 受容体の形成する大型の孔、マキシアニオンチャネル、塩素イオンチャネルを介する経路からである。しかし最近、高濃度の ATP が貯蔵されている酸性小胞がアストロサイト内に存在することが明らかとなり、アストロサイトは、他の神経細胞や内分泌細胞のように、開口放出のメカニズムで ATP を放出している可能性が示唆されている。そこで、P2Y1 受容体シグナルから ATP 放出に至る分子メカニズムの解析を行った。低濃度 MeHg ( $0.1 \mu\text{M}$ ) はアストロサイト単独培養系からは ATP 放出を惹起しなかったが、ミクログリア単独培養系では僅かな ATP 放出を ( $180.8 \pm 20.3\%$  of control (MeHg free),  $n=12$ )、しかしミクログリア+アストロサイト共培養系では顕著な ATP 放出を引き起こした ( $800.2 \pm 57.6\%$  of control (MeHg free),  $n=6$ )。ミクログリア+アストロサイト共培養系からの ATP 放出は、pannexin/connexin ヘミチャネル阻害薬 carbenoxorone では影響されず ( $710.8 \pm 77.2\%$  of control (MeHg free),  $n=6$ )、BAPTA-AM による細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  の除去 ( $80.5 \pm 12.6\%$  of control (MeHg free),  $n=12$ )、SNARE 蛋白阻害薬ボツリヌス毒素 ( $280.6 \pm 22.4\%$  of control (MeHg free),  $n=9$ ) 及び小胞型 H-ATPase 阻害薬 bafilomycin ( $320.2 \pm 22.4\%$  of control (MeHg free),  $n=7$ ) により抑制された。開口放出は  $\text{Ca}^{2+}$  の上昇により SNARE 蛋白質類が小胞の形質膜への移動・融合を引き起こすイベントである。また ATP は酸性小胞内に蓄えられていたので、bafilomycin により小胞型 H-ATPase を阻害すると小胞の  $\text{H}^+$  勾配が消失して ATP の貯蔵が出来なくなる。これらの結果は、ミクログリアの ATP 化学情報が、アストロサイトの P2Y1 受容体により  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇に変換され、開口放出のメカニズムでさらなる細胞外へ放出されることが明らかとなった。

開口放出は、神経細胞や内分泌細胞が化学情報を発信するときに用いる、最も積極性・調節性に富んだ化学情報の発信機構である。細胞外 ATP は、形質膜の物理的な傷害による漏出によっても増大するが、今回、アストロサイトがこの様な開口放出のメカニズムを用いて、ATP を放出していることが明らかとなった。MeHg の情報をミクログリアから受け取ったアストロサイトは、極めて積極性・調節性に富んだメカニズムで ATP 化学情報を発信し、神経細胞の機能を調節している可能性が示唆された。

## V 結論

ミクログリアが低濃度 MeHg を感知して応答する様式、またアストロサイトとのコミュニケーションのメカニズム、さらに情報を受け取ったアストロサイトが ATP 放出に至る分子メカニズムの解明を行った。

1. 低濃度 MeHg を感知したミクログリアは、 $\text{Ca}^{2+}$  流入、ROS 産生、p38MAP キナーゼの活性化を介して、「ATP 放出」という形で情報を発信すること、
2. アストロサイトは、ミクログリアが発信した ATP 化学情報を、「P2Y1 受容体」で感知し、自身の  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇を引き起こすこと、
3. アストロサイトは、P2Y1 受容体活性化による  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  上昇により、積極性・調節性に富んだ「開口放出」のメカニズムによりさらなる ATP を放出すること、

が明らかとなった。

## VI 次年度以降の計画

- (1) 本年度計画の1つであった、ミクログリア-アストロサイト-神経細胞共培養系（三細胞培養系）を用いた研究が未解決である。これは、三細胞の培養系が上手く機能しなかったことに起因する。培養条件の改良により、三細胞が正常に育つ実験系の構築はほぼ終了した。従って、MeHg を感知したミクログリアからの一連の情報発信が、これら三種の細胞間のコミュニケーションを介して神経細胞野機能に与える影響及びその分子メカニズムを明らかとする。特に、(a) 活性化型ミクログリアの機能変化が脳機能の保護・修復に与える影響、(b) 慢性的な MeHg 曝露により過度に活性化したミクログリアによる脳機能障害・慢性化誘発、の二つの異なる側面に注目して解析する。また、ミクログリア自身が直接神経細胞機能に与える影響についても検討する。
- (2) ミクログリアが低濃度 MeHg を感知する分子メカニズムを解明する。
- (3) 低濃度 MeHg に曝露された初代培養ミクログリアのトランスクリプトーム解析は昨年度から行っているが、一部再現性に問題があること、定量的 PCR による結果との相関がとれていないこと等で、まだ検討中である。トランスクリプトーム解析の再現性、定量性を確認した後に、再度分子の絞り込みを行う。メチル水銀により発現誘導される遺伝子を、メチル水銀の低濃度及び高濃度に分けて解析する。特に低濃度メチル水銀により惹起される脳保護因子に注目して候補分子を絞り込む。(a) 神経修復因子、(b) 神経保護因子、さらに (c) アストロサイト活性化因子を見出す。

## 参考文献

- 1) Haydon, P.G.: GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**: 185-193, 2001.
- 2) Miller, G.: Neuroscience. The dark side of glia. *Science*, **308**: 778-781, 2005.
- 3) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. & Inoue, K.: Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**: 11023-11028, 2003.
- 4) Koizumi, S., Shigemoto-Mogami, Y., Nasu-Tada, K., Shinozaki, Y., Ohsawa, K., Tsuda, M., Joshi, B.V., Jacobson, K.A., Kohsaka, S. & Inoue, K.: UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, **446**: 1091-1095, 2007.
- 5) Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J.: Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, **29**: 3974-3980, 2009.

この研究に関する現在までの研究状況、業績  
論文発表（2007年度以降）

19. Koizumi, S. (2011) A new role of astrocytes. *Japanese Journal of Neurosurgery*, **20**, 552-558.

18. Shibata, K., Sugawara, T., Fujishita, K., Shinozaki, Y., Matsukawa, T., Suzuki, T. and Koizumi, S.

- (2011) The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. PLoS One, 6, e23510.
17. Chi, Y., Li, K., Yan, Q., Koizumi, S., Shi, L., Takahashi, S., Zhu, Y., Matsue, H., Takeda, M., Kitamura, M. and Yao, J. (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMPK. J. Pharmacol. Exp. Ther., 339, 257-266.
  16. 小泉修一 (2011) グリオトランスミッターとシナプス制御、Clinical Neuroscience, 29, 1273-1277.
  15. 小泉修一 (2011) 中枢神経障害とグリア、Cardiovascular Anesthesia, 15, 83-89.
  14. 小泉修一 (2011) グリア伝達物質放出と脳機能、脳循環代謝、22, 24-28.
  13. 小泉修一 (2011) グリア・ニューロン連関、BioClinica, 26, 77-82.
  12. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca<sup>2+</sup> oscillations in astrocytes. FEBS J. 277, 286-292.
  11. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, K., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. J. Bio. Chem., 284, 21257-21264.
  10. Fujishita, K., Ozawa, T., Shibata, K., Tanabe, S., Sato, Y., Hisamoto, M., Okuda, T. and Koizumi, S. (2009) Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes, reveals its neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. Cell Mol Neurobiol., 29, 1121-1129.
  9. Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K. and Torimitsu, K. (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X<sub>4</sub> receptors. PLoS Biology, 7, e103.
  8. 小泉修一、井上和秀 (2008) ニューロン・ミクログリア相互作用、BioClinica, 23, 97-102.
  7. 小泉修一 (2008) ATP を介したグリア・ニューロン相互作用、細胞, 40, 12-16.
  6. 小泉修一、井上和秀 (2009) 脳内グリア細胞における ATP センサーを介した情報伝達、生化学、81, 35-38.
  5. 小泉修一 藤下加代子. アストロサイトを介したニューロン・アストロサイト相互調節, Brain and Nerve 2007; 56:707-715.
  4. 工藤佳久 小泉修一 和田圭司 橋本謙二. グリア細胞を標的とする医薬品の創製, 日薬理誌 2007; 130: 185-192.
  3. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M. (2007) The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. J Neurochem 2007; 102:1447-1458.
  2. Shinozaki Y Sato Y Koizumi S et al. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-Jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase, Neurosci 2007; 147: 153-163.
  1. Koizumi S Shigemoto-Mogami, Y Nasu-Tada K et al. UDP acting at P2Y<sub>6</sub> receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis, Nature 2007; 446:1091-1095.

# Effects of low concentration of methylmercury on glial cells

Schuichi Koizumi<sup>\*1</sup>, Youichi Shinozaki<sup>\*1</sup>, Yoji Sato<sup>\*2</sup>

<sup>\*1</sup>Department of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, <sup>\*2</sup>Division of Cellular and Gene therapy products, National Institute of Health Sciences

*Keywords:* Methylmercury; Astrocytes, Microglia; ATP; P2Y1 receptor

## **Abstract**

Glial cells are highly involved in various brain diseases. Thus, changes in their characteristic features affect brain functions. However, effects of chemicals or other hazardous environmental molecules including methylmercury (MeHg) on glial functions/dysfunctions remain largely unknown. Previously, we showed that MeHg (~3  $\mu$ M)-induced release of ATP, followed by production of IL-6 in astrocytes, which in turn protected neuronal cell death against MeHg. Here we showed that microglia, another types of glial cells in the CNS, sense much lower MeHg and transfer the information to astrocytes. Microglia but not astrocytes sensed lower MeHg (0.01-0.1  $\mu$ M) and released ATP. The microglial release of ATP was dependent on activation of p38 MAPkinase. Stimulation of MeHg (0.1 $\mu$ M) with astrocytes or microglia alone had not produce IL-6. However, when incubated with co-culture of microglia plus astrocytes, MeHg (0.1 $\mu$ M) stimulated IL-6 production. The low MeHg-evoked IL-6 production in the co-culture was inhibited by the selective P2Y1 antagonist MRS2179 or disappeared when stimulated with co-culture of normal microglia plus P2Y1-knockout astrocytes. The activation of astrocytic P2Y1 receptors by microglial ATP resulted in further release of ATP, which in turn acted on activated astrocytic P2Y1 receptors as an autocrine signal, thereby leading to IL-6 production. As for mechanisms underlying ATP release from astrocytes, Ca<sup>2+</sup>-dependent exocytotic events appeared to be involved. These findings suggest that microglia, as a high sensitivity sensor for MeHg, sense low concentration of MeHg, and transmit the information to astrocytes as a chemical signal of ATP. Such microglia-astrocytes-neurons communications would be important to maintain homeostasis in the brain.



## V メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究



# 研究課題名 メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究

主任研究者 西澤 正豊 新潟大学脳研究所・教授

## 研究要旨

メチル水銀曝露による神経障害については、根本的な治療法は確立されていない。そこで、水俣病の患者等を対象に、治療法の開発が求められている感覚障害に関して、効果が期待できる治療薬による臨床試験を行い、その有効性を探索することを目的とした。2011年度は協力を得られた患者57名について、神経学的所見の評価を行い、次年度に計画している臨床研究への参加者を選定する作業を開始した。

キーワード： 新潟水俣病、感覚障害、神経因性疼痛治療薬、臨床研究

## 研究者協力者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

下畑 享良	新潟大学脳研究所・准教授
河内 泉	新潟大学医歯学総合病院・病院講師
高橋 哲也	新潟大学医歯学総合病院・助教
池内 健	新潟大学超域学術院・准教授

## I 研究目的

水俣病は昭和 31 年に公式確認されて以来、既に半世紀が経過し、メチル水銀の濃厚曝露終了から長期間が過ぎているため、水俣病患者等の加齢による影響や他疾患の併発等が生じ、症状が多様化している。また、水俣病の社会的な特殊性により、近年は、網羅的・科学的な現状把握がより一層困難になっている。とりわけ、治療法に関する研究は、発生初期を除けばほとんどなされておらず、治療法の現状把握や評価が求められている。一方、これまで対応が困難であった神経因性疼痛に対しては、症状の緩和が期待できる新薬が開発されており、治療が可能となることが期待される。

本研究ではまず、新潟水俣病患者等を対象に、神経症状及び治療法の現状を把握する。次いで、感覚障害に対して症状の緩和が期待できる神経因性疼痛治療薬プレガバリンを用いた臨床試験を実施し、水俣病の感覚障害に対する治療効果を探索する（末尾に引用文献を示す）。臨床試験は無作為対照試験が望ましいが、先行研究がなく、症例集積の困難性、併発症の多様性、時間的制約を考慮すると、対照群を設定しないpilot studyに留めることが現実的である。これらの成果は、一定の効果が期待される治療法の普及に繋がることから、その社会的意義は大きいと考える。

## II 研究方法

### 1. 新潟水俣病患者等の神経症状及びその治療法の現状把握と評価

研究は断面調査、記述疫学により、患者団体等の協力を得て、新潟水俣病患者等を対象として、現在有する神経症状、及び現在行われている治療法を把握する。神経症状については、研究参加者の外来受診時における問診、神経学的診察、神経生理学的検査等により、新潟水俣病に特徴的な神経症状のみでなく、高血圧、糖尿病などの併発症による症状も調査する。また感覚障害に関

する現時点での治療法については、主治医からの情報提供等により調査する。これらの情報を総合して、新潟水俣病における感覚障害の現状を把握し、その実態を明らかにする。

## 2. プレガバリン試験のための対象者選定

上記1で得られた新潟水俣病患者の神経症状等に関する情報を基に、被験者の選定基準について検討し、プレガバリン治療に進む対象者を選定する。

### (倫理面への配慮)

本研究は臨床研究として、新潟大学倫理委員会より承認を得た。

本研究で扱う試料（情報）については、研究内容が本研究への参加に同意した新潟水俣病患者等に、新潟大学医歯学総合病院神経内科外来にて神経学的診察、血液検査、電気診断検査を実施するものであることから、カルテ、血液、生理検査データは当科外来に受診する他患者と同じ取り扱いとなる。

インフォームド・コンセントについては、研究参加者本人より文書で取得する。インフォームド・コンセントの受領に係る書類は、新潟大学倫理委員会に本研究申請書と同時に提出し、併せて承認を得た。

その他の倫理面への配慮として、臨床研究は厚生労働省の指針に従って実施する。個人のプライバシーの保護には細心の注意を払い、結果の公表に際して個人が特定されないように配慮する。

## III 研究結果

受託研究契約が2011年9月に締結されたことを受けて、患者団体と10月初めに会合を持ち、本研究について説明し、参加を要請した。11月末までに57名より参加の意思表示があり、環境省、参加者代表、主任研究者の間で合意事項に関する「覚書」を12月に作成した。

これを受けて、2012年1月より新潟大学医歯学総合病院神経内科への外来受診の日程調整に入り、2月13日より順次、外来にて問診、神経学的所見の確認、主治医よりの情報確認、血液検査、神経生理学的検査を実施している。3月16日までに参加者57名について初回の受診を終了する予定である。

今後、参加者の神経学的所見、合併症の有無、神経生理学的検査所見が揃った段階で、これらを総合的に勘案し、次年度に神経因性疼痛治療薬であるプレガバリンによる臨床試験に進む参加者を選定する。

## IV 考察

新潟水俣病患者等の協力を得ながら臨床研究を遂行するためには、当事者との連絡調整に多大の労力を必要とする。研究の開始が実質2012年2月からとなったため、当初の計画よりも進行が遅れを生じてはいるものの、2011年度の計画に沿って感覚障害を評価するために必要な臨床情報は収集できつつある。当事者の協力が不可欠である臨床研究の性質上、進行の遅れはやむを得ないが、次年度の治療計画に進む参加者を選定することは可能と判断している。

## V 結論

新潟水俣病患者等を対象に、治療法の開発が求められている感覚障害に関して、効果が期待できる治療薬による臨床試験を行い、その有効性を探索することを目的とし、2011年度は本研究に

協力を得られた57名について、感覚障害等の神経学的所見の評価を行い、次年度に計画している治療研究への参加者を選定する作業を開始した。

## VI 次年度以降の計画

2年計画の2年目として、感覚障害を有する参加者に対して、プレガバリンの感覚障害に対する効果を検証する臨床試験を準臨床試験（非ランダム化、無対照群、非ブラインド化）として実施し、感覚障害の改善度を指標にして、プレガバリンの効果を明らかにする（末尾にプレガバリンの効果に関する引用文献を示す）。効果判定の指標には、感覚障害の改善に関する定性的解析、自覚症状の改善度（順位尺度評価）、疼痛の改善度（Visual Analogue Scale、改善度）、日常生活能力の標準化指標を用いた評価を用いる。プレガバリンの有効性が確認された場合には、水俣病の感覚障害に対する治療指針の作成を予定している。

この研究に関する現在までの研究業績

なし

## 引用文献

Sun P Zhao Y Zhao Z Bernauer M Watson P. Dosing pattern comparison between duloxetine and pregabalin among patients with diabetic peripheral neuropathic pain. *Pain Pract.* 2012 Feb 15. [Epub ahead of print]

Zaccara G Perucca P Gangemi PF. The adverse event profile of pregabalin across different disorders: a meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol.* 2012 Jan 21. [Epub ahead of print]

Jensen MP Gammaitoni AR Bolognese JA Alon A Smugar SS Galer BS Hewitt DJ. The pain quality response profile of pregabalin in the treatment of neuropathic pain. *Clin J Pain.* 2011 Dec 7. [Epub ahead of print]

Vorobeychik Y Gordin V Mao J Chen L. Combination therapy for neuropathic pain: a review of current evidence. *CNS Drugs.* 2011; 25: 1023-34.

Tanenberg RJ Irving GA Risser RC Ahl J Robinson MJ Skljarevski V Malcolm SK. Duloxetine, pregabalin, and duloxetine plus gabapentin for diabetic peripheral neuropathic pain management in patients with inadequate pain response to gabapentin: an open-label, randomized, noninferiority comparison. *Mayo Clin Proc.* 2011; 86: 615-26.

# Evaluation of neuropathic pain in Niigata Minamata disease and possible therapeutic efficacy of pregabalin and duloxetine.

Masatoyo Nishizawa, Takayoshi Shimohata, Izumi Kawachi,  
Tetsuya Takahashi, and Takeshi Ikeuchi

*Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University*

*Keywords:* Methylmercury; Niigata Minamata disease; neuropathic pain; treatment; pregabalin; duloxetine

## **Abstract**

**Background:** Since the discovery of Niigata Minamata disease in 1965, there have been few therapeutic approaches to its neurological signs and symptoms, especially to severe sensory disturbance and/or neuropathic pain. We are now able to use pregabalin, which binds to the  $\alpha_2\delta$  subunit of the voltage-dependent calcium channel in the central nervous system and decreases the release of neurotransmitters such as glutamate, noradrenaline, and substance P, and duloxetine, which is a serotonin-noradrenaline reuptake inhibitor, for intractable neuropathic pain of peripheral origin.

**Objective:** To confirm therapeutic efficacy of these new drugs in the neuropathic pain of Niigata Minamata disease.

**Methods:** For the above purpose, a total of 57 patients with Niigata Minamata disease have been enrolled, and their neurological symptoms and signs have been assessed.

**Results and discussion:** We have almost finished the initial evaluation of the present neurological symptoms and signs in these patients, and prepared for inclusion criteria to recruit them to a new therapeutic study using pregabalin and duloxetine.

**Conclusion:** A clinical study has been launched to investigate the therapeutic effect of pregabalin and duloxetine in amelioration of sensory disturbance and/or neuropathic pain of Niigata Minamata disease.

平成 23 年度  
メチル水銀研究ミーティング  
講演要旨集

期間：2011 年 12 月 20 日～21 日

会場：LMJ 東京研修センター

主催：環境省



## プログラム

一般講演：30分（発表20分、質疑応答10分）

特別講演：60分（発表50分、質疑応答10分）

若手発表会（ポスター発表）：2セッション×1.5時間（Duty Timeは2日目のセッションのみ）

### 【1日目】12月20日（火）

17:00～18:30 若手発表会（ポスター発表）（参加者の都合に合わせて掲示<sup>1</sup>）

19:00～21:00 懇親会（任意参加；詳細は別途お知らせの通り）

### 【2日目】12月21日（水）

9:00 開会（事務局）

9:00～9:10 挨拶（環境省）

9:10～9:15 発表会進め方説明（事務局）

#### ■第1部 特別講演

座長 永沼 章（東北大薬・教授）

9:15～10:15 佐藤 洋 低濃度メチル水銀ばく露の生体影響—胎児におけるばく露の神経行動学的影響と成人におけるばく露の心拍変動におよぼす影響  
(国環研・理事)

10:15～10:30 休憩

#### ■第2部 一般講演「メチル水銀の神経毒性（その1）」

座長 渡辺 知保（東大院医・教授）

10:30～11:00 演題1 中村 政明 メチル水銀中毒の臨床とその診断  
(国立水俣研・室長)

11:00～11:30 演題2 坂本 峰至 メチル水銀の胎児影響  
(国立水俣研・部長)

11:30～12:00 演題3 鍛冶 利幸 メチル水銀による大脳障害の局在性に関する要因としての血管内皮および周皮細胞の機能異常  
(東京理科大薬・教授)

12:00～13:00 昼食

#### ■第3部 一般講演「メチル水銀の神経毒性（その2）」

座長 安武 章（熊本大院自然科学・特別事業研究員）

13:00～13:30 演題4 藤村 成剛 メチル水銀による神経軸索障害の神経細胞死への寄与と Rho/ROCK 経路の抑制による毒性軽減作用  
(国立水俣研・室長)

13:30～14:00 演題5 熊谷 嘉人 メチル水銀の新奇リスク軽減因子としての H<sub>2</sub>S 産生酵素  
(筑波大院人間総合科学・教授)

<sup>1</sup> 12月20日の研究成果発表会に参加するメチル水銀研究ミーティングのポスター発表者は、20日17:00までにポスターを掲示する。

14:00～15:30 若手発表会（ポスター発表）Duty Time（討論時間）

■第4部 一般講演「メチル水銀毒性の分子機構」

座長 鍛冶 利幸（東京理科大薬・教授）

15:30～16:00 演題6 臼杵 扶佐子  
（国立水俣研・室長）

メチル水銀によるセレン含有抗酸化酵素の  
転写後変化と酸化ストレス発生

16:00～16:30 演題7 黄 基旭  
（東北大薬・講師）

メチル水銀毒性と蛋白質のパルミチン酸化

16:30～16:40 閉会の挨拶（環境省）

【ポスター発表プログラム】

演題 No.	発表者	所属 役職・学年等	発表タイトル
P1	とやま たかし 外山 喬士	筑波大院人間総合 博士研究員	HPLC/AAS 法による臓器中疎水性メチル水銀代謝物の分析
P2	ひらた あきしげ 平田 明成	東京理科大薬 修1	培養血管内皮および周皮細胞のポリオール経路に対するメチル水銀の毒性
P3	ひろおか たかし 廣岡 孝志	東京理科大薬 助教	傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層の修復に対する阻害作用は低酸素下において増強される
P4	いおい みゆき 岩井 美幸	東北大院医 学振特別研究員 PD	魚肉に含有されるメチル水銀と塩化メチル水銀との胎児期曝露影響の比較
P5	たつた のぞみ 龍田 希	東北大院医 助手	周産期における環境由来化学物質ばく露と新生児の行動発達
P6	り じん よん 李 辰 竜	東北大院薬 博士研究員	ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用とミトコンドリア機能障害との関係
P7	おー そん ぶん 吳 成恩	東北大院薬 博2	メチル水銀毒性軽減蛋白質 TEX27 のメチル水銀による核移行

## 特 別 講 演

## 低濃度メチル水銀ばく露の生体影響

—胎児におけるばく露の神経行動学的影響と成人におけるばく露の心拍変動におよぼす影響—

○佐藤 洋（東北大学医学系研究科環境保健医学分野）

水銀の地球化学的循環において、メチル水銀は自然界（主に水圏）の生態系内で合成され、食物連鎖による生物濃縮によって、大型の肉食魚や海棲哺乳類に蓄積する。したがって大型の肉食魚や海棲哺乳類を食べればもちろんのこと、その他の魚介類の摂食によっても、メチル水銀にばく露される。そのばく露レベルは、毛髪の水銀濃度で、通常の食事をしている日本人で 1-3ppm 程度、キンメダイ漁業者の最高値で 20ppm 程度、イルカ類を食する地域では、さらに高値も報告されている。

魚介類は、良質なタンパク源であり、さらに DHA や EPA 等の不飽和脂肪酸にも富み、セレンや亜鉛等の必須微量元素の供給源にもなり得るので、メチル水銀が含有されているからと言ってまったく食べないとする選択肢は考えにくい。

したがって、魚介類の摂食を通じた低濃度メチル水銀ばく露の生体影響が、一般集団においてどのようなひろがりを持ってあらわれるのか（あるいはあらわれないのか）、その影響は真にメチル水銀によるものなのか（メチル水銀以外の汚染物質等ではないのか）、その影響のあらわれ方の交絡要因は何か、健康におよぼす影響の度合いはどの程度であるのか等を明らかにすることは、重要な課題である。この講演では、感受性が高いと考えられている胎児期のメチル水銀ばく露の出生後の影響と成人におけるメチル水銀摂食による心血管系への影響について述べる。

1. 胎児期メチル水銀ばく露の出生後の影響（出生コホート調査）：メチル水銀や PCBs 等の周産期ばく露が出生児の発達、特に心理、行動、認知面における発達に及ぼす影響を調

べる目的で、出生コホート調査を実施している（Tohoku Study of Child Development, TSCD）。妊娠中期に健康な母親から調査の同意を得た。出産時に採取された臍帯血の PCBs 全異性体測定を行った。出産後 2 日目に採取された母親毛髪（毛根部より 3cm）を原子吸光光度法により分析した。母親の魚摂取量については、出産後 4 日目に実施された半定量式食物摂取頻度調査（FFQ）から推定した。生まれた子どもには、生後 3 日目に新生児期の神経行動学的検査であるブラゼルトン新生児行動評価（NBAS）を実施した。NBAS は、7 つのクラスターの得点で評価されるが、運動クラスターは母親毛髪中水銀濃度および PCBs と負の相関を示し、魚摂取量と正の相関を示した。しかしながら、三つの変数に母親の年齢、喫煙、飲酒等、児の性別、出生時体重等の交絡要因を組み入れた重回帰による分析では、水銀濃度だけが運動クラスターと負の関連を示した。

2. メチル水銀摂食による心拍数の変動：成人男女 27 名にメチル水銀濃度が  $1\mu\text{g/g}$  程度のメバチマグロ、メカジキを暫定耐容摂取量（ $3.4\mu\text{g/kg}$  体重/週、厚生省、1973 年）を限度として 14 週間摂取させ、ばく露終了後も更に 15 週間の観察期間を設け、摂取群と同じく 27 名の成人男女を対照群とした。ばく露前、ばく露終了時、観察終了時に心拍動 R-R 間隔を測定し、その変動の様子を観察した。血球中の水銀濃度の推移は、14 週目でもっとも濃度が高く、ベース時の血球中総水銀濃度の平均（標準偏差）は  $13.5$  ( $6.4$ )  $\text{ng/g}$  に対して、14 週のピーク時は  $56.9$  ( $13.5$ )  $\text{ng/g}$ 、最終 29 週時は  $24.2$  ( $8.3$ )  $\text{ng/g}$  であった。心拍変動（Heart

Rate Variability) は、ベースライン時、15 週目、29 週目に 10 分間の安静臥床後、心拍動 R-R 間隔を 5 分間測定し、得られたデータの中から、標準偏差 (SD) が最小となる 100 個の連続した R-R 間隔を自動的に抽出し、その抽出された区間のデータを用いて周波数分析を行った。摂取群において、15 週目の CCVLF、LF/HF ratio、%LF がベースライン時に比べて有意に上昇し、15 週目の LF/HF ratio および %LF には、2 群間に有意差が認められた。LF/HF ratio、%LF の上昇は副交感神経活動の減少または交感神経活動の上昇によって交感-副交感神経活動のバランスの変化を示すと報告されており、CCVLF の上昇からは交感神経活動の上昇が示唆される。したがって本研究では、交感神経活動の上昇による交感神経優位の状態が引き起こされたと考えられた。

ここに述べた 2 つの例では、いずれも一般環境下のばく露や暫定耐容摂取量内での摂取であったが、影響が認められた。しかしながら、それらの影響は、深刻な症状をもたらすような健康影響ではなく、また一過性であり、変化と呼ぶべきものであったかもしれない。神経行動学的な手法にしる、電気生理学的な手法にしる、あるいは他の手法にしる、微細な変化を捕捉することができるようになった現代において、これら微細な変化を健康影響としてどのように考えてゆくべきなのか、長期的な予後も含めてあらためて考えることが重要であると思われる。

## 参考文献

1. Nakai Kunihiko, Suzuki Keita, Oka Tomoko, Murata Katsuyuki, Sakamoto Mineshi, Okamura Kunihiro, Hosokawa Toru, Sakai Takeo, Nakamura Tomoyuki, Saito Yoshinori, Kurokawa Naoyuki, Kameo Satomi, Satoh Hiroshi. The Tohoku study of child development: a cohort study of effects of perinatal exposures to methylmercury and environmentally persistent organic pollutants on neurobehavioral development in Japanese children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 2004; 202: 227-237.
2. Suzuki Keita, Nakai Kunihiko, Sugawara Tomoko, Nakamura Tomoyuki, Ohba Takashi, Shimada Miyuki, Hosokawa Toru, Okamura Kunihiro, Sakai Takeo, Kurokawa Naoyuki, Murata Katsuyuki, Satoh Chieko, Satoh Hiroshi. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs, and seafood intake: neonatal behavioral assessment scale results of Tohoku study of child development. *Environmental Research* 2010; 110: 699-704.
3. Yaginuma-Sakurai Kozue, Murata Katsuyuki, Shimada Miyuki, Nakai Kunihiko, Kurokawa Naoyuki, Kameo Satomi, Satoh Hiroshi. Intervention study on cardiac autonomic nervous effects of methylmercury from seafood. *Neurotoxicology and Teratology* 2010; 32: 240-245.



# 口 頭 発 表

## メチル水銀中毒の臨床とその診断

○中村政明（国立水俣病総合研究センター・臨床部）

### 1. 目的

近年、変形性頸椎症やメタボリックシンドロームなどによる症状の合併による水俣病の臨床症状の多様化のため、臨床的な神経学的所見だけで水俣病を診断することは困難になってきている。従って、客観的に他の疾患と鑑別できる水俣病を含めたメチル水銀中毒の診断法の確立が必要不可欠である。

これまで、水俣病に対して、体性感覚誘発電位(Short-latency somatosensory potentials: SSEP) や頭部 CT、MRI 検査による検討が行われたが、水俣病の客観的評価法は確立していないのが現状である<sup>1) 2)</sup>。近年、MEG (脳磁図) や fMRI など、開頭することなく脳の働きを視覚化する技術 (非侵襲計測技術) の進歩などにより、脳機能の科学的な解明の飛躍的な発展が期待されるようになってきている。そこで、本研究ではメチル水銀中毒の脳機能障害の客観的評価における MEG の有用性を明らかにすることを目的とする。

### 2. 方法

#### 2-1. air-puff 装置と MEG による 2 点識別覚の客観的評価

メチル水銀中毒の中核となる症候は中枢性感覚障害であるため、2 点識別覚や皮膚書字覚などは重要な検査法であると考えられるが、これまでの方法は被験者の主観に基づいたものであり、特異性や感受性に乏しいという欠点があった。赤塚らは MEG を用いて 2 点識別覚を客観的に評価するシステムを開発したが<sup>3)</sup>、手背を電気刺激するため侵襲性の問題がある。そこで、我々は、より侵襲性の低い air-puff 装置による空気刺激を通常日常診療で 2 点識別覚を評価する示指に行う 2 点識別覚の客観的評価法を開発し、

検査法の有用性について検討した。

#### 2-2. 末梢から中枢までの感覚刺激の伝播の評価

手首で正中神経の電気刺激を行い、筋電図と脳磁計の同時測定を行うことで、末梢から中枢までの感覚刺激の伝播を評価することが可能になった (図 1 参照)。

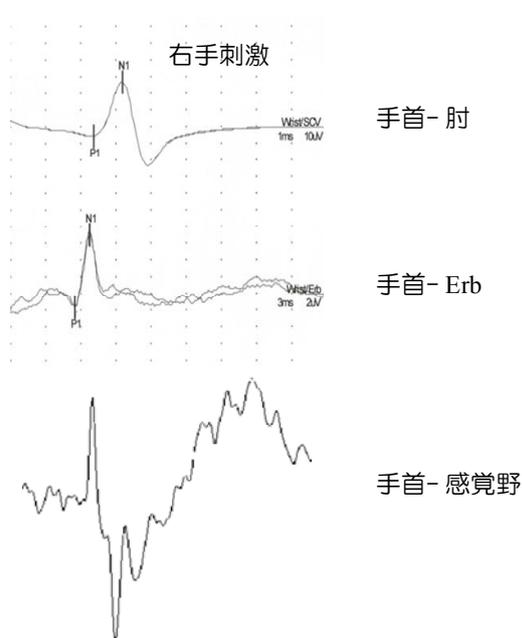


図 1. MEG と筋電図の同時測定による感覚刺激の伝播の評価

末梢神経障害の代表疾患である糖尿病の症例で MEG と筋電図の同時測定を行うことで、末梢神経障害の 2 点識別覚に及ぼす影響について検討した。

#### 2-3. 水俣病認定患者での解析

上記の方法を用いて、水俣病認定患者について検討を行った。

### 3. 結果および考察

今回の検討では神経疾患以外の研究協力者では 2 点識別覚の反応がほぼ検出された。視床は、

視覚、聴覚、体性感覚などの感覚入力を大脳新皮質へ中継する重要な役割を担っており、視床出血で中枢性感覚障害を呈することが知られている。今回、右視床出血後遺症の方で検査を行ったが、健側の左半球では2点識別の反応が見られたが、病変のある右半球では2点識別の反応が見られなかったことから、本法により中枢性感覚障害を客観的に評価できる可能性が示唆された。今回開発した方法は注意の向けられていない一定の刺激系列の中でまれな逸脱刺激を自動的に無意識的に検出する脳反応であるミスマッチ反応<sup>34)</sup>を利用したもので、被験者の前意識の段階での反応であるため、これまで客観的評価が困難であった感覚検査において画期的な検査法と考えられる。

また、MEGと筋電図の同時測定により、糖尿病の症例で、末梢神経障害によるSEF（体性感覚誘発磁場）のN20m成分の低下が見られたが、2点識別覚の反応が見られたことから、ある程度感覚野に情報が入力されれば2点識別覚には影響が少ないことが示唆された。

水俣病認定患者では、MEGと筋電図の同時測

定により、末梢神経の伝導速度、振幅が保たれているにもかかわらず、SEF（体性感覚誘発磁場）のN20m成分の消失が見られたことから、水俣病の感覚障害は中枢性感覚障害が主体であると考えられた。しかしながら、2点識別覚の反応が見られたことから、慢性期では2点識別覚の評価は慎重に行う必要があると考えられた。

今後、頸椎症や糖尿病、脳血管障害後遺症などの感覚障害を呈する症例および水俣病認定患者の症例を集めて、水俣病における感覚障害に対する本検査法の有用性を検証していく予定である。

#### 4. 文献

- 1) 若宮純司、宮嶋誠二：水俣病患者における体性感覚誘発電位。国立水俣病総合研究センター年報，第15号，pp. 3-4, 1995.
- 2) Tokuomi H, Uchino M, Imamura S, Yamana H, Nakanishi R, Ideta T: Minamata disease (organic mercury poisoning): neuroradiologic and electrophysiologic studies. *Neurology*, 32, pp. 1369-1375, 1982.
- 3) Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, Inui K, Hoshiyama M, Kakigi R: Mismatch responses related to temporal discrimination of somatosensory stimulation. *Clin Neurophysiol.*, 116, pp. 1930-1937, 2005.
- 4) Näätänen R, Simpson M, Loveless NE: Stimulus deviance and evoked potentials. *Psychol Bull.*, 92, pp. 605-640, 1982.

## メチル水銀の胎児影響

○坂本 峰至（国立水俣病総合研究センター）

水俣病の特徴の一つは、胎盤を通過したメチル水銀による胎児性水俣病の発生であり、メチル水銀の次世代影響が世界の注目を集めた。今回の発表ではメチル水銀の胎児影響とし、以下の5研究結果について概説する。

### 1. 保存臍帯を用いた水俣地域における水銀汚染に関する Retrospective Study

チソンのアセトアルデヒドの生産量の推移に伴い臍帯中メチル水銀濃度も変化し、1 ppm を超える高いメチル水銀濃度は 1947 - 1968 年に生まれた住民に認められた。生産を中止以降は漸減し、1975 年以後は対照とほぼ同じレベルに低下した。地理的には水俣市、出水市・津奈木町の順に高い水銀値が出現する傾向であった。

日本人は児の出生記念として臍帯を保存する風習があり、過去の汚染の推移や個人の出生時のメチル水銀曝露レベルを知りうる唯一のバイオマーカーである。本研究は、保存臍帯のメチル水銀を測定して、過去に遡って水俣地域におけるメチル水銀汚染汚の経時的変化・地理的分布をとらえた行政上も意義のある研究である。

Sakamoto M (1<sup>st</sup>), Murata K, Tsuruta K, (他 2 名). Retrospective study on temporal and regional variations of methylmercury concentrations in preserved umbilical cords collected from inhabitants of the Minamata area, Japan Ecotoxicol Environ Saf. 73 (2010), 1144-1149.

### 2. 水俣地域における出生性比に関する研究

水俣市全体で汚染が最も激しかった昭和 29 年

から 34 年の 5 年間に、水俣市全体で男児の出生数が低下し女児の出生数が多いという結果が得られた。この傾向は袋地区、漁民、水俣病患者と強くなっており、死産や流産で男児がより多く死亡したことが原因として考えられた。

水俣の高濃度メチル水銀汚染で観察された出生性比の低下に関する研究は海外からも高い注目を浴びた。

Sakamoto M, Nakano A, Akagi H. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. Environ Res Section A (2001) 87, 92-98.

### 3. ヒトにおける胎児期および乳児期の母親由来メチル水銀曝露量の違いに関する研究

胎児の発達期の脳自体の感受性が環境汚染物質に対して高いと考えられている。その上に、メチル水銀は胎児に母親より高く蓄積することが明らかになり、これら双方が胎児のメチル水銀に対するリスクが特に高い原因であると考えた。一方、母乳からのメチル水銀移行は少なく、3ヶ月で乳児の血液の水銀濃度も出産時の2/1に低下し、乳児ではリスクが急激に低下するであろうと考えられた。

胎児期は脳の感受性が高い上に母親より高濃度にメチル水銀が蓄積するが、乳児期にそのリスクが低下するという研究成果は、魚介類の摂取に関する注意が必要なリスクの大きなグループは妊婦であり、授乳中の母親はその対象から外すという食品安全委員会の決定にも貢献した。

Sakamoto M, Kubota M, Matsumoto S, Nakano A, Akagi H. Declining risk of methylmercury exposure to infants during lactation. Environ Res (2002) 90, 185-189.

Sakamoto M, Kakita A, Wakabayashi K, Takahashi H, Nakano A, Akagi H. Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. Brain Res (2002) 949, 51-59.

#### 4. 成人性水俣病と胎児性水俣病の脳の傷害部位の分布の違いに関する研究

ラット新生仔を使った実験で、脳の発達前期曝露では脳幹部に、中期曝露では大脳皮質に、後期曝露（成熟期）では小脳および末梢神経と曝露時期ごとに特定の部位に神経傷害が出現することが明らかになった。更に、脳の発達の前期から後期に渡って長期にメチル水銀を曝露させた場合に、胎児性水俣病と同じように脳全体および末梢に広範な傷害部位を呈することが明らかになった。

脳の発達期ごとに傷害を受けやすい部位が異なることが明らかになった。特に、典型的胎児性水俣病患者における脳全体および末梢に亘る広範な傷害は、脳の発達の前期から後期に渡る長期のメチル水銀曝露で引き起こされたと考察できた。また、この一連の研究により世界で初めての胎児性水俣病モデル・ラット作成に成功した。

Sakamoto M, Wakabayashi K, Kakita A, Takahashi H, Adachi T, Nakano A. Widespread neuronal degeneration in rats following oral

administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type Minamata Disease. Brain Res 784, 351-354. (1998)

Wakabayashi K, Kakita A, Sakamoto M, Su M, Iwanaga K, Ikuta F. Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal development phases. Brain Res 705, 267-272. (1995)

Sakamoto M, Nakano A, Kajiwara Y, Naruse I, Fujisaki T. Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. Environ Res 61, 43-50. (1993)

#### 5. ラットの脳発達期のメチル水銀投与による神経細胞死に及ぼすセレン・メチオニンの効果に関する研究

セレン・メチオニンをメチル水銀と併用投与すると、脳中水銀濃度はメチル水銀単独群より高くなるに係らず、メチル水銀による脳における神経変性をセレンが直接防御することが明らかになった。

メチル水銀による体重減少、神経症状、行動異常をセレンが防御するという報告はあったが、本結果はメチル水銀による脳における神経変性をセレンが直接防御することを示した最初の報告である。食品由来のアミノ酸態セレンで効果が得られたことも、食品由来のセレンがメチル水銀の中枢への作用を防御することを期待させる意味でも意義があると考えられる。

## メチル水銀による大脳障害の局在性に関与する要因としての 血管内皮および周皮細胞の機能異常

○ 鍛冶 利幸 (東理大薬)

### 1. 背景

メチル水銀は水俣病の原因物質として知られる有機金属であり、ハンター・ラッセル症候群とよばれる中枢神経症状を特徴とした毒性を発現することがよく知られている。メチル水銀の毒性発現のメカニズムには不明な点が多いが、水俣病患者の所見によると、メチル水銀による大脳の傷害が脳組織全体に広がっておらず、深い脳溝周辺に局在していることが病理学的には重要であると思われる。この所見は、特に成人の水俣病患者に特徴的に観察される。

このような大脳における傷害の局在性については、メチル水銀中毒動物の病理組織学的な観察から、メチル水銀による脳浮腫形成とそれともなう二次的な組織循環障害による神経細胞の脆弱化が原因であるとする“浮腫仮説”が衛藤らによって提唱されている。しかしながら、“浮腫仮説”の分子基盤はまったく分かっていなかった。

我々は、重金属の血管毒性に関する研究を展開してきたものであるが、脳浮腫形成には脳微小血管の機能異常が重要であることから、メチル水銀の血管毒性を評価することが“浮腫仮説”の分子基盤の理解に重要であると考えた。

### 2. 目的

脳浮腫は脳実質内に異常な水分貯留を生じた状態である。脳浮腫の機序については古くから研究されており、2つの型があるとされる(図1)。ひとつは血管原性浮腫と呼ばれるものであり、血液脳関門の障害、すなわち脳微小血管の機能異常によって血管透過性が高まり、水分が主として細胞外腔に溜まるものである。もうひとつは細胞の傷害を原因と

して細胞内に水分が溜まるもので、細胞毒性浮腫と呼ばれる。臨床的にはこの2つの型は同時に発生するとされる。

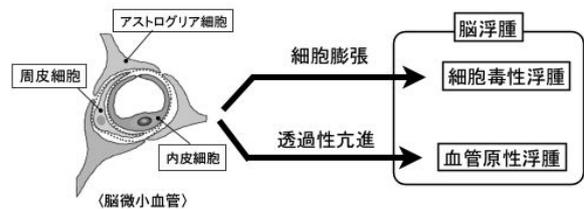


図1 細胞毒性浮腫と血管原性浮腫

本研究の目的は、“浮腫仮説”の分子基盤を解明することである。そのために、ヒト脳微小血管内皮および周皮細胞の培養系を用いて、細胞毒性浮腫についてはメチル水銀に対する内皮細胞および周皮細胞の感受性を評価し、併せて細胞内水分の貯留メカニズムについて検討を行った。血管原性浮腫については、内皮細胞と周皮細胞の機能異常について、特に血管透過性と細胞外マトリックスへの水分貯留のメカニズムについて検討を加えた。

### 3. 結果

#### 3-1. 細胞毒性浮腫に関わるメチル水銀の毒性

周皮細胞は、細胞密度が低いときにメチル水銀の細胞傷害性に対する感受性を示した。そのメカニズムを解析したところ、細胞密度が低いときにはメチル水銀を細胞内に輸送する中性アミノ酸トランスポーターLAT1の発現レベルが高く、しかもその発現がメチル水銀によって誘導されるために、細胞内メチル水銀の蓄積が高くなることに起因することが示された1)。

内皮細胞においても細胞密度が低い場合にはLAT1の発現が高くメチル水銀も多く細胞内に蓄積していたが、メチル水銀の毒性を

軽減し得るグルタチオンとメタロチオネインの合成レベルも高いために、メチル水銀の細胞傷害性に対して抵抗性を示すことが分かった 2)。

しかしながら、あらかじめ傷害した内皮細胞層の修復に対しては、メチル水銀は強い阻害作用を示した 3)。そのメカニズムとして、メチル水銀が内皮細胞の線維芽細胞増殖因子の発現を低下させ、そのために修復に必要な増殖が阻害されるためであることが明らかになった 4)。

ポリオール経路は高血糖時に強く誘導され、糖尿病における網膜症などの合併症を引き起こす糖代謝の副経路である。ポリオール経路の亢進によって生成されるソルビトールの異常蓄積は細胞内浸透圧の上昇、水分貯留による浮腫状態を引き起こすとされる。そこで、ポリオール経路に対するメチル水銀の毒性を調べたところ、メチル水銀が周皮細胞において、グルコースからソルビトールを生成させるアルドース還元酵素の発現を上昇させるだけでなく、ソルビトールをフルクトースに変換するソルビトール脱水素酵素の発現を低下させることを見いだした。

### 3-2. 血管原性浮腫に関わるメチル水銀の毒性

血管の透過性は血管原性浮腫の発生に関わるが、その制御には VEGF システムが重要である。そこで、メチル水銀に曝露した内皮および周皮細胞における VEGF システムを構成するタンパク質の発現を調べたところ、メチル水銀は内皮細胞においては機能受容体 VEGFR-2 とそのデコイ受容体 VEGFR-1 および VEGFR-1 に選択的に結合する PlGF の発現を上昇させるのに対し、周皮細胞に対しては VEGF-A の発現を誘導することが示された。この結果は、メチル水銀に曝露した脳微小血管では、VEGF システムの傍分泌型を活性化し、結果として血管透過性を亢進させることを示唆している (図 2)。

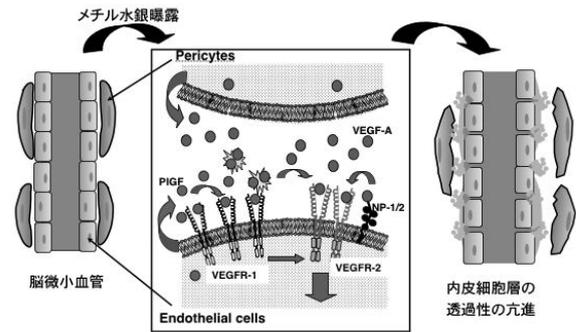


図 2 メチル水銀による VEGF システムの異常

さらに、メチル水銀は、内皮細胞および周皮細胞の両方において、細胞外マトリックスにおいて水分を貯留するヒアルロنانの合成を上昇させることが示された。そのメカニズムとして、ヒアルロナン合成に関与する酵素群のうち、内皮細胞では UGDH の発現が、周皮細胞では HAS-2 の発現が、メチル水銀によって上昇することによることが示された。

## 4. 結論

メチル水銀中毒の病理に血管毒性が深く関わっていることが示唆される。

## 引用文献

- 1) Hirooka, T., Fujiwara, Y., Minami, Y., Ishii, A., Ishigooka, M., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Satoh, M., Yasutake, A., Eto, K. and Kaji, T. (2010) *Toxicol. In Vitro*, 24: 835-841.
- 2) Hirooka, T., Fujiwara, Y., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A., Satoh, M., Eto, K. and Kaji, T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, 35: 287-294.
- 3) Hirooka, T., Fujiwara, Y., Yamamoto, C., Yasutake, A. and Kaji, T. (2007) *J. Health. Sci.*, 53: 450-456.
- 4) Hirooka, T., Fujiwara, Y., Inoue, S., Shinkai, Y., Yamamoto, C., Satoh, M., Yasutake, A., Eto, K. and Kaji, T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, 34: 433-439.

## メチル水銀による神経軸索障害の神経細胞死への寄与と Rho/ROCK 経路の抑制による毒性軽減作用

○藤村成剛（国立水俣研）、臼杵扶佐子（国立水俣研）、David Godefroy（仏国・インサーム）、  
William Rostene（仏国・インサーム）、川村美和子（鹿児島大）、出雲周二（鹿児島大）

環境毒の中には脳神経系を標的器官として重篤な神経機能障害を引き起こすものがある。その環境毒とはメチル水銀、無機水銀、鉛、パーキンソン病外部因子説に基づくロテノン等である。その中でも特にメチル水銀は重篤かつ不可逆的な神経機能障害をもたらす。メチル水銀の主な標的器官である神経細胞は、他の細胞と異なり神経突起（神経軸索および樹状突起）を有する形態学的に特殊な細胞である。

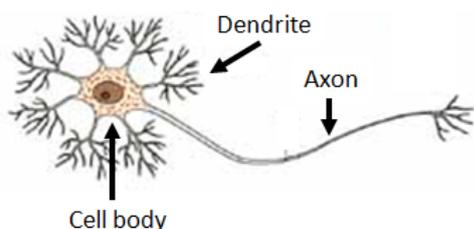


図 1 神経細胞の構造

また、培養神経細胞においてメチル水銀は培養液への添加濃度の約 50 倍から 100 倍が細胞内に集積することが報告されており<sup>1)</sup>、メチル水銀中毒患者の剖検脳およびメチル水銀中毒モデル動物の脳内水銀濃度から考えると、培養細胞実験における *in vivo* を反映したメチル水銀の添加濃度は  $1 \cdot M$  以下での検討も必要であると考えられる。

本研究においては、メチル水銀による神経細胞死においてこれまで注目されていなかった神経突起変性に着目し、さらに培養神経細胞に対するメチル水銀の曝露濃度においても  $1 \cdot M$  以下での検討を行った。低濃度 (100 nM) のメチル水銀は、神経突起変性を引き起こした後、カスパーゼ経路を介するアポトーシス神経細胞死を

誘発した。また、神経軸索の指標である Tau 陽性神経突起の変性が樹状突起の指標である MAP2 陽性神経突起の変性に先行したことから、メチル水銀の作用は神経突起の中でも神経軸索に特異的なことが判明した。さらに神経突起形成およびアポトーシス神経細胞死を規定している Rho 蛋白について解析を行った。メチル水銀は、RhoA (神経突起収縮因子) の発現を変化させることなく、Rac1 と Cdc42 (神経突起伸展因子) の発現を低下させ、特に Rac1 の低下が顕著であった。これらの結果から、低濃度メチル水銀が Rac1 発現低下による神経軸索伸展/収縮の不均衡を引き起こし、神経軸索変性および神経細胞死を誘発していることが示唆された<sup>2)</sup>。

以上の結果は、新しいメチル水銀による神経毒性作用メカニズムを明らかにするとともに、Rho/ROCK 経路 (RhoA およびその下流に存在する ROCK の経路)<sup>3)</sup> の阻害がメチル水銀による神経軸索の不均衡を是正し、神経細胞死を抑制する可能性を示すものであった。そこで、まず、培養神経細胞において Rho 阻害薬 (C3 toxin) および ROCK 阻害薬 (Y-27632, Fasudil)<sup>4, 5, 6)</sup> の効果を試したところ、低濃度 (100 nM) メチル水銀による神経軸索障害および細胞死を抑制することが明らかになった。次に末梢投与によって神経系に移行する Fasudil についてメチル水銀中毒動物モデル (20 ppm メチル水銀水の 4 週間飲水投与) を用いた検討を行った。Fasudil (3 mg/kg/day, 皮下投与) は、メチル水銀中毒動物モデルにおける末梢神経病変 (後根神経) および神経症状 (後肢交差) を抑制した<sup>7)</sup>。

以上、本研究において、新しいメチル水銀による神経毒性作用メカニズムを明らかにし、さ

らにそのメカニズムに基づいて薬剤によるメチル水銀の毒性軽減が可能であることを *in vitro* および *in vivo* メチル水銀中毒モデルで示唆することができた。

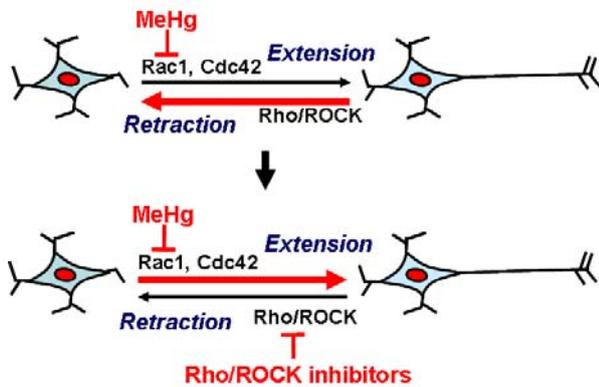


図2 神経細胞における Rho/ROCK 経路の阻害によるメチル水銀毒性の軽減作用

## 引用文献

- 1) Meacham C.A. et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 2005.
- 2) Fujimura M et al., Neurotoxicology, 2009.
- 3) Uehata M. et al., Nature, 1997
- 4) Lehmann M. et al., J. Neurosci., 1999.
- 5) Bito H. et al., Neuron, 2000.
- 6) Yamashita K. et al., Brain Res., 2007.
- 7) Fujimura M et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 2011.

○熊谷嘉人（筑波大学医学医療系）

## 1. 背景と目的

メチル水銀 (MeHg) は血液脳関門を通過して中枢神経障害を呈する親電子物質である。その作用機序のひとつとして、タンパク質のシステイン残基を介した化学修飾 (S-水銀化) が示唆されている。我々は MeHg がグルタチオン (GSH) 抱合されて親電子性を消失した後に、多剤耐性関連タンパク質 (MRP) トランスポーターを介して細胞外に排泄されることに着目し、一連の解毒・排泄に関与するタンパク質群を統括的に制御する転写因子 Nrf2 が MeHg の毒性防御に重要な役割を担っていることを細胞レベルおよび個体レベルで明らかにしてきた<sup>1-3)</sup>。このように種々の組織にはグルタチオン (GSH) が高濃度存在して親電子物質の解毒に寄与しているが、神経細胞では他の細胞と比較して GSH 濃度が低い。一方、硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は血管弛緩作用等を有するガス状シグナル分子であり、シスタチオニンβ-合成酵素 (CBS) およびシスタチオニンγ-切断酵素 (CSE) から産生される。両酵素は共に各組織に広く分布するが、脳内では特に CBS の発現量が高い。我々は H<sub>2</sub>S の pKa 値が 6.76 であることから、生理的条件下ではその 81% が HS<sup>-</sup> の形で存在するために、MeHg のチオール基付加反応を介してその解毒に重要な役割を担っていると考えた。

## 2. 結果と考察

H<sub>2</sub>S の発生剤をヒト神経芽 SH-SY5Y 細胞 (CBS を特異的に発現) に前処置すると、MeHg 曝露による濃度依存的な細胞毒性は抑制された。CBS を本細胞に高発現すると MeHg の細胞毒性は減少し、逆に CBS をノックダウンする

と毒性は有意に増加した。MeHg と H<sub>2</sub>S との反応で生成した物質は、EI-MS において親イオンピークとして  $m/z=464$ 、フラグメントピークとして  $m/z=248$  および 449 を示し、元素分析の結果から (MeHg)<sub>2</sub>S であることが明らかとなった。ヒト CBS を用いた酵素反応系に MeHg を添加しても (MeHg)<sub>2</sub>S が生成した。一方、MeHg を曝露した細胞および個体試料中には、MeHg やその GSH 抱合体以外の未知の代謝物の存在が認められた。この代謝物は HPLC 上で合成標品である (MeHg)<sub>2</sub>S と同じ保持時間を有し、EI-MS においても親イオンピークおよびフラグメントピーク共に本標品と完全に一致した。MeHg を SH-SY5Y 細胞に曝露すると、複数の細胞内タンパク質の S-水銀化が見られ、それに伴う濃度依存的な細胞毒性が生じたが、(MeHg)<sub>2</sub>S の場合は S-水銀化は見られず、細胞毒性も顕著に低下した。MeHg (0.1 mmol/kg) をマウスに腹腔内投与すると、24 時間以内にその 80% が死亡するのに対して、同容量の (MeHg)<sub>2</sub>S を投与しても MeHg 曝露と変わらない臓器内水銀蓄積量であるにも係わらず、全く致死効果は示さなかった。以上より、SH-SY5Y 細胞や動物において、CBS (あるいは CSE) から産生する H<sub>2</sub>S の大半は HS<sup>-</sup> に変換され、それが MeHg を求核付加攻撃することで最終的に (MeHg)<sub>2</sub>S に代謝されることが示唆された (図 1)。(MeHg)<sub>2</sub>S は MeHg とは異なり、タンパク質の S-水銀化や毒性を殆ど呈さないことから MeHg の新奇解毒代謝物であることが考えられた<sup>4)</sup>。

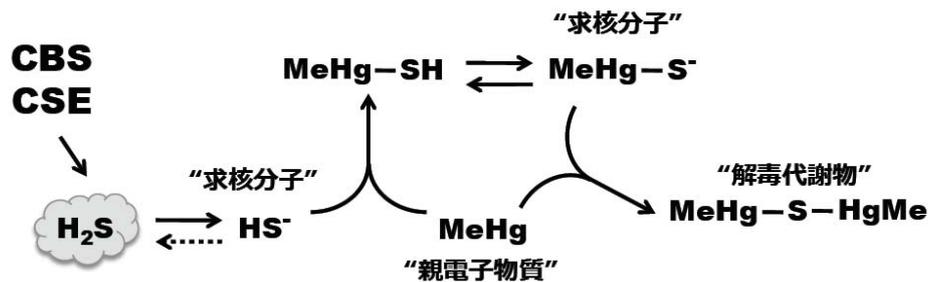


図1. H<sub>2</sub>Sによるチオール基付加反応を介したメチル水銀の解毒経路

### 3. 国内外の研究状況

約30年前に井村らの研究グループより、微生物においてH<sub>2</sub>SがMeHgの有害性を抑制していることが報告されている<sup>5)</sup>。同じ時期に、英国の研究グループが土壤中等にH<sub>2</sub>Sを生成する微生物等が存在することに着目して、環境中でのMeHgとH<sub>2</sub>Sの反応性を見出している(Nature誌に掲載)<sup>6)</sup>。それにも関わらず、哺乳類の細胞内での検討は皆無に等しい。憶測すれば、毒性学者にとってH<sub>2</sub>Sの毒ガスとしての認識が本研究の発展を妨げた可能性がある。それに対して、1998年の一酸化窒素(NO)の生理作用の発見に対するノーベル医学・生理学賞受賞を契機に、内在性ガス状物質の研究は一酸化炭素(CO)、さらにはH<sub>2</sub>Sへと発展しており、生理学者および細胞生物学者にとってホットな分野である。事実、PubMed上ではH<sub>2</sub>Sのシグナル分子に関する論文が最近10年間で654報掲載されている。欧米では神経疾患や心疾患にH<sub>2</sub>Sの臨床応用も始まっており、H<sub>2</sub>Sの有害性は有用性へと変貌している。

### 4. 本研究の特色・独創点

これまでの研究では、その物性および生理作用からH<sub>2</sub>Sはガス状シグナルという捉え方が主流と言える。本研究は、世界で初めて哺乳類の細胞内で産生したH<sub>2</sub>SがMeHgの毒性防御に働くことを明らかにし

ており、(MeHg)<sub>2</sub>S生成の発見はMeHgの生体内変換のパラダイムシフトに繋がる。得られた研究成果は、CBSおよびCSEのようなH<sub>2</sub>S産生酵素がMeHgの新奇リスク軽減因子であることを示唆している。GSHが親電子物質の解毒に働くことは論を待たないが、GSHと比較してH<sub>2</sub>Sの①拡散律速による細胞内外の移動性、②解離常数に起因する反応性、③立体障害性がない点から、我々は細胞内でGSHをサポートする“第2の求核バッファー分子”ではないかと想定している。本研究は、MeHgだけでなくH<sub>2</sub>Sによる親電子物質のシグナル制御という新たな学問分野の開拓にも貢献することが期待される。

### 5. 引用文献

- 1) Toyama T et al. Biochem Biophys Res Commun 363: 645-650, 2007.
- 2) Toyama T et al. Toxicol Appl Pharmacol 249: 86-90, 2010.
- 3) Toyama T et al. Environ Health Perspect 119: 1117-1123, 2011.
- 4) Yoshida E et al. Chem Res Toxicol 24: 1633-1635, 2011.
- 5) Pan-Hou HS, Imura N. Arch Microbiol 129: 49-52, 1981.
- 6) Craig PJ, Bartlett PD. Nature 275: 635-637, 1978.

## 講演 6

### メチル水銀によるセレン含有抗酸化酵素の転写後変化と酸化ストレス発生

○白杵扶佐子（国立水俣病総合研究センター）

#### 【背景】

これまで、低濃度メチル水銀でアポトーシスが  
おこるモデル細胞培養系を構築してメチル水銀  
毒性メカニズムについて検討し、メチル水銀毒性  
の病態に酸化ストレス傷害の関与が重要である  
こと<sup>1-4</sup>)を明らかにしてきた。メチル水銀毒性発  
現における酸化ストレスの関与は、メチル水銀中  
毒モデルラットにおいても確認された<sup>5</sup>)。メチル  
水銀曝露により生体ではさまざまなストレス応  
答がおこる。メチル水銀が誘発した生体ストレス  
応答の破綻がアポトーシスであるが、メチル水銀  
の曝露によってストレスシグナル伝達系が活性  
化され、そのシグナルが核に到達して遺伝子の発  
現変化がおこり、細胞の生死が選択されると考え  
られる。cDNAマイクロアレイを用いた網羅的な遺  
伝子発現プロファイルの解析やcaspase活性の変  
動解析から、メチル水銀によるアポトーシス過程  
では後期に小胞体 (ER) ストレスが関与してい  
ることも明らかになった<sup>4</sup>)。しかしながら、メチル  
水銀による酸化ストレス発生の分子メカニズム  
の詳細はなお不明な部分が多い。

#### 【目的】

メチル水銀曝露による酸化ストレス発生の分  
子メカニズムについて明らかにする。

#### 【方法】

メチル水銀曝露 24 時間後までにアポトーシス  
がおこることが明らかになっている培養細胞系<sup>2</sup>)  
を対象とした。メチル水銀曝露後の生体内酸化  
還元系の酵素群の発現変動を real-time PCR にて  
検討するとともに、活性酸素種 (ROS) の変動、ア  
ポトーシスをフローサイトメトリーにて検討し  
た。また、mRNA 監視機構である  
nonsense-mediated mRNA decay (NMD)<sup>6</sup>)のメチル  
水銀曝露後の酸化ストレス発生への関与につい

て、NMD の主要な構成分子である SMG-1、SMG-7  
を標的とした siRNA を用いて検討した。

#### 【結果】

毒性発現の早期から酸化ストレス防御に関与  
する多くの酵素の mRNA 発現が増加する一方、過  
酸化水素消去に作用するセレン含有酵素である  
glutathione peroxidase 1 (GPx1) mRNA の発現  
は低下した。このメチル水銀曝露後の GPx1 mRNA  
発現の低下は、セレン添加で回復した。NMD の主  
要な構成分子である SMG-1、SMG-7 を siRNA に  
よりノックダウンして NMD 活性を抑制した細胞で  
は、メチル水銀曝露後の GPx1 mRNA 発現低下は抑  
制された。チオレドキシン系における主要なセレ  
ン含有酵素である thioredoxin reductase 1  
(TrxR1) は、mRNA 発現はメチル水銀曝露後増加  
したが、その活性は低下した<sup>7</sup>)。

#### 【考察】

GPx1 は、終止コドンと同じ UGA でコードされ  
る特異なアミノ酸であるセレノシステイン (Sec)  
を分子内に 1 個もつ selenoprotein である。GPx1  
の Sec をコードする UGA コドンは、一個あるイン  
トロンの 105 塩基上流に存在する。メチル水銀曝  
露後の GPx1 mRNA の低下がセレンの添加により回  
復したこと、さらに NMD 活性の抑制により  
GPx1 mRNA の発現低下が抑制されたことから、メ  
チル水銀曝露後の GPx1 mRNA の低下は、メチル水  
銀曝露による細胞内セレンの相対的な不足によ  
り Sec をコードする UGA コドンが PTC (premature  
translation termination codon) として認知さ  
れ、GPx1 mRNA が mRNA 監視機構である NMD に  
より分解されたことによると考えられた。GPx1 と  
同様に Sec を活性基としてもつ selenoprotein  
である TrxR1 は、GPx1 と異なり Sec をコードす

る UGA codon が NMD の無効な最終 exon に存在するため TrxR1 mRNA の発現はメチル水銀曝露後増加したと考えられる。しかしながら、TrxR1 の酵素活性は低下しており、UGA codon が Sec として翻訳されないため aberrant TrxR1 が生じたと考えられる。GPx1、TrxR1 の変動は、他の酸化ストレス防御に関与する酵素群の変化より早く、酸化ストレス発生以前に生じており、メチル水銀がもたらす細胞内活性型セレンの変動が NMD の作動を通して遺伝子転写後の発現を変化させ、酸化ストレス発生に寄与することが示唆された。

#### 【文献】

- 1) Usuki F and Ishiura S: Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increases oxidative stress. *NeuroReport* 9: 2291-2296, 1998
- 2) Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N et al. : Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA- transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 267: 739-743, 2000
- 3) 臼杵扶佐子: メチル水銀による酸化ストレスと神経細胞死. *医学のあゆみ 別冊 酸化ストレス Ver. 2* フリーラジカル医学生物学の最前線(吉川敏一編集)p. 431-4, 2006
- 4) Usuki F, Fujita E, Sasagawa N: Methyl-mercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *NeuroToxicology* 29:22-30, 2008
- 5) Usuki F, Yasutake A, Umehara F et al. : In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury- intoxication in the rats. *Neurosci Lett* 304: 199-203, 2001
- 6) 臼杵扶佐子、山下暁朗: Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) による変異 mRNA 排除と疾患. *細胞工学* 29 : 155-160, 2010
- 7) Usuki F, Yamashita A, Fujimura M: Post-transcriptional defects of antioxidant selenoenzymes cause oxidative stress under methylmercury exposure. *J Biol Chem* 286: 6641-9, 2011

## メチル水銀毒性と蛋白質のパルミチン酸化

黄 基旭 (東北大学・大学院薬学研究科)

中枢神経障害を主症状とする水俣病は、メチル水銀による環境汚染が原因となって引き起こされた公害病として世界的に良く知られている。近年、「魚介類を介してメチル水銀を比較的多く摂取した女性から生まれた子供に運動や精神の発達障害が認められる」との疫学調査結果が発表されるなど、メチル水銀による健康影響が世界的に懸念されている。しかし、メチル水銀による毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構は未だほとんど解明されていない。

我々は、メチル水銀による毒性発現機構を解明するために、酵母細胞を用いてメチル水銀耐性に関わる遺伝子の検索を行い、ユビキチン転移酵素ファミリーの1つである Cdc34 がメチル水銀に対する防御因子として機能することを初めて見出した。<sup>1)</sup> ヒト Cdc34 をヒト由来培養細胞中に高発現させても顕著なメチル水銀耐性が認められることから、Cdc34 は酵母からヒトに至る真核生物全般においてメチル水銀毒性に対する防御因子として機能していると考えられる。<sup>2)</sup>

Cdc34 は細胞内で蛋白質の分解に関わるユビキチン・プロテアソームシステム (UP システム) の一員である。UP システムはユビキチン活性化酵素、ユビキチン転移酵素およびユビキチンリガーゼの連続した働きによって、基質となる蛋白質にユビキチンを連結させ、このユビキチン鎖をプロテアソームが認識して基質蛋白質を分解する重要な細胞内機構である。<sup>3)</sup>

これまでの分子レベルでの詳細な検討により、細胞内にはメチル水銀毒性を増強させる蛋白質が存在し、Cdc34 が関与する UP シ

ステムはメチル水銀曝露に応答してこのメチル水銀毒性増強蛋白質のユビキチン化を促進させることによってプロテアソームでの分解を促し、その結果としてメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにした。<sup>4)</sup> したがって、このメチル水銀毒性を増強させる蛋白質を同定することによって、メチル水銀毒性の発現機構を解明する上での重要な手掛かりが得られるものと思われる。酵母遺伝子欠損株ライブラリーを用いて、UP システムによって分解されるメチル水銀毒性増強蛋白質の検索を行ったところ、Whi2 (機能未知) が同定された。

Whi2 はメチル水銀毒性増強作用を有し、Cdc34 依存的にユビキチン化された後にプロテアソームで分解される。さらに、Whi2 がパルミチン酸転移酵素の1つである Akr1 の作用 (メチル水銀毒性軽減作用) を抑制することによってメチル水銀毒性増強作用を発揮していることも判明した。Akr1 は基質蛋白質にパルミチン酸を付加させるパルミチン酸転移酵素ファミリーの1つである。Akr1 による基質蛋白質へのパルミチン酸の付加 (パルミチン酸化) は多くの脂質修飾とは異なり可逆的な修飾であり、ある種の蛋白質を細胞膜に繋ぎ止める膜アンカーとして働くことによって細胞膜上での情報伝達を効率化していると考えられている。<sup>5)</sup> 我々は、パルミチン酸転移酵素ファミリーの中で Akr1 のみがメチル水銀毒性軽減に関与すること、および、Akr1 がリソソームの膜上でマイクロオートファジーの調節に関わる Meh1 をパルミチン酸化させることによってメチル水銀毒性軽減に関与していることを明らかにしている。

一方、Akr1 のヒトアナログである HIP14 は神経変性疾患の 1 つであるハンチントン病の原因遺伝子産物と相互作用する蛋白質として知られている<sup>6)</sup>が、HIP14 を高発現させたヒト由来培養細胞にも顕著なメチル水銀耐性が認められることから、酵母細胞と同様にヒト細胞においてもパルミチン酸転移酵素がメチル水銀毒性に対する防御因子として機能し

ていると考えられる。

### 引用文献

- 1) Mol. Pharmacol., 61, 738-741 (2002)
- 2) FASEB J., 16, 709-711 (2002)
- 3) Annu. Rev. Biochem., 67, 425-479 (1998)
- 4) J. Health Sci., 57, 129-133 (2011)
- 5) J. Lipid Res., 47, 1118-1127 (2006)
- 6) Nat. Neurosci., 9, 824-831 (2006)

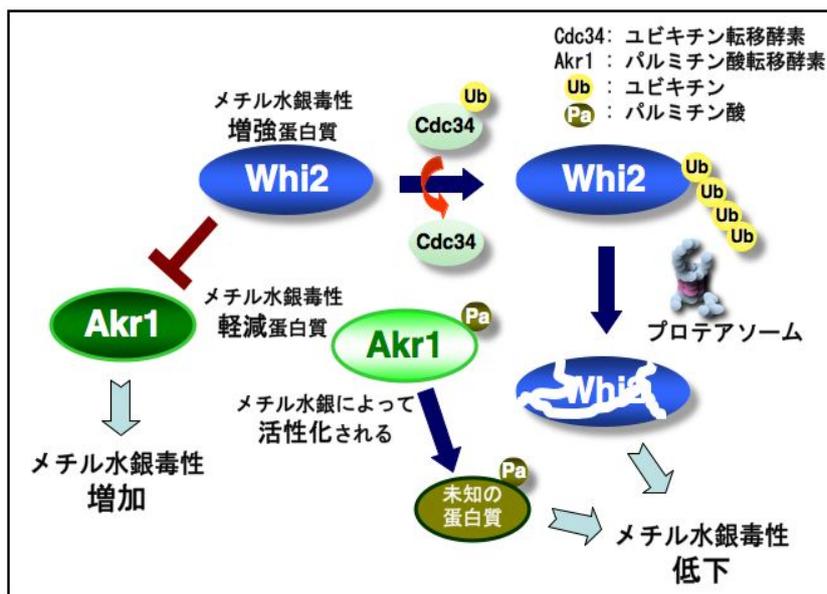


図 1. メチル水銀毒性発現における各因子の関与



## ポスター発表

## HPLC/AAS 法による臓器中疎水性メチル水銀代謝物の分析

○ 外山喬士（筑波大院、日本学術振興会）、吉田映子（筑波大院）、熊谷嘉人（筑波大院）

## 1. 背景と目的

メチル水銀（MeHg）は、GSH による抱合を受けることで親水性が増し、システインやメルカプトツール酸付加体を経ることで細胞外、体外へと排泄される。これは約 40 年程前から明らかにされてきた MeHg の古典的な解毒代謝経路である。このような親水性 MeHg 代謝物の分析にはゲルろ過カラムと原子吸光法（AAS）を組み合わせた化学形態別分析が試みられてきたが、意外なことに疎水性の MeHg 代謝物の分析はほとんど検討されていない。

我々は CBS や CSE から生産される内在的な硫化水素（ $H_2S$ ）が、下記の 2 段階の反応により MeHg の親電子性を消失させ、その有害性を抑制する新規の解毒因子であることを細胞から個体レベルで明らかにした<sup>1)</sup>。

1.  $MeHg^+ + H_2S \rightarrow MeHg-SH + H^+$
2.  $MeHg-SH + MeHg^+ \rightarrow (MeHg)_2S + H^+$

本反応の最終産物である  $(MeHg)_2S$  は、疎水性の高い新奇 MeHg 解毒代謝物であることから、未知の MeHg の生体影響や代謝経路を解明するために MeHg の疎水性代謝物を分析する重要性を痛感した。そこで本研究では、HPLC/AAS による分析法を確立し、 $(MeHg)_2S$  を初めとする疎水性 MeHg 代謝物の臓器分布の解明を目的とした。

## 2. 結果と考察

疎水性 MeHg 代謝物の分析法を確立するため、 $(MeHg)_2S$  をモデル物質として検討を行った。臓器ホモジネート中から、固相抽出による疎水性水銀の濃縮法を添加回収実験によって検討した結果、約 70%の  $(MeHg)_2S$  が回収できた。また、

10%メタノールと 0.1%ギ酸を移動相に用いた HPLC/AAS 分析をすることで、MeHg、 $(MeHg)_2S$  および未知の MeHg 代謝物を分離分析できた。そこで、本分析法により臓器中疎水性 MeHg 代謝物の測定を試みた。

雄性の C57/BL6J マウスに MeHg（0.05 mmol/Kg）を腹腔内投与し、24 時間後と 72 時間後に臓器を取り出した。各臓器はホモジネート後、固相抽出で疎水性水銀化合物を濃縮し、HPLC/AAS による化学形態別分析をした。興味深いことに、他臓器と比較して心臓では  $(MeHg)_2S$  が時間依存的に蓄積するのに対して、脳では未知の疎水性 MeHg 代謝物の顕著な蓄積が見られた。

神経系および循環器系は MeHg の毒性標的として示唆される臓器であるため、今後これらの未知疎水性 MeHg 代謝物の同定を進め、その生体影響に関して検討していく。また我々は、各種培養細胞を用いた検討から、心筋細胞が MeHg に高い感受性を示すことを見出している。心筋細胞は  $H_2S$  産生酵素の発現量が極めて低いことから、個体レベルにおける心臓中での  $(MeHg)_2S$  の防御的意義の解明を目指したい。

## 3. 引用文献

- 1) Yoshida E et al. Chem, Res, Toxicol, 23: 1633-1635, 2011.

## 培養血管内皮および周皮細胞のポリオール経路に対するメチル水銀の毒性

○平田 明成 (東理大薬), 廣岡 孝志 (東理大薬), 山本 千夏 (北陸大薬),  
鍛冶 利幸 (東理大薬)

### 1. 目的

水俣病患者に特異的な大脳障害の特徴は、深い脳溝周辺に傷害が限局されていることである。その原因として「メチル水銀が浮腫を引き起こし周辺組織が圧迫されて循環障害が発生するが、その影響は形態的な理由から脳溝周辺に起こりやすい」とする浮腫仮説が病理組織学的研究から提唱されている。脳浮腫には、脳微小血管構成細胞の透過性の亢進による血管原性浮腫とその非特異的な傷害による細胞毒性浮腫が知られているが、多くの疾患において両者は同時に発生する。当研究室ではメチル水銀の血管毒性の観点から、血管内皮細胞と周皮細胞の間の傍分泌型 VEGF システムの亢進やヒアルロナン合成の促進が血管原性浮腫の分子基盤である可能性を見出した。しかしながら、細胞毒性浮腫形成に至る分子機構については不明のままであった。ポリオール経路は高血糖時に強く誘導され、糖尿病における網膜症などの合併症を引き起こす糖代謝の副経路である。ポリオール経路の亢進によって生成されるソルビトールの異常蓄積は細胞内浸透圧の上昇、水分貯留による浮腫状態を引き起こす。本研究の目的は、ポリオール経路に対するメチル水銀の毒性をヒト脳微小血管内皮および周皮細胞の培養系を用いて検討し、メチル水銀による細胞毒性浮腫に分子基盤が存在することを示すことである。

### 2. 方法

コンフルエントのヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞をメチル水銀 (1, 3, 5  $\mu$ M)

または高グルコース (25 mM) で 24 時間処理し、その浮腫性変化を形態学的観察で評価した。またコンフルエントの内皮および周皮細胞について、ポリオール経路の代謝酵素であるアルドース還元酵素 (AR) およびソルビトール脱水素酵素 (SDH) の mRNA とタンパク質の発現変動を Real-time RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により分析した。

### 3. 結果および考察

メチル水銀に曝露した内皮細胞においては、形態学的には細胞間隙の広がり観察されたのみであり、またメチル水銀による AR および SDH の発現の変化は認められなかった。これに対し、メチル水銀に曝露した周皮細胞においては、紡錘形から敷石状への形態の変化が認められた。このとき、メチル水銀による濃度依存的な AR 発現の上昇および SDH 発現の低下が mRNA およびタンパク質レベルで確認された。敷石状への形態変化と AR の発現上昇は、高グルコースで処理した場合にも観察された。以上の結果は、メチル水銀に曝露した脳微小血管では周皮細胞において細胞毒性浮腫が発生しやすいこと、およびその浮腫性の形態変化がポリオール経路における AR の発現上昇と SDH の発現低下によってソルビトールが細胞内に過剰に蓄積したために細胞内浸透圧と水分貯留が上昇したことに起因することを示唆している。今後、周皮細胞および内皮細胞の AR と SDH の活性の変化および細胞内ソルビトール蓄積量の測定を行い、メチル水銀毒性とポリオール経路の関連性について詳細に検討する。

## 傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層の修復に対するメチル水銀の阻害作用は 低酸素下において増強される

○ 廣岡 孝志 (東理大薬), 山本 千夏 (北陸大薬), 安武 章 (熊大自然),  
衛藤 光明 (医療法人信和会), 鍛冶 利幸 (東理大薬)

### 1. はじめに

水俣病においてメチル水銀の脳の深い脳溝周辺組織への選択的な障害は、重要な病理学的な特徴である<sup>1)</sup>。このメチル水銀の部位選択的な毒性発現機構は、水俣病が公式確認されてから50年以上を経た現在においてもほとんど解明されていない。一方、衛藤らは、メチル水銀に曝露させたコモン・マーモセットの脳の病理組織学的な研究から、メチル水銀曝露による脳浮腫形成とその圧迫による二次的な組織循環障害が深い脳溝組織に誘発されることにより、部位選択的な脳障害を引き起こされるとする「浮腫仮説」を提唱している<sup>2)</sup>。この仮説は、脳におけるメチル水銀毒性の部位選択的な発現メカニズムを合理的に説明している。しかしながら、「浮腫仮説」の分子基盤は明らかではない。

浮腫形成による二次的な組織循環障害は、その組織を低酸素環境へと変化させると考えられる。低酸素による細胞周囲の微細環境の悪化は、脳構成細胞のメチル水銀毒性への感受性を増大させると推測される。従って、低酸素下におけるメチル水銀の細胞毒性発現を理解することは、「浮腫仮説」の分子基盤の解明において重要である。しかしながら、低酸素がメチル水銀の毒性発現に与える影響を調べた研究報告はない。そこで、本研究では、メチル水銀による傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層の修復阻害に対する低酸素の影響を調べた。

### 2. 実験方法

物理的に傷害し修復過程にある内皮細胞層および異なる細胞密度に播種した内皮細胞層を調製し、低酸素 (1% O<sub>2</sub>) および通常条件 (20% O<sub>2</sub>) 下、37°Cで24時間、メチル水銀 (1, 2, 3 μM)

処理した。傷害細胞層の修復を形態学的観察により、細胞の非特異的な傷害を細胞から培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性により、それぞれ評価した。細胞増殖活性は、細胞数の変化により評価した。別に、FGF-2 システム関連 mRNA および FGF-2 タンパク質の発現レベルを Real-time RT-PCR と Western blot 分析により調べた。

### 3. 結果・考察

1% O<sub>2</sub> と 20% O<sub>2</sub> 培養において、メチル水銀は傷害内皮細胞層の修復を濃度依存的に阻害し、その阻害作用は 1% O<sub>2</sub> 培養において増強された。しかしながら、培養酸素濃度の差によるメチル水銀の内皮細胞の傷害および増殖阻害の差は確認できなかった。一方、傷害細胞層の修復に決定的な役割を担う FGF-2 システムに関連する遺伝子群のうち、FGF-2 mRNA とそのタンパク質の発現が、1% O<sub>2</sub> 下で 20% O<sub>2</sub> 下よりも強く阻害され、その阻害作用はメチル水銀濃度依存的に増強されることが確認された。以上の結果は、メチル水銀の傷害ヒト脳微小血管内皮細胞層の修復阻害が低酸素下で増強されること、その分子機構の1つとして低酸素によるメチル水銀の FGF-2 の発現低下の増強が示唆される。

### 4. 引用文献

- 1) Eto, K. : Pathology of Minamata disease., *Toxicol. Pathol.*, pp. 614-623, 1997.
- 2) Eto, K., Yasutake, A., et al. : Methylmercury poisoning in common marmosets—a study of selective vulnerability within the cerebral cortex., *Toxicol. Pathol.* pp. 565-573, 2001.

## 魚肉に含有されるメチル水銀と塩化メチル水銀との胎児期曝露影響の比較

岩井美幸（東北大院医環境保健医学）、○龍田希、山下倫明（水産総合研究セ）、仲井邦彦（東北大院医発達環境医学）、柳沼梢、黒川修行、佐藤洋（東北大院医環境保健医学）

### 1. 背景

メチル水銀影響に関する動物実験では、化学物質としてのメチル水銀を投与することが一般的である。例外的に 1975 年 Olson & Boush が、メチル水銀濃度の高い魚肉あるいはメチル水銀を添加した魚肉を妊娠中に曝露した実験において、出生仔の迷路学習の成績が異なるという報告した。その報告ではメチル水銀濃度の高い魚肉を摂取した母から出生した仔では、遊泳能力の発達遅延、学習能力の低下が示された<sup>1)</sup>。しかし、成績の違いをもたらす原因は不明であり、その後の追試もなされていない。そこで、魚肉に含有されるメチル水銀と塩化メチル水銀の胎児期曝露影響について比較検討することを目的とした。

### 2. 方法

#### 2-1. 曝露方法

10 週齢の雌 C57BL/6Ncr (日本エスエルシー株式会社) を非曝露の雄と交配させた。プラグ確認後、曝露餌を与え、在胎 17 日目に通常飼料に切り替えた。餌は精製飼料として販売される AIN93G (妊娠、授乳および成長用, オリエンタル酵母工業株式会社) を使用し、通常含有されるタンパク源 (カゼイン 20%) を魚粉に置き換えた。メチル水銀は餌中に 1.6mg/kg になるように調製した。魚粉はカゼインと比較すると、リン (P) の含有量が少ないため、魚粉をタンパク源とする飼料には必要量の P を予め添加したものを使用した。実験群は魚中水銀の有無とメチル水銀添加、不飽和脂肪酸の関係から AIN93G を与えた対照群 (CL)、AIN93G にメチル水銀を添加した群 (CMM)、タンパク源を水銀含有が少ないメジマグロ粉に置換した群 (FCL)、メジマグロ粉にメチル水銀を添加した群 (FMM)、メバチマグロ粉に置換した群 (FHg) の 5 群を設定した。出生後

4 日目に間引きを行い、仔数を 4-6 匹に揃え飼育した。なお、動物実験の実施および計画については、東北大学より承認を得て、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規定」に基づき実施した (受付番号 22 医動-354)。

#### 2-2. 離乳前発達試験

離乳前発達試験は、生後 (postnatal day: PND) 7, 10, 12, 14, 16 日目に行った。体重、眼瞼開裂、耳介展開、歯芽萌出、皮膚毛生、歩行、起き上がり反射、握り反射、断崖回避および背地走性 (45°) の試験項目を実施した。

#### 2-3. 神経行動学的試験

若齢期に相当する 5 週齢からオープンフィールド試験 (情動)、水迷路試験 (学習記憶) およびローターロッド試験 (運動) を行った。オープンフィールド試験は 11 時から 14 時の間に 1 回実施した。水迷路試験は 1 日目に遊泳練習を実施し、翌日から 5 日間に 1 日 3 回のトレーニングを実施し、その学習を評価した。ローターロッド試験では、3 から 26rpm に 180 秒で回転数が上昇するように設定し、300 秒までを 1 トレーニングとし、1 日 4 回のトレーニングをインターバル 10 分で実施し評価した。なお、離乳前発達試験、オープンフィールド試験および水迷路試験については Sugawara ら<sup>2)</sup>、ローターロッド試験では Bellum ら<sup>3)</sup> の実験プロトコルを参考とした。

#### 2-4. 化学分析

飼料について基本成分 (5 大栄養素)、熱量、アミノ酸、脂肪酸、セレン (Se) などの微量元素、および総水銀分析を実施した。出生仔は PND4, 21, 47 に解剖を行い、脳および血液を採取した。また母は離乳時に解剖し、分析に供するまで -80°C で保管した。総水銀 (THg) は還元気化原子吸光光度法にて、Se は Watkinson 法にて測定を行った。

## 2-5. 統計解析

離乳前発達試験の成功率や神経行動学試験結果について、一般化線形モデルを用い解析を行った。統計学的有意水準は5%とした。

## 3. 結果

### 3-1. 飼料分析

本研究で使用した飼料の基本成分、熱量ならびに魚粉に含有される脂肪酸のうちドコサヘキサエン酸 (DHA) とエイコサペンタエン酸 (EPA) について表 1 に記載した。餌中 THg および Se 濃度は表 2 に記載した。メバチ魚粉を使用した餌は、Se 濃度が他の飼料よりも高くなった。

表 1. 使用した飼料の基本成分

餌の配合	粗蛋白質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)	熱量 (kcal/100g)	DHA (mg/100g)	EPA (mg/100g)
AIN93G	16.4	4.4	1.8	2.8	405	N.D.	N.D.
AIN93Gカゼイン(-)+メジ	14.8	6.6	1.1	2.8	372	506	110
AIN93Gカゼイン(-)+メバチ	16.7	6.3	1.0	2.4	391	377	69

表 2. 餌中 THg および Se 濃度

餌の配合	略名	THg 濃度 (ng/mg)	Se 濃度 (ng/mg)
AIN93G	CL	N.D.	0.20±0.02
AIN93G+MeHg	CMM	1.30±0.94	0.21±0.02
AIN93Gカゼイン (-)+メジ	FCL	0.17±0.02	0.36±0.05
AIN93Gカゼイン (-)+メジ+MeHg	FMM	1.40±0.02	0.37±0.04
AIN93Gカゼイン (-)+メバチ	FHg	1.43±0.03	0.53±0.03

ばく露に使用したエサの分析値 4, Mean±S.D.

### 3-2. 出産・育児に関する影響

出産および育児に関する結果を表 3 に示した。

表 3. 出産・育児に関する結果

実験群	交配数	出産数	育児数	着床数	生存仔数 (PND4)	体重 (PND4)
CL	7	7	7	7.3±0.8	6.0±1.7	2.9±0.4
CMM	9	5	4	8±2.0	7.0±1.4	3.0±0.4
FCL	8	7	7	9.3±1.0	7.7±1.5	2.7±0.2
FMM	8	6	5	9.4±0.5	7.6±1.1	2.7±0.2
FHg	9	6	6	9.6±1.6*	9±1.1*	2.4±0.1*

\*p<0.05, Mean ±S.D.

着床数、PND4 における生存仔数および体重について群間に有意な差が観察された。多重比較の結果、タンパク源をメバチマグロ粉に置換し

た FHg 群において他群と比較し、着床数および生存仔数が多く、体重が小さくなった (p<0.05)。

### 3-2. 離乳前発達試験

妊娠期間中の母親の体重経過に違いはないものの、出生した仔マウスはメチル水銀曝露がある場合に有意に小さくなった (p<0.01, 図 1)。

離乳前発達試験では、魚粉を摂取した群で成績が良くなる項目 (起き上がり反射や歩行) があつた。塩化メチル水銀曝露においては握り反射、魚由来メチル水銀曝露においては断崖回避の試験項目で遅れが観察された。

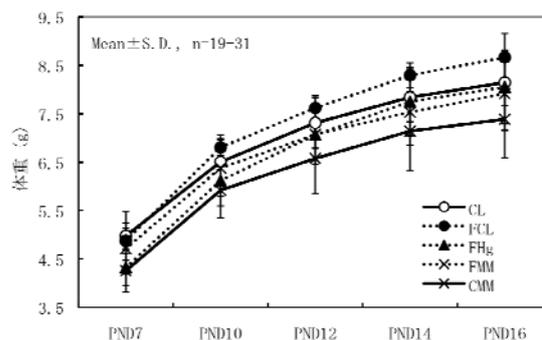


図 1. 出生仔の体重経過

体重は、FCL>CL>FMM, FHg>CMM の順で小さくなった。

### 3-3. 神経行動学試験

オープンフィールド試験における移動距離、移動速度および糞尿の数ともに各群間に有意な差はみられなかった。ただ、潜時について、雄で CL に比較して他群が早い傾向であった。

水迷路試験では、日毎にプラットホームまでの到達時間および遊泳距離が有意に短縮した (p<0.01)。到達時間、遊泳距離に各群間に有意な差はみられなかった。平均遊泳速度において、雄で群間に有意差が観察され (p<0.01)、CL に比較して FHg の遊泳速度が遅いことが明らかとなった。

ローターロッド試験ではトレーニングを重ねることで落下するまでの時間が有意に延長した (p<0.01)。また雄において群間での有意差がみられ (p<0.05)、FCL と比較して FMM の落下時間が早くなった。雌では群間について有意傾向となった (p=0.068)

### 3-4. 脳内 THg 濃度

脳内の THg 濃度を表 4 に示す。胎児期の曝露濃度を反映すると考えられる生後 4 日目の脳は、メチル水銀曝露がある場合に 1200ng/g 前後であった。神経行動学試験を実施後に採取した PND47 については、ほとんど THg は検出されない濃度に低下していた。

表 4. 脳内の総水銀濃度 (ng/g)

群	PND4	PND21	PND47
CL	N. A.	N. D.	N. D.
FCL	112(2)	N. D.	N. D.
CM	N. A.	85±8	N. D.
FM	1228±104	73±17	N. D.
FHg	1255±330	86±15	N. D.

Mean±S.D. n=2-11, Not detection (N. D.), Not analysis (N. A.)

#### 4. 考察

本研究は、魚肉に含有されるメチル水銀と塩化メチル水銀の胎児期曝露影響について比較検討を実施した。授乳期間中の体重は、メチル水銀曝露の負の影響が観察されたものの、魚中水銀と塩化メチル水銀に相違はみられなかった。また離乳前発達試験の握り反射では、メチル水銀の曝露による発達への遅れが観察された。また、断崖回避では魚中水銀の曝露による発達への遅れが観察され、魚中水銀と塩化メチル水銀の曝露により、影響として検出される試験項目にて違いが認められた。

若齢期に相当する 5 週齢から開始した神経行動学試験では、オープンフィールド試験の潜時、水迷路試験の平均遊泳速度およびローターロッド試験における落下するまでの時間で、雄に群間での有意差が認められた。以上の結果から、胎児期のメチル水銀曝露は、成長後に脳内 THg

がほとんど検出されないにも関わらず、成長後にもその影響が残存し、特に雄でメチル水銀への感受性が高いと考えられた。

Olson & Boush は、メチル水銀濃度の高い魚肉を摂取した母から出生した仔では、学習能力の低下および遊泳能力の発達遅延を報告している<sup>1)</sup>。本実験結果では、水迷路試験における学習能力の低下は観察されなかったものの、平均遊泳速度は魚由来水銀群 (FHg) で CL と比較し遅く、遊泳能力への影響という視点で同様の結果が得られた。一方で Olson & Boush が実施していない運動能力を示す試験では、魚中水銀ではなく、魚に塩化メチル水銀を添加した群で添加していない群に比較し落下時間が早い結果を示した。以上のことから、魚中水銀と塩化メチル水銀添加による胎児期曝露影響について、飼料に含有される成分の交絡等により、その結果は必ずしも一致したものではないと考えられた。従って、ヒトの魚食のリスクとベネフィットを考慮する際に、長期的な曝露実験なども今後視野に入れ、慎重に結果の解釈を行う必要があると考えられた。

#### 引用文献

- 1) Olson K., Boush GM. Decreased learning capacity in rats exposed prenatally and postnatally to low doses of mercury, *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology* 13 (1975) 73-79.
- 2) Sugawara N., Ohba T., et al. Effects of perinatal co-exposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls on neurobehavioral development in mice. *Archives of Toxicology* 82(2008) 387-397.
- 3) Bellum S., Thuett KA., et al. Coordination deficits induced in young adult mice treated with methylmercury. *International Journal of Toxicology* 26 (2007) 115-121.

## 周産期における環境由来化学物質ばく露と新生児の行動発達

○龍田 希、仲井邦彦（東北大学院医・発達環境医学）、村田勝敬（秋田大学院医・環境保健学）、島田美幸、柳沼梢、黒川修行、佐藤 洋（東北大学院医・環境保健医学）

### 1. 背景

胎児期および新生児期は、中枢神経系が発達する時期であり、残留性有機汚染物質およびメチル水銀等の化学物質によるばく露に対して感受性が高い。これら残留性有機汚染物質およびメチル水銀は主に魚介類を摂取することで人体に取り込まれるが、海外における先行研究により、周産期にばく露を受けて出生した子どもの語彙力や知能等の低下が報告されている<sup>1,2)</sup>。我々は、我が国における残留性有機汚染物質およびメチル水銀ばく露に起因した健康への影響を明らかにするため、出生コホート調査(Tohoku Study of Child Development, TSCD)<sup>3)</sup>を進めている。TSCDでは、東北地方における中核都市とともに、中核都市と比べると魚摂取量が多い沿岸都市の2地域で調査を継続している。

中核都市における研究結果<sup>4)</sup>によると、メチル水銀へのばく露濃度が高くなると、生後3日目に実施した新生児行動評価(Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale, NBAS)のMotorクラスターの得点が低下した。一方で、魚摂取量が増えると、その負の影響が打ち消される可能性が示唆され、魚介類に含まれる栄養学的な利点、例えば胎児の健全な脳の発達に関与すると考えられるDHA、あるいはメチル水銀ばく露に対して防御的に働くと期待されるセレン等の重要性が示唆された。

本報告では、中核都市で得られた結果を沿岸都市対象母子でも再検証するため、生後3日目に実施したNBASとメチル水銀の関連性を検討する。また、栄養学的利点についても明らかにするため、セレンおよびDHAについても検証し、魚介類摂取のリスクおよびベネフィットを検証する。

### 2. 方法

#### 2-1. 対象者

周産期における環境由来化学物質が出生児の成長や発達におよぼす影響を調べることを目的とし、東北大学大学院医学系研究科で出生コホート調査(Tohoku Study of Child Development, TSCD)を進めてきた<sup>3)</sup>。TSCDでは、東北地方中核都市にて2001年1月から2003年9月、また魚摂取量が多いと考えられる沿岸都市にて2002年12月から2006年3月の間に、合計で1,348組(中核都市599組、沿岸都市749組)を登録した。

#### 2-2. 調査内容

出生児の発達指標として、生後3日目にNBASを実施した。NBASは、Brazeltonが1973年に作成した新生児の行動を評価する指標である。検査者は、長崎大学における訓練センター(主宰 穂山ら)の訓練コースを受講し、認定を受けたものが実施した。行動評価28項目と反射18項目から構成され、7つのカテゴリーに分類される。Reflexクラスター以外は得点が高い場合に子どもの状態が良いことを示す。

#### 2-3. 生体試料

沿岸都市では、出産時に臍帯血、出産後の朝食前に母体血、出産後4日目に母親の毛髪を採取した。毛髪総水銀は原子吸光光度法(毛根部~3cm)、臍帯血セレンは蛍光分析、母体血DHAはGC法でそれぞれ測定を行った。

#### 2-4. 交絡要因

カルテから出生時体重、在胎週数、子どもの性別、出産時の母親年齢、出生順位、分娩様式を転載した。出産後4日目に妊娠中の喫煙の有無や飲酒の有無、父母の学歴を自記式アンケートにより調査した。魚摂取量を把握するために、食物摂取頻度調査(Food Frequency Questionnaire (FFQ))を実施した。

#### 2-5. 分析方法

ばく露指標については、必要に応じて対数変換後の値を解析に使用した。中核都市および沿岸都市対象母子における属性の差異を検討する際には、*t* 検定および $\chi^2$  検定を行った。NBAS とばく露指標の関連性を検討する際には、Pearson の積率相関係数および重回帰分析（強制投入法）を用いた。統計処理には、SPSS version 13.0 を用いた。統計学的有意水準は5%とした。

なお、本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に研究計画を提出し、承認を得て実施した。

### 3. 結果

#### 3-1. 中核都市と沿岸都市の差異

中核都市のコホート調査に登録された 599 組の母子および沿岸都市のコホート調査に登録された 749 組の母子のうち、臍帯血総水銀、毛髪総水銀、魚摂取量のデータが揃った 557 組と 730 組で差異を検討した(表 1)。中核都市の対象者の方が出生時の体重が軽く、母親の出産時年齢が高く、第一子の割合が少なく、妊娠中の飲酒率が高く、妊娠中の喫煙率が低く、父親と母親の学歴が高いことが示された。ばく露指標については、沿岸都市にて臍帯血総水銀および毛髪総水銀の濃度が統計学的に有意に高いことが示

された。しかしながら、魚摂取量については統計学的に有意な差異はみられなかった。

#### 3-2. 沿岸都市における NBAS とばく露指標の関連性

沿岸都市対象母子の NBAS とばく露指標のデータが揃った 669 組(男児 337 名、女児 332 名)を解析対象とした。対象母子のプロフィールを表 2 に示す。毛髪総水銀と臍帯血総水銀の間には  $r=0.86$  ( $p<0.01$ ) で高い相関が見られたため、本研究では母親の毛髪総水銀濃度を水銀のばく露指標として用いた。

NBAS の得点とばく露指標の関連性を検討するために、Pearson の積率相関係数を算出した。毛髪総水銀と Regulation of State (刺激量が増大したときに状態を調整する能力) クラスタにおいて統計学的に有意な負の相関( $r=-0.10$ ,  $p<0.01$ ) がみられた。また、臍帯血セレンと Motor (運動性能と動き、筋緊張の質) ( $r=0.08$ ,  $p<0.05$ ) および Autonomic Stability (中枢神経系の恒常性を調整する能力) クラスタ ( $r=0.09$ ,  $p<0.05$ ) でそれぞれ有意な正の相関がみられた。母体血 DHA については、有意な相関が見られたクラスタは確認されなかった。

次に、単相関で有意な関連がみられた Regulation of State クラスタを従属変数、独立変数にばく露指標および出生時体重等の交

表1 中核都市対象母子と沿岸都市対象母子の差異

	中核都市			沿岸都市			t値	$\chi^2$ 値
	平均	SD	%	平均	SD	%		
出生時体重 (g)	3073	336.2		3143	359.2		3.56 *	
在胎週数 (週)	39.5	1.2		39.7	1.2		1.91	
子どもの性別 (% 男児)			52.1			50.5		0.29
出産時年齢 (歳)	31.3	4.4		29.5	4.9		-7.11 *	
出生順位 (% 第一子以外)			48.1			58.1		12.63 *
分娩様式 (% 自然分娩以外)			26.8			28.2		0.34
飲酒の有無 (% 飲んだ)			31.4			16.2		41.3 *
喫煙の有無 (% 吸った)			7.7			12.5		7.76 *
父学歴 (% 13年以上)			68.8			34.6		143.17 *
母学歴 (% 13年以上)			75.3			41.4		147.47 *
臍帯血総水銀 (ng/g)	11.2	6.1		18.2	10.9		14.82 *	
毛髪総水銀 ( $\mu$ g/g)	2.2	1.1		2.9	1.7		8.15 *	
魚摂取量 (g/day)	51.8	35.4		58.5	44.5		1.01	

\*  $p<0.01$

絡因子を加えた重回帰分析を行った(表3)。毛髪総水銀は、Regulation of State クラスターと関連の強い出生時体重等の要因を調整しても統計学的に有意な負の関連を示した。Motor クラスターについては、出生時体重と強い関連がみられ、出生時体重で調整すると臍帯血セレンとの正の関連性は消失した。また、Autonomic Stability クラスターは、出生時体重および子どもの性別と強く関連しており、これらで調整すると臍帯血セレンとの統計学的に有意な関連性を見いだすことはできなかった。

#### 4. 考察

本報告では、周産期における環境由来化学物質ばく露が生後3日目の出生児におよぼす影響を調べた。本研究の対象となった沿岸都市では中核都市に比べると毛髪総水銀および臍帯血総水銀の濃度が有意に高かった。魚摂取量も沿岸都市で多いと考えられたが、統計学的に有意な差異はみられなかった。消費している魚介類の種類が異なる等の可能性が考えられ、食物連鎖

表2 対象母子のプロフィール (N=669)

	平均	SD	最小-最大	%
出生時体重 (g)	3145	351.2	2410-4322	
子どもの性別 (% 男児)				50.4
在胎週数 (週)	39.7	1.2	35.3-42.4	
出産時年齢 (歳)	29.6	4.9	16-43	
出生順位 (% 第一子以降)				59.3
分娩様式 (% 自然分娩以外)				28.3
妊娠中の飲酒歴 (% 飲んだ)				16.7
妊娠中の喫煙歴 (% 吸った)				12.3
父親の学歴 (% 13年以上)				34.3
母学歴 (% 13年以上)				40.7
<b>ばく露指標</b>				
魚摂取量 (g/日)	58.0	43.8	0.0-325.7	
毛髪総水銀 (μg/g)	2.9	1.7	0.3-11.0	
臍帯血セレン (ng/g)	66.7	9.7	42.5-103.3	
母体血DHA (μg/ml)	173.3	49.2	56.1-464.7	
<b>NRASの得点</b>				
Habituation	7.4	1.4	1.0-9.0	
Orientation	4.3	1.0	1.3-6.8	
Motor	4.9	0.7	2.3-6.6	
Range of State	3.9	0.7	1.0-5.3	
Regulation of state	4.3	1.3	1.0-8.0	
autonomic stability	6.1	0.9	3.0-7.7	
Reflexes	3.4	1.8	0.0-12.0	

表3 Regulation of Stateクラスターとばく露指標(重回帰分析)

	モデル1	モデル2	モデル3
調整済R <sup>2</sup>	0.01 *	0.03 *	0.02
毛髪総水銀	-0.10 *	-0.09 *	-0.10 *
臍帯血セレン	-0.05	-0.04	-0.04
母体血DHA	-0.03	-0.03	-0.02
出生時体重		-0.09 *	
子どもの性別		0.06	0.05
出産時年齢		0.06	0.05
妊娠中の飲酒		-0.04	-0.04
妊娠中の喫煙		0.01	0.01

\* p<0.05, \*\* p<0.01

数値は、標準化βを示す。テスターで補正した。

の上位に相当する大型魚等に着目した解析が必要と思われた。

本研究の結果から、Regulation of State は低濃度にもかかわらず胎児期メチル水銀ばく露により影響を受けることが示唆された。また、Motor および Autonomic Stability へはセレン濃度が影響を与えるように見られたが、出生時体重等の他の要因が強く影響しており、共変量の取り扱いで結果に一貫性が認められなかった。さらに、DHA は胎児の脳の発達に関与することが知られるが、本研究ではその影響は確認できなかった。

#### 引用文献

- 1) Grandjean P., et al.: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. Neurotoxicology and Teratology 19, 417-428, 1997.
- 2) Davidson PW., et al.: Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. JAMA 280, 701-707, 1998.
- 3) Nakai K., et al.: The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. Tohoku Journal of Experimental Medicine 202, 227-237, 2004.
- 4) Suzuki K., et al.: Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs, and seafood intake: Neonatal behavioral assessment scale results of Tohoku study of child development. Environmental Research 110, 699-704, 2010.

## ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用とミトコンドリア機能障害との関係

○李 辰竜（東北大・院・薬）、黄 基旭、永沼 章

## 1. 背景

メチル水銀はヒトに重篤な中枢神経障害を引き起こすことが知られているが、その毒性発現機構およびそれに対する生体の防御機構は未だにほとんど解明されていない。我々は、酵母を用いた遺伝子スクリーニングにより pyruvate 合成に関わる数種の酵素がメチル水銀毒性の増強に関わることを明らかにし、さらに、酵母およびヒト由来神経芽腫細胞において培地中への pyruvate 添加によってメチル水銀毒性が著しく増強されることを見出している。そこで本研究では、メチル水銀毒性発現における pyruvate の役割を検討した。

## 2. 酵母におけるピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用

酵母の細胞質で産生された pyruvate はミトコンドリアの内膜に存在する transporter (Yi1006w) を介してミトコンドリアマトリックスに取り込まれ、pyruvate dehydrogenase により acetyl-CoA に変換された後に、TCA cycle に入って ATP 産生に関与する。そこで、まず、pyruvate のミトコンドリア中への取り込みおよびミトコンドリア中での代謝とメチル水銀毒性との関係を検討した。その結果、Yi1006w 欠損酵母はメチル水銀に対して顕著な耐性を示し、野生型酵母で認められる pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用を示さなかった。また、TCA cycle を構成する各酵素をそれぞれ欠損させてもメチル水銀毒性にはほとんど影響が認められなかったが、pyruvate dehydrogenase の活性を低下させた酵母は高いメチル水銀感受性を示した。この pyruvate dehydrogenase の活性低下酵母では、野生型酵母に比べ、pyruvate 添加によるメチル水銀毒性増強作用がより顕著に認められた。これらのことから、ミトコンドリア中に取り込まれた pyruvate は、acetyl-CoA に代謝

されることなく、メチル水銀毒性の増強に関わると考えられる。

メチル水銀がミトコンドリア中の pyruvate レベルを上昇させ、ミトコンドリア中に過剰に蓄積した pyruvate が細胞毒性を引き起こしている可能性が考えられる。そこで、メチル水銀が細胞内の pyruvate レベルに与える影響を検討したところ、メチル水銀処理によってミトコンドリア中の pyruvate レベルは上昇し、その上昇に伴い、細胞質中の pyruvate レベルは減少した。一方、Yi1006w 欠損酵母ではミトコンドリア中の pyruvate レベルのメチル水銀による変動は認められなかった。以上の結果は、メチル水銀が Yi1006w を介したミトコンドリア中への pyruvate 取り込みを促進し、その結果生じるミトコンドリア中 pyruvate 濃度の上昇が細胞に障害を与えるという可能性を示唆している。

## 3. 培養細胞におけるピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用とミトコンドリア機能障害との関係

Pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用は酵母のみならず、ヒトの神経芽腫細胞 (IMR-32 細胞) においても著しく認められた。また、IMR-32 細胞においても、メチル水銀はミトコンドリア中への pyruvate 取り込みを促進させることが確認された。そこで、IMR-32 細胞を用いて、pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用とミトコンドリア機能との関係について検討した。メチル水銀はミトコンドリアからの活性酸素種の産生を促進することが知られているため、pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用と活性酸素種との関係について検討したところ、メチル水銀単独処理は細胞内活性酸素種レベルを上昇させ、そのレベルは pyruvate の添加によってさらに上昇した。また、抗酸化作用を示す N-アセチルシステインの前処理によってメチル水

銀毒性は著しく軽減され、pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用も顕著に抑制された。これらのことは、pyruvate によるメチル水銀毒性増強作用に活性酸素種が関与していることを示唆している。

ミトコンドリア中での活性酸素種の産生には主に電子伝達系 complex I または complex III が関与することが知られている。そこで、complex I の阻害剤である rotenone または complex III の阻害剤である antimycin A で IMR-32 細胞をそれぞれ処理したところ、共に、メチル水銀毒性が軽減され、pyruvate によるメチル水銀毒性増強の度合いも顕著に低下した。なお、siRNA を用いて両 complex の活性に必要な蛋白質をコードする遺伝子をそれぞれノックダウンしたところ、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用が有意に抑制された。以上のことから、pyruvate によるメチル水銀毒性増強に電子伝達系の complex I または III が関与している可能性が考えられる。ミトコンドリアの膜

電位もメチル水銀単独処理によって低下し、pyruvate を添加することによってさらに顕著な低下を示した。

#### 4. 結論

メチル水銀によって増加したミトコンドリア中の pyruvate が電子伝達系の complex I または complex III に何らかの影響を与え、その結果として、活性酸素種の産生およびミトコンドリア膜電位の低下が生じる可能性が考えられる。これまでに、エネルギー代謝の中間産物である pyruvate がメチル水銀のみならず薬毒物の毒性を増強させるとの報告はなく、本研究で得られた知見は毒性学的にも興味深いものである。今後、メチル水銀によってミトコンドリア中に過剰に取り込まれた pyruvate がミトコンドリアの機能に与える影響を詳細に検討することによって、新しいメチル水銀毒性発現機構が明らかになるものと期待される。

## メチル水銀毒性軽減蛋白質 TEX27 のメチル水銀による核移行

○ 呉 成恩 (東北大・院・薬)、黄 基旭、永沼 章

## 1. 背景・目的

我々は、siRNA ライブラリーを用いた screening より、発現抑制によって細胞に高いメチル水銀感受性を与える因子として TEX27 を同定した。TEX27 は、その構造中の C 末端に AN1-like zinc finger domain (AN1-Znf) を持つことから、転写因子として機能すると予想されているが、詳細な機能は殆ど不明である。TEX27 は通常、そのほとんどが post nuclear 画分に存在するが、メチル水銀処理によって nuclear 画分中の TEX27 レベルが経時的に増加することから、TEX27 はメチル水銀暴露によって核へ移行し、何らかの形でメチル水銀毒性の軽減に関与している可能性が示唆されている。一方、TEX27 は、ユビキチンがタンデムに繋がったリニアポリユビキチン蛋白質 (以下 linear Ub) である UBC と結合することが知られている。ヒトの linear Ub には UBC 以外に UBB も存在し、これら linear Ub の発現を同時に抑制させた細胞は対照細胞に比べて高いメチル水銀感受性を示すことが明らかになっている。また、これら linear Ub は TEX27 と同一の経路でメチル水銀毒性の軽減に関与している可能性も示唆されている。そこで本研究では、メチル水銀による核中 TEX27 レベルの増加における TEX27 の AN1-Znf および linear Ub との関与について検討した。

## 2. 結果・考察

Myc タグを融合したネイティブ TEX27 (TEX27-myc) または AN1-Znf を欠失させた変異 TEX27 を発現するプラスミドをそれぞれヒト胎児腎臓由来 HEK293 細胞に導入し、TEX27 の細胞内分布を調べた。その結果、nuclear 画分中 TEX27 のレベルは AN1-Znf を欠失することによって増加した。このことから、TEX27 の AN1-Znf は nuclear 画分中 TEX27 レベルの増加を負に制

御している可能性が考えられる。

次に、メチル水銀処理が変異 TEX27 の細胞内分布に与える影響を調べた結果、この変異 TEX27 の nuclear 画分中のレベルもメチル水銀処理によって経時的に増加したものの、その程度はネイティブ TEX27 に比べて著しく低かった。このことから、TEX27 の AN1-Znf はメチル水銀による核中 TEX27 レベルの増加に必須ではないが、何らかの形で一部関与している可能性が考えられる。

一方、TEX27-myc 発現細胞に control siRNA または UBBC siRNA (UBC および UBB を同時に抑制する siRNA) をそれぞれ導入し、メチル水銀処理が TEX27 の細胞内分布に与える影響を調べた結果、linear Ub 発現抑制細胞ではメチル水銀による核中 TEX27 レベルの増加の程度が対照細胞に比べて低かった。このことは、TEX27 の AN1-Znf に加えて linear Ub もメチル水銀による核中 TEX27 レベルの増加に一部関与していることを示している。

今後、メチル水銀による核中 TEX27 レベルの増加に関わる分子機構を詳細に検討することによって TEX27 によるメチル水銀毒性軽減機構が解明されると共に、メチル水銀毒性発現機構の一部が明らかになるものと期待される。

## 3. 引用文献

- 1) Fenner, B.J., Scannell, M. and Prehn, J.H. (2009): Identification of polyubiquitin binding proteins involved in NF-kappaB signaling using protein arrays. *Biochim Biophys Acta.*, 1794(7):1010-1016.
- 2) de Luis, O., López-Fernández, L.A. and del Mazo, J. (1999): Tex27, a gene containing a zinc-finger domain, is up-regulated during the haploid stages of spermatogenesis. *Exp Cell Res.*, 249(2):320-326.





リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可

この印刷物は、グリーン購入法に基づく基本方針における「印刷」に係る判断の基準にしたがい、印刷用の紙へのリサイクルに適した材料〔Aランク〕のみを用いて作製しています。