

平成 25 年度環境省委託業務報告書

平成 25 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 26 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 企画課 特殊疾病対策室の委託業務「平成 25 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 26 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平成 25 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（継続）	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	1
2.3	研究班の設置（新規）	2
2.4	推進委員会の開催	3
2.5	重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）	4
2.6	メチル水銀研究ミーティングの開催	4
2.7	推進・評価合同委員会の開催	4
2.8	研究計画書の作成の依頼	5
2.9	推進委員会の開催	5
2.10	研究報告書の作成	6
2.11	研究成果還元業務の実施	6
3	各研究班の報告	6
	○水俣病に係る有効な診断方法	7
	I 研究課題：高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発	9
	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）	
	○水俣病患者の経年的変化及び自然史	29
	II 研究課題：水俣病患者の経年的変化および自然史の把握	31
	安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野 教授）	
	○メチル水銀への曝露量と症状の関係	39
	III 研究課題：メチル水銀曝露量に依存したグリア細胞の機能シフトと中枢神経細胞障害	41
	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）	
	IV 研究課題：メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー	57
	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）	
	V 研究課題：メチル水銀曝露量と神経症状との関係解明に資するためのメチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の同定と作用機構解析	89
	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）	
	VI 研究課題：メチル水銀の脳への影響の MRI による検出と行動異常との相関解析	101
	山崎 岳（広島大学大学院総合科学研究科行動科学講座 教授）	
	参考資料	
	メチル水銀研究ミーティング講演要旨集	121

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月に成立した「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」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。

本業務は、このような状況を踏まえ、水俣病について水俣病に関する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（継続）

平成24年度に開催された推進委員会で取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、以下の研究班を設置し、調査研究を行った。

なお、研究班に係る研究の実施にあたっては、「平成25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（前払いを行った）。

また、研究計画において、必要と認められた場合には、研究職の任を用意し、その給与を研究費の範囲において支弁しうるものとした。

Ⅱ 研究課題： 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

主任研究者： 安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野
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」）について審議するため、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	医療法人社団全仁会 上野病院 顧問
北川 正信	障害児入所施設・療養介護施設あゆみの郷 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	公益財団法人慈愛会 今村病院分院 神経内科 部長
林 泰史	東京都リハビリテーション病院 院長
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）6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 麻薬・覚せい剤乱用防止センター 理事長
○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	京都府立医科大学附属 北部医療センター 病院長 京都府立医科大学大学院 医学研究科 教授

○：委員長

2.3 研究班の設置（新規）

本業務の受託に先立って行われる研究者公募、及びそれに関する推進委員会の審議の結果に応じて、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 で開催した推進委員会において採択された下記の研究課題について新規に研究班を設置し、調査研究を行った。

なお、研究班に係る研究の実施にあたっては、「平成 25 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（前払いを行った）。

また、研究計画において、必要と認められた場合には、研究職の任を用意し、その給与を研究費の範囲において支弁しうるものとした。

○水俣病に係る有効な診断方法

I 研究課題： 高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

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）

○メチル水銀への曝露量と症状の関係

III 研究課題： メチル水銀曝露量に依存したグリア細胞の機能シフトと中枢神経細胞障害

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）

IV 研究課題： メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

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）

V 研究課題： メチル水銀曝露量と神経症状との関係解明に資するためのメチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の同定と作用機構解析

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）

VI 研究課題： メチル水銀の脳への影響の MRI による検出と行動異常との相関解析

主任研究者： 山崎 岳（広島大学大学院総合科学研究科行動科学講座 教授）

2.4 推進委員会の開催

平成 25 年 6 月 5 日に日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて「第 1 回重金属等による健康影響に関する総合的研究推進委員会」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。推進委員会では、本業務の受託に先立ち行われた研究者公募に応じた研究課題について、新規に研究班を採択した(2.3 参照)。出席した推進委員会委員は以下の通りである。なお、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。さらに、推進委員会の審議の結果に基づいて、採択対象とされた研究計画の内容について、研究者と所要の調整を行った。

<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、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

2.5 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）

平成 25 年 12 月 10 日に LMJ 東京研修センター2 階特大会議室にて、「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非公開で開催した。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。評価委員会委員は発表を聞いた上で、同日開催された推進・評価合同委員会（2.7 を参照）にて各研究成果を評価した。なお、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給し、研究発表会が午前から午後にかけて開催されたため、昼食を支給した。この研究発表会及び推進・評価合同委員会に出席した評価委員会委員及び一部の推進委員会委員は以下の通りである。

<研究発表会及び推進・評価合同委員会への出席委員>

評価委員：衛藤光明、遠藤仁、北川正信、櫻井治彦、中村好一、濱田陸三、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、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

また、研究発表会前に、2.1「研究班の設置（継続）」、2.3「研究班の設置（新規）」で設置された研究班の主任研究者等より成果報告書等の提出を受け、「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」の受託者から提供された成果報告等とともに、評価委員会の委員に送付し、事前評価を依頼し、評価結果を取りまとめた。

2.6 メチル水銀研究ミーティングの開催

2.5「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）」の翌日の平成 25 年 12 月 11 日に LMJ 東京研修センター2 階特大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合的研究」の更なる発表に資することを目的に「メチル水銀研究ミーティング」を非公開で開催した。メチル水銀による健康影響に関する研究者である坂本峰至部長（環境省国立水俣病総合研究センター）を特別講演者として招待し、一般講演者及び若手講演者を公募し、研究状況を演題発表の形で共有した。演題発表時には演者等の講演内容や発表内容に応じて進行役の座長を置いた。若手発表によるメチル水銀に関する研究活動を促進するため、各座長と相談して、特に優秀な発表者 2 名に対して表彰を行った。演者等にたいしては、仕様書に従って旅費及び謝金を支給した。

なお、「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。

2.7 推進・評価合同委員会の開催

平成 25 年 12 月 10 日に LMJ 東京研修センター5 階大会議室にて、「重金属等による健康

影響に関する総合的研究推進・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。2.5の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委員会に報告し、平成26年度に行う研究について検討した。出席した全委員に対して旅費及び謝金を支給した。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、北川正信、櫻井治彦、中村好一、濱田陸三、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、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

また、推進・評価合同委員会の審議内容等を踏まえ、2.1「研究班の設置（継続）」、2.3「研究班の設置（新規）」で設置される研究班の研究成果ならびに、「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」の受託者の設置した研究班の研究成果に対する評価結果をとりまとめた。とりまとめた評価結果について、2.1「研究班の設置（継続）」、2.3「研究班の設置（新規）」で設置された研究班に送付するとともに、「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」の受託者に送付した。

2.8 研究計画書の作成の依頼

推進・評価合同委員会の審議内容等を踏まえ、平成26年度に研究を継続する予定である研究班、安東班（熊本大学大学院）、中村班（国立長寿医療センター）、小泉班（山梨大学大学院）、村田班（秋田大学）、永沼班（東北大学大学院）、山崎班（広島大学大学院）に、平成26年度の研究計画書の作成を依頼した。

また、2.9の推進委員会の開催後に、とりまとめた評価結果を各研究班に送付するとともに、平成26年度の研究計画書の修正を依頼した。

2.9 推進委員会の開催

平成26年2月19日に東京大学山上会館001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」の研究班から提出された平成26年度の研究計画書について評価を行った。出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。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：石本二見男、井村伸正、鈴木庄亮、遠山千春、中川正法（敬称略、五十音順）

2.10 研究報告書の作成

2.7 の推進・評価合同委員会及び 2.9 の推進委員会の審議内容等を踏まえ、「水俣病に関する総合的研究」の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）を受け取り、必要事項が記載されているかどうか確認した上で、業務結果を取りまとめた報告書に掲載し、環境省に提出した。

各研究班の研究報告書は下記 3 に示す通りである。

2.11 研究成果還元業務の実施

環境省が定めた範囲において、2.1「研究班の設置（継続）」及び 2.3「研究班の設置（新規）」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）について、研究班の申請に基づいて、環境省担当官と協議の上、1 研究課題につき 200,000 円を上限として支払うこととなっている。

本年度は、2.3「研究班の設置（新規）」で設置した小泉班（山梨大学大学院）より、Nature Publication グループのオープンアクセスジャーナルである Scientific Research 誌等の国際誌へ投稿するため、英文校正費用について研究成果還元費の申請があり、112,140 円を支払った。

3 各研究班の報告

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病に係る有効な診断方法

I 高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

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

我々はこれまでに、二点識別覚の客観的検査法の開発を行い、実用レベルに近づけてきた。しかしそれを実際にメチル水銀中毒のバイオマーカーとして利用するためには、末梢神経障害が合併した場合の評価法やその妥当性について明らかにしておくことが重要である。そこで本研究は、末梢神経障害の合併も想定し、高齢者の皮膚感覚機能を総合的、かつ客観的に評価できる方法を開発していくことを目標とする。

今年度は主に、1) 末梢神経障害を評価するため、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の開発、2) 口唇や舌刺激が可能な脳磁図対応の二点識別覚刺激装置の開発に焦点をあて研究を進めた。

その結果、皮膚電気刺激を用いて、痛覚を反映すると考えられる皮膚感覚機能の客観的閾値推定システムの開発に成功した。刺激の強度と刺激の認知確率はS字フィットする生理特性を示し、約2分間の簡単な検査で感覚閾値を客観的に算出できることが明らかとなった。また、脳磁図測定により、これらの感覚閾値が本人のフィードバックなくとも客観的に推定できることも示唆された。更に、舌や口唇で二点識別覚の脳磁図測定が可能となるような刺激装置も新規に作成し、実用に向けての検証を行った。

[キーワード]

二点識別覚, 皮膚感覚, 客観的測定, 脳磁図, 体性感覚誘発磁場, ミスマッチ反応, 電気刺激

[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）

[研究協力者]

山岸美沙子（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）

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）

野田 信雄（栄商金属株式会社）

I. 研究目的

二点識別覚は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が、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。我々はこの二点識別覚閾値を信頼のおけるバイオマーカーとして利用可能とすることを目指し、これまでに、1)病的意義を判定するために基準となる二点識別覚閾値の正常値範囲の設定、2)客観的な測定を可能とする二点識別覚自動検査システムの開発、を行い、更に、3)脳磁図による体性感覚ミスマッチ反応(MMR)¹⁾を用いた客観的検査法についても実用化に向けた検討を進めてきた。しかし、これらを実際にメチル水銀中毒患者に応用するには、根本的かつ不可避の問題がまだ残されている。それは、メチル水銀中毒の中核症状としての四肢末端優位の感覚障害の存在であり、これがある場合に二点識別覚検査がどの程度信頼のおけるものであるのかが不明ということである。そこで本研究は、末梢神経障害の合併も想定し、高齢者の皮膚感覚機能を総合的、かつ客観的に評価できる方法の開発を目指して行っていく。

今年度は主に以下の点に注力して研究を進めた。

- 1) 末梢神経障害を評価するための、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の開発：
皮膚感覚は通常神経学的診察により触覚、温痛覚、深部感覚等の検査を行って異常の有無を調べるが、客観的な評価は容易ではない。そこで、次の3つの項目に取り組んだ。
 - a) 皮膚感覚の自動閾値判定システムの開発
 - b) 開発システムを用いた実測定による検証
 - c) 開発システムと脳磁図を組み合わせた皮膚感覚の客観的閾値推定の試み

- 2) 口唇や舌刺激が可能な、脳磁図対応の二点識別覚刺激装置の開発：
末梢神経障害は通常手袋靴下状に分布し、口唇や舌は通常 spare される。従ってこれらの部分で脳磁図による二点識別覚検査ができれば、より有用性が高まると考えられる。次の2項目に取り組んだ。
 - a) 新規刺激プローブの作成
 - b) 舌、口唇刺激を可能とする非磁性スタンドの開発

II. 研究方法

- 1) 末梢神経障害を評価するための、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の開発
 - a) 皮膚感覚の自動閾値判定システムの開発
以前開発した二点識別覚閾値自動判定システムでは、二点識別覚の認知特性が、誤答率と二点間距離でプロットするとS字カーブにフィットするという性質を利用して、数学的に50%弁別閾値を推定するものであった(図1, 左)。我々は、この方法は他の感覚機能にも一般応用が可能であると仮定した。すなわち、横軸にその感覚に対する刺激強度、縦軸を(1-認識率)としてプロットした場合、刺激が弱すぎる場合は全く認識できず、刺激が十分強ければ100%認識でき、その間には感覚が曖昧で認識できたりできなかつたりする領域が存在し、その認知特性はS字フィットするであろうと予測した(図1, 右)。この予測が正しければ、刺激強度の異なる刺激をランダムに与え、刺激を認知したらボタン押し反

応をするようなシステムを構築することにより、汎用性を持った感覚の自動閾値判定システムが構築できるはずである。そこで今回は、皮膚の電気刺激に対する自動閾値判定システムを開発を行った。システムは以下の要件を満たすことを条件とした。

①電気刺激コントロール部分：

電気刺激の強度や刺激間隔を、PC からコントロール可能であること。

少なくとも6パターンの異なる強度の電気刺激を、指定したシーケンスで出力できること。

時間コントロールは0.01 ms 以下の精度で、脳磁図用に TTL のトリガー出力もできること。

②反応収集・データ解析部分

被験者のボタン押し反応を PC に取り込み、反応速度と正答率が正確に収集できること。

得られた反応の正答率を自動的にヒストグラム化できること。

ヒストグラム化したデータを下記(1) に示す式で S 字フィットを行い、50% 認識閾値を推定できる。

$$f(x) = \frac{1}{\exp^{a(x-b)} + 1} \quad (1)$$

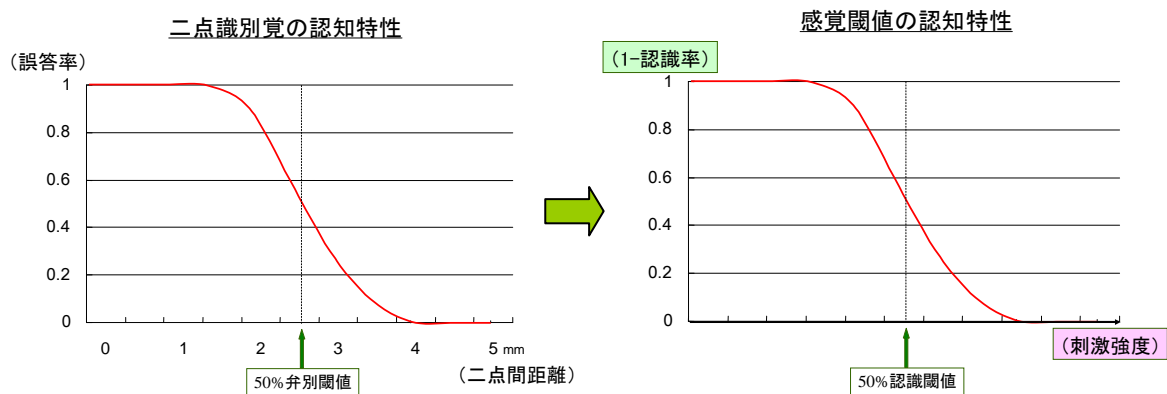


図 1：二点識別覚の認知特性（左）と、これを一般化して感覚閾値の認知特性を予測したモデル（右）

b) 皮膚感覚の自動閾値判定システムを用いた実測定

上記で開発したシステムを用いて、若年成人ボランティア 8 名を対象に検査を行った。測定は右示指先端部に 6 種類の強さの異なる電気刺激をそれぞれ 10 回ずつ計 60 回（刺激間隔は 2000±400 ms）ランダムに与え、被験者は閉眼して指先の感覚に集中し、刺激を感じたらボタンを押すように教示した。与えた刺激の強度は、個人毎におおよその感覚閾値をマニュアル操作で決定した後、その初期閾値に対して 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 倍 の 6 種類である。

得られたボタン押し反応は、PC に取り込まれ、開発したシステムを用いて 50% 認識閾値を推定した。

c) 開発システムを用いた脳磁図測定と、皮膚感覚の客観的閾値推定の試み

上記のシステムを用いて、同じ若年成人 8 名を対象に体性感覚誘発磁場の測定を行った。刺激は b) の認知行動学的検査で用いたものと同じ、6 種類の強さの異なる電気刺激で、刺激間隔は 350-450 ms でラ

ンダムに jittering を行った。脳磁図測定は Elekta Neuromag 社製 306 ch システムを用い、各強度毎に 150 回以上の epoch を個別に加算平均した。

2) 口唇や舌刺激が可能な、脳磁図対応の二点識別覚刺激装置の開発：

a) 新規刺激装置の作成

これまでに開発した脳磁図対応の二点識別覚刺激装置は、構造上 1.5mm 以下の二点間距離の刺激が困難で、また、大きなストロークやモーメント力の発生にも限界があった。そこでこれらの問題点を解消できるような刺激プローブを新規に開発した。

b) 舌、口唇刺激を可能とする非磁性スタンドの開発

脳磁図測定室という磁性体の持ち込めない限られた空間の中で、被験者の負担にならないように舌や口唇といった狭く敏感な領域を正確に刺激できるようなスタンドを新規開発した。

<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。研究協力の被験者には、あらかじめインフォームドコンセントのもとに書面による同意を得た上で検査を行った。

III. 研究結果及び考察

1) 末梢神経障害を評価するための、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の開発

a) 皮膚感覚の自動閾値判定システムの開発

開発されたシステムの概要を図 2 に示す。電気刺激をコントロールするソフトウェア（図 2，左上パネル）は、刺激間隔と刺激強度、及びそれに対応したトリガーシグナルを 1 刺激ずつ自由に設定して、電気刺激装置に送る。刺激のシークエンスも自由に作成でき、エクセル等の市販ソフトウェアで作成したものを読み込むことも可能である。電気刺激装置（図 2，左下パネル）は、脳磁図測定装置に付属しているもので、アイソレーターにより過電流が流れないような安全策が講じられている。これにより発生した電気刺激は、被験者の右示指先端部に医療用テープで固定された刺激プローブを介して与えられ、被験者は、刺激を感じたらボタン押しを行うと、その反応は PC に取り込まれてデータを解析することができる（図 2，右パネル）。

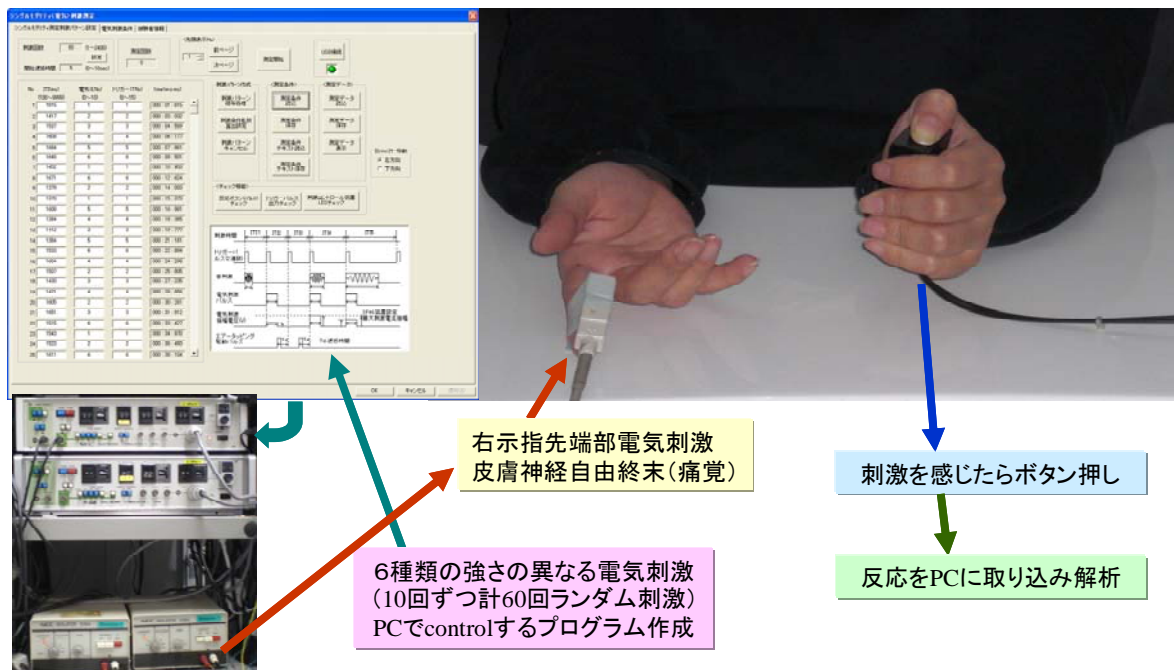


図2：電気刺激に対する皮膚感覚の自動閾値判定システムの概略

b) 開発したシステムを用いた皮膚感覚閾値の実測定

1回の検査に要する時間は約2分間で、被験者に負担なく検査を行うことができた。また、全被験者で安定した測定結果を得ることができた。図3に代表的被験者における測定結果を示す(左図)。電気刺激の強度に対する反応は我々の予測通りS字フィットする生理特性を示した。すなわち、強度が十分強いと刺激は100%認識され、十分弱いと逆に100%認識されない、その間の閾値の周辺では判定が曖昧になっている。被験者8名全員がこのようなS字フィットする認知特性を示した。8名の平均閾値(50%認識閾値)は 1.60 ± 0.39 mAであり、時間において測定した2回目の結果は 1.50 ± 0.34 mAとほぼ同様の値であった(図3-右)。個人毎の2回の測定値の差は、0.8 mAと比較的大きな値を示した1例を除き全て0.2 mA以下であり、再現性も概ね良好であると考えられた。示指先端の皮膚電気刺激では、正中神経刺激のような直接の末梢神経刺激とは異なり、皮膚の神経自由終末を刺激するため、この方法により痛覚に対応した感覚機能を客観的に評価できると期待できる。

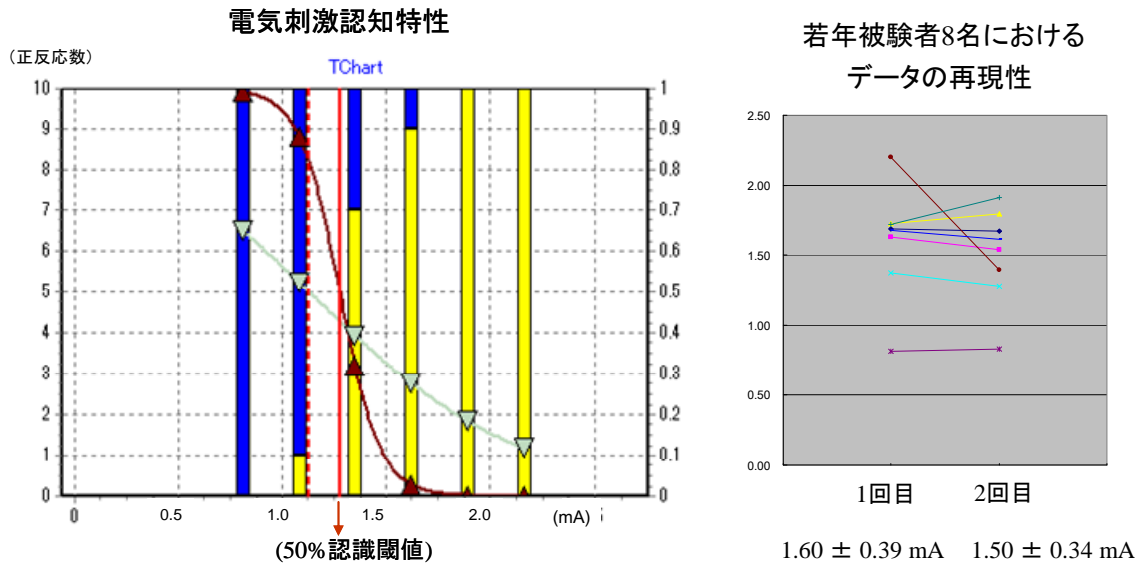


図3：代表例における測定結果（左）。刺激強度（横軸：mA）と刺激を認知した反応数（第1縦軸）及び「1-認識率」（第2縦軸）。棒グラフは反応結果（黄色が正反応）。赤実線はS字フィットにより推定された50% 認識閾値。

若年被験者8名における50% 認識閾値とデータの再現性(右)。縦軸は50% 認識閾値(mA)。

c) 開発システムを用いた脳磁図測定と、皮膚感覚の客観的閾値推定の試み

脳磁図測定では、全例で刺激対側頭頂部のセンサーから体性感覚誘発脳磁場波形が計測された。誘発波形は全般的に潜時40ms前後、及び60-70ms前後にpeakを持ち、刺激強度に依存して波形の振幅が変化した。波形にnoiseの混入が強かった1例を除き、ほぼ全例で50%認識閾値より強い刺激では一次体性感覚野を発生源と考えられる等磁場分布を呈する有意な波形が誘発されたが、逆に閾値以下の刺激では有意な誘発波形は得られなかった(図4)。この結果は二点識別刺激により誘発されるMMR脳磁反応と閾値の関係と同様であり、脳磁図波形を分析するだけで客観的に被験者の感覚閾値を類推できることを示唆するものであった。

認知閾値上の刺激で明瞭な脳磁反応が得られる

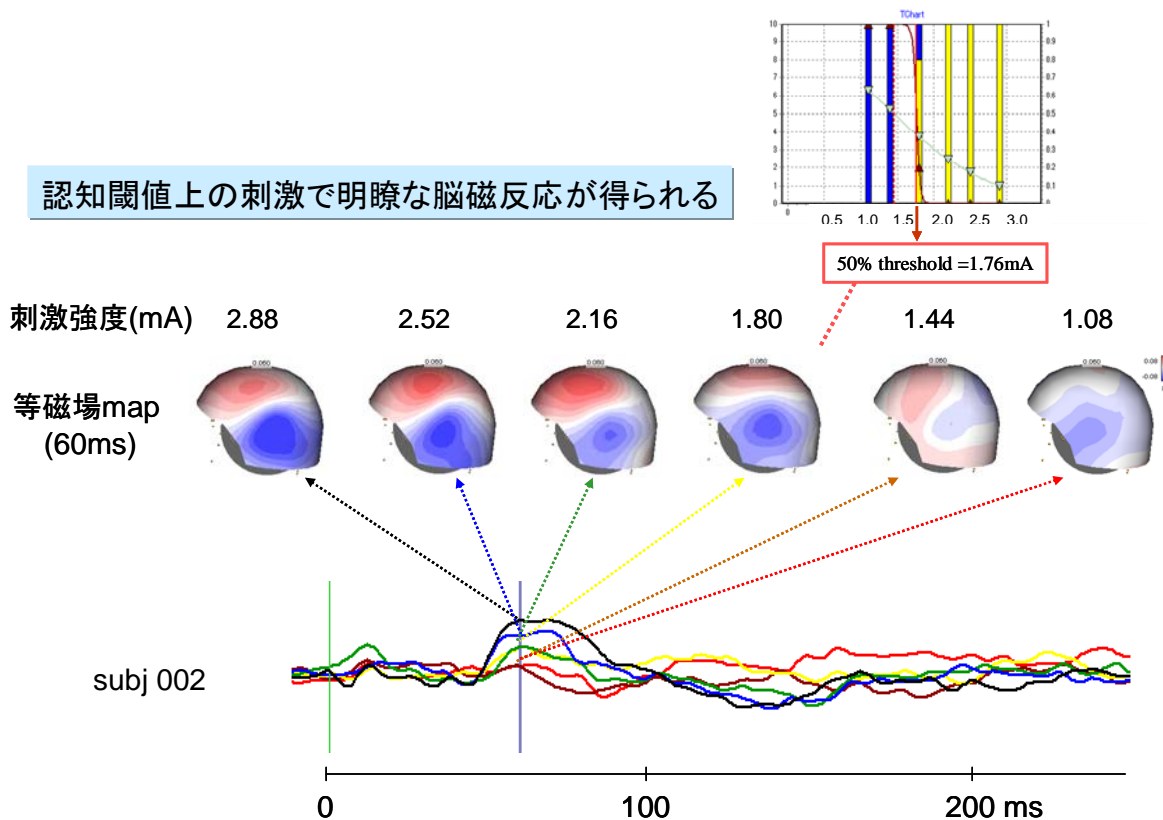


図4：体性感覚誘発反応の代表波形、及び潜時60msにおける等磁場map。

それぞれの刺激強度（2.88 - 1.08 mA，最上段）に対応した加算波形が、黒、青、緑、黄、茶、赤で示してあり、潜時60msにおける等磁場分布はそれぞれの色の矢印で示されている。右上のパネルは同じ被験者の認知行動学的検査結果を示し、S字フィットの結果50%認識閾値が1.76mAであることを示す。脳磁図波形は刺激強度に依存して振幅が変化し、閾値以下の刺激では明瞭な反応波形や、電源の存在を示唆するような等磁場mapパターンが得られないことがわかる。

2) 口唇や舌刺激が可能な、脳磁図対応の二点識別覚刺激装置の開発（分担研究報告書参照）：

a) 新規刺激プローブの作成

以前開発したプローブは、回転モーメントによる刺激を発生していたため1.5mm以下の二点間距離の刺激が困難で、また、大きなストロークやモーメント力の発生にも限界があった。そこで根本的に設計を変更し、新規に刺激装置を作成した（図5）。本体は、構造部をアルミニウム合金A5052、および、摺動部をポリオキシメチレンPOMによって作成した。プローブの脱着は、天然ゴム系Oリングを用いて固定した、なお、天然ゴムは人体には触れず、機構内部に留まるように設計されている。プローブ高さ、および、プローブストロークの調整は刺激方向と直行する方向にスロープ式の幅調整機構を新たに考案し、刺激方向と同方向では問題のある振動時のゆるみやストローク幅への影響を免ずるものとした。さらに、エアバックおよび駆動アーム部は、大型化したものの機構は同一のものとし、応答性および再現性は現行と同等性を確保した。なお、刺激ストロークはプッシュロッドを新たに設け、回転モーメントから

直動に変更した。今後は刺激発生時の変位が $60\mu\text{m}$ から、 $10\mu\text{m}$ となることの影響を確認した後に実測定に応用する予定である。

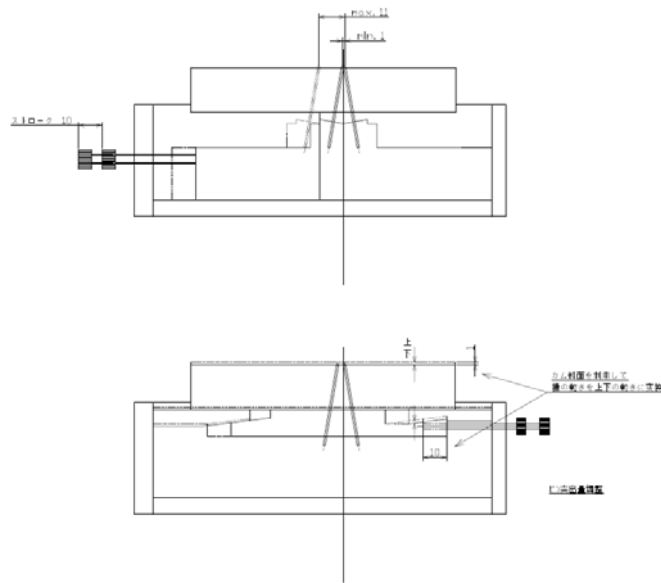


図 5：刺激部全体図

b) 舌、口唇刺激を可能とする非磁性スタンドの開発

上記で開発した刺激プローブ部分を装着し、舌や口唇といった狭く敏感な領域を正確に刺激できるようなスタンドを新規開発した (図 4)。スタンドは完全に非磁性体のみで設計されており、高さ、角度をフレキシブルに微調整可能である。尚プローブが舌や口唇と接触する部分は、厚さ 0.02mm の使い捨てのポリウレタン製の薄膜を貼ることにより清潔性を担保した。この膜の介在によるプローブ接触感覚の変化はほとんどないことも確認した。しかし、プローブを実際に動作させて脳磁図即手を行ったところ、脳の反応よりも大きな磁場ノイズ混入が判明し、装置の更なる改良が必要であることが明らかとなった (分担報告書)。

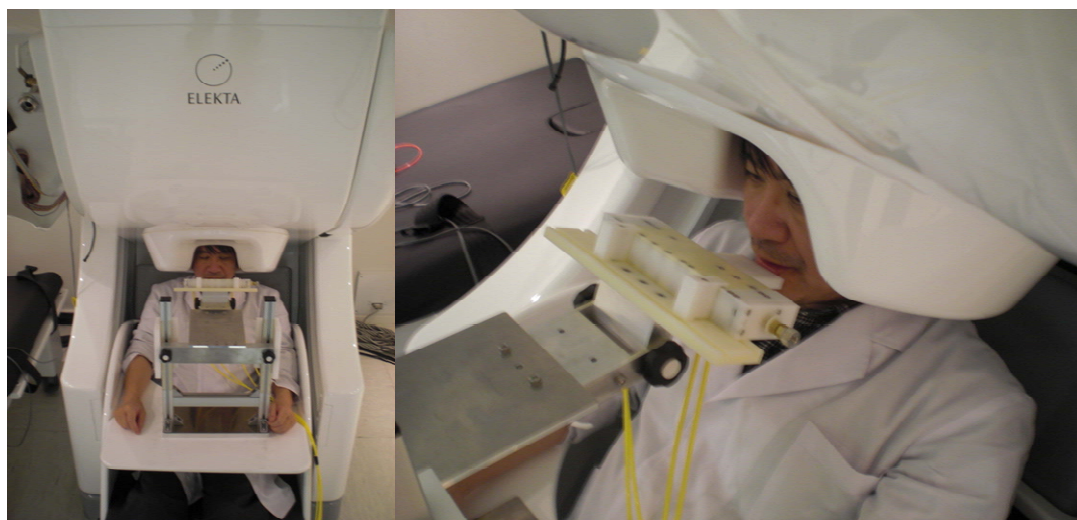


図 6：刺激プローブをスタンドに装着し、口唇を刺激する様子

IV. まとめ

末梢神経障害も想定し、高齢者の皮膚感覚機能を総合的、かつ客観的に評価できる方法の開発を目指して取り組みを進めた。

- 1) 皮膚電気刺激を用いて、痛覚を反映すると考えられる皮膚感覚機能の客観的閾値推定システムを開発し、8名の若年被験者を対象にその有用性を検討した。
- 2) 刺激の強度と刺激の認識確率は、S字フィットする生理特性を示し、約2分間の簡単な検査で電気刺激に対する感覚閾値を客観的に算出できることが明らかとなった。
- 2) 同システムを脳磁図測定に用いたところ、体性感覚誘発反応の振幅は電気刺激強度に依存して変動し、閾値以下の刺激では明瞭な誘発反応や等磁場 map が得られなかった。これらの結果は、本人のフィードバックがなくても、脳磁図測定によって感覚閾値を完全に客観的に推定できることが示唆された。
- 3) 舌や口唇で二点識別覚の脳磁図測定が可能となるような刺激装置を新規作成した。その検証を行ったところ、微弱なノイズ混入が認められたため、更なる機器の改善の必要性が明らかとなった。

V. 次年度以降の計画

- 1) 今回開発した、電気刺激を用いた皮膚感覚機能の客観的推定法を高齢者（10名以上）にも行い、その有用性を検証する。また、脳磁図測定も行い、脳磁図による感覚閾値客観的推定についても検証する。
- 2) 開発中の舌・口唇刺激が可能なる二点識別覚刺激装置の問題点を解決して完成させ、健常被験者の Mismatch 反応を計測して、その特徴や手指刺激に対する Mismatch 反応との異同を明らかにする。
- 3) 皮膚感覚の中枢機能を評価できる可能性のある体性感覚誘発反応の回復曲線²⁾にも焦点をあてて検討を進め、高齢者の正常値を求めていく。
- 4) また、熊本大学神経内科グループ（安東班）と共同して、これまでに開発した感覚機能の客観的評価法の水俣病患者に対する応用や、MRI と組み合わせた新たなアプローチについても検討を行っていく。

本研究に関連した過去5年間の業績

1. A Nakamura, B Maess, T Knoesche, A Friederici. Different Hemispheric Roles in Recognition of Happy Expressions. PLoS One. 9(2):e88628, 2014.
2. 伊藤健吾,加藤隆司, 文堂昌彦, 中村昭範:アルツハイマー病診断の画像診断, 基礎講座:老年精神医学と Brain Imaging. 老年精神医学雑誌, 24:707-714, 2013
3. 中村昭範, 根本哲也他:脳磁図対応の触覚二点識別覚刺激装置の開発と二点識別覚閾値の客観的推定の試み. 日本生体磁気学会誌, 25(1), 60-61, 2012.
4. 加藤公子・中村昭範他:健常高齢者における抑制機能の特異性, 老年精神医学雑誌, 23(12):1463-1470, 2012
5. K. Ono, A. Nakamura, K. Yoshiyama, T. Kinkori, M. Bundo, T. Kato, K. Ito. The effect of musical experience on hemispheric lateralization in musical feature processing. Neurosci Lett. 496(2):141-5, 2011.
6. 中村昭範, 吉山顕次, Diers Kersten, 加藤隆司, 他:Alzheimer 型認知症における聴覚中潜時誘発反応の増大と脳血流変化. 日本生体磁気学会誌, 23(1), 138-139, 2010.
7. 中村昭範, 広汎性発達障害の神経イメージング. 臨床脳波 52(7),379-384, 2010.

8. 加藤公子, 中村昭範, 柏原考爾, 加藤隆司, 他: ストループ課題実行時の脳内情報処理過程の加齢変化. 日本生体磁気学会誌, 23(1), 118-119, 2010.

参考文献

1. Näätänen, R.. The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear* 1995; 16: 6-18.
2. Y. Ugawa et al. Somatosensory evoked potentials recovery (SEP-R) in myoclonic patients. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section*, Volume 80, 1991, 21-25

高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

分担研究報告書：脳磁図対応の二点識別覚刺激装置の開発

[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）

研究要旨

昨年度までに、脳磁図測定にも対応した二点識別刺激装置及びそのコントロールソフトウェアを開発し、実際の脳磁図測定にも応用した。今年度は、これまでの知見から得られた測定時の改良点、すなわち、プローブの脱着性向上、刺激のストローク長さの増長、さらには手部のみの刺激箇所を口唇部へ拡張させるため、新たに刺激装置と固定治具の製作を行った。この測定機器を用いて口唇部刺激による脳磁図測定を行った結果、脳磁波形を大きく上回るノイズ成分が計測された。この成分は、測定機器駆動時のノイズであることがわかり、プローブ駆動部の影響もしくは、測定機器本体の振動の影響であることが考えられる。

I. 研究目的

脳磁図対応の二点識別刺激装置を口唇部へ拡張させるため、刺激部を適正な位置・角度で口唇部に連続して刺激可能な保持スタンドと、口唇部刺激に適応可能なように、プローブの脱着性の向上と刺激機構の変更によるプローブの突出ストロークの向上を図る刺激部について新規に設計製作を行った。

また、口唇部に拡張した際の脳磁図測定において、測定データへの影響を調べるとともに、より高精度のデータ取得のための測定機器の構築を目指す

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改良

昨年度は主に刺激強さの改良を行ったが、刺激駆動部であるエアバック自体の容積が小さく、大きなストロークおよび、モーメント力の発生には限界があった。今年度は口唇部への適用が目的であり、昨年度までのエアバックでは、機能の律速ポイントなることが予測されるため、昨年度までの知見で得られた改良点を内包した、新規刺激部を製作することとした。また、口唇部は被験者による位置調整が困難であるため、位置決めスタンドも新たに製作し、口唇部の計測が被験者の負担にならず、また、安定した測定が行えるようにした。エアバックは容積を拡大するとともに、回転モーメントによる刺激では、刺激幅に依存する駆動アーム角が 0.134rad を極限として $\pm 2\text{mm}$ のストロークを確保していたものを、駆動アーム角に寄らず刺激幅を固定する機構を考案した。

2) 口唇部刺激時に見られるノイズ成分の解析

二点弁別測定機を駆動させると、MEGによる脳磁図の波形にノイズが発生した。このノイズは周期的に発生しているものの、二点弁別測定機を駆動しない場合には見られないことから、この測定機による影響であることが考えられる。ノイズの発生メカニズムについては、二点弁別測定機の駆動部分が金属であるため、その金属が動くこと、もしくはプローブの駆動によりプローブ本体が振動することで、MEG

コイルの磁場を乱すことによると思われる。

そこで、プローブと二点識別測定機と縁切りした固定端を起歪体を起歪体で接続し、二点識別測定機の駆動にともなう起歪体の振動を測定した。なお、プローブは、実際に MEG 室で使用するステージに取付け、万力でテーブルに固定した。同時に、プローブの駆動周期とプローブ本体の振動の関係を調べるため、唇を押し付ける部分の針の入出周期を測定した。なお、本実験系においては、 $1 \mu \text{ strain} = 0.05 \text{ mm}$ の変位である。

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改良

新規に考案した刺激装置図を図 1 に示す。本体は、構造部をアルミニウム合金 A5052、および、摺動部をポリオキシメチレン POM によって作成した。プローブの脱着は、天然ゴム系 O リングを用いて固定した、なお、天然ゴムは人体には触れず、機構内部に留まるように設計されている。プローブ高さ、および、プローブストロークの調整は刺激方向と直行する方向にスロープ式の幅調整機構を新たに考案し、刺激方向と同方向では問題のある振動時のゆるみやストローク幅への影響を免ずるものとした。さらに、エアバックおよび駆動アーム部は、大型化したものの機構は同一のものとし、応答性および再現性は現行と同等性を確保した。なお、刺激ストロークはプッシュロッドを新たに設け、回転モーメントから直動とした。今後は刺激発生時の変位が $60 \mu \text{ m}$ から、 $10 \mu \text{ m}$ となることの影響を確認した後に測定を開始する予定である。

2) 口唇部刺激時に見られるノイズ成分の解析

プローブ駆動の影響によるプローブ本体の振動測定結果を図 2~4 に示す。また、振動の大きさを表 1 に示す。図 2 はプローブが静止している状態の結果であり、図 3 はプローブの 2 本の針を同時に駆動させた状態で、図 4 は交互に駆動させた状態である。表 1 からわかるように、プローブが静止している場合 2.9 mm 、プローブを駆動させた場合 3.0 mm の振幅が発生しているように見える。また、プローブを駆動させた時の起歪体のひずみと同時に測定したプローブの入出周期を図 5、6 に示す。図 5 はプローブの 2 本の針を同時に駆動させた状態で、図 6 は交互に駆動させた場合である。図 5、6 からわかるように、起歪体のひずみは、プローブの入出周期の影響を受けていないことがわかる。

しかし、触感による振動の観察では、駆動による振動を確認できた。このことからプローブが静止した場合と駆動した場合の差 $2 \mu \text{ strain}$ 、すなわち 0.1 mm の振幅でプローブ本体が振動していると考えられる。

IV. 結論および今後の展開

本測定機器は脳磁図計測において、電気や空気圧によらず物理的刺激による実験系を構築可能な装置であるが、本考察の結果、物理的刺激発生部周辺の駆動によるノイズが認められた。また、本体の振動も計測の結果認められたことから、これらの要因が引き起こすノイズ成分を分離低減することが求められる。来年度は、機器の構成材料（磁性率）や機械摺動部を見直すことによるノイズ低減を目指す。

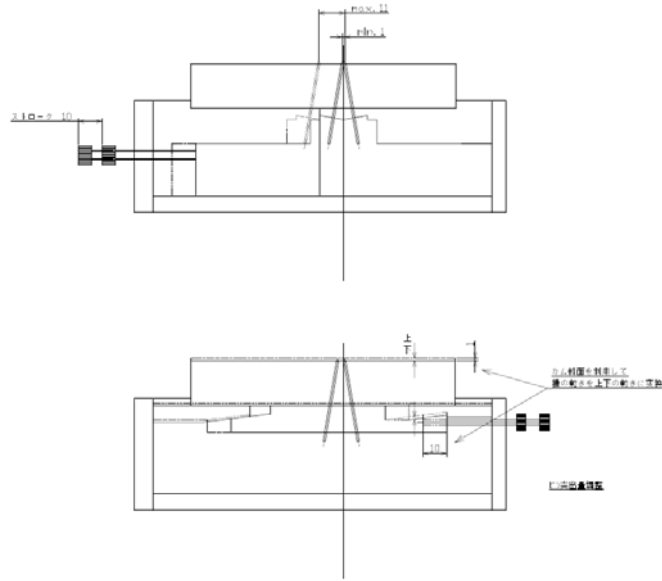


図1 刺激部全体図

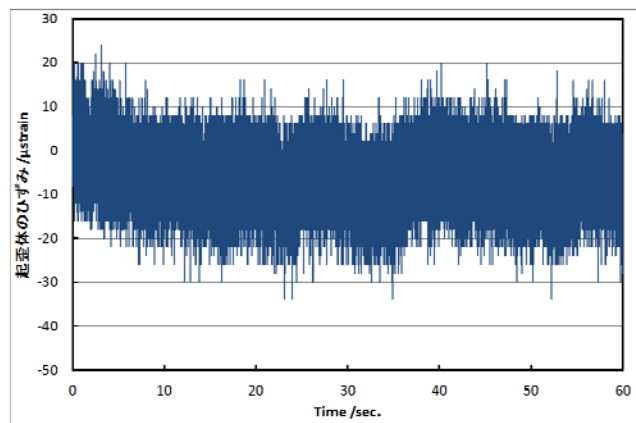


図2 静止状態

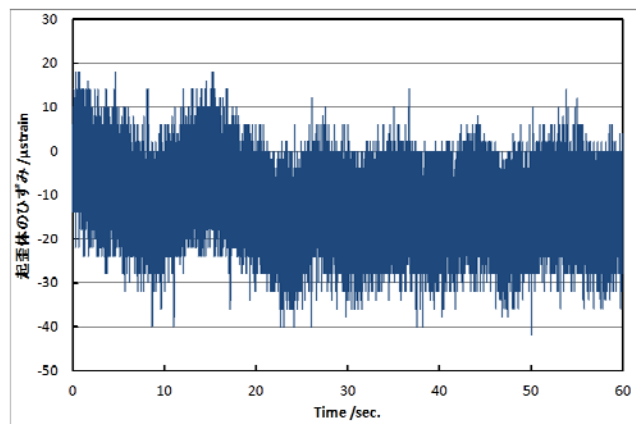


図3 2本の針を同時に駆動させた状態

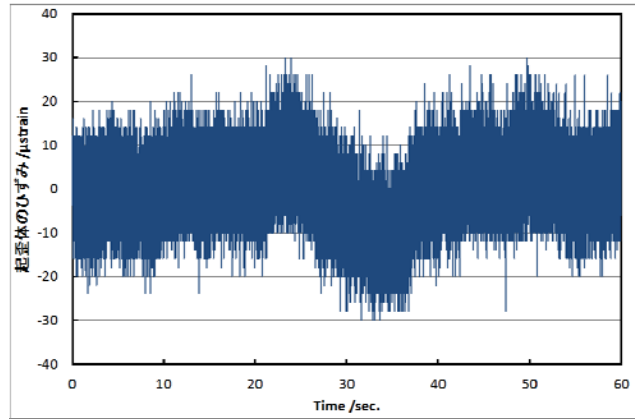


図4 2本の針を交互に駆動させた状態

表1 振動の大きさ (上段: μ strain, 下段:(mm))

駆動	最大	最小	周期の絶対幅
なし	24 (1.2)	-34 (-1.7)	58 (2.9)
2本の針を同時	30 (1.5)	-30 (-1.5)	60 (3.0)
2本の針を交互	18 (0.9)	-42 (-2.1)	60 (3.0)

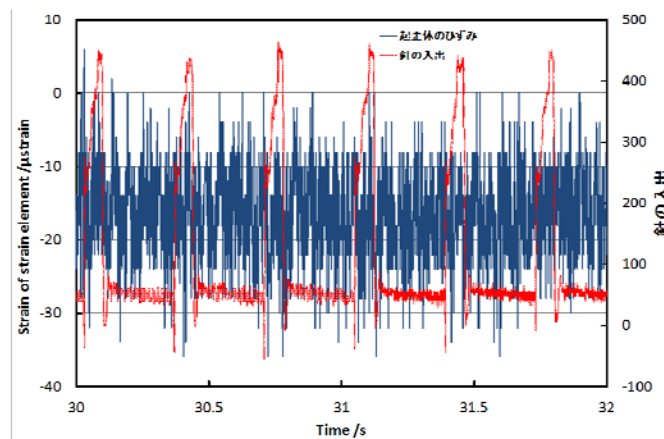


図5 2本の針を同時に駆動させた状態の起歪体のひずみとプローブの駆動周期

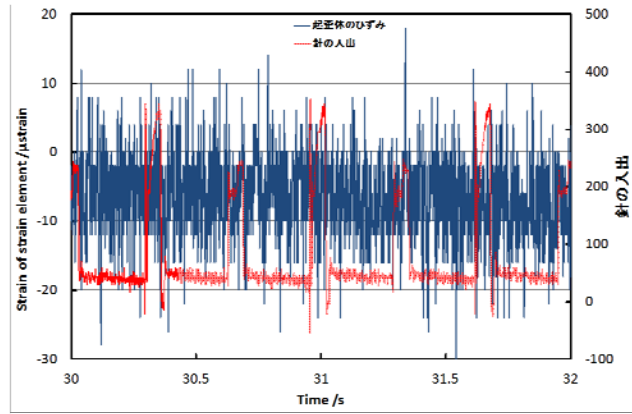


図5 2本の針を交互に駆動させた状態の起歪体のひずみとプローブの駆動周期

Development of systems for objective assessment of the cutaneous sensation in elderly people

Akinori Nakamura^{*1}, Tetsuya Nemoto^{*2}, Misako Yamagishi^{*1}, Kaori Iwata^{*1},
Nobuo Noda^{*3}

^{*1}*Department of Clinical and Experimental Neuroimaging, National Center for Geriatrics and Gerontology*

^{*2}*Department of Gerontechnology, National Center for Geriatrics and Gerontology*

^{*3}*Eisho Kinzoku corporation*

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

Abstract

Cutaneous two-point discrimination is known to be impaired in patients with Minamata disease and is expected to be useful as one of the biological markers for methyl-mercury intoxication. Therefore, we have developed an automatic two-point discrimination measurement system that enabled objective and reliable evaluation of the two-point thresholds. However, it remains still unclear whether the system is applicable or not if a subject has peripheral neuropathy, which is one of the common symptoms in methyl-mercury intoxication. Therefore the objective of this project is to develop systems which can assess the cutaneous sensation objectively, even in cases having peripheral neuropathy.

This year, we mainly focused on following two studies;

1) In order to evaluate peripheral neuropathy objectively, we developed a new method which can assess superficial skin sensation. Using a PC-controlled electric stimulation with button feedback system, we measured sensory thresholds in 8 young subjects. We found that individual sensory thresholds could be reliably estimated in 2 minutes. Further, we measured somatosensory evoked magnetic fields (SEFs) using this system. We found that electric thresholds to elicit SEF waves corresponded with individual sensory threshold determined behaviorally. The results suggested that MEG is useful to estimate individual sensory thresholds objectively.

2) Since peripheral neuropathy generally causes glove-and-stocking type sensory disturbance, and oral areas are normally spared, we consider detecting abnormal two-point threshold in the oral areas can provide important information. Therefore, we also developed a new tactile

two-point stimulator which is compatible for MEG measurements and can stimulate the lip or tongue.

○水俣病患者の経年的変化及び自然史

Ⅱ 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

主任研究者 安東由喜雄

(熊本大学大学院 生命科学研究部 神経内科学分野 教授)

研究要旨

メチル水銀高曝露患者において、現在における神経症候の増悪は、加齢による合併疾患によるものの可能性があると思定されているが、その実態は明らかになっていない。本検討では、神経症候増悪のあった患者を対象として、合併疾患、家族歴、服薬歴を調査した。神経症候の増悪が合併疾患によるものと推定された患者も存在したが、なかには合併疾患のない例もあった。

キーワード: メチル水銀高曝露、神経症候増悪、合併疾患、服薬歴

研究者協力者 植田明彦 (熊本大学大学院 生命科学研究部 神経内科学分野 特任助教)

I 研究目的

かつて高濃度のメチル水銀曝露を受けて発症した水俣病患者において、今日において見られる神経症候がどのように変化するか明らかになっていない^{1-5, 7, 8)}。曝露がない現在において、メチル水銀による新たな神経症候の出現はないものと想定され、現在、新たに出現した神経症候は、加齢により合併した疾患による可能性があるかと推定されているが、十分な実態調査はなされていない。そこで本調査では、不知火海沿岸在住で魚介類多食歴のある患者を対象として、神経症候増悪の要因を明らかにすることを目的とした。

II 研究方法

水俣市立総合医療センターおよび天草地域医療センター神経内科外来を受診した患者で、昭和20年代後半から昭和40年代にかけて、不知火海沿岸で魚介類多食歴のある患者を対象とした。対象患者は、1) 公健法認定患者(公健法)、2) 平成7年政治解決受給者(H7年)、3) 特措法救済者(特措法)の3群に分けて解析した。患者背景として、居住地域および魚介類の多食歴、家族歴(水俣病認定の有無)、服薬歴を調査した。病歴として、神経症候の増悪を自覚した時期、期間について調査した。神経症候の増悪は過去10年間に神経症候の増悪を認めた例と定義した。

III 研究結果

2012年9月より2013年11月までの期間に受診した10例(平均年齢 63 ± 10 歳、男性4例)を対象とした。公健法3例、H7年5例、特措法2例であった。受診時の主訴としては、感覚障害2例(舌のしびれ1例:特措法;手足のしびれ1例:H7年)、小脳失調3例(歩行障害1例:公健法;ふらつき感2例:H7年)、不随意運動2例(上肢のバリズム様運動1例:公健法;振戦1例:特措法)、その他3例(公健法1例;H7年2例)であった。

10例中6例で神経症状の増悪(感覚障害1例、小脳失調3例、不随意運動2例)を認めた。失調症状の増悪を認めた1例では脊髄小脳変性症が疑われたが、確定診断には至っていない。ふらつき感の増悪を認めた他の2例は、合併疾患等の原因を同定できなかった。振戦の発症増悪を認めた例では、甲状腺機能亢進症はなく、振戦は全身に認め、本態性振戦と異なっていた。

【症例1】59歳女性(昭和29年生まれ)。

認定状況としては、昭和52年の一斉検診で一次審査を受けた後、二次審査には社会的状況から自己判断で申請せず、平成7年に医療手帳を受給された。

生活歴としては、水俣湯堂に生まれ、15歳(昭和44年)まで魚介類を多食している。その後、就職のため、県外で生活、21歳から水俣に戻り、それ以降、水俣に在住されている。

家族歴 いたどこにも同様の症状あり。

既往歴は平成9年子宮筋腫手術を受け、その後C型肝炎を指摘され、インターフェロン療法を受けた。

現病歴としては、20歳頃にすでにふらつき感を自覚していた。40歳頃にはふらつき感が増悪して、伝い歩きやつかまり歩行であった。50歳にそれまでの服薬

を中止したのちにふらつき感が軽減して、歩行可能となった。59歳で水俣市立総合医療センター外来に受診された。

受診時の神経学的所見では、求心性視野狭窄は、はっきりしない。斜視があり。難聴はなし。構音障害なし。運動では明らかな筋力低下はなく、感覚では四肢のしびれ感および振動覚の著明な低下があり。反射では腱反射は四肢で全体に亢進、下肢に病的反射があり。歩行は痙性歩行であり、つぎ足歩行はやや不安定であった。

検査所見では、頸椎X線写真では、頸椎症の所見はなく、頭部MRIでは、明らかな小脳萎縮はなく、後頭葉内側面の萎縮もなかった。血液検査では、HTLV-1抗体陰性であった。

【症例2】66歳女性（昭和21年生まれ）。

認定状況としては、これまで検診を受けず、特措法にて救済されている。

生活歴としては、御所浦で生まれ、現在も御所浦で生活。実家は漁業関係。羽は平成7年に医療手帳を受給されている。

現病歴は、平成9年に胃切除を受けられている。胃切除後より、四肢のふるえが出現し、平成22年に天草地域医療センターを受診された。

受診時の神経所見は、求心性視野狭窄なし、難聴はなし、両上下肢に姿勢時振戦が著明であった。姿勢時振戦は、粗大であり、姿勢時に出現するが、両下肢にも著明に認め、加齢による本態性振戦とは異なっていた。協調運動では明らかな異常なく、感覚では、四肢末端のしびれがあり。腱反射は正常範囲で、病的反射はなし。歩行は普通歩行可能であった。

検査所見では、甲状腺機能は正常範囲であった。

IV 考察

本研究は、水俣病の自然史を記録することであるが、発生より50年以上経過した現在において、様々加齢性の合併症も併発しており、現在の神経症候が、水俣病による神経症候とそれ以外の神経症候であるか区別して記録しなければならない。50歳以上で合併しやすい神経疾患としては、頸椎症や糖尿病であり、これらの疾患が四肢末端のしびれを呈する事から、その存在を明らかにしなければならない。小脳失調をきたす疾患としては、脊髄小脳変性症などの変性疾患は、50歳以降に発症しやすく、アルコール性小脳萎縮症やフェニトインによる薬物中毒などのその他の中毒性疾患でも小脳症状を発症する。錐体路徴候においては、南九州に好発するHTLV-1関連脊髄症も痙性歩行をきたす疾患であり、常に念頭に置く必要がある。水俣病の自然史を記録するには、まずこれらの疾患の合併の有無について、十分な評価をしなければならない。本検討では、経過中にふらつき感の増悪を認め、小脳失調の増悪と推測された。小脳失調に関しては、変性疾患の合併も考慮すべきであり、小脳性の変性疾患で頻度の高い、脊髄小脳変性症や多系統萎縮症の合併などは、詳細な家族歴の聴取や自律神経障害合併の有無などから鑑別しなければならない。

水俣病はメチル水銀による中毒性疾患であることから、曝露から神経症候発生までの期間により、その因果関係は容易に証明できる。しかし、発生より50年以上経過した現在において、水俣病患者での神経症候の増悪が水俣病と関係しているかどうかその因果

関係を証明することは極めて困難である。また、水俣病の主症状のひとつである感覚障害といった患者の主観によるものが多く、客観的に神経症候の増悪を証明することは容易ではない。したがって、患者が自ら診療を望む場面でないと十分な情報を患者から得られない。本検討では、症例数は少ないものの、いずれの患者も患者自らが、自身の身体に不安をかかえ、進んで神経内科外来を受診されている。したがって、公健法や特措法での水俣病検診とは異なり、一般診療における患者医師間の関係が成立している状況で診療しているため、整合性の高い信頼性のある診療情報が得られていると考えられる。今後、個々の症例の追跡することで、水俣病の自然史の一部が明らかにするとともに、臨床の現場で活用できる客観的な感覚障害の評価方法の開発が望まれ、MEG研究による感覚障害の客観的評価法の成果を臨床の現場に還元する作業が必要と考えられる。

水俣病はメチル水銀による中毒性疾患であり、曝露のない現在において、メチル水銀による神経症候が増悪しないものと推定される。本検討では、6例の患者で神経症候の増悪を認めたが、今回検査した範囲では、神経症候増悪の原因となる他疾患の合併は検出できなかった。今回の検討では、前年度の班会議での指摘事項に従い、服薬歴等の調査を行った。症例数が少ないものの、その中から共通する事項に重点をおき、今後検討する必要がある。また、神経症候の増悪に関しても、過去の神経症候の記録は乏しく、患者からの問診によるものであるため、実際にどの程度増悪しているか客観的な情報が得られていない。小脳失調の評価には、半定量的な臨床スコアが脊髄小脳変性症の臨床治験で活用されており、そのような臨床スコアを用いて、現在および今後の神経症候の推移を前向きに追跡することが重要であると考えられた。

V 結論

不知火海沿岸での魚介類多食歴のある患者で、この10年間に神経症候の増悪を認めた患者のなかには、加齢による合併疾患を認めない患者も存在した。

VI 次年度以降の計画

不知火海沿岸での魚介類多食歴のある患者で神経症候の悪化を認めた例を対象として、加齢による合併疾患を見落とすことなく、精査するとともに、合併疾患のない患者において、服薬歴⁶についての実態調査を継続する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

特記事項なし

引用文献

- 1) Takeuchi T, Eto K, Tokunaga H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. *Neurotoxicology* 1989; 10: 651-7.
- 2) Komyo Eto, et al. Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases-The pathologic point of view. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 666.
- 3) Yorifuji T, Tsuda T, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and neurologic signs in Minamata and neighboring communities. *Epidemiology* 2008; 19: 3-9.
- 4) Yorihuji T, Tsuda T, Kashima S, Takano S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury

- and its effects on hypertension in Minamata disease. *Environment Research*, 2010; 110: 40-46,
- 5) Yoriuji T, Tsuda T, Kashima S, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata. *Environment Research* 2010; 110: 40-46.
 - 6) Imura N, et al. Chemical methylation of inorganic mercury with methylcobalamin, a vitamin B12 analog. *Science* 1971; 172.
 - 7) Uchino M, et al. Clinica investigation of the lesions responsible for sensory disturbance in Minamata disease. *Tohoku J. Exp. Med* 2011; 195, 181-189.
 - 8) Uchino M, et al. The severity of Minamata diases declined in 25 years: Temporal profile of the neurological findings analyzed by multiple logistic regression model. *Tohoku J. Exp. Med* 2005; 205: 53-63

Neurological symptoms of Minamata disease (MD) in long-term-analyses

Yukio Ando¹, Akihiko Ueda¹, Hiroshi Sato², Masaaki Nakamura³

¹Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University

²Sato Neurological Clinic

³National Institute for Minamata Disease

Keywords: Minamata disease, aged complication, neurological symptoms

Abstract

Minamata disease (MD) was caused by ingestion of seafood from the methylmercury-contaminated areas. Although 50 years have passed since the discovery of MD, a few studies were available on the neurological findings in patients with MD in long-term-analyses. Thus, we evaluated changes in neurological symptoms and sign of MD. We also evaluated neurological symptoms modified by ages and various complications.

We evaluated 10 patients who visited Minamata City General Hospital and Medical Center, since their neurologic symptoms got worse. We did not determine their cause of worsen neurological symptoms in 6 patients of them.

We should distinguish neurological symptoms of MD from that of aged complication. We should be careful in looking over treatable complications such as cervical spondylosis.

○メチル水銀への曝露量と症状の関係

Ⅲ メチル水銀曝露量に依存したグリア細胞の 機能シフトと中枢神経細胞障害

メチル水銀曝露量に依存したグリア細胞の機能シフトと中枢神経細胞障害

小泉修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

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るようになってきたが^{1,2}、メチル水銀 (MeHg) 等、脳の有害作用を惹起する化学物質がグリア細胞及びグリア細胞-神経細胞連関に与える影響に関しては、多くは不明のままである。申請者は、平成 19-24 年度の「重金属等の健康影響に関する総合的研究」を通じ、グリア細胞が MeHg の高感度センサーとして機能していること、また、このグリア細胞が低濃度 MeHg を感知することで、グリア細胞間及びグリア-神経細胞間のコミュニケーションが亢進し、MeHg 障害の回避に繋がっていることを見出した³。しかし、高濃度 MeHg や長期曝露は、むしろこれら細胞間コミュニケーションを介して炎症応答を亢進させ、神経細胞障害の増悪・慢性化の原因になっている可能性も示唆した。本年は、研究テーマ (2) に設定された「メチル水銀への曝露量と症候の関係」について、メチル水銀濃度・曝露期間により両刃の剣として変化するグリア細胞のフェノタイプ変化の視点から解明する。MeHg の濃度及び曝露時間により (1) 如何にそのフェノタイプを変化させるのか、(2) フェノタイプ依存的な神経保護及び障害誘発様式、及び (3) (2) の分子メカニズムの解明を目指して研究を行った。研究には、各種グリア細胞性因子の遺伝子改変動物のスライス培養系を用いた *in situ* 解析を主体とし、各種生化学、分子生物学及びイメージング手法で補完した。

キーワード：メチル水銀(MeHg)、曝露依存性、ミクログリア、アストロサイト、スライス培養系

研究者協力者 氏名 篠崎陽一（山梨大学医学部薬理学）

I. 研究目的

本研究は、MeHg 曝露量の違いにより惹起される神経細胞障害を、グリア細胞（特にミクログリア）の視点から明らかとすることを目的とする。到達目標は、(1) MeHg 曝露量に依存したグリア細胞変化のフェノタイプを精査する、(2) 各種 MeHg 濃度により変化する、グリア細胞間、グリア細胞-神経細胞間コミュニケーションの性質変化を明らかとする、(3) グリア細胞間及びグリア-神経細胞連関変調と、神経細胞障害の関連性を明らかとする、の3点である。本年平成 25 年度は特に上記 (1) に注目して行う。昨年度までに、ミクログリアは低濃度 MeHg (100 nM 未満) を感知し、Ca²⁺、p38MAP キナーゼ依存的に ATP を放出して、アストロサイトにその情報を伝え、アストロサイトの神経保護因子 (IL-6) 産生、神経保護作用を誘導することを明らかとした³。低濃度 MeHg 及び長時間 MeHg により惹起されるミクログリアの解析から、ミクログリア-アストロサイト-神経細胞間連関様式を解明する。平成 26 年度以降は、前年度に得られた高濃度 MeHg により惹起されるグリア細胞-神経細胞連関変調が神経細胞障害に与える影響及びその分子メカニズムを明らかとする。グリア細胞の二面性のスイッチ機構を探ることにより、グリア細胞の視点から MeHg 誘発性の神経細胞障害及びその慢性化の分子メカニズムの一端が明らかになることが期待出来る。また、弱いストレスや脳虚血経験すると、その後の強い脳虚血に対する抵

抗性が増す「虚血耐性」獲得にも、グリア細胞の軽度の活性化が必須であることが明らかとされた（未発表データ）。低濃度 MeHg 負荷によるグリア性 MeHg 抵抗性獲得現象のメカニズムが解明されれば、MeHg の神経細胞障害抑制及び治療に新しい方向性を提案できる。

II. 研究方法

スライス培養：実験には、生後 6～8 日齢の C57BL6 系マウスを用いた。氷冷 HBSS 中にて素早く大脳皮質を取り出し、Mclwain Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.)により 350 μm 厚にスライスを作成した。スライスは Millicel[®] Cell Culture Insert (0.4 μm pore, 30 mm diameter, Millipore)上に 6～8 スライス/インサートで培養した。培養液は大脳皮質スライス用培地(glucose 6.5 g/l, penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, MEM 50%, HBSS 25%, Horse serum 25%, L-glutamine 2 mM)を用い、3 日に一度交換して培養を行った。

MeHg の添加：培養 7 日目から添加を行った。上記の培地交換に併せ、3 日に 1 度 MeHg (100 nM) を添加した。

死細胞の評価：Propidium Iodide(PI)(5 mg/ml)を加え、37 $^{\circ}\text{C}$ 1 時間取り込ませることにより、その蛍光画像を取得し、その強度を蛍光画像解析ソフトウェア (Image J) により定量した。

免疫染色：スライスをパラホルムアルデヒド(4%, 1 時間@室温)にて固定し、0.1% Triton-X 入り PBS(PBS-T)にて処置(1 時間@室温)後、3% ヤギ血清入り PBS-T にてブロッキング(1 時間@室温)を行った。1 次抗体(anti-NeuN, anti-GFAP, anti-CD11b, anti-ssDNA)と反応(24 h@4 $^{\circ}\text{C}$)後、蛍光標識 2 次抗体と反応(1h@RT)させた。観察はオリンパス共焦点顕微鏡 FV-1000 を用いて行った。

Western Blot：MeHg を任意の時間処置したスライスをサンプルバッファーに溶解、ソニケーション後、95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min にて処理。12.5%アクリルアミドゲルにて分離後、PVDF メンブレンに転写した。

Blockace/TBST にてブロッキング後、各種 1 次抗体と反応(24 時間@4 $^{\circ}\text{C}$)させ、HRP 結合 2 次抗体と反応(1 時間@室温)させた。バンドの検出は LAS4000 にて行った。

(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。また、遺伝子改変動物は、遺伝子組み替え実験安全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行った。

III. 及び IV. 研究結果及び考察

これまでミクログリア、アストロサイト及びアストロサイト-ミクログリア関連に注目して MeHg の作用を検討し、得られた結果の模式図を図 1 に示した。

1. 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、VNUT 依存的な「ATP の開口放出」という形で情報を発信すること⁴、
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、「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。
4. これらの一部は、スライス標本（スライス培養）を用いた検討により、*in situ* で再現された。

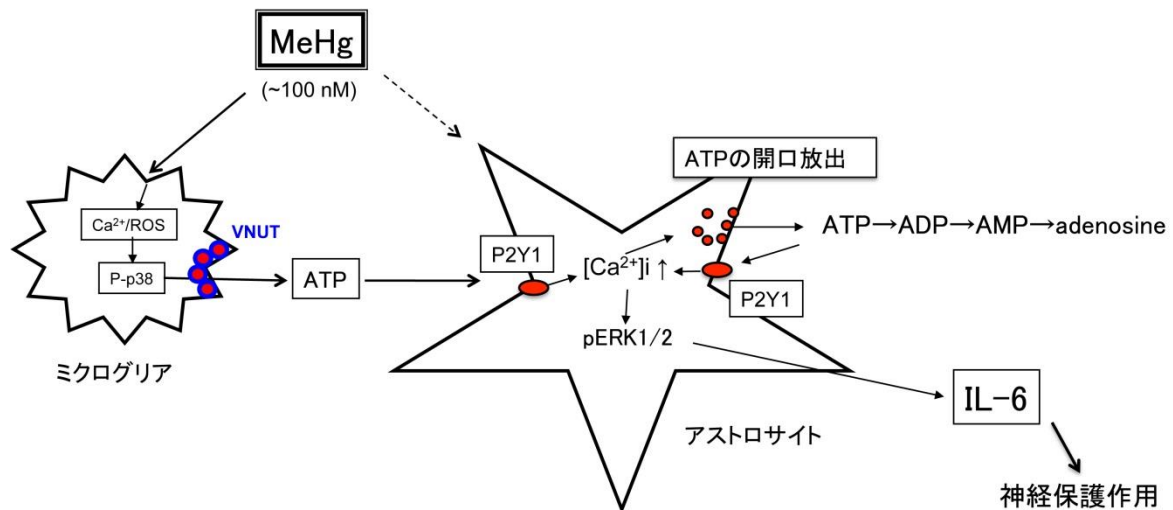


図1 低濃度 MeHg に暴露されたミクログリア及びアストロサイトの応答

ミクログリアが低濃度 MeHg を感知して、VNUT 依存的な開口放出により ATP を放出する。この ATP がアストロサイトの P2Y1 受容体(P2Y1)を刺激することにより Ca^{2+} 及び ERK1/2 を介して IL-6 を産生・放出する。この IL-6 依存的に神経保護作用を呈する。

また、これらに対する推進委員、評価委員のコメントは以下である。

推進委員、評価委員のコメント：

- 論文としてまとめ、積極的に公表すること。
- ミクログリアが MeHg の高感度センサーとして機能し、ATP を介してアストロサイト、神経細胞にその情報を伝え、脳機能穂下的に作用している可能性を示したが、水俣病における神経症状を解明する視点を持って頂きたい。
- ある濃度を超えるとミクログリアの感知能は機能しないのか？
- 実際のどんな局面でこうした保護機能が働くことを想定しているのか？
- 初代培養系での知見を、生体(再構成系)で確認すること。
- 海馬で行う意味がわからない(大脳皮質等の実際の MeHg 障害が起き易い脳部位で要検討)

以上を踏まえ、本年は、これまでの結果で得られた重要な分子の各種遺伝子改変マウスのスライス標本を用いた *in situ* 実験系(スライス培養系)を中心に据え、MeHg

Short exposure

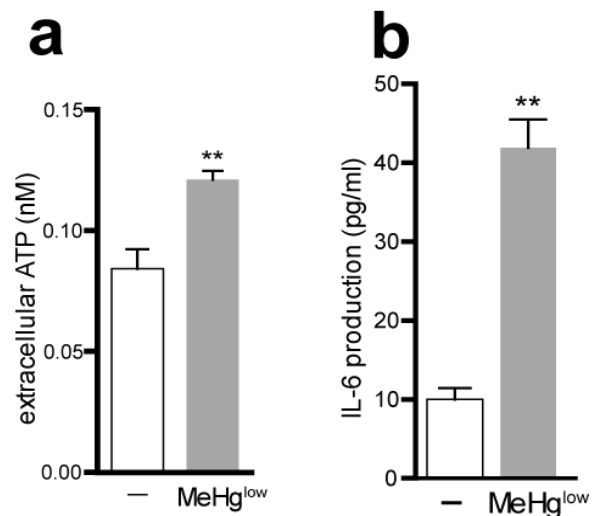
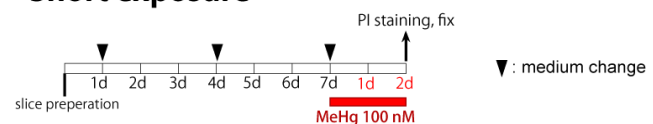


図2 大脳皮質スライス標本における MeHg^{low} の急性期応答性

上段：投与スケジュール。下段：a. 細胞外 ATP 濃度、b. IL-6 産生。

MeHg^{low}: 100 nM, 3 h (ATP), 24 h (IL-6). ATP: n=5, **p < 0.01, Student's t-test. IL-6: n=4, **p<0.01, Student's t-test. MeHg^{low} 処置 24 h 前に serum starvation.

の曝露量（濃度及び時間）と神経傷害との関連性をグリア細胞（特にミクログリア細胞）のみに注目して解析した。

(1) 急性期の低濃度 MeHg^{low} (100 nM) がミクログリア機能に対する影響（大脳皮質スライス培養系を用いた解析）

大脳皮質スライス標本を用いて、先ず分散培養系と同様の急性期（Short exposure）の MeHg 傷害モデルを作成した。図 2 に示すように、スライス培養が安定する、作成・培養後 1 週間後に低濃度 MeHg (MeHg^{low}; 100 nM) を添加し、その 48 時間後に PI を添加しその蛍光強度により傷害を評価した。図 2 a 及び b で示す様に、培養細胞で認められた ATP 放出及び IL-6 の産生は、スライス標本でも確認できた。In vitro 培養系同様、MeHg^{low} 単独では顕著な傷害はみとめられなかった（図 3 b）。これは、ミクログリアによる MeHg^{low} 感知を発端とする一連の神経保護カスケードが働くためと考えられる。そこで、本 in situ スライス培養系においてミクログリアの活性化を minomycin により抑制した（図 3、mino）。MeHg^{low} 単独では認められなかった PI シグナルの亢進がみとめられ、これは、P2Y1 受容体 (P2Y1R)

阻害薬 MRS2179 及び IL-6 の中和抗体によっても再現することができた。従って、図 1 で示したような、in vitro 分散培養系の結果が in situ でも再現できることが明らかとなった。PI シグナルは、

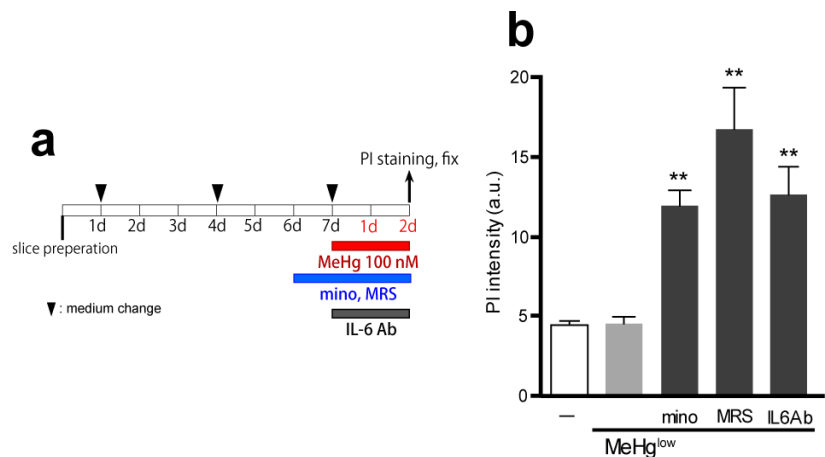


図 3 ミクログリア/P2Y1R/IL-6 システムの神経保護作用
a. MeHg^{low} 及び各種薬物の投与スケジュール。b. MeHg^{low} による傷害とミクログリア。ミクログリアの活性化抑制 (mino; minomycin)、P2Y1R 阻害薬(MRS2179)、IL-6 抗体(IL6Ab)により、MeHg^{low} による傷害が惹起された。

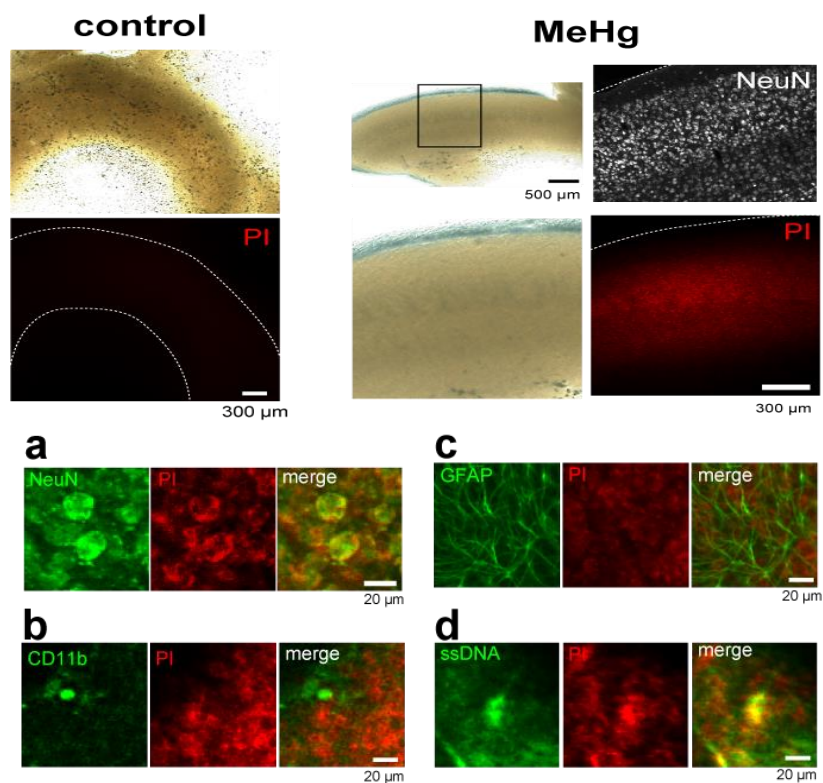


図 4 MeHg 刺激により惹起される PI シグナルは神経細胞由来
上段：左 PBS, 右 MeHg 0.5 μM 48 hr 刺激後の PI シグナル
下段：a NeuN(神経), b CD11b (ミクログリア), c GFAP (アストロサイト), d ssDNA 傷害神経、とそれぞれ PI シグナル

NeuN と重なっており、他の CD11b 及び GFAP とは重ならないことから、神経細胞由来のシグナルであることが明らかとなった (図 4)。また、PI 陽性シグナルは、アポトーシス時に観察されるシングルストランド DNA (ssDNA) シグナル陽性であった (図 4 d)。Lapham ら⁵は、軽度小児水俣病患者の脳幹で、ミクログリアが活性化していることを報告している。この報告は、ヒトの脳においても低濃度 MeHg の暴露が、ミクログリア→アストロサイトといった一連の応答を引き起こしている可能性を示唆し、非常に興味深い。カニクイザルを用いた研究で、50 µg/kg の MeHg を投与した場合には、大脳皮質視覚野の神経細胞死が誘発されず、同部位でミクログリアの活性化が観察されることが報告されている⁶。本実験で用いた MeHg 濃度は、体重 1 kg に換算すると 21.56 µg/kg に相当するため、上述した過去の *in vivo* 実験結果とよく一致していると考えられる。

またこれまでに、ミクログリアは VNUT を介した ATP 開口放出によって MeHg^{low} の情報をアストロサイトに伝えていること、アストロサイトは ATP 情報を P2Y1R で感知していることを明らかとした。そこで、VNUT 欠損 (VNUTKO) 及び P2Y1R 欠損 (P2Y1KO) マウスを作成し、VNUTKO 及び P2Y1KO 由来大脳皮質スライス培養系を用いた検討を行った。図 5 で示す様に、VNUTKO スライス標本からは、MeHg^{low} による ATP の放出及び IL-6 の産生は認められなかった。また、図 6 のように、VNUTKO 大脳皮質は脆弱であり、通常は傷害が誘発されない MeHg^{low} によっても強い PI シグナルの亢進が認められた。これは、それぞれ ATP 及び IL-6 の添加により抑制された。

また同様に図 7 で示す様に、P2YKO 由来スライスからは、MeHg^{low} による IL-6 産生は認められなかった。また、この標本は MeHg に対して脆弱であり、MeHg^{low} 負荷により顕著な PI シグナルの亢進を認めた。この傷害は、IL-6 添加により抑制されたが、ATP 添加では抑制することができなかった。これは、一連の神経保護カスケードにおいて、P2Y1R を介する応答がミクログリアの ATP 放出

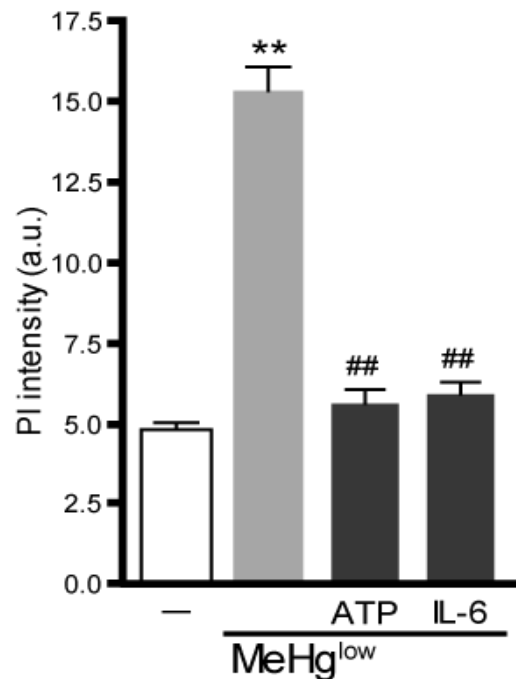


図 5 VNUTKO マウス由来を用いた検討
VNUTKO 由来の大脳皮質を用いてスライス培養系を構築し、MeHg^{low} 刺激を行った。VNUTKO 標本では、MeHg^{low} による ATP 放出(a)及び IL-6 産生(b)は認められなかった。

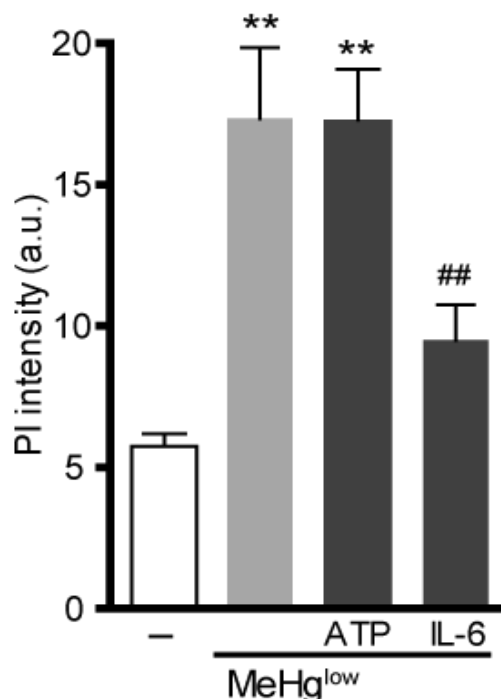


図 6 VNUTKO マウス由来を用いた検討
VNUTKO 由来の大脳皮質を用いてスライス培養系では、MeHg^{low} 刺激により強い傷害が認められた。これは、ATP 及び IL-6 の添加により抑制された。

の下流にあることを、強く指示する結果である。

以上、ミクログリアは MeHg^{low} を感知し活性化し、ATP を VNUT 依存的な開口放出により放出する。この ATP を P2Y1R により感知したアストロサイトが IL-6 産生により神経細胞保護効果を呈することが示唆された。これは、我々のこれまでの分散培養系での成果を支持するものである。

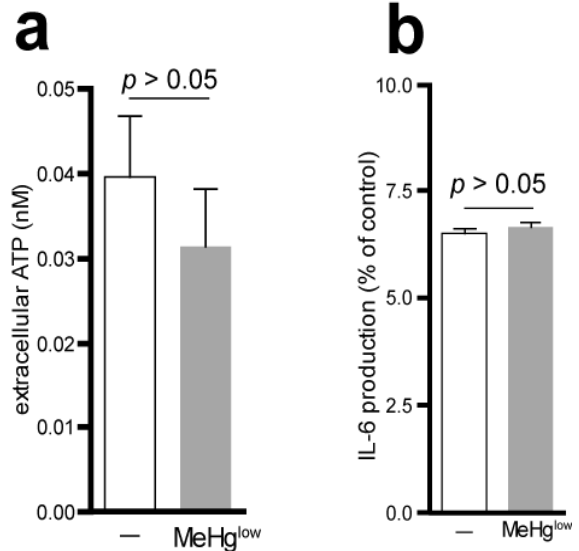
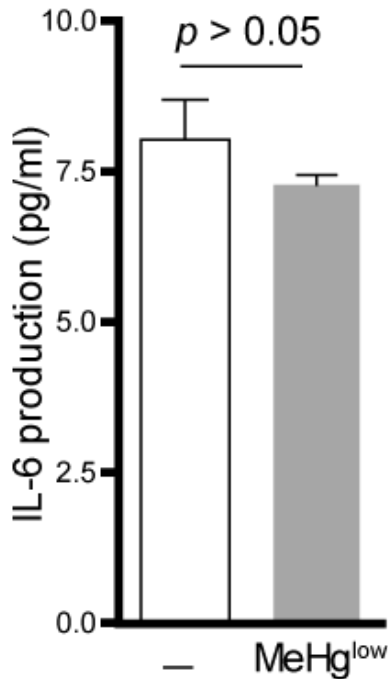


図 7 P2Y1KO マウス由来を用いた検討

P2Y1KO 由来の脳皮質を用いてスライス培養系を構築し、MeHg^{low} 負荷を 48 h 行った。MeHg^{low} による IL-6 産生は認められなかった(n=6)。MeHg 負荷 24 h 前から serum starvation を行った。

図 8 P2Y1KO マウス由来を用いた検討

P2Y1KO 由来の脳皮質を用いてスライス培養系を構築し、MeHg^{low} 刺激を行った。P2Y1KO スライスには、MeHg^{low} により強い傷害性を呈した。IL-6(200 pg/ml)添加はこの傷害を抑制したが、ATP(100 μM)添加は影響がなかった。n=8-11。

(2) 慢性期の低濃度 MeHg^{low} (100 nM) がミクログリア機能に対する影響 (脳皮質スライス培養系を用いた解析)

短期投与では影響が出ない MeHg^{low} の長期投与の神経細胞に対する影響を、脳皮質スライス培養系を用いて検討した。また、短期投与では神経細胞保護的なフェノタイプを示したミクログリアの応答性が長期投与によりどのように変化するかも併せて検討した。

Long exposure

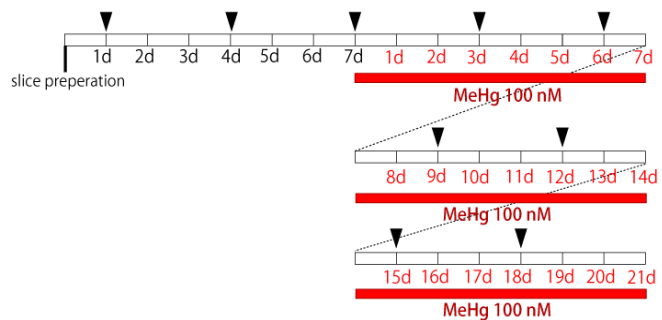


図 9 MeHg^{low} の長期投与のスケジュール

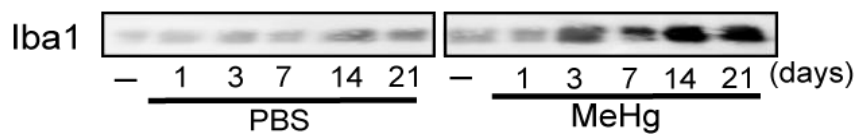
図9に長期投与スケジュールを示した。大脳皮質スライス作成7日後から、MeHg^{low}を培地交換のタイミングに合わせて添加した(黒矢頭、2日おき)。

図10はMeHg^{low}負荷後の各種グリア細胞マーカーを経日的に解析した。活性化型ミクログリアの指標であるIba1は、MeHg^{low}負荷3日後から顕著に亢進し、早期から活性化型に変化していた。一方活性化型アストロサイト指標であるGFAPは、

MeHg^{low}負荷3週間では殆ど変化していなかった。しかし、3PGDH(L-セリン合成酵素、アストロサイト特異的なマーカー)の一過性な亢進、S100βの消失(アストロサイト特異的カルシウム結合蛋白質)の消失等、アストロサイトのバイオマーカーにも変化が認められた。しかし、これらの変化の意義は今のところ不明である。

次に、スライス培養における各種細胞内シグナルの経日的変化を解析した。図11は、MeHg^{low}負荷による誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)、リン酸化STAT3(P-STAT3)、リン酸化Akt(P-Akt)、MAPkinase(P-JNK, P-ERK1/2, P-p38)及びリン酸化Smad2(P-Smad2)の変化を解析した。長期のMeHg^{low}負荷によりiNOSの誘導(7日目以降)、P-STAT3及びP-Aktの低下が認められた。iNOSが細胞傷害性と強くリンクしていること、またP-STAT及びP-Aktが細胞生存シグナルと強く関与することから、MeHg^{low}を長期に負荷すると、グリア細胞が傷害性のフェノタイプにシフトすることが示唆された。そこで、MeHg^{low}の

a microglia



b astrocytes

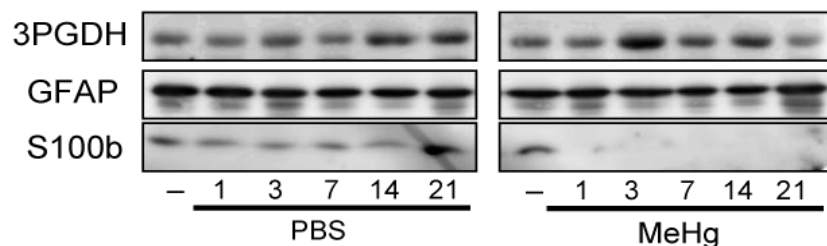


図10 各種グリア細胞マーカーの経日的変化
 a. ミクログリア特異的蛋白質 Iba1 の経日的変化
 b. アストロサイト特異的蛋白質の変化。3PGDH, 3-phosphoglycerate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; S100β.

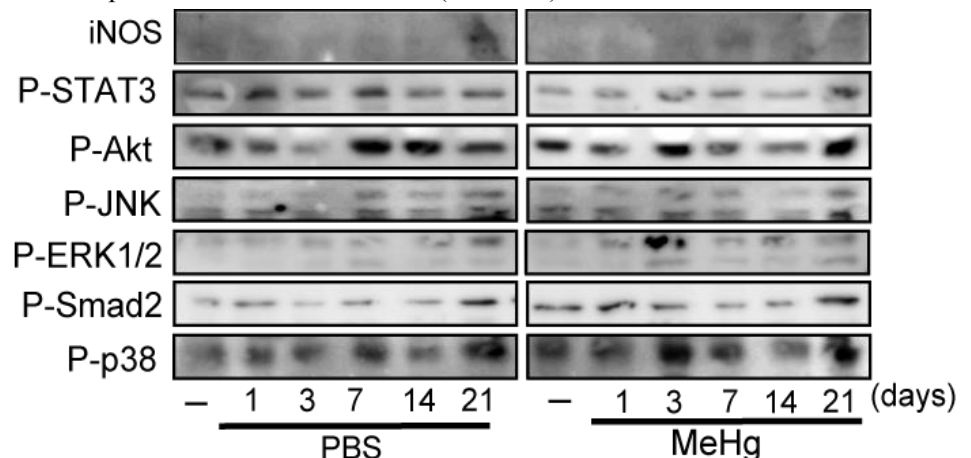


図11 各種グリア細胞マーカーの経日的変化
 a. ミクログリア特異的蛋白質 Iba1 の経日的変化
 b. アストロサイト特異的蛋白質の変化。3PGDH, 3-phosphoglycerate dehydrogenase; GFAP, glial fibrillary acidic protein; S100β.

長期負荷が神経細胞に与える影響を、大脳皮質スライス培養系を用いて検討した。図 12 は MeHg^{low} 負荷 7 日目の PI 蛍光シグナルを示したものである。MeHg^{low} の負荷であっても、7 日目以降は傷害性が認められた。MeHg^{low} 負荷後 14 及び 21 日目も、大脳皮質スライスには強い傷害が認められたが、PBS 投与群の傷害も強くなってきており、統計学的な有意差は認められなかった。

最後に、MeHg^{low} の長期負荷により惹起される神経傷害に対するミクログリアの作用を調べた。ミクログリアは MeHg^{low} 曝露の急性期には、細胞保護的な役割を呈した。そこで、minocyclin の投与タイミングを変えて、ミクログリアの活性化の時期をずらすことにより、MeHg^{low} 負荷による神経細胞傷害の影響を解析した。図 13a は実験スケジュールを示す。Minocyclin を MeHg^{low} 負荷の 1 日前 (mino-0d) 及び 3 日後 (mino-3d) から投与し、MeHg^{low} 負荷による 7 日目の PI シグナルに対する影響を解析した。MeHg^{low} 負荷が無い場合には、minocyclin は PI シグナルには

全く影響しなかった (mino-0d 及び mino-3d 単独)。しかし、MeHg^{low} 負荷の初期からミクログリアを抑制すると (mino-0d)、MeHg^{low} により惹起される PI シグナルは強くなり、逆に MeHg^{low} 負荷 3 日後からミクログリアを抑制すると (mino-3d)、MeHg^{low} による PI シグナルは減弱した (図 13)。これらは、MeHg^{low} に曝露された際に、ミクログリアはその初期には神経細胞に対して保護的に働くこと、しかし一定期間曝露された後には、むしろ神経細胞傷害性なフェノタイプにシフトする可能性が示唆された。

以上、ミクログリアは MeHg^{low} に曝露された際に、二面性の応答 (神経細胞保護と傷害性) を呈することが明らかとなった。このようなミクログリアのフェノタイプの変化が、MeHg^{low} 負荷に対する脳の傷害性を規定する重要な因子である可能性が示唆された。

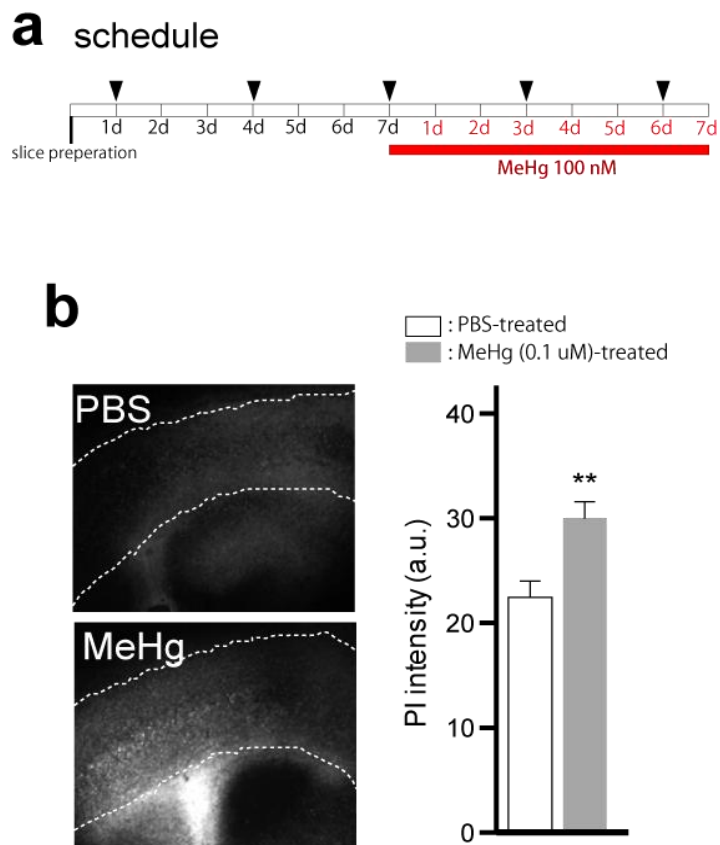


図 12 MeHg^{low} 長期投与における PI シグナル
a. 実験スケジュール。大脳皮質スライス標本作製 7 日目から、MeHg^{low} を添加した。
b. MeHg^{low} 投与 7 日目における大脳皮質スライスの PI シグナルの代表例。PBS 群にと比べ、有意に PI シグナルの亢進が認められた。n = 10. **p<0.01 vs PBS.

V. 結論

大脳皮質スライス培養系を用いて MeHg の曝露量が神経細胞に与える影響を評価する系を構築した。また、低濃度 MeHg (100 nM) (MeHg^{low}) の曝露時間が神経細胞に与える影響を、特にグリア、特にミクログリアのフェノタイプ変化の視点から、解析した。

1. MeHg^{low} の急性期モデルでは、MeHg^{low} 単独では傷害性が認められないこと、またミクログリアの機能を阻害すると傷害が誘発されることが明らかとなった。各種遺伝子改変動物の大脳皮質を用いた実験より、ミクログリアが MeHg^{low} を感知して、VNUT 依存的に

ATP を放出すること、ATP を P2Y1R で感知したアストロサイトが IL-6 を産生・放出することにより神経細胞に対する保護作用を呈している可能性が強く示唆された。これらは、神経・グリア細胞分散培養系を用いてこれまで得られた結果とよく一致していた。

2. MeHg^{low} の慢性期モデルでは、MeHg^{low} 単独の負荷で傷害が惹起された (7日以降)。時間経過と共に、グリア細胞性の炎症応答が亢進すること、さらに細胞保護因子が低下することから、慢性期モデルでは急性期にはグリア細胞のフェノタイプが変化することにより神経細胞の傷害が惹起される可能性が示唆された。

3. ミクログリアを抑制するタイミングを変化させることにより、MeHg^{low} の急性期及び慢性期モデルにおけるミクログリアの役割を解析し、慢性期モデルにおいて MeHg^{low} 負荷により惹起される神経細胞傷害におけるミクログリア依存性を明らかとした。ミクログリアは、急性期には神経細胞保護的に、慢性期には細胞傷害的に機能していることが明らかとなった。この様なミクログリアのフェノタイプモーダルシフトが起きる分子メカニズムは不明のままである。

4. 以上、ミクログリアが MeHg^{low} 曝露量に応じてそのフェノタイプを変化させる二面性を有していること、さらにこのフェノタイプの変化が神経細胞の傷害性と強く関連していることが明らかとなった。

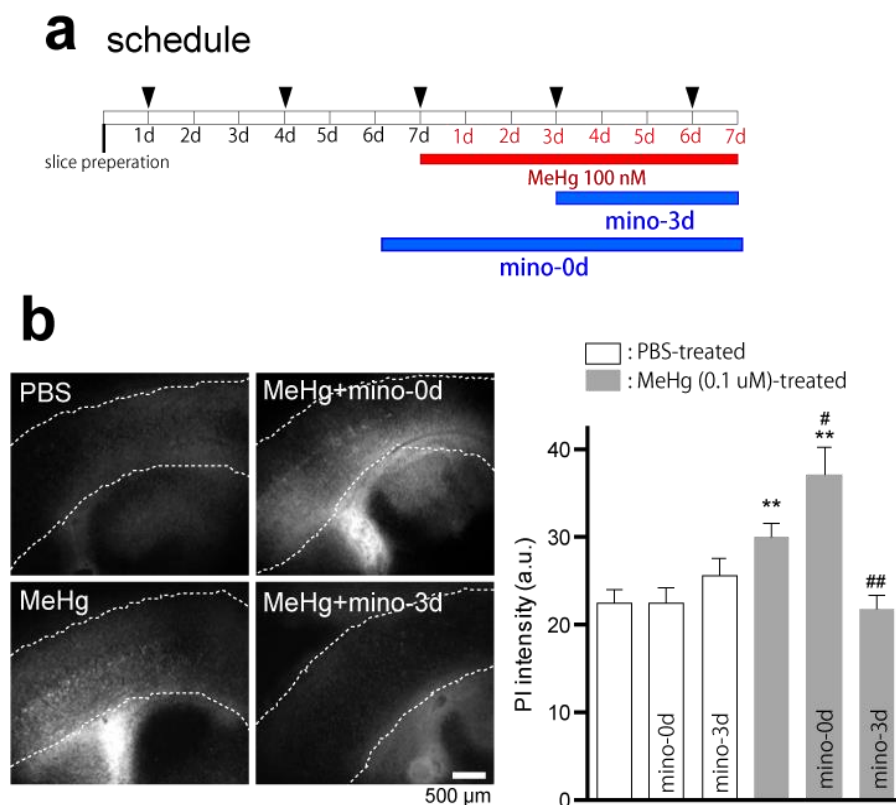


図 13 MeHg^{low} 長期負荷による傷害に対するミクログリアの関与

A. タイムスケジュール。B. MeHg 無添加 (control) の 1 週間後の海馬スライス培養標本の PI 染色像。典型的な 8 スライス標本の例を示した。C. 低濃度 MeHg (0.1 μ M) 添加 1 週間後の海馬スライス培養標本の PI 染色像。典型的な 8 スライスの例を示した。

VI. 今後の課題

1. ミクログリアのフェノタイプが変化する分子メカニズムを解明する。
2. 慢性モデルの改良を行う（もっと長期間の作用を解析する）。
3. 慢性期モデルにおけるアストロサイトの機能変化、さらにミクログリア-アストロサイト関連の機能変化と神経細胞傷害の関連性を解明する。

<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. Noguchi, Y., *et al.* Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLoS One* **8**, e57898 (2013).
4. Imura, Y., *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**, 1320-1330 (2013).
5. Lapham, L.W., *et al.* An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology* **16**, 689-704. (1995).
6. Charleston, J.S., *et al.* Increases in the number of reactive glia in the visual cortex of Macaca fascicularis following subclinical long-term methyl mercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **129**, 196-206 (1994).

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）>

28. Shinozaki, Y., Nomura, M., Iwatsuki, K., Moriyama, Y., Gachet, C., Moriyama, Y. and *Koizumi, S. (2014) Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. **Scientific Reports**, in press
27. Inoue, K., Komatsu, R., Imura, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Moriyama, Y. and *Koizumi, S. (2013) Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, in press.
26. Imura, Y., Morizawa, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Moriyama, Y. and *Koizumi S. (2013) Microglia release ATP by exocytosis. **Glia**, 61, 1320-1330.
25. Chin Y, Kishi, M., Sekino, M., Nakajo, F., Abe, Y., Terazono, Y., Kato, F., Koizumi, S., Gachet, C. and Hisatsune, T. (2013) Involvement of glial P2Y1 receptors in cognitive deficit after focal cerebral stroke in a rodent model. **J. Neuroinflamm**, 10, 95. (doi: 10.1186/1742-2094-10-95)
24. Noguchi, Y., Kayoko, F., Shinozaki, Y., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C. and *Koizumi, S. (2013) Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y1 receptor-mediated pathways. **PLoS One**, 8, e57878.
23. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and *Koizumi, S. (2013) Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of tonic P2Y₁₄ receptor-mediated signal(s). **Cell. Mol. Neurobiol.** 33, 47-58.
22. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2012) Purinergic receptors in microglia -Functional modal shift of microglia mediated by P1 and P2 receptors-. **Glia** 61, 47-54.
21. Suyama, S., Sunabori, T., Kanki, H., Sawamoto, K., Gachet, C., Koizumi, S. and *Okano, H. (2012) Purinergic signaling promotes proliferation of the adult mouse subventricular zone cells. **J. Neurosci.**

- 32, 9238-9247.
- 20 Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S. and Koizumi, S. (2012) Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. **Cell. Mol. Neurobiol.** 32, 953-956.
 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 Ca²⁺ 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 Ca²⁺ 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 P2X₄ 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 P2Y₆ receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis, **Nature** 2007; 446:1091-1095.

<学会発表>

3. Shinozaki, Y. and Koizumi, S. Microglia trigger astrocytes-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission、日本薬理学会、2014年、3月、仙台（発表予定）
2. Shinozaki, Y. and Koizumi, S. Microglia-derived ATP triggers astrocytic P2Y₁ receptor-mediated IL-6 production and neuroprotection. 日本薬理学会、2013年3月、福岡
1. Shinozaki, Y., Noguchi, Y., Imura, Y., Morizawa, Y., Hirayama, Y., Komatsu, R., Shibata, K., Fujishita, K. and Koizumi, S. Methylmercury-evoked release of ATP from microglia increases IL-6 production from astrocytes via P2Y₁ receptor activation. 日本薬理学会、2012年3月、京都

Effects of low concentration of methylmercury on glial cells

Schuichi Koizumi, Youichi Shinozaki

Department of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

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

Abstract

Glia functions as a high-sensitive sensor to monitor changes in brain microenvironment and, is changed into various phenotypes. Thus, these changes affect brain functions. However, effects of chemicals or other hazardous environmental molecules including methylmercury (MeHg) on glial functions/dysfunctions remain largely unknown. Microglia are highly sensitive to even small changes in the brain environment, such as invasion of non-hazardous toxicants or the presymptomatic state of diseases. However, the physiological or pathophysiological consequences of their responses remain unknown. Here, we report that cultured microglia sense low concentrations of the neurotoxicant methylmercury (MeHg^{low}) and provide neuroprotection against MeHg, for which astrocytes are also required. When exposed to MeHg^{low}, microglia exocytosed ATP via p38 MAPK- and vesicular nucleotide transporter (VNUT)-dependent mechanisms. Astrocytes responded to the microglia-derived ATP via P2Y₁ receptors and released interleukin-6 (IL-6), thereby protecting neurons against MeHg^{low}. These neuroprotective actions were also observed in organotypic hippocampal slices from wild-type mice, but not in slices prepared from VNUT knockout or P2Y₁ receptor knockout mice. These findings suggest that microglia sense and respond to even non-hazardous toxicants such as MeHg^{low} and change their phenotype into a neuroprotective one, for which astrocytic support is required.

IV メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

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（八戸学院大学人間健康学部・教授/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）
龍田 希（東北大学大学院医学系研究科発達環境医学・助教）
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）
岩井美幸（東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学・特別研究員）
柳沼 梢（尚綱学院大学総合人間科学部健康栄養学科・講師）
坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学研究部・部長）

研究要旨

水俣病が発生してから半世紀以上経過し、日本での高濃度メチル水銀汚染はもはやないものの、自然界および産業界から依然として水銀は排出されており、胎児や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、モンゴル・アジア、アフリカなどの発展途上国における、特に金採掘に伴う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および水銀由来の健康障害に関する、主に疫学研究の文献レビューをおこなった。

今年度の文献レビューにより、以下のことが示された。①2008年以降、メチル水銀を扱った論文の中で疫学研究の割合は減少傾向にあったが、2013年はこの種の研究が激減した。②2009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10月10日に熊本で「水銀に関する水俣条約」が採択、署名された。③2013年のメチル水銀の疫学研究は、先進国の曝露レベルが低くなっているためか、斬新な研究成果は今期報告されなかった。④わが国で環境省がおこなっている「エコチル調査」とともに、世界で同様の出生コホート研究がおこなわれており、この中で新たなメチル水銀に関連する研究報告が今後現れる可能性がある。⑤メチル水銀の毒性に対しセレンが拮抗作用を持つことが知られているが、ゼブラフィッシュ胚実験でセレノネインがメチル水銀の脱メチル化を促進することが実証され、またラットで自然界由来のセレノメチオニンが脳内の神経細胞死を直接防御することが示された。⑥小規模金精錬や水銀鉱山で働く人々およびその作業現場近くの地域に住む人々の健康問題が懸念される。

以上より、今後とも継続的な文献収集とその分析を続けていくことが、メチル水銀および水銀による健康影響を明らかにするとともに、発展途上国の問題解決策の鍵となると考えられた。

キーワード： メチル水銀、水銀、セレン、低濃度曝露、発展途上国、エコチル調査

I. 研究目的

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た日本はこれまで様々な情報を発信してきた。近年は、開発途上国における金採掘に伴う水銀汚染が問題となっている。このため、胎児期の低濃度曝露、成人期の低濃度曝露、途上国での水銀汚染の実態など国際的なメチル水銀／水銀曝露による健康被害（症候・症状、検査測定結果）に関して文献レビューを行い、日本での健康被害との比較や、日本がおこなうべき情報の発信、国際協力のあり方について検討することを目的とする。

本研究は、経年的に文献レビューすることにより、世界のメチル水銀／金属水銀の健康影響に関する研究の動向を探り、世界で現時点に求められているメチル水銀研究の存在意義を明らかにするものである。特に、低濃度のメチル水銀毒性は、メチル水銀以外の各種物質（セレン、鉛、多価不飽和脂肪酸など）によってメチル水銀固有の健康影響が攪乱され、検出され難くなること近年明らかになった。これを受けて、各々の研究の批判的吟味に際して、交絡因子や共変量をどの程度考慮しているのか、また曝露指標としてどのような生体試料を用いているのか等々に至るまで検討する予定である。さらに、これらの成果は環境省エコチル調査などにおける詳細調査（特に、メチル水銀の健康影響評価が行われる場合）においても大いに参考になると考える。

新たな多数の化学物質が新規に届出されている中において、本邦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毎に減少している。したがって、若い研究者にメチル水銀中毒の問題を再認識してもらい、同時にこの研究の重要性について、雑誌、学会等の場において発表・講演することにより、広く情報発信する。

本年度は、①メチル水銀および水銀に関する疫学研究論文の最近の推移を示すとともに、②2013年に発表された海外と我が国の疫学研究論文の概要、③メチル水銀とセレンの相互作用に関する論文の概要、④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、今後のメチル水銀研究の方向性を探った。

II. 研究方法

国際的な文献データベース Medline (PubMed) を用いて、2013年までに報告された①ヒトへのメチル水銀の曝露評価、②ヒトへの低濃度メチル水銀曝露に関するリスク評価、③途上国での水銀汚染の実態など国際的なメチル水銀曝露による健康被害に関して文献レビューをおこなった。

（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。

III. 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 key word となっている総論文数を 2002 年から 2013 年までを

PubMed を用いて検索すると、126 編～335 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 119 編であった (下表)。2002～2004 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 年以降低調になった。特に 2010 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ないし横ばい状態である。同様に、水銀 (mercury) を keyword とする論文も、2005 年以降ヒトを扱った論文数の割合が減少傾向にあり、2012、2013 年に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となった。2010 年の増加は 2009 年の減少分が上乗せされた形に見える。なお、2013 年分については、PubMed への掲載が遅れている雑誌もありうるので、集計途上の暫定的数値である。

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 1998～2000 年にあり¹⁻⁶⁾、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多数報告された。また、同時期の 2002 年に New England Journal of Medicine 誌上でメチル水銀の冠動脈疾患リスクに関連する論争が始まり⁷⁻⁹⁾、メチル水銀の問題が世間を騒がせた。混迷の続く中、2008 年にセイシェル小児発達栄養研究の成果が発表された^{10, 11)}。これにより、フェロー諸島とセイシェルのメチル水銀論争に終止符が打たれ、メチル水銀に関する関心が薄れてきたように思われる¹²⁾。換言すれば、疫学研究で検証できる主要仮説が 1 つ減り、新たな研究仮説を樹立する途上期に突入したようにもみえる¹³⁾。ただ、ヒトにおけるメチル水銀・水銀の心血管系への影響や細胞・遺伝毒性の機序などについては明確な説明がされていないことから、今後、この領域で斬新な研究仮説が立てられ、検証されなくてはならない。

「メチル水銀」関連の PubMed 上の論文数の推移

	西 暦 年											
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
“methylmercury” の 入った論文数	126	144	162	206	231	300	299	257	290	335	332	270
ヒトを対象とした 論文数	55	60	74	67	75	107	110	85	113	115	119	56
割合 (%)	43.7	41.7	45.7	32.5	32.5	35.7	36.8	33.1	39.0	34.3	35.8	20.7
“mercury” の入っ た論文数	934	898	983	1240	1327	1422	1499	1436	1564	1733	1758	1627
ヒトを対象とした 論文数	366	361	374	398	440	455	499	435	504	528	505	272
割合 (%)	39.2	40.2	38.0	32.1	33.2	32.0	33.3	30.3	32.2	30.5	28.7	16.7

2) 水銀条約

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 10 月 10 日に熊本で「水銀に関する水俣条約」が採択・署名された^{14,15)}。この前文では、①水銀のリスクに対する認識や国際的な水銀対策の推進と必要性、水銀対策を進める際の基本的な考え方を記載し、②水俣病の教訓として水銀汚染による人の健康および環境への深刻な影響、水銀の適切な管理の

確保の必要性および同様の公害の再発防止を謳い、③汚染者負担原則および予防的アプローチを宣言したりオ原則を記している。この条約の意義は、①先進国と途上国が協力して、水銀の供給、使用、排出、廃棄等の各段階で総合的な対策を世界的に取り組むことにより、水銀の人為的な排出を削減し、越境汚染をはじめとする地球規模の水銀汚染の防止を目指しており、②世界最大の水銀利用・排出国である中国や、化学物質や廃棄物に関する条約をこれまで批准していない米国も積極的に交渉に参加し、このように多くの国の参加を確保しつつ、その中で水銀のリスクを最大限削減できる内容の条約に合意できた、③“Minamata Convention”の命名は、水俣病と同様の健康被害や環境破壊を繰り返してはならないとの決意と、こうした問題に直面している国々の関係者が対策に取り組む意志を世界で共有する意味で有意義であり、また、水俣病の教訓や経験を世界に伝えるとともに、今の水俣市の姿を国内外にアピールした。なお、この条約の発効は50カ国が批准してから90日後とされており、その時期は2016年頃と予想されている。

3) メチル水銀に関するコホート研究の国際動向

フェロー諸島とセイシェル共和国で行われたメチル水銀の胎児期曝露に関する先行研究は、2008年のセイシェル小児発達栄養研究の報告により、メチル水銀の発達神経影響はn-3多価不飽和脂肪酸(PUFA)の影響を考慮すると存在するとの結論を得て、当初の役目は終わった。その後、2つの先行研究は方向を転換し、各々独自の研究をおこなっているように思える。

■ 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、フェロー出生コホート研究を通して、メチル水銀の胎児期曝露による小児神経発達影響について多数報告してきたが、近年は有機フッ素系化合物(perfluorinated compounds)^{16,17}、ポリ塩化ビフェニル(PCB)^{18,19}、等の環境化学物質の曝露影響や精液や生殖ホルモン²⁰)に研究テーマを移行している。メチル水銀の神経生理学的影響として、これまでに聴性脳幹誘発電位や心電図RR間隔変動解析の結果が出ていたが²¹⁻²⁴、7歳児で測定した視覚誘発電位の結果が報告された。1994~95年に集めた出生コホートIIの182名であるが、視覚誘発電位が測定できたのはそのうちの139名で、重回帰モデルを用いた解析により、出産後の母親毛髪水銀濃度の増加に伴い、視覚誘発電位のN145潜時が有意に延長することが示された²⁵。これまでの出生コホートIの1,022名(1986~87年に登録)では視神経機能に影響すると考えられているPUFAが測定されていなかったが、出生コホートIIでは測定された。この結果、PUFAの調整を施すと、有意な関連が認められたものである。このように、低濃度メチル水銀曝露の影響を評価するには重要な交絡因子(ないし共変量)を測定し忘れないようにすることが重要となる。

この他、メチル水銀ではなく、PCBやジクロロジフェニルジクロロエチレン(DDE)と肥満発達に関する研究では、過体重の母親を持つフェロー諸島5~7歳女児では、PCBやDDEが肥満指数(BMI)と関連するが、男児ではこのような関連は認められないという論文やフェロー諸島男性(22~27歳)で精子濃度やテストステロンを生成するライディッヒ細胞能力がデンマーク人よりも低下していたと報告した¹⁸。

■ セイシェル小児発達研究からの発信

セイシエルの小児発達研究(Seychelles child development study)および小児発達栄養研究(Seychelles Child Development and Nutrition Study)の成果として4編の論文が発表されている。こ

これらのうちメチル水銀ないし水銀に関連するのは以下の3編であった。

自閉症スペクトル障害 (ASD) と水銀曝露との関連は現在においても懸念されている。そこで、セイシェル小児発達研究のコホート 1,784 名を対象に、Social Communication Questionnaire を行い²⁶⁾、さらにそのうちの 537 名については、10 歳の時に Social Responsiveness Scale を学校教員に依頼した。この対象の出産時母親の毛髪水銀濃度は平均 6.7 (標準偏差 4.4) $\mu\text{g/g}$ であり、Social Responsiveness Scale の得点は 57.6 (標準偏差 26.8) であった。子どもの性別や、母子の年齢を考慮して線形および非線形回帰分析をおこなっても、毛髪水銀濃度と ASD の間には有意な関連が認められなかった。したがって、ASD 表現型の行動に対して、メチル水銀は重要であるとは考えられないと結論した。但し、この解析ではセレンや PUFA などの影響を考慮していない。

セイシェル小児発達栄養研究の 5 歳児コホート 236 名において、出産時母親毛髪水銀濃度、母親の PUFA、Hollingshead 社会経済指標、性・年齢などを調整した後、母親の歯アマルガム装着数 (金属水銀曝露) と小児神経発達検査結果との関連を調べた²⁷⁾。しかしながら、胎児期の金属水銀曝露と小児神経発達検査成績との関連は認められなかった。

セイシェル小児発達研究の 19 歳児コホート 533 名において、各種神経行動学的検査をおこなった²⁸⁾。出産時母親毛髪水銀濃度 (平均 6.9 $\mu\text{g/g}$) の他に、19 歳児の毛髪水銀濃度 (平均 10.3 $\mu\text{g/g}$) や PUFA 濃度を調べ、神経発達に及ぼす影響を検討した。19 歳児の男子の毛髪水銀濃度 12.5 $\mu\text{g/g}$ は女子の 8.7 $\mu\text{g/g}$ と比べて高かったが、ドコサヘキサエン酸 (DHA) とエイコサペンタエン酸 (EPA) は男女平均で 0.04 mg/ml であり、男女差はなかった。19 歳児毛髪水銀濃度は、(男性ではなく) 女性でフィンガータッピング得点と負の関連を、また男女全体で Kaufman 簡易知能検査 (K-BIT) と負の関連を示した。しかしながら、出産時母親毛髪水銀は 19 歳児の子どもの神経行動学的検査には影響を及ぼさなかった。

■ 世界の環境保健領域の出生コホート研究の中のメチル水銀関連論文

環境要因 (特に化学物質) が子どもの健康に与える影響を明らかにする試みが世界中で行われており²⁹⁾、これらから得られる証拠を各国政府および関連機関がリスク管理に反映しようと考えている。わが国では、子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査) が環境省が実施する国家プロジェクトとして行われており、全国 10 万人の出生コホートを平成 26 年 3 月末までにリクルートする予定である。調査期間は 21 年間 (リクルート 3 年、追跡 13 年、解析 5 年) であり、期待される成果として、①子どもの健康に影響を与える環境要因の解明、②子どもの脆弱性を考慮したリスク管理体制の構築、③次世代の子どもが健やかに育つ環境の実現、④国際競争と国益を挙げている。本調査では、出生時のメチル水銀、鉛、カドミウム、ヒ素、セレン、ダイオキシン類、PCB などの有害化学物質の他、PUFA なども測定されることになっており、メチル水銀に交絡する要因も含まれている。気懸かりな点としては、精神神経発達の評価をどのようにおこなうのかについて必ずしも明確に定まっていないことである。

この他、環境保健領域の出生コホート研究をおこなっているのは米国チルドレンズ・スタディ、ボストン出生コホート研究、オスウィーゴ新生児・幼児発達プロジェクト、ロチェスター長期鉛研究、クリーブランド・コホート、ノースカロライナコホート、ミシガン・コホート (米国)、メキシコシティ前向き鉛研究、ノルウェー母と子のコホート研究、デンマーク国家出生コホート、ドイツコホート、オランダ PCB・ダイオキシン研究、ポートペリー・コホート (オーストラリ

ア)、ニュージーランド研究、クライストチャーチ健康と発達研究 (ニュージーランド)、韓国母体コホート調査などであり、これらの中でメチル水銀曝露の健康影響について検討している研究を当研究で今後レビューする予定である。

さらに近年、International Childhood Cancer Cohort Consortium (I4C) が、小児期および成人以後の癌リスクに関連する各種修飾要因および遺伝要因を個々人の生体試料データを用いて調べる大規模国際前向きコホート研究をおこなっており、特に小児癌および他の疾患に影響する胎児期および幼少期曝露の役割について解明しようと計画している。これには Murdoch Children's Research Institute (オーストラリア)、Boldrini's Children Center (ブラジル)、University of Copenhagen (デンマーク)、Statens Serum Institut (デンマーク)、IARC (UN/WHO)、Inserm (フランス)、Hadassah Medical Organization (イスラエル)、Michson Foundation (ナイジェリア)、Norwegian Institute of Public Health (ノルウェー)、Oslo University Hospital (ノルウェー)、Centre for Research in Environmental Epidemiology (スペイン)、Institute of Child Health, University College London (英国)、Circle Solutions, Inc. (米国)、National Institute of Health (米国)、University of California, Berkeley (米国)、National Cancer Institute (米国) などが参加しており、日本のエコチル調査もその参加を含めて動向に注目している。

4) 日本から発信しているヒト水銀研究の概要

■ わが国の出生コホート研究

日本の主たる出生コホート研究は「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」と「東北コホート調査」であり、両者とも現在進行形の中で毎年研究発表をおこなっている。環境と子どもの健康に関する北海道スタディは札幌市内の1産院コホート(対象者514名)と、北海道全域での大規模コホート(妊婦20,000名)の2つからなり、前者は母体血、臍帯血、毛髪、母乳のダイオキシン類、有機フッ素系化合物、水銀等の化学物質による小児の出生時体格、神経発達、アレルギー疾患などの健康影響を詳細に検討する目的で2002年に開始され、後者は先天異常発生と化学物質曝露の因果関係、化学物質代謝酵素等の遺伝子多型に基づく個人感受性素因の相違と先天異常との関連を解明する目的で2003年に立ち上げられた。2013年の研究成果では、コホートの妊婦150名から2003~2011年に採取された血漿中有機フッ素系化合物の値が雑誌に掲載された³⁰⁾。これらの対象者の年齢および出産回数を調整した perfluorooctanoic acid (PFOA) および perfluorooctane sulfate (PFOS) 濃度は各々1.35 ng/ml と 3.86 ng/ml であり、米国1999-2000年および2003-2004年国民健康栄養調査研究 (NHANES) の対象者1,076名と比べて半分以下の低い濃度であり³¹⁾、しかも国内の21-63歳男性35名のPFOAおよびPFOSより若干低目であった³²⁾。

	Perfluorooctanoate (PFOA, ng/mL)		Perfluorooctane sulfonate (PFOS, ng/mL)	
秋田 (平均39歳男性)	中央値 2.32	95%CI, 1.06~5.07	中央値 7.03	95%CI, 3.34~37.15
北海道 (平均31歳女性)	中央値 1.30	Interquartile, 0.8~1.7	中央値 5.20	Interquartile, 3.4~7.2
米国 (平均40歳男女)	平均 4.54		平均 24.7	

東北コホート調査は難分解性環境汚染物質 (POPs) およびメチル水銀による胎児~新生児期曝露と児の成長・発達との関連性を明らかにするために計画され、2001年より登録を開始した。2013年には、このコホートのうち7歳児で母乳保育と家庭内測定血圧と水銀血圧測定のデータが解析

され、母乳保育は血圧上昇に保護的に働くことを見出したが³³⁾、有害環境化学物質曝露との関連については報告がなかった。

■ わが国のメチル水銀に関連する疫学研究

Takaoka らは、1970 年代にカナダの Ontario 州にあるカセイソーダ工場から排出された水銀に汚染された魚を食べていた Grassy Narrows 住民を集め、自覚症状、神経学的所見、体性感覚所見を 2010 年に調べた³⁴⁾。対象は、カナダ人若年者 36 名 (16~45、平均 34.4 歳)、カナダ人中高年者 44 歳 (46~76、平均 57.5 歳)、日本人メチル水銀曝露者 88 名 (平均 59 歳)、日本人対照者 164 名 (平均 58 歳) で比較すると、最小触覚閾値、振動覚閾値、位置覚閾値、2 点識別閾で有意な差が認められた。概して、カナダ人中高年者、日本人曝露者、カナダ人若年者は日本人対照者よりも悪かった。また、カナダ Grassy Narrows 住民の臨床症状は日本の水俣病の記録と同じであるように見えたが、この研究では水銀曝露レベルに相当するデータは一切含まれていなかった。

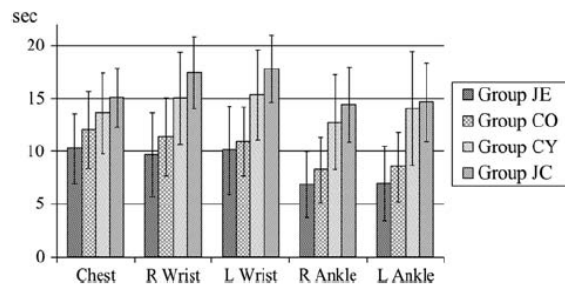


Fig. 2. Threshold for vibration sense – group comparisons. JC, JE: $p < 0.01$ (all locations), JC, CO: $p < 0.01$ (all locations), JC, CY: $p < 0.01$ (bilateral wrist), $p < 0.05$ (chest and R ankle), n.s. (L ankle), JE, CO: $p < 0.01$ (chest), n.s. (L wrist), $p < 0.05$ (other locations), JE, CY: $p < 0.01$ (all locations), and CO, CY: n.s. (chest), $p < 0.01$ (all other locations).

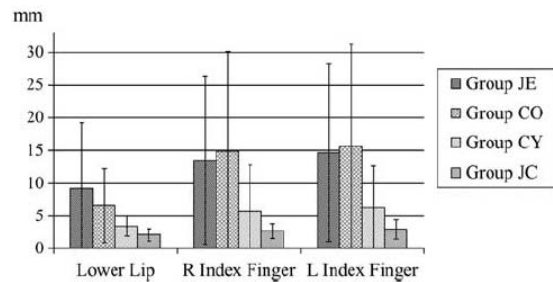


Fig. 4. Threshold for two-point discrimination – group comparisons. JC, JE: $p < 0.01$ (all locations), JC, CO: $p < 0.01$ (all locations), JC, CY: $p < 0.05$ (R index finger), $p < 0.01$ (other locations), JE, CO: $p < 0.05$ (lower lip), n.s. (other locations), JE, CY: $p < 0.01$ (all locations), and CO, CY: $p < 0.01$ (all locations).

胎児は母親が曝露された有害環境汚染物質に経胎盤的に曝露を受ける。Sakamoto らは胎盤と臍帯組織中の元素とその意義に関して、母体血赤血球と臍帯血赤血球元素と併せて検討した³⁵⁾。福岡の産婦人科で出産時に集めた 48 母子の胎盤絨毛部と臍帯組織 (これらは凍結乾燥した)、母体血および臍帯血を採取し、必須元素として銅、亜鉛、セレン、有害金属として総水銀、無機水銀、鉛、カドミウムを測定した。メチル水銀を除き、全ての金属濃度は臍帯組織と比べて胎盤の値が有意に高かった。特に、カドミウム濃度は臍帯組織よりも 59 倍も胎盤で高く、次で無機水銀濃度が 2.4 倍高かった。このことはカドミウムの胎児への移行に対して胎盤が強力なバリアとしての役目があると考えられた。他の金属と異なり、メチル水銀濃度は胎盤より 1.6 倍も臍帯組織で高く、メチル水銀は胎盤で能動輸送されることが示唆された。胎盤中メチル水銀は母体血および臍帯血の赤血球中総水銀と有意に高い相関を示した (順位相関係数 r_s は各々 0.80 と 0.91)。臍帯組織中メチル水銀も母体血および臍帯血赤血球中総水銀と高い相関関係があった (各々 $r_s=0.75$ と 0.85)。以上より、胎盤も臍帯組織も母体および胎児のメチル水銀曝露を予測するのに有用であると考えられた。また、胎盤中セレン濃度は母体および臍帯赤血球中濃度と有意な相関を保っていた (各々 $r_s=0.38$ と 0.57)。胎盤および臍帯組織の鉛、亜鉛、銅濃度は母体血あるいは臍帯血赤血球中濃度と有意な関連を示さなかったが、カドミウムは母体血赤血球中濃度と弱い有意な相関があった ($r_s=0.41$)。これより、妊娠中の母体のカドミウム曝露を予測するのに有用であると考えられた。

1950 年代に水俣で起こった大規模メチル水銀中毒 (水俣病) の病気の診断基準は現在も変わらぬままであり、その診断基準の鑑別診断に係る正確度を検討した研究は殆どない。Yorifuji らは、1971 (昭和 46) 年に熊本大学医学部神経精神科教室がおこなった地域調査³⁶⁾のうちの高曝露地域

の水俣地区住民（当時未認定であった10歳以上の779名）と低曝露地域の有明地区住民（当時10歳以上の755名）を選択し、メチル水銀中毒の神経症候（四肢末端の知覚障害、口周囲の知覚障害、全身の知覚障害、失調、構音障害、振戦、病的反射、視野狭窄、難聴）の有病率とその基準の妥当性を検討した³⁷⁾。性・年齢を考慮しても、全ての神経症候の有病率は水俣地区住民の方が有明地区住民よりも有意に高かった。水俣地区住民で「四肢末端知覚障害」を有する人は206名（26.4%）いたが、1977年の認定基準を適用して水俣病と判定されるのは136名（66.0%）であった。すなわち「四肢末端知覚障害」があっても、それを含む幾つかの症候の組合せで診断した1977年の認定基準は、水俣病の発症数をかなり低く見積もっていたと、著者らは主張した。もっとも、患者が「四肢末端知覚障害」症候を訴えた時にそれを客観的に証明する方法が明確でなく、かつメチル水銀の曝露評価もなかったため、測定 of 正確度を検討したことになる。

この他に、メチル水銀および水銀毒性に関する総説ないし水俣病について概説した書物が2013年に出版された³⁸⁻⁴¹⁾。このうち、「水俣（水銀）条約に係る現状と課題」を特集とする雑誌に坂本らの総説が掲載された³⁸⁾。水銀は常温で唯一液体の金属で、古くから多くの用途に使われてきたが、水銀の使用に伴う危険性が人や野生動物において明らかになった。その最も大きな健康被害が水俣病である。そのうえで、過去の水銀汚染例、化学形態別水銀の毒性や生体内代謝、メチル水銀の生体濃縮や胎児移行性、低濃度メチル水銀の胎児影響について概説されている。

■ わが国のメチル水銀に関連する動物実験等の論文

動物実験ないし細胞等を用いた実験研究としてPubMedで検索された論文は11編あった⁴²⁻⁵²⁾。これらのうち、幾つかはメチル水銀とセレンの相互関係を検討したものであった。したがって、セレンと関係の深い論文は次章（水銀とセレンの関係）の中で詳述する。

5) 水銀とセレンの関係

メチル水銀とセレンおよびセレン化合物との相互作用や毒性修飾影響に関する新たな知見を調べるため、PubMedを用いて“methylmercury”と“selenium”2つのkey wordsで検索された2013年発行の原著論文をレビューした。

■ 疫学的研究—高血圧、糖尿病、インフルエンザ

Parkらは2003~2006年にかけて行われた米国の大規模疫学研究NHANES（National Health and Nutrition Examination Survey）の一環として、成人6,607名の血中および尿中水銀濃度と高血圧に関するかについて横断的調査をおこなった⁵³⁾。血・尿中水銀濃度は40歳以上の成人2,201名、血清セレン濃度は2,117名について分析し、食事調査（24時間思い出し法）によりPUFAであるn-3脂肪酸の平均摂取値を算出した。血中総水銀濃度の幾何平均値は1.03 µg/L、尿中水銀濃度は0.51 µg/Lであり、対象者のうち高血圧の者（降圧剤服用者または収縮期血圧140 mmHgまたは拡張期血圧90 mmHg以上であった）は32.2%であった。高血圧の調整オッズ比は、年齢、性、人種、学歴、BMI、飲酒習慣、血中コチニン濃度を調整因子とした場合、血中水銀濃度が2倍に増加すると0.94（95%信頼区間（CI）、0.87 - 1.01）、尿中水銀が2倍になると0.87（同、0.78 - 0.99）となった。さらに調整因子として血清セレン濃度やn-3 PUFAを考慮しても結果は変わらなかった。尿中水銀濃度と高血圧罹患には負の相関関係がある可能性が示されたとしている。なお昨年、Mozaffarianらは米国人6,045名の足爪中水銀濃度を分析し、前向きコホート調査では水銀の曝露

増加による高血圧の発症リスクの上昇は認められなかったことを報告している⁵⁴⁾。

魚へのメチル水銀投与で腓ランゲルハンス島β細胞が傷害されるという報告があったことから、Heらは成人を対象に糖尿病発症リスクに関する前向きコホート調査を実施した⁵⁵⁾。1987年時点で糖尿病のない20～32歳の3,875名の米国人について、足爪中の各種元素を中性子放射化分析法により測定し、2005年まで6回追跡調査をおこなった。18年間の追跡で288名の糖尿病発症者が認められ、年齢、性別、人種、教育、喫煙・飲酒習慣、身体活動量、糖尿病の家族歴、n-3脂肪酸とマグネシウム摂取量を調整因子として解析したところ、爪中水銀とセレン濃度は糖尿発症率と正に相関していた。爪水銀濃度分布の四分位で比較すると、最高位群の最低位群に対する糖尿病発症のハザード比は1.65 (95%CI、1.07 - 2.56) であり、1987年に高い水銀曝露が認められた者では、インスリン分泌指数 (β細胞機能の恒常性評価) が低下したことが示された。

新型インフルエンザ A (H1N1) 型は2009年に世界流行を引き起こしたが、Moyaらは肺炎を発症した者で A (H1N1) 型が原因と同定された40名とその対照群 (別型インフルエンザ感染者、肺炎患者) の血中の各種元素濃度を分析した⁵⁶⁾。その結果、新型インフルエンザ群では血中鉛、水銀、カドミウム、クロム、ヒ素濃度が有意に高く、セレンが欠乏傾向にあり、Zn/Cu比が増加していた。抗酸化作用のあるグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の活性化に最適な血中セレン濃度のカットオフ値は12.5 μg/dLであるが、新型インフルエンザ群で血中セレン値12.5 μg/dL以上であった者は、肺炎発症後に回復し死亡には至らなかった。本研究グループは、重症の肺炎患者について引き続きセレン濃度を評価し、治験を実施すると述べている。

■ 疫学的研究—生体・飲食物中の水銀およびセレン濃度の測定・比較検討

欧州では、イタリア人900名、スロヴェニア人584名、クロアチア人234名、ギリシャ人484名の臍帯血と母乳中水銀およびセレン濃度を分析した結果を、Miklavčičらが報告した⁵⁷⁾。毒性金属値が最も高濃度であったのはギリシャ人集団で、中央値は臍帯血中の総水銀が5.8 ng/g、ヒ素が3.3 ng/g、母乳中では総水銀0.6 ng/g、ヒ素が0.8 ng/gであった。セレンはイタリア人で最も高濃度で、臍帯血中の中央値が113 ng/gであった。また水銀、ヒ素、セレン濃度は臍帯血、母乳中とも有意な相関が見られた。総魚摂取頻度との間の相関係数が高かったのは、臍帯血中の総水銀 (Spearman 順位相関係数、 $r_s=0.442$) とヒ素 ($r_s=0.350$) および毛髪中の水銀 ($r_s=0.421$) であった。

Lairdらは、水銀摂取量が多いことが知られているカナダ北極地方に居住するイヌイト人の食事調査を横断的に行い、血中レベルとの関係を調べた⁵⁸⁾。セレン、EPA、DHA摂取量はカナダの食事摂取基準を満たしており、水銀、セレン、EPA、DHA摂取量はそれぞれ、血中の値と相関関係が認められた (順に $r=0.41$ 、 0.44 、 0.32 、 0.28 ; $P<0.001$)。水銀の平均摂取量は7.9 μg/kg 体重/週であり、水銀毒性の基準値 (TRV) 5.0 μg⁵⁹⁾を集団の35%が超過していた。一方、水銀摂取量はセレン、EPA、DHAと高い正相関があり (順に $r=0.92$ 、 0.82 、 0.81)、イヌイト人の伝統的な食生活を制限するにあたっては、利得と損失のバランスを考慮しなければならないと論じている。

Seharらは、パキスタンのカシムアバード地区 (人口約5千人) の飲み水である地下水の水質を、WHOガイドラインに従って検査した⁶⁰⁾。誘導結合プラズマ発光分光装置 (ICP-AES) による分析の結果、鉄が地区内の3箇所、アルミニウムが2箇所、モリブデンが1箇所で水質基準値より高かったほかは、27元素ともガイドライン値以下であり、水銀についても基準値の6 μg/Lの値を超えたところはなかったと報告した。

■ 環境中モニタリング—昆虫・動物

米国のテネシー州では 2008 年 12 月 22 日、化石燃料工場の石炭フライアッシュを含む岩脈が崩落し、米国史上で最悪の石炭灰流出事故が発生した。Otter らが工場付近の川床の沈殿物と、地域に生息するアシナガグモの各種金属濃度を分析したところ、セレンとニッケル濃度が米国環境保護庁 (EPA) の川床残渣物の環境基準値を超えており、曝露地域に生息した蜘蛛のセレン濃度は対照地域の蜘蛛より有意に高濃度であった⁶¹⁾。総水銀に対するメチル水銀の割合はその他の動物と同レベル (65~75%) であったので、汚染物質の水生から陸生動物への移行を追跡する際に、アシナガグモが指標動物の 1 つとして利用できる可能性を提唱した。

Alvarez らは、スペインで 1998 年に発生した鉱山廃滓流出事故後の 1999-2000 年に、スペイン南西部の国立公園 (DNP) 内および近辺に生息する鳥類 11 種の血中水銀、メチル水銀、セレン濃度を分析した⁶²⁾。総水銀濃度は 1~587 ng/mL の範囲で高濃度の汚染は観察されず、マガモを除くと総水銀濃度の 80%以上がメチル水銀であった。水銀濃度の変動要因として最も強い関係が示された因子は、鳥の種類、次に栄養状態、捕獲地域の順であったが、個体の年齢は水銀濃度とは関係しなかった。セレン濃度は 108 - 873 ng/mL の範囲であり、鳥種や栄養状態、捕獲地域とは関連性は認められなかった。血中水銀濃度は、国立公園領域外で生息し、流出事故による汚泥に直接曝露されたと思われる鳥類で高濃度であった。

Cheng らは、中国貴州省の PCB とメチル水銀汚染が危惧される地区の米、卵、魚の総水銀、メチル水銀、セレン、PCB 類を測定し、一日摂取量を推計した⁶³⁾。その結果、メチル水銀と PCB は許容上限値を超えていることがわかった。アヒルの種々の組織中総水銀濃度とセレンは高い相関があり、脳組織では特にセレンと水銀のモル比がほぼ 1 であったことが、セレンの水銀毒性に対する防御機構の存在を裏付けると論じている。また、抗酸化作用のあるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) と GPx 活性はアヒルの脳で高かったが、卵や肝臓組織中の活性は低かったことから、水銀と PCB 類の摂取・蓄積により卵や肝臓ではフリーラジカル、アルキル・フリーラジカル、スーパーオキシドラジカルなどの産生が増加していると推測した。

Xia らは、中国沿岸に生息する 3 種類の魚 (フウセイ、キグチ、マナガツオ) の総水銀、メチル水銀、セレンとその他の金属 (Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb, Sr, Zn) 濃度を分析した⁶⁴⁾。メチル水銀と総水銀濃度は相関しており、その比はキグチで最も高く、一方、魚の組織中の総水銀濃度が高いとセレンは低濃度である傾向にあった。EPA 勧告の人への摂取許容上限値は、どの金属も超えていないことがわかった。

水銀汚染で知られているオーストラリアの河口流域に生息する魚中の総水銀、メチル水銀、セレン濃度を Jones らが分析したところ、捕獲場所による濃度変動がみられたが、水銀に対するセレン比はほとんどが 1 以上であった⁶⁵⁾。一地域のみ比が負の値 (水銀過多) を示したが、魚の種類によって汚染された地域にうまく適応している場合もあり、セレンの健康利得値 (health benefit value) は一元的に規定すべきではないと著者らは述べた。

ブルキナ共和国での鉱山業による汚染影響を調べるため、Ouédraogo らは 334 種の魚類と 10 箇所の貯水槽中の水銀、セレン、ヒ素濃度を測定した⁶⁶⁾。魚ではいずれの濃度も許容基準値以下であり、金採掘業による弊害はみられなかった。メチル水銀濃度に関連する因子として、水の温度と伝導性があげられた。貯水槽中の水銀、ヒ素、セレン濃度が高い場所では硫酸塩濃度も高かつ

たため、自然由来ではなく人為的な混入が疑われる。魚中濃度はほかのアフリカ地域での報告値と同じかやや高いレベルであり、野生生物保護のためのメチル水銀環境基準値を魚食動物の70%以上が超過していた。毒性拮抗作用の観点から Se/Hg および As/Se 比を検討すると、83%の魚が食用しても安全であると推計された。

ニュージャージーで捕獲されたムツ科ブルーフィッシュ 40 匹の脳、腎、肝、筋肉、皮膚組織中の水銀とセレン濃度を Burger らが分析すると、可食部筋肉組織中の総水銀濃度は 0.32 ± 0.02 ppm、脳組織では 0.09 ± 0.01 ppm であり、セレンはそれぞれ 0.37 ± 0.03 ppm と 0.36 ± 0.03 ppm であった⁶⁷⁾。腎組織と皮膚のセレンおよび水銀濃度は相関がみられた。水銀は腎で最も高濃度で、脳と皮膚では低かった。セレンも腎で高く、脳と白筋肉組織で最も低かった。筋、腎、皮膚の水銀濃度は体長と正相関しており、セレンでは筋、腎、肝組織で体長と正相関がみられたが、脳組織のセレン濃度のみ体長と逆相関していた。また、筋、腎、肝組織、脳のセレン・水銀モル比は体長と逆相関しており、年齢が高く体長の大きい魚は小さい魚に比べ、水銀毒性への防御機構が十分機能していない可能性があると考えられている。

■ 哺乳小動物におけるセレンと水銀の投与実験

哺乳小動物へのセレンと水銀の投与実験の結果は、国内外で3件発表されている。

Glaser らは、これまでに、メチル水銀 21 日間の経口投与で、マウス的大脑皮質と小脳に毒性発現量のメチル水銀が蓄積されたことを報告したが、今回はセレン有機化合物であるジフェニルジセレニド(PhSe)₂ 5 $\mu\text{mol/kg}$ を投与し、神経毒性が軽減されるかを検討した⁶⁸⁾。マウス的大脑皮質において、神経毒性を評価するため各種影響指標 (ミトコンドリア化合物 I、II、II-III および IV、GPx、GR、TBA-RS、8-OHdG、BDNF) と金属蓄積量を調べたところ、メチル水銀の脳内蓄積とともに、I、II、IV および GPx 活性の低下、GR、TBS-RS、8-OHdG の増加、BDNF 低下などの影響が認められたが、これらはジフェニルセレニドを同時投与することにより抑制されることを報告した。

Sakamoto らは、14 週齢のラットにメチル水銀 8 mg Hg/kg/日およびセレンメチオニン 2 mg Se/kg/日を単独あるいは両方を同時に 10 日間経口摂取させる実験をおこなった⁴²⁾。水銀単独投与群では大脑皮質に神経変性と反応性星状細胞の増加が認められたが、セレン同時投与群ではそれらが抑制された。ラットの脳において、経口摂取されたセレンが直接、脳内でメチル水銀の神経毒性作用を防御したと述べている。

Newland らは妊娠中雌ラットと新生仔マウスに、メチル水銀 0.5 または 5 ppm (水銀曝露量として 40、400 $\mu\text{g/kg}$ 体重/日) 含有の飲水とともに、0.06 または 0.6 ppm のセレン含有の餌を与え、神経行動機能に関する実験をした⁶⁹⁾。投与群として 6 群、すなわち、水銀・セレンの各単独投与群と 2 段階濃度別の両投与群を含め 2×3 の実験群を設定し、母および仔マウスにスキナー箱内の音刺激後レバーを押し下げると砂糖粒 (強化子) が与えられるオペラント条件付けで高頻度レバー押し行動を獲得させ、次にレバー押し頻度低下課題を与えた。その結果、メチル水銀投与群はレバー押し頻度抑制が阻害され、セレン同時投与群でも同様の結果であった。したがって、セレンの投与の有無に拘わらず、メチル水銀曝露により反応抑制機構が障害されることを示唆した。

■ 魚類におけるセレンと水銀の投与実験

セレン添加による影響を淡水魚で調べるため、Mailman らは湖のメソコス装置 (水域の一部

をシートで仕切った隔離水界)に亜セレン酸を濃度 1.6 µg/L となるよう加えた上で、水銀スパイク試験、すなわち安定同位体 ¹⁹⁸Hg を少量添加してどのシグナル強度が変化するかを確かめる試験をおこなった⁷⁰⁾。セレンの添加は、魚筋肉組織中のスパイク水銀濃度や肝臓中総水銀濃度および水中プランクトンのメチル水銀濃度を減少させ、水中食物網の水銀循環にセレンが影響を及ぼすことが示唆された。魚の生殖腺中のセレン濃度は水中セレン濃度と正相関していたが、実験 8 週間後でも生殖毒性を及ぼす濃度には至らなかった。低濃度セレンの添加はメチル水銀の生態系集積を減少させ、魚の生殖腺中セレン濃度を上昇させることがわかった。ただし、水中生態系への長期間のセレン投与は、セレン自体の生殖毒性にも留意して慎重に行わなければならないと考察されている。

Huang らは、シロチョウザメの子ども各群 10 匹にセレノメチオニン 500 µg Se/kg とメチル水銀 850 µg Hg/kg を単独または両方ともに、挿管法により経口摂取させる実験をおこなった⁷¹⁾。血液と尿を挿管の 48 時間後まで採取し、その後屠殺し水銀とセレンの体内分布を調べたところ、セレン・水銀両投与群では血中水銀とセレンおよび組織中セレン濃度が水銀単独投与群に比べ低下した。どの群も Se/Hg 比は組織中で 1 以上になるよう保たれており、セレノメチオニンの追加投与がなくても、腎組織等からのセレンの再分配により脳内のモル比は 1 以上に恒常的に維持されるものと考えられた。

■ *in vivo* 実験からみたセレンと水銀

Truong らは、硫酸還元菌 (*Desulfovibrio desulfuricans*) の培地に硫化物、亜セレン酸、水銀イオンを添加して、嫌氣的条件下で生育の阻害影響を調べた⁷²⁾。2 価水銀イオンの添加により、バクテリアの生育状況に比例して培地中でメチル水銀の産生が増え、添加水銀イオンの 50~80% が金属水銀や硫化水銀の形態に変わった。亜セレン酸の添加では、一部が細胞内にセレンが蓄積したが、最大でも添加セレン量の 49% までにとどまり、無毒化メカニズムの 1 つとして揮発性の高い亜セレン酸ジメチルの形成が考えられた。亜セレン酸と水銀イオンの同時添加でも元素状態のセレンと水銀が生じ、培養上清のセレンが増加していたことから亜セレン酸水銀生成によって細胞内への取り込みが制御されたと思われる。

メチル水銀とセレノシステインをヒト HepG2 細胞に同時添加すると、セレノメチルセレノシステインやセレノメチオニンとメチル水銀を添加した場合よりも水銀毒性は軽減された⁷³⁾。セレノシステインは、抗酸化酵素活性を高めることで活性酸素種 (ROS) の産生を抑制したり、メチル水銀誘発のアポトーシスを遅延させることで水銀毒性を緩和する機序が推測される。

■ セレンおよび水銀の測定法

セレンや水銀形態に関する分析法も年々改良されており、HPLC と ICP-MS を組み合わせることで、メチル水銀、無機水銀、4 価セレンを同時に抽出して分析ができ、検出限界は 110 - 230 ng/L と低く、精度も変動係数 15% 以内と良好で水質やヒト血漿サンプルの分析に適すると報告されている⁷⁴⁾。

分析法の改善化が進み、魚の血中の主な有機セレン化合物が、抗酸化物質のセレノネインであることが最近国内の研究グループにより発見された⁷⁵⁾。水産総合研究センターの Yamashita らは、マグロ血合肉から抽出した有機セレン化合物を、高分解能質量分析と NMR 解析により構造分析し、エルゴチオネインのチオケトン基がセレノケトン基に置換した新規の化合物をセレノネイン

と命名した。本研究グループはさらに、有害化学物質に対する胎児影響のモデル生物であるゼブラフィッシュ胚を用いた実験を行い、セレノネインがメチル水銀の脱メチル化を促進することを実証した⁵¹⁾。セレノネインは酸化ストレス条件下でも細胞増殖能を増強し、ラジカル生成を抑制するなど、動物組織における強力な抗酸化物質であることを示した。

Pedrero らは、カマイルカの肝組織中のメチル水銀分析を行い、約 60%が高分子の水溶性分画に存在したことが判明したため、ICP-MS と ESI-MS により分画中たんぱく質を抽出し、 μ RPLC によりメチル水銀結合部位を調べた⁷⁶⁾。その結果、主な結合部位はヘモグロビン β 鎖上のシステイン残基であり、分解に先立ちメチル水銀が血中から肝臓に輸送される際、ヘモグロビンが主なメチル水銀の結合蛋白であることが示された。セレンの大部分がセレン含有抗酸化物質であるセレノネインとして存在しており、これらが水銀毒性緩和に大きく貢献しているであろうと著者らは述べた。

6) 発展途上国における水銀の健康問題

発展途上国では数百万人が貧困から脱出するため、小規模金鉱山に従事し、水銀による金抽出をおこなっている。その結果、金鉱山周辺では水銀による環境汚染と地域住民への健康影響が拡大している。近年、金抽出に水銀-金アマルガム法の代替法としてシアン化法が用いられているが、シアンによる環境汚染については余り知られていない。一方、中国では水銀鉱山における水銀の生産はその周辺の環境汚染と地域住民への健康影響に加え、土壌の水銀汚染が穀物への無機水銀やメチル水銀の蓄積を引き起こすという、新たな問題となりつつある。

ここでは key words として “mercury gold mining”、“mercury mining” および “mercury cyanide” を入力し、2013 年度に発表された論文を検索した。検索した論文の中から小規模金鉱山や水銀鉱山における採掘に伴う水銀およびシアンによる健康影響および環境汚染に関する内容を紹介する。

■ 金鉱山周辺のシアン化合物の環境および健康影響

小規模金鉱山では金鉱石から金を抽出する方法として水銀アマルガム法やシアン化法が用いられている。南エクアドルの Portovelo-Zaruma 地区の小規模金鉱山では水銀アマルガム法とシアン化法で年間 9~10 トンの金を採取すると同時に 0.65 トンの無機水銀と 6000 トンのシアン化ナトリウムが近くの河川に放出されている。Tarras-Wahlberg らは、この地区を流れる Puyango 川流域の環境影響について報告している⁷⁷⁾。Puyango 川のシアン化合物や金属濃度は水質環境基準を上回り、支流の Calera 川では乾期に遊離シアン 5,200 μ g/L、総シアン 6,300 μ g/L が検出されている。シアン化合物による河川の汚染は微小動物相のトビケラ、カゲロウ、ユスリカの減少を引き起こし、生物多様性に影響を与えている。

Guimaraes らは、Portovelo-Zaruma 地区の河川におけるメチル水銀の生成に対するシアンの長年の影響を調べた⁷⁸⁾。遊離シアンは金採掘場の上流では検出されないが、下流地区では 280 μ g/L と高く、100 km 下流まで検出されている (図 1)。しかも、シアンの 50%が水溶液に溶解し、50%が懸濁物と結合していた。微生物の活性は懸濁物当たりで表した場合、金採掘周辺の流域では低い (図 2)。土砂中の微生物の活性と水銀のメチル化は相関性が認められるが、遊離シアンとは逆であり、金採掘場近郊の下流では微生物の活性は低く、水銀のメチル化は不検出であった。彼らは遊離シアンが微生物の活性阻害と水銀のメチル化阻害を引き起こしていると述べている。

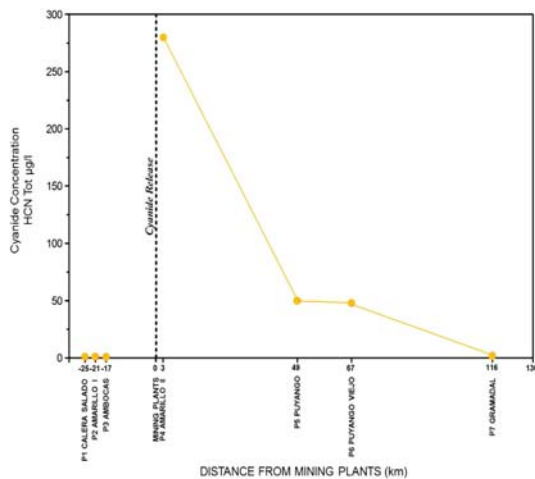


図1 Puyango 川の水質中の総シアン濃度

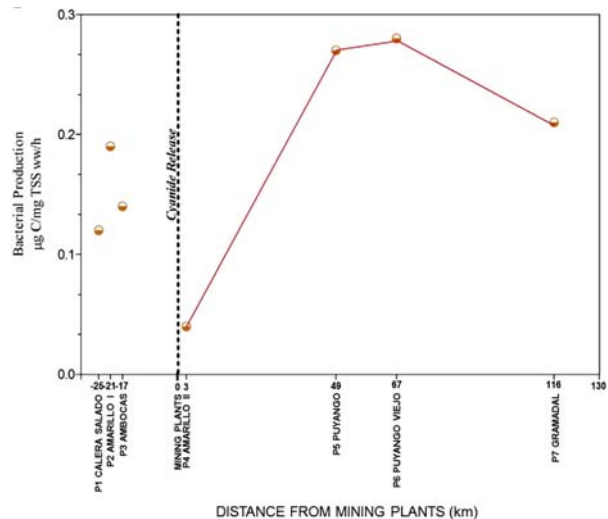


図2 懸濁物の重量当たりで表したときの Puyango 川の微生物活性 (µgC/mg wet weight/h)

ガーナでも金採掘企業の多くがシアン化法に金抽出をおこなっており、廃液にはシアンや種々の毒性化学物質が含まれている。Obiri らは Bogoso Gold 社の近郊住民の表層水や地下水からのシアンの経口および経皮曝露による健康影響評価をおこなった⁷⁹⁾。会社周辺の Bogo 川上流でのシアン化合物の慢性的曝露による住民の非癌健康リスクは、中央傾向曝露 (CTE) 指標において経口曝露で 230、経皮曝露で 43 であった。一方、Bogo 川下流での慢性的曝露による住民の非癌健康リスクは CTE 指標において経口曝露では 0.031、経皮曝露では 0.57 とシアン化合物の毒性に関連した非癌健康リスクは 1 より低く、健康影響は極めて低かった。Bogoso Gold 社の近郊住民は急性シアン化合物曝露による健康リスクが非常に高いことを示すとともにシアン化合物を含む水の偶発的な誤飲や皮膚との接触はこの集団における原因不明の死に関係すると述べた。

Counter らはエクアドルの Nambija および Portovel 金鉱山村落から離れたアンデス山脈の Saraguro 地区と Mestiro 地区の子供 114 人を対象に水銀中毒の有病率を調査した⁸⁰⁾。両地区の 77 名の血液中水銀濃度は平均 18.2 ± 15.5 (範囲、2 - 89) $\mu\text{g/L}$ と Portovel 金鉱山地区 37 名の平均 4.9 ± 2.3 $\mu\text{g/L}$ や対照群 15 名の平均 2.4 ± 1.3 $\mu\text{g/L}$ に比べ高値であった。血液中水銀濃度は Portovel 金鉱山地区の子供と対照群の子供との間を除き、Portovel 金鉱山地区や対照群の子供と Saraguro 地区と Mestiro 地区の子供との間に統計的有意差が認められた。頭痛、記憶喪失、注意力障害、発作などの自覚症状の調査では、Portovel 金鉱山から離れている Mestiro 地区の子供に慢性的な頭痛、眩暈、無気力感、吐き気、胃腸障害が見られた。頭痛の愁訴率は Saraguro 地区では 44% (14 名)、Mestiro 地区では 29% (13 名) そして Portovel 金鉱山地区では 38% (14 名) であった。また Mestiro 地区の子供 5 名 (16%) に眩暈の既往歴があり、その中の 6 歳の男児は一時的失神、記憶喪失ともなう発作の既往歴があった。Saraguro 地区では子供 6 名 (13%)、Portovel 金鉱山地区では子供 9 名 (24%) に眩暈の既往歴があった。さらに 3 地区 12 名の子供 (Saraguro 地区 5 名、Mestiro 地区 3 名、Portovel 金鉱山地区 4 名) にエレチズムの既往歴があり、1 名が自閉症と診断された。8 歳の女兒に痙攣性不全麻痺とバランス問題が見られた。耳鼻科学的異常については Saraguro 地区、Mestiro 地区、Portovel 金鉱山地区の子供 23 名に顎下膨張、扁桃炎、外耳炎、中耳炎、鼓膜硬化、鼓膜陥凹、耳垢などが見られた。特に、血液中水銀濃度が $10 \mu\text{g/L}$ 以下である Portovel 金鉱山地区の子供の耳科

学的異常はこの地域の金採掘に用いられているシアン化ナトリウムによる曝露の影響の可能性を示唆した。

■ 小規模金鉱山周辺の環境汚染と健康影響

小規模金鉱山周辺の植物、土壌、堆積物、河川等の水銀汚染状況が調査されている。Terán-Mitaらは、ボリビア・ラパス地方の2箇所の小規模金鉱山 (Virgen del Rosario と Rayo Rajo) 周辺の土壌中の水銀から植物や家畜への水銀蓄積について調査した⁸¹⁾。土壌中の水銀濃度が 0.5~48.6 mg/kg であり、この濃度は非汚染地区の 5~60 倍であり、ヨーロッパ諸国の基準値をかなり超えていた。植物の水銀濃度はイネ科、バラ科やキク科の葉の部分で 0.6~18 mg/kg であり、根の部分で 0.2~28.3 mg/kg であった。イネ科やバラ科の植物に含まれる高濃度の水銀はこれらの植物を食べて成長するラマやアルパカへと食物連鎖による水銀濃度の上昇の可能性を示唆した。また、ボリビアの小規模金鉱山周辺の水銀に汚染された土壌の浸食はアマゾン川流域の下流への水銀汚染を引き起こすと述べた。

インドネシアの西ジャワの Cikaniki 川流域の手掘りによる小規模金鉱山地区の土壌、堆積物や河川の水銀分布が Tomiyasa らによって調査された⁸²⁾。森林土中総水銀濃度は 0.11~7.0 mg/kg にあり、最も高い値は小規模金鉱山地区の村であった。村周辺の 0~10 cm の森林土の垂直断面の水銀濃度は表面が最も高く、深くなるに従って減少した。金抽出に使用された水銀が大気を通して拡散され、土壌表面に沈着することを示した。また全有機炭素含有量の垂直断面の濃度も水銀と同様であり、両者の間に直線関係が認められた。森林土の表面に沈着した水銀は有機物質によって吸収され、水銀の直線勾配は小規模金鉱山地区の村近くで大きく、この周辺の水銀の蓄積性が高いことを示した。堆積物中の総水銀量は 10~70 mg/kg であり、川下に向かって濃度は減少しており、採鉱廃棄物が河川の流れとともに運ばれ、川沿いに堆積することを明らかにした。

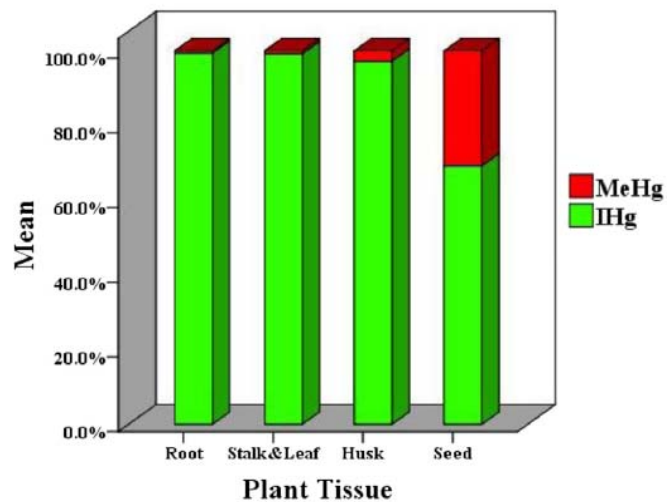
Leiva と Morales は、チリのコキンボ地方の Andacollo 市の近くの金鉱山の荒野の水銀濃度を測定し、この地域における水銀汚染の環境評価をおこなった⁸³⁾。ISO 10381 ガイドラインに従い、土壌中水銀濃度を地表面と深さ 2 m のところで 14 箇所測定した。そのうち 1 箇所が 13.6±1.4 mg/kg とカナダの環境担当大臣の会議で定められた土品質ガイドライン (CA-SQG) やオランダのガイドライン (NL-RIVM) より高い値を示していた。また 4 箇所が CA-SQG や NL-RIVM の勧告値の許容レベル内であった。しかし、14 箇所はいずれもアメリカ環境保護局の勧告値 (23 mg/kg) より低く、ヒトへ危険性をもたらすようではなかった。

小規模金鉱山で採掘、水銀-アマルガム法によって回収した水銀を含む粗金は町にある金ショップで取引される。金ショップでは粗金に含まれる水銀を除去するため再度、加熱する。その結果、金ショップの近郊で働いている或いは住んでいる人々が断続的に水銀蒸気に曝露される。Cordyらはコロンビアの Segoviaya やチリの Andacollad の中心地で移動式水銀分析計を用いで数週間にわたり水銀濃度を測定した⁸⁴⁾。Segoviaya の中心地では平均 1.26 µg/m³、Andacollad の中心地で平均 1.26 µg/m³ と WHO (2007)⁸⁵⁾の年間平均許容濃度 0.02µg/m³ を超えており、これらの町は健康被害を生じる濃度に曝露されている。金鉱山周辺のみならず、町中の金ショップ周辺の住民に対しても深刻な神経や腎の疾患が生じるだろうと述べた。

■ 水銀鉱山周辺の環境汚染と健康影響

中国の水銀鉱山周辺では水銀採掘に伴い大気、土壌、植物等の水銀汚染が報告され、中でも水田の汚染による穀類中メチル水銀が深刻な問題となっている。Mengらは中国の湖南省から2箇所、貴州省から4箇所、広東省から1箇所の水銀鉱山周辺から収穫時期の155本の稲を集め、根域から土壌とともに根、軸と葉、外皮と種(玄米)に分け、各部位の水銀汚染度について調べた⁸⁶⁾。水銀汚染度は地域によって異なるが総水銀濃度は根、軸と葉、外皮、

図3 稲の各種組織中の総水銀に対するメチル水銀の割合

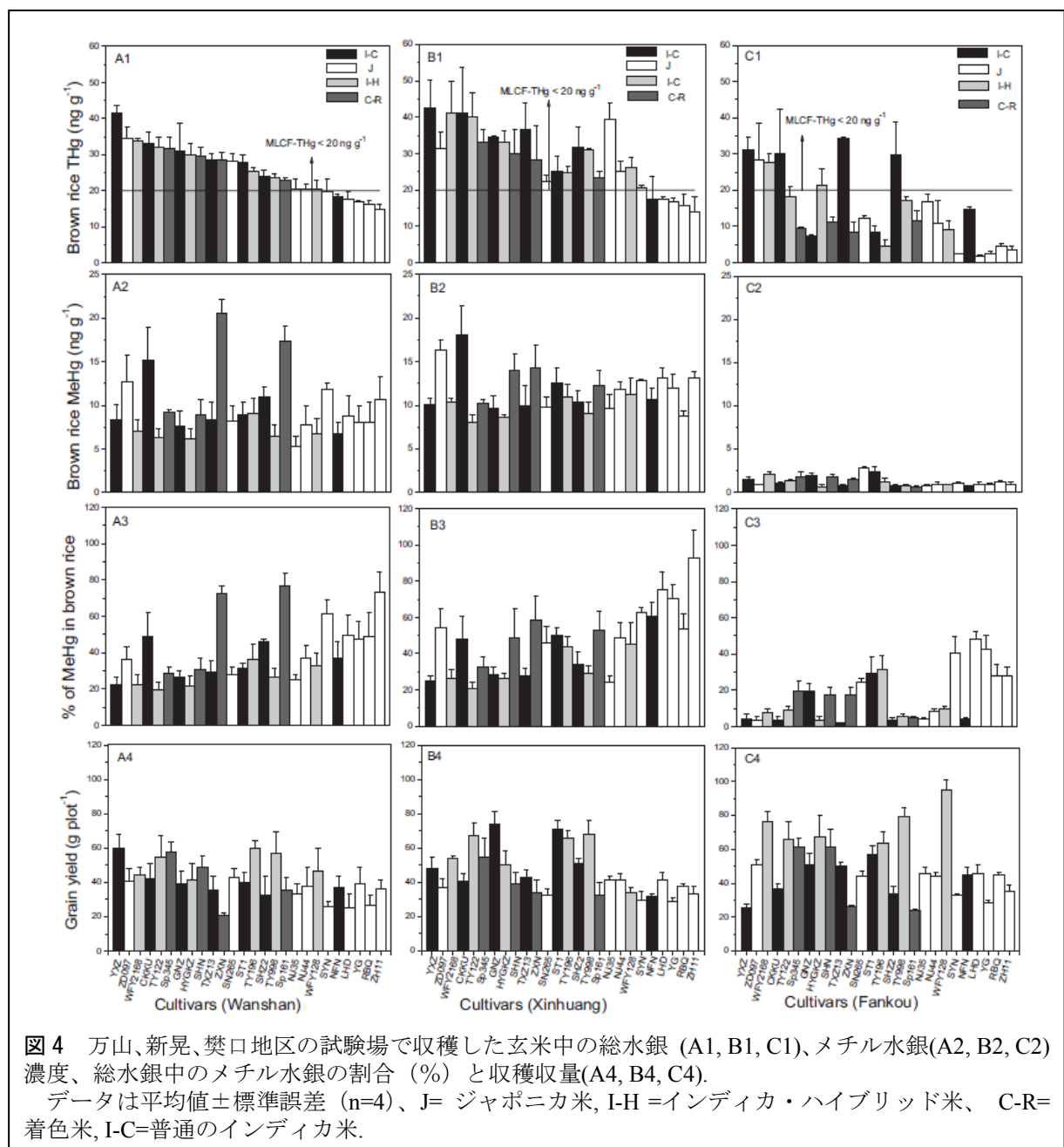


種の順に高く、メチル水銀は根について種が高く、根や種のメチル水銀の蓄積能力の高さを示した。メチル水銀の総水銀に対する割合は根で0.7%、軸と葉で0.9%、外皮で2.9%そして種で30.9%と最も高い値であった(図3)。しかし総水銀、メチル水銀濃度共に土壌中の水銀濃度と高い相関を示すことから、土壌が稲の無機水銀とメチル水銀の重要な汚染源と述べている。また稲における総水銀とメチル水銀の分布様式の違いは両水銀化合物蓄積の取り込みの違いを反映するものである。土壌中の水溶性水銀はコメ組織の高い相関性を示すことから、水溶性水銀は稲におけるメチル水銀蓄積に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

Liらは中国3か所の水銀鉱山(万山、新晃、樊口)地域の水銀に汚染された水田を野外試験として選び、水稻26品種の総水銀とメチル水銀濃度を測定し、地理的そして品種に相違によるそれぞれの水銀の蓄積について調査した⁸⁷⁾。品種間に水銀蓄積に有意な変動が見られ、万山水銀鉱山地域ではその濃度は総水銀で13~52 ng/g、メチル水銀で3.4~23 ng/gであり、メチル水銀の割合は17.7~89%であった。ジャポニカ米は他の品種と比較して総水銀濃度は低い、着色米の品種は玄米より高いメチル水銀濃度であった(図4)。幾つかの稲の栽培品種は水銀によって水田が深刻な汚染されているにも関わらず玄米の総水銀とメチル水銀は食糧安全基準以下の濃度であった。適切な栽培品種の選択が水銀汚染地域で栽培する米の種に総水銀とメチル水銀の蓄積を減少させる方法であることを示唆している。

Qiuらは中国貴州省Yanwuping水銀鉱山採掘地域で水田の土壌、米穀物中の総水銀とメチル水銀、表層水中の水銀、大気中の金属水銀の汚染分布を調べた⁸⁸⁾。最も高い値を示したのは煨焼堆積物や尾鉱(選鉱屑)の近くの土壌であり、煨焼堆積物は5.6~240 mg/kg、尾鉱は0.66~7.3 µg/kgであり、米の総水銀濃度は10~45 µg/kg、メチル水銀濃度は高く、3.2~39 µg/kgであった。土壌中のメチル水銀濃度は米のメチル水銀濃度と相関しており、米のメチル水銀の汚染は土壌に起因するとしている。この地域の表層水の水銀濃度は低いが、煨焼堆積物の近くでは高く、総水銀濃度が3.8~51 ng/L、メチル水銀濃度が0.14~2.7 ng/Lであり、未処理の廃鉱石が水銀汚染源であり、この水を灌漑用水と用いるべきでないとしている。煨焼堆積物からは水銀蒸気が平均46±35 ng/m³(12~180ng/m³)検出されている。穀類における高いメチル水銀濃度はこの地域の住民に潜在的な健康リスクを有しており、穀類のメチル水銀の制限を食品安全のため設けるべきとしている。

スロベニアの旧 Idria 水銀鉱山は 500 年 (1490~1995 年) 以上にわたる採掘の結果、この地域の土壌は水銀に汚染された。Miklavčič らは旧 Idria 水銀鉱山地域内の精錬施設そして Idria 市街地の食物 (野菜、キノコ、魚) 中の総水銀とメチル水銀を継続的に測定し、水銀汚染状況を評価した⁸⁹⁾。総水銀濃度はキノコには平均 5,680 (346~17,100) ng/g 乾燥重量 (dw)、チコリには平均 1,950 (86~12,700) ng/g dw 蓄積していた。分析した食品中の水銀濃度は決して高くはないが、非汚染地区と比べると高値であった。メチル水銀濃度はキャベツについては精錬施設で平均 26 (7~44) ng/g dw、Idria 市街地で平均 25 (3~88) ng/g dw であり、非汚染地区では 0.4 ng/g dw であった。チコリは精錬施設で平均 21 (18~23) ng/g dw、Idria 市街地で平均 136 (0.9~623) ng/g dw で、非汚染地区では 0.2 ng/g dw であった。パセリは精錬施設では平均 248 (206~291) ng/g dw、Idria 市街地では平均 28 (1.2~127) ng/g dw と非汚染地区の 0.5 ng/g dw と比べ高値であった。食物の高濃度の水銀含有量は水銀鉱山閉山後、15 年経った今も減少は認められていない。しかしながら、チコリのよう



に季節の野菜として住民は毎日摂食することから、注意が必要であると述べた。

中国西南部の Chatian 水銀鉱山周辺の水銀による環境汚染と居住者の健康リスク評価が Li によっておこなわれた⁹⁰⁾。廃鉱石と尾鉱の水銀濃度が特に高く、最高で 88.5 µg/g を示し、灌漑用表層水でも最高 9.92 µg/L であった。水田の土壌は 3.90~55.70 µg/g と中国の土壌に対する環境基準グレードⅡのベンチマーク値を超えていた。水稻の水銀濃度も平均 30.6 ng/g 乾燥重量 (10~150 ng/g) であり、11 サンプル (15 サンプル中) が中国の穀類に対する最大許容濃度 (20 ng/g 乾燥重量) を超えていた。しかも、水田の土壌中水銀濃度は水田の根、茎、穀物の水銀濃度と相関しており、土壌が水稻組織中水銀の主要な汚染源である。この地区の住民 15 名の毛髪中水銀濃度は平均 3.73 µg/g (1.04~10.32 µg/g) であり、米国環境保護庁 (EPA) が推奨する限界 1 µg/g を超えていた。また、著者は経口による水銀の 1 日摂取量 (ADD) を下式の EPA の曝露評価法を用いて計算した。

$$ADD (\mu\text{g/kg BW/day}) = [C \times IR \times ED] / [BW \times AT]$$

C: 環境試料中の水銀濃度 (例: 土壌 µg/kg、穀類 µg/kg、水 µg/L など)

IR: 摂取量 (kg/day、L/day)

ED: 曝露期間 (day)

BW: 体重 (body weight)

AT: 摂取量が平均値になる期間 (day)

この地域における成人の水銀の ADD は 0.241 µg/kg BW/日そして就学前の学童では 0.624 µg/kg BW/日であり、JECFA が提案した暫定耐容一日摂取量 PTDI 0.47 µg/kg BW/日を上回っており、経口による主な水銀摂取は穀類であった (下表)。現時点ではこの地域において、明らかな健康問題は生じていないが、長期間の穀類の摂取や土壌の偶発的な経口摂取は潜在的な健康リスクを有していることを示唆している。

表 経口による地元住民の 1 日の水銀摂取量

Pathway	Parameter	Average mercury content	ADD (µg kg ⁻¹ BW per day)
Drinking water by adults	2 L	0.14 µg L ⁻¹	0.005
Drinking water by preschool children	1 L	0.14 µg L ⁻¹	0.009
Rice ingestion by adults	402 g day ⁻¹	30.6 ng g ⁻¹	0.205
Rice ingestion by preschool children	200 g day ⁻¹	30.6 ng g ⁻¹	0.383
Soil ingestion by adults	100 mg day ⁻¹	18.59 µg g ⁻¹	0.031
Soil ingestion by preschool children	200 mg day ⁻¹	18.59 µg g ⁻¹	0.232
Total ADD for adults			0.241
Total ADD for preschool children			0.624

成人の体重は 60 kg/人、就学前児童の体重は 16 kg/人。

IV. 考察

環境保健領域の有害化学物質のひとつであるメチル水銀は、ここ数年の論文を概観すると、低濃度曝露健康影響の検討に入ってから多くの疑問点にぶつかり、ヒト研究の方向性を見失いかけているように思える。世の中で有害と言われる多くの化学物質において「ある (閾値) 濃度を超え

ると健康影響が現れ始める」という発想で論じられてきたが、実は低濃度においても生体への影響は存在し、その延長上に臨床症状や臨床所見が出現する。翻って言えば、カドミウムは高濃度曝露でカドミウム腎症をヒトに呈するが、そのような濃度と著しくかけ離れた低濃度でも尿中 α_1 -microglobulin 濃度との間に有意な正の関連を示す⁹¹⁾。一方、そのような低濃度曝露下においては、似たような有害化学物質が数多あり似たような生体影響を示すので、1化学物質だけの検討では全体像が見えなくなる。また、ヒトではなく実験動物を用いると、種や遺伝形質の相違が障壁となり、ヒトへの毒性の適用限界も見え隠れする。そのうえ、基本的な毒性発現の機序が判っている化学物質（例えば、有機リン系農薬）もあるが、古くより知られている鉛、水銀、メチル水銀などでは十分に毒性機序が明らかにされていない。このことが一層毒性学を難しくしている。

魚を多食すると n-3 PUFA が多く摂取され、心血管疾患発症を予防することが知られている。また、魚摂取によりジベンゾ-*p*-ダイオキシンやジベンゾフラン (PCDD/Fs)、PCB、メチル水銀などが取り込まれると心血管疾患を発症する可能性もある。そこで、フィンランドの一般人口を対象とした Health2000 調査の参加者男女 1,173 人 (45~74 歳) と、魚を多食し環境汚染物質に曝露していると考えられる漁師の男女 225 人 (22~74 歳) において、魚摂取量、血清 PUFA 濃度、血清 PCDD/Fs+PCB 濃度および血中メチル水銀濃度で 3 群に分割し、それらの曝露と心血管疾患発症の間に何等かの傾向 (関連) があるか否かを Turunen らは検討した⁹²⁾。その結果、Health2000 調査参加男女および男性漁師において、PUFA 摂取量の増加に伴い中性脂質が有意に減少する傾向が見られた。PUFA 摂取量の増加に伴い、Health2000 参加男女の腫瘍壊死因子 α とインターロイキン 6 が、また Health2000 参加女性のインシュリン抵抗性と C 反応蛋白 (CRP) が有意に減少する傾向が認められた。これに対し、PUFA 摂取量の増加により、血管弾性は Health2000 参加男性で減少し、逆に男性漁師で増加した。血清 PCDD/Fs+PCB 濃度および血中メチル水銀濃度の影響を検討したのは漁師のみであったが、有意な傾向が認められたのは男性の血中メチル水銀濃度のみであり、メチル水銀濃度が高いほど血管弾性が上昇し、内頸動脈プラーク発症率比は減少した。以上より、男性漁師はメチル水銀を含む環境汚染物質の曝露によりインシュリン感受性と血管弾性に対する PUFA 摂取の効果は打ち消されると解された。但し、内頸動脈プラーク発症に対するメチル水銀の有害効果はないと考えられた。

このように、低濃度メチル水銀曝露による精神神経発達に関する研究は多くなされているが、低濃度メチル水銀 (あるいは無機水銀) 曝露による心血管系への影響は未だ混沌としたままである。Grandjean らは、臍帯血中水銀濃度 1~10 $\mu\text{g/L}$ あるいは母親の出産時毛髪水銀濃度 0.2~2 $\mu\text{g/g}$ の Faroe 諸島の 7 歳児で水銀曝露と血圧の関係を重回帰分析で検討し、有意な正の関係のあることを報告したが^{4,23)}、前述した Mozaffarian らは米国人の足爪中水銀濃度を用いて水銀の高血圧症への影響を検討し、否定的であった⁵⁴⁾。Park らも血中水銀と高血圧との間に何等有意な関係を見つけていない⁵³⁾。心血管系影響として今後問題となるのは、胎児期メチル水銀曝露と生後のメチル水銀曝露による血圧への影響が異なるのかどうか、また尿中水銀と血圧との間で見つかった負の関連が何を意味するかどうかであろう。

ヒト研究として、わが国環境省が「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」おこなっており、また世界の国々でも同様の研究が同時並行的に実施されている。これらの出生コホート研究ではメチル水銀以外の有害化学物質も扱うことになっている。本研究でも結果に記し

た研究機関の研究報告を細大漏らさず収集するように努めるが、低濃度曝露の有害化学物質の相互影響が今後ますます解明されることが望まれる。

種の違いはあるものの2013年の発見で注目すべきは、ゼブラフィッシュ胚で「メチル水銀毒性は、セレノネインに対する特異的なトランスポーターとして同定された OCTN1 を介して、解毒される機序」⁵¹⁾が提示されたことである。また、ラットで自然界由来のセレノメチオニンが脳内の神経細胞死を直接防御することが示された⁴²⁾。これらはメチル水銀の毒性機序ではないものの、ヒトにおける解毒機序解明の第一歩と考えられる。このような研究が今後も着実にこなわれることを期待したい。

開発途上国における水銀による環境汚染と健康影響を巡る問題は枚挙に暇がなく、毎年数多くの報告がある。特に近年問題視されているのは、小規模金鉱山でのシアン化法による金抽出は河川へシアン化合物が大量に放出され、水生微小動物の減少等の生物多様性に大きな影響を与えていることである。金鉱山地区の近郊住民の健康リスクは対照地区に比べ高く、さらにシアン化合物の偶発的な誤飲や皮膚接触による事故の危険性も潜在的に存在する。金抽出に水銀-金アマルガム法やシアン化法の使用はいずれも環境汚染や地域住民に対する健康被害を引き起こすことから早急な対策が求められる。水銀-金アマルガム法により回収した水銀を含む粗金の町の金ショップでの精製は周辺の新たな水銀汚染を引き起こす可能性がある。

水銀鉱山での水銀生産にともなう周辺の水田の土壌汚染は穀類の水銀汚染を引き起こしている。とくに稲の種(玄米)におけるメチル水銀濃度は高く、これらの米の摂食は就学前児童では JECF が提案した暫定耐容一日摂取量を上回っており、将来、水銀による健康影響が危惧される。その一方、稲の栽培品種による水銀蓄積に関する研究が行われ、適切な栽培品種を用いることにより総水銀、メチル水銀の蓄積を減少させることが可能であり、今後の水稻栽培への活用が期待される。

V. 結論

2013年のメチル水銀および水銀に関連する論文をレビューした。“2013年発行”とされる論文の全てが2013年度末までに PubMed に全て掲載されているとは考えられないが、ヒトを対象とし

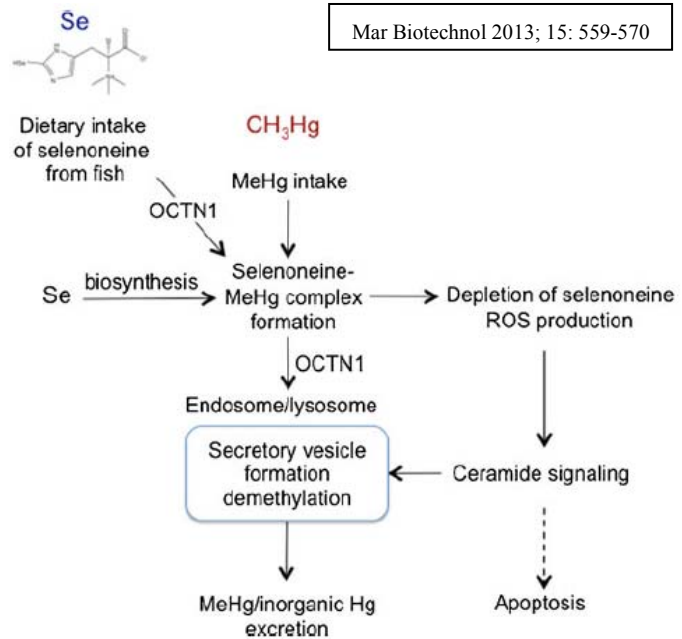


Fig. 10 Hypothesis for the influence of dietary intake of selenoneine on MeHg accumulation and toxicity. The main dietary source of selenoneine is fish, and it can be biologically synthesized from other selenium sources. Selenoneine plays an important role in selenium redox mechanisms. During MeHg exposure, selenoneine mediates the uptake of MeHg into endosomal and/or lysosomal secretion vesicles through OCTN1 function. MeHg exposure induces oxidative stress owing to the depletion of selenoneine and production of ROS. Stress-activated signaling mechanisms enhance proapoptotic ceramide signals, accelerating MeHg excretion. Demethylation occurs in the secretory lysosomal vesicles

た論文の絶対数およびその割合は近年の10年間で最低であった。これは、低濃度メチル水銀曝露による健康影響をどう評価すべきかという道標が見えなくなったことによるかもしれない。すなわち、①先進国でメチル水銀・水銀に対する規制が加えられ、ヒトのメチル水銀・水銀の曝露レベルが極めて低減した、②メチル水銀影響と雖も、他の数多ある化学物質の幾つかは似通った毒性を持つものもあり、メチル水銀の特異的影響なのかどうか判断できない、③メチル水銀毒性に拮抗作用を持つと言われているセレンや PUFA の濃度が各々の研究で測定されていたり、測定されていなかったりして、どちらが正しいのか結論し難くなった、等々が挙げられよう。

金属水銀に由来する健康問題もヒトにとって由々しき問題である。これは金精錬の廃止（あるいはシアン化法による金抽出への変更）や水銀鉱山の廃坑を唱えることはいとも容易いが、そこで生活の糧を得ている人々の生存権を誰が保障するのかという新たな問題を常に孕んでいる。水銀（およびメチル水銀）の健康影響を最小限にしながら、そこで働く人々とともに当該地域で暮らす人々の健康を守るために世界の叡智が何をすべきか？これが水銀に係る問題の本質であり、今後とも世界中の実情報告および研究報告を収集・整理し、それらの中から答えを見つけ出すしかない。

VI. 次年度以降の計画

出生コホート研究を追跡すると、メチル水銀を含む有害化学物質（鉛、PCB など）により、神経発達に影響する時期が異なりそうな結果が幾つか示唆されている。したがって、この種の発達影響の発現および消失を時系列的に検討する研究が重要と考えられる。また、低濃度メチル水銀曝露による健康影響を臓器（疾患）別に明確化する必要がある。さらに、途上国における水銀の健康影響に関する論文が急増しているので、これらを整理すると、水銀影響の防護法にも繋がる可能性がある。

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, 荻田香苗, 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. Grandjean P. Seven deadly sins of environmental epidemiology and the virtues of precaution. *Epidemiology* 2008; 19: 158-162.
 14. United Nations Environment Programme. Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013. [<http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf>]
 15. United Nations Environment Programme. Mercury: Acting Now!. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013. [<http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/Documents/Publications/Mercury%20Acting%20Now.pdf>]
 16. Grandjean P, Budtz-Jørgensen E. Immunotoxicity of perfluorinated alkylates: calculation of benchmark doses based on serum concentrations in children. *Environ Health* 2013; 12: 35.
 17. Vesterholm Jensen D, Christensen J, Virtanen HE, Skakkebæk NE, Main KM, Toppari J, Veje CV, Andersson AM, Nielsen F, Grandjean P, Jensen TK. No association between exposure to

- perfluorinated compounds and congenital cryptorchidism: a nested case-control study among 215 boys from Denmark and Finland. *Reproduction* 2013; 147: 411-417.
18. Tang-Peronard JL, Heitmann BL, Andersen HR, Steuerwald U, Grandjean P, Weihe P, Jensen TK. Association between prenatal polychlorinated biphenyl exposure and obesity development at ages 5 and 7 y: a prospective cohort study of 656 children from the Faroe Islands. *Am J Clin Nutr* 2014; 99: 5-13.
 19. Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, Jensen TK, Sørensen N, Andersson AM, Juul A, Skakkebaek NE, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod Toxicol* 2012; 34: 498-503.
 20. Halling J, Petersen MS, Jørgensen N, Jensen TK, Grandjean P, Weihe P. Semen quality and reproductive hormones in Faroese men: a cross-sectional population-based study of 481 men. *BMJ Open* 2013; 3: e001946.
 21. Murata K, Weihe P, Araki S, Jørgensen EB, Grandjean P. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 471-472.
 22. Murata K, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Benchmark dose calculations for methylmercury-associated delays on evoked potential latencies in two cohorts of children. *Risk Anal* 2002; 22: 465-474.
 23. 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.
 24. Murata K, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr* 2004; 144: 177-183.
 25. Yorifuji T, Murata K, Bjerve KS, Choi AL, Weihe P, Grandjean P. Visual evoked potentials in children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology* 2013; 37: 15-18.
 26. van Wijngaarden E, Davidson PW, Smith TH, Evans K, Yost K, Love T, Thurston SW, Watson GE, Zareba G, Bums CM, Shamlaye CF, Myers GJ. Autism spectrum disorder phenotypes and prenatal exposure to methylmercury. *Epidemiology* 2013; 24: 651-659.
 27. Watson GE, van Wijngaarden E, Love TM, McSorley EM, Bonham MP, Mulhem MS, Yeates AJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Strain JJ, Thurston SW, Hamington D, Zareba G, Wallace JM, Myers GJ. Neurodevelopmental outcomes at 5 years in children exposed prenatally to maternal dental amalgam: The Seychelles Child Development Nutrition Study. *Neurotoxicol Teratol* 2013; 39: 57-62.
 28. van Wijngaarden E, Thurston SW, Myers GJ, Strain JJ, Weiss B, Zarccone T, Watson GE, Zareba G, McSorley EM, Mulhem MS, Yeates AJ, Henderson J, Gedeon J, Shamlaye CF, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure in relation to neurodevelopment and behavior at 19 years of age in the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicol Teratol* 2013; 39: 19-25.
 29. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Satoh H, Working Group of the Epidemiological Research for Children's

- Environmental Health. Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014; 14: 25.
30. Okada E, Sasaki S, Saijo Y, Washino N, Miyashita C, Kobayashi S, Konishi K, Ito YM, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y, Saito K, Nakazawa H, Kishi R. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and relationship with allergies and infectious diseases in infant. *Environ Res* 2012; 118-125.
 31. Lin CY, Lin LY, Chiang CK, Wang WJ, Su YN, Hung KY, Chen PC. Investigation of the associations between low-dose serum perfluorinated chemicals and liver enzymes in US adults. *Am J Gastroenterol* 2010; 105: 1354-1363.
 32. Iwata T, Arai K, Saito N, Murata K. The association between dietary lifestyles and hepatocellular injury in Japanese workers. *Tohoku J Exp Med* 2013; 231: 257-263.
 33. Hosaka M, Asayama K, Staessen JA, Ohkubo T, Hayashi K, Tatsuta N, Kurokawa N, Satoh M, Hashimoto T, Hirose T, Obara T, Metoki H, Inoue R, Kikuya M, Nakai K, Imai Y, Satoh H. Breastfeeding leads to lower blood pressure in 7-year-old Japanese children: Tohoku Study of Child Development. *Hypertens Res* 2013; 36: 117-122.
 34. Takaoka S, Fujino T, Hotta N, Ueda K, Hanada M, Tajiri M, Inoue Y. Signs and symptoms of methylmercury contamination in a first nations community in Northwestern Ontario, Canada. *Sci Total Environ* 2013; 468-469: 950-957.
 35. Sakamoto M, Yasutake A, Domingo JL, Chan HM, Kubota M, Murata K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int* 2013; 60: 106-111.
 36. Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and psychiatric symptoms in residents of Minamata, Japan. *Environ Int* 2011; 37: 907-913.
 37. Yorifuji T, Tsuda T, Inoue S, Takao S, Harada M, Kawachi I. Critical appraisal of the 1977 diagnostic criteria for Minamata disease. *Arch Environ Occup Health* 2013; 68: 22-29.
 38. 坂本峰至, 村田勝敬. 水銀の毒性—汚染の歴史と研究の現状—. *環境技術* 2013; 42: 584-589.
 39. Sakamoto M, Murata K, Kakita A, Sasaki M. A review of mercury toxicity with special reference to methylmercury. In: Liu G, Gai Y, O'Driscoll N (ed.) *Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury*. John Wiley & Sons, Inc. 2012; pp.501-516.
 40. Satoh H. Mercury. In: Weiss B (ed.) *Aging and Vulnerability to Environmental Chemicals: Age-related disorders and their Origins in Environmental Exposures*. RSC Publishing, 2013; pp.125-150.
 41. Murata K, Sakamoto M. Minamata disease. In: *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. Elsevier, 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.020275-3>.
 42. Sakamoto M, Yasutake A, Kakita A, Rhufuku M, Chan HM, Yamamoto M, Oumi S, Kobayashi S, Watanabe C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 2862-2868.
 43. Usuki F, Fujimura M, Yamashita A. Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Sci Rep* 2013; 3: 2346.

44. Kodamatani H, Tomiyasu T. Selective determination method for measurement of methylmercury and ethylmercury in soil/sediment samples using high-performance liquid chromatography-chemiluminescence detection coupled with simple extraction technique. *J Chromatogr A* 2013; 1288: 155-159.
45. Yamazaki T, Yamamoto M, Ishihara Y, Komatsu S, Munetsuna E, Onizaki M, Ishida A, Kawato S, Mukuda T. De novo synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal slices. *PLoS One* 2013; 8: e55559.
46. Noguchi Y, Shinozaki Y, Fujishita K, Shibata K, Imura Y, Morizawa Y, Gachet C, Koizumi S. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLoS One* 2013; 8: e57898.
47. Kumagai Y, Kanda H, Shinkai Y, Toyama T. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013: 848279.
48. Iwai-Shimada M, Nakamura T, Sugawara N, Kurokawa N, Nakai K, Satoh H. Increase in accumulation of polychlorinated biphenyls in offspring mouse brain via maternal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 689-696.
49. Watanabe J, Nakamachi T, Ohtaki H, Naganuma A, Shioda S, Nakajo S. Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces caspase mediated-apoptosis in cultured neural progenitor cells. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 931-935.
50. Hirooka T, Yamamoto C, Yasutake A, Eto K, Kaji T. Expression of VEGF-related proteins in cultured human brain microvascular endothelial cells and pericytes after exposure to methylmercury. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 837-845.
51. Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani Y, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto K, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. Selenoneine, a novel selenium-containing compound, mediates detoxification mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish embryo. *Mar Biotechnol (NY)* 2013; 15: 559-570.
52. Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Sato MH, Itoh T, Kiyono M. Increase methylmercury accumulation in *Arabidopsis thaliana* expressing bacterial broad-spectrum mercury transporter MerE. *AMB Express* 2013; 3: 52.
53. Park SK, Lee S, Basu N, Franzblau A. Associations of blood and urinary mercury with hypertension in U.S. adults: the NHANES 2003-2006. *Environ Res.* 2013; 123: 25-32.
54. Mozaffarian D, Shi P, Morris JS, Grandjean P, Siscovick DS, Spieqelman D, Willett WC, Rimm EB, Curhan GC, Forman JP. Mercury exposure and risk of hypertension in US men and women in 2 prospective cohort. *Hypertension* 2012; 60: 645-652.
55. He K, Xun P, Liu K, Morris S, Reis J, Guallar E. Mercury exposure in young adulthood and incidence of diabetes later in life: the CARDIA Trace Element Study. *Diabetes Care* 2013; 36: 1584-1589.
56. Moya M, Bautista EG, Velázquez-González A, Vázquez-Gutiérrez F, Tzintzun G, García-Arreola ME, Castillejos M, Hernández A. Potentially-toxic and essential elements profile of AH1N1 patients in Mexico City. *Sci Rep* 2013; 3: 1284.

57. Miklavčič A, Casetta A, Snoj Tratnik J, Mazej D, Krsnik M, Mariuz M, Sofianou K, Spirić Z, Barbone F, Horvat M. Mercury, arsenic and selenium exposure levels in relation to fish consumption in the Mediterranean area. *Environ Res* 2013; 120: 7-17.
58. Laird BD, Goncharov AB, Egeland GM, Chan HM. Dietary advice on Inuit traditional food use needs to balance benefits and risks of mercury, selenium, and n3 fatty acids. *J Nutr* 2013; 143: 923-930.
59. Bureau of Chemical Safety. Human health risk assessment of mercury in fish and health benefits of fish consumption. Ministry of Health, Ottawa, 2007.
60. Sehar S, Naz I, Ali N, Ahmed S. Analysis of elemental concentration using ICP-AES and pathogen indicator in drinking water of Qasim Abad, District Rawalpindi, Pakistan. *Environ Monit Assess* 2013; 185: 1129-1135.
61. Otter RR, Hayden M, Mathews T, Fortner A, Bailey FC. The use of tetragnathid spiders as bioindicators of metal exposure at a coal ASH spill site. *Environ Toxicol Chem* 2013; 32: 2065-2068.
62. Álvarez CR, Moreno MJ, Alonso LL, Gómara B, Bernardo FJ, Martín-Doimeadios RC, González MJ. Mercury, methylmercury, and selenium in blood of bird species from Doñana National Park (Southwestern Spain) after a mining accident. *Environ Sci Pollut Res Int* 2013; 20: 5361-5372.
63. Cheng J, Zhao W, Wang Q, Liu X, Wang W. Accumulation of mercury, selenium and PCBs in domestic duck brain, liver and egg from a contaminated area with an investigation of their redox responses. *Environ Toxicol Pharmacol* 2013; 35: 388-394.
64. Xia C, Wu X, Lam JC, Xie Z, Lam PK. Methylmercury and trace elements in the marine fish from coasts of East China. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2013; 48: 1491-1501.
65. Jones HJ, Butler EC, Macleod CK. Spatial variability in selenium and mercury interactions in a key recreational fish species: Implications for human health and environmental monitoring. *Mar Pollut Bull* 2013; 74: 231-236.
66. Ouédraogo O, Amyot M. Mercury, arsenic and selenium concentrations in water and fish from sub-Saharan semi-arid freshwater reservoirs (Burkina Faso). *Sci Total Environ* 2013; 444: 243-254.
67. Burger J, Jeitner C, Donio M, Pittfield T, Gochfeld M. Mercury and selenium levels, and selenium:mercury molar ratios of brain, muscle and other tissues in bluefish (*Pomatomus saltatrix*) from New Jersey, USA. *Sci Total Environ* 2013; 443: 278-286.
68. Glaser V, Moritz B, Schmitz A, Dafré AL, Nazari EM, Rauh Müller YM, Feksa L, Straliootaa MR, de Bem AF, Farina M, da Rocha JB, Latini A. Protective effects of diphenyl diselenide in a mouse model of brain toxicity. *Chem Biol Interact* 2013; 206: 18-26.
69. Newland MC, Hoffman DJ, Heath JC, Donlin WD. Response inhibition is impaired by developmental methylmercury exposure: Acquisition of low-rate lever-pressing. *Behav Brain Res* 2013; 253: 196-205.
70. Mailman M, Bodaly RA, Paterson MJ, Thompson S, Flett RJ. Low-Level Experimental Selenite Additions Decrease Mercury in Aquatic Food Chains and Fish Muscle but Increase Selenium in Fish Gonads. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014; 66: 32-40.
71. Huang SS, Strathe AB, Fadel JG, Johnson ML, Lin P, Liu TY, Hung SS. The interactive effects of

- selenomethionine and methylmercury on their absorption, disposition, and elimination in juvenile white sturgeon. *Aquat Toxicol* 2013; 126: 274-282.
72. Truong HY, Chen YW, Belzile N. Effect of sulfide, selenite and mercuric mercury on the growth and methylation capacity of the sulfate reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*. *Sci Total Environ* 2013; 449: 373-384.
 73. Cordero-Herrera I, Cuello S, Goya L, Madrid Y, Bravo L, Cámara C, Ramos S. Molecular mechanisms involved in the protective effect of selenocystine against methylmercury-induced cell death in human HepG2 cells. *Food Chem Toxicol* 2013; 59: 554-563.
 74. Moreno F, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Simultaneous speciation and preconcentration of ultra trace concentrations of mercury and selenium species in environmental and biological samples by hollow fiber liquid phase microextraction prior to high performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2013; 1300: 43-50.
 75. Yamashita Y, Yamashita M. Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *J Biol Chem* 2010; 285: 18134-18138.
 76. Pedrero Zayas Z, Ouerdane L, Mounicou S, Lobinski R, Monperrus M, Amouroux D. Hemoglobin as a major binding protein for methylmercury in white-sided dolphin liver. *Anal Bioanal Chem* 2014; 406: 1121-1129.
 77. Tarras-Wahlberg NH, Flachier A, Lane SN, Sangfors O. Environmental impacts and metal exposure of aquatic ecosystems in rivers contaminated by small scale gold mining: the Puyango River basin, southern Ecuador. *Sci Total Environ* 2001; 278: 239-261.
 78. Guimaraes JR, Betancourt O, Miranda MR, Barriga R, Cueva E, Betancourt S. Long-range effect of cyanide on mercury methylation in a gold mining area in southern Ecuador. *Sci Total Environ* 2011; 409: 5026-5033.
 79. Obiri S, Doodoo DK, Okai-Sam F, Essumang DK. Non-cancer health risk assessment from exposure to cyanide by resident adults from the mining operations of Bogoso Gold Limited in Ghana. *Environ Monit Assess* 2006; 118: 51-63.
 80. Counter SA, Buchanan LH, Ortega F, Laurell G. Elevated blood mercury and neuro-otological observations in children of the Ecuadorian gold mines. *J Toxicol Environ Health A* 2002; 65: 149-163.
 81. Terán-Mita TA, Faz A, Salvador F, Arocena JM, Acosta JA. High altitude artisanal small-scale gold mines are hot spots for Mercury in soils and plants. *Environ Pollut* 2013; 173: 103-109.
 82. Tomiyasu T, Kono Y, Kodamatani H, Hidayati N, Rahajoe JS. The distribution of mercury around the small-scale gold mining area along the Cikaniki river, Bogor, Indonesia. *Environ Res* 2013; 125: 12-19.
 83. Leiva MA, Morales S. Environmental assessment of mercury pollution in urban tailings from gold mining. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; 90: 167-173.
 84. Cordy P, Veiga M, Crawford B, Garcia O, Gonzalez V, Moraga D, Roeser M, Wip D.

- Characterization, mapping, and mitigation of mercury vapour emissions from artisanal mining gold shops. *Environ Res* 2013; 125: 82-91.
85. World Health Organization (WHO). Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. 2007; <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad50.htm>
 86. Meng M, Li B, Shao JJ, Wang T, He B, Shi JB, Ye ZH, Jiang GB. Accumulation of total mercury and methylmercury in rice plants collected from different mining areas in China. *Environ Pollut* 2013; 184C: 179-186.
 87. Li B, Shi JB, Wang X, Meng M, Huang L, Qi XL, He B, Ye ZH. Variations and constancy of mercury and methylmercury accumulation in rice grown at contaminated paddy field sites in three Provinces of China. *Environ Pollut* 2013; 181: 91-97.
 88. Qiu G, Feng X, Meng B, Zhang C, Gu C, Du B, Lin Y. Environmental geochemistry of an abandoned mercury mine in Yanwuping, Guizhou Province, China. *Environ Res* 2013; 125: 124-130.
 89. Miklavčič A, Mazej D, Jaćimović R, Dizdarevi T, Horvat M. Mercury in food items from the Idrija Mercury Mine area. *Environ Res* 2013; 125: 61-68.
 90. Li Y. Environmental contamination and risk assessment of mercury from a historic mercury mine located in southwestern China. *Environ Geochem Health* 2013; 35: 27-36.
 91. 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.
 92. Turunen AW, Jula A, Suominen AL, Männistö S, Marniemi J, Kiviranta H, Tiittanen P, Karanko H, Moilanen L, Nieminen MS, Kesäniemi YA, Kähönen M, Verkasalo PK. Fish consumption, omega-3 fatty acids, and environmental contaminants in relation to low-grade inflammation and early atherosclerosis. *Environ Res* 2013; 120: 43-54.

A review on health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata¹, Minoru Yoshida², Kanae Karita³, Toyoto Iwata¹, Nozomi Tatsuta⁴,
Kunihiko Nakai⁴, Miyuki Iwai-Shimada⁵, Kozue Yaginuma-Sakurai⁶, Mineshi Sakamoto⁷

¹ *Department of Environmental Health Sciences, Akita University Graduate School of Medicine*

² *Hachinohe Gakuin University Faculty of Human Health*

³ *Department Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine*

⁴ *Department of Development and Environmental Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine*

⁵ *Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences*

⁶ *Department of Human Health and Nutrition, Shokei Gakuin University Faculty of Comprehensive Human Sciences*

⁷ *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

Abstract

More than fifty years have passed since the outbreak of Minamata disease, and there seems to exist no high-level methylmercury contamination in Japan. Meanwhile, mercury is continuously discharged from natural sources and industrial activities, and health problem of low-level exposure to mercury among fetuses and children has not fully been resolved. Accordingly, mercury contamination due to gold mining is a world-wide problem especially in developing countries such as Brazil, those in southeastern Asia, or those in Africa. From this view point, we provide an review of articles mainly concerning to epidemiological studies on the health effects of methylmercury and mercury including low-level exposures.

The following conclusions were obtained from our investigation of this fiscal year:

(1) Proportion of epidemiological study articles among articles which deal with methylmercury tended to decrease since 2008. The number of such studies decreased extremely in 2013. (2) The decision to prepare a global legally binding instrument on mercury was taken by the twenty-fifth session of the United Nations Environment Programme (UNEP) Governing Council/Global Ministerial Environment Forum held at UNEP headquarters, Nairobi, in 2009. On 10 October 2013 at a Diplomatic Conference held in Kumamoto the “Minamata Convention on Mercury” was adopted and opened for signature by States and regional economic integration organizations. (3) Outstanding results did not emerge from epidemiological research in 2013, presumably because methylmercury levels of developed countries had already declined. (4) Birth cohort studies including the Japan Environment and Children's Study (JECS), established by the Ministry of the Environment, are in progress in many nations. Novel insights into health effects of methylmercury are expected to be provided from these studies. (5) As a mechanism of well-known selenium's protection against methylmercury toxicity, selenoneine, an anti-oxidant, was observed to enhance demethylation in zebrafish embryo. Moreover, food-originated selenomethionine was shown to protect directly cerebral cortex neurons of rats from degeneration. (6) Health effect of methylmercury among people in artisanal and small-scale gold mining and smelting and among people residing in

surrounding area is concern.

These results suggested that continuous collection and analysis of articles are needed to elucidate health effects of methylmercury and mercury in humans and to provide keys to resolve contamination problems in developing countries.

V メチル水銀曝露量と神経症状との関係解明に資するための
メチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の同定と作用機構解析

メチル水銀曝露量と神経症状との関係解明に資するための
メチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の同定と作用機構解析
主任研究者 永沼 章（東北大学大学院薬学研究科教授）

研究要旨

前年度までの研究において、ゴルジ体から multivesicular body (MVB) ソーティングシステムを經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、この輸送系を介して液胞に運ばれる蛋白質の中にメチル水銀毒性を増強させる蛋白質(X-蛋白質)が存在することが示唆された。また、この輸送系の阻害またはメチル水銀処理によって、37kDaのユビキチン化蛋白質のレベルが上昇することも明らかにした。しかし、この37kDaのユビキチン化蛋白質の中からX-蛋白質の同定を試みてきたが、目的とする蛋白質の同定には至っていない。そこで本年度はこれまでとは異なる方法でX-蛋白質を検索し、その候補として6種類の蛋白質を同定したが、その中にメチル水銀毒性増強作用を示す蛋白質は存在しなかった。これらの結果から、X-蛋白質は37kDa以外の分子量をもつユビキチン化蛋白質である可能性が考えられる。

一方、我々は siRNA を利用したヒト遺伝子スクリーニングを実施し、発現抑制されることによって HEK293 細胞をメチル水銀耐性にする蛋白質として HOXB13 を同定した。そして、メチル水銀が HOXB13 を介して TNF- α の発現を誘導し、TNF- α の細胞外濃度を上昇させることが判明した。TNF- α と TNF 受容体との結合を阻害する WP9QY で細胞を処理することによってメチル水銀毒性が顕著に抑制されることも明らかとなった。また、TNF- α によって活性化されるシグナル伝達経路の中で JNK 経路のみがメチル水銀毒性発現に関与していることが示唆され、メチル水銀による JNK の活性化は WP9QY の培地中への添加または HOXB13 の発現抑制によってほとんど観察されなくなった。さらに、JNK 阻害剤が示すメチル水銀毒性軽減作用が、HOXB13 の発現抑制または TNF- α 阻害剤処理によってほとんど認められなくなった。以上の結果から、メチル水銀によって HOXB13 を介して発現誘導された TNF- α が細胞外に放出され、その結果として JNK が活性化され、それによってメチル水銀毒性が増強されるという可能性が考えられる。

キーワード：メチル水銀、感受性決定遺伝子、MVB ソーティングシステム、Hoxb13

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、これまで酵母を用いてメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子のスクリーニングにより、ユビキチン・プロテアソームシステムや multivesicular body (MVB) ソーティングシステムに関わる多くの因子がメチル水銀毒性の発現に関与していることを明らかにしてきた。一方、我々は最近、ヒト由来培養細胞を用いた網羅的遺伝子スクリーニングも実施し、メチル水銀感受性に影響を与える遺伝子を数多く同定することに成功した。この中には蛋白質分解機構関連因子や転写因子などの遺伝子が含まれており、それらのほとんどはメ

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る。本研究では、これら遺伝子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の解明を目指す。本研究で得られる成果は、メチル水銀毒性発現機構の解明に大きく貢献すると共に、メチル水銀暴露量と神経障害発現程度の関係における遺伝的要因の解明にも資することとなり、その社会的意義は大きい。

II 研究方法

1. 酵母からの蛋白質抽出およびユビキチン抗体を用いた免疫沈降

野生型酵母および Vps27 欠損酵母の single colony を SD 培地 10mL に植菌し、30°C で一晚培養した後、 5×10^6 cells/mL を 200 mL の SD 選択培地で 3 時間振盪培養した。塩化メチル水銀を 4 μ M となるように添加して 30°C で 90 分間振盪培養した。集菌し、氷冷した滅菌水で一度洗浄後、10% TCA を 500 μ L 加え氷上に 30 分放置した。その後、PBS で 3 回洗浄した後、薬さじ 1 杯分の glass beads と 100 μ L の PBS を加えた。Tomy MS-100R を用いて 5 分間、4,000 rpm で酵母を破碎後、34 μ L の lysis buffer (4% SDS、180 mM Na-HEPES (pH 7.5)) を加え、100°C で 5 分間加熱した。その後、20,400 \times g で 5 分間遠心し、上清を cell lysate とした。得られた酵母抽出物を DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量した後、総蛋白質量が一定 (1 g) で、かつ、SDS 濃度が 0.1% 以下になるように PBS で希釈した。あらかじめ PBS で 3 回洗浄しておいた Protein A shepharose beads[®]を入れて 4°C で 1 時間以上インキュベートすることによって IgG と非特異的に結合する他の物質を遠心して除去する。その後、StressGen 社のユビキチン抗体 (5 μ L) を入れて 4°C で 3 時間以上 incubate した後に、PBS で 3 回洗浄しておいた Protein A shepharose beads[®]を入れて 4°C で 1 時間以上インキュベートすることによってユビキチン抗体と結合している蛋白質を免疫沈降する。得られた beads を PBS で洗浄後、beads と PBS を合わせて 50 μ L となるように調整し、さらに 2 \times sample buffer を加えた。100°C で 3 分加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

2. 質量分析法による蛋白質の同定

銀染色を行ったゲルを Western blotting の結果と比較し、37kDa 付近のユビキチン化蛋白質のバンドを切り出した。その後、システイン残基の還元を行い、トリプシンで蛋白質を断片化・同定し、質量分析を行った。

3. 酵母のメチル水銀に対する感受性

野生型酵母またはそれぞれの遺伝子欠損または高発現酵母の single colony を SD 培地 2 mL に植菌し 30°C で一晚振盪培養した後、 1×10^6 cells を SD 培地 900 μ L に植菌し、滅菌水または、2、4、6、8、10 μ M の塩化メチル水銀を 100 μ L 加えた (final: 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μ M)。30°C で 3 時間静置培養した後、集菌し、100 μ L の滅菌水で懸濁し、SD 寒天培地に 5 μ L スポットティングした (final: 5×10^4 cells/spot)。気相インキュベーターを用いて 30°C で 24 時間培養後、観察した。

4. 発現抑制が細胞のメチル水銀に対する感受性

細胞を剥がし、 2.5×10^5 cells/2.3 mL DMEM (10% FBS) となるように細胞数を合わせ、そこに transfection complex (OptiMEM 94 μ L に同じ遺伝子をターゲットする二種の 4 μ M siRNA を 3 μ L ずつ添加し、12 μ L の HiPerFect transfection reagent を入れた後、15 分以上インキュベートし

た。)を添加し、2、3回転倒混和させた後、10分間室温でインキュベートした。その後、2.1 mLのD' MEM (10% FBS)を加え、96-well plateに 5×10^3 / 90 μ L/wellとなるように添加し、48時間、37°C、5% CO₂で培養後、2 μ M~10 μ M MeHgClを10 μ Lずつ添加した。さらに48時間、37°C、5% CO₂で培養した後、培地を取り除き、10% Alamar Blueを含むDMEM/10% FBSを75 μ Lを加え約2時間、37°C、5% CO₂で培養後、蛍光プレートリーダーで蛍光測定した (excitation 544 nm, emission 590 nm)。

5. RNAの単離

$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の細胞を1 x PBSでwashした後、Isogen II 300 μ Lを添加し細胞を溶解させた。そこに120 μ LのRNase free水を添加し15秒間ボルテックスして室温で5~15分間放置した後、15,000 x gで15分間遠心した。上清300 μ Lを回収し300 μ Lのイソプロパノールを加えて転倒混和したものを10分間室温で放置した後、12,000 x gで10分間遠心した。上清を除去し500 μ Lの75%エタノールを加え8,000 x gで3分間遠心した。これをもう一度繰り返し、上清を除去しペレットをRNase free水で溶解した。

6. 逆転写反応 (PrimeScript RT reagent Kit)

RNA 500 ngに対し、5 x PrimeScript buffer 2 μ L、PrimeScript RT enzyme mix 0.5 μ L、oligo dT primer 25 pmol、random 6-mer primer 50 pmolとなるように反応液を調整し、37°C、15分間逆転写反応を行い、反応後、酵素を失活させるため、85°Cで5秒間処理した。

7. 定量PCR

SYBR Premix Ex Taqを5 μ L、cDNAを1 μ L、H₂Oを3.6 μ L、10 μ M forward-、10 μ M reverse- primerを0.2 μ Lずつ計10 μ Lに調整し、Thermal Cycler Dice real time systemで定量PCRを行った。mRNA量は内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられているGAPDH mRNAを用いて標準化した。

8. Immunoblotting

6-well plateに 5×10^5 cell/1.8 mLとなるようにHEK293細胞を播種し、24時間、37°C、5% CO₂で培養後、200 μ L/wellのメチル水銀 (20 mM)を入れ0.5~6時間、37°C、5% CO₂で培養した。その後、培地を除去し、1度1 x PBSでwashし、その後1 x RIPA bufferを300 μ L加え、氷上で粘性が弱くなるまでピペッティングを行い、回収した。その後15分間氷上でインキュベートした後、20,000 x g、15分、4°Cで遠心し、その上清をwhole cell lysateとした。そこに同量の2 x sample bufferを加えSDS-PAGE用サンプルとした。Transfer後のmembraneをblocking solution (5%スキムミルク、20 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl)に1時間以上振盪 blockingした後、一次抗体に浸し、室温で4時間以上振盪した。その後、washing solution (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl)で3回、それぞれ10分間振盪して洗浄した後に、二次抗体に浸し1時間振盪した。その後再びwashing solution (20mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl)で3回、それぞれ10分間振盪して洗浄した後に、Immobilon Westernを用いて化学発光させ、Versa Doc Model 5000により検出した。

(倫理面への配慮)

培養細胞および酵母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を介してメチル水銀毒性を増強する蛋白質 (X-蛋白質) の同定とその作用機構解析

本研究はヒトの遺伝子について実施するものであるが、前年度までの酵母を用いた検討によって MVB ソーティングシステムがメチル水銀毒性の増強に大きく関与していることが判明していることから、MVB ソーティングシステムとメチル水銀毒性との関係についても継続して検討を行った。

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である。我々はこれまで、酵母を用いた検討によって、MVB ソーティングシステムに関わることが判明している全ての蛋白質 (13 種) のうち、どれでも一つが欠けるとメチル水銀毒性が顕著に軽減されることを見出し、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。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。

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 MVB ソーティングシステムの停止またはメチル水銀処理によって約 37 kDa のユビキチン化蛋白質レベルが顕著に上昇することを明らかにした。この約 37 kDa のユビキチン化蛋白質が 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) である可能性が考えられたことから、前年度までの本研究において X-蛋白質の同定に挑んできた。電気泳動および質量分析を用いた検索によって候補蛋白質として Rps3 および Sis1 を見出し、両蛋白質が酵母のメチル水銀感受性に影響を与えることも確認された。しかし、計算されるモノユビキチン化された両蛋白質の分子量が 37 kDa より大きいことと、両蛋白質が共にごく一部しか MVB ソーティングシステムによって液胞に運ばれないことから、本年度は方法を一部改良して再度 X-蛋白質の同定を試みた。

我々がこれまで行ってきた 2 次元電気泳動/質量分析法による検索においては、同定された蛋白質の中にユビキチン化されていない蛋白質も多く含まれていた。その理由として、免疫沈降に利用可能なユビキチン抗体を入手することができず、非ユビキチン化蛋白質を予め除去できなかったためと考えられる。しかし、最近発売された 3 種のユビキチン抗体を用いて免疫沈降の可否を検討したところ、StressGen 社のユビキチン抗体がユビキチン化蛋白質の免疫沈降に有効であることが確認された。そこで、このユビキチン抗体を用いて非ユビキチン化蛋白質を除去した後に X-蛋白質の検索実験を行った。その結果、MVB ソーティングシステムを停止させた際に 37 kDa 付近に泳動されるユビキチン化蛋白質として新たに Car1、Ras2、Rp18a、Rp113b、Sma1 および Ygr021w

が同定された。MVB ソーティングシステムが正常に働いている野生型酵母においては 37 kDa 付近に泳動される蛋白質の中にこれら蛋白質がほとんど検出されなかったことから、これら蛋白質がユビキチン化された後に MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれている可能性が考えられた。しかし、これら蛋白質をそれぞれ欠損させても酵母のメチル水銀感受性にはほとんど影響が認められず、Ras2 欠損が僅かなメチル水銀耐性を与えただけであった。以上の結果から、37 kDa のユビキチン化蛋白質は MVB ソーティングシステムの機能や意義を考えるうえで重要な蛋白質であることは間違いないものの、少なくともその中にはメチル水銀毒性の増強に関与する蛋白質 (X-蛋白質) は含まれていないという可能性が考えられる。したがって、MVB ソーティングシステムによって液胞に運ばれ、かつ、メチル水銀毒性の増強に関与する蛋白質を明らかにするためには、37 kDa 以外の分子量を持つ蛋白質にも注目する必要があると思われる。

(2) HOXB13 によるメチル水銀毒性増強機構の解析

我々は、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 つずつ発現抑制したのちに、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、発現抑制によりヒト培養細胞に強いメチル水銀耐性を与える蛋白質をいくつか同定することに成功したが、その中に、構造中に DNA 結合ドメインとして機能するホモオボックスドメインを有する蛋白質である HOXB13 が含まれていた (平成 23 年度に報告)。そこで、本年度は HOXB13 が示すメチル水銀毒性増強作用について検討した。

HOXB13 の機能はあまり詳細には検討されていない。しかし、HOXB13 が androgen receptor の DNA 結合ドメインに結合し、それによって下流遺伝子の発現を抑制することが知られており、さらに、HOXB13 が Wnt シグナル経路に関わる蛋白質である TCF4 のレベルを減少させるとの報告もある。そこで、androgen receptor および TCF4 に対する siRNA をそれぞれヒト培養細胞に導入したところ、いずれの siRNA を導入しても細胞のメチル水銀感受性にはほとんど影響が認められなかった。このことから、HOXB13 によるメチル水銀毒性増強作用に androgen receptor や Wnt シグナル経路は関与しないと考えられる。

一方、平成 23 年度に報告したように、HOXB13 は TNF- α の合成誘導に関わることも知られていることから、TNF- α の発現に対するメチル水銀の影響を検討したところ、メチル水銀が HEK293 細胞の TNF- α mRNA レベルを顕著に上昇させ、HOXB13 をノックダウンすることによってこのメチル水銀による TNF- α の発現誘導が抑制されるという興味深い事実が判明した。そして、TNF- α と TNF 受容体との結合を阻害する TNF- α 阻害剤 (WP9QY) の培地への添加によってメチル水銀毒性が軽減されることから、メチル水銀が HOXB13 を活性化して TNF- α 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が示唆された。そこで本研究では、HOXB13 を介した TNF- α 発現誘導とメチル水銀毒性との関係およびそれに関わる TNF- α のシグナリング経路について HEK293 細胞を用いて検討した。

まず、メチル水銀が TNF- α の細胞外への遊離に与える影響を TNF- α 抗体を用いて検討したところ、HEK293 細胞をメチル水銀で処理することによって培地中の TNF- α 濃度が有意に上昇することが確認された。細胞外に放出された TNF- α は、細胞膜に存在する TNF 受容体に作用することによって、アポトーシスや神経変性に関わる MAPK 経路の JNK、ERK、または p38 などのキナーゼを活

活性化することが知られている。そこで、これらのシグナル伝達経路にメチル水銀が与える影響を検討したところ、細胞をメチル水銀で4時間処理することによって JNK、ERK および p38 の全てのキナーゼの活性上昇が観察された。次に、JNK 阻害剤 (SP-600125)、ERK 阻害剤 (PD-98059) または p38 阻害剤 (SB-203580) の添加が細胞のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、JNK 阻害剤の添加濃度に依存したメチル水銀毒性の軽減が認められた。このことは、メチル水銀が TNF- α を介して JNK、ERK および p38 経路を活性化するが、これら経路の中で JNK 経路のみがメチル水銀毒性発現に関与していることを示唆している。また、メチル水銀による JNK の活性化は TNF- α 阻害剤 (WP9QY) の培地中への添加または HOXB13 の発現抑制によってほとんど観察されなくなった。このことから、メチル水銀によって HOXB13 を介して発現誘導された TNF- α が細胞外に放出され、その結果として JNK が活性化されると考えられる。一方、HOXB13 発現抑制細胞または TNF- α 阻害剤処理細胞を JNK 阻害剤である SP-600125 で処理してメチル水銀感受性を検討したところ、JNK 阻害剤が示すメチル水銀毒性軽減作用は HOXB13 の発現抑制または TNF- α 阻害剤処理によってほとんど認められなくなった。この結果は、HOXB13 が示す TNF- α を介したメチル水銀毒性増強作用に JNK の活性化が一部関与していることを示唆している。

(3) HOXB13 の発現抑制がメチル水銀以外の物質の細胞毒性に与える影響

金属化合物であるカドミウム、亜ヒ酸、トリブチルスズ、無機水銀、制がん剤であるアドリアマイシンおよび小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンの HEK293 細胞に対する毒性は HOXB13 発現抑制による影響をほとんど受けなかった。しかし、酸化ストレス誘導剤である過酸化水素、*N*-エチルマレイミドおよびパラコートの毒性は HOXB13 の発現抑制によって有意に軽減された。メチル水銀が酸化ストレスを誘導するとの報告が多数存在することから、HOXB13 が酸化ストレスによる細胞障害を促進することによってメチル水銀毒性を増強している可能性も否定できない。

(4) メチル水銀を投与したマウスにおけるサイトカインの発現変動

HEK293 細胞において、メチル水銀が TNF- α の発現を誘導することが判明したことから、個体レベルにおける TNF- α の発現に対するメチル水銀の影響をマウスを用いて検討した。C57BL/6 雄性マウスに 25 mg/kg のメチル水銀を投与し、1, 3, 5, 7 日後に脳組織 (大脳、小脳) を摘出して、TNF- α を含む 30 種のサイトカイン分子種 (TNF ファミリー6種、インターロイキン 24種) の発現レベルの変動を調べた。その結果、メチル水銀投与による脳組織中での TNF- α 発現レベルの有意な上昇が認められた (大脳; 約 14 倍、小脳; 約 5 倍)。脳組織以外の臓器 (肝臓、腎臓) では TNF- α 発現レベルの顕著な変動は観察されなかったことから、メチル水銀は TNF- α の発現レベルを脳特異的に上昇させると考えられる。なお、メチル水銀投与したマウス脳において、TNF- α 以外の TNF ファミリーにはほとんど発現変動が見られず、インターロイキンに関しては IL-19 のみが有意な発現上昇を示した。したがって、メチル水銀は脳組織において TNF- α および IL-19 など特定のサイトカイン類の発現を上昇させると考えられる。上述した培養細胞を用いた検討によってメチル水銀が TNF- α の発現を誘導することによって細胞毒性を発現している可能性が示唆されたが、メチル水銀が脳特異的に TNF- α の発現を誘導するという本現象が、メチル水銀が示す脳選択的な毒性の発現機構にも関与している可能性があり、今後の研究の進展が期待される。

IV 結論

MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれ、かつ、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質 (X-蛋白質) を同定するために、MVB ソーティングシステムの停止およびメチル水銀処理によって細胞内レベルが顕著に上昇する 37 kDa のユビキチン化蛋白質の中から X-蛋白質を質量分析法により検索したが、メチル水銀毒性を増強させる蛋白質を見出すことはできなかった。この結果から、X-蛋白質を明らかにするためには、37 kDa 以外の分子量を持つ蛋白質にも注目する必要があると思われる。一方、ノックダウンによってヒト由来細胞 (HEK293) をメチル水銀に対して高感受性にするヒト蛋白質として同定された HOXB13 の作用機構解析を行った結果、メチル水銀によって HOXB13 を介して発現誘導された TNF- α が細胞外に放出され、その TNF- α による JNK の活性化がメチル水銀毒性の発現に関与している可能性が示唆された。

V 次年度以降の計画

HOXB13 がメチル水銀毒性の発現に重要な役割を果たしていることが判明した。この作用に TNF- α が関与する可能性が示唆されたが、TNF- α 以外の因子が関与している可能性も否定できない。そこで、HOXB13 によって発現誘導される遺伝子を検索し、その中から、メチル水銀毒性の発現に関係する遺伝子を特定する。また、メチル水銀による HOXB13 を介した TNF- α の発現誘導機構を検討し、未だ明らかにされていないメチル水銀に対する細胞応答機構を明らかにする。また、メチル水銀による脳特異的な TNF- α 発現誘導機構についても検討する予定である。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Kim MS Takahashi T Lee JY Hwang GW Naganuma A: Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific expression of CCL3 and CCL4. *J Toxicol Sci.*, 2013; 38:925-929.
- 2) Nakano R Takahashi T Naganuma A Hwang GW: Knockdown of the gene for homeobox protein HOXB13 reduces toxicity of oxidative-stress inducers in HEK293 cells. *J Toxicol Sci.*, 2013; 38:821-822.
- 3) Hwang GW Lee JY Kim MS Sato M Takahashi T Naganuma A: Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury. *J Toxicol Sci.*, 2013; 38:703-706.
- 4) Hwang GW, Mastuyama F, Takahashi T, Lee JY, Naganuma A: Deletion of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc2 confers resistance to methylmercury in budding yeast by promoting Whi2 degradation. *J Toxicol Sci.*, 2013; 38:301-303.
- 5) Hwang GW Ogiwara Y Takahashi T Naganuma A: Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 2012; 37:1287-1290.
- 6) Hwang GW Kimura Y Takahashi Y Lee JY Naganuma A: Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 2012; 37:1283-1286.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) 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.

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; MVB sorting pathway; HOXB13

Abstract

We have found that the protein-transport pathway from Golgi to vacuole is strongly involved in mechanism of enhancement of methylmercury toxicity in yeast. Proteins (X-proteins) that are transported from Golgi to vacuole and enhance methylmercury toxicity might exist in yeast cells. We have also found that cellular levels of ubiquitinated protein(s) of 37kDa were increased by inhibition of the transport pathway or by treatment of cells with methylmercury. This 37kDa protein might be the candidate of X-proteins. Although identification of X-proteins has been tried out from 37kDa protein, it has not been successful. In the present study, we tried again to identify the X-proteins from 37kDa protein using a new method, and identified six proteins as the candidate. However, we could not find the proteins, which enhance toxicity of methylmercury, from the candidate. These results suggest that X-protein might be a protein with molecular weights other than 37kDa.

On the other hand, we carried out human gene screening using siRNA. We found that the decreased expression of the gene for HOXB13 conferred resistance to methylmercury in human HEK293 cells. Moreover, we found that methylmercury induces expression of TNF- α through function of HOXB13. TNF- α might have an important role in the augmentation of methylmercury toxicity by HOXB13.

VI メチル水銀の脳への影響の MRI による検出と
行動異常との相関解析

メチル水銀の脳への影響のMRIによる検出と行動異常との相関解析

主任研究者 山崎 岳 (広島大学大学院総合科学研究科 行動科学講座 教授)
分担研究者 伊藤 康一 (徳島文理大学 香川薬学部 薬物治療学講座 教授)

(主任研究者・分担研究者による共同報告)

研究要旨

メチル水銀は神経毒として、脳の形態変化や行動異常を引き起こす。MRIは非侵襲的な検出法であり、臓器を生きた状態で撮像できるので、脳の形態変化を時空間的に観察できる。さらに、様々な撮像法で得られたMRI画像解析により病態生理学的変化も検出可能である。本研究ではマウスにメチル水銀を2か月間経口投与して脳の形態変化をMRIで時空間的に観察し、同時に同一マウスでの行動試験を行い、メチル水銀毒性を解析した。

4週齢の雄性ICRマウスに、2ないし4 mg Hg/kgの塩化メチル水銀を8週間隔日投与した。1週間ごとにオープンフィールド探索行動試験、2週間ごとにMRI撮像を、8週間の投与後にローターロッド試験を行った。MRIは1.5T小動物用装置を用いて、イソフルラン麻酔下、1mm厚スライスのT1WI、T2WI及びDWIを撮像した。

今回のメチル水銀投与量では、8週間にわたりマウスの体重、オープンフィールド探索行動試験結果に有意な変化は認められなかった。ローターロッド試験では、4 mg Hg/kgにおいてのみ、落下時間の有意な短縮が認められた。それらのマウスのMRI所見では、T1WI、T2WIにおいてメチル水銀投与2週間後より用量依存的に側脳室及び第3脳室の顕著な拡大が認められた。また、メチル水銀4 mg Hg/kg投与により、下丘領域でのT1信号強度の増加が見られた。

MRIを用いることにより、行動に影響を与えないメチル水銀投与量において脳室の拡大が観察され、MRIが高感度なメチル水銀毒性の検出法であることが示された。

また、次年度以降の研究に向けて、メチル水銀投与前の脳内のステロイドホルモン濃度を測定し、さらにこの研究の実験条件におけるメチル水銀の最大投与量を見いだした。

キーワード: MRI、行動異常、メチル水銀毒性、脳内ステロイド

研究参加者: 石原 康彦 (広島大学大学院総合科学研究科 行動科学講座 助教)
富士谷 法子 (広島大学大学院総合科学研究科 総合科学専攻 博士課程前期2年)
高橋 亮平 (広島大学大学院総合科学研究科 総合科学専攻 博士課程前期1年)
竹本 拓矢 (広島大学大学院総合科学部総合科学科 4年)

I 研究目的

本研究は、マウスを用いたメチル水銀の亜急性毒性モデルについて、脳の形態異常や脳浮腫、神経活動の亢進・抑制の状態を、非侵襲的手法である MRI で時空間的に観察し、更に MRI 撮像前後の運動障害・感覚障害などの行動異常を経時的に観察することで、(1)メチル水銀暴露に伴う脳の形態変化の推移と行動異常の推移の詳細なデータを収集すること、(2)MRI 所見と、運動障害・感覚障害などを同一マウスで計測することで、両者の相互関係や個体差を解析し、ヒトのメチル水銀中毒の MRI による診断の基礎データを得ることを目的とする。

メチル水銀毒性について、実験動物を用いて MRI を継時的に測定した例はこれまでほとんど報告されていない。

ヒトのメチル水銀中毒の診断において、MRI 画像という新たな情報を、運動障害・感覚障害などの従来の水俣病診断の情報に加えることによって、診断の客観性が向上し、また時間経過による症状の変化を直接脳のダメージの変化として捉えられる可能性がある。

マウスのデータは直接ヒトに適用できるわけではないが、本研究により、ヒトでは得にくいメチル水銀暴露に伴う脳の形態と運動障害・感覚障害の症状の変化の経時的で詳細なデータが得られ、ヒトのメチル水銀中毒の診断に外挿可能な重要な基礎データとなりうる。

さらに (3) 脳内性ステロイドの濃度を正確に定量することにより、メチル水銀暴露に伴う脳病変の選択的特異性、性差の原因、発達毒性と性ホルモンの関連などを明らかにすることも目的の一つである。

II 研究方法

実験 1. マウスへの低用量メチル水銀投与と MRI および行動障害の観察

オスマウスに 2 か月間メチル水銀：システイン溶液（モル比 1 : 1）を 2 または 4 mg Hg/kg の用量で投与し、メチル水銀への亜急性毒性試験を行った。投与法は、ヒトが汚染された魚介類を週 3 回摂取するという状況を想定し、週 3 回経口投与とした。

1 群 4 匹のマウス（日本クレア ICR、オス 4 週齢）は、1 群/1 ケージで、12 時間ずつの明暗条件（明期 8:00-20:00）、温度 22 ± 1 °C で飼育した。餌（日本クレア CE-2）、飲水は自由摂取とした。1 週間の順化の後、胃ゾンデ（フチガミ器械）を用いてメチル水銀とシステインの混合溶液、またはシステイン溶液（溶媒）のみを投与した。投与容量を 0.10 mL とし、10 mmol/L 塩化メチル水銀（関東化学）と 10 mmol/L L-システイン（ナカライ）の 1:1 混合溶液（ストック溶液）を、各マウスの体重に合わせてシステイン溶液で希釈して、投与用量を 2 または 4 mg Hg/kg のメチル水銀として週 3 回（火、木、土曜）午前 9 時から 10 時の間に投与した。

マウスは、週 3 回（火、木、土曜）の体重測定、週 1 回（日曜）のオープンフィールドテスト、週 1 回（日曜）のロータローッドテスト、週 1 回（火曜）の尾静脈からの採血を行い、2 週間ごとに徳島文理大に搬送して MRI 撮像を行った。

II-1-1 オープンフィールドテスト

オープンフィールドは、60cm×60cm×高さ 40cm の黒色プラスチック製で、底面は白色ラインで一辺 20 cm の正方形 9 区画にくぎってある。マウスをオープンフィールドの中央に入れ、移動をビデオ撮像し（今回の研究費で購入した、Web カメラ 478-9809 Logicool HD Webcam C525 およびパーソナルコンピュータ DELL Inspiron 15R Special Edition ベーシックを使用）、同時に白色ラインをまたいだ回数を 10 分間記録した。

II-1-2 ローターロッドテスト

ローターロッドテストは、ROTA-ROD/RS (Panlab, HARVARD apparatus、バイオリサーチ社) を用い、回転数 4 - 40rpm の 5 分間の回転数増加条件で、落下までの時間を計測した。

II-1-3 採血

週 1 回尾静脈より 5 μ L の採血を行い 45 μ L のミリ Q 水と混和し凍結保存している。今後、血中の総水銀含量を、国立水俣病総合研究センターとの協同研究として測定する。

上記、メチル水銀投与、体重測定、オープンフィールドテスト、ローターロッドテスト、採血は、研究参加者の高橋が中心となり、富士谷、竹本の補助の元で広島大学で実施した。

II-1-4 MRI

MRI 撮像には、徳島文理大学香川薬学部の MRminiSA, 1.5T を使用し、T1 強調画像(T1WI)、T2 強調画像(T2WI)、拡散強調画像(DWI)を撮像し、形態の変化を観察した。

撮像時、マウスはイソフルラン麻酔 (150mL/min 2.0%) 下で、直腸温を測定して循環温水で体温を 37.5°C に維持した。撮像は、内径 20mm のラジオ周波数コイルを使用し、2D マルチスライススピンエコー法によりフリップ角 = 90°、Field of view = 20 × 40 mm、voxel size 0.156 × 0.156 × 1 mm、画素数 = 128 × 256 とした。各シーケンスのパラメータは T1WI : TR = 500 msec、TE = 9 msec、T2WI : TR = 2500 msec、TE = 69 msec、DWI : TR = 2500 msec、TE = 69 msec、b 値 = 800 s / mm² とした。また各切片は 1 mm 厚とし、11 枚の前額断面を撮像した。一部のマウスは、水平断面、矢状断面も撮影した。画像積算回数は T1 WI: 8 回、T2WI と DWI : 4 回とした。

一部のマウスでは血液脳関門の破綻部位の有無を検討するため、ガドリニウム造影剤 (プロハンス (ガドテリドール) Bracco Diagnostics, Inc) を、尾静脈より 0.4 mmol/kg 注射し、10 分後より T1WI を撮像した。

一部のマウスには、30 mmol/L 塩化マンガン (0.9%NaCl 溶液) を 0.4mL 腹腔内投与し、投与 10 分、60 分、18 時間後に T1WI を撮像した。

画像解析は Image J (NIH) 及び RealiaPro (サイバーネットシステム) を用い画像コントラストの閾値を一定にし、画像間の補正を行った。

MRI の撮像は、研究分担者の伊藤、および研究参加者の高橋が行った。初回は主任研究者の山崎、研究参加者の石原、竹本も補助として同行した。

8 週間のメチル水銀投与後、半数のマウスはパラホルムアルデヒドで還流固定を行い、20 μ m のスライスを作製した。一部のスライスは NeuN 抗体と核染色で染色し、検鏡を行い、結果を解析中である。

半数のマウスは、脳を各部位に分けて液体窒素中で保存してある。今後、水銀含量、ステロイド濃度や各種 mRNA の定量を行う。

実験 2. コントロールマウスの脳内ステロイドホルモン濃度の測定

8 週齢の ICR オスマウスの脳を摘出し、大脳、小脳、海馬、下丘付近に切り分けて液体窒素で急速凍結した。アスカ製薬メディカル(株)に発送し、ステロイドホルモン (エストラジオール、デヒドロエピアンドロステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、ジヒドロテストステロン、プロゲステロン) 濃度を高感度 LC-MS/MS 分析で定量した。

実験 3. マウスへの高用量のメチル水銀投与と行動障害の観察

オスマウスに高用量 (10mg Hg/kg) のメチル水銀：システイン溶液 (モル比 1 : 1) を連日投与し、体重測定、オープンフィールドテスト、ローターロッドテストを行った。

2 群 10 匹ずつのマウス (日本クレア ICR、オス 8 週齢) を、実験 1 と同じ条件で飼育し、胃ゾンデを用いて 10 mg Hg/kg のメチル水銀とシステインの混合溶液 (1 群)、またはシステイン溶液 (溶媒) のみ (1 群) を連日、午前 9 時から 10 時の間に投与した。

マウスは連日、体重測定、オープンフィールドテスト、ローターロッドテスト、尾静脈からの採血を行った。実験手法は実験 1 と同様である。

(倫理面への配慮)

マウスの飼育、運搬、取り扱い、広島大学動物実験等規則、徳島文理大学香川薬学部実験動物研究施設利用心得および徳島文理大学香川薬学部動物実験指針、および動物の愛護及び管理に関する法律等、実験動物に関する国の基準、指針に準拠した (広島大学動物実験計画 承認番号 C13-14、承認期間 平成 25 年 8 月 5 日から平成 28 年 6 月 30 日まで)。

Ⅲ 研究結果

Ⅲ-1

実験1：マウスへの低用量メチル水銀投与の結果

オスマウス（4週齢）に2か月間2または4 mg Hg/kg メチル水銀を週3回経口投与した。

Ⅲ-1-1 体重変動

メチル水銀投与マウスは、今回の投与量では順調に体重が増加し、コントロールである溶媒投与マウスとの差異は見られなかった（図1）。

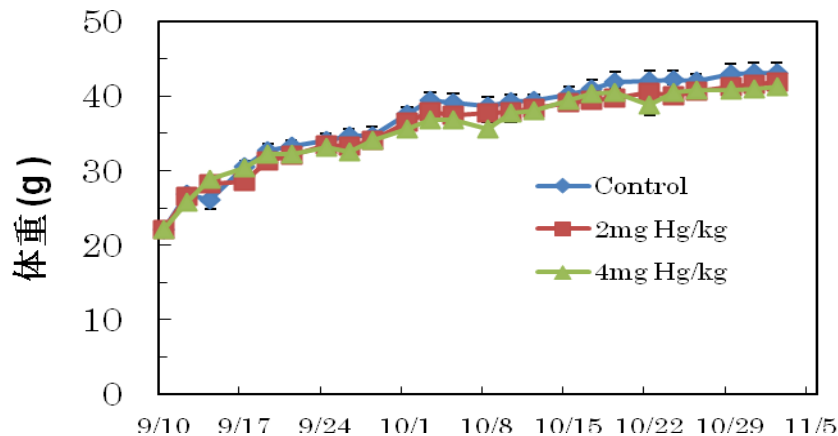


図1 メチル水銀投与後の体重推移
4週齢ICR雄マウスに、9月10日よりメチル水銀、または溶媒のみ(Control)を週3回投与した。投与時に測定した体重を示す。横軸は日付け。

Ⅲ-1-2 オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストで、自発運動量、新規探索行動を計測した。テストの初回（メチル水銀投与前）のみやや移動が活発であったが、メチル水銀投与の影響、投与後の経時的な変動は見られなかった（図2）。

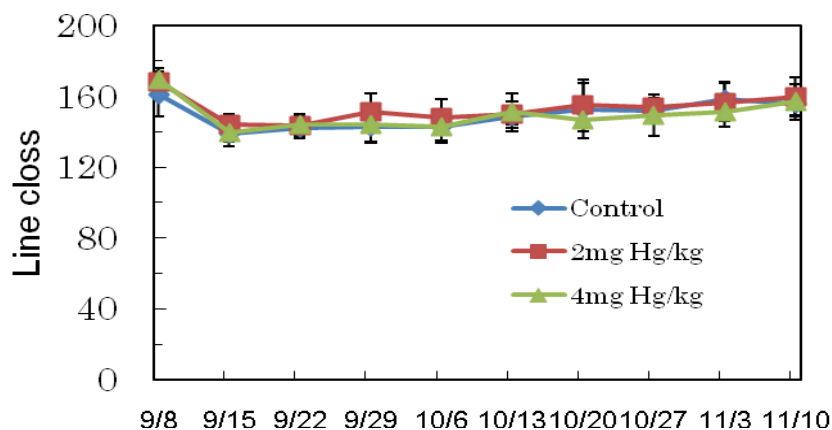


図2 オープンフィールドテストの経時変化
60cm×60cm のオープンフィールドを9区画の正方形に区切り、その区切り線を通じた回数を10分間測定した。測定は、週1回実施した。9月8日はメチル水銀投与前である。

III-1-3 ローターロッドテスト

ローターロッドを用い、回転する円柱からマウスが落下するまでの時間（持続時間）をメチル水銀投与 8 週間後に計測した。4 mg Hg/kg 投与群のみ、有意に落下までの時間が短くなり、メチル水銀毒性の影響が見られた（図 3）。

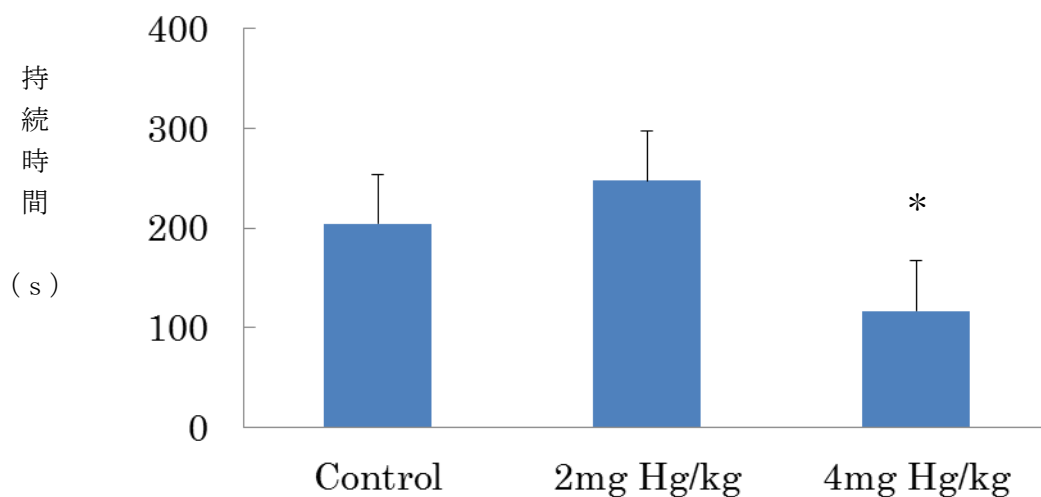


図 3 メチル水銀投与 8 週間後のローターロッドテスト結果

回転数 4・40rpm の 5 分間の回転数増加条件で、落下までの時間（持続時間）を計測した。縦軸は、落下までの持続時間（秒）、横軸はメチル水銀の投与量である。各群 4 匹のマウス。

* $p < 0.05$, vs 溶媒投与群(Control)

III-1-4 MRI 画像

T1 強調画像（図 4）、T2 強調画像（図 5）、拡散強調画像（図 6）は、1 mm 厚で、嗅球から 1.2 mm きざみで 11 枚撮像した。図 4、5、6 では、メチル水銀 4 mg Hg/kg を 6 週間投与したマウスの画像、それぞれ 12 枚を示す。

コントロール（溶媒投与）群とメチル水銀投与群の MRI 画像を比較すると、第 3 脳室および側脳室の面積、下丘核領域のシグナル強度に大きな相違が見られた。図 7、9 に、拡大した画像を示し、相違点を定量的に示す。

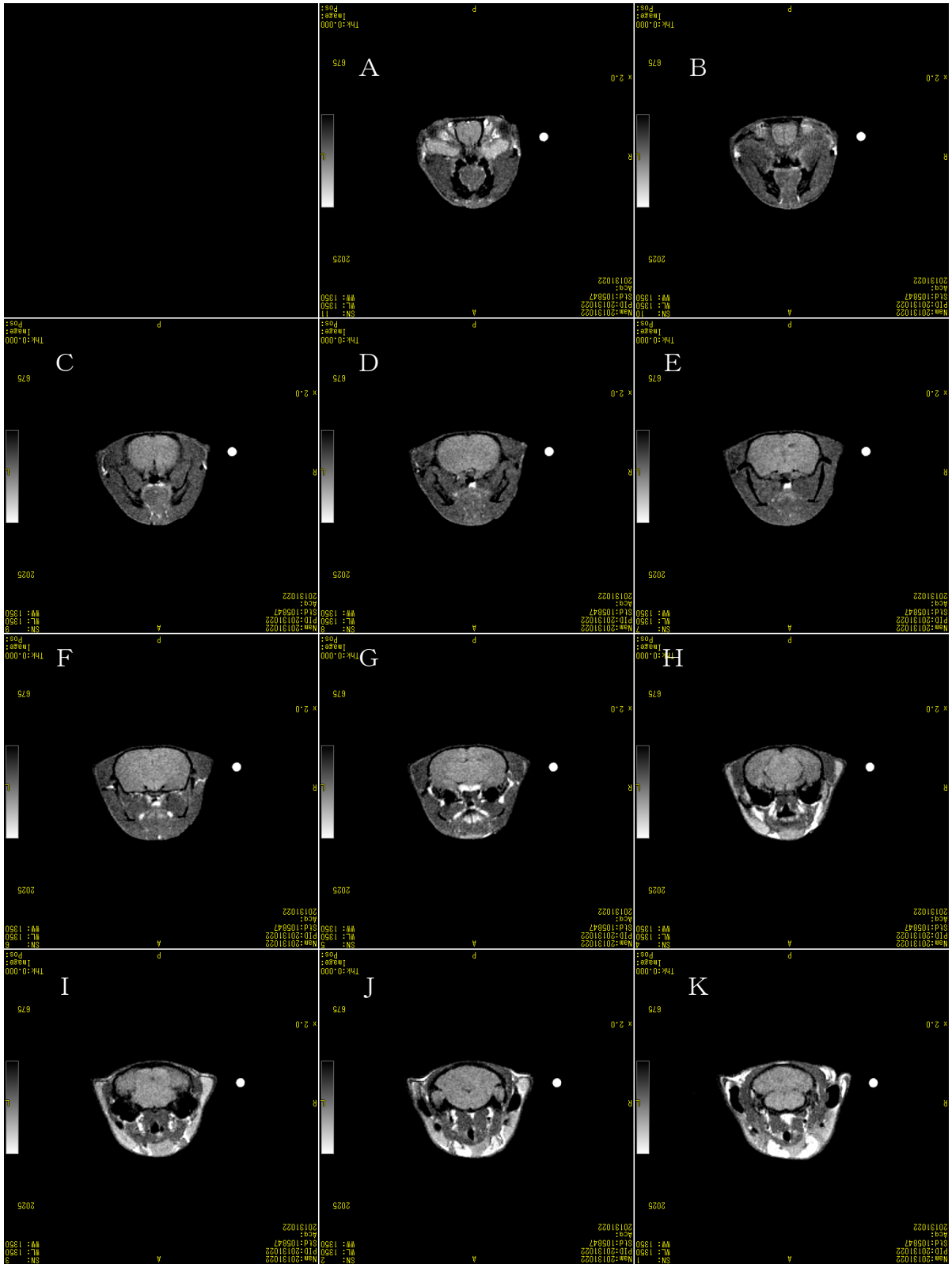


図4 T1 強調画像
 メチル水銀 4 mg Hg/kg を週 3 回、6 週間投与したマウスの T1 強調画像。嗅球の位置 (A) から (K) まで 1.2 mm 刻みで 11 枚撮像。

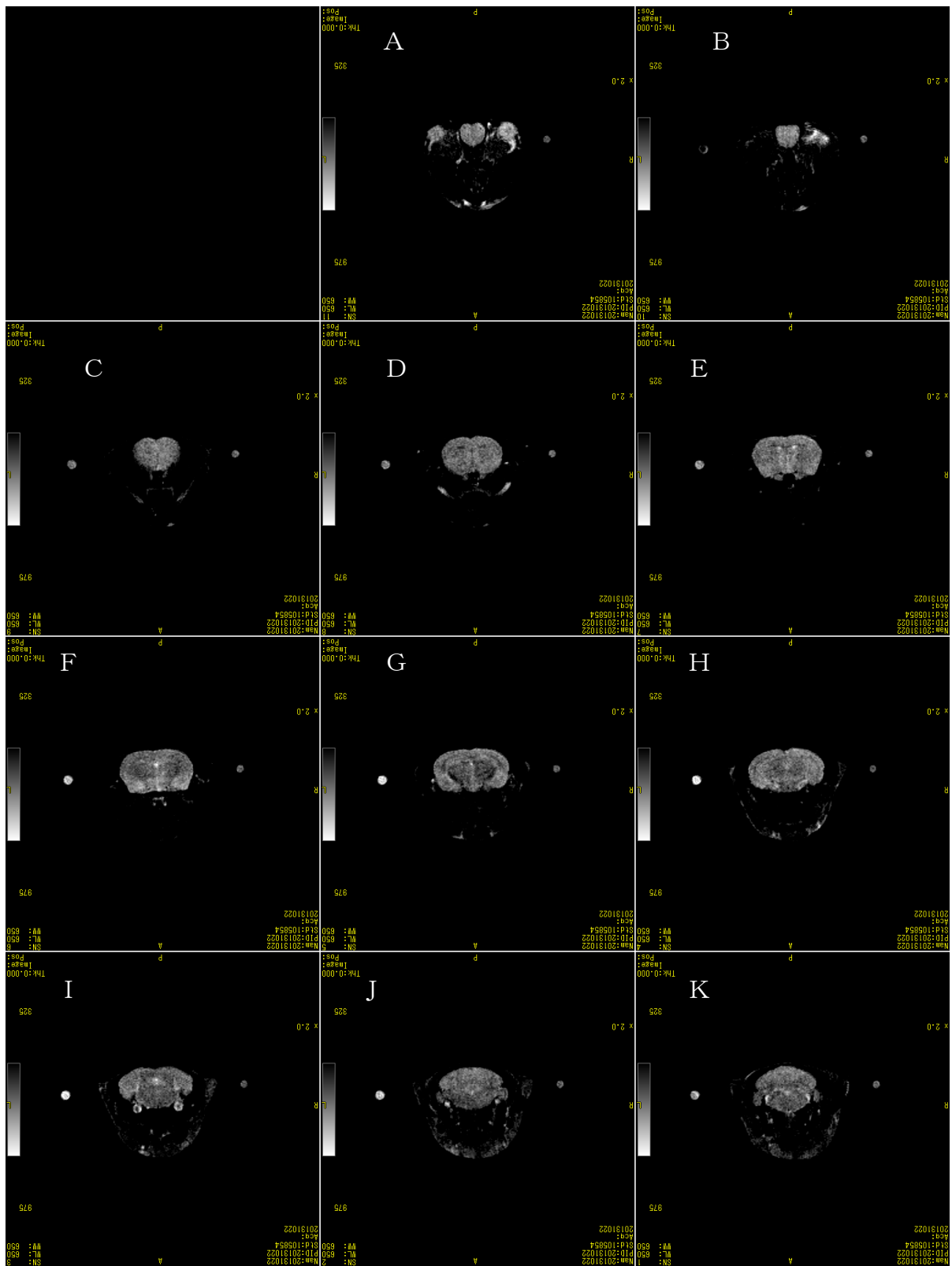


図5 T2強調画像

メチル水銀 4 mg Hg/kg を週 3 回、6 週間投与したマウスの T2 強調画像。嗅球の位置 (A) から (K) まで 1.2 mm 刻みで 11 枚撮像。

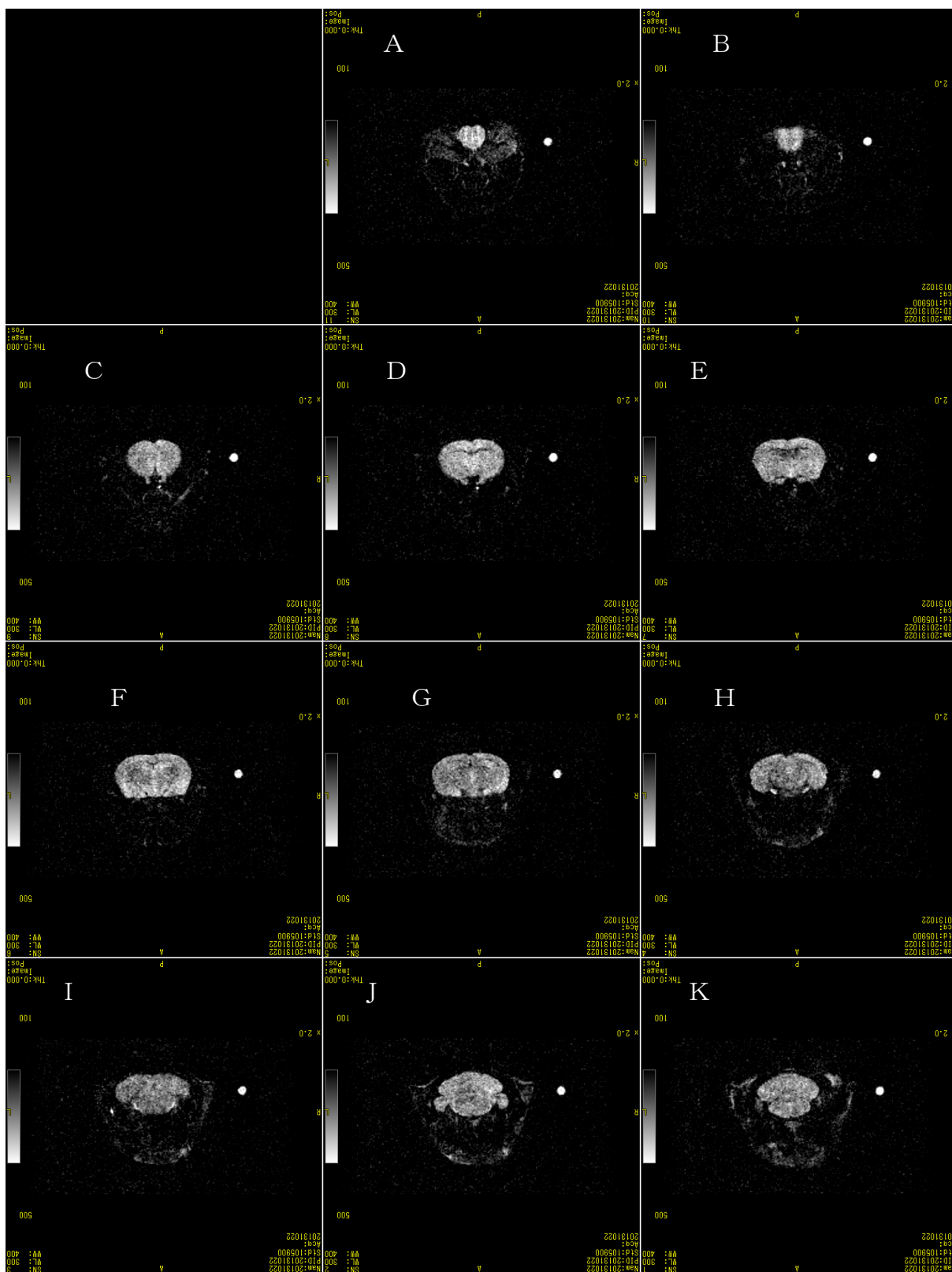


図6 拡散強調画像

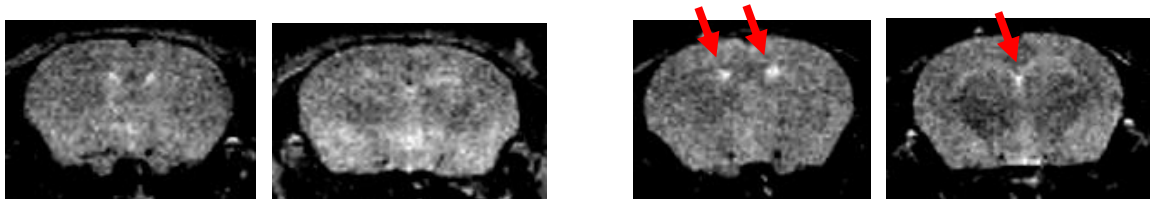
メチル水銀 4 mg Hg/kg を週 3 回、6 週間投与したマウスの拡散強調画像。嗅球の位置 (A) から (K) まで 1.2 mm 刻みで 11 枚撮像。

III-1-5 側脳室、第3脳室の相対面積

嗅球から 4.8mm、6mm の位置の T2 強調画像（図 5、E、F にあたる）を用い、側脳室、第 3 脳室（図 7、矢印）の面積を脳全体の面積で割った値を、脳室の相対面積とした。

メチル水銀 4 mg Hg/kg 投与マウスでは、2 週目から脳室が有意に広がり、溶媒を投与したコントロールマウスの約 2 倍となった。投与 6 週目は、有意差がなかった。

投与 8 週目では、メチル水銀 2、4 mg Hg/kg 投与で、脳室面積の増加に濃度依存性が見られた（図 8）。



溶媒 2 週間投与マウス（コントロール）

メチル水銀 4 mg Hg/kg 2 週間投与マウス

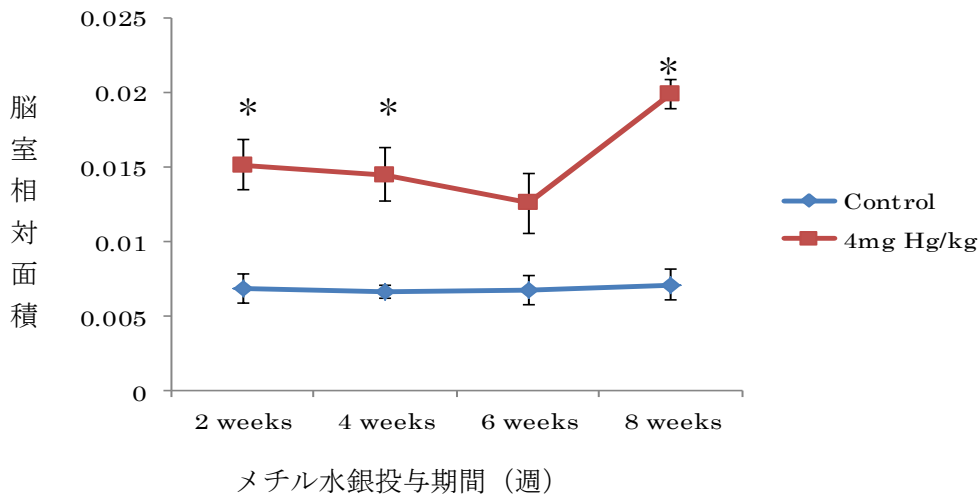


図 7 側脳室、第 3 脳室の相対面積の経時変化

溶媒、またはメチル水銀 4 mg Hg/kg を投与したマウスの T2 強調画像の脳室部分の面積を、脳全体の面積で割った相対値。各群 4 匹のマウス

* $p < 0.05$, vs 溶媒投与マウス (Control)

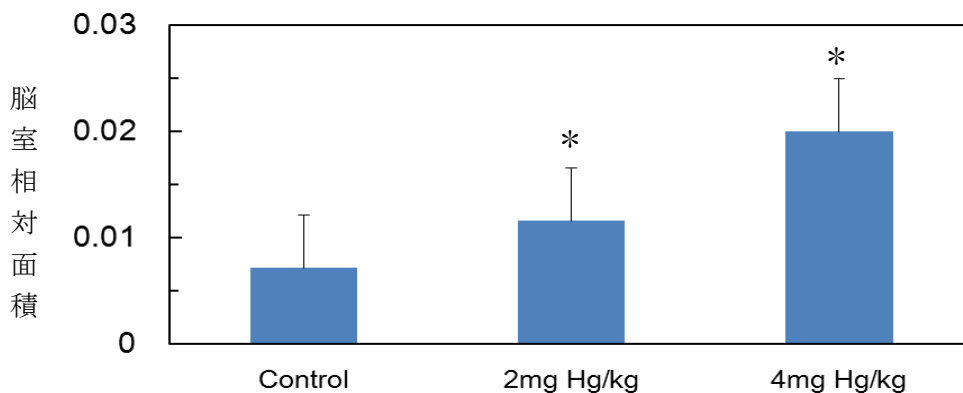


図 8 側脳室、第 3 脳室の相対面積のメチル水銀濃度依存性

溶媒、またはメチル水銀を 8 週間投与したマウスの T2 強調画像の脳室部分の面積を、脳全体の面積で割った相対値。各群 4 匹のマウス

* $p < 0.05$, vs 溶媒投与マウス (Control)

III-1-6 下丘核領域の障害

嗅球より 9.6 mm の位置の T1 強調画像 (図 4、I にあたる) において、メチル水銀 4 mg Hg/kg を 2、4 週間投与したマウスの下丘核領域に、顕著なシグナル増加が見られた (図 9)。これは、下丘核に器質的な障害が起きていることを示唆している。ただし、4 mg Hg/kg 投与 6、8 週目では、シグナルの増加は弱まり、コントロール (溶媒投与) マウスとの差が明確でなくなった (図 4、I)。2 mg Hg/kg 投与では、顕著なシグナルの増加は見られなかった。

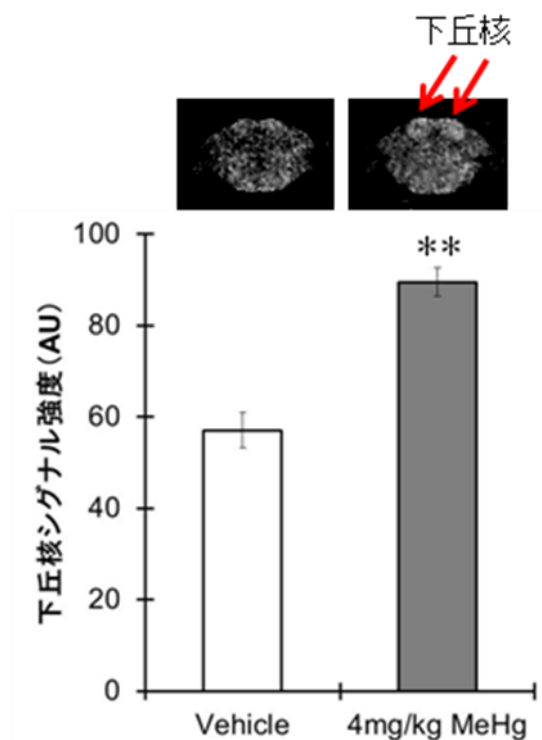


図 9 メチル水銀による下丘核の障害

溶媒(Vehicle)、またはメチル水銀 4 mg Hg/kg を 4 週間投与したマウスの T1 強調画像。下丘核領域において、メチル水銀投与マウスのシグナルの増加が観察された。

III-1-7 ガドリニウム造影剤による、血液脳関門の検討

ガドリニウム造影剤を用いて、血液脳関門破たん箇所を検出を試みた。今回、メチル水銀 4 mg Hg/kg 投与 6 週目のマウスでの撮像を行ったが、ガドリニウムのシグナルは血液脳関門内部の領域には見られず、関門の破たん箇所は検出されなかった (図 10)。

また、同じメチル水銀投与条件で塩化マンガンを投与して T1 強調画像を撮像した。マンガンは、NMDA 受容体などのカルシウムチャンネルを介して神経細胞内に取り込まれ、かつ代謝・排泄が遅いため、T1 強調画像でマンガンの脳内分布を測定することにより、神経活動の亢進、抑制部位が同定できる。しかし、今回の条件では、顕著なシグナル変化は検出されなかった (データは示していない)。

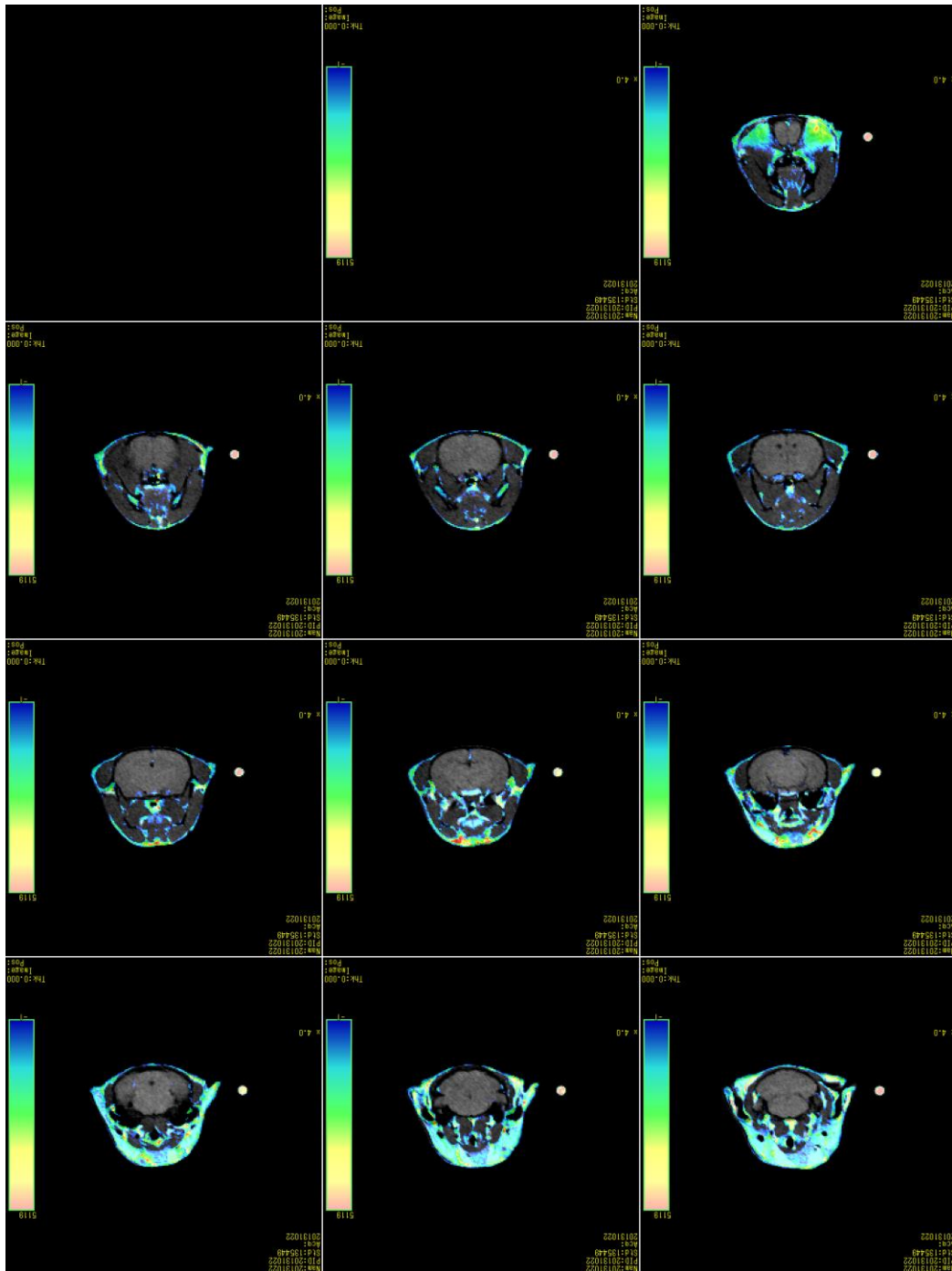


図10 ガドリニウム造影剤を用いた、血液脳関門破たん箇所の検出

メチル水銀 4 mg Hg/kg 投与 6 週目のマウスの T1 強調画像を撮像後、ガドリニウムキレート剤（プロハンス（ガドテリドール））を、尾静脈より注射し、10 分後に同じシーケンスで撮像した。キレート剤投与後の T1 強調画像のシグナルから投与前のシグナルを差し引くことでガドリニウムのシグナル強度を算出し、疑似カラーで表した。図では T1 強調画像と重ねて示してある。血液脳関門の破綻箇所があれば、脳内にガドリニウムのシグナル(カラーで表示)が検出される。

Ⅲ-2

実験2：コントロールマウスの脳内ステロイドホルモンの定量

8週齢オスマウスの各脳部位のステロイドホルモン濃度を定量した結果を表Iに示す。

表I マウス脳内ステロイドホルモン濃度

エストラジオール、E2；デヒドロエピアンドロステロン、DHEA；アンドロステンジオン、A-dione；テストステロン、T；ジヒドロテストステロン、DHT；プロゲステロン、P4

No.	検体名	E2	DHEA	A-dione	T	DHT	P4
		pg/g	pg/g	pg/g	ng/g	pg/g	pg/g
1	1:マウス大脳	13.8	56.4	89.4	1.79	470.9	104.6
2	2:マウス小脳	32.9	110.2	60.2	1.21	261.7	168.2
3	3:マウス海馬	14.8	162.8	81.4	1.76	401.3	142.1
4	4:マウス下丘付近	19.1	213.0	86.1	1.27	343.3	119.4

Ⅲ-3

実験3：マウスへの高用量のメチル水銀投与による行動障害の観察

オスマウス（8週齢）に10 mg Hg/kg メチル水銀を連日経口投与し、行動観察を行った。今回はMRI撮像は行っていない。

Ⅲ-3-1 体重変動

メチル水銀投与マウス（10匹）は投与2日目以降体重が有意に減少し、投与6日目、7日目、10日目、12日目、13日目にそれぞれ1匹ずつ死亡、もしくは著しく運動量が低下したので屠殺した。コントロール（溶媒投与）群には体重減少は見られなかった（図11）。

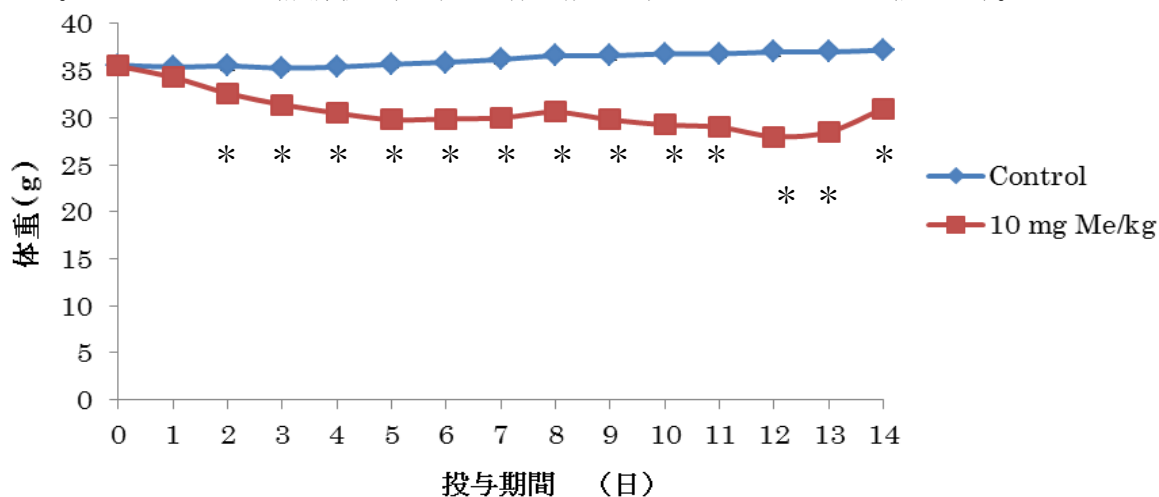


図11 メチル水銀投与後の体重推移

8週齢ICR雄マウスに、メチル水銀、または溶媒のみ(Control)を毎日投与した（各群10匹ずつ）。投与時に測定した体重を示す。横軸は投与日数。

* p < 0.05, vs 溶媒投与群(Control)

Ⅲ-3-2 オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストで、自発運動量、新規探索行動を計測した。今回測定したマウスでは、投与群とコントロール（溶媒投与）群間で有意な差は認められなかった（データは示していない）。

Ⅲ-3-3 ローターロッドテスト

回転数4・40rpmの5分間の回転数増加条件で、マウスがローターから落下するまでの時間（持続時間）を計測した（図12）。10 mg Hg/kgのメチル水銀を投与すると、3日目から有意に持続時間が短くなり、6日目以降は平均で50秒以下、11日目以降は、10秒以下で落下した。

溶媒投与群では、持続時間に有意な変化は見られなかった。

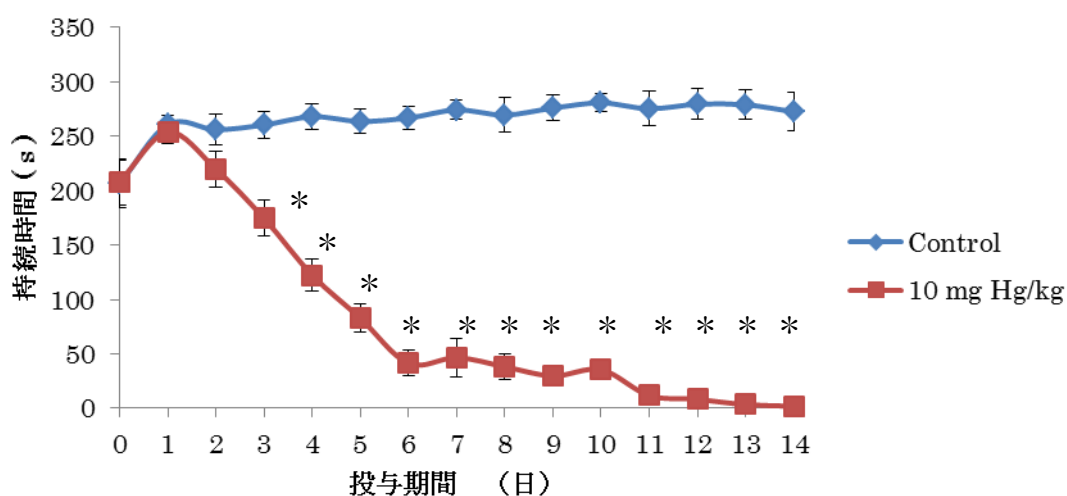


図12 ローターロッドテスト結果の経時変化

8週齢ICR雄マウスに、メチル水銀、または溶媒のみ(Control)を毎日投与した（各群10匹ずつ）。回転数4・40rpmの5分間の回転数増加条件で、落下までの時間を計測した。縦軸は、落下までの持続時間（秒）、横軸はメチル水銀の投与期間である。0は、投与前に測定した。* $p < 0.05$, vs 溶媒投与群(Control)

IV 考察

実験1により、比較的低用量のメチル水銀投与でのマウス脳への神経毒性が、MRI撮像により高感度で検出された。

今回の投与量のうち、2 mg Hg/kg 週3回投与では、ローターロッドテスト、オープンフィールドテストや体重に変動が見られず、運動機能や全身への影響は検出されなかった。この投与量でも、MRI画像では脳室の有意な拡大が観察された。これは、MRIが高感度なメチル水銀毒性の検出手法であることを示している。

メチル水銀 4 mg Hg/kg 週3回投与では、ローターロッドテストで有意差があり、運動機能への影響が見られた。この投与量では、MRI画像による脳室の拡大はより顕著になり、さらに下丘核領域のシグナル増加が観察された。

脳室の拡大の原因は、脳の委縮や、脳脊髄液の増加などが考えられる。現在行っている脳スライスの検鏡結果を解析して脳室拡大の原因を調べ、メチル水銀毒性との関連を追及していく。

また、下丘核でのMRIシグナルの変動が、脳組織の解剖学的変異とどのように関連付けられるかも、現在行っている脳スライスの検鏡の結果を用いて解析する。下丘は聴覚神経核であり、周波数弁別や、ヒトでの音声言語の認知などの聴覚機能をつかさどる部位である。メチル水銀中毒は聴覚障害を引き起こすことが知られており、胎児性水俣病患者や、フェロー諸島コホート研究、マデエイラ諸島での疫学研究などで、メチル水銀による下丘を含む聴覚伝導路への影響が言及されている（文献1-4）。下丘領域でのMRIシグナルの変動が、聴覚異常という高次脳機能の障害と関連付けられる可能性もあり、今後も下丘の変動を可能な範囲で追求していく。

今回、4 mg Hg/kg 週3回投与という脳や行動に異常が観察された投与量でも、ガドリニウム造影剤による血液脳関門の破綻は検出されなかった。ヒトの中毒では、メチル水銀は血液脳関門を破壊せずに脳内に侵入するとされているので、今後は血液脳関門の解析は行わない予定である。

実験2では、平常時のマウス脳内ステロイドホルモン濃度を定量した。今後この値に基づいて、ステロイドの定量に必要なサンプル量を算定し、メチル水銀投与マウスの脳障害部位やその周辺のステロイド濃度を測定していく。

実験3では、10 mg Hg/kg の連日投与という投与量では、投与3日目以降には顕著な行動異常が観察された。マウスは最短で投与6日目で致死的なダメージを受け、12日目までに6割が死亡した。今後、この投与量を最大投与量として、MRI所見と行動異常の関連性を追求していく。

V 結論

MRI撮像により、行動や運動機能の異常が見られない程度のメチル水銀暴露条件で、有意な脳室の拡大が観察された。これは、MRIが、感度の高いメチル水銀の神経毒性の検出手法であることを示している。

MRIにより、メチル水銀が下丘核に器質的な影響を与えることが示された。これは、MRI所見によりメチル水銀が引き起こす高次脳機能障害(聴覚障害)を捉えている可能性がある。

このように、非浸襲的な画像診断法であるMRIは、メチル水銀毒性による運動障害や感覚障害といった症状を実際の脳画像の変異と関連付けることを可能にし、診断の客観化、そして病態のメカニズム解明への活用が期待できる。

VI 次年度以降の計画

平成 25 年度の研究によって、メチル水銀曝露による脳の異常が MRI によって、脳室拡大、下丘核のシグナル異常として高感度で検出された。しかし投与量が比較的低用量であったので行動や運動機能障害が顕著ではなく、MRI 所見との関連性の解析が充分に行えなかった。また、性差の解析も行っていない。

そこで、次年度以降は、やや高用量のメチル水銀投与による影響を解析し、ついで性差や胎児性メチル水銀障害の研究へと発展させていく。

平成 26 年度

実験 1. マウスへの高用量のメチル水銀投与

性成熟後（8 週齢）の ICR オスマウス（1 群 8 匹程度）に 6-8 mg Hg/kg 程度のメチル水銀を毎日経口投与し、行動や運動機能障害を顕著に発現させて MRI 所見との関連性を追及する。

(A) 行動異常、運動機能及び感覚神経障害の評価（広島大学で実施）

行動や運動機能障害について、ローターロッドテスト、オープンフィールドテストに加え、後肢への熱痛覚を計測するプランターテストを実施し、末梢知覚神経障害を測定する。末梢神経への病理的影響は、坐骨神経を剖検することで解析する。その際、脳の各部位、肝臓、腎臓の水銀濃度を測定し、水銀の蓄積状態を把握しながら実験を行う。

(B) MRI による脳障害の評価（徳島文理大学香川薬学部で分担研究者が実施）

メチル水銀を投与したマウスの T1 強調画像、T2 強調画像、拡散強調画像で脳の形態変化（脳室の拡大など）を数値化する。さらに、脳の部位ごとに画像を分割してそれぞれのシグナル強度を数値化して詳しく解析し、下丘で観察されたようなシグナル強度変化が他の部位で見られないか、精査する。

(C) 脳障害の病理学的検査（広島大学で実施）

メチル水銀投与後のマウス脳を還流固定して薄片スライスを作製し、脳室の拡大、下丘核の MRI シグナルの変動がどのような病理組織学的変化と関連しているか、明らかにする。上記（B）で他の脳部位に障害が見出された場合は、その部位の病理組織学的変化との関連も追求する。

(D) メチル水銀で惹起される行動や運動障害、MRI シグナルの変動、そして脳と末梢神経の病理組織学的変化の関連を、末梢神経障害と中枢神経障害の区別に注意を払いながら解析する。

実験 2. 性差の検出と脳内ステロイドの定量

マウスへのメチル水銀曝露では、水銀の排泄機能に性差が見られる場合があり、脳への蓄積量が異なる可能性がある。そこで、まず ICR メスマウスにメチル水銀を投与し、臓器の水銀含量をモニターして、脳内水銀量がオスと同程度になるように投与の条件を調整する。メチル水銀投与後、メスマウスの行動や運動障害、MRI 像を計測し、水銀蓄積量が同程度のオスマウスの所見と比較して、性差を解析する。

メチル水銀投与前後のオス、メスマウスの脳内と血中の各ステロイド量を定量し、性差とステロイドの関連を解析する。25 年度に測定した投与前のオスマウスの脳内ステロイド量を参考にして、サンプリング部位、サンプリング量を決める。

平成 27 年度

実験 3. メチル水銀毒性に対する脳内ステロイドの影響

性腺除去したオスまたはメスマウスに、エストラジオールまたはテストステロンのペレットを埋め込み、血中および脳内ステロイド濃度を人為的にコントロールする。低ステロイド濃度、生理的濃度、高濃度の 3 群を調製し、平成 26 年度の実験で顕著な影響が見られた用量のメチル水銀を投与し、行動や運動機能障害、MRI 所見、脳や臓器の組織学的変動と脳

内ステロイド濃度の関連を解析する。

実験 4. 胎児性メチル水銀中毒の、MRI による検出

母マウスに妊娠初期から離乳時までメチル水銀を投与し、胎児性メチル水銀中毒マウスを作製する。そのマウスの行動や運動機能障害、MRI 所見を観測し、胎児性メチル水銀毒性の検出と、その経時的変化の解析を行う。

引用文献

- 1) Grandjean, P. et al.: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol. Teratol.* 1997;19: 417-428
- 2) Grandjean, P. et al.: Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese Birth Cohort. *J. Pediatr.* 2004; 144: 169-176
- 3) Murata, K. et al.: Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J. Pediatr.* 2004; 144: 177-183
- 4) Murata, K. et al.: Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol. Teratol.* 1999; 21: 343-348,

Correlation of magnetic resonance imaging of brain with behavioral disorder in neurotoxicity of methylmercury

Takeshi Yamazaki^{*1}, Kouichi Itoh^{*2}, Yasuhiro Ishihara^{*1}, Ryohei Takahashi^{*1}, Noriko Fujitani^{*1}, Takuya Takemoto^{*1}

**1 Laboratory of Molecular Brain Sciences, Graduate School of Integrated Arts and Sciences,
Hiroshima University*

**2 Laboratory for Brain Sciences, Department of Pharmacy,
Faculty of Pharmaceutical Sciences at Kagawa Campus, Tokushima Bunri University,*

Keywords: neurotoxicity of methylmercury; magnetic resonance imaging, behavioral disorder

Abstract

Methylmercury is a neurotoxin that induces neuronal damage in the central nervous system and various behavioral disorders. Relationship between time dependent changes in neuroanatomical lesion and behavioral disorders induced by methylmercury has not been clarified yet. Magnetic resonance imaging (MRI) is a noninvasive method that can analyze anatomical change of brain in living animals. In this project, the time dependent changes of anatomical lesions in brain and the behavioral disorders of mice exposed to methylmercury were investigated for 8 weeks.

Male ICR mice (4 weeks old) were orally given 2 or 4 mg Hg/kg of methylmercury chloride for 3 days per week. Spontaneous locomotor activities were determined by open field test once a week. Once a fortnight, MRI measurements of T1-, T2- and diffusion-weighted images were performed using a MRmini-SA device consisting of 1.5-Tesla permanent magnet on isoflurane anesthetized mice. The motor coordination in mice exposed to methylmercury for 8 weeks was analyzed by rotarod test.

Body weight and spontaneous locomotor activities of mice were not significantly changed regardless of dose of methylmercury for 8 weeks. Abnormality of motor coordination was observed in mice given 4 mg Hg/kg of methylmercury but not in 2 mg Hg/kg. According to their MR images, volume of lateral ventricles and the third ventricle were enlarged both in 2 and 4 mg Hg/kg methylmercury-treated mice in a dose-dependent manner. The T1-weighted signal on the area of nucleus of inferior colliculus was significantly increased in mice given 4 mg Hg/kg of methylmercury.

These results indicate that MR imaging is a sensitive method for detecting toxicity of methylmercury, since the signal change of MRI was observed even in 2 mg Hg/kg of methylmercury-administrated mice, in which no significant changes on behavioral disorders were detected.

平成 25 年度
メチル水銀研究ミーティング

講演要旨集

期間：2013 年 12 月 11 日

会場：LMJ 東京研修センター 2 階 特大会議室

主催：環境省

目 次

プログラム	1
発表要旨	
<u>特別講演</u>	
メチル水銀の特異的経胎盤移行と胎児影響（坂本 峰至）	5
<u>一般講演</u>	
講演 1 メチル水銀による翻訳伸長因子 eEF1A の発現低下（藤村 成剛）	11
講演 2 メチル水銀毒性に対するニューロステロイドの神経保護作用（山崎 岳）	15
講演 3 メチル水銀と活性イオウ分子（熊谷 嘉人）	20
講演 4 メチル水銀の病理を担う分子機構（鍛冶 利幸）	25
講演 5 魚肉におけるメチル水銀の蓄積とセレンによる解毒作用（山下 倫明）	29
講演 6 胎生期および発育・発達期における低濃度複合水銀曝露による神経行動毒性	34
について（吉田 稔）	
講演 7 メチル水銀トランスポーターを利用した水銀化合物のファイトレメディエ	39
ーション（清野 正子）	
<u>若手発表</u>	
発表 1 エキソソームを介するメチル水銀排出経路（今村 伸太郎）	45
発表 2 メチル水銀とそのグルタチオン抱合体による Keap1/Nrf2 経路の活性化（新	48
開 泰弘）	
発表 3 メチル水銀による脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の PGI ₂ /PGE ₂ 合成の	50
誘導（栗田 賢）	
発表 4 メチル水銀による脳特異的な CCL4 ケモカイン誘導（高橋 勉）	52
発表 5 ピルビン酸が示すメチル水銀毒性増強作用（李 辰竜）	54
発表 6 メチル水銀の視覚系組織への影響（今田 敏博）	57
発表 7 水銀耐性菌のメチル水銀トランスポーターに関する研究（曾根 有香）	60
発表 8 周産期におけるメチル水銀曝露が生後 30 ヶ月時の行動におよぼす影響	62
—沿岸地域に住む母子を対象に—（龍田 希）	

趣 旨 : 本ミーティングは、メチル水銀による健康影響に関する研究について各研究者の研究
成果の発表及び討論する場を設けることにより、若手研究者の育成を推進し、研究者
間での連携を強化し、環境省が実施する「重金属等による健康影響に関する総合的研
究」の更なる発展に資することを目的とする。

日 時 : 平成 25 年 12 月 11 日 (水) 9:00~17:00 (特別講演、一般講演、若手発表)

場 所 : LMJ 東京研修センター 2 階 特大会議室

参加資格 :

本ミーティングに参加できるのは、以下のいずれかに該当する者とする。

- ①環境省及び事務局より招待されまたは参加を依頼された者
- ②公募により発表の申請のあった参加予定者
- ③①②から紹介された者で事前に事務局に登録された者
- ④研究成果発表会への参加者であって、事前に事務局に登録された者

プログラム

特別講演 : 60分 (発表 50分、質疑応答 10分)
一般講演 : 30分 (発表 20分、質疑応答 10分)
若手発表 : 15分 (発表 10分、質疑応答 5分)

12月11日(水)

9:00 開会(事務局)

9:01~9:10 挨拶(環境省)

9:10~9:15 研究ミーティング進行についての説明(事務局)

■第1部 一般講演「メチル水銀毒性の分子メカニズム」

座長 臼杵 扶佐子(国水研・主任研究企画官)、永沼 章(東北大薬・教授)

9:15~9:45 演題1 藤村 成剛
(国水研・室長) メチル水銀による翻訳伸長因子 eEF1A の発現低下

9:45~10:15 演題2 山崎 岳
(広島大院総合科学・教授) メチル水銀毒性に対するニューロステロイドの神経保護作用

10:15~10:45 演題3 熊谷 嘉人
(筑波大医学医療・教授) メチル水銀と活性イオウ分子

10:45~10:55 休憩

■第2部 特別講演

座長 佐藤 洋(内閣府食品安全委員会・委員長代理)

10:55~11:55 坂本 峰至
(国水研・部長) メチル水銀の特異的経胎盤移行と胎児影響

11:55~12:35 昼食

■第3部 若手発表「メチル水銀研究の新展開」

座長 佐藤 雅彦(愛知学院大薬・教授)

12:35~12:50 発表1 今村 伸太郎
(水産総合研究センター中央水研・主任研究 エキソソームを介するメチル水銀排出経路員)

12:50~13:05 発表2 新開 泰弘
(筑波大医学医療・助教) メチル水銀とそのグルタチオン抱合体による Keap1/Nrf2 経路の活性化

13:05~13:20 発表3 栗田 賢
(東京理科大院薬・M2) メチル水銀による脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の PGI₂/PGE₂ 合成の誘導

13:20~13:35 発表4 高橋 勉
(東北大院薬・助教) メチル水銀による脳特異的な CCL4 ケモカイン誘導

座長 鍛冶 利幸(東京理科大薬・教授)

13:35~13:50 発表5 李 辰竜
(愛知学院大薬・助教) ピルビン酸が示すメチル水銀毒性増強作用

- 13:50～14:05 発表 6 今田 敏博
(慶應義塾大医・D3) メチル水銀の視覚系組織への影響
- 14:05～14:20 発表 7 曾根 有香
(北里大薬・助教) 水銀耐性菌のメチル水銀トランスポーターに関する研究
- 14:20～14:35 発表 8 龍田 希
(東北大院医・助教) 周産期におけるメチル水銀曝露が生後 30 ヶ月時の行動におよぼす影響
—沿岸地域に住む母子を対象に—

14:35～14:45 休 憩

■第 4 部 一般講演「メチル水銀の神経毒性」

座長 熊谷 嘉人 (筑波大医学医療・教授)、黄 基旭 (東北大院薬・講師)

- 14:45～15:15 演題 4 鍛冶 利幸
(東京理科大薬・教授) メチル水銀の病理を担う分子機構
- 15:15～15:45 演題 5 山下 倫明
(水産総合研究セ中央水研・グループ長) 魚肉におけるメチル水銀の蓄積とセレンによる解毒作用
- 15:45～16:15 演題 6 吉田 稔
(八戸学院大人間健康・教授) 胎生期および発育・発達期における低濃度複合水銀曝露による神経行動毒性について
- 16:15～16:45 演題 7 清野 正子
(北里大薬・准教授) メチル水銀トランスポーターを利用した水銀化合物のファイトレメディエーション

16:45～16:55 「若手研究奨励賞」授賞者発表および表彰式

16:55～17:00 閉会の挨拶 (環境省)

特 別 講 演

メチル水銀の特異的経胎盤移行性と胎児影響

○坂本 峰至（環境省 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を担う胎児への強い影響が世界の注目を集めた。今回はメチル水銀の特異的胎児移行と胎児影響を中心に、以下の構成で概説する。

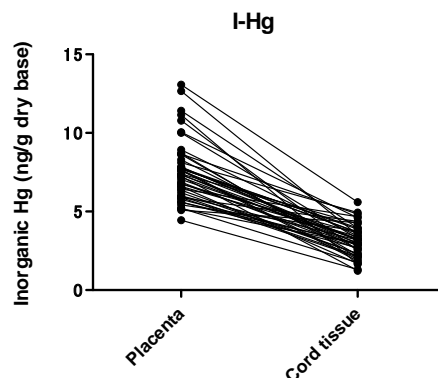
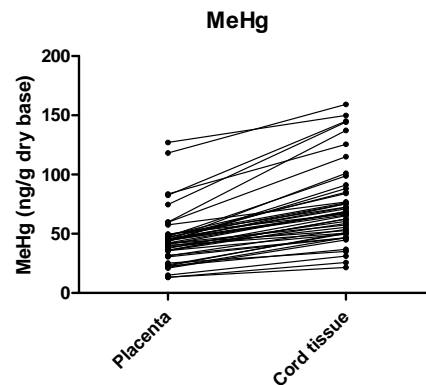
1. 水俣病とイラクのメチル水銀中毒のビデオでメチル水銀のハイリスクグループが胎児であることの再認識

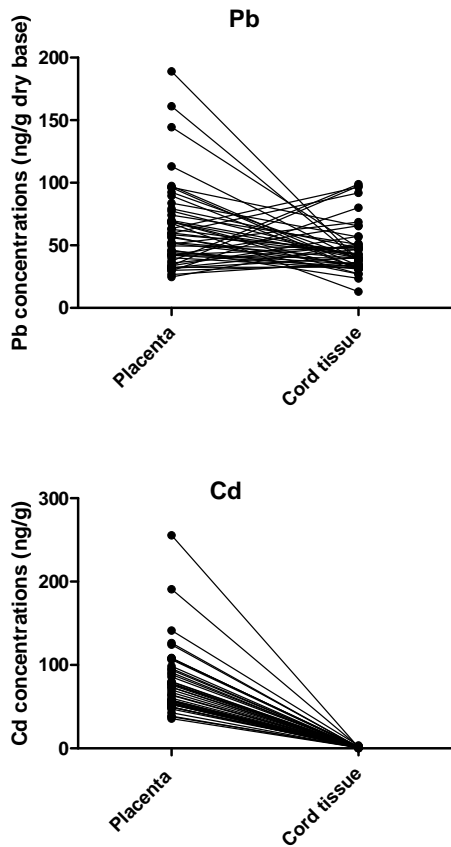
水俣病の成人における主要臨床症候は、四肢末端の感覚障害、小脳性運動失調、求心性視野狭窄、中枢性聴力障害、中枢性平衡機能障害等である。また、水俣病では母親に症状が全くないかあっても軽度であるにもかかわらず、脳性麻痺様の症状を示す胎児性水俣病患者が発生し、メチル水銀の次世を担う胎児への強い影響が世界の注目を集めた。イラクではメチル水銀で消毒した種子小麦を誤って食したために大規模なメチル水銀中毒事件が発生し、わずか二ヶ月間で犠牲者は6,530人（うち、459人死亡）に上った。イラクのメチル水銀中毒でも、出生前に曝露を受けた児が、水俣病で報告されたような重度の脳性麻痺様症状を呈したことが報告されている。

2. メチル水銀の特異的胎児移行性に関する研究

胎児は胎盤を介して母親から酸素や栄養を受け取る。しかし、水銀、鉛、カドミウムなどの有害金属も胎盤を介して胎児に移行する。ただ、その移行性には大きな差があることを、我々は、出産時の母体血と臍帯血（胎児側の血液）中の有害金属を測ることで明らかにし

てきた。今回の研究では、胎盤中で有害金属がトラップ（捕囚）されると考えられる絨毛部位と胎児側の組織である臍帯の元素を直接測定して比較検討した。カドミウム（Cd）や無機水銀（I-Hg）は胎盤にしっかり捕囚されていた。鉛（Pb）は、例外はあるが、臍帯より胎盤の濃度の方が高い。ところが、メチル水銀は胎盤に捕囚されるどころか、むしろ臍帯（胎児）に高い濃度で移行していた。胎児にアミノ酸を送り込む機序によって、メチル水銀がアミノ酸の一種としてむしろ能動的に胎児に送り込まれている。このようにメチル水銀は他の有害金属とは全く異なる特異的な胎児移行を示す。胎児はメチル水銀への感受性が高い上に、母親より高い濃度でメチル水銀を蓄積するため、結果として、母親よりはるかに強い影響を受けることが再確認された。



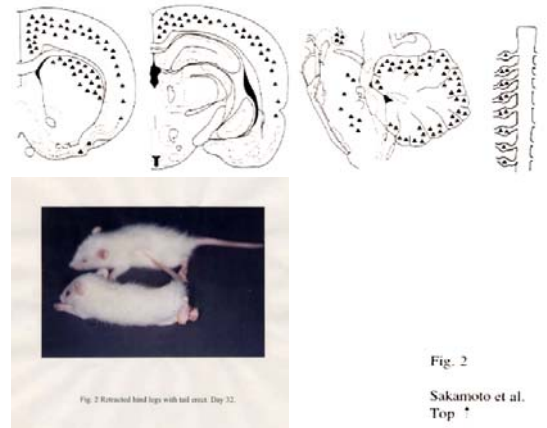


3. ラット新生仔を用いた胎児性水俣病外挿研究の取り組み

ヒトでは脳の発達のピーク時が出産前の3ヶ月間で、脳のメチル水銀に対する感受性もその時期が最も高いとされている。ラットでは脳の発達期のピークは生後に起こる。しかし、ラットの脳の発達期にミルクからではメチル水銀の移行が少ない。即ち、母親ラットにメチル水銀を与える実験系では脳全体に病変が広がるヒトの胎児性水俣病を外挿する実験とならない！そこで、ラットの脳の発達ピークが出生後にあることに注目し、胎児期ではなく新生仔期のラットに直接メチル水銀を投与することによって胎児性水俣病で見られたようなメチル水銀の脳への影響が観察できると期待した。

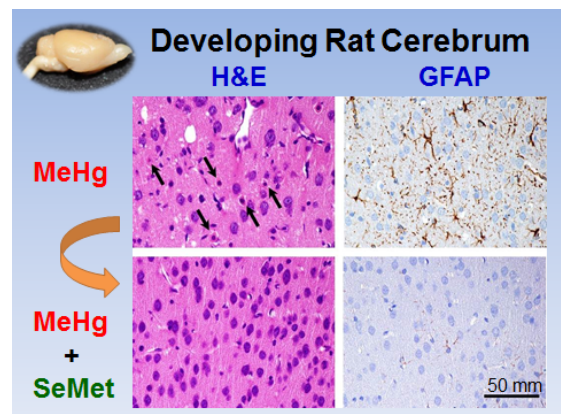
ラット新生仔を使った実験で、脳の発達前期曝露では脳幹部に、中期曝露では大脳皮質に、後期曝露（成熟期）では小脳および末梢

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した。



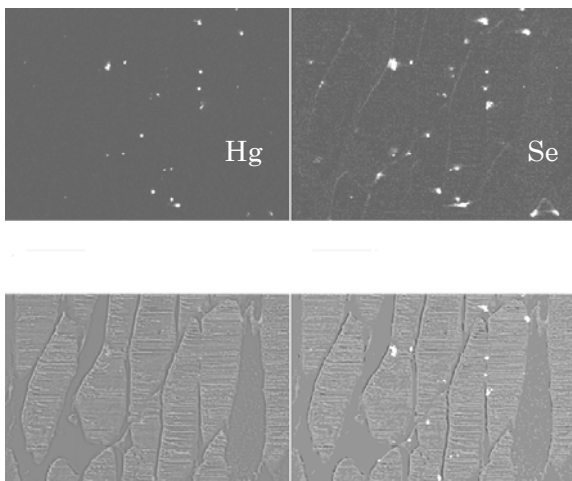
4. ラットの脳発達期のメチル水銀投与による神経細胞死をセレン・メチオニンの効果に関する研究

大脳皮質にメチル水銀で神経細胞死を引き起こすモデルを使い。セレン・メチオニンに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。



5. 歯クジラ筋肉中の水銀とセレンの関係

歯クジラ類は、比較的高濃度の水銀を体内に蓄積するが、無機化能力が高く、メチル水銀は一定の濃度で頭打ちになるようであった。無機化された水銀はセレンとモル比 1:1 で結合し、非活性で無毒なセレン化水銀に変化することが示唆された。クロアナライザ (EPMA) 分析で水銀とセレンの解析を行った結果、水銀とセレンがほぼ同じ場所に粒状に点在することが確認された。これらのことから、歯クジラ類は自身の解毒作用として、メチル水銀を無機化し、無毒なセレン化水銀となったものが筋内膜部に残留していると考えた。



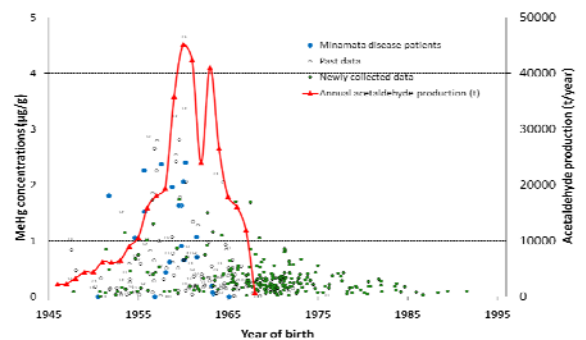
6. ラット新生仔を用いた最新の研究成果

大脳皮質に神経細胞死を引き起こすモデル・ラットを使い脳の発達期のメチル水銀曝露が GPx や TrxR のセレン含有抗酸化系酵素活性を低下させることが確認された。

7. 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、1ppm 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

ベルに低下するという歴史的汚染の変遷がより鮮明になった。



臍帯中メチル水銀濃度の歴史的変動

8. 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

水俣市全体で汚染が最も激しかった昭和 30 年から 34 年の 5 年間に、袋地区、漁民、水俣病患者と量・反動的に男児の出生数が低下し女児の出生数が多いという出生性比の低下が見られた。この出生性比の低下は、水俣市全体でも観察され、水俣における水銀汚染が如何に激しかったかを物語っていた。出生性比の低下は、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。

関連論文

1. Sakamoto M, et al. (2013). Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: Potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int.* 2013 Sep 9;60C:106-111.
2. Sakamoto M, Yasutake A, Kakita A, (他 6 名) (2013) Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ Sci Technol.* 2013 Mar 19; 47(6):2862-8.
3. Sakamoto M (1st), 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.

4. Sakamoto M, Murata K, Kubota M, et al. Mercury and heavy metal profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2010 ;73(1):1-6.
5. 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.* 103(1):106-11 (2007).
6. Sakamoto M, Kubota M, Murata K, Nakai K, Sonoda I, Satoh H. Changes in mercury concentrations of segmental maternal hair during gestation and their correlations with other biomarkers of fetal exposure to methylmercury in the Japanese population. *Environ Res.* 106(2):270-6 (2008)
7. 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.
8. 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.
9. 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)
10. 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)
11. Sakamoto M, Nakano A, Kajiwara Y, Naruse I, Fujisaki T. Effects of methylmercury in postnatal developing rats. *Environ Res*61, 43-50. (1993)

一 般 講 演

メチル水銀による翻訳伸長因子 eEF1A の発現低下

○藤村成剛（国立水俣研）、臼杵扶佐子（国立水俣研）

1. 背景

メチル水銀の胎児期曝露は剖検脳研究から、広域な脳神経部位に神経病変（神経細胞死およびグリオーシス等）を誘発し、その結果、神経症状を生じると考えられている。しかしながら、神経病変が観察されたのは高濃度曝露による重症例であり、現在、注目されている、より低濃度の曝露においては、神経病変を生じなくても神経症状を呈している可能性がある。

低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症に関する研究については、“フェロー諸島出生コホート研究”および“セイシェル小児発達研究”が有名である。“フェロー諸島出生コホート研究”においては、7歳児と14歳児で神経系の検査が行われ、記憶、注意、言語などの能力が出生時のメチル水銀の増加に伴って低下した。一方、“セイシェル小児発達研究”においては、5.5歳児と9歳児で神経系の検査が行われたが、メチル水銀濃度と神経発達影響との関係に一貫性が認められなかった。さらに、後発の“東北コホート研究”においては、メチル水銀の増加が新生児行動評価における運動機能低下と関連したと報告されている。

以上のように、これまでの出生コホート研究において、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症について統一した見解には至っていないが、低濃度のメチル水銀であっても、胎児期曝露においては影響があることが示されている。

2. 目的

これまで解明されていない低濃度メチル水銀曝露における神経症状誘発因子を明らかにするために、低濃度メチル水銀曝露によっ

て神経病変（神経細胞死およびグリオーシス等の一般的な神経病変）を誘発せずに神経症状を呈する動物モデルを用い、さらに、神経症状誘発因子の解析に分子生物学的手法（mass spectrum を用いた蛋白質の質量分析、および siRNA を用いた機能解析）を用いて、網羅的な原因因子の探索を行う。

さらに、これらの知見を発展させ、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による影響診断、毒性防御および治療への応用へ繋げることを目的とする。

3. 方法と結果

3-1. 低濃度メチル水銀の胎児期曝露モデルの作成

母ラットに 0, 1, 5, 10 ppm(それぞれ 0, 0.05, 0.25, 0.50 mg/kg/day に相当) のメチル水銀水を妊娠確定から授乳期終了まで(子ラットの 3 週齢まで) 母体に飲水投与した。0, 1, 5 ppm のメチル水銀水曝露によって、新生児出生数、重量、雌雄比率には影響をおよぼさなかったが(各 3 例のうち全例で出産が認められた)、10 ppm の曝露では、全例(3 例) が出産に至らなかった。

3-2. 低濃度メチル水銀の胎児期曝露における神経行動解析

出生 6 週後(6 週齢) に協調運動(Rota-rod test) および記憶能測定(Y-maze test) を行った。メチル水銀は 1 ppm の曝露までは影響を示さなかったが、5 ppm の曝露において、協調運動を有意に障害した(図 1)。また、メチル水銀は 5 ppm の曝露でも記憶能に影響をおよぼさなかった。

Effects of MeHg on rotating rod test (coordinated movement) in rat pups

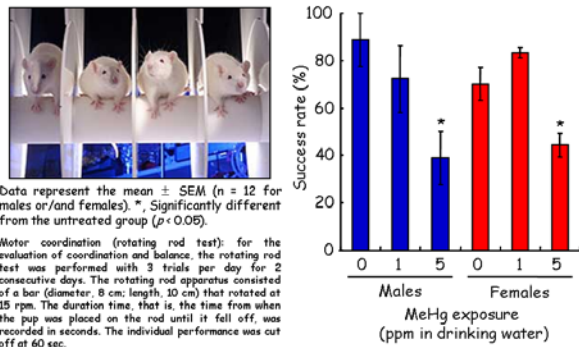


図 1 低濃度メチル水銀の胎児期曝露による協調運動への影響

3-3. 低濃度メチル水銀の胎児期曝露における組織化学解析

出生直後(0週齢)、授乳期終了直後(3週齢)、成体期(6週齢)に脳組織のサンプルを採取し組織化学的な解析を行ったが、神経病変(神経細胞死およびグリオシス等の一般的な神経病変)は観察されなかった(図2)。

しかしながら、免疫組織染色を用いたシナプス構成蛋白質(Synaptophysin, PI₃R1, PSD95等)の観察によって、6週齢において協調運動障害の責任部位である小脳の顆粒細胞(CGCs)にシナプス恒常性不全(シナプス構成因子であるSynaptophysinの発現低下)が生じていることを見出した(図3)。

Effects of MeHg on histopathology in rat pups of cerebellum

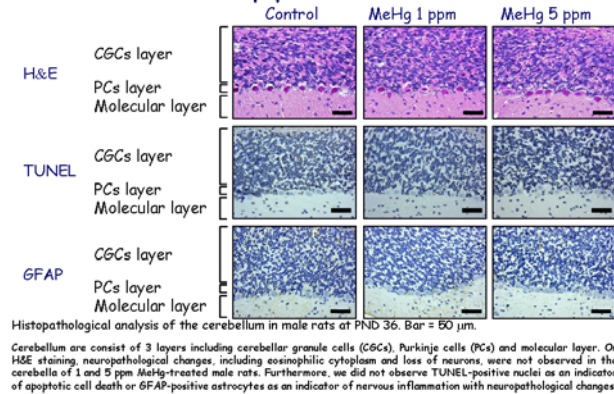
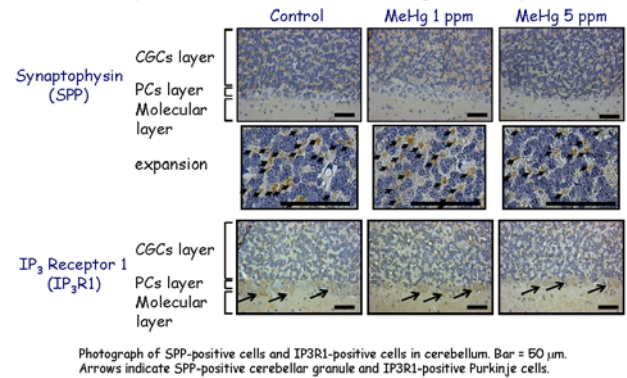
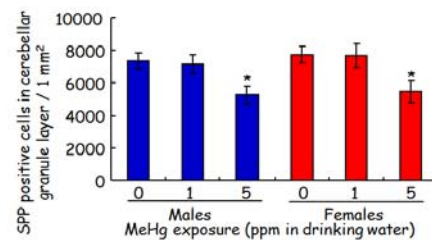


図 2 低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経病変への影響

Effects of MeHg on synaptic proteins in rat pups of cerebellum -Histological analysis-



Effects of MeHg on synaptic proteins in rat pups of cerebellum -Histological analysis-



The bar graph shows the number of cells per 1 mm². Data represent the mean \pm SEM (n = 6 for males or/and females). *Significantly different from the untreated group (p < 0.05, respectively).

図 3 低濃度メチル水銀の胎児期曝露によるシナプス蛋白質発現への影響

3-4. 低濃度メチル水銀の胎児期曝露における蛋白質発現解析

神経栄養因子はシナプス形成を含む神経形成に重要な役割を果たすことから、各種神経栄養因子(NGF, BDNF, NT-3)およびその受容体(TrkA, B, C)発現について出生直後(0週齢)、授乳期終了直後(3週齢)、成体期(6週齢)に小脳組織のサンプルを採取し、解析を行った。その結果、それらの発現についてはメチ

ル水銀曝露の影響はみられなかった(図 4)。

しかしながら、BDNF 抗体に反応する約 50 kDa の蛋白質(BDNF は 13.5 kDa) が、5 ppm のメチル水銀曝露によって 0 週齢時に顕著に低下することを発見した(図 5)。さらに、この蛋白質について mass spectrum を用いた解析を行った結果、この蛋白質はトリプシン消化ペプチドの相同性から、シナプス形成に関与する翻訳伸長因子 eEF1A である可能性が示された。そこで、eEF1A の蛋白質発現について Western blotting 法によって解析した結果、メチル水銀曝露によって eEF1A が低下することが明らかになった(図 6)。

Effects of MeHg exposure on expression levels of neurotrophic factors and their receptors in cerebellum

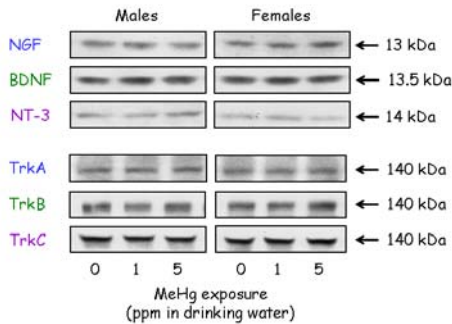


図 4 低濃度メチル水銀の胎児期曝露による小脳の神経栄養因子およびその受容体発現への影響

Effects of MeHg exposure on expression levels of unknown protein in cerebellum

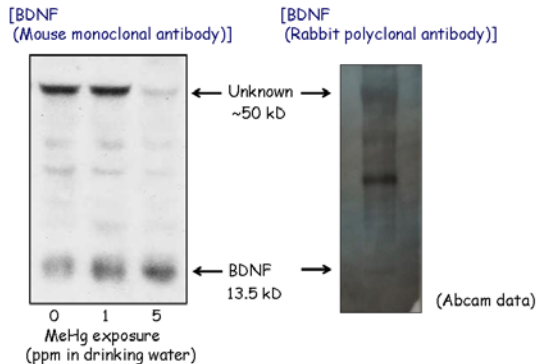


図 5 低濃度メチル水銀の胎児期曝露による BDNF 抗体に反応する蛋白質の発現低下

Effects of MeHg exposure on expression levels of estimated proteins using Mass spectrometry in cerebellum

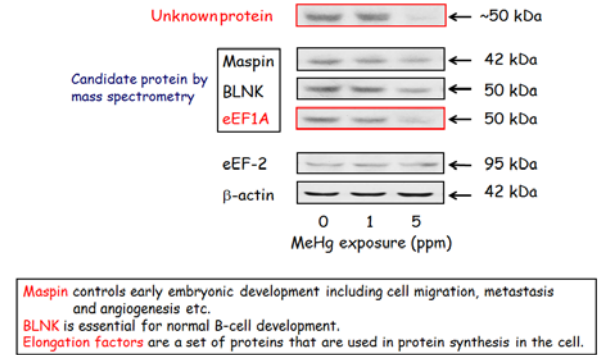


図 6 低濃度メチル水銀の胎児期曝露による eEF1A の発現低下

3-5. 培養神経細胞における eEF1A 発現抑制によるシナプス恒常性解析

培養神経細胞である PC12 細胞に eEF1A siRNA を作用させることによって eEF1A 発現を低下させ、シナプス形成におよぼす eEF1A の作用を解析した。その結果、eEF1A の低下によって Synaptophysin の発現が低下することが明らかになった(図 7)。

また、細胞にメチル水銀を添加すると、eEF1A 発現が低下し、Synaptophysin の発現も低下することが明らかになった(図 8)。

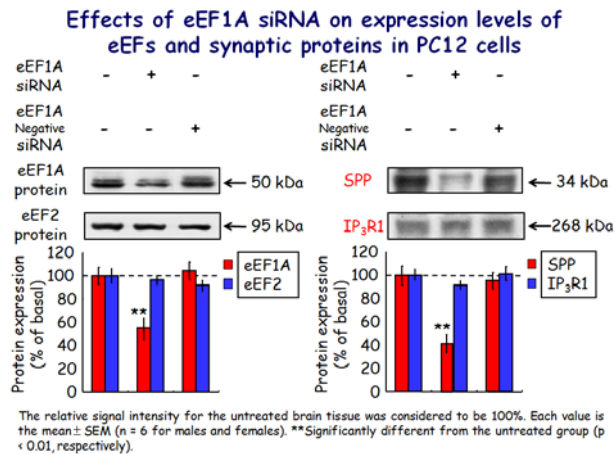


図7 培養神経細胞における eEF1A 発現抑制によるシナプス蛋白の発現低下

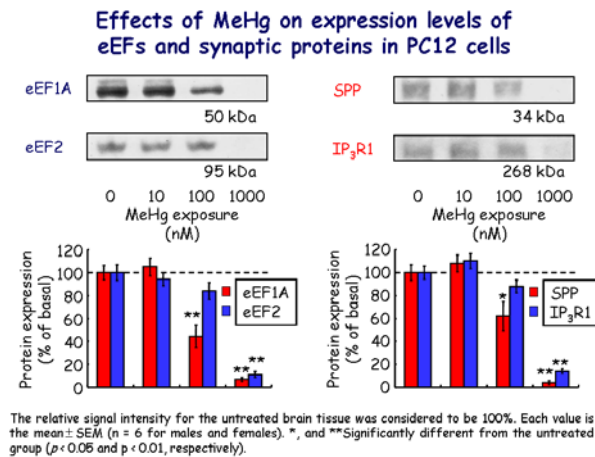


図8 培養神経細胞におけるメチル水銀曝露によるシナプス蛋白の発現低下

4. 結論

低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症メカニズムを解明するため、実験動物(ラット)を用いた検討を行った。低濃度メチル水銀(0.25 mg/kg/day)の胎児期曝露によって、神経病変を誘発せずに、成体期(6週齢以降)に神経症状(協調運動障害)を発症する動物モデルを作成することに成功した。ラットを用いた動物実験において、メチル水銀の胎児期曝露は、1 mg/kg/day 以上で神経

病変を伴う神経症状を生じるが、本モデルの場合、より低濃度(0.25 mg/kg/day)で神経病変を伴わずに神経症状を発症させることができた。さらに本モデルにおいて詳細な組織学的検討を行った結果、免疫組織染色を用いたシナプス構成蛋白質の観察によって、協調運動障害の責任部位である小脳の顆粒細胞(CGCs)にシナプス恒常性不全(シナプス構成因子である Synaptophysin の発現低下)が生じることを見出し、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発症にシナプス恒常性不全が関与していることを示唆することができた¹⁾。

次に小脳蛋白質について mass spectrum を用いた解析を行った結果、シナプス形成に関与する翻訳伸長因子 eEF1A が、メチル水銀曝露によって低下することが明らかになった。さらに、培養神経細胞である PC12 細胞に eEF1A siRNA を作用させることによって eEF1A 発現を低下させ、シナプス形成におよぼす eEF1A の作用を解析した結果、eEF1A の低下によって Synaptophysin の発現が低下することを確認した。

以上の結果から、低濃度メチル水銀の胎児期曝露による神経症状発現に小脳 eEF1A 発現低下によるシナプス恒常性不全が関与していることが示唆された。

5. 引用文献

- 1) Fujimura M, Cheng J, Zhao W. (2012) Perinatal exposure to low dose of methylmercury induces dysfunction of motor coordination with decreases of synaptophysin expression in the cerebellar granule cells of rats. *Brain Res.*, 1464, 1-7. *Neurotoxicology*, 30: 1000-1007.

メチル水銀毒性に対するニューロステロイドによる神経保護作用

○ 山崎 岳、石原 康宏（広島大学大学院総合科学研究科）

1. ニューロステロイド

脳はステロイドホルモンの標的器官である。例えば胎児期・周産期の脳の性分化や神経ネットワークの構築、成熟後の性行動や記憶・学習などは、ステロイドホルモンによって様々な影響を受ける。また、逆に性腺や副腎のステロイドホルモン合成は、脳によってフィードバック制御されている。

1980年代、脳自身がステロイドホルモンを合成していることが明らかになり、ニューロステロイドと命名された¹⁻³⁾。その合成量は、生殖腺や副腎皮質などの1000分の1以下であるが、局所的に作用することで、神経の分化、発達、記憶や学習など、いろいろな局面で重要な働きをしていることが明らかになりつつある。

2. 脳内ステロイドの起源

ニューロステロイドの発見以降、いろいろな臓器がステロイドホルモンを合成していることが明らかになった⁴⁾。また、血中の前駆体ステロイドが標的臓器内で活性をもつステロイドホルモンに変換されることも明らかになった⁵⁾。ヒトでは、副腎皮質から分泌されるデヒドロエピアンドロステロンが様々な臓器やガン細胞で性ホルモンに変換され、生理機能やガンの増殖に関与している⁵⁾。

脳でも、血中のステロイドホルモンやその前駆体が様々なステロイドホルモンに変換される。すなわち、脳のステロイドホルモンは、
1) 生殖腺や副腎で合成され、血流で運ばれたステロイドホルモン、
2) 血中の前駆体が脳内で変換されて生じたステロイドホルモン、
3) 脳でコレステロールから *de novo* で合成

されたニューロステロイド、の3通りの起源がある。

3. ニューロステロイドの神経保護作用

ステロイドホルモンの一部は、神経保護作用を持つ⁶⁾。女性ホルモンであるエストラジオールやプロゲステロン、また脳特異的なステロイドであるアロプレグナノロンなどは、外部から添加すると強い神経保護作用を発揮する。しかし、脳が合成するニューロステロイドが脳自身を保護しているのかどうかは明らかではなかった。

我々は、メチル水銀などの神経毒、虚血・再還流といった脳障害に対するニューロステロイドによる神経保護作用について研究を行っている。

脳内ステロイドには3通りの起源があるので、血流由来のステロイドホルモンを排除してニューロステロイドの作用を調べるために、我々は海馬スライスの無血清培養系を用いている。この系では、外部からのステロイドホルモンの供給を容易にコントロールできる。

4. 脳で合成されたエストラジオールによる神経保護作用

生後10-12日齢のWistarオスラットの海馬を0.3 mmにスライスし、組織培養を行った。細胞死は、ヨウ化プロピジウム添加後の蛍光強度を用いて数値化した。

スライスにメチル水銀を作用させると、濃度依存的な神経細胞死が観察された。1 μ Mで24時間作用させると、海馬の神経領域の細胞の約50%が死滅した(図1)。特に歯状回の顆粒細胞への毒性が強く見られた。この

水銀濃度は、亡くなられた水俣病患者の脳内濃度にあたる⁷⁾。

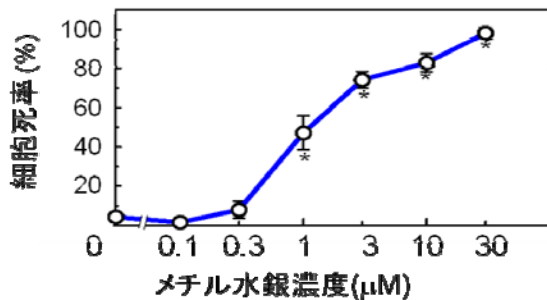


図1 海馬スライスに対するメチル水銀の神経毒性

ラット海馬スライスの培地にメチル水銀を投与し、24時間後の神経細胞領域の細胞死率を測定⁷⁾。

海馬スライスを、女性ホルモンであるエストラジオールとインキュベートすると、メチル水銀による細胞死が著しく軽減された。エストラジオールはメチル水銀と同時に添加しても効果はなく、30分以上のプレインキュベーションが必要であった。

このスライスは、エストラジオールを合成している⁸⁾。無血清培地で48時間培養すると、テストステロンとエストラジオール量が2倍以上に増加する。このエストラジオールの *de novo* 合成は、エストラジオール合成酵素 (P450arom、CYP19) の阻害剤であるレトロゾールの添加によって完全にブロックされた⁷⁾。

スライスをレトロゾールと24時間インキュベートしてから、1 μM のメチル水銀を作用させると、メチル水銀の神経毒性は、30%増加して、80%になった (図2の黒いバー)。この条件でエストラジオールを外から添加すると、メチル水銀の神経毒性は軽減された。すなわち、*de novo* で合成されているエストラジオールは、常にスライス自身を守っていることが分かった⁷⁾。

エストラジオールによる神経保護作用は、エストロゲンレセプター (ER) α、および ERβ を介して発揮される。スライスを ER の

アンタゴニストである ICI 182780 で処理してからメチル水銀を作用させると、細胞死がやはり30%増加した (図3の黒いバー)。ICI 182780 の存在下では、外からエストラジオールを添加しても細胞死は回復しない。よって、*de novo* 合成されたエストラジオールだけでなく、外から添加したエストラジオールによる保護作用も、ER を介している。ERα、ERβ の特異的アゴニストである PPT と DPN がそれぞれメチル水銀による神経毒性を軽減したことから、ERα、ERβ の両方が関与していることが示唆された⁷⁾。

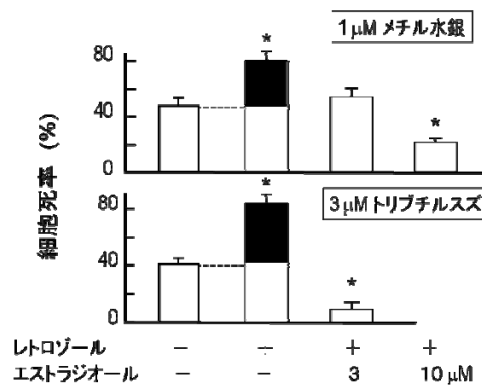


図2 有機金属神経毒性に対する、エストラジオール合成阻害剤の効果

ラット海馬スライスの培地にレトロゾールを投与し、24時間後に有機金属を添加。その24時間後に細胞死率を測定した。エストラジオールは、有機金属投与の2時間前に投与。

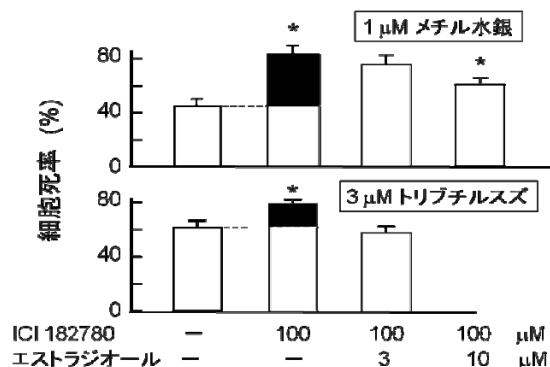


図3 有機金属神経毒性に対する、エストロゲンレセプターアンタゴニストの効果

ラット海馬スライスの培地に ICI182780 を投与し、6時間後に有機金属を作用させた。その24時間後に細胞死率を測定。エストラジオールは、有機金属投与の2時間前に投与。

エストラジオールによる神経保護作用は、別の有機金属神経毒であるトリブチルスズに対しても見られた。トリブチルスズは、船底や漁網の防汚塗料として用いられていた環境汚染物質である⁹⁾。トリブチルスズによる海馬培養スライスに対する神経毒性も、*de novo*のエストラジオール合成をレトロゾールで阻害すると増加し、外部からエストラジオールを添加すると細胞死は抑制された(図2)。また、ICI182780でERをブロックすると神経毒性は増加し、この時は外部からエストラジオールを投与しても保護されない(図3)。ER α 、ER β の特異的アゴニストであるPPTとDPNも、それぞれトリブチルスズの神経毒性を軽減したことも、メチル水銀毒性と同様であった。

5. エストラジオールによる神経保護の分子機構

エストロゲンレセプターを介した神経保護作用には、転写を活性化するゲノミックな作用と、主にERKやAktのリン酸化を介するノンゲノミックな作用機構が知られている。トリブチルスズに対する神経保護作用が、どちらのメカニズムであるか調べた。

図2や3で見られたエストラジオールによる神経保護作用は、転写阻害剤のアクチノマイシンDや翻訳阻害剤のシクロヘキシミドを同時に添加しても影響されなかったため、転写の活性化によるゲノミック作用によるものではない。リン酸化ERKとリン酸化Aktに対する特異的抗体を用いて、これらの酵素のリン酸化状態を調べたところ、エストラジオールやトリブチルスズは、海馬スライスのERKのリン酸化状態には影響しなかったが、Aktのリン酸化は、トリブチルスズを作用させると減少し、エストラジオールの添加でリン酸化が回復した。これは、エストラジオールによる神経保護作用が、Aktのリン酸化を

介して発揮されることを示唆している。トリブチルスズのラット海馬スライスに対する神経毒性は、酸化ストレスによって引き起こされる⁹⁾。Aktの活性化によってこの酸化ストレスが軽減され、これが神経を保護する機構の一部と思われる(未発表)。

以上まとめると、ラット海馬は、*de novo*合成しているエストラジオールによって、メチル水銀やトリブチルスズの神経毒性から自身を保護しており、その機構はER α 、ER β を介しAktのリン酸化によって酸化ストレスを軽減するノンゲノミックなメカニズムであった。

6. プロゲステロンによる神経保護作用

メチル水銀による神経毒性は、女性ホルモンであるプロゲステロンによっても保護される(図4)。

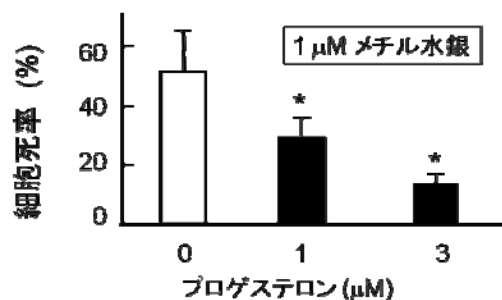


図4 メチル水銀神経毒性に対する、プロゲステロンの効果

ラット海馬スライスの培地にプロゲステロンを投与し、2時間にメチル水銀を添加して24時間後に細胞死率を測定。

プロゲステロンによる神経保護機構を、トリブチルスズを用いて、詳しく調べた¹⁰⁾。

プロゲステロンによるラット海馬スライスの保護作用は、プロゲステロンレセプター(PR)のアンタゴニストであるミフェプリストンによって影響されなかったことから、RPを介した作用ではなかった。プロゲステロンは、脳内で、神経保護作用を持つエストラジオールやアロプレグナロンに変換されるの

で、プロゲステロンの代謝の影響を調べた。

プロゲステロンからエストラジオールへの変換を阻害する SU-10603 をプロゲステロンと同時に作用させた場合、プロゲステロンの神経保護作用に影響はなかった。しかし、アロプレグナノロンへの変換を阻害するフィナステリドを添加すると、神経保護作用がブロックされた。質量分析計を用いて海馬スライスでのプロゲステロンからアロプレグナノロンへの代謝を調べると、強い代謝活性が認められ、それはフィナステリドで完全にブロックされた。アロプレグナノロンはプロゲステロンと同じ濃度で同程度の神経保護作用を發揮した¹⁰⁾。この結果は、プロゲステロンは PR を介さずに、脳内でアロプレグナノロンに代謝されて、神経を保護することを示唆している。

アロプレグナノロンは、GABAA レセプターのモジュレーターである。そこで、神経保護作用と GABAA レセプターの関連を調べた。GABAA レセプターのアンタゴニストであるビククリンは、プロゲステロンとアロプレグナノロンによる神経保護作用をブロックし、GABAA レセプターのアゴニストのムッシモールは、単独で神経保護作用を示した¹⁰⁾。これは、プロゲステロンとアロプレグナノロンによる神経保護作用は、GABAA レセプターの活性化を介して發揮されることを示す。

以上、プロゲステロンによるラット海馬スライスのトリブチルスズからの保護作用は、PR を介さず、代謝産物であるアロプレグナノロンによる保護作用であり、それは GABAA レセプターを介したメカニズムで發揮されることが示された。

7. 虚血-再還流モデルに対する、ニューロステロイドの保護機構

メチル水銀の神経毒性を軽減するエストラジオールやプロゲステロンは、他の神経障害

からも脳を保護する。

脳梗塞後の血流回復（虚血—再還流）のモデル実験系である酸素-グルコース欠乏、再酸素化（OGD）実験を、ラット海馬スライスを用いて行った。この脳障害に対しても、テストステロン、プロゲステロン、エストラジオールといった性ホルモンは神経保護作用を示した。しかし、この場合のエストラジオールによる保護作用は、ER アンタゴニストである ICI 182780 で影響されず、エストロゲンレセプターを介していないことが示唆された。また、プロゲステロンによる保護作用は、ミフェプリストンでブロックされ、PR を介した作用のようである。

このように、同じラットの海馬スライスを用いて、同じステロイドによる神経保護作用を調べても、神経障害が異なると全く異なるメカニズムが働いていることが分かった。

8. 脳内エストラジオール濃度の安定性

成熟雄ラットの脳内エストラジオール濃度は血中よりもはるかに高く、前駆体であるテストステロンの脳内濃度を去勢によって下げても、一定に保たれている（図5）。神経を保護する大事なステロイドの濃度を、なんらかの機構で維持しているのかもしれない¹¹⁾。

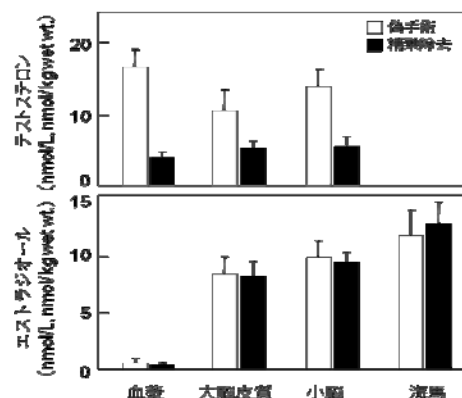


図5 成熟オスラットの脳内と血中のステロイドホルモン濃度

生後3-4カ月のラットを去勢、または偽手術し、10日後の血漿と脳内のテストステロンとエストラジオールをそれぞれEIAまたはRIAで定量した。

また、脳内のエストラジオールなどの濃度、合成活性は、脳部位によって異なる。これら脳内ステロイドの部位特異性は、神経障害に対する脳の感受性の部位特異性に関係している可能性がある。

9. まとめ

メチル水銀による神経毒性は、エストラジオールやプロゲステロンで軽減される。ラット海馬では、*de novo* 合成したエストラジオールが海馬自身を保護している。そのメカニズムは、エストロゲンレセプターを介したノンゲノミックな機構であった。プロゲステロンは、海馬内でアロプレグナノロンに代謝されてそれが神経保護作用を発揮する。このようにステロイドが異なると神経保護の作用機序も異なる。また、エストラジオールによる保護機能であっても、虚血-再還流モデル系のように脳障害の機序が異なると、保護の作用機序も異なる。

エストラジオールなどの脳内ステロイドの起源は、血流で運ばれた生殖性由来、血中の前駆体からの脳内での合成、脳内での *de novo* 合成の3通り考えられるが、脳内のエストラジオールは前駆体ステロイドの濃度が低下しても一定値を保っており、何らかの安定化機構が存在するようである。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費補助金(基盤研究 B, C) による援助と、国立水俣病総合研究センターの山元恵博士、広島大学の学生であった宗綱栄二博士(現藤田保健衛生大医学部)、小松翔太(現アサヒビール株)、川見友人(現サタケ株) 他多くの方々との共同研究でなされたものである。

引用文献

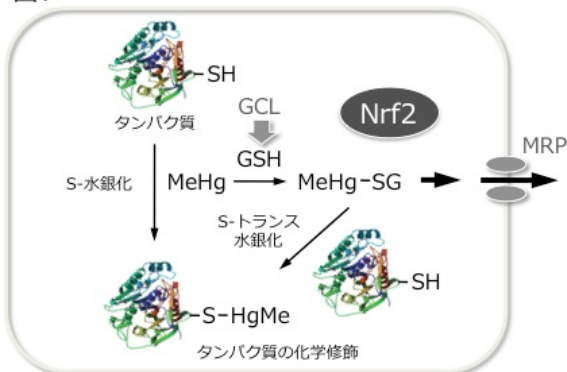
- 1) Baulieu EE (1997) Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* **52**, 1-32.
- 2) Kawato S, Yamada M, and Kimoto T (2003) Brain neurosteroids are 4th generation neuromessengers in the brain: cell biophysical analysis of steroid signal transduction. *Adv Biophys* **37**, 1-48.
- 3) Mellon SH (2007) Neurosteroid regulation of central nervous system development. *Pharmacol Ther* **116**, 107-24.
- 4) Taves MD, Gomez-Sanchez CE, and Soma KK (2011) Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **301**, E11-24.
- 5) Labrie F, Luu-The V, Lin SX, Simard J, Labrie C, El-Alfy M et al. (2000) Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* **25**, 1-16.
- 6) Wojtal K, Trojnar MK, and Czuczwar SJ (2006) Endogenous neuroprotective factors: neurosteroids. *Pharmacol Rep* **58**, 335-40.
- 7) Yamazaki T, Yamamoto M, Ishihara Y, Komatsu S, Munetsuna E, Onizaki M et al. (2013) De novo synthesized estradiol protects against methylmercury-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal slices. *PLoS One* **8**, e55559.
- 8) Munetsuna E, Hojo Y, Hattori M, Ishii H, Kawato S, Ishida A et al. (2009) Retinoic acid stimulates 17beta-estradiol and testosterone synthesis in rat hippocampal slice cultures. *Endocrinology* **150**, 4260-9.
- 9) Ishihara Y, Kawami T, Ishida A, and Yamazaki T (2012) Tributyltin induces oxidative stress and neuronal injury by inhibiting glutathione S-transferase in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurochem Int* **60**, 782-90.
- 10) Ishihara Y, Kawami T, Ishida A, and Yamazaki T (2013) Allopregnanolone-mediated protective effects of progesterone on tributyltin-induced neuronal injury in rat hippocampal slices. *J Steroid Biochem Mol Biol* **135**, 1-6.
- 11) Hojo Y, Higo S, Ishii H, Ooishi Y, Mukai H, Murakami G et al. (2009) Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* **150**, 5106-12.

1. これまでの研究背景

親電子性を有するメチル水銀 (MeHg) は細胞内に取り込まれると、タンパク質のシステイン残基のような求核置換基を化学修飾 (S-水銀化) し、このことが MeHg の毒性発現の一因と理解されている (図 1)。たとえば、MeHg は抗酸化酵素である Mn-SOD の Cys196 を S-水銀化することが本酵素活性低下に関係すること¹⁾や、MeHg による尿素サイクルの鍵酵素であるアルギナーゼ I の S-水銀化 (Cys の修飾部位は未同定) が、結果的に補欠分子である Mn の保持不能に繋がることが知られている²⁾。それに対して、MeHg による Cys151 を介した Keap1 の S-水銀化は転写因子 Nrf2 の活性化を引き起こし、生体側の環境応答に関係する^{3,4)}。MeHg の毒性防御における Keap1/Nrf2 システムの重要性は、植物由来の Nrf2 活性化成分を用いた細胞レベルおよび個体レベルでの研究成果により支持されている⁵⁾。言い換えれば、生体側の解毒応答システムを活性化する成分を含んだ食材を摂取することが、ヒトにおける MeHg のリスク軽減に繋がると言えよう。

一方、MeHg の一部は、各臓器に mM オーダーで存在するグルタチオン (GSH) のシステイン残基とも共有結合して付加体を形成し、多剤耐性関連タンパク質 (MRP) のようなトランスポーターを介して細胞外に排泄される (図 1)。しかし、SH-SY5Y 細胞を本 GSH 付加体のモノエステル化し

図1



た前駆体に曝露した実験より、MeHg-SG 付加体の結合は可逆的であり、反応性システイン残基を有するタンパク質と S-トランス水銀化反応を介してタンパク質付加体を生じる (図 1)。その結果、上記したようなタンパク質の機能障害が考えられるが、MeHg-SG 付加体は Cys319 を介した S-トランス水銀化に起因して Nrf2 の活性化を生じ、MeHg の解毒・排泄に係る下流遺伝子群の転写誘導を引き起こすことも分かった (当研究室の新開が発表予定)。

2. 我々の作業仮説と先行研究成果

我々は GSH の pKa 値が 9.12 と高いことから、GSH 以外の求核低分子が MeHg と付加体を形成するのではないかと予想した。その可能性のひとつが生体内でメチオニン代謝の鍵酵素であるシスタチオニンβ-synthase (CBS) やシスタチオニンγ-lyase (CSE) から産生される硫化水素 (H₂S) だった。その理由は、本ガス状物質の pKa 値は 6.76 であることから、生理的条件下において、このガス状分子は約 80% HS⁻ の形で存在することによる。本仮説に従い、MeHg と NaHS を反応させると、メタリックグレーの結晶が析出し、質量分析および元素分析の結果、本生成物は (MeHg)₂S であることが明らかとなった。MeHg に曝露された細胞および MeHg を投与したラット臓器中から、新規代謝物として (MeHg)₂S を同定した⁶⁾ (図 2)。(MeHg)₂S の

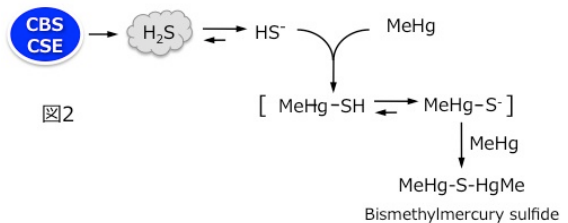


図2

合成標品を用いた検討より、MeHg と異なり本イオウ付加体は親電子性を有さないために、MeHg と比較してタンパク質の S-水銀化能はなく、マウスを用いた急性致死効果は示さないことが分かった⁶⁾。

さらに、SH-SY5Y 細胞に CBS を高発現すると MeHg の細胞毒性は軽減され、CBS をノックダウンすると本細胞毒性は増加したことから⁶⁾、我々は (MeHg)₂S 産生が MeHg の解毒に関連すると考察した。

3. 活性イオウ分子のパラダイムシフト

H₂S/ HS が神経疾患および循環器疾患に有効な分子であることが次々と報告されるにつれて、本分野は世界的に注目を集めている。たとえば、H₂S の生物学的意義に関する総説は、最近 3 年間で 250 報を超える。我々は東北大学・赤池教授らとの共同研究により、MeHg 以外の内因性および外因性親電子物質が H₂S/ HS と反応してイオウ付加体を生成することを世界に先駆けて報告した⁷⁾。従前の学説では、H₂S/ HS は CBS や CSE から生成される主要産物として認知されていたが、LC-MS/MS を駆使した赤池教授らの研究より、H₂S/ HS は 1 次生成物ではなく、高い抗酸化能および高い求核性を有するシステインパースルフィド (-S-SH, -S-SR) およびそれを起点として産生されたポリスルフィド (-S-Sn-SH, -S-Sn-R, n>2) であるという驚くべき事実が最近明らかにされた (図 3)。システイン残基にイオウ原子が付加すると、α 効果によりチオール基の pKa 値は低くなり、MeHg のような環境中親電子物質との反応性は高くなる。彼らの報告によると、脳内での GSH パースルフィド (GS-SH) 濃度は 0.2 mM 近傍であり、本組織中で

の抗酸化作用および親電子物質の不活性化に重要な活性イオウ分子であることも示唆された。さらに、このような活性イオウ分子で修飾を受けた細胞内タンパク質が複数存在することも見出された。以上の研究成績を受けて、我々は MeHg から生じる (MeHg)₂S 生成における生体内活性イオウ分子の役割について再検証することにした。

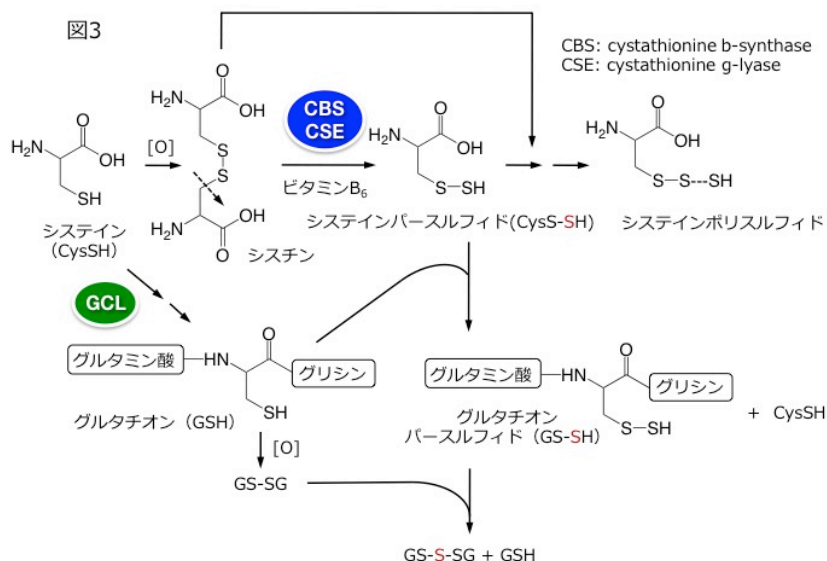
4. 我々の最近の研究成果

4-1. MeHg の毒性および (MeHg)₂S の生成における CSE の役割

MeHg を曝露した野生型マウス脳、肝臓、心臓および腎臓中から (MeHg)₂S の生成が見られるのに対して、CSE ノックアウトマウスのそれぞれの臓器中から本代謝物は殆ど検出されなかった。また、野生型マウスにおいて、MeHg が全く有害性を示さない用量でも、CSE 欠損により振戦および致死効果を生じた。これらの知見は、CSE が個体レベルでの (MeHg)₂S 生成の主役を司るだけでなく、本酵素で産生される活性イオウ分子が MeHg の有害性の防御に重要であることを示唆している。

4-2. (MeHg)₂S の生体内運命

(MeHg)₂S とリン酸緩衝液、SH-SY5Y 細胞破碎液およびマウス肝臓ホモジネート液と一定時間反応させてその回収率を調べた結果、緩衝液、マウス肝臓ホモジネート液および SH-SY5Y 細胞破碎液の順番で低いことが示唆された。マウスあるいは SH-SY5Y 細胞を MeHg および (MeHg)₂S に等モル量曝



露すると、MeHg の場合、マウスでは投与後 48 時間において 90%の死亡率が観察されるのに対して、代謝物の (MeHg)₂S では全く致死効果は見られなかった。しかし、SH-SY5Y 細胞では曝露 24 時間後において、MeHg に比べて弱い細胞毒性が見られた。一連の知見は、それぞれの生体試料中における (MeHg)₂S の安定性の差異を示唆している。

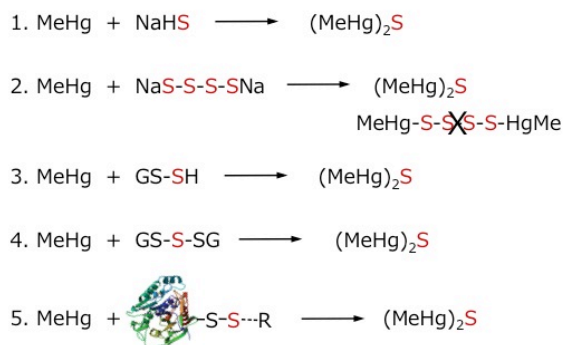
そこで、(MeHg)₂S をリン酸緩衝液およびマウス肝臓ホモジネート液と反応させて、経時的な本代謝物の分解を検討した。その結果、それぞれの試料中の総水銀量は反応後 7 日目まで殆ど変動せず、各試料中に残存していたが、(MeHg)₂S は緩やかに分解反応が進行して、リン酸緩衝液中では反応後 5 日目で対照値の 40%、マウス肝臓ホモジネート液中では 100%が消失した。また、本分解反応の生成物として微量の無機水銀が見られたが、MeHg への変換は全く観察されなかった。さらに、マウスが MeHg 投与後 24 時間で全滅するような用量と同モル量の (MeHg)₂S を投与すると、投与後 3 日目で 30%、投与後 7 日目で 70%、および投与後 14 日目で 100%の致死効果が観察された。以上より、MeHg と活性イオウ分子との反応で生じた (MeHg)₂S は新電子性を消失して暫定的に解毒された後、徐々に分解反応が進行し、有害性に係る未同定代謝物に変換され、一部は無毒な無機水銀に変換されることが明らかとなった (吉田ら、未発表データ)。このことは、従前から示唆されていた MeHg の無機化に一部、(MeHg)₂S が中間体として関与していることを示唆している。

4-3. (MeHg)₂S の生成における MeHg と活性イオウ分子の反応様式

図 4 に示すとおり、MeHg は NaHS だけでなく、Na₂S₄あるいは GSH-SH と MeHg を反応させると、何れの場合も (MeHg)₂S が生成された。Na₂S₄との反応により、MeHg-S-S-S-S-HgMe の産生は検出されないことから、4 つのイオウ原子の何れかと MeHg が反応して 1 原子のイオウを引き抜いていることが考えられた。興味深いことに、MeHg は GS-S-SG との反応でも (MeHg)₂S を生成することが GC/MS の結果より示唆された。以上の結果は、側鎖の解離型 S だけでなく、MeHg が GS-S-SG の (求核性を示す) S の親電子攻撃を介してイオウ原子を引き抜

き、(MeHg)₂S を生成した可能性を示唆している。

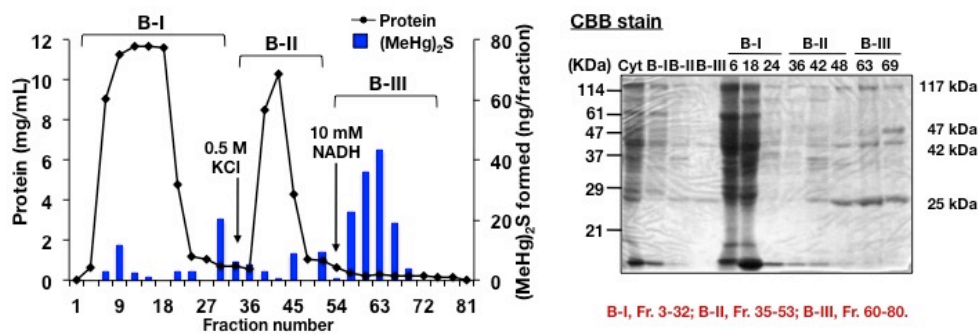
図4



4-4. (MeHg)₂S 生成アッセイを利用した活性イオウ分子含有タンパク質の同定

つぎに、(MeHg)₂S 生成に関与する低分子およびタンパク質由来の活性イオウ分子を調べる目的で、マウス肝臓可溶性画分を用いて検討した (図 5)。MeHg と低分子を除いた本可溶性画分との反応で見られる (MeHg)₂S 生成量は、低分子を除かない時の 42%だったことから、本代謝物の産生には低分子およびタンパク質由来活性イオウ分子が同程度関与することが示唆された。つぎに本可溶性画分を Cibacron Blue 3GA カラムクロマトグラフィーを行った結果、未吸着画分、KCl 溶出画分および NADH 溶出画分の何れにも複数の活性イオウ分子を有するタンパク質 (図 4 の反応 5 を参照) が存在することが示唆された。興味深いことに、NADH 溶出画分中にはアプライしたマウス肝臓可溶性画分の 1%程度のタンパク質しか回収されていないにも係らず、(MeHg)₂S 生成量は全体の 51%だった (図 5 中の表)。最終的に NADH 溶出画分をゲルろ過カラムで分離を行った結果、SDS-PAGE 上で 25 kDa を示す単一タンパク質の精製に成功した。当該タンパク質を LC-MS で解析した結果、GST Pi であることが明らかとなった。大腸菌での高発現系で調製したマウス GST Pi と MeHg を反応させても、(MeHg)₂S の生成は確認された。また、蛍光プローブ SSP4 および “Tag-Switch-Tag”アッセイにより、GST Pi の分子中にポリスルフィドが存在することも示唆された。

図5



Mouse liver cytosol (4 g of protein) was applied onto a Cibacron Blue 3GA column (10 x 1.5 cm, i.d.) and proteins were eluted with 50 mM Tris-HCl (pH 7.2)-0.25 M sucrose (Buffer A), followed by Buffer A-0.5 M KCl and Buffer A-0.5 M KCl-10 mM NADH.

Fraction	Volume (mL)	Protein (mg)	(MeHg) ₂ S formed		Yield (%)
			(ng/fraction)	(ng/mg of protein)	
Mouse liver cytosol	36	4200	7360 (100)	4	
Dialysis	35	3990	3085 (42)	2	100
B-I	105	1266	327	0.3	11
B-II	72	908	224	0.2	7
B-III	60	33	1598	48	51

5. 考察および今後の展望

MeHg と GSH が反応して MeHg-SG 付加体を生成すると、MeHg の親電子性が消失するだけでなく、MRP を介して細胞外へ排泄されることから、古くから MeHg の重要な解毒経路として示唆されてきた。一方、我々の MeHg-SG モノエステル体による SH-SY5Y 細胞実験および MeHg による細胞内タンパク質の S-水銀化を検出するアッセイの開発⁸⁾により、MeHg-SG 付加体は S-トランス水銀化を介して結果的に MeHg のタンパク質付加体 (図 1) を形成するために細胞毒性を有することが分かった。このことは、MRP を阻害すると MeHg-SG 付加体の細胞内滞留の増加に伴うタンパク質の S-水銀化および細胞毒性の上昇により支持された。しかし、GSH 合成の律速酵素 GCL および MRP の発現誘導を制御している転写因子 Nrf2 のノックアウトマウスおよびその初代肝細胞での検討より、Nrf2 を欠損すると、臓器中水銀濃度の増加を伴い、MeHg に対する有害性は増強されることが明らかとなっている。以上の知見からすると、Nrf2 による MeHg のリスク軽減は臓器中水銀の排泄促進に関連することが示唆されるものの、MeHg-SG 結合体の生成増加に起因するとは考えにくい。

一方、CSE ノックアウトマウスを用いた検討より、本酵素が個体レベルにおいて (MeHg)₂S 生成量に必要な活性イオウ分子の主要供給源であるだ

けでなく、MeHg のリスク軽減因子であることも示唆された。パースルフィド (ポリスルフィド) のような活性イオウ分子はタンパク質の翻訳後修飾だけでなく、高い抗酸化活性を有することから、生体内のレドックス制御に重要な役割を演じている。それ故、MeHg が生体内に侵入して GS-SH やタンパク質由来パースルフィド (ポリスルフィド) と反応し、親電子性を消失した (MeHg)₂S を生成する一方で、恒常性維持に必須の活性イオウ分子を減少させることが MeHg の有害性の一因になる可能性がある。また、GS-SH およびタンパク質由来パースルフィド (ポリスルフィド) 産生には CSE だけでなく、GSH の合成を介して Nrf2 が寄与していることも考えられるので、Nrf2 と CSE ダブルノックアウトマウスでの実験を実施する予定である。

引用文献

- Shinyashiki M, Kumagai Y, Horma-Takeda S, Nagafune J, Suzuki J, Matsuzaki I, Satoh S, Sagai M, Shimojo N. Selective inhibition of the mouse brain Mn-SOD by methylmercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2: 359-366, 1996.
- Kanda H, Sumi D, Endo E, Toyama T, Chen GL, Kikushima M, Kumagai Y. Reduction of arginase I activity and manganese levels in the liver during exposure of rats to

methylmercury: a possible mechanism. *Archives of Toxicology* 82: 803–808, 2008.

3. Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363: 645–650, 2007.
4. Kumagai Y, Kanda H, Shinkai Y, Toyama T. The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Article ID 84827, 2013.
5. Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A, Uchida K, Yamamoto M, Kumagai Y. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environmental Health Perspectives* 119: 1117–1121, 2011.
6. Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian Cells. *Chemical Research in Toxicology* 24: 1633–1635, 2011.
7. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, Ono K, Inoue H, Ihara H, Motohashi H, Yamamoto M, Suematsu M, Kurose H, Van der Vliet A, Freeman BA, Shibata T, Uchida K, Kumagai Y, Akaike T. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chemical Biology* 8: 714–724, 2012.
8. Toyama T, Shinkai Y, Kaji T, Kumagai Y. A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *Journal of Toxicological Sciences* 38: 477–484, 2013.

1. 背景と目的

1-1. 血管毒性

血管はあらゆる組織に存在する組織である。血管の構造はその大きさと場所によって異なるが、血管内腔を一層で被う血管内皮細胞の存在は共通である。脳微小血管では、周皮細胞が内皮細胞層を裏打ちしている。内皮細胞と周皮細胞は独自に微小血管機能を調節するだけでなく、相互に機能調節を行っている。

我々は重金属の毒性の理解には、血管内皮細胞に対する毒性の解明が重要かつ不可欠であると考えている。第一に、血管はあらゆる組織に普遍的に存在するので、血管の機能障害が金属の器官毒性に影響を及ぼす可能性を常に考える必要がある。第二に、器官実質細胞が血管を経ずに経口的に摂取された重金属に曝露することはできないため、内皮細胞は常に重金属の毒性の標的になるだけでなく、その機能異常は背後の器官に影響を及ぼし得ると考えられる。

もちろん、重金属の器官毒性における内皮細胞の機能異常の影響の大きさと現れ方は、その器官を構成する実質細胞の種類と特性によって異なるのは当然のことである。

このような観点から、我々は主として血管内皮細胞に対する重金属の毒性発現機構について研究を行ってきた。その結果、内皮細胞が重金属に対して特異な応答を示すことを知った。例えば、代表的なメタロチオネイン誘導因子である亜鉛は、内皮細胞に対してはほとんど誘導することができない。また、重要な内皮細胞機能である線溶タンパク質の発現については、カドミウム

と鉛はともに線溶活性を低下させるが、カドミウムの作用が PAI-1 合成の誘導であるのに対し、鉛の作用は t-PA 合成の阻害である。しかしながら、メチル水銀については、血管毒性の意義を見出せずにいた。

2-2. メチル水銀による大脳および小脳障害の特徴

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、衛藤らによる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とされる。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という。また、小脳においては顆粒細胞に特に強い傷害が観察されるという特徴的な変化が認められる (図 1)。

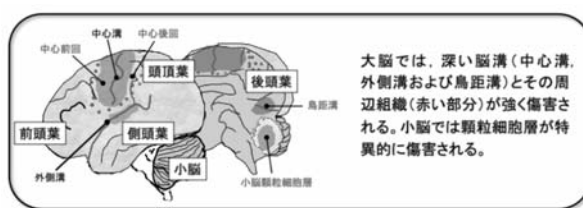


図 1. メチル水銀による部位特異的な傷害

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に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¹⁾。

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。

一方、小脳については、例えばメチル水銀に対する顆粒細胞とプルキンエ細胞の感受性の差ではないかとの観点から研究が行われてきた。しかしながら、合理的かつ十分に顆粒細胞特異的な傷害を説明できる病理仮説の確立には至っていない。

3-3. メチル水銀による大脳障害における血管毒性の解明と小脳障害の病理仮説の構築

脳浮腫形成には、脳微小血管の機能異常が重要である。すなわち、メチル水銀による大脳障害の分子基盤にはメチル水銀の血管毒性が深く関与していることが推察される。

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。脳浮腫のメカニズム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2)。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。もう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。臨床的にはこの2つの型は同時的に進行するとされる。

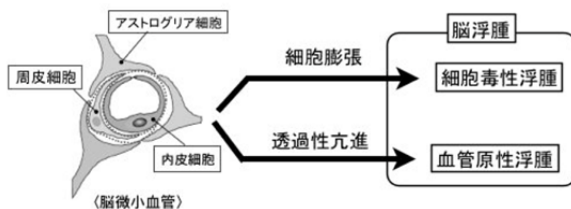


図2 細胞毒性浮腫と血管原性浮腫

メチル水銀による部位特異的な大脳傷害のメカニズムに関与する血管毒性として、浮腫に関わる機能異常が重要であることになる。そこで、細胞毒性浮腫の要因として、

(1) 血管内皮細胞および周皮細胞に対するメチル水銀の細胞毒性、および(2) 細胞内への水分貯留に関わるポリオール経路に対するメチル水銀の作用を調べた。また、血管原性浮腫の要因として、(1) 血管透過性に関わる VEGF システムに対するメチル水銀の作用、および(2) 血管周囲に水分を貯留する分子であるヒアルロナンの合成に対するメチル水銀の作用を調べた。

一方、小脳については、明確な病理仮説が存在しないことから、メチル水銀投与ラットの小脳について、病理組織学的検索を行った。

以上の研究を通じて、血管毒性からメチル水銀の病理の分子基盤を探ることが本研究の目的である。

2. メチル水銀の大脳障害を担う分子機構

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²⁾。

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³⁾。

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⁴⁾。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⁵⁾。

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 PIGF 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。⁶⁾ 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)。

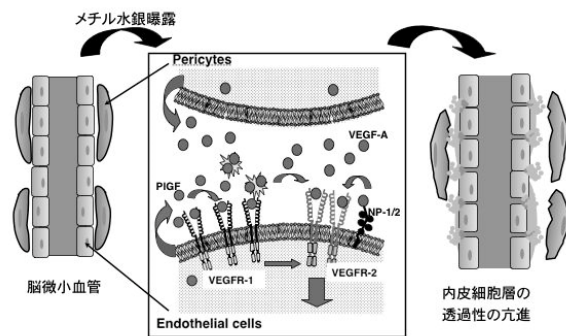


図 2 メチル水銀による VEGF システムの異常

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ナン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。

3. メチル水銀の小脳障害についての病理仮説とそれを担う想定される分子機構

ラットに塩化メチル水銀を 10 mg/kg/day の用量で 5 日間連続経口投与した。投与終了後 1, 7, 14, 21 および 28 日間経過したラットから脳を摘出し、中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン切片を作成した。各組織切片について Hematoxylin-Eosin (HE) 染色による病変部位の検索を起こった。顕著な傷害発現を認めた小脳顆粒細胞層における顆粒細胞のアポトーシスを Tunel 染色によって確認した。小脳顆粒細胞層における T-細胞 (CD3 陽性細胞), 細胞傷害性 T-細胞 (CD8 陽性細胞), マクロファージ (CD68 陽性細胞) の浸潤を免疫組織化学的に確認した。

その結果、メチル水銀中毒ラットの小脳では脱髄鞘やグリオーシスは認められな

ったが、メチル水銀投与後 21 日目以降において顆粒細胞層の顕著な萎縮性の退行性変化が観察された。しかし、プルキンエ細胞層や分子層（白質）では顆粒細胞層のような萎縮性の退行性変化は認められなかった。このとき顆粒細胞のアポトーシスが Tunel 染色により著明に確認された。また、顆粒細胞層へのリンパ球細胞の浸潤が HE 染色により確認された。そこでリンパ球細胞の種類を免疫細胞化学により特定した結果、顆粒細胞のアポトーシス発生に伴った細胞傷害性 T-細胞およびマクロファージの顆粒細胞層への浸潤が確認された。

これらの結果は、メチル水銀による顆粒細胞の傷害が引き金となり、細胞傷害性 T-細胞が小脳顆粒細胞層に浸潤し、例えばパーフォリン／グランザイム経路を介して顆粒細胞にアポトーシスを誘発し、引き続いて浸潤したマクロファージや活性化されたミクログリアが死細胞を貪食するという炎症性変化の経過が連鎖して重篤な小脳顆粒細胞層の萎縮性の退行性変化が生じることを示唆している（図 3）。

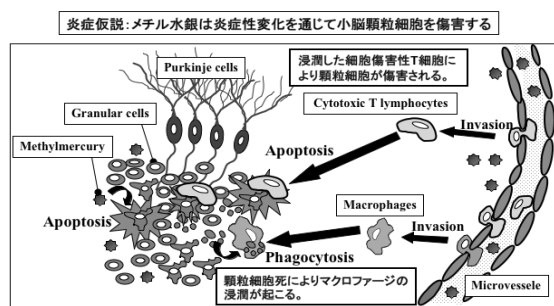


図 3 メチル水銀による小脳障害の病理仮説

この中で、我々はメチル水銀がマクロファージ様細胞 Raw 264.7 細胞に対してその TNF- α の発現を上昇させることを見出した。そのメカニズムは不明であるが、MAPK 経路が関与している可能性を予備的に観察している。また、我々は細胞傷害性 T-細胞

のパーフォリン／グランザイムの発現もメチル水銀によって上昇するのではないかと考え、その検証を進めているところである。

我々の結果にはまだ確認すべきことも多いが、この段階でもメチル水銀による小脳顆粒細胞層の障害に炎症性変化が深く関わっていることが強く示唆される。我々は、この新しいメカニズム (pathogenesis) を「炎症仮説」して提案したい。

4. 結論

メチル水銀の脳障害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。また、メチル水銀の小脳における顆粒細胞層特異的な傷害に炎症性変化が関与することが示唆される。

引用文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozeaki T, Tokunaga H, Kaneko Y. (2001) *Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-573.
- 2) Hirooka T, Fujiwara Y, Minami Y, Ishii A, Ishigooka M, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2010) *Toxicol. In Vitro*, **24**: 835-841.
- 3) Hirooka T, Fujiwara Y, Shinkai Y, Yamamoto C, Yasutake A, Satoh M, Eto K, Kaji, T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 287-294.
- 4) Hirooka T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Yasutake A, Kaji T. (2007) *J. Health. Sci.*, **53**: 450-456.
- 5) Hirooka T, Fujiwara Y, Inoue S, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, **34**: 433-439.
- 6) Hirooka T, Yamamoto C, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2013) *J. Toxicol. Sci.*, **38**: 837-845.

魚肉におけるメチル水銀の蓄積とセレンによる解毒作用

○ 山下倫明（水研セ・中央水研）

マグロ類やカジキ類、キンメダイ、ハクジラ類などの海洋の高次捕食者には、食物連鎖網を通じてメチル水銀が生物濃縮され、筋肉に蓄積する。魚介類のメチル水銀は、年齢が高い大型の個体で含有量が高い。日本人の水銀の摂取量は、8.4 $\mu\text{g}/\text{人}/\text{日}$ （体重 50 kg で 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週）であり、このうちの 88% を魚介類から摂取している¹⁾。魚介類由来の水銀は、筋肉や肝臓に蓄積したメチル水銀と無機水銀である。魚介類にはメチル水銀の毒性緩和作用を有するセレンや ω 3 高度不飽和脂肪酸（PUFA）に富むことから、これら成分の機能性を考慮して魚食由来メチル水銀の健康障害リスクを評価する手法を確立する必要がある。

1. 筋肉におけるメチル水銀の蓄積

1-1 メチル水銀結合タンパク質としてのミオシン

筋肉に含まれるメチル水銀は主に筋原繊維タンパク質のチオール基に配位している²⁾。タンパク質のメチル水銀結合部位を同定するため、水銀含量が 1 ppm 程度含まれるクロマグロ筋肉から筋原繊維を調製し、トリプシンで消化したところ、メチル水銀は可溶化し、サブフラグメント-1（S1）に分画された。水銀を含むタンパク質を、各種クロマトグラフィーによって精製

した。得られたタンパク質をトリプシン消化によって、低分子化し、メチル水銀含有ペプチドを質量分析によって測定した結果、メチル水銀はミオシンの 706 残基目のシステイン、すなわち反応性の高い SH1 チオール基に結合していた³⁾。心筋、血合筋などでも、ミオシンに水銀が検出された。ミオシンは、広く動物に共通した水銀結合タンパク質であると考えられる。メチル水銀によるミオシンの化学修飾によって ATPase 活性が増大したことから、メチル水銀によるミオシンの化学修飾は筋収縮や心機能に関与する可能性が考えられた。

1-2 メチル水銀に対する抗体の開発

メチル水銀が結合した SH1 チオール基を含むミオシン由来ペプチドを抗原とし、ウサギに免疫して特異抗体を作製した³⁾。その結果、メチル水銀が付加されたミオシンを免疫組織化学およびウエスタンブロットによって検出することが可能となった。メチル水銀を曝露したゼブラフィッシュおよびマミチョグの筋肉におけるメチル水銀の局在性を組織化学的に検出した結果、筋繊維間の顆粒に染色像が認められた。高濃度のメチル水銀に曝露された魚体の筋肉では、メチル水銀が付加したミオシンは分解され、筋繊維外に分泌されて、筋繊維間に留まる可能性が

考えられた。魚肉におけるメチル水銀はミオシンの SH 1 チオール基に配位して存在することによって、メチル水銀単独での毒性が低下すると推定された。

肝臓や血液には無機水銀が検出されることから、ほ乳類や魚類は、メチル水銀を分解し、無機化する作用を有している。鯨類の肝臓には、数百 ppm ものセレン化水銀が存在している⁴⁾。これは、セレンによる解毒産物であると考えられる。魚肉の場合、水銀のほとんどがメチル水銀であるが、クロカジキ肉の場合は総水銀に対してメチル水銀が少なく、無機水銀を多く含んでいた (図 1)。

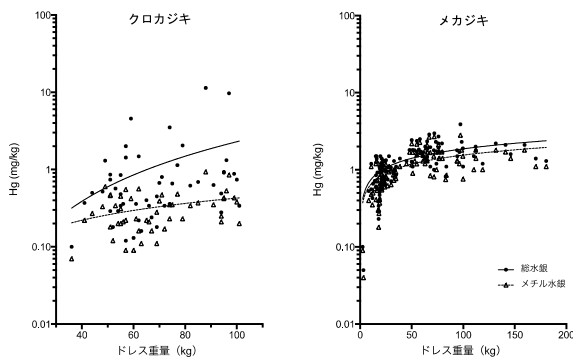


図 1 メカジキおよびクロカジキ筋肉に含まれる総水銀およびメチル水銀含量

魚肉をプロテイナーゼ K 処理したのち不溶物を遠心分離で回収すると無機水銀とセレンが検出された⁸⁾。このことから、クロカジキ筋肉中の水銀は、メチル水銀だけではなく、セレン化水銀として存在することがわかった。従って、海

産哺乳類と同様に魚類にもセレンによるメチル水銀の無機化経路が存在すると考えられた。セレンによるメチル水銀無機化は、生物種や臓器によって異なるものと考えられる。

2. 魚介類由来セレンの生化学的特徴と機能性

動物組織ではセレンは、酸化還元反応を担うセレンタンパク質に含まれることが知られている。ところが、セレン含量が高いマグロ類組織の主要なセレンは、イミダゾール化合物のセレノネイン (2-selenyl- $N_{\alpha},N_{\alpha},N_{\alpha}$ -trimethyl-L-histidine) であることが見出された⁵⁾。マグロ類、サバ類、ブリ類等の回遊性魚にとくに多く含まれるが、魚類だけでなく哺乳類やスルメイカにも広く分布している (表 1)。

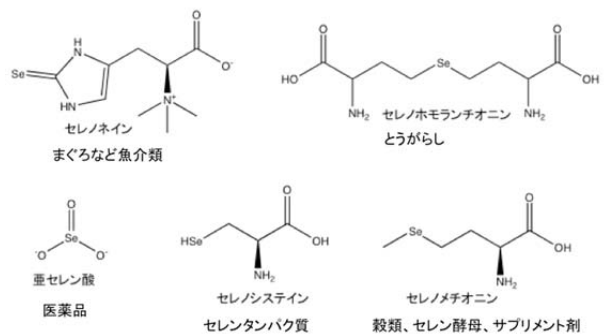


図2 食品に利用されるセレン化合物

セレノネインはミオグロビンやヘモグロビン、遊離のヘムに結合することから、ヘムの自動酸化防止に作用し、低酸素適応に関与することが推定された。マグロ類普通筋の中ではミオグロビン含量の高いメバチ筋肉に最も多かった⁶⁾。一

方、プランクトン食のサケ科魚や底魚では少ない。肉食性のサメ類も少なかった。鯨類は多いが、陸上動物は少なかった。ゼブラフィッシュ胚に無機態の亜セレン酸を投与するとセレノネインが生合成された。これらのことから、セレノネインは、海洋生態系での食物連鎖網を介して高次捕食者に生物濃縮されるとともに、他のセレン源からも生合成されると推定された。

特異的なトランスポーター（organic cation/carnitine transporter 1, OCTN1）によってセレノネインの細胞への取り込みとメチル水銀の排出・無機化が促進された⁸⁾。このことから、食事由来のセレノネインは、OCTN1を介して生体内に取り込まれ、レドックス回路を強化し、ラジカルスカベンジャーとして活性酸素種の発生を抑制すると考えられる。OCTN1はクローン病の原因遺伝子の一つとして報告されている。また、クローン病や潰瘍性大腸炎とセレン欠乏の関連性を示唆する報告もある。魚食によるセレノネイン摂取はこれらの疾病の発症予防に関係しているかもしれない。

魚食頻度の高い離島住民の赤血球からセレノネインが検出された（赤血球の総セレン含量 0.51 µg /g, セレノネイン含量 0.21 µg Se/g)⁸⁾。血清からは検出されなかった（血清総セレン含量 0.174 µg /g）。魚食の頻度の高い場合に、赤血球セレノネイン含量が高いことから、セ

レノネインは魚介類中心の食事によって、生体内に取り込まれ、とくに赤血球に濃縮して蓄積すると考えられた。赤血球セレノネインは、メチル水銀および血清のω3-PUFAとともに、魚食のバイオマーカーとして利用できる。魚食によるセレノネインの摂取は、酸化ストレスを軽減し、発がんや糖尿病リスクを低下させるのか、また、糖尿病リスクに関わるGPx活性やセレノプロテインPを誘導するかどうかを今後検証する必要がある。

3. セレンによるメチル水銀の解毒機構

セレンによるメチル水銀毒性軽減効果は、Ganther ら（1972年）によって報告された⁹⁾。メチル水銀を添加したまぐろ缶詰肉をウズラに投与したところ、ほとんどの個体が生き残った。その後、多くの追試がなされた。Ralston らは、ラットにメチル水銀と亜セレン酸を投与し、セレン対水銀のモル比が0.2以上の飼料において、メチル水銀による神経への毒性が消失することを明らかにした¹⁰⁾。このことから、メチル水銀の健康リスクとセレンのベネフィットを考慮した評価指標を提案している^{11,12)}。サメ類とハクジラ類の肉はメチル水銀に対して、セレンが少ない点で健康リスクが高いことが推定される（図3）。

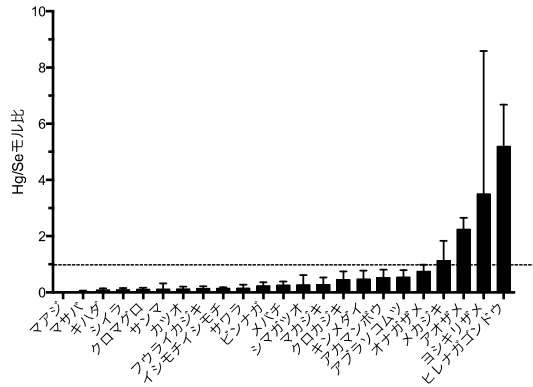


図3 魚肉・鯨肉の水銀・セレンのモル比
 文献12に国内産魚のデータを追加。モル比が1（破線）より大きくなると、健康リスクが生じる可能性（メカジキ、アオザメ、ヨシキリザメおよびヒレナガゴンドウが該当）が考えられる。

このようなセレンによるメチル水銀の毒性軽減の分子機構にセレノネインが関与している。セレノネインとメチル水銀をゼブラフィッシュ胚に投与すると、メチル水銀単独では投与量に応じて、胚にメチル水銀が蓄積し、過剰なアポトーシスが誘導されたが、セレノネインが存在すると、アポトーシスが抑制され、メチル水銀の蓄積は低下した⁷⁾。胚からはメチル水銀とともに無機水銀が検出されたことから、セレノネインはメチル水銀の無機化を促進する作用を有することが明らかとなった。受精卵の卵黄内にメチル水銀を注入した場合には、速やかに胚体外に排出された。培養水を超遠心分離して分泌顆粒を回収し、分泌顆粒に含まれる化学成分を測定すると、水銀はリソソーム由来の分泌顆粒エキソソームに含まれていた。

セレノネイントランスポーターzOCTN1の翻訳阻害によって、胚からのメチル水銀の排出が阻害された⁷⁾。これらのことから、セレノネインに

よるメチル水銀の排出と無機化には、OCTN1が関与することが見出された。ヒト腎臓由来 HEK293細胞に対して、hOCTN1を過剰発現させた場合にもセレノネインによるメチル水銀の排出と無機化が促進された⁷⁾。

これらの結果から、メチル水銀は、細胞内でセレノネインと複合体を形成し、OCTN1輸送体を介してエンドソーム内に取り込まれた後、分泌顆粒として細胞外へ分泌される機序が推定された⁷⁾。メチル水銀曝露による酸化ストレス条件によって、セラミドが生成し、エンドソーム膜からの分泌顆粒生成が促進されると考えられる。スジイルカ肝臓抽出物のLC-ICP-MS分析によって、水銀とセレンが同時検出されるセレノネイン-メチル水銀付加体が見出された。メチル水銀の無機化は、エンドソーム内または分泌顆粒内でセレノネイン-メチル水銀複合体が分解されて、セレン化水銀が生じるためであると考えられた^{7,13)}。

先の住民調査では、赤血球セレノネイン含量とメチル水銀含量との間に正の相関関係が見られた⁸⁾。セレノネインは赤血球におけるメチル水銀の代謝・蓄積と関係することから、メチル水銀はセレノネインを介して赤血球や他の臓器に輸送される可能性が考えられる。このとき、赤血球のセレン/メチル水銀モル比は、3.5倍から81倍(平均約42倍)であった。メチル水銀の蓄積に対してセレノネイン過剰な生理状態であると考えられ、メチル水銀の解毒効果が作用すると

推定される。この集団(赤血球メチル水銀 87 ppb)では、魚食によるメチル水銀曝露が筋肉痙攣(こむら返り)をもたらすことが報告されている。魚食による低レベルのメチル水銀の長期曝露に対して、セレノネインによるメチル水銀解毒機構やPUFAによる神経毒性の緩和作用が働いた結果、微弱ながら健康影響が生じるものと考えられた。

魚食のメチル水銀研究の今後の課題として以下の項目を解明する必要がある。

- 1) メチル水銀無機化の分子機構
- 2) メチル水銀の解毒産物であるセレン化水銀やエキソソームの検出
- 3) 動物モデル実験および疫学調査によるセレノネインとPUFAによるメチル水銀毒性の緩和作用の検証
- 4) 魚食による生活習慣病予防効果の解明
- 5) メチル水銀を比較的高濃度に含むメカジキ、サメ類、ハクジラ類肉などの摂食について、機能性成分のメチル水銀毒性緩和作用を考慮した健康リスクの推定

文献

- 1) 食品安全委員会. 魚介類等に含まれるメチル水銀について. 2004.
- 2) Arima S, Umemoto S. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 1976; **42**: 931-937.
- 3) 特許 5248841 号
- 4) Ng P-S, Ji H, Matsumoto K, Yamazaki S, Kogure T, Takagi T, Nagasawa H. *Proc. Japan. Acad.* 2001; **77**: 178-183.
- 5) Yamashita Y, Yamashita M. *J. Biol. Chem.* 2010; **285**: 18134-18138.

- 6) Yamashita Y, Amlund H, Suzuki T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K, Yamashita M. *Fish. Sci.* 2011; **77**: 679-686.
- 7) Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani K, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. *Marine Biotech.* 2013; **15**: 559-570.
- 8) Yamashita M, Yamashita Y, Ando T, Wakamiya J, Akiba S. *Biol. Trace Elem. Res.* 2013; **156**: 36-44.
- 9) Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P. *Science* 1972; **175**: 1122-1124.
- 10) Ralston NV, Ralston CR, Blackwell JL 3rd, Raymond LJ. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology* 2008; **29**: 802-811.
- 11) Ralston NV. Selenium health benefit values as seafood safety criteria. *Ecohealth.* 2008; **5**: 442-455.
- 12) Kaneko JJ, Ralston NV. Selenium and mercury in pelagic fish in the central north pacific near Hawaii. *Biol. Trace Elem. Res.* 2007; **119**: 242-254.
- 13) 山下倫明, 今村伸太郎, 山下由美子. 化学と生物 2012; **50**: 807-817.

表1 動物組織におけるセレノネインおよび総セレン含量

分析試料	種名	セレノネイン mg Se/kg	総セレン mg/kg	n
筋肉				
血合筋(養殖)	クロマグロ	15.0 ± 0.6	17.2 ± 1.1	3
心臓(養殖)	クロマグロ	1.18 ± 0.12	10.0 ± 1.2	3
普通筋	メカジキ	0.22 ± 0.05	0.53 ± 0.12	3
普通筋	メバチ	0.20 ± 0.14	1.13 ± 0.52	3
普通筋	クロマグロ	0.18 ± 0.01	0.60 ± 0.09	3
普通筋	キハダ	0.13 ± 0.04	0.76 ± 0.31	3
普通筋	ビンナガ	0.13 ± 0.03	1.50 ± 0.66	3
普通筋	カツオ	0.08 ± 0.05	0.49 ± 0.27	3
筋肉	ゴマサバ	0.20 ± 0.07	0.54 ± 0.12	26
筋肉	ナメタガレイ	0.18 ± 0.01	0.32 ± 0.06	8
普通筋	マイワシ	0.11 ± 0.04	0.33 ± 0.07	3
普通筋	アオメエソ	0.11 ± 0.04	0.37 ± 0.10	3
普通筋	キンメダイ	0.10 ± 0.04	1.43 ± 1.02	3
普通筋	マアジ	0.04 ± 0.02	0.40 ± 0.11	3
普通筋	マサバ	0.04 ± 0.01	0.27 ± 0.04	3
普通筋	マダイ	0.03 ± 0.01	0.29 ± 0.06	3
普通筋	ヤマトカマス	0.01 ± 0.01	0.14 ± 0.01	3
筋肉	サンマ	0.01 ± 0.01	0.20 ± 0.03	10
普通筋	サンマ	ND	0.21 ± 0.00	3
普通筋	サケ	ND	0.30 ± 0.02	3
普通筋	イシモチ	ND	0.28 ± 0.06	3
普通筋	カタクチイワシ	ND	0.25 ± 0.14	3
筋肉	マダラ	ND	0.23 ± 0.04	10
普通筋	マアナゴ	ND	0.20 ± 0.09	3
普通筋	マコガレイ	ND	0.11 ± 0.00	3
筋肉	スルメイカ	0.01 ± 0.00	0.21 ± 0.01	10
心臓	ニワトリ	ND		3
筋胃	ニワトリ	ND		3
血液				
血球(養殖)	クロマグロ	51.6 ± 5.7		3
全血(養殖)	クロマグロ	34.0 ± 6.5		3
全血(天然)	クロマグロ	6.55 ± 2.29	12.0 ± 3.1	3
全血	マサバ	34.5 ± 12.6		3
全血(養殖)	ティラピア	0.07 ± 0.05		3
血球	ヒト	0.21 ± 0.36	0.510 ± 0.389	167
血清	ヒト	ND	0.174 ± 0.038	167
内臓				
脾臓(養殖)	クロマグロ	3.24 ± 1.26	20.8 ± 2.9	3
肝臓(養殖)	クロマグロ	3.08 ± 0.59	13.0 ± 3.0	3
肝臓	スルメイカ	0.73 ± 0.28		3
肝臓	ニワトリ	0.02 ± 0.01		3
肝臓	ブタ	ND		3
腎臓	ブタ	0.03 ± 0.01		3

数値は、平均値±標準偏差をしめす。ND：検出限界以下(0.004 mg Se/kg)。

胎生期および発育・発達期における低濃度複合水銀曝露による神経行動毒性について

○吉田 稔（八戸学院大学）、佐藤雅彦（愛知学院大学）、渡辺知保（東京大学）、古澤 華（東京大学）、李 辰竜（愛知学院大学）

【緒言】

小規模金鉱山における金採掘は中南米、東南アジア、アフリカなどの50カ国以上の発展途上国で行われ、国際労働機関は小規模金鉱山で働く鉱夫は1,100~1,300万人で、うち女性が250万人、子供が25万人含まれていると推定している。多くの子供は家族の家計と助けるため両親と共に働いていることから水銀蒸気(Hg^0)曝露による健康影響が危惧されている。

近年、小規模金鉱山や水銀鉱山では手掘りによる金や水銀採掘が周辺地域の水銀汚染を引起している。とくに土壌の水銀汚染は穀類への水銀蓄積を引起し、穀物中に高濃度のメチル水銀(MeHg)が検出されている。この地域の住民は大気からの水銀蒸気曝露に加えて、穀物からのメチル水銀曝露による複合曝露が問題視されてきている

一般に胎生期や小児期における水銀に対する感受性は、成人に比べ高いことが知られている。しかしながら、胎生期や発育期における複合水銀曝露の影響に関する知見は殆どない。発展途上国では今なお金鉱山や水銀鉱山周辺地域で妊婦や小児が低濃度の複合水銀曝露を受けていると考えられる。本研究は胎生期および発育・発達期における低濃度水銀蒸気と低濃度メチル水銀による複合水銀曝露が神経行動機能へどのような影響を与えるかを検討した。

【実験方法】

1) 胎生期における複合水銀曝露実験

1-1 動物

C57BL/6系マウスを日本クレア(株)より購入し、10週齢に達したとき雄と雌を一対一で同居させて行い、翌朝にプラグの確認をもって妊娠0日目とした。この間、餌はCE-2(日本クレア)飼料を与え、飼育した。

1-2 曝露方法

水銀蒸気(Hg^0)曝露：妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m^3 (範囲 $0.017\sim 0.038\text{ mg/m}^3$)で1日6時間、妊娠18日目まで連日曝露を行った。

メチル水銀(MeHg)曝露：妊娠したマウスは直ちにメチル水銀5ppm含有飼料を与え、飼育した。メチル水銀含有飼料は出産10日目まで与え、その後は、メチル水銀を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。

水銀蒸気+メチル水銀(Hg^0 +MeHg)曝露：妊娠したマウスは直ちに水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.030 mg/m^3 (範囲 $0.017\sim 0.038\text{ mg/m}^3$)で1日6時間、妊娠18日目まで連日曝露を行った。同時に、メチル水銀5ppm含有飼料を出産10日目まで与え飼育し、その後はメチル水銀を含まないメチル水銀無添加飼料で飼育した。

出産後、仔の数を雌雄3匹に揃えた。出産10日目に新生仔雌雄各2匹をエーテル麻酔下で屠殺し、脳・腎臓・肝臓を摘出し、 -80°C で冷凍保存した。出産28日目に離乳させ、仔が8週齢に達したとき、行動解析を行った。行動解析には母親から出産した雌雄各1~2匹を用い、実験群は一群5~6匹とし、8週齢で実施した。

2) 小児期における複合水銀曝露実験

2-1 動物

出産2週齢のC57BL/6Jマウスを日本クレア(株)より60匹を購入し、動物飼育室内で実験開始まで飼育した。この間、飲料水は水道水で、飼料はMF(オリエンタル酵母)を用い、自由に摂食させた。出産21日目に対照群、 Hg^0 曝露、MeHg群、 Hg^0 +MeHg曝露に分け、母親から出産し

た 2~3 匹の雌性マウスを用い、一群 22 匹とした。

2-2 曝露方法

水銀曝露は 3 週齢（出産 21 日）から 7 週齢までの 4 週間（28 日間）行った。

Hg⁰曝露：マウスを水銀蒸気曝露装置内に入れ、曝露濃度平均 0.096（範囲 0.055~0.143）mg/m³ で 1 日 8 時間連日曝露を行った。

MeHg 曝露：塩化メチル水銀（和光純薬工業）を蒸留水で 5ppm 水溶液に調整し、飲水させた。

Hg⁰+MeHg 曝露：水銀蒸気曝露装置内で Hg 曝露を行うと共に 5ppm MeHg 含有蒸留水を自由摂取させた。

曝露終了後、一般飼料と水道水に戻し、行動試験開始 10 週目まで飼育した。行動試験は 10 週目（曝露終了 3 週目）より開始した。

3. 行動試験

マウスの自発運動量（運動活動性、探索行動）はオープンフィールド（OPF）試験で行った。嫌悪体験学習は受動的回避反応（Passive avoidance）試験で行った。空間認知による学習能力についてはモリス水迷路試験または 8 方向放射状迷路（RM）試験を用いて行った。

4. 組織中水銀濃度の測定

組織中水銀濃度測定には、組織をユニシール分解ルツボ（イスラエル製）に入れ、濃硝酸を 3ml 加え、140℃で 90 分間、加熱湿式灰化した後、水銀濃度を還元気化 - 原子吸光光度法で測定した。

5 統計処理

各群間の平均値の有意差検定は、一元配置分散分析、あるいは、繰り返しのある二元配置分散分析を行ったのちに Holm-Sidak 検定で処理した。

【結果】

I) 胎生期における複合水銀曝露実験

出産 8 週齢における雌雄マウスの対照群と Hg⁰曝露群、MeHg 曝露群、Hg⁰+MeHg 複合曝露群の OPF 試験における自発運動量を表す総移動距離を示した。

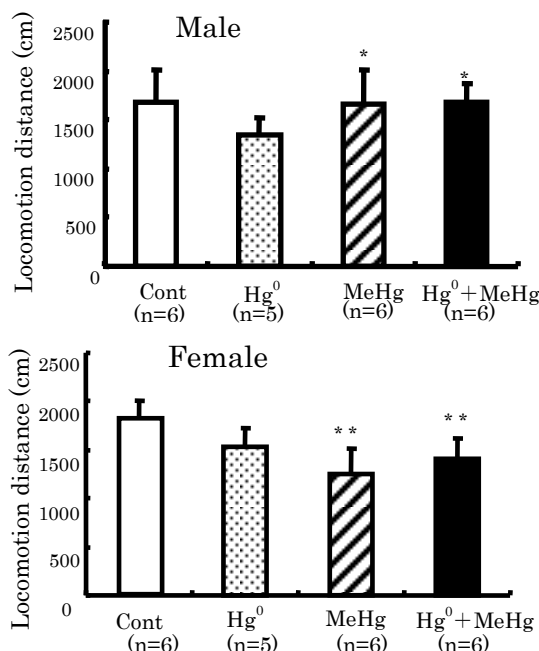


図 1 マウスの出産 8 週齢の OPF 試験における総移動距離。*p < 0.05 で対照群との間に有意差あり **p < 0.01 で対照群との間に有意差あり

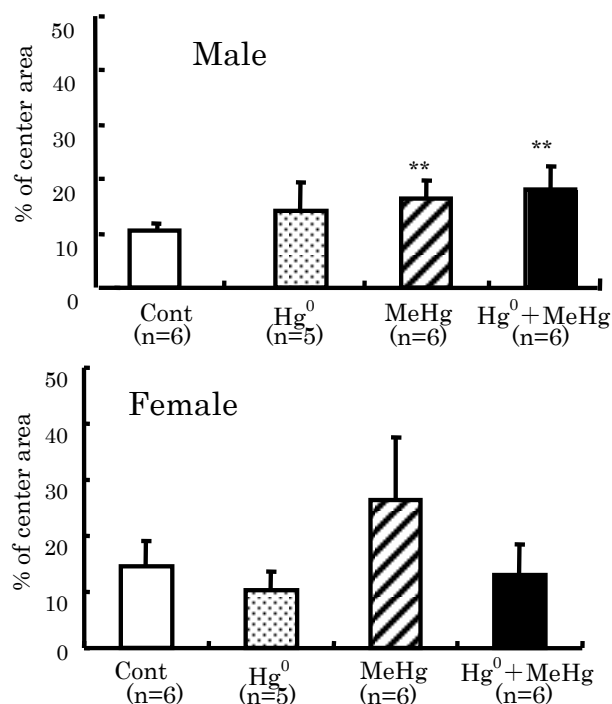


図 2. 雌雄マウスの出産 8 週齢の OPF 試験での

中心に滞在した割合。 $**p<0.01$ で対照群との間に有意差あり

雄マウスでは MeHg 曝露群と Hg^0+MeHg 曝露群の総移動距離は対照群に比べ高く、自発運動量の亢進が見られたが、雌マウスでは MeHg 曝露群と Hg^0+MeHg 曝露群の総移動距離は低く、自発運動量は低下していた (図 1)。

図 2 に OPF 試験での探索行動の活動度を表す中心に滞在していた割合を示す。 Hg^0 曝露群で、雌雄マウスともに対照群との間に有意な差異は認められなかった。しかし、MeHg 曝露群では、雄マウスにおいて対照群より有意に高値 ($p<0.01$) を示したが、雌マウスでは対照群との間に有意な差異は認められなかった。 Hg^0+MeHg 複合曝露群では、MeHg 曝露群と同様、雄マウスにおいてのみ対照群より有意に高値 ($p<0.01$) を示した (図 2)。

受動回避反応試験では雌雄マウスとも、初日に行った訓練試行の回避反応時間には、対照群と Hg^0 、MeHg、 Hg^0+MeHg 各曝露群との間に有意な差異は認められなかった。そして翌日に行った嫌悪体験が記憶されているかを調べる保持試行の回避反応試験でも、対照群と Hg^0 、MeHg、 Hg^0+MeHg 各曝露群との間で回避反応時間に有意な差異は認められなかった (Data not shown)。

モリス水迷路試験では Hg^0 曝露群では、訓練試行において、雌雄マウスともに 5 日間ともに対照群と Hg^0 曝露群との間に回避反応時間に有意な差異は認められなかった。MeHg 曝露群の雄マウスでは、5 日間に回避反応時間は短縮せず、訓練 4 日目と 5 日目に対照群との間に回避反応時間の間に有意な差が認められた ($p<0.05$) (図 3)。これに対し、雌マウスは対照群との間に 5 日間とも回避反応時間に有意な差異は認められなかった。 Hg^0+MeHg 複合曝露群では、MeHg 曝露群と同様、雌雄マウスでは訓練を重ねても回避反応時間の短縮は認められなかった。しかも、訓練 4 日目では対照群と Hg^0+MeHg 複合曝露群との

間に回避反応時間に有意な差が認められ ($p<0.05$)。雌マウスでは対照群と Hg^0+MeHg 複合曝露群との間で回避反応時間に有意な差異は認められなかった (図 4)。

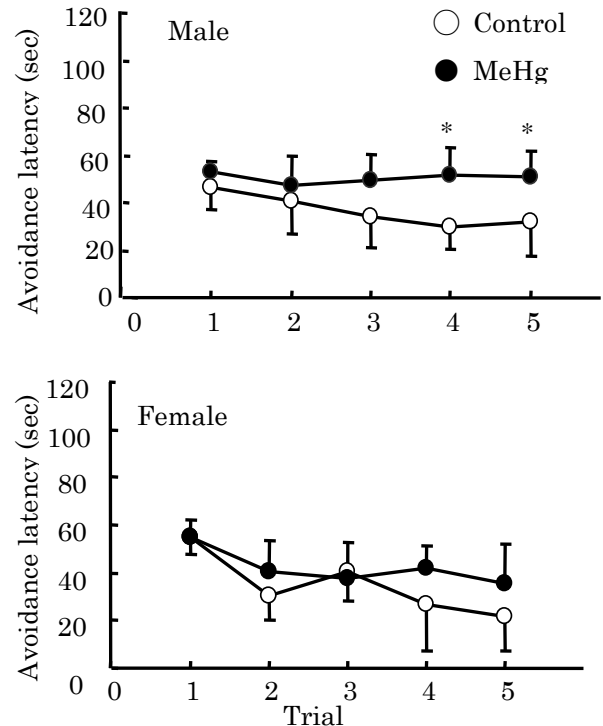


図 3 MeHg 曝露群のモリス水迷路試験での回避反応時間、*: $p<0.05$ で対照群との間に有意差あり

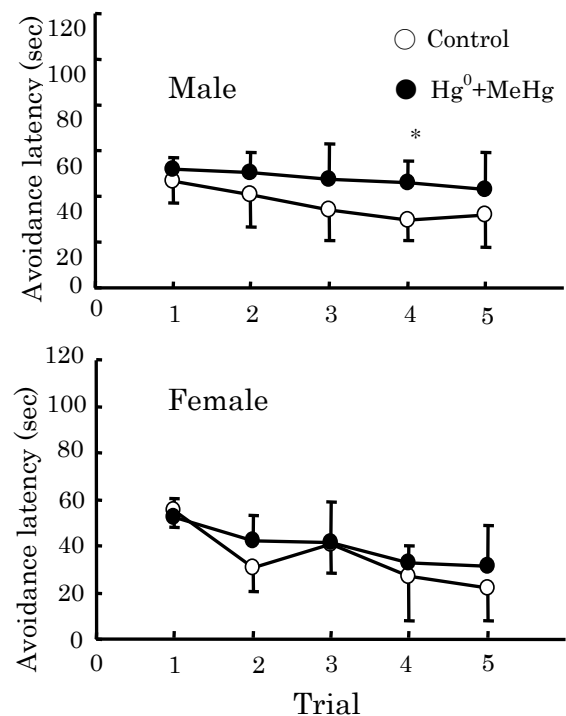


図 4 Hg^0+MeHg 曝露群のモリス水迷路試験での回

避反時間、*: $p < 0.05$ で対照群との間に有意差あり

表 1 出産 10 日目における組織中の水銀濃度

	Male (ng Hg/g wet wt.)		
	Brain	Liver	Kidney
Control	1.7±0.4	5.3±2.5	19.5±0.9
Hg ⁰	3.0±0.3*	6.7±0.6	23.7±5.5
MeHg	340±91**	308±45**	397±50**
Hg ⁰ +MeHg	652±33**	425±81**	356±76**
	Female (ng Hg/g wet wt.)		
	Brain	Liver	Kidney
Control	2.07±0.4	6.0±1.0	18.0±1.6
Hg ⁰	3.2±0.6*	8.0±1.7	18.2±1.5
MeHg	380±89**	444±39**	267±28**
Hg ⁰ +MeHg	341±69**	588±62**	425±99**

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ で対照群との間に有意差あり

表 1 には 出産 10 日目の組織中の水銀濃度を示す。Hg⁰ 曝露群では、雌雄マウスともに脳では対照群に比べ、有意な差異が認められた。MeHg 曝露群は、雌雄マウスともに脳で約 180 倍高値を示した。また腎では約 20 倍高値を示し、肝では 60 倍高値を示した。Hg⁰+MeHg 複合曝露群は、雄マウスの脳で約 380 倍、雌マウスで約 170 倍高値を示した。また腎では MeHg 曝露群と同様、雌雄マウスで約 20 倍高値を示し、肝では雌雄マウスともに約 80 倍高値を示した。

II) 小児期における複合水銀曝露実験

出産 3 週齢～7 週齢に曝露を行ったマウスの OPF 試験の結果を図 5、図 6 に示す。図 5 には 10 週齢で測定した 2 分間の自発運動量を示す。30 秒毎および総移動距離は対照群と曝露群の間に統計的に有意差は認められなかった。図 6 にはフィールド内の中心もしくは辺縁に滞在していた時間を示し、群間に統計的有意差はなかった。

受動回避反応時間は訓練試行、保持試行ともに対照群と各曝露群間で統計的に有意な差は認められなかった (Data not shown)。

図 7 には 12～13 週齢で行った放射状迷路試験

の結果を示す。

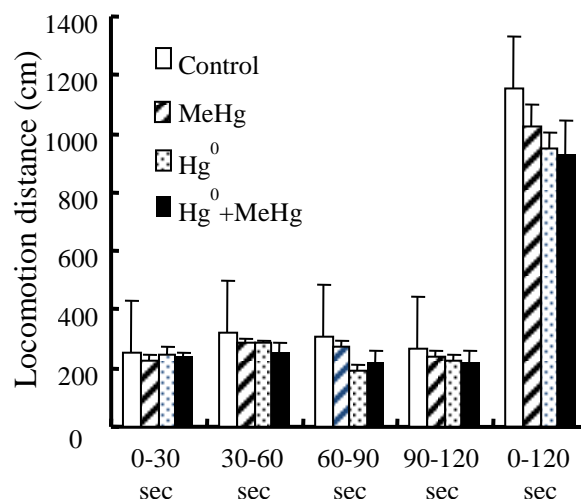


図 5 10 週齢雌性マウスにおける OP 試験の移動距離 (各群のマウス数は 7 匹)

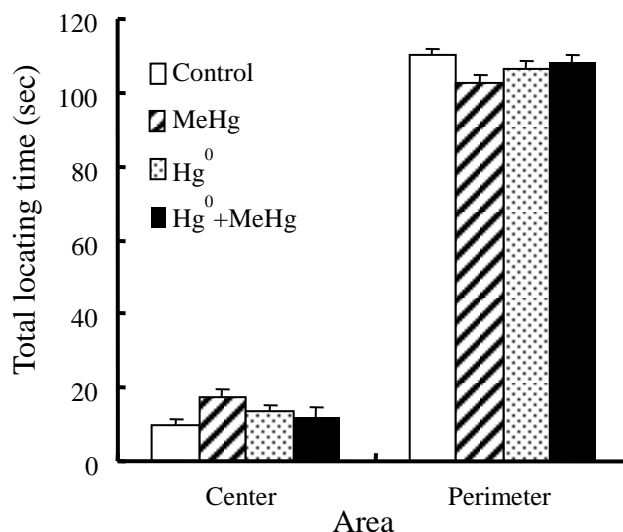


図 6 10 週齢雌性マウスにおける OPF 試験の中心に滞在している時間 (各群のマウス数は 7 匹)

の結果を示す。図 7 上段の「既に獲得したアームを訪れるエラー数」は対照群と Hg⁰ 曝露群との間にのみ有意な群間差 ($p < 0.05$) があったが、試行間に有意な差はなかった。図 7 下段の「餌の獲得数」には対照群と曝露群の間に有意差はなかったが、試行間で有意に獲得数が上がっていた ($p < 0.05$)。

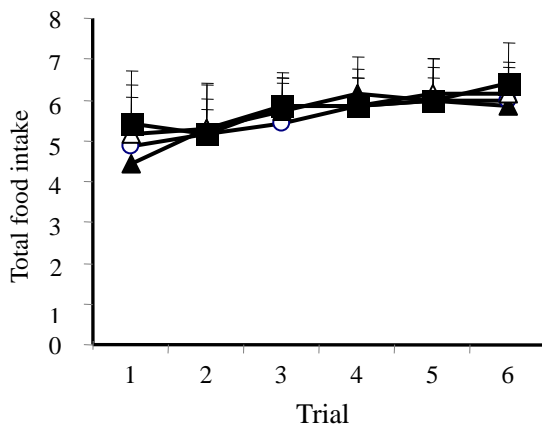
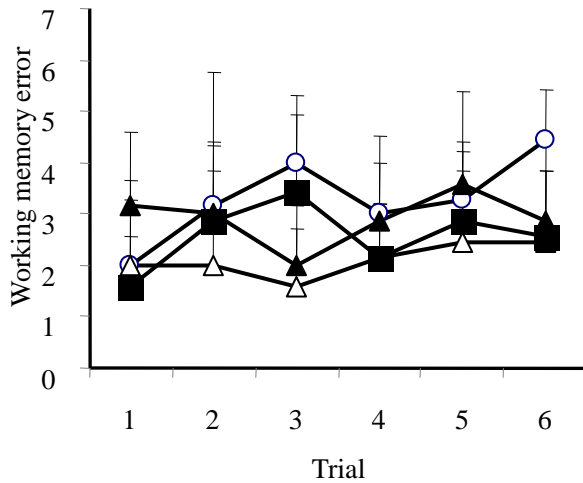


図7 放射状迷路試験（既に餌を獲得したアームを訪れる数、餌の獲得数）

○-○:control, -▲-:MeHg, -△-:Hg⁰,
-■-:Hg⁰+MeHg

表2には曝露終了後と行動試験終了後（曝露終了後8週目）の組織中濃度を示す。

行動試験終了後（曝露終了後15週）の水銀濃度は大脳ではHg⁰+MeHg複合曝露群が対照群より約20倍高値を示した。小脳は対照群に比べ、MeHg曝露群は約7倍、Hg⁰曝露群は約7倍、Hg⁰+MeHg複合曝露群は約15倍と高値を示した。いずれの曝露群も小脳からの水銀消失は緩やかであるが、とくにHg⁰+MeHg群は他の曝露群より緩やかであった。

表2 組織中水銀濃度(ng Hg/g wet wt.)

	曝露終了後		
	Cerebrum	Cerebellum	Kidney
Control	26±7	8±6	8±5
Hg ⁰	352±32**	599±102**	1348±452**
MeHg	2080±85**	1155±186**	27039±5545**
Hg ⁰ +MeHg	2322±210**	1619±256**	27798±2958**

	行動試験終了後		
	Cerebrum	Cerebellum	Kidney
Control	8±5	21±4	15±9
Hg ⁰	15±9	158±82*	30±28
MeHg	23±24	148±82*	332±28**
Hg ⁰ +MeHg	167±30**	325±64**	297±22**

* p < 0.05, ** p < 0.01 で対照群との間で有意差あり

【結論】

胎生期における曝露実験では、母体がWHOの推奨したNOEL（無影響量）0.025 mg/m³に近いHg⁰曝露（0.03 mg/m³）を受けてもその後の神経行動に対する影響は少ないことが明らかとなった。しかし、5ppm MeHg また Hg⁰+MeHg 複合曝露を受けた場合、OPF試験の探索行動量に影響が見られ、特に雄マウスでMeHgに対する感受性が高いことが判明した。また今回、Hg⁰とMeHgによる複合曝露の影響を見たが、MeHg曝露群よりHg⁰+MeHg複合曝露群により強い行動影響は認められなかった。

小児期における雌マウスの曝露実験では、曝露終了3週目（生後10週目）に行ったOPF試験、PA試験において、いずれも対照群とHg⁰曝露群、MeHg曝露群、Hg⁰+MeHg複合曝露群との間に有意差は認められなかった。またRM試験では「既に獲得したアームを訪れるエラー数」は対照群とHg⁰曝露群との間にのみ有意な群間差があったが、試行間に有意な差はなかった。「餌の獲得数」には対照群と曝露群の間に有意差はなかった。曝露終了後の各曝露群ともに大脳に比べ小脳からの水銀消失は緩やかであった。

メチル水銀トランスポーターを利用した水銀化合物のファイトレメディエーション

○清野正子、曾根有香（北里大学薬学部）

1. 研究目的

水銀汚染土壌の従来の浄化方法として、汚染土壌を掘削し、新しく客土をする物理化学的手法が用いられてきたが、多大な費用を要することや運び出した汚染土壌の廃棄処理の問題などの短所がある。このような状況下、環境中に排出された重金属の安全かつ有効な浄化方法の早急な開発が待ち望まれている。近年、ファイトレメディエーションとよばれる植物を用いた生物学的手法が注目されている。この技術は、比較的 low cost で、低濃度で広範囲な汚染に対して有効であると考えられている。しかしながら、野生種の植物を用いる場合、処理に時間がかかる等の欠点がある。水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物の創生により、処理時間を短縮することができると考えられた。

そこで、植物に重金属高蓄積能を付与する因子として、細菌由来のメチル水銀トランスポーター MerE に注目した。MerE は細菌の細胞膜に発現し、メチル水銀 (CH_3Hg^+) および無機水銀 (Hg^{2+}) を細胞外から細胞内へ輸送するトランスポーターである。MerE を発現させたトランスジェニックシロイヌナズナを作出し、環境中に放出された水銀化合物の効率の良い浄化法の開発を目的とした。

2. 研究方法

Tn21 由来の *merE* 遺伝子を植物培養細胞用ベクターに組換え、シロイヌナズナ培養細胞に形質転換した。MerE タンパク質の培養細胞内における局在はコンフォーカルレーザーキャニグ顕微鏡を用いて観察した。

merE 遺伝子を植物ベクター pMAT137 に組換え、常法に従い *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ) に形質転換し、 T_1 種子を収穫

した。その後、 T_2 および T_3 世代の種子を収穫するとともに、各段階の植物体を用いて、*merE* 遺伝子のゲノムへの組換えおよび mRNA の発現を調べた。ゲノム PCR により *merE* 遺伝子のゲノムへの組換え、RT-PCR により *merE* 遺伝子の mRNA 発現、Western blotting により *merE* 遺伝子の産物をそれぞれ確認した。さらに、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性は常法に従い、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} 蓄積量は還元気化原子吸光度法に従い検討した。

3. 研究結果

merE と *gfp* を植物培養細胞用ベクターに組換え、シロイヌナズナ培養細胞に形質転換し、MerE の細胞内局在について検討した結果、シロイヌナズナ培養細胞内において GFP-MerE は細胞膜および小胞体に発現すると示唆された (Fig. 1)。

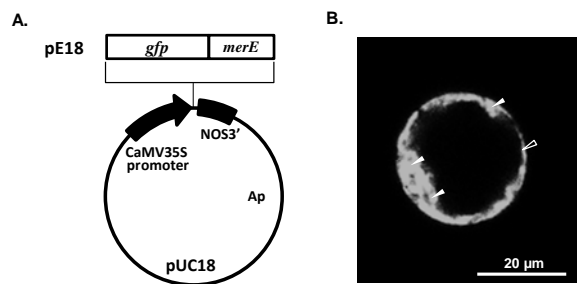


Fig.1 Construction of *gfp-merE* fusion plasmid (A) and cellular localization of GFP-MerE in suspension-cultured plant cells (B). GFP-tagged fusion proteins were expressed in suspension-cultured plant cells and viewed by confocal laser scanning microscopy. GFP fluorescence images are shown for GFP-MerE (B). Bars = 20 μm .

T₁ 種子をカナマイシン培地で選抜したところ、11 株の形質転換体を獲得した。作出した株において *merE* 遺伝子の植物ゲノムへの組換えが検出され、*merE* の mRNA が発現した系統を 6 株 (E2, E3, E4, E5, E6, E7) 獲得した (Fig. 2)。これらの株は野生株と同様の発生・分化・生育を示した。6 株の表現型および mRNA の発現量はそれぞれほぼ同等であった為、以降の検討には E2 株を用いた。

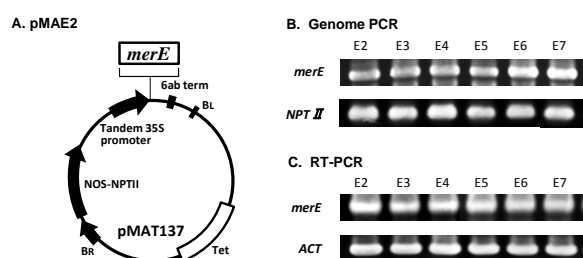


Fig.2 Characterization of *merE* in transgenic plant lines.

The structure of the DNA region transferred using the plant expression plasmids pMAE2 (A). Confirmation of the expression of *merE* (E2, E3, E4, E5, E6, and E7) in transgenic plants based on genomic PCR expression analysis (B). Expression analyses of *merE* (E2, E3, E4, E5, E6, and E7) in transgenic plants, which were determined by reverse transcription PCR (C).

E2 株における MerE の発現を抗 MerE 抗体を用いて Western blotting した結果、MerE は粗抽出画分および膜画分において検出された (Fig. 3)。

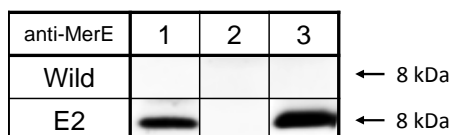


Fig.3 Immunoblot of MerE protein in transgenic plants.

Immunoblot analysis of the crude cell extracts (lane 1), soluble fractions (lane 2), and membrane fractions (lane 3) obtained from wild type (Wild) and *merE* (E2) transgenic plants, which were performed using anti-MerE polyclonal antibodies. The amount of protein applied in each lane was 25 μ g. The arrow indicates MerE (8 kDa).

次に、E2 株の CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および蓄積性について検討した結果、E2 株は野生株に比べ、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対し耐性を示した (Fig. 4A)。さらに、E2 株は野生株に比べて有意に高い CH_3Hg^+ 蓄積量および Hg^{2+} 蓄積量を示した (Fig. 4B)。

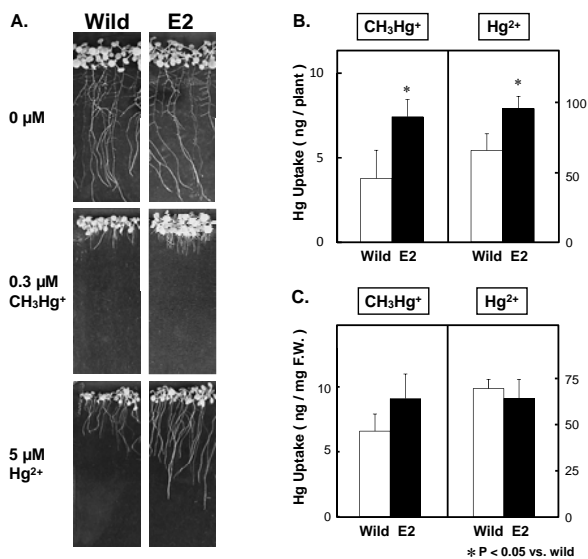


Fig.4 Susceptibility and accumulation of transgenic plants to CH_3Hg^+ and Hg^{2+} . Sterilized seeds of wild-type (Wild) and transgenic (E2) plants were germinated and grown on MS gellan gum plates in the presence or absence of 5 μ M HgCl_2 and 0.3 μ M CH_3HgCl (A). The amounts of mercury (B; ng/plant, C; ng/fresh weight) that accumulated in wild-type plants (Wild; empty bar) and *merE*-transgenic plants (black bar) were determined after culture for 2 weeks on MS gellan gum plates with various concentrations of HgCl_2 or CH_3HgCl , as described in the Materials and Methods. The data are expressed as the means \pm S.E.M. based on four determinations from three independent experiments. * $P < 0.05$ vs. the wild type.

4. 考察

微生物由来の CH_3Hg^+ および Hg^{2+} トランスポーター MerE を高発現させた植物 (E2) を作出した。E2 株は野生株と表現型がほぼ等しく、その植物体において MerE が転写、

翻訳されることが確認された (Fig.2 & Fig.3)。また、MerE 産物は植物体の小胞体および細胞膜に発現すると示唆された (Fig.1 & Fig.3)。さらに、E2 株が CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対してコントロールに比べ有意に高い耐性および蓄積性を示した (Fig.4) ことより、MerE を用いたファイトレメディエーションは、水銀化合物の回収に適した技術であると考えられた。

5. 結論

MerE トランスジェニック植物において、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} に対する耐性および総水銀蓄積量が上昇したことから、MerE を利用したファイトレメディエーションは、 CH_3Hg^+ および Hg^{2+} の浄化に効果的である可能性が示唆された。本研究により得られた知見が、より効率的な水銀化合物浄化のためのファイトレメディエーションの開発に繋がると期待される。

6. 研究発表

- 1) Kiyono M, Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Sakabe K. The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a novel, broad mercury transporter in *Escherichia coli*. *FEBS let* 583: 1127-1131 2009
- 2) Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Sato MH, Itoh T, Kiyono M. Increase methylmercury accumulation in *Arabidopsis thaliana* expressing bacterial broad-spectrum mercury transporter MerE. *AMB express* 3: 52 2013

若 手 発 表

エキソソームを介するメチル水銀排出経路

○今村伸太郎（水産総合研究センター中央水産研究所）

1. 研究の背景

ヒトや哺乳動物では高濃度のメチル水銀曝露によって脳中枢における視覚領野、感覚領野および小脳顆粒細胞を構成するグルタメートニューロンで細胞死が誘発され、感覚障害が生じることが知られている¹⁾。セレンによるメチル水銀の毒性軽減作用は Ganther *et al.* によって報告され²⁾、まぐろ肉由来のセレン化合物によるメチル水銀の解毒機構の存在が示唆された。

ゼブラフィッシュは発生学や遺伝学の動物モデルであり、環境汚染物質や化学物質に対する毒性評価に利用されている。OECD の毒性試験ガイドラインでは、魚類胚の毒性試験が提案されている³⁾。本研究では、胚のバイオアッセイ系を利用して、メチル水銀の蓄積および解毒排出機構の分子メカニズムを解析した。

2. 材料と方法

2-1. ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀投与

ゼブラフィッシュ胚は E3 メディウム (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄) で培養した。受精後 8 時間に培養水にメチル水銀システインを 5-500 ng Hg/ml の範囲で添加し、メチル水銀の曝露に対する生物影響を 24 時間から 72 時間まで観察した。

2-2. メチル水銀の生物影響の観察

グルタメートニューロンは NMDA レセプターに対する抗体 (Anti-NMDAR2B, ab65875, Abcam) を用いて免疫染色し、観察した。細胞死の検出はアクリジンオレンジ染色および TUNEL 法を用いた。

2-3. メチル水銀の検出

ゼブラフィッシュに蓄積した水銀は冷蒸気原子吸光法によって測定した。胚の無機水銀とメチル水銀の測定は、5 M HCl, 0.25M NaCl 中で、60°C で 10 分反応させ、アンモニア水で中和した後、C18 逆相カラム (Inertsil Sulfa C18, 150 × 4.6 mm: GL Sciences) で LC-ICP-MS を用いて検出した⁴⁾。

2-4. 飼育水中のエキソソームの精製および解析

メチル水銀システイン溶液 (100 µg Hg/ml) を受精後 6 時間胚の卵黄嚢に 5 nl マイクロインジェクション法によって注入し、22 時間培養後、卵膜を除去し、飼育水を回収した。超遠心分離 (100,000g × 3 時間) によりエキソソーム画分を得た。エキソソーム画分のタンパク質・酵素類・水銀含量を分析した。

3. 結果および考察

3-1. ゼブラフィッシュ胚に対するメチル水銀の生物毒性

受精後 8 時間のゼブラフィッシュ胚の培養液

にメチル水銀システイン溶液を 5 から 200 ng Hg/ml 濃度で投与した。受精後 24 時間には、100 ng Hg/ml のメチル水銀濃度では神経組織の萎縮、心臓および血管の発生異常、体節の湾曲が観察され、濃度依存的に異常個体の割合が増加した。100 ng Hg/ml 以上で脳、脊髄、骨格筋および尾部先端において激しい細胞死が生じ、脳におけるグルタメートニューロンが減少した。このように 10-100 ngHg/ml 程度のメチル水銀曝露によって初期発生や神経での形態異常が観察されることから、ゼブラフィッシュ胚のバイオアッセイ系は、ヒトの胎児影響モデルとして十分な検出感度を有した。

3-2. セレンによるメチル水銀の解毒作用の解析

マグロ類組織の主要なセレンは、イミダゾール化合物のセレノネイン (2-selenyl- $N_{\alpha},N_{\alpha},N_{\alpha}$ -trimethyl-L-histidine) であることが見出された⁵⁾。セレノネインの存在下ではメチル水銀の蓄積と毒性は著しく低下し、メチル水銀による形態異常発生および細胞死が抑制された⁶⁾。セレノネインによるメチル水銀の毒性軽減にはメチル水銀の無機化および排出経路が関わることを見出した。ゼブラフィッシュ胚にメチル水銀を投与すると、濃度依存的にメチル水銀が胚に蓄積したが、1.6 μ M セレノネイン存在下では、メチル水銀濃度はメチル水銀単独で投与した胚と比較して、37%まで低下し、無機水銀は総水銀に対して 61%まで産生された⁶⁾。これらの結果から、セレノネインは、メチル水銀を無機化するとと

もに、体外に排出する作用があることが見出された^{6,7)}。

3-3. セレノネイン特異的トランスポーター

メチル水銀の排出と無機化には organic cation/carnitine transporter 1 (OCTN1) が関与していた⁶⁾。OCTN1 はプロトン輸送型有機カチオントランスポーターであり、カルニチンやエルゴチオネインのトランスポーターとして機能し、腎臓における薬剤の排出に重要な因子である⁸⁾。OCTN1 の発現をモルフォリノノックダウン法によって抑制したゼブラフィッシュ胚や OCTN1 遺伝子を欠失したミュータントは、メチル水銀に対して感受性が高いことから、メチル水銀の解毒にはセレノネインおよび OCTN1 を介する解毒機構が関与した⁶⁾。亜セレン酸の場合も OCTN1 を介するメチル水銀の解毒が認められたことから、亜セレン酸から生合成されたセレノネインが解毒に関与すると推定されるが、亜セレン酸とメチル水銀の両方の曝露は毒性が強く、亜セレン酸は 0.1 μ M 以下の濃度範囲に限定された。

3-4. エキソソームを介するメチル水銀排出作用

エキソソームは、エンドソームから形成される多胞体が細胞膜と融合することにより細胞外に開口分泌される分泌顆粒である。エキソソームによって、メチル水銀の細胞外への排出に作用する解毒機構を見いだした。エキソソーム画分には、エキソソームのマーカータンパク質である CD63 が含まれ (図 1)、リソソーム酵素のカ

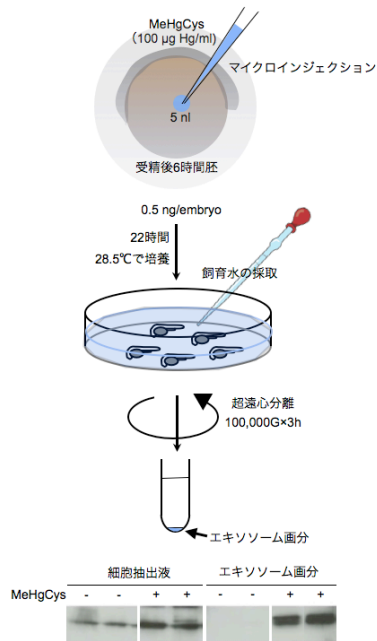


図1 飼育水中に放出されたエクソソームの精製と CD63 タンパク質の検出

テプシン L や膜結合型セリンプロテアーゼがメチル水銀とともに検出された。このエクソソームはリソゾームを介して生じる分泌作用によるものであった。また、メチル水銀の減少と無機化は V 型 ATP アーゼ阻害剤バフィロマイシン A1 (0.1 µM) によるリソソーム形成阻害により抑制され、胚内にメチル水銀が過剰に蓄積した。分子シャペロンの HSC70 や CDC48 は、細胞質の解糖系酵素群など基質となるタンパク質に結合して、リソゾームに輸送するシャペロン介在性オートファジーを促進し、エクソソームの形成過程に関与すると考えられる。

従来、エクソソームはスモールRNAを含有し、細胞間シグナル伝達を担う輸送体としての役割が推定されてきたが、本研究によって、エクソソームはメチル水銀の解毒に利用される分泌排出経路を担うことが明らかにされた。エクソソ

ームを構成するタンパク質、脂質、RNA、金属等を同定することによって、メチル水銀および他の有害化学物質の分泌排出におけるエクソソームの役割と発現の分子機序を解明することが可能であると考えられる。

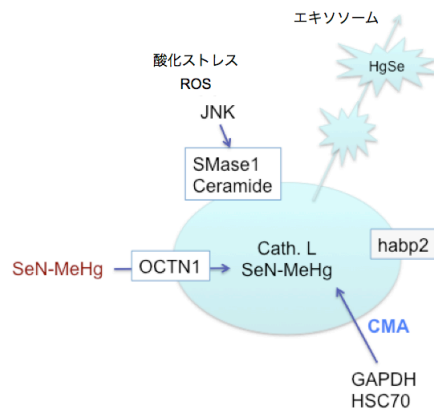


図2 推定されるエクソソームを介するメチル水銀排出経路
メチル水銀曝露によって生じた酸化ストレス (ROS) がストレス応答性 MAP キナーゼ (JNK) を活性化し、スフィンゴミエリナーゼによってセラミドが合成され、エンドソームが形成される。エンドソームの OCTN1 トランスポーターを介してセレンネイン-メチル水銀複合体 (SeN-MeHg) がエンドソームに取り込まれ、リソゾームを介して生じる分泌作用およびシャペロン介在性オートファジー (CMA) によってエクソソームが形成される。メチル水銀はセレン化水銀に変換され、エクソソームを通して細胞外に排出される。

引用文献

- 1) Miyamoto K, Nakanshi H, Moriguchi S, Fukuyama N, Eto K, Wakamiya J, Murao K, Arimura K, Osame M: Involvement of enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors in vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity. *Brain Res.* 2001; 901: 252-258.
- 2) Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 1972; 175: 1122-1124.
- 3) OECD Guidelines for the testing of chemicals, fish embryo acute toxicity (FET) test, adopted. 2013.
- 4) Reyes LH, Rahman GMM, Kingston HMS. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues. *Anal. Chim. Acta.* 2009; 631: 121-128.
- 5) Yamashita Y, Yamashita M. Identification of a novel selenium-containing compound, selenoneine, as the predominant chemical form of organic selenium in the blood of bluefin tuna. *J. Biol. Chem.* 2010; 285: 18134-18138.
- 6) Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani K, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto T, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. Selenoneine, a novel selenium-containing compound, mediates detoxification mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish embryo. *Marine Biotech.* 2013; 15: 559-570.
- 7) 山下倫明, 今村伸太郎, 山下由美子. 化学と生物 2012; 50: 807-817.
- 8) Gründemann D, Harlfinger S, Golz S, Geerts A, Lazar A, Berkels R, Jung N, Rubbert A, Schömig E. Discovery of the ergothioneine transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005; 102: 5256-5261.

メチル水銀とそのグルタチオン抱合体による Keap1/Nrf2 経路の活性化

○新開泰弘、吉田映子（筑波大学）、外山喬士（東京理科大学）、熊谷嘉人（筑波大学）

1. 背景および目的

メチル水銀（MeHg）は生物濃縮により大型魚類への蓄積を経て人体に吸収される環境中親電子物質である。MeHgは細胞内求核低分子の1つであるグルタチオン（GSH）に抱合された後、多剤耐性関連タンパク質（MRP）を介して細胞外へ排泄・解毒される。一方、MeHgは生体内でタンパク質のシステイン残基のチオール基と特異的に共有結合（S-水銀化）し、これにより毒性発現やシグナル伝達の活性化を惹起する。

ところで、親電子物質に対する感知・応答システムとして Keap1/Nrf2 系が重要な役割を演じていることが知られている。転写因子 Nrf2 は定常時は Keap1 と結合することによりユビキチン/プロテオソーム系により素早い分解を受けているが、Keap1 の反応性システイン残基が親電子物質により修飾を受けることで相互作用が低下し、分解を免れた Nrf2 が核に移行して抗酸化剤応答配列（ARE）に結合し、下流の解毒代謝遺伝子群を誘導する。

これまで、グルタチオン抱合を受けた MeHg（MeHg-SG）は親電子を消失していることから解毒代謝物として理解されてきた。しかし MeHg-SG の Hg-S 結合は可逆的であるため、MeHg-SG はタンパク質のチオール基と交換反応（S-トランス水銀化）を起こすことが予想される。すなわち、MeHg およびその代謝物である MeHg-SG はいずれも Keap1 のシステイン残基と共有結合を形成し、Nrf2 の活性化を引き起こすことが予想される。本研究では、MeHg による S-水銀化および MeHg-SG による S-トランス水銀化を介した Keap1/Nrf2 経路の活性化とその防御的役割を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

化合物: MeHg-SG および MeHg-GSH モノエステル体（MeHg-SGEt）を合成し、 $^1\text{H-NMR}$ および LC-MS^E にて構造決定した。細胞: ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞を用いた。タンパク質の発現: ウェスタンブロット法を用いた。遺伝子発現: リアルタイム PCR 法にて検出した。ARE の転写活性化: ルシフェラーゼ法を用いた。細胞内 S-(トランス)水銀化の検出: ビオチンマレイミド沈降法¹⁾を用いた。S-(トランス)水銀化の同定: マウス Keap1 精製タンパク質を用いて、ビオチンマレイミド標識法¹⁾および LC-MS^E にて解析した。

3. 結果および考察

3-1. MeHg による Keap1/Nrf2 経路の活性化

MeHg の曝露により細胞内 Keap1 の S-水銀化が観察され、それに伴って Nrf2 の活性化が生じた。同条件下において、MeHg は ARE の転写活性化を引き起こし、下流のヘムオキシゲナーゼ-1（HO-1）およびグルタミルシステインリガーゼ（GCL）の mRNA およびタンパク質の発現を誘導した。リコンビナントマウス Keap1 を用いて MeHg による Keap1 の修飾部位を解析したところ、Cys151 が同定された²⁾。このことから、MeHg は Keap1 の反応性システイン残基である Cys151 の S-水銀化を介して Nrf2 を活性化していることが示唆された。

MeHg に対する Nrf2 の防御的役割を検討するために Nrf2 をノックダウンしたところ、MeHg の細胞毒性は有意に増強した³⁾。更に、Nrf2 欠損マウスは野生型マウスと比較して、MeHg 曝露条件下において高い水銀蓄積性および高感受性を示した⁴⁾。

3-2. MeHg-SG による Keap1/Nrf2 経路の活性化

MeHg-SG を容易に細胞内へ取り込ませるために MeHg-SGEt を合成した。MeHg-SGEt に SH-SY5Y 細胞を曝露すると、本化合物は細胞内で容易に MeHg-SG に水解された。生成した MeHg-SG は親電子性を消失しているにも関わらず濃度依存的な細胞毒性を生じ、細胞溶解液中の複数のタンパク質を S-水銀化した。また、MeHg-SGEt による細胞毒性は MRP 阻害剤である MK-571 の前処理により有意に増強した。このことは、MeHg-SG の細胞内滞留に伴い、S-水銀化タンパク質の増加が細胞毒性の上昇に関与していることを示唆している。細胞内 Keap1 に対する MeHg-SG の S-トランス水銀化能を検討したところ、MeHg-SGEt の曝露により細胞内 Keap1 の S-水銀化が検出され、それに伴う Nrf2/ARE 経路の活性化が観察された。同条件下において、MeHg-SGEt は ARE 下流の HO-1 および GCL の mRNA およびタンパク質の発現を誘導した。興味深いことに、MeHg-SG は MeHg と異なり、リコンビナントマウス Keap1 の Cys319 を S-トランス水銀化反応を介して S-水銀化していた。このことから、MeHg およびその GSH 抱合体による Nrf2 の活性化には、Keap1 の異なるシステイン残基の修飾が関与することが示唆された。

以上より、MeHg-SG は S-トランス水銀化反応を介して、システイン残基を有する細胞内タンパク質を結果的に S-水銀化することが証明された。言い換えれば、MeHg-SG は MRP で速やかに細胞外に排泄されることが解毒に必須であることを示唆している。

4. 結論

細胞内に取り込まれた MeHg は Keap1 の Cys151 を S-水銀化し、毒性防御に重要な役割を果たす転写因子 Nrf2 を活性化する一方で、

その GSH 抱合体である MeHg-SG も S-トランス水銀化反応を介して Cys319 を S-水銀化し、Nrf2 を活性化させる働きを持つことが明らかとなった。すなわち、Keap1/Nrf2 システムは MeHg だけでなく、その GSH 抱合体に対しても感知・応答能を有し、MeHg の毒性防御に働いていることが示された。

引用文献

- 1) Toyama T. et al., J Toxicol Sci, 38, 477-484, 2013.
- 2) Kumagai Y. et al., Oxid Med Cell Longev, 848279, 2013.
- 3) Toyama T. et al., Biochem Biophys Res Commun, 363, 645-650, 2007.
- 4) Toyama T. et al., Environ Health Perspect, 119, 1117-1122, 2011.

メチル水銀による脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の PGI₂/PGE₂ 合成の誘導

栗田 賢 (東京理大)、山本 千夏 (東邦大)、鍛冶 利幸 (東京理大)

1. 目的

メチル水銀中毒である水俣病はハンター・ラッセル症候群と呼ばれる中枢神経障害を特徴とするが、その病理には不明な点が多く残っている。特に、大脳障害が深い脳溝の周辺に限局して発生していることが組織学的に最も重要な問題の1つとして挙げられる。

その原因について、メチル水銀による脳浮腫形成と、それに伴う循環障害の発生が原因であるとする「浮腫仮説」が提唱されている¹⁾。脳浮腫には脳微小血管組織の非特異的な傷害による細胞毒性浮腫と血管透過性の亢進による血管原性浮腫とが存在する²⁾。

シクロオキシゲナーゼ (COX) はアラキドン酸からのプロスタグランジン (PG) 合成に関わる酵素であり、恒常的に発現している COX-1 とサイトカインなどにより発現が誘導され、炎症反応に関与する COX-2 の2つのアイソザイムがある³⁾。特に、COX-2 により合成されたプロスタグランジン I₂ (PGI₂) およびプロスタグランジン E₂ (PGE₂) は血管透過性を亢進させ、炎症性浮腫を引き起こす⁴⁾ことから、メチル水銀による血管原性浮腫形成に深く関わっている可能性がある。

本研究の目的は、脳微小血管内皮細胞および周皮細胞のプロスタグランジンの合成に対するメチル水銀の作用を検討し、メチル水銀による血管原性浮腫の分子基盤解明に貢献することである。

2. 実験方法

培養ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮

細胞をメチル水銀で処理し、PGI₂ (6-keto PGF_{1α}として) および PGE₂ の放出量を ELISA 法により測定した。また、COX-2 タンパク質発現をウエスタンブロット法により、mRNA 発現を Real-Time RT-PCR 法により調べた。内皮細胞においては、メチル水銀による ERK1/2, p38 MAPK, JNK の活性化をウエスタンブロット法で調べた。

3. 結果

内皮細胞においてはメチル水銀による PGI₂ の合成促進が確認された。PGE₂ は検出されなかった。一方、周皮細胞では、PGI₂ と PGE₂ の両方が検出され、ともにメチル水銀による合成促進が認められた。

このとき、内皮細胞および周皮細胞においてメチル水銀による COX-2 の発現増加が、タンパク質および mRNA レベルの両方において確認された。COX-2 の発現誘導機構として MAPK 経路が知られているため、メチル水銀による MAPK タンパク質の活性化を確認した。その結果、内皮細胞および周皮細胞ではメチル水銀による ERK1/2 および JNK の活性化は認められず、p38 MAPK のリン酸化のみが確認された。そこで、内皮細胞を p38 MAPK の阻害剤である SB203580 で前処理したところ、メチル水銀による COX-2 タンパク質の発現誘導は阻害された。

p38 MAPK の活性化には、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) が関与しているとされているので、メチル水銀による EGFR の活性化を内皮細胞において検討したところ、メチル水銀による EGFR のリン酸化が認められた。このとき、内皮細胞を

EGFR の阻害剤 SB153035 で前処理すると、メチル水銀による p38 MAPK のリン酸化が抑制された。

一方、PGI₂ および PGE₂ はアデニル酸シクラーゼを活性化し、cAMP の産生を促進することが知られている。そこで、内皮細胞にアデニル酸シクラーゼの阻害剤である SQ22536 を前処理したところ、メチル水銀による COX-2 タンパク質の発現誘導が抑制された。

4. 考察

これらの結果から、メチル水銀は内皮細胞および周皮細胞の EGFR のリン酸化を通じて p38 MAPK を活性化し、活性化した p38 MAPK は COX-2 発現の誘導を通じて内皮細胞では PGI₂ の合成を、周皮細胞では PGI₂ および PGE₂ の合成を促進することが示唆される。EGFR の活性は Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B) によって負に制御されていることが報告されている。PTP1B は多環芳香族炭化水素キノン体 1,2-ナフトキノンなどの求電子性をもつ化学物質によって阻害されることが知られている⁵⁾。したがって、メチル水銀は PTP1B を標的としてその活性を阻害し、結果として EGFR を活性化すると考えられる。

PGI₂ および PGE₂ は血管透過性を亢進させる作用を有することが知られている。メチル水銀が脳微小血管を構成する内皮細胞および周皮細胞において PGI₂ および PGE₂ の合成を誘導することは、メチル水銀が脳微小血管におけるプロスタグランジン合成調節システムに対する毒性発現によって血管透過性を亢進させることを示唆するものである。血管透過性の亢進は、炎症性浮腫の重要な要因となり得ることから、メチル水銀による脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の PGI₂/PGE₂ 合成の誘導は、メチル水

銀中毒によって発生する脳浮腫の分子基盤を構成するメカニズムの 1 つであると思われる。

PGI₂ および PGE₂ は cAMP 経路を活性化するとされている⁶⁾。cAMP 経路は COX-2 の発現を誘導するため、メチル水銀による PGI₂/PGE₂ 合成の誘導はポジティブフィードバックループによって増幅されることが示唆される。アデニル酸シクラーゼを阻害したときにメチル水銀による COX-2 タンパク質の発現誘導が抑制された結果は、このことを支持している。

以上より、メチル水銀が脳微小血管内皮細胞および周皮細胞において引き起こす COX-2 の誘導は、PGI₂ および PGE₂ の合成促進による血管原性浮腫を通じて大脳障害の分子基盤に関与することが示唆される。

引用文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozeaki T, Tokunaga H, Kaneko Y. (2001) Methylmercury poisoning in common marmosets - a study of selective vulnerability within the cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 29, 565-573.
- 2) Klatzo I. (1967) Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 26, 1-14.
- 3) Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P (1994) Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase-2 in inflammation and pain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91, 12013-12017
- 4) Williams TJ. (1979) Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. *Br J Pharmacol.*, 65, 517-24.
- 5) Iwamoto N, Sumi D, Ishii T, Uchida K, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. (2007) Chemical knockdown of protein-tyrosine phosphatase 1B by 1,2-naphthoquinone through covalent modification causes persistent transactivation of epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem.*, 282, 33396-33404.
- 6) Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. (1990) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.*, 79, 1193-226.

メチル水銀による脳特異的な CCL4 ケモカイン誘導

○高橋 勉¹、金 暎錫¹、李 辰竜^{1,2}、黄 基旭¹、永沼 章¹ (¹東北大院・薬、²愛知学院大・薬)

1. 背景および目的

メチル水銀は中枢神経系に対して選択的な毒性を示すが、その毒性発現機構は不明な点が多い。メチル水銀による中枢神経障害機構に関わる細胞内因子を明らかにするために、本研究では、メチル水銀を投与したマウスの小脳における遺伝子の発現変動を解析した。

2. 方法

2-1. メチル水銀を投与したマウスにおける遺伝子発現変動

8週齢雄性の C57BL/6 マウスに 10 mg/kg/day のメチル水銀を1日1回ずつ7日間連続投与し、最終投与の24時間後に各組織（小脳、大脳、腎臓および肝臓）を摘出し、各遺伝子の発現レベルを DNA マイクロアレイ法および定量 PCR 法によって解析した。

3. 結果および考察

メチル水銀を投与したマウスの小脳における遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ法によって解析したところ、メチル水銀によって発現レベルが上昇する遺伝子が 21 種同定された¹⁾。メチル水銀によって特に顕著に発現上昇した遺伝子の中にはケモカインをコードする遺伝子（CCL2, 4, 7 など）が複数含まれていた。ケモカインは主に免疫細胞から分泌される白血球走化性サイトカインの一種で炎症の形成に関与している。現在までにマウスのケモカインは 37 種同定されており、その構造上の特徴から 4 つのサブファミリー（C、CC、CXC および CX3C）に分類される。近年、ケモカインが免疫細胞のみならず、脳、腎臓、肝臓など様々な臓器でも分

泌されることが明らかにされている。メチル水銀によって脳特異的に発現誘導されるケモカイン分子種を明らかにするため、メチル水銀投与による各組織中での全 37 種のケモカイン分子種の遺伝子発現変動を検討したところ、CCL3 および CCL4 がメチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されることが明らかとなった²⁻³⁾。本知見は、メチル水銀によって脳特異的に発現誘導される蛋白質が同定された最初の例である。

最近、ケモカイン分子種の 1 つである CCL2 を培地中に添加するとラット初代培養小脳顆粒細胞に対するメチル水銀の毒性が軽減されることが報告された。しかし、同様の検討をマウス初代培養小脳顆粒細胞を用いて行ったところ、リコンビナント CCL4 または CCL4 受容体 (CCR5) のアンタゴニストを培地中に添加しても同細胞のメチル水銀感受性はほとんど影響を受けなかった。なお、本研究においては CCL2 の添加によるメチル水銀毒性軽減作用も観察されなかったことから、ケモカインの作用に動物種差がある可能性も考えられる。また、メチル水銀による CCL4 の発現誘導は、マウス神経前駆細胞 (C17.2 細胞) でも認められたが、経時的に検討したところ、この CCL4 mRNA レベルの上昇はメチル水銀による細胞死が引き起こされるより早い時点で認められた。したがって、CCL4 はメチル水銀曝露に応答してメチル水銀毒性が出現するよりも早期に発現誘導されると考えられる。一方、C17.2 細胞を用いて CCL4 のプロモーター領域をレポーターアッセイにより解析したところ、転写開始点から上流 50 bp までの領域がメチル水銀による CCL4 の発現誘導に必要であることが判明した。このプロモーター領域中

に認識配列が存在する転写因子 10 種についてメチル水銀による CCL4 の発現誘導機構への関与を調べたところ、SRF (Serum Response Factor) または FOXA1 (Forkhead box protein A1) のノックダウンによってメチル水銀による CCL4 発現レベルの上昇程度が減弱することが明らかとなった。また、両転写因子のノックダウンはメチル水銀による CCL3 発現誘導も抑制した。したがって、メチル水銀は SRF および FOXA1 の活性化を介して CCL3 および CCL4 の発現を誘導している可能性が考えられる。今後、メチル水銀による脳組織特異的な CCL3 および CCL4 の発現誘導機構における SRF および FOXA1 の役割について明らかにしていきたい。

引用文献

- 1) Hwang, G.W., Lee, J.Y., Ryoke, K., Matsuyama, F., Kim, J.M., Takahashi, T., Naganuma, A., Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury J. Toxicol. Sci., 36, 528-583, (2011)
- 2) Lee J.Y., Hwang G.W., Kim M.S., Takahashi T., and Naganuma A. Methylmercury induces brain-specific expression of CCL4 chemokine in mice. J. Toxicol. Sci., 37, 1279-1282 (2012).
- 3) Kim M.S., Takahashi T., Lee J.Y., Hwang G.W., and Naganuma A. Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury triggers brain-specific induction of expression of CCL3 and CCL4. J. Toxicol. Sci., 38, 925-929 (2013).

ピルビン酸が示すメチル水銀毒性増強作用

○李 辰竜^{1,2}、黄 基旭²、佐藤雅彦¹、永沼 章²
 (¹愛知学院大・薬、²東北大院・薬)

1. 背景

これまで我々は、メチル水銀毒性に対する防御機構としてユビキチン・プロテアソーム (UP) システムが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。UP システムは真核生物に広く保存されている選択的な蛋白質分解経路で、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン転移酵素 (E2) およびユビキチンリガーゼ (E3) という三つの酵素の連続した働きによって細胞内で蛋白質にユビキチンを連結する。そして、ここでユビキチン化された蛋白質は、最終的にプロテアソームによって認識されて分解される。酵母を用いたこれまでの検討により、細胞内にはメチル水銀毒性の増強に関与する蛋白質が存在し、UP システムによってその蛋白質の分解が促進されることで、メチル水銀毒性が軽減される可能性が示唆されている¹⁾。

ユビキチン化反応に関わる因子の中には、UP システムで分解される基質蛋白質と直接結合する F-box 蛋白質が存在し、E3 である SCF (Skp1/Cdc53/F-box protein) 複合体の一員として基質蛋白質の認識に関与している。酵母のメチル水銀毒性に影響を与える F-box 蛋白質を検索したところ、17 種ある F-box 蛋白質の中で Hrt3 および Ylr224w が高発現によって酵母に強いメチル水銀耐性を与えることが判明した²⁾。したがって、両 F-box 蛋白質によって認識される基質蛋白質の中に、メチル水銀毒性の増強に関与する蛋白質が含まれている可能性が考えられる。

2. 目的

本研究では、Hrt3 および Ylr224w によって認識される基質蛋白質のうち、メチル水銀

毒性の増強に関与する蛋白質を同定し、それら蛋白質のメチル水銀毒性発現における役割について検討した。

3. 結果

3-1. メチル水銀毒性発現に関与する Hrt3 または Ylr224w の標的蛋白質の同定

Hrt3 または Ylr224w が認識する基質蛋白質を yeast two-hybrid 法で検索したところ、Hrt3 は Dld3 および Grs1、また Ylr224w は Eno2 を基質として認識することが明らかとなった。これら三種の蛋白質をそれぞれ高発現させた酵母は全てがメチル水銀に対して高い感受性を示し、これら蛋白質が共にメチル水銀毒性の増強に関与することが判明した。すなわち、Dld3、Grs1 および Eno2 などのメチル水銀毒性増強蛋白質の分解が UP システムの亢進によって促進され、その結果として酵母のメチル水銀毒性が軽減されると考えられる。

3-2. Dld3 および Eno2 高発現によるメチル水銀毒性増強機構の解析

上記の Dld3 および Eno2 は共に解糖系の産物であるピルビン酸の産生に関与する酵素である。また、Eno2 の下流因子である Cdc19 の高発現も酵母にメチル水銀高感受性を与えた。これらのことは、Dld3、Eno2 および Cdc19 の高発現によるメチル水銀毒性増強作用に細胞内ピルビン酸レベルの上昇が関与している可能性を示唆している。そこで、培地中へのピルビン酸添加が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、ピルビン酸の添加濃度に依存してメチル水銀毒性が増強された。これは、ピルビン酸がメチル水銀毒性の増強に関与していることを示唆する初めての

知見である。

3-3. ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用の解析

酵母の細胞質で産生されたピルビン酸はミトコンドリアの内幕に存在するトランスポーター (Yi1006w) を介してミトコンドリアマトリックスに取り込まれ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼによってアセチル CoA に変換される。その後、TCA サイクル (tricarboxylic acid cycle) に入って ATP 産生に関与する。そこで、Yi1006w の欠損が酵母のメチル水銀感受性に与える影響を検討したところ、Yi1006w 欠損酵母は野生型酵母に比べて強いメチル水銀耐性を示し、野生型酵母で認められるピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用は観察されなかった。また、TCA サイクル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、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ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、ピルビン酸添加によるメチル水銀毒性増強作用が野生型酵母よりも顕著に認められた。これらのことから、ミトコンドリア中に取り込まれたピルビン酸は、アセチル CoA に代謝されることなく、メチル水銀の毒性増強に関わっていると考えられる。

ミトコンドリアの電子伝達系は ATP 産生に重要な役割を果たすと共に、活性酸素種の産生やサイトクロム *c* の放出によるアポトーシス誘導にも関わっている。そこで、電子伝達系に関わる因子をコードする遺伝子をそれぞれ欠損させた酵母についてメチル水銀感受性を検討したところ、電子伝達系複合体 III の構成因子である Rip1 を欠損させた酵母のみが野生型酵母に比べてメチル水銀耐性を示した³⁾。また、Rip1・Yi1006w 二重欠損酵母のメチル水銀感受性は相加的ではなく Rip1 または

Yi1006w の単独欠損酵母とほぼ同程度であった。さらに、Rip1 欠損酵母では Yi1006w 欠損酵母と同様にピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用がほとんど認められなかった。このことから、Rip1 と Yi1006w は同一の経路でピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用に関与していると考えられる。次に、メチル水銀が活性酸素 (ROS) 産生に与える影響を検討したところ、野生酵母ではメチル水銀濃度依存的に ROS 産生量が増加したのに対し、両欠損酵母ではメチル水銀による ROS の産生量の増加がほとんど認められなかった。以上の結果から、メチル水銀による ROS 産生量の増加はミトコンドリア内に過剰に流入されたピルビン酸によって引き起こされている可能性が考えられる。

3-4. 培養細胞におけるミトコンドリアを介したピルビン酸のメチル水銀毒性増強作用

ヒトの神経芽腫細胞 (IMR-32 細胞) においても顕著なピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用が認められた。なお、メチル水銀は IMR-32 細胞のミトコンドリアへのピルビン酸の取り込み速度を有意に促進させた。この結果は、酵母の場合と同様に培養細胞においても、メチル水銀がミトコンドリアへのピルビン酸取り込みを促進させ、このミトコンドリア内のピルビン酸レベルの上昇がメチル水銀毒性増強に関与している可能性を示唆している。

酵母において、ピルビン酸によるメチル水銀毒性増強作用に電子伝達系の関与が示唆されたため、IMR-32 細胞の電子伝達系複合体 I または電子伝達系複合体 III の活性抑制が同細胞におけるピルビン酸のメチル水銀毒性増強作用に与える影響を検討した。両複合体の活性中心蛋白質をコードする遺伝子を siRNA

で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軽減された。

ミトコンドリアはまた、膜電位を維持してその機能を発揮するが、メチル水銀はミトコンドリア膜電位を低下させ、この作用をピルビン酸が増強させることも判明した。なお、ミトコンドリアの異常はカスパーゼ3の活性化を誘導してアポトーシスを引き起こすことが知られているが、メチル水銀はカスパーゼ3を活性化させ、ピルビン酸によりその活性化作用が更に増強された。以上のことから、ミトコンドリア内に過剰蓄積されたピルビン酸は、メチル水銀がミトコンドリア機能に与える影響を促進することによってメチル水銀毒性を増強させると考えられる。

4. まとめ

遺伝子の多くがヒトなどのほ乳類と機能的に共通し、分子生物学的に取り扱いが容易な出芽酵母を用いた研究により、ピルビン酸合成に関わる数種の酵素がメチル水銀毒性の増強に関与していることが明らかとなった。また、酵母およびヒト由来神経芽腫細胞において培地中へのピルビン酸の添加によってメチル水銀毒性が著しく増強されることも判明した。ピルビン酸はミトコンドリア内に取り込まれ、その代謝経路を介してATP産生に関与しているが、メチル水銀はミトコンドリア内へのピルビン酸取り込みを促進させ、その結果生じるミトコンドリア内ピルビン酸の過剰蓄積が細胞障害を促進させる可能性が考えられる。さらに、ヒトの神経芽腫細胞において、ピルビン酸がメチル水銀のミトコンドリア機能障害作用を促進させることも明らかとなった。

これまでに、エネルギー代謝の中間産物であるピルビン酸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。

引用文献

- 1)Hwang, G.W., Furuchi, T. and Naganuma, A. A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury. *FASEB J.*, 16, 709-711, 2002.
- 2)Hwang, G.W., Ishida, Y. and Naganuma, A. Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 580, 6813-6818, 2006.
- 3)Lee, J.Y., Hwang, G.W. and Naganuma, A. Rip1 enhances methylmercury toxicity through production of reactive oxygen species (ROS) in budding yeast. *J Toxicol Sci.*, 34, 715-717, 2009.

メチル水銀の視覚系組織への影響

○今田敏博、中村滋、坪田一男（慶應大）、藤村成剛（国立水俣研）

1. 背景

高濃度のメチル水銀摂取により、顕著な中枢毒性が現れるが¹⁾、視覚系組織への影響に関しては知見に乏しい。水銀摂取による視覚機能変化を類推するという観点からもその影響を検討する必要がある。

2. 目的

高濃度水銀暴露による視覚系組織への影響を病理組織学的に検討した。

3. 方法

Wister ラット（♂、6 週齢）を用いた。屠殺 1-4 週前よりメチル水銀含有水（20ppm）の飲水投与を開始し、10 週齢時に組織を採取した。溶媒飲水投与ラットを対照群とした²⁾。

各臓器に蓄積した水銀量は加熱気化金アマルガム法にて測定し、組織内局在は水銀染色により、光顕的にも確認した。メチル水銀による病理学的変化は、飲水投与（3 週間）群の視覚系組織を用い、HE 染色により比較した。涙腺については、透過型電子顕微鏡（TEM）を用い、超微形態学的観察を行った。

水銀輸送担体³⁾の遺伝子発現は、in situ hybridization 法、リアルタイム PCR 法で解析し、涙腺、腎臓、肝臓、唾液腺を比較検討した。

4. 結果

4.1 水銀蓄積量

腎臓・肝臓・心筋への顕著な蓄積が認められた。視覚系組織の中では、涙腺、水晶体に多量の蓄積が認められ、その蓄積量は肝臓と同程度だった。他の視覚系組織（角膜、虹彩、網膜）、および脳組織では、蓄

積が少なかった。

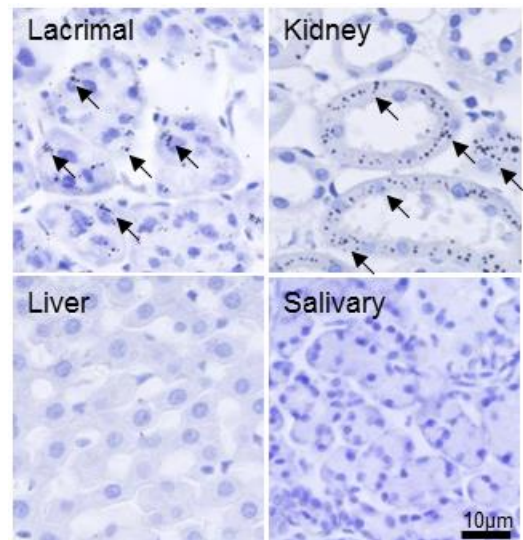
表 1. 水銀蓄積量

	Control	1w	2w	3w	4w
Whole blood	0.5>	120.21 ± 15.25	158 ± 20.01	200.86 ± 37.92	228.34 ± 28.7
Plasma	0.01>	1.12 ± 0.14	1.37 ± 0.17	1.64 ± 0.31	1.63 ± 0.32
Liver	0.2>	24.5 ± 2.96	33.14 ± 4.46	22.99 ± 27.62	68.23 ± 26.01
Kidney	0.2>	134.82 ± 14.39	138.27 ± 23.37	122.12 ± 19.02	100.96 ± 7.24
Heart muscle	0.2>	18.77 ± 1.98	28.46 ± 1.41	33.11 ± 5.47	78.39 ± 41.65
Cerebral cortex					
Frontal	0.2>	5.33 ± 0.69	9.73 ± 1.91	11.84 ± 3.53	18.77 ± 4.43
Parietal	0.2>	5.32 ± 0.21	8.85 ± 2.19	15.03 ± 3.21	16.83 ± 6.07
Occipital	0.2>	5.29 ± 0.56	8.31 ± 1.56	14.54 ± 3.52	17.87 ± 5.25
Hippocampus	0.2>	5.18 ± 0.66	8.91 ± 1.65	15.7 ± 2.69	17.68 ± 5.07
Striatum	0.2>	5.64 ± 0.75	10.16 ± 1.81	17.02 ± 3.08	21.25 ± 7.95
Cerebellum	0.2>	6.27 ± 0.44	10.41 ± 1.54	13.46 ± 3.35	19.77 ± 5.19
Eye					
Cornea	0.2>	2.7 ± 0.7	5.18 ± 1.21	6.01 ± 1.7	9.1 ± 0.65
Iris	0.2>	4.44 ± 2.05	5.34 ± 1.36	7.01 ± 2.31	11.61 ± 3.13
Retina	0.2>	4.42 ± 2.74	6.68 ± 2.74	8.14 ± 3.34	8.6 ± 2.7
Crystalline lens	0.2>	6.88 ± 2.55	19.78 ± 4.05	34.92 ± 11.85	53.56 ± 9.74
Lacrimal gland	0.2>	27.18 ± 4.46	36.51 ± 5.43	41.26 ± 9.01	52.11 ± 4.82
Salivary gland	0.2>	10.43 ± 3.23	14.14 ± 2.88	16.21 ± 3.96	20.05 ± 3.54

Mean ± SE, n=19-21.

4.2 水銀染色

涙腺の腺房細胞、腎臓の近位尿細管において、水銀の局在が確認されたが、肝臓、唾液腺では陽性領域はなかった。

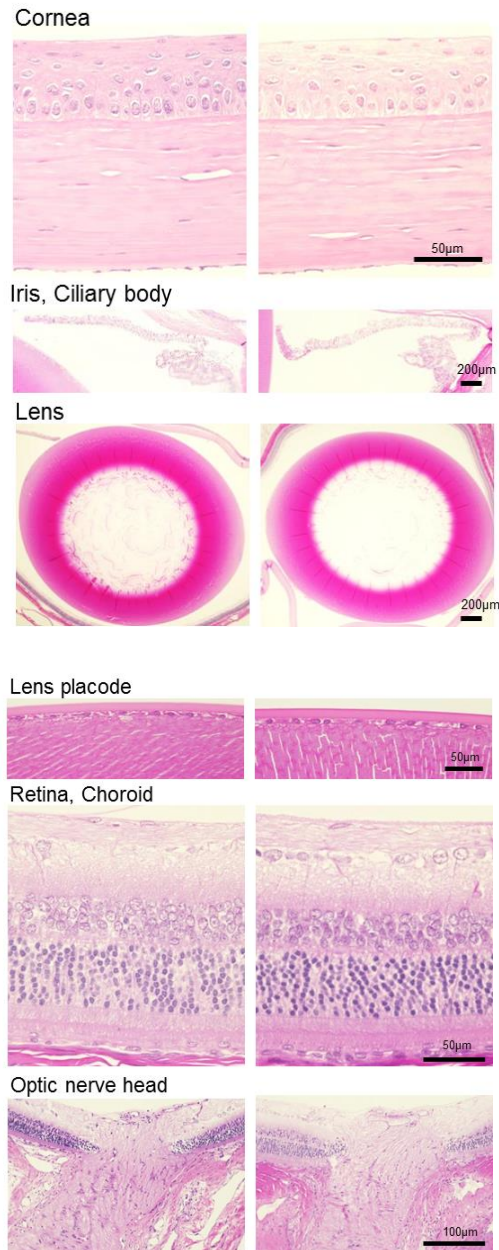


メチル水銀飲水投与 3 週後の組織

図 2. 水銀染色

4.3 視覚系組織の病理組織学的評価

眼球組織（角膜、虹彩、水晶体、網膜、視神経乳頭）では、メチル水銀投与による変化は認められなかった。



Control(左)、MeHg(右)

図 1. メチル水銀の眼球組織への影響

涙腺においては、対照群と比較し、導管周囲の線維化、腺房細胞の委縮が顕著だった。

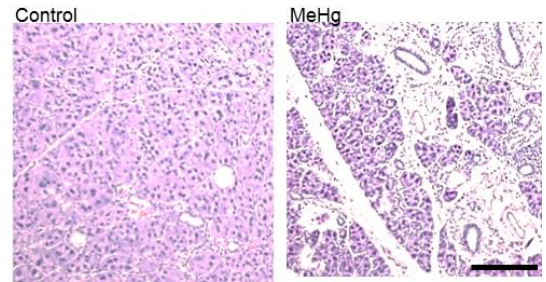
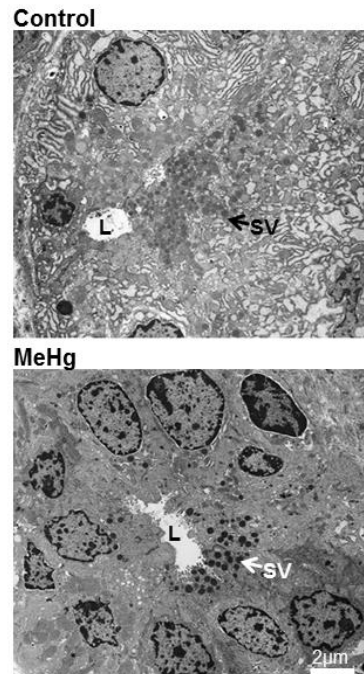


図 2. メチル水銀による涙腺の病理変化

TEM 観察では、対照群と比較し、メチル水銀投与群では、粗面小胞体の減少、核質の黒色領域の増加が顕著であり、分泌顆粒数も少なかった。



腺腔(L)、分泌顆粒(SV)

図 3. 涙腺の TEM 像

4.4 水銀輸送担体の遺伝子発現解析

中性アミノ酸トランスポーター（LAT1, 2、ATB0+、ASCT1, 2）の発現量は、涙腺と比較し、腎臓、肝臓、唾液腺で有意に低値だった。OAT1、MRP2 に関しては、涙腺と比較し、腎臓、肝臓でそれぞれ有意に高発現していた（データ示さず）。

5. 結論

視覚系組織の中で、涙腺は、最もメチル水銀の蓄積量が多く機能低下を示す病理学的変化も顕著であった。涙腺への水銀蓄積、病理変化は、腎臓・肝臓とは異なる涙腺特有の水銀輸送機構によるものであることが推察された。

6. 引用文献

- 1) Eto K et al., Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases--the pathologic point of view. *Toxicol Pathol.* 1999, 27, 664-671.
- 2) Fujimura M et al., Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2011, 250, 1-9.
- 3) Zalups RK., Molecular interactions with mercury in the kidney. *Pharmacol Rev.* 2000, 52, 113-143.

水銀耐性菌のメチル水銀トランスポーターに関する研究

○曾根有香、清野正子（北里大学薬学部）

1. 研究目的

自然界には種々の生物にとって強い毒性を示す水銀化合物に対して耐性を示す細菌が存在する。その細菌が示す水銀耐性は、plasmid あるいは transposon 上に存在する機能の異なる複数の水銀耐性遺伝子により構成される水銀耐性オペロン (*mer* operon) により支配される。*Shigella flexneri* 由来の NR1 (R100) の transposon Tn21 上に存在する *mer* operon は、*merR*-*o/p*-*merT*-*merP*-*merC*-*merA*-*merD*-*merE* から構成される (Fig. 1)。この中で、*merD* 遺伝子の下流に位置する *merE* 遺伝子の菌体内における発現及び機能については未解明のまま残されていた。

本研究では *merE* 遺伝子産物の同定、MerE の菌体内における局在及び機能解析を目的とした。

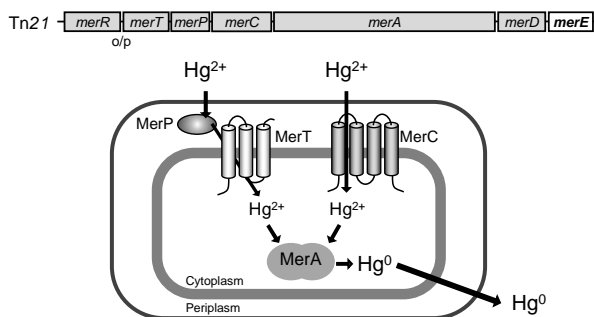


Fig. 1 Tn21 の *mer* operon および細菌の水銀耐性機構
merR, *merD*: 水銀応答調節遺伝子、*merT*, *merC*: 水銀輸送遺伝子、*merP*: 水銀結合遺伝子、*merA*: 水銀還元酵素(レダクターゼ) 遺伝子

2. 研究方法

2-1. Tn21 を持つ菌における *merE* 遺伝子産物の同定

大腸菌より MerE 産物を精製し、これを常法に従いウサギに免疫し、抗 MerE ポリクローナル抗体を作製した。次に、この抗 MerE

抗体を用いて、Tn21 (*merR*-*o/p*-*merT*-*merP*-*merC*-*merA*-*merD*-*merE*) にコードされる *merE* の翻訳状況及び MerE 産物の菌体内における局在をウェスタンブロット法により検討した。

2-2. *merE* 遺伝子組換え大腸菌における MerE の局在および水銀化合物に対する耐性及び蓄積性の検討

Pseudomonas K-62 由来の plasmid pMR26 上の水銀調節遺伝子 (*merR*-*o/p*) の下流に *Shigella flexneri* 由来の Tn21 上の *merE* を結合させた遺伝子 (*merR*-*o/p*-*merE*) を pKF19k vector に組換え、plasmid pE4 を構築した。この plasmid を大腸菌 XL1-Blue に形質転換した MerE 組換え株を作製し、*merE* 遺伝子産物の菌体内における局在について検討した。

また、MerE 組換え株のメチル水銀 (CH_3Hg^+) 及び無機水銀 (Hg^{2+}) に対する耐性及び取り込みを検討した。pKF19k vector を大腸菌に形質転換した株をコントロールとして用いた。 CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} 耐性は阻止円法により、 CH_3Hg^+ 取り込みは放射性 $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}^+$ を用いて液体シンチレーションカウンターにより、 Hg^{2+} 取り込みは還元気化原子吸光光度法により測定した。

3. 研究結果

3-1. Tn21 を持つ菌における *merE* 遺伝子産物の同定

Tn21 (*merR*-*o/p*-*merT*-*merP*-*merC*-*merA*-*merD*-*merE*) をもつ菌において、 Hg^{2+} 非存在下 MerE 産物は微量に検出された。一方、 Hg^{2+} 存在下 MerE 産物は粗抽出画分及び膜画分において検出された (Fig. 2A)。

3-2. *merE* 遺伝子組換え大腸菌における MerE の局在および水銀化合物に対する耐性及び取り込みの検討

pE4 (*merR*-*o/p-merE*) を持つ菌 (MerE 組換え株) において、 Hg^{2+} 存在下 MerE 産物は粗抽出画分及び膜画分において検出された (Fig. 2B)。

MerE 組換え株はコントロール株に比べ、 CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} による阻止円がそれぞれ有意に増大した。また、MerE 組換え株における CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} の取り込み量はコントロール株に比べ、それぞれ有意に増加した (Fig. 3)。

4. 考察

Tn21 上の *merE* は通常菌体内で微量に発現しているが、菌体内で Hg^{2+} により誘導され、転写・翻訳されていることが明らかとなった (Fig. 2A)。また、細胞内画分を分画したウェスタンブロッティングの結果より、MerE は細胞膜に局在するタンパク質であると考えられた (Fig. 2B)。MerE を持つ大腸菌の CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} の取り込み量はそれぞれコントロールに比べ有意に上昇した (Fig. 3)。以上の結果から、MerE は Hg^{2+} によって転写・翻訳され、膜タンパク質として CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} を取り込むトランスポーターであることが初めて明らかとなった。

5. 結論

Tn21 由来の MerE は大腸菌の細胞膜に局在する新規の CH_3Hg^+ 及び Hg^{2+} トランスポーターであることを明らかにした。細菌が有するトランスポーターの中で MerE が CH_3Hg^+ 輸送活性を持つ初めての報告である。



Fig. 2 Western blot analyses of the crude cell extracts (CCE), soluble fractions (SF), and membrane fractions (MF) of the transformant strain with plasmid NR1 (Tn21) (A) or plasmid pE4 (B) were performed using the anti-MerE polyclonal antibodies. *E. coli* JE5525 with plasmid NR1 and *E. coli* XL1-Blue with plasmid pE4 were prepared and grown with Hg^{2+} . The arrow indicates purified MerE (8 kDa). Lane M represents the purified MerE (8 kDa).

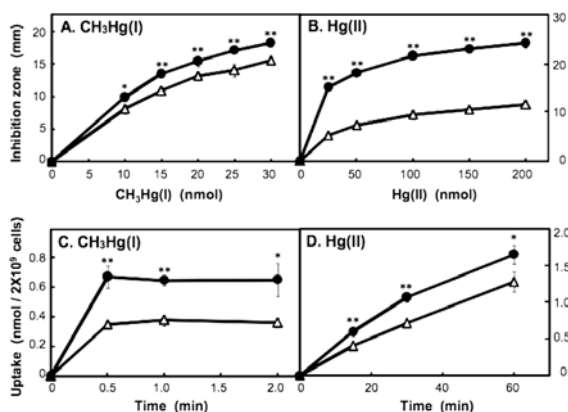


Fig. 3 the bacterial susceptibility to CH_3Hg^+ (A) or Hg^{2+} (B) and the bacterial uptake of $^{14}\text{CH}_3\text{Hg}^+$ (C) or Hg^{2+} (D). *E. coli* XL1-Blue with vector (Δ) or pE4 (\bullet) was grown, prepared and assayed. All values represent the means of triplicate determinations from three experiments. Values are expressed as means \pm S.D. The asterisk indicates means that were significantly different from the control value at the same time point (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test).

6. 研究発表

Kiyono M, Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Sakabe K. The MerE protein encoded by transposon Tn21 is a novel, broad mercury transporter in *Escherichia coli*. *FEBS let* 583: 1127-1131 2009

周産期におけるメチル水銀曝露が生後 30 ヶ月時の行動に及ぼす影響

—沿岸地域に住む母子を対象に—

○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）、岩井美幸（東北大学・院・薬・生体防御薬学）、佐藤 洋（東北大学・院・医・環境保健医学）

1. 背景

メチル水銀曝露に対して、胎児期および新生児期は感受性が高いことが知られている。このため、この時期は、低濃度の曝露であっても何らかの健康影響が懸念される。我々は、胎児期および新生児におけるメチル水銀曝露が出生後の子どもの発達に及ぼす影響を検証することを目的とし、出生コホート調査（Tohoku Study of Child Development, TSCD）¹⁾を進めている。調査地は、メチル水銀の主な摂取経路は魚介類の摂取によるものと考えられることから、魚介類摂取量が多い沿岸都市である。2002年12月から2006年3月の間に同意が得られた749組の母子を登録した。

これまでの本ミーティングにおいて、胎児期および新生児期におけるメチル水銀曝露が生後3日目、7ヶ月ならびに18ヶ月時の発達に及ぼす影響について報告してきた。本報告では、メチル水銀曝露が生後30ヶ月時の情緒および行動に及ぼす影響を検討した。また、魚介類にはセレンおよびDHAなどの栄養素が豊富に含まれていることから、これらの栄養学的因子を共変量とした。

2. 方法

2-1. 対象者

TSCDに登録された母子を対象に、出生児が生後30ヶ月時に質問票を送付した。そのうち570組の母子から返送が得られた（追

跡率76.1%）。

2-2. 調査内容

情緒・行動上の問題を評価する質問票であるChild Behavior Checklist age for 2-3 (CBCL/2-3)を実施した。CBCL/2-3では、内向的な問題を評価する内向尺度得点、外向的な問題を評価する外向尺度得点、ならびに総得点から評価される。

2-3. 生体試料

臍帯血を出産時に、母体血を出産直後の朝食前に採取した。臍帯血全血の総水銀は還元気化原子吸光光度法、臍帯血血漿のセレンはWatkinson法、母体血血漿DHAはガスクロマトグラフィー法でそれぞれ測定を行った。

2-4. 交絡要因

出生時体重、在胎週数、子どもの性別などの情報をカルテから転載した。育児環境を評価するため、安梅ら²⁾が開発した育児環境評価を使用した。

2-5. 統計学的解析

対数正規分布については、対数変換後の値を解析に用いた。発達指標と曝露指標との関連性はPearsonの積率相関係数および重回帰分析（強制投入法）より解析した。統計処理には、SPSS version 19.0を使用し、統計学的有意水準は5%とした。

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

データの揃った 526 組の母子を解析の対象とした。対象母子の基本属性を表 1、CBCL/2-3 の得点を表 2、曝露レベルを表 3 に示す。

表 1 対象母子の基本属性

	Mean	SD	Min	Max	%
在胎週数 (週)	39.7	1.2	36.3	42.1	
出生時体重 (g)	3134	354.0	2282	4322	
子どもの性別 (% 男児)					49.8
母親の出産時年齢	29.6	4.7	16	41	
出生順位 (% 第二子以降)					60.3
分娩様式 (% 自然分娩)					70.9
妊娠中の飲酒の有無 (% 有)					15.8
妊娠中の喫煙の有無 (% 有)					13.7
母親の学歴 (% 13年以上)					44.1
育児環境評価の得点	27.0	3.7	16	36	

妊娠中の喫煙について、妊娠中も喫煙していた場合と妊娠を機にやめた場合を喫煙群、喫煙していなかった場合を非喫煙群とした。

表 2 CBCL/2-3 の得点

	Mean	SD	Min	Max
反抗 (外向尺度)	8.8	5.5	0	29
引きこもり (内向尺度)	1.1	1.5	0	11
攻撃 (外向尺度)	4.7	3.4	0	15
分離不安 (内向尺度)	3.3	2.5	0	14
不安神経質 (内向尺度)	1.8	2.1	0	13
発達	0.5	0.9	0	9
睡眠食事	3.1	2.3	0	11
注意集中 (外向尺度)	2.6	1.9	0	8
その他	2.7	2.2	0	11
内向尺度	46.1	8.9	32	80
外向尺度	48.7	9.8	29	91
総得点	47.6	9.6	25	91

表 3 曝露レベル

	Median	5%tile	95%tile
臍帯血全血総水銀 (ng/g)	15.7	5.9	37.5
臍帯血血漿セレン (ng/g)	66.3	51.0	83.4
母体血血漿DHA (mg/ml)	168.5	100.4	257.2

3-1. 生後 30 ヶ月時の行動と曝露指標

CBCL/2-3 の得点と曝露指標との関連性

を単相関分析により検討した結果、臍帯血総水銀および臍帯血セレンとの間には関連性がみられなかった。一方、母体血 DHA と内向尺度得点との間に負の関連が認められ、DHA の濃度が高い場合に内向的な情緒および行動上の問題が少ないことが示された (表 4)。下位尺度毎にみると、母体血 DHA は引きこもり尺度および不安神経質尺度との間に負の関連性を示した。

表 4 CBCL/2-3 と曝露指標 (単相関)

	内向得点	外向得点	総得点
臍帯血全血総水銀	-0.058	-0.026	-0.045
臍帯血血漿セレン	0.049	-0.015	-0.002
母体血血漿DHA	-0.089 *	-0.067	-0.075

Pearson's *r* を示す。

* $p < 0.05$

表 5 内向尺度下位尺度と曝露指標 (単相関)

	引きこもり	分離不安	不安神経質
臍帯血全血総水銀	-0.060	-0.043	-0.047
臍帯血血漿セレン	0.000	0.049	0.082
母体血血漿DHA	-0.095 *	-0.048	-0.091 *

Pearson's *r* を示す。

* $p < 0.05$

次に、CBCL/2-3 の内向尺度得点、下位尺度の引きこもり尺度得点および不安神経質尺度得点を従属変数、曝露指標および交絡因子を独立変数とした重回帰分析をそれぞれ実施した (表 6)。その結果、曝露指標についてはいずれも有意な関連性は観察されなかった。一方、出生順位で関連性が認められ、対象児が第一子の場合に得点が低く、情緒および行動上の問題が少ないことが示された。

CBCL/2-3 の得点は出生順位と関連が認められたため、第一子と第二子以降で層別して重回帰分析を行った。CBCL/2-3 と曝露指標との間にはいずれも関連性は認められ

なかった（表 7、表 8）。

表 6 CBCL/2-3 と曝露指標（重回帰）

	内向尺度	引きこもり	不安神経質
Adjusted R ²	0.069 *	0.030 *	0.082 *
臍帯血全血総水銀	-0.020	-0.023	-0.004
臍帯血血漿セレン	0.013	-0.017	0.047
母体血血漿DHA	-0.061	-0.078	-0.062
出生順位	-0.268 *	-0.210 *	-0.276 *

* p<0.001

標準化βを示す。

共変量として、在胎週数、出生時体重、子どもの性別、母親の出産時年齢、分娩様式、妊娠中の飲酒歴および喫煙歴、母親の学歴、検査時月齢

表 7 第一子の CBCL/2-3 と曝露指標

第一子	内向尺度	引きこもり	不安神経質
Adjusted R ²	-0.007	-0.016	-0.027
臍帯血全血総水銀	-0.046	-0.054	0.012
臍帯血血漿セレン	0.008	0.007	0.041
母体血血漿DHA	-0.081	-0.106	-0.031

* p<0.001

標準化βを示す。

共変量として、在胎週数、出生時体重、子どもの性別、母親の出産時年齢、分娩様式、妊娠中の飲酒歴および喫煙歴、母親の学歴、検査時月齢を投入した。

表 8 第二子以降の CBCL/2-3 と曝露指標

第二子以降	内向尺度	引きこもり	不安神経質
Adjusted R ²	-0.021	-0.010	0.002
臍帯血全血総水銀	0.014	0.010	-0.019
臍帯血血漿セレン	0.002	-0.040	0.041
母体血血漿DHA	-0.069	-0.068	-0.105

* p<0.001

標準化βを示す。

共変量として、在胎週数、出生時体重、子どもの性別、母親の出産時年齢、分娩様式、妊娠中の飲酒歴および喫煙歴、母親の学歴、検査時月齢を投入した。

4. 考察

メチル水銀に関する海外の先行研究としてデンマーク領フェロー諸島やインド洋の島国であるセイシェル共和国などで出生コホート調査が進められている。その中で、フェロー諸島の出生コホート調査では、1997年に胎児期メチル水銀曝露の影響として、7歳時の言語、言語記憶、空間認知、

反応時間、運動機能との間に負の関連がみられたことを報告した（出産時の母親毛髪総水銀の中央値が 4.5 ppm³⁾。一方、セイシェル共和国では、2013年に、10歳時に自閉症スペクトラム障害特有にみられる行動の有無を調べ、その行動とメチル水銀曝露との間に関連性はみられなかったことから、行動面への影響は示されないと述べた⁴⁾。

本研究の結果、メチル水銀の影響は、生後 30ヶ月時の情緒および行動上の問題との関連性は観察されなかった。このことから、海外の先行研究同様、メチル水銀の曝露影響は行動には観察されなかった。今後、子どもの言語や空間認知などへの影響について検証し、メチル水銀の健康影響について明らかにする計画である。

引用文献

- 1) 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.
- 2) 安梅勅江ら：質問紙による養育環境スクリーニングの研究. *小児保健研究* 45, 556-560, 1986
- 3) Grandjean P., et al.: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 417-428, 1997.
- 4) van Wijngaarden E, et al. Autism spectrum disorder phenotypes and prenatal exposure to methylmercury. *Epidemiology* 24, 651-659, 2013.

留意事項

本要旨及び発表ファイルは、環境省委託事業の報告書に掲載される可能性があり、情報公開法に基づいた公開請求があった場合に開示されることも想定されます。

講演要旨集そのものの著作権等は環境省に帰属しますが、個別のデータ、図表等の著作権等は発表者に帰属します。

リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます

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。