

平成 26 年度環境省委託業務報告書

平成 26 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 27 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 26 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 27 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平成 26 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	2
2.3	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）	3
2.4	メチル水銀研究ミーティングの開催	3
2.5	推進・評価合同委員会の開催	3
2.6	研究計画書の作成の依頼	4
2.7	推進委員会の開催	4
2.8	研究報告書の作成	4
2.9	研究成果還元業務の実施	5
3	各研究班の報告	5
	○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	11
	中村 昭範（独立行政法人国立長寿医療研究センター脳機能画像診断開発部 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	33
	安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学 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	43
	小泉 修一（山梨大学大学院医学工学医学部薬理学 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	61
	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	97
	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	109
	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	149
	メチル水銀研究ミーティング講演要旨集	

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した。

2 業務の実施内容

2.1 研究班の設置（継続）

平成25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6つの研究班を設置し、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、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き、研究班の請求に応じてすみやかに一括で概算払い（前払い）を行った。

また、研究職の任を用意して、その給与を研究費の範囲において支弁するような研究計画は、以下のいずれの研究班からも提出されなかった。

研究領域：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（独立行政法人国立長寿医療研究センター脳機能画像診断開発部 室長）

水俣病患者の経年的変化及び自然史

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 教授）

研究領域：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医学部薬理学 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 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）

2.2 「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（主任研究者又は研究者以外の有識者）9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下表の通りである。

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
二塚 信	熊本大学 名誉教授

○：委員長

②推進委員会の設置

第三者（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、推進委員会委員の下表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	東京慈恵会医科大学 客員教授
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
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
○渡辺 知保	東京大学大学院 医学系研究科 教授

○：委員長

2.3 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 26 年 12 月 4 日 9:00～15:55 に LMJ 東京研修センター5 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（2.5 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、小椋陽介、北川正信、櫻井治彦、濱田陸三、二塚信
（敬称略、五十音順）

推進委員：赤木洋勝、石本二見男、井村伸正、遠山千春、中川正法、渡辺知保
（敬称略、五十音順）

また、研究発表会前には、2.1「研究班の設置（継続）」で設置された研究班の主任研究者等より中間成果報告書の提出を受け、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。

2.4 メチル水銀研究ミーティングの開催

2.3「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 26 年 12 月 5 日 9:00～16:30 に LMJ 東京研修センター4 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」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赤木洋勝取締役所長（有限会社国際水銀ラボ）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。演者等に対しては、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。

2.5 推進・評価合同委員会の開催

平成 26 年 12 月 4 日 16:00～18:00 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」を開催した。2.3 の研究発表会における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 27 年度に行う研究について検討した。なお、出席した全委員に対して旅費及び謝金を支給した。この推進・評価合同委員会の出席者は以下の通りである。

<推進・評価合同委員会への出席委員>

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

推進委員：赤木洋勝、石本二見男、井村伸正、遠山千春、中川正法、渡辺知保（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、各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）」で設置された研究班及び関係者に送付した。

2.6 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 27 年度に研究を継続する予定である研究班、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 27 年度の研究計画書の作成を依頼した。

また、2.7 の推進委員会の開催後に、取りまとめた評価結果を各研究班に送付するとともに、継続が認められた研究班に対して平成 27 年度の研究計画書の修正を依頼した。

2.7 推進委員会の開催

平成 27 年 3 月 5 日に日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて、推進委員会を開催し、2.6 の依頼に基づいて各研究班から提出された平成 27 年度の研究計画書について評価を行った。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、遠山千春、中川正法、渡辺知保（敬称略、五十音順）

2.8 研究報告書の作成

2.5 の推進・評価合同委員会及び 2.7 の推進委員会の審議内容等を踏まえ、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。

2.9 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、2.1「研究班の設置（継続）」で設置した山崎班（広島大学大学院）より、第41回日本毒性学会学術年会（2014年7月2日～4日、神戸）に参加し、『メチル水銀により誘導されるアストロサイトの神経栄養因子放出とその保護作用』及び『MRIを用いたマウス脳へのメチル水銀毒性の検出』の2つの演題で発表したため、学会参加費及び旅費について申請があり、研究成果還元費を支払った。

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

主任研究者 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室長）
分担研究者 根本 哲也（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学部室長）

研究要旨

末梢神経障害を有していても水俣病の皮膚感覚機能を客観的に評価できる方法を確立していく目的で、以下の3つの課題に取り組んだ。①末梢神経障害の客観的評価法の確立：昨年度開発した「皮膚感覚の自動閾値判定システム」を用い健康高齢者8名の測定を行い、電気刺激認知閾値の加齢変化を検討した。更に、6名の高齢者で脳磁図測定もを行い、感覚閾値と脳磁図反応波形の関係を、**Statistical Parametric Mapping** による統計学的手法を用いて客観的に判定する方法を開発した。②舌や口唇での二点識別覚の脳磁図測定が可能な刺激装置を完成し、実測定を行った結果、舌の二点識別に対応したMismatch反応の測定に成功した。更に、1点刺激と2点刺激に対する反応の違いが有意なものかどうかを統計学的に客観的に判定できることも示した。③水俣病における感覚障害や小脳症状に対応して中枢神経に生じる変化を、最新のMRI解析技術により客観的に評価することを目指して、熊本大学医学部神経内科（安東班）との共同研究を立ち上げた。本年度はまず、健康高齢者81名のMRI画像を詳細に解析し、小脳皮質、一次視覚野、一次聴覚野、一次体性感覚野等の皮質平均ボリュームの健康高齢者データベースを作成した。また、試験的に胎児性水俣病患者1例の解析もを行い、小脳皮質ボリュームが健康高齢者に比べ有意に低下していることを示した。

キーワード: 二点識別覚, 客観的測定, 脳磁図, 体性感覚誘発磁場, ミスマッチ反応, MRI

研究者協力者氏名:

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）

Kersten Josef Diers（Department of Psychology TU Dresden Dresden Germany 助手）

I 研究目的

本研究の目的は二点識別覚を中心とした皮膚感覚の客観的測定法を開発し、高齢者の皮膚感覚機能を客観的かつ総合的に評価できるシステムを構築することである。また、これらを用いてメチル水銀中毒の皮膚感覚障害の評価や鑑別に役立てていくことが本研究のゴールである。

背景及び必要性：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。我々はこれまでの研究で自動二点識別覚測定システムを開発し、これと脳磁図のMismatch反応(MMR)¹⁾を組み合わせることで、客観的に二点識別覚の閾値を推定できる可能性を示した。しかし、一般応用するには、1)個人差の大きい脳磁図波形の正常範囲の反応を明らかにしていくと共に、検査の信頼性そのものを更に高めていく必要がある、2)メチル水銀中毒で高頻度に合併する末梢神経障害がある場合にどのような評価ができるのかが不明である、といった問題点をクリアしていかなければならない。そのため、①末梢神経障害の客観的評価法の確立、②舌や口唇での二点識別覚の測定、③中枢神経の直接的評価、の3つの異なる視点からこの問題に取り組んでいる(図1)。

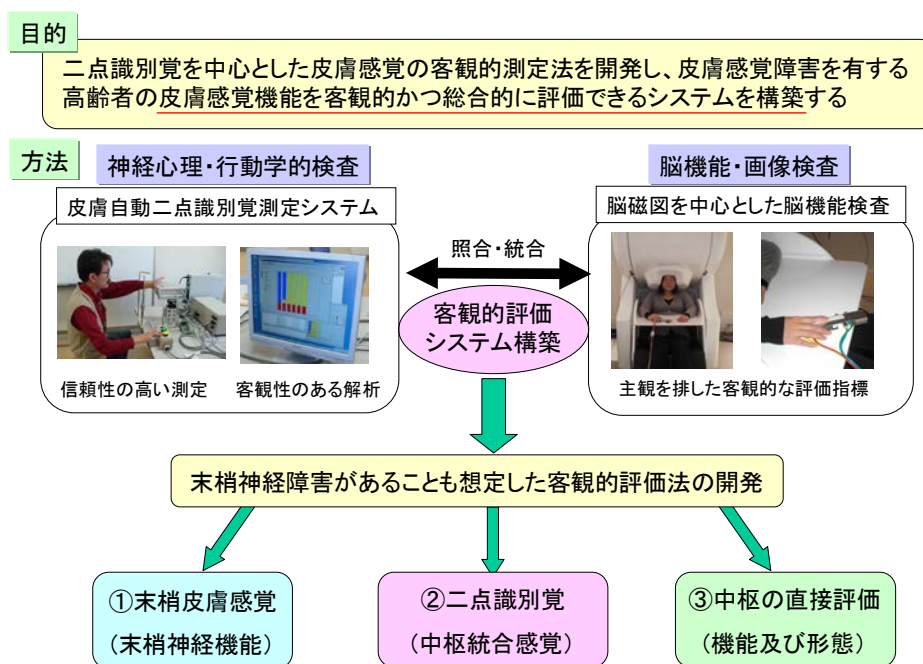


図1: 本プロジェクトの概要

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) 昨年度開発した皮膚感覚の自動閾値判定システム(図2)を用い、健康高齢者8名(62-74歳、平均68.4±4.2歳)を対象に測定を行った。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に取り込み、開発したシステムを用いて50% 認識閾値を推定して前年度の若年者8名の結果と比較した。

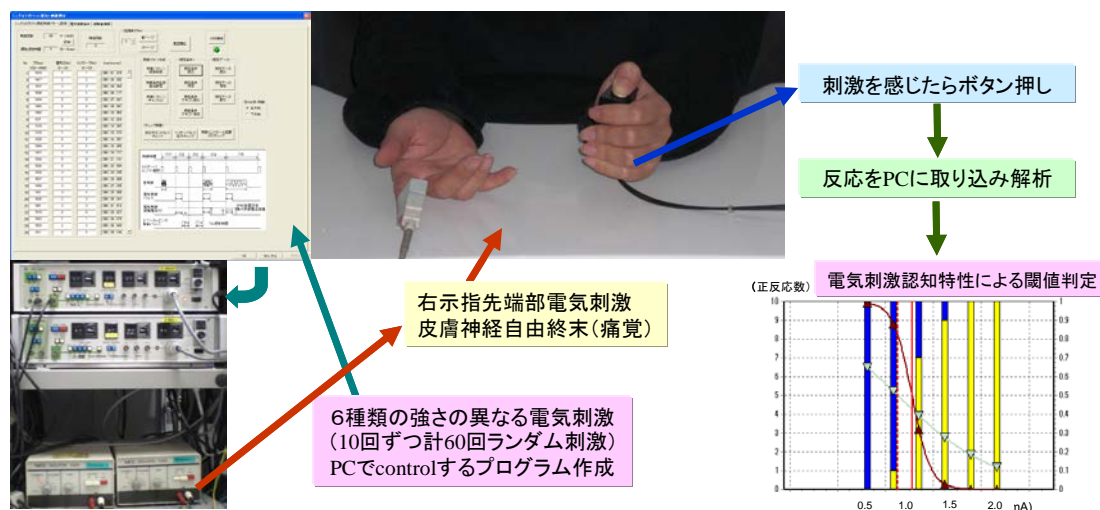


図 2: 電気刺激に対する皮膚感覚の自動閾値判定システムの概略。6種類の異なる強さの電気刺激をランダムに被検者皮膚に与え、刺激を感じたらボタンを押し反応を行う。反応はPCに取り込み、S字フィッティングにより50%認識閾値を計算して求める。

b) 上記被検者のうち6名を対象に脳磁図を用いて体性感覚誘発脳磁場(SEF)の測定を行い、反応波形の解析を行った。また、得られたSEF波形が、有意な脳の反応であるかどうかを客観的に判定するための分析手法についても検討した。

②口唇や舌における二点識別覚関連Mismatch反応の検討

末梢神経障害は通常手袋靴下状に分布し、口唇や舌はspareされるため、末梢神経障害の影響をあまり考えずに二点識別覚の評価ができると考えられる。従ってこれらの部位でMismatch反応を測定できるシステムを構築することは重要である。そこで前年度、脳磁図に対応した、舌・口唇刺激が可能な新規刺激装置の開発に取り組んだが、ノイズ混入が多く、実用的な測定には装置のさらなる改良が必要であることが明らかとなった。従って今年度は、以下の課題に取り組んだ。

a) 脳磁図対応の舌・口唇刺激装置の改良。

実際の脳磁図測定装置を用いて個々の部品素材の磁場ノイズ強度を測定し、最適な素材を選定して装置を基本パーツから完全に組み立て直した。

b) 舌刺激による脳磁図の実測定。

若年成人1名、高齢者6名を対象に、脳磁図実測定を行った。

c) 更に反応が有意なものであるかどうかを客観的に判定する方法を検討した。

③ 脳MRIによる定量的な解剖学的解析

二点識別覚異常は中枢病変でも生じるため、中枢の変化を直接的に解析することは有用である。また、二点識別覚のみならず、水俣病の中核症状である小脳症状、視覚障害、聴覚障害に対応した脳の解剖学的変化は、最新のMRI解析技術により客観的に評価できる可能性がある。そこで、熊本大学医学部神経内科（安東班）との共同研究の第一弾として、まず水俣病患者のMRIを詳細に解析するプロジェクトを立ち上げた。今年度はこれまでに、

- a)健康高齢者81名を対象に撮像した3D撮像のT1強調MRI画像を、FreeSurfer²⁾を用いて脳皮質領域分割抽出を行い、小脳皮質、一次視覚野、一次聴覚野、一次体性感覚野等の皮質平均ボリュームの健康高齢者データベースを作成した。
- b) 安東班が撮像した胎児性水俣病患者のMRIの解析を行った。

(倫理面への配慮)

1. 本研究は世界医師会「ヘルシンキ宣言」及び厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」に示される倫理規範に則り計画された臨床研究であり、国立長寿医療研究センターの倫理・利益相反審査委員会の承認を既に得ている（平成25年8月26日承認）。
2. インフォームドコンセントのもとに、書面で協力を同意が得られた者のみを対象に行われる。
3. 検査は被験者のペースを尊重し、適宜休憩を取りながら行う。ひとつの検査セッションは5-10分程度とし、各セッション間には必ず1-2分程度の小休憩をはさむ。
4. 被験者が検査の中止を希望した場合、速やかに中止する。
5. プライバシーを守秘し、いかなる個人情報も外部に漏れないよう配慮する。
6. データ分析は、全ての個人情報を切り離して、匿名化されたID（アルファベット+番号）管理のもとに行い、いかなる不慮の、あるいは悪意のデータ漏洩があっても、個人情報にたどり着くことはできないデータ形式に変換する。匿名の連結情報ファイルはフロッピーディスクに保存し、認知症先進医療開発センター長室の鍵のかかる書庫に保管される。
7. 皮膚感覚検査で皮膚に接触するプローブの先端部分は皮膚を傷つける可能性がないよう、通常のスピアマン型の二点識別覚測定器よりも先端が鈍、かつ滑らかに加工されており、更にプローブが舌や口唇等の粘膜面に接触する場合は被験者毎に滅菌処理されたものを使用する等、衛生面でも十分な配慮がなされている。また、今回開発した脳磁図対応の舌・口唇刺激装置は、口との接触面を医療用の粘着性創傷被覆保護材でカバーし、被検者毎に交換している。

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を用いて高齢者8名の測定を行った結果、50%認識閾値は 2.63 ± 0.56 mAで、昨年測定した若年成人8名(21-24歳, 平均 21.8 ± 1.4 歳)に対する結果 1.60 ± 0.39 mAよりも有意に閾値が高いことが認められ($p < 0.001$) (図3)、加齢による影響と考えられた。

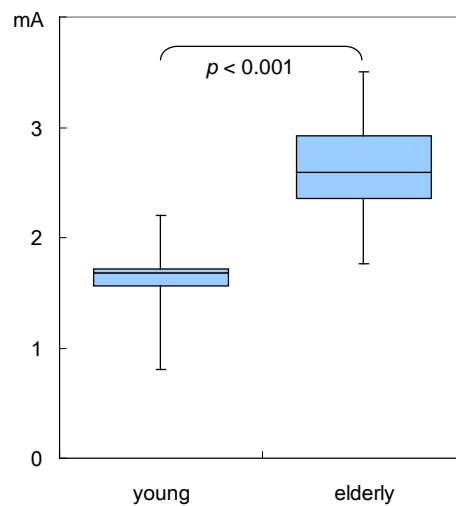


図3: 電気刺激認識閾値の若年者と高齢者の差

- b) 上記被検者のうち6名を対象に脳磁図を用いて体性感覚誘発脳磁場(SEF)の測定を行った。代表的波形を図4に示す。昨年度若年者に対する測定で得られた結果と同様、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示された。測定した全員で、同様の傾向を示す反応が認められた。

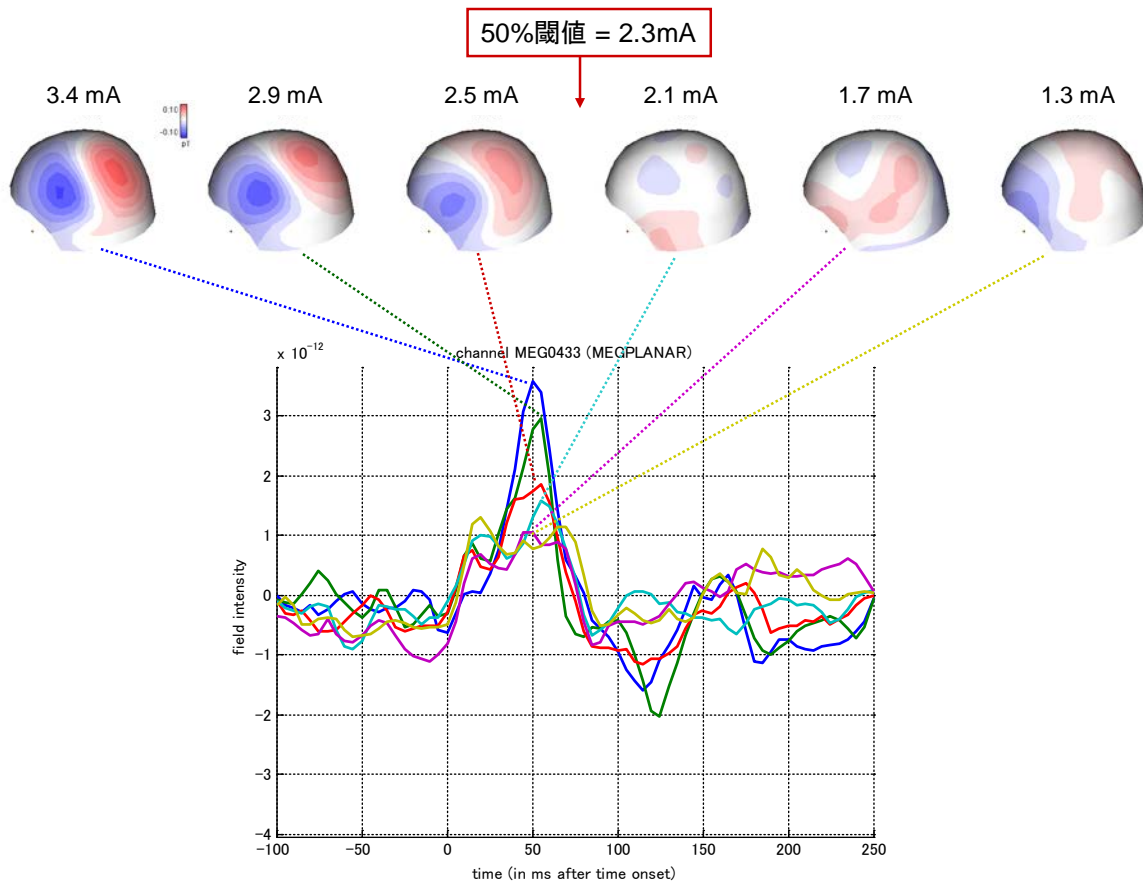


図4: 高齢者における各電気刺激強度 (3.4 – 1.3 mA) に対するSEFの代表的反応波形 (下)、及び、頂点潜時 (50ms) における各等磁場線図 (上)。

- c) 脳磁図の測定結果から各被検者の感覚閾値を推定するには、「有意な」波形が得られたかどうかを判定する必要があるが、視覚的な判定では客観性に難があり、特にノイズ混入が強くS/Nが低いデータの場合は、視覚判定は困難である。そこで、「反応が有意なものかどうか」を客観的な方法で判定する方法を確立するため、統計学的手法による判定が可能かどうか検討を行った。通常の脳磁図測定では、一つの刺激に対する個別の反応波形は、背景脳波や外部ノイズに隠れてほとんど意味のある波形としては認識できない。そのため、この個別反応波形を100-200回程度加算平均を行うことによって、明瞭な反応波形が得られ、これを分析に用いる (図5)。我々は、加算平均後は通常不必要となる個別反応波形に注目し、statistical parametric mappingの手法を用いて、異なる刺激に対する個別反応の群間差を検討した (図5)。分析にはSPM8 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College, London, UK) を使い、Sensor配列を64 x 64の仮想2次元空間 (x, y軸) に配置し、time courseをz軸として、3次元のvoxel by voxelのt検定を行った。

図4の被検者のデータを用い、1.3 mA刺激の個別反応に対する、各強度の刺激に対する個別反応それぞれ約150個の群間比較をSPMで解析した結果を図6に示す。図4と同様、閾値2.3 mAを超える刺激では、潜時50 ms前後に、左頭頂部センサーを中心に統計学的に有意な反応波形変化があることが示され、この方法が脳磁図波形の客観的判定に有用であることが示唆された。他の被検者のデータも同様の傾向を示した。

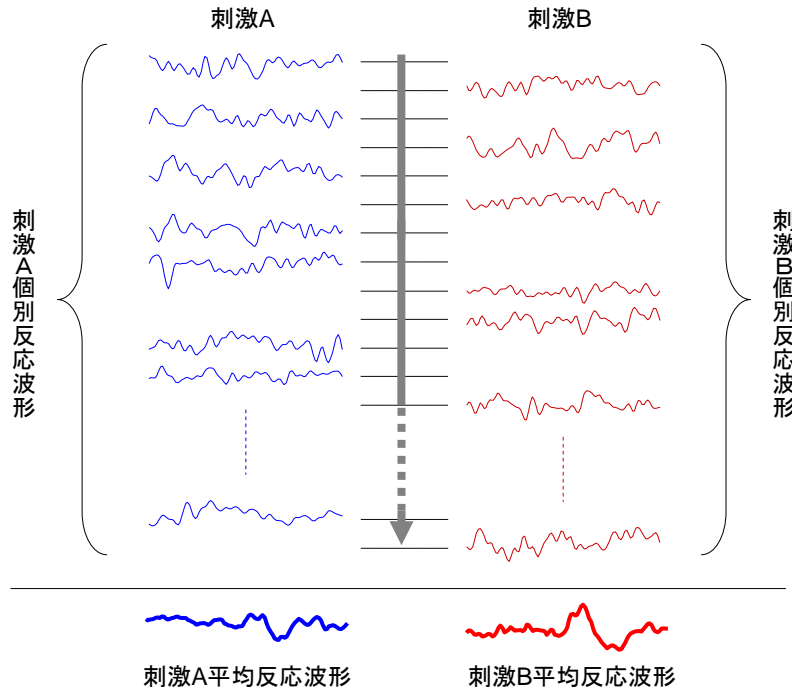


図5: 個別反応波形を用いた統計解析の概略。刺激Aに対する n 個の個別反応波形群と、刺激Bに対する m 個の個別反応波形群を、statistical parametric mappingの手法を用いて群間比較を行う。

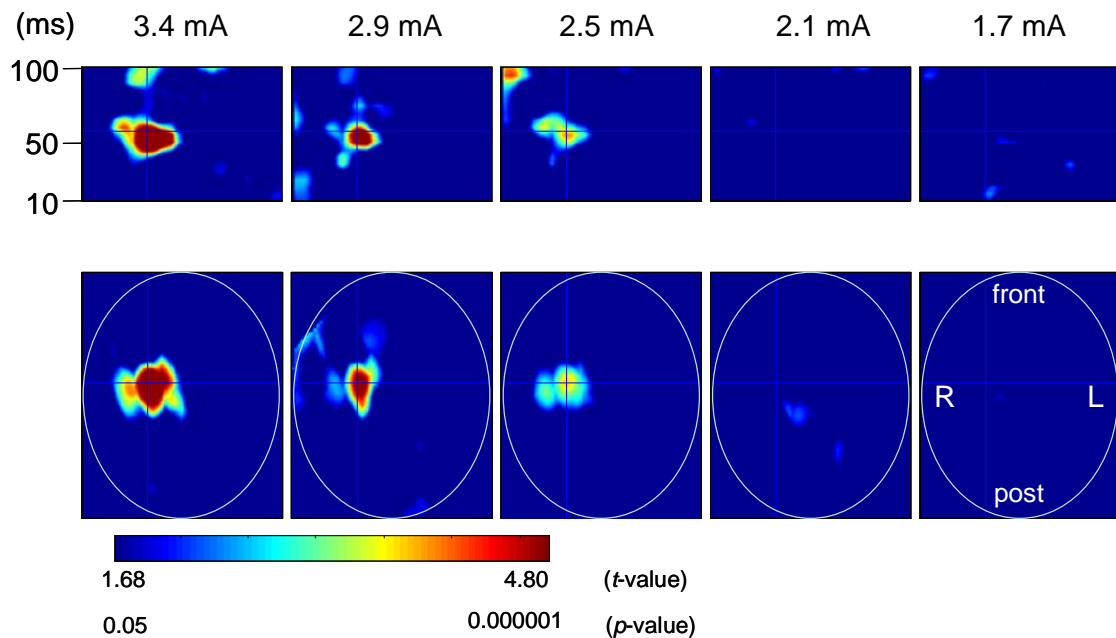


図6: SPMによる個別反応波形の解析結果。1.3 mAの個別反応波形に対する比較を行った各刺激の強度 (mA) を最上段に示す。下段のブルーのBoxはsensor配列を2次元に展開したもので、そこに薄いブルーで示されたR-L line上のsensor波形の時系列を、z軸上に展開したものが上段のブルーのBoxに示されている。Rainbow colorは、群間差をt値で示したもので、p値換算で0.05 から0.000001までの範囲でカラーマッピングされている。

②口唇や舌における二点識別覚関連Mismatch反応の検討

a) 脳磁図対応の舌・口唇刺激装置の改良（分担研究報告書参照）。

前年度、指刺激用の脳磁図対応刺激装置と同等の部品を用いて舌・口唇刺激装置を開発したが、磁場ノイズ混入が強く実測定に用いることはできなかった。これは、口唇・舌刺激用の装置は、プローブが脳磁図センサーアレイの中に入るほど接近するため、非常に弱い磁場ノイズでも脳磁図センサーが反応してしまうためと考えられた。そこで、部品に用いる素材決定のため、脳磁図センサーに近接した部分で、air-puffによりいろいろな素材をtriggerに同期して動かしながら脳磁図測定を行い、混入ノイズの程度を検証した。目標としたノイズレベルは、50回加算で少なくとも10fT以下、基本的にbase lineが乱れないことを条件とした。その結果をTable 1に示す。非磁性体金属として知られているSUS304では非常に大きなnoiseを発生し、また、プラスチック素材でも帯電防止コーティングがなされているとnoise源となり得ることも明らかとなった。この結果を踏まえ、駆動・構造体はアルミ合金A2017、ボルト等はPOM（プラスチック）、エア駆動膜はシリコン樹脂を用いて、装置を組み立て直した。完成した刺激装置を図7に示す。

Table 1: 素材磁場ノイズ実験結果

	材料名称		添加剤	静的試験結果	動的試験結果
プラスチック	ポリエチレン	LDPE	なし	GOOD	GOOD
	超高分子ポリエチレン	HDPE	なし	GOOD	GOOD
	ポリメタクリル酸メチル	PMMA	なし	GOOD	GOOD
	ポリカーボネート	PC	なし	GOOD	GOOD
	ポリアミド66	PA66	なし	GOOD	GOOD
	ポリアミド6	PA6	帯電防止剤	GOOD	NG
	ポリオキシメチレン	POM	なし	GOOD	GOOD
	ポリテトラフルオロエチレン	PTFE	なし	GOOD	GOOD
	非鉄金属	ステンレス	SUS304	なし	NG
アルミ		A2017	なし	GOOD	GOOD

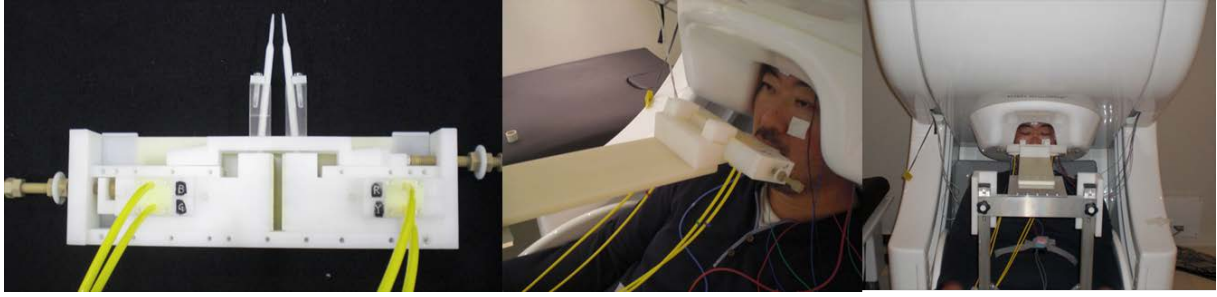


図7:完成した刺激装置。皮膚刺激プローブ部分は全てプラスチック素材を用いた（左）。刺激部はカセットで覆い、それを軽く口にくわえて舌尖や口唇を当てると、スリットから刺激プローブが突出して皮膚を刺激する（中）。装置の全体像（右）。

b) 舌刺激による脳磁図の実測定。

上記装置を用い、若年成人1名、高齢者6名を対象に、脳磁図実測定を行った。刺激部位は舌尖部とし、1点刺激が80%、2点刺激が20%となるようにランダムに与えられるOddball課題を用い、2点刺激の間隔が5 mm 及び、2 mmに対する誘発反応を個別に記録した。総刺激回数は各セッション500-600回行った。プローブの動作音による脳の誘発反応を防ぐ目的で、測定中はイヤホンを通じて音楽を聴かせ、刺激を無視して音楽を聴くように教示を行った。

若年成人の2点間隔5 mmの刺激に対する脳磁図測定結果を図8に示す。刺激後潜時約110-150 msをpeakに、明瞭な脳磁波形が誘発され、指先刺激に対する反応波形とは異なり、両側の頭頂部センサーから反応が記録された。これは、舌の感覚が解剖学的に両側支配であることと一致する所見であることから、舌の機械的刺激に対する体性感覚誘発反応の記録に成功したと考えられた。更に、潜時約145 msでは、特に左側で2点刺激に対する反応が1点刺激に対する反応よりも大きく、1点・2点刺激を自動的に弁別する脳の反応であるMMRも捉えられていることが示された（図8, 下）。この反応が統計学的に有意な差のある反応かどうかを検討する目的で、上述①-c)と同様の方法でSPMを用いて1点刺激と2点刺激に対する個別反応波形の群間比較を行ったところ、図8で示された潜時約145 ms 前後の反応の違いは有意であり、客観的にも舌の機械刺激によるMMRが誘発されていることが示された（図9）。これは我々の知るところ世界で初めての成果である。被検者の内在性ノイズが大きくて解析が困難であった2例を除くと、2点間隔が5mmのOddball刺激の場合は全員でMMRが観察されたが、間隔が2mmの場合は1名のみであり、二点間距離に依存してMMRの出現頻度が変わることが示された。

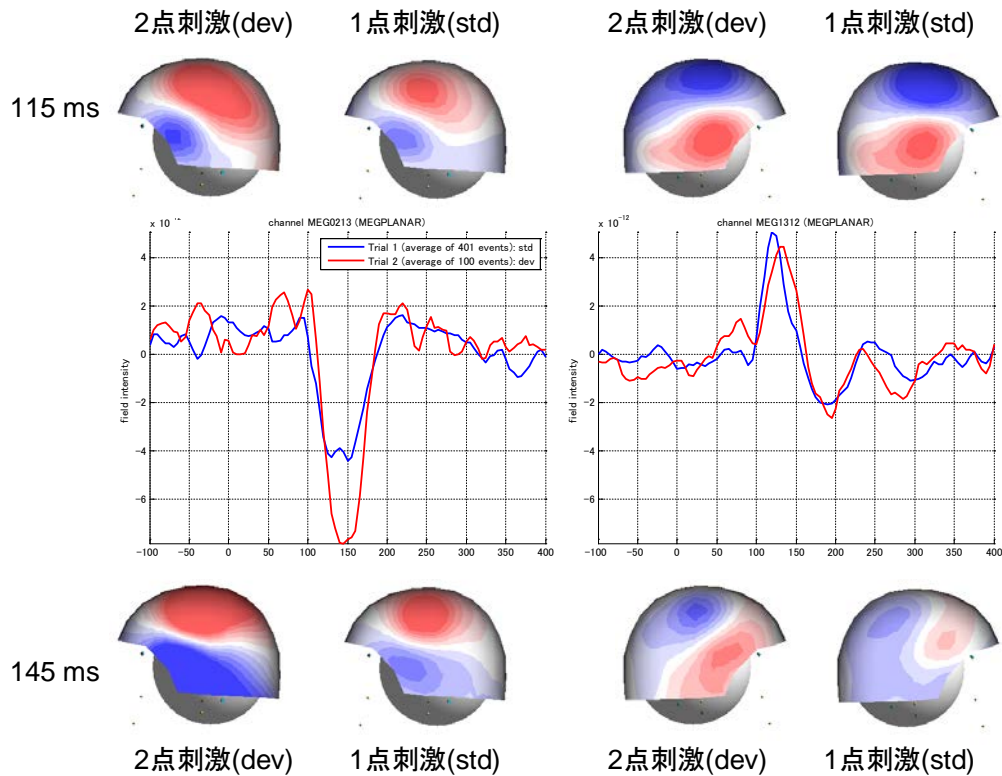


図8:左右の頭頂部センサーから捉えられた、舌のOddball刺激に対する誘発反応波形 (赤:2点刺激、青:1点刺激)。潜時115 msにおける等磁場線図(上)は、両側頭頂部を発生源とした二つの電源が活動していることを示す。また、潜時145 msにおける等磁場線図(下)は、2点刺激に対する反応が1点刺激よりも大きく、MMRが捉えられていることを示唆する。

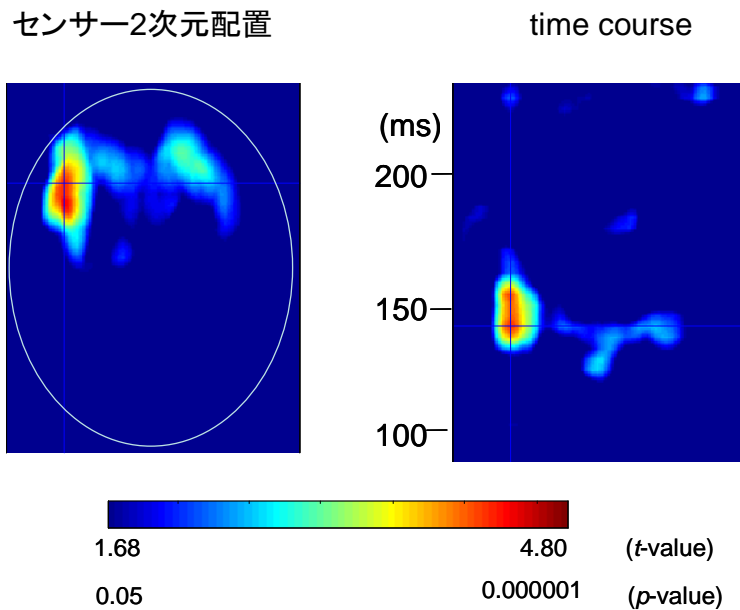


図9: SPMによる1点刺激と2点刺激の個別反応波形の群間差検定

③ 脳MRIによる定量的な解剖学的解析

- a) FreeSurferを用いた、健康高齢者の各脳領域の皮質ボリュームのデータベース作成。
健康高齢者81名の3D撮像T1強調画像をFreeSurferで処理し、灰白質と白質のsegmentation、及び、解剖学的Atlas-baseの細分割を行った（図10）。次にoutputされた各領域の灰白質のvolumeを、同じくoutputされる個人毎の頭蓋容積の平均値でnormalizeし、領域毎の灰白質volumeのdata baseを作成した（Table 2）。
- b) 今後はこのデータベースを元に、安東班と協力して水俣病患者の脳MRIを詳細に解析していく。パイロットスタディーとして行った、胎児性水俣病患者1名のMRI解析結果を図11に示す。本例では健常高齢者に比べ、小脳皮質のボリュームが低下していることが認められる一方、一次感覚野のボリュームは正常範囲であることが認められる。水俣病の脳の形態変化をMRIを用いて評価した研究は、90年代に行われたものが中心であるが、今回試みた方法のように、近年の高精度MRIと画像解析技術の進歩はめざましいものがあり、これらの解析方法を取り入れることで、水俣病の中核症状である小脳症状、視覚障害、聴覚障害に対応した脳の解剖学的変化を客観的、かつ定量的に評価できる可能性が示された。

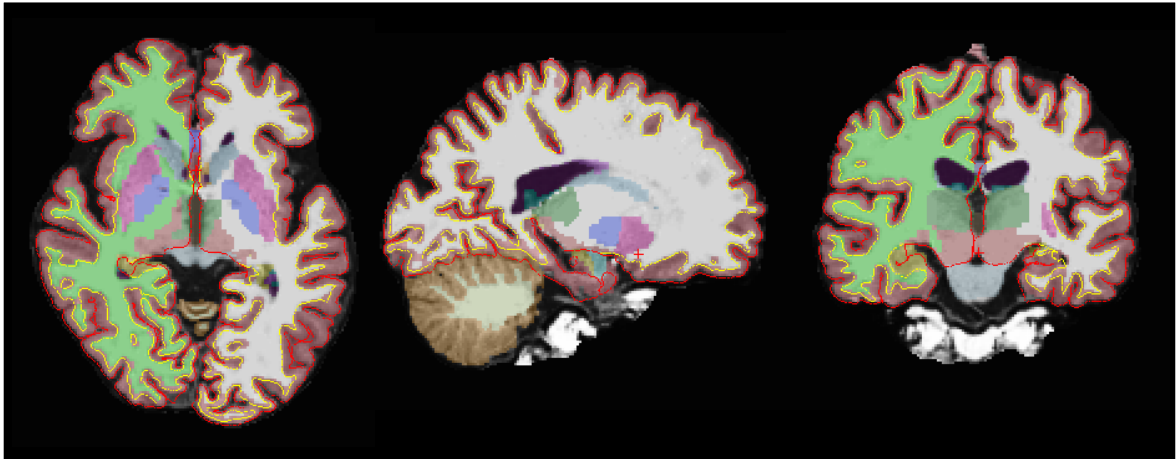


図10: FreeSurferによる、Atlas-baseの解剖学的細分割の実例。コンピューター処理により、脳の各領域が自動的に細分割されている。

Table 2: 健康高齢者81名の脳各領域の標準化皮質ボリューム

小脳皮質	一次視覚野	一次聴覚野	一次体性感覚野
48663 ± 5299	4004 ± 541	906 ± 134	8989 ± 929

(左右の平均値 ± SD, mm³)

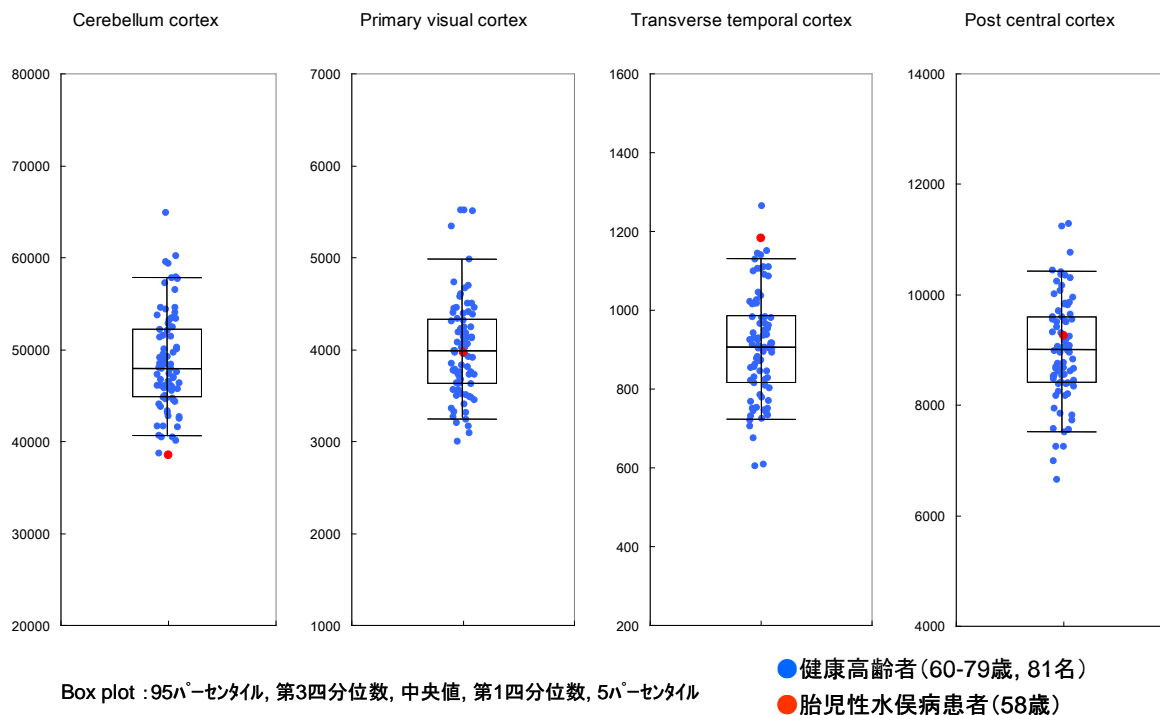


図11:正常データベースと胎児性水俣病患者1例の解析結果比較

IV 結論

高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法が開発されつつある。また、安東班との研究協力により、水俣病患者のMRIの詳細な解析といった、これまでにはなかった新しい試みにも着手した。

V 次年度以降の計画

これまでの研究で確立した方法論をベースに、脳磁図測定の対象被検者数を拡充し、可能な限り高齢者における正常反応の範囲を明らかにしていくと同時に、より洗練された客観的な評価法の確立も目指す。

また、熊本大学医学部神経内科（安東班）に加え、国立水俣病研究センター、及び水俣市立総合医療センターとも共同研究を行い、可能な範囲で水俣病患者のMRIの解析や、皮膚感覚の検査・脳磁図測定も行っていく。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

1. A Nakamura, B Maess, T Knoesche, A Friederici. Different Hemispheric Roles in Recognition of Happy Expressions, PLoS One. 2014 ; 9(2):e88628.
2. P Cuesta, P Garces, N P Castellanos, ME Lopez, S Aurtenetxe, R Bajo, J Pineda, R Bruna, A G Marin, M Delgado, A Barabash, I Ancin, J A Cabranes, A Fernandez, M Sancho, A Marcos, A Nakamura, F

- Maestú. Influence of the APOE ϵ 4 allele and MCI diagnosis in the disruption of the MEG resting state functional connectivity at sources space, *J. Alzheimer Dis.* 2014 ; Oct 3. [Epub ahead of print]
3. P Cuesta, A Barabash, S Aurteneixe, P Garcés, ME López, R Bajo, M Llanero-Luque, I Ancín, JA Cabranes, A Marcos, M Sancho, A Nakamura, F Maestú, A Fernandez. Source Analysis of Spontaneous Magnetoencephalographic Activity in Healthy Aging and Mild Cognitive Impairment: Influence of Apolipoprotein E Polymorphism, *J. Alzheimer Dis.* 2014 Jul 30. [Epub ahead of print]
 4. J L Mueller, S A Rueschemeyer, K Ono, M Sugiura, N Sadato, A Nakamura. Neural networks involved in learning lexical-semantic and syntactic information in a second language, *Front. Psychol.* 2014; 5 : 1209
 5. N Kaneko, A Nakamura A, Y Washimi, T Kato, T Sakurai, Y Arahata, M Bundo, A Takeda, S Niida, K Ito, K Toba, K Tanaka, K Yanagisawa. Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition, *Proc. Jpn. Acad.* 2014 ; Ser B: 90: 353-364.
 6. 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, 2013; 24 : 707-714
 7. 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, 2012 ; 25(1): 60-61.
 8. 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, 2012 ; 23(12) : 1463 - 1470.
 9. 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.* 2011; 496(2): 141-145.
 10. 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, 2010 ; 23(1) : 138-139.
 11. 中村昭範. 広汎性発達障害の神経イメージング. 臨床脳波, 2010 ; 52(7) : 379-384.
 12. 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, 2010 ; 23(1): 118-119.

引用文献

1. Näätänen, R.. The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear* 1995; 16: 6-18.
2. Dale, A.M., Fischl, B., Sereno, M.I., Cortical surface-based analysis. I. Segmentation and surface reconstruction. *Neuroimage* 1999 ; 9, 179-194.

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）

脳磁図対応の舌・口唇刺激装置の開発

前年度、指刺激用の脳磁図対応刺激装置と同等の部品を用いて舌・口唇刺激装置を開発したが、磁場ノイズ混入が強く実測定に用いることはできなかった。これは、口唇・舌刺激用の装置は、プローブが脳磁図センサーアレイの中に入るほど接近するため、非常に弱い磁場ノイズでも脳磁図センサーが反応してしまうためと考えられた。そこで、本年度は舌・口唇刺激装置の磁場ノイズ因子を明らかにし、それぞれの因子における対応・対策について検討し、これらの改良点を総合した装置について磁場ノイズ低減性を求めた。

装置の空間的問題 舌・口唇刺激装置を駆動させると、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。その結果、刺激部を駆動させるエアバックを拡張する際にプローブ部が0.1 mm程度の振幅で振動していることがわかった。

材料的問題 舌・口唇刺激装置に用いる候補材料について、MRIで測定された磁場ノイズから影響の程度を評価した。候補材料の設置場所は、脳磁図センサーに近接した位置（測定被験者の口唇部付近に相当）とした。また、駆動時に舌・口唇刺激装置のエアバック拡張時のプローブの可動の影響で振動することから、候補材料は振幅運動するようにair-puffにより固定した。候補材料は、一般的なプラスチックおよび非鉄金属材料から選定した。供試材の選定には、一般にエンジニアリングプラスチックと呼ばれる比較的強度の高い材料と磁性の低い金属材料を選定した。また、プラスチックの場合には改質剤としてフィラー等が添加されることがあるため、帯電防止添加剤の影響についても調べた。候補材料をtriggerに同期して動かしながら脳磁図測定を行い、混入ノイズの程度を検証した。目標としたノイズレベルは、50回加算で少なくとも10fT以下、基本的にbase lineが乱れないことを条件とした。その結果をTable 1に示す。静的な状態で候補材料を固定した際の計測でSUS304で影響が認められた。このことはSUS304は非磁性体であるものの、加工の影響等によりオーステナイトからマルテンサイトへ変態することにより磁性を発現することがあるためであると考えられ、SUS304の加工による磁性化に注意が必要であることが示唆された。次に振幅運動した際の試験の結果では、SUS304およびPA6に影響が認められた。一般に非磁

性とされるプラスチック材料でも添加剤によって磁性が発現し、ノイズ源となる可能性が示唆された。PA6のノイズの場合、SUS304に比して十分に小さいものの、100fT程度のピークであり測定結果に対する影響が大きかった。

磁場ノイズに影響のない材料で作成した舌・口唇刺激装置 この結果を踏まえ、駆動・構造体はアルミ合金A2017、ボルト等はPOM（プラスチック）、エア駆動膜はair-puffに用いられているシリコン樹脂を用いて、装置を組み立て直した。完成した刺激装置を図に示す。

Table 1: 素材磁場ノイズ実験結果

	材料名称		添加剤	静的試験結果	動的試験結果
プラスチック	ポリエチレン	LDPE	なし	GOOD	GOOD
	超高分子ポリエチレン	HDPE	なし	GOOD	GOOD
	ポリメタクリル酸メチル	PMMA	なし	GOOD	GOOD
	ポリカーボネート	PC	なし	GOOD	GOOD
	ポリアミド66	PA66	なし	GOOD	GOOD
	ポリアミド6	PA6	帯電防止剤	GOOD	NG
	ポリオキシメチレン	POM	なし	GOOD	GOOD
	ポリテトラフルオロエチレン	PTFE	なし	GOOD	GOOD
非鉄金属	ステンレス	SUS304	なし	NG	NG
	アルミ	A2017	なし	GOOD	GOOD

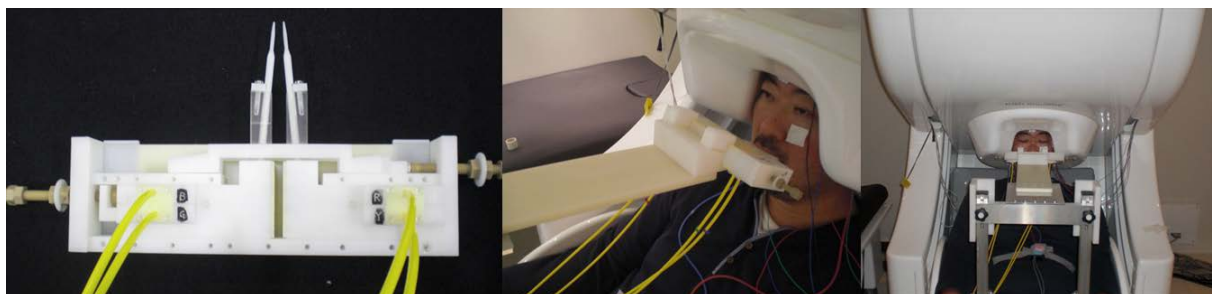


図:完成した刺激装置。皮膚刺激プローブ部分は全てプラスチック素材を用いた(左)。刺激部はカセットで覆い、それを軽く口にくわえて舌尖や口唇を当てると、スリットから刺激プローブが突出して皮膚を刺激する(中)。装置の全体像(右)。

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

Akinori Nakamura^{✉1} and Tetsuya Nemoto^{✉2}

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

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

Keywords: two-point discrimination, objective measurements, Magnetoencephalography, somatosensory evoked field, mismatch response, MRI

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 three 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 and 6 elderly subjects. We found that individual sensory thresholds could be reliably estimated in 2 minutes, and the elderly group showed significantly higher ($p < 0.001$) threshold than that in young group. 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. We also established the method to detect meaningful MEG deflections using statistical parametric mapping (SPM8) in order to determine the sensory threshold 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 newly developed a tactile two-point stimulator which is compatible for MEG measurements and can stimulate the lip or tongue. Using this stimulator, we measured somatosensory evoked fields related to two-point discrimination at tongue in 7 subjects. We could successfully measured mismatch response (MMR) related to two-point discrimination. We also found that the MMR waveforms were changed as a function of the two-point distances.

3) Since Minamata disease is known to cause brain atrophy in the primary sensory areas as well as

cerebellum, we have started a new study to assess the cortical volume using MRI. This year, we made a database for cortical volume in the cerebellum, primary visual, auditory and somatosensory cortices with 81 healthy elderly MRIs.

○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

水俣病患者発生以来、半世紀以上が経過した現在において、メチル水銀高曝露患者の神経症候がどのように変化しているか明らかになっていない。本調査では、明水園に入所中の患者および水俣市立総合医療センター外来の患者を対象として、その実態調査を行った。胎児性患者では高度の知能障害に加え、構音障害、錐体路徴候を認めた。小児性では、知能障害はなく、失調性構音障害および四肢の運動失調を認めた。成人型の患者では、構音障害はなく、軽度の小脳失調に加えて、加齢による他疾患の合併による歩行障害を認めた。曝露より半世紀以上経過した現在においても曝露当時の各臨床像の特徴は保たれていた。今後の追跡調査としては、知能障害が軽度で合併疾患も少ない小児性患者が最適であると考えられた。

キーワード: メチル水銀高曝露、小脳失調、小児性、胎児性、臨床像

研究協力者 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 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の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)}。水俣病は1951年(昭和26年) 8月にチッソ水俣工場でのアセトアルデヒド産生の行程で用いる助触媒を二酸化マンガンの使用を停止して、硫化第二鉄に変更された。この助触媒の変更を契機にメチル水銀が直接水俣湾に大量に放出された¹¹⁾。その後、工場からの水俣湾へのメチル水銀排泄は昭和43年まで続いた。メチル水銀の曝露より半世紀以上経過した現在において、メチル水銀曝露患者の神経症候がどの程度残存しているのか明らかにされていない。有機水銀への曝露の程度は曝露の時期により様々であり、胎児性、小児性、成人型に分類されている。長期経過のなかで、各表現型の臨床像がどのように変化するのか長期経過を追跡した報告はなく、その実態は明らかになっていない。また、加齢により合併する疾患もあり、各表現型の臨床像がどのように修飾されているのか明らかになっていない。そこで本研究では明水園入所中の水俣病患者の実態を調査して、水俣病患者の長期経過後の実態を明らかにすることを目的として調査した。

II 研究方法

明水園における水俣病患者の実態調査

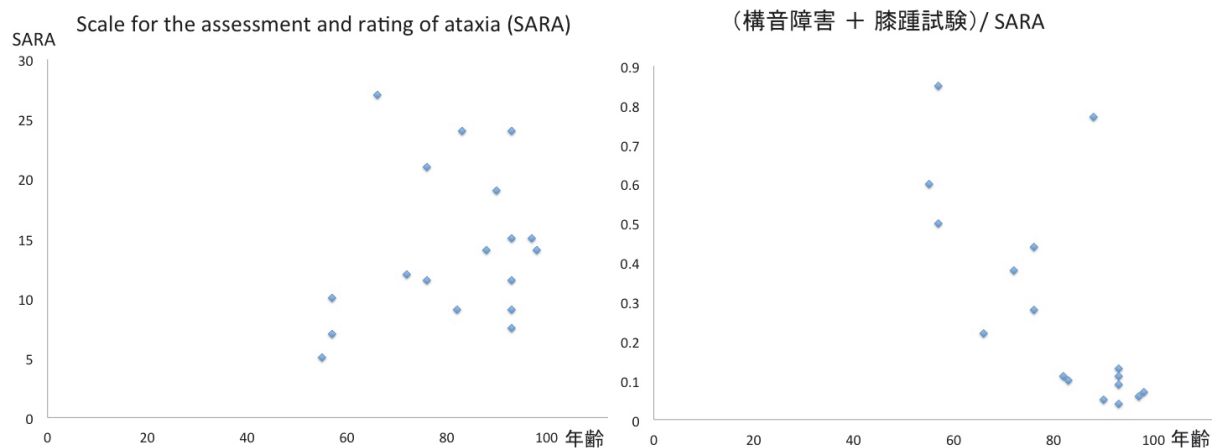
平成26年10月現在に入所中の患者 女性46名(83.2 ± 12)、男性19名(70.6 ± 10.2)名のうち、20名(男性2名 54歳、女性18名 81 ± 13.9歳)に聞き取り調査を行った。胎児性5例、

小児性 3 例、成人型 12 例に聞き取り調査および簡易的なスクリーニング診察を行った。現在の臨床像の特徴を曝露時の各年代別に解析した。

III 研究結果

- 1) 胎児性の 5 例中 4 例は出生地が水俣であり、4 例とも知能障害を認め、および構音障害を認めた。5 例中 1 例は出生地が芦北で、重度の不随意運動を認め、他の 4 例とは臨床像が異なっていた。重度の歩行障害は 5 例中 1 例で認めた。
- 2) 小児性患者 3 例は、知能障害がなく、質問に対する回答も通常どおり可能であった。3 例とも構音障害および四肢の運動失調を認めた。3 例中 2 例は錐体路徴候を認めた。重度の歩行障害は 3 例中 1 例であった。
- 3) 成人型 12 例では、11 例に知能障害はなく、1 例で認知症を認めた。重度の歩行障害は 10 例に認めたが、失調性構音障害や膝踵試験での運動失調は軽度であった。

小脳失調に関して、SARA スコアにより半定量的に評価した。SARA 総スコアに関しては、胎児性、小児性、成人型の各世代間にスコアのばらつきがあるが、水俣病に特異的な神経所見である構音障害、下肢の運動失調の評価項目を SARA の総スコアで割った数値は、胎児性、小児性で高値であり、成人型では低値であった。成人型では、多くの症例で変形性膝関節症や脳血管障害など加齢に伴う疾患を合併していたことがその要因と考えられた。



IV 考察

水俣病患者の実態を報告した。出生年や出生地により一定の臨床像の特徴を有していた。曝露より50年以上経過した現在においても、胎児性、小児性、成人型の各特徴が保存されていた。1) 胎児性は高度の知能障害、構音障害、錐体路徴候が特徴であった。2) 小児性は構音障害、四肢の運動失調に加え、錐体路徴候を認めた。3) 成人型では構音障害は、ほとんどなく、軽度の運動失調に加え、加齢による歩行障害が高率に見られた。

本実態調査で特筆すべきこととしては、1) 水俣病の中核症状である小脳失調は、現在もなお継

続してみられ、重度の小脳失調には、四肢の運動失調に加え、水俣病に特有の構音障害を伴っていた。2) 胎児性や小児性の他感覚所見として、錐体路徴候も高率に見られ、現在も保存されていた。左右対称性、全身性の錐体路徴候は神経所見のなかでも神経診察で他覚的に捉えやすい所見であった。

過去に平成8年から11年にかけて、水俣病患者の自然歴の経過について調査されている。水俣病患者の多くの症状は有症率が低下するものの、深部感覚障害、特に振動覚の低下は持続すると報告されている。水俣病患者の病理像としては、びまん性の大径有髄線維の脱落と小径有髄線維の保持が特徴とされ、中毒性疾患としての特徴を有する。今後の課題としては、本調査の対象患者の感覚障害の有無について、詳細に調査する必要があると考えられた。

今後の追跡調査の対象としては、加齢による歩行障害合併例の割合も少なく、意思疎通も可能な60歳から80歳の小児性患者が最適と考えられた。小児性患者は、水俣病の中核症状である小脳失調が保存されており、錐体路徴候も高率に見られた。入所中の胎児性患者は、知能障害が重度であるため、調査が困難な面もあるが、加齢による修飾をうけておらず、本患者も追跡調査の対象となりうると考えられた。

今後の課題としては、本対象患者において、現在見られる神経症候が有機水銀によるものか、他の合併疾患によるものを鑑別する必要がある。小脳症状を来す合併疾患としては、自己抗体による小脳変性症や脊髄小脳変性症などが挙げられる。また、感覚障害としては、糖尿病性ニューロパチー、家族性アミロイドポリニューロパチー（非集積地の高齢発症型）、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、膠原病に伴う末梢神経障害、M蛋白血症に伴う末梢神経障害などが挙げられる。今後、各疾患との鑑別に各種検体検査が必要と考えられた。

V 結論

長期経過した現在においても胎児性、小児性、成人型の特徴が保存されていた。80歳以上の高齢者は軽度の小脳症状に対し、加齢による歩行障害を伴い、80歳未満の胎児性・小児性の患者では、失調性構音障害を伴う運動失調および錐体路徴候が保存されていた。

VI 次年度以降の計画

水俣病の経年的変化を知るには前向きな追跡調査が必要であり、小脳失調の経年的変化を評価する臨床スコアをつけ、追跡する。他の合併しうる疾患との経年的変化の違いから、水俣病による小脳症状と脊髄小脳変性症による小脳症状を区別することができるか調査する。

対象患者の感覚障害の有無について詳細に調査する。特に表在覚、深部感覚、複合感覚の程度について詳細に調査する。また、過去の病理組織を解析して、現在に見られる水俣病患者の神経症候と病理所見を対比する。

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) Yorifuji T, Tsuda T, Kashima S, Takano S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and its effects on hypertension in Minamata disease.
- 5) Yorifuji 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 disease declined in 25 years: Temporal profile of the neurological findings analyzed by multiple logistic regression model. *Tohoku J. Exp. Med* 2005; 205: 53-63.
- 9) Takeuchi and Eto. Pathology of mild prolonged cases of Minamata Diseases. *Recent Advances in Minamata Disease studies*. 1986
- 10) Igara. Neurological aspects of Methylmercury Poisoning in Minamata. *Recent Advances in Minamata Disease studies*. 1986
- 11) 西村肇, 岡本達明著 水俣病の科学, 日本評論社

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

Yukio Ando¹, Akihiko Ueda¹, Masaaki Nakamura²

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

²*National Institute for Minamata Disease*

Keywords: methylmercury, high-dose exposure, cerebellar ataxia, pediatric, clinical symptom

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 20 patients who were officially diagnosed as Minamata disease. The mean age of these patients were 81 ± 13.9 . Five patients showed infant type of Minamata disease. They had pyramidal signs, slightly ataxia, and loss of intelligence. Three patients showed child type of Minamata disease. They also had pyramidal signs and ataxia, but had no loss of intelligence. Twelve patients showed adult type of Minamata disease. Most of them had ataxia, but had no loss of intelligence. Most of them had difficulty of walking, because they had aged complications.

○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

小泉修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

研究要旨

脳機能・脳疾患に果たすグリア細胞の役割が注目され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、昨年度までの「重金属等の健康影響に関する総合的研究」を通じ、急性期には、ミクログリアが MeHg の高感度センサーとして機能し、低濃度 MeHg (MeHg^{low}) を感知することで、ミクログリア-アストロサイト、及びグリア-神経細胞間のコミュニケーションを亢進させることで、神経保護的に働いていることを見出した³。しかし、MeHg^{low} に長期曝露されたミクログリアは、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、神経細胞障害を増悪させる原因となり得る。本年は、MeHg^{low} に長期曝露されたミクログリアの性質変化を精査することにより、ミクログリアの障害性フェノタイプの分子生物学的及び機能的性質を明らかとし、水俣病の分子病態、症状が発現する病因の一端を、グリア細胞の視点から明らかにすることを試みる。先ず、昨年まで評価できなかった (1) *in vitro* スライス培養系を用いた MeHg^{low} 長期曝露濃による神経障害評価系を確立し、(2) MeHg^{low} が障害性フェノタイプに変化するタイミング及び分子メカニズム、(3) 障害性フェノタイプ依存的な神経保護及び障害誘発様式の解明を目指して研究を行った。種々の神経変性疾患で、発症前及び重症化に先行してミクログリアが過剰に活性化すること、これが種々の脳機能障害引き金となるとの知見が報告されるようになった⁴。本研究は、水俣病症状発現メカニズムの解明にも繋がる可能性がある。

キーワード：メチル水銀(MeHg)、曝露時間依存性、障害性ミクログリア、スライス培養系

研究者協力者 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 26 年度は先ず、昨年まで評価できなかった (1) *in vitro* 大脳皮質スライス培養系を用いた低濃度 MeHg (MeHg^{low}) 長期曝露濃による神経障害評価系を確立し、(2) MeHg^{low} によりミクログリアが障害性フェノタイプに変化するタイミング及びその分子メカニズム、(3) 障害性ミクログリアによる神経障害誘発メカニズムの解明を目指して研究を行う。MeHg^{low} 長期曝露によるミクログリアの性質変化メカニズムを探ることにより、グリア細胞の視点から水俣病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。

II. 研究方法

大脳皮質スライス培養

通常の実験には、生後 6~8 日齢の C57BL6 系マウスを、またミクログリアのライブイメージングには、Iba1-EGFP マウス (Hirasawa et al., J Neurosci Res, 2005) を用いた。氷冷 HBSS 中にて素早く大脳皮質を取り出し、McIlwain tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.)により 350 μm 厚のスライスを作成した。スライスは Millicell culture insert (0.4 μm pore, 30 mm diameter, Millipore)。上に 4 スライス/インサートで培養した。培養液(MEM50%, HBSS25%, Horse serum 25%, L-glutamine 2 mM, glucose 6.5 g/l, penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 $\mu\text{g/ml}$)を 2~3 日おきに交換し、培養後 7 日目より実験を行った。

メチル水銀投与

MeHg は最終濃度 100 nM になるよう培地中に添加し、培地交換 (▼) に併せて新たな MeHg を投与した。

Ca²⁺ imaging

スライス培地を BSS (Balanced Salt Saline, NaCl 150, KCl 5, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.2, HEPES 25 and D-glucose 10 mM, pH7.4)に置換後、Rhod2-AM (5 μM)及び Pluronic F127 (0.05%)を加えて 37 $^{\circ}\text{C}$, 40 min インキュベートして二光子励起顕微鏡にて観察を行った。アストロサイトの細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) カルシウムシグナルは Oregon Green BAPTA-AM (5 μM)及び Sulfo-rhodamin 101 (1 μM)で検出した。

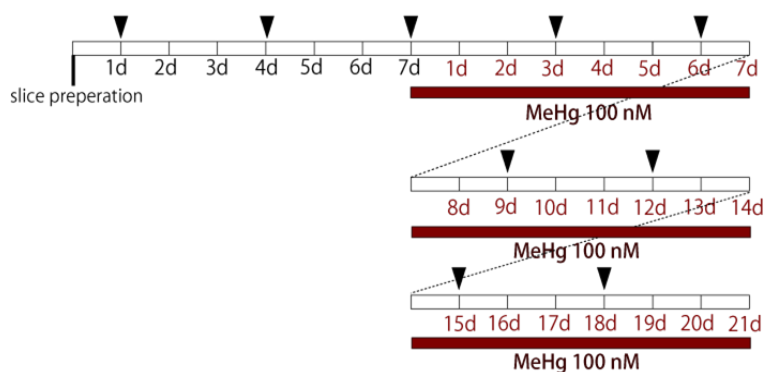


図 1 大脳皮質スライス培養系における低濃度 MeHg (MeHg^{low})の長期投与スケジュール

スライス標本作成から 1 週間は補正期間とし、その後、実験を開始した (赤ライン)。MeHg^{low} は最終濃度が 100nM となるよう、実験開始後の培地交換時に投与した (黒▼は培地交換)。本条件で、MeHg^{low} 非曝露群は実験開始 21 日後にも神経障害の指標である PI シグナルが認められず、また、MeHg^{low} 曝露群では、7~10 日以降に PI シグナルが観察できた。

二光子励起顕微鏡

スライス内部の観察は二光子励起レーザー顕微鏡システム (オリンパス FV1000MPE) で行った。対物レンズは 40 倍水浸レンズを使用した。Rhod2 のカルシウムイメージングは単一平面で 500 msec/frame で画像を取得した。Iba1 のシグナルは単一細胞全体が観察できるように z スタックをすべてのフレームにかけて観察した。

ミクログリア突起の運動性の解析

Image J プラグイン「Manual Tracking」を用いた。突起の先端部の x, y 座標を各タイムポイントでプロットし、1 分あたりの移動度から突起の速度を算出し、スタートの位置からの移

動度から伸展/退縮の距離を算出した。

ミクログリア突起の長さ解析

Image J プラグイン「Neuron J」を用いた。「add tracings」により半自動的に各一次突起をトレースし、「measure tracings」で定量を行った。

ミクログリア突起の複雑性の解析(ショール解析)

Iba-GFP ミクログリアの GFP シグナルを二値化処理し、ImageJ プラグイン「Sholl analysis」にて細胞体から 1 μm 毎に同心円を描き、交差する突起の数を定量化した。

免疫染色

スライスをパラホルムアルデヒド(4%, 1 h@RT)にて固定し、0.1% Triton-X 入り PBS(PBS-T)にて処置(1h@RT)後、3% ヤギ血清入り PBS-T にてブロッキング(1 h@RT)を行った。1 次抗体と反応(24 h@4°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。

ウェスタンブロット

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°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(24h @ 4°C)させ、HRP 結合 2 次抗体と反応(1 h@RT)させた。バンドの検出は LAS4000 にて行った。

死細胞の評価

Propidium Iodide(PI)(5 mg/ml)を加え、37°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。

(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

MeHg^{low} に暴露された急性期のミクログリア-アストロサイト-神経細胞連関に注目した解析により、これまでに得られた結果を以下にまとめた (図 2)。

1. 低濃度 MeHg (MeHg^{low}) を感知したミクログリアは、Ca²⁺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⁵、
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 $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ 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。
 5. しかし、昨年度までの研究により、長期投与によりミクログリアは障害性フェノタイプに変化する可能性が示唆され、このフェノタイプ変化が、水俣病が難治であること及び慢性的であることと関係する可能性が示唆された。

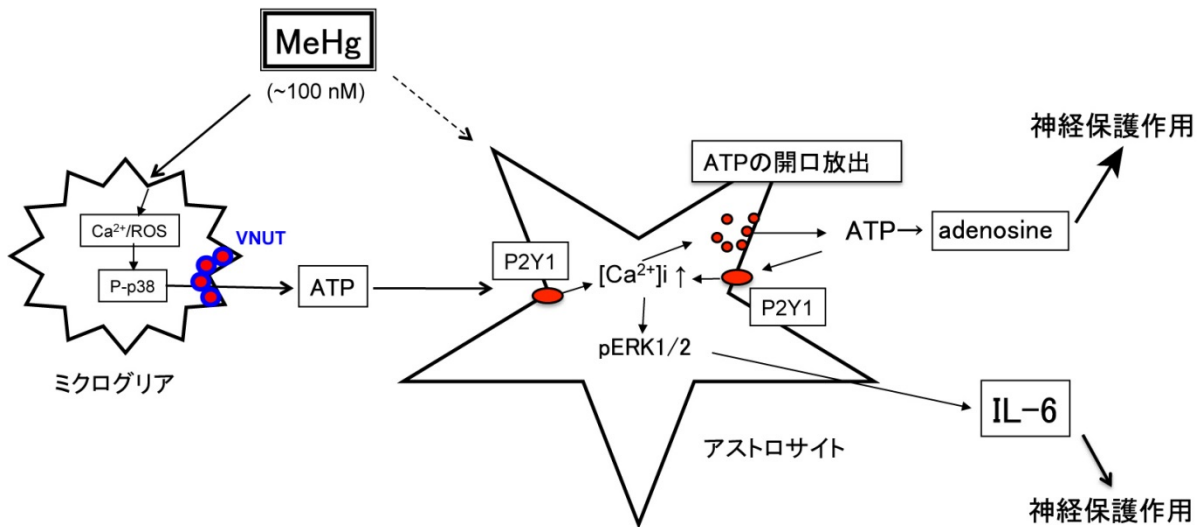


図2 低濃度 MeHg に暴露されたミクログリア及びアストロサイトの応答

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 はアストロサイト P2Y1 受容体 (P2Y1) にてこの情報を感知し、 Ca^{2+} 及び ERK1/2 を介して IL-6 を産生・放出を、さらに ATP の放出を引き起こす。(1)ATP (又は代謝された adenosine) は直接的に (過剰興奮抑制)、又は 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 H25 年度の推進委員、評価委員の先生方からのコメントは以下であった。

推進委員、評価委員のコメント：

- ・ 長期曝露のスライス培養実験系が不安定で、本実験系での評価が難しい (MeHg 未処置でも長期培養により神経障害マーカーが上昇している)。長期培養に耐えられるスライス培養系を確立し、評価すること。
- ・ スライス中のメチル水銀濃度変化について考察する必要がある。
- ・ 水俣病の病態との関連性に関する考察を深めること。
- ・ 環境行政との直接的な関連が薄い。本研究が水俣病の病態解明に関連することを意識すること。
- ・ 基礎研究であることを考慮しても、水俣病という言葉が全く出てこないのはおかしい。臨床を意識すること。

以上を踏まえ、本年は、先ず、長期観察が可能となるスライス培養系の確立に注力した。次いで本実験系を用い、低濃度 MeHg がミクログリアのフェノタイプ変化に与える影響、その分子メカニズム、さらに障害性に変化したミクログリアがアストロサイト及び神経細胞に与える影響の解明を目指した。また、これらを実際の水俣病の病態と関連付けるべく、水俣病の症状が発現する点にミクログリアのフェノタイプ変化を結びつけられるよう、意識して行う。

1. 大脳皮質長期スライス培養確立

これまでの大脳皮質（又は海馬）スライス培養法では、長期間に渡りスライスコンディションを良好に保つことが出来ず、MeHg 未処置のコントロール群でも神経障害（PI 陽性シグナル）が出現し、MeHg の長期作用を解析することが出来なかった

（昨年度までは、投与2日目までの急性期応答及び7日目まで長期応答の解析）。そこで本年度は先ず、長期培養法の確立を始めた。培地条件、スライス作成法、補正法等の改良（図3上段）により、実験開始3週間（補正期間を併わせると4週間）は、正常なスライスコンディションを保つことが可能となり、以前のようなコントロール群でPI陽性シグナルを認めることは無くなった（図3下段）。本年は、この条件において、MeHg^{low}長期曝露がミクログリア、アストロサイト及び神経細胞に与える影響について解析を行った。

2. 神経細胞保護的と神経細胞傷害的フェノタイプ

MeHg^{low}曝露により惹起されるPI強度の頃日変化を示した。PIシグナルは、7日以降に急造した。ミクログリアの影響を調べるために、ミクログリア活性化を阻害するminocyclineを種々のタイミングで投与した。Minocyclineの急性期（1-7日）投与は、PIシグナルを亢進させた、つまりこの時期のミクログリアは神経細胞保護的に働いていることが示唆された。ところが14日以降の投与により、PIシグナルは逆に抑制された。つまり、この時期のミクログリアは神経傷害性フェノタイプであることが示唆された。そこで、これら

以前の条件	新しい条件
培地の組成 ・ MEM 50% ・ HBSS 25% ・ Horse Serum 25% ・ Glucose 6.5 g/L ・ Peni-St 1% ・ L-Glutamine 2 mM	培地の組成 ・ <u>2x MEM 25%</u> ・ HBSS 25% ・ Horse Serum 25% ・ Peni-St 0.5% ・ <u>Tris-(hydroxymethyl)aminometane</u> 60 mg/100ml ・ <u>7.5% NaHCO₃</u> 455 ul/100 ml ・ <u>HEPES</u> 6.25 mM 操作 ・ 切片作成後に 30 - 60 min 氷冷

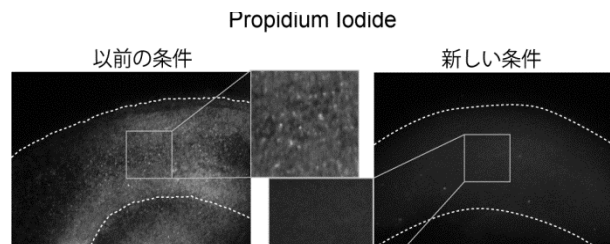


図3. 長期大脳皮質スライス培養法の確立

上段：変更箇所

下段：28日（補正7日+実験21日）培養後の大脳皮質スライス培養標本のPI染色像。長期培養そのもにによる神経細胞障害は激減した。

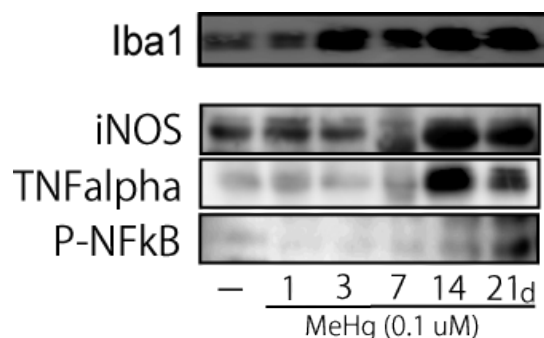


図4. MeHg^{low}曝露による各種M1マーカー発現の経日変化

MeHg^{low}曝露1-21日後大脳皮質スライス培養標本のIba1、iNOS、TNFα及びpNFκBの経日的変化をwestern blotにより検出した。

の時期のミクログリアの生化学的マーカーの探索を行った。

3. MeHg^{low} 短期 (1-2 日) から長期 (21 日) 曝露により変化するミクログリアの変化

(1) 発現分子変化の生化学的解析

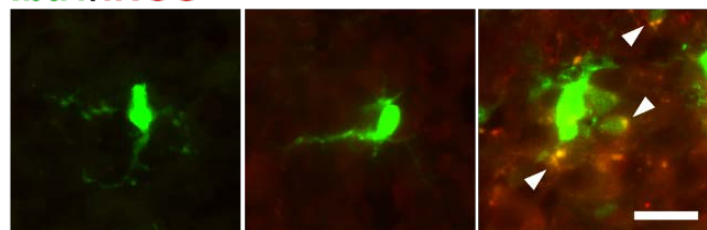
ミクログリアはその活性化状態によって、便宜的に神経障害的「M1」フェノタイプ並びに神経保護的「M2」フェノタイプに分類されている。M1 マーカーとして iNOS, TNF α , IL-1 β , IL-12, IL-23, CD86, CD80, MHC class II, IL-1RI, TLR2, TLR4, CCL2~11 などが、一方 M2 マーカーとしては Arginase-1, IL-4, IL-10, Ym1, IGF1, IL-1Ra, TGF β などが知られている。そこで、これら活性化マーカーを指標として長期間の MeHg 曝露がミクログリアの M1/M2 フェノタイプ変化に与える影響を検討することにした。

大脳皮質スライス標本に MeHg^{low} (100 nM) 刺激を行い、経日的に M1 マーカーの発現変化を western blot により検出した。まず、活性化により発現が亢進することが良く知られているミクログリアマーカー Iba1 は、MeHg^{low} 曝露直後から発現が亢進し、21 日後までその高い発現は持続した。従って、Iba1 は MeHg^{low} の曝露時間依存的に変化するミクログリアの性質を区別するバイオマーカーにはなり得ないことが解った。また、同時にミクログリアの活性化には、複数のタイプがあることも明らかとなった。さらに、ミクログリアの活性化及び強炎症応答を制御するマスター分子

の 1 つ、NF κ B のリン酸化(pNF κ B) は、MeHg^{low} 短期曝露 (1-7) ではむしろ低下し、長期曝露 (14-21 日) により初めて顕著シグナルの亢進が認められた (図 4)。M1 マーカーである TNF α 及び iNOS の発現は無処置群及び MeHg^{low} 曝露 1 日では明瞭なシグナルが観察されなかったが、MeHg^{low} 曝露 14~21 日後にこれらシグナルの顕著な亢進が認められた。(図 4)。これらシグナルの責任細胞を明らかとする

目的から、MeHg^{low} 曝露 1 及び 21 日後の大脳皮質スライス培養標本の免疫組織学的解析を行った (図 5)。iNOS 又は TNF α 抗体と Iba1 (ミクログリアの分子マーカー) との二重染色により調べたところ、これら M1 シグナルの発現パターン

Iba1/iNOS



Iba1/TNF α

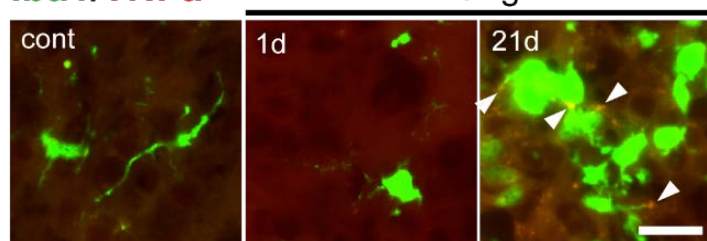


図 5. MeHg^{low} 長期曝露によるミクログリアにおける M1 マーカーの発現パターン

MeHg^{low} 曝露 1 及び 21 日後の大脳皮質スライス培養標本の iNOS 及び TNF α (alpha) の免疫染色像。ミクログリアの同定は Iba1 染色により行った。

一方、M2 マーカーである Arg1(Arginase-1)の発現を検討したところ、無処置群(cont)では一部の細胞に発現が見られ、MeHg^{low} 1日曝露でシグナルが増加している細胞が観察された(図 6, 矢頭)。しかし 21 日後には、同シグナルは大きく減弱していた。

以上、MeHg^{low} 曝露により、ミクログリアは活性化するが (Iba1)、この活性化には、弱炎症性 (低 pNFkB) と強炎症性 (高 pNFkB) のものがあり、前者は M2 マーカー Arg1 の増加と、後者は M1 マーカーの iNOS 及び TNFα の発現の時空間パターンとよく一致していることが明らかとなった。

(2) 解剖学的解析 (2 光子励起レーザー顕微鏡を用いた解析)

MeHg^{low} 曝露されたミクログリアの経日的変化を形態及び機能的フェノタイプの側面から明らかとする目的で、ミクログリアの形態及び突起の動きを精査した。

ミクログリアのライブイメージングには Iba1-EGFP マウス(Hirasawa et al. J Neurosci Res 2005)を用いた。通常の蛍光顕微鏡及び共焦点レーザー顕微鏡では、

スライス標本の表層しか観察することが出来ず、スライス培養の補正期間を経ても、長い突起を有する静止型ミクログリアの形態を観察することは出来なかった。しかし、二光子励起顕微鏡(FV1000MPE)を用い、より組織透過性の高い長波長励起光を使い、スライス内部のミクログリアの形態及び動きを解析した。スライス作成後、補正期間を経た培養 7 日目のスライス組織内ミクログリアは、図 7 のように小型細胞体に長く分岐のある突起を複数持つ形態を呈し (図 7 右)、これは 10 週齢の *in vivo* 大脳皮質ミクログリアの形状(図 7 左)とよく一致していた。

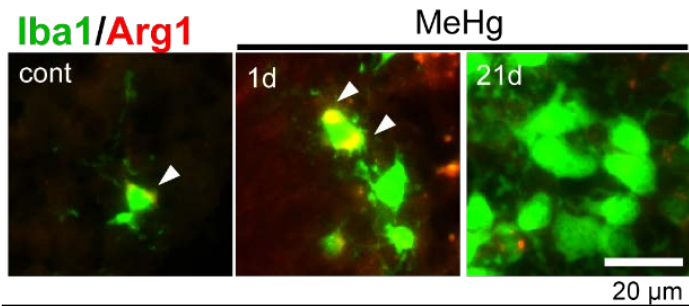


図 6. MeHg^{low} 長期曝露によるミクログリアにおける M2 マーカーの発現パターン
MeHg^{low} 曝露 1 及び 21 日後の大脳皮質スライス培養標本の Arg1 の免疫染色像。ミクログリアの同定は Iba1 染色により行った。

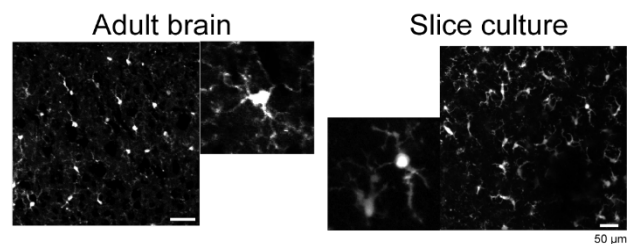


図 7 スライス培養ミクログリアの形態
10 週齢大脳皮質ミクログリア (左、adult brain) 及び培養 7 日後の大脳皮質を用いてスライス培養 (右、slice culture) のミクログリアの形態比較。

次に、MeHg^{low} 処置時間によるミクログリアの形態及び運動性に対する影響を調べた。スライスを無処置(cont)、MeHg^{low} 曝露1日または21日の3群に分けてGFP陽性ミクログリアの形態を比較した(図8)。これらの変化を

より定量的に評価するため、(a)一次突起(primary process)数、(b)突起の長さ、(c)細胞体の大きさ。突起の数はMeHg^{low} 処置によって時間依存的に減少した(図8a)。突起の長さはMeHg^{low} 1日では変化が無かったが、21日処置では大きく減少した(図8b)。細胞体の大きさは非常に小さな差であるが、MeHg^{low} 1日で有意に増加しており、21日では著しく大きくなった(図8c)。また、突起の複雑性を解析するために頻用されるショール解析を行った(図5)。ショール解析は細胞体の中心から同心円を描き、交差する突起

の数をプロットする解析法である。ショール解析の結果、MeHg^{low} 1日(図5, 青線)では突起の長さ自体は大きな変化がないものの、突起の複雑性が減弱していることが明らかとなった。MeHg^{low} 21日(図5, 赤線)ではそのような変化がさらに顕著に現れていた。

通常ミクログリア(静止型)は、長い突起を忙しく動かしながら、あたかも周囲を監視しているような動きを取る⁶。しかし、活性化したミクログリア突起は退縮し、動きも減る。そこで、ミクログリアの性質を突起の運動性の面から解析した。ミクログリア1細胞の突起全体が入るようにzスタック画像を15秒毎に撮影してその運動性を解析した。無処置群では突起の伸長/退縮が観察され、20μm以上も伸長するものが観察された(図10, Control)。MeHg^{low} 1日でも同様に突起の伸長/退縮が観察されたが、多くのものが短い距離しか伸長/退縮しなかった。突起の運動スピード自体には変化はなかった(図10b)。

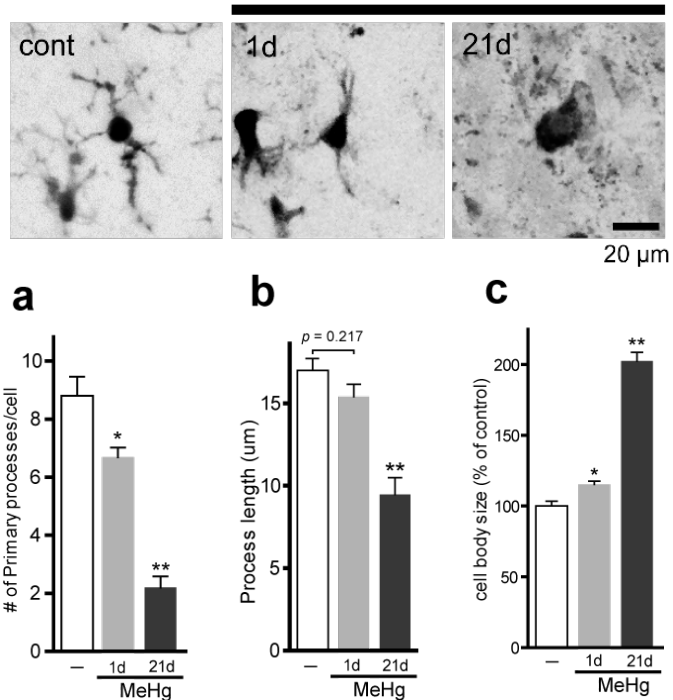


図8 MeHg^{low} 曝露によるミクログリア形態の経日変化
 上段: MeHg^{low} 曝露後1及び21日後の大脳皮質スライス培養のミクログリアの形態比較。
 下段: 突起数 (a), 突起長 (b)、細胞体の大きさ (c) の比較

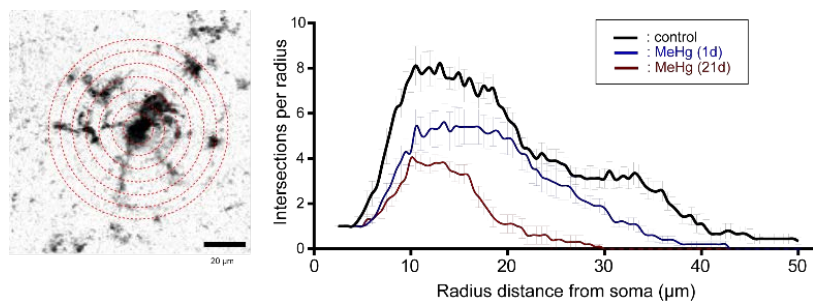


図9 MeHg^{low}によるミクログリア形態変化のSholl解析
 ミクログリア中心から種々の長さの同心円を描き(左)、接触する突起数を中心からの距離に対してプロットした(右)。

MeHg^{low}21 日では突起の運動スピードが著しく減少していた。

以上、ミクログリアの形態及びその運動性を精査することにより、MeHg^{low} 短期から長期曝露により大きく変化する特徴は、突起長の短縮と細胞体肥大化、さらに突起の運動性低下であることが解った。これらの解剖学的な特徴変化が、ミクログリアの障害性フェノタイプとどのようにリンクしているのかについては、今後明らかにすべき課題である。

4. M1 マーカーの ON/OFF によるミクログリア傷害性制御

(1) 炎症性サイトカインによるアストロサイト P2 受容体変化の解析

MeHg^{low} に長期間曝露されたミクログリアは、M2 から M1 型へ、また突起数、長さが短く、その運動性が低下したフェノタイプへと変換することが明らかとなった。サイトカインアレイによる解析により、MeHg^{low}21 日後には、各種炎症性サイトカインの発現が顕著に亢進することが明らかとなった。そのうち、図 5 で示した M1 マーカーでもあり、最も顕著な発現上昇を示した TNF α の作用を検討した。TNF α はアストロサイトの P2 受容体発現を顕著に抑制することが明らかとなった（追加実験中）。従って、M1 型にモダシフトしたミクログリアは、TNF α 等のサイトカインを介し、アストロサイトの神経保護のマスター分子、P2Y1 受容体の発現を抑制することで、保護作用の消失又は、神経障害型フェノタイプとして、神経細胞の MeHg 毒性を増悪させている可能性が示唆された。

(2) ROCK 阻害薬がミクログリアのフェノタイプに与える影響

平成 26 年度成果発表回において、“人への臨床応用への道筋を”、“可能な限り水俣病に近づけた研究を”との指摘をされた。最近、ROCK 阻害薬が水俣病の神経症状を改善させることが報告された⁷。また非常に興味深い事に、ROCK 阻害薬はパーキンソン病モデル動物のドパミン神経傷害をも軽減させるが、これは、神経細胞に直接作用というわけではなく、むしろミクログリアに対する作用に起因していた⁸。そこで、ROCK 阻害薬が、本実験系の *in vitro* MeHg^{low} 長期曝露による神経傷害に対する作用、さらにミクログリアの機能に与える作用の検討研究を計画し、それらが現在進行中である。

V. 結論

大脳皮質スライス培養系を用いて MeHg^{low} の長期曝露による神経障害評価系を構築した。

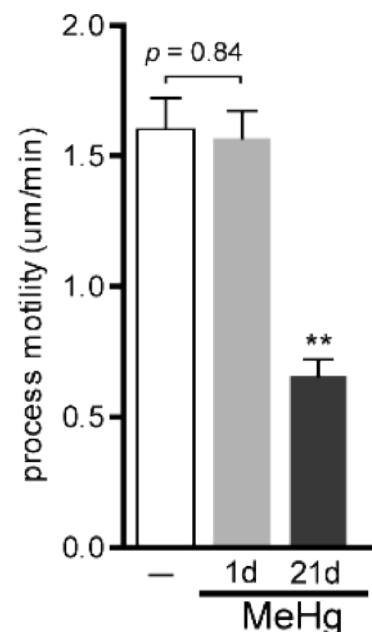


図 10 MeHg^{low}によるミクログリアの運動性の経日変化
無処置 (control), MeHg^{low} 曝露 1 日、MeHg^{low} 曝露 21 日後のミクログリアから各 5 本の突起を選び、その運動性を 30 分間観察し、突起伸長 (退縮) の平均速度を算出した。

これを用い、MeHg^{low}に短期間（1日）及び長期間（21日）曝露されたミクログリアは、それぞれ神経保護的及び神経障害的フェノタイプであることを見出した。また、生化学的、解剖学的性質を精査し、それぞれのフェノタイプの生化学的及び解剖学的性質を際立たせた。さらに、曝露時間が長くなることによるフェノタイプ変化の分子メカニズム、さらにアストロサイトに与える影響について以下の事を明らかとした。

1. ミクログリア活性化のマーカーとして頻用される Iba1 は、MeHg^{low} 曝露直後から長期に渡り発現が亢進していたことから、Iba1 は神経保護的及び神経障害的ミクログリアを区別し得るバイオマーカーにはならないことが明らかとなった。しかし同時に、「活性化ミクログリア」にも複数のフェノタイプが存在することが明確になった。
2. ミクログリアは、MeHg^{low} 短期曝露により Arg1 を発現する M2 型ミクログリア様の性質を呈しするのに対し、長期曝露では iNOS, TNF α 等の M1 型ミクログリア様の性質に変化した。さらに、ミクログリアの強い炎症応答に関与する NF κ B のリン酸化型は、短期曝露時には抑制されており、長期曝露により発現が亢進された。このような生化学的な特徴が、これらミクログリアフェノタイプと関連することが強く示唆された。
3. 解剖学的な解析により、ミクログリアは MeHg^{low} 短期曝露ではあまり影響を受けないが、MeHg^{low} 長期曝露により突起数が減り、突起長が短縮し、さらにその運動性が顕著に低下した。これら解剖学的な性質の違いが、ミクログリアの神経保護及び神経障害性とのように関連するののかについては今後の課題である。
4. MeHg^{low} 長期曝露によりミクログリアで強発現する M1 ミクログリアマーカー、TNF α は、アストロサイトの P2Y1 受容体発現を顕著に低下させた。ATP/P2Y1 受容体を介した一連の神経保護メカニズムの消失、さらにアストロサイト Ca²⁺ホメオスタシスの消失が、ミクログリアによる神経障害性と関連している可能性が示唆された。

以上、MeHg^{low} 曝露時間に応じてそのフェノタイプを神経保護的から障害的に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障害性と強く関連していることが明らかとなった。Lapham ら⁹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と、この小児に神経症状が認められなかったことから、水俣病におけるミクログリアの神経保護的な役割が強く示唆される。種々の神経変性疾患で、発症前及び重症化に先行してミクログリアが過剰に活性化すること、これが種々の脳機能障害引き金となるとの知見が報告されるようになった。例えば、加齢に伴う種々の脳機能変化においても、先行してミクログリアが過剰に活性化し、これが引き金となり種々の脳機能ホメオスタシス破綻及び脳機能低下が惹起される⁴。本研究成果を直ぐにこれらの既報に外挿することは出来ないが、脳内外環境の微細な変化により、MeHg^{low} 曝露ミクログリアが脳保護性から脳傷害性フェノタイプへとドラスティックに変化すること、この変化が水俣病の発現に重要な役割を果たす可能性が示唆された。これは、グリア細胞の視点から水俣病分子病態の解明、さらに症状悪化抑制における新規戦略に繋がる基礎データとなり得ると考える。

VI. 次年度以降の計画

1. ミクログリアのフェノタイプ変化の分子メカニズムを解明する。

2. ミクログリアのフェノタイプ変化が、アストロサイト機能、神経機能に与える影響の精査と、その分子メカニズムの解明。特に P2Y1 受容体の発現制御の視点から、解析を行う。
3. ミクログリアのフェノタイプ変化の制御と MeHg 神経毒性との関連性を解明する。
4. 可能であれば、ミクログリアのフェノタイプ変化を抑制する候補物質の探索。

<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. Zhang, G., *et al.* Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature* **497**, 211-216 (2013).
5. Imura, Y., *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**, 1320-1330 (2013).
6. Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* **29**, 3974-3980 (2009).
7. Fujimura, M., Usuki, F., Kawamura, M. & Izumo, S. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **250**, 1-9 (2011).
8. Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A.I., Villar-Cheda, B., Guerra, M.J. & Labandeira-Garcia, J.L. Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology* **85**, 1-8 (2014).
9. Lapham, L.W., *et al.* An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology* **16**, 689-704. (1995).

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) >

33. Nghia, N.A., Hirasawa, T., Kasai, H., Obata, C., Moriishi, K., Mochizuki, K., Koizumi, S. and Kubota, T. (2015) Long-term imipramine treatment increases N-methyl-D-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. **Eur J Pharmacol**, in press
32. Narita, K., Sasamoto, S., Koizumi, S. Okazaki, S., Nakamura, H., Inoue, T. and Takeda, S. (2015) TRPV4 regulates the integrity of the blood-cerebrospinal fluid barrier and modulates transepithelial protein transport. **FASEB J**, in press
31. Hirayama, Y. Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H. and *Koizumi, S. (2015) Astrocytes mediate ischemic tolerance in the brain. **J Neurosci**, in press.
30. Sukigara, S., Dai, H., Nabatame, S., Otsuki, T., Hanai, S., Honda, R., Saito, T., Nakagawa, E., Kaido, T., Sato, N., Kaneko, Y., Takahashi, A., Sugai, K., Saito, Y., Sasaki, M., Goto, Y., Koizumi, S. and Itoh, M. (2014) Astrocyte Pathology of Cortical Dysplasia with Intractable Epilepsy: Expression Analyses of Astrocyte-Related Receptors. **J Neuropathol Exp Neurol**, 134, 1465-1468.

29. Miyamoto, T., Mochizuki, T., Nakagomi, H., Kira, S., Watanabe, M., Takayama, Y., Suzuki, Y., Koizumi, S., Takeda, M. and Tominaga, M. (2014) Targeting Piezo1 expressed in urothelial cell cultures with GsMTx4 treatment inhibits the stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release. **J. Biol. Chem.**, 289, 16565-16575.
28. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki, Moriyama Y, Gachet C and *Koizumi S. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission **Scientific Reports**, **4**, 4329 (2014)
27. Inoue, K., Komatsu, R., Imura, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Moriyama, Y. and *Koizumi, S. (2014) Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, 134, 1465-1468.
26. Imura, Y., Morizawa, Y., Komatus, 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. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y1 receptor-mediated pathways. **PLoS One**, in press.
23. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and *Koizumi, S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of tonic P2Y₁₄ receptor-mediated signal(s). **Cell. Mol. Neurobiol.** in press.
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** in press.
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>

国際学会

1. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki, Moriyama Y, Gachet C and Koizumi S. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission FENS2014, July 5-9, 2014, Milano, Italy

国内学会

1. 小泉修一、篠崎陽一、メチル水銀の神経毒性におけるグリア性 ATP と IL-6 の役割(シンポジウム)第 41 回日本毒性学会学術年会、神戸、2014 年 7 月 2~4 日
2. 篠崎陽一、小泉修一、ミクログリアは ATP によるグリア伝達を介してアストロサイトの神経保護作用を誘導する、第 87 回日本薬理学会年会、仙台、2014 年 3 月 19~21 日
3. 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

4. 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^{*1}

**1 Department of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi*

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

Abstract

Activation of glial activation includes both neuroprotective and neuro-hazardous effects. We previously showed that microglia function as a high-sensitive sensor to monitor changes in brain microenvironment and, is changed into neuroprotective phenotypes in response to low concentration of methylmercury (MeHg^{low}). However, effects of long-exposure MeHg^{low} on microglial function remained to be clarified. Here we found following 3 new findings. (1) Firstly, we established a long-term slice-culture system of cortex of mice *in situ*, by which we could evaluate the effect of long-exposure MeHg^{low} on the neuronal functions. Using this system, we found that when stimulated for over 2 week, microglia changed their phenotype from neuroprotective to hazardous ones. (2) We found molecules that could characterize neuro-hazardous microglia, among which M1 factors such as iNOS, TNF α were drastically increased. Exogenously applied TNF α induced neuro-hazardous microglia. Inflammatory diseases or age-dependent increase in pro-inflammatory cytokines might be an important factor that causes phenotypical changes of microglia from neuroprotective to neurohazardous under exposure of MeHg^{low}. (3) We also found that a decrease in both motility and complexity of processes could be biomarkers of hazardous microglia.

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

主任研究者 村田勝敬 (秋田大学大学院医学系研究科環境保健学・教授)
分担研究者 吉田 稔 (八戸学院大学人間健康学部・教授/学部長)
 苅田香苗 (杏林大学医学部衛生学公衆衛生学・准教授)
 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 (尚絅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・部長)
研究協力者 岩田豊人 (秋田大学医学部社会環境医学環境保健学・助教)

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、特に金採掘に伴う水銀汚染はブラジル、東南アジア、アフリカなどの発展途上国をはじめとした世界的な問題である。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疫学研究を主体とした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。①近年 **OpenAccess** 誌が多数発行され、その結果メチル水銀・水銀に関する論文数も増加傾向にある。しかし、これは読むに値する論文が増えたことを必ずしも意味していないので、別途検討する必要がある。②2013年10月10日に熊本で「水銀に関する水俣条約」が採択、署名されたことを受けてか、メチル水銀の疫学研究論文が激減した。③メチル水銀の主たる健康影響は神経影響と考えられているが、神経発達に及ぼす他の有害因子 (PCBs や鉛) も古くから知られており、これらの同時曝露を想定した研究が増えてきた。一方で、メチル水銀研究の中心課題が失せ、次なる課題が模索されているように考えられた。④大規模出生コホート研究が世界の彼方此方で行われるようになったが、胎児期曝露と出生後曝露のいずれの影響かを検討する方法も必要となってきた。⑤メチル水銀の毒性に対しセレン化合物が拮抗作用を持つことが水生生物、*in vitro* 実験などで解明されつつあるものの、疫学研究ではまだメチル水銀毒性に対しセレンが拮抗作用を持つとする確実な証拠となっていない。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、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して、今後も継続的な文献収集とその内容の吟味を続けていくことが重要であると考えられた。

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、レビュー

I. 研究目的

水俣病は発生から 50 年以上が経過しており、日本では健康影響が危惧されるような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続けている。また、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。国際的には小児における低濃度水銀の曝露評価およびその健康影響に関する問題や、火力発電所からの化石燃料の燃焼に伴う水銀蒸気の湖沼への蓄積や、中国、ブラジル、東南アジア、アフリカなどの発展途上国における金採掘および小規模水銀鉱山による水銀汚染が問題になっている。このような観点から、低濃度曝露を含めた国際的なメチル水銀（および無機水銀を含む）曝露による健康障害（症候、症状、各種検査結果）に関する文献レビューを行う。このレビューを通して、メチル水銀（金属水銀・無機水銀を含む）曝露と症候および健康影響との関係を検討する。

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、長鎖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、検出され難くなるのが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か、また曝露指標としてどの生体試料を用いたか、生体試料をどの時期に採取した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。

新たな化学物質が新規に多数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々減少している。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理解してもらうために、雑誌・学会等の場で繰り返し発表することにより、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、②2014年に発表された海外と我が国の疫学研究論文の概要、③メチル水銀と他の化学物質（例えば、セレン化合物）の相互作用と、それにより現れる症候および健康影響に関するレビュー、④発展途上国で顕在化している水銀の健康影響に関するレビューを行い、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、2014 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メチル水銀毒性の評価に当たっての考慮すべき事項（解析方法、交絡因子）の評価、④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する文献の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の調査であり、研究対象者への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) をキーワードとしている総論文数を 2003 年から 2014 年まで PubMed を用いて検索すると、143 編～339 編 (全言語) であり、このうちヒトを扱った論文数は 1 年当たり 60 編から 122 編であった (表 1)。“methylmercury” を扱った総論文数は徐々に増加し、2003 年と比べると倍増している。これは、近年 OpenAccess 誌の発刊が急増しているためと考えられた。2003～2004 年までヒトを対象とした研究は 4 割以上を維持していたが、2005～2014 年まで 4 割以下であった。2014 年にはこれまでになくメチル水銀関連論文のうち疫学研究が激減した。同様に、“mercury” をキーワードとする論文も 2 倍近くに増えた。このうちヒトを扱った水銀論文の比率は 2003 年時点で 40% であったが、2005 年以降 35% 以下にまで減少し、特に 2014 年には (前年度比でも半分以下の) 13.3% とこれまでの最低となった。

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⁾、こ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^{10,11)}、フェロー諸島とセイシェルのメチル水銀論争に一旦終止符が打たれ、メチル水銀に関する関心も薄れてきたかのように思われる^{12,13)}。一方で、世界各地で出生コホート研究が行われるようになり¹⁴⁾、これらの調査目的により異なるものの神経発達に影響するメチル水銀は無視できない化学物質であり、暫くの間はメチル水銀のヒトへの影響等を扱った論文が報告されよう。ただ、2013 年の熊本における「水銀に関する水俣条約」の採択・署名を受け^{15,16)}、ヒトを対象とする研究に関心が薄れてきたのかもしれない。

表 1 「メチル水銀」関連の PubMed 上の論文数の推移 (2015 年 1 月 24 日現在)

	西 暦 年											
	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
“methylmercury” の 入った論文数	143	162	206	231	300	300	259	292	339	337	293	337
ヒトを対象とした 論文数	60	74	67	75	107	111	85	114	117	122	97	61
割合 (%)	42.0	45.7	32.5	32.5	35.7	37.0	32.8	39.0	34.5	36.2	33.1	18.1
“mercury” の入っ た論文数	898	983	1240	1327	1422	1504	1440	1575	1744	1776	1752	1763
ヒトを対象とした 論文数	361	374	398	440	456	505	435	510	534	528	504	235
割合 (%)	40.2	38.0	32.1	33.2	32.1	33.6	30.2	32.4	30.6	29.7	28.8	13.3

2) 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^{10,11)}、長鎖 *n*-3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の影響を考慮すると、メチル水銀の発達神経影響は現れるとの結論を得て、当初の役目は終えた。その後、2つの先行研究は方向を転換し、独自の研究を進めている。

■ 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、昨年の文献検索以降の論文として7編がPubMedに掲載されている¹⁷⁻²³⁾。そのうちの3編にはメチル水銀が含まれず、ポリ塩化ビフェニル (PCBs) と肥満¹⁷⁾ないし精子性染色体比¹⁸⁾との関連性、フェロー諸島出生コホート男性の精子形状と生殖ホルモンの経時的推移¹⁹⁾に関連する論文であった。

魚や海産食品の汚染物質の1つであるメチル水銀は、発達段階で神経系に悪影響を及ぼしうる。一方、海産食品中のPUFAは脳の発達に良好な影響を及ぼすとの認識が広く知られるようになった。したがって、水銀毒性とともにPUFAの栄養学的利点を考慮しないと、発達影響が過小評価されてしまう恐れがある。Choiらは臍帯血と母親毛髪で胎児期メチル水銀曝露量が判っているフェロー諸島の子ども176名で臍帯血漿リン脂質中の脂肪酸相対濃度を測定し²⁰⁾、7歳時の言語、運動、注意、空間、記憶に関する神経心理学的能力との関係性を評価した。カリフォルニア言語習得テスト (CVLT) の短期間想起 (%変化) は臍帯血メチル水銀が高くなるにつれ低下 (傾き-18.9、95%信頼区間=-36.3~-1.51) する関係が観察されたが、重回帰分析の中に交絡因子として脂肪酸濃度を入れると、この関連性はさらに強まった (-22.0、95%CI=-39.4~-4.62)。構造分析モデルで脂肪酸濃度を調整しても、記憶機能の低下 (学習課題検査やCVLTの短期間想起の低成績に対応) はメチル水銀曝露の増加と関連した (-1.94、95%CI=-3.39~-0.49)。以上より、メチル水銀曝露の影響を過小評価することのないようにするため、*n*-3脂肪酸を当初より測定しておく必要がある。但し、脂肪酸濃度を絶対値で評価するか^{17,18,24-28)}、相対濃度で評価するかで結果は大きく変わる可能性があり、どちらが良いのか今後決定されねばならない。

これまでのメチル水銀研究は、胎児期の曝露濃度がその後の健康 (神経発達) に継続的に影響するという仮定の上で解析されてきた。しかしながら、東日本大震災のような突発的な大災害が追跡期間中に発生すると、人々の食生活が大きく変化する。かかる意味で、生後のメチル水銀曝露がどの程度神経行動に影響するのかは明確でない。その上、小児の食事由来の曝露は母親のものと相関するので攪乱を生じる可能性もある。Grandjeanらはこの問題を1986-87年生まれのフェロー諸島出生コホートを用いて検討した²¹⁾。使用した曝露指標は、出産時母親毛髪と臍帯血、それに7歳調査時の子の血液・毛髪中の水銀濃度 ($N=923$) であった。回帰分析では、7歳児血中水銀 ($N=694$) は神経心理検査指標と弱い関連を示したが、視覚空間記憶は有意な負の関連を示した。相互に補正することにより胎児期曝露の見かけ上の影響は減ったが、このような補正では或る誤差を含みやすい曝露指標により相関関係が過小評価され易くなる。共分散構造分析では、全種類のメチル水銀曝露指標を“総曝露量を反映する潜在曝露指標”と見做す。この潜在曝露指標は胎児期の曝露指標を主たる情報としており、神経発達異常に有意な関連を示した。一方、生後のメチル水銀曝露は、特に、視覚空間の処理・記憶に関する神経毒性影響を示した。以上、異なる時点

で得られた曝露情報を回帰分析に入れるのは有益でなく、このような場合には共分散構造分析が用いられるべきと主張した。

Kim らは、デンマーク領フェロー諸島の出生コホート集団 514 名のデータに韓国人母子環境保健調査の対象者 797 名を加えて、臍帯血および母体血中の水銀濃度の分析・比較を行った²³⁾。各種分析値間の関係を、線型回帰モデルと共分散構造分析 (SEM) により交絡因子を調整して検討したところ、臍帯血中水銀濃度はヘモグロビン値と有意な関連があり、潜在的なメチル水銀曝露をよく反映していたのは母体毛髪より臍帯血中の水銀濃度であった。母体血と臍帯血中水銀濃度をヘモグロビン補正すると、関連性はより強化されたが、母体血セレン濃度で補正した場合は変わらなかった。小児発達におけるメチル水銀毒性作用の指標として臍帯血水銀濃度を用いる際、著者らはセレン濃度よりむしろヘモグロビンの値を重視した方が良いと述べた。ただ、本研究はデンマークと韓国の精度管理の異なる研究機関データを合算しておこなっており、研究デザインに無理があるようにも映る。

メチル水銀、PCBs、有機フッ化化合物 (PFCs) は彼方此方に存在する難分解性の環境化学物質であり、神経系や免疫系への毒性が疑われている。動物実験では組織障害により自己抗体が生じる事が知られている。しかし、毒性物質の曝露後に自己抗体がヒトで同様に作られ、検出されるのか否かは知られていない。そこで、Osuna らは環境化学物質に曝露した 7 歳児で神経ないし非神経の抗原に特異的な自己抗体が検出できるかどうか検討する予備的研究をおこなった²²⁾。胎児期と 7 歳時の水銀、PCBs、PFCs 曝露はフェロー諸島の 38 人の子供で測定した。子ども達は海産食品によってこれらの化学物質に幅広いレベルで曝露されていた。神経 (ニューロフィラメント、コリンアセチル転移酵素、アストロサイトグリア線維性酸性蛋白、ミエリン塩基性蛋白)、非神経 (アクチン、デスミン、ケラチン) の抗原特異的 IgM、IgG 抗体の濃度を測定し、これらの自己抗体の濃度と化学物質曝露との関連を線形回帰分析で検討した。7 歳時血水銀濃度は複数の神経、非神経特異的抗体 (主に IgM) の力価と正の関連があった。さらに、胎児血の水銀と PCBs は抗ケラチン IgG と負に関連し、胎児血 PFOSs は抗アクチン IgG と負に関連した。これらの探索的な知見は、自己抗体が環境化学物質曝露後にヒト末梢血中で検出されうる事を示す。曝露と非神経抗原特異的抗体との関連は予期されたものではなかったが、これらの化学物質は未知なる毒性を有する可能性を示唆している。

■ 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 2013 年後半から 2014 年までに 2 編の論文が発表されている^{29,30)}。このうちメチル水銀ないし水銀に関連する研究は以下の 1 編であった。

疫学研究において、胎児発達の指標 (出生体重) への長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA) およびメチル水銀の複合曝露の影響に関して明確な結論が出ていない。van Wijngaarden らはセイシェル共和国で生まれた子ども 230 名の出生時体重と妊娠 28 週と出産後の母体血中の PUFA 濃度および出産時毛髪メチル水銀濃度を収集し、これらの関係を検討した²⁹⁾。子どもの性別、在胎週数、母親年齢、妊娠中喫煙習慣、妊娠中の体格指数 (BMI)、母親社会経済状態、出生順位、妊娠中糖尿病の有無、妊娠中飲酒習慣などの影響を除外するため重回帰分析を用いて解析した。出生時体重の

平均は 3,252 g (1,654~4,450 g) であり、在胎週数は平均 39 週 (34~41 週) であった。胎児期メチル水銀曝露および PUFA は出生児体重と関連は見られず、性別と在胎週数が唯一の予測変数であった (男性と在胎週数の長い場合に出生児体重は大きかった)。以上より、メチル水銀や PUFA の出生時体重との関連性を支持する所見は得られなかった。

■ 世界のメチル水銀関連論文

海外での最近の疫学研究として、水銀その他の環境汚染物質の影響を調べたカナダ Quebec 州のイヌイット小児発達研究がある。Boucher らは、産科診療所でリクルートした 94 人の母親から生まれた児の臍帯血を採取し、水銀、PCB、鉛、セレン、ドコサヘキサエン酸 (DHA) を測定した後、6.5~11 ヶ月児に成育した時点で、Fagan Test of Infant Intelligence (FTII) と A-not-B 課題 <注；箱 A に隠した物を乳児に探索させ、目の前で箱 B に玩具を隠して再び探索させるテストで、通常、抑制機能が働かない 9 ヶ月以下の乳児は箱 A を探索し続けてしまうが、12 ヶ月児では正しく探索できる> および Bayley Scales of Infant Development-2nd Edition (BSID-II) を実施した³¹⁾。各々の臍帯血分析項目について重回帰分析を行った結果、臍帯血 PCB 濃度が高い場合は FTII 検査の新奇選好傾向が低下し、視覚認識における記憶力低下との関連性が示唆された。臍帯血水銀の高値は A-not-B 課題の得点低下と関連し、実行機能の過渡的機能 (precursor) に関与すると云われる作業記憶の低下に係わっていた。臍帯血鉛についても FTII 検査の情報処理能力の得点低下との関連が示された。一方、これら化学物質曝露は認知・言語・運動面の発達を調べる BSID-II の成績低下に関係していなかった。乳児期に個別の認知機能を詳細に検査することにより、学童期にならないと発見できないような将来的な発達遅滞を事前に把握できる可能性がある。

Orenstein らは米国 Massachusetts 州 New Bedford の PCB 汚染のある港近くに住んでいる母親から産まれた子ども 393 名を用いて、PCBs、有機塩素系殺虫剤 (DDE)、メチル水銀の低濃度胎児期曝露と神経発達との関係を検討した³²⁾。視覚記憶、言語記憶、学習は Wide Range Assessment of Memory and Learning (WRAML) を用いて、8 (7~11) 歳時に評価し、年齢については 100±15 ヶ月に標準化した。臍帯血清 PCBs は低く、総 PCBs で血清重量当たりの平均値は 0.3 (0.01~4.4) ng/g であった。母親周産期の毛髪水銀濃度は合衆国の典型的な魚摂食集団の値であり、平均 0.6 (0.3~5.1) µg/g であった。考え得る交絡因子を調整した後の毛髪水銀 1 µg/g の増加により、視覚記憶得点は -2.8 (95%信頼区間 -5.0~-0.6, $p=0.01$)、学習得点は -2.2 (-4.6~0.2, $p=0.08$)、言語記憶得点は -1.7 (-3.9~0.6, $p=0.14$) 低下する関係があった。一方、PCBs や DDE は WRAML 指標のいずれとも有意な関連を示さなかった。以上の結果は、メチル水銀の低濃度胎児期曝露と小児期の記憶や学習 (とりわけ、視覚記憶) との負の関連を肯定するものであった。

Kalish らは米国 Massachusetts 州で実施している出生コホート研究の母子 1,103 組に対して、成人の心血管疾患の重要因子となる小児期血圧に及ぼす胎児期メチル水銀曝露の影響を検討した³³⁾。子どもが 3.2 歳時あるいは 7.7 歳時に調査で訪れた母親の妊娠中期赤血球水銀濃度の平均 (SD) は各々 4.0 (3.9) ng/g と 4.0 (4.0) ng/g であった。また、子どもが調査に訪れた 3.2 歳時あるいは 7.7 歳時の収縮期血圧は各々 92.1 (10.4) mmHg と 94.3 (8.4) mmHg であった。母子の属性を調整した後、妊娠中期赤血球水銀濃度といずれかの時期の子ども収縮期血圧との関連は統計的に有意でなかった。妊娠中期のドコサヘキサエン酸やエイコサペンタエン酸とともに母親の魚摂食量などを更に調整してもメチル水銀の血圧への影響は本質的に変わらなかった。以上より、一般米合衆国国民

のように低レベルの水銀曝露では小児血圧に影響があるように思えないと結論した。

Hsi らは台湾の母子 83 組を対象に追跡調査を行い、各種生体試料中の水銀/メチル水銀濃度と神経学的影響の関係を調べた³⁴⁾。認知、言語、運動発達を評価するために Bayley Scale of Infant/Toddler Development (Bayley-III) が用いられた。胎便中の総水銀の幾何平均は 89.6 ng/g、また 3 歳児の毛髪、手指爪、足指爪のメチル水銀濃度は各々 1.96 µg/g、0.64 µg/g、0.55 µg/g であり、3 歳児の 70% が米合衆国環境保護庁 (EPA) の基準 1 µg/g を超えていた。有意な正の相関が毛髪、手指爪および足指爪の間で観察された。これらメチル水銀レベルは子どもの魚摂取と正の相関があり、Bayley-III の表現言語得点と負の相関を示した。しかし、胎児期水銀曝露 (胎便中総水銀) は神経発達と有意な関連を示さなかった。以上より、小児期の魚多食はメチル水銀レベルに対し重大なリスク要因となり、かつ表現言語得点を低下させる可能性がある。

Basu らは Early Life Exposures in Mexico to Environmental Toxicants 出生コホートをを用いて、妊婦 348 名 (生体試料は妊娠後期の血液と臍帯血)、母子 825 組、メキシコ市で得られる 91 海産物およびツナ缶の水銀レベルを調べた³⁵⁾。妊娠後期の母体血水銀レベル (26.8±5.7 歳) は平均 3.4 µg/L であった。臍帯血水銀濃度は 4.7 µg/L であり、妊娠後期の水銀レベルと有意な相関があった (妊娠前期あるいは中期の水銀レベルとは有意な相関はなし)。子ども (10.3±2.6 歳) においては、血中、毛髪、尿中水銀レベルは平均値で各々 1.8 µg/L、0.6 µg/g、0.9 µg/L であり、相互に有意な相関があった。これらの子どもの母親の毛髪水銀濃度は 0.5 µg/g であり、子どもの毛髪水銀濃度と有意な相関があった。妊婦のツナ缶、新鮮魚、ニシン缶、貝の月当たりの平均摂取回数は各々 3.1、2.2、0.5、1.0 であった。23 海産物中の 7 個および 9 種類の市販ツナ缶の 5 個が米合衆国 EPA のガイドライン値の 0.3 µg/g を超えていた。以上より、メキシコ市の妊婦および子どもの水銀曝露は米合衆国、カナダなどの報告値よりも 3~5 倍高く、特に母親の参加者の 29~39% の水銀レベルが EPA 基準値よりも上回っていた。

Carneiro らは、ブラジルの地域住民の血漿中無機水銀とメチル水銀レベルを分析し、男女差はみられなかったが、加齢影響が認められることを報告した³⁶⁾。血漿中メチル水銀濃度の平均は 3.6 µg/L で総水銀量の 41% を占めており、魚の摂取量と相関関係が認められたのに対し、総水銀の 59% を占めた無機水銀 (平均 5.7 µg/L) は、魚の摂取量とは関係していなかった。血漿中メチル水銀濃度は酸化ストレスマーカーとも強く関連しており、慢性的な水銀曝露のバイオマーカーとして血漿中メチル水銀は有用で信頼性が高いと結論した。

3) 日本から発信しているメチル水銀研究の概要

■ 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。

2014 年の研究成果にはメチル水銀/水銀と健康影響について検討した報告はなかった^{37,38)}。2 論文のうちの 1 編で、コホートの妊婦 2,062 名から 2003~2009 年に妊娠 28~32 週時に採取された血漿中パーフルオロアルキル酸 (PFAAs) と生後 24 ヶ月児の湿疹との関係を解析した³⁸⁾。湿疹は、パーフルオロトリデカノイン酸 (PFTrDA) およびパーフルオロウンデカノイン酸 (PFUnDA) が高い母親から産まれた女兒において発症リスクが有意に低下した (各々、オッズ比 0.50、95%CI 0.30~0.81 とオッズ比 0.39、95%CI 0.23~0.64)。また、ジエチルヘキシルフタル酸 (DEHP) 曝露は動物実験で生殖毒性があることが知られているので、202 組のヒト妊娠 23~35 週の母体血から DEHP の一次代謝物であるモノエチルヘキシルフタル酸 (MEHP) を測定し、また臍帯血からエストラジオール (E2)、テストステロン (T)、プロゲステロン (P4)、インヒビン B、インシュリン様因子 3 (INSL3) も測定した。母体血 MEHP は T/E2、P4、インヒビン B と負の関連があり、特に男児ではこれらの関連が統計的に有意であった。さらに MEHP を 4 区分すると、男児で P4、インヒビン B および INSL3 が有意な減少傾向を示した。胎盤経由の DEHP 曝露は男性のセルトリ細胞とライディヒ細胞の発達を抑制する可能性のあることを示唆した。

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。2014 年には、Tatsuta らが 42 ヶ月児 387 名の知能を評価するために Kaufman Assessment Battery for Children (K-ABC) 検査を実施した²⁸⁾。臍帯血中総 PCB およびその同族体、総水銀、鉛を測定し、このうち高塩素化合物の 9 塩素化合物 (CBs) は継次処理尺度 (sequential processing) と認知処理尺度 (mental processing) 得点と有意な負の関連を示したが、この K-ABC 得点は総水銀や鉛濃度との間に有意な関係を示さなかった。なお、9CBs の負の影響は総水銀や鉛などを調整しても有意であった。また、K-ABC 得点は女兒に比べて男児で低く、9CBs と K-ABC 得点との標準回帰係数は男児においてのみ統計的に有意であった。以上より、知能は高塩素化合物 (9CBs) の胎児曝露によって障害されることが示唆された。なお、この影響が長期に亘り継続するのかどうかは今後の研究を待たねばならない。

■ わが国のメチル水銀に関連する疫学研究

国内の横断研究として、Nakamura らが伝統捕鯨地域である和歌山県太地町の湾岸地域に居住する 194 人 (男性 117 名、女性 77 名、年齢 20~85 歳) の毛髪水銀濃度を測定するとともに、各種神経学的検査 (聴覚検査、MRI、神経筋電図検査) と食事調査を実施した³⁹⁾。さらに対象者のうち 23 名については血中水銀とセレン濃度も測定された。その結果、毛髪水銀の平均値は 14.9 $\mu\text{g/g}$ であり、神経症状が出現する可能性のある下限値とされる 50 $\mu\text{g/g}$ (WHO) を上回る住民が 12 人認められた。毛髪水銀濃度は鯨肉の日平均摂取量との間に正の相関がみられ、一部の住民ではメチル水銀の高曝露が疑われた (最大は男性で毛髪水銀が 101.9 $\mu\text{g/g}$)。毛髪水銀濃度と神経学的検査結果との間に重回帰分析では関連はみられず、年齢因子のみが幾つか検査結果と関連していた。血中の水銀とセレン濃度は正の相関があり、水銀/セレンモル比は分析対象者全員が 1 未満であった。今回の調査ではメチル水銀曝露による神経症状の影響が観察されなかったが、その理由として、十分量のセレンの習慣性摂取によってメチル水銀毒性が防御 (抑制) されたのではないかと推測した。

Yan らは宮城県唐桑半島地域住民 102 世帯、189 名の頭髪メチル水銀値を調査した⁴⁰⁾。総水銀濃度の幾何平均値は成人男性 23 名で 5.74 (範囲 2.21 - 15.0) $\mu\text{g/g}$ 、成人女性 81 名で 3.78 (1.08 - 16.0) $\mu\text{g/g}$ 、子ども 85 名で 2.37 (0.6 - 10.8) $\mu\text{g/g}$ であり、頭髪総水銀 5 $\mu\text{g/g}$ を超える割合は成人男性 56.5%、成人女性 30.9%、子ども 12.9%であった。マグロとサバが地域住民によって通常食べられる魚であり、頭髪水銀濃度との有意な正の相関も各々で示された。したがって、これらの魚を高頻度かつ大量摂食していることが当地のメチル水銀曝露源と考えられた。

4) メチル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をキーワードに、前年度以降に新たに刊行された原著論文を検索・収集し、相互作用や毒性修飾影響などに着目してレビューした。大別すると、疫学研究、水生動物や水鳥の体内レベルの分析、毒性修飾影響に関する *in vivo* 実験、水域や土壌、マウス・ラットへの投与実験などに関する研究があり、近年の傾向として、海洋生物が含有する水銀やセレンの関連指標を分析した報告の割合が多くなっている。

■ 疫学的研究

Yamashita らは、魚介類の摂取量が多いと見込まれる日本人のセレンの栄養状態と水銀曝露の実態を調べる目的で、鹿児島県の離島住民 167 人 (男性 75 名、女性 92 名) の血中総セレン、セレノネイン、メチル水銀、無機水銀、長鎖多価不飽和脂肪酸 (LC-PUFA) を測定した⁴¹⁾。著者グループはこれまでの研究で、マグロ類に多く含まれるメチル水銀の解毒機能を持つ新規のセレン化合物

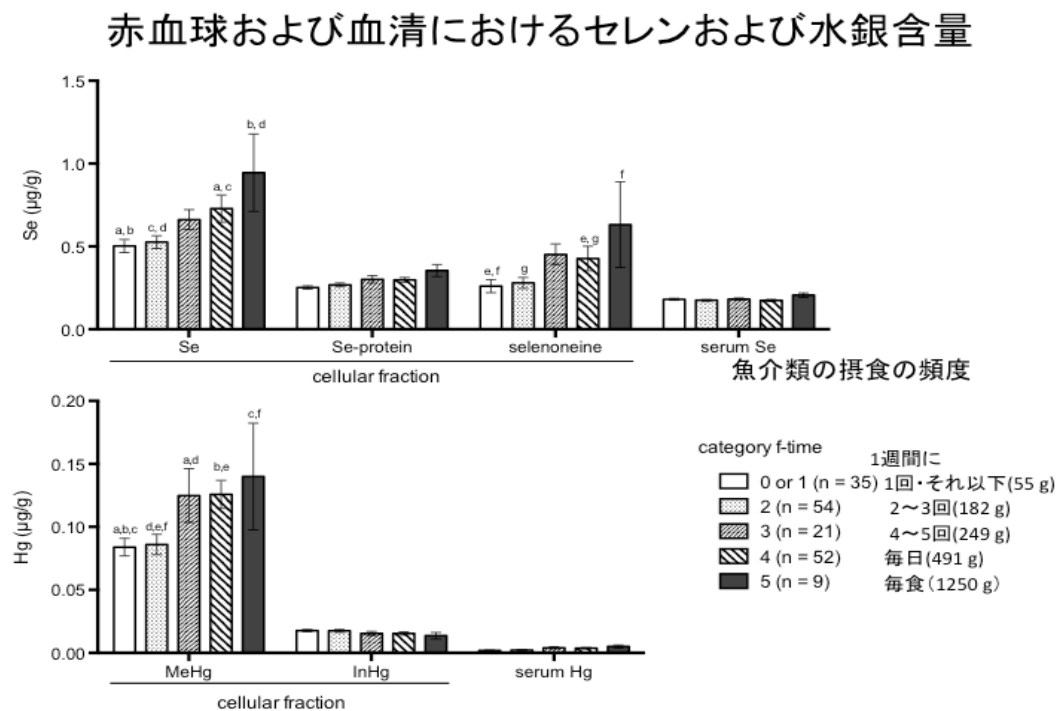


図 1 Mean selenium and mercury concentrations of groups categorized by volume of fish consumption. Concentrations of total selenium, selenoneine, and Se-containing proteins (Se protein) in the cellular fraction, total selenium in the serum, methylmercury (MeHg) and inorganic mercury in the cellular fraction, and total mercury in the serum were compared to the volume of fish consumption. The subjects were divided into five categories of the amount of fish meat per meal: 25 g per meal = f-mass 1, 50 g per meal = f-mass 2, 75~100 g per meal = f-mass 3, 150 g per meal = f-mass 4, 200 g or more per meal = f-mass 5. a-f, significant differences between the mean values (ANOVA).

物を発見し、セレノネインと命名した。この化合物は、ヒスチジンのアミノ基がトリメチル化され、イミダゾール環にセレン原子が配位した化学構造を持ち、ヘムに結合することから、鉄の自動酸化の抑制にも作用すると推定されている。本研究では、試料をゲル濾過カラムで分離後 ICP 質量分析を行い、赤血球中のセレノネインおよびセレン濃度は、魚の摂取頻度が多い住民で有意に高く、両者とも赤血球中のメチル水銀濃度と相関していることを明らかにした。赤血球中のセレン蛋白、無機水銀、血清中のセレン・水銀濃度には魚介類摂取との量依存関係は認められなかった (図 1)。以上より、魚介類に多く含まれるセレノネインがメチル水銀の毒性低減に大きく貢献しているのではないかと著者らは述べた。

米合衆国では Karimi らが、魚介類の摂取頻度の高いといわれる New York 州ロングアイランド地区在住成人の血中水銀値とセレンや脂肪酸などの栄養素濃度を測定した⁴²⁾。代表的な魚介類の水銀値や他の栄養素量を既存文献で収集して食事由来の摂取量を推定すると、正準判別分析の結果、魚介類からの各種摂取物の中では水銀の発現パターンが特徴的であり、摂食習慣の違いが血中レベルによく反映されていた。例えば、鮭の摂取頻度が高い人は n-3 脂肪酸の摂取割合が高く、また、食物連鎖網上位の大型魚類を好んで食べる人は水銀の摂取量が多かったが、血中のセレンや n-3 脂肪酸などの必須栄養素濃度は栄養価の低い魚介類をよく食べる人とあまり変わらなかった。これらの結果は、魚介類摂食習慣のタイプ別に、水銀曝露や摂取栄養素量が特徴付けられることを示し、魚介類消費者のリスク・ベネフィットを考えるうえで有用な情報になると思われた。

■ 水生生物における含有量分析研究

生体内の含有レベルを分析した研究では、海洋哺乳類や魚類、甲殻類、水鳥などの水生生物の臓器・組織中水銀・セレン濃度を調べた報告が幾つかある。

Guedes Seixas らは、ブラジルの南東海岸湾に生息するプランクトン (25 μm 以上)、甲殻類の筋肉組織、2 種の魚類およびイルカの肝臓・筋肉組織中のセレン、水銀、メチル水銀レベルを分析した⁴³⁾。その結果、魚とイルカでは肝臓中でセレン、水銀濃度が最も高かった。メチル水銀濃度は食物連鎖網が上位になるに従い濃縮されていることが示され、遠洋生息生物では海底生物の食物連鎖網に比べ、より濃縮度が高かった。いずれの臓器・組織においてもセレンは水銀よりモル比でみると過剰状態にあり、また、捕食種である肉食性魚類やイルカの筋および肝臓中にはほぼ同レベルのメチル水銀が存在した。これらの筋組織中の総水銀に対するメチル水銀比は同等であったが、肝組織では肉食性魚でメチル水銀比が 69%であったのに対し、イルカでは 18%と低かった。魚類の肝組織中セレンとメチル水銀濃度は相関していたが、肝のセレン・水銀モル比が上昇しても、総水銀に対するメチル水銀の比率は変わらず一定であった。これらの結果は魚体内でのメチル水銀の蓄積に対しセレンが防御的に作用することへの傍証となり、イルカと他の肉食魚ではその生理的メカニズムに差異があると考えられた。

イルカの肝組織のメチル水銀レベルについては、Zayas らも分析を行っており、カマイルカの肝臓をホモジナイズして ICP-MS と ESI-MS/MS 分析すると、総メチル水銀の 60%が高分子蛋白質の水溶性分画に存在していた⁴⁴⁾。メチル水銀の主な結合部位は Hb β 鎖上のシステイン残基にあることが示され、海洋哺乳類ではヘモグロビンがメチル水銀の主要結合蛋白となって肝臓へ運搬されることが考えられた。また、セレンの大部分はセレノネインとして存在することが明らかとなり、このセレン化合物がメチル水銀の無毒化に重要な役割を果たすのではないかと考察した。

Razavi らは、中国東部亜熱帯地方の7つの貯水池に生息する鯉の水銀、セレン、必須脂肪酸 (EFA) レベルを調べ、富栄養化の影響を検討した⁴⁵⁾。コクレン鯉の背部筋組織の総水銀とメチル水銀、セレン、エイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) 濃度を分析すると、セレンと水銀のモル比は 1.0 を大きく超えており、総必須脂肪酸量も 44.2~53.6% と多く、そのうち EPA は 6.9~12.5%、DHA は 16.1~23.2% を占めた。貯水池のクロロフィル a などのプランクトン密度が高くなるにつれ、水中総リン量は増加するが、逆に鯉の筋組織中のセレン・水銀モル比と EPA 濃度は低下していくことが観察された。生育している植物プランクトン種の組成割合から、セレン濃度を予測することは可能であるが、水銀濃度や必須脂肪酸割合を予測することはできなかった。ガイドラインと比較すると、どの鯉の水銀濃度も低レベルであった。貯水池の富栄養化でプランクトンの生育種と密度が変化すると、生息している魚の低栄養化に繋がり、メチル水銀毒性防御機構に及ぼすセレンや EPA の有効性が低下するであろうと著者らは述べた。

Raimundo らは、南ポルトガルの 2 箇所の海岸で採取したコウイカの鰓、外皮、消化腺、鰓心臓、腎臓の水銀、メチル水銀、セレン濃度を分析した⁴⁶⁾。コウイカではこれらの濃度分析がこれまで行われたことがなく、水銀が消化腺、鰓心臓に高く蓄積されていることが初めて示された。外皮のメチル水銀割合は個体により 6.1~92% と多様であったが、各臓器の総水銀とメチル水銀濃度はいずれも正の相関があり、鰓と鰓心臓の相関係数が最も高かった。どの臓器でも水銀・セレン比をみるとセレン過剰の状態、水銀・セレンの結合体はわずかしき見られず、コウイカではメチル水銀の毒性が閾値に達していないであろうと考察した。

その他の水生生物として、Burger らは米合衆国北西部のオタマジヤクシと食用ガエルを分析した⁴⁷⁾。2種の食用ガエルのセレン・水銀のモル比は 19~38 の範囲であったが、オタマジヤクシでは 16~330 と変動幅が大きく、生息地により有意に異なった。同じ場所で採取したカエルとオタマジヤクシのセレン・水銀モル比にも有意差があり、セレン濃度の方に差異が大きいと報告した。

Perrault は大量のゼラチン状プランクトンを餌とする大西洋オサガメの水銀とセレン摂取量について調べるため、121種の獲物やプランクトンのセレン・水銀濃度を測定した。海域への人為的な水銀排出が、大西洋オサガメのような長寿の絶滅危惧種に多大な影響を及ぼす恐れがあると述べた⁴⁸⁾。

水辺に生息する鳥の体内レベルの分析については、ポーランドから 2 件、カナダから 1 件の報告が出ている。このうち、ポーランドのセレン欠乏地方で中程度の水銀汚染地帯に生息する水鳥コウライアイサ (潜水ガモ) 16 匹の胸筋中の総水銀、メチル水銀、セレンを Kalisinska らが測定した⁴⁹⁾。平均総水銀、メチル水銀、無機水銀濃度はそれぞれ 2.63、1.92、0.46 $\mu\text{g/g}$ であり、セレン濃度は 0.54 $\mu\text{g/g}$ であった。健康状態が良好な水鳥では良好でない水鳥と比べて総水銀とメチル水銀濃度が高かったが、水銀・セレン比およびメチル水銀・セレンのモル比も高かった (2.32 vs 1.36, $p < 0.01$; 1.98 vs 1.03, $p < 0.05$)。ポーランドに生息する水鳥は、カナダ、北米、他の欧州諸国の水鳥と比較すると、総水銀に対するメチル水銀の割合は同程度であったが、セレン濃度は数倍低く、また総水銀・セレン比は 2.0 を超える高い値であった。セレン欠乏地域の水鳥では、生体内で水銀毒性を緩和する機序が他の地域の水鳥と異なり、セレンを利用する以外に別の仕組みも働いている可能性があると考えられている。また同研究グループは、セレン欠乏地域に生息するコウライアイサの肝臓・腎臓中の含有水銀、セレンレベルについても分析を行った⁵⁰⁾。肝・腎組織におい

ても胸筋中の分析結果と同様に、カナダ、北米、他の欧州の水鳥と総水銀濃度は同レベルであったが、セレン濃度は低く、総水銀・セレン比は 1.7 以上の高値であった。セレンが十分に供給されない水鳥では、メチル水銀の無毒化に対して、別の作用機序が存在するのかもしれない。

Hall らは、カナダ Saskatchewan 州の草原に生息するミミヒメウ (鶉) と 5 箇所の湖で捕獲された食用魚の水銀とセレン濃度を分析した⁵¹⁾。水鳥の鶉では、総水銀、メチル水銀の大部分が胸筋と肝臓中で検出され、その濃度は一般的な鳥のレベルと同等であった。肝臓中のメチル水銀割合は 4.5~52%と変動が大きく、脱メチル化作用により無機水銀に置換されていると推測されたが、一部の塩水湖では、セレンが欠乏していると思われる鶉の繁殖が認められた。

■ 動物・水・土壌への投与実験研究

これまでの研究で Huang らは、シロチョウザメに経口挿管でセレノメチオニンとメチル水銀を強制投与した場合、組織中セレン蓄積量と血中および腎臓水銀濃度が低下することを報告した⁵²⁾。同研究グループでは、更に、組織中に蓄積されたセレン形態を調べることを目的として、新たに強制経口投与実験を実施した¹⁶⁾。本研究では、セレノメチオニン (500 µg Se/kg 体重)、メチル水銀 (850 µg Hg/kg 体重) をそれぞれ単独で、または同時にシロチョウザメに経口挿管投与し、48 時間後に筋肉、肝臓、腎臓と血液 (血中のみ 12、24、48 時間後) 中の 3 種類の有機セレン体 (セレノシステイン、メチルセレノシステイン、セレノメチオニン) と 2 種類の無機セレン体 (4 価および 6 価無機セレン) を定量した。その結果、セレノメチオニンとメチル水銀を同時投与した場合には、血中セレノシステイン比、セレノメチオニン比、セレン代謝産物が緩やかに増加し、一方肝臓では、セレン単独投与群に比べセレノメチオニン比が 1/8 まで低下し、生理活性の高いセレン形態への *de novo* 合成がみられた。肝臓において、メチル水銀の脱メチル化にセレンが利用されたと推測される。筋肉組織中では、メチル水銀の単独投与でセレノメチオニンが低下し、その際血中にはセレノメチオニンが検出され、また同時投与では筋肉中セレノメチオニン濃度が増加した。腎臓では単独・同時の投与群に拘わらず、形態不明のセレン代謝物濃度が高くなり、4 価の無機セレンが検出されたことから、腎臓ではセレン化合物の形成を強く抑制して体外に排泄しているものと思われた。シロチョウザメではメチル水銀に曝露されると、主要臓器中のセレン形態を制御して体内の総セレンレベルを維持し、セレンの生物学的利用効率をより高めるストラテジーをとっていると考察された。

Olsvik らは、タイセイヨウタラ (鱒) に 10 週間のメチル水銀とセレンの給餌実験を行った⁵³⁾。投与群は対照群 (普通食)、セレン添加群 (3 mgSe/kg 体重)、メチル水銀添加群 (10 mgHg/kg 体重)、セレン・メチル水銀同時添加群 (3 mgSe + 10 mgHg/kg) の 4 群とし、魚の体重が 11.4±3.2 g になった時点で肝臓の分析を行った。その結果、メチル水銀が投与された 2 群では、肝臓の水銀レベルは 1.5 mg Hg/kg 体重で対照群の 44 倍以上であったのに対し、セレンレベルはいずれの群においても対照群との差違が 2 倍以下であった。肝臓中の水銀レベルにセレン投与は何の影響も及ぼさなかったが、メチル水銀とセレンの同時投与で肝蓄積セレン量は減少した。メチル水銀 10 mg Hg/kg 量の 10 週間の混餌投与では、魚の成長・成育に影響を与えなかった。肝組織を転写解析した結果、メチル水銀とセレンが共存すると、幾つかのグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX1、GPX3、GPX4B 等) に交互作用がみられ、グルタチオン代謝経路に影響が及んでいることが観察された。セレン 3 mg/kg の投与量では、肝組織でセレンは抗酸化作用よりもむしろ酸化促進作用

(プロオキシダント) を発現する可能性がある」と述べた。

Penglage らは、ゼブラフィッシュ雌に受精後 73 から 226 日目まで、セレノメチオニンとメチル水銀を混餌投与した⁵⁴⁾。実験デザインは、セレンの推奨投与量群 (乾燥重量 kg 当たり 0.7 mgSe) と高投与量群 (同 10 mgSe)、水銀の低投与量群 (同 0.05 mgHg) と高投与量群 (同 12 mgHg) 各々について 2×2 実験計画に従い混餌投与を行った。受精後 151 から 206 日を経た各実験群の雌魚に無処置の雄を交配し、卵と魚の水銀、セレン濃度を分析した。高投与量セレン群では、成魚と卵両方の水銀濃度を低下させ、水銀セレン両高投与量群ではセレン単独投与群に比べ、卵のセレン濃度が有意に上昇した。セレン単独投与群では雌魚の成長や生存に影響を与えなかったが、高投与量群では産卵力や受精卵の生存力が減衰した。水銀高投与量群で雌魚の生存と成長が阻害され、生殖毒性影響も見られたが、セレンの同時投与によりその影響は軽減されることが示された。

Mailman らは、湖の一部をシートで仕切った隔離水界のメゾコスモズに亜セレン酸を添加して、魚の体内水銀蓄積量の変化を調べる実験を行った⁵⁵⁾。実験水域の亜セレン酸濃度が 1.6 µg/L 以下となるよう調整した上で、安定同位体 ¹⁹⁸Hg を少量添加したところ、魚の筋肉中では ¹⁹⁸Hg スパイク総水銀と肝臓水銀濃度が低くなり、また、プランクトン類とユスリカ幼虫のスパイクメチル水銀濃度も対照群に比べて低下した。亜セレン酸の投与により水中水銀濃度は変化しなかったが、水中食物連鎖網の水銀濃縮度を軽減させた。魚の生殖腺のセレン濃度は水中セレンレベルと相関がみられたが、セレン添加開始 8 週間後でも生殖毒性閾値を超えなかった。水域への低濃度のセレン投与は、メチル水銀の生体蓄積量を減らし、魚の生殖腺セレン濃度を高める効果があるが、長期間に亘ると生殖腺に対するセレン自体の毒性作用レベルを超える恐れがあるので注意が必要であると述べた。

土壌中へのセレンの添加については、Wang らが報告した⁵⁶⁾。セレンと水銀を添加・処置した栽培液または培養土で 2 種類の稲 (日本産米とインディカ米) を育て、根・枝・玄米中の総水銀、メチル水銀、セレン濃度を測定した。水銀汚染土壌へ高濃度セレン (5 µg/g) を添加した場合は玄米収穫量が 48% 増加し、さらにセレン濃度を 2 倍にすると総水銀は 47%、メチル水銀濃度が 55% まで減少した。高濃度のセレン添加で培養土中の可溶性水銀とメチル水銀濃度が大きく低減するとともに、稲の根内皮細胞の細胞壁バリアも高まり、根からの水銀取り込み量が減少することが示唆された。

■ *in vivo* 実験研究

Truong らは、硫酸還元細菌のデスルフォビブリオに 2 価の水銀イオンと亜セレン酸を添加して培養した⁵⁷⁾。水銀セレン同時添加群 (0.5 µM Hg + 6.3 µM Se) では、水銀のメチル化が抑制され、メチル水銀産生量が有意に低下した。二次元電気泳動と質量分析を組み合わせたプロテオーム解析で、これらの培地では Dde_1198 タンパク-グルタミン酸-O-メチル転移酵素が完全に抑制されていることが示された。これらの蛋白は無機水銀のメチル化に必要であり、セレンの存在化で産生抑制されることは、メチル水銀毒性を防御する上で重要と思われる。水銀セレン同時添加群の細胞膜には、X 線吸収分光法により不活性型の HgSe 体の存在が認められ、セレンの毒性防御作用が分子レベルで裏付けられたと著者らは述べた。

Branco らは、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞への水銀添加実験を行った⁵⁸⁾。細胞株への 2 価の無機水銀添加で、抗酸化酵素であるチオレドキシシン 1 (Trx1) の発現が高まったが、メチル

水銀の添加で逆に抑制された。2価無機水銀と亜セレン酸の同時投与で Trx1 の発現が更に高まったが、メチル水銀と亜セレン酸の同時投与では発現の低下が見られた。メチル水銀の毒性修飾にチオレドキシニン系、すなわち、細胞内酸化還元系の恒常性を維持するミトコンドリア内の酸化還元酵素・抗酸化蛋白質が関与することが示唆された。

Moreno らは、キラル型 (分子触媒を用いて合成した鏡に映した形と元の形が一致しない化合物) のセレノメチオニン (SeMet) がメチル水銀毒性を軽減できるかどうかを藻類クロレラを用いて実験した⁵⁹⁾。DL-SeMet、L-SeMet または D-SeMet をクロレラ培地に添加して生育させ、その後定期的にメチル水銀 (MeHg(+)) を添加すると、両光学異性体の SeMet では MeHg(+) 単独投与群に比べ葉緑素とカロチノイド量および酸素産生の有意な増加がみられた。SeMet 前処理群では細胞中の MeHg(+) レベルが低かったことから、MeHg(+) の細胞外排出が促進されたと推定された。L-SeMet は水銀の脱メチル化に直接関与したが、D-SeMet 前処理群では培地中に D-SeMet が検出されなかったため、メチルセレノシステイン (SeMeSec) や L-SeMet に変換され、72 時間後にほぼ排出されたものと推測された。セレン水銀化合物は検出されなかったが、試料分解後の代謝中間体のセレンと水銀量の総和では全量の 77% 程度しか説明できなかったため、未検出のセレン水銀体が存在していた可能性がある。

哺乳小動物にメチル水銀を経口投与した実験については、以下に述べる 3 件の報告がある。Joshi らは、ラットでのメチル水銀曝露に伴う生化学的変化と酸化ストレスに対して、キレート剤を腹腔投与すると防御的な効果がみられるか実験を行った⁶⁰⁾。雄 SD ラットに 21 日間メチル水銀 1.5 mg/kg 体重を経口投与し、キレート剤として N-アセチルシステイン 0.6 mg/kg 体重、またはジチオスレイトール 15.4 mg/kg 体重を各 5 日間、腹腔投与した。メチル水銀投与により血清中への乳酸脱水素酵素、アルカリフォスファターゼ、トランスアミラーゼの放出が増大し、肝、腎、脳での脂質過酸化反応の増加とグルタチオン量の低下、および組織学的変化がみられた。キレート剤やセレンの単独投与群よりも、セレンとともに N-アセチルシステインやジチオスレイトールを同時投与した群で、これらの水銀曝露による毒性影響や障害は早く回復する傾向がみられた。メチル水銀に曝露された場合の治療方法として、このようなセレンとキレート剤との混合使用がより効果を発揮する可能性が示された。

Mohamed らは、ラットの胎児期にメチル水銀を曝露 (2.5 mg/L を母ラット妊娠 1~21 日目に飲水投与) し、出生 28 日後の脳の各種微量元素濃度を分析した⁶¹⁾。その結果、亜鉛、銅、マンガン、セレン濃度が対照群より有意に高く、逆に鉄は低濃度であった。出生 60 日後に 6-ヒドロキシドーパミン (6-OHDA) を投与すると、生理食塩水投与のコントロール群に比べ、鉄、亜鉛、銅、マンガン濃度は上昇したが、胎児期水銀曝露ラットへの 6-OHDA 追加投与群では、それらの元素濃度をさらに上回る高濃度になった。6-OHDA による神経毒性影響 (パーキンソン様症状の誘発など) がメチル水銀で促進されることが示唆された。血清中抗酸化能 (TAC) はメチル水銀単独投与群と対照群で差はなかったが、6-OHDA の追加投与群では対照群より有意に低下した。出生 28 日での脳の TAC レベルは雌より雄ラットで高かったが、胎児期メチル水銀曝露群では TAC の上昇は 74 日目になっても認められなかった。胎児期メチル水銀曝露は脳微量元素レベルのホメオスタシス制御異常を引き起こし、抗酸化能を低下させる可能性があると考えられた。

Li らは、飲水に 0.01 mM のメチル水銀を添加し、Balb/c 雌マウスのリンパ組織の増殖と NK 細

胞機能が抑制されることを報告した⁶²⁾。メチル水銀経口投与の際に同時にセレン・イーストを餌に添加すると、メチル水銀に引き起こされた免疫毒性影響が抑えられ、回復傾向がみられた。また、セレンの同時投与により水銀が促進した ROS (reactive oxygen species) 産生や、抗酸化作用のある酵素および物質濃度の低下が阻止された。十分量のセレンの供給が体内の水銀量を減少させ、さらに、幾つかの重要な抗酸化物質の活性をセレンが維持したり高めたりしたことが、水銀の免疫細胞毒性に対する防御効果をもたらしたと考えられる。

5) 発展途上国における水銀／メチル水銀の健康問題

小規模金鉱山では金抽出にほぼ等量の水銀を使用する水銀アマルガム法が用いられている。発展途上国では手掘り小規模金鉱山に 1,500 万人の作業員、そのうち女性と子供が 300 万人従事している。大気中への水銀の放出量の約 37%が手掘り小規模金鉱山に起因していると推定されている。近年、多くの科学者が小規模金鉱山周辺の環境汚染そして鉱山作業員や周辺住民の健康影響に関する調査・研究を行った結果、水銀汚染が深刻な事態になっていることが明らかになった。特に金鉱山作業員とその家族、鉱山周辺の集落住民への水銀曝露に加えて、鉱山周辺を流れる河川下流の集落ではメチル水銀に汚染された魚介類摂取による健康影響が問題視されている。ここでは PubMed でキーワードとして “mercury gold mining”、“mercury mining” を入力し、2014 年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による環境汚染および健康影響に関する内容を紹介する。

■ 小規模金鉱山周辺の環境汚染と健康影響について

2002～2012 年の間における金価格の 4 倍以上の高騰は、この間の国際経済の危機に対する安全な投資要因となり、発展途上国での金増産に繋がった。発展途上国の小規模金鉱山では金抽出に水銀アマルガム法を用いており大量の水銀が使用される。Secatore らは世界における小規模金鉱山で生産される金の量から幾つかの仮説のもと水銀の消費量を推定した⁶³⁾。手掘りによる金生産量は国や大陸によって異なるが、小規模金鉱山での水銀消費量は金の生産と相関することから、労働者数の推定、金の価格変化と生産を計算のするための調整因子として用い、水銀の消費量を計算した。小規模金鉱山 (ASM) 労働者数に対する金鉱山での金の生産性 (金のグラム数/一人当たりの労働者) は大陸間で相違が見られ、労働者の多い地域は低く、労働者の少ない地域は高い傾向にあった (図 2)。特に南米では、労働者数は少ないが金の生産性は高く、金の抽出に対する高い技術を示した。金生産量は労働者の技術に依存しており、大陸間の金の生産量を見ると南米が最も高く、アジア、中央アメリカ、アフリカの順であった。2011 年時点で 1,600 万人手掘り作

業者が金抽出に携わっており、年間 380～480 トンの金が生産されている。回収効率についても大陸間で相違があり、低い技術の国では水銀の放出量が高い (図 3)。

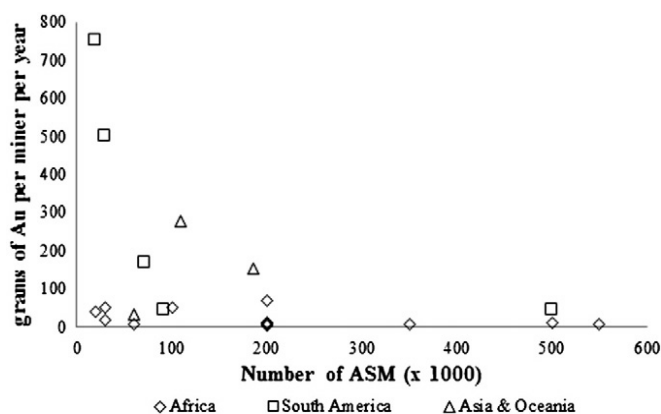
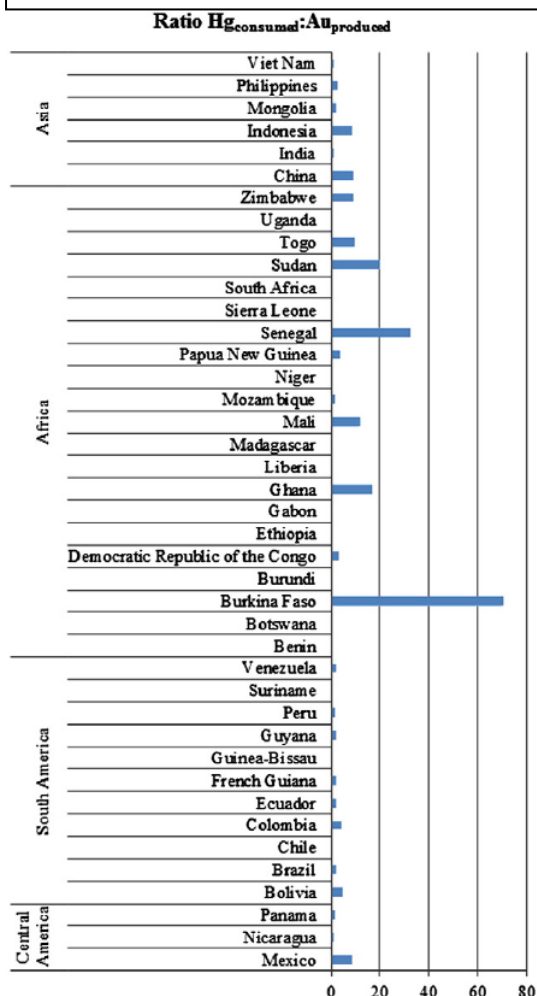


図 2 Number of ASM population vs Au produced, by continent. The point for South America with high ASM population and low productivity refers to Brazil that has the largest ASM population in the continent characterized by a lower technological level compared to other neighbor states.

図 3 Ratio of Hg consumed vs. Au produced by country per continent.



手掘りによる金採掘による小規模金鉱山周辺地域の水銀による環境汚染状況に関する調査がアフリカ、南米の各地で行われた。Odumo らはケニアの Migori-Transmara 地域における手掘り金採掘活動による環境影響について報告し、手掘りの金採掘作業に使用される水銀の環境中への放出が土壌や水域の荒廃に寄与していることを明らかにした⁶⁴⁾。高濃度の水銀が土壌 (140 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、堆積物 (430 $\mu\text{g}/\text{kg}$) そして尾鉱 (鉱滓, 8,900 $\mu\text{g}/\text{kg}$) で検出されている。植物では地衣が平均 430 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であり、苔は平均 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であった (表 2)。また、土壌や植物中の水銀を測定し、陸上生態系への水銀輸送機構に湿性・乾性沈着が関わっていることも明らかにした。すなわち、水銀汚染の生物指標として用いた地衣や苔の水銀濃度は採掘地域と関係しており、採掘から遠方では低濃度であった。以上より、Migori-Transmara 地域は高濃度の水銀に汚染されており、この原因は水銀アマルガム法による金抽出が金採掘周辺の高い水銀汚染を引き起こしていると結論し、環境中水銀の低減のための金抽出法の転換を考慮すべきであると提言した。

表 2 Statistical summary of the Hg concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$) in the soil, ore sediment (tailing and river), lichen and moss samples

	Number	Mean	Median	SD	Min.	Max.	1st Qu	3rd Qu
Soil	103	140	100	170	20	1,100	70	130
Ore	42	410	350	380	10	1,500	140	420
Tailing	41	8,900	2,560	9,990	200	31,500	890	14,560
River sediment	69	430	230	510	30	2,380	100	600
Lichens	45	430	220	430	60	1,040	160	670
Mosses	57	400	210	470	150	2,020	150	430

Nyanza らはアフリカの北西タンザニアに位置する小規模水銀鉱山周辺の Rwamngasa 村の水質、土壌、植物中の水銀およびヒ素濃度を報告した⁶⁵⁾。水質の水銀濃度は $47.8 \pm 187 \mu\text{g}/\text{L}$ であり、水源の 33% が WHO の飲料水基準 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 以上であり、ヒ素は 12% が飲料水基準 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ を超えていると述べた。カッサバの葉の水銀濃度は 64.1 ± 46.6 (8.3~167) $\mu\text{g}/\text{g}$ と高濃度であり、ヒ素も 225 ± 272 (60~1,120) $\mu\text{g}/\text{g}$ と高濃度検出され、しかもカッサバの葉は根の水銀濃度やヒ素濃度に比べ高値であった。土壌中の水銀は 58.4 ± 188 (5.8~1,759) $\mu\text{g}/\text{g}$ 、ヒ素は $3,941 \pm 383$ (183~20,298) $\mu\text{g}/\text{g}$

であり、Rwamngasa 村に水銀汚染が広がっていると述べた。

インドネシアの Mollucas 州 Buru 島の Botak 山で 2012 年に金が発見されて以来、金抽出に大量の水と水銀が使用され、Wamsaite 川や Kayeli 湾に水銀沈殿・沈着が生じている。Male らは河川や湾の堆積物中の水銀を測定し、将来の健康リスクと食料の安全性について検討した⁶⁶⁾。金を抽出するために使用された池の総水銀濃度は 680 mg/kg 以上であり、地元の川河口の堆積物では 3.0 mg/kg 以上で、入江の河口の堆積物では 7.66 mg/kg 以上であった。河川や湾の堆積物は金属水銀に比べ利用できる形態の水銀の割合は高く、また回転篩いにかけて廃棄される堆積物に比べ強く硫化水銀として結合していることを明らかにした。このことは水銀の長期分布と形態に対する懸念となっている。氾濫平野は重要な農業資源地であるとともに Mollucas 州はインドネシアの漁業資源地でもあることから、地域や指導者に潜在的な将来のリスクを伝え、水銀廃棄物を減少させるための方策を講じることが必要であると述べた。

仏領ギニアでは、金鉱山で水銀が 2006 年まで使用され、今日でも土壌や河川の堆積物中の水銀濃度が高いことが Laperche らによって報告された⁶⁷⁾。彼らは仏領ギニアを流れる 5 つの主な河川 (Approuague 川、Comté 川、Mana 川、Oyapock 川) を対象に 5,450 km の 1,211 測定点から堆積物中の水銀濃度を測定し、水銀汚染マップを作成した。非金採掘地域の河川における 241 測定点の地質学的バックグラウンド (平均濃度) は 108 ± 42 ng/g (最大濃度 150 ng/g) であった。金採掘地域と非金採掘地域の堆積物中水銀濃度と間に有意差が認められている。また金採掘地域の 5 つの河川の間でも金採掘地域を非採掘地域の堆積物中水銀濃度の間に差異が認められ、これらは過去の金採掘活動における大量の水銀使用を物語るものである (図 4)。

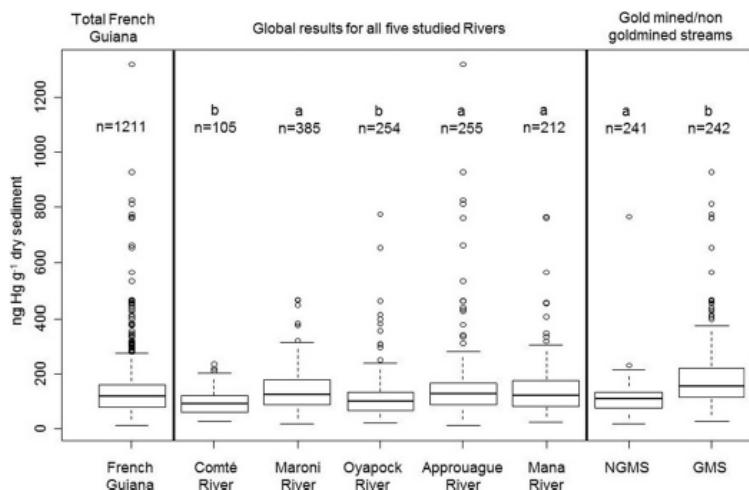


図 4 Boxplot comparing Hg contents in sediments from the gold-mined and non-gold-mined streams (GMS and NGMS) from the five main river sectors.

金鉱山労働者の水銀曝露の実態調査は世界各地で行われている。Mostafazdeh らはイラン北西部の 25~56 歳の金鉱山労働者 16 名を対象に水銀曝露と D-ペニシラミン投薬治療の血清および尿中水銀濃度について報告した⁶⁸⁾。16 名は神経精神病様の徴候を呈しており、病院で全員が D-ペニシラミン投薬治療を受けた。その治療前後の平均血清中水銀濃度は 198 ± 132 μ g/L と 9.6 ± 4.1 μ g/L であり、また平均尿中水銀濃度は 123 ± 52 μ g/L と 16 ± 7.9 μ g/L で、治療後いずれも統計学的に有意に低下した。肝臓や腎臓の超音波検査や投薬前後の生化学検査に有意な変化は認められなかった。これらの結果はイラン北西部の金鉱山労働者が高濃度水銀蒸気曝露を受けていたことを示している。

Ohlander らはチリ北部の伝統的な金鉱山地域にある 2 つの公立小学校の 1~6 年の学童を対象に

水銀曝露による危険性を報告した⁶⁹⁾。調査では両親 418 名に、子ども 288 人の演繹的水銀曝露の危険性、潜在的水銀曝露の経路、人口統計に関するアンケート調査を行い、かつ子どもの爪中水銀濃度を測定した。爪水銀濃度が 75 パーセンタイル以上を示す群とそれ以下群の 2 群に分け、ロジスティック回帰分析で危険因子の影響について (潜在的交絡因子で調整して) 解析した。年齢は平均 9.6±1.9 歳で、爪水銀濃度は 0.13 (平均)±0.11 µg/g (範囲 0.001~0.86 µg/g) であった。75 パーセンタイル値 (0.165 µg/g) を超える水銀レベルの子供に影響する危険因子は、家族が水銀を取り扱い、子供が家の中で遊ぶことであった (調整オッズ比 3.49、95%信頼区間 1.23~9.89)。さらに金鉱山企業で両親が働いている子供は銅鉱山企業で働く両親の子供に比べ、水銀レベルが高く、かつオッズ比も高値であった (表 3)。以上より、小規模金鉱山における水銀曝露はその労働者の家族である子供にまで影響を及ぼすかもしれない、これらの結果は、金-水銀アマルガム燃焼を禁止していることを家庭内の人達に理解させるのにも役に立つであろう。

表 3 Main risk factors for mercury exposure above the 75th percentile (0.165 µg/g).

Risk factor	N (%) >75th Hg-percentile	Pre imputation ¹		Post imputation ²			
		Adjusted OR	95% CI	Unadjusted OR	95% CI	Adjusted OR	95% CI
Sex:							
Male	42 (26.9)	1		1		1	
Female	27 (20.5)	0.46	(0.19–1.10)	0.69	(0.37–1.28)	0.60	(0.30–1.19)
Fish consumption:							
<1 times/week	15 (16.9)	1		1		1	
1–4 times/week	36 (26.5)	0.96	(0.36–2.57)	1.58	(0.76–3.29)	1.57	(0.74–3.26)
>4 times/week	18 (28.6)	1.16	(0.34–4.01)	0.79	(0.48–1.29)	0.78	(0.46–1.32)
Father working in:							
Industrial gold mine	5 (26.3)	1		1		1	
Industrial copper mine	10 (18.5)	0.51	(0.07–3.92)	0.58	(0.12–2.79)	0.52	(0.10–2.58)
Traditional gold mining	15 (27.3)	0.80	(0.11–5.91)	0.95	(0.22–4.20)	0.78	(0.17–3.51)
Outside mining	39 (24.4)	0.71	(0.12–4.18)	0.83	(0.19–3.71)	0.82	(0.19–3.51)
Mother in contact with Hg during pregnancy:							
No	43 (21.8)	1		1		1	
Yes	25 (27.7)	1.10	(0.41–2.91)	1.35	(0.62–2.94)	1.03	(0.46–2.31)
Hg work in household and child playing inside:							
No	52 (20.6)	1		1		1	
Yes	17 (48.5)	4.91	(1.41–17.03)	3.40	(1.28–9.07)	3.49	(1.23–9.89)

Descriptive data, pre imputation (adjusted) and post imputation (unadjusted and adjusted) logistic regression models with odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). N = 288.

¹Pre imputation adjusted odds ratios (for all variables in table).

²Post imputation unadjusted and adjusted (for all variables in table) odds ratios based on all seven imputed datasets combined.

コロンビアは手掘りによる金採掘が盛んであり、世界で水銀汚染者が最も多い国の 1 つである。De Miguel らは最も金生産量の多い 12 地区で潜在的に健康影響に及ぼす問題の度合いを確率的リスク評価により評価した⁷⁰⁾。リスク評価における水銀の曝露形態は水銀蒸気の吸入と魚介類からのメチル水銀摂取である。魚介類摂取量などの成人集団における曝露パラメーターは全国調査から入手し、大気中や魚介類の水銀濃度は以前の調査データを用いた。魚の摂取量は 12 地区間で差異があり、1 日当たり 0 から 0.3 kg である。魚介類の水銀濃度は 0.026~3.3 µg/g (N=70) であり、550 箇所の作業場の気中水銀濃度は検出限度~1 mg/m³、261 箇所の屋外の水銀濃度は検出限度~0.652 mg/m³であった。これらはリスクの計算ための濃度として確率分布の作成に用いている。12 地域における水銀に汚染された魚介類摂取に関連したハザード指数 (HQ = [推定 1 日摂取量] ÷ [経口摂

取基準値 Rfd) がリスクありとされる $HQ \geq 1$ 以上は 2 地区を除き、中央値の 95 パーセンタイルが 4~90 を示した (表 4)。水銀蒸気曝露を受ける場合、全ての町で HQ が 1 を超えており、アマルガム燃焼作業員においては、 HQ は 2 桁高く、95 パーセンタイルが 200 に達した (表 5)。コロンビアの小規模金鉱山コミュニティ屋外での水銀の負荷に加えて、水銀に汚染された魚介類摂取も問題を悪化させている。作業場で水銀アマルガムを燃焼する作業員においては健康影響をもたらす環境基準の 200 倍あるいはそれ以上であった。コロンビアでは鉱山作業員のみならず小規模金鉱山コミュニティの一般集団に対しても極端に高いレベルの持続的リスクとなっていると考えられた。

表 4 Summary statistics of the distribution of Hazard Quotients associated with the ingestion of Hg-contaminated fish

	Min.	Median	Mean	p95	Max.	Std. dev.
Antioquia	2.1E-05	2.5	4.5	17.8	22.0	5.3
Santander	2.0E-06	0.6	1.8	9.1	11.3	2.8
Nariño	2.3E-07	0.5	1.1	4.4	5.5	1.4
Cauca	1.1	3.6	4.2	8.7	10.0	2.2
Caldas	0.2	2.7	4.5	13.9	16.0	4.4
Guainía	1.1	3.2	4.0	8.0	8.6	2.1
Vaupés	1.1	3.2	4.0	8.0	8.6	2.1
Quindío	1.3	4.3	4.8	8.7	10.0	2.1
Bolívar	0.0	8.8	21.5	91.2	116.7	28.8
Chocó	0.5	11.1	16.1	46.8	53.6	15.3
Córdoba	2.6	9.6	15.5	77.5	111.9	21.2
Tolima	1.0	3.3	8.6	55.4	71.1	16.3

表 5 Summary statistics of the distribution of Hazard Quotients associated with the inhalation of Hg in outdoor air and workshops' atmospheres, in mining sites of Antioquia.

		Min.	Median	Mean	p95	Max	Std. dev.
Miner-smelters	Remedios	93.4	130.6	130.9	147.2	176.1	9.7
	Segovia	136.3	168.2	168.4	183.0	211.5	8.7
	Bagre	20.6	43.0	43.5	56.1	79.3	7.2
Residents	Remedios	7.7	12.8	12.9	15.0	18.7	1.3
	Segovia	9.7	24.0	24.4	33.0	55.0	4.9
	Bagre	12.0	21.4	21.4	25.0	30.1	2.2

Peplow らはスリナム共和国の小規模な手掘り金採掘活動に伴う環境中への水銀放出による危険性が東南部に位置する Apetina 村の先住民 Wayana にあると報告した⁷¹⁾。Wayana の集団は他の集団と比べて魚介類を多食することから水銀影響をより受けやすい。彼らは先のリスク評価研究で Wayana の集団が水銀曝露による健康影響の生涯リスクを見出し、今回の研究ではメチル水銀曝露で見られやすい神経毒性影響が一連の神経学的検査が行われた曝露集団で同定された。運動性や認知能力は、毛髪中水銀が亜急性レベルであったアマゾン地区の他の研究と比べ全く同じとは言えないものの、これらの神経学的障害が毛髪中水銀と関連性を示すことを確認した。

Rodríguez Martín-Doimeadios らは金採掘地域のアマゾン川下流の魚介類の水銀化合物の形態分析を行い、河川の水銀汚染状況について報告した⁷²⁾。アマゾンで最大の金採掘地域の Tapajós 川下流に位置する Itaituba の市場と水銀非汚染地域の Belém の市場で入手した魚類の無機水銀とメチル水銀を分析し、水銀汚染の比較を行った。Itaituba の市場では 5 種類の魚食魚 (tucunaré, sarda, pescada branca, filhote, dourada) と 4 種類の非魚食魚 (aracu, pacu, caratinga, jaraqui)、Belém の市場では 5 種類の魚食魚を測定すると、①Tapajós 川の魚食魚のメチル水銀濃度は非汚染地区の魚食魚に比べ高かった。②Itaituba の dourada、filhote、sarda の魚食魚は WHO 安全基準や米合衆国 EPA の組織内残留物基準より高値であった。③無機水銀濃度の増加に伴ってメチル水銀濃度も増加していた。④Itaituba の魚食魚の平均総水銀濃度はほぼ同じレベルであったが、非魚食魚の平均総水

銀濃度は時間の経過とともに減少傾向にあった (表 6)。これらの事実は今後も持続的なモニタリングの重要性を示すととも、にアマゾンにおける水銀問題に対する予防戦略や政府の活動をサポートするものである。

表 6 Methylmercury (MeHg), inorganic mercury (IHg), and total Hg concentrations ($\mu\text{g/g}$ in dry weight (d.w.)) and percentages of MeHg in fish muscle from exposed (Itaituba) and non-exposed (Belém) areas

Common name	Location	MeHg		IHg		Total Hg		%MeHg	
		Interval	Mean \pm SD	Interval	Mean \pm SD	Interval	Mean \pm SD	Interval	Mean \pm SD
Piscivorous									
Dourada	Belém	0.02–0.06	0.05 \pm 0.02	<LOD–0.03	0.01 \pm 0.01	0.03–0.08	0.06 \pm 0.02	75–100	80 \pm 14
	Itaituba	0.80–8.47	3.2 \pm 3.0	0.10–0.24	0.15 \pm 0.06	0.91–8.71	3.3 \pm 3.1**	87–97	94 \pm 4
Filhote	Belém	0.06–0.14	0.08 \pm 0.03	0.004–0.03	0.02 \pm 0.01	0.07–0.16	0.10 \pm 0.03	65–94	83 \pm 11
	Itaituba	0.26–2.74	1.3 \pm 1.1	0.002–0.14	0.05 \pm 0.05	0.27–2.81	1.3 \pm 1.1**	95–100	97 \pm 2
Pescada Branca	Belém ^a	0.02–0.14	0.07 \pm 0.05	0.005–0.03	0.02 \pm 0.01	0.03–0.15	0.10 \pm 0.05	62–89	77 \pm 11
	Itaituba	0.04–1.54	0.6 \pm 0.6	0.002–0.12	0.05 \pm 0.05	0.04–1.58	0.62 \pm 0.62*	65–97	89 \pm 14
Sarda	Belém	0.10–0.17	0.13 \pm 0.03	0.004–0.06	0.02 \pm 0.02	0.11–0.19	0.16 \pm 0.03	66–96	86 \pm 12
	Itaituba	1.00–5.39	2.2 \pm 2.1	0.009–0.30	0.09 \pm 0.14	1.02–5.70	2.3 \pm 2.3**	95–99	97 \pm 2
Tucunaré	Belém ^b	0.59–3.92	1.7 \pm 1.3	0.008–0.08	0.05 \pm 0.03	0.66–4.00	1.8 \pm 1.3	90–100	96 \pm 4
	Itaituba	0.05–2.42	1.8 \pm 1.0	0.004–0.11	0.05 \pm 0.04	0.05–2.45	1.8 \pm 1.0	92–99	96 \pm 3
Surubim	Itaituba	0.25–1.02	0.55 \pm 0.38	0.04–0.26	0.11 \pm 0.09	0.28–1.16	0.66 \pm 0.45	78–89	83 \pm 6
Non-piscivorous									
Aracu	Itaituba	0.03–0.20	0.12 \pm 0.07	0.005–0.03	0.02 \pm 0.01	0.05–0.23	0.13 \pm 0.08	68–96	87 \pm 11
Caratinga	Itaituba	0.02–0.28	0.13 \pm 0.10	<LOD–0.21	0.05 \pm 0.09	0.02–0.33	0.18 \pm 0.14	36–100	84 \pm 27
Jaraqui	Itaituba	0.07–0.18	0.12 \pm 0.04	0.01–0.04	0.02 \pm 0.01	0.08–0.22	0.14 \pm 0.05	80–88	82 \pm 3
Pacú	Itaituba	<LOD–0.04	0.02 \pm 0.02	<LOD–0.03	0.006 \pm 0.01	<LOD–0.05	0.03 \pm 0.02	37–100	68 \pm 46

The number of individuals was $n=5$ except for filhote ($n=6$) and sarda ($n=4$) from Itaituba. LOD was 0.0028 $\mu\text{g/g}$ for MeHg (as Hg) and 0.002 $\mu\text{g/g}$ for IHg

* $p<0.05$ and ** $p<0.01$ versus the same species collected in Belém

^aFished in Marajó Island

^bFished in Tucuruí dam

表 7 Concentration of THg, MeHg and trace metals in different parts of rice plants collected at near Wanshan Hg mine, Guizhou Providence

Location (m)	Part	Concentration of Hg		Concentration of trace metals (mg/kg)					
		Total (mg/kg)	MeHg ($\mu\text{g/kg}$)	Cd	Cu	Pb	Zn	Ni	Mn
0	Brown rice	0.16 \pm 0.021	15 \pm 1.2	0.28 \pm 0.031	4.2 \pm 0.20	N.D.	16 \pm 0.47	2.4 \pm 0.27	18 \pm 1.4
	Husk	0.58 \pm 0.073	0.46 \pm 0.054	0.48 \pm 0.062	5.6 \pm 0.39	1.8 \pm 0.13	23 \pm 1.4	12 \pm 1.5	89 \pm 11
	Straw	1.10 \pm 0.10	1.7 \pm 0.16	0.47 \pm 0.071	8.6 \pm 1.2	1.8 \pm 0.27	29 \pm 3.8	15 \pm 2.0	94 \pm 5.5
	Root	10 \pm 1.1	5.8 \pm 0.60	1.5 \pm 0.14	33 \pm 3.6	14 \pm 1.3	64 \pm 7.7	42 \pm 6.0	140 \pm 12
500	Brown rice	0.21 \pm 0.031	28 \pm 1.0	0.47 \pm 0.041	3.8 \pm 0.24	N.D.	18 \pm 1.4	2.3 \pm 0.072	13 \pm 0.42
	Husk	0.54 \pm 0.062	0.58 \pm 0.064	0.53 \pm 0.061	4.6 \pm 0.28	1.5 \pm 0.19	18 \pm 1.6	6.8 \pm 0.73	45 \pm 2.1
	Straw	2.4 \pm 0.083	2.0 \pm 0.050	0.63 \pm 0.053	4.1 \pm 0.46	4.4 \pm 0.64	21 \pm 2.6	12 \pm 1.7	42 \pm 4.3
	Root	15 \pm 1.1	9.3 \pm 1.0	2.4 \pm 0.27	45 \pm 3.3	25 \pm 1.7	91 \pm 7.8	37 \pm 1.6	210 \pm 27
1000	Brown rice	0.13 \pm 0.023	30 \pm 1.2	0.32 \pm 0.042	3.6 \pm 0.30	N.D.	18 \pm 2.9	2.3 \pm 0.36	14 \pm 0.62
	Husk	0.75 \pm 0.053	1.2 \pm 0.081	0.45 \pm 0.073	5.6 \pm 0.51	1.1 \pm 0.071	25 \pm 1.2	14 \pm 1.4	56 \pm 6.0
	Straw	1.5 \pm 0.19	2.7 \pm 0.31	0.59 \pm 0.044	4.8 \pm 0.36	1.2 \pm 0.11	24 \pm 1.7	15 \pm 1.4	56 \pm 5.1
	Root	23 \pm 2.6	12 \pm 0.82	2.6 \pm 0.33	29 \pm 3.0	19 \pm 1.0	61 \pm 6.3	33 \pm 2.2	240 \pm 22
Control	Brown rice	N.D.	N.D.	0.10 \pm 0.011	4.9 \pm 0.32	0.09 \pm 0.012	12 \pm 0.76	4.7 \pm 0.46	11 \pm 0.44
	Husk	N.D.	N.D.	0.14 \pm 0.011	6.7 \pm 0.48	0.35 \pm 0.020	15 \pm 1.0	23 \pm 1.3	50 \pm 3.8
	Straw	N.D.	N.D.	0.10 \pm 0.012	7.4 \pm 0.62	0.59 \pm 0.041	17 \pm 1.1	30 \pm 1.5	51 \pm 3.4
	Root	N.D.	N.D.	0.14 \pm 0.011	46 \pm 4.2	7.02 \pm 0.69	50 \pm 2.4	78 \pm 2.3	160 \pm 8.5

^aData are mean \pm standard error ($n=4$). Detection range: Hg, 0.002–10 $\mu\text{g/kg}$; MeHg, 0.5–10 $\mu\text{g/kg}$; Cd, 0.01–0.1 $\mu\text{g/kg}$; Pb, 1–10 $\mu\text{g/kg}$; Cu, Zn, Fe, Ni, and Mn, 0.1–10 $\mu\text{g/kg}$.

THg = total mercury; MeHg = methylmercury; N.D. = not detected.

■ 水銀鉱山周辺の環境汚染について

中国の貴州省の万山水銀鉱山周辺では水田土壌や米が水銀によって汚染されていることが知られている。Liらは万山水銀鉱山地域における水銀や他の微量金属について調査した⁷³⁾。米の水銀

化合物と他の微量元素との関係や土壌のタイプと物理学的指標との関係を調べ、米摂食による健康リスクについて検討した。万山水銀鉱山地区で調べられた土壌中微量元素うち水銀とカドミウムが最も多かった。しかし、総水銀、ジエチレントリアミン五酢酸-水銀、水溶性水銀濃度は土壌の根圏と非根圏で異なっていた。玄米中の総水銀濃度は0.17 mg/kgそしてカドミウムは0.36 mg/kgであり、政府の国家規格の許容濃度を超過しており、特に稲のメチル水銀は根、殻、わらなどの他の部位に比べ玄米に最も多かった(表7)。またメチル水銀(MeHg)は土壌から根そして玄米への移行や生物濃縮係数も高かった。計算による食事摂取量、標的ハザード指数(Hazard Quotient = [推定1日摂取量] ÷ [経口摂取基準値 Rfd])、ハザードインデックス(Hazard Index)の解析により万山水銀鉱山地区の米を消費したときの水銀、カドミウム、メチル水銀の人間への取り込みは潜在的リスクとなっており、この地区の汚染米消費はヒトの健康に対する潜在的な脅威であると結論づけた。

スロベニアの旧イドリア水銀鉱山地域中心部のイドリア町では水銀汚染問題がある。イドリア町は世界で2番目に汚染された水銀鉱山地域であり、この町の河川の堆積物や排水溝路の堆積物の水銀汚染について Bavec らが報告した⁷⁴⁾。水銀濃度は河川の堆積物に比べて排水溝路の堆積物で低く、その濃度は0.125 mm以下の粒子で16~110 mg/kg(中央値 29 mg/kg)、0.04 mm以下の粒子で7~125 mg/kg(中央値 35 mg/kg)であった。一方、河川の堆積物の濃度は0.125 mm以下の粒子で10~610 mg/kg(中央値 95 mg/kg)、0.04 mm以下の粒子で10~440 mg/kg(中央値 105 mg/kg)であった(図5)。河川の堆積物の高濃度水銀は、採取した堆積物が排水地域に位置しているため、水銀を含む鉱石、鉱石残渣、焙焼前の鉱石などが水銀源と考えられた。しかし、確認された水銀源と排水溝路の堆積物の水銀量の関連性は認められていない。熱脱着法による固相水銀の測定では両者の堆積物は同一であり、金属水銀、岩石基質と結合した水銀、辰砂の3種類であった。そして試料の約50%が非辰砂であり、これらは潜在的に生物にとって利用可能となる。調査した全ての堆積物中の金属水銀が測定されたがその量はわずかであった。500年以上の水銀採掘活動の結果、イドリア市街地の堆積物が水銀に汚染されていることが明らかとなった。

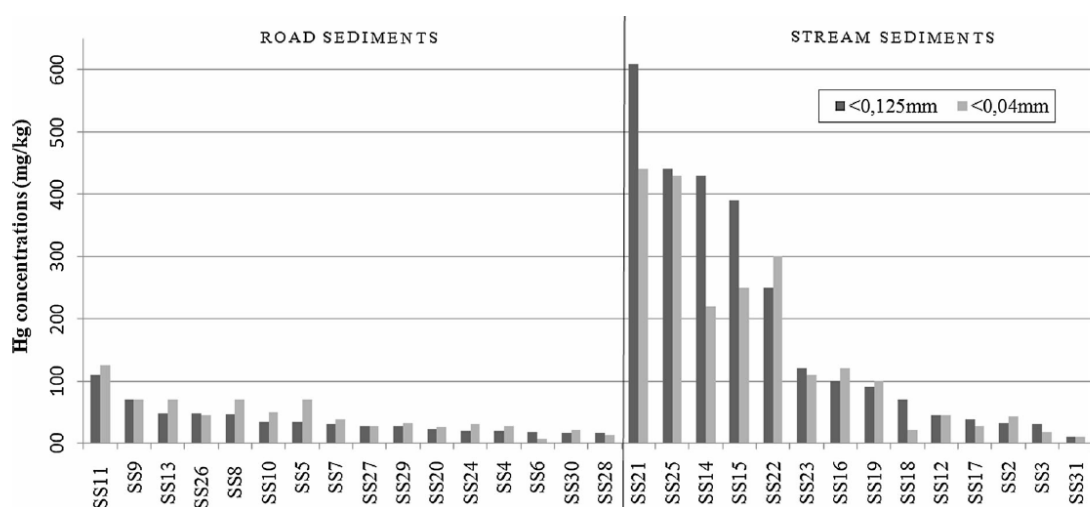


図5 Hg concentrations of road sediments (n = 16) from gully pots of urban drainage system and stream sediments (n = 14) from natural streams flowing through the urban area for two different grain sizes (<0.125 mm and <0.04 mm)

IV. 考察

2014年になって、メチル水銀の小児神経発達に及ぼす影響が胎児期曝露のせいではなく、出生後の曝露影響とする論文が発表された。台湾の Hsi らの研究である³⁴⁾。この研究では、従来より胎児期曝露指標として使われている臍帯血水銀濃度や出産時母親毛髪水銀濃度を用いず、①胎便中総水銀であり、かつ②対象者数が83名と多くないため、現時点においてこの結論をそのまま受け入れることは難しい。同様の発表は2004年の Murata らも行っている⁷⁵⁾。フェロー諸島出生コホート研究で、14歳児の聴性脳幹誘発電位の末梢側と中枢側の伝導時間(各々I-III潜時およびIII-V潜時)において、前者は胎児期曝露指標である出産時母親毛髪水銀濃度と有意な正の関連が認められ、一方後者は14歳児の毛髪水銀濃度と有意な正の関連が認められた。2014年に掲載された Grandjean らの論文の中で述べられているように²¹⁾、胎児期曝露とともに出生後曝露をも考慮しなくては、胎児期曝露による神経発達影響を正當に評価できなくなってしまう。すなわち、今後益々低濃度曝露の集団を用いた研究が増える傾向にあり、一方で健康影響は出生時に測定した検査成績でないことが多く(例えば、神経発達などでは出生直後に調べられる項目は少ない)、胎児期曝露と健康影響評価の間にはかなりの時間差が生じ易い。したがって、今後の出生コホート研究などでメチル水銀の影響を評価する場合、児の生体試料(指標)で胎児期曝露を評価するとともに、神経発達評価を行う時点の曝露評価も行うことが望まれる。特に、魚多食集団(日本人やセイシェル国民)においては、魚介類がメチル水銀曝露源であり続け、河川・海洋中に排出されるメチル水銀/水銀量が産業構造や各種規制、あるいは生活習慣の変遷とともに大きく変化しうるからである。

一方、胎児期とともに出生後の曝露データを有する場合、これら2つの影響を峻別するためにどのような多変量解析法を用いるべきかが問題となる。上述の Grandjean らは共分散構造分析法を推奨したが²¹⁾、実際には、2つの異なる時点の曝露指標が多数得られることは(多くの有害化学物質の曝露評価が求められている今日においては)滅多にない。また、胎児期と出生後の2時点の曝露指標の間に有意な相関が認められても、関連性が弱い場合には共分散構造分析や正準相関分析を使って潜在曝露指標として1つに要約することが間違った解釈に繋がる恐れもあろう。今後も同様の検討を含む研究例を集め、それらをよく吟味した後にケースバイケースで解析方法を決定すべきである。少なくとも、“共分散構造分析を用いたから大丈夫”と批判的吟味を怠ることは避けたい。

メチル水銀の神経系影響を否定する研究者はいない。一方、メチル水銀以外の鉛、ヒ素、マンガ、ポリ塩化ビフェニル(PCB)なども神経系に影響し^{25,28,76-81)}、セレンや長鎖多価不飽和脂肪酸(PUFA)などは単独あるいは毒性作用に対する拮抗作用として交絡することも明らかにされている^{11,39)}。フェロー諸島出生コホート研究では、7歳と14歳でほぼ同じ神経発達指標を用いており、異なる年齢においても同様の神経発達影響が胎児期のメチル水銀曝露と関連すると報告された^{75,82,83)}。また Choi らは、一連のフェロー諸島出生コホート研究において胎児期メチル水銀曝露の影響が PUFA を考慮することによって更に強くなったことを強調した²⁰⁾。これに対し、Tatsuta らは胎児期曝露指標としてメチル水銀、鉛、PCBs を使い、神経発達段階に合致した神経影響評価を行い、それら神経発達に胎児期曝露のどの化学物質が影響したのか分析した^{25,28,84)}。その際、

これまでの東北コホート調査では、逆に、異なる年齢に対して同じ神経心理検査を使っていないために影響する曝露物質が異なったのか、あるいは異なる神経発達段階で異なる化学物質が影響したのかを判別することができなくなってしまった。Boucher らの研究では検査項目により影響する化学物質が異なることが示唆された³¹⁾。今後の研究では、特定臓器影響を検討する場合でも、低濃度曝露であることを強く意識して、可能性のある化学物質を全て測定する、ないし各々の測定時点で生体試料の一部を保存しておくことも重要と思われる。さらに同一臓器でも異なる機能が評価できるよう幾つかの検査をおこなうと、想定外の事態にも対処可能となろう。

Sørensen らは、フェロー諸島出生コホート研究で、1~10 µg/L の臍帯血中水銀濃度 (あるいは 0.2~2 µg/g の出産時母親毛髪水銀濃度) が7歳児の血圧と有意な正の関係を持つことを報告した⁴⁾。それ以上の曝露レベルでは量-影響関係は見られなかった。これに対し、Kalish らは米国内のコホート調査で妊娠中期の血中水銀濃度と3.2歳および7歳児の収縮期血圧の間に有意な関係は見られなかったと報じた³³⁾。恐らく、米国の子どもの胎児期曝露レベルはフェロー諸島の低濃度曝露レベルの集団 (上記の毛髪水銀で 0.2~2 µg/g) と変わりなかった筈である。この相対立する結果をどのように解釈するのかについては、人種、気候 (気温)、生活時間、子どもの食物調理・摂食法、ひいては血圧の測定方法 (フェロー諸島では水銀血圧計で計2名の小児科医が測定、米国では自動血圧計で複数の研究補助員が測定) に至るまで吟味しなければ、本来の科学と言えない。

測定バイアスは、特定疾患患者や高濃度曝露者を対象とする場合には結果を大きく歪曲しないかもしれぬが、健常小児を対象とする神経発達検査などでは慎重に検討しなくてはならない。すなわち、検査者の言動・行動は子どもの検査得点に鋭敏に影響する。子どもは、例えば、少しでも強権的な口調と感じるとその後の検査者に対する返答が単調になってしまうし、また間の置き方次第で検査に集中できなくなってしまう。フェロー諸島出生コホート研究の7歳児および14歳児の神経心理検査 (Wechsler 知能検査の中の類似性問題を除く⁸⁵⁾) は臨床神経心理士1名によって実施されたので測定者間のバイアスは存在しなかった⁸⁶⁾。セイシエルの小児神経発達検査は複数の検査者がおこなったが、検査時にビデオ撮影し、検査後に専門家が実施状況をビデオ画像より逐一確認し、さらに検査者にダミー変数を付して統計解析の中で調整した¹⁰⁾。東北コホート調査でも、K-ABC 検査において検査者にダミー変数を付して解析した²⁵⁾。わが国のエコチル調査で無作為抽出された5,000名の詳細調査が行われようとしている。ユニットセンター毎に検査者1名を擁して実施するとしても14以上のダミー変数が必要となる。この種の調査結果を世界水準並にするためにどのように実施すれば良いのか事前に検討しなくてはならないし、測定の誤差・偏りが大きい場合にはその理由 (excuse ではなく rationale) を特定することも重要となる。少なくとも、“大数調査なので問題はない”と考えるのは素人の発想であり、検査者内変動や検査者間変動に問題がないことを確認してからデータ解析は行われなければならない。多くの場合、小児において同一検査を二度以上行うことは難しいので、検査者間変動はダミー変数を付して解析するしか調整方法はないように思われる。

メチル水銀毒性に拮抗する作用を持つとされるセレン化合物の生化学的機序の解明が進んでいる。ゼブラフィッシュ胚実験で、セレン蛋白質に含まれる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示された⁸⁷⁾。同様に、*in vivo* 実験なども行われ、分子レベルでの解明も進み

つつある⁵⁷⁾。ヒトでも同様の機序・作用が存在するのかが今後の課題である。Nakamuraらはゴンドウクジラなどを食べる文化を持つ和歌山県太地町の研究で、高濃度曝露の成人集団に神経内科学的検査を実施したが、殆ど神経症状は観察されなかった。その理由として、水銀/セレンモル比が1未満と低いことから、十分量のセレン摂取によってメチル水銀毒性が抑制されたのではないかと考えた³⁹⁾。但し、後者の調査対象者数は23名と少なく、さらなる調査が必要と思われる。

小規模金鉱山においては金抽出で使用する水銀アマルガム法により、周辺の土壌のみならず植物の水銀汚染が今日も続いている⁶⁴⁾。さらに金鉱山周辺の河川のみならず河口の堆積物まで水銀汚染が及んでおり、農業・漁業資源への影響によるヒトへの健康リスクが危惧されている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。特に、金鉱山地域で子供に対する水銀曝露リスクの原因を調査した研究では、親が金採掘作業、家族が水銀を使用、子供が家で遊ぶなどが危険因子として挙げられ、さらに家庭内での金-水銀アマルガムの燃焼もリスク要因の1つとされた⁶⁹⁾。また、金鉱山周辺住民の水銀によるリスク評価では水銀蒸気曝露以外にも水銀に汚染されている魚介類摂取がリスクを高めていることが判明した⁷¹⁾。金鉱山周辺の河川で採取される魚介類は他地区に比べ水銀濃度が高く、中でも魚食魚は非魚食魚に比べて高く、持続的なモニタリングが必要であることが明らかとなった⁷²⁾。さらに、中国の水銀鉱山周辺の土壌中の微量金属を測定すると、水銀とカドミウムが高値であった⁷³⁾。しかも玄米にも水銀、カドミウム、メチル水銀が許容濃度以上に含有しており、汚染米の消費はヒトへの健康に対する潜在的なリスクとなっている。これらの事実を踏まえて、発展途上国での健康管理や保健計画を練っていく必要がある。また近年、金の抽出に水銀やシアンを用いない礬砂による新しい抽出技術が開発されており、今後の水銀汚染防止対策に期待が寄せられる。

V. 結論

今年度の文献レビューにより、以下のことが示された。①近年 OpenAccess 誌が多数発行され、その結果メチル水銀・水銀に関する論文数も増加傾向にある。しかし、これは読むに値する論文が増えたことを必ずしも意味していないので、別途検討する必要がある。②2013年10月10日に熊本で「水銀に関する水俣条約」が採択、署名されたことを受けてか、メチル水銀の疫学研究論文が激減した。③メチル水銀の主たる健康影響は神経影響と考えられているが、神経発達に及ぼす他の有害因子 (PCBs や鉛) も古くから知られており、これらの同時曝露を想定した研究が増えてきた。一方で、メチル水銀研究の中心課題が失せ、次なる課題が模索されているように考えられた。④大規模出生コホート研究が世界の彼方此方で行われるようになったが、胎児期曝露と出生後曝露のいずれの影響かを検討する方法も必要となってきた。⑤メチル水銀の毒性に対しセレン化合物が拮抗作用を持つことを水生生物、*in vitro* 実験などを通して解明されつつあるものの、疫学研究ではまだメチル水銀毒性に対しセレンが拮抗作用を持つとする確実な証拠となっていない。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。

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、PCBs、セレンなど）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。また本年度の文献レビューにも出てきたが、低濃度メチル水銀曝露による健康影響を臓器（疾患）別に明確にする必要がある。また、疫学研究のデザイン・実施・解析方法に係わる注視点や考慮すべき点を文献レビューの中で例示することにより、わが国で実施されているエコチル調査の参考となるよう努めたい。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, Nyssonen 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, Jancius 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, Jancius 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. 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.
 15. 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>]
 16. 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>]
 17. Tang-Péronard 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(1): 5-13.
 18. Kvist L, Giwercman A, Weihe P, Kold Jensen T, Grandjean P, Halling J, Skaalum Petersen M, Lundberg Giwercman Y. Exposure to persistent organic pollutants and sperm sex chromosome ratio in men from the Faroe Islands. *Environ Int* 2014; 73: 359-364.
 19. 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(3): e001946.
 20. Choi AL, Mogensen UB, Bjerre KS, Debes F, Weihe P, Grandjean P, Budtz-Jørgensen E. Negative confounding by essential fatty acids in methylmercury neurotoxicity associations. *Neurotoxicol Teratol* 2014; 42: 85-92.

21. Grandjean P, Weihe P, Debes F, Choi AL, Budtz-Jørgensen E. Neurotoxicity from prenatal and postnatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 2014; 43: 39-44.
22. Osuna CE, Grandjean P, Weihe P, El-Fawal HA. Autoantibodies associated with prenatal and childhood exposure to environmental chemicals in Faroese children. *Toxicol Sci* 2014; 142: 158-166.
23. Kim BM, Choi AL, Ha EH, Pedersen L, Nielsen F, Weihe P, Hong YC, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Effect of hemoglobin adjustment on the precision of mercury concentrations in maternal and cord blood. *Environ Res* 2014; 132: 407-412.
24. Todaka T, Hori T, Hirakawa H, Kajiwara J, Yasutake D, Onozuka D, Kato S, Sasaki S, Nakajima S, Saijo Y, Sata F, Kishi R, Iida T, Furue M. Congener-specific analysis of non-dioxin-like polychlorinated biphenyls in blood collected from 195 pregnant women in Sapporo City, Japan. *Chemosphere* 2008; 73: 923-931.
25. Tatsuta N, Nakai K, Murata K, Suzuki K, Iwai-Shimada M, Yaginuma-Sakurai K, Kurokawa N, Nakamura T, Hosokawa T, Satoh H. Prenatal exposures to environmental chemicals and birth order as risk factors for child behavior problems. *Environ Res* 2012; 114: 47-52.
26. 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.
27. Kishi R, Kobayashi S, Ikeno T, Araki A, Miyashita C, Itoh S, Sasaki S, Okada E, Kobayashi S, Kashino I, Itoh K, Nakajima S. Ten years of progress in the Hokkaido birth cohort study on environment and children's health: cohort profile-updated 2013. *Environ Health Prev Med* 2013; 18: 429-450.
28. Tatsuta N, Nakai K, Murata K, Suzuki K, Iwai-Shimada M, Kurokawa N, Hosokawa T, Satoh H. Impacts of prenatal exposures to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and lead on intellectual ability of 42-month-old children in Japan. *Environ Res* 2014; 133: 321-326.
29. van Wijngaarden E, Harrington D, Kobrosly R, Thurston SW, O'Hara T, McSorley EM, Myers GJ, Watson GE, Shamlaye CF, Strain JJ, Davidson PW. Prenatal exposure to methylmercury and LCPUFA in relation to birth weight. *Ann Epidemiol* 2014; 24(4): 273-278.
30. Lyngdoh T, Viswanathan B, van Wijngaarden E, Myers GJ, Bovet P. Cross-sectional and longitudinal associations between body mass index and cardiometabolic risk factors in adolescents in a country of the African region. *Int J Endocrinol* 2013; 2013: 801832.
31. Boucher O, Muckle G, Jacobson JL, Carter RC, Kaplan-Estrin M, Ayotte P, Dewailly É, Jacobson SW. Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: results from the Environmental Contaminants and Child Development Study in Nunavik. *Environ Health Perspect* 2014; 122(3): 310-316.
32. Orenstein STC, Thurston SW, Bellinger DC, Schwartz JD, Amarasiriwardena CJ, Altshul LM, Korrick SA. Prenatal organochlorine and methylmercury exposure and memory and learning in school-age children in communities near the New Bedford Harbor Superfund site, Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2014; 122(11): 1253-1259.

33. Kalish BT, Rifas-Shiman SL, Wright RO, Amarasiriwardena CJ, Jayawardene I, Jayawardene I, Gillman MW, Lipshultz ST, Oken E. Associations of prenatal maternal blood mercury concentrations with early and mid-childhood blood pressure: a prospective study. *Environ Res* 2014; 133: 327-333.
34. Hsi HC, Jiang CB, Yang TH, Chien LC. The neurological effects of prenatal and postnatal mercury/methylmercury exposure on three-year-old children in Taiwan. *Chemosphere* 2014; 100: 71-76.
35. Basu N, Tutino R, Zhang Z, Cantonwine DE, Goodrich JM, Somers EC, Rodriguez L, Schnaas L, Solano M, Mercado A, Peterson K, Sanchez BN, Hernandez-Avila M, Hu H, Tellez-Rojo MM. Mercury levels in pregnant women, children, and seafood from Mexico City. *Environ Res* 2014; 135: 53-69.
36. Carneiro MF, Grotto D, Barbosa F Jr. Inorganic and methylmercury levels in plasma are differentially associated with age, gender, and oxidative stress markers in a population exposed to mercury through fish consumption. *J Toxicol Environ Health A* 2014; 77: 69-79.
37. Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Nakajima T, Naito H, Ito S, Sasaki S, Cho K, Ikeno T, Nonomura K, Kishi R. Association between maternal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate and reproductive hormone levels in fetal blood: The Hokkaido Study on Environment and Children's Health. *PLoS One* 2014; 9(10): e109039.
38. Okada E, Sasaki S, Kashino I, Matsuura H, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh K, Ikeno T, Tamakoshi A, Kishi R. Prenatal exposure to perfluoroalkyl acids and allergic diseases in early childhood. *Environ Int* 2014; 65: 127-134.
39. Nakamura M, Hachiya N, Murata KY, Nakanishi I, Kondo T, Yasutake A, Miyamoto K, Ser PH, Omi S, Furusawa H, Watanabe C, Usuki F, Sakamoto M. Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. *Environ Int* 2014; 68: 25-32.
40. Yan J, Inoue K, Asakawa A, Harada KH, Watanabe T, Hachiya N, Koizumi A. Methylmercury monitoring study in Karakuwacho Peninsular area in Japan. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014; 93: 36-41.
41. Yamashita M, Yamashita Y, Ando T, Wakamiya J, Akiba S. Identification and determination of selenoneine, 2-selenyl-N α , N α , N α -trimethyl-L-histidine, as the major organic selenium in blood cells in a fish-eating population on remote Japanese Islands. *Biol Trace Elem Res* 2013; 156: 36-44.
42. Karimi R, Fisher NS, Meliker JR. Mercury-nutrient signatures in seafood and in the blood of avid seafood consumers. *Sci Total Environ* 2014; 496: 636-643.
43. Guedes Seixas T, Moreira I, Siciliano S, Malm O, Kehrig HA. Mercury and selenium in tropical marine plankton and their trophic successors. *Chemosphere* 2014; 111: 32-39.
44. Zayas ZP, 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.
45. Razavi NR, Arts MT, Qu M, Jin B, Ren W, Wang Y, Campbell LM. Effect of eutrophication on mercury, selenium, and essential fatty acids in Bighead Carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) from reservoirs of eastern China. *Sci Total Environ* 2014; 499C: 36-46.

46. Raimundo J, Pereira P, Vale C, Canário J, Gaspar M. Relations between total mercury, methylmercury and selenium in five tissues of *Sepia officinalis* captured in the south Portuguese coast. *Chemosphere* 2014; 108: 190-196.
47. Burger J, Feinberg J, Jeitner C, Gochfeld M, Donio M, Pittfield T. Selenium:mercury molar ratios in bullfrog and leopard frog tadpoles from the northeastern United States. *Ecohealth* 2014; 11: 154-163.
48. Perrault JR. Mercury and selenium ingestion rates of Atlantic leatherback sea turtles (*Dermochelys coriacea*): a cause for concern in this species? *Mar Environ Res* 2014; 99: 160-169.
49. Kalisinska E, Gorecki J, Okonska A, Pilarczyk B, Tomza-Marciniak A, Budis H, Lanocha N, Kosik-Bogacka DI, Kavetska KM, Macherzynski M, Golas JM. Mercury and selenium in the muscle of piscivorous common mergansers (*Mergus merganser*) from a selenium-deficient European country. *Ecotoxicol Environ Saf* 2014; 101: 107-115.
50. Kalisinska E, Gorecki J, Okonska A, Pilarczyk B, Tomza-Marciniak A, Budis H, Lanocha N, Kosik-Bogacka DI, Kavetska KM, Macherzynski M, Golas J. Hepatic and nephric mercury and selenium concentrations in common mergansers, *Mergus merganser*, from Baltic Region, Europe. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 421-430.
51. Hall BD, Doucette JL, Bates LM, Bugajski A, Niyogi S, Somers CM. Differential trends in mercury concentrations in double-crested cormorant populations of the Canadian Prairies. *Ecotoxicology* 2014; 23: 419-428.
52. Huang SS, Hung SS, Chan HM. Maintaining tissue selenium species distribution as a potential defense mechanism against methylmercury toxicity in juvenile white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Aquat Toxicol* 2014; 156C: 88-95.
53. Olsvik PA, Amlund H, Sæle O, Ellingsen S, Skjaerven KH. Impact of dietary selenium on methylmercury toxicity in juvenile Atlantic cod: A transcriptional survey. *Chemosphere* 2014; 120C: 199-205.
54. Penglase S, Hamre K, Ellingsen S. Selenium and mercury have a synergistic negative effect on fish reproduction. *Aquat Toxicol* 2014; 149: 16-24.
55. 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.
56. Wang X, Tam NF, Fu S, Ametkhan A, Ouyang Y, Ye Z. Selenium addition alters mercury uptake, bioavailability in the rhizosphere and root anatomy of rice (*Oryza sativa*). *Ann Bot* 2014; 114: 271-278.
57. Truong HY, Chen YW, Saleh M, Nehzati S, George GN, Pickering IJ, Belzile N. Proteomics of *Desulfovibrio desulfuricans* and X-ray absorption spectroscopy to investigate mercury methylation in the presence of selenium. *Metallomics* 2014; 6: 465-475.
58. Branco V, Godinho-Santos A, Gonçalves J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Mitochondrial thioredoxin reductase inhibition, selenium status, and Nrf-2 activation are determinant factors modulating the toxicity of mercury compounds. *Free Radic Biol Med* 2014; 73: 95-105.

59. Moreno F, García-Barrera T, Gómez-Jacinto V, Gómez-Ariza JL, Garbayo-Nores I, Vílchez-Lobato C. Antagonistic interaction of selenomethionine enantiomers on methylmercury toxicity in the microalgae *Chlorella sorokiniana*. *Metallomics* 2014; 6: 347-355.
60. Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK, Srivastav SK. Methylmercury toxicity: amelioration by selenium and water-soluble chelators as N-acetyl cysteine and dithiothreitol. *Cell Biochem Funct* 2014; 32: 351-360.
61. Mohamed Moosa Z, Daniels WM, Mabandla MV. The effects of prenatal methylmercury exposure on trace element and antioxidant levels in rats following 6-hydroxydopamine-induced neuronal insult. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 459-469.
62. Li X, Yin D, Yin J, Chen Q, Wang R. Dietary selenium protect against redox-mediated immune suppression induced by methylmercury exposure. *Food Chem Toxicol* 2014; 72C: 169-177.
63. Seccatore J, Veiga M, Origiasso C, Marin T, De Tomi G. An estimation of the artisanal small-scale production of gold in the world. *Sci Total Environ* 2014; 496: 662-667.
64. Odumo BO, Carbonell G, Angeyo HK, Patel JP, Torrijos M, Rodríguez Martín JA. Impact of gold mining associated with mercury contamination in soil, biota sediments and tailings in Kenya. *Environ Sci Pollut Res* 2014; 21: 12426-12435.
65. Nyanza EC, Dewey D, Thomas DS, Davey M, Ngallaba SE. Spatial distribution of mercury and arsenic levels in water, soil and cassava plants in a community with long history of gold mining in Tanzania. *Bull Environ Contam Toxicol* 2014; 93: 716-721.
66. Male YT, Reichelt-Brushett AJ, Pocock M, Nanlohy A. Recent mercury contamination from artisanal gold mining on Buru Island, Indonesia--potential future risks to environmental health and food safety. *Mar Pollut Bull* 2013; 77: 428-433.
67. Laperche V, Hellal J, Maury-Brachet R, Joseph B, Laporte P, Breeze D, Blanchard F. Regional distribution of mercury in sediments of the main rivers of French Guiana (Amazonian basin). *Springerplus* 2014; 3: 322.
68. Mostafazadeh B, Kiani A, Mohamadi E, Shaki F, Shirazi FH. Mercury exposure of gold mining workers in the northwest of Iran. *Pak J Pharm Sci* 2013; 26: 1267-1270.
69. Ohlander J, Huber SM, Schomaker M, Heumann C, Schierl R, Michalke B, Jenni OG, Caflisch J, Muñoz DM, von Ehrenstein OS, Radon K. Risk factors for mercury exposure of children in a rural mining town in northern Chile. *PLoS One* 2013; 8: e79756.
70. De Miguel E, Clavijo D, Ortega MF, Gómez A. Probabilistic meta-analysis of risk from the exposure to Hg in artisanal gold mining communities in Colombia. *Chemosphere* 2014; 108: 183-189.
71. Peplow D, Augustine S. Neurological abnormalities in a mercury exposed population among indigenous Wayana in Southeast Suriname. *Environ Sci Process Impacts* 2014; 16: 2415-2422.
72. Rodríguez Martín-Doimeadios RC, Berzas Nevado JJ, Guzman Bernardo FJ, Jimenez Moreno M, Arrifano GPF, Herculano AM, do Nascimento JLM, Crespo-Lopez ME. Comparative study of mercury speciation in commercial fishes of the Brazilian Amazon. *Environ Sci Pollut Res* 2014; 21: 7466-7479.

73. Li WC, Ouyang Y, Ye ZH. Accumulation of mercury and cadmium in rice from paddy soil near a mercury mine. *Environ Toxicol Chem* 2014; 33: 2438-2447.
74. Bavec S, Biester H, Gosar M. Urban sediment contamination in a former Hg mining district, Idrija, Slovenia. *Environ Geochem Health* 2014; 36: 427-439.
75. 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.
76. Needleman HL, Gatsonis CA. Low-level exposure and the IQ of children. A meta-analysis of modern studies. *JAMA* 1990; 263: 673-678.
77. Baghurst PA, McMichael AJ, Wigg NR, Vimpani GV, Robertson EF, Roberts RJ, Tong SL. Environmental exposure to lead and children's intelligence at the age of seven years. The Port Pirie Cohort Study. *N Engl J Med* 1992; 327: 1279-1284.
78. Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. *Pediatrics* 1992; 90: 855-861.
79. Dietrick KN, Berger OG, Succop PA, Hammond PB, Bornschein RL. The developmental consequences of low to moderate prenatal and postnatal lead exposure: intellectual attainment in the Cincinnati Lead Study Cohort following school entry. *Neurotoxicol Teratol* 1993; 15: 37-44.
80. Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, Kline J, van Geen A, Slavkovich V, Loiacono NJ, Levy D, Cheng Z, Graziano JH. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 285-289.
81. Claus Henn B, Schnaas L, Ettinger AS, Schwartz J, Lamadrid-Figueroa H, Hernandez-Avila M, Amarasiriwardena C, Hu H, Bellinger DC, Wright RO, Tellez-Rojo MM. Associations of early childhood manganese and lead coexposure with neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 126-131.
82. 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.
83. Debes F, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28: 363-375.
84. Suzuki K, Nakai K, Sugawara T, Nakamura T, Ohba T, Shimada M, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Kurokawa N, Murata K, Satoh C, Satoh H. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs and seafood intake: Neonatal Behavioral Assessment Scale results of Tohoku Study of Child Development. *Environ Res* 2010; 110: 699-704.
85. 村田勝敬, 嶽石美和子, 岩田豊人. フェロー諸島における出生コホート研究. *環境科学会誌* 2004; 17: 169-180.
86. 村田勝敬, 嶽石美和子. 胎児性メチル水銀曝露の小児発達影響と臨界濃度—セイシェルおよびフェロー諸島の研究を中心に—. *日衛誌* 2005; 60: 4-14.
87. 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.

A review on health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata¹, Minoru Yoshida², Kanae Karita³, Nozomi Tatsuta⁴, Toyoto Iwata¹, Kunihiro 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 of Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine

⁴ 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

Keywords: methylmercury; mercury; selenium; low-level exposure; developing countries; review

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, but health problem of low-level exposure to methylmercury among fetuses and children has not fully been resolved. For this reason, mercury contamination due to gold mining is a worldwide problem especially in developing countries such as Brazil, in southeastern Asia, or in Africa. From this view point, we provide an overview of epidemiological studies, mainly issued in 2014, on health effects of low-level exposures to methylmercury and mercury.

The following findings were obtained in this fiscal year: (1) Recently open-access journals increase and the number of papers addressing methylmercury or mercury also tends to increase, which does not always imply that there are a lot of papers to be of great value to readers. (2) The proportion of epidemiological research among papers addressing methylmercury and mercury greatly decreased in 2014. (3) A statistical method for assessing the toxic effects of prenatal and postnatal exposures to methylmercury on child neurodevelopment was introduced. Hereafter, a statistical method for distinguishing clearly the effects of the prenatal exposure from those of the postnatal exposure also has to be developed. (4) Antagonistic interactions of selenium against the toxicity of methylmercury were demonstrated in aquatic organisms and *in vitro* studies. In epidemiological studies, however, there is little evidence of the toxicological modification of methylmercury by selenium. (5) Toxic effects of methylmercury and mercury are of great concern to workers engaged in small-scale gold mining and smelting and to people residing in the surrounding area.

These results suggested that continuous collection and analysis of published papers are needed to clarify other adverse effects of methylmercury and mercury on human health and to find a key 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

我々は網羅的遺伝子スクリーニングを行い、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として **HOXB13** を同定した。昨年度の検討により、メチル水銀がこの **HOXB13** を介して **TNF- α** の発現を誘導することが明らかとなった。そこで、本年度は更に詳細な検討を行った。その結果、まず、**TNF- α** の発現誘導に関わる主要な転写因子として知られる **NF- κ B** がメチル水銀によって活性化されることが確認された。**NF- κ B** の構成因子である **RELA** のノックダウンは **HOXB13** のノックダウンと同様にメチル水銀による **TNF- α** の発現誘導を著しく抑制すると共に細胞にメチル水銀耐性を与えたが、両者を同時にノックダウンさせてもどちらか片方をノックダウンさせた場合よりもそれらの程度が上昇することはなかった。**HOXB13** が細胞内で **RELA** と結合しないことが確認されたことから、**HOXB13** は **NF- κ B** との何らかの協調作用を介して **TNF- α** の発現誘導およびメチル水銀毒性発現に関与しているものと考えられる。一方、昨年度の検討によって、**TNF- α** と **TNF** 受容体との結合を阻害する環状ペプチドである **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たことから、メチル水銀によって発現誘導されて細胞外に放出された **TNF- α** がメチル水銀毒性発現に関与している可能性が示唆されていた。ところが、本年度の検討によって、**TNF- α** のノックダウンまたはリコンビナント **TNF- α** および **TNF- α** 抗体の培地中への添加が細胞のメチル水銀感受性を低下させないことが判明した。しかし、メチル水銀で処理した細胞の培養液中に細胞毒性を示す因子が放出されていることが確認されたことから、本因子を同定することによってメチル水銀毒性発現機構解明の突破口が開かれるものと期待される。一方、メチル水銀によってマウス脳中で発現上昇するサイトカイン分子種をより明確にするため、**TNF** ファミリーおよびインターロイキンファミリーに属する全てのサイトカイン分子種について検討を行ったところ、昨年度同定された **TNF- α** および **IL-19** 以外に **TNFSF8** および **IL-1 β** が見出され、これらの中で **TNF- α** および **IL-19** がメチル水銀によって脳特異的に発現誘導されることが確認された。

キーワード：メチル水銀、感受性決定遺伝子、Hoxb13、NF- κ B、TNF- α

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、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を実施し、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. 蛋白質の抽出および 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×PBS で wash し、その後 1×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×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×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 した後に、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。

2. 核画分の分画

$1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells に 400 μ L の hypotonic buffer を加え、細胞を回収し、氷上で 15 分間静置させる。その後、10 % NP-40 を 10 μ L 加えピペッティングした後遠心 (1,500×g、5 分、4°C) した。上清を取り除き (上清を post nuclear 画分とする) 得られたペレットに 75 μ L の nuclear lysis buffer を加え、超音波処理 (メモリ 1 で 20 回) した後、氷上で 30 分間インキュベートした。最後に遠心 (15,000×g、5 分、4°C) し、得られた上清を nuclear 画分とした。それらに同量の 2×sample buffer を加え SDS-PAGE 用サンプルとした。

3. 細胞へのプラスミドの導入

5×10^5 cells の HEK293 細胞を 2 mL の D'MEM / 10% FBS (penicillin / streptomycin free) で 6-well plate に播種し、24 時間、37°C、5% CO₂ で培養後、transfection complex 500 μ L (240 μ L OptiMEM に Lipofectamine2000 10 μ M を混合し 5 分間室温でインキュベートした後、DNA 1 μ g と OptiMEM 250 μ L を混合したものを合わせ、15 分間室温でインキュベートして調整した。) を添加して、6 時間、37°C、5% CO₂ で培養後、2 mL の D'MEM / 10% FBS (+ penicillin / streptomycin) で置換し、24 時間、37°C、5% CO₂ で培養した。

4. 免疫沈降

0.5% NP-40 lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4、150 mM NaCl、2 mM MgCl₂、0.5% NP-40、protease inhibitor cocktail) で蛋白質を抽出した後、DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量後、総蛋白質量が一定で、0.5% NP-40 lysis buffer で希釈した。あらかじめ 3 回洗浄しておいた anti-V5 affinity gel を加え、4°C で 3 時間以上インキュベートした。Beads を洗浄後、beads と 0.5% NP-40 lysis

buffer を合わせて 30 μL となるように 0.5% NP-40 lysis buffer を加え、更に 2 \times sample buffer を加えた。100 $^{\circ}\text{C}$ で 5 分加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

5. RNA の単離

$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ の細胞を 1 \times PBS で wash した後、Isogen II 300 μL を添加し細胞を溶解させた。そこに 120 μL 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 $\times g$ で 15 分間遠心した。上清 300 μL を回収し 300 μL 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 $\times g$ で 10 分間遠心した。上清を除去し 500 μL の 75%エタノールを加え 8,000 $\times g$ 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 \times PrimeScript buffer 2 μL 、PrimeScript RT enzyme mix 0.5 μL 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、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 $^{\circ}\text{C}$ で 5 秒間処理した。

7. 定量 PCR

SYBR Premix Ex Taq を 5 μL 、cDNA を 1 μL 、H₂O を 3.6 μL 、10 μM forward-、10 μM reverse- primer を 0.2 μL ずつ計 10 μL に調整し、Thermal Cycler Dice RELA 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. ノックダウン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 D'MEM (10% FBS)となるように細胞数を合わせ、そこに transfection complex (OptiMEM 94 μL に同じ遺伝子をターゲットする二種の 4 μM siRNA を 3 μL ずつ添加し、12 μL 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 μL /well となるように添加し、48 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ で培養後、2 μM ~ 12 μM MeHgCl を 10 μL ずつ添加した。さらに 48 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ で培養した後、培地を取り除き、10% Alamar Blue を含む D'MEM/10% FBS を 75 μL を加え約 2 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、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)。

9. 各種阻害剤または各種抗体の添加が細胞のメチル水銀に対する感受性

96-well plate に 1×10^4 cells/80 μL D'MEM (10% FBS)となるように細胞数を播き、24 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ で培養後、2 μM ~ 12 μM MeHgCl を 10 μL と、各種阻害剤もしくは各種抗体希釈液をそれぞれ 10 μL ずつ連続して添加した。さらに 48 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ で培養した後、培地を取り除き、10% Alamar Blue を含む D'MEM/10% FBS を 75 μL を加え約 2 時間、37 $^{\circ}\text{C}$ 、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)。

(倫理面への配慮)

培養細胞の遺伝子組み換え体を用いた研究は、東北大学遺伝子組換え実験安全専門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。動物実験についても、東北大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北大学における動物実験等に関する規程」に従って実施した。

III 研究結果と考察

(1) HOXB13 を介した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として同定されたものの中に、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）。HOXB13 は細胞のメチル水銀感受性を高める作用を有すると考えられるが、その機能はほとんど知られていない。我々は昨年度の本研究において HOXB13 が示すメチル水銀毒性増強作用について検討し、メチル水銀が HOXB13 を介して TNF- α の発現を誘導することを明らかにすると共にこの際に細胞外に高濃度に放出された TNF- α がメチル水銀毒性の発現に重要な役割を果たしている可能性を示唆した。

メチル水銀による HOXB13 の活性化機構として、メチル水銀が HOXB13 の核内への移行を促進している可能性が考えられる。そこで本年度はまず、HOXB13 の細胞内分布に与えるメチル水銀の影響を HEK293 細胞を用いて検討した。その結果、メチル水銀処理をしていない状態においても細胞内の HOXB13 のほとんどが核内に存在し、メチル水銀はこの HOXB13 の細胞内分布やそのレベルに影響を及ぼさないことが判明した。これらのことから、HOXB13 は核内で何らかの機構によってメチル水銀による TNF- α の発現誘導に関与しており、メチル水銀は核内において HOXB13 を活性化するか、または、細胞質中に存在する他の蛋白質を核内に移行させて当該蛋白質の核内での HOXB13 との相互作用を促進させることによって間接的に HOXB13 を活性化している可能性が考えられる。

TNF- α の発現誘導に関わる主な転写因子として NF- κ B が知られている。通常時の NF- κ B は I κ B α と結合することによってその活性が抑制された形で細胞質中に存在している。しかし、外来刺激によって I κ B α がリン酸化されてプロテアソームで分解されると I κ B α によりマスクされていた NF- κ B の核内移行シグナルが露出し、NF- κ B は核内に移行するようになる。その後、NF- κ B は DNA 上の κ B モチーフと呼ばれる配列に結合し、目的遺伝子の転写活性化を行うことが知られている。そこで、メチル水銀が I κ B α の細胞内レベルに与える影響を検討したところ、細胞内 I κ B α レベルのメチル水銀処理時間に依存した減少が認められ、メチル水銀が NF- κ B を活性化させていることが示された。また、NF- κ B の構成因子である RELA をノックダウンさせたところ、メチル水銀による TNF- α の発現誘導が著しく減少した。これらのことは、メチル水銀による TNF- α の発現誘導に NF- κ B が関与していることを示唆している。次に、メチル水銀による TNF- α の発現誘導における HOXB13 と NF- κ B との関わりを検討したところ、HOXB13 または RELA のノッ

クダウンによってメチル水銀による TNF- α の発現誘導が抑制され、両因子を同時にノックダウンしても更なる TNF- α の発現誘導の抑制は認められなかった。HOXB13 が細胞内で RELA と結合しないことが免疫沈降法により確認されたことから、HOXB13 は NF- κ B と結合することなく、NF- κ B との何らかの協調作用を介してメチル水銀による TNF- α の発現誘導に関与していると考えられる。また、RELA のノックダウンは細胞にメチル水銀耐性を与えたが、メチル水銀耐性を示す HOXB13 ノックダウン細胞においては RELA をノックダウンさせても更なるメチル水銀毒性の軽減作用はほとんど認められなかった。以上の結果から、HOXB13 は NF- κ B との協調作用を介して TNF- α の発現誘導およびメチル水銀毒性発現に関与しているものと考えられる。

(2) メチル水銀によって細胞外に放出されるメチル水銀毒性増強因子

昨年度の検討において、我々は TNF- α と TNF 受容体との結合を阻害する環状ペプチドである 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を見出し、このことからメチル水銀によって発現誘導されて細胞外に放出された TNF- α がメチル水銀毒性発現に関与している可能性が示唆された。そこで本年度は、TNF- α のノックダウンが細胞のメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、予想に反して、TNF- α ノックダウン細胞は対照細胞に比べて僅かながら高いメチル水銀感受性を示した。定常状態において TNF- α は細胞接着分子の発現や抗体産生を亢進させることにより感染防御や発癌抑制に関与しているが、過剰に産生された TNF- α は関節リウマチや乾癬などの炎症性疾患を誘発することが知られている。TNF- α をノックダウンした際に認められた高いメチル水銀感受性は、定常レベルでの TNF- α の機能も欠失されたために生じた現象である可能性も否定できない。そこで、リコンビナント TNF- α および TNF- α 抗体の培地中へ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。その結果、何れの添加も細胞のメチル水銀感受性にほとんど影響を与えなかった。このことから、HOXB13 を介してメチル水銀によって誘導される TNF- α は少なくとも培養細胞レベルではメチル水銀感受性の増強にほとんど関与していない可能性が考えられる。しかし、TNF- α 阻害剤である WP9QY の添加が細胞のメチル水銀毒性を軽減し、HOXB13 ノックダウン細胞では WP9QY を添加してもメチル水銀毒性の軽減が認められないことから、TNF- α 以外の未知の蛋白質が細胞外に放出されて細胞膜に存在する受容体に結合することによってメチル水銀毒性発現に関与している可能性が考えられる。そこで、NF- κ B によって発現が誘導されることが報告されているサイトカインである IL-2、IL-6、IL-8、IL-12A および IL12-B の発現にメチル水銀が与える影響を検討した。その結果、IL-8 の発現のみがメチル水銀によって誘導され、この誘導は HOXB13 のノックダウンによって著しく抑制された。しかし、IL-8 の抗体を培地中に添加しても細胞のメチル水銀感受性にほとんど影響が認められなかった。これらのことから、少なくとも IL-2、IL-6、IL-8、IL-12A および IL12-B は培養細胞でのメチル水銀毒性発現に関与していないと考えられる。

次に、メチル水銀によって細胞外放出が促進され、かつ、細胞毒性を示す因子の検索を試みた。細胞をメチル水銀で 2 時間処理した後に培地を除去し、緩衝液で細胞を洗浄した後に新しい培地に交換して更に 6 時間培養した際の培地を回収して、その培地で別に用意しておいた細胞を培養した。その結果、メチル水銀で処理した細胞の培養液が細胞毒性を示すことが判明した。このメチル水銀処理細胞培養液は 100°C、30 分間の加熱により細胞毒性をほとんど示さなくなった。なお、メチル水銀処理細胞培養液中には少量ながらメチル水銀が残存しているが、この濃度のメチル水銀はほとんど細胞毒性を示さないことが確認された。これらの結果から、細胞をメチル水銀

で処理することによって、細胞毒性を有する因子（熱によって変性する蛋白質？）が細胞外に放出されると考えられる。本因子はメチル水銀の細胞毒性発現機構に深く関わっていると考えられ、また、細胞生物学的に非常に興味深い因子でもある。そこで現在、本因子の同定を目指して、精製・濃縮方法等を検討中である。

（3）HOXB13 によって発現誘導される遺伝子群の同定

HOXB13 は転写因子として機能することによってメチル水銀毒性発現に関与していると考えられる。上述したように、HOXB13 はメチル水銀による TNF- α および IL-8 の発現誘導に関与していることが判明したが、少なくとも培養細胞レベルでは両サイトカインはメチル水銀毒性の発現には関与していないと考えられる。そこで、HOXB13 によって発現誘導される新規遺伝子群の同定を行うために、HOXB13 ノックダウン細胞を用いてマイクロアレイ解析を行った。その結果、メチル水銀によって発現レベルが4倍以上に上昇した遺伝子群の中にHOXB13 ノックダウンによってその発現上昇が有意に抑制された遺伝子が16種存在した。これらの遺伝子の中でHOXB13 ノックダウンによる発現誘導抑制率が高い上位3種について定量PCRを用いて再検討を行ったところ、RFPL4A および OSM の発現がメチル水銀によって誘導され、HOXB13 ノックダウンによってその誘導誘導が著しく抑制されることが確認された。OSM 遺伝子によってコードされるオンコスタチン M は IL-6 ファミリーの一員として造血や免疫、代謝などにおいて重要な機能を果たしていることが知られている。現在、メチル水銀毒性とオンコスタチン M との関係について検討している。

（4）メチル水銀によってマウス脳中で発現上昇するサイトカイン

昨年度のマウスを用いた検討により、メチル水銀によって脳組織で発現上昇するサイトカインとして TNF ファミリーに属する TNF- α とインターロイキンファミリーに属する IL-19 が同定された。本年度は、メチル水銀によって脳組織で発現上昇するサイトカイン群の分子種をより明確にするため、TNF ファミリーおよびインターロイキンファミリーに属する全てのサイトカイン分子種について検討を行った。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 日後に大脳および小脳を摘出して、サイトカイン分子種（TNF ファミリー全 18 種、インターロイキン全 30 種）の発現レベルの変動を調べた。その結果、メチル水銀によって脳組織において発現上昇するサイトカインとして TNF- α および IL-19 以外に TNFSF8 および IL-1 β が同定された。これらのサイトカイン分子種の脳組織以外の臓器（肝臓、腎臓）における発現レベルを調べたところ、TNF- α および IL-19 発現レベルの顕著な変動は観察されなかったが、TNFSF8 および IL-1 β は腎臓においてもメチル水銀による発現誘導が観察された。この結果から、メチル水銀は TNF- α および IL-19 の発現レベルを脳特異的に上昇させると考えられる。

IV 結論

本研究によって、TNF- α の発現誘導に関わる主要な転写因子として知られる NF- κ B がメチル水銀によって活性化されることが確認され、HOXB13 は NF- κ B と結合することなく NF- κ B との何らかの協調作用を介して TNF- α の発現誘導およびメチル水銀毒性発現に関与している可能性が示唆された。一方、昨年度の検討によって、メチル水銀によって発現誘導されて細胞外に放出された TNF- α がメチル水銀毒性発現に関与している可能性が示唆されていたが、本年度の検討によ

って TNF- α は細胞のメチル水銀感受性を増強させないことが判明した。しかし、メチル水銀で処理した細胞の培養液中に細胞毒性を示す因子が放出されていることが確認されたことから、本因子を同定することによって、メチル水銀毒性発現機構解明の突破口が開かれるものと期待される。

なお、TNF- α は細胞のメチル水銀感受性を増強させないことが判明したものの、マウスを用いた個体レベルでの検討によって、これまでに知られている主要なサイトカイン分子種の中で、TNF- α および IL-19 のみがメチル水銀によって脳特異的に発現誘導されることが確認された。したがって、メチル水銀による TNF- α の発現誘導機構を明らかにすることによって脳選択的なメチル水銀毒性解明のための重要な手掛かりが得られると思われる。

V 次年度以降の計画

HOXB13 が NF- κ B との何らかの協調作用を介して TNF- α の発現誘導およびメチル水銀毒性発現に関与している可能性が示唆された。TNF- α は細胞のメチル水銀感受性を増強させないことが判明したが、メチル水銀で処理した細胞の培養液中に細胞毒性を示す因子が放出されていることが確認されたことから、この因子の細胞外濃度上昇機構に HOXB13 および NF- κ B が関与している可能性が考えられる。そこで次年度は、メチル水銀によって細胞外に放出されるメチル水銀感受性増強因子を同定してその作用を明確にすると共に、同因子の細胞外濃度上昇機構における HOXB13 および NF- κ B の役割を検討する。また、HOXB13 によって発現誘導される遺伝子として同定された RFPL4A および OSM とメチル水銀毒性との関係、および、メチル水銀による HOXB13 を介した 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) Hwang GW Murai Y Takahashi T Naganuma A. The protein transportation pathway from Golgi to vacuoles via endosomes plays a role in enhancement of methylmercury toxicity, *Scientific Reports* 2014; 4: 5888.
- 2) 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.
- 3) Takahashi T Kim MS Saito T Lee JY Hwang GW Naganuma A. Brain-specific induction of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury, *J Toxicol Sci* 2013; 38: 963-965.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Lee JY Hwang GW Kim MS Takahashi T Naganuma A. Methylmercury induces a brain-specific increase in chemokine CCL4 expression in mice, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1279-1282.

- 8) Kim MS Takahashi T Lee JY Hwang GW Naganuma A. Methylmercury induces CCL2 expression through activation of NF-kappaB in human 1321N1 astrocytes, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1275-1278.
- 9) 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: 1283-1286.
- 10) Hwang GW Kimura Y Takahashi T Lee JY Naganuma A. Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1287-1290.
- 11) Hwang GW Ryoike 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.
- 12) Hwang GW Lee JY Ryoike 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.
- 13) Hwang GW Tobita M Takahashi T Kuge S Kita K Naganuma A. siRNA-mediated AMPKalpha1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells, *J Toxicol Sci* 2010; 35: 601-604.
- 14) Hwang GW Ryoike 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.

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; HOXB13; TNF- α

Abstract

We have performed human gene screening using siRNA, and found that the decreased expression of the gene for HOXB13 conferred resistance to methylmercury in human HEK293 cells. We have also found that methylmercury induces expression of TNF- α , and HOXB13 has an essential role in this induction.

In the present study, we performed more detailed examination on the mechanism and significance of the methylmercury-induced expression of TNF- α . We observed that NF- κ B, known as a main transcription factor for expression of TNF – α , was activated by methylmercury. Similar to the case of knockdown of HOXB13, a knockdown of NF- κ B also suppressed the methylmercury-induced expression of TNF- α and conferred a resistance to methylmercury. These results suggest that HOXB13 participates in the methylmercury-induced expression of TNF- α and manifestation of the methylmercury toxicity through some kind of cooperative action with NF- κ B. On the other hand, we found that a cytotoxic factor(s) was released into the culture medium of cells treated with methylmercury. Identification of this factor will be helpful for elucidation of mechanism of the methylmercury toxicity.

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

メチル水銀のマウス脳への影響を、非侵襲的に脳の形態や器質的異常を検出できるMRIで解析し、同時に行動試験、体重測定、聴覚検査、病理検査を行って従来の毒性検出手法とMRI所見の比較を行った。

まず、脳に大きなダメージを与える高用量投与条件として、半数のマウスが1週間後に死亡するメチル水銀(10 mg Hg/kg)の連日投与を8週齢のICRオスマウスに行った。この条件では、MRIによって投与2日後から側脳室、第3脳室の拡大が観察された。第4脳室の大きさは1週間の投与でも影響を受けなかった。協調運動障害(ローターロッド試験)、体重減少も投与2-3日後から観察され、MRI所見とほぼ同時に影響が生じた。

次に、メチル水銀4 mg Hg/kgを8週齢のICRオスマウスに8週間に渡って連日投与した。この条件では脳室の拡大は投与2週目から観察された。脳室の拡大率、第4脳室が影響を受けない事などは、高用量投与の結果と類似していた。このマウスの体重減少は4週目から、協調運動障害は5週目から観察され、MRI所見での脳の形態変化は、運動障害や体重異常が生じる2-3週間前から検出可能であることが見いだされた。

メスのICRマウス(8週齢)にメチル水銀4 mg Hg/kgを連日投与してオスマウスと比較した。脳室の拡大は投与2週目から観察され、経時変化、拡大率、第4脳室が影響を受けない事などオスマウスとの差異は見られなかった。しかし体重減少、協調運動障害共に3週目から観察され、オスより2-3週間早く影響がでた。これは、同じ投与量であるにも関わらず、脳内水銀蓄積量がメスはオスの3倍以上であった事と関連すると思われる。

4週齢の発達期のICRオスマウスにメチル水銀4 mg Hg/kgを連日投与した場合、投与2週目と4週目にマウスの下丘領域にMRIのT1強調画像上でシグナルの増加が見られた。同じ条件でメチル水銀を投与したマウスの聴性脳幹反応を測定すると、投与4週目では下丘の誘発電位に異常が見られたが2週目には異常が観察されなかった。ここでも、MRI画像による下丘核領域のシグナル増加は、聴覚異常の2週間前に観察されることが見出された。メチル水銀投与4週目のマウスに塩化マンガンを投与し、40kHzで24時間聴覚刺激を行ってからマンガン増強MRIを撮像したところ、下丘のT1シグナルの低下が見られ、この手法でも器質的異常が観察された。脳の凍結切片の免疫組織化学染色を行うと、下丘でニューロンのネクロシスとその後のグリオシスとみられる所見が見られ、MRIシグナルの異常との関連が示唆された。

以上のように今年度の研究により、MRIを用いることで、行動や聴覚に影響が見られないメチル水銀投与条件において脳室の拡大や下丘核の異常が観察され、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。

キーワード: MRI、メチル水銀毒性、行動異常、聴覚異常、性差

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）
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 2年）
竹本 拓矢 （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）
島田 真一 （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）

I 研究目的

この研究の背景として、近年の診断用 MRI の普及がある。特に脳障害では MRI と CT による撮像は、診断の必須項目と言ってよい。しかし、水俣病発生時には MRI も CT もまだ存在していなかったため、メチル水銀中毒の初期の症候と MRI 所見の関連は、ほとんど追及されていない。

MRI は非侵襲的であり、同一個体の脳の変化を長期間追跡することができる。これにより、脳のダメージの時空間的变化と、行動異常や感覚障害などの経時変化を、関連付けて解析することが可能となり、新たな診断法に結びつく可能性がある。

実験動物を使った研究でも、メチル水銀中毒を MRI 画像を用いて解析した研究は例が少ない。すでに動物実験を含めてメチル水銀暴露と中枢神経障害について膨大なデータが蓄積しているにも関わらず、MRI を用いて脳障害の経時変化を追及した研究は皆無である。

また、メチル水銀中毒の性差については、やはり研究例が少なく、解明が進んでいない。

この研究の目的は（1）MRI を用いた非侵襲的で高感度なメチル水銀毒性検出法確立のため、MRI 画像とメチル水銀毒性を関連付ける基礎データを得ること（2）性差や脳内性ステロイド濃度とメチル水銀毒性との関連を調べること、の2点である。

目的（1）の為に、マウスを用いてメチル水銀毒性による脳の形態変化や器質的变化を、動物が生きたまま MRI で経時的に解析し、同じマウスの行動異常、感覚障害を並行して観察することにより、それらの相互関係を解析した。また目的（2）の為に、今年度はメチル水銀毒性の性差を解析した。次年度に、脳内性ステロイド濃度との関連を明らかにする実験を行う。

環境行政の課題との関連性としては、近年広く普及している MRI をヒトのメチル水銀中毒の診断に利用するための基礎的データが得られることがある。動物実験ではあるが、この研究により、メチル水銀毒性の検出手法として、MRI は体重減少や協調運動障害、聴覚異常よりも短期間の暴露で有意に脳の異常が検出できることが示された。すなわち、MRIによって「発症前診断」を行える可能性が示唆され、MRI は全く新しいメチル水銀毒性や他の環境汚染物質毒性の検出法として、環境行政に利する可能性がある。

また、この研究では、解明の遅れている性差と毒性の関連性に関しても、基礎的で重要なデータを得ることが期待できる。

II 研究方法

II-1 概要

平成 26 年度は、下記の 4 種類のメチル水銀投与実験を実施した。

(1) 高用量メチル水銀投与による脳への影響の MRI による検出

まず重篤なダメージを受けた脳の MRI での解析を行った。

8 週齢のオス ICR マウスを用い、10 日以内に半数以上のマウスが死亡するメチル水銀投与条件 (10 mg Hg/kg 連日投与) で、MRI 撮像と協調運動の測定 (ローターロッド試験) を経時的に行った。脳室への影響は、昨年度よりも精度の高い手法で定量化した。さらに、このように毒性が強い条件で脳浮腫が生じていないかを MRI シグナルと水分含量の測定で検討した。実験後のマウスを用い、臓器内水銀濃度の測定と坐骨神経の病理検査を行った。

(2) メチル水銀による亜急性毒性の MRI による検出

体重変動が見られる最低用量のメチル水銀投与下での MRI 像の経時変化を解析した。

4 mg Hg/kg のメチル水銀連日投与条件で、MRI 撮像と様々な行動実験を同じマウスに対して実施し、毒性発現の経時変化を調べた。また、末梢神経への影響の有無を検証するための痛覚刺激への反応を測定するプランター試験など、ローターロッド以外のいくつかの行動試験を行った。実験後のマウスは、脳内水銀濃度の測定を行った。

(3) 性差の検討

メスの ICR マウスにメチル水銀 4 mg Hg/kg を連日投与し、MRI 画像と行動異常の経時変化を観察し、上記 (2) の実験によるオスの結果と比較して性差を検討した。実験後のマウスは、脳内水銀濃度の測定を行った。

(4) メチル水銀による下丘核の MRI シグナル異常と聴覚、病理変化との関連

発達期の 4 週齢 ICR マウスに 4 mg Hg/kg のメチル水銀を連日投与し、2 週目、4 週目の MRI シグナルと聴性脳幹反応を測定して、聴覚の異常と下丘核の MRI シグナルの関連を解析した。さらに、投与 4 週目のマウスを用い、マンガン増強 MRI で下丘核の神経機能を測定し、下丘核の凍結切片によるアポトーシスの観察、ニューロン、ミクログリア、アストロサイトそれぞれのマーカータンパク質による抗体染色、炎症マーカー mRNA の real-time PCR による定量を行った。

II-2 実験方法

II-2-1 マウスの飼育とメチル水銀投与

ICR マウス（日本クレア、オス 7 週齢または 3 週齢）は、4 匹/1 ケージで、12 時間ずつの明暗条件（明期 8:00-20:00）、温度 $26 \pm 1^\circ\text{C}$ 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 4 または 10 mgHg/kg のメチル水銀として毎日午前 9 時から 10 時の間に投与した。

マウスは、毎日（高用量投与実験）または毎週（亜急性投与実験、および聴覚測定実験）体重測定およびローターロッド試験を実施した。高用量投与実験は、徳島文理大学香川薬学部で実施した。亜急性投与実験では、広島大学で毎週ブリッジ試験、ワイヤーハング試験、プランター試験、Y 字迷路試験を行い、メチル水銀投与前と投与後 2 週間ごとに、マウスを徳島文理大に搬送して MRI 撮像を行った。

II-2-2 MRI 撮像

MRI 撮像には、徳島文理大学香川薬学部の MRminiSA, 1.5T を使用し、主として T1 強調画像 (T1WI) を撮像し、一部のマウスでは T2 強調画像 (T2WI)、拡散強調画像 (DWI) も撮像した。

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ノエコー法によりフリップ角 = 90° 、Field of view = 20×40 mm、voxel size $0.156 \times 0.156 \times 1$ mm、画素数 = 128×256 とした。各シークエ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 = $800 \text{ s} / \text{mm}^2$ 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。画像積算回数は T1 WI: 8 回、T2WI と DWI: 4 回とした。

脳室体積の測定には、3D-flash シークエンスで T1 強調画像を 0.156mm ごとに撮像した画像を用いた。

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。

II-2-3 ローターロッド試験

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。最長測定時間は 300 秒とした。2 回の測定値の平均を求めた。

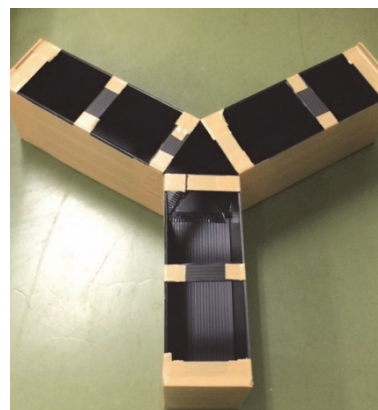
II-2-4 ブリッジ試験 (beam walking test)

マウスを直径 15mm、長さ 80cm、高さ 40cm の木の棒（右写真）の上を歩かせ、落下までの時間を計測した。最長測定時間は 300 秒とした。



II-2-5 ワイヤーハング試験

長さ 80cm, 高さ 40cm のワイヤー (スチール製、20 番線) にマウスを捕まらせ、落下までの時間を計測した。

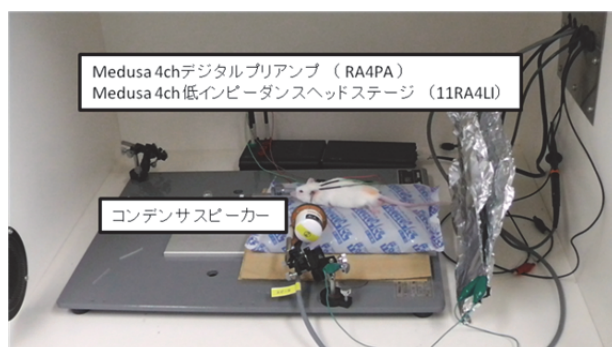
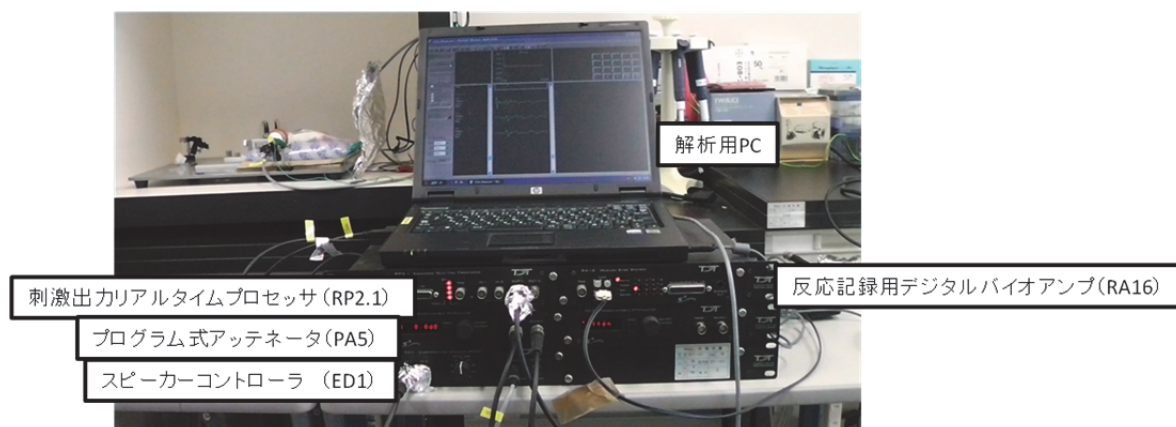


II-2-6 Y字迷路試験

1 辺 30cm, 幅 10cm, 高さ 15cm の迷路 (右写真) の手前のアームにマウスを入れ、各アームへの出入りを 8 分間測定した。すべてのアームへの進入回数と、3 回連続で異なるアームに入った回数の進入回数に対する割合 (自発的交替行動) を求めた。3 回以上のトレーニングの後に計測した。

II-2-7 聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response ; ABR) 測定

マウスは体重測定後、ネンブタール (50 mg / kg 腹腔内投与) で麻酔して固定台に固定し、耳後方及び頭頂部に電極を挿入した。スピーカーは内耳により音刺激が妨げられない位置に固定した (下写真)。音刺激による誘発電位を聴性脳幹反応 ABR システム (Tucker-Davis Technologies) を用いて、クリック音の音圧レベルを 90 db から 0 db まで 5 db ずつ下げながら、500 回積算で計測した。測定は防音箱内で行った。誘発電位はソフトウェア : BioSigRP (Tucker-Davis Technologies) を用いて解析した。



II-2-8 脳内水分含量の測定

MRI 測定後、頸椎脱臼により屠殺したマウスから脳を摘出し、小脳、大脳、海馬、下丘（中脳）に切り分けた。100 °C 24 時間で恒量とした秤量瓶に、水分をキムワイプで拭き取った脳組織を入れ、湿重量を測定した。これを 100°C で 24 時間乾燥させて恒量とし、乾燥重量を測定した。水分含量は、重量%として算出した。

II-2-9 臓器の総水銀含量の測定

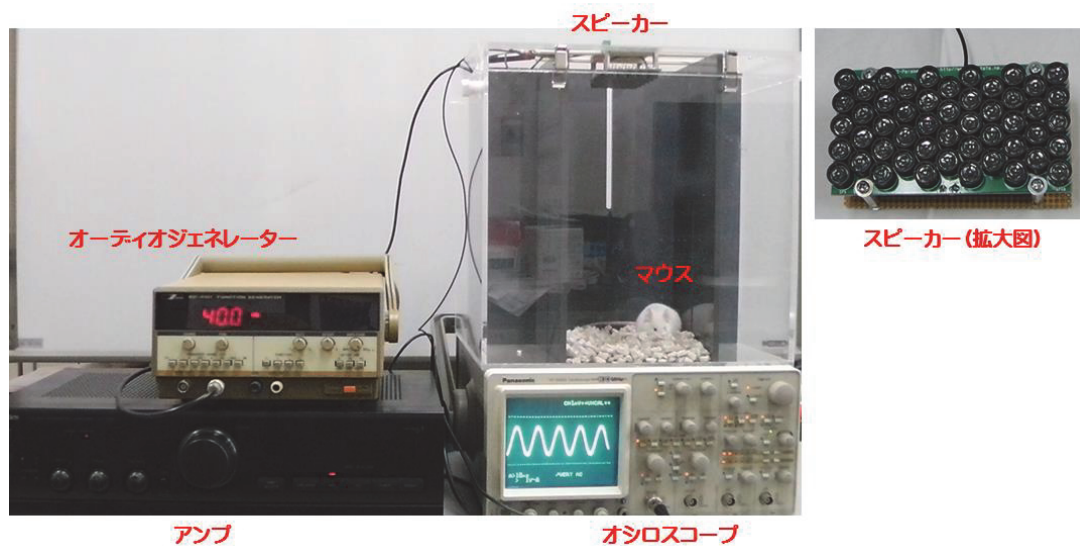
マウスの血液は 26G 注射針で尾静脈に穿孔し出血させ、ピペットマンにより 5 μ L 採取し 45 μ L のミリQ水で希釈、溶血し -20 °C で保存した。臓器は頸椎脱臼による屠殺後摘出し、PBS により洗浄後 -20 °C で保存した。血液、組織中の総水銀含量は、国立水俣病総合研究センター基礎研究部生理影響研究室の山元恵先生に測定を依頼し、加熱気化原子吸光法により測定した。

II-2-10 坐骨神経の病理検査

MRI 測定の後には坐骨神経を摘出して直ちにパラホルムアルデヒド固定し、株式会社 バイオ病理研究所に切片作成と染色を外注した。

II-2-11 マンガン増強 MRI

マウスに、40mg/kg $MnCl_2$ を腹腔内注射し、その 24 時間後に聴覚を刺激した。聴覚刺激は、下の写真のように、オーディオジェネレーターでケージ上部のスピーカーから 40 kHz の超音波を発生させ、24 時間マウスに聞かせることで行った。音量はオシロスコープでモニターした。



聴覚刺激後、II-2-2 に記した方法で、嗅球から 1.2 mm ごとに MRI T1 強調画像の冠状面画像を撮像した。

II-2-12 脳の免疫組織化学染色

マウスにイソゾール(日医工、25mg / mL) を 5mg / mouse、200 μ L 腹腔内投与して麻酔し、腹部及び胸部を切開して 左心室に還流器の針を挿入し、肝動脈より放血させて、PBS 10 mL と 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液 10 mL を還流した。

摘出した脳は 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に 1 晩浸漬し、その後 10%スクロース入り PBS に 1 晩、20%スクロース入り PBS に 1 晩、30%スクロース入り PBS に 1 晩浸漬し浸透圧を調整した。ブレインスライサー (Alto, 1 mm 用) とマイクロトーム刃(フェザー、C35)を用いて前部、中部、後部の 3 つに切り分け、OTC コンパウンド (SAKURA) で包埋後ドライアイス上で凍結した。クリオスタット(Leica CM3050 s) の庫内温度を -20°C 、試料台温度は -18°C にセットし、 $10\ \mu\text{m}$ 厚にスライスした。切片は連続断面となるようにスライドガラスに順番に張り付け、1 時間以上風乾した後染色した。

HE 染色: スライドガラスを PBS に 4 分、マイヤーヘマトキシリン (和光) に 5 分浸し、 60°C で水洗。80% エタノール 1 分、エオジン 5 分、90% エタノール 4 分、99.5% エタノール 5 分、キシレン 10 分に順に浸し、エンテランニューを用い封入した。

蛍光 Nissl 染色: スライドガラスを PBS に 40 分、PBS + 0.1% Triton X-100 に 10 分 PBS に 5 分浸し、Neuro Trace Working Solution (Mol Prob, green N2148060) に 20 分、PBS + 0.1% Triton X-100 に 10 分、PBS に 5 分浸し、PBS 中に 2 時間以上置いたのち、Vectashield で封入した。

TUNEL 法: スライドガラス上の切片を in situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (ロシュ)を用いてキットのプロトコールに従って反応させ、Vectashield で封入した。

免疫蛍光抗体染色: スライドガラスを 4% パラホルムアルデヒドで 15 分固定し、PBS で 5 分ずつ 3 回洗浄、5% ヤギ血清でブロッキング、1 次抗体 Anti-GFAP antibody (rabbit) (Dako IS5324) または Anti-Iba1 antibody (rabbit) (和光純薬 019-19741)、2 次抗体として Anti-rabbit IgG Alexa488 (goat) (Mol Prob) を用いて定法で染色し、Vectashield で封入した。

オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-9000、KEYENCE) を用い、染色像を撮影した。

II-2-13 下丘域の mRNA 発現量の解析

マウスにイソゾール(日医工、 $25\text{mg}/\text{mL}$) を $5\text{mg}/\text{mouse}$ 、 $200\ \mu\text{L}$ 腹腔内投与して麻酔し、脳を素早く摘出してブレインスライサー (Alto, 1 mm 用) とマイクロトーム刃(フェザー、C35)を用いて厚さ 1 mm の切片に切断し、下丘域をメスで摘出した。ただちに High Pure RNA Tissue Kit (ロシュ)を用いて total RNA を抽出し、ReverTra Ace (TOYOBO) で cDNA を合成した。LightCycler (ロシュ) と、Thunderbird Sybr qPCR Mix (TOYOBO) を用い、腫瘍壊死因子 (TNF α) と、インターロイキン-18 (IL-18)の cDNA を増幅して定量した。定量値は、各サンプルの GAPDH の cDNA 量で補正し、コントロール (溶媒投与) マウスの値とメチル水銀投与マウスの値の比として算出した。

(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、指針に準拠して行った。両大学共、動物実験計画書の提出を義務付け、実験内容について倫理面を含めて動物実験委員会で審査し、国・大学の基準・指針に準拠していることを確認した後、動物実験を許可している。広島大学では、この研究について平成 25 年 8 月 5 日～平成 28 年 6 月 30 日の承認を受け、徳島文理大でも平成 26 年度の承認を受けている。

III 研究結果

III-1 高用量メチル水銀投与による脳への影響の MRI による検出

10 mg Hg/kg のメチル水銀をICRマウスに連日投与し、脳の形態と器質的变化を MRI 画像から解析した。7日間の投与後、脳内と臓器の水銀濃度の定量を行った。

III-1-1 MRI 画像とその解析

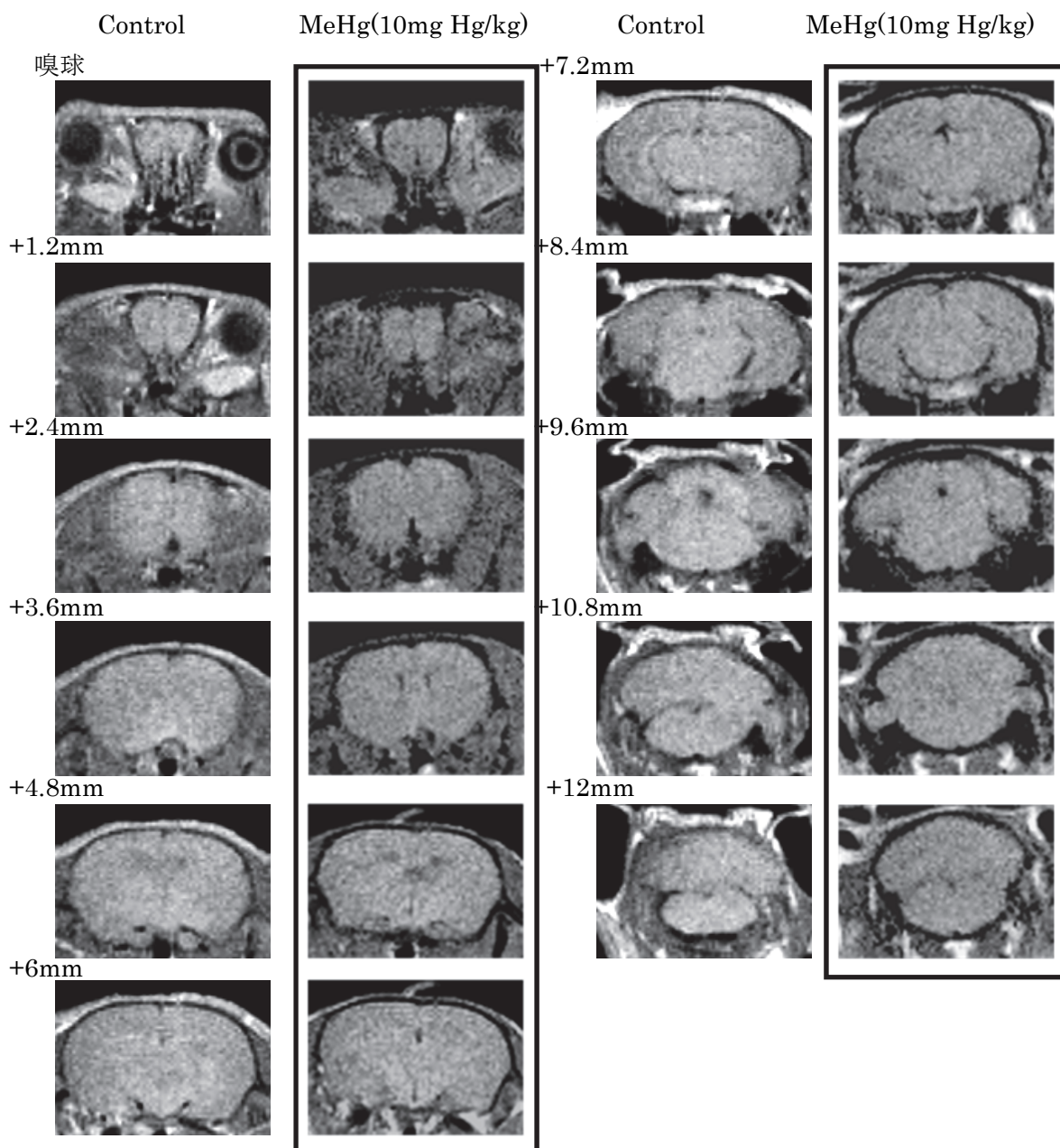


図1 マウス脳の MRI T1 強調画像

ICR オスマウス (8週齢) に 溶媒(10mmol/L シス테인溶液) (Control)またはメチル水銀(10 mg Hg/kg) を7日間連日投与し、イソフルラン麻酔下で T1 強調画像を撮像した。嗅球から1.2 mm ほどの冠状面画像を示す。

図1のように、嗅球から +3.6mm、+4.8mm の冠状面画像で見られる側脳室、+6mm、+7.2mm の画像で見られる第3脳室が、メチル水銀処理で顕著に拡大していた。+9.6mmの画像で見られる第4脳室は、拡大していなかった。

III-1-2 脳室体積の経時変化

3D-flash シークエンスで撮像した 0.156mm ごとの T1 強調画像を用い、各像の脳室断面積に厚さ 0.156mm をかけて積算 (4~6 枚) することで、脳室体積を求めた (下、説明図)。

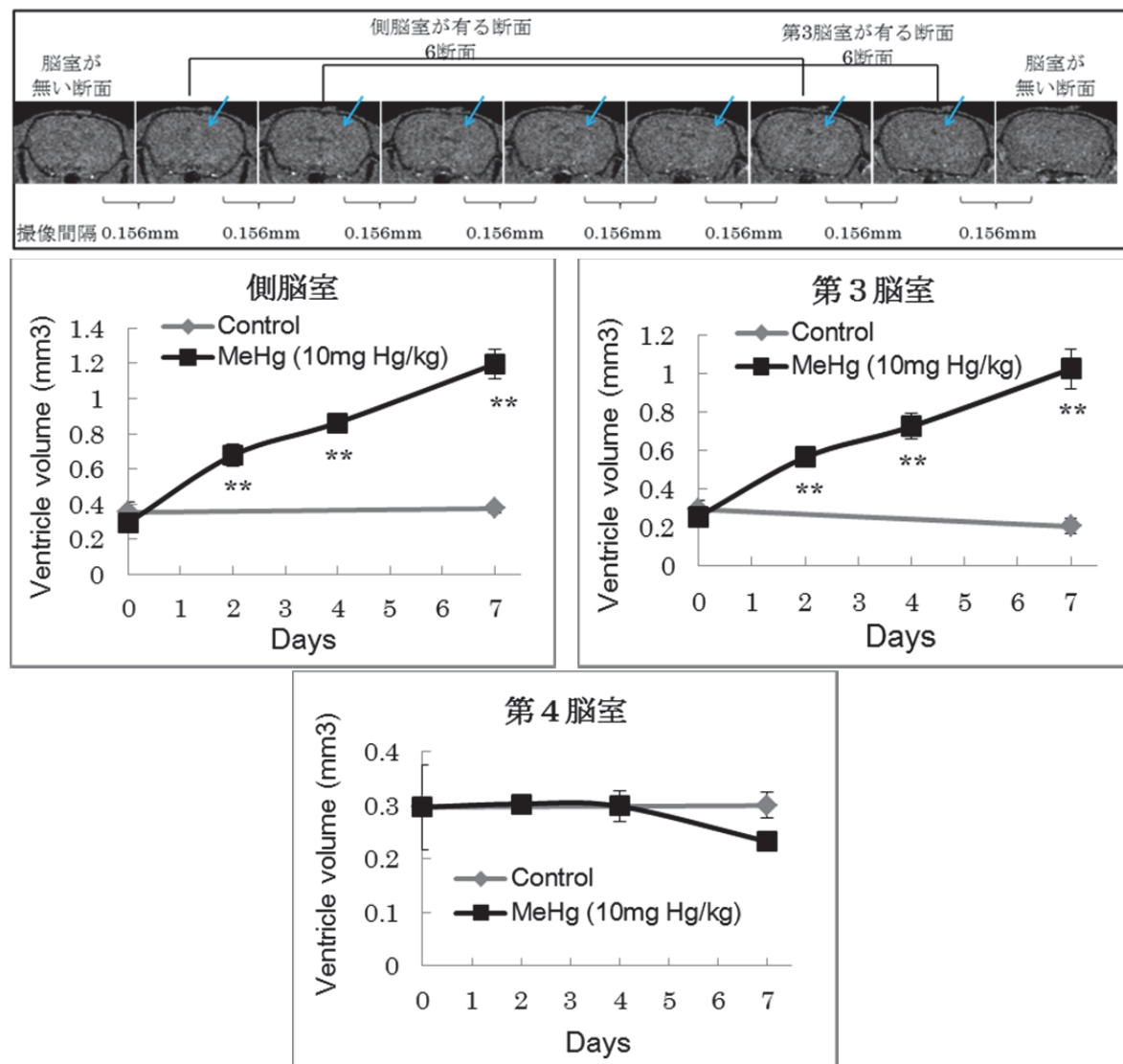


図2 マウスの脳室体積の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10 mgHg /kg) を連日投与し、投与前、投与 2, 4, 7 日目に各脳室の体積を求めた。

Control n = 5, MeHg n=10, mean ± S.E, **p < 0.01 vs 0 day

図2 のように、メチル水銀投与 2日目以降、側脳室、第3脳室の体積は時間依存的に有意に拡大した。体積の拡大率は、7日目で側脳室は 4.0 倍、第3脳室は 4.5 倍であった。第4脳室の体積に有意な変動はなかった。

III-1-3 MRI および水分含量測定による、脳浮腫の検討

脳はダメージを受けると、浮腫が生じることが多い。脳に浮腫が生じると、MRI の T2 強調画像でシグナルが強くなる。血管原性浮腫の場合は拡散強調画像のシグナルが増加し、細胞障害性浮腫の場合は拡散強調画像シグナルは変化しない。また、浮腫は脳の水分含量を増大させる。

そこで MRI 画像の解析と、水分含量の測定によって、メチル水銀を高用量で投与したマウスの脳浮腫について検討した。

まず、T2 強調画像と拡散強調画像(DWI)の冠状面画像（添付図 I）を用いて、下図に示す大脳皮質、線条体、海馬、小脳 各領域のシグナル強度を数値化して投与前と比較した。

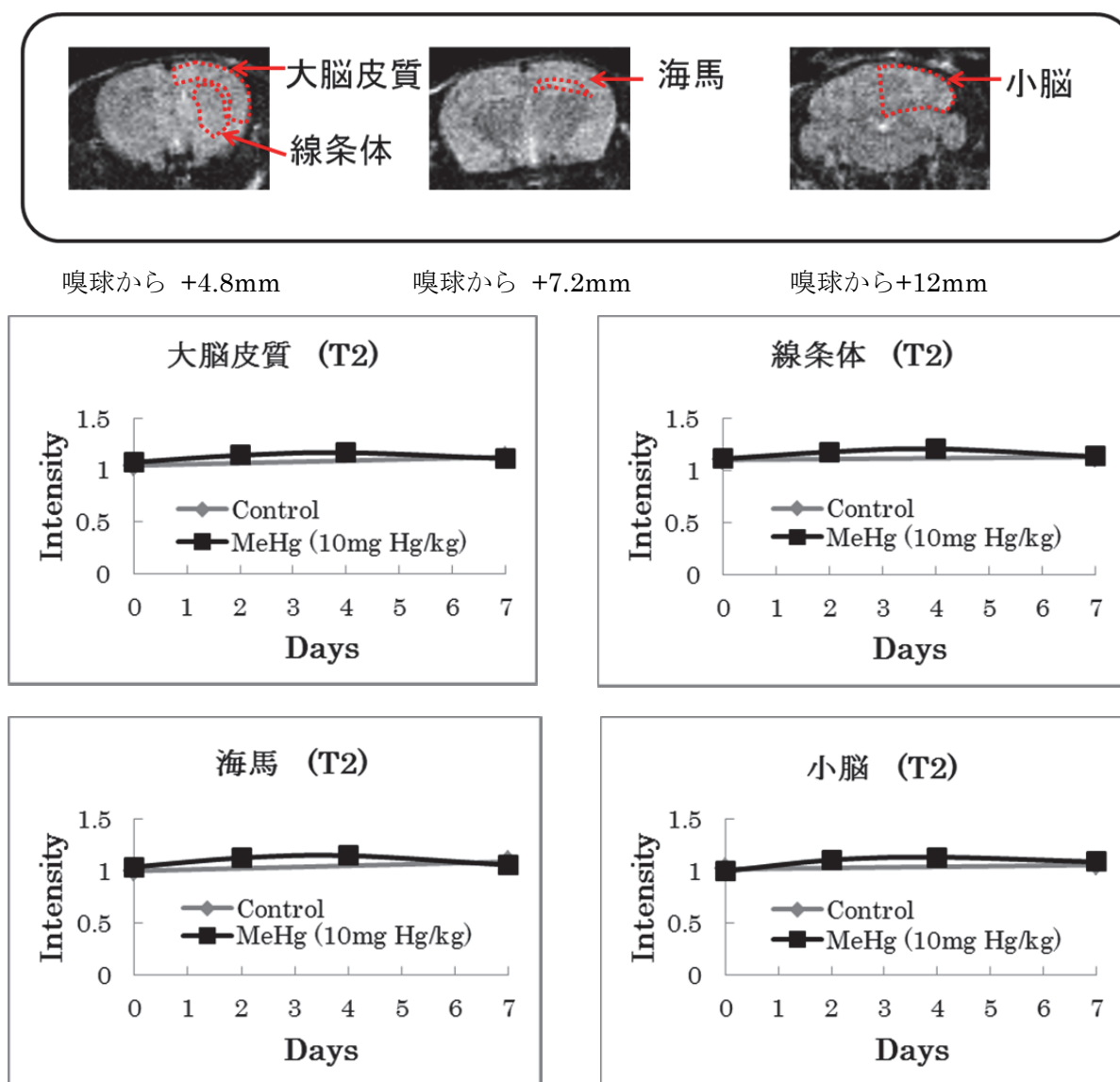


図3 T2 強調画像の脳部位別シグナル強度の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒(Control) またはメチル水銀(10 mgHg /kg) を連日投与し、投与前、投与 2, 4, 7 日目に T2 強調画像を撮像した。各部位のシグナル強度を頸部の筋肉のシグナル強度で割って標準化し、投与前と比較した。

Control n = 5、MeHg n=10、mean ± S.E

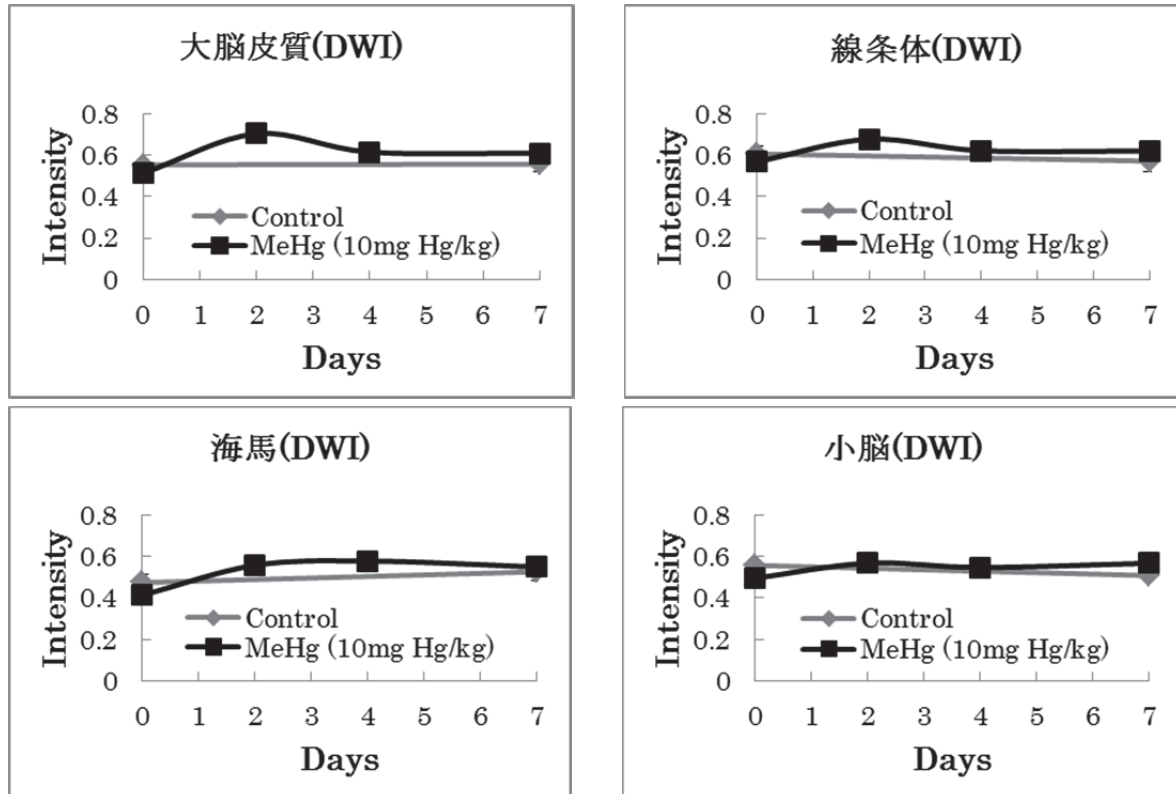


図4 拡散強調画像 (DWI) の脳部位別シグナル強度の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10mg Hg /kg) を連日投与し、投与前、投与 2, 4, 7 日目に拡散強調画像を撮像した。各部位のシグナル強度を頸部の筋肉のシグナル強度で割って標準化し、投与前と比較した。

Control n = 5、MeHg n=10、mean ± S.E

図3、4に示したように、脳の各領域の T2 強調画像、拡散強調画像とも、メチル水銀投与によるシグナル強度の変動は見られなかった。

次に、脳の各部位の水分含量を調べた。

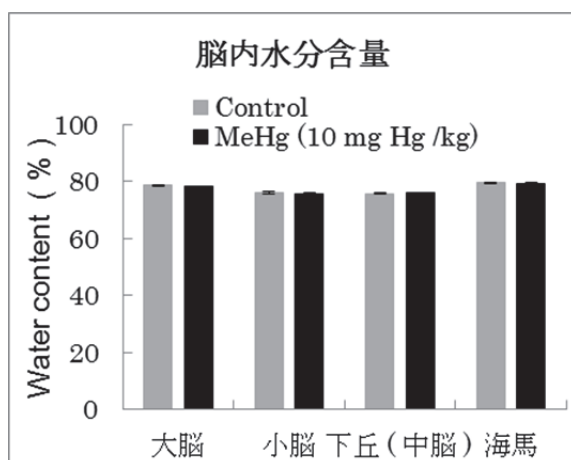


図5 脳の各部位の水分含量

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10 mgHg/kg) を 7 日間連日投与し、脳を大脳、小脳、下丘を含む中脳領域、海馬に分け、各部位の水分含量を測定した。

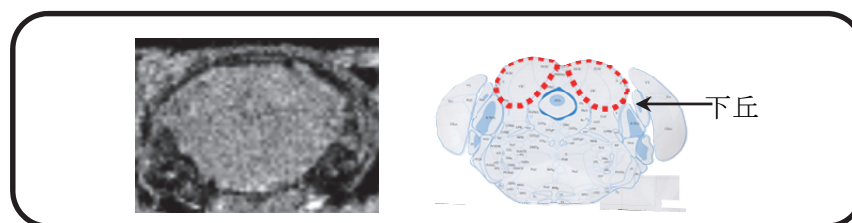
n = 5、mean ± S.E

図5に示す通り、水分含量もメチル水銀投与による有意な変化は見られなかった。

MRIシグナル、水分含量の測定では、メチル水銀(10 mg Hg/kg) の7日間連日投与による脳浮腫の兆候は見られなかった。

III-1-4 MRI による下丘核領域の障害の検出

平成25年度の研究により、4週齢のICRマウスにメチル水銀 4 mg Hg/kg を週3回投与すると、下丘核領域のMRI T1強調画像のシグナル強度が増強した。そこで、今回の高用量のメチル水銀投与条件でのマウス下丘核領域(下図)のT1シグナル強度を調べた。



嗅球から +10.8mm

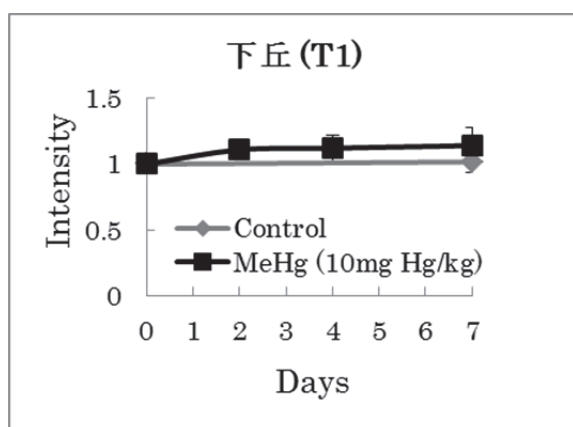


図6 下丘核領域のT1強調画像の計時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10 mg Hg/kg) を連日投与し、投与前、投与 2, 4, 7 日目に T1 強調画像を撮像した。下丘核領域のシグナル強度を頸部の筋肉のシグナル強度で割って標準化し、投与前と比較した。Control n = 5、MeHg n = 10、mean ± S.E

高用量投与マウスでは、一部の個体で下丘核領域の T1 シグナルのわずかな増加が検出されたが、全個体 (メチル水銀投与マウス n=10) の平均では、メチル水銀によるシグナルの増加はわずかであり、投与前と比較して有意差はなかった (図6)。

III-1-5 脳、腎臓、肝臓、血液のメチル水銀濃度

メチル水銀 10 mgHg/kg 7 日間連日投与後のマウスから、脳 (嗅球)、腎臓、肝臓を摘出し、血液と合わせて総水銀含量を測定した。

	嗅球	腎臓	肝臓	血液
Control	0.19 ± 0.04	0.57 ± 0.07	0.64 ± 0.32	0.011 ± 0.003
MeHg 10 mg Hg/kg	63.3 ± 4.5	176 ± 21	105 ± 27	53.9 ± 11.5

単位は $\mu\text{g Hg/g tissue}$ 、 $\mu\text{g Hg/mL}$

これらの値は、5 mg Hg/kg のメチル水銀 14日間投与後のマウスの各臓器の総水銀含量 (文献 1) と類似していた。

III-1-6 体重変動とローターロッド試験の経時変化

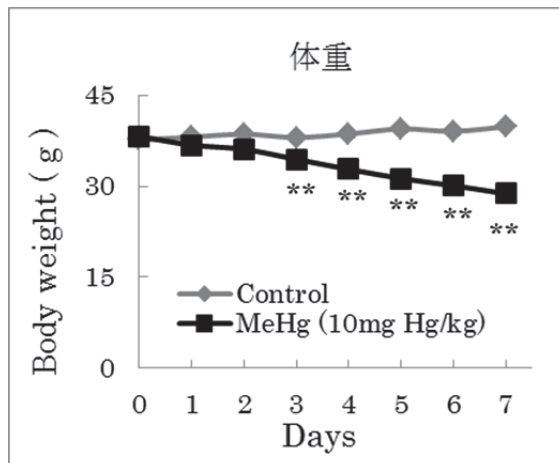


図7 マウス体重の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10 mg Hg /kg) を連日投与し、体重を測定した。

Control n = 5、MeHg n=10、mean ± S.E、
**p < 0.01 vs control

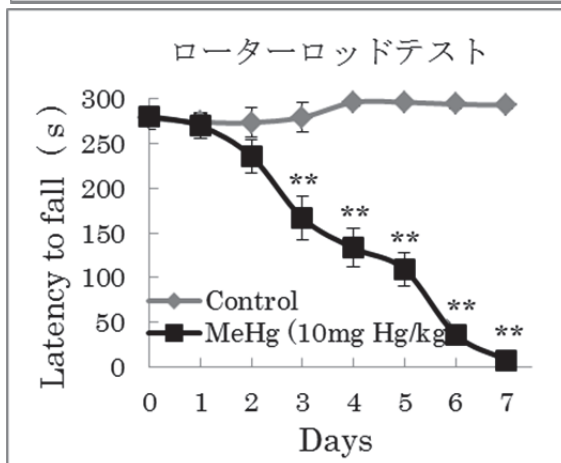


図8 ローターロッド試験の結果の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(10 mg Hg/kg) を連日投与し、ローターロッド試験を行った。図には 2 回の平均値を示す。

Control n = 5、MeHg n=10、mean ± S.E、
**p < 0.01 vs control

図 7、8 のように、高用量のメチル水銀 (10 mg Hg/kg) 投与によるマウスの体重変動、ローターロッドによる協調運動障害の計測では、それぞれ投与 3 日目から有意な減少が見られた。

III-1-7 高用量投与実験の総括

メチル水銀高用量 (10 mg Hg /kg) 連日投与では、脳室拡大は投与 2 日目から、体重の低下とローターロッド試験による協調運動能力の低下は 3 日目から有意な変化として観察された。25 年度の予備実験でも、体重と協調運動能力の有意な低下はそれぞれ 2 日目、3 日目から見られたので再現性もあり、すべての影響がほぼ同時に現れたと言える。

メチル水銀による脳室の拡大は、側脳室と第 3 脳室のみにみられ、第 4 脳室の体積は変化しなかった。

この投与条件では、下丘核領域を含む MRI シグナルの顕著な変動や、脳浮腫の兆候は見られなかった。

水銀の脳 (嗅球) への蓄積量は、投与 8 日後で $63.3 \pm 4.5 \mu\text{g Hg/g tissue}$ であった。

III-2 メチル水銀による亜急性毒性の MRI による検出

マウスの体重低下が数週間程度で観察される最低投与量である 4 mg Hg/kg のメチル水銀を ICR オスマウスに連日投与し、脳の MRI 所見と、様々な行動試験の結果の時間依存性を解析した。

III-2-1 MRI 画像

平成25年度に報告した図と基本的に同等なため、添別図IIに示した。

III-2-2 脳室体積の経時変化

3D-flash シークエンスで撮像した 0.156mm ごとの T1 強調画像を用い、各像の脳室断面積に厚さ0.156mmをかけて積算（4~6枚）することで、脳室体積を求めた（図9）。

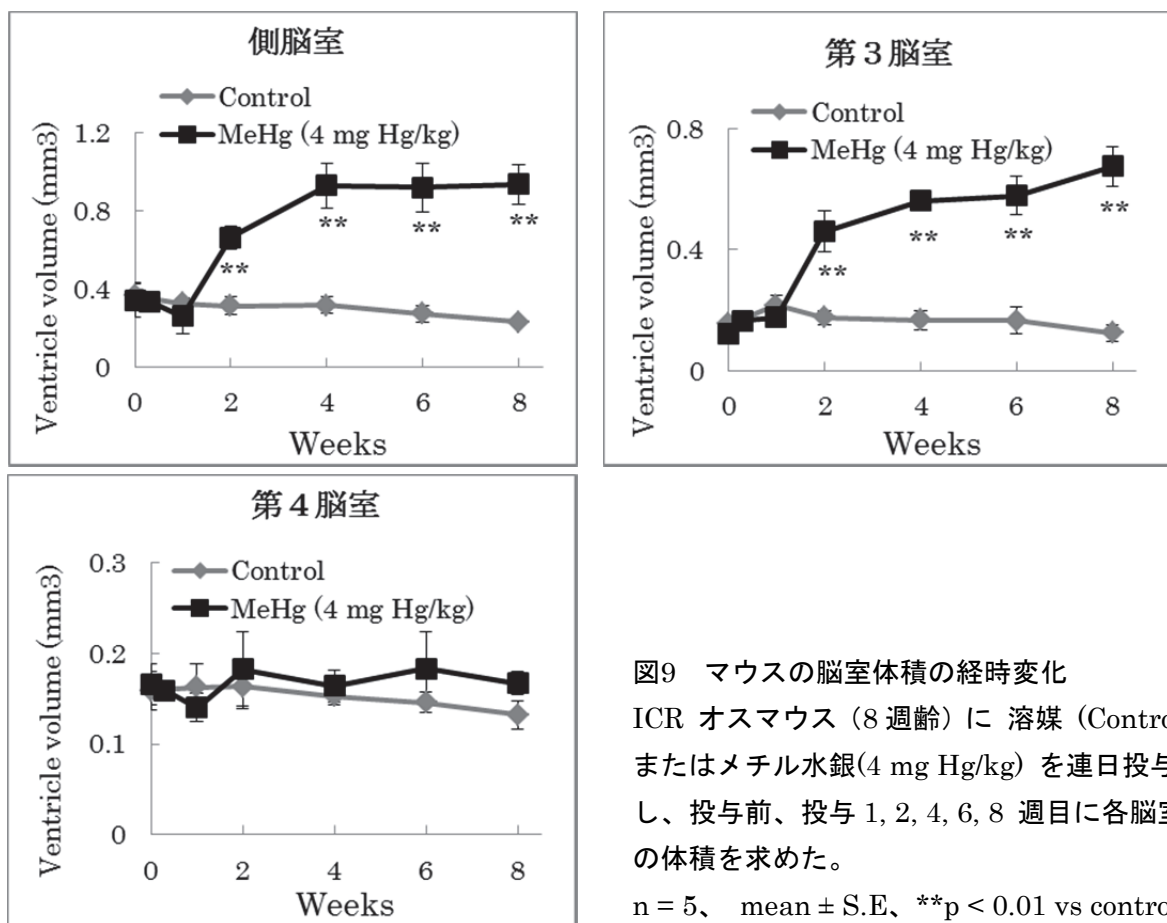


図9 マウスの脳室体積の経時変化
ICR オスマウス（8週齢）に 溶媒（Control）
またはメチル水銀（4 mg Hg/kg）を連日投与し、
投与前、投与 1, 2, 4, 6, 8 週目に各脳室
の体積を求めた。

n = 5、 mean ± S.E、 **p < 0.01 vs control

メチル水銀投与1週間目までは脳室体積の変動は見られなかった。2週目以降、側脳室、第3脳室の体積が時間依存的に有意に拡大した。体積の拡大率は、8週目で側脳室は2.7倍、第3脳室は5.6倍であった。これは、メチル水銀高用量(10 mg Hg/kg) 7日投与マウスの拡大率 4.0倍、4.5倍と同等であった。また、メチル水銀高用量投与マウスと同様、第4脳室の体積には有意な変動は見られなかった。

高用量投与条件と比較すると、側脳室、第3脳室が拡大するまでの日数が2日から2週間と大きく伸びるが、脳室の拡大率、第4脳室が拡大しないことなど類似点が多い。

4 mg Hg/kg 投与と 10 mg Hg/kg 投与の脳室の拡大率が類似していたので、今年度の実験と

して予定していたメチル水銀中間用量投与（6 mg Hg /kg、8 mg Hg /kg）の実験は行なわなかった。

III-2-3 水分含量測定による、脳浮腫の検討

添別図IIにあるように、T2 強調画像、拡散強調画像共にメチル水銀投与によるシグナルの顕著な変動はみられなかったが、脳浮腫の有無について水分含量を測定してさらに解析した。

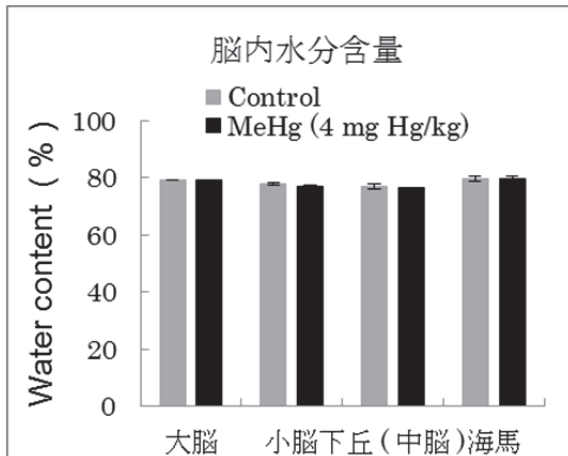


図10 脳の各部位の水分含量
ICR オスマウス（8 週齢）に溶媒（Control）またはメチル水銀（4 mg Hg/kg）を 8 週間連日投与し、脳を大脳、小脳、下丘を含む中脳領域、海馬の各部位に分け、水分含量を測定した。
n = 5、mean ± S.E

図10に示すように、脳の各部位での水分含量の変動は見られなかった。MRI 像にも変化がなかったことと合わせて、メチル水銀 4 mg Hg/kg の 8 週間連日投与条件での脳浮腫の兆候は見られなかった。

III-2-4 体重の経時変化

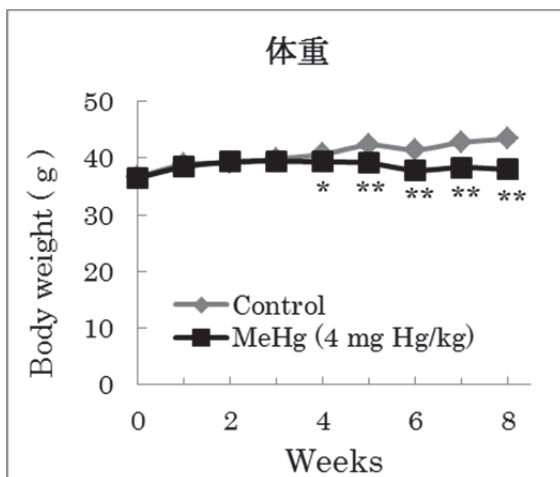


図11 マウス体重の経時変化
ICR オスマウス（8 週齢）に 溶媒（Control）またはメチル水銀（4 mg Hg/kg）を連日投与し、毎週体重を測定した。
n = 5、mean ± S.E、
*p < 0.05 vs control, **p < 0.01 vs control

図11 に示したように、メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与 4 週目から溶媒投与群と比べて有意な体重の差が見られ、経時的に差は広がった。実際には、水銀投与群は体重が増加しなくなり、溶媒投与群は増加し続けたために群間の差異が広がる結果になった。

なお25年度には、メチル水銀を 4 mg Hg/kg 週3回投与した実験を行った。総投与量は今回の約半分であったが、その条件では 8 週間にわたりメチル水銀投与群も順調に体重が増加し、溶媒投与群との体重差は見られなかった。

III-2-5 種々の行動実験の経時変化

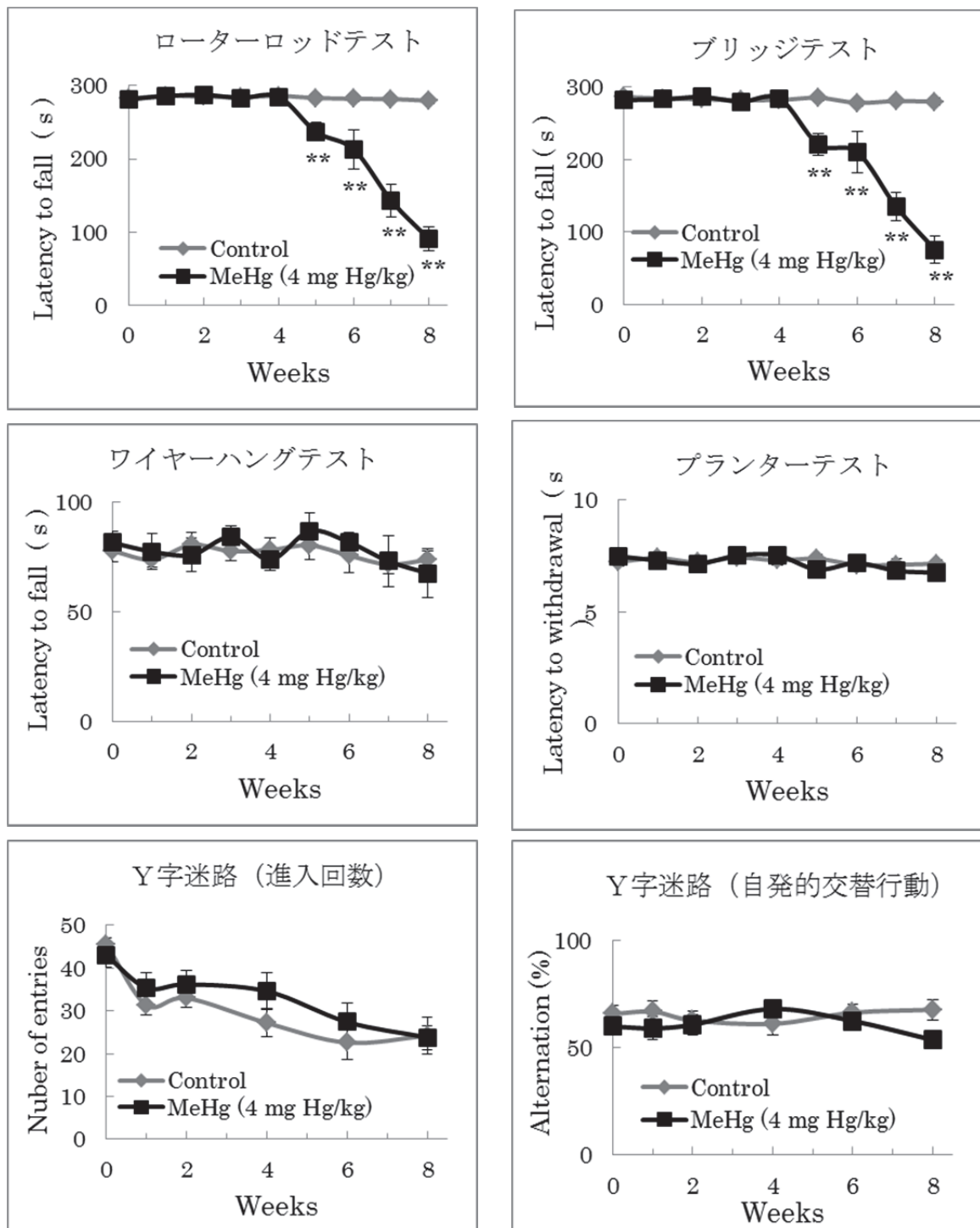


図12 マウス行動実験の経時変化

ICR オスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(4 mg Hg/kg) を連日投与し、投与前と投与後毎週 ローターロッド試験、ブリッジ試験、ワイヤーハング試験、プランター試験、Y字迷路試験を実施した。n = 5、mean ± S.E.、**p < 0.01 vs 0 day

図12 に見られるように、協調運動を測定するローターロッド試験、ブリッジ試験 (beam walking test)では、メチル水銀投与5週間目から有意に影響が検出され、互いに良く似た経時変化

を示した。

握力、運動能力、筋力を測定するワイヤーハング試験、後肢への熱刺激に対する後肢の引っ込み運動を測定するプランター試験、空間作業記憶を測定するY字迷路の自発的交替行動試験では、コントロールマウスとメチル水銀投与マウスとの差異も、メチル水銀投与による経時変化も検出されなかった。自発運動量を示すY字迷路での侵入回数試験では経時的な減少が見られたが、これはY字迷路への順化によって探索行動が減少するためと解釈されている。この試験でも溶媒投与マウスとメチル水銀投与マウスとの差異は観察されなかった。

この結果は、今回の投与量(4 mg Hg/kg 8 週間連日投与)のメチル水銀では、マウスに運動能力の障害、痛覚刺激とそれへの反応の障害、空間作業記憶能力の障害、自発運動量への影響は生じていないことを示している。

ロータロッド試験、ブリッジ試験で測定する協調運動は、運動機能障害でも低下する可能性がある。しかし今回は運動能力や自発運動量などに変化が生じていないことから、協調運動能力の低下は脳の障害で生じたことが示唆された。

空間作業記憶は海馬の機能の一つであり、ここにメチル水銀による影響がない事から今回の投与条件では海馬へのダメージはあまり生じていないと推定できる。マウスでは海馬は比較的メチル水銀障害を受けにくいとされており、今回の結果はそれと矛盾しない。

III-2-6 大脳皮質と血中の水銀濃度

上記実験と同じ条件でメチル水銀を投与した別の1群のマウスを用い、大脳皮質、血中の総水銀濃度を定量した。なお、脳の他の部位、腎臓、肝臓などのサンプルも保存しているが、装置の関係で水銀定量が間に合わなかったため、今回は大脳皮質と血中濃度のデータのみを示す。

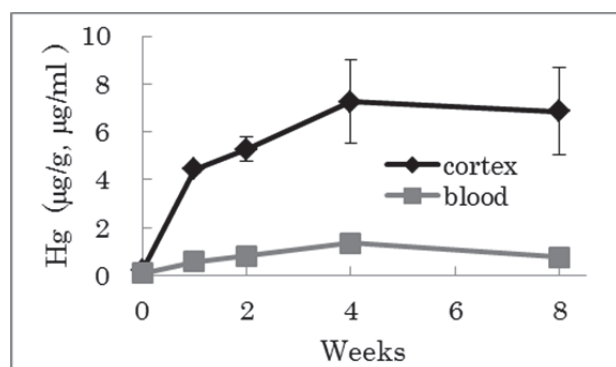


図13 マウス水銀含量の経時変化
ICR オスマウス (8 週齢) にメチル水銀(4 mg Hg/kg) を連日投与し、大脳皮質 (cortex)、血液 (blood) の総水銀含量を定量した。
n = 3、mean ± S.E.

図13 に示したように、この投与条件では、4 週目以降、大脳皮質、血中の水銀含量は一定値を示し、排出と投与量がバランスしたことが示唆された。

脳室の拡大の経時変化と比較すると、投与 1 週目で大脳皮質の水銀濃度は 4 µg Hg/g tissue 以上に達しており、投与 2 週目の値とあまり変わらなかったが、脳室は投与 1 週目では全く拡大せず、2 週目に半分程度拡大した (図9)。この結果は、まず脳内に水銀が蓄積してから遅れて脳室が拡大したことを示している。

また、脳室の拡大率は、4 mg Hg/kg のメチル水銀投与 4 週以降 (図9) と、10 mg Hg/kg 7

日間連日投与（図2）でほぼ同程度であったが、水銀の脳内濃度は前者は 7.6 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ （大脳皮質）後者は 63 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ （嗅球）と10 倍程度異なる。脳室の拡大率は、脳内に水銀が数 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ 以上蓄積すればすでに最大で、それ以上水銀濃度が上がっても変わらないのかもしれない。ただし、脳室が拡大する時期は、10 mg Hg/kg 投与では投与 2 日目から、4 mg Hg/kg では 1 週目以降と、投与量に大きく依存していた。

血中水銀濃度は、4 mg Hg/kg のメチル水銀投与マウスでは 0.6-1.4 $\mu\text{g Hg/mL}$ と、10 mg Hg/kg 7日間投与後の 53.9 $\mu\text{g Hg/mL}$ の50分の1程度であった。脳内の水銀濃度の比は10分の1程度であったので、血中水銀濃度が低い時のほうが効率よく水銀が脳に蓄積するのかもしれない。

III-2-7 亜急性毒性試験の総括

メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与により、脳室の拡大は投与 2 週目から観察され、体重減少は 4 週目から、ローターロッド試験による協調運動障害の検出は 5 週目から有意に見られた。

脳内水銀含量は、投与 1 週目から 4 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ 以上に達しており、まず脳内に水銀が蓄積してから脳室が拡大するようであった。

脳室の拡大については、投与 4 週目以降の拡大率が約 4 倍であること、また第 4 脳室に変化が見られないことなど、メチル水銀高用量（10 mg Hg/kg）7日投与マウスで観察された脳室拡大と類似していた。

最大水銀蓄積量は、大脳皮質で 7 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ 程度と高用量投与時の10分の1程度であったが、脳室の拡大率等が同等であったことから、脳室拡大は数 $\mu\text{g Hg/g tissue}$ 程度の水銀の脳への蓄積で最大に達し、それ以上水銀濃度が高くなっても変化しないのかもしれない。ただし、拡大の時期は、高用量では 2 日目から、4 mg Hg/kg 連日投与では 1 週目以降からと、投与量に大きく依存していた。

MRI 画像、水分含量測定からは、脳に浮腫が生じている兆候は観察されなかった。

プランター試験に影響がなかったことから、後肢への痛覚刺激や運動に関与する末梢神経の顕著な障害は、この投与条件では生じていないことが示唆された。

今回の投与条件では、脳へのダメージを、メチル水銀投与後最も早期に検出したのは MRI であった。

25年度の実験では、体重や協調運動に影響しない投与量（2 mg Hg /kg 週3回投与 8週間）で有意な脳室の拡大が検出された。

これらの結果を総合して、メチル水銀毒性の検出法として、体重減少、協調運動障害、MRI による脳室拡大の 3 手法を比較すると、MRI は他よりも低用量、低投与期間でメチル水銀の影響が検出できる、最も高感度な検出法であると言えそうである。

III-3 メスマウスへのメチル水銀投与

III-2 と同じ実験条件で、メス ICR マウスに4 mg Hg/kg のメチル水銀を連日投与し、マウス脳の MRI 画像で検出される脳室の拡大と、体重、ローターロード試験結果の時間依存性を解析した。

III-3-1 脳室体積の経時変化

3D-flash シークエンスで撮像した 0.156mm ごとの T1 強調画像を用い、各像の脳室断面積に厚さ0.156mmをかけて積算 (4~6枚) することで、脳室体積を求めた (図13)。

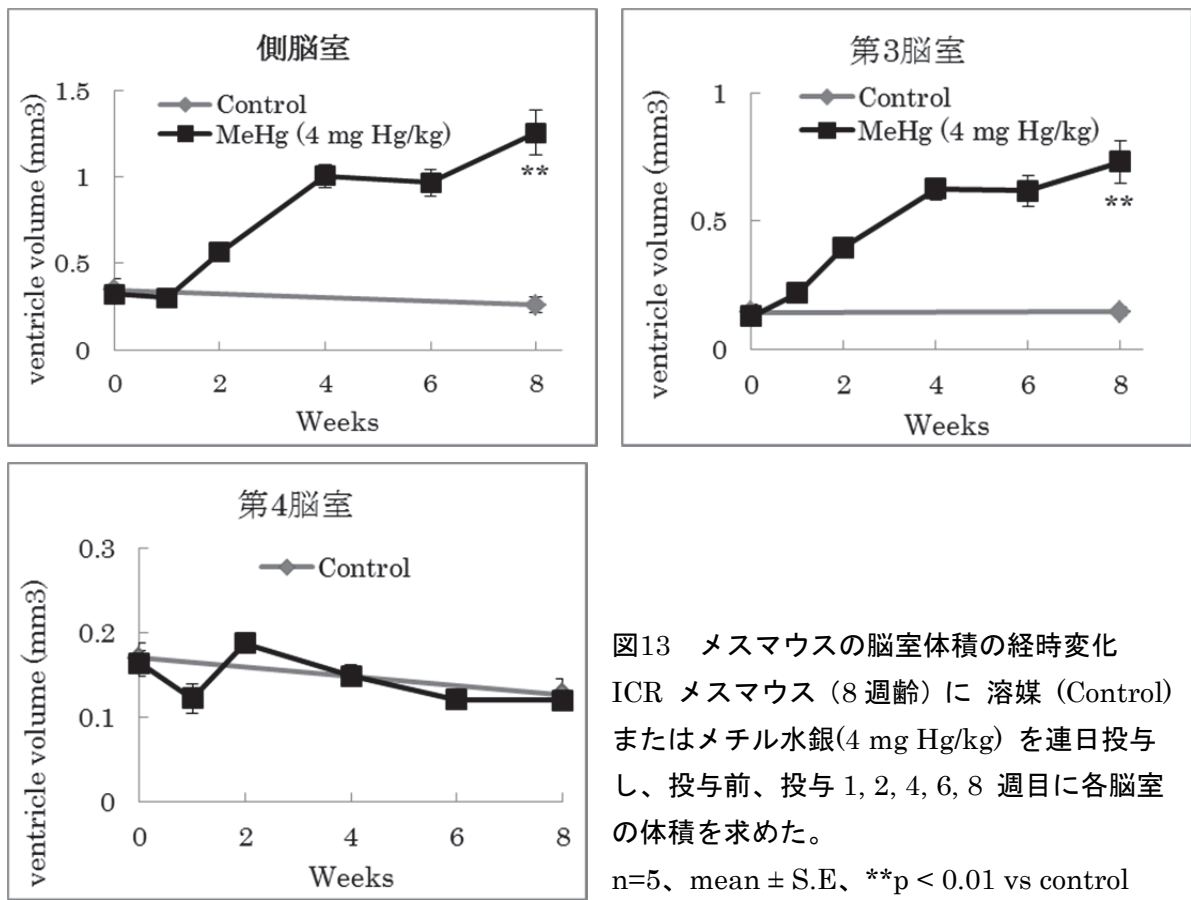


図13 メスマウスの脳室体積の経時変化
ICR メスマウス (8週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(4 mg Hg/kg) を連日投与し、投与前、投与 1, 2, 4, 6, 8 週目に各脳室の体積を求めた。
n=5、mean ± S.E、**p < 0.01 vs control

メチル水銀投与 2 週目以降、側脳室、第 3 脳室の体積が拡大した。第 4 脳室の体積に大きな変動は見られなかった。

オスマウス (図9) との比較を、次ページ 図14 に示す。この投与条件では、脳室の拡大に雌雄差は見られなかった。

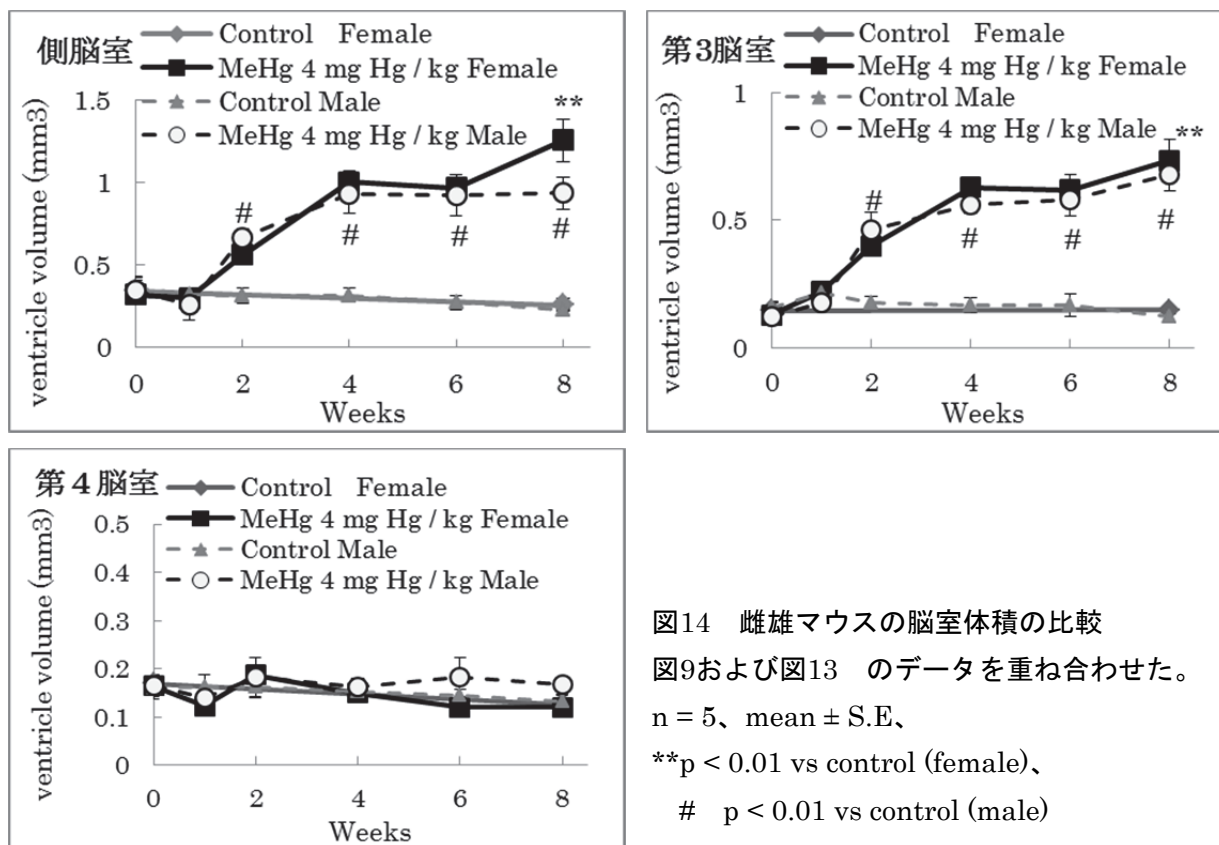


図14 雌雄マウスの脳室体積の比較
 図9および図13 のデータを重ね合わせた。
 n = 5、mean ± S.E、
 **p < 0.01 vs control (female)、
 # p < 0.01 vs control (male)

III-3-2 メスマウス体重の経時変化

図15に示すように、メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与 3 週目から溶媒投与群と比べて有意な体重の減少が見られ、経時的に差は広がった。オスでは、図11（下に再掲）に示すように、4 週目から有意な差異が見られたので、メスの方が 1 週間早く影響が現れた。

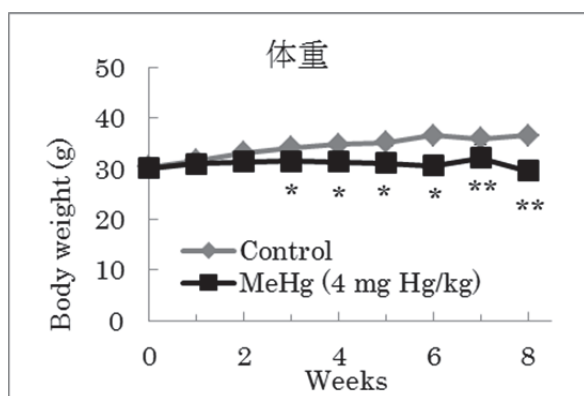


図15 メスマウス体重の経時変化
 ICR メスマウス (8 週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(4 mg Hg/kg) を連日投与し、毎週体重を測定した。

n = 5、mean ± S.E、*p < 0.05 vs control, **p < 0.01 vs control

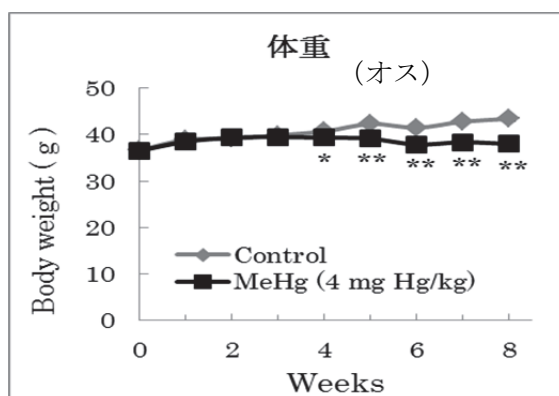


図11 オスマウス体重の経時変化(再掲)

III-3-3 メスマウスのローターロッド試験の経時変化

図16 に示すように、メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与 3 週目から溶媒投与群と比べて有意な体重の減少が見られ、経時的に差は広がった。オスでは、図12（下に再掲）に示すように、5 週目から有意な差異が見られたので、メスの方が 2 週間早く影響が現れたことになる。

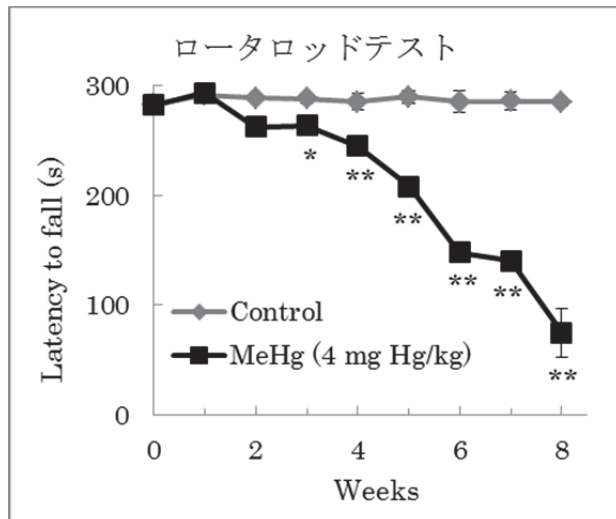


図16 メスマウスローターロッド試験の経時変化
ICR メスマウス（8週齢）に 溶媒（Control）またはメチル水銀（4 mg Hg/kg）を連日投与し、投与前と投与後毎週 ローターロッド試験を行った。

n = 5, mean ± S.E, *p < 0.05 vs 0 day, **p < 0.01 vs 0 day

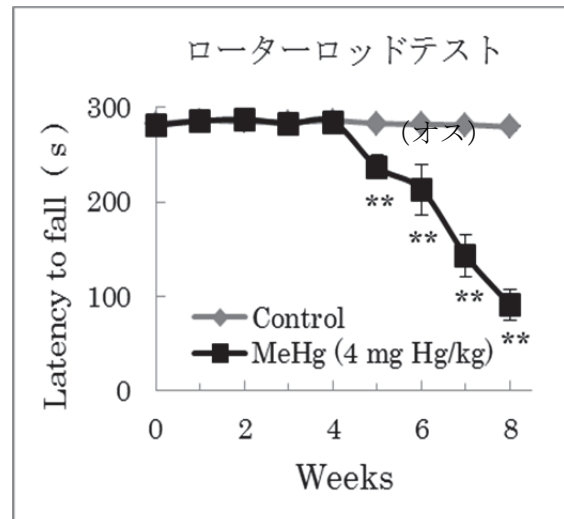


図12 オスマウスローターロッド試験の経時変化（再掲）

III-3-4 大脳皮質の水銀濃度

投与 8 週目のメスマウス大脳皮質の水銀含有量は $22.9 \pm 2.4 \mu\text{g Hg/g tissue}$ であり、同じ条件のオスマウス ($6.85 \pm 1.8 \mu\text{g Hg/g tissue}$) の3倍程度であった。同様の脳内水銀濃度の雌雄差は、Yasutake らが C57BL/6N マウスで観察しており、その原因としてメチル水銀の尿への排出能力がオスの方が高いためと報告している(文献1, 2)。BALB/cA マウスでは水銀蓄積量の雌雄差は見られなかったが(文献1)、ICR マウスはC57BL/6N マウスと同様の雌雄差があるようである。

III-3-5 メスマウスへのメチル水銀投与実験の総括

メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与により、脳室の拡大は投与 2 週目から観察された。拡大までの投与期間、拡大率などはオスマウスとほぼ同じであり、性差は観察されなかった。

体重減少と、ローターロッド試験による協調運動障害は 3 週目から有意に見られた。これらは、同じ投与量のオスマウスより 1-2 週間早く観察された。

大脳皮質の水銀含量は、投与 8 週目でメスはオスの 3 倍ほどであった。体重減少や協調運動障害が現れる時期がメスの方が早いのは、水銀の蓄積量と関係があるのかもしれない。しかし脳室拡大の時期に性差が見られなかったことなど説明できない点もあり、今後も追及していく。

III-4 メチル水銀による聴覚異常と MRI シグナルの関連

平成 25 年度の研究により、発達期の ICR マウス (4 週齢) にメチル水銀 4 mg Hg/kg を週 3 回投与すると、投与 2、4 週目の下丘核領域に、顕著な MRI T1 強調画像のシグナル増加が見られた。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。投与 6、8 週目ではシグナルの増加は弱まり、2 mg Hg/kg の週 3 回投与では、シグナルの増加は見られなかった。

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。そこで今回聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response ; ABR) を用いてメチル水銀を投与したマウスの聴覚を調べ、MRI 所見との関連を解析した。

さらに、下丘核の異常をマンガン増強 MRI や、免疫組織化学染色法、炎症マーカー mRNA の real-time PCR による定量で追及した。

III-4-1 MRI T1 強調画像による下丘核領域のシグナル変動の検出

発達期の 4 週齢 ICR マウスに、メチル水銀 4 mg Hg/kg を連日投与した。投与条件が昨年と異なるので、まず今回の投与条件での MRI の下丘核領域 T1 シグナルの変動を調べた。

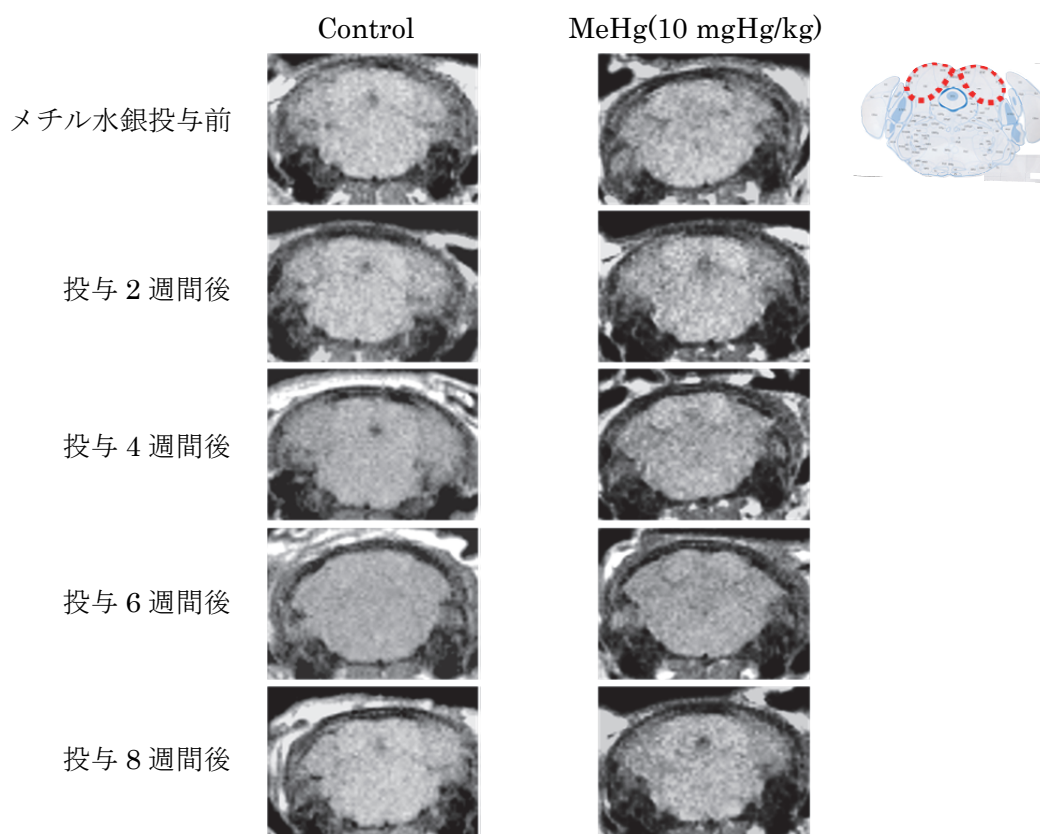


図17 下丘核領域の MRI T1 強調画像

ICR オスマウス (4 週齢) に溶媒 (Control) またはメチル水銀(4 mg Hg /kg) を連日投与した場合の、投与前、投与 2、4、6、8 週目の T1 強調画像。右上の模式図に下丘核領域を示す。

図 17 に示すように、メチル水銀投与 2 週目と 4 週目に下丘核領域 (右模式図) の T1 シグナルの増加が見られた。シグナル増加は 6 週目ではほとんど、8 週目にはまったく見られなくなって、昨年度の実験結果との整合性が見られた。

III-4-2 聴覚の測定

聴性脳幹反応 ABR システムを用い、ネンブタール麻酔したマウスを防音箱内保温パッド上に固定し、耳後方及び頭頂部に電極を挿入した。さらに内耳により音刺激が妨げられない位置にスピーカーを固定し誘発電位を測定した。誘発電位の波形と帰属を図 18 に示す。

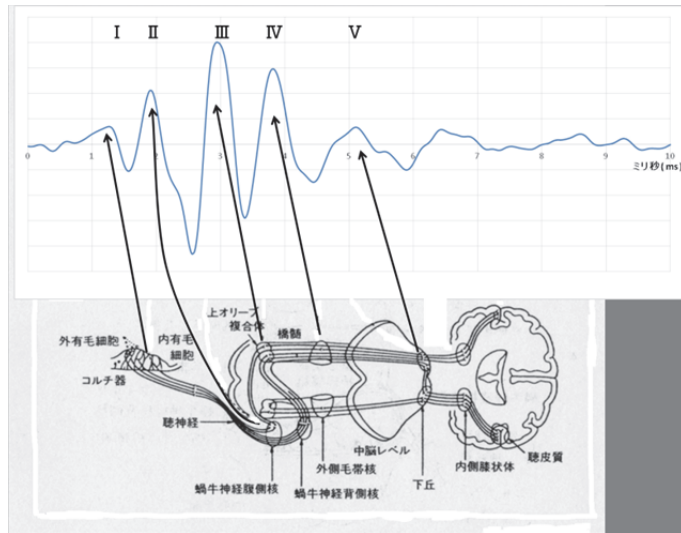


図 18 ABR の誘発電位の典型的波形とその帰属

マウスの ABR においては誘発電位に I ~ V の波が観測される。音刺激から、各誘発電位のピークまでの典型的な時間と電位発生部位の帰属は、

- I : 1.3~1.5 ms ; 聴神経 (蝸牛神経)、
- II : 1.8~2.2 ms ; 蝸牛神経核
- III : 3.0 ms± ; 上オリーブ核 (橋)
- IV : 3.8~4.2 ms ; 外側毛体核 (橋)
- V : 5.0 ms± ; 下丘 (中脳)

III-4-3 音圧スレッシュホールドと、各成分の潜時の測定

ICR オスマウスのクリック音の音刺激による誘発電位を測定した。音圧レベルは 90 db から 5 db ずつ下げながら 500 回積算で計測した。

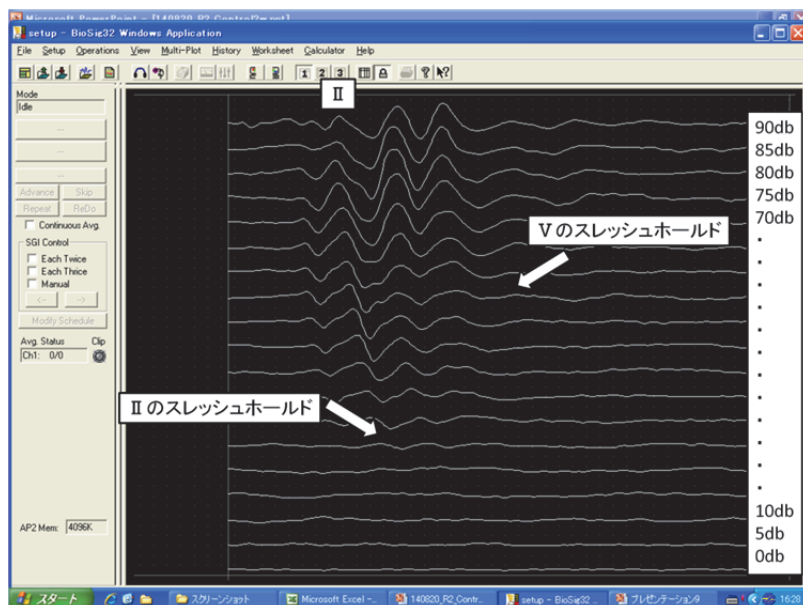


図 19 誘発電位測定画面

図 19 に示すように、最も低い音圧レベルで検出できたピークは II であった。そこで II のピークと下丘由来の V のピークの音圧レベルスレッシュホールドを、メチル水銀 4 mg Hg/kg を 2 ないし 4 週間投与したマウスについて求めた (図 20)。

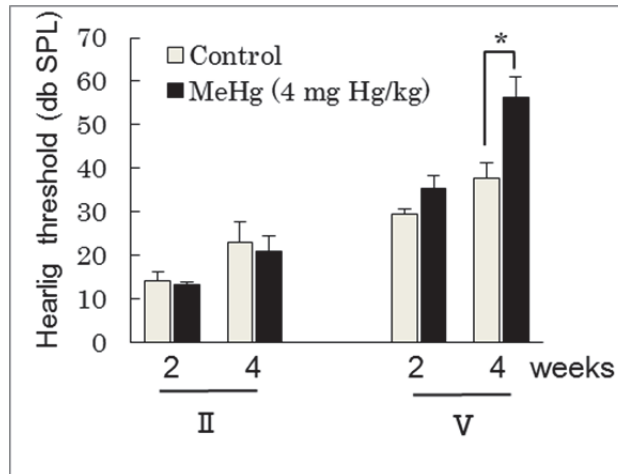


図 20 音圧レベルスレッショールド

ICR オスマウス（4 週齢）に溶媒（Control）またはメチル水銀（4 mg Hg /kg）を連日投与した場合の、投与 2, 4 週目の音圧レベルスレッショールドを sound pressure level: db SPL で表した。

n = 4 ~ 5、mean ± S.E、 *p < 0.05 VS Control

II のスレッショールドはメチル水銀投与では変化しないが、下丘由来の V ではメチル水銀を 4 週間投与した群に於いて有意な増加が認められ、より大きな音でないと反応しないことが観察された。投与 2 週目では有意な変化は見られなかった。

次に、各ピークの潜時を求め、その値からピーク間の潜時を算出した。

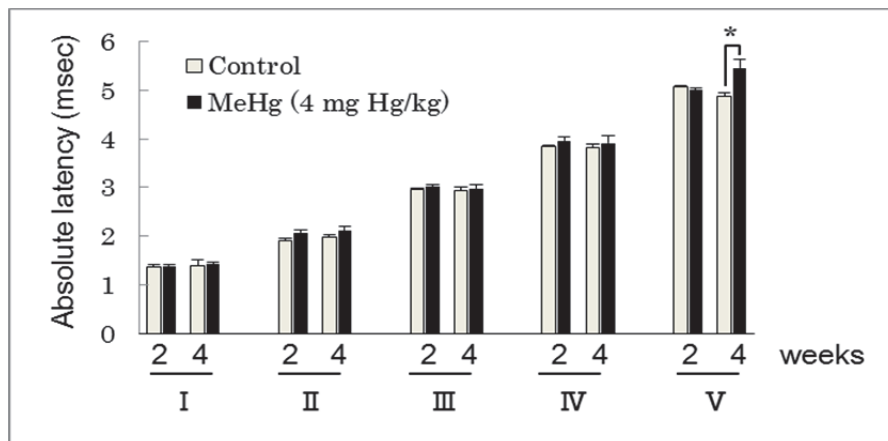


図 21 80db における各誘発電位の潜時

ICR オスマウス（4 週齢）に溶媒（Control）またはメチル水銀（4 mg Hg /kg）を連日投与し、投与 2, 4 週目に ABR を測定した。音刺激から各誘発電位のピークまでの時間（潜時）を求めた。n = 4 ~ 5、mean ± S.E、 *p < 0.05 VS Control

I ~ IV の誘発電位の潜時はメチル水銀を投与しても変化しないが、下丘由来の V の誘発電位はメチル水銀を 4 週間投与した群に於いて有意な遅延が認められた。投与 2 週目ではどの潜時にも有意な変化は見られなかった。

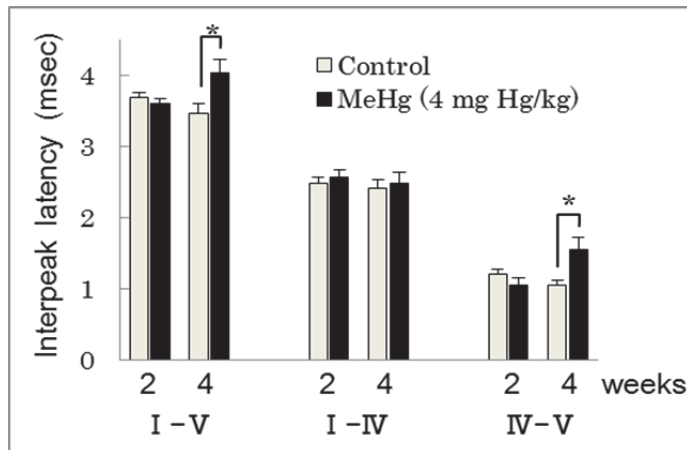


図 22 80db における各誘発電位間の潜時

図 18 に示した各誘発電位潜時から、I-V、I-IV、IV-V間の潜時を求めた。n = 4 ~ 5、mean ± S.E

*p < 0.05 VS Control

メチル水銀を 4 週間投与した群では I-V間で潜時の有意な増加が認められた。I-IV間には有意な潜時の変化はなく、IV-V間でのみ潜時が増加していた。投与 2 週目ではどの潜時にも有意な変化は見られなかった。

以上の結果は、メチル水銀 4 mg Hg/kg の 2 週間の投与では聴覚伝達路に影響は見られず、投与 4 週目では、下丘核のみで誘発電位を生じる音の大きさの増加、誘発電位の伝達の遅延が生じ、下丘の機能に異常が生じた事を示唆している。

III-4-4 マンガン増強 MRI で観察した神経活動の下丘域での変化

マンガンイオン(Mn²⁺) は血液脳関門を通過し、MRI の T1 強調画像上で強いシグナルを発する。Mn²⁺ はカルシウムイオン(Ca²⁺) と似た挙動を示すため、神経細胞の活動が盛んな部位で多く取り込まれ、T1 強調画像上のシグナル強度が増大する。

マウスに 24 時間、40 kHz の超音波（ヒトの可聴域より高いが、マウスの可聴域内）を聞かせて聴覚を刺激し、刺激しないマウスと共に、脳のマンガン増強 MRI を撮像した（添付図 III）。

溶媒を投与したコントロールマウスでは、聴覚を刺激すると下丘域のマンガン増強 MRI シグナルが顕著に増加し、聴覚刺激による下丘の神経活動の亢進が検出された。メチル水銀 4 mg Hg/kg を 4 週間連日投与したマウスでは、聴覚刺激による亢進がほとんどなく、下丘域に器質的異常が生じていることが示された。

III-4-5 下丘域の切片の免疫組織化学染色

4 週齢 ICR マウスに、メチル水銀 4 mg Hg/kg を連日投与し、脳を還流固定した後に下丘域の切片（10 μm）を作成し、免疫組織化学的に解析した。

まず、ニューロンを選択的に染色する Neuro Trace 染色で、下丘のニューロン数を調べた。

添付図 IV の上段のように、溶媒投与群とメチル水銀投与群間で、ニューロン数に変動はなかった。単位面積当たりの Neuro Trace 陽性細胞数も計測したが、有意差はなかった(n=3)。

次に、TUNEL 法でアポトーシスを起こしている細胞を調べたが、下丘域ではメチル水銀投与の有無にかかわらず、アポトーシスはほとんど検出されなかった（添付図 IV 中段）。

下丘域の切片のヘマトキシリン-エオシン染色を行った（添付図 V）。図の青い矢印は、ネクローシス様の像であるが、コントロール群(vehicle)に比べ、メチル水銀投与群では、明らかにネク

ローシスが増加していた。

さらに、ミクログリアを選択的に検出できる Iba 1 と活性化アストロサイトのマーカーである GFAP の抗体を用いた免疫染色を行った (添付図VI)。

Iba 1 陽性細胞数に、メチル水銀投与の影響は見られず、ミクログリアの形態にも差異は見られなかった (添付図VI上段)。

活性化アストロサイトを染色する GFAP では、コントロール群(vehicle)ではほとんど陽性細胞は観察されないが、メチル水銀投与群では、グリオシス様の陽性像が観察された (添付図VI 下段)。

III-4-6 下丘域のサイトカインの mRNA 解析

一部のマウスでは、還流固定を行わずに下丘を摘出し、total RNA を抽出して real-time RT-PCR によって、サイトカインの mRNA 量の変動を解析した。

ミクログリアが活性化されたときに放出されるサイトカインとして、腫瘍壊死因子 (Tumor Necrosis Factor α , TNF α) と、インターロイキン-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β) の mRNA 量を real-time RT-PCR で求めた。図23 に示すように、コントロール群とメチル水銀投与群とで、mRNA 量に有意差は認められなかった。

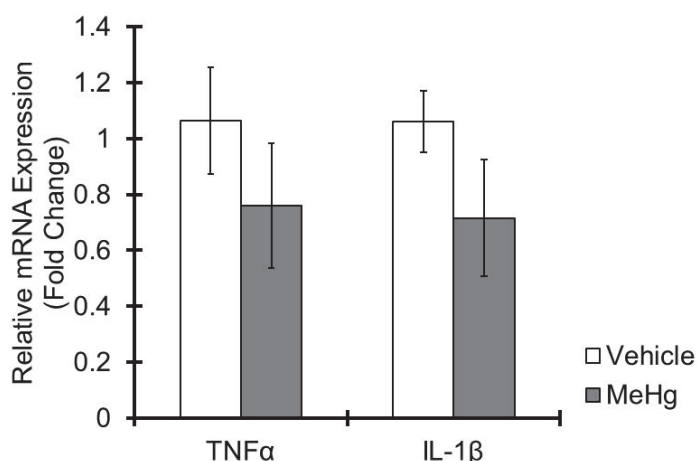


図 23 下丘域のサイトカインの mRNA 量

ICR オスマウス (4 週齢) に溶媒 (Vehicle) またはメチル水銀 (4 mg Hg/kg) を連日投与し、投与 4 週目に下丘を摘出して total RNA を抽出した。real-time RT PCR により、TNF α と IL-1 β mRNA 量を求め、vehicle に対する相対値で表した。 n= 4

III-4-4 メチル水銀による聴覚異常と MRI シグナルの関連の総括

発達期である 4 週齢の ICR マウスにメチル水銀 4 mg Hg/kg を連日投与した。

MRI の T1 強調シグナルは、メチル水銀投与 2 週目と 4 週目に下丘核領域で増加した。

ABR の測定では、メチル水銀 投与 2 週目では聴覚の異常は観察されなかった。投与 4 週目に、聴神経伝達経路のうち下丘の誘発電位の音圧レベルスレッショールドの有意な増加 (小さな音に反応しなくなる) と潜時の遅延が見られた。なお、ICR マウスにメチル水銀を投与した際の ABR の変動が報告されており (文献 3)、我々の今回の結果と矛盾しない。

マンガン増強 MRI を用いることにより聴覚刺激に対する下丘の神経活動の亢進が検出されたが、メチル水銀を 4 週間投与すると、この下丘の反応が著しく低下した。

免疫組織化学染色により、メチル水銀投与 4 週目の下丘では、ネクロシスの増加とグリオシスが検出された。これらメチル水銀投与 4 週目の下丘域の器質的異常は、ABR で見られた下

丘域の聴覚異常と関連している可能性がある。なお、ミクログリア数には大きな変動は無く、ミクログリア由来のサイトカインの mRNA 量に変動が無い事と整合性がある。アポトーシスも検出されなかったが、ネクローシスが増加しているにも関わらず、ニューロン数の変動が検出されず、やや不可解である。これらは今後経時的な追及を行っていく予定である。

下丘核に起因する聴覚異常は、メチル水銀投与 4 週目で見られたが、MRI による下丘 T1 シグナルの増加は、投与 2 週目から検出された。これは MRI により、聴覚異常の発症前診断が可能であることを示しているのかもしれない。

IV 考察

今年度の研究は、まず 7 日で半数程度のマウスが死亡する高用量のメチル水銀投与で、重篤なダメージを脳に与え、その脳の MRI での解析を行った。

メチル水銀 10 mg Hg/kg の高用量連日投与を 7 日間行ったところ、側脳室と第 3 脳室の体積が約 4 倍に拡大した。第 4 脳室の体積は変化しなかった。脳室拡大の機序については、次年度の課題として重点的に追及する。

高用量のメチル水銀投与では、脳室拡大と体重減少、協調運動障害が投与 2-3 日目からほぼ同時に観察された。

次に、体重変動が見られる最低量のメチル水銀投与量で MRI 解析を行った。

メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与を 8 週間行ったところ、脳室拡大は投与 2 週目から見られ、投与 4 週目以降は 3-4 倍の拡大率となり、高用量メチル水銀投与と同等の拡大率であった。この投与量でも第 4 脳室の体積は変動しなかった。メチル水銀の脳内蓄積量は高用量投与の 10 分の 1 と、投与量の差異よりも大きかった。これは、メチル水銀の排出と投与量が、4 mg Hg/kg 連日投与の場合はバランスしたためと思われる。投与量の違いは脳室体積が拡大するまでの期間に影響したが、脳室の拡大率は同じであった。また、脳室拡大に先だって脳内にメチル水銀が蓄積しているようであり、水銀蓄積量と脳室拡大の関係も追及すべき課題である。

この低用量のメチル水銀投与では、まず脳室の拡大が 2 週目に始まり、それがピークに達した 4 週目から体重がわずかに減少しはじめ、5 週目以降に協調運動が時間依存的に障害を受けるという順番であった。この結果は、脳のダメージの重篤化によって現れる症状が異なることを意味しているのか、ダメージを受ける部位が投与期間と共に推移するのか、今後投与 2 週、5 週のマウスを剖検して検討していきたい。

MRI による脳室の拡大は、協調運動障害や体重減少よりも早期に観察されるので、「メチル水銀による運動障害の発症前診断」を行える可能性が示唆された。

聴覚異常と MRI 所見の関連について、発達期の 4 週齢のマウスを用いて検討した。

4 週齢マウスにメチル水銀 4 mg Hg/kg を連日投与したところ、投与 2 週目では ABR による聴覚異常は検出されなかったが、4 週目では、聴神経伝達経路のうち下丘でのみ、誘発電位の潜時の遅延や音圧レベルスレッショールドの増加が見られた。すなわちメチル水銀が引き起こすマウスの聴覚異常は下丘がターゲットということである。

マンガン増強 MRI を適用したところ、聴覚刺激に対する下丘の神経活動の亢進が検出されたが、メチル水銀の 4 週間投与でこの下丘の反応が著しく低下し、また免疫組織化学染色により、メチル水銀投与 4 週目の下丘でのネクローシスの増加とグリオーシスが検出された。これらメチル水銀投与 4 週目の下丘域の器質的異常は、ABR で見られた下丘域の聴覚異常と関連している可能性がある。

通常 MRI である T1 強調画像所見では、下丘域のシグナル増加がメチル水銀投与 2 週目と 4 週目に観察された。投与 2 週目では聴覚異常は検出されていないので、聴覚異常が発生する 2 週間前に MRI で下丘の異常が検出されたことになる。MRI で観察された下丘の異常が聴覚異常と関連するのであれば、MRI によって「聴覚異常の発症前診断」を行っていると言えるのかもしれない。

V 結論

- ・メチル水銀高用量 (10 mg Hg/kg) 連日投与では、脳室拡大と体重低下、協調運動能力の低下は 2-3 日目からほぼ同時に有意な変化として観察された。
- ・メチル水銀による脳室の拡大は、側脳室と第 3 脳室のみにみられ、第 4 脳室の体積は変化しなかった。
- ・メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与では、脳室の拡大は投与 2 週目から観察され、体重減少は 4 週目から、ローターロッド試験による協調運動障害の検出は 5 週目から有意に見られた。
- ・脳室の拡大については、投与 4 週目以降の拡大率、また第4脳室に変化が見られないことなど、高用量投与マウスで観察された脳室拡大と類似していた。
- ・プランター試験に影響がなかったことから、後肢への痛覚刺激や運動に関与する末梢神経の顕著な障害は、この投与条件では生じていないことが示唆された。
- ・ABR の測定では、メチル水銀 4 mg Hg/kg 投与 4 週目に、聴神経伝達経路のうち下丘の誘発電位の音圧レベルスレッショホルドの有意な増加（小さな音に反応しなくなる）と潜時の遅延が見られた。
- ・MRI の T1シグナルは、メチル水銀 4 mg Hg/kg 連日投与 2 週目と 4 週目に下丘核領域で増加した。すなわち、MRI を用いると、聴覚に異常が見られる 2 週間前に下丘の器質的変化をとらえられたことになる。
- ・マンガン増強 MRI を用いることにより、聴覚刺激に対する下丘の神経活動の亢進が検出され、それはメチル水銀 4 mg Hg/kg 投与 4 週間で低下することが示された。
- ・免疫組織化学染色により、メチル水銀 4 mg Hg/kg 投与 4 週間で、下丘域にネクロシスの増加とグリオシスが検出された。これらは聴覚に影響する器質的変化をとらえている可能性がある。

・これらの結果を総合して、メチル水銀毒性の検出法として、体重減少、協調運動障害、ABR による聴覚異常、MRI による脳室拡大と下丘域のシグナル増強の 4 手法を比較すると、MRI は他よりも短い投与期間でメチル水銀の影響が検出できる検出法であった。

・MRI では、運動障害や聴覚異常が発症する前に脳の異常をとらえることが可能であり、「発症前診断」を行える可能性が示唆された。

VI 次年度以降の計画

平成 27 年度

実験 1. 脳室拡大を生じるメチル水銀最小投与量および無毒性量の決定

8 週齢 ICR マウスを用い、メチル水銀 0、0.1、0.2、0.5、1 mg Hg/kg を連日投与し、1、2、4、6、8 週目に MRI の撮像、ローターロード試験、脳内水銀量の定量を行い、脳室の拡大や下丘域の MRI シグナルの増加が観察される 最小投与量および無毒性量を求める。必要があればより低い投与量で実験を行う。

実験 2. 水銀投与中止後の、脳室体積と運動障害の推移

8 週齢 ICR マウスに、メチル水銀 1 ないし 4 mg Hg/kg を 2 週間連日投与する。これらの投与条件では、運動障害も体重変動も生じないが、脳室は拡大する。その後 6 週間、水銀を投与せずに飼育し、2 週間おきに MRI の撮像、ローターロード試験、体重計測を行い、脳室拡大が回復可能か、一度脳室が拡大すると運動障害や体重変動がその数週間後に必ず起こるのかどうか、解析する。

実験 3. 脳室拡大の病理学的追及

脳室の拡大した ICR マウス脳の連続切片を用い、脳室周囲の病変を解析する。

マウスを、メチル水銀 1 mg Hg/kg 2 週間投与（わずかに脳室が開く）、4 mg Hg/kg 2 週間（ほぼ完全に開く）、4 mg Hg/kg 4 週間（体重が減少）、4 mg Hg/kg 5 週間（協調運動障害発生）のような異なる条件で飼育し、それぞれの脳の連続切片を作成する。切片は、ヘマトキシリン-エオシン染色、クリューバー・バレラ染色を行い、共同研究者である香川大学医学部病理医の上野教授、または山口大学の篠田教授に病理診断をお願いし、特に脳室と中脳水道周辺での異常所見を検出する。

また、蛍光ニッスル染色用試薬 NeuroTrace を用いたニューロン染色によるニューロン脱落の評価、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出、ミクログリアマーカー Iba1 染色による脳内炎症の検出、さらに、アストロサイトマーカー GFAP 染色によるグリオシスの検出を行い、上述の病理診断の結果と合わせて、脳室周囲で生じている病変を特定する。

脈絡叢を含む脳室周辺部位や、病理診断で異常が発見された部位から RNA を抽出し、アクアポリンや炎症マーカー類の mRNA を定量し、どのようなメカニズムで病変が生じているか解析する。

末梢神経の軸索については、マッソントリクローム、Neurofilament 染色で、軸索変性について検討する。

実験 4. メチル水銀に対する感受性の性差と脳内ステロイド

ICR マウスでも、C57BL/6N マウス同様、メチル水銀を投与した場合の水銀蓄積量に大きな性差が見られた。そこで 8 週齢のメスの ICR マウスに 0.5 mg Hg/kg のメチル水銀を連日投与し、2 週間おきに MRI の撮像、ローターロード試験を行った後、8 週間後に脳内水銀量を定量する。実験 1 のデータのうち、8 週間後の脳内水銀量が今回のメスと同等であった投与量のオスを選ん

で、MRI 所見、協調運動障害を今回のメスのデータと比較して、メチル水銀への脳の感受性の性差を解析する。

脳内水銀量が同等になるメチル水銀投与条件でオスとメスを飼育し、脳内のエストラジオール、テストステロン濃度を定量し、メチル水銀感受性への性ホルモンの影響を解析する。

実験 5. マウスへのメチル水銀投与と下丘 T1 強調画像の撮像

4 週齢オス ICR マウスに 4 mg Hg/kg の用量で 2 ヶ月間メチル水銀を連日投与する。この間、MRI により T1 強調画像を撮像する。26 年度までの研究成果より、メチル水銀投与 2 週間後より、下丘核におけるシグナルの増大が観察される。下丘核 T1 シグナルが増大したマウス個体を以下の実験に供する。

実験 6. 下丘組織標本の作製と病理診断

パラホルムアルデヒドにより脳組織を固定し、下丘断面のヘマトキシリン-エオシン染色、及び、クリューバー・バレラ染色を行う。共同研究者である香川大学医学部病理医の上野教授に病理診断をお願いし、異常所見を検出する。

また、蛍光ニッスル染色用試薬 NeuroTrace を用いたニューロン染色によるニューロン脱落の評価、TUNEL 法によるアポトーシス細胞の検出、ミクログリアマーカー Iba1 染色による脳内炎症の検出、さらに、アストロサイトマーカー GFAP 染色によるグリオシスの検出を行い、上述の病理診断の結果と合わせて、下丘で生じている病変を特定する。

実験 7. 下丘病変の生化学的解析

実験 2 より得られた病変について、生化学解析も併用し、測定の確実性を上げる。具体的には、アポトーシスが生じていた場合は、断片化した Caspase-3 と PARP をウエスタンブロットで検出する。脳内炎症は、real-time PCR による炎症性サイトカイン mRNA の測定より、グリオシスは同じく GFAP、S100 β mRNA 測定により精査する。さらに、酸化ストレスについて、過酸化脂質測定により調べる。

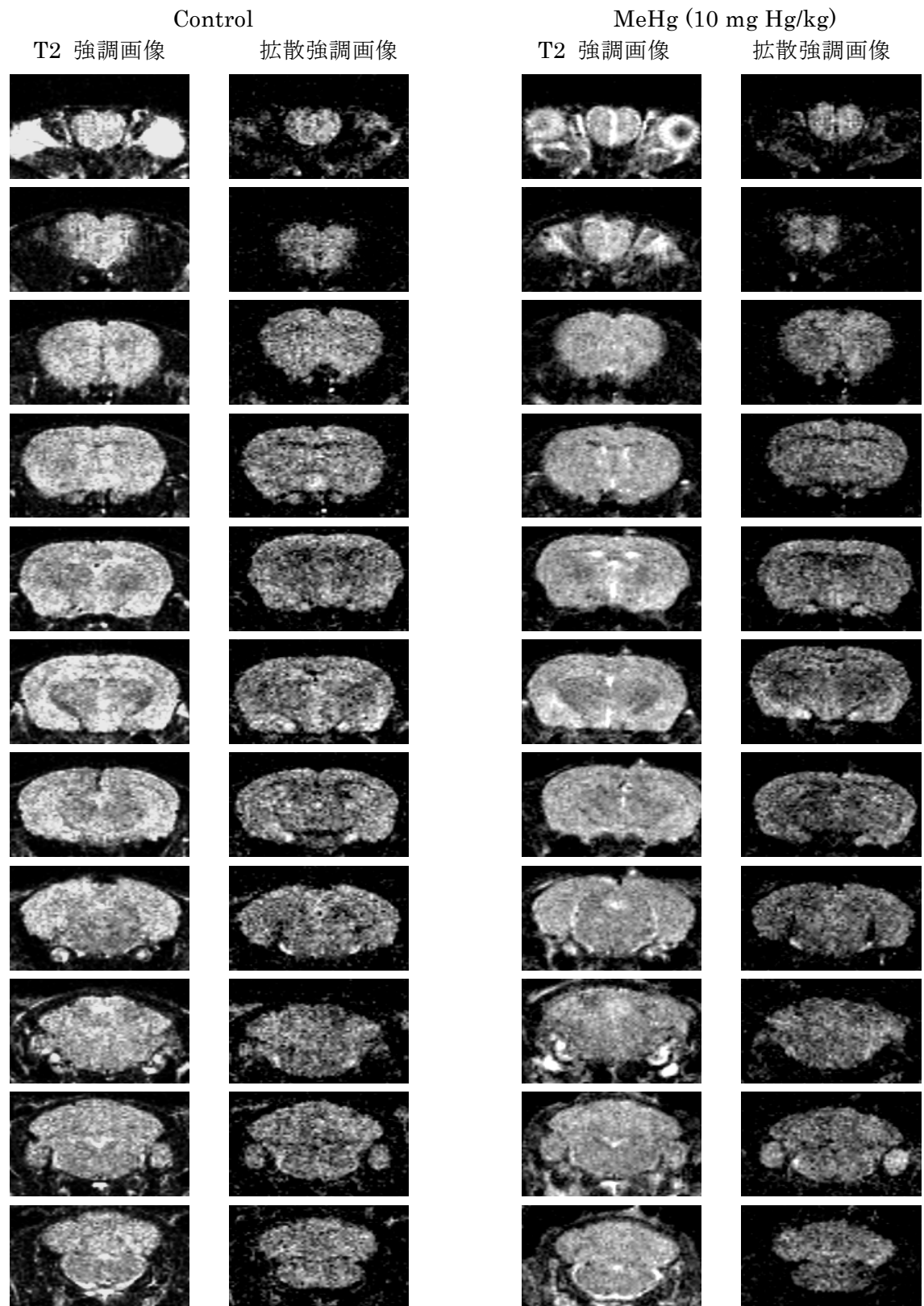
実験 8. マンガン増強 MRI 法を用いた下丘神経機能異常の早期検出の試み

マンガンイオンは、神経系においてカルシウムイオンと同様の挙動を示し、電位依存的カルシウムチャネルや NMDA 受容体を介して神経細胞内に流入することが知られている。つまり、神経活動が活発な細胞ほど、多くのマンガンイオンを取り込むことになる。マンガンイオンは、長く使用されている MRI 造影剤であり、T1 強調画像法で撮像すると、マンガンイオンの周囲のシグナルが増強する。

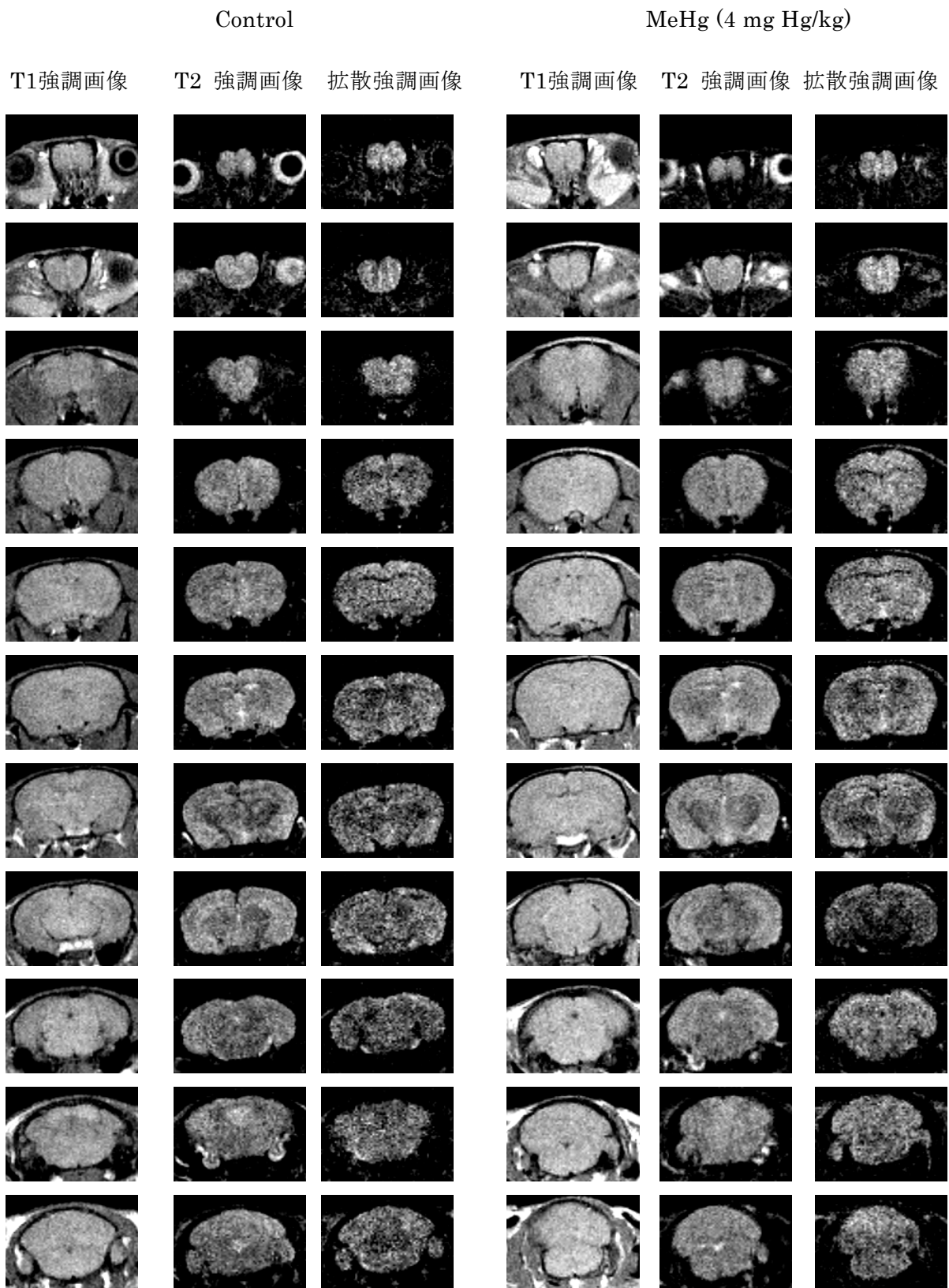
塩化マンガン を 40mg/kg の用量で腹腔内投与した後、40kHz で 24 時間聴覚刺激を行う。MRI により T1 強調画像を撮像し、聴覚刺激による下丘シグナルの変化を定量することにより、メチル水銀により生じる下丘神経機能の異常を時空間的（どの投与時期に、下丘のどの領域が障害されるか）に解析する。

引用文献

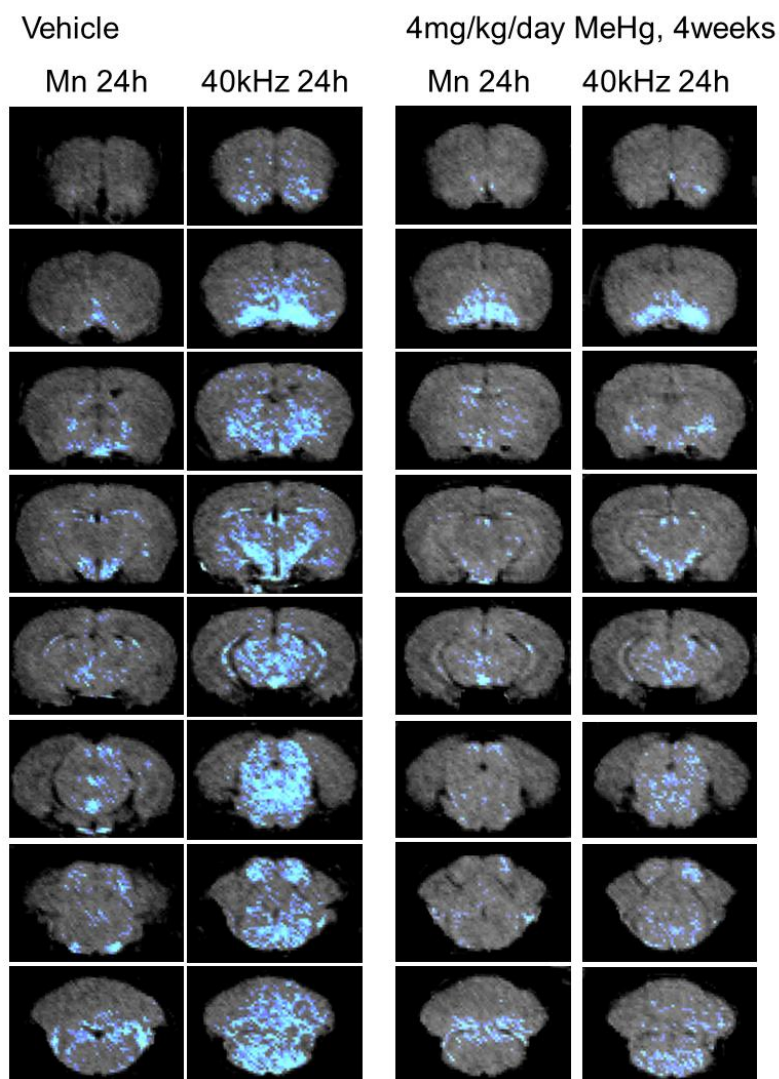
- 1) Yasutake A Hirayama K, Sex and strain differences of susceptibility to methylmercury toxicity in mice, *Toxicology* 1988; 51: 47-55
- 2) Hirayama K, Yasutake A, Inoue M. Effect of sex hormones on the fate of methylmercury and on glutathione metabolism in mice. *Biochem Pharmacol.* 1987; 36: 1919-24.
- 3) Chuu JJ Hsu CJ Lin-Shiau SY, Abnormal auditory brainstem responses for mice treated with mercurial compounds: involvement of excessive nitric oxide, *Toxicology* 2001; 162 :11-22.



添付図 I 高用量メチル水銀投与マウスの脳の MRI T2 強調画像および拡散強調画像
 ICR オスマウス (8週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀 (10 mg Hg/kg) を 7日
 間連日投与し撮像した。嗅球から 1.2 mm ごとの冠状面画像を示す。



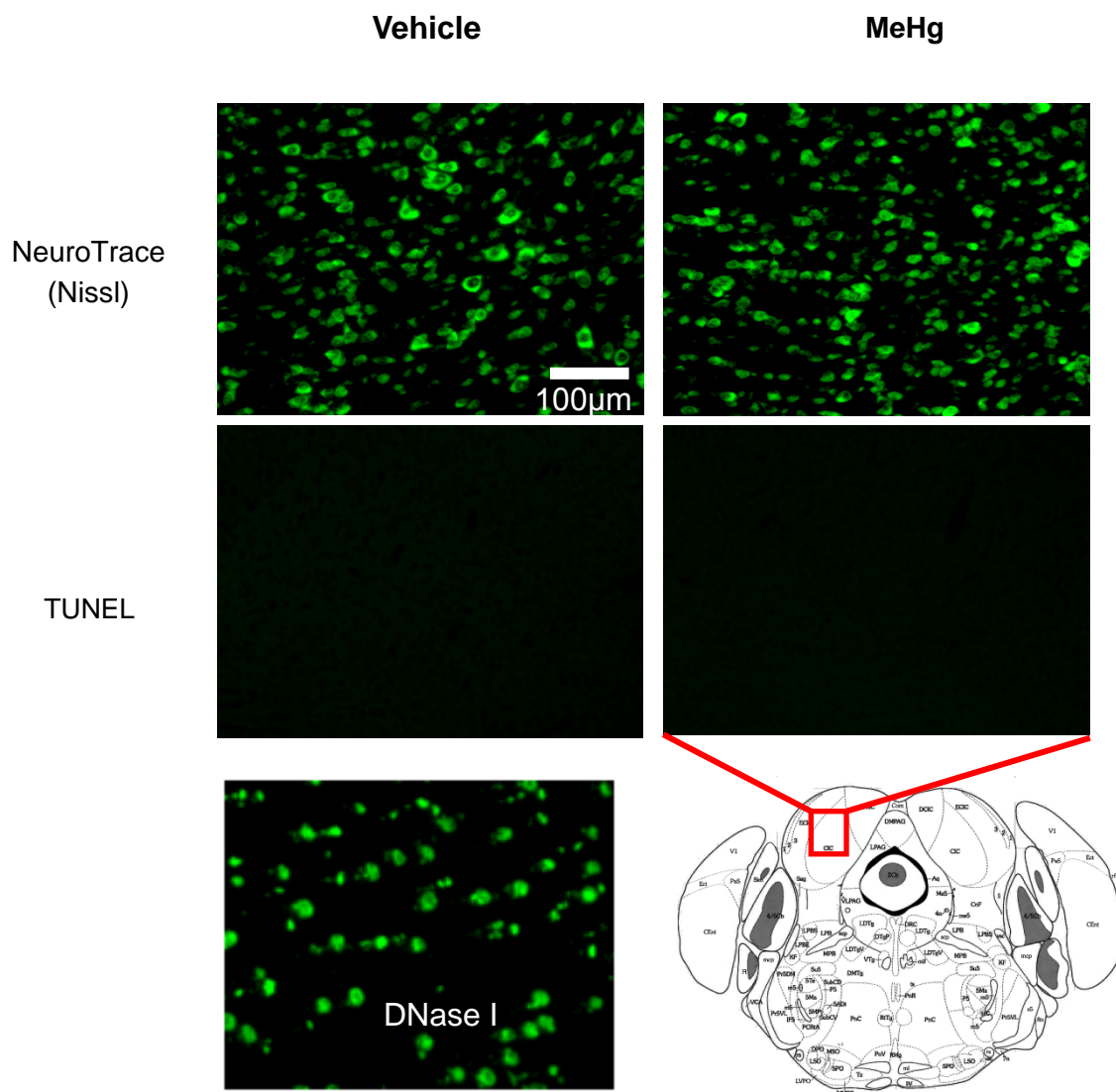
添付図Ⅱ メチル水銀 8 週間投与後のマウス脳の MRI 画像
 ICR オスマウス (8週齢) に 溶媒 (Control) またはメチル水銀(4 mg Hg/kg) を8週間
 連日投与し撮像した。嗅球から1.2 mm ごとの冠状面画像を示す。



添付図Ⅲ マンガン強調 MRI 画像

ICR オスマウス（4 週齢）に溶媒（vehicle）またはメチル水銀（4 mg Hg /kg）を連日 4 週間投与した後、40mg/kg MnCl₂ を腹腔内投与。その 24 時間後に 40 kHz で 24 時間聴覚を刺激して、嗅球から 1.2 mm ごとに T1 強調画像の冠状面画像を撮像（n=3）。信号強度を疑似カラーで示した。青が明るいほどシグナルが強い。

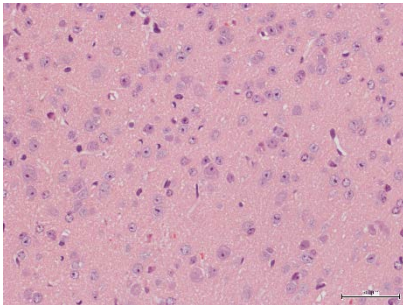
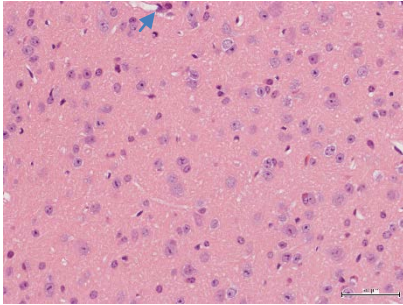
図は、左列から、溶媒投与聴覚刺激無し、有り、メチル水銀投与聴覚刺激無し、有り、の典型例を示す。下丘は、下から 2 列目に見える。右下の模式図に、下丘域を赤線で囲ってある。



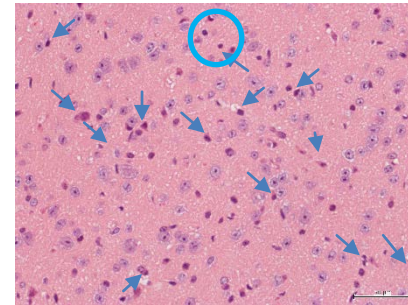
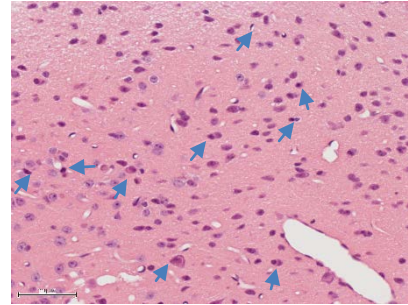
添付図IV 下丘域のニューロンとアポトーシスの検出

ICR オスマウス (4 週齢) に溶媒 (vehicle) またはメチル水銀 4 mg Hg /kg (MeHg) を連日 4 週間投与した後、還流固定して下丘域を摘出し、10 μ m の切片を作成した。Neuro Trace でニューロンを染色し (上段)、TUNEL 法でアポトーシスを検出した (中段)。下段左は、切片に DNase I を作用させた、TUNEL 法のポジティブコントロールである。下段右は、画像の下丘域での位置を示す。

Vehicle

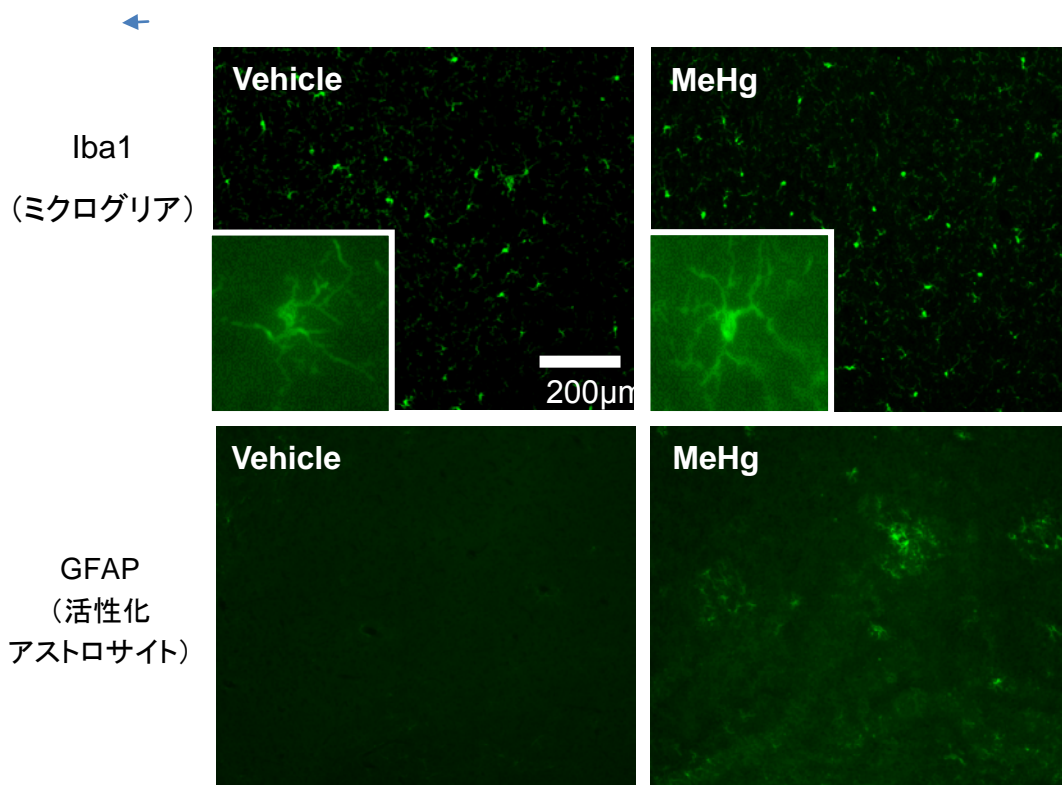


MeHg



添付図V 下丘域のヘマトキシリン-エオシン染色画像

ICR オスマウス (4 週齢) に溶媒 (vehicle) またはメチル水銀 4 mg Hg /kg (MeHg) を連日 4 週間投与した後、還流固定して下丘域を摘出し、10 μ m の切片を作成した。ネクローシス様の細胞を青い矢印で示してある。



添付図VI 下丘域のミクログリアと活性化アストロサイトの検出

ICR オスマウス (4 週齢) に溶媒 (vehicle) またはメチル水銀(4 mg Hg /kg) を連日 4 週間投与した後、還流固定して下丘域を摘出し、10 μ m の切片を作成した。

抗 Iba 1 抗体でミクログリアを(上段)、抗 GFAP 抗体で活性化アストロサイトを(下段) 染色した。上段の挿入図は、ミクログリアの拡大写真。

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}, Takuya Takemoto^{*1}, Shinichi Shimada^{*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

Magnetic resonance imaging (MRI) is a noninvasive method that can analyze anatomical change of brain in living animals. In this project, relationship between the time dependent changes of anatomical lesions in brain and locomotor activity of mice exposed to methylmercury was analyzed.

Male ICR mice (8 weeks old) were orally given 10 mg Hg/kg of methylmercury chloride every day. The lateral ventricles and the third ventricle were enlarged but no change of the fourth ventricle was observed in MR image after the 2 days administration. Body weight and spontaneous locomotor activities which were determined by lotarod tests also decreased after 2-3 days of the administration.

Then, the other group of mice (male, 8 weeks old) was orally administrated 4 mg Hg/kg of methylmercury chloride every day. Their body weight and spontaneous locomotor activities decreased after 4 and 5 weeks of the administration, respectively. However, volume of lateral ventricles and the third ventricle in MR image were enlarged after 2 weeks of the administration. These findings indicate that MRI could detect abnormalities in the brain morphology 2 or 3 weeks earlier than that in the body weight or locomotor activities.

Female ICR mice (8 weeks old) were orally given 4 mg Hg/kg of methylmercury chloride every day. Enlargement of lateral ventricles and the third ventricle was observed after 2 weeks of the administration, just the same as the male mice. Decreases in their body weight and locomotor activities, however, were observed after the 3 weeks administrations, 1 or 2 weeks earlier than the male mice which given same amounts of methylmercury. Mercury content in the female brain was 3 times higher than that in male mice after 8 weeks of the administration. These facts indicate sexual differences in the accumulation of mercury in the brain and their motor activities.

Four mg Hg/kg of methylmercury was administrated in immature mice (male, 4 weeks old) every day. An intensified signal in T1 weighted image of MRI was detected at the inferior colliculus after 2 and 4 weeks of administration. In the auditory brain-stem response test, abnormalities of the auditory response at the inferior colliculus region was not observed after the 2 weeks administration but detected after 4 weeks. Damages of inferior colliculus were also detected by manganese enhanced MRI and histochemical analysis after 4 weeks administration.

In summary, MRI can detect toxicity of methylmercury in mice as anatomical abnormalities in the brain 2 or 3 weeks before the abnormalities in body weight and locomotor activities.

参 考 资 料

平成 26 年度
メチル水銀研究ミーティング

講演要旨集

期間：2014 年 12 月 5 日

会場：LMJ 東京研修センター 4 階 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>	
世界的に懸念される水銀汚染と水俣（赤木 洋勝）	5
<u>一般講演</u>	
講演 1 水銀トランスポーターMerC を利用した水銀浄化植物の作出（清野 正子）	9
講演 2 メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内シグナル伝達（鍛冶 利幸）	13
講演 3 南西諸島の生態系における（総）水銀分布（渡邊 泉）	18
講演 4 疾患由来の代謝異常がメチル水銀の毒性発現に及ぼす影響～2 型糖尿病マウスを用いた実験研究～（山元 恵）	19
講演 5 メチル水銀神経毒性の軽減に関する実験的研究（藤村 成剛）	22
講演 6 メチル水銀の新規毒性発現機構 活性イオウ分子によるレドクスシグナル制御の破綻（居原 秀）	26
講演 7 分泌エキソソームによるメチル水銀排出の分子機構（今村 伸太郎）	31
講演 8 小胞体ストレスプレコンディショニングによるメチル水銀毒性防御（臼杵 扶佐子）	35
<u>若手発表</u>	
発表 1 メチル水銀の妊娠期曝露による胎児脳下垂体および副腎のホルモン合成系への影響と性差（武田 知起）	41
発表 2 メチル水銀の視覚系組織への影響（今田 敏博）	44
発表 3 メチル水銀の聴覚伝導路への影響（石原 康宏）	47
発表 4 メチル水銀による脳微小血管組織の透過性亢進に関わる VEGF 発現誘導メカニズム（吉田 映子）	50
発表 5 水銀トランスポーター（MerC, MerE, MerF, MerT）の水銀輸送について（曾根 有香）	53
発表 6 胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 84 ヶ月時の言語能力に及ぼす影響（龍田 希）	55
発表 7 周産期のメチル水銀および POPs の混合曝露マウスにおける育児および神経行動発達への影響（岩井 美幸）	58

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、それらの研究領域における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 26 年 12 月 5 日 (金) 9:00~16:30 (特別講演、一般講演、若手発表)

場 所 : LMJ 東京研修センター 4 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（講演50分、質疑応答10分）
一般講演：25分（講演15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5日（金）（8:30開場）

9:00 開会（事務局）

9:01～9:05 挨拶（環境省）

9:05～9:10 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「メチル水銀汚染と毒性発現機構」

座長 藤村 成剛（国水研）、永沼 章（東北大薬）

9:10～9:35 演題1 清野 正子 水銀トランスポーターMerCを利用した水銀浄化植物の作出
(北里大薬)

9:35～10:00 演題2 鍛冶 利幸 メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内シグナル伝達
(東京理科大薬)

10:00～10:25 演題3 渡邊 泉 南西諸島の生態系における（総）水銀分布
(農工大)

10:25～10:50 演題4 山元 恵 疾患由来の代謝異常がメチル水銀の毒性発現に及ぼす影響
(国水研) ～2型糖尿病マウスを用いた実験研究～

10:50～11:00 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）

11:00～12:00 赤木 洋勝 世界的に懸念される水銀汚染と水俣
(国際水銀ラボ)

12:00～12:40 昼食

■第3部 若手発表「メチル水銀研究の新展開」

座長 臼杵 扶佐子（国水研）

12:40～12:55 発表1 武田 知起 メチル水銀の妊娠期曝露による胎児脳下垂体および副
(九州大院薬) 腎のホルモン合成系への影響と性差

12:55～13:10 発表2 今田 敏博 メチル水銀の視覚系組織への影響
(慶應義塾大医)

13:10～13:25 発表3 石原 康宏 メチル水銀の聴覚伝導路への影響
(広島大院総合科学)

13:25～13:40 発表4 吉田 映子 メチル水銀による脳微小血管組織の透過性亢進に関わ
(東京理科大薬) る VEGF 発現誘導メカニズム

座長 鍛冶 利幸（東京理科大薬）

13:40～13:55 発表5 曾根 有香 水銀トランスポーター（MerC, MerE, MerF, MerT）の
(北里大薬) 水銀輸送について

- 13:55～14:10 発表6 龍田 希 (東北大院医) 胎児期におけるメチル水銀曝露が生後84ヶ月時の言語能力に及ぼす影響
- 14:10～14:25 発表7 岩井 美幸 (東北大院薬) 周産期のメチル水銀および POPs の混合曝露マウスにおける育児および神経行動発達への影響

14:25～14:35 休憩

■第4部 一般講演「メチル水銀毒性とその防御の分子メカニズム」

座長 熊谷 嘉人 (筑波大医学医療)、黄 基旭 (東北大院薬)

- 14:35～15:00 演題5 藤村 成剛 (国水研) メチル水銀神経毒性の軽減に関する実験的研究
- 15:00～15:25 演題6 居原 秀 (大阪府立大院理) メチル水銀の新規毒性発現機構 活性イオウ分子によるレドクスシグナル制御の破綻
- 15:25～15:50 演題7 今村 伸太郎 (水産総合研究セ中央水研) 分泌エキソソームによるメチル水銀排出の分子機構
- 15:50～16:15 演題8 臼杵 扶佐子 (国水研) 小胞体ストレスプレコンディショニングによるメチル水銀毒性防御

16:15～16:25 「若手研究奨励賞」授賞者発表および表彰式

16:25～16:30 閉会の挨拶 (環境省)

特別講演

世界的に懸念される水銀汚染と水俣

○赤木 洋勝 (有)国際水銀ラボ
(元国立水俣病総合研究センター)

水銀は古くからさまざまな用途で利用され、水銀汚染とそれに伴う健康被害も繰り返されてきた。わが国で1950 - 1960年代にかけて二度も発生し多数の犠牲者を出した、いわゆる「水俣病」はこれまで人類が経験した環境汚染に起因する水銀禍の中で最も悲惨な事件の一つである。現在までの水俣病認定患者は発生地域の不知火海沿岸、阿賀野川流域を合わせて約3,000人に及んでいる。一方、この「水俣病」事件よりさらに規模の大きい事件に、1971年暮からわずか2ヶ月間に中毒患者6530人余(うち459人死亡)を出したイラクでの中毒禍がある。前者は、アセトアルデヒド製造工程で副生されたメチル水銀化合物が工場廃水とともに排出されて周辺海域を汚染し、メチル水銀に高度に汚染された魚介類を長期にわたって摂取することにより発生したものであり、後者は、メチル水銀を含む農薬で種子消毒された小麦を一般大衆の食用に供した、いわば食品の誤用によるメチル水銀中毒事件である。「水俣病」の場合、産業活動の結果として排出・廃棄された有害物質が広域の自然環境、生態系を著しく汚染し、それが食物連鎖を通して現世代だけでなく未来世代の生存をも脅かし、その被害に至るプロセスにおいて複雑な要因を含んだ特異的な機序により起きた事件という観点から、わが国における公害の原点となっている。

イラクの事件からも分かるように、この水俣病の教訓は残念ながら長年生かされてこなかった。水銀による汚染問題が国際的に認識されるようになったのは、スウェーデンにおいて水銀農薬散布による野鳥の激減に始まっている。1960年代の後半には、魚類をはじめ食品が著しいメチル水銀汚染を受けていること、

さらには自然界で他の水銀化合物からメチル水銀が生成することが報告されるに及んで多くの研究者の注目を集めた。その後の分析技術の発展により一般環境に生息する魚類にも及ぶ水銀汚染の実態も明らかにされ、社会的にも多大な関心が寄せられるようになった。こうした背景の下に、多くの国々で水銀の使用制限、禁止等の措置がとられてきたが、これらの動きとは裏腹に、近年新たな水銀汚染問題が顕在化し世界的関心事となっている。1992年6月、リオ・デ・ジャネイロで開催された地球サミットの折に表面化したこの水銀汚染問題は、アマゾン川流域において活発化している金採掘活動に伴う金属水銀の環境への放出によるものであるが、その後同様な汚染問題はアマゾン川を取巻く南米諸国はもとより、タンザニアを中心とする東南アフリカ諸国、フィリピン、インドネシア、ベトナム、中国等の国々で相次いで顕在化し、金採掘現場の労働者の総数は現在公表されているだけでも500万人にも上り、不法侵入者も多く、これを含めると実際には1,000万人以上と推定されている。金採掘の過程で使用された水銀の回収は殆んどなされていないのが現状であり、その汚染の深刻さは計り知れない。

これらの水銀汚染において重要なのは、自然界に放出された無機水銀から生物濃縮性の高いメチル水銀への変化であり、したがって気散性の高い金属水銀を直接扱う労働者への水銀蒸気曝露による被害はもとより、河川流域に沿って生活し、水系に食糧を依存する地域住民へのメチル水銀暴露による健康被害の懸念も広がっている。放出された無機水銀が河川系でメチル化され、それが食物連鎖網を通じて魚類に高度に濃縮、その汚染魚介類を

反復摂取することで人体に移行蓄積され、成人では顕著な毒性を示さない暴露量でも、感受性の高い胎児には無視できない神経毒性が現れる可能性が指摘されているからである。

このように近年世界的関心事となってきた水銀汚染問題に対しては、世界各国による調査研究が進められてきたものの、その実態把握のための適切な手法がなく、その汚染解明は困難を極めていた。当時、筆者らは国水研（当時）において水俣湾を対象に水銀の化学形別分布、環境内挙動、並びに人体曝露後の生体内動態等を解明するための独自の総水銀分析法及びメチル水銀分析法を開発し改良を重ねてきたが、それらの分析技術・手法が思いがけず現地の汚染調査研究に役立つこととなった。すなわち、アマゾンの水銀汚染問題に精力的に取り組んでいたリオ・デ・ジャネイロ連邦大学から要請を受けたことが機縁と

なり、1993年には日伯科学技術協定が締結され、それに基づき環境庁地球環境研究総合推進費による4年間にわたる「アマゾン川流域の水銀汚染に関する研究」が開始された。その翌年には水銀分析技術移転のためのJICA技術協力プロジェクトもスタートし、その後の世界各地での技術移転に繋がった。これらの分析手法は、「水銀汚染対策マニュアル（日本公衆衛生協会、2001）」、「水銀分析マニュアル（環境省、2003）」、「食品衛生検査指針（厚労省、2005）」、等に掲載され、前二者については海外向けの英文版も出されている。

ここでは甚大な犠牲者を出した水俣湾の水銀汚染について環境科学的側面から概説するとともに、これまで水俣の経験を生かし取り組んできた世界の水銀汚染に係る国際協力の一例としてブラジル・アマゾン川流域の水銀汚染問題を取り上げ、その概要を紹介したい。

一 般 講 演

水銀トランスポーター MerC を利用した水銀浄化植物の作出

○清野正子、曾根有香（北里大学薬学部）

1. 研究目的

水銀汚染土壌の浄化方法として、汚染土壌を掘削し、客土する物理化学的手法が用いられているが、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コストで、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、浄化効率と浄化にかかる期間においては、物理化学的処理よりも劣る面がある。そこで、筆者らは、水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物を作出することで、浄化効率の上昇と処理時間の短縮を目指した研究を行っている。

これまでに筆者らは、水銀回収・蓄積能を付加させたトランスジェニック植物による水銀浄化を目指し、摂南大学薬学部芳生秀光教授の元で、以下の知見を得ている^{1, 2)}。遺伝子工学技術を用いて、水銀輸送遺伝子 *merT*、有機水銀を無機水銀に分解するリアーゼ遺伝子 *merB*、二価金属をキレートする活性をもつポリリン酸生合成酵素遺伝子 *ppk* を組換えた水銀高蓄積タバコの作出を試みた。*ppk/merT/merB* 遺伝子組換え株のメチル水銀浄化活性を調べた結果、本遺伝子組換え株には野生株および *ppk/merT* 遺伝子組換え株に比べ、有意に高い水銀蓄積量を示した。この結果から、本遺伝子組換え株は取り込まれたメチル水銀が有機水銀リアーゼ MerB により無機水銀に分解された後、無機水銀-ポリリン酸キレート体となってタバコ細胞内に蓄積していることが示唆された。

なお、培地中に残存するメチル水銀量を測定したところ、野生株および *ppk/merT* 遺伝子組換え株ではいずれも培地中に多量のメチル水銀が残存していたのに対し、*ppk/merT/merB* 遺伝子組換え株のメチル水銀残存量は大きく減少した。このことから、*ppk* および *merB* 遺伝子が遺伝子組換えタバコ中に効果的に働いていることが確認できた。これらの知見は、細菌由来の有用遺伝子を植物に組換えることで、水銀汚染の浄化効率が上昇することを示した。

今回、筆者らは、以上の知見を踏まえ、水銀輸送遺伝子を植物細胞内の特定の器官に発現させるエンジニアリングを新たにモデル植物であるシロイヌナズナに加えることにより、浄化効率のさらなる上昇をもたらすことができると考え、以下の研究を開始した。

これまでに水銀耐性菌から同定された水銀トランスポーターは MerT 以外に MerC, MerE, MerF が存在する。最近、筆者らは、これらの中でも MerC は、無機水銀のみならずフェニル水銀やメチル水銀の輸送活性を有する可能性を明らかにした³⁾。そこで、様々なトランスポーターの中から MerC を植物に組換え、水銀浄化に利用することにした。次に、MerC の植物細胞内局在をコントロールする因子として、シロイヌナズナ由来の SNARE ファミリーに注目した。シロイヌナズナ由来の SNARE ファミリーの SYP121 は細胞膜に、AtVAM3 は液胞膜にそれぞれ特異的に局在する膜タンパク質である。

本研究では、MerC に膜輸送タグとして SYP121 または AtVAM3 を融合させたタンパク質 (MerC-SYP121, MerC-AtVAM3) を発現させた遺伝子組換え植物を構築し、水銀に対

する耐性と蓄積性を指標とした機能解析を行うことを目的とする。

2. 研究方法

Tn21由来*merC*遺伝子、細胞内局在因子融合タンパク質*merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*遺伝子は、それぞれ*gfp*と融合させた形で、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。GFP-MerC, GFP-MerC-SYP121, GFP-MerC-AtVAM3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スキニング顕微鏡を用いて観察した。

merC, *merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*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、T₁ 種子を収穫した。その後、T₂ および T₃ 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、*merC*, *merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*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 *merC*, *merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*遺伝子のゲノムへの組換え、RT-PCR により *merC*, *merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*遺伝子の mRNA 発現、Western blotting により *merC*, *merC-SYP121*, *merC-AtVAM3*遺伝子の産物をそれぞれ確認した。

植物体の水銀化合物に対する耐性および蓄積性については、常法に従い還元気化原子吸光光度法を用いて検討した。

3. 研究結果

GFP-MerC, GFP-MerC-SYP121, GFP-MerC-AtVAM3 タンパク質の培養細胞内における局在を検討した結果は Fig. 1 に示した。GFP-MerC は小胞体に局在するのに対し、GFP-MerC-SYP121 は細胞膜に、GFP-MerC

-AtVAM3 は液胞膜に、それぞれ発現した (Fig. 1)⁴⁾。

T₁ 種子をカナマイシン培地で選抜したところ、*merC* 遺伝子組換え植物は 17 株、*merC-SYP121* 遺伝子組換え植物は 20 株、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物は 15 株得られた。*merC*、*merC-SYP121* または *merC-AtVAM3* を組換えた株については、植物体としての形態に異常は認められず、野生株と同様の発生・分化・生育を示した。これらの株の中から *merC* 遺伝子の植物ゲノムへの組換えが検出され、*merC* の mRNA が発現した系統を抽出した。その結果、*merC* 遺伝子組換え植物は 5 株 (C5, C7, C9, C10, C14)、*merC-SYP121* 遺伝子組換え植物は 4 株 (CS8, CS14, CS15, CS17)、*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物は 3 株 (CV2, CV7, CV11) 選抜した (Fig. 2)⁴⁾。次に、それぞれの目的遺伝子をゲノムに保持し、Hg²⁺ 存在下においても安定して mRNA が発現しているクローン C10 (*merC* 遺伝子組換え植物)、CS17 (*merC-SYP121* 遺伝子組換え植物)、CV11 (*merC-AtVAM3* 遺伝子組換え植物) を選抜し、以降の実験に用いた⁵⁾。

C10, CS17, CV11 における MerC の発現を抗 MerC 抗体を用いて Western blotting したところ、MerC はそれぞれ粗抽出画分および膜画分において検出された (Fig. 3)⁴⁾。

水銀耐性について、C10, CS17, CV11 は野生株に比べてそれぞれ高い耐性を示した。CS17 は、C10 や CV11 に比べても、高い耐性を示した。水銀蓄積性について、低濃度の場合、C10, CV11 は野生株とほぼ同等の蓄積性を示すのに対し、CS17 は野生株よりも高い蓄積性を示した。高濃度の場合、C10, CS17, CV11 は野生株に比べてそれぞれ高い蓄積性を示し、この中でも CS17 が高い傾向がみられた (Fig. 4)⁵⁾。

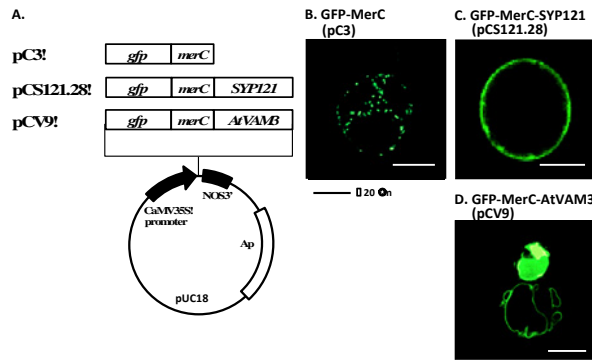


Fig.1 Construction of *gfp-merC* and *gfp-merC-SNAREs* fusion plasmids (A) and cellular localization of MerC and MerC-SNAREs in suspension-cultured plant cells (B-D). GFP-tagged fusion proteins were expressed in suspension-cultured plant cells and viewed by confocal laser scanning microscopy. GFP fluorescence images are shown for GFP-MerC (B), GFP-MerC-SYP121 (C) and GFP-MerC-AtVAM3 (D). Bars = 20 μ m.

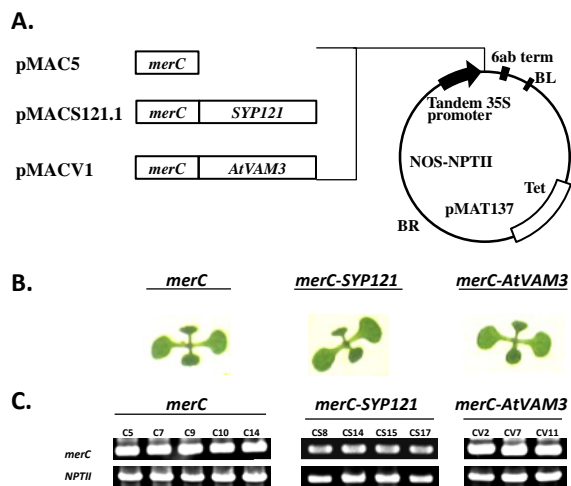


Fig.2 Characterization of *merC*, *merC-SYP121* and *merC-AtVAM3* in transgenic plant lines. The structure of the DNA region transferred in the plant expression plasmids pMAC5, pMAC121.1 and pMACV1 (A). Representative growth phenotypes of *merC*, *merC-SYP121* and *merC-AtVAM3* transgenic plant lines (B). Confirmation of the expression of *merC* (C5, C7, C9, C10 and C14), *merC-SYP121* (CS8, CS14, CS15 and CS17), and *merC-AtVAM3* (CV2, CV7 and CV11) in transgenic plants by genomic PCR expression analysis (C).

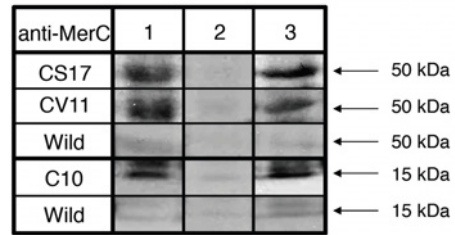


Fig.3 Immunoblot of MerC protein in transgenic plants. Immunoblot analysis of the crude cell extracts (lane 1), soluble fractions (lane 2) and membrane fractions (lane 3) of wild-type (Wild) and *merC* (C10), *merC-SYP121* (CS17) and *merC-AtVAM3* (CV11) transgenic plants were performed using the anti-MerC polyclonal antibodies. The arrow indicates MerC (15 kDa), MerC-SYP121 (50 kDa) or MerC-AtVAM3 (90 kDa).

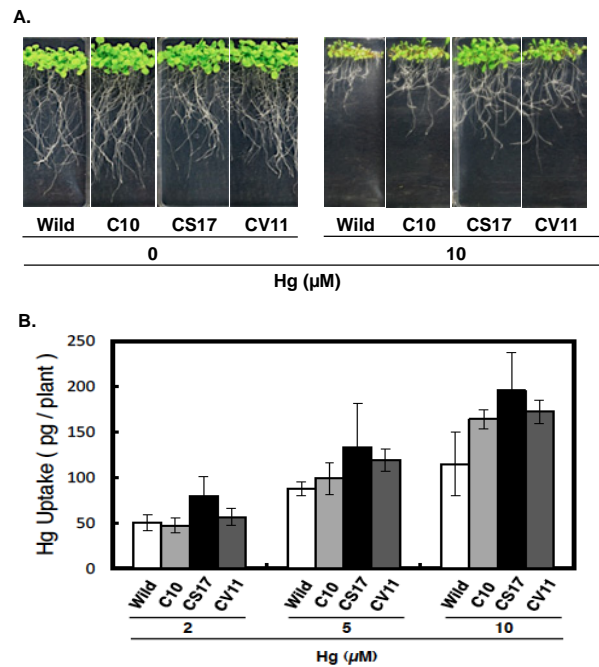


Fig.4 Susceptibility of transgenic plants to $HgCl_2$ and accumulation of mercury. Sterilized seeds of wild-type (Wild) and transgenic (C10, CS17, CV11) plants were germinated and grown in GMA medium plates in the presence or absence of 10 μ M $HgCl_2$ (A). The amount of mercury accumulated in wild-type plants (empty bar) and transgenic plants (C10: light gray shading, CS17: black bar, CV11: dark gray shading) was determined after 2 weeks culture on GMA medium plates with various concentrations of $HgCl_2$ (B). The data are expressed as the means \pm S.E.M. based on four determinations from three independent experiments.

4. 考察

植物培養細胞を用いて検討した結果、MerCは小胞体に発現するのに対し、MerC-SYP121は細胞膜に、MerC-AtVAM3は液胞膜にそれぞれ発現した (Fig. 1) ことから、微生物由来の水銀トランスポーターMerCの植物細胞内局在をシロイヌナズナ由来SNAREを用いてコントロールすることができたと考えられる。SYP121を用いることでMerCを細胞膜に、AtVAM3を用いることでMerCを液胞膜に、それぞれ局在化する可能性が示唆された。これにより、水銀をより効率的に植物に取り込ませることができると示唆され、次に、これらの遺伝子を組換えた植物を作出した。その結果、C10 (*merC* 遺伝子組換え植物)、CS17 (*merC*-*SYP121* 遺伝子組換え植物)、CV11 (*merC*-*AtVAM3* 遺伝子組換え植物)は、野生株と表現型がほぼ等しく、その植物体においてMerCが転写、翻訳されることが確認された (Fig.2 & Fig.3)。さらに、C10、CS17、CV11はそれぞれ水銀に対してコントロールに比べ高い耐性および蓄積性を示したが、CS17が最も高い傾向が見られた (Fig.4) ことより、SYP121を用いてMerCを細胞膜に局在化し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。

今後は、CS17とCV11を交配することで、MerCを細胞膜と液胞膜に同時に発現する株を作出し、水銀の植物への取り込みの上昇と液胞への水銀の隔離による毒性の軽減を目指し、水銀浄化について検討する予定である。

引用文献

- 1) Nagata T, Kiyono M, Pan-Hou H. Engineering expression of bacterial polyphosphate kinase in tobacco for mercury remediation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 777-782 2006
- 2) Nagata T, Morita H, Akizawa T, Pan-Hou H. Development of a transgenic tobacco plant for phytoremediation of methylmercury pollution. *Appl Microbiol Biotechnol* 87: 781-786 2010
- 3) Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurial and the transport of mercurial in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 36: 1835-1841 2013
- 4) Kiyono M, Oka Y, Sone Y, Tanaka M, Nakamura R, Sato MH, Pan-Hou H, Sakabe K, Inoue K. Expression of the bacterial heavy metal transporter MerC fused with a plant SNARE, SYP121, in *Arabidopsis thaliana* increases cadmium accumulation and tolerance. *Planta* 235: 841-850 2012
- 5) Kiyono M, Oka Y, Sone Y, Nakamura R, Sato MH, Sakabe K, Pan-Hou H. Bacterial heavy metal transporter MerC increases mercury accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Eng J* 71: 19-24 2013

メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内シグナル伝達

○ 鍛冶 利幸（東京理科大学薬学部）

1. メチル水銀の病理組織学的特徴と血管毒性の意義

1-1. 血管毒性の意義

血管はあらゆる器官に必ず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、血管はあらゆる器官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。

メチル水銀はハンター・ラッセル症候群と呼ばれる中枢神経障害を引き起こすので、従前の研究は神経細胞に対する毒性発現に焦点が当てられてきた。しかしながら、水俣病患者に関する病理組織学的知見は、神経細胞に対するメチル水銀の直接作用の研究では説明するのが困難な問題を含んでいる。我々は、その問題にメチル水銀の血管毒性からアプローチしている。

1-2. メチル水銀による大脳および小脳障害の特徴

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）。

大脳における傷害の局在性については、メチル水銀中毒動物の病理組織学的な観察から、メチル水銀による脳浮腫形成とそれとともに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

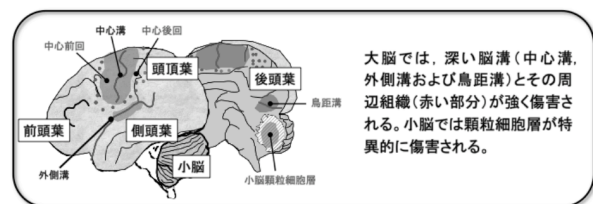


図 1. メチル水銀による部位特異的な傷害

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不明であった。

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。

このように、メチル水銀中毒による脳組織の病理は大脳と小脳でそれぞれ解明すべき問題が異なっている。本講演では、大脳障害の病理仮説“浮腫仮説”の分子基盤に関わるメチル水銀の血管毒性と、その発現に関与する細胞内シグナル伝達に焦点を当て、我々の最近の知見を含め報告する。

1-3. メチル水銀による大脳障害に関与し得る血管毒性

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による脳浮腫形成が重要に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貯留するもので、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つの型は同時に進行するとされる。

脳微小血管を構成する細胞を反応の場としたとき、“浮腫仮説”に関して次のような内皮細胞および周皮細胞の機能異常が考えられる

(1) 細胞毒性浮腫に関与する細胞内への水分の貯留。我々は、ソルビトール脱水素酵素がメチル水銀の標的となり得るとする先行研究

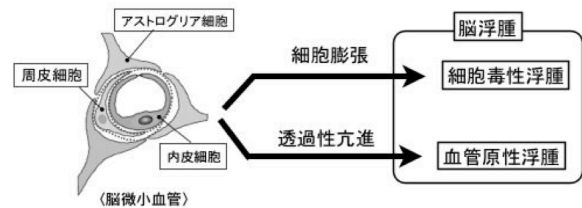


図2 細胞毒性浮腫と血管原性浮腫

からポリオール経路に着目した。

一方、血管原性浮腫については、

(2) 血管透過性の亢進。そのメカニズムとして、内皮細胞と周皮細胞の傍分泌型調節によって制御される VEGF システムが重要であると思われる。

(3) 細胞外マトリックスに水分を貯留するメカニズムの亢進。細胞外マトリックスの構成成分の1つであり、高い水分保持能をもつヒアルロン酸が重要であろう。

(4) 炎症性変化。我々は、炎症性変化を促進するだけでなく、血管透過性も亢進し、浮腫形成と炎症細胞の浸潤を促すプロスタグランジン₂ (PGI₂, 以下プロスタサイクリン) に着目した。

(5) 循環障害に寄与する線溶活性の低下。線溶活性は内皮細胞から分泌される組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA) とプラスミノゲンアクチベーター1型 (PAI-1) のバランスに依存するので、メチル水銀は t-PA の合成を阻害するか、PAI-1 の合成を誘導するか、その両方を引き起こすことが予想される。

これらの細胞レベルでの機能異常は動物実験では精密に捉えることは困難である。また、病理組織学的方法でも詳細を捉えることは難しい。そこで、ヒト脳微小血管内皮細胞および周皮細胞の培養系を用いて検討を行った。

また、これらの機能以上に関与する細胞内シグナル伝達についても干渉 RNA 法や阻害剤を用いた実験によって検討を加えた。すべての解明に成功したわけではないが、我々の研究は、

メチル水銀の血管毒性が脳障害につながる血管の機能障害を引き起こし得ること、およびその機能障害にはメチル水銀のセンサータンパク質の存在とその下流にあるシグナル伝達が存在することを示している。

2. メチル水銀による内皮細胞および周皮細胞の機能異常

2-1. メチル水銀の細胞毒性

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⁾。

2-2. ポリオール経路の活性化

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細胞内へ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。

2-3. VEGF システムの活性化

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3)。

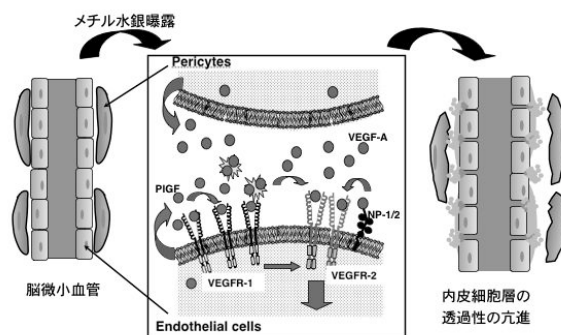


図3 メチル水銀によるVEGFシステムの異常

2-4. ヒアルロナン合成の誘導

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の合成を上昇させることが示された。そのメカニズムとして、ヒア

ルロナン合成に関与する酵素群のうち、内皮細胞では UGDH の発現が、周皮細胞では HAS-2 の発現が、メチル水銀によって上昇することによって示された。

2-5. プロスタサイクリン合成の促進

プロスタサイクリンは血管透過性と炎症性変化の促進を通じて浮腫形成に関与し得るプロスタノイドである。

メチル水銀は、内皮細胞および周皮細胞の両方においてプロスタサイクリンの放出を増加させた。周皮細胞においては、プロスタグランジン E₂ の放出も促進していた。このとき、内皮細胞および周皮細胞において、炎症の際にプロスタサイクリンの合成を行うシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現がメチル水銀によって増加していた。

2-6. 線溶調節への毒性発現

Fibrin zymography によって、メチル水銀が内皮細胞の線溶活性を低下させることが示された。内皮細胞から培地への t-PA および PAI-1 分泌量を ELISA によって調べたところ、メチル水銀は PAI-1 分泌量に影響を及ぼすことなく t-PA 分泌量を濃度依存的に減少させることが示された。このとき、t-PA mRNA の発現低下も起こっていた。

2-7. 脳浮腫とメチル水銀による血管毒性

以上の結果は、メチル水銀による脳浮腫形成がメチル水銀の血管毒性の結果として理解できるという我々の仮説を支持するものであった。

すなわち、メチル水銀による脳浮腫形成は、

- (1) アルドース還元酵素の誘導を介してポリオール経路を活性化し、それによって少なくとも周皮細胞において血管毒性浮腫を発生させ、
- (2) 内皮-周皮傍分泌型 VEGF システムを活性化することによって血管の透過性を亢進し、そ

れによって血管外への水分の移動を可能にし、
 (3) ヒアルロナンの合成促進によって、血管の細胞外マトリックスにおける水分の貯留を可能にし、(4) これら一連の炎症性変化に関わるプロスタサイクリンの合成を COX-2 の誘導によって促進し、さらに (5) t-PA の合成障害を通じて線溶活性を低下させ、循環障害を悪化させる、という血管毒性に起因することが示唆された (図 4)。

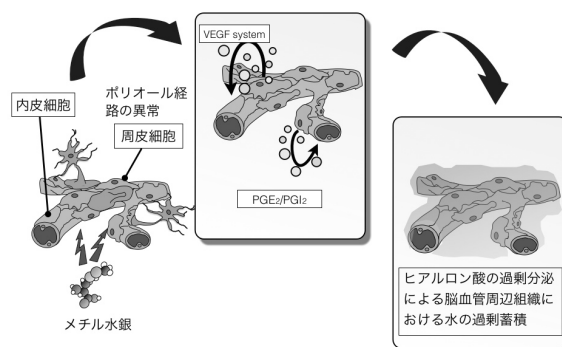


図 4 脳浮腫形成とメチル水銀の血管毒性

3. メチル水銀の血管毒性を介在するセンサータンパク質と細胞内シグナル伝達

3-1. メチル水銀のセンサータンパク質

メチル水銀のセンサータンパク質についてはよく分かっていないのが現状である。しかしながら、熊谷らは転写因子 Nrf2 がその 1 つであることを示している⁷⁾。また、同じく熊谷らは、自己リン酸化した EGFR を脱リン酸化して活性化する protein-tyrosine phosphatase-1B (PTP1B) が求電子物質 1,2-naphthoquinone のセンサータンパク質であることも明らかにしている。メチル水銀は強い求電子物質であり、この 2 つのセンサータンパク質は重要と思われる⁸⁾。

そこで、内皮細胞および周皮細胞についてこれらを検討したところ、メチル水銀による Nrf2 を活性化と PTP1B の障害が認められた。

3-2. メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内

シグナル伝達

3-2-1. アルドース還元酵素の誘導

アルドース還元酵素の誘導の上流に Nrf2 の活性化が存在することが知られているので、その確認を行った。その結果、メチル水銀が周皮細胞において Nrf2 を活性化すること、および干渉 RNA 法によって Nrf2 の発現を抑制するとメチル水銀によるアルドース還元酵素の誘導が起こらないこと、およびそのときメチル水銀による細胞の浮腫様の形態変化も消失すること、が示された。

3-2-2. 周皮細胞における VEGF の発現

周皮細胞における VEGF の発現はメチル水銀によって誘導されたが、この誘導は adenylyate cyclase 阻害剤 SQ22536 および protein kinase A (PKA) 阻害剤 H89 によって消失した。また、メチル水銀は p38 MAPK を活性化したが、その阻害剤 SB203580 もメチル水銀による VEGF の誘導を阻害した。さらに、EGFR tyrosine kinase 阻害剤 PD153035 も同様の阻害作用を示した。

3-2-3. 内皮細胞における COX-2 の発現

メチル水銀による COX-2 の誘導も、SQ22536, H89, SB203580, および PD153035 によって阻害された。

3-2-4. 内皮細胞における t-PA の合成

メチル水銀による t-PA の誘導は、SQ22536, H89, COX2 阻害剤 NS398, SB203580, および PD153035 によって抑制された。

3-2-4. メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内シグナル伝達経路

以上の結果から、血管内皮/周皮細胞では、Nrf2 および PTP1B がメチル水銀のセンサータンパク質として機能しており、その下流のシグナリングを通じてこれらの細胞の機能異常が

発生するものと思われる (図 5)。

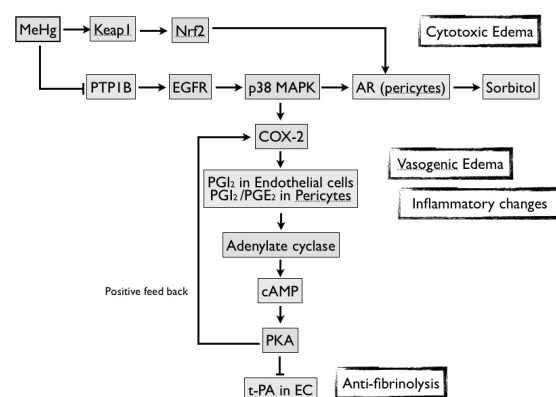


図 5 メチル水銀の血管毒性を介在する細胞内シグナル伝達経路

4. 結論

メチル水銀の脳障害の病理には、血管毒性が深く関わっていると思われる。その中で Nrf2 と PTP1B がメチル水銀のセンサータンパク質として働いており、後者については PTP1B の阻害の結果、EGFR が活性化され、その下流にある p38 MAPK/COX-2/Prostacyclin/cAMP/PKA 経路の活性化が起こることが重要であると思われる。

参考文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozeki 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.
- 7) Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **363**: 645-650.
- 8) Iwamoto N, Sumi D, Ishii T, Uchida K, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**: 33396-33404.

南西諸島の生態系における水銀分布

○渡邊 泉 (東京農工大学 大学院 農学研究院)

1. はじめに

近年、途上国の急速な経済発展により、大気を介した越境汚染が問題となっている¹⁾。我が国においても、近隣のアジア諸国の活発な工業活動により、水銀や鉛といった強毒性の重金属類が負荷されていることが明らかにされつつあり²⁾。とくに南西諸島は地理的条件から汚染の影響が懸念されている³⁾。実際、南西諸島に生息する高次生物からは、高濃度の水銀やヒ素、鉛などが検出され⁴⁾、生態系における汚染の進行が指摘されている。本報告は、南西諸島のおもに沖縄島と奄美大島を中心とした生態系における水銀の分布把握を試みた研究を紹介する。あわせて、水銀の高濃度蓄積種と考えられるフィリマングースの濃縮メカニズムについて究明を行った事例も報告する。

2. 試料

おもに2008年から2010年に、沖縄島、奄美大島、座間味島から採取された植物5種、無脊椎動物9種、魚類4種、両生類5種、爬虫類7種、鳥類23種、哺乳類10種を供試した。また、奄美大島と沖縄島では表層土壌も採取し、水銀の空間分布を検討した。

3. 結果と考察

2001年に奄美大島で問題となっていた特定外来生物フィリマングースの駆除個体の肝臓から極めて高濃度の水銀が検出された(最高214 $\mu\text{g/g}$ DW)。その後、沖縄島のやんばる地域の同種からも更に高濃度の水銀が検出され(432 $\mu\text{g/g}$ DW)、そのほとんどが無機態で保持されていた。この事実を受け、奄美大島およびやんばる地域で、植物から無脊椎動物、脊椎動物における水銀分布を検討した。分析の結果、マングースほど高濃度で水銀を蓄積している種はみられなかったが、猛禽類やハブなど高次の生物に比

較的高い水銀濃度がみられ(図1)、 $\delta^{15}\text{N}$ の分析からも、食物網を通じた生物増幅が確認された。

一方で、沖縄島中部および九州本土のマングースからは高濃度の水銀が認められず、餌生物の解析からも、奄美大島およびやんばるの個体群における濃縮は、いわば豊かな生態系を反映していると考えられた。座間味島のニホンイタチとの比較の結果、マングースは換毛による水銀排泄能も低かった。一方で、組織病理的解析と初代肝細胞培養を用いたアプローチから、本種の肝細胞は水銀感受性が高く、さらに炎症性変化がみられる部位に水銀が分布している現象がみられた(肝臓、腎臓でそれぞれ小葉中心および近位尿細管に蓄積)。以上の結果から、いまだマングースにおける水銀濃縮(蓄積・耐性)のメカニズム解明は不十分と結論され、今後の解明が待たれる。くわえて、南西諸島の希少な生態系における水銀モニタリングの必要性が示された。

(本研究は環境省地球環境研究総合推進費 RF-085とRF-0908によって遂行されました)

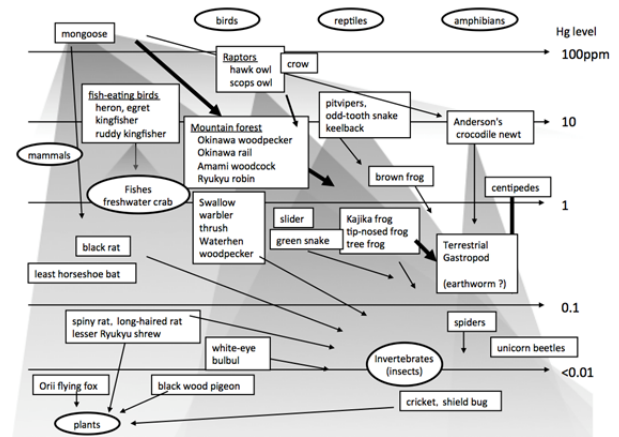


図1 南西諸島の生態系における水銀濃縮の概念図

引用文献

- 1) 丸本・坂田, 環境科学会誌, 20, 47-60: 2007.
- 2) Jaffe *et al.*, Atmospheric Environment, 39, 3029-3038: 2005.
- 4) 鈴木ら, 人間と環境, 37, 72-85: 2011.
- 5) 渡邊ら, 地球化学, 45, 29-42: 2010.

講演 4

疾患由来の代謝異常がメチル水銀の毒性発現に及ぼす影響 ～2型糖尿病マウスを用いた実験研究～

○山元 恵、柳澤利枝、本村恵理子、中村政明、坂本峰至（国立水俣研）、竹屋元裕（熊本大院）、
衛藤光明（介護老人保健施設樹心台）

1. 背景

基礎疾患を有する人々は、メチル水銀曝露に対する感受性が健常者と異なることが想定される¹⁾。現在、世界の成人人口の約5～6%が糖尿病に罹患しており、その罹患率の増加は公衆衛生学的に最も重要な問題の一つである²⁾。メチル水銀曝露と糖尿病の関連については、糖尿病の罹患歴を持つ水俣病患者において約半数が認定されている³⁾。しかしながら糖尿病に由来する代謝異常とメチル水銀毒性発現の詳細な関連については明らかになっていない。

2. 目的

疾患モデル動物（2型糖尿病マウス）を用いて、糖尿病に伴う代謝変化がメチル水銀の生体内動態や毒性発現に及ぼす影響を明らかにする。本研究を進めることにより、メチル水銀曝露に対する疾患由来の感受性要因の一端が明らかになり、メチル水銀曝露のリスク評価に役立つ知見が得られることが期待される。

3. 方法

実験動物およびメチル水銀投与条件：4週齢の2型糖尿病モデル KK-Ay マウスおよび C57BL/6J (BL/6) マウスに、メチル水銀（5 mg Hg/kg BW）を、週三回、約6週間経口投与する。

神経症状の評価：後肢交叉および行動異常（歩行障害等）を観察する。

免疫組織化学染色：各細胞傷害マーカーにより評価する。アストロサイト：Glial

Fibrillary Acidic Protein (GFAP)。ミクログリア：ionized calcium binding adaptor molecule 1 (Iba1)。マクロファージ：CD204 (class A scavenger receptor)。

総水銀の測定：全血、各組織（大脳、腎臓、膵臓、脾臓、肝臓、精巣上体脂肪組織）における総水銀値を加熱気化法により測定する。

4. 結果・考察

① 実験開始時におけるBL/6マウスとKK-Ayマウスのコントロール群の平均体重は、ほぼ同様であり (BL/6：16.3±0.8 g, KK-Ay：16.4±0.5 g)、実験終了時のKK-Ayマウスの平均体重(42.3±1.3 g)は、BL/6の1.7倍(24.8±0.3 g)であった。メチル水銀投与群のKK-Ayマウスは、投与開始後、約5週目より体重減少が観察され、実験終了時の平均体重は、28.7±2.4 gであった。メチル水銀投与群のKK-Ayマウスは、投与開始後16～30日の間に摂餌量が減少し始めた(図1)。

② メチル水銀投与群のKK-Ayマウスは、実験終了時に、7匹中6匹が後肢交叉等の神経症状を示した。

③ メチル水銀投与開始後、KK-Ayマウスの血中総水銀の平均値は9.8±0.9 µg/mlに達したが、BL/6マウスの血中総水銀の平均値は、投与開始後、10日目以降2.8±0.16 µg/mlであった(図2)。

④ KK-Ayマウスの各組織（大脳、腎臓、膵臓、脾臓、精巣上体脂肪組織、肝臓）における総水銀平均値は、各々27±3.3 µg/g、51.7±4.8 µg/g、40.9±5.4 µg/g、32.0±1.6 µg/g、1.6±0.3 µg/g、41.4±4.9 µg/gであり、BL/6

マウスにおける値は、各々 $7.4 \pm 1.0 \mu\text{g/g}$ 、 $51.9 \pm 2.7 \mu\text{g/g}$ 、 $10.4 \pm 1.7 \mu\text{g/g}$ 、 $6.9 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ 、 $0.6 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ 、 $8.0 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ であった (表 1)。

⑤ 大脳 (写真 1)、小脳 (写真 2)、腎臓 (写真 3)、膵臓 (写真 4)、脾臓 (写真 5) について免疫組織化学的検討を行った結果、神経症状が顕著なKK-Ayマウスの脳において、GFAP (上)、Iba1 (中)、CD204 (下) 発現の増強が観察された。また、これらの個体の腎臓、脾臓において、CD204発現の増強が見られた

以上の結果は、体重あたり等容量のメチル水銀に曝露すると、2型糖尿病における脂肪量の増加および脂肪組織における水銀の低蓄積性に伴って各組織におけるメチル水銀濃度が高くなり、結果として毒性発現が増強されることを示すものと考えられた (図 3)。また、CD204がメチル水銀による組織傷害の新規なマーカーとなり、メチル水銀の毒性発現にM2マクロファージが寄与することを示した⁴⁾。

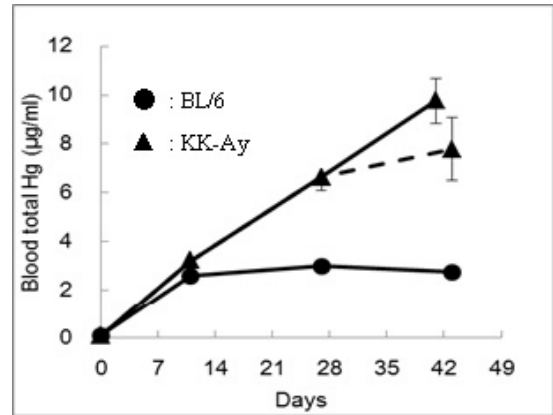


図 2

組織	BL/6 Hg (µg/g)	KK-Ay Hg (µg/g)
腎臓	7.4 ± 1.0	27.0 ± 3.3
腎臓	51.9 ± 2.7	51.7 ± 4.8
膵臓	10.4 ± 1.7	40.9 ± 5.4
脾臓	6.9 ± 0.8	32.0 ± 1.6
精巣上体脂肪	0.6 ± 0.1	1.8 ± 0.3
肝臓	8.0 ± 0.5	41.1 ± 4.9

表 1

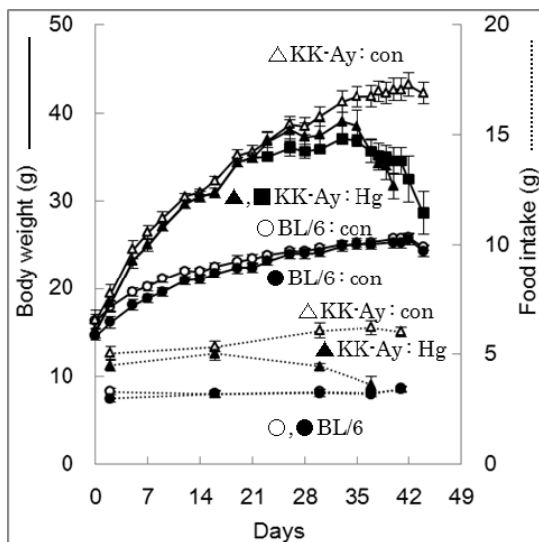


図 1

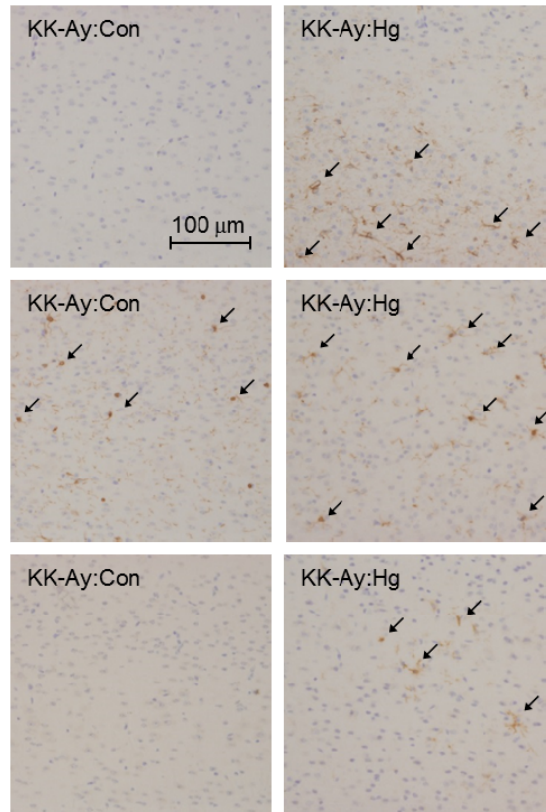


写真 1

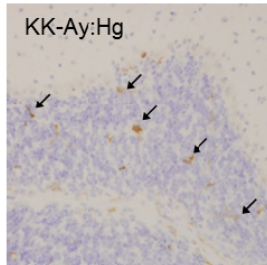
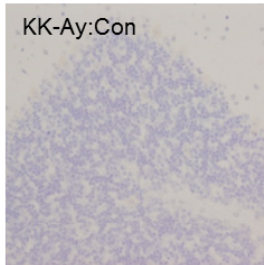
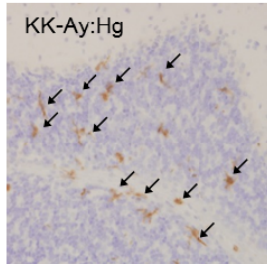
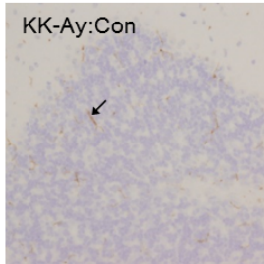
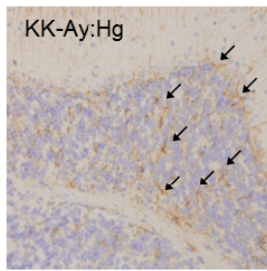
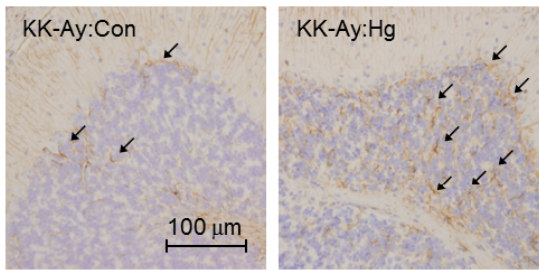


写真 2

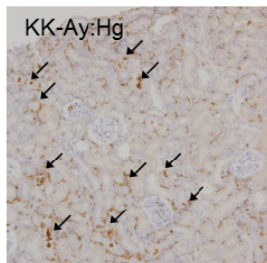
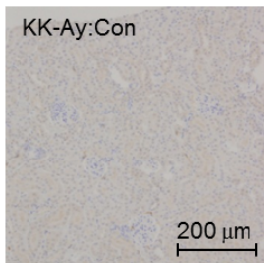


写真 3

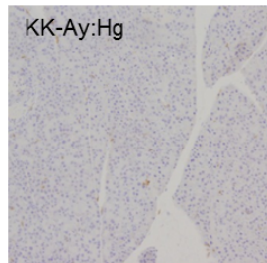
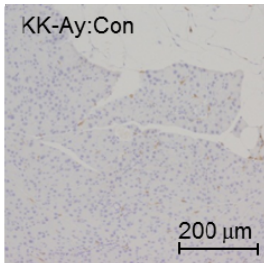


写真 4

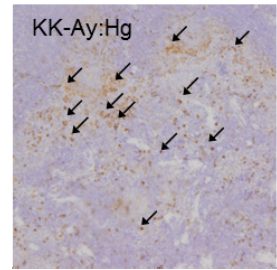
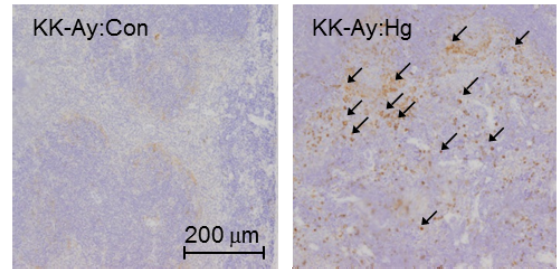


写真 5

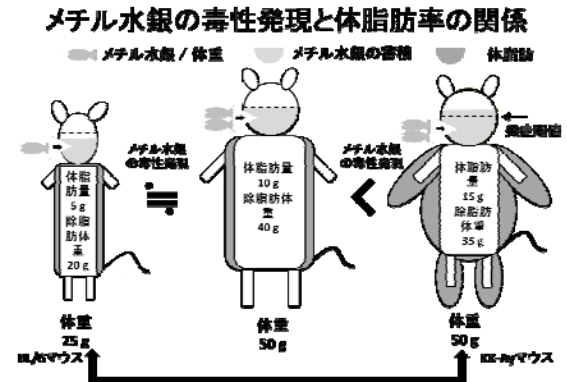


図 3

[参考文献]

- 1)WHO. 2008. Guidance for identifying populations at risk from mercury exposure. WHO: Geneva
- 2)WHO. 2011. Diabetes Fact sheet №312.WHO: Geneva.
- 3)Takeuchi T and Eto K. 1999. List of Autopsy Cases from the Methylmercury-Polluted Area. In: The Pathology Minamata Disease - a Tragic Story of Water Pollution, Nakayama H, Sumiyoshi A (eds). Kyushu University Press: Fukuoka; 226-282.
- 4)Yamamoto M, Yanagisawa R, Motomura E, Nakamura M, Sakamoto M, Takeya M, Eto K. 2014. Increased methylmercury toxicity related to obesity in diabetic KK-Ay mice. J. Appl. Toxicol. 34(8):914-23.

メチル水銀神経毒性の軽減に関する実験的研究

○藤村成剛（国立水俣研）、臼杵扶佐子（国立水俣研）

1. 背景

メチル水銀は再生困難な神経細胞を傷害するため、重篤かつ不可逆的な神経機能障害をもたらす。しかしながら、薬剤等による予防または早期の進行抑制によりその毒性を軽減できる可能性がある¹⁾。

また、メチル水銀は、神経幹細胞の分化/増殖に影響することがわかってきているが、その標的分子については不明な部分が多い²⁾。神経幹細胞の分化/増殖は、脳神経系形成に重要な役割を果たしているため、神経幹細胞に対するメチル水銀の標的分子解析は、メチル水銀中毒の軽減につながる可能性がある。

2. 目的

本研究の目的は、メチル水銀による神経機能障害の軽減を可能にするため、メチル水銀神経毒性の作用メカニズムを明らかにし、薬剤等のメチル水銀毒性に対する効果を実験的に検証することである。

また、神経幹細胞を用いてメチル水銀によって影響を受ける標的分子を特定し、その標的分子の修飾による神経毒性の軽減の可能性について明らかにすることも目的とする。

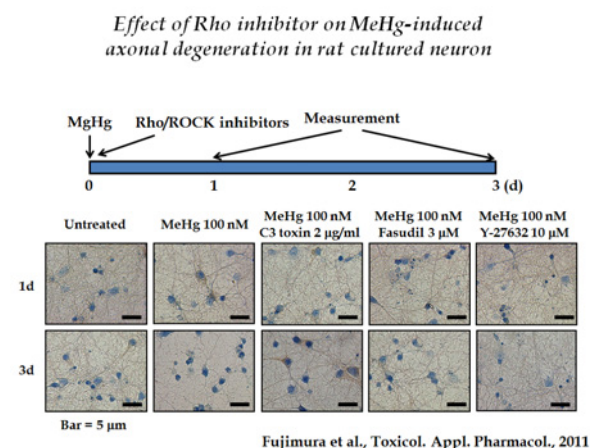
3. 方法と結果

3-1. メチル水銀神経毒性に対する ROCK 阻害剤の作用

以前の培養神経細胞を用いた研究において、低濃度の MeHg 曝露が神経障害を誘発する前に神経突起伸展に参与する Rac1 の発現低下作用を示すことから、MeHg による神経軸索変性が神経突起伸展の障害に起因することが示唆された³⁾。このことから、低濃度 MeHg による軸索変性が神経突起の伸展/収縮不均

衡によるものという仮説を立て、神経軸索形成およびアポトーシス細胞死に参与する Rho/ROCK 経路に着目した研究を行った。

本報告では、Rho/ROCK 経路の抑制が培養神経細胞および動物実験において MeHg による神経変性を防止することを示す。Rho 阻害剤である C3 毒素および ROCK 阻害剤である Fasudil, Y-27632 は、培養神経細胞を用いた実験において MeHg (100 nM, 3 日曝露) による軸索変性およびアポトーシス神経細胞死を有意に抑制した (図 1)。さらに、Fasudil は動物実験において MeHg (20 ppm 飲料水, 28 日曝露) による後根神経節の large pale 神経の消失、後根神経変性、脊髄後索の空胞変性およびメチル水銀中毒モデルに特徴的な後脚交差を部分的に防御した (図 2)。以上の結果から、Rho/ROCK 経路の抑制が MeHg による神経突起の伸展/収縮不均衡を防御し、MeHg による軸索変性およびアポトーシス神経細胞死の防止に効果的なことが示唆された¹⁾。



Effect of Rho/ROCK inhibitors on MeHg-induced apoptotic neuronal cell death in rat cerebrocortical neuron

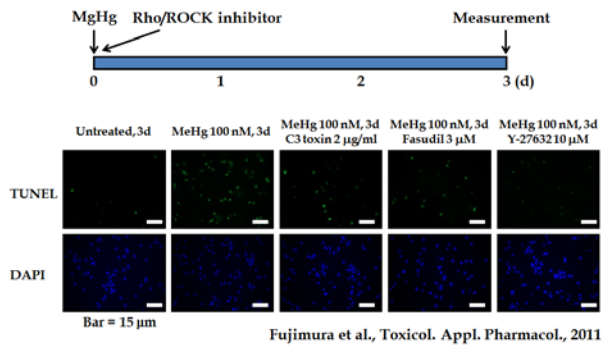
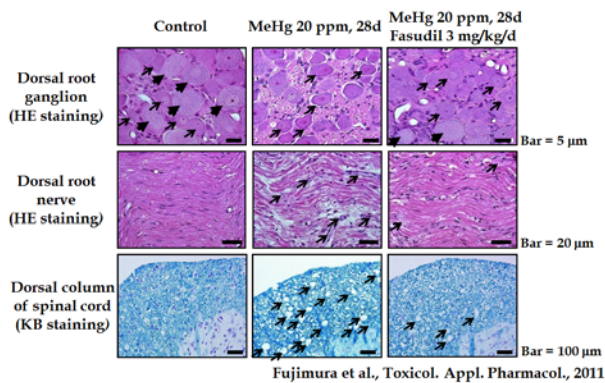


図1 培養神経細胞におけるメチル水銀誘発軸索変性およびアポトーシス神経細胞死に対する Rho 阻害剤および ROCK 阻害剤の作用

Effect of ROCK inhibitor on MeHg-induced axonal degeneration and neuronal cell death of dorsal root nerve system in rats



Effect of ROCK inhibitor on MeHg-induced hind limb retraction in rats

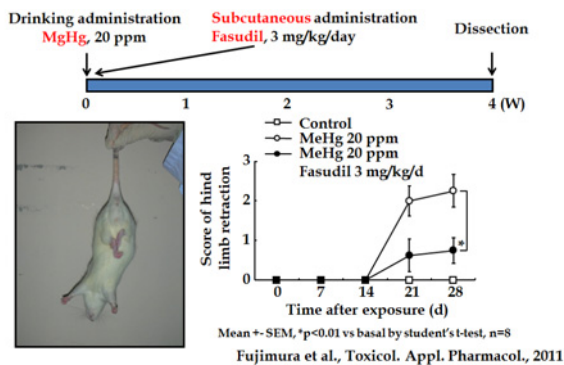
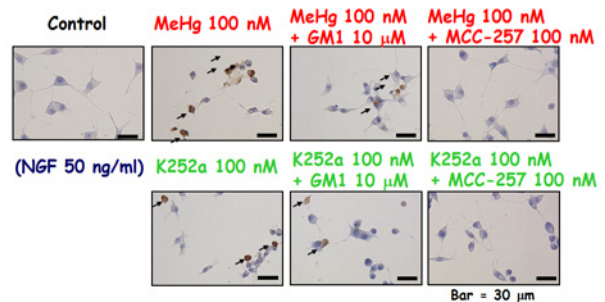


図2 メチル水銀中毒モデルにおける神経変性および神経行動に対する ROCK 阻害剤 (Fasudil) の作用

3-2. メチル水銀神経毒性に対する GM1 ganglioside およびその誘導体の作用

GM1 ganglioside は TrkA 経路を活性化することが知られている。そこで TrkA 経路が観察しやすい培養神経モデル細胞として分化 PC12 細胞を用いた検討を行った。本実験において、MeHg は TrkA pathway を抑制することによって神経細胞特異的に低濃度 (100 nM) で神経細胞死 (apoptosis) を引き起こし、GM1 ganglioside およびその誘導体である MCC-257 は逆に TrkA pathway を活性化させることによって MeHg による神経細胞死 (apoptosis) を抑制することが明らかになった (図 3)。さらに、MCC-257 は MeHg 中毒ラットモデルにおいても小脳における神経細胞死 (apoptosis) および神経症状 (後脚交差) を抑制できることが明らかになった (図 4)。

Effects of GM1 and MCC-257 on MeHg- or K252a-induced apoptosis in differentiating PC12 cells



TUNEL analysis confirmed that 10 μM GM1 ganglioside and 100 nM MCC-257 significantly protected against MeHg- or K252a-induced apoptosis.

図3 メチル水銀誘発アポトーシス神経細胞死に対する GM1 ganglioside および MCC-257 の作用

Effect of MCC-257 on apoptosis in cerebellum of MeHg intoxicated rat model

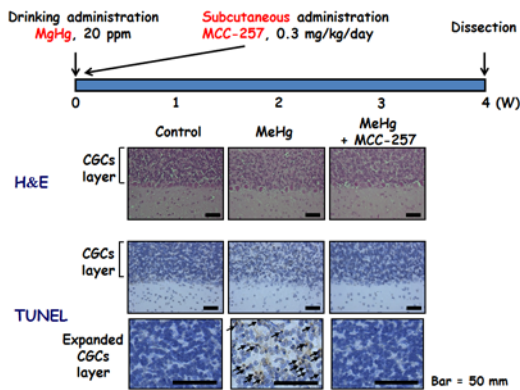
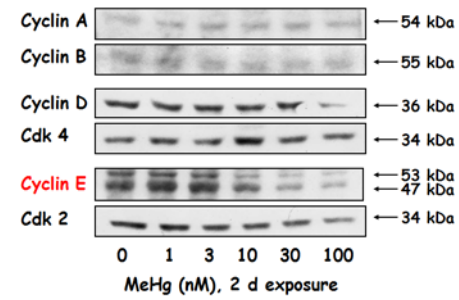


図4 メチル水銀中毒モデルにおける神経変性に対する MCC-257 の作用

Effect of MeHg on the expression of cyclins and their Cdk



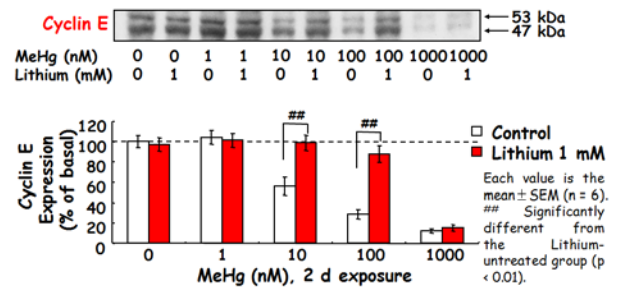
Very low level (10 nM) of MeHg selectively suppressed the expression of cyclin E in NPC.

図6 メチル水銀による cyclin E の発現低下作用

3-4. メチル水銀神経毒性に対する Lithium の作用

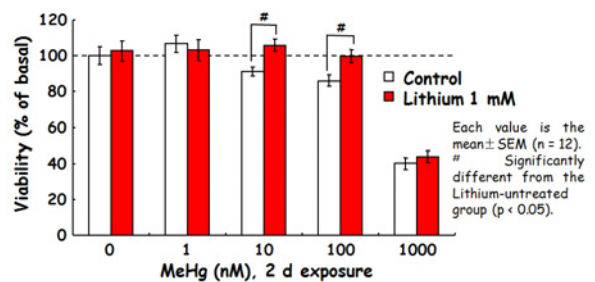
増殖性を有する神経幹細胞として、ラット大脳皮質から神経前駆細胞(NPCs) を安定的に得ることに成功した(図 5)。本細胞を用いた実験系において、メチル水銀は極めて低濃度(10 nM) で Cyclin E の発現低下を介して NPC の増殖を抑制することが明らかになった (図 6)。これに対して Lithium は GSK-3β を阻害することによって cyclin E の消失を防ぎ、その結果、メチル水銀による NPCs の増殖能低下に対して抑制作用を示すことが明らかになった(図 7)。

Effect of Lithium on MeHg-induced degradation of Cyclin E in NPCs



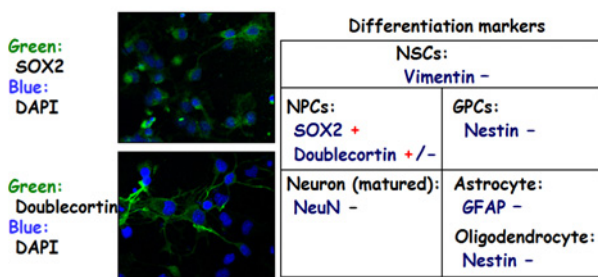
Lithium, a GSK-3β inhibitor, protected against low dose (10~100 nM) MeHg-induced degradation of cyclin E in NPCs.

Effect of Lithium on MeHg-induced decrease of viability in NPCs



Lithium, a GSK-3β inhibitor, protected against low dose (10~100 nM) MeHg-induced decrease of viability in NPCs.

Identification of neural progenitor cells using immunocytochemical analysis



Immunocytochemical analyses for SOX2 and doublecortin indicated that the primary culture system was NPCs.

図5 ラット大脳皮質から得られた神経前駆細胞 (NPC)

図7 メチル水銀による cyclin E 発現低下および増殖能低下に対する Lithium の作用

4. 結論

演者の藤村は国立水俣病総合研究センターにおいて約 10 年間、培養神経細胞および実験

動物を用いて、メチル水銀による神経毒性の軽減に関する研究を行ってきた。その中で ROCK 阻害剤, GM1 誘導体および Lithium がメチル水銀による神経毒性（神経軸索傷害, 神経細胞死, 神経機能障害等）を軽減する可能性があることを見出した。今回は、上記 3 薬剤のメチル水銀神経毒性に対する毒性軽減メカニズムについて報告を行った。

ROCK 阻害剤に関する研究においては、低濃度 (100 nM) メチル水銀が神経軸索を保持する Rac1 を減少させることによって神経軸索変性を引き起こすことを見出した。このことから、ROCK 阻害剤を用いて逆に軸索変性を誘発する Rho/ROCK 経路を阻害することによって、メチル水銀による軸索変性を抑制することを思いついた。実際に ROCK 阻害剤によってメチル水銀による軸索変性が抑制できることが、培養神経細胞および実験モデルにおいて明らかになった。

次に GM1 ganglioside およびその誘導体である MCC-257 についての研究を行った。その結果、低濃度メチル水銀 (100 nM) が TrkA 経路を抑制することによって神経細胞特異的な細胞障害を引き起こすことを見出した。このことから、逆に TrkA 経路を活性化する GM1 ganglioside およびその誘導体を用いて、メチル水銀による神経細胞特異的な細胞障害を抑制することを思いついた。両薬剤は神経細胞モデルである分化 PC12 細胞においてメチル水銀によるアポトーシス細胞死を抑制することが明らかになった。また、MCC-257 はメチル水銀中毒モデルにおいても小脳顆粒細胞

におけるアポトーシス細胞死を抑制することが確認された。

さらに Lithium について神経幹細胞に対する作用を検討した。メチル水銀は極めて低濃度 (10 nM) でラット胎児脳から調整した神経前駆細胞の増殖を抑制し、そのメカニズムは GSK-3 β の活性化を介した増殖因子である cyclin E の消失であることを明らかになった。このことから、GSK-3 β の阻害剤である Lithium がメチル水銀の細胞増殖に対する作用を抑制することを思いついた。実際に Lithium によってメチル水銀による細胞増殖に対する作用を抑制できることが、培養神経前駆細胞を用いた実験によって明らかになった。

5. 引用文献

- 1) Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S (2011) Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 250, 1-9.
- 2) Tamm C, Duckworth J, Hermanson O, Ceccatelli S (2006) High susceptibility of neural stem cells to methylmercury toxicity: effects on cell survival and neuronal differentiation. *J. Neurochem.* 97, 69-78.
- 3) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Rostene W, Godefroy D, Takashima A (2009) Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1, leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology*, 30, 16-22.

講演 6

メチル水銀の新規毒性発現機構 — 活性イオン分子によるレドクスシグナル制御の破綻 —

○居原 秀 (大阪府大院・理学・生物科学野)

1. 背景

1-1. メチル水銀毒性の発現機構

メチル水銀が神経毒性を示すことは周知の事実であり、その毒性発現機構がいくつか報告されている (図1) ¹⁻³⁾。

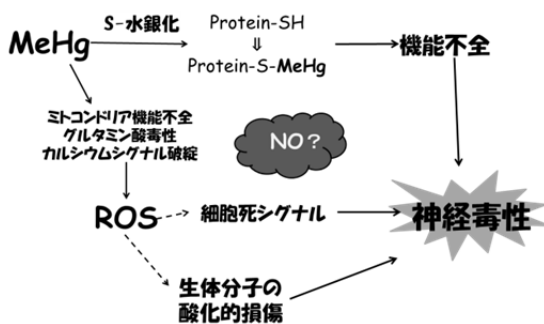


図1 メチル水銀毒性の発現機構

1-1-1. タンパク質 S-水銀化

メチル水銀は、親電子性分子であるため、親核性を持つタンパク質システインチオール基と容易に共有結合を形成する。このメチル水銀によるタンパク質チオール基の化学修飾を「S-水銀化」と呼び、タンパク質の機能不全を引き起こすことによってメチル水銀毒性の発現に関与していると考えられている (図1) ¹⁻³⁾。標的タンパク質として、Mn-SOD, 神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)、アルギナーゼ I などが知られている ¹⁾。

1-1-2. メチル水銀毒性と酸化ストレス

メチル水銀は、アストロサイト、神経細胞前シナプスに作用して、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させる。上昇したグルタミン酸は、細胞内に過剰のカルシウムイオンを流入させ、カルシウムシグナルを破綻させ (グルタミン

酸毒性)、活性酸素種 (ROS) の産生を導く。またメチル水銀は、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害し、細胞質 ROS レベルを上昇させる。このように神経細胞内で酸化ストレスが生じ、直接的に生体分子 (DNA、タンパク質、脂質など) を酸化的に損傷させ機能不全を導く、あるいは細胞死シグナルに作用し間接的に神経毒性を引き起こす (図1) ^{2, 3)}。

1-1-3. メチル水銀毒性と NO

神経細胞内でカルシウムイオン濃度が上昇すると、nNOS が活性化されることから、メチル水銀毒性に NO が関与すると考えられる。実際に、動物実験、細胞実験より、メチル水銀処理により NO 産生が亢進することが報告されており、神経毒性との関与が示唆されてきた ⁴⁻⁷⁾。一方で、上述の S-水銀化により、nNOS の酵素活性は、阻害されることが知られており ^{1, 6)}、メチル水銀毒性と NO の関連性は不明な点が残されている (図1)。

1-2. NO/ROS レドクスシグナルと活性イオン分子

1-2-1. NO/ROS レドクスシグナル

NO は、可溶性グアニル酸シクラーゼに作用し二次メッセンジャーとして cGMP を産生することによって、下流シグナルを活性化して細胞シグナル伝達を行う。一方、ROS は、これまで非特異的生体分子損傷を引き起こす毒性分子として捉えられてきたが、近年シグナル分子として機能することが明らかとなってきた。筆者らは、2007年に、NO と ROS が協調して (NO/ROS レドクスシグナル)、親電子性二次メッセンジャーとして 8-ニトロ-cGMP が

産生されることを世界に先駆けて発見した (図2)⁸⁾。8-ニトロ-cGMPは、ストレス応答、細胞死などの多様な生理機能に関与していることを明らかにしてきた⁸⁻¹²⁾。

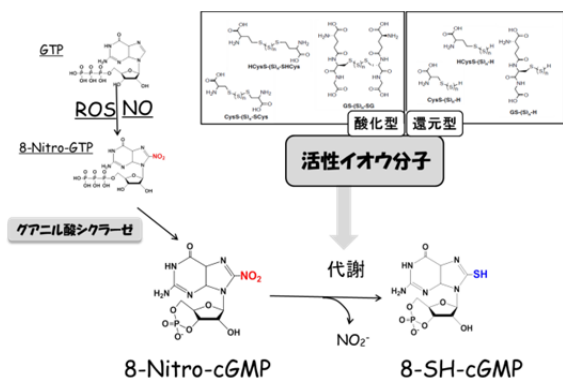


図2 8-ニトロ-cGMPの産生機構と活性イオウ分子による代謝

1-2-2. 活性イオウ分子

システインチオール基 [Cys-SH] にさらに過剰なイオウ原子が付加したシステインパースルフィド [Cys-SSH] やポリスルフィド [Cys-S(S)nH] が細胞、組織で同定・定量され、活性イオウ分子として注目されている (図2)¹³⁾。活性イオウ分子は、親電子性分子と反応するため、強力な抗酸化活性を持ち、活性酸素の多彩な生理活性、その他様々な親電子性物質の代謝を制御する¹³⁾。また、上述の8-ニトロ-cGMPの代謝にも関与しており、新規の環状ヌクレオチドである8-メルカプト-cGMP (8-SH-cGMP) を生成させる (図2)¹³⁾。生体内で8-SH-cGMPの産生も確認されているがその機能は不明である¹³⁾。このように活性イオウ分子は、生体内のレドクスシグナルを制御する重要な分子であることが明らかとなっている¹³⁾。

1-2-2. メチル水銀と活性イオウ分子

メチル水銀は、親電子性分子であるため、活性イオウ分子と反応することが予想された。

実際に、メチル水銀は活性イオウ分子と反応し、S-メチル水銀ビス体 (MeHg)₂S が生成される (図3)¹⁴⁾。興味深いことに、S-メチル水銀ビス体は、メチル水銀と比較して毒性が顕著に低いことから、活性イオウ分子によるS-メチル水銀ビス体の生成は、メチル水銀の解毒作用の一つとして示唆された (図3)¹⁴⁾。

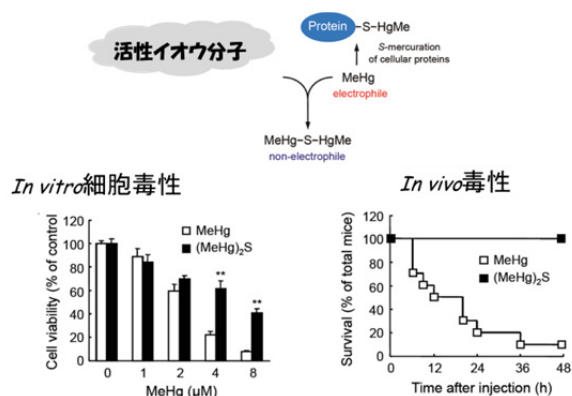


図3 S-メチル水銀ビス体の生成機構と毒性 (文献14より引用改変)

2. 目的

これまでメチル水銀の毒性発現機構には、完全解明には至っていない。これは、メチル水銀が強い親電子性を持ち、多様な生体反応に影響を与え、その毒性発現機構が複雑になっているためであると考えられる。本研究では、レドクスシグナルの制御因子である活性イオウ分子に着目し、メチル水銀毒性の発現機構を再検討することを目的とした。

3. 結果

3-1. メチル水銀毒性への nNOS の関与

nNOSの発現量の異なる神経系の細胞を用いてメチル水銀毒性を評価した (図4)。用いた細胞は、ラット副腎髄質褐色腫 PC12 細胞、ヒト神経芽腫 SH-SY5Y 細胞、初代培養ラット小脳顆粒ニューロン (CGNs) の三種で、メチ

ル水銀感受性は CGNs、SH-SY5Y、PC12 の順で高かった。また nNOS の発現量は、CGNs、SH-SY5Y、PC12 の順で多く、nNOS 発現量と、メチル水銀感受性との間に相関が認められた。nNOS 発現と感受性との関係を明らかにするため、PC12 細胞に nNOS を恒常的に発現させた NPC12 細胞を作製した。nNOS を発現させることにより、メチル水銀感受性が高まったことから、nNOS がメチル水銀毒性の増悪因子であることが明らかとなった (図 4)。

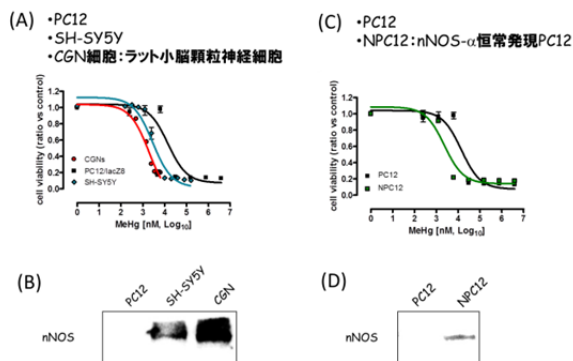


図 4 各種神経系細胞を用いたメチル水銀毒性と nNOS 発現

3-2. CGNs における ROS、8-ニトロ-cGMP、活性イオウ分子、8-SH-cGMP レベルに及ぼすメチル水銀の影響

メチル水銀毒性には、ROS の関与が報告されているので、本実験でも CGNs を用いて、メチル水銀誘発性 ROS の産生を検討した。ROS 感受性蛍光プローブ Dihydroethidium (DHE) を用いて解析した結果、メチル水銀処理により ROS 産生が確認された (図 5)。次に NO、ROS の二次メッセンジャーである 8-ニトロ-cGMP の CGNs における産生を免疫染色、質量分析で検討したところ、メチル水銀処理により産生量の増加が認められた (図 5)。

一方で、CGNs における活性イオウ分子量をワシントン州立大学 Ming 博士が開発した活性イオウ分子特異的蛍光プローブ SSP2 で解

析したところ、活性イオウ分子量は減少していた (図 5)。また、活性イオウ分子と 8-ニトロ-cGMP の反応生成物である 8-SH-cGMP も、同様に減少していることを免疫染色、質量分析で確認した (図 5)。

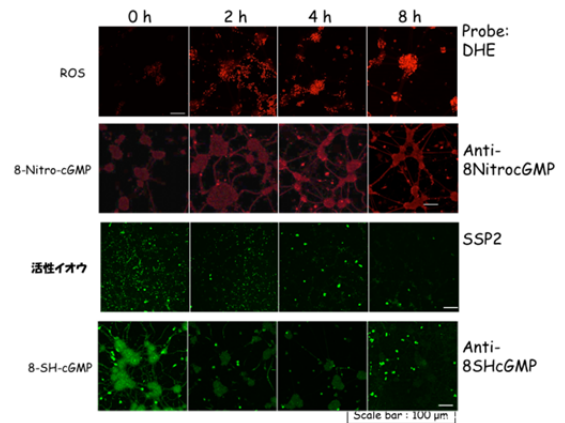


図 5 CGNs における ROS、8-ニトロ-cGMP、活性イオウ分子、8-SH-cGMP レベルに及ぼすメチル水銀の影響

3-3. CGNs における S-メチル水銀ビス体の産生

次に、メチル水銀の活性イオウ分子による解毒生成物である S-メチル水銀ビス体を、HPLC/還元加熱原子吸光法で解析した。メチル水銀未処理の細胞では、S-メチル水銀ビス体は検出されなかったが、メチル水銀で処理した細胞では、S-メチル水銀ビス体の産生が認められた (図 6)。

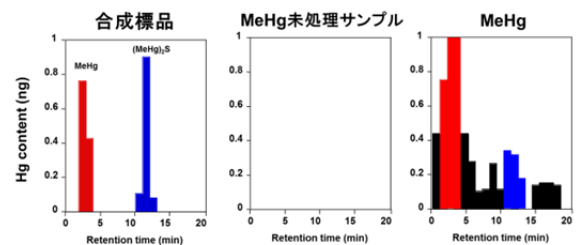


図 6 CGNs における S-メチル水銀ビス体の産生

3-4. *In vivo*におけるメチル水銀誘発性 8-ニトロ-cGMP の生成

また、*in vivo*での 8-ニトロ-cGMP の産生を検討するため、ラットにメチル水銀を 8 日間投与し、小脳における 8-ニトロ-cGMP の産生を免疫染色で解析した (図 7)。その結果、投与終了後 2、5 日目には、プルキンエ細胞、顆粒細胞で 8-ニトロ-cGMP の産生が確認された。また 8、11 日目には、プルキンエ細胞、顆粒細胞の脱落が確認された (図 7)。

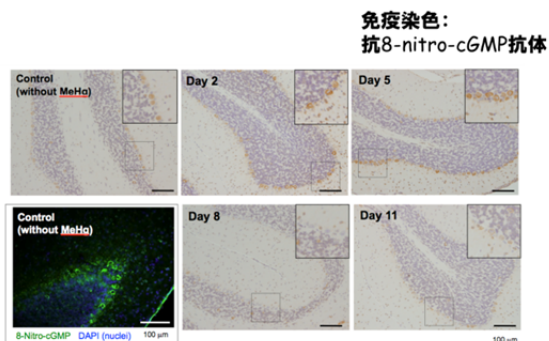


図 7 ラット小脳における 8-ニトロ-cGMP、レベルに及ぼすメチル水銀の影響

3-5. メチル水銀の HRas/MEK/ERK シグナルへの影響

8-ニトロ-cGMP は、低分子 GTP 結合タンパク質の一つである HRas に作用しその下流シグナルの MEK/ERK を活性化し、細胞死を誘発することが知られている¹¹⁾。そこで、CGNs のメチル水銀処理によって、このシグナルが活性化されるかを検討した (図 8)。

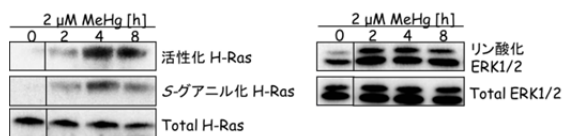


図 8 CGNs におけるメチル水銀誘発性 HRas、ERK の活性化

活性化型 HRas プルダウンアッセイ、ウェスタンブロットの結果、HRas の活性化および ERK リン酸化の亢進が確認された (図 8)。

また、メチル水銀毒性に HRas/MEK/ERK シグナルが関与しているかを検討するため、メチル水銀毒性に及ぼす MEK 阻害剤 (PD98059) の効果を検討した (図 9)。その結果、2.5 μ M MEK 阻害剤でメチル水銀毒性は軽減され、5 μ M において、さらなる軽減は認められなかった (図 9)。この結果は、HRas/MEK/ERK シグナルが、メチル水銀毒性に部分的に関与していることを示唆している。

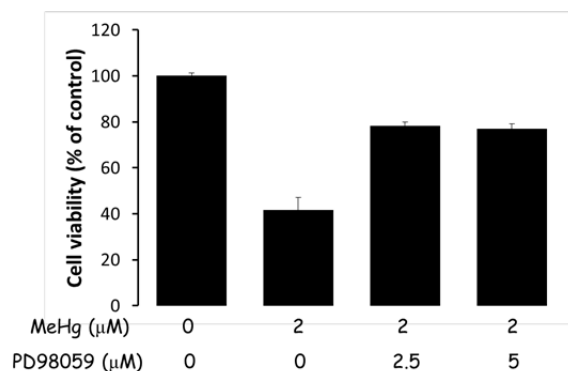


図 9 CGNs におけるメチル水銀毒性に及ぼす MEK 阻害剤の影響

4. まとめ

上述の結果をまとめると図 10 に示すようなモデルが考えられる。メチル水銀は、細胞内で活性イオウ分子と反応し、S-メチル水銀ビス体を形成し解毒される。しかし、メチル水銀が多くなると、その解毒処理能力を超え、他の生体分子へ作用する。その結果 ROS 産生、8-ニトロ-cGMP の産生が増加する。通常状態では、8-ニトロ-cGMP は、活性イオウ分子によって 8-SH-cGMP に代謝され、レドクスシグナルは制御されているが、メチル水銀により活性イオウ分子が消費されるため、8-ニトロ-cGMP は代謝されず、細胞内レベルが上昇す

る。その結果、HRas/MEK/ERK シグナルが活性化され、細胞死が誘導される。

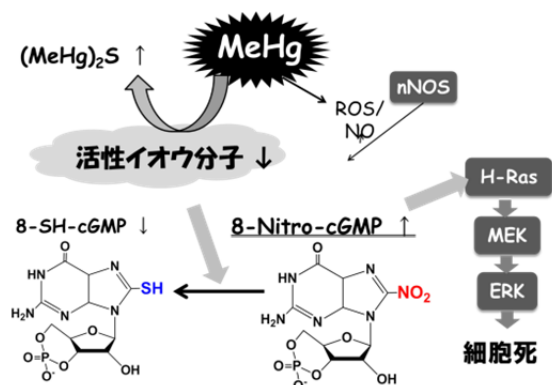


図 10 活性イオウ分子によるレドクスシグナル制御とメチル水銀による破綻

本研究は、メチル水銀を親電子性分子として捉え、親電子シグナル分子である 8-ニトロ-cGMP、親電子物質の代謝調節因子である活性イオウ分子との関連性に注目している。本研究結果は、これまでにない新たなメチル水銀毒性の発現機構を示している。今後さらなる検討が必要であるが、本研究が、メチル水銀毒性の予防法および治療法の確立に貢献することが期待される。

5. 引用文献

- 1) The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. Kumagai Y, Kanda H, Shinkai Y, et al., *Oxid Med. Cell Longev.*, 2013, 2013, 848279.
- 2) Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. Ceccatelli S, Daré E, Moors M., *Chem Biol Interact.*, 2010, 188, 301-8.
- 3) Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. Farina M1, Rocha JB, Aschner M., *Life Sci.*, 2011, 89, 555-63.

- 4) Purkinje cells express neuronal nitric oxide synthase after methylmercury administration. Himi T, Ikeda M, Sato I, et al., *Brain Res.*, 1996, 718, 189-92.
- 5) Role of nitric oxide in the cerebellar degeneration during methylmercury intoxication. Yamashita T, Ando Y, Sakashita N, et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1997, 1334, 303-11.
- 6) Differential changes in rat brain nitric oxide synthase in vivo and in vitro by methylmercury. Shinyashiki M, Kumagai Y, Nakajima H, et al., *Brain Res.*, 1998, 798, 147-55.
- 7) Induction of neuronal nitric oxide synthase by methylmercury in the cerebellum. Ikeda M1, Komachi H, Sato I, et al., *J. Neurosci. Res.*, 1999, 55, 352-6.
- 8) Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3',5'-cyclic monophosphate. Sawa T, Zaki MH, Okamoto T, et al., *Nature. Chem. Biol.*, 2007, 3, 727-735, 2007
- 9) The critical role of nitric oxide signaling, via protein S-guanylation and nitrated cyclic GMP, in the antioxidant adaptive response. Fujii S, Sawa T, Ihara H, et al., *J. Biol. Chem.*, 2010, 285, 23970-84.
- 10) Regulation by mitochondrial superoxide and NADPH oxidase of cellular formation of nitrated cyclic GMP: potential implications for ROS signaling. Ahmed KA, Sawa T, Ihara H et al., *Biochem. J.*, 2012, 442, 719-30.
- 11) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. Nishida M, Sawa T, Kitajima N, et al., *Nature. Chem. Biol.*, 2012, 8, 714-24.
- 12) Redox signal regulation via nNOS phosphorylation at Ser847 in PC12 cells and rat cerebellar granule neurons. Kasamatsu S, Watanabe Y, Sawa T et al., *Biochem. J.*, 2014, 459, 251-63.
- 13) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Ida T, Sawa T, Ihara H, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111, 7606-11.
- 14) Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells. Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y et al., *Chem. Res. Toxicol.*, 2011, 24, 1633-5.

分泌エクソソームによるメチル水銀排出の分子機構

○今村伸太郎, 鈴木珠水, 原竜朗, 東畑頭, 石原賢司, 山下由美子 (水研セ中央水研), 藪健史, 司馬肇 (日大生物資源), Ståle Ellingsen, Heidi Amlund, Anne-Katrine L. Haldorsen (NIFES, Norway), 山下倫明 (水研セ中央水研)

1. 要約

セレンによるメチル水銀の解毒メカニズムを明らかにするため, 分泌エクソソームの誘導によるメチル水銀の分泌・排出経路を解析した。ゼブラフィッシュ胚へのメチル水銀システイン投与によって胚から培養水中にエクソソームが分泌された。その分泌量はメチル水銀の投与量に依存的に増加した。走査型プローブ顕微鏡観察によって, エクソソームの直径は20-40 nmであった。セレン含有イミダゾール化合物セレノネインに対するトランスポーターとして同定された OCTN1 を遺伝的に発現しないゼブラフィッシュ欠損変異体 *octn1^{-/-}* を作出し, メチル水銀に対する毒性を調べた結果, *octn1^{-/-}* 系統の胚ではエクソソームの分泌および水銀排出が抑制された。以上の結果から, セレンによるメチル水銀の解毒は, セレノネインとそのトランスポーターOCTN1 を介するエクソソーム分泌経路によることを見出された。

2. 背景

魚食でのメチル水銀の毒性軽減が報告され^{1,2,3)}, セレンの解毒効果が明らかにされた。クロマグロ血液からセレン含有イミダゾール化合物 (セレノネイン: 2-selenyl-N_α,N_α,N_α-trimethyl-L-histidine) が同定された⁴⁾。セレノネインはゼブラフィッシュ胚およびヒト腎臓 HEK293 細胞内のメチル水銀排出と無機化を促進した⁵⁾。

エクソソームは細胞から分泌される膜状小胞 (20-150 nm) であり, エンドサイトーシスによ

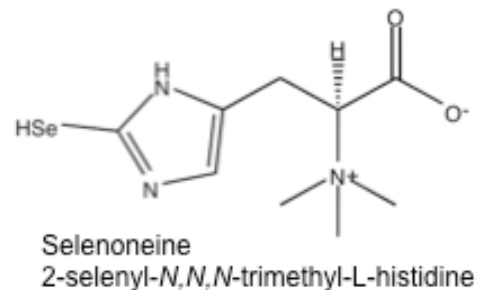


図1 クロマグロ血液から同定されたセレン含有イミダゾール化合物セレノネイン

って細胞内に取り込まれた小胞が多胞体に陥入して前駆体が形成され, 細胞膜との融合により細胞外に放出される。エクソソームにはタンパク質, DNA, mRNA, miRNA, 脂質が含まれており⁶⁾, 体内の離れた細胞・組織に輸送する情報伝達の役割を果たすと考えられる。ほ乳類培養細胞を用いた研究から, 細胞種ごとに異なった性質のエクソソームが分泌されることが知られる。例えば, 癌細胞から分泌されるエクソソームは標的細胞へ miRNA を輸送し, 遺伝子発現制御によって転移先の環境を整備する分子機序が推定される。

本研究は, セレノネイントランスポーターを介するエクソソームの分泌作用が重金属や薬剤, とくにメチル水銀の解毒・排出に関与するという新たな分子メカニズムを提案するものである。

3. 材料と方法

3-1. エクソソームの分離

メチル水銀システイン (10-200 μg Hg/ml) をマイクロインジェクション法によって受精後 8 時間胚の卵黄嚢に注入し, 16 時間培養後, 培養

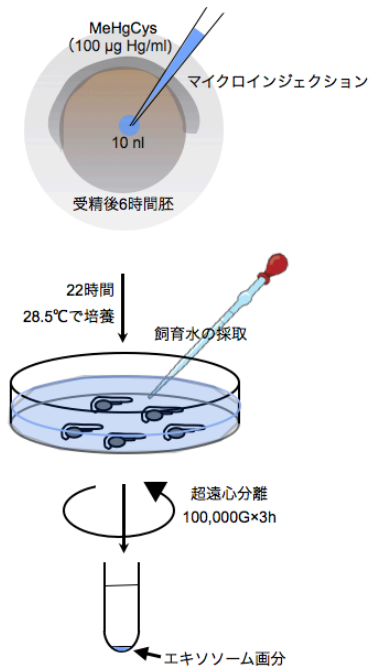


図 2 培養水中に放出されたエキソソームの分離法

液を超遠心 (100,000×g, 1-3 時間) によって、エキソソームを分離した⁷⁾ (図 2)。

3-2. エキソソームの化学性状

分泌されたエキソソームはタンパク質含量、アセチルコリンエステラーゼ活性⁸⁾、エキソソームマーカータンパク質 CD63 量が測定された。CD63 は抗 CD63 抗体 (サンタクルズ) を用いてウエスタンブロット法により定量した。

3-3. 水銀の定量

胚 (1~10 個) およびエキソソーム画分を湿式加熱分解し、総水銀量を冷蒸気原子吸光法 (水銀測定装置) で測定した。

3-4. 走査型プローブ顕微鏡観察

分離したエキソソームの形態は走査型プローブ顕微鏡 (NanoNavi ステーション SPA-400: SII 社) を用いて測定した。

3-5. 欠損変異系統 *octn1*^{-/-} の樹立

有機カチオントランスポーター OCTN1 遺伝子の第 4 エキソン領域を 10 bp 欠失 (ナンセンス変異) したゼブラフィッシュ欠損変異系統 (*octn1*^{-/-}) を Zinc finger nuclease を用いて作出した。PCR-RFLP またはヘテロ二本鎖移動度アッセイ⁹⁾ を用いて変異体を選別した。

4. 結果

4-1. メチル水銀を注入されたゼブラフィッシュ胚の培養液中に分泌されたエキソソーム

メチル水銀の注入 (0.5-2 ng Hg/胚) によって、ゼブラフィッシュ胚から培養液中にエキソソームがメチル水銀の投与量に依存して分泌された。エキソソームに含まれる総タンパク質量はメチル水銀量に依存して増加した。エキソソームにはアセチルコリンエステラーゼが含まれ、タンパク質量と同様にメチル水銀曝露によって活性が増大した。エキソソームのマーカータンパク質 CD63 はウエスタンブロット法で検出され、メチル水銀の曝露量に依存して増加した。以上の結果から、メチル水銀はエキソソーム排出を促進した。このエキソソームには水銀 (0.05-0.1ng Hg/胚) が濃度依存的に含まれていた。これらの結果から、エキソソームを介してメチル水銀が体外に排出されることが明らかになった。

4-2. エキソソームの形態

メチル水銀曝露によってゼブラフィッシュ胚から分離されたエキソソームを走査型プローブ顕微鏡で観察した結果、20-40nm の球形顆粒であり、メチル水銀曝露によって分泌量は増加した (図 3)。

4-3. セレノネインによるエキソソームの誘導

メチル水銀存在下でセレノネイン (3 µM) を培養水に投与すると、エキソソーム分泌および水銀排出が促進された。

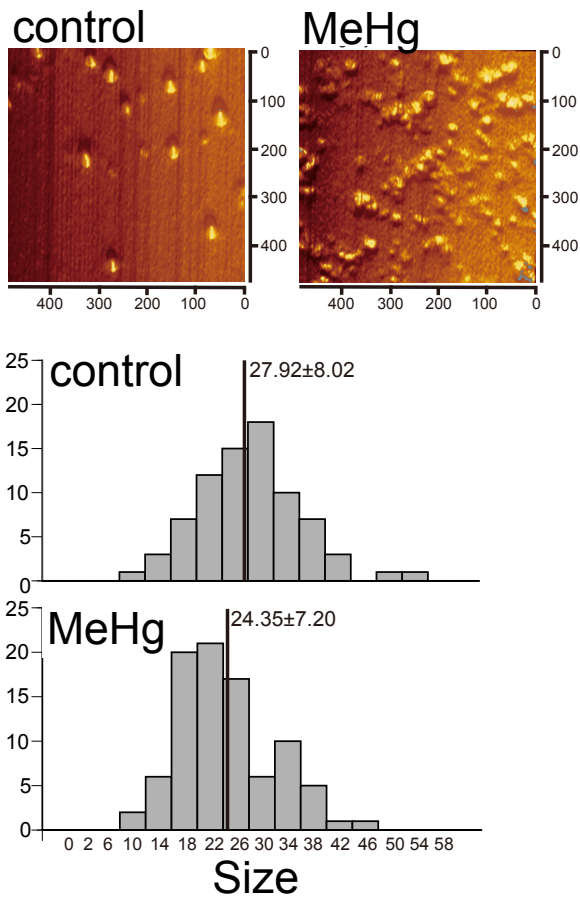


図3 メチル水銀システインを注入された胚から分泌されたエクソソームの形態観察

4-4. セレノネイン特異的トランスポーター OCTN1 の欠損変異系統 *octn1^{-/-}* の樹立

セレノネイントランスポーターの欠損変異系統 *octn1^{-/-}* の胚に対して、上述の方法でメチル水銀システインをマイクロインジェクション法によって投与したのち、メチル水銀による毒性およびエクソソーム生成を分析した。野生型ゼブラフィッシュ胚では、メチル水銀システイン 100 ngHg/ml の低濃度の投与条件では、形態異常は観察されず、アポトーシスが誘導されないが、*octn1^{-/-}* 胚はメチル水銀に対して高感受性であり、100 ngHg/ml 濃度でのメチル水銀曝露条件では、眼の小型化、脳・脊髄の形態異常、膜鰭の消失などが観察され、異常部位では過剰なアポトーシスが検出された (図4)。*octn1^{-/-}* 胚ではエクソソーム分泌および水銀排出が抑制された。

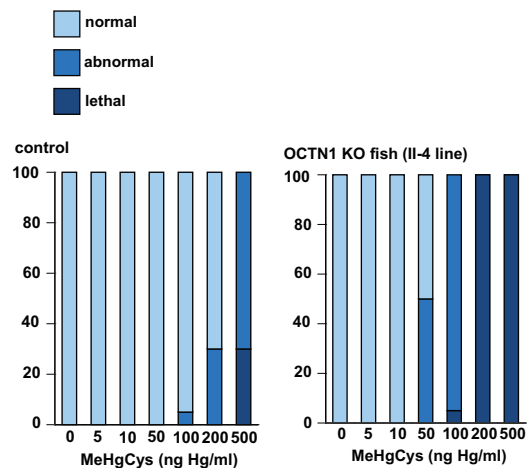
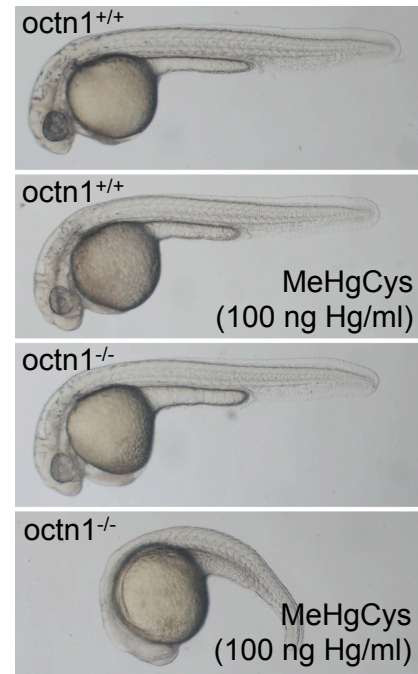


図4 セレノネイントランスポーターの欠損変異系統 *octn1^{-/-}* のメチル水銀感受性

5. 考察

マイクロインジェクション法による細胞内へのメチル水銀システインの直接注入投与によって、ゼブラフィッシュ胚からのエクソソームが分泌誘導され、水銀の胚体外への排出が促進された。OCTN1 の欠損変異系統 *octn1^{-/-}* の胚は、エクソソームを介するメチル水銀の排出経路が作用せず、メチル水銀に対する毒性が増大した。これらの結果から、セレンによるメチル水銀の

解毒には、セレノネインとそのトランスポーター-OCTN1 を介するエキソソーム分泌経路が関与することが確認された。

メチル水銀によって分泌されるエキソソームにはリソソームおよびオートファゴソーム形成に関わる分子が含まれる。セレノネインはメチル水銀や他のラジカルと複合体を形成して、OCTN1 を介してエンドソーム内に移行し、酵素的もしくは非酵素的にメチル水銀を無機化し、リソソームを介するエキソソーム経路を用いて細胞外に排出されることが推定された。

セレノネインは、マグロ類、サバ類など回遊魚に多く含まれ、魚食習慣のある離島住民の赤血球からも高濃度に検出された¹⁰⁾。また、ゼブラフィッシュ胚に放射性亜セレン酸を投与することによって、セレノネインが生合成され、さらにセレノネインはセレンタンパク質の合成にも利用された¹¹⁾。分裂酵母でもセレノネインの生合成が報告された¹²⁾。これらの事実から、セレノネインは食事から摂取するとともに、他のセレン源から生合成され、生体内に蓄積し、トランスポーターを介してメチル水銀の解毒に作用すると考えられた。

OCTN1 遺伝子は慢性大腸炎・クローン病の原因遺伝子の一つとして報告されていることから、セレン欠乏条件における OCTN1 の機能低下は、メチル水銀感受性を高める可能性が考えられる。

引用文献

1. Ganther et al, Science, 175, 1122-1124, 1972
2. Ralston et al., Neurotoxicol, 29, 802-811, 2008
3. Raymond et al, SMDJ Seychelles Niger. Med. Dent. J, 7, 72-77, 2004
4. Yamashita et al, J Biol Chem, 285, 18134-18138, 2010
5. Yamashita et al, Mar Biotechnol, 15, 559-570, 2013
6. ExoCarta <http://www.exocarta.org>
7. Imamura et al, 水産学シリーズ179, 魚食と健康, 2013
8. Savina et al, J Biol Chem, 278, 20083-20090, 2003
9. Ota et al, Genes Cells, 18, 450-458, 2013
10. Yamashita et al, Biol Trace Elem Res, 156, 36-44 2013
11. Yamashita et al, 10th International Symposium on Selenium in

講演 8

小胞体ストレスプレコンディショニングによるメチル水銀毒性防御

○白杵扶佐子（国立水俣研）

1. 背景と目的

これまで、培養細胞系、メチル水銀中毒モデルラットを用いて、メチル水銀毒性発現の分子基盤について検討し、メチル水銀毒性発現には酸化ストレス傷害が重要な役割を果たすことを *in vitro*, *in vivo* において明らかにしてきた¹⁻⁵⁾。さらに、セレン基に対するメチル水銀の親和性がもたらす細胞内の相対的な活性型セレンの低下により、酸化還元系の重要なセレン含有酵素である glutathione peroxidase 1 (GPx1) mRNA や thioredoxin reductase 1 mRNA が、mRNA 監視機構である nonsense-mediated mRNA decay (NMD)⁶⁾ の作動により転写後障害されることが、メチル水銀による酸化ストレス発生のメカニズムとして重要であることも明らかにした⁷⁾。メチル水銀曝露後早期に発生する酸化ストレスに対し抗酸化防御系で対応できない場合、細胞ストレスシグナル伝達系の活性化が生じ、毒性後期には小胞体ストレスが起こってアポトーシスがもたらされる⁸⁾。

生体は軽いストレスを受けると、その後の強いストレスに対し耐性をもつことが知られている (preconditioning、プレコンディショニング)。メチル水銀曝露では曝露後期に小胞体ストレスが生じることから、小胞体ストレスを前処理後 (Endoplasmic reticulum (ER) stress preconditioning)、メチル水銀曝露を行い、その後のストレス応答の変化、細胞傷害について検討した

2. 方法

低濃度メチル水銀曝露でアポトーシスをおこすことが明らかになっているメチル水銀高感受性のマウス細胞培養系^{1, 2)} を用いた。小胞体ストレスプレコンディショニングとして、ER Ca^{2+} -ATPase である

thapsigargin (TPG) をメチル水銀曝露前に16時間投与した。

3. 結果

3-1. メチル水銀毒性に及ぼす小胞体ストレスプレコンディショニング効果

TPG (100-600 ng/ml) を16 h 前投与した細胞は、その後のメチル水銀曝露による傷害が防御された(図1)。フローサイトメーターによる検討で、小胞体ストレスプレコンディショニングはアポトーシスを抑制することが明らかになった。

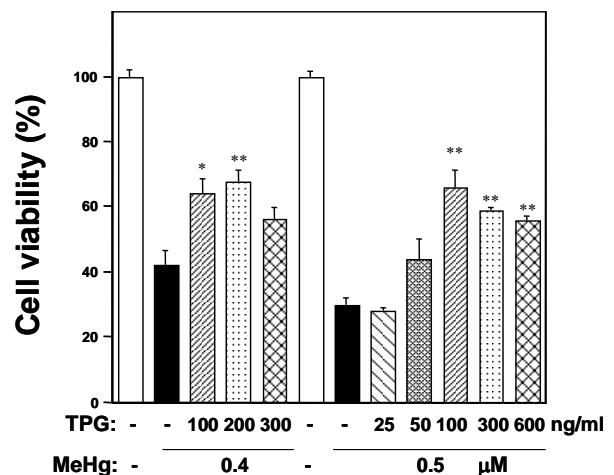


図1. TPG前投与によるメチル水銀毒性防御

メチル水銀によるアポトーシスの誘導は、細胞内活性酸素の増加が引き金になっていることをすでに明らかにしているが、小胞体ストレスプレコンディショニングにより細胞内活性酸素の増加は抑制された。さらにメチル水銀による活性酸素の増加は MAPK シグナル伝達系の SAPK/JNK シグナル伝達系の活性化をひきおこすが、小胞体ストレスプレコンディショニングは、SAPK/JNK シグナル伝達系

の活性化を抑制し、ERKシグナル伝達系を活性化した。

抗酸化酵素の発現の検討では、小胞体ストレスプレコンディショニングにより、GPx1 mRNA、manganese superoxidase dismutase (Mn-Sod) mRNA、thioredoxin reductase 1 (Txnrd1) mRNAの発現増加が認められた。

3-2. 小胞体ストレスプレコンディショニングによるストレス関連蛋白質の変動

小胞体ストレスプレコンディショニングによるメチル水銀毒性防御のメカニズムを知るために、ストレス関連蛋白質、すなわち小胞体シャペロンである glucose regulated protein of 78 kDa (Grp78)、酸化ストレスで誘導されるmetallothionein 1 (Mt1)、ストレス応答転写因子activating transcription factor 4 (Atf4) のmRNA発現変動について検討した。

Grp78 mRNAはメチル水銀曝露9時間後4.5倍に増加したが、抗酸化剤の同時投与により発現は抑制された。小胞体ストレスプレコンディショニングにより、Grp78 mRNAの発現は7倍の増加を認めた。Mt1 mRNAの発現も、メチル水銀曝露5時間後増加し、抗酸化剤の同時投与により発現は抑制された。小胞体ストレスプレコンディショニングは、Mt1 mRNAの発現をメチル水銀単独投与以上に増加させた。Atf4 mRNA発現も小胞体ストレスプレコンディショニングにより増加した。

さらに、蛋白質レベルの検討で小胞体ストレスプレコンディショニングによりAtf4、Grp78や蛋白質の翻訳抑制に関与するphospho-eukaryotic initiation factor 2 alpha (Eif2 α) の発現が増加することが明らかになった。Atf4遺伝子は、5'非翻訳領域にopen reading frame (uORF)をもつことから、mRNA監視機構であるNMDの作動がその発現に関係することが考えられたため、小胞体ストレスプレコンディショニング下におけるNMD活性について検討したところ、NMDは小胞体ストレスプレコンディショニングにより抑制されることが明らかになった。しかしながら、

NMD構成因子をsiRNAによりノックダウンしたNMD抑制細胞では、Atf4 mRNAは増加するものの、Atf4 蛋白質の発現増加は認められず、Atf4 蛋白質の発現増加はNMD抑制が主原因ではないと考えられた。

3-3. Grp78、Mt1ノックダウンのメチル水銀毒性への影響

小胞体ストレスプレコンディショニングによる誘導の大きい Grp78、Mt1 のメチル水銀毒性への影響を知るために、siRNAを用いてそれぞれの蛋白質をノックダウンした培養細胞系を用いて、そのストレス応答への関与について検討した。Grp78、Mt1 ノックダウン 48 時間後の細胞生存率の検討では、Mt1 ノックダウン細胞では、non-silencing siRNA 導入の control 細胞と同様の生存率であったが、Grp78 ノックダウンでは生存率は有意に低下した(図 2)。

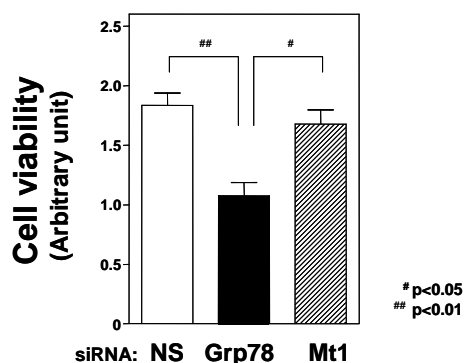


図 2. Grp78、Mt1 ノックダウン 48 時間後の細胞生存率

さらに、Mt1 ノックダウン細胞は、非ストレス下においては non-silencing siRNA 導入の control 細胞と同様にアポトーシス細胞は少なかったが、Grp78 ノックダウンでは非ストレス下においても non-silencing siRNA 導入細胞、Mt1 ノックダウン細胞に比し有意に高いアポトーシス細胞の出現が認められ、Grp78 が細胞の生存に重要であることが示唆された。メチル水銀曝露下では、siRNA

導入全ての細胞株でアポトーシスは有意に増加したが、Grp78 ノックダウン細胞でより高いアポトーシス細胞の出現を認めた。

小胞体ストレスプレコンディショニングにより、メチル水銀毒性は軽減されることが明らかになったが、小胞体ストレスプレコンディショニングの効果は、Mt1ノックダウン細胞でもみられたことから、Mt1ノックダウン下で小胞体ストレスプレコンディショニングを与えた細胞の抗酸化酵素群 (GPx1、Txnrd1、Mn-Sod) およびGrp78 mRNA変動について real-time PCRを用いて検討した。その結果、Mt1ノックダウン下で小胞体ストレスプレコンディショニングを与えた細胞では、いずれのmRNAも有意に上昇することが明らかになったが、特にGrp78 mRNAはnon-preconditioning 細胞の27倍ときわめて高い増加を示した (図3)。従って、Grp78はメチル水銀毒性を防御する重要な因子であることが示唆された。

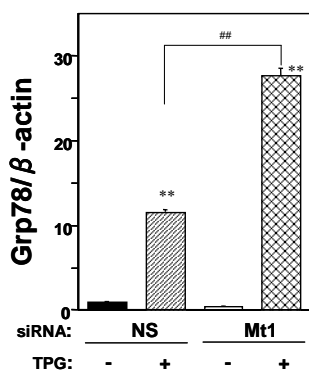


図3. Preconditioning後のGrp78 mRNA発現変化

4. 考察

小胞体ストレスプレコンディショニングは、ストレス関連蛋白質である Grp78、Mt1、Atf4、抗酸化酵素、phospho-Eif2α など、ストレス防御に有用な蛋白質発現を誘導する。今回の siRNA を用いた検討からは、Grp78 がメチル水銀毒性防御に重要であることが明らかになった。

さまざまな環境ストレス下では、ストレス応答に関係しない蛋白質の合成は抑制される。この翻訳制御は、翻訳開始因子である Eif2α のリン酸化が引き

金となる。小胞体ストレスプレコンディショニングにより、NMD の抑制が起こるが、NMD の抑制のみでは Atf4 mRNA の誘導はおこるものの、Atf4 蛋白質は誘導されなかった。したがって、Atf4 蛋白質の発現は、NMD 抑制により生じるのではなく、主として小胞体ストレスプレコンディショニングにより同時に生じるリン酸化 Eif2α によって Atf4 mRNA の uORF が抑制されたことによって誘導されると考えられた (図4)。

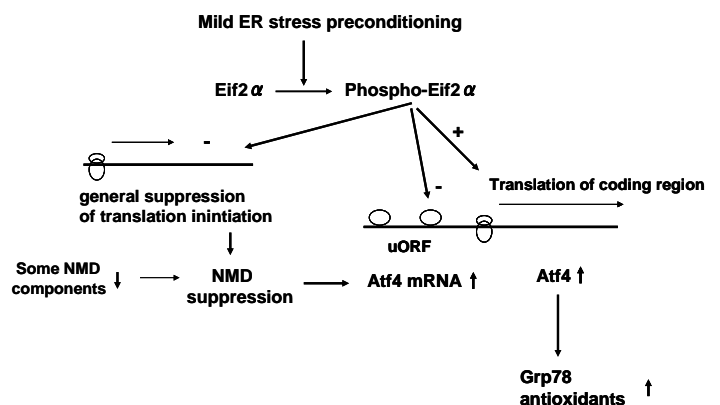


図4. ER stress preconditioning によるストレス応答誘導

5. 結論

小胞体ストレスプレコンディショニングは phospho-Eif2α、Atf4、Grp78 蛋白質発現、ERKシグナル伝達系の活性化等のストレス応答を惹起することによりメチル水銀毒性を防御する。小胞体ストレスの制御はメチル水銀傷害を軽減するための治療として有用である。

以上の内容は、Scientific Reports (2013) 3:2346 doi:10.1038/srep02346⁹⁾ に publish された。

6. 引用文献

- 1) Usuki F and Ishiura S (1998) Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increases oxidative stress. NeuroReport 9: 2291-2296.
- 2) Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N et al. (2000) Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines. Biochem Biophys

Res Comm 267: 739-743.

- 3) Usuki F, Yasutake A, Umehara F et al. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury- intoxication in the rats. *Neurosci Lett* 304: 199-203.
- 4) Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Higuchi I (2004) Beneficial effects of mild lifelong dietary restriction on skeletal muscle: prevention of age- related mitochondrial damage, morphological changes, and vulnerability to a chemical toxin. *Acta Neuropathol*, 108, 1-9.
- 5) 臼杵扶佐子 (2006) メチル水銀による酸化ストレスと神経細胞死. 医学のあゆみ 別冊 酸化ストレス Ver. 2 フリーラジカル医学生物学の最前線 (吉川敏一編集) p. 431- 4.
- 6) 臼杵扶佐子、山下暁朗(2010) Nonsense- mediated mRNA decay (NMD) による変異 mRNA 排除と疾患. *細胞工学* 29 : 155-160.
- 7) Usuki F, Yamashita A, Fujimura M (2011) Methylmercury-induced relative selenium deficiency causes oxidative stress through its post-transcriptional effect. *J Biol Chem* 286: 6641-9.
- 8) Usuki F, Fujita E, Sasagawa N (2008) Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *NeuroToxicology* 29:22-30.
- 9) Usuki F, Fujimura M, Yamashita A (2013) Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Scientific Reports* 3:2346 doi: 10.1038/srep02346

若手発表表

メチル水銀の妊娠期曝露による胎児脳下垂体および副腎のホルモン合成系への影響と性差

○武田知起 (九州大院)、服部友紀子、仮屋菌侑大 (九州大院)、藤村成剛 (国立水俣研)
石井祐次、山田英之 (九州大院)

1. 背景および目的

胎児期のメチル水銀 (MeHg) 曝露は、成熟個体に影響が生じない低い用量であっても出生後に神経障害等の毒性を惹起するため問題が大きい。胎児/発達期は、ホルモンをはじめとする生理活性物質の刺激によって組織の分化や発達が起こる。近年、多くの環境化学物質がこれらのホルモン作用を発達期に攪乱することで組織の分化・発達を破綻させ、障害をインプリントする危険性が危惧されつつある。しかし、MeHg が同様の障害性を示すか否かに関しては十分に解析されていない。そこで本研究では、これを検証するため、MeHg の妊娠期飲水曝露が胎児脳下垂体、副腎および生殖腺のホルモン合成に及ぼす影響を調査した。

2. 実験方法

2-1. 動物処理

妊娠 Wistar rat を作製し、妊娠 1 日目 (GD1) より GD20 までの間、MeHg (0.1, 1 および 5 ppm) 含有水を自由に与えた。GD20 に胎児および母体より視床下部、脳下垂体、生殖腺、副腎、肝臓および血液を採取し、以下の解析に供した。

2-2. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

採取した組織より total RNA を抽出した。Real-time RT-PCR 法を用いて、目的タンパク質の mRNA 発現量を定量した。各遺伝子の発現量は、 β -actin mRNA で補正したのち解析した。

2-3. イムノブロット法

採取した胎児精巣 (3 匹分) をまとめてホモジナイズしたのち、遠心分離によってミトコンドリア画分を調製した。イムノブロット法により steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) タンパク質の発現量を解析した。

2-4. メタボローム解析

雌胎児肝臓を 4 倍量の 50 mM Tris-HCl を用いてホモジナイズしたのち、メタノールを加えて極性成分を抽出した。これを、ultra-performance liquid-chromatography time-of-flight mass chromatography (UPLC-TOF-MS) 装置に付してメタボローム変動を解析した。

3. 結果および考察

3-1. 胎児のホルモン合成に対する影響と性差

MeHg の妊娠期飲水曝露により、雌胎児脳下垂体において growth hormone、prolactin および thyroid-stimulating hormone β -subunit の mRNA 発現が用量依存的に低下し、いずれも 5 ppm では有意に認められた (図 1)。生殖腺ホルモン合成の上位制御因子である luteinizing hormone 遺伝子には影響は認められず (図 1)、これと符合して雌雄胎児生殖腺における StAR 等の性ホルモン合成系タンパク質の発現も変動しなかった。一方、雄胎児および母体脳下垂体に対しては、いずれの用量においても変化は観察されず、MeHg による胎児脳下垂体ホルモン発現への影響は雌胎児に特異的であることが示唆された。さらに、母子の副腎における StAR 等のホルモン合成系タンパク質も、雌胎児のみで減少ないし減少傾向

を示した。副腎ホルモン合成の上位刺激因子である脳下垂体 adrenocorticotropin の mRNA (図 1) ならびに血清中ホルモンレベルに変動は認められなかったことから、MeHg による副腎ホルモンの合成抑制は少なくとも上位制御因子以外に対する影響を介して生起するものと推定された。

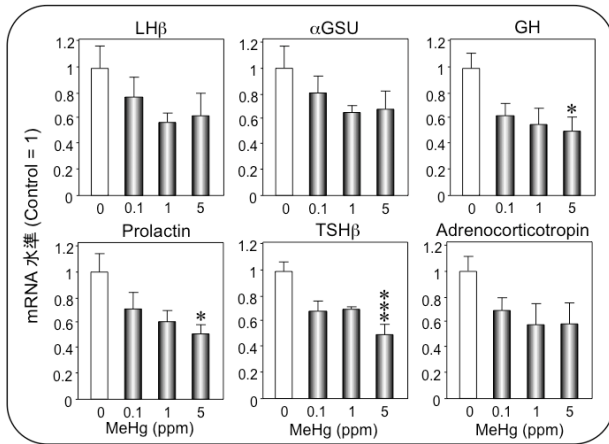


図 1. 雌胎児脳下垂体のホルモン合成へ影響

3-2. 組織中の総 Hg 濃度

胎児肝臓、副腎、生殖腺、視床下部および脳下垂体の総 Hg 濃度を測定した結果、雌雄ともに肝臓および副腎において高濃度に蓄積することが確認された (図 2)。最も高い集積を示した肝臓においては、雌胎児の方が有意に高い傾向を示し (図 2)、上記のホルモン合成に対する影響が雌胎児に感受性が高い事実と符合した。すなわち、MeHg による胎児ホルモン合成への影響の性差の要因の一つには、集積性の違いが寄与する可能性が示唆された。母体に関しても、肝臓において高値を示した一方で、副腎においては胎児に認められた様な高い蓄積性は観察されなかった (図 2)。この結果は、胎児副腎においてホルモン合成系に影響が認められる事実を支持しており、胎児副腎への MeHg 蓄積により、直接的に副腎のホルモン合成を抑制する可能性が考えられた。

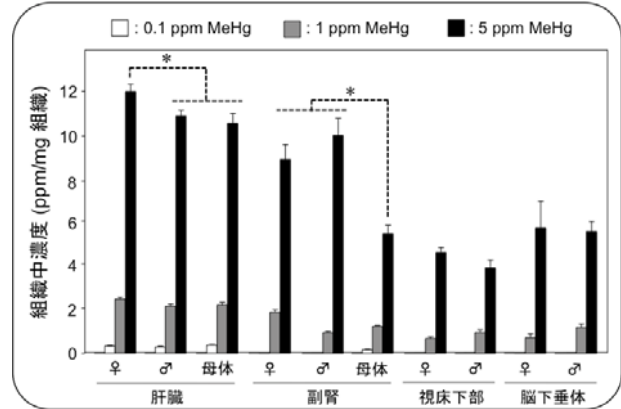


図 2. MeHg の組織中濃度

3-3. 雌胎児肝臓のメタボローム解析

UPLC-TOF-MS 解析によって得られた結果をもとに主成分分析を行った結果を Score plot として図 3A に示す。群ごとに明確なプロットクラスターが形成され、MeHg の用量依存的に control 群とのクラスターの乖離の程度が大きくなる傾向が確認された (図 3A)。すなわち、MeHg は用量依存的にメタボローム変動を惹起すると推定された。さらに、直交型部分最小二乗法を用いて各用量と control 間の比較を行った結果を S-plot としてそれぞれ示す (図 3B-D)。相関係数 0.8 以上および -0.8 以下のプロットを有意に増加および減少したイオンとして抽出し、データベース解析に付したところ、0.1 ppm、1 ppm および 5 ppm の MeHg 曝露によって、60、111 および 177 化合物の変動がそれぞれ推定された。トリプトファン、チロシンおよびプロリンをはじめとして多くのアミノ酸の代謝物や前駆物質の変動が見受けられ (表 1)、MeHg は雌胎児肝臓において複数のアミノ酸代謝異常を惹起するものと推定された。さらに、過剰状態によって細胞障害性を示す物質であるスフィンゴミエリン、オロチジン酸-5'-一リン酸 および 8-ヒドロキシキナールジン酸が用量依存的に増加し、MeHg はこれらを通して胎児障害を惹起する可能性が見出され

た (図 1)。また、ミトコンドリアの脂肪酸酸化の異常によって逸脱するジカルボン酸であるセバシン酸の増加が見られ、これと符合して脂肪酸の変動も観察された (表 1)。これらと関連して、脂肪酸代謝や糖代謝に重要であるパントテン酸類の減少を示唆する変動も確認された (表 1)。さらに、クエン酸回路の成分である *cis*-アコニット酸

の減少や、酸化リン酸化の構成成分であるユビキノン類の減少も認められ (表 1)、エネルギー産生停滞も示唆された。以上の成果から、妊娠期の MeHg 曝露は雌胎児肝臓中のメタボロームを大きく変動させ、これらの複合的に影響することで障害を惹起する可能性が見出された。

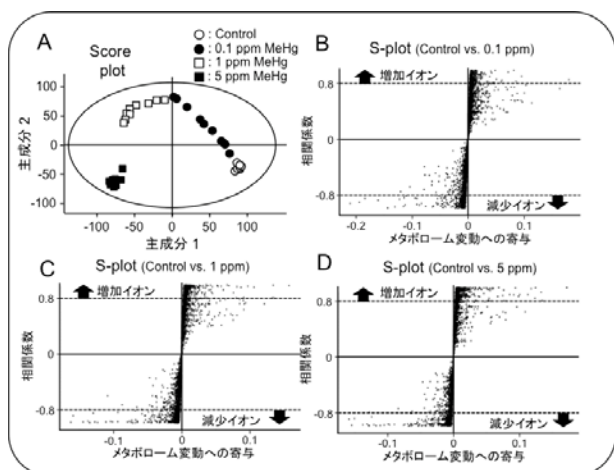


図 3. 雌胎児肝臓のメタボローム解析

表 1. 5 ppm で変動が推定された代表的な成分

増加	減少
スフィンゴミエリン	2-アミノムコン酸
オロチジン-5'-リン酸	3-デヒドロシキミ酸
8-ヒドロキシキナルジン酸	L-キヌレニン
セバシン酸	5-ヒドロキシトリプトファン
L-ホルミルキヌレニン	11-デオキシコルチコステロン
5-ヒドロキシインドールアセトアルデヒド	<i>cis</i> -アコニット酸
5-ヒドロキシ酢酸	ユビキノール
16 α -ヒドロキシエピアンドロステンジオン	2-スクシニル安息香酸
アルドステロンヘミアセトール	2-デヒドロバントイン酸
β -アラニル-L-アルギニン	N-バントニール-システイン
ヒスチジン	ラウリル酸
N-アセチルセロトニン	ケノデオキシコール酸
N-アセチルノイラミン酸	フェニルエチルアミン
バルミトイル酸	チロシン
グルコース-6-リン酸	D-プロリン
4-アミノ安息香酸	ホモセリン
インドール-3-グリセロールリン酸	O-ホスホ-ホモセリン
	メチルテトラヒドロ葉酸
	ピリドキサル-6-リン酸
	タウリン
	AMP

発表 2

メチル水銀の視覚系組織への影響 —涙腺への取り込み機構解析—

○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

我々は、これまでに、高濃度水銀暴露動物モデル¹⁾において、視覚系組織を比較した結果、涙腺における水銀蓄積、病理変化が顕著であり、涙腺の水銀輸送タンパク質が、腎臓・肝臓よりも高発現していることから、この病理変化には、涙腺特有の水銀輸送機構が関与している事が示唆されている（メチル水銀ミーティング 2013）。

2. 目的

涙腺における、水銀輸送機構を明らかにするため、輸送担体に対する阻害剤存在下における水銀輸送動態を比較した。

3. 方法

SD ラット（♂、10 週齢）を用いた。屠殺後、涙腺を摘出し、コラゲナーゼ処理を行うことにより、涙腺腺房細胞を単離した。

メチル水銀（1-100 μ M）は 4 倍量の還元型グルタチオン（以下、GSH）、もしくはシステイン（以下、Cys）と共に室温で 3 時間インキュベートすることにより、それぞれの抱合体を作成し、使用した。

下記輸送担体に対する阻害剤（1mM）を用い、水銀取り込み阻害効果、取り込み動態の変化を Michaelis-Menten 式を用い、解析した。すべての反応は 37°C で実施し、水銀量は加熱気化金アマルガム法にて測定した。

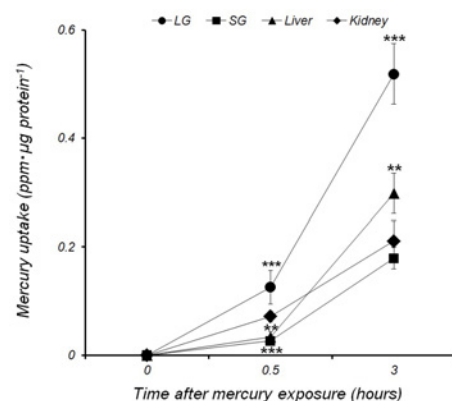
表 1. 水銀輸送担体阻害剤

Inhibitor	Target
BCH	L-type amino acid transporter (LAT)
DL-Trp	Neutral and basic amino acid transporter B0+ (ATB0+)
SMLC	Neutral amino acid transporter (ASCT1)
GPNA	Neutral amino acid transporter (ASCT2)
MK571	Multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)
Na ⁺ -free	Na ⁺ -dependent amino acid transporter

4. 結果

4.1 組織間における水銀取り込み量比較

検討したすべての組織（腎臓・肝臓・涙腺・唾液腺）において、時間依存的な水銀取り込み量の増加が認められた。涙腺における水銀取り込み量は、水銀暴露 30 分後、3 時間後で、腎臓・肝臓よりも有意に多かった。

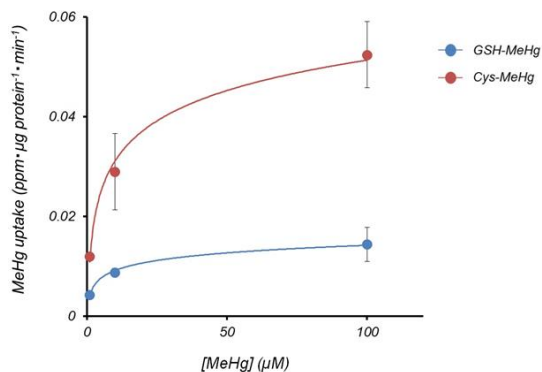


Mean \pm SD, n=6. **P<0.01, ***P<0.001 vs Kidney.

図 1. 水銀取り込み量

4.2 GSH 抱合体、Cys 抱合体メチル水銀の取り込み動態比較

涙腺における、Cys 抱合体メチル水銀の取り込み反応速度は、GSH 抱合体メチル水銀と比較し、約 4 倍だった。



Mean ± SD, n=6.

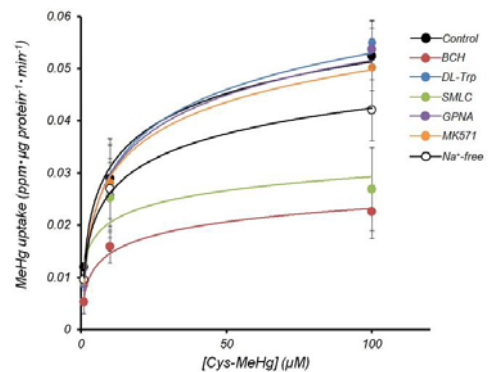
図 2. 水銀取り込み動態の比較

表 2. 水銀輸送動態、反応速度

	Vmax (ppm · μg protein ⁻¹ · min ⁻¹)	Km (μM)
GSH-MeHg	0.0117	1.8252
Cys-MeHg	0.0408	2.4409

4.3 水銀輸送担体存在下における、Cys 抱合体メチル水銀の取り込み動態変化

Cys 抱合体メチル水銀の涙腺への取り込み反応速度は、Control (阻害剤非存在下) と比較し、LAT 阻害剤存在下で約 1/2、ASCT1 阻害剤存在下では約 3/4 に低下していた。細胞外 Na⁺除去下においても、わずかな反応速度の低下が見られた。阻害剤の結合親和性(Ki)は LAT 阻害剤、ASCT1 阻害剤で低く、水銀取り込みに対する阻害効率の高さが示された。



Mean ± SD, n=6.

図 3. 阻害剤存在下の Cys-MeHg の取り込み動態

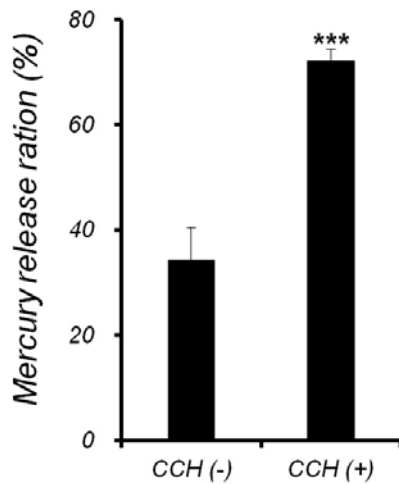
表 3. 阻害剤存在下の取り込み動態比較

	Vmax (ppm · μg protein ⁻¹ · min ⁻¹)	Km (μM)	Ki (μM)
Control	0.0408	2.4409	—
BCH	0.0215	3.7027	1.9345
DL-Trp	0.0415	2.7291	8.4702
SMLC	0.0288	2.8838	5.5112
GPNA	0.0388	2.6956	9.5844
MK571	0.0408	2.6288	12.9898
Na ⁺ -free	0.0360	2.8176	6.4602

4.4 涙腺、水銀排泄機構の検討

涙腺細胞に対する水銀暴露 30 分後に、涙腺の分泌刺激薬であるカルバコール存在下、非存在下において、30 分間インキュベートし、水銀排泄量を比較した。

カルバコール存在下では、非存在下に比べ、水銀の排泄率が有意に高かった。



Mean ± SD, n=6. ***P<0.001 vs CCH(-).

図 4. カルバコール存在下における水銀排泄率

5. 結論

涙腺における水銀の取り込みは、腎臓・肝臓と比較し、多量だった。

水銀は Cys 抱合体で涙腺に取り込まれやすく、この際、LAT、ASCT1 を介して細

胞内に水銀を取り込んでいる事が示唆された。

ドライアイは涙液の減少・変化により眼表面の健康が損なわれる疾患であり²⁾、国内では推定 2400 万人の患者がいる。本邦のドライアイ有病率は欧米と比較し、高く³⁾、魚食による水銀の過剰摂取が、潜在的なドライアイ発症要因となっている可能性がある。

6. 引用文献

- 1) 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.
- 2) Lemp MA., Advances in understanding and managing dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 2008, 146, 350-356.
- 3) Lin PY et al., Prevalence of dry eye among an elderly Chinese population in Taiwan: the Shihpai Eye Study. *Ophthalmology.* 2003, 110, 1096-1101.

発表 3

メチル水銀の聴覚伝導路への影響

○石原 康宏 (広島大院・総合科学)、高橋 亮平、山崎 岳、
伊藤 康一 (徳島文理大・香川薬)

1. 序論

メチル水銀は中枢神経系に対して選択的な毒性を示し、知覚障害、運動失調、視野狭窄や聴力障害など、様々な中枢性の症状を引き起こすことが知られているが¹⁻³、その発症メカニズムはほとんど解明されていない。私たちは、核磁気共鳴画像法 (MRI) を用いて、メチル水銀を投与したマウスの脳の形態、および、T1 強調画像のシグナル強度を網羅的に調べたところ、下丘神経核の T1 シグナルが増大していることが明らかとなった (Fig. 1)。下丘神経核は聴覚伝導路の一部であり、蝸牛で感知した聴覚刺激を大脳皮質聴覚野に伝える中継核である。そこで、本研究では、メチル水銀の聴覚伝導路への影響について、下丘神経核に着目して調べた。

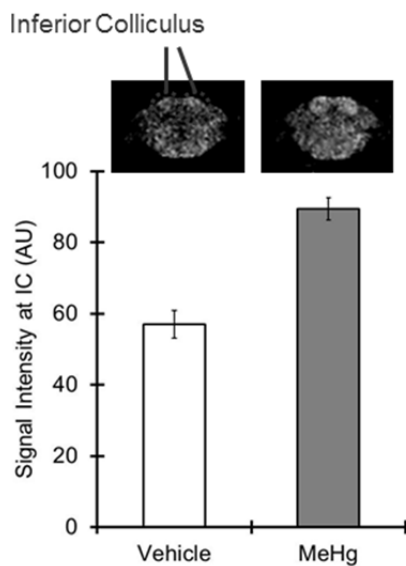
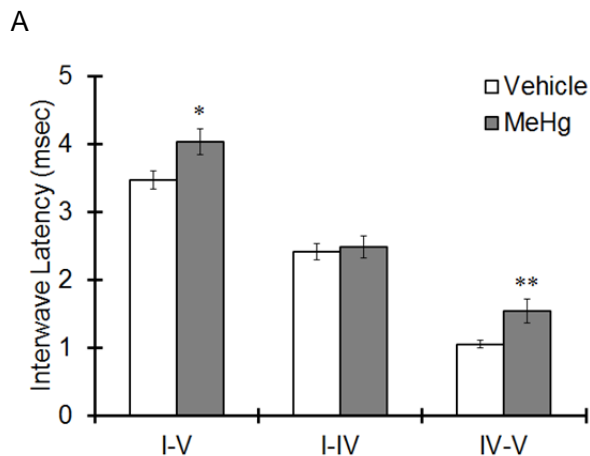


Fig. 1. メチル水銀による下丘神経核 T1 シグナル強度の上昇

2. 聴性脳幹反応によるメチル水銀投与マウスの聴覚異常の検出

まず、メチル水銀投与により、マウス聴覚に異常が生じるか否かを検討した。4 週齢の雄性 ICR マウスに 4mg/kg の用量でメチル水銀を毎日投与した。投与 2 週間後、および、4 週間後のマウス聴覚を聴性脳幹反応 (ABR) により測定した。マウスを 40kHz、80dB の音波で刺激し、蝸牛神経 (I 波)、蝸牛神経核 (II 波)、オリブ核 (III 波)、外側毛帯 (IV 波)、及び下丘 (V 波) で生じる誘発電位の遅延時間 (潜時) を測定したところ、メチル水銀投与 2 週間のマウスでは、vehicle 群と違いは認められなかった一方、メチル水銀投与 4 週間のマウスにおいて、I から IV への伝達時間は正常であったが、IV から V への伝達が有意に遅延していた (Fig. 2A)。このとき、V 波の閾値を測定したところ、vehicle 群で 37dB であった一方、メチル水銀投与群では 57dB と、閾値が有意に増大していた (Fig. 2B)。従って、メチル水銀を 4 週間投与すると、聴覚機能に異常が生じることが明らかとなり、この原因部位は下丘であることが示唆された。



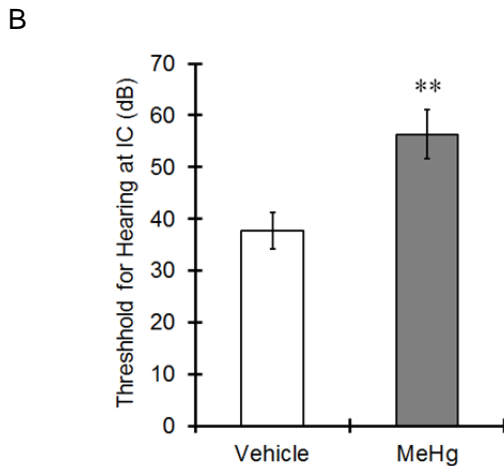


Fig. 2. メチル水銀による聴覚伝導路異常
(A) 波形間の潜時、(B) V 波の閾値

3. マンガン増強 MRI を用いた下丘機能の測定

マンガンイオンは、神経系においてカルシウムイオンと同様の挙動を示し、電位依存的カルシウムチャンネルや NMDA 受容体を介して神経細胞内に流入することが知られている。つまり、神経活動が活発な細胞ほど、多くのマンガンイオンを取り込むことになる。さらに、マンガンイオンは、周囲に存在する水のプロトンの T1 緩和時間を短縮させるため、MRI における T1 強調画像法で撮像すると、マンガンイオンの周囲のシグナルが増強する。従って、塩化マンガン投与後に MRI で撮像すると、神経活動が活発な領域が高信号を示すため、神経活動を可視化することができる⁴。

塩化マンガン投与した後、40kHz で 24 時間聴覚刺激を行ったところ、vehicle マウスにおける下丘の T1 シグナルが増大した。一方、メチル水銀投与マウスの下丘 T1 シグナルは、vehicle と比較して弱かった (Fig. 3)。従って、メチル水銀により、下丘に神経機能異常が生じていることが示唆される。

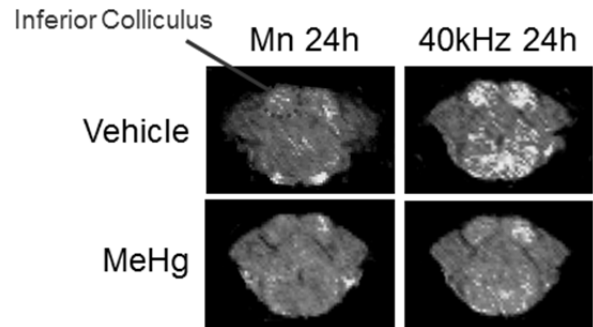


Fig. 3. マンガン増強 MRI による下丘核神経機能異常の測定

4. 下丘の浮腫の評価

メチル水銀により脳浮腫が生じることが報告されている⁵。そこで、MRI と水分含量測定により、細胞性浮腫と血管原生浮腫を評価した。

メチル水銀を 4mg/kg の用量で 4 週間投与し、T2 強調画像、拡散強調画像を測定したところ、下丘核領域において、vehicle 群との差は認められなかった。また、下丘の水分含量についても vehicle 群と変化なかったことから、下丘において浮腫は起こっていないと考えられる。

5. 下丘神経細胞死の評価

次に、メチル水銀による神経細胞死の有無を評価した。メチル水銀を 4mg/kg の用量で 4 週間投与した後、凍結切片を作製し、NeuroTrace によりニューロンを染色し、さらに、TUNEL 染色によりアポトーシス細胞を検出した。

Vehicle 群とメチル水銀処置群において、ニューロンの数に大きな違いはなく、また、ともに TUNEL 陽性細胞は検出されなかった。従って、本研究における投与量、期間では、下丘で細胞死は生じていないと結論した。

6. 下丘におけるグリア細胞の挙動

メチル水銀は、ミクログリアやアストロサイトを活性化して炎症応答を引き起こすことが報告されている⁶。そこで、メチル水銀を 4mg/kg の用量で 4 週間投与した後、凍結切片を作製し、ミクログリアのマーカーである Iba1、および、

アストロサイトのマーカーである GFAP 抗体を用いて免疫染色を行い、また、real-time PCR により、炎症性サイトカインである TNF α と IL-1 β mRNA を測定した。Vehicle 群とメチル水銀投与群において、下丘のミクログリア数、および形態に変化は認められなかった一方、GFAP 陽性の細胞が大きく増加していた (Fig. 4)。このとき、TNF α 、IL-1 β mRNA 量に変化はなかった。従って、メチル水銀は下丘においてアストロサイトを活性化し、すなわち、グリオシスを引き起こすが、このとき、炎症は生じないと考えられる。

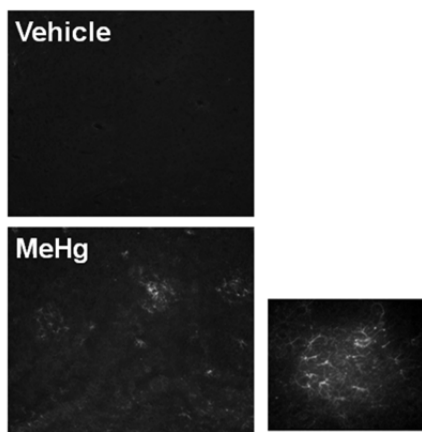


Fig. 4. 下丘の GFAP 染色像

7. 下丘酸化ストレスの聴覚異常への関与

メチル水銀は、ミトコンドリア刺激や細胞外グルタミン酸濃度上昇などを引き起こして、酸化ストレスを惹起することが知られている⁷⁾。そこで、次に、下丘の酸化ストレスを測定した。4mg/kg メチル水銀4週間投与群の下丘において、過酸化脂質量 (チオバルビツール酸反応性物質 (TBARS) 量として測定) が有意に上昇していた。さらに、抗酸化薬である α -トコフェロール

を 300mg/kg/day の用量でメチル水銀と共に投与すると、聴覚異常が改善され、さらに、マンガン増強 MRI で検出された下丘 T1 シグナルの低下が抑制された。従って、メチル水銀により下丘で生じる酸化ストレスは、聴覚異常の一因となっていることが示唆された。

8. 結論

メチル水銀は、マウスの聴覚障害と下丘の神経機能異常を引き起こす。下丘では浮腫や神経細胞死が起きない一方、グリオシスが認められ、酸化ストレスが生じていた。 α -トコフェロールにより酸化ストレスを抑制すると、聴覚障害と下丘の神経機能異常が改善した。従って、メチル水銀により下丘で生じる酸化ストレスは、聴覚障害の一因であると考えられる。今後、酸化ストレス誘導メカニズムやアストロサイトの障害への関与など、より詳細なメカニズムの解析が必要である。

引用文献

- 1) Eto K. Minamata disease, *Neuropathology: official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 20 Suppl S14-19, 2000.
- 2) Takeuchi T. Pathology of Minamata disease. *Acta Pathologica Japonica* 32 Suppl 1 73-99, 1982.
- 3) Bakir et al. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 181 230-241, 1973.
- 4) Itoh et al. The entry of manganese ions into the brain is accelerated by the activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuroscience* 154 732-740, 2008.
- 5) Eto et al. Methylmercury poisoning in common marmosets—a study of selective vulnerability within the cerebral cortex. *Toxicol Pathol* 29 565-573, 2001.
- 6) Shinozaki et al. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. *Sci Rep* 4 4329, 2014.
- 7) Farina et al. Oxidative stress in MeHg-induced neurotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 256 405-417, 2011.

発表 4

メチル水銀による脳微小血管組織の透過性亢進に関わる VEGF 発現誘導メカニズム

○吉田映子（東京理大），鍛冶利幸（東京理大）

1. 目的

メチル水銀は水俣病の原因物質となった環境化学物質であり、ハンター・ラッセル症候群と呼ばれる中枢神経障害を主徴とした毒性を発現することが知られている。そのため、従前より中枢神経系におけるメチル水銀の毒性発現機構の解明研究が盛んに行われてきた。

一方、水俣病患者における病理組織学的に重要な問題として、大脳障害が鳥距溝などの深い脳溝周辺に限局していることが挙げられる。水俣病が公式に報告されてから約 60 年経過した今でも、この病理所見に関する分子基盤は十分に説明されていない。毒性発現機構の解明を目的とした従来の研究では、メチル水銀の作用を理解することは可能であるが、このような毒性発現の局在性を説明することは困難である。

この限局性についての病理仮説として、メチル水銀により初期段階において脳浮腫が形成されることで、深い脳溝周辺組織が特に強く圧迫され、その結果生じる組織障害により神経の脆弱化が起こるという“浮腫仮説”が衛藤らにより提唱されている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が存在する²⁾。

浮腫形成メカニズムは単純ではないが、脳微小血管の機能障害に基づく血管透過性の亢進が、脳浮腫形成の重要な要因であると考えられる。Vascular endothelial growth factor (VEGF) は血管内皮細胞増殖因子であり、血管透過性を亢進させ浮腫形成を促進することが知られている。当研究室の先行研究において、ヒト脳微小血管

周皮細胞において、メチル水銀により VEGF が誘導されることを見出していることから³⁾、メチル水銀による VEGF の発現誘導が脳浮腫形成に深く関与している可能性が示唆される。

本研究の目的は、脳微小血管周皮細胞においてメチル水銀による VEGF 発現誘導機構の分子基盤を明らかにし、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

培養ヒト脳周皮細胞をメチル水銀で処理し、VEGF mRNA 発現を Real-Time RT-PCR 法、VEGF タンパク質発現量を ELISA 法により検討した。また、細胞内 cAMP を増加させる agents として forskolin, IBMX, および PGE₁ を用いた。さらに、周皮細胞において、メチル水銀による EGFR, ERK1/2, p38 MAPK および JNK のリン酸化をウエスタンブロット法にて検出した。また、アデニル酸シクラーゼ阻害剤として SQ22536, PKA 阻害剤として H89, EGFR 阻害剤として PD153035, p38 MAPK 阻害剤として SB203580, COX-2 阻害剤として NS398 を用いた。

3. 結果

メチル水銀に曝露した周皮細胞において、濃度依存的な VEGF mRNA レベルの上昇、および VEGF タンパク質の発現誘導が認められた。VEGF の発現誘導には細胞内 cAMP の増大が関与することから、細胞内 cAMP を増加させる agents を処理すると、メチル水銀単独で曝露した場合と比較して、

高濃度の agents によりメチル水銀による VEGF mRNA レベルの上昇が抑制された。さらに、アデニル酸シクラーゼおよび cAMP 依存性タンパク質リン酸化酵素である PKA の阻害剤を処理し、VEGF mRNA の変動を検討した結果、メチル水銀による VEGF mRNA レベルの上昇が抑制された。これらの結果より、メチル水銀は cAMP/PKA 経路の活性化を介して VEGF を誘導することが示された。

一般に COX-2/プロスタサイクリン経路は MAPK により誘導され、その特異的な受容体を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内の cAMP が増加する⁴⁾。当研究室では、メチル水銀が周皮細胞において COX-2 を誘導し、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) の合成が促進されることを見出している。そこで、COX-2 誘導の上流を検討したところ、メチル水銀より EGFR が活性化され、その結果 p38 MAPK のリン酸化が促進し、それによって COX-2 が誘導されることが明らかとなった。次に、各シグナル因子とメチル水銀による VEGF 発現誘導の関連性を検討するため、EGFR、p38 MAPK、COX-2 阻害剤を前処理し VEGF mRNA 発現を検討した。その結果、各阻害剤によりメチル水銀による VEGF mRNA レベルの上昇が有意に抑制された。これらの結果から、メチル水銀は EGFR/p38 MAPK/COX-2 シグナルにより VEGF を誘導することが明らかとなった。

4. 考察

以上の結果を総合すると、ヒト脳微小血管周皮細胞において、メチル水銀は EGFR/p38 MAPK/COX-2 シグナルに介在される cAMP/PKA 経路の活性化により VEGF を誘導することが示された。

VEGF は、その特異的な受容体である VEGFR-1/-2 を介して強力に血管透過性を亢進させる因子であり、浮腫形成を促進することが知られている。また当研究室では、メチル水銀により内皮細胞の VEGFR-1/-2 の発現が上昇することを見出しており、メチル水銀による脳浮腫形成には VEGF システムの亢進が関与している可能性を提示している³⁾。従って、メチル水銀は、周皮細胞において、EGFR/p38 MAPK/COX-2 シグナルに介在される cAMP/PKA 経路の活性化により VEGF の発現を誘導し、内皮細胞においては、VEGFR-1/-2 の発現を上昇させることにより、脳微小血管組織における VEGF システムが亢進し、血管透過性が上昇すると考えられる。

また、COX-2 により合成された PGI₂ および PGE₂ も同様に、血管透過性を亢進させ、炎症性浮腫を引き起こすことから⁶⁾、EGFR/p38 MAPK シグナルの活性化による COX-2 の誘導は、PGI₂/PGE₂ の合成を促進し、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示唆される。

水俣病の公式発表から半世紀以上が経過し、これまでの研究により様々な知見が得られてきた。しかしながら、それらの研究のほとんどは神経細胞を標的としたものであり、メチル水銀による大脳の深い脳溝周辺に局所的な傷害を惹起する分子メカニズムの解明には至っておらず、メチル水銀による脳浮腫形成メカニズムには不明な点が多く残されていた。メチル水銀による VEGF システムを介した浮腫形成メカニズムを解明することは、水俣病患者の病理組織において深い脳溝周辺に限局する大脳障害を理解する上で重要である。本研究により、メチル水銀に曝露されたヒト脳微小血管周皮細胞において、EGFR/p38 MAPK/COX-2 シグナルに介在される

cAMP/PKA 経路の活性化により VEGF を誘導し、血管の透過性が向上することが示唆された。本メカニズムは、浮腫仮説の分子基盤を構成し、メチル水銀による局所的な大脳障害を解明する上で有用な知見であると考えられる。

引用文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozecki T, Tokunaga H, Kaneko Y. (2001) *Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-573.
- 2) Klatzo I. (1967) *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **26**, 1-14.
- 3) Hirooka T, Yamamoto C, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2013) *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 837-845.
- 4) Höper MM, Voelkel NF, Bates TO, Allard JD, Horan M, Shepherd D, Tuder RM. (1997) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **17**, 748-56.
- 5) Norata GD, Callegari E, Inoue H, Catapano AL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **24**, 871-877.
- 6) Williams TJ. (1979) *Br J Pharmacol.*, **65**, 517-24.

発表 5

水銀トランスポーター (MerC, MerE, MerF, MerT) の水銀輸送について

○曾根有香、清野正子 (北里大学薬学部)

1. 背景及び目的

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。菌体外の無機水銀 (Hg^{2+}) は細胞間隙に存在する水銀結合タンパク質 MerP に結合した後、内膜に存在する水銀トランスポーター MerT により菌体内に取り込まれ、レダクターゼである MerA により還元され、金属水銀 (Hg^0) となり菌体外に放出される。水銀耐性菌から同定された水銀トランスポーターは MerT 以外にも MerC, MerE, MerF が存在する。MerE は無機水銀輸送活性の他にメチル水銀を、MerT はフェニル水銀をそれぞれ輸送することが明らかにされている^{1),2)}。しかし、これらのトランスポーターの機能については未だ不明な点が多く残されている。

本研究では、4 種の水銀トランスポーター MerC, MerE, MerF, MerT の無機水銀、フェニル水銀及びメチル水銀に対する輸送活性について検討することを目的とする。

2. 方法

Pseudomonas K-62 由来の plasmid pMR26 上の水銀調節遺伝子 (*merR-o/p*) の下流に plasmid R100 由来の *merC* または *merE*, pMER327/419 由来の *merF*, pMR26 由来の *merT* 遺伝子をそれぞれ結合させた遺伝子を pKF19k vector に組換え、plasmid pC7, pE4, pF17, pT5 を構築した。各 plasmid をそれぞれ大腸菌 XL1-Blue に形質転換した MerC,

MerE, MerF, MerT 組換え株を作製し、抗 MerC, MerE, MerF または MerT 抗体をそれぞれ用いて、遺伝子産物の菌体内における局在を Western blot 法により検討した。

また、各遺伝子組換え株の無機水銀 (Hg^{2+})、フェニル水銀 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$) 及びメチル水銀 (CH_3Hg^+) に対する耐性及び取り込みについて検討した。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。 Hg^{2+} , $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ 及び CH_3Hg^+ に対する耐性は Growth curve 法により、 Hg^{2+} 及び $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ 取り込みは還元気化原子吸光光度法により、 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測定した。

3. 結果

MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株において、 Hg^{2+} 存在下、各遺伝子産物はそれぞれ粗抽出画分及び膜画分において検出された (Fig. 1)。

Hg^{2+} に対して、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株はコントロールに比べ耐性がそれぞれ低下し、 Hg^{2+} 取り込み量が有意に上昇した。MerC 及び MerT 組換え株の耐性低下及び取り込みの上昇が MerE 及び MerF 組換え株に比べて顕著であった (Fig. 2AB)。 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ に対して、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株はコントロールに比べ耐性がそれぞれ有意に低下し、 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ 取り込み量が有意に上昇した。また、それらの取り込み量はほぼ同等であった (Fig. 2CD)。 CH_3Hg^+ に対して、MerC, MerE, MerF, MerT 組換え株はコントロールに比べ耐性がそれぞれ有意に低下し、 CH_3Hg^+ 取り込み量が有意に上昇した。中でも、MerC 組換え株の耐性低下及び取り込み

量の上昇がより顕著であった (Fig. 2EF)。

4. 考察

細胞内画分を分画した Western blot の結果より、各 Mer タンパク質 は細胞膜に局在すると考えられた (Fig. 1)³⁾。MerC, MerE, MerF または MerT を持つ大腸菌の Hg^{2+} , $C_6H_5Hg^+$ 及び CH_3Hg^+ 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. 2)³⁾。以上の結果から、MerC, MerE, MerF および MerT はそれぞれ Hg^{2+} , $C_6H_5Hg^+$ 及び CH_3Hg^+ を取り込むトランスポーターであることが示唆された。MerE の CH_3Hg^+ 輸送活性については過去に明らかにしたが、本研究により MerC, MerF, MerT が CH_3Hg^+ 輸送活性を持つ可能性を初めて明らかにした。また、MerT は $C_6H_5Hg^+$ 輸送活性を持つことが知られていたが、MerC, MerE, MerF が MerT と同等の輸送活性を持つ可能性が初めて明らかとなった。

今回得られた知見から、MerE, MerF, MerT, MerC いずれも Hg^{2+} , $C_6H_5Hg^+$ 及び CH_3Hg^+ のバイオレメディエーションに適用できる可能性が示唆された。この中でも活性の高い MerC が最も有力な候補因子であると考えられた。

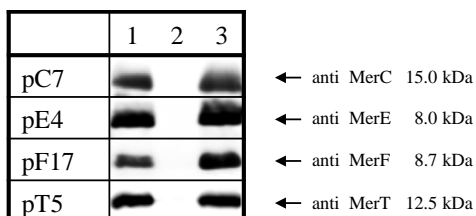


Fig. 1 Western blot analyses of the four proteins. The crude cell extracts (lane 1), soluble fractions (lane 2), and membrane fractions (lane 3) of the transformant strains containing plasmids pC7, pE4, pF17, and pT5 were analyzed using anti-MerC, anti-MerE, anti-MerF, and anti-MerT polyclonal antibodies. *E. coli* XL1-Blue cells containing the plasmids pC7, pE4, pF17, or pT5 were generated and grown with $Hg(II)$. The arrows indicate MerC (15.0 kDa), MerE (8.0 kDa), MerF (8.7 kDa), and MerT (12.5 kDa).

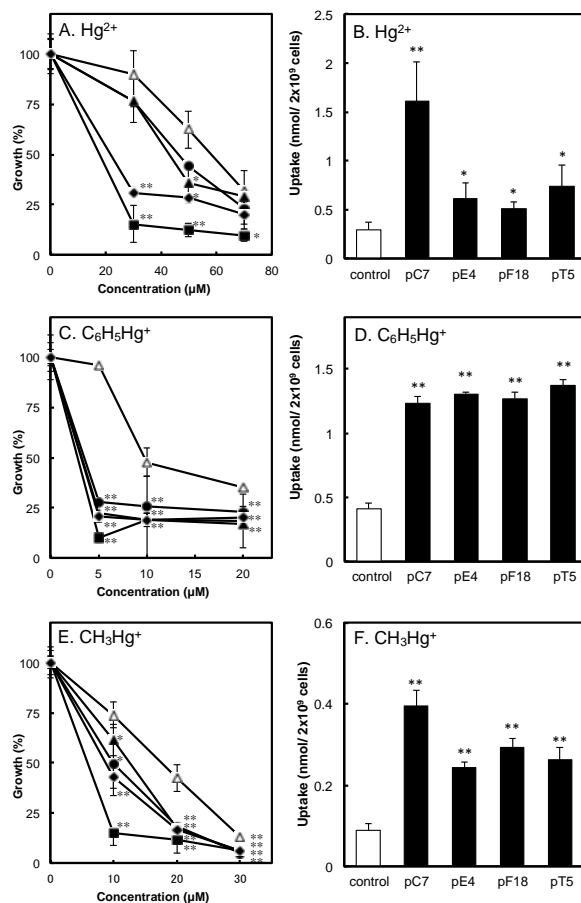


Fig. 2 the bacterial susceptibility to Hg^{2+} (A), $C_6H_5Hg^+$ (C) or CH_3Hg^+ (E) and the bacterial uptake of Hg^{2+} (B), $C_6H_5Hg^+$ (D) or $^{14}CH_3Hg^+$ (F). *E. coli* XL1-Blue with vector (Δ), pC7 (\blacksquare), pE4 (\bullet), pF17(\blacktriangle) or pT5 (\blacklozenge) was grown, prepared 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).

引用文献

- 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) Uno Y, Kiyono M, Tezuka T, Pan-Hou H. Phenylmercury transport mediated by *merT-merP* genes of *Pseudomonas* K-62 plasmid pMR26. *Biol Pharm Bull* 20: 107-109 1997
- 3) Sone Y, Nakamura R, Pan-Hou H, Itoh T, Kiyono M. Role of MerC, MerE, MerF, MerT, and/or MerP in resistance to mercurials and the transport of mercurials in *Escherichia coli*. *Biol Pharm Bull* 36: 1835-1841 2013

発表 6

胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 84 ヶ月時の言語能力に及ぼす影響

○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

メチル水銀の胎児期曝露の健康影響を検証したコホート調査に、フェロー諸島で進められてきた小児発達コホート調査¹⁾がある。ここでは、917名の7歳児を対象として言語能力を測定する Boston Naming Test (BNT)²⁾が実施された。出産時の母親毛髪総水銀濃度（中央値 $4.3 \mu\text{g/g}$ ）が高くなるにつれて、BNTの得点が低下し、胎児期メチル水銀曝露が出生児の言語能力に影響を及ぼす可能性が示唆された。この結果から、BNTはメチル水銀の曝露影響を評価する上で鋭敏な指標であると報告された。

日本人は、メチル水銀の主な曝露源である魚介類を多食することから、我が国におけるメチル水銀等の魚介類由来の化学物質曝露に起因した健康影響が懸念された。そこで、胎児期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）³⁾を進めてきた。本研究では、フェロー諸島で進められている小児発達コホート調査を参考に、メチル水銀曝露が生後84ヶ月（7歳）時の言語能力に及ぼす影響を調べることにした。言語能力を調べるためにBNTを用い、曝露指標には臍帯血総水銀および臍帯血ポリ塩化ビフェニル（PCB）を用いた。交絡要因もフェロー諸島の小児発達コホート調査と同様の変数を用いて再現性を検証した。

2. 方法

2-1. 対象者

TSCDでは、同意が得られた599組の母親と出生児を登録した。登録された出生児が生後84ヶ月時にBNTを実施した。生後84ヶ月時の調査には、455組の母子が参加した（参加率76.0%）。

2-2. 調査内容

BNTは1983年に開発された言語能力を測定する検査である。白黒の線で描かれた絵の名称を対象児に回答させるものであり、全60問から構成される。その手続きは、まず対象児に絵を提示し、制限時間（20秒）内に正答が得られれば次問に進む。得点範囲は0~60点となり、得点が高い場合に言語能力が高いと判断される。

2-3. 生体試料と曝露指標

臍帯血全血の総水銀は原子吸光光度法、臍帯血PCBは高分解能ガスクロマトグラフ質量分析で測定した。

2-4. 交絡要因

子どもの性別、出生順位はカルテから転載した。妊娠中の飲酒歴および喫煙歴は自記式質問票により情報収集した。対象児が生後18ヶ月時に母親の推理能力を測定するためにRaven's Standard Progressive Matrices (RSPM)⁴⁾を実施した。生後84ヶ月調査時に対象児の身長を測定した。

2-5. 統計学的解析

BNTで得られた得点と曝露指標との関連性は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 20.0 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 375 組の母子を解析の対象とした。対象母子の基本属性および BNT の得点を表 1、曝露レベルを表 2 に示す。

表 1 対象母子の基本属性および BNT の得点

	Average	SD	%
子どもの性別 (% 男児)			50.7
出生順位 (% 第一子)			48.5
妊娠中の飲酒歴 (% 有)			32.5
妊娠中の喫煙歴 (% 有)			8.1
RSPM* の得点	52.2	6.5	
調査時の対象児身長 (cm)	119.8	9.8	
BNT の得点	29.0	5.8	
検査時の月齢 83.4ヶ月 (SD 6.3)			

*Raven's Standard Progressive Matrices

表 2 曝露レベル

	Median	5%ile	95%ile
臍帯血総水銀 (ng/g)	9.9	4.3	22.3
出産時の母親毛髪総水銀 (μ g/g)	2.0	1.0	4.2
調査時の対象児毛髪総水銀 (μ g/g)	2.1	0.7	4.8
臍帯血PCB (ng/g-wet)	0.1	0.0	0.3

3-1. BNT の得点と曝露指標との関連性

BNT の得点と曝露指標との関連性を Pearson の積率相関係数および Spearman の順位相関係数から検討した (表 3)。Pearson の積率相関係数の結果をみると、いずれも統計学的に有意な関連性は認められなかった。一方、Spearman の順位相関係数の結果をみると、臍帯血総水銀と BNT の得点との間に有意な負の関連性が示された。これは、臍帯血総水銀の濃度が高い場合に BNT の得点が低くなると解釈される。一方、出産時の母親毛髪総水銀および調査時の対象児毛髪総水銀と BNT の得点との間には有意な関連性はみられなかった。

なお、臍帯血 PCB では統計学的に有意な関連性は観察されなかった。

表 3 BNT の得点と曝露指標 (単相関)

	Pearson r	p値	Spearman ρ	p値
臍帯血総水銀	-0.082	0.112	-0.109	0.035
出産時の母親毛髪総水銀	-0.078	0.131	-0.098	0.057
調査時の対象児毛髪総水銀	-0.015	0.777	-0.013	0.799
臍帯血PCB	0.086	0.096	0.100	0.053

3-2. BNT の得点と関連のある要因の検討

BNT の得点を従属変数、曝露指標および交絡要因を独立変数とした重回帰分析 (強制投入法) を実施した (表 4)。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。出生順位、妊娠中の飲酒歴ならびに RSPM の得点で有意な関連性が認められた。このとき、調査時の対象児毛髪総水銀については、単相関分析で BNT の得点との関連性が示されなかったため、多重共線性に配慮し、解析からは除外した。

表 4 重回帰分析の結果 (全対象児)

調整済R ²	0.102 p<0.001	
	標準化 β	p値
子どもの性別	0.034	0.500
出生順位	-0.150	0.004
妊娠中の飲酒歴	-0.128	0.010
妊娠中の喫煙歴	0.030	0.549
RSPM* の得点	0.247	<0.001
調査時身長	0.065	0.219
臍帯血総水銀	-0.083	0.099
臍帯血PCB	0.085	0.100

交絡要因: テスター、月齢、PCBの分析社
*Raven's Standard Progressive Matrices

3-3. 出生順位で層別した解析結果

出生順位は BNT の得点と関連が確認されたことから、出生児が第一子か、それ以降かで層別して重回帰分析を行った (表 5)。その結果、第一子のみで解析した場合、臍帯血総水銀と BNT の得点との間に負の関連性が示された。一方、第一子以降の対象児

のみを対象として解析した場合には曝露指標と BNT の得点との間に有意な関連性は示されなかった。

表 5 重回帰分析の結果（出生順位で層別）

調整済R ²	第一子 (n=193)		それ以降 (n=182)	
	標準化β	有意確率	標準化β	有意確率
子どもの性別	0.034	0.635	0.043	0.566
妊娠中の飲酒歴	-0.177	0.012	-0.067	0.363
妊娠中の喫煙歴	-0.008	0.906	0.065	0.389
RSPM*の得点	0.173	0.018	0.285	<0.001
調査時身長	0.121	0.112	0.034	0.666
臍帯血総水銀	-0.161	0.024	-0.008	0.914
臍帯血PCB	0.072	0.322	0.115	0.129

その他の交絡要因：テスター、月齢、PCBの分析社

*Raven's Standard Progressive Matrices

4. 考察

本研究では、胎児期におけるメチル水銀曝露が出生児の言語能力に及ぼす影響について検証した。その結果、対象児の出生順位が第一子の場合に、メチル水銀曝露が高いと言語能力が低下することが示された。フェロー諸島で進められているコホート調査の結果では出生順位にかかわらずメチル水銀は言語能力に影響を及ぼすことが示されており、一部で再現性が確認された。再現性が確認できなかった部分に関する理由として、フェロー諸島のコホート調査対象者（出産時の母親毛髪総水銀濃度の中央値 $4.3 \mu\text{g/g}$ ）と本コホート調査対象者（出産時の母親毛髪総水銀濃度の中央値 $2.0 \mu\text{g/g}$ ）のメチル水銀曝露レベルの違いが考えられた。一方、BNT の得点に最も大きな影響をもたらす要因が RSPM の得点である点については一致した結果が得られた。

本コホート調査では、臍帯血中の鉛やセレンの濃度についても測定してきた。そこで、これらの影響も考慮して解析を行ったが、第一子においてメチル水銀曝露が高い場合に言語能力が低下するという結果は変

わらなかった。第一子のみで負の影響が観察されているが、その理由については今後検討する必要があるだろう。

以上より、胎児期におけるメチル水銀曝露は言語能力に影響を及ぼす可能性が示唆されたとともに、BNT がメチル水銀の曝露影響を検証する鋭敏な指標であると思われる。言語能力は、子どもの育つ環境の影響を最も大きく受けることが知られていることから、今後の子どもの言語能力にメチル水銀曝露が及ぼす影響を検証していきたい。

引用文献

- 1) Grandjean P., et al.: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology* 19, 417-428, 1997.
- 2) Kaplan E., et al.: *The Boston Naming Test* (2nd ed.). Philadelphia: Lea & Febiger. 1983.
- 3) Nakai K, et al.: The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202, 227-237, 2004.
- 4) Raven JC.: *Standard Progressive Matrices: Sets A, B, C, D and E*. London, Lewis. 1958.

発表 7

周産期のメチル水銀および POPs の混合曝露マウスにおける育児および神経行動発達への影響

○岩井美幸、永沼章（東北大学・院・薬・生体防御薬学）、龍田希、仲井邦彦（東北大学・院・医・発達環境医学）、黒川修行（宮城教育大学）、佐藤洋（東北大学・名誉教授）

1. 背景

現在の環境汚染物質曝露は、食品等を介した多種類かつ低濃度の化学物質による混合曝露である。そのため単独の化学物質曝露とは異なる相加・相乗的な影響が懸念される。特に、魚が主要な曝露源であるメチル水銀とポリ塩化ビフェニル(PCB)は共に神経毒性をもち、感受性の高い胎児および乳児への複合曝露影響が懸念される。両物質の複合曝露に関して、相加・相乗的な影響があるとする報告(Bemis et al., 1999; Roegge et al., 2004)がある一方で、必ずしもそうでないとする報告(Widholm et al., 2004; Coccini et al., 2006)もある。本発表者は、これまでにメチル水銀と PCB との複合曝露影響に関する研究を進めてきた。両物質に同時曝露させた親から生まれたマウスを用いて実施した神経行動学的試験において、相加・相乗的な影響ではなく、打ち消し合うような影響が認められた(Sugawara et al., 2008)。そこで本研究では、メチル水銀と、ヒトの曝露実態を反映させるためにクジラの脂肪分を用いて環境残留性の高い PCB を含めた残留性有機汚染物質(POPs)との周産期混合曝露を行い、神経行動学的影響について検討した。

2. 方法

2-1. 曝露油および飼料の作製

曝露油は、混獲等により得た歯クジラ類の6個体から油をとった後、各々POPs分析を実施した。そのうち、汚染度の高い油を

高 POPs 油とし、汚染度の低い油を低 POPs 油、対照群として大豆油を使用した。飼料は、AIN93G（妊娠・泌乳用,オリエンタル酵母工業株式会社）に含有される大豆油を抜いた粉末に、それぞれ該当する油を混ぜ曝露飼料とした。メチル水銀の曝露を実施する群ではメチル水銀を餌中に 1mg/kg (as Hg)になるように添加した。

2-2. 実験群の設定

妊娠マウス C57BL/6NCr（日本エスエルシー社,在胎1日目）を用いた。実験群は、POPs 曝露の高低、メチル水銀曝露の有無の関係から、対照群（大豆油:CL）、大豆油+メチル水銀(CL+Hg)、低 POPs (LP)、低 POPs +メチル水銀(LP+Hg)、高 POPs (HP)、高 POPs +メチル水銀(HP+Hg)の6群を設定した。胎児期曝露を反映した出産日(生後0日目;PND 0),授乳期を反映した離乳時のPND21に母仔をセットで解剖した。PND3に1腹あたり4-6匹になるように間引きを行った。なお、動物実験は、東北大学より承認を得て実施した。

2-3. 離乳前発達試験

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

2-4. 神経行動学的試験

神経行動学的試験は PND28 に達した時点で、open field test (情動)を午前11時から午後14時の間に1機会実施した。Water maze test(学習記憶)は、PND30-35に行い、

初日は遊泳練習、次の日から5日間1日3回のトレーニングを実施し学習を評価した。

2-5. 化学分析

飼料について基本成分、総水銀、POPsの分析を実施した。総水銀分析は還元気化原子吸光光度法にて測定した。POPs分析については、高度な設備の面から、いであ株式会社への委託分析とした。マウス試料のPOPs分析は、総PCB濃度の60~70%相当となる15種の異性体に限定して実施した(対象異性体:#28、#74+#61、#99、#118、#138、#153、#170、#180+#193、#187+#182、#194、#196+#203)。DDTとその代謝物については、p,p'-DDEに限定して分析を行った。また育児指標としてプロラクチンをELISA法により分析した。試料は分析に供するまで-80°Cで保管した。

2-6. 統計解析

離乳前発達試験の成功率や神経行動学試験結果について、ロジスティック回帰分析および分散分析により解析を行った。統計学的有意水準は5%とした。

3. 結果

3-1. 曝露飼料

本研究で使用した飼料の基本成分は表1に、飼料中総水銀およびPOPs濃度について表2および3にそれぞれ記載した。

表1. 飼料の基本成分

実験群	添加油	MeHg添加	油由来POPs	水分%	粗蛋白質%	粗脂肪%	粗繊維%	粗灰分%	熱量kcal/100g
CL	大豆油	-	-	20.8	14.6	4.8	1.2	2.2	374
CL+Hg	大豆油	+	-						
LP	カマイルカ	-	低	21.1	15.1	4.8	0.9	2.2	369
LP+Hg	カマイルカ	+	低						
HP	スナメリ	-	高	17.6	15.6	4.9	0.9	2.2	385
HP+Hg	スナメリ	+	高						

表2. 飼料の総水銀濃度

実験群	総水銀濃度	
	(ng/mg-wet)	(ng/mg-dry)
CL	N.D.	N.D.
CL+Hg	0.88±0.01	1.10±0.01
LP	N.D.	N.D.
LP+Hg	0.79±0.01	1.00±0.01
HP	N.D.	N.D.
HP+Hg	0.79±0.01	0.97±0.01

表3. 飼料のPOPs濃度

		CL/CL+Hg	LP/LP+Hg	HP/HP+Hg
		(μg/g-wet)	(μg/g-wet)	(μg/g-wet)
PCBs	Total MoCBs	N.D.	N.D.	N.D.
	Total DiCBs	0.00	0.00	0.00
	Total TrCBs	N.D.	0.00	0.01
	Total TeCBs	N.D.	0.01	0.18
	Total PeCBs	N.D.	0.02	0.38
	Total HxCBs	0.00	0.04	0.89
	Total HpCBs	0.00	0.02	0.37
	Total OcCBs	N.D.	0.01	0.07
	Total NoCBs	N.D.	0.00	0.00
	DeCB	N.D.	0.00	0.00
	Total PCBs	0.00	0.09	1.90
Chlordanes	cis-Chlordane	N.D.	0.00	0.01
	trans-Chlordane	N.D.	0.00	0.00
	oxychlordane	N.D.	0.00	0.11
	cis-Nonachlor	N.D.	0.00	0.15
	trans-Nonachlor	0.00	0.01	0.53
DDTs	o,p'-DDD	N.D.	0.00	0.00
	p,p'-DDD	N.D.	0.01	0.06
	o,p'-DDE	N.D.	0.00	0.01
	p,p'-DDE	0.00	0.04	0.94
	o,p'-DDT	N.D.	0.01	0.01
	p,p'-DDT	N.D.	0.02	0.01
	p,p'-DDE d8	0.00	0.00	0.09
Drins	Aldrin	N.D.	N.D.	0.00
	Dieldrin	N.D.	0.00	0.06
	Endrin	N.D.	0.00	0.00
Heptachlor	Heptachlor	N.D.	N.D.	0.00
	trans-Heptachlorepoxyde	N.D.	N.D.	N.D.
	cis-Heptachlorepoxyde	N.D.	0.00	0.01
HCB	α-HCH	0.00	0.00	0.01
HCH	α-HCH	N.D.	0.00	0.00
	β-HCH	N.D.	0.00	0.06
	γ-HCH	N.D.	0.00	0.00
	δ-HCH	N.D.	N.D.	N.D.
Mirex		N.D.	0.00	0.00
Toxaphene	parlar-26	N.D.	0.00	0.00
	parlar-41	N.D.	0.00	0.00
	parlar-40	N.D.	0.00	N.D.
	parlar-44	N.D.	0.00	0.00
	parlar-50	N.D.	0.00	0.00
	parlar-62	N.D.	0.00	0.00
	Total POPs	0.00	0.19	3.97

3-2. 出産・育児に関する影響

出産および育児に関する結果を表4に示した。HP群で顕著な食仔および育児放棄が観察され、プロラクチンレベルの低下も観察された(P<0.05)。

表4. 出産・育児への影響

ブラグ確認	出産 (%)	PO解剖 (%)	育児 (%)	食仔放棄
CL	42 (43)	5	12 (67)	1
CL+Hg	34 (41)	6	5 (36)	4 ^a
LP	37 (46)	6	8 (67)	3
LP+Hg	23 (52)	5	7 (58)	1 ^a
HP	42 (48)	5	5 (25)	10 [*]
HP+Hg	26 (50)	5	7 (54)	1

^aPO解剖時に育児放棄もみられた個体があった。
^{*}P<0.05

3-3. 離乳前発達試験

発達試験項目の中で統計学的な有意差が検出されたのは、眼瞼開裂、背地走性、握り反射、断崖回避であった。そのなかで、特に眼瞼開裂については、CLに対してHP群の発達の遅延が認められた。

3-4. 神経行動学試験

オープンフィールド試験における糞尿の数ともに各群間に有意な差は認められなかった。潜時は、雄で高POPs曝露があった場合に長くなった。

水迷路試験では、遊泳距離および移動速度に有意な差はみられなかった。プラットフォームへの到達時間において、雄でメチル水銀の曝露があった場合に遅延が認められた。

3-5. 総水銀および POPs の脳内濃度

脳内の総水銀および POPs 濃度を表 5 および 6 に示す。生後 0 日目の脳は、メチル水銀曝露がある場合に 1000-1600ng/g 前後であった。離乳時の脳内 PCB および DDE 濃度はメチル水銀の曝露があった場合に有意に高くなった。

表5. 脳内総水銀濃度 (ng/g)

母仔	生後	CL	CL+Hg	LP	LP+Hg	HP	HP+Hg
母	PND0	0.3±0.6 (5)	689±18 (3)	N.D. (5)	953±105 (5)	0.9±0.6 (4)	1028±105 (4)
仔	PND0	N.D. (5)	1052±320 (7)	N.D. (5)	1606±214 (10)	N.D. (4)	1656±91 (7)
母	PND21	N.D (6)	2333±48 (5)	N.D (6)	2293±41 (7)	N.D (3)	2433±54 (4)
仔	PND21	雄	N.D.(2)	242±21 (4)	N.D. (5)	240±19 (5)	N.A. 196±25 (3)
		雌	N.D. (3)	265±24 (3)	N.A.	186±18 (5)	N.D. (3) 183±24 (3)
仔	8週	雄	N.A.	10.8±1.8 (4)	N.A.	13.2±1.6 (5)	N.A. 12±1.6 (5)
		雌	N.A.	23±3.1 (5)	N.A.	22±3.4 (4)	N.A. 17±3.1 (5)

Mean±S.D. (n), N.D.; 検出限界以下, N.A.; 分析せず.

表6. 脳内PCBおよびp,p'-DDE濃度 (ng/g)

生後	母仔	PCB異性体の合計 (ng/g)		p,p'-DDE (ng/g)	
		HP	HP+Hg	HP	HP+Hg
PND0	母	467±61	590±89	80±8.4	97±6.7*
	仔	180±42	213±38	42±4.0	53±6.0*
PND21	母	255±19	268±33	50±4.8	53±7.0
	仔	968±188	1039±60*	213±62	323±3.9*

Mean±S.D., n=3-4, *p<0.05, HP vs. HP+Hg

4. 考察

本研究は、ヒトの曝露実態を反映すべく食物連鎖の上位にいる歯クジラ類の油を用いて POPs の曝露影響を検証し、なおかつ共に魚が主な曝露源となるメチル水銀との複合曝露影響にも焦点をあて、感受性の高い胎児期および授乳期における混合曝露の神経発達への影響を、マウスを用いて検討したものである。

その結果、空間学習面ではメチル水銀の影響を観察した一方で、発達や情動面への影響を顕著に示したのは HP(高 POPs)群であった。詳細なメカニズムは不明であるが、HP+Hg 群では HP 群で認められた影響が観察されなかった。本研究に先行して実施された Sugawara らのメチル水銀と PCB の複

合曝露でも情動面において打ち消し合うような現象が観察されており、この先行研究を支持する結果が示された。我々はメチル水銀と PCB の複合曝露下では、仔の PCB 蓄積量が増加することを報告(Iwai-Shimada et al., 2013)しているが、本研究でも僅かながら、HP+Hg 群で PCB および DDE 濃度の上昇が観察された。多種類の化学物質曝露があった場合、それらの仔への移行量が増す可能性が考えられ、今後更なる検討が必要である。

引用文献

- 1) Bemis JC, Seegal RF (1999) Polychlorinated biphenyls and methylmercury act synergistically to reduce rat brain dopamine content in vitro. *Environ. Health Perspect.* 107, 879-885.
- 2) Roegge CS., et al (2004) Motor impairment in rats exposed to PCBs and methylmercury during early development. *Toxicol. Sci.* 77, 315-324.
- 3) Widholm JJ., et al (2004) Spatial alteration deficits following developmental exposure to Aroclor 1254 and/or methylmercury in rats. *Toxicol. Sci.* 82, 577-589.
- 4) Coccini T., et al (2006) Effects of developmental co-exposure to methylmercury and PCB153 on cholinergic muscarinic receptors in rat brain. *Neurotoxicol.* 27, 468-477
- 5) Sugawara N., et al (2008) Effects of perinatal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls on neurobehavioral development in mice. *Arch Toxicol.* 82, 387-97.
- 6) Iwai-Shimada., et al(2013) Increase in accumulation of polychlorinated biphenyls in mouse brain via maternal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls. *J. Toxicol. Sci.* 38, 689-696.

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。