

課題名	R F - 0 8 5 やんばる生態系をモデルとした水銀の生物蓄積に関する研究		
課題代表者名	渡邊 泉（東京農工大学大学院共生科学技術研究院環境毒性学研究室）		
研究期間	平成20年度	合計予算額	9,100千円 ※上記の予算額には、間接経費2,100千円を含む
研究体制	<p>研究体制</p> <p>(1) 水銀代謝機構の解析（鹿児島大学）</p> <p>(2) 野生動物の初代肝細胞培養系の確立（琉球大学）</p> <p>(3) 生態系の水銀動態に関する解析（東京農工大学）</p>		
研究概要	<p>研究概要</p> <p>1. 序</p> <p>近年、東アジアの発展にともなう越境大気汚染の存在が指摘されている。とくに、産業に多用され残留性の高い重金属類は、低品質石炭の燃焼で水銀やヒ素などが負荷されている可能性が懸念される。我が国の南部に位置する南西諸島は、絶滅危惧種ヤンバルクイナなどを含めた希少な固有種が多種生息する貴重な生態系を有する。しかし一方で、越境汚染をこうむる地理的条件を備えることから、その把握は急務であると考えられた。</p> <p>これまで、我々の研究チームは、奄美大島および沖縄島に分布拡大をつづける侵略的移入種ジャワマンダースが、その体内に高濃度で水銀を蓄積する現象を明らかにした。このことは、少なくとも両島に蓄積されうる水銀が存在することを示唆している。しかし、沖縄島北部森林地帯、通称やんばる地域の生態系の構成種の多くについて水銀蓄積性に関する情報は未把握の状態であった。これらの背景から、「やんばる生態系の特徴」は化学汚染を考慮した生態系保全のモデル・ケースとして適していると考えられた。</p> <p>また、ジャワマンダースでみられた水銀の高蓄積は幾つもの未解明課題が存在した。まず、その曝露経路が不明であり、さらに水銀の蓄積メカニズム・無毒化メカニズムが特殊である可能性が考えられた。海生哺乳類などで報告されながら、未だ不明な点が多い野生動物の水銀濃縮に関して陸生哺乳類のジャワマンダースは貴重なモデル動物になりうると期待された。</p> <p>2. 研究目的</p> <p>沖縄島北部（やんばる地域）に生息し、最終的にジャワマンダースまで到達する生態系構成種がどのような水銀蓄積を示しているか現状把握を行うことを目的とした。とくに、ヤンバルクイナやノグチゲラ、オキナワトゲネズミ、ケナガネズミなど絶滅危惧種の水銀蓄積の状況を明らかにする。そのデータを用いジャワマンダースに高蓄積している水銀の濃縮経路を特定するとともに、やんばる生態系における水銀の動態・物質循環を把握する。</p> <p>また、ジャワマンダースの初代肝細胞培養の確立と水銀代謝機構の解析も目的とした。これまで海鳥類やクジラ類で認められている高い水銀の無毒化能力は半世紀近く未解明のままである。陸生哺乳類で顕著な同様のメカニズムを有するジャワマンダースの蓄積・解毒機構の解明は、その突破口になりうると考えられた。本研究は、これまでほとんど行われていない野生動物の初代肝細胞培養系を構築し、解毒メカニズムの解明を目指すことを目的とした。</p>		

### 3. 研究の方法及び結果

#### (1) 水銀代謝機構の解析

ジャワマングース肝初代培養細胞および対照としてラット肝初代培養細胞にメチル水銀、塩化水銀およびセレンを24時間暴露させ、これらの重金属に対する抵抗性を比較検討した。すなわち、マングースおよびラットの肝細胞を96ウェルのディッシュの各ウェルに細胞数を2000に合わせて播き、一晚培養後、培地を交換してメチル水銀MeHg (1、5、10、15、20、30、50  $\mu$ M)、塩化水銀(5、10、40、100、200、300、500  $\mu$ M)、およびセレン(5、10、40、100、200、300、500  $\mu$ M)を加え24時間暴露した。この時、重金属を増加させることで死細胞数は増加するが、その細胞数の約半分が死滅する際の重金属濃度をIC50 (50%致死量) として算出し、各細胞の重金属に対する抵抗性を検討した。重金属による細胞毒性については、Tetrazoliumを加え、生細胞により産生されるFormazanを570nmの吸収波長を測定 (MTTアッセイ) して定量化を行なった。

重金属暴露に対する取り込み、代謝、蓄積、排出など一連の金属解毒機構・責任分子の同定を試みた。重金属暴露に応答して発現が変化する遺伝子は、金属解毒機構に関与する責任分子である可能性が高い。これを調べるために、チオレドキシンの関連蛋白質とその代謝酵素、グルタチオンの代謝酵素と関連蛋白質、メタロチオネインの代謝酵素など、金属やレドックス代謝に関連する分子について、マングースの各遺伝子のPCRプライマーセットの作製を行なった。マングースのように、全くゲノム情報のない生物種の遺伝子配列についてプライマーセットを作製するには、ヒト、マウスのゲノムの構造情報からイントロンの部位とイントロンのサイズを予測し、大きなイントロンを含む部分は、当初のターゲットにはしないというアプローチで試みた。データベース上に数種類の哺乳動物のDNA配列は掲載されるが、これらの代謝酵素の遺伝子上の進化解析が明確でないことから、情報として精度が保たれていると考えられるイヌとネコの相同部位を用いた。

#### (2) 野生動物の初代肝細胞培養系の確立

マングース肝細胞を用いた初代細胞培養技術を確立することを目的とし、細胞分離法、培養条件を検討し至適条件を決定した。麻酔下にあるマングースを開腹、コラゲナーゼ等を含む緩衝液を門脈から肝臓内に十分に灌流した後、肝臓を摘出した。注射針にて肝臓をホモジナイズすることにより細胞を遊離、遠沈にて細胞を回収した。回収した細胞は、10%ウシ血清、1  $\mu$ M インスリン、1  $\mu$ M デキサメタゾン、100  $\mu$ g/ml カナマイシン、0.5  $\mu$ g/ml ファンギゾンを追加した3種類の培地 (DMEM、RPMI1690、William's E) に懸濁、それぞれ10 cm コラーゲンコートディッシュに $2.5 \times 10^6$ 細胞ずつ播種した。37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>インキュベータ中で3日間培養、経時的にディッシュへの細胞接着性および細胞形態について、顕微鏡を用いて比較観察を行った。

また、マングース主要臓器の組織学的な状態を把握するために、病理組織学的観察を行った。ホルマリン固定した各主要臓器のパラフィン包埋/薄切標本を作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色、コッサ渡銀染色、ベルリンブルー染色、PAS染色をそれぞれ行い、顕微鏡にて観察した。

さらに、水銀の局在を組織学的に検出する方法としてAMG法を用いたプロトコルを確立し、マングース臓器での組織学的な水銀検出に成功した。

#### (3) 生態系の水銀動態に関する解析

やんばる生態系より無脊椎動物を9種、両生類5種、爬虫類7種、鳥類23種、哺乳類7種を収集した。また、やんばる生態系近隣より、それぞれ比較もしくは限定された試料数の補完として座間味島から、マングースと同等の高次捕食者ニホンイタチ、奄美大島よりアマミノクロウサギ、アマミトゲネズミを供試した。同様に、鳥類は9種と爬虫類の2種が奄美大島から採取された。さらに、やんばる生態系からの水銀のアウトプット先の場合として沿岸海域を設定し、魚類4種も供試した。

試料は、それぞれ筋肉・肝臓・腎臓など詳細解剖を施し、分析に供する組織・器官を得た。その後、化学分析まで-80 $^{\circ}$ C-30 $^{\circ}$ Cで保存され、室温にて解凍後、必要量をステンレス製のメスで切り出し、乾燥・粉化された。水銀 (総水銀と有機水銀) および、水銀の解毒や曝露経路の推定を目的とした微量元素25種分析は既報に従い、それぞれ冷炎気化原子吸光光度法、金-アマルガム捕集-加熱気化原子吸光法、そして誘導結合プラズマ質量分析計にて濃度を測定した。

### 4. 考察

#### (1) 水銀代謝機構の解析

メチル水銀についてはマングースのIC50値の5.04  $\mu$ Mに対して、ラットでは9.02  $\mu$ M、また、塩化水銀に対する感受性は22.1  $\mu$ Mに対してラット61.6  $\mu$ M、さらにセレンに対する感受性は67.2  $\mu$ M

Mに対して153  $\mu\text{M}$ といずれもラットに対する値より低く、予想に反して、マンガースの初代培養肝細胞はラットよりこれらの重金属に対して感受性が高いという結果が得られた。このことから、初代培養に用いたマンガースの、個体レベルの重金属の蓄積について調べた。つまり生存時に、重金属の高い蓄積を示す個体は、培養レベルでも重金属に対して高い耐性を示し、逆に蓄積が低ければ、その個体から分離培養した肝細胞は、重金属に対して耐性を示さないとも考えられる。本研究で用いたマンガースでは、肝細胞を分離する前に、一部、肝を切除して、重金属を直接測定した結果、これまでにサンプリングしてきたマンガースに対して、蓄積が低いということがわかった。また、チオレドキシニンレダクターゼ遺伝子特異的なプライマーを用いて、1レーン、マンガース繊維芽細胞のゲノムを鋳型としたPCRでは約300bpのフラグメントが検出され、2、3、4レーンでは、それぞれ繊維芽細胞、卵巣、精巣のcDNAを鋳型としてPCRを行なったところ、ゲノムからイントロンを除いた約144bpのフラグメントが検出された。

## (2) 野生動物の初代肝細胞培養系の確立

肝細胞の初代培養法はマウス、ラットなど比較的小型のモデル動物で確立されている。マンガースでは、マウスやラットに比較し大型であるため、灌流に用いる注射針と灌流方法に工夫を加えた。また、初代培養肝細胞の至適培地は動物種により異なることが報告されているが、マンガースではWilliam's E培地で培養した細胞がコラーゲンコートディッシュへの接着性が最も優れていた。また細胞形態も生体内での肝細胞の特徴を良く反映し、マンガース初代培養肝細胞にはWilliam's E培地が最適と考えられた。

病理組織学的観察の結果、複数個体の肝および腎臓に組織学的な障害を伴う炎症性変化がみられることが判明した。他に鉄の沈着（肺、脾、肝）、加齢による変化としてよく観察される色素沈着（肝）およびカルシウム沈着（腎）が認められた。

水銀の局在を組織学的に検出した結果から、これまでの臓器ホモジネートを用いた微量元素分析結果と照合して妥当と考えられる結果が得られた。組織内での水銀分布は肝臓では血液の流れに沿って蓄積していく傾向（小葉中心性）が顕著であった。また、腎では物質の再吸収に関与する近位尿管に認められた。

## (3) 生態系の水銀動態に関する解析

本研究で分析されたジャワマンガースの肝臓から得られた水銀の最高濃度は300  $\mu\text{g/g}$ （乾重あたり：以下DW）を超えた。やんばる生態系の栄養段階が低次の生物の水銀レベルは平均で0.66  $\mu\text{g/g}$  DW、分析された試料の中で最高濃度はムカデ類の1.9  $\mu\text{g/g}$  DWであった。このレベルは、報告された北米大陸における非汚染陸上生態系の参考値より高く、汚染地のレベルと同程度であった。両生類では、とくにイボイモリで他種に比較して顕著に高い水銀レベルが認められた。分析された爬虫類は、栄養段階がマンガースと同様に高い種が含まれたが、顕著な高値はみられなかった。鳥類においては魚食性のサギ類などに比較的高濃度の水銀が認められたが、この傾向は、これまでの多くの報告と一致するものであった。しかし、魚食性でない山林生の希少種ノグチゲラ、ヤンバルクイナ、アマミヤマシギ、アカヒゲの筋肉や肝臓に比較的高レベルの水銀とセレンが検出された。哺乳類は、分析された希少種に、鳥類のような高濃度は確認されなかった。また、やんばる地域における沿岸生魚類イソフエフキの筋肉から0.27~0.49  $\mu\text{g/g}$  DWの濃度が検出された。以上の結果から、やんばる生態系に存在する水銀レベルは、比較的高めであることが示唆され、ジャワマンガースの水銀濃縮に、イボイモリやヤンバルクイナ、ヤマシギなど山林生の希少種であり、かつ水銀濃度の高い種が寄与している可能性が示された。

また、産業での使用や環境汚染が懸念される微量元素25種との相関などの検討の結果、鉛やカドミウム、銀といった強毒性元素にくわえ、セレンや、クロム、バナジウム、ニッケル、コバルトといった、必須元素であるが、産業活動で多用されている元素とも連動して動いている可能性が示唆された。詳しくみれば、水銀の解毒に関与するとされるセレンや、汚染元素カドミウム、クロムさらにストロンチウムは高次になるほど水銀と連動した蓄積がみられ、反対に鉛、銀、コバルトそしてニッケルなどは低次の生物で水銀と連動した蓄積を示した。バナジウムは、高次、低次通じて水銀と強い相関関係を示した。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

これまで野生動物の初代培養細胞を用いて重金属暴露応答性の遺伝子発現変化を実験的に検証

した知見は極めて少ない。本研究は、ジャワマングースの初代培養肝細胞を用いて一過性の水銀暴露試験を行ない、感受性について検証を行なった。このことは、水銀蓄積が高い野生動物について細胞レベルで検証を行なうという、世界でも例のない報告である。また、細胞培養実験では負荷物質に対する遺伝子発現変化を検証するのが定法であり、マングースの水銀蓄積解毒機構の解明に、その初代培養細胞を用いて検証を行なうのは科学における正常進化である。歴史的には個体レベルの交配による遺伝形質の獲得と表現系解析、その分子メカニズムの検証に培養細胞レベル、その責任分子の個体レベルの機能理解にはノックアウト技術が確立されてきたが、現段階でマングースの水銀耐性機構を解明は、この動向の渦中にあるといえる。しかし科学的根拠に基づいた、不変的な水銀蓄積・代謝機構を検証するには現状では検体数が少なく、また検体に用いる個体のバックグラウンドやその生理学的特徴を可能な限り明確にすることで、培養細胞・生化学実験の結果との相関性も検証を行なうことが必要と考えられる。このことを可能として、科学的意義を唱えたい。

また、実際に水銀が蓄積している組織の状態を把握し、組織内局在（標的細胞）を明らかにできたことで、標的細胞の有する生物学的、生理学的な機能に基づいた水銀蓄積・代謝機構解析が可能となった。さらに、本研究で使用した組織化学およびAMG法は検索対象の種を問わないため、世界各地で問題となっている多種の動物における水銀検出に応用することができる。

さらに、特定の生態系における水銀分布の把握が行われた。とくに、“やんばる（沖縄島北部森林地帯の通称）”地域という、我が国においても有数の希少な固有種を有する生態系において、その最高次捕食者であるジャワマングースに濃縮される水銀動態の一端を明らかにできた。その結果、とくに希少な山林生両生類イボイモリや鳥類ノグチゲラ、ヤンバルクイナ、アカヒゲなどがジャワマングースに至る水銀の供給源として機能している可能性を示唆した。

## （２）地球環境政策への貢献

ハブ退治を目的として導入されたマングースは天敵がない状況で、勢力を拡大し、沖縄島で独自に守られてきた生態系を破壊している。本研究はマングースにみられる水銀蓄積量が海生動物なみに高値であることを明らかにした。このように、神経障害を有することなく水銀を蓄積しうる陸生哺乳動物は希である。海生動物では食物連鎖の上位に生物で水銀が高値であることが報告されているが、そのメカニズムの解明は飼育や新鮮な組織の入手などが困難なことから、そのほとんどが明らかにされていない。これに対してマングースは我が国の生態系を脅かす外来種として捕獲・排除されている。すなわち、水銀蓄積生物種として捕獲検体の飼育や、細胞の分離・初代培養や形態学的解析が可能である。我々はこのことに注目し、マングース初代培養肝細胞を用いて水銀負荷による遺伝子発現変化から代謝機構の責任分子の同定を試みた。このようなアプローチによってマングース特有の水銀蓄積解毒機構の解明が進めば、その責任分子特異的な阻害剤を探索することによってマングースのみを選択的に排除する薬剤の開発が可能と考えられる。水銀蓄積が低いマングースに由来する培養肝細胞は水銀に高感受性を示したことから、逆に、マングース個体レベルで水銀蓄積解毒機構の破綻を招けば、マングース独自の食餌行動から蓄積する水銀によって、マングースのみを排除することが出来ると考えられる。これらは在来種に影響を与えることなく、さらに深刻化が懸念されるマングースの氾濫を食い止める唯一のツールであるといえる。

また、海生動物には比較的高濃度の水銀が含まれること、とりわけ高次栄養段階である海生哺乳類の中には極めて高濃度の水銀を蓄積する種が存在し、食物連鎖の頂点にある我々“ヒト”の“食の安全”も脅かされている。しかし、これら水銀を高蓄積する海生動物がどのような機序で水銀を蓄積していくのか依然不明な点が多い。ジャワマングースで得られる実験的検証に立脚した知見は、海生動物を含め高濃度の水銀を蓄積する動物が有する水銀代謝機構を解明する突破口になると考えられる。さらに水銀蓄積・代謝経路が判明すれば、生態系におけるハイリスクアニマルの特定と水銀に対する防御対策に有用な知見がもたらされ、生態系の保全に貢献することが期待される。

現時点では、各種答申に貢献したり、実際の政策に寄与するなど具体的な成果はないが、今後は、データの公表を通じ、成果をやんばる生態系の保全へ応用するよう提言する予定である。とくに、希少な山林生鳥類に比較的高濃度の水銀や、その他の有害微量元素蓄積が確認された、本研究の知見は、それら希少種の保護において、有害金属を含まない餌の選択などに有効な示唆が可能であると考えている。

## 6. 研究者略歴

課題代表者：渡邊 泉

1971年生まれ，愛媛大学農学部卒業，博士（農学），現在，東京農工大学共生科学技術研究院准教授

主要参画研究者

(1) : 渡邊 泉 (同上)

(2) 1) : 山本雅達

1972生まれ，福岡大学薬学部卒業，現在，鹿児島大学大学院医歯学総合研究科助教

2) : 柳 久美子

1968生まれ，徳島大学歯学部卒業，徳島大学歯学部助手，現在，琉球大学医学部助教

## 7. 成果発表状況（本研究課題に係る論文発表状況。）

(1) 査読付き論文

なし