

平成 22 年度環境省委託業務報告書

平成 22 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 23 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

はじめに

本報告書は、環境省 総合環境政策局 環境保健部委託業務「平成 22 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 23 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平成 22 年度 水俣病に関する総合的研究

目 次

1	業務の背景及び目的	1
2	業務の実施内容	1
2.1	研究班の設置	1
2.2	「重金属等による健康影響に関する総合的研究」評価委員会及び推進 委員会の設置	2
2.3	「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の開 催	3
2.4	推進・評価合同委員会の開催	4
2.5	研究計画書の作成の依頼および新規研究に関する公募の事務	4
2.6	推進委員会の開催	4
2.7	研究報告書の作成	4
2.8	研究成果還元業務の実施	5
3	各研究班の報告	5
○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域(社会的課題に関する研究)		
		7
I	水俣病発生地域住民の健康問題に関する研究	9
	研究項目：水俣病発生地域住民の健康支援プログラム及び介護予防プログラ ムの開発	11
	加藤 貴彦(熊本大学大学院医学薬学研究部公衆衛生・医療科学分野 教授)	
II	神経症状・感覚器障害に関する研究	25
	研究項目：高齢者の二点識別覚に関する研究	27
	中村 昭範(国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部脳機能再生研 究室 室長)	
III	メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究	49
	研究項目：メチル水銀による健康障害に関する国際的レビュー	51
	村田 勝敬(秋田大学医学部社会環境医学講座環境保健学分野 教授)	
○メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する研究領域(水俣病 に関する基盤的研究)		
		73
IV	メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究	75
	研究項目：メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究	77
	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)	

V	水俣病の病態生理と治療に関する研究.....	85
	研究項目：低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究.....	87
	小泉 修一（山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学 教授）	

1 業務の背景及び目的

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

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

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

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

2 業務の実施内容

2.1 研究班の設置

本業務は、研究内容に応じて5つの個別の研究班を設置し、調査研究を進めた。研究は、「水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域」（社会的課題に関する研究）、「メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する研究領域」（水俣病に関する基盤的研究）の2つの領域において、以下のⅠ～Ⅴの研究班を組織し、個々の研究ごとに研究項目を設定して実施した。

なお、すべての研究班に係る研究の実施にあたっては、「平成22年度水俣病に関する総合的研究委託業務仕様書」の仕様書別紙「再委任等に関する内容」により再委任した。

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

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

Ⅰ 水俣病発生地域住民の健康問題に関する研究

研究項目：水俣病発生地域住民の健康支援プログラム及び介護予防プログラム

の開発

主任研究者：加藤 貴彦（熊本大学大学院医学薬学研究部公衆衛生・医療科学分野 教授）

II 神経症状・感覚器障害に関する研究

研究項目：高齢者の二点識別覚に関する研究

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

III メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究

研究項目：メチル水銀による健康障害に関する国際的レビュー

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

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

IV メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究

研究項目：メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究

主任研究者：永沼 章（東北大学大学院薬学部研究科生体防御薬学分野 教授）

V 水俣病の病態生理と治療に関する研究

研究項目：低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究

主任研究者：小泉 修一（山梨大学大学院医学工学総合研究部薬理学 教授）

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

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

①評価委員会の設置

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

委員	所属・役職
衛藤 光明	医療法人信和会 介護老人保健施設 樹心台 施設長
遠藤 仁	杏林大学 名誉教授（北里大学医学部客員教授）
小椋 陽介	昭和大学医学部 客員教授

北川 正信	重症心身障害児（者）施設 あゆみの郷 施設長
○櫻井 治彦	中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター 技術顧問
中村 好一	自治医科大学 保健科学 教授
濱田 陸三	独立行政法人国立病院機構 鹿児島医療センター脳血管内科 部長
林 泰史	東京都リハビリテーション病院 院長
二塚 信	九州看護福祉大学 学長
渡辺 知保	東京大学大学院 医学系研究科 教授

○：委員長

②推進委員会の設置

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

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

○：委員長

2.3 「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の開催

平成22年12月7日に三田共用会議所にて、「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」を「イタイイタイ病及び慢性カドミウム中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。研究発表会では、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウム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、評価委員会委員及び推進委員会委員がこの発表に参加するとともに、評価委員会委員は各研究成果を評価した。出席した評価委員会委員及び推進委員会委員は以下の通りである。

<研究発表会への出席委員>

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

推進委員：赤木洋勝、石本二見男、井村伸正、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

2.4 推進・評価合同委員会の開催

平成 23 年 1 月 11 日に三田共用会議所にて、推進・評価合同委員会を「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。研究発表会における「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班の発表内容を受けて、個々の研究班の研究成果についての評価を評価委員会から推進・評価合同委員会に報告するとともに、平成 23 年度新規に公募する研究課題について検討した。推進委員会は、当該報告を受けて、今後の研究の方向性等についてとりまとめた。推進・評価合同委員会の出席者は以下の通りである。

＜推進・評価合同委員会への出席委員＞

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

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

2.5 研究計画書の作成の依頼および新規研究に関する公募の事務

推進・評価合同委員会において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、すべての研究班の主任研究者等に対し、平成 23 年度の研究計画書の作成を依頼した。さらには、平成 23 年度から実施する新規研究に関する公募の研究課題について、推進委員から課題案の提案を募り、後述の推進委員会において審議した結果、最終的に 2 課題を新たに平成 23 年度から実施する研究課題とすることを決定した。

2.6 推進委員会の開催

平成 23 年 3 月 8 日、日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して推進委員会を開催し、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班から提出された平成 23 年度の研究計画書及び予算についての評価と、平成 23 年度に新規に開始する研究課題の採択を行った。推進委員会の開催前に、すべての研究班に対し平成 23 年度研究計画書案の提出を求め、すべての研究班から回収した同計画書案を推進委員会に提出した。推進委員会の出席者は以下の通りである。

＜推進委員会への出席委員＞

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

2.7 研究報告書の作成

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

2.8 研究成果還元業務の実施

環境省が定めた平成 22 年 8 月 26 日付「研究成果還元業務について」に基づいて、2.1 で設置した研究班が本研究で得られた成果を学会発表や論文掲載を実施する場合、その経費（宿泊費、交通費、学会参加費、論文掲載料、英文翻訳料等を想定）について研究班の申請に応じて、環境省担当官と協議の上、1 研究につき 200,000 円を上限として支払うこととした。

本年度は、2.1 で設置した小泉班より、平成 23 年 3 月 22 日～24 日に開催予定の第 84 回日本薬理学会年会において本研究で得られた成果を発表するため、宿泊費、交通費、学会参加費について研究成果還元業務申請があったが、平成 23 年 3 月 11 日の東北地方太平洋沖地震の発生に伴い開催が中止となったため、申請が取り下げられた。

3 各研究班の報告

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域

(社会的課題に関する研究)

I 水俣病発生地域住民の健康問題に関する研究

水俣・芦北地域住民の健康支援・介護予防プログラムの開発 —高齢者の転倒予防プログラムの開発—

主任研究者 加藤貴彦（熊本大学大学院生命科学研究部 公衆衛生・医療科学分野 教授）
分担研究者 西阪和子（熊本大学大学院生命科学研究部 地域看護学 教授）
東 清己（熊本大学大学院生命科学研究部 地域看護学 教授）
根本博代（熊本大学大学院生命科学研究部 地域看護学 助教）
藤井良宜（宮崎大学教育文化学部 生物統計学 教授）
撫中正博（日産自動車健康保険組合 九州地区健康推進センター 産業医）
大森久光（熊本大学大学院生命科学研究部 公衆衛生・医療科学分野准教授）

研究要旨

本研究の目的は、水俣病発生地域住民に対するカスタマーメイド健康支援プログラム及び介護予防プログラムの開発である。ベースライン調査の結果、過去1年間の転倒経験群が非経験群に比し、有意に足趾力や健脚度[®]が低く、転倒に足趾力が関連していた。足趾は歩行の安定に関与し、下駄や草履は足趾の筋活動量を増加させることから、足趾の積極的な使用が予測される履物着用が足趾力を向上させ転倒を予防すると考えた。そこで本年度は、転倒リスクの高いといわれる女性高齢者を対象に、草履を用いた転倒予防介入の効果の検証を目的とした。

研究方法は、認知機能、身体機能を考慮し選定した女性高齢者のうち、文書にて同意の得られた100名に対し介入群と対照群にランダムに振り分け、1年間の介入を実施した。介入群50名の4ヶ月間の草履着用の介入結果について報告する。

結果は、足趾力および健脚度[®](10m全力歩行時間・最大1歩幅下肢長比・踏み台昇降評価)において介入後のデータが有意に向上していた一方、つぎ足歩行は有意差がなかった。また、つまずきにくくなり、歩行に安定感があるといった主観的变化がみられた。草履着用時間は、1日平均で3.1±1.7(時間)であった。介入群の過去1年間の転倒歴は14名(28%)が経験していたが、介入期間中の転倒発生はなかった。

さらに、メチル水銀高曝露地域と非メチル水銀高曝露地域に分けて改善の程度を比較した。身体測定値はメチル水銀高曝露地域が低くなっていたが、2地域とも介入後のデータは向上していた。また、右足趾力のみメチル水銀高曝露地域在住者が有意な改善がみられた($p < 0.05$)。その他の項目に有意差はなかった。

以上の結果より、4ヶ月間の草履の着用、さらに散歩などの活動をすることで足趾力および健脚度[®]の向上がはかれた。しかし、つぎ足歩行では有意差がみられなかったことから、草履着用は下肢筋力や移動能力の向上に寄与するが、バランス能力の向上には他の影響要因の検討が必要である。

キーワード 水俣市、介護予防事業、転倒予防、足趾力、健脚度[®]、履物

I 研究目的

水俣病は公式確認から 52 年が経過した。かつてメチル水銀曝露をうけた地域住民の高齢化は進み、中枢神経系障害以外の様々な健康問題が出現している。このような状況において、高齢化に伴い顕在化してきた地域住民の健康問題の特徴を把握することが、今後の当該住民に対する健康支援を進めるうえで不可欠である。熊本県下でも高齢化率(県平均 25.5%に対し 32.6%)および要介護認定率(県平均 18.1%に対し 19.3%)¹⁾の高い水俣市にとって、介護予防に向けた対策は重要である。現在、介護予防対策として特定高齢者および一般高齢者施策などの地域支援事業が広がりつつあり、具体的には、食事や排泄といった日常生活動作(以下 ADL)や外出や家事といった手段的日常生活動作(以下 IADL)の維持、閉じこもりや機能低下防止があげられている²⁾。特に、転倒は、その約 10%に骨折が生じ³⁾、さらに、ADL・活動能力障害の独立したリスク要因⁴⁾といわれている。そのため、転倒予防は介護予防の重要な対策の 1 つである。本研究では、地域住民のライフスタイル・生活機能に関連するデータと介護予防・リハビリテーションに関する地域の取組みを検討することにより、個人と地域特性を分析し、水俣病発地域住民に対する健康支援および介護予防プログラムの開発を目的とする。

前年度、地域住民のライフスタイル把握の一環として、転倒要因調査(ベースライン調査)を実施した。その結果、過去 1 年間の転倒経験群が非経験群に比し、有意に足趾間圧力(以下、足趾力)や健脚度[®]が低く、転倒に足趾力が関連していた。足趾は歩行の安定性と推進力機能をもつといわれ、足趾力は転倒リスク評価に有用であると示唆されている⁵⁾。さらに、転倒発生の約半数は歩行時であるという報告⁶⁾からも、転倒予防には、下肢筋力の向上つまり、足趾力の向上がのぞましいと考えた。そこで、足趾力の向上という点と高齢者が継続して生活に取り入れるため、安価で簡便な方法を用いることも重要であることから履物に着目した。鼻緒を足趾で挟む下駄着用による足趾の積極的な使用が足部障害の予防に有効であるとの報告や草履による足趾屈筋の筋活動量増加の報告^{7, 8)}から下駄や草履などの履物が足趾力向上につながるのではないかと推測された。また、健脚度[®]も併せて測定することで、移動能力を評価できると考えた。よって、本年度は、転倒リスクの高いといわれる女性高齢者^{9, 10)}を対象に、1 年間の草履を用いた転倒予防介入の効果の検証を目的とした。本報告は、介入群 50 名の 4 ヶ月間の草履着用の介入結果について報告する。

II 研究方法

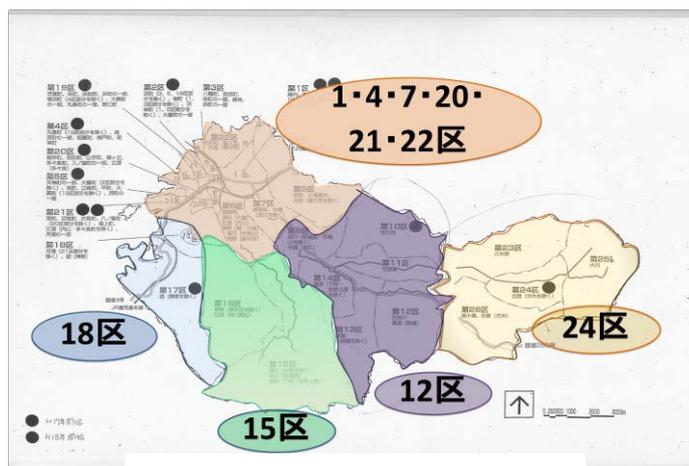
1. 対象者

水俣市の介護予防事業の参加者のうち、ベースライン調査を受けた 65 歳以上の女性高齢者 325 名の中から、以下に示す基準に該当する 100 名を抽出し、各 50 名ずつ介入群と対照群にランダムに振り分けた。選定基準は、転倒率または転倒しそうになった率がベースライン調査結果の平均値より高い地域に在住していること及び以下の安全性を考慮した条件をすべて満たす者である。

- ① 65～84歳の女性
- ② 要介護度において非該当者～要支援1，要支援2まで
- ③ 日常生活に支障のない視力であり，整形外科的疾患の治療中でない（整体・針灸は可）
- ④ 家族と同居あるいは近所に住んでいるまたは同じ地域に家族と同等程度の親しい人がいる
- ⑤ 認知レベルが日常生活に支障がない

対象者の選定地域は Figure 1 に示した。

メチル水銀高曝露地域は，4・18・21区，その他が非メチル水銀高曝露地域とした。



2. データ収集および評価方法

介入期間は，2009年10月から2010年9月の1年間であった。

介入群には，1年間，足趾力向上が期待できる草履を日常的(外出時・室内)にはいてもらい，着用状態の観察および着用継続の支援のため，4ヶ月後，8か月後，12か月後に足趾力測定，健脚度[®]測定，転倒の有無および草履着用に関する聞き取り調査を実施した。測定結果は説明を加えて対象者へフィードバックした。

介入研究のアウトカムとして，以下の3つを設定した。

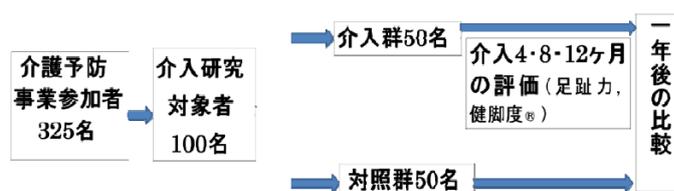
- ① 介入期間中(1年間)の転倒発生率が，介入群10%，対照群25%であること。
- ② 足趾力の向上が，介入群30%(ベースライン比) 対照群不変であること。
- ③ 健脚度[®]点数の向上が，介入群30%(ベースライン比)，対照群不変であること。

介入群離脱者については，開始から離脱するまでの期間を記し，その期間のデータを使用した。また，非介入群より草履着用の申し出がある場合は可能とした。

なお，介入中止の判断基準として，以下の3つを設定した。

- ① 転倒が発生した場合
- ② 草履着用に関する聞き取り調査から着用身体的負担が生じていると研究者が判断する場合
- ③ 3つ目に本人の離脱希望の申し出がある場合

Figure 2 に研究のプロセスを示した。



研究遂行にあたっては、熊本大学疫学倫理委員会の承認を得た。

データ収集は、研究者および水俣市保健センター職員、介護予防事業所職員が担当した。

評価に用いた足趾力および健脚度[®]の測定方法について説明する。足趾力測定は、「チェッカーくん」(日伸産業株式会社)を用いた。測定方法は、可動式の2本のバーを足母趾と足第2趾で挟み、その圧力を計測するものであり、測定値は左右2回ずつ測定し最大値を用いた。足趾力は、転倒予測に重要である動的筋力つまり下肢筋力を間接的に推定でき、転倒リスクを評価する上で有用といわれている⁵⁾。

健脚度[®]は、「10m全力歩行・最大1歩幅・踏み台昇降」の3つで構成され、加えて動的バランス能力を評価する「つぎ足歩行」を合わせて測定する。「健脚度[®]」測定実践ハンドブックに従い、10m全力歩行は会場の都合上、5m全力歩行を実施し測定値を2倍として評価を行った。最大1歩幅については、下肢長補正を行い、最大1歩幅/下肢長比(最大1歩幅/下肢長)を算出した。

さらに、5歳年齢階級と性別で補正を行った(5段階評価(評価は1が最も低く、評価5が最も高い)。健脚度[®]の評価を5段階評価の1と2を0点、3を1点、4と5を2点に点数化し総合的な移動動作として検討できるようにした¹¹⁾)。対象者に測定方法の説明を行い1~2回の練習後に測定した。

3 分析方法

統計学的検定では、介入前後の比較は、対応のあるt検定またはWilcoxon rank-sum testを用いた。メチル水銀高曝露地域と非メチル水銀高曝露地域の比較には介入前後の各測定値の変化値を用いてt検定またはMann-Whitney U testを行った。有意確率は5%とし、統計解析は、SPSS Ver17を用いた。

III 研究結果

1. 分析対象者(介入群)の概要

測定人数は50名であったが、介入2ヶ月目に1名が膝痛で継続困難となり49名となった。介入中止となった対象者に発症の確認を行い、草履着用と関係ないことが推測された。

平均年齢は、76.4±4.9歳、75歳未満の前期高齢者が17名(34.7%)、75歳以上の後期高齢者が32

名(65.3%)であった。要介護認定者は、要支援2が1名であった。介入前の過去1年間の転倒歴は、14名(28%)、転倒しそうになった経験は、20名(40.8%)であったが、介入4か月間の転倒発生報告はなかった。

草履着用時間は、屋内外合わせて平均 3.1 ± 1.7 時間、範囲は1~9 時間であった。着用中の行動は、散歩、家事、買い物などの動的な活動が多くみられた。草履着用による主観的变化は、45名(91.8%)が、足取りが軽く感じる、足趾でふんばれるようになった、歩行時安定感がある、つまずきにくくなったと回答した。一方、4名(8.2%)は変化なしという回答であった。また、対象者の中に足部障害(外反母趾2名、扁平足2名、浮き趾2名)がみられたが、介入期間中のトラブルはなかった。

2. 介入4か月間の身体測定値における変化

1) 足趾力

測定人数は48名であり、1名は私用のため測定を欠席した。結果はTable 1に示すとおり、左右足趾力とも介入後の値が有意に高くなっていた。

2) 健脚度®

測定人数は47名であり、1名はベールライン調査時の健脚度®測定を実施しておらず比較ができなかった。結果はTable 1に示すとおり、10m全力歩行時間は介入後の値が有意に短くなっていた。最大1歩幅および最大1歩幅下肢長比、踏み台昇降、健脚度®点数は介入後の値が有意に高くなっていた。しかし、つぎ足歩行の有意差はなかった。

Table 1. 介入4か月間の足趾力、健脚度®変化

項目	介入前	介入4か月	P値
右足趾力(kgf)	2.4±1.1	2.9±1.0	<0.001
左足趾力(kgf)	2.0±1.0	2.5±0.9	<0.001
10m 全力歩行時間(秒)	6.7±1.2	6.3±1.2	0.004
つぎ足歩行(歩)	7.0±4.0	7.0±3.0	0.421
最大1歩幅(cm)	84.5±12.5	87.9±11.2	0.009
最大1歩幅下肢長比(%)	109.8±15.8	114.4±14.3	0.008
踏み台昇降評価	4.2±0.8	4.5±0.6	0.004
健脚度®点数	5.5±1.9	6.2±1.5	0.002

数値は mean±SD を示した。

3) 2地域の比較

メチル水銀高曝露地域，非メチル水銀高曝露地域の比較を行った。

対象者数は，メチル水銀高曝露地域に14名，非メチル水銀高曝露地域に35名であった。

平均年齢は，メチル水銀高曝露地域は76.3±5.4(歳)，非メチル水銀高曝露地域は76.4±4.8(歳)で有意差はなかった。

Table 2 に示すとおり，メチル水銀高曝露地域は非メチル水銀高曝露地域に比べ，全般的に身体測定値が低くなっており，有意項目もみられた。しかし，2 地域とも介入後の身体測定値は，つぎ足歩行を除く全ての項目で向上していた。

次に，介入による向上の程度をみるため，介入前後の身体測定値の変化を比較した。

Figure 3 ， 4 に示すとおり，2 地域の比較において有意な変化 がみられたのは右足趾力のみであった。その他の項目の有意差はなかった。

Table 2. 地域別介入前後の足趾力，健脚度®比較

項 目		メチル水銀 高曝露地域	非メチル水銀 高曝露地域	<i>P</i> 値
右足趾力 (kgf)	介入前	2.1±0.5	2.5±1.2	0.114
	介入後	3.0±0.6	2.9±1.1	0.825
左足趾力 (kgf)	介入前	1.5±0.6	2.2±1.1	0.021
	介入後	2.1±0.6	2.7±1.0	0.069
10m 全力歩 行時間 (秒)	介入前	7.3±1.2	6.4±1.1	0.015
	介入後	6.8±0.6	6.2±1.3	0.039
つぎ足歩行 (歩)	介入前	5.8±4.0	7.7±3.4	0.083
	介入後	4.5±3.1	7.7±2.9	0.004
最大1歩幅 (cm)	介入前	78.8±8.8	86.8±13.0	0.060
	介入後	81.9±7.8	90.2±11.6	0.021
最大1歩幅 下肢長比(%)	介入前	102.5±11.0	112.9±16.4	0.035
	介入後	106.3±7.5	117.5±15.1	0.015
踏み台昇降	介入前	4.2±0.9	4.3±0.7	0.970
	介入後	4.3±0.6	4.6±0.6	0.100
健脚度® 点数	介入前	4.9±1.4	5.9±1.8	0.049
	介入後	5.3±1.3	6.6±1.4	0.004

数値は mean±SD を示した。

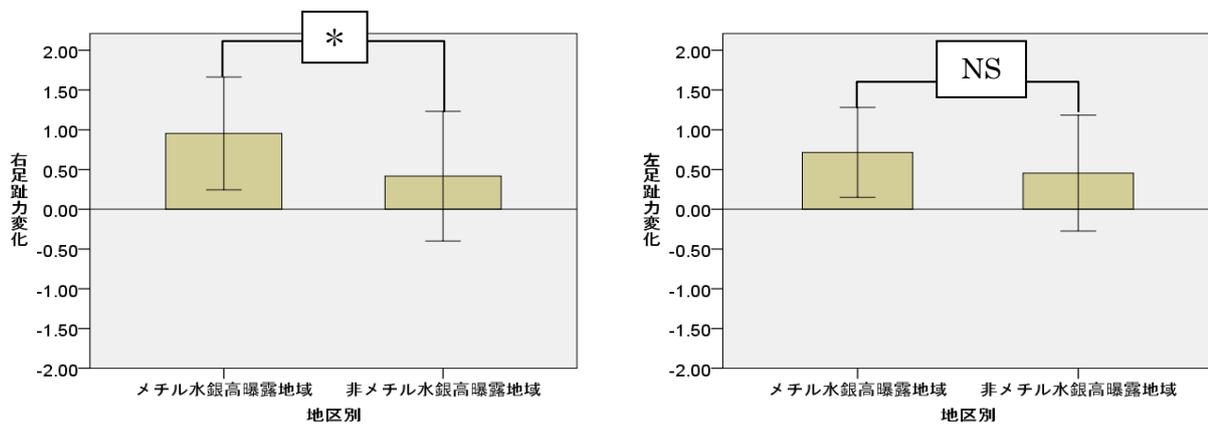


Figure 3. 2地域の足趾力変化の比較 * $p < 0.05$ NS= not significant

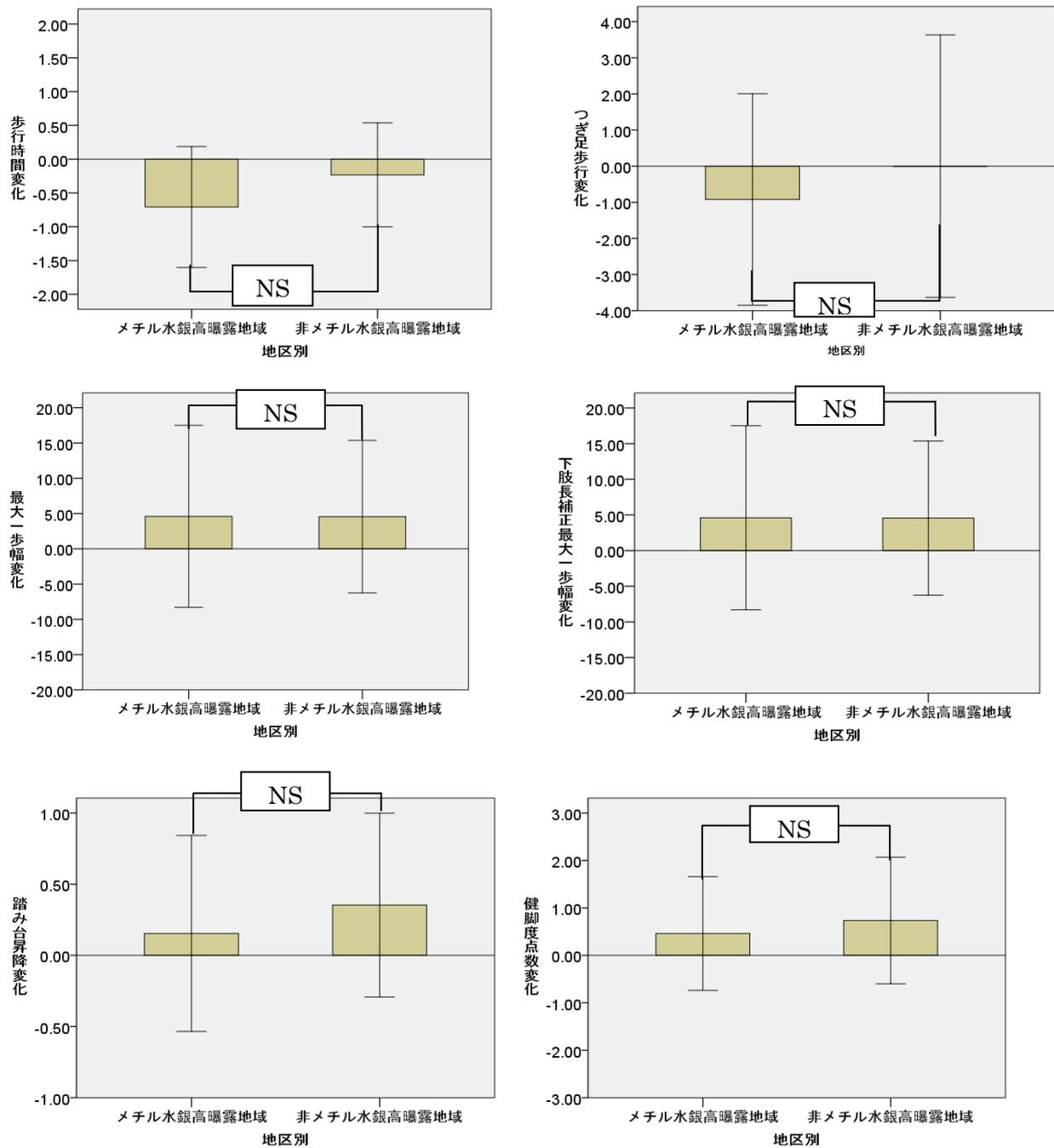


Figure 4. 2地域の健脚度®変化の比較 NS= not significant

IV 考察

本研究の結果より、草履着用4か月でつぎ足歩行を除く全てのデータで改善がみられた。先行研究によると、草鞋の機能を模擬した足部装具装着によって、立脚期後期の蹴りだし力の増大、歩行の重心移動の安定化を示唆している¹²⁾。今回の結果である足趾力の向上、全力歩行時間の短縮、最大1歩幅の拡大、主観的变化である「踏ん張りがきく」「歩行時の安定感」は、先行研究を踏まえて、歩行時の推進力向上および安定化につながっていると推測される。また、踏み台昇降は、他の動作よりも下肢の荷重が増大するため、その評価が向上したことは、脚力に変化がみられたことを示唆している。以上の結果より、草履着用によって積極的に足趾の機能を活かすことは、足趾力だけでなく移動能力の向上をもたらし、前脛骨筋の低下で発生するといわれる転倒原因で最も多い「つまずき」防止に寄与する可能性がある。

一方、動的バランス能力を評価するつぎ足歩行については改善がみられなかった。先行研究にて、足趾機能が高い方が、動的姿勢制御能(Functional Reach Test)や10m歩行時間が良好であるという報告^{13, 14, 15)}や動的バランス能力の低下と転倒との関連¹⁶⁾について示唆されている。そのため、動的バランス能力は歩行時の安定につながり重要である。しかし、バランス能力は加齢による影響を受けやすい姿勢中枢、前庭機能、視覚による情報も関与している¹⁷⁾。以上の関連要因の検討やバランス能力の向上に要する期間の違いなども考えられ、今後経過を観察していく必要がある。

また、介入4か月間に転倒発生はなかった。履物と転倒に関する先行研究では、転倒防止対策としてスポーツシューズやスニーカーの有用性を示した報告¹⁸⁾や転倒リスクの高い履物ではスリッパなどの靴紐固定のない履物・柔らかすぎる踵カウンターや靴底・屈曲した靴底のある履物¹⁹⁾があげられている。室内では裸足や靴下着用が転倒の危険があると報告²⁰⁾されている。しかし、草履と転倒に関する先行研究は見当たらない。さらに、地域高齢者を対象にした横断研究によると足趾・爪に問題のある高齢者が有意に転倒経験をもち、約3割の高齢者は適切な靴を履いていないと認識していた。足部障害の解決に適切な靴の着用は重要であり、高齢者の履物に対する問題意識が低いことも問題点として指摘されている²¹⁾。草履は足部障害の予防に有効であるとすでに報告されており⁷⁾、続いて、この介入研究により草履による転倒予防策の可能性が見出されることが期待される。

次に、メチル水銀高曝露地域と非メチル水銀高曝露地域の比較について検討した。

ベースライン調査において、メチル水銀高曝露地域の対象者が非メチル水銀高曝露地域に比べ、足趾力や健脚度[®]といった下肢筋力や移動能力が低く、身体を動かす機会も減少していた。今回の結果は、非メチル水銀高曝露地域に比べ、メチル水銀高曝露地域は身体測定値が低いながらも介入4か月後のデータは向上していた。しかし、つぎ足歩行は、非メチル水銀高曝露地域が不変であるのに比べ、メチル水銀高曝露地域は低下していた。

先行研究にて、65歳以上のメチル水銀汚染地域として推定される地域の住民は、基礎的ADL、特に「移動」の自立割合が地域住民の先行研究に比べ低い可能性がある²²⁾と報告されている。

また、水俣病認定申請者は加齢に伴い、自覚症状の有訴率は高くなり、特に、躓きやすさ、転倒しやすさ、手足の伸展のしにくさは顕著であることも報告されている²³⁾。これらの報告が、身体測定値が他の地域と比較すると全般的に低下している一要因であることが推測された。また、メチル水銀中毒では、大脳および小脳皮質が侵されやすく、視覚・運動・感覚・聴覚障害が出現する。特に、小脳皮質は前庭神経と関わりがあるため平衡障害が現れる^{24, 25)}。よって、動的バランス能力を評価する「つぎ足歩行」は、他の地域と比べ、有意差がみられたと推測される。しかし、身体的健康度が低くあっても、介入後にデータが改善していたことは、草履着用は、身体機能低下群であっても効果が期待できる可能性があることが推測される。

今回の限界点と課題について、介入群のみの検討であり、その効果について述べることは推測の域であることや2 地域の比較においては、50名を2分したことにより統計量として十分でない可能性があることを考慮する必要がある。しかし、地域で身体的健康度に差があることが明らかになり、地域に密着した転倒予防対策を開発する基礎資料となることから、ある程度の示唆が得られていることは評価できる。また、1年間通常的生活の中で草履着用を実施することを説明しているが、本人のコンプライアンスの問題を考慮し、継続して1-2 週間毎の健康チェック時の聞き取りでフォローしていく必要がある。

V 結論

草履着用による介入4か月の結果より、以下の点が明らかになった。

1. 介入群の過去1年間の転倒歴は14名(28%)が経験していたが、介入期間中の転倒発生はなかった。
2. 左右足趾力(kgf)は、介入後のデータが有意に改善した。
3. 健脚度[®]は、10m全力歩行時間、最大1歩幅および最大1歩幅下肢長比、踏み台昇降評価において介入後のデータが有意に改善した。
4. 動的バランス能力をみるつぎ足歩行は、介入後のデータに有意な改善がみられなかった。この要因として、介入期間やバランス能力に関連する感覚器の影響なども踏まえ、今後検討が必要である。
5. メチル水銀高曝露地域と非メチル水銀高曝露地域で改善の程度を比較した結果、身体測定値はメチル水銀高曝露地域が低くなっていたが、2地域とも介入後のデータは向上していた。また、右足趾力のみメチル水銀高曝露地域在住者が有意な改善がみられた($p < 0.05$)。その他の項目に有意差はなかった。
6. 草履着用による主観的变化として、つまずきにくくなり、歩行に安定感があるといった回答があった。

以上の結果より、4ヶ月間の草履の着用、さらに散歩などの活動をすることで足趾力および一部の健脚度[®]の向上がはかれ、草履着用は下肢筋力や移動能力の向上に寄与することが示唆された。

VI 次年度以降の研究計画

地域高齢者の重要な課題である転倒予防に関する研究として、以下のような研究の継続が可能である。

- 1) 草履着用による足趾力向上および転倒予防プログラムの実施と効果の検証の継続
- 2) 健康支援プログラムの基礎資料となる健康不安者などを対象者とした地域住民の健診や調査

本研究に関する現在までの研究状況・実績

- ・根本博代, 西阪和子, 東清巳, 加藤貴彦, 和田恭子, 水俣市における地域住民の健康実態調査—「健康まつり」参加者のデータを通して—. 熊本大学医学部保健学科紀要, 2009; 5: 27-36.
- ・根本博代, 西阪和子, 東清巳, 加藤貴彦(2010): 足趾を活用した草履着用による転倒予防の効果. 第69回日本公衆衛生学会総会抄録集 57(10): 355

文献

- 1) 熊本県(更新日 2009/6/2). 高齢者関係資料集. 高齢支援課. 情報入手日 2010/11/11.
<http://www.pref.kumamoto.jp/soshiki/28/>
- 2) 渡辺美鈴, 渡辺丈眞, 松浦尊鷹, 他. 生活機能の自立した高齢者における閉じこもり発生の予測因子. 日本老年医学会雑誌 2007; 44(2): 238-246.
- 3) 内閣府. 平成17年度高齢者の住宅と生活環境に関する意識調査
- 4) 原田和弘, 佐藤ゆかり, 齋藤圭介, 他. 在宅自立高齢者におけるADLと活動能力障害の出現率, および転倒既往と閉じこもりの関与. 理学療法学 2006; 33(5): 263-271.
- 5) 山下和彦. 高齢者転倒防止能力の足指間圧力計測による推定. 計測自動制御学会 2002; 38(11): 952-957.
- 6) 新野直明, 小坂井留美, 江藤真紀. 在宅高齢者における転倒の疫学. 日本老年医学会雑誌 2003; 40: 484-486.
- 7) 柴田義守, 土屋大志, 和田郁雄. 外反母趾の調査(第3報)—X線像から見た鼻緒付き履き物と横アーチパッドの効果に関する検討—. 日本足の外科学会雑誌 2006; 27(2): 133-137.
- 8) 金井秀作, 大塚彰, 沖貞明, 他. 下駄を用いた足部内在筋強化の可能性. 靴の医学 2003; 17(2): 5-8.
- 9) World Health Organization(WHO). Global Report on Falls Prevention in Older Age. WHO 2009. 情報入手日
- 10) 2010/11/11. http://www.who.int/ageing/publications/Falls_prevention7March.pdf
- 11) Niino N, Tsuzuku S, Ando F, Shimokata H. Frequencies and circumstances of falls in the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging. Journal of Epidemiology 2000; 10(1 Suppl):S90-94.
- 12) 岡田真平, 高橋亮輔, 高橋美絵, 他. 要介護状態への移行を予測するスクリーニングおよび運動器の重要性を啓発する手法としての高齢者移動能力評価法「健脚度測定」の有効性に関する研究. 「健康寿命の延伸に関わる調査研究事業」報告書 2007: 1-17.

- 13) 長谷和徳, 梶大介, 留置昌幸, 他 . 草鞋を模擬した足部装具が身体運動に及ぼす影響の運動力学分析. 人間工学 2009 ; 45(1) : 58-64.
- 14) 木藤伸宏, 井原秀俊, 三輪恵, 他. 高齢者の易転倒性を予測する因子の抽出とその予防のための訓練法の開発 , 健康医科学研究助成論文 2000 ; 15: 25-36.
- 15) 木藤伸宏, 井原秀俊, 三輪恵, 他. 高齢者の転倒予防としての足趾トレーニングの効果. 理学療法学 2001 ; 28(7): 313-319.
- 16) 金井秀作, 長谷川正哉, 島谷康司, 他 . 高齢者の立位バランスに靴の着用は影響する. 靴の医学 2007 ; 21(2) : 60-64.
- 17) Dargent MP, Favier F, Gradjean H, et al . Fall-related factors and risk of hip fracture. the EPIDOS prospective study. Lancet 3 1996 ; 48(9021) : 145-149.
- 18) 中村隆一, 齋藤宏, 長崎浩. 基礎運動学第 6 版. 東京: 医歯薬出版株式会社, 2008 東京: 351-408.
- 19) Koepsell TD, Wolf ME, Buchner DM, et al . Footwear Style and Risk of Falls in Older Adults. Journal of American Geriatrics 2004 ;52 : 1495-1501.
- 20) Catherine S, Hylton BM . An evaluation of footwear worn at the time of fall-related hip fracture. Age and Aging 2003 ; 32 : 310-314.
- 21) Hylton BM, Meg EM, Stephen RL. Footwear Characteristics and Risk of Indoor and Outdoor Falls in Older People. Gerontology2006 ; 52 : 172-180.
- 22) 原田和弘, 岡浩一郎, 柴田愛, 他. 地域在住高齢者における足部に関する問題と転倒経験・転倒不安との関連. 日本公衆衛生雑誌 2010 ; 57(8) : 612-623.
- 23) 牛島佳, 成元哲, 川北稔, 他. 不知火海沿岸地域住民の水俣病補償制度上の位置と日常生活動作能力との関連, 日本公衆衛生雑誌, 2008 ; 63:699-710.
- 24) 牛島佳代, 成元哲, 川北稔, 他. 水俣病認定申請者の居住歴と健康状態. 公衆衛生 2006 ; 70(3) : 211-214.
- 25) Eto K . Pathology of Minamata disease. Toxicol Pathol 1997 ;25:614-623.
- 26) Eto K , Marumoto M, Takeya M .The pathology of methylmercury poisoning (Minamata disease). Neuropathology 2010;30 : 471-479 .

The development of a health support program for the inhabitants of Minamata / Ashikita area

-The development of the fall prevention program of elderly people-
Effect of enhancing toe function on fall prevention

Takahiko Katoh¹, Kazuko Nishisaka¹, Kiyomi Higashi¹, Hiroyo Nemoto¹,
Yoshinobu Fujii², Masahiro Munaka³, Hisamitsu Omori¹

¹*Graduate Scholl of life Sciences, Kumamoto University*

²*Graduate Scholl of Education, Miyazaki University*

³*Nissan Motor Company, Ltd.*

*Key words: Minamata City, long-term care preventive system, the fall prevention,
toe-gap force, good walker score, footwear*

Abstract

The purpose of this study is the development of a Customer-made Health Support Program and Preventive Care Program for the inhabitants of the Minamata disease outbreak area. In 2009, we evaluated the relationship of toe-gap force and good walker index with the incidence of falling of participants aged 65 years and older in the preventive care programs. The result showed that lower toe-gap force and good-walker score were significantly associated with falling. Toe function relates to stable walking movement, and a function of Japanese clogs (geta) and sandals (zori) is increased toe muscular activity. Therefore, the purpose of this study was to determine whether wearing zori reduces the incidence of falling and improves toe-gap force and good-walker score.

One hundred female participants aged 65 years and older without difficulty of cognitive and physical function were randomized to wear zori or be in the control group during 2009-2010. This time, we reported the effects of wearing zori after 4 months on the degree of physical health.

As a result, toe-gap force and good-walker score (maximal gait time for 10 meters, the maximal step length, 40 or 20-cm step test) improved significantly except for tandem gait, which is evaluation of balance ability. Besides, there was no the incidence of falling in 4 months.

We also divided Minamata City into two areas according to the differences in the living environment: the “seaside area”, which is considered to have been exposed to methylmercury at one time, and the others area. In the comparison of the 2 groups, decreased values of “toe-gap force and good-walker score” were observed in the “seaside area” with a high exposure to methylmercury as compared to the “others area”, however, the degree of physical health improved after 4 months in both areas.

These results suggest that the intervention of wearing zori would contribute to enhanced “toe-gap force”, which is an indirect assessment of lower-limb muscular strength and “good-walker score”, which evaluates the capacity for locomotion. More consideration is needed, however, regarding how to improve balance ability.

II 神経症状・感覚器障害に関する研究

高齢者の二点識別覚に関する研究

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

[研究要旨]

皮膚の二点識別覚はメチル水銀中毒のバイオマーカーのひとつとして利用できる可能性があるが、現状では信頼のおけるの正常値の範囲が明確でないため、測定値から病的意義を評価することが困難である。従って本研究の目的は、二点識別覚に加齢が与える影響を検討し、高齢者の二点識別覚の正常値の範囲を信頼できるレベルで明らかにしていくことである。我々はこれまでの研究で、まず「二点識別覚自動検査システム（自動二点識別覚検査装置、検査プロトコル、及びデータ分析法）」を開発し、科学的に信頼のおける方法で二点識別覚検査が行える土台を固めた上で、150名の健常成人（高齢者118名、若年者32名）を対象に、示指先端、下口唇、及び舌尖で二点識別覚検査を行い、正常データベースを構築してきた。今年度は胎児性水俣病の年齢層でもある40-50才台の中年健康ボランティア60名を対象に、これまでと同じ条件で二点識別覚検査を行い、正常データベースを更に拡充すると共に、加齢の影響について詳細に検討を加えた。

その結果、示指先端、下口唇、舌尖、の全ての部位で、二点識別覚関連閾値と年齢の間に有意な正の相関が認められ、加齢と共に感度が低下していくことが明らかとなった。一方、従来の検査法に準じた手動の検査では示指先端以外において有意な加齢の影響を検出できず、我々が開発した二点識別覚自動検査システムを用いた測定法が、高い感度と信頼性を有していることもあらためて証明された。

更に、これらの研究成果を脳機能画像検査にも今後生かしていく目的で、二点識別覚自動検査システムと同様の刺激が可能な二点識別覚刺激装置の作成も行った。本装置は、二点識別覚自動検査システムと全く同じ形状のプロブを用いることにより、皮膚のメカノレセプターに同等の刺激を与えることができる。また、刺激と同期したトリガーを発生でき、磁場を一切乱さない非磁性体設計であるため、脳磁図の測定にも問題なく利用できることが確認された。

キーワード：二点識別覚、閾値、自動測定、手動測定、正常値、加齢変化、脳磁図

[分担研究者]

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

松浦 弘幸（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部長）

[研究協力者]

加藤 公子（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 流動研究員）

西井 匠（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 流動研究員）

久保田 怜（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 流動研究員）

野田 信雄（栄商金属株式会社）

I. 研究目的

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

これまでの研究で我々は、まず、従来の二点識別覚検査法の問題点（刺激の物理的パラメーターの客観的制御が困難でプローブの当て方によって閾値が変わりうる、そもそも測定プロトコルや閾値分析法自体が曖昧でその定義によっても閾値が変わりうる）を克服するような「二点識別覚自動検査システム」を開発した。このシステムは、a)刺激の物理的パラメータを客観的に制御できる自動二点識別覚検査装置、b)人の二点識別覚の認知特性にかなった検査プロトコル、及び、c)客観的なデータ分析法、が統合されたシステムである。次に、このシステムを用いて150名の健常成人（高齢者118名、若年者32名）を対象に、左示指先端、下口唇、及び舌尖で二点識別覚検査を行い、システムの信頼性と有用性を確認すると同時に、健常者の二点識別覚関連閾値のデータベースを構築してきた。

これらの成果を踏まえ、今年度は以下の研究を行った。

- 1) 胎児性水俣病の年齢層でもある40-50才台の中年年齢層の健康ボランティア60名を対象に、これまでと同じ方法で二点識別覚測定を行った。結果は昨年度までに得られた150名の検査データと統合して分析し、加齢の影響や各年齢層における正常値の範囲を明らかにした。また、従来の手動による検査法と、我々が開発した「二点識別覚自動検査システム」の差異についても検討した。
- 2) これらの研究成果を脳機能画像検査にも生かす目的で、新たに二点識別覚刺激装置の開発も行った。これは、二点識別覚自動検査システムと同様の刺激が可能で、脳磁図測定にも利用できるといった仕様を満たすように作成した。

II. 研究方法

1) 中年年齢者における実測定

<対象>

近隣住民から募集した40-50才台の健康ボランティア60名（男性30名、女性30名）を対象に昨年度と同様の二点識別覚測定を含む検診を行った（Table 1）。

Table1: 今年度対象者の年齢層と人数

年齢(才)	男	女	計(人)
40-49	15	15	30
50-59	15	15	30
計	30	30	60

<検査方法>

検診内容は、①問診と神経内科学的診察、②手動の二点識別覚検査、③二点識別覚自動検査システムを用いた検査で、各項目の詳細は以下の通りである。

①問診と神経内科学的診察: 認定医資格を持つ神経内科専門医が、1人あたり15分以上の時間をかけ、特に皮膚感覚の異常の有無について注意を向けながら入念に診察を行った。

②手動の二点識別覚検査: デジタルノギスを加工して開発したスピアマン型類似の二点識別覚検査計(図1)を用いて行った。検査部位は、左示指末節腹側部(縦方向に刺激)、下口唇中央粘膜部(口を半開して下口唇の湿った粘膜部分を露出し横方向に刺激)、舌尖端中央部(口を半開して舌を門歯の上に軽く置く感じで提出させ、舌の横方向に刺激)、の3箇所で行った。刺激の与え方は、プローブ先端の一点もしくは二点を、約45°の角度で2mm程度沈む圧力で約1秒接触させ、口答あるいは指のサインで一点・二点を答えさせた。

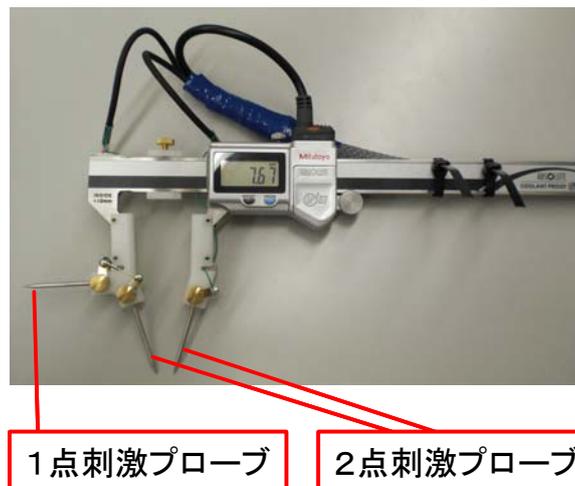
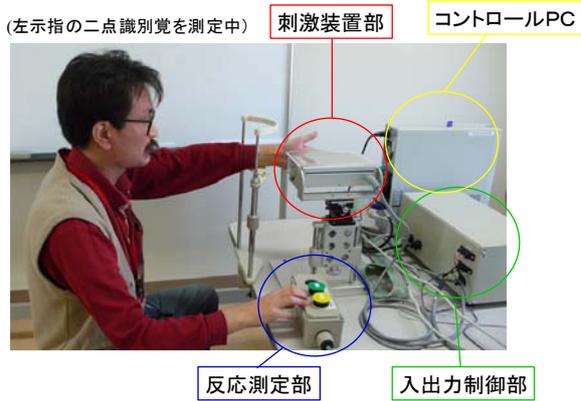


図1 ; 手動検査に用いた器具

③二点識別覚自動検査システムによる検査: 手動の二点識別覚検査と同じ3箇所の皮膚部位を検査した。左示指末節腹側部は2号機(図2右)を用い、下口唇中央粘膜部及び舌尖端中央部は1号機(図2左)を用いて検査を行った。プローブの押出圧は一定、押出角は約70°、押出距離は皮膚接触面から約1.5mm沈むように設定した。一点・二点の回答は、二つの反応ボタンを押し分けることによって行わせ、各皮膚部位の本検査前には毎回、明らかに二点が識別できる距離で一点・二点刺激をランダムに行い、ボタン押し反応の練習とプローブ接触位置の確認を行った。

尚、手動・自動測定とも、全被験者で測定部位の皮膚温を計測し、28°C以下だった場合は、ヒーターなどを用いて28°C以上に皮膚温を温めてから測定を行った。

自動二点識別覚測定装置(1号機Ver2.0)



自動二点識別覚測定装置(2号機)

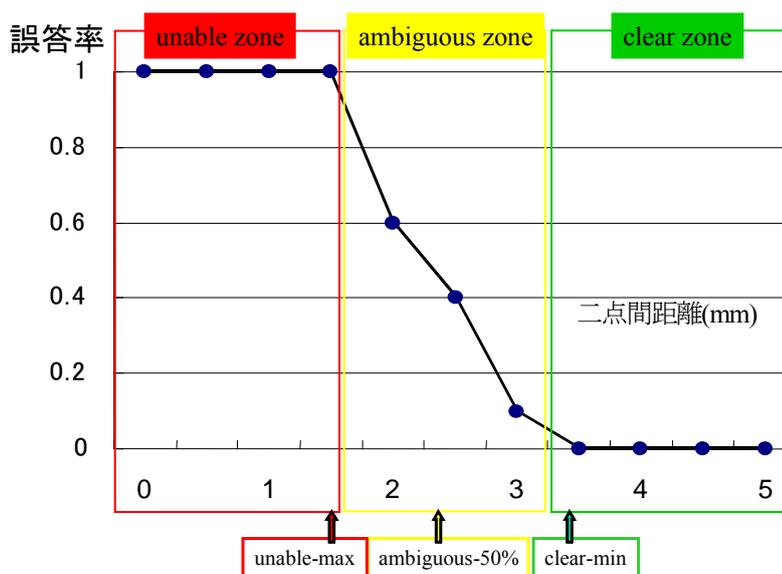


図2：二点識別覚自動検査システム

測定プロトコル及びデータ分析の詳細もこれまでに策定したものと同等である。すなわち、二点識別覚の生理的認知特性が二点間距離依存のS字曲線状となることを利用し、まず図3に示されるごとく、二点を確実に二点と認識できる二点間距離の範囲を clear zone、二点を一点としか感じられない範囲を unable zone、そしてそれに挟まれるように二点に感じられたり一点に感じられたりする曖昧な認知を呈する範囲を ambiguous zone と定義し、個人の二点識別覚に関連した閾値を次のように求めた。

1. 明らかに二点とわかる「clear zone」の最小値(clear-min)
2. 二点か一点か曖昧な「ambiguous zone」の中心点(ambiguous-50%)
3. 一点としか感じられない「unable zone」の最大値(unable-max)

二点識別覚の認知特性



→ 閾値決定法を明確に定義しないと、値が大きく異なる！

図3：二点識別覚の認知特性と用語定義

当てずっぽう回答による攪乱を避け、統計学的にも信頼のおける関連閾値を得るために、ひとつの二点間距離あたりの刺激の繰り返し回数を 10 回、一点・二点の混入比率を 2:8 とした。検査及び分析プロトコルの詳細はこれまでと同様、以下の通りである。

1. Sigmoid 曲線がプロットできるように、両端に clear zone と unable zone が必ず含まれるような範囲を設定し、最低 6 ポイントの二点間距離において検査する。(今回の中年齢者の検査においては、ほとんどのケースで 0-5mm の範囲に clear zone も unable zone も含まれたため、[0.5, 1, 2, 3, 4, 5mm] の 6 種類の二点間距離を基本とし、必要に応じて 6, 7 mm の二点間距離の検査も行った)。
2. 各二点間距離のポイントで二点刺激を 8 回、一点刺激を 2 回ランダムに与えた。
3. 自動二点識別覚測定装置を使った測定では、二点間距離も毎回ランダムに変更する。刺激回数はひとつの皮膚部位あたり 60 回を基本とし、30 回ずつ 2 セット、舌刺激の場合は 20 回ずつ 3 セットに分けて行い、必要に応じてもう 1 セット追加した。手動の検査では、二点間距離は最大 2 点間距離から始め、10 回の検査 (二点刺激 8 回、一点刺激 2 回) ごとに、二点間距離を徐々に縮めていった。
4. ひとつの二点間距離において、8 回中 7 回以上正解した場合 (危険率 3.1%) を clear zone の範囲内、逆に 8 回中 7 回以上誤答した場合を unable zone の範囲内 (同様に危険率 3.1%) とし、まず clear-min と unable-max 値を得た後に、両者の平均値を求め ambiguous-50% の値とした。
5. これらに加えて、得られた誤答率の sigmoid 曲線からフィッティングを行い、文末の参考資料の方法で計算上の 50% 弁別閾値 (sigmoid-50%) を求めた。
6. マシン自動測定では、一点に感じたか二点に感じたかをなるべく速く正確にボタン押し反応をさせ、反応時間を測定した。各被験者の平均反応時間は四分位偏差の 1.5 倍を外れ値として除外した後、再計算して求めた。

例えば、図 4 に示されるような検査結果 (各二点間距離における、正答数と誤答数) が得られた場合、閾値関連の値は次のように判定した。

clear-min = 3mm
 unable-max = 1mm
 ambiguous-50% = 2mm
 sigmoid-50% = 1.8mm

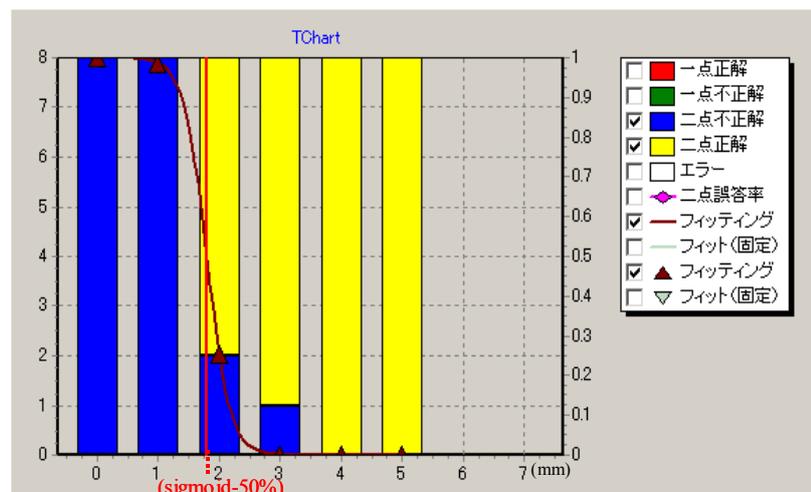


図 4 : 関連閾値決定法のサンプル

2) これまでの全測定データを用いたデータ解析

今回の 60 名の測定結果と、これまでに行った 150 名の健常者に対する測定結果を統合して、二点識別覚関連閾値に対する加齢の影響を詳細に検討した。分析は、年齢層により 20 才台 (Young)、40-50 才台 (Middle)、60-70 才台 (Elderly) の三群 (Table 2) に分けて ANOVA、及び Scheffe 法による多重比較を行い、有意差レベルを $p < 0.05$ とした。また、年齢と二点識別覚関連閾値の相関の解析も行い、相関係数 $R > 0.2$ かつ無相関の帰無仮説の棄却閾 $p < 0.05$ の場合を有意な相関ありとし、回帰分析も行った。

Table2: 全対象者の年齢層と人数

	平均年齢(才)	人数	女:男
Young	21.9±1.1	32	16:16
Middle	49.3±6.0	60	30:30
Elderly	68.9±5.1	118	56:62

3) 脳機能画像検査に利用可能な二点識別覚刺激装置の作成

以下の点に留意して開発を行った。

- これまで蓄積した二点識別覚関連閾値のデータベースをそのまま利用できるように、「二点識別覚自動検査システム」と全く同じ形状のプロープを用いて、皮膚のメカノレセプターに同等の刺激を与えることができること。
- 一点・二点刺激をパソコンから自由にコントロールでき、刺激と同期した TTL レベルのトリガー信号も発生できること。
- 磁場を一切乱さない非磁性体設計とし、脳磁図の測定にも問題なく利用できること。

<倫理面への配慮>

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

検査は被験者のペースを尊重して行われ、1 回の小検査は長くとも 5 分程度とし、各小検査の間には少なくとも 1-2 分間の小休憩を挟み、次の検査に移るタイミングは被験者に決定させた。また、30-60 分に一度は 5-15 分程度の長休憩も挟んだ。1 人あたりの実検査の総時間は 80 分程度であり、準備、説明、休憩も含めた、検査協力の総拘束時間は最大でも 3 時間を越えないこととした。検査の清潔性を担保するため、手動測定及び、自動測定に使用するプロープは被験者毎に滅菌処理 (エタノール洗浄後オートクレーブ) を行ったものに交換した。更に口唇や舌と接触する可能性のある部分は、毎回消毒用エタノール綿で清拭した後に、数枚重ねにした新品の食品用ラップでカバーした。

プライバシー、個人情報の保護には格段の配慮を行い、データ分析にあたって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) 管理のもとに行った。

III. 研究結果

1) 中年齢者における実測定

a) 問診と神経内科的診察

問診で糖尿病が3名、高血圧が3名、甲状腺機能亢進症が1名、同低下症が1名、頸椎症が1名あったが、診察の結果、神経学的な異常を呈する対象者は1例もなかった。

b) 二点識別覚検査

全対象者で手動検査、及び二点識別覚自動検査システムによる測定が問題なく行え、分析用のデータを取得することができた。

2) これまでの全測定データを用いたデータ解析

a) 年齢層による群間比較

各年齢層における二点識別覚関連閾値の測定結果を Table 3, 4 及び図 5 に示す。手動測定では、左示指の clear-min 値と ambiguous-50%値で若年者群は中年者群及び高齢者群よりも有意に小さな値を示し、加齢の影響があると認められた。しかし下口唇や舌においては、有意な加齢の影響は認められなかった (Table 3 及び、図 5 上段)。一方、二点識別覚自動検査システムによる測定では明確な加齢変化が捉えられた。Sigmoid-50%値は全ての皮膚部位でひとつ以上の群間比較で統計学的有意差が認められ、clear-min 値と unable-max 値も示指、及び舌で有意な群間差が認められた (Table 4 及び、図 5 下段)。皮膚部位別に見ると、左示指の値変化が最も大きく、加齢の影響を受けやすいことが示された。

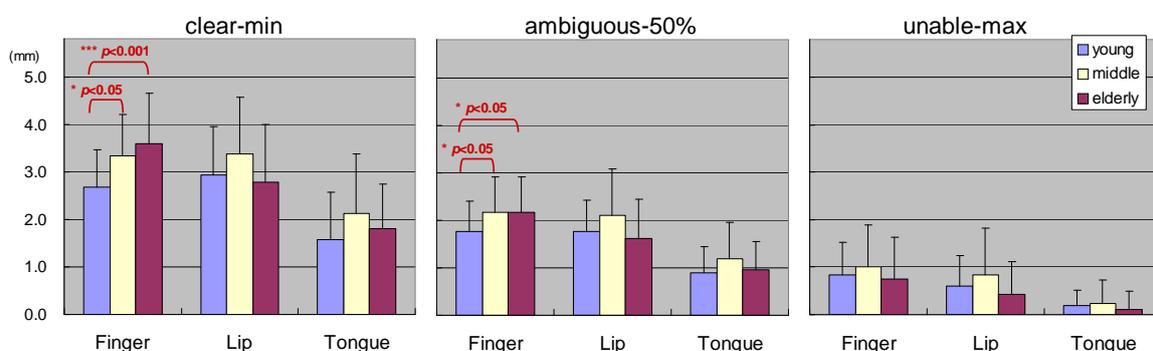
Table 3: 手動測定による二点識別覚関連閾値 (平均±SD mm)

		clear-min	ambiguous-50%	unable-max
左示指	Young (n=32)	2.7 ± 0.8	1.8 ± 0.6	0.8 ± 0.7
	Middle (n=60)	3.3 ± 0.9	2.2 ± 0.7	1.0 ± 0.9
	Elderly (n=117)	3.6 ± 1.1	2.2 ± 0.8	0.7 ± 0.9
下口唇	Young (n=32)	2.9 ± 1.0	1.8 ± 0.7	0.6 ± 0.6
	Middle (n=60)	3.4 ± 1.2	2.1 ± 1.0	0.8 ± 1.0
	Elderly (n=118)	2.8 ± 1.2	1.6 ± 0.8	0.4 ± 0.7
舌	Young (n=32)	1.6 ± 1.0	0.9 ± 0.6	0.2 ± 0.3
	Middle (n=60)	2.1 ± 1.3	1.2 ± 0.8	0.2 ± 0.5
	Elderly (n=118)	1.8 ± 0.9	1.0 ± 0.6	0.1 ± 0.4

Table 4: 二点識別覚自動検査システムによる二点識別覚関連閾値(平均±SD mm)

		clear-min	sigmoid-50%	unable-max
左示指	Young (n=32)	2.0 ± 0.9	1.1 ± 0.6	0.4 ± 0.6
	Middle (n=60)	3.2 ± 1.1	1.9 ± 0.8	0.9 ± 0.7
	Elderly (n=114)	3.7 ± 1.3	2.1 ± 1.0	1.0 ± 0.8
下口唇	Young (n=31)	3.4 ± 1.2	1.8 ± 0.9	0.7 ± 0.6
	Middle (n=60)	4.0 ± 1.4	2.2 ± 0.9	0.8 ± 0.8
	Elderly (n=102)	4.0 ± 1.5	2.3 ± 1.2	0.9 ± 1.0
舌	Young (n=32)	1.9 ± 1.0	0.9 ± 0.6	0.3 ± 0.4
	Middle (n=60)	2.6 ± 1.3	1.4 ± 0.7	0.5 ± 0.5
	Elderly (n=112)	2.8 ± 1.3	1.6 ± 0.9	0.7 ± 0.6

手動測定



二点識別覚自動検査システム

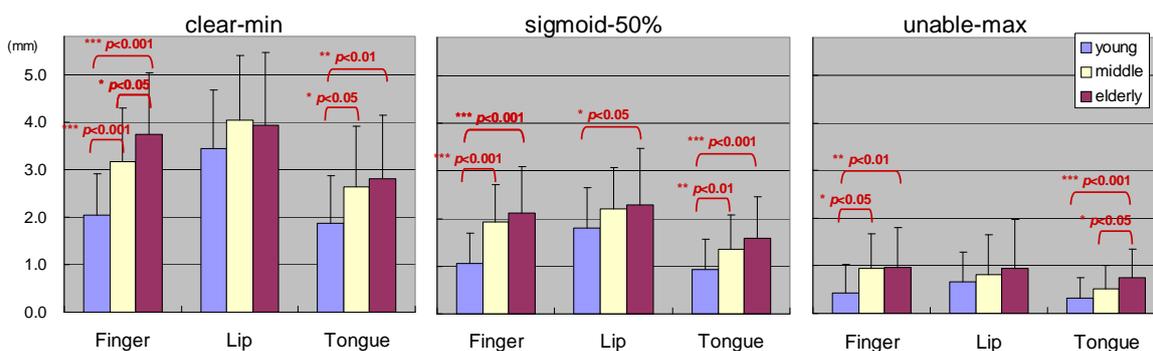


図5：手動測定及び二点識別覚自動検査システムによる二点識別覚関連閾値と加齢変化 (*p 値は ANOVA 及び Scheffe 法による post hoc 検定で有意な加齢変化が認められたもの)

b) 年齢との相関分析

年齢と二点識別覚関連閾値との相関分析を行った結果を Table 5, 6 に示す。上述の年齢層による群間比較と同様、手動測定では年齢との有意な相関はほとんど捉えられず、左示指の clear-min 値で弱い正の相関が認められたのみである (Table 5)。一方、二点識別覚自動検査システムを用いた測定では全ての測定部位で軽度～中等度の正相関が認められた (Table 6)。部位別に見ると左示指が最も年齢との相関が強く、舌がこれに続いた。下口唇は加齢の影響が最も弱く捉えられ、sigmoid-50% で弱い相関を認めるのみであった。図 5 は手動、及び自動それぞれの検査における 50% 弁別閾値 (ambiguous-50%、及び sigmoid-50%) と年齢との関係をプロットしたもので、有意な相関があるものについては回帰分析による近似直線も示している。この図からも手動検査では加齢の影響がはっきりしないものの (図 5 : 手動測定)、二点識別覚自動検査システムによる測定では加齢の影響が明確に捉えられていることがわかる。また、回帰直線の傾きから、示指が最も加齢の影響を受けやすいこともわかる (図 5 : 二点識別覚自動検査システム)。

Table 5: 手動測定による二点識別覚関連閾値と年齢の相関

		clear-min	ambiguous-50%	unable-max
左示指	相関	R = 0.36, $p < 0.0001$	なし	なし
	回帰式	$y = 0.021x + 2.20$	—	—
	SE (standard error)	0.96	—	—
下口唇	相関	なし	なし	なし
	回帰式	—	—	—
	SE	—	—	—
舌	相関	なし	なし	なし
	回帰式	—	—	—
	SE	—	—	—

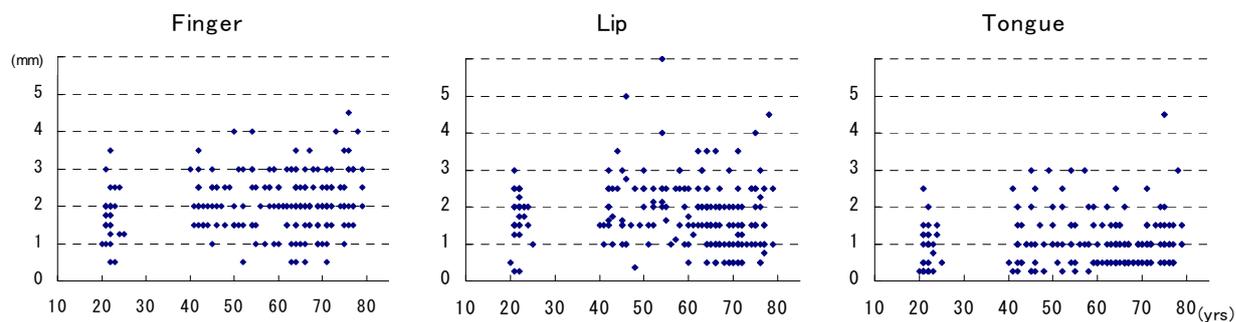
(相関係数 $R < 0.2$ もしくは無相関の帰無仮説の棄却閾 $p > 0.05$ の場合を有意な相関なしと判定)

Table 6: 二点識別覚自動検査システムによる二点識別覚関連閾値と年齢の相関

		clear-min	sigmoid-50%	unable-max
左示指	相関	R = 0.49, $p < 0.0001$	R = 0.42, $p < 0.0001$	R = 0.27, $p < 0.0001$
	回帰式	$y = 0.037x + 1.25$	$y = 0.022x + 0.66$	$y = 0.012x + 0.21$
	SE (standard error)	1.14	0.84	0.77
下口唇	相関	なし	R = 0.21, $p < 0.005$	なし
	回帰式	—	$y = 0.013x + 1.50$	—
	SE	—	1.04	—
舌	相関	R = 0.29, $p < 0.0001$	R = 0.32, $p < 0.005$	R = 0.29, $p < 0.0001$
	回帰式	$y = 0.022x + 1.41$	$y = 0.015x + 0.62$	$y = 0.009x + 0.11$
	SE	1.26	0.77	0.54

(相関係数 $R < 0.2$ もしくは無相関の帰無仮説の棄却閾 $p > 0.05$ の場合を有意な相関なしと判定)

手動測定 (ambiguous 50%)



二点識別覚自動検査システム (sigmoid 50%)

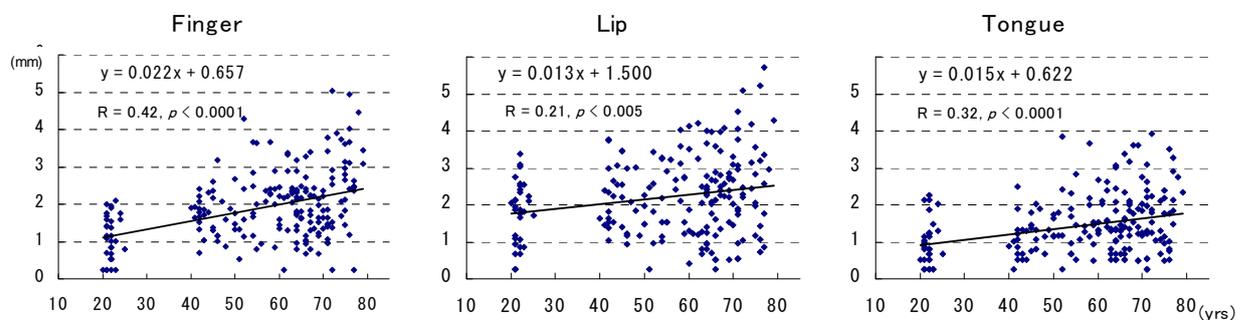


図6 : 50%弁別閾値(ambiguous-50% 及び sigmoid-50%)と年齢との関係

c) 二点識別の反応時間と加齢の影響

二点識別に要する弁別・反応時間に加齢が与える影響についても、左示指のボタン押し反応に対するリアクションタイムを各年齢層毎に分析して検討を行った。その結果、年齢層が高くなるほど弁別・反応時間が遅くなることが示された(Table 7)。二点間距離と平均反応時間の関連をプロットすると、年齢層によって異なる曲線を呈することが示された(図 7)。二点識別覚関連閾値と曲線の関係を詳細に検討すると、全ての年齢層において、明らかに二点と弁別できる二点間距離、即ち clear-min よりも大きい二点間距離の場合に反応時間が最も短く、二点か一点か判別が曖昧な ambiguous-zone の二点間距離 (Young: 0.4 - 2mm, Middle: 0.9 - 3.2mm, Elderly: 1 - 3.7mm) の間に入ると急激に反応時間が遅くなることが示された(Table 4, Table 7、及び図 7)。この傾向は個人レベルで見てもほぼ例外なく当てはまった。

Table 7: 若年者と高齢者における左示指の平均二点弁別反応時間(sec ± SD)

二点間距離(mm)	0.5	1	2	3	4	5
Young	1.59 ± 0.41	1.58 ± 0.37	1.46 ± 0.26	1.40 ± 0.26	1.38 ± 0.27	1.37 ± 0.26
Middle	1.68 ± 0.23	1.71 ± 0.25	1.64 ± 0.24	1.64 ± 0.23	1.55 ± 0.18	1.53 ± 0.17
Elderly	1.84 ± 0.39	1.88 ± 0.44	1.87 ± 0.38	1.80 ± 0.37	1.71 ± 0.34	1.66 ± 0.28

各年齢層の平均二点弁別反応時間(左示指)

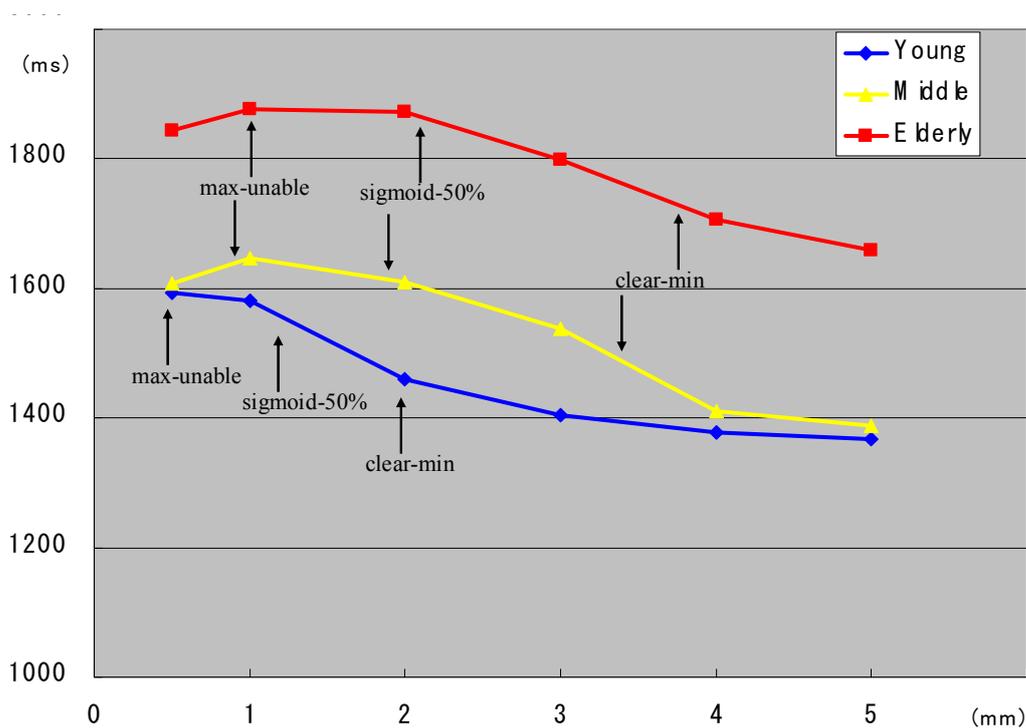


図 7：二点識別に要する弁別・反応時間と二点間距離の関連

3) 脳機能画像検査に利用可能な二点識別覚刺激装置の作成

今回開発した二点識別覚刺激装置の全体像を図8に示す。脳磁図で用いるためには磁場を乱すようなモーター類は一切使えないため、刺激プローブ部分を Air tube を介してポンプから送られる空気によって駆動する仕組みとした。刺激生成本体は USB を介して PC に接続し、PC から二点・一点刺激を自由にコントロールすることが出来る (図8、上)。本体側面には Air tube 接続口、Trigger signal in/out BNC、電源 in/out 等のコネクタ類が設置されている (図8、左下)。この刺激装置システム全体は、アタッシュケースに入れて持ち運びできるように、非常にコンパクトに設計されている (図8、右下)。



図8：二点識別覚刺激装置の概観

刺激プローブ部は、二点識別覚自動検査システム（図2）と同じ形状にすることにより皮膚のメカノレセプターに同等の刺激を与えることができるような形状となっており、ait tube を介して送られたきた air puff によって稼動する（図9）。この部分は全て非磁性体で設計されており、超高感度の脳磁計でも駆動によるノイズが混入しないことを確認した。また、PC から2点・1点刺激を自由にコントロールして、BNC ケーブルを介して脳磁計にその Trigger signal を送ることにより、刺激に同期した誘発脳磁場の計測が可能なことも確認した。

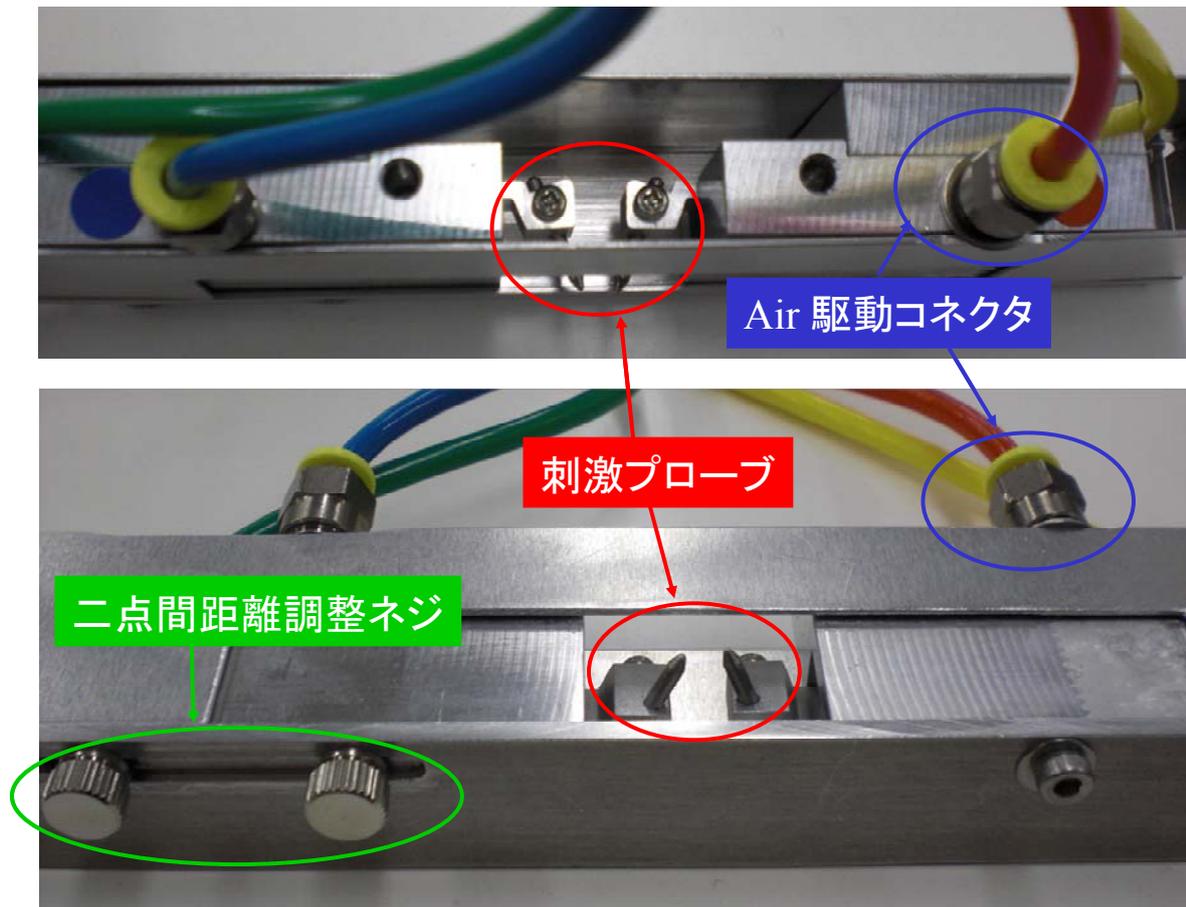


図9：刺激プローブ部分の拡大

IV. 考察

これまでに開発した二点識別覚自動検査システム（測定機器、検査プロトコール、及びデータ分析法）を用いることにより、本年度の中年齢層に対する検査もこれまでと同様に行うことができた。これにより、正常データベースは胎児性水俣病の年齢層を含むほぼ全世代まで拡充され、加齢の影響についても詳細な検討を行うことができた。

<二点識別覚関連閾値の加齢による影響>

昨年度の報告と同様、手動測定の場合、有意な加齢の影響は示指のみで認められ、下口唇や舌では、有意な加齢変化は認められなかった（Table 3, 5, 及び図 5, 6）。これは、手では加齢に伴い二点識別覚が低下するといった報告^{1,2)}や、舌尖では加齢の影響をあまり受けないといった報告^{3,4)}ともよく合致する所見である。しかし、二点識別覚自動検査システムによる測定では、左示指、下口唇、舌の全ての部位で有意な加齢の影響が捉えられた（Table 4, 6, 及び図 5, 6）。これは、二点識別覚自動検査システムが手動測定に比べて、より感度と信頼性の高い測定を可能にしているためと考えられる。具体的には以下の理由があげられる。

- a) マシン測定では二点間の距離、及び一点・二点刺激が完全にランダムとなっているが、手動測定の場合は、一点・二点刺激はランダムに与えられるものの、二点間距離は、広い距離から始め、少しずつ短くしていく方法を取っている。このため、被験者は徐々に間隔が狭くなっていくことにより順応していくチャンスが与えられ、また、「二点間距離は次第に狭められていく」といったことを知っている事による心理的バイアスが働く可能性もある。従って、こういった心理的ストラテジーを利用できないマシン自動測定の方が、より純粋な二点識別覚関連閾値を測定できると考えられる。
- b) マシン測定は刺激の物理的パラメータを一定にできるので、手動測定よりも、精密にコントロールした刺激が与えられる結果、高い信頼性と客観性を持った測定が脳となっている。
- c) 今回認められた二点識別覚関連閾値の高齢者と若年者との差は、ほとんどが 1mm 以下の微細な変化である。このような微細な変化を 1mm ピッチの検査で捉えるのは簡単ではないと考えられる。マシン測定の場合、sigmoid 曲線にフィッティングさせて 50%閾値を求めると、1mm 以下の微細な変化に対しても感度が高いと考えられる。

<加齢の影響を補正した二点識別覚関連閾値の正常範囲>

これまでの全検査データを用いて相関分析と回帰分析によって得られた結果を元に、年齢補正を考慮した 50%弁別閾値（sigmoid-50%）上限値の計算式を求めた（Table 8）。正常上限値を+2SE に設定した場合は、検査を行った健常被験者約 200 名のうち外れ値を示す例が 4-8 例（約 2-4%）、+3SE に設定した場合は 1-2 例（約 0.5-1%）であり、信頼のおける正常上限値として利用できると考えられた。これを用いて 20-90 才までの各年齢における 50%弁別閾値の参考正常値を求めた（Table 9）。これによると、50%弁別閾値が左示指や下口唇で 6 mm、舌で 5 mm を越えていたら、年齢に関係なく異常である可能性が高いことがわかる。

Table 8: 50%弁別閾値(sigmoid-50%)正常上限の推定式及び健常対照検査でこれを外れた実数

		正常上限値推定式	外れ値実数
左示指	+2SE上限	閾値上限値(mm) = 0.022 x 年齢 + 2.34	8/206 (3.9%)
	+3SE上限	閾値上限値(mm) = 0.022 x 年齢 + 3.18	2/206 (1.0%)
下口唇	+2SE上限	閾値上限値(mm) = 0.013 x 年齢 + 3.58	4/193 (2.1%)
	+3SE上限	閾値上限値(mm) = 0.013 x 年齢 + 4.62	1/193 (0.5%)
舌	+2SE上限	閾値上限値(mm) = 0.015 x 年齢 + 2.16	8/204 (3.9%)
	+3SE上限	閾値上限値(mm) = 0.015 x 年齢 + 2.93	1/204 (0.5%)

Table 9: 各年齢の50%弁別閾値(sigmoid-50%)参考正常値(mm)

年齢(才)		20	30	40	50	60	70	80	90
左示指	平均値	1.1	1.3	1.5	1.8	2.0	2.2	2.4	2.7
	+2SE上限値	2.8	3.0	3.2	3.4	3.7	3.9	4.1	4.3
	+3SE上限値	3.6	3.8	4.1	4.3	4.5	4.7	4.9	5.2
下口唇	平均値	1.8	1.9	2.0	2.1	2.3	2.4	2.5	2.7
	+2SE上限値	3.8	4.0	4.1	4.2	4.3	4.5	4.6	4.7
	+3SE上限値	4.9	5.0	5.1	5.3	5.4	5.5	5.6	5.8
舌	平均値	0.9	1.1	1.2	1.3	1.5	1.6	1.8	1.9
	+2SE上限値	2.4	2.6	2.7	2.9	3.0	3.2	3.3	3.5
	+3SE上限値	3.2	3.4	3.5	3.6	3.8	3.9	4.1	4.2

<脳機能画像検査に利用可能な二点識別覚刺激装置の作成>

二点識別覚の客観的検査法としては、我々の開発した二点識別覚自動検査システムを用いた感覚検査として行う方法以外にも、柿木班でこれまでに行われてきた脳機能画像検査を用いる方法がある⁶⁻⁸⁾。これは、Mismatch反応⁹⁾という、脳の自動弁別プロセスを脳磁図や機能的MRIを用いて可視化するもので、被験者の注意や意思に関係なく測定できるという客観性を持っている点が特に優れている。従って、我々が開発した方法をこのような脳機能画像検査を併用することによって、二点識別覚検査に別の角度からの客観性を持たせることができると期待される。しかし、柿木班の方法は主に末梢神経やその神経終末を直接刺激する電気刺激を用いているため、我々が行っているような皮膚のメカノレセプターを刺激する通常の二点識別覚検査とは皮膚における刺激メカニズムが異なり、これまでに求めた正常値をそのまま適用することができない。また、湿気によるリーク電流のため、舌や口唇刺激における正確な二点間距離の設定も不可能である。そこで前年度我々が提唱した二点識別覚異常自動判定アルゴリズム(図10)を実現するためにも、二点識別覚自動測定システムと同等の刺激を用いて脳機能画像検査を行うことができる刺激装置を開発することが重要と考えられた。今回開発した二点識別覚刺激装置は、脳磁図検査といった最も厳密さが要求される測定にも耐えられる仕様であり、今後の実運用によって有用なデータを蓄積していくことが期待される。

二点識別覚異常値自動判定アルゴリズムの発展型

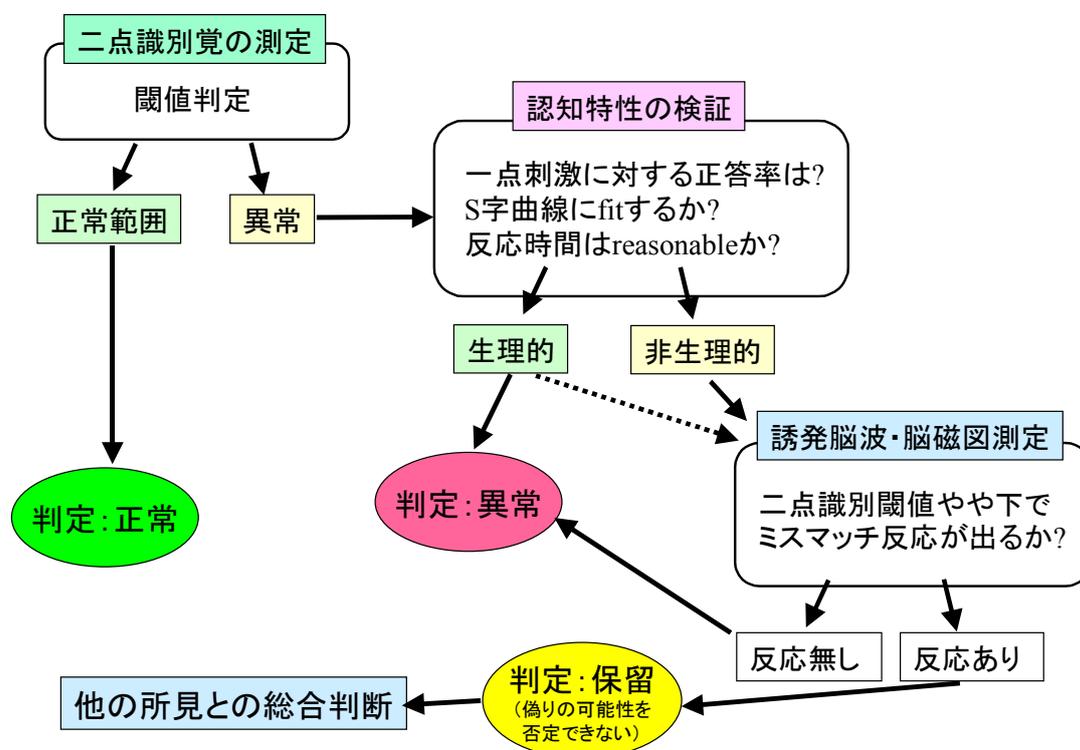


図10

V. 結論

- 1) 今年度は胎児性水俣病の年齢層である40-50才台の健康ボランティア60名を対象にこれまでと同様の二点識別覚検査を行い、正常データベースをほぼ全世代にわたって拡充した。
- 2) これまでに行った約200名に対する全検査データを用いて加齢の影響についても詳細な検討を行い、左示指先端、下口唇、舌の3箇所全て加齢により二点識別覚関連閾値が有意に増大することを明らかにした。
- 3) 自動二点識別覚自動検査システムは、手動検査よりも感度や信頼性に優れており、従来捉えるのが困難であった舌や口唇における二点識別覚の加齢変化を捉えることができた。
- 4) 年齢補正を加味した二点識別覚正常上限値の計算式を明らかにし、各年齢における正常範囲を呈示した。
- 5) 脳機能画像検査に利用可能な二点識別覚刺激装置を新たに開発した。

VI. 次年度以降の計画

次年度以降も以下の点を中心にして研究を更に進展させていく予定である。

- 1) 二点識別覚関連閾値の正常値の信頼性を高めるため、今後も対象者数を拡大していく。
- 2) 今回開発した二点識別覚刺激装置を脳磁図検査に応用していく。実際の体性感覚誘発脳磁図波形を見ながら、刺激装置や刺激ソフトの検証を行っていき、信頼性の高い、安定した波形が記録できるようにチューニングを行って実運用を目指す。また、実際に健常被験者を対象に二点識別刺激による mismatch 反応測定を行い、二点識別覚関連閾値との関係を明らかにしていく。

引用文献

1. Shimokata H, Kuzuya F. Two-point discrimination test of the skin as an index of sensory aging. *Gerontology*. 1995;41:267-72.
2. Dinse HR, Kleibel N, Kalisch T, et al. Tactile coactivation resets age-related decline of human tactile discrimination. *Ann Neurol*. 2006;60:88-94.
3. Calhoun KH, Gibson B, Hartley L, et al. Age-related changes in oral sensation. *Laryngoscope*. 1992;102:109-16.
4. Fukunaga A, Uematsu H, Sugimoto K. Influences of aging on taste perception and oral somatic sensation. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2005; 60:109-13.4.
5. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, et al. Objective examination for two-point stimulation using a somatosensory oddball paradigm: an MEG study. *Clin Neurophysiol*. 2007;118:403-11.
6. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, et al. Mismatch responses related to temporal discrimination of somatosensory stimulation. *Clin Neurophysiol*. 2005;116:1930-7.
7. Akatsuka K, Noguchi Y, Harada, et al.. Neural codes for somatosensory two-point discrimination in inferior parietal lobule: an fMRI study. *Neuroimage*. 2008; 40:852-8.
8. Näätänen, R.. The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear* 1995; 16: 6-18.

参考資料：二点識別閾値「sigmoid-50%」計算法

得られた誤答率ヒストグラムから自動的に 50% 弁別閾値 (sigmoid-50%) を求めるため、まず (1) に示す式で sigmoid 曲線にフィッティングができる。

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

しかしこの場合、短い二点間距離での被験者の正答率が高いと、計算上の 50% 弁別閾値がマイナス値をとることがあり問題となる。そこで、「二点間距離が 0mm の場合は、二点刺激は全て一点と認識される(誤答率が 100%となる)はずである」という、生理学的な constrain を与えることにより、sigmoid-50% 値がマイナス値にならないように次のように改変を行った。

上式(1)で二点弁別の誤答率をフィッティングする。フィッティング関数 $f(x)$ による推定値と測定値との残差を E とし、 E が最小になる条件は

$$E = \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i))^2 \quad (2)$$

$$\frac{\partial E}{\partial a} = 0 \quad (3)$$

$$\frac{\partial E}{\partial b} = 0 \quad (4)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial E}{\partial a} &= 2 \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i)) \left(-\frac{\partial}{\partial a} f(x_i) \right) \\ &= -2 \sum_{i=1}^n \left(y_i - \frac{1}{\exp^{a(x_i-b)} + 1} \right) \frac{(x_i - b) \exp^{a(x_i-b)}}{(\exp^{a(x_i-b)} + 1)^2} \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial E}{\partial b} &= 2 \sum_{i=1}^n (y_i - f(x_i)) \left(-\frac{\partial}{\partial b} f(x_i) \right) \\ &= 2 \sum_{i=1}^n \left(y_i - \frac{1}{\exp^{a(x_i-b)} + 1} \right) \frac{a \exp^{a(x_i-b)}}{(\exp^{a(x_i-b)} + 1)^2} \end{aligned} \quad (6)$$

である。そこで、この連立方程式を a と b について解くことができればよいが、それは困難であるため数値的に探索を行う。 a と b についてある範囲を定め、メッシュを切って残差 E が最小になる a と b の組み合わせを探す。そしてその近傍が十分に滑らかで下に凸であることを確かめてから最小値を二次関数フィットで探索を行う。

次に測定値が $x=0$ で $y=1$ であるべきであるという条件から、この条件をフィッティング関数のパラメータ a , b に課すとすると、 a と b に拘束条件が付く。すなわち

$$f(0) = \frac{1}{\exp^{-ab} + 1} = 1 - \epsilon \quad (7)$$

ここで $f(0) = 1 - \epsilon$ としたのは、本来この関数が 1 になるのは $\lim_{x \rightarrow -\infty} f(x) = 1$ であるためである。a と b について式を書き直すと、

$$ab = \log \left| \frac{1 - \epsilon}{\epsilon} \right| \quad (8)$$

$f(0) = 1$ に近づけるには $\epsilon \rightarrow 0$ とすればよいが、 $ab \rightarrow \infty$ となる。フィッティングパラメータとして b を選択すれば、必然的に a の値は大きくなり、関数 $f(x)$ は階段関数化する。

Cutaneous two-point discrimination in elderly people

Akinori Nakamura^{*1}, Tetsuya Nemoto^{*2}, Kimiko Kato^{*1}, Takumi Nishii^{*2},
Ryo Kubota^{*2}, Nobuo Noda^{*3}, Hiroyuki Matsuura^{*2}

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

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

^{*3}*Eisho Kinzoku corporation*

Keywords: two-point discrimination, automated examination, manual examination, normal value, ageing effects, automatic evaluation, Magnetoencephalography

Abstract

Cutaneous two-point discrimination is known to be impaired in patients with Minamata disease and therefore is expected to be useful as one of the biological markers for methyl-mercury intoxication. The main goal of this project is to reveal the effects of aging on two-point discrimination, and to determine scientifically reliable standard values for two-point discrimination thresholds in elderly people.

Previously, we have established an *automatic two-point discrimination measurement system* which consisted of: 1) automated examination machines, which can control physical features of the stimuli, 2) a measurement protocol which enables subjective and reliable measurements, and 3) analytic methods that can automatically estimate the reliable two-point thresholds. Finally we measured two-point thresholds at the index finger, lower lip and tongue in 150 healthy volunteers including 32 young and 118 elderly people using this system.

This year, we have measured two-point thresholds in 60 middle-aged (40-59 yrs) subjects, who are the same generation as the patients with fetal Minamata disease, using the identical methods. The effects of ageing on two-points thresholds were analyzed in detail by combining all of the data from 210 subjects.

The results demonstrated that all of the index finger, lip and tongue showed significant ageing effects that the two-point thresholds become larger according to the age. The ageing effects were the largest at the index finger and the smallest at the lip. The measurements using the *automatic two-point discrimination measurement system* showed higher sensitivity in detecting the ageing effects than the manual measurements that could detect the effects only at the index finger. With the results, we have obtained formulas to estimate the upper limit of the normal value for 50%-discriminable two-point thresholds as follows;

Index finger : +2SE upper range (mm) = 0.022 * age (yrs) + 2.34

Lower lip : +2SE upper range (mm) = 0.013 * age (yrs) + 3.58

Tongue : +2SE upper range (mm) = 0.015 * age (yrs) + 2.16

(SE: standard error)

Additionally, we have newly developed a two-point stimulation machine in order to apply our system for functional neuroimaging technique such as magnetoencephalography (MEG) and fMRI. Since this machine can stimulate the skin mechano-receptors as identical with our *automatic two-point discrimination measurement system*, we are able to refer the same normal database which we have established. The probe part of the stimulator is made of magnetic-free materials and does not produce any noise detectable by supersensitive MEG sensors. Using this new stimulator, we are going to measure MEG in next years.

Ⅲ メチル水銀ばく露による健康問題の国際的課題に関する研究

メチル水銀曝露による健康障害に関する国際的レビューに関する研究

村田勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学教授）

吉田 稔（八戸大学人間健康学部教授）

仲井邦彦（東北大学大学院医学系研究科環境保健医学准教授）

坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学部長）

岩田豊人（秋田大学医学部社会環境医学環境保健学助教）

柳沼 梢（東北大学大学院医学系研究科環境保健医学）

島田美幸（東北大学大学院医学系研究科環境保健医学）

研究要旨

水俣病は発生から 50 年以上経過して日本でのメチル水銀汚染はもはやないが、自然界から水銀は発生しており、小児における低濃度水銀曝露の健康影響に関する問題は必ずしも全て解決している訳ではない。また、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、特に金採掘による水銀汚染も世界的な問題になっている。このような観点から、低濃度曝露を含む国際的なメチル水銀による健康障害に関する文献レビューを行った。

今年度のレビューにより、以下のことが示された。(1) メチル水銀および水銀を扱った PubMed 掲載論文の中で、2008 年以降ヒト研究の報告数が減少傾向にある。(2) メチル水銀の介入研究により、高濃度メチル水銀含有魚を長期間摂食し続けると交感副交感神経バランスに関連する心疾患の潜在的リスクを高める可能性がある。(3) 胎児期のメチル水銀および PCB 曝露量および妊娠期間の魚介類摂食量を含めて小児行動発達影響を検討すると、運動機能にメチル水銀が影響している可能性が示唆された。(4) 出産前後の母子赤血球中の重金属濃度を測定すると、胎盤経由の母から子どもへの移行は、メチル水銀が最も高く、カドミウムはあまり移行しないと考えられた。一方、ヒ素も有機ヒ素として海産物に多く含まれ、メチル水銀とともにヒ素も魚摂取によって体内に多く取り込まれ、かつ胎盤経由で子どもにも移行した。(5) 臍帯組織中メチル水銀濃度を解析すると、水俣病発生時期の水俣地域の曝露濃度はチッソ水俣工場でアセトアルデヒドの生産量が増えた 1955～1959 年に最も高く、それ以後徐々に低下した。また、水俣近辺の地区別臍帯組織メチル水銀濃度の推移を検討すると、史的事実と一致していた。

途上国の水銀汚染に関しては、小規模金鉱山における採掘活動にともなう作業者の健康被害がアマゾン流域に留まらずアフリカ、東南アジアでも深刻な社会問題となっている。特に、水銀アマルガム燃焼作業者の多くが典型的な慢性水銀中毒症状を呈しており、水銀汚染の影響の大きさが窺える。アマゾン流域では国連工業開発機構の下で水銀による健康被害対策が実施されているが、まだ多くの発展途上国で対策の遅れが目立つ。中国では小規模水銀鉱山作業者に慢性水銀中毒症状が見られている。加えて、水銀採掘活動に伴い周辺地域の土壌の水銀汚染が穀物中のメチル水銀含量の増加を招いていることから、環境からの水銀蒸気曝露に加え、食物からのメチル水銀曝露もあり、複合曝露によるリスクが危惧される。また旧水銀鉱山を抱える地域では水銀による環境への影響をモニタリングする動きも出てきている。

キーワード： メチル水銀、低濃度曝露、胎児期、成人期、発展途上国

I. 研究目的

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

本年度は、①メチル水銀の疫学研究のここ 10 年間の推移を示すとともに、②2010 年に日本発の疫学研究論文の概要、③途上国での水銀汚染の実態などメチル水銀（および水銀）曝露による健康影響の実態および研究動向を文献レビューし、その影響や地域の特徴を検討した。

II. 研究方法

文献データベース Medline (PubMed) を用いて、2010 年末までに報告された①メチル水銀に関連する論文数の推移、②日本発の疫学研究論文の概要、③途上国での水銀汚染の実態など、メチル水銀曝露による健康影響に関する文献レビューを行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、公開された文献調査であるので、倫理的配慮は必要としない。

III. 研究結果

1) メチル水銀（および水銀）のヒト研究の推移

メチル水銀 (methylmercury) がキーワードとなっている総論文数を 2000 年から 2010 年までを PubMed を用いて検索すると (表 1)、124 編~298 編 (全言語) であり、このうちヒトを対象とした論文数は 1 年当たり 55 編から 109 編である。2000~2004 年までヒトを対象とした研究が 4 割以上を維持していたが、2005 年以降 PubMed での登録雑誌数の増加とともに幾分低率になり、特に 2008 年以降メチル水銀関連論文に占めるヒト研究は総数および率ともに減少の一途を辿っている。同様に、水銀 (mercury) をキーワードとする論文も、2005 年以降ヒトを対象とした論文数の割合が減少傾向にある。

1998~2000 年にメチル水銀を巡るフェロー諸島出生コホート研究とセイシェル小児発達研究の一大論争があり¹⁻⁶⁾、それに伴いメチル水銀のヒト (特に小児) 健康影響に関する論文が発表され始めた。また、機を同じくして 2002 年の New England Journal of Medicine 誌でのメチル水銀の冠状動脈疾患リスクに関連する論争があり⁷⁻⁹⁾、メチル水銀の問題が世間を騒がせた時期と呼応する。一方、2008 年にセイシェル小児発達栄養研究の成果が発表され^{10,11)}、フェロー諸島とセイシェル

のメチル水銀論争の結末が見えるとともにメチル水銀に関する関心が薄れてきたかに思える。

表 1 「メチル水銀」関連の PubMed 上の論文数の推移

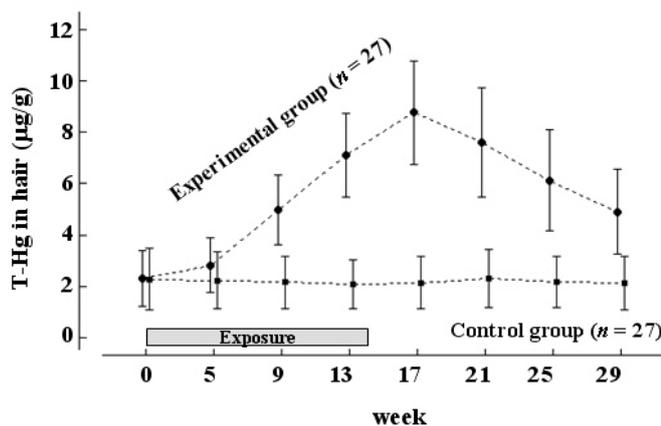
	西 暦 年										
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
“methylmercury” の 入った論文数	148	145	124	143	159	201	227	298	294	249	267
ヒトを対象とした 論文数	62	59	55	60	74	67	75	106	109	82	75
割合 (%)	41.9	40.7	44.4	42.0	46.5	33.3	33.0	35.6	37.1	32.9	28.0
“mercury” の入った 論文数	820	834	931	897	980	1227	1320	1414	1479	1403	1464
ヒトを対象とした 論文数	342	351	366	361	374	398	440	453	493	422	349
割合 (%)	41.7	42.1	39.3	40.2	38.2	32.4	33.3	32.0	33.3	30.1	23.8

2) メチル水銀の介入研究

2006 年以降から 2010 年末までに発表された疫学論文のうち、介入研究 (Intervention study) は Yaginuma-Sakurai らの研究 1 編¹²⁾しかない。これまでの介入研究では、メチル水銀の体内動態が検討されてきたが¹³⁻¹⁶⁾、メチル水銀摂取によるヒト健康影響まで研究した報告は殆どない。

Yaginuma-Sakurai らは 1973 年に日本の厚生省より出された暫定的耐容週間摂取量 (PTWI、3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週) 相当のメチル水銀をメバチマグロおよびメカジキ (体重 60 kg の人で約 200 g/週) を通して被検者 27 名 (平均年齢 25 歳) に 14 週間摂食してもらい、またその摂食終了後 15 週まで毛髪水銀濃度の動態を測定した。この研究では、メチル水銀曝露群とともに、通常の食事を続ける対照群 27 名 (平均年齢 24 歳) でも同様の測定を行った。この結果を図 1 に示しているが、曝露群の毛髪水銀濃度は曝露前が 2.30 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、曝露終了時が 8.76 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、曝露離脱後が 4.90 $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。これに対して、対照群の毛髪水銀濃度は 2.1 $\mu\text{g}/\text{g}$ 付近であった。

図 1 マグロ摂食 (メチル水銀曝露) 群と対照群の毛髪総水銀濃度 (T-Hg) の時間的経過



PTWI レベルのメチル水銀曝露による毛髪水銀の上昇率 (傾き) は 0.54 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{week}$ であり、曝露離脱中の下降率 (傾き) は -0.33 $\mu\text{g}/\text{g}/\text{week}$ であった。また、摂食したメチル水銀が毛髪に移動するまでの時間的ズレ (time-lag) は 3 週間と算出され、この値は Hislop らの結果¹⁷⁾とほぼ同様の値 (約 20 日) であった。曝露終了後の毛髪水銀の半減期も計算され、図 1 に一回帰式を当てはめると約 95 日であったが、この半減期は Al-Shahristani と Shihab¹⁸⁾ がイラクでのメチル水銀中毒禍の患者で計算した値 (35~189 日、平均 72 日) と似通っていた。さらに、4 週毎に毛髪採取が全員で行われたが、その際、被検者後頭部

の同一部位で採取され、54名の平均毛髪発育速度は約1.3 cm/4週と計測された。この毛髪発育速度は、アフリカ人や白人の毛髪発育速度1 cm/月^{19,20}よりも速く、毛髪を生体試料として使う場合には対象集団の毛髪発育速度を確認しておくことも必要となろう。

この対象者54名は曝露前(0週)、曝露終了直後(15週)、曝露離脱後(29週)に採血され、多価不飽和脂肪酸(血漿DHA+EPA)濃度が測定され、かつ心拍変動も測定された。対照群ではいずれの値も有意な変動を示さなかったが、曝露群ではDHA+EPA濃度、心拍変動の交感副交感神経バランス(LF/HF比)、交感神経活動比率(%LF)、交感神経成分の心拍変動(CCV_{LF})が毛髪水銀濃度の変化に伴って有意に変動した。また、メチル水銀曝露終了直後の交感神経活動レベル(曝露前後の差分)は、対照群と比べて、曝露群で有意に大きかった(図2)。Okaらは胎児性水俣病患者で副交感神経活動レベルが有意に低下していたと報告しているが²¹、同じ結果と解釈することができる。

図2 メチル水銀曝露群と対照群の心拍変動指標(曝露前後の差分)の比較

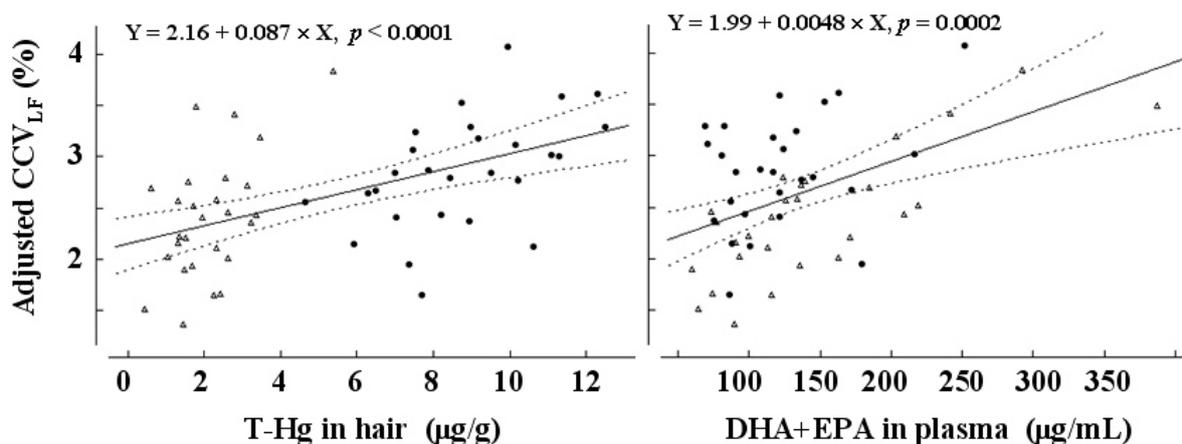
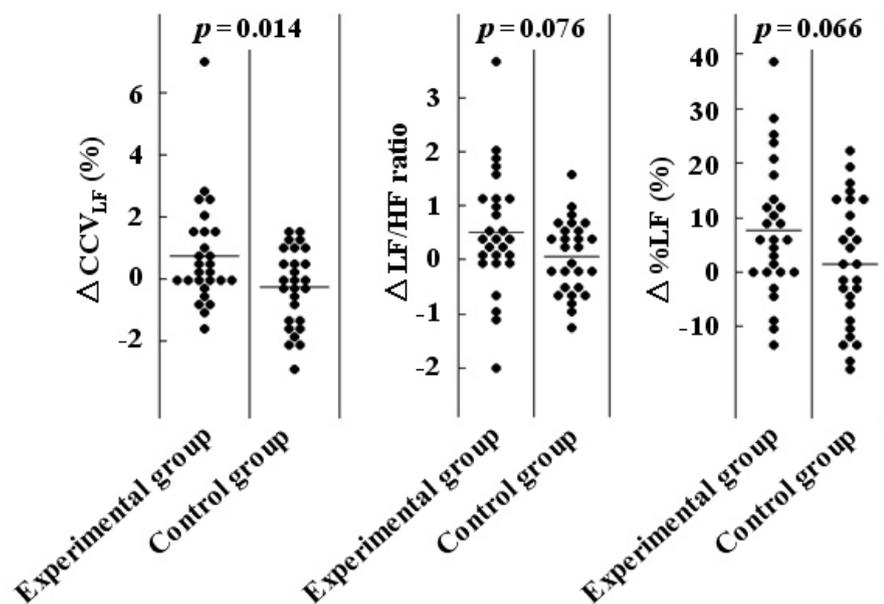


図3 毛髪水銀濃度および多価不飽和脂肪酸(DHA+EPA)と交絡因子調整後の自律神経指標(交感神経の変動係数CCV_{LF})の関係

さらに、対象者54名の曝露終了直後の毛髪水銀濃度と性・年齢、肥満度指数(BMI)で調整した交感神経成分の心拍変動(CCV_{LF})には有意な量依存関係が認められた(図3)。これらのメチ

ル水銀曝露による量依存関係は Murata ら²²⁾ や Grandjean ら²³⁾ の結果とほぼ一致する（但し、Grandjean らは交感神経および副交感神経活動レベルともにメチル水銀の胎児期曝露によって低下している）。本研究におけるこの種の自律神経機能変動はマグロ摂食による一時的変化と解釈することも可能であるが、PTWI レベルのメチル水銀曝露が成人の健康に対して安全であるということを保証するものではないだろう。すなわち、本研究では14週で摂食を止めているが、その後も摂食を続ければ毛髪水銀濃度がさらに高くなる可能性を示唆している。換言すると、長期のメチル水銀曝露（例えば、毎日マグロを食べている人）は交感副交感神経バランスに関連する心疾患の潜在的リスクを高めることになるかもしれない²⁴⁾。なお、血漿 DHA+EPA 濃度と調整後 CCV_{LF} と有意な正の関連が認められており（図3）、この関係についてはさらに詳細な検討が今後必要である。また、この介入研究の曝露群においては、さらに毎週（曝露終了後は隔週）採血もされており、毛髪-血液中水銀比率などの動態の解析が検討される予定であり、今後の成果に期待したい。

3) Tohoku Study of Child Development—東北コホート調査

魚多食集団におけるメチル水銀の小児神経発達影響は、これまでフェロー諸島（クジラ）^{1,3,4,23,25,26)}、セイシェル（カツオなど）^{2,6,27)} およびニュージーランド（サメ）^{28,29)} の出生コホート研究の報告に頼ってきた。しかしながら、各々の国によって食べる魚も量も違ふし、基本的な食生活習慣が異なる。したがって、わが国固有の出生コホート研究の成果発表に期待が寄せられていた。研究デザインに関する論文³⁰⁾ が2004年に出されてから6年経過し、2010年に漸く東北コホート調査の成果が Suzuki らによって報告された³²⁾。この研究ではセイシェルおよびニュージーランドのコホート研究で測定されなかった臍帯血 polychlorinated biphenyls (PCB) も測定されており、神経行動学的検査成績に及ぼす PCB およびメチル水銀の影響を検討したフェロー諸島出生コホート研究⁵⁾ に次ぐ快挙と言えよう。

東北コホート調査では、出産時母親毛髪水銀、PCB および多価不飽和脂肪酸（DHA や EPA）を反映すると考えられる母親の妊娠期の魚介類摂取量を曝露指標（説明変数）として、ブラゼルトン新生児行動評価（NBAS）に影響する要因を検討した。重要な曝露因子や交絡因子（共変量）を欠いたまま解析した以前の研究と異なり、曝露に関連する要因を全て含んだ研究として評価される。

ブラゼルトン新生児行動評価は、生後3日の新生児498名で行われ、28の行動項目と18の反射項目からなり、7つのクラスターに分けられる³¹⁾。出産時の母親毛髪水銀濃度は $2.22 \pm 1.16 \mu\text{g/g}$ （範囲、0.29~9.35 $\mu\text{g/g}$ ）であり、この値はセイシエルの母親の平均毛髪水銀 6.8 $\mu\text{g/g}$ やフェロー諸島の母親の 4.3 $\mu\text{g/g}$ よりも低かった。また、臍帯血の総 PCB 濃度は 52.4 ± 32.6 (7.0~273.8) ng/g 脂質であり、Todaka ら³³⁾ や Kawashiro ら³⁴⁾ の測定した日本人妊婦の値とほぼ同等であったが、フェロー諸島研究^{5,35)} の値よりはかなり低かった。臍帯血甲状腺ホルモン (T_3) も測定され、総 PCB 値と有意な相関 ($r=0.139$) が認められた。

ブラゼルトン新生児行動評価の7クラスターのうち、運動クラスターの得点は毛髪水銀および総 PCB 濃度と有意な単相関（各々、 $r=-0.126$ と $r=-0.140$ ）を示した。次に、毛髪水銀、総 PCB、魚介類摂取量の他に関連する交絡因子を説明変数とし、運動クラスター得点を目的変数とする重回帰分析を行うと、毛髪水銀濃度のみが有意な負の関連を示したが、総 PCB は有意な関連性を示

さなかった。この結果はフェロー諸島出生コホート研究の結果⁵⁾と一致した。すなわち、臍帯組織 PCB はボストン語彙検査 (Boston Naming Test) および注意集中機能検査 (反応時間) の低下と有意に関連したが、水銀濃度を調整するとこれらの有意な関連性は消失した。

PCB の周産期曝露による神経行動/心理学的影響は、多くの疫学研究が行われているものの、必ずしも一定の結論が得られている訳ではない。例えば、米国 (ミシガン西部)³⁶⁾、ドイツ (デュッセルドルフ)³⁷⁾、オランダ^{38, 39)} におけるコホート研究では小児神経発達に PCB が悪影響を及ぼすことが報告されている。米国ノースカロライナコホートでは、周産期 PCB 曝露の影響が小児の加齢に伴い変わった⁴⁰⁻⁴²⁾。すなわち、新生児および2歳児では有意な関連があったが、3～5歳児になるとそのような有意な関連は見られなくなった。一方、幾つかのコホート研究では周産期 PCB 曝露と神経行動指標との間に有意な関係を見つけることができなかった^{5, 43, 44)}。東北コホート調査の PCB 濃度が高くなかったということもあるが、メチル水銀曝露の影響を考慮すると PCB の影響は見られない。この結論が確定的であるか否かについては今後の研究動向を追跡していかねばならない。ただ、前述の多くのコホート研究で重要な有害物質 (メチル水銀や鉛) の影響を考慮しておらず、このことが PCB の影響評価の結論を先送りしている理由の一つと考えられる。いずれにしても、環境中のメチル水銀、PCB、鉛などの濃度は年々低くなり、妊婦のこれら物質の環境曝露も低下するであろう。このことは、当該物質の曝露による健康影響も益々軽微になっていくことを示唆する。したがって、「低濃度なので同時曝露物質としなかった」^{1, 2)}ではなく、本研究のように吟味していく姿勢が重要となる。

4) 母体および臍帯血の水銀と他の化学物質の関係

高度経済成長期に排出された水銀、鉛、カドミウム、ヒ素などの重金属による環境汚染により、人類は健康問題に遭遇した。先進諸国では、今日、これらの化学物質に対して厳しい規制が行われ、公害に相当するような重篤な汚染は発生していないように思われる。にもかかわらず、これらは自然界からも発生するので、汚染が皆無になるということはない。その結果、先進諸国では慢性低濃度曝露による健康影響が危惧され続けている^{19, 45-47)}。また、これに伴い、研究の標的集団も成人から子ども、特に胎児へと推移しつつある (次のIII-5を参照)。したがって、胎児期の曝露影響を表すと考えられる臍帯血中の重金属濃度の動態を明らかにすることは意義深い。Sakamoto らは、九州福岡県にある産婦人科医院に通院している出産前1週間の妊婦の血液とその出生児の臍帯血 (81 ペア) を収集し、赤血球中の水銀、鉛、カドミウム、ヒ素、セレン濃度を測定した⁴⁸⁾。ここで赤血球中濃度を測定したのは、血清あるいは血漿中水銀は金属水銀あるいは無機水銀の生体曝露指標であるが、赤血球中水銀はメチル水銀の最も良い生体曝露指標とみなされているからである^{15, 49)}。

表2が母子ペア81組から算出された重金属の平均±標準偏差の値である。これらの母子間の値は水銀、鉛、ヒ素およびセレンで正の相関 ($P<0.01$) があり、カドミウムでも正の相関 ($P<0.05$) が見られた (すなわち、母体赤血球濃度が高いほど臍帯血赤血球濃度も高くなる)。また、いずれの重金属も母子間で有意な差が認められ (対応のある t 検定、 $P<0.01$)、水銀とセレンは臍帯血赤血球中濃度の方が母体血赤血球中濃度よりも高かった。このため、臍帯と母体の赤血球中濃度比は水銀とセレンで1より大きくなり、胎児へのこれら金属の胎盤移行度が高いことが推定された。

メチル水銀が必須アミノ酸と結合した形で胎児に移行することは過去の報告でも知られていた^{50, 51)}。しかし、セレンについては Sakamoto らの結果⁴⁸⁾と同様の報告もあるが⁵²⁾、逆に臍帯血セレンが母体血セレンよりも低いとする報告もあり^{53, 54)}、人種あるいは食生活の違いによって異なるのか現時点で決定することはできない。一方、カドミウムの胎盤経由の移行はこれら金属の中で最も低く、他の報告^{53, 55-60)}でも同様の結果であった。胎盤でのカドミウム蓄積量が母体血や臍帯血よりも高いことは知られており^{55, 59, 61)}、胎盤がカドミウムに対する障壁として効果的に働いていることを示唆しているのかもしれない。

表2 水銀(Hg)、鉛(Pb)、カドミウム(Cd)、ヒ素(As)、セレン(Se)の平均値±標準偏差 (ng/g)

	Hg	Pb	Cd	As	Se
母体赤血球中濃度	9.41±4.19	26.4±9.74	1.97±0.72	6.12±3.40	192±25.1
臍帯赤血球中濃度	15.3±7.43	13.2±4.12	0.22±0.20	3.76±2.27	227±33.9
臍帯/母体赤血球比	1.63±0.28	0.52±0.11	0.12±0.08	0.62±0.17	1.18±0.11

体内の金属間の関係を調べると、母体内の水銀が高いと、ヒ素およびセレンも高くなり(各々、 $r=0.31$ と $r=0.29$)、胎児内の水銀が高いとヒ素も高い ($r=0.24$)⁴⁸⁾。このヒ素の多くは有機ヒ素 (arsenobetaine) であり^{62, 63)}、海産物の摂食に由来するものである^{64, 65)}。このため、海産物を多食する人ではメチル水銀もヒ素も共に高くなるし、臍帯血で同様の観察が見られても不思議でない。有機ヒ素そのものは毒性が低いと言われているが、体内で無機ヒ素に変わりうる。無機ヒ素の神経毒性は広く知られているので⁶⁶⁻⁶⁸⁾、今後もメチル水銀、鉛、ヒ素の同時曝露による健康影響(特に、神経発達影響)に注意を向けていく必要がある。

5) 水俣地域住民の「臍の緒」のメチル水銀濃度の推移

水俣病は、メチル水銀が高濃度に蓄積された魚介類の摂取によって起きたメチル水銀中毒であり、環境への配慮を欠いた産業活動がもたらした公害の原点である。水俣病の歴史を描いた和書は多数あるが、英文で記された書は必ずしも多くない⁶⁹⁻⁷³⁾。それら歴史書によると、水俣病が発生していた当時の生体試料中の水銀測定法は十分確立されていなかった。このためかメチル水銀の量-反応関係を評価する際、世界の研究者はイラクで発生した農薬によるメチル水銀中毒禍のデータを用い⁷⁴⁻⁷⁶⁾、曝露データを持たない水俣病の疫学研究を殆ど利用しなかった。水俣病研究を世界に再認識させる契機になったのは保存「臍の緒」から測定されたメチル水銀濃度であり⁷⁷⁻⁷⁹⁾、この歴史的意義を再評価したのは環境保健領域の先導的雑誌“Environmental Health Perspectives”に2010年に掲載された総説である⁸⁰⁾。

図4 保存臍帯の例



1950年代を挟む歴史的時期に熊本県の水俣地域で集められた臍帯組織(図4)のメチル水銀濃度の大半は国立水俣病総合研究センターで測定され、同じ臍帯組織メチル水銀データが異なる機

関から発表された^{81,82)}。ここでは、2010年に発表された Sakamoto ら⁸²⁾の報告を紹介する。

表3 水俣地域で生まれた住民の臍帯組織メチル水銀濃度

表3は出生が1945～1989年の5年毎の水俣地域全体における臍帯組織中メチル水銀濃度の中央値とその25および75パーセントイル値である。1955～1959年のメチル水銀の臍帯組織濃度が最も高く、その後徐々に濃度は低下した。

Years	n	Median (μg/g)	25-75 Percentiles
1945-1949	6	0.401	0.205-0.747
1950-1954	43	0.166	0.082-0.539
1955-1959	63	0.777	0.346-1.680
1960-1964	88	0.350	0.182-0.715
1965-1969	91	0.250	0.188-0.400
1970-1974	21	0.170	0.143-0.330
1975-1989*	13	0.100	0.056-0.190

表4 水俣地域以外の臍帯組織メチル水銀濃度

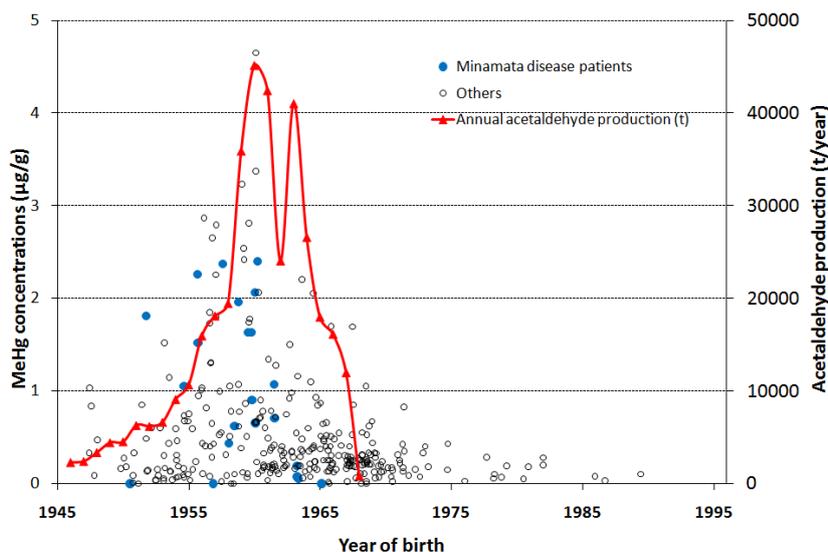
表4は比較的最近生まれた対照地域の子どもの臍帯組織のメチル水銀濃度である。出生地が宮崎、秋田、鳥取では保存臍帯(*)、対馬(長崎)、福岡、東京では乾燥臍帯(**)を用いて、メチル水銀濃度が測定された。表3と表4を比較すると、水俣地域でも1975～1989年生まれの子どもの臍帯組織メチル水銀濃度は対照地域の値と殆ど変わらないが、それ以前の臍帯組織からは高濃度のメチル水銀が検出されたことが明らかである。すなわち、1955～1959年に水俣地域で生まれた子どもは対照地域から生まれた子どもの8倍以上も高いメチル水銀の曝露を受けていた。

Population	n	Median (μg/g)	25-75 Percentiles
Miyazaki	106	0.060	0.039-0.068
Akita*	91	0.080	0.040-0.133
Tottori*	45	0.098	0.062-0.148
Tsushima**	38	0.054	0.038-0.072
Fukuoka**	55	0.088	0.076-0.121
Tokyo**	17	0.131	0.096-0.197

メチル水銀は胎盤を介して容易に胎児に移行し、胎児に母親よりも高い濃度で蓄積し⁸³⁾、発達中の胎児の脳に悪影響を及ぼす^{19,80)}。この胎児期曝露後の小児発達影響を調べる最も優れた生体指標として、National Research Councilは臍帯血水銀を推奨した¹⁹⁾。ただ、臍帯血は母親の妊娠後期の食事内容に影響され易いので、Grandjean ら⁸⁴⁾は臍帯組織水銀濃度も胎児期メチル水銀の曝露指標として有用であると述べている。実際、Murata ら²²⁾は7歳児の自律神経機能を評価する際に曝露指標として臍帯組織中メチル水銀濃度を用い、両者に有意な関連があったことを報告している。

図5 アセトアルデヒド生産量と臍帯組織中メチル水銀濃度の関係

さらに、Sakamoto らは水俣地域で得られた保存臍帯組織のメチル水銀濃度とともに、チッソ水俣工場のアセトアルデヒドの生産量の年次推移を重ね、アセトアルデヒドの生産量低下に伴い臍帯組織中メチル水銀濃度も低下したことを示した(図5)⁸²⁾。そして、生産を中止した1968年の翌年以降は1 μg/gを超えるメチル水銀濃度は検出されていないと述べた。但し、この調査は悉皆あるいはランダムサンプリング調査でなく、保存臍帯の収集は水俣病患者団体のリーダーに依頼したので、高値を危惧する人た



た。この調査は悉皆あるいはランダムサンプリング調査でなく、保存臍帯の収集は水俣病患者団体のリーダーに依頼したので、高値を危惧する人た

ちが多く含まれていた可能性はありうる。一方、典型的胎児性水俣病患者は1名しか含まれていなかった。

地区別に臍帯組織メチル水銀濃度を検討すると⁸²⁾、1 µg/g を超える濃度は水俣、出水および津奈木の出生児に見られたが、芦北やその他不知火海沿岸では認められなかった。さらに、1 µg/g を超える濃度は水俣市で1947～1968年に、出水地区では1953～1967年に、津奈木地区では1956～1961年に観察された。これら時間的空間的な推移は水俣病の歴史に刻まれた事実を裏付けるものと考えられた。

6) 発展途上国における水銀の健康問題

多くの発展途上国では小規模金鉱山で金採掘に多量の水銀が使用され、その水銀は回収されないまま環境中に放出されるため、水銀による環境汚染や採掘に携わる作業員やその周辺住民の健康影響が社会的な問題となっている。特に中国貴州省の手掘り採掘を行う水銀鉱山においては、周辺地域の水銀汚染や作業員の健康影響が問題視されている。本章は2010年に発表された論文をもとに小規模金鉱山や水銀鉱山の採掘に伴う最近の水銀汚染とその健康影響について報告する。

①小規模金鉱山における水銀による環境汚染と健康影響

国連工業開発機構 (UNIDO) によりタンザニアの小規模金鉱山地区の作業員を対象に健康評価が行われた⁸⁵⁾。水銀曝露地区 Rwanmagasa で水銀を取扱わない作業員 52 名、水銀を取扱うが水銀アマルガム燃焼作業を行わない作業員 34 名、アマルガム燃焼作業員 104 名、これに対照地区 Katoro の住民 31 名 (対照群) を加えて医学的、神経学的、神経心理的検査を実施した。アマルガム燃焼作業員の血液中水銀濃度は平均 4.62 (0.73～6.06) µg/l、尿中水銀濃度 (クレアチニン補正值、Cr) は平均 3.55 (0.12～36.77) µg/g Cr であり、対照群の血液水銀濃度は平均 1.05 (0.22～2.29) µg/l、尿中水銀濃度は平均 0.24 (0.04～0.92) µg/g Cr と比べかなり高値であった。アマルガム燃焼作業員の 25 名 (約 24%) に慢性水銀中毒症状である振戦、流唾過多、運動失調、歯肉の色素沈着、感覚障害が認められている。また、自覚症状として食欲不振、記憶力減退、倦怠感等を有する者の割合が対照群に比べ高く、しかも鉛筆タッピング (p<0.01) やマッチ箱検査 (p<0.05) 成績も対照群に比べ悪かった。タンザニアの小規模金鉱山におけるアマルガム燃焼者の水銀蒸気による健康影響は深刻であり、さらなる悪化を防止するために水銀曝露の軽減が必要である。

インドネシアでは中央カリマンタン地区と北スラウイシ地区の 2 つの小規模金鉱山で作業員の健康評価が行われた⁸⁶⁾。水銀曝露を受けている地域住民 84 名 (カリマンタン地区 66 名とスラウイシ地区 18 名)、水銀による金抽出を行う作業員 47 名 (カリマンタン地区 30 名とスラウイシ地区 17 名)、アマルガム燃焼作業員 129 名 (カリマンタン地区 69 名とスラウイシ地区 60 名)、これに対照群としてスラウイシ地区住民 21 名を加えて、医学的、神経学的、神経心理的検査を行った。両地区のアマルガム燃焼作業員の平均血中水銀濃度はカリマンタン地区で 38.92 (2.01～429) µg/l、スラウイシ地区で 27.43 (4.55～186) µg/l であり、また平均尿中水銀はカリマンタン地区で 69.35 (0.72～1697) µg/g Cr、スラウイシ地区で 31.89 (0.48～231.8) µg/g Cr であり、対照群の平均血中水銀濃度 4.92 (2.36～10.12) µg/l、平均尿中水銀濃度 0.43 (0.09～1.35) µg/g Cr と比べて、高かった。これら作業員には運動失調、振戦、拮抗運動反復不全などの典型的な水銀中毒症状が見られ、カリマンタン地区では 62%、スラウイシ地区では 55% のアマルガム燃焼作業員が慢性水銀中毒に

罹患していた。神経心理学的検査である記憶検査、フロスティグ視知覚発達検査、マッチ箱検査、鉛筆タッピングの成績は、いずれも対照群と比べ、両地区のアマルガム燃焼者で有意に劣っていた。アマルガム燃焼作業員以外にも鉱山周辺の一般住民にも高い割合（カリマンタン地区で31.8%、スラウイシ地区で16.7%）で中毒症状が見られたことから、一般住民の中毒予防にはアマルガム燃焼による大気中に放出される水銀量を減少させることが重要である。

ガーナ共和国でも小規模金鉱山が全国に遍在している。Yasaswi ら⁸⁷⁾は Upper-East にある Talensi-Nabdram 地区の金鉱山作業員 120 名を対象に健康評価を行った。作業員の 1/5 以上が尿中水銀値 10 µg/l 以上であり、5%の作業員が WHO ガイドラインである 50 µg/l を上回っていた。特に、アマルガム燃焼作業員 5 名の尿中水銀値は中央値 43.8 µg/l、平均 171.1 (±296.5) µg/l であり、機械操作作業員 4 名（中央値 11.6 µg/l）や管理者 11 名（中央値 5.6 µg/l）と比べてかなり高値であった。ガーナ共和国では 200,000 人が小規模金鉱山に従事しており、これらの人々の健康リスクを最小化するために水銀曝露の実態を説明することが重要である。

アメリカのネバダ州にある 2 つの露天掘り金鉱（Cortez-Pipeline 鉱山と Twin Creeks 鉱山）には高濃度の水銀を含む鉱物があり、金採掘活動に伴い水銀が放出される。Eckley ら⁸⁸⁾は 2 つの金鉱からの水銀放出量を算出した。捨石集積（0.6～3.5 µg Hg/g）からの水銀流出量は <1500 ng/m²/day であり、尾鉱（2.8～58 µg Hg/g）からは 684,000 ng/m²/day であり、しかも水銀流出量は鉱物中の水銀濃度、表面の粒径、含水量と関連していた。最も高い水銀放出は金抽出を行う際のシアン浸出中の鉱物や加工処理した高純度鉱物を含む尾鉱を貯めている水からであった。これらの結果から鉱山敷地の埋め立てや捨石（ズリ）の利用中止などは水銀の放出減少に繋がるようであった。また、Eckley らは 2 つの金鉱山で表面から放出される水銀量を鉱物や環境条件を基に計算すると、年間 19kg と 190kg と推定した⁸⁹⁾。これらは各々の鉱山から放出される水銀の 56% と 14% に相当し、浸出している堆積や尾鉱を貯めている水にある鉱物が主な放出源であり、水銀放出を軽減するためには採掘操作を中断するしかないと示唆した。

②小規模水銀鉱山における水銀による環境汚染と健康影響

中国貴州省には幾つかの水銀鉱山が偏在している。多くは手掘りであり、周辺の環境汚染と作業員の健康影響が危惧される。Li ら⁹⁰⁾は、濫木廠（Lanmuchang）、銅仁（Tongren）、貴州などの地域で尿および毛髪水銀を測定し、手掘り水銀鉱山作業員の水銀曝露を調査した。Gouxu では住民 13 名の尿中水銀濃度の幾何平均が 30.6 µg/g Cr であるのに対し作業員 25 名は 216 µg/g Cr であり、また濫木廠の住民 12 名は 39.2 µg/g Cr、作業員 6 名は 560 µg/g Cr であった。いずれの地区でも作業員の尿中水銀は高値であり、しかも臨床症状の手指振戦が 3 名の作業員（Gouxu 地区 2 名、濫木廠地区 1 名）で認められた。

さらに、水銀鉱山周辺では食物の水銀汚染が問題視されている⁹¹⁾。濫木廠水銀鉱山地区では土壌中の水銀汚染により穀物や野菜の水銀汚染が発生している。しかも米の中にもメチル水銀が含まれており、この地区の住民は魚介類摂取に依らない米食によるメチル水銀曝露のあることが報告されている。Gouxu と濫木廠の両地区住民の毛髪中メチル水銀濃度を測定すると、Gouxu 地区では平均 4.26 (1.87～10.6) µg/g、濫木廠地区では 4.55 (2.29～9.55) µg/g であり、しかも毛髪メチル水銀濃度は米のメチル水銀摂取量との間に有意な相関 ($r=0.73$) が認められた。手掘り水銀採掘に伴う水銀汚染は作業員だけでなく住民にも水銀蒸気とメチル水銀の複合曝露による健康リス

クの増強を示唆する。また、Li ら⁹²⁾ は水銀鉱山周辺で収穫された米のメチル水銀の化学形態を高速液体クロマトグラフィー／誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 装置を用いて解析した。生の米のメチル水銀の化学形態は血液-脳関門や胎盤関門を通過するとき $\text{CH}_3\text{Hg-L-Cysteine}$ 型として存在していた。しかし、調理後の米には $\text{CH}_3\text{Hg-L-Cysteine}$ は検出されず、他の化学形態に変化しているようであるが、その化合物の同定および毒性は不明のままである。

Fang ら⁹⁴⁾ は蕪湖都市周辺 (Wuhu urban area) の5地区で土壌中の総水銀と生物学的に利用される水銀分布を調査し、小児に対する健康リスク評価を行った。土壌中水銀は平均 0.207 mg/kg ($0.024 \sim 2.844 \text{ mg/kg}$) であり、塊状に分布し、都心から周辺地区に向けて減少し、人間活動が活発な鏡湖地区では最も高い値 (0.332 mg/kg) を示した。土壌中で生物学的に利用される平均水銀量は 3.8 ($2.6 \sim 4.9$) $\mu\text{g/kg}$ で、総水銀の $0.28 \sim 6.44\%$ であった。野菜の平均水銀濃度は 6.53 ($2.7 \sim 15.2$) $\mu\text{g/kg}$ であり、土壌中で生物学的に利用される水銀量と正の相関を示した。また、小児のハザード指数 (HQ) を計算すると、土壌からの水銀蒸気の吸入は 80.3% と主な曝露経路であることを示すが、HQ値は 2.517×10^{-2} であった。しかも、ハザード指標 (HI) は安全レベルである $\text{HI}=1$ よりかなり低く、蕪湖都市周辺では土壌由来の水銀曝露による小児への健康リスクは低いことを示唆した。

メキシコには多くの水銀鉱山があり、Guerrero 州の北部地帯には4つの水銀鉱山がある。Maria ら⁹⁵⁾ はこれら水銀鉱山地域に住む12歳以上の女性122名を対象に尿中水銀レベルやその変動を調査し、汚染された土壌からの健康影響の評価を行った。土壌中水銀濃度が 625 ppb 以上の汚染地域に住む30歳以上の女性の尿中水銀 (クレアチン補正值) は汚染が少ない地域の女性より 212% も高く、歯科アマルガム充填者よりも 120% 高かった。この地域の女性の尿中水銀は $50 \mu\text{g/g Cr}$ 以上が 5% 、 $35 \mu\text{g/g Cr}$ 以上が 7% 、 $5 \mu\text{g/g Cr}$ 以上が 54% であった。この汚染地区の女性の尿クレアチニン値の平均は 0.7 ($0.1 \sim 3.8$) g/l であり、汚染が少ない地域の女性の平均 0.4 ($0.1 \sim 2.4$) g/l より 41% も高値である。汚染地区の女性の水銀曝露には歯科アマルガム充填材、雨水、井戸水で洗浄した食物も寄与していることが明らかとなり、鉱山周辺住民の健康影響の保護のためにも採鉱廃棄物の管理が重要である。

近年になり、環境中の高濃度の水銀がヒトや生態系に大きな影響を及ぼすことが示され、旧水銀鉱山から環境中に放出される水銀のモニタリングが行われている。スロベニアの旧イドリア水銀鉱山は500年以上にわたり年間1200万トンの水銀鉱石を産出した。イドリア地方の大気中水銀の発生源、空間分布そして堆積に関する調査が行われた⁹⁵⁾。大気中水銀濃度は大半が 10 ng/m^3 以下であったが、旧鉱山の精錬所周辺では 5000 ng/m^3 を超えていた。大気中の水銀蒸気、ガス状無機水銀、粒子状水銀の形態別分析を行うと、ガス状無機水銀と粒子状水銀の割合は 1% 以下であった。大気中の粒子状水銀は降水量により変動するが、降水中の水銀の大半が粒子性の水銀であった。走査型電子顕微鏡検査では、降水中や降下物中に辰砂が存在しており、これはこの地域の地表面の辰砂が風の侵食作用によって飛散したものであった。

スペインのアストゥリアス地区にはアルマデン水銀鉱山など幾つかの水銀鉱山がある。Loredo ら⁹⁶⁾ はアストゥリアス地区の Mieres と Poll de Lena 地域の水銀鉱山から廃棄された水銀鉱石の表層水のモニタリングを Caudal 川集水域で行った。水銀が鉱化された地域ではヒ素の豊富な黄鉄鉱、鶏冠石、少量の硫砒鉄鉱などを含有しており、捨石集積からの鉱山排水や浸出液には酸性条件下で高濃度のヒ素を含み、Caudal 川支流に流れ込んでいた。一方、水銀鉱山地区の川上や川下の表

層水中の水銀濃度はいつも 0.5 µg/l 以下であり、過去の水銀採掘や廃鉱石の風化にも拘わらず、河川は水銀によってあまり汚染されていなかった。

IV. わが国のメチル水銀影響に関する疫学研究の動向

2000 年前後より、わが国でも出生コホート研究が行われるようになり、その先鞭をつけたのは「東北コホート調査」と「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」である。北海道スタディは主に環境化学物質による次世代影響として、①泌尿生殖器系の先天異常、②神経行動発達、③甲状腺機能への影響、④免疫・アレルギー性疾患等に焦点を当てて実施しており、化学物質曝露としては主にダイオキシン類、PCBs、有機フッ素化合物、水銀、妊婦の喫煙などを測定し、研究成果を発表している⁹⁷⁻¹⁰¹⁾。ただ、水銀影響に関する発表論文を我々が見落としているかもしれない。東北コホート調査でも様々な化学物質曝露について検討しているが、常にメチル水銀や PCBs 曝露による小児発達影響を睨んでおり、神経発達指標の測定を行える適齢期に合わせて検査を継続している。今回紹介した研究成果^{12, 31)}は発達段階にある一時期に測定された神経発達影響の解析結果であり、これからも徐々に研究成果が出てくることが期待される。さらに、平成 23 年に入ってから環境省の「子どもの健康と環境に関する全国調査（エコチル調査）」の出生コホートの参加募集が本格的に始まった。したがって、今後わが国でもエコチル調査で行われる環境曝露評価（生体試料、食事調査、質問票調査、生活環境測定）と健康影響評価により、環境中の有害化学物質のヒトへの健康影響の全国レベルの実態が明らかにされよう。

水俣病が発生した当時の水俣地域と比べて、メチル水銀の曝露レベルは著明に低下している⁸²⁾。但し、我々が魚摂食を止めない限り一定レベルの低濃度メチル水銀曝露は避けられないように思われる。今回および以前のレビューを通してメチル水銀のヒトへの健康影響を概観すると、マグロや歯クジラなど高濃度のメチル水銀を含む魚介類を多食し続けると様々な健康影響が見え隠れした¹²⁾。先進諸国におけるメチル水銀曝露で臨床症状が観察されたとする報告はないが¹⁻⁷⁾、様々な神経毒性物質の曝露影響に特別の配慮を払うと、無症候性の軽微な神経影響は現れてくる^{10-12, 22-26, 31)}。そのような神経影響は恐らく臨床医にとって意味を持たないかもしれないが、人々が健康的な生活を送れるようにするために、その軽微な有害影響の出始める曝露濃度（臨界濃度）や発症リスク比を蓄積していくことが予防医学にとって必須である。今後の研究はまさに低濃度長期曝露による健康影響であり、検出は一層難しいことが予想される。それにもかかわらず、有害と言われている化学物質濃度とともに、ヒトの生体に起こっている些細な有害影響を地道に測定・解析・検討していかねばならない。

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) メチル水銀および水銀を扱った PubMed 掲載論文の中で、2008 年以降ヒト研究の報告数が減少傾向にある。(2) メチル水銀の介入研究により、高濃度メチル水銀含有魚を長期間摂食し続けると交感副交感神経バランスに関連する心疾患の潜在的リスクを高める可能性がある。(3) 胎児期のメチル水銀および PCB 曝露量お

よび妊娠期間の魚介類摂食量を含めて小児行動発達影響を検討すると、運動機能にメチル水銀が影響している可能性が示唆された。(4) 出産前後の母子赤血球中の重金属濃度を測定すると、胎盤経由の母から子どもへの移行は、メチル水銀が最も高く、カドミウムは殆ど移行しないと考えられた。一方、ヒ素も有機ヒ素として海産物に多く含まれ、メチル水銀とともにヒ素も魚摂取に比例して体内に多く取り込まれ、かつ胎盤経由で子どもにも移行した。(5) 臍帯組織中メチル水銀濃度を解析すると、水俣病発生時期の水俣地域の曝露濃度はチッソ水俣工場でアセトアルデヒドの生産量が増えた 1955～1959 年に最も（現在と比べ 8 倍以上）高く、それ以後徐々に低下していた。また、水俣近辺の地区別臍帯組織メチル水銀濃度の推移を検討すると、史的事実と一致していた。

途上国の水銀汚染に関しては、小規模金鉱山における採掘活動にともなう作業者の健康被害がアマゾン流域に留まらずアフリカ、東南アジアでも深刻な社会問題となっている。特に、水銀アマalgam 燃焼作業者の多くが典型的な慢性水銀中毒症状を呈しており、水銀汚染の影響の大きさが窺える。アマゾン流域では UNIDO の下で水銀による健康被害対策が実施されているが、まだ多くの発展途上国で対策の遅れが目立つ。中国では小規模水銀鉱山作業者に慢性水銀中毒症状が見られている。加えて、水銀採掘活動に伴い周辺地域の土壌の水銀汚染が穀物中のメチル水銀含量の増加を招いていることから、環境からの水銀蒸気曝露に加え、食物からのメチル水銀曝露もあり、複合曝露によるリスクが危惧される。また旧水銀鉱山を抱える地域では水銀による環境への影響をモニタリングする動きも出てきている。

VI. 次年度以降の計画

メチル水銀曝露は低濃度でも小児の神経発達に影響することが多くの論文で示されている。一方で鉛、ヒ素、マンガンなどの化学物質も神経毒性があることが知られており、これらのメチル水銀との同時曝露による神経発達影響に関する研究が今後なされていくと考えられる。したがって、2011 年に発表される論文の中で、このような内容を含む論文を選択的に収集し、その中でメチル水銀がどのように評価されているのか検討したい。

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, Nyyssönen 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; 247: 1755-1760.
10. Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JM, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Clarkson TW. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 2008; 29: 767-775.
11. Strain JJ, Davidson PW, Bonham MP, Duffy EM, Stokes-Riner A, Thurston SW, Wallace JM, Robson PJ, Shamlaye CF, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Myers GJ, Clarkson PW. 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. Yaginuma-Sakurai K, Murata K, Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. Intervention study on cardiac autonomic nervous effects of methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* 2010; 32: 240-245.
13. Miettinen JK, Rahola T, Hattura T, Rissanen K, Tillander M. Elimination of ²⁰³Hg-methylmercury in man. *Ann Clin Res* 1971; 3: 116-122.
14. Birke G, Johnels AG, Plantin LO, Sjostrand B, Skerfving S, Westermark T. Studies on humans exposed to methylmercury through fish consumption. *Arch Environ Health* 1972; 25: 77-91.
15. Kershaw TG, Clarkson TW, Dhahir PH. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Arch Environ Health* 1980; 35: 28-36.
16. Sherlock J, Hislop J, Newton D, Topping G, Whittle K. Elevation of mercury in human blood from controlled chronic ingestion of methylmercury in fish. *Hum Toxicol* 1984; 3: 117-131.

17. Hislop JS, Collier TR, White GF, Khathing DT, French E. The use of keratinized tissues to monitor the detailed exposure of man to methyl mercury from fish. In: *Chemical Toxicology and Clinical Chemistry of Metals*, New York: Academic Press, 1983; pp. 145-148.
18. Al-Shahristani H, Shihab KM. Variation of biological half-life of methylmercury in man. *Arch Environ Health* 1974; 28: 342-344.
19. National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington DC: National Academy Press, 2000.
20. Mergler D, Anderson HA, Chan LH, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, Stern AH. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. *Ambio* 2007; 36: 3-11.
21. Oka T, Matsukura M, Okamoto M, Harada N, Kitano T, Miike T, Futatsuka M. Autonomic nervous functions in fetal type Minamata disease patients: assessment of heart rate variability. *Tohoku J Exp Med* 2002; 198: 215-221.
22. Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Dakeishi M, Iwata T, Liu XJ, Satoh H. Subclinical effects of prenatal methylmercury exposure on cardiac autonomic function in Japanese children. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 379-386.
23. Grandjean P, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth cohort. *J Pediatr* 2004; 144: 169-176.
24. Choi AL, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Salonen JT, Tuomainen TP, Murata K, Nielsen HP, Petersen MS, Askham J, Grandjean P. Methylmercury exposure and adverse cardiovascular effects in Faroese whaling men. *Environ Health Perspect* 2008; 117: 367-372.
25. 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.
26. 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: 536-547.
27. Crump KS, van Landingham C, Shamlaye C, Cox C, Davidson PW, Myers GJ, Clarkson TW. Benchmark concentrations for methylmercury obtained from the Seychelles child development study. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 257-263.
28. Kjellström T, Kennedy P, Wallis S. Physical and mental development of children with prenatal exposure to mercury from fish. Stage 2, interviews and psychological tests at age 6 (Report 3642). Stockholm: National Swedish environmental Protection Board, 1989.
29. Crump KS, Kjellström T, Shipp AM, Silvers A, Stewart A. Influence of prenatal mercury exposure upon scholastic and psychological test performance: benchmark analysis of a New Zealand cohort. *Risk Anal* 1998; 18: 701-713.
30. Nakai K, Suzuki K, Oka T, Murata K, Sakamoto M, Okamura K, Hosokawa T, Sakai T, Nakamura T, Saito Y, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. 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 J Exp Med* 2004; 202: 227-237.
31. 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.
32. Brazelton TB, Nugent JK. Neonatal Behavioral Assessment Scale 3rd ed. London: Mac Keith Press, 1995.
 33. 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.
 34. Kawashiro Y, Fukata H, Omori-Inoue M, Kubonoya K, Jotaki T, Takigami H, Sakai S, Mori C. Perinatal exposure to brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in Japan. *Endocrine J* 2008; 55: 1071-1084.
 35. Longnecker MP, Wolff MS, Gladen BC, Brock JW, Grandjean P, Jacobson JL, Korrick SA, Rogan WJ, Weisglas-Kuperus N, hertz-Picciotto I, Ayotte P, Stewart P, Winneke G, Charles MJ, Jacobson SW, Dewailly E, Boersma ER, Altshul LM, Heinzow B, Pagano JJ, Jensen AA. Comparison of polychlorinated biphenyl levels across studies of human neurodevelopment. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 65-70.
 36. Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 1996; 335: 783-789.
 37. Winneke G, Bucholski A, Heinzow B, Kramer U, Schmidt E, Walkowiak J, Wiener JA, Steingruber HJ. Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 423-428.
 38. Huisman M, Koopman-Esseboom C, Fidler V, Hadders-Algra M, van der Paauw CG, Tuinstra LG, Weisglas-Kuperus N, Sauer PJ, Touwen BC, Boersma ER. Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins and its effect on neonatal neurological development. *Early Hum Dev* 1995; 41: 111-127.
 39. Patandin S, Lanting CI, Mulder PG, Boersma ER, Sauer PJ, Weisglas-Kuperus N. Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J Pediatr* 1999; 134: 33-41.
 40. Rogan WJ, Gladen BC, McKinney JD, Carreras N, Hardy P, Thullen J, Tinglestad J, Tully M. Neonatal effects of transplacental exposure to PCBs and DDE. *J Pediatr* 1986; 109: 335-341.
 41. Rogan WJ, Gladen BC. PCBs, DDE, and child development at 18 and 24 months. *Ann Epidemiol* 1991; 1: 407-413.
 42. Rogan WJ, Gladen BC. Neurotoxicology of PCBs and related compounds. *Neurotoxicology* 1992; 13: 27-35.
 43. Daniels JL, Longnecker MP, Klebanoff MA, Gray KA, Brock JW, Zhou H, Chen Z, Needham LL. Prenatal exposure to low-level polychlorinated biphenyls in relation to mental and motor development at 8 months. *Am J Epidemiol* 2003; 157: 485-492.

44. Despres C, Beuter A, Richer F, Poitras K, Veilleux A, Ayotte P, Dewailly E, Saint-Amour D, Muckle G. Neuromotor functions in Inuit preschool children exposed to Pb, PCBs, and Hg. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 245-257.
45. Tsuji JS, Benson R, Schoof RA, Hook GC. Health effect levels for risk assessment of childhood exposure to arsenic. *Regul Toxicol Pharmacol* 2004; 39: 99-110.
46. Akesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Skerfving S, Vahter M. Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 830-834.
47. Chen A, Cai B, Dietrich KN, Radcliffe J, Rogan WJ. Lead exposure, IQ, and behavior in urban 5- to 7-year-olds: does lead affect behavior only by lowering IQ? *Pediatrics* 2007; 119: e650-658.
48. Sakamoto M, Murata K, Kubota M, Nakai K, Satoh H. Mercury and heavy metal profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. *Ecotoxicol Environ Safe* 2010; 73: 1-6.
49. Svensson BG, Schutz A, Nilsson A, Akesson I, Akesson B, Skerfving S. Fish as a source of exposure to mercury and selenium. *Sci Total Environ* 1992; 126: 61-74.
50. Aschner M, Clarkson TW. Distribution of mercury 203 in pregnant rats and their fetuses following systemic infusions with thiol-containing amino acids and glutathione during late gestation. *Teratology* 1988; 38: 145-155.
51. Kajiwara Y, Yasutake A, Adachi T, Hirayama K. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Arch Toxicol* 1996; 70: 310-314.
52. Kantola M, Purkunen R, Kroger P, Tooming A, Juravskaja J, Pasanen M, Seppanen K, Saarikoski S, Vartiainen T. Selenium in pregnancy: is selenium an active defective ion against environmental chemical stress? *Environ Res* 2004; 96: 51-61.
53. Osman K, Akesson A, Berglund M, Bremme K, Schutz A, Ask K, Vahter M. Toxic and essential elements in placentas of Swedish women. *Clin Biochem* 2000; 33: 131-138.
54. Al-Saleh E, Nandakumaran M, Al-Shammari M, Al-Harouny A. Assessment of maternal-fetal status of some essential trace elements in pregnant women in late gestation: relationship with birth weight and placental weight. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2004; 16: 9-14.
55. Tsuchiya H, Mitani K, Kodama K, Nakata T. Placental transfer of heavy metals in normal pregnant Japanese women. *Arch Environ Health* 1984; 39: 11-17.
56. Korpela H, Loueniva R, Yrjanheikki E, Kauppila A. Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1086-1089.
57. Soong YK, Tseng R, Liu C, Lin PW. Lead, cadmium, arsenic, and mercury levels in maternal and fetal cord blood. *J Formos Med Assoc* 1991; 90: 59-65.
58. Plockinger B, Dadak C, Meisinger V. Lead, mercury and cadmium in newborn infants and their mothers. *Z Geburtshilfe Perinatol* 1993; 197: 104-107.
59. Baranowska I. Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Occup Environ Med*

- 1995; 52: 229-232.
60. Iyengar GV, Rapp A. Human placenta as a 'dual' biomarker for monitoring fetal and maternal environment with special reference to potentially toxic trace elements. Part 1: physiology, function and sampling of placenta for elemental characterization. *Sci Total Environ* 2001; 280: 195-206.
 61. Breen JG, Eisenmann C, Horowitz S, Miller RK. Cell-specific increases in metallothionein expression in the human placenta perfused with cadmium. *Reprod Toxicol* 1994; 8: 297-306.
 62. Mandal BK, Ogra Y, Anzai K, Suzuki KT. Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 307-318.
 63. Sakurai T, Kojima C, Ochiai M, Ohta T, Fujiwara K. Evaluation of in vivo acute immunotoxicity of a major organic arsenic compound arsenobetaine in seafood. *Int Immunopharmacol* 2004; 4: 179-184.
 64. Yeh CF, Jiang SJ. Speciation of arsenic compounds in fish and oyster tissues by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2005; 26: 1615-1621.
 65. Uneyama C, Toda M, Yamamoto M, Morikawa K. Arsenic in various foods: cumulative data. *Food Addit Contam* 2007; 24: 447-534.
 66. Wasserman GA, Liu X, Parvez F, Ahsan H, Factor-Litvak P, van Geen A, Slavkovich V, Lolocono NJ, Cheng Z, Hussain I, Momotaj H, Graziano JH. Water arsenic exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1329-1333.
 67. Dakeishi M, Murata K, Grandjean P. Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ Health* 2006; 5: 31.
 68. Wang SX, Wang ZH, Cheng XT, Li J, Sang ZP, Zhang XD, Han LL, Qiao XY, Wu ZM, Wang ZQ. Arsenic and fluoride exposure in drinking water: children's IQ and growth in Shanyin county, Shanxi province, China. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 643-647.
 69. Kurland LT, Faro SN, Siedler H. Minamata disease. *World Neurology* 1960; 1: 370-395.
 70. Igata A. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. *Environ Res* 1993; 63: 157-169.
 71. Watanabe C, Satoh H. Evolution of our understanding of methylmercury as a health threat. *Environ Health Perspect* 1996; 104(Suppl 2): 367-379.
 72. Social Scientific Study Group on Minamata Disease. In the Hope of Avoiding Repetition of a Tragedy of Minamata Disease: What We Have Learned from the Experience. Kumamoto: National Institute for Minamata Disease, 2001.
 73. Murata K, Sakamoto M. Minamata disease. In: Nriagu J (Editor), *Encyclopedia of Environmental Health*. Amsterdam: Elsevier, (in press).
 74. Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, Murtadha M, Khalidi A, al-Rawi NY, Tikriti S, Dahahir HI, Clarkson TW, Smith JC, Doherty RA. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science* 1973; 181: 230-241.
 75. Marsh DO, Clarkson TW, Cox C, Myers GJ, Amin-Zaki L, Al-Tikriti S. Fetal methyl mercury poisoning: relationship between concentration in single strands of maternal hair and child effects. *Arch Neurol* 1987; 44: 1017-1022.
 76. Cox C, Clarkson TW, Marsh DO, Amin-Zaki L, Tikriti S, Myers GG. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand

- hair analysis. *Environ Res* 1989; 49: 318-332.
77. Nishigaki S, Harada M. Methylmercury and selenium in umbilical cords of inhabitants of the Minamata area. *Nature* 1975; 258(5533): 324-325.
 78. Akagi H, Grandjean P, Takizawa Y, Weihe P. Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. *Environ Res* 1998; 77: 98-103.
 79. Harada M, Akagi H, Tsuda T, Kizaki T, Ohno H. Methylmercury level in umbilical cords from patients with congenital Minamata disease. *Sci Total Environ* 1999; 234: 59-62.
 80. Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1137-1145.
 81. Yorifuji T, Kashima S, Tsuda T, Harada M. What has methylmercury in umbilical cords told us?-Minamata disease. *Sci Total Environ* 2009; 408: 272-276.
 82. Sakamoto M, Murata K, Tsuruta K, Miyamoto K, Akagi H. Retrospective study on temporal and regional variations of methylmercury concentrations in preserved umbilical cords collected from inhabitants of the Minamata area, Japan. *Ecotoxicol Environ Safe* 2010; 73: 1144-1149.
 83. Murata K, Dakeishi M, Shimada M, Satoh H. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child development: messages from the newborn. *Tohoku J Exp Med* 2007; 213: 187-202.
 84. Grandjean P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Weihe P. Umbilical cord mercury concentration as biomarker of prenatal exposure to methylmercury. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 905-908.
 85. Bose-O'Reilly S, Drasch G, Beinhoff C, Tesha A, Drasch K, Roider G, Taylor H, Appleton D, Siebert U. Health assessment of artisanal gold miners in Tanzania. *Sci Total Environ*. 2010; 408: 796-805.
 86. Bose-O'Reilly S, Drasch G, Beinhoff C, Rodrigues-Filho S, Roider G, Lettmeier B, Maydl A, Maydl S, Siebert U. Health assessment of artisanal gold miners in Indonesia. *Sci Total Environ*. 2010; 408: 713-725.
 87. Paruchuri Y, Siuniak A, Johnson N, Levin E, Mitchell K, Goodrich JM, Renne EP, Basu N. Occupational and environmental mercury exposure among small-scale gold miners in the Talensi-Nabdam District of Ghana's Upper East region. *Sci Total Environ* 2010; 408: 6079-6085.
 88. Eckley CS, Gustin M, Marsik F, Miller MB. Measurement of surface mercury fluxes at active industrial gold mines in Nevada (USA). *Sci Total Environ* 2011; 409: 514-522.
 89. Eckley CS, Gustin M, Miller MB, Marsik F. Scaling non-point-source mercury emissions from two active industrial gold mines: influential variable and annual emission estimates. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 392-399.
 90. Li P, Feng X, Shang L, Qiu G, Meng B, Zhang H, Guo Y, Liang P. Human co-exposure to mercury vapor and methylmercury in artisanal mercury mining areas, Guizhou, China. *Ecotoxicol Environ Safe* 2010 Nov 4; [Epub ahead of print].
 91. Li P, Feng X, Qiu G, Shang L, Li G. Human hair mercury levels in the Wanshan mercury mining area, Guizhou Province, China. *Environ Geochem Health* 2009 Jan 22; [Epub ahead of print].
 92. Li L, Wang F, Meng B, Lemes M, Feng X, Jiang G. Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area. *Environ Pollut* 2010; 158: 3103-3107.

93. Fang F, Wang H, Lin Y. Spatial distribution, bioavailability, and health risk assessment of soil Hg in Wuhu urban area, China. *Environ Monit Assess* 2010 Oct 27; [Epub ahead of print].
94. de Lourdes Soto-Ríos M, Rothenberg SJ, Juárez-Pérez CA, Aguilar-Madrid G. Variability of mercury in urine among Mexican women residing in a mining area. *J Occup Environ Med* 2010; 52: 62-66.
95. Kocman D, Vreča P, Fajon V, Horvat M. Atmospheric distribution and deposition of mercury in the Idrija Hg mine region, Slovenia. *Environ Res* 2011; 111: 1-9.
96. Loredó J, Petit-Domínguez MD, Ordóñez A, Galán MP, Fernández-Martínez R, Alvarez R, Rucandio MI. Surface water monitoring in the mercury mining district of Asturias (Spain). *J Hazard Mater* 2010; 176: 323-332.
97. Sasaki S, Kondo T, Sata F, Saijo Y, Katoh S, Nakajima S, Ishizuka M, Fujita S, Kishi R. Maternal smoking during pregnancy and genetic polymorphisms in the Ah receptor, CYP1A1 and GSTM1 affect infant birth size in Japanese subjects. *Mol Hum Reprod* 2006; 12: 77-83.
98. Sata F, Yamada H, Suzuki K, Saijo Y, Yamada T, Minakami H, Kishi R. Functional maternal catechol-O-methyltransferase polymorphism and fetal growth restriction. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16: 775-781.
99. Sasaki S, Sata F, Katoh S, Saijo Y, Nakajima S, Washino N, Konishi K, Ban S, Ishizuka M, Kishi R. Adverse birth outcomes associated with maternal smoking and polymorphisms in the N-Nitrosamine-metabolizing enzyme genes NQO1 and CYP2E1. *Am J Epidemiol* 2008; 167: 719-726.
100. Washino N, Saijo Y, Sasaki S, Kato S, Ban S, Konishi K, Ito R, Nakata A, Iwasaki Y, Saito K, Nakazawa H, Kishi R. Correlations between prenatal exposure to perfluorinated chemicals and reduced fetal growth. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 660-667.
101. Konishi K, Sasaki S, Kato S, Ban S, Washino N, Kajiwara J, Todaka T, Hirakawa H, Hori T, Yasutake D, Kishi R. Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 2009; 109: 906-913.

A review of health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata¹, Minoru Yoshida², Kunihiro Nakai³, Mineshi Sakamoto⁴, Toyoto Iwata¹,
Kozue Yaginuma-Sakurai³, Miyuki Shimada³

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

² *Hachinohe University Faculty of Human Health*

³ *Department of Environmental Health Sciences, Tohoku University Graduate School of Medicine*

⁴ *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

Abstract

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

The following suggestions were obtained concerning low-level methylmercury exposure: (1) In recent years, the proportion of human studies among methylmercury- or mercury-related reports tends to decrease. (2) According to an intervention study, long-term exposure to methylmercury through consumption of fish such as bigeye tuna and swordfish may pose a potential risk for cardiac events involving sympathovagal imbalance. (3) Prenatal exposure to methylmercury contained in seafood, even at low levels, adversely affects neonatal neurobehavioral function after adjusting for polychlorinated biphenyls and maternal seafood intake during pregnancy, while maternal seafood intake has some benefits. (4) Fetal exposure to mercury, lead, arsenic, and selenium reflected each maternal exposure levels, and placental transfer of methylmercury seemed to be extremely high but that of cadmium to be limited. (5) In measuring methylmercury concentrations in preserved umbilical cords collected from inhabitants born in Minamata areas between 1947 and 1989, elevated methylmercury concentrations ($\geq 1 \mu\text{g/g}$) were mainly observed in inhabitants born between 1947 and 1968, and that peak coincided with the peak of acetaldehyde production in Minamata. Thereafter, the methylmercury levels gradually decreased to the control levels.

Keywords: Methylmercury; Low-level exposure; Infant development; Gold and mercury mining

○メチル水銀の生体影響及びメチル水銀汚染後の環境修復に関する

研究領域

(水俣病に関する基盤的研究)

IV メチル水銀の細胞毒性発現機構に関する研究

メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究

研究者 永沼 章（東北大学大学院薬学研究科教授）

研究要旨

我々は酵母において、ゴルジ体から multivesicular body (MVB) sorting pathway を経由して液胞に蛋白質を輸送する経路がメチル水銀毒性増強に深く関与していることをはじめで見出し、この輸送系によって液胞に運ばれることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質 (X-蛋白質) が酵母内に存在する可能性が示唆された。X-蛋白質の候補として Sis1 および Rsp3 が同定されたことから、両蛋白質と MVB sorting pathway との関係を調べた。MVB sorting pathway の基質となる蛋白質はモノユビキチン化されていることが知られているが、MVB sorting pathway を抑制することによって両蛋白質のモノユビキチン化体が細胞内に検出されるようになることが確認された。一方、我々はタンデムユビキチンである Ubi4 がこの基質蛋白質のモノユビキチン化に関わる可能性を示唆するデータを得ているが、両蛋白質のモノユビキチン化にも Ubi4 が必要であることが判明した。Ubi4 はユビキチンがタンデムに5つ連結した蛋白質であり、脱ユビキチン酵素によってプロセシングされた後にモノユビキチンとして機能すると考えられている。酵母には17種の脱ユビキチン酵素が存在することが知られているが、その中で Ubp7, Ubp13 および Ubp15 をそれぞれ欠損させた酵母がメチル水銀に対して高感受性を示すことが明らかとなった。これら脱ユビキチン酵素の欠損が酵母に与えるメチル水銀高感受性には、Ubi4 または MVB sorting pathway 活性が必須であることも判明した。これらのことから、Ubp7, Ubp13 および Ubp15 は共に Ubi4 のモノユビキチンへのプロセシングを触媒し、モノユビキチン化されたある種の蛋白質 (Sis1 および Rsp3?) が MVB sorting pathway を介して液胞に運ばれることによってメチル水銀毒性が増強されると考えられる。

キーワード：メチル水銀、感受性、蛋白質液胞輸送、MVB sorting pathway、酵母

研究協力者

黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科講師）

高橋 勉（東北大学大学院薬学研究科助教）

I 研究目的

メチル水銀が示す中枢神経毒性の発現機構は不明のままであり、解明の糸口さえほとんど得られていない。メチル水銀に対する感受性の決定に関わる細胞内因子を同定することができれば、メチル水銀の毒性発現機構を解明する上で非常に重要な手掛かりとなる。

我々はこれまで、酵母をヒトと同じ真核生物のモデルとして用いた網羅的遺伝子スクリーニングを行い、酵母の全遺伝子の中から高発現によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子をいくつか同定してきた。酵母は扱いが容易であり倍加時間が2時間と短いことから短時間で結果を得ることができ、また、哺乳類細胞よりも遺伝学的解析が簡単に確実にできるなど多くの利点を有している。さらに、酵母遺伝子の多くはヒト遺伝子と機能的な相同性が高く、これまでも酵母を用いた基礎的研究がヒト細胞内機能の解明に大きく貢献してきた。そこで、より精度

の高いとして方法として遺伝子欠損酵母ライブラリーを用いた機能的遺伝子スクリーニング法を確立し、本法を用いて欠損によって酵母にメチル水銀耐性を与える遺伝子群を網羅的に検索したところ、MVB (multivesicular body) sorting pathway に関わる複数の蛋白質がメチル水銀の細胞毒性を増強する作用を有することが判明した。MVB sorting pathway は、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれた膜蛋白質 (受容体やトランスポーター) などを、液胞 (リソソーム) に運んで分解するか細胞膜に戻して再利用するかを選別する重要な細胞内機構の一つと考えられている。MVB sorting pathway とメチル水銀との関係について検討された例はなく、我々が見出した「エンドソーム・リソソーム蛋白質分解系に関わる因子がメチル水銀の細胞毒性を増強する」という知見は、これまでに知られていない蛋白質分解を介した全く新しいメチル水銀毒性発現機構の存在を示唆するものである。そこで本研究では、エンドソーム・リソソーム蛋白質分解系とメチル水銀毒性との関係を詳細に検討し、その機構及び意義を明らかにすることを目的とする。

これまでに我々は、MVB sorting pathway に関わることが知られている全ての蛋白質 (13 種) とメチル水銀毒性との関係を検討し、これら蛋白質が一つでも欠けるとメチル水銀毒性が軽減されることを明らかにし、さらに、様々な蛋白質輸送経路の内、ゴルジ体から MVB sorting pathway を介して液胞に輸送する経路がメチル水銀毒性の増強に関与することも明らかにしている。また、本 pathway によって認識される蛋白質を yeast two-hybrid 法により検索し、候補蛋白質として Ubi4 (ユビキチンがタンデムに連結した蛋白質) を同定している。しかし、詳細な検討の結果、この Ubi4 は MVB sorting pathway の基質ではなく、基質蛋白質のモノユビキチン化に関わることが示唆された。Ubi4 はメチル水銀の毒性を増強させる作用を有しており、MVB sorting pathway が Ubi4 に依存してメチル水銀毒性を増強させることも判明している。本研究では平成 22 年度〜24 年度の 3 年間で、Ubi4 に依存し、かつ、MVB sorting pathway を介してメチル水銀毒性を増強させる酵母蛋白質を明らかにすると共に、その蛋白質の作用機構と MVB sorting pathway との関係性を解明し、さらに、得られた知見に基づいてヒト細胞でのメチル水銀毒性と MVB sorting pathway との関係も検討する。また、MVB sorting pathway 以外にもメチル水銀毒性の発現に関与する遺伝子群を同定しているため、以上の目的が早期に達成された場合等には、それら遺伝子群がメチル水銀毒性に与える影響とその作用機構についても検討する。

II 研究方法

1. 酵母のメチル水銀に対する感受性

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

2. 酵母細胞からの蛋白質の抽出

酵母の single colony を SD 培地 2 mL 中に加えて 30°C で一晩振盪培養した後に、 1×10^8 cells または 5×10^8 cells を 10 mL または 50 mL の SD 培地に懸濁して 30°C でさらに培養した。3 時間培養後に $8 \mu\text{M}$ となるように塩化メチル水銀を添加し、再び 1.5 時間振盪培養した。この酵母を脱イオン水で 2 回洗浄後、1 mL の 10% TCA を加え氷上に 30 min 放置した。TBS で中性になるまで洗浄後、ガラスビーズと $150 \mu\text{L}$ の TBS を加えて 4000 rpm、5 min で酵母を破碎した。その懸濁液

150 μ L を別のチューブに移し、そこに 50 μ L の lysis buffer (4% SDS、180 mM Na-HEPES ; pH7.5) を加えて 100°C、5 min 加熱した後に、20,000 \times g、5min で遠心し、上澄を総蛋白質サンプルとした。総蛋白質サンプル中の総蛋白質量は DC protein assay kit を用いて定量した。また本上澄を総蛋白質量 20 μ g、総容量 20 μ L となるように sample buffer および脱イオン水で希釈した後に 100°C、5 min 処理し、5,000 \times g、5 min で遠心して SDS-PAGE 用サンプルを得た。

(倫理面への配慮)

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

III 研究結果と考察

MVB sorting pathway の基質となる蛋白質はモノユビキチン化されており、MVB sorting pathway を構成する因子の 1 つである Vps27 がこのモノユビキチン化蛋白質を基質として認識・結合して選別システムに受け渡すと考えられている。上述のように、我々は本システムによって認識される蛋白質 (Vps27 と結合する蛋白質) として Ubi4 を同定したが、詳細な検討によって Ubi4 は MVB sorting pathway の基質ではなく、基質蛋白質のモノユビキチン化に関わることが示唆された。したがって、Ubi4 によってモノユビキチン化され、MVB sorting pathway を介してエンドソーム内に取り込まれた後に液胞へ運ばれることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質 (X-蛋白質) が存在すると考えられる。MVB sorting pathway の活性が低下すると X-蛋白質の細胞内濃度は上昇すると考えられることから、我々はこの X-蛋白質を同定するために、Vps27 の欠損によって細胞内濃度が上昇するユビキチン化蛋白質を電気泳動法によって検索し、分子量が約 37 kDa のユビキチン化蛋白質濃度が上昇することを見出した。そこで、この 37 kDa ユビキチン化蛋白質を 2次元電気泳動/質量分析法によって解析したところ、Sis1 と Rsp3 という 2つの蛋白質が同定された。昨年度の本研究によって両蛋白質が細胞内でユビキチン化されることが確認され、さらに、メチル水銀毒性を Rsp3 は増強し Sis1 は逆に軽減する蛋白質であることも判明した。しかし、少なくとも Rsp3 はモノユビキチン体として細胞内に存在することが示唆されたが、Sis1 のモノユビキチン体は検出することができなかった。そこで、本年度は Sis1 および Rsp3 について詳細に検討した。また、Ubi4 のプロセッシングに関与する脱ユビキチン酵素の同定も行った。

1. Sis1 のモノユビキチン化およびメチル水銀毒性との関係

昨年度は、HA タグ付きの Sis1 および Myc タグ付きのユビキチンを発現させた酵母の抽出液中から HA-Sis1 を HA 抗体で免疫沈降させ、沈降物を電気泳動した後に Myc 抗体を用いて Western blotting を行うことによりユビキチン化された HA-Sis1 のレベルを調べた。しかし、上述のように Sis1 のモノユビキチン体を検出することはできなかった。そこで、Myc タグ付きのユビキチンを発現させることなく、HA-Sis1 と内因性ユビキチンとの結合を電気泳動法で調べたところ、野性株酵母では HA-Sis1 のモノユビキチン体は検出されなかったものの、Vps27 を欠損させることによって HA-Sis1 のモノユビキチン体が検出されるようになった。この Vps27 欠損によって増加したモノユビキチン化 HA-Sis1 のバンドは Ubi4 の欠損によって消失したことから、HA-Sis1 のモノユビキチン化には Ubi4 が必要であると考えられる。また、メチル水銀がモノユビキチン化

HA-Sis1 のレベルを増加させることも判明した。したがって、メチル水銀が Sis1 のモノユビキチン化または液胞への輸送を亢進させている可能性も考えられる。なお、HA-Sis1 ではなく内因性の Sis1 のモノユビキチン化を観察するために Sis1 のポリクローナル抗体を本年度作製したので、現在、同抗体を用いたモノユビキチン化内因性 Sis1 の検出を検討している。

2. Rsp3 のモノユビキチン化およびメチル水銀毒性との関係

HA-Rsp3 を発現させた酵母を用いた検討により、Vps27 の欠損によってモノユビキチン化 HA-Rsp3 のバンドが出現し、このバンドが Ubi4 の欠損によって消失することが明らかとなった。このことから、HA-Rsp3 のモノユビキチン化にも Ubi4 が必要であると思われる。Rsp3 はメチル水銀毒性を増強させる蛋白質であることから、今後は、Rsp3 の液胞への輸送とメチル水銀毒性増強作用との関係を検討することによって、メチル水銀毒性発現における MVB sorting pathway の役割を明らかにする予定である。

3. Ubi4 のプロセシングに關与する脱ユビキチン酵素の同定

Ubi4 はユビキチンがタンデムに5つ連結した蛋白質であり、脱ユビキチン酵素によってプロセシングされた後にモノユビキチンとして機能すると考えられている。酵母には17種の脱ユビキチン酵素が存在することが知られているので、その中でメチル水銀毒性に關連する分子種の同定を試みた。その結果、Ubp7, Ubp13 および Ubp15 をそれぞれ欠損させた酵母がメチル水銀に対して高感受性を示すことが判明した。Ubp7 と Ubp13 を二重欠損させたところ、メチル水銀感受性の相対的上昇が認められたことから、両脱ユビキチン酵素は異なる経路でメチル水銀毒性の軽減に關与していると考えられる。一方、Ubp13 と Ubp15 を二重欠損させた場合には相対的な感受性の上昇が認められず、両脱ユビキチン酵素が同一の経路でメチル水銀毒性の軽減に關わっている可能性が示唆された。また、Ubp7 と Ubp13 の二重欠損酵母または Ubp13 と Ubp15 の二重欠損酵母の Ubi4 をそれぞれ欠損させたところ、Ubi4 単独欠損株とほぼ同程度のメチル水銀耐性が認められた。このことから、これら脱ユビキチン酵素の欠損が酵母に与えるメチル水銀高感受性には、Ubi4 の存在が必要であると考えられる。これらのことから、Ubp7, Ubp13 および Ubp15 は共に Ubi4 のモノユビキチンへのプロセシングを触媒し、これら酵素の欠損は Ubi4 のプロセシングを抑制することによって酵母にメチル水銀高感受性を与えるという可能性を考えることができる。

MVB sorting pathway によって液胞に運ばれることが決定されたモノユビキチン化蛋白質は最終的に Doa4 によってユビキチンが脱離された後に液胞に運ばれる。そこで次に、Ubp7, Ubp13 または Ubp15 の欠損酵母が示すメチル水銀高感受性に対する Doa4 欠損の影響を検討した。その結果、これら脱ユビキチン酵素欠損酵母は Doa4 が欠損するとメチル水銀高感受性を示さなくなり、この高感受性には Doa4 の存在が必要であることが判明した。すなわち、Ubp7, Ubp13 または Ubp15 の欠損酵母が示すメチル水銀高感受性には、ある種の蛋白質が MVB sorting pathway を介して液胞に運ばれることが必要であると考えられる。

4. メチル水銀が Ubi4 の蛋白質レベルに与える影響

プロセシングを受けていない全長の Ubi4 は無処理酵母中にはほとんど検出されなかったが、メチル水銀で酵母を処理することによって全長 Ubi4 レベルが上昇した。また、Ubp7, Ubp13 および Ubp15 を全て欠損させることによって全長 Ubi4 レベルの上昇が観察され、メチル水銀の効果も

より顕著に認められた。一方、プロセッシングを受けない変異 Ubi4 を酵母中に発現させたところ、正常 Ubi4 を発現させた酵母に比べて増殖が遅く、かつ、より強いメチル水銀毒性が認められた。また、変異 Ubi4 発現による増殖抑制の程度は変異 Ubi4 の発現量依存的に上昇した。このことから、プロセッシングを受けていない全長 Ubi4 は細胞増殖抑制作用を有しており、この全長 Ubi4 レベルの上昇が少なくとも一部はメチル水銀が示す細胞毒性に関与していると考えられることもできる。

IV 結論

MVB sorting pathway を経由して液胞に輸送されることによってメチル水銀毒性を増強させる蛋白質の候補として Sis1 および Rsp3 が同定された。今後、両蛋白質の機能及び細胞内挙動とメチル水銀毒性との関係を詳細に検討することによって、MVB sorting pathway から液胞への蛋白質輸送経路のメチル水銀毒性発現における役割が解明されると期待される。

V 次年度以降の計画

Sis1 および Rsp3 の機能及び細胞内挙動とメチル水銀毒性との関係を詳細に検討することによって、新しいメチル水銀の毒性発現機構が明らかになるものと期待される。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Hwang GW Tobita M Takahashi T Kuge S Kita K Naganuma A: siRNA-mediated AMPK1 subunit gene PRKAA1 silencing enhances methylmercury toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35:601-604.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Kanda H Kikushima M Homma-Takeda S Sumi D Endo A Toyama T Miura N Naganuma Kumagai Y, Downregulation of arginase II and renal apoptosis by inorganic mercury: overexpression of arginase II reduces its apoptosis. *Arch. Toxicol* 2008;82:67-73.
- 8) Hwang G W Furuchi T Naganuma A, The ubiquitin-conjugating enzymes, Ubc4 and Cdc34, mediate cadmium resistance in budding yeast through different mechanisms. *Life Sci* 2008;82: 1182-1185.
- 9) Hwang GW Hayashi T Kita K Takahashi T Kuge S Naganuma A, siRNA-mediated inhibition of

- phosphatidylinositol glycan class B (PIGB) confers resistance to methylmercury in HEK293 cells, *J Toxicol Sci* 2007; 32: 581-583.
- 10) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, Overexpression of Cdc34 confers cadmium resistance in *Saccharomyces cerevisiae* through decreased cellular utilization of sulfid, *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 873-878.
 - 11) Hwang GW Ishida Y Naganuma A, Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2006;580: 6813-6818.
 - 12) Hwang GW Sasaki D Naganuma A, Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins, *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1074-1078.
 - 13) Hwang GW Furuoya Y Naganuma A et al., Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2, *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 378-385.
 - 14) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury, *FASEB J* 2002; 16: 709-711.
 - 15) Furuchi T Hwang GW Naganuma A, Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Pharmacol* 2002; 61: 738-741.
 - 16) Naganuma A Miura N Kaneko S et al., GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *FASEB J* 2000; 14: 968-972.
 - 17) Miura N Kaneko S Hosoya S et al., Overexpression of L-glutamine:D-fructose-6-phosphate amidotransferase provides resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *FEBS Lett* 1999; 458: 215-218.

Molecular mechanism for toxicity of methylmercury and its biological protection

Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang and Tsutomu Takahashi

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

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

Abstract

We have searched the genes that affected sensitivity of yeast cells to methylmercury to elucidate the mechanism of methylmercury toxicity. We have found that the protein transport pathway into vacuole through MVB sorting pathway from Golgi strongly involved in mechanism of enhancement of methylmercury toxicity. Proteins (X-proteins) that are transported from Golgi to vacuole and enhance methyl mercury toxicity might be included in yeast cells. We identified Sis1 and Rsp3 as candidates for X-proteins. Cellular levels of the monoubiquitinated Sis1 and Rsp3 were significantly increased by suppression of activity of the MVB sorting pathway. Knockdown of Rsp3 gene conferred resistance to methylmercury in yeast. These results suggest that Rsp3 might enhance toxicity of methylmercury after its monoubiquitination and transportation into vacuole through MVB sorting pathway.

V 水俣病の病態生理と治療に関する研究

低濃度メチル水銀暴露からの中枢神経細胞保護に関する研究

小泉修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

研究要旨

脳機能・脳疾患に果たすグリア細胞の役割が注目されている。これまで、メチル水銀はアストロサイトに作用して IL-6 を産生・放出し、これにより神経細胞を保護することを明らかとした。本年は、この IL-6 産生の分子メカニズムを解明した。さらに、アストロサイトが応答しない低濃度メチル水銀においても、ミクログリアがこれを感知すること、アストロサイトはミクログリアからの情報を得ることにより IL-6 を産生することを明らかとした。ミクログリアは、高感度センサーとして脳の危機情報をアストロサイトさらに神経細胞に伝えていることにより、脳機能を保護している可能性が示唆された。

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

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

I 研究目的

種々の脳機能¹⁾及び脳疾患²⁾にグリア細胞が重要な役割を果たしていることが明らかとされつつある。しかし、種々の医薬品、化学物質、環境汚染物質等がグリア細胞機能にどの様に影響するかに関してはほとんど知られていない。本研究は、有機水銀（メチル水銀）により惹起される脳機能障害における、グリア細胞の役割を明らかとすることを目的とするものである。前年度までのトランスクリプトーム解析により、メチル水銀に暴露されたアストロサイトはインターロイキン 6 (IL-6) を非常に強く発現すること、この IL-6 がメチル水銀による神経細胞傷害に対して保護効果を呈していることを見出した。本年度の到達目標（1）は、IL-6 産生の分子メカニズムを明らかとすることである。また、より低濃度のメチル水銀によってもグリア細胞は種々の応答性を示す。そこで到達目標（2）は、低濃度メチル水銀に曝露されたミクログリアの解析を行い、本応答とアストロサイト機能、神経機能との関連性を明らかとすることである。本研究結果は、グリア細胞の側面から、メチル水銀による脳機能障害誘発機序に関する全く新しい知見を得られることが期待される。

II 研究方法

初代アストロサイト及び神経細胞の培養は、既報³⁾に従った。各種生化学的手法も既報に従い、また遺伝子の網羅的解析には、Affymetrix 社のマイクロアレイを用いた⁴⁾。Cell viability は、WST-1 アッセイにより定量した。細胞外 ATP の測定方法には、luciferin-luciferase 法を用いた。細胞外 ATP 分解酵阻害剤 ARL6739 存在下でメチル水銀刺激を行い、細胞外液を回収した後、luciferin-luciferase 法による ATP 化学発光反応をルミノメーターで定量解析した。

（倫理面への配慮）

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

III 研究結果

MeHgにより惹起される IL-6 mRNA 亢進に対する、種々の細胞外因子の関与を検討した。種々のグリア関連分子を試したところ、P2受容体拮抗薬により、その発現亢進が抑制されることが明らかとなった。図1はMeHg誘発IL-6 mRNA産生に対するP2受容体拮抗薬 suramin 及び PPADS の作用を示したものである。両者とも有意に抑制した。また、P2Y1受容体特異的拮抗薬である、MRS2179(10 μ M)も同様の作用を示したことから、P2受容体のなかでもP2Y1受容体の関与が強く示唆された。

P2受容体の関与が明らかとなったことより、まず、MeHgがアストロサイトのATP放出を亢進させるかどうかを解析した。アストロサイトの $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を間接的に測る手段として頻用される Ca^{2+} waveをfura2法にて測定した(図2左上)。図2で示すように、MeHgの添加により、頻度の高い Ca^{2+} waveが観察された(緑線)。これは、ATP分解酵素であるapyrase(赤線)によりほぼ消失したことから、ATP依存的な Ca^{2+} waveであることが確認できた。 Ca^{2+} waveの頻度(赤アスタリスクで示した回数)を定量化した(図2左下)。アストロサイトの Ca^{2+} waveは、通常は殆ど起きないが、MeHgにより強く誘発され、これはapyraseで完全に消失した。従って、ATPの放出促進が示唆された。

ATP/P2Y1受容体システムは、MeHgによるアストロサイトのIL-6産生に参与する

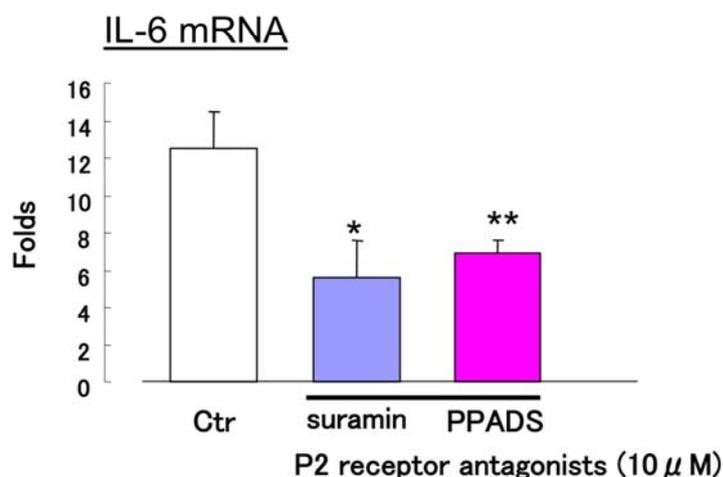


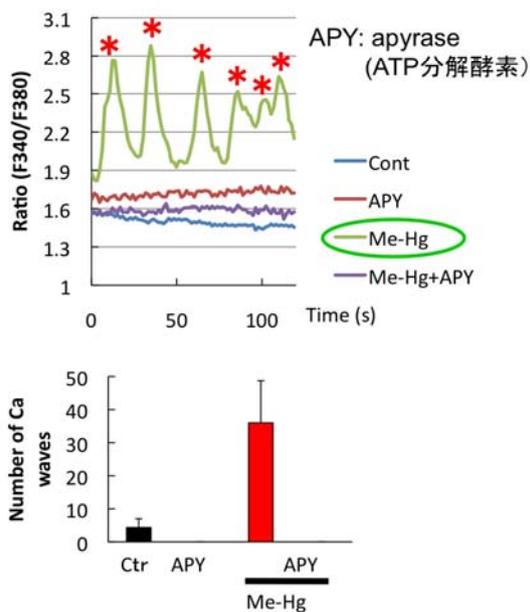
図1 MeHgにより惹起されるIL-6 mRNA発現更新に対するP2受容体の抑制作用

MeHgにより惹起されるIL-6 mRNA発現(Ctr)は、P2受容体拮抗薬のsuramin(10 μ M)及びPPADS(10 μ M)により有意に抑制された。

そこで次に ATP を luciferin-luciferase 法にて定量した (図 2 右)。これまで、MeHg による直接的な ATP 測定が困難であったため、Ca²⁺ wave 法を用いていたが、今回、ATP 分解酵素阻害薬、ARL67156 を添加して定量することにより、ATP を直接測定することが可能となった。MeHg はアストロサイトから濃度依存的に ATP 放出を誘導することが明らかとなった。

MeHgによるATP依存的Ca²⁺ wave及びATP分解酵素阻害薬存在下でのアストロサイトからのATP放出

Ca²⁺ wave



ATP放出 (luciferin-luciferase法)

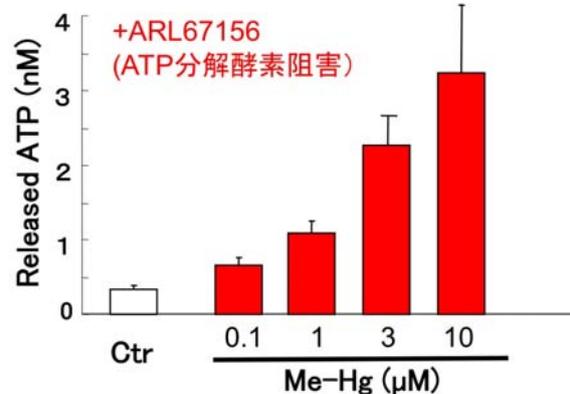


図2 メチル水銀 (MeHg) により惹起される初代培養アストロサイトの [Ca²⁺]_i 上昇と細胞外ATP濃度上昇

左カラム Ca²⁺ wave : MeHg (3 μM) によりアストロサイトにおいて Ca²⁺ 振動を伴った [Ca²⁺]_i 上昇が認められた (Ca²⁺ wave)。この Ca²⁺ wave は ATP 分解酵素である apyrase (APY) を添加することにより、消失したことから、ATP 依存的な応答であることが示唆された。一定時間中の Ca²⁺ wave 頻度を比較すると (左下図)、MeHg により有意な Ca²⁺ wave が出現し、これは APY により消失することが明らかとなった。

右カラム : 各種濃度の MeHg に曝露されたアストロサイトの上清を採取し、上清中の ATP 含量を luciferin-luciferase 法により定量した。放出された ATP が測定前に分解されないように、上清には、ATP 分解酵素阻害薬の ARL67156 を添加した。MeHg は、濃度依存的に ATP を放出させることが明らかとなった。

MeHgによるアストロサイトIL-6産生に関するERK1/2系シグナル

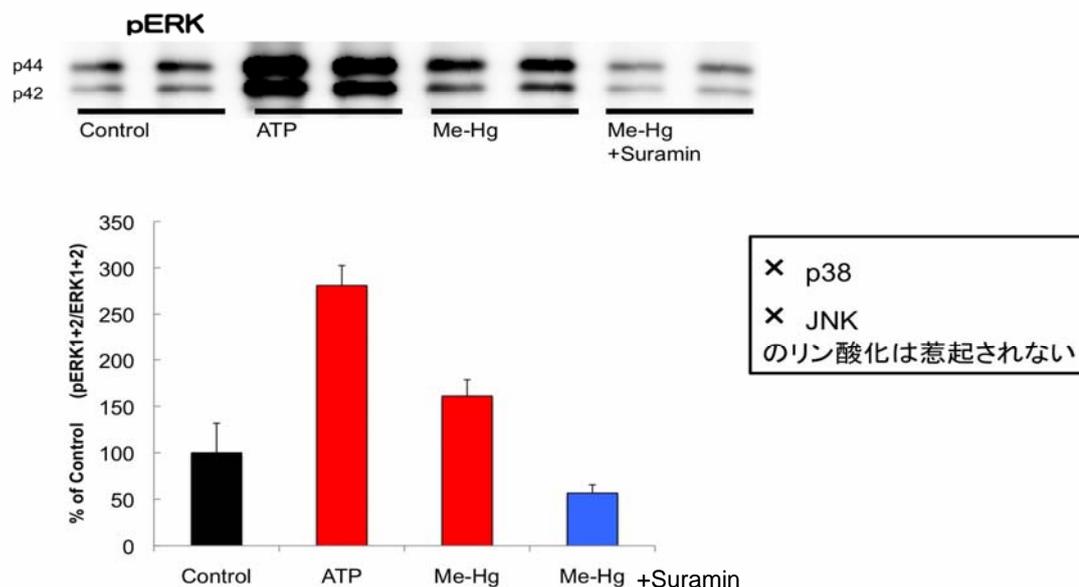


図3 ATP及びMeHgにより惹起されるERKリン酸化に対するsuraminの作用

ATP (30 μ M) により、アストロサイトでは ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1/2) が亢進した。また、MeHg (3 μ M) 刺激によっても p-ERK1/2 の顕著な亢進が認められた。これは、P2 受容体拮抗薬の suramin で抑制された。

MeHg はアストロサイトから ATP 放出を誘導し、これがオートクライン様に P2 受容体を刺激することにより、IL-6 の産生・放出が誘導されることが明らかとなった。次に細胞内シグナルの関与について検討を行った。昨年度の検討により、種々の MAPkinase の阻害薬が MeHg による IL-6 産生を抑制することが明らかとなった。そこで、実際にこれら MAPkinase 類が活性化されているか否か (リン酸化されるか否か) を検討した。リン酸化 MAPkinase を特異的に認識する抗体を用いて検討を行った結果、図3で示すように、MeHg により ERK1/2 のリン酸化 (pERK1/2) が観察されたが、他の MAPkinase である p38 及び JNK は活性化されなかった。また、MeHg は ATP 放出を引き起こすことを示したが (図2)、MeHg による pERK1/2 は P2 受容体拮抗薬 suramin により抑制された (図3, 右カラム)。また、pERK1/2 誘導は、ATP 刺激によっても再現できた。以上、MeHg によって放出された ATP が、P2 受容体を介した ERK1/2 活性化経路により IL-6 を誘導していることが明らかとなった。これらを図4にまとめた。

アストロサイトによる神経保護作用の模式図

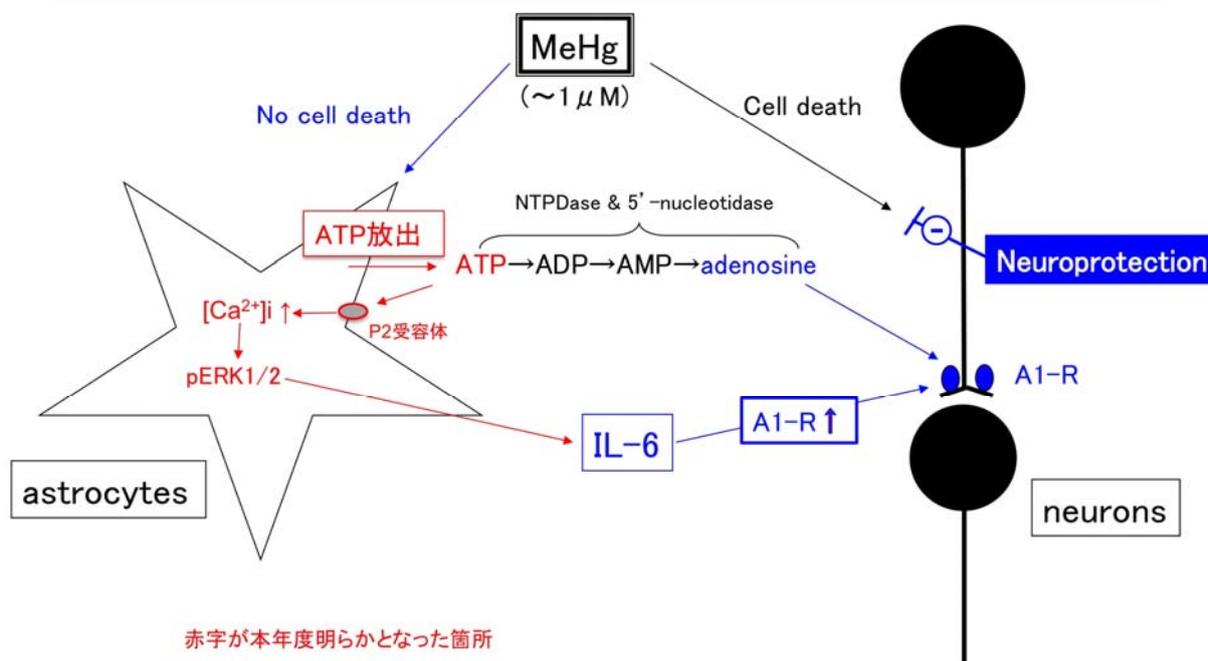


図4 MeHgにより惹起される神経細胞死に対するIL-6の保護作用

MeHg (1 μM) は、神経細胞傷害 (Cell viability を約50%に低下) を引き起こすが、アストロサイトの cell viability には影響しない。この時、アストロサイトはATPを放出するが、このATPは、①代謝されて adenosine となり神経細胞の adenosine A1 受容体に作用して神経保護効果を呈する (青字)。一方でATPは、②アストロサイトのP2受容体にオートクライン様に作用し、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇、pERK1/2 亢進により、IL-6 産生を引き起こす。このアストロサイト由来IL-6は、神経細胞のA1受容体の発現を亢進させることにより、adenosine/A1系シグナルを強力にし、神経保護作用をより亢進させる。

最後に低濃度MeHgがミクログリアに対する作用を検討した。ミクログリアは脳内環境の変化に非常に敏感であり、低濃度のMeHg (0.01 μM) に対しても、種々の形態変化を示す (データ not shown)。しかし、MeHg (0.01 μM) はミクログリア及びアストロサイト両者のCell Viabilityに影響しなかった (図5左)。また、この低濃度MeHgによるこれらグリア細胞からのIL-6産生に与える影響を検討したところ、ミクログリア及びアストロサイト単独に作用させた場合は、IL-6の産生には全く影響しなかった。しかし、ミクログリア-アストロサイト共培養系に低濃度MeHgを処理した場合には、IL-6の劇的な産生亢進が引き起こされた (図5右)。低濃度MeHgを感知したミクログリアからの何らかの情報が、アストロサイトのIL-6産生を誘導したとことが示唆される。

ミクログリアは低濃度MeHgを感知しアストロサイトのIL-6産生を惹起

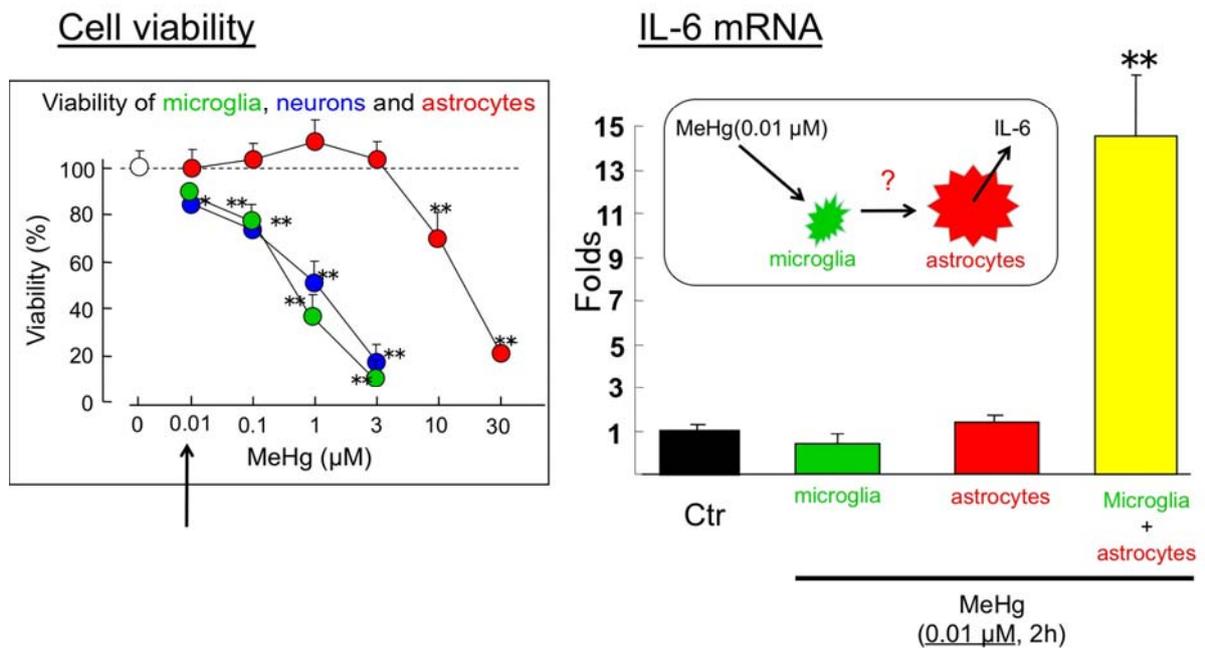


図5 低濃度MeHgにより誘導される、ミクログリア-アストロサイト連関

MeHg (0.01 μM) はミクログリア及びアストロサイト両者の Cell Viability に影響しない。また、この低濃度 MeHg は、ミクログリア及びアストロサイト単独に作用させた場合、IL-6 の産生には全く影響しない。しかし、ミクログリア-アストロサイト共培養系に MeHg を処理すると、IL-6 の劇的な産生亢進が引き起こされる。低濃度 MeHg を感知したミクログリアからの何らかの情報が、アストロサイトの IL-6 産生を誘導したとことが示唆される。

IV 考察

MeHg は非常に多くの作用を有しており、複数の標的を攻撃し、また複数のメカニズムで神経細胞死を誘発することが報告されている⁵⁾。アストロサイトに対しても、その応答性は多義にわたるため、最も特徴的な応答である IL-6 産生にも複数の経路が複雑に関与していることが予想された。そのなかで今回、MeHg が非常に強い ATP 依存的 Ca²⁺wave を誘導することから、ATP/P2 受容体シグナル系の強い関与が示唆された。事実、P2 受容体拮抗薬は、IL-6 の産生を抑制し、また ATP の放出が確認できた。また、細胞内シグナルカスケードとしては、ERK1/2 の活性化が強く関与していた。これは、MeHg による ERK1/2 リン酸化は、P2 受容体拮抗薬 suramin で抑制され、さらに ATP/P2 受容体系刺激によって再現されたことから、ATP の放出が以下の応答の引き金になっているものと考えられる。

しかし、今回の ATP 放出のメカニズムは不明のままである。アストロサイトのような、非興奮性細胞からの ATP 放出メカニズムは、現在よく分かっておらず、少なくとも5種類の生理的な経路、つまり、connexin/pannexin-hemichannel, P2X7 receptors, maxi-anion channels, Cl⁻ channel, exocytosis が提唱されている。また、細胞外 ATP は、形質膜の物理的な傷害による漏出によって

も増大する。今回の ATP は、①比較的短時間（2分程度）刺激による上清を回収したものであること、②本濃度では cell viability の低下が起きていないこと、より、生理的な放出経路を介していると考えられるが、その放出経路・メカニズムの解明は今後の課題である。また、より高濃度の MeHg に曝露された際には、傷害による ATP の漏出の関与が強くなると思われる。しかし、このような傷害性アストロサイトの場合には、P2 受容体を介したオートクライン様作用で IL-6 産生が起こるかどうかについても、不明のままであり、今後の課題である。

最後に、より低濃度の MeHg (0.01 μ M) による応答性を検討した。非常に興味深いことに、このような低濃度 MeHg でミクログリア及びアストロサイトを単独に刺激した場合には、全く IL-6 産生が認められないのに対し、これらの共培養系を用いた場合には、劇的な IL-6 産生が認められた。低濃度 MeHg でミクログリアの cell viability は変化しなかったこと、低濃度 MeHg でミクログリアの形態変化が生じたこと、ミクログリアは脳内の高感度センサーとして知られていること等を鑑みると、まず、ミクログリアが低濃度 MeHg を感知したことが示唆される。MeHg を感知したミクログリアは、アストロサイトにその情報を伝え、IL-6 の産生を促し、神経保護に備える。この様な、ミクログリア-アストロサイト-神経細胞の三者間コミュニケーションが、脳内で巧妙に行われ、種々の脳内環境変化に対応していることが示唆された。低濃度 MeHg を感知したミクログリアがアストロサイトにその情報を伝える分子メカニズムは、来年度以降の課題である。

MeHg 刺激から、アストロサイト IL-6 産生に至る分子メカニズムとして、ATP 放出→ATP/P2 受容体→ $[Ca^{2+}]_i$ 上昇→ERK1/2 リン酸化、を示せた点は評価できる進歩であった。しかし、他の分子の関与については、まだ予想の域を出ていない。また、今回はミクログリアの関与、しかも非常に低濃度 MeHg による応答性を、アストロサイトとのコミュニケーションの視点で明らかとすることができたことは、評価できると考える。本コミュニケーションの分子メカニズムと、その生理的・病態生理的な役割の解明が今後の課題である。

V 結論

これまでの研究より、MeHg が誘発するアストロサイト IL-6 は、神経細胞保護作用を呈する。本年はこの分子メカニズムを明らかとした。

1. MeHg はアストロサイトからの ATP を放出させる。この ATP がオートクライン様にアストロサイト P2 受容体に作用し、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を経て、ERK1/2 のリン酸化を介して IL-6 の発現を亢進させる。
2. アストロサイトが反応しないような低濃度 MeHg においても、ミクログリアはこの情報を感知し、アストロサイトに情報を送ることにより IL-6 産生を引き起こすことが明らかとなった。

VI 次年度以降の計画

低濃度メチル水銀に曝露された各種グリア細胞の機能変化の詳細解析に加え、ミクログリア-アストロサイト-神経細胞共培養系（三細胞培養系）を用い、メチル水銀の高感度センサーであるミクログリアの応答・機能変化が、これら三種の細胞間のコミュニケーションを介して脳機能（三細胞培養系）に与える影響及びその分子メカニズムを明らかとする。特に、（1）活性化型ミクログリアの機能変化が脳機能の保護・修復に与える影響、（2）過度に活性化したミクログリアによる脳機能障害・慢性化誘発、の二つの異なる側面に注目して解析する。

1. 平成 22 年度より開始しているメチル水銀に曝露された初代培養ミクログリアのトランスクリプトーム解析による分子の絞り込みを行い、メチル水銀により発現誘導される遺伝子を、メチル水銀の低濃度及び高濃度に分けて解析する。本年度は特に、低濃度メチル水銀 (10^{-9} - 10^{-8} M) 暴露に対する mRNA 発現変化に注目する。まず、低濃度メチル水銀により惹起される脳保護因子に注目して候補分子を絞り込む。(1) 神経修復因子、(2) 神経保護因子、さらに (3) アストロサイト活性化因子を見出す。特に (3) では、アストロサイトからの IL-6 放出を誘導する因子を同定する。昨年度から行っているアストロサイトのトランスクリプトームによる結果も同時に継続して解析を行う。
2. ミクログリア-アストロサイト-神経細胞共培養系 (三細胞培養系) を用い、ミクログリア由来の脳保護に関係する候補分子が、神経細胞に与える影響、グリア細胞自身に与える影響を、各種生化学的、分子生物学的、解剖学的、薬理学的手法を用いて、明らかとする。また、三細胞培養系を用い、神経細胞保護の分子メカニズムに関する検討も行う。
3. 上記 2 においては、特に平成 22 年度に明らかとした、ミクログリア由来のアストロサイト IL-6 発現誘導因子の同定に力を入れる。

また、神経細胞障害誘発・慢性化に関与しうる候補分子の抽出作業も開始する。これらの候補分子による、神経障害誘発・慢性化作用、及びその分子メカニズムに関しては、次年度以降、三細胞系を用いて明らかとする。

参照文献

- 1) Haydon, P.G. GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* **2**, 185-193 (2001).
- 2) Miller, G. Neuroscience. The dark side of glia. *Science* **308**, 778-781 (2005).
- 3) Koizumi, S., Fujishita, K., Tsuda, M., Shigemoto-Mogami, Y. & Inoue, K. Dynamic inhibition of excitatory synaptic transmission by astrocyte-derived ATP in hippocampal cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11023-11028 (2003).
- 4) Shinozaki, Y., *et al.* Cytoprotection against oxidative stress-induced damage of astrocytes by extracellular ATP via P2Y1 receptors. *Glia* **49**, 288-300 (2005).
- 5) Atchison, W.D. & Hare, M.F. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity. *FASEB J* **8**, 622-629 (1994).

この研究に関する現在までの研究状況、業績
論文発表 (2007 年度以降)

12. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca^{2+} oscillations in astrocytes. *FEBS J.* 277, 286-292.
11. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, K., Takeda,

- M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca^{2+} 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.

Effects of low concentration of methylmercury on glial cells

Schuichi Koizumi^{*1}, Keisuke Shibata^{*1}, Yoji Sato^{*2}

^{*1}Department of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi, ^{*2}Division of Cellular and Gene therapy products, National Institute of Health Sciences

Keywords: Methylmercury; Astrocytes, Microglia, Interleukin-6, ATP

Abstract

Glial cells are very much involved in various brain diseases. Thus, changes in their characteristic features affect brain functions. However, effects of chemicals or other hazardous environmental molecules including methylmercury (MeHg) on glial functions/dysfunctions remain largely unknown. Previously, we showed that MeHg-induced IL-6 in astrocytes, which in turn protected neuronal cell death against MeHg. Here we showed mechanisms underlying MeHg-induced IL-6 induction in astrocytes, as well as effect of MeHg on microglia. MeHg induced an increase in extracellular ATP concentration, followed by ATP-dependent Ca²⁺ waves in astrocytes. Both events were responsible for induction of IL-6 in astrocytes. As for intracellular mechanisms, MeHg-induced phosphorylation of ERK1/2 (pERK1/2), which was also responsible for IL-6 induction. The MeHg-induced pERK1/2 was dependent of P2 receptors, suggesting that extracellular ATP could be a trigger for the subsequent events. Lower MeHg concentration (0.01 μM) had no effect on both astrocytes and microglia. However, when these cells were co-cultured and stimulated with low MeHg, it induced a drastic increase in IL-6 in the cultures. These findings suggest that microglia should function as a high sensitivity sensor for MeHg or other toxic molecules, and when they sense low concentration of MeHg, microglia would transmit their information to astrocytes to make preparation for neuroprotection against future hazardous events, i.e., induction of IL-6. Such microglia-astrocytes-neurons communications would be important to maintain homeostasis in the brain.

リサイクル適性の表示：紙へリサイクル可

本報告書は、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。