

平成 24 年度環境省委託業務報告書

平成 24 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 25 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 24 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 25 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平成 24 年度 水俣病に関する総合的研究

目 次

1	業務の背景及び目的	1
2	業務の実施内容	1
2.1	研究班の設置	1
2.2	「重金属等による健康影響に関する総合的研究」評価委員会及び推進委員会の設置	2
2.3	新規研究に関する公募の事務	3
2.4	「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」の開催	4
2.5	「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の開催	4
2.6	メチル水銀・カドミウム研究ミーティングの開催	4
2.7	推進・評価合同委員会の開催	5
2.8	研究計画書の作成の依頼	5
2.9	推進委員会の開催	5
2.10	研究報告書の作成	5
2.11	研究成果還元業務の実施	5
3	各研究班の報告	6
	○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域（社会的課題に関する研究）	7
I	研究課題：高齢者の二点識別覚に関する研究	11
	中村 昭範（国立長寿医療センター研究所長寿脳科学研究部脳機能再生研究室室長）	
II	研究課題：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	27
	村田 勝敬（秋田大学医学部社会環境医学講座環境保健学分野 教授）	
III	研究課題：水俣病患者の経年変化および自然史の把握	57
	安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野 教授）	
	○メチル水銀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）	61
IV	研究課題：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	65
	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	研究課題：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	77
	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）	

VI 研究課題：メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究	89
西澤 正豊（新潟大学脳研究所・神経内科学分野 教授）	

参考資料

メチル水銀研究ミーティング講演要旨集	95
--------------------------	----

1 業務の背景及び目的

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

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

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

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

2 業務の実施内容

2.1 研究班の設置

本業務は、研究内容に応じて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・Ⅱ・Ⅳ・Ⅴ・Ⅵ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24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 研究課題 : 高齢者の二点識別覚に関する研究

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

II 研究課題 : 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 研究課題 : 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 研究課題 : 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)

VI 研究課題 : メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究

主任研究者: 西澤 正豊 (新潟大学脳研究所神経内科学分野教授)

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

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

①評価委員会の設置

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

委員	所属・役職
衛藤 光明	医療法人信和会 介護老人保健施設 樹心台 施設長
遠藤 仁	杏林大学 名誉教授（北里大学医学部客員教授）
小椋 陽介	昭和大学医学部 客員教授
北川 正信	障害児入所施設・療養介護施設あゆみの郷 施設長
○櫻井 治彦	中央労働災害防止協会 労働衛生調査分析センター 技術顧問
中村 好一	自治医科大学 保健科学 教授
濱田 陸三	公益財団法人慈愛会 今村病院分院 神経内科 部長
林 泰史	東京都リハビリテーション病院 院長
二塚 信	九州看護福祉大学 学長
渡辺 知保	東京大学大学院 医学系研究科 教授

○：委員長

②推進委員会の設置

第三者（委託者、主任研究者または研究者以外の有識者）6名で構成される推進委員会を設置した。なお、推進委員会委員の構成は以下の通りである。

委員	所属・役職
赤木 洋勝	有限会社国際水銀ラボ 取締役所長
石本 二見男	介護老人保健施設ミレニウムマッシーランド 施設長
井村 伸正	財団法人 麻薬・覚せい剤乱用防止センター 理事長
○鈴木 庄亮	国際エコヘルス研究会 理事長・群馬大学名誉教授
遠山 千春	東京大学大学院 医学系研究科附属疾患生命工学センター 健康・環境医工学部門 教授
中川 正法	京都府立医科大学大学院 教授

○：委員長

2.3 新規研究に関する公募の事務

平成23年度に実施された推進委員会において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、新規研究に関する公募の事務を行った。公募時に提出された申請書を受け取り、記載事項を確認するとともに、必要に応じて申請者に修正を依頼した。

また、現在設置されている研究班による研究は、平成24年度をもってすべて終了となる。そのため、平成24年度に設置された推進委員会において取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、平成25年度から実施する新規研究に関する公募を平成25年3月下旬に開始した。

2.4 「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」の開催

「推進委員会の開催（新規研究課題）」を平成 24 年 6 月 20 日に日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて開催し、推進委員は上記 2.3 で公募された研究課題について、今年度新規で実施される研究班を採択した。なお、採択された研究に関する経費については、受託者と研究班の間で事務委任契約を締結し、その契約内容に基づいて、研究班の請求に応じて概算払いを行った。出席した推進委員会委員は以下の通りである。

<推進委員会への出席委員>

推進委員：赤木洋勝、石本二見男、井村伸正、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

Ⅲ 研究課題：水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

主任研究者：安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野 教授）

2.5 「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」の開催

平成 24 年 12 月 18 日に東京国際交流館 プラザ平成 メディアホールにて、「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」を「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の受託者と協力して開催した。研究発表会では、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウムの中毒に関する総合的研究」の各研究班の主任研究者等が前年度及び年度途中までの研究成果を発表した。評価委員会委員及び推進委員会委員はこの発表に参加するとともに、評価委員会委員は各研究成果を評価した。出席した評価委員会委員及び推進委員会委員は以下の通りである。

<研究発表会への出席委員>

評価委員：衛藤光明、遠藤仁、小椋陽介、北川正信、櫻井治彦、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、佐藤洋、鈴木庄亮（敬称略、五十音順）

2.6 メチル水銀・カドミウム研究ミーティングの開催

平成 24 年 12 月 19 日に東京国際交流館 プラザ平成 メディアホールにて、2.5「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」に併せて、「メチル水銀・カドミウム研究ミーティング」を開催した。毒物学や疫学、神経内科学等の分野の研究者を演者等として招き、重金属等による健康影響に関する研究状況を演題発表ないし口頭発表の形で共有した。またそれらの成果を各主任研究者等が次年度の研究計画へ反映させた。「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。「メチル水銀・カドミウム研究ミーティング」のプログラム及び講演要旨集は参考資料の

通りである。

2.7 推進・評価合同委員会の開催

平成 24 年 12 月 18 日に東京国際交流館 プラザ平成 メディアホールにて、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委員会に報告した。また、平成 25 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、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）

2.8 研究計画書の作成の依頼

推進・評価合同委員会において決められた研究の方向性等の方針に基づき、平成 24 年度新規で採択された、安東班（熊本大学大学院）に、平成 25 年度の研究計画書の作成を依頼した。

2.9 推進委員会の開催

平成 25 年 3 月 1 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」の研究班から提出された平成 25 年度の研究計画書について評価を行った。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、鈴木庄亮、遠山千春、中川正法（敬称略、五十音順）

2.10 研究報告書の作成

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）を受け取った。

2.11 研究成果還元業務の実施

環境省が定めた事務連絡「研究成果還元業務について」に基づいて、2.1 で設置した研究

班が本研究で得られた成果を学会発表や論文掲載を実施する場合、その経費（宿泊費、交通費、学会参加費、論文掲載料、英文翻訳料等を想定）について研究班の申請に応じて、環境省担当官と協議の上、1研究につき200,000円を上限として支払うこととした。

本年度は、研究成果還元業務申請がなかった。

3 各研究班の報告

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病患者や汚染地域住民の健康問題等に関する研究領域

(社会的課題に関する研究)

I 高齢者の二点識別覚に関する研究

高齢者の二点識別覚に関する研究

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

[研究要旨]

我々はこれまでの研究で、まず「二点識別覚自動検査システム（自動二点識別覚検査装置、検査プロトコル、及びデータ分析法）」を開発し、科学的に信頼のおける方法で二点識別覚検査が行える土台を固めた上で、20～80才までの健常成人210名を対象に、示指先端、下口唇、及び舌尖で二点識別覚検査を行って正常データベースを構築し、各年齢層の正常範囲や、二点識別覚に加齢が与える影響を明らかにしてきた。昨年度は、これらの研究成果と脳機能画像による客観的評価をカップリングさせることを目的に、脳磁図測定にも対応した二点識別刺激装置及びそのコントロールソフトウェアを開発し、実際の脳磁図測定にも応用した。その結果、脳磁計測により触覚の1点/2点刺激を脳が自動的に弁別するプロセスを反映していると考えられる誘発反応（ミスマッチ反応）が記録可能であることが示された。

今年度は、この研究を更に発展させる目的で、まず脳磁図対応の二点識別刺激装置の改良を行った上で、本装置を用いた誘発反応の特徴を解析し、刺激プロトコルの最適化を行った。その後、高齢者9名及び若年者7名に行った脳磁図計測の結果を解析したところ、1) ミスマッチ反応は振幅や潜時等の個人差が大きいが全例で同定可能な反応が得られ、2) 二点間距離によって振幅が変化し、3) 反応が誘発されるための最小二点間距離は、個人の二点識別弁別閾値と有意な相関（ $R=0.65$, $p=0.007$ ）がある、等が明らかとなった。以上により、脳磁図を用いた非侵襲脳機能計測により、客観的に二点識別覚を推定できる可能性が示された。

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

[分担研究者]

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

[研究協力者]

山岸美沙子（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

岩田 香織（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

加藤 公子（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）

久保田 怜（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学研究部 研究員）

野田 信雄（栄商金属株式会社）

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、メチル水銀中毒で低下することが知られているため、メチル水銀中毒のバイオマーカーのひとつとして利用することが期待されているが、現在のところ二点識別覚の閾値からその病的意義の程度を類推することは困難である。それは、二点識別覚閾値の正常値の範囲といったものが信頼できるレベルで確立されておらず、加齢の影響も明確にされていないこと等に起因する。従って本研究の目的は、高齢者の二点識別覚の正常値の範囲やその特徴を、可能な限り科学的に妥当な方法で、高い信頼性をもって明らかにしていくことである。

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

これらの成果を土台にして更に研究を進展させていく目的で、昨年度より、脳機能画像の立場から客観的な二点識別覚測定に関する研究・開発に取り組んでいる。これまでに我々が開発した二点識別覚自動検査システムは、科学的で信頼性の高い測定を可能にしたが、あくまで被験者本人の主観的感覚に基づくボタン押しフィードバックをデータ計測の拠り所としているため、完全に客観的な検査とは言えない。この難点を克服し、本人の主観的フィードバックを一切必要とせず、感覚弁別機能を客観的に評価できる方法として、電気生理学的脳機能計測によって得られるミスマッチ反応（MMR）を利用できる可能性がある。MMRはNäätänen¹⁾によって発見された脳の誘発反応であり、Oddball課題のように二種類の異なる刺激をそれぞれ高頻度（standard）、及び低頻度（deviant）で呈示して脳波や脳磁図を記録した場合、Primary responseよりもやや遅い潜時で低頻度刺激は高頻度刺激よりも大きな反応を誘発し、両者に対する反応の差分をMMRと呼ぶ（脳波の場合はMismatch Negativity: MMN、脳磁図の場合はMismatch Field: MMFとも言う）。MMRは、刺激に注意を向けずに無視した状態でも誘発されるため、一次感覚野近傍に短期間貯蔵された記憶痕跡のテンプレートと、新たな異なる入力を自動的に照合している過程を反映する反応と考えられている。従って、MMRを分析することにより、二種類の異なる感覚刺激に対する前注意段階の自動的弁別過程を客観的に評価することができると期待される。MMRは当初聴覚刺激に対する反応として発見されたが、柿木班の研究では、これを体性感覚刺激に応用し、脳磁図による体性感覚のMMR計測が、二点識別覚の客観的検査法として利用できる可能性を明らかにした²⁾。この柿木班の優れた研究成果と我々のこれまでの研究成果をカップリングさせることは非常に意義深いと思われるが、残念ながら現状では以下のような多くの問題があり、実現困難である。

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

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

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

これらの問題を克服するために、昨年度は二点識別覚自動測定システムと同等の触覚刺激を与えながら脳磁図を測定できる刺激装置及び、それをコントロールするためのソフトウェアを開発した。また、これを用いて実際に健康成人を対象に脳磁場計測を行い、触覚の 1 点/2 点刺激を脳が自動的に弁別するプロセスを反映していると考えられる脳の誘発反応（MMR）が記録可能であることを示した。

今年度はこれらの研究を更に発展させ、脳磁図を用いた非侵襲脳機能計測により、客観的に二点識別覚の閾値が推定できるかどうか検討を行った。そのために、まず脳磁図対応の二点識別刺激装置の改良を行った。次に本装置を用いた刺激による体性感覚誘発反応の特徴を解析し、MMR を効果的に誘発できるように刺激プロトコルの最適化を行った。更に高齢者 9 名及び若年者 6 名に行った脳磁図計測の結果を解析し、二点識別覚自動検査システムを用いた閾値測定結果との関連を検討した。

II. 研究方法

1) 脳磁図対応二点識別覚刺激装置、及びコントロールソフトウェアの改良

昨年度使用した刺激装置は、実際の二点識別覚検査に比べると皮膚に対するプローブの押出圧がやや弱く、脳の誘発反応の振幅にも影響があると考えられたため、駆出系に改良を加えた。また刺激コントロールソフトウェアもより効率的に刺激を制御できるように更なる改良を加えた。

2) 健康若年成人、及び高齢者を対象にした脳磁場計測

a) まずパイロットスタディとして健康ボランティアを対象に脳磁場の計測を行い、本刺激装置を用いた場合の触覚誘発磁場の特徴を解析して本実験の格的運用における最適な刺激条件を決定する参考とした。

b) 次に本実験として、30-40 才台の健康成人 7 名（男 2 名、女 5 名、平均 37.7 ± 4.6 才）及び、60-70 才台の高齢者ボランティア 9 名（男 7 名、女 2 名、平均 71.2 ± 3.6 才）を対象に誘発脳磁場を計測した。個々の触覚刺激は原則的に被験者の右示指先端で行ったが、右示指先端を欠損した高齢者 1 名については左示指先端で行った。具体的には、プローブが皮膚に対して約 1.5 mm、200 ms 押し出し、その後 450~650 ms の間でランダムに設定された時間は皮膚から離れて元に戻る設定にした。課題は 1 点刺激（standard 刺激：80%）と 2 点刺激（deviant 刺激：20%）をランダムに与える触覚 Oddball 課題で、二点間距離を、2mm

～ 6.5mm の間で変化させて、それぞれの 2 点間距離に対する誘発脳磁場を別々のセッションで少なくとも 4 回測定した。尚、測定中は被験者はイヤホンを通して音楽を聴かせ、指の刺激は無視するように伝えた。これにより、デバイスから発生するわずかな音もキャンセルされた。脳磁計は、Elekta 社 Neuromag (306 ch system) を用い、1kHz のサンプリングレートで連続データ収集を行い、アーチファクトを除去した後、1 点刺激 (standard 刺激) と 2 点刺激 (deviant 刺激) に対するエポックを個別に加算平均した (deviant 刺激に対する加算回数が 120 回以上になるようにデータ収集を行った) 後、1 - 50 Hz のオフラインフィルタ処理を行った。MMR は deviant 刺激に対する誘発反応から、standard 刺激に対する誘発反応を差し引くことによって求めた。これらの得られた波形は ASA (ANT software) を用いて分析した。また、被験者は脳磁計測とは別に右 (1 名では左) 示指先端において二点識別覚自動検査システムを用いた二点識別覚閾値測定も行い、脳磁図のデータと照合した。統計解析にはエクセル統計 2012 (社会情報サービス株式会社) を用いた。

<倫理面への配慮>

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

III. 研究結果及び考察

1) 脳磁図対応二点識別覚刺激装置、及びコントロールソフトウェアの改良

プローブの押出圧を強くするため、Air 駆動部分のポンプに改良を加えた。その結果、押出圧は 0.18 Kg/cm² から、0.34 Kg/cm² と約二倍近くになり、触れた感覚もより実際の二点識別覚検査に近いものとなった。また、コントロールソフトウェアも細かな不具合を修正した上で GUI もタッチパッド対応に改良し、全体の視認性や操作性が向上した (図 1, 右)。

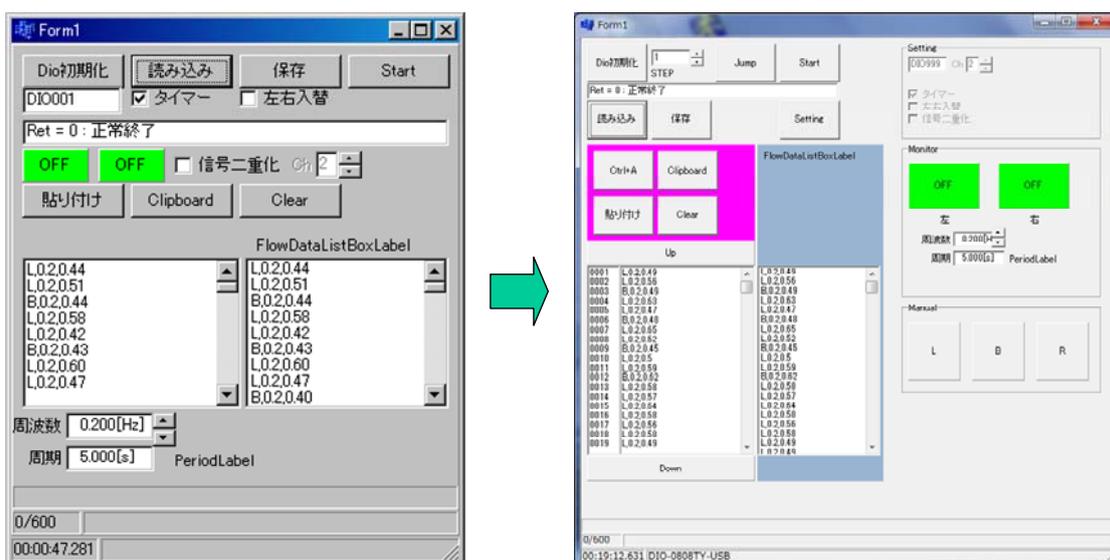


図 1

2) 健康若年成人、及び高齢者を対象にした脳磁場計測

a) パイロットスタディ結果

①プローブ押出時間が体性感覚誘発反応に与える影響の検討

プローブが押出されて皮膚に接触している時間は、最も重要な条件設定項目のひとつである。これが短すぎると一点／二点の弁別感覚が弱くなると予想され、また長くなると弁別感覚に必要な接触時間は保たれるものの、一回の検査時間が長くなる。そこで、プローブの押出時間を 50 ms, 100 ms, 200 ms, 300 ms と変化させた場合の一点刺激に対する誘発反応を比較した (図 2)。いずれの押出時間でも刺激トリガー入力後約 110 ms で刺激対側の頭頂葉を中心に誘発反応が得られた (図 2, 赤矢印)。これは、触覚刺激に対する 1 次体性感覚野の初期応答反応と考えられる。注目すべきは、押出時間が 100 ms, 200 ms, 300 ms の場合は、それぞれ押出時間に相当した時間後にもうひとつの反応ピークが認められることである (図 2, 青矢印)。また、これら二つの反応の磁場分布はほぼ同じであることより、共に一次体性感覚野を発生源とする反応と推定される。これらの反応が誘発されるタイミングと、実際のプローブの動きを時間軸を揃えて表示すると、一つ目の反応はプローブが皮膚に触れた直後、二つ目の反応はプローブが皮膚から離れた直後のタイミングで誘発されていることがわかる (図 3)。従って両者は、一定長の聴覚刺激の場合に誘発される onset 及び offset 反応³⁾ に相当した誘発成分であると考えられた。

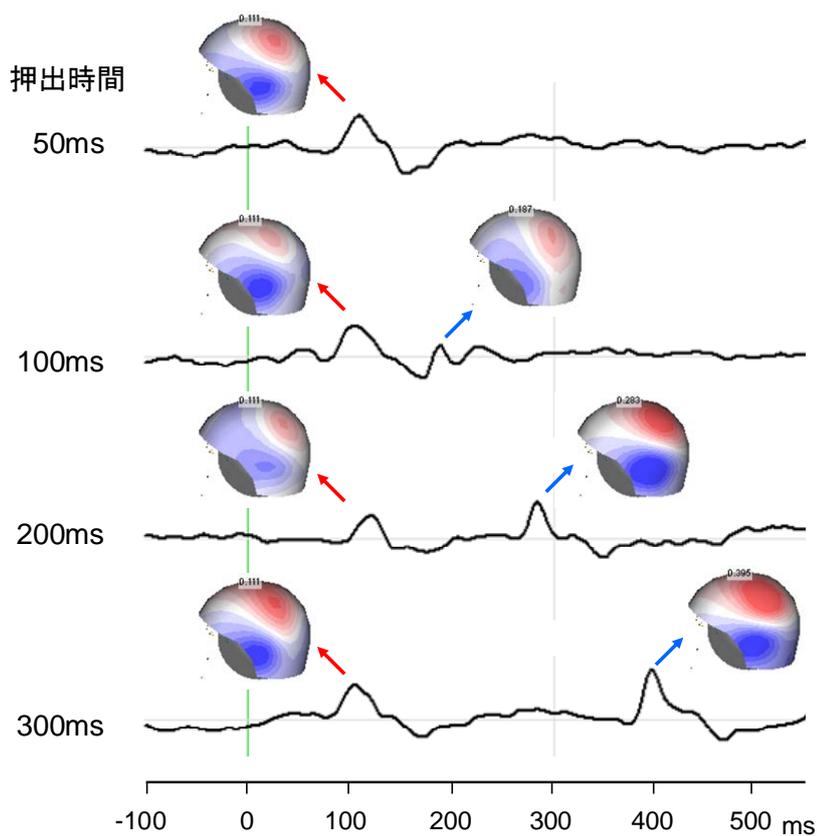


図 2：触覚刺激誘発磁場に、プローブの押出時間が与える影響

Probeの動作タイミングと脳磁図誘発波形の関係

(押出時間200msの場合)

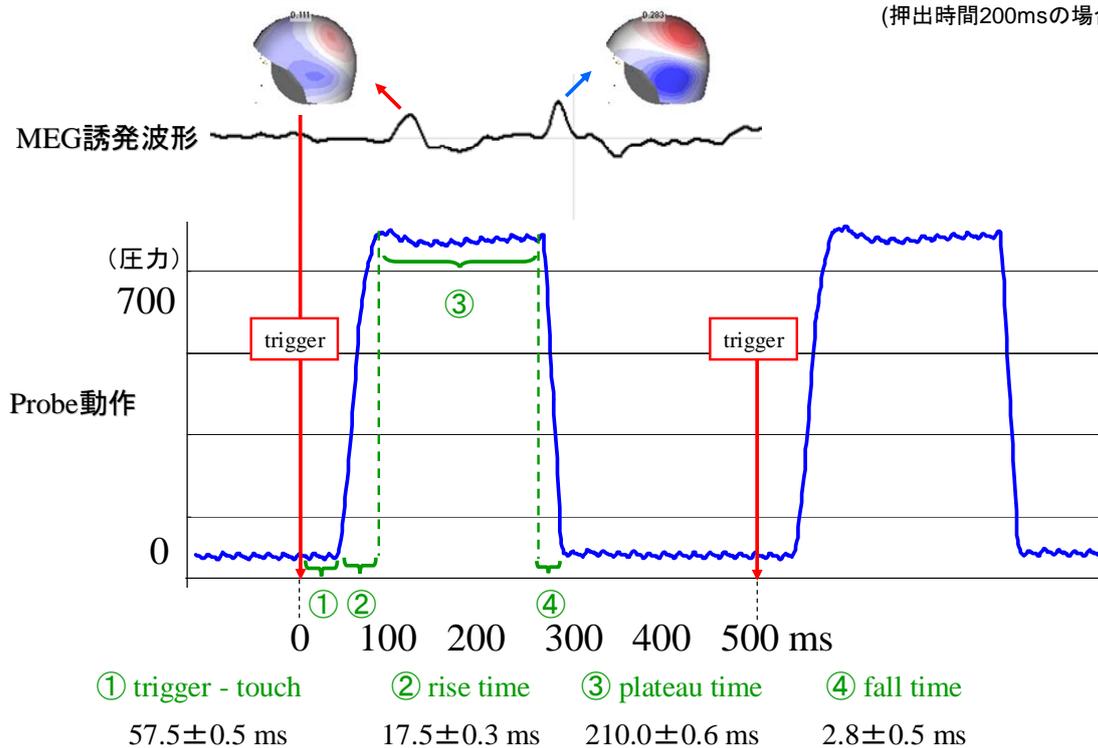


図3

②プローブ押出時間が体性感覚 MMR に与える影響の検討

上記検討で明らかとなった触覚刺激の offset 反応は、条件によっては本研究で特に注目する MMR と潜時がオーバーラップして、MMR の分析の妨げとなる可能性がある。そこで、健康ボランティア (40 才男性) を対象に、実際の 1 点 / 2 点刺激による触覚 oddball 刺激に対する MMR と押出時間との関係も検討した (図 4)。押出時間が 50 ms の場合は offset 反応がないので条件としては優れているが、弁別感覚が弱くなる可能性があるかと予測したとおり、実際の弁別感覚がわかりにくくだけでなく、MMR もほとんど誘発されなかった。従って、至適な条件からは除外された。また、押出時間 100 ms では offset 反応と MMR が時間的にオーバーラップするためこれも除外された。押出時間 200 ms と 300 ms はいずれも同等の強さの MMR を誘発し、offset 反応のオーバーラップは問題とならないレベルであった。一回の測定時間 (600 回刺激、ISI 450-650 とした場合) は 200 ms の場合約 7 分半、300 ms の場合は約 8 分半となるため、検査時間が短くてすむ 200 ms を本実験に採用することとした。

Probe押出時間がMMRに及ぼす影響

(2点間距離5mm, Oddball刺激)

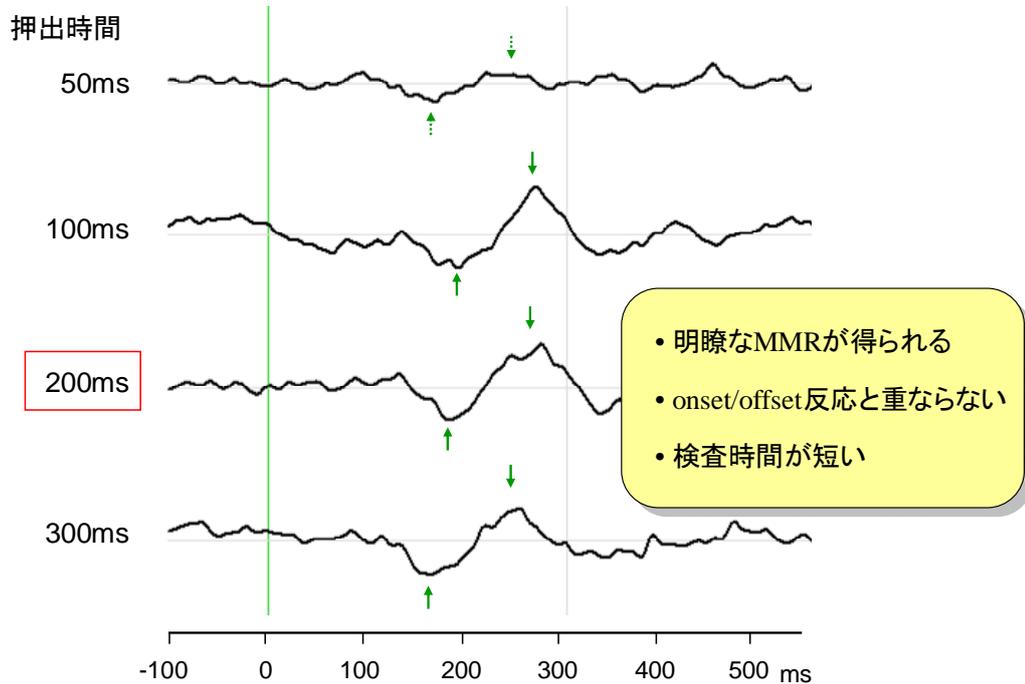


図4

b) 本実験結果

図5に高齢者2名の代表的波形を示す。若年者を含め、全ての被験者で二点間距離や、deviant/standard刺激に関係なく onset 反応 (図5, 赤矢印) と offset 反応 (図5, 青矢印) が誘発され、そのピーク潜時も被験者間のバラツキが少なく安定していた (Table 1)。一方 deviant 刺激に対する反応から standard 刺激に対する反応を差し引くことによって得られる MMR は個人差が大きく、人によって同定されるピークの数も異なった (図5)。一つ目のピーク (MMR1) は全例で認められたが、二つ目のピーク (MMR2)、三つ目のピーク (MMR3) と、ピークの数が増えると共にその出現頻度は低下した (Table 1)。MMR の潜時も同様に被験者間のバラツキが大きく、反応に個人差が認められることが示された (Table 1)。今回の解析では、少なくともひとつ以上の MMR が誘発され、かつ、その等磁場 map の分布が、一次体性感覚野近傍由来と判断された場合「MMR 出現」と判定した。

高齢者における代表的誘発波形

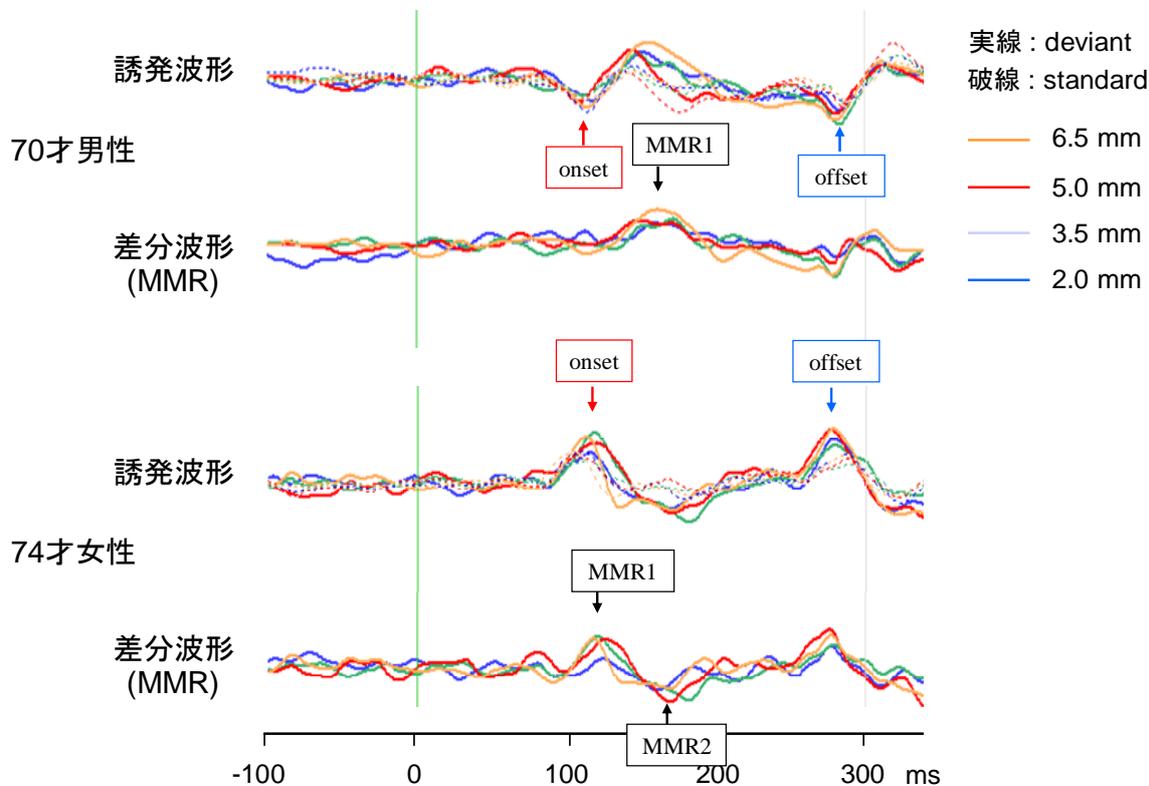


図5：高齢者2名における代表的誘発波形とその差分波形

Table 1: 各誘発成分の出現頻度と Peak 潜時 (ms)

	onset反応	MMR1	MMR2	MMR3	offset反応
誘発頻度	100%	100%	75%	19%	100%
peak潜時	111±9	149±18	187±21	232±25	285±6

この MMR は、二点間距離によって振幅が異なり、二点間距離が小さいと振幅が小さくあるいは同定不能になる傾向が認められた。MMR が出現する最小二点間距離を個人毎に求め、同一被験者で別途二点識別覚自動検査システムを用いて測定した二点識別覚閾値（50% 弁別閾値）との相関関係を分析したところ、両者の間に有意な正の相関 ($R = 0.67, p = 0.006$) があることが明らかとなった (図 6)。これは、MMR が個人の二点識別覚閾値の推定に有用であることを示唆する重要な所見である。

各二点間距離における MMR の出現頻を検討したところ、若年者、高齢者共に二点間距離が 5 mm 以上だと MMR が 100% 誘発された (図 7)。これまでの我々の研究で、210 名の健常成人を対象に二点識別覚自動検査システムを用いて測定した結果得られた二点識別覚の正常範囲を参照すると (Table 2)、5 mm の二点間距離はほとんどの年齢層においてプラス 3SE の正常上限値を超える値であることがわかる。従って、a) 二点識別覚 (50% 弁別閾値) の測定結果が 5 mm 以上で、なおかつ b) 脳磁図計測で 5 mm の二点間距離のオッドボール刺激に対して MMR が出ない被験者が見られた場合は、その被験者の「二点識別覚は異常である」と判定できる可能性が高いと考えられた。

個人の二点識別覚閾値と MMR 誘発二点間距離の相関

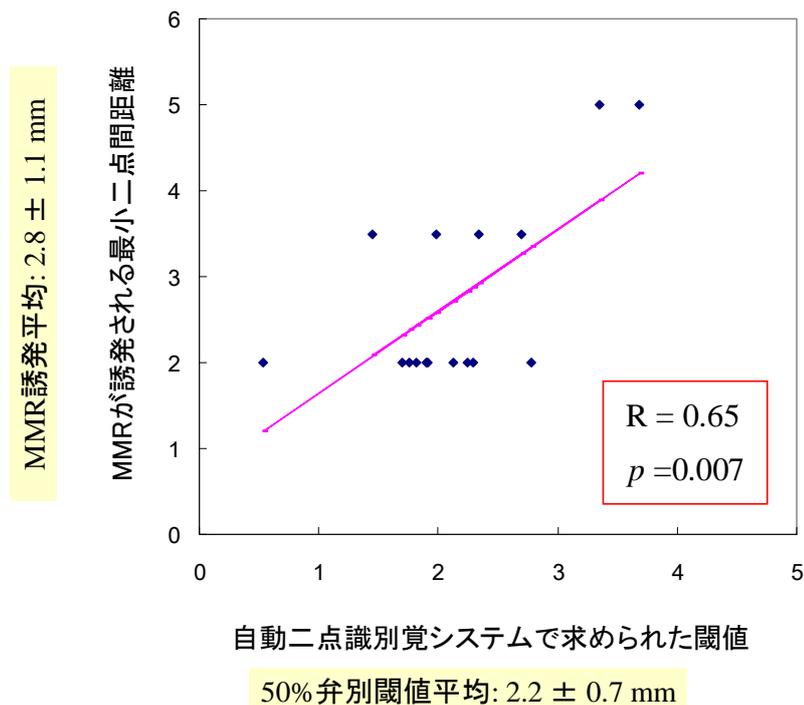


図 6

各二点間距離におけるMMRの出現頻度

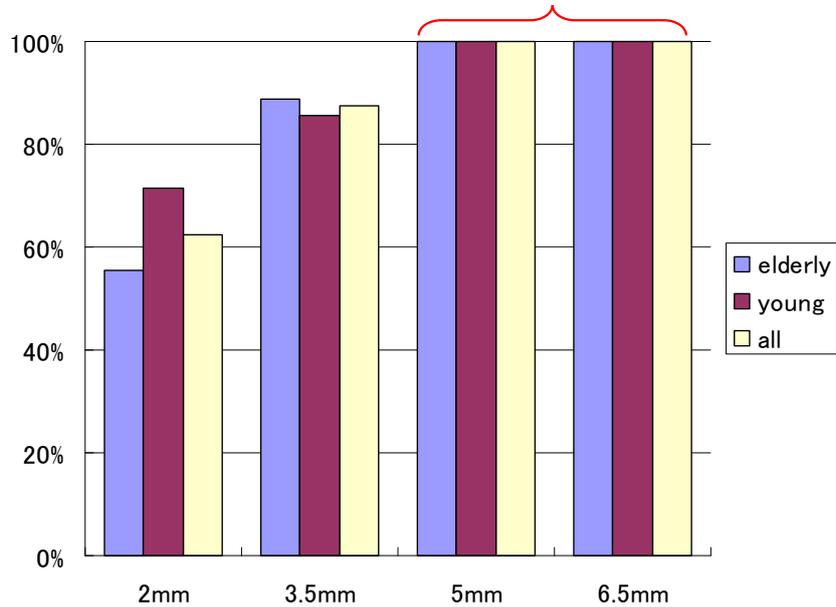


図 7

Table 2: 示指先端部における各年齢層の二点識別覚閾値（50%弁別閾値）の正常範囲

年齢(才)	20	30	40	50	60	70	80	90
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

IV. まとめ及び今後の課題

今回の検討により以下の結果が得られた。

1. 二点識別覚検査と同等の刺激を皮膚に与えることができる装置を用いて、触覚刺激に対する脳磁反応の基本的特徴を解析し、MMR を効率的に誘発するための至適条件を明らかにした。
2. 個人毎の MMR が出現する最小二点間距離は、二点識別覚の 50% 弁別閾値と有意な相関が認められたことより、脳磁図を用いた非侵襲脳機能計測によって、完全に客観的に二点識別覚閾値を推定できる可能性が示された。
3. 仮に二点間距離を 5mm に設定して脳磁図検査を行えば、異常の有無を比較的簡便に判定できる可能

性が示された。

一方で、今回の方法を実際に応用していくにはまだ次のような課題も残されていると考えられた。

1. MMR は個人差が大きく、人によっては S/N が MEG の測定限界に近い場合、判定に苦慮する場面が少なくないため、客観的信頼性を向上していくためには S/N を更に改善する工夫が必要である。
2. 今回の検討では MMR 出現の有無の判定を視覚的に行ったため、恣意性混入の余地がある。従って、より客観的な判定法を開発する必要がある。
3. 触覚 MMR の基本的な特徴や脳内メカニズムについてはまだ不明なことも多く、更に詳細に検討していく必要がある。

参考文献

1. Näätänen, R.. The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear* 1995; 16: 6-18.
2. Akatsuka K, Wasaka T, Nakata H, et al., Objective examination for two-point stimulation using a somatosensory oddball paradigm: an MEG study. *Clin Neurophysiol.* 2007; 118 (2): 403-11.
3. Hari R, Pelizzone M, Makela JP, et al., Neuromagnetic responses of the human auditory cortex to on- and offsets of noise bursts. *Audiology*, 1987; 26: 31-43.

Cutaneous two-point discrimination in elderly people

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

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

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

^{*3}*Eisho Kinzoku corporation*

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

Abstract

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

Magnetoencephalography (MEG) could be an alternative approach to assess the individual two-point discrimination ability. Therefore, we developed a tactile two-point stimulator which is compatible for MEG measurements. The magnetic-free probes were driven by air pressure via air tubes, and their motions were precisely controlled by a PC with accurate timing. Using this stimulator, we measured somatosensory evoked magnetic fields to tactile Oddball paradigm (standard: 80% one-point stimuli, deviant: 20% two-point stimuli) in 7 young and 9 elderly healthy volunteers. In each subject, magnetic responses were recorded in 4 different measurement blocks with randomly varied two-point distances from 2 to 6.5 mm (2, 3.5, 5 and 6.5 mm). The MEG data demonstrated that the tactile mismatch responses (MMRs), which are though to reflect the automatic discrimination processes between one- and two-point stimuli, were elicited in all subjects. The MMRs appeared to change their magnitude in association with the two-point distances, and were often not detectable if a two-point distance was short. There was significant positive correlation ($R = 0.65$, $p = 0.007$) between the individual two-point

thresholds and the minimum two-point distances that could elicit detectable MMRs. These results suggest that individual two-point thresholds may be objectively estimated using MEG.

II メチル水銀による健康障害に関する国際的レビュー

メチル水銀曝露による健康障害に関する国際的レビューに関する研究

村田勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学教授）

吉田 稔（八戸大学人間健康学部教授）

坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学部長）

苅田香苗（杏林大学医学部衛生学公衆衛生学准教授）

岩田豊人（秋田大学医学部社会環境医学環境保健学助教）

龍田 希（東北大学大学院医学系研究科発達環境医学助手）

柳沼 梢（尚絅学院大学総合人間科学部健康栄養学科講師）

岩井美幸（東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学特別研究員）

仲井邦彦（東北大学大学院医学系研究科発達環境医学教授）

研究要旨

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

今年度の文献レビューにより、以下のことが示された。①2008 年以降、メチル水銀を扱った論文の中で疫学研究の割合は減少傾向にあったが、2011 年には増加した。②魚摂取による胎児期メチル水銀影響は、例え低濃度であっても、妊娠中の母親魚摂取量や PCB を調整すると小児神経発達に軽微な負の影響を及ぼしうるが、健康影響を評価したときの年齢で有害物質の影響の有無が異なるようであるので、年齢別に有害物質毎の影響を整理する必要がある。③セレンのメチル水銀の有害影響を抑制する作用については、ヒトや動物種により異なると考えられ、一定の作用を確定するに至らなかった。④小規模金鉱山での水銀の拡散は世界中の途上国で行われているが、金回収法に水銀を用いない別の新たな代替法を検討する必要がある。

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

I. 研究目的

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

本年度は、①メチル水銀および水銀に関する疫学研究論文の最近の推移を示すとともに、②2012年に発表された海外と我が国の疫学研究論文の概要、③メチル水銀とセレンの相互作用に関する論文の概要、④発展途上国での水銀汚染の実態やメチル水銀（および水銀）曝露による健康影響の実態を文献レビューし、今後のメチル水銀研究の方向性を探った。

II. 研究方法

文献データベース Medline (PubMed) を用いて、2012 年末までに報告された①メチル水銀・水銀に関する論文数の推移、②世界の疫学研究の概要、③途上国での水銀汚染の実態など、メチル水銀曝露に関連するヒト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 2001 年から 2012 年までを PubMed を用いて検索すると、124 編～334 編（全言語）であり、このうちヒトを対象とした論文数は 1 年当たり 55 編から 109 編であった（下表）。2001～2004 年までヒトを対象とした研究が 4 割以上を維持していたが、2005 年以降低調になった。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ないし横ばい状態である。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り、2010 年にはメチル水銀および水銀の全論文数に占めるヒト研究は最低水準となった。2011 年の増加は 2010 年の減少分が上乗せされた形に見える。なお、2012 年分については、PubMed への掲載が遅れている雑誌もありうるので、集計途上の暫定的数値とみなすべきである。

メチル水銀を巡るフェロー諸島出生コホート研究とセイシェル小児発達研究の一大論争が 1998～2000 年にあり¹⁻⁶⁾、それに伴いメチル水銀のヒト（特に小児）健康影響に関する論文が多数報告

された。また、同時期の2002年にNew England Journal of Medicine誌上でメチル水銀の冠動脈疾患リスクに関連する論争が始まり⁷⁻⁹⁾、メチル水銀の問題が世間を騒がせた。混迷の続く中、2008年にセイシェル小児発達栄養研究の成果が発表された^{10, 11)}。これにより、フェロー諸島とセイシェルのメチル水銀論争に終止符が打たれ、メチル水銀に関する関心も薄れてきたように思われる¹²⁾。これは、疫学研究で検証できる主要仮説が減り、枝葉末節的な仮説しか残っていないことを暗示しているようにもみえる¹³⁾。ただ、ヒトにおけるメチル水銀・水銀の細胞・遺伝毒性の機序などについては明確な説明がされていないことから、今後この領域での新たな研究仮説が立てられ、検証されなくてはならない。

「メチル水銀」関連のPubMed上の論文数の推移

	西 暦 年											
	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
“methylmercury” のに入った論文数	145	124	143	159	201	227	298	294	249	267	334	314
ヒトを対象とした 論文数	59	55	60	74	67	75	106	109	82	75	108	76
割合 (%)	40.7	44.4	42.0	46.5	33.3	33.0	35.6	37.1	32.9	28.0	32.3	24.2
“mercury”の入っ た論文数	834	931	897	980	1227	1320	1414	1479	1403	1464	1718	1657
ヒトを対象とした 論文数	351	366	361	374	398	440	453	493	422	349	518	321
割合 (%)	42.1	39.3	40.2	38.2	32.4	33.3	32.0	33.3	30.1	23.8	30.2	19.4

2) メチル水銀に関するコホート研究の国際動向

フェロー諸島とセイシェル共和国で行われたメチル水銀の胎児期曝露に関する先行研究は、2008年のセイシェル小児発達栄養研究の報告により^{11,12,14)}、メチル水銀の発達神経影響は長鎖不飽和脂肪酸の影響を考慮すると存在するとの結論を得て、当初の役目は終えた。その後、2つの先行研究は方向を転換し、各々独自の研究を行っているように思える。

■ フェロー諸島出生コホート研究からの発信

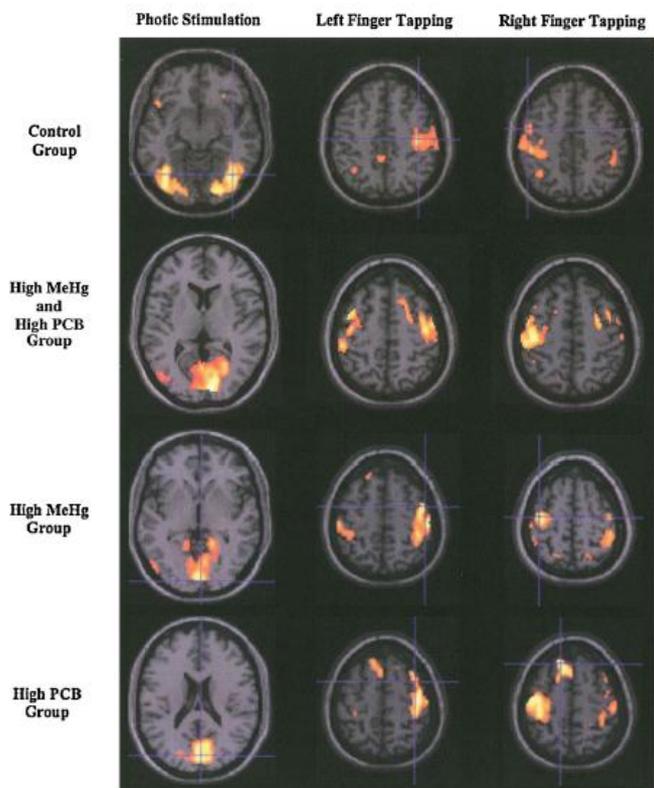
Grandjeanらの研究グループは、フェロー出生コホート研究を通して、メチル水銀の胎児性曝露の小児神経発達影響について多数報告してきたが、近年は有機塩素系¹⁵⁾、有機フッ素系化合物(perfluorinated compounds)¹⁶⁾、ポリ塩化ビフェニール(PCB)^{17,18)}等の環境化学物質の曝露影響に研究テーマを移行している。昨年、Sakamotoら¹⁹⁾の母体血と臍帯血の胎盤経由の各種重金属の移行に関する研究を紹介したが、同様の仕事をGrandjeanらの研究グループも行った²⁰⁾。この研究では環境化学物質が生まれてくる子どもにどの程度移行するのかを明らかにすることを目的とした。母体血、臍帯血、臍帯組織、胎盤、母乳の各生体試料でカドミウム、鉛、水銀、セレンが測定されたが、これら生体試料間で高い相関を示したのは水銀のみであった。また、有機ハロゲン化合物(organohalogen compounds)の他、ペンタクロロベンゼンやヘキサクロロシクロヘキサン(γ -hexachlorocyclohexane)なども測定された。有機ハロゲン化合物は全ての生体試料で検出

され、母体血清の有機ハロゲン化合物は臍帯血清の 1.7 倍、臍帯・胎盤組織の 2.8 倍と高かったが、母乳中濃度の 0.7 倍であり、しかも母体血清中有機ハロゲン化合物は他の生体試料中濃度と高い相関を保っていた ($r^2 > 0.5$)。有機フッ素系化合物の母乳への移行は殆ど検出限界以下であり、その中の PFOA (perfluorooctanic acid) が僅かに検出された。

メチル水銀や PCB の胎児期から幼少期の曝露は神経行動学的検査で評価される認知障害、知覚障害、運動障害と関連する。共同研究者の White らはフェロー出生コホート研究で追跡中の 15 歳児を対象として、行動課題を与えている間に機能的磁気共鳴画像 (fMRI) を撮ることにより、神経行動に関連する脳機能偏位が視覚化できるか否か検討した²¹⁾。視覚および運動課題の間、低濃度曝露者は正常対照者で示されるのと同じ fMRI 活動パターンを示したが、高濃度曝露者は、低フェローコホートの 15 歳児の 4 グループの臍帯水銀 ($\mu\text{g/L}$) と臍帯組織中 PCB (ng/g 湿重量) 濃度 (各グループは 3 名ずつの男子)

	臍帯水銀 ($\mu\text{g/L}$)	臍帯組織 PCB (ng/g 湿重量)
High mercury group	30.70 - 67.70	0.22 - 0.36
High PCB group	10.10 - 13.30	3.93 - 6.08
High mixed group	81.30 - 114.0	4.60 - 6.91
Low mixed group	4.30 - 13.80	0.40 - 0.53

濃度曝露者と比べ、脳のより大きな部分での活動や、また活動が異なる、ないしより広い活動パターンを示した。メチル水銀および PCB 曝露の増加に伴って観察される脳活動パターンはこれらの神経毒性に照らして意義深く、fMRI を用いた方法は曝露により起こる神経行動機能障害の視覚的心理測定に有用性を持つ可能性を示唆した。



Average activation by exposure group during tasks of photic stimulation and finger tapping. The control group refers to the 3 subjects with low methylmercury and low PCB exposure (left hemisphere is on left side of brain slices).

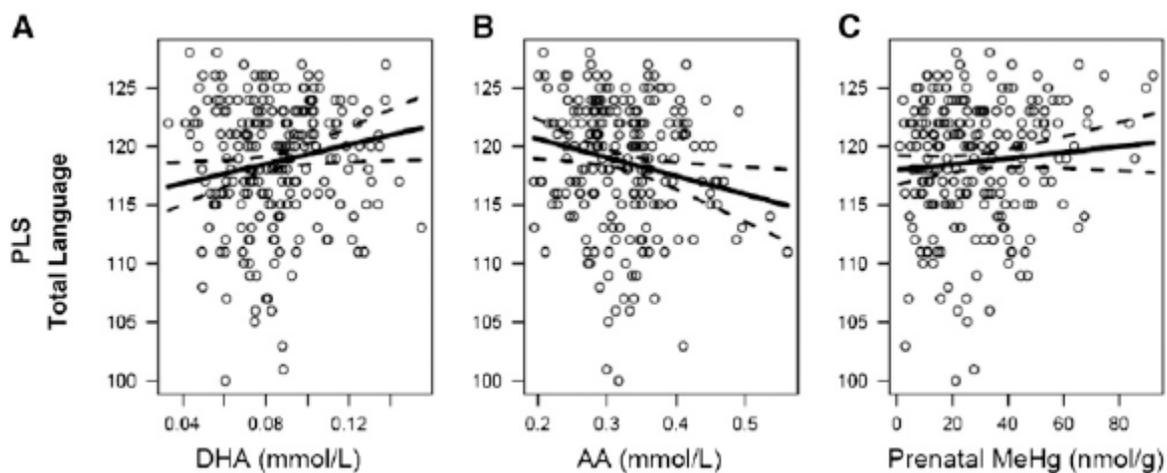
■ セイシェル小児発達栄養研究からの発信

セイシエルの小児発達研究 (Seychelles child development study) の成果として2編の論文が発表され^{22,23)}、また小児発達栄養研究 (Seychelles Child Development and Nutrition Study) の成果が4編発表されている²⁴⁻²⁷⁾。

Davidson らは、セイシェル小児発達研究の対象者を17歳まで追跡し、小児のカリフォルニア言語学習検査 (CVLT)、Woodcock-Johnson 学力検査 (W-J-II) など27の検査を行った²²⁾。その結果、現在のメチル水銀曝露量、母親の知能指数 (IQ)、社会経済状況指標 (SES)、測定時の年齢、性などを考慮して解析すると、Woodcock-Johnson 学力検査成績は出産時の母親毛髪水銀濃度と有意な正の関連があった。この研究の問題点は、従来より指摘されている、*n-3* 長鎖不飽和脂肪酸が考慮されていないことである。また、子どものIQを養育者のIQで調整する時、回帰モデルの中に各々を独立変数として入れたが、母子のIQの差分を1説明変数とする方が良いかもしれない。経時的にIQを測定し、有害物質曝露の前後でIQが低下するか否か検討する手法は理解可能である。

セイシエルの歯科用アマルガムには50%の金属水銀が含まれており、水銀蒸気として微量ではあるが口腔内に放出される。このため、妊娠中の母親にアマルガムが充填されているならば、これにより胎児期に小児が水銀曝露を受けていたことになる。Watson らは妊娠中の母親のアマルガム総数とアマルガム咬合面数を調べ、66ヶ月児の神経発達検査成績 (Woodcock-Johnson 学力検査) との関係を検討した²³⁾。この研究では、母親のアマルガム充填が小児の神経行動学的結果に影響を及ぼしたという仮説を支持する証拠は提示できなかった。同様の研究は、セイシェル小児発達栄養研究の9ヶ月および30ヶ月児でベイリー乳幼児発達検査 (BSID) を行って検討された²⁶⁾。交絡因子を調整した重回帰分析を用いて男女合計で解析すると、母親のアマルガム総数およびその咬合面数と検査得点との有意な関連はなかった。しかし、女兒のみで計算すると咬合面数と認知発達指標得点 (MDI) の間に有意な負の関連が認められた。

Strain らは、セイシェル小児発達栄養研究で5歳児に preschool language scale (就学前言語尺度、PLS) 検査を行い、母親出産時の毛髪総水銀濃度、多価不飽和脂肪酸、母親IQ、社会経済状況指標 (SES)、測定時年齢などの言語尺度得点に及ぼす影響を調べた²⁵⁾。その結果、ドコサヘキサエン酸 (DHA) が高い程言語尺度得点は良くなり (図A)、一方アラキドン酸 (AA) が高いと悪くなるという結果を得たが (図B)、出産時の毛髪総水銀濃度とは有意な関連を示さなかった (図C)。



■ メチル水銀が米國小児 2,550 万人の IQ 得点損失に及ぼす影響の推定

環境化学物質の曝露と小児神経発達の関係性を評価しようとする時、影響の大きさ (effect size) やその確率 P 値 (例えば、 $P < 0.05$ であるかどうか) にのみ目が向けられる。影響の大きさとは、曝露群-非曝露群間の平均値の差、生体曝露指標の単位変化当たりの得点変化、あるいは生体影響指標値に対する相対リスクや Odds 比など様々な形で表される。臨床的に重要でないという理由で影響の大きさを無視することもあるが、そのような見方をすると、影響評価を公衆衛生の場に適切に置けなくなる。あるリスク要因に起因する集団負荷を見積もる場合、当該要因によるリスクの大きさと集団内での発生頻度を反映する測定基準が必要となる。大きな衝撃を有するリスク要因は患者に重篤な影響を及ぼすが、その発生頻度が稀であるなら集団負荷に影響する主要因と言えなくなる。逆に、発生に伴う衝撃は小さくとも発生頻度が高いならば集団に大きな負荷をかけることになる。Bellinger は、疾病の重篤さに重きを置くのではなく、リスク要因により集団全体にかかる負荷を推定する方法を考案した²⁸⁾。

全米の 5 歳以下 2,550 万人の知能指数 (full-scale IQ) に降りかかる医学リスク、社会リスク、化学リスクに由来する IQ 損失を過去に報告された文献から算出し、そのリスクの大きさを評価する方法である。例えば、早期出産による IQ 損失は 34,031,025 点となるが、これは以下のように算出された。①米国では、小児の約 12.3% が在胎齢 37 週未満の早期出産と言われている。②Bhutta らは 15 の研究から症例群 1,556 名と対照群 1,720 名をメタ分析に用いた。メタ分析より算出される症例群の IQ 低下の平均値は 10.85 であった。③これを 2,550 万人の米國小児に当てはめると 34,031,025 点となる。

リスク要因	IQ の損失得点
Medical condition	
Congenital heart disease	104,805
Preterm birth	34,031,025
Type 1 diabetes	185,640
Acute lymphocytic leukemia	135,788
Brain tumors	37,288
Duchenne muscular dystrophy	68,850
Neurodevelopmental disorders	
Autism spectrum disorders	7,109,899
Pediatric bipolar disorder	8,164,080
Attention deficit hyperactivity disorder	16,799,400
Postnatal traumatic brain injury	5,827,300
Socioeconomic, nutritional, psychosocial factors	
Nonorganic failure to thrive	5,355,000
Iron deficiency	9,409,500
Environmental chemical exposures	
Methylmercury	284,580
Organophosphate pesticides	16,899,488
Lead	22,947,450

小児 IQ の損失得点に及ぼす環境化学物質 (本研究ではメチル水銀、有機リン系殺虫剤、鉛のみ) の影響は集団負荷としてみると、かなり大きい。なお、この表の算出では、胎児性水俣病のような“影響の大きさ”の大小というより、その発症および曝露頻度の高さが数値を決めてしまう。したがって、メチル水銀は毛髪水銀濃度が 1.11 $\mu\text{g/g}$ 以上の米国女性 10% に当てはめて算出されたが、全レンジに当てはめると、1,875,017 点となると述べた。

■ 日本の出生コホート研究からの発信

日本の主たる出生コホート研究は「環境と子どもの健康に関する北海道スタディ」と「東北コ

ホート調査」であり、両者とも現在進行形の中で毎年研究発表を行っている。環境と子どもの健康に関する北海道スタディは札幌市内の1産院コホート（対象者514名）と、北海道全域での大規模コホート（妊婦の参加目標20,000名）の2つからなり、前者は母体血、臍帯血、毛髪、母乳のダイオキシン類、有機フッ素系化合物、水銀等の化学物質による小児の出生時体格、神経発達、アレルギー疾患などの健康影響を詳細に検討する目的で2002年に開始され、後者は先天異常発生と化学物質曝露の因果関係、化学物質代謝酵素等の遺伝子多型に基づく個人感受性素因の相違と先天異常との関連を解明する目的で2003年に立ち上げられた。2012年の研究成果は葉酸に関する論文2編と有機塩素系殺虫剤に関する論文1編が雑誌に掲載されている²⁹⁻³¹）。

東北コホート調査は難分解性環境汚染物質（POPs）およびメチル水銀による胎児～新生児期曝露と児の成長・発達との関連性を明らかにするために計画され、2001年より登録を開始した。2012年には、このコホート（30ヶ月児）を用いてPCB、メチル水銀、鉛のいずれが小児の行動上の問題に影響を及ぼすのか検討した結果をEnvironmental Research誌に掲載した³²）。対象者306名の臍帯血の総水銀の中央値は10.2（5～95 percentiles、4.1～24.5）ng/g、総PCBは48.3（18.6～116.3）ng/g 脂質、鉛は1.0（0.5～1.7）μg/dlであった。

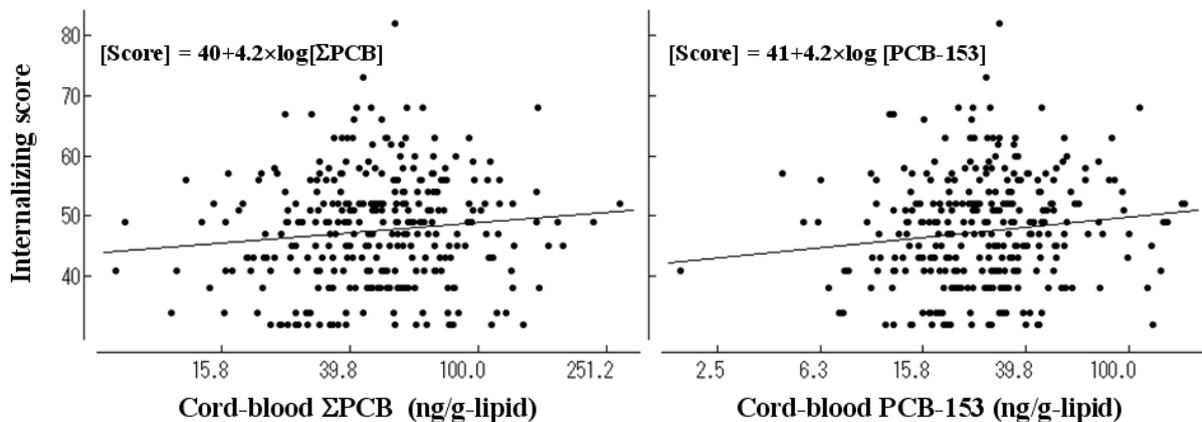
母子ペア306組の子どもの行動チェックリスト得点に対する曝露指標および交絡因子の関係
—重回帰分析の結果（重相関係数と標準回帰係数）—

	(R)	Internalizing score		Externalizing score		Total score	
		Model 1	Model 2	Model 1	Model 2	Model 1	Model 2
Multiple correlation coefficient	(R)	0.418**	0.319**	0.320**	0.315**	0.376**	0.327**
log ₁₀ [Cord-blood ΣPCB]		0.063	0.158*	0.067	0.085	0.048	0.114
log ₁₀ [Cord-blood THg]		-0.005	-0.004	-0.033	-0.033	-0.038	-0.037
log ₁₀ [Cord-blood lead]		-0.107	-0.070	-0.038	-0.032	-0.092	-0.066
Birth weight		0.025	0.048	0.014	0.019	0.016	0.031
Child gender		-0.001	-0.010	0.027	0.026	0.019	0.013
Maternal age at parturition		-0.077	-0.216**	-0.143*	-0.170**	-0.105	-0.200**
Birth order		-0.313**		-0.059		-0.216**	
Delivery type		-0.024	0.010	-0.067	-0.061	-0.052	-0.028
Drinking habit during pregnancy		0.016	0.027	0.035	0.037	0.023	0.031
Smoking habit during pregnancy		0.018	-0.004	0.057	0.055	0.057	0.047
log ₁₀ [Maternal seafood intake]		-0.060	-0.076	-0.077	-0.080	-0.066	-0.077
Raven score		-0.116*	-0.074	-0.052	-0.044	-0.059	-0.030
Score of the EES at 18 months		-0.128*	-0.139*	-0.144*	-0.146*	-0.156**	-0.164**
Breastfeeding		-0.032	-0.038	-0.127*	-0.128	-0.089	-0.093

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (THg, 総水銀).

子どもの行動チェックリスト（Child Behavior Checklist, CBCL）を神経発達指標として用い、その中の内向尺度得点（Internalizing 得点）は、総水銀や鉛濃度との間に有意な相関を示さなかったが、総PCBと有意な相関を示した。交絡因子を入れた重回帰分析（上表 Model 1）を行うと総PCBの有意な相関は消失した。そこで出生順序の変数を交絡因子から取除くと（上表 Model 2）、再び内向尺度得点と総PCBの間に有意な関係が見られた。第1子の行動チェックリスト得点および総PCB濃度は、第2子またはそれ以上と比べ、有意に高いので、第1子とそれ以外で別々に検討すべきと考えられた。第2子またはそれ以上の群で、出生順序を除く交絡因子の影響を調整した偏

相関係数を算出すると、有意な正の相関が認められた。以上より、小児の内向的な行動上の問題は PCB の胎児期低濃度曝露により影響されることが示唆された。



3) 日本から発信しているヒト水銀研究の概要

2012年にわが国の研究者から発信されたヒトの水銀に関する論文は4編あった³³⁻³⁶⁾。

■ 妊娠期間中の母親血および臍帯血メチル水銀とドコサヘキサエン酸 (DHA)

魚は、発達段階の脳に対して有害影響をもたらすメチル水銀とともに、有益な DHA を多く含んでいる。Sakamoto らは、54 名の出産後の母親頭髪 1 cm 間隔の水銀濃度とともに、その妊娠早期および出産時の母体血と臍帯血からメチル水銀および DHA を測定した³³⁾。出産時の母体血水銀濃度は妊娠早期と比べて幾分低値であり、臍帯血水銀濃度は出産時の母親血と比べて 1.9 倍高かった。一方、出産時母体血漿 DHA レベルは、妊娠早期および臍帯血と比べ、2.3 および 1.6 倍高かった。この時、胎児循環中の水銀および DHA は有意な正の相関 ($r=0.40, P<0.01$) が見られた。

母体 1 cm 毎頭髪水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$)	Pearson 積率相関係数		
	臍帯血水銀 7.64 \pm 2.64 (ng/g)	母体血漿 DHA 136 \pm 38 (mg/L)	臍帯血漿 DHA 60 \pm 15 (mg/L)
0-1 cm (n=54)	1.43 \pm 0.57	0.87**	0.33*
1-2 cm (n=54)	1.36 \pm 0.55	0.82**	0.24
2-3 cm (n=54)	1.34 \pm 0.35	0.79**	0.21
3-4 cm (n=54)	1.38 \pm 0.66	0.61**	0.23
4-5 cm (n=54)	1.34 \pm 0.81	0.68**	0.41**
5-6 cm (n=54)	1.33 \pm 0.48	0.62**	0.43**
6-7 cm (n=54)	1.38 \pm 0.50	0.55**	0.35*
7-8 cm (n=54)	1.39 \pm 0.53	0.50**	0.38*
8-9 cm (n=54)	1.45 \pm 0.62	0.26	0.24
9-10 cm (n=52)	1.45 \pm 0.67	0.20	0.21

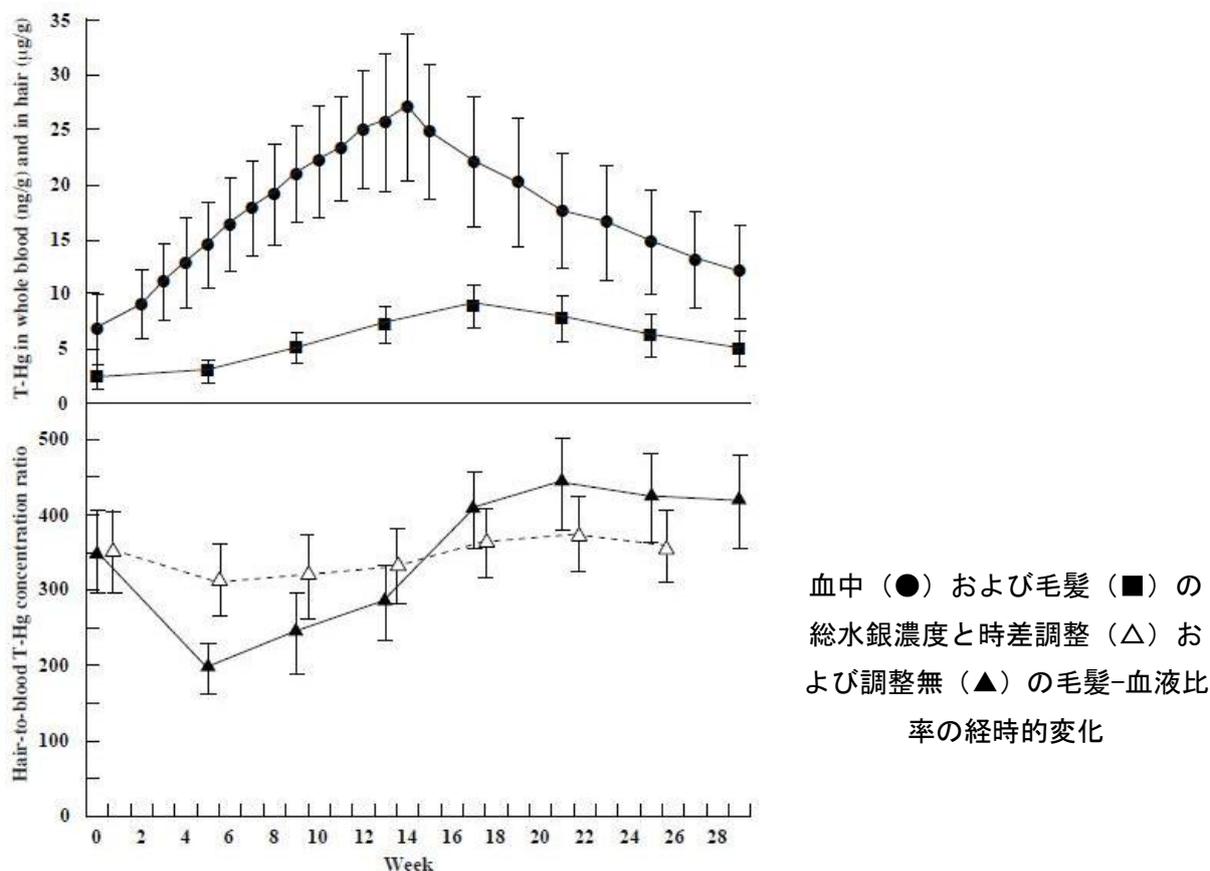
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. 濃度は Mean \pm SD で表示.

臍帯血水銀は出産時頭皮から最初の 1 cm の母体頭髪水銀と最も高い相関があった (上表)。また、出産時母体および臍帯の血漿 DHA 濃度は頭髪根元から 4~6 cm の毛髪水銀濃度と最も強い相関を示した。以上より、著者らは胎児メチル水銀は妊娠後期の母体メチル水銀曝露を反映すること、また母体および胎児の血漿 DHA レベルは妊娠中期の魚摂取を反映すると考えた。

■ メチル水銀の毛髪-血液比率と生物学的半減期

One-compartment モデルにおけるメチル水銀の毛髪-血液比率と生物学的半減期は過去と現在で

異なっているように思われることから、Yaginuma らは健康対象者 27 名にマグロの摂食によるメチル水銀曝露 (3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週の 14 週間摂食) 実験を行い、毛髪総水銀および血中総水銀濃度を各々 4 週毎、1-2 週毎に測定した³⁴⁾。



血中 (●) および毛髪 (■) の総水銀濃度と時差調整 (△) および調整無 (▲) の毛髪-血液比の経時的変化

血液および毛髪の水銀は経時的に有意に変化し、14週までに血中総水銀は6.7から26.9 ng/g へ、毛髪総水銀は2.3から8.8 $\mu\text{g}/\text{g}$ へと増加した。血液から毛髪への時間差を調整した後の毛髪-血液比率は全期間で 344 ± 54 であった。また、生データから算出される総水銀の生物学的半減期は血液で 94 ± 23 日、毛髪で 102 ± 31 日であったが、バックグラウンド値を引いた値から算出する半減期は各々 57 ± 18 日および 64 ± 22 日であった。以上より、過去の研究から算出されたメチル水銀の毛髪-血液比率は、今回の研究に照らすと、過小評価されているように思われた。実用性とともバックグラウンド値の不確かさを考慮すると、生データから算出される生物学的半減期の方が、バックグラウンド値を引いて算出した値 (この値の方が従来の値に近い) よりも、好ましいと考えられると著者らは結んでいる。どちらの算出法が採用されるべきかは今後の課題である。

■ 母体血、臍帯血、乳幼児血中の金属濃度の変化

胎児および幼児の発達途上の脳は環境化学物質の汚染に影響を受け易いが、乳児期の母乳摂取が体内の金属にどれほど影響するのか明らかでない。そこで、Sakamoto らは3ヶ月の母乳摂取期間前後のメチル水銀、鉛、ヒ素、カドミウムおよびセレンの体内変化を検討した³⁵⁾。母子16組から得られた出産時の母体血、臍帯血および3ヶ月児の乳児血から赤血球分画を集め、金属濃度が測定された。なお、赤血球の水銀の大半はメチル水銀として存在するので、赤血球中の総水銀濃度はメチル水銀曝露を反映することになる。

母体、臍帯、3ヶ月児の赤血球水銀、鉛、ヒ素、カドミウム、セレン濃度(中央値 ng/g と 25-75 パーセントイル値)と母体、臍帯、3ヶ月児の赤血球濃度間の Spearman 順位相関係数(r)

n=16	水銀	鉛	ヒ素	カドミウム	セレン
母体赤血球	7.87 (5.88-10.34)	24.5 (16.7-32.4)	6.28 (4.53-7.41)	2.81 (2.30-3.16)	238 (229-276)
臍帯赤血球 ^a	11.76 (9.9-18.0)**	14.8 (9.9-18.0)**	3.84 (2.99-4.51)*	0.57 (0.50-0.62)**	280 (259-306)
3ヶ月児赤血球 ^b	7.37 (4.31-8.54)**	15.3 (13.4-17.4)	1.89 (1.43-2.46)	0.63 (0.54-0.70)	207 (194-226)**
相関係数(r)					
母体 vs 臍帯血	0.81**	0.79**	0.48	0.08	0.61**
臍帯 vs 3ヶ月児血	0.69**	0.69*	0.12	0.56*	0.68**

^a 母体と臍帯赤血球の間、^b 臍帯と3ヶ月児赤血球の間の差は Friedman 検定後の Dunn の多重比較法で解析

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

臍帯血赤血球中の総水銀濃度は母親と比べて 1.5 倍高いが、3ヶ月の母乳摂取の間に約 60%まで減少した。臍帯血セレン濃度は母体レベルとほぼ同じであるが、乳児においては3ヶ月の間に約 75%まで減少した。臍帯赤血球中の鉛およびヒ素濃度は母体の約 60%位であり、その後殆ど変わらなかった。臍帯赤血球中カドミウム濃度は母体赤血球中の約 20%程度であり、3ヶ月後も同様のレベルのままであった。以上より、妊婦は高いメチル水銀曝露に特別の注意を払う必要があるが、今回の対象者にとって、母乳摂取による金属曝露を問題視することはないと考えた。

■ 水俣市における高血圧死亡に及ぼしたメチル水銀の影響

近年メチル水銀曝露が心筋梗塞や高血圧症に悪影響を及ぼすことが示唆されているが、その証拠は限られている。そこで、Inoue らは過去にメチル水銀中毒の発生した水俣において標準化死亡比 (SMR) を用いてこの関係を調べた³⁶⁾。水俣市民の高血圧症と粥状動脈硬化性心疾患の死亡率を熊本県の当該死亡率と比較した。1953年から1970年までの粥状動脈硬化性心疾患の SMR と 95%信頼区間を推定すると、1953~1967年は絶えず低かった。逆に1963~1967年の高血圧症 SMR は有意に高く (SMR 1.38、95%信頼区間 1.06~1.79)、その後低下した。

水俣市民の粥状動脈硬化性心疾患、高血圧症、その他の心疾患による死亡者数と年齢調整標準化死亡比およびその 95%信頼区間 (熊本県民死亡率を基準)

期間 \ 疾患名	変性心疾患を含む			前記 3 疾患の合計
	粥状動脈硬化性心疾患	高血圧症	他の心疾患	
1953-1957 年の水俣市民の死亡数	84	17	13	114
年齢調整死亡比と 95%信頼区間	0.77 (0.62-0.95)	0.96 (0.59-1.54)	0.67 (0.46-1.32)	0.79 (0.66-0.95)
1958-1962 年の水俣市民の死亡数	73	23	47	143
年齢調整死亡比と 95%信頼区間	0.79 (0.63-0.99)	1.09 (0.72-1.64)	0.99 (0.74-1.31)	0.88 (0.75-1.04)
1963-1967 年の水俣市民の死亡数	107	56	32	195
年齢調整死亡比と 95%信頼区間	0.76 (0.63-0.92)	1.38 (1.06-1.79)	0.91 (0.64-1.29)	0.89 (0.77-1.02)
1969-1970 年の水俣市民の死亡数	不算出	23	不算出	不算出
年齢調整死亡比と 95%信頼区間		1.07 (0.71-1.61)		

この結果を、著者らはメチル水銀曝露が高血圧を引き起こしたと考えた。しかし、当時不知火海や水俣湾で獲れる魚を食べていたことは事実としても、魚摂食時に相応の塩分を使用していた可能性は否定できず、この結果のみでメチル水銀のせいとするには無理があろう。

4) 水銀とセレンの関係

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

か検討を行った報告が散見される。

魚中水銀レベルに着目した各国の魚摂取に関する規制

対象魚種 国名・対象者 (実施機関)	マ カ ジ キ	メ カ ジ キ	サ メ	マ グ ロ 類	ツ ナ 缶	そ の 他	注 意 事 項 要 点	実施年
日本 ① (厚生労働省)		○	●			○*	○: ≤60~80g/週 2回、●: ≤60~80g/週 1回 *その他: パンドウイカ ≤60~80g/2ヶ月に1回	2003
米 国 ①②⑤ (FDA, EPA)		○	○	△	●		○: 摂取を避けるべき (他にカラ、アマダイ)、●: ≤12 オンス(340g)/週 (他にエビ、サケ、タラ、ナマズ) ・個人が捕獲した魚については各地域の勧告を優先、 幼児の場合は勧告に従いかつ量を減らす	2001 2004
E U ①②⑤ (保健・消費者保護総局)	○	○	○	●		○	○: 大型の捕食性の魚≤1食(100g未滿)/週 ●: マグロは週2回まで	2004
オーストラリア ③ ^注 (豪州・ニュージーランド食品基準局)	○	○	○			○*	注) ①④: ≤1食 150g/月 2~3回 (6歳以下の小児、1食 75g 以下/月 2~3回)、サメ(フルク)又はカジキ類は 2週間に1食、それ以外の魚をその2週間摂取しない。 ①④以外: サメ、カジキ類は週1食、それ以外の魚は週2~3食 *その他: オレンジラフィー(シーパーチ), ナマズ	2001 2004
ニュージーランド ^① (豪州・ニュージーランド食品基準局)	○	○	○	○		○*	①≤1食約 150g/週 4回 *その他: エイ、バラマンディ、ギンサワラ、オレンジラフィー、リング、地熱水域で漁獲される魚	2001
ノルウェー ①② (食品衛生監視局)	○	○	○	○		○*	①②はクジラを食べるべきではない。特に①はクジラ以外に左記の魚も食べるべきではない。 *その他: クジラ、カワカマス、パーチ(25cm 以上)、マス及びイワナ(1kg 以上)、エイ	2003
英 国 ①④ (FSA/英国食品基準庁)	○	○	○	○	○		①: サメ、メカジキ、マカジキの摂取を避ける、マグロ缶詰≤4個(560g)/週、又はマグロステーキ≤2枚(280g)/週。④: サメ、メカジキ、マカジキの摂取を避ける。	2002 2003 2004
カナダ ①③④ (カナダ保健省)		○	○	○			左記の魚の摂取は1食/週、また①⑤は1食/月	2002
アイルランド ③ ^注 (アイルランド食品安全庁)	○	○	○	○	○		注) ①②⑤: サメ、メカジキ、マカジキの摂取を避ける、マグロステーキ≤1枚(8オンス、約230g)/週、又はマグロ缶詰≤2缶(1缶=8オンス、約230g)/週を限度とする。 それ以外: サメ、メカジキ、マカジキの摂取は週1食まで、マグロは摂食制限なし。	2004
デンマーク ①②④ (デンマーク家畜・食品管理局)		○	○	○		○*	週に 100g 未滿 *その他: スズキ、カレイ、バラムツ、ニシラクダザメ、カマス、パーチ	2004

①: 妊娠・妊娠する可能性のある女性 ②: 授乳中の母親 ③: 全ての人 ④: 小児 ⑤: 幼児

メチル水銀とセレンの2つのキーワードで検索された2012年発行の原著論文は14編あり、内訳は疫学研究1編³⁷⁾、ヒトの血中レベル分析1編³⁵⁾、動物における投与実験5編³⁸⁻⁴²⁾、海洋生物の含有レベル分析5編⁴³⁻⁴⁷⁾、*in vivo* 実験1編であった。セレンと水銀に関する疫学調査やヒト対象の研究は2011年より更に減少しており、魚など海洋産物に含有される水銀やセレン関連指標に着目した研究報告が近年増加している。これは、高濃度メチル水銀を含む魚の長期摂取により、胎盤経由で小児神経発達に悪影響が及んだり、循環器疾患等の潜在的リスクが上昇することが知られるようになったことと、水銀濃度の高い魚の摂食基準について欧米諸国やわが国で指針を公表したことに関連するかもしれない(各国の水銀規制の要約表)。海洋産物類の食用リスクに対する関心が高まり、魚含有のセレン化合物がメチル水銀毒性を軽減するメカニズムや生物種による差異を明らかにしようとする研究が増えていると言えよう。

■ 高血圧疾患への影響

Mozaffarian らは、米国大規模コホートで収集した対象者の足の爪を保存し、冠動脈疾患や心筋梗塞を発症した 3,427 人と年齢、性、人種、喫煙習慣をマッチさせた対照群の足爪中水銀とセレン濃度を分析し、魚摂取由来の水銀が冠動脈疾患や心筋梗塞発作の発症に影響を及ぼす証拠は得られなかったと 2011 年の *New England Journal of Medicine* 誌に掲載したが¹²⁾、2021 年には高血圧発症リスクについて発表した³⁷⁾。

水銀曝露レベル毎の高血圧発症の多変量調整相対危険（ハザード比）
—2つの前向きコホート研究における米国男女 6,045 名を対象として—

Cohort	Quintiles of Toenail Mercury Concentration*					P for Trend
	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	
Men (HPFS)						
Mercury median, $\mu\text{g/g}$	0.10	0.18	0.30	0.46	0.92	
Geometric mean, $\mu\text{g/g}$	0.08	0.18	0.30	0.46	1.00	
No. of events	144	152	155	149	138	
Hazard ratio (95% CI)						
Age and sex-adjusted	1.00 (reference)	1.07 (0.85–1.34)	1.05 (0.84–1.32)	1.04 (0.82–1.30)	0.88 (0.70–1.11)	0.12
Multivariable†	1.00 (reference)	1.06 (0.84–1.34)	1.07 (0.84–1.36)	1.01 (0.79–1.30)	0.86 (0.66–1.12)	0.10
Multivariable + diet‡	1.00 (reference)	1.02 (0.81–1.30)	1.03 (0.81–1.32)	0.97 (0.75–1.25)	0.82 (0.62–1.08)	0.06
Women (NHS)						
Mercury median, $\mu\text{g/g}$	0.09	0.15	0.21	0.31	0.55	
Geometric mean, $\mu\text{g/g}$	0.08	0.15	0.21	0.31	0.64	
No. of events	578	558	561	553	552	
Hazard ratio (95% CI)						
Age and sex-adjusted	1.00 (reference)	0.95 (0.84–1.07)	0.96 (0.85–1.08)	0.93 (0.83–1.05)	0.89 (0.79–1.00)	0.06
Multivariable†	1.00 (reference)	0.99 (0.88–1.12)	1.02 (0.90–1.15)	1.00 (0.88–1.13)	0.94 (0.83–1.07)	0.29
Multivariable + diet‡	1.00 (reference)	0.99 (0.88–1.12)	1.01 (0.90–1.14)	1.00 (0.89–1.14)	0.96 (0.84–1.09)	0.46

健康な男女 6,045 名の平均 14.9 年追跡後の高血圧発症者は 3,540 名であった。この集団を爪水銀濃度で 5 分位に分割し、最も低い集団（表 Q1）を対照群とした。集団全体の水銀曝露レベルは概して低く、最も高い Q5 集団が毛髪水銀濃度換算値で 2.0 $\mu\text{g/g}$ 以上に相当したが、米国の基準レベル（reference level）の 2.5 倍を超えない集団であった。爪水銀濃度の最も高い Q5 集団の交絡因子調整後高血圧症に対するハザード比は女性で 0.96（95%信頼区間 0.84–1.09）、男性で 0.82（同、0.62–1.08）、男女合計で 0.94（同、0.84–1.06）であった。水銀濃度の分割カテゴリーを変えたり、魚や n-3 系脂肪酸、セレンの摂取量、BMI、年齢で層別化しても結果は変わらず、水銀曝露の増加による高血圧症のリスク上昇は認められなかった。

■ 動物における投与実験研究

Jin らは、ラットに食餌 1 kg 当りにセレン 1 mg または 3 mg とビタミン E 250 mg または 750 mg を単独または両方混合したものを各々 28 日間与え、メチル水銀（3 mg メチル水銀/kg 体重）を 2 週間経口投与する実験を行った³⁸⁾。メチル水銀投与が心臓血管系に毒性作用を及ぼしたことを示す証拠、すなわち、パラオキシナーゼ活性の低下、血清酸化 LDL の増加および全身性炎症と血管内皮炎症の徴候などが観察された。事前にセレンとビタミン E を投与した群では毒性指標の軽減影響が認められたが、種類・投与量の組み合わせによっては増悪傾向が見られる実験群もあり、セレンやビタミン E が水銀毒性を修飾する機序は未だ解明されていない点が多いと考えられた。

同じくラットの投与実験として、Joshi らが 10mg/kg 体重 のジメチル水銀と同時に N-アセチル

システイン、亜鉛あるいはセレンを投与し、毒性軽減影響を調べた。その結果、混合投与により血液・組織中酸化ストレス指標の改善やDNA損傷による分子構造変化を修復する効果が見られたことを報告している³⁹⁾。

Bourdineaudらはマウスにメチル水銀含有の食用魚成分、あるいはそれと同等の精製品の塩化メチル水銀を各々2か月間食餌に混ぜて摂食させる実験を行った⁴⁰⁾。2か月後のopen fieldの迷路実験で、魚由来の水銀投与群でも塩化メチル水銀投与群と同じように認知行動機能の低下が認められ、脳海馬でのドーパミン代謝のタンオーバーが増加していることが観察された。魚含有の栄養素である多価飽和脂肪酸やセレンが水銀毒性を緩和する効果は本研究では明らかにされなかった。

Huangらはシロチョウザメ10匹に経口挿管でセレノメチオニンとメチル水銀を投与する実験を行い⁴¹⁾、同時投与した群の方が単独投与群より血中セレン・水銀濃度および組織中セレン濃度が低くなったと報告した。

Heinzらは、マガモ、ニワトリ、ミミヒメウの有精卵への塩化メチル水銀とセレノLメチオニンの注入実験を行った⁴²⁾。その結果、メチル水銀単独投与(0.2 µg水銀/g)よりセレノメチオニン単独投与群(0.1 µgセレン/g)の方がどの種でも(特にマガモで)奇形例が多く発生し、セレンと水銀の同時投与群で明らかな毒性軽減あるいは交互作用はみられず、同時投与時のみ特異的にみられる奇形(脊椎破裂、頭蓋脊椎破裂)も観察された。鳥の卵への水銀やセレン投与は少量でも奇形をもたらすこと、セレノメチオニンの毒性をメチル水銀が修飾する可能性があるとして述べている。

■ 海洋生物の分析研究

Lailson-Britoらは、ギアナイルカ19匹(胎児から30年まで、オス11匹とメス8匹)の肝組織中の総水銀、メチル水銀、有機水銀、セレン濃度を分析した⁴³⁾。いずれのレベルも年齢群間で有意差が見られ、また水銀とセレンの含有モル濃度に高い正の相関がみられた。X線分析により微細構造分析を行うと、組織中に鉍物(無定形結晶)化したセレン化水銀の存在が確認され、メチル水銀の脱メチル化による解毒プロセスにセレンが介在する知見が支持された。

Hongらは、食用魚中とバルチモア国立水族館で飼育された7匹のバンドウイルカの血液および組織中のセレン、水銀、モノメチル水銀濃度を分析した⁴⁴⁾。食用魚の総水銀量の85~91%がモノメチル水銀であり、魚中セレンは水銀に対して十分過剰なモル濃度で存在していた。飼育イルカの血中水銀濃度はフロリダや南カリフォルニア海域にいる野生イルカの水銀濃度報告値より一桁低く、大気沈降物の水銀レベルの差異によると考察されている。また飼育イルカでは、血中のモル構成比が野生イルカに比べ、より低水銀・高セレン傾向になっており、水銀による神経毒性影響を潜在的に受けにくくなっているであろうと述べた。

Burgerらはアラスカ産魚類と水鳥のセレンおよび水銀濃度の分析を行い、セレン/水銀モル比は種間や種内で有意差があるものの、全てが平均1以上で水銀よりセレンのモル濃度が過剰であると報告した⁴⁵⁾。セレン/水銀モル比はカラフトイワナ種を除く全ての海水魚で体長と負に相関しており、カラフトイワナやマダラなど一部の魚種の個体ではモル比が1未満のものもあったが、水鳥ではモル比が1未満(すなわち水銀が過剰)の種はみられなかった。モル比にかなりのバラツキがあったため、魚摂取のリスク評価にセレン/水銀モル比の見積りを入れて毒性防御効果を考慮するのは困難であると考察した。

Mulder らはノルウェー産マスの血清甲状腺ホルモン濃度を分析し、筋肉と肝組織中のセレン/水銀のモル比が最もホルモンレベルとの相関性が高いこと、さらに過剰な水銀レベルが活性型甲状腺ホルモンである T3 濃度を低下させることを示した⁴⁶⁾。甲状腺ホルモン T4 を T3 に変換するにはセレン酵素である脱ヨード化酵素が必須であるため、水銀の解毒化にセレン-水銀化合物が合成・消費されると、セレン酵素の活性阻害に続いて甲状腺ホルモンの機能低下が引き起こされ、魚の成長や生殖、発達の妨げになると述べた。

Bjerregaard らは、小型茶色エビの海産 *Crangon crangon* の食餌に各種セレン化合物を混入・投与し、水銀の排出変化について観察を行った⁴⁷⁾。その結果、亜セレン酸ナトリウムとセレノシステイン、セレノメチオニンを投与した場合にはメチル水銀の排泄量が増加したが、セレン酸二ナトリウムの投与では変化がなかったと報告した。

■ 上記以外のセレンの研究

メチル水銀毒性に対するセレンの防御作用について、*in vivo* で検討を行った Branco らの実験では、グルタチオンパーオキシダーゼ活性を指標とした際、鯛の脳・腎組織では毒性軽減作用がみられたが、筋肉組織では認められなかったと報告している⁴⁸⁾。

また *in vitro* の実験として、塩化第二水銀とメチル水銀の投与によるグルタチオン s-トランスフェラーゼ pi 1 への影響を Goodrich らが検査したところ、非同義単一ヌクレオチド多型 (GSTP1; Ile/Val 105, Ala/Val 114) の違いによって、酵素反応速度や阻害影響に有意な差異がみられたと報告した⁴⁹⁾。

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

5) 発展途上国における水銀の健康問題

南米、アフリカ、東アジア諸国における小規模金鉱山における水銀による金抽出および中国の水銀鉱山における鉱石採掘はそれら周辺的环境汚染と地域住民への健康影響を引き起こし、社会的な問題となっている。近年は金鉱山周辺の河川の水銀汚染による魚介類へのメチル水銀の蓄積に加え、水銀鉱山周辺の土壌汚染に由来する穀物へのメチル水銀の蓄積が新たな問題となりつつある。この章は PubMed で “mercury gold mining” あるいは “mercury mining” を入力し、2012 年に発表された論文を検索し、その中から小規模金鉱山や水銀鉱山における水銀による健康影響と環境汚染に関する報告を紹介する。

■ 小規模金鉱山における作業員および周辺住民の水銀曝露評価と健康影響

南米では今なお伝統的な水銀-金アマルガム化法による金抽出が手掘り金鉱山で使用されている。Harari らはエクアドルの海岸沿岸の 3 つ金鉱山の金鉱夫 (220 名)、金売買人 (37 名)、対照群 (72 名) を対象として水銀曝露量と神経運動機能について調査した⁵⁰⁾。尿中水銀濃度は、金鉱夫で平均 3.3 (範囲、0.23~170) $\mu\text{g/g}$ Creatinine (Cr)、粗金に残存している水銀を再び燃焼して精製した後に金を販売する金売買人で 37.0 (3.2~420) $\mu\text{g/g}$ Cr、対照群で 1.6 (0.2~13) $\mu\text{g/g}$ Cr であった。全血中の平均水銀濃度は各々 5.2、30.0、5.0 $\mu\text{g/l}$ であり、金売買人の尿および血液水銀濃度がともに高値を示した。しかし、金売買人が水銀-金アマルガム燃焼を中止すると、尿中水銀濃度が低下

することも報告している。神経運動機能の手のふるえは、3 群間に有意な差を認めなかったが、手のふるえの中心周波数は尿や血液中水銀濃度の増加とともに有意に高くなった。同様に、反応時間も3 群間に有意差を認めなかったが、尿および血液中水銀濃度の増加に伴い、有意に延長した。身体重心動揺も、3 群間に有意差を認めなかったが、尿や血液中水銀濃度と有意な負の関連があった。

CounterらはNambija 金鉱山地区の子ども22名と成人29名を対象に脳幹経由の音響性アブミ骨筋反射に及ぼす水銀影響を検討した⁵¹⁾。血中水銀濃度は子どもで 15.6 ± 21.3 (範囲 2.0~89) $\mu\text{g/L}$ 、成人で 8.5 ± 7.1 (2.0~32) $\mu\text{g/L}$ であった。2,000Hzのスクリーニング用周波数に対する対側アブミ骨筋反射閾値は、子どもで 92.9 ± 6.1 (80~105) dB HLであり、成人で 90.0 ± 6.4 (65~105) dB HLであった。子どものアブミ骨筋反射閾値は血中水銀濃度の増加に伴い有意に高くなった。このことは、水銀に関連する聴性脳幹障害を示唆すると考えられた。

ペルーのMadre de Dios 地区の手掘り金鉱山でも水銀-金アマルガム化法による金抽出が行われ、30,000人以上の人が従事している。Yardらはペルー内陸にあるMadre de Diosの鉱山地区の居住者103名を対象として、水銀のリスク評価を行った⁵²⁾。居住者の1/3が金鉱夫で、居住者の尿中水銀濃度は幾何平均で 5.5 (0.7~151) $\mu\text{g/g Cr}$ 、91%に血中メチル水銀 (幾何平均 2.7 $\mu\text{g/L}$ 、0.6~10 $\mu\text{g/L}$) が検出され、しかも13名に腎機能障害または神経障害が認められた。特に、水銀-金アマルガム燃焼者の尿中水銀濃度は非燃焼者に比べて有意に高値であった。また、メチル水銀濃度は魚摂食者の方が非魚摂食者よりも有意に高かった。著者らは、水銀曝露はMadre de Dios川を經由して、Huaypetueにまで広範囲に広がっているかもしれないと推測した。

AsheはペルーのMadre de Dios 地域の中心にあるPuerto Maldonado市の金鉱山近郊の住民204名の魚摂取量、性・年齢、居住地域と毛髪水銀濃度を調査した⁵³⁾。毛髪水銀濃度は、居住期間や性との間に関係は認められないが、月当たりの魚摂取量が多くなるにつれ毛髪水銀濃度も高くなった。また、毛髪水銀濃度は金鉱山地域に住む住民の方が市部に住んでいる人々より有意に高く、金鉱山地域では男子(3.39 $\mu\text{g/g}$)が女子(2.23 $\mu\text{g/g}$)より有意に高かった。

コロンビアではマクダレナ川やカウカ川流域で金採掘が行われている。Olivero-Verbelらはマクダレナ川やカウカ川流域住民1,328名の毛髪総水銀濃度測定と自覚症状を行った⁵⁴⁾。毛髪水銀濃度は、金鉱近くに位置するラ・ラーヤ地区で 5.27 ± 0.32 $\mu\text{g/g}$ 、アチ地区で 2.44 ± 0.22 $\mu\text{g/g}$ 、モンテ・クリスト地区で 2.20 ± 0.20 $\mu\text{g/g}$ と、金鉱山からの距離が遠くなるにつれ低値となった。男子は女子より水銀濃度は有意に高いが、魚摂取頻度との間には有意な相関は認められなかった。また、これらの地区住民には水銀曝露に起因する自・他覚症状は見られなかった。しかしながら、今後の健康調査の継続は必要である。

フランス領ギアナのMaroni川に沿って金鉱山があり、長年の採掘によって陸生・水生動植物が水銀汚染に晒されている。Fujimuraらは、2004~2009年の間にUpper Moroni地区に住むアメリカ原住民387名(男性153名、女性234名)の毛髪水銀を測定し、環境汚染による住民の水銀曝露の評価を行った⁵⁵⁾。毛髪水銀濃度の平均値は男性で9.4 ppm、女性で9.9 ppmといずれも高値であった。原住民37名の魚介類摂取量と毛髪水銀の関係を調べると、相関係数は $r^2 = 0.373$ ($P < 0.05$)であった。またMaroni川上流の魚肉水銀濃度を測定すると、高濃度(0.18~0.40 ppm)であり、アメリカ原住民の高い毛髪水銀濃度は水銀に汚染された魚介類摂取に起因していると考えられた。

アフリカでも多くの国々で小規模手掘り金採掘が行われているため、水銀による周辺住民の健康影響が懸念されている。西アフリカにあるブルキナファソにおいても6地区に8金鉱山が存在する。Tomicicらはこれら金鉱山で水銀-金アマルガムの燃焼などに携わる作業員93名に水銀曝露評価とその影響について調査した⁵⁶⁾。尿中水銀濃度は作業員の16%が350 µg/g Crを上回り、作業員の69%がACGIHの生物学的許容値35 µg/g Crを越えていた。自覚症状では頭痛(53.3%)、眩暈(53.8%)、胸痛(34.1%)、疲労(33%)、震え(31.9%)などの愁訴率が高く、作業員の1/3には自覚症状に加え、蛋白尿が認められた。

■ 小規模水銀鉱山作業員およびその周辺住民の健康影響

中国の貴州省には多くの水銀鉱山が点在しており、水銀鉱山作業員や周辺住民の健康調査および採掘活動による環境汚染調査が実施されている。Liらは湖南省西部に位置する茶田水銀鉱山周辺にある茶田町民54名と鶏心町民47名(対照群)の血中水銀濃度測定と腎機能検査(血清のクレアチニンと尿素窒素値)を行い、性・年齢別(子ども18歳未満、成人18~60歳、高齢者60歳以上)の潜在性の水銀影響を評価した⁵⁷⁾。茶田町民の血中水銀(平均6.09 µg/L、範囲1.29~15.07 µg/L)は対照群(3.67 µg/L、0.97~5.06 µg/L)と比べ有意に高かった。また、血清クレアチニンおよび血清尿素窒素は茶田町民の平均値で74.24 µmol/Lと13.26 mmol/L、対照群で各々62.02 µmol/Lと11.65 mmol/Lであり、茶田町民の方が有意に高かった。茶田町民における血中水銀と腎機能検査値との相関係数は、血清クレアチニンで $r=0.45$ ($P<0.01$)、血清尿素窒素で $r=0.20$ ($P<0.05$)であり、水銀曝露量が高くなるにつれ腎機能が悪くなることを示した。女性の血中水銀、血清クレアチニン、血清尿素窒素は男性よりいずれも高く、また高齢者が若年者よりも高値であったことから、女性と高齢者が水銀曝露による影響を受けやすいと考えられた。

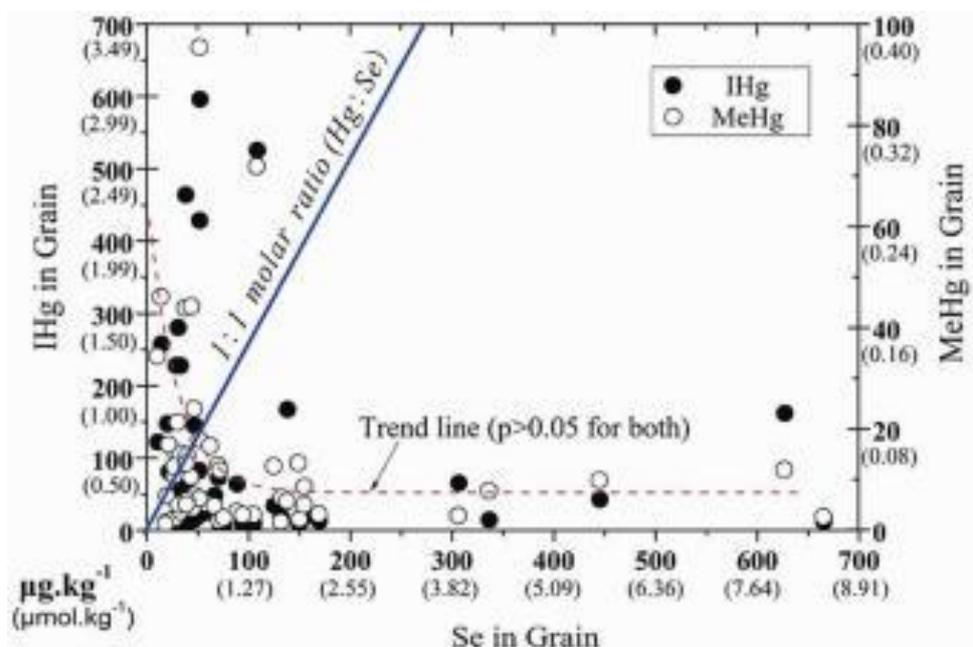
中国万山地域では、長年にわたる水銀採掘により地元住民は高濃度の水銀蒸気に曝露され、健康影響に悩まされている。Liらは万山地域で住民103名のボランティアを募り、うち50名に有機セレン含有(100 µg)酵母を3ヶ月間サプリメントとして与え、その効果を検討した⁵⁸⁾。セレンサプリメント投与群は尿中への水銀排泄の増加と酸化ストレスのマーカーであるマロンズアルデヒドや8-ヒドロキシ-2-デオキシグアニンの尿中排泄の減少が観察された。以上より、この地域住民へのセレンサプリメントの投与は、安易ではあるが、健康状態の回復や改善に実用的な方法であると報告した。

■ 小規模金鉱山および水銀鉱山周辺の環境汚染

インドネシアには手掘りの小規模金鉱山が点在し、金採掘に伴う水銀の環境汚染が生じている。KrisnayantiらはLombok島やSumbawa島における小規模金鉱山における水銀の環境中への排出について述べた⁵⁹⁾。金の抽出はアマルガム化法とシアン化法の2つの工程を経て行われ、その尾鉱は直接、陸地や海洋に廃棄される。アマルガム化法の尾鉱には水銀が平均3,000 mg/kg、シアン化法の尾鉱には1,600 mg/kg含まれていた。シアン化法の尾鉱が廃棄されている沼近くの水稲米のメチル水銀濃度は100 ng/g以上を示し、この濃度は中国の国内許容濃度の5倍以上であった。Lombok島の小規模金鉱山作業員40名の毛髪総水銀濃度は平均7.7 µg/gであり、非曝露群40名の平均2.5 µg/gと比べ高値であったが、メチル水銀濃度に有意差はなく、作業員の水銀曝露は大気からの曝露であると考えられた。しかし、シアン化法の尾鉱が今後も廃棄され続けるならばメチル水銀による汚染米の摂取による健康影響が懸念されるので、尾鉱管理の必要性を提言している。

ガーナの西にある Bibiani-Anwiaso-Bekwai 地区の金鉱山廃鉱からの採鉱廃棄物が堆積した土壌中の水銀汚染を Nartey らが調査した⁶⁰⁾。総水銀濃度は表層土で 0.067~0.876 mg/kg あり、同じ土壌の深さ 20cm で 0.102~1.066 mg/kg、深さ 40cm で 0.037~4.037 mg/kg、深さ 60cm で 0.191~4.998 mg/kg であった。有機水銀濃度は表層で 0.012~0.260 mg/kg、深さ 20cm で 0.016~0.653 mg/kg、深さ 40cm で 0.041~1.093 mg/kg、深さ 60cm で 0.101~2.546 mg/kg であった。特に galamsey と呼ばれる金鉱夫が廃棄した尾鉱の土壌は他の地区に比べて高く、総水銀、有機水銀とも土壌の深さに伴って増加する傾向を示した。一方、シアン化法で金抽出を行っている地区では水銀濃度は低値であった。

中国の水銀鉱山周辺では収穫された穀物に比較的高い濃度のメチル水銀が検出され、地域住民に対する健康影響が問題となっている。Zhang らは水銀化合物の毒性に対するセレンの拮抗作用を利用し、米-土壌系における無機水銀やメチル水銀の取り込みや移行に対するセレンの影響を調査した⁶¹⁾。米穀中セレン濃度は無機水銀やメチル水銀濃度と逆相関関係にあり、土壌中ではセレン濃度との無機水銀濃度やメチル水銀濃度との間に相関関係が認められ、土壌中のセレン濃度の増加は若芽への無機水銀やメチル水銀の移行を抑制することが観察された(図)。根でもセレン濃度と無機水銀濃度との間に相関が見られ、セレンは稲への無機水銀やメチル水銀の吸収、移行、蓄積の抑制に重要な役割を果すことを示唆している。



小規模金鉱山地区周辺に住む小児に水銀による神経系への影響が報告され、水銀曝露による健康影響が大人から小児まで及んでいること明らかになってきた。加えて、水銀に対する感受性は高齢者や女性に高いことが示されている。金鉱山あるいは水銀鉱山周辺の住民にとって、大気のみならず食物（魚介類や米穀）からの水銀曝露問題へと深刻化しつつある。小規模金鉱山周辺の水銀による環境汚染および健康被害に対策には、金の回収法に水銀を使用しない別の新たな代替法への転換が早急の課題となってきている。なお、シアン化法は規模が大きい所で使用されており、環境への負荷（環境汚染問題）は水銀-金アマルガム化法より小さいように思えるが、シアン化法も有害物質を扱うので健康問題の点では水銀-金アマルガム化法と大差ない可能性がある。

IV. 考察

重化学工業化政策期に排出された水銀、鉛、カドミウム、ヒ素などの重金属の環境汚染により、人類は様々な健康問題に遭遇した。今日、先進諸国ではこれらの化学物質に対して厳しい規制を行い、また 2009 年にナイロビで開催された第 25 回国連環境計画 (UNEP) 管理理事会では水銀によるリスク削減のための法的拘束力のある「水銀条約」制定に向けた議論が交わされ、2013 年には「水俣条約」として採択・署名される見通しになっている。一方で、発展途上国における水銀鉱山付近では嘗ての水俣湾の水質汚染に似た環境汚染が継続的に起こっており、環境科学雑誌のトピックスになっている⁵⁰⁻⁶¹。環境科学者は対岸の火事を傍観するのではなく、当該地域に積極的に出かけ、第三、第四の水俣病が発生しないような具体的な予防策を講じなければならない^{62,63}。然もなくば、「知っている」が「何もしない」空想科学者の誹りを免れないのである。年を重ねる中で人は経験を積むと言う。その経験がかけがいのない地球を守るために役に立たないならば、環境科学者とは名ばかりとみなされ、将来失墜する。

小児の神経発達に及ぼすメチル水銀の有害影響は、高濃度曝露だけでなく、低濃度曝露でも起こり得る¹²。高濃度曝露時の曝露評価の場合には毛髪水銀濃度を測定すれば完璧であった。しかしながら、低濃度曝露で対象者が小児の場合、妊婦が食べた魚に対してメチル水銀や PCB に注意を払うとともに多価不飽和脂肪酸 (DHA など) やセレンの含有量にも目を向けなくてはならず¹⁴、しかもメチル水銀の胎盤経由の移行は母子間で大きく異なるので⁶⁴、代用指標で健康影響を推定することは難しいかもしれない。このような研究では、間接的な指標を用いると誤った結論を引き出してしまう可能性のあることを肝に銘じておかねばならない。換言すると、低濃度曝露の場合、より直接的な曝露物質 (例えば、臍帯血中のメチル水銀や DHA) を測定し、解釈・検討すべきであると考えられる。

Davidson らはセイシェル小児発達研究の 17 歳児の Woodcock-Johnson 学力検査の結果を 2011 年に発表した²²。その中では母親毛髪水銀濃度とその学力検査成績との間に有意な正の関連があり、メチル水銀の増加はむしろ神経発達にとって有益であると、過去の論文と同じような結論を出した。昨年度までの本報告書に記したように、セイシェル小児発達研究の曝露指標には多価不飽和脂肪酸に関連するデータは一切含まれていない^{2,6}。一方、2000 年より彼等が新たに始めたセイシェル小児発達栄養研究では、魚を多食することによりメチル水銀も増加するが多価不飽和脂肪酸 (特に、DHA) も増加し、しかもメチル水銀と DHA の間には強い正の相関があった¹¹。すなわち、測定された毛髪水銀濃度値はメチル水銀の曝露指標であるとともに、魚摂取による DHA の指標であると考えられた。それにもかかわらず、毛髪水銀濃度値はメチル水銀の曝露指標であると主張し続けているのである。誤解されないよう一言付け加えると、我々は魚の有害性を強調するつもりは全くない。魚に含まれる DHA 等の有益な物質について触れないで、魚摂食によって高くなったメチル水銀が小児の神経発達に有益であると述べたことに対し異議を唱えるのである。

セレンがメチル水銀の毒性を減弱させることは動物実験で示された^{61,65-69}。また、ヒトを対象とした介入研究で有機セレン含有 (100 µg) 酵母の 3 ヶ月間のサプリメントの投与により、尿への水銀排泄の増加と酸化ストレスのマーカーであるマロンズアルデヒドや 8-ヒドロキシ-2-デオキシグアニンの尿中排泄量の減少が観察された⁵⁸。これに対し、他の疫学研究では必ずしもセレン

の影響は明らかでなく⁷⁰⁻⁷²⁾、今回紹介した Mozaffarian らの高血圧発症に関する研究でもセレンの作用は確認できなかった³⁷⁾。低濃度メチル水銀曝露の影響を明らかにする際に微妙に問題となるメチル水銀とセレンの相互作用や、メチル水銀と多価不飽和脂肪酸の相互作用について、今後もさらに情報を収集し、一定の結論を共有することが求められよう。

水俣病患者の死亡原因が Tamashiro らによって調べられ、1984年にその結果が発表された⁷³⁾。熊本県における水俣病患者 1,422 名のうち、1980 年末までに 378 名が死亡した。このうち、1954 年に最初の死亡が確認され、水俣病が公式に認められた 1956 年に最初のピークを迎えた。死亡数が急速に増加したのは 1972 年以降であり、そのピークは 1976 年であった。1970 年以降の死亡原因の筆頭は脳血管疾患 (18.0%) で、悪性新生物 (14.7%)、心血管疾患 (14.1%)、水俣病 (14.1%) が続いたが、対照群との比較では、悪性新生物や高血圧疾患は低い傾向にあったとされる。メチル水銀の高血圧症に及ぼす影響に関する論文が 2012 年に 2 編発表された。水銀曝露レベルが極めて低い対象集団を扱った Mozaffarian らはメチル水銀の増加による高血圧症のリスク上昇を認めなかった³⁷⁾。一方、Inoue らは水俣市民の 1963~1967 年の高血圧症の死亡率は有意に高く、水俣湾で汚染された魚の摂食によるメチル水銀のせいであろうと推定した³⁶⁾。両者の研究背景(対象者、曝露指標・曝露レベル、交絡因子)は全く異なるのでここで安易に結論を出すに至らなかったが、後者で高血圧症死亡率が高いという事実は揺るがないとしても、それがメチル水銀曝露のせいなのか否かについては推測の域を出ていないと考えられる。今後、これらの議論を含め、メチル水銀・水銀の臓器別影響を整理していく必要がある。

本研究はメチル水銀のヒト健康影響に関する論文を主として扱っているが、環境中のメチル水銀の移動・蓄積に関する研究も歴大である。わが国の水銀研究に多大なる貢献をされた故鈴木継美教授は嘗て「マグロ筋肉中のメチル水銀は全て無機水銀のメチル化によるのか？」との疑問を懐いておられたそうである。マグロの筋肉中のメチル水銀濃度は高く、またマグロの筋肉中には無機水銀をメチル化する活性のあることが示唆された頃の話である。Ishihara らは、この問いに答えるため、青森県大間で捕獲されたクロマグロのホルマリン固定された胃内容物を水銀分別定量し、毒性学関連の雑誌に投稿した。しかし、当時何れの雑誌にも受理されなかったそうである。その後原稿は行方知れずとなったが、数年前に最終原稿の写しが見つかり、文献等を更新して 2009 年に公表された⁷⁴⁾。この論文の結論は「マグロ胃内容物(餌)中のメチル水銀濃度はかなり高く、メチル化機構の存在は否定しないものの、マグロ筋肉中のメチル水銀は餌由来であると考えられる」であった。現在であれば、厚生労働省の「妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項の見直し」を閲覧すれば⁷⁵⁾、魚類、クジラ、貝類、水産動物の総水銀およびメチル水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$) は「魚介類に含まれる水銀の調査結果」の中に公表されており⁷⁶⁾、マグロがどのような餌を食べるのかさえわかれば疑問に答えられよう。因みに、マグロの胃内容物 21 試料(魚)のうち最も多かったのはカタクチイワシであり、その総水銀中のメチル水銀割合は 73.6~100%であった⁷⁴⁾。

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。①2008 年以降、メチル水銀を扱った論文の中で疫学研究の割合は減少傾向にあったが、2011 年には増加した。②魚摂取による胎児期メ

チル水銀影響は、例え低濃度であっても、妊娠中の母親魚摂取量や PCB を調整すると小児神経発達に軽微な負の影響を及ぼしうるが、健康影響を評価したときの年齢で有害物質の影響の有無が異なるようであるので、年齢別に有害物質毎の影響を整理する必要がある。③セレンのメチル水銀の有害影響を抑制する作用については、ヒトや動物種により異なると考えられ、一定の作用を確定するに至らなかった。④小規模金鉱山での水銀の拡散は世界中の途上国で行われているが、金回収法に水銀を用いない別の新たな代替法を検討する必要があるかもしれない。

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

VI. 次年度以降の計画

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

引用文献

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

- Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23: 305-317.
6. Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 2003; 361: 1686-1692.
 7. Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer HH, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 645-655.
 8. Guallar E, Sanz-Gallardo MI, van't Veer PV, Bode P, Aro A, Gomez-Aracena J, Kark JD, Riemersma RA, Martin-Moreno JM, Kok FJ. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 347: 1747-1754.
 9. Yoshizawa K, Rimm EB, Morris JS, Spate VL, Hsieh CC, Spiegelman D, Stampfer MJ, Willett WC. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2002; 347: 1755-1760.
 10. Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JM, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Clarkson TW. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 2008; 29: 767-775.
 11. Strain JJ, Davidson PW, Bonham MP, Duffy EM, Stokes-Riner A, Thurston SW, Wallace JM, Robson PJ, Shamlaye CF, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Janciuras J, Myers GJ, Clarkson TW. Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles child development nutrition study. *Neurotoxicology* 2008; 29: 776-782.
 12. 村田勝敬, 吉田 稔, 坂本峰至, 岩井美幸, 柳沼 梢, 龍田 希, 岩田豊人, 荻田香苗, 仲井邦彦. メチル水銀毒性に関する疫学的研究の動向. *日衛誌* 2011; 66: 682-695.
 13. Grandjean P. Seven deadly sins of environmental epidemiology and the virtues of precaution. *Epidemiology* 2008; 19: 158-162.
 14. Mahaffey KR, Sunderland EM, Chan HM, Choi AL, Grandjean P, Mariën K, Oken E, Sakamoto M, Schoeny R, Weihe P, Yan CH, Yasutake A. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev* 2011; 69: 493-508.
 15. Julvez J, Debes F, Weihe P, Choi AL, Grandjean P. Thyroid dysfunction as a mediator of organochlorine neurotoxicity in preschool children. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1429-1435.
 16. Grandjean P, Andersen EW, Budtz-Jørgensen E, Nielsen F, Mølbak K, Weihe P, Heilmann C. Serum vaccine antibody concentrations in children exposed to perfluorinated compounds. *JAMA* 2012; 307: 391-397.
 17. Grandjean P, Weihe P, Nielsen F, Heinzow B, Debes F, Budtz-Jørgensen E. Neurobehavioral deficits at age 7 years associated with prenatal exposure to toxicants from maternal seafood diet. *Neurotoxicol*

- Teratol 2012; 34: 466-472.
18. Grandjean P, Grønlund C, Kjær IM, Jensen TK, Sørensen N, Andersson AM, Juul A, Skakkebak NE, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Reproductive hormone profile and pubertal development in 14-year-old boys prenatally exposed to polychlorinated biphenyls. *Reprod Toxicol* 2012; 34: 498-503.
 19. Sakamoto M, Murata K, Kubota M, Nakai K, Satoh H. Mercury and heavy metal profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 1-6.
 20. Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, Jørgensen PJ, Nielsen F, Patterson DG Jr, Sjödin A, Turner WE, Weihe P. Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues. *Environ Sci Technol* 2011; 45: 1121-1126.
 21. White RF, Palumbo CL, Yurgelun-Todd DA, Heaton KJ, Weihe P, Debes F, Grandjean P. Functional MRI approach to developmental methylmercury and polychlorinated biphenyl neurotoxicity. *Neurotoxicology* 2011; 32: 975-980.
 22. Davidson PW, Cory-Slechta DA, Thurston SW, Huang LS, Shamlaye CF, Gunzler D, Watson G, van Wijngaarden E, Zareba G, Klein JD, Clarkson TW, Strain JJ, Myers GJ. Fish consumption and prenatal methylmercury exposure: cognitive and behavioral outcomes in the main cohort at 17 years from the Seychelles child development study. *Neurotoxicology* 2011; 32: 711-717.
 23. Watson GE, Lynch M, Myers GJ, Shamlaye CF, Thurston SW, Zareba G, Clarkson TW, Davidson PW. Prenatal exposure to dental amalgam: evidence from the Seychelles child development study main cohort. *J Am Dent Assoc* 2011; 142: 1283-1294.
 24. McAfee AJ, Mulhern MS, McSorley EM, Wallace JM, Bonham MP, Faure J, Romain S, Esther C, Shamlaye CF, Watson GE, Myers GJ, Clarkson TW, Davidson PW, Strain J. Intakes and adequacy of potentially important nutrients for cognitive development among 5-year-old children in the Seychelles child development and nutrition study. *Public Health Nutr* 2012; 15: 1670-1677.
 25. Strain JJ, Davidson PW, Thurston SW, Harrington D, Mulhern MS, McAfee AJ, van Wijngaarden E, Shamlaye CF, Henderson J, Watson GE, Zareba G, Cory-Slechta DA, Lynch M, Wallace JM, McSorley EM, Bonham MP, Stokes-Riner A, Sloane-Reeves J, Janciuras J, Wong R, Clarkson TW, Myers GJ. Maternal PUFA status but not prenatal methylmercury exposure is associated with children's language functions at age five years in the Seychelles. *J Nutr* 2012; 142: 1943-1949.
 26. Watson GE, Evans K, Thurston SW, van Wijngaarden E, Wallace JM, McSorley EM, Bonham MP, Mulhern MS, McAfee AJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Strain JJ, Love T, Zareba G, Myers GJ. Prenatal exposure to dental amalgam in the Seychelles child development nutrition study: associations with neurodevelopmental outcomes at 9 and 30 months. *Neurotoxicology* 2012; 33: 1511-1517.
 27. Strain JJ, McSorley EM, van Wijngaarden E, Kobrosly RW, Bonham MP, Mulhern MS, McAfee AJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Henderson J, Watson GE, Thurston SW, Wallace JM, Ueland PM, Myers GJ. Choline status and neurodevelopmental outcomes at 5 years of age in the Seychelles child development nutrition study. *Br J Nutr* 2013; 9: 1-7.
 28. Bellinger DC. A strategy for comparing the contributions of environmental chemicals and other risk factors to neurodevelopment of children. *Environ Health Perspect* 2012; 120: 501-507.

29. Yila TA, Sasaki S, Miyashita C, Brainmoh TS, Kashino I, Kobayashi S, Okada E, Baba T, Yoshioka E, Minakami H, Endo T, Sengoku K, Kishi R. C. Effects of maternal 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and tobacco smoking on infant birth weight in a Japanese population. *J Epidemiol* 2012; 22: 91-102.
30. Kanazawa A, Miyasita C, Okada E, Kobayashi S, Washino N, Sasaki S, Yoshioka E, Mizutani F, Chisaki Y, Saijo Y, Kishi R. Blood persistent organochlorine pesticides in pregnant women in relation to physical and environmental variables in the Hokkaido study on environment and children's health. *Sci Total Environ* 2012; 426: 73-82.
31. Yamada T, Morikawa M, Yamada T, Kishi R, Sengoku K, Endo T, Saito T, Cho K, Minakami H. First-trimester serum folate levels and subsequent risk of abortion and preterm birth among Japanese women with singleton pregnancies. *Arch Gynecol Obstet* 2013; 287: 9-14.
32. Tatsuta N, Nakai K, Murata K, Suzuki K, Iwai-shimada M, Yaginuma-Sakurai K, Kurokawa N, Nakamura T, Hosokawa T, Satoh H. Prenatal exposures to environmental chemicals and birth order as risk factors for children behavior problems. *Environ Res* 2012; 114: 47-52.
33. Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kawakami S, Murata K. Mercury and docosahexaenoic acid levels in maternal and cord blood in relation to segmental maternal hair mercury concentrations at parturition. *Environ Int* 2012; 44: 112-117.
34. Yaginuma-Sakurai K, Murata K, Iwai-Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Tatsuta N, Satoh H. Hair-to-blood ratio and biological half-life of mercury: experimental study of methylmercury exposure through fish consumption in humans. *J Toxicol Sci* 2012; 37: 123-130.
35. Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kubota M, Murata K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. *Ecotoxicol Environ Saf* 2012; 84: 179-184.
36. Inoue S, Yorifuji T, Tsuda T, Doi H. Short-term effect of severe exposure to methylmercury on atherosclerotic heart disease and hypertension mortality in Minamata. *Sci Total Environ* 2012; 417-418: 291-293.
37. Mozaffarian D, Shi P, Morris JS, Grandjean P, Siscovick DS, Spieqelman D, Willett WC, Rimm EB, Curhan GC, Forman JP. Mercury exposure and risk of hypertension in US men and women in 2 prospective cohort. *Hypertension* 2012; 60: 645-652.
38. Jin X, Hidirglou N, Lok E, Taylor M, Kapal K, Ross N, Sarafin K, Lau A, De Souza A, Chan HM, Mehta R. Dietary selenium (Se) and vitamin E (V(E)) supplementation modulated methylmercury-mediated changes in markers of cardiovascular diseases in rats. *Cardiovasc Toxicol* 2012; 12: 10-24.
39. Joshi D, Mittal DK, Shukla S, Srivastav AK. Therapeutic potential of N-acetyl cysteine with antioxidants (Zn and Se) supplementation against dimethylmercury toxicity in male albino rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64: 103-108.
40. Bourdineaud JP, Marumoto M, Yasutake A, Fujimura M. Dietary mercury exposure resulted in behavioral differences in mice contaminated with fish-associated methylmercury compared to methylmercury chloride added to diet. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 681016.

41. Huang SS, Strathe AB, Fadel JG, Johnson ML, Lin P, Liu TY, Huang SS. The interactive effects of selenomethionine and methylmercury on their absorption, disposition, and elimination in juvenile white sturgeon. *Aquat Toxicol* 2013; 15: 274-282.
42. Heinz GH, Hoffman DJ, Klimstra JD, Stebbins KR. A comparison of the teratogenicity of methylmercury and selenomethionine injected into bird eggs. *Arch Environ Contam Toxicol* 2012; 62: 519-528.
43. Lailson-Brito J, Cruz R, Dormeles PR, Andrade L, Azevede Ade F, Fragoso AB, Vidal LG, Costa MB, Bisi TL, Almeida R, Carvalho DP, Bastos WR, Malm O. Mercury-selenium relationships in liver of Guiana dolphin: the possible role of Kupffer cells in the detoxification process by tiemannite formation. *PLoS One* 2012; 7: e42162.
44. Hong YS, Hunter S, Clayton LA, Rifkin E, Bouwer EJ. Assessment of mercury and selenium concentrations in captive bottlenose dolphin's (*Tursiops truncatus*) diet fish, blood, and tissue. *Sci Total Environ* 2012; 414: 220-226.
45. Mulder PJ, Lie E, Eggen GS, Ciesielske TM, Berg T, Skaare JU, Jenssen BM, Sørmo EG. Mercury in molar excess of selenium interferes with thyroid hormone function in free-ranging freshwater fish. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 9027-9037.
47. Bjerregaard P, Christensen A. Selenium reduces the retention of methyl mercury in the brown shrimp *Crangon crangon*. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 6324-6329.
48. Branco V, Canario J, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Mercury and selenium interaction in vivo: effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Ree Radic Biol Med* 2012; 52: 781-793.
49. Goodrich JM, Basu N. Variants of glutathione s-transferase pi 1 exhibit differential enzymatic activity and inhibition by heavy metals. *Toxicol In Vitro* 2012; 26: 630-635.
50. Harari R, Harari F, Gerhardsson L, Lundh T, Skerfving S, Strömberg U, Broberg K. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicol Lett* 2012; 213: 75-82.
51. Counter SA, Buchanan LH, Ortega F. Acoustic stapedius muscle reflex in mercury-exposed Andean children and adults. *Acta Otolaryngol* 2012; 132: 51-63.
52. Yard EE, Horton J, Schier JG, Caldwell K, Sanchez C, Lewis L, Gastañaga C. Mercury exposure among artisanal gold miners in Madre de Dios, Peru: a cross-sectional study. *J Med Toxicol* 2012; 7: 1-6.
53. Ashe K. Elevated mercury concentrations in humans of Madre de Dios, Peru. *PLoS One* 2012; 7: e33305.
54. Olivero-Verbel J, Caballero-Gallardo K, Marrugo Negrete J. Relationship between localization of gold mining areas and hair mercury levels in people from Bolivar, north of Colombia. *Biol Trace Elem Res* 2012; 144: 118-132.
55. Fujimura M, Matsuyama A, Harvard JP, Bourdineaud JP, Nakamura K. Mercury contamination in humans in upper Maroni, French Guiana between 2004 and 2009. *Bull Environ Contam Toxicol* 2012; 88: 135-139.
56. Tomicic C, Vernez D, Belem T, Berode M. Human mercury exposure associated with small-scale gold mining in Burkina Faso. *Int Arch Occup Environ Health* 2011; 84: 539-546.

57. Li Y, Zhang B, Yang L, Li H. Blood mercury concentration among residents of a historic mercury mine and possible effects on renal function: a cross-sectional study in southwestern China. *Environ Monit Assess* 2012; [Epub ahead of print, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22791021>].
58. Li YF, Dong Z, Chen C, Li B, Gao Y, Qu L, Wang T, Fu X, Zhao Y, Chai Z. Organic selenium supplementation increases mercury excretion and decreases oxidative damage in long-term mercury-exposed residents from Wanshan, China. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 11313-11318.
59. Krisnayanti BD, Anderson CW, Utomo WH, Feng X, Handayanto E, Mudarisna N, Ikram H, Khususiah. Assessment of environmental mercury discharge at a four-year-old artisanal gold mining area on Lombok Island, Indonesia. *J Environ Monit* 2012; 14: 2598-2607.
60. Nartey VK, Klake RK, Doamekpor LK, Sarpong-Kumankomah S. Speciation of mercury in mine waste: case study of abandoned and active gold mine sites at the Bibiani-Anwiaso-Bekwai area of South Western Ghana. *Environ Monit Assess* 2012; 184: 7623-7634.
61. Zhang H, Feng X, Zhu J, Sapkota A, Meng B, Yao H, Qin H, Larssen T. Selenium in Soil Inhibits Mercury Uptake and Translocation in Rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Sci Technol* 2012; 46: 10040-10046.
62. Grandjean P, Satoh H, Murata K, Eto K. Adverse effects of methylmercury: environmental health research implications. *Environ Health Perspect* 2010; 118: 1137-1145.
63. Murata K, Sakamoto. Minamata disease. In: Nriagu JO (ed) *Encyclopedia of Environmental Health Vol. 3*. Elsevier: Burlington, 2011; pp. 774-780.
64. 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.
65. Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P. Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science* 1972; 175: 1122-1124.
66. El-Begearmi MM, Ganther HE, Sunde ML. Dietary interaction between methylmercury, selenium, arsenic, and sulfur amino acids in Japanese quail. *Poult Sci* 1982; 61: 272-279.
67. Satoh H, Yasuda N, Shimai S. Development of reflexes in neonatal mice prenatally exposed to methylmercury and selenite. *Toxicol Lett* 1985; 25: 199-203.
68. Fredriksson A, Gårdlund AT, Bergman K, Oskarsson A, Ohlin B, Danielsson B, Archer T. Effects of maternal dietary supplementation with selenite on the postnatal development of rat offspring exposed to methyl mercury in utero. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72: 377-382.
69. Beyrouthy P, Chan HM. Co-consumption of selenium and vitamin E altered the reproductive and developmental toxicity of methylmercury in rats. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28: 49-58.
70. Mozaffarian D, Shi P, Morris JS, Spiegelman D, Grandjean P, Siscovick D, Willett WC, Rimm EB. Mercury exposure and risk of cardiovascular disease in two U.S. cohort. *N Engl J Med* 2011; 364: 1116-1125.
71. Wennberg M, Bergdahl IA, Hallmans G, Norberg M, Lundh T, Skerfving S, Strömberg U, Vessby B, Jansson J-H. Fish consumption and myocardial infarction: a second prospective biomarker study from northern Sweden. *Am J Clin Nutr* 2011; 93: 27-36.

72. Choi AL, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Steurwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Selenim as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. *Environ Res* 2008; 144: 177-183.
73. Tamashiro H, Akagi H, Arakaki M, Futatsuka M, Roht LH. Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates. *Int Arch Occup Environ Health* 1984; 54: 135-146.
74. Ishihara N, Akimichi T, Suzuki T. Methylmercury concentrations in gastric contents of tuna (*Thunnus thynnus*). *Trace Elements Electrolytes* 2009; 26: 101-103.
75. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課. 妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項の見直しについて (平成 17 年 11 月 2 日).
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/051102-1.html>
76. 厚生労働省医薬食品局食品安全部基準審査課. 魚介類に含まれる水銀の調査結果 (まとめ).
<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/05/dl/s0518-8g.pdf>

A review on health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata¹, Minoru Yoshida², Mineshi Sakamoto³, Kanae Karita⁴, Toyoto Iwata¹,
Nozomi Tatsuta⁵, Kozue Yaginuma-Sakurai⁶, Miyuki Iwai-Shimada⁷, Kunihiro Nakai⁵

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

² *Hachinohe University Faculty of Human Health*

³ *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

⁴ *Department of Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine*

⁵ *Department of Development and Environmental Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine*

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

⁷ *Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences*

Abstract

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

The following conclusions were obtained from the reviews on methylmercury and mercury exposure: (1) Concerning human studies addressing methylmercury and mercury, the number of papers published in 2011 increased as compared to those in 2008-2010. (2) Prenatal exposure to methylmercury originating from fish consumption, even at relatively low levels, appears to affect child neurodevelopment adversely, if maternal fish consumption during gestation, polyunsaturated fatty acids and polychlorinated biphenyls are adjusted for in the assessment process. But, the effects of several hazardous chemicals on development may differ in children's age. Further studies are needed to clarify which effect each hazardous chemical can induce in age-specific children. (3) Selenium has been suggested to modify the adverse effect of methylmercury since 1970s, but such protective effects of selenium on hypertension were not observed in recent studies. (4) Since there are many small-scale gold miners and people residing near the mines with signs/symptoms involved in chronic mercury poisoning in developing countries, precautions should be taken against it.

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

Ⅲ 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

水俣病認定患者における臨床症候の自然歴の解析

研究者 安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野教授）

研究要旨

水俣病公式発見から50年以上が経過し、患者の高齢化に伴い、神経症候は多様化してきている。そこで、水俣病認定患者の感覚障害の自然歴を明らかにし、水俣病による感覚障害と水俣病患者に加齢性変化により加わった感覚障害の違いを明らかにし、水俣病認定患者に新たに加わった治療可能な疾患を見逃さないようにしなければならない。

キーワード

水俣病、感覚障害、経年的変化、加齢性変化、合併症

研究協力者

植田明彦（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野助教）

佐藤宏（佐藤神経内科クリニック）

山下賢（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野講師）

菅智宏（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野）

平原智雄（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野助教）

前田寧（熊本大学大学院生命科学研究部神経内科学分野講師）

中村政明（国立水俣病総合研究センター）

I 研究目的

水俣病患者で本症の主症候のひとつである感覚障害に焦点をあて、自然歴を明らかにすること。

II 研究方法

水俣病認定患者を対象として、感覚障害の経年的変化を過去のカルテ記録、問診などの情報に基づき、発症時期、発症後の増悪の有無を記録した。2012年9月から11月までの期間に水俣市立総合医療センターを受診した水俣病認定患

者の感覚障害の罹病期間および発症後の増悪について調査した。対照として、同時期に感覚障害で受診した患者の罹病期間について調べた。

Ⅲ 研究結果

外来を受診した感覚障害のある患者 14 例（69±8 歳、女性 6 例）のうち、1 例（82 歳、女性）が水俣病認定患者であった。対照患者は 13 例（68±7.4、女性 5 例）であり、頸椎症 6 例、腰椎症 2 例、糖尿病性神経障害 1 例、葉酸欠乏 1 例、慢性炎症性脱髄性多発神経炎 1 例、不明 2 例であった。罹病期間に関しては、対照症例は 4.8±5.7 年に対し、認定患者は 50 年であった。認定患者の発症は昭和 30 年代であり、感覚障害に関しては、四肢末端の感覚障害は発症後増悪なく経過していたが、平成 23 年に四肢末端の痺れに加え、前腕にも新たに出現したため、MRI を撮影したところ、頸椎症性変化を認めた。

現在の進捗状況として、水俣病認定患者の調査に関しては、研究協力者である佐藤神経内科クリニックの協力が得られており、水俣病認定患者の 20 例を対象として、自然歴について調査中である。

Ⅳ 考察

これまでの調査では、水俣病認定患者の感覚障害の発症時期は、昭和 30～40 年代であり、発症後の増悪はほとんどなく、症候が一定であると報告されている。¹⁾ 本研究では、外来に受診した水俣病認定患者を詳細に診療することにより、水俣病認定患者の神経症候の自然歴を記録し続けることが重要であると考えられた。また、水俣病認定患者において、経過中に感覚障害が急速に増悪した場合、水銀中毒以外の原因によることもあり、加齢により合併する治療可能な疾患を見過ごさないためにも、認定患者の定期的な神経診察が必要であると考えられた。

Ⅴ 結論

水俣病患者の感覚障害の自然歴を明らかにして、水俣病患者に加齢により加わった疾患による感覚障害を見過ごさないことが重要である。

Ⅵ 次年度以降への計画

症例の収集に関しては、佐藤神経内科クリニックに通院中の 20 例に加えて、

水俣市立総合医療センターに通院中の認定患者を対象として、当病院の神経内科外来を受診していただき、定期的な神経診察を行うとともに経年的な変化や曝露歴等の情報を収集する。患者については、どの診断基準による認定であるか示す必要がある。また患者研究において、学内の倫理委員会の承認を得る必要がある。

今年度は、感覚障害に焦点をあて調査したが、感覚障害の客観的評価方法や長期追跡データの信頼性など感覚障害を長期追跡する問題点が挙げられた。また、カルテ記録による追跡と問診による主観的なデータを分けて報告する必要性を指摘された。次年度へ向け感覚障害の客観的評価方法を導入して、他覚的所見を記録する必要があると考えられた。また、中核症候である小脳失調は、感覚障害と比べ、他覚的所見が得られやすいため、小脳失調に関する経年的変化を調査すべきであると指摘された。経過中に使用されていた薬剤に関しても重要な情報であるため、調査の際には確認する必要がある。

さらに小脳失調を認める患者に MRI および SPECT を撮影して、神経症候と画像所見の対比を行う。また、古典的水俣病患者において、協力が得られれば、MEG と二点間識別覚との関係性を評価する必要がある。

社会的背景から特定の状況がない限り、大規模な実態調査は困難であるが、協力が得られる患者を集め、1例でも MEG と二点間識別覚異常との対比を行う。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

特記事項なし

引用文献

1. Uchino M, Hirano T, Satoh H, Arimura K, Wakamiya J. The severity of Minamata disease declined in 25 years: temporal profile of the neurological findings analyzed by multiple logistic regression model. *Tohoku J Exp Med.* 205: 53-63, 2005.

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

Akihiko Ueda¹, Hiroshi Sato², Masaaki Nakamura³, Satoshi Yamashita¹, Tomohiro Suga¹, Tomoo Hirahara¹, Yashushi Maeda¹, Yukio Ando¹

¹Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University, ²Sato Neurological Clinic, ³National Institute for Minamata Disease

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

We evaluated 14 patients who visited Minamata City General Hospital and Medical Center to suffer from sensory impairment of the extremities. We discovered one patient who had been suffering from MD. The patient had shown new neurological symptoms since three years ago. The symptoms were caused by cervical spondylosis.

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

○メチル水銀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 メチル水銀に対する感受性決定の分子機構に関する研究

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

前年度までの研究において、ゴルジ体から multivesicular body (MVB) ソーティングシステムを經由して液胞に蛋白質を輸送する経路がメチル水銀毒性増強に深く関与していることを見出し、この輸送系を介して液胞に運ばれる蛋白質の中にメチル水銀毒性を増強させる蛋白質が存在することが示唆された。また、この輸送系の阻害またはメチル水銀処理によって 37kDa のユビキチン化蛋白質のレベルが上昇することも明らかにした。この蛋白質の候補として Sis1 および Rsp3 を同定したが、本年度における詳細な検討によって、目的とする 37kDa 蛋白質は Sis1 と結合する未知のユビキチン化蛋白質である可能性が示唆された。そこで再度質量分析解析を行ったところ、9 種の蛋白質が同定された。現在、メチル水銀毒性とこれら蛋白質との関係について検討中である。一方、我々は siRNA を利用したヒト遺伝子スクリーニングを実施し、ノックダウンされることによって HEK293 細胞をメチル水銀に対して高感受性にする蛋白質として TEX27（機能未知の転写因子様蛋白質）を同定している。TEX27 と結合する蛋白質として直鎖ポリユビキチン蛋白質である UBC が報告されているが、ヒトには UBC 以外に直鎖ポリユビキチン蛋白質として UBB が存在することから、これら直鎖ポリユビキチン蛋白質の発現を同時に抑制する siRNA (UBBC siRNA) を作製して、その影響を検討した。その結果、UBBC siRNA を導入した細胞は対照細胞に比べて高いメチル水銀感受性を示し、TEX27 発現抑制細胞にさらに UBBC siRNA を導入しても、相加的または相乗的なメチル水銀高感受性の上昇は認められないことから、直鎖ポリユビキチン蛋白質は TEX27 と同一の経路で細胞のメチル水銀毒性軽減に関与している可能性が示唆された。次に UBC と結合することが知られている蛋白質（約 30 種）の中から、TEX27 および直鎖ポリユビキチン蛋白質と同一の経路を介してメチル水銀毒性の軽減に関与する因子を検索したところ、p47 が同定された。

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

研究協力者

黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科講師）

高橋 勉（東北大学大学院薬学研究科助教）

I 研究目的

メチル水銀毒性に対する感受性には遺伝的な個体差があると考えられるが、感受性決定の分子機構はほとんど解明されていない。我々はこれまで、酵母をヒトと同じ真核生物のモデルとして用いた網羅的遺伝子スクリーニングを行い、酵母の全遺伝子の中から高発現によって酵母のメチル水銀感受性に影響を与える遺伝子をいくつか同定してきた。酵母は扱いが容易であり倍加時間が 2 時間と短いことから短時間で結果を得ることができ、また、哺乳類細胞よりも遺伝学的解析が簡単に確実に行えるなど多くの利点を有している。さらに、酵母遺伝子の多くはヒト遺伝子と機能的な相同性が高く、これまでも酵母を用いた基礎的研究がヒト細胞内機能の解明に大きく

貢献してきた。最近我々は、より精度の高い方法として、高発現ではなく、各遺伝子をそれぞれ欠損した酵母のライブラリーを用いた機能的遺伝子スクリーニング法を確立した。この方法を用いた検索で、欠損によって酵母にメチル水銀耐性を与える遺伝子群が数多く同定され、しかもそれら遺伝子のほとんどはメチル水銀毒性に関与することが初めて示されたものであった。そこで本研究では、これら遺伝子群の作用機構を解析することによって、メチル水銀に対する感受性決定機構解明を目指す。

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

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

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

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

II 研究方法

1. 酵母のメチル水銀に対する感受性

酵母の single colony を SD 培地に植菌し一晩振盪培養した後、この培養液を SD 培地で 1×10^4 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 μL の TBS を加えて 4000 rpm、5 min で酵母を破碎した。その懸濁液 150 μL を別のチューブに移し、そこに 50 μL 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 μg 、総容量 20 μL 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。

3. 免疫沈降

蛋白質を抽出した後、DC protein assay kit を用いて総蛋白質量を定量後、総蛋白質量が一定で、かつ、SDS 濃度が 0.1%以下になるように PBS で希釈した。あらかじめ 3 回洗浄しておいた anti-HA high affinity matrix を加え、4°C で 3 時間以上 incubate した。Beads を洗浄後、beads と PBS を合わせて 50 μL となるように PBS を加え、さらに 2 \times sample buffer を加えた。100°C で 3 分加熱し、SDS-PAGE 用サンプルとした。

4. 共焦点顕微鏡を用いた各蛋白質の細胞内分布の観察

GFP 融合蛋白質を発現させた酵母を SD 選択培地 2 mL に植菌し、30°C で増殖対数期 (OD600 = 0.5) となるまで振盪培養した後、 5×10^6 cells を SD 選択培地に total 1 mL となるよう懸濁し 30°C で 1 時間培養した。2300 \times g で 1 分間遠心して集菌し、上清 950 μL を除いて 2 mM FM4-64 を 2 μL (final 80 μM 添加してさらに 40 分培養した。培養後、950 μL の生理食塩水を加えてから 2300 \times g で 1 分間遠心して集菌し、SD 培地を 900 mL 加え、0, 20 μM の塩化メチル水銀を 100 μL 加え (final 0, 2 μM)、30°C で 90 分間振盪培養した。その後集菌し、滅菌水で洗浄後、PBS で希釈した。観察は共焦点顕微鏡で行った (Filter: FGFP, Alexa Fluor 568)。

siRNA 導入細胞のメチル水銀感受性

14 ml tube 内で 2.3 ml の D'MEM に 1×10^4 cells の HEK293 を懸濁した。AllStars negative control siRNA および各遺伝子の siRNA 300 ng (導入時の siRNA 濃度 : 10 nM) を希釈し、12 μL HiPerFect transfection reagent を添加して混和した。Transfection complex 形成のため、室温で 10 分以上 incubate した後に、一滴ずつ complex を HEK293 に添加して siRNA を導入した。さらに、室温 15 分インキュベートした後に 2.1 mL の D'MEM を追加し、96-well plate の各 well に、 5×10^3 cells となるように播種した。37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間培養した後に、塩化メチル水銀を 96-well plate に 10 μL ずつ添加した。処理 24~48 時間後に塩化メチル水銀を含む培地から 10 % Alamar blue を含む培地 75 μL に交換し、37°C、5 % CO₂ 存在下で約 3 時間培養した後、蛍光マイクロプレートリーダーで蛍光を測定した (excitation, 544 nm ; emission, 590 nm)。

核画分の分画

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

(倫理面への配慮)

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

III 研究結果と考察

(1) MVB ソーティングシステムを介してメチル水銀毒性を増強する蛋白質 (X-蛋白質) の同定とその作用機構解析

我々は、Ubi4 に依存し、かつ、MVB ソーティングシステムを介してメチル水銀毒性を増強させる酵母蛋白質 (X-蛋白質) を検索し、平成 22 年度にその候補として Rps3 および Sis1 を同定した。興味深いことに、Rps3 はメチル水銀毒性を増強させる作用を有し、逆に Sis1 はメチル水銀毒性の軽減に関与することが判明した。Rps3 は MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれることによって初めてメチル水銀毒性増強作用を発揮するようになり、Sis1 は通常はメチル水銀毒性軽減因子として機能しているが Sis1 の一部は MVB ソーティングシステムを介して液胞に運ばれてその機能を失う (分解される?) ため、MVB ソーティングシステムが抑制されると Rps3 はメチル水銀毒性増強作用を発揮できず、また、Sis1 はメチル水銀毒性軽減機能を維持するようになるため、結果としてメチル水銀毒性が軽減されると予想することができる。しかし、平成 23 年度の検討によって、両蛋白質が共にごく一部しか MVB ソーティングシステムによって液胞に運ばれない可能性が示唆された。また、C 末端に HA タグを融合させた Sis1 を発現させた酵母の細胞抽出液を HA 抗体で免疫沈降した後に電気泳動で分離してユビキチン抗体で Western blotting を行ったところ、MVB ソーティングシステムの停止 (同システムの構成因子である Vps27 の欠損) はモノユビキチン化された Sis1 [分子量 46 kDa (Sis1=37.6 kDa、ユビキチン=8.5 kDa)] よりも 37 kDa 付近に泳動されるユビキチン化蛋白質のバンド量を著しく増加させた。同様の結果が Rps3 でも認められることから、Sis1 および Rps3 は細胞内でプロセッシングを受けている可能性も考えられる。そこで本年度は Sis1 を例にとって、細胞内プロセッシングの可能性について検討した。

Sis1 が細胞内プロセッシングを受けるか否かを調べるために、N 末端または C 末端に HA タグを融合させた Sis1 (HA-Sis1 または Sis1-HA) をそれぞれ酵母内に発現させた。そして、HA 抗体で免疫沈降した後にユビキチン抗体で Western blotting を行ったところ、MVB ソーティングシステムの停止によって C 末端のみならず N 末端に HA タグを融合させた Sis1 を発現させた細胞においても 37 kDa 付近に泳動されるユビキチン化蛋白質のバンド量が増加した。このことから、37 kDa 付近に認められるユビキチン化蛋白質のバンドはプロセッシングされた Sis1 ではないことが明らかになった。したがって、この 37 kDa 付近に認められるバンドは、Sis1 と結合する未知のユビキ

チン化蛋白質である可能性が考えられる。そこで、このユビキチン化蛋白質を同定するために、Sis1-HA 発現プラスミドを導入した Vps27 欠損酵母の細胞抽出液を抗 HA 抗体で処理した後にユビキチン抗体で免疫沈降するという方法で非ユビキチン化 Sis1-HA をできるだけ除去したサンプルを SDS-PAGE で分離し、37 kDa 付近のバンドを切り出してシステイン残基の還元およびゲル内消化を行った後に質量分析装置で解析したところ、Mrs4、Rnr1、Rsf2、Ura8、Zrt2、Fba1、Kri1、Myo2 および Tpc1 が同定された。現在これら、蛋白質とメチル水銀毒性との関係を検討している。

(2) メチル水銀が MVB ソーティングシステムおよび液胞の活性に与える影響

MVB ソーティングシステムを介した液胞への蛋白質の輸送系がメチル水銀毒性増強に深く関与していることは間違いない。そこで、メチル水銀が MVB ソーティングシステムの活性に与える影響を検討した。膜蛋白質（酵母フェロモン受容体）である Ste3 は、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後に MVB ソーティングシステムを介して液胞へ運ばれて分解されることが知られている。この Ste3 の分解に与えるメチル水銀処理の影響を検討したところ、蛋白質合成阻害剤の存在下において、Ste3 は速やかに分解されたのに対し、メチル水銀はその分解を抑制した。なお、この濃度のメチル水銀は酵母のエンドサイトーシス機能および液胞機能には影響を与えなかった。この結果から、メチル水銀は MVB ソーティングシステムを亢進させることなく、むしろ負に制御していると考えられる。

(3) メチル水銀毒性の発現に関与することが判明したヒト転写因子の作用機構解析

メチル水銀毒性の発現に影響を与えるヒト遺伝子を明らかにするために、siRNA を利用した遺伝子検索法を開発した。本法はヒト由来 HEK293 細胞を用い、約 22,000 とされるヒト遺伝子の中で機能の判明している約 17,000 の遺伝子を siRNA によって 1 つずつノックダウンしたのちに、それら細胞（約 17,000 種）のメチル水銀に対する感受性を調べるものである。この方法を用いたスクリーニングによって数多くのヒト遺伝子が同定されたが、その中に転写因子様蛋白質 TEX27 が含まれていた。

TEX27 のノックダウンは HEK293 細胞をメチル水銀に対して高感受性にする。TEX27 はその機能についてほとんど検討されていないが、構造中に zinc-finger ドメインを有することから転写因子であると考えられる。昨年度の検討によって、メチル水銀が TEX27 の核移行を促進させることが明らかになっており、TEX27 が細胞のメチル水銀暴露に応答して作用する防御因子である可能性が示唆されている。

TEX27 と結合する蛋白質として直鎖ポリユビキチン蛋白質である UBC が報告されているが、ヒトには UBC 以外に直鎖ポリユビキチン蛋白質として UBB が存在する。そこで本年度は、これら直鎖ポリユビキチン蛋白質の発現を同時に抑制する siRNA (UBBC siRNA) を作製して、その影響を検討した。その結果、UBBC siRNA を導入した細胞は対照細胞に比べて高いメチル水銀感受性を示した。また、TEX27 発現抑制細胞にさらに UBBC siRNA を導入しても、相加的または相乗的なメチル水銀高感受性の上昇は認められず、TEX27 発現抑制細胞と同程度のメチル水銀高感受性を示した。このことから、直鎖ポリユビキチン蛋白質は TEX27 と同一の経路で細胞のメチル水銀毒性軽減に関与していると考えられる。直鎖ポリユビキチン蛋白質はモノユビキチンの供給源として機能することが知られている。しかし、TEX27 発現抑制細胞および UBBC 発現抑制細胞のモノユビキチンのレベルは対照細胞と同程度であった。また、メチル水銀処理はこれら細胞中のモノユビキチン

レベルに顕著な影響を与えなかった。以上のことから、TEX27 および直鎖ポリユビキチン蛋白質によるメチル水銀毒性軽減作用に、少なくとも、モノユビキチンレベルの変動は関与していないと考えられる。

次に、UBC と結合することが知られている蛋白質（約 30 種）の中から、TEX27 および直鎖ポリユビキチン蛋白質と同一の経路を介してメチル水銀毒性の軽減に関与する因子を検索したところ、p47 が同定された。p47 は、細胞分裂の際にゴルジ体の分裂・再融合に関与する ATPase である VCP の cofactor として機能する蛋白質である。VCP はゴルジ体の分裂・再融合以外に小胞体関連分解に関与することが知られており、VCP の発現抑制が細胞に高いメチル水銀感受性を与えることも見出している。しかし、対照細胞および TEX27 発現抑制細胞をメチル水銀で処理しても小胞体ストレスの誘導は認められなかったことから、TEX27 によるメチル水銀毒性軽減に小胞体ストレスは関与していないと考えられる。

IV 結論

Sis1 が細胞内でプロセッシングを受けたものと予想された低分子量のユビキチン化蛋白質が、Sis1 のプロセッシング体ではなく、Sis1 に結合する別のユビキチン化蛋白質であることが示された。本蛋白質が同定されれば、MVB ソーティングシステムから液胞への蛋白質輸送経路のメチル水銀毒性発現における役割が解明されると期待される。

一方、ノックダウンによってヒト由来細胞（HEK293）をメチル水銀に対して高感受性にするヒト蛋白質として同定された TEX27（機能未知の転写因子様蛋白質）の結合蛋白質として報告のある直鎖ポリユビキチン蛋白質が TEX27 と同一の経路で細胞のメチル水銀毒性軽減に関与している可能性が示唆された。

V 次年度以降の計画

Sis1 に結合するユビキチン化蛋白質について詳細に検討することによって、MVB ソーティングシステムから液胞への蛋白質輸送経路のメチル水銀毒性発現における役割を解明する。また、ヒトの転写因子様蛋白質 TEX27 についても直鎖ポリユビキチン蛋白質との関係のみならずメチル水銀に対する応答・活性化などについても検討し、その意義を明確にする予定である。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Hwang GW Ogiwara Y Takahashi T Naganuma A: Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation. *J. Toxicol. Sci.*, 2012; 37:1287-1290.
- 2) Hwang GW Kimura Y Takahashi Y Lee JY Naganuma A: Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Toxicol. Sci.*, 2012; 37:1283-1286.
- 3) Hwang GW Ryoike K Lee JY Takahashi T Naganuma A: siRNA-mediated silencing of the gene for heat shock transcription factor 1 causes hypersensitivity to methylmercury in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:851-853.
- 4) Hwang GW Du K Takahashi T Naganuma A: Inhibition of F-box protein FBXO6 gene expression by RNA interference enhances cadmium toxicity in HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:847-849.

- 5) Hwang GW Lee JY Ryoke K Matsuyama F Kim JM Takahashi T Naganuma A: Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 2011; 36:389-391.
- 6) 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.
- 7) Hwang GW Ryoke K Takahashi T Naganuma A: Silencing of the gene for homeobox protein HOXB13 by siRNA confers resistance to methylmercury on HEK293 cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2010; 35:941-944.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, Overexpression of Cdc34 confers cadmium resistance in *Saccharomyces cerevisiae* through decreased cellular utilization of sulfid, *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 363: 873-878.
- 11) Hwang GW Ishida Y Naganuma A, Identification of F-box proteins that are involved in resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 2006;580: 6813-6818.
- 12) Hwang GW Sasaki D Naganuma A, Overexpression of Rad23 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of the degradation of ubiquitinated proteins, *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1074-1078.
- 13) Hwang GW Furuoya Y Naganuma A et al., Overexpression of Bop3 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae* through interaction with other proteins such as Fkh1, Rts1 and Msn2, *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 378-385.
- 14) Hwang GW Furuchi T Naganuma A, A ubiquitin-proteasome system is responsible for the protection of yeast and human cells against methylmercury, *FASEB J* 2002; 16: 709-711.

- 15) Furuchi T Hwang GW Naganuma A, Overexpression of the ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 confers resistance to methylmercury in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Pharmacol* 2002; 61: 738-741.
- 16) Naganuma A Miura N Kaneko S et al., GFAT as a target molecule of methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *FASEB J* 2000; 14: 968-972.

Molecular mechanism for toxicity of methylmercury and its biological protection

Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang and Tsutomu Takahashi

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

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

Abstract

To elucidate the mechanism of methylmercury toxicity, we have searched the genes that affect sensitivity of yeast cells to methylmercury. 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 methylmercury toxicity might be included in yeast cells. In the last year, we identified Sis1 and Rsp3 as candidates for X-proteins. However, results of the present study indicated that Sis1 was not X-proteins, and proteins that can bind to Sis1 might exist in cells as X-proteins. Thus, we searched the Sis1-binding ubiquitinated proteins by gel electrophoresis and mass spectrometry, and found 9 proteins as candidates for the X-proteins. Now we are examining the relationship between these proteins and toxicity of methylmercury. On the other hand, we found that the decreased expression of the gene for TEX27 sensitized human HEK293 cells to methylmercury. TEX27 has been reported to bind to polyubiquitin such as UBB and UBC. The inhibition of expression of the gene for polyubiquitin also sensitized the cells to methylmercury. Simultaneous inhibition of these two genes showed neither an additive nor synergistic increase in the hypersensitivity to methylmercury. Thus, TEX27 may decrease the methylmercury sensitivity through same pathway to polyubiquitin.

V 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

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）

要旨

脳の支持細胞と考えられていたグリア細胞であるが、これらの細胞機能の理解は、脳の生理機能・病態を理解するために必須であると考えられるようになってきた。これまで、メチル水銀(MeHg)に暴露された脳（分散培養細胞系）で、ミクログリアが低濃度の MeHg を感知しその情報を ATP の化学情報としてアストロサイトに伝えること、アストロサイトは P2Y1 受容体でこの情報を感知し、神経細胞保護因子である IL-6 を産生・放出することを報告してきた。本年は、これら一連の応答に関連する、P2Y1 受容体欠損動物、さらに P2Y1 受容体をグリア細胞特異的に ON/OFF 制御した動物を用い、より脳内に近い実験条件である、脳スライス培養系を用いて、MeHg に暴露された脳が、ミクログリア、アストロサイトさらに神経細胞それぞれで、どのような応答を呈するのかを解析した。一連の応答の鍵となる、P2Y1 受容体欠損動物では、MeHg による傷害（PI 染色により評価）が大きく、またこれはアストロサイトの P2Y1 受容体を特異的に欠損させた場合も同様であった。逆に、アストロサイトで P2Y1 受容体を過剰発現させた脳では、MeHg に対する抵抗性が増すことが明らかとなった。さらに、これまでのアストロサイトの ATP システムは、急性期の傷害に対して脳保護に働くことを示してきたが、より低濃度の MeHg による慢性的な傷害においては、グリア細胞の過剰活性化及び ATP シグナルが、むしろ傷害を亢進させることが明らかとなった。このようにグリア細胞の・ATP/P2Y1 受容体シグナルは、二面性を有すること、これらを踏まえた解析が重要であることが明らかとなった。

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

研究者協力者氏名・篠崎陽一（山梨大学医学部薬理学）

I. 研究目的

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

II. 研究方法

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

MeHg の添加： 培養 7 日目に、各種濃度 MeHg (100 nM - 3 μM) を添加した。急性期の障害は添加 24 時間後に、また慢性期の障害は添加 7 日後に Propidium Iodide (PI) 染色により評価した。

(倫理面への配慮)

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

III. 及び IV. 研究結果及び考察

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

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

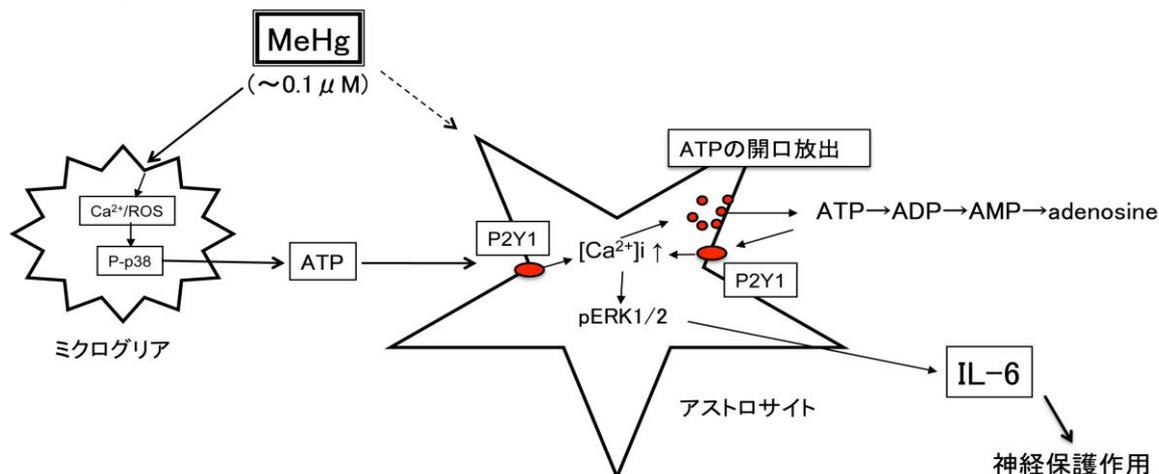


図 1 MeHg に暴露されたミクログリア及びアストロサイトの応答

ミクログリアが感知して、ATP を放出する。この ATP がアストロサイトの P2Y1 受容体を刺激することにより Ca^{2+} 及び ERK1/2 を介して IL-6 を産生・放出する。この IL-6 依存的に神経保護作用を呈する。本年は、赤で示したアストロサイト P2Y1 に特に注目して検討する。

また、これらに対する推進委員、評価委員のコメントは以下である。

推進委員、評価委員のコメント：

- ・ 論文としてまとめ、積極的に好評すること。
- ・ MeHg を感知したミクログリアが、アストロサイト及び神経細胞にその情報をつたえて保護作用を呈するという知見は大変興味深い、水俣病における神経症状を解明するという視点を持って頂きたい。
- ・ 高濃度ではミクログリアの感知能は機能するのか？自身の防御応答は起こらないのか？
- ・ 実際のどんな局面でこうした保護機能が働くことを想定しているのか？
- ・ 初代培養系での知見を、生体（再構成系）で確認すること。

本年は、昨年度からの課題である、再構成系により、培養細胞で得られた知見が in situ (スライス培養) で再現できるか否か、また水俣病の神経症状を意識した慢性傷害モデルを作成し本慢性モデルにおけるグリア細胞の役割、に注目して検討した。

(1) 海馬スライス培養系を用いた MeHg 傷害モデルの作成

海馬スライス標本を用いて、分散培養系と同様の急性期の MeHg 傷害モデルを作成した。図 2A で示すように、培養 1 週間後に MeHg を添加し、その 24 時間後に PI を添加しその蛍光強度により傷害を評価した。図 2B は典型例。

海馬錐体細胞層で顕著な PI 陽性シグナルが観察された。この PI 陽性シグナルは、アポトーシス時に観察されるシングルストランド DNA (ssDNA) シグナル陽性であった。図 2C に示す様に、

コントロール (MeHg 無添加) 海馬は PI 染色陰性であるが、高濃度 MeHg (1 μM 以上) により強い PI 蛍光シグナル、つまり傷害が認められた。これまで、分散培養系を用いた実験系で、MeHg (1 μM) がアストロサイトから ATP を放出させ、これがオートクラインシグナルとして P2Y1 受容体を介して IL-6 を産生・放出することにより神経保護作用を呈することを示してきた。そこで、MeHg により惹起される傷害に対する、アストロサイトの活性化阻害薬 (fluorocitrate)、P2Y1 受容体

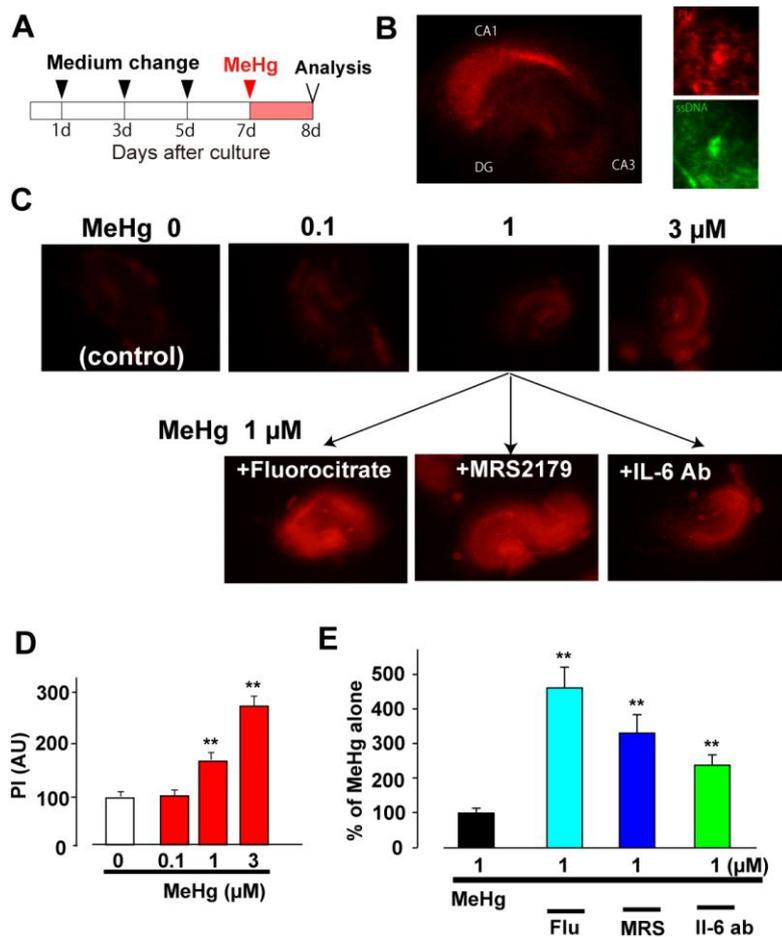
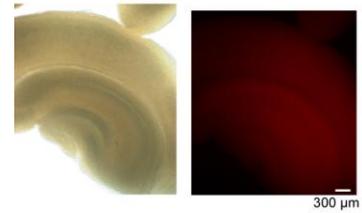


図 2 海馬スライス培養系を用いた MeHg 傷害モデル
A. 実験スケジュール。B. 左：PI による典型的な染色像。主に錐体細胞で PI シグナルが認められた。右：PI シグナルは、ssDNA 陽性であった。C. MeHg 傷害の濃度依存性。また、MeHg (1 μM) により惹起される傷害に対する、fluorocitrate、MRS2179 及び IL6 中和抗体の作用。D 及び E はこれらのまとめ。

拮抗薬(MRS2179)及びIL-6をトラップする中和抗体の作用を検討した。Fluorocitrate、MRS2179及びIL-6中和抗体はすべて、MeHg(1 μ M)により惹起される傷害を亢進させた。さらに、これらは傷害が認められない0.1 μ M MeHgを添加した海馬スライス標本において、顕著な傷害作用を呈した。これらの結果は、MeHgに応答したアストロサイトは、活性化し、ATP/P2Y1受容体シグナル及びIL-6を介して、神経細胞に対して補語的に作用していることが示唆された。これは、我々のこれまでの分散培養系での成果を支持する結果であった。

MeHgによる神経細胞傷害は、脳部位により大きな差が認められる。特に、海馬は他の脳虚血による傷害等と大きく異なり、MeHgに対して最も抵抗性を示す脳部位であることが知られている⁴⁾。しかし本研究のような、スライス培養を用いた系では、海馬及び大脳皮質の障害程度がほぼ等しかった(図3)。若齢脳では海馬におけるMeHg障害が認められること、また技術的な制約によりスライス培養の結果は若齢動物脳の結果であることを考慮すると、今回の海馬スライス培養におけるMeHg障害性は若齢脳の障害を一部模倣した結果である可能性が考えられる。

低濃度MeHg(0.1 μ M)単独では、神経細胞傷害が認められないが、アストロサイトの一連の応答を阻害すると、顕著な傷害が惹起されることが明らかとなった。従って、低濃度MeHgも神経細胞の傷害を惹起するが、アストロサイトの保護作用によってマスクされていることが示唆された。神経細胞が、MeHg誘発性傷害に対する抵抗性を獲得するために、アストロサイトがきわめて重要な役割をしていると考えられることが示唆された。しかし我々はこれまで、アストロサイトはMeHg(0.1 μ M)に応答しないことを報告してきた。この矛盾は、スライス標本中のミクログリアのサポートに起因すると考えられる。これまでの分散培養系を用いた研究により、MeHg高感度センサーであるミクログリアは、低濃度MeHgを感知し、その情報をアストロサイトに伝えることにより、ATP/P2Y1受容体以下の一連の応答を呈する。従って今回も、スライス培養中のミクログリアが低濃度MeHgを感知し、アストロサイトに情報を伝え、アストロサイトの保護作用に結びついたことが示唆される。Laphamら³⁾は、軽度小児水俣病患者の脳幹で、ミクログリアが活性化していることを報告している。この報告は、ヒトの



MeHg: 0.5 μ M, 48 hr

図3 海馬及び大脳皮質スライス培養系を用いたMeHg傷害モデル

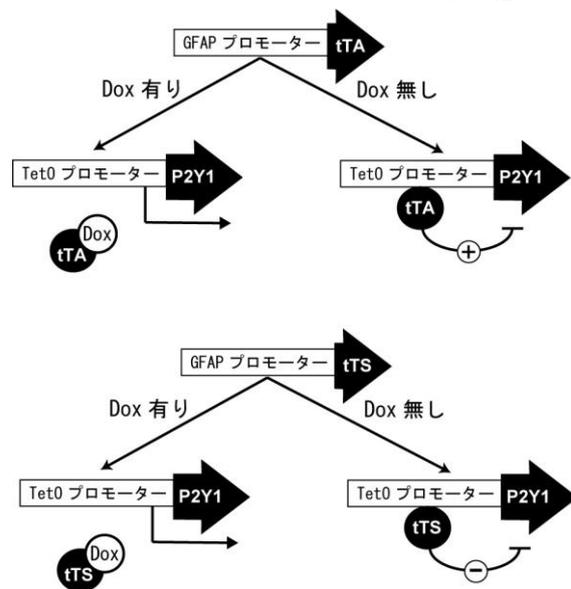


図4 グリア特異的なP2Y1受容体のON/OFF
アストロサイト特異的プロモーター(GFAPプロモーター)にtTA(tetracycline trans-activator)(上段)及びtTS(tetracycline trans-suppressor)(下段)を発現したマウスと、Tet0-P2Y1マウスを交配して作成したGFAP-tTA_tet0-P2Y1(上段)及びGFAP-tTS-P2Y1(下段)マウス。ドキシサイクリン(Dox)の有/無により、tTA及びtTSのスイッチOFF/ONが可能となる。上段はアストロサイト特異的にP2Y1受容体発現亢進(ON)、下段はアストロサイト特異的にP2Y1受容体欠損(OFF)である。

脳においても低濃度 MeHg の暴露が、ミクログリア→アストロサイトといった一連の応答を引き起こしている可能性を示唆し、非常に興味深い。

MeHg 添加後の海馬スライス標本のグリア細胞の活性化を免疫組織学的に検討した。アストロサイト (GFAP) 及びミクログリア (Iba-1) は、ともに GFAP 及び Iba-1 に対する強い陽性シグナルを呈し、また突起が退縮した活性化型となっていた。また、IL-6 陽性のシグナルが、アストロサイトに強く観察された。これらも、これまでの知見を支持する結果であった。

(2) P2Y1 受容体遺伝子改変動物を用いた検討

P2Y1 受容体の重要性が強く示唆されたため、P2Y1 受容体の薬理的な制御に加えて分子生物学的な手法により P2Y1 受容体の各種遺伝子改変動物を用いた検討を行った。実験には、P2Y1 完全欠損動物 (P2Y1-KO) 動物に加え、図 4 で示すようにアストロサイト特異的に P2Y1 受容体を tTA 及び tTS 系で制御可能とする、アストロサイト特異的 P2Y1 欠損 (P2Y1-astro-OFF) 及び P2Y1 強制過剰発現 (P2Y1-astro-ON) マウスを用いた。これら遺伝子改変動物の海馬スライス標本を用いて MeHg により惹起される傷害の程度を検討した (図 5)。P2Y1-KO では、MeHg により惹起される傷害の亢進が認められた。これは、P2Y1-astro-OFF を用いた検討でもほぼ同程度であった。従って、アストロサイトの P2Y1 受容体が重要であることが明らかとなった。さらに、興味深いことに、

P2Y1-astro-ON、つまり P2Y1 受容体をアストロサイトで過剰発現させた場合には、MeHg による傷害が顕著に抑制された。すなわち、アストロサイトの (1) P2Y1 受容体欠損により傷害が亢進し、(2) P2Y1 受容体過剰発現により傷害が抑制されたのである。これは、アストロサイトの P2Y1 受容体が MeHg により惹起される急性期神経細胞傷害に強く関与すること、またこの OFF/ON により本神経細胞傷害の制御が可能

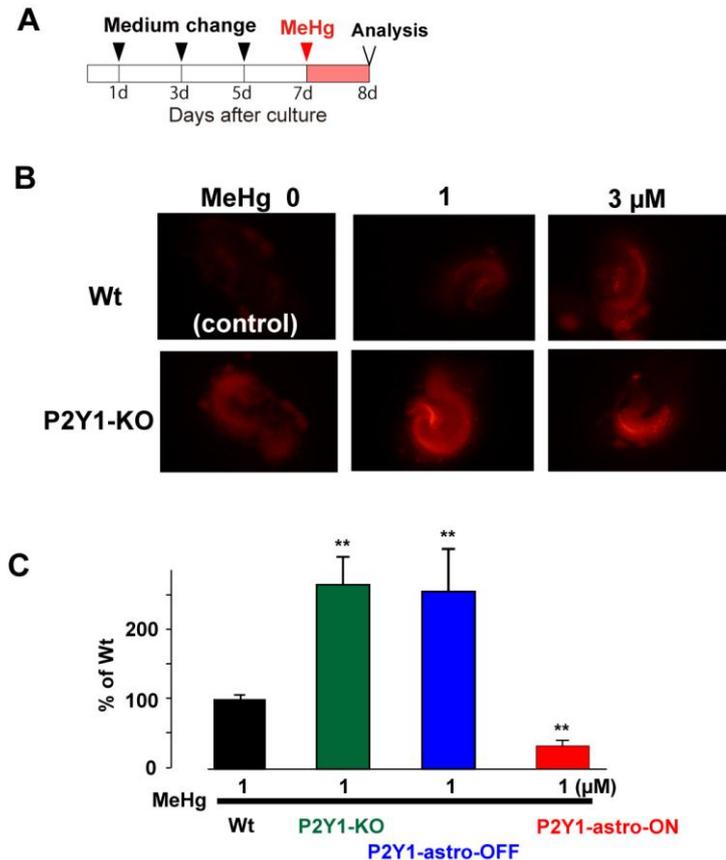


図 5 P2Y1 受容体の分子生物学的な制御と MeHg 傷害
 A. 海馬スライス培養系を用いた実験スケジュール。培養 7 日目に MeHg を添加し、その 24 時間後に PI を添加して評価を行った。B. MeHg (0-3 μM) により惹起される神経細胞傷害の Wt と P2Y1-KO の比較。P2Y1-KO では、MeHg によるより強い傷害が認められた。C. 各種 P2Y1 受容体遺伝子改変動物を用いた検討。MeHg (1 μM) により惹起される Wt における傷害程度との比較である。P2Y1-KO 及び P2Y1-astro-OFF では約 2.5 倍以上の強い応答が観察された。しかし、P2Y1-astro-ON では、その傷害は顕著に抑制された。**p<0.01 vs Wt.

となる可能性を強く示唆するものである。

(3) 慢性的 MeHg 傷害モデルの作成

海馬スライス培養系では、低濃度 MeHg (0.01-0.1 μ M) で 24 時間の刺激を加えただけでは、殆ど傷害が認められなかった (図 2)。そこで、曝露時間を 1 週間に延長し、海馬錐体細胞に対する傷害性を観察した (スケジュールは図 6A)。図 6C は、低濃度 MeHg (0.1 μ M) で 7 日間刺激した際の PI 染色像である。低濃度 MeHg 長期間刺激により、海馬錐体細胞層で強い PI シグナルが観察された。さらに低濃度 MeHg (0.01 μ M) 刺激でも、有意に強い PI シグナルを認めた。しかし、MeHg 無添加のコントロール群でも、7 日間の培養により弱いながらも PI 陽性シグナルが出現した (図 6B)。更に培養期間を延長すると、コントロール群の PI 陽性シグナルが顕著になったため、この 7 日間の培養スケジュールを用いた海馬スライス培養系を、慢性 MeHg 傷害モデルとし、グリア細胞の影響を検討した。

急性 MeHg モデルとは異なり、本慢性モデルでは、MeHg (0.1 μ M) に

より惹起される PI 陽性シグナルは P2Y1-KO ($76.4 \pm 7.8\%$ of Wt, $p < 0.05$) 及び P2Y1-astro-OFF ($70.5 \pm 8.2\%$ of Wt, $p < 0.05$) 動物で抑制され、P2Y1-astro-ON ($170.3 \pm 33.2\%$ of Wt, $p < 0.05$) で亢進した。急性期と慢性期の MeHg 傷害に対するアストロサイト及び P2Y1 受容体の役割が、全く逆であった。ATP/P2 受容体を介するシグナルは、種々の炎症応答を亢進させることが知られている。また、この ATP シグナルによりグリア細胞は活性化し、さらなる炎症応答を亢進させ、炎症の慢性化を引き起こす。このような炎症応答の亢進が、今回の慢性モデルにおける、P2Y1 受容体の傷害増悪作用と関係する可能性が高い。しかし、詳細な分子メカニズムの解明は、今後の課題として残された。

グリア細胞及び ATP/P2 受容体シグナルが、MeHg 傷害に対して二面性 (傷害保護と増悪) を有することが明らかとなった。グリア細胞の MeHg による神経症状に対するグリア細胞の関与は、急性期と慢性期で全く異なっていることが予想される。

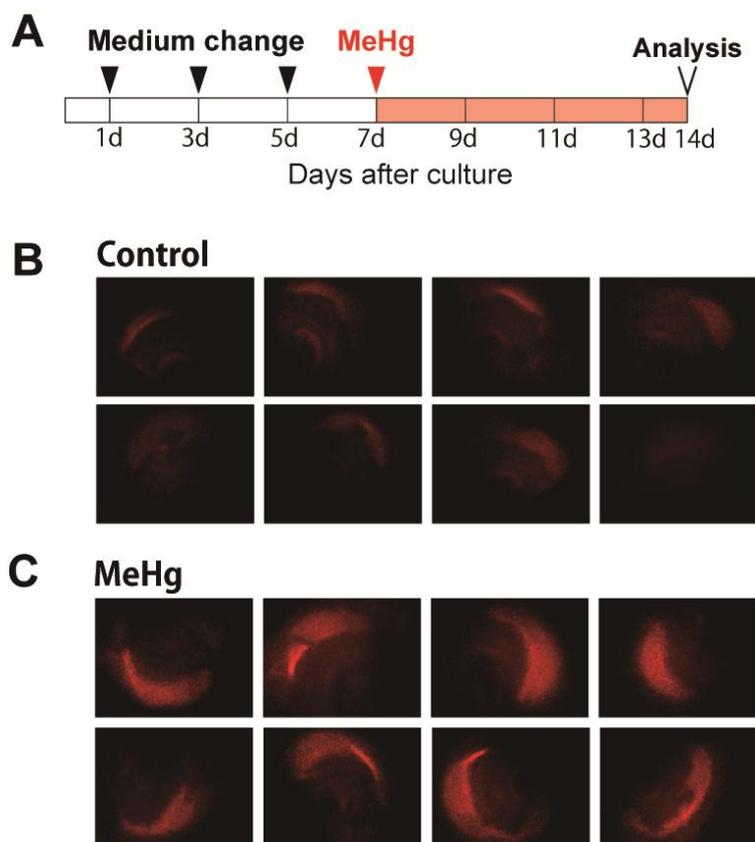


図 6 低濃度 MeHg による慢性傷害モデル

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

V. 結論

海馬スライス培養系を用いた MeHg 傷害モデル系を構築し、MeHg 傷害に対するアストロサイト及び ATP/P2Y1 受容体シグナルの役割を検証した。

1. 高濃度 MeHg による急性 MeHg モデルでは、アストロサイト ATP/P2Y1 受容体シグナルは、IL-6 を介して海馬神経細胞を保護していた。これは、分散培養系を用いたこれまでの結果と良く一致していた。
2. P2Y1-astro-ON では、MeHg 傷害は非常に強く抑制された。アストロサイト P2Y1 受容体の制御により、急性期 MeHg 傷害をコントロールできる可能性が示唆された。
3. 低濃度 MeHg による慢性 MeHg モデルを作成した。この慢性モデルでは、MeHg 傷害に対するアストロサイト及び P2Y1 受容体シグナルの関与は、これまでと逆で、傷害を増悪するシグナルとした働く可能性が示唆された。
4. グリア細胞及び ATP シグナルは、二面性を有していることが明らかとなった。

VI. 今後の課題

1. 急性高濃度 MeHg 傷害における、ミクログリアの役割解明。また、他の ATP 関連シグナル及び付随して誘導されるグリア性因子の役割を明らかとする。
2. 慢性低濃度 MeHg 曝露により神経細胞が傷害される様式を詳細に検討する。また、グリア細胞及び ATP シグナルによる増悪作用の分子メカニズムを明らかとする。特に、低濃度 MeHg を感知し得るミクログリアに注目して、検討を行う。

<参考文献>

- 1) Haydon, P.G.: GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci*, **2**: 185-193, 2001.
- 2) Miller, G.: Neuroscience. The dark side of glia. *Science*, **308**: 778-781, 2005.
- 3) Lapham, LW et al. An analysis of autopsy brain tissue from infants prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicology*, **16**: 689-704, 1995.
- 4) Takeuchi, T and Eto, K. The pathology of Minamata Disease. Ed Nakayama, H and Sumiyoshi, A. Kyushu University Press, 1999.

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) >

24. Noguchi, Y., Kayoko, F., Shinozaki, Y., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C. and *Koizumi, S. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y1 receptor-mediated pathways. **PLoS One**, in press.
23. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and *Koizumi, S. (2013) Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of tonic P2Y₁₄ receptor-mediated signal(s). **Cell. Mol. Neurobiol.** 33, 47-58.
22. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2013) Purinergic receptors in microglia -Functional modal shift of microglia mediated by P1 and P2 receptors-. **Glia** in press.
21. Suyama, S., Sunabori, T., Kanki, H., Sawamoto, K., Gachet, C., Koizumi, S. and *Okano, H. (2012)

- Purinergic signaling promotes proliferation of the adult mouse subventricular zone cells. **J. Neurosci.** 32, 9238-9247.
- 20 Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S. and Koizumi, S. (2012) Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. **Cell. Mol. Neurobiol.** 32, 953-956.
19. Koizumi, S. (2011) A new role of astrocytes. *Japanese Journal of Neurosurgery*, 20, 552-558.
18. Shibata, K., Sugawara, T., Fujishita, K., Shinozaki, Y., Matsukawa, T., Suzuki, T. and Koizumi, S. (2011) The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. *PLoS One*, 6, e23510.
17. Chi, Y., Li, K., Yan, Q., Koizumi, S., Shi, L., Takahashi, S., Zhu, Y., Matsue, H., Takeda, M., Kitamura, M. and Yao, J. (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMPK. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 339, 257-266.
16. 小泉修一 (2011) グリオトランスミッターとシナプス制御、*Clinical Neuroscience*, 29, 1273-1277.
15. 小泉修一 (2011) 中枢神経障害とグリア、*Cardiovascular Anesthesia*, 15, 83-89.
14. 小泉修一 (2011) グリア伝達物質放出と脳機能、*脳循環代謝*, 22, 24-28.
13. 小泉修一 (2011) グリア・ニューロン連関、*BioClinica*, 26, 77-82.
12. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca²⁺ oscillations in astrocytes. *FEBS J.* 277, 286-292.
11. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, K., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J. Bio. Chem.*, 284, 21257-21264.
10. Fujishita, K., Ozawa, T., Shibata, K., Tanabe, S., Sato, Y., Hisamoto, M., Okuda, T. and Koizumi, S. (2009) Grape seed extract (GSE) acting on astrocytes, reveals its neuronal protection against oxidative stress via interleukin-6-mediated mechanisms. *Cell Mol Neurobiol.*, 29, 1121-1129.
9. Shinozaki, Y., Sumitomo, K., Tsuda, M., Koizumi, S., Inoue, K. and Torimitsu, K. (2009) Direct observation of ATP-induced conformational changes in single P2X₄ receptors. *PLoS Biology*, 7, e103.
8. 小泉修一、井上和秀 (2008) ニューロン・ミクログリア相互作用、*BioClinica*, 23, 97-102.
7. 小泉修一 (2008) ATPを介したグリア・ニューロン相互作用、*細胞*, 40, 12-16.
6. 小泉修一、井上和秀 (2009) 脳内グリア細胞におけるATPセンサーを介した情報伝達、*生化学*, 81, 35-38.
5. 小泉修一 藤下加代子. アストロサイトを介したニューロン・アストロサイト相互調節, *Brain and Nerve* 2007; 56:707-715.
4. 工藤佳久 小泉修一 和田圭司 橋本謙二. グリア細胞を標的とする医薬品の創製, *日薬理誌* 2007; 130: 185-192.
3. Inoue K, Koizumi S, Tsuda M. (2007) The role of nucleotides in the neuron-glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem* 2007; 102:1447-1458.

2. Shinozaki Y Sato Y Koizumi S et al. Retinoic acids acting through retinoid receptors protect hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-mediated cell death by inhibition of c-Jun-N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase, *Neurosci* 2007; 147: 153-163.
1. Koizumi S Shigemoto-Mogami, Y Nasu-Tada K et al. UDP acting at P2Y₆ receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis, *Nature* 2007; 446:1091-1095.

<学会発表>

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

Effects of low concentration of methylmercury on glial cells

Schuichi Koizumi, Youichi Shinozaki

Department of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, University of Yamanashi

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

Abstract

Glial cells change their characteristic features in responses to various brain insults. Thus, these changes affect brain functions. However, effects of chemicals or other hazardous environmental molecules including methylmercury (MeHg) on glial functions/dysfunctions remain largely unknown. Previously, we showed that MeHg (~3 μ M)-induced release of ATP, followed by activation of P2Y1 receptors, production of IL-6 in astrocytes, which in turn protected neuronal cell death against MeHg. However, it has remained unknown whether such responses occur in situ. Here, we showed that these neuro-protective action by astrocytes occurred in situ slice culture system. Hippocampal slice cultures were stimulated with MeHg (0.1- 3 μ M), and then, their neuronal damages were accessed by a PI staining method. MeHg elicited neuronal damages in the hippocampus, which was increased by inhibition by either fluorocitrate, MRS2179 or anti-IL-6 antibody, suggesting that astrocytic activation, P2Y1 receptor activation or IL-6, respectively, have neuro-protective roles against MeHg. These results are well accordance with those obtained from dissociated culture system we previously showed. In addition, using P2Y1 receptor-transgenic mice, and we deleted (P2Y1-astro-OFF) or over-expressed (P2Y1-astro-ON) P2Y1 receptors in astrocytes. The MeHg-evoked neuronal damages were enhanced by P2Y1-astro-OFF but decreased by P2Y1-astro-ON, suggesting that astrocytic P2Y1 receptor should be a key molecule that show neuro-protection against MeHg.

VI メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究

研究課題名 メチル水銀曝露による神経症状の治療に関する研究

主任研究者 西澤 正豊 新潟大学脳研究所・教授

研究要旨

メチル水銀曝露による神経障害の根本的な治療法は確立されていない。そこで、新潟水俣病の患者を対象に、感覚障害に関して、治療効果が期待できるプレガバリンによる臨床試験を行った。

研究デザインは対象が少数であることから準臨床試験とし、非ランダム化、非盲検化、無対照群で実施した。プレガバリン150 mg/日の内服後6週間、及び内服終了後4週間の時点で感覚障害に対する効果を評価した。65名の「新潟水俣病」患者の協力を得、このうち45名がプレガバリンの内服を希望したが、肝・腎機能障害、高度の糖尿病の合併、あるいは感覚障害を認めない等の理由で11名が除外され、34名に対しプレガバリンの内服試験を行なった。このうち7名が副作用を訴えたため内服を中断し、最終的に27名（男16名、女11名；70.5±7.9歳（49～82歳））が合計12週間の経過観察を完了した。

自覚的改善は16/27名（59%）でみられた。visual analogue scaleの評価では、治療前後で有意な痛みの改善が認められ（ $P=0.012$ ）、痛みを訴えた23名中9名（39%）で痛みが消失した。しびれ感については有意な改善は認めなかった（ $P=0.204$ ）。一方、副作用の出現頻度が21/27名（78%）と高く、眠気やめまい・ふらつきが多かった。最終的に20/27名（74%）が内服の継続を希望した。

以上の結果から、プレガバリンはメチル水銀曝露後の痛みに対し有効であると考えられるが、使用にあたってはふらつき等の副作用に注意する必要がある。

キーワード: 新潟水俣病、感覚障害、神経因性疼痛治療薬、臨床研究、プレガバリン

研究者協力者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

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

I 研究目的

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

本研究では、「新潟水俣病」患者等を対象に、感覚障害に対して症状の緩和が期待できる神経因性疼痛治療薬プレガバリンを用いた臨床試験を実施し、水俣病の感覚障害に対する治療効果を探索した（末尾に引用文献を示す）。臨床試験は無作為対照試験で実施することが望ましいが、先行研究がないこと、症例集積の困難性、合併症の多様性、時間的制約等を考慮し、今回の試験は対

照群を設定しないpilot studyに留めた。

II 研究方法

対象は「新潟水俣病」患者とし、プレガバリン内服開始の選定基準としては、しびれ感ないし痛みを認め、かつプレガバリン内服を希望する者とした。高度の肝・腎機能障害、高度の糖尿病、感覚障害を認めない症例、およびすでにプレガバリンを内服している2症例は除外した。

まず対象が現在有する神経症候、および現在行われている治療法を把握した。神経症状については、問診、神経学的診察、神経伝導検査（尺骨神経、後脛骨神経、腓腹神経）を行い、さらに糖尿病、変形性脊椎症などの併発症による症状も調査した。

プレガバリンは75 mg/日から開始し、2週後に150 mg/日（朝夕食後）に増量し、開始後8週間の時点で、しびれ感・痛みに対する自覚的な効果、しびれ感・痛みに対するvisual analogue scale (VAS)、疼痛生活障害評価尺度（Pain Disability Assessment Scale : PDAS）、および副作用について確認した。その後、4週間の休薬の後に再度、しびれ感・痛みに対するVASを確認し、さらに内服継続の希望の有無を確認した。

(倫理面への配慮)

本研究は臨床研究として、新潟大学倫理委員会より承認を得た。本研究で扱う試料（情報）については、研究内容が本研究への参加に同意した「新潟水俣病」患者等に、新潟大学医歯学総合病院神経内科外来にて神経学的診察、血液検査、神経伝導検査を実施するものであることから、カルテ、血液、生理検査データは当科外来に受診する他患者と同じ取り扱いとなる。インフォームド・コンセントについては、研究参加者本人より文書で同意を取得した。インフォームド・コンセントの受領に係る書類は、新潟大学倫理委員会に本研究申請書と同時に提出し、併せて承認を得た。その他の倫理面への配慮として、臨床研究は厚生労働省の指針に従い、個人のプライバシーの保護には細心の注意を払い、結果の公表に際して個人が特定されないようにした。

III 研究結果

65名の「新潟水俣病」患者が参加し、このうち45名が内服を希望した。しかし、肝・腎機能障害、高度の糖尿病の合併、感覚障害を認めない、すでにプレガバリンを内服している等の理由で11名が脱落し、34名に対してプレガバリンの投薬を行なった。このうちさらに7名が副作用を訴えて内服を中断し、最終的に27名（男16名、女11名；70.5±7.9歳（49～82歳））が8週間の内服と内服中止後の4週間の経過観察を完了した。

併発症としては、糖尿病を7/27名（26%）、変形性脊椎症を10/27名（40%）で認めた。神経症候としては、四肢のしびれ感を27/27名（100%）、四肢の痛みを23/27名（85%）、視野狭窄を3/27名（12%）、眼球運動障害を5/27名（19%）、四肢失調を9/27名（35%）、体幹失調を9/27名（36%）、2点識別覚障害（>3cm）を21/27名（78%）で認めた。神経伝導検査では尺骨神経、後脛骨神経、腓腹神経では一部の症例に軽度の神経伝導速度の低下を認めた。しびれ感・痛みに対する治療の現状に関しては、内服薬による治療が8/27名（30%）で行われ、カルバマゼピン、芍薬甘草湯、ビタミンB製剤、鎮痛剤等が使用されていた。リハビリテーションは7/27名（26%）で行われていた。

プレガバリン内服開始 8 週間後に行なった評価では、しびれ感・痛みに対する自覚的改善は 16/27 名 (59%) で認められた。VAS の評価ではしびれ感については治療前の 5.3 ± 2.2 が 4.6 ± 2.4 に減少したが、有意差は認めなかった ($P = 0.204$; 対応のある t 検定)。一方、痛みについては、 4.7 ± 3.1 が 3.1 ± 2.9 に有意に改善し ($P = 0.012$; 対応のある t 検定)、さらに痛みを訴えた 23 名中 9 名 (39%) では痛みが消失した。PDAS も治療前の 24.8 ± 11.3 が 16.5 ± 11.7 に改善した ($P = 0.002$; 対応のある t 検定)。また内服を終了して 4 週間後の評価では、しびれ感・痛みとも増悪した。一方、副作用の頻度が 21/27 名 (78%) と高く、眠気やめまい・ふらつきが多かった。最終的に 20/27 名 (74%) が内服の継続を希望した。

IV 考察

プロトコルを完了した 27 名における検討では、自覚的改善は 59% と高く、さらに VAS および PDAS を用いた評価にて、痛みに対する改善効果を確認した。一方、しびれ感については有意な改善は認めなかった。これらの知見は、プレガバリンのもつ末梢神経障害性疼痛に対する抑制作用がメチル水銀曝露に関連する感覚障害 (痛み) においても有効であることを示唆している。しびれ感については、他の薬剤の有効性を検討する必要がある。

本研究の問題点としては、対照群を設定しない pilot study であること、並びに研究開始後の脱落が多かったことが挙げられる。後者については、副作用として眠気やめまい・ふらつきが多かったことが影響していた。しかし、最終的にプレガバリン内服希望者が 20/27 名 (74%) に達したことから、副作用より有効性が勝った例が多いものと考えられる。今後プレガバリンによる治療を継続する場合には、副作用の出現に十分に注意して治療を行う必要がある。

V 結論

「新潟水俣病」患者を対象に、治療法の開発が求められている感覚障害に関してプレガバリンによる臨床試験を行い、内服開始 8 週間において痛みに対する有効性を確認した。この成果は、一定の効果が期待される治療法の普及に繋がることから、その社会的意義は大きいものと考えられる。

この研究に関する現在までの研究業績

なし

引用文献

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

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

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

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

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

Evaluation of therapeutic efficacy of pregabalin in neuropathic pain of Niigata Minamata disease

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

Department of Neurology, Brain Research Institute, Niigata University

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

Abstract

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

Objective: To evaluate therapeutic efficacy of pregabalin in the severe sensory disturbance and/or neuropathic pain of Niigata Minamata disease.

Methods: The study was conducted as a single center, single dose, non-randomized, non-blinded, non-controlled trial because of insufficient participants. We evaluated the efficacy of 150 mg daily of pregabalin in the sensory disturbance and/or neuropathic pain at both 6 weeks after initiation of therapy and 4 weeks after completion of therapy. A total of 65 patients with Niigata Minamata disease cooperated with this study. Although 45 patients wanted to enroll this clinical trial, 11 patients were excluded because of dysfunction of the liver or kidney, severe diabetes, or lack of neuropathic pain. Among 34 patients, 7 patients were discontinued therapy because of adverse effects. Eventually, 27 patients (16 male, 11 female; 70.5 ± 7.9 years (49-82years) completed 12 weeks observation period.

Results and discussion: Subjective improvement was observed in 16 out of 27 patients (59%). There was a significant improvement in visual analogue scale (VAS) scores of neuropathic pain before and after therapy with pregabalin ($P = 0.012$), and 9 out of 23 patients with neuropathic pain patients felt completely painless after therapy. In contrast, there was no significant improvement in VAS scores of sense of numbness before and after therapy ($P = 0.204$). Adverse effects were frequently reported (21 out of 27 patients; 78%), such as sleepiness and dizziness. Finally, 20 out of 27 patients (74%) wanted to continue pregabalin therapy.

Conclusion: The present study revealed the therapeutic efficacy of pregabalin in amelioration of neuropathic pain of Niigata Minamata disease, although adverse effects such as sleepiness and dizziness need to be paid attention.

平成 24 年度
メチル水銀・カドミウム研究ミーティング

講演要旨集

期間：2011 年 12 月 19 日

会場：東京国際交流館 3 階 プラザ平成 メディアホール

主催：環境省

プログラム

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

12月19日(水)

9:00 開会(事務局)
9:00~9:10 挨拶(環境省)
9:10~9:15 発表会進め方説明(事務局)

■第1部 特別講演

座長 永沼 章(東北大薬・教授)

9:15~10:15 佐藤 政男 カドミウム等の金属による脂肪組織における毒性発現
(徳島文理大・名誉教授)

10:15~10:30 休憩

■第2部 一般講演「カドミウムによる健康影響と毒性メカニズム」

座長 熊谷 嘉人(筑波大医学医療・教授)、黄 基旭(東北大院薬・講師)

10:30~11:00 演題1 堀口兵剛 カドミウムの経口曝露を受けた農家で観察された腎尿細管機能障害とメタロチオネインの関与
(秋大院医・准教授)

11:00~11:30 演題2 佐藤 雅彦 カドミウムの腎毒性発現に関わる標的分子
(愛知学院大薬・教授)

11:30~12:00 演題3 姫野 誠一郎 カドミウム耐性および輸送の機構 —古くて新しい謎—
(徳島文理大薬・教授)

12:00~13:00 昼食

■第3部 一般講演「メチル水銀による健康影響と毒性メカニズム」

座長 鍛冶 利幸(東京理科大薬・教授)、臼杵 扶佐子(国水研・部長)

13:00~13:30 演題4 藤村 成剛 メチル水銀の選択的細胞傷害 —マイクロダイセクション法を用いた各種神経細胞における抗酸化酵素の発現解析—
(国水研・室長)

13:30~14:00 演題5 小泉 修一 メチル水銀毒性とグリア細胞 —ATP シグナルによるミクログリア-アストロサイト-神経細胞連関—
(山梨大院医工総合・教授)

14:00~14:30 演題6 森 信子 ミトコンドリア機能から見たメチル水銀毒性
(熊本大院生命科学・助教)

14:30~14:45 休憩

■第4部 若手発表「メチル水銀・カドミウム研究の新展開」

座長 堀口 兵剛 (秋田大院医・准教授)

- 14:45～15:00 発表1 李 辰竜
(愛知学院大薬・助教) カドミウムによる鉄吸収阻害の分子機構
- 15:00～15:15 発表2 杜 可
(東北大院薬・院生(D3)) カドミウムによる小胞体ストレス誘導：小胞体関連分解系(ERAD)の関わり
- 15:15～15:30 発表3 藤代 瞳
(徳島文理大薬・助教) 消化管由来Caco-2細胞におけるカドミウム輸送機構 —消化管におけるカドミウム吸収における亜鉛輸送体の役割—
- 15:30～15:45 発表4 本田 晶子
(京大院工・特定研究員) カドミウム毒性に対するメタロチオネイン-IIIの関与

座長 佐藤 雅彦 (愛知学院大薬・教授)

- 15:45～16:00 発表5 外山 喬士
(筑波大医学医療・博士研究員) メチル水銀による細胞内鍵分子のS-水銀化に起因する未知シグナル伝達経路の探索
- 16:00～16:15 発表6 岩井 美幸
(東北大院薬・学振特別研究員) 母乳を介したメチル水銀ばく露量の算出
- 16:15～16:30 発表7 柳沼 梢
(尚絅学院大総合人間科学・講師) 低濃度メチル水銀の成人期ばく露による心拍変動への影響
- 16:30～16:45 発表8 龍田 希
(東北大院医・助手) 周産期におけるメチル水銀ばく露が生後7ヶ月および18ヶ月の発達におよぼす影響 —沿岸都市に住む母子を対象に—

16:45～16:55 閉会の挨拶 (環境省)

特別講演

カドミウム等の金属による脂肪組織における毒性発現

○佐藤 政男、川上隆茂、門田佳人、鈴木真也（徳島文理大・薬学）

1 はじめに

カドミウム（Cd）の日本の現代における毒性学的意義はなんだろうか。

Cdの摂取が、腎尿細管障害を引き起こすことは詳細に研究されている。最近では、三浦らはバイオリズムによる作用発現変動があること、昼夜勤務の曝露時の障害発現防止も考慮すべきことを示唆している。さらにCd曝露は、生体の糖代謝異常や高血圧を引き起こす可能性が示唆され、また、疫学調査では、2型糖尿病患者において血中の抗メタロチオン（MT）抗体量が多いという報告もされ¹、Cd曝露が生活習慣病リスクの増加に寄与することが考えられる。

生体のエネルギー恒常性維持には、肝臓、骨格筋および白色脂肪組織（WAT）における糖代謝能や脂質代謝能が重要である。中でもWATは、脂質蓄積だけではなく、生体の恒常性維持に寄与する生理活性物質（アディポカイン）を分泌する内分泌器官である。各種のアディポカイン分泌バランスの乱れが生活習慣病を惹起させることが報告されている。

カロリーの過剰摂取などにより肥満が生じ、脂肪細胞が肥大化すると、インスリン感受性を低下されるアディポカインが相対的に血中に出やすくなり、糖尿病などを発症させると考えられている。ところが日本人は重度の肥満でないにもかかわらず糖尿病となっているケースも多い。その機序は遺伝子的な背景もありうるが、詳細は不明である。また、脂肪細胞が小型であってもアディポカイン分泌の乱れがおこる可能性も考えられる。そこで我々は脂肪細胞のサイズとアディポカイン分泌に影響を与える因子として（1）ストレス、（2）有機化合物、及び（3）無機性物質に

ついて検討してきた。ここでは、Cdを中心として金属の脂肪細胞への影響を報告する。

2 Cd毒性発現の形状

最初に、Cdはどのように毒性を発現するかを検討した。一般的に長期間のCd曝露の後に障害が発現する。このCd毒性の軽減にはメタロチオン（MT）が大きく寄与し、また、Cdは多くのMT誘導因子中で最大の誘導能を有する。長期曝露によるCd障害は、誘導されたCd-MTが細胞に取り込まれた後に分解された後に遊離Cdを放出し、その蓄積により毒性が発現することを明らかにした。このことはCd毒性発現度は、Cd蓄積量と単純に比例しないことを示している。この基本点をおさえておくことが必要である。

3 Cdの毒性

3-1 Cdによる血糖上昇作用

Cdをマウスに投与すると血糖を上昇させ、容易に低下しにくい作用を示した。インスリンレセプター発現に対する作用の可能性はある。

3-2 アポトーシス誘導

Cdは血球系細胞に障害を与えるとされている。そこで、HL-60（ヒト前骨髄性白血病）細胞を用いて無機水銀（Hg）と比較しつつ、Cdが与えるアポトーシス誘起能について検討した。

アポトーシスの経路には、ミトコンドリア、小胞体やdeath receptorを介する系などがある。Cdはミトコンドリア膜を開口させてcytochrome cを遊離させ、同時にcaspase-9の活性化させアポトーシスを誘導することが認められた²。

無機HgもCdと同じようにcytochrome c

を遊離し、ミトコンドリア依存的経路を介して DNA を断片化した。

我々は、Cd は曝露初期に細胞内カルシウム量を上昇させるが、それはカルシウムキレーターを用いた系によっても確認した。また、Hg は p38 MAPK 活性化させた。その下流で caspase-1, 8, 9 を活性化させてアポトーシス誘導することを見いだした。

4 Cd が脂肪組織に影響を与える可能性

肥満は様々な疾患を発症させるリスク要因であり、肥満発症には遺伝子要因と環境要因があるとされる。

特に皮下脂肪組織よりも腹部臓器周辺の白色脂肪組織が増大し、メタボリックシンドローム状態となる。

肥満化した脂肪組織では小胞体ストレスや酸化ストレスなどが起こり、糖尿病や循環器疾患、発がんなど多種の生体影響が発現する。

マウスに Cd を曝露させると、肝臓重量には影響を与えない用量において、脂肪組織重量や脂肪細胞サイズを減少させた。その時の脂肪組織中の Cd 濃度は、肝臓に比べて 1/500 程度と極めて少量だった³。

高脂肪食を摂取させたマウスは、脂肪細胞サイズの肥大化に伴い、脂肪組織重量は増大して肥満となる。このことはアディポカイン分泌の乱れを生じさせる(表 1)。実際、脂肪細胞サイズの肥大化によりインスリン感受性亢進因子のアディポネクチンは減少し、インスリン感受性低下因子のレジスチンと TNF α は増大する。この脂肪細胞のサイズは、正常化するとその分泌の乱れも改善される。

一方 Cd を曝露すると脂肪細胞サイズは、小型化してその数が増大した。脂肪細胞サイズの小型化により、機能の正常化が期待されたが、レプチンやアディポネクチン発現はむしろ抑制された。従って、これは生理的に正常な脂肪細胞の小型化ではないことを示唆した。

生体状態		正常	肥大化	Cd
脂肪細胞サイズ		小	巨大化	極少化
	亢進因子	Adip	Adip ↓	Adip ↓
インスリン感受性		均衡		
因子遺伝子発現度	抑制因子	TNF α	TNF α ↑	TNF α ↑
		Res	Res ↑	Res ↓
Adip:adiponectin, Res:resistin				

4 Cd と MT の関係

このような Cd の脂肪細胞における作用発現が Cd-MT の状態でも発現するのか、Cd⁺⁺もしくは Cd-MT から遊離した Cd⁺⁺が作用を示すのかを知るため、I および II 型 MT を欠損させたマウスを用いて検討した。

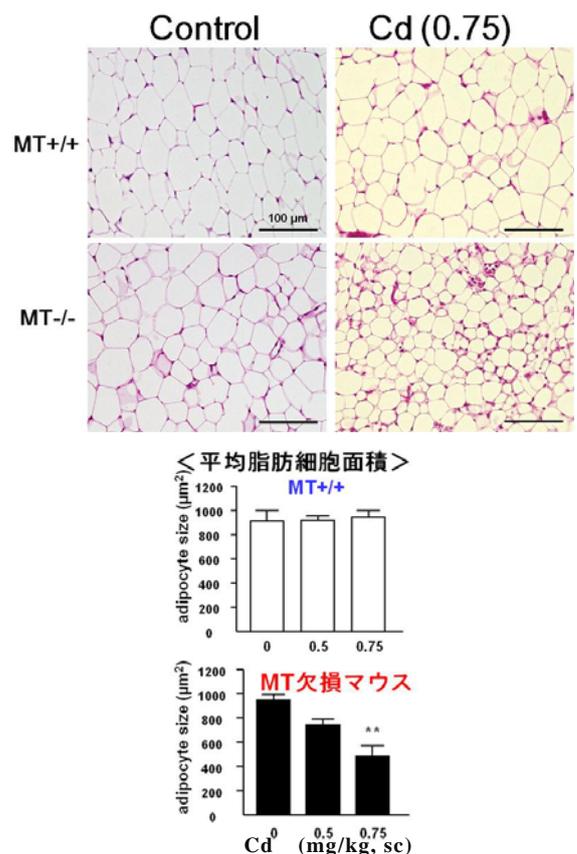


図 1 MT 欠損マウスへの Cd 投与による脂肪細胞の小型化
各投与量を連続 7 日間、皮下投与

野生型マウスでは脂肪細胞サイズに変化がおこらないような投与量を用いた場合でも、MT 欠損マウスでは著しい脂肪細胞の小型化が見られた (図 1)。

Cd連続曝露したMT欠損マウス白色脂肪組織内には、浸潤マクロファージが増加し、Cdは脂肪組織に炎症を引き起こし易い事を示唆した。この状態では MCP-1、IL-6、TNF- α などの炎症関連因子の遺伝子発現を増大させた (図 2)。これらは Cd⁺⁺ によって生じることが示唆された。

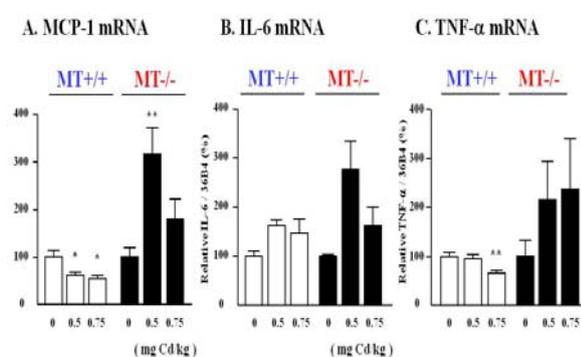


図 2 Cd 曝露による野生型、MT 欠損マウスにおける炎症関連因子の遺伝子発現

脂肪細胞の数に關与する PPAR γ 、脂肪細胞のサイズを大きくする肥大化因子 MEST mRNA 発現、また、エネルギー代謝や食欲に關与する leptin は、野生型、MT 欠損型の両系統マウスで Cd 用量依存的な低下を示し、① Cd の影響を受けること、② Cd-MT でも作用を受ける可能性、③ Cd⁺⁺ が作用する可能性を示唆した。

腎臓中 Cd は、年齢が増えると増大し、それに伴い MT が誘導される。しかし、Yoshida らは、日本人の中で高年齢になっても MT がほとんど増大しない人々の存在を報告し⁴、MT 誘導能力の低い人集団が存在する可能性を示唆した。このような集団は MT 欠損マウスでみられたように Cd による影響を受けやすいのかもしれない。我々は雌性野生型マウスでは高脂肪食摂取で肥満にはならない条件

でも Cd 毒性防御の中心をなす MT が欠損したマウスでは高脂肪食摂取により肥満になることを報告した⁵。

5 Cd による脂肪細胞縮小のメカニズム

我々は、MT 欠損マウス脂肪組織由来幹細胞株を樹立し解析に用いた。Cd による脂肪細胞小型化は、脂肪細胞の分化・増殖の抑制、成熟脂肪細胞形成期の脂肪の取り込みの抑制、脂肪分解亢進などが考えられる。

今回は脂肪分解亢進の可能性について検討した。脂肪滴周囲に存在してリパーゼによる脂肪分解から脂肪を保護するタンパク質ペリリピンが、Cd 曝露によりリン酸化され、脂肪分解が開始される事を明らかにした。

6 Cd 以外の金属の脂肪組織への影響

6-1 水銀、ヒ素、コバルト、マンガン

Hg, As, Co, Mn の 4 種の元素も脂肪細胞を縮小化させる作用を有することを見出した。しかし、Hg と As は、正常化を越えた過度の縮小化と機能障害を伴ったが、Co はサイズの正常化と糖代謝機能の亢進作用を示した⁶。

6-2 亜鉛

Cd と同様に、高脂肪食を摂取中の肥満形成期に亜鉛 (Zn) を曝露させると、脂肪組織と脂肪細胞のサイズを減少させた。しかし、Cd は、脂肪細胞の機能障害、Zn は機能正常化という異なる作用を示した。

7 総括

Cd が脂肪組織、脂肪細胞へいかに作用を与えるか、生活習慣病へのリスク要因となる可能性を検討した。同時に Cd 以外の Hg, As, Co, Mn など必須および非必須元素、さらに Cd と強い拮抗作用を有する Zn とともに検討した。

Cd は、低濃度で脂肪組織に作用し、脂肪脂肪を正常サイズに戻すのではなく、過度に縮小化させる作用を有することが明らかとなった。

さらに Cd は組織中のレプチンやアディポネクチン遺伝子の発現の発現を抑制し、TNF α 、IL-6 や MCP-1 などの炎症性因子発現を誘導した。すなわち、肥満時には脂肪細胞の過剰な肥大化によって、様々な疾病に関与するアディポカインの分泌破綻や炎症性サイトカインの分泌亢進が認められるが、Cd 曝露は脂肪細胞の過剰な小型化を引き起こし、上記に示した生理活性物質など発現のかく乱を引き起こすことが本研究で示された。

日本人は、Cd 摂取量が多い傾向にあり、MT 誘導能に個人差がある可能性もある。Cd が脂肪細胞に関与した疾病発現を修飾する可能性を考慮する必要がある。

引用文献

1. Chen L., Lei L., Jin T., Nordberg M., Nordberg GF. Plasma metallothionein antibody, urinary cadmium, and renal dysfunction in a Chinese type 2 diabetic population. *Diabetes Care* 2006, **29**, 2682-7.
2. Kondoh M., Araragi S., Kato K., Sato M., Higashimoto, M., Takiguchi M. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation, in HL-60 cells. *Toxicology* 2002, **170**, 111-117.
3. Kawakami T., Sugimoto H., Furuichi R., Kadota Y., Inoue M., Setsu K., Suzuki S., Sato M. Cadmium reduces adipocyte size and expression levels of adiponectin and Peg1/Mest in adipose tissue, *Toxicology* 2010, **267**, 20-26.
4. Yoshida M., Ohta H., Yamauchi Y., Seki Y., Sagi M., Yamazaki K., Sumi, Y. Age-dependent changes in metallothionein levels in liver and kidney of the Japanese. *Biol Trace Elem Res* 1998, **63**, 167-175.
5. Sato M., Kawakami T., Kondoh M., Takiguchi M., Kadota Y., Himeno S., Suzuki S. Development of high-fat-diet-induced obesity in female metallothionein-null mice, *FASEB J.* 2010, **24**, 2375-84.
6. Kawakami T., Hanao N., Nishiyama K., Kadota Y., Inoue M., Sato M., Suzuki S., Differential effects of cobalt and mercury on lipid metabolism in the white adipose tissue of high-fat diet-induced obesity mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012, **258**, 32-42.

一 般 講 演

講演 1

カドミウムの経口曝露を受けた農家で観察された腎尿細管機能障害と メタロチオネインの関与

○堀口兵剛（秋田大院医、環境保健学）

1. はじめに

平成 19 年度の国立医薬品食品衛生研究所の調査結果によれば、日本人のカドミウム（Cd）摂取のうち米由来のものが最も多く、約 40%を占める。しかし、我が国では食品衛生法の規定に基づいて米中 Cd 濃度の規格基準が 0.4ppm と決められているため、一般消費者が過剰な Cd 経口曝露を受ける危険性は今日ではほとんどないと考えられる。

ところが、国内には鉱山や製錬所などの影響で土壌中 Cd 濃度の高い農村地域が多数存在し、そこで生産された米の Cd 濃度は基準値を超える危険性がある。そして農家は Cd 濃度を測定していない自家産米を摂取していることが多いため、そのような地域の農家が実は Cd 経口曝露のハイリスクグループであると言える。

秋田県ではかつて大小の鉱山が多数活動していたため、その影響で土壌中 Cd 濃度の高い農村地域が広範囲に存在する。実際に Cd に係る農用地土壌汚染対策地域（すなわち、生産される米の Cd 濃度が 0.4 mg/kg を超えると認められる地域）の指定件数、指定面積はともに秋田県が全国最多である（表 1）¹⁾。従って、Cd 濃度の高い自家産米の継続的な摂取により過剰な Cd 経口曝露を受けた農家も多数存在すると推測される。

表 1 Cd に係る農用地土壌汚染対策地域

都道府県	指定件数	指定面積 (ha)
秋田	25	1771.8
富山	3	1630.1
群馬	2	519.9
石川	1	518.6
山形	3	297.6
愛知	3	244.9
福岡	2	223.4

岐阜	2	221.0
三重	1	168.9
兵庫	4	161.9
島根	2	132.7
福島	1	112.0
宮城	2	72.4
長崎	1	57.8
熊本	2	55.0
宮崎	1	53.3
岩手	2	49.9
京都	1	44.2
茨城	2	30.7
大分	1	27.7
長野	1	20.1
栃木	1	14.6

注 1: 平成 22 年度農用地土壌汚染防止法の施行状況より引用。

注 2: 解除地域も含む。

演者らの秋田大学の研究グループは、上記の Cd 曝露のハイリスクグループと考えられる秋田県内の農家を対象に近年疫学調査を行ったところ、やはり鉱山の近隣の農村地域で米作を営む農家では血中・尿中 Cd 濃度が高く、しかも腎尿細管機能への影響も現れていることが判明した^{2,3)}。

ところで、Cd 曝露によりメタロチオネイン（metallothionein ; MT）という低分子量蛋白質の産生が肝臓や腎臓で誘導されるが、これは Cd と結合してその体内運搬や毒性軽減などの働きをしている⁴⁾。一方で、MT は Cd による腎尿細管機能障害との関連も指摘されているが、高度の Cd 曝露を受けた実際のヒトの集団での研究報告はいまだ限られており、詳細はいまだ明らかではない⁵⁾。

今回、秋田県の自家産米摂取により高度の Cd の経口曝露を受けた農家の集団における疫学調査により観察された腎尿細管機能障害の実態及びそれに対する MT の関与について報告する。

2. 対象と方法

当該研究は秋田大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会から承認を得て行われた（受付番号：761；課題名：自家産米摂取によってカドミウムの経口曝露を受けた農家の集団における疫学研究；研究責任者：堀口兵剛）。

平成 21 年から 23 年にかけて、秋田県内の過去に上流の鉱山から影響を受けたと考えられる農村地域において、影響の度合いが異なることが推測される 4 つの水系から 12 部落を選択し、40 歳以上の男女農家を対象に健康診断の受診を依頼した。具体的には、地元の JA や部落代表者の協力により、自治会館での説明会や戸別訪問などを通して受診の勧誘を行い、受診希望者からはインフォームド・コンセントを得た。

健康診断では身長・体重測定、採血・採尿、質問票による居住歴・米摂取歴・病歴等の聴取、自家産米の回収、等を行った。Cd 曝露の指標として血中・尿中・米中 Cd 濃度を ICP/MS (Agilent 7500ce) によって測定した。腎尿細管機能の指標として尿中 α_1 -ミクログロブリン (α 1MG)、 β_2 -ミクログロブリン (β 2MG) をラテックス凝集比濁法によって測定した。尿中の MT 濃度の測定は、「Metallothionein ELISA キット」(株式会社フロンティア研究所) を用いて行った。尿中物質の濃度はクレアチニン濃度によって補正した。

3. 結果と考察

当該地域における対象者は 1,382 人であったが、975 人（男性 431 人、女性 544 人、39-95 歳、39 歳の女性 2 人を含む）が健康診断を受診し、受診率は 70.5% であった。

自家産米は平成 22、23 年に受診者の各世帯から計 370 サンプルを回収した。その中には基準値以上の Cd 濃度の米はまったく見ら

れなかったが、それは近年米中 Cd 濃度を低減するために実施されている湛水管理（8 月の稲の出穂期に田に水を張る）によるものと考えられた。

調査対象部落を鉱山からの影響のレベルが異なると予想される 4 つの水系に分け、Cd 曝露レベルとその腎尿細管機能への影響について水系間で性別・年齢別の比較を行った。血中・尿中 Cd 濃度は、いずれの水系においても男女ともに高齢になるにつれて高い値を示す傾向にあった。そして、より鉱山の近くに位置する水系の方が、そうでない水系よりも血中・尿中 Cd 濃度のレベルが高く、特に腎尿細管機能障害発症の閾値とされている尿中 Cd 濃度 10 $\mu\text{g/g cr.}$ を超える人の割合は、直近に鉱山のあった水系の女性で最も多く、1/4 近くを占めていた。また、尿中 α 1・ β 2MG 濃度については、60 歳未満では水系間の差は男女ともに明確ではなかったが、70 歳以上の女性では直近に鉱山のあった水系の尿中 α 1MG 濃度、尿中 β 2MG 濃度ともに他の水系と比較して高い値を示した。

全部落の受診者を統合して検討すると、血中・尿中 Cd 濃度はともに高齢者で高い値を示しており、特に 70 歳を超える女性の高齢者の中には Cd による腎尿細管機能障害、すなわちカドミウム腎症が疑われる人（尿中 β 2MG 濃度が 10,000 $\mu\text{g/g cr.}$ 以上）が数人見つかった。従って、やはり当該地域の農家は過去に高度の経口 Cd 曝露を受けたために体内に Cd が高度に蓄積しており、その中でも特に高齢の女性において腎尿細管機能への影響が現れているものと考えられた。

尿中 MT 濃度と血中・尿中 Cd 濃度との関係を散布図で検討したところ、尿中 MT 濃度は男女ともに Cd 曝露レベルに応じて高くなる傾向が見られた。但し、Cd 曝露レベルが高度になると両者の関係は横ばい状態となるため、Cd 曝露に対する MT 産生には上限が

存在することが示唆された。また逆に、Cd 曝露レベルがそれ程高くないにも拘らず非常に高い尿中 MT 濃度を示す「高 MT 産生者」が存在することも示唆された。

尿中 MT 濃度を従属変数に、年齢、尿中 Cd 濃度、尿中 α 1MG 濃度あるいは尿中 β 2MG 濃度を独立変数にとった重回帰分析を男女別に行ったところ、年齢はいずれの重回帰モデルにおいても有意ではなかったが、尿中 Cd 濃度と尿中 α 1・ β 2MG 濃度は常に有意な正の回帰係数を示した。従って、Cd 曝露による尿中への MT 排泄増加には、Cd による MT の産生誘導作用と腎尿細管の再吸収機能低下作用の両方が複合的に働いているものと考えられた。

更に、より精密に MT と腎尿細管機能との関係を観察するために、尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度（同程度の Cd 曝露における MT 産生量、すなわち MT 産生能の指標と考える）と尿中 α 1 MG 濃度、尿中 β 2MG 濃度との関係を散布図で観察した。その結果、高度の尿中 α 1 MG 濃度、尿中 β 2MG 濃度を示す者は尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度の小さい方、すなわち MT 産生能の低い方でのみ存在し、尿中 MT 濃度 / 尿中 Cd 濃度の大きい方、すなわち高 MT 産生者ではそのような者は認められなかった。以上の結果より、Cd 曝露による腎尿細管機能に対する影響には MT 産生能が関与しており、MT 産生能の低い者では高度の Cd 曝露を受けた場合の腎尿細管機能障害の発症リスクが高いことが示唆された。

4. 結論

鉱山の影響により土壤中 Cd 濃度の高い秋田県の農村地域では、近年は湛水管理により米中 Cd 濃度が低減してはいるものの、農家はかつての Cd 濃度の高い自家産米の継続的

な摂取により高度の Cd 曝露を受け、高齢の女性では腎臓への影響も現れていることが判明した。また、そのような農家では尿中 MT 濃度は Cd 曝露レベルに応じて高くなるが、それには Cd による MT の産生誘導作用と腎尿細管の再吸収機能低下作用の両方が複合的に働いているものと考えられた。更に、Cd 曝露による腎尿細管機能に対する影響には MT 産生能が関与しており、MT 産生能の低い者では高度の Cd 曝露を受けた場合の腎尿細管機能障害の発症リスクが高いことが示唆された。

5. 謝辞

当研究は、厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業、研究課題：自家産米摂取によってカドミウム曝露を受けた農家に対する砒素と鉛の複合曝露とその健康影響、課題番号：H22-食品-一般-014）によって行われた。

引用文献

- 1) 環境省水・大気環境局：平成 22 年度農用地土壌汚染防止法の施行状況. 2011.
- 2) Horiguchi H, Oguma E, Sasaki S, Miyamoto K, Ikeda Y, Machida M, Kayama F: Dietary exposure to cadmium at close to the current provisional tolerable weekly intake does not affect renal function among female Japanese farmers. *Environ Res* 95:20-31, 2004.
- 3) 堀口兵剛：日本人のカドミウム曝露の現状 —特に米中カドミウム濃度の基準値及び農家の自家産米摂取による曝露とその近位尿細管機能への影響—, *日本衛生学雑誌* 67:447-454, 2012.
- 4) Kägi JH: Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:613-626, 1991.
- 5) Tohyama C, Mitane Y, Kobayashi E, Sugihira N, Nakano A, Saito H: The relationships of urinary metallothionein with other indicators of renal dysfunction in people living in a cadmium-polluted area in Japan. *J Appl Toxicol* 8:15-21, 1988.

カドミウムの腎毒性発現に関わる標的分子

○佐藤雅彦（愛知学院大学薬学部）

1. 緒言

有害金属であるカドミウムの慢性曝露による主要標的臓器は腎臓であり、近位尿細管障害が特徴的に認められる。しかしながら、カドミウムによる腎毒性発現の分子機構は不明な点が多く、未だ明確にされていないのが現状である。我々は、カドミウムによる腎毒性発現機構を分子レベルで明らかにすることを目的に、Toxicogenomics の手法を活用して腎毒性発現に関与する標的分子の特定を試みている。これまでに、カドミウムがユビキチン転移酵素の 1 つである Ube2d ファミリーの遺伝子発現を抑制することによって p53 依存のアポトーシスを誘導することを見いだした。本講演では、カドミウムの毒性発現に関わる標的分子について、これまでの研究成果を紹介する。

2. DNA マイクロアレイ法を用いたカドミウムによる変動遺伝子の網羅的解析

カドミウムの毒性発現に関わる標的分子を特定するために、ラット腎近位尿細管上皮細胞 (NRK-52E 細胞) を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、50 μM のカドミウムで 4 時間処理することにより *Mt1* や *Hmox1* などのストレス応答遺伝子を含めて 73 遺伝子の発現が上昇し、42 遺伝子の発現が減少した¹⁾。酵母において、ユビキチン転移酵素の一つである UBC4 がカドミウムの毒性発現に関与することが報告されている^{2,3)}。そこで、選択的タンパク質分解系であるユビキチン-プロテアソームシステムに関連する遺伝子に着目したところ、ユビキチン転移酵素の一つであり、UBC4 のホモログである Ube2d4 (表 1) の遺伝子発現がカドミウム

処理によって半減していることが見いだされた¹⁾。Ube2d4 は Ube2d ファミリーに属し、Ube2d ファミリーにはその他に Ube2d1、Ube2d2、Ube2d3 が存在する(表 1)。そこで、カドミウム腎毒性発現に関与する候補遺伝子として *Ube2d* ファミリーに着目し、詳細な検討を行った。

表 1 真核生物における Ube2d ファミリーの相同性

Yeast	Human	Rat	Mouse
	UBE2D1 (UbcH5A)	Ube2d1	Ube2d1
UBC4	UBE2D2 (UbcH5B)	Ube2d2	Ube2d2
UBC5	UBE2D3 (UbcH5C)	Ube2d3	Ube2d3
	UBE2D4 (UbcH5D)	Ube2d4	unconfirmed

3. ラット腎近位尿細管上皮細胞 (NRK-52E 細胞) における検討

まず、NRK-52E 細胞に対するカドミウムの毒性評価を行った。NRK-52E 細胞をカドミウム (2-10 μM) で 3-24 時間処理して、培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) の活性を測定した。その結果、5 および 10 μM のカドミウムで 24 時間処理することによって、LDH 活性の有意な上昇が認められた。さらに、カドミウムで 24 時間処理した細胞をギムザ染色したところ、2 μM のカドミウム処理では形態学的な変化は確認できなかったが、5 および 10 μM のカドミウム処理では、細胞数がコントロールに比べて顕著に減少した。

次に、*Ube2d* ファミリー遺伝子の発現に及ぼすカドミウムの影響を調べた。NRK-52E 細胞をカドミウム (2-10 μM) で 3, 6, 12 時

間処理して、細胞内の *Ube2d1*、*Ube2d2*、*Ube2d3* および *Ube2d4* mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、*Ube2d1*、*Ube2d2*、*Ube2d3* および *Ube2d4* mRNA 量は、いずれもカドミウム 6 時間以上の処理によって顕著に減少することが確認された。しかも、*Ube2d1* と *Ube2d4* の mRNA 量はカドミウム 3 時間処理で有意に減少した。このように、カドミウム処理した NRK-52E 細胞では、毒性が認められる時期より早い時期から *Ube2d* ファミリーの遺伝子発現が抑制されることが判明した (図 1)。

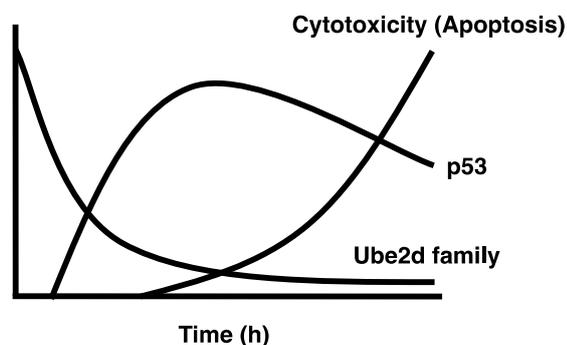
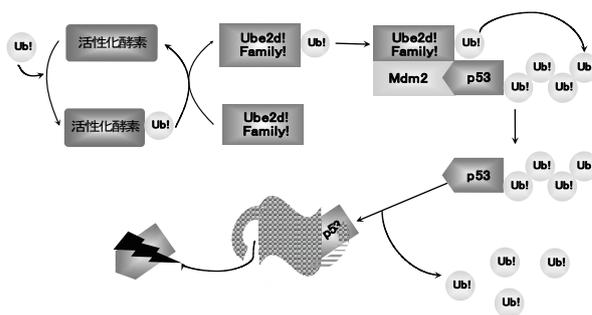


図 1 カドミウムによる *Ube2d* ファミリー遺伝子の発現抑制を介した p53 の過剰蓄積と細胞毒性との関係

Ube2d ファミリーはアポトーシス誘導因子である p53 のユビキチン化に関わることが報告されている⁴⁾ (図 2)。そこで、カドミウム (2-10 μM) 処理後の p53 タンパク質量を p53 EIA Kit を用いて定量したところ、細胞内の p53 タンパク質濃度は、いずれもカドミウム 6 時間処理から増加し始め、12 時間処理では顕著に増加した。以上のように、p53 タンパク質もカドミウムの細胞毒性が出現するよりも早い段階から細胞内での過剰蓄積が引き起こされることが明らかとなり、カドミウムによる p53 の過剰蓄積は、カドミウム毒性の発現に深く関与する可能性が示唆された

(図 1)。

カドミウムによる p53 の過剰蓄積の一因として、カドミウムにより p53 mRNA 量が増加し、p53 の合成が促進されている可能性が考えられる。そこで、カドミウム処理後の細胞内 p53 mRNA 量を測定したところ、p53 mRNA 量は減少傾向にはあったものの増加することはなかった。したがって、カドミウムによる p53 の過剰蓄積に p53 の合成促進は関与しないことが判明した。また、カドミウムによる p53 の過剰蓄積がプロテアソームの阻害による可能性もあることから、プロテアソーム活性に及ぼすカドミウムの影響を検討したところ、プロテアソーム活性はカドミウムによって影響を受けないことが判明した。



Ub: 

図 2 ユビキチン-プロテアソームシステムを利用した p53 タンパク質の分解

p53 はリン酸化されることによって活性化してアポトーシスを誘導することから、カドミウムによるアポトーシス誘導とリン酸化 p53 タンパク質濃度の変動を検討した。NRK-52E 細胞をカドミウム (2-10 μM) で 6-24 時間処理して、細胞を回収し、DNA 断片化をアガロース電気泳動法により観察した。その結果、カドミウムで 24 時間処理した細胞はいずれの濃度においても DNA 断片化が観察され、カドミウムによってアポトーシスが引き起こされることが明らかとなった。特に 5 μM の

カドミウム処理群で顕著な DNA 断片化が認められた。しかも、この時、カドミウム処理によってリン酸化 p53(活性型)が検出され、カドミウムによるアポトーシス誘導には過剰蓄積した p53 のリン酸化が深く関与することが示唆された。

以上の結果より、カドミウムは細胞内で p53 を過剰蓄積させ、その一部がリン酸化されてアポトーシスを引き起こすことが見いだされた⁵⁾(図 1)。カドミウムによる p53 の過剰蓄積は、p53 遺伝子の発現誘導やプロテアソームの機能不全によるものではなく、Ube2d ファミリー遺伝子の発現を抑制することで p53 タンパク質のユビキチン化が阻害され、プロテアソームでの分解が滞ることに起因する可能性が示唆された⁵⁾(図 2, 3)。

4. ヒト腎近位尿細管上皮細胞 (HK-2 細胞)

における検討

HK-2 細胞に対するカドミウムの毒性評価を行うため、HK-2 細胞をカドミウム (20-100 μM) で 6 または 24 時間処理して、AlamarBlue 法により細胞生存率を測定した。その結果、カドミウム 24 時間処理において、40 μM から濃度依存的に細胞生存率の低下が認められた。しかし、カドミウム 6 時間処理は 80 μM まで細胞生存率に影響を与えなかった。次に、p53 タンパク質量と UBE2D ファミリーの遺伝子発現に及ぼすカドミウムの影響を検討した。HK-2 細胞を 40 μM のカドミウムで 18 時間処理したところ、細胞内 p53 タンパク質量の増加が認められた。一方、UBE2D ファミリーのうち UBE2D2 並びに UBE2D4 の mRNA レベルが 40 μM のカドミウム 6 時間処理で有意に減少した。以上の結果より、ヒトの腎尿細管上皮細胞においても、カドミウムは UBE2D ファミリー遺伝子の発現抑制並びに p53 タンパク質の過剰蓄積を引

き起こすことが明らかとなった。

カドミウムによる p53 タンパク質の細胞内蓄積における UBE2D ファミリー遺伝子の関与、およびカドミウムによるアポトーシス誘導における p53 の関与を明らかにするため、siRNA による UBE2D ファミリー遺伝子ノックダウン細胞や p53 ノックダウン細胞を作製した。UBE2D2/UBE2D4 ダブルノックダウン細胞では p53 タンパク質量の増加が認められ、p53 ノックダウン細胞ではカドミウムによるアポトーシス誘導が抑制された。以上の結果より、カドミウムによる UBE2D2 および UBE2D4 遺伝子の発現抑制が細胞内 p53 タンパク質の過剰蓄積を引き起こすこと、並びにカドミウムによるアポトーシス誘導に p53 の過剰蓄積が深く関与することが明らかとなった。

5. カドミウム長期曝露マウスにおける検討

5 週齢雌性 C57BL/6J マウスを 300 ppm のカドミウムを含む固形飼料で飼育し、飼育開始 6 および 12 ヶ月後に、エーテル麻酔下で採血し、腎臓並びに肝臓を摘出した。腎毒性の指標として血清中の尿素窒素およびクレアチニン量を、肝毒性の指標として血清中の GOT 並びに GPT 活性を測定した。その結果、カドミウム長期曝露によって血清中尿素窒素量は僅かに増加したが、クレアチニン量は変化しなかった。血清中の GOT および GPT 活性もカドミウム曝露により若干上昇した。したがって、本研究で行われたカドミウム長期曝露はマウスに軽微な肝毒性および腎毒性を与えることが示された。

次に、腎臓および肝臓中 Ube2d1、Ube2d2、Ube2d3 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。その結果、腎臓中 Ube2d1、Ube2d2 および Ube2d3 の mRNA レベルはカドミウムの長期曝露によって有意に減少し

た。一方、肝臓中の Ube2d1、Ube2d2 および Ube2d3 の mRNA レベルは、6 ヶ月の曝露では変動しなかったが、12 ヶ月の曝露により有意な減少を示した。続いて、腎臓および肝臓中 p53 タンパク質濃度を p53 EIA Kit を用いて測定したところ、腎臓中 p53 タンパク質濃度はカドミウム投与期間依存的に顕著な増加を示したが、肝臓中の p53 タンパク質濃度はカドミウム曝露によって変動しなかった。以上の結果から、カドミウムの長期曝露により腎毒性を引き起こす初期段階で腎臓中 Ube2d ファミリー遺伝子の発現抑制と p53 の過剰蓄積が確認され、*in vivo* においても *in vitro* と同様の結果が得られた。一方、カドミウム長期曝露マウスの肝臓では Ube2d ファミリーの遺伝子発現抑制に伴う p53 タンパク質の増加は認められなかった。

組織での p53 およびアポトーシスの局在を調べるために、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した腎臓および肝臓をパラフィン包埋し、5 μm の連続切片を作成した。抗 p53 抗体を用いた免疫染色により p53 の局在性を、TUNEL 染色によりアポトーシスを検出した。その結果、カドミウム長期曝露によって、腎尿細管特異的に p53 タンパク質が顕著に増加した。しかも、その同一部位にアポトーシスの検出が認められた。一方、カドミウム長期曝露マウスの肝臓では p53 タンパク質の増加およびアポトーシスの検出は認められなかった。以上の結果より、カドミウムは腎尿細管特異的に p53 依存的アポトーシスを引き起こすことが明らかとなった。

6. まとめ

腎近位尿細管上皮細胞やカドミウム長期曝露マウスを用いた検討により、カドミウムは Ube2d ファミリー遺伝子の発現抑制

を介して p53 を過剰蓄積させ、p53 依存的なアポトーシスを誘導することが見いだされた⁶⁾ (図 2, 3)。このように、Toxicogenomics を活用することにより、カドミウムによる腎毒性発現の標的分子として Ube2d ファミリーを見いだすことができた。

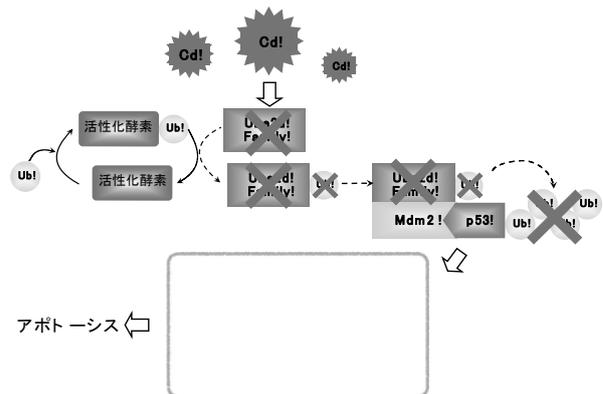


図 3 カドミウムによるアポトーシス誘導における Ube2d ファミリーと p53 の関与

引用文献

- 1) Tokumoto M., Ohtsu T., Honda A., Fujiwara Y., Nagase H., Satoh M. DNA microarray analysis of normal rat kidney epithelial cells treated with cadmium. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 127-129, 2011.
- 2) Jungmann J., Reins H.A., Schobert C., Jentsch S. Resistance to cadmium mediated by ubiquitin-dependent proteolysis. *Nature*, 361: 369-371, 1993.
- 3) 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.*, 82: 1182-1185, 2008.
- 4) Saville M.K., Sparks A., Xirodimas D.P., Wardrop J., Stevenson L.F., Bourdon J.C., Woods Y.L., Lane D.P. Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 279: 42169-42181, 2004.
- 5) Tokumoto M., Fujiwara Y., Shimada A., Hasegawa T., Seko Y., Nagase H., Satoh M. Cadmium toxicity is caused by accumulation of p53 through the down-regulation of Ube2d family genes *in vitro* and *in vivo*. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 191-200, 2011.
- 6) Tokumoto M., Satoh M. Cadmium induces p53-dependent apoptosis through the inhibition of Ube2d family gene expression. *Jpn. J. Hyg.*, 67: 472-477, 2012.

カドミウム耐性および輸送の機構 —古くて新しい謎—

○姫野誠一郎、藤代 瞳（徳島文理大学薬学部）

1. はじめに

イタイイタイ病発見以来 50 年以上がたつが、現在なおカドミウムがどのようにして細胞に取り込まれ、排泄されるのか、という基本的な謎が未解明のまま残っている。カドミウムは、生体に取り込まれると主に腎臓に蓄積するが、腎臓におけるカドミウムの生物学的半減期は 20 年以上とされており、この特異的な蓄積性の高さがカドミウム毒性を特徴付けている。したがって、カドミウムの毒性発現機構、および、それに対する生体の防御機構を解明するためには、カドミウムの輸送機構を明らかにすることが必須である。

本研究者らは、カドミウム耐性細胞の樹立とトキシコゲノミクスの活用によって、カドミウムに対する耐性機構とカドミウム輸送機構の解明を目指してきた。これまでの研究により、カドミウムの細胞への取り込みに亜鉛輸送体ファミリーのうちの ZIP8 と ZIP14 が関与する可能性を明らかにしてきた。また、これらの輸送体が生体内でのカドミウム蓄積に実際どのように関与しているのか、解明を試みている。

2. 腎臓へのカドミウム蓄積におけるメタロチオネインの役割

メタロチオネインは、カドミウムの生体内代謝、毒性軽減に最も重要な役割を果たす生体内因子である。これまでの研究により、分子量が約 6000 という小さなサイズのメタロチオネインは腎臓の糸球体を通過して原尿にろ過されるため、血漿中でメタロチオネインに結合したカドミウムは、メタロチオネインとともに一度原尿に排泄された後、近位尿細

管の管腔から上皮細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれると考えられてきた。実際、近位尿細管上皮細胞の微絨毛に存在するメガリンという分子が関与して、カドミウム-メタロチオネイン複合体 (Cd-MT) がエンドサイトーシスを受けることが様々な研究によって明らかにされている。エンドソーム内で分解されたメタロチオネインから、遊離のカドミウムイオンが細胞質中に放出されると、そこで新たにメタロチオネインの誘導合成が起こり、様々なタンパク質にカドミウムが結合して毒性を発揮するというモデルが提出されている。このように、腎臓へのカドミウムの蓄積機構は Cd-MT のエンドサイトーシスという現象でほぼ明らかになっていた。メガリンは近位尿細管上皮細胞のうち、S1 と S2 の部位に局在するため、カドミウムの腎障害発現部位とも一致する。

しかし、腎臓以外の組織にどのようにしてカドミウムが取り込まれるのかについては、ほとんど分かっていなかった。

3. カドミウム蓄積性の低いカドミウム耐性細胞の樹立

このような状況の中で、本研究者らはカドミウム輸送機構の解明のために、カドミウム耐性細胞を活用する、という手法を考えた。これまで、多くの化学物質の輸送体はその化学物質に対する耐性細胞を樹立することで同定されてきた歴史がある。カドミウムについても、すでに多くの耐性細胞が樹立されていた。しかし、これまで樹立されたほぼすべてのカドミウム耐性細胞において、メタロチオネインの遺伝子の増幅、タンパク質レベルの

増加が観察されていた。しかし、これらの細胞におけるカドミウムの蓄積性を詳細に調べた報告はほとんどなかった。むしろ、メタロチオネインが著しく誘導されるためにカドミウムの蓄積量がかえって高くなっていても、カドミウム耐性を獲得している、と考えられてきた。したがって、カドミウム耐性細胞を樹立することによってカドミウムの輸送機構を解明することは非常に困難に思われた。

そこで、我々は、メタロチオネイン遺伝子をノックアウトしたマウスの胎仔由来細胞を活用してカドミウム耐性細胞を樹立することにした。まず、メタロチオネイン欠損マウス胎仔から得た初代培養細胞に SV40 large T 抗原を導入することによって細胞を不死化した¹⁾。そこで、この細胞の培地中のカドミウム濃度を徐々に上昇させることにより、カドミウムに耐性を示す培養細胞株を複数樹立することができた。

これらのカドミウム耐性細胞株の性質を検討した結果、最も重要な形質の変化は、カドミウムを蓄積しにくい、ということだった。メタロチオネイン欠損細胞からスタートすることにより、我々は世界で初めてカドミウムの蓄積性が低下したためにカドミウム耐性を示す細胞株の樹立に成功したのである²⁾。

カドミウム蓄積量は培地にカドミウムを添加して 24 時間後の変化を観察しているので、取り込みの低下によって蓄積量が減ったのか、排泄が亢進して蓄積量が減ったのかを調べたところ、カドミウム耐性細胞ではカドミウムの取り込み効率が著しく低下していることを見出した²⁾。

生物は、カドミウムのような汚染金属を細胞内に取り込むためのカドミウムに特化した輸送システムを持っているとは考えられない。カドミウムは細胞にとって必須の金属の輸送

システムに相乗りする形で細胞内に入ってくるものと考えられる。したがって、カドミウムの取り込みが著しく低下した細胞では、カドミウム以外の必須金属の取り込み機構が抑制されているために、カドミウムも巻き添えを食って取り込まれなくなるのだろう、という仮説を立てた。そこで、この仮説を検討するため、理化学研究所で開発されたマルチトレーサー法を活用し、20 種類以上の元素の取り込み効率を一斉に測定してカドミウム耐性細胞と親株細胞の間で差があるかどうか調べた。その結果、カドミウム耐性細胞では、マンガンの取り込みが著しく低下していた³⁾。マルチトレーサーではなく、シングルトレーサーとしてマンガンを追加した際にも、カドミウム耐性細胞では、やはりマンガンの取り込みが顕著に低下していた。カドミウムは、マンガンと共通の輸送システムを利用して細胞内に入っている可能性が初めて示された。

その可能性をさらに明らかにするため、親株細胞を用いて、培地にカドミウムとマンガンの両方を添加したときに、それぞれに元素の取り込みが阻害されるかどうか検討した。その結果、親株細胞のみならず、HeLa 細胞や Caco-2 細胞などの他の哺乳動物細胞においても、カドミウムとマンガンの取り込みが相互に阻害されることを見出した。

この細胞を樹立した当時、カドミウムとマンガンの両方を基質とすることができる唯一の金属輸送体として、2 価鉄の輸送体である divalent metal transporter 1 (DMT1) が知られていた。DMT1 は、プロトン共輸送体であり、至適 pH が約 5.5 である。そこで、親株細胞とカドミウム耐性細胞におけるカドミウム取り込みの pH 依存性を比較したところ、親株細胞に比べて、カドミウム耐性細胞では中性付近のカドミウムの取り込みが低下していた。この結果から、我々が樹立したカドミ

ウム耐性細胞で発現が抑制されている金属輸送体は、DMT1 以外の新たな輸送体であろうと考えられた。しかし、この時点では、その実体は不明であった。

4. カドミウム輸送体としての ZIP8 の発見

カドミウム耐性細胞において発現が低下している可能性のある金属輸送体を同定するため、カドミウム耐性細胞と親株細胞の cDNA を用いてマイクロアレイを行った。その結果、カドミウム耐性細胞において、SLC39a14 の発現が低下していることを見出した⁴⁾。SLC39a14 は、Zrt, Irt-related protein (ZIP) ファミリーの ZIP14 をコードする遺伝子である。ZIP ファミリータンパク質は、細胞の中に亜鉛を取り込む輸送体タンパク質である。

そこで、我々は、SLC39a14 と相同性の高い SLC39a8、あるいは他の SLC39a ファミリーの遺伝子発現を調べたところ、SCL39a14 のみならず、SLC39a8 の発現が顕著に減少していること、また、ZIP8 のタンパク質レベルも顕著に減少していることを見出した。同じ頃に米国のグループが、カドミウムを投与しても精巣出血を起こさないマウスの系統と起こす系統との違いの原因となっている遺伝子を検索し、やはり SLC39a8 にたどり着いていた。しかし、これだけでは、ZIP8 がカドミウムの輸送に関与しているかどうか不明である。そこで、我々は ZIP8 の発現を shRNA を用いてノックダウンした際に、カドミウムの取り込みが低下するかどうかを調べた。その結果、ZIP8 の発現抑制によって、顕著にカドミウムの蓄積が低下した⁵⁾。これにより、ZIP8 がカドミウムの取り込みに重要な役割を果たす金属輸送体であることが明らかになった。

さらに、カドミウム耐性細胞において、な

ぜ ZIP8 の発現が低下したのか検討した結果、SLC39a8 遺伝子の CpG island のメチル化が亢進しており、これを 5-azacytidine によって脱メチル化すると、ZIP8 の発現が復活し、カドミウムの蓄積も上昇した⁶⁾。この結果は、耐性細胞を樹立する過程でカドミウムに長期間曝露されることによって、SLC39a8 遺伝子の発現がエピジェネティックな制御によって抑制されたことを示すものである。

我々は、さらにメタロチオネイン遺伝子が発現しているマウス胎仔の不死化細胞からもカドミウム耐性細胞を樹立し、この細胞においても、カドミウムの蓄積が低下していること、その原因として ZIP8 の発現の低下が重要な役割を果たしていること、さらにこの細胞はマンガンの蓄積性も低下してマンガンにも耐性を示すことを明らかにした⁷⁾。したがって、ZIP8 はカドミウムとマンガンの両方を基質とすることのできる亜鉛輸送体であると考えられる。

5. カドミウムとマンガン輸送における ZIP8 の役割

ZIP8 がカドミウムとマンガンの輸送に関与していることをさらに明らかにするため、我々は、カドミウムに高い感受性を示す細胞であるラット好塩基性白血病細胞由来の RBL-2H3 細胞に注目した。この細胞は、カドミウムが非常に蓄積しやすいこと、その原因は ZIP8 の発現が高いこと、さらにマンガンにも高感受性であり、その原因としてマンガンの蓄積性も高いことを見出した⁸⁾。また、ZIP8 siRNA を導入すると、カドミウムとマンガンの取り込み効率が減少するが、その際、特に重炭酸依存的なカドミウムとマンガンの取り込みが減少することも見出した。

我々は、さらに RBL-2H3 細胞からカドミウム耐性細胞とマンガン耐性細胞の両方を樹

立した。仮説として、もし、ZIP8のようなカドミウムとマンガンに共通の輸送体がRBL-2H3細胞でのカドミウムとマンガンの高い蓄積性に重要な役割を果たしているのであれば、そこから樹立されるカドミウム耐性細胞とマンガン耐性細胞は、それぞれに対する交叉耐性を示し、また、共通する性状変化を引き起こすのではないかと考えた。そして、予測通りに、RBL-2H3細胞から樹立したカドミウム耐性細胞はマンガンにも耐性を示し、マンガン耐性細胞はカドミウムにも耐性を示した。さらに、両耐性細胞ともに、ZIP8の発現が低下していた。これらの結果から、ZIP8がカドミウムとマンガンの輸送に重要であることがさらに確認された。

6. 腎臓でのカドミウム輸送におけるZIP8の役割

ここまでの検討結果は、マウスの胎仔由来細胞やラットの白血病細胞などから得られたものである。カドミウムの標的臓器は腎臓であり、腎臓におけるカドミウム輸送に本当にZIP8が関与しているかどうかを確認する必要があった。そこで、マウス近位尿細管上皮細胞を不死化したPT細胞を用いて、ZIP8、ZIP14、DMT1の役割を検討した⁹⁾。さらに、その際、トランスウェルを用いたカップ培養法を活用することにより、近位尿細管上皮細胞の管腔(apical)側と血管(basolateral)側のカドミウムの輸送をそれぞれ調べた。カドミウムの取り込み効率はbasolateral側に比べてapical側からの方が高かった。

そこで、予めPT細胞にZIP8、ZIP14、あるいは、DMT1のsiRNAを導入した後、細胞をトランスウェルに移して培養し、細胞間のタイトジャンクションが十分形成されたことを電気抵抗値の上昇で確認した後、カドミウムの取り込みを比較した。その結果、ZIP8、

あるいはZIP14のsiRNAを導入した際にはカドミウムの取り込みが約50%に低下した。しかし、DMT1 siRNAを導入した際にはほとんどカドミウム取り込みに影響を及ぼさなかった。したがって、ZIP8とZIP14はPT細胞におけるカドミウム取り込みに何らかの役割を果たしているものと考えられる。

一方、カップ培養により、カドミウムの排泄についても調べたところ、PT細胞からのカドミウムの排泄は、そのほとんどがapical側で起こっていることが分かった。したがって、カドミウムは、腎臓の近位尿細管において、一度上皮細胞に取り込まれた後、再び、尿細管管腔側に排出されている可能性が示唆された。このような現象は、腎臓における尿酸の輸送ですでに知られている。すなわち、尿酸は糸球体をろ過された後、管腔から上皮細胞への取り込み、上皮細胞から管腔への排出、再び、上皮細胞への取り込み、最終的な尿中への排出、という複数のステップを経ることが知られている。

これまで、腎臓におけるカドミウム輸送については、S1、S2領域でのCd-MTのエンドサイトーシスのみが考慮されてきたが、実は、一部のカドミウムは管腔側に排出され、再び、尿細管の下流側で再度吸収されている可能性もある。その際、S3領域でZIP8やZIP14がカドミウムの再吸収に関わっている可能性がある。そこで、この仮説を検討するため、マウスの腎臓切片を用いて、*in situ* hybridizationを実施した。プローブとして、ZIP8、ZIP14、DMT1の3種類を検討した。その結果、皮質と髄質の境界付近の近位尿細管のS3領域が多く集まる部位においてZIP8とZIP14が強く発現していた。

上記の結果から、現時点での仮説として、S1、S2領域でCd-MTがエンドサイトーシスで取り込まれた後、一部のカドミウムがイオ

ンとして尿細管管腔に溶出し、S3領域で今度は ZIP8 や ZIP14 のような金属輸送体を介して取り込まれる可能性がある。今後、この仮説について詳しく検討していく予定である。

6. 終わりに

今回、時間の都合で、消化管、骨における ZIP8, ZIP14, DMT1 の役割に関する検討結果は割愛したが、消化管については低濃度のカドミウムの吸収に ZIP14 が関与している可能性を見出している。

つい最近、これまで不明だったイネの根からのカドミウムの吸収機構が解明された。驚くべきことに、イネの根に存在するマンガンを取り込むための輸送体 OsNramp5 がカドミウムの取り込みに関与していることが明らかになった。OsNramp5 の遺伝子をノックアウトしたイネでは、マンガンの取り込みが顕著に減少し、カドミウムの取り込みはほぼ完全に抑制された¹⁰⁾。一方、重イオンビームの照射によってこの OsNramp5 に変異を導入

したイネは、カドミウム汚染土壌で栽培しても玄米中のカドミウム濃度がほとんど検出できない程度にまで低下した¹¹⁾。これまで、本研究により、哺乳動物細胞におけるカドミウム輸送にマンガン輸送系が関与していることを示してきたが、イネにカドミウムが蓄積する過程においてもマンガン輸送体が関与していることが明らかにされた。

引用文献

- 1) Kondo Y, et al., *Life Sic.* 64, PL145-150, 1999.
- 2) Yanagiya T, et al., *Life Sci.* 65, PL177-182, 1999.
- 3) Yanagiya T, et al., *J. Exp. Pharm. Therap.*, 292, 1080-1086, 2000.
- 4) Fujishiro H et al., *J. Health Sci.*, 52, 292-299, 2006.
- 5) Fujishiro H et al., *J. Appl. Toxicol.* 29, 367-373, 2009.
- 6) Fujishiro H, et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 241, 195-201, 2009.
- 7) Fujishiro H, et al., *Toxicology*, 280, 118-125, 2011.
- 8) Fujishiro H, et al., *Metallomics*, 3, 710-718, 2011.
- 9) Fujishiro H, et al., *Metallomics*, 4, 700-708, 2012.
- 10) Sasaki A, et al., *Plant Cell*, 24, 2155-2167, 2012.
- 11) Ishikawa S, et al., *Proc. Nat. Acad. USA*, 109, 19166-19171, 2012.

講演 4

メチル水銀の選択的細胞傷害

-マイクロダイセクション法を用いた各種神経細胞における抗酸化酵素の発現解析-

○藤村成剛（国立水俣研）、白杵扶佐子（国立水俣研）

1. 背景

メチル水銀の主な標的器官は脳神経系であり、その毒性感受性は脳の発達段階で異なるのみならず、同年齢層においても部位や細胞によって異なる。例えば、成人期においてメチル水銀曝露は大脳皮質の一部、後根神経節細胞、小脳顆粒細胞に顕著な細胞死を引き起こすが、他の部位では神経細胞死を誘発し難い。このようなメチル水銀毒性の選択的細胞傷害については未だ情報が不足しており、メチル水銀による神経機能障害を理解する上での障害となっている。

2. 目的

メチル水銀中毒モデル動物を用いて、神経病変が起こる部位と起こらない部位について、分子病理学的、生化学的、分子生物学的な手法を用いて、メチル水銀の選択的細胞傷害の原因について明らかにする。さらに、これらの知見を発展させて、メチル水銀中毒の診断、毒性防御および治療への応用へ繋げることを目的とする。

3. 方法と結果

3-1. マウスを用いた大脳皮質と海馬の比較検討

水俣病剖検脳の観察では、前述した大脳皮質の一部、後根神経節細胞、小脳顆粒細胞に顕著な細胞死を引き起こすが、虚血および他の毒物に脆弱な海馬では神経細胞死を引き起こさない。

今回、マウスを用いて大脳皮質と海馬の神経病変および神経細胞死経路について比較検討を行った。8週間のメチル水銀飲水投与(30 ppm)によって、深部大脳皮質において

神経細胞の減少(図1)、アストログリアの増加等が観察されたが、海馬において神経病変は観察されなかった。ウェスタンブロット法を用いて、神経細胞死に関連するキナーゼ経路について検討を行った結果、大脳皮質特異的に mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) と c-jun- N-terminal kinase (JNK) の活性化が確認された(図2)。また、海馬の水銀濃度は大脳皮質よりも高値を示したにもかかわらず、神経病変および JNK 経路の活性化は検出されなかった。これらの結果は、メチル水銀が大脳皮質特異的に JNK 経路を活性化し、神経変性を引き起こすことを示唆している¹⁾。

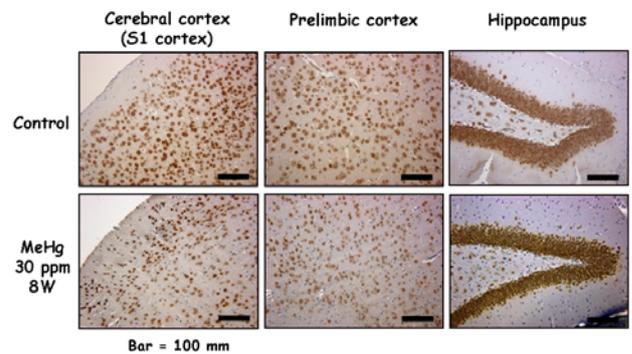


図1 メチル水銀曝露によるマウス大脳皮質神経細胞の減少

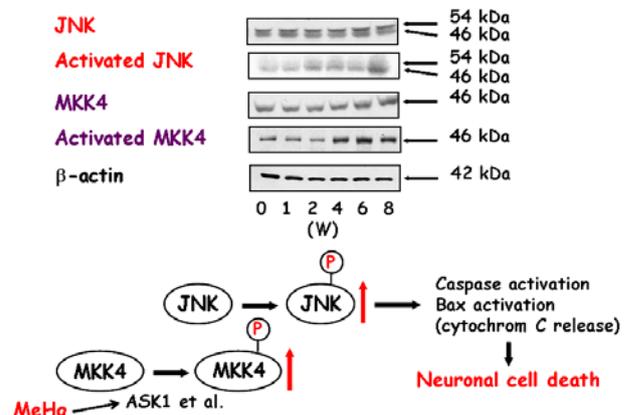


図2 メチル水銀曝露によるマウス大脳皮質における JNK 経路の活性化

3-2. ラットを用いた後根神経系と前根神経系の比較検討

メチル水銀曝露は中枢神経系だけではなく、末梢神経系にも神経病変を引き起こすが、その神経病変部位にも選択性があり、後根神経に軸索変性を伴う神経変性を引き起こす。

今回、ラットを用いてメチル水銀曝露の末梢神経系へ影響について検討した結果、4週間のメチル水銀飲水投与(30 ppm)によって、後根神経特異的に軸索変性を伴う神経変性が観察された(図3)²⁾。一方、前根神経には病変は観察されなかった。さらに、培養神経細胞を用いて軸索変性の原因について検討した結果、メチル水銀が Ras homologous (Rho) 蛋白質発現(特に Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) の低下)に影響して、軸索変性、さらには引き続いて起こる神経細胞死を引き起こすことが示唆された^{3,4)}。この Rac1 発現低下による軸索変性を伴う神経変性は、siRNA を用いた検討によっても確認された(図4)。

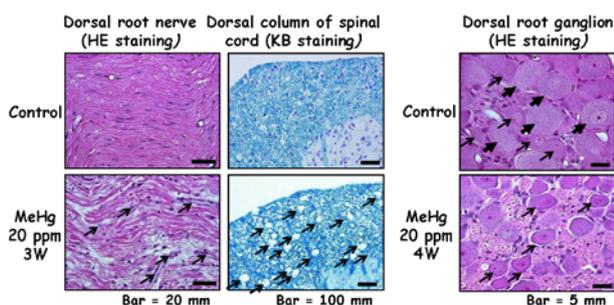


図3 メチル水銀曝露によるラット後根神経の変性

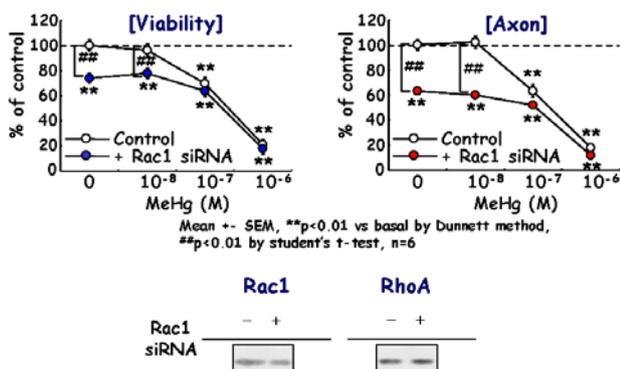


図4 Rac1 siRNA による神経細胞死と神経軸索変性への影響

3-3. ラットを用いた各種小脳神経細胞の比較検討

メチル水銀は小脳に神経変性を引き起こすが、小脳神経細胞の中でも特に顆粒細胞に顕著な神経変性を引き起こす。

今回、ラットを用いてメチル水銀曝露の小脳神経細胞へ影響について検討した結果、4週間のメチル水銀飲水投与(20 ppm)によって、顆粒細胞特異的に神経変性が観察された(図5)。マイクロダイセクションシステム(図6)を用いて、ラット小脳の各種神経細胞(顆粒細胞、プルキンエ細胞、分子層神経細胞)を分取した。まず、メチル水銀を曝露したラット小脳の各種神経細胞について加熱気化法を用いた水銀量測定を行ったが、メチル水銀投与群においてもその水銀値は検出限界以下(0.5 ng/sample)であった。

次にメチル水銀の選択的細胞傷害に関連すると考えられる抗酸化酵素⁵⁾の mRNA 発現について解析を行った。解析の結果、Superoxide dismutase 2 (SOD2), glutathione peroxidase 1 (GPx1), Thioredoxin reductase 1 (TRxR1)の mRNA 発現濃度が、分子層細胞、プルキンエ細胞に比べ顆粒細胞で低いことが示された。また、免疫組織化学による蛋白質発現においても同様の結果が得られた。さらに、SOD2 については、小脳水銀値が上昇するメチル水銀投与3週目において mRNA 発現が有意に上昇した(図7)。以上の結果から、小脳顆粒細胞のメチル水銀傷害に対する脆弱性が、抗酸化酵素(SOD2, GPx1, TRxR1)の低含量に起因することが示唆された。また、メチル水銀曝露による SOD2 mRNA の上昇は、メチル水銀毒性に対する神経細胞の耐性に関与する可能性が示された。

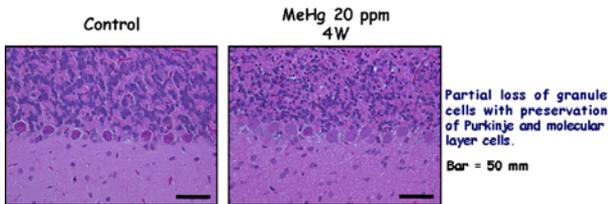


図5 メチル水銀曝露によるラット小脳神経の変性

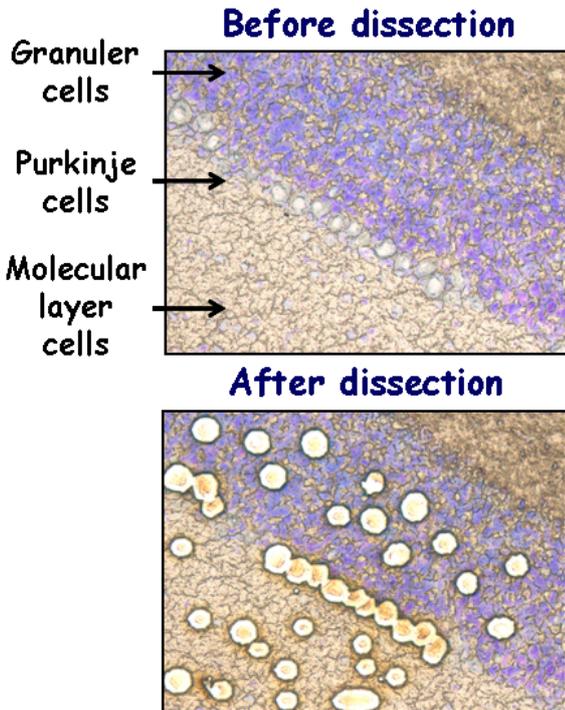


図6 マイクロダイセクションシステムを用いた各種小脳神経細胞の分取

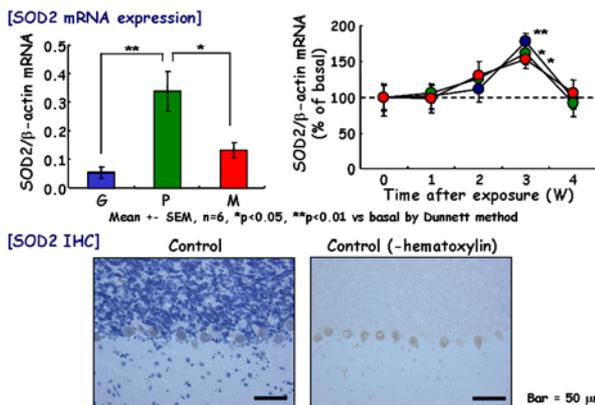


図7 小脳神経における SOD2 mRNA および蛋白質の発現

4. 結論

実験動物を用いた検討によって、メチル水銀曝露によってヒトと同様な神経変性を起こす部位は、動物種によって異なることが判明した。大脳皮質で顕著に神経変性を生じるの

はマウスであり、後根神経および小脳で神経変性を生じるのはラットであった (表 1)。

次にメチル水銀神経毒性の選択性について、分子病理学的、生化学的、分子生物学的な手法を用いて検討を行った。(1) マウスを用いて大脳皮質における神経細胞傷害について海馬を比較対象とした検討を行い、メチル水銀が大脳皮質特異的に JNK 経路を活性化し、神経変性を引き起こすことが示唆された。(2) ラットを用いて末梢神経系における検討を行い、メチル水銀が後根神経特異的に軸索変性を伴う神経病変を生じさせることがわかった。また、培養神経細胞を用いた検討によって、メチル水銀が Rho 蛋白質発現 (特に Rac1 の低下) に影響して、軸索変性、さらには引き続いて起こる神経細胞死を引き起こすことが示唆された。(3) ラットを用いて各種小脳神経における検討を行い、小脳顆粒細胞のメチル水銀傷害に対する脆弱性が、抗酸化酵素 (SD2, GPx1, TRxR1) の低含量に起因することが示唆された。

表 1 メチル水銀曝露によって引き起こされるヒトとげっ歯類の神経病変比較

	Human	Mouse (C57BK)	Rat (Sb)
Cerebral cortex	Pathological changes	Pathological changes	Slightly changes
Cerebellum	Pathological changes	No changes	Pathological changes
Peripheral nerve (Dorsal root nerve)	Pathological changes	No changes	Pathological changes
Hippocampus	No reports	No changes	No changes

5. 引用文献

- 1) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Takashima A. (2009) Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology*, 30: 1000-1007.
- 2) Fujimura M, Usuki F, Kawamura M, Izumo S. (2011) Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following

methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 250: 1-9.

- 3) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Rostene W, Godefroy D, Takashima A. (2009) Methylmercury exposure downregulates the expression of Rac1, leads to neuritic degeneration and ultimately apoptosis in cerebrocortical neurons. *Neurotoxicology*, 30: 16-22.
- 4) Fujimura M, Usuki F. (2012) Differing effects of toxicants (methylmercury, inorganic mercury, lead,

amyloid β and rotenone) on cultured rat cerebrocortical neurons: differential expression of Rho proteins associated with neurotoxicity. *Toxicol. Sci.*, 126: 506-514.

- 5) Usuki F, Yamashita A, Fujimura M. (2011) Methylmercury-induced relative selenium deficiency causes oxidative stress through its posttranscriptional effect. *J. Biol. Chem.*, 286: 6641-6649.

メチル水銀毒性とグリア細胞 —ATP シグナルによるミクログリア-アストロサイト-神経細胞連関—

○小泉 修一 (山梨大・医・薬理)、篠崎陽一 (山梨大・医・薬理)

1. はじめに

脳には、神経細胞の10倍もの多数のグリア細胞が存在している。グリア細胞は電気生理学的に非興奮性細胞であることから、これまで神経細胞の物理的な支持、老廃物の排除等、裏方的な役割は果たす細胞と考えられており、その発見から百数十年間、脳科学の表舞台に登場することはなかった。しかしここ十数年来の脳科学の進歩により、グリア細胞が各種神経伝達物質の受容体、イオンチャネル等を有する事、化学伝達物質に応答して情報を発信すること等々、種々の機能的側面が次々と明らかとされ、グリア細胞と脳の生理機能¹⁾及び脳疾患²⁾の関連性に注目が集まっている。グリア細胞は、外傷、神経変性疾患等各種脳疾患時に、その性質を激変させる非常に感度の高い細胞である。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。

本研究の目的は、有機水銀（メチル水銀, MeHg）により惹起される脳機能障害におけるグリア細胞の役割を明らかとすることである。到達目標は、(1)MeHgがアストロサイト及びミクログリア細胞の応答性、応答様式機能さらに情報発信様式を精査し、その分子メカニズムを明らかとすること、(2) MeHgにより惹起されたグリア細胞の機能変化が神経細胞機能及び障害に与える影響を明らかとすること、である。

2. 実験方法

実験は既報¹⁾に従い、Wistar系ラット及びC57BL系マウスの初代培養ミクログリア、アストロサイト及び海馬神経細胞を用いた。ま

た、スライス培養には、C57BL系マウスを用いた。Ca²⁺ imagingは、既報に従い、fura2法を用いた。DNA arrayは、Affymetrix社製U34A GeneChip DNA microarrayを用いた。神経細胞の細胞生存率はWST-1法（タカラバイオ社）にて、Interleukin-6 (IL-6)の定量はELISA法（Quantikine, R&D System社）にて、細胞外ATPの定量は、luciferin-luciferase法（ATP bioluminescence assay kit, Roche Diagnostics社）を用いて行った。

3. 結果及び考察

3-1. MeHgにより惹起されるグリア細胞遺伝子発現変化の網羅的解析

まずは、各種細胞の初代分散培養系を用いて検討を行った。MeHgに曝露されたラット海馬初代神経培養細胞、アストロサイト及びミクログリアの遺伝子発現変化を網羅的に解析した。特にアストロサイトにおいて、変化した遺伝子の種類及び遺伝子変化率が大きかった。表1はアストロサイトにおいて上昇率が大きかった上位5遺伝子を示した。特にIL-6は600倍以上の上昇を呈したことから、特にこのサイトカインに注目した。定量的RT-PCR法、さらにWestern blotting法により、MeHgによりIL-6のmRNA及び蛋白質発現が亢進していることを確認した。

表1 MeHgによりアストロサイトで発現上昇した遺伝子トップ5

gene ID	gene name	fold increase
M26744	interleukin-6 (IL-6)	638
Z27118	heat shock protein 70 (Hsp 70)	98
S67722	cyclooxygenase-2 (COX-2)	35
X06769	c-fos	24
M28259	fibronectin	18

3-2. IL-6 介したアストロサイトの神経細胞を保護作用

アストロサイトから放出された IL-6 の海馬神経細胞死に対する作用を検討した。図 1 のように、MeHg はごく低濃度から、濃度依存的に神経細胞死を惹起した。アストロサイトはこの濃度では MeHg に対して強い抵抗性を示した。低濃度からにより惹起される神経細胞死は、アストロサイト conditioned medium (ACM) により抑制され、これは IL-6 中和抗体により消失した。さらに神経細胞に recombinant IL-6 を前処置することにより、やはり MeHg による神経細胞死は抑制された。これらは、アストロサイトが IL-6 を介して、初期 MeHg 障害を保護していることを示唆する。

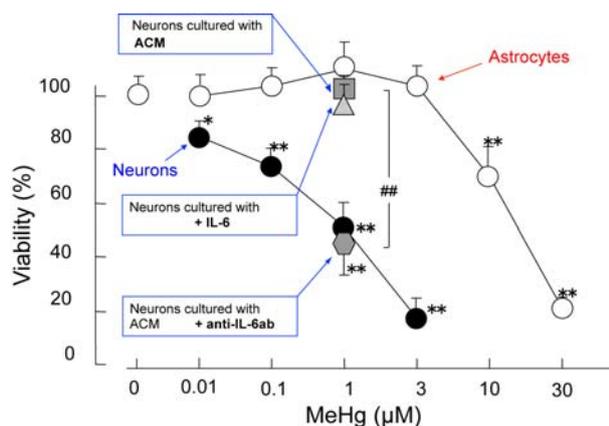


図 1 MeHg により惹起される神経細胞及びアストロサイトの細胞死

神経細胞はアストロサイトよりも MeHg に対して脆弱であるが、ACM 又は IL-6 の添加により障害抵抗性を獲得する。ACM の作用は、IL-6 依存的。

3-3. MeHg により惹起されるアストロサイト IL-6 産生メカニズム

3-3-1. P2Y1 受容体の関与

MeHg により惹起されるアストロサイト IL-6 産生に対する種々薬物の影響を解析した。図 2 のように、P2 受容体拮抗薬及び P2Y1 受容体拮抗薬によりこの産生が抑制された。また、ATP 分解酵素 apyrase さらに P2Y1 欠損動物で (P2Y1-KO) でこの IL-6 の産生は消失した。従って、細胞外 ATP の放出、及び

それに引き続く P2Y1 受容体の活性化がこの IL-6 産生の必要条件であることが示唆された。

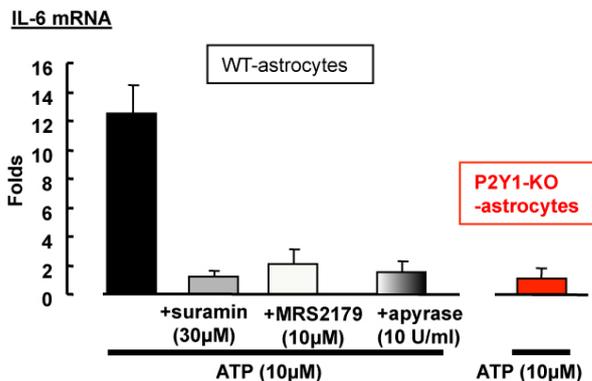


図 2 MeHg により惹起されるアストロサイト IL-6 mRNA 産生と P2Y1 受容体 MeHg によりアストロサイト IL-6 産生は、細胞外 ATP 及び P2Y1 受容体依存的である。

3-3-2. 細胞外 ATP の測定

MeHg により惹起される ATP 放出を、luciferin-luciferase による直接測定及び Ca²⁺ imaging による間接測定により解析した。MeHg は濃度依存的に一過性の ATP を放出すること、これは P2Y1-KO により消失することが明らかとなった (図 3)。また、この ATP は Ca²⁺ 依存性な開口放出のメカニズムで放出されていることが明らかとなった。

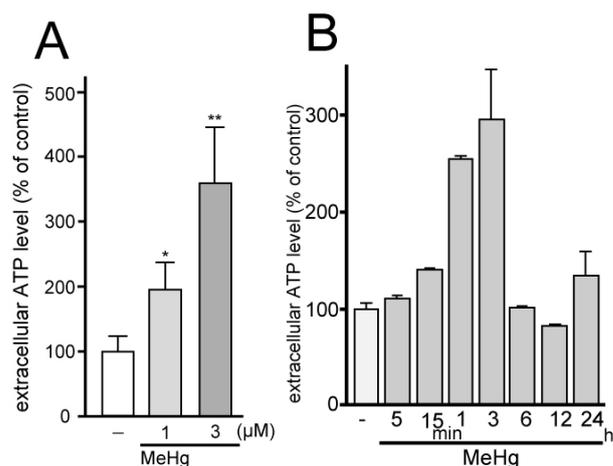


図 3 MeHg により惹起されるアストロサイトからの ATP 放出

A. MeHg 濃度依存的なアストロサイトからの ATP 放出。B. MeHg (1 μM) 刺激による ATP 放出のタイムコース。細胞外 ATP 濃度は、luciferin-luciferase 法により定量した。

3-3-3. 細胞内シグナル

また P2Y1 受容体刺激から IL-6 産生に至る細胞内シグナルとして、ERK1/2MAPkinase が関与していることが明らかとなった。

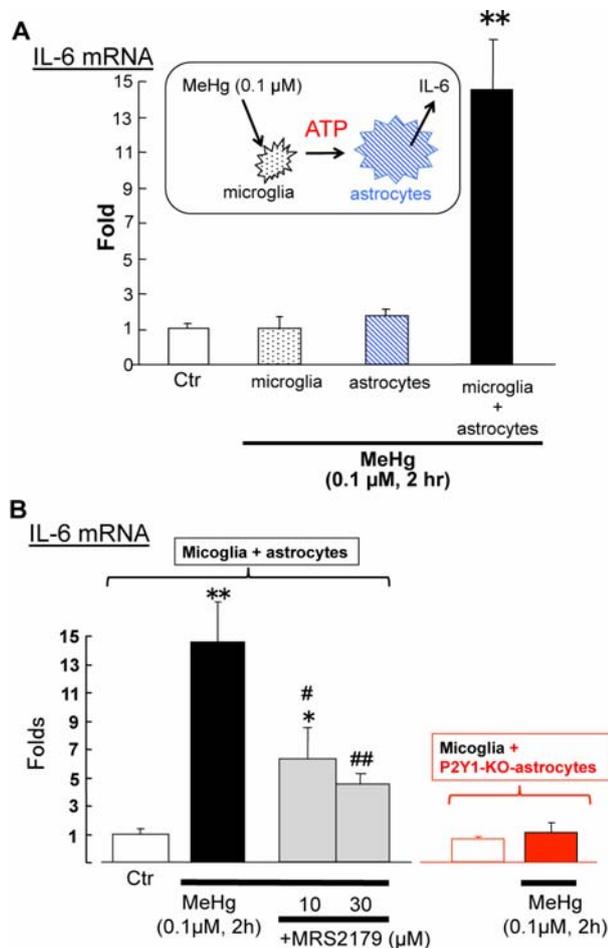


図 4 低濃度 MeHg による IL-6 産生

A. MeHg (0.01-0.1 μM) で、ミクログリア単独、アストロサイト単独培養をそれぞれ刺激しても、IL-6 mRNA の発現は亢進しない。しかし、ミクログリア及びアストロサイトが共に存在する場合には、低濃度 MeHg でも IL-6 mRNA の顕著な発現亢進が認められた。B. ミクログリア-アストロサイト共培養系における IL-6 産生は、P2Y1 受容体拮抗薬 MRS2179 で抑制され、またアストロサイトのみ P2Y1 受容体を欠損させた共培養系 (microglia+P2Y1-KO-astrocytes) で消失した。

3-4. ミクログリアによる低濃度 MeHg 感知とアストロサイトコミュニケーション

低濃度 MeHg (10-100 nM) は、アストロサイトではなく、ミクログリアが感知していることが明らかとなった。つまり、ミクログリア単独、アストロサイト単独では MeHg により IL-6 は産生されないが、ミクログリア-アストロサイトの共培養系に低濃度 MeHg を添

加すると、IL-6 が産生された。これは、P2Y1 受容体阻害薬により抑制され、P2Y1-KO では消失した。さらに、低濃度 MeHg によりミクログリアも ATP を放出していることが明らかとなった (図 4)。つまり、ミクログリアが低濃度 MeHg を感知し、それを ATP の化学情報としてアストロサイトに伝えていること、さらにアストロサイトは P2Y1 受容体でこれを感じて、3-3 で述べたメカニズムにより、IL-6 を放出している可能性が示唆された。

3-5. スライス培養法を用いたミクログリア-アストロサイト-神経細胞コミュニケーションによる神経細胞保護作用

海馬スライス標本を用いて、分散培養系と同様の急性期の MeHg 傷害モデルを作成した。図 5 A で示すように、培養 1 週間後に MeHg を添加し、その 24 時間後に PI を添加しその蛍光強度により傷害を評価した。図 5 B は典型例。海馬錐体細胞層で顕著な PI 陽性シグナルが観察された。この PI 陽性シグナルは、アポトーシス時に観察されるシングルストランド DNA (ssDNA) シグナル陽性であった。図 5 C に示す様に、コントロール (MeHg 無添加) 海馬は PI 染色陰性であるが、高濃度 MeHg (1 μM 以上) により強い PI 蛍光シグナル、つまり傷害が認められた。これまで、分散培養系を用いた実験系で、MeHg (1 μM) がアストロサイトから ATP を放出させ、これがオートクラインシグナルとして P2Y1 受容体を介して IL-6 を産生・放出することにより神経保護作用を呈することを示してきた。そこで、MeHg により惹起される傷害に対する、アストロサイトの活性化阻害薬 (fluorocitrate)、P2Y1 受容体拮抗薬 (MRS2179) 及び IL-6 をトラップする中和抗体の作用を検討した。Fluorocitrate、MRS2179 及び IL-6 中和抗体はすべて、MeHg (1 μM) により惹起される傷害を亢進させた。さらに、これらは傷害が認められない

0.1 μ M MeHg を添加した海馬スライス標本において、顕著な傷害作用を呈した。これらの結果は、MeHg に応答したアストロサイトは、活性化し、ATP/P2Y1 受容体シグナル及び IL-6 を介して、神経細胞に対して補語的に作用していることが示唆された。

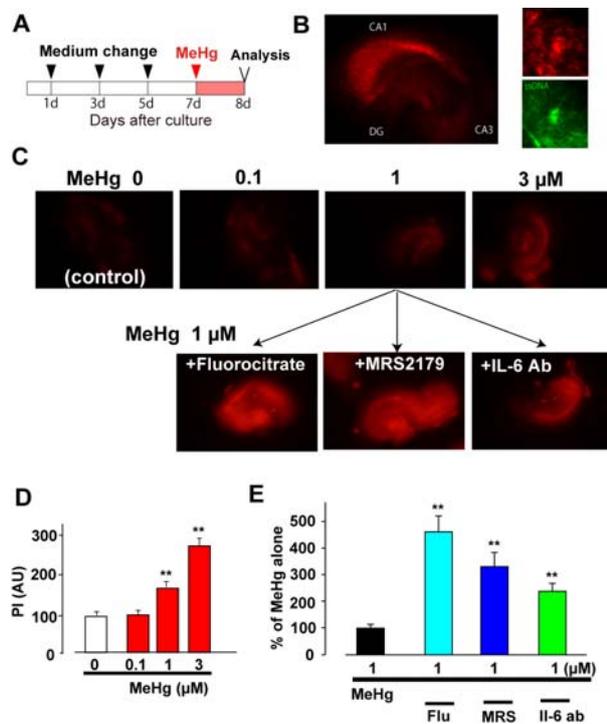


図5 海馬スライス培養系を用いたMeHg障害モデルによる解析

A.実験スケジュール。B.左：PIによる典型的な染色像。主に錐体細胞でPIシグナルが認められた。右：PIシグナルは、ssDNA陽性であった。C.MeHg傷害の濃度依存性。また、MeHg(1 μ M)により惹起される傷害に対する、fluorocitrate(Flu)、MRS2179(MRS)及びIL6中和抗体(IL-6 ab)の作用。D及びEはこれらのまとめ。

P2Y1 受容体の重要性が強く示唆されたため、P2Y1 受容体の薬理的な制御に加えて分子生物学的な手法により P2Y1 受容体の各種遺伝子改変動物を用いた検討を行った。実験には、P2Y1 完全欠損動物 (P2Y1-KO) 動物に加え、アストロサイト特異的に P2Y1 受容体を tTA 及び tTS 系で制御可能とする、アストロサイト特異的 P2Y1 欠損 (P2Y1-astro-OFF) 及び P2Y 強制過剰発現 (P2Y1-astro-ON) マウスを用いた。これら遺伝子改変動物の海馬スライス標本を用いて MeHg により惹起される傷害の程度を検討し

た (図6)。P2Y1-KO では、MeHg により惹起される傷害の亢進が認められた。これは、P2Y1-astro-OFF を用いた検討でもほぼ同程度であった。従って、アストロサイトの P2Y1 受容体が重要であることが明らかとなった。さらに、興味深いことに、P2Y1-astro-ON、つまり P2Y1 受容体をアストロサイトで過剰発現させた場合には、MeHg による傷害が顕著に抑制された。すなわち、アストロサイトの (1) P2Y1 受容体欠損により傷害が亢進し、(2) P2Y1 受容体過剰発現により傷害が抑制されたのである。これは、アストロサイトの P2Y1 受容体が MeHg により惹起される急性期神経細胞傷害に強く関与すること、またこの OFF/ON により本神経細胞傷害の制御が可能となる可能性を強く示唆するものである。

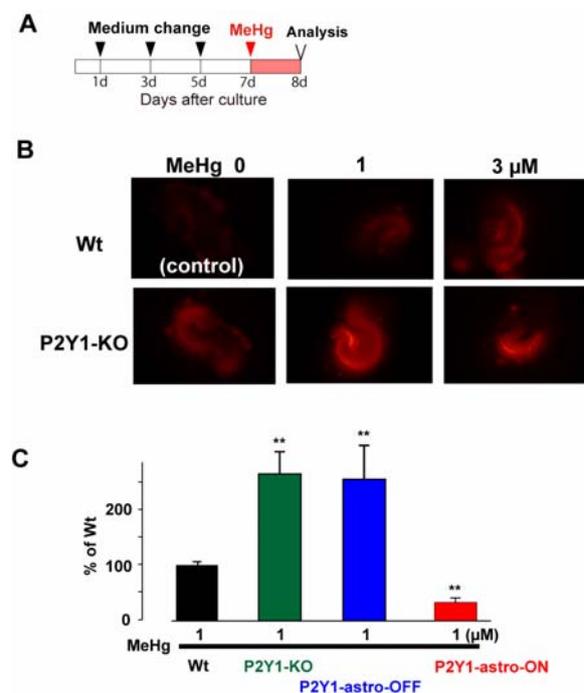


図6 P2Y1 受容体の分子生物学的な制御と MeHg 傷害

A.海馬スライス培養系を用いた実験スケジュール。培養7日目に MeHg を添加し、その 24 時間後に PI を添加して評価を行った。B.MeHg (0-3 μ M)により惹起される神経細胞傷害の Wt と P2Y1-KO の比較。P2Y1-KO では、MeHg によるより強い傷害が認められた。C.各種 P2Y1 受容体遺伝子改変動物を用いた検討。MeHg(1 μ M)により惹起される Wt における傷害程度との比較である。P2Y1-KO 及び P2Y1-astro-OFF では約 2.5 倍以上の強い応答が観察された。しかし、P2Y1-astro-ON では、その傷害は顕著に抑制された。** $p < 0.01$ vs Wt.

これらはすべて、これまでの分散培養系での成果を支持する結果であった。これまでの結果を図7にまとめた。

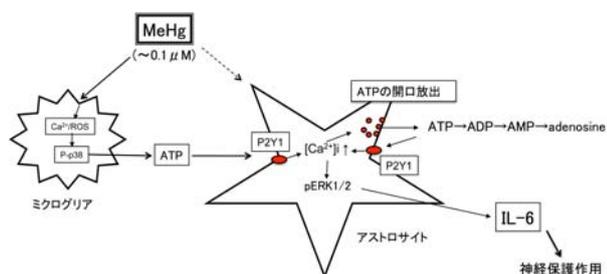


図7 MeHg 感知からアストロサイトの IL-6 放出に至るメカニズム

4. 結論

1. MeHg を感知したグリア細胞は、IL-6 を産生し神経細胞傷害を保護していた。
2. これらの応答には、中心的グリア伝達物質である細胞外 ATP、及びその特異的受容体 P2Y1 受容体が中心的な役割を果たしていた。

3. 低濃度 MeHg はミクログリアが感知した。ミクログリアは、それを ATP 化学情報に変換してアストロサイトに伝えていることが明らかとなった。

4. In situ により近い海馬スライス培養系と各種遺伝子改変動物を組み合わせた MeHg 傷害モデル系を構築し、これまでの分散培養系の結果が再現できることを確認した。

以上、アストロサイト P2Y1 受容体の制御により、急性期 MeHg 傷害をコントロールできる可能性が示唆された。

引用文献

- 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.

ミトコンドリア機能から見たメチル水毒性

○森 信子 (熊本大院)、安武 章 (熊本大院)、平山紀美子 (熊本リハ学院)

1. 目的

メチル水銀 (MeHg) が中枢神経系に特異性の高い毒性をもたらす機構については十分に解明されているとは言えない。MeHg は SH 基に対して高い親和性を示すため¹⁾、SH 基を持つ種々の生体分子 (タンパク質) が標的となり、その機能に影響を与えると考えられる。しかし、細胞の機能がどの組織においても普遍的であることを考えると、中枢神経系にのみ特異的な標的分子が存在することは考えにくい。MeHg の中枢神経系における蓄積は末梢組織よりも低いことを考えると、むしろ、SH 基をもつ標的分子がおかれている微小環境での毒性発現因子の感受性の違いによって、その選択性が左右される可能性が示唆される。MeHg の毒性発現機構の一つとして酸化ストレスの関与が示唆されているが^{2,3)}、今回は、MeHg による中枢神経系の選択的毒性発現機構 (大脳よりも小脳で強く傷害される) を、酸化ストレスに対するミトコンドリア機能の変化に焦点を当て、ミトコンドリア微小環境における MeHg の活性酸素産生制御因子に対する影響について検討した。

2. 方法

2-1. *in vivo* 曝露実験

Wistar 系ラット (雄、9 週齢) に MeHgCl (10 mg/kg/day, 8 mg Hg) または精製水を 5 日間経口投与後 14 日目に、大脳及び小脳を摘出し、Lee らの方法に従ってミトコンドリア分画を調製した。ミトコンドリアの一部は 3 回凍結融解を繰り返し、電子伝達系複合体の酵素活性測定に、一部は更にミトコンドリア膜分画 (SMP) を調製し、スーパーオキシド (O_2^-) 産生量の測定に用いた。また、低張処

理でミトコンドリアを破壊後、3 回凍結融解を繰り返し超遠心操作により得られた上清をミトコンドリア可溶性分画として抗酸化系物質 (グルタチオン (GSH) 濃度、SOD 活性及び GPX (Glutathione peroxidase) 活性) の測定に用いた。

更に、摘出した大脳および小脳の一部をハサミで細切後、Mitochondria/Cytosol fractionation Kit (BioVision 社製) を用いて細胞質分画を調製し、細胞質中のチトクローム C 濃度及びカスパーゼ 3 活性を市販キット (Quantikine Rat/Mouse Cytochrome c Immunoassay (R&D System 社製) 及び Caspase-3 Cellular Assay Kit PLUS (Biomol 社製)) を用いて測定した。

2-2. *in vitro* 曝露実験

Wistar 系ラット (雄、9 週齢) から大脳と小脳を摘出し、上記に記載した方法でミトコンドリア分画、ミトコンドリア膜分画 (SMP) 及びミトコンドリア可溶性分画を調製した。これら分画に種々の濃度の MeHgCl (終濃度 0, 12.5, 25, 37.5, 50, 100 nmol/mg protein/ml) を *in vitro* 曝露し、ミトコンドリア諸機能への直接的影響について以下の方法で検討した。ミトコンドリア膜機能を評価するためにミトコンドリアの膨潤 (540nm における吸光度変化) と膜電位の変化 (膜感受性シアニン色素 dis-C₃-(5) を用いた蛍光測定法) を、アポトーシスの有無を評価するためにミトコンドリアからのチトクローム c の遊離を、活性酸素産生能を評価するために O_2^- 産生量と電子伝達系複合体酵素 (II, III 及びコハク酸脱水素酵素 SDH) の活性を、活性酸素消去能を評価するために GPX 活性及び SOD 活性を測定した。尚、一連の O_2^- 産生量は MCLA-化学発光法を

用いて、電子伝達系複合体酵素の活性は分光学的手法を用いて測定した。また、GSH 濃度と SOD 活性は市販キット (Total Glutathione Quantification kit 及び SOD Assay Kit-WST、いずれも同仁化学製) を用いて、GPX 活性は Lawrence & Bürk の方法に従って測定した。

3. 結果

3-1. *in vivo* 曝露実験

ラットに典型的な中毒症状 (後肢交差と歩行失調) が認められた、MeHgCl (10mg/kg/day) の 5 日間経口投与後 14 日目には、小脳ミトコンドリアにおいて、コハク酸を基質とした O_2^- 産生量の有意な増加が認められたが、大脳ではコハク酸、NADH いずれの基質を用いてもその影響は認められなかった。また、電子伝達系複合体酵素のうち、複合体 II の酵素活性は、小脳ミトコンドリアにおいてのみ、MeHg 曝露により有意な活性の低下が認められた。一方、他の酵素は大脳、小脳いずれの組織においても MeHg の影響は認められなかった。更に、ミトコンドリア中の抗酸化系物質のうち、GSH 濃度は MeHg の曝露により有意な低下が認められた。

アポトーシスの指標である細胞質へのチトクローム C の遊離は、小脳においてのみ、その有意な増加が認められたが、カスパーゼ 3 活性は大脳、小脳いずれの組織においても MeHg 曝露の影響は認められなかった。

3-2. *in vitro* 曝露実験

小脳ミトコンドリアは大脳と比較して、生来、膨潤が起こりやすい状態であったが、MeHg を曝露しても大脳、小脳ともにミトコンドリアの更なる膨潤は認められなかった。一方、大脳、小脳ミトコンドリアのいずれも、MeHg の濃度が高くなるにつれて、膜電位の低下が認められた。また、その低下は小脳でより顕著であった。更に、この時のミトコンドリア

からのチトクローム C の遊離は、大脳では MeHg 曝露の影響を受けなかったが、小脳では MeHg の濃度が高くなるにつれて増加した。

ミトコンドリアからの O_2^- 産生量は、大脳、小脳いずれも MeHg の濃度が高くなるにつれて増加した。特に、小脳からの O_2^- 産生量は大脳よりもより低濃度の MeHg 曝露で非曝露時と比較して有意に増大した。ミトコンドリアの電子伝達系複合体酵素のうち、複合体 II 及び SDH の酵素活性は大脳、小脳いずれも MeHg の曝露により濃度依存的に活性の低下が認められた。特に、小脳では大脳よりもより低濃度の MeHg 曝露によってその活性の有意な低下が認められた。一方、複合体 III の酵素活性は大脳、小脳いずれも MeHg の影響は認められなかった。

ミトコンドリア中の SOD 活性及び GPX 活性には MeHg の影響は認められなかった。

4. 考察

我々はこれまでに、大脳と小脳ミトコンドリアにおいて、活性酸素産生制御因子のバランスの違いがあり、大脳と比較して小脳では、生来酸化的ストレスに対する感受性が高いことを見出した⁴⁾。今回、MeHg 曝露ラットでは小脳ミトコンドリアにおいてのみ、 O_2^- 産生量の増大と電子伝達系複合体 II の酵素活性及び GSH 濃度の低下が認められた^{4,5)}。また、単離ミトコンドリアを用いた系で検討したところ、*in vivo* 曝露実験の結果 (O_2^- 産生量の増大と複合体 II の酵素活性の低下) を反映していた。これらのことから、ミトコンドリア周囲の環境ではなく、ミトコンドリア内の微小環境における活性酸素産生と消去のバランスの乱れが MeHg の選択的毒性発現に寄与している可能性が示唆された。更に、メチル水銀の作用部位はミトコンドリアの電子伝達系複合体 II (特に SDH) であり、他の組織と比較して酸

化的ストレスに脆弱である小脳ミトコンドリアにおいて、MeHg 処理によるその活性低下が O_2^- 産生の増大をもたらし、結果としてチロクローム C の遊離を引き起こし、この後、アポトーシス誘導を伴う機能傷害をもたらすと考えられる。

5. 引用文献

- 1) Simpson, R.B. : Association constants of methylmercury with sulfhydryl and other bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 83, 4711-4717, 1961.
- 2) Yee, E. and Choi, B.H.: Methylmercury poisoning induces oxidative stress in the mouse brain. *Exp. Mol. Pathol.*, 60, 188-196, 1994.
- 3) Yee, S. and Choi, B.H.: Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, 17, 17-26, 1996.
- 4) Mori, N., Yasutake, A. and Hirayama, K. (2007): Comparative study of activities in reactive oxygen species production/defense system in mitochondria of rat brain and liver, and their susceptibility to methylmercury toxicity. *Arch. Toxicol.*, 81, 769-776.
- 5) Mori, N., Yasutake, A. and Hirayama, K. (2011): Methylmercury inhibits electron transport chain activity and induces cytochrome c release in cerebellum mitochondria. *J. Toxicol. Sci.*, 36, 253-259.

若 手 発 表

カドミウムによる鉄吸収阻害の分子機構

○李 辰竜 (愛知学院大学薬学部)

1. 目的

環境有害金属であるカドミウムは、一般環境中に広く分布している重金属であり、長期間比較的高レベルのカドミウム曝露を受け続けると腎毒性や骨毒性、貧血などを引き起こすことが知られている。カドミウムによる貧血については、疫学的研究や実験動物を用いた検討により、溶血性貧血、腎性貧血および鉄欠乏性貧血などを引き起こすことが示されているが、それらの発症メカニズムについては不明な点が残されている^{1,2}。また、カドミウム曝露によって、消化管からの鉄吸収が阻害されることが知られているが、その詳細なメカニズムについても明らかにされていない。鉄の吸収は、主として十二指腸絨毛頂端部でおこなわれるが、近年、鉄の小腸からの吸収に関わる分子として、非ヘム鉄の還元酵素である duodenal cytochrome b (DCYTB)、2 価鉄の輸送体である divalent metal transporter 1 (DMT1) および ferroportin 1 (FPN1)、鉄の酸化酵素である hephaestin (HEPH)、ヘムの輸送体である heme carrier protein 1 (HCP1) が見いだされている (図 1)。そこで本研究では、カドミウムによる消化管からの鉄吸収阻害の分子機構を明らかにする目的で、ヒトの小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞並びにマウスを用いて鉄吸収関連分子に対するカドミウムの作用を検討した。

2. 方法

2-1. 細胞実験

ヒト結腸がん由来 Caco-2 細胞を上皮様に分化させるためにコンフルエントの状態に 21 日間培養後、カドミウム (5 および 10 μ M) を含む新鮮な増殖培地中で 72 時間処理した。カド

ミウム処理した細胞から total RNA を抽出した後、鉄吸収関連分子である DMT1、FPN1、DCYTB および HEPH の各 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。DMT1 および FPN1 については、それらのタンパク質量を Western blot 法により測定した。また、カドミウム曝露による細胞毒性は、細胞層から培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素の活性を指標に評価した。

2-2. 動物実験

8 週齢雌性の C57BL/6J マウスにカドミウム (50 mg/kg) を単回経口投与し、その 3 および 24 時間後にエーテル麻酔下で採血した後、近位十二指腸および遠位十二指腸 (各 2 cm) を摘出した。血清中鉄濃度は、Fe-C テストワコーを用いて測定した。各摘出組織から total RNA を抽出した後、鉄吸収関連分子である DMT1、FPN1、DCYTB、HEPH、HCP1 およびヘムの分解酵素である heme oxygenase 1 (HO-1) の各 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により測定した。また、DMT1 および FPN1 のタンパク質量を Western blot 法により測定した。

3. 結果

3-1. Caco-2 細胞における鉄輸送関連分子の発現に対するカドミウムの阻害作用

小腸上皮細胞モデルである Caco-2 細胞において、カドミウムは DMT1、FPN1、DCYTB および HEPH の mRNA 量をすべて有意に減少させた。さらに、上皮細胞への鉄吸収に関わる DMT1 および上皮細胞からの鉄排出に関わる FPN1 のタンパク質量を測定したところ、カドミウム処理により DMT1 並びに FPN1 タンパク質量の減少がともに認められた。なお、この

とき培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素の活性はカドミウム曝露により有意に変化しなかった。したがって、カドミウムによる鉄輸送関連分子の発現抑制は細胞毒性にもとづくものでないことが示された。

3-2. マウス十二指腸における鉄輸送関連分子の発現に対するカドミウムの阻害作用

3-2-1. 非ヘム鉄輸送関連分子に対するカドミウムの作用

細胞レベルで認められたカドミウムによる鉄輸送関連分子の発現抑制作用について、個体マウスレベルで検討した。はじめに血清中鉄濃度を測定したところ、投与3時間後では対照群とカドミウム投与群の間で変化は認められなかったが、投与24時間後において、カドミウムによる血清中鉄濃度の有意な減少が認められた。この結果は、カドミウムがマウスの鉄代謝調節に対して影響を及ぼしていることを示している。そこで、本実験条件下で小腸鉄輸送関連分子の発現に対するカドミウムの作用を検討したところ、カドミウム投与3時間後のマウス近位十二指腸中のDMT1、FPN1、DCYTBおよびHEPHのmRNA量は、対照群に比べていずれも顕著に減少した。カドミウム投与24時間後においては、HEPHのmRNA量は対照群レベルまで回復した。一方、DMT1、FPN1およびDCYTBのmRNA量についても回復傾向は認められたものの、投与24時間後においてもカドミウムによる発現抑制効果は持続していた。同様のカドミウム投与による発現抑制効果は、遠位十二指腸においても認められた。さらに、カドミウム投与24時間後の近位および遠位十二指腸では、DMT1並びにFPN1のタンパク質量の減少も認められた。

3-2-2. ヘム鉄輸送関連分子に対するカドミウムの作用

ヘム鉄はHCP1によって上皮細胞内に取り

込まれ、細胞内のHO-1によって2価の鉄に分解された後、非ヘムと同様の経路によって全身に運搬されると考えられている。近位十二指腸におけるHCP1並びにHO-1の遺伝子発現に対するカドミウムの作用を検討したところ、HO-1のmRNA量は、カドミウム投与3時間後から顕著に増加した。一方、HCP1のmRNAはカドミウム投与3時間後から顕著に減少した。したがって、カドミウムはHO-1の遺伝子発現を強く誘導するものの、ヘム鉄の吸収に関わるHCP1の遺伝子発現を顕著に抑制することから、カドミウムは非ヘム鉄だけでなくヘム鉄の十二指腸からの吸収も阻害することが示唆された。

4. まとめ

本研究において、カドミウムのマウスへの単回経口投与によって、24時間後の血清中鉄濃度が減少することが示された。このとき、カドミウムが非ヘム鉄の十二指腸からの吸収に関与するDMT1、FPN1、DCYTBおよびHEPHの遺伝子発現を曝露3時間後から強く抑制することが明らかとなった。同様のカドミウムによる抑制効果は小腸上皮細胞モデルであるCaco-2細胞においても認められた。さらに、カドミウムはヘム鉄の吸収に関与するHO-1の遺伝子発現を誘導する一方で、HCP1の発現を抑制することも見いだされた。したがって、経口摂取されたカドミウムは小腸上皮細胞のDMT1、FPN1、DCYTB、HEPHおよびHCP1の発現抑制を介して消化管からの鉄吸収を阻害している可能性が示唆された(図1)。

引用文献

- 1) 堀口兵剛. カドミウム中毒における貧血. 日衛誌. 62, 888-904, 2007.
- 2) Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. Cadmium induces anemia through interdependent progress of hemolysis, body iron accumulation, and insufficient erythropoietin production in rats. Toxicol. Sci., 122, 198-210, 2011.

謝辞

本研究は、佐藤雅彦教授のご指導のもとで実施されました。また、本研究の遂行にあたり、

ご協力いただいた藤原泰之准教授に心より感謝申し上げます。

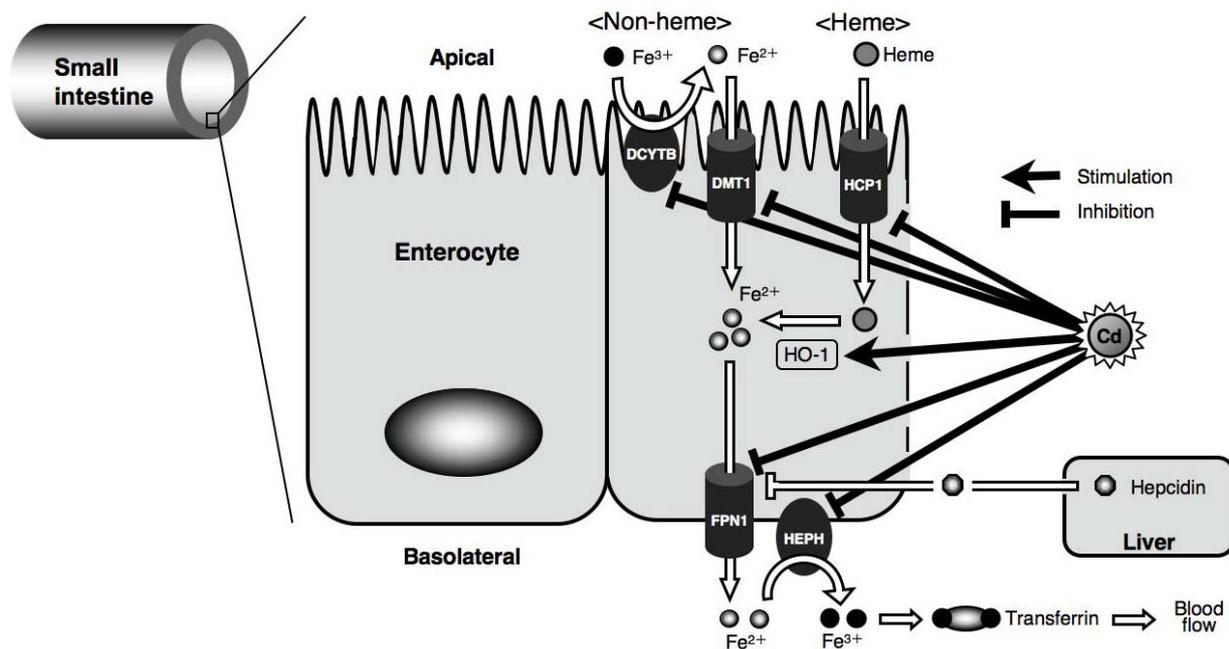


図1. 小腸からの鉄吸収経路とカドミウムによる鉄吸収阻害の分子機構

発表 2

カドミウムによる小胞体ストレス誘導：小胞体関連分解系（ERAD）の関わり

○杜 可、黄 基旭、永沼 章（東北大院・薬）

1. 背景・目的

小胞体ストレスがカドミウムの毒性発現に関与することが知られている。しかし、カドミウムによる小胞体ストレスの誘導機構はほとんど解明されていない。小胞体ストレスは、ミスフォールド蛋白質が小胞体内に蓄積することにより引き起こされる。我々は、siRNAを用いたスクリーニングにより、カドミウム毒性発現に関与する因子群を網羅的に検索し、発現抑制により細胞に高いカドミウム感受性を与える因子として小胞体内でミスフォールド蛋白質の除去機構である小胞体関連分解系(ERAD)に関与する因子を多数同定した。このことは、カドミウムによる小胞体ストレス誘導にERADが何らかの形で関与している可能性を示唆している。そこで本研究では、カドミウムによる小胞体ストレス誘導におけるERADの関わりについて検討した。

2. 結果・考察

同定されたERAD関連因子の中では、FBXO6が発現抑制によって細胞に最も高いカドミウム感受性を与えた1。カドミウムによる小胞体ストレス誘導がこのFBXO6の発現抑制によって更に亢進されることが判明した。FBXO6はERADに関与する蛋白質である2ことから、FBXO6の発現抑制によってERADの機能が低下したため、カドミウムによる小胞体ストレス誘導が更に亢進された可能性が考えられる。カドミウムがERAD機能に与える影響を検討するため、ERADの基質蛋白質であるNHKおよびTCR α の細胞内レベルに与えるカドミウムの影響を検討したところ、両蛋白質のレベルがカドミウム処理濃度に依存して増加し、これら蛋白質の分解速度がカドミウム処理によって遅延し

た。このカドミウムによるERAD機能阻害作用は、FBXO6発現抑制によって更に増加した。また、小胞体内のERAD基質蛋白質を細胞質へ引き出す蛋白質であるVCPの発現抑制またはプロテアソーム阻害剤であるMG132の添加は、カドミウム処理時と同様に、TCR α のレベルも増加させ、それに伴って小胞体ストレスマーカーであるBIPおよびCHOPのレベルも上昇した。このことから、カドミウムはERAD機能を抑制することによって小胞体ストレスを誘導している可能性が考えられる。なお、カドミウムが示すERAD機能阻害作用は、カドミウム以外の小胞体ストレス誘導剤であるtunicamycin、DTTおよびthapsigarginの処理では認められなかった。このことから、カドミウムは特異的にERAD機能を阻害し、ミスフォールド蛋白質の分解を抑制することによって、小胞体ストレスを誘導すると考えられる。また、FBXO6の発現抑制は、カドミウムによるNHKおよびTCR α レベルの蓄積を更に上昇させたが、他の小胞体ストレス誘導剤の効果には殆ど影響を与えなかった。したがって、FBXO6はカドミウムによるERAD阻害作用を特異的に軽減し、小胞体内でミスフォールド蛋白質を減少させることによって、カドミウムが誘発する小胞体ストレスを軽減していると考えられる。

本研究により、カドミウムは特異的にERAD機能を阻害し、ミスフォールド蛋白質の分解を抑制することによって、小胞体ストレスを誘導することが始めて明らかになった。現在、カドミウムによって引き起こされるERAD機能阻害の分子機構について検討中である。

引用文献

1) Hwang GW, Du K, Takahashi T, Naganuma A. (20): Inhibition

of F-box protein FBXO6 gene expression by RNA interference enhances cadmium toxicity in HEK293 cells. *J Toxicol Sci.*,36(6):847-9.

2) Yoshida Y, Tokunaga F, Chiba T, Iwai K, Tanaka K, Tai T. (2003): Fbs2 is a new member of the E3 ubiquitin ligase family that recognizes sugar chains. *J Biol Chem.*, 278(44):43877-84.

発表 3

消化管由来 Caco-2 細胞におけるカドミウム輸送機構 —消化管におけるカドミウム吸収における亜鉛輸送体の役割—

○藤代瞳、姫野誠一郎（徳島文理大学薬学部衛生化学講座）

1. 目的

これまで消化管におけるカドミウム (Cd) 吸収機構については、2 価鉄 (Fe^{2+}) の輸送体である divalent metal transporter1 (DMT1) によって小腸粘膜上皮細胞に取り込まれると考えられてきた。しかし、Cd の輸送体として、DMT1 以外に、亜鉛輸送体の Zrt/Irt-related protein 14 (ZIP14) が消化管で発現しているが、消化管における Cd 輸送に ZIP14 が関与するかについては調べられていない。そこで本研究では消化管のモデル細胞として Caco-2 細胞を使用し、管腔側と血管側における Cd 輸送を分別できるカップ培養系を用いて消化管細胞における Cd 輸送機構を検討した。

2. 方法

ヒト大腸癌由来細胞 (Caco-2) を用いた。カップ培養には Thin Cert Cell Culture insert を使用した。細胞内への金属の取り込みおよび排泄は、 $[^{109}\text{Cd}]\text{-CdCl}_2$, $[^{54}\text{Mn}]\text{-MnCl}_2$ を用いて、 γ カウンターにより測定した。

3. 背景

Cd の消化管での吸収については、鉄 (Fe) と同様、主に DMT1 によって小腸上皮細胞内に取り込まれると考えられていた¹⁻³⁾。しかし、これまでの消化管での Cd 吸収に関する報告に使用されてきた Cd 濃度を計算してみると、

消化管管腔内の濃度として $10 \mu\text{M}$ を超える濃度での検討であった (表 1)。米中に含まれる Cd 濃度を約 0.1 ppm として換算すると、食事摂取後の消化管の管腔に存在すると考えられる Cd 濃度は $0.1 \mu\text{M}$ か、それよりもずっと低い濃度であることが推測された。このことから考えて、これまでの研究で明らかにされてきた消化管における Cd 吸収に関わる検討は、もっと低濃度でも同様に DMT1 が機能するのか、また DMT1 以外の輸送体の関与があるのかどうか検討する必要があると考えられた。

4. 結果および考察

4-1. Caco-2 細胞における Cd 取り込み効率および排泄効率

Caco-2 細胞における管腔側からの Cd の取り込み効率は、血管側と比べて Cd では 7 倍高かった。また、Cd を 2 時間細胞に取り込ませた後、Cd-free 培地に交換し、1 時間後の培地への Cd 排出量を調べた結果、血管側にはほとんど排出されず、約 50% が管腔側へと排出された。よって、一度消化管細胞に取り込まれた Cd が比較的短時間に管腔側へと排泄されることが、Cd の消化管吸収率の低さの原因の 1 つである可能性が考えられた。

表1.これまでの消化管におけるCd吸収に関する報告とCd濃度

動物 / 投与経路	Cd投与濃度	推定消化管内 Cd濃度	report
mice, 経口投与	1 mg/kg, 5 days	数100 μM	Min, K-S., et al. Toxicology Letters 176: 85-92, 2008.
mice, 経口投与	0.4 $\mu\text{mol/kg}$	数10 μM	Park J.D. et al. Toxicological Science 68: 288-294, 2002
mice, 飲水投与	1 ppm, 2 weeks	約10 μM	Suzuki, T. et al. Toxicology and Applied Pharmacology 227: 462-467, 2008.

4-2.Caco-2 細胞における管腔側からの Cd 取り込みに対する各輸送体の役割

これまで DMT1 変異マウスにおいても Cd の吸収効率は変わらないという報告がある⁴⁾。また、Cd と Mn を共通して輸送する輸送体として、DMT1, ZIP14 が消化管で発現している。そこで、siRNA を用いて DMT1 と ZIP14 の発現を抑制し、0.1, 1, 5 μM の Cd の取り込みを比較した。その結果、DMT1 を発現抑制すると 5 μM の Cd 取り込みがコントロールの約 80% にまで低下したが、0.1, 1 μM の Cd の取り込みは変化しなかった。一方、ZIP14 の発現を抑制すると 0.1, 1 μM の Cd 取り込みがそれぞれ 70%, 54% に低下した。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた実験では、Cd に対する親和性は DMT1 より ZIP14 の方が高いことがすでに報告されている。以上の結果より、消化管における Cd 吸収において、特に低濃度の Cd の吸収については、DMT1 以外に ZIP14 が重要な役割を果たす可能性を見出した。

5. まとめと今後の展望

消化管由来の Caco-2 細胞において、特に低濃度の Cd の吸収には ZIP14 が重要な役割を果たす可能性を見出した。

今後、ZIP14 ノックアウトマウスを用いて消化管における Cd 吸収に対する ZIP14 の役割についてさらに明らかにしていきたい。

6. 引用文献

- 1) Bannon DI, Abounader R, Lees PS, Bressler JP (2003) Effect of DMT1 knockdown on iron, cadmium, and lead uptake in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C44-50.
- 2) Fleming RE, Migas MC, Zhou X, Jiang J, Britton RS, et al. (1999) Mechanism of increased iron absorption in murine model of hereditary hemochromatosis: increased duodenal expression of the iron transporter DMT1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3143-3148.
- 3) Xu H, Jin J, DeFelice LJ, Andrews NC, Clapham DE (2004) A spontaneous, recurrent mutation in divalent metal transporter-1 exposes a calcium entry pathway. *PLoS Biol* 2: E50.
- 4) Suzuki T, Momoi K, Hosoyamada M, Kimura M, Shibasaki T (2008) Normal cadmium uptake in microcytic anemia mk/mk mice suggests that DMT1 is not the only cadmium transporter in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol* 227: 462-467.

カドミウム毒性に対するメタロチオネイン-III の関与

○本田晶子（京大院工）

1. 目的

カドミウム (Cd) は肝毒性、精巣毒性、腎毒性および骨毒性などを引き起こす有害金属である。また、Cd 毒性に対する生体内防御タンパク質としてメタロチオネイン (MT) が知られており、4 種類の分子種が確認されている。これらの分子種のうち、MT-I および MT-II は、Cd による肝毒性、腎毒性および骨毒性に対して防御効果を示すことが MT-I/II 欠損マウスを用いた検討によって明らかにされている。一方、MT-III の Cd 毒性に及ぼす影響を検討した報告はほとんどない。そこで本研究では、Cd 毒性（肝毒性および精巣毒性）に対する MT-III の効果について MT-III 欠損マウスを用いて検討した。なお、比較対象として、MT-I/II 欠損マウスも併せて検討した。

2. 方法

2-1. 実験動物

雌雄の 129/Sv 系 MT-I/II 欠損マウス、MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスを米国ジャクソン研究所より購入した。飼育室は適度な温湿度および 12 時間サイクルの明暗照明が維持され、本研究における動物実験は、愛知学院大学薬学部内動物実験センターで「愛知学院大学薬学部動物実験指針」に従って十分な動物擁護の配慮下で行った。

2-2. Cd 肝毒性

2-2-1. 血清中 ALT・AST 活性の測定および肝臓の病理組織学的な形態観察

10-12 週齢の雄性 MT-I/II 欠損マウス、MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスに Cd (5、10、20 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 回皮下投与して、その 2 日後にエーテル麻酔下で心採血し、肝臓を摘出した。肝障害の指標として、血清中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) および血清中アスパ

ラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を臨床化学自動分析装置スポットケム EZ を用いて測定した。摘出した肝臓は包埋カセットに入れ、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋し、5 μm の切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的な形態変化を観察した。

2-2-2. Cd による肝臓での SAA1 および SAA2 遺伝子発現変動の測定

10-12 週齢の雄性 MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスに Cd (20 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 回皮下投与して、その 4 時間後にエーテル麻酔下で心採血し、肝臓を摘出した。肝臓中 Total RNA を抽出した後、急性期炎症性タンパク質である serum amyloid A1 (SAA1) および SAA2 mRNA 量を RT-PCR により測定した。

2-2-3. 肝実質細胞の Cd 毒性に対する感受性の測定

8-9 週齢の雄性 MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスをエーテル麻酔下で開腹し、マウス肝実質細胞を単離した。肝実質細胞を Cd (1、3、5、10 μM) で 24 時間処理した後、培地を回収し、細胞傷害性の指標として細胞から培地中に逸脱した乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を測定した。さらに、細胞の生存率を MTT アッセイにより評価した。

2-3. Cd 精巣毒性

2-3-1. 精巣中ヘモグロビン濃度の測定および精巣の病理組織学的な形態観察

10-12 週齢の雄性 MT-I/II 欠損マウス、MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスに Cd (15 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 回皮下投与して、その 6、12 および 24 時間後にエーテル麻酔下で心採血し、精巣を摘出した。精巣障害（出血）の指標として、精巣中のヘモグロビン濃度をヘモグロビン B-テストワコーキットを用いて測定した。摘出

した精巢は包埋カセットに入れ、10% 中性緩衝ホルマリン液で固定した後、パラフィン包埋し、5 μm の切片を作成して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的な形態変化を観察した。

2-3-2. Cd による精巢での遺伝子発現の網羅的解析

10-12 週齢の雄性 MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスに Cd (15 $\mu\text{mol/kg}$) を 1 回皮下投与して、その 6 時間後にエーテル麻酔下で心採血し、精巢を摘出した。精巢中 Total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法により遺伝子発現の網羅的解析を行った。なお、DNA チップは、マウス 35,852 遺伝子からデザインされたオリゴヌクレオチドを搭載した DNA チップ (OpArray Mouse) を用いた。顕著に変動した遺伝子については、リアルタイム RT-PCR により mRNA 量を確認した。

3. 結果

3-1. Cd 肝毒性

3-1-1. 肝障害

20 $\mu\text{mol/kg}$ の Cd を投与した野生型マウスの血清中 ALT および AST 活性は、コントロールに比べて有意に上昇した。これに対して、MT-III 欠損マウスの血清中 ALT および AST 活性は、いずれの Cd 投与群においてもコントロール群と比較して有意な変動を示さなかった。一方、MT-I/II 欠損マウスでは、10 $\mu\text{mol/kg}$ 以上の Cd 投与によって血清中 ALT および AST 活性の有意な増加が認められた。従って、20 $\mu\text{mol/kg}$ の Cd を投与した 3 系統のマウスの血清中 ALT および AST 活性は、MT-I/II 欠損マウス > 野生型マウス > MT-III 欠損マウスの順であった。

肝臓の病理組織学的な形態変化を観察したところ、野生型マウスでは Cd (20 $\mu\text{mol/kg}$) の投与によって、肝細胞の空胞変性および壊死が認められた。これに対して、MT-III 欠損マウスでは、

Cd 投与による形態の著変は観察されず、ごく稀に小さな壊死巣が認められた。一方、MT-I/II 欠損マウスでは、Cd の投与によって肝細胞の空胞変性および壊死が観察され、しかも、その傷害性は野生型マウスより重篤であった。

3-1-2. Cd による肝臓での SAA1 および SAA2 遺伝子発現

野生型マウスの肝臓中 SAA1 および SAA2 mRNA 量は Cd を投与しても変動しなかった。これに対して、MT-III 欠損マウスでは、肝臓中 SAA1 および SAA2 mRNA 量がともに Cd 投与によって著しく減少した。

3-1-3. 肝実質細胞の Cd 毒性に対する感受性

野生型マウスおよび MT-III 欠損マウス由来の肝実質細胞を 5 および 10 μM の Cd で処理したところ、培地中の LDH 活性はコントロールに比べて有意に上昇した。また、両細胞の LDH 活性を比較すると、いずれの Cd 処理群においても有意な差は認められなかった。さらに、MTT アッセイにおいても、5 μM 以上の Cd 処理によって細胞生存率の減少が認められたが、両細胞間で有意な差は認められなかった。

3-2. 精巢毒性

3-2-1. 精巢障害

Cd を投与した 3 系統のマウス精巢の肉眼的観察では、いずれのマウスにおいても時間依存的な出血が認められた。3 系統のマウス精巢中ヘモグロビン濃度においても、いずれも時間依存的な増加が認められた。Cd による精巢出血の程度を 3 系統のマウスで比較すると、Cd 投与 12 および 24 時間後において、MT-I/II 欠損マウス \approx 野生型マウス > MT-III 欠損マウスの順に軽度であった。肉眼的所見および精巢中ヘモグロビン濃度を指標とした精巢出血の程度は、ほぼ同様の結果が得られた。

Cd (15 $\mu\text{mol/kg}$) を投与して 12 時間後のマウス精巢の病理組織学的な形態変化を観察したところ、野生型マウスおよび MT-I/II 欠損マウスでは、間質における重度の出血並びに精細管

上皮細胞の変性・脱落が認められた。一方、MT-III 欠損マウスでは、間質の水腫が観察されたものの、重度の傷害は認められなかった。

3-2-2. 精巣で発現変動する遺伝子の網羅的解析

それぞれ無処置の MT-III 欠損マウスと野生型マウスとを比較したところ、35,852 遺伝子中 37 種の発現が増加し、79 種の発現が減少した。一方、Cd を投与した MT-III 欠損マウスと野生型マウスとの比較では、35,852 遺伝子中 14 種の発現が増加し、128 種の発現が減少した。2 つのマイクロアレイ解析においてともに著しい発現変動を示した遺伝子のうち、核酸配列が確定されている 5 つの遺伝子 (Pnp2、Rd3、Cdh24、RIKEN cDNA 2010204K13 および Olfr272) に注目した。なお、マイクロアレイ解析における MT-III 欠損マウスおよび野生型マウスの MT-III mRNA 量は、検出限界以下であった。

Cd 投与後の Pnp2、Rd3、Cdh24、RIKEN cDNA 2010204K13 および Olfr272 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR 法により経時的に測定した結果、Olfr272 mRNA 量は、両マウスともに検出限界以下であったが、リアルタイム RT-PCR による Pnp2、Rd3 および Cdh24 mRNA 量の結果は、マイクロアレイ解析結果と一致した。

4. 考察

以上の結果より、新たな知見として MT-III 欠損マウスが Cd による肝毒性および精巣毒性に対して抵抗性を示すことが見いだされ、MT-III は MT-I/II とは異なり Cd が引き起こす肝毒性や精巣毒性の発現に深く関与することが明らかとなった。また、*in vitro* では肝実質細胞において、正常細胞および MT-III 欠損細胞の間で、Cd に対する感受性に差は認められなかったことから、肝臓における MT-III の毒性増強効果には、MT-III が肝実質細胞で直接作用するのではなく、他の組織などを介して二次的に作用している可能性が考えられる。さらに、毒性発現様式のマカニズムとして SAA1、SAA2 (肝臓)、Pnp2、Rd3、Cdh24 (精巣)をはじめとする遺伝子が関与している可能性も考えられる。

謝辞

本研究は、佐藤雅彦教授 (愛知学院大学) のもとで実施され、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜り深謝致します。また、本研究の遂行にあたり、御指導、御協力を賜りました藤原泰之准教授 (愛知学院大学)、瀬子義幸先生および長谷川達也先生 (山梨県環境科学研究所)、島田章則教授 (麻布大学)、永瀬久光教授、保住功教授並びに原英彰教授 (岐阜薬科大学)、犬塚貴教授 (岐阜大学) に謝意を表します。

メチル水銀による細胞内鍵分子の S-水銀化に起因する
未知シグナル伝達経路の探索

○外山 喬士 (筑波大学、東京理科大学)、鍛冶 利幸 (東京理科大学)、熊谷 嘉人 (筑波大学)

1. 背景および目的

メチル水銀 (MeHg) は環境中に存在する親電子物質の一種であり、生体内でタンパク質のチオールと特異的に共有結合 (S-水銀化) する。これにより毒性発現やシグナル伝達の活性化を惹起する。これまで我々は、細胞毒性が発現する以下の濃度の MeHg は、親電子センサータンパク質の一つである Keap1 を S-水銀化することで、応答分子である転写因子 Nrf2 を活性化し、グルタチオン抱合系の酵素や排泄トランスポーターを誘導することで MeHg の毒性を防御することを明らかにしてきた^{1, 2)}。上記の経験から一定濃度以下の MeHg は、特定のセンサータンパク質 (鍵分子) を S-水銀化することで応答分子を活性化し、防御応答のシグナル伝達を亢進する可能性が考えられた。鍵分子を特定することで、このような MeHg の防御応答を明らかにすることは、MeHg の毒性に対する感受性や毒性発現における個体差の解明に繋がる。しかし、これまで網羅的な MeHg の鍵分子探索は行われていない。

本研究では、二次元電気泳動 (2D-SDS/PAGE)、原子吸光法 (AAS) および高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC-MS/MS) を組み合わせた複合分析法により、MeHg に対する細胞内鍵分子の網羅的な探索と、その S-水銀化に起因するシグナル伝達の活性化に関して解明を目指した。本研究戦略を図示する (図 1)。



図 1. MeHg に対する鍵分子および
応答分子同定のための研究戦略

2. 方法 (複合分析法)

ヒト神経芽細胞種 SH-SY5Y 細胞に MeHg (1 μM) を曝露し、2D-SDS/PAGE によりタンパク質を分離した。ゲルを 256 個の小片 (3 x 3 x 1 mm; W x H x D) に切り、それぞれの水銀量を測定した。本条件における AAS の検出限界値は 0.012 ng であり、0.06 ng 以上の水銀が検出されたゲルに関して、LC/MS/MS にてゲル中タンパク質の同定を行った。

3. 結果および考察

3-1. MeHg に対する鍵分子の同定

複合分析の結果、pI 5-6 を示す 140 kDa、80 kDa および 25 kDa 付近の 4 つのゲル小片に 0.06 ng 以上の比較的高濃度の水銀が検出された。それらのゲル小片からタンパク質を抽出し、LC-MS/MS で分析した結果、150 kDa oxygen regulated protein (ペプチド同定率 12%、pI=5)、78 kDa glucose regulated protein (ペプチド同定率 52.9%、pI=4.9)、Nucleolin (ペプチド同定率 32%、pI=4.4)、ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (ペプチド同定率 59.6%、pI=5.2) および heat shock protein 27 (ペプチド同定率 57.1%、pI=6) の 5 種類のタンパク質を同定した。特に ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) を含むゲル小片には 0.116 ng の

水銀が検出され、全てのゲル小片の中で最も高濃度の水銀が検出された。

3-2. 鍵分子 UCH-L1 と応答分子 Akt

UCH-L1 は、マウスの脳においては可溶性タンパク質の 2%と豊富に存在しており、神経細胞における脱ユビキチン化酵素の一種で、細胞内モノユビキチン量の調節を司る因子である。一方、Akt を負に制御するシグナル伝達制御因子としての報告もある³⁾。そこで MeHg による Akt/CREB シグナル伝達の活性化を検討した。

SH-SY5Y 細胞に MeHg を曝露すると、その濃度依存的に Akt はリン酸化し、リン酸化した Akt は核へ移行した。それに伴い、転写因子 CREB が活性化して下流の抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 の発現が約 2 倍上昇した。PI3K の阻害剤である LY294002 および Wortmannin の処理により、MeHg による本シグナル伝達の活性化および Bcl-2 の誘導は定常状態まで抑制され、MeHg による細胞死は有意に増強した。以上から、本細胞は応答分子 Akt の活性化を介して MeHg に対して防御応答を亢進することが明らかとなった。

3-3. UCH-L1 の Cys151 を介した Akt シグナルの活性化

UCH-L1 精製タンパク質を調製し、S 水銀化されるシステインを MALDI-TOF/MS によって特定したところ、その立体構造に重要な Cys151 が特異的に S 水銀化されていた。また、UCH-L1 を SH-SY5Y 細胞に高発現することで、MeHg による Akt の活性化は低下したが、Cys151 の Ser 変異体の高発現によって Akt シグナルは野生型 UCH-L1 の高発現

と比較し顕著に抑制された。UCH-L1 と Akt の相互作用に関しては現在検討中である。

以上から、UCH-L1 は MeHg に対する鍵分子の一つであり、Cys151 の S 水銀化を介して生存シグナルである Akt/CREB シグナルの活性化に関与すると考えられる。今後、本研究で同定された他の鍵分子に対しても、それぞれの応答分子とそれに係わるシグナル伝達の解明が期待される。

4. 結論

MeHg に対する鍵分子の網羅的探索から同定された UCH-L1 は、Cys151 が S 水銀化されることで Akt/CREB シグナル伝達を亢進し、防御応答に関与する (図 2)。

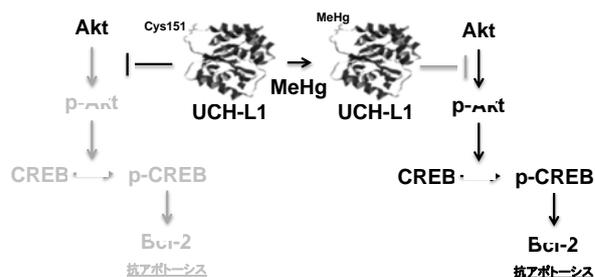


図 2. 鍵分子 UCH-L1 の S 水銀化を介した Akt/CREB シグナルの活性化

引用文献

- 1) Toyama T. et al., Biochem Biophys Res Commun 363: 645-650, 2007.
- 2) Toyama T. et al., Environ Health Perspect 119: 1117-1122, 2011.
- 3) Wang W. J. et al., Int J Oncol 33: 1037-1045, 2008.

母乳を介したメチル水銀ばく露量の算出

○岩井美幸（東北大学・院・医・環境保健医学、同・薬・生体防御薬学、日本学術振興会特別研究員 PD）、佐藤 洋（東北大学・院・医・環境保健医学）、龍田 希、仲井邦彦（東北大学・院・医・発達環境医学）、赤木洋勝（国際水銀ラボ）

1. 背景

メチル水銀は神経毒性をもち、感受性の高い胎児期および乳児期のばく露により児の発達への影響が懸念される。メチル水銀は胎盤透過性が高く、母体血と比較し臍帯血中のメチル水銀濃度は2倍程度高い。一方、母乳へのメチル水銀移行は少ないと考えられ、母乳を介した乳児へのメチル水銀ばく露に関しあまり議論は進んでいない。母乳は乳児期における主要な栄養源であり、感受性の高いこの時期のばく露を把握する意義は大きい。また母乳中の総水銀に占めるメチル水銀割合は、総水銀と無機水銀定量後の減算により算出されたもの、あるいは母乳中水銀が低濃度であることから総水銀のみのデータがほとんどである。そこで、本研究では母乳中総水銀およびメチル水銀を定量し、ばく露レベルと総水銀に占めるメチル水銀の割合 (Me/T) を算出したのち、乳児のメチル水銀ばく露量を推定した。

2. 方法

2-1. 対象者

子どもの発達に関する東北スタディ (Tohoku Study of Child Development, TSCD)¹⁾ の対象者より収集したサンプルを用いた。母体血赤血球、血漿および母乳を使用した。十分な試料量、すべての試料が揃う対象者を抽出し、毛髪総水銀濃度からランダムに28組を抽出した。うち1件は母乳中メチル水銀分析の際に試料が不足したため、27組の結果を示す。

2-2. 生体試料

母体血は出産直後の朝食前に、母乳は出産1ヶ月後に採取した。

2-3. 化学分析

総水銀は、湿式分解-還元気化原子吸光光度法により測定した。メチル水銀は、ジチゾン抽出-ECD-ガスクロマトグラフィー法によって定量した²⁾。母乳については分析法を改良し次のように実施した。5gの母乳に1N KOH-エタノールを加え100℃で10分間加熱処理後、20%EDTA-4Naを加え振盪した。次いで1NHCl、ヘキサンを順次加え振盪し、ヘキサン相中に試料中の油分を分離抽出した。ヘキサン相を除去後、水相に精製0.01%ジチゾン-トルエン溶液を加え振盪しメチル水銀を分離抽出した。水相を除去後、トルエン相を1N NaOHで振盪洗浄してトルエン相中過剰ジチゾンを除去し、澄明なトルエン相を得た。トルエン相中のメチル水銀は5ppmアルカリ性硫化ナトリウム溶液を用いてクリーンアップ後、精製0.01%ジチゾン-トルエン溶液を加えてメチル水銀を再抽出した。水相を除去後、トルエン相中の過剰なジチゾンは上記と同様に1N NaOHを加えて振盪洗浄して除去し、澄明なトルエン相を得た。これに1N HClを加え酸性化し試験溶液としECD-ガスクロマトグラフィーにて測定を行った。総水銀及びメチル水銀測定については標準添加法および標準試料を用いて精度確認を実施した。

母乳中タンパク量についてはBradford法 (Bio-rad社)にて分析を行った。母乳中脂質はレーゼゴットフリー法にて日本食品分析

センターに委託し分析を行った。

2-4. 統計学的解析

統計処理には、JMP version 7.0 を使用し、各媒体間の相関係数を算出した。統計学的有意水準は 5% とした。なお、本研究は東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に研究計画を提出し、承認を得て実施した。

3. 結果

3-1. 分析結果

母体血赤血球中水銀濃度の平均値 (Min-Max) は、総水銀 20.7 (3.7-40.5)、MeHg 20.3 (3.6-41.4) ng/g であった。血漿中水銀濃度の平均値 (Min-Max) は総水銀 1.7 (0.4-3.9)、メチル水銀 1.4 (0.3-3.7) ng/g であった。母乳中水銀濃度の平均値 (Min-Max) は、総水銀 0.84 (0.14-1.87)、メチル水銀 0.46 (0.06-1.20) ng/g であった。母乳中タンパクの平均値 (Min-Max) は、7.75 (3.94-11.28) mg/ml であった (n=25)。母乳中脂質の平均値 (Min-Max) は、3.58 (0.5-6.6) g/100g であった。

3-2. 総水銀に占めるメチル水銀割合

各検体のメチル水銀割合を図 1 に示した。

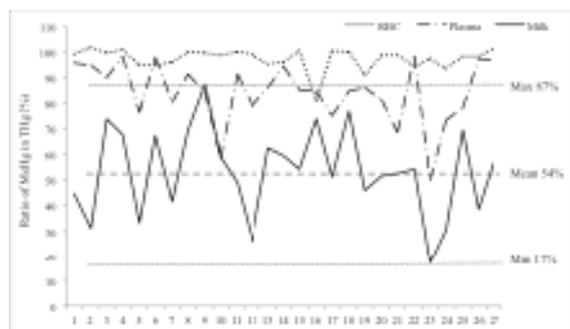


図 1. 総水銀に占めるメチル水銀割合

母体血赤血球中の総水銀に占めるメチル水銀割合の平均 (Min-Max) は、98 (81-102)% であ

った。血漿中の Me/T は 84 (50-98)% であった。母乳中の Me/T は 54 (17-87)% であった。

3-3. 母乳中メチル水銀と各媒体間の相関

母乳中メチル水銀は、採取日が異なるにもかかわらず母体血赤血球および血漿と高い相関を示した。また母乳中メチル水銀および総水銀に占めるメチル水銀割合は、母乳中脂質と高い相関を示したものの、タンパク量との相関は確認されなかった。

表 1. 各媒体間の相関関係

a) 母体血と母乳間	RBC-MeHg	Plasma-MeHg	母乳-THg	母乳-MeHg
RBC-MeHg (ng/g)	1.000	0.905**	0.565**	0.683**
Plasma-MeHg (ng/g)		1.000	0.398*	0.588**
母乳-THg (ng/g)			1.000	0.821**
母乳-MeHg (ng/g)				1.000

b) 母乳の分析値間	母乳-MeHg	母乳-Me/T	母乳中脂質	母乳中タンパク
母乳-MeHg (ng/g)	1.000	0.511**	0.583**	-0.029
母乳-Me/T (%)		1.000	0.592**	-0.073
母乳中脂質 (g/100g)			1.000	0.289
母乳中タンパク (mg/ml)				1.000

p<0.05*, p<0.01**

3-4. 母乳からの水銀ばく露量の推定値

新生児が 1 ヶ月時に 1 回に飲む母乳量を 120ml (120g と換算)、1 日あたりの授乳回数を 7 回、1 ヶ月児の体重を 4kg と想定し、母乳中の総水銀ならびメチル水銀濃度から 1 週間あたりの総水銀およびメチル水銀ばく露量を算出した。その結果、総水銀の 1 週間あたりのばく露量の平均値は 1.23 μ g/kgbw/week (最小値 0.20-最大値 2.75) であった。1 週間あたりのメチル水銀ばく露量は平均値 0.68 μ g/kgbw/week (最小値 0.09-最大値 1.76) であった。

4. 考察

本研究は母乳中メチル水銀を定量し、一般環境ばく露下において、総水銀に占めるメチル水銀の割合を明らかにした新たな報告である。メチル水銀は、胎児期のばく露が重要視され、メチル水銀の授乳期ばく露量に関する

データは少ない。本解析結果では、授乳回数や授乳量の設定などにもよるがわが国のメチル水銀の耐容週間摂取量(2.0 μ g/kgbw/week)を超えるばく露量になる新生児はいなかった。2003年に合同食品添加物専門家会議(JECFA)が示した耐容週間摂取量である総水銀 4 μ g/kgbw/week、(うちメチル水銀 1.6)を超える対象者が1名いた。

わが国では、「魚介類等に含まれるメチル水銀に係る摂食に関してハイリスクグループを胎児とし、妊娠中あるいは妊娠の可能性のある者の耐容週間摂取量を 2.0 μ g/kg 体重/週 (Hg として) とする」³⁾と食品安全委員会が定め、厚生労働省もメチル水銀濃度の高いいくつかの魚種に関して妊婦に摂食頻度の制限をするよう勧告をしている⁴⁾。ハイリスクグループに乳幼児が対象になっていないのは、母乳中のメチル水銀割合が 16%程度と低く、その多くは無機水銀であるとする知見や母乳中濃度が極めて低いという先行研究⁵⁾を反映させたものと考えられる。しかしながら、我々のコホート調査で得られた母乳について、メチル水銀を測定したところ、メチル水銀は平均で 54%と半分以上がメチル水銀であるこ

とが明らかとなった。乳幼児のメチル水銀ばく露について、分析数を増やすなどさらなる調査が必要と考える。

謝辞

本調査にご協力いただいたすべての参加者およびご家族の方々に深く感謝致します。

本研究はメチル水銀の低濃度曝露による健康影響に関する調査(環境省)により行われた。

引用文献

- 1) Nakai K., et al.: The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202: 227-237,2004.
- 2) 環境省, 水銀分析マニュアル, 2004.
- 3) 食品安全委員会評価書(評価案件 ID kya20040723175), 魚介類等に含まれるメチル水銀について, 2005
- 4) 医薬食品局食品安全部基準審査課, 妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項の見直しについて(平成17年11月2日), 厚生労働省, 2005
- 5) Skerfving S.: Mercury in women exposed to methylmercury through fish consumption, and in their newborn babies and breast-milk. *Bull Environ Contam Toxicol* 41:475-482,1988.

低濃度メチル水銀の成人期ばく露による心拍変動への影響

○柳沼梢（尚絅学院大、東北大院）、村田勝敬（秋田大院）、仲井邦彦、佐藤洋（東北大院）

1. 背景と目的

環境由来化学物質であるメチル水銀は、食物連鎖を介して魚介類に蓄積する。そのため、人は魚介類の摂取を介して低濃度ながら慢性的にメチル水銀のばく露を受ける。メチル水銀の健康リスクは、主として胎児期ばく露による児への発達影響が知られるが、海外においては、成人期ばく露による心血管系への影響も近年問題提起されている。東部フィンランドは、冠状動脈疾患の死亡率が高いことが知られており、Salonen ら¹⁾は1995年に東部フィンランドの一般住民を対象としたメチル水銀ばく露と心疾患による死亡率に関するコホート調査を行なった。その結果、メチル水銀の低濃度ばく露が心疾患のリスクファクターになりうることを指摘した。その後、米国²⁾や英国³⁾においてもメチル水銀と心血管疾患との関係に関する疫学調査が行われたが、相反する結果が報告され、メチル水銀ばく露による心血管系への影響については、未だ結論に至っていない。

我々は、人におけるメチル水銀の体内動態の理解を目的として、魚摂取に関するランダム化比較試験として低用量メチル水銀負荷実験を行った。その過程で、心拍変動への影響が観察されたので報告する。

2. 方法

2-1. 対象

調査参加者として宮城県内の大学にポスター掲示をして募集した成人男女 54 名（男性 28 名、女性 26 名）を対象とした。本研究は、東北大学医学系研究科倫理委員会の審査と承認のもとに実施した。

2-2. メチル水銀の負荷方法

54 名の対象者を、性、年齢、BMI を考慮して、メチル水銀を負荷する実験群（男性 14 名、女性 13 名）と負荷しない対照群（男性 14 名、女性 13 名）の 2 群に分けた。メチル水銀の負荷は、成人の暫定的耐容週間摂取量（PTWI、3.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/週、1973 年、厚生省）を限度とし、魚の摂取を介して 14 週間継続して行った。メチル水銀の負荷には、メバチマグロおよびメカジキ（どちらもメチル水銀濃度 1.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ ）を用いた。個人毎のメチル水銀摂取量の許容値を体重から算出し、その量が含まれる規定量の魚の切り身およびすき身のセットを作成した。実験群には、1 週間に 1 度魚を配布し、14 週間継続して摂取するよう指示した。対照群には、これまでの食生活を変えず、普段通りの生活を送るよう指示した。

2-3. 毛髪中総水銀濃度および血漿中不飽和脂肪酸濃度の観察

メチル水銀のばく露指標として、毛髪中総水銀濃度を用いた。実験開始前に後頭部の毛髪を 1 cm^2 程度剃り落とし、その部分から伸びた毛髪を 4 週間毎に採取し、分析に用いた。魚にはメチル水銀が含まれる一方、循環器疾患のリスクを下げる効果があるといわれる n-3 系不飽和脂肪酸（PUFA）が豊富に含まれるため、血漿中 PUFA の観察も行った。血液は、摂取開始前（ベースライン）、摂取終了時（15 週目）、観察終了時（29 週目）に採取した。

2-4. 化学分析

毛髪中および魚肉中の総水銀分析は、湿式灰化-還元気化原子吸光光度法により行った。血漿中および魚肉中の DHA、EPA 分析は、ガスクロマトグラフィー法によりエスアールエル株式会社にて行なった。

2-5. 心拍変動の測定

心拍変動 (Heart Rate Variability: HRV) の測定は、ベースライン、15 週目、29 週目に行なった。10 分間の安静臥床後、心拍動 R-R 間隔を 5 分間測定した。測定したデータの中から、標準偏差が最小となる 100 個の連続した R-R 間隔を自動的に抽出し、その抽出された区間のデータを用いて周波数分析を行った。

2-6. 統計解析

HRV パラメータの PSD_{LF}、PSD_{HF}、LF/HF ratio はいずれも対数正規分布を示したため、対数変換後の値を統計解析に用いた。統計解析は全て両側検定とし、有意水準を p<0.05 とした。統計解析ソフトは SPBS (Murata and Yano 2002) を用いた。

3. 結果

3-1. 対象者の属性

各群の年齢および BMI の平均値 (標準偏差) は、それぞれ実験群 25.2 (4.1) 歳、22.2 (3.2) kg/m²、対照群 23.7 (3.2) 歳、21.0 (2.7) kg/m² で、年齢、BMI とも 2 群間に有意差は認められなかった。血圧および一般血液生化学検査の結果においても、全ての項目で 2 群間に有意差は認められなかった。

3-2. 毛髪中総水銀濃度の変動

群毎の毛髪中総水銀濃度の変動の様子を図 1 に示す。

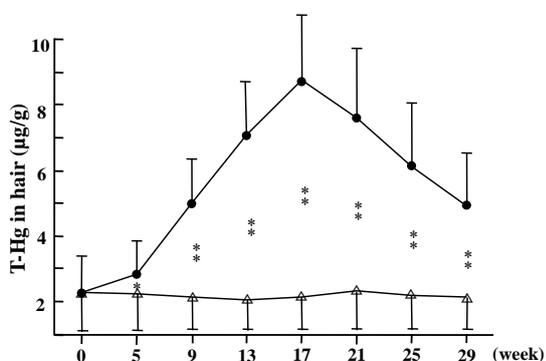


図 1 毛髪中総水銀濃度の変動

注 1 : ●は実験群 (n=27)、△は対照群 (n=27) を示す
 注 2 : Hotelling T² statistics=673.7, p<0.001
 Student's t-test (* p<0.05, ** p<0.001)

実験群と対照群の変動パターンは有意に異なり、0 週目を除く全ての週において、2 群間の平均毛髪中総水銀濃度に有意差が認められた。実験群の毛髪中総水銀濃度は、摂取を開始すると徐々に上昇し、17 週目のピーク時には 8.76 (2.01) µg/g に達した。17 週目を過ぎると下降に転じ、調査終了の 29 週目には 4.90 (1.65) µg/g まで減少した。一方、対照群の毛髪中総水銀濃度は常に 2.0 µg/g 程度を維持し、有意な変動は認められなかった。

3-3. 心拍変動パラメータの変化

実験群において、15 週目の CCV_{LF}、LF/HF ratio、%LF がベースライン時に比べて有意に上昇し、15 週目の LF/HF ratio および %LF には、2 群間に有意差が認められた (図 2)。

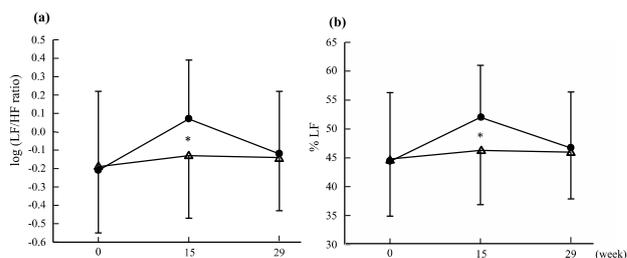


図 2 LF/HF ratio (a)および%LF (b)の経時的変化

注 1 : ●は実験群 (n=27)、△は対照群 (n=27) を示す
 注 2 : Student's t-test (* p<0.05)

ベースライン時から 15 週目までの変化量については、CCV_{LF} においてのみ 2 群間に有意差が認められ、実験群の変化量が対照群の変化量に比べて有意に大きかった (p<0.05)。なお、15 週目に上昇した実験群の CCV_{LF}、LF/HF ratio、%LF は、29 週目にはもとのレベルに戻っていた。血漿中 DHA+EPA 濃度は、実験群において徐々に減少していった (p<0.05)。対照群においては、HRV パラメータおよび血漿中 DHA+EPA 濃度、毛髪中総水銀濃度の全てにおいて有意な変化は認められなかった。

15 週目における性、年齢、BMI、血漿中 DHA+EPA で補正した CCV_{LF} と毛髪中総水銀濃度との関係を図 3 に示す。 CCV_{LF} と毛髪中総水銀濃度間に有意な正の関連性が認められた。この関係は 15 週目の測定値においてのみ認められ、ベースライン時および 29 週目の測定値においては認められなかった。

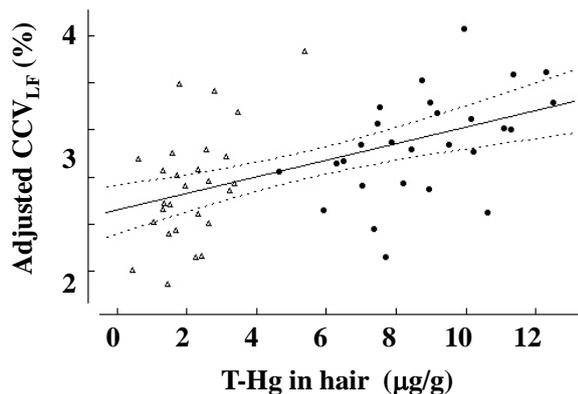


図 3 15 週目における CCV_{LF} (性、年齢、BMI、血漿中 DHA+EPA で補正) と毛髪中総水銀濃度との関係 (n=54)

注 1: ● は実験群 (n=27)、△ は対照群 (n=27) を示す
注 2: $Y = 2.16 + 0.087 X$ ($\beta=0.105, p<0.05$)

4. 考察

実験期間中に対象者の体調不良や体重減少、また、血液生化学マーカーや血算値に異常は認められず、本負荷実験が安全に遂行できたことが確認された。

本研究において、14 週間の PTWI を限度としたメチル水銀の負荷後、HRV パラメータの CCV_{LF} 、LF/HF ratio、%LF が上昇した。これらのパラメータの変化は、いずれも交感神経活動の上昇を意味する。交感神経活動の上昇は、精神的ストレスの負荷がかかった状態においてもみられるが、その場合は心拍数や血圧も同時に上昇する。しかし、本研究においては心拍数と血圧に変動は認められず、この現象に精神的ストレスの関与はなかったと考えられる。LF/HF ratio および %LF は、交感

副交感神経活動のバランスを反映し、副交感神経活動の減少または交感神経活動の上昇によって変化する。したがって、本研究では、交感神経活動の上昇による交感神経優位の状態が引き起こされたと考えられる。また、魚に含まれる n-3PUFA の循環器疾患を防ぐ効果が報告されていることから、血漿中 DHA+EPA 濃度も観察し、交絡因子として解析に加えたが、水銀レベルの上昇と交感神経活動上昇の関係は変わらなかった。しかしながら、本研究では魚を摂取しているにもかかわらず、実験群の血漿中 DHA+EPA 濃度が減少しており、HRV と n-3PUFA の関係を解析するには、n-3PUFA の摂取量も統制した新たな介入研究が必要と考えられた。

本研究で観察されたメチル水銀負荷後の交感神経優位の状態は、29 週目にはもとの状態に戻っており、メチル水銀の影響が可逆的な現象であったことが示された。しかしながら、ばく露が長期間に及んだ場合も、このような可逆的な現象であるかは明らかではない。このようなメチル水銀の低濃度ばく露が、ただちに健康リスクを与えるかについては定かでない。しかし、少なくとも、許容値レベルでもメチル水銀の継続的なばく露が心臓性自律神経活動のバランスに影響を与えることが示された。今後、低濃度メチル水銀ばく露による心血管系への健康リスクを明らかにするための更なる検討が必要と考えられた。

引用文献

- 1) Salonen JT et al. 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.
- 2) Guallar E et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 2002; 347: 1747-1754.
- 3) Yoshizawa K et al. Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 2002; 347: 1755-1760.

発表 8

周産期におけるメチル水銀ばく露が生後7ヶ月および18ヶ月の発達におよぼす影響 —沿岸都市に住む母子を対象に—

○龍田 希、仲井邦彦（東北大学・院・医・発達環境医学）、村田勝敬（秋田大学・院・医・環境保健学）、岩井美幸（東北大学・院・医・環境保健医学、同・薬・生体防御薬学）、柳沼 梢（尚絅学院大学・総合人間科学部・健康栄養学科）、黒川修行（宮城教育大学・教育・保健体育講座）、阿部和真（東北大学・院・医・発達環境医学）、佐藤 洋（東北大学・院・医・環境保健医学）

1. 背景

胎児期および新生児期は、中枢神経系が発達する時期であり、メチル水銀等の化学物質ばく露に対して感受性が高い。我々は、我が国におけるメチル水銀ばく露に起因した影響の有無を明らかにするため、出生コホート調査（Tohoku Study of Child Development, TSCD）¹⁾を進めている。メチル水銀の主な摂取経路は魚介類の摂取によるものと考えられることから、TSCDでは中核都市および魚介類摂取量が多い沿岸部の都市にて2002年12月から2006年3月の間に749組の母子を登録した。

昨年度の本ミーティングでは、沿岸都市で登録された母子を対象とし、胎児期および新生児期におけるメチル水銀ばく露が生後3日目に実施した新生児行動評価におよぼす影響について報告した。本報告では、生後7ヶ月および18ヶ月に実施した発達検査におよぼす影響を調べる。また、セレンおよびDHAなどの栄養学的因子にも配慮する。

2. 方法

2-1. 対象者

TSCDのうち、沿岸都市で登録された母子を対象として出生児が生後7ヶ月および18ヶ月に調査を実施した。

2-2. 調査内容

発達指標として、生後7ヶ月および18ヶ月に Kyoto Scale of Psychological Development 2001（KSPD）および Bayley

Scales of Infant Development second edition (BSID)をそれぞれ実施した。KSPDは国内で標準化された発達検査であり、認知-適応(C-A)、言語-社会(L-S)、姿勢-運動(P-M)と総合的な発達指数(DQ)が算出される。BSIDは、海外の疫学研究で多用されている発達検査法だが、国内では標準化されていない。Mental Developmental Index (MDI)とPsychomotor Developmental Index (PDI)の2指標から構成される。

2-3. 生体試料

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

2-4. 交絡要因

出生時体重、在胎週数などの情報を収集した。育児環境を評価するため、安梅が開発した育児環境評価を使用した。母親の推理能力を調べるため、Raven's Standard Progressive Matricesを実施した。

2-5. 統計学的解析

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

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

て実施した。

3. 結果

対象母子の基本属性および発達検査の得点を表 1、ばく露レベルを表 2 に示す。

表 1 対象母子の基本属性

	n	平均値	標準偏差	%
在胎週数 (週)	702	39.7	1.2	
出生時体重 (g)	702	3144	356.6	
子どもの性別 (% 男児)	702			50.9
出産時の母親年齢	702	29.5	4.9	
出生順位 (% 第一子以降)	702			58.8
妊娠中の飲酒の有無 (% 有)	699			16.4
妊娠中の喫煙の有無 (% 有)	699			12.4
育児環境評価の得点	581	26.6	3.8	
Ravenの得点	622	50.0	5.9	
7ヶ月時の調査結果				
KSPD				
C-A	615	106.1	7.8	
L-S	615	85.1	11.4	
P-M	615	96.4	12.4	
DQ	615	101.5	7.1	
BSID-II				
MDI	615	92.3	5.4	
PDI	615	80.3	9.4	
18ヶ月時の調査結果				
KSPD				
C-A	572	95.5	10.2	
L-S	572	96.9	11.3	
P-M	572	85.2	12.8	
DQ	572	93.7	8.5	
BSID-II				
MDI	572	87.1	10.4	
PDI	572	84.6	10.3	
7ヶ月検査時平均月齢7.0、標準偏差0.2				
18ヶ月検査時平均月齢18.0、標準偏差0.2				

表 2 ばく露レベル

	n	中央値	5%ile	95%ile
臍帯血総水銀 (ng/g)	692	15.7	5.5	31.0
臍帯血セレン (ng/g)	702	66.3	51.0	80.0
母体血DHA (mg/ml)	702	169.0	101.1	236.6

3-1. 7ヶ月の発達指標とばく露指標

生後7ヶ月の調査では615組を解析対象とした(表1)。発達検査の得点とばく露指標との関連性を単相関分析により検討した結果、臍帯血総水銀とKSPDのL-SおよびBSIDのMDI

との間に有意な正の関連性が示された。臍帯血セレンは、KSPDのP-M、DQおよびBSIDのPDIと正の関連性が認められた。一方、母体血DHAについて関連性は観察されなかった(表3)。

次に、KSPDのL-SおよびBSIDのMDIをそれぞれ従属変数、ばく露指標および交絡因子を独立変数とした重回帰分析を実施した(表4)。KSPDのL-S($p=0.001$)およびBSIDのMDI($p=0.029$)は交絡要因の影響を調整しても臍帯血総水銀との間に有意な正の関連を示した。一方で、臍帯血セレンと関連性がみられた発達指標は、重回帰分析では有意な関連性は消失した。

3-2. 18ヶ月の発達指標とばく露指標

生後18ヶ月の調査では572組を解析対象とした(表1)。発達検査の得点とばく露指標との関連性を単相関分析により検討した結果、臍帯血総水銀とBSIDのPDIとの間に有意な負の関連性が示された($p=0.020$)。一方、臍帯血セレンおよび母体血DHAについては、有意な関連性は観察されなかった(表5)。

次に、BSIDのPDIを従属変数、ばく露指標および交絡因子を独立変数とした重回帰分析を実施した(表6)。臍帯血総水銀は、交絡要因の影響を調整してもBSIDのPDIとの間に有意な負の関連を示した($p=0.008$)。PDIは子どもの性別と関連性がみられたため、子どもの性別で層別して解析を行った。その結果、男児において、臍帯血総水銀とBSIDのPDIとの間に負の関連性が認められた($p=0.004$)。

表 3 生後7ヶ月の発達指標とばく露指標(単相関)

	KSPD				BSID-II	
	C-A	L-S	P-M	DQ	MDI	PDI
臍帯血総水銀 (ng/g)	0.020	0.148 **	0.016	0.046	0.103 *	0.059
臍帯血セレン (ng/g)	0.065	0.000	0.109 **	0.097 *	0.022	0.084 *
母体血DHA (mg/ml)	0.010	0.058	-0.068	-0.023	0.059	-0.022

Pearson's r を示す。
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

表 4 生後 7 ヶ月時のばく露指標と発達指標
(重回帰)

	KSPDのL-S		BSID-IIのMDI	
Adjusted R ²	0.050	**	0.087	**
臍帯血総水銀 (ng/g)	0.156	**	0.100	*
臍帯血セレン (ng/g)	-0.020		0.060	
母体血DHA (mg/ml)	0.015		0.029	

* p<0.05, ** p<0.01

標準化βを示す。

共変量として、在胎週数、出生時体重、子どもの性別、出産時の母親年齢、出生順位、妊娠中の飲酒の有無、妊娠中の喫煙の有無、育児環境評価の得点、Ravenの得点、検査時の月齢、テスター

表 5 生後 18 ヶ月の発達指標とばく露指標(単
相関)

	KSPD				BSID-II	
	C-A	L-S	P-M	DQ	MDI	PDI
臍帯血総水銀 (ng/g)	0.023	0.032	0.009	0.030	-0.053	-0.098 *
臍帯血セレン (ng/g)	0.001	0.017	0.032	0.014	0.053	0.020
母体血DHA (mg/ml)	0.042	-0.010	0.018	0.040	0.011	0.007

Pearson's rを示す。

* p<0.05, ** p<0.01

表 6 生後 18 ヶ月時のばく露指標と発達指標
(重回帰)

	全対象児		男児	女児
Adjusted R ²	0.055	**	0.076	0.065
臍帯血総水銀 (ng/g)	-0.123	**	-0.201	**
臍帯血セレン (ng/g)	0.025		0.035	0.015
母体血DHA (mg/ml)	0.050		0.112	0.000

* p<0.05, ** p<0.01

標準化βを示す。

共変量として、在胎週数、出生時体重、子どもの性別、出産時の母親年齢、出生順位、妊娠中の飲酒の有無、妊娠中の喫煙の有無、育児環境評価の得点、Ravenの得点、検査時の月齢、テスター

4. 考察

メチル水銀の影響としては生後 7 ヶ月で正の影響、生後 18 ヶ月では男児でのみ負の影響が観察され、矛盾する結果となった。この矛

盾について理由は定かではないが、海外の先行研究に、男児にのみ負の影響が示された研究^{2,3)}もあり、その点では一致する見解が得られた。臍帯血セレンはメチル水銀の毒性を軽減する働きがあるとされるが、共変量の取り扱いで結果に一貫性が認められなかった。DHA は胎児の脳の発達に関与することが知られるが、本研究ではその影響は確認できなかった。

なお、中核都市で実施した調査では、メチル水銀の影響は生後 7 ヶ月でも 18 ヶ月でも観察されておらず、沿岸都市とは異なる結果であった。沿岸都市は中核都市に比べてメチル水銀へのばく露レベルが高いことが原因の一つと考えられた(臍帯血総水銀の中央値: 中核都市 10.0 ng/g、沿岸都市 15.9 ng/g)。

今後も子どもの発達を追跡し、メチル水銀ばく露の健康リスクを明らかにすることが必要と考えられた。

引用文献

- 1) Nakai K., et al.: The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202, 227-237, 2004.
- 2) Davidson PW., et al.: Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months. *Neurotoxicology* 16(4), 677-688, 1995.
- 3) Myers GJ., et al.: Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361(9370), 1686-1692, 2003.

リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます

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