

平成 27 年度環境省委託業務報告書

平成 27 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 28 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社



はじめに

本報告書は、環境省 総合環境政策局 環境保健部 企画課 特殊疾病対策室の委託業務「平成 27 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 28 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社



平成 27 年度 水俣病に関する総合的研究  
委託業務報告書  
目 次

1	業務の背景及び目的	1
2	業務の実施内容	1
2.1	研究班の設置（継続）	1
2.2	「重金属等による健康影響に関する総合的研究」評価委員会及び推進委員会の設置	2
2.3	新規研究課題の公募に関する事務	3
2.4	推進委員会の開催（新規研究課題の採択）	3
2.5	重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）	4
2.6	推進・評価合同委員会の開催	4
2.7	メチル水銀研究ミーティングの開催	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	6
2.11	研究成果還元業務の実施	6
3	各研究班の報告	6
	○水俣病に係る有効な診断方法	7
	I 研究課題：高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発	9
	中村 昭範（国立研究開発法人国立長寿医療研究センター脳機能画像診断開発部 室長）	
	○水俣病患者の経年的変化及び自然史	39
	II 研究課題：水俣病患者の経年的変化および自然史の把握	41
	安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学 教授）	
	○メチル水銀への曝露量と症状の関係	49
	III 研究課題：メチル水銀曝露量に依存したグリア細胞の機能シフトと中枢神経細胞障害	51
	小泉 修一（山梨大学医学部薬理学 教授）	
	IV 研究課題：メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー	69
	村田 勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学 教授）	
	V 研究課題：メチル水銀曝露量と神経症状との関係解明に資するためのメチル水銀毒性発現に関わる細胞内因子の同定と作用機構解析	115
	永沼 章（東北大学大学院薬学研究科 教授）	
	VI 研究課題：水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露指標の開発に関する研究	125
	上野 眞也（熊本大学政策創造研究教育センター 教授）	
	VII 研究課題：メチル水銀の捕獲・不活性化に関わる新奇リスク軽減因子の実態解明	147
	熊谷 嘉人（筑波大学医学医療系 教授）	

参考資料.....	155
メチル水銀研究ミーティング講演要旨集	

## 1 業務の背景及び目的

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

本業務は、このような状況を踏まえ、水俣病について水俣病に関する研究を行うことを目的とした。

## 2 業務の実施内容

### 2.1 研究班の設置（継続）

平成26年度に開催された推進委員会で取り決められた研究の方向性等の方針に基づき、以下の4つの研究班を設置し、調査研究を行った。

なお、研究班に係る研究の実施にあたっては、受託者と研究班の間で事務委任契約を締結し、その契約内容に基づき、研究班の請求に応じてすみやかに一括で概算払い（前払い）を行った。

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

研究領域：水俣病に係る有効な診断方法

I 研究課題： 高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

主任研究者： 中村 昭範（国立研究開発法人国立長寿医療研究センター脳機能画像診断開発部 室長）

研究領域：メチル水銀への曝露量と症状の関係

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

主任研究者： 小泉 修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

IV 研究課題： メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

主任研究者： 村田 勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学 教授）

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

主任研究者： 永沼 章（東北大学大学院薬学研究科 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」）の各課題の外部評価を進めるに当たって、以下の委員会を設置した。また、各委員会の運営要綱を作成した。なお、評価を進めるに当たっては、環境省の研究開発評価指針に基づいた評価方針を作成した。

### ①評価委員会の設置

第三者（主任研究者又は研究者以外の有識者）9名で構成される評価委員会を設置した。なお、評価委員会委員の構成は下表の通りである。

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

○：委員長

### ②推進委員会の設置

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

委員	所属・役職
赤木 洋勝	有限会社国際水銀ラボ 取締役所長
石本 二見男	東京慈恵会医科大学 客員教授
井村 伸正	財団法人 麻薬・覚せい剤乱用防止センター 理事長
遠山 千春	東京大学 名誉教授
中川 正法	京都府立医科大学附属 北部医療センター 病院長 京都府立医科大学大学院 医学研究科 教授
○渡辺 知保	東京大学大学院 医学系研究科 教授

○：委員長

## 2.3 新規研究課題の公募に関する事務

本業務の受託に先立って行われる研究者公募、及びそれに関する推進委員会の審議の結果に応じて、新規研究に関する公募の事務を行った。公募時に提出された申請書を受け取り、記載事項を確認するとともに、必要に応じて申請者に修正を依頼した。2.4「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」で開催した推進委員会において採択された下記の研究課題について新規に研究班を設置し、調査研究を行った。

なお、研究班に係る研究の実施にあたっては、「平成 27 年度水俣病に関する総合的研究委託業務仕様書」の仕様書別紙「再委任等に関する内容」により再委任した。

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

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

研究領域：水俣病患者の経年的変化及び自然史

II 研究課題： 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

主任研究者： 安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学 教授）

研究領域：メチル水銀への曝露量と症状の関係

VI 研究課題： 水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露指標の開発に関する研究

主任研究者： 上野 眞也（熊本大学政策創造研究教育センター 教授）

VII 研究課題： メチル水銀の捕獲・不活性化に関わる新奇リスク軽減因子の実態解明

主任研究者： 熊谷 嘉人（筑波大学医学医療系 教授）

## 2.4 推進委員会の開催（新規研究課題の採択）

平成 27 年 6 月 23 日に日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて「第 1 回重金属等による健康影響に関する総合的研究推進委員会」を開催した。推進委員会では、本業務の受託に先立ち行われた研究者公募に応じた研究課題について、新規に計 3 班の研究班を採択した（2.3「新規研究課題の公募に関する事務」参照）。出席した推進委員会委員は以下の通りである。なお、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。さらに、推進委員会の審議の結果に基づいて、採択対象とされた研究計画の内容について、研究者と所要の調整を行った。

<推進委員会への出席委員>

推進委員：石本二見男、井村伸正、中川正法、渡辺知保（敬称略、五十音順）

## 2.5 重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）

平成 28 年 1 月 8 日 9：00～16：25 に LMJ 東京研修センター2 階特大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」を非公開で開催した。研究発表会では、「水俣病に関する総合的研究」及び「イタイイタイ病及び慢性カドミウム中毒に関する総合的研究」の各研究班の主任研究者等が前年度及び年度途中までの研究成果を発表した。評価委員会委員は発表を聞いた上で、同日開催された推進・評価合同委員会（2.6 「推進・評価合同委員会の開催」を参照）にて各研究成果を評価した。なお、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。この研究発表会及び推進・評価合同委員会に出席した評価委員会委員及び一部の推進委員会委員は以下の通りである。

<研究発表会への出席委員>

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

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

また、研究発表会前には、2.1「研究班の設置（継続）」、2.4「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」で設置された研究班の主任研究者等より中間成果報告書の提出を受け、評価委員会の委員に送付し、事前評価を依頼し、評価結果を取りまとめた。

## 2.6 推進・評価合同委員会の開催

平成 28 年 1 月 8 日 16:30～18:00 に LMJ 東京研修センター3 階大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合的研究 推進・評価合同委員会」を開催した。2.5「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）」における各研究班の発表内容を受けて、個々の研究班の研究成果についての評価を評価委員会から推進委員会に報告し、平成 28 年度に行う研究について検討した。なお、出席した全委員に対して旅費及び謝金を支給した。この推進・評価合同委員会の出席者は以下の通りである。

<推進・評価合同委員会への出席委員>

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

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

また、推進・評価合同委員会の審議内容等を踏まえ、各研究班の研究成果に対する評価結果をとりまとめた。とりまとめた評価結果について、2.1「研究班の設置（継続）」、2.4「推

進委員会の開催（新規研究課題の採択）」で設置された研究班及び関係者に送付した。

## 2.7 メチル水銀研究ミーティングの開催

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）の前日の平成 28 年 1 月 7 日 9:00～17:00 に LMJ 東京研修センター2 階特大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合的研究」の更なる発表に資することを目的に「メチル水銀研究ミーティング」を開催した。メチル水銀による健康影響に関する研究者である吉田稔教授（八戸学院大学）を特別講演者として招待し、一般講演者及び若手講演者を公募し、研究状況を演題発表の形で共有した。演題発表時には演者等の講演内容や発表内容に応じて進行役の座長を置いた。若手発表によるメチル水銀に関する研究活動を促進するため、各座長と相談して、特に優秀な発表者 2 名に対して表彰を行った。演者等に対しては、仕様書に従って旅費及び謝金を支給した。メチル水銀研究ミーティングの開催にあたり、メチル水銀ミーティングの運営に係る要領等を定めた。

なお、「メチル水銀研究ミーティング」のプログラム及び講演要旨集は参考資料の通りである。

## 2.8 研究計画書の作成の依頼

推進・評価合同委員会の審議内容等を踏まえ、平成 28 年度に研究を継続する予定である研究班、安東班（熊本大学）、上野班（熊本大学）、熊谷班（筑波大学）に、平成 28 年度の研究計画書の作成を依頼した。

また、2.9「推進委員会の開催」の後に、取りまとめた評価結果を各研究班に送付するとともに、継続が認められた研究班に対して平成 28 年度の研究計画書の修正を依頼した。

## 2.9 推進委員会の開催

平成 28 年 3 月 3 日に日本エヌ・ユー・エス株式会社大会議室にて、推進委員会を開催し、2.8「研究計画書の作成の依頼」に基づいて各研究班から提出された平成 28 年度の研究計画書について、推進・評価合同委員会からの評価結果の報告に基づいて、平成 28 年度における継続の可否にかかる評価を行い、平成 28 年度における新規研究課題の設定や研究費の配分等について議論を行った。なお、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。推進委員会の出席者は以下の通りである。

<推進委員会への出席委員>

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

## 2.10 研究報告書の作成

2.6「推進・評価合同委員会の開催」、2.9「推進委員会の開催」の審議内容等を踏まえ、各研究班に対して平成27年度の研究報告書の作成と電子媒体による提出を求め、すべての研究班から研究報告書（英文サマリーを含む）を受け取り、必要事項が記載されているかどうか確認した上で、業務結果を取りまとめた報告書に掲載し、環境省に提出した。各研究班の研究報告書は下記3.「各研究班の報告」に示す通りである。

## 2.11 研究成果還元業務の実施

環境省が定めた範囲において、2.1「研究班の設置（継続）」及び2.4「推進委員会の開催（新規研究課題の採択）」で設置した研究班が本研究で得られた成果を学会発表や論文掲載する場合、その経費（宿泊費、交通費、学会参加費、論文掲載料、英文翻訳料等）について、研究班の申請に基づいて、環境省担当官と協議の上、1研究課題につき200,000円を上限として支払うこととなっている。

本年度は、該当研究班からの申請はなかった。

## 3 各研究班の報告

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病に係る有効な診断方法



## I 高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発



## 高齢者の皮膚感覚機能の客観的評価法の開発

主任研究者 中村 昭範（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部室長）  
分担研究者 根本 哲也（国立長寿医療研究センター 長寿医療工学部室長）

### 研究要旨

水俣病の皮膚感覚機能を客観的に評価できる方法を確立していく目的で、以下の3つの課題に取り組んだ。①末梢神経障害を評価するための、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の検証：昨年度までに開発した皮膚感覚の自動閾値判定システムと脳磁図測定を組み合わせ、行動学的に計測した電気刺激に対する皮膚感覚閾値と、脳磁図反応波形との関連を検討した。高齢者12名の測定データを解析した結果、行動学的に計測した感覚閾値と、脳磁場反応とは非常によく一致し、感覚閾値以上の刺激で有意な反応波形が得られることが示された。②昨年度開発した舌や口唇での二点識別覚の脳磁図測定が可能な刺激装置を用い、計11名の高齢者の舌の二点識別に対応した脳磁図誘発波形を測定し、Mismatch反応の解析を行った。更に、代表例における脳磁図の電源解析を行い、舌の二点識別覚に関連した脳の責任領域の可視化に成功し、それが一次体性感覚野と、そのやや後方の頭頂間溝と下頭頂小葉領域にあることを示した。③水俣病における感覚障害や小脳症状に対応して中枢神経に生じる変化を、最新のMRI解析技術を用いて詳細に解析した。健康高齢者91名のMRI画像を対象に、水俣病患者6名のMRI画像を比較した結果、水俣病患者群では、小脳、一次視覚野、一次体性感覚野、一次運動野、一次聴覚野の灰白質の有意な萎縮を認め、発症後約半世紀を経過しても、これまで明らかにされていた病理学的所見とよく一致した変化が認められることが示された。更に、脳磁図で推定した二点識別覚に対応した脳の関連領域と、水俣病による脳萎縮部位がオーバーラップしていることも明らかとなり、水俣病による二点識別覚障害がこの部位のダメージと関連していることが強く示唆された。

キーワード: 二点識別覚, 客観的測定, 脳磁図, 体性感覚誘発磁場, ミスマッチ反応, MRI Voxel Based Morphometry (VBM), 皮質領域容積, 脳萎縮

研究者協力者氏名:

岩田香織（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）  
加藤隆司（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 室長）  
藤原 謙（国立長寿医療研究センター 脳機能画像診断開発部 研究員）  
Kersten Diers（Department of Psychology TU Dresden Dresden Germany 助手）  
中村政明（国立水俣病総合研究センター・臨床部）  
植田明彦（熊本大学神経内科）

## I 研究目的

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

背景及び必要性：二点識別覚は統合皮膚感覚の空間分解能の指標となる基本的な認知能力のひとつであるが、メチル水銀中毒で低下することが知られているため、メチル水銀中毒のバイオマーカーのひとつとして利用することが期待されている。我々はこれまでの研究で自動二点識別覚測定システムを開発し、これと脳磁図のMismatch反応<sup>1)</sup>を組み合わせることにより、客観的に二点識別覚の閾値を推定できる可能性を示した。しかし、一般応用するには、1)個人差の大きい脳磁図波形の正常範囲の反応を明らかにしていくと共に、検査の信頼性そのものを更に高めていく必要がある、2)末梢神経障害がある場合にどのような評価ができるのかが不明である、といった問題点をクリアしていかなければならない。そのため、①末梢神経障害の客観的評価法の確立、②舌での二点識別覚の測定、③中枢神経の直接的評価、の3つの異なる視点からこの問題に取り組んでいる (図1)。

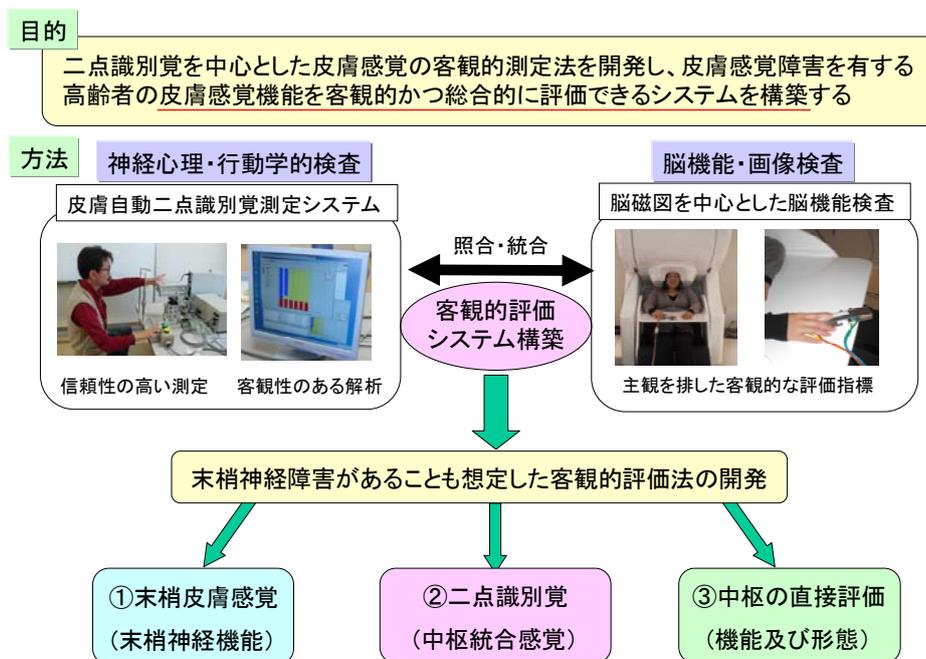


図1: 本プロジェクトの概要

## II 研究方法

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

昨年度までに開発した皮膚感覚の自動閾値判定システム (図2) と脳磁図測定を組み合わせ、行動学的に計測した電気刺激に対する皮膚感覚閾値と、脳磁図反応波形との関連を検討した。解析対象は、昨年度計測した5名のデータを含む、認知機能が正常な健康高齢者12名 (63-79才、71.5±5.1才、女性7名) である。

## <測定>

測定は、1)まず右示指先端に刺激電極をテープで固定し、電気刺激の強さを徐々に変化させながら、ギリギリ感じる限界の電気刺激の強さを被検者に口頭で答えてもらって感覚閾値を仮設定し、2)次にこの仮設定閾値に対して0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6倍の6種類の強さの電気刺激を、右示指先端部にランダムに与え（それぞれ10回ずつ計60回、刺激間隔は $2000 \pm 400$  ms）、被験者は閉眼して指先の感覚に集中し、刺激を感じたらボタンを押すような課題を行ってもらった。3)引き続いて同じ6種類の刺激をランダムに与えながら（刺激間隔は $200 \pm 50$  ms、各刺激150回ずつ）Elekta社製Neuromag (306 ch system)を用いて脳磁図測定を行い（脳磁図測定中は安静座位でボタン押し反応は行わない）、4) 脳磁図測定終了後、再び 2)と同様のボタン押し課題を行ってもらった。

## <データ解析>

個人毎の感覚閾値は、まず、PCに取り込んだボタン押し反応データを我々が開発したS字フィッティングアルゴリズムで50%認識閾値を計算して求め（図2）、次に、脳磁図測定前後2回の測定データの平均値を求めて行動学的な感覚閾値とした。

脳磁図データは、昨年度開発した統計学的手法による客観的な「有意波形」判定法を用いた（図3）。分析には、SPM8 (Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, University College, London, UK) を用い、Sensor配列を $64 \times 64$ の仮想2次元空間（x, y軸）に配置し、time courseをz軸として、個別反応波形に対する3次元のvoxel by voxelのt検定を行った。今回の解析では、仮設定閾値の0.6倍の刺激に対する反応と比較して、P値が0.001以下の有意差を示す脳磁波形変動のクラスターを、刺激対側のセンサーにおいて認められた場合を「有意な反応あり」とした。

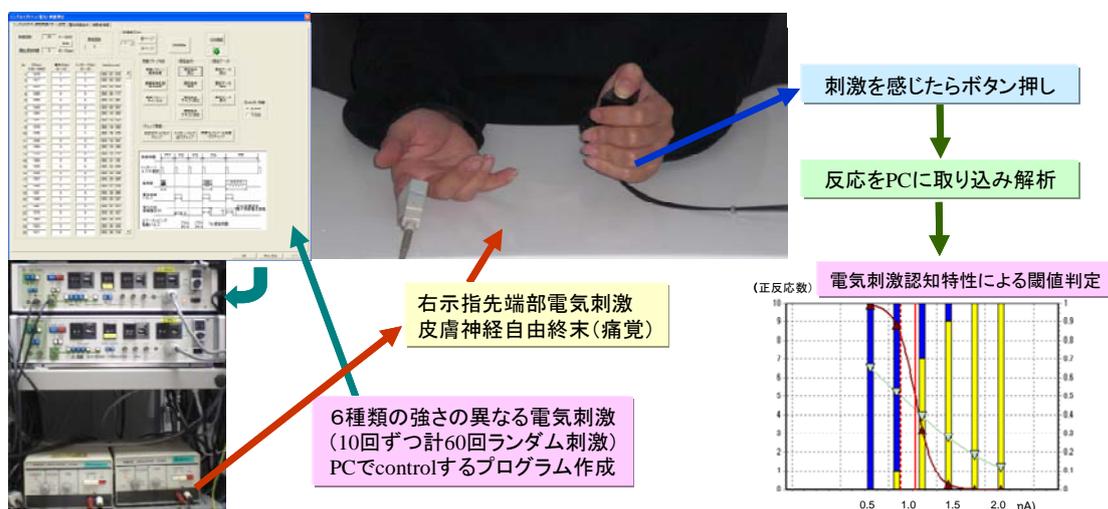


図 2 : 電気刺激に対する皮膚感覚の自動閾値判定システムの概略。6種類の異なる強さの電気刺激をランダムに被検者皮膚に与え、刺激を感じたらボタンを押して反応を行う。反応はPCに取り込み、S字フィッティングにより50%認識閾値を計算して求める。

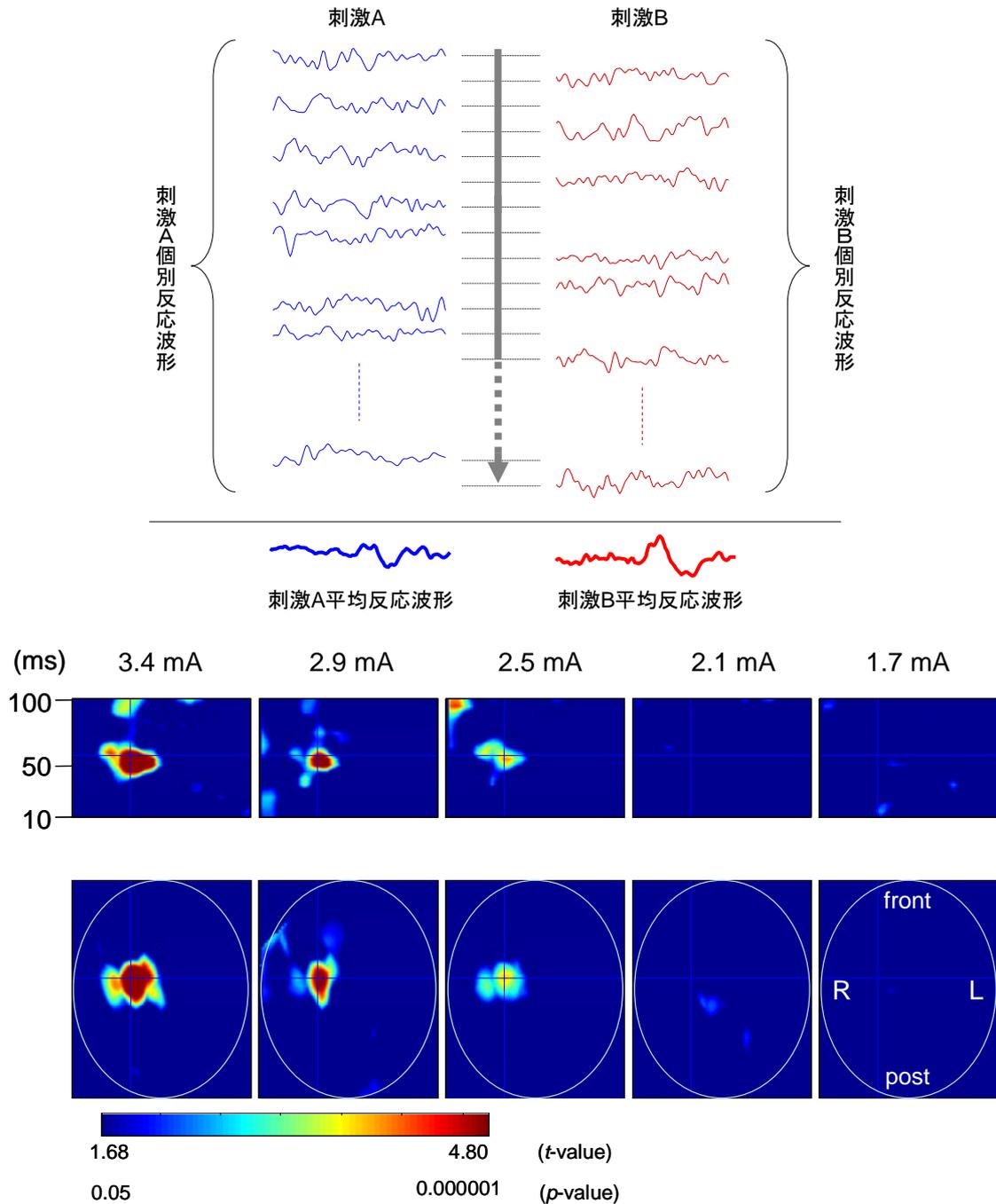


図3: 上: 個別反応波形を用いた統計解析の概略。刺激Aに対するn個の個別反応波形群と、刺激Bに対するm個の個別反応波形群を、statistical parametric mapping (SPM) の手法を用いて群間比較を行う。下: SPMによる個別反応波形の解析結果。下段のブルーのBoxはsennsor配列を2次元に展開したもので、そこに薄いブルーで示されたR-L line上のsennsor波形の時系列を、z軸上に展開したものが上段のブルーのBoxに示されている。Rainbow colorは、群間差をt値で示したもので、p値換算で0.05 から0.000001までの範囲でカラーマッピングされている。この事例では2.5mA以上の強度の電気刺激で脳の有意な反応が得られていることが示されている。

## ②舌刺激に対する二点識別覚関連Mismatch反応の検討

末梢神経障害は通常手袋靴下状に分布して舌はspareされるため、舌においては末梢神経障害の影響をあまり考えずに二点識別覚の評価ができると考えられる。言い換えると、舌で二点識別覚の異常を認めた場合には、中枢の病変が疑われることになる。そこで昨年度、舌の二点識別覚に関連した脳磁図反応を測定できるシステムを完成させ（図4）、実際に若年成人1名、高齢者6名を対象に脳磁図実測定を行った。今年度は、更に5名の高齢者を対象に脳磁図測定を行い、昨年度行った測定と併せて高齢者11名のデータをまとめて解析した。

### <脳磁図測定>

触覚刺激は被験者の舌尖端に1点刺激（standard：80%、400～480回）と2点刺激（deviant：20%、100～120回）をランダムに与えるOddball刺激である。2点間距離を5mm及び2mmに設定し、刺激間隔は650～850ms、プローブの押出時間200msとした場合の誘発反応を個別に測定記録した。尚、測定時には、プローブの駆動に伴う微弱な音が聞こえないように、イヤホンを通じて音楽を聴かせた。

### <データ解析>

有意なMismatch反応が得られたかどうかは、昨年度開発したSPM8を用いた客観的判定法を用いて評価を行った（図5）。判定基準は、standard刺激に対する反応とdeviant刺激に対する反応とを比較して、P値が0.001以下の有意差を示すクラスターが、刺激対側のセンサーにおいて認められた場合を「有意なMismatch反応あり」とした。

更に、二点識別覚に関連した脳の責任領域を明らかにする目的で、脳磁図反応の電源解析も試みた。電源解析もSPM8を用いて行った。まず、個人のMRIを用いてrealistic head modelを作成し、MNI (Montreal Neurological Institute) の標準脳テンプレート上のsource reconstruction meshを個人の脳のhead model上に逆変換した後、SPM8のgreedy search routineでdistributed source modelに基づく電源推定を行った。この方法における推定電源座標は、MNIテンプレート上の標準脳座標にそのまま変換される。



図4:脳磁図に対応した舌の二点識別覚刺激システム。刺激プローブ（右下）は空気圧で駆動し、1点/2点刺激の種類、押し出しタイミング、持続時間等をミリ秒以下の精度でPCを用いて精密に制御できる（上）。刺激プローブ部分は全てプラスチック素材を用いており、磁場ノイズを一切発生しない。刺激部はカセットで覆い、それを軽く口にくわえて舌尖や口唇を当てると、スリットから刺激プローブが突出して皮膚を刺激する（左下）。

**2点間隔=5mm**

**2点間隔=2 mm**

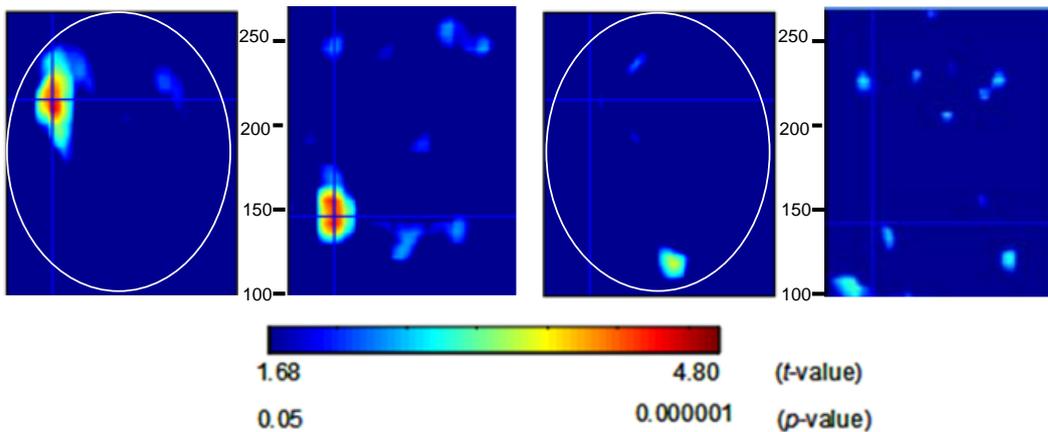


図5:SPMを用いた反応波形の評価例。左は2点間隔を5mmにした場合の1点刺激と2点刺激に対する反応差の検定、右は2点間隔を2mmにした場合の同様の検定。2点間隔が5mmの場合には有意な反応差が認められ、この場合は客観的に有意な Mismatch反応が得られていると判定される。

### ③ 脳MRIによる定量的な解剖学的解析

二点識別覚異常は中枢病変でも生じるため、中枢の変化を直接的に解析することは有用である。また、二点識別覚のみならず、水俣病の中核症状である小脳症状、視覚障害、聴覚障害等に対応した脳の解剖学的変化は、最新のMRI解析技術により客観的に評価できる可能性がある。そこで、熊本大学医学部神経内科、国立水俣病総合研究センターと共同で、水俣病患者を含む水俣地区住民のMRIを詳細に解析するプロジェクトに取り組んでいる（図6）。

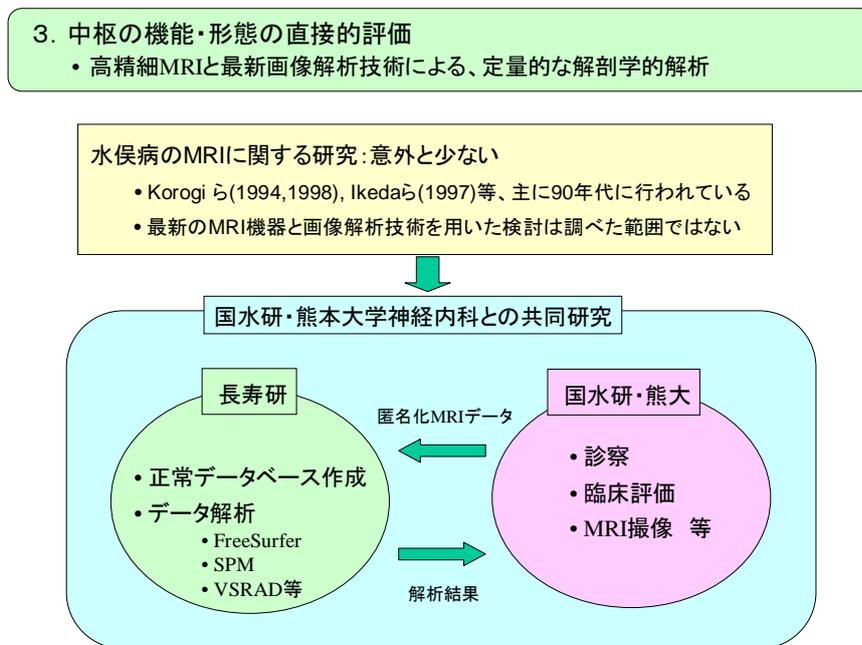


図6：共同プロジェクトの概要

これまでに以下の解析を行った。

- a)健康高齢者を対象に撮像した3D撮像のT1強調MRI画像を、FreeSurfer<sup>2)</sup>を用いて脳皮質領域分割抽出を行い、小脳皮質、一次視覚野、一次体性感覚野、一次聴覚野等の灰白質平均ボリュームの健康高齢者データベースを91名分にまで拡充した。これらの対象高齢者は、MMSE (Mini-Mental State Examination), CDR (Clinical Dementia Rating), ADAS-Jcog (Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive Component-Japanese version), Logical Memory I/II from the Wechsler Memory Scale-Revised 等の詳細な認知機能検査を行い、軽度認知障害や認知症でないことを確認しており、更にMRI T2強調画像やFLAIR画像で認知機能に影響を与えるような脳病変がないことも確認しているため、質の高い健康高齢者データベースが構築されている。
- b) 国立水俣病総合研究センターの3T MRI装置を用い、水俣病患者6名（胎児性1名を含む）のMRI撮像を行った。詳細な解剖学的画像解析として、1) FreeSurferを用いた脳領域毎の灰白質ボリュームの解析（図7）、2) Voxel-based Specific Regional Analysis System for Alzheimer's Disease (VSRAD® advance, Eisai Co., Ltd., Tokyo, Japan)、及びSPM8を用いたVoxel Based Morphometry (VBM) 解析（図8）を行い、個人毎の萎縮部位の可視化や、水俣病認定患者群と健康高齢者群の群間比較も行った。

## FreeSurferを用いた領域毎灰白質容積の評価の概要

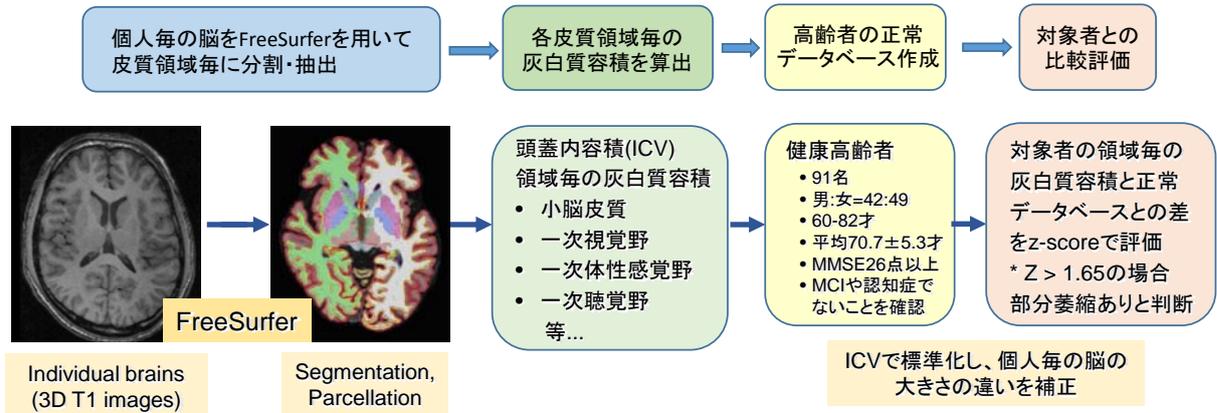


図7

## Voxel Based Morphometry (VBM) の概要

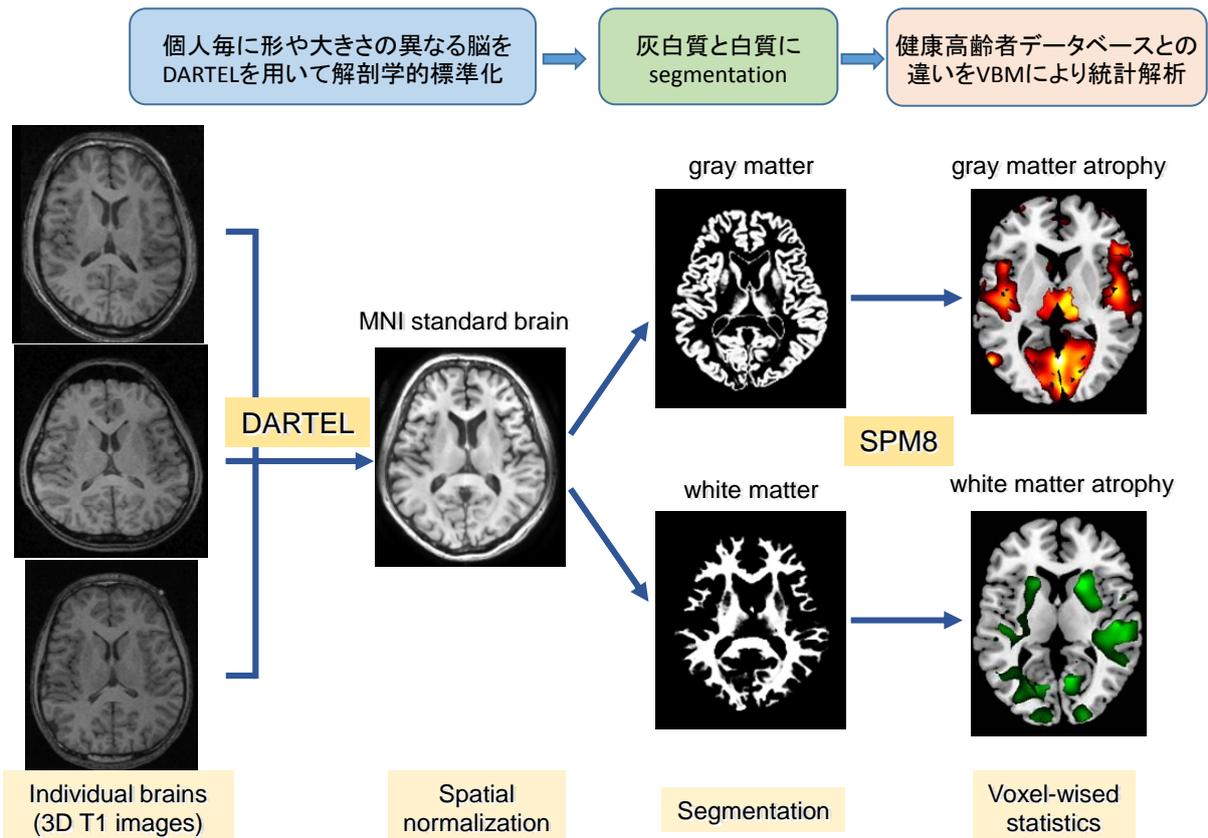


図8

(倫理面への配慮)

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

### III 研究結果

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

行動学的検査による電気刺激に対する感覚閾値は、脳磁図測定前は $2.74 \pm 0.56$  mA、測定後は $2.91 \pm 0.62$  mA、平均 $2.93 \pm 0.56$  mAであった。脳磁図測定前後の値を比較すると、測定後には有意に閾値が上昇 ( $P=0.006$ , paired  $t$ -test) していることが示され、habituationの影響と考えられた。また、高齢者の平均閾値は、以前測定した若年成人8名(21-24歳, 平均 $21.8 \pm 1.4$ 歳)の値 $1.60 \pm 0.39$  mAよりも有意に高いことが認められ( $p < 0.001$ )、加齢による影響と考えられた(図9, 左)。SPM8を用いて脳磁図反応の有意性を客観的に評価した結果、全例、最初に仮設定した閾値の1-1.4倍 ( $1.15 \pm 0.17$ )の強さ以上の電気刺激が加えられると有意な脳磁反応が得られることが示された。自動閾値判定システムのS字フィットアルゴリズムによって求められた行動学的な感覚閾値を用いて有意な脳磁図反応が得られる電気刺激の強さをより正確に計算したところ、行動学的感覚閾値の0.87-1.18倍( $1.01 \pm 0.09$ )が有意な脳磁図反応が得られる電気刺激の強さとなり、感覚閾値(この場合は50%認知閾値)と有意な脳磁図反応が得られる閾値が、非常によく一致することが示され(図9, 右)、脳磁図測定により表在感覚閾値(末梢神経障害の有無)を客観的に推定可能であることが示唆された。

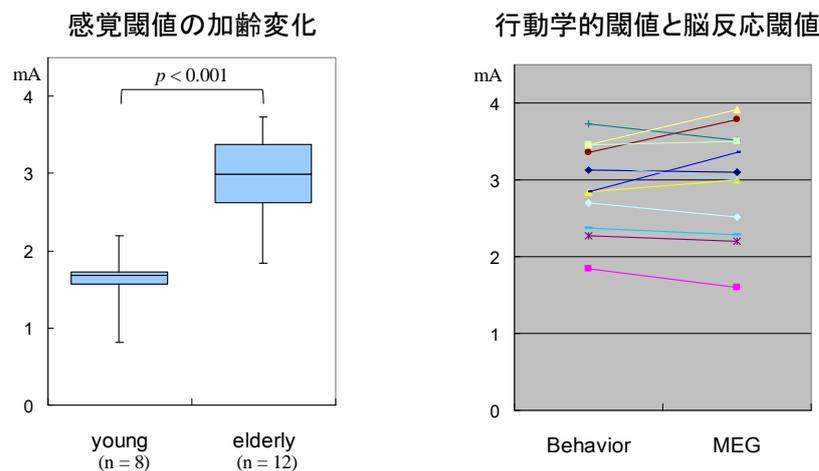


図9: 電気刺激の感覚閾値に対する年齢の影響(左)、及び、行動学的閾値と脳磁反応の出現閾値の関係(右)

#### ②舌刺激に対する二点識別覚関連Mismatch反応の検討

ノイズ混入が強く、解析が困難であった2例を除いた9例の健康高齢者のデータを解析したところ、プローブの2点間隔が5mmの場合は、全例で有意なMismatch反応が認められた。2点間隔が2mmの場合は、9例中7例で有意なMismatch反応が認められた。尚、昨年度の解析では2点間隔が2mmに対するMismatch反応は認められない例が多いと判定されていたが、今年度の解析では統計値のthresholdを $P < 0.001$ と、昨年度のthreshold (FDR-corrected  $P < 0.05$ )よりも甘く設定したため、有意と判定される例が大幅に増えている。

次に、最もSN比の高い誘発反応が得られた若年成人1名のデータを用い、舌の二点識別覚に対応した脳反応の電源解析を行った。その結果、一次体性感覚野の舌の領域に相当する部位は、1点、2点の刺激双方に反応するのに対し、そこよりも後方の頭頂間溝及び下頭頂小葉が、2点刺激のみに反応する部位として推定され(図10)、Mismatch反応に対応する部位と考えられた。

# 舌の二点識別刺激に対する電源推定結果

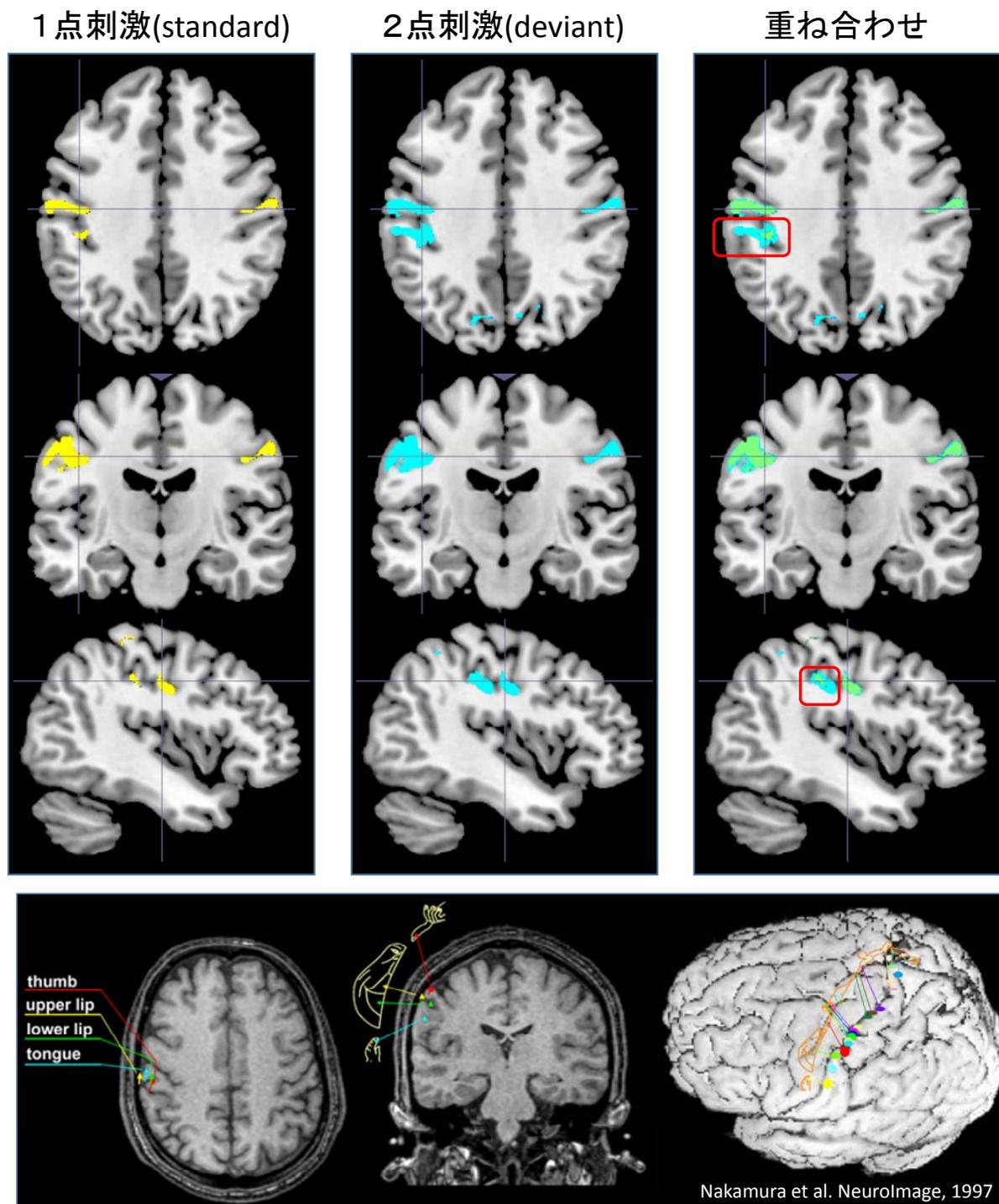


図10: 代表例における、舌の二点識別刺激に対する脳磁場反応の電源推定結果。1点刺激 (standard) に対する反応部位を黄色 (左上)、2点刺激 (deviant) に対する反応部位を水色 (中上)、両電源のover lap部位を黄緑色 (右上) で示す。1点、2点刺激双方に反応する部位は、以前我々が明らかにした体性感覚野の舌の領域 (下) とよく一致し、2点刺激のみに反応する部位 (Mismatch 反応に相当) はそれよりも後方の頭頂間溝及び下頭頂小葉にあることが示されている (上右、赤枠)。

### ③ 脳MRIによる定量的な解剖学的解析

#### 1) FreeSurferを用いた、脳領域毎の灰白質ボリューム解析

図11及びTable 1に解析結果を示す。小脳皮質ボリューム (Cerebellum)は、認定患者6名中5名で健康高齢者データベースから算出したZ-scoreが1.65 (片側  $P<0.05$ ) 以上を示し、小脳皮質が有意に萎縮していると考えられた。群間比較でも、患者群の小脳皮質ボリュームは age-matchされた健康高齢者群に比べて有意に( $P<0.0001$ )小さいことが示された。また、一次視覚野 (Primary Visual) は3例で、一次体性感覚野 (Postcentral)は2例で、一次運動野 (Precentral) は4例の認定患者で有意な皮質の萎縮が認められ、群間比較でもそれぞれ、健康高齢者群に比べ有意に (それぞれ  $P<0.005$ ,  $P<0.05$ ,  $P<0.0001$ ) 皮質ボリュームの低下が認められた。一方、一次聴覚野 (Primary Auditory)は 1例のみで有意な皮質ボリュームの低下が認められ、群間比較では健康高齢者群と有意差は認められなかった。

## 健康高齢者91名と認定患者6名の脳各領域の灰白質容積

(頭蓋内容積で標準化, 左右半球合計値)

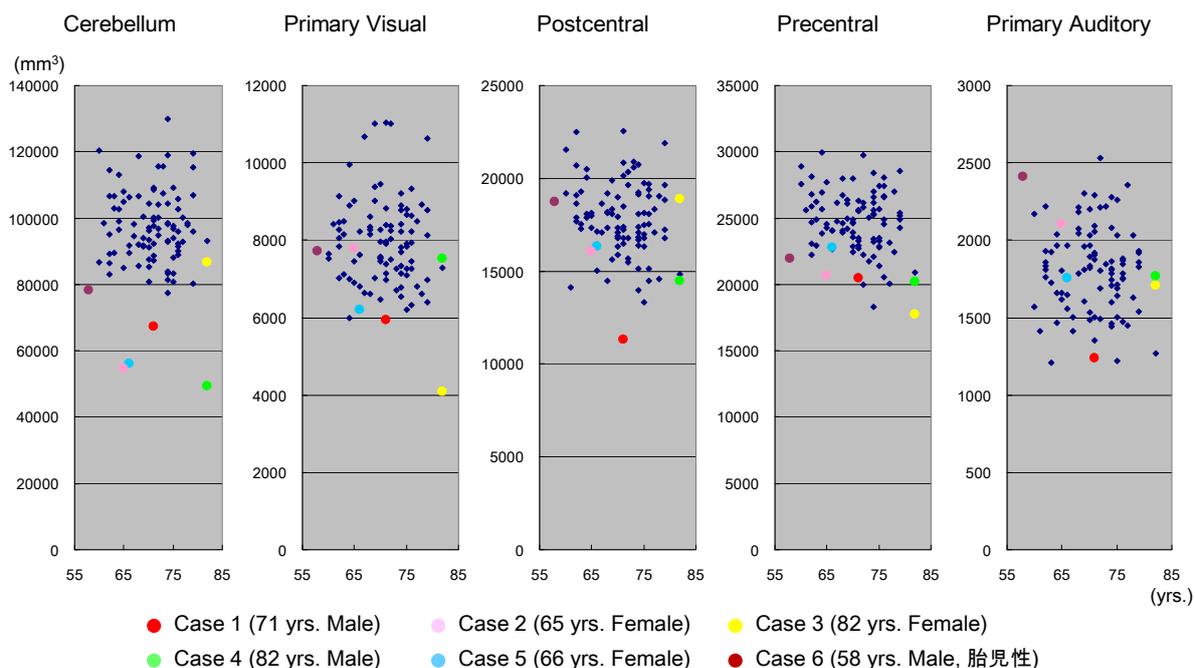


図11: FreeSurferによる脳の領域毎の灰白質容積を年齢を横軸にしたプロット。健康高齢者91名の個々のデータは青の点で、水俣病患者はカラーの円で示されている。灰白質容積は、個人毎の脳の大きさの違いを補正するために頭蓋内容積で標準化された値で、左右半球の合計値を示す。

Table 1: 認定患者6名の各皮質領域灰白質体積と健康高齢者データベースとの比較

	sex	age	Cerebellum	Primary Visual	Postcentral	Precentral	Primary Auditory
Case 1	M	71	67201 (2.87)	5928 (1.89)	11315 (3.39)	20477 (1.96)	1235 (2.11)
Case 2	F	65	54843 (4.04)	7783 (0.19)	16066 (0.94)	20673 (1.87)	2105 (-1.06)
Case 3	F	82	86766 (1.02)	4096 (3.57)	18876 (-0.52)	17754 (3.18)	1709 (0.38)
Case 4	M	82	49384 (4.56)	7528 (0.43)	14469 (1.76)	20177 (2.09)	1768 (0.17)
Case 5	F	66	56227 (3.91)	6195 (1.65)	16352 (0.79)	22801 (0.91)	1754 (0.22)
Case 6	M	58	78218 (1.83)	7720 (0.25)	18762 (-0.46)	21966 (1.29)	2411 (-2.18)
患者 (n=6)	M:F=3:3	70.7±9.7	65440±14671***	6542±1441**	15973±2840*	20641±1732***	1830±398
健康高齢者 (n=91)	M:F=41:50	70.7±5.3	97511±10562	7995±1093	17875±1935	24836±2228	1814±274

( )内は健康高齢者データベースと比較したZ-score, 黄色セルは  $Z > 1.65$  (片側  $P < 0.05$  で萎縮あり) \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0001$

## 2) Voxel Based Morphometry (VBM) 解析

### a) 個人解析

まずVSRADを用いて、個人毎の萎縮部位の可視化を行った。Case 1 (図12)は、FreeSurfer解析で示されたのと同様、小脳、一次視覚野、一次体性感覚野、一次運動野、一次聴覚野の全てにおいて灰白質の萎縮を認め、典型的な水俣病の脳病理像とよく一致する所見を呈した。また、白質の萎縮も顕著で、小脳白質、上下小脳脚、脳幹、後頭葉、放線冠等、広範な領域で萎縮を認めた。Case 2 (図13)も Case 1と同様水俣病に特徴的な領域の萎縮を認め、FreeSurferでは有意なボリュームの低下と認められなかった一次視覚野や一次体性感覚野、一次聴覚野においても部分的な萎縮を認めた。またこの症例も白質の全般的萎縮が顕著であった。Case 3 (図14)はFreeSurfer解析では小脳皮質ボリュームのZ-scoreが1.02で有意な萎縮とは認められなかったが、詳細に解析すると部分的な萎縮が認められた。本症例では一次視覚野の萎縮は顕著であるが、一次体性感覚野の萎縮は認められなかった。一次運動野や一次聴覚野には部分的な萎縮を認めた。白質の萎縮は軽度で主に脳幹部に局限していた。Case 4 (図15)は、小脳皮質の萎縮が特に目立ち、一次体性感覚野や一次運動野の萎縮も明確であった。一方、一次視覚野や一次聴覚野の萎縮は非常に部分的であった。白質の萎縮は主に小脳と脳幹部に局限していた。Case 5 (図16)は小脳皮質と一次視覚野の萎縮が明確で、一次聴覚野の部分萎縮も認められた。一方、一次体性感覚野や一次運動野の萎縮は軽微であった。白質の萎縮は主に小脳と脳幹部に局限していた。胎児性水俣病であるCase 6 (図17)は、小脳半球皮質、一次視覚野に部分的な萎縮を認め、中心溝周辺内側部(足に対応した運動感覚野)にも萎縮を認めたが、一次聴覚野の萎縮は認めなかった。中脳周辺に白質萎縮を認めた。

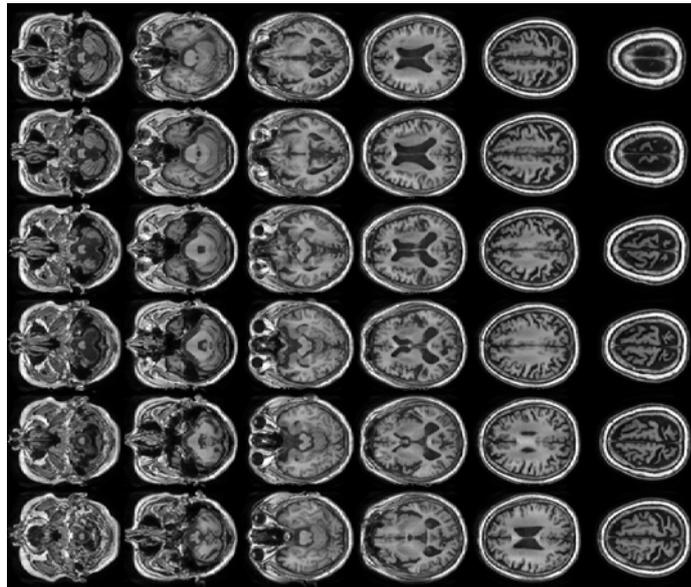
### b) 集団解析

次にSPM8を用いた集団解析を行った。この解析では、年齢が若く、画像の特徴もやや異なる胎児性水俣病患者を除外した5名の認定患者と、91名の健康高齢者の群間比較を行った。その結果は図18に示すように、小脳、一次視覚野、一次体性感覚野、一次運動野、一次聴覚野の灰白質の萎縮を認め、典型的な水俣病の脳病理像とよく一致する所見であった。また、前頭眼窩野、及び視床も有意な皮質萎縮領域として捉えられた。これらのうち、一次

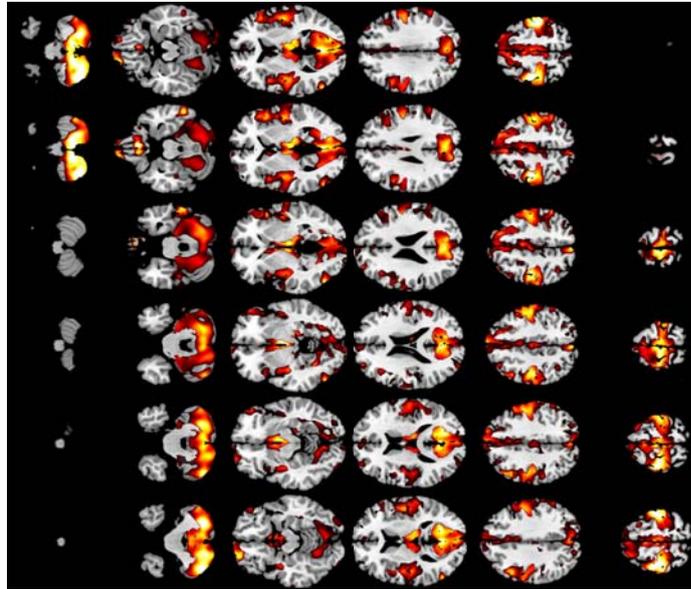
聴覚野の萎縮以外は、FDR (False Discovery Rate)で多重比較補正をしても有意な萎縮領域として残存し、統計学的にも信頼性の高い萎縮領域であることが示された。白質は、主に小脳、小脳脚、脳幹、後頭葉及び放線冠等で萎縮を認め、これらの萎縮もFDR補正後も有意な萎縮領域として抽出された。

# Case 1: 71才男性

## Original T1画像



## 灰白質萎縮 Z-map



## 白質萎縮 Z-map

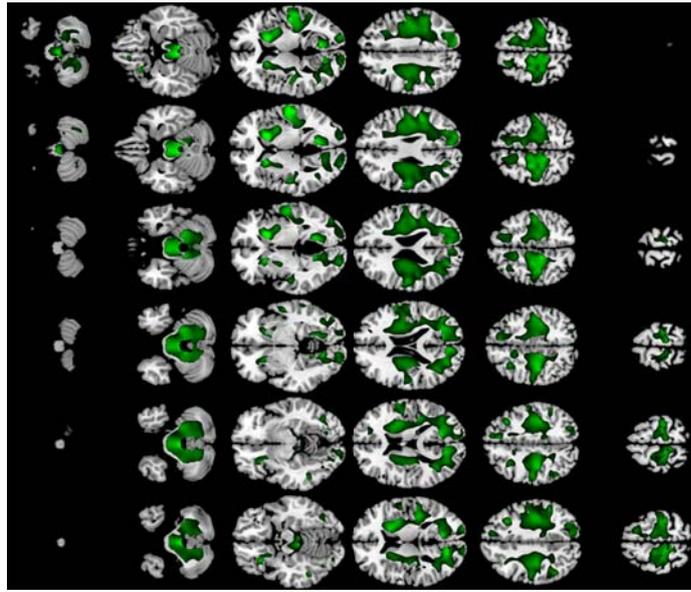
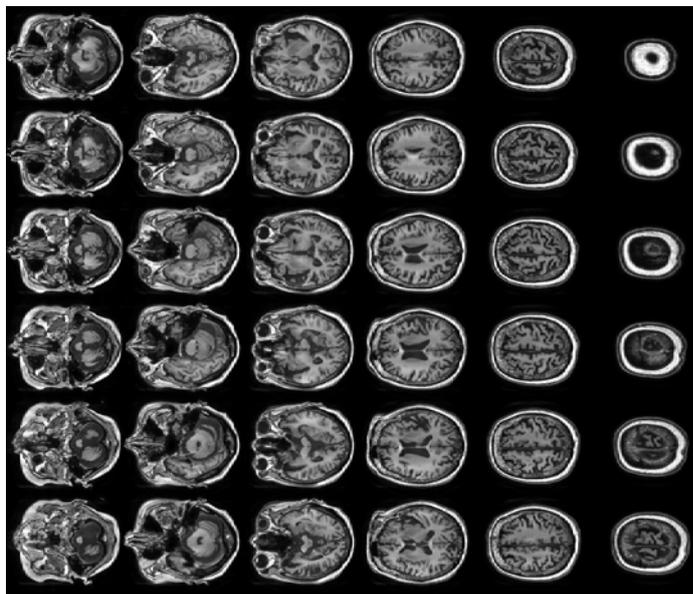


図12 : Case 1のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で

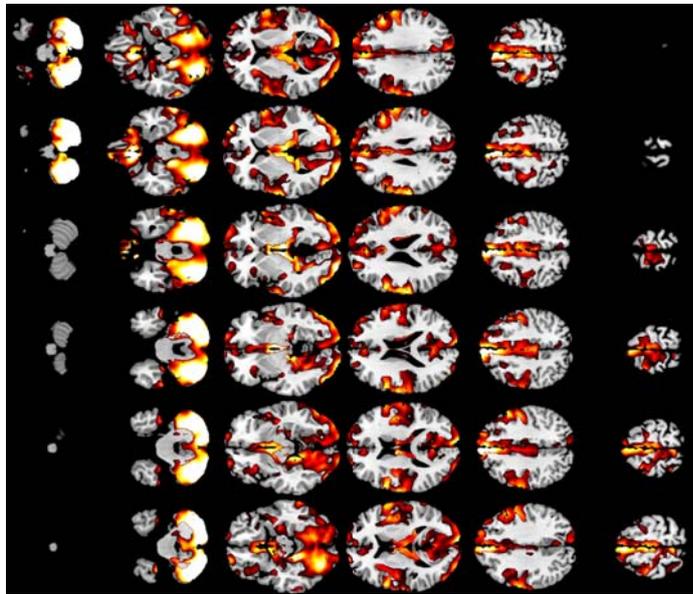
示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

Case 2: 65才女性

Original T1画像



灰白質萎縮 Z-map



白質萎縮 Z-map

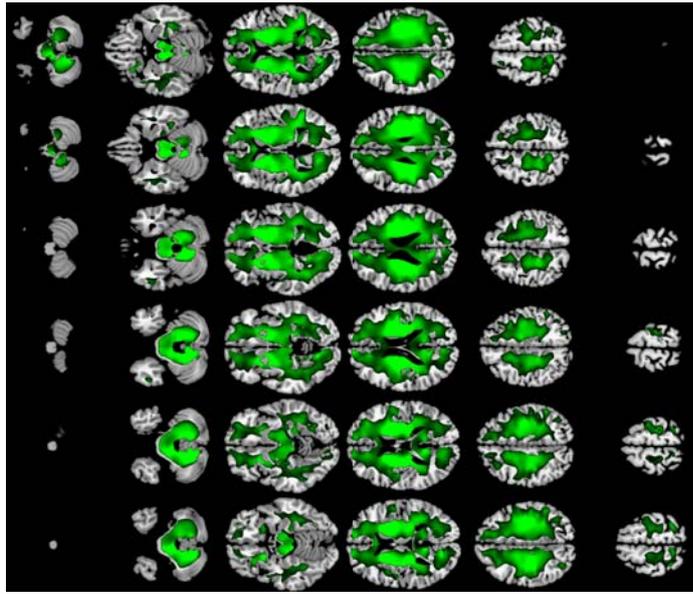
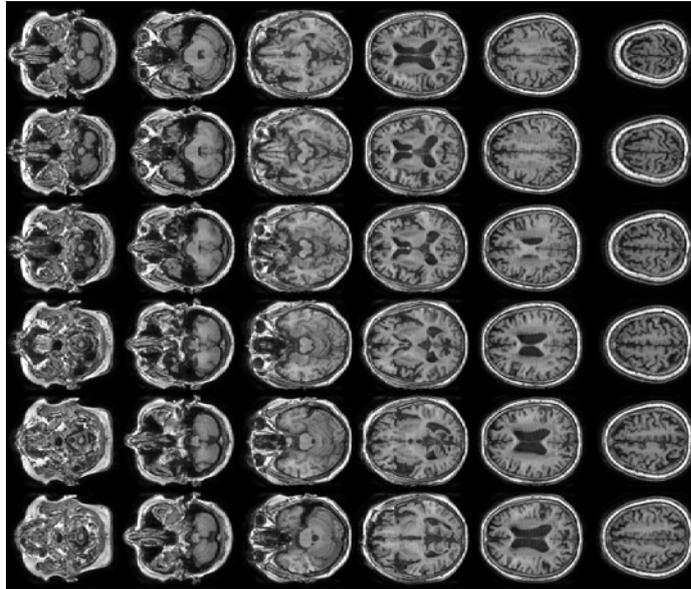


図13 : Case 2のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で

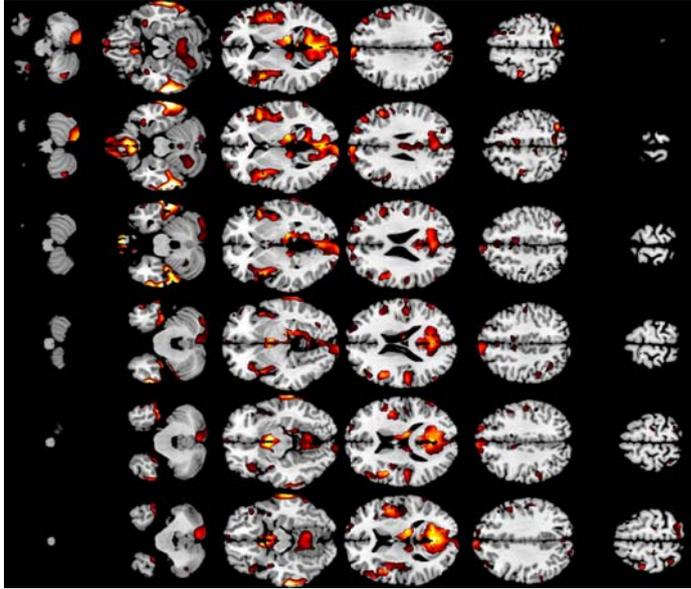
示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

### Case 3: 82才女性

#### Original T1画像



#### 灰白質萎縮 Z-map



#### 白質萎縮 Z-map

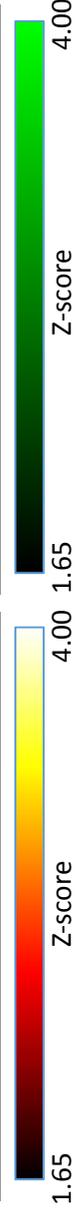
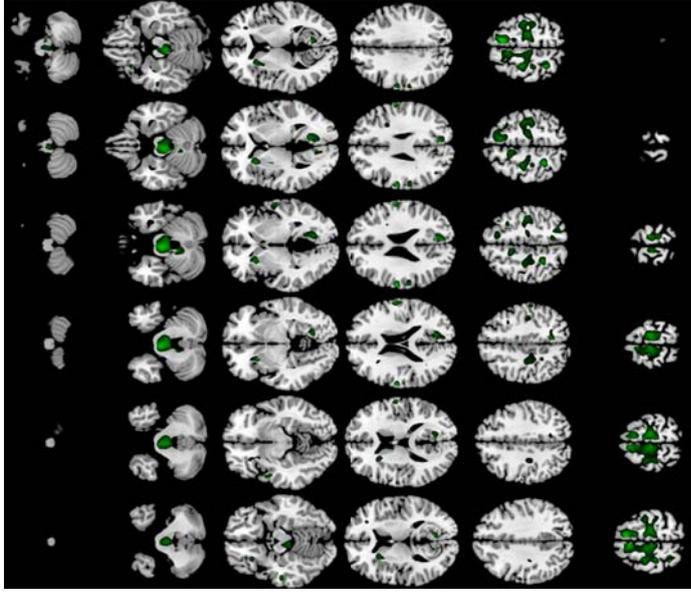
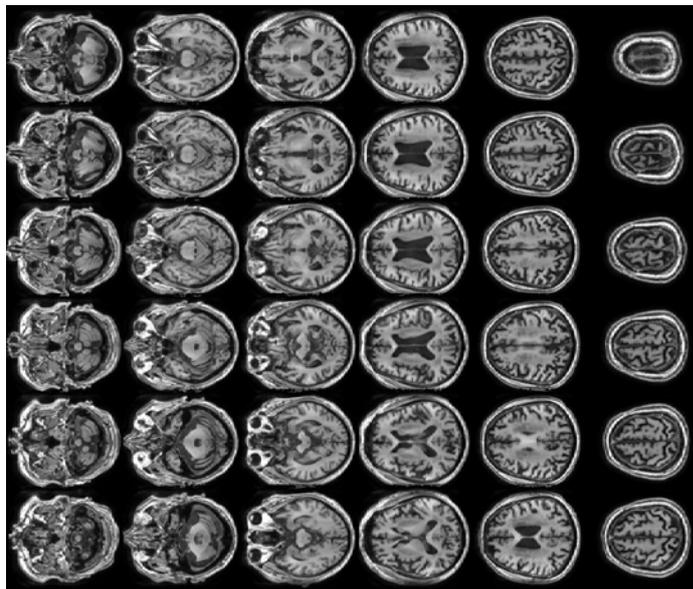


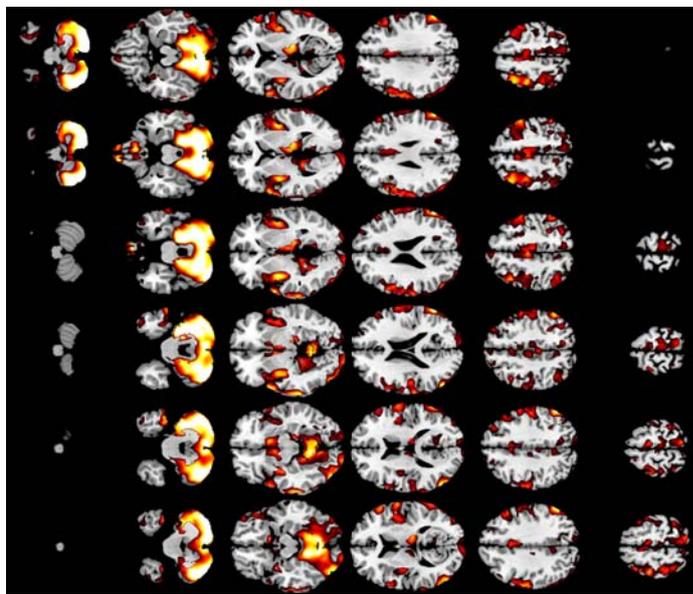
図14 : Case 3のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

# Case 4: 82才男性

## Original T1画像



## 灰白質萎縮 Z-map



## 白質萎縮 Z-map

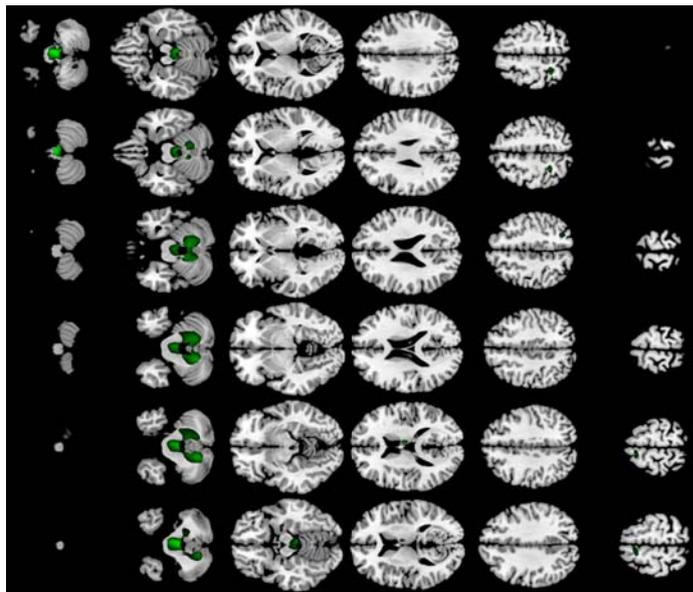
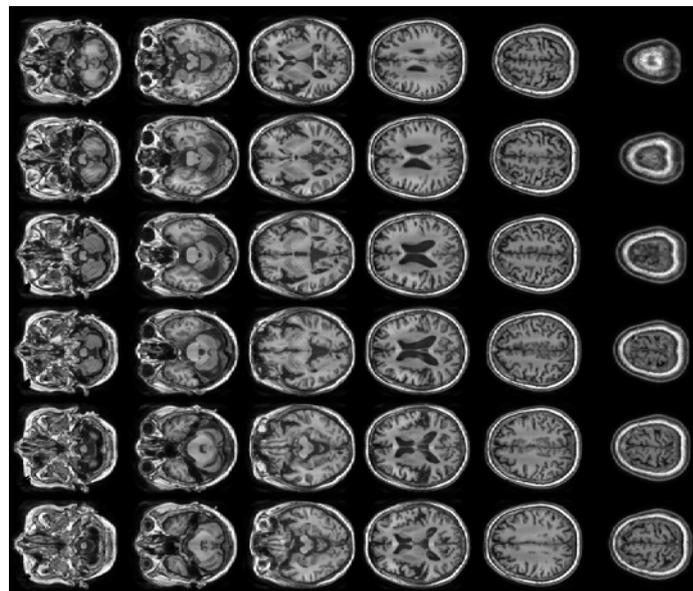


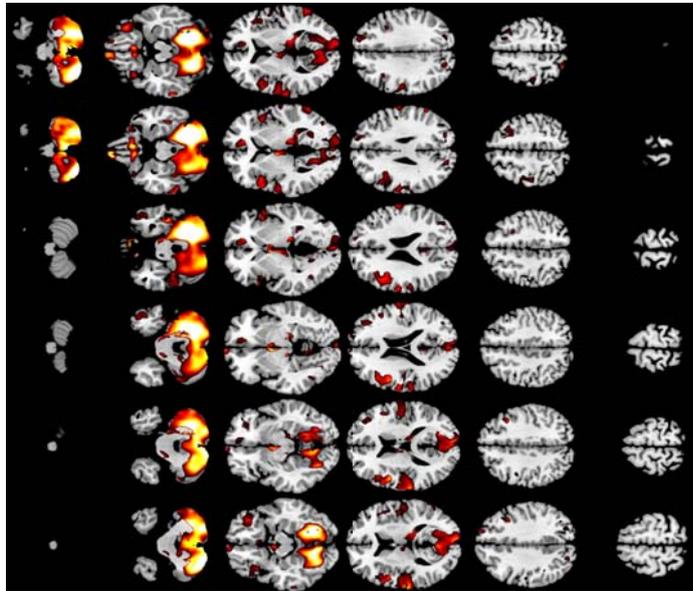
図15 : Case 4のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

# Case 5: 66才女性

## Original T1画像



## 灰白質萎縮 Z-map



## 白質萎縮 Z-map

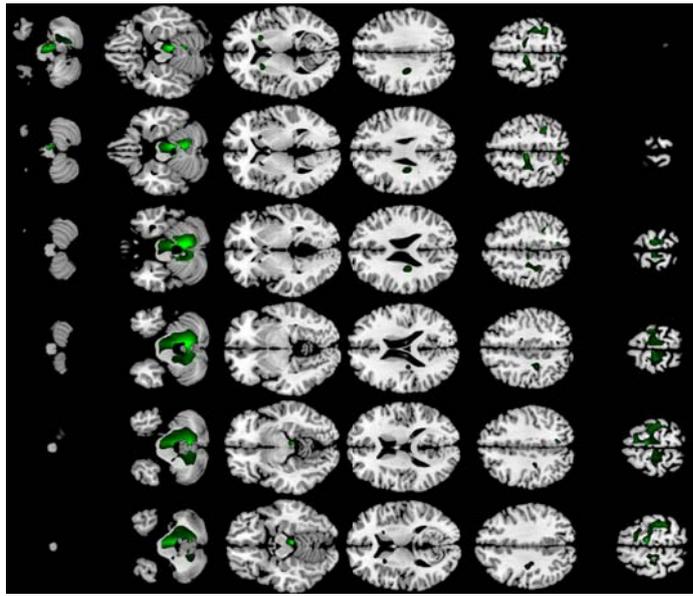
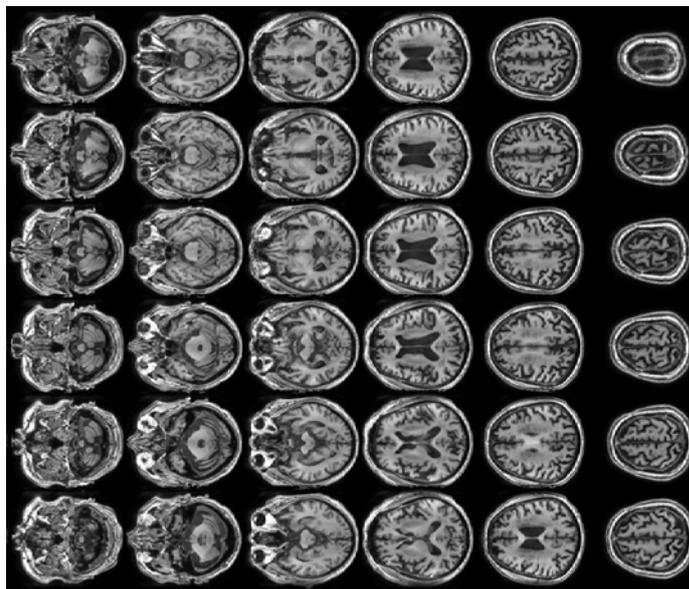


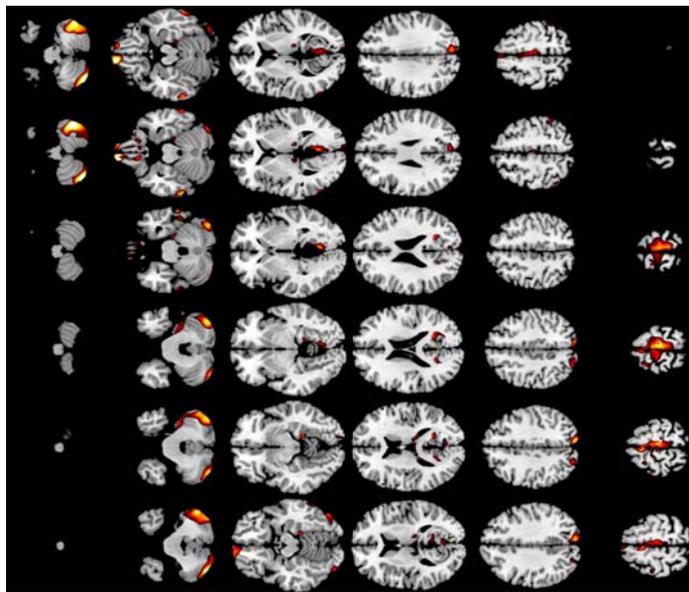
図16 : Case 5のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

Case 6: 58才男性(胎児性)

Original T1画像



灰白質萎縮 Z-map



白質萎縮 Z-map

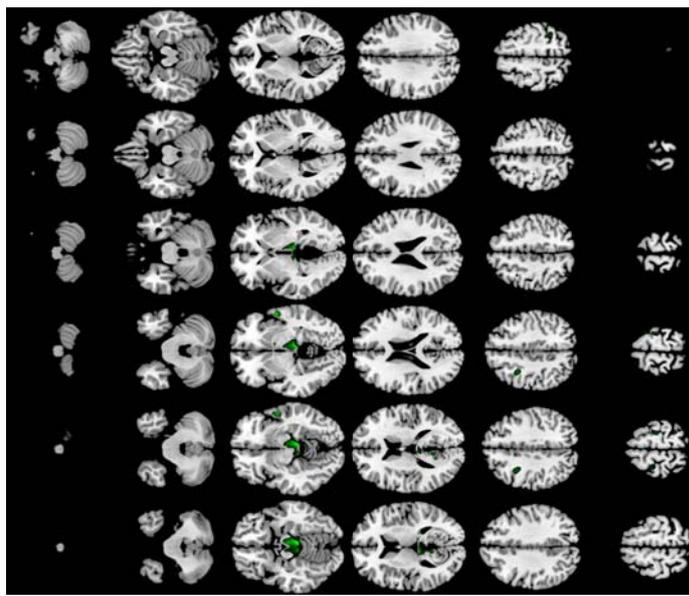


図17 : Case 6のオリジナルT1強調画像 (左)、及び、灰白質 (右)、白質の萎縮を標準脳上で示した統計画像。オリジナル画像と統計画像は、スライス位置が異なることに注意。

# 認定患者5名 vs 健康高齢者91名

(ANCOVA, adjusted for age)

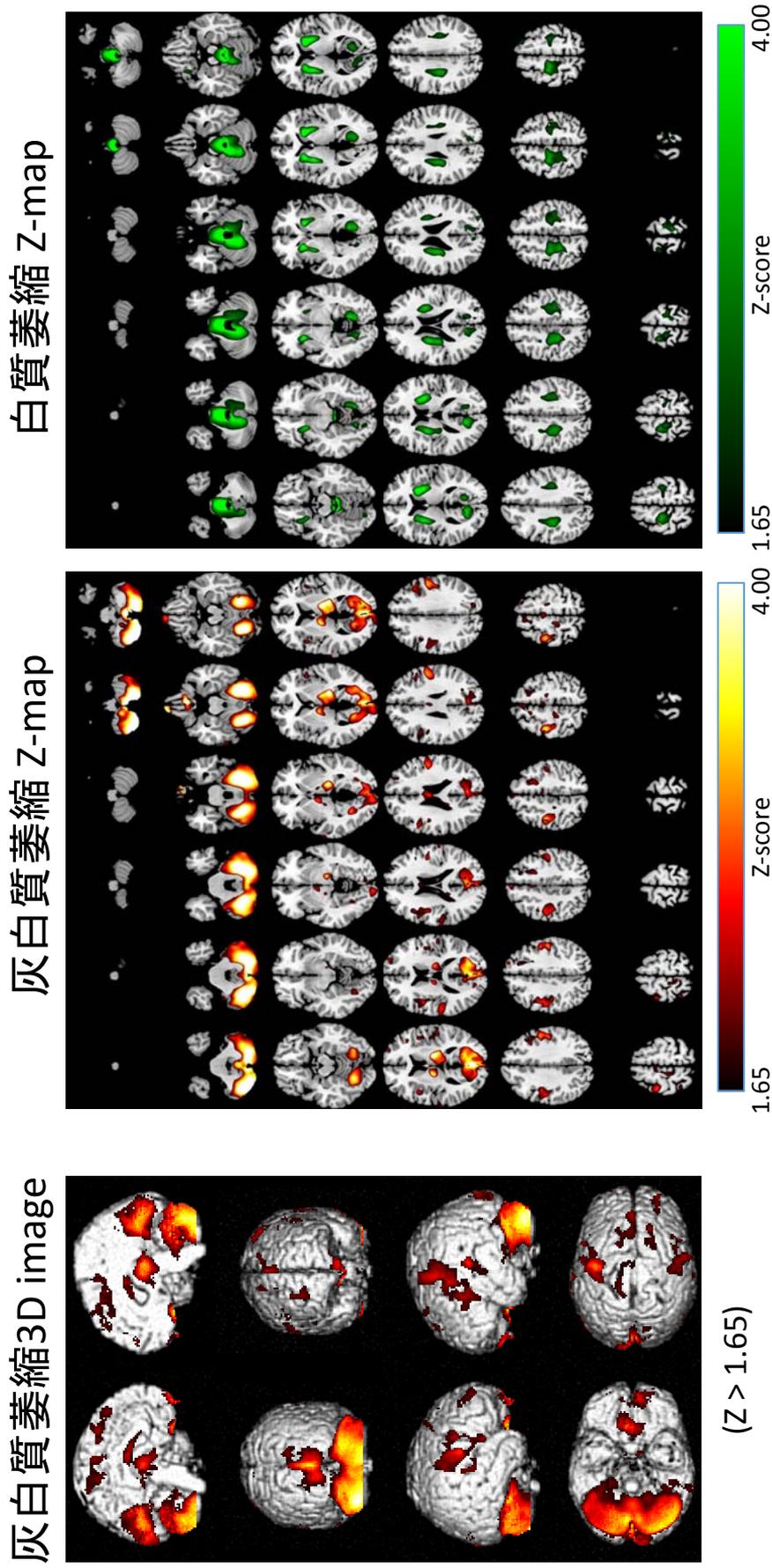


図18：胎児性水俣病を除いた患者5名と、健康高齢者91名を比較した統計画像。左は灰白質萎縮部位を3D ポリユームレンダリングした脳上で示したものの。

## IV 考察

### 1. 皮膚感覚の客観的評価

末梢神経障害を評価するための、表在皮膚感覚機能を客観的に測定する方法の検証では、行動学的に測定した感覚閾値と、脳磁図で推定した反応誘発閾値が非常によく一致することが示された。この結果は、脳磁図測定により、表在皮膚感覚の閾値を本人のフィードバックなしに客観的に推定できることを示す。また、舌の二点識別刺激に対する脳磁場反応についても、Mismatch反応出現の有無から、二点識別ができていないかどうかの推定が可能であると推察される。今回の結果から、2点間隔が5mmの刺激に対してMismatch反応が誘発されない場合は、「二点識別覚が異常である」と判定できる可能性が高いことが示された。

### 2. 二点識別覚に対応した脳領域と、水俣病における二点識別覚障害のメカニズム

今回の検討で、舌の二点識別覚に対応した脳の情報処理の責任領域を可視化することができた。その領域は、舌の受容野に相当する一次体性感覚野と、そのやや後方の頭頂間溝と下頭頂小葉領域であり、前者が1点/2点刺激に関わらず反応するのに対し、後者は1点と2点の刺激の違いに対して反応すると考えられ、いずれの領域が障害されても二点識別覚に問題が生じると考えられる。今回水俣病患者の詳細な解剖学的画像の解析を行うこともできたので、健康高齢者群との比較で明らかとなった水俣病患者群の脳萎縮領域と、MEGによって推定された舌の二点識別覚の責任領域との重ね合わせを行ってみた（図19）。その結果、両者はよくオーバーラップし、水俣病における二点識別覚障害が、中枢、特に一次体性感覚野とその近傍の直接的なダメージによって生じていることをサポートする結果と考えられた。

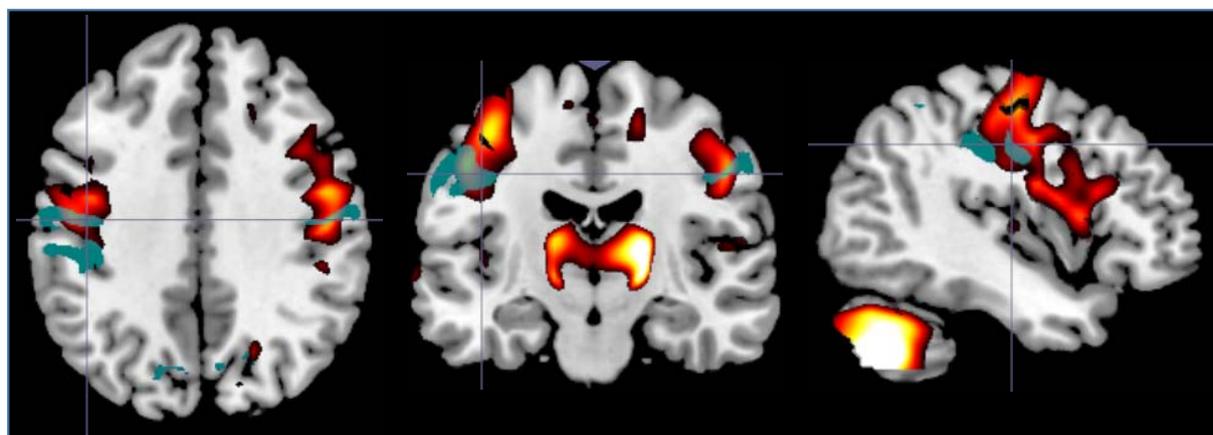


図19: 今回脳磁図を用いて推定された舌の二点識別覚に関連した責任領域（緑青）と、MRI解析で明らかとなった水俣病患者群の脳萎縮領域（赤-白グラデーション）の重ね合わせ画像。

### 3. 脳MRIによる詳細な解剖学的解析による水俣病の特徴

今回の解析の結果、水俣病患者群では、小脳、一次視覚野、一次体性感覚野、一次運動野、一次聴覚野の灰白質の萎縮を認め、これまでの病理学的検討で明らかとなっていた所見とよく一致していた。非侵襲的脳画像検査により、これほど明瞭に水俣病患者の脳の形態学的特徴を可視化

できたのは歴史上初めてと考えられる。また、これらの領域が揃って萎縮する疾患は、他の変性疾患や中毒性神経疾患を含めても思い当たらず、水俣病の特徴をよく捉えたものであると考えられ、発症後約半世紀を経過してもその特徴が保たれていることが明らかとなった。

これらの水俣病に特徴的な脳萎縮パターンを組み合わせることにより、MRIによる客観的な“水俣病らしさ”の評価ができる可能性がある。例えば、今回のFreeSurferを用いた検討では、小脳皮質のボリュームが最も健康高齢者と水俣病認定患者との差が大きく、両群を分ける上で感度の高い領域であることが示されたが（図11、及び Table 1）、それだけでは、例えば脊髄小脳変性症との鑑別が困難となる。しかし水俣病に特徴的な萎縮を呈する領域それぞれの皮質ボリュームを、健康高齢者のデータベースを対象にして得られたZ-scoreとして求め、この合計値を求めることにより(Minamata Disease Z-score summation: MD Z-sum)、水俣病に特徴的な皮質萎縮のパターンを客観的な数値として表現することができると考え、今回のデータに適用したところ、認定患者群と健康高齢者群との分離能をかなり高めることができることが示された（図20）。

今回の検討では、小脳、一次視覚野、一次体性感覚野、一次運動野、一次聴覚野の萎縮に加え、前頭眼窩野や視床の有意な萎縮を認めた。これらの領域の萎縮は我々の知るところあまり報告がないが、これも水俣病の特徴の一つである可能性がある。例えば、水俣病では嗅覚障害も認められることが報告されているが、今回抽出された前頭眼窩野の萎縮領域は嗅球ともオーバーラップしており、責任病巣と考えても矛盾はない。視床の萎縮はメチル水銀による直接的ダメージ以外にも、一次体性感覚野、もしくは後根神経節の障害の影響と考えることも可能である。

白質は、主に小脳、小脳脚、脳幹、後頭葉及び放線冠等で萎縮を認め、これらの萎縮も皮質の萎縮と関連して考えるとreasonableである。ただし、今回捉えられた放線冠の萎縮は内包にまで繋がっておらず、むしろ基底核にオーバーラップした領域が白質萎縮として捉えられている。これについては今後の検討を要する。

### 複数領域の萎縮度の組み合わせによる“水俣病らしさ”の評価の試み

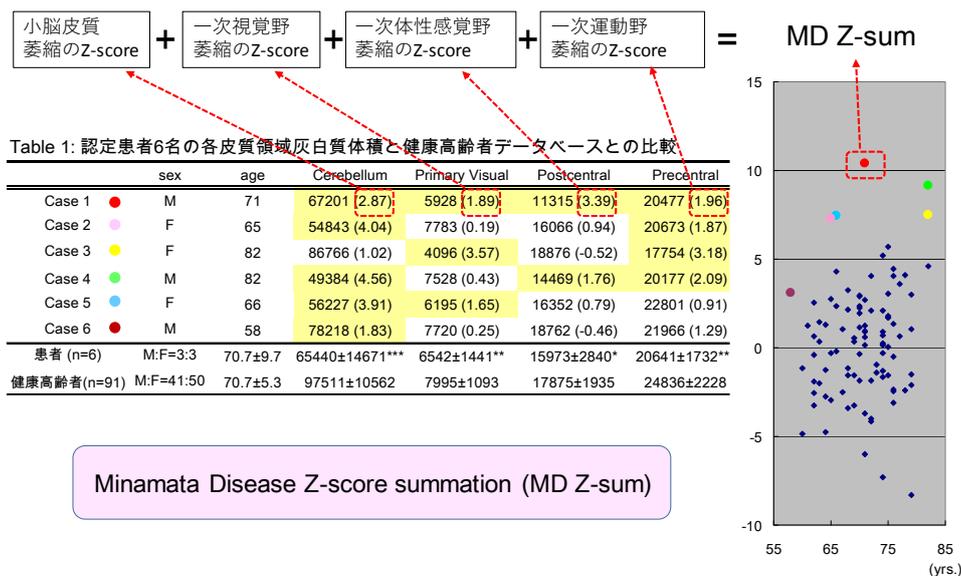


図20: 複数領域の皮質萎縮度の組み合わせによる、水俣病らしさの客観的評価の試み。

FreeSurferで得られた皮質volumeのZ-scoreの合計値を求めることにより、水俣病に特徴的な皮質萎縮の程度を客観的に数値で評価できる。

#### 4. Future direction

- 1) 今回の検討で、水俣病による二点識別覚の障害が、一次体性感覚野及びその近傍のダメージによって生じていることが示唆された。実際に個別の水俣病患者の二点識別覚障害の程度の評価を行うことができれば、責任領域の脳萎縮との関連をより明確に検討することができる。
- 2) 今回MRI解析の対象となった水俣病患者のn数はまだ十分な数ではない。今後対象者を更に増やすことができれば、より高いエビデンスレベルで水俣病患者の現在の脳形態の特徴を明らかにできる。
- 3) 水俣病患者MRIの個人レベルの解析では、萎縮領域やその程度が個人毎にかなり異なることが示された。それらの個人差と、発症当時の症状、現在の症状との関連を見ることは重要である。これらの解析については、今後の熊本大学神経内科や国立水俣病総合研究センターの解析に委ねたい。
- 4) もし毛髪水銀量等で推定した当時のメチル水銀曝露量のデータが利用可能ならば、MRI画像との相関解析が可能で、曝露量と脳の障害部位や程度との関連が明らかになると期待される。
- 5) 水俣病に認定されていない当時のメチル水銀汚染地区住民のMRIの集団解析を行うことができると、潜在的な脳形態の変化が捉えられる可能性がある。

#### V 結論

脳磁図やMRIといった非侵襲的脳イメージングにより、これまでには見られなかった水俣病の特徴や病態生理メカニズムを明らかにすることができてきている。

本研究に関する現在までの研究状況、業績（過去3年分）

1. Cuesta P, et al., Nakamura A, et al.: Source Analysis of Spontaneous Magnetoencephalographic Activity in Healthy Aging and Mild Cognitive Impairment: Influence of Apolipoprotein E Polymorphism. *J. Alzheimer Dis.* 2015; 43(1):259-73
2. Cuesta P, et al., Nakamura A, Maestu F: Influence of the APOE  $\epsilon$  4 allele and MCI diagnosis in the disruption of the MEG resting state functional connectivity at sources space. *J. Alzheimer Dis.* 2015; 44(2):493-505.
3. Ono K, Nakamura A, Maess B: Keeping an Eye on the Conductor: Neural Correlates of Visuo-motor Synchronization. *Frontiers. Hum. Neurosci.* 2015 Apr 2; 9:154
4. Maestu F, et al, Nakamura A, et al.: A multicenter study of the early detection of synaptic dysfunction in mild cognitive impairment using magnetoencephalography-derived functional connectivity. *NeuroImage: Clinical* (2015)
5. Kato K, Nakamura A, Kato T, et al.: Age-related changes in attentional control using an n-back working memory paradigm. *Experimental Aging Research* (in press)
6. 齊藤千晶, 中村昭範, 他: 非言語性コミュニケーションシグナルを積極的に用いたリハビリテーション「にこにこリハ」:-多施設による試験的介入-, *日本認知症ケア学会誌*. 2015 (in press)
7. 中村昭範, 加藤隆司, 他: Alzheimer 病に伴う大脳皮質興奮性の亢進: SEF 回復曲線と PET amyloid imaging 併用による検討. *日本生体磁気学会誌*, 2015 vol28. (1) 158-159
8. 岩田香織, 他, 中村昭範: 舌の二点識別覚: 脳磁図対応触覚刺激装置の開発とミスマッチ反応の測定, *日本生体磁気学会誌* 2015 vol28. (1) 128-129
9. Nakamura A, Maess B, et al.: Different Hemispheric Roles in Recognition of Happy Expressions, *PLoS One.* 2014 ; 9(2):e88628.
10. Kaneko N, Nakamura A, et al.: Novel plasma biomarker surrogating cerebral amyloid deposition. *Proc Jpn Acad Ser B.* 2014; 90(9): 353-64.P
11. Mueller J L., et al., Nakamura A: Neural networks involved in learning lexical-semantic and syntactic information in a second language. *Front. Psychol.* 2014 Oct 30;5 :1209
12. 伊藤健吾, 加藤隆司, 文堂昌彦, 中村昭範. アルツハイマー病診断の画像診断, 基礎講座: 老年精神医学と Brain Imaging. *老年精神医学雑誌*, 2013; 24 : 707-714
13. 中村昭範, 根本哲也 他. 脳磁図対応の触覚二点識別覚刺激装置の開発と二点識別覚閾値の客観的推定の試み. *日本生体磁気学会誌*, 2012 ; 25(1): 60-61.
14. 加藤公子, 中村昭範 他. 健常高齢者における抑制機能の特異性. *老年精神医学雑誌*, 2012 ; 23(12) : 1463 - 1470.

引用文献

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

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

Akinori Nakamura<sup>✉1</sup> and Tetsuya Nemoto<sup>✉2</sup>

<sup>✉1</sup>*Department of Clinical and Experimental Neuroimaging, National Center for Geriatrics and Gerontology*

<sup>✉2</sup>*Department of Gerontechnology, National Center for Geriatrics and Gerontology*

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

## **Abstract**

The objective of this project was to develop systems which can assess the cutaneous sensation objectively, even in cases having peripheral neuropathy which is one of the typical symptoms of Minamata disease. For that purpose, we focused on following three studies:

1) In order to evaluate peripheral neuropathy objectively, we developed a new method which can assess superficial skin sensation. Using a PC-controlled electric stimulation system with button feedback, we measured behavioral sensory thresholds in 12 elderly subjects and compared with 8 young subjects. We found that individual sensory thresholds could be reliably estimated by the system, and the elderly group showed significantly higher ( $p < 0.001$ ) thresholds than those in the young group. Further, we measured somatosensory evoked magnetic fields (SEFs) using MEG, and estimated thresholds to obtain statistically significant brain responses using statistical parametric mapping (SPM8). The results demonstrated that the behavioral sensory thresholds corresponded well with the thresholds to obtain significant brain responses, suggesting that MEG can estimate individual sensory thresholds objectively.

2) As peripheral neuropathy generally causes glove-and-stocking type sensory disturbance and oral areas are generally spared, evaluation of the two-point threshold to the tongue is expected to be not influenced by the peripheral neuropathy. Therefore, we developed a tactile two-point stimulator which can stimulate the tongue and is compatible for MEG measurements. Using this stimulator, we measured somatosensory evoked fields related to two-point discrimination at the tongue in 11 elderly subjects. We analyzed 9 subjects' data that showed less-noisy MEG data using SPM8. When the two-point distance was 5 mm, all of the 9 subjects showed significant mismatch responses (MMRs) related to two-point discrimination, whereas 7 of 9 subjects showed significant MMRs when the two-point distance was 2 mm. The electromagnetic sources related to two-point discrimination were estimated in the primary somatosensory cortex and inferior parietal lobule.

3) Since Minamata disease is known to cause brain atrophy in the primary sensory areas as well as cerebellum, we assessed the individual cortical volume using MRI volumetry. We analyzed 3D T1 MRIs in 6 Minamata disease patients and compared with those in 91 healthy elders. The patients with Minamata disease showed significant gray matter atrophy in the cerebellum, primary visual, primary motor-sensory, and

primary auditory cortices. These findings were compatible with reported pathological changes in Minamata disease, demonstrating that patients with Minamata disease still preserve characteristic brain damages even about 50 years after the onset.



○水俣病患者の経年的変化及び自然史



## Ⅱ 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握



# 水俣病の自然歴の実態調査

主任研究者 安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野教授）

## 研究要旨

現在における胎児性小児性水俣病患者の臨床像および類似する神経疾患との鑑別点は明らかにされていない。本研究では、明水園に入所中および水俣市立総合医療センター外来通院中、ほっとはうすに通所中の胎児性、小児性水俣病認定患者を対象として臨床的特徴を調査した。中核症状は、知能障害や錐体路徴候であり、胎児性水俣病患者に高率に認めた。成人型水俣病の中核症状である感覚障害を欠いていた。運動失調を認めるが、軽度の例もあった。頸椎症性脊髄症や神経変性疾患との鑑別には、知能障害の評価、錐体路障害の局所症候の評価が重要であると考えられた。胎児性水俣病の成人例は、神経発育遅滞、錐体路障害、運動失調を中核症状とし、感覚障害を欠くなど成人型水俣病の臨床像とは異なることを念頭におき、外来患者の診療を行う必要があると考えられた。

キーワード: メチル水銀高曝露、小脳失調、小児性、胎児性、臨床像

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

## I 研究目的

成人型水俣病の臨床診断には感覚障害や小脳失調などの複数の神経症候の組み合わせが重要である。感覚障害と小脳失調を合併する疾患の鑑別には、アルコール性小脳失調症とアルコール性末梢神経障害の合併した例や脊髄小脳変性症に糖尿病性神経障害を合併した例など挙げられる。一方、胎児性小児性水俣病の臨床診断としては、1) 出生時の異常や先天性代謝異常症などの他の原因のない脳障害を認め、2) 知能障害や失調症状に加え、様々な程度の神経障害を認め、3) 感覚障害以外の成人型水俣病の神経症候を認めると記載されている。他の疾患との鑑別としては、1) 1969年昭和44年以降の出生、2) 知能障害を認めるが、運動失調がない例、3) 進行性、4) 片側性、5) 他の疾患で説明できる神経症候を認める例であり、このような神経症候の特徴や経過を認める場合には他疾患の可能性を考慮するように明記されている。しかし、曝露より半世紀以上経過した現在において、胎児性小児性水俣病患者の臨床像がどのように変化してきているのか明らかにされていない。本研究では、現在における胎児性小児性水俣病の臨床像を明らかにすることを目的とした。

## II 研究方法

対象は、明水園、ほっとはうす、水俣市立総合医療センター外来の胎児性、小児性水俣病患者である。方法は、知能障害、言語障害、歩行障害など現在の神経所見を調査した。

各神経所見の評価基準としては、知能障害は、意思疎通が困難な例を重症とした。簡単な会話

や指示動作が可能であるが、何らかの高次脳機能障害がある例を知的障害陽性（+）とした。運動失調は、小脳失調の評価スコアの SARA を参考にして、指鼻試験や指追い試験で、3 cm 未満の振戦や 5 cm 未満の測定障害は（±）、3 cm 以上の振戦や 5 cm 以上の測定障害を（+）とした。

反復拮抗運動障害は、わずかに不規則を（±）、明らかに不規則を（+）、膝踵試験もわずかに異常を（±）、明らかに異常を（+）とした。病的反射は、上肢の Wartenberg 反射のみ陽性を（±）、Babinski や Chaddock などの下肢の病的反射陽性を（+）とした。振動覚低下は、音叉の振動を開始して、5 秒後に、検者が用手で振動を停止させる。患者は、振動の停止がわかったら、素早く挙手するといった方法で確認した。この振動停止を感知できない例を振動覚低下とした。

（倫理面への配慮）

本疫学研究に関しては、熊本大学医学部の倫理委員会に平成25年12月4日付けで承認されており、その規定に基づき調査を行った。

III 研究結果

本調査対象は 15 例で、男性 8 例で平均年齢 61.5 歳であった。明水園 8 例、ほっとうす 2 例、水俣市立総合医療センター外来 5 例であった。胎児性は 11 例、小児性は 4 例であった。知的障害は 15 例中 14 例に認め、4 例は重度の知的障害を認めた。運動失調に関しては、反復拮抗運動障害を高頻度に認めたが、指鼻試験や膝踵試験での運動失調は軽度の例もあった。腱反射亢進や病的反射、

下肢の痙縮など  
錐体路徴候は高  
頻度に認めた。

また、舌運動の  
拙劣さを伴う構  
音障害を高頻度  
に認めた。感覚  
障害に関しては、  
手袋靴下型の自  
覚的しびれ感や  
表在覚鈍麻など  
末梢神経障害に  
よる感覚障害の  
特徴を認めた例  
はなかった。感

年齢 出生年	出身	知能 障害	視 野 狭 窄	難 聴	構 音 障 害	上 肢 失 調	反 復 拮 抗	下 肢 失 調	腱 反 射 亢 進	病 的 反 射	下 肢 痙 縮	歩 行 障 害	つ ぎ 足 歩 行 障 害	日 常 生 活 Barthel index	手 袋 靴 下 型	表 在 覚 鈍 麻	振 動 覚 低 下	位 置 覚 異 常 Romberg	腱 反 射 低 下	
男性 8例 平均年齢 61.5歳																				
52M S38	丸島	+	+	-	+	+	+	±	+	+	+	+	+		-	+	±	-	-	悪化
55M S34	獅子島	+	+	-	+	±	+	+	+	+	+	+	+	100			-			不変
56M S33	水俣	重			+							-	-	100						不変
58M S31	水俣	重			+				+	+	+	-	-	85						不変
57F S32	湯堂	重										+	+	0						不変
58F S31	水俣	+	-	-	+	±	+	±	+	+	+	-	-	95	-	-	-	-	-	不変
58M S31	水俣	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75	-	+	+	+	-	悪化
58F S31	袋	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	75	-	-	-	-	+	悪化
59M S30	水俣	+		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	5	-	-			-	不変
60F S29	出水	+	+	-	±	±	±	±	+	±	-	-	+	100	-	-	-	-	-	不変
60M S29	茂道	重										+	+						-	不変
67F S25	米ノ津	+	-	-	+	+	+	±	±	±	-	+	+	65	-	-	-	+	+	悪化
72M S18	茂道	-	+	+	+	+	+	-	-	-	±	+	+	100					-	不変
73F S16	湯堂	+		-	±	+	+	+	+	+	±	+	+	95	-	-	-	-	-	不変
77F S13	水俣	+	-	+	+	±	+	+	±	+	+	+	+	85	±	-	±	-	-	不変

覚障害を認めた例は、4 例であり、いずれもこの 10 年以内に神経症候が悪化した例であった。1 例は頸椎性脊髄症であり、1 例は腰部の脊髄性神経根症であった。

今回の調査した対象の臨床像と昭和41年1966年の時点での先天性17例、小児性18例の臨床像を比較した。両者とも協調運動障害、歩行障害、言語障害を高頻度に認めた。嚥下障害は、今回調査対象が比較的健康状態のよい患者を対象としていることや嚥下障害があった例では長期生存が困難であるため、両者に差があった。表在知覚異常は両者とも低頻度であり、知能障害も両者とも高頻度であることなど一致していた。

本調査結果では、胎児性小児性水俣病の中核症状は知能障害に錐体路徴候であり、水俣病に特有の構音障害を高頻度に認めた。運動失調は軽度から重度まで様々であった。感覚障害は欠く例が大多数であり、感覚障害の出現は加齢性脊椎疾患の合併によるものであった。半世紀以上経過した現在でも胎児性小児性水俣病患者の神経所見は残存していた。

昭和41年(1966年)			平成27年(2015年)		
	先天性	小児性		先天性	小児性
症例数	17例	18例	症例数	11例	4例
協調運動不良	100%	100%	協調運動不良	86%	100%
歩行障害	100	100	歩行障害	64	100
言語障害	100	94.4	言語障害	91	100
嚥下障害	100	88.9	嚥下障害	0	0
腱反射亢進	82.3	72.2	腱反射亢進	100	50
病的反射陽性	76.5	50.0	病的反射陽性	88	25
表在知覚異常	—	—~±	表在知覚異常	—	—~±
知能障害	100	100	知能障害	100	75

水俣病 熊本大学医学部水俣病研究班  
(昭和41年3月刊行)

#### IV 考察

胎児性小児性水俣病と脳性小児麻痺との鑑別点は、1) 胎児性水俣病では胎児仮死や核黄疸など出生時の明らかな障害はなく、一方、脳性小児麻痺では胎児仮死や核黄疸などの出生時の異常を伴う事が多い。2) 脳性小児麻痺では、胎児仮死に伴う痙性麻痺や、核黄疸に伴うアテトーゼ様の不随意運動など定型的神経症候を認めることに対して、胎児性水俣病では、そのような定型的神経症候ではなく、多彩な神経症候を呈する複合型である。3) 脳性小児麻痺では運動失調はなく、胎児性小児性水俣病では運動失調を認めるため、運動失調の有無が両者の鑑別に重要である。本検討では運動失調の程度については、軽度から中等度であり、その程度は様々であったが、両者の鑑別には有用と考えられた。4) 本検討では、舌運動拙劣に伴う構音障害などの言語障害が特徴的であり、この言語障害の特徴が両者の鑑別に重要かもしれない。5) 知能障害に関しては、胎児性水俣病患者の知能障害は軽度のことも多く、知能障害の特徴としては、コミュニケーションや感情面での反応は良好なことに対して、計算や図形模写などの頭頂葉の機能障害が強く、高次脳機能障害の偏りがある。この高次脳機能障害の偏りは脳性小児麻痺と胎児性水俣病患者の鑑別に有用かもしれない。

本検討では4例の患者でここ数年の間に神経所見の増悪を認めていた。水俣病では高頻度に脊椎変形を認め、加齢の影響も加わり、脊髄症や神経根症などの脊椎症を合併しやすい可能性がある。また、小脳失調に加齢性変化が加わり、変形性膝関節症を合併しやすい可能性もある。感覚障害や腱反射低下など胎児性・小児性水俣病で頻度が少ない神経症候を認めた場合には、脊椎症性神経根症の合併を考慮して、診療すべきであると考えられた。胎児性小児性水俣病では、錐体路症候を高頻度に認めるが、錐体路症候に著しい左右差を認めた場合、頸椎症性脊髄症の合併を考慮すべきであると考えられた。歩行障害の進行の要因として、変形性膝関節症の合併頻度も高いため、診療の際には、膝痛の有無についても評価すべきであると考えられた。

## V 結論

現在の胎児性小児性水俣病の症候は知能障害と錐体路症候が主な神経症候であり、運動失調に関しては、その障害の程度にばらつきがあるものの、運動失調の有無は脳性小児麻痺との鑑別に有用であると考えられた。進行性の経過、感覚障害の合併、片側性の増悪の際には、加齢性の脊椎疾患を鑑別する必要があると考えられた。

## VI 今後の計画

明水園に入所中の患者で未診察の患者を今後の調査に加える。ほっとはうすの患者を定期検診する。熊本県水俣病保健課と協力して、在宅患者への訪問診療を行い、外来への受診を促し、在宅患者を本研究対象に加える。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

特記事項なし

## 引用文献

- 1) Takeuchi T, Eto K, Tokunaga H. Mercury level and histochemical distribution in a human brain with Minamata disease following a long-term clinical course of twenty-six years. *Neurotoxicology* 1989; 10: 651-7.
- 2) Komyo Eto, et al. Differential diagnosis between organic and inorganic mercury poisoning in human cases-The pathologic point of view. *Toxicol Pathol* 1999; 27: 666.
- 3) Yorifuji T, Tsuda T, Takao S, Harada M. Long-term exposure to methylmercury and neurologic signs in Minamata and neighboring communities. *Epidemiology* 2008; 19: 3-9.
- 4) Yorifuji, et al. *Arch Environ Occup Health* 2015
- 5) Uchino M, et al. The severity of Minamata disease declined in 25 years: Temporal profile of the neurological findings analyzed by multiple logistic regression model. *Tohoku J. Exp. Med* 2005; 205: 53-63.

# Clinical features of Patients with infantile Minamata disease (MD) in long-term-analyses

Akihiko Ueda<sup>1</sup>, Yukio Ando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Neurology, Graduate School of Medical Sciences, Kumamoto University*

*Keywords:* infantile Minamata Disease, cervical myelopathy, higher brain functions

## **Abstract**

A few studies were available on the neurological findings in patients with the infantile Minamata Disease (MD) in long-term-analyses. We investigated clinical features of patients with the infantile MD. Main neurological symptoms were higher brain function and pyramidal signs. Most of patients with the infantile MD showed a lack of sensory disturbance. Evaluation of higher brain function and pyramidal signs is important to differ symptoms of MD from that of cervical myelopathy or cerebellar degeneration.

Major symptoms of the infantile MD are disturbance of higher brain functions, pyramidal signs, and cerebellar ataxia without sensory disturbance. When we examine neurological symptoms of the infantile Minamata disease, we should take care for the difference points of clinical features of the infantile MD from those of adult types MD.



○メチル水銀への曝露量と症状の関係



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



小泉修一（山梨大学医学部薬理学 教授）

## 研究要旨

グリア細胞が種々の脳機能を制御していること、その機能変調が種々の脳疾患とリンクしていることが明らかとなりつつあり、グリア細胞と脳疾患の関連性に大きな注目が集まっている<sup>1,2</sup>。しかし、メチル水銀 (MeHg) 等の化学物質がグリア細胞及びグリア細胞-神経細胞連関に与える影響に関しては、多くは不明のままである。申請者は、昨年度までの「重金属等の健康影響に関する総合的研究」を通じ、ミクログリアが MeHg の高感度センサーとして機能し、急性期には低濃度 MeHg (MeHg<sup>low</sup>) を感知して神経細胞に対して保護的な役割を果たしていること<sup>3</sup>、しかし、MeHg<sup>low</sup> に長期曝露されたミクログリアはむしろ神経細胞障害性フェノタイプに変化することを明らかとした。本年は、続けてこの神経細胞障害性ミクログリアの性質の解明を継続し、その制御に関する知見を得る。特に、MeHg 誘発性の神経障害<sup>4</sup>をはじめ、他の神経変性疾患の治療<sup>5-7</sup>に有効性が認められている Rho キナーゼ (ROCK) 阻害薬の作用を検討し、本薬物がミクログリアの障害性フェノタイプを制御することにより、MeHg<sup>low</sup> 誘発神経細胞障害を抑制していることを明らかとした。

キーワード：MeHg、曝露時間依存性、障害性ミクログリア、貪食性細胞死、ROCK 阻害薬、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・講師）

## I. 研究目的

本研究は、低濃度 MeHg (MeHg<sup>low</sup>) により惹起される神経細胞障害を、グリア細胞（特にミクログリア）の視点から明らかとすることを目的とする。平成 27 年度の到達目標は、昨年度確立した *in vitro* 長期スライス培養標本を用い（1）MeHg<sup>low</sup> に長期曝露されることにより障害性に変化したミクログリアの性質を明らかにすること、次いで、（2）MeHg<sup>low</sup> が障害性フェノタイプに変化する分子メカニズムについて、特に Rho キナーゼ (ROCK) に注目した解析を行うこと、さらに（3）障害性フェノタイプへの薬理的な介入 (ROCK 阻害薬等) が、MeHg<sup>low</sup> 誘発性の神経細胞死に与える影響を明らかにすること、である。これらを通し、ミクログリアが MeHg<sup>low</sup> 誘発神経障害に果たす役割及びそのメカニズム、さらにミクログリア等グリア細胞へ介入することの有用性を示す基礎データを蓄積する。

## II. 研究方法

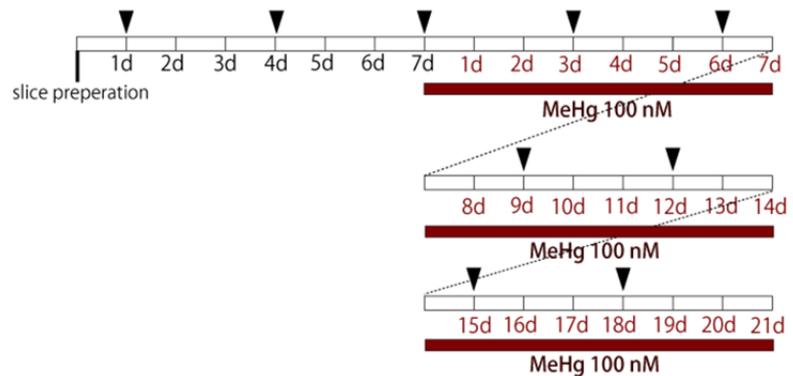
### 大脳皮質スライス培養

通常の実験には、生後 6~8 日齢の C57BL6 系マウスを用いた。氷冷 HBSS 中にて素早く大脳皮質を取り出し、McIlwain tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd.) により 350  $\mu\text{m}$  厚のスライスを作成した。スライスは Millicell culture insert (0.4  $\mu\text{m}$  pore, 30 mm diameter,

Millipore)。上に4スライス/インサートで培養した。培養液(MEM50%, HBSS25%, Horse serum 25%, L-glutamine 2 mM, glucose 6.5 g/l, penicillin 100 unit/ml, streptomycin 100 µg/ml)を2~3日おきに交換し、培養後7日目より実験を行った。

### メチル水銀投与

低濃度 MeHg (MeHg<sup>low</sup>) は最終濃度 100 nM になるよう培地中に添加し、培地交換 (▼) に併せて新たな MeHg を投与した。また、MeHg<sup>low</sup> の短期曝露は 1-3 日 (MeHg<sup>short</sup>)、長期投与は 1-21 日 (MeHg<sup>long</sup>) とした。



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

スライス標本作成から1週間は補正期間とし、その後、実験を開始した(赤ライン)。MeHg<sup>low</sup>は最終濃度が100nMとなるよう、実験開始後の培地交換時に投与した(黒▼は培地交換)。

### 免疫染色

スライスをパラホルムアルデヒド(4%, 1 h@RT)にて固定し、0.1% Triton-X 入り PBS(PBS-T)にて処置(1h@RT)後、3% ヤギ血清入り PBS-Tにてブロッキング(1 h@RT)を行った。1次抗体と反応(24 h@4°C)後、蛍光標識2次抗体と反応(1h@RT)させた。観察はオリンパス共焦点顕微鏡 FV-1200 及び 1000 を用いて行った。

### ウェスタンブロット

MeHg を任意の時間処置したスライスをサンプルバッファーに溶解、ソニケーション後、95℃, 5 minにて処理。12.5%アクリルアミドゲルにて分離後、PVDFメンブレンに転写した。Blockace/TBSTにてブロッキング後、各種1次抗体と反応(24h @ 4℃)させ、HRP結合2次抗体と反応(1 h@RT)させた。バンドの検出はLAS4000にて行った。

### 死細胞の評価

Propidium Iodide (PI)(5 mg/ml)を加え、37°C 1時間取り込ませることにより、その蛍光画像を取得し、その強度を蛍光画像解析ソフトウェア (Image J) により定量した。また、細胞死によって漏出する乳酸脱水素酵素 (LDH) を定量し、もう一つの細胞障害の指標とした。

(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

昨年度までの研究により、MeHg<sup>low</sup>に暴露されたミクログリア-アストロサイト-神経細胞連関に注目した解析により、これまでに得られた結果をまとめた（図2，3）。

1. MeHg<sup>low</sup> 曝露により、ミクログリアは、初期には神経細胞保護的、後期には障害性フェノタイプに変化した（図2）
2. MeHg<sup>low</sup> を感知した初期ミクログリアは、Ca<sup>2+</sup>流入、ROS 産生、p38MAP キナーゼの活性化を介して、VNUT 依存的な「ATP の開口放出」という形で情報を発信した<sup>8</sup>。アストロサイトは、ミクログリアが発信した ATP 化学情報を、「P2Y1 受容体」で感知し、自身の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を引き起こし、ATP/adenosine 発信及び IL-6 産生を介した神経細胞保護作用を呈した（図3A）。
3. しかし、長期曝露によりミクログリアは M1 型に変化し、これは障害性フェノタイプであった。このフェノタイプ変化が水俣病の難治化及び慢性化と関係している可能性が示唆された（図3B）。

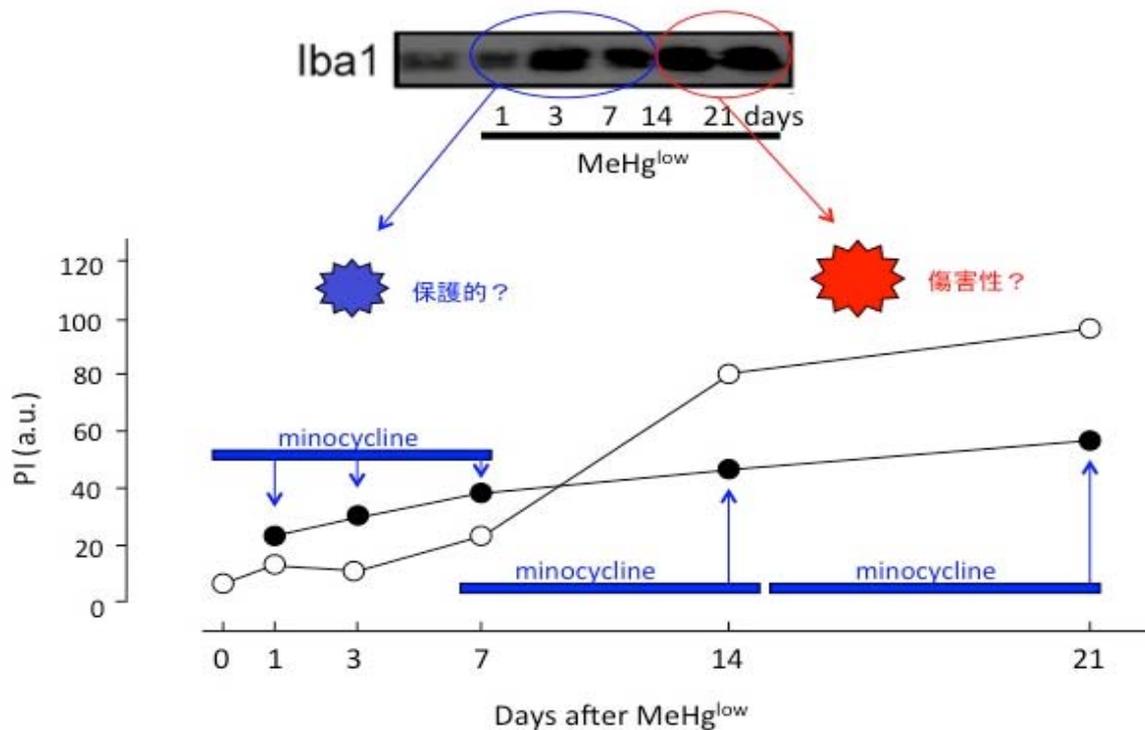


図2 MeHg<sup>low</sup> 曝露による神経細胞障害に対するミクログリアの時期依存的な作用

ミクログリアは、MeHg<sup>low</sup> 刺激の初期（1-3日）から活性化する（Iba1 の増）。しかし、その性質は初期と後期で異なる。ミノサイクリン（minocycline）により、初期のミクログリア活性化を抑制すると、MeHg<sup>low</sup> による神経細胞障害（PI 取り込み量で評価；定量的なものではない）が増悪され（●）、後期のミクログリアを抑制すると逆に神経細胞障害は抑制された。従って、初期には神経細胞保護的、後期には細胞障害性フェノタイプに変化していることが示唆された。

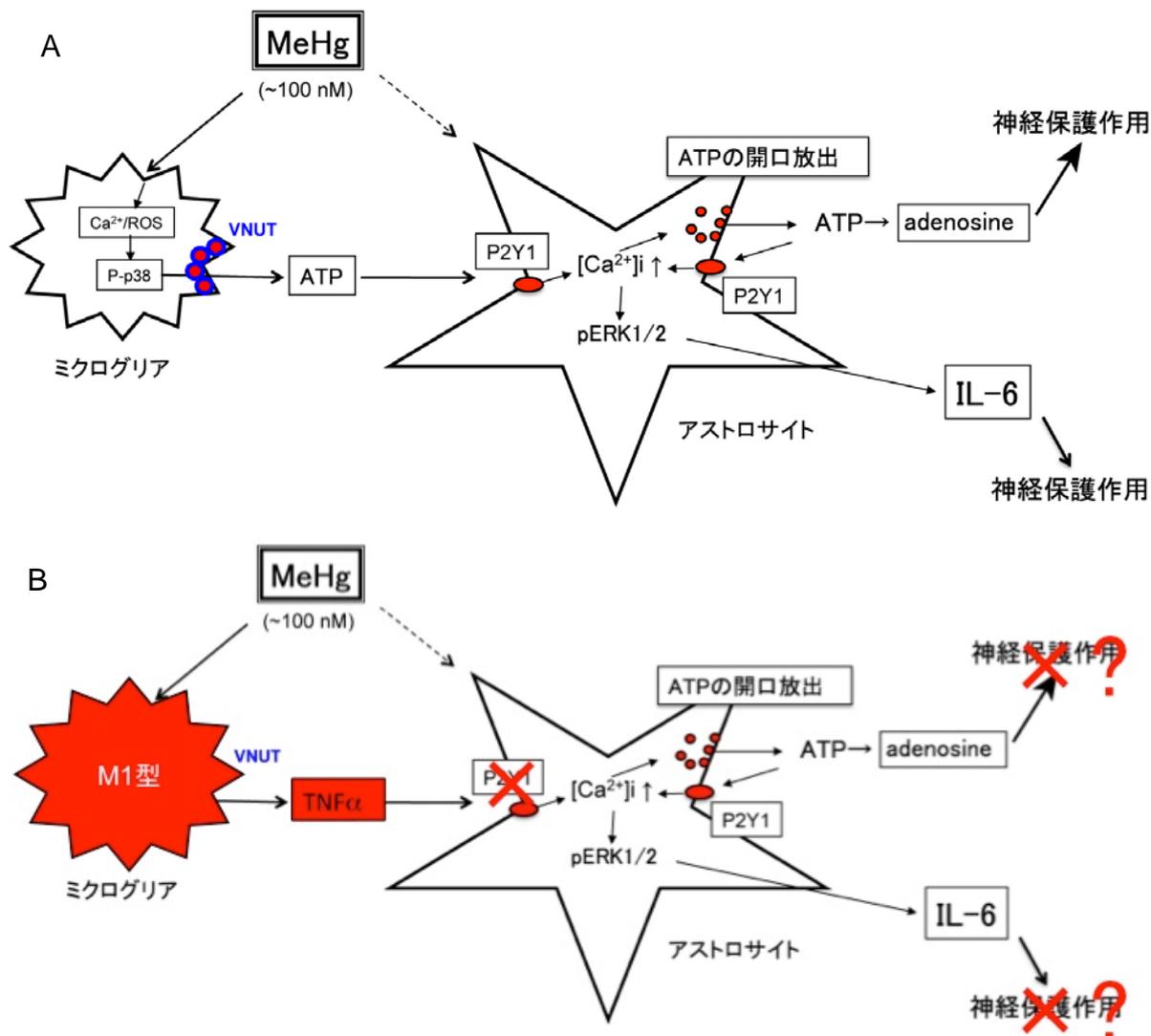


図3 MeHg<sup>low</sup>に暴露されたミクログリア及びアストロサイトの応答

A. MeHg<sup>low</sup>短期曝露(1-3日)では、ミクログリアが低濃度 MeHg を感知して、VNUT 依存的な開口放出により ATP を放出する。この ATP はアストロサイト P2Y1 受容体(P2Y1)にてこの情報を感知し、 $Ca^{2+}$ 及び ERK1/2 を介して IL-6 を産生・放出を、さらに ATP の放出を引き起こす。(1)ATP (又は代謝された adenosine) は直接的に(過剰興奮抑制)、又は IL-6 依存的に神経保護作用を呈する。B. MeHg<sup>low</sup>長期曝露(14-21日)になると、ミクログリアは、 $TNF\alpha$ , iNOS 等を産生する M1 型にシフトする。特に  $TNF\alpha$  は ATP を介したミクログリア-アストロサイト間コミュニケーションを低下させ、よって神経細胞保護機能を消失させる(×印)。

また、これらに対する推進委員、評価委員の先生方からのコメントは以下であった。

推進委員、評価委員のコメント：

- ①ミクログリアの動きに関しては probable にさえ至っていない。
- ②大変興味深いですが、ミクログリアの障害型への形態的变化が解らなかった。
- ③加齢性発症水俣病説は、故武内忠男名誉教授の仮説であり、人体例では実証されていない。
- ④ミクログリアが障害性フェノタイプに転換するメカニズムを明らかにして欲しい。

- ⑤ 生体での MeHg の作用を超高感度に検出できる細胞とその最小作用濃度を示す結果に期待する。In vivo では MeHg の作用する局所濃度を測定するのが極めて困難なので、動物の大脳皮質スライスの培養系での実験成果を待ちたい。
- ⑥ ヒトへの臨床応用に関する道筋を示して頂きたい。
- ⑦ 基礎研究としての続行の価値はあるが、水俣病理解の関連では「道なお遠し」の感である。
- ⑧ ROCK 阻害剤の作用は、水俣病の改善という観点からは離れているが、薬理・毒性学的には調べる意味がある。

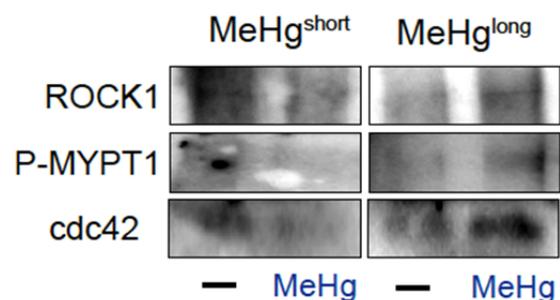
#### 対応について

- ①、②に関しては、今回の報告書では触れない。しかし、ミクログリア突起の動きと病態に関する多くの新しい知見が得られつつあるので、別途継続していく。
- ③ コメントに従いこれ以上の検討は行わない。
- ④ 薬理的な介入実験により、そのメカニズム解明に取り組む。
- ⑤ ミクログリアの応答性変化の視点から、変化を呈する最低濃度に関する検討を行う。
- ⑥ - ⑧ 本研究計画を、直ぐにヒトへの臨床応用への道筋を示すことは難しいと考える。しかし、MeHg 曝露に対するグリア細胞の機能変調、という視点で丹念にデータを積み重ねることで、水俣病の新しい分子病態が見えてくると考える。そのための橋渡しの一つが、人での有効性が期待される薬物の動物での作用、グリア細胞に対する作用を見出すことである。これは、薬理学の古典的な手法でもある。今回は、水俣病を含む、種々の神経変性疾患に有効性が報告されている（又は期待されている）ROCK 阻害薬のグリア細胞に対する作用から、水俣病の分子病態、さらに治療を指向したグリア細胞の役割の基礎データを蓄積する。

### 1. MeHg<sup>low</sup> の Rho キナーゼ (ROCK) に対する作用

種々の神経変性疾患に対して ROCK 阻害薬が有効であることが示され<sup>6</sup>、MeHg 誘発神経細胞障害に対する有用性も報告された<sup>4</sup>。さらに、ROCK 阻害薬の標的が、ミクログリアである可能性も唆されている<sup>5,7</sup>。そこで、昨年度確立した長期大脳皮質（又は海馬）スライス培養法を用い、低濃度 MeHg (MeHg<sup>low</sup>) 短期曝露（1 - 3 日、MeHg<sup>short</sup>）及び長期曝露（21 日、MeHg<sup>long</sup>）が、ROCK に与える影響を調べた。

ROCK シグナル (ROCK1、P-MYPT1、cdc42) は、MeHg<sup>short</sup> では抑制されるのに対し、MeHg<sup>long</sup> では逆に増強された。これはミクログリアの細胞保護性及び障害性の時間経過と良く一致していた。また、スライス培養系を用いた免疫組織学的な検討により、MeHg<sup>long</sup> はミクログリアで ROCK シグナルを亢進させていることが明らか



**図 4. MeHg<sup>low</sup> 曝露が ROCK シグナルに与える影響**  
 MeHg<sup>short</sup> は ROCK シグナル (ROCK1、リン酸化 MYPT1、cdc42) を抑制するが、MeHg<sup>long</sup> はむしろこれらを亢進させた。

となった (図5)。

MeHg<sup>low</sup>により、ミクログリアで ROCK シグナルが変化するかどうかを確認するために、初代培養ミクログリアを用いた同様の検討を行った。初代培養ミクログリアの場合は、MeHg<sup>short</sup> (12時間曝露)、MeHg<sup>long</sup> (96時間)とした。MeHg<sup>short</sup>は、ミクログリアの ROCK シグナル (P-MYPT1) を抑制し、MeHg<sup>long</sup>は逆に同シグナルを亢進させた (図6)。

以上、MeHg<sup>low</sup>は、ROCKの活性化を誘発することが明らかとなった。MeHg<sup>short</sup>はROCKを抑制し、MeHg<sup>long</sup>は逆に亢進させた。これらのシグナルは、スライス標本中のミクログリアでも、初代培養ミクログリアを用いた検討でも確認できたことから、少なくとも一部はミクログリアでの変化であることが示唆された。さらに、MeHg<sup>low</sup>によって誘導される細胞保護的ミクログリア及び障害性ミクログリアの時間経過 (図2) と、ROCKの抑制及び増強作用のそれが良く一致していたことから、これらミクログリアのフェノタイプと、ROCK活性化が関連している可能性が示唆された。

## 2. ROCK阻害薬がMeHg<sup>low</sup>誘発神経細胞障害に与える影響

大脳皮質スライス培養系を用い、ROCK阻害薬 Y-27632 が MeHg<sup>low</sup> 誘発神経細胞障害に与える影響を検討した。これまでの報告と同様に、MeHg<sup>long</sup>は顕著な神経細胞障害を惹起した (図7右、LDH漏出量を指標とした解析)。しかし、MeHg<sup>short</sup>単独では、LDHの漏出は起きず、逆にミクログリア活性化阻害薬ミノサイクリン(mino)及びROCK阻害薬(Y-27632)を添加により、障害が誘発された。これは、MeHg<sup>short</sup>ではミクログリアが細

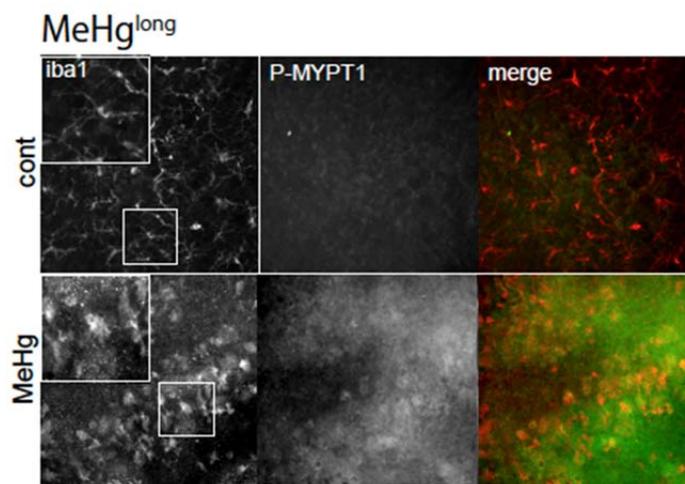


図5. MeHg<sup>long</sup>が in situ ミクログリアの ROCK シグナルに与える影響

MeHg<sup>long</sup>は、大脳皮質スライス培養標本の、ミクログリア活性化 (Iba1 陽性シグナル亢進) と、ROCK シグナル亢進 (P-MYPT1 陽性シグナル) を惹起した。これらの ROCK シグナルはミクログリアで亢進した。

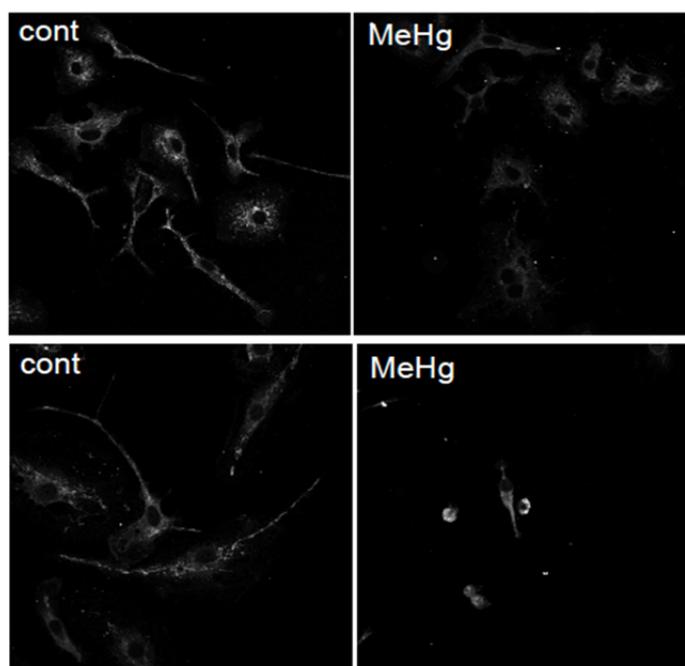
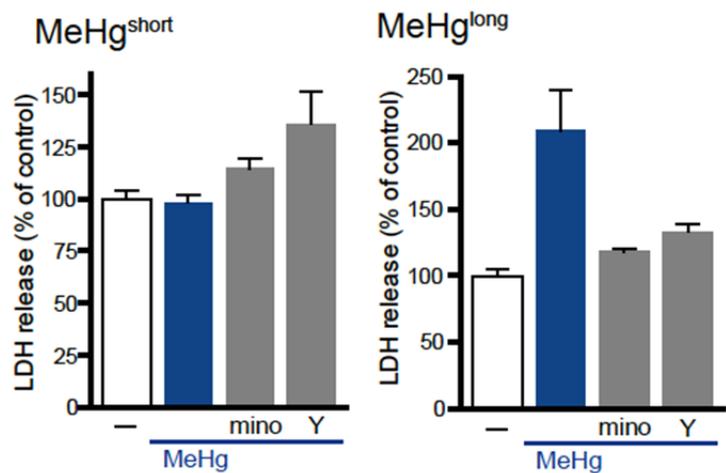


図6. MeHg<sup>low</sup>が初代培養ミクログリアの ROCK シグナルに与える影響

MeHg<sup>short</sup> (上段) は ROCK シグナル (P-MYPT1) を抑制するが、MeHg<sup>short</sup> (下段) は逆に亢進させた。

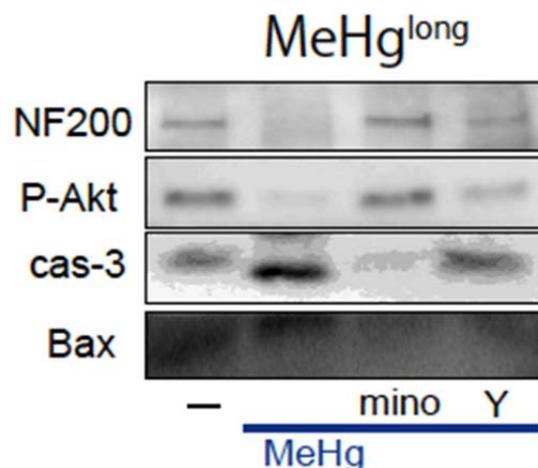
胞保護的に働いており、この抑制が障害を誘発するとの、昨年度までの報告を支持する結果である。MeHg<sup>short</sup> と異なり、ミノサイクリンは、MeHg<sup>long</sup> により惹起される神経細胞障害をほぼ消失させた。興味深いことに、Y-27632 (30 μM) も MeHg<sup>long</sup> による神経細胞障害を顕著に抑制した (図 7 右、Y)。Y-27632 の保護作用は濃度依存的 (1-100μM) であった。これは、MeHg<sup>long</sup> による神経細胞障害の惹起に、ミクログリア及び ROCK の活性化が関与している事を示しており、さらに、ミクログリア自身の ROCK 活性化の重要性をも示唆するものである。

MeHg<sup>long</sup> により惹起される、神経細胞死に対する ROCK 阻害薬 Y-27632 の作用を各種バイオマーカーの発現を指標として検討した (図 8)。MeHg<sup>long</sup> は、神経線維マーカー ニューロフィラメント 200 (NF200)、アポトーシス抑制マーカー リン酸化 Akt (P-Akt) を顕著に抑制し、これはミノサイクリン及び Y-27632 (30 μM) により回復した。また MeHg<sup>long</sup> は、アポトーシスマーカー カスパーゼ 3 (cas-3) 及び Bax を亢進させ、これらはミノサイクリン及び Y-27632 により抑制された。従って、MeHg<sup>long</sup> により、神経細胞死、特にアポトーシスが亢進すること、ミクログリアの活性化阻害によりこれらが抑制されることが明らかとなった。ROCK 阻害薬の作用も、ミクログリア活性化阻害と同様の作用であった。従って、ミクログリアの ROCK 活性化を制御することで、



**図 7. ROCK 阻害薬 Y-27632 による MeHg<sup>long</sup> 誘発性神経障害抑制作用**

大脳皮質スライス培養系を用い、MeHg<sup>long</sup> により惹起された障害に対する Y-27632 (Y, 30 μM) の作用を検討した。右: MeHg<sup>long</sup> により惹起された障害は、ミノサイクリン (mino, 10 μM) 及び ROCK 阻害薬によりほぼ消失した。MeHg<sup>short</sup> は、障害を惹起しなかったが、ミノサイクリン及び ROCK 阻害薬は、むしろ障害を増強させた。LDH 漏出により評価した。



**図 8. MeHg<sup>long</sup> により惹起されるアポトーシスに対する ROCK 阻害薬 Y-27632 の作用抑制作用**

大脳皮質スライス培養系を用い、MeHg<sup>long</sup> による各種バイオマーカーに対するミノサイクリン (mino) 及び ROCK 阻害薬 (Y) の作用を検討した。NF200, Neurofiramant200; P-Akt, リン酸化 Akt; cas-3, カスパーゼ 3; Bax.

MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害を制御できる可能性が示唆された。

大脳皮質スライス培養標本において、MeHg<sup>long</sup>はROCKシグナルを亢進させ、ROCK阻害薬Y-27632は、これをほぼ消失させた(図9左、Y)。またこのROCKシグナルの亢進は、ミクログリア活性化阻害薬ミノサイクリンでも顕著に抑制された(図9左、mino)。免疫組織学的検討により、MeHg<sup>long</sup>がミクログリアのROCKシグナルを亢進させること、これがミノサイクリン及びY-27632で抑制されることが明らかとなった(図9右)。

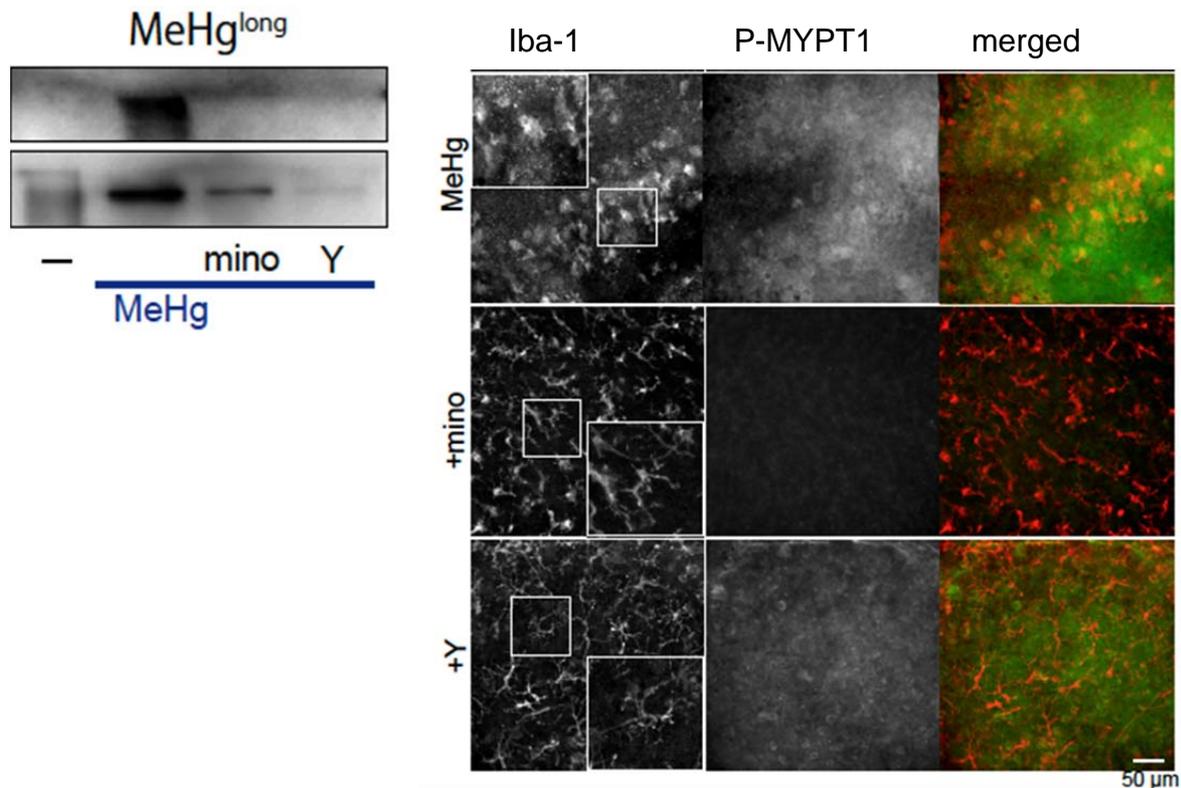
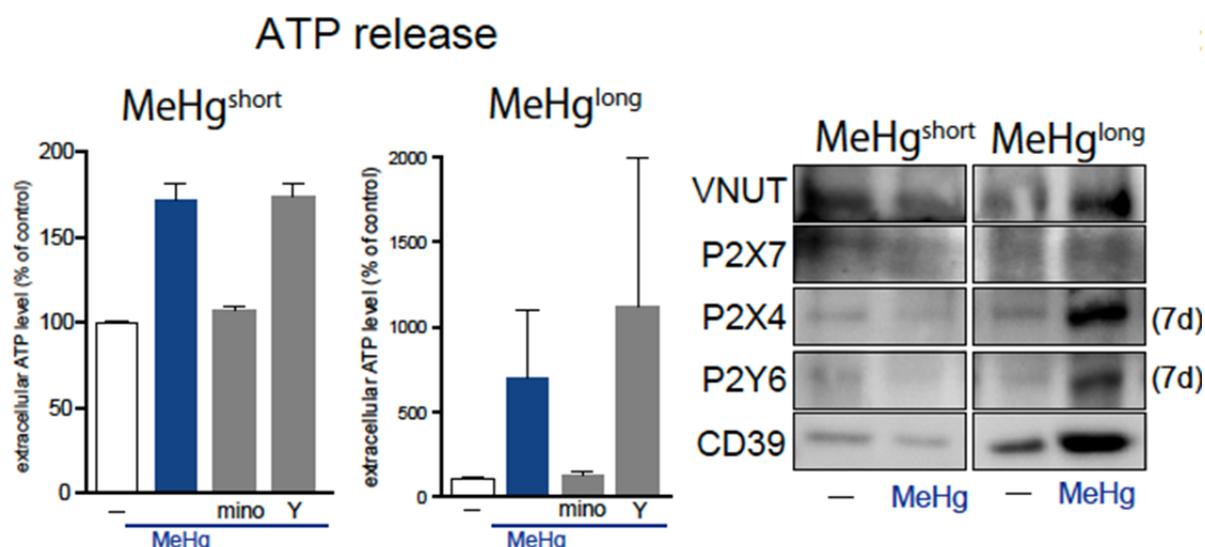


図9. MeHg<sup>long</sup>により惹起されるROCKシグナルに対する、ミクログリア活性化阻害薬及びROCK阻害薬の作用

左；大脳皮質スライス培養系を用い、MeHg<sup>long</sup>により惹起されるROCKシグナルの活性化を解析した。上段ROCK1，下段P-MYPT1

右；MeHg<sup>long</sup>により惹起されるIba-1シグナル及びROCKシグナル亢進(P-MYPT1)に対するミノサイクリン(+mino)及びROCK阻害薬Y-27632(30 μM)(+Y)の作用の免疫組織学的解析。上段図は図5下段図と同じ。



**図 10. MeHg<sup>long</sup>により惹起される ATP 放出に対するミクログリア活性化阻害薬及び ROCK 阻害薬の作用抑制作用**

左；大脳皮質スライス培養系における、MeHg<sup>short</sup> 及び MeHg<sup>long</sup> により惹起される ATP 放出に対するミノサイクリン(mino) 及び Y-27632 (Y) の作用。ミノサイクリンは ATP 放出を抑制するが、Y-27632 は抑制しなかった。

右；大脳皮質スライス培養系における、MeHg<sup>short</sup> 及び MeHg<sup>long</sup> により惹起される ATP 関連分子の発現変化。VNUT, vesicular nucleotide transporter; P2X7, P2X4 及び P2Y6, それぞれ P2 受容体；CD39, 細胞外ヌクレオチド分解酵素 1。

### 3. MeHg<sup>long</sup>による ROCK 活性化のメカニズム

ルシフェリン・ルシフェラーゼ法による細胞外 ATP 濃度測定により、MeHg<sup>long</sup>により非常に多くの ATP が細胞外に放出・漏出されていることが明らかとなった (図 10)。ミクログリア活性化阻害薬ミノサイクリンはこの ATP 放出をほぼ消失させたが、ROCK 阻害薬は全く影響しなかった。従って、細胞外 ATP の下流に、ROCK シグナル亢進があることが示唆される。さらに、ミクログリア ATP 放出に関連が深い vesicular nucleotide transporter (VNUT)<sup>8</sup>、ミクログリアに高発現している ATP 受容体 (P2X7, P2X4, 及び P2Y6)<sup>9-11</sup>、ミクログリアに発現が多い ATP 分解酵素 CD39 の発現が亢進していた。これらは、ミクログリアの ATP/P2 受容体シグナルが強く亢進していることを示唆するものである。MeHg<sup>short</sup>でも細胞外 ATP 濃度亢進は確認できた。しかし、その程度は MeHg<sup>long</sup>のそれと比較すると小さく、また各種 P2 受容体の発現亢進は誘発されていなかった。

最後に、MeHg<sup>long</sup>による ROCK シグナル亢進が、ATP/P2 受容体シグナルにより抑制されるか否かを検討した。ROCK シグナル (P-MYPT1) 亢進は、上記 P2 受容体アンタゴニストの混合液及び ATP 分解酵素アピラーゼによりほぼ消失した (図 11)。これらは、初代培養ミクログリアを使った検討でも確認できた。さらに、MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害は、

上記 P2 受容体アンタゴニスト混合液及びアピラーゼにより、抑制された (図 12)。従って、MeHg<sup>long</sup>によるミクログリアの ATP/P2 受容体シグナルの亢進が、ROCK シグナルを亢進させ、さらに神経細胞障害を誘発することが示唆された。

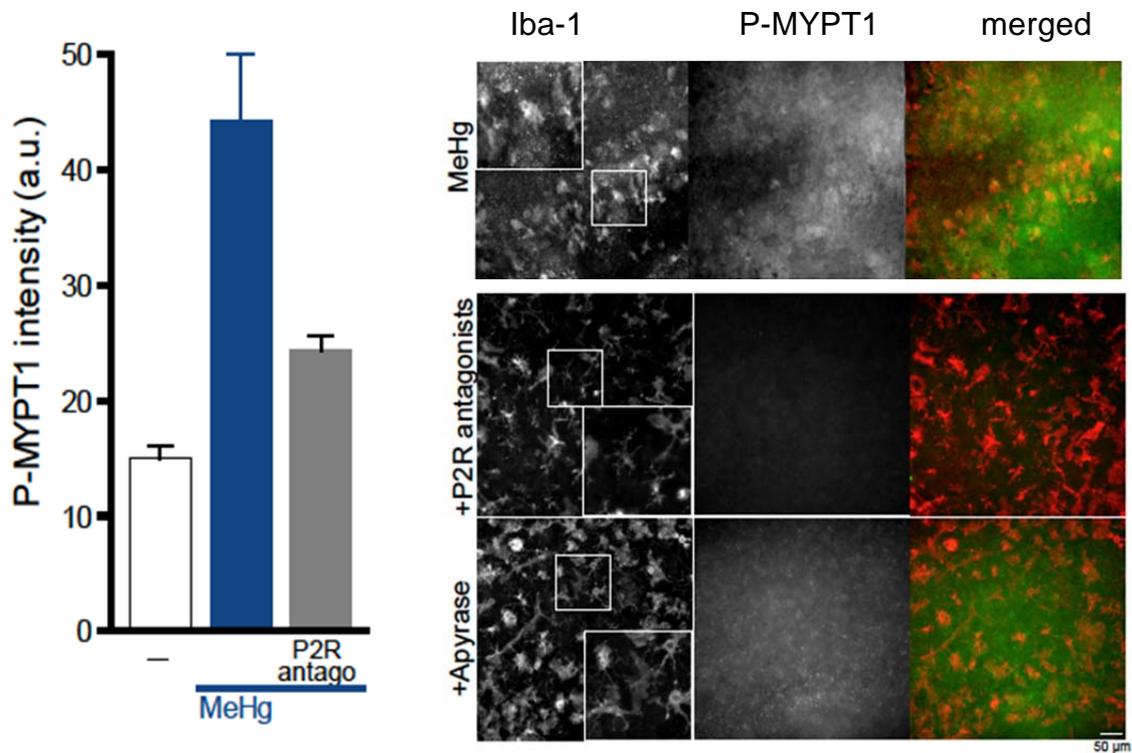


図 11. MeHg<sup>long</sup>により惹起される ROCK 活性化に対する P2 受容体アンタゴニスト及び ATP 分解酵素の作用

左: 大脳皮質スライス培養において、MeHg<sup>long</sup>により惹起される ROCK シグナル亢進 (P-MYPT1) は、P2 受容体アンタゴニスト混合薬 (P2R antagonists; suramin, PPADS 及び RB-2、各 10 μM) で顕著に抑制された。右: 大脳皮質スライス培養において、MeHg<sup>long</sup>により惹起されるミクログリアの ROCK シグナル亢進 (P-MYPT1) は、P2 受容体アンタゴニスト混合薬、及びアピラーゼ (+Apyrase, 2.5 unit/ml) によりほぼ消失した。上段図は図 5 下段図と同じ。

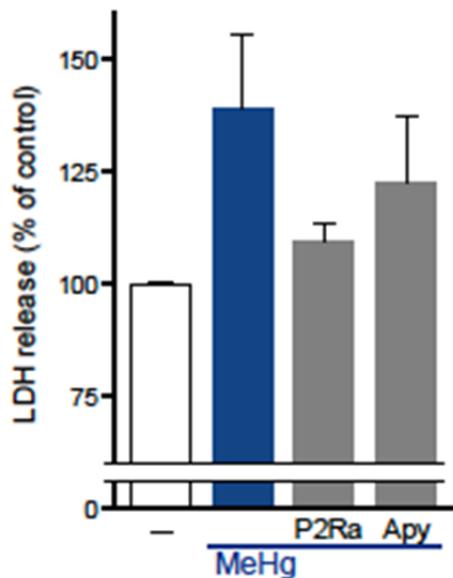


図 12. MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害に対する ATP/P2 受容体の関与

MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害 (LDH 漏出) は、P2 受容体アンタゴニスト混合薬 (P2Ra) 及びアピラーゼ (+Apy) により抑制された。

## V. 結論

大脳皮質スライス培養系を用い、MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害を、障害性フェノタイプに変化したミクログリアの ROCK シグナルの視点から解析した。

1. MeHg<sup>long</sup>により活性化したミクログリアで ROCK シグナルが亢進した。
2. この ROCK シグナルの亢進は、ROCK 阻害薬 Y-27632 で抑制されるが、同時にミクログリア活性化阻害薬ミノサイクリンにより抑制された。
3. MeHg<sup>long</sup>により惹起される神経細胞障害は ROCK 阻害薬により抑制されるが、これは、ミクログリアの ROCK シグナル抑制に起因している可能性が示唆された。
4. MeHg<sup>long</sup>により惹起されるミクログリアの ATP/P2 受容体シグナルの亢進が、ROCK シグナル亢進を惹起する可能性が示唆された。
5. 以上、ROCK 阻害薬が MeHg 誘発神経障害を抑制すること、またその標的細胞として活性化したミクログリアが重要である可能性が示唆された。しかし、本研究結果は、ROCK 阻害薬の標的が、神経細胞及び他の細胞種であることを否定するものではない。

多くの神経変性疾患において、脳内ミクログリアが異常に活性化していること<sup>2</sup>、これにより脳内が炎症状態に陥っていることが明らかにされている。このミクログリア依存的な脳内炎症状態には、ATP、種々の炎症性サイトカイン、さらに ROCK シグナルが重要な役割を果たす<sup>7</sup>。水俣病の分子病態においても、このような活性化ミクログリアを介する炎症応答が重要な役割を果たしていること、これらミクログリア関連シグナルが治療の標的になり得ることが示唆された。

## VI. 今後の課題

1. ROCK 阻害薬によりミクログリアで誘発される分子生物学的プロファイルの解析と、MeHg 誘発神経細胞障害との関連性を明らかとする。

2. ミクログリアの ROCK シグナルを分子生物学的に制御することで、今回の ROCK 阻害薬の作用を再現できるかどうかを確認する。さらにこれらが、障害性ミクログリアの誘導、性質、さらに神経障害における与える影響を確認する。
3. MeHg 誘発神経細胞障害に対する ROCK 阻害薬の作用を *in vivo* システムを用いて解析する（他施設との共同が必要）。

## 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).
3. Noguchi, Y. *et al.* Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y(1) receptor-mediated pathways in astrocytes. *PLoS One* **8**, e57898 (2013).
4. Fujimura, M., Usuki, F., Kawamura, M. & Izumo, S. Inhibition of the Rho/ROCK pathway prevents neuronal degeneration in vitro and in vivo following methylmercury exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* **250**, 1-9 (2011).
5. Borrajo, A., Rodriguez-Perez, A.I., Villar-Cheda, B., Guerra, M.J. & Labandeira-Garcia, J.L. Inhibition of the microglial response is essential for the neuroprotective effects of Rho-kinase inhibitors on MPTP-induced dopaminergic cell death. *Neuropharmacology* **85**, 1-8 (2014).
6. Zhao, Y.F. *et al.* Multitarget intervention of Fasudil in the neuroprotection of dopaminergic neurons in MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* **353**, 28-37 (2015).
7. Hensel, N., Rademacher, S. & Claus, P. Chatting with the neighbors: crosstalk between Rho-kinase (ROCK) and other signaling pathways for treatment of neurological disorders. *Front Neurosci* **9**, 198 (2015).
8. Imura, Y. *et al.* Microglia release ATP by exocytosis. *Glia* **61**, 1320-1330 (2013).
9. Tsuda, M. *et al.* P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* **424**, 778-783 (2003).
10. Boucsein, C. *et al.* Purinergic receptors on microglial cells: functional expression in acute brain slices and modulation of microglial activation in vitro. *Eur J Neurosci* **17**, 2267-2276 (2003).
11. Koizumi, S. *et al.* UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature* **446**, 1091-1095 (2007).

## 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）>

34. 小泉修一（2015） グリア細胞機能とグリオトランスミッター、脳分子論, in press
33. 小泉修一（2015） 神経細胞死とミクログリアの貪食、**Clinical Neuroscience**, 33 (12)1363-1365.
32. Taguchi, M., Shinozaki, Y., Kashiwagi, K., Shigetomi, E., Robaye, B. and Koizumi, S. Müller cell-mediated axon outgrowth of the retinal ganglion cells via P2Y<sub>6</sub> receptor signals. **J Neurochem**, in press.
31. Hirayama, Y. Ikeda-Matsuo, Y., Notomi, S., Enaida, H., Kinouchi, H. and Koizumi, S. (2015) Astrocytes mediate ischemic tolerance in the brain. **J Neurosci**, 35, 3794-3805.

30. Sukigara, S., Dai, H., Nabatame, S., Otsuki, T., Hanai, S., Honda, R., Saito, T., Nakagawa, E., Kaido, T., Sato, N., Kaneko, Y., Takahashi, A., Sugai, K., Saito, Y., Sasaki, M., Goto, Y., Koizumi, S. and Itoh, M. (2014) Astrocyte Pathology of Cortical Dysplasia with Intractable Epilepsy: Expression Analyses of Astrocyte-Related Receptors. **J Neuropathol Exp Neurol**, 73,798-806.
29. Miyamoto, T., Mochizuki, T., Nakagomi, H., Kira, S., Watanabe, M., Takayama, Y., Suzuki, Y., Koizumi, S., Takeda, M. and Tominaga, M. (2014) Targeting Piezo1 expressed in urothelial cell cultures with GsMTx4 treatment inhibits the stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> influx and ATP release. **J. Biol. Chem.**, 289, 16565-16575.
28. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki, Moriyama Y, Gachet C and Koizumi S. (2014) Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission. **Scientific Reports**, 4, 4329.
27. Inoue, K., Komatsu, R., Imura, Y., Fujishita, K., Shibata, K., Moriyama, Y. and Koizumi, S. (2013) Mechanisms underlying ATP release in human epidermal keratinocytes. **J. Invest. Dermatol.**, in press.
26. Imura, Y., Morizawa, Y., Komatus, R., Shibata, K., Shinozaki, Y., Moriyama, Y. and Koizumi S. (2013) Microglia release ATP by exocytosis. **Glia**, 61, 1320-1330.
25. Chin Y, Kishi, M., Sekino, M., Nakajo, F., Abe, Y., Terazono, Y., Kato, F., Koizumi, S., Gachet, C. and Hisatsune, T. (2013) Involvement of glial P2Y1 receptors in cognitive deficit after focal cerebral stroke in a rodent model. **J. Neuroinflamm**, 10, 95. (doi: 10.1186/1742-2094-10-95)
24. Noguchi, Y., Kayoko, F., Shinozaki, Y., Shibata, K., Imura, Y., Morizawa, Y., Gachet, C. and \*Koizumi, S. Astrocytes protect neurons against methylmercury via ATP/P2Y1 receptor-mediated pathways. **PLoS One**, in press.
23. Kinoshita, M., Nasu-Tada, K., Fujishita, K., Sato, K. and \*Koizumi, S. Secretion of matrix metalloproteinase-9 from astrocytes by inhibition of tonic P2Y<sub>14</sub> receptor-mediated signal(s). **Cell. Mol. Neurobiol.** in press.
22. Koizumi, S., Ohsawa, K., Inoue, K. and Kohsaka, S. (2012) Purinergic receptors in microglia -Functional modal shift of microglia mediated by P1 and P2 receptors-. **Glia** in press.
21. Suyama, S., Sunabori, T., Kanki, H., Sawamoto, K., Gachet, C., Koizumi, S. and \*Okano, H. (2012) Purinergic signaling promotes proliferation of the adult mouse subventricular zone cells. **J. Neurosci.** 32, 9238-9247.
20. Morizawa, Y., Sato, K., Takaki, J., Kawasaki, A., Shibata, K., Suzuki, T., Ohta, S. and Koizumi, S. (2012) Cell-autonomous enhancement of glutamate-uptake by female astrocytes. **Cell. Mol. Neurobiol.** 32, 953-956.
19. Koizumi, S. (2011) A new role of astrocytes. **Japanese Journal of Neurosurgery**, 20, 552-558.
18. Shibata, K., Sugawara, T., Fujishita, K., Shinozaki, Y., Matsukawa, T., Suzuki, T. and Koizumi, S. (2011) The astrocyte-targeted therapy by Bushi for the neuropathic pain in mice. **PLoS One**, 6, e23510.
17. Chi, Y., Li, K., Yan, Q., Koizumi, S., Shi, L., Takahashi, S., Zhu, Y., Matsue, H., Takeda, M.,

- Kitamura, M. and Yao, J. (2011) Nonsteroidal anti-inflammatory drug flufenamic acid is a potent activator of AMPK. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 339, 257-266.
16. 小泉修一 (2011) グリオトランスミッターとシナプス制御、 **Clinical Neuroscience**, 29, 1273-1277.
  15. 小泉修一 (2011) 中枢神経障害とグリア、 **Cardiovascular Anesthesia**, 15, 83-89.
  14. 小泉修一 (2011) グリア伝達物質放出と脳機能、 **脳循環代謝**, 22, 24-28.
  13. 小泉修一 (2011) グリア・ニューロン連関、 **BioClinica**, 26, 77-82.
  12. Koizumi, S. (2010) Synchronized Ca<sup>2+</sup> oscillations in astrocytes. **FEBS J.** 277, 286-292.
  11. Mochizuki, T., Tokabe, T., Araki, I., Fujishita, K., Shibasaki, K., Uchida, K., Naruse, K., Koizumi, K., Takeda, M. and Tominaga, M. (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> 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 P2X<sub>4</sub> 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 P2Y<sub>6</sub> receptors is a novel mediator of microglial phagocytosis, **Nature** 2007; 446:1091-1095.

<学会発表>  
国際学会

2. Shinozaki, Y., Tanaka, K., Ikenaka, K., Koizumi, S. Microglia induce neuroprotective astrocytes via P2Y<sub>1</sub> receptor down-regulation. XII European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2015年7月15日～18日、Bilbao, Spain
1. Shinozaki Y, Nomura M, Iwatsuki, Moriyama Y, Gachet C and Koizumi S. Microglia trigger astrocyte-mediated neuroprotection via purinergic gliotransmission FENS2014, July 5-9, 2014, Milano, Italy

### 国内学会

5. 小泉修一、繁富英治、平山友里、森澤陽介、篠崎陽一 Glial assembly: gliotransmission and pathophysiological consequences. 第58回日本神経化学会大会、2015年9月13日、大宮
4. 小泉修一、篠崎陽一、メチル水銀の神経毒性におけるグリア性 ATP と IL-6 の役割(シンポジウム)第41回日本毒性学会学術年会、2014年7月2～4日、神戸
3. 篠崎陽一、小泉修一、ミクログリアは ATP によるグリア伝達を介してアストロサイトの神経保護作用を誘導する、第87回日本薬理学会年会、2014年3月19～21日、仙台
2. Shinozaki, Y. and Koizumi, S. Microglia-derived ATP triggers astrocytic P2Y<sub>1</sub> 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 P2Y<sub>1</sub> receptor activation. 日本薬理学会、2012年3月、京都

# Effects of low concentration of methylmercury on glial cells and subsequent neuronal damages

Schuichi Koizumi, Youichi Shinozaki

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

*Keywords:* Methylmercury; Microglia; ROCK inhibitor; ATP

## **Abstract**

Microglia function as a high-sensitive sensor of brain microenvironment. When sense low concentration of methylmercury ( $\text{MeHg}^{\text{low}}$ ), microglia are changed into neuroprotective phenotype. However, long-exposure (over 2 weeks) of  $\text{MeHg}^{\text{low}}$  ( $\text{MeHg}^{\text{long}}$ ) induced rather neurohazardous microglia. Recently, Rho kinase (ROCK) inhibitors reveal several neurodegenerative diseases including  $\text{MeHg}^{\text{long}}$ -induced one, some of which were mediated by inhibition of microglia functions. Thus, we tested effect of a ROCK inhibitor Y-27632 on microglial functions and neuronal damages induced by  $\text{MeHg}^{\text{long}}$ . Here we found following 4 findings. (1)  $\text{MeHg}^{\text{long}}$  induced activation of ROCK in microglia, (2) Y-27632 inhibited both microglial ROCK and  $\text{MeHg}^{\text{long}}$ -induced neuronal damages, (3) Neuroprotective effect by Y-27632 was dependent on microglia, (4) the  $\text{MeHg}^{\text{long}}$ -induced microglial ROCK activation was dependent on extracellular ATP and P2 receptor activation in microglia. All these findings suggest that microglial ROCK should be an indispensable molecule that induces the  $\text{MeHg}^{\text{long}}$ -induced neuronal damages.

#### IV メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー



## 平成 27 年度水俣病に関する総合的研究 メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

主任研究者 村田勝敬 (秋田大学大学院医学系研究科環境保健学・教授)  
研究協力者 吉田 稔 (八戸学院大学人間健康学部・教授/学部長)  
              苅田香苗 (杏林大学医学部衛生学公衆衛生学・教授)  
              龍田 希 (東北大学大学院医学系研究科発達環境医学・助教)  
              仲井邦彦 (東北大学大学院医学系研究科発達環境医学・教授)  
              岩井美幸 (東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学・特別研究員)  
              柳沼 梢 (尚絅学院大学総合人間科学部健康栄養学科・講師)  
              前田恵理 (東京大学大学院医学系研究科公衆衛生学・特別研究員)  
              坂本峰至 (国立水俣病総合研究センター疫学・部長)  
研究参加者 岩田豊人 (秋田大学医学部社会環境医学環境保健学・助教)

### 研究要旨

水俣病の発生から 60 年近く経過し、日本での高濃度メチル水銀汚染はもはやない。しかしながら、自然界および産業界から依然として水銀は排出されており、胎児や小児における低濃度水銀曝露の健康影響に関する問題は必ずしも解決している訳でない。特に、金採掘に伴う水銀汚染はブラジル、東南アジア、アフリカなどの発展途上国をはじめとした世界的な問題である。このような観点から、低濃度曝露を含むメチル水銀および水銀由来の健康障害に関する疫学研究を主体とした文献レビューをおこなった。

2015 年の文献レビューにより、以下のことが示された。①近年 Open Access 誌が多数発行され、その結果メチル水銀・水銀に関する論文総数も増加している。また水俣会議での水銀条約の採択以後、各国でメチル水銀の曝露評価に関心が高まっていると思われる。②メチル水銀の主たる健康影響は神経毒性と考えられているが、フェロー諸島出生コホートの 22 歳児研究で胎児期メチル水銀曝露が言語性理解・知識の低下と関連していることが示された。③メチル水銀曝露以外に PCB、有機塩素系殺虫剤なども曝露指標とした研究で、胎児期メチル水銀曝露が小児の記憶および学習(特に視覚性記憶)の低下と関連することを示した。④小児の発達影響を評価するために多くの検査法が開発されているが、神経発達検査で性差が散見されるようになった。このため研究デザインを考える際に、神経発達の男女差が検出できるサンプルサイズを有することが重要と考えられた。⑤海棲哺乳動物の総水銀とセレン濃度は強い正の相関があり、セレン/水銀モル比は無機水銀レベルが高くなるにつれて低下し、1 に近づくことが確認された。この機序がヒトのメチル水銀毒性を軽減することを説明するかもしれない。⑥小規模金精錬や水銀鉱山で働く人々およびその作業現場近くの地域に住む人々の健康問題が懸念される。特に、これらの住民については米食に由来する水銀曝露を今後も監視することが重要と考えられた。

以上より、メチル水銀および水銀の健康影響の解明のため、今後も継続的な文献収集とその内容の吟味を続けていくことが重要であると考えられた。

キーワード： メチル水銀、水銀、セレン、低濃度曝露、発展途上国、レビュー

## I. 研究目的

水俣病の発生から早 60 年も経過し、日本では健康影響が危惧されるようなメチル水銀汚染はもはやない。しかしながら、自然界や産業活動からの水銀排出は依然としてあり、胎児や小児における低濃度水銀曝露による健康影響問題は必ずしも全て解決している訳でない。特に、国際的には小児における低濃度水銀の曝露評価およびその健康影響に関する問題や、火力発電所からの化石燃料の燃焼に伴う水銀蒸気の大気中への放出および湖沼への蓄積や、中国、ブラジル、東南アジア、アフリカなどの発展途上国における金採掘および小規模水銀鉱山に由来する水銀汚染およびそのメチル化が問題になっている。このような観点から、国際的なメチル水銀、金属水銀および無機水銀曝露による健康影響 (症候、症状、各種検査結果) に関する文献レビューを行う。このレビューを通して、メチル水銀 (金属水銀・無機水銀を含む) 曝露と症候などの健康影響との関係を検討する。

本研究は、経年的に文献レビューすることにより、世界のメチル水銀/金属水銀の健康影響に関する研究の動向を探り、世界で現時点に求められているメチル水銀研究の存在意義を明らかにするものである。特に、低濃度のメチル水銀毒性は、メチル水銀以外の各種物質 (セレン、長鎖多価不飽和脂肪酸など) によってメチル水銀固有の健康影響が隠蔽され、検出され難いことが近年明らかになった。これを受けて、各々の研究の批判的吟味に際して、交絡因子や共変量を十分考慮しているか、また曝露指標としてどのような生体試料を用いたか、生体試料をどの時期に収集したか等々に至るまで精査することが必要となっている。一方、このレビューで得られる成果は環境省エコチル調査などにおける詳細調査 (特に、メチル水銀の健康影響評価が行われる場合) においても大いに参考になる。

新たな化学物質が新規に多数届出されている中において、わが国ではメチル水銀による健康被害について熟知する専門家の数が年々減少している。したがって、若い研究者がメチル水銀中毒の問題を再確認し、またこの研究の重要性を理解するために、雑誌・学会等の場で反復かつ幅広く情報発信する必要がある。

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、②2015年に発表された海外と我が国の疫学研究論文の概要、③メチル水銀と他の化学物質 (特に、セレン化合物) の相互作用と、それにより現れる症候および健康影響に関するレビュー、④発展途上国で顕在化している水銀の健康影響に関するレビューを行い、現状および今後のメチル水銀研究の方向性を探索した。

## II. 研究方法

国際的な文献データベース Medline (PubMed) を用いて、2015 年までに報告された①ヒトへのメチル水銀の曝露評価、②ヒトへの低濃度メチル水銀曝露による健康影響評価、③メチル水銀毒性に影響するセレンの評価、④途上国での水銀汚染の実態など国際的なメチル水銀曝露による健康調査に関する文献のレビューをおこなった。

(倫理面への配慮)

本研究は公開された文献の調査であり、研究対象者への倫理的配慮は必要としない。

### Ⅲ. 研究結果

#### 1) メチル水銀（および水銀）のヒト研究の推移

"methylmercury"をキーワードとしている総論文数を2004年から2015年までPubMedを用いて検索すると、173編～382編(全言語)であり、このうちヒトを扱った論文数は1年当たり49編から134編であった(表1)。“methylmercury”を扱った総論文数は徐々に増加し、2004年と比べると倍増している。これは、近年Open Access誌の発刊が急増しているためと考えられた。2004年まではヒトを対象とした研究は4割以上を維持していたが、2005年以降は4割に達していない。特に、2005年、2006年、2009年および2014年は、メチル水銀関連論文の中の疫学研究は1/3以下であった。同様に、“mercury”をキーワードとする論文も2倍近くに増えた。このうちヒトを扱った水銀論文の比率は4割未満であり、特に2011年以降は30%前後を低迷している。

表1 「メチル水銀」関連のPubMed上の論文数の推移(2016年2月5日現在)

	西 暦 年											
	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
“methylmercury” の 入った論文数	173	227	241	313	317	274	303	354	349	306	382	356
ヒトを対象とした 論文数	77	78	81	113	119	95	118	119	127	109	134	49
割合 (%)	44.5	34.4	33.6	36.1	37.5	34.7	38.9	33.6	36.4	35.6	35.1	13.8
“mercury”の 入った論文数	983	1240	1327	1422	1504	1440	1577	1745	1779	1767	1915	1783
ヒトを対象とした 論文数	374	398	440	456	505	435	511	535	532	545	532	259
割合 (%)	38.0	32.1	33.2	32.1	33.6	30.2	32.4	30.7	29.9	30.8	27.8	14.5

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<sup>1-6)</sup>、これに伴いメチル水銀のヒト(特に小児)健康影響に関する論文が多数報告された。また、2002年に*New England Journal of Medicine*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<sup>7-9)</sup>、メチル水銀の問題は世間を騒がせた。混乱の続く中、2008年にセイシェル小児発達栄養研究の成果が発表され<sup>10,11)</sup>、フェロー諸島とセイシールのメチル水銀論争に一旦終止符が打たれ、メチル水銀に関する関心も薄れてきたかのように思われた<sup>12,13)</sup>。一方、世界各地で出生コホート研究が新たに行われるようになった。各国が独自の研究目的を掲げて開始しているものの、実施を取り止めた国もある<sup>14-16)</sup>。それにも拘わらず、神経発達に影響するメチル水銀は無視できない化学物質であり、メチル水銀のヒトへの影響等を扱った論文は今後も報告されよう。特に、2013年の熊本における「水銀に関する水俣条約」の採択・署名を受け<sup>17,18)</sup>、ヒトを対象とした曝露評価に高い関心が向けられているように思われる。

## 2) 海外から発信しているメチル水銀研究

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<sup>10,11)</sup>、長鎖多価不飽和脂肪酸 (PUFA) の影響を考慮すると、メチル水銀の発達神経影響は観察されるとの結論を得て、当初の役目を終えたように思える。このため論文数は減っているが、お互い存在意義を誇示する論文が時折発表されている。今年度はフェロー諸島出生コホート 22 歳児を解析した報告がなされた。

### ■ フェロー諸島出生コホート研究からの発信

Grandjean *et al* の研究グループは、フェロー諸島出生コホート研究を通して、メチル水銀の胎児期曝露による小児神経発達影響について多数報告してきた。2015年のフェロー諸島に関連する文献検索では 8 編が PubMed で見つかったが<sup>19-26)</sup>、メチル水銀に関連する論文は 2 編であった。しかし、このうちの 1 編は微量元素としての鉛、メチル水銀およびヒ素の発達神経毒性の総説<sup>25)</sup>であった。

最近のメチル水銀に関する論文の背景 (Background) の中には、“胎児期のメチル水銀曝露は低濃度であっても小児神経発達に影響を及ぼす”と常套文句の如く書かれている。しかし、これは 2008 年の Strain *et al* の論文<sup>11)</sup>が *Neurotoxicology* に掲載されて以後の話である。この端緒はフェロー諸島出生コホート研究である。この研究は 1986-1987 年に母子ペア 1,022 名が登録され、胎児期メチル水銀曝露として臍帯血水銀濃度と出産時の母親毛髪水銀濃度が測定された。これまでの 7 歳児および 14 歳児の研究で、神経心理学的検査、神経行動学的検査、神経生理学的検査で胎児期のメチル水銀曝露がこれら測定項目と関連することが示されている<sup>1,3-5,27-29)</sup>。特に、14 歳児の解析では、胎児期の曝露データだけでなく、7 歳時および 14 歳時のコホートの毛髪水銀濃度も調べられ、これらの値を考慮しても胎児期のメチル水銀曝露が影響すること、すなわち“非可逆性影響”である可能性を示唆した<sup>27,28)</sup>。2015 年に掲載された Debes *et al* の研究はメチル水銀による認知機能の低下が大人になってもあるのか検討したものである<sup>22)</sup>。神経内科学的疾患や精神疾患と診断された人を除いた 814 名の 22 歳コホートに主要な神経機能領域を反映する一連の神経心理学的検査が 2008-2009 年に実施された(出産時母親毛髪水銀 4.24 μg/g、その 25-75 パーセンタイル 2.61-7.70 μg/g)。多変量解析では過去の研究で調整が必要とされた共変量を全て用いた。その結果、Boston 呼称検査および他の言語能力を調べる検査の低得点が臍帯血水銀濃度と有意に関連することが示された。7 歳児/14 歳児と比べ有意な関連の認められる検査項目数は減ったが、実施された他の検査においても (臍帯血水銀濃度が高くなるにつれ) 低得点となる傾向は観察された。特異的な神経機能領域の脆弱性における差違や一般知能との全関連性を確認するために共分散構造分析モデルを用いたが、いずれも知能と負の関連を示し、特に言語性理解・知識と胎児期メチル水銀曝露との負の関連は統計学的に有意であった。Boston 呼称検査結果は、臍帯血水銀濃度が 10 倍になると、得点が 2.2 低下することを示した。以上より、妊娠中のメチル水銀を含む魚摂食による影響は 22 歳になった出生コホートにおいても見られるので、胎児期メチル水銀曝露による認知機能障害は長く続いている可能性が考えられる。

### ■ セイシェル小児発達研究からの発信

セイシエルの小児発達研究 (Seychelles Child Development Study) および小児発達栄養研究 (Seychelles Child Development and Nutrition Study) の成果として 2015 年に 4 編の論文が発表された

30-33)。このうちメチル水銀ないし水銀に関連する研究は以下の3編であった。

胎児期メチル水銀曝露量と心臓自律神経機能に関わる心拍変動の低下との関連は幾つか示唆されているが<sup>27,34)</sup>、この関連性を圧反射感受性を用いて検討した研究はない。Periard *et al*の研究ではセイシエルの若年成人において圧反射感受性の分布と急な起立性低血圧、それらと出生前および直近の出生後メチル水銀との関連について検討した<sup>32)</sup>。セイシエル小児発達研究の1989-1990年に生後6ヶ月に登録された最初のコホートが19歳になった2008年4月から2009年6月に行われた。このうちの95名で安静時および活動時の非侵襲性の心拍・血圧モニタリングが行われた。胎児期曝露は妊娠中の母親毛髪で、また直近の出生後の水銀曝露は19歳児の毛髪で測定した。胎児期メチル水銀曝露は男女(6.7±4.3、6.7±3.8 μg/g)で類似していたが、19歳時の毛髪レベルは男性の方が高かった(11.2±5.8 μg/g、7.9±4.3 μg/g;  $P=0.003$ )。圧反射感受性は自発的に上昇ないし下降する血圧波形を同定する時系列分析で推定した。心拍変動はPNN50(直後の正常間隔より50 ms以上短い正常間隔の相対数)、rMSSD(連続する間隔の差の二乗平均平方根)、LF/HF(交感神経活動/副交感神経活動成分の比)、平均呼出期/吸入期RR間隔の比(E/I比)、立上り30秒後の最長RR間隔と15秒での最短RR間隔の比(Max30/Min15)の指標で測定した。一過性起立性低血圧は起立後15秒までの血圧最大低下量とした。自律性心拍調節の指標は男女とも正常範囲にあった(BRS 24.8±7 ms/mmHg、PNN50 24.9±6.8%、rMSSD 68±22、LF/HF 0.61±0.28)。立上り後、対象者の51.4%が40 mmHg以上の大きい一過性血圧低下を示したが、めまいを報告したのは5.3%のみであった。出生前および直近の出生後メチル水銀曝露量は圧反射感受性、E/I比、PNN50、rMSSD、LF/HF比、Max30/Min15比、起立性低血圧のいずれも有意な関連を示さなかった。以上より、本研究は魚類摂取による出生前や出生後のメチル水銀曝露が自律神経系心拍調節機能の障害と関連するという仮説を支持するものでなかった。

2014年の*Bulletin of World Health Organization*に掲載された論文“Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review”は、世界43カ国の143編の論文をレビューし、その中で女性および小児のメチル水銀曝露指標である母親毛髪総水銀ないし母体/胎児血総水銀の平均値および最大値を比較検討した<sup>35)</sup>。その結果、①小規模金採鉱地域の川岸近くで魚を食べている住民のメチル水銀摂取はFAO/WHO基準値(暫定耐容週間摂取量の毛髪総水銀換算値2.2 μg/g)より数倍高く、また北極地域で海洋生物を食べる人達もその基準値を超えていた、②東南アジア、西太平洋沿岸、地中海沿岸地域の海岸部のメチル水銀の集団平均はFAO/WHO基準値付近であった、③小規模金採鉱地域や北極地域のグループは後者に比べ高い神経毒性リスクを有するが、海岸地域は元来大きなリスクを抱え得る場所である、④水銀曝露指標の最大値はいずれの地域ともFAO/WHO基準を超えていた。この論文に対し、水俣会議で採択された水銀規制条約に賛成の意を表明したMyers *et al*は以下の論法で異議を唱えた<sup>31)</sup>：“上の論文は母親の魚摂食に由来するバックグラウンドレベルの胎児期メチル水銀曝露が小児に神経発達障害を起こすか否かについて取扱っていないにも拘わらず、これを扱っているかのような標題にしている。魚はヒトのメチル水銀曝露の主要な源ではあるが、一方で世界の29億人の基本的な栄養源でもあるということをはっきり認識することが重要である。尤も、これらの人達の多くは限られた栄養・健康資源しかない発展途上国に住んでいる人であるが…。確かに、セイシエル小児発達研究の対象である妊娠中母親の毛髪メチル水銀濃度の中央値は5.9 μg/g(範囲、0.5~26.7

μg/g) と幾分高いが、少なくとも、このコホートの胎児期曝露と神経発達との間に有意な関係は認められていない。”セイシェル小児発達研究は重要な交絡因子を測定していなかったため、評価し難いが、Myers *et al* の意見は「FAO/WHO や米国環境保護庁 (EPA) のメチル水銀の規制値ばかりが一人歩きしている」ことに対して警鐘を唱えたものと理解できる。

セイシェル小児発達栄養研究の中で、多価不飽和脂肪酸の影響を考慮するとメチル水銀曝露が神経発達と負に関連したことを2008年に発表した Straine *et al* は更なるセイシェル小児発達栄養研究を展開した<sup>33)</sup>。この研究では一貫して生体マーカーとして妊婦母体血メチル水銀と *n*-3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA) に絞り、他の鉛、PCBs、有機塩素系殺虫剤などの測定は行っていない。コホートが20ヶ月に達した時、Bayley 発達検査 (BSID-II)、MacArthur Bates Communicative Development Inventories (CDI)、改訂版 Infant Behavior Questionnaire を行い、これら全てのデータの揃った1,265名が今回の研究対象者となった。母親毛髪メチル水銀値は  $3.92 \pm 3.46$  (平均±標準偏差、範囲0~31.66) μg/g、血清アラキドン酸  $0.20 \pm 0.08$  mg/mL、ドコサヘキサエン酸 (DHA)  $0.19 \pm 0.09$  mg/mL であった。胎児期メチル水銀曝露は神経発達のいずれの指標とも直接的な関連を示さなかった。有意な相互作用は BSID-II の運動発達指標 (PDI) に対してメチル水銀と PUFA の間で見られた。メチル水銀が高くなるにつれ PDI が低くなる関係はあったが、それは高い *n*-6:*n*-3 比を持つ母親の子どもに限られた。*n*-3 PUFA の高い母親で、増加するメチル水銀は PDI が改善する関係を示した。母親の高い DHA は CDI の身振り (言語発達を指す) 得点の改善と関連したが、メチル水銀の調整の有無に拘わらず認知発達指標 (MDI) とは有意な負の関連を示した。高い *n*-6:*n*-3 比は CDI の3指標全ての低得点と関連した。以上より、著者らは胎児性メチル水銀曝露と神経発達指標との間に負の関連を総じて観察することはなかった。しかし、母親の PUFA は胎児期メチル水銀曝露と PDI との関係を修飾しているように思えた。DHA の高い状態は言語発達と正の関係を、また MDI と負の関係を示しており、これらは神経発達の種々の場面でアラキドン酸と DHA の軽妙なバランスの存在を示すのかもしれない。

## ■ 世界のメチル水銀関連論文

2015年にPubMedで検索可能なメチル水銀に関連する論文を概観すると、メチル水銀の①健康影響に関するものと②曝露評価に関するものに大別された。そのうち、後者は世界各地の曝露レベルを調べたものと、曝露指標の測定精度、代謝速度、曝露指標間の関連性を調べたものに分類される。ただ、雑誌によってはかなりいい加減と思われる論文もあり、注意を要する。

### A. メチル水銀の用量-影響関係に関する研究

最近の疫学研究では、メチル水銀の他に、ポリ塩化ビフェニール (PCBs)、有機塩素系殺虫剤などを神経毒性物質と見做し、これらの同時曝露モデルを導入した報告がされるようになった。Orenstein *et al* はこれらの物質の胎児性低濃度曝露と記憶および学習機能との関係を検討した<sup>36)</sup>。対象は1993年から1998年までの間に米国 Massachusetts 州 New Bedford の PCB で汚染した港近くで生まれた学童393名であり、母親出産時毛髪水銀の他に臍帯血清中 PCBs およびジクロロジフェニルジクロロエチレン (DDE) が胎児期曝露指標である。記憶と学習の評価には Wide Range Assessment of Memory and Learning (WRAML) を用い、7歳から11歳までの学童 (平均8歳児) で実施され、その得点は平均100、標準偏差15となるよう標準化された。WRAMLの指標は視覚性記憶、言語性記憶および学習であった。各々の影響指標と胎児期曝露指標の関連を、考え得る交

絡因子を調整した重回帰分析で解析した。4つのPCBを合計した臍帯血清総PCB濃度は低かった(平均0.3 ng/g、範囲0.01~4.4 ng/g)が、毛髪水銀濃度は典型的な米国魚摂食集団と同レベルであった(0.6 µg/g、0.3~5.1 µg/g)。重回帰分析の結果、毛髪水銀1 µg/gが増加する毎に視覚性記憶は2.8点(95%信頼区間、0.6~5.0点)、学習に関しては2.2点(-0.2~4.6点)、言語性記憶は1.7点(-0.6~3.9点)低下する関係が示された。PCBやDDEはWRAML指標と有意な関係を示さなかった。これらの結果は、胎児期低濃度のメチル水銀曝露は小児の記憶および学習(とりわけ視覚性記憶)に有害影響を及ぼし得ることを示唆する。

母親が摂食する魚介類から体内に入るメチル水銀に起因する小児神経発達影響の評価は、身体に有益である多価不飽和脂肪酸を交絡因子として調整することにより、補強される。Gaskin *et al* はカナダ Ontario に住む妊娠を考えている女性に実施している血中水銀濃度の妊娠前後スクリーニングプログラムの費用対効果を検証した<sup>37)</sup>。仮説は「介入閾値を超える血中水銀レベルを有する女性に魚摂食の忠告は必要である」であり、複合決定樹/マルコフモデルを用いて、提案したスクリーニング介入と標準的な対処の場合とで質調整生存年(quality adjusted life years, QALY)を考慮して比較した。成功した妊娠調節に対して胎児期メチル水銀曝露による認知機能低下を見積もるのに、2009-2011年のカナダ健康測定調査で報告された20~49歳女性の血中水銀分布が用いられた。モデルとなる健康影響には生活の質に関わる損失や改善教育費用を含む。情報の価値分析はそのモデル結果周辺にある不確実性を評価し、この不確実性に最も貢献する指標が何であるのか同定するために行われた。提案したスクリーニング介入で得られたQALY当たりの増分費用対効果比(ICER)は18,051ドルと見積もられ、ICERが支払意志額の1 QALY当たり50,000ドルに収まる割合の期待値は0.61と推定された。以上より、妊娠を考えている女性に提案した妊娠前後の血中水銀スクリーニングプログラムは社会的視野から見て大いに費用対効果があろうと述べた。

淡水魚由来のメチル水銀およびチメロサル含有ワクチン(TMV)由来のメチル水銀は、魚摂取やワクチンを使用している小児において、神経毒性曝露の主要な源となりうる。しかし、アマゾン河流域の採鉱環境で暮らす子どもは廃棄物質中の有害金属にさらに晒される。Marques *et al* はブラジルの錫鉱石の開放採鉱の中心地であるBom Futuroに住む子ども294名(男子105名、女子189名)で水銀曝露と神経発達の関係調べた<sup>38)</sup>。子どもとその妊娠中母親の毛髪水銀濃度と総エチル水銀が測定された。そして、性別影響の検討に2変量解析を、また出生前後の水銀曝露がBayley発達検査(BSID)の運動発達指標(PDI)や認知発達指標(MDI)と関連するか否かを評価するために重回帰分析を使用した。歩行開始年齢および会話開始年齢とともに、BSIDは6ヶ月と24ヶ月の時に実施された。毛髪水銀濃度は6ヶ月男児で0.97(範囲0.50-1.90) µg/g、同女児で0.98(0.46-1.90) µg/gであり、また24ヶ月男児で1.72(0.57-5.70) µg/g、同女児で1.75(0.61-5.42) µg/gであった。6ヶ月および24ヶ月のMDI得点には有意な性差が観察された(各々、 $P = 0.0073$ 、 $P = 0.0288$ )。重回帰分析では、男子にのみ6ヶ月のMDI得点が家族収入( $\beta = 0.288$ )および出生体重( $\beta = -0.216$ )と有意な関連を示し、また男子の24ヶ月のMDI得点は出生時毛髪水銀濃度と有意な関連( $\beta = -0.222$ )があった。さらに、男子では歩行開始年齢は毛髪水銀濃度( $\beta = 0.188$ )および授乳期間( $\beta = -0.282$ )と有意に関連したが、女子では歩行開始年齢のみが授乳期間( $\beta = -0.275$ )と関連した。以上より、胎児期水銀曝露と弱い関連を示す採鉱環境において、神経発達に有意な性差があり、特に男子が小児発達尺度の遅れに対して鋭敏であることが示唆された。

スリナム共和国の Puleowime (Apetina) の住民のいる Wayana 地区は多くの他地区と比べて魚摂取量が多く、しかも同地区に面するスリナム東部および南東部の多くの場所で小規模の金採鉱が行われており、環境中に放出される水銀曝露の危険もある。2008年に住民主導で実施されたリスク評価では、Wayana 住民は水銀曝露による健康障害に対する高い生涯リスクがあると示された。この地で Peplow & Augustine は Puleowime 住民に水銀曝露に関連する健康影響があるか否かを調べた<sup>39)</sup>。2008年に 20 µg/g を超える毛髪水銀濃度であった住民 22 名の値は 23±6 µg/g (平均±標準偏差) であったが、2012年 (13±6 µg/g) には有意に低下していた。2012年に神経内科的検査バッテリーがおこなわれ、メチル水銀曝露に一致する神経影響が曝露住民に見られた。特異的な運動および認知障害は必ずしも同じではなかったが、毛髪水銀濃度が亜急性レベルであるアマゾン川流域で行われた他の研究と比べて、毛髪水銀濃度と神経学的障害の間に類似した関連性が観察された。なお、この論文は症例研究であるため対象者数も少なく、明確な結論は示されていない。

### B. メチル水銀の健康影響に関連する研究

一部の疫学研究で、メチル水銀は心血管系疾患との関連が示されている。これについては未だ一定の結論に達していないが、一貫性のない結果は魚摂取に由来する心臓保護作用のある *n-3* 多価不飽和脂肪酸とともにメチル水銀の同時曝露によってもたらされているという事実に起因する。それゆえ、この機序に関する情報を提示するならば、メチル水銀が心血管系の健康リスクであるかどうかを理解しやすくなるであろう。現在までに明らかにされている事実として、メチル水銀は蛋白質のスルフヒドリル基を不活化する酸化促進剤である。そこで Ginsberg *et al* は、この生化学的作用は動脈硬化防止に働く重要な抗酸化防御機構を減退させることかもしれないと考えた<sup>40)</sup>。この防御機構の 1 つは高比重リポ蛋白中に存在するパラオキシナーゼ 1 (PON1) 酵素であり、血中脂質の酸化および血管内皮への沈着を抑制する。PON1 は有機リン化合物のオキシソンの解毒に重要な酵素であるだけでなく、心血管系リスクの臨床マーカーとして有用である可能性が高い。メチル水銀やその他の金属はガラス器内で PON1 活性を阻害することが知られている。メチル水銀は魚摂取集団において血清 PON1 活性の低下と関連した。PON1 を低下させる影響は様々なメチル水銀量で引き起こされる PON1 の集団分布内の変化を予測することで評価され、1 日当たりのメチル水銀量 0.3 µg/kg で集団の平均 PON1 レベルを 6.1% 減少させ、急性心血管疾患発症リスクを集団全体の 9.7% 上昇させると推定された。この評価は、メチル水銀による心血管疾患発症リスクに可能な機序を示すとともに、そのリスクを定量化する方法を示唆するものである。この研究は、ヒトのリスク評価の中で、背景疾患の発症過程に及ぼす化学毒性の付加的影響を評価する逆方向での疾患生体マーカーを利用した例である。

動物実験では肥満が高い血中および組織中の水銀濃度と関連するが、疫学研究にはそのような証拠はない。この関連性の根拠となる機序は不明瞭であるが、肥満はメチル水銀の代謝や分布を変えるかもしれない。そこで Rothenberg *et al* は米国健康栄養調査 (2007-2010 年 NHANES) で水銀分析用の血液採取 24 時間以内に魚介類を食べた参加者の二次データを用い、妊娠していない米国成人 (20 歳以上) 1,138 名と小児 (2-19 歳) 206 名を対象とし、魚介類由来のメチル水銀摂取や他の交絡因子を考慮して、メチル水銀が大部分を占める血中水銀レベルに肥満が影響するのか検討した<sup>41)</sup>。血中水銀レベルを従属変数とし、24 時間以内に食べた魚のメチル水銀曝露、成人では肥満指数 (BMI)、小児では BMI の z 得点、その他の交絡因子を独立変数として、米国保健統計センタ

一によって提供されている重みを利用した多変量重み付け最小二乗回帰モデルで解析した。調整後モデルで、血中水銀レベルは大人の BMI と負の相関を示した ( $\beta = -0.54$ 、95%信頼区間-0.90~-0.18)。小児の血中水銀レベルは BMI z 得点と負の相関を示したが、統計的には有意でなかった ( $\beta = -0.16$ 、95%信頼区間-0.066~0.035)。肥満の成人や小児を正常体重者と比較すると、血中水銀濃度は肥満成人で平均 22%低く (95%信頼区間-33%~-82%)、肥満小児では血中水銀濃度に有意差は見られなかった (-1.7%、-31%~+39%)。以上より、主要な外因性メチル水銀曝露 (すなわち、魚介類摂取由来) や他の交絡因子の影響を調整すると、成人ではメチル水銀の代謝、分布、排出が BMI の増加に伴って変化し得ると考えられた。

### C. メチル水銀の測定法および代謝に関する研究

多くのメチル水銀影響に関する研究は長期曝露を評価するためにメチル水銀の 1 生体マーカーを測定することによっておこなわれている。それゆえ、長期間高い再現性を有するデータであるためには長期曝露を映し出すマーカーの測定法の信頼性を評価することが求められる。Kioumourtzoglou *et al* は女性 57 名の 10~15 年に亘るメチル水銀の 1 マーカーである赤血球中水銀の被験者間の再現性を検討した<sup>42)</sup>。10~15 年 (中央値 12 年) 隔てた 2 つの血液試料が Nurses' Health Study II の女性 57 名より提供され、その血液試料より赤血球中水銀濃度が測定された。被験者間の変動を評価するために、2 つの試料間の相関係数 ( $r$ ) と級内相関係数 (ICC) を算出した。さらに、初回の赤血球中水銀に対して魚介類摂取に関する変数も含めた異なるモデルを、予測性能を検討するため leave-one-out (一個抜き) 交差検証を用いて比較した。結果は、10~15 年を隔てて強い相関 ( $r = 0.69$ ) と高い ICC (0.67、95%信頼区間 0.49~0.79) が認められた。初回の赤血球中水銀試料と同時に得た魚介類摂取量は、赤血球中水銀の変動の 26.8%を説明した ( $r = 0.52$ )。時間とともに赤血球中水銀は低下したが、10~15 年隔てて強い級内相関が認められたことから、被験者内での相対的安定性が示された。これより、赤血球中水銀の単回測定は長期曝露指標として妥当であると著者らは判断したが、この結論は彼らの限られた対象にしか適用できないだろう。

メチル水銀が脳および神経系に有害健康影響を引き起こすことはよく知られている。血液あるいは毛髪中のメチル水銀の生物学的半減期から算出される消失速度定数を推定することはメチル水銀摂取のガイドライン値を求める際に重要となる。そこで、Jo *et al* は韓国成人のメチル水銀の生物学的半減期を、血中メチル水銀濃度とメチル水銀の 1 日当たりの食事摂取の間に直接的関係があるとする 1 コンパートメントモデルを使用して推定した<sup>43)</sup>。集団のメチル水銀の生物学的半減期の個人間変動を定量化し、そのモデルのパラメーターを推定するために事前情報 (informative priors) を利用した。メチル水銀の集団全体の生物学的半減期は  $80.2 \pm 8.6$  日と推定され、また男子で  $81.6 \pm 8.4$  日、女性で  $78.9 \pm 8.6$  日であった。生物学的半減期の標準偏差は  $25.0 \pm 8.6$  日と算出された。血中メチル水銀濃度とメチル水銀摂取量の直接的関係を利用すると、本研究の生物学的半減期は、以前ガイドライン値を設定する際に使われた研究で算出された値よりも長いと考えられた。

### D. メチル水銀の曝露評価に関する研究

メチル水銀に汚染された魚摂取は、特に妊娠中の母親では、胎児への健康障害を起こしうる。米国国民健康栄養調査 (NHANES) 2011-2012 年版にはアジア系米国人などの人種分類とともに、総水銀およびメチル水銀などの測定を含んでおり、リスクの決定要因の解析を行うことができる。

そこで、Buchanan *et al* はメチル水銀影響を受け易い身体的に脆弱な集団や高頻度の魚摂食に由来する健康影響リスクを持ちうる集団（つまり、妊娠可能年齢や 50 歳以上の女性）について、米国における現在のメチル水銀曝露量を調べた<sup>44)</sup>。メチル水銀の予測値の幾何平均値とともにその 90 および 95 パーセンタイル値を算出し、また重回帰分析を用いて全ての予測変数に関連する平均メチル水銀の比例変化を推定した。さらに、高くなるメチル水銀を予測するために血中総水銀検査法と魚摂食調査票を使ってスクリーニング法の妥当性を検討した。メチル水銀の幾何平均値はアジア系妊娠可能年齢女性 (1.17  $\mu\text{g/L}$ ) と 50 歳以上のアジア系米国人 (2.49  $\mu\text{g/L}$ ) で最も高かった。アジア系妊娠可能年齢女性の 23%以上が 3.5  $\mu\text{g/L}$  以上の値であり、50 歳以上アジア系米国人の 25%が 5.8  $\mu\text{g/L}$  以上の値であった。魚摂食頻度はメチル水銀の全変動の 21~23%を説明した。魚を週 2 回以上摂食する女性の 25%が 3.5  $\mu\text{g/L}$  以上のメチル水銀値であった。血中総水銀は 5.8  $\mu\text{g/L}$  以上のメチル水銀で高い妥当性を示し、魚料理を月 2 回以上食べる二段階スクリーニング（血中総水銀で追跡）も高い妥当性を示した。以上より、魚摂食によりアジア系妊娠可能年齢女性のメチル水銀曝露は増え続けており、その子どももリスクを背負うこととなる。高リスク群におけるメチル水銀のスクリーニングが考慮されるべきであろう。

Xu & Newman は、米国 Virginia 州海岸部のアジア系が大多数を占める 2 つの教会区住民と対照群である非アジア系教会区住民を対象として魚摂食とそれに関連する水銀曝露について比較検討した<sup>45)</sup>。魚介類摂食量は中国系住民で 1 日一人当たり 36.9 g またベトナム系住民で 1 日一人当たり 52.7 g であり、米国一般集団の魚摂食量 12.8 g よりも多かった。同様に、毛髪水銀濃度は各々中国系 0.52  $\mu\text{g/g}$ 、ベトナム系 1.46  $\mu\text{g/g}$  であり、米国一般女性の 0.2  $\mu\text{g/g}$  よりも高かったが、公表されている WHO の曝露閾値 14  $\mu\text{g/g}$  よりも低かった。回帰モデルを使い、魚介類摂食量と毛髪水銀濃度との正の関係を示し、魚介類摂食による水銀曝露であることを示唆した。これら研究対象集団においてモンテカルロ法で算出した年平均の 1 日当たりのメチル水銀摂取量は、ベトナム系住民が最も高く、次いで中国系住民、最後に非アジア系住民であった。にもかかわらず、彼らの 1 日当たりのメチル水銀摂取量はいずれも米国 EPA の基準値 (0.1  $\mu\text{g/kg}$  体重/日、*RfD*) に比べて低かった。結論として、魚摂食パターンは人種間で異なり、その結果水銀曝露レベルも異なる。非アジア系住民に比べてアジア系住民は魚介類/水銀摂取量が多いので、人種毎に個別の魚介類摂食指導が必要であると考えられた。そうしないと、魚摂食による健康有益性は、水銀曝露の有害リスクに比べて、意味のないものになってしまう。

公衆衛生で世界的な関心が持たれている水銀曝露は主に魚摂取由来のメチル水銀と歯科用アマルガム由来の金属水銀である。Goodrich *et al* は、二元的曝露のある集団における水銀の体内負荷量と主要曝露源を明らかにするために、米国歯科医師会の歯科医師 630 名に呼びかけた<sup>46)</sup>。参加者は質問紙を通して職業実態と魚摂取について回答した。金属水銀およびメチル水銀の生体マーカーとして尿中水銀と毛髪および血液水銀が Direct Mercury Analyzer-80 を使って測定された。対象者の水銀幾何平均（および 95%信頼区間）値は尿中で 1.28 (1.19~1.37)  $\mu\text{g/L}$ 、毛髪中で 0.60 (0.54~0.67)  $\mu\text{g/g}$ 、血液中で 3.67 (3.38~3.98)  $\mu\text{g/L}$  であり、米国一般集団より高かった。重回帰分析で、歯科医としての勤務年数、扱うアマルガム量、就業時間および性ととも個人のアマルガム量が尿中水銀レベルを予測できた。魚摂食パターンで毛髪水銀および血液水銀を予測することができ、白人に比べてアジア系人種で高かった。魚のうち 5 種、すなわち、メカジキ、マグロ、マグロ白

缶詰、ホワイトフィッシュ (鮭)、大サバ (king mackerel) が推定水銀摂取の大部分を占めた。水銀の職業性曝露を有する集団を研究する時、大部分の総曝露を占める金属水銀とメチル水銀の両者の環境曝露を評価することが重要である。

韓国内の食事由来のメチル水銀曝露を評価するために、Yang *et al* は小売店から集められた魚缶詰、魚ソース、乾燥カツオ、冷凍マグロ刺身などの海産物中の総水銀およびメチル水銀含有量を調べた<sup>47)</sup>。直接水銀解析装置およびガスクロマトグラフィー電子捕獲検出器を使って各々総水銀とメチル水銀が測定された。最も高い総水銀およびメチル水銀を示したにはマグロの刺身であり、次いで乾燥カツオであった。マグロ缶は他の魚缶詰と比べて頻回検出され、かつ高い含有量を示した。1週間当たりの曝露量を推定すると、海産物中の水銀曝露は安全な範囲にあり、総水銀は暫定耐容週間摂取量 (PTWI, 4 µg/kg 体重/週) の 2.59% であり、メチル水銀は PTWI 1.6 µg/kg 体重/週 の 1.82% またメチル水銀の基準値 (EPA RfD, 0.7 µg/kg 体重/週) の 4.16% であった。しかし、小児のような脆弱集団を守りかつ食物摂取を制限するために、魚および海産物中の水銀量を定期的にモニターする必要があると述べた。

食物摂取による健康リスクを評価するために、Lei *et al* は有機塩素系殺虫剤、PCB、ポリ臭化ビフェニールエーテル、多環芳香族炭化水素および毒性重金属 (水銀、クロム、カドミウム、鉛およびヒ素) のヒト 1 日当たりの摂取量と取込量を中国上海にある市場から集めた動物性食品を基に推定した<sup>48)</sup>。単一食品摂取で生体に入ってくる汚染物質の摂取および取込推定量は成人で各々 9.4~399 ng/kg 体重/日と 4.2~282 ng/kg 体重/日であり、小児では 10.8~458 ng/kg 体重/日と 4.8~323 ng/kg 体重/日であった。また複数食品摂取で入ってくるこれらの推定値は成人で各々 0.2~104 ng/kg 体重/日 (摂取) と 0.05~58.1 ng/kg 体重/日 (取込)、小児で 0.2~119 ng/kg 体重/日 (摂取) と 0.06~66.6 ng/kg 体重/日 (取込) であった。これら汚染物質によって脅かされる非癌性および癌性健康リスクは、米国 EPA のリスク評価法に従い、危険指数 (hazard quotient, HQ) および生涯癌リスク法を使って推定された。結果は、単一ないし複数食品摂取による多数の汚染物質に対する複合危険指数は 1 以下であり、上海住民は有意な非癌性健康リスクを受けているとは考えられなかった。調査した汚染物質の中でメチル水銀の潜在的な非癌性リスクが最も高かった。しかし、多くの食物中で多数の汚染物質によって脅かされる複合癌性リスクは  $10^{-6}$  の許容リスクを超え、無機ヒ素が主たる寄与因子であり、無機ヒ素の癌性リスクは上海市場の動物性食品において関心事の 1 つである。なお、癌性および非癌性影響を誘発するポリ臭化ビフェニールエーテルのリスクは無視しうるものであった。

サハラ砂漠以南のアフリカで胎児期メチル水銀曝露は殆ど知られていないが、メチル水銀は世界的に分布する神経発達毒性物質である。Obi *et al* はナイジェリアの Nnewi にある病院で集められた母親-新生児 95 組の臍帯血および母体血中の総水銀濃度を測定し、人口学的ないし食事性因子が血中水銀と関連するかどうか、また水銀レベルが自記式健康調査および出産児健康状態と関連するか調べた<sup>49)</sup>。母体血中水銀レベルは平均で 3.6 µg/L で、範囲 1.1~9.5 µg/L であった。臍帯血水銀は平均で 5.1 µg/L (範囲 1.2~10.6 µg/L) であった。臍帯血/母体血の水銀比は平均で 1.5 (0.4~3.2) であった。母親および臍帯血中水銀は有意な正の相関があった ( $r = 0.471$ )。1/3 以上の母親が少なくとも月に 1 度は魚摂食をしていると報告したが、魚摂食によって生じる血中水銀の増加は小さいものであった ( $P = 0.08$ )。臍帯血水銀は出生時体重および身長、頭囲および胸囲とも有意な

正の関連があった。参加者の 36%の水銀レベルが米国 EPA の基準値 (RfD) に関連する生体モニタリング指導値を超えていた。以上より、本対象集団である妊婦およびその新生児はメチル水銀に曝露されており、その曝露は世界の他地域の一般集団値よりも高いことを示した。

### 3) 日本から発信しているメチル水銀研究

#### ■ わが国の出生コホート研究

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

2015 年の研究成果のうち、メチル水銀/水銀に関連する論文が Miyashita *et al* によって報告された<sup>50)</sup>。PCB やメチル水銀の胎児期曝露の有害性、また妊娠中母親の魚摂取による栄養の有益性は胎内成長に影響を及ぼし得る。そこで、高頻度の魚摂取をしていることが知られている日本人における出生サイズに及ぼす PCB やメチル水銀の胎内影響を検討するために、妊娠中および分娩時の母体血中 PCB と多価不飽和脂肪酸、毛髪総水銀 (これはメチル水銀曝露の生体指標) を測定した。母親の魚 (脂肪に富んだ魚と赤身魚に分類) や貝の摂取は分娩時になされた食品頻度調査票より計算された。新生児の人体計測データは出生記録から得られた。化学物質曝露と出生サイズの関連性は交絡因子を調整した重回帰分析を用いて母子 367 組で解析された。出生体重 (平均±標準偏差) は 3,073±37 g であった。妊娠年齢相応より小さい (SGA) 体重児の発生頻度は 4.9% であった。PCB および毛髪水銀濃度の中央値は各々 108 ng/g (脂質当たり) と 1.41 µg/g であった。水銀濃度と出生体重、児身長、胸囲、頭囲との間に有意な関係は見られなかった。多価不飽和脂肪酸を調整した重回帰分析を用いると、SGA 体重児のリスクはメチル水銀の増加に伴い減少することが示された。以上より、必須栄養の有益な影響は出生サイズに及ぼすメチル水銀影響を隠蔽するかもしれないことが示唆された。

東北コホート調査は残留性有機汚染物質 (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。Tatsuta *et al* が宮城県内の三陸海岸地域の 7 歳児に小児用 Wechsler 知能検査 (WISC-III) を実施している最中に東日本大震災に見舞われた<sup>51)</sup>。そのため、7 歳児の知能検査 (IQ) 結果は震災前後で心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の有無も考えられ、分割して検討することとなった。震災前に WISC-III を行った群 (震災前群) 123 名の臍帯血総水銀、鉛、母体血 DHA 濃度 (中央値) は各々 15.5 (5 および 95 パーセントイル値、6.4~39.9) ng/g、0.4 (0.2~1.0) µg/dL、171.7 (109.9~259.3) µg/mL であり、震災後群 289 名は各々 16.7 (5.9~39.7) ng/g、0.4 (0.1~1.1) µg/dL、169.3 (98.3~249.4) µg/mL であった。両群にこれら化学物質曝露の有意差はなかったが、母親妊娠時の飲酒率が 23.4% と 13.1% と有意に異なった。このため、飲酒の有無と知能検査の検査者 (ダミー変数) を共変量として、震災

前後群で知能検査成績を比較した。生後 30 ヶ月に実施された子どもの行動チェックリスト (CBCL)、生後 42 ヶ月に実施された Kaufman 心理・教育アセスメントバッテリー (K-ABC) 得点、子どもの養育環境に関する検査得点、7 歳時の WISC-III の動作性 IQ 得点には有意差は見られなかったが、WISC-III の言語性 IQ 得点で震災後群が震災前群に比べて有意に低かった。さらに、K-ABC 検査では大きく認知処理過程尺度と習得度尺度に分かれ、前者は学業等に影響されない生まれつきの能力、後者は文化・教育環境に影響される能力と考えられている。42 ヶ月時に実施されたこの 2 つの尺度も共変量に加えて WISC-III 得点を比較しても結果は変わらなかった。その際、言語性 IQ 得点は認知処理過程尺度および習得度尺度と正の関連があり、また動作性 IQ は認知処理過程尺度とのみ正の関連が見られた。以上より、著者らは災害がもたらす教育環境への悪影響を早期に取り除かないと算数や知識などを含む言語性 IQ の低下を招くと報告した。

WISC-III (IQ) scores after adjusting for possible covariates in predisaster and postdisaster groups (N=123 and N=289, respectively): results of covariance †

	Predisaster group	Postdisaster group	P value	Covariates					
				Mean±SD	Mean±SD	Mental processing score	Achievement processing score	Tester 1	Tester 2
						t value	t value	t value	t value
Verbal IQ	103.9±12.2	99.8±9.5	0.001	3.84 **	8.70 **	2.90 **	0.00		
Information	10.5±2.9	9.5±2.5	0.002	2.28 *	7.35 **	1.15	-0.86		
Similarities	10.6±2.9	10.2±2.6	0.217	1.86	5.74 **	1.90	0.91		
Arithmetic	11.2±2.5	10.2±2.4	0.001	3.19 **	4.30 **	1.69	0.17		
Vocabulary	10.9±2.7	10.1±2.3	0.012	3.25 **	5.51 **	3.81 **	0.79		
Comprehension	10.0±2.9	9.9±2.5	0.666	1.61	4.93 **	0.86	-1.02		
Digit span	9.6±1.8	9.0±2.2	0.010	5.23 **	2.06 *	1.65	3.30 **		
Performance IQ	101.1±11.2	101.4±10.6	0.814	6.22 **	1.00	0.26	-1.72		
Picture completion	10.8±2.8	11.1±2.2	0.349	3.25 **	0.93	-0.47	-5.30 **		
Coding	9.1±2.4	9.5±2.3	0.225	4.15 **	-0.69	1.14	-0.89		
Picture arrangement	10.8±2.6	10.3±2.6	0.070	4.23 **	0.52	-0.07	-2.17 *		
Block design	9.9±2.4	10.1±2.6	0.686	4.21 **	1.43	-0.06	0.50		
Object assembly	10.0±3.2	10.1±2.8	0.954	3.15 **	0.75	0.33	2.02 *		
Symbol search	10.5±2.4	10.3±2.3	0.458	3.66 **	1.78	3.80 **	2.38 *		
Total IQ	102.8±10.6	100.6±9.2	0.053	5.99 **	6.11 **	2.02	-1.01		

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.001$ .

† Covariates are K-ABC scores after adjusting for maternal drinking habit during pregnancy and testers of K-ABC, and testers of WISC-III.

### ■ わが国のメチル水銀に関連する疫学研究

国内の横断研究として、Sakamoto *et al* は水銀化合物の曝露のない健康な妊婦 54 名を対象とし、妊娠初期および出産期女性の血液、手足爪、毛髪および臍帯血を測定した<sup>52)</sup>。この研究は、妊娠中のメチル水銀曝露の標的臓器は胎児脳であり、特に妊娠後期の胎児脳は感受性が高いことが知られている。このため、妊娠後期のメチル水銀曝露量を示す指標は小児発達影響を検討する際に必須となるので実施された。この結果、妊娠初期の手足爪の水銀濃度は、頭皮から 3-4 cm の毛髪水銀濃度と最も高い正の相関係数が得られ、約 5 ヶ月前のメチル水銀曝露指標であることが示唆

された。出産時の手足爪の水銀濃度は臍帯血水銀濃度と高い相関を示し、また出産時の頭皮から 0-1 cm、1-2 cm、2-3 cm の毛髪水銀濃度と同様に高い相関を示した。以上より、出産時の手足爪は母親および胎児の妊娠後期のメチル水銀負荷量を知る上で有用であると結論した。特に、海外で臍帯血や母親の毛髪が得られない場合でも比較的容易に入手できる爪でメチル水銀の曝露評価を行うことができることを指す。

1950 年代にメチル水銀による大規模食品中毒 (水俣病) が水俣で発生した。この疾患の診断基準は当時より論争の余地もありかつ難しかったが、熊本大学研究班は 1972 年から 1973 年にかけてその臨床的特徴を精査するために大規模研究を行った。その時の結果を基に作られた 1977 年版診断基準を吟味するために、二塚はこの研究結果を再評価することを試みた<sup>53)</sup>。曝露地区の大多数の住民は神経学的徴候、とりわけ手袋・足袋型知覚障害を示し、水俣市に住む男性住民の陽性反応的中率は 0.73、陰性反応的中率は 0.23 であった。知覚障害のみの相対危険度は、対照とした有明地区の有病率を 1 (基準) とすると、水俣地区で 2.6 (95%信頼区間は 2.0~3.3) であり、御所浦地区は 1.2 (0.9~1.5) であった。その診断基準は、少なくとも 1977 年まで必ずしも十分とは言えなかったが、妥当なものであった。そうではあるが、水俣病登録患者の追跡調査には効率の良い新たな診断基準の開発が必要であろうと述べた。

なおヒトデータではないが、Matsuyama *et al* は水俣湾の海底堆積物中の水銀濃度の詳細調査を 2012 年 5 月に行い、湾の 107 採取点から総計 691 の堆積物を集めた<sup>54)</sup>。加重平均総水銀濃度および海底堆積物中の水銀総量は各々乾燥重量当たり 2.3 mg/kg と 3.4 トンと推定された。堆積物表層の総水銀平均濃度は乾燥重量当たり 3.0 mg/kg であり、表層の総水銀の分布パターンは 25 年前に報告された結果と比べ殆ど変わっていなかった。さらに、2010 年から 2012 年にかけての水俣湾の海水モニター結果によると、堆積物から動員され海水中に溶出する推定総水銀量およびメチル水銀量は各々 0.7 および 0.1 kg/年であった。

#### 4) メチル水銀とセレンの関係

"methylmercury"と"selenium"および"selenium compounds"をキーワードに、2015 年 1 月以降の報告で新たに検索されたものは、オンライン掲載分を含め 24 文献であった。大別すると、疫学研究、摂取セレンの評価、水生生態系での生物濃縮、環境モニタリング・含有量分析、セレンと水銀の加給態率、水銀曝露実験などに関する研究があった。

##### ■ 疫学的研究

2015 年に報告された疫学論文 4 編のうち 3 編は、妊娠女性の血液や臍帯血中の水銀・セレン濃度を分析したもので、その他の 1 編は地域住民の毛髪中レベルを分析したものであった。

米国では、胎児の神経発達上の水銀影響を考慮して、妊娠女性の魚介類の摂取量を週に 340 g 以下にすることを推奨している。しかし、魚介類には水銀毒性拮抗作用を有するセレンも豊富であるため、水銀とセレンの両方を考慮してリスク評価を行うことが望ましい。Gilman *et al* は、先に食事摂取調査を行ったハワイ在住コホートで妊娠・出産した女性を対象として、胎盤と臍帯血を分析し、水銀、セレン、セレノプロテイン mRNA、蛋白質および酵素活性について調べた<sup>55)</sup>。その結果、魚介類の摂取量によって、胎盤と臍帯血中水銀濃度に差異がみられ、魚を食べない群が最も平均水銀濃度が低かった。しかし、魚を食べないにも拘わらず高い水銀値を示す、あるいは

は魚を多く食べていても低い水銀値を示した人も少なからずおり、魚の摂取量と血中水銀の間に有意な相関関係は見られなかった。胎盤中のセレンプロテイン mRNA や蛋白質、酵素活性値は、食事摂取パターンで分類したどの群間にも差異は認められなかった。全く魚を摂取しない群を除外すると、魚介類の摂取量と水銀値、セレンタンパク質やセレンエンザイム活性などとの間に明らかな相関関係は見られなかった。

Wells *et al* は、メチル水銀曝露が胎児成長に影響を及ぼす際の交絡因子や交互作用について着目し、横断研究を行った<sup>56)</sup>。メリーランド州 Baltimore 市で 2004~2005 年に生まれた単胎 271 児を対象として、臍帯血中の各種水銀と血清中 *n*-3 多価不飽和脂肪酸 (PUFA、3 つまたはそれ以上の二重結合を有する不飽和脂肪酸) およびセレン濃度を測定した。重回帰分析における調整変数は、在胎週数、出生時体重、母の年齢、出産数、妊娠前 BMI、喫煙歴、高血圧、糖尿病、血中セレン、PUFA および無機水銀とした。分析の結果、臍帯血中メチル水銀の幾何平均値は 0.94 µg/L (95%信頼区間 0.84~1.07) であり、体格指数 (ポンドラル指数、体重 [kg] の立方根を 100 倍して身長 [cm] で割った値) に対する調整モデルでは、 $\beta \ln(\text{MeHg}) = -0.045 \text{ (g/cm}^3\text{)} \times 100$  (95%信頼区間 -0.084~ -0.005) という予測式が導かれた。体格指数におけるメチル水銀と性別の交互作用は見られなかったが、出生時身長に対してはメチル水銀と PUFA の間に交互作用が認められた (PUFA 低値群で、 $\beta \ln(\text{MeHg}) = 0.40 \text{ cm}$ 、95%信頼区間 -0.02~0.81; PUFA 高値群で、 $\beta \ln(\text{MeHg}) = 0.15$ 、95%信頼区間 -0.54~0.25; 交互作用項  $P = 0.048$ )。メチル水銀と出生体重および体格指数との関連は *n*-3 PUFA とセレンおよび無機水銀濃度に修飾されることがわかった。結論として、メチル水銀濃度が高い新生児では体格指数が低下し、メチル水銀と PUFA 間には交互作用があり、メチル水銀と PUFA が高値の新生児では出生時身長と頭囲長が短くなる可能性があるとして述べた。

Lei *et al* は 310 人の不妊症女性と 57 人の妊娠中女性について食物摂取頻度調査と血中メチル水銀濃度の分析を行い、不妊症女性ではさらに FSH および LH ホルモンとセレン、亜鉛濃度もあわせて測定した<sup>57)</sup>。その結果、不妊症女性では、刺身の摂取量が多く、中国の漢方薬とアルコールの摂取頻度が高く、運動量が少なく、また、血中メチル水銀濃度は妊娠女性に比べて有意に高かった。血中メチル水銀の基準値 (5.8 µg/L) で不妊症女性を 2 群に分けたところ、FSH と LH ホルモン値に有意差はなく、どちらもほぼ正常範囲内であった。不妊女性の主なメチル水銀摂取源は魚食と刺身であり、魚介類の摂取頻度が高いと、血中メチル水銀濃度も上昇することが観察された。メチル水銀濃度が 5.8 µg/L 以上の群では、5.8 µg/L 未満の群に比べ、週 1、2 回魚を食べている人が 3.35 倍、また週 3 回以上魚を食べている人は 4.42 倍多かった。妊娠可能年齢層の女性に対する魚の推奨摂取量を考慮する際に、役立つ一報告となるであろう。

Faial *et al* はブラジル Para 州の Tapajós 川沿い Barreiras 地区住民 141 人の毛髪中水銀、メチル水銀濃度を分析した<sup>58)</sup>。この地区では金採掘が違法に行われており、住民が川で捕獲して食べる 9 種の魚の水銀やセレン濃度の分析の他、川の水質検査も行われた。その結果、毛髪総水銀濃度は全サンプルの 84% が許容基準値の 6.0 µg/g を超えており、男性では 2.07~24.93 µg/g、女性では 4.84~27.02 µg/g の濃度範囲に分布していた。毛髪中メチル水銀濃度は男性で平均 11.68 (範囲 1.49~19.57) µg/g、女性で平均 10.38 (3.73~22.35) µg/g であった。肉食系魚類では平均水銀濃度が 0.66 (0.30~0.98) µg/g であり、現行の規制値を超えているものが多かったが、非肉食系魚類では平均 0.09 (0.02~0.44) µg/g と規制値以下のレベルであった。セレン濃度は肉食系魚類で平均 0.34 (0.18

～0.54)  $\mu\text{g/g}$ 、非肉食系魚で 0.32 (0.16～0.56)  $\mu\text{g/g}$  であった。川の水質検査では規制値を超えるものはなかった。毛髪水銀濃度と川魚の摂取頻度に関連が見られなかったことについては、魚体内のセレン/水銀比が関わるためと著者らは考察した。

エステル分解酵素のパラオキシナーゼ (PON1) は高比重リポ蛋白 (HDL) の主成分でもあり、人の動脈硬化進展を抑制する。PON1 活性の違いは基本的に PON1 遺伝形質に依存するが、環境由来化学物質もその活性を修飾するという証拠が蓄積しつつある。Laird *et al* の横断研究は、水銀、カドミウム、鉛、セレンに日常的に曝露するイヌイトにおいて、環境中の様々な金属への曝露と PON1 活性との関連を確認することを目的とした<sup>59)</sup>。2,172 人の健康な対象者から採取した血液中の PON1 活性と金属濃度を測定した。社会人口学、人体測定学、生活習慣に関わる変数も測定した。PON1 活性、血中金属濃度、HDL、*n*-3 脂肪酸濃度、年齢、性別、BMI、生活習慣 (喫煙、飲酒量) の関連を重回帰分析で検討した。PON1 活性は血中セレン濃度と正の関連があった ( $\beta = 0.056$ ,  $P = 0.001$ ) が血中カドミウム濃度と負の関連を示した ( $\beta = -0.025$ ,  $P < 0.001$ )。PON1 活性と血中水銀や鉛濃度との関連は認められなかった。この結果、PON1 活性は金属曝露に修飾され、イヌイトの伝統食はセレン摂取量が多いことで PON1 活性を高め、健康に寄与する可能性が示唆された。この所見は、カナダ極地地方に住むイヌイトの現在の環境中金属曝露が中毒学的に重要性の高い生化学指標のパラオキシナーゼ活性と関連することを支持する。

#### ■ 摂取セレンの評価

魚に含有される水銀が問題視されているが、魚の栄養成分であるセレンや不飽和脂肪酸の水銀毒性に対する保護作用が見出されて以来、魚類や食事の水銀・セレン比の評価に関する報告が毎年少なからず出されている。

Ralston *et al* は、近年更新された水銀のリスク評価に関する論文を概観し、今後セレン健康便益値を活用することを推奨している<sup>60)</sup>。すなわち、必須元素のセレンは、脳組織の酸化損傷の防御など重要な生体機能に関わっているが、妊娠中の女性が高濃度のメチル水銀に曝露されると、セレンの胎盤輸送が著しく阻害され、胎児脳のセレン含有酵素合成が妨げられる。母親のセレン摂取量は胎児脳のセレン酵素活性へ反映されるため、魚や海産物中の水銀とセレン含有比はリスク評価の際に重要な情報となる。メチル水銀濃度が低い場合は、指数関数的にセレン水銀比が高値となり、ゼロ除算エラーの誤謬に陥りやすいので、調整セレン健康便益値 ( $\text{HBV}_{\text{Se}}$ ) を使うことが勧められている。妊娠中や授乳中女性への FDA/EPA の勧告に沿って、セレンの濃度範囲が様々である海産物について摂取を避けるか奨めるべきかを、 $\text{HBV}_{\text{Se}}$  を目安に判定できる可能性があるとして述べている。

魚の摂取に関して、セレン健康便益値  $\text{HBV}_{\text{Se}}$  を提示した報告が Reash *et al* により出されている<sup>61)</sup>。米国の石炭を燃料とする多くの火力発電所では、大気環境管理に必要な脱硫排気装置が取り付けられており、水銀やセレンその他の化学物質を受水河川に排出している。食物連鎖で生物濃縮される微量元素の潜在的な危険性について関心が高まっているため、著者らは石炭火力発電所近くのオハイオ川に生息する魚を採取し、ヒ素、総水銀、メチル水銀、セレン濃度を分析した。6 種の魚の切身総計 50 サンプルについて調べたところ、3 サンプル (6%) でのみ、メチル水銀濃度が米国 EPA の健康影響の管理基準値 (0.3 mg/kg 湿重量) を超えており、いずれもニベ科の成魚であった。EPA が公表した生殖影響に対するセレンの許容基準値を超えたサンプルはなかった。ヒ

素濃度が 1.0 mg/kg 湿重量を超えたものは 8 サンプルのみであった。全魚種でのセレン健康便益値  $HBV_{Se}$  の平均は 4 以上あり、オハイオ川の魚を食べても、十分量のセレンで潜在的な水銀健康影響リスクが相殺される可能性がある。生物濃縮の程度は、石炭火力発電所からの距離によって差異はなかったが、工場廃水が交じり合う河川流域では生物濃縮が増強されるケースが見られた。水圧等の物理的要因で、オハイオ河川中水銀のメチル化は低く抑えられていることが観察された。

イヌイット文化圏の国産食糧には、セレンと  $n-3$  多価不飽和脂肪酸 ( $n-3$  PUFA) が多く含まれるが、一方、同地域で獲れる海産物ではメチル水銀の生物濃縮が問題となると報告されている。北ケベック地方の Nunavik では、セレンと  $n-3$  PUFA の健康有益性に関する調査がなされているが、近年の研究で、胎児期のメチル水銀曝露が、幼児期に視覚・認知・行動障害をもたらすことが示された。Lemire *et al* の研究では、Nunavik での現代の食糧におけるメチル水銀、魚食のセレンおよび  $n-3$  PUFA 源を、地域差を考慮した上で出産可能年齢層の女性が消費するものを中心に調査した<sup>62)</sup>。すなわち、2004 年の Nunavik 健康調査 (男性 315 名、女性 387 名) での食事調査記録と血中マーカー、および Nunavik 野生生物種のメチル水銀、セレン、PUFA レベルの分析値を用いて、食事からの寄与 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日) を推計した。ベルーガ (チョウザメ) を最も捕獲・食する地域では、出産可能年齢の女性のうち 78.4% が  $8 \mu\text{g}/\text{L}$  以上の水銀を摂取している危険性があった。その他ほとんどの国産食糧のメチル水銀含有量は低く、イヌイット人はあまり食べないベルーガ肉で水銀の寄与が最も高かった。アザラシの肝臓とベルーガの脂肪付き皮の寄与はそれほど高くなく (メチル水銀摂取のうち 0.06~0.15)、ベルーガ脂肪皮にはセレンも比較的高濃度で含まれていた (セレン摂取の 0.30)。PUFA の主な摂取源は、北極イワナとベルーガ脂肪皮、アザラシの脂肪であった。妊娠可能年齢女性ではベルーガ肉からのメチル水銀摂取を最小限にすべきであるが、国産食糧の有益性を示すために、地域エコシステムや食生活習慣の関わりについても考慮する必要があると述べている。

#### ■ 水生生態系での生物濃縮

無酸素状態で水中のバクテリアにより無機水銀がメチル化されると、水銀毒性は増強される。遠洋の食物連鎖でメチル水銀がどのように生物濃縮されるか調べるため、Ruus *et al* は Kongsfjorden (ノルウェー Svalbard 諸島のフィヨルド) に生息する動物プランクトン、魚、海鳥の組織中メチル水銀濃度を測定した<sup>63)</sup>。生態系の栄養段階が上がるにつれ、メチル水銀は生物濃縮され、低緯度地帯では過去の報告よりも顕著な濃縮状態が観察された。総水銀とメチル水銀濃度間には強い相関がみられ、ミツユビカモメのメチル水銀濃度は季節変動 (5 月から 9 月にかけて低くなる) も認められた。海鳥のセレンと総水銀濃度に有意な正の相関がみられたが、動物プランクトンではそのような相関関係は見られなかった。水銀濃度の高い生物では、水銀の毒性軽減にセレンが重要な役割を果たしていると考えられている。

Ouédraogo *et al* は、西アフリカ・ブルキナファソでの亜熱帯淡水生態系の食物網について、水銀、セレン濃度の生物濃縮の実態を調べた<sup>64)</sup>。2010 年の雨季に、3 箇所の貯水池から水、沈殿物、魚、動物プランクトン、軟体動物を採集し、総水銀、メチル水銀、総セレン濃度を分析した。炭素・窒素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) を解析し、食物網の構造と魚類への蓄積・伝達パターンについて検討した。食物連鎖長 (FCLs) について、消費下位層に位置する主な生物分類群を部位特異的に収集し、平均の全窒素同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) を求めることにより算出した。殆どの魚類で総水銀とセ

レンは低濃度であり、遠洋と沿岸の両方の生物を食餌源とする魚類では、食物連鎖長は 3.3~3.7 と短かった (魚の食物網における生物濃縮因子は、総水銀では 2.9~6.5、メチル水銀では 2.9~6.6 の範囲内にあった)。一方、セレンでは、食物網での生物濃縮は認められなかった。調整済み  $\delta^{15}N$  とログ変換したセレン/水銀比の間には逆相関が見られ、上位捕食者ではセレンの毒性防御効果が減衰することが示唆された。魚の水銀濃度を説明する因子は、栄養段階、炭素源、魚長 (大きさ) であった。他のアフリカ湖産物の既存報告データを含めて解析すると、総水銀の生物濃縮率と食物連鎖長との間に正の相関が見られた。西アフリカ亜熱帯地方の貯水池で、水銀の生物濃縮度が比較的低かったのは、食物連鎖長が短いことによると思われた。

食物連鎖の上位に位置する歯クジラは、小魚を多量に食べるため、高濃度の水銀を蓄積することで知られている。Sakamoto *et al* は、歯クジラ類 4 種の背部筋肉組織中の総水銀、メチル水銀、無機水銀およびセレン濃度と、水銀の化学形態について分析した<sup>65)</sup>。分析種の内訳はバンドウイルカ 31 匹、ハナゴンドウ 30 匹、スジイルカ 29 匹、コビレゴンドウ 30 匹であり、いずれの種でもメチル水銀濃度は総水銀濃度とともに上昇するが、高濃度では頭打ち状態が見られた。分析種ごとの総水銀に占めるメチル水銀の割合は、総水銀濃度が低い時は 90~100% で、総水銀濃度が高くなると 20~40% に低下していた。総水銀とセレン濃度は強い正の相関関係にあり、セレン/無機水銀モル比は、無機水銀レベルが上がるにつれ低下し、最終的にはどの種でもほぼ 1 になった。筋組織中メチル水銀の脱メチル化により、セレン化水銀 (HgSe) が合成されると考えられた。すなわち、総水銀濃度が高くなると、メチル水銀が一定濃度 (種類に応じて 3~8 ppm) を超えたものは無機化が進み、無毒化されたセレン化水銀 (無機水銀とセレンが 1:1 で結合したもの) となることが示唆された。X 線吸収微細構造分析 (XAFS) により、最も高い水銀濃度を示したバンドウイルカ筋肉中の水銀化学形態を調べたところ、主要化合物はセレン化水銀と推定された。また電子プローブ・マイクロアナライザー (EPMA) により、セレン化水銀は主に細胞の筋肉膜近くに局在し、顆粒状に蓄積していることが観察された。バンドウイルカの筋組織内に蓄積された高濃度の水銀は 3~8 ppm 程度のメチル水銀と、残りは脱メチル化により最終的に不活性化・無毒化されたセレン化水銀であることが明らかとなった。

#### ■ 環境モニタリング・含有量分析

Scheuhammer *et al* は、カナダの北極諸島に生息する野生動物や魚の水銀曝露状況に関する総説を出した<sup>66)</sup>。カナダ北部の Northwest Territories やイヌイット人が治める Nunavut の湖に生息する魚介類では、水銀濃度は総じて基準値 0.5-1.0  $\mu\text{g/g}$  体重を超えていた。淡水魚より低濃度のはずの海産ニシオンデンザメ (Greenland shark) の水銀濃度は特に高く、毒性影響をおこしうるレベルにあった。北極諸島の海鳥ゾウゲカモの卵やベルーガ・イルカおよび北極グマでは、次世代影響や神経毒性を及ぼすほどの高濃度水銀は認められなかった。そのほか西 Hudson 港のアザラシの肝臓や筋肉の水銀濃度は高く、潜在的な健康影響が危惧される。セレンによる水銀毒性の緩和作用が考えられるため、動物体内の水銀毒性防御効果についてさらに検討する必要があると述べられている。

地中海ではマッコウクジラの集団座礁は稀にしか見られないが、2014 年 9 月にイタリア南方のアドリア海沿岸に 7 匹の鯨が打ちあげられた。この海域で集団座礁は、1555 年以来 7 度目の出来事であり、これら鯨のうち雌 3 匹の脳、筋肉、肝臓、腎臓濃度の総水銀、メチル水銀、セレン濃

度を Squadrone *et al* が分析した<sup>67)</sup>。肝臓と脳の総水銀濃度は、それぞれ最大 200 mg/kg および 21 mg/kg と、腎臓や筋組織に比べて著しく高く、個体年齢による変動がみられた。肝臓と脳ではセレン濃度も高く、セレン/水銀モル比はどの臓器でも 1 以上であったことより、セレンによる水銀毒性軽減作用が働いているものと思われる。

Kehrig *et al* は、ブラジル南方の海岸に打ち上げられた幼若マゼランペンギンの羽、肝臓、腎臓中のセレン、総水銀、メチル水銀、無機水銀、鉛、カドミウム、メタロチオネイン濃度を分析した<sup>68)</sup>。メチル水銀とセレン、鉛、カドミウム濃度は内臓組織で高濃度であり、羽のセレンとカドミウム濃度は極低濃度であった。肝臓のセレン・メタロチオネイン濃度は、カドミウム、鉛、無機水銀濃度との間に相関がみられ、これら元素の無毒化に関与していることが示唆されたが、メチル水銀と相関がみられたのは肝臓セレン濃度のみであった。

Kenow *et al* の報告によると、米国 Wisconsin 州湖産のハシグロアビ (水に潜って魚を食べる鳥類) の卵の総水銀濃度は、0.17 ~ 1.23 µg/g 湿重量であり、孵化したひな鳥の血中水銀濃度は 0.84 ~ 3.86 µg/g 湿重量であった<sup>69)</sup>。水質の pH が低い酸性の湖に生息するオスのアビは、中性の湖に生息するものより体長が小さかったが、卵のセレンやカルシウム濃度に差異はなかった。オスの成鳥の体長が小さいのは、生息地別の遺伝的特性によるものとも考えられ、酸性湖に生息するアビの卵の水銀濃度が高いことが雛鳥にどう影響するのか、明らかとされていない。

水生生物種の分析以外には、主食の米の含有量を測定した報告があった。マダガスカルは一人当たり世界一の米消費国であるが、マダガスカル産米を調べたデータは少ない。Rothenberg *et al* は、マダガスカル産 51 在来種の玄米中の総水銀、メチル水銀、ヒ素、カドミウムなどの毒性元素と亜鉛、セレン、その他の微量必須元素濃度を測定した<sup>70)</sup>。いずれの毒性・必須元素とも一様に低濃度であり、赤糠種 ( $n=20$ ) とこげ茶糠種 ( $n=31$ ) ではマンガンを除いて必須元素の濃度に差異は見られなかった。必須元素の中では稲中の師部輸送に関わるルビジウム濃度が、最もメチル水銀および総水銀濃度と高く相関しており ( $r=0.33, 0.44, P<0.05$ )、逆に木質部輸送に関わるストロンチウム濃度との相関が最も低かったことから、水銀は木質部より師部経路で可動性が高いことが示唆される。

## ■ セレンと水銀の可給態率

Matos *et al* は、ヨシキリザメを生および調理して食べる際のリスクと便益について、*in vitro* 消化法により水銀、セレン、メチル水銀の可給態率 (bioaccessibility, 含有量に対する消化液中への遊離量の割合) を調べて検討を行った<sup>71)</sup>。調理済みサメのセレン、水銀、メチル水銀濃度は生のものより高く、特に焼いた場合で高くなった。焼いて調理したサメのセレンの可給態率は 83% 以上であったのに対し、水銀とメチル水銀の可給態率は 50% 程度であった。セレン健康便益値の  $HBV_{Se}$  は負の値となり、メチル水銀/セレンのモル比は 1 より高かった。サメの年間許容摂取量をリスク便益の観点から評価できるかもしれないが、多様な魚介類を摂るバランスのとれた食事を推奨することがより重要である。

Afonso *et al* は、淡水食用魚オオニベの総脂質、EPA、DHA、セレン、水銀、メチル水銀濃度を生食用と調理したもの各々について、可給態率評価手法で分析した<sup>72)</sup>。*in vitro* 消化管モデルでの総脂質の可給態率は、焼魚を除き、生・調理後ともに概ね高く、一方 EPA や DHA の可給態率は生・煮魚・焼き魚ともに低く、50% を上回ることはなかった。セレン可給態率は焼き魚で 82% か

それ以上であり、同様に水銀・メチル水銀とも可給態率が高かった (例外は焼き魚で、水銀 54%、メチル水銀 64%)。推奨されるオオニベの摂取頻度は、煮魚では最大で週 2 回、焼魚で週 3 回程度という結果が、リスク便益の可能性評価により導かれた。

同研究グループでは、マグロのセレン、水銀、メチル水銀の可給態率を評価するため、生と調理したもの (煮る・焼く) およびツナ缶の各々について分析した<sup>73)</sup>。セレンの可給態率は高かったが、缶詰のものは生のものよりは低かった。メチル水銀の可給態率は、生・調理済みともに高く、一方、総水銀可給態率は調理済みで 39~48%、缶詰では 20%未満と低いことがわかった。*in vitro* 消化管モデルの可給態分画で、セレンとメチル水銀の総モル比は 1 以上 (10~74) であった。リスク便益の可能性を評価したところ、ツナ缶を毎週摂取してもリスクは低い、マグロの生・煮魚・焼魚では、少なくとも妊婦や授乳中の女性で月 1 回以上を摂取しないことが望ましいと述べた。

### ■ 水銀曝露実験

水生生態系における食物連鎖での毒性物質としてメチル水銀が注目され続けており、魚の食餌への添加実験によって生体内濃度や分布が精査されている。

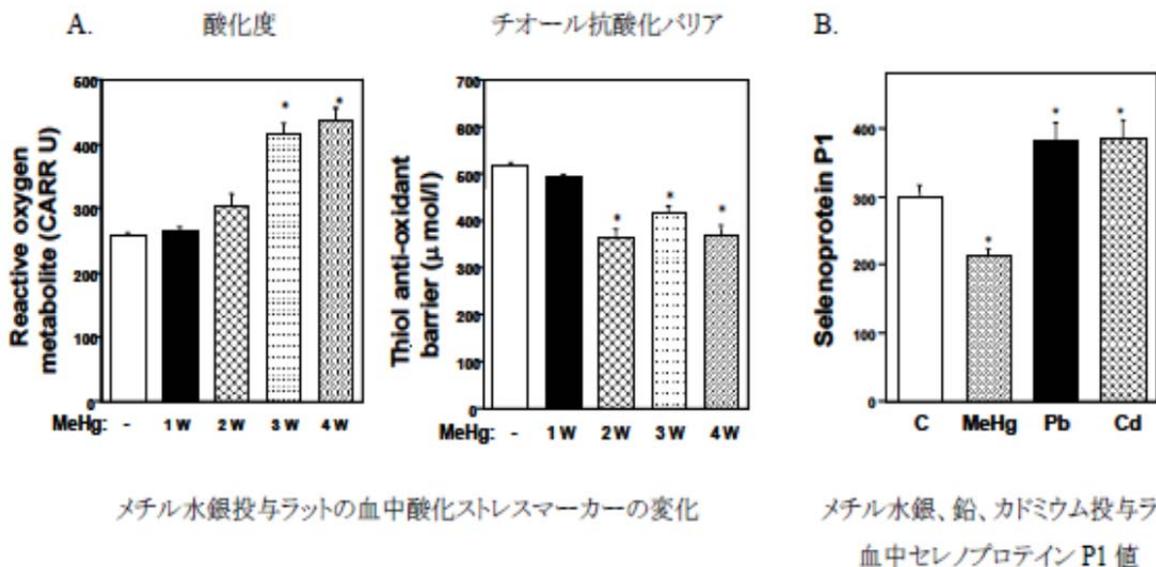
Amlund *et al* は、経口摂取由来のメチル水銀の同化と浄化作用および添加セレンのメチル水銀毒性へ修飾影響について、ゼブラフィッシュを用いて検討した<sup>74)</sup>。成魚のゼブラフィッシュの食餌に 5 または 10  $\mu\text{g/g}$  のシステイン化合物のメチル水銀を与えた群と、さらにセレン (セレノメチオニン) 5  $\mu\text{g/g}$  を添加する群と添加しない群に分け、8 週間飼育し、4 週間の浄化期間を設けた。その結果、メチル水銀は筋肉、肝臓、脳に蓄積し、特に肝臓と脳の濃度が高くなった。8 週間の実験後の筋肉中メチル水銀濃度は 5  $\mu\text{g/g}$  添加群で  $3.4 \pm 0.2$ 、10  $\mu\text{g/g}$  添加群では  $6.4 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  湿重量であった。浄化期間後に筋肉中メチル水銀濃度は有意に低下し、5 および 10  $\mu\text{g/g}$  添加群で各々、 $2.4 \pm 0.1$  と  $4.0 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  湿重量となった。セレン添加群ではメチル水銀の蓄積が低減し、筋肉中メチル水銀濃度は、単独投与群に比べ水銀・セレン同時投与群で明らかに低くなった (10  $\mu\text{g Hg} + 5 \mu\text{g Se/g diet}$  群では  $5.8 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$  湿重量、10  $\mu\text{g Hg/g diet}$  群では  $6.4 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$  湿重量)。4 週間の浄化期間の後では、セレン同時投与群の方が、筋肉中メチル水銀濃度がコントロール群よりも低かった (各々  $3.3 \pm 0.1$ 、 $4.0 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$  湿重量)。セレノメチオニンの食餌添加はメチル水銀蓄積量を減じるとともに、筋肉中メチル水銀の排泄を促進することが確かめられた。

MacDonald *et al* は、脊椎動物のモデル生物実験系として幼生期ゼブラフィッシュを用い、蛍光 X 線イメージング法を用いて水銀・セレンの交互作用構造について調べた<sup>75)</sup>。ゼブラフィッシュに無機水銀を曝露した場合、ナノスケール構造でセレンと水銀の共局在化が認められたが、メチル水銀の曝露では、そのような共存構造は見られなかった。マイクロ X 線吸収分光法により解析したところ、共局在化した結晶構造のほとんどが、不溶性の水銀・セレンカルコゲン化合物が混合する立方閃亜鉛鉱型であると推測された。

Olsvik *et al* は、大西洋タラの幼魚に、対照群には通常の餌、スパイク実験群としてセレン添加餌 (3 mg Se/kg)、メチル水銀添加餌 (10 mg Hg/kg)、セレン・メチル水銀混合添加餌をそれぞれ 10 週間投与する実験を行った<sup>76)</sup>。メチル水銀を投与された 2 つの群では水銀が対照群の 44 倍高い値 (1.5 mg/湿組織重量) となったが、セレン濃度の対照群との差異は 2 倍以内におさまった。セレン同時投与により肝臓組織中の水銀レベルへ影響は見られなかったが、セレン濃度はメチル水銀の

同時投与で低減されることが観察された。メチル水銀による魚の成長 (魚長) への影響は認められなかった。魚の体重が  $11.4 \pm 3.2$  g になった時点で肝臓組織の転写解析を行ったところ、セレン・メチル水銀同時投与による発現転写レベルへの相互作用は、CAT (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)、GPX1, GPX3 (グルタチオンペルオキシダーゼ 1 および 3)、FE2L2 (ストレスによって誘導される転写因子 Nrf2)、UBA52 (ユビキチン A-52 残基)、SEPP1 (セレノプロテイン P)、DNMT1 (DNA メチル化酵素) に認められた。メチル水銀投与による有意な影響は DNMT1 と PPARG (ペルオキシソーム増殖剤活性化レセプター) に、また、セレン投与による有意な影響は DNA メチル基転移酵素活性の他 GPX4B と SEPP1A に認められた。メチル水銀による細胞内セレンの相対的な低下が、セレン含有の抗酸化酵素の転写後変化を起こし、この投与レベルでは抗酸化作用よりもむしろ酸化促進作用を及ぼすことが分子生物学的に示唆された。

メチル水銀は、アミノ酸やタンパク質のチオール基 (-SH) やセレノ基 (-Se) と高い親和性があり、メチル水銀に誘導される酸化ストレスを緩和する際にセレン酵素や蛋白質が重要な役割を果たすと考えられる。メチル水銀毒性に対する防御能を反映する適切なバイオマーカーがあれば、毒性発現に対する感受性の高い個体群を知ることができる。Usuki *et al* は、小脳病変が 4 週目で明



らかなるメチル水銀投与モデルラットを用いて実験を行い、血漿の酸化ストレスマーカーであるチオール抗酸化バリアがメチル水銀曝露後 2 週目という早い時期に低下することを明らかにした (図 A)<sup>77)</sup>。全身性酸化ストレス度の指標となる d-ROMs (Diacron-reactive oxygen metabolites) は、メチル水銀投与後 3 週目で有意な上昇がみられたが、チオール抗酸化バリアはそれよりも早い時期で低下した。血中セレノプロテイン P やセレン依存酵素のグルタチオンペルオキシダーゼも 3 ~4 週目には低下したが、非セレン依存酵素のグルタチオンレダクターゼは増加した。メチル水銀でみられたチオール抗酸化バリアの低下は、酢酸鉛や塩化カドミウムの投与では認められず、セレノプロテイン P レベルは逆に、鉛やカドミウムの投与で増加した (図 B)。メチル水銀曝露下で細胞毒性が進行する際に、個々人の防御能力を比較・検討するバイオマーカーとして、チオール抗酸化バリアやセレン蛋白質の低下を調べるのが有用となりうる。

水銀とセレンをキーワードとして含む *in vitro* 系の実験は、一報告のみであった。

メチル水銀などの水銀化合物は、環境中や食品中の有害物質として厳しく監視されているのに対し、チメロサル (エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム, TM) はいまだ複数回接種用ワクチンの保存料や防腐剤として使われ、発展途上国の子どもへ日常的に接種されている。Rodrigues *et al* は、*in vitro* 実験系で、TM とその分解物質であるエチル水銀が、ペントースリン酸経路のチオレドキシニン系と NADP 依存性デヒドロゲナーゼに影響を及ぼすか検討を行った<sup>78)</sup>。その結果、TM とエチル水銀は精製懸濁液中でチオレドキシニン系酵素を阻害し、エチル水銀の毒性影響はメチル水銀毒性に匹敵した。TM またはエチル水銀を神経芽細胞腫と肝細胞に処置すると、細胞生存能力が減衰し、チオレドキシニン (Trx) とチオレドキシニン・リダクターゼ (TrxR) 活性が時間および用量依存的に低下した (神経芽細胞腫細胞へのエチル水銀処置で活性が Trx 60%、TrxR 80% 低下、肝癌細胞ではほぼ 100% 阻害)。亜セレン酸ナトリウムを添加して細胞培養した場合は、TrxR 阻害影響が軽減された。TM と特にその代謝産物であるエチル水銀は、チオレドキシニン系での NADPH の電子放出を妨害することで毒性を発揮すると予想される。

## 5) 発展途上国における水銀／メチル水銀の健康問題

小規模金鉱山における手掘りによる金の採掘量は年間 500～800 トン生産される。この量は世界の金総生産量の約 30% 相当する。今や小規模金鉱山における金採掘は中南米、東南アジア、アフリカなどの 70 カ国以上の発展途上国で行われている。採掘後の金抽出には水銀アマルガム法やシアン化法が用いられており、その結果、金鉱山周辺地域では水銀やシアンによる環境汚染や住民に対する健康影響を引き起こしていることが多くの研究者によって報告された。さらに金鉱山周辺の土壌や河川の堆積物の水銀汚染が深刻な事態にあり、河川で捕食される魚介類の水銀汚染による健康影響も危惧されている。一方、中国の水銀鉱山周辺では鉱石採掘に伴う水銀による環境汚染と住民への健康影響に加えて、土壌汚染によって生じた穀物へのメチル水銀蓄積が新たな問題になっている。

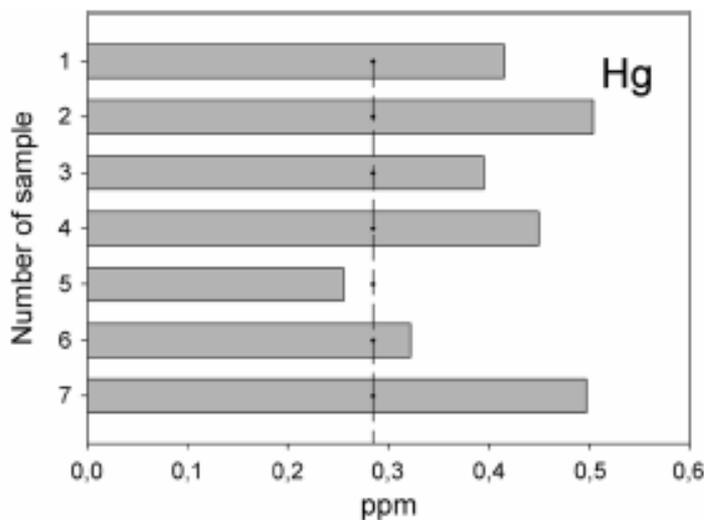
PubMed で "mercury gold mining", "mercury mining" および "mercury cyanide" のキーワードを入力し、2015 年に発表された論文を検索した。これらの中から小規模金鉱山や水銀鉱山における採掘に伴う水銀、シアンによる環境汚染および健康影響に関する論文を紹介する。

### ■ 小規模金鉱山周辺の水銀／メチル水銀による環境汚染と健康影響

小規模金鉱山では金を抽出する際に使用する水銀に起因する周辺の住民の水銀蒸気曝露による健康影響が危惧されている。Nakazawa *et al* はインドネシアの中部 Sulawesi 州の Palu 市住民の大気中水銀による健康リスクについて水銀濃度を測定した<sup>79)</sup>。Palu 市近郊に位置する Poboya 地域の水銀鉱山はインドネシアでも最も採掘が活発であり、海風や山風の向きにより住民の水銀蒸気曝露は左右される。携帯型水銀連続測定装置 (EMP-2) および水銀分析計 (UT-3000) で大気中水銀濃度測定を Poboya 地域と Palu 市の 4 か所で 3 年間行った。24 時間の平均水銀蒸気濃度は金処理地域で高く (9,172 ng/m<sup>3</sup>)、都市では北部地区 (524 ng/m<sup>3</sup>)、中央地区 (141 ng/m<sup>3</sup>)、南部地区 (116 ng/m<sup>3</sup>)、西部地区の順に高値を示した。都市の大気中水銀濃度は陸風の影響により、日中より夜間に高値を示した。2011 年 7 月の 3 日間にわたる市内 4 か所での日中の大気中水銀濃度測定では水銀濃度は 2,096～3,299 ng/m<sup>3</sup> であり、都市住民は常に高濃度の水銀蒸気に曝露されていた。一方、Poboya の金処理地域では 12,782 ng/m<sup>3</sup> であり、Poboya 地域、Palu 市の大気中水銀濃度は WHO の空気質

ガイドライン値  $1,000 \text{ ng/m}^3$  より高値を示した。確率的リスク評価法で水銀曝露のハザード指数 (HQ) を計算すると、試料全体の 93% が  $\text{HQ} \geq 1$  の水銀毒性の危険があり、慢性水銀蒸気曝露による中枢神経系影響の危険性を示した。Palu 市では北部地区の 83%、中央地区の 84%、南部地区の 95% そして西部地区の 95% が  $\text{HQ} \geq 1$  であり、住民は一般大気から高濃度の水銀蒸気曝露の危険性が存在することを示唆した。

小規模金鉱山周辺では深刻な環境汚染/影響を未だもたらしている。López-Blanco *et al* はエクアドルのアマゾン地域 Yacuambi 川の土壌中の水銀濃度を測定し、この地域の水銀採掘に起因する水銀アマルガム法に伴う汚染範囲を評価した<sup>80)</sup>。上流地域 (No.1) から下流地域 (No.7) の土壌中水銀濃度はバックグラウンド値よりいずれも高値であるが、カナダの環境保全のための土壌推奨値  $6.6 \text{ mg/kg}$  よりも低値であった。彼らは河川土への水銀蓄積は水生生物の潜在的な毒性源であり、将来のヒトの健康へのリスクであると述べた。



川から採取した土壌中の水銀濃度 (mg/kg). 帯グラフは Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health の限界値 (Canadian Council of Ministers of the Environment 2007), また破線はバックグラウンド値を示す (水銀のデータのみ抜粋).

コロンビアでも小規模金鉱山で採掘が活発であり、水銀汚染は廃鉱の堆積物、土壌および水路に至るまで及んでいる。Pinedo-Hernández *et al* はコロンビアの Mojana 地域の小規模金鉱山採掘に伴い影響を受けた堆積物の表面の水銀形態と生物学的利用能を調べた<sup>81)</sup>。鉱山地域から水銀を運んでくる水流の到達する観測点での総水銀濃度は僅かに高く、 $196.2 \sim 1187.6 \text{ ng/g}$  (平均  $524.2 \pm 256.8 \text{ ng/g}$  乾燥重量) であった。メチル水銀濃度は総水銀や有機物との間に相関が見られ、総水銀に対する割合は  $1.7 \sim 3.6\%$  (平均  $2.6\%$ ) であった。5段階連続抽出法で調べた堆積物中の総水銀は大部分が有機的に結合した水銀 (Hg-o) で  $48.4\%$ 、次に Fe/Mn 酸化物のような非晶質化合物と結合した金属水銀が  $26.5\%$ 、そして硫黄と結合した分画 (Hg-s) が  $18.7\%$  であった。また水溶性水銀や胃酸可溶性水銀などの交換性水銀は  $1.7 \sim 4.7\%$  であった。この分画の割合は低いけれども水中に入ったとき、健康に対する高いリスクを示すとともに、生物濃縮されることを報告している。そして有機物、総水銀とメチル水銀との間で見られた有意な相関は堆積物中の水銀の分布、移動性、生物学的利用能をコントロールすることが重要であることを示唆する。

Marrugo-Negrete *et al* は小規模金鉱山の影響を受ける2か所の熱帯沼地の沈殿物の水銀形態と生物学的利用能を調べた<sup>82)</sup>。Ayapel 沼地では沈殿物の総水銀濃度は  $145 \sim 313 \text{ ng/g}$  乾燥重量 (dw) (平均  $235 \pm 49 \text{ ng/g dw}$ ) であった。Grande Achi 沼地では Ayapel 沼地に比べ3倍高値 ( $543 \sim 1021 \text{ ng/g dw}$ ;

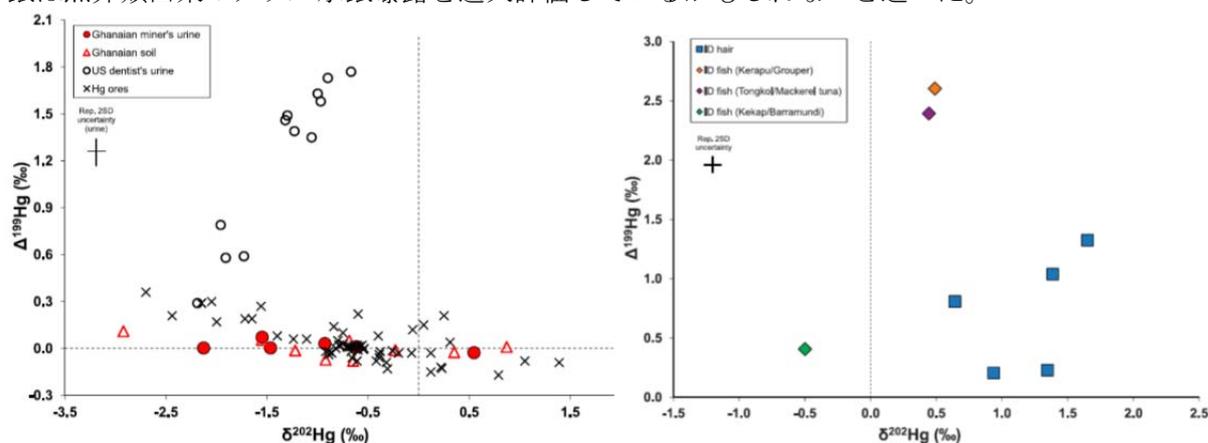
平均 $722 \pm 145$  ng/g dw) であった。Ayapel沼地の水銀レベルは低いが、メチル化はGrande Achi沼地より高く、しかも雨季より乾季に著しい。Ayapel沼地での高いメチル化は沼地の総水銀、メチル水銀と有機物質間の有意な相関に起因しており、メチル化の割合はGrande Achi沼地では $33 \pm 5\%$ 、Ayapel沼地は $43 \pm 5\%$ と両者の間に統計的に有意差が認められた。この差は有機画分と関係しており、有機画分はGrande Achi沼地に比べ、Ayapel沼地で高い。一方、上流の小規模金鉱山地区において金の回収工程で放出される水銀に関係した金属水銀画分の割合はGrande Achi沼地で高かった。生物学的利用能画分の割合の上昇は化学変化を起こし易い水銀が水中に入ることにより、生物相で濃縮され、その結果、水生の環境やヒトの健康に潜在的危険性が生じると述べている。

アマゾン川流域のマディラ川は金採掘活動、森林伐採、水力発電所ダムにより最も影響を受けている。Bastos *et al*はマディラ川の異なる栄養段階での84魚種から3,182検体の総水銀とメチル水銀濃度を測定し、魚食によるヒトへの健康影響に対する実態を明らかにした<sup>83)</sup>。第一栄養段階の魚種(魚食性魚、肉食性魚)は総水銀濃度平均 $51 \sim 1,242$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ と最も高く、プランクトン食性魚や雑食性魚の総水銀濃度は $26 \sim 494$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ と中間にあり、腐食性魚や草食性魚の総水銀濃度は平均 $9 \sim 275$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ と最も低かった。魚種の体長と総水銀濃度間の相関係数はプランクトン食性魚では $r = 0.474$  ( $P < 0.0001$ )、魚食性魚では $r = 0.459$  ( $P < 0.0001$ )、腐食性魚では $r = 0.227$  ( $P < 0.0001$ )、肉食性魚では $r = 0.212$  ( $P = 0.0001$ )、草食性魚では $r = 0.156$  ( $P = 0.01$ ) と有意であったが、雑食性魚では $r = 0.064$  ( $P = 0.0685$ ) と有意な相関は見られなかった。魚の食物連鎖はメチル水銀/総水銀比にも影響を与え、その割合は $70 \sim 92\%$ に達した。標準的な体長の範囲内の魚で比較すると、過去10年間で水銀濃度はある種の魚で顕著な増加しており、魚種特異性が見られた。生育環境による違いがある種の魚に見られたが、過去の砂金採掘活動による環境汚染に対し、時間的趨勢は認められなかった。魚への水銀の生物濃縮は種特異的であることから、魚介類から栄養を得る方法は水銀の生物濃縮パターンの顕著な影響を受けることになる。

小規模金鉱山での水銀アマルガム法による金回収は作業員や周辺住民への水銀曝露の他、水生環境でメチル水銀に汚染された魚介類の摂取による健康影響が問題となっている。Castilhos *et al*は鉱山従事者325名と非従事者321名を対象に水銀蒸気曝露とメチル水銀汚染魚摂取による健康リスク評価をブラジル・アマゾン川地域のPará州の2つの金鉱山地区(São ChicoとCrepORIZINHO)で行った<sup>84)</sup>。生物学的指標は尿、血液、毛髪中の水銀測定に加え、各々の地区で13淡水魚種の73検体と11種の161検体を採取し、総水銀測定を行い、そして水銀曝露のハザード指数(HQ)を算出した。魚介類の水銀濃度はSão Chico地区で $2.53 \pm 0.43$   $\mu\text{g}/\text{g}$  ( $n=73$ )、CrepORIZINHO地区で $0.36 \pm 0.33$   $\mu\text{g}/\text{g}$  ( $n=161$ )であり、両地区で捕獲した66検体の22%以上がWHO推奨のヒトにおける魚介類摂取の規制値 $0.5$   $\mu\text{g}/\text{g}$ を超えており、HQも $1.5 \sim 28.5$ であった。CrepORIZINHO地区では殆どの場所でHQは約2であった。一方、São Chico地区ではメチル水銀に汚染されたホットスポット(貯水池)の魚介類を摂取することにより、HQは最高レベルの28になった。鉱山従事者の生体試料中の平均水銀濃度はSão Chico地区では尿 $17.37$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、血液 $27.74$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、毛髪 $4.5$   $\mu\text{g}/\text{g}$ であり、CrepORIZINHO地区では尿 $13.75$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、血液 $25.23$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、毛髪 $4.58$   $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。一方、非従事者の平均水銀濃度はSão Chico地区では尿 $5.73$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、血液 $16.50$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、毛髪 $3.16$   $\mu\text{g}/\text{g}$ そしてCrepORIZINHO地区では尿 $3.91$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、血液 $21.04$   $\mu\text{g}/\text{L}$ 、毛髪 $1.88$   $\mu\text{g}/\text{g}$ であった。明らかに両地区の鉱山作業員の数値は高値であり、水銀曝露を受けていることが示唆された。これらの結果は鉱山作業員や鉱山周辺に住む従事者の高い水銀

レベルは水銀蒸気の吸入とメチル水銀汚染魚の摂取による両者の水銀曝露による潜在的な危険性を示唆するものである。

Sherman *et al*はガーナとインドネシアでも小規模金鉱山作業員を対象に水銀アマルガム法による水銀蒸気曝露と魚介類由来メチル水銀曝露の評価を毛髪と尿中の総水銀濃度を生物学的指標に用いた<sup>85)</sup>。評価には水銀安定同位元素を用いている。ガーナの鉱山作業員の尿中の水銀安定同位元素比は平均 $^{199}\text{Hg}=0.01\text{‰}$  ( $n=6$ )で鉱床由来の $\Delta^{199}\text{Hg}$ 比と同じであり(左図)、鉱山作業員の尿中総水銀は無機水銀曝露を反映していた。毛髪の $\Delta^{199}\text{Hg}$ 水銀比は $0.23\sim 0.55\text{‰}$  ( $n=6$ )と低く、しかも総水銀に対するメチル水銀の割合が $7.6\sim 29\%$  ( $n=7$ )と低いことから、鉱山作業員の毛髪中水銀は外因性の無機水銀の吸着であり、魚介類由来のメチル水銀ではなかった。一方、毎日、魚介類を摂取するインドネシアの鉱山作業員の毛髪の $\Delta^{199}\text{Hg}$ 比は $0.21\sim 1.32\text{‰}$  ( $n=5$ )と幅広く(右図)、そして総水銀に対するメチル水銀の割合も $32\sim 74\%$  ( $n=4$ )であった。この結果はインドネシアの鉱山作業員の毛髪中総水銀は外部からの無機水銀の吸着と魚介類摂取によるメチル水銀の混合物であることを示した。ガーナとインドネシアの鉱山作業員のデータから小規模金鉱山の毛髪中の総水銀は魚介類由来のメチル水銀曝露を過大評価しているかもしれないと述べた。

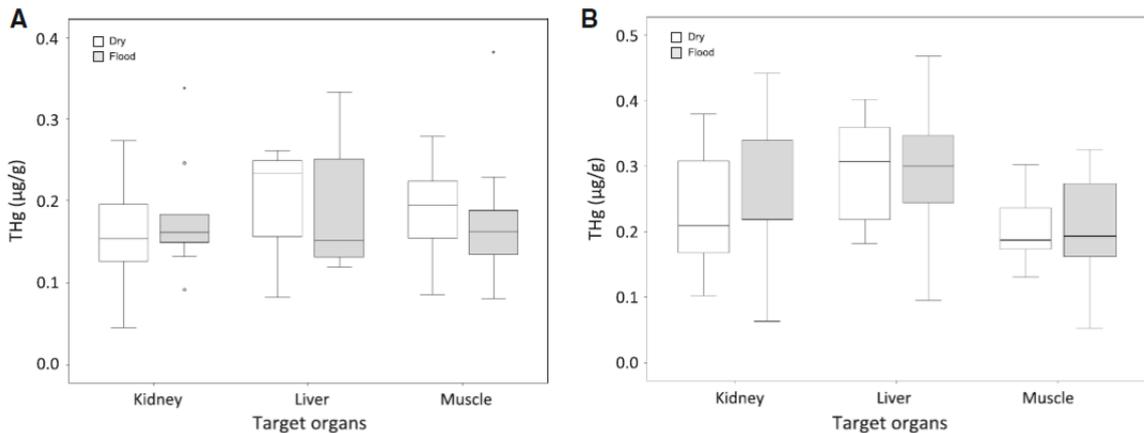


ガーナ鉱夫の尿と土壌の $\delta^{202}\text{Hg}$ と $\Delta^{199}\text{Hg}$ の関係 (単位はいずれも‰)

インドネシア鉱夫の毛髪と魚の $\delta^{202}\text{Hg}$ と $\Delta^{199}\text{Hg}$ の関係 (単位はいずれも‰)

Ceccatto *et al*はブラジルのPantanal湿地地域における魚介類摂取を介した水銀曝露によるヒトの健康リスク評価を行った<sup>86)</sup>。リスク評価は2種類の魚種 (Crenicichla lepidotaとPygocentrus nattereri)の水銀濃度と蓄積パターンで行った。評価に当たってはBento川とParaguay川の異なる生態系の魚を対象に洪水と干ばつの季節に水銀分析を行った。結果はBento川では金鉱山の直接的な影響を受けており、魚の水銀濃度は未開地域のParaguay川と比べ、高値であるが、有意差は見られなかった(箱ヒゲ図)。また季節変動による魚の水銀濃度にも差異は認められなかった。魚の水銀濃度はFAO/WHOの規制値 ( $0.5 \mu\text{g/g}$ )を上回ってはいないが、Pantanal湿地地域の住民は食習慣から1日6オンス以上の魚介類を摂食することもあり、多量の水銀摂取量による健康影響の可能性を示唆した。推定1日摂取量とHQを用いてヒトに対する水銀の健康リスク評価を行ったところ、大人(妊娠可能年齢女性を含む)や子どもの1日当たりの推定水銀摂取量は $0.49\sim 1.08 \mu\text{g Hg/kg}$ であり、この量は川辺に住む住民は推奨参照用量を超えており、危険な状況にあった(下表)。特に子ども、妊婦そして妊娠可能年齢の女性に対して魚介類摂取量に関する社会教育や規制措置が必要であると述べた。

Paraguay川 (A) およびBento Gomes川 (B) 大水期と渇水期の魚種Pygocentrus nattereriの総水銀濃度を表す箱ヒゲ図



メチル水銀含有魚を食べてPantanalで伝統的暮らしをしている住民の潜在的リスクの推定

	BW <sup>a</sup> (kg)	IR <sup>b</sup> (g)	EDI	MeHg <sub>PSL</sub>	HQ
Children	25	140	1.08 (0.36)	0.04 (0.01)	11
Women of childbearing age	67	170	0.49 (0.16)	0.09 (0.03)	5
Rest of the population	78	200	0.49 (0.16)	0.09 (0.03)	5

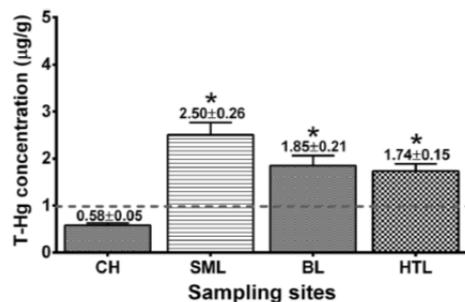
Values as mean (SD)

BW body weight (kg), IR ingestion rate (g/日), EDI estimated daily intake of methylmercury (µg/kg体重/日), MeHg<sub>PSL</sub> permissible safety level, which is the concentration of methylmercury in fish for human consumption (µg/g), HQ hazard quotient.

<sup>a</sup>NCHS 1993, US EPA 2011

<sup>b</sup>Considering 7.77 times a week (Tavares et al. 2005), C<sub>MeHg</sub> = 0.193 ± 0.064 µg/g was used

Olivero-Verbel *et al.*は南米コロンビアのSan Martin de Loba金鉱山地区の住民の毛髪、魚介類、水、大型植物、堆積物の総水銀レベルの測定し、総水銀摂取に対する魚介類摂取によるリスク評価を行った<sup>87)</sup>。San Martin de Loba金鉱山地区周辺の全住民の平均毛髪総水銀濃度は2.12 µg/gで、対照地であるCesarのChimichagua地区の住民は0.58 µg/gであった。平均総水銀濃度は鉱山周辺の地域住民の間で差異はないが、Chimichagua地区住民との間では差異がみられた (下図)。San Martin de Loba金鉱山地区を除く、調査した地域の総水銀濃度は年齢、身長そして魚介類摂取量との間に弱い相関関係を示した (下表参照)。高濃度の水銀を含む魚種はPseudoplatystoma magdaleniatum、Caquetaia kraussii、Ageneiosus pardalis、Cyrtrocharax magdalenae、Triportheus magdalenaeであり、低濃度の魚種はProchilodus magdalenae、Hemiancistrus wilsoniであった。魚介類摂取による水銀曝露に関しては、低濃度水銀の魚種のみが水銀に関連した健康問題に対するリスクが低いことを示した。また、水、浮遊大型水生植物そして鉱山周辺から流出する堆積物は高濃度の水銀値を示した。San Martin de LobaやHatillo de Loba金鉱山の堆積物は汚染指標であるgeoaccumulation指標は6を超えており、極めて汚染が高いことを示した。これらのことから金鉱山周辺の水銀に汚染された環境は鉱山周辺住民の健康に悪影響をもたらすリスクが存在することが明らかになった。



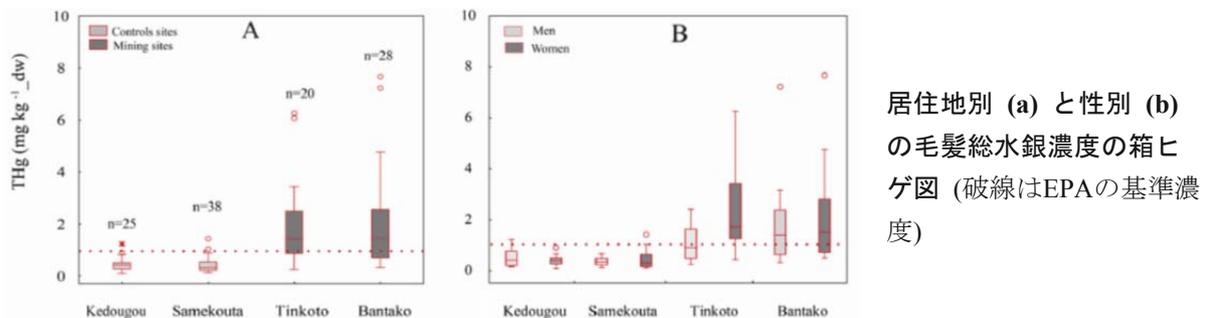
鉱山周辺地域 (SML, Ssan Martin de Loba; BL, Barranco de Loba; HTL, Hatillo de Loba) とChimichagua地区(CH)との毛髪水銀の比較 (Kruskal-Wallis test with Dunnett,  $P < 0.01$ )

地区毎の研究集団の年齢、身長、魚摂取量と毛髪総水銀濃度とのSpearman相関係数 (P値)

Characteristic	Municipality			
	SML	BL	HTL	CH
Age (years)	0.282 (0.001)	0.313 (0.001)	0.383 (0.001)	0.508 (0.001)
Height (cm)	0.370 (0.001)	0.316 (0.001)	0.265 (0.022)	0.334 (0.001)
Fish intake <sup>a</sup>	0.108 (0.136)	0.418 (0.001)	0.411 (0.001)	0.433 (0.001)

<sup>a</sup> Number of times (meals) a week that fish is part of the diet

Niane *et al*はセネガルの小規模金鉱山で水銀アマルガム法を使用しているKedougou地方のヒトや食物網への水銀曝露を調査した<sup>88)</sup>。食物網への影響はGambia川の魚類8種 (32検体) と甲殻類2種 (7検体) の総水銀測定、ヒトへの影響は性、年齢別にKedougouやSamekoutaの都市住民とTinkotoやBantakoの金鉱山周辺住民、合計111人の毛髪中総水銀測定で評価した。魚類の水銀濃度は0.03~0.51 mg/kg湿重量であり、甲殻類の水銀濃度は0.5~1.05 mg/kg湿重量であった。魚類の水銀濃度はWHOのガイドライン以下の濃度であったが、甲殻類は全てガイドライン以上の値を示した。2ヶ所の金鉱山周辺を流れるGambia川の魚介類を摂食している住民の毛髪中総水銀濃度 (中央値) はTinkotoで1.45 µg/g、Bantakoで1.50 µg/gであり、Kedougou市の0.42 µg/gや Samekouta市の0.32 µg/gに比べて高値であった。金鉱山周辺住民は毛髪水銀基準濃度 (RfD) 1 µg/gを住民の30%が超えていた。Tinkoto金鉱山周辺の女性は伝統的に水銀アマルガム燃焼を分担しており、高濃度の水銀蒸気に曝露されている。金鉱山周辺住民の毛髪中高濃度水銀は、魚介類の摂食より、直接的な水銀蒸気曝露であることを示唆する。



居住地別 (a) と性別 (b) の毛髪総水銀濃度の箱ヒゲ図 (破線はEPAの基準濃度)

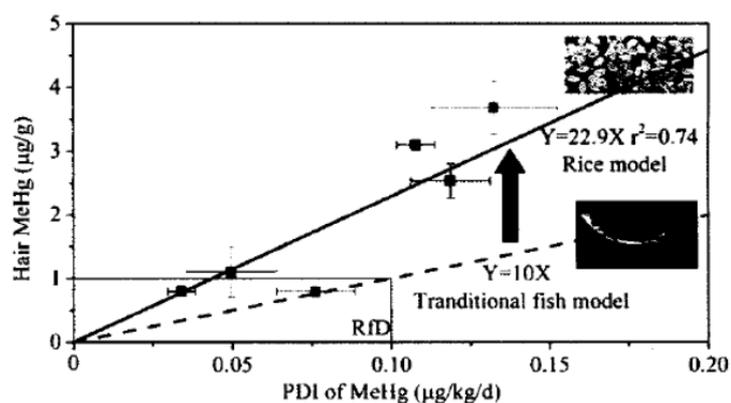
金採掘に伴う水銀曝露による健康影響に関して、Rajae *et al*はガーナのUpper East州の小規模金鉱山周辺のKejetia住民と自耕自給農業を営むGorogo住民を対象に水銀曝露による心血管系と血圧への影響に関する横断研究を行った<sup>89)</sup>。心血管系への影響評価は安静時心拍数と血圧を用い、水銀曝露評価は毛髪と尿の水銀濃度で行った。対象はKejetiaでは鉱山作業員75人と非作業員70人そして対照地区のGorogoの26人である。尿中水銀濃度の中央値はKejetiaの鉱山作業員で5.15 µg/L、非作業員で1.18 µg/L、Gorogoの住民で0.154 µg/Lであり、毛髪中水銀はKejetiaの鉱山作業員で0.946 µg/g、非作業員で0.419 µg/g、Gorogo住民で0.181 µg/gであり、Kejetiaの鉱山作業員は非作業員およびGorogo住民に比べ、尿および毛髪ともに水銀濃度は高値であった。高血圧の有病率はKejetia住民では17.7%で、Gorogo住民では21.3%であった。尿中および毛髪中水銀濃度と収縮期および拡張期血圧の間には性、年齢、喫煙状況を調整してもKejetiaとGorogo住民には関連性は認められなかった。

シアン化法による金抽出はその周辺住民や生態系に有害な影響を及ぼすことが知られている。Hassan *et al*はマレーシアの金鉱山周辺に居住する住民の環境からのシアン化物曝露による健康影響について報告した<sup>90)</sup>。曝露群 255 名と対照群 117 名に健康状態と金鉱山からのシアン物の曝露に関するアンケート調査を行い、生物学的指標として尿中チオシアン酸を測定した。尿中チオシアン酸濃度は曝露群で平均  $0.30 \pm 0.26$  mg/dL であり、対照群の平均  $0.24 \pm 0.23$  mg/dL より有意に高値であった ( $P = 0.0021$ )。曝露群において頭痛 (有病オッズ比 (OR) = 2.6,  $P = 0.001$ )、眩暈 (OR = 3.7,  $P < 0.001$ )、皮膚炎 (OR = 2.1,  $P = 0.04$ ) そして目の炎症 (OR = 5.1,  $P = 0.004$ ) の有病率が高かった。尿中チオシアン酸と食事性曝露の間には有意な関連は見られなかった。金鉱山周辺に住む喫煙者の尿中チオシアン酸濃度は  $0.56$  mg/dL であり、対照地区の喫煙者 ( $0.49$  mg/dL) に比べ高い値を示した。金鉱山周辺の住民は対照住民に比べ明らかにシアン物に曝露されており、喫煙者ではシアン化物の曝露が相加的要因となっている。

### ■ 水銀鉱山周辺の環境汚染と健康影響

中国の貴州省の水銀鉱山周辺地域では水銀汚染に伴う米へのメチル水銀の蓄積が地域住民のメチル水銀の曝露源となっている。しかしながら、水銀汚染地域の住民の無機水銀による影響に関する包括的研究は行われていない。Li *et al*は貴州省の万山水銀鉱山周辺のA~Gの7地域住民を対象に無機水銀曝露による腎機能への影響について調べた<sup>91)</sup>。採鉱廃棄物の山から3 km以内に住む住民 (A地区、D地区、E地区) の尿中水銀濃度は高く、幾何平均値はA地区  $8.29$   $\mu\text{g/g Cr}$ 、D地区  $5.13$   $\mu\text{g/g Cr}$ 、E地区  $10.3$   $\mu\text{g/g Cr}$ であった。尿中水銀濃度は汚染源に近い住民ほど高値であった。尿中水銀濃度と血清クレアチン (SCr) との間に有意な相関が見られたが、血清尿素窒素 (SBUN) との間に有意な関連は認められなかった。特に尿中水銀濃度で四分位 (Q1, Q2, Q3, Q4) にした時のQ3グループ以上で高いSCr値が観察されたことから、この地域の住民は無機水銀曝露による腎機能影響が見られたと考えられる。また、水銀の推定1日摂取量の計算から、地元住民の水銀の摂取は水銀蒸気曝露によるものではなく無機水銀曝露によるものと考えられた。

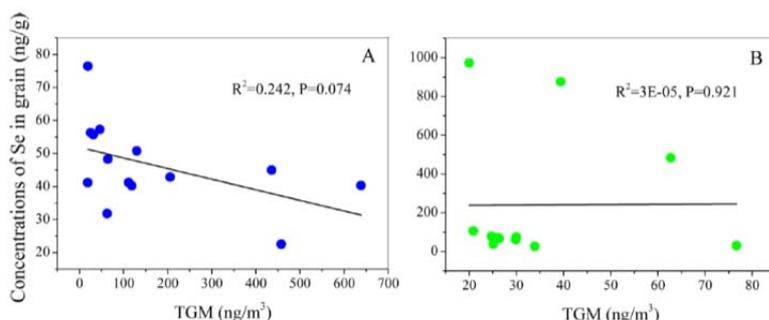
水銀汚染地域では米穀物中にメチル水銀が蓄積することが知られており、この地域に居住する住民の米からメチル水銀曝露を受ける。Li *et al*は中国貴州省万山水銀鉱山地域における米を主食とする住民を対象に食事性メチル水銀摂取量と体内負荷量との関係からリスク評価を行った<sup>92)</sup>。毛髪中メチル水銀濃度は  $2.07 \pm 1.79$  (平均  $\pm$  標準偏差)  $\mu\text{g/g}$  で、血液中メチル水銀濃度は  $2.2 \sim 9.36$   $\mu\text{g/L}$  であり、総水銀に対するメチル水銀の割合は毛髪では  $52.8 \pm 17.5\%$  で、血液では  $71.7 \pm 18.2\%$  であった。米を介したメチル水銀の1日摂取推定量は血液中メチル水銀 ( $R^2 = 0.83$ ,  $P < 0.001$ ) および毛髪水銀濃度 ( $R^2 = 0.74$ ,  $P < 0.001$ ) との間に高い正の相関を認めた。血液および毛髪中メチル水銀濃度は総水銀濃度よりメチル水銀曝露の指標として用いることができ、特に毛髪中メチル水銀濃度の月内変動は少なかった。しかしながら、毛髪中総水銀濃度は無機水銀曝露の影響を受けた。本研究の米消費集団における高い毛髪/血液メチル水銀比 ( $361 \pm 105$ ) の結果は魚介類摂取に基



づいたメチル水銀曝露の毒物動態モデルではヒトの毛髪中メチル水銀レベルは低く見積られる(前頁右図参照)。したがって、魚介類摂取に基づくリスク評価モデルの適用は米が主食である内陸の鉱山採掘地域には不適當かもしれないと述べている。

中国の水銀鉱山周辺では米が主なメチル水銀の曝露源となっており、高濃度の水銀に汚染された土壌で生育する米の水銀蓄積が大きな問題となっている。Zhou *et al*は米の生育に対する水銀汚染土壌の影響、米への水銀の取込みと水銀の化学形態について鉢植えを用いて調べた<sup>93)</sup>。米の生育が土壌中の水銀有機結合体への変換を促進することから、メチル水銀産生の危険性が増大することを明らかとした。生物濃縮係数は無機水銀については減少したが、メチル水銀は土壌中の総水銀の増加に対し一定であった。根や茎では土壌中無機水銀が主な汚染源であったが、葉では大気と土壌中水銀が関与していた。土壌中の水溶性や置換性の水銀割合から無機水銀やメチル水銀の生物学的利用能を予見でき、それは生物学的に利用可能な水銀の取込み割合を量的に説明することを可能にした。水田土壌中において0.0087 mg/kgを超える水溶性や置換性の水銀は米粒の規格の許容限度を超える総水銀濃度の原因となるとともに、メチル水銀濃度が0.0091 mg/kg以上の水田土壌はヒトに対する健康リスクを与え得る。

中国の穀物の水銀汚染はメチル水銀蓄積に加えて、新たな問題が持ち上がっている。中国では食事由来のセレン摂取は主として米(イネ科)からであるが、米のセレン濃度に対する水銀で汚染された土壌の影響は不明である。Zhang *et al*中国の万山地方の水銀汚染における必須微量元素である土壌中セレンの米への取り込みに対する水銀の影響について調査を行った<sup>94)</sup>。活動中の水銀鉱山地域と閉山水銀鉱山地域から29の稲全体を集めた。二つの水銀鉱山周辺の土壌中のセレン濃度はほぼ同じであるが、中国のバックグラウンド濃度より高値であった。しかしながら、米粒のセレン濃度は明らかに異なり、活動中の水銀鉱山周辺では $51 \pm 3$  ng/gで、閉山水銀鉱山周辺では $235 \pm 99$  ng/gであった。一方、大気中の水銀蒸気濃度は活動中の水銀鉱山周辺では $231$  ng/m<sup>3</sup>で、閉山水銀鉱山周辺では $34$  ng/m<sup>3</sup>であり、採鉱地域では穀物のセレン濃度と大気中水銀濃度との間に負の相関が見られた(下図)。米のセレンの由来は採鉱地域では土壌中セレンよりも大気であり、閉山地域では大気と土壌であることが主成分分析で明らかとなった。さらに大気中水銀蒸気の土壌への落下は水銀とセレンが反応を起こし、米穀物へのセレンの取り込みを阻害する。この結果、水銀鉱山周辺住民のセレン必要栄養量が不足するとともに水銀中毒のリスク因子となり得る。



採鉱地域 (A) と閉山鉱山周辺 (B) の大気中水銀濃度 (TGM) と米穀中セレン濃度の関係

#### IV. 考察

各国のメチル水銀摂取量ないしメチル水銀曝露量がFAO/WHO基準値ないし米国EPAの規制値

(*R/D*) より高い地域、低い地域という論文が2014年の *Bulletin of World Health Organization* に発表されて以後<sup>35)</sup>、2015年にはメチル水銀の曝露評価に関する論文が多数掲載された。この種の論文が増えた理由は、2013年の「水銀に関する水俣条約」が採択され、各国でメチル水銀/水銀曝露量を把握することが必要となったからとされる。ただ、そのような論文の多くは単に基準値を超えるのが何%である等々に終始し<sup>44,45,47,49,80,87,88)</sup>、研究論文として読む際に内容的につまらなくなつた感が否めない(このような調査報告は、例えばサンプルサイズが大きくとも症例報告と同等であり、少なくとも新奇性の高い論文とは言い難い)。同時に、FAO/WHOあるいは米国EPAから出された数値が一人歩きしているようであり、Myers *et al*が指摘したように<sup>31)</sup>、小児の神経発達について全く吟味することもなく、その数値を超えると神経発達障害があるかのように書く軽薄さまでもが世界共通になっているように映る。各々の国でメチル水銀の曝露状況(食物摂取量の推定や生体濃度の測定)を掌握するのは大いに結構であるが、その上でどのような健康問題あるいは社会問題の発生・派生と関連しているのか踏み込んだ研究であって欲しい。

Grandjean *et al*のグループは胎児期のメチル水銀曝露が高次神経機能の低下と関連することをフェロー諸島出生コホートの、7歳児および14歳児だけでなく、22歳児で再確認した<sup>22)</sup>。確かに、胎児性水俣病患者や森永ヒ素ミルク事件患者の自然経過の観察例を調べると<sup>95-97)</sup>、発症後の神経中毒症状が非可逆的と思われたものは幾つもある。このような神経発達影響に関して<sup>27-29)</sup>、もっと総合的に捉え直すことも重要と思われる。そのヒントは2011年に発生した東日本大震災前後の7歳児のIQ測定の結果である<sup>51)</sup>。IQは、本来、誕生の瞬間より持っている能力と考えられている。このため、両親の遺伝形質が左右するので、親のIQが交絡因子となりうると考えられている。しかしながら、そのような能力を測る検査法は人為的に考案されたものであり、生来の能力を評価する検査もあれば、生まれた後の教育・生活環境を反映する能力も含めて評価しているものもある。すなわち、それらを一纏めにしてIQと呼んでいる可能性が高いのである。Wechsler知能検査(WISC-III)には言語性IQと動作性IQの2種類がある<sup>98)</sup>。Kaufmanの心理・教育アセスメントバッテリー(K-ABC)は認知処理過程尺度と習得度尺度に大別される<sup>99)</sup>。これまでに知られている範囲では、認知処理過程尺度で評価される能力は学業等に影響されない生まれつきの能力と考えられ、習得度尺度は文化・学校教育環境によって変わりうる能力とされている<sup>100)</sup>。Tatsuta *et al*はこれまであまり明らかでなかったWISCのIQ値とK-ABC検査結果との関係を検討し、動作性IQは認知処理過程尺度と正に関連するが、言語性IQは認知処理過程尺度だけでなく習得度尺度とも正に関連することを示した<sup>51)</sup>。今後の知能検査に関する研究においては、神経毒性物質(例えば、メチル水銀、鉛、ヒ素など)によってどちらのIQが障害されるのかを明らかにする必要がある。特に、生後曝露によるIQ低下なのか、胎児期影響としてのIQ低下なのかなどの具体的な記述が求められる可能性も出てこよう。一方、注意欠如/多動性障害や自閉症を持つ患者ではIQ検査細目の斑模様状の障害が見られると理解されており<sup>101)</sup>、IQ検査の再定義・再編成も考えねばならないかもしれない。

1970年代に低出生体重(特に2,500 g未満)では小児の神経発達遅延や欠陥のリスクが高くなるとの記述がある<sup>102)</sup>。1990年代になって、魚介類由来の高濃度メチル水銀曝露は出生体重の低下と関連することが示された<sup>103)</sup>。一方、Eyssens *et al*は高い出生体重は妊婦のメチル水銀を含む魚摂食と関連するかもしれないと述べた<sup>104)</sup>。このような背景にも拘わらず、胎児期メチル水銀曝露の出

生時体格（例えば、低出生体重）への影響をフェロー諸島出生コホート研究やセイシェル小児発達研究は直接扱っているように思えない（出生体重の中央値は前者で3,600 g前後、後者で3,200 gであった）<sup>27,105</sup>。ところで、出生時の体格指標が将来の生活習慣病発症と関連することは以前より示唆されており、2015年には3組の研究者が出生時体格について解析した。Obi *et al*は1.2~10.6（平均5.1） $\mu\text{g/L}$ の臍帯血水銀が出生体重（平均3.4 kg）、身長、頭囲および胸囲と有意な正の関連を示すことを報告した<sup>49</sup>。同様に、Miyashita *et al*も在胎週数相応より小さい体重児リスクが、多価不飽和脂肪酸を調整すると、メチル水銀の増加に伴い減少すると発表した（集団の平均出生体重3,073 g）<sup>50</sup>。これに対して、Wells *et al*はメチル水銀および多価不飽和脂肪酸が高い新生児では出生時の身長と頭囲長が短くなる可能性があるとして記した（臍帯血メチル水銀幾何平均値0.94  $\mu\text{g/L}$ 、平均出生体重3,212 g）<sup>56</sup>。最近の結果を見る限り、何を交絡因子として採択するかによってメチル水銀の出生時体格への影響が変わるようであり、一定の結論に到達したと判断することはできない。このような場合、出生時体格の異常頻度に関わる個々の因子の寄与率を重回帰分析などで検討し、その寄与が有意であっても極端に小さい（あるいは“ありそうにない”）ならば「考察」の中で正当化しない（＝コメントする価値があると考えない）ことも選択肢の一つである<sup>106</sup>。実際、妊娠中の詳細な喫煙情報（妊娠中のどの時期に1日当たり何本のタバコを吸っていたか [例えば、妊娠中の総喫煙本数]、およびどの程度・頻度の受動喫煙に晒されていたか）を調べることもせず議論しても詮なき事のように映る。

2014年の報告の中でも触れたが、先進国の有害化学物質の環境曝露濃度は低下の一途を辿っており、特定の一化学物質が特異的な健康障害を引き起こすに十分な濃度とは考えにくくなりつつある。換言すれば、毒性を有すると考えられる化学物質全ての同時曝露モデルとして解析することが重要になっている<sup>14,36,54,107-110</sup>。そして、毒性物質単独の影響か、毒性物質間の相乗作用あるいは拮抗作用として捉えるべきか、得られた結果を眺めながら決定しなくてはならない。また、出生から成人に至るまで臓器発達（とりわけ神経発達）の程度は年齢により異なる。つまり、同じ有害化学物質であっても異なる年齢で評価すれば結果が違って不思議ではないので、その変曲点（年齢）を見極めることが大切である。さらに、有害化学物質濃度を含む少数の交絡因子で解析した後に新たな化学物質を含めて解析する場合、単に「以前の化学物質を交絡因子として加えて解析した」と述べるのではなく、それらの詳細な関連性結果も表に提示すべきである。同時曝露を想定する際に、解析に加える化学物質の選択によって関連性が変わってしまうことは（低濃度曝露であるが故に）大いにありうる。一貫性の観点からは、以前の交絡因子で解析した用量-影響関係と、その後追加された後の用量-影響関係が同じであることが望まれる。しかし、新たな化学物質を説明変数に導入する際に、以前の有意な用量-影響関係が消失することもあり得る<sup>11</sup>。この事実を結果に記す/記さないによって、個々の化学物質の影響の方向と強さ（＝毒性評価）が科学史の中で変わってくる。かかる意味で、得られた事実を著者の都合で隠蔽することなく提示し、新規に得られた結果に基づいて説明や解釈を試みることが求められよう。

神経発達に及ぼすメチル水銀の影響に性差があることが報告された<sup>38</sup>。すなわち、Marques *et al*はBayley 発達検査 (BSID) を用い、6ヶ月男児の認知発達指標 (MDI) が毛髪水銀濃度と負の関連があった。一方、Goudarzi *et al*も同じBSIDを用いていたが、6ヶ月女児のMDIが有機フッ素化合物のパーフルオロオクタン酸 (PFOA) と負の関連があった<sup>110</sup>。これは調査で測定された有害化学物

質の違いによるかもしれない。また、Tatsuta *et al*が使用したKaufman心理・教育アセスメントバッテリー (K-ABC) においては、男児の得点が女児よりも低下し<sup>109)</sup>、かつ有害化学物質 (臍帯血中の難分解性環境汚染物質である高塩素化合物の9塩素化合物、9CB) との関連も認められた。研究対象のサンプルサイズにもよるが、このように性差を意識して解析することは新たな発見に結びつく。研究デザインの段階で性差を検出できるサンプルサイズとすることが鍵となろう。

海棲哺乳動物のセレン濃度を測定した論文2編が発表され<sup>65,67)</sup>、いずれもセレン/水銀モル比が1以上であることが示された。特にSakamoto *et al*は、総水銀濃度が高くなるにつれ、無毒化されたセレン化水銀になっていることを示し、セレンが水銀毒性の軽減に一役買っていることを示唆した。ラットの動物実験では自然界由来のセレノメチオニンが脳内の神経細胞死を直接防御することが既に推定されており<sup>111)</sup>、またゼブラフィッシュ胚でメチル水銀毒性がセレノネインに対して特異的なトランスポーターとして同定された有機陰イオン/オルニチントランスポーター (OCTN1) を介して解毒される機序も示されている<sup>112)</sup>。ヒトでは、Choi *et al*がフェロー諸島出生コホート研究のデータ解析を行い、セレンがメチル水銀毒性に保護作用を有するという証拠は見つからなかったと報告した<sup>113)</sup>。一方、Laird *et al*は18歳以上のイヌイットの伝統食でセレン摂取量が多く、これがパラオキシナーゼ (PON1) 活性を高めて健康に寄与したと推測した<sup>59)</sup>。Nakamura *et al*はわが国で伝統的にクジラを食べ続けている漁師に神経学的異常が観察されなかった理由として、漁師の血中水銀とセレン濃度との有意な正の相関とセレン/水銀モル比が1以上であったことを挙げてメチル水銀毒性がセレンによって防御されたのではないかと推測した<sup>114)</sup>。これらの事実を要約すると、ヒト成人において、セレンはメチル水銀の神経毒性に直接的な拮抗作用を示す証拠は未だないものの、メチル水銀の無毒化に対して寄与している可能性は高い。しかし、胎児期メチル水銀曝露を考える上で、臍帯血のメチル水銀濃度は母体血の2倍位高いにも拘わらず母子間のセレン濃度に差がないことから<sup>115)</sup>、今後水銀とセレン濃度との関連性が見られなかった胎児での検討が必要となる。

発展途上国における小規模金鉱山で金採取に使用する水銀の関心事は水生環境への影響、特にメチル化に伴う魚介類へのメチル水銀蓄積と魚摂食する住民の健康リスクに向けられている<sup>58,81-88)</sup>。水域系での水銀のメチル化に関して、総水銀およびメチル水銀と有機物質との間に関連があり、第一栄養段階では、魚食性魚や肉食性魚の総水銀濃度やメチル水銀の割合が高く、生物濃縮も顕著である<sup>81)</sup>。推定1日水銀摂取量とハザード指数 (HQ) を用いたヒトに対する健康リスク評価の研究では、メチル水銀汚染魚の摂食がHQを高めることから水銀蒸気とメチル水銀の曝露による危険性が指摘された<sup>84)</sup>。さらに、魚の水銀濃度はFAO/WHOの規制値以下であっても、妊娠可能年齢女性や子供の摂取量は推奨参照用量を超えており、健康影響の懸念があった<sup>86)</sup>。小規模金鉱山周辺住民の心血管系影響の評価では高血圧の有病率は鉱山従業員および非従業員と対照地域住民との間に差はなく、しかも尿中および毛髪中水銀濃度と収縮期および拡張期血圧との間には性、年齢、喫煙状況で補正しても関連性は認められていない<sup>89)</sup>。一方、シアン化法による金抽出を行う鉱山周辺住民のシアン化合物曝露の健康影響調査では頭痛、眩暈、皮膚炎、目の炎症等の有病率が高く、鉱山からのシアン曝露も認められた<sup>90)</sup>。

水銀鉱山周辺住民の無機水銀曝露による腎機能影響に対する調査では、採鉱廃棄物地域に近い住民ほど無機水銀曝露が高く、尿中水銀濃度と血清クレアチン濃度との間に関連が認められた。

また住民の水銀曝露は水銀の推定1日摂取量から、水銀蒸気ではなく無機水銀であることが明らかになった<sup>91)</sup>。水銀鉱山周辺の水銀汚染地域の住民は米穀類に含まれるメチル水銀 (2012年に報告された中国南部地域の米穀総水銀濃度は平均0.01 ppm、範囲0.00086~0.047 ppm) 曝露の危険性が指摘されている<sup>116)</sup>。米由来のメチル水銀摂取量と体内負荷量から曝露評価を行った結果、米食集団の毛髪/血液メチル水銀比は魚介類摂取からのメチル水銀曝露による薬物動態モデルで算出される毛髪/血液メチル水銀比に比べ高く、従来の曝露評価モデルに当てはまらないとしている。水田土壌中のメチル水銀濃度が0.0091 mg/kg以上の場合、米粒の総水銀濃度の許容限度を超え、ヒトに健康リスクを与え得ると警鐘している<sup>92)</sup>。なお、わが国でも有機水銀系農薬が使用されていた頃は米の中に水銀が含まれていたが、この農薬の使用が1973年に中止されて以後低下し<sup>117)</sup>、現在、わが国の玄米に含まれる水銀量は検出限界 (0.03 ng/mL) 以下と報告されている<sup>118,119)</sup>。

小規模金鉱山および水銀鉱山の作業員や周辺住民の水銀曝露によるリスクは水銀蒸気に加えて食事由来のメチル水銀が存在しており、今後、複合曝露による健康影響について調査研究を重ねることが重要である。最近、金の抽出に水銀やシアンを用いないホウ砂による新しい抽出技術が開発され、フィリピンの小規模金鉱山で導入されており、発展途上国におけるホウ砂法の実用化の拡大が期待される<sup>120)</sup>。

## V. 結論

2015年の文献レビューにより、以下のことが示された。①近年 Open Access 誌が多数発行され、その結果メチル水銀・水銀に関する論文総数も増加している。また水俣会議での水銀条約の採択以後、各国でメチル水銀の曝露評価に関心が高まっていると思われる。②メチル水銀の主たる健康影響は神経毒性と考えられているが、フェロー諸島出生コホートの22歳児研究で胎児期メチル水銀曝露が言語性理解・知識の低下と関連していることが示された。③メチル水銀曝露以外にPCB、有機塩素系殺虫剤なども曝露指標とした研究で、胎児期メチル水銀曝露が小児の記憶および学習(特に視覚性記憶)の低下と関連することを示した。④小児の発達影響を評価するために多くの検査法が開発されているが、神経発達検査で性差が散見されるようになった。このため研究デザインを考える際に、神経発達の男女差が検出できるサンプルサイズを有することが重要と考えられた。⑤海棲哺乳動物の総水銀とセレン濃度は強い正の相関があり、セレン/水銀モル比は無機水銀レベルが高くなるにつれて低下し、1に近づくことが確認された。この機序がヒトのメチル水銀毒性を軽減することを説明するかもしれない。⑥小規模金精錬や水銀鉱山で働く人々およびその作業現場近くの地域に住む人々の健康問題が懸念される。特に、これらの住民については米食に由来する水銀曝露を今後も監視することが重要と考えられた。

## 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)やセレンなどにより、神経発達に影響する時期が異なりそうな結果が幾つか示唆されている。したがって、この種の発達影響の発現および消失を時系列的に検討する研究が重要と考えられる。また、疫学研究

のデザイン・実施・解析方法に係わる注視点や考慮すべき点を文献レビューの中で例示することにより、わが国で実施されているエコチル調査の参考となるよう努めたい。本年度の文献レビューで、各国のメチル水銀の曝露評価に関する研究報告が盛んになってきた。これは論文としての新奇性には乏しいものの、水銀条約後に世界のメチル水銀/水銀曝露がどのように推移していくのかを見据える上で重要である。さらに、途上国における水銀の健康影響に関する論文が急増しているので、これらを整理すると、水銀影響の防護法にも繋がる可能性がある。

## 引用文献

1. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1997; 19: 417-428.
2. Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Axtell C, Shamlaye C, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Needham L, Choi A, Wang Y, Berlin M, Clarkson TW. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles child development study. *JAMA* 1998; 280: 701-707.
3. Murata K, Weihe P, Araki S, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P. Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 1999; 21: 471-472.
4. Sørensen N, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, Grandjean P. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at seven years of age. *Epidemiology* 1999; 10: 370-375.
5. Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, Debes F, Murata K, Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF. Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23: 305-317.
6. Myers GJ, Davidson PW, Cox C, Shamlaye CF, Palumbo D, Cernichiari E, Sloane-Reeves J, Wilding GE, Kost J, Huang LS, Clarkson TW. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 2003; 361: 1686-1692.
7. Salonen JT, Seppanen K, Nyyssonen K, Korpela H, Kauhanen J, Kantola M, Tuomilehto J, Esterbauer HH, Tatzber F, Salonen R. Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 1995; 91: 645-655.
8. Guallar E, Sanz-Gallardo MI, vant 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. Kawamoto T, Nitta H, Murata K, Toda E, Tsukamoto N, Hasegawa M, Yamagata Z, Kayama F, Kishi R, Ohya Y, Saito H, Sago H, Okuyama M, Ogata T, Yokoya S, Koresawa Y, Shibata Y, Nakayama S, Michikawa T, Takeuchi A, Satoh H, Working Group of the Epidemiological Research for Children's Environmental Health. Rationale and study design of the Japan environment and children's study (JECS). *BMC Public Health* 2014; 14: 25.
  15. Landrigan PJ, Baker DB. The National Children's Study - end or new beginning? *N Engl J Med* 2015; 372: 1486-1489.
  16. Pearson H. Wanted: 80,000 British babies for massive study: UK launches effort to track children from birth, months after US counterpart closes. *Nature* 2015; 518: 464-465.
  17. United Nations Environment Programme. *Global Mercury Assessment 2013: Sources, Emissions, Releases and Environmental Transport*. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013. [<http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf>]
  18. United Nations Environment Programme. *Mercury: Acting Now!*. UNEP Chemicals Branch, Geneva, Switzerland, 2013. [<http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/Documents/Publications/Mercury%20Acting%20Now.pdf>]
  19. Perry MJ, Young HA, Grandjean P, Halling J, Petersen MS, Martenies SE, Karimi P, Weihe P. Sperm aneuploidy in Faroese men with lifetime exposure to dichlorodiphenyldichlorethylene (DDE) and polychlorinated biphenyl (PCB) pollutants. *Environ Health Perspect* 2015; [DOI: 10.1289/ehp.1509779].
  20. Mogensen UB, Grandjean P, Nielsen F, Weihe P, Budtz-Jørgensen E. Breastfeeding as an exposure pathway for perfluorinated alkylates. *Environ Sci Technol* 2015; 49: 10466-10473.
  21. Tang-Péronard JL, Heitmann BL, Jensen TK, Vinggaard AM, Madsbad S, Steuervald U, Grandjean P, Weihe P, Nielsen F, Andersen HR. Prenatal exposure to persistent organochlorine pollutants is associated with high insulin levels in 5-year-old girls. *Environ Res* 2015; 142: 407-413.
  22. Debes F, Weihe P, Grandjean P. Cognitive deficits at age 22 years associated with prenatal exposure to methylmercury. *Cortex* 2015; [DOI: 10.1016/j.cortex.2015.05.017].
  23. Timmermann CA, Osuna CE, Steuerwald U, Weihe P, Poulsen LK, Grandjean P. Asthma and allergy

- in children with and without prior measles, mumps, and rubella vaccination. *Pediatr Allergy Immunol* 2015; 26: 742-749.
24. Tøttenborg SS, Choi AL, Bjerve KS, Weihe P, Grandjean P. Effect of seafood mediated PCB exposure on desaturase activity and PUFA profile in Faroese septuagenarians. *Environ Res* 2015; 140: 699-703.
  25. Grandjean P, Herz KT. Trace elements as paradigms of developmental neurotoxicants: lead, methylmercury and arsenic. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 31: 130-134.
  26. Petersen MS, Halling J, Weihe P, Jensen TK, Grandjean P, Nielsen F, Jørgensen N. Spermatogenic capacity in fertile men with elevated exposure to polychlorinated biphenyls. *Environ Res* 2015; 138: 345-351.
  27. Grandjean P, Murata K, Budtz-Jørgensen E, Weihe P. Cardiac autonomic activity in methylmercury neurotoxicity: 14-year follow-up of a Faroese birth. *J Pediatr* 2004; 144: 169-176.
  28. Murata K, Weihe P, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Grandjean P. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *J Pediatr* 2004; 144: 177-183.
  29. Debes F, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicol Teratol* 2006; 28: 627-632.
  30. Yeates AJ, Love TM, Engstrom K, Mulhem MS, McSorley EM, Grzesilk K, Alhamdow A, Wahlberg K, Thurston SW, Davidson PW, van Wijngaarden E, Watson GE, Shamlaye CF, Myers GJ, Strain JJ, Broberg K. Genetic variation in FADS genes is associated with maternal long-chain PUFA status but not with cognitive development of infants in a high fish-eating observational study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2015; 102-103: 13-20.
  31. Myers GJ, Davidson PW, Watson GE, van Wijngaarden E, Thurston SW, Strain JJ, Shamlaye CF, Bovet P. Methylmercury exposure and developmental neurotoxicity. *Bull World Health Organ* 2015; 93: 132-133.
  32. Periard D, Beqiraj B, Hayoz D, Viswanathan B, Evans K, Thurston SW, Davidson PW, Myers GJ, Bovet P. Associations of baroreflex sensitivity, heart rate variability, and initial orthostatic hypotension with prenatal and recent postnatal methylmercury exposure in the Seychelles child development study at age 19 years. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 3395-3405.
  33. Strain JJ, Yeates AJ, van Wijngaarden E, Thurston SW, Mulhem MS, McSorley EM, Watson GE, Love TM, Smith TH, Yost K, Harrington D, Shamlaye CF, Henderson J, Myers GJ, Davidson PW. Prenatal exposure to methyl mercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 mo of age in an observational study in the Republic of Seychelles. *Am J Clin Nutr* 2015; 101: 530-537.
  34. Murata K, Sakamoto M, Nakai K, Dakeishi M, Iwata T, Liu XJ, Satoh H. Subclinical effects of prenatal methylmercury exposure on cardiac autonomic function in Japanese children. *Int Arch Occup Environ Health* 2006; 79: 379-386.
  35. Sheehan MC, Burke TA, Navas-Acien A, Breyse PN, McGready J, Fox MA. Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review.

- Bull World Health Organ* 2014; 92: 254-269.
36. Orenstein STC, Thurston SW, Bellinger DC, Schwartz JD, Amarasiriwardena CJ, Altshul LM, Korrick SA. Prenatal organochlorine and methylmercury exposure and memory and learning in school-age children in communities near the New Bedford harbor superfund site, Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2015; 122: 1253-1259.
  37. Gaskin J, Rennie C, Coyle D. Reducing periconceptional methylmercury exposure: cost-utility analysis for a proposed screening program for women planning a pregnancy in Ontario, Canada. *Environ Health Perspect* 2015; 123: 1337-1344.
  38. Marques RC, Bernardi JVE, Abreu L, Dorea JG. Neurodevelopment outcomes in children exposed to organic mercury from multiple sources in a tin-ore mine environment in Brazil. *Arch Environ Contam Toxicol* 2015; 68: 432-441.
  39. Peplow D, Augustine S. Neurological abnormalities in a mercury exposed population among indigenous Wayana in Southeast Suriname. *Environ Sci Processes Impacts* 2014; 16: 2415-2422.
  40. Ginsberg G, Sonawane B, Nath R, Lewandowski P. Methylmercury-induced inhibition of paraoxonase-1 (PON1)-implications for cardiovascular risk. *J Toxicol Environ Health A* 2014; 77: 1004-1023.
  41. Rothenberg SE, Korrick SA, Fayad R. The influence of obesity on blood mercury levels for U.S. non-pregnant adults and children: NHANES 2007-2010. *Environ Res* 2015; 138: 173-180.
  42. Kioumourtzoglou MA, Roberts AL, Nielsen F, Tworoger SS, Grandjean P, Weisskopf MG. Within-person reproducibility of red blood cell mercury over a 10-to 10-year period among women in the Nurses' Health Study II. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2014; [DOI: 10.1038/jes.2014.82].
  43. Jo S, Woo HD, Kwon HJ, Oh SY, Park JD, Hong YS, Pyo H, Park KS, Ha M, Kim H, Sohn SJ, Kim YM, Lim JA, Lee SA, Eom SY, Kim BG, Lee KM, Lee JH, Hwang MS, Kim J. Estimation of the biological half-life of methylmercury using a population toxicokinetic model. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 9054-9067.
  44. Buchanan S, Anglen J, Turyk M. Methyl mercury exposure in populations at risk: analysis of NHANES 2011-2012. *Environ Res* 2015; 140: 56-64.
  45. Xu X, Newman MC. Mercury exposure as a function of fish consumption in two Asian communities in Coastal Virginia, USA. *Arch Environ Contam Toxicol* 2015; 68: 462-475.
  46. Goodrich JM, Chou HN, Gruninger SE, Franzblau A, Basu N. Exposures of dental professionals to elemental mercury and methylmercury. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2016; 26: 78-85.
  47. Yang HR, Kim NY, Hwang LH, Park JS, Kim JH. Mercury contamination and exposure assessment of fishery products in Korea. *Food Addit Contam (Part B)* 2015; 8: 44-49.
  48. Lei B, Zhang K, An J, Zhang X, Yu Y. Human health risk assessment of multiple contaminants due to consumption of animal-based foods available in the markets of Shanghai, China. *Environ Sci Pollut Res* 2015; 22: 4434-4446.
  49. Obi E, Okafor C, Igwebe A, Ebenebe J, Afonne OJ, Ifediata F, Orisakwe OE, Nriagu JO, Basu N. Elevated prenatal methylmercury exposure in Nigeria: evidence from maternal and cord blood.

- Chemosphere* 2015; 119: 485-489.
50. Miyashita C, Sasaki S, Ikeno T, Araki A, Ito S, Kajiwara J, Todaka T, Hachiya N, Yasutake A, Murata K, Nakajima T, Kishi R. Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size. *Sci Total Environ* 2015; 533: 256-265.
  51. Tatsuta N, Nakai K, Satoh H, Murata K. Impact of the Great East Japan Earthquake on child's IQ. *J Pediatr* 2015; 167: 745-751.
  52. Sakamoto M, Chan HM, Domingo J, Oliveira RB, Kawakami S, Murata K. Significance of fingernail and toenail mercury concentrations as biomarkers for prenatal methylmercury exposure in relation to segmental hair mercury concentrations. *Environ Res* 2015; 136: 289-294.
  53. 二塚 信. 水俣病の疫学～病像のとられ方を中心に～. *日衛誌* 2015; 70: 271-276.
  54. Matsuyama A, Yano S, Hisano A, Kindaichi M, Sonoda I, Tada A, Akagi H. Reevaluation of Minamata Bay, 25 years after the dredging of mercury-polluted sediments. *Mar Pollut Bull* 2014; 89: 112-120.
  55. Gilman CL, Soon R, Sauvage L, Ralston NV, Berry MJ. Umbilical cord blood and placental mercury, selenium and selenoprotein expression in relation to maternal fish consumption. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 30: 17-24.
  56. Wells EM, Herbstman JB, Lin YH, Jarrett J, Verdon CP, Ward C, Caldwell KL, Hibbeln JR, Witter FR, Halden RU, Goldman LR. Cord blood methylmercury and fetal growth outcomes in Baltimore newborns: potential confounding and effect modification by omega-3 fatty acids, selenium, and sex. *Environ Health Perspect* 2015; [DOI: 10.1289/ehp.1408596].
  57. Lei HL, Wei HJ, Chen PH, Hsi HC, Chien LC. Preliminary study of blood methylmercury effects on reproductive hormones and relevant factors among infertile and pregnant women in Taiwan. *Chemosphere* 2015; 135: 411-417.
  58. Faial K, Deus R, Deus S, Neves R, Jesus I, Santos E, Alves CN, Brasil D. Mercury levels assessment in hair of riverside inhabitants of the Tapajós river, Pará State, Amazon, Brazil: fish consumption as a possible route of exposure. *J Trace Elem Med Biol* 2015; 30: 66-76.
  59. Laird BD, Goncharov AB, Ayotte P, Chan HM. Relationship between the esterase paraoxonase-1 (PON1) and metal concentrations in the whole blood of Inuit in Canada. *Chemosphere* 2015; 120: 479-485.
  60. Ralston NV, Ralston CR, Raymond LJ. Selenium health benefit values: updated criteria for mercury risk assessments. *Biol Trace Elem Res* 2015; [DOI 10.1007/s12011-015-0516-z].
  61. Reash RJ, Brown L, Merritt K. Mercury and other trace elements in Ohio River fish collected near coal-fired power plants: Interspecific patterns and consideration of consumption risks. *Integr Environ Assess Manag* 2015; 11: 474-480.
  62. Lemire M, Kwan M, Laouan-Sidi AE, Muckle G, Pirkle C, Ayotte P, Dewailly E. Local country food sources of methylmercury, selenium and omega-3 fatty acids in Nunavik, Northern Quebec. *Sci Total Environ* 2015; 509-510: 248-259.
  63. Ruus A, Øverjordet IB, Braaten HF, Evenset A, Christensen G, Heimstad ES, Gabrielsen GW, Borgå K. Methylmercury biomagnification in an Arctic pelagic food web. *Environ Toxicol Chem* 2015; 34:

2636-2643.

64. Ouédraogo O, Chételat J, Amyot M. Bioaccumulation and trophic transfer of mercury and selenium in African sub-tropical fluvial reservoirs food webs (Burkina Faso). *PLoS One* 2015; 10: e0123048.
65. Sakamoto M, Itai T, Yasutake A, Iwasaki T, Yasunaga G, Fujise Y, Nakamura M, Murata K, Chan MH, Domingo JL, Marumoto M. Mercury speciation and selenium in toothed-whale muscles. *Environ Res* 2015; 143: 55-61.
66. Scheuhammer A, Braune B, Chan HM, Frouin H, Krey A, Letcher R, Loseto L, Noël M, Ostertag S, Ross P, Wayland M. Recent progress on our understanding of the biological effects of mercury in fish and wildlife in the Canadian Arctic. *Sci Total Environ* 2015; 509-510: 91-103.
67. Squadrone S, Chiaravalle E, Gavinelli S, Monaco G, Rizzi M, Abete MC. Analysis of mercury and methylmercury concentrations, and selenium: mercury molar ratios for a toxicological assessment of sperm whales (*Physeter macrocephalus*) in the most recent stranding event along the Adriatic coast (Southern Italy, Mediterranean Sea). *Chemosphere* 2015; 138: 633-641.
68. Kehrig HA, Hauser-Davis RA, Seixas TG, Fillmann G. Trace-elements, methylmercury and metallothionein levels in Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) found stranded on the Southern Brazilian coast. *Mar Pollut Bull* 2015; 96: 450-455.
69. Kenow KP, Meyer MW, Rossmann R, Gray BR, Arts MT. Influence of in ovo mercury exposure, lake acidity, and other factors on common loon egg and chick quality in Wisconsin. *Environ Toxicol Chem* 2015; 34: 1870-1880.
70. Rothenberg SE, Mgutshini NL, Bizimis M, Johnson-Beebout SE, Ramanantsoanirina A. Retrospective study of methylmercury and other metal(loid)s in Madagascar unpolished rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Pollut* 2015; 196: 125-133.
71. Matos J, Lourenço HM, Brito P, Maulvault AL, Martins LL, Afonso C. Influence of bioaccessibility of total mercury, methyl-mercury and selenium on the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked blue shark (*Prionace glauca*). *Environ Res* 2015; 143: 123-129.
72. Afonso C, Costa S, Cardoso C, Bandarra NM, Batista I, Coelho I, Castanheira I, Nunes ML. Evaluation of the risk/benefit associated to the consumption of raw and cooked farmed meagre based on the bioaccessibility of selenium, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, total mercury, and methylmercury determined by an in vitro digestion model. *Food Chem* 2015; 170: 249-256.
73. Afonso C, Costa S, Cardoso C, Oliveira R, Lourenço HM, Viula A, Batista I, Coelho I, Nunes ML. Benefits and risks associated with consumption of raw, cooked, and canned tuna (*Thunnus* spp.) based on the bioaccessibility of selenium and methylmercury. *Environ Res* 2015; 143: 130-137.
74. Amlund H, Lundebye AK, Boyle D, Ellingsen S. Dietary selenomethionine influences the accumulation and depuration of dietary methylmercury in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat Toxicol* 2015; 158: 211-217.
75. MacDonald TC, Korbas M, James AK, Sylvain NJ, Hackett MJ, Nehzati S, Krone PH, George GN, Pickering IJ. Interaction of mercury and selenium in the larval stage zebrafish vertebrate model. *Metallomics* 2015; 7: 1247-1255.

76. Olsvik PA, Amlund H, Sæle Ø, Ellingsen S, Skjaerven KH. Impact of dietary selenium on methylmercury toxicity in juvenile Atlantic cod: a transcriptional survey. *Chemosphere* 2015; 120: 199-205.
77. Usuki F, Fujimura M. Decreased plasma thiol antioxidant barrier and selenoproteins as potential biomarkers for ongoing methylmercury intoxication and an individual protective capacity. *Arch Toxicol* 2015; [DOI 10.1007/s00204-015-1528-3].
78. Rodrigues J, Branco V, Lu J, Holmgren A, Carvalho C. Toxicological effects of thiomersal and ethylmercury: Inhibition of the thioredoxin system and NADP(+)-dependent dehydrogenases of the pentose phosphate pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 286: 216-223.
79. Nakazawa K, Nagafuchi O, Kawakami T, Inoue T, Yokota K, Serikawa Y, Cyio B, Elvince R. Human health risk assessment of mercury vapor around artisanal small-scale gold mining area, Palu city, Central Sulawesi, Indonesia. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015; 124: 155-162.
80. López-Blanco C, Collahuazo L, Torres S, Chinchay L, Ayala D, Benítez P. Mercury Pollution in soils from the Yacuambi river (Ecuadorian Amazon) as a result of gold placer mining. *Bull Environ Contam Toxicol* 2015; 95: 311-316.
81. Pinedo-Hernández J, Marrugo-Negrete J, Díez S. Speciation and bioavailability of mercury in sediments impacted by gold mining in Colombia. *Chemosphere* 2015; 119: 1289-1295.
82. Marrugo-Negrete J, Pinedo-Hernández J, Díez S. Geochemistry of mercury in tropical swamps impacted by gold mining. *Chemosphere* 2015; 134: 44-51.
83. Bastos WR, Dórea JG, Bernardi JV, Lauthartte LC, Mussu MH, Lacerda LD, Malm O. Mercury in fish of the Madeira river (temporal and spatial assessment), Brazilian Amazon. *Environ Res* 2015; 140: 191-197.
84. Castilhos Z, Rodrigues-Filho S, Cesar R, Rodrigues AP, Villas-Bôas R, de Jesus I, Lima M, Faial K, Miranda A, Brabo E, Beinhoff C, Santos E. Human exposure and risk assessment associated with mercury contamination in artisanal gold mining areas in the Brazilian Amazon. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 11255-11264.
85. Sherman LS, Blum JD, Basu N, Rajae M, Evers DC, Buck DG, Petrlik J, DiGangi J. Assessment of mercury exposure among small-scale gold miners using mercury stable isotopes. *Environ Res* 2015; 137: 226-234.
86. Ceccatto AP, Testoni MC, Ignácio AR, Santos-Filho M, Malm O, Díez S. Mercury distribution in organs of fish species and the associated risk in traditional subsistence villagers of the Pantanal wetland. *Environ Geochem Health* 2015; [DOI 10.1007/s10653-015-9754-4].
87. Olivero-Verbel J, Caballero-Gallardo K, Turizo-Tapia A. Mercury in the gold mining district of San Martín de Loba, South of Bolívar (Colombia). *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 5895-5907.
88. Niane B, Guédron S, Moritz R, Cosio C, Ngom PM, Deverajan N, Pfeifer HR, Poté J. Human exposure to mercury in artisanal small-scale gold mining areas of Kedougou region, Senegal, as a function of occupational activity and fish consumption. *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 7101-7111.

89. Rajae M, Sánchez BN, Renne EP, Basu N. An investigation of organic and inorganic mercury exposure and blood pressure in a small-scale gold mining community in Ghana. *Int J Environ Res Public Health* 2015; 12: 10020-10038.
90. Hassan NA, Sahani M, Hod R, Yahya NA. A study on exposure to cyanide among a community living near a gold mine in Malaysia. *J Environ Health* 2015; 77: 42-48.
91. Li P, Du B, Chan HM, Feng X. Human inorganic mercury exposure, renal effects and possible pathways in Wanshan mercury mining area, China. *Environ Res* 2015; 140: 198-204.
92. Li P, Feng X, Chan HM, Zhang X, Du B. Human body burden and dietary methylmercury intake: the relationship in a rice-consuming population. *Environ Sci Technol* 2015; 49: 9682-9689.
93. Zhou J, Liu H, Du B, Shang L, Yang J, Wang Y. Influence of soil mercury concentration and fraction on bioaccumulation process of inorganic mercury and methylmercury in rice (*Oryza sativa* L.). *Environ Sci Pollut Res Int* 2015; 22: 6144-6154.
94. Zhang C, Qiu G, Anderson CW, Zhang H, Meng B, Liang L, Feng X. Effect of atmospheric mercury deposition on selenium accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) at a mercury mining region in southwestern China. *Environ Sci Technol* 2015; 49: 3540-3547.
95. Dakeishi M, Murata K, Grandjean P. Long-term consequences of arsenic poisoning during infancy due to contaminated milk powder. *Environ Health* 2006; 5:31.
96. Murata K, Sakamoto M. Minamata disease. In: Nriagu JO (ed). *Encyclopedia of Environmental Health, Volume 3*. Burlington: Elsevier, 2011; 774-780.
97. 西村 肇, 岡本達明. 水俣病の科学 (増補版). 東京: 日本評論社, 2006.
98. Wechsler D. *Wechsler Intelligence Scale for Children - Third Edition (WISC-III)*. San Antonio, TX: Psychological Corporation, 1991.
99. Kaufman AS, Kaufman NI. *Kaufman Assessment Battery for Children Interpretive Manual*. Circle Pines, MN: American Guidance Service, 1983.
100. Lange RT. Performance IQ. *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology*. New York, NY: Springer, 2011; 1907-1908.
101. 苗村育郎. 自殺の内景—若者の心と人生. 秋田: 無明舎出版, 2015.
102. Grandjean P, Weihe P. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. *Environ Res* 1993; 61: 176-183.
103. Foldspang A, Hansen JC. Dietary intake of methylmercury as a correlate of gestational length and birth weight among newborns in Greenland. *Am J Epidemiol* 1990; 132: 310-317.
104. Eyssen GEM, Ruedy J, Neims A. Methylmercury exposure in northern Quebec. II. Neurologic findings in children. *Am J Epidemiol* 1983; 118: 470-479.
105. Shamlaye CF, Marsh DO, Myers GJ, Cox C, Davidson PW, Choisy O, Cernichiari E, Choi A, Tanner MA, Clarkson TW. The Seychelles child development study on neurodevelopmental outcomes in children following in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: background and demographics. *Neurotoxicology* 1995; 16: 597-612.
106. Rushton L. Reporting of occupational and environmental research: use and misuse of statistical and

- epidemiological method. *Occup Environ Med* 2000; 57: 1-9.
107. Suzuki K, Nakai K, Sugawara T, Nakamura T, Ohba T, Shimada M, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Kurokawa N, Murata K, Satoh C, Satoh H. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs and seafood intake: Neonatal Behavioral Assessment Scale results of Tohoku study of child development. *Environ Res* 2010; 110: 699-704.
108. 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 factor for child behavior problems. *Environ Res* 2012; 114: 47-52.
109. Tatsuta N, Nakai K, Murata K, Suzuki K, Iwai-Shimada M, Kurokawa, Hosokawa T, Satoh H. Impacts of prenatal exposures to polychlorinated biphenyls, methylmercury and lead on intellectual ability of 42-month-old children in Japan. *Environ Res* 2014; 133: 321-326.
110. Goudarzi H, Nakajima S, Ikeno T, Sasaki S, Kobayashi S, Miyashita C, Ito S, Araki A, Nakazawa H, Kishi R. Prenatal exposure to perfluorinated chemicals and neurodevelopment in early infancy: The Hokkaido Study. *Sci Total Environ* 2016; 541: 1002-1010.
111. Sakamoto M, Yasutake A, Kakita A, Rhufuku M, Chan HM, Yamamoto M, Oumi S, Kobayashi S, Watanabe C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 2862-2868.
112. Yamashita M, Yamashita Y, Suzuki T, Kani Y, Mizusawa N, Imamura S, Takemoto K, Hara T, Hossain MA, Yabu T, Touhata K. Selenoneine, a novel selenium-containing compound, mediates detoxification mechanisms against methylmercury accumulation and toxicity in zebrafish embryo. *Mar Biotechnol (NY)* 2013; 15: 55-570.
113. Choi AL, Budtz-Jørgensen E, Jørgensen PJ, Steuerwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Selenium as a potential protective factor against mercury developmental neurotoxicity. *Environ Res* 2008; 107: 45-52.
114. Nakamura M, Hachiya N, Murata KY, Nakanishi I, Kondo T, Yasutake A, Miyamoto K, Ser PH, Omi S, Furusawa H, Watanabe C, Usuki F, Sakamoto M. Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. *Environ Int* 2014; 68: 25-32.
115. Sakamoto M, Murata K, Kubota M, Nakai K, Satoh H. Mercury and heavy profiles of maternal and umbilical cord RBCs in Japanese population. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010; 73: 1-6.
116. Li P, Feng X, Yuan X, Chan HM, Qiu G, Sun GX, Zhu YG. Rice consumption contributes to low level methylmercury exposure in southern China. *Environ Int* 2012; 49: 18-23.
117. Nakagawa R, Yumita Y. Change and behavior of residual mercury in paddy soils and rice of Japan. *Chemosphere* 1998; 37: 1483-1487.
118. 大島晴美, 上野英二, 斎藤 勲, 松本 浩. 玄米および魚介類中カドミウム鉛水銀ヒ素セレンマンガン銅および亜鉛の分析における誘導結合プラズマ質量分析法と原子吸光光度法の比較. *食衛誌* 2004; 45: 270-276.
119. Kido M, Yustiawati Syawal MS, Sulastri, Hosokawa T, Tanaka S, Saito T, Iwakuma T, Kurasaki M. Comparison of general water quality of rivers in Indonesia and Japan. *Environ Monit Assess* 2009;

156: 317-329.

120. Køster-Rasmussen R, Westergaard ML, Brasholt M, Gutierrez R, Jørs E, Thomsen JF. Mercury pollution from small-scale gold mining can be stopped by implementing the gravity-borax method: a two-year follow-up study from two mining communities in the Philippines. *New Solut* 2015; 25: 567-587.

# A review on health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata<sup>1</sup>, Minoru Yoshida<sup>2</sup>, Kanae Karita<sup>3</sup>, Nozomi Tatsuta<sup>4</sup>, Kunihiko Nakai<sup>4</sup>, Miyuki Iwai-Shimada<sup>5</sup>, Kozue Yaginuma-Sakurai<sup>6</sup>, Eri Maeda<sup>7</sup>, Mineshi Sakamoto<sup>8</sup>, Toyoto Iwata<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Environmental Health Sciences, Akita University Graduate School of Medicine*

<sup>2</sup> *Hachinohe Gakuin University Faculty of Human Health*

<sup>3</sup> *Department of Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine*

<sup>4</sup> *Development and Environmental Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine*

<sup>5</sup> *Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Tohoku University Graduate School of Pharmaceutical Sciences*

<sup>6</sup> *Department of Human Health and Nutrition, Shokei Gakuin University Faculty of Comprehensive Human Sciences*

<sup>7</sup> *Department of Public Health, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo*

<sup>8</sup> *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

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

## *Abstract*

Approximately sixty years have passed since the outbreak of Minamata disease, and there seems to exist no high-level methylmercury contamination in Japan. But, mercury is continuously discharged from natural sources and industrial activities, and health problem of low-level exposure to methylmercury among fetuses and children has not fully been resolved. Meanwhile, mercury contamination due to gold mining is a worldwide problem especially in developing countries such as Brazil, in southeastern Asia, or in Africa. From this view point, we provide an overview of epidemiological studies, mainly issued in 2015, addressing health effects of low-level exposures to methylmercury and mercury.

The following findings were obtained in this fiscal year: (1) A number of papers addressing exposure assessment of methylmercury/mercury were published, probably because an international treaty to control anthropogenic mercury emissions (i.e., the Minamata Convention on Mercury) was adopted in October, 2013. (2) The principal health effect of methylmercury is thought to be neurotoxic, and a consistent association between cord-blood mercury concentration and deficits in Boston Naming Test and other tests of verbal performance was observed in Faroese cohorts at age 22 years. (3) In a model with concurrent exposures to methylmercury, polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides, an adverse relationship between low-level prenatal methylmercury exposure and childhood memory and learning, particularly visual memory, was demonstrated. (4) Many methods for the assessment of child neurodevelopment have been developed, and sex differences in such test scores are frequently reported. For this reason, it is important to consider sample size of the epidemiological study in order to detect the sex difference in study design. (5) In marine mammal tissues, strong positive correlations were observed between the levels of mercury and selenium, and selenium/mercury molar ratios decreased with the increase of mercury and tended to reach almost 1. This evidence may explain the role of selenium in the detoxification of methylmercury. (6) Toxic effects of methylmercury and mercury are of great concern to workers engaged in small-scale gold mining and smelting and to people residing in the surrounding area.

These data suggest that continuous collection and analysis of published papers are needed to clarify other adverse effects of methylmercury and mercury on human health and to find a key to resolve contamination problems in developing countries.

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



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

主任研究者 永沼 章（東北大学大学院薬学研究科教授）

## 研究要旨

我々は、発現抑制によりヒト培養細胞に強いメチル水銀耐性を与える蛋白質として転写因子 **HOXB13** を同定し平成 25 年度に報告した。そして平成 27 年度（昨年度）の本研究において、メチル水銀によって発現誘導され、かつ、その誘導が **HOXB13** のノックダウンによって抑制される遺伝子を探索し、**IL-6** ファミリーの一員であるオンコスタチン **M (OSM)** を見出した。そこで本年度は、**HOXB13** を介した **OSM** 誘導とメチル水銀毒性との関係について検討した。まず、メチル水銀耐性を示す **HOXB13** ノックダウン細胞に **OSM** を同時ノックダウンさせたところ、更なるメチル水銀耐性度の増加は認められず、メチル水銀による **OSM** の発現誘導に **HOXB13** が関与している可能性が示唆された。**HOXB13** は未処理細胞では **OSM** 遺伝子プロモーター領域にほとんど結合していなかったが、メチル水銀濃度に依存した結合レベルの増加が観察されたことから、**HOXB13** は転写因子として機能することによってメチル水銀による **OSM** の発現誘導に関与していると考えられる。**OSM** の細胞外放出量はメチル水銀によって増加したが、その増加は **HOXB13** のノックダウンによって認められなくなった。また、**OSM** 中和抗体を培地中に添加することによってメチル水銀毒性が軽減され、さらに、**OSM** ノックダウン細胞が示すメチル水銀耐性がリコンビナント **OSM** を培地に添加することによってほとんど認められなくなった。これらのことは、メチル水銀によって **HOXB13** を介して発現誘導された **OSM** が細胞外に放出された後にメチル水銀毒性増強に関与していることを示唆している。一方、昨年度の検討によって **HOXB13** が示すメチル水銀毒性増強作用に **TNF** 受容体が関与していることが示唆されていたが、本年度の検討の結果、**HEK293** 細胞に発現している 12 種の **TNF** 受容体の中で **TNFR3** のノックダウンが細胞に強いメチル水銀耐性を与えることが判明した。**TNFR3** ノックダウン細胞の **OSM** をノックダウンさせても更なるメチル水銀耐性度の増加は認められなかったことから **OSM** と **TNFR3** は同一経路を介してメチル水銀毒性発現に関与していると考えられる。試験管内実験によって、メチル水銀非存在下において **OSM** が **TNFR3** と結合し、その結合レベルがメチル水銀濃度に依存して上昇することも判明した。以上の結果から、メチル水銀は **HOXB13** を介して **OSM** の発現を誘導し、この **OSM** が細胞外に放出されて **TNFR3** に結合することによってメチル水銀毒性を増強させていると考えられる。

キーワード：メチル水銀、感受性決定遺伝子、Hoxb13、サイトカイン、オンコスタチン **M (OSM)**

## 研究協力者

黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科准教授）

外山喬士（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、メチル水銀毒性の発現に影響を与えるヒト遺伝子を明らかにするために、siRNA を利用した遺伝子検索法を開発した。本法はヒト由来 HEK293 細胞を用い、約 22,000 とされるヒト遺伝子の中で機能の判明している約 17,000 の遺伝子を siRNA によって 1 つずつ発現抑制したのちに、それら細胞（約 17,000 種）のメチル水銀に対する感受性を調べるものである。この方法を用いたスクリーニングによって、発現抑制によりヒト培養細胞に強いメチル水銀耐性を与える蛋白質として同定されたものの中に、構造中に DNA 結合ドメインとして機能するホメオボックスドメインを有する蛋白質である HOXB13 が含まれていた（平成 23 年度および 24 年度に報告）。

HOXB13 は細胞のメチル水銀感受性を高める作用を有すると考えられるが、その機能はほとんど知られていない。我々は平成 25 年度の本研究において HOXB13 とメチル水銀毒性との関係について検討し、メチル水銀が HOXB13 を介して細胞障害性のサイトカインである TNF- $\alpha$  の発現を誘導し、細胞外に放出される TNF- $\alpha$  量を顕著に上昇させることを明らかにした。TNF- $\alpha$  受容体の阻害剤である WP9QY で処理した細胞がメチル水銀耐性を示すこと、さらに、HOXB13 の発現抑制が細胞に与えるメチル水銀耐性が WP9QY 処理によって認められなくなることも判明した。しかし昨年度の検討において、TNF- $\alpha$  のノックダウンまたはリコンビナント TNF- $\alpha$  および TNF- $\alpha$  抗体の培地中への添加が HEK293 細胞のメチル水銀感受性を低下させないことが分かった。

HOXB13 が示すメチル水銀感受性増強作用が細胞の WP9QY 処理によって抑制されることから、少なくとも HEK293 細胞においては、メチル水銀によって HOXB13 を介して TNF- $\alpha$  以外の因子の細胞外放出が促進されることによってメチル水銀感受性が増強されていると考えられる。そこで昨年度、メチル水銀によって発現レベルが上昇し、かつ、HOXB13 ノックダウンによってその発現上昇が抑制される遺伝子を検索したところ OSM が同定された。OSM 遺伝子によってコードされるオンコスタチン M (OSM) は IL-6 ファミリーの一員として造血や免疫、代謝などにおいて重要な機能を果たしていることが知られている。

そこで本年度は、HOXB13 を介した OSM 誘導とメチル水銀毒性との関係について検討した。本研究で得られる成果は、メチル水銀毒性発現機構の解明に大きく貢献すると共に、メチル水銀暴露量と神経障害発現程度の関係における遺伝的要因の解明にも資することとなり、その社会的意義は大きいと考えられる。

## II 研究方法

### 1. RNA の単離

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

### 2. 逆転写反応 (PrimeScript RT reagent Kit)

RNA 500 ng に対し、 $5 \times \text{PrimeScript buffer}$  2  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript RT enzyme mix 0.5  $\mu\text{L}$ 、oligo dT primer 25 pmol、random 6-mer primer 50 pmol となるように反応液を調整し、 $37^\circ\text{C}$ 、15 分間逆転写反応を

行い、反応後、酵素を失活させるため、85°Cで5秒間処理した。

### 3. 定量 PCR

SYBR Premix Ex Taq を 5  $\mu$ L、cDNA を 1  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O を 3.6  $\mu$ L、10  $\mu$ M forward-、10  $\mu$ M reverse- primer を 0.2  $\mu$ L ずつ計 10  $\mu$ L に調整し、Thermal Cycler Dice REAL time system で定量 PCR を行った。mRNA 量は内標準対照遺伝子として一般的に発現量が一定であると考えられている GAPDH mRNA を用いて標準化した。

### 4. ノックダウンが細胞のメチル水銀に対する感受性

細胞を剥がし、 $2.5 \times 10^5$  cells/2.3 mL D' MEM (10% FBS)となるように細胞数を合わせ、そこに transfection complex (OptiMEM 94  $\mu$ L に同じ遺伝子をターゲットする二種の 4  $\mu$ M siRNA を 3  $\mu$ L ずつ添加し、12  $\mu$ L の HiPerFect transfection reagent を入れた後、15 分以上インキュベートした。) を添加し、2、3 回転倒混和させた後、10 分間室温でインキュベートした。その後、2.1 mL の D' MEM (10% FBS) を加え、96-well plate に  $5 \times 10^3$  / 90  $\mu$ L/well となるように添加し、48 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養後、2  $\mu$ M ~ 12  $\mu$ M MeHgCl を 10  $\mu$ L ずつ添加した。さらに 48 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した後、培地を取り除き、10% Alamar Blue を含む D'MEM/10% FBS を 75  $\mu$ L を加え約 2 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養後、蛍光プレートリーダーで蛍光測定した (excitation 544 nm, emission 590 nm)。

### 5. 各種阻害剤または各種抗体の添加が細胞のメチル水銀に対する感受性

96-well plate に  $1 \times 10^4$  cells/80  $\mu$ L D'MEM (10% FBS)となるように細胞数を播き、24 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養後、2  $\mu$ M ~ 12  $\mu$ M MeHgCl を 10  $\mu$ L と、各種阻害剤もしくは各種抗体希釈液をそれぞれ 10  $\mu$ L ずつ連続して添加した。さらに 48 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養した後、培地を取り除き、10% Alamar Blue を含む D'MEM/10% FBS を 75  $\mu$ L を加え約 2 時間、37°C、5% CO<sub>2</sub> で培養後、蛍光プレートリーダーで蛍光測定した (excitation 544 nm, emission 590 nm)。

### 6. GST-TNFR3-V5 融合蛋白質の発現と精製

リコンビナント発現ベクターである pEGX-3X に TNFR3 の C 末端に V5 タグを融合した TNFR3-V5 を挿入した DNA プラスミドをプロテアーゼ欠損の大腸菌 (BL-21 株) に導入し、得られたコロニーを 0.1 mM IPTG を含む LB 培地で 25°C、5 時間培養した。培養後、4°C で 4000 $\times$ g、10 分間遠心して集菌し、1% triton X-100 を含め PBS 溶液に懸濁した後、Branson Sonifier を用いて超音波処理を行った。その後、菌液を 4°C で 10000 $\times$ g、15 分間遠心し、得られた上清を glutathione sepharose 1ml を充填したカラムに通導させてグルタチオンに親和性のある GST 融合蛋白質をカラムに吸着させた。Glutathione sepharose を PBS で洗浄した後、GST-TNFR3-V5 融合蛋白質を 10 mM グルタチオンで溶出させた。

### 7. TNFR3-V5 と OSM との結合

6 で得られた GST-TNFR3-V5 融合蛋白質 (40 nmol) と市販のリコンビナント OSM (8 nmol) 混合した後に 0 ~ 0.1  $\mu$ M の塩化メチル水銀を添加して 37°C で 20 分間培養し、その反応液は TBS で total volume が 800  $\mu$ l になるように調整して、更に 10% BSA でブロッキング処理した anti-V5

beads を 30  $\mu$ l 添加し、一晩 4°C で回転培養した。その後、anti-V5 beads を TBS で 5 回洗浄し、2% SDS を含む sample buffer で anti-V5 beads に結合した蛋白質を溶出し、抗 V5 および抗 OSM 抗体を用いて immunoblotting を行った。

(倫理面への配慮)

培養細胞の遺伝子組み換え体を用いた研究は、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会の承認を得た研究の一環として実施したものであり、遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律を遵守し、P2 指定実験室で作業を行った。動物実験についても、東北大学動物実験専門委員会の承認を得て、「東北大学における動物実験等に関する規程」に従って実施した。

### III 研究結果と考察

#### (1) HOXB13 を介したメチル水銀毒性増強機構の解析

上述したように、OSM はメチル水銀によって発現誘導され、その誘導が HOXB13 のノックダウンによって抑制される。したがって、OSM はメチル水銀によって HOXB13 の作用を介して発現誘導されると予想される。そこでまず、HEK293 細胞を用いて、HOXB13 と OSM の同時ノックダウンがメチル水銀感受性に与える影響を検討した。その結果、メチル水銀耐性を示す HOXB13 ノックダウン細胞に OSM を同時ノックダウンさせても、更なるメチル水銀耐性度の増加は認められず、同細胞は HOXB13 単独ノックダウン細胞と同程度のメチル水銀感受性を示した。この結果は HOXB13 と OSM が同一経路を介してメチル水銀毒性発現に関与している可能性を示唆しており、メチル水銀による OSM の発現誘導に HOXB13 が関与しているという我々の予想を支持するものである。そこで次に、OSM 遺伝子のプロモーター領域への HOXB13 の結合を検討した。OSM 遺伝子の上流約 2,000 bps 領域(プロモーター領域)に相当するオリゴヌクレオチドを biotin 標識した probe を作成し、細胞核抽出物と反応させた後に streptavidin beads を用いて同 probe を回収して SDS-PAGE で分離した後に抗 HOXB13 抗体を用いて immunoblotting を行った。その結果、OSM 遺伝子プロモーター領域への HOXB13 の結合は未処理細胞ではほとんど認められなかったが、メチル水銀で細胞を処理したところメチル水銀濃度に依存した結合レベルの増加が観察された。このことから、HOXB13 は転写因子として機能することによってメチル水銀による OSM の発現誘導に関与していると考えられる。

OSM はマクロファージ、T 細胞および樹状細胞から産生された後に細胞外に放出されることが知られている。そこで、HEK293 細胞を培養した際の培地中 OSM 濃度を調べたところ、その濃度は細胞のメチル水銀処理によって上昇し、HOXB13 をノックダウンさせることによって認められなくなった。また、OSM 中和抗体を培地中に添加することによってメチル水銀毒性が軽減され、さらに、OSM ノックダウン細胞が示すメチル水銀耐性がリコンビナント OSM を培地に添加することによってほとんど認められなくなった。これらのことは、メチル水銀によって HOXB13 を介して発現誘導された OSM が細胞外に放出された後にメチル水銀毒性増強に関与していることを示唆している。

一方、昨年度の検討において、TNF- $\alpha$  と TNF 受容体との結合を阻害する環状ペプチドである WP9QY で細胞を処理することによってメチル水銀毒性が顕著に抑制され、本作用が HOXB13 ノックダウン細胞ではほとんど認められなくなることが判明している。このことは、HOXB13 によ

るメチル水銀毒性増強作用に TNF 受容体が関与している可能性を示唆している。ヒトには 22 種の TNF 受容体が存在している。そこで、HEK293 細胞における TNF 受容体の発現を定量 PCR 法で調べたところ、TNFR1a、TNFR3 (LTBR)、TNFR5 (CD40)、TNFR6 (FasR)、TNFR9 (CD137)、TNFR10b (DR5)、TNFR10c、TNFR10d、TNFR16 (NGFR)、TNFR19 (TROY)、TNFR21 (DR6) および TNFR25 の 12 種が発現していることが確認された。また、これらの TNF 受容体の発現をそれぞれノックダウンしてメチル水銀感受性を調べたところ、TNFR3、TNFR10b または TNFR10c のノックダウン細胞が対照細胞に比べて強いメチル水銀耐性を示した。これらのノックダウン細胞を WP9QY で処理したところ、TNFR10b および TNFR10c ノックダウン細胞では WP9QY によるメチル水銀毒性軽減作用が認められたのに対し、TNFR3 ノックダウン細胞ではその作用が認められなかった。また、メチル水銀耐性を示す HOXB13 ノックダウン細胞にさらに TNFRSF3 の発現をノックダウンさせても、メチル水銀耐性度の相加的な増加は認められず、HOXB13 単独ノックダウン細胞と同程度であった。以上のことから、HOXB13 が示すメチル水銀毒性増強作用には TNFR3 受容体を介したシグナル経路が関与していると考えられる。TNF 受容体には TNF- $\alpha$  以外にも数多くのサイトカインなどがリガンドとして結合することが知られている。そこで、メチル水銀毒性発現に関わることが明らかになった OSM と TNFR3 との関係を検討したところ、メチル水銀耐性を示す TNFR3 ノックダウン細胞の OSM をノックダウンしても、更なるメチル水銀耐性度の増加は認められず TNFR3 ノックダウン細胞と同程度のメチル水銀感受性を示した。このことから、OSM と TNFR3 は同一経路を介してメチル水銀毒性発現に関与していると考えられる。そこで次に、受容体として機能する TNFR3 細胞外ドメインに V5 タグを融合したリコンビナント TNFR3-V5 を作製してリコンビナント OSM との結合を試験管内で検討した。その結果、メチル水銀非存在下において OSM と TNFR3-V5 との結合が認められ、その結合レベルはメチル水銀濃度に依存して増加した。このことから、OSM は TNFR3 に結合して何らかのシグナルを細胞内に伝え、メチル水銀は OSM または TNFR3 に直接作用して両者間の結合を促進させると考えられる。

以上の結果から、メチル水銀は HOXB13 を介して OSM の発現を誘導し、この OSM が細胞外に放出されて TNFR3 に結合することによってメチル水銀毒性を増強させていると考えられる。

#### (2) メチル水銀がマウス組織中の OSM 発現レベルに与える影響

メチル水銀による OSM の発現誘導はマウス神経幹細胞である C17.2 細胞においても認められた。そこで、雄の C57BL/6 マウスに塩化メチル水銀 (25 mg/ kg) を皮下投与して、1、3、5、7 日後に大脳、小脳、肝臓および腎臓を摘出し、OSM 遺伝子の発現変動を定量 PCR により解析した。その結果、大脳および小脳ではメチル水銀投与 5 日後から OSM 遺伝子発現レベルの経時的な増加が認められた。また、腎臓ではメチル水銀投与 5 日後に増加が認められたがその後は低下した。なお、肝臓での OSM 遺伝子発現レベルは検出限界以下であった。この時の各組織中の水銀濃度を測定したところ、腎臓中の水銀蓄積が最も高く、次に肝臓>小脳>大脳の順であった。これらの結果から、メチル水銀は脳以外の組織においても OSM 遺伝子の発現を上昇させるが、その程度は組織によって異なり、必ずしも水銀蓄積濃度に依存したものではないと考えられる。

#### IV 結論

メチル水銀が HOXB13 を介して OSM の発現を誘導し、この OSM が細胞外に放出され、細胞膜に存在する TNF 受容体の 1 種である TNFR3 に結合することによってメチル水銀毒性を増強さ

せている可能性が示唆された。また、HOXB13 がメチル水銀に依存して OSM 遺伝子のプロモーター領域に結合することも判明し、HOXB13 が有する転写促進作用のメチル水銀による活性化機構が存在することが明らかとなった。

## V 次年度以降の計画

メチル水銀非存在下で OSM が TNFR3 と結合し、その結合レベルがメチル水銀濃度に依存して上昇することが試験管内実験により明らかとなった。これまでにメチル水銀が蛋白質間の結合を解離させるという事例は複数報告されているが、結合を促進させるという例はない。したがって、本知見は蛋白質結合に関わる細胞内機能とメチル水銀との関係を考えるうえでも重要と考えられる。そこで、OSM と TNFR3 の結合とそれに与えるメチル水銀の影響を細胞レベルで確認すると共に、メチル水銀による両者の結合促進機構を検討する。また、HOXB13 は未処理細胞では OSM 遺伝子プロモーター領域にほとんど結合しておらず、メチル水銀処理時にはその濃度に依存して結合レベルが増加することが判明した。そこで、OSM 遺伝子プロモーター領域中でメチル水銀による発現誘導に関わる部位を特定すると共に、そこへの結合に必要な HOXB13 ドメインを決定する。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Toyama T Hwang GW Naganuma A. Citrulline enhances methylmercury toxicity in HEK293 and C17.2 cells, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015; 2: 229-231.
- 2) Toyama T Hwang GW Naganuma A. Metabolomic analysis of low molecular weight substances released into medium from HEK293 cells treated with methylmercury, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015; 2: 227-228.
- 3) Toyama T Murakami S Kuge S Hwang GW Naganuma A. Methylmercury induces release of a cytotoxic factor from HEK293 cells into medium, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015; 2: 223-226.
- 4) Lee JY Ishida Y Kuge S Naganuma A Hwang GW. Identification of substrates of F-box protein involved in methylmercury toxicity in yeast cells, *FEBS Lett.* 2015; 589: 2720-2725.
- 5) Iwai-Shimada Yamashita M Kurokawa N Nakai K Ishida M Naganuma A Satoh H. Effect of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral development in male mice: comparison between methylmercury in fish and methylmercury chloride added to diets, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2015; 2: 67-78.
- 6) Du K Takahashi T Iwai-Shimada M Miura N Naganuma A Hwang GW. CDC23 knockdown reinforces methylmercury sensitivity in HEK293 cells, *Fundam. Toxicol. Sci.* 2014; 1: 161-164.
- 7) Hwang GW Murai Y Takahashi T Naganuma A. The protein transportation pathway from Golgi to vacuoles via endosomes plays a role in enhancement of methylmercury toxicity, *Scientific Reports* 2014; 4: 5888.
- 8) Watanabe J Nakamachi T Ohtaki H Naganuma A Shioda S Nakajo S. Low dose of methylmercury (MeHg) exposure induces caspase mediated-apoptosis in cultured neural progenitor cells, *J Toxicol Sci* 2013; 38: 931-935.
- 9) Takahashi T Kim MS Saito T Lee JY Hwang GW Naganuma A. Brain-specific induction of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury, *J Toxicol Sci* 2013; 38:

963-965.

- 10) Kim MS Takahashi T Lee JY Hwang GW Naganuma A. Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury induces brain-specific expression of CCL3 and CCL4, *J Toxicol Sci* 2013; 38: 925-929.
- 11) Hwang GW Mastuyama F Takahashi T Lee JY Naganuma A. Deletion of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc2 confers resistance to methylmercury in budding yeast by promoting Whi2 degradation, *J Toxicol Sci* 2013; 38: 301-303.
- 12) Hwang GW Lee JY Kim MS Sato M Takahashi T Naganuma A. Changes in the levels of low molecular weight metabolites in the mouse cerebellum following treatment with methylmercury, *J Toxicol Sci* 2013; 38: 703-706.
- 13) Lee JY Hwang GW Kim MS Takahashi T Naganuma A. Methylmercury induces a brain-specific increase in chemokine CCL4 expression in mice, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1279-1282.
- 14) Kim MS Takahashi T Lee JY Hwang GW Naganuma A. Methylmercury induces CCL2 expression through activation of NF-kappaB in human 1321N1 astrocytes, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1275-1278.
- 15) Hwang GW Ogiwara Y Takahashi T Naganuma A. Ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 mediates methylmercury resistance in *Saccharomyces cerevisiae* by increasing Whi2 degradation, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1283-1286.
- 16) Hwang GW Kimura Y Takahashi T Lee JY Naganuma A. Identification of deubiquitinating enzymes involved in methylmercury toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Toxicol Sci* 2012; 37: 1287-1290.
- 17) Hwang GW Ryoke K Lee JY Takahashi T Naganuma A. siRNA-mediated silencing of the gene for heat shock transcription factor 1 causes hypersensitivity to methylmercury in HEK293 cells, *J Toxicol Sci* 2011; 36: 851-853.
- 18) 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.

# **Molecular mechanism for toxicity of methylmercury and its biological protection**

Akira Naganuma, Gi-Wook Hwang and Takashi Toyama

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

*Keywords:* Methylmercury; Sensitivity; HOXB13; Oncostatin M

Abstract

We have identified a transcription factor HOXB13 as a protein which increased sensitivity of human cultured cells to methylmercury. Thus, we searched the gene that is induced by methylmercury and whose induction is inhibited by a knockdown of HOXB13. By the screening, we identified oncostatin M (OSM) which is a member of the IL-6 family. Knockdown of OSM conferred resistance to methylmercury, but HOXB13/ OSM double-knockdown cells showed neither an additive nor synergistic increase in methylmercury resistance. This result suggests that HOXB13 is involved in the induction of expression of OSM. Amount of OSM released from cells to the medium was increased by methylmercury and the increase was inhibited by a knockdown of HOXB13. In addition, the methylmercury toxicity was reduced by addition of OSM antibody into the cell culture medium. These results suggest that OSM is released into the medium after induction by methylmercury through HOXB13 and then participates in the reinforcement of methylmercury toxicity.

VI 水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露指標の開発  
に関する研究



# 水俣病発生地域等における メチル水銀曝露指標の開発に関する研究

主任研究者 上野眞也(熊本大学・政策創造研究教育センター・教授)

## 研究要旨

本研究は、不知火海（八代海）の漁業と魚介類の行商流通についてフィールド調査を行い、メチル水銀曝露リスクを解明する研究である。水俣湾で汚染された魚介類がどのような経路で、どの程度の量が遠方まで運ばれたのかについては、これまでの研究でも十分な解明がなされていなかった。聞き取り調査や史資料の探索を行い、統計や行政資料でも明確にできない昭和30年代から40年代にかけての不知火海の魚介類の流通と摂食状況について新たな知見を得るとともに、当時の曝露リスクについて解明を試みた。2015年7月から2016年2月まで26人にインタビューし、当時の食事内容や一週間の魚の摂食頻度や量、魚種、購買方法、及び地区を訪れた行商人数やその頻度、運搬量などについて調査した。メチル水銀曝露リスクは、行商で運ばれた魚の汚染度や、摂食量と頻度などの因子から推計が可能となる。現在までの調査結果からは、行商が売り歩いた中山間地域での魚食慣習では、健康を害するほどのメチル水銀曝露リスクに晒されたとは考えられない。今後さらに調査サンプルを増やし、さまざまな行商ルート of 解明と曝露リスク因子の分析をすすめることで、この推計を検証することができるようになる。

キーワード: メチル水銀曝露リスク、行商、魚介類の摂食、インタビュー調査

## 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

蜂谷 紀之（環境省国立水俣病総合研究センター・環境・疫学研究部環境保健研究室・室長）

平田 郁夫（熊本県水産研究センター・参事）

藤木 素士（筑波大学・名誉教授）

二塚 信（熊本大学・名誉教授）

山中 進（熊本学園大学・社会福祉学部・特任教授）

## I 研究目的

本研究の目的は、水俣病発生地域及びその周辺地域におけるメチル水銀曝露状況について、地域別・年代別に、①不知火海の魚介類汚染状況、②魚介類の捕獲状況、③魚介類の流通状況、移入路の探索、④住民の魚介類の摂食状況に関する知見を収集する。そして疫学や社会科学、水産学等の様々な手法を用いて多角的な観点からそれらの知見を統合し、地域別・年代別のメチル水銀曝露状況の全体像の把握や個人の曝露量に関連する因子（曝露指標）の探索を行うことである。

環境行政の課題との関連性及び期待される効果：特に水俣病多発地域の周辺地域における詳細かつ客観的な曝露量に関連性の高い因子については、これまで十分な研究が行われていない。周辺地域も含めたメチル水銀曝露指標の開発は、水俣病問題に関する実態解明に役立つ知見を得ることが期待される。

## II 研究方法

1. 不知火海の魚介類の流通状況や移入路（輸送方法）、行商・販売店、魚種、世帯ごとの摂食傾向、摂食頻度などに関する史資料の探索と、各地域の客観的な事実に関する意見が聞ける者へのインタビュー調査を行う。
2. 海水中のメチル水銀の汚染の拡散や、過去の毛髪水銀量調査などの先行研究について整理し、今回の社会調査で得られた知見を加えてメチル水銀曝露のリスクモデルを検討する。
3. 漁業関係者への聞き取り、漁業統計資料や過去の文献の探索を行い、漁業権、慣行的な縄張り（漁場）、漁港（漁協）ごとの水揚げ状況など魚介類の捕獲状況に関する知見を収集し、整理する。
4. 疫学的なフィールド調査による魚介類の摂食状況と曝露リスクの調査と分析を行う（魚種、頻度、世帯ごとのばらつきと傾向、世帯内や家族内でのばらつきと傾向）。

### (倫理面への配慮)

熊本大学生命倫理憲章、及び日本疫学会「疫学研究を実施するにあたっての倫理指針」、日本学術会議「科学者の行動規範（暫定版）」（平成18年）に基づき研究を実施した。

インタビュー等の社会調査内容や研究のために提供を受けたデータの取り扱いは、個人情報保護法の趣旨に則り個人情報の管理を徹底して行い、収集されたデータについては全て個人が特定できる情報を削除した形で利用・保管しており、倫理面に問題はない。

## III 研究結果

初年度の研究として、主として(1)魚介類の捕獲、流通と摂食に関するフィールド調査、(2)八代海南部の魚類中総水銀濃度の推移の研究に取り組んだ。

水俣病発生地域およびその周辺地域から山間地、島嶼部をモデル地区として選定し、不知火海の魚介類汚染状況と魚介類の捕獲状況、魚介類の流通状況、移入路の探索<sup>8)</sup>、住民の魚介類の摂食状況等<sup>2) 4) 6) 7)</sup>について聞き取り調査を行った。フィールドワークで得られた知見に公表された統計や文献等の探索から新たに分かってきた知見を統合し、メチル水銀曝露状況や関連性の高いと考えられる因子（曝露指標）について分析を行った。

### (A) 魚介類の捕獲、流通と摂食に関するフィールド調査について

#### 1 調査地域・年代区分

##### ① 地域区分

- 1) 芦北町（山間部（大岩地区）、海浜部（計石地区））
- 2) 水俣市山間部（旧山野線沿線）
- 3) 天草地区（上天草市姫戸町、龍ヶ岳町、天草市御所浦町、天草市河浦町、天草市栖本町、天草市倉岳町）
- 4) 伊佐市（大口、山野地区）

##### ② 年代区分

- 1) 昭和 28 年～34 年

- 2) 昭和 35 年～43 年
- 3) 昭和 44 年以降

## 2 フィールドワーク研究の方法論とインタビュー調査のあらまし

フィールドワークに基づいた本研究では、直線的な因果関係の仮説検証だけではなく、社会調査を行いつつリサーチクエスチョンの設定と再構築とを繰り返して、真実に迫るリサーチ・トライアングルの方法をとった<sup>3)</sup> (図 1)。

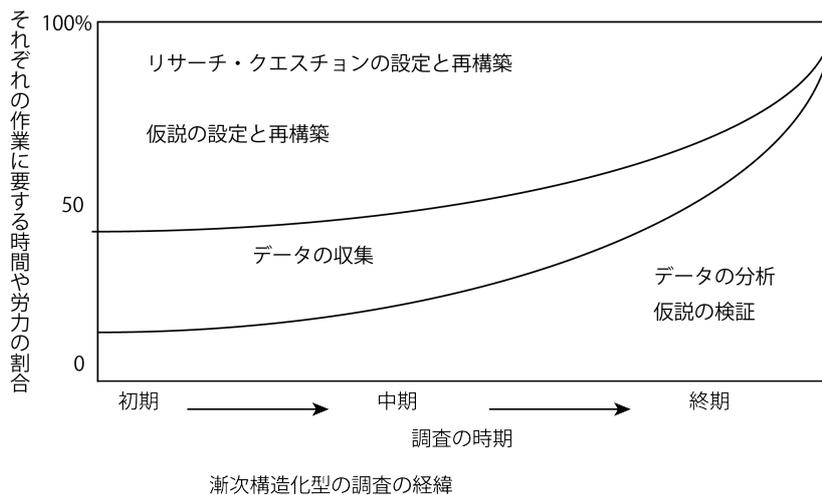


図 1 リサーチ・トライアングルの概念図

出典：佐藤郁哉『社会調査の考え方 上』東京大学出版会、2015 年。

問題発生から 60 年近くが経過しており、魚の流通や摂食については統計データ等も限られていることから、当時の経験を有し記憶している者へのインタビュー調査は残された貴重な可能性の一つである。しかしながらフィールド調査には香月<sup>23)</sup>が言うように、次のような記憶<sup>1</sup>と語りの限界もある。

- ① 人は今とこれからを考えるために過去を語り位置づける。
- ② 人は自分に起こったすべてのことをありのままに記憶できるものではない。自分に都合の良い形に再生して伝えられる。

これらの不確定さを多分に含む表現をどう受け止め体系的に探るかには、「聞き書き」による個々の経験、知識、記憶を共同体に刻まれた様々な記憶の問題として捉え、真偽を見極めつつ、時代の価値観や生きる姿勢、習慣などを抽出する実証的な姿勢が重要となる。

インタビューに際して以下の作業仮説を設定し、それらの仮説検証を進めた。社会調査として行ったインタビューの概要は表 1 のとおりである。インタビュー相手については、地域社会の状況について幅広く客観的な事実に関する意見が聞ける人物を選定して行った。結果的には、インタビュー者には特措法の救済を受けている者も多く含まれている。

- 仮説 1 内陸部へ行商で運ばれた魚の量は大量であり、曝露リスクが高かった。
- 仮説 2 昭和 30～40 年代前半、内陸部で日常的に魚を食べる機会が多かった。

表1 インタビュー調査

調査地域	インタビュー対象者
芦北町	大岩地区の農業・林業・商工業者、計石地区の漁師、行政職員
津奈木町	行政職員
上天草市	姫戸町牟田の漁師、姫浦の漁師、龍ヶ岳町の住民
天草市	河浦町、倉岳町、栖本町の漁師、御所浦町の団体職員
水俣市	鮮魚店、食堂、山間部の商工業者
伊佐市	伊佐市大口の農家、住民、山野地区の住民

(注) 平成 27 年 7 月～平成 28 年 2 月までの調査先。延べ 26 人。

### 3 不知火海沿岸地域の漁獲量とメチル水銀曝露リスク

#### (1) 漁港別年度別漁獲量

水産庁の水産統計にもとづき不知火海域魚種別漁獲量の推移を示したものが表 2 である<sup>19) 20)</sup>。昭和 38 (1963) 年から 47 (1972) 年の期間は水産統計の集計方法が変更されており<sup>2)</sup>、不知火海での漁獲量の変遷について一貫したデータを得ることはできない。また水俣病の発生、過剰な漁獲などにより、魚種別の漁獲量には年度ごとに大きな変動が見られる。不知火海では多様な魚介類が捕られているが、とりわけカタクチイワシ、タチウオ、ボラ、クロダイ、アジ、イカ・タコ・エビなどの漁獲量が多い。

昭和 33 (1958) 年当時、熊本県水産試験場が各漁港別漁協で漁師に直接聞き取りをして調査したデータでは、図 2 上に見られるように漁獲量は御所浦がその他の漁港を抜いて突出した漁獲となっていたことがわかる。各漁港別に水揚げされた魚種ごとの量は図 2 下のようにになっており、漁港ごとに漁法や漁区の違いがあることが窺える。しかし芦北、水俣方面の漁港についてはこの間の統計データの記録がない。

この時代、水俣・芦北地域では奇病が広がったため、昭和 32 (1957) 年以降、水俣湾内、湾外でしばしば漁獲自粛、摂食自粛が繰り返されていた。また航路浚渫工事や公害防止期間などもあり、水俣湾内外で操業ができた期間については図 3 のように整理される。当時、鮮魚商小売組合は水俣湾の魚の不買決議を行い、消費者に安心感を与えようとしたが、魚の値は低迷し多くの鮮魚商が廃業に追い込まれた。水俣病の広がりにより漁業は大きなダメージを受け、不知火海沿岸の漁民などがチッソに漁業補償を求めて漁民総決起大会を行い抗議した。昭和 48 年不知火海沿岸 30 漁協は知事の斡旋でチッソと漁業補償交渉を行い、天草島を含む不知火海沿岸の各漁協へ補償金 22 億円及び漁業振興のための協力金 8 千万円を支払った。出水 3 漁協補償もチッソが 7 億 2 千万払うことで補償解決した。

魚は生息海域、深度、食性(草食・肉食)、寿命などにより、メチル水銀への曝露や生物濃縮への関わりは異なる。魚類に関する経年的な曝露リスクの変化については、さらに今後、先行研究や調査データを整理し検討していきたいと考える。

不知火海では、永きにわたってカタクチイワシ漁は大きな産業であった。天草市河浦町や長島(東町)、獅子島では、不知火海沿岸を漁場として大規模なカタクチイワシ漁が行なわれていた。捕れたカタクチイワシは、食用ではいりこに加工したり、また土佐のカツオー本釣り漁船のエサとして取引された。エサとしてのカタクチイワシは生きてまま巨大な罎籠に入れて東町の仲

買人に売却され、カツオ漁船が引き取りに来ていた。現在も天草市河浦町の水産会社はカタクチイワシ漁を行い、いりことして乾燥させ関西の食品加工会社へだしの素として販売するとともに、カツオ漁船へのエサ販売も継続して行っている。

表 2 不知火海域魚種別漁獲量の推移

単位：t

(昭和)年	総漁獲量(t)	カタクチイワシ	クロダイ	アジ	ボラ	タチウオ	魚類小計	貝類	タコ	水産動物小計
27	6,016.5	1,159.5	43.1	1,429.1	39.0	13.1	5,720.2	3.4	100.5	580.5
28	5,516.3	1,710.0	96.4	501.0	203.6	61.5	3,823.9	836.3	37.1	823.9
29	4,020.4				350.3	78.0	1,483.5	531.8	44.6	693.8
30	5,730.0	2,243.6			275.0	137.5	4,223.0	716.3		699.1
31	4,998.0	1,558.5		44.6	211.1	265.1	3,187.5	719.6	49.5	648.0
32	4,101.8	889.5	78.4	19.5	144.4	235.5	2,565.0	715.9	48.8	624.0
33	4,383.1	960.1	126.3	148.4	167.1	467.9	3,482.5	687.7	72.9	608.4
34	3,912.8	427.2	13.0	8.8	137.9	246.9	2,031.6	1,256.3	54.6	489.3
35	4,022.8	164.2	176.9	10.7	52.0	267.1	1,814.2	903.5	50.3	592.8
36	4,342.4	295.6	223.8	29.2	175.3	378.6	2,264.4	569.7	126.6	786.4
37		491.6	211.7	48.0	426.3	395.7	3,473.1	696.4	127.9	1,052.3
38~47	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
48	7,993.0	2,152.0	184.0	56.0	432.0	648.0	5,393.0	132.0	126.0	1,135.0
49	5,310.0	1,293.0	184.0	53.0	301.0	533.0	3,796.0	287.0	42.0	1,097.0
50	5,813.0	764.0	202.0	46.0	370.0	335.0	3,138.0	1,709.0	74.0	948.0
51	5,874.0	904.0	162.0	32.0	303.0	316.0	3,139.0	1,568.0	141.0	1,091.0
52	5,308.0	232.0	167.0	48.0	385.0	362.0	2,578.0	1,275.0	79.0	1,200.0

出典：熊本県「熊本県の水産」(各年度)。

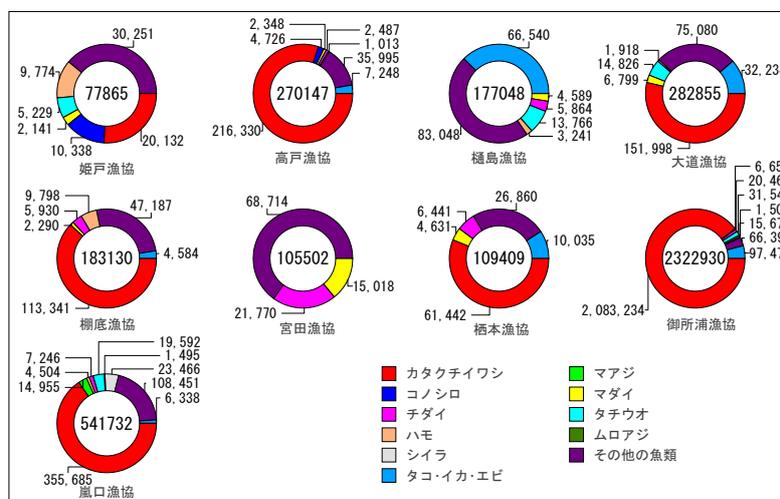
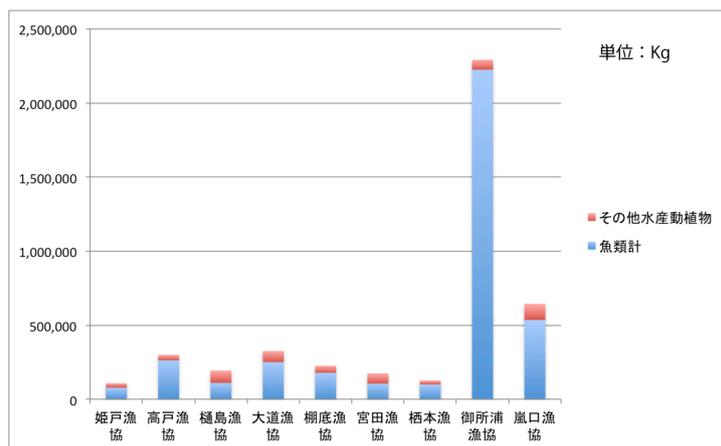


図 2 不知火海の各漁港の漁獲状況

(単位：キログラム)

(注) 昭和 33 年に熊本県水産試験所が各漁港の漁師に直接聞き取りをして調べた魚種と漁獲量。上図は漁港別漁獲量、下図は漁港別魚種別漁獲量を示す。水俣市、葦北郡についてはデータなし。出典：「不知火海沿岸漁村の漁業実態調査」『不知火海の概要と水俣調査中間報告』熊本水産試験場、1959 年のデータを再集計。

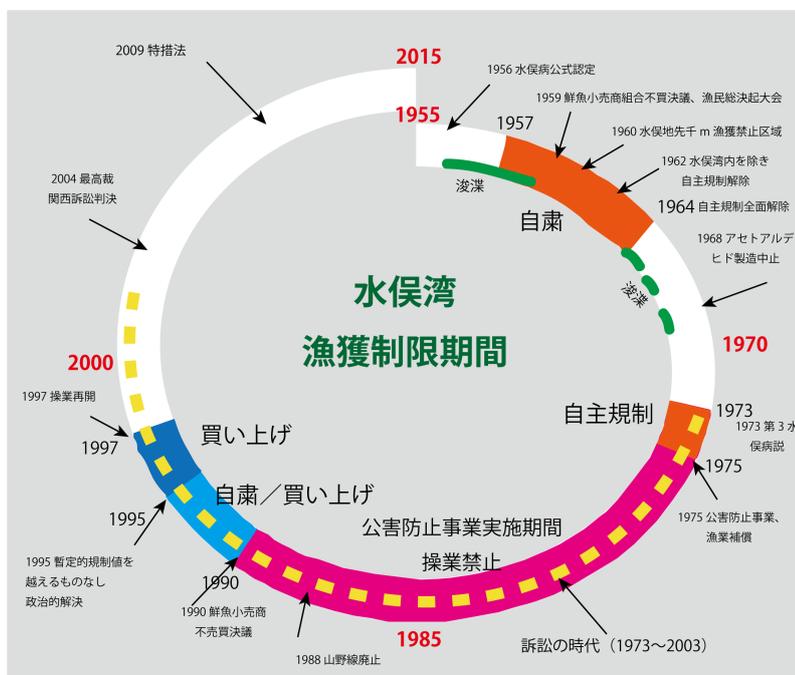


図 3 水俣湾の漁獲制限期間

(注) 白地の部分は水俣湾内の漁獲操業に制限がなかった期間を示す。

緑帯は航路浚渫工事により漁業補償がなされ操業ができなかった期間を示す。

## (2)行商で扱われる魚介類

漁師は商品になる魚は全て売り、自家では商品にならない雑魚を食べる。何が商品となる魚種なのかについてはマーケットとの関係性や地域性が見られる。行商については、地域毎に魚行商の呼称と商品は異なっていた。芦北町計石地区では漁師の妻が、商品にならないあらゆる雑魚を干物にし、行商で売り歩いていた。水俣市や旧大口市では「目籠いねどん」<sup>11)</sup>と呼び、鮮魚店、仲買人等から仕入れた鮮魚や干物を固定客に売りに行っていた。天草地域では「目籠いね」と呼び、仲買人が各漁港におろしていく魚を近隣集落へ売りに行った。基本的に行商は固定の顧客に対して売りにいくものであり、飛び込みでの商いはしない。地区ごとに行商人の得意地区ができている。

行商人の運搬手段は、天秤棒を担いで歩いて移動する形態が一般的である。列車などで魚介類を運ぶ場合はガンガン（アルミ缶）が利用された。行商では保冷が困難であり、魚の上に少し氷を載せて運搬するが、商品は塩物、干物が多かった。移動手段は徒歩が基本であるが、地域によっては自動車やトラック便への同乗など交通を利用したものも見られる。しかし魚介類販売ではバス利用は臭いのため少ない。街中ではリヤカーや自転車も利用された。

昭和 40 年代までは各種の商品流通では行商人が活躍したが、道路整備が進む昭和 50 年代になると車社会となり、次第に行商は減少した。誤解してならないことは、行商人は、各種食料品、

果物、衣類などさまざまな商品を地域へ流通させる役割を果たしていたことである。水俣からの行商人も、魚以外にも馴染みの客に頼まれればミカンやバナナ、練り物製品などいろいろなものを運んで商いをしていた。

### (3)行商ルート

芦北町大岩ルート、芦北町計石ルート、津奈木町ルート、水俣市から山野線沿いの渡瀬、大口ルート、及び天草の姫戸、龍ヶ岳、御所浦、倉岳、栖本の各漁港について調査した。その結果明らかとなった行商ルートは、図4の地図のとおりである。このようなルートは、さらに各地域で調査を進めると、多様なものが判明してくると思われる。

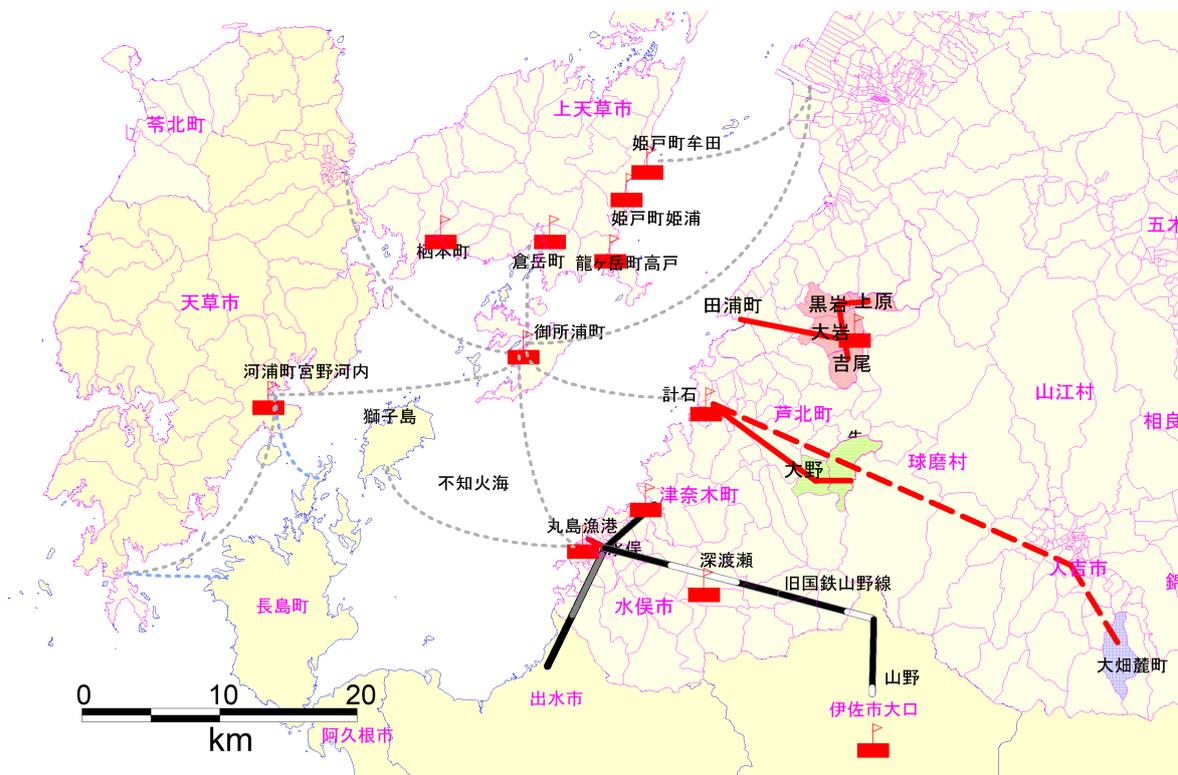


図4 行商調査箇所と分析した行商ルート

(注) 赤旗印はインタビュー調査箇所。

#### a) 芦北町大岩ルート<sup>9)10)</sup>

3~4人の行商が日替わりで大岩、黒岩、吉尾、上原<sup>うわばる</sup>地域を行商。魚は田浦から入手。行商人1人が徒歩により天秤棒で運ぶ量は10貫(37.5キロ)(少々氷を含む)であり、顧客は大岩、黒岩、吉尾、上原地域の住民であった。肥薩線<sup>かいじ</sup>を使って海路から上原へ回ってくる八代市日奈久の行商人(通称日奈久さんと呼ばれる)は、上原から山を降りて黒岩、大岩方面へ売りに来ることはなかった。魚の摂食頻度は、少数の比較的裕福な所帯では週に3回程度、多くの貧しい所帯では週に1回程度であった。

#### b) 芦北町計石から大野、告、球磨村渡方面への行商ルート

昭和30年~50年にかけて計石では、漁家の女性が天秤棒を担いで早朝4時頃計石の自宅を出て大野、かんそめ(告)方面の顧客を徒歩で売って回っていた。魚が売れないときは球磨川方面

まで足を伸ばすこともあった。帰宅は夕方5時頃である。

従姉妹は球磨村渡まで歩いて行っていた。魚の代金は、現金と物々交換が半々であり、行きは魚を担いで、帰りは米を担いでという商いであった。行商に運ぶ魚の量は、氷を籠に少々入れて10貫目である。昭和50年ごろになると芦北町の内陸部にもバスが通うようになって、行商を止めるまでの数年間はバスで行商した。しかし道路交通の発達とともに行商は廃れていった。

#### c) 芦北町計石から人吉市大畑への行商ルート

計石の漁家の女性たちが泊まりがけで人吉市方面へ行商に出かけた（芦北町からは、いりこや干しエビなどを扱う水産会社のトラックに便乗して人吉市へ移動）。最初は自家で作った干物を持っていき、商品が売り切れると水産会社に注文してトラック便で送らせ、それを売って回った。行商の商品は、チリメンジャコ、イリコ、生のものであった。人吉では知人宅に2~3泊、長いときは2~3月泊まって売り歩くこともあったという。

#### d) 津奈木から山野線を使った行商ルート

アルミ缶（ガンガン）に入れて、旧国鉄山野線で久木野、大口方面へ行商にいった。列車を利用する行商人は、水俣からの魚行商人だけではなく、鹿児島県出水市、阿久根などからの魚行商人もいた。扱った魚は、①いりこ、②雑魚の干物、③鮮魚である。

#### e) 山野線大口、山野方面の行商ルート

行商人が、ガンガンに入れた鮮魚を、水俣から薩摩大口駅までは山野線でやって来て、駅から山野の集落までは担いで売り歩いていた。馴染み客の家で行商人が商いをしていると、近隣住民も集まってくることもあった。当時は、無塩の魚は大口など内陸部では珍しかった。魚の行商には、出水方面からも来ていた。摂食した魚種はマイワシ、サバ、イカ、タコ類であった。

鹿児島県大口保健所は、昭和33年8月に、水俣湾内で捕れた魚介類はよく注意せよと各家庭へ警告を出している。記事によると、当時大口保健所認可済みの担ぎ屋は21名となっている<sup>3</sup>。山野線は昭和63年に廃線となったあとも山野線代替バスが走ったが、バスで魚を運ぶことは困難であり担ぎ屋も廃業していった。

#### (4)行商人が運んだ魚の量と摂食による曝露リスクの推計（昭和30年代）

調査で明らかになった知見を用いて芦北町大岩地区におけるメチル水銀曝露リスクを推計してみよう。魚介類及び海域のメチル水銀濃度については、定期的にモニタリングされてきた。次節(B)で論じるように、藤木などの先行研究では、1964年（昭和39年）以降水俣病を発症するだけの汚染魚は不知火海では確認されていない。

しかし、リスクを最大化して仮に発症させる濃度(4ppm)に汚染された魚を芦北町大岩地区住民が摂食したと仮定して、住民の魚介類による1週間の水銀摂取量を計算すると、

$$\text{マアジ 1匹 } 100 \text{ g} \times \text{水銀量 } 4 \text{ mg/kg} \div 1000 \times 3 \text{ 回/週} = 1.2 \text{ mg}$$

魚介中総水銀濃度をメチル水銀に換算すると、

$$1.2 \text{ mg} \times 75/100 = 0.9 \text{ mg}$$

この推計値は、水俣病を発症する曝露リスクには満たないものである。

行商により毎週大岩、黒岩、吉尾、上原地区（これらの地区の世帯数、人口は表3のとおり）に運ばれた魚の総量は、

$$30 \text{ kg} \times 4 \text{ 人} \times 2 \text{ 回/週} = 240 \text{ kg} \quad \text{と推計される。}$$

表3 行商人が回った地区の昭和47年及び57年の世帯数、人口

行政区	昭和47 世帯数	人口	昭和57年 世帯数	人口
黒岩	51	291	51	225
大岩2	44	207	43	180
岩屋川内	83	375	77	300
大岩1	47	201	46	151
上原	29	153	26	124
吉尾	83	202	45	158
計	337	1,429	288	1,138

出典：芦北町「芦北町勢要覧・資料編」、昭和47年、57年。

#### 4 昭和30～40年代前半の農山魚村の暮らしと魚の摂食頻度に関する聞き取り<sup>21)</sup>

##### (1)農山村の食事

- ①麦飯、カライモが主食。漬け物、らっきよ、梅干しで、特に献立といったことを考えるような生活ではなかった。戦時中からいつもひもじい思いをし、山野で食べられるものを探して食べた。
- ②米は食料管理法で供出。米の産地では、規格外の米のみ留保しておき、物々交換に用いた。
- ③魚は裕福な家で2～3日に一回、貧しい家で週に1回程度、行商から買った。イワシは骨まで焼いて食べた。ある母は子や夫に魚の身を食べさせ、自分はいつも頭を食べていたので、子どもは母は魚の頭が好きだと思って育ったと語るように当時の農村の生活は非常に儉しい生活であった。米との物々交換も裕福な百姓でなければ出来ないことであった。
- ④魚の代金支払いは、現金と米の物物交換が半々。(盆暮れ払いがよく行われた)
- ⑤流通する品物もあまりない時代であった。
- ⑥魚は干物、塩物が中心であった。無塩の魚はあまり流通していない(冷蔵庫がない、保冷運搬ができない)。
- ⑦いりこは流通していた。貧しい家庭でも買ってあった。
- ⑧農山村に回ってくる行商は漁師の家の女性が従事している場合が多かった。
- ⑨漁師は小魚や雑魚を日干しに加工して販売した。農山村では非常に辛めの味付けが好まれたので、そのような干物を作った。
- ⑩内陸部の地域では、よほどのことがないと魚は食べる習慣がなかった。
- ⑪ボラなど浮き袋のある魚は年一回のお祭りの時しか食べられなかった。祭時に練り物も部落で注文して入手していたが、貧乏で注文できない家庭もあった。

##### (2)漁村の食事

- ①カライモ、魚でまず腹を膨らませてから、麦飯を食した。
- ②いい魚、エビ、カニ類は商品として出すので自宅では食べない。
- ③魚は雑魚や傷ついて商品価値のないものや、漁の網に混入した魚を食べた。
- ④青ものの魚は不知火海では捕れない。マイワシは牛深沖か島原、阿久根でしかとれない。
- ⑤魚は近所から貰うもので、買うものではなかった。

⑥網子は毎朝網元の家に桶を持ってカタクチイワシを貰いに行った。それを家族の面々が自分で刺身にして、朝食の足しにしていた。

### (B) 八代海南部の魚類中総水銀濃度の推移

水俣市に存在した化学工場を発生源とする水銀化合物による魚介類汚染が、いつ頃どのような地域にどのような濃度で拡散したかについて、喜田村ら<sup>12)</sup>、入鹿山ら<sup>13)</sup>、西海区水産研究所<sup>14)</sup>、藤木ら<sup>15)</sup>、西海区水産研究所ら<sup>16)</sup>の八代海南部魚介類総水銀分析調査結果を用いて、魚類中の総水銀量の年次変動および汚染源からの距離による変動(距離減衰)の検討を試みた。

上述の5文献の調査結果によると、1960年頃は水俣湾および水俣市八幡地先周辺海域では24ppmの総水銀を含む魚類が存在していたが、1963年には調査された検体の平均値は5ppm程度にまで急速に減少し、1968年に工場が水銀触媒を使用する装置の稼働を停止した以後は水俣湾内魚介類の総水銀濃度の平均値は1ppm以下となり、1974年以降は暫定基準値0.4ppm(参考資料1)以下となっている(以下図表番号は本(B)節の、表1、図1、図2)。

表1 八代海南部の魚類中総水銀濃度(ppm)の推移

地点	1960年 <sup>1)</sup>			1961年 <sup>2)</sup>			1963年 <sup>2)</sup>			1964年 <sup>3)</sup>			1971年 <sup>4)</sup>			1974年 <sup>5)</sup>		
	魚種数	検体数	平均値	魚種数	検体数	平均値	魚種数	検体数	平均値	魚種数	検体数	平均値	魚種数	検体数	平均値	魚種数	検体数	平均値
水俣湾内側 KM30	3	4	6.3	4	4	12.75	6	6	2.85	18	69	0.82	7	10	0.565	22	214	0.253
水俣湾外側 KM24	5	5	15.8										5	15	0.25	10	111	0.166
津奈木 KM23	2	4	4.4							8	11	0.59				9	130	0.129
湯の浦	1	4	0.2															
計石・佐敷 KM22	2	2	8.3							4	6	0.25				11	138	0.096
田浦 KM21	1	1	3.4							6	9	0.66				8	120	0.045
八代 KM16	1	2	0.06							1	1	0.1	3	4	0.019	8	100	0.049
下大戸崎 KM13										2	2	0.6				8	118	0.077
姫の浦 KM17										6	10	0.33				8	130	0.064
高戸 KM20										5	18	0.2				12	140	0.107
磯の島	2	4	3.5															
崖口崎 KM19										2	2	0.3				11	133	0.068
御所浦南 KM26										8	10	0.24	5	5	0.052	10	120	0.079
倉岳 KM18													5	5	0.172	10	130	0.065
牛深 KM28													8	9	0.102	11	140	0.054
米ノ津 KG01										5	6	0.15				9	131	0.07
串崎 KG04																7	100	0.103
赤崎 KG03										11	15	0.41				9	106	0.054

1) 喜田村ら: 熊本医会誌, 34(補3):598, 1960

2) 入鹿山ら: 日本公衛, 19(1):27, 1972

3) 水俣病に関する水産の調査研究: 西海区水産研究所, 1964

4) 藤木ら: 熊本医会誌, 48(2):107, 1974

5) 有明・八代海産魚介類の重金属(特に水銀)蓄積に関する実態とその解析: 西海区水産研究所他: 1974

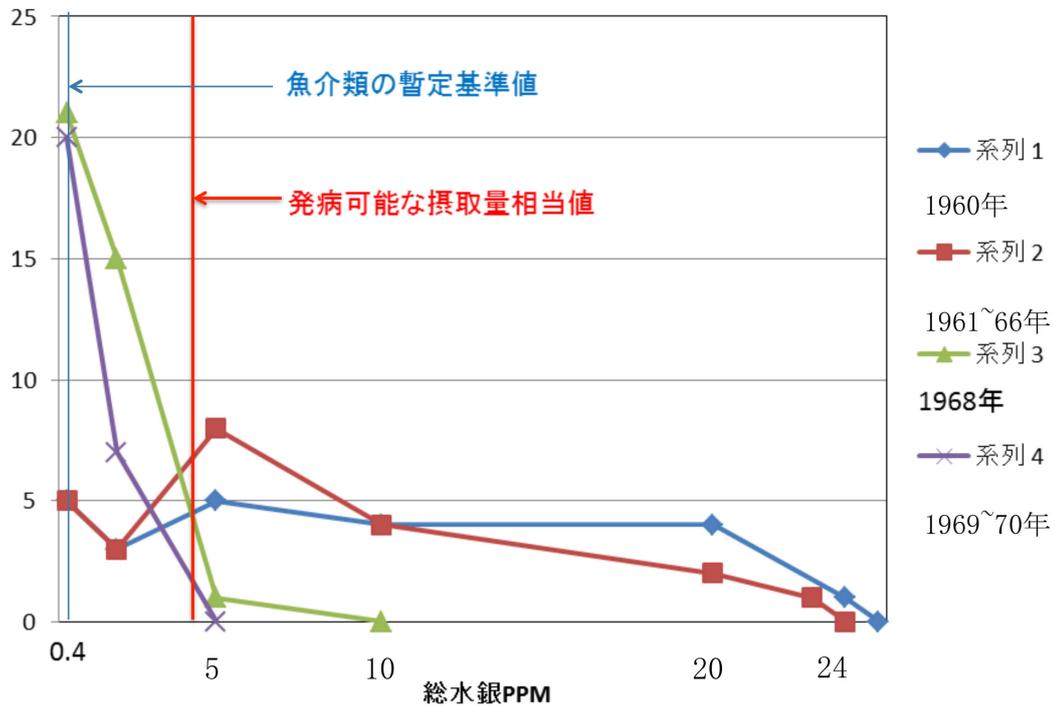
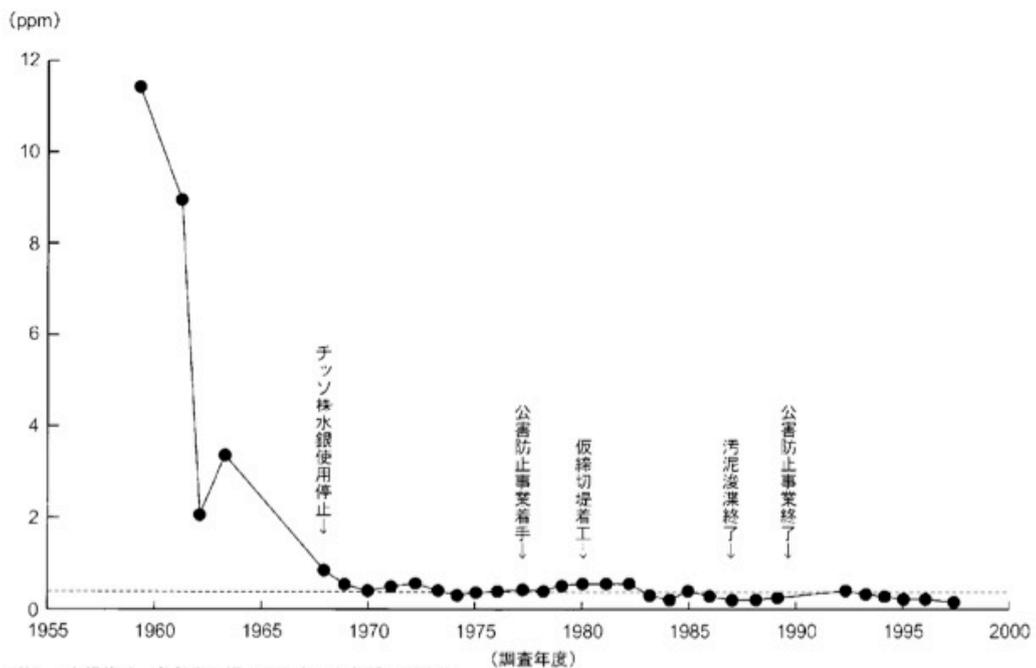


図1 水俣湾魚類中の総水銀濃度の推移



(注) 1.水銀値は、各年度に調査した全ての魚種の平均値  
 2.調査結果は、1959～1963年度は熊本調査、1968～1972年度は熊本委託(熊本)調査、1973～1988年度は公害防止事業に伴う監視調査(10魚種調査)、1989年度は魚介類対策に伴う追跡調査(1992年度以降は7～23魚種調査)  
 3.グラフの破線は、国が定めた魚介類の水銀の暫定的規制値(総水銀:0.4ppm)

図2 水俣湾の魚介類の総水銀値の推移

## 参考資料 1

### 魚介類の水銀の暫定的基準値（日本）

理論計算（メチル水銀として）

$$\frac{\text{週間摂取量限度 } 0.17 \text{ (mg)}}{\text{週間最高摂取量 } 108.9 \text{ (g)} \times 7 \text{ (day)}} = 0.3 \text{ (ppm)}$$

実際の基準（総水銀として）

$$0.3 \text{ ppm} \times \frac{100}{75} = 0.4 \text{ ppm}$$

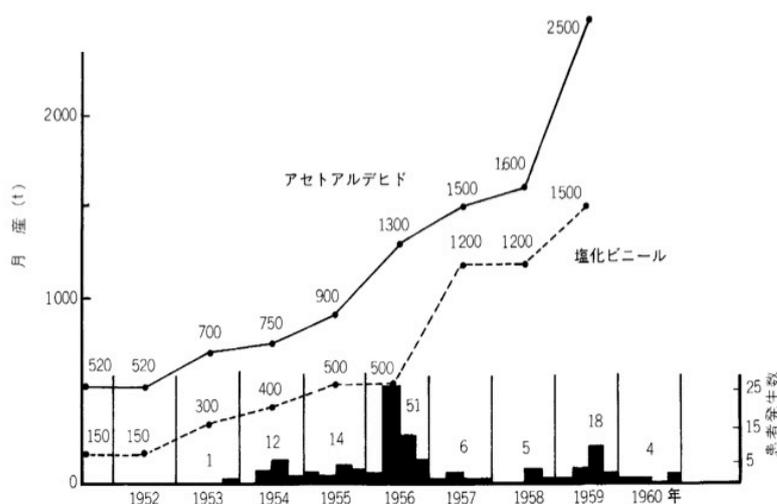
暫定的基準値を越える魚介類

魚介類中の平均総水銀量が0.4 ppmを越える場合は、メチル水銀を測定し、0.3 ppmを越えるものが対象となる

昭和48年7月 厚生省環境衛局長通達による

12

水俣工場では1932年からアセトアルデヒド、1949年から塩化ビニルの生産を開始しており、とくに1952年頃から生産量が増大している。水俣病患者の発生数は1957年に対策が取られる迄、生産量とほぼ平行して増加している(図3)。また、水俣地域での出生者の臍帯に含まれたメチル水銀濃度は1955年頃がピークである(図4)ことから、水俣湾および八幡地先の魚類の総水銀値もその当時がピークであったと思われる。その後、魚類中総水銀濃度が急激に減少したのは工場が排水処理を行ったこと(表2)によるものと考えられる。その後の魚類中総水銀値は、1968年に水銀触媒を使用する装置を撤去して、新たな水銀汚染がなくなった以降は環境中に残留していた水銀化合物からの取り込みと、魚類中の水銀が魚の生物学的半減期に従って減少するという作用と反作用の結果として、魚類中総水銀濃度がバックグラウンドに近い値まで漸減しつつある状態であったと考えられる。

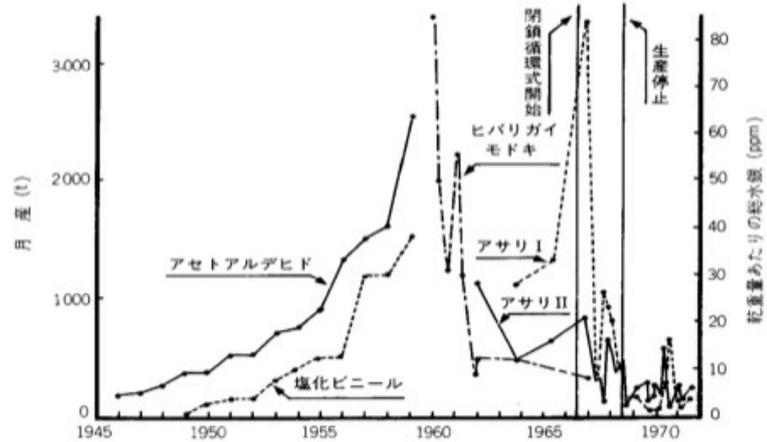


† 入鹿山ら：日衛誌，16(6)：476，1962

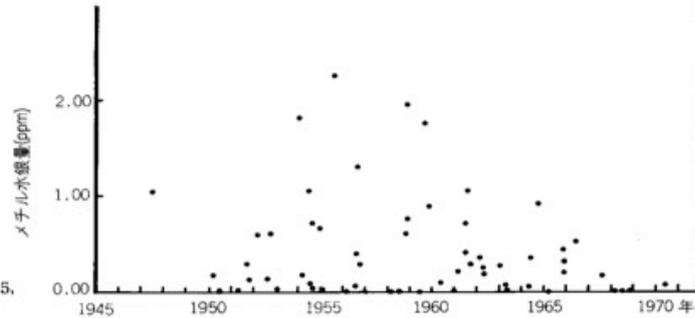
図3 水俣工場のアセトアルデヒドおよび塩化ビニールの生産量と水俣病患者発生の年次変化

5

水俣工場のアセトアルデヒドおよび塩化ビニールの生産量と水俣湾貝類中の水銀の年次変化



水俣湾の貝類中のメチル水銀量の生年月による年次変化



† 藤木ら：日衛誌，27(1)：115，1972<sup>7)</sup>

図 4

6

表 2 水俣工場廃水量

設備	廃水量 $m^3/hr$								備 考
	1952	1953	1954	1955	1956	1957	1958	1959	
アルデヒド酢酸設備	2	2	2	3	4	4	4	6	年4回解体掃除( $30m^3/hr$ ) 1946年2月→1958年9月酢酸廃水ピットを経て百間排水溝へ 1958年9月→1959年9月八幡プールへ
塩化ビニール、モノマー水洗塔廃水	1	2	2	3	3	10	10	10	1949年10月→1959年9月鉄屑槽を経て百間排水溝へ
硫酸設備、ビーボディ廃水					60	60	60	60	1956年8月→1957年8月平畑プールを経て百間排水溝へ 1957年8月→1959年9月八幡プールへ
磷酸設備廃水				40	40	70	70	70	1955年3月→1959年9月八幡プールへ
カーバイドアセチレン残渣廃水	25	30	40	40	60	80	80	110	1946年2月→1959年9月八幡プールへ
カーバイド密閉炉廃水						250	250		1958年6月→1959年9月八幡プールへ
重油ガス化設備廃水						60	80	80	1957年4月→1957年7月藪佐プールを経て百間排水溝へ 1957年7月→1959年9月八幡プールへ

註 八幡プールからさらに水俣川河口に流される。

† 新日窒水俣工場：“水俣工場の排水について—その歴史と処理及び管理”，1959.11

7

水俣湾および八幡地先のみでなく、八代海全域あるいは八代以南の海域について、魚類中の総水銀を調査した報告から、総水銀濃度の分析値を用いて、それぞれの年代における魚類中総水銀濃度と汚染源からの距離との関係の検討を試みた<sup>17)18)</sup>。1960年の調査資料からは、水俣病を発症させ得ると考えられる魚中総水銀濃度4ppm（参考資料2）を超えるものが計石・佐敷でも見られるが、1964年以降の調査では4ppmを超える魚類は見られなくなった。この時代は水銀分析の技術や処理装置が未熟で、単純に後年の分析結果と比較することはできないが、あえて推論という形で試みると、1960年の調査結果の解析からは回帰直線が4ppmを超える地点の水俣湾・八幡地先からの距離は4km前後までであった（図5,9）と推計される。1964年以降については水俣湾からの距離減衰は明確ではないが、水俣病を発症させ得る濃度の総水銀量（4ppm以上）を含む魚類は存在していなかったと考えられる（図6,7,8）。

## 参考資料 2

### 魚を介した場合の摂取量限度

理論計算(メチル水銀として)

$$\frac{\text{週間摂取量限度} \quad 1.7(\text{mg})}{\text{週間最高摂魚量} \quad 108.9(\text{g}) \times 7(\text{day})} = \frac{\quad}{\quad} = 3(\text{ppm})$$

摂取量限度(発症閾値)に相当する魚介中総水銀濃度

$$3\text{ppm} \times \frac{100}{75} = 4\text{ppm}$$

昭和48年6月厚生省“魚介類の水銀に関する専門家会議”による

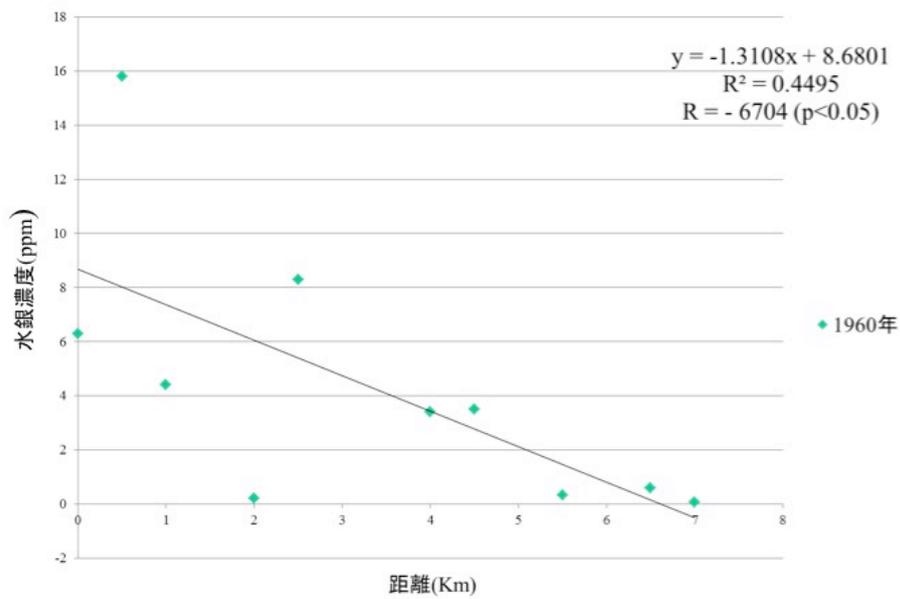


図 5 1960年調査における距離減衰の検討

8

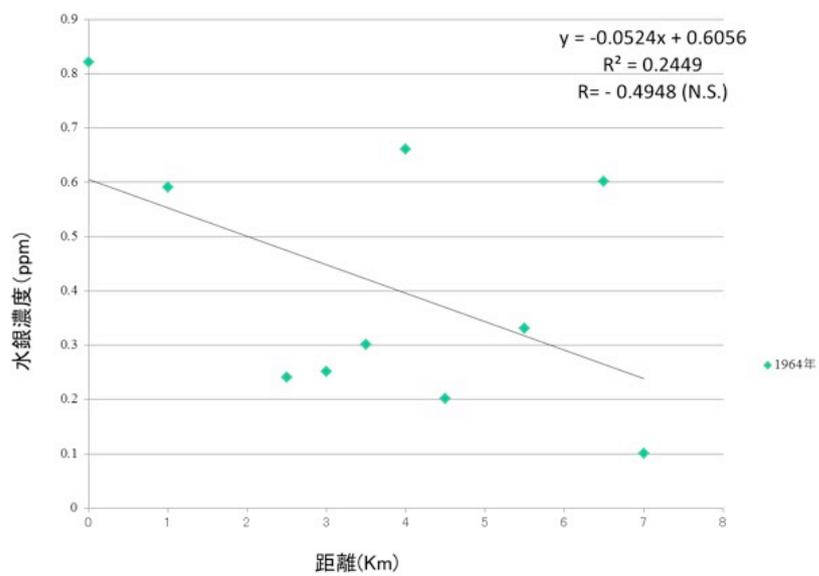


図 6 1964年度調査における距離減衰の検討

9

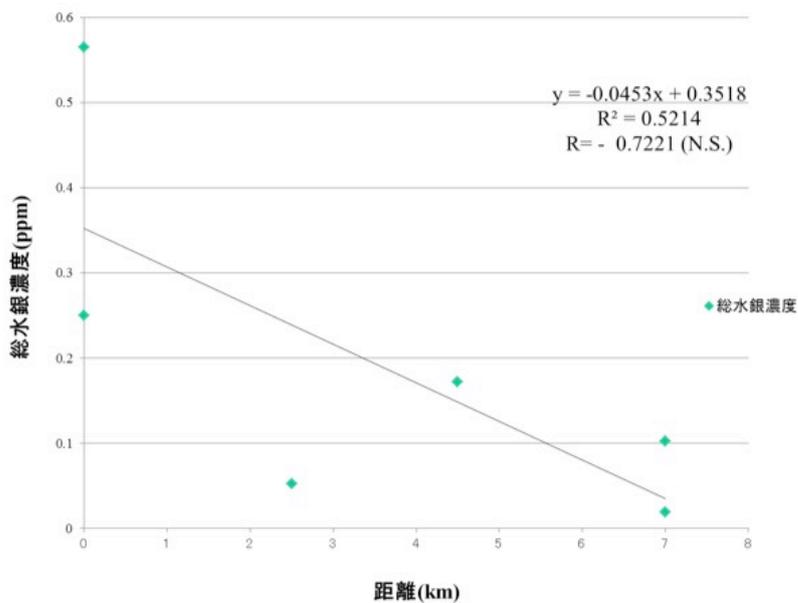


図 7 1971年度における距離減衰の検討

10

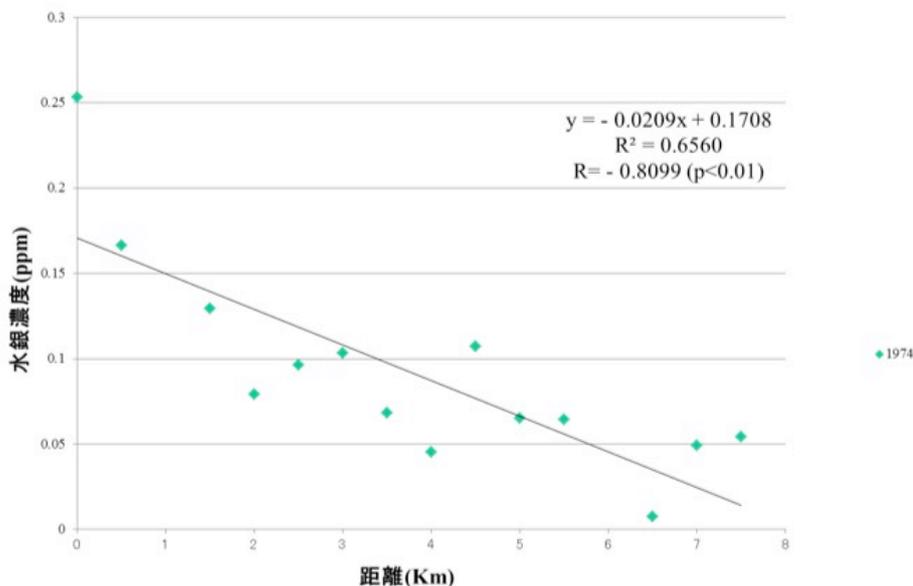


図 8 1974年度における距離減衰の検討

11

水俣病は工場から排出されたメチル水銀が海水に移行し、海水から魚介類に取り込まれ、この魚介類を摂食したヒトにメチル水銀が移行して発症した中毒である。工場から排出されたメチル水銀は八代海で距離の二乗に反比例して希釈拡散される（深い海域では三乗に反比例する）が、海水中での拡散に加えて潮流や海域の地形の影響を受け、メチル水銀は複雑に希釈拡散されながら八代海を移動すると思われる。移動した海域ではメチル水銀は魚介類に移行蓄積する。水俣湾でメチル水銀を取り込んだ魚介類が八代海を回遊する場合、水俣湾から遠ざかる間に生物学的半減期に従って体内に蓄積されていたメチル水銀は体内から排出され、体内のメチル水銀濃度は低

下する。このようにして、メチル水銀に汚染された魚介類は八代海沿岸地域に拡散、漸減したと考えられる。

#### IV 考察

##### (A)魚介類の流通と摂食に関するフィールド調査に関する中間的な考察

仮説1に関する考察：内陸部へ行商で運ばれた魚の量は多量であり、曝露リスクは高かった

これまでの検証から、行商が持ち込んだ魚介類の流通量及び住民の魚介類摂食状況は、芦北町大岩、黒岩など山間部の地域では少ないと推定された。仮に最大リスクでメチル水銀に汚染された魚を摂食したと仮定しても、これらの地域では水俣病を発病させるだけのメチル水銀曝露量はないと考えられる。

旧国鉄山野線による大口方面へ向かう魚の行商人は、列車の1運行で数名（2～4人）程度の乗車であった。ガンガンに氷を少し載せて魚を入れ運んでいた。列車はボックス席であり、魚行商に関しては一車両に2人乗るのが限界。出水、阿久根、津奈木、芦北方面から様々な商品を扱う行商人が山野線を利用していた。山野線、宮之城線は、大口方面行きは大口高校への通学者や通勤者で早朝6時半くらいから列車は満員状態であった。

先行研究では、水俣から魚行商人100人あまりが鮮魚商組合を組織し、組合員バッチを付け各地へ水俣湾の汚染魚を運んだという説がある。しかし現時点で水俣市内の鮮魚店や住民の証言からはそのような多数の魚行商人の列車利用については確認できていない。水俣から内陸部へ向かったといわれる行商人の商売実態については、聞き取り、資料・写真の収集などによりさらに調査を行う必要がある<sup>4</sup>。

仮説2に関する考察：昭和30～40年代前半、内陸部で日常的に魚を食べる機会は多かった

今回の聞き取り調査を行った中山間地域では、いりこを除いて、日常的に魚介類を購入し摂食するだけの流通や、購買行動の習慣は見られない。また流通した魚介類も干物、塩物が主である。漁村と中山間地の農村とでは全く食生活が異なっており、山間部でメチル水銀曝露による健康被害が出るほど大量の魚介類を毎日摂食することができたとは一般的には考えられない。

##### (B) 八代海南部の魚類中総水銀濃度の推移に関する中間的な考察

距離減衰、生物濃縮、生物の寿命、閉鎖水域における海流による希釈など八代海南部の魚類中総水銀濃度の推移を検討する因果関係には多様な要因が考えられる。1960年から1974年までの過去の調査データを再検討し、当時のメチル水銀曝露リスクについてモデル的な考察を行った。その結果、八代海南部の魚類中総水銀濃度は、1974年以降は暫定基準値を下回って水俣病を発症しうるほどの曝露リスクはなかったと推定された。

#### V 結論

1 行商人が流通させた魚介類の量、摂食状況は、芦北町大岩、黒岩など山間部の地域では少なく、住民の生活状況からはメチル水銀曝露による水俣病を発病させるだけの曝露リスクは今回の調査からは窺えなかった。

告発を目的とした文献には、水俣から多数の魚行商人鮮魚商組合を組織し、各地へ水俣湾の汚染魚を運んだということになっている<sup>22</sup>。しかし現時点で、水俣市内の鮮魚店や地域住民の証

言からは、そのような多数の魚行商人が山野線を利用して、水俣市で水揚げされた魚介類を各地へ多量に流通させていた事実は確認できていない。また水俣駅が行商人で賑わっていたという言説についても確認できなかった。水俣から来たという行商人の実態については、さらなる調査が必要である。

出水、阿久根、津奈木、芦北方面の行商が山野線を利用してその沿線に行商していたことは分かった。また宮之城線ルートも利用されており、鹿児島県内の行業流通についても今後の調査が必要である。

インタビュー調査から、山野線沿線の集落住民の魚介類の摂食頻度は非常に少ないことが分かった。摂食した魚種をさらに解明することにより、不知火海産の魚か鹿児島産（外海の魚）など他所の魚かを識別できる可能性がある。

2 近年、水俣に近い山村地域には、社会運動団体等の働きかけにより行商人によってメチル水銀汚染魚が拡散した可能性の懸念が噂されている。科学的な知見として、魚の総水銀濃度を4ppmと仮定した条件では、毎日100gの汚染魚を摂食すると医学的に水俣病を発症する可能性がある。山村地域での魚の摂食回数が二日か三日に一度となると、たとえ同程度の魚を食べる機会があったとしても、発症の可能性はきわめて低くなる。

また、水俣漁協は水俣湾の航路浚渫時期以降、水俣湾等公害防止事業後の安全宣言に至る間、実質的な漁をしていなかった。したがって、行商者が仕入れた魚は佐敷など水俣市外から流通してきた魚であったと考えられる。このように現在までの調査結果からは、汚染魚の行商経路による拡散はほとんどメチル水銀曝露リスクの拡散には影響していなかったと思われる。今後さらに事例数を増やし、この知見の検証と頑健性を高めていくことが必要である。

## VI 次年度以降の計画

初年度は、水俣病発生地域及びその周辺地域から、不知火海島嶼部と山間部のモデル地区として主として芦北地区、天草地区及び水俣山間部を選定し、これまでの研究や史資料の収集・分析と社会調査による曝露リスクの調査を行った。

2年目はこれまでの研究進捗状況を踏まえ、今回調査した地区の事例数を増やすとともに、さらに天草や芦北郡の未調査地域、そして鹿児島県の出水地区（米ノ津）、御所浦地区、獅子島地区（長島町（旧東町））、伊佐（大口）地区等へ聞き取り調査対象地域を拡大し、不知火海沿岸地域および紛争が広がりつつある内陸部の地域別のメチル水銀曝露リスクに関する調査を実施する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績  
なし

## 引用文献

- 1) 熊本県. 水俣湾環境復元事業の概要, 1998.
- 2) 水俣市. 水俣病-その歴史と教訓 2007, 2008.
- 3) 佐藤郁哉. 社会調査の考え方 上. 東京: 東京大学出版会, 2015年.
- 4) 岡本達明. 水俣病の民衆史 第1巻~第6巻. 東京: 日本評論社, 2015.
- 5) 西村肇・岡本達明. 水俣病の科学 [増補版]. 東京: 日本評論社, 2001.
- 6) 有馬澄雄. 水俣病-20年の研究と今日の課題. 東京: 青林舎, 1979.

- 7) 水俣病研究会. 水俣病事件資料集 上・下巻. 福岡：葦書房, 1996.
- 8) 田中啓爾. 塩および魚の移入路-鉄道開通前の内陸交通. 東京：古今書院, 1957.
- 9) 芦北町誌編集委員会. 芦北町誌, 1977.
- 10) 芦北町誌編集委員会. 芦北町誌追録, 1977.
- 11) 水俣市史編さん委員会. 新水俣市史 民族・人物編, 1997.
- 12) 喜田村ら. 熊本医学会誌. 1960; 34(補3); 598.
- 13) 入鹿山ら. 日本公衛. 1972; 19(1); 27.
- 14) 西海区水産研究所. 水俣病に関する水産の調査研究, 1964.
- 15) 藤木ら. 熊本医学会誌. 1974; 48(2); 107.
- 16) 熊本県企画部公害課. 昭和44年水俣水銀環境汚染調査報告書, 1970.
- 17) 日本公衆衛生協会. 昭和44年水銀環境汚染調査纏め, 1970.
- 18) 水産庁. 魚介類等の水銀調査結果について（昭和48年度全国総点検調査（水銀等）及び有明海・八代海総合調査結果）, 1974.
- 19) 熊本県水産課. 熊本県の水産 1955-1970年版.
- 20) 熊本県. 熊本県の水産 昭和49年, 51年, 52-53年版.
- 21) 二塚 信ほか. 不知火海沿岸漁家の食生活構造より見たメチル水銀摂取量の変遷に関する検討」日本公共衛生誌. 1977; 第24巻第10号; 667-679.
- 22) 水俣病裁判提訴40周年記念誌編集委員会編. 水俣から未来を見つめてPARTII. 東京: 花伝社, 2009.
- 23) 香月洋一郎. 記憶すること・記録すること—聞き書き論ノート. 東京: 吉川弘文堂, 2002.

<sup>1</sup> 香月洋一郎. 記憶すること・記録すること—聞き書き論ノート. 吉川弘文堂, 2002年は、忘れ方には次のような類型があるとする。

- (1) マルワスレ・・・まるまる話を忘れてしまっている
- (2) トコロパッチ・・・話の所々しか覚えていないので首尾一貫して語れない
- (3) トトポウラッポ・・・話の始めと終わりくらいしか覚えておらず、中身は忘れてしまっていて話がいっこうにまとまらない
- (4) トリツケフリツケ・・・あの話、この話を継ぎ合わせて2つ以上の話が混乱している
- (5) ドワスレ・・・一時の忘却で、そのときは分からないが後で思い出す

<sup>2</sup> 国の統計が変更され、不知火海の漁獲量について公表されなかった期間は、図4に示す漁獲の自粛や禁止期間と符合する期間となっている。水俣市漁協が水俣湾内及び地先1000メートルを漁獲自主規制していたが、昭和37（1962）年水俣湾地先の自主規制を解除し、昭和49（1974）年には全面解除となる。しかし昭和48（1973）年には第3水俣病説が出されまた自主規制となった。

<sup>3</sup> 「水俣湾の魚には注意を」『熊本日日新聞』、昭和33年8月22日。

<sup>4</sup> 行商の許可を出していた熊本県水俣保健所は、火災により焼失したため記録が残されていない。

# Methylmercury Exposure Risk on Distant Places from the Designated Minamata Disease Area

Shinya Ueno<sup>\*1</sup>

*\*1 Center for Policy Studies, Kumamoto University*

*Keywords:* Methylmercury exposure risk; fish peddler; fish-eating habit; interview

## **Abstract**

This study examined the methylmercury exposure risk on distant places from the designated Minamata disease area. It is said that many contaminated fish with methylmercury in Shiranui sea were vended by fishwife widely, not only coast areas but also more inland areas, methylmercury poisoning has occurred after people have eaten these fish. However, few studies have analyzed peddler and exposure risk outside of the designated area. Our data was based on fieldwork conducted in mountainous areas and remote fish villages in Kumamoto and Kagoshima from July 2015 to February 2016. Interviewees were people who memorize the life well in 1950s to 1970s. In the interview, they were asked about their frequency and volume of eating fish per week and number of peddlers in their area. Based on interview, documents and data, this study found several routes of peddlers, and estimated delivered fish volume and exposure level of fish. An analysis of 26 interviews suggests some important observations concerning the methylmercury exposure risk in those areas. We can say with fair certainty that risk was not potentially harmful by the estimation of their fish-eating habit. Despite its preliminary study, this type of research will contribute to better understanding of methylmercury exposure risk outside of Minamata. Further studies can explore some of the issues identified in this study using a larger sample.

VII メチル水銀の捕獲・不活性化に関わる新奇リスク軽減因子  
の実態解明



# メチル水銀の捕獲・不活性化に関わる新奇リスク軽減因子の実態解明

主任研究者 熊谷嘉人 (筑波大学医学医療系 教授)

## 研究要旨

【背景・目的】未だ低濃度曝露による健康リスクが懸念される**メチル水銀 (MeHg)**は高い親電子性を有し、タンパク質の求核基に共有結合することで細胞毒性を示す。一方、MeHgは求核低分子であるグルタチオン (GSH) により抱合され (フェーズ2反応)、その極性代謝物が細胞外に排泄 (フェーズ3反応) されることにより細胞内の恒常性が維持されている (MeHgは酸化されない)のでフェーズ1反応は関与しない)。我々は近年、GSHよりも高い求核性および抗酸化性を有する**活性イオウ分子 (Reactive sulfur species, RSS)**が細胞内外でMeHgを捕獲し、イオウ付加体形成を介して不活性化する新たなシステム (**フェーズゼロ反応**) を発見し、RSSがMeHgの初期防御に関与している可能性を見出した<sup>1-3)</sup>。

そこで、本研究では“フェーズゼロ反応”を介したRSSによる初期防御機構の実態を明らかにし、生体内RSSがMeHg曝露における**新奇リスク軽減因子**であることを実証することで、MeHg曝露量とそれに起因する症候関係に対する新しい知見を提供することを目的とした。上記の目的を達成するため、本年度では生体内RSSがMeHg曝露における新奇リスク軽減因子であることの証明を個体レベルで試みた。

【方法・結果】RSS主要産生酵素である**cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE)**の遺伝子欠損マウスを用いて生体内RSS量を減少させ、MeHg曝露に対し高感受性を示すか否かを検討した。その結果、野生型マウスにおいて中毒症状が全く見られない濃度のMeHgにCSE欠損マウスを曝露すると、運動失調や後肢交差といった中毒症状を呈し、最終的に殆どのマウスが死亡した。

【考察・結論】上記の結果から、生体内RSSはMeHg曝露における新奇リスク軽減因子で有ることが示され、生体内RSS量がMeHg曝露に対する感受性を制御する重要な要因であることが示唆された。今後、CSE高発現マウスや植物由来RSSを用いて、本年度結果の裏取り実験を行うと共に、“フェーズゼロ反応”を介したRSSによる初期防御機構の実態を解明することで、MeHg高感受性集団におけるRSSの重要性を提言する。

キーワード: 活性イオウ分子、フェーズゼロ反応、(MeHg)<sub>2</sub>S

## 研究者協力者

秋山雅博(筑波大学医学医療系 助教)、安孫子ユミ(筑波大学医学医療系 助教)

## I 研究目的

MeHgは未だ魚介類などを介して低濃度ながら慢性的に曝露されている現状にあり、**低濃度曝露による健康リスク**が懸念されている。MeHgによる毒性はその**高い親電子性**によるタンパク質求核基への共有結合が一因であると理解されており、この共有結合に対する生体防御機構として求核低分子であるGSHによる抱合反応が従来知られている。それに対して、我々はGSHよりも高い求核性および抗酸化性を呈するRSS (システインパースルフィド、GSHパースルフィドおよびそのポリスルフィドのようにイオウ原子が付加して $\alpha$ 効果によりpKa値が低下した高い反応性物質)の生体内産生系を立証し<sup>3)</sup>、このものが細胞内(外)でMeHgを捕獲してイオウ付加体

(MeHg)<sub>2</sub>Sを形成することで、MeHgの親電子性を不活性化することを明らかにした<sup>1,2)</sup>。このことは、従来のGSHによる防御系の前段階にRSSによる初期防御機構（フェーズゼロ反応）が存在し、MeHg曝露に対する感受性を制御している可能性を示唆している。

そこで本研究では、“フェーズゼロ反応”を介したRSSによるMeHgの捕獲・不活性化を明らかにし、生体内RSSがMeHg曝露における新奇リスク軽減因子であることを実証することで、MeHg曝露量とそれに起因する症候関係に対する新しい知見を提供することを目的とした。

（構成:研究の背景・目的。環境行政の課題との関連性を含めて記載する。）

## II 研究方法

本研究では生体内RSS量を減少させるために、RSS主要産生酵素であるCSE遺伝子を全身で欠損しているCSE欠損マウスを用いた。まず、野生型マウスおよびCSE欠損マウスに対してMeHg (5 mg/kg/day)を12日間経口投与し、中毒症状を示すか否かを検討した。症候の指標として体重の減少や生存率に加え、MeHg毒性が引き起こす障害の1つである運動機能障害をロータールットテストや後肢交差、振戦の有無によって評価した。次にMeHg毒性は運動失調を生じ、その標的組織は脳または末梢組織であると考えられたことから、上述の各マウスに対して組織学的変化を病理解析学的手法で解析した。

### （倫理面への配慮）

倫理面への配慮としてマウスを用いた動物実験に関して、筑波大学が定める動物実験取扱規定にそって動物実験を計画し、動物福祉、安全性、倫理的及び科学的観点からその妥当性を審査する筑波大学動物実験委員会による審査を受け、学長の承認を受けた後に、適切な飼養保管施設内において苦痛の軽減に関する基準に従い、適正に実施した。特に毒性実験など苦痛の程度の高い実験における人道的エンドポイントの適切な設定に留意した。また、実験従事者は飼養保管施設内での実験動物の取扱に対し十分な教育訓練を受けた後、動物実験を実施した。

## III 研究結果

無処置時において、CSE欠損マウスは野生型マウスと比べ行動異常は観察されず、MeHgを曝露した野生型マウスでも無処置と同様に異常は見られなかった。ところが、MeHgを曝露したCSE欠損マウスでは、ロータールットテストを指標とした際に曝露後10日以降から有意な運動失調を呈し、マウスでのMeHg中毒症状の指標である後肢交差や振戦が観察された。このような条件下において、GFAP染色を用いて脳の組織学的変化を調べた結果、大脳皮質の一部と小脳(分子層、プルキンエ細胞層、顆粒細胞層)においてグリオーシスなどの病変が観察された。CSE欠損マウスはその後時間と共に野生型と比して体重減少が見られ、中毒症状末期（曝露後16日目）において脳組織の萎縮が観察され、最終的に殆どのマウスが死亡した。以上より、MeHgが有害性を示さない曝露濃度時において、CSEの欠損により健康リスクが生じることが明らかとなった。

## IV 考察

我々は最近、内在性の低分子RSSであるGS-SHやGS-S-SGとMeHgが反応すると(MeHg)<sub>2</sub>Sを産生すること、MeHgを曝露した各種臓器中で(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成が見られるのに対して、CSE欠損マウスのそれらからは殆ど検出されないことを明らかにしている<sup>1)</sup>。このことは、CSEから産生され

るRSSが効率良くMeHgを捕獲して、(MeHg)<sub>2</sub>Sに変換していることを示唆している。この考えに一致して、CSE欠損ではMeHgに対する感受性が上昇していた。以上より、CSEがRSS産生を介してMeHg曝露によるリスクを制御する重要な要因であることが明らかとなった。また、野生型に比べCSE欠損マウスではRSS産生の減少に起因してレドックスバランスが低下していることが想定され、さらにMeHgの生体内侵入により、RSSがMeHgで捕獲されてレドックスホメオスタシスの破綻が起きている可能性がある。そのため、今後は今回観察された運動失調や中毒症状とRSS低下との因果関係について検討する必要があると考える。本年度の研究成果はRSSがMeHgの新奇リスク軽減因子であることを個体レベルで初めて実証したものであり、MeHgリスク軽減に対する新たな研究分野を切り開くことが出来たと評価する。

## V 結論

本年度の研究成果により、RSSがMeHgに対する新奇リスク軽減因子で有ることが実証され、生体内RSS量がMeHg曝露による健康リスクの重要な制御要因である事が明らかとなった。今後、RSSがMeHgリスクに対する新たな判断基準となりえると共に、RSSによる初期防御機構の解明やRSS含有植物成分サプリメントの開発は、MeHg曝露量とそれに起因する症候関係に対する新しい知見を提供し、慢性的な低濃度MeHg曝露による健康リスクの軽減に大きく寄与するものと結論付ける。

## VI 次年度以降の計画

本年度はCSE欠損マウスを用いて、生体内RSSが低濃度MeHg曝露によるリスクを軽減させる鍵分子であることを個体レベルで実証した。この成果を受けて、H28年度はCSE高発現マウスを製作し、これを用いて裏取り実験を展開すると共にRSS含有植物成分サプリメントを介した新たなMeHgの健康リスク軽減策を提案する。また、我々は現在、LC/MSによる安定同位体希釈法での組織および細胞内（外）の種々の内在性RSSの定量法を確立しつつある。本法により、今後はMeHgの曝露量に依存したRSS量の低下を測定することで、MeHgの健康リスクと生体内RSS量との関係を調べる。さらにH29年度はRSSによる防御機構が従来のGSHによる防御系の前段階に存在することを証明するために、GSHによるMeHgの解毒・排泄を統括的に制御している転写因子Nrf2<sup>4)</sup>の欠損マウスおよびCSE高発現マウスを掛けあわせたNrf2欠損/CSE高発現マウスを用いて、MeHgのリスク軽減においてRSSがNrf2非依存的に寄与することを実証すると共に、ヒトに対しRSSサプリメント摂取の効果を検討する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Nishida M, Kumagai Y, Ihara H et al. Redox signaling regulated by electrophiles and reactive sulfur species. *J Clin Biochem Nut* 2016; 58: 91-98.
- 2) Toyama T, Abiko Y, Katayama Y et al. S-Mercuration of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 through Cys152 by methylmercury causes inhibition of its catalytic activity and reduction of monoubiquitin levels in SH-SY5Y cells. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 887-893.
- 3) Ishii I, Kamata S, Hagiya Y, Abiko Y, Kasahara T, Kumagai Y. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 837-841.
- 4) Saund SS, Sosa V, Henriquez S et al. The chemical biology of hydropersulfides (RSSH): Chemical

- stability, reactivity and redox roles. *Arch Biochem Biophys* 2015; 588: 15-24.
- 5) Abiko Y, Ishii I, Kamata S et al. Formation of sulfur adducts of N-acetyl-p-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: Participation of reactive persulfides. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1796-1802.
  - 6) 熊谷嘉人、内田浩二. RSS による環境中親電子物質の解毒代謝. 細胞工学「活性イオン分子種の生理機能に迫るチオールバイオロジーの新たなステージ」 2015; 34: 358-363.
  - 7) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological dimethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
  - 8) Abiko Y, Luong CN, Kumagai Y. A biotin-PEAC<sub>5</sub>-maleimide labeling assay to detect electrophiles. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 405-411.
  - 9) Shinkai Y, Abiko Y, Ida T et al. Reactive sulfur species-mediated activation of the Keap1-Nrf2 pathway by 1,2-naphthoquinone through sulfenic acids formation under oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 838-847.
  - 10) Nakano S, Ishii I, Shinmura K et al. Hyperhomocysteinemia abrogates fasting-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion by limiting bioavailability of hydrogen sulfide anions. *J Mol Med* 2015; 93: 879-889.
  - 11) Hagiya Y, Kamata S, Mitsuoka S et al. Hemizygoty of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 282: 195-206.
  - 12) Makino K, Okuda K, Sugino E et al. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methyl mercury. *Neurotoxicol Res* 2015; 27: 99-105.
  - 13) 西田基宏、外山喬士、熊谷嘉人、富田拓郎. 活性硫黄種によるレドックス恒常性維持機構に基づいた新規心不全治療戦略の構築. *YAKUGAKAU ZASSHI* 2014; 134: 1239-1243.
  - 14) Ono K, Akaike T, Sawa T et al. The redox chemistry and chemical biology of H<sub>2</sub>S, hydropersulfides and derived species: Implication to their possible biological activity and utility. *Free Radic Biol Med* 2014; 77: 82-94.
  - 15) 澤智裕、熊谷嘉人、赤池孝章. たくさん繋がる S. 実験医学「驚愕の代謝システム」 2014; 32: 46-50.
  - 16) Yoshida E, Abiko Y, Kumagai Y. Glutathione adduct of methylmercury activates the Keap1-Nrf2 pathway in SH-SY5Y cells. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 1780-1786.
  - 17) Kanda H, Shinkai Y, Kumagai Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J Toxicol Sci* 2014; 39: 687-700.
  - 18) Ida T, Sawa T, Ihara H et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 7606-7611.
  - 19) Asahi M, Kawai M, Toyama T et al. Identification and quantification of in vivo metabolites of 9,10-phenanthrenequinone in human urine associated with producing reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 2014; 27: 76-85
  - 20) 熊谷嘉人. 酸化ストレスと親電子シグナル制御. 医学のあゆみ「活性酸素-基礎から病態解明・制御まで」 2013; 247: 787-793.

- 21) Toyama T, Shinkai Y, Kaji T, Kumagai Y. A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 477-484.
- 22) 熊谷嘉人. 環境中親電子リガンドの細胞内侵入とそれに伴うシグナル伝達の模倣および攪乱. 実験医学「活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患」 2012; 30: 70-75.
- 23) Kanda H, Toyama T, Shinohara-Kanda A et al. S-Mercuration of rat sorbitol dehydrogenase by methylmercury causes its aggregation and the release of the zinc ion from the active site. *Arch Toxicol* 2012; 86: 1693-702.
- 24) Nishida M, Sawa T, Kitajima N et al. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nature Chem Biol* 2012; 8: 714–724.
- 25) Shinkai Y, Iwamoto N, Miura T, Ishii T, Cho AK, Kumagai Y. Redox cycling of 1,2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 1222-1230.
- 26) Yamada H, Akahoshi N, Kamata S et al. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine  $\gamma$ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 1716-1726.
- 27) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1633-1635.  
Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A et al. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1117-1122.

#### 引用文献

- 1) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological dimethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301–1306.
- 2) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y et al. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol* 2011; 17:1633-1635.
- 3) Ida T, Sawa T, Ihara H et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111: 7606–7611.
- 4) Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A et al. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1117-1122.

# Role of reactive sulfur species as a key molecule to diminish toxicity of methylmercury in mice

Masahiro Akiyama<sup>1</sup>, Yumi Abiko<sup>1</sup>, Yoshito Kumagai<sup>1</sup>

\*1 *Faculty of Medicine, University of Tsukuba*

*Keywords:* Reactive sulfur species; Bismethylmercury sulfide; Phase-zero reaction

## **Abstract**

Methylmercury (MeHg) is an environmental electrophile that readily modifies protein thiols, resulting in dysfunction of enzymes and neurotoxicity. Endogenous reactive sulfur species (RSS) such as glutathione persulfide (GSSH) and protein-bound RSS are captured by MeHg to form bismethylmercury sulfide (MeHg)<sub>2</sub>S identified as a metabolite of MeHg *in vivo* (Yoshida E et al. *Chem Res Toxicol* 2011; Abiko Y et al. *Chem Res Toxicol* 2015). We also found that cystathionine gamma-lyase (CSE) is an enzyme to produce cysteine persulfide that easily reacts with GSH to yield GSSH and protein-bound RSS (Ida T et al. *PNAS* 2014). These findings suggest that CSE to form RSS is a key protein to diminish MeHg toxicity. To address this issue, we used CSE-KO mice: When MeHg (10 mg/kg) was intraperitoneally injected into wild-type and CSE-KO mice, (MeHg)<sub>2</sub>S was detected in the brain, heart, liver and kidney, although little appreciable formation of the metabolite was seen, suggesting that CSE plays a role in (MeHg)<sub>2</sub>S formation *in vivo*. Exposure of wild-type mice to MeHg (5 mg/kg/day for 12 days) did not cause a toxic effect on the mice; however, CSE deletion resulted in motor dysfunction and body weight loss. These results suggest that RSS produced by CSE is essential for reduction of MeHg toxicity *in vivo*.

## 参 考 资 料



平成 27 年度  
メチル水銀研究ミーティング

講演要旨集

期間：2016 年 1 月 7 日

会場：LMJ 東京研修センター 2 階 特大会議室

主催：環境省



## 目 次

プログラム .....	1
発表要旨	
<u>特別講演</u>	
職業性水銀蒸気曝露の疫学研究から動物実験への変遷（吉田 稔） .....	5
<u>一般講演</u>	
講演 1  歯クジラ筋肉の水銀の化学形態別分析とセレン濃度（坂本峰至） .....	11
講演 2  加熱気化原子吸光法を用いた生物試料中メチル水銀の簡易分析法（山元恵） .....	15
講演 3  野生哺乳類における Hg 蓄積特性と蓄積機構解明へのアプローチ（寶來佐和子） .....	20
講演 4  メチル水銀による小脳傷害のメカニズムに関する提案（鍛冶 利幸） .....	25
講演 5  脳内CREBリン酸化に対するメチル水銀の影響（藤村 成剛） .....	29
講演 6  メチル水銀中毒バイオマーカーとしての血漿チオール抗酸化バリアとセレノ蛋白質（臼杵 扶佐子） .....	34
講演 7  メチル水銀毒性における MARCKS タンパク質の関与とそのリン酸化動態への影響（白石 光也） .....	39
講演 8  オートファジー関連分子 p62 によるメチル水銀毒性防御機構（高根沢 康一） .....	39
<u>若手発表</u>	
発表 1  メチル水銀の妊娠期飲水曝露が胎児のメタボロームに及ぼす影響と性差（武田 知起） .....	45
発表 2  胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 42 ヶ月時の知能に及ぼす影響の検討：沿岸都市に住む母子を対象に（龍田 希） .....	48
発表 3  脳由来神経栄養因子は初代培養小脳顆粒細胞のメチル水銀細胞死を GSH の減少を介して促進する（牧 武宏） .....	50
発表 4  メチル水銀による脳特異的なセクレトグロビン 3A1 誘導とその機構解析（高橋 勉） .....	52
発表 5  メチル水銀によるアストロサイト適応応答とその神経保護作用（石原 康宏） .....	54
発表 6  メチル水銀と活性イオウ分子との反応により生じるビスメチル水銀サルファイド（安孫子 ユミ） .....	57
発表 7  メチル水銀に対する新奇リスク軽減因子としての活性イオウ分子（秋山 雅博） .....	60
発表 8  メチル水銀による小胞体ストレスを介した神経細胞死惹起機構（奥田 洸作） .....	60

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

日 時 : 平成 28 年 1 月 7 日 (木) 9:00~16:30 (特別講演、一般講演、若手発表)

場 所 : LMJ 東京研修センター 2 階 特大会議室

参加資格 :

本ミーティングに参加できるのは、以下の①~⑤のいずれかに該当する者とする。

- ①公募で講演・発表を申請し登録された参加予定者 (一般講演者、若手発表者)
- ②環境省及び事務局より招待または参加依頼された者 (特別講演者、座長など)
- ③「重金属等による健康影響に関する総合的研究」推進・評価委員 (オブザーバー)
- ④翌日開催の「重金属等による健康影響に関する総合的研究」研究成果発表会の参加者で事前に事務局に登録された者 (傍聴者)
- ⑤①②③④から紹介された者で事前に事務局に登録された者 (傍聴者)

# プログラム

特別講演：60分（講演50分、質疑応答10分）

一般講演：25分（講演15分、質疑応答10分）

若手発表：15分（発表10分、質疑応答5分）

9:00 開会（事務局）

9:01～9:05 挨拶（環境省）

9:05～9:10 研究ミーティング進行についての説明（事務局）

## ■第1部 一般講演「メチル水銀汚染と毒性発現機構」

座長 熊谷嘉人(筑波大学医学医療系)、永沼 章(東北大学薬学部)

- |             |                      |                                 |
|-------------|----------------------|---------------------------------|
| 9:10～9:35   | 一般1 坂本峰至<br>(国水研)    | 歯クジラ筋肉の水銀の化学形態別分析とセレン濃度         |
| 9:35～10:00  | 一般2 山元 恵<br>(国水研)    | 加熱気化原子吸光法を用いた生物試料中メチル水銀の簡易分析法   |
| 10:00～10:25 | 一般3 寶來佐和子<br>(鳥取大地域) | 野生哺乳類における Hg 蓄積特性と蓄積機構解明へのアプローチ |
| 10:25～10:50 | 一般4 鍛冶利幸<br>(東京理科大薬) | メチル水銀による小脳傷害のメカニズムに関する提案        |

10:50～11:00 休憩

## ■第2部 特別講演

座長 佐藤雅彦(愛知学院大学薬学部)

- |             |                 |                          |
|-------------|-----------------|--------------------------|
| 11:00～12:00 | 吉田 稔<br>(八戸学院大) | 職業性水銀蒸気曝露の疫学研究から動物実験への変遷 |
|-------------|-----------------|--------------------------|

12:00～12:45 昼食

## ■第3部 若手発表「メチル水銀研究の新展開」

座長 坂本峰至(国立水俣病総合研究センター)

- |             |                             |  |
|-------------|-----------------------------|--|
| 12:45～13:00 | 若手1 武田知起<br>(九州大院薬)         | メチル水銀の妊娠期飲水曝露が胎児のメタボロームに及ぼす影響と性差                 |
| 13:00～13:15 | 若手2 龍田 希<br>(東北大院医)         | 胎児期におけるメチル水銀曝露が生後42ヶ月時の知能に及ぼす影響の検討：沿岸都市に住む母子を対象に |
| 13:15～13:30 | 若手3 牧 武宏<br>(ハムリー(株)睡眠科学研究) | 脳由来神経栄養因子は初代培養小脳顆粒細胞のメチル水銀細胞死をGSHの減少を介して促進する     |
| 13:30～13:45 | 若手4 高橋 勉<br>(東京薬科大薬)        | メチル水銀による脳特異的なセクレトグロビン3A1誘導とその機構解析                |

座長 臼杵扶佐子(国立水俣病総合研究センター)

- |             |                         |                                      |
|-------------|-------------------------|--------------------------------------|
| 13:45～14:00 | 若手5 石原康宏<br>(広島大院総合科学)  | メチル水銀によるアストロサイト適応応答とその神経保護作用         |
| 14:00～14:15 | 若手6 安孫子ユミ<br>(筑波大医学医療系) | メチル水銀と活性イオウ分子との反応により生じるビスメチル水銀サルファイド |

14:15～14:30 若手7 秋山雅博  
(筑波大医学医療系) メチル水銀に対する新奇リスク軽減因子としての活性  
イオウ分子

14:30～14:45 若手8 奥田洸作  
(岡山大院医歯薬) メチル水銀による小胞体ストレスを介した神経細胞死  
惹起機構

14:45～15:00 休 憩

■第4部 一般講演「メチル水銀毒性とその防御の分子メカニズム」  
座長 姫野誠一郎(徳島文理大学薬学部)、鍛冶利幸(東京理科大学薬学部)

15:00～15:25 一般5 藤村成剛  
(国水研) 脳内CREBリン酸化に対するメチル水銀の影響

15:25～15:50 一般6 臼杵扶佐子  
(国水研) メチル水銀中毒バイオマーカーとしての血漿チオール  
抗酸化バリアとセレノ蛋白質

15:50～16:15 一般7 白石光也  
(鹿児島大共同獣医) メチル水銀毒性における MARCKS タンパク質の関与  
とそのリン酸化動態への影響

16:15～16:40 一般8 高根沢康一  
(北里大学薬) オートファジー関連分子 p62 によるメチル水銀毒性防  
御機構

16:40～16:50 「若手研究奨励賞」授賞者発表および表彰式

16:50～17:00 閉会の挨拶(環境省)

# 特 別 講 演



# 職業性水銀蒸気曝露の疫学研究から動物実験への変遷

吉田稔（八戸学院大学・人間健康学部）

## 1. 緒言

水銀による健康被害は古くから知られている。我が国においても、戦前には種々の水銀取扱職場で数多く水銀中毒が発生している。戦後、水俣病発生を契機に環境中の水銀汚染および産業界で使用される水銀の労働者への影響が社会的に注目された。最近では、水銀による健康被害は使用する産業の減少、職場での健康管理、作業管理、作業環境管理といった労働衛生の啓発により、大企業ではほとんど見られない。しかし、家内工業的な色彩強い職場には、潜在的な水銀中毒患者が存在する<sup>1)</sup>。我々は家内水銀温度計製造あるいは水銀精製作業を行っている作業者に慢性水銀中毒を発見した。これらの患者はエレチスム、振戦、口内炎といった水銀中毒の三大主徴を呈していた<sup>2)</sup>。中でも水銀精製販売を営む作業者が最も重篤<sup>3)</sup>で、この中毒患者の家族に知的障害や運動機能の低下をもつ子供（7歳児）がおり、この障害は水銀曝露による影響と考えられた。母親も軽度ながら振戦が見られ、体内水銀負荷量も高いことから、妊娠中に水銀が胎盤と通過し、胎児に蓄積したことによる影響の可能性も高い。新生児期における水銀の曝露はその後の発育・発達に大きな影響を与えることが知られている。子供の症状は胎児期あるいは新生児期のいずれの水銀曝露の影響なのかは不明である。これらの問題を解明するため、動物を用いて胎児から新生児期の水銀動態の検討や神経行動毒性試験を行った。

## 2. 水銀取り扱い業種の疫学調査

水銀取り扱い業種である棒状温度計工場、体温計工場、隔測温度計工場、食塩電解工場そして無機水銀化合物製造工場を対象に水銀曝露実態調査を行った。水銀棒状温度計製造業の作業環境は最も悪く、当時の許容濃度（0.05mg/m<sup>3</sup>）をほとんどの事業場で超えており、作業員の中には尿中水銀濃度が1,950 μg/l、血液中無機

水銀濃度は275ng/mlを示した（表1）。多くは家内工業的温度計製造業であり、従業員の尿および血液中水銀濃度も他の業種に比べ高く、尿中水銀濃度が300 μg/l、血液中無機水銀濃度が100ng/mlを超えた作業員に振戦が見られた（図1）。自覚症状として食欲不振、体重減少などの消化器症状が見られた。他覚症状として振戦の他に、運動失調、言語障害、流唾過多、被刺激性亢進などが見られた<sup>1)</sup>。

表1 水銀取り扱い工場の気中水銀濃度と作業員の血中および尿中水銀濃度

業種	気中水銀 (mg/m <sup>3</sup> )	血中水銀 (ng/ml)	尿中水銀 (mg/l)
硝子水銀温度計工場 (9ヶ所)	84 (42~312)	~278	~1950
水銀体温計工場 (2ヶ所)	32 (15~49)	~50	~181
隔測水銀温度計工場 (2ヶ所)	14 (10~18)	~20	~94
水銀法食塩電解工場 (11ヶ所)	15 (2~47)	~63	~218
無機水銀化合物工場 (1ヶ所)	59	~55	~127

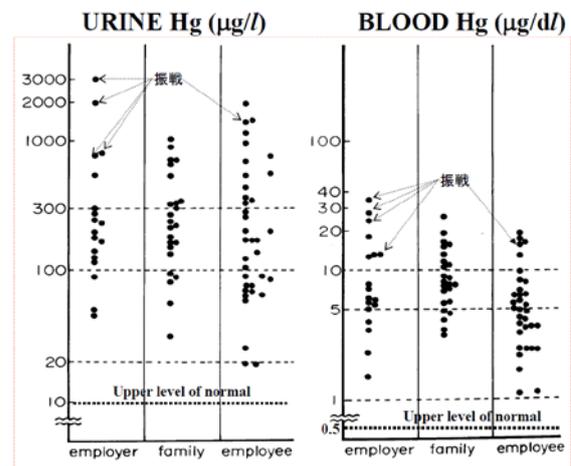


図1 温度計製造業者とその家族の尿および血中水銀濃度<sup>1)</sup>

慢性水銀蒸気曝露による腎臓への影響としてタンパク尿の出現が報告されている。水銀温度計製造業者や重症の慢性水銀中毒患者の観察においてタンパク尿は認

められず、タンパク尿は腎臓に対する水銀の影響を反映するものではなかった。また近位尿細管障害の指標である尿中  $\beta_2$ -ミクログロブリン排泄量は重症の慢性水銀中毒患者で神経症状の激しい時期にわずかな増加が見られるが、水銀温度計製造作業員（尿中水銀濃度 44~1049  $\mu\text{g/l}$ ）の調査では尿中  $\beta_2$ -ミクログロブリン排泄量の増加は認められない（図2）<sup>4</sup>。

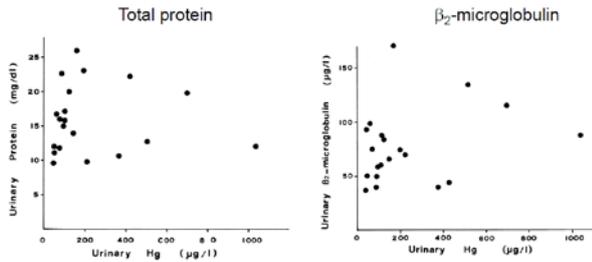


図2 水銀温度計作業員の尿中タンパク濃度と尿中  $\beta_2$ -ミクログロブリン量<sup>4</sup>

### 3. 慢性水銀中毒事例<sup>3</sup>

小規模水銀温度計製造工場の疫学調査の中、重篤な慢性水銀中毒症状を呈した水銀精製販売業者(54歳)を発見した。本症例は典型的な慢性水銀中毒の三大主徴である「エレチスム」、「振戦」、「口内炎」を呈していた。エレチスムは全体に落ち着きはなく、臆病であり、短気で、しかも不安な状態にあり、鬱状態、健忘、不眠などの症状が認められた。慢性中毒の典型的症状である振戦は手指に見られ、ボタンをはめたり、コップを持ったり、字を書いたりしなどの動作時に増強した（図3、図4）。水銀口内炎は唾液過多と歯肉炎による歯牙は脱落が見られた（図5）。長期間高濃度曝露によって生じる目の水晶体前嚢に水銀沈着（アトキンソン徴候）が見られた。



図3 慢性水銀中毒患者の企図振戦



図4 慢性水銀中毒症状（左：歩行失調、右：入院時書字試験）



図5 慢性水銀中毒患者の歯牙の脱落

治療はD-ペニシラミン投薬 1000mg/日から始めたが、投薬中に振戦が悪化したため、薬剤の減量や他のチオール剤（チオラ）への変更を行った。約3か月後には振戦、歩行障害、言語障害の改善が認められた。血液中水銀濃度はD-ペニシラミン投与の有無に関わらず指数関数的減少した。半年後、軽度な書字障害とアトキンソン徴候は認められたが、一般症状は改善したため退院となった（図6）。

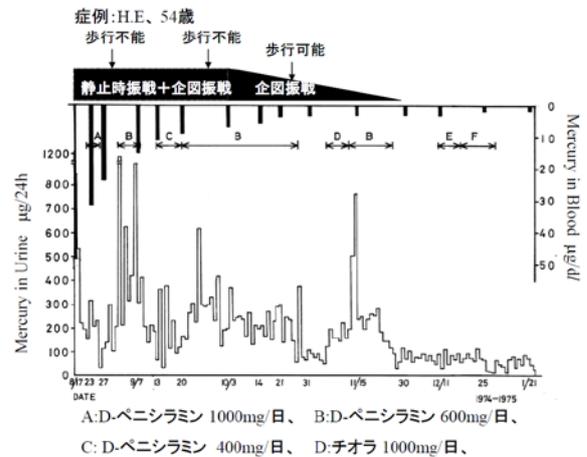


図6 入院経過と尿中および血液中水銀の推移<sup>3</sup>

本症例の作業場と住居と兼ねていたため、居住空間

の水銀濃度も高く、妻（44歳）や子（7歳）の尿中水銀濃度は $2,080 \mu\text{g}/1$ と $3,280 \mu\text{g}/1$ そして血液中水銀濃度は $320\text{ng}/\text{ml}$ と $300\text{ng}/\text{ml}$ と高値を示した。妻には軽い振戦が認められ、子は2歳半より次第に言葉が少なくなり、言語不能に至った。子の動作は鈍く、歩行失調を示し、知能は低く口、内炎などの症状を呈しており小児慢性水銀中毒と診断された。入院5か月後、尿中・血液中水銀濃度の低下、運動機能の改善が認められたが、言語障害は改善しなかった。児の水銀曝露による影響は胎生期における曝露なのか、発育・発達期における曝露かは不明であった。

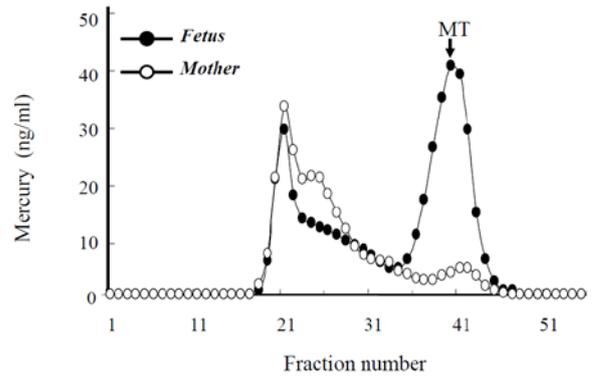


図8  $\text{Hg}^0$ 曝露後の母体と胎子の肝臓中水銀のゲルクロマトグラフィー<sup>6)</sup>

#### 4. 水銀蒸気の胎盤透過と体内水銀動態

胎盤関門は血液-脳関門と同様に無機水銀( $\text{Hg}^{2+}$ )に対しては胎児への移行を抑制するが、水銀蒸気( $\text{Hg}^0$ )は容易に胎盤を通過し胎児に移行する。しかし、周産期をめぐる水銀の体内動態は十分に解明されていない。妊娠後期のモルモットへの $\text{Hg}^0$ 曝露実験では、胎子の臓器中水銀濃度は母体の臓器と比較すると、肝臓を除いて極めて低いが、胎子肝臓の水銀濃度は母体より高値である(図7)。胎子の肝臓では、50%以上の水銀が、金属結合蛋白質であるメタロチオネイン(MT)と結合して存在しているが、母体の肝臓ではほとんどの水銀は高分子の蛋白質と結合している(図8)。

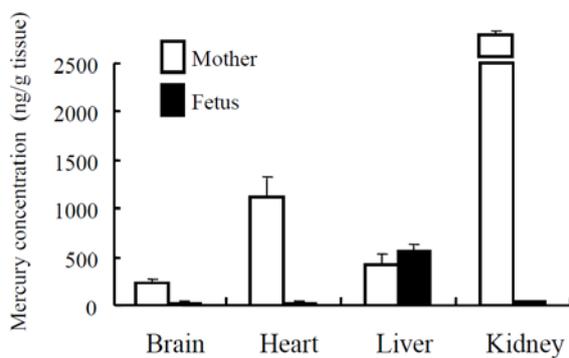


図7  $\text{Hg}^0$ 曝露後の母体と胎子の臓器中水銀の分布<sup>5)</sup>

MTは重金属毒性の軽減効果を示すことから、胎子の肝MTは、胎児における水銀毒性の軽減への関与が示唆された。出産後、新生仔モルモットの肝MT量の低下に伴い、肝臓中水銀は低下し、反対に脳、腎の水銀濃度は著しく増加が認められ、体内水銀の再分布が生じた(図9)。

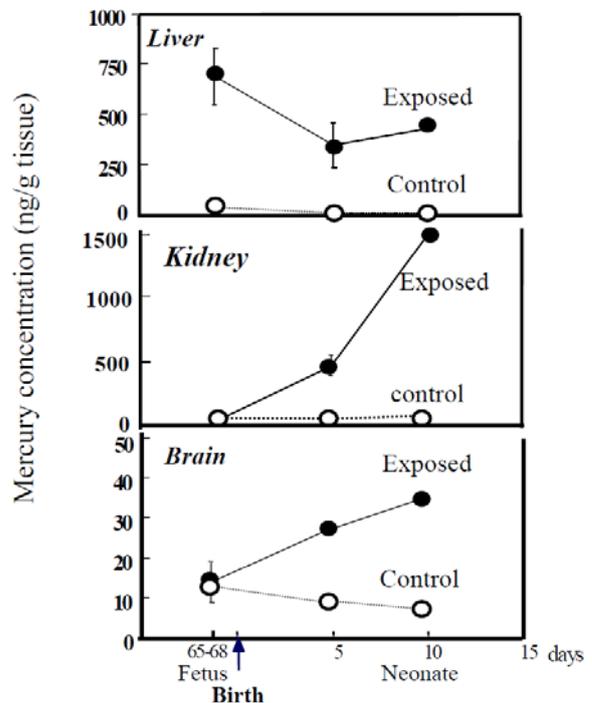


図9 妊娠中 $\text{Hg}^0$ 曝露を受けた胎子の出産後の体内水銀の動態<sup>7)</sup>

## 5. 発育・発達期におけるHg<sup>0</sup>曝露による神経行動毒性

発育・発達期に Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた場合、成人に比べ水銀毒性に対する感受性が高く、水銀中毒に罹患すると成人と異なり、その後、後遺症が残ることが報告されている。また水銀毒性を修飾する因子の1つにメタロチオネイン(MT)があり、ヒト集団においてMT合成能力の低い集団がいることが報告されている<sup>8)</sup>。胎生期および授乳期において低濃度 Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた時に神経行動毒性を C57/BL6 系野生型マウス(wild-type)と MT-I/II 遺伝子欠損マウス(MT-null)を用いて検討した。Hg<sup>0</sup> 曝露は妊娠中そして出産後は離乳まで連続して曝露を行った。行動異常はオープンフィールド(OPF)による個体の運動活動性や情動反応、受動的回避(PA)装置による嫌悪体験記憶に基づく回避学習、そしてモリス水迷路(WM)による空間学習などで評価した。

### 5-1. 胎生期 Hg<sup>0</sup> 曝露

妊娠中に Hg<sup>0</sup> 濃度 0.50~0.56mg/m<sup>3</sup> を1日6時間、出産まで曝露を受けた胎仔の生後12週齢で測定した結果、雄性MT-nullマウスのOPF試験で総移動距離と中心滞在割合、雌性MT-nullマウスのPA試験とWM試験で対照群との間に有意な差が認められた(表2)<sup>9)</sup>。

表2 胎生期に Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた野生型マウスと MT-null マウスの神経行動毒性<sup>9)</sup>

行動試験	Wild-type		MT-null	
	♂	♀	♂	♀
オープンフィールド (総移動距離)			P<0.05	
オープンフィールド (中心滞在割合)			P<0.05	
受動回避試験				P<0.05
水迷路試験				P<0.05

P<0.05, P<0.01: 対照群との間に有意差あり

### 5-2. 授乳期 Hg<sup>0</sup> 曝露

出産後から離乳までの授乳期に Hg<sup>0</sup> 濃度 0.023~0.43mg/m<sup>3</sup> を母子ともに1日6時間連日曝露を行い、生後12週齢に行動試験を実施した。雌性MT-nullマウスのOPF試験の総移動距離、中心滞在割合に対照群との

間に有意な差異が認められた(表3)。

表3 授乳期に Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた野生型マウスと MT-null マウスの神経行動毒性<sup>10)</sup>

行動試験	Wild-type		MT-null	
	♂	♀	♂	♀
オープンフィールド (総移動距離)				P<0.05
オープンフィールド (中心滞在割合)				P<0.05
受動回避試験				
水迷路試験				

P<0.05: 対照群との間に有意差あり

### 5-3. 加齢の影響

発育・発達期に Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた場合、成人に比べ水銀毒性に対する感受性が高いことが知られている。発育・発達期に低濃度 Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた場合の加齢による代償機能の低下が神経行動動静に及ぼす影響について検討した。C57/BL6 系野生型雌性マウスを授乳期に Hg<sup>0</sup> 濃度 0.03~0.108mg/m<sup>3</sup> で24時間連日曝露を行い、出産3か月と15か月に行動試験を行った。出産3か月の若年期では行動異常は認められないが、1年後の行動試験ではOPF試験の中心滞在割合に影響が認められた。

表4 授乳期に Hg<sup>0</sup> 曝露を受けた野生型雌性マウスの加齢の影響<sup>11)</sup>

行動試験	3 months	15 month
オープンフィールド (総移動距離)		
オープンフィールド (中心滞在割合)		P<0.01
受動回避試験		
水迷路試験		

P<0.01: 対照群との間に有意差あり

## 6. 結語

水銀取扱い業種の従業員の水銀曝露の実態調査では、棒状水銀温度計製造工場の職場環境が最も悪く、作業員の尿中水銀濃度が 300 μg/l そして血液中無機水銀

濃度が 100ng/ml を超えると振戦等の中毒症状が出現することが明らかとなった。中でも水銀精製販売業者は重篤な慢性水銀中毒症状を呈し、その児も慢性水銀中毒と診断された。児の水銀曝露は動物実験等の研究から妊娠中の胎児期そして出産後、乳児期・小児期の水銀曝露に起因することが示唆された。しかも水銀中毒にり患すると成人と異なり、その後、後遺症が残ること判明した。

近年、発展途上国では手掘り小規模金鉱山に1,100～1,300万人の作業員、そのうち女性250万人そして子供25万人が従事していると推定されている。小規模金鉱山で金抽出のために使用される水銀アマルガム法は鉱山従業員や地域住民への Hg<sup>0</sup> 曝露を引き起こしている。このことは労働者や住民に対し水銀による健康被害のみならず周辺の環境汚染をもたらすことから大きな社会問題となっている。とくに女性や発育期の小児への Hg<sup>0</sup> 曝露はその後に神経行動機能に大きな影響を与えるため健康リスクへの早急な対策が望まれる。

## 7. 謝 辞

本研究を行うに当たり、多岐にわたりご指導を賜りました聖マリアンナ医科大学名誉教授・故 山村行夫先生に深く感謝申し上げます。

## 8. 引用文献

- 1) 山村行夫ら、産業医学、14:455-461, 1972
- 2) 山村行夫ら、産業医学、15:431-439, 1973
- 3) 須崎二郎ら、日本内科学雑誌、63:43-48, 1976
- 4) 吉田稔ら、産業医学、25:272-273, 1983
- 5) Yoshida M. et al, Arch Toxicol., 58, 225., 1986
- 6) Yoshida M. et al, Toxicol Lett., 37, 1-6, 1987
- 7) Yoshida M. et al, J. Trace Elem. Exp. Med., 3, 219, 1990
- 8) Yoshida M. et al, Biol. Trace Elem. Res., 63:167-175, 1998
- 9) Yoshida M. et al, Toxicol Lett. 2005 155(3):361-8, 2005
- 10) Yoshida M. et al, J Toxicol Sci., 36(5):539-547, 2011
- 11) Yoshida M. et al, J Toxicol Sci., 38(1):1-6, 2013



# 一 般 講 演



## 歯クジラ筋肉の水銀の化学形態別分析とセレン濃度

○坂本峰至、安武章、中村政明、丸本倍美（国水研）、板井啓明（愛媛大 沿岸環境科学研究センター）、岩崎俊秀（水産総合研究センター 東北区水産研究所）、安永玄太、藤瀬良弘（日本鯨類研究所）、村田勝敬（秋田大学）、 Hing Man Chan（オタワ大学・カナダ）

### 1. 目的

歯クジラは食物連鎖の頂点に位置し、広く世界の海洋に生息して、主に魚、イカ、甲殻類を食べ筋肉を含む各臓器に高濃度の水銀を蓄積する<sup>1), 2), 3)</sup>。ゆえに、座礁した鯨の継続的なモニタリングは将来における地球規模の水銀汚染の予測にも役立つと考えられる。しかし、水銀汚染指標として使う前に、歯クジラの筋肉中に高い水銀が蓄積する機序について理解をする必要がある。遠藤ら<sup>7)</sup>は、本研究に使用した歯クジラ中総水銀濃度が 0.44-98.9  $\mu\text{g/g}$  湿重量であることを報告している。

セレン (Se) 濃度も歯クジラの組織で高く<sup>9), 10)</sup>、Se は水銀との親和性が非常に高いことが知られている。Se は無機水銀やメチル水銀の毒性を防御することが動物実験で知られている<sup>4), 13), 14)</sup>。また、海洋ほ乳類や鳥類にはメチル水銀を脱メチルし<sup>5), 6), 10), 11), 12)</sup>、臓器、特に肝臓に高い濃度で不活性なセレン化水銀を蓄積することが知られている。そこで、Se は水銀の蓄積機構を理解する上で重要な役割を果たすと考えられる。

加えて、水銀の化学形態は、特に歯クジラを食する集団において公衆衛生上の問題点でもある。

本研究では、ハンドウイルカ bottlenose dolphin (n=31)、ハナゴンドウ risso's dolphin (n=31)、スジイルカ striped dolphin (n=29)、マゴンドウ short-finned pilot whale (n=30)、ほぼ雌雄同数の各種歯クジラ類に関し、筋肉中の水銀の化学形態について、生物学的情報（体長、性別）を加味して、T-Hg、MeHg、I-Hg、Se の関連・モル比等

を解析する。次に、X線吸収微細構造 (XAFS) 分析を、高濃度水銀濃度を示したバンドウイルカの背部筋肉で行い、筋肉中の水銀の主要化学形態を推定する。最後に、電子プローブ・マイクロアナリシス (EPMA) を行い、ハンドウイルカの筋繊維細胞での水銀と Se の局在を視覚化する。

### 2. 方法

T-Hg、MeHg の測定は試料に 5 倍容の蒸留水を加えてホモジナイズした溶液で、赤木らの方法に準じ、原子吸光法、ECD-ガスクロマトグラフィーで行なった。Se 測定は試料に 5 倍容の 2N-NaOH で 30 分間加熱した分解溶液で、ICP-MS で行った。X-線吸収微細構造分析線 (XAFS) 解析を、高濃度水銀濃度を示したハンドウイルカの筋肉で行い、筋肉中の水銀の主要化学形態を推定する。最後に、電子プローブマイクロアナリシス (EPMA) 解析を行い、ハンドウイルカの筋繊維細胞での水銀と Se の局在を視覚化する。

### 3. 結果

化学分析の結果、それぞれの歯クジラの筋肉中水銀と Se 濃度は種に依存した濃度を示した。ハンドウイルカの T-Hg、MeHg、I-Hg 及び Se 濃度は他の 3 種の歯クジラよりも有意に高い濃度であった。一方、MeHg% は最も低い値を示した(表 1)。

図 1 に 4 種歯クジラにおける体長、性別の個体別水銀濃度を示した。雌雄、体長と T-Hg 濃度の間には明らかな差は認められなかった。よって、以降の解析には雌雄のデータを合わ

せて用いた。

表 1. 4 種歯クジラにおける総水銀、無機水銀、セレン濃度

Table 1. T-Hg, MeHg and Se concentrations in muscle of 4 species of tooth-whales

Species 平均(標準偏差)	T-Hg ppm	MeHg ppm	MeHg (%)	I-Hg ppm (T-Hg-MeHg)	Se ppm
Bottlenose dolphin n=31	31.0 (18.2)	7.21 (1.80)	35.4 (24.7)	23.8 (17.3)	14.6 (10.5)
Risso's dolphin n=31	4.31 (3.02)	2.60 (0.660)	70.9 (18.9)	1.70 (2.69)	1.74 (1.22)
Striped dolphin n=29	7.21 (5.02)	2.37 (0.697)	50.0 (29.3)	4.84 (4.75)	3.48 (2.89)
Short-finned pilot whale n=30	7.92 (4.29)	4.40 (1.79)	62.9 (21.9)	3.52 (3.37)	2.75 (1.57)

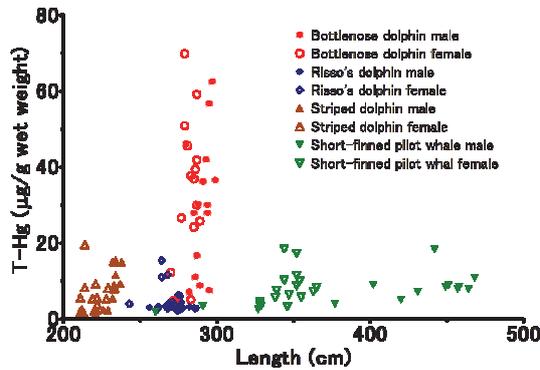


FIGURE 1a. Individual distribution of T-Hg concentrations (wet w.) in muscles by sex and length of bottlenose dolphin ハンドウイルカ(n=29), risso's dolphin ハナゴンドウ(n=31), striped dolphin スジイルカ(n=31), and short-finned pilot whale コビレゴンドウ(n=30).

図 1. 4 種歯クジラにおける体長、性別の個体別水銀濃度

歯クジラの筋肉では、T-Hg の増加に伴って MeHg 濃度増加したが、MeHg 濃度は各種ごとに一定の値(3-8ppm)でプラトーになる傾向にあった (図 2 a)。

図 2 b に示すように、T-Hg の濃度が低い場合には 4 種の歯クジラ筋肉中のメチル水銀の割合は、ほぼ 90~100%であった。だが、MeHg のパーセンテージは T-Hg の濃度の増加に伴って急激に減少し 10~30%となった。

図 3 には T-Hg と Se/I-Hg モル比を示した。T-Hg 濃度が高まるにつれ Se/I-Hg モル比は 1:1 に急激に収束した。即ち、T-Hg 濃度が高まるにつれ、脱メチル水銀化反応が進み、

T-Hg 濃度の増加に従い、急激に I-Hg と Se の当モル複合体が形成されることが示唆された。

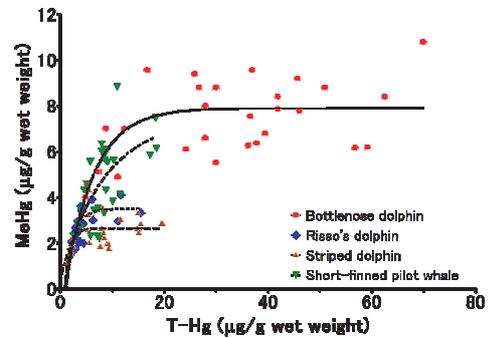


FIGURE 2a. The relationships between T-Hg and MeHg concentrations (µg/wet g) in muscles of bottlenose dolphin ハンドウイルカ(n=31), risso's dolphin ハナゴンドウ(n=31), striped dolphin スジイルカ(n=29), and short-finned pilot whale コビレゴンドウ(n=30).

図2a. 4 種歯クジラにおける総水銀とメチル水銀濃度の関連

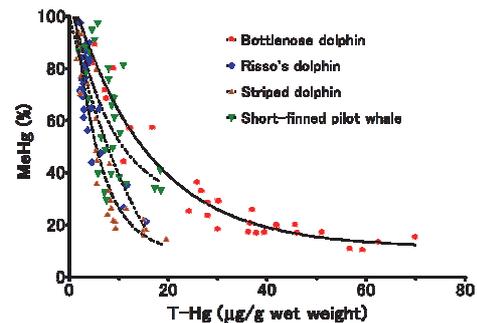


FIGURE 2b. Relationships between T-Hg concentrations (µg/wet g) and the percentage of MeHg in muscles of bottlenose dolphin ハンドウイルカ(n=31), risso's dolphin ハナゴンドウ(n=31), striped dolphin スジイルカ(n=29), and short-finned pilot whale コビレゴンドウ(n=30).

図2b. 4 種歯クジラにおける総水銀とメチル水銀 (%)の関連

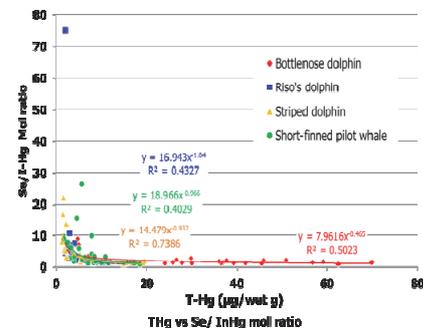


FIGURE 3a. Relationships between T-Hg and Se concentrations (µg/wet g) in muscles of bottlenose dolphin ハンドウイルカ(n=31), risso's dolphin ハナゴンドウ(n=31), striped dolphin スジイルカ(n=29), and short-finned pilot whale コビレゴンドウ(n=30).

図3. 4 種歯クジラにおける総水銀と Se / I-Hg モル比との関係

図4 a, b に示した XAFS 解析による、ハンドウイルカと水銀化合物標準試薬のスペクトルを示した。ハンドウイルカのスペクトルは HgSe のスペクトルと一致した。このことから、ハンドウイルカの主要水銀セレン複合体は HgSe であるという結果が得られた。

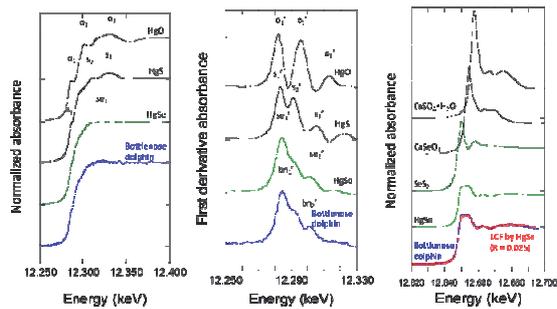


FIGURE 4a. Mercury LIII XANES spectra of standard compounds and FIGURE 4b. First derivative (HgO, HgS and HgSe) and the muscle of bottlenose dolphin/ハンドウイルカ。FIGURE 4c. Normalized absorbance of Se K-edge XANES spectra of standard compounds (CaSO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O, CaSeO<sub>2</sub>, SeS<sub>2</sub>, HgSe) and the muscle of bottlenose dolphin/ハンドウイルカ。

図4a. ハンドウイルカと水銀化合物標準物質の XANES と一次微分スペクトル, 4b ハンドウイルカとセレン化合物標準物質の XANES スペクトル

図5. に示したように、EPMA により水銀と Se のイメージ画像から、これらの元素が筋細胞内の同じ場所に顆粒状に蓄積されていることが示唆された。

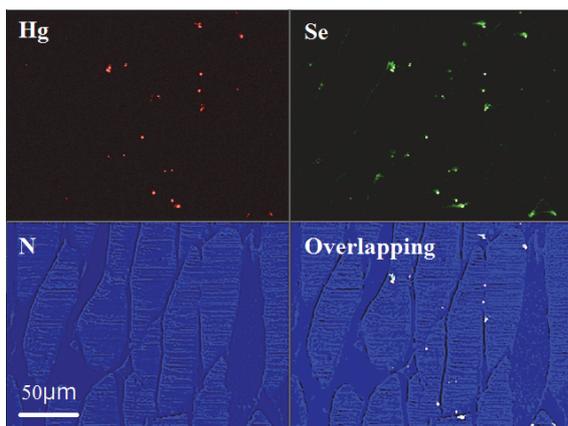


FIGURE 5. Electron probe microanalysis (EPMA) mapping of mercury (red dots), selenium (green dots), compositional image of nitrogen and co-localization of Hg and Se (white dots) in longitudinally cut muscle fibers of bottlenose dolphin.

図5. EPMA マッピングによる水銀(赤)、セレン(緑)、窒素による細胞組成、重複(白)イメージ

即ち、歯クジラ類は MeHg の無機化能が高く、筋肉でも T-Hg の上昇に伴い無機水銀が形成され、形成された HgSe は、不活性で細胞からの排出経路が無いので、筋細胞内の細胞膜内側に顆粒状に蓄積されていくものと考えられた。

## 引用文献

- 1) Andre, J., Boudou, A., Ribeyre, F., Bernhard, M., 1991. Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts. *Sci. Total Environ.* 104, 191-209.
- 2) Caceres-Saez, I., Dellabianca, N.A., Goodall, R.N., Cappozzo, H.L., Guevara, S.R., 2013. Mercury and selenium in subantarctic Commerson's dolphins (*Cephalorhynchus c. commersonii*). *Biol. Trace Elem. Res.* 151, 195-208.
- 3) Chang, L.W., Suber, R., 1982. Protective effect of selenium on methylmercury toxicity: a possible mechanism. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 29, 285-289.
- 4) Chen, M.H., Shih, C.C., Chou, C.L., Chou, L.S., 2002. Mercury, organic-mercury and selenium in small cetaceans in Taiwanese waters. *Mar. Poll. Bull.* 45, 237-245.
- 5) Dietz, R., Nielsen, C.O., Hansen, M.M., Hansen, C.T., 1990. Organic mercury in Greenland birds and mammals. *Sci. Total Environ.* 95, 41-51.
- 6) Dietz, R., Outridge, P.M., Hobson, K.A., 2009. Anthropogenic contributions to mercury levels in present-day Arctic animals—a review. *Sci. Total Environ.* 407, 6120-6131.
- 7) Endo, T., Hotta, Y., Haraguchi, K., Sakata, M., 2003. Mercury contamination in the red meat of whales and dolphins marketed for human consumption in Japan. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2681-2685.
- 8) George, G.N., MacDonald, T.C., Korbas, M., Singh, S.P., Myers, G.J., Watson, G.E., O'Donoghue, J.L., Pickering, I.J., 2011. The chemical forms of mercury and selenium in whale skeletal muscle. *Metallomics: integrated biometal science* 3, 1232-1237.
- 9) Itano, K., Kawai, S., Miyazaki, N., Tatsukawa, R., Fujiyama, T., 1984. Mercury and selenium levels in striped dolphins caught off the Pacific coast of Japan. *Agric. Biol. Chem.* 48, 1109-1116.
- 10) Koeman, J.H., van de Ven, W.S., de Goeij, J.J., Tjioe, P.S., van Haften, J.L., 1975. Mercury and selenium in marine mammals and birds. *Sci. Total Environ.* 3, 279-287.
- 11) Lemes, M., Wang, F., Stern, G.A., Ostertag, S.K., Chan, H.M., 2011. Methylmercury and selenium speciation in different tissues of beluga whales

- (Delphinapterus leucas) from the western Canadian Arctic. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2732-2738.
- 12) Nakazawa, E., Ikemoto, T., Hokura, A., Terada, Y., Kunito, T., Tanabe, S., Nakai, I., 2011. The presence of mercury selenide in various tissues of the striped dolphin: evidence from  $\mu$ -XRF-XRD and XAFS analyses. *Metallomics: integrated biometal science* 3, 719-725.
  - 13) Ralston, N.V., Ralston, C.R., Blackwell, J.L., 3rd, Raymond, L.J., 2008. Dietary and tissue selenium in relation to methylmercury toxicity. *Neurotoxicology* 29, 802-811.
  - 14) Sakamoto, M., Yasutake, A., Kakita, A., Ryufuku, M., Chan, H.M., Yamamoto, M., Oumi, S., Kobayashi, S., Watanabe, C., 2013. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2862-2868.

## 加熱気化原子吸光法を用いた生物試料中メチル水銀の簡易分析法

○山元 恵、宮本謙一郎、桑名 貴、中野篤浩（国立水俣病研）、吉本圭佑（国立水俣病研、熊本県立大）、安藤哲夫、郡山千早、山本 淳（鹿児島大）、石橋康弘（熊本県立大）、田端正明（佐賀大）

### 1. 背景

ヒトにおけるメチル水銀の主な曝露源は魚介類の摂取である。水銀の生体内動態や健康影響はその化学形により異なるが、特にメチル水銀は血液脳関門、血液胎盤関門を通過するため、脳神経系や胎児への影響や健康リスクを評価するために生物試料中のメチル水銀を測定する必要がある。

従来、生物試料中の総水銀は原子吸光法で測定され、メチル水銀はガスクロマトグラフィー法で測定されることが多く、二種類の装置と分析技術を具備する必要がある。また、最近では GC-ICP/MS、LC-ICP/MS といった様々な手法によるメチル水銀分析も報告されているが、水銀による環境汚染が問題となっている多くの開発途上国においては、高価な機器・ランニングコスト、高度な技術を要する水銀分析をルーティンに遂行することは困難であるため、簡便でコストパフォーマンスに優れたメチル水銀分析法が求められている。

### 2. 目的

簡便でコストパフォーマンスの優れた生物試料中のメチル水銀分析法の開発を行い、基礎医学・疫学研究や環境生物試料中の水銀濃度のデータベース構築へ貢献することを目的とする。

### 3. 方法

Magos らの方法<sup>1)</sup>に準じて魚介類、毛髪等の生物試料を NaOH により加熱・溶解後、クロロホルム・ヘキサンにより脱脂し、可溶化液の総水銀を加熱気化原子吸光法により測定した。続いて本可溶化液を HBr とトルエンにより処理し、最終的にシステイン化合物として有機水銀画分を抽出した。これまでエチル水銀を含むワクチン

を接種されたヒト検体を除き、自然界の生物試料からメチル水銀以外の有機水銀の検出は報告されていないため、本法により抽出される有機水銀をメチル水銀として加熱気化原子吸光法により測定した。メチル水銀の水溶液、および検討を行った一般的な生物試料（毛髪、魚介類筋肉等）におけるメチル水銀の抽出効率はいずれもほぼ 95%であったため、95%を補正係数として試料中のメチル水銀濃度を算出した。

さらに本法における生物試料の脱脂ステップに用いるクロロホルムをメチルイソブチルケトン（MIBK）に置換することにより、さらなる簡便化を試みた。

### 4. 結果・考察

4-1: 本研究で開発したメチル水銀分析原法<sup>2)</sup>におけるメチル水銀の抽出効率や精度の確認について、メチル水銀水溶液、およびメチル水銀水溶液をスパイクした毛髪または魚介類の可溶化液を用いて行った。その結果、メチル水銀水溶液の抽出効率は  $94.2 \pm 1.1\%$ 、 $94.4 \pm 1.4\%$ 、および  $0.1 \mu\text{g/ml}$  メチル水銀水溶液をスパイクした毛髪または魚介類の可溶化液におけるメチル水銀抽出効率は各々  $94.4 \pm 1.0\%$ 、 $94.6 \pm 1.4\%$ であった。（表 1）

4-2: 本メチル水銀分析原法におけるメチル水銀抽出効率や精度の確認試験を毛髪（NIES, No. 13, IAEA-085）、および魚介類（CRMS-463）の認証標準物質を用いて行った結果、メチル水銀の実測値は認証値とほぼ一致した。（表 2）

4-3: さらに本法における生物試料の脱脂ステップに用いるクロロホルムをメチルイソブチルケトン（MIBK）に置換したメチル水銀分析改良法におけるメチル水銀抽出効率や精度の確認試験を毛髪（NIES, No. 13）、および魚介類の認

証標準物質 (NMIJ, 7402-a, NMIJ, 7403-a) を用いて行った。その結果、メチル水銀の抽出効率は各々95.1±0.9%、95.3±0.5%、94.6±0.4%であり、またメチル水銀の実測値は認証値とほぼ一致した。(表3、4)

4-4: 魚介類の筋肉を用いて本メチル水銀分析改良法における測定精度についてGC-ECDによるメチル水銀分析法<sup>3)</sup>とのクロスチェックを行った結果、ほぼ同等の値が得られた。(表5)

4-5: 本改良法適用の一環として、市販のマダイ、イトヨリダイの組織(筋肉、肝臓)中の総水銀およびメチル水銀を測定した結果、各組織(筋肉、肝臓)中のメチル水銀/総水銀の割合は、筋肉では各々97.6%、96.8%、肝臓では63.2%、35.9%であった。(表6)

これらの検討を通じて、一個の生物試料を用いて一台の機器(加熱気化原子吸光計)を用いた一連の抽出操作により、総水銀とメチル水銀の分析が可能となり、従来のメチル水銀分析法と同等の測定精度を持つことが確認された。本法は、2013年の水銀に関する水俣条約において環境省が示した今後の重要検討項目である「メチル水銀の簡便な分析法の開発」に貢献するものと考えられる。

表1

メチル水銀分析原法によるメチル水銀水溶液およびメチル水銀スパイク毛髪・魚介類のメチル水銀回収率

Sample	Recovery (%)	
	Standard solubilized MeHg solution	MeHg-spiked solubilized solution
Hair	94.2 ± 1.1	94.4 ± 1.0
Fish	94.4 ± 1.4	94.6 ± 1.4

表2

メチル水銀分析原法による毛髪・魚介類認証標準物質のメチル水銀測定値

	Certified MeHg value (μg/g)	HVAAS (μg/g)
Human hair (NIES, No. 13)	3.8 ± 0.4	3.81 ± 0.09
Human hair (IAEA-085)	22.9	23.1 ± 0.06
Tuna fish meal (CRMs-463)	2.83	2.81 ± 0.10

表3

メチル水銀分析改良法による毛髪・魚介類認証標準物質のメチル水銀回収率

	T-Hg		MeHg	
	Recovery (%)	CV (%)	Recovery (%)	CV (%)
Cod fish (NMIJ, CRM 7402-a)	99.5±0.5	0.5	95.1±1.0	1
Swordfish (NMIJ, CRM 7403-a)	101.9±0.7	0.7	95.3±0.6	0.6
Hair (NIES, CRM No.13)	100.0±0.3	0.7	94.6±0.4	0.5
Average	100.5±1.3	1.3	95.1±0.5	0.5

表4

メチル水銀分析改良法による毛髪・魚介類認証標準物質の総水銀・メチル水銀の測定値

	Measured value (μg/g)				Certified value (μg/g)	
	T-Hg	CV (%)	MeHg	CV (%)	T-Hg	MeHg
Cod fish (NMIJ, 7402-a)	0.61±0.00	0.5	0.58±0.01	1	0.61±0.02	0.58±0.02
Swordfish (NMIJ, 7403-a)	5.44±0.04	0.7	5.02±0.03	0.6	5.34±0.14	5.00±0.22
Hair (NIES, No. 13)	4.42±0.03	0.8	3.78±0.02	0.5	4.42±0.20	3.80±0.40

表5

魚介類筋肉を用いたメチル水銀分析改良法とGC-ECD法のメチル水銀測定精度のクロスチェック

Tissues	MeHg (ng/g wet)	
	Current method	GC-ECD method
Muscle	479	486
	483	491

表 6

魚介類筋肉・肝臓を用いたメチル水銀分析改良法の実地応用

Species	Tissues	T-Hg ( $\mu\text{g/g}$ )	MeHg ( $\mu\text{g/g}$ )	MeHg/ T-Hg (%)
Red seabream ( <i>Pagus major</i> )	Muscle	0.083 $\pm$ 0.012	0.081 $\pm$ 0.012	97.6 $\pm$ 0.5
	Liver	0.059 $\pm$ 0.007	0.038 $\pm$ 0.005	63.2 $\pm$ 1.7
Golden threadfin bream ( <i>Nemipterus virgatus</i> )	Muscle	0.097 $\pm$ 0.006	0.094 $\pm$ 0.005	96.8 $\pm$ 0.4
	Liver	0.091 $\pm$ 0.009	0.033 $\pm$ 0.003	35.9 $\pm$ 1.4

## 参考文献

- 1) Magos, L.; Clarkson, TW. Atomic absorption determination of total, inorganic, and organic mercury in blood. J Assoc Off Anal Chem. 1972, vol. 55, no. 5, p. 966-71.
- 2) Miyamoto K, Kuwana T, Ando T, Yamamoto M, Nakano A. Methylmercury analyses in biological materials by heating vaporization atomic absorption spectrometry. J Toxicol Sci. 2010 Apr;35(2):217-24.
- 3) 水銀分析マニュアル. 環境省. 平成 16 年 3 月.  
[http://www.nimd.go.jp/kenkyu/docs/mercury\\_analysis\\_manual\(j\).pdf](http://www.nimd.go.jp/kenkyu/docs/mercury_analysis_manual(j).pdf)

## 野生哺乳類における Hg 蓄積特性と蓄積機構解明へのアプローチ

○寶來佐和子（鳥取大学地域学部）、柳 久美子、要 匡、田辺信介、渡邊 泉、阿部慎太郎、小倉剛、山本雅達、古川龍彦（鹿児島大学医歯学総合研究科）

### 1. はじめに

水銀 (Hg) はグローバルな汚染物質であり、そのリスク評価は現在ハイレベルの国際環境政策課題となっている。その理由として、1950 年代に日本における水俣病の発生、1960 年から 1970 年にかけて北欧で有機水銀農薬の散布による汚染、1970 年代後半には、南米や東南アジアの国々で苛性ソーダ工場による水銀汚染、1980 年代にはアマゾン川流域、ミンダナオ島やスラウェシ島、ビクトリア湖にて金鉱山の水銀汚染等の顕在化と、それらの汚染が長期的に継続していることがあげられる。つまり、社会的関心が高いにもかかわらず、世界における水銀公害は依然として発生している。人間活動による環境中への水銀放出量は年間約 2200 トンと見積もられ、その中で経済発展が著しいアジア諸国の占める割合は 54% である (Pacyna et al. 2006)。また、環境中への水銀放出量は経済発展の速度と明らかに比例していることから (Shi et al. 2010)、今後アジア諸国からの水銀放出量は増加する可能性がある。環境中に放出された水銀は、体内でメチル水銀に変換され、生物濃縮により高次栄養段階の野生生物に高蓄積される。その現象は海洋生態系において顕著であり、多くの海棲哺乳類から高レベルの水銀が検出されている (Wagemann et al. 1998; Cardellicchio et al. 2000; Fant et al. 2001; Woshner et al. 2001; Cardellicchio et al. 2002; Chen et al. 2002; Monteiro-Neto et al. 2003; Ikemoto et al. 2004 a, b; Lemes et al. 2011)。我々の先行研究において、外洋性鯨類であるカズハゴンドウとスジイルカの肝臓からそれぞれ最高 1240ppm、770ppm (乾重量) の濃度の Hg が検出された (未発表データ)。これらのレベルは水俣病患者 (国

立水俣病総合研究センター, 2005) やネコ (Eto et al. 2001) から検出された濃度をはるかに上回り、毒性が発現してもおかしくない値であった。その一方、水銀を高蓄積する生物種の肝臓は卓越したメチル水銀解毒機構を有していることが指摘されていることから (Ikemoto et al. 2004; Horai et al. 2008)、野生動物における水銀のリスクを正しく評価するには、脳における毒性影響だけでなく、肝臓のメチル水銀解毒能を理解することも重要となるだろう。なぜな

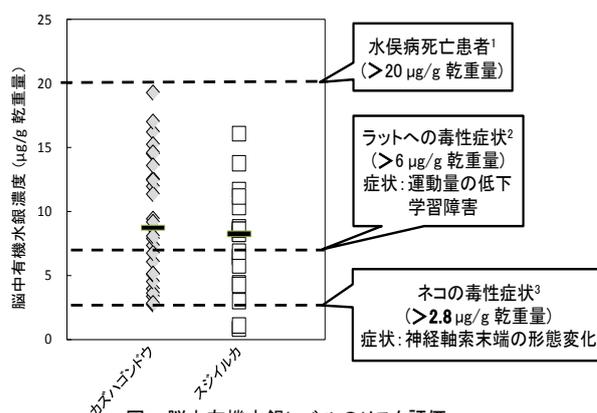


図1 脳中有機水銀レベルのリスク評価

(1和田1985; 2 Sakamoto et al. 2002, 3 Oliveira et al. 2008)

ら、メチル水銀毒性の主な標的器官は脳であるが、多くの生物において、肝臓がメチル水銀の解毒・代謝場所であり、水銀高蓄積種の本臓器において、水銀をもっとも高蓄積しているからである。

野生動物の脳を用いた水銀汚染のモニタリングやリスク評価に関する報告は極めて少ないのが現状である。そこでカズハゴンドウとスジイルカの脳を用いてメチル水銀暴露による毒性影響がみられた実験動物 (Sakamoto et al. 2002; Oliveira et al. 2008) と比較したところ、多くの検体で毒性レベルを超過していた (図 1)。鯨類は化学汚染物質を高

蓄積している一方で、実験動物よりも毒性に

脆弱であると言われている (立川, 1995)。さらに近年メチル水銀暴露によるヒトを対象とした疫学調査 (Wigle et al. 2008) や実験動物 (Castoldi et al. 2008) を用いた研究から、繁殖や胎児の発育や神経発達への影響が懸念されている。そのため、生態系保全や生物種存続のためにも海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性評価は重要である。先行研究において、実験動物 (ゼブラフィッシュ等) を用いたメチル水銀の脱メチル化に関する遺伝子発現研究は若干あるものの (Gonzalez et al. 2005)、関与遺伝子の特定に至っていないのが現状である。また、近年、水銀高蓄積鯨類種であるシロイルカの神経毒性のバイオマーカー候補が報告されたが (Ostertag et al, 2014)、水銀高蓄積野生哺乳類種における肝臓中脱メチル化機構に関する報告は皆無である。以上のことから、海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性に対するリスク評価法の確立は急務である。

ファイリマングース (*Herpestes auropunctatus*) の原産国はインドやパキスタンなどの東南アジアである。本種はネズミやヘビの駆除に有効であると考えられ、いくつかの地域に導入された。しかし、在来種を捕食して、地域固有の生態系をかく乱することが判明したことから、導入先では外来移入種として駆除対象となった。日本における本種のおもな生息地は、沖縄本島と奄美大島であり、他の導入国と同様、駆除対象となっている。本種の元素蓄積特性に着目して研究を遂行してきた中で、本種は陸上哺乳類であるにもかかわらず、肝臓中水銀レベルが海棲哺乳類と同等に高レベルであり、また総 Hg 濃度が高くなるに従って、有機 Hg の割合が減少することや、Hg と Se のモル比が 1 に近似することなど、水銀高蓄積種である海棲哺乳類と類似した蓄積パターンを示すことが判明した (Horai et al., 2006)。これらの事実から、ファイリマングースが水銀高蓄積のモデル動物として有効であることが考えられ、本種肝臓内の水銀代謝を明らかにすることで、海棲哺乳類体内の水銀動態解明に

繋がることを期待される。本研究のゴールは、ファイリマングース肝細胞内における水銀代謝機構の解明である。そのファーストステップとし

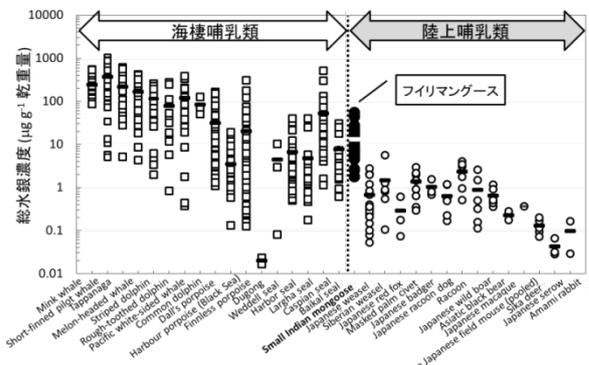


図2 肝臓中水銀濃度の種間比較

て、本種肝細胞内の水銀分布を把握するために、細胞内小器官分画と肝組織の Autometallography (AMG) 染色を実施した。

本種肝臓の水銀代謝を理解するためには、水銀投与実験が必要となる。本種は外来移入種であることや野生動物であることから、取り扱いや安定供給の面などにおいて制約が生じる。従って、*in vivo* 試験はきわめて困難である。初代細胞は短期間ではあるが、*in vivo* とほぼ同等の肝機能を発現する。そこで、本種肝臓におけるメチル水銀に対する細胞内分子応答を *in vitro* で明らかにするため、本種の初代肝細胞培養法を確立した (Horai et al. 2014)。

## 2. 結果と考察

### 2-1. ファイリマングース肝細胞内小器官における Hg 分布

ファイリマングースの肝臓から核、ミトコンドリア、細胞質、小胞体、細胞膜に細胞分画し、それら細胞内小器官中の総水銀 (T-Hg)、有機水銀 (O-Hg)、Se 濃度を測定した。その結果、T-Hg と Se 濃度は小胞体と細胞膜画分で高値であり、同様の分布を示した。一方、O-Hg は、細胞質で高い濃度を示した。このように、T-Hg および Se と O-Hg の細胞内小器官における分布は異なることが明らかとなった。次に、各画分における T-Hg に対する O-Hg を解析した結果、小胞体画分にお

いて、有意に低いことが示された。このことから、小胞体においてO-Hgの脱メチル化が促進されていることが推察された。

本種肝臓中T-Hgレベルと細胞内小器官中T-Hgレベルとの関係を解析したところ、肝臓中レベルが低いと、小胞体画分中レベルが高かった。そして肝臓中レベルの上昇に伴い、小胞体と細胞膜画分中レベルが上昇した。従って、肝臓中Hgは、その濃度が低いときは小胞体に分布するが、濃度上昇により、細胞膜に分布することが示唆された。

## 2-2. フィリマンゲース肝組織におけるAMG染色法を用いたHg分布

本種肝組織中のHg分布を明らかにするため、Auto metallography (AMG) 染色法 (Danscher and Stoltenberg; 2006) を用いて、ラットと比較した (図3 矢印)。フィリマンゲースの肝組織において褐色のドットが検出された。これらはHgがSeあるいはSと化合物を形成していることを示

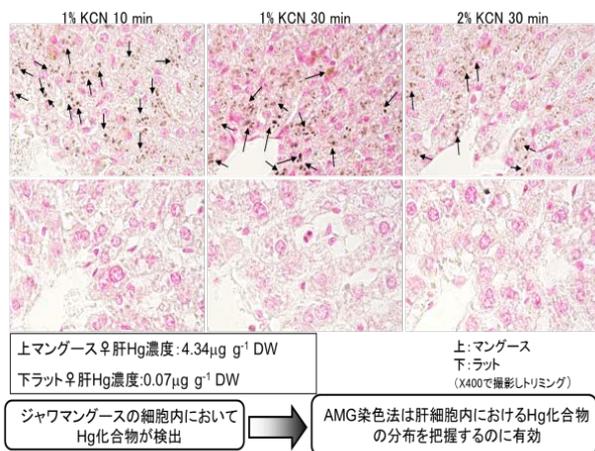


図3 AMG染色法を用いた肝組織における水銀化合物の検出

す。さらにその化合物は、肝小葉中心に多く存在していることを明らかにした (図4 矢印)。この分布場所は小胞体が多く存在する分布域と一致しており、多くの薬物代謝酵素が活発に作用している場所である。これらの事実から、メチル水銀の脱メチル化に薬物代謝酵素が関与していることが推察された。このことは、我々がこれまで立てていた仮説の一部 (Horai et al.

2008) を裏付けるものでもある。

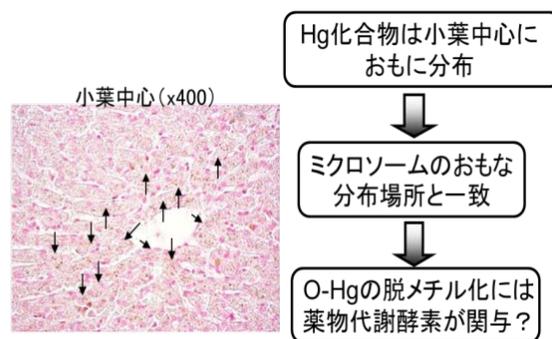


図4 AMG染色法によるHg化合物の肝組織内分布

## 2-3. フィリマンゲース由来初代肝細胞培養法の確立

種によって初代肝細胞培養に最適な培地は異なる。そこで、3種の培地 (DMEM、RPMI-1640、Williams E) から、本種の初代肝細胞に適した培地を選択した。3日目で、目視で顕著な差を観察できた。DMEMとRPMI-1640培地では、細胞死と形態異常が観察された一方で、Williams E培地では、それらがほとんど観察されなかった。このことから、本種の初代肝細胞培養培地にWilliams E培地を選択した。

肝臓はおもに肝実質細胞と4種の類洞細胞で構成されている。PAS染色はグリコーゲンを染める染色方法で、ファイibroblastや内皮細胞ではわずかにしか染まらない。そこで得られた初代肝細胞が肝実質細胞かどうかPAS染色法を用いて検討した。その結果、PAS陽性を示したことから、得られた初代肝細胞は、そのほとんどが実質細胞であることが判明した。

## 2-4. フィリマンゲース由来初代肝細胞を用いた水銀毒性試験

MTTアッセイ法を用いて本種の水銀およびセレンの毒性試験を実施し、ラットと比較した。メチル水銀毒性に差はみられなかったものの、HgCl<sub>2</sub>のIC<sub>50</sub>はラットよりフィリマンゲースにおいて高い傾向がみられた。一方、亜セレン酸 (Na<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Se) のIC<sub>50</sub>はラットで高い傾向がみられ

た。これらのことから、ファイリマングースの肝臓はラットと比べて、 $\text{HgCl}_2$  耐性はあるものの、セレンの毒性に弱いことが推察された。例数がすくないため、今後例数を増やしてさらに検討する必要があるだろう。

次に本種の肝臓中 T-Hg 濃度と、メチル Hg および亜セレン酸の  $\text{IC}_{50}$  との関係解析した。その結果、肝臓中 T-Hg 濃度とメチル Hg の  $\text{IC}_{50}$  との間に正の相関がみられた。このことから、肝臓中 T-Hg 濃度が上昇すると、メチル Hg 毒性に強くなることが推察された。一方、肝臓中 T-Hg 濃度と亜セレン酸の  $\text{IC}_{50}$  との間には相関性はみられなかったものの、肝臓中 T-Hg 濃度が上昇すると、亜セレン酸毒性に弱く傾向がみられた。

今後の展開として、初代肝細胞を用いた水銀の取り込み試験、排泄試験、毒性試験、水銀代謝に関連する遺伝子の探索を実施する予定である。

### 3. 謝辞

本研究は、環境研究総合推進費 (RF-085、RF-0908) および科学研究費補助金若手研究 B (23710044) の助成を受けたものである。

### 4. 引用文献

Cardellicchio, N., Giandomenico, S., Ragone, P., Di Leo, A. (2000) Tissue distribution of metals in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Apulian coasts, Southern Italy. *Mar. Environ. Res.* 49, 55-66.

Cardellicchio, N., Decataldo, A., Di Leo, A., Misino, A. (2002) Accumulation and tissue distribution of mercury and selenium in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from the Mediterranean Sea (southern Italy). *Environ. Pollut.* 116, 265-271.

Castoldi AF, Coccini T, Ceccatelli S, Manzo L. (2001) Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Res Bull.* ;55:197-203.

Chen MH, Shih CC, Chou CL (2002) Mercury, organic-mercury and selenium in small cetaceans in Taiwanese waters. *Mar Pollut Bull* 45:237-245.

Danscher G, Stoltenberg M (2006) Autometallography (AMG) Silver enhancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from

metal implants and particles. *Prog Histochem Cytochem* 41:57-139.

Eto, K., Yasutake, A., Nakano, A., Akagi, H., Tokunaga, H., Kojima, T. (2001) Reappraisal of the historic 1959 cat experiment in Minamata by the Chisso Factory. *Tohoku J. Exp. Med.* 194, 197-203.

Fant ML, Nyman M, Helle E, Rudbak E (2001) Mercury, cadmium, lead and selenium in ringed seals (*Phoca hispida*) from the Baltic Sea and from Svalbard. *Environ Pollut* 111:493-501.

Gonzalez P, Dominique Y, Massabuau JC, Boudou A, Bourdineaud JP. (2005) Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*) *Environ Sci Technol.* ;39:3972-3980.

Horai S, Minagawa M, Ozaki H, Watanabe I, Takeda Y, Yamada K, Ando T, Akiba S, Abe S, Kuno K (2006) Accumulation of Hg and other heavy metals in the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) captured on Amamioshima Island, Japan. *Chemosphere* 65:657-665.

Horai S, Furukawa T, Ando T, Akiba S, Takeda Y, Yamada K, Kuno K, Abe S, Watanabe I (2008) Subcellular distribution and potential detoxification mechanisms of mercury in the liver of the Javan mongoose (*Herpestes javanicus*) in Amamioshima Island. *Jpn Environ Toxicol Chem* 27(6):1354-1360.

Ikemoto T, Kunito T, Tanaka H, Baba N, Miyazaki N, Tanabe S (2004a) Detoxification mechanism of heavy metals in marine mammals and seabirds: interaction of selenium with mercury, silver, copper, zinc, and cadmium in liver. *Arch Environ Contam Toxicol* 47:402-413.

Ikemoto T, Kunito T, Watanabe I, Yasunaga G, Baba N, Miyazaki N, Petrov EA, Tanabe S (2004b) Comparison of trace element accumulation in Baikal seals (*Pusa sibirica*), Caspian seal (*Pusa caspica*) and northern fur seals (*Callorhinus ursinus*). *Environ Pollut* 127:83-97.

Lemes M, Wang F, Stern GA, Ostertag SK, Chan HM (2011) Methylmercury and selenium speciation in different tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the Western Canadian Arctic. *Environ Toxicol Chem* 30:2732-2738.

Monteiro-Neto C, Itavo RV, de Souza Moraes LE (2003) Concentrations of heavy metals in *Sotalia fluviatilis* (Cetacea: Delphinidae) off the coast of Ceara', northeast Brazil. *Environ Pollut* 123:319-324.

Ostertag, S. K., Shaw, A. C., Basu, N., & Chan, H. M. (2014). Molecular and Neurochemical Biomarkers in Arctic Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*) Were Correlated to Brain Mercury and Selenium Concentrations. *Environmental science & technology*, 48(19), 11551-11559.

Sakamoto M., Kakita A., Wakabayashi K., Takahashi H., Akagi H., (2002) Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study with consecutive and moderate dose exposure throughout gestation and lactation periods. *Brain Res.*, 949, 51-59.

Wagemann, R., Trebacz, E., Lockhart, W.L., (1998) Methylmercury and total mercury in tissues of arctic

marine mammals. *Sci. Total Environ.* 218, 19-31.

Woshner, V.M., O' Hara, T.M., Bratton, G.R., Suydam, R.S.,  
Beasley, V.R., (2001) Concentrations and interactions of  
selected essential and non-essential elements in bowhead  
and beluga whales of Arctic Alaska. *J. Wildlife Dis.* 37  
(4), 693-710.

国立水俣病総合研究センター, 2005, 平成 16 年度成果報告書.

In: Eto, T., Takahashi, H., Kakita, A., Tokunaga, H.,  
Yasutake, A., Nakano, A. (Eds.), pp. 4-8.

立川 涼 (1995) 環境化学と私ー道後平野から世界へー創風社  
出版 pp.172.

## メチル水銀による小脳障害のメカニズムに関する提案

吉田 映子, ○鍛冶 利幸 (東京理大薬)

### 1. はじめに

水俣病の病理において未解決となっている主要問題は以下の2つであると思われる。

第一は、大脳組織の病変部位の局在性である。成人における大脳組織の傷害は、大脳皮質の中心溝、外側溝および視覚野が存在する後頭葉の鳥距溝など深い脳溝周辺の組織に局限しており、傷害部位に依存して感覚障害、聴力障害、視野狭窄など特徴的な神経症状が観察される。このメチル水銀による部位特異的な大脳傷害の発生のメカニズムとしては衛藤らにより提唱された「浮腫仮説」が有力である。この仮説においては、大脳におけるメチル水銀の毒性発現の特異性は、初期病変として脳溝深部に形成された浮腫により招来された組織の循環障害により、メチル水銀による神経細胞の傷害が増長された結果であると説明される。我々は「浮腫仮説」の分子的基盤を検討し、メチル水銀がアルドース還元酵素の誘導によって細胞毒性浮腫を起こし得ること、血管原性浮腫につながる VEGF システムの活性化、ヒアルロナンの過剰蓄積、プロスタグランジン  $I_2/E_2$  の合成亢進、および線溶活性の低下がメチル水銀によって起こること、を示した。また、その細胞内シグナリングについては、Keap1 および PTP1B がメチル水銀のセンサータンパク質として機能しており、特に血管原性浮腫においては PTP1B/EGFR/p38 MAPK/COX-2/cAMP/PKA 経路が重要であることを解明した。

第二は、小脳において、小脳性運動失調の原因となる顆粒細胞層の特異的傷害が発生するメカニズムである。小脳においてもメチル水銀中毒初期に大脳と同じく浮腫形成が認められるが、顆粒細胞層特異的な病変形成を「浮腫

仮説」で十分に説明することは難しい。しかしながら、それに代わる病理的仮説は存在しない。メチル水銀による小脳傷害に関するこれまでの研究の観点は、小脳組織を構成する顆粒細胞、プルキンエ細胞およびグリア細胞のメチル水銀への感受性の差から顆粒細胞特異的な毒性発現を説明しようとするものであり、その感受性差のメカニズムが重要だと考えられてきた。しかしながら、そのような感受性差はメチル水銀の神経細胞に対する直接作用の理解には重要であるが、小脳組織においてメチル水銀により急速かつ大規模に発生する顆粒細胞層の傷害の発現メカニズムを合理的に説明することはできなかった。

我々は血管毒性の立場からメチル水銀の神経毒性にアプローチする研究を行ってきた<sup>1-6)</sup>。メチル水銀による大脳障害のメカニズムにメチル水銀の血管毒性が重要に関わることを示唆する結果を得てきた。しかしながら、メチル水銀の小脳障害のメカニズムを血管毒性で説明するのは困難であると思われた。そこで、本研究において、最初にメチル水銀中毒により後肢交叉という典型的な中毒症状が誘発されたラットの小脳について病理組織学的検討を行った。その結果をもとに、培養細胞を用いて分子的基盤を検討した。

### 2. メチル水銀中毒ラットの小脳の組織学的変化

メチル水銀中毒ラットの小脳において、脱髄鞘やグリオシスは認められなかったが、メチル水銀投与後 21 日目以降において顆粒細胞層の萎縮性の退行性変化が顕著に観察された。しかしながら、プルキンエ細胞層や分子層（白

質)では、顆粒細胞層のような萎縮性の退行性変化は認められなかった。

この顆粒細胞の退行性変化がアポトーシスに起因することがTunel染色により確認された。このとき、顆粒細胞層へのリンパ球細胞の浸潤がHE染色により観察されたので、リンパ球細胞の種類を免疫細胞化学的に同定した結果、顆粒細胞のアポトーシスが細胞傷害性 T-リンパ球およびマクロファージの顆粒細胞層への浸潤を伴っていることが確認された。

これらの変化の経時性を勘案すると、以下の事象が順次発生したことが示唆される。すなわち、(1) 初期にメチル水銀による顆粒細胞の傷害が発生した。(2) これが引き金となり、細胞傷害性 T-リンパ球が小脳顆粒細胞層に浸潤した。(3) 細胞傷害性 T-細胞は、パーフォリン・グランザイム経路を介して顆粒細胞にアポトーシスを誘発した。(4) 引き続いてマクロファージが浸潤し、おそらくは活性化されたミクログリアとともに死細胞を食食するが、このとき TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインを分泌し顆粒細胞のアポトーシスを加速した。そして、(5) このような炎症性変化の経過が連鎖したために小脳顆粒細胞層に重篤な萎縮性の退行性変化がある時期から急速に生じた。

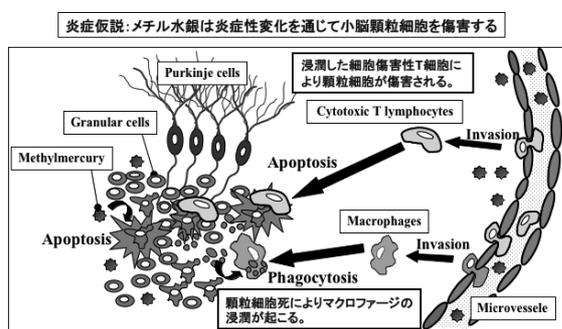


図 1. 炎症仮説

すなわち、メチル水銀による小脳顆粒細胞の傷害にはメチル水銀の直接作用だけでなく炎症性変化をもたらす細胞傷害性 T-リンパ球

およびマクロファージが関与する退行性変化が重要であると想定されるので、我々は、メチル水銀によるこの小脳顆粒細胞層傷害のメカニズム (pathogenesis) を「炎症仮説」として提案する (図 1)。

### 3. 細胞傷害性 T-リンパ球細胞に対するメチル水銀の作用

細胞傷害性 T-リンパ球による顆粒細胞の傷害にはパーフォリン・グランザイム経路が重要であるとの仮説に基づき、以下の検討を行った。細胞傷害性 T-リンパ球のモデル細胞として Jurkut 細胞を用いた。

#### 3-1. パーフォリン・グランザイム経路の活性化

メチル水銀に曝露した Jurkut 細胞において、曝露濃度および時間依存的に培地中へのパーフォリンおよびグランザイム B の蓄積が増加した。このとき、メチル水銀によるパーフォリン mRNA の発現誘導は微弱であったが、グランザイム B mRNA は顕著に上昇した。メチル水銀は、パーフォリンタンパク質については転写後に作用し、グランザイム B については遺伝子発現レベルで誘導し、パーフォリン・グランザイム経路を活性化することを示している。

#### 3-2. パーフォリンおよびグランザイムの発現上昇を介在する細胞内シグナリング

パーフォリンおよびグランザイム B の発現誘導に関わるシグナルとして、PI3K/MEK/ERK 経路が報告されている<sup>9)</sup>。しかしながら、Jurkat 細胞に PI3K 阻害剤を処理しても、メチル水銀によるパーフォリンおよびグランザイム B の発現上昇への影響は微弱であった。そこで、メチル水銀による EGFR/MAPK 経路を検討したところ、メチル水銀により EGFR および MAPKs (ERK, p38 MAPK, および JNK) が活性化され、それぞれの阻害剤によりメチル水銀

による培地中へのパーフォリンおよびグランザイム B の分泌量の増加が抑制された。グランザイム B については、メチル水銀による mRNA の発現上昇も顕著に抑制された。

### 3-3. メチル水銀による小脳顆粒細胞傷害における細胞傷害性 T-リンパ球の役割

以上の結果から、メチル水銀は Jurkat 細胞のパーフォリン・グランザイム B 経路を活性化すること、さらにその活性化経路は、既知の PI3K/MEK/ERK 経路よりも EGFR/MAPK 経路によって介在されることが明らかになった。すなわち、メチル水銀は細胞傷害性 T-リンパ球の EGFR/MAPK 経路を介してパーフォリン・グランザイム B 経路を活性化し、顆粒細胞を傷害することが示唆される。

## 4. マクロファージに対するメチル水銀の作用

マクロファージによる顆粒細胞の傷害には TNF- $\alpha$  が重要であるとの仮説に基づき、以下の検討を行った。マクロファージのモデル細胞として RAW264.7 細胞を用いた。

### 4-1. TNF- $\alpha$ の発現上昇

メチル水銀に曝露した RAW264.7 細胞において、曝露時間および濃度依存的な TNF- $\alpha$  mRNA レベルの上昇が認められ、それに伴い培地中への TNF- $\alpha$  分泌量が有意に増加した。これは、メチル水銀に曝露したマクロファージでは、TNF- $\alpha$  が遺伝子発現レベルで誘導され、TNF- $\alpha$  の分泌が促進されることを示している。

### 4-2. TNF- $\alpha$ の発現上昇を介在する細胞内シグナリング

メチル水銀による TNF- $\alpha$  の発現誘導に関わるシグナルとして MAPK 経路を検討したところ、RAW264.7 細胞において、メチル水銀は、ERK1/2, p38 MAPK および JNK をすべて活性化した。ERK1/2 の阻害剤は、メチル水銀によ

る TNF- $\alpha$  の分泌に影響を及ぼさなかったが、p38 MAPK および JNK の阻害剤はメチル水銀による TNF- $\alpha$  の分泌を抑制した。

### 4-3. メチル水銀による小脳顆粒細胞傷害におけるマクロファージの役割

以上の結果から、メチル水銀は顆粒細胞層に浸潤したマクロファージに対し、p38 MAPK 経路および JNK の活性化を通じて TNF- $\alpha$  の発現を上昇させ、顆粒細胞を傷害することが示唆される。

## 5. 結論

メチル水銀の脳障害の病理は、メチル水銀の血管毒性によってその分子的基盤の重要部分を説明することができる。しかしながら、小脳障害においては病理組織学的観察から、炎症性細胞の関与が推察される。すなわち、本研究は、顆粒細胞層に浸潤した細胞傷害性 T-リンパ球およびマクロファージがメチル水銀に刺激され、特定の細胞内シグナリングが活性化される結果、それぞれパーフォリン・グランザイム経路の活性化および TNF- $\alpha$  の分泌亢進によって顆粒細胞を傷害することを示唆している。

## 引用文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozeaki T, Tokunaga H, Kaneko Y. (2001) *Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-573.
- 2) Hirooka T, Fujiwara Y, Minami Y, Ishii A, Ishigooka M, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2010) *Toxicol. In Vitro*, **24**: 835-841.
- 3) Hirooka T, Fujiwara Y, Shinkai Y, Yamamoto C, Yasutake A, Satoh M, Eto K, Kaji T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, **35**: 287-294.
- 4) Hirooka T, Fujiwara Y, Yamamoto C, Yasutake A, Kaji T. (2007) *J. Health. Sci.*, **53**: 450-456.
- 5) Hirooka T, Fujiwara Y, Inoue S, Shinkai Y, Yamamoto C, Satoh M, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2010) *J. Toxicol. Sci.*, **34**: 433-439.
- 6) Hirooka T, Yamamoto C, Yasutake A, Eto K, Kaji T. (2013) *J. Toxicol. Sci.*, **38**: 837-845.
- 7) Jiang K, Zhong B, Gilvary L D, Corliss C B, Hong-Geller E, Wei S, Djeu Y J. (2000) *Nature Innu.*, 1:419-425.

# 脳内 CREB リン酸化に対するメチル水銀の影響

○藤村成剛、白杵扶佐子、永野匡昭（国立水俣研）

## 1. 背景と目的

老化学説として提唱されてきた酸化ストレス仮説は、神経変性疾患（さらには脳虚血）病態との関係が重要視されている<sup>1)</sup>。メチル水銀は酸化ストレスを引き起こすことから<sup>2)</sup>、メチル水銀曝露と神経変性疾患との関係について様々な調査研究<sup>3,4)</sup>および基礎研究<sup>5,6)</sup>が行われてきた。しかしながら、これらの結果は、その関係性を肯定するものもあれば、逆に否定するものもあり、結論には至っていない。

そこで、今回、培養神経細胞およびメチル水銀曝露モデル動物を用いた研究を行い、メチル水銀と神経変性疾患との関係について実験的に検証することを試みた。

## 2. 方法

### 2-1. 培養神経細胞におけるメチル水銀の作用

妊娠 17 日目の SD ラット胎児から大脳皮質細胞を調整し、7 日間の培養によって神経細胞へと分化させた。培地中にメチル水銀を添加し、神経変性疾患の 1 つであるアルツハイマー病の評価指標である Tau リン酸化および amyloid 産生量への影響、さらに神経細胞死作用について測定を行った。

### 2-2. メチル水銀曝露モデル動物（短期間曝露）におけるメチル水銀の作用

6 週齢の C57BL/6N マウスに対して、メチル水銀水 (30 ppm) の飲水曝露を 0-8 週間行った。曝露後に解剖を行い、神経病理変化、Tau リン酸化および酸化ストレスへの影響について

測定を行った。

### 2-3. メチル水銀曝露モデル動物（長期間曝露）におけるメチル水銀の作用

6 週齢の C57BL/6N マウスに対して、メチル水銀水 (10 ppm) の飲水曝露を 10 ヶ月間行った (10 ppm 以上の投与量では、3 ヶ月以上の生存が不可能であった)。行動指標 (Y-maze) の測定を行った後、解剖を行い、神経病理変化および Tau リン酸化への影響について測定を行った。

また、6 週齢の SD ラットに対して、メチル水銀水 (0, 4, 40, 400 ppb) の飲水曝露を 1 年間行った。行動指標 (Y-maze) の測定を行った後、解剖を行い、神経病理変化、Tau リン酸化および酸化ストレスへの影響について測定を行った。さらに、神経変性疾患に関与する生化学的指標である脳内 CREB リン酸化およびそのリン酸化経路への影響について解析を行った。

## 3. 結果および考察

### 3-1. 培養神経細胞におけるメチル水銀の作用

メチル水銀 (1  $\mu$ M) の曝露は、Tau リン酸化を一過性 (30 分後) に亢進させた後、全 Tau 蛋白質を減少させ (4 時間後)、最終的に神経細胞死を引き起こした (1 日後)。その際の Tau リン酸化酵素は、GSK-3 $\beta$  および JNK によることが示唆された。一方、メチル水銀の曝露は、amyloid 産生に対しては影響を示さなかった。

以上の結果から、培養神経細胞におけるメチル水銀の神経細胞死誘発作用に GSK-3 $\beta$  お

よび JNK による Tau 蛋白質のリン酸化が関与していることが示唆された。

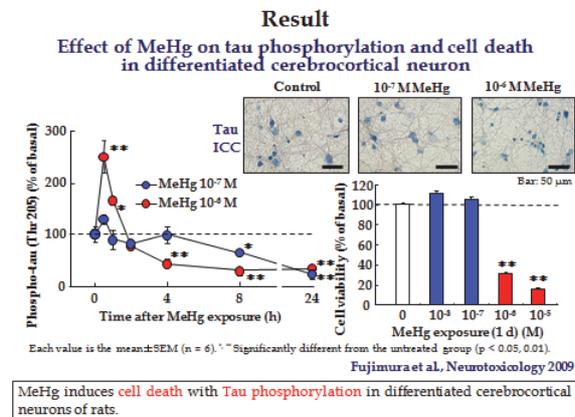


図1 培養神経細胞におけるメチル水銀の神経細胞死および Tau リン酸化に対する作用

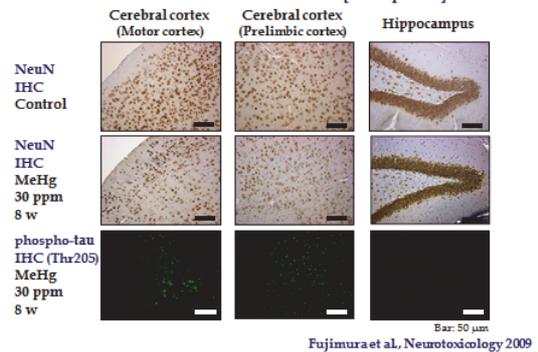
### 3-2. メチル水銀曝露モデル動物(短期間曝露)におけるメチル水銀の作用

C57BL/6N マウスにおける8週間のメチル水銀水(30 ppm)の曝露は、大脳皮質および海馬に酸化ストレスを生じさせた。さらに、大脳皮質に特異的に神経細胞死および Tau リン酸化を引き起こした。その際の Tau リン酸酵素は、GSK-3 $\beta$ および JNK であることが示唆された。しかしながら、メチル水銀水の曝露は、海馬において神経細胞死および Tau リン酸化を引き起こさなかった。

以上の結果から、メチル水銀曝露モデル動物(短期間曝露)におけるメチル水銀の大脳皮質における神経細胞死誘発作用に、酸化ストレスを介した GSK-3 $\beta$ および JNK による Tau 蛋白質のリン酸化が関与していることが示唆された。なお、本研究結果については、既に論文化されている<sup>7)</sup>。

### Result 1

Effect of MeHg on cell death, tau phosphorylation and oxidative stress in brain of mice [8w exposure]



### Result 2

Effect of MeHg on tau phosphorylation and mercury concentration in brain of mice [8w exposure]

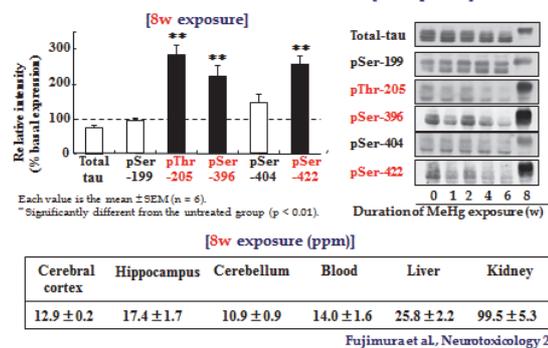


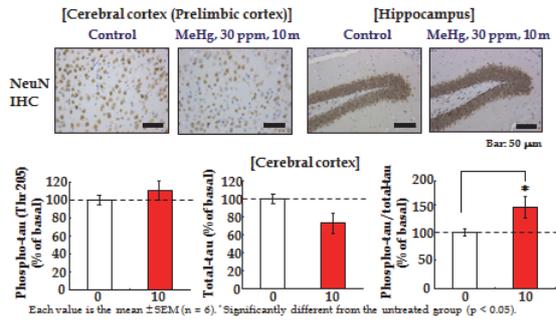
図2 メチル水銀曝露モデルマウス(短期間曝露)における神経細胞死および Tau リン酸化に対する作用

### 3-3. メチル水銀曝露モデル動物(長期間曝露)におけるメチル水銀の作用

C57BL/6N マウスにおける10ヶ月間のメチル水銀水(10 ppm)の曝露は、大脳皮質に特異的に神経細胞死および Tau リン酸化を引き起こした。しかしながら、海馬には影響を示さなかった。さらに、メチル水銀水の曝露は、行動指標(Y-maze)を低下させた。

以上の結果から、メチル水銀曝露モデルマウス(長期間曝露)の大脳皮質における神経細胞死および行動指標(Y-maze)における短期記憶能の低下に Tau 蛋白質のリン酸化が関与していることが示唆された

**Result 5**  
Effect of exposure to MeHg on neuropathological changes and tau phosphorylation in mice [10m exposure]



**Result 6**  
Effect of MeHg exposure on Y-maze in mice [10m exposure]

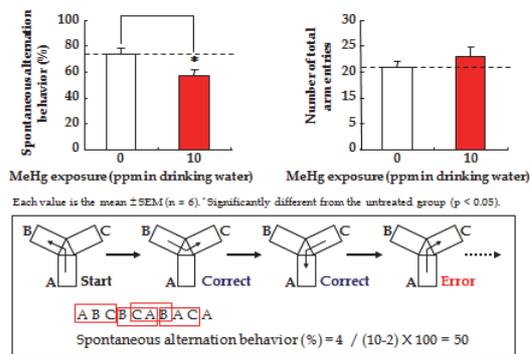


図 3 メチル水銀曝露モデルマウス(長期間曝露)における神経細胞死, Tau リン酸化および短期記憶に対する作用

SD ラットにおける 1 年間のメチル水銀水 (400 ppb) の曝露は、神経細胞死を引き起こさなかった。さらに、脳内酸化ストレスおよび Tau リン酸化に対しても影響しなかった。しかしながら、行動指標 (Y-maze) においては短期記憶の低下が示唆された。そこで、神経変性疾患に関係する生化学的指標である脳内 CREB リン酸化について測定を行った結果、メチル水銀水 (400 ppb) の飲水曝露は、海馬において特異的に CREB リン酸化を低下させることが明らかになった。さらに、そのリン酸化経路について検討を行った結果、リン酸化酵素である PKA の活性が低下していた。

以上の結果から、メチル水銀曝露モデルラット (長期間曝露) の海馬における PKA 活性の低下が CREB リン酸化の低下、ひいては、行

動指標 (Y-maze) における短期記憶低下の原因であることが示唆された。

**Result 9**  
Effect of MeHg exposure on Y-maze and neuropathological changes in rats [1y exposure]

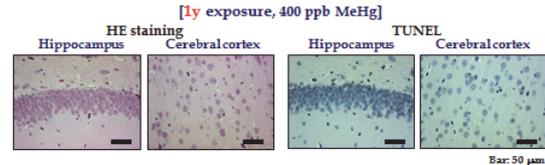
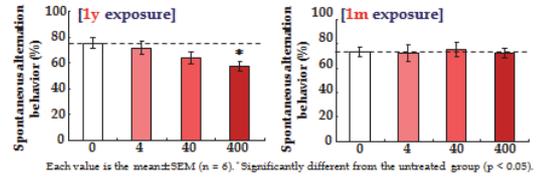
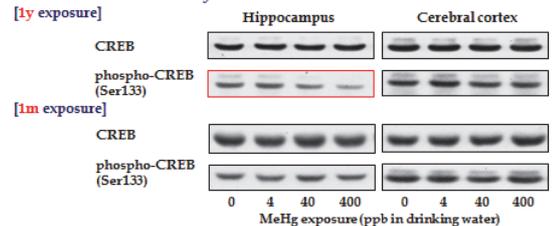


図 4 メチル水銀曝露モデルラット (長期間曝露) における神経細胞死および短期記憶に対する作用

**Result 10**  
Effect of MeHg exposure on the phosphorylation of CREB and mercury concentration in brain of rats



	1y exposure (400 ppb)	1m exposure (400 ppb)
Cerebral cortex	305 $\pm$ 36	150 $\pm$ 35
Cerebellum	362 $\pm$ 40	208 $\pm$ 44
Hippocampus	344 $\pm$ 33 (ppb)	210 $\pm$ 36 (ppb)

Each value is the mean  $\pm$  SEM (n = 6)

**Result 12**  
Effect of MeHg exposure on PKA activity in hippocampus of rats

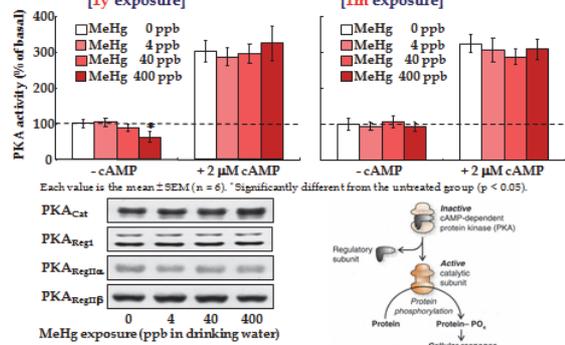


図 5 メチル水銀曝露モデルラット (長期間曝露) における海馬の CREB リン酸化および PKA 活性の低下作用

#### 4. 結語

培養神経細胞およびメチル水銀曝露モデル動物を用いて、メチル水銀の高容量(神経細胞死を引き起こす)曝露の実験を行った。その結果、高容量のメチル水銀は、大脳皮質神経細胞に特異的に酸化ストレスを伴う神経細胞死を引き起こし、その際に GSK-3 $\beta$ および JNK による Tau 蛋白質のリン酸化が関与していることが示唆された。

また、メチル水銀曝露モデル動物を用いて、メチル水銀の低容量(神経細胞死を引き起こさない)曝露の実験を行った。その結果、低容量のメチル水銀は、海馬神経細胞に特異的に酸化ストレスを伴わない CREB リン酸化低下作用を示し、その際に PKA 活性の低下が関与していることが示唆された。

なお、低用量長期間曝露実験で用いたメチル水銀曝露の容量は、20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  であり、日本人の平均水銀摂取量である 0.162  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  と比較すると約 120 倍である。さらに、実際にヒトにおけるメチル水銀摂取の際には、神経保護的に作用する不飽和脂肪酸およびセレン化合物等も摂取している。よって、本実験結果から直接、“メチル水銀摂取が神経変性疾患の発症および増悪に繋がる”との結論が導かれるものではなく、むしろ、“長期間、メチル水銀摂取を行ってもその容量が高くない限り(通常摂取の 120 倍以上)、神経変性疾患の発症および増悪に繋がる可能性は低い”ことを示唆する研究結果であると考えられる。

#### 5. 引用文献

- 1) Lin MT, Beal MF (2006) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443, 787-795.
- 2) Yee S, Choi BH. (1996) Oxidative stress in neurotoxic effects of methylmercury poisoning. *Neurotoxicology*, 17, 17-26.

- 3) Hock C, Drasch G, Golombowski S, Müller-Spahn F, Willershausen-Zönnchen B, Schwarz P, Hock U, Growdon JH, Nitsch RM. (1998) Increased blood mercury levels in patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm*, 105, 59-68.
- 4) Oyanagi K, Ikuta F (1993) The aging of central nervous system in methylmercury intoxication in Niigata, Japan--quantitative investigation of neurofibrillary tangles and senile plaques. *No To Shinkei*, 145, 241-244
- 5) Petroni D, Tsai J, Agrawal K, Mondal D, George W (2011) Low-dose methylmercury-induced oxidative stress, cytotoxicity, and tau-hyperphosphorylation in human neuroblastoma (SH-SY5Y) cells. *Environ Toxicol*, 27, 549-555.
- 6) Alattia JR, Kuraishi T, Dimitrov M, Chang I, Lemaitre B, Fraering PC (2011) Mercury is a direct and potent  $\gamma$ -secretase inhibitor affecting Notch processing and development in *Drosophila*. *FASEB J*, 25, 2287-2295.
- 7) 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.

# メチル水銀中毒バイオマーカーとしての血漿チオール抗酸化バリアとセレノ蛋白質

○白杵扶佐子、藤村成剛(国水研)

## 1. 背景と目的

これまで、培養細胞系、メチル水銀中毒モデルラットを用いて、メチル水銀毒性発現の分子基盤について検討し、メチル水銀毒性発現には酸化ストレス傷害が重要な役割を果たすことを *in vitro*, *in vivo* において明らかにしてきた<sup>1-5)</sup>。さらに、セレノ基に対するメチル水銀の親和性がもたらす細胞内の相対的な活性型セレンの低下により、酸化還元系の重要なセレン含有酵素である glutathione peroxidase 1 (GPx1) mRNA や thioredoxin reductase 1 mRNA が、mRNA 監視機構である nonsense-mediated mRNA decay (NMD)<sup>6)</sup> の作動により転写後障害されることが、メチル水銀による酸化ストレス発生のメカニズムとして重要であることも明らかにした<sup>7)</sup>。

メチル水銀の体内負荷指標として、毛髪や爪、赤血球の水銀濃度測定が有用であるが、メチル水銀による毒性発現は、負荷されたメチル水銀量だけでなく、メチル水銀に対する個体感受性、ストレス応答能(酸化ストレス防御能)が重要になる。

メチル水銀はセレノール基やチオール基と親和性が高く、この性質は酸化ストレス発生のメカニズムにも関係する。血液を用いたメチル水銀曝露による生体の酸化ストレス応答指標、抗酸化能指標を知るために、メチル水銀中毒モデルラットの血液を用いて検討するとともに、メチル水銀以外の酸化ストレスを惹起することが知られている鉛やカドミウムについても、メチル水銀との相違を検討した。

## 2. 方法

メチル水銀は15 あるいは20 ppm MeHgCl<sub>2</sub>、鉛は0.1 % (w/v) あるいは 0.2 % (w/v) Pb

acetate、カドミウムは10 ppm あるいは15 ppm CdCl<sub>2</sub> で4週間給水曝露を行い、モデルラットを作成した。

体重測定、症状チェック、採血を経時的に行い、水銀、鉛、カドミウム濃度は全血にて測定した。投与4週後に解剖し、脳、肝臓、腎臓について組織病理学的な検討を行った。

新鮮血漿における生体内酸化度(d-ROM, diacron reactive oxidant metabolites)、還元度(BAP, biological antioxidant potential)、チオール抗酸化バリア(-SHp, -SH of plasma compounds)は、Diacron Internatioal 社製のFREEを用いて経時的に測定した。また、血漿セレノ蛋白質であるselenoprotein P1 (SeP1)、glutathione peroxidase 3 (GPx 3)、非セレノ蛋白質であるglutathione reductase (GR)について、SeP1値はELISAにて測定し、GPx 3、GRは活性測定を行った。

以上の実験は、国立水俣病総合研究センター動物安全倫理委員会の承認を得て行われた。

## 3. 結果

### 3-1. メチル水銀投与モデルラットの体重、小脳組織病変の経時変化

メチル水銀曝露2週後から体重減少が認められ、4週後にはコントロールに比し、30 % の体重減少を認めた。後肢交差現象は投与3週後から認められた。小脳病変は投与4週後で認められ、小脳顆粒層でTUNEL陽性のアポトーシス所見とglial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性のアストロサイトが多数確認された。

### 3-2. メチル水銀投与モデルラットの血漿酸化

### 度、チオール抗酸化バリア、還元度の経時変化

新鮮血漿を用いたメチル水銀曝露後の経時的な酸化度(d-ROM)、チオール抗酸化バリア(-SHp)、還元度(BAP)についての検討で、d-ROMが投与3週後からコントロール群に比し有意に増加するのに対し、-SHpは、小脳における病理変化や血漿酸化ストレス出現より早く、メチル水銀投与2週後から有意に低下することが明らかになった(図1)。

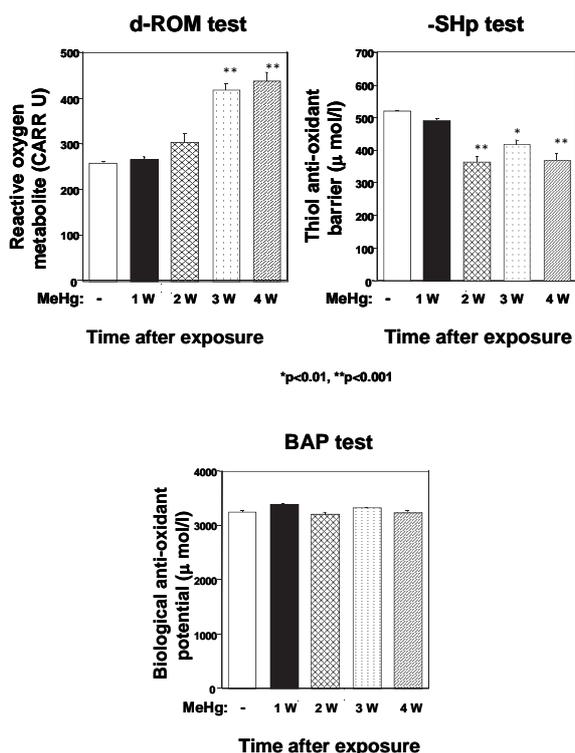


図1. メチル水銀中毒モデルラットの酸化度、還元度、チオール抗酸化バリアの経時変化

### 3-3. 鉛、カドミウム投与モデルラットの血漿酸化度、チオール抗酸化バリア、還元度の検討

メチル水銀投与ラットにおける早期の-SHpの低下がメチル水銀に特異的なものであるかどうかを検証するために、組織における酸化ストレス発生が知られている鉛、カドミウム投与ラットで検討した。今回のモデルでは、0.2% Pb acetate 4週投与ラットでは体重減少が認められたが、カドミウム投与モデルラットでは体重減少は認められなかった。

d-ROM、-SHp、BAPについての検討では、d-ROM、-SHpがメチル水銀投与ラットでは有意に

変化したが、鉛、カドミウム投与ラットでは血漿酸化ストレスマーカーはいずれも有意な変動は認められなかった(図2)。

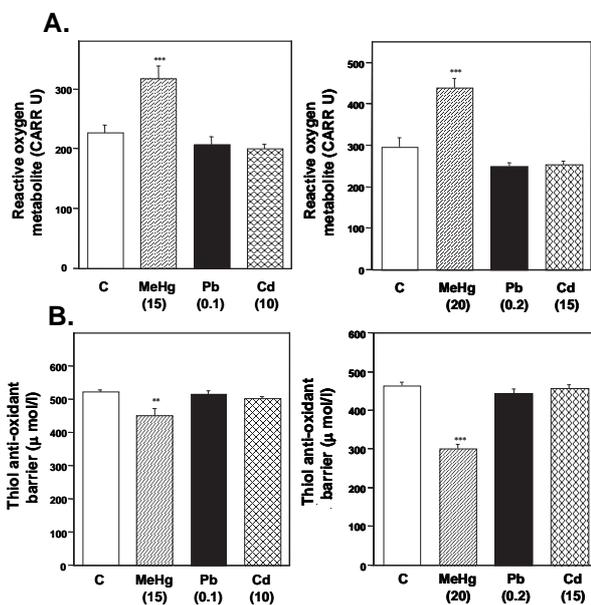


図2. メチル水銀中毒モデルラットの酸化度(A)、チオール抗酸化バリア(B)の経時変化

### 3-4. 鉛、カドミウム投与ラットにおける組織病理学的検討

アストロサイトマーカーであるGFAP免疫染色で、Pb acetate 4週間投与ラットの小脳において、コントロールに比し、小脳顆粒層の強いGFAP陽性のグリア細胞増殖とプルキンエ細胞の脱落が認められた。海馬では歯状回で軽度なGFAP陽性染色を認めた。カドミウム投与ラットでは、小脳、海馬に病理変化は認めず、また、肝臓、腎臓にもHE染色で変化は認められなかった。

### 3-5. メチル水銀、鉛、カドミウム投与モデルラットの血漿セレノプロテインの検討

メチル水銀、鉛、カドミウム投与ラットの血漿酸化ストレスマーカーの発現の差をさらに検討するために、メチル水銀と高い親和性を有する-SeH基を分子内に10個もつ血漿SeP1の発現をELISAにて検討した。4週投与ラットの結果を図3に示すが、SeP1はメチル水銀投与ラットではコントロール群に比し

有意に低下したが、鉛、カドミウム投与ラットでは、いずれも有意な増加が認められた。

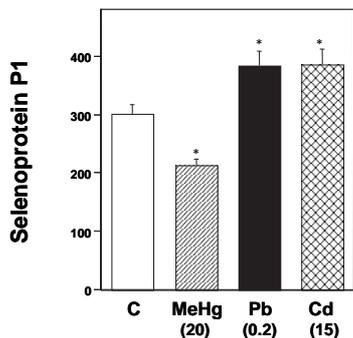


図3. メチル水銀、鉛、カドミウム4週投与ラットのSeP1値

### 3-6. メチル水銀投与ラットの血漿におけるセレン含有、セレン非含有蛋白質の経時的発現

20 ppm メチル水銀投与ラットの血漿におけるSeP1, GPx3, GRの経時変動について検討したところ、セレン蛋白質であるSeP1値とGPx3活性はメチル水銀投与後有意に低下した。一方、非セレン蛋白質であるGR活性は、メチル水銀投与後有意に増加することが明らかになった。

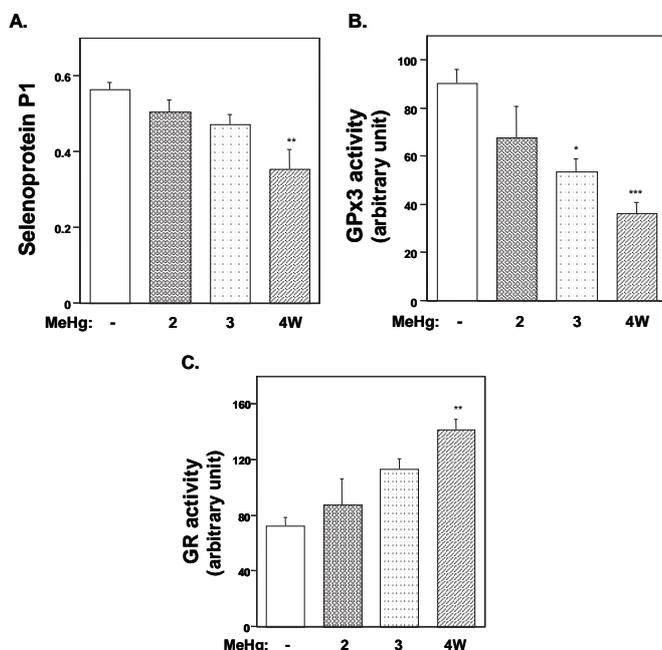


図4. メチル水銀中毒モデルラットのSeP1値(A)、GPx3活性(B)、GR活性(C)の経時変化

## 4. 考察

メチル水銀投与モデルラットでは、小脳における病理変化や血漿酸化ストレス出現より早く、体重減少に一致してメチル水銀投与2週後からチオール抗酸化バリアが低下することが明らかになった。一方、鉛投与ラットでは、小脳や海馬の組織病変は認められるものの、血漿酸化ストレスマーカーの有意な変化は認められなかった。カドミウム投与ラットでは、組織病変、血漿酸化ストレスマーカーの変動ともに認められなかった。さらに、メチル水銀投与モデルラットでは、血漿セレン蛋白質(SeP1, GPx3)が有意に低下し、非セレン蛋白質(GR)が有意に増加したが、鉛、カドミウム投与ラットではSeP1の有意な増加が認められた。

鉛、カドミウム投与ラットでは、酸化ストレス防御のためにSeP1が増加するが、メチル水銀投与ラットでは、セレンール基、セレン基に対するメチル水銀の親和性がもたらす細胞内の相対的な活性型セレンの低下によりセレン蛋白質が、mRNA監視機構であるNMD<sup>6)</sup>の作動により転写後障害され<sup>7)</sup>、SeP1、GPx3の合成がブロックされると考えられた。鉛やカドミウム投与ラットでは組織酸化ストレスが先行するのに対し、メチル水銀投与ラットでは血漿中に存在するアルブミンやシステインの-SH基やSeP1、GPx3、TrxR1などの-SeH基とメチル水銀が反応し、さらにセレン蛋白質の転写後障害があることで、曝露早期より血漿酸化ストレス度の増加とチオール抗酸化バリアの低下が生じることが考えられた。

## 5. 結論

血漿チオール抗酸化バリア、セレン蛋白質(SeP1、GPx3)は、メチル水銀曝露時の*in vivo*におけるバイオマーカーとして有用である。

以上の内容は、Arch Toxicol 2015; doi:10.1007/s00204-015-1528<sup>8)</sup>にpublishされた。

## 6. 引用文献

- 1) Usuki F and Ishiura S (1998) Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increases oxidative stress. *NeuroReport* 9: 2291-2296.
- 2) Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N et al. (2000) Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 267: 739-743.
- 3) Usuki F, Yasutake A, Umehara F et al. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rats. *Neurosci Lett* 304: 199-203.
- 4) Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Higuchi I (2004) Beneficial effects of mild lifelong dietary restriction on skeletal muscle: prevention of age-related mitochondrial damage, morphological changes, and vulnerability to a chemical toxin. *Acta Neuropathol*, 108, 1-9.
- 5) 白杵扶佐子 (2006) メチル水銀による酸化ストレスと神経細胞死. 医学のあゆみ 別冊 酸化ストレス Ver. 2 フリーラジカル医学生物学の最前線(吉川敏一編集)p. 431- 4.
- 6) 白杵扶佐子、山下暁朗(2010) Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) による変異 mRNA 排除と疾患. *細胞工学* 29: 155-160.
- 7) Usuki F, Yamashita A, Fujimura M (2011) Methylmercury-induced relative selenium deficiency causes oxidative stress through its post-transcriptional effect. *J Biol Chem* 286: 6641-9.
- 8) Usuki F, Fujimura M (2015) Decreased plasma thiol antioxidant barrier and selenoproteins as potential biomarkers for ongoing methylmercury intoxication and an individual protective capacity. *Arch Toxicol* 2015;doi:10.1007/s00204-015-1528-3.

## メチル水銀毒性における MARCKS タンパク質の関与とそのリン酸化動態への影響

○白石光也、Islam Md. Zahorul、Dao Van Cuong、宮本篤（鹿児島大・共同獣医・薬理）

### 1. 背景

Myristoylated arabinin-rich C kinase substrate (MARCKS) は、特に中枢神経系に豊富に発現するタンパク質である。その構造中にはミリストイル化領域に加え、分子中央部に塩基性アミノ酸のクラスターからなるエフェクタードメイン (ED) と呼ばれる領域があり、この ED を介してアクチン、ホスファチジルイノシトール二リン酸、カルモジュリンなどのターゲット分子と相互作用することが知られている。また、この ED がプロテインキナーゼ C (PKC) や Rho キナーゼによりリン酸化されることで、ターゲット分子との結合が減弱することから、MARCKS の機能制御におけるリン酸化の重要性が示唆されている<sup>1)</sup>。

我々は、ヒト神経芽細胞腫由来の培養神経細胞株である SH-SY5Y 細胞を用いた検討から、ラメリポディア形成や神経突起伸長など神経細胞の成熟過程に認められる細胞形態変化において、MARCKS のリン酸化制御が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた<sup>2,3)</sup>。

さらに MARCKS 欠損マウスでの検討から MARCKS が大脳皮質の正常な構造形成に必須のタンパク質であることが報告されているほか、神経細胞の運動性やシナプス構造の維持、神経可塑性、学習や記憶への関与など、多彩な役割が報告されている<sup>1)</sup>。また近年では、アルツハイマー病、気分障害、統合失調症患者の脳において MARCKS リン酸化の異常が報告されており、病態との関連についても注目されている<sup>1)</sup>。しかし、毒性学見地からの MARCKS の重要性については明らかとなっていないことから、我々は化学物質による神経毒性作用と MARCKS との関連について着目するに至った。

### 2. 中枢神経系へのメチル水銀 (MeHg) の影響と MARCKS タンパク質の関与

#### 2-1. 培養神経細胞株を用いた検討<sup>4)</sup>

培養神経細胞株である SH-SY5Y 細胞を用い、MeHg 処置による影響を検討した。MeHg (1  $\mu$ M) の処置により、神経突起の退縮が処置後 1 時間以内に観察され、24 時間後には細胞死に起因すると考えられる浮遊細胞の増加が観察された。MeHg (0.1-3  $\mu$ M) の 24 時間処置により濃度依存的な細胞生存率の低下が引き起こされ、MeHg (1  $\mu$ M) はアポトーシスの指標である caspase-3 の活性化を誘導したことから、MeHg 処置による細胞生存率低下の一因としてアポトーシス誘導が関与していると考えられた。

MeHg (0.1-1  $\mu$ M) 処置による MARCKS 発現量への影響を Western blot 法にて検討したところ、処置 24 時間後に MARCKS 発現量の有意な減少が認められた (図 1)。

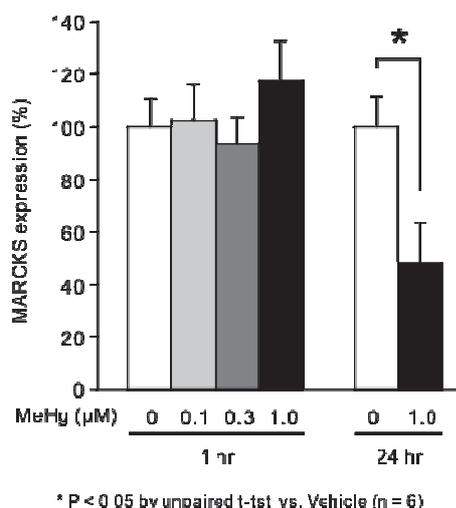
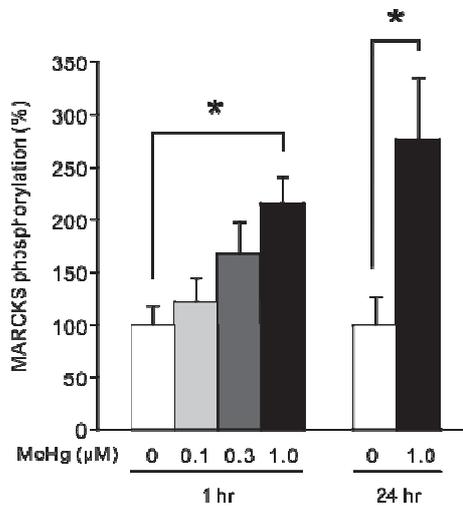


図 1 MeHg による MARCKS 発現量の減少 (SH-SY5Y 細胞)

また、MeHg (0.1-1  $\mu$ M) の処置により濃度依存的な MARCKS リン酸化の上昇が処置 1 時間

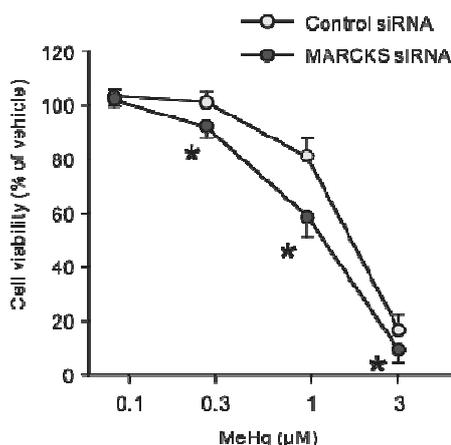
後に観察され、このリン酸化の上昇は処置 24 時間後まで持続していた (図 2)。



\* P < 0.05 by Dunnett or unpaired t-test vs. Vehicle (n = 6)

図 2 MeHg による MARCKS リン酸化の上昇 (SH-SY5Y 細胞)

MeHg の神経毒性発現メカニズムにおける MARCKS の関与を明らかにする目的で、RNA 干渉法による MARCKS ノックダウンの影響を観察したところ、MARCKS ノックダウン細胞において MeHg による細胞生存率低下の増強が認められた (図 3)。



\* P < 0.05 by paired t-test vs. Negative control siRNA (n = 9)

図 3 MARCKS ノックダウンによるメチル水銀毒性への影響 (SH-SY5Y 細胞)

以上の結果から、培養神経細胞株における MeHg 毒性に、MARCKS 発現量とリン酸化の変化が関与する可能性が示唆された。

## 2-2. MeHg 暴露ラットを用いた検討<sup>4)</sup>

Wistar ラットに MeHg (40 ppm) を含む飲用水を 28 日間自由飲水させ、MeHg 暴露ラットを作製した。この MeHg 暴露ラットの脳を大脳、小脳、脳幹、嗅球の領域に分け、それぞれの領域における MARCKS 発現量を Western blot 法にて測定した。MARCKS の発現は全ての領域で認められ、大脳において発現量の減少傾向が認められた (図 4)。

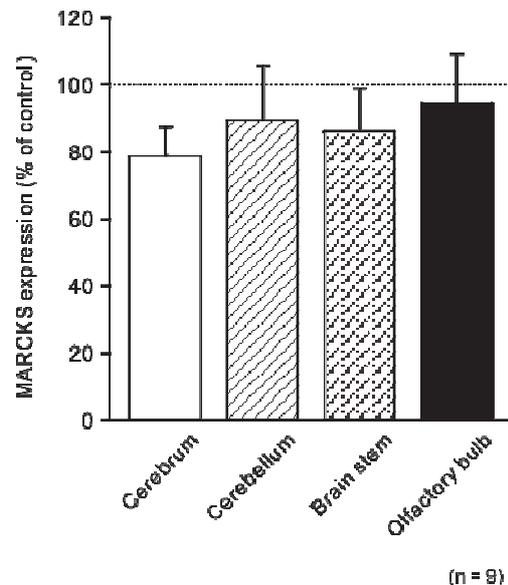
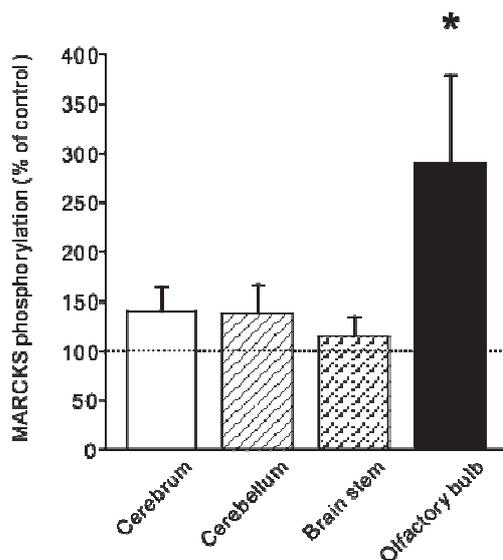


図 4 メチル水銀暴露ラットの脳における MARCKS 発現量の変化

一方、MARCKS リン酸化についても同様に検討を行ったところ、MARCKS リン酸化の上昇傾向が大脳と小脳で観察され、嗅球において有意な上昇が認められた (図 5)。培養神経細胞株の場合と同様に、MARCKS リン酸化の上昇が MeHg 暴露ラットの脳においても観察されたことから、MARCKS が MeHg による神経毒性の発現に深く関与していることが示唆された。



\* P < 0.05 by unpaired t-test vs. MeHg (-) (n = 9)

図5 メチル水銀暴露ラットの脳における MARCKS リン酸化の変化

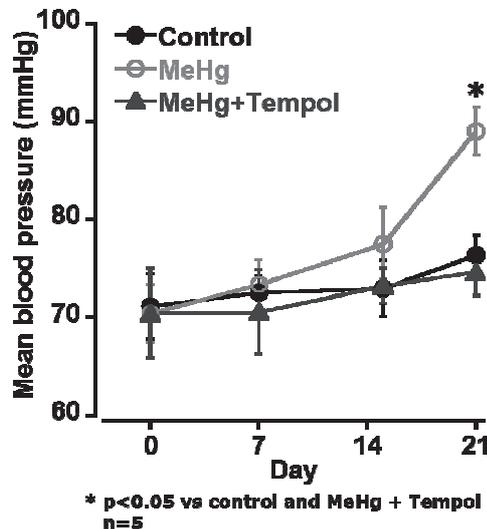
### 3. 心血管系への MeHg の影響と MARCKS タンパク質の関与

MeHg への暴露は中枢神経系における障害に加え、心血管系にも異常を引き起こす可能性が示唆されている<sup>5)</sup>。また MARCKS は中枢神経系のほか、血管、特に内皮細胞に強く発現することが知られており、内皮細胞の増殖や運動性、透過性調節などの機能に関わることが報告されている<sup>6)</sup>。そこで MeHg 暴露マウスを作製し、血圧への影響と摘出血管における収縮および弛緩反応への影響を検討した。また MeHg により産生が誘導される活性酸素種 (ROS) がその毒性に関与することが知られていることから、活性酸素除去剤 (tempol) を用いて MeHg による心血管毒性への関与を検討した。

#### 3-1. MeHg 暴露マウスを用いた検討

ICR マウスに MeHg (40 ppm) を含む飲用水を 21 日間自由飲水させ、MeHg 暴露マウスを作製した。MeHg 暴露マウスにおいて非観血的テイルカフ法により平均血圧の変化を観察し

たところ、経時的な血圧の上昇が観察され、MeHg 暴露 21 日後には対照に比べ有意に高い値を示した (図 6)。



\* p < 0.05 vs control and MeHg + Tempol n = 5

図6 メチル水銀暴露マウスにおける平均血圧の経時的変化

また MeHg 暴露時に tempol を飲水中に投与することで MeHg 暴露マウスにおける血圧上昇が消失したことから、MeHg による ROS 産生の誘導が MeHg 暴露マウスにおける血圧上昇のメカニズムとして考えられた (図 6)。

そこで、有意な血圧上昇を示した MeHg 暴露 21 日後のマウスより脳底動脈と胸部大動脈を摘出し、アンジオテンシン II に対する血管収縮反応とアセチルコリンによる血管弛緩反応を観察し、対照マウスより摘出した血管と比較した。MeHg 暴露マウスの脳底動脈ではアンジオテンシン II による血管収縮反応が対照にくらべ有意に増強されていた (図 7)。一方、胸部大動脈ではアンジオテンシン II による血管収縮反応に差は認められなかった。また tempol は MeHg 暴露マウスにおける収縮反応の増強を消失させた。

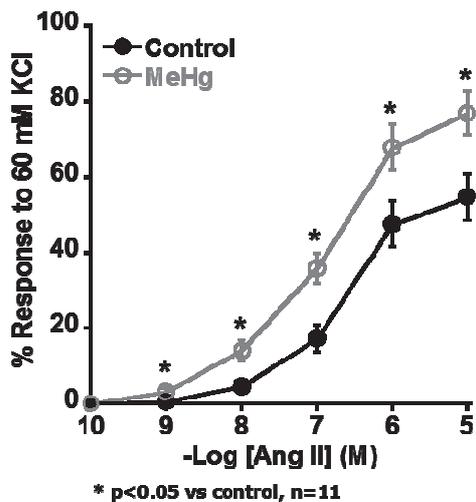


図7 メチル水銀暴露マウスの脳底動脈における血管収縮反応

次にアセチルコリンによる血管弛緩反応を比較したところ、脳底動脈における血管弛緩反応の有意な減弱が認められた (図8)。

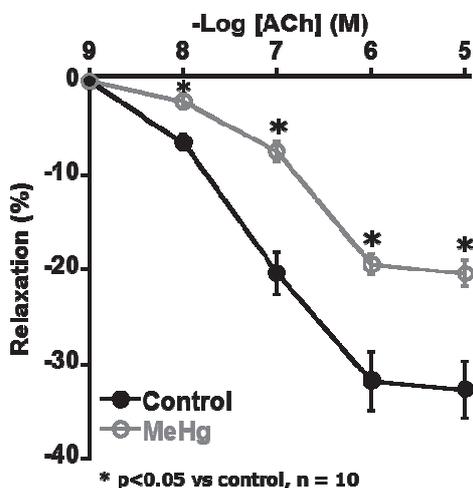


図8 メチル水銀暴露マウスの脳底動脈における血管弛緩反応

このアセチルコリンによる血管弛緩反応の大部分は内皮細胞から産生される一酸化窒素

(NO) に依存している<sup>7)</sup>ことから、MeHg暴露は内皮細胞の NO 産生を障害していると考えられた。一方、胸部大動脈では血管弛緩反応に差は認められず、MeHg は脳底動脈に対して選択的な毒性を発揮していることが示唆された。また tempol は MeHg 暴露マウスにおける弛緩反応の減弱も消失させたことから、MeHg による心血管系の異常において ROS が中心的な役割を果たしていることが示唆された。

### 3-2. 培養血管内皮細胞株を用いた検討

MeHg 暴露マウスにおいて内皮依存性の血管弛緩反応に異常が認められたことから、ヒト臍静脈由来の培養内皮細胞株である EA. Hy926 細胞を用い、MeHg の内皮細胞に対する毒性作用について検討した。

MeHg(0.1-3 μM)により濃度依存的な MARCKS 発現量の減少とリン酸化の上昇が認められた (図9)。

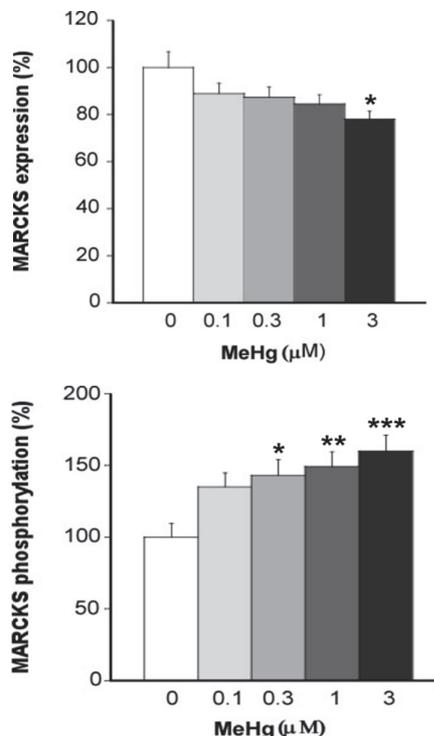


図9 MeHg による MARCKS 発現量およびリン酸化への影響 (EA. hy926 細胞)

また MeHg は細胞生存率の低下を引き起こし、この低下は MARCKS ノックダウン細胞において増強された (図 10)。

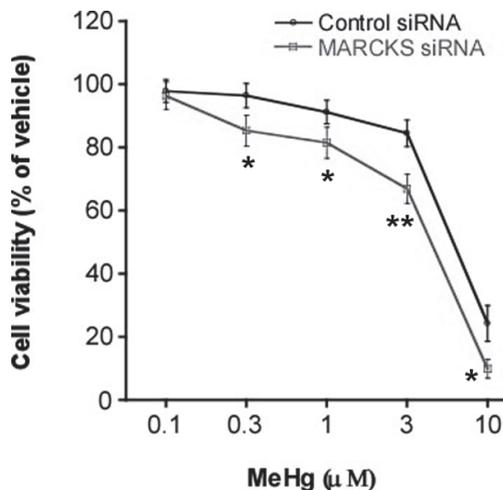


図 10 MARCKS ノックダウンによるメチル水銀毒性への影響 (EA. hy926 細胞)

さらに、血管新生モデル (内皮細胞チューブ形成アッセイ)、細胞遊走 (スクラッチアッセイ)、NO 産生 (Griess 法) への MeHg (0.1-1 μM) の影響を観察したところ、全ての内皮細胞機能が MeHg 処置により抑制された。現在、MeHg の血管内皮細胞への毒性作用と MARCKS との関与について、詳細を検討中である。

#### 4. まとめ

MeHg は神経細胞において神経突起の退縮や細胞死を誘導すると同時に、MARCKS 発現量の減少とリン酸化の上昇を引き起こし、同様の傾向が MeHg 暴露ラットの脳においても観察された。さらに血管内皮細胞においても、MeHg は MARCKS 発現量の減少とリン酸化の上昇を引き起こした。両培養細胞株において、MARCKS ノックダウンにより MeHg 毒性の増強が観察されたことから、MARCKS は MeHg の毒性発現メカニズムに深く関与していることが

示唆された。

#### 引用文献

- 1) X MARCKS the spot: myristoylated alanine-rich C kinase substrate in neuronal function and disease. Brudvig JJ, Weimer JM. *Front Cell Neurosci.* 9:407. (2015) doi: 10.3389/fncel.2015.00407.
- 2) Unphosphorylated MARCKS is involved in neurite initiation induced by insulin-like growth factor-I in SH-SY5Y cells. Shiraishi M, Tanabe A, Saito N, Sasaki Y. *J Cell Physiol.* 209:1029-1038. (2006)
- 3) MARCKS regulates lamellipodia formation induced by IGF-I via association with PIP<sub>2</sub> and beta-actin at membrane microdomains. Yamaguchi H, Shiraishi M, Fukami K, Tanabe A, Ikeda-Matsuo Y, Naito Y, Sasaki Y. *J Cell Physiol.* 220:748-755. (2009)
- 4) Alteration in MARCKS phosphorylation and expression by methylmercury in SH-SY5Y cells and rat brain. Shiraishi M, Hangai M, Yamamoto M, Sasaki M, Tanabe A, Sasaki Y, Miyamoto A. *Environ Toxicol Pharmacol.* 37:1256-1263. (2014)
- 5) Short-term effect of severe exposure to methylmercury on atherosclerotic heart disease and hypertension mortality in Minamata. Inoue S, Yorifuji T, Tsuda T, Doi H. *Sci Total Environ.* 417-418:291-293. (2012)
- 6) Angiotensin-II and MARCKS: a hydrogen peroxide- and RAC1-dependent signaling pathway in vascular endothelium. Kalwa H, Sartoretto JL, Sartoretto SM, Michel T. *J Biol Chem.* 287:29147-29158. (2012)
- 7) Vasomotor effects of acetylcholine, bradykinin, noradrenaline, 5-hydroxytryptamine, histamine and angiotensin II on the mouse basilar artery. Islam MZ, Watanabe Y, Nguyen HT, Yamazaki-Himeno E, Obi T, Shiraishi M, Miyamoto A. *J Vet Med Sci.* 76:1339-1345. (2014)

# オートファジー関連分子 p62 によるメチル水銀毒性防御機構

○ 高根沢康一、清野正子（北里大学薬学部）

## 1. 背景と目的

メチル水銀は、チオール基に対する親和性が高いため、システインやグルタチオンのような低分子物質、あるいはタンパク質のチオール基などと結合することが知られている。この反応によってタンパク質の変性、あるいはタンパク質の機能不全を引き起こし、メチル水銀の細胞毒性発現の一要因になると考えられる。

細胞は変性タンパク質（不良タンパク質）の蓄積を防ぐため、タンパク質品質管理機構を働かせて恒常性を維持している。タンパク質の合成過程、あるいは外部からの刺激により生じた変性タンパク質はオートファジーやユビキチン-プロテアソーム系により判別され、分解・除去する機構を有している。

オートファジーは、栄養不良時に自己の成分を使い栄養供給を行う進化的にも保存された細胞内のバルクな分解経路である。飢餓刺激により、小胞体から伸びた二重膜が、標的となった細胞内成分を取り囲み、オートファゴソームと呼ばれる膜を形成する。最終的には、リソソームと融合して、内容物や内側の膜が栄養素の構成単位まで分解される。近年、オートファジーは、このような飢餓時の栄養供給だけでなく、変性タンパク質や、傷ついたミトコンドリアなどのオルガネラの分解を行う反応であることが分かってきた。さらに、最近の研究では、神経変性疾患、肝障害、がんなど様々な疾患との関係が次第に明らかにされつつある。

しかしながら、メチル水銀毒性とオートファジーの関連性に関しては、まだ不明な点が多く残されている。本研究では、このオートファジーに着目し、メチル水銀に対する防御機構について検討を行った。

## 2. 方法

### 2-1. RT-PCR 法

total RNA を抽出し、逆転写反応を行った。PCR 反応は SYBR Green PCR Master Mix を用い、mRNA 量を定量した。発現量は GAPDH の mRNA にて補正した。

### 2-2. 免疫蛍光染色解析

培養細胞にメチル水銀を処理後、メタノールあるいは 4% パラホルムアルデヒドにて固定した。免疫染色後、DAPI を含むマウント剤で封入し、蛍光標識を共焦点顕微鏡 (LSM-710) にて解析を行った。

## 3. 結果および考察

### 3-1. メチル水銀による細胞内 LC3-II の蓄積

様々な培養細胞を用いて、メチル水銀による Light chain-3 (LC3) の変化をウエスタンブロット法により調べた。オートファジー関連タンパク質である LC3 は通常 LC3-I として細胞質に存在しているが、オートファジーの活性化に伴い脂質と共有結合した LC3-II となる。調べたすべての培養細胞において、メチル水銀を処理した細胞群では LC3-II の増加が認められた (図 1A)。

また、GFP-LC3 発現したマウス胎児線維芽 (MEF) 細胞において、メチル水銀処理により、核の周辺に GFP-LC3 点状構造物 (puncta) の形成が見られ、オートファゴソームの形成が示唆された (図 1B)。

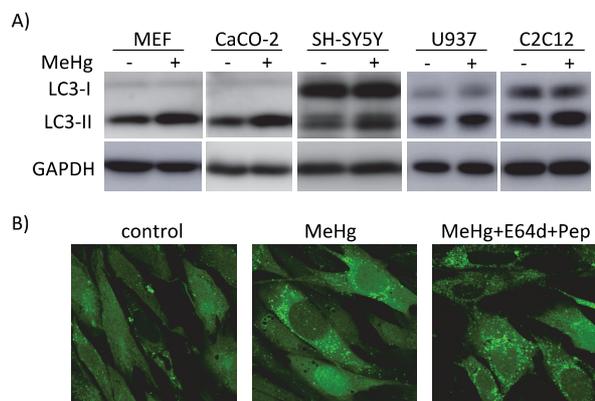


図1. A) メチル水銀によるLC3-IIの蓄積  
B) メチル水銀によるLC3のpuncta形成

### 3-2. メチル水銀によるオートファジーの活性化

メチル水銀による LC3-II の増加がオートファジーの活性化によるものかをオートファジーの阻害剤であるバフィロマイシン A1 (BAF)、あるいはクロロキン (CQ) を用いたオートファジーフラックスアッセイを行った。BAF 及び CQ 処理では、オートファジーが阻害され、LC3-II の増加が見られた。これら阻害剤とメチル水銀を同時に処理すると、LC3-II は阻害剤単独よりも増加することが認められた (図 2)。これらの結果から、メチル水銀による LC3-II の増加はオートファジーの活性化によるものであると考えられた。

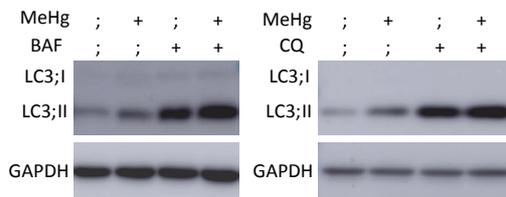


図2. オートファジーフラックスアッセイ

### 3-3. ATG5 欠損細胞におけるメチル水銀の感受性

オートファジーは ATG 遺伝子と呼ばれる一連の分子群により隔離膜の伸長、オートファゴソーム膜の形成が行われ、成熟、進行する。ATG5 はオートファジーの初期段階に働く分子であり、この分子が欠損した細胞ではオートファジーが抑制され、LC3-II は検出されない。この ATG5 欠損 MEF 細胞を用いて、メチル水銀に対する毒性感受性を WST-8 アッセイにより評価した。ATG5 欠損 MEF 細胞は、野生型 MEF 細胞よりもメチル水銀に対し細胞生存率が有意に低く、脆弱性を示した (図 3)。以上の結果から、オートファジーはメチル水銀の毒性に対し防御的に働いていることが示唆された。

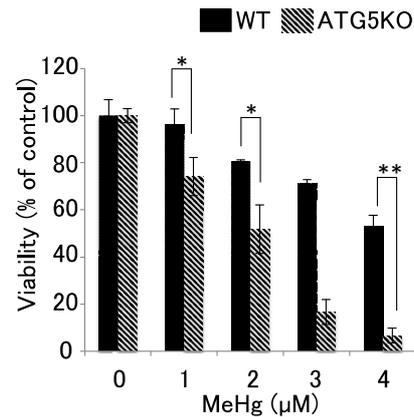


図3. ATG5KO細胞におけるメチル水銀に対する感受性

### 3-4. メチル水銀によるオートファジー関連分子 p62 の発現

p62 は LC3 と結合するタンパク質として同定され、オートファジー活性化時に LC3 と共にオートファゴソームに局在する分子である。また、分子内に LC3 結合領域の他、カスパーゼ 8、TRAF6、keap1 などの結合領域などを有し、様々なシグナル伝達への関与が示唆されている。また、C 末端にはユビキチン化タンパク質との相互作用する領域を持ち、ユビキチン化された基質をオートファゴソームに輸送するレセプター、あるいはアダプター分子であると考えられている。

メチル水銀によるオートファジーの活性化に伴い、p62 がどのような発現変化を示すのかをウェスタンブロット法により調べた。p62 はメチル水銀処理後 4 時間後から継続的に増加し、LC3 よりも早期に増加が見られた (図 4)。

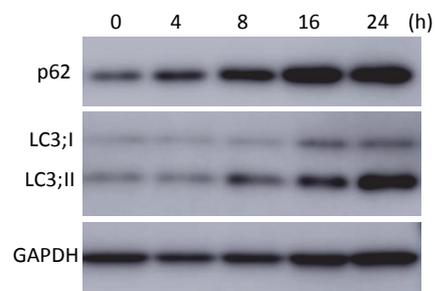


図4. メチル水銀によるp62の発現

また、RT-PCR 法により p62 の mRNA を調べると、メチル水銀による発現増加が確認された (data not shown)。以上の結果から、メチル水銀による p62 の発現増加は、転写を介していることが示された。

### 3-5. メチル水銀による p62 とユビキチン化タンパク質の細胞内局在

タンパク質にユビキチンが付加されると、分解のシグナルとなり、細胞内分解装置であるプロテアソームに運ばれて分解を受ける。近年、このユビキチン-プロテアソーム系に加え、オートファジーがユビキチン化タンパク質の分解に関与することが示されている。

メチル水銀による細胞内のユビキチン化タンパク質の影響をウエスタンブロット法により調べると、継時的な増加が認められた。コントロール細胞において、細胞質にわずかに検出されるユビキチン化タンパク質は、メチル水銀により核周囲に集積し、ドット状の染色像を示した。また、p62 もメチル水銀により、核周囲に集積し、そのほとんどがユビキチン化タンパク質と共局在した (data not shown)。

さらに、免疫沈降法により、p62 とユビキチン化タンパク質との相互作用が確認された。また、メチル水銀により、p62 に結合するユビキチン化タンパク質の増加が認められた (data not shown)。

### 3-6. p62 欠損 MEF 細胞におけるメチル水銀によるユビキチン化タンパク質と LC3 の発現

メチル水銀により、ユビキチン化タンパク質の増加が認められたが、p62 欠損 MEF 細胞にメチル水銀を処理すると、野生型 MEF 細胞より顕著なユビキチン化タンパク質の増加が認められた。さらに、高濃度のメチル水銀により、p62 欠損 MEF 細胞においてユビキチン化タンパク質の凝集した染色像が認められた。一方、野生型 MEF 細胞においてユビキチン化タンパク質の凝集した染色像は、ほとんど見られなかった。

続いて、この p62 欠損 MEF 細胞におけるユビキチ

ン化タンパク質の細胞内局在を調べた。オートファジー阻害剤である CQ を処理すると、野生型および p62 欠損 MEF 細胞におけるユビキチン化タンパク質の蓄積と LC3 のオートファゴソームへの局在化がそれぞれ誘導された。この CQ 処理下、野生型 MEF 細胞では、LC3 とユビキチン化タンパク質の局在が一致した。一方、p62 欠損 MEF 細胞では両者の局在は一致しなかった。次に、CQ に加えメチル水銀を処理すると、野生型 MEF 細胞では、LC3 とユビキチン化タンパク質の局在が増強されたが、p62 欠損 MEF 細胞では、ユビキチン化タンパク質の増加は見られるものの、LC3 との局在は一致しなかった (data not shown)。以上の結果から、ユビキチン化タンパク質のオートファゴソームへの輸送には p62 が必要であることが示唆された。

### 3-7. p62 欠損 MEF 細胞におけるメチル水銀に対する感受性

メチル水銀に対する p62 欠損 MEF 細胞の感受性は野生型 MEF 細胞と比較して、脆弱性を示した (data not shown)。このことから、p62 はメチル水銀毒性の防御因子として働いていることが示唆された。

## 4. 結論

メチル水銀は、オートファジーを活性化することが明らかとなった。また、オートファジーを阻害すると、メチル水銀に対する毒性が増加することが示された。

さらに、メチル水銀は、オートファジー関連分子である p62 の発現を誘導した。一方、メチル水銀は、ユビキチン化タンパク質を増加させた。p62 欠損細胞において、メチル水銀により誘導されたユビキチン化タンパク質は、オートファゴソームへの局在を示さなかった。

以上の結果から、p62 はユビキチン化タンパク質をオートファゴソームに輸送することにより、メチル水銀毒性に対し防御的に働いていることが示唆された。



# 若手発表



# メチル水銀の妊娠期飲水曝露が胎児のメタボロームに及ぼす影響と性差

○武田知起 (九州大院)、人見将也、服部友紀子 (九州大院)、藤村成剛 (国立水俣研)  
石井祐次、山田英之 (九州大院)

## 1. 背景および目的

メチル水銀 (MeHg) は胎盤を容易に通過して母体から胎児へと移行し、出生後に脳性麻痺や運動・知的機能の発達遅延など様々な神経毒性を惹起する<sup>1,2)</sup> (Fig. 1)。これらは、成熟個体への曝露よりも低用量で起こり、障害形質が持続するため問題が大きい、発現機構の多くは不明である。また、これら障害の一部は男児により顕著であるが<sup>3,4)</sup>、この理由も理解されていない。本研究ではこれらの問題解決を目指し、MeHg 妊娠期曝露がラット胎児の肝メタボロームに及ぼす影響と性差を解析し、毒性に寄与する因子を探索した。さらに、本解析によって推定された副腎ステロイド系への影響の性差に着目した解析も実施した。

## 2. 実験方法

### 2-1. 動物処理

妊娠 Wistar rat を作製し、妊娠 1 日目 (GD1) より GD20 までの間、MeHg (0.1, 1 および 5 ppm) 含有水を自由に与えた。GD20 に胎児および母体より視床下部、副腎、肝臓および血液を採取し、以下の解析に供した。なお、本検討での曝露条件においては、胎児の生存数や体重ならびに性比に影響は観察されなかった。

### 2-2. メタボローム解析

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

タボローム変動を解析した。

### 2-3. Real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法

採取した組織より total RNA を抽出したのち、real-time RT-PCR 法により、目的タンパク質の mRNA 発現量を定量した。各遺伝子の発現量は、 $\beta$ -actin mRNA で補正したのち解析した。

### 2-4. Enzyme immunoassay

血清中のコルチコステロン濃度は、AssayMax corticosterone ELISA kit を用いて添付説明書に従って測定した。血清は、kit 添付の希釈用溶媒にて 100 倍希釈したのちに測定に供した。

## 3. 結果および考察

### 3-1. MeHg が胎児肝臓メタボロームに及ぼす影響とその性差

UPLC-TOF-MS 解析によって得られたデータを主成分分析に付した結果、雌雄胎児共に Score plot において MeHg の用量依存的にプロットの乖離が認められた (図 1A)。すなわち、MeHg は用量依存的に胎児肝臓メタボロームを変動させることが明らかになった。S-plot において、相関係数 0.8 以上および -0.8 以下を有意に増減したイオンとして抽出し、データベース解析に付したところ、雌雄共に変動成分数は用量依存的に増加したが、オスの方が多かった (図 1B and C)。MeHg は雄胎児に対してより多くのメタボロームを変動させ、これが毒性の性差の一因となる可能性が示唆された。雌雄胎児共に、脂質、アミノ酸、核酸およびホルモン類等の多くの栄養成分の

変動が推定されたが (表 1)、特に副腎ステロイド系への影響は雄胎児で顕著であることが判明した (表 1)。胎児期における糖質コルチコイドの過剰状態は成長遅延を引き起こすことから<sup>5)</sup>、本ステロイドへの影響が障害感受性の性差に寄与する可能性が浮上した。一方、雌胎児においては抗酸化ホルモンであるメラトニンの増加が確認され、雌胎児では防御系が亢進している可能性も考えられた (表 1)。

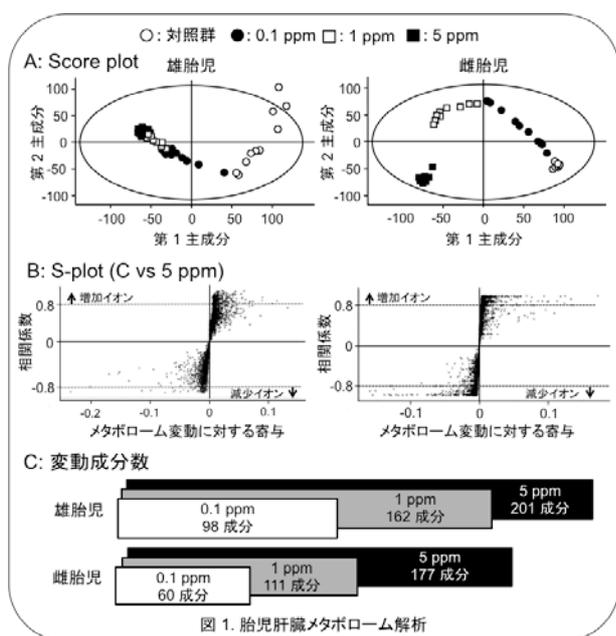


図 1. 胎児肝臓メタボローム解析

表 1. MeHg の妊娠期飲水曝露によって変動が推定された代表的成分

MeHg 濃度 (ppm)	変動成分	
	増加	減少
雄胎児	0.1 ppm	
	17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone Neopterin Dihydroneopterin 5-Hydroxytryptophan L-Kynurenine	6-Hydroxymeratonin
	1 ppm	
	Progesterone 3-Hydroxy-L-kynurenine	11-Dehydrocorticosterone 11-Deoxicorticosterone
5	11 $\beta$ -Hydroxyandrostenedione Histidine	
	雌胎児	
0.1	Leukotriene F4	3-Hydroxy-L-kynurenine 17 $\alpha$ -Hydroxypregnenolone 11-Deoxycortisol
	1	
1	Orotidine monophosphate (OMP) Sphingomyelin	Progesterone 11-Deoxicorticosterone Cholesterol 5-Hydroxytryptophan
	5	
5	Aldosterone hemiacetal Melatonin N-Formylkynurenine L-Kynurenine	3-Dehydroshikimate 2-Aminomuconate cis-Aconitate

1 および 5 ppm での成分は、新たに有意な変動となった成分のみを記載。下線は、雌雄に共通の変動成分を示す。

### 3-2. コルチコステロン増加とその機構解析

血中コルチコステロン濃度を精密定量した結果、メタボローム解析の結果と合致して、MeHg は雄胎児のみで濃度を有意に増加させた (図 2A)。これを支持して、コルチコステロンによって発現制御を受ける遺伝子である regulated in development and DNA damage response 1 (REDD1) の mRNA レベルが雄胎児視床下部のみで用量依存的に増加した (図 2B)。REDD1 は、神経分化/成熟ならびに維持に重要である mammalian target of rapamycin complex-1 (mTORC1) の抑制因子であることから<sup>6)</sup>、MeHg は雄胎児のみでコルチコステロン依存的な REDD1 増加を通して mTORC1 活性化を抑制し、神経機能に対してより顕著に影響を及ぼす可能性が考えられた。

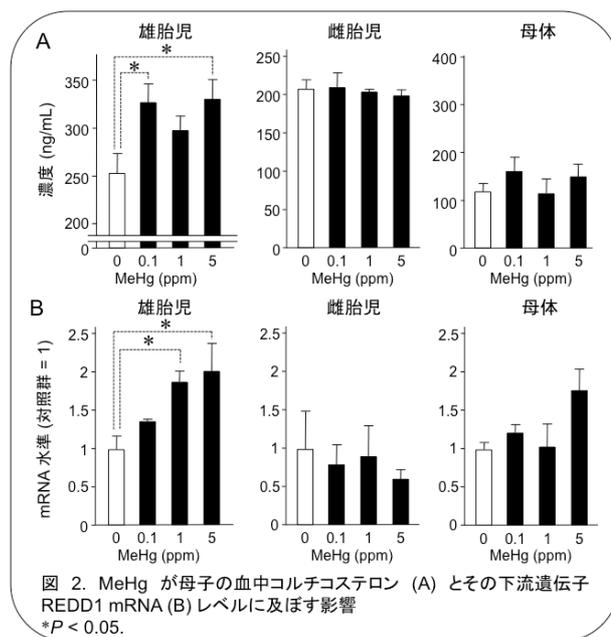


図 2. MeHg が母子の血中コルチコステロン (A) とその下流遺伝子 REDD1 mRNA (B) レベルに及ぼす影響  
\* $P < 0.05$ .

次に、コルチコステロン増加の機構解析の一環として、副腎ステロイド合成および代謝酵素の mRNA 発現水準に対する影響を解析した。その結果、コルチコステロンの不活性化への関与が推定されている<sup>7)</sup> UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) 1A1 の肝臓における発現が、MeHg 曝露によって雄胎児のみで減少した (図 3A)。一方、MeHg は副腎におけるコルチコステロン合成系

タンパク質群の発現の一部を、雌胎児のみで減少させた (図 3B)。

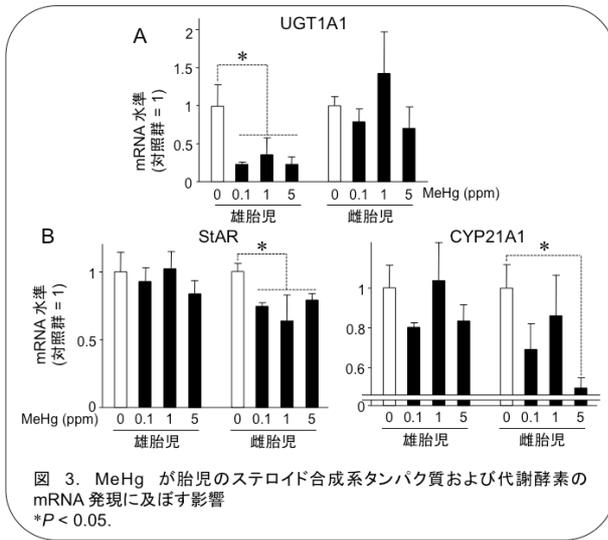


図 3. MeHg が胎児のステロイド合成系タンパク質および代謝酵素の mRNA 発現に及ぼす影響  
\*P < 0.05.

以上の成果より、MeHg による発達毒性とその性差は、肝臓での代謝攪乱を通じたメタボローム (障害成分/防御応答成分) の変動が複合的に作用し誘起される可能性が浮上した。

#### 4. 引用文献

- 1) Clarkson TW, Magos L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. *Crit. Rev. Toxicol.*, **36**: 609-662 (2006).
- 2) Farina M, Rocha JB, Aschner M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: evidence from experimental studies. *Life Sci.*, **89**: 555-563 (2011).
- 3) Rossi AD, Ahlbom E, Ögren SO, Nicotera P, Ceccatelli S. Prenatal exposure to methylmercury alters locomotor activity of male but not female rats. *Exp. Brain. Res.*, **117**: 428-436 (1997).
- 4) Sakamoto M, Nakano A, Akagi H. Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environ. Res. Sec. A*, **87**: 92-98 (2001).
- 5) Fetal hypoxia increases vulnerability of hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: role of glucocorticoid receptors. *Neurobiol. Dis.*, **65**: 172-179 (2014).
- 6) Ota KT, Liu RJ, Voleti B, Maldonado-Aviles JG, Duric V, Iwata M, Duthel S, Duman C, Boikess S, Lewis DA, Stockmeier CA, DiLeone RJ, Rex C, Aghajanian GK, Duman RS. REDD1 is essential for stress-induced synaptic loss and depressive behavior. *Nat. Med.*, **20**: 531-535 (2014).
- 7) Itäaho K, Mackenzie PI, Ikushiro S, Miners JO, Finel M. The configuration of the 17-hydroxy group variably influences the glucuronidation of beta-estradiol and epiestradiol by human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab. Dispos.*, **36**: 2307-2315 (2008).

胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 42 ヶ月時の知能に及ぼす影響の検討：  
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）、佐藤洋（東北大学・院・医・環境保健医学）

## 1. 背景

メチル水銀は胎盤を通過して胎児の脳に移行するが、胎児期は中枢神経系が発達する時期であることからメチル水銀曝露に対する感受性が高いことが知られる。その曝露レベルが低濃度であっても出生児の発達に何らかの影響を及ぼすことが海外の先行研究から示されている<sup>1,2)</sup>。そこで我々は、我が国におけるメチル水銀曝露に起因した健康影響の有無を明らかにすることが必要と考え、出生コホート調査(Tohoku Study of Child Development, TSCD)<sup>3)</sup>を進めている。TSCDでは、中核都市と沿岸都市でそれぞれコホート調査を進めているが、今回は、沿岸都市のコホート調査結果について報告する。

平成 24 年度の本ミーティングでは、胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 18 ヶ月の男児の運動発達に負の影響を及ぼすことを報告した。本報告では、同じ対象児が生後 42 ヶ月になったときに実施した知能検査に及ぼす影響を検討する。

## 2. 方法

### 2-1. 対象者

TSCDのうち、沿岸部のコホート調査では、平成 14 年 12 月から平成 18 年 3 月の間に同意が得られた 749 組の妊娠女性とその出生児を登録しており、その出生児が生後 42 ヶ月に調査を実施した。

### 2-2. 調査内容

生後 42 ヶ月にて、Kaufman Assessment

Battery for Children(K-ABC)を実施した。K-ABC は日本で標準化された知能検査であり、認知処理過程と習得度の 2 尺度から構成される。認知処理過程は、さらに同時処理と継次処理に分けられる。これら 4 尺度の得点を解析に用いた。なお、K-ABC は日本文化科学社が主宰する研修を受けた 4 名が検査者を担当した。

### 2-3. 生体試料

母親の毛髪を出産後 4 日目、臍帯血を出産時、母体血を出産直後の朝食前に採取した。毛髪の総水銀は原子吸光光度法（毛根部～3cm）、臍帯血血漿のセレンは Watkinson 法、母体血血漿のドコサヘキサエン酸(以下、DHA)は Gas Chromatography 法でそれぞれ測定を行った。

### 2-4. 交絡要因

カルテから子どもの性別や出生順位を転記した。出産後 4 日目に妊娠中の喫煙や飲酒習慣を自記式調査票により調査した。母親の推理能力は、Raven's Standard Progressive Matrices<sup>4)</sup>を用いて評価した。

### 2-5. 統計学的解析

曝露指標については、正規分布ではない場合に対数変換後の値を解析に使用した。曝露指標と K-ABC の結果との関連性は単相関分析および重回帰分析（強制投入法）より解析した。毛髪総水銀の濃度で群分けし、K-ABC 得点の違いについて共分散分析および傾向分析から検討した。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

#### 3-1. 対象母子の基本属性と曝露指標

本解析では、データの揃った 542 組の母子を解析対象とした。検査時の平均月齢は 42.0 ヶ月（標準偏差 0.2）であった。対象母子の基本属性および K-ABC 得点を表 1、曝露レベルを表 2 に示す。

表 1 対象母子の基本属性と K-ABC 得点

	平均値	標準偏差	%
子どもの性別 (% 男児)			50.6
出生順位 (% 第一子)			41.7
妊娠中の飲酒歴 (% 有)			15.3
妊娠中の喫煙歴 (% 有)			12.0
Ravenの得点*	50.1	5.4	
42ヶ月時のK-ABCの得点			
認知処理過程得点	90.8	14.4	
同時処理得点	85.0	15.5	
継次処理得点	96.3	16.1	
習得度得点	92.3	14.0	

\* Raven's Standard Progressive Matrices

表 2 曝露レベル

	中央値	5%ile	95%ile
母親毛髪総水銀 ( $\mu\text{g/g}$ )	2.5	1.0	5.9
臍帯血セレン (ng/g)	65.9	51.0	83.4
母体血DHA ( $\mu\text{g/ml}$ )	168.8	100.9	253.4

#### 3-2. 曝露指標と K-ABC 得点との関連性

曝露指標と K-ABC 得点との関連性を Pearson の積率相関係数から検討した (表 3)。毛髪総水銀および母体血 DHA については、K-ABC 得点との間に統計学的な関連性は認められなかった。一方で、臍帯血セレンと K-ABC の同時処理得点との間に正の関連性が観察され、臍帯血セレンの濃度が高い場合に K-ABC の同時処理得点が高くなることが示された。

表 3 K-ABC 得点と曝露指標 (単相関)

	認知処理	同時処理	継次処理	習得度
毛髪総水銀	-0.035	-0.057	0.012	0.016
臍帯血セレン	0.065	0.087 *	0.020	0.013
母体血DHA	0.002	-0.004	0.007	0.014

Pearsonの積率相関係数

\*  $p < 0.05$

#### 3-3. K-ABC 得点と関連のある要因

K-ABC 得点を従属変数、曝露指標および交絡要因を独立変数とした重回帰分析 (強制投入法) を実施した (表 4)。その結果、いずれの曝露指標も K-ABC 得点との間に関連性は観察されなかった。単相関分析で観察された臍帯血セレンと同時処理得点との間に見られた正の関連性も消失した。

表 4 重回帰分析の結果 (全対象児)

	認知処理	同時処理	継次処理	習得度
調整済R <sup>2</sup>	0.081	0.064	0.059	0.041
毛髪総水銀	-0.043	-0.058	-0.002	0.023
臍帯血セレン	0.037	0.057	0.005	-0.007
母体血DHA	0.024	0.023	0.013	0.016
子どもの性別	-0.212 *	-0.208 *	-0.149 *	-0.114 *
出生順位	-0.043	-0.023	-0.050	-0.150 *
Ravenの得点	0.158 *	0.144 *	0.131 *	0.097 *

標準化  $\beta$  を示す。

\*  $p < 0.05$

共変量: 検査時月齢、検査テスター、妊娠中の飲酒/喫煙歴

#### 3-4. K-ABC 得点と子どもの性別

重回帰分析の結果から、子どもの性別が K-ABC 得点と関連することが示されたため (表 4)、子どもの性別で層別して K-ABC の得点に影響を及ぼす要因を検討した。その結果、男児のみで毛髪総水銀と K-ABC の同時処理得点との間に負の関連性が認められた (表 5)。毛髪総水銀の濃度で 5 群に分類し、知能検査の得点の差異を調べた。その結果、統計学的に有意な差異は認められなかったものの ( $F(1, 4) = 0.135$ ,  $p = 0.714$ )、傾向分析の結果、毛髪総水銀の濃度が高い

ほど同時処理得点が低下することが示された (p for trend 0.024) (図 1)。

表 5 重回帰分析の結果 (層別解析)

同時処理 調整済R <sup>2</sup>	男児 (n=274)		女児 (n=268)	
	標準化β	p値	標準化β	p値
毛髪総水銀	-0.142	0.031	0.026	0.693
臍帯血セレン	0.067	0.272	0.052	0.420
母体血DHA	0.102	0.114	-0.054	0.418

共変量: 検査時の月齢、検査テスター、出生順位、  
妊娠中の飲酒/喫煙歴、Ravenの得点

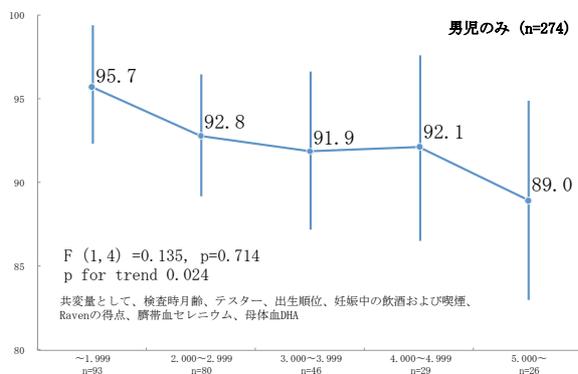


図 1 毛髪総水銀の濃度で 5 群に分けたときの同時処理得点

#### 4. 考察

胎児期におけるメチル水銀曝露が生後 42 ヶ月児の知能に及ぼす影響について調べた。その結果、対象児が男児の場合に、メチル水銀曝露が高いと知能指数が低下することが示された。同一対象児が生後 18 ヶ月に実施した発達検査の運動発達得点についても、毛髪総水銀の曝露レベルが高い場合に負の影響が観察されており、一貫した結果が得られた。

化学物質の曝露影響については、先行研究により、メチル水銀<sup>1,2)</sup>のみならず、鉛<sup>5)</sup>、ダイオキシン類<sup>6)</sup>、ポリ塩化ビフェニル<sup>7)</sup>においても男児で感受性が高いことが報告されている。本研究でも同様の現象が示されており、子どもの発達へ

の影響については、低濃度の曝露レベルであっても軽視すべきでないと考えられた。

#### 引用文献

- 1) Myers GJ, et al: Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361(9370), 1686-1692, 2003
- 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: 677-688, 1995
- 3) Nakai K, et al.: The Tohoku Study of Child Development: A Cohort Study of Effects of Perinatal Exposures to Methylmercury and Environmentally Persistent Organic Pollutants on Neurobehavioral Development in Japanese Children. *Tohoku Journal of Experimental Medicine* 202, 227-237, 2004
- 4) Raven JC.: *Standard Progressive Matrices: Sets A, B, C, D and E.* London, Lewis. 1958
- 5) Jedrychowski W, et al: Gender specific differences in neurodevelopmental effects of prenatal exposure to very low-lead levels: the prospective cohort study in three-year olds. *Early Hum Dev* 85(8): 503-510, 2009
- 6) Konishi K, et al: Prenatal exposure to PCDDs/PCDFs and dioxin-like PCBs in relation to birth weight. *Environ Res* 109(7): 906-913, 2009
- 7) Tatsuta N, et al: Impacts of prenatal exposures to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and lead on intellectual ability of 42-month-old children in Japan. *Environ Res* 133:321-326, 2014

## 脳由来神経栄養因子は初代培養小脳顆粒細胞のメチル水銀細胞死を GSHの減少を介して促進する

○牧 武宏(ハムリー株式会社 睡眠科学研究所), 坂上 元栄(麻布大学 獣医学部)

メチル水銀は中枢神経系の発達と成長に影響を及ぼす強力な神経毒性物質である。メチル水銀問題は、現在も我々が主に魚介類より摂取していることから、胎児や子供への影響が疑われている。

メチル水銀毒性の特徴として、成熟個体よりも発生・発達期の個体の神経細胞が高感受性である点、すべての神経細胞が標的となるのではなく大脳および小脳皮質の顆粒細胞など、特定の神経細胞が標的となる点の二つがある。しかし、この二点の重要な特徴がどのような機序で生じるのかについては不明である。Sakaueら(2009)は、神経細胞の生存や分化、神経発達に重要な神経成長因子の一つ Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が、メチル水銀による神経細胞死を促進することを明らかにした。この促進作用は、神経細胞に BDNF の高親和性受容体である tropomyosin-related kinase B (TrkB) の発現が必要であることから、BDNF が神経細胞のメチル水銀感受性の決定因子の一つである可能性を示している。メチル水銀による神経細胞死には、内因性抗酸化物質であるグルタチオン (GSH) の減少が関与する。一方で、初代培養小脳顆粒細胞において、細胞内 GSH 量減少がグルタミン酸誘導性神経細胞死を誘導し、グルタミン酸レセプターのアゴニストである NMDA による細胞死を BDNF が促進することが報告されている。このように細胞内 GSH 量が減少すると、消去される活性酸素種 (ROS) が増加し、結果として細胞死を引き起こすとする報告があることから、メチル水銀による

細胞死においても BDNF が細胞内 GSH 量を減少させることで細胞死を誘導すると推測される。

そこで本研究では、BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用の機序を解明することを目的として、BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用に GSH の減少が関与するのか、そこには BDNF の受容体 TrkB が関与しているのか、TrkB が関与している場合に TrkB 以下の三つの主要な細胞内シグナル伝達経路 (MAPK 経路, PI3K/AKT 経路, PLCK 経路) のうち、どの経路を介するのかを検討した。

### 初代培養小脳顆粒細胞における BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死および細胞内 GSH 量に及ぼす影響

これまでの研究から、BDNF がメチル水銀誘導性の神経細胞死を促進し、メチル水銀毒性によって誘導される細胞死には細胞内 GSH 量減少が関与すると考えられる。そこで、初代培養小脳顆粒細胞 (以下、初代培養細胞) における BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用への細胞内 GSH 量減少の関与を検討するため、細胞内 GSH 量を減少させる GSH 合成酵素阻害剤 *L*-buthionine sulfoximine (BSO) あるいは GSH 枯渇剤 diethyl maleate (DEM) による細胞内 GSH 量減少誘導性神経細胞死モデルを用いて検討した。

メチル水銀, BSO, DEM, および BDNF を処理し、細胞生存率および細胞内 GSH 量を測定した。メチル水銀 (100 nM) を 48 時間処

理, BSO (300  $\mu$ M) を 72 時間処理, DEM (200  $\mu$ M) を 24 時間処理した。各々の細胞生存率は, 各対照群と比較して有意に減少した。メチル水銀, BSO および DEM 処理とともにそれぞれに BDNF 100 ng/mL を共処理すると, メチル水銀, BSO および DEM 単独処理群と比較して細胞生存率がさらに有意に減少したことから, BDNF は, メチル水銀だけではなく, 細胞内 GSH 量を減少させる二種類の薬剤 BSO および DEM 誘導性の神経細胞死を促進することが明らかとなった。

また, 初代培養細胞における細胞内 GSH 量に関しては, いずれの処理も細胞生存率が対照群と有意差を示さない処理時間で行った。メチル水銀単独処理群では, 処理 12 時間後と比較して処理 24 時間後の細胞内 GSH 量が有意に減少した。メチル水銀と BDNF 共処理群の 12, 24 時間後の細胞内 GSH 量は, メチル水銀単独処理の場合と比較して有意に減少した。また, BSO 処理群, DEM 処理群においても, メチル水銀処理群と同様に, BDNF を共処理すると細胞内 GSH 量が有意に減少した。つまり, BDNF が細胞死の誘導に先行して細胞内 GSH 量減少を促進することが明らかとなった。

#### B35 細胞における BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死および細胞内 GSH 量への影響

BDNF が細胞内 GSH 量減少による神経細胞死を, 細胞内 GSH 量をさらに減少させることで促進することが示されことから, 次に TrkB の有無による BDNF の作用の違い, さらに細胞種間でこの BDNF の作用に違いがあるのかを検討するため, TrkB 非発現細胞であるラット神経芽細胞腫由来 B35 細胞の TrkB 強制発現株 (B35<sup>TrkB</sup>) を樹立し, TrkB 非発現株 (B35<sup>Mock</sup>) とともに, メチル水銀, BSO, お

よび BDNF を処理し, 処理 24, 40 時間後における細胞生存率と, 細胞内 GSH 量に関して細胞生存率が対照群と有意差を示さない処理時間 (メチル水銀処理 24 時間, BSO 処理 12 時間) で測定した。

B35<sup>TrkB</sup> おいて, メチル水銀 (600 nM) を 40 時間処理, BSO (50  $\mu$ M) を 24 時間処理した細胞生存率は, 各対照群と比較して有意に減少し, それぞれに BDNF 100 ng/mL を共処理すると, 細胞生存率はさらに有意に減少した。

一方, 細胞内 GSH 量に関しては, B35<sup>TrkB</sup> において, メチル水銀あるいは BSO と BDNF を共処理すると, メチル水銀および BSO 単独処理群と比較して細胞内 GSH 量が有意に減少した。しかし, B35<sup>Mock</sup> では, BDNF 処理による B35<sup>TrkB</sup> のような細胞内 GSH 量の変化はみられなかった。このことから, BDNF は TrkB を介して細胞内 GSH 量を減少させ, その細胞内 GSH 量減少促進に伴って細胞生存率の減少が促進されることが示された。

#### BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用と細胞内シグナル伝達経路の関与

B35<sup>TrkB</sup> を用いた実験で, 初代培養細胞と同様の BDNF による細胞死促進作用が生じ, BDNF は TrkB を介して, メチル水銀誘導性神経細胞死および細胞内 GSH 量減少性細胞死を促進していることが考えられた。

そこで, BDNF のメチル水銀誘導性神経細胞死促進作用に, TrkB の下流に存在する主な三つの細胞内シグナル伝達経路が関与しているかを検討した。初代培養細胞に, メチル水銀, BDNF, U0126 (MAPK 経路の MEK1/2 の特異的阻害剤) 1  $\mu$ M, PD98059 (MAPK 経路の MEK1 の特異的阻害剤) 30  $\mu$ M, LY294002 (PI3K/Akt 経路の特異的阻害剤) 1  $\mu$ M,

U73122 (PLC $\gamma$  経路の特異的阻害剤) 3  $\mu$ M を処理し, 細胞生存率の測定は処理 48 時間後に, 細胞内 GSH 量測定は処理 24 時間後に行った。

初代培養細胞において, U0126 だけが, メチル水銀処理およびメチル水銀と BDNF の共処理によって誘導された神経細胞死と細胞内 GSH 量減少を有意に抑制した。

本研究結果から

(a) 初代培養細胞および B35 細胞におけるメチル水銀誘導性神経細胞死では, 細胞内 GSH 量が減少し, そこに BDNF を共処理すると, 初代培養細胞および B35<sup>TrkB</sup> だけで, GSH 量がさらに減少することが示された。

(b) 実験 2 の結果および初代培養細胞には内在的に TrkB が発現していることから, BDNF による細胞内 GSH 量の減少促進には TrkB が関与していることが示された。

(c) BDNF が BSO および DEM による細胞死を促進したことから, BDNF は, 細胞内 GSH 量減少が関与する細胞死を促進することが明らかとなった。

つまり, BDNF は, 本来の「神経保護作用」に加えて, 本研究で示した機序による「神経細胞死促進作用」という相反する二面性を持つことが示された。

一方, メチル水銀誘導性神経細胞死およびそれに先行した細胞内 GSH 量減少を, U0126 だけが抑制した。しかし, BDNF 処理による細胞内 GSH 量減少は, U0126 でも PD でも抑制されなかった。このことから, メチル水銀あるいは BDNF 処理による細胞内 GSH 量減少は, メチル水銀, BDNF いずれにおいても, 本研究で検討した三つのシグナル伝達経路いずれも介していない可能性が示唆された。

また, 胎児・発育個体では神経細胞保護や生存維持のために BDNF が不可欠なためその

分泌が盛んである一方, 成熟個体では, BDNF 分泌量は少ない。

仮に本研究の結果をあてはめた場合, その状態にメチル水銀が暴露されることで, BDNF 分泌量が多い胎児・発育個体では, 成熟個体とは対照的に神経細胞死が誘導・促進されることとなる。さらに, TrkB 発現神経細胞と TrkB 非発現神経細胞で比較すると, メチル水銀暴露によって TrkB 発現神経細胞では BDNF を受容することでメチル水銀誘導性神経細胞死が促進されることとなるが, TrkB 非発現神経細胞では BDNF が周囲に存在したとしても細胞は受容しないため, メチル水銀誘導性神経細胞死に影響を与えることはなく, TrkB 発現神経細胞の方がメチル水銀によって細胞死が誘導されやすくなると考えられる。本研究で示した BDNF の神経細胞死促進作用は, 以上のようなメチル水銀毒性の未解明部分である「発生・発達期で高感受性」および「神経細胞間における感受性の差」を説明できる可能性がある。

## メチル水銀による脳特異的なセクレトグロビン 3A1 誘導とその機構解析

○高橋 勉（東京薬科大・薬、東北大院・薬）、趙 倩、齋藤 隆寛、金 ミンソク、黄 基旭、永沼 章（東北大院・薬）

### 1. 背景および目的

メチル水銀は、中枢神経系に選択的かつ重篤な毒性を示すが、その毒性発現機構はほとんど明らかにされていない。我々はこれまでにメチル水銀による中枢神経毒性に関わる遺伝子群を明らかにするため、メチル水銀を投与したマウス脳組織中での遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ法で解析し、メチル水銀によって発現上昇する遺伝子を 21 種同定している<sup>1)</sup>。このうち 5 種の遺伝子はケモカイン分子種をコードしており、その中で CCL4 がメチル水銀によって脳特異的に発現誘導されることを明らかにしている<sup>2, 3)</sup>。本研究では、残りの 16 種の遺伝子について、メチル水銀を投与したマウスの各組織における発現変動を解析し、メチル水銀によって脳特異的に発現上昇する遺伝子の同定を試みた。

### 2. 方法

#### 2-1. メチル水銀を投与したマウスにおける遺伝子発現変動

8 週齢雄性的 C57BL/6 マウスに、10 mg/kg/day のメチル水銀を 1 日 1 回ずつ 7 日間連続投与、または 25 mg/kg のメチル水銀を単回投与した。メチル水銀を投与したマウスから各組織（小脳、大脳、腎臓および肝臓）を摘出し、各遺伝子の発現レベルを定量 PCR 法によって解析した。

#### 2-2. メチル水銀を投与したマウス脳において活性化される転写因子の検索

25 mg/kg のメチル水銀を単回投与したマウスの脳組織から核抽出液を調製し、345 種類の転写因子の活性を調べる事が出来る Protein/DNA

Arrays (Affymetrix)を用いて、メチル水銀によって活性化される転写因子を検索した。

### 3. 結果および考察

メチル水銀 (10 mg/kg/day) を 1 日 1 回ずつ 7 日間連続皮下投与し、最終投与の 24 時間後の各組織における 16 種の遺伝子の mRNA レベルを定量 PCR 法によって調べた。その結果、脳組織での発現が確認できなかった遺伝子 (1 種) を除いて、15 種の遺伝子の脳組織 (大脳または小脳) での発現レベルの上昇が確認された。このうち、SCGB3A1 以外の 14 種の遺伝子については、腎臓または肝臓でも発現レベルの上昇が認められた。したがって、SCGB3A1 がメチル水銀によって脳組織特異的に発現誘導されると考えられる<sup>4)</sup>。SCGB3A1 (セクレトグロビン 3A1) は、セクレトグロビンファミリーに属する低分子量の分泌蛋白質で、抗炎症作用や抗腫瘍活性を有していることが報告されているが、その機能には不明な点が多く、特に脳内での機能についてはほとんど明らかにされていない。

本研究では、さらに、マウスおよび培養細胞を用いてメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導とその毒性学意義について検討した。メチル水銀を投与したマウスの脳組織における毒性発現と SCGB3A1 発現との関係を明らかにするため、マウス脳組織における病理変化を神経細胞マーカーである NeuN の陽性細胞数を指標として、SCGB3A1 発現レベルは定量 PCR 法および *in situ* hybridization 法によって調べた。その結果、マウスへのメチル水銀投与によって、脳組織中の病理変化 (神経細胞数の減少) が認められ

る前に SCGB3A1 の発現が上昇することが判明した。メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導はマウス神経前駆細胞 (C17.2 細胞) でも認められ、細胞においてもマウスの場合と同様に、メチル水銀による細胞死が引き起こされるより早い時点で SCGB3A1 mRNA レベルが上昇した。これらのことから、SCGB3A1 の発現誘導は、メチル水銀によって細胞が障害された結果として認められる現象ではなく、メチル水銀に対する細胞応答によるものと考えられる。また、siRNA を用いた SCGB3A1 の発現抑制によって C17.2 細胞のメチル水銀に対する感受性が上昇し、培地中へのリコンビナント SCGB3A1 の添加はメチル水銀毒性に対して軽減効果を示した。したがって、分泌蛋白質である SCGB3A1 は細胞外からの作用によってメチル水銀の毒性を軽減すると考えられる。

我々は転写因子 NF- $\kappa$ B がメチル水銀によって活性化されることを明らかにしている<sup>5)</sup>。そこで次に、メチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導における NF- $\kappa$ B の関与を調べたところ、NF- $\kappa$ B のノックダウンによってメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導が部分的に抑制された。メチル水銀によって NF- $\kappa$ B の核内レベルが上昇し、SCGB3A1 プロモーターへの結合量も増加したことから、メチル水銀は NF- $\kappa$ B の活性化を介して SCGB3A1 を誘導していると考えられる。一方、Protein/DNA アレイキット (Affymetrix) を用いてメチル水銀投与によってマウス脳中で活性化される転写因子を網羅的に検索したところ、3 種の転写因子が同定された。これら 3 つの転写因子とメチル水銀による SCGB3A1 発現誘導との関係を C17.2 細胞を用いて調べたところ、そのうちの 1 つである TCF3 のノックダウンによってメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導が部分的に抑制されることが判明した。NF- $\kappa$ B と TCF3 を同時にノックダウンしても相加的な抑制効果が

が認められないことから、NF- $\kappa$ B と TCF3 は同一の経路を介してメチル水銀による SCGB3A1 の発現誘導に関与している可能性が考えられる。以上の結果から、TCF3 および NF- $\kappa$ B を介した SCGB3A1 の発現誘導はメチル水銀毒性に対する生体防御システムとして重要な役割を果たしていると考えられる。今後、本発現誘導機構の詳細を明らかにすることによって、メチル水銀が示す中枢神経選択的な毒性発現機構の解明に繋がることが期待される。

## 引用文献

- 1) Hwang, G.W., Lee, J.Y., Ryoke, K., Matsuyama, F., Kim, J.M., Takahashi, T., Naganuma, A., Gene expression profiling using DNA microarray analysis of the cerebellum of mice treated with methylmercury *J. Toxicol. Sci.*, 36, 528-583, 2011.
- 2) Lee J.Y., Hwang G.W., Kim M.S., Takahashi T., Naganuma A. Methylmercury induces brain-specific expression of CCL4 chemokine in mice. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1279-1282. 2012.
- 3) Kim M.S., Takahashi T., Lee J.Y., Hwang G.W., Naganuma A. Global chemokine expression in methylmercury-treated mice: methylmercury triggers brain-specific induction of expression of CCL3 and CCL4. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 925-929, 2013.
- 4) Takahashi, T., Kim, M.S., Saito, T., Lee, J.Y., Hwang, G.W., Naganuma, A. Brain-specific induction of expression of secretoglobin 3A1 expression in mice treated with methylmercury. *J. Toxicol. Sci.*, 38, 963-965, 2013.
- 5) Kim, M.S., Takahashi, T., Lee J.Y., Hwang, G.W., Naganuma, A., Methylmercury induces expression of CCL2 by activation of NF- $\kappa$ B in 1321N1 human astrocyte cells. *J. Toxicol. Sci.*, 37, 1275-1278, 2012.

# メチル水銀によるアストロサイト適応応答とその神経保護作用

○ 石原 康宏、竹本 拓矢、山崎 岳 (広島大・院総科)

## 1. 序論

アストロサイトは長年、ニューロンの支持細胞であると考えられてきたが、神経伝達物質の取り込みやイオン環境の維持、液性因子の放出などを介して脳内環境を積極的に維持していることが明らかとなってきた。加えて、アストロサイトが神経毒に応答し機能変化を起こすことで、ニューロンに対し保護作用を示すことも報告された。アストロサイトは、ドパミンに応答してメタロチオネインを産生・放出し<sup>1</sup>、また、虚血刺激により TGF- $\beta$ 1 を遊離してニューロンを保護する<sup>2</sup>。従って、アストロサイトは様々な有害性刺激に対して積極的に応答し、神経保護にはたらくことが示唆される。

メチル水銀は脳においてアストロサイトに優先的に蓄積されることや<sup>3</sup>、その暴露によるアストロサイトの膨化が報告されていることから<sup>4</sup>、アストロサイトはメチル水銀の主要な標的になり得ると考えられる。しかし、メチル水銀に応答したときのアストロサイトの機能変化、および神経保護作用に係る研究は十分ではない。そこで、本研究では、メチル水銀のアストロサイトへの作用について、アストロサイトの適応応答を介した神経保護に焦点を当てて調べた。

## 2. 方法

生後 1～3 日齢の Wistar ラットより大脳皮質を分離し、トリプシンで細胞を分散させてアストロサイトを培養した。振とうによりミクログリア細胞を除き、14 日間培養した後実験に使用した。アストロサイトの培養上清を回収し、培養液を加えながら限外ろ過し、ここで得た溶液をアストロサイトコンディシ

ョナルメディウム (CM) として用いた。ヒト神経芽腫細胞株 SH-SY5Y 細胞は定法に倣って培養した。細胞生存率は MTT アッセイにより、mRNA 量は real-time PCR により、タンパク質量はウエスタンブロットと ELISA によりそれぞれ測定した。

## 3. 結果

### 3-1. アストロサイト培養上清による神経細胞死の抑制

SH-SY5Y を通常の培養液もしくはアストロサイトコンディショナルメディウム (CM) で 24 時間の前処置をした。その後、 $1\mu\text{M}$  のメチル水銀で 24 時間処置したところ、通常の培養液で前培養した SH-SY5Y の生存率は  $43.3 \pm 7.2\%$  まで低下した (Fig. 1)。一方、未処置アストロサイトの CM はメチル水銀による生存率の低下を有意に抑制した (Fig. 1)。非常に興味深いことに、メチル水銀処置したアストロサイトの CM はメチル水銀による SH-SY5Y の細胞死をほぼ完全に抑制した (Fig. 1)。このことから、メチル水銀に応答したアストロサイトの放出物が、SH-SY5Y をメチル水銀毒性から保護したと考えられる。

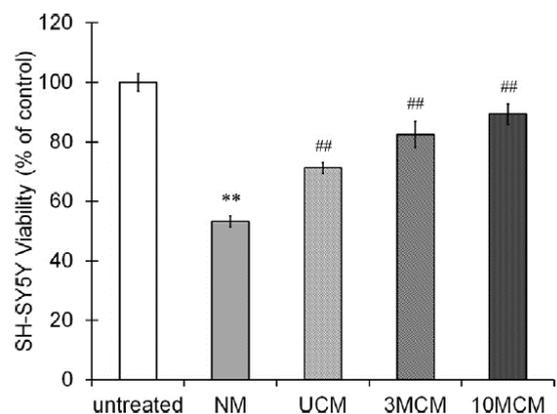


Fig. 1. アストロサイト培養上清によるメチ

### ル水銀誘導細胞死の抑制

(NM: 培養液、UCM: 未処置アストロサイト培養上清、3MCM: 3  $\mu$ M メチル水銀処置アストロサイト培養上清、10MCM: 10  $\mu$ M メチル水銀処置アストロサイト培養上清)

### 3-2. メチル水銀処置による神経増殖因子と神経栄養因子の発現上昇

アストロサイトは中枢神経系におけるニューロトロフィンの主要な産生細胞である。しかし、ニューロトロフィンのメチル水銀毒性に及ぼす影響については議論があり、例えば、脳由来栄養因子 (BDNF) は、メチル水銀による毒性を抑制する一方、Trk シグナルを干渉することも報告されている<sup>5</sup>。そこで、本研究では、アストロサイトの産生するニューロトロフィンに着目して、アストロサイトのメチル水銀毒性軽減作用について調べた。

アストロサイトに6時間のメチル水銀処置(3, 10  $\mu$ M)を行った際のニューロトロフィン(NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5)の発現量をリアルタイムPCRで調べた。メチル水銀処置により、NGFとBDNFのmRNA発現がメチル水銀濃度依存的に上昇した(Fig. 2)。しかし、NT-3とNT-4/5の発現量の変化は3, 10  $\mu$ Mどちらにおいても見られなかった(Fig. 2)。このことから、メチル水銀はアストロサイトにおいてNGFとBDNFの発現を上昇させることが明らかとなった。また、アストロサイト細胞内、及び、培養上清中のNGFとBDNFのタンパク量の変化をウェスタンブロットにより調べたところ、メチル水銀処置によりアストロサイト培養液中のNGFとBDNFタンパク量が濃度依存的に増加した。一方、細胞内のタンパク量はほとんど変化が無かった。従って、アストロサイトはメチル水銀に応答してNGFとBDNFを合成し、さらに、放出していると考えられる。

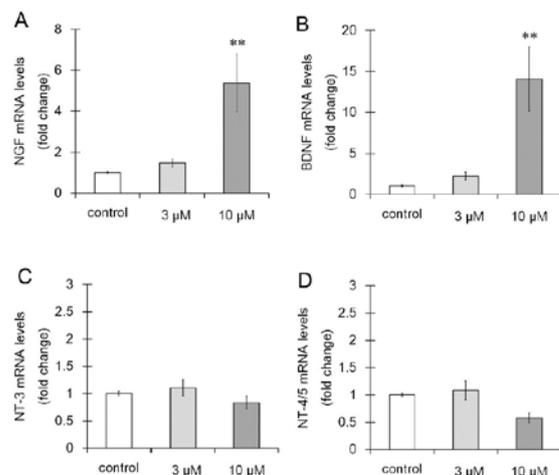


Fig. 2. メチル水銀による NGF と BDNF の発現上昇

(A:NGF、B:BDNF、C:NT-3、D:NT-4/5)

### 3-3. Trk アンタゴニストによる細胞障害亢進作用

メチル水銀処置した CM の神経保護作用に、NGF と BDNF が関与しているかどうかを調べるために、NGF の受容体である TrkA のアンタゴニスト GW441756 と BDNF の受容体である TrkB のアンタゴニスト Cyclostraxin-B を使用した。SH-SY5Y を GW441756 で前処置した後、メチル水銀を処置したときの CM を処置して 24 時間培養した。その後、メチル水銀を処置して 24 時間培養すると、アストロサイト CM の神経保護作用が消失した (Fig. 3)。Cyclostraxin-B も同様に CM の保護効果を消失させた (Fig. 3)。さらに、アストロサイト CM と NGF、または BDNF の中和抗体を混合した後に SH-SY5Y に処置したところ、CM のメチル水銀誘導細胞死の抑制作用が減弱した (data not shown)。従って、メチル水銀処置したアストロサイト CM 中に含まれる NGF と BDNF が、メチル水銀による SH-SY5Y の障害を抑制したと考えられる。

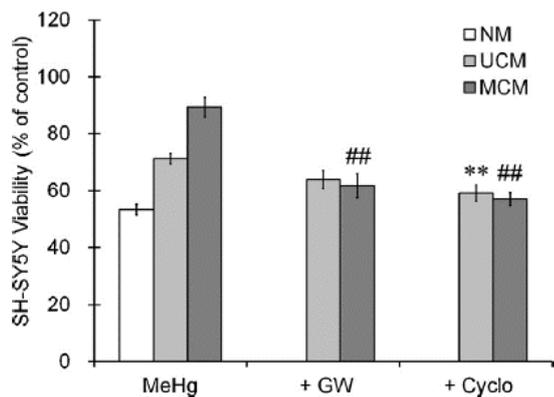


Fig. 3. Trk アンタゴニストによるアストロサイト CM 依存的保護作用の消失

### 3-4. メチル水銀による海馬ニューロン障害に対する Trk アンタゴニストの作用

アストロサイトの NGF、BDNF を介した神経保護作用をより生理的な系で確認するために、ニューロンとグリアがともに含まれる海馬スライス培養系を使用した。海馬スライスをメチル水銀で処置したところ、歯状回領域のニューロンが細胞死を起こした (Fig. 4)。GW441756 または Cyclotraxin-B で前処置した後にメチル水銀で処置すると、メチル水銀による歯状回ニューロンの障害が増進した (Fig. 4)。従って、メチル水銀による神経障害は、Trk により軽減されていることが示唆される。

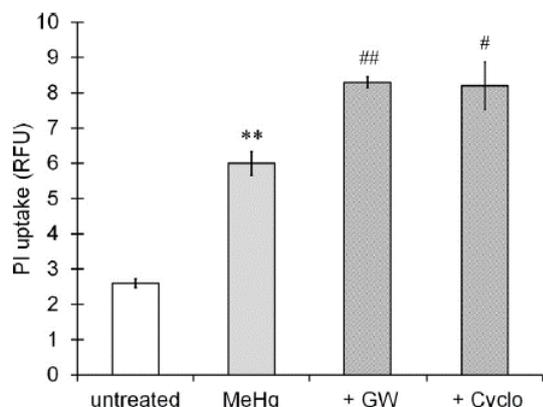


Fig. 4. 海馬スライス歯状回におけるメチル水銀神経細胞死の Trk アンタゴニストによる亢進

## 4. 結論

本研究より、メチル水銀に反応してアストロサイトが産生・放出する NGF と BDNF は、メチル水銀からニューロンを保護することが明らかとなった。メチル水銀はアストロサイトに優先的に蓄積することから、アストロサイトはメチル水銀の主要なターゲットとなる<sup>3</sup>。従って、アストロサイトによるメチル水銀応答性 NGF、BDNF 産生・放出は、毒物から脳を保護するための適応応答であると考えられる。また、アストロサイトによる NGF、BDNF の発現は、有機スズ化合物によっても上昇することから、本研究で示したアストロサイト適応応答はより多くの有害性刺激に対して起こりうるのかもしれない。

## 引用文献

- 1) Miyazaki I, Asanuma M, Kikkawa Y et al. Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. *Glia* 59:435-451, 2011.
- 2) Lin CH, Cheng FC, Lu YZ et al. Protection of ischemic brain cells is dependent on astrocyte-derived growth factors and their receptors. *Exp Neurol* 201:225-233, 2006.
- 3) Aschner M, Eberle NB, Goderie S et al. Methylmercury uptake in rat primary astrocyte cultures: the role of the neutral amino acid transport system. *Brain Res* 521:221-228, 1990.
- 4) Garman RH, Weiss B, Evans HL. Alkylmercurial encephalopathy in the monkey (*Saimiri sciureus* and *Macaca arctoides*): a histopathologic and autoradiographic study. *Acta Neuropathol* 32:61-74, 1975.
- 5) Sakaue M, Mori N, Makita M et al. Acceleration of methylmercury-induced cell death of rat cerebellar neurons by brain-derived neurotrophic factor in vitro. *Brain Res* 1273:155-162, 2009.

# メチル水銀と活性イオウ分子との反応により生じるビスメチル水銀サルファイド

○安孫子ユミ（筑波大学医学医療系）

吉田映子（筑波大学人間総合科学研究科、現東京理科大学）

熊谷嘉人（筑波大学医学医療系）

## 1. 研究の背景

ヒトを含めた好気性生物は分子状酸素を利用してエネルギー代謝を営む一方で、その一部がスーパーオキシドや過酸化水素のような活性酸素種（ROS）に変換される。しかし、生体内にはグルタチオン（GSH）に代表される抗酸化物質やスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）、カタラーゼのような抗酸化タンパク質群が ROS を消去することで、レドックスホメオスタシスが担保されている。それに対して、異物が生体内に侵入して過剰な ROS を産生する場合は、ROS の産生と消去のバランスが崩壊して酸化ストレスに陥る。

メチル水銀（MeHg）は酸化ストレスを生じる重金属として知られているが、その詳細はわかっていない。MeHg は鉄や銅のようなレドックスサイクル能を有さないことから、我々は3つの仮説を提案した。すなわち、①何らかのメカニズムを介して抗酸化タンパク質活性を減弱する、②MeHg の親電子性によりグルタチオンを捕獲して本抗酸化物質を枯渇する、③生体内に存在する高い抗酸化能を有する未知物質を捕獲して、結果的にレドックスホメオスタシスの破綻を引き起こす。

## 2. これまでの研究成果

### 2-1. 第1の仮説検証

マウスに MeHg を皮下投与すると、脳内の Cu, Zn-SOD 活性は変化しないのに対して Mn-SOD 活性は有意に低下した。この現象は Mn-SOD の mRNA およびタンパク質レベルの減少でなく、本酵素の Cys196 への S-水銀化による活性低下であることが示唆された<sup>1</sup>。後

に、永沼教授らの研究より、抗酸化タンパク質の中で Mn-SOD が MeHg の酸化ストレス依存的な細胞死に重要であることが確認されている。

### 2-2. 第2の仮説検証

試験管内で MeHg と GSH を反応させると、濃度に応じて GSH が枯渇して MeHg-SG 付加体が観察される。それに対して細胞を MeHg に曝露すると、細胞死が見られない条件下ではむしろ細胞内 GSH 量は増加した。この矛盾は MeHg が Keap1 を S-水銀化することで転写因子 Nrf2 を活性化して、その下流遺伝子である GSH 合成の律速酵素 GCL の発現量を亢進するためである<sup>2</sup>。我々は MeHg-SG 付加体の Hg-S 結合が共有結合にも係わらず不安定であることに着目して<sup>3</sup>、MeHg-SG 付加体のモノエステル体を化学合成して検討した。その結果、細胞内で MeHg-SG 付加体はタンパク質のチオール基と S-S 交換反応を介して MeHg のタンパク質付加体が生成し、代償的に GSH が遊離する事実が明らかとなった（図1）<sup>4</sup>。

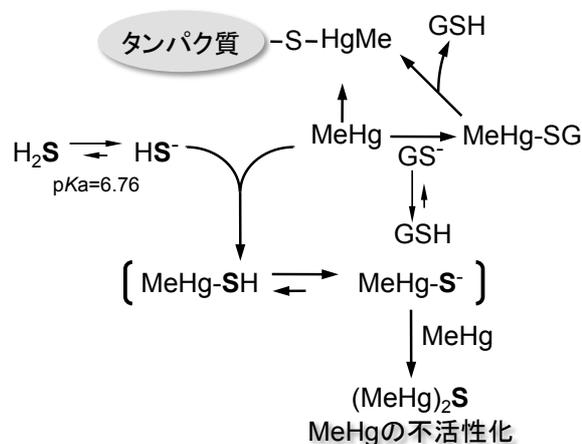


図1. チオール基を介したMeHgの動態

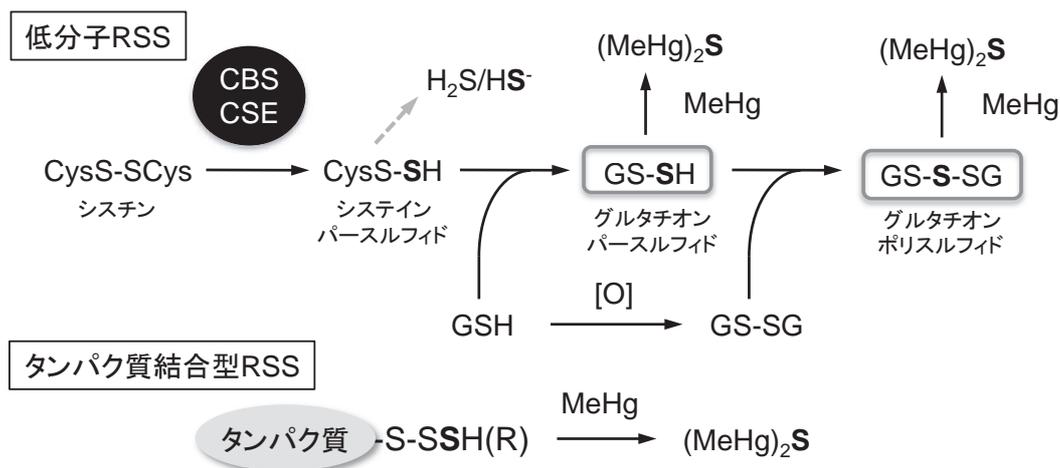


図2. 活性イオウ分子によるMeHgから(MeHg)<sub>2</sub>Sへの変換

以上より、細胞内 GSH 量が減少しない理由は、Keap1/Nrf2 システムを介した MeHg の酸化ストレスに対する初期応答だけでなく、MeHg-SG 付加体の不安定さが関係していることが示唆された。

### 2-3. 第3の仮説検証

硫化水素 (H<sub>2</sub>S) は神経疾患や循環器疾患の保護に働く内在性ガス状分子として注目されている。興味深い点は GSH の pKa 値が 9.12 であるのに対して、H<sub>2</sub>S のそれは 6.76 と低い。このことは H<sub>2</sub>S が生理的条件下ではその約 80% が HS<sup>-</sup> の形で存在し、MeHg と反応してイオウ付加体を形成する可能性を示唆している

(図 1)。実際に H<sub>2</sub>S と MeHg を反応させると、ビスメチル水銀サルファイド ((MeHg)<sub>2</sub>S) が効率良く生成した。これを標品として MeHg 曝露による (MeHg)<sub>2</sub>S の産生を検討した結果、MeHg を曝露したラット肝臓および SH-SY5Y 細胞中から (MeHg)<sub>2</sub>S をそれぞれ同定することに成功した<sup>5</sup>。当初、我々は (MeHg)<sub>2</sub>S 生成には CBS および CSE から産生する H<sub>2</sub>S が関与すると考えていたが、昨年東北大・赤池教授との共同研究により、H<sub>2</sub>S は僅かに生じる副産物であり、その実態はシスチンから生じるシステインパーサルフィド、それが起点となりイオウ付加反応を介して生成する GSH パース

ルフィドおよびそのポリスルフィドのような高い求核低分子であることから (図 2)、我々はこれらを活性イオウ分子 (Reactive Sulfur Species, RSS) と定義した<sup>6</sup>。事実、内在性 RSS と MeHg の反応により、何れの場合も (MeHg)<sub>2</sub>S が産生することが示された。さらに注目すべき点は、野生型マウスの肝臓のタンパク質画分でも (MeHg)<sub>2</sub>S 産生が見られ、CSE 欠損マウスの場合は顕著に減少した。このことは CSE 由来の RSS がタンパク質のシステイン残基に付加してパーサルフィド/ポリスルフィド化していることを示唆している。これを確認する目的で、カラムクロマトグラフィーによりマウスの肝可溶性画分中タンパク質を分離した。我々は得られたフラクション中に含まれるタンパク質と MeHg を反応させて (MeHg)<sub>2</sub>S が生成する場合は、そこにパーサルフィド/ポリスルフィド化したタンパク質が存在するという理屈で研究を行った。驚くことに、複数のタンパク質に (MeHg)<sub>2</sub>S 産生活性が認められた (図 3)。本結果は、タンパク質結合型 RSS を他の方法で検出した先行研究と同様であった<sup>6</sup>。高い (MeHg)<sub>2</sub>S 産生活性を呈する B-III 画分 (図 3) を Sephacryl S-100 カラムで分離し、単一な 25 kDa のタンパク質を得た。UPLC-MS 解析により、本タンパク質は GSTP1 と同定された。精製 GSTP1 タンパク

質と MeHg とを反応させた場合でも (MeHg)<sub>2</sub>S を産生したことから、GSTP1 が RSS 含有タンパク質の一つであることが始めて証明された<sup>7)</sup>。

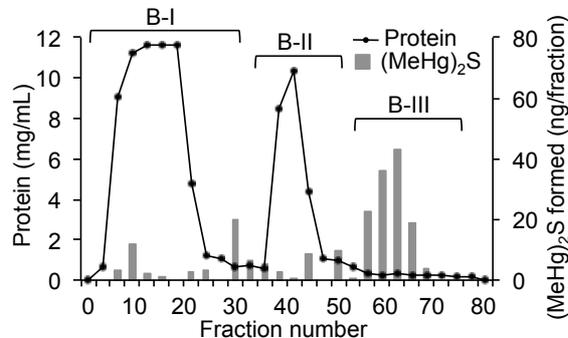


図3. Cibacron Blue 3GAカラムによるタンパク質の溶出と(MeHg)<sub>2</sub>Sの産生

### 3. 今後の展望

赤池教授らとの共同研究で明らかにした RSS は、その高い求核性および抗酸化性から鑑みて、レドックスホメオスタシスを制御する鍵分子として世界で注目され始めていることが引用回数から伺える。興味あることに、風邪薬として汎用されているアセトアミノフェンの親電子代謝物である *N*-アセチルベンゾキノニンイミンも (MeHg)<sub>2</sub>S のようなイオウを付加体として尿中に排泄されることを最近見出した<sup>8)</sup>。このことは、親電子性のある化学物質（カドミウム、アクリルアミド等）も生体内の RSS で捕獲され、イオウ付加体として不活性化されていることを示唆している。

上述したとおり、MeHg の酸化ストレスには少なくとも Mn-SOD 活性低下や RSS の捕獲が寄与していることが示唆されたが、タンパク質の翻訳後修飾にパーサルフィド/ポリサルフィド化が関係している事実が蓄積していることからすると、MeHg によるタンパク質中からのイオウ原子の捕獲は、当該タンパク質の高次構造の維持に影響することが考えられ、結果的にレドックスホメオスタシスの破綻に繋がることが予想される。我々の個体レベルで

の検討より、MeHg 曝露で見られる運動機能低下や行動異常が CSE 欠損により増大することも観察されており、これらの現象と生体内 RSS 低下との関係を CSE 高発現マウスと併せて比較検討する予定である。

### 引用文献

- 1) Kumagai Y, Homma-Takeda S, Shinyashiki M, Shimojo N. Alteration in superoxide dismutase isozymes by methylmercury. *Applied Organometallic Chemistry* 11: 635-643, 1997.
- 2) Toyama T, Sumi D, Shinkai Y, Yasutake A, Taguchi K, Tong KI, Yamamoto M, Kumagai Y. Cytoprotective role of Nrf2/Keap1 system in methylmercury toxicity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 363: 645-650, 2007
- 3) Rabenstein DL, Reied RS, Isab AA. H NMR study of the effectiveness of various thiols for removal of methylmercury from hemolyzed erythrocytes. *Journal of Inorganic Biochemistry* 18: 241-251, 1983.
- 4) Yoshida E, Abiko Y, Kumagai Y. Glutathione adduct of methylmercury activates the Keap1-Nrf2 pathway in SH-SY5Y cells. *Chemical Research in Toxicology* 27: 1780-1786, 2014.
- 5) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y, Sawa T, Akaike T, Kumagai Y. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian cells. *Chemical Research in Toxicology* 24: 1633-1635, 2011.
- 6) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto JM, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 111: 7606-7611, 2014.
- 7) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I, Fukuto JM, Akaike T, Kumagai Y. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chemical Research in Toxicology* 28: 1301-1306, 2015.
- 8) Abiko Y, Ishii I, Kamata S, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Ihara H, Akaike T, Kumagai Y. Formation of sulfur adducts of *N*-acetyl-*p*-benzoquinoneimine, an electrophilic metabolite of acetaminophen in vivo: Participation of reactive persulfides. *Chemical Research in Toxicology* 28: 1796-1802, 2015.

# メチル水銀に対する新奇リスク軽減因子としての活性イオウ分子

○秋山雅博、安孫子ユミ、熊谷嘉人（筑波大学医学医療系）

## 1. これまでの研究背景

環境中親電子物質であるメチル水銀 (MeHg) は分子中に電子密度の低い (親電子性) 部位を持つため、電子密度の高い (求核性) タンパク質のチオール基 (-SH 基) に容易に共有結合し、付加体を形成する (S-水銀化)。MeHg 曝露量の増加によりタンパク質の S-水銀化が過剰に行われると、レドックスホメオスタシスの攪乱に伴う被修飾タンパク質の担う細胞機能が破綻し、これが MeHg による毒性発現の主因と考えられている。一方、MeHg は求核低分子であるグルタチオン (GSH) により抱合され (フェーズ 2 反応)、その極性代謝物は多剤耐性関連タンパク質 (MRP) を介して細胞外に排泄 (フェーズ 3 反応) されることにより細胞内の恒常性維持されている (MeHg は酸化されないのでフェーズ 1 反応は関与しない)。さらに、フェーズ 2 および 3 反応に関与する遺伝子群を統括的に制御する NF-E2-related factor 2 (Nrf2) が MeHg のリスク軽減に重要な役割を担っていることを我々は報告しており<sup>1</sup>、MeHg に対する生体防御は求核低分子である GSH を主としたフェーズ 2 および 3 反応が重要な役割を担っている事は論を俟たない (図 1A)。しかしそれ故、他の求核性分子による生体防御の可能性は殆ど検証されていない現状にある。最近、我々のグループは東北大

学・赤池教授との共同研究により、これまで硫化水素 (H<sub>2</sub>S/HS<sup>-</sup>) を生成するとされていた cystathionine  $\gamma$ -lyase (CSE) および cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS) が、実は非常に高い求核性/抗酸化性を有するシステインパースルフィド (Cys-SSH) および、その可動性イオウ原子が転移したグルタチオンパースルフィド (GS-SH)、またそれらから派生するポリスルフィド (例えば、GS-S-SG) という活性イオウ分子 (Reactive sulfur species, RSS) を産生する酵素であることを発見した<sup>2</sup>。さらに我々は RSS が低分子だけでなく、タンパク質にも結合していることを見出した<sup>3</sup> (図 1B)。

## 2. 作業仮説と先行研究成果

我々はこれまでに MeHg を投与したラットやマウスの臓器中から、(MeHg)<sub>2</sub>S を新奇代謝物として同定し、(MeHg)<sub>2</sub>S を投与しても MeHg で観察される有害作用 (親電子性) は見られないことから、本代謝物は MeHg の不活性化に関与すると想定した<sup>4</sup>。また、CSE が欠損すると (MeHg)<sub>2</sub>S は殆ど生成されないことから、個体レベルでの (MeHg)<sub>2</sub>S 生成に CSE が重要な役割を演じている事、MeHg が低分子 RSS だけでなくタンパク質結合性 RSS と反応して (MeHg)<sub>2</sub>S を生成する事を見出した<sup>3</sup> (図 1A)。さらに最

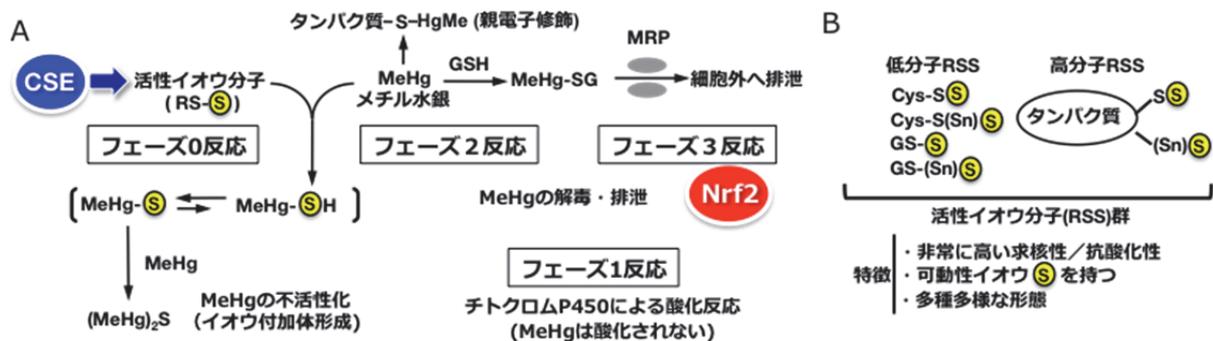


図1 MeHgのリスク軽減に係る防御システムと活性イオウ分子

近の検討により、細胞内で CSE から産生された低分子 RSS は細胞外に排泄され、MeHg が細胞内に取り込まれる前に不活性化している可能性が分かり始めた。RSS の化学的特性は分子内に GSH のような C-S 結合を介した非動性イオウではなく、可動性イオウを含有しており、GSH と比較して非常に高い求核性を持つことにある。このことから、生体に侵入してくる MeHg は細胞内外で RSS の可動性イオウと代償的に反応し、不活性化される初期防御システムではないかと考えた。すなわち、GSH による解毒・排出を介した従来の防御機構の前段階にあり、低濃度 MeHg に対しては RSS による捕獲・不活性化が初期防御であり、MeHg 曝露量の増加に伴い RSS が枯渇すると、GSH による解毒と排出が生体を守る階層的防御機構であることが想定された。このようなシステムの存在は未知であり、関連する反応の謂れから我々はこれを“フェーズゼロ反応”と名付けた。以上から、RSS がフェーズゼロ反応を介して MeHg の初期防御として機能しており、低濃度 MeHg 曝露に対する感受性を制御する新奇リスク軽減制御因子であるという作業仮説を立てた。

### 3. 研究成果

生体内 RSS が MeHg に対する新奇リスク軽減因子であることを証明するために、生体内 RSS の産生酵素のひとつである CSE 遺伝子欠損 (CSE KO) マウスに対し、野生型マウスでは急性中毒症状が全く見られない低濃度の MeHg (5 mg/kg/day) を 12 日間経口投与し、中毒症状を示すか否かを検討した。症候の指標として、体重の減少や生存率に加え、MeHg 毒性が引き起こす障害の 1 つである運動機能障害をローターロッドテストや後肢伸張および振戦の有無によって評価した。

その結果、曝露後 10 日以降から有意な協

調運動能の低下を呈し (図 2)、マウスでの MeHg 中毒症状の指標である後肢伸張 (ラットは後肢交叉) や振戦が観察された。曝露後 12 日目以降から徐々に後肢麻痺による歩行不良の症状が見え始めた。しかし、このような条件下において、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて脳の組織学的変化を調べた結果、脳組織構造に顕著な変化は認められなかった。また運動機能を司る小脳に対して、免疫染色法を用いて細胞単位での解析を行った結果、顆粒細胞およびプルキンエ細胞の数やその形態にも異常は認められなかった。CSE KO マウスは MeHg 曝露後 13 日目に野生型と比して体重減少が見られ、最終的に殆どのマウスが死亡した。以上より、MeHg が野生型マウスで有害性を示さない低濃度曝露時において、CSE の欠損により健康リスクが生じることが明らかとなり、RSS が MeHg に対する新奇リスク軽減因子であることが示された。

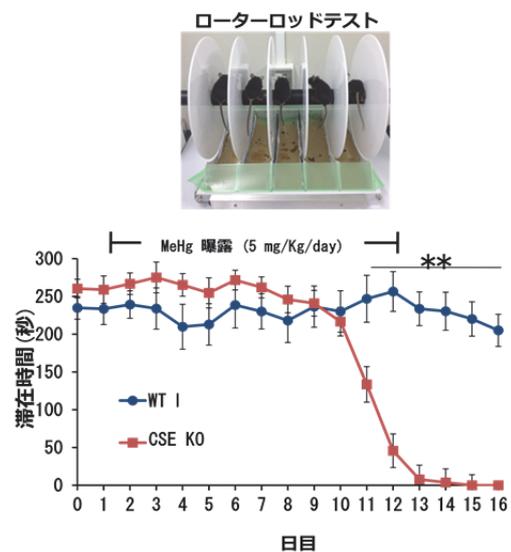


図2 MeHg曝露による運動機能に及ぼすCSE欠損の効果

### 4. 考察および今後の展望

我々は最近、内在性の低分子RSSであるGS-SHやGS-S-SGとMeHgが反応すると (MeHg)<sub>2</sub>Sを産生すること、MeHgを曝露した各種臓器中

で(MeHg)<sub>2</sub>Sの生成が見られるのに対して、CSE欠損マウスのそれらから殆ど検出されないことを明らかにした<sup>3</sup>。このことは、CSEから産生されるRSSが効率良くMeHgを捕獲して、(MeHg)<sub>2</sub>Sに変換していることを示唆している。この考えに一致して、CSE欠損によりMeHg低濃度曝露によるマウスの協調運動能の低下、後肢伸張や振戦、さらに体重減少が生じた。以上より、CSEがRSS産生を介して低濃度曝露でのMeHgリスクを制御する重要な要因であることが明らかとなった。一方、生体内にはCBS、CSEおよび3MST等の酵素からRSSが産生することが知られている。今回の検討より、CSE KOマウスにおいて中枢や末梢組織で顕著な病理的变化は見られなかったことから、CBSや3MSTから産生されるRSSがMeHgを何らかの形で捕獲・不活性化している可能性が示唆された。

また、MeHg曝露は神経伝達に関わるシグナル分子の活性を低下させることが報告されており<sup>5</sup>、中毒症状初期で見られた運動機能障害は神経伝達機能の異常に起因している可能性が高い。このことは生体内RSSがMeHgによる細胞毒性だけでなく、シグナル分子機能に対しても重要な保護効果を発揮していることを伺わせるものであり、今後はより多面的なRSSの役割を検証する必要がある。我々は現在、LC/MSによる安定同位体希釈法での組織および細胞内(外)の種々の内在性RSSの定量法を確立しつつある。本法により、今後はMeHgの曝露量に依存したRSS量の低下を測定することで、MeHgの健康リスクと生体内RSS量との関係を調べる。さらに、RSSによる生体防御機構が従来のGSHによる防御系の前段階に存在することを証明するために、GSHによるMeHgの解毒・排泄を統括的に制御している転写因子Nrfの欠損とCSE高発現マウス掛け合わせや、Nrf2/CSEダブルKOマウスを用いて、MeHgのリスク軽減においてRSSがNrf2非依存的に寄与して

いることを実証する予定である。

## 5. 引用文献

- 1) Toyama T, Shinkai Y, Yasutake A et al. Isothiocyanates reduce mercury accumulation via an Nrf2-dependent mechanism during exposure of mice to methylmercury. *Environ Health Perspect.* 2011; 119: 1117-1122.
- 2) Ida T, Sawa T, Ihara H et al. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 7606-7611.
- 3) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of Reactive Persulfides in Biological Bismethylmercury Sulfide Formation. *Chem Res Toxicol.* 2015; 28: 1301-1306.
- 4) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y et al. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide-producing enzyme in Mammalian cells. *Chem Res Toxicol.* 2011; 17: 1633-1635.
- 5) Omata S, Hirakawa E, Daimon Y et al. Methylmercury-induced changes in the activities of neurotransmitter enzymes in nervous tissues of the rat. *Arch. Toxicol.* 1982; 51, 285-294.

## メチル水銀による小胞体ストレスを介した神経細胞死惹起機構

○奥田 洗作 (岡山大院), 外山 喬士, 熊谷 嘉人 (筑波大院),  
藤村 成剛 (国水研), 牧野 堅人, 上原 孝 (岡山大院)

### 1. 研究目的

水俣病の原因物質として広く知られるメチル水銀 (MeHg) は高濃度曝露時に中枢神経系を傷害し神経細胞死を惹起するが, 細胞死に至るまでの詳細な分子機構については不明な点が多い. 当研究室では以前, 神経細胞の小胞体内において新生タンパク質成熟機構を担うシャペロン分子の一つであるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (protein disulfide isomerase ; PDI) の活性部位が, 一酸化窒素 (nitric oxide ; NO) による酸化修飾 (S-ニトロシル化 ; SNO 化) を受けることでその酵素活性を消失することを見出した. その結果, PDI の機能不全により小胞体内に未成熟なタンパク質の蓄積が生じ (この状態を小胞体ストレスと呼ぶ), そのストレスに応答して神経細胞死が誘導されることを報告した<sup>1</sup>. 一方, タンパク質の SNO 化部位であるシステイン (Cys) 残基チオール基は NO 以外の親電子物質に対しても反応性が高いことが知られている<sup>2</sup>.

MeHg は Cys 残基に共有結合し, S-水銀化と呼ばれる不可逆的な化学修飾を起こす. その結果, タンパク質の構造や活性を変化させ, 生体内恒常性の破綻を導くことが MeHg の細胞毒性発現に関係すると考えられている<sup>3</sup>. そこで, PDI の Cys 残基が MeHg により S-水銀化されることで酵素活性が抑制され, タンパク質成熟機構の破綻をもたらし, 小胞体ストレスを介した神経細胞死が惹起されるか否かを以下検討した.

### 2. 研究方法

タンパク質 S-水銀化は, SNO 化タンパク質を特異的に検出するビオチンスイッチ法を応用して検出した. 神経細胞の生存率は MTT アッセイを, 神経細胞内における小胞体ストレス誘導の有無は RT-PCR 法, レポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイ系ならびに各種特異的抗体を用いたウェスタンブロット解析を用いて検討した. PDI の S-水銀化部位は, MALDI-TOF/MS 解析を用いて特定した. また, PDI の酵素活性は, 基質として変性 (還元型) リボヌクレアーゼ A (RNaseA) を用いて, その回復したりボヌクレアーゼ活性から評価した.

### 3. 結果および考察

MeHg はヒト線維芽細胞腫由来 SH-SY5Y 細胞の生存を著しく低下させた. この時, MeHg 処理によって小胞体ストレスセンサーの一つである activate transcription factor 6 $\alpha$  (ATF6 $\alpha$ ) の限定分解が観察されるとともに, BiP や CHOP の転写活性が促進されることを確認した (図 1). しかしながら, ATF6 $\alpha$  と同じく小胞体ストレス応答 (unfolded protein response : UPR) を担う分子である inositol-requiring enzyme 1 $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ ) や PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の活性化は見られなかった.

つぎに, MeHg は SH-SY5Y 細胞において PDI を S-水銀化修飾することを見出した. PDI には N 末端と C 末端の両方に Cys 残基を 2 つずつ有する酵素活性中心と考えられているチオレドキシシン様部位 (CGHC) が存在するが, S-水銀化は C 末端側チオレドキシシン様部

位に存在する Cys 残基 (Cys383 もしくは Cys386) に特異的に起こることが分かった。また, リコンビナント PDI の活性に対する MeHg の影響を評価した結果, MeHg 処理濃度依存的に活性が抑制されることが示された (図 2) . したがって, PDI 活性部位の S-水銀化により酵素活性が抑制される可能性が示唆された。

以上の結果より, MeHg が PDI の C 末端側活性部位を S-水銀化することによりタンパク質成熟機構が破綻して生じる小胞体ストレスに応じて, ATF6 $\alpha$ 経路が選択的に活性化されることが明らかとなった。さらに, ATF6 $\alpha$ 経路の下流ではアポトーシス誘導因子である CHOP の発現が増加するため, 神経細胞死が惹起されると推定した<sup>4</sup> (図 3)

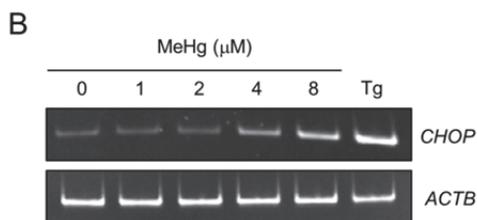
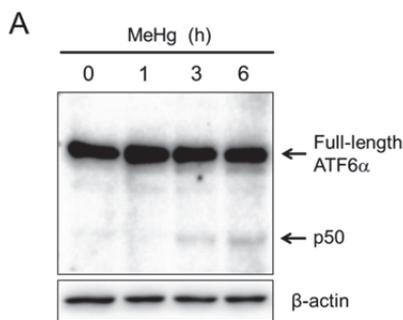
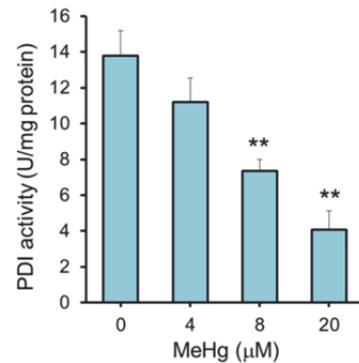


図 1. MeHg による ATF6 $\alpha$ の活性化

- A) MeHg 処理時間依存的な全長 ATF6 $\alpha$ および分解産物である転写因子 p50の検出。(ウエスタンブロット法)  
 B) MeHg 処理濃度依存的な CHOP 発現の検討。(RT-PCR)



(n=3, each bar indicates mean  $\pm$  SEM, \*\*p<0.01 vs control, One-Way ANOVA, Dunnet test)

図 2. PDI の酵素活性に対する MeHg の影響

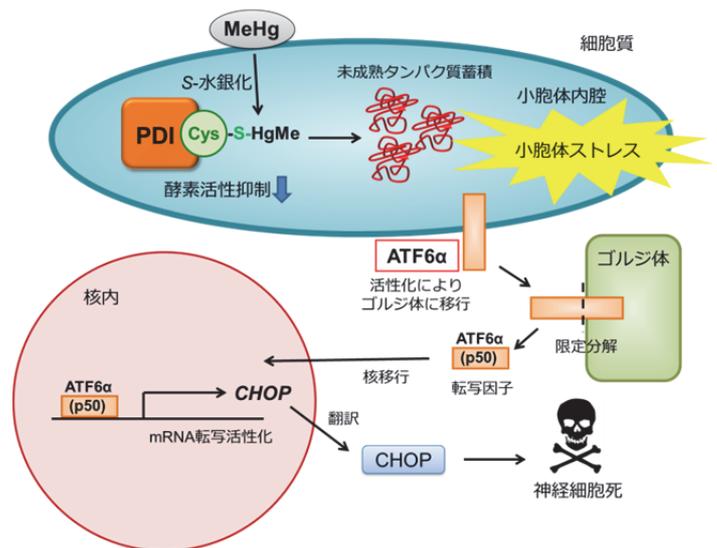


図 3. MeHg の神経細胞死惹起機構

#### 4. 引用文献

1. Uehara, T. et al. "S-nitrosylated protein-disulfide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration" (2006) *Nature*, **441**, 513-17.
2. Winterbourn, CC. et al. "Thiol chemistry and specificity in redox signaling" (2008) *Free Radic. Biol. Med.*, **45**, 549-61.
3. Kanda, H. et al. "S-mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications" (2014) *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 687-700.
4. Makino, K. et al. "Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuration and neurotoxicity induced by methylmercury" (2015) *Neurotox. Res.*, **27**, 99-105.



#### 留意事項

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

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



リサイクル適性の表示：印刷用の紙にリサイクルできます

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