

平成 28 年度環境省委託業務報告書

平成 28 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 29 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 環境保健企画管理課 特殊疾病対策室の委託業務「平成 28 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 29 年 3 月

日本エヌ・ユー・エス株式会社

平成 28 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	1
2.3	新規研究課題の公募に関する事務	2
2.4	推進委員会の開催（新規研究課題の採択）	2
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）	3
2.6	推進・評価合同委員会の開催	3
2.7	メチル水銀研究ミーティングの開催	4
2.8	研究計画書の作成の依頼	4
2.9	推進委員会の開催	4
2.10	研究報告書の作成	4
2.11	研究成果還元業務の実施	5
3	各研究班の報告	5
	○水俣病に係る有効な診断方法	7
	I 研究課題：MRI を用いた水俣病患者の脳構造の統計学的解析	9
	平井 俊範（宮崎大学）	
	○水俣病患者の経年的変化および自然史	21
	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	23
	安東 由喜雄（熊本大学）	
	○メチル水銀への曝露量と症状の関係	31
	III 研究課題：水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露状況に関する研究	33
	上野 眞也（熊本大学）	
	IV 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	73
	熊谷 嘉人（筑波大学）	
	V 研究課題：メチル水銀によるオンコスタチン M の細胞外排出促進を介した細胞増殖抑制機構	87
	黄 基旭（東北大学）	
	VI 研究課題：メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する研究	97
	鍛冶 利幸（東京理科大学）	
	VII 研究課題：発達期メチル水銀曝露の神経系に対する影響と新規エピジェネティクス機構の解明	105
	位田 雅俊（岐阜薬科大学）	
	VIII 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	115
	村田 勝敬（秋田大学）	

参考資料.....	161
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条においては、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、水俣病問題の解決に向けて水俣病に関する科学的知見を得ることを目的とした。

2 業務の実施内容

2.1 研究班の設置（継続）

平成27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3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（2.4項において新規に開始された研究のために設置された研究班においても同様。）。

研究領域：水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

Ⅱ 研究課題： 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

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

研究領域：メチル水銀への曝露量と症状の関係

Ⅲ 研究課題： 水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露状況に関する研究

主任研究者： 上野 真也（熊本大学政策創造研究教育センター 教授）

Ⅳ 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）

2.2 「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

「重金属等による健康影響に関する総合的研究」にかかる調査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、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策定した。

①評価委員会の設置

第三者（主任研究者又は分担研究者以外の有識者）10名で構成される評価委員会を

設置した。なお、評価委員会委員の構成は下表の通りである。

委 員	所属・役職
安西 尚彦	千葉大学大学院 医学研究院 教授
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
小椋 陽介	医療法人社団全仁会 上野病院 顧問
○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
柴崎 敏昭	シバ労働衛生コンサルタント事務所 代表取締役
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
中村 好一	自治医科大学 公衆衛生学教室 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	原宿リハビリテーション病院 名誉院長
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（主任研究者または分担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	筑波大学 客員教授
平野 照之	杏林大学 医学部 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

昨年度に設置された推進委員会において決められた研究の方向性等の方針に基づいて、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）

平成 28 年 5 月 26 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、出席した委員全員に対して旅費及び謝金を支給した。

推進委員会では、2.3 により応募のあった研究課題について、新規に以下の計 5 班の研究

班を採択した。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。

研究領域：水俣病に係る有効な診断方法

I 研究課題： MRI を用いた水俣病患者の脳構造の統計学的解析

主任研究者： 平井 俊範（宮崎大学医学部病態解析医学講座 教授）

研究領域：メチル水銀への曝露量と症状の関係

V 研究課題： メチル水銀によるオンコスタチン M の細胞外排出促進を介した細胞増殖抑制機構

主任研究者： 黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科 准教授）

VI 研究課題： メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する研究

主任研究者： 鍛冶 利幸（東京理科大学薬学部 教授）

VII 研究課題： メチル水銀のドパミン神経発達に対する影響と新規エピジェネティクス機構の解明

主任研究者： 位田 雅俊（岐阜薬科大学医療薬剤学大講座 准教授）

VIII 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 教授）

2.5 重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）

平成 28 年 12 月 27 日に LMJ 東京研修センター5 階特大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合研究総会（研究発表会）」を非公開で開催した。研究発表会では、各研究班の主任研究者又はその代理人が前年度及び本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 参照）にて各研究成果を評価した。なお、出席した評価委員及び推進委員の全員に対して旅費及び謝金を支給した。

また、研究発表会前には、2.1 及び 2.4 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を提出させ、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 12 月 27 日に LMJ 東京研修センター5 階大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合的研究」推進・評価合同委員会を開催した。2.5 の研究発表会における各研究班の発表内容を受けて、個々の研究班の研究成果についての評価を評価委員会から推進委員会に報告し、平成 29 年度に行う研究について検討した。なお、出席した評価委員及び推進委員の全員に対して旅費及び謝金を支給した。

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

結果を取りまとめた。取りまとめた評価結果について、2.1 及び 2.4 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

2.5 の研究発表会の前日の平成 28 年 12 月 26 日に LMJ 東京研修センター5 階特大会議室にて、「重金属等による健康影響に関する総合的研究」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等に関する研究者に対して、一般講演者及び若手発表者を公募し、参加者間で研究状況を演題発表の形で共有した。なお、予定よりも多くの講演の応募があったため、環境省と協議の上で本年度は特別講演者の招へいは行わなかった。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、特に優秀な若手発表者 2 名（秋山雅博（筑波大学医学医療系）、石原康宏（広島大院総合科学））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、メチル水銀研究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は、巻末の参考資料に示す通りである。

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 29 年度に研究を継続する予定である研究班に、平成 29 年度の研究計画書の作成を依頼した。

2.9 推進委員会の開催

平成 29 年 3 月 9 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 に基づいて各研究班から提出された平成 29 年度の研究計画書（案）について、推進・評価合同委員会での評価結果の報告に基づき、平成 29 年度における継続の可否にかかる評価を行うとともに、平成 29 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。

また、推進委員会の開催後に、取りまとめた評価結果を各研究班に送付するとともに、継続が認められた研究班に対して平成 29 年度の研究計画書の修正を依頼した。

2.10 研究報告書の作成

2.6 の推進・評価合同委員会、2.9 の推進委員会での審議内容等を踏まえ、各研究班に対して平成 28 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.に示す通りである。

2.11 研究成果還元業務の実施

本年度は、村田勝敬（秋田大学）より成果還元費について申請があり、環境省担当官と協議の上、日本衛生学雑誌への論文投稿に係る掲載料、英文校閲費、別刷代等について、環境省が定めた範囲内で支払った。

3 各研究班の報告

各研究班の報告を以下に示す。

○水俣病に係る有効な診断方法

I MRI を用いた水俣病患者の脳構造の統計学的解析

MRIを用いた水俣病患者の脳構造の統計学的解析

主任研究者 平井俊範（宮崎大学医学部病態解析医学講座放射線医学分野 教授）

研究要旨

水俣病の画像診断において、頭部MRIデータを用い*in vivo*で標準脳での統計解析にて脳の形態変化を検討した報告はみられない。本研究では水俣病患者と健常者の頭部MRI画像データを画像統計解析することにより水俣病患者の特徴的な脳の局所的形態変化、白質線維連絡変化を明らかにする。

キーワード: 水俣病、MRI、画像統計解析

研究者協力者

中村政明 国立水俣病総合研究センター臨床部総合臨床室室長
阿部 修 東京大学大学院医学系研究科生体物理医学専攻放射線医学講座教授
東美菜子 宮崎大学医学部附属病院放射線科助教
門田善仁 宮崎大学医学部附属病院放射線科助教

I 研究目的

水俣病患者の診断において、現在画像を用いた客観的な診断法が確立されていない。水俣病患者の脳は病理学的に後頭葉、頭頂葉の中心後回、前頭葉の中心前回、小脳を中心に侵されていることが明らかにされているが、頭部MRIを用い*in vivo*で多数例を標準脳に重ねた統計解析して検討した報告はみられない。なお、標準脳にて解析を行う理由は個々の症例で頭部の大きさや形態に違いがあり、脳構造の比較するためにはそれを補正する必要がある（図1）。本研究の目的は、水俣病の客観的な診断法の確立に寄与するため、脳の形状（脳溝、脳回等）には個人差があることを踏まえ、頭部MRIの画像データを標準脳に重ねた統計解析をすることで、水俣病患者の脳が健常者と比べて脳の局所的形態、および白質線維連絡がどのように異なるかについて明らかにすることである。本研究により画像を用いた客観的な診断法が確立できることが期待される。

II 研究方法

国立水俣病総合研究センターの中村政明室長から、水俣病患者 22 例、健康高齢者 111 例の過去にすでに 3T MRI で撮像された 3D T1 強調 MRI 画像を対象に用いた。なお、健康高齢者は熊本県内で水俣とは離れた地域の住民とし、年齢、性別、動脈硬化のリスク因子は脳構造に影響するものと考えられていることから、マッチングにおいてはこれらの条件を可能なかぎり揃えることとした。画像データの評価を行い不適切な症例があれば除外した。この画像評価は宮崎大学の門田善仁助教、東美奈子助教、平井俊範教授で行った。

東京大学医学部放射線医学教室の阿部修教授に画像データを標準脳に重ね合わせる処理を行った上で、確立された形態解析の手法である Voxel-based morphometry (VBM) の Statistical parametric mapping (SPM) や Surface-based morphometry (SBM) の FreeSurfer を用い（図2）、脳構造を部位別に統計解析を行った。なお、VBM と SBM のそれぞれの利点と欠点を下記に示

す（表1）。family wise error (FWE)、または false discovery rate (FDR)の多重比較補正を行って有意な部位を表示した。コントロール群と水俣病患者群の比較において、1) 健常者と全水俣病患者、2) 健常者と胎児型水俣病患者、3) 健常者と小児型水俣病患者、4) 健常者と成人型水俣病患者、にて評価した。

表1. SPM と FreeSurfer のそれぞれの利点と欠点

1. SPM (VBM)

- 白質ラクナのような信号値は CSF や灰白質信号に類似するが、事前確率密度分布マップを使うことによって、その部分に CSF や灰白質が存在することはあり得ない、と言う情報を提供できる。
- 検討する症例群にカスタマイズした、粗いテンプレートから微細なテンプレートまでの位置合わせを何度も繰り返すことによって空間的変形(正規化)の精度を高めることができる。

2. FreeSurfer (SBM)

- 局所皮質容積は皮質厚 (cortical thickness)、皮質表面積 (surface area)、脳回皺襞 (cortical folding) の総合情報を反映し、SBM 法は VBM 法よりも鋭敏な形態変化検出が可能である。
- 信号強度のみから灰白質、白質を分離するので元画像の信号強度により依存する、言い換えると信号強度、アーチファクトによっては分画の精度が低下する。
- SBM の優位点は、皮質厚、表面積、脳回の深さ等の総合情報のため、VBM と異なりその一つ一つの情報を区別して計測できることであるが、元々の画質が不良で正確な分画ができていなければ、その利点は発揮できない。

(倫理面への配慮)

① 研究等の対象となる個人の人権の擁護

本研究は、「ヘルシンキ宣言」及び「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に遵守して実施する。

② 倫理審査委員会に倫理審査を依頼して、承認を得る。

③ 個人情報保護の体制

研究実施にかかわる資料・試料などを取り扱う際は、連結可能匿名化とし、被験者の個人情報とは無関係の番号を付して管理し被験者の秘密保護に十分配慮する。

④ 研究等の対象者に理解を求め同意を得る方法

本研究では、既存の情報については、後方視的研究となるため被験者からインフォームド・コンセントを受けることは難しい。そのため、当該臨床研究の目的を含む研究の実施についての情報を公開する。これから対象となる被験者からは、インフォームド・コンセントを受けることとする。

III 研究結果

水俣病患者22例、健常者111例の画像データが集まったが、健常者に80歳以上の症例がなく、年齢のマッチングの観点から、今回は80歳未満の水俣病患者16例を選定した。水俣病患者の内訳

は、胎児型が10例、小児型と成人型が3例ずつであった。成人型の水俣病患者の1例は先天奇形（polymicrogyria）かと思われる所見がみられ（図3）、今回の対象から除外した。最終的に水俣病患者15例、健常者111例の画像データを対象とした。

SPMを用いたVBM解析にて、健常者と全水俣病患者の間に小脳と海馬に有意差がみられた（図4）。胎児型においては脳の形態に有意な差がある部位はみられなかった。小児型においては小脳と烏距溝部位が水俣病患者において有意に小さかった（図5）。成人型においては海馬や帯状回で有意差がみられた（図6）。FreeSurferでのSBM解析では両群間に明かな有意差はみられなかった。

IV 考察

SPMを用いたvoxel-based morphometryにて、過去の病理学的所見と一致したのは小児型のみであった。成人型は数か所で有意差がみられたが、過去の病理学的所見と一致しなかった。今回2例と少なく十分な統計解析ができなかった可能性がある。胎児型はグローバルに脳が障害されるとされるが、今回の検討では健常者と有意差がみられた部位はなかった。胎児型の診断法や元画像を含めて再評価が必要である。

今回の初回の検討から幾つかの問題点が明らかになった。まず、80歳以上の健常者が含まれていなかったため、年齢のマッチングにより成人型の患者の対象者が極めて少数となった。今後の検討においては80歳以上の健常者を増やす必要がある。次に、水俣病患者の中に先天奇形と思われるMRI所見がみられ、この症例は除外した。また、3D T1強調MRI画像に大脳皮質にアーチファクトを含む症例があり、FreeSurfer解析では両群間に明かな有意差はみられなかった。これらの結果から、水俣病患者のほか健常者の画像元データを再評価する必要があると思われた。

V 結論

SPMを用いたvoxel-based morphometryにて健常者と水俣病患者の間に幾つかの部位で有意差がみられた。しかし、80歳以上の健常者を増やすことや患者・健常者の画像元データの再評価の必要性が明らかとなった。

VI 次年度以降の計画

（平成29年度）

平成28年度の中間発表会で指摘された事項に対して検討を行う。

- 1) 患者やコントロールの厳密な選択：国立水俣病総合研究センターの中村政明室長に患者選択を神経学的所見や臍帯血の水銀値などから厳密に見直し、最も適切と思われる患者およびコントロールを選択する。
- 2) 80歳以上の健常高齢者データの収集：中村室長に80歳以上の健常高齢者を新たにリクルートしてもらい画像データを取得。
- 3) 患者および健常高齢者データの評価：神経放射線科医3名が画像データを一人ずつ見直し、最も適切と思われる患者および健常者を選択する。
- 4) 統計学的解析の十分な検討：主任研究者は研究協力者と統計学的に十分に検討する予定である。

次に、厳密に選択された患者とコントロールに対して東京大学の阿部修教授に 3D T1 強調 MRI 画像を用いた画像統計解析を再検討する。

前回の検討で FreeSurfer の解析が困難であったため、SPM を用いた voxel based morphometry (VBM) の最新版を用い、皮質厚や容積についても解析する。また、脳の白質線維に依存する拡散異方性の程度を定量的に測定することが可能である拡散テンソル画像のデータも併せて提供していただき、tract-based spatial statistics : TBSS (確立された手法) やグラフ理論を用いた structural connectivity (確立された手法はなく、方法論を確立することは難しいが、使用するツールは connectome mapper を使用予定) を用い、脳白質線維の連絡の強さを部位別に統計解析を行う。感覚性皮質が特異的に侵されることが予想されるため、この部位と関係する白質線維に異常が起こる可能性があるため、詳細に検討する予定である。TBSS では局所の白質線維の方向性の大きさなどを解析するのに対して、structural connectivity ではネットワークのつながりに焦点を当てた解析であり、両者を組み合わせることにより総合的な評価に寄与するものと考えられる。

得られた画像解析データにおいて解剖学的位置情報を含め、さらに宮崎大学の門田善仁助教、東美奈子助教、平井俊範教授で水俣病の客観的な診断法の確立に資する部位の特定について評価する。

(平成30年度)

得られた画像統計データから脳皮質、白質の両面から形態解析および拡散解析を進め、網羅的に水俣病の客観的な診断法の確立に資するような部位の特定等の検索を行う。得られた解析データはさらに水俣病の客観的な診断法の確立に資する部位の特定について検討・評価を行い、結果をまとめて国内外の学会にて発表する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

現在のところ特になし。

引用文献

- 1) Eto K. Pathology of Minamata Disease, Toxicologic Pathology 1997; 25: 614-623.
- 2) Takeuchi T, Eto K. The Pathology of Minamata Disease, Fukuoka: Kyushu University Press, 1999; 53-78.
- 3) Ashburner J. A fast diffeomorphic image registration algorithm. Neuroimage. 2007;38:95-113.
- 4) Fischl B, Dale AM. Measuring the thickness of the human cerebral cortex from magnetic resonance images. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97:11050-11055.

図 1. 個々の脳データの標準脳への変換

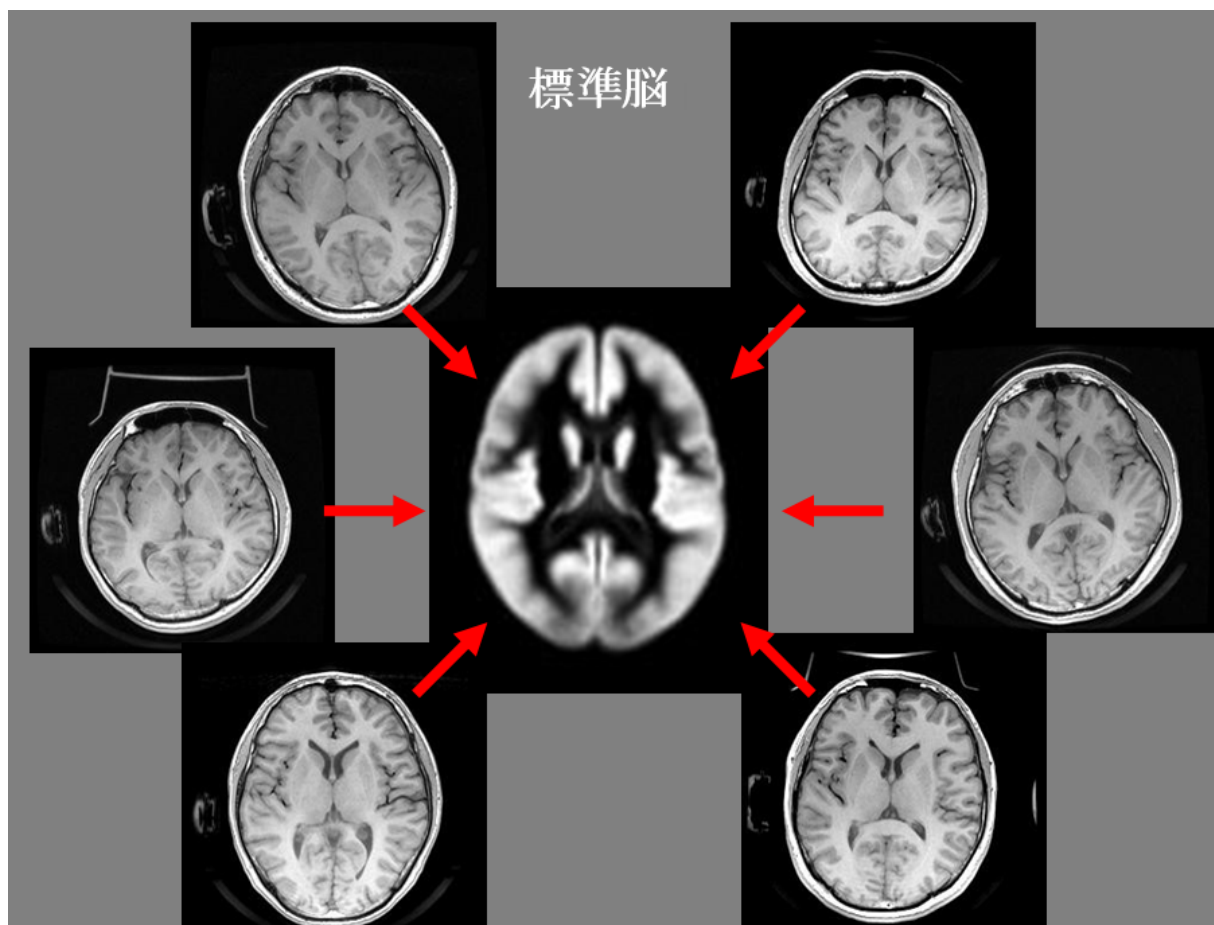


図 2. MRI を用いた脳構造の統計解析の手法

Structural MRI

- **Voxel-based morphometry**
 - **Statistical parametric mapping**
 - **DARTEL (Ashburner 2007)**
 - **New segmentation**
 - **VBM8 (<http://dbm.neuro.uni-jena.de/vbm/>)**
 - **FSL**
 - **SIENA**
- **Surface-based morphometry**
 - **Freesurfer (Fischl PNAS 2000)**
 - **BrainVoyager**
 - **TOADS-CRUISE**
 - **ARCTIC**
 - **CIVET**

図3. 先天奇形と思われる症例

成人型水俣病患者 74歳女性

多小脳回症 polymicrogyria 疑い

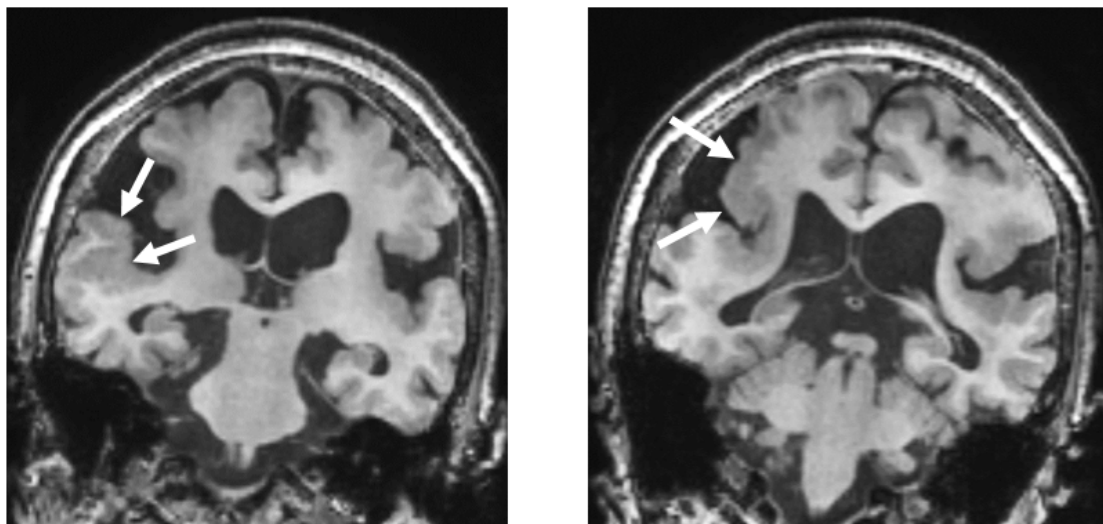


図4. SPM を用いた VBM 解析：健常者 vs. 全水俣病患者

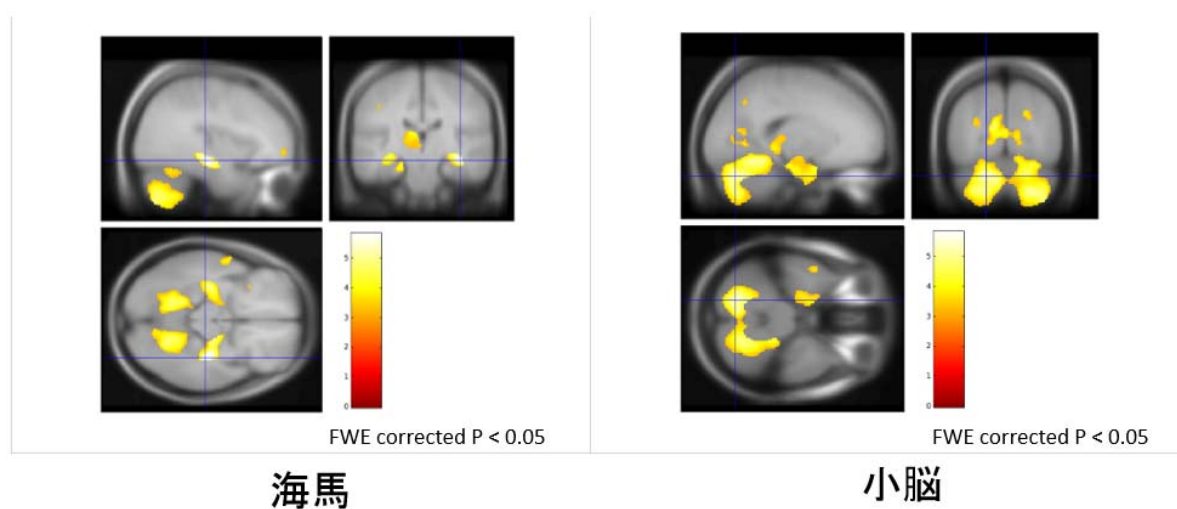
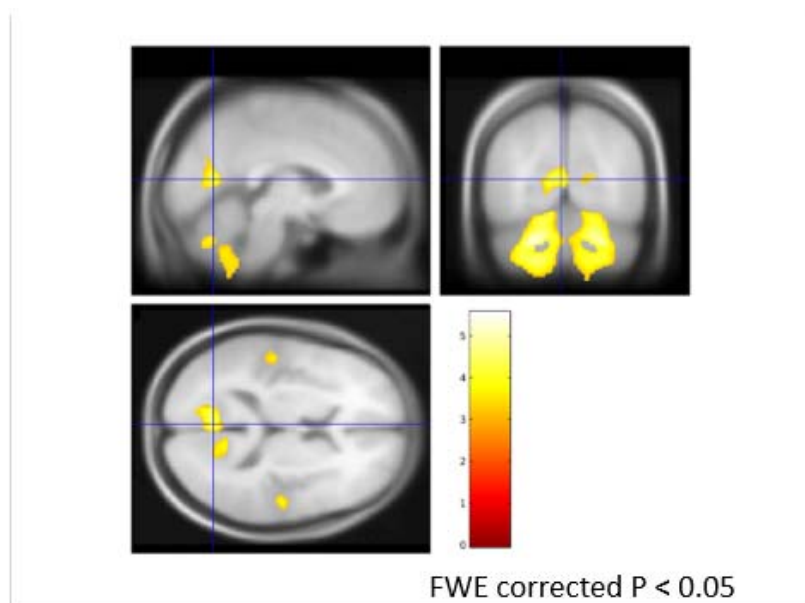
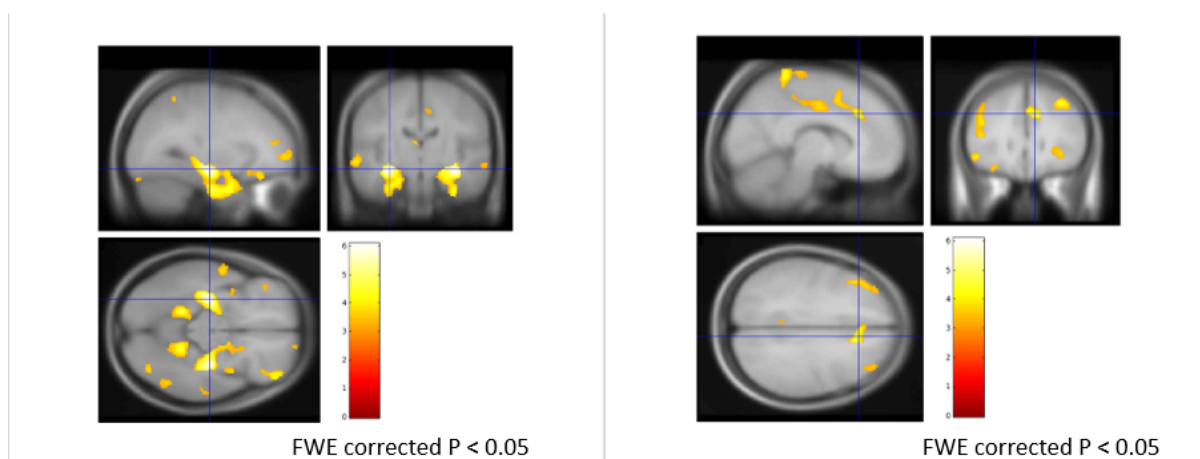


図5. SPM を用いた VBM 解析：健常者 vs.小児型水俣病患者



小脳、烏距溝部

図6. SPM を用いた VBM 解析：健常者 vs. 成人型水俣病患者



海馬

左帯状回

Statistical brain structure analysis of Minamata disease using MR imaging

Toshinori Hirai^{*1}, Masaaki Nakamura^{*2}, Osamu Abe^{*3}, Minako Azuma^{*4}, Yoshihito Kadota^{*4}

**1 Department of Radiology, Faculty of Medicine, University of Miyazaki*

**2 Department of Clinical Medicine, National Institute for Minamata Disease*

**3 Department of Radiology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo*

**4 Department of Radiology, Miyazaki University Hospital, University of Miyazaki*

Keywords: Methylmercury; Brain cortex; MRI; Minamata disease

Abstract

The pathological brain damage of Minamata disease have been well documented. This disease is known to cause brain atrophy in the primary sensory areas as well as cerebellum. Although there are a few reports regarding its MR imaging findings, statistical brain structure analysis of Minamata disease using MR imaging has not been systematically investigated. In the present study, a case-control study involving persons living in Minamata of Kumamoto Prefecture in Japan was performed. We collected MR imaging data of 22 patients and 111 controls who attended National Institute for Minamata Disease in Minamata and underwent 3T MRI. Based on age matching and image appropriateness, three-dimensional MR imaging data of 15 patients (fetal-type, 10; infant-type, 3; Adult-type, 2) and 111 controls were finally included. Voxel-based morphometry analysis demonstrated no significant differences in any structures between the fetal-type patient and control groups, while it showed a significantly smaller volume in the cerebellum and calcarine area for infant-type patients. In adult-type patients, a significantly smaller volume was found in the hippocampus, cingulate gyrus, and superior temporal gyrus. The structure analysis using FreeSurfer showed no significant differences in any structures between the patient and control groups. These observations were not consistent with the previous pathological findings except the results of infant-type patients. The disagreement is probably due to the very small population and inappropriateness of patient selection. Further studies using larger population with appropriate patient selection are needed to obtain adequate results in the case-control study.

○水俣病患者の経年的変化及び自然史

Ⅱ 水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

水俣病患者の経年的変化および自然史の把握

主任研究者 安東由喜雄（熊本大学大学院生命科学研究部 神経内科学分野教授）

研究要旨

水俣病の公式確認より60年が経過した現在、当初より存在している水俣病患者の臨床像は明らかになっていない。そこで我々は有機水銀曝露後長期経過した公健法認定水俣病患者の臨床像を明らかにすることを目的として、本実態調査を行った。胎児性患者では、知能障害や斜視、関節変形など外見上明らかな異常所見が見られ、運動失調、錐体路症候などの神経症候を認めた。小児性患者では、斜視や構音障害、錐体路症候、運動失調を認めた。成人型では運動失調および感覚障害を認めた。公式確認より60年経過した現在においても、曝露時の年齢による臨床像の違いが残存していた。認定患者の全年齢層とも、加齢性疾患を高率に合併する年齢に達しており、加齢に伴う神経疾患の合併も認められた。水俣病患者に合併する加齢性変化を見過ごすことなく、適切な医療を提供するためには、各年齢層による臨床像の特徴を把握したうえで、個々の患者の神経症候の評価を継続してその変化を捉えることが重要であると考えられた。

キーワード: メチル水銀高曝露、小脳失調、小児性、胎児性、臨床像

研究者協力者 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

公式確認より60年が経過した現在において、当初より存在している水俣病患者の神経症候がどのような状態で残存しているかについては明らかになっていない。これまで慢性期の水俣病の臨床像は報告されているものの、胎児性および小児性患者が加齢性疾患を高率に合併する年齢に達しており、これらの患者で神経症候にどのような変化がみられるか明らかになっていない^{1)・10)}。そこで水俣病患者の現在の神経症候を明らかにすることを目的として、公健法認定患者の神経症候を調査した。

II 研究方法

公健法認定の水俣病患者を対象とした。知能障害、斜視、手指の変形、視野狭窄、難聴、運動失調、末梢神経障害について調査した。また、構音障害や錐体路徴候の有無の頻度を調査した。

(倫理面への配慮)

本研究を実施するにあたっては、熊本大学疫学一般研究として生命科学研究部長より承認（倫理第746号、承認期間：平成25年12月4日から平成31年3月31日まで）を受けている。

また、水俣病患者やその介護者がおかれる社会的状況の中で、患者の生活や受診の目的を損なうことなく、研究を進めている。入所生活や外来受診の目的は、患者の将来の安心や患者自身に発生した問題の解決であり、そのために診療を行う。本研究における患者からの情報は、そのような状況において取得される情報である。こうした診療の合間に情報を得るため、情報量が限られているが、本研究が患者の心情や受診、入所生活の目的を損なわないように十分配慮して行っている。

III 研究結果

本調査対象は 20 例で、男性 5 例で平均年齢 75.4 ± 15.3 歳であった。胎児性 8 例、小児性 5 例、成人例 7 例であった。

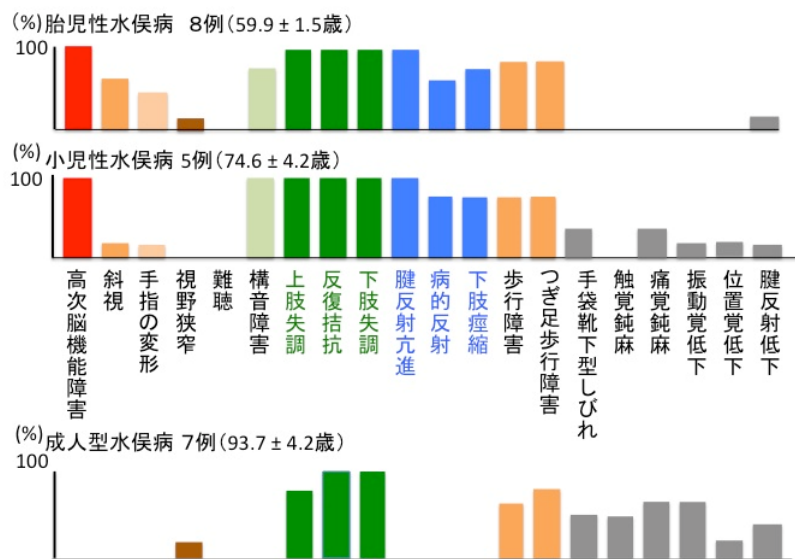
- 1) 胎児性患者の平均年齢は 59.9 ± 1.46 歳であった。8 例中 8 例で知能障害を認めた。2 例は重度の知能障害を認め、意思疎通が困難であった。6 例では意思疎通は可能であるが、構成失行等の高次脳機能障害を認めた。5 例は斜視を認めた。手指関節の変形は 4 例、構音障害、腱反射亢進や病的反射などの錐体路徴候および運動失調を高率に認めた。

- 2) 小児性患者の平均年齢は 74.6 ± 4.2 歳であった。全例で軽度の知能障害を認めた。会話などの言語でのコミュニケーションは良好であるが、図形模写などの空間認知機能低下を認めた。斜視は 5 例中 2 例に認められた。手指の変形は 1 例に認められた。構音障害は 5 例中 5 例に認められた。小脳失調は 5 例中 5 例に認められた。

感覚障害は自覚的しびれ感は 1 例のみで、痛覚鈍麻を伴っていた。痛覚鈍麻および振動覚低下は 1 例であった。残りの 3 例は構音障害が強く、感覚障害の詳細な評価は困難であった。腱反射亢進や運動失調は高率に認められた。

- 3) 成人例 7 例の平均年齢は 93.7 ± 4.2 歳であった。1 例は高度の難聴を認め、意思疎通が困難であり、詳細な診察は困難であった。残りの 6 例中 1 例で腱反射低下を伴わない全感覚性障害（表在覚および深部感覚）を認めた。本例は視野狭窄や運動失調を伴っていた。6 例中 2 例で痛覚鈍麻および振動覚の低下を認めたが自覚的しびれや触覚鈍麻はなく、関節位置覚も正常であった。

胎児性、小児性、成人型水俣病患者の現在の所見

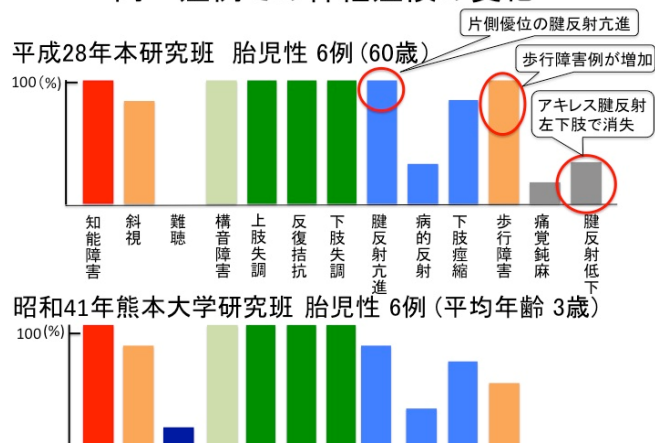


経年的変化について

本調査の対象の胎児性水俣病患者 8 例のうち 6 例は、昭和 41 年の熊本大学水俣病研究班が行った実態調査の対象となった症例であり、同一症例間で、曝露時の神経所見と現在の神経所見を比較した。悪化を認めた所見を右図の中で、丸で示す。

- 1) 幼少時には半数が歩行できたが、加

同一症例での神経症候の変化



齢に伴い、全例、歩行できなくなった。

2) 幼少時、腱反射消失はなかったが、2例でアキレス腱反射が消失した。

3) 幼少時、腱反射亢進がなかった例で、片側優位の腱反射亢進を認めた。

【検診中に検出された加齢性変化】

本検診時に1例の胎児性患者で変形性腰椎症による神経根症を認めた。左足先のしびれ感の訴えがあり、神経所見では、両側の膝蓋腱反射が亢進しているにもかかわらず、右アキレス腱反射は正常に対して、左アキレス腱反射が消失していた。以前から左の腰部痛を訴える事が頻繁にあり、腰椎の変形性脊椎症による神経根症合併が疑われた。

【追跡期間中に合併した加齢性変化】

追跡期間中にADLの増悪を認めた症例は3例であった。それぞれ、胎児性患者、小児性患者、成人型患者1名ずつであった。胎児性症例では追跡調査開始時には歩行可能であったが、脊椎性疾患を合併して、歩行が困難となった。小児性症例では変形性膝関節症を合併して、歩行が困難になった。成人型症例では、高度の難聴から意思疎通が困難となり、合併性疾患の加療に伴い長期臥床状態となっていた。

IV 考察

メチル水銀の曝露した年齢による神経症候の違いは、公式確認より60年経過した現在においても残存していた。水俣病患者の健康調査において、曝露した年齢による神経症候の違いを十分把握したうえで、新たに出現した神経症候の原因を考える必要がある。胎児性や小児性患者では上下肢の腱反射亢進を高率に認めるため、腱反射低下や腱反射の左右差を認めた場合、加齢性疾患による変形性脊椎症を疑い、評価する必要がある。一方、成人型においては、腱反射亢進を認める例はほとんどなく、腱反射亢進などの錐体路徴候を認めた場合、頸椎症性脊髄症の合併などを考慮して、精査すべきである。胎児性、小児性、成人型の間で神経症候の特徴に違いがあるうえ、症例ごとに神経症候の違いがある。加齢性疾患の合併を見逃すことなく、適切な医療を提供するためにも、個々の症例の神経症候を継続して評価する必要があると考えられた。

立方体透過図模写は視空間認知機能の評価法であり、頭頂葉の障害を反映する。本調査では、胎児性、小児性水俣病患者

で視空間認知機能障害を認めた。過去の病理の報告では、成人型が感覚野や視覚野の脳溝周囲に障害を認め、一方、胎児性、小児性水俣病では、脳全体に障害が広がると報告されている。また、胎児期曝露患者では視空間認知機能も障害されると報告されている。本検討の結果は、これらの報告に一致した結果であった。

【考 察】

立方体透過図模写は視空間認知機能の評価法であり、頭頂葉の障害を反映する。本検討では、胎児性、小児性水俣病患者で視空間認知機能障害を認めた。



成人型では、感覚野や視覚野の脳溝周囲に障害を認める。一方、胎児性、小児性水俣病では脳全体に障害が広がる。

(Takeuchi, et al. Kumamoto Shuho Publishing Co 1968; 141-256)
(Eto, et al. Neuropathol 2010; 30: 471)

胎児期曝露患者では視空間認知機能も障害される。

(Yorifuji, et al. Archives of Environment & Occupational Health 2016; 71: 170)

V 結論

胎児性、小児性、成人型の神経症候の特徴を把握したうえで、個別に神経症候の評価を継続することが、加齢性疾患の合併を見過ごすことなく、適切な医療を提供する上で重要であると考えられた。

VI 今後の計画

対象者を拡大して、水俣病の全体像が把握できるようにする。他施設への訪問診療や在宅訪問など、対象者を増やすように努める。

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) Komyo Eto, Hidehiro Tokunaga, Kazuo Nagashima, Tadao Takeuchi. An autopsy case of minamata disease (Methylmercury poisoning)- pathological viewpoints of peripheral nerves. *Toxicologic pathology* 2002; 30: 714-722.
- 4) Makoto Futatsuka, Takao Kitano, Masahiro Shono, Megumi Nagano, Junji Wakamiya, Kenichiro Miyamoto, Masanori Nakawaga, Tsukasa Inaoka, Yoshiharu Miyamoto, Masanori Nakagawa, Kimiyoshi Arimura, Misuhiro Osame. Long-term follow up study of health status in population living in methylmercury polluted area. *Environmental Sciences* 2005; 12: 239-282.
- 5) 二塚信 水俣病の疫学 日衛誌 2015; 70: 271-276.
- 6) 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.
- 7) Yorifuji, et al. *Arch Environ Occup Health* 2015
- 8) Uchino M, et al. The severity of Minamata disease declined in 25 years: Temporal profile of the neurological findings analyzed by multiple logistic regression model. *Tohoku J. Exp. Med* 2005; 205: 53-63.
- 9) Uchino M, Okajima T, et al. Neurologic features of chronic minamata disease certified at autopsy. *Internal medicine* 1995; 34: 744-747.
- 10) Akihiro Igata. Clinical aspects of Minamata disease. Neurological aspects of methylmercury poisoning in Minamata. Recent advances in Minamata disease studies. Edited by Tadao Tsubaki and Hitoshi Takahashi.
- 11) Johanna Sundberg, Bo Ersson, Bo Lönnerdal, Agneta Oskarsson. Protein binding of mercury in milk and plasma from mice and man- a comparison between methylmercury and inorganic mercury. *Toxicology* 1999; 137: 169-184.

Clinical features of Patients with Minamata disease (MD) in a half century after the patients were exposed by methylmercury

Akihiko Ueda¹, Yukio Ando¹

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

Keywords: Minamata disease, higher brain dysfunction, cerebellar ataxia, Sensory disturbance, diseases associated with aging

Abstract

We investigated clinical features of patients with Minamata disease (MD) in a half century after the patients were exposed by methylmercury. In the infant and child type of MD, main neurological symptoms were higher brain dysfunction, cerebellar ataxia, and pyramidal signs. Sensory disturbance was absent in most of patients with the infant type of MD. In the adult type of MD, those symptoms were sensory disturbance and cerebellar ataxia. Tremor and higher brain dysfunction were observed in some patients with adult type of MD. These results suggest that neurological symptoms of MD persist even a half century after the patients were exposed by methylmercury. Evaluation of higher brain dysfunction may be important to differentiate symptoms of MD from aging associated disorders, such as cervical myelopathy or cerebellar degeneration. When we examine neurological symptoms of patients with MD, we should take care of the different points of clinical features of MD from those found in aging associated disorders.

○メチル水銀への曝露量と症状の関係

Ⅲ 水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露状況に関する研究

水俣病発生地域等におけるメチル水銀曝露状況に関する研究

主任研究者 上野真也(熊本大学・政策創造研究教育センター・教授)

研究要旨

本研究では、(1) 不知火海域のメチル水銀汚染状況、魚介類の汚染状況、(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) 食生活、魚介類の摂食状況、(5) 人体蓄積・健康影響に関して、聞き取り調査及び史資料の発掘と活用により指定地区及び周辺地域のメチル水銀曝露状況を調査し、曝露指標の探索と時間空間的な変化を可視化することに取り組んだ。不知火海の漁場や漁法、魚種の詳細が分かってきた。また鮮魚流通が広域でダイナミックに行われていたことが明らかになった。水俣鮮魚商組合の構成員や鮮魚店の位置、行商ルートの解明についても新たな発見があった。行商等が持ち込んだ魚介類による周辺地域へのメチル水銀曝露状況については、総合的な検討から摂食量や頻度、魚種などによりリスクが大きく異なり、特殊なケースを除き低いものであったと推測された。

キーワード：メチル水銀曝露リスク、魚介類の流通、行商、仲買人

研究者協力者

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	熊本大学名誉教授

I 研究目的

本研究は、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社会科学や疫学、水産学等の多角的な観点からアプローチし、それらの情報を総合することでできる限り客観的な曝露状況の解明、及び地域別・年代別に当時のメチル水銀汚染の曝露指標の探索を行うことを目的とする。

これまで不知火海沿岸のメチル水銀曝露リスクに関して、必ずしも十分に分かっていなかった魚介類の捕獲や流通、中山間地集落などへの移入経路、地域別の魚介類の摂食量などの社会経済的な因子について調査を行う。またさまざまな被害者救済政策が未だ事件収束でに至らないことについて、政策科学的観点から検討を行う。

本研究から期待される成果として、水俣病発生地域及びその周辺地域も含めた汚泥、海水、魚介類から流通、摂食までを一連の因果プロセスに沿って曝露リスクを考察し、時間的・空間的に可視化することで疫学調査の精度をあげることに貢献し、水俣病の迅速かつ客観的な行政審査にも役立つ知見が得られることが期待できる。

II 研究方法

平成 27 年度の研究状況を踏まえて、これまで構築してきた調査手法や作業仮説を活用して、

水俣・芦北地域、天草地域、伊佐市（旧大口市）、出水市、島嶼部の長島町（旧東町）、獅子島を調査対象地域として以下の観点について聞き取り調査を実施するとともに、関係する史資料の収集整理を行った。

- ①調査法は、地域の当時の事情について知見・経験のある者を地域の識者や公的組織の協力を得て探索、選定し、聞き取り調査を行う。
- ②海水中のメチル水銀の汚染拡散状況について、過去の調査研究データを収集し、新たな観点から曝露モデルを検討し、汚染の時間的空間的な広がりを推計する。
- ③漁業権や慣行的な縄張り、漁場、漁法、漁港ごとの漁獲状況など不知火海域で行われた水産業の時代別の状況を明らかにする。
- ④魚介類の流通状況や行商等の移入路を探索するとともに、魚種、輸送方法、販売頻度、販売量、売買・物々交換・贈与などの取引形態、地域ごとの魚食傾向などを明らかにする。
- ⑤魚介類の摂食状況について、魚種、購買・摂食頻度、世帯・家族ごとの魚食のばらつき傾向について明らかにする。
- ⑥聞き取り調査と史資料などのデータを組み合わせ、総合的で正確性を担保した分析とする。
- ⑦水俣病患者救済にかかる社会運動や訴訟活動などの展開と、水俣病対策の政策形成の関係性について政策科学的な分析を行う。
- ⑧並行して、時代ごとの不知火海魚介類の汚染状況や魚介類の捕獲・流通状況、漁業の状況に関するデータや史資料、その他この研究目的に資する文献等（論文、新聞記事、行政文書、写真など）の収集と、過去の先行研究の整理を行う。

（倫理面への配慮）

熊本大学生命倫理憲章に基づき研究を実施する。熊本大学大学院生命科学研究部の医学系研究疫学・一般部門倫理委員会で倫理的観点及び科学的観点から審査を受け承認を得た。インタビュー等の社会調査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・保管を行う。聞き取り調査についてはインタビュー対象者の精神的肉体的負担に配慮し、自由意思に基づく聞き取りを行う。

III 研究結果

今年度は、（１）不知火海域のメチル水銀汚染、魚介類の汚染の状況、（２）魚介類の捕獲の状況、（３）魚介類の流通状況、移入路の探索、（４）食生活、魚介類の摂食状況、（５）人体蓄積・健康影響に関して指定地区及び周辺地域のメチル水銀曝露状況を重点的に調査した。

聞き取り調査は現在まで、鹿児島県伊佐市（旧大口）、出水市、長島町（旧東町、獅子島）、熊本県水俣市、芦北町に居住する漁業者、魚介類仲買人など延べ16人に対し実施した。調査地域は、図1の通り不知火海沿岸を網羅する地域である。この調査研究で明らかになった知見やデータ等の分析については、延べ8回の研究会で議論し総合的な観点で研究を進めた。



図1 聞き取り調査実施地域

これまで水俣病公式発見以来60年間、各専門分野の科学者によりメチル水銀中毒の原因究明や、因果関係の解明、曝露リスクの広がり、健康被害状況の把握、患者治療、救済制度の検討、産業や社会への影響に関する研究など、分厚い研究蓄積がなされている。しかし工場の放水溝から海中に排出されたメチル水銀が、どのように海水・海底で拡散あるいは滞留し、魚介類に曝露したのか。またどのような汚染魚介類が漁業により大量に捕獲され、流通や自家消費に回ったのか。魚介類の地元消費と他地域へ移送の状況はどうだったのか。また汚染魚介類は各地にどのような経路で行商等により運ばれたのか。地域の人々はどのような魚介類の摂食機会を持っていたのか、などについては、学問的に細分化された観点で語られがちであった。だがミクロなレベルでの正確な知見だけでは、各要因の関連性や水俣病が地域社会にもたらしたインパクトの広がりを俯瞰的に理解することは困難がある。そのことから本研究班では、様々な要因に関するデータを再検討し、各要因間のミッシングリンクを合理的に推測できるよう、過去のデータや資料の再評価と分析、昭和20年代後半から50年代に地域で暮らしてきた当事者への聞き取りなどを行って、周辺地域のメチル水銀曝露リスクの時間的・空間的なインパクトを推察し、それを可視化することを試みた。

この各局面における因果関係は動的に関係しあって問題を生み出し、またそのリスク状況もダイナミックに変化していったと思われる。排水口から海へメチル水銀が排出され、汚染水からプランクトンや魚介類が曝露、そして人がその魚介類を直接獲って摂食し曝露したケース、広く流通する魚介類から曝露したケース、行商人が汚染魚を周辺地域へ運んで曝露したケースなどの経路で、因果関係が次々につながり被害を生み出した一連の因果関係は図2のようにモデル化できよう。このような原因から結果につながる自然科学的、生物学的、そして医学的な因果関係が重要であるとともに、さらに社会過程にも留意し、周辺地域へ曝露リスクを含む統合的なメチル水銀曝露状況を明らかにする研究を本研究班は目指した。

この目的から本研究班が取り扱う分野は必然的に広範なものとなる。まだ中間年度としての考察であるが、本年度の（１）～（５）の研究成果の一部について報告する。

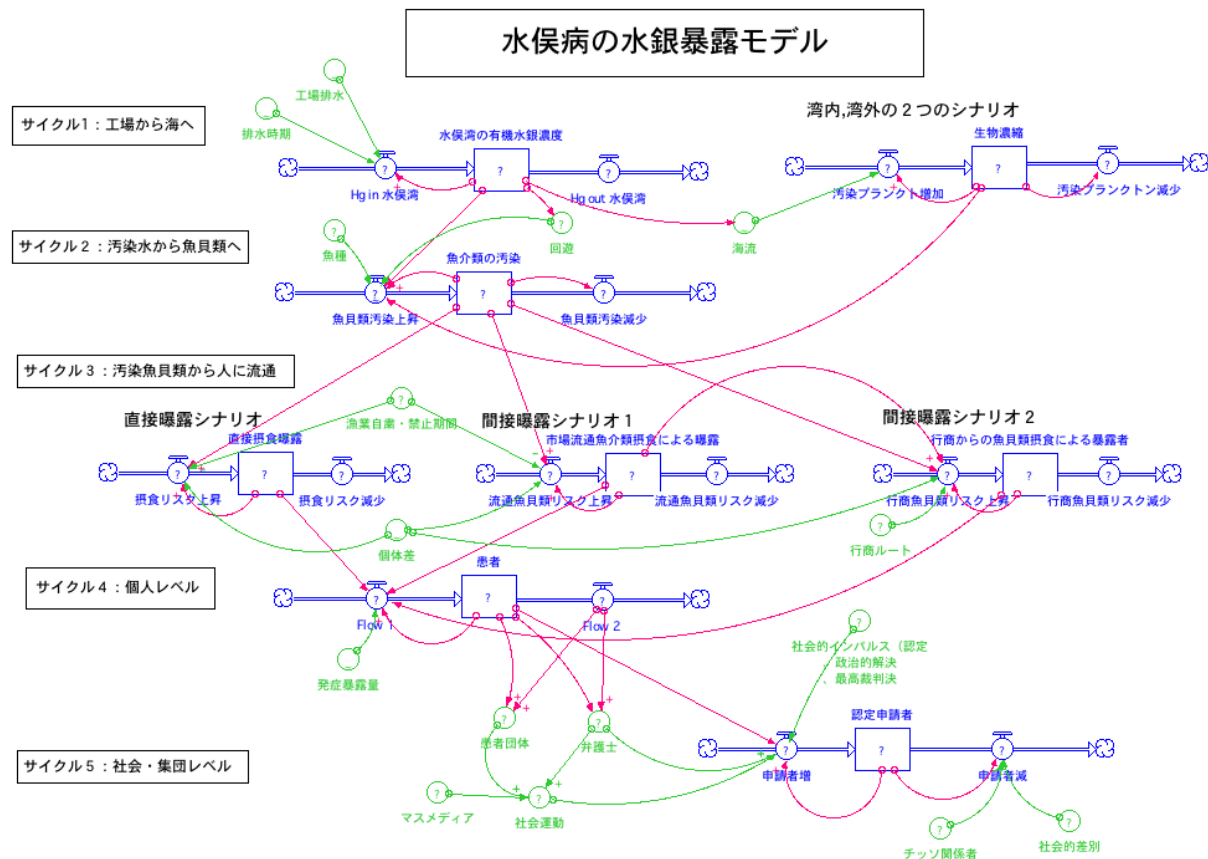


図2 メチル水銀曝露リスクのシステムダイナミクス

(1) 不知火海域のメチル水銀汚染、および魚介類の汚染状況

チッソ水俣工場から排出された水銀量は、図3に示されるようにアセトアルデヒドの生産増加にともない昭和29年～34年まで急増している。この時代は工業化が進展するとともに、他方で不知火海における漁業も漁船エンジンの能力向上、網など漁法の改良、魚群探知機など技術の進歩、魚介類等の流通網の拡大と魚介物市場の全国化により、漁獲量も増加していった。

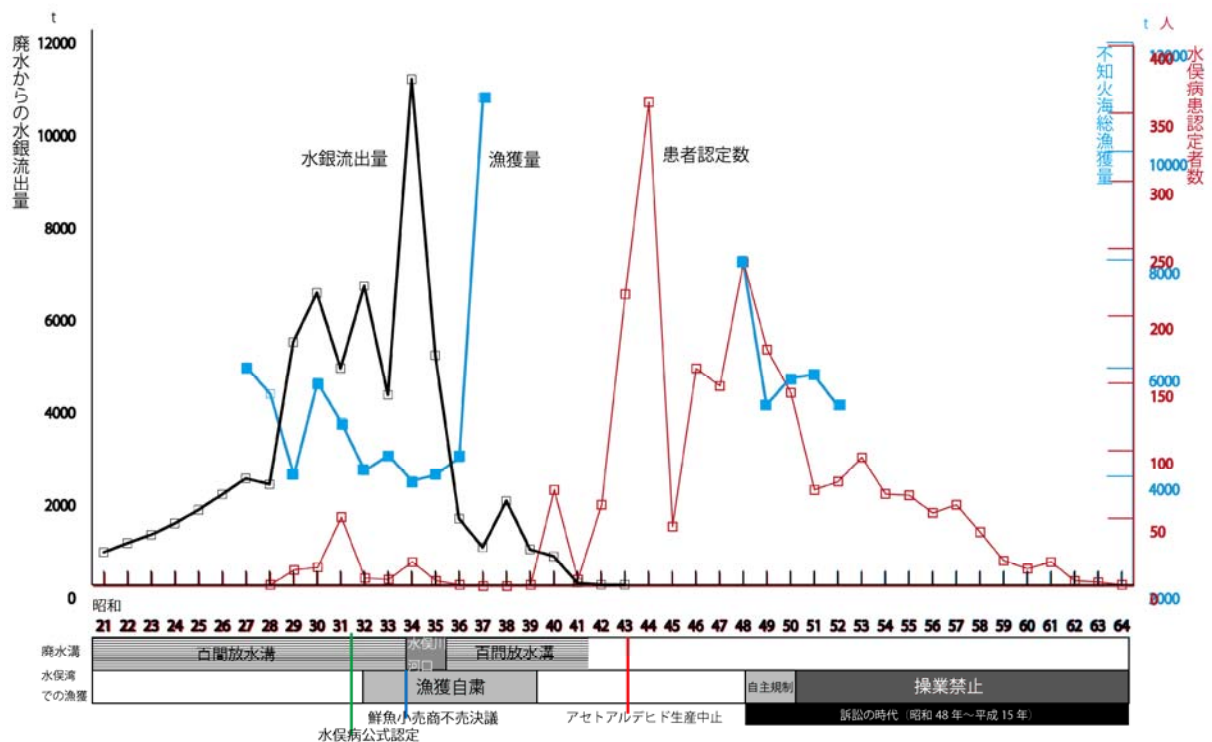


図3 流出水銀量、患者認定状況、放水溝の位置、水俣湾内漁業の制限期間

(注) 昭和38年から昭和47年までの不知火海の漁獲量については、農水省漁業センサスが集計公表されておらず不明。

水俣病の患者認定者数のピークはメチル水銀の流出量のピークは時間差がある。これは被害補償要求が、社会的な要因と強く関連していたためと推測される。湯堂、茂道などの水俣湾の零細小漁村を襲った健康被害が、その後芦北や出水、御所浦、天草、長島、獅子島など不知火海一円へと拡大していったメカニズムについては、さまざまな文献や言説があるがいまだ十分に科学的解明が尽くされているとはいえない。海流など海中での拡散の可能性、汚染魚介類が移動したり生物濃縮による生物学的な拡散の可能性、そして汚染した魚介類を直接獲って食べたり、あるいは流通によりそれらを摂食した可能性を考慮しなければならない。現在の水俣病紛争の争点は、初期の劇症型の患者や胎児性の患者像から微量なメチル水銀曝露による健康被害の可能性や加齢との関連性、そして汚染魚介類の広域流通・摂食による曝露リスクの拡大へと焦点と移している。本研究は、そのような論点の基盤となる曝露リスクが時間的・空間的どのような広がりをもっていったのかを明らかにすることを目指している。

不知火海域自体の汚染を考える際には、たとえば海水についても表層、中層、低層、そして泥中の汚染の別、また魚介類についてもそれぞれの生息深度や、移動性の違いなどを勘案して論じる必要がある。閉鎖水域である不知火海域は、球磨川など河川水の影響が卓越し複雑な動きをすることから、汚染状況を流体力学的に数値モデル化することは困難であり詳細な研究蓄積がなされていない。しかしこれまでの観測値から、海域の表層における定常流は図4のような動きをしていることが分かっている。この閉鎖的の海域には北側に1カ所、南側に2カ所（黒之瀬戸、八幡瀬戸）の開口部があり、日に二回の潮流変化で外界と激しく海水や魚介類の出入りを繰り返している。カタクチイワシをはじめとする不知火海の水産資源の多くは、毎年外海から不知火海に入

り込みこの海域で成長してきたものが多い。また図5は鹿児島県出水市の米ノ津港沖の表層定常流を示したものであるが、名護港の漁師が打瀬漁を行う経路と重なっている。かつて漁業は風と潮流を利用した生業であった。不知火海の名物となっている打瀬網漁もこの自然と風土を活かした漁法であり、漁民の暮らしや行動範囲と密接な関係性を持っている。メチル水銀曝露リスクも、自然の影響力と、人為的な暮らしとの関わりの両面から考えていく必要がある。

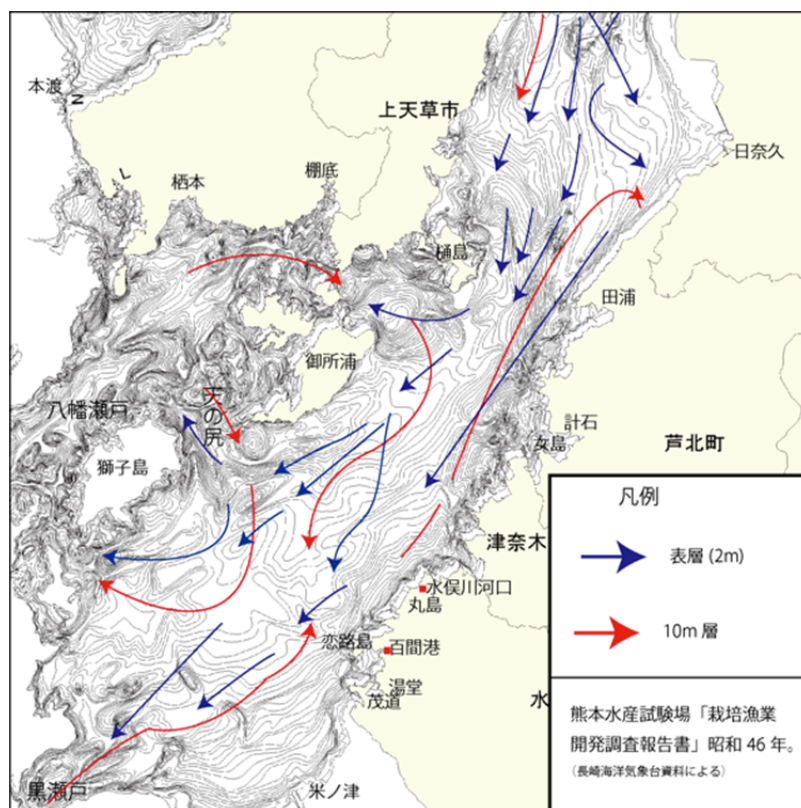


図4 不知火海の表層定常流と海底地形図

(出典) 表層定常流は熊本県水産試験場「栽培漁業開発報告書」昭和46年を参考に作成。海底地形図は、日本水路境界海洋情報研究センターの海底地形デジタルデータをGISマップに合成して作成。海中の線は海岸線、低潮線、等深線を示す。



図5 米ノ津港前の海域の表層定常流

昭和30年の水俣病問題勃発を契機に、不知火海の各海域で海水中の水銀濃度や捕獲した魚介類の水銀値の調査研究がなされてきた。魚介類の汚染度調査については、水銀値の測定技術が十分に確立されていない時代から現代まで数多くのデータの蓄積がある。しかしこれらのデータを同列で比較することは問題がある。そこでマクロな視点で不知火海域の海と魚の汚染度を一元的に俯瞰するために、個々のポイントにおける過去のデータを活用して、魚介類の水銀値の水平的分布と海底泥中の水銀含有量の分布を可視化した。

図6からはチッソの放水溝があった水俣湾百間港や水俣川河口に近い部分だけではなく、御所浦と芦北の中間点や長島、伊唐島近海にも底質中有水銀濃度が高い箇所が見られる。これらの海域は打瀬網や巾着漁などの漁場としてよく使われてきた。いろいろな地点で捕獲が容易であるテンジクダイとエビの総水銀濃度を見よう。昭和36年に行われた打瀬網、刺網の試験データを地図化すると図7のような分布となっている。汚染度の高いエビが姫戸、田浦沖、水俣湾で捕獲され、またテンジクダイについては獅子島沖、水俣湾、津奈木沖に多く見られた。

もっとも、この図で示されている総水銀濃度は無機水銀を含む総水銀値である。無機水銀とメチル水銀は毒性において異なることに十分に留意して、曝露リスクは考える必要がある。ただ無機水銀が拡散した、あるいは移動したと考えられるこの痕跡は、メチル水銀もある時期にこのような場所に流れ出た可能性を窺わせる。

昭和36年当時、この広い海域内でさまざまな魚介類がメチル水銀のリスクになにがしか曝されていた。しかし水銀蓄積は、魚種や個体の大きさ、曝露時間、メチル水銀濃度により大きく異なることが分かっている。このような変数の特質は曝露リスクを考える上で複雑性の要因となっている。

例えば宇土半島の松合沖で生まれたエビは不知火海を南下しながら大きく成長し、また産卵期には北上して戻っていく習性がある。このエビを網で獲るのが打瀬漁である。図7で示された昭和36年当時に捕獲されたこれらのエビはメチル水銀を含む海水から曝露したのか、あるいは汚染されたベントスなどを捕食したことにより生物濃縮が起きたかについてはまだわからない。ただ不知火海の魚介類の個体寿命は1年から長いものでも5年程度である。この間、他の生物に捕食されたり、この海域で死んで分解され、それが他の生物に吸収されて、ある量のメチル水銀が形を

変えつつこの海域内に保存されている可能性は理論的にはあるかもしれない。他方で、漁獲されたり、外海に出て行ったり、不知火海域の海水自体も1か月ほどで全て入れ替わるほどの潮汐効果がある。以上のことから、メチル水銀曝露リスクは工場からのメチル水銀の排出が止まった段階から徐々に減少していく傾向にあったという推測には合理性がある。

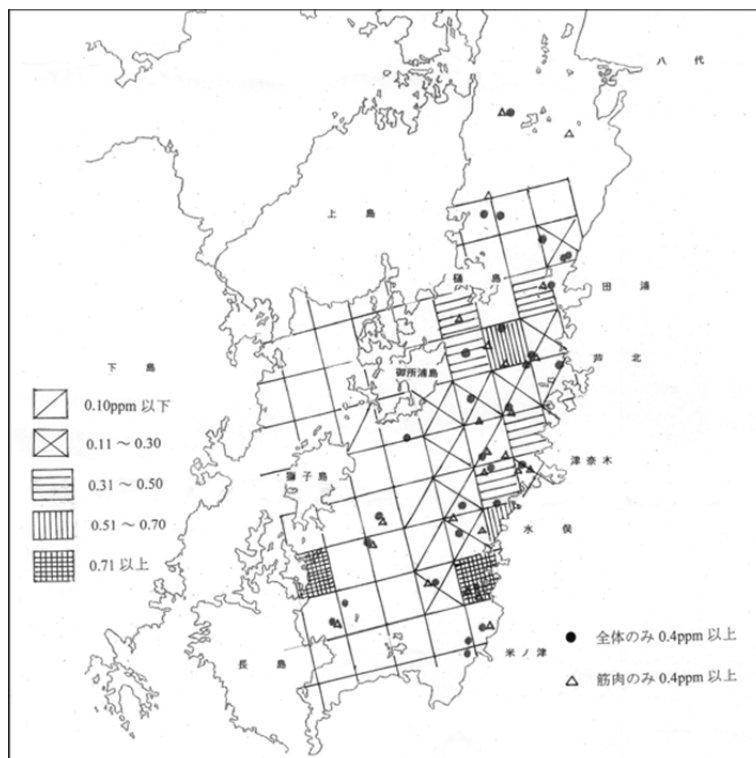


図6 魚介類の総水銀水平分布と海底泥中の水銀含有量の分布図

(注1) 平成28年10月、11月開催の水俣病研究会での平田郁夫の報告を受け山中進が「表層底泥中の総水銀量の等濃度分布図（環境庁昭和49年）」、西海区水産研究所他（昭和49年）『有明海・八代海産魚介類の重金属（とくに水銀）蓄積に関する実態と調査』および「八代海における第1～4海打瀬網・刺網試験総合位置図（昭和46年3月21～27日）」を使って地図に再構成した。

(注2) メッシュのデータは、「第2図 不知火海底土中水銀含有量」による。

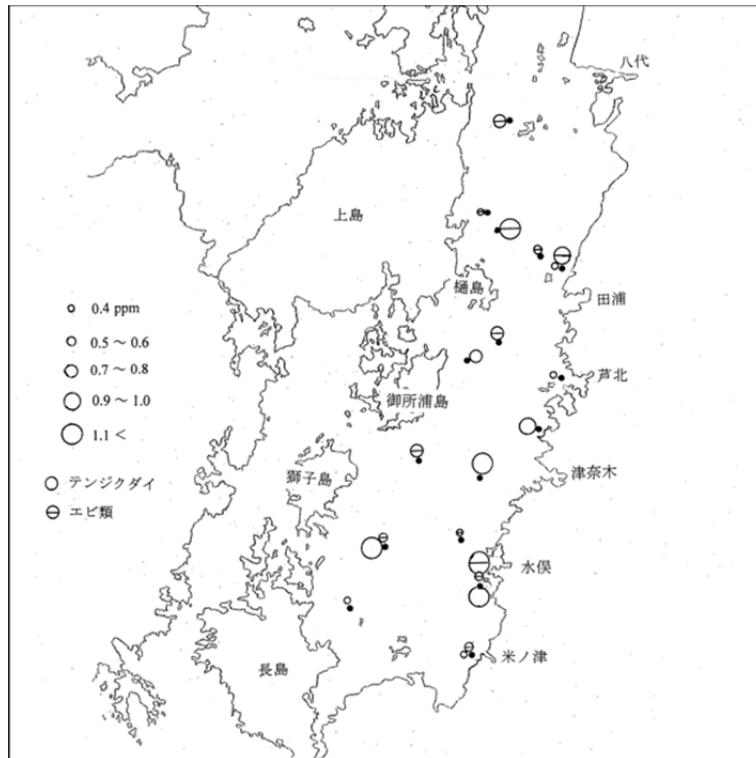


図7 魚介類総水銀濃度の水平分布（全体部）テンジクダイ、エビ類

（注1）エビ類は、クルマエビ、クマエビ、ヨシエビ。

（注2）データは「第9図 八代海における第1～4回打瀬網・刺網試験操業、昭和36年3月21日～27日」に基づき、山中進が地図として作成。

（2）魚介類の捕獲の状況

各地の漁協の活動、漁場、漁業権、漁法、船の動力、漁獲高、漁港への水揚げ量などを明らかにすることを目的として、漁師、漁協長、鮮魚仲買人、鮮魚小売商、鮮魚行商人への聞き取り調査、及び史資料の収集分析を行ってきた。図8は漁師達から聞き取った不知火海沿岸で漁獲量の大きなエビとカタクチイワシが成長し移動する経路を示している。この経路に沿って打瀬網やカタクチイワシ漁は展開されてきた。また魚食性のタチウオはカタクチイワシの群れを追って移動するため、打瀬船の網に混入することが多い。漁師にとって混ざり込んだタチウオは、水俣地域で好まれ高値で取引されるため貴重な収入源となっていた。現在でも芦北町田浦では、延縄によるタチウオ釣「田浦銀太刀」がブランド化され漁業の主流となっている。

芦北漁民が操業する漁場について昭和34年9月熊本県水産試験場が調査したデータを図化したものが図9である。それぞれ漁師は狙った魚介類を効率的に捕獲するための漁具や漁法を駆使して、たくさんの魚が獲れる場所を求めてこれらの海域一円で漁を行ってきた。近年ではカタクチイワシやイカなどの子を「ちりめんじゃこ」漁で一気に獲り尽くしたり、藻場を底引きで壊したりするために稚魚が育たず、不知火海の魚介類が急激に減少しているといわれるが、漁場は基本的に昔と変わっていない。

田浦の網元漁師の出漁日誌や公的な資料によると、昭和34年はカタクチイワシ漁が不良の年で、阿久根漁協に依頼して特別に鹿児島県の水域で漁をすることの許可をもとめている。また網子や火船を雇って出漁しても漁獲が上がらないため経営が逼迫し、タチウオ漁で凌ぐという状況があ

った。

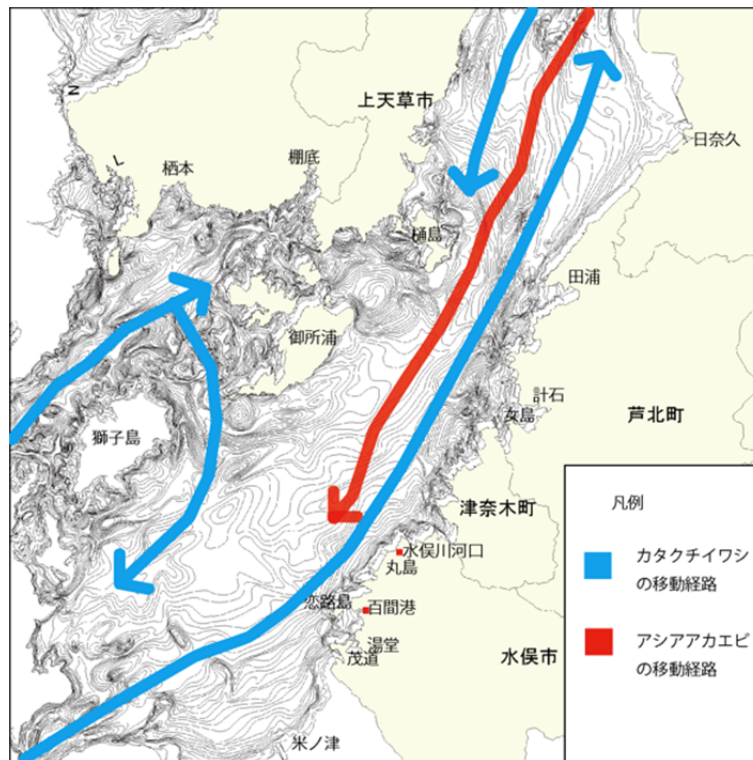


図8 カタクチイワシとエビの経路

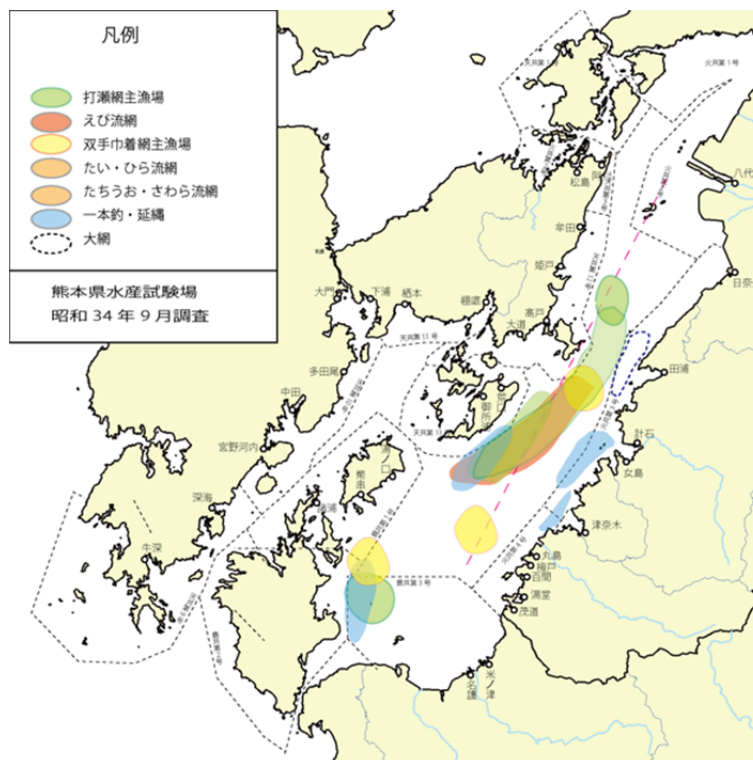


図9 芦北漁民の不知火海における漁場

(注) データは熊本水産試験場調査、昭和34年9月。

水俣漁協の水揚げ高及び水俣市の漁業経営体の変遷については別表1に示されるように、年によって大きく変動している。漁獲高自体は、海水や海流などさまざまな条件が魚の回遊に関わり乱高下することは常態であった。ただ水産統計は、水俣病発生時には国の漁業センサスが不知火海域での集計をやめ、国・県ともに昭和30年～40年台の統計に空白が生じている。水俣市の行政資料も年度のより集計項目が変更され、一貫したデータが得られない。そのためこの表は複数種類の統計データを整理しているため、経年的な量的変化を捉えるという意味に於いて難点がある。ただ魚種別の捕獲量などから当時の漁業の状況を推測することは可能である。統計から大きな流れを見ると昭和11年頃はサバやイワシが漁業にとって大きなビジネスであったことが分かる。その後次第にカタクチイワシ漁が盛んになっていく。また値段の高いエビやタイも獲られるようになっていく。戦後、タチウオやボラが地元消費の魚として増加していく。

水俣市内にある丸島、茂道、湯堂の3漁港別の昭和49年と昭和51年のデータを見ると、それぞれ漁獲における主たる魚種が異なっている。漁村間に、漁業者の設備投資規模や漁法、漁場に大きな違いがあることが窺われる。丸島漁港は水俣で一番大きな漁港で、漁業協同組合や製氷施設があり、仲買人が沢山おり、水俣の漁民だけではなく対岸の獅子島、御所浦の漁師達もこの魚市場に水揚げをしていた。多い魚種としてエビ、アジ、ボラ、タチウオがあがっている。茂道、湯堂は水俣市街地から隔絶しており零細な小規模漁村であり、そこに暮らす漁民も天草などから移り住んだ者である。茂道はアジとエビ、その他、と限られた小規模漁業であった。湯堂はアジ、タチウオ、その他、でさらに零細な漁業であった。昭和41年の丸島、茂道、湯堂の各漁港別の漁獲量は、およそ6：3：1の割合である。漁業経営体も、水俣市全体で324、従業者は442人となっているが、丸島に229経営体、236人、茂道は51経営体、116人、湯堂は44経営体、90人であった。

水俣病の発生により、水俣市漁協は昭和32年8月から水俣湾内での漁獲を自主規制した。昭和35年7月から地先1000m以内を規制区域に拡大し、市と漁協の監視船でパトロール活動を行ってきた。そのため水俣湾内外での操業や魚介類の商取引はなくなり、廃業転職など壊滅的な打撃を受けた。漁師は対馬へイカ釣り船団を送ってみたり、鮮魚を扱う仲買人、小売店、加工業者も廃業、出稼ぎなど大きな打撃を受けた。鮮魚商や小売店では「水俣産の魚は扱いません、阿久根の魚です」などと看板を掲げ、仕入れ先を阿久根や熊本、福岡からに変更して細々と商いを継続する工夫をした。だが昭和35年以降はチッソが排水浄化装置を設置したことで危機は終息したものと考えられた。水俣漁協は昭和37年4月に水俣湾内を除く漁獲自主規制を解除し、続いて昭和39年には水俣湾内も含めて全面規制解除を行った。ところが昭和48年5月熊本大学第2次水俣病研究班が水俣湾の魚介類の危険性を発表したことで、水俣病問題が再発し漁協は再び水俣湾の漁獲の自主規制を行うわざる得なくなった。その後は水俣湾の仕切り網設置や水俣湾の浚渫埋め立てなどで、水俣湾で漁業自体ができない状況が長く続いた。水俣市漁協は漁業から利益ではなく、漁業補償や港湾浚渫補償、チッソの下請けとしての陸上輸送業、県の委託事業である汚染魚介類の捕獲作業などで糊口を凌いできた。

沿岸の各漁村の地先の海域は、共同漁業権としてそれぞれ独占的に漁を行う権利が認められている。地図中に点線で囲まれた例えば火共第3号など地先の海域がそれぞれの地元の領海である。これは県が共同漁業権域として定めているものであるが、地域ではこの中にもそれぞれの浜の地先として慣行的な漁業の縄張りがある。つまり海は慣行及び法規則により業として行う漁業は詳細なルールが存在している。かつての艀こぎや焼き玉エンジンの低馬力の船から、ヤンマーなど

の小型船舶用ディーゼルエンジンの普及で高出力化が可能となり、漁法も潮流や風任せの漁法から、船の馬力で網を曳き回す漁法に変わっていった。また船団を組み魚群探知機で海域をあちこちと魚を探して走り回り、火船の集魚灯で魚を集めてごっそりと獲るカタクチイワシ漁などが盛んに不知火海では展開されてきた。だが強い馬力のエンジンを積んだ船は高速度で海中の網を曳くため、狙った魚種以外にも根こそぎ捕獲してしまう。そのため網にかかった魚であっても狙った魚以外は不要と海に捨てたり、あるいは魚網で傷つき大量に魚が死んでしまうという事態も広がった。

水俣病汚染の広がりを語る際に大量の弱ったり死んだりした魚の目撃談がある。その原因として、メチル水銀中毒で弱ったり死んだりしたものがあるが、聞き取りからはそれ以外にも網に入ったが売れない魚だと捨てられたものや、網をくぐり抜けたものの傷つき死んでしまった魚などが混在していた。

図10は今年度の聞き取りで長島、獅子島、出水（名護）、田浦、佐敷の漁業者から聞いた漁場を図示している。この図には共同漁業区での漁は煩雑になるため記載していないが地元漁師を中心に網や一本釣りなど漁法で操業が行われている。不知火海の海底は、水俣芦北の陸側は泥状であり、御所浦方面に向かって次第に水深が深くなり土質も砂になる。水俣湾内はヘドロが厚く堆積し、どろどろとぬめり臭う状況であった。移動性の高いカタクチイワシやタチウオなどの魚は、海域の東側と西側を海流に乗って移動する。エビ、カニ類も非常に速いスピードで海底を長距離移動している。熊本県芦北町の打瀬は地図に点線で示されている八代沖の築島から樋島の岬である枇杷の首を結ぶ線を延長した西側の海域で盛んに操業された。熊本県では佐敷（計石港）を中心として帆掛け船によるエビ漁が盛んであり、田浦沖から水俣近くの県境までの海域を風に任せて網を曳く。とりわけ計石港の漁民達が活動する佐敷沖だけは、佐敷川から吹き下ろす東風があるため年間の操業日が他の漁港より多く有利であった。芦北では船も4本マストの5tクラスの漁船である。名護の漁師も同様に打瀬船でエビ漁を行うが、こちらは海域が狭く県境から南西方面に何回もこまめに網を曳く方法で漁を行う。船も3本マストの小型船である。

業として行う漁業については、一本釣りは全国どこの海域でも自由に行うことができるが、その他の魚種については漁業資源保全の観点で各県が魚種、場所、操業期間など細かに規定し、知事がそれぞれの漁師に漁業許可書を交付している。漁協はこのような申請手続きを代行している。各県は監視船を出して違法操業の取り締まりを常時行ってきた。違反者には多額の罰金や県庁への出頭など処罰の負担が大きく、漁師は罰されないよう気を遣っている。打瀬漁師は「一度捕まると一月分の収入がなくなるので馬鹿らしく違法操業はしない」と語る。天草の倉岳、栖本、新和、河浦などから櫓を漕いで水俣湾まで頻繁に密漁にきていて、そこで獲った魚を食べて曝露したという言説が特措法申請絡みで聞かれた。しかし、その時代に合理的に移動できた距離や漁における必然性など聞き取り調査から分かってきた事実からは信憑性に疑問が残る。水俣湾内の漁獲について自粛や不買運動が起きた時期に、水俣の漁船が地先に出漁できないのを見計らって、他所の密漁者がこの海域を荒らしたという噂については、どの程度そのような事実があったのか更なる調査が必要である。

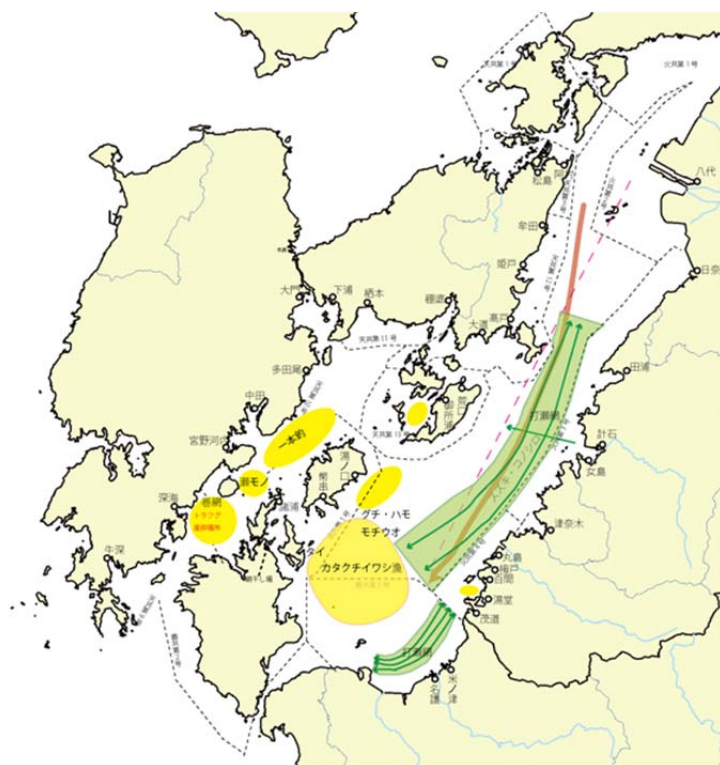


図10 長島、獅子島、名護、田浦、佐敷の漁民からの聞き取った操業海域
(注) 平成28年聞き取り調査。

これまでみてきたように不知火海の漁業と言っても、漁港ごとに漁民が狙う魚種が違い、また経済的・技術的能力の違い、地理的条件などにより漁法の違いなど、それぞれに特異性がある。たとえば芦北町一つとっても、田浦では釣りや巾着網などが、佐敷では打瀬漁が盛んに行われてきた。図11は、不知火海に面した姫戸、倉岳、栖元、御所浦の昭和33年の各漁協別漁獲高を示している。円グラフの大きさが漁獲量の大きさを示す。例えば一番大きな御所浦漁港は2,322,930kg、小さな姫戸漁協は77,865kgである。多数の漁協でカタクチイワシが多く見られるが、宮田漁協ではその他の魚種であるチダイ、マダイが多く、樋島ではその他の魚種であるタコ・イカ、エビ漁が中心である。姫戸でもその他の魚種が一番大きく、2番目にカタクチイワシ、3番目はコノシロとなっている。このように一口に不知火海の漁場といっても漁港毎に魚種や漁獲高は大きく異なる。このことは漁民の生活や、漁場、漁法、漁家の規模、そして常食した魚種（多くは魚市場で商品にならない魚類）に大きな多様性があるということを示している。

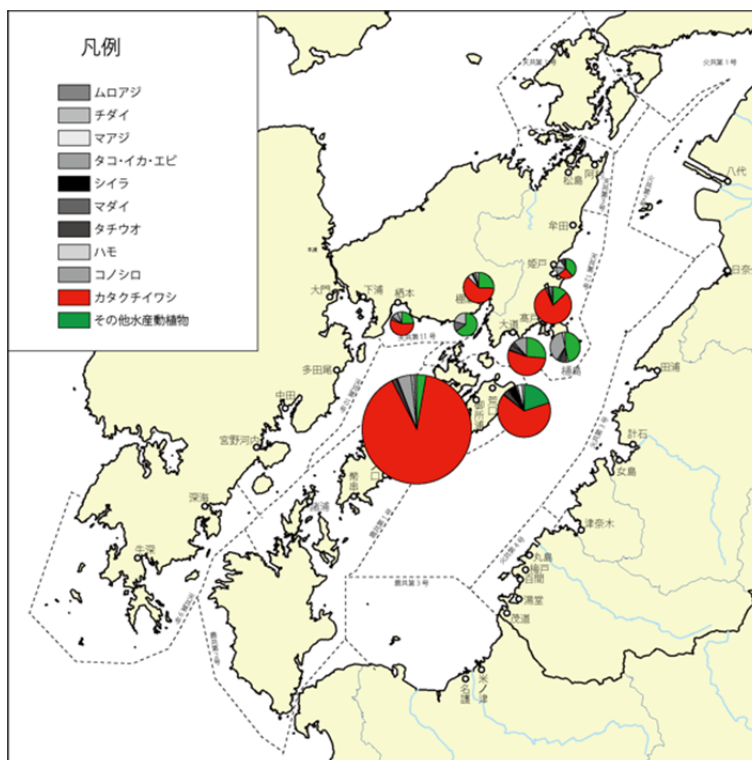


図11 不知火海の漁協別漁獲の状況

(注) 昭和33年。

(3) 魚介類の流通状況、及び行商の移入路の探索

まず、魚介類の流通状況から見ておこう。周辺地域におけるメチル水銀曝露による健康被害申し立ての伝搬拡散は、日常的に水俣の魚を大量に摂食したことを理由としている。そこでどのような経路で水俣から各地へ汚染された魚介類が流通したのかを明らかにする必要がある。一般的に沿岸部では比較的容易に魚が入手できるが、内陸山間部では入手が困難である。よくマスコミや支援団体が取り上げる「行商人が売りに来ていた。魚が好きであったので毎日行商人から買って食べた」という言説がある。この論点については、それぞれの地域性を考慮に入れて考える必要がある。本研究班の不知火海沿岸各地での聞き取り調査から、水俣産といわれる魚がどのようなものであったのかが次第に明らかになってきた。図12は水俣へ運ばれてくる魚のルート、また水俣から各地に送られる魚のルートを示している。

まず漁協は組合員の水揚げにかかる手数料や燃料代などが重要な収入である。漁民は獲った魚は基本的に自分の漁港に持ち帰って水揚げする。例外は、幾つかの魚種はそれを扱う流通業者が限定されておりそれぞれ専門の仲買人の入るところへ水揚げしたり、あるいは「送り」という他所への輸送がなされる。また漁場へ直接船で現金をもって買い付けに来る仲買人がいたり、カタクチイワシのように土佐のカツオ漁船が注文して生きたエサとして受け取りに来るというようなものもあった。また燃料代が水揚げ額から天引きされることを嫌って、時に他所の港へ水揚げすることもあったという。次に鮮魚は地域性・季節性があり、小売店は一地域だけでは品揃えができない。そのため小売店は仲買人を通して全国各地から魚を取り寄せ、あるいは仲買人は逆にその地域で捌ききれない魚を「送り」で全国各地の市場に出荷するという流通網が戦前からできていた。毎日、主要都市の魚市場-仲買人-小売店の間を魚が、海上は仲買人の鮮魚運搬船で、陸上はトラックや鉄道でダイナミックに動いている。

つまり水俣の丸島魚市場に並んでいた魚は必ずしも水俣市の漁民が獲ったものだけではない。水俣地域の鮮魚商が扱っていた魚は、常時、県内外からの魚が多く含まれ、また水俣の市場に運び込まれた魚も県内外に流通していた。水俣漁協取り扱いの魚介類のどの程度が地元で消費され、どの程度が県内、県外に流通していたかについて図13が示している。昭和31年では57%が地元で消費され、20%が県内の熊本市や人吉市、多良木方面へ送られていた。また23%は鹿児島や福岡、宮崎、遠くは岡山など全国各地へ出荷されている。昭和45年になると魚食離れもあり地元消費率はさらに減少したと考えられている。

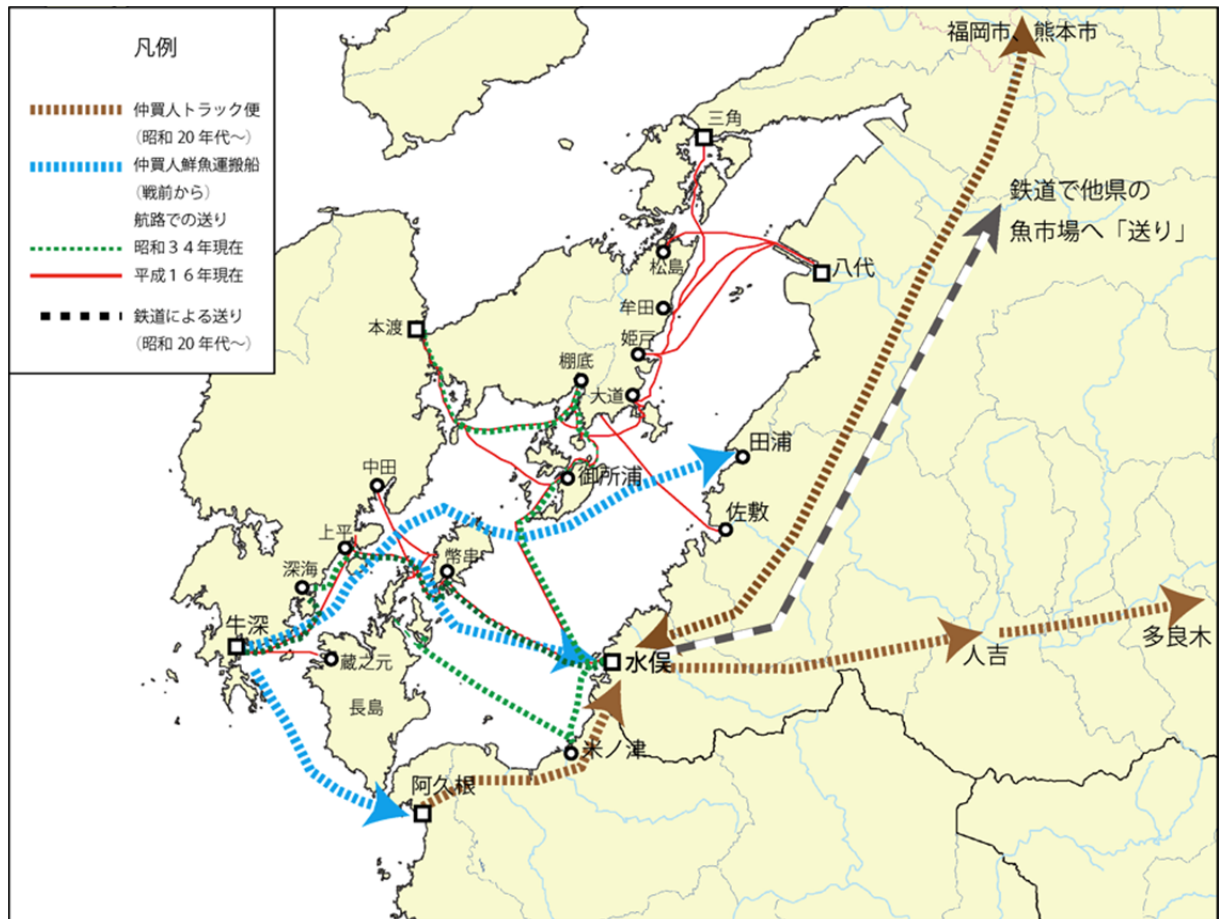


図12 水俣を中心とする魚介類の流通経路図

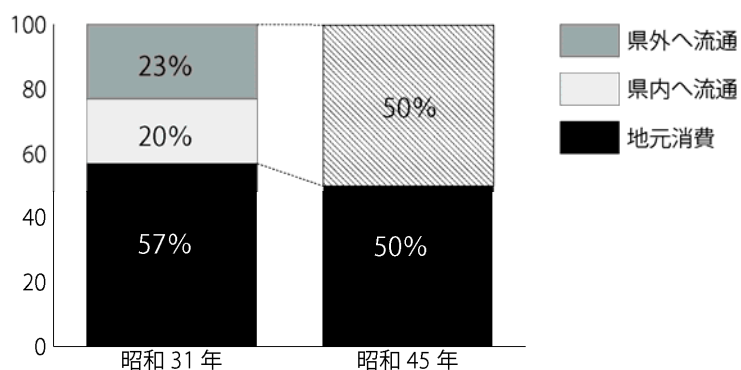


図13 水俣漁協取扱魚介類の地元消費比率

(注) 水俣市行政要覧、昭和31年。

大衆魚であるイワシなど青ものの魚は、不知火海ではほとんど獲れない魚である。周辺地域での曝露リスクを検討するときには、どこの魚種を摂食したのかの観点は重要である。水俣・芦北地方で食された大衆魚であるイワシは、外洋で獲られたものが牛深に水揚げされ仲買人の鮮魚運搬船やフェリーなど定期航路で水俣へ送られてきた。また水俣や田浦の仲買人は毎日福岡、阿久根、鹿児島中央、熊本の魚市場に送ったり、そこから買い付けたりしていた。岡山などの遠隔地向けには樽に氷を入れて水俣駅から貨車に積み、全国各地の魚市場へ「送り」を行っていた。産地から送った魚は、せりで売れると代金が送金されてくる仕組みになっており、実績が上がると取引量も増えていった。また地域によって好みの魚が異なり、仲買人はそのチャンスを読んで「送り」を行っていた。他方で仲買人は、地元の小売店や料亭、旅館なども顧客として販売をしたり、水産加工場や製氷施設を持ったりと多角的な経営を行っていた。

各魚種別の漁獲量と単価、そして仕向先については昭和28年の資料が新たに見つかった。これによるとカタクチイワシが量的に一番大きい、この多くはカツオ漁船のエサ用である。また昔は田や畑の肥料用にもカタクチイワシが用いられた。食用のいりこ加工も漁民や地元加工業者が行ってきたが、これを専門とする業者はいりこ用のカタクチイワシの原料を安定的に確保するため四国など遠方からカタクチイワシを買い入れ、水俣で加工をして、また遠方で売するという商売形態になっていた。エビやタイは高価で住民が日常的に食べる魚ではなく、鹿児島や県内の他の市場へ多量に出荷されている。またエビは水産加工会社が加工して、干物販売のルートで人吉など県内外の各地へ運ばれ売られた。鮮魚、乾物、加工品はそれぞれことなる流通ルートを持つ。地元消費率の高い魚はボラ（100%）、タチウオ（90%）、アジ（80%）、その他（50%）である。このように水俣の魚市場から他市場へ仕向けられている流通状況は、昭和30年代初頭に水俣産の魚介類の不買運動が起きるまで同じトレンドであったと推測される。

ここで水俣市の丸島、茂道、湯堂の3漁港の漁業就業者数を見てみよう（図14）。昭和11~13年には900~1100人くらいが漁村で暮らしていた。しかしこの時期の市の行政資料では水産業はすっぱり抜け落ちており、行政が地域の産業として水産業を認識されない程度の細々とした生業であったことがうかがえる。当時一家の家族員数は10名程度であり、この人数をそのまま就業者として捉えることには問題がある。昭和25年以降はおおよそ200人前後で推移している。

表1 水俣漁協の魚種別漁獲量、単価、仕向先（昭和28年）

種類	数量(貫)	%	金額(円)	%	単価		仕向先(%)		
					高単価	低単価	鹿児島	県内	地元
イワシ	29,293	38%	3,815,830	20%	35	6	23	70	7
アジ	13,302	17%	3,515,479	18%	67	8	0	20	80
ボラ	7,620	10%	3,474,053	18%	100	6	0	0	100
エビ	6,297	8%	2,228,123	11%	386	10	65	15	20
タイ	5,405	7%	2,320,962	12%	134	10	60	30	10
サバ	569	1%	123,616	1%	38	15	60	40	0
カレイ	137	0%	50,531	0%	65	20	50	10	40
太刀魚	1,181	2%	287,549	1%	57	5	0	10	90
フカ	513	1%	72,760	0%	18	3	20	55	25
イカ	1,348	2%	353,623	2%	65	10	40	35	25
その他	11,149	15%	3,195,970	16%	93	5	30	20	50
計	76,814	100%	19,438,496	100%					

出典：水俣市行政一覧、昭和28年。

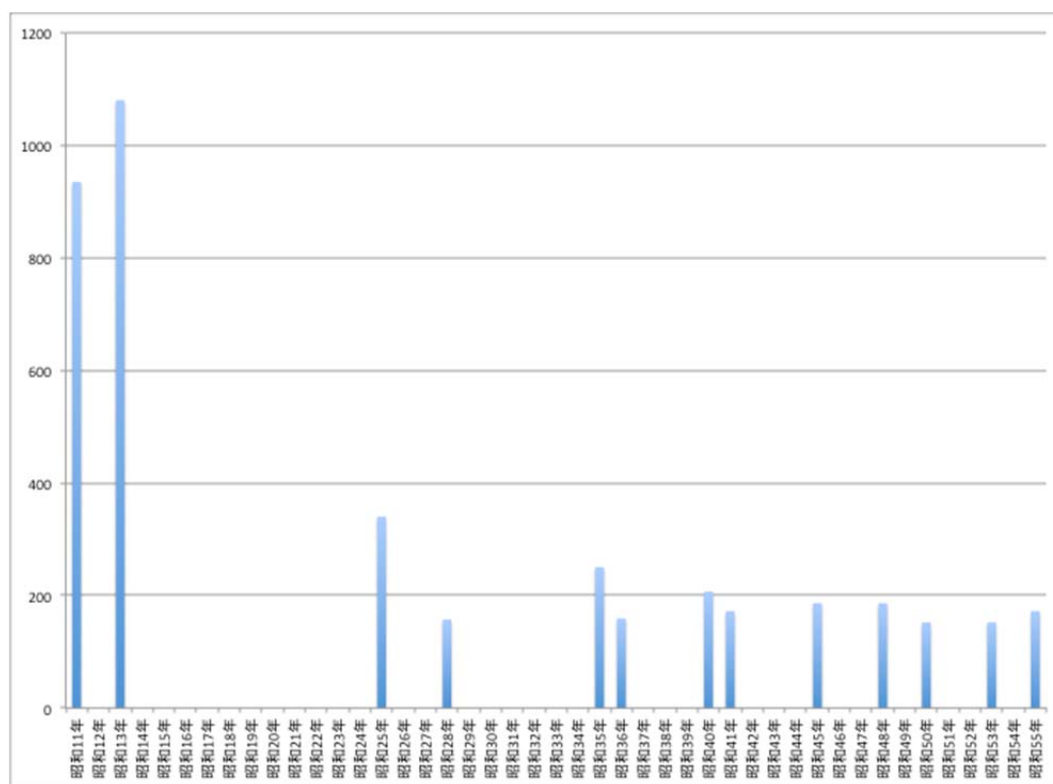


図14 水俣市の漁業就業者数の変遷

出典：各年度の水俣市行政要覧。年度に記載がないものはデータが欠損。

次に、行商について見てみよう。いわゆる「めごいな」と呼ばれる行商人は、主に（高齢）女性の仕事であり、およそ30キロの魚と少量の氷を竹籠に入れ天秤棒で担いで顧客のところへ売り歩く商いである。顧客は先代から譲って貰うなどして、個々の行商人が自分の縄張りである販売

区域を回っていた。日持ちのしない商品を無闇に当てもなく売り歩くことはない。その地域の農家との関係性は長期にわたるもので濃く、農繁期には手伝ったり、祭りに招かれたり、あるいは顧客の家に逗留して干物を売り歩くなど永続的な濃厚な関係性が育まれていた。徒歩の行商圈は、調査では早朝家を出て魚市場で仕入れをし、顧客を回って夕方に帰宅する、およそ10~13キロ圏内くらいの範囲であったことが推定される。街場での行商はリヤカーで引いて回ったり、道路の辻で小さな店を開くなどの方法をとっていた。このような徒歩による行商人は、漁師の妻や家族が自家で獲った魚を売り歩いたのではなく、家計の補助として行商をしている高齢女性などが多かった。不知火海の漁家は夫婦船で知られているように、夫婦ともに本業の漁で忙しく妻が長時間をかけて魚を売り歩く商売はあまり行われなかった。

昭和35年から、保健所は行商人に対して鮮魚は氷で冷やすなど冷蔵が必要で、ブリキ缶の容器を使うこと、また保健所への取扱食品毎の登録許可が必要と指導した。竿秤についても尺貫法が禁止された。規制により重量が嵩むようになったためリヤカーの利用が増加する。自転車は高価で、行商人が自転車を買って売りあるくようなものではなかった。表2は水俣市の輸送・交通の変遷を示している。昭和20年代にはまだ自動車の普及は少なかった。昭和33年になると自動二輪が普及し始める。昭和35年になると軽自動車が増加してくる。昭和33年にスバル360が発売され自動車社会の幕開けとなる。昭和35年頃まではトラックは三輪車が主流であったが、その後次第に四輪車、軽トラックが普及していった。

では次にトラックによる鮮魚行商であるが、これには冷蔵設備の投資が必要であり、また魚、肉、乳製品、野菜とそれぞれの保健所許可が必要であった。トラックは2tトラックに、魚だけではなく肉、乳製品、野菜、菓子、頼まれた品などを載せて得意先を回った。縄張りをはじめいなど同様にある。聞き取りでは、魚の仕入れ先は水俣から3分の1、熊本から3分の1、鹿児島から3分の1であった。熊本の田崎市場を午前7時に運び屋が出て午前10時に水俣で受け取る。売り上げの6~7割は得意先での売り上げになる。自分のテリトリー内を、曜日を決めて週2回訪れるようにしている。取扱魚種は青ものは、アジ以外は不知火海ではほとんど獲れないため、イワシ、サバ、キビナゴは阿久根産を取り寄せた。瀬もの、光りもの、白身魚は高いので、値段の安い魚を取りそろえる必要がある。魚の行商にも、塩干物、冷凍物、鮮魚は仕入れ先が全く異なる。昭和40年代に入ると自動車道の整備、農村地域への農協の暮らしのセンターやスーパーなど小売店舗の普及に伴い、行商人は次第に姿を消していった。とくにスーパーの隆盛は、個人経営の魚屋を軒並み潰していった。小売では成り立たなく、学校給食、病院、施設関係などへの「納め」で経営を維持していた。行商人は魚のうまさを知った顧客にスーパーの扱わない魚種で売り込んだ。八代など沿岸部出身で内陸部に嫁いだ妻などが良い顧客であった。水俣病勃発当時は、内陸部ではボラとコノシロが危ない魚だと噂されていた。めごいな型の行商人は昭和40年代までは各地で細々と続いていたが、バスや交通網の普及で廃業、あるいは店舗型に切り替わっていった。

水俣の鮮魚商組合は、ギルド制のように水俣の魚市場で入札に参加する資格を持つものであり、40万円の保証金が求められた。メンバーは、漁協と鮮魚商組合の同業者の両方から認められたものだけが加入できた。魚市場との代金決済は毎週行われ、それが滞るとせり権の停止など制裁を受けた。かつて86人ほどいた行商も昭和61年には23人、現在は水俣芦北地域で3人だけである。鮮魚商組合の構成員は水俣病による補償を得るため協力し会員のバッチを作って交渉を行ったり、あるいは得た補償金をどう配分するかを巡って意見の対立があった。新たに発見された資料から組合構成員の概要が把握できた。

路上で販売する行商人はこのような資格を持つものだけではなく、仲買人や小売店から少量の魚を分けて貰って売り歩いた者も含まれる。後者は鮮魚店を営む者からはヤミ商人とよばれる存在であった。戦中、戦後は食料の闇取引は経済警察が取り締まった。列車などで見つかったと没収であった。その後、公衆衛生の観点から保健所が行商人の許認可を行い、列車や国道で許可を受けているか取り締まりをした。熊本・鹿児島両県をまたがって来る行商人は出水、大口、水俣保健所が協力して取り締まった。この3市の保健所は共同して保健業務を進める定期的な会議体も設けていた。

研究班では、水俣から大量の鮮魚行商人が列車を利用して大口方面へ入っていたという患者支援団体等の告発証言やマスコミ報道についてもその事実を調査確認しているが、現在まで車両が鮮魚商で一杯であったとか、水俣駅前には鮮魚行商人がたくさんいたという証拠や証言はみつからない。聞き取りでは国鉄山野線の一車両に2人程度の鮮魚等を扱う行商人が乗っていたことは確認された。また阿久根、出水からの行商人が水俣駅で乗り換えて大口方面へも入っていたこと、津奈木から一人行商人が列車を利用して入っていたことも確認された。これらの者は水俣の物資を持って地方に売りに行き、帰りは米などと物々交換して持ち帰るタイプの行商だった。また大口方面から水俣に野菜などを売りに来て、帰りに海産物を商品として持って行く者もいた。

表2 水俣市の交通・運輸など輸送手段の変遷

	昭和28年	昭和30年	昭和33年	昭和35年
バス	7	14	18	
貨物自動車	62	82	108	127
乗用自動車	9	11	19	86
小型自動四輪車	15	37	87	
自動三輪車	51	118	139	151
自動二輪車	2	349	305	22
特殊作業用自動車	1			19
自転車	3,621	6,417	9,262	
荷積馬車	58	38	10	
荷積小車	369	224	134	
リヤカー	1,037	1,527	1,338	
軽自動車				399
原動機付自転車				1,569
計	5,232	8,817	11,420	2,373

それでは、周辺地域である農山村に、行商人は具体的にどのような経路をたどり、どの程度の量の魚介類を運んだのであろうか。芦北町の田浦、佐敷、そして出水市名護の行商人の具体的な販売ルートを見てみよう。図15は芦北町佐敷（計石港）から球磨川方面の山間地集落へ行商に行っていた女性の辿ったルートである。この行商人は計石港で獲れた魚を天秤棒で担いで、早朝に家を出て、徒歩で大野村を訪ね、まだ魚が売れ残ったときにはさらに球磨川沿いの告、時には球磨村の渡まで足を伸ばした。夕刻には家事があるため帰宅していた。一回の運搬量は魚と氷で約30キロであった。鮮魚だけではなく、雑魚を濃い味の味醂干しに加工した塩干物も扱った。

第2に田浦の行商人で九州山地の山間部の集落を行商した例（図16）。旧葦北郡吉尾村の大岩、黒岩、永谷、横居木集落には日替わりで3人の行商人が田浦漁港から通っていた。いずれも天秤棒を担ぎ、約30キロの魚と氷を担って山を登ってきていた。一人の男性は大変早足で峠を登ってきたという。大岩や黒岩地域は山間部の小規模農家が林業の作業員などを兼業にしながら細々と暮らしている。昭和20～30年代は各家庭とも子供の数が多く、子供たちは小学校を終えると八代などへ奉公に出されていた。ほとんどの家では魚は週に一回程度しか買えなかった。練り物や浮き袋のついた魚は年に一回の祭りの時だけの晴食で見かけるだけであった。後に行商人の一人がオートバイを使うようになり、その後村にも店ができて、行商はなくなっていった。

第3に出水市名護の行商人である。名護の行商には中村周作（1984）による詳細な先行研究がある。それによると名護の行商人は、戦前は漁協を通さない婦人行商販売が中心であったが、戦後の数年は外地からの引き揚げ者の流入などで急増したものの、すぐに激減した。また漁協水揚げ制度が確立されたことから、仲買組合加入者のみがせりに参加し行商を行う権利を有することとなった。せりは築港市場と名護漁港市場で一日4回行われ、名護漁協市場に行く者が多い。仲買人は、鮮魚輸送業者、店舗・軽トラによる移動販売業者、行商人である。扱われた鮮魚は出水市漁協の資料から、サバ、イカ類、タイ類、アジ、ボラが多く売られたことが分かる。漁業も打瀬網漁によるクルマエビ捕獲が中心であったが、水俣病問題の影響を受け昭和35年をピークに減少した。名護の行商には、出水平野の半径13キロを行動圏とする鮮魚日帰り行商と、打瀬船で獲れたクルマエビを主とする加工品行商の二種類があった。後者は日持ちも良いため大口、菱刈、宮之城、川内市など遠方まで行く。クルマエビは1束は米1俵と交換された。塩干物の行商は売り尽くすまで1週間程度現地のなじみの家に滞在して商をおこなった。行商人数は、戦後すぐが100戸、昭和35年には半減して50戸、昭和55年に22戸になった。行商人の一日は午前4時に起床、午前5～6時にせりで仕入れ。午前10時半頃までに行商に出る。午後12時には一旦終えて帰宅し、昼食後漁協でせりに参加して午後3時頃にまた行商に出る。午後5～6時頃帰宅。交通手段は、自転車、バイク、知人の車に乗せてもらう、バスなど個人差がある。

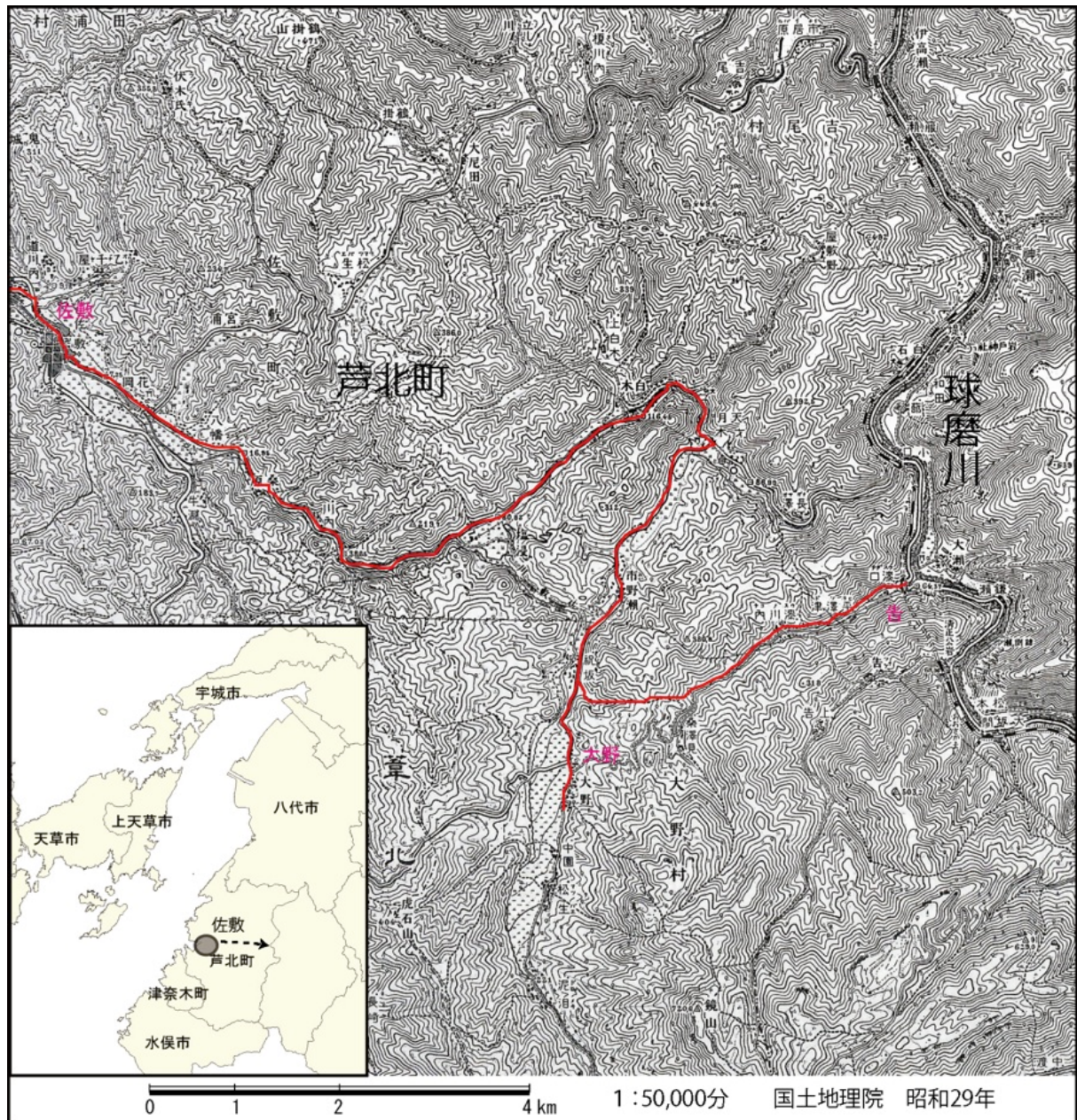


図15 佐敷の行商ルート

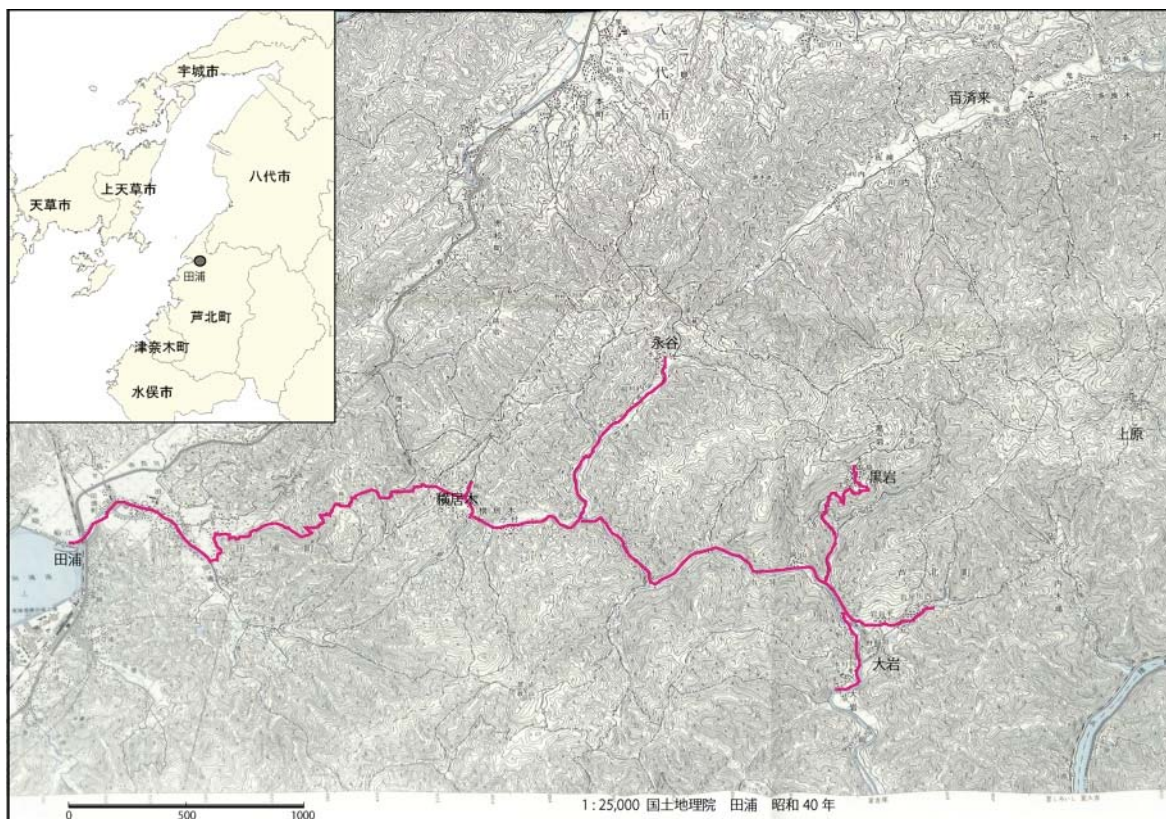


図16 田浦の行商ルート



図17 名護中集落の行商人行商圈

出典：中村周作「海産物行商からみた集落間結合とその変化—出水市名護地区と背域との関係を中心に」歴史地理学紀要、26、1984.

（４）食生活、魚介類の摂食状況について

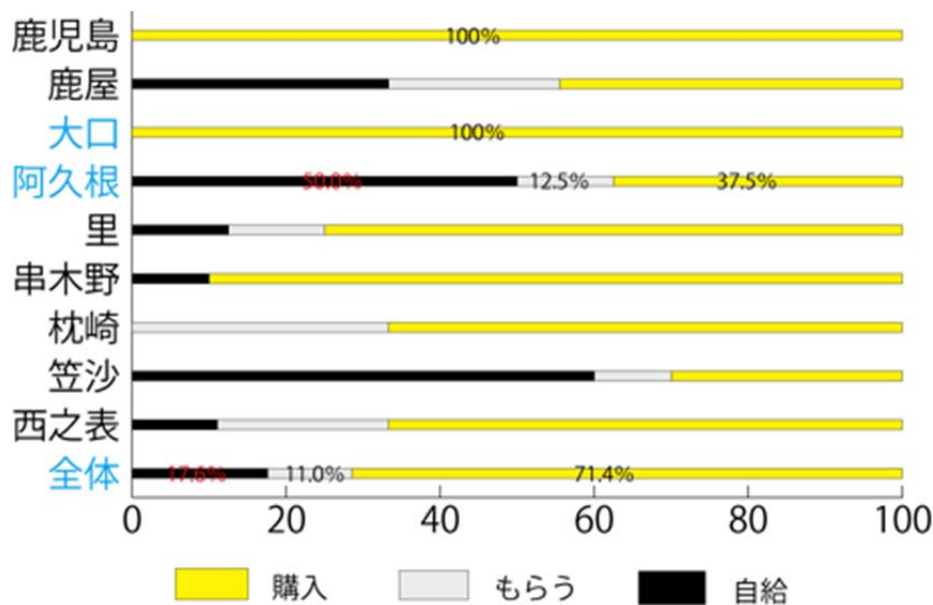
魚介類摂食（魚種、頻度、量）、入手方法（自家採取、親戚からの譲渡、行商人から購入）、風評被害の影響など食生活実態について聞き取りを行った。昭和20～30年代は、基本的に沿海部では魚介類がいわゆるお米代りであり、毎食事で大量に魚が食べられていた。その魚は、魚市場で出せない魚種や傷ついて商品にならないものを自家消費した。漁村では、隣近所で獲れた魚を分かち合う習慣も多くみられ、魚を買うということは希であった。また農家の農作物と交換ということもあった。

他方で、内陸部の農山村は農作物による自給的生活であり、いりこは買うものの、魚はたまに買うという生活が一般的であった。購入には現金か物々交換の米が代金として必要であり、小農家にとって魚介類の購入は週1回程度が経済的能力の限度であった。富農家ではイワシやアジを週に2～3回食べたという事例もあるが、このような家庭は極めてまれであった。農山村部ではハエやウナギ、沢ガニなどの川魚を捕ったり、庭に池を作ってコイを飼いそれを食べる習慣がある地域（大口市）もあった。今でもそのコイ用の池を農家の庭先にみることができる。

日常的な魚介類の入手方法に関する竹原らの鹿児島県の調査（2003）では、図18のように沿海部では自給や近所からもらうことが多い。魚種毎の調理頻度は、農村米作地帯である大口市は、アジ、サバ、タイの順で調理されるが、阿久根ではアジ、キビナゴ、サバ、鹿児島市ではアジ、サバ、エビである。

刺身を味噌で食べる魚介類の種類という調査結果では、興味深いことに地域で入手しやすい魚種と思われるものの特徴が見られる（表3）。大口市ではコイ、キビナゴが挙がり、阿久根市ではアジ、イサキ、ウルメ、キビナゴ、ブリ、マス、鹿児島市ではキビナゴ、イワシ、コイ、アオヤギ、エイ、オキアミ、キス、サバ、タコ、チム、マグロと豊富な魚種が入手されている。青ものは不知火海にはいない魚である。

聞き取り調査および先行研究を参考に考えると、一般的に沿海部住民の魚介類入手方法は40パーセント程度は購入、13～23パーセントもらう 30～50パーセント自給で入手している。他方、内陸部では100パーセント購入である。現金もしくは米・野菜との物々交換がなされなければ入手できない。塩干魚介類の利用比較では、大口9パーセント、阿久根4パーセント、鹿児島8パーセントであった。



出典：竹原小菊ほか、『鹿児島県における魚介類の利用実態調査』、平成 20 年、図 6。

表3 調理頻度の高い魚介類上位3品目

	鹿児島小海区		農村米作地域	北薩小海区		南薩小海区			種子島小海区	全体
	鹿児島	鹿屋	大口	阿久根	里	串木野	枕崎	笠沙	西之表	
1 位	あじ (4.6) さば (4.6) えび (4.6)	かんぱち (6.7)	あじ (5.8)	あじ (9.2)	あじ (9.0)	あじ (4.7)	かつお (14.5)	あじ (5.0)	きびなご (8.2)	あじ (5.1)
2 位		あじ (4.1) さば (4.1)	さば (4.8)	きびなご (5.4) さば (5.4)	きびなご (8.5)	いか (3.7) さば (3.7)	あじ (7.0)	さば (5.0)	とびうお (7.9)	さば (3.4)
3 位			たい (4.2)		いさき (6.0) ぶり (6.0)		きびなご (5.7)	いさき (4.8) えび (4.8)	いか (6.8)	きびなご (2.4)
4 位			こい							

熊本県の食生活に関しては『日本の食生活全集43 聞き書熊本の食事』が大正の終わりと昭和の初め頃の食事を主婦に聞き書きしたものを纏めており参考になる。戦中、戦後は経済・流通が戦争により破壊され物資不足に陥っており、戦後復旧状況や聞き取りから戦前の生活水準に戻るのに昭和30年代までかかっていることが分かっている。魚食の習慣を考える上で参考となるので引用する。

るのを、煮魚、焼き魚、刺身などにして一日おきに使うが塩物も多い。いわしは近所でもよって（集まって）箱で買い分けた後、塩をまぶして塩いわしにしたり、砂糖、醤油、こしょうで甘辛く煮て、忙しいときに昼や夕食のしゃ（菜）にする。鯛は祝い事の時、たまに食べる。「だしご（煮干し）は佐敷から年に2、3回いなくて（担いで）売りに来るものを袋（1斗くらい）で買い、干物や煮物のだしにする。いわし子（いわしの生干し）も佐敷からいなくて売りに来るのを買い、5月6月の忙しいときは、そのまま醤油をかけて食べる」。

「川でとれるいだ（うぐい）は、塩焼き、中骨をつけたまま背の方から薄く刺身のように切った背切り、味噌汁に使う。ほえ（おいかわ）は串に刺して焼き、だしにしたり、甘露煮で煮込む」。「球磨盆地ではくじら肉をよく食べる。くじら肉には、皮くじら（皮に接した脂肪部分を塩漬けにしたもの）、身くじら（赤身のところに薄く塩をしたもの）がある。皮くじらは薄く切って熱湯を2回かけて酢味噌で刺身のように食べる。身くじらは湯がいて、ゆずごしょうやしょうが醤油で刺身風に、塩くじらは焼いて山行きの弁当によく使う」「皮からは、いだ（うぐい）、ほえ（おいかわ）をとり、酢味噌、塩焼き、味噌焼き、甘露煮、出しようとして利用する」「魚の多くは、海のもの利用が多く、行商人から買う。いわし、さば、このしろなどは日常食によく食べ、塩いわし、塩くじらは弁当や忙しいときに、鯛、干しエビが行事食に、皮くじらはタケノコの時期に、棒だらは盆用に買う」という。

県南の八代市竜蜂地区は、「普段の食生活では、さばや、いわしが多く、新鮮な無塩（生もの）の魚が手に入ると、尾引き（手で裂いて開いた刺身）の酢の物や煮付け、塩焼き、おつけにするほか、いわしはぬか漬けにしておくこともある。このしろは姿寿司にしたり、吉野ずし（おからをいれるずし）にして晴れ食に使うことが多い。わりあい安く手に入るのがしゃく（穴じゃこ）である。海藻類ではなごや（おごのり）や青のりを八代海までとりに行く。いわしは、秋から冬にかけて箱ごとかって、ぬか漬けにしておく」。「川からは、あゆ、ふな、ほえなどがとれ、焼き魚や煮魚にしたり、田楽にして食べる。川魚は保存用として、丸のまま竹串に刺して、ゆるりによくあぶり、わらずとにつきさして天井に下げておくと長い期間保存できる。あきのがね（川がに）とりは楽しみであった。春になると田にはいったにしろいをする。いで（井堰）ではえんぐり（川の渦あげ）をして、ふな、なまず、うなぎ、どんか（どんこ）などをとる」。「ふだんの食べ物として口に入るのは、天草西海でとれるさばやいわしなどの無塩、塩ものがほとんどで、もっこ棒でいこう（担いで）売りに来る行商人から買ったり、米や雑穀との交換で手に入れる」。

不知火海沿岸地域ではないが、漁村の食事の一例として天草の西北端、天草灘に面する苓北町逆瀬川の聞き取りでは、「海岸に迫る急斜面にひらかれた畑と、川沿いにひらかれた棚田と、限られて耕地からとれる麦8、米2の麦飯が続く。その麦飯をさらに食い延ばすために、からいもをふかしたり、こっぱをつくりそれを粉にして補いにする。豊富にとれる魚の中でも、ふだんはさばやあじ、ことにいわしを菜（しゃ）にして儉約しながら、物事のある日には、何種類もの魚や買いの刺身の盛り込みで海の幸を味わう。沿岸の専業漁家ではふだんはからいもをごはんがわりに食べるところもある」。

「逆瀬川村の沖合は沿岸漁業に最適な漁場で、魚の種類も多く、一年中漁が行われている。しかし水揚げされる鯛、くろうお（めじな）、ちん（黒鯛）、すすき、かれい、ぼら、いっさき（いさき）、いせえび、あわび、さざえ、うになどのほとんどは高級魚として売りさばくので、祝いごとの時以外は、漁家であってもふだんに食べることはない。また兼業漁家

の一本釣も盛んであるが、すっこべ（かわはぎ）、くさび（べら）、がらかぶ（かさご）などの雑魚まで主婦達がめごい（ふれ売り）をして換金するのがふつうである。まして山手の木場地区などでは、魚をふだんの菜（しゃ）にすることは少ない。いずれにせよ、農家がふだんに食べる魚はあじ、さば、いわし、きびなごであり、なかでも年間を通して一番利用するのはいわしである。魚はふだんはめごいながら一斤か二斤くらいをかうのがやっとなが、大漁の時は安くなるのでいわしなど一かい（とろ箱で一杯）買って、あぶりうおや塩辛、さくら干しなどにして保存する。ふだんはしっかり節約するが、祭りとか客のあるときには、新鮮な魚が手に入るので思い切ってぜいたくをする。

魚が少ないときは問屋から卸してもらい、一緒に売ることが多い。天秤でぜんごのめごばら（こたつきの竹かご）に5、6貫をいなって山越えして行き、買い付け（上得意）の家を中心に売りをかけて売り歩く。遠くまで行くのは大変であるが、近くで売るより高価で売れるし、それだけ商いになる。商いは現金ですが、近くの農家などに売るときには、自分の都合で混めや野菜と換えてもらうことがある。また、魚によって売り方が違う。たとえばふつうの魚は一びきづつちきり（秤）にかけて斤単位で売り、これをかけもんという。くさび（べら）、どんば（はぜ）、ちんばりごち、しまがれい、めだかがれい、赤えびなどの雑魚や小魚類ははかりもんといって枡ではかつて売る。最後は安くしてでも売り残すことはしないが、ときにはくさびやすべっこ（かわはぎ）などを家に残して出かけることもある。いずれにせよ、農家が札如区食べる魚はあじ、さばや値段の安いいわしである。漁期にはいわしをどこの家でも大量に買い込んで塩漬けや干物に加工し、すこしずつ大事に利用する」という。

現代的物流体制が確立しはじめる昭和40年後半から50年代より以前の世界を考えるとときには、食生活には地域性があること、常食できる素材は自給できるものが中心であることなどに留意する必要がある。

（5）メチル水銀の人体蓄積・健康影響（蜂谷紀之）

毛髪水銀値調査、臍帯水銀値調査、公健法認定患者を收集整理し曝露リスクを可視化する。

1. 昭和30年代後半の八代海沿岸住民の毛髪水銀濃度について

毛髪にはメチル水銀が濃縮される性質があるため、毛髪の総水銀濃度を測定することによってメチル水銀曝露量を推定することが可能である。なお、現在の全国の毛髪水銀濃度（幾何平均）は男 2.5 ppm、女 1.6 ppm で、熊本市内および水俣市内でも全国平均と比較して大きな違いはない。

熊本県衛生公害研究所では、昭和35年11月中旬～36年3月に、水俣市、津奈木町、湯浦町、芦北町、田浦町、御所浦村、龍ヶ岳町、姫戸村の漁協組合員およびその家族を対象に毛髪水銀調査を実施し、毛髪試料の提出がなかった姫戸村を除く 998 名について毛髪水銀濃度を測定している¹⁾。さらに、昭和36年度（昭和36年10月～37年3月）および昭和37年度（昭和36年10月～昭和37年3月）に追加調査が実施され、合わせて1、728件の集計結果が公表された^{2) 3)}。

このうち、昭和35年度分の分析値の原データを入手し、サンプル量などが不十分で分析でき

なかったものを除く 955 件について再集計を行った。なお、参照値としての熊本市のデータは、昭和 37 年度までの集計値を上記報告書第三報より引用した。表 4 に示すように、八代海沿岸 7 地域の平均値（幾何平均）は 26.9 ppm であった。地域別平均では、もっとも低い龍ヶ岳の 15.4 ppm から最も高い湯浦の 42.5 ppm などが得られた。住民の最高値は御所浦の住民の 920 ppm であったのをはじめ、水俣、津奈木、芦北、田浦、湯浦、龍ヶ岳すべての地区において地域別最高値は 150 ppm を超えていた。御所浦の 920 ppm の女性は神経症状があり、水俣病も疑われていたが⁴⁾、認定されないまま昭和 42 年に死亡している。

毛髪水銀濃度の分布（表 5）によると、メチル水銀による感覚障害発症の最大無作用量（毛髪水銀濃度で 50～125 ppm）の下限值 50 ppm を超えているものは、上記 7 地区全対象者の 23.5%であった。この頻度が最も高かったのは芦北で、半数 50%がこれを超過していた。同様に、この濃度の超過頻度は水俣、津奈木、湯浦、田浦で 29.4～41.7%であったほか、御所浦、龍ヶ岳でも 7.0～18.0%に超過がみられた。

参照地区としての熊本市の算術平均濃度は 9.4 ppm で上記 7 地区の算術平均 37.7 ppm より低かった（熊本市の幾何平均は不明）。熊本市在住者に漁民は含まれないが、魚をまったく食べないものでは分析不能となる例もあったとされる。一方、最大無作用量の超過例では、熊本市内においても、昭和 36 年度に 122 ppm の例があったほか、昭和 37 年度にも 104.5 ppm の例が報告されている。このほか、昭和 36 年度および昭和 37 年度に 50～100 ppm を示したものが各一例報告されているが、これらが同一人の再測定によるものであるかどうかは不明である。

鹿児島県衛生研究所では昭和 35 年 5 月～昭和 38 年度に、出水市、阿久根市、高尾野町、東町の不知火海沿岸住民（漁業従事者およびその他）を対象に毛髪水銀調査を実施している^{5、6)}。対象数は昭和 35 年度 556 名・596 検体、37 年度 427、38 年度 224 であった。この報告書から、初年度の地域別毛髪水銀濃度の分布を表 6 に引用する。これによると、出水市（米ノ津）、阿久根市、高尾野町、東町すべての地域で、感覚障害発生の最大無作用量の下限值（50 ppm）を超過する住民の存在が確認され、その超過頻度は沿岸部全域で 30.7%であった。一方、参照地区である鹿児島市ではこのような超過者はみられなかった。なお、50 ppm 超過者の頻度はこれ以降急激に減少し、昭和 37 年 4.5%（n=424）、38 年 1.7%（n=237）であった（図 19）。

（まとめ）

昭和 35 年から 38 年にかけての八代海沿岸住民のメチル水銀曝露レベルは非常に高く、全対象者の 1/4 以上は感覚障害が発症するレベルを超過していた。このレベルの超過者の存在は水俣湾周辺地域だけではなく、当時はまだ水俣病の認定患者が確認されていなかった地域にも及び、出現頻度は低下するものの龍ヶ岳（7.0%）や阿久根（9.1%）などでも観察されていた。

- 1) 松島義一・溝口彰一，水俣病に関する毛髪中の水銀量に関する調査・第一報，熊本県衛生研究所 昭和 36 年 5 月
- 2) 土井節生・松島義一，水俣病に関する毛髪中の水銀量に関する調査・第二報，熊本県衛生研究所 昭和 37 年 5 月
- 3) 土井節生・松島義一・千代幸子，水俣病に関する毛髪中の水銀量に関する調査・第三報，熊本県衛生研究所報 昭和 38 年 5 月
- 4) 徳臣晴比古・岡嶋透・山下昌洋・松井重雄，水俣病の疫学，神経進歩，1962 年 3 月）
- 5) 坂田旭・折田武雄・郡山宗晏・中原さん・穂積テイ子，水俣病に関する毛髪中の水銀量の調

査について：第 1 報，鹿児島県衛生研究所 昭和 37 年 3 月

- 6) 坂田旭・中原きん・樺山テイ子，水俣病に関する毛髪中の水銀量の調査について：第 2 報，
鹿児島県衛生研究所 昭和 37 年 3 月)

表 4 地域別毛髪水銀濃度（ppm）の平均値および範囲（熊本県）

居住地	試料数	幾何平均	算術平均	範囲
芦北町	40	38.2	147.4	1.5 - 192
御所浦村	477	26.0	36.3	0.9 - 920
水俣市	193	27.3	41.2	1.0 - 150
津奈木村	102	23.9	38.1	1.0 - 159
田浦町	33	31.5	45.1	5.5 - 200
湯浦町	24	42.5	51.0	12.0-139
龍ヶ岳町	86	15.4	22.5	0.5 - 167
小計	955	26.9	37.7	0.5 - 920
熊本市	328	不明	9.4	(不明-122)

表 5. 地域別の毛髪水銀濃度分布（熊本県）

居住地	毛髪水銀濃度(ppm)								
	～1	～5	～10	～50	～100	～150	～200	～1000	計
芦北町		1		19	19		1		40
	0.0%	2.5%	0.0%	47.5%	47.5%	0.0%	2.5%	0.0%	100%
	50.0%				50.0%				100%
御所浦村	4	15	37	335	72	11	1	2	477
	0.8%	3.1%	7.8%	70.2%	15.1%	2.3%	0.2%	0.4%	100%
	82.0%				18.0%				100%
水俣市	2	14	11	106	49	10	1		193
	1.0%	7.3%	5.7%	54.9%	25.4%	5.2%	0.5%	0.0%	100%
	68.9%				31.1%				100%
津奈木村		5	9	58	23	5	2		102
	0.0%	4.9%	8.8%	56.9%	22.5%	4.9%	2.0%	0.0%	100%
	70.6%				29.4%				100%
田浦町			6	15	11		1		33
	0.0%	0.0%	18.2%	45.5%	33.3%	0.0%	3.0%	0.0%	100%
	63.6%				36.4%				100%
湯浦町				14	9	1			24
	0.0%	0.0%	0.0%	58.3%	37.5%	4.2%	0.0%	0.0%	100%
	58.3%				41.7%				100%
龍ヶ岳町	2	7	16	55	5		1		86
	2.3%	8.1%	18.6%	64.0%	5.8%	0.0%	1.2%	0.0%	100%
	93.0%				7.0%				100%
小計	8	42	79	602	188	27	7	2	955
	0.8%	4.4%	8.3%	63.0%	19.7%	2.8%	0.7%	0.2%	100%
	76.5%				23.5%				100%
熊本市	12	227		85	2	2			328
	3.7%	69.2%		25.9%	0.6%	0.6%	0.0%	0.0%	100%
	98.8%				1.2%				100%

表 6 地域別の毛髪水銀濃度分布（鹿児島県）

居住地	毛髪水銀濃度(ppm)								
	～1	～5	～10	～50	～100	～150	～200	～1000	計
米ノ津	114			188	105	25	7	6	445
	25.6%			42.2%	23.6%	5.6%	1.6%	1.3%	100%
	67.9%			32.1%				100%	
米ノ津以外 の出水	6			5	0	0	0	0	11
	54.5%			45.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100%
	100.0%			0.0%				100%	
高尾野	1			4	5	0	0	0	10
	10.0%			40.0%	50.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100%
	50.0%			50.0%				100%	
東町	11			39	23	2	0	0	75
	14.7%			52.0%	30.7%	2.7%	0.0%	0.0%	100%
	66.7%			33.3%				100%	
阿久根	21			9	1	0	1	1	33
	63.6%			27.3%	3.0%	0.0%	3.0%	3.0%	100%
	90.9%			9.1%				100%	
鹿児島県 沿岸部計	153			245	134	27	8	7	574
	26.7%			42.7%	23.3%	4.7%	1.4%	1.2%	100%
	69.3%			30.7%				100%	
鹿児島市	21			1	0	0	0	0	22
	95.5%			4.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	100%
	100.0%			0.0%				100%	

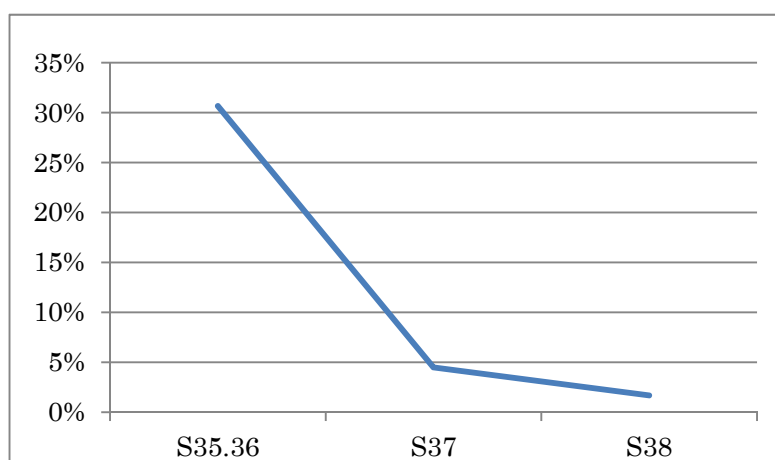
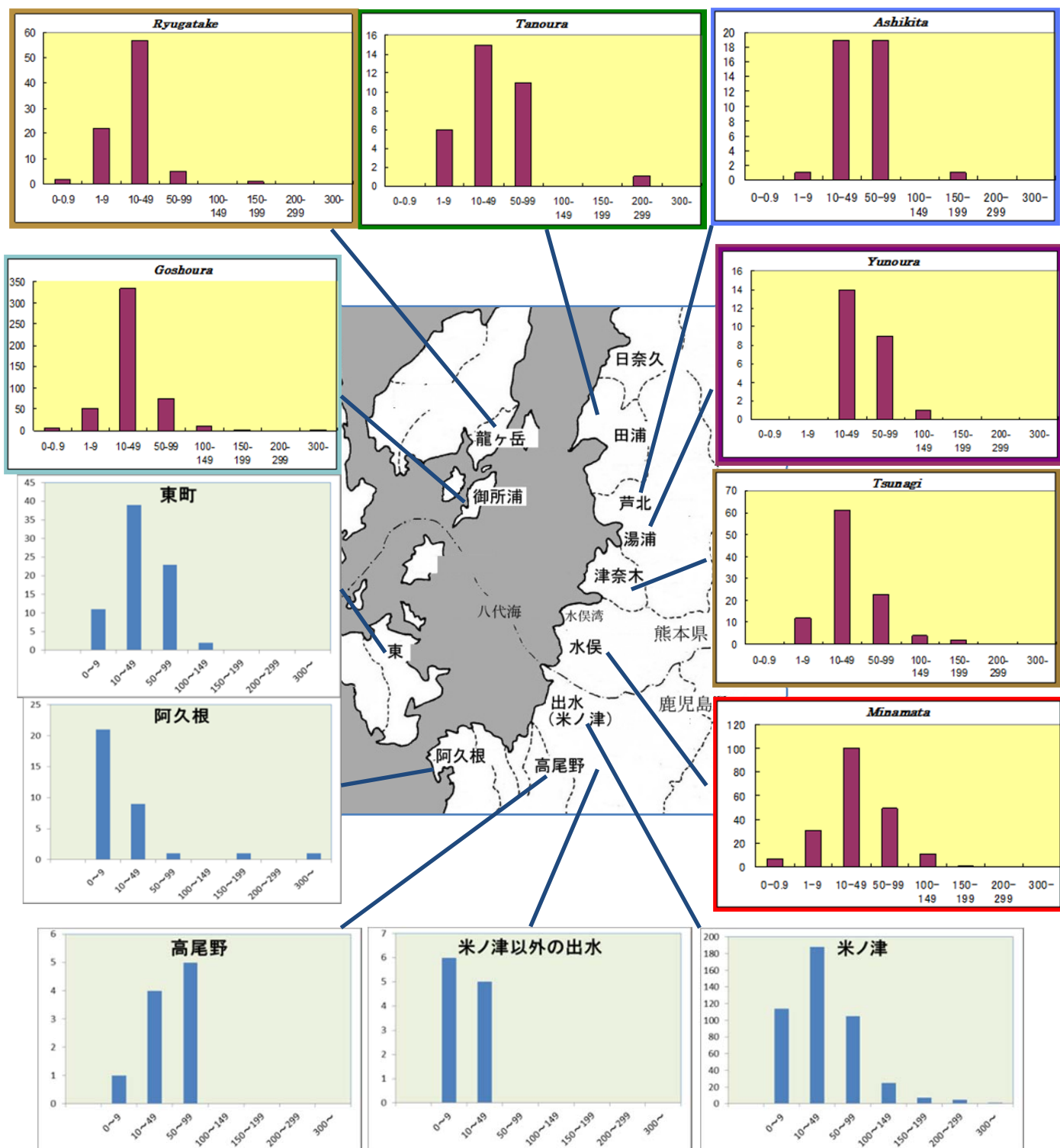


図 19 鹿児島県沿岸部 4 市町の毛髪水銀 50 ppm 超過者頻度の年次変化

(参考図) 地域別毛髪水銀濃度



2. 保存臍帯のメチル水銀濃度による地域別曝露状況の推定

1920年代から1980年代に出生した新生児の保存臍帯中のメチル水銀を分析し、地域別の年次変化を追求した報告により、以下の事実が明らかにされている。

水俣、芦北、出水、御所浦を比較した Yorifuji ら¹⁾によると、保存臍帯中のメチル水銀濃度は、水俣では1955年頃にピークがあったのに対して、出水・芦北・津奈木ではそれより5年ほど遅れてピークが見られた(図20)。このときの最高濃度は、水俣が5.28 ppmであったのに対して、出水でも4.65 ppmとほぼ同程度で、これを母体の毛髪水銀濃度に換算(係数20)すると96~106 ppmとなる。感覚異常などの神経症状が出現するのは毛髪水銀濃度50~125 ppm以上で、臍帯メチル水銀レベルは2.5 ppm以上であるが、これを超過する例は出水でも数多く確認される。また、ほぼ同様の検討を行った Sakamoto ら²⁾も一致した傾向を認めている。

これらの結果は、水俣湾周辺における漁獲自主規制による何らかの影響を反映しているとも考えられる一方、八代海のメチル水銀汚染が水俣湾周辺だけでなく、経年的に拡大していた可能性を示すものでもある。さらに、母親のメチル水銀曝露レベルが水俣市と出水市でほぼ同程度であったことは、昭和35年ころの八代海沿岸住民の毛髪水銀調査の結果ともよく一致しており、水俣病の被害拡大の要因を追求する上で重要な手がかりになると考えられる。

- 1) Yorifuji T, Kashima S, Tsuda T, Harada M., What has methylmercury in umbilical cords told us? - Minamata disease, Sci Total Environ, (2009) 408, 272-276
- 2) Sakamoto M, Murata K, Tsuruta K, Miyamoto K, Akagi H., Retrospective study on temporal and regional variations of methylmercury concentrations in preserved umbilical cords collected from inhabitants of the Minamata area, Japan. Ecotoxicol Environ Safety (2010) 73, 1144-1149

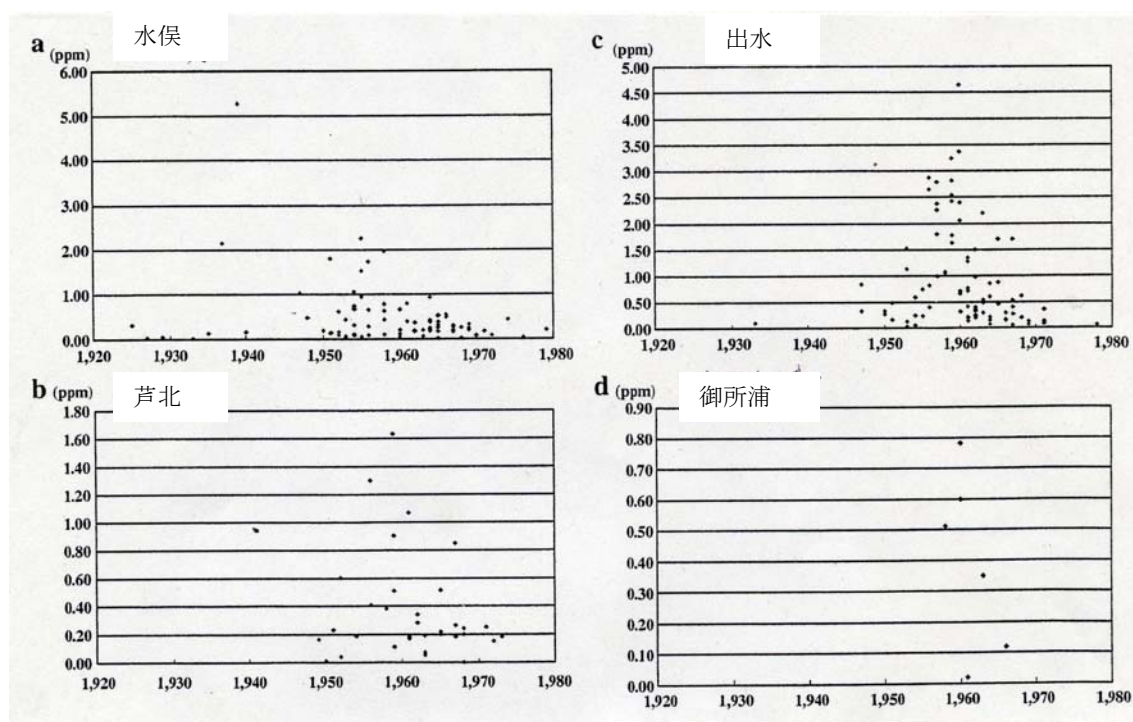


図20 保存臍帯中メチル水銀濃度の地域別経時変化

IV 考察

Ⅲの研究報告で既に考察についても言及をした。これまでの研究では魚介類の曝露と流通、健康調査の横断的な分析を通して、不知火海沿岸のメチル水銀曝露リスクを可視化して議論できるようになってきた。しかしまだ経年的・空間的に詳細な事実を押さえるまでには至っていない。昭和30年～50年までの地域の状況をさらに動的に理解するための更なる調査が必要である。

V 結論

- (1) 不知火海域のメチル水銀汚染、魚介類の汚染の状況については、過去の水質、魚介類の調査データを吟味し再利用することにより海水から魚介類の曝露リスクまで関連性を持たせた研究の可能性が確認された。データが膨大であり時間はかかるが、さらなる研究の価値が認められる。
- (2) 魚介類の捕獲の状況についても、聞き取り、行政資料、漁協や統計資料、漁師の日記などから時代別の漁場や漁法、魚種などがある程度明らかになった。さらに民俗学的な調査手法などを併用することで、不知火海沿岸地域の多様な漁業の状況が浮き彫りになると考えられる。
- (3) 魚介類の流通状況、移入路の探索については、これまで魚は地元消費されるものという先入観があったが、意外にも仲買人が広域で魚を流通させていること、また行商人の具体的流通経路や運搬量などが分かってきた。聞き取りができる対象者は年々減少しており時間の制約があるが、存命者から学べるものがまだまだたくさんあると考えられる。
- (4) 食生活、魚介類の摂食状況に関して、これまで二塚論文など疫学者や栄養士が協力した研究成果があるが、それぞれの地域で、どこから運ばれたどのような魚種の魚が、どれほどの頻度で摂食されたのかなどについて、聞き取り調査で得られる知見の価値は大きいことが確認された。
- (5) 人体蓄積・健康影響に関して指定地区及び周辺地域のメチル水銀曝露状況については、行政が行った健康調査データなどを再収集し分析した研究から、地域毎の曝露リスクの違いについて新たな知見が得られつつある。
- (6) 公害被害者救済施策の政策効果など、水俣病の経験に学んだ社会科学の研究が求められている。

これらの研究をつないで、不知火海域全体のメチル水銀曝露リスクに関する統合的なモデルとするにはまだ調査と研究が必要であるが、少しずつミッシングリンクが繋がりにつつあると考える。

VI 次年度以降の計画

聞き取りの信頼性が十分に担保されていない周辺あるいは内陸地域での調査をさらに補うことで水俣病問題にかかる全ての地域を網羅する研究とする。時間・空間別のメチル水銀リスクの広がり、年代別の魚介類の流通や地域集落への移入路、魚種や流通量や摂食量、健康被害の広がり状況等について複数の知見から検証を行う。

収集された知見を総合して、地域別・年代別のメチル水銀曝露状況を推認する因子について総合的な取りまとめの考察を行う。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) 上野眞也「不知火海の漁業・流通とメチル水銀曝露リスク」、熊本大学政策研究、第7巻、平成28年、3-13 ページ。

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 日本公衆衛生誌. 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PART II. 東京: 花伝社, 2009.
- 23) 水俣病不知火患者会+北岡秀郎『見捨てられた水俣病患者たち一救済を待つ人びと』花伝社, 2015.
- 24) 高峰 武『水俣病を知っていますか』岩波ブックレット, 岩波書店, 2016.
- 25) 藤崎童士『のさりー水俣両氏、杉本家の記憶より』新日本出版社, 2013.
- 26) 中村周作「海産物行商からみた集落間結合とその変化—出水市名護地区と背域との関係を中心に」歴史地理学紀要、26、1984.
- 27) 最首悟「不知火海漁業の移り変わりー葦北郡女島の巾着網漁について」色川大吉編『不知火海総合学術調査報告 (上)』筑摩書房、1983年、pp. 241-321。
- 28) 田中豊治「水産物消費市場の流通形態の変化と産地市場—山陰地方の場合」漁業経済研究

- 17-1,1968.
- 29) 熊本県水産試験場「葦北郡漁協に於ける漁業実態調査」(復命書),昭和 34 年.
 - 30) 鹿児島県出水郡東町『有形民俗資料調査報告書』東町教育委員会、南人文化研究所,昭和 46 年.
 - 31) 色川大吉編『水俣の啓示—不知火海総合調査報告(下)』筑摩書房,1983.
 - 32) 塩田武史「水俣からの報告・5 1/9-行商と山間部水俣病」技術と人間,アクネ,5 (12),1976,57-68.
 - 33) 竹原小菊、福司山エツ子、木戸めぐみ、山崎歌織、外西壽鶴子、進藤智子、徳田和子「鹿児島県における魚介類の利用の実態調査」鹿児島女子短期大学紀要,第 43 号(2003),7-25.
 - 34) 『薩摩・川内・出水・阿久根・さつまの今昔』郷土出版,2012.
 - 35) 九州農政局統計情報部「熊本県の海面漁業(昭和 29 年復刻版)」,1999.
 - 36) 鹿児島県『鹿児島県の水産史』,1968.
 - 37) 熊本県の農商課『熊本県漁業誌』、明治 23 年

水俣市魚類別漁獲高

単位:kg(昭和49年を除く)

漁種	昭和11年	昭和13年	昭和28年	昭和31年	水俣漁獲自 業期間	昭和46年(丸 島漁港)	内訳			昭和49年(港 道漁港)	昭和51年	内訳	
							昭和46年(港 道漁港)	昭和46年(港 道漁港)	昭和46年(港 道漁港)			昭和51年(港 道漁港)	昭和51年(港 道漁港)
イワシ	45,000	97,500	109,849	124,019	統計なし					21,000	16,100	52,000	11,000
アジ	8,750	5,625	43,883	21,078		132,000	118,000	9,000	5,000	15,000	18,000	13,000	7,000
ボラ	6,750	5,250	28,575	8,057		25,000	24,000	1,000		26,400	18,700	15,000	4,000
エビ	13,500	0	23,614	18,285		48,000	47,000	1,000		32,500	8,500		8,000
ムロアジ	0	0	0	0									
タイ	3,600	3,750	20,269	17,966									
サバ	58,250	1,125	2,134	67,581		260,000	260,000						
クロダイ	0	4,500	0	0									
カレイ・ヒラメ	0	750	514	750									
コノシロ	0	3,750	0	2,969									
タチウオ	0	0	4,429	56,173		290,000	284,000	3,000	3,000	24,000	17,500	22,000	11,000
ハモ	0	0	0	8,401									
フリ	0	0	0	1,215									
キビナゴ	0	0	0	1,487									
フカ	0	0	1,924	0									
イカ	6,750	0	5,035	3,614									
タコ	4,500	0	0	2,028									
とり貝	0	405,338	0	0								67,000	35,000
養殖たい	0	0	0	0									
養殖めし	0	0	0	0									
その他	32,850	9,675	41,809	18,896		484,000	449,000	34,000	1,000	21,375	4,275	67,000	35,000
計	175,950	537,263	288,053	351,769		1,239,000	1,182,000	48,000	9,000	143,275	83,075	236,000	119,000
経営体				428		314				324	229	143	75
従業員				427		428				442	236	336	165
出典	昭和11年市勢 昭和13年市勢 昭和28年市勢 昭和31年市勢 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換					昭和48年市勢要覧(漁業センサス)					SS1水俣市勢要覧(商工観光課)		
統計の単位	kg単位					kg単位					* (千円単位)		

自主規制

水俣市内漁業禁止

(注)
年度により水俣市商工観光課調べと漁業センサスが混在している。

漁種	昭和52年	昭和53年	昭和54年	昭和55年(丸 島漁港)	昭和56年	昭和57年	昭和58年	昭和59年	昭和60年	昭和61年
イワシ	5,000	8,000	0	8,000	27,000	68,000	180,000	101,400	111,965	90,000
アジ	6,000	11,000	6,000	4,000	10,000	22,000	26,000	21,535	22,435	12,000
ボラ	96,000	133,000	30,000	56,000	34,000	53,000	37,000	86,000	37,698	47,000
エビ										
ムロアジ										
タイ	25,000	25,000	0	0						
サバ										
クロダイ										
カレイ・ヒラメ	4,000				19,000	18,000	10,000	8,767	8,040	6,000
コノシロ	14,000	24,000	12,000	6,000	46,000	35,000	26,000	31,000	36,263	44,000
タチウオ										
ハモ										
フリ										
キビナゴ										
フカ										
イカ	26,000	28,000	12,000	10,000	15,000	10,000	14,000	7,813	10,650	10,000
タコ	8,000	13,000	4,000	6,000	24,000	14,000	19,000	20,000	25,085	16,960
とり貝	26,000				59,000	54,000	66,000	28,000	1,310	1,000
養殖たい					0	38,000	4,000	2,000	680	2,000
養殖めし	43,000	48,000	25,000	14,000	27,000	37,000	90,000	58,000	50,369	45,320
その他					250,000	410,000	311,000	455,000	290,920	288,030
計	228,000	292,000	116,000	72,000	250,000	410,000	311,000	455,000	290,920	288,030
経営体		101	82	43	36	165	151	169	169	169
従業員		309	146	96	67	303	303	304	303	283
出典	昭和52年市勢 昭和53年市勢 昭和54年市勢 昭和55年市勢 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換 買をkgに変換					SS5水俣市勢要覧(商工観光課)				
統計の単位	kg単位					kg単位				

Methylmercury Exposure Risk in Minamata and Adjacent Areas

Shinya Ueno^{*1}

**1 Center for Policy Studies, Kumamoto University*

Keywords: Methylmercury exposure risk; fish distribution; fish pedder; fish broker

Abstract

The purpose of this study is to examine the methylmercury exposure risk in Minamata and adjacent areas from the following five points of view. (1) Methyl mercury contamination risk in the Shiranui Sea Areas, (2) Fishing industry, (3) Fish distribution and fish peddler's routes in mountainous areas, (4) Ichthyophagy, and (5) Methylmercury exposure risk to human health. Our data are based on the fieldworks in Kumamoto and Kagoshima prefectures. An analysis of interviews to the locals and historical documents' survey finds that the fishing in the Shiranui Sea and the fish distribution on the markets were conducted dynamically in wide areas. These findings were visualized on the maps in chronological order. There was also a new discovery about the members of the Minamata Fish Merchant Cooperative Association and the fish peddlers' trade routes to mountainous areas. The exposure risk of the methyl mercury in the adjacent areas where peddlers brought in fish and shellfishes were varied depending on food consumption, frequency, and fish species. These findings suggested that methylmercury exposure risk in the adjacent areas outside of the designated area was not so high except the special cases.

IV 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】メチル水銀（MeHg）は、食用魚類の摂取を介した低濃度曝露による健康リスクが懸念されている環境中親電子物質である。MeHgの細胞毒性の一因は、タンパク質の求核基への共有結合によると理解されている。我々は、高い求核性を有する**活性イオウ分子（Reactive sulfur species, RSS）**がMeHgを捕獲し、イオウ付加体形成を介してMeHgを解毒・不活性化することを報告した¹⁻³。昨年度はRSS主要産生酵素であるcystathionine γ -lyase（CSE）の遺伝子欠損マウスを用いて、RSSが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。

これらの研究成果を受けて、本年度は生体内RSS量とMeHg感受性との相関関係を実証することで、MeHg曝露量とそれに起因する毒性発現について検討した。また、CSE高発現マウスおよびRSS含有植物成分サプリメント投与によるMeHgのリスク軽減効果を確認することで、新たなMeHgに対する健康リスク軽減策を提言することを目的とした。

【方法・結果】生体内RSS量の定量方法として、LC/MSによる安定同位体希釈法を確立した。野生型およびCSE欠損マウスの臓器中でのRSS量を測定した結果、CSE欠損により肝臓や腎臓ではRSS量の低下と共にシステイン（CysSH）やグルタチオン（GSH）量の減少が見られた。また、MeHg曝露は肝臓、腎臓および小脳中のRSS量やCysSHおよびGSHも減少させた。

本研究ではニンニクのヘキササン抽出物をRSS含有植物成分サプリメントとして用いた。ニンニクのヘキササン抽出物をマウスへ経口投与すると、血漿中RSS量の有意な増加が観察された。当該抽出物とMeHgを混合投与した結果、MeHg単体投与に比べて体重の減少や生存率の低下が有意に改善された。本混合液中でMeHgとニンニク中RSS含有低分子が反応して $(\text{MeHg})_2\text{S}$ に変換されることが確認された。一方、CSE高発現マウスは各臓器で高いCSE発現を示したにもかかわらず、急性中毒のMeHg曝露条件（7.5 mg/kg/day、10日間経口投与）に対しては野生型と同程度の感受性を示した。また、臓器中のRSS量は野生型と比べ有意な変化は見られなかったが、興味深いことに血漿中のRSS量は野生型のそれに比べて顕著に増加していた。

【考察・結論】CSEはシスチンを基質とすると、システインパースルフィド（CysSSH）のようなRSSを産生する一方で、シスタチオニンからCysSHを産生する酵素でもある。そのためCSEの欠損は、CysSHの生体内レベルの低下に伴い、GSHやCysSSHの産生を低下させることが示唆された。このようなイオウ含有低分子の減少がMeHg曝露に対する感受性を上昇させる一因であることが考えられた。また、MeHgの毒性がRSSを含んでいるニンニクヘキササン抽出物との混合投与で軽減され、RSS含有植物成分サプリメントとMeHgが含まれる大型魚類等の食品との同時摂取によるMeHgリスク軽減策の有効性を示唆する結果を得た。一方、CSE高発現マウスにおいては、予想に反してRSSの臓器中濃度は野生型のそれと変わらず、MeHg感受性も野生型と同程度であった。ところが、CSE高発現マウスの血漿中RSS濃度が野生型の2-3倍増加していた。本結果は、臓器（細胞）中で産生された余剰のRSSを臓器（細胞）外へと排泄するシステムの存在を示唆した。今後の研究推

進により、MeHg曝露時におけるイオウ含有低分子の生体内挙動とMeHgイオウ付加体量の増減およびRSS含有食品成分を詳細に検討することで、低濃度MeHg曝露による健康リスクの軽減に大きく寄与できるものと結論付ける。

キーワード：活性イオウ分子、システイン代謝、フェーズゼロ反応、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$ 、活性イオウ分子含有植物成分サプリメント

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

メチル水銀 (MeHg) は、主に食用魚類の摂取などを介した**低濃度曝露による健康リスクが懸念されている**。一方、食用魚類は健康の維持に良いとされるオメガ3系の脂肪酸等を多く含むためにその摂取が推奨されており、リスクトレードオフ問題に苛まれているのが現状である。MeHgは環境中親電子物質として知られ、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MeHg毒性の一因であると理解されている。

一般的に、親電子物質は、生体内求核低分子であるグルタチオン (GSH) により抱合体化され、細胞外へ排泄されることで解毒される。同様に、MeHgもGSHと抱合体を形成することで解毒されることが知られている。近年、我々はMeHg曝露ラットおよびマウス臓器中から、MeHgの新規代謝物の一つとしてMeHgのイオウ付加体であるビスMeHgスルフィド $[(\text{MeHg})_2\text{S}]$ を同定し、本ビス体中のイオウ分子の由来が生体内の高反応性イオウ含有低分子 (Reactive Sulfur Species, RSS) であることを示した^{1,2}。すなわち、GSHよりも反応性の高いGSHパースルフィド (GSSH) が、MeHgと代償的に反応した結果として $(\text{MeHg})_2\text{S}$ およびGSHを生成することを明らかにした¹。親電子性を有さない $(\text{MeHg})_2\text{S}$ は、MeHgよりも遥かに毒性が低いことから、RSSはMeHgの不活性化に関与する因子と考えられた。東北大赤池教授らとの共同研究により、cystathionine γ -lyase (CSE) がシステインを基質とした時に産生されるCysSHパースルフィド (CysSSH、生体内RSSの一つ) とGSHとの反応でGSSHが産生されることを示唆した。昨年度は、RSS主要産生酵素であるCSEの欠損マウスを用いて、RSSがMeHg中毒症状を抑制する重要な分子の一つであることを実証した。

本研究課題は、MeHg曝露量とそれに起因する毒性発現に対する新しい知見を提供すること、および新たなMeHgに対する健康リスク軽減策を提言することを目指している。本年度は、生体内RSS量とMeHg感受性との相関関係を解明すること、およびCSE高発現マウスおよびRSS含有植物成分サプリメントを利用して、MeHg毒性に対しRSSが“新たなリスク軽減因子”であることを実証することを目的とした。

II 研究方法

マウスおよび初代肝細胞：16–20週齢の雌のC57BL/6Jマウスを用いた。RSS産生酵素であるCSEのMeHg曝露における関与を検討するために、C57BL/6JのCSE欠損マウスおよびCAGプロモーターの下流でCSEを高発現するCSEトランスジェニックマウス (CSE高発現マウス) を用いて、野生型マウスと比較した。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ひとつである運動機能障害をローターロッドテスト

によって評価した。野生型およびCSE高発現マウスから初代肝細胞を採取した。なお、CSEの高発現の程度は、当研究室で作製した抗CSE抗体を用いたウエスタンブロット法により評価した。

CysSH、GSHおよびRSSの定量： LC/MSによる安定同位体希釈法を用い、野生型およびCSE欠損マウスの臓器および初代肝細胞中CysSH、GSHおよびRSS（CysSSH、GSSHおよびHSSH）を定量した。さらに、同法によりMeHg曝露による生体内RSS量の変化を測定した。

MeHgによる毒性の評価および水銀蓄積量の測定：昨年度、さらにに詳細な病理学的検討が望まれたため、神経系組織の病理学的所見としてGFAP染色による解析を行った。神経損傷時に、アストロサイトはGFAP強陽性となり、突起の形状も変化した反応性アストロサイトとなることが知られる。そのため、GFAP染色はGFAP発現の増強が特徴の一つである反応性アストロサイトの検出に用いた。また、各臓器での水銀蓄積量は、原子吸光分析法にて測定した。RSSによる防御機構がMeHg特異的であるか否かを検討するために、環境中親電子物質であるカドミウムとアクリルアミドをCSE欠損マウスおよび野生型マウスに投与し、MeHg曝露マウスと比較した。カドミウムによる毒性の指標として肝障害を用い、肝障害は血漿中aspartate transaminaseとalanine transaminase量の変化をもとに評価した。アクリルアミドによる毒性は体重や生存率の低下に加え、アクリルアミド毒性が引き起こす障害の1つである運動神経障害を指標とした。運動神経障害は下肢伸展反射異常の有無によって評価した。

ニンニクのヘキサン抽出の調整および投与： ジューサーミキサーを用いて、*Allium sativum*（ニンニク）のジュースのみを搾取し、その二倍容量のヘキサンと混和して二時間攪拌した。そのヘキサン層のみを分取し、乾固させたものをヘキサン抽出物とした。コーンオイルに溶解した本抽出物（50 mg/mL）をマウスに胃ゾンデを用いて投与した。

（構成:研究・調査・実験・解析に関する手法の記述および資料・材料の集め方について、実施経過が分かるように具体的に記載する。）

（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

野生型およびCSE欠損マウスの肝臓、腎臓、小脳および血漿中のRSS量を測定した結果、CSE欠損マウスの腎臓中CysSSH、GSSHおよび肝臓中CysSH、GSH、CysSSH、GSSH量が野生型より有意に低かった。しかし、小脳と血漿中では、野生型とCSE欠損マウス間でのRSS量に殆ど差は見られなかった。MeHg曝露（5 mg/kg/day、10日間経口投与）により、

野生型およびCSE欠損マウス両方の肝臓および腎臓中のGSHとGSSH量が、小脳においてはCysSSH量がそれぞれ減少した。しかしながら、MeHg曝露により野生型マウスでは肝臓および腎臓中のCysSHおよびCysSSHが逆に増加した。一方、CSE欠損マウスでは肝臓中のCysSSHを除いては野生型と比べて有意な増加は認められなかった。また、両マウスにおけるMeHgによる毒性を比較したところ、昨年度は野生型マウスにおいて中毒症状が見られない濃度のMeHg（5 mg/kg/day、12日間経口投与）にCSE欠損マウスを曝露すると、運動失調や振戦といった中毒症状を呈することを報告した。本年度は、更に詳細な病理学的検討を行った結果、野生型マウスと比べて、CSE欠損マウスの小脳ではMeHg曝露による水銀蓄積量が野生型と比べて有意に増加し、反応性アストロサイトの増加が引き起こされることを明らかにした。CSE欠損マウスにおけるMeHg蓄積量の増加は脳でも認められ、逆に腎臓では有意な減少が見られた。また、肝臓や腎臓ではMeHgによる傷害は観察されなかった。

CSE欠損による感受性の増強がMeHg以外の環境中親電子物質でも観察されるか否かを検討するため、カドミウム（4 mg/kg/day、1日間腹腔内投与）を野生型およびCSE欠損マウスに曝露した。その結果、CSE欠損マウスは野生型マウスに比べ、血漿中aspartate transaminaseおよびalanine transaminase量の有意な上昇を示した。また、アクリルアミド（50 mg/kg/day、12日間経口投与）を野生型およびCSE欠損マウスに曝露した結果、曝露後5日以降からCSE欠損マウスにおいて、体重減少および運動神経障害の指標である下肢伸展の反射異常が観察された。その後、CSE欠損マウスの生存率は低下し、最終的に殆どのマウスが死亡した。一方、野生型マウスは投与期間中に体重減少、下肢伸展の反射異常および生存率の低下は観察されなかった。

次に、MeHg毒性に対してRSSが保護効果を有するか否かを検討した。我々の初期検討より、ニンニク中にRSSを含有する低分子の存在が示唆されたことから、ニンニクのヘキササン抽出物をRSS含有植物成分サプリメントとして用いた。ニンニクのヘキササン抽出物投与によるRSS補完効果を検証するために、ニンニクのヘキササン抽出物をマウスへ経口投与したところ、血漿中RSS量は有意に増加した。本抽出物とMeHgを混合投与した結果、MeHg単体投与で見られた体重の減少や生存率の低下が有意に改善された。

さらに、内因性のRSSによる保護効果を検討するために、CSE高発現マウスを作製した。作製したCSE高発現マウスは各臓器でのCSEタンパク質量が、野生型マウスに比べ少なくとも2倍以上高かった。本条件下において、生体内のRSS量を測定した結果、予想に反して、臓器中のRSS量は野生型と比べて殆ど変化は見られず、急性中毒のMeHg曝露条件（7.5 mg/kg/day、10日間経口投与）における運動障害の程度をローターロード法にて試験した結果も、野生型と同程度の成績を示した。次に、CSEが高発現しているにもかかわらず、臓器中でRSS量が増加しない理由を明らかにするために、初代肝細胞を用いてCSE高発現マウスにおけるRSSの細胞内外の挙動を解析した。その結果、CSE高発現マウス初代肝細胞の細胞内RSS量は野生型と比べ大差ないものの、細胞外（培地中）でのRSS量が顕著に増加していることを見出した。また、当初予想されたRSS量の増加に伴う還元ストレスも、CSE高発現マウス初代肝細胞では観察されなかった。このことから、生体でも余剰のRSSが臓器（細胞）外へ放出されていると考え、臓器外である血漿中のRSS量を測定した。その結果、野生型と比べCSE高発現マウスで有意なRSS量の増加が認められた。

IV 考察

本年度の研究により、CSEは小脳におけるMeHg毒性の発現を制御すること、MeHg曝露

に対しては細胞外RSSよりも細胞内RSSが重要な役割を有すること、およびRSS含有植物成分とMeHgとの同時曝露ではMeHgの毒性を有意に予防できることが明らかとなった。

先行研究において、MeHg曝露野生型マウス（肝臓、腎臓および脳）で検出された(MeHg)₂SはCSEの欠損マウスでは殆ど検出されなかったことから、個体レベルでの(MeHg)₂S生成にCSEが重要な役割を演じていることを見出した¹。CSEは低い基質特異性を有する酵素として知られ、シスタチオンを基質とするとCysSHを産生する。CysSHはGSH合成の律速アミノ酸であることから、CSE欠損マウスではCysSH量の減少に起因するGSHレベルの低下が認められる⁵。一方、我々はCSEがシスチンを基質とするとCysSSHを産生することを世界に先駆けて報告した^{3,4}。また、CSEの発現レベルは肝臓および腎臓では高いが、脳では低いことが報告されている⁷。RSS産生酵素として、CSEの他にcystathionine β-synthaseや3-mercaptopyruvate sulfurtransferaseが知られており、中枢神経系に豊富であることが報告されている⁸⁻¹⁰。これらのことから、野生型マウスと比較してCSE欠損マウスでは肝臓および腎臓におけるRSS量は低値を示し、脳内のRSS量の大幅な変動はみられないことが推測された。この仮説と一致して、本年度の研究において我々は、CSE欠損が肝臓および腎臓におけるRSS量を低下させるのに対して、小脳におけるRSS量は有為な低下は認めなかった。

イオウ含有求核低分子（CysSH、GSHおよびRSS等）は、親電子物質であるMeHgと容易に共有結合してMeHg-SG付加体や(MeHg)₂Sのようなイオウ付加体を形成するために、結果的に臓器中の当該物質の消費が予想された。このことを証明するために、毒性を示さない濃度のMeHg（5 mg/kg/day）を10日間経口投与したマウスの臓器中イオウ含有低分子の挙動を検討した。その結果、MeHg曝露により肝臓中GSSH、腎臓中GSH/GSSHおよび小脳中CysSSH量は減少した。しかし一方で、MeHg曝露は、肝臓および腎臓中のCysSHおよびCysSSH量を増加させることが明らかとなった。我々はこれまでに、MeHgがシスチンのトランスポーターであるxCTを調節する転写因子Nrf2を正に制御することを見出している^{11,12}。このことから、肝臓および腎臓でみられたCysSH/CysSSH量の上昇はxCTを介したシスチンの取り込み促進に起因している可能性が高い。

MeHg-SG付加体はMeHgの細胞外への排泄だけでなく、臓器間のMeHg輸送にも関与することが知られている。永沼らはマウスにおける肝臓中GSHの枯渇が、MeHg曝露後の腎臓への水銀蓄積を減少させる一方で、MeHg-SG付加体を投与したマウスの臓器中水銀蓄積は、MeHgを投与したマウスよりも腎臓で高く、脳では逆に低くなることを報告している¹⁴。この結果と一致して、本研究でも肝臓中GSH量が低下したCSE欠損マウスにおける水銀蓄積は、野生型マウスと比較して腎臓では低く、大脳および小脳では逆に高かった。以上より、CSE欠損によって引き起こされる臓器への水銀蓄積量の変化は、少なくとも一部が肝臓中GSH量の低下に起因するものと示唆された。また、野生型と比してCSE欠損マウスにおける脳中水銀の蓄積量が高かったことから、CSE欠損マウスの小脳はMeHgに対する影響を受けやすいことが予想された。MeHgによる小脳への影響の指標としてGFAP染色で調べた結果、野生型と比較してCSE欠損マウスの小脳では有意な反応性アストロサイトの増加が観察された。このことは、CSEがMeHg曝露による小脳への影響を制御していることを示唆している。MeHg曝露による運動機能障害は、部分的に小脳機能の障害から生じると報告されていることから¹³、MeHg曝露で認められたCSE欠損マウスにおける運動機能障害は、少なくとも一部はMeHgの小脳蓄積増加に起因する本臓器の機能障害に関連していると考えられた。しかしながら、MeHgが末梢神経への傷害を介して、本研究で観察された運動機能障害を引き起こしている可能性も否定できないために、現在未

梢神経に対する病理解析を進行中である。ところで、CSE欠損マウスはMeHgだけではなく、環境中親電子物質のひとつであるカドミウムやアクリルアミドに対しても同様に高感受性を示した。したがって、CSEはMeHg特異的ではなく、環境中親電子物質に共通したリスク軽減因子の可能性が示唆された。

予備検討において、ニンニクのヘキササン抽出物をMeHgと反応させると $(\text{MeHg})_2\text{S}$ が生成することから、当該抽出物中にはRSSを含有する低分子成分が存在することが明らかとなった。本研究において、マウスへのニンニクのヘキササン抽出物の経口投与は、CSE高発現マウス同様に血漿中のRSS量を増加させたことから、外因性RSSの経口摂取が内因性RSS量を増やすことが実証された。このことは、ニンニクのヘキササン抽出物の可動性イオウ原子は、生体内のCysSH、GSHおよびそれぞれの酸化体に付加してCysSSHやGSSHのようなRSSを生成することを示唆している。マウスにニンニクのヘキササン抽出物とMeHgを混合投与すると、MeHg単体投与に比べ体重の減少や生存率の低下が改善させた。つまり、ニンニク由来のRSSがMeHgと反応して $(\text{MeHg})_2\text{S}$ を生成することで、MeHgの毒性を中和することが考えられる。今後、MeHg曝露により低下したRSSを補完できるか否か、およびCSE欠損マウスのようなMeHg高感受性群における当該抽出液の有用性について検討を進める予定である。

興味深いことに、RSSを含むイオウ含有低分子の量を制御するCSEを高発現したマウスの初代肝細胞は、野生型のそれに比べて細胞内で産生した余剰のRSSを細胞外へと放出する結果を得た。CSE高発現マウスにおいても同様に、臓器中でのRSS量は野生型マウスと比べて同レベルであったにもかかわらず、臓器外である血漿中では顕著なRSS量の増加が観察された。RSSは、その高い求核性・抗酸化性から細胞内に高濃度蓄積するとレドックスバランスが還元よりに傾き、毒性を示す可能性がある。そのため、生体（細胞）は余剰なRSSによる細胞内の還元ストレスを回避するために、細胞外へと積極的に放出するシステムを有していることが考えられる。放出されたRSSは、血中に侵入したMeHgなどの親電子物質を解毒・不活性化していることが予想されるが、急性中毒のMeHg曝露条件において、CSE高発現による臓器外でのRSS量の増加は野生型と比べ感受性の低下を示さなかったことから、MeHgの感受性は主に細胞（臓器）外でのRSSよりも細胞（臓器）内のRSS量に依存することが示唆された。

本成果は、従来から知られていGSHだけではなく、RSSを含むイオウ含有低分子のMeHg毒性における重要性、およびRSS含有植物成分摂取によるMeHgリスク軽減の可能性を示すものである。本年度の研究を通じて、MeHgリスク軽減に対する有益な知見を提供出来たと評価する。

V 結論

本年度の研究結果は、CSEによるCysSH、GSHおよびそれぞれのRSSの産生が、 $(\text{MeHg})_2\text{S}$ やMeHg-SGの解毒代謝物形成を介して保護的役割を果たすことを示した。このことは、CysSH代謝が生体内のRSSを含む求核低分子量の維持に重要な役割を有し、その破綻による生体内求核低分子量の低下がMeHg曝露に対するリスクを高めることを示唆している。それを裏付けるように、RSS含有植物成分はMeHg毒性を減少させると共に生体内のRSS量を増加させることが示された。しかし、CSE高発現マウスの実験より、細胞内で過剰に産生されたRSSは積極的に細胞（臓器）外へと放出するシステムが存在することも示唆された。

本年度得られた知見はRSSによるMeHgの捕獲・不活性化（フェーズゼロ反応）を介し

た防御機構の解明や、RSS含有植物成分サプリメントの開発に大きく寄与するものであり、今後の研究推進により、MeHg曝露量とそれに起因する毒性発現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できるものと結論付ける。

VI 次年度以降の計画

本年度はCSEが生体において、GSHによるMeHg-SGおよびRSSによる(MeHg)₂S形成の両方に重要な役割を持つ可能性が示された。そのため、来年度はMeHgに対するCSEの役割をより明確に評価するため、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Nrf2¹⁵の欠損マウスとCSE高発現マウスを掛けあわせたNrf2欠損/CSE高発現マウスおよびCSE/Nrf2両欠損マウスを用いて検討を行う。

また、本年度の研究結果より、ニンニクのヘキササン抽出物中にRSS成分の存在が示され、ヘキササン抽出物がMeHg毒性を減少させると共に、生体内のRSS量を増加させることを明らかにした。次年度は、ニンニクのヘキササン抽出物中のRSS成分の化学構造をGC/MSおよびNMRを用いて同定し、その有効性を実証する。

さらに、当初計画では想定されていなかった、細胞（臓器）内のRSS量を制御する輸送システムの存在が、CSE Tgマウスを用いた本年度の研究により示唆された。生体内RSS量がMeHgの毒性発現において重要な制御因子の一つであることから、RSS輸送システムはMeHg毒性発現において重要な役割を持つと予想された。そこで、次年度の研究計画に、MeHg毒性におけるRSS輸送システムの役割の解明を新たに加える。研究方法として、ノックダウン及び強制発現系を用いたスクリーニング法によりRSSの排出トランスポーターを同定する。同定後は、ウイルスベクターを用いて、マウス臓器においてトランスポーターをノックダウン及び強制発現させ、トランスポーター量の増減による臓器中RSS量とMeHg毒性に対する感受性の変化を検討する。

本研究に関する現在までの研究状況、業績

- 1) Unoki T, Abiko Y, Toyama T et al. Methylmercury, an environmental electrophile capable of activation and disruption of the Akt/CREB/Bcl-2 signal transduction pathway in SH-SY5Y cells. *Scientific Reports*. 2016; 6: 28944, doi: 10.1038/srep28944.
- 2) Millikin R, Bianco CL, White C et al. The chemical biology of protein hydropersulfides: Studies of a possible protective function of biological hydropersulfide generation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2016; 97: 136-147.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Ishii I, Kamata S, Hagiya Y, Abiko Y et al. Protective effects of hydrogen sulfide anions against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 837-841.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
 - 9) Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
 - 10) Abiko Y, Luong CN, Kumagai Y. A biotin-PEAC₅-maleimide labeling assay to detect electrophiles. *J Toxicol Sci* 2015; 40: 405-411.
 - 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) Hagiya Y, Kamata S, Mitsuoka S et al. Hemizygosity of transsulfuration genes confers increased vulnerability against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 282: 195-206.
 - 14) 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.
 - 15) 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. *YAKUGAKU ZASSHI* 2014; 134: 1239-1243.
 - 16) Ono K, Akaike T, Sawa T et al. The redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides and derived species: Implication to their possible biological activity and utility. *Free Radic Biol Med* 2014; 77: 82-94.
 - 17) 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.
 - 18) 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.
 - 19) Kanda H, Shinkai Y, Kumagai Y. S-Mercuration of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J Toxicol Sci* 2014; 39: 687-700.
 - 20) 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.
 - 21) 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.
 - 22) 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.
 - 23) Toyama T, Shinkai Y, Kaji T et al. A convenient method to assess chemical modification of protein thiols by electrophilic metals. *J Toxicol Sci* 2013; 38: 477-484.
 - 24) 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.

- 25) 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: 1693-1702.
- 26) Nishida M, Sawa T, Kitajima N et al. Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 714–724.
- 27) Shinkai Y, Iwamoto N, Miura T, Ishii T et al. 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.
- 28) Yamada H, Akahoshi N, Kamata S et al. Methionine excess in diet induces acute lethal hepatitis in mice lacking cystathionine γ -lyase, an animal model of cystathioninuria. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 1716-1726.
- 29) Yoshida E, Toyama T, Shinkai Y et al. Detoxification of methylmercury by hydrogen sulfide producing enzyme in mammalian cells. *Chem Res Toxicol* 2011; 24: 1633-1635.
- 30) 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) Steegborn C, Clausen T, Sondermann P et al. Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase - toward the rational control of transsulfuration. *J Biol Chem* 1999; 274:12675–12684.
- 5) McBean GJ. The transsulfuration pathway: A source of cysteine for glutathione in astrocytes. *Amino Acids* 2012; 42: 199–205.
- 6) 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.
- 7) Ishii I, Akahoshi N, Yu XN et al. Murine cystathionine gamma-lyase: Complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 2004; 381: 113–123.
- 8) Guo W, Kan JT, Cheng ZY et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 878052, doi: 10.1155/2012/878052.
- 9) Martin GR, McKnight GW, Dickey MS et al. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Digest Liver Dis* 2010; 42: 103–109.
- 10) Zhao H, Chan SJ, Ng YK et al. Brain 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3mst): Cellular localization and downregulation after acute stroke. *Plos One* 2013; 8: e67322, doi: 10.1371/journal.pone.0067322.

- 11) Ishii T, Mann GE. Redox status in mammalian cells and stem cells during culture in vitro: Critical roles of nrf2 and cystine transporter activity in the maintenance of redox balance. *Redox Biol* 2014; 2: 786–794.
- 12) Kumagai Y, Kanda H, Shinkai Y, Toyama T. The role of the keap1/nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 848279, doi: 10.1155/2013/848279
- 13) Franco JL, Teixeira A, Meotti FC et al. Cerebellar thiol status and motor deficit after lactational exposure to methylmercury. *Environ Res* 2006; 102: 22–28.
- 14) Naganuma A, Odaurano N, Tanaka T et al. Possible role of hepatic glutathione in transport of methylmercury into mouse kidney. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 291–296.
- 15) 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 Akiyama¹, Yumi Abiko¹, Yoshito Kumagai¹

**1 Faculty of Medicine, University of Tsukuba*

Keywords: Reactive sulfur species; Bismethylmercury sulfide; Cystathionine γ -lyase

Abstract

Methylmercury (MeHg) is an environmental electrophile that readily modifies protein thiols, causing toxicity. MeHg is inactivated by sulfur nucleophiles such as cysteine (CysSH), glutathione (GSH) and its related reactive persulfides through the formation of GSH adduct (MeHg-SG) and bismethylmercury sulfide ((MeHg)₂S), respectively. Cystathionine γ -lyase (CSE) catalyzes production of CysSH and its persulfides (CysSSH). Previously, we reported that CSE was required for *in vivo* formation of (MeHg)₂S, suggesting that CSE is a key protein for protection against MeHg toxicity. In the present study, we investigated the role of CSE in MeHg toxicity *in vivo*. Wild-type and CSE knockout mice were orally administered with MeHg. Loss of coordinated movement, body weights, survival rates and pathological changes in the brain were monitored to assess sensitivity to MeHg. Levels of mercury and sulfur nucleophiles in the organs were measured with an atomic absorption mercury detector and a mass spectrometer, respectively. CSE knockout mice were more sensitive to MeHg than wild-type mice and, concomitantly, had higher mercury accumulation in the brain. Levels of CysSH, GSH, and their persulfide derivatives were lower in the liver and kidney of CSE knockout mice than in those of wild-type mice. MeHg administration altered the levels of sulfur nucleophiles, including reactive persulfides, in the liver, kidney and cerebellum. These observations suggest that CSE deletion in mice caused decreased levels of sulfur nucleophiles due to the disruption of CysSH metabolism, resulting in increased sensitivity to MeHg. We demonstrated for the first time that CSE is essential for protection against MeHg toxicity *in vivo*.

V メチル水銀によるオンコスタチン **M** の細胞外排出促進を介した
細胞増殖抑制機構

メチル水銀によるオンコスタチン M の細胞外排出促進を介した 細胞増殖抑制機構

主任研究者 黄 基旭（東北大学大学院薬学研究科准教授）

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転写因子として tmRT1 (別名 HOXB13) を見出し、さらに、tmRT1 を介してメチル水銀によって発現誘導され、かつ、メチル水銀毒性増強に関わる遺伝子産物としてオンコスタチン M (OSM) を同定した。また、メチル水銀によって発現誘導された OSM は細胞外に放出されて細胞膜上の TNF 受容体の一種である TNF receptor 3 (TNFR3) に結合し、この結合がメチル水銀によって促進されることによってメチル水銀毒性が増強されるという可能性が示唆されている。そこで本年度は、細胞外に放出された OSM と TNFR3 との結合様式およびメチル水銀による OSM 発現誘導に関わる分子機構について検討した。まず、TNFR3-V5 発現プラスミドを導入した細胞を用いた免疫染色を行ったところ、メチル水銀は培地中に添加したリコンビナント OSM と細胞膜上の TNFR3 との結合を促進させることが確認された。メチル水銀は蛋白質のシステイン残基に直接結合することが知られている。そこで、SH 基修飾剤であるヨードアセトアミドおよび N-エチルマレイミドで処理したところ、メチル水銀と同様にリコンビナント OSM とリコンビナント TNFR3-V5 との結合が増加した。OSM の構造の中で遊離型として存在する 105 番システインをセリンに置換した OSM 変異体はメチル水銀非存在下での TNFR3-V5 との結合レベルが野生型 OSM に比べて著しく高かった。このことから、OSM の 105 番システイン残基が遊離型として存在することが OSM と TNFR3 との結合を抑制している可能性が考えられる。また、105 番システイン置換 OSM 変異体をメチル水銀非存在下で培地中へ添加することによって細胞増殖が抑制されたが、この作用は TNFR3 発現抑制細胞ではほとんど認められなかった。野生型 OSM の添加は細胞の増殖にほとんど影響を与えなかったことから、105 番システイン残基が修飾された OSM は TNFR3 との結合能の増加を介して細胞増殖抑制作用を示している可能性が考えられる。レポーターアッセイ法により、OSM 遺伝子プロモーターの中でメチル水銀による OSM 発現誘導に関わる領域を検討したところ、OSM 遺伝子の転写開始点から上流-300~-250 および-100~-50 領域がメチル水銀による OSM の発現誘導において重要であることが明らかになった。また、特定された OSM 遺伝子プロモーター領域の中に OSM 発現誘導に関わる既知の転写因子が結合するコンセンサス配列が存在しなかったことから、メチル水銀による OSM の発現誘導にはこれまで知られていない新しい分子機構が関与している可能性が考えられる。

キーワード：メチル水銀、感受性決定遺伝子、tmRT1、オンコスタチン M (OSM)、TNFR3

研究協力者

永沼 章（東北大学大学院薬学研究科教授）

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。我々はヒト由来培養細胞を用いた網羅的遺伝子スクリーニングによって、細胞のメチル水銀感受性に影響を与える転写因子として tmRT1 (別名 HOXB13) を同定した。tmRT1 の遺伝子をノックダウンさせた細胞はメチル水銀に対して高い耐性を示すことから、tmRT1 は細胞のメチル水銀感受性を増強させる蛋白質と考えられる。また、tmRT1 を介してメチル水銀によって発現誘導され、かつ、メチル水銀毒性増強に関わる遺伝子産物としてオスモスタチン M (OSM) が同定された。

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すサイトカインであることが知られている。我々はこれまでの検討により、メチル水銀が tmRT1 を介して OSM の発現を誘導し、細胞外に放出される OSM の量を顕著に上昇させることを明らかにした。また、細胞外に放出された OSM は細胞膜上に存在する TNF receptor 3 (TNFR3) に結合することによってメチル水銀毒性を増強していることも判明している。

そこで本年度は、細胞外に放出された OSM と TNFR3 との結合様式およびメチル水銀による OSM 発現誘導に関わる分子機構について検討した。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. 免疫染色

5×10^5 cells/well の HEK293 細胞を 6 well plate の底に乗せた cover glass に巻き、24 時間培養した後、Lipofectamine 2000 transfection reagent を用いて、1000 ng の TNFR3-V5 (pEF5) plasmid を導入した。5 時間培養した後、新しい DMEM 培地に交換した。更に 19 時間培養した後に、500 ng のリコンビナント OSM と 20 μ M の塩化メチル水銀を添加し、1 時間培養した後、培地を除き、1 ml の 1×TBS で二回 wash した。その後、0.5 ml の 4% paraformaldehyde を添加し、20 分間培養した。4% paraformaldehyde を除き、1 ml の 1×TBS で三回 wash した後、cover glass を取り出し、0.5 ml の 1% BSA-TBS を加え、30 分間培養した。その後、BSA を除き、200 μ l 50 倍希釈したの TNFR3 抗体を cover glass の上に乗せて 30 分間反応させた。一次抗体を回収し、1 ml の 1×TBS で三回 wash した。次に、100 μ l 200 倍希釈したの FITC 二次抗体を cover glass の上に乗せて 30 分間反応させた。その後、DAPI 入りの封入剤 (Vectashield with DAPI) を用いて cover glass を封入した。次に、共焦点レーザ顕微鏡 (FV1000) を用いて、80 倍レンズで観察した。(DAPI: EX 358 nm EM 461 nm、FITC: ex 492 nm EM 520 nm)

2. 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×g、10 分間遠心して集菌し、1% triton X-100 を含む 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×g、15 分間遠心し、得られた上清を glutathione sepharose 1 ml 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。

3. 実験管内での TNFR3-V5 と OSM との結合

2 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) を混合した後に 0 ~ 0.1 μ 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 μ 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 μ 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。

4. レポーターアッセイ

5 X 10⁵ cells /well の HEK293 細胞を 6 well plate に巻き 24 時間培養した後に、Lipofectamine 2000 transfection reagent を用いて 500 ng tmRT1-V5 plasmid, 50 ng pRL-TK plasmid, 1000 ng OSM promoter reporter plasmid を導入した。その後、5 時間培養した後に新しい DMEM 培地に交換して更に 19 時間培養した。培養した細胞に 20 μ M の塩化メチル水銀を添加し、6 時間培養した後、培地を除き、1 ml の 1×PBS で一回 wash した。その後、Dual-Luciferase Reporter System (Promega 社製) を用いて luciferase 活性を測定した。

(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) OSM と TNFR3 との結合様式

上述したように、メチル水銀によって発現誘導された OSM は細胞外に放出され、細胞膜上に存在する TNFR3 に結合することによってメチル水銀毒性増強に関与している可能性が考えられる。また、試験管内反応実験によって、メチル水銀が OSM と TNFR3 との結合を促進させることも判明している。そこでまず、TNFR3-V5 発現プラスミドを導入した細胞の V5 抗体を用いた免疫染色により、細胞膜上での TNFR3 と OSM との結合にメチル水銀が与える影響を検討した。その結果、リコンビナント OSM を培地へ添加した後に免疫染色を行ったところ、細胞膜上に検出される TNFR3-V5 のレベルが僅かに減少したのに対し、リコンビナント OSM とメチル水銀を同時に添加した場合は細胞膜上の TNFR3-V5 レベルが著しく減少した。これは、OSM が細胞膜上の TNFR3-V5 と結合することによって V5 抗体が抗原を認識できなくなり、その結果として細胞膜上に検出される TNFR3-V5 のレベルが減少したものと推測される。なお、メチル水銀単独処理は細胞膜上の TNFR3-V5 レベルにほとんど影響を与えなかった。以上の結果から、細胞においても、試験管内実験の結果と同様に、細胞膜上に存在する TNFR3 に OSM が結合し、その結合はメチル水銀によって促進されると考えられる。

メチル水銀は蛋白質のシステイン残基に直接結合することが知られており、OSM の構造中には 5 つのシステイン残基が存在する。これらのシステイン残基の中で、31 番システインは 152 番システインと、74 番システインは 192 番システインとそれぞれジスルフィド結合を形成しており、これらの結合が OSM の構造や活性の維持に必須である。そこで、OSM の 31 番と 74 番のシステインに加えて、遊離型として存在する 105 番システインをセリンに置換した OSM 変異体を作成してプルダウンアッセイにより TNFR3-V5 との結合を調べた。その結果、31 番または 74 番システインをセリンに置換した OSM 変異体はメチル水銀の有無に関わらず TNFR3-V5 とほとんど結合しなかった。このことは、OSM 構造中の 2 箇所のジスルフィド結合が共に TNFR3 との結合に必須であることを示唆している。一方、105 番のシステインをセリンに置換した OSM 変異体はメチル水銀非存在下での TNFR3-V5 との結合レベルが野生型 OSM に比べて著しく高かった。このことから、OSM の 105 番システインが遊離型として存在することが OSM と TNFR3 との結合を抑制している可能性が考えられる。しかし、この 105 番システイン変異 OSM と TNFR3-V5 との結合は 25 nM のメチル水銀添加によってほとんど認められなくなった。105 番システインをアラニンまたはメチオニンに置換した OSM 変異体も作成したが、いずれの OSM 変異体もセリンへ置換した OSM 変異体と同様にメチル水銀非存在時には TNFR3 との顕著な結合が認められ、メチル水銀添加によってその濃度依存的に結合レベルは低下した。また、SH 基修飾剤であるヨードアセトアミドまたは N-エチルマレイミドの処理によっても、メチル水銀と同様にそれぞれの添加濃度に依存して OSM と TNFR3-V5 との結合レベルが増加した。なお、105 番システインをメチオニンに置換した OSM 変異体と TNFR3-V5 との結合も、メチル水銀処理と同様に、両修飾剤によって顕著に抑制された。これらの結果から、メチル水銀は OSM の 105 番システイン残基および/または TNFR3 中の何れかのシステイン残基に結合することによって OSM と TNFR3 との結合を増加させ、OSM の 105 番システインを非 SH アミノ酸に置換した場合には TNFR3 中のシステイン残基とメチル水銀が結合することによって OSM と TNFR3 の結合が抑制される可能性が考えられる。

上記の検討により、野生型 OSM に比べて 105 番システイン置換 OSM 変異体の TNFR3 との結合能がはるかに高いことが明らかになった。そこで、105 番システイン残基置換 OSM 変異体の培地への添加が HEK293 細胞の増殖に与える影響を検討した。その結果、メチル水銀非存在下で野生型 OSM を培地に添加しても細胞増殖にはほとんど影響が認められなかったのに対して、105 番システイン残基置換 OSM 変異体の 3 種をそれぞれ培地に添加することによって細胞の増殖が約 40%程度抑制された。また、これらの OSM 変異体による細胞増殖抑制作用は TNFR3 発現抑制細胞ではほとんど認められなかった。これらのことから、105 番システイン残基が修飾された OSM は TNFR3 との結合能の増加を介して細胞増殖抑制作用を示している可能性が考えられる。

(2) メチル水銀による OSM 発現誘導に関わる分子機構

これまでの検討により、メチル水銀は tmRT1 を介して OSM の発現を誘導することが判明しており、メチル水銀によって OSM 遺伝子プロモーター領域への tmRT1 のリクルートが促進されることが示されている。以前我々は、tmRT1 がメチル水銀によって TNF α プロモーター領域にリクルートされることによってその発現誘導に関与すること、さらに、NF- κ B も転写因子としてメチル水銀による TNF α の発現誘導に関与していることを明らかにしている。しかし、NF- κ B 構成因子である p65 をノックダウンさせてもメチル水銀による OSM の発現誘導はほとんど影響を

受けなかったことから、メチル水銀による TNF α または OSM の発現誘導に関わる分子機構は異なると予想される。そこでまず、OSM 遺伝子上流約 2,200 bps 領域（プロモーター領域）にルシフェラーゼ遺伝子を融合させたレポータープラスミドを導入した細胞を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行うことにより OSM 遺伝子のプロモーターの中でメチル水銀による OSM 発現誘導に関わる領域の特定を試みた。その結果、OSM 遺伝子の転写開始点から上流-300~-250 および-100~-50 領域がメチル水銀による OSM の発現誘導において重要であることが明らかになった。これまでに、OSM の発現誘導に関わる主な転写因子として CREB、c-JUN および STAT5 などが報告されている。しかし、これらの転写因子が結合するコンセンサス配列はメチル水銀による OSM の発現誘導に必要とされるプロモーター領域中には存在しなかった。このことは、メチル水銀による OSM の発現誘導に、これまでに知られていない全く新しい分子機構が関与していることを示している。

IV 結 論

メチル水銀は OSM の発現を誘導し、細胞外に放出された OSM はメチル水銀によって 105 番のシステイン残基が修飾され TNFR3 との結合が促進されることによって細胞の増殖を抑制することが示唆された。また、メチル水銀による OSM の発現誘導にこれまで知られていない全く新しい分子機構が関与していることが判明した。

V 次年度以降の計画

OSM はメチル水銀によって 105 番のシステイン残基が修飾されることによって TNFR3 との結合が促進されることが示唆された。これまでに、メチル水銀によって修飾されたサイトカインが本来とは異なる受容体に結合して細胞増殖を抑制するという例はなく、全く新しいメチル水銀毒性増強機構の存在が考えられる。一方、TNFR3 の細胞外ドメイン中にもシステイン残基が存在し、これらが OSM との結合に関わる可能性がある。そこで、TNFR3 変異体を作成して OSM との結合における TNFR3 中のシステイン残基の関与について検討する。また、メチル水銀による OSM の発現誘導に関わる OSM 遺伝子プロモーター領域への tmRT1 の結合とそれに対するメチル水銀の影響を検討する。また、メチル水銀による tmRT1 の活性化に関わる分子機構を解明するために、tmRT1 結合蛋白質を検索・同定しその蛋白質が OSM 遺伝子プロモーター領域への tmRT1 の結合に与える影響とそれに対するメチル水銀の作用を検討する。

この研究に関する現在までの研究業績

- 1) Kim MS Takahashi T Lee JY Miura N Asanuma M Hwang GW Naganuma A. Identification of transcription factors activated by methylmercury in mouse brain, *Fundam Toxicol Sci* 2017; 4: 34-37.
- 2) Iwai-Shimada M Takahashi T Kim MS Fujimura M Ito H Toyama T Naganuma A Hwang GW. Methylmercury induces the expression of TNF- α selectively in the brain of mice, *Sci Rep* 2016; 6: 38294.
- 3) Hwang GW Fukumitsu T Ogiwara Y Takahashi T Miura N Kuge S Naganuma A. Whi2 enhances methylmercury toxicity in yeast via inhibition of Akr1 palmitoyltransferase activity, *Biochim Biophys Acta* 2016; 1860: 1326-133.

- 4) Lee JY Ishida Y Takahashia T Naganuma A Hwang GW. Transport of pyruvate into mitochondria is involved in methylmercury toxicity, *Sci Rep* 2016; 6:21518.
- 5) Ogiwara Y Miura N Kuge S Naganuma A Hwang G.W. Overexpression of palmitoyl transferase HIP14 confers resistance to methylmercury in SH-SY5Y human neuroblastoma cells, *Fundam Toxicol Sci* 2016; 3:75-77.
- 6) Toyama T Hwang GW Naganuma A. Citrulline enhances methylmercury toxicity in HEK293 and C17.2 cells, *Fundam Toxicol Sci* 2015; 2: 229-231.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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, *Sci Rep* 2014; 4: 5888.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 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.

- 19) 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.
- 20) 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.
- 21) 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.

Mechanism of inhibition of cell proliferation via promotion of extracellular excretion of oncostatin M by methylmercury

Gi-Wook Hwang, Tsutomu Takahashi and Akira Naganuma

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

Keywords: Methylmercury; Oncostatin M; Cell proliferation

Abstract

We have found that tmRT1, a transcription factor, is involved in the enhancement of methylmercury toxicity, and the induction of OSM (oncostatin M; interleukin 6 group of cytokines) expression by methylmercury was dependent upon tmRT1. It has been suggested that OSM induced by methylmercury and released into the outside of the cell may inhibit cell proliferation through binding to TNFR3 receptor present on the cell membrane. In the present study, we examined the binding model between OSM and TNFR3, and found that methylmercury increased the level of binding between both proteins *in vitro*. Methylmercury can directly bind proteins via available cysteine residues, and OSM has one free cysteine residue (Cys105). Site-directed mutation of Cys105 of OSM increased the binding level with TNFR3 in the absence of methylmercury, and SH-modifying agents also increased the binding level between both proteins. These results suggest the possibility that the binding of the OSM and TNFR3 was promoted by modification of Cys105 of OSM by methylmercury. Moreover, we performed OSM gene promoter analysis by using the reporter gene assay, and found that upstream 300~250 and 100~50 regions from the OSM gene transcription start point are important for inducing expression by methylmercury.

VI メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する 研究

メチル水銀による感覚神経優位な傷害の分子的基盤に関する研究

主任研究者 鍛冶 利幸 (東京理科大学薬学部環境健康学研究室・教授)

研究要旨

水俣病がハンター・ラッセル症候群といわれる中枢神経障害であることから、メチル水銀毒性の基礎研究の多くはこの中枢神経障害説のもとに展開され、中枢神経を構成する cell type を対象に、メチル水銀の毒性発現機構に関する分子細胞毒性学的研究が行われてきた。しかしながら、これらの研究は、総じて「メチル水銀はなぜ中枢神経毒なのか」という問いに答えようとするものであり、メチル水銀中毒症状で認められる末梢神経、特に感覚神経優位な傷害についての議論は事実上置き去りになっている。

我々の研究指針は「メチル水銀による感覚神経優位な傷害」が生じるという病理組織学的知見に対応する分子的基盤を解明することである。

キーワード: 末梢神経障害, 感覚神経, 前根神経節, 後根神経節, 炎症仮説 (6個以内)

研究協力者

篠田 陽・東京薬科大学薬学部公衆衛生学教室 (講師)

吉田 映子・東京理科大学薬学部環境健康学研究室 (助教)

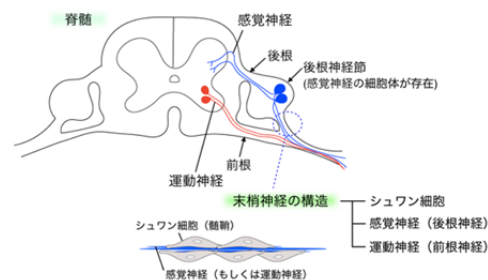
I 研究目的

水俣病の初期症状として出現する、四肢末端の感覚障害は、中枢性（中心後回）病変によるものと、脊髄末梢感覚神経病変によるものとが考えられている。衛藤らは、初期脳病変は脳浮腫によること、末梢神経病変は軸索変性が先行することを見出している¹⁾。末梢神経病変については、メチル水銀による著明な軸索変性が病理組織学的に示されているが、末梢神経、特に感覚神経病変の分子的基盤については未だ不明な点が多い。

我々は、衛藤らの水俣病剖検例においてマクロファージ浸潤が運動神経よりも脊髄表面に近い感覚神経において強いことに注目した^{1,2)}。我々が提唱する“炎症仮説”は、「炎症性細胞が小脳細胞層に浸潤するとメチル水銀により活性化され、その結果放出された炎症性サイトカイン TNF- α によって顆粒細胞が傷害されるが、この連鎖が繰り返されて傷害が大規模化する」というものであり、事実、我々はメチル水銀により活性化されたマクロファージから TNF- α が過剰産生されることを見出しており、これは感覚神経傷害にも適用できる可能性を示唆している。

本研究の目的は、メチル水銀による末梢神経障害を、末梢神経を構成する cell type 単位でその毒性発現に関わる分子的基盤を解明することによって、感覚神経細胞優位な傷害が生じるメカニズムを明らかにすることである。一年目の本年度は、末梢神経の神経細胞単位におけるメチル水銀および TNF- α に対する感受性評価、また個体レベルにおける病理組織学的検討から感覚神経細胞優位なメチル水銀の毒性発現と炎

メチル水銀が感覚神経優位な傷害を惹起する分子的基盤の解明



メチル水銀への感受性およびマクロファージなどの炎症性細胞に対する応答に末梢神経を構成する細胞間で大きく異なる可能性

症性変化の関連について検討した。

II 研究方法

細胞：ラットシュワン細胞および運動神経の細胞体である前根神経節細胞は ScienCell Research Lab より購入した。感覚神経の細胞体である後根神経節細胞は、ラット胎児（胎生期 12~13 日）の胸椎から仙椎を摘出し、後根神経節を分離して得た。各神経細胞の培養については、米沢らの方法を改良し 9 日間培養した後^{3,4)}、メチル水銀（0.01 ~5 μM ）および TNF- α （20 ng/mL）を処理した。

動物：紀和実験動物研究所より購入した Wistar Rat（8 週齢・オス）に、2mg/ml に調製した塩化メチル水銀水溶液をゾンデにより経胃的に 6.7 mg/kg/day で 5 日間投与 2 日間未投与のサイクルで 1 週間若しくは 2 週間投与した。

方法 1 (*in vitro*)：末梢神経を構成するシュワン細胞，前根神経節細胞および後根神経節細胞を用いてメチル水銀および TNF- α に対するそれぞれの cell type における感受性を評価した。各神経細胞の細胞生存率は MTT assay を用いて評価した。

方法 2 (*in vivo*)：メチル水銀投与したラットより投与開始 7 日後，14 日後に二酸化炭素で深麻酔を行い，腰椎から後根神経節（L1-L5），感覚神経繊維，運動神経繊維を摘出し，摘出した組織は超音波破碎を行い，RNeasy kit（キアゲン）により Total RNA を抽出した。タンパク質サンプルは超音波破碎後凍結保存した。組織学標本作製においては麻酔したラットの心臓より 200 mL の PBS を灌流，引き続き 4% PFA / 0.1 M PB 溶液を灌流して組織固定し，上記同様に腰椎より後根神経節，感覚神経繊維，運動神経繊維を摘出し，20% sucrose / PBS 溶液に置換後包埋，クライオスタットにて凍結標本を作成し，常法に従って蛍光免疫組織化学染色を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は人権の保護やそれに関する法令の遵守を必要とする研究には該当しない。

動物実験については東京理科大学の動物委員会で承認されたものであり（承認番号 Y16060），承認された内容に沿って適切に実施した。また，研究協力者についても所属する東京薬科大学の動物実験委員会により承認された実験方法により（承認番号 P16-92），法令および動物実験倫理規定に沿って研究を行った。

メチル水銀を含む有害な化学物質を用いる実験に関しては，安全に留意し，廃棄に関しては学内外の環境汚染防止ならびに生活環境の保全を図るために，東京理科大学環境安全センターおよび東京薬科大学環境安全規定が定める廃棄手順に従い，適切に廃棄した。

III 研究結果

シュワン細胞，前根神経節細胞（運動神経細胞）および後根神経節細胞（感覚神経細胞）のメチル水銀に対する感受性を検討した。0.01~5 μM のメチル水銀を処理すると，シュワン細胞および前根神経節細胞に対する細胞傷害が認められたものの，1 μM のメチル水銀を処理してもその細胞傷害性は20%程度であった。一方，後根神経節細胞に0.01~5 μM のメチル水銀を処理すると，メチル水銀による細胞傷害性が増強し，1 μM のメチル水銀により約50%の細胞傷害が生じた。

さらに、シュワン細胞、前根神経節細胞および後根神経節細胞のTNF- α に対する感受性を評価した。その結果、シュワン細胞や前根神経節細胞にTNF- α を処理しても細胞傷害性は認められず、加えてTNF- α はシュワン細胞や前根神経節細胞に対するメチル水銀の細胞傷害性を増強しなかった。これについては、後根神経節細胞も他の神経細胞と同様に、TNF- α や、メチル水銀とTNF- α を処理しても後根神経節細胞への傷害は増強しなかった。

メチル水銀投与ラットにおいて、個体の表現形として尾懸垂による後肢交差、後肢の引き摺り行動、軽度の振戦、体重の緩やかな減少が観察された。また摘出した後根神経節において、これまでの報告同様に大型の神経細胞の選択的脱落、神経線維の顕著な縮退が認められ、再現性が確認された。現在後根神経節細胞の細胞特異的抗体および髄鞘、軸索特異的抗体を用いて後根神経節病変の詳細な解析を行っている。また、コントロール、投与開始7日、14日それぞれ4個体合計12個体後根神経節よりTotal RNAサンプルを作製し、現在DNAチップ研究所にてマイクロアレイ受託解析を行っている。

IV 考察 および V 結論

初代神経細胞の培養系において、末梢神経を構成するシュワン細胞、前根神経節細胞および後根神経節細胞に対するメチル水銀の感受性評価を行った結果、シュワン細胞や前根神経節細胞と比較して後根神経節細胞がメチル水銀に対して高感受性であることが示唆された。しかしながら、TNF- α については、いずれの末梢神経細胞に対してもメチル水銀による細胞毒性を更に増強する傾向は認められなかったが、濃度依存的なTNF- α 処理が各神経細胞に与える影響を検討していないこと、*in vivo*（後根神経節細胞へのマクロファージの浸潤や各種サイトカインの検出など）および*in vitro*（TNF- α 処理濃度依存的な影響など）において更なる検討を重ねた上で、メチル水銀による感覚神経優位な傷害に対するTNF- α の影響を最終考察する必要がある。

VI 次年度以降の計画

初代神経細胞の培養系において、末梢神経を構成するシュワン細胞、前根神経節細胞および後根神経節細胞に対するメチル水銀の感受性評価を行った結果、シュワン細胞や前根神経節細胞と比較して後根神経節細胞がメチル水銀に対して高感受性であることが示唆された。このことは、水俣病患者の初期に見られる末梢感覚神経病変が「感覚神経優位な傷害が生じる」ことに起因するという我々の仮説を支持するものである。

次年度以降は、メチル水銀による感覚神経優位な傷害に関して、毒性試験のみならず、メチル水銀が各神経細胞に与える傷害の作用様式（軸索伸長への影響、アポトーシス・ネクローシスの検出など）を検討する。これに加えて、（１）感覚神経細胞におけるメチル水銀高感受性についての分子的基盤、および（２）TNF- α などの炎症性サイトカインによる感覚神経細胞優位な細胞毒性に関する分子的基盤について検討する。（１）および（２）の計画についての詳細は下記に述べる。

（１）感覚神経細胞におけるメチル水銀高感受性についての分子的基盤

*in vitro*培養系：これまで明らかにされてきたメチル水銀の毒性軽減に関する防御因子—メチル水銀の細胞内取り込み・排出に関わるトランスポーター（LAT-1, MRP）、グルタチオン合成酵素、メタロチオネインや活性イオウ分子産生酵素CSE・CBSの発現量、およびNrf2の活性化—について

て、シュワン細胞、ラット胎児より分離・培養した、前根神経節細胞および後根神経節細胞を用いて検討し比較する。

in vivo：メチル水銀投与ラットについてもそれら防御因子の遺伝子およびタンパク質の発現について、*in situ hybridization*、免疫組織化学、ウェスタンブロット、Real-time RT-PCR等を用いて解析する。

同時に、ラット個体へのメチル水銀曝露による末梢神経の病理学的解析と遺伝子・タンパク質発現の網羅的解析を行う。マイクロアレイ解析により見出された、メチル水銀により変動が生じた遺伝子およびタンパク質の発現について、培養細胞レベルで詳細に検討する。

加えて、本年度の個体レベルにおける病理組織学的な検討結果から、メチル水銀投与ラットより摘出した後根神経節において、大型の神経細胞の選択的脱落、神経線維の顕著な縮退が認められ、さらに脱落部位へのマクロファージ（CD68染色）浸潤が観察された。これにより、マイクロアレイ解析により見出された炎症性サイトカインについてもTNF- α と同様に後根神経節細胞への影響を検討する。加えて、神経細胞の選択的脱落に細胞外マトリックスの変化が関与するかについても検討する予定である。

（２）TNF- α による感覚神経細胞優位な細胞毒性に関する分子的基盤

まず、各末梢神経におけるTNF- α 濃度依存的な細胞傷害についてより詳細に検討する。本実験の検討の後、メチル水銀処理群、TNF- α 処理群、TNF- α およびメチル水銀処理群において、各細胞におけるNOS誘導能をmRNAおよびタンパク質レベルで検討する。さらに、TNF- α によるNO産生量および酸化ストレスレベルを測定する。TNF- α 受容体の発現量についても遺伝子およびタンパク質レベルで、各神経細胞のcell typeごとに検討し比較する。

この研究に関する現在までの研究状況、業績

特になし

引用文献

- 1) 衛藤光明, 竹屋元裕, 秋間道夫. 水俣病（メチル水銀中毒）の感覚障害に関する考察-末梢神経の病理学的所見を踏まえて-. 最新医学. 2004 ; 59 : 150-156.
- 2) 衛藤光明. 水俣病（メチル水銀中毒）の病因について-最新の知見に基づいての考察-. 最新医学. 2002 ; 57 : 144-149.
- 3) 米沢猛. 組織培養. 中井, 岡本編. 朝倉書店. 1964 ; 392.
- 4) Braschler UF *et al.* Journal of Neuroscience Methods, 1989 ; 29 : 121-129

The cytotoxicity of methylmercury in rat dorsal root ganglion neurons

Eiko Yoshida ^{*1}, Yo Shinoda ^{*2}, Toshiyuki Kaji ^{*1}

*Department of Environmental Health, Faculty of Pharmaceutical Sciences, *1 Tokyo University of Science
and *2 Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences*

Keywords: Methylmercury; Peripheral nerve; Sensory nerves;

Abstract

Methylmercury is an environmental pollutant that induces serious neurological damage in the brain of humans and animals, as is observed in patients with Minamata disease. The important characteristics of methylmercury-induced pathological changes in the cerebrum is the localization of the damage; the lesions are localized around the deep sulci and fissures in the cerebrum cortex. This localization may be a result of edematous change occurred in the white matter. On the other hand, the pathological changes of peripheral nerves appear to be unique; the sensory nerves are selectively damaged with regeneration in chronic intoxication of methylmercury. The purpose of this study is to investigate the molecular mechanisms underlying the toxic effects of methylmercury on the sensory nerves such as dorsal root ganglion neurons *in vivo* and *in vitro*. In the *in vivo* study, cross or tralling fo hind-limbs, slight tremor, and moderate decrease in the body weight were observed as phenotypes of methylmercury intoxication in rats. Selective disappearance of large neural cells and degenerative changes of the nerve fiber were confirmed in the resected dorsal root ganglion neurons of the rats, as reported previously. In addition, in the *in vitro* study using a culture system, three cell types that compose the peripheral nerve—Schwann cells, ventral root cells, and dorsal root ganglion neurons— were observed after after exposure to methylmercury. It was found that dorsal root ganglion neurons were marked sensitive to methylmercury. This result supports the hypothesis that selective damage of sensory nerves depends on the sensitivity of the cell types in the peripheral nerves to methylmercury.

VII 発達期メチル水銀曝露の神経系に対する影響と
新規エピジェネティクス機構の解明

発達期メチル水銀曝露の神経系に対する影響と新規エピジェネティクス機構の解明

主任研究者 位田 雅俊 (岐阜薬科大学 薬学部 薬物治療学研究室 准教授)

研究要旨

胎児期や乳児期におけるメチル水銀 (MeHg) 曝露は成人期のMeHg曝露に比べ、脳組織にMeHgが蓄積しやすい。そのため、MeHgの毒性を考える上で、発達期の曝露影響は特に重要である。ヒトにおいて、周産期MeHg曝露は子におけるAttention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)の発症率の増加、Intelligence Quotient (IQ)の低下などを引き起こす可能性があり、これらの異常にはドパミン神経系の攪乱が考えられる。本研究は、MeHgが及ぼすドパミン神経の発達系への影響および、その機能の攪乱機構を、エピジェネティクスの観点から解明を試みる。まず、神経分化誘導期における長期間のMeHg曝露影響を検討した。ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y)に神経分化誘導開始から神経分化完了の6日間、種々の濃度でMeHgを曝露したところ、曝露6日目で1000 nM MeHg群では細胞生存率は約20%、500 nM MeHg群では約60%であった。またドパミン合成の律速酵素であるtyrosine hydroxylase (TH)の発現量は、6日間の250 nM MeHg曝露群において上昇した。一方で、ヒトのドパミン神経分化をより忠実に再現できる、ヒト胎児中脳由来不死化幹細胞 (LUHMES細胞)を用いたドパミン神経分化誘導系を確立することができた。このLUHMES細胞ドパミン神経分化誘導系を用いて、神経分化誘導開始2日目から神経分化終了までの8日間、MeHgを曝露したところ、神経分化誘導終了時において15 nM以上のMeHg濃度での細胞生存率は20%であった。今後は、このLUHMES細胞を用いたヒトドパミン神経誘導系も併せて用いることで、MeHgのドパミン神経発達毒性を解析する。また、ドパミン神経ならびに中脳のみならず、その他の大脳皮質をはじめとする、海馬などの神経系全般についての解析も併せて行う。細胞培養系、初代培養系、マウス実験系を用い、MeHgが神経発達に及ぼす影響とそのエピジェネティクス分子機構を体系的に解明する。

キーワード: メチル水銀、神経分化誘導系、ドパミン神経

研究協力者 保住 功 (岐阜薬科大学 薬学部 薬物治療学研究室 教授)

栗田 尚佳 (岐阜薬科大学 薬学部 薬物治療学研究室 助教)

I 研究目的

水俣病はメチル水銀(MeHg)が原因の、我が国を揺るがした公害病の1つであるが、約60年経った現在では当時のような高濃度のMeHgの汚染はない。近年では、我が国での教訓を基にUNEP (国連環境計画)が主導となり、国際社会の環境における水銀のリスク軽減のために、平成25年に「水銀に関する水俣条約」が制定されるなど、国際的な取組みが成されている。しかしながら、MeHgは、環境中に幅広く存在するため、食物連鎖を介してマグロなどの大型魚をはじめとする上位の生物に生物濃縮される。よって、現在では主に魚介類摂取を介する日常的なヒトへの曝露が課題である。また成人へのMeHg曝露に比べて、胎児期や乳児期における曝露はさらに、線条体、小脳、脊髄など、脳組織に蓄積しやすい。そのため、MeHgの毒性を考える上で、発達期の

曝露影響は特に重要である。ヒトにおいて、周産期MeHg曝露は子におけるAttention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD)の発症率の増加¹⁾、Intelligence Quotient (IQ)の低下²⁾ などとの関連が示唆されている。したがって、神経系の発達過程におけるMeHgによる基質的な機能異常の可能性が想定される。そのうち、ドパミン神経系の機能異常は、パーキンソン病のみならず、うつ病や、統合失調症、ADHDなどの多くの精神疾患にも深く関わっている。ヒトにおける疫学調査にてMeHg曝露が、パーキンソン病の発症率を増加させるという報告³⁾ があり、実験的にも、MeHgはドパミン分泌機構の攪乱を引き起こすことが知られている⁴⁾。以上のことから、MeHgが引き起こす神経疾患のメカニズムを解明する点において、ドパミン神経系は重要な標的である。近年、胎生期の化学物質曝露が遺伝子のエピジェネティクス変化を引き起こし、後天的な疾患のリスクとなることが懸念されている。前述の通り、MeHgは特に胎児の脳に移行しやすく、その曝露量が高濃度でなくても、神経発達期という感受性が高い時期では、エピジェネティクスな記憶が遺伝子へと刻印され、出生後の認知機能や、成人後の神経系の疾患に影響を及ぼす可能性がある。そのエピゲノム変化を介したメカニズム解明は、胎生期MeHg曝露による後天的な疾患発症や機能的な毒性表現型の予測に重要である。本研究においては、MeHgが及ぼすドパミン神経の発達系への影響および、その機能の攪乱機構を、エピジェネティクスの観点から解明する。

II 研究方法

ドパミン神経誘導時の長時間における MeHg 曝露影響を、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞)を用いて検討を行った。

SH-SY5Y 細胞に 0, 1, 10, 25, 50,

75, 100, 250, 500 および 1000 nM の濃度で、神経分化誘導開始から神経分化完了の 6 日間、MeHg を曝露し、細胞生存率を WST-8 assay により経時的に評価した。SH-SY5Y 細胞の神経分化誘導は、分化誘導開始 3 日目まではレチノイン酸 (RA) 10 μ M、分化誘導開始 3 日目から 6 日目までは、ホルボールエステル (PMA) 80 nM を処置することで行った (Fig.1)。

また、6 日間の長期曝露において、毒性が認められなかった 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 および 250 nM の MeHg 濃度を用いて、ドパミン合成律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH)の発現量をウエスタンブロットで解析を行った。また神経分化前後のサンプルにおいてヒストン H3 アセチル化、ヒストン H3 リジン 14 アセチル化およびヒストン H3 セリン 10 リン酸化の発現量をウエスタンブロットにより検討した。一方、よりヒトのドパミン神経分化に近いモデルであるヒト胎児中脳由来不死化幹細胞 (LUHMES 細胞)を用いて、ドパミン神経分化誘導の検討を行った。LUHMES 細胞のドパミン神経誘導は、basic fibroblast growth factor (bFGF)、ドキシサイクリン、cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)、glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)を含む分化誘導培地で 10 日間培養した (Fig.2)。

LUHMES 細胞のドパミン神経誘導の評価はリアルタイム

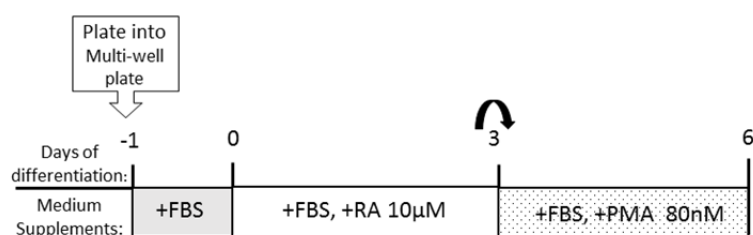


Fig. 1 SH-SY5Y細胞 神経分化誘導プロトコール

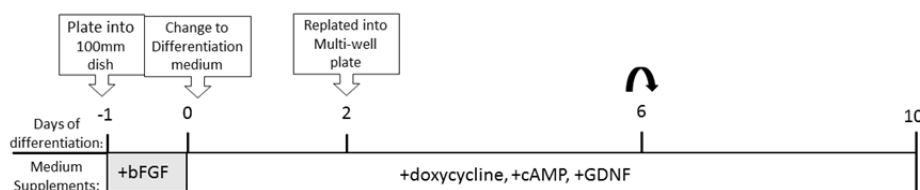


Fig. 2 LUHMES細胞 神経分化誘導プロトコール

RT-PCR を用いて、ドパミン神経マーカー、神経分化マーカーを測定することで行った。確立した LUHMES 細胞ドパミン神経分化誘導系を用いて、0, 1, 10, 15, 20, 25, 35, 50, 100, 1000 nM の MeHg 濃度で神経分化誘導開始 2 日目から完了までの 8 日間曝露し、WST-8 assay を用いて経時的な細胞死の検討を行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、患者由来のサンプルを用いる実験計画はなく、倫理面の問題はない。

III 研究結果

まず、MeHgの神経分化誘導期の長期間の曝露による毒性影響を検討した。ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) に MeHg を種々の濃度で神経分化誘導開始から終了までの 6 日間曝露したところ、曝露 6 日目で 1000 nM MeHg 曝露群では細胞生存率は約 20%、500 nM MeHg 曝露群では約 60% であった (Fig.3)。またドパミン合成律速酵素である TH の発現量は、6 日間の 250 nM MeHg 曝露において上昇した (Fig.4)。細胞内全体のヒストン修飾変化についてウエスタンブロットにて検討したところ、ヒストン H3 アセチル化レベルは、MeHg 曝露による明確な変化は認められなかった。ヒストン H3 リジン 14 アセチル化レベルは、MeHg 曝露により減少し、またヒストン H3 セリン 10 リン酸化レベルは増加傾向が認められた (Fig.5)。今後は TH をはじめとする、神経分化に関する個々の遺伝子のエピジェネティクス解析を行う予定である。

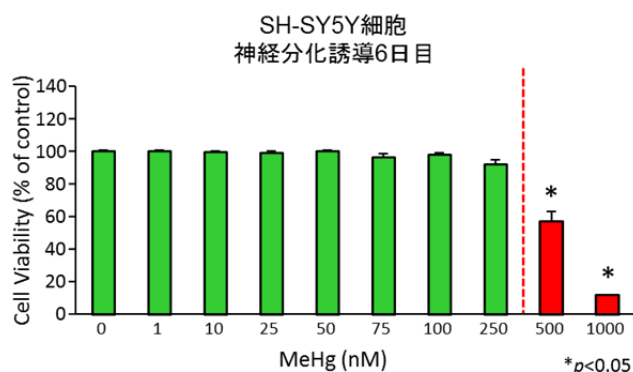


Fig.3 SH-SY5Y細胞の神経分化誘導6日目における細胞生存率

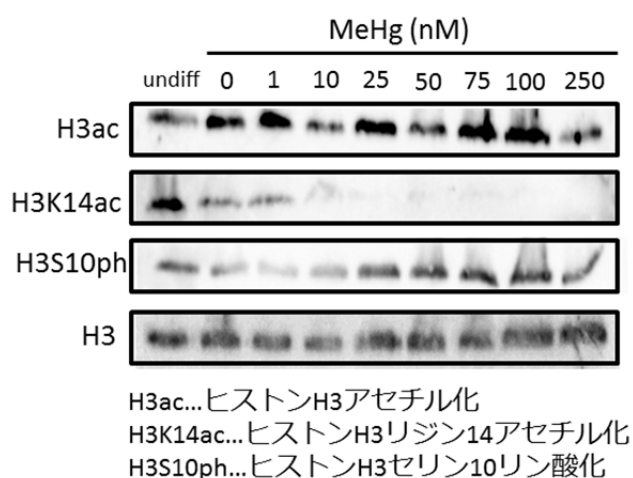


Fig.5 SH-SY5Y細胞の神経分化誘導6日目におけるヒストン修飾変化

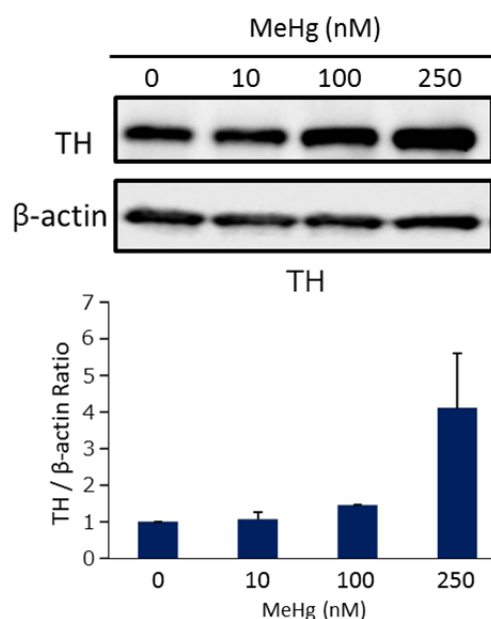


Fig.4 SH-SY5Y細胞の神経分化誘導6日目におけるTH発現量

さらに、ヒトのドパミン神経分化をより忠実に再現できる、ヒト胎児中脳由来不死化幹細胞 (LUHMES細胞)を用いたドパミン神経分化誘導系を確立できるかの検討を行った。分化誘導完了後、リアルタイムRT-PCRを用いて各種マーカー発現量を検討した。未分化細胞と比較して分化後細胞において、神経分化マーカーである *TUBB*、*SYN1* の上昇、未分化マーカーである *WNT5A* の減少、およびドパミン神経細胞マーカーである *TH*、*DRD2*、*KCNJ6*、*SLC18A2* の上昇を確認した (Fig.6)。これらの結果から、LUHMES細胞からドパミン神経を分化させることに成功した。そして、このLUHMESドパミン神経分化誘導系を用いて、MeHgを神経分化開始2日目から神経分化完了までの8日間曝露した。神経分化誘導完了時において、10 nM MeHg曝露群で細胞生存率は約40%、15 nM以上のMeHg曝露群における細胞生存率は約20%であった (Fig.7)。

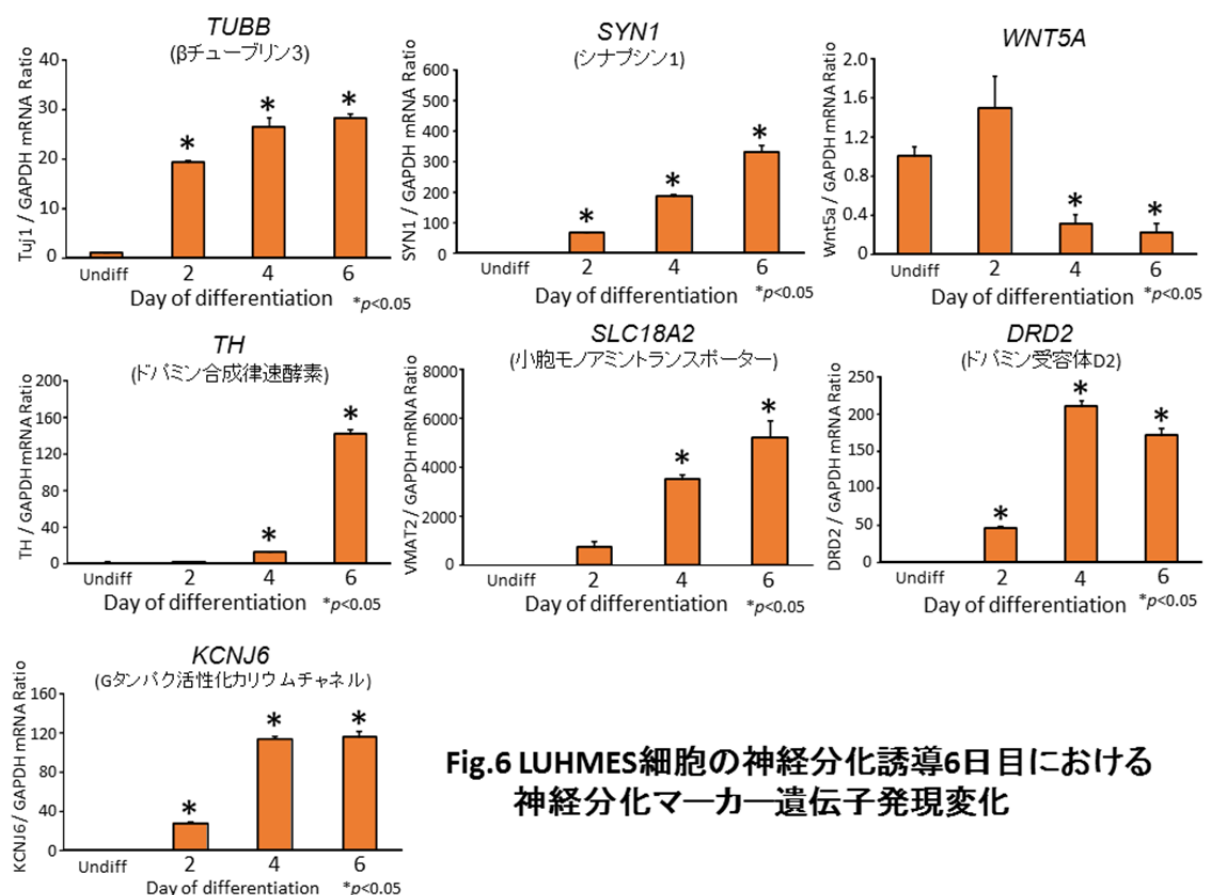


Fig.6 LUHMES細胞の神経分化誘導6日目における神経分化マーカー遺伝子発現変化

IV 考察

神経分化誘導期にMeHg曝露したSH-SY5Y細胞において、細胞死が引き起こされないMeHg濃度でTH発現量の増加が認められた。これまでに、マウスMN9D細胞を用いた報告において、比較的高濃度の短時間 (MeHg 1~10 μ M、24~48時間)のMeHg曝露では、TH発現量が減少することが報告されてい

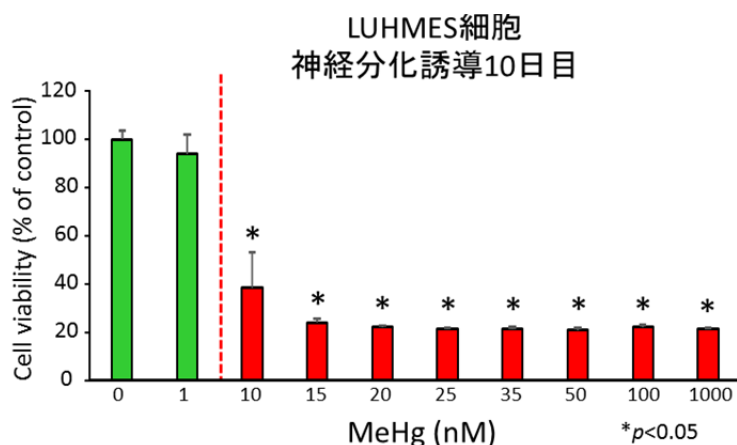


Fig.7 LUHMES細胞の神経分化誘導10日目における細胞生存率

る⁵⁾。先行報告では、ヒト細胞系を用いたMeHgのドパミン神経系への影響を検討した報告はほとんどなく、今回のヒト細胞を用いた長期間のMeHg曝露ではTH発現量は上昇した。しかしながら、本研究においてMeHgの細胞死とTH発現量の上昇との相互の関連性については不明である。ドパミン産生過剰による毒性は、これまでも報告されている⁶⁾。よって、SH-SY5Y細胞におけるTH発現量の上昇が、MeHg毒性の原因の1つである可能性が考えられるが、TH阻害剤を用いたさらなる検討が必要である。細胞全体のヒストン修飾変化についてウェスタンブロット法にて検討したところ、ヒストンH3アセチル化レベルは、MeHg曝露により明確な変化は認められなかった。ヒストンH3リジン14アセチル化レベルは、MeHg曝露により減少、またヒストンH3セリン10リン酸化レベルは増加傾向が認められた。今後はTHをはじめとする、神経分化に関する個々の遺伝子のエピジェネティクス解析を行う予定である。

一方で、よりヒトのドパミン神経分化に近いモデルである、LUHMES細胞を用いたドパミン神経分化の実験系を確立することに成功した。そして、このLUHMES細胞ドパミン神経分化誘導系を用いて、MeHgを神経分化開始2日目から神経分化終了までの8日間曝露したところ、神経成熟終了時において、15 nM以上のMeHg曝露群での細胞生存率は20%であった。今後、この細胞生存率でのMeHg毒性発現濃度を基に、LUHMES細胞のドパミン神経分化誘導系を用いて、MeHg曝露によるドパミン神経分化への影響ならびにそのエピゲノム変化解析を行う。

V 結論

本研究から、SH-SY5Yにおける長期MeHg曝露では、TH発現量の上昇が確認された。またLUHMES細胞を用いたヒトドパミン神経分化誘導系を確立した。したがって、MeHg曝露によるドパミン神経分化への影響ならびにエピゲノム解析を行うための、ヒト細胞モデル系の準備が完了した。今後はドパミン神経ならびに中脳のみならず、その他の大脳皮質をはじめとする、海馬などの神経系全般についての解析も併せて行っていく予定である。

VI 次年度以降の計画

次年度は、本年度に確立したLUHMES細胞のヒトドパミン神経分化誘導系を用いて、MeHg曝露によるドパミン神経分化への影響ならびにドパミン神経分化に関連する遺伝子のエピゲノム解析を行う。加えて、ドパミン神経ならびに中脳のみならず、その他の大脳皮質をはじめとする、海馬などの神経系全般についての解析も併せて行う。そのために、マウス胎仔から摘出した大脳皮質、中脳および海馬から初代神経培養系を確立し、脳部位別のMeHgによる神経発達影響を評価する。また、個体レベルへの解析を進めるために、妊娠期MeHg曝露マウスを用いて胎仔における神経発達期の影響を検討する。マウス評価系においても組織学的な形態学的解析、およびエピジェネティクス解析を含めた分子メカニズム解析を行う。これらの解析からMeHgが神経発達に及ぼす影響とそのエピジェネティクス分子機構を体系的に解明する。

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) Boucher O, Jacobson SW, Plusquellec P, Dewailly E, Ayotte P, Forget-Dubois N, Jacobson JL, Muckle

- G. Prenatal methylmercury, postnatal lead exposure, and evidence of attention deficit/hyperactivity disorder among Inuit children in Arctic Québec. *Environ Health Perspect* 2012; 120(10): 1456-1461
- 2) Oken E, Radesky JS, Wright RO, Bellinger DC, Amarasiwardena CJ, Kleinman KP, Hu H, Gillman MW. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am J Epidemiol* 2008; 167(10): 1171-1181
 - 3) Palacios N, Fitzgerald K, Roberts AL, Hart JE, Weisskopf MG, Schwarzschild MA, Ascherio A, Laden F. A prospective analysis of airborne metal exposures and risk of Parkinson disease in the nurses' health study cohort. *Environ Health Perspect.* 2014; 122(9): 933-938
 - 4) Tiernan CT, Edwin EA, Hawong HY, Ríos-Cabanillas M, Goudreau JL, Atchison WD, Lookingland KJ. Methylmercury impairs canonical dopamine metabolism in rat undifferentiated pheochromocytoma (PC12) cells by indirect inhibition of aldehyde dehydrogenase. *Toxicol Sci.* 2015; 144(2): 347-356.
 - 5) Shao Y, Chan HM. Effects of methylmercury on dopamine release in MN9D neuronal cells. *Toxicol Mech Methods.* 2015; 25(8): 637-644
 - 6) Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death. *Toxicol Sci.* 2014; 139(2): 466-78

Investigation of epigenetic alterations in dopamine neuronal differentiation caused by methylmercury exposure

Masatoshi Inden^{*1}, Hisaka Kurita^{*1}, Isao Hozumi^{*1}

^{*1} *Laboratory of Medical Therapeutics and Molecular Therapeutics, Gifu Pharmaceutical University*

Keywords: Methylmercury; Epigenetics; Dopamine; Neuronal differentiation

Abstract

Prenatal methylmercury (MeHg) exposure results in more accumulation in the fetal brain than postnatal exposures do to the adult brain. Therefore, it is paramount to consider the toxic effects of prenatal MeHg exposure on neural development. Previous experimental studies have shown that MeHg toxicity causes impairment of the dopamine system; however, the mechanisms underlying this effect are not fully understood. The purpose of this study is to investigate the epigenetic mechanisms responsible for the MeHg-driven effects on dopamine differentiation. To this end, we have established an *in vitro* experimental model of human dopamine neuronal differentiation and long-term MeHg exposures. Briefly, the human neuroblastoma cell line (SH-SY5Y) was exposed to MeHg (0-1000 nM) for 6 days of the neuronal differentiation period. Statistically significant decreased cell viability occurred at day 6 of neuronal differentiation, decreased to about 20% in 1000 nM MeHg group, and about 60% in 500 nM MeHg group, relative to the control group. The level of tyrosine hydroxylase (TH), the rate-limiting enzyme for dopamine synthesis, was significantly increased in 250 nM MeHg at day 6 of neuronal differentiation. In addition, we established a dopamine neuronal differentiation experimental system by using immortalized human dopaminergic neuronal precursor cells (LUHMES). We differentiated LUHMES into dopaminergic neurons for 6 days, and confirmed the increase of dopamine neuronal differentiation molecular markers, such as *TH*, *DRD2*, *SLC18A2* and *KCNJ6* mRNA. At day 8 of differentiation, the viability of LUHMES cells exposed to MeHg (0-1000 nM) for 6 days, from day 2 to day 8 of dopamine neuronal differentiation, was decreased to 20% in ≥ 15 nM MeHg exposures, indicating that MeHg specifically affects differentiating LUHMES in comparison with SH-SY5Y. In conclusion, we have shown that long-term MeHg exposure in the human SH-SY5Y and LUHMES cell lines specifically disrupts neuronal and dopamine differentiation. To understand the mechanism underlying this disruption, we need to delineate the epigenetic alterations resulting from MeHg exposure using these human neuronal differentiation models. Furthermore, systematic evaluation of additional experimental models, such as primary cell cultures and mouse models, may be required to elucidate the mechanisms of neuronal and dopamine differentiation disruption caused by MeHg, which span the dopamine neurons of the midbrain, cortex and hippocampus.

VIII メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

メチル水銀曝露による健康影響に関するレビュー

主任研究者 村田勝敬（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学・教授）

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、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、2016 年に発表された低濃度曝露を含むメチル水銀／水銀由来の健康障害に関する疫学研究の文献レビューをおこなった。

PubMed で検索されるメチル水銀および水銀に関する論文は 2010 年以降、各々 300 編および 1700 編を超えているが、疫学研究の割合は 2015 年以降減少しているように思われた。(1) メチル水銀に関する疫学研究では、胎児期メチル水銀曝露による神経発達影響が既知の事実として書かれることが多くなったが、小児の鉛曝露による知能障害ほど明確ではなく、メチル水銀濃度の増加に伴う IQ 低下の傾きなどの精度を高める研究（メタ分析）が必要である。この一環として胎児期メチル水銀曝露と神経発達影響の関係を種々の発達（知能）検査毎に整理することが有用と考えられ、第一弾として、Bayley 乳幼児発達検査（BSID）を用いた研究で調べると、曝露条件・設定が各々の研究で異なることから一貫性が必ずしもあるとは言えないものの、メチル水銀は認知発達指標（MDI）よりも運動発達指標（PDI）に影響が出やすいことが示唆された。(2) 脳神経系の発達が著しい乳幼児においてメチル水銀曝露による影響については殆ど情報がなく、可及的速やかに研究する必要がある。(3) メチル水銀とセレンの関係についての疫学研究では、水銀による脂質異常症のリスク上昇をセレンが抑制する可能性が報告されたが、この機序は一定レベル以上の水銀曝露がある場合のみに限られる可能性も示唆された。セレンのヒト研究の場合、毒性緩和に有効な生体内でのセレンの存在形態を明らかにする研究が必要と考えられた。(4) 小規模金鉱山での水銀-アマルガム燃焼時の作業者の水銀曝露量はかなり高いことが示され、またアマルガム燃焼を家屋でおこなうと作業者の腎障害の他、小児の運動機能への影響も観察された。

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

研究協力者 荻田香苗（杏林大学医学部衛生学公衆衛生学・教授）
吉田 稔（八戸学院大学健康医療学部・教授/学長補佐）
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（国立環境研究所環境リスク・健康研究センター・研究員）
柳沼 梢（尚絅学院大学総合人間科学部健康栄養学科・講師）
坂本峰至（国立水俣病総合研究センター疫学・部長）
研究参加者 岩田豊人（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学・助教）
前田恵理（秋田大学大学院医学系研究科環境保健学・助教）

I. 研究目的

水俣病の発生から 60 年以上が経過し、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おこなう。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<以下、PUFA と略す>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おこなわれる場合）においても大いに参考になろう。

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、②2016 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おこない、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、2016 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 2005 年から 2016 年まで PubMed を用いて検索すると、227 編～364 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 27 編から 127 編であった (表 1)。特に 2011 年以降は 300 編以上となり、新興 Open Access 誌が PubMed に掲載されるようになったためと考えられる。このうち 2004 年まではヒトを対象とした疫学研究は 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。同様に、“mercury”をキーワードとする論文も 1.5 倍近く増えた。しかし、ヒトを扱った水銀論文の比率は “methylmercury”と同様に 4 割未満であり、特に 2011 年以降は 30%前後を低迷している。理由はよく判らないが、“methylmercury” および “mercury” とも 2015 年はヒト研究が激減している。

表 1 「メチル水銀」関連の PubMed 上の論文数の推移 (2016 年 11 月 17 日現在)

	西 暦 年											
	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
“methylmercury” の入った論文数	227	241	313	317	274	303	354	349	306	364	341	313
ヒトを対象とした 論文数	78	81	113	119	95	118	119	127	109	127	77	27
割合 (%)	34.4	33.6	36.1	37.5	34.7	38.9	33.6	36.4	35.6	34.9	22.6	8.6
“mercury” の入っ た論文数	1240	1327	1422	1504	1440	1577	1745	1779	1767	1930	1877	1563
ヒトを対象とした 論文数	398	440	456	505	435	511	535	532	551	584	414	126
割合 (%)	32.1	33.2	32.1	33.6	30.2	32.4	30.7	29.9	31.2	30.3	22.1	8.1

2013 年 10 月に熊本で「水銀に関する水俣条約 (Minamata Convention on Mercury)」が採択・署名された^{1,2)}。これは、2009 年にナイロビで開催された第 25 回国連環境計画 (UNEP) 管理理事会で交わされた水銀によるリスク削減のための法的拘束力のある「水俣条約」制定に向けた議論を受けてのことであった。条約では、1) 水銀のリスクに対する認識や国際的な水銀対策の推進と必要性、水銀対策を進める際の基本的な考え方を記載し、2) 水俣病の教訓として水銀汚染による人の健康および環境への深刻な影響、水銀の適切な管理の確保の必要性および同様の公害の再発防止を謳い、3) 汚染者負担原則および“予防的アプローチ”³⁾を宣言したリオ原則が記されている。この意義は、i) 先進国と途上国が協力して水銀の供給、使用、排出、廃棄等の各段階で総合的な対策に取り組むことにより、水銀の人為的排出を削減し、越境汚染をはじめとする地球規模の水銀汚染の防止を目指し、ii) 世界最大の水銀利用・排出国である中国や、化学物質や廃棄物に関する条約をこれまで批准していない米国を含め、多くの国の積極的な参加を確保しつつ、その中で水銀のリスクを最大限低減できる内容の条約に合意し、iii) “Minamata”を冠したのは「水俣病」と同様の健康被害や環境破壊を繰り返してはならないという決意と、こうした問題に直面している国々が対策に取り組む意志を世界で共有したことであった。

この「水銀に関する水俣条約」を受けて、Sheehan らは 2014 年に “Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review” という論文を発表した⁴⁾。同様のレビューは存在するが⁵⁾、これは「水銀に関する水俣条約」の採択を受け、これまでに報告された魚摂食集団のメチル水銀曝露レベルを地域枠で改めて要約したものである。同時に、各国にメチル水銀/水銀の曝露評価を促すことを目的とした。したがって、今後数年間は、この論文に沿う形で、各国/各地域の曝露濃度が測定され、FAO/WHO 食品添加物専門家会議 (JECFA) の暫定耐容週間摂取量 (PTWI) や米国環境保護庁 (EPA) の参照値 (*RfD*) を超過する度合いについて発表されよう。

2) 2016 年に発信されたメチル水銀研究

最近のメチル水銀に関する論文は、小児神経発達から離れ、他臓器への影響が取り上げられるようになってきた。この理由として、上述した Sheehan らが（彼らは一切神経毒性について研究していないにも拘わらず）発達神経毒性を既知の事実として扱っているためと考えられる⁴⁾。特に、免疫系影響に関する論文は注目に値するが、その他は種々の疾患等が研究課題となっている。ここでは、メチル水銀の疫学研究の元祖となった①フェロー諸島出生コホート研究とセイシエルの小児発達研究が現在どのような研究をおこなっているのか、②わが国でメチル水銀に関連した論文でどのような研究成果が出たのか、③他臓器の健康影響としてどのような報告があるのか、④メチル水銀の曝露評価としてどのような論文が発表されているのかについて、概説する。

■ フェロー諸島出生コホート研究からの発信

Grandjean らの研究グループは、フェロー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が、2016 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⁶⁻¹³⁾。ここではメチル水銀に関する論文 2 編を紹介するが、その他の論文はメチル水銀以外の難分解性化学物質 (POPs) を扱った論文が多い。

発達免疫毒性を検討するために、Oulhote らはフェロー諸島出生コホートの母子 56 組で 5 歳児の白血球を精査した¹⁰⁾。末梢血中の白血球とは好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球 (T 細胞、NK 細胞、B 細胞)、単球であり、PCB や殺虫剤を含む有機リン系化合物、5 種類のパーフルオロアルキル化合物 (PFHxS、PFOA、PFOS、PFNA、PFDA) および総水銀が生後 18 ヶ月の母子および 5 歳児で測定された。胎児期のメチル水銀曝露 (臍帯血水銀幾何平均 4.65 $\mu\text{g/L}$ 、0.77~21.06 $\mu\text{g/L}$) は総白血球数 (特に、リンパ球) の減少と関連 (臍帯血水銀の 1 SD の変化で白血球数の SD で -23% (その 95%信頼区間<以後、95% CI と略す>は -43~-4%) の減少) していた。有機リン系化合物の胎児期曝露は好中球数の減少と関連していた。逆に、5 歳児のパーフルオロアルキル化合物曝露は好塩基球の増加 (1 単位当たり 46% の増加、95% CI は 13~79%) と関連した。B 細胞や CD4+T ヘルパー細胞、および CD4+胸腺由来細胞のようなリンパ球の有意な減少は細胞性免疫影響と T 細胞由来の免疫の調整不全を示唆しているかもしれない。このように、環境由来の免疫毒性物質の発達期曝露は小児期の白血球数に異なる影響を示すと考えられたと著者らは述べているものの、白血球数以外の免疫細胞は相対値 (%) を使った解析であり、絶対値での増加あるいは減少 (反応) を見ておらず、免疫機能を正しく評価しているかどうか疑問が残る。

メチル水銀曝露は神経幹細胞を減らすことが知られているが、有酸素運動機能は海馬の神経生成に依存する成人の脳に良好な影響を及ぼす事が知られている。そこで青年の最大酸素摂取量 ($\text{VO}_{2\text{Max}}$) と神経認知機能との関連を、胎児期メチル水銀曝露による効果修飾の可能性とともに

Oulhote らは検討した¹²⁾。対象は 1986-1987 年に形成したフェロー諸島出生コホート 1,022 名のうち 262 名で、22 歳時で多段階負荷有酸素運動機能検査をおこなない VO_{2Max} を測定した。出生前メチル水銀曝露は臍帯血総水銀濃度 (中央値 23.5 µg/L) を用いた。神経認知機能は多項目検査結果を探索的因子分析から取り出した 3 つの潜在機能指標を用いておこなった。構造方程式モデルに性別、運動習慣、喫煙、BMI、喫煙、両親の雇用状態や教育水準等、臍帯血水銀濃度を加えて VO_{2Max} と神経認知機能の関連を検討したところ、VO_{2Max} の 1 標準偏差 (SD) の増加は短期記憶と認知処理速度のそれぞれ 0.21 SD (95% CI、-0.04~0.46)、0.28 SD (95% CI、0.02~0.54) の好得点と関連していた。胎児期メチル水銀曝露の低い (35 µg/L 未満) 群では、VO_{2Max} の 1 SD 増加は認知処理速度 0.45 SD (95% CI、0.08~0.81) の高得点および極めて軽微ではあるが短期記憶の高得点と関連していた。胎児期メチル水銀曝露の高い群ではこのような関連は見られなかった。以上より、有酸素運動機能が良いほど短期記憶と処理速度が良好になる関連があるものの、胎児期メチル水銀曝露はこれらの良好影響を弱めてしまうと考えられた。

■ セイシェル小児発達研究からの発信

セイシールの小児発達研究 (Seychelles Child Development Study) および小児発達栄養研究 (Seychelles Child Development and Nutrition Study) をおこなっている Rochester 大学グループの成果として論文 3 編が発表された¹⁴⁻¹⁶⁾。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 2 編であった。なお、Rand らの論文¹⁶⁾はセイシールのコホートを対象としていない。

ABC トランスポーターは、細菌からヒトに至るまでよく保存された ATP-結合ドメインをもつ膜タンパク質で、様々な物質の輸送をおこなっている。ABCC サブファミリーのうち ABCC1、ABCC2 は GSH/グルクロン酸抱合体排出に関わり、ハエやマウスでメチル水銀毒性との関連が知られている。ABCB1 はがん細胞の多剤耐性と関連するが、メチル水銀毒性との関連は不明である。母親の ABC トランスポーターの遺伝子多型について、①母親の妊娠中毛髪メチル水銀と②子の神経発達との関連を Engstrom らは検討した¹⁵⁾。対象は 2008~2011 年にセイシェル共和国で集められた母子観察コホート 1,331 組であり、胎児期メチル水銀曝露指標として妊娠期間に生えた母親毛髪総水銀を測定した (平均 3.9 µg/g)。また 20 ヶ月児に Bayley 乳幼児発達検査 (BSID-II) をおこない、母の ABCC1、ABCC2、ABCB1 の 15 の遺伝子多型について検討した結果、15 のうち 7 個 (ABCC1 rs11075290、rs212093、rs215088; ABCB1 rs717620; ABCB1 rs10276499、rs1202169、rs2032582) は母親毛髪総水銀濃度と関連していた ($p < 0.001$ から 0.013)。ABCC1 rs1107290 の遺伝子多型は神経発達と関連していた。ABCC1 の rs11075290 の CC 型の母親 (平均毛髪水銀 3.6 µg/g) から生まれた子は TT 型の母親 (平均毛髪水銀 4.7 µg/g) から生まれた子よりも認知発達指標 (MDI) で平均 2 点、運動発達指標 (PDI) で平均 3 点低く、CT 型 (平均毛髪水銀 4.0 µg/g) は中間の得点であった。以上より、ABC トランスポーターの遺伝子多型は母親毛髪水銀濃度と関連が見られ、神経発達にも違いが見られたことから更なる検討が必要である。

食事からの魚由来のメチル水銀曝露は公衆衛生の優先的関心事となっている。所与のメチル水銀曝露に対する反応の個人差およびその後のメチル水銀の生体内変換はこの問題の理解を複雑にする。体内からのメチル水銀の排出は (1 日当たりの排出速度 k_{el} が約 0.01 であり、半減期 $t_{1/2}$ も約 70 日とされているように) 緩徐であり、それも魚摂食に由来する水銀負荷の主要な決定要素となる。体内からのメチル水銀の排出をコントロールする当該機序は殆ど明らかにされていない。そこで、レーザーアブレーション ICP-MS を用いた毛髪の長期水銀分析でメチル水銀排出速度を算出する改良方法を Rand らは開発した¹⁶⁾。4 ヶ月間の洗い出し期間 (魚を食べてはならない期間)

を挟む、週一回計3回の魚料理（マグロステーキ）を食べさせた後に75日間追跡する2回の試行をおこなった対象8名（24～51歳、男女各4名）で毛髪水銀の排出速度を測定した。さらに、メチル水銀の無機水銀への生体内変換は水銀排出と関連するので、対象者のメチル水銀の脱メチル化状態を推定するために糞便中の無機、メチル、総水銀濃度を測定した。個人間および個人内のメチル水銀排出速度はかなり異なり、排出速度 k_{el} は 0.0054～0.0163/日、推定の半減期 $t_{1/2}$ は 42.5～128.3 日であった。糞便中のメチル水銀と無機水銀の比率も個人で大きく異なった。糞便中の無機水銀比率は歯アマルガムによって影響されたが、アマルガムのない対象者の所見では、メチル水銀排出速度が早い程、より完全な脱メチル化を示す糞便中の無機水銀比率が高いという関係を示した。これらの方法はメチル水銀不活化に影響する遺伝的要因あるいは食事因子に関する今後の研究に寄与するものと考ええる。

■ 日本から発信しているメチル水銀に関する研究

熊本市内の産科病院で出産時に得られた54組の湿/乾重量臍帯組織のメチル水銀/総水銀濃度、母体血、臍帯血および母親頭髮の総水銀濃度を測定し、臍帯組織中水銀濃度が母親および胎児のどの妊娠時期におけるメチル水銀曝露を反映するのかを Sakamoto らは検討した¹⁷⁾。その結果、乾燥臍帯組織総水銀濃度（中央値 62.2 ng/g、範囲 7.6～164 ng/g）は臍帯血総水銀濃度（7.26 ng/g、1.48～14.4 ng/g）と強い相関（ $r = 0.91$ ）を示した。また、これらの総水銀濃度は毛髪1 cm 毎に測定した総水銀濃度のうち0-1 cm の値（1.35 μg/g、0.18～3.47 μg/g）との間で最も相関係数が高く（ $r = 0.85$ ）、頭皮より遠位部にいくにつれて相関係数は小さくなった。乾燥臍帯組織中の総水銀およびメチル水銀濃度から母親頭皮0-1 cm の頭髮総水銀濃度への換算係数は22.4と24.1であった。この換算係数を用い、和歌山県太地町・勝浦町の小児検診時に得られた保存臍帯41検体から推定される出産時の母親頭髮水銀濃度は太地町で2.1 μg/g、勝浦町で3.2 μg/g（最大19.2 μg/g）であった。本研究により、保存臍帯組織は妊娠後期の胎児のバイオマーカーであり、かつこれを用いた後ろ向き研究で出産当時の母親のメチル水銀曝露レベルを評価することが可能と考えられた。

2006年時点で、50歳前後の約40人の公式患者が胎児性水俣病の生き証人として水俣市に存在した。これら患者のうちの24名と性・年齢がマッチした対照群67名（患者および対照群の曝露レベルは不明）に対し、神経運動機能の病態生理学的特徴を調べる目的でコンピュータを用いた手のふるえ検査および身体重心動揺検査をおこない、2016年にその成果が Iwata らによって報告された¹⁸⁾。胎児性水俣病患者の手のふるえ強度は両手とも全周波数帯で対照群よりも有意に大きかった。また対照群と比べ、患者群では両手とも1-6 Hz のふるえ強度の割合が大きく、逆に6-10 Hz の強度割合は小さかった。この結果、患者群のふるえの中心周波数は対照群よりも有意に低かった。患者の日常生活活動レベルが極端に低いため、患者群のうち男性8名しか身体重心動揺検査をおこなうことができなかった。開眼時および閉眼時ともに身体重心動揺変数の多くは、男性対照群に比べ、患者で有意に大きかった。同様に、重心動揺の前後方向の Romberg 指数は患者群で有意に高かった。以上の結果より、胎児性水俣病患者は、水俣病の公式確認から50年以上経ているにも拘わらず、6 Hz 以下の低周波の手のふるえおよび身体不安定性の増強を示した。手のふるえおよび身体重心動揺のスペクトル解析は胎児期メチル水銀曝露に由来する小脳病変に関連する病態的变化を評価するのに有用であると考えられた。

メチル水銀 (MeHg) は主に魚介類摂食により曝露される。メチル水銀曝露パターンは、魚介類から毎日ほぼ一定量を摂取する場合と、かなり高い水銀濃度を有する歯鯨などを月に2～3回食することで間欠的に多量摂取する場合がありうる。胎児への影響は後者の研究（フェロー出生コホ

ート研究) から示されたことから、米国科学アカデミーはメチル水銀の間欠的多量曝露が体内水銀蓄積量や神経系に与える影響を解明すべきと指摘した¹⁹⁾。Sakamoto らは、成獣ラットと妊娠ラットを用いて、毎日一定量メチル水銀を摂取させた場合と間欠的多量メチル水銀摂取させた場合の2群を比較し、間欠的多量メチル水銀曝露が水銀蓄積量や神経系に与える影響を検討した²⁰⁾。成獣ラットへのメチル水銀曝露は①毎日0.3または1.5 mg MeHg/kg と、②週1回2.1または10.5 mg MeHg/kg であり、5週間経口投与した。その結果、成獣ラットに週1回7倍量のメチル水銀を投与した群の血中水銀濃度は漸増波形を示したものの、最終的な解剖時に脳の水銀濃度は毎日投与群とほぼ同等であり、神経病変に差は認められなかった。また、妊娠ラットに③毎日1 mg MeHg/kg 投与した群と④5日間に1回5 mg MeHg/kg (③の5倍量) を投与した群を設け20日間投与したが、両群の出産直前の妊娠ラットおよび胎児ラットの血液・脳中水銀濃度はほぼ同様であった。胎児ラットの脳の平均水銀濃度は妊娠ラットと比べて約2倍高かった。ヒトのメチル水銀曝露蓄積ワンコンパートメントモデル (メチル水銀の半減期を70日と想定) では、体重70kgの成人に7 µg MeHg/日、49 µg MeHg/週、98 µg MeHg/2週を投与する時の水銀蓄積曲線は、間欠群の振れに量依存関係があるものの、ほぼ同様と推定された (図1)。以上より、メチル水銀の曝露量が積算量として同じ場合、一定量連続曝露と間欠的多量曝露でメチル水銀の体内・脳内蓄積量および脳組織病変に差は見られないと考えられた。

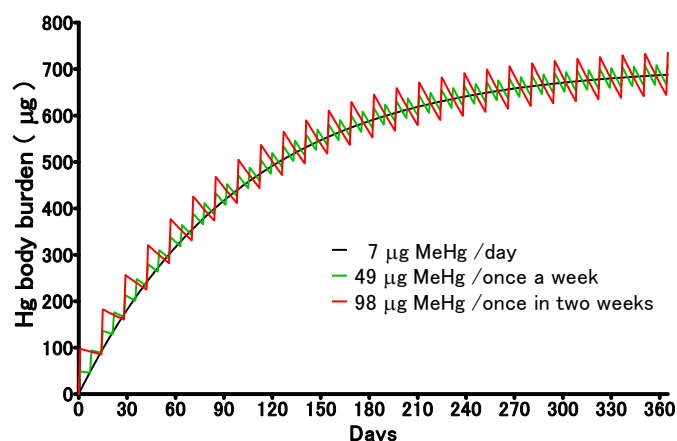


図1 一定期間内の総投与量を同量にして連続曝露と間欠的多量曝露した場合の体内水銀蓄積量の変化

荻田らは2013～2015年度の本研究班のまとめとして総説を報告した²¹⁾。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おり、メチル水銀/水銀に関する論文総数は増加している。疫学研究で依然として注目されているのはメチル水銀の神経毒性に最も感受性の高い胎児期の曝露影響である。これは環境汚染に由来する低濃度曝露による小児発達影響という環境保健学的にも究明すべき最重要課題の一つであるが、軽度でかつ特異性も乏しい影響をより精確に把握する必要がある、この困難を克服する方策を新たに開発していかねばならないことを指摘した。また、出生コホートが成長する中でIQ低下や機能低下が持続するのか、生後の低濃度メチル水銀曝露によって悪影響がもたらされるのか、今後の課題は尽きない。さらに、検出しようとする影響を攪乱するPCBや殺虫剤系毒性物質など、低濃度での同時曝露による影響の評価も益々重視される。このために検査法や相互作用の見直しを踏まえた研究デザインの立案が求められる。以上より、メチル水銀毒性の修飾作用機序については未だ不明な点も多く、ヒトでのデータの蓄積が重要であることは言うまでもないが、さらに実験的および分子毒性的研究を組み合わせた双方向のアプローチによって毒性機序の解明が一層進展することに期待したい、と最後を結んだ。

なお、北海道スタディは2016年に14編の論文を発表しているが²²⁻³⁵⁾、メチル水銀に関連した論文はなかった。

■ メチル水銀の神経／発達に及ぼす影響に関する論文

Bellinger らは胎児期メチル水銀曝露による知的障害発生頻度を国別に推計した³⁶⁾。最初に系統的レビューをおこない80カ国、305論文について検討した。一般集団での母親毛髪水銀の代表値と広がりについての推定値が得られる信頼性の最も高い論文を国毎に1編選定した。論文の得られない国は、WHO 地球環境モニタリングシステム／食品汚染モニタリングプログラム (GEMS/Food) で同じ地域に分類されるうち代表的な国の結果を用いた。血中水銀濃度しか得られない場合は250:1で毛髪水銀濃度を推定し、いずれも得られない場合は魚摂取量から推定した。フェロー諸島、セイシェル、ニュージーランドでのメチル水銀曝露と子どものIQの量-影響関係から「母親の毛髪水銀1 $\mu\text{g/g}$ 増加に伴い子どものIQは0.18低下する」と仮定し、メチル水銀曝露による軽度・中等度・重度・最重度知的障害 (各々IQ 50~69、35~49、20~34、20未満) の発生率を国別に推計した。毛髪中水銀の分布は0~18 $\mu\text{g/g}$ であったことから、メチル水銀曝露による軽度知的障害発生率の地域内中央値は出生千人当たり0.55件未満から9.9件まで大きな差があり、特に10/1,000を超える国はアンティグア (19.47/1,000)、フランス領ポリネシア (17.21/1,000)、バルバドス (15.08/1,000)、グレナダ (13.33/1,000)、サンタルチア (13.81/1,000)、ポルトガル (15.39/1,000) であった。中等度知的障害では1/1,000を超える国はなく、重度知的障害では2/100,000未満となり、最重度知的障害が認められる国はなかった。島嶼諸国で推定値が高かったが、発生率が低くても中国、ブラジル、フィリピンなど出生数の多い国では世界疾病負荷への寄与は大きくなる。今後の課題として、知的障害の有無だけでは影響を過小評価する可能性があるため、曝露量および量-影響関係の推定精度を向上させる必要がある。

アマゾン川流域の伝統的生活では魚摂取量が多く授乳期間も長い。Marques らはブラジル西部Rondonia州の非都市部の健康な母と先天性障害のない子のペアでおこなわれているコホート研究の対象者のうちの690組を用いて、母乳栄養および水銀曝露の神経発達に及ぼす影響を検討した³⁷⁾。母乳栄養期間により第1群 (6ヵ月)、第2群 (7~12ヵ月)、第3群 (24ヵ月) に分けると、離乳時毛髪総水銀は母では第1群 (平均12.6 $\mu\text{g/g}$) が第3群 (平均9.8 $\mu\text{g/g}$) より高く、子では第1群 (平均2.7 $\mu\text{g/g}$) より第3群 (平均4.1 $\mu\text{g/g}$) が高かった。出産時母の毛髪水銀は週当たり魚摂取回数と有意な正の相関があり ($r_s = 0.86$)、離乳時の子の毛髪水銀は授乳月数と有意な正の相関があった ($r_s = 0.15$)。生後6ヵ月、24ヵ月におこなったBayley乳幼児発達検査 (BSID) の認知発達指標 (MDI) と運動発達指標 (PDI) に3群間に差はなかったが、母の5段階毛髪水銀濃度と母の教育年数 (2区分) で差があった。したがって、授乳期間や水銀曝露の神経発達影響を検討する場合、これらの交絡要因を慎重に考慮する必要がある。

妊娠中の魚介類摂取量は小児の神経心理発達に有益であると考えられているが、大規模コホート研究で具体的な魚摂食量も扱い、魚種毎にその関連性を解析したものは見当たらない。Julvez らは2004-2008年にスペインで立ち上げた集団ベースのコホート調査において、14ヵ月児 (1,892名) と5歳児 (1,589名) の神経心理発達を評価するために、BSID (14ヵ月児) とMcCarthy知能検査 (5歳児)、そして小児アスペルガー症候群検査をおこなった³⁸⁾。多変量線形回帰モデルの結果は、社会人口学的特徴の他、脂質血水銀濃度とPUFA濃度で調整した。魚介類摂食頻度調査 (FFQ) で調べられた妊娠初期3ヵ月の魚介類の総摂取量は平均498 (中央値454) g/週であり、週に約3回魚を食べている計算になった。高い魚摂食量を示した母親はスペイン生まれが多く、社会経済

状態および教育歴の高い年配者であり、妊娠中喫煙率は低いが飲酒率は高く、臍帯血水銀濃度も PUFA も高かった (臍帯血水銀濃度 8.5 $\mu\text{g/L}$ を超えたのは 795 で、それ未満は 746)。全体として、魚摂取量が推奨限界の 340g/週を超えた母親の子どもで BSID の MDI 得点が高くなった。赤身魚に加えて、脂ののった大型魚の摂食は正の関連を示した。魚摂食量 4 分割した際、238 g/週以上の最も多く魚を食べていた母親から生まれた子どもでは McCarthy の一般知能が、最も少量しか魚を食べなかった群に比べ、2.29 点 (95% CI は 0.42~4.16) 高かった。同様の結果は小児アスペルガー症候群検査でも得られた。水銀または PUFA で調整すると回帰係数の β 値は 15~30% 小さくなった。妊娠中の脂ののった大型魚の摂食は適度の小児神経心理発達に有益であり、これには認知機能の向上や自閉症スペクトラム障害になりにくいことなども含まれた。

魚介類の摂取は健康への様々な良好影響で勧奨されているが、既知の神経毒である水銀を含有していることへの憂慮が高まっている。Morris らは魚介類摂取が脳の水銀レベル増加と相関しているか、さらに魚介類摂取または脳の水銀レベルが脳の神経病理と関係があるのか検討した³⁹⁾。2004-2013 年に行われた臨床神経病理学的コホート研究対象者の死亡者に関する横断研究であり、参加者はシカゴの退職者コミュニティおよび扶助住宅に居住していた。研究は 554 名の死亡者から 286 個 (51.6%) の剖検脳を得ておこなった。死亡時年齢 (SD) は 89.9 (6.1) 歳で、女性は 67% (193 名) で、就学年数の平均 14.6 (2.7) 年であった。認知症に関わる病理ではアルツハイマー病、レビー小体、肉眼的および微小梗塞巣の数が調べられ、魚介類と *n*-3 PUFA の食事摂取量は死亡以前 (平均 4.5 年前) に毎年食事頻度調査 (FFQ) で測定した。水銀とセレンの組織内濃度は機器中性子放射化分析 (INAA) で測定した。剖検脳の水銀レベルは 3 分割集団で、0.02 (25-75 パーセンタイル値 0.01~0.03) $\mu\text{g/g}$ (67 名)、0.06 (0.03~0.20) $\mu\text{g/g}$ (69 名)、0.56 (0.20~6.88) $\mu\text{g/g}$ (67 名) であり、一週間当たりの魚介類食頻度と有意な正の関連を示した ($p=0.16$)。年齢、性別、教育、総摂取エネルギー量を調整したモデルで魚介類摂取 (週 1 食以上) は、老人斑が少ないこと ($\beta=-0.69$ スコアユニット [95% CI, -1.34~-0.04])、神経原線維変化がより弱く広がっていること ($\beta=-0.77$ スコアユニット [95% CI, -1.52~-0.02])、神経病理学的に決定されたアルツハイマー病が少ないこと ($\beta=-0.53$ スコアユニット [95% CI, -0.96~-0.10]) を含む、アルツハイマー病病理変化が少ないことと相関していた (但し、アポリポ蛋白 E (APOE ϵ) 保有者に限定した場合)。高濃度 α -リノレン酸 (18:3 *n*-3) は脳肉眼的梗塞巣 Odds が低い (第 3 三分位の第 1 に対する Odds 比 0.51 [95% CI, 0.27~0.94]) ことと相関していた。魚油サプリメントはいずれの神経病理指標とも有意な関連はなかった。脳水銀濃度は脳神経病理的变化の増加と関連しなかった。以上の横断研究より、中程度の魚介類摂食はアルツハイマー病病理の少ないことと関連があった。一方、魚介類摂取は脳水銀濃度と相関するものの、その濃度と脳神経病理との相関は見られないと考えられた。

■ メチル水銀の免疫機能に及ぼす影響に関する論文

水銀曝露が免疫状態に影響する事は実験動物のサイトカイン発現において示されているが、胎児ないし小児期の低濃度曝露がヒトの免疫状態に影響するのか明らかでない。Hui らは胎児、小児の水銀曝露が小児のサイトカインプロファイルに関連するという仮説を検討し、小児のセレン濃度と検出された関連とに交互作用があるか調べた⁴⁰⁾。以前構築した出生コホートから募った 6~9 歳児 407 名で血中の水銀、セレン、サイトカインプロファイル (インターロイキン (IL)-4、6、8、10、13 および TNF- α) を測定した。重回帰分析を用いて現在の水銀濃度 (中央値 2.6 $\mu\text{g/L}$ 、25~75 パーセンタイル値 1.7~3.7 $\mu\text{g/L}$)、現在のセレン濃度、臍帯血水銀濃度 (9.2 $\mu\text{g/L}$ 、6.6~13.0 $\mu\text{g/L}$) との関連も検討すると、IL-10 と現在の水銀濃度との間に負の関連があった。こ

の影響は臍帯血水銀濃度が低く現在のセレン濃度が低い対象者で最も強かった。他のサイトカイン濃度は、臍帯血水銀濃度と IL-6 との間に負の関連があった以外、臍帯血水銀濃度とも現在の血中水銀濃度とも関連は見られなかった。以上より、小児の水銀曝露は IL-10 と負の関連を示した。セレンは防御的に働くが、中央値よりも低い群の胎児期水銀曝露は小児期の負の関連の程度の増強させると思われた。この観察結果の臨床的意義についてはさらなる研究が必要である。

■ メチル水銀のその他臓器・疾病に及ぼす影響に関する論文

Al-Saleh らは小児神経発達検査結果に及ぼす水銀曝露による酸化ストレスの役割を検討した⁴¹⁾。944 人のサウジアラビア王国の健康な母親とその子 (3-12 ヶ月) をリヤドの 57 保健所で集め、総水銀を母子の尿と毛髪、母体血、母乳で測定し、メチル水銀 (MeHg) を母子の毛髪と母体血で測定した。尿中の 8-ヒドロキシ-2'-デオキシングアノシン (8-OHdG)、マロンジアルデヒド (MDA)、ポルフィリンを酸化ストレス評価に用いた。子の神経発達はデンバー発達判定法 (DDST-II) と「親による発達状況評価」(PEDS) で測定した。母の尿、子の尿、母の毛髪、子の毛髪、母体血、母乳の総水銀中央値はそれぞれ 0.995 µg/L、0.716 µg/L、0.118 µg/g dw、0.101 µg/g dw、0.635 µg/L、0.884 µg/L であった。母の毛髪、子の毛髪、母の血液の MeHg 中央値はそれぞれ 0.132 µg/g dw、0.091 µg/g dw、2.341 µg/L であった。母の尿、血液、毛髪、母乳、子の尿、毛髪の水銀測定値間の相関に注目された。この事は母の様々な経路からの異なった形態の水銀 (総水銀と MeHg) への曝露がその子の金属負荷に有意に寄与することを示している。水銀曝露は低かったが、母と子の水銀測定値と酸化ストレス指標との間に有意な相関が認められた。水銀測定値と酸化ストレス生体指標との相乗効果作用を重回帰分析で検討した。母と子の尿中水銀と酸化ストレス生体指標 (8-OHdG と MDA) とに有意な相互作用が認められた。母と子の毛髪 MeHg 濃度にも類似した相互作用パターンが認められ、いずれも p 値は 0.001 未満であった。これらの結果は、対象児の胎児ないし新生児期に母を介した水銀水銀曝露が酸化ストレスを増悪させ、それが我々が以前報告した子の神経発達遅延に影響したことを示唆する。結果は子の毛髪 MeHg と 8-OHdG および MDA との相互作用が有意に DDST-II 得点の低下と関連していた事を支持する ($\beta = -0.188$, $p = 0.028$)。この知見は水銀に引き起こされた酸化ストレスが子の認知神経発達につながる可能性のあることを初めて提示したものであるが、実際にそうであるか否かは将来の研究で検証されるべきである。当研究の対象者の MeHg レベルは低いので結果は特に重要である、と著者は述べた。ただ、母児の水銀濃度と酸化ストレス指標との関連を、水銀濃度と酸化ストレス指標との交互作用項を加えた重回帰分析で検討する際、交互作用項に含めた変数の主作用が検討されていないようであり、交互作用項が 3 項もの積であること、神経発達指標と水銀濃度との関係を検討する重回帰分析で神経発達指標を独立変数としているなど、統計解析が適切におこなわれたかどうか疑問が残る。

最も頻繁な水銀曝露経路である海産食品摂取による低用量毒性機序はよく知られていない。Karimi らは海産食品による水銀曝露は酸化還元状態の変化に関係しており、血中還元型グルタチオンの酸化型に対する比 (GSH:GSSG) の減少ないし酸化還元ポテンシャル (Eh) の増加に反映される、という仮説を検討した⁴²⁾。同時に、主要な海産食品の栄養素 (セレン (Se)、 $\omega 3$ 脂肪酸) がこの変化に交絡または効果修飾している可能性も検討した。血中総水銀、Se、GSH、GSSG、 $\omega 3$ 指数 (赤血球膜総脂肪酸中 $\omega 3$ 脂肪酸%) をニューヨーク州ロングアイランドの海産食品摂取者 (US EPA の RfD 0.1 µg Hg/kg BW/day を超える量の魚を食べているので水銀の影響が現れやすいと考えられる対象者) 268 名で測定した (血中総水銀の平均値は 7.71 µg/L、25-75 パーセンタイル値 2.46~10.50 µg/L)。総水銀、GSH:GSSG 比、Eh 間の関連を検討すると、血中水銀増加 (> 5.8 µg/L)

と GSH:GSSG 比減少は関連していた ($\beta = -116.73$, $p = 0.01$) が、Se や $\omega 3$ 指数による交絡の証拠は認められなかった。しかし、 $\omega 3$ 指数で層化したモデルにおいて、 $\omega 3$ 指数の高値者 ($> 6\%$) では水銀と GSH:GSSG 比との関連は弱まり ($\beta = -63.46$, $p = 0.28$)、低値者では強まっていた ($\beta = -182.53$, $p = 0.01$)。Eh の水銀に対する関連でも類似のパターンが認められた。これらの結果は本研究の対象者では $\omega 3$ 脂肪酸に修飾されながら「海産食品からの水銀曝露が、酸化ストレスにつながる酸化還元状態の変化に関連している」という仮説を支持する。他の海産食品栄養素や水銀で生じる酸化還元状態の変化の、水銀曝露増加に伴う様々な健康影響における役割をさらに検討しなくてはならない。

水銀は地学のおよび人為的発生源から環境中に放出される地球的汚染物質である。生体中に入るや複数の中毒機構を惹起し、酸化ストレスがその主要なるものとして提案されている。金属への感受性は、生理行動学的結果として小児で大きい。メキシコ・ユカタン地方では、不法投棄物や家庭ごみの焼却、海洋の頂点捕食動物の摂取、陶器製造がとりわけ水銀曝露を進展させうる。しかしながら、ユカタン住民について、水銀レベルとそれに関係する小児の酸化ストレス状態について報告されていない。そこで Rangel-Mendez らはユカタン地方の 3 地域の健康な小児 107 名で、水銀レベル (血中総水銀および尿中総水銀のレンジは Progreso 地区 36 名で血中濃度が検出限界以下 [$< 0.1 \mu\text{g/L}$ 、以下 LOQ] $\sim 77.0 \mu\text{g/L}$ および尿中濃度が LOQ $\sim 44.8 \mu\text{g/L}$ 、Merida 地区 35 名で血中 LOQ $\sim 11.0 \mu\text{g/L}$ および尿中 LOQ $\sim 54.5 \mu\text{g/L}$ 、Ticul 地区 36 名で 血中 LOQ $\sim 12.7 \mu\text{g/L}$ および尿中 LOQ $\sim 20.1 \mu\text{g/L}$) と酸化ストレス生体指標—脂質過酸化物を反映するマンデル酸 (MDA)、酸化ストレスにより減少する還元型グルタチオン (GSH)、抗酸化酵素の 1 つで癌化や心血管疾患発症に関連するとされるパラオキシナーゼ (PON-1) を測定し、これらの関連を検討した⁴³⁾。水銀測定では LOQ 以上の血中レベルの対象児は 11 名 (10.28%) であり、LOQ 以上の尿中レベルの対象児は 38 名 (35.51%) であった。14 名は水銀推奨レベル (血中水銀 $10 \mu\text{g/L}$ または尿中水銀 $20 \mu\text{g/L}$) より高値だった。酸化ストレス生体指標は他の研究との比較ではわずかに高く、また対象地区間で有意に異なっていた (MDA は Merida および Ticul 地区の方が Progreso 地区より高く、GSH は Progreso および Merida 地区の方が Ticul 地区より高かった)。水銀レベルと酸化ストレス生体指標間に有意な相関はなかった。しかし、探索的に用いた多変量のクラスター分析をおこなうと、測定された変数間で非線形の関係が認められた。要約すると、本研究はメキシコの東南 (ユカタン) 地方の若年対象者において水銀レベルに関する情報とそれらの酸化的ストレス生体指標との関連について初めて提供するものである。水銀に関する世界的関心に応じて、本研究はメキシコ国内の研究者間にヒト (特に小児) の金属モニタリングに関する研究、規制政策樹立、人への健康リスク軽減を振興させんとするものである。

PUFA は心血管疾患のリスクの低下と関連するが、脳卒中との関連については知られていない。 $n-3$ PUFA の主たる源である魚はまたメチル水銀を含むので、魚は心血管系疾患の高リスク要因ともなり、また $n-3$ PUFA の有益性を損なう要因ともなる。Daneshmand らの調査では、血清 $n-3$ および $n-6$ PUFA および毛髪水銀の男性脳卒中リスクとの関連を調べるため、前向き Kuopio 虚血性心疾患リスク要因研究の対象者 (すなわち、1984-1989 年に登録された 42~60 歳の心血管疾患のない男性) 1,828 名について、1993 年から 2012 年の間に脳卒中の発症があったかどうか調べられた⁴⁴⁾。年齢や検査年を考慮すると、唯一統計的に有意な関連が見られたのは $n-3$ PUFA の α リノレン酸と脳出血の間であり、最も低い 4 分位に対する最も高い 4 分位のハザード比は 0.33、95% CI は 0.13~0.86 であった。しかしながら、さらに交絡因子を考慮すると、その関連は有意でなく

なった。毛髪水銀は脳卒中のリスクと関連しなかったが、中央値 (1.26 $\mu\text{g/g}$) 以上の毛髪水銀を持つ者の中では血清 *n*-3 PUFA (EPA、ドコサペンタエン酸、DHA および EPA 単独) は脳梗塞の発症リスクと関連があった。本研究の男性コホートにおいて、血清 *n*-3 あるいは *n*-6 PUFA あるいは毛髪水銀が脳卒中リスクと関連すると結論できなかったが、脳梗塞に対する水銀と *n*-3 PUFA の間の相互作用についてはさらに研究が必要であると考えられた。

Yeter らは、西洋に住んでいても東アジアの子どもは 10-20 倍川崎病に罹り易いことから、魚介多食の文化的背景が影響している可能性について、米国 0-4 歳児の川崎病入院率と 1-5 歳の血液サンプルという別々の公開データベースを用いて検討した⁴⁵⁾。アジア系の血中総水銀平均 0.92 (0.11-5.18) $\mu\text{g/L}$ 、カドミウム 0.17 $\mu\text{g/L}$ 、マンガン 12.69 $\mu\text{g/L}$ は他の人種 (ヒスパニック系、白人、アフリカ系) よりも高かったが、鉛濃度 0.092 $\mu\text{g/dL}$ は最も低かった。人種別 (ヒスパニック系、白人、アジア系、アフリカ系) の平均血中水銀値 (2011-2012 年国民健康栄養調査 NHANES の 1-5 歳 713 名から算出) と川崎病の人種別入院率 (小児入院患者データベース KID コホート 10,880 名の 1997 年、2000 年、2006 年の 0-4 歳 10 万人当たりの入院率) の相関を調べると、相関係数 0.967 ($p < 0.05$) の有意な量-影響関係が見られ、次にカドミウムが有意な正の相関を示したが、マンガン、鉛、セレンは有意な関係を認めなかった。川崎病になりやすい体質の子どもが川崎病を発症するのに Hg (と Cd) が影響している可能性が示唆された。

鉛、水銀、カドミウムなどの重金属が中国長江河口域や浙江省杭州湾にある島々で検出され、それら曝露が住民の潜在的健康リスクとなっている。そこで、Tang らはこれら重金属の曝露レベルを評価するために 103 組の母子から非侵襲性生体試料として臍帯血を収集し、出生児指標との関係を調べた⁴⁶⁾。曝露レベルは高く、その中央値 (および 25-75 パーセンタイル値) は鉛で 76.20 (44.71-115.8) $\mu\text{g/L}$ 、水銀で 21.94 (15.1-27.64) $\mu\text{g/L}$ 、カドミウムで 6.36 (3.63-13.34) $\mu\text{g/L}$ であった。母親の BMI、年齢、教育歴、児の性別、流産数、出生順位、妊娠中の体重増加を調整するために重回帰分析を用いた結果、臍帯血清鉛濃度の 1 $\mu\text{g/L}$ 増加により出生時身長が 0.29 (95% CI -0.50-0.09) cm および頭囲が 0.22 (-0.44-0.00) cm 短縮するという関係が見られたが、出生時体重には有意な関連は認められなかった。各々の濃度で 3 分割して検討すると、鉛と水銀曝露の第二分位 (middle tertile) 集団では、第一分位 (low tertile) 集団と比べて、出生指標と有意な負の関連が見られた。カドミウムはいずれの出生児指標とも有意な関連が認められなかった。以上より、長江河口域および杭州湾に住む魚摂食者においては、鉛および水銀曝露が出生児指標に潜在的な悪影響を持ちうると考えられた。

■ メチル水銀の曝露評価に関する研究

Al-Saleh らは、健康なサウジアラビア王国の母子 (3-12 か月) の水銀レベルを測定し、デンバー発達スクリーニング検査 (Denver Developmental Screening Test II、DDST-II) と親による発達状況評価 (Parents' Evaluation of Developmental Status、PEDS) のスクリーニング法を用いて水銀の小児神経発達への影響を検討する横断研究をおこなった⁴⁷⁾。リヤドの 57 保健所で母子 944 組が集められた。母子の尿中総水銀、毛髪総水銀、母乳中および母体血中総水銀が測定した。メチル水銀は母子の毛髪から測定した。毛髪メチル水銀量で米国環境保護庁 (EPA) の基準値 (RfD 、1 $\mu\text{g/g}$) を超過していた母は 1.8% (中央値 0.132 $\mu\text{g/g}$)、小児は 0.3% (0.091 $\mu\text{g/g}$) であったが、このメチル水銀濃度は DDST-II 得点と有意な関連を示した。一方、母親のクレアチニン補正した尿中総水銀、母親毛髪総水銀、小児毛髪総水銀、母親毛髪メチル水銀は小児 PEDS 得点との有意な関連を示した。WHO の尿 (5 $\mu\text{g/g Cr}$) および EPA の毛髪 (1 $\mu\text{g/g}$) の基準値を超える割合とその

集団中央値は尿中総水銀で 3%と 0.695 $\mu\text{g/g Cr}$ 、母親毛髪総水銀で 4.1%と 0.118 $\mu\text{g/g dw}$ 、小児毛髪総水銀で 2.8%と 0.101 $\mu\text{g/g}$ 、母親毛髪メチル水銀で 1.8%と 0.132 $\mu\text{g/g}$ であった。この研究は、低濃度曝露でかつ小児の授乳状態に関係なく、水銀測定値の一部と小児神経発達遅延に関連する証拠を提供した。他の研究でも示されているように、幼児期の精神発達の遅延は子どもの神経認知発達の指標で、かつ成人期まで続き得るので、この結果は危惧すべき問題である。DDST-II は長年使用されてはいるものの、サウジアラビアで DDST-II や PEDS が標準化されていないことは多少問題となろう。したがって、標準化された発達スクリーニング検査を開発することは、幼少期より神経発達問題の危険に晒されている全ての子どもを見つけ出し、適切かつ時宜を得た治療(介入)を受けられるようにするために必要である。

金属汚染物質は胎盤を経由し、胎児発達を攪乱するリスクを発現する。胎盤濃度や低～中等度曝露からの潜在的毒性金属の移行に関する情報は欠けている。Punshon らは New Hampshire Birth Cohort Study に参加した女性から集めた胎盤 750 個のカドミウム、鉛、水銀、マンガン、セレンおよび亜鉛濃度を測定し、主成分分析を使ってこれら金属間の相関、それに亜鉛およびセレン濃度で二分割した時の毒性金属 (カドミウム、鉛、水銀、マンガン) 間の関係を調べた⁴⁸⁾。年齢別では、胎盤カドミウム濃度は母親 30 歳未満 ($3.0 \pm 1.9 \text{ ng/g}$) と 30 歳以上 ($3.9 \pm 2.6 \text{ ng/g}$) で有意差があり、BMI 別 ($\text{BMI} < 25$ 、 $30 > \text{BMI} \geq 25$ 、 $\text{BMI} \geq 30$) では胎盤カドミウム (順に、 3.8 ± 2.6 、 3.6 ± 2.2 、 $2.8 \pm 1.6 \text{ ng/g}$)、鉛 (2.7 ± 4.6 、 2.0 ± 1.9 、 $1.8 \pm 1.6 \text{ ng/g}$)、水銀 (2.7 ± 10.0 、 1.9 ± 2.1 、 $1.9 \pm 2.1 \text{ ng/g}$)、マンガン (78.3 ± 47.7 、 71.3 ± 24.3 、 $66.7 \pm 24.9 \text{ ng/g}$)、亜鉛 (11.0 ± 4.6 、 10.3 ± 2.7 、 $10.1 \pm 2.8 \mu\text{g/g}$) 濃度が肥満度の上昇につれ有意に低かった。なお、喫煙状態によって胎盤金属濃度が有意に異なるものはなかった。胎盤金属濃度は 6 金属全ての間、特に亜鉛とマンガン、亜鉛とカドミウム、で有意な相関があり、加えて亜鉛あるいはセレンを高い/低い群に分けるとその 2 群間で主成分に有意な差があった。胎盤と母体足爪の間の相関ではセレンと鉛濃度が有意であったが、その他の金属では有意な相関はなかった。

腸内細菌叢がメチル水銀代謝に果たす役割には不明な点が多い。Rothenberg らは、腸内細菌叢とメチル水銀生体指標 (便、毛髪、臍帯血) との関連、腸内細菌叢による水銀のメチル化/脱メチル化と便中メチル水銀との関連について妊婦コホートを用いてパイロットスタディをおこなった⁴⁹⁾。36-39 週の妊婦 17 人の毛髪・便検体および、うち 7 名の臍帯血を用いた (毛髪水銀の平均値 57 ng/g)。メチル水銀値の高い 6 検体および低い 6 検体についてゲノム解析をおこなって水銀メチル化遺伝子 (*hgcA*) および脱メチル化に関する遺伝子 (*merA* と *merB*) を検索した。Chao1 という稀な細菌を除いて毛髪および便中水銀と細菌量に関連はなかった。*merA* は低メチル水銀濃度の 6 サンプル全てで検出されたが、*hgcA* 及び *merB* について明らかな結果は得られなかった。便中のメチル水銀の違いは腸内細菌のメチル化/脱メチル化による直接的影響ではないと考えられた。

3) メチル水銀とセレンの関係

PubMed に収録された 2016 年 1 月以降の報告のうち、ここでは” methylmercury” と” selenium” の 2 語をキーワードに抽出された文献についてレビューをおこなった。この 2 語をキーワードとして含む原著論文の年間報告数は、2013~2015 年の 3 年間は 23~26 編であったが、2016 年は 16 編に減少し、新たに報告された疫学研究は以下の 3 編であった。

■ 疫学研究

魚食由来の水銀摂取に伴う幼・小児への神経発達影響に関する疫学研究はこれまで数多く報告されているが、成人での神経行動学的影響を調べた研究は少ない。Vacchi-Suzzi らは、ニューヨーク州ロングアイランド在住の魚介類多食者 199 人（うち男性 84 人）の血中総水銀、セレンおよび *n*-3 PUFA 濃度を測定し、各種神経行動学的検査（符号数字テスト、タッピングテスト、反応時間、持続処理課題、遅延見本合わせ、数唱、逆転学習検査）をおこなった⁵⁰⁾。血中水銀濃度は年齢、*n*-3 PUFA、魚の摂取頻度と正の相関を示したが、血中セレン濃度との間に相関関係は見られなかった。性別、年齢（18～84 歳）、人種、教育歴、所得、飲酒習慣、食物摂取頻度その他の交絡因子を調整すると、神経行動学的検査のアウトカムはいずれも血中水銀濃度とは関連しなかった。魚の摂取頻度はいずれの神経行動学的検査結果にも関与しなかったが、自覚症状の疲労の Odds 比は魚摂取の増加に伴い 0.85 (95% CI 0.72～1.01) となり、また神経症状を合わせた指標（平衡感覚または協調運動の失調、口もとの痺れ感、集中力低下のいずれかの自覚症状有り）の Odds 比は 0.79 (95% CI 0.66～0.96) となった。本研究結果では魚介類摂取習慣のある成人における水銀・*n*-3 PUFA レベルと神経行動学的機能との間に関連は認められず、魚の多食が神経学的障害や疲労感に影響を及ぼす可能性について、さらに大規模な調査をおこなって検討する必要があると述べている。

in vivo や *in vitro* 実験では検証されているものの、慢性水銀曝露と脂質異常症との関係については限定的にしか調べられておらず、セレンの関与まで含めて検討した研究は稀である。そこで Park らは、脂質異常症との関係を調べる横断研究を実施し、韓国南部ヨンナム地域の住民コホート男性 232 人と女性 269 人を対象に、健診の際に足爪と空腹時血液を採取して血清中脂質濃度と爪の水銀・セレン濃度を放射化分析により測定した⁵¹⁾。交絡因子となる年齢、世帯所得、喫煙・飲酒習慣、身体活動度、身長・体重等の情報は質問票で収集した。男性の爪の平均水銀濃度は 0.47μg/g、女性では 0.34μg/g であり、濃度を 3 分位に分割して交絡因子を調整のして比較したところ、爪濃度が最高分位であった者は最低分位であった者に比べ LDL コレステロール異常高値となる Odds 比が 4.08 (95% CI 1.09～15.32, 傾向性検定 $p = 0.02$)、脂質異常症となる Odds 比が 2.24 (95% CI 1.15～4.37, 傾向性検定 $p = 0.004$) となった。セレンはこれらの関連を有意に修飾する因子となり、爪セレン濃度が 0.685μg/g 以下であった者では、爪水銀濃度 3 分位比較における高 LDL コレステロール値と高脂血症リスクの Odds 比がともに上昇した（前者の Odds 比 5.25, 95% CI 1.04～26.38、後者 Odds 比 2.98, 95% CI 1.16～7.66）。一方、セレン濃度が 0.685 μg/g を超える者では統計的に有意なリスク上昇は認められなかった（それぞれ Odds 比 0.98, 95% CI 0.25～3.80、Odds 比 1.99, 95% CI 0.73～5.45）。水銀曝露が危惧される魚の多食者でもセレンの摂取量次第で有害影響を抑制できる可能性があり、適切な魚摂取の推奨量を算定するためには、前向きコホート調査や RCT 研究が求められる。

日本では和歌山県太地町に居住する男性 48 人、女性 68 人（年齢 33～82 歳）の毛髪と血中の水銀およびセレン濃度の分析と食物摂取頻度調査がおこなわれた⁵²⁾。血中総水銀濃度は血中および血清中セレン濃度と正相関していたが、層別化すると水銀濃度が中央値より高い群でのみ、セレンとの有意な相関関係が認められた（図 2）。過去 3 か月間の魚や鯨の摂取頻度が多かった者では血中水銀濃度も有意に高かったが、セレン濃度との関連は見られず、水銀とセレンの相関関係が魚の摂取量に依存するものではないと考えられた。血清中のセレン蛋白であるグルタチオン・パーオキシダーゼ (GPx) とセレノプロテイン P (SePP) を分離定量した結果、高水銀濃度群では SePP のみが血中水銀レベルと有意な相関を示し、低水銀濃度群では GPx と SePP いずれも関連性

を示さないことがわかった。血中水銀が血清セレン濃度と相関する機序として、水銀の曝露に伴い臓器での SePP の要求度が増すことで血清セレンは上昇するのだろうと考察している。

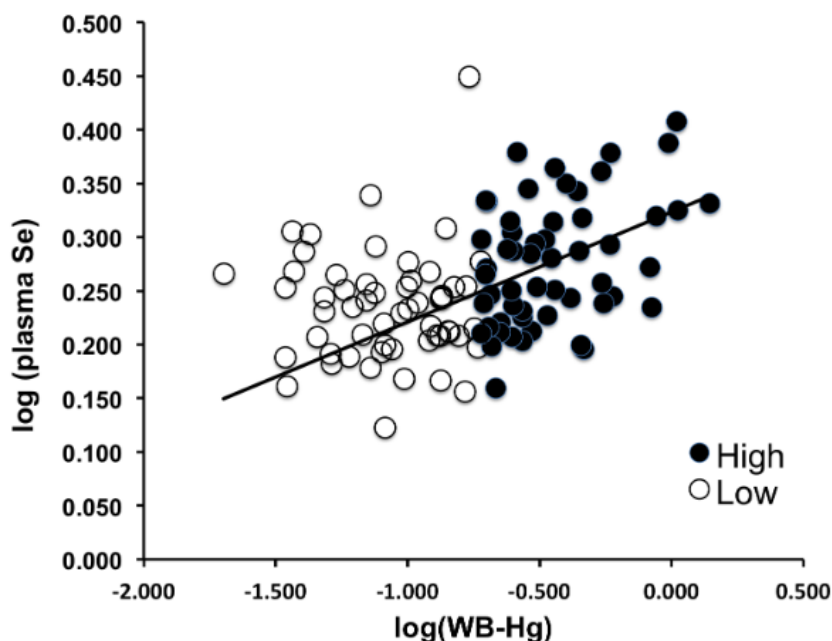


図 2 Relationship between plasma selenium (Se) concentration (ordinate) and blood Hg concentration (abscissa) in the low (open triangle, $n = 56$) and high (closed circle, $n = 55$) Hg exposure groups. Both values are expressed as the logarithm of $[\mu\text{mol/L}]$. The solid line is the regression for the high Hg exposure group, which was statistically significant ($p = 0.031$). Regression for the low Hg group was not significant and is not shown.

■ 動物におけるモニタリング結果

魚食習慣のある者の水銀基準値を検討する際には、毒性学研究から特異的に導出して外挿したり、生態系フィールド内の魚類への影響濃度を調べたりするほか、魚介類中の水銀レベルを産業化が進む以前と現在の濃度とで比較したデータなどを基に算定しているが、いずれもエビデンスは限定的で、基準値の推計は十分になされていない。Fuchsman らは、有効とされる現行の水銀基準値を超えているにも拘わらず有害影響が見られなかったとする報告もあると指摘した⁵³⁾。その理由として、魚におけるセレンの栄養状態が交絡因子となったり、実験研究で用いられたメチル水銀の化学形態が自然の生態系のものと乖離していた可能性があるとして述べている。これまでの報告の量-反応関係から導出された水銀の影響濃度 (EC20; 20%影響量など) は、実験データに基づく影響閾値と近似していたが、さらに強固な量-反応関係の根拠となる研究が必要であると結論付けている。

Gajdosechova らは、Scotland の海岸に打ち上げられた 21 匹のヒレナガゴンドウクジラの肝、腎、筋肉、脳組織中の各種金属濃度を分析した。どの組織にもある程度の水銀蓄積が観察されたが、カドミウムは肝臓にのみ蓄積が認められ、血液脳関門での防御機構がゴンドウクジラにおいても稼働していることが示された⁵⁴⁾。成体および亜成体での脳組織中の総水銀濃度は、神経系に影響するとされる閾値の上限を超えており、脳組織のメチル水銀濃度は平均 2.2 mg/kg であった。相関関係を調べたところ、全ての組織において水銀とセレンおよびカドミウムとセレン濃度の間に正の相関が認められた。脳と肝臓組織中の各金属濃度は、若年、亜成体、成体の個体群でそれぞれ有意な差異がみられ、マグネシウム、鉄、亜鉛、セレン、水銀、メチル水銀は肝臓中濃度が最も高かったのに対し、カドミウムは主に腎臓への蓄積が見られた。高濃度の水銀とカドミウムがゴンドウクジラの各組織で認められたことから、海棲哺乳動物への重金属汚染の拡大が危惧される。

メチル水銀の毒性軽減に係るセレンの役割を理解するためには、メチル水銀から水銀・セレン

の結合体が形成される過程を生化学的に解明することが重要である。Gajdosechova らは⁵⁵⁾さらに、座礁したヒレナガゴンドウクジラの組織を誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) と X 線吸収微細構造解析 (XANES) により詳細に分析し、水銀とセレンの化学形態別の構造分析をおこなった。クジラの個体年齢が上がるにつれ、肝臓および脳組織で見出された水銀とセレン含有粒子径は増大しており、セレン・水銀複合体を形成して脱メチル化した不活性の水銀が蓄積されていた (図 3-a)。肝臓組織で見られた水銀およびセレン含有の最大粒子サイズは、いずれも平均して若年体に比べ成体クジラで有意に大きかった (図 3-b)。XANES で分析すると、肝臓と脳組織のセレン化水銀 (HgSe) ナノ粒子はセレン豊富な層に付着しており、分子量の大きいセレン・水銀結合体を形成する際の核となり、クジラ個体の成長に伴って 5 μm を超える大きさにまでなることを確認した。水銀微粒子体は幼若なクジラの組織からも観察され、毒性軽減のシステムは成長の早い段階から十分に機能していることがわかった。メチル水銀を無毒化するために、セレン貯蔵物であるセレノメチオニンが使われて減少する一方、必須であるセレノシステインの脳や肝臓中レベルは保持されていた。生物学的に利用可能な貯蔵セレンが減少するという観察結果より、メチル水銀を経口摂取した際に働く神経毒性緩和のための生体内メカニズムの存在が示唆された。

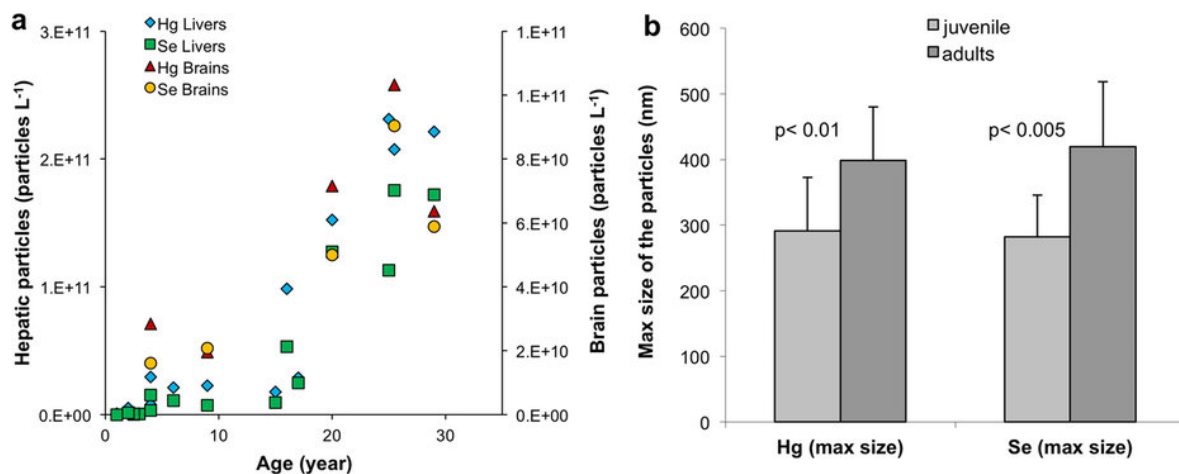


図 3 Number and size of Se and Hg containing particles in the liver and brain is increasing during the lifespan of pilot whales.

Looi らは、マラッカ海峡で採取されたポロトススカニウス (ゴンズイ科魚類) とジャイアントマッドスキッパー (ハゼ科魚類) の組織中水銀、メチル水銀、セレン濃度を分析した⁵⁶⁾。筋組織中の平均メチル水銀濃度はコーデックス公表の食品及び飼料中の汚染・毒性物質の一般基準値 (CODEX STAN 193-1995) よりも低く、また、マレーシアや日本の同様な食品基準値よりも低値であった。水銀とメチル水銀濃度は、ポロトススカニウスでは肝臓、マッドスキッパーでは鰓組織で最も高く、またセレン濃度は前者では肝臓、後者では消化管組織で最も高い値を示した。セレン・水銀モル比は 1 を超えて、セレン健康便益値 (HBVSe) が正の値となっており、水銀毒性に対するセレンの防御機構が作用していることが示唆された。両魚の摂取による水銀とメチル水銀の推定週間摂取量は、JECFA (FAO/WHO 食品添加物専門家会議) の暫定耐容週間摂取量より低く見積もられ、現状ではこれらの魚類摂取による差し迫った問題はないと述べている。

コロンビア川流域に生息する淡水魚 10 種類におけるセレンと水銀濃度のモル比を Cusack らが調べたところ、両者の差異が最も少なかったのがウォールアイ (スズキの一種) で 3.42:1 であり、差異が最も大きかったチヌークサーモン (サケの一種) では 27.2:1 と魚種ごとでばらつきが見ら

れた⁵⁷⁾。イエローパーチやニジマスなどの例外を除いて、どの魚も体長に伴って水銀とセレンの相関関係が強くなる傾向がみられ、健康便益値 HBV_{Se} はすべて 2 を上回っていた。魚介類摂取は低脂肪蛋白の栄養源となる一方、メチル水銀の取り込み源ともなるため、魚摂取のリスクマネジメントをおこなう際に水銀毒性拮抗作用のあるセレン比の情報をどのように盛り込んでいくか、今後の検討課題であると著者らは述べている。

Ackerman らは、3 種の鳥の雌親計 107 匹の血液、筋肉、肝、腎、胸部羽毛、頭毛とそれらの卵 399 個について水銀とセレン濃度を分析した⁵⁸⁾。総水銀およびメチル水銀濃度は母鳥の臓器と卵とで高い正の相関関係がみられたが ($R^2 \geq 0.95$)、羽毛と卵の間には相関関係は見られなかった。母鳥の水銀濃度が上昇するにつれ、卵へ移行した水銀の割合は低下していた。水銀レベルが同程度の母鳥では、卵に移行する水銀割合が鳥種ごとで異なり、メリケンアジサシとクロエリセイタカシギの雌鳥では、アメリカソリハシセイタカシギと比べ、より多い割合でメチル水銀が卵に移行していた。セレン濃度は、雌親の肝臓と卵とで高い相関があり ($R^2 = 0.87$)、またアジサシの卵中セレン濃度と水銀濃度は、雄親の臓器中濃度とも高い相関関係がみられた。孵化した雄のアジサシでは、雌に比べて血中水銀濃度が平均で 21% 高かった。本研究結果に基づき、採取した鳥の組織から卵の汚染レベルを推定できる予測式を著者らは提示した。

■ 動物へのメチル水銀およびセレンの投与実験

ラットの実験ではこれまで、亜セレン酸ナトリウムの投与後にメチル水銀に曝露すると、肝臓のマロンジアルデヒド (MDA) と尿中水銀濃度が低下することが報告されている。Li らは、ラットへ亜セレン酸 (Na_2SeO_3 , 300 $\mu\text{g/kg}$) とメチル水銀 (4 mg/kg) を隔日で強制経口投与し、血清中水銀濃度とその存在形態について調べた⁵⁹⁾。処理 30 日および 90 日後のラット血清で水銀濃度の上昇が認められ、クロマトグラフィー誘導結合プラズマ質量分析法でそれらの血清を精査したところ、水銀結合蛋白分画は分子量約 21、40、75 kDa のもの 3 種類、セレン結合蛋白分画は 40、75 kDa の 2 種類が同定された。分子量 75 kDa の蛋白分画では水銀濃度が特に増加しており、水銀とセレンの複合体が観察された。セレンを前投与したメチル水銀中毒のラットで、尿中水銀排泄量が減る現象を説明できる観察結果であったと述べている。さらに、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF-MS) による分析をおこなうと、75 kDa 蛋白分画では水銀とセレンにアルブミンが結合しており、21 kDa 蛋白分画では水銀に結合したメタロチオネインが存在することがわかり、ラット生体内でのセレンと水銀の存在形態が明らかとなった。

Evans らは、捕獲した 106 匹の若年 (生後 1 年未満) の雄ミンクに様々な濃度のメチル水銀とセレンを餌に混ぜて飼育し、13 週間後に毛皮、血液、脳、肝臓、腎臓中の総水銀レベルと脳組織中のセレン濃度を分析した⁶⁰⁾。餌のメチル水銀濃度 (0.1~2.0 $\mu\text{g/g}$ 湿重量) が上がるにつれ、各組織中の総水銀濃度も上昇し、毛皮、肝臓および腎臓、血液の順で濃度が高かった。毛皮の水銀濃度は肝、腎、血液、脳組織中濃度と正相関していた。セレン 0.8 $\mu\text{g/g}$ 湿重量の餌への添加は、どの組織の総水銀濃度へも影響を与えず、肝臓/血液、腎臓/血液、脳/血液の存在比も不変であったが、毛皮と血液の存在比には若干の変化が見られたと報告している。

■ 土壌中セレンと穀類への影響

Wang らは、メチル水銀に対するセレンの修飾影響を調べる目的で、セレンを添加した土壌または葉面施肥を用いて稲を栽培したところ、セレン入り土壌改良剤で穀類と土のメチル水銀濃度を最大で 73% 低減することができたと報告した⁶¹⁾。一方、セレン入り葉面施肥 (肥料葉面散布) では、穀類中のメチル水銀濃度は変わらないままセレン濃度が 3~12 倍高くなった。セレン改良剤

による穀類へのメチル水銀毒性の低減効果は、植物内部での作用ではなく、土壌において水銀とセレンの拮抗作用が働いてもたらされることがわかった。さらに、エネルギー分散型 X 線分光法 (TEM-EDX) と X 線吸収微細構造解析 (XANES) の結果から、土壌中で水銀・セレン複合体が形成されたことで、土の微生物のメチル水銀濃度が抑制されると考えられた。セレン化合物は速やかに化学形態が変化し、土壌の水銀濃度の改善に亜セレン酸とセレン酸塩は同程度の効能を保持していることが推測された。

水銀で汚染された水田では土壌でのメチル水銀産生を制御することが重要だが、自然界では無酸素条件下で硫酸塩還元菌が産生に関与することが知られている。また、セレン添加が土壌中メチル水銀毒性の低減効果をもたらすことが近年の研究で明らかになっており、土壌の酸化還元条件の違いにより硫酸塩やセレンがメチル水銀産生にどのように関わるか小生態系を実験的に作って調べる必要がある。主に硫酸塩還元菌がメチル水銀産生に関与する土壌に亜セレン酸やセレン酸塩を添加し、穀類を育てた Wang らの一連の研究で、硫酸塩の添加により土壌中のメチル水銀量が固体で 18% 以下、溶解物質では 25% 以下となることが報告された⁶²⁾。亜セレン酸の添加により、さらにメチル水銀産生が抑制されたため、無酸素環境下で水田などの水銀リスクを評価する際は、慎重に硫酸塩とセレン両者の影響を考慮しなければならないと述べている。

同著者グループはさらに、土壌に 40 日間または 5 日間の無酸素状態下で 3.0 mg/kg のセレンを添加した場合と添加しない場合で 0~960 mg/kg の硝酸塩を加えると、土壌のメチル水銀レベルがある程度影響を受け、有酸素環境で再酸化するとコントロールに比べメチル水銀濃度が 18~40% 高くなったと報告した⁶³⁾。硫酸塩と鉄の動態がメチル水銀産生に関与していたが、セレンを添加した場合では、硫酸塩添加の有無にかかわらず土壌中メチル水銀産生をコントロール群の 23~86% に抑制した。エネルギー分散型 X 線分光法 (TEM-EDX) と X 線吸収微細構造解析 (XANES) の分析結果より、硫酸塩の存在の有無にかかわらず HgSe ナノ粒子体の形成が観察され、メチル水銀の産生には硫酸塩よりセレン存在の役割が大きいと考察されている。

■ セレンのメチル水銀に対する防御効果に関する *in vitro* 実験

北海に生息するゼニガタアザラシの血中水銀とセレン濃度は比較的高レベルであると報告されているが、Das らは、メチル水銀に曝露したゼニガタアザラシのリンパ球増殖に対する亜セレン酸ナトリウムおよびセレノメチオニンの潜在性の防御効果について *in vitro* で評価した⁶⁴⁾。コンカナバリン A 刺激活性化 T リンパ球へのメチル塩化水銀 0.75 μM の *in vitro* 曝露では、ミトコンドリア膜が失われることで、DNA 合成が著しく抑制されることがうかがわれた。アザラシの T リンパ球増殖を指標とした場合に、メチル水銀毒性に対する亜セレン酸やセレノメチオニンの防御影響は見られなかった。また、亜セレン酸とセレノメチオニンの添加によりリンパ球増殖やミトコンドリア膜電位へ悪影響は及ぼされていなかった。水銀・セレン比が 1:10 である北海ゼニガタアザラシでは、免疫細胞への *in vitro* のメチル水銀曝露ではセレンの防御効果は認められないと結論付けている。

メチル水銀毒性に対する有機セレン化合物の有益影響についての研究が蓄積されつつあり、マウスの実験研究においてメチル水銀誘導のミトコンドリア機能不全やその他の毒性に対する二セレンジフェニルの防御効果が報告済みである。Dalla Corte らは、二セレンジフェニル (PhSe)₂ とメチル水銀を同時投与したラットで、肝臓の水銀蓄積量が低減するかを調べた⁶⁵⁾。ラットの肝臓切片に 37 度で 30 分間、二セレンジフェニル (0.5 または 5 μM) とメチル水銀 (25 μM) を同時処理した後、ホモジネートした切片、P1 フラクション、ミトコンドリアおよび培養培地中のセレンと

水銀濃度を誘導結合プラズマ質量分析計で測定した。どのサンプルにおいても単独処理したものと、セレンと水銀を同時処理したものとでセレン濃度や水銀濃度に有意な差異は見られなかった。二セレンジフェニルの防御効果は、メチル水銀自体のレベルの低減をもたらすものではなく、細胞の重要分子構造部とメチル水銀との結合を阻害する複合体の形成で生じるものだとしている。すなわち、二セレンジフェニルが内因性チオールにより還元され、中間生成体であるセレノール／セレノラート ($\text{PhSeH}/\text{PhSe}^-$) とメチル水銀とが結合して複合体 PhSeHgMe を生成することで、ミトコンドリア機能不全の原因となる分子結合が妨げられたと考えられる (図 4)。

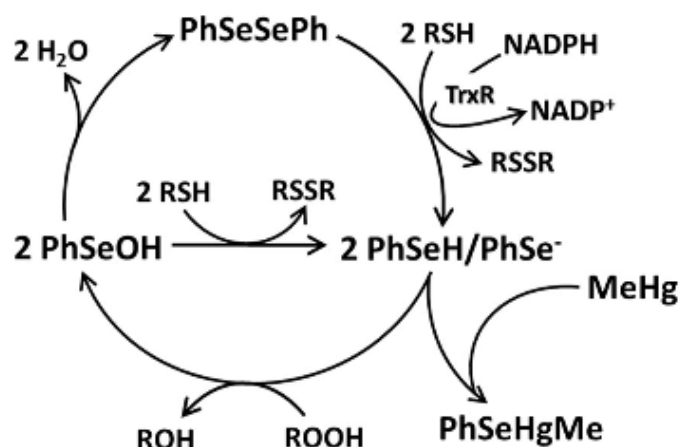


図 4 Scheme on $(\text{PhSe})_2$ mechanism of protection against MeHg toxicity

4) 発展途上国における水銀／メチル水銀の健康問題

発展途上国における小規模金鉱山での金鉱石の採掘は、手掘りで、金の抽出には水銀アマルガム法が世界 70 国以上で用いられており、水銀の人為的汚染として最大である。特に、ブラジル・アマゾン川流域では 1970 年以来、2,000～3,000 トンの水銀が環境中に放出された。このような小規模金鉱山には推定 5000 万人の労働者が従事しており、金採掘に伴う水銀の使用は生態系の水銀汚染問題とともに採掘作業や周辺住民への健康影響が問題となっている。特に、河川の水銀汚染は魚介類へのメチル水銀蓄積そして土壌汚染は穀物へのメチル水銀蓄積という新たな問題を引き起こした。

ここでは PubMed を用い検索キーワード“mercury gold mining”、“mercury mining”および“mercury cyanide”を入力し、2016 年度に発表された論文を検索した。検索した論文の中から小規模金鉱山や水銀鉱山における採掘に伴う水銀、シアンによる環境汚染および健康影響に関する内容を紹介する。

■ 小規模金鉱山採掘作業や周辺住民の健康影響と環境への影響

発展途上国における小規模金鉱山における水銀—金アマルガム法による金抽出は作業者のみならず周辺住民に対し、深刻な健康影響を及ぼしている。Black らは、西アフリカに位置するブルキナファソの Zopal 小規模金鉱山で作業者の職業性水銀曝露量を個人サンプラー (マーキュリーバッジ) を用いて評価した⁶⁶⁾。住民 100 名に対するアンケート調査と作業員 44 名に対する個人サンプラーによる曝露量の測定をおこなった。水銀曝露量は屋外でアマルガムの燃焼をおこなう作業員では時間加重平均値 (TWA) で $7,026 \pm 6,857 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 、傍観者では $1,412 \pm 2,870 \mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、燃焼時には 82% の人々が許容曝露限界値 (PEL) $1,000 \mu\text{g}/\text{m}^3$ を超えた曝露があり、その内、11% のヒトが米国産業衛生協会の脱出限界許容濃度 (Immediately Dangerous to Life and Health, IDLH)

10,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ を超える曝露であった。アマルガム燃焼作業に従事しない対照作業員でも 24% が PEL を超えており、大気中に潜在的に水銀放出は水銀アマルガムの燃焼に由来するものであった。86% のアマルガム燃焼作業員そして 59% の対照作業員の 8 時間 TWA 値は推奨限界値を超えていた (図 5)。この研究はアマルガム燃焼により高濃度の水銀が発生するというこれまでの研究を生物学的曝露手法と異なる水銀の個人サンプラーを用いて明らかにした。

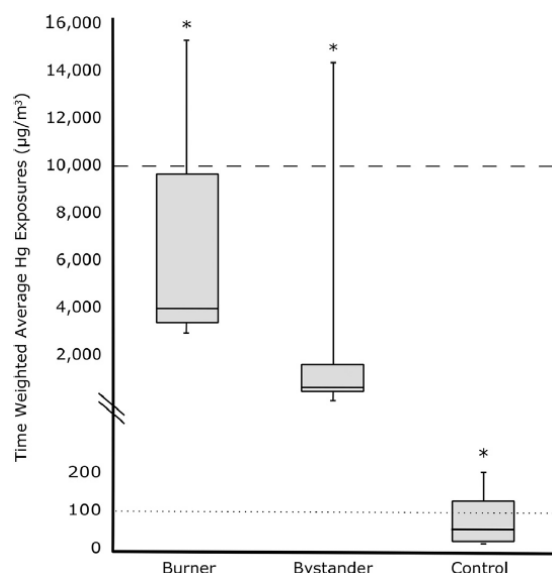


図 5 Box and whisker plot of the time-weighted average (TWA) personal Hg exposure of the burners ($n = 3$) and bystanders ($n = 25$) during the 3 open-air burn events, compared to controls who were not present at the burn ($n = 17$). The PEL (dotted line; 100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) was exceeded by 82% of the burners and bystanders and 24% of the control miners. The IDLH (dashed line; 10,000 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) was exceeded by 11% of the burners and bystanders. *Significantly different TWA values ($p < 0.05$).

小規模金鉱山採掘作業員の水銀曝露による腎機能への影響について、Rodríguez らは、コロンビアの北東部に位置する小規模金鉱山に従事している作業員を対象に水銀による腎機能への影響について横断調査をおこなった⁶⁷⁾。金鉱山作業員 164 名と非鉱山地域住民 127 名を対象に、血液中、尿中そして毛髪中水銀濃度と腎機能のバイオマーカーとして血清クレアチニン、アルブミン、 β_2 -ミクログロブリン排泄量を測定するとともに推定糸球体濾過率 (eGFR) も求めた。金鉱山作業員は非鉱山地域住民より血液中、尿中、毛髪中水銀濃度が有意に高かったが、eGFR は非鉱山地域住民の方が有意に低く、他の腎機能指標には有意差はなかった。多重ロジスティック回帰モデルで年齢、性別、喫煙、コーヒー摂取、魚食による水銀推定摂取量を調整して検討しても水銀濃度と eGFR 低下 ($< 76.4 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$) とに関連は認められず、重回帰分析では尿中水銀濃度が 10 倍になると eGFR が $3.3 \text{ mL}/\text{min}/1.73\text{m}^2$ 上昇する関連が認められた。これは金鉱山作業員の血液中水銀濃度が $3.4 \sim 11.0 \mu\text{g}/\text{L}$ 、尿中水銀濃度が $1.3 \sim 9.6 \mu\text{g}/\text{g Cr}$ で水銀曝露レベルが低または中レベルであったこと、作業員の年齢が若く eGFR と年齢の関連が調整しきれなかったことから、水銀曝露による腎機能への影響が認められなかったと考えられた。

小規模金鉱山周辺の住民健康調査について、Bose-O'Reilly らはインドネシアの Cisitu の小規模金鉱山の住民の水銀による健康影響を調べた⁶⁸⁾。この地域は大気、土壌、農作物、魚介類が水銀によって汚染されている。しかも住民の主食であるコメも水銀に汚染されており、住民はコミュニティにおける重症疾患が金鉱山から放出される水銀に関連することに危惧し、医学的検査で神経学的徴候をもつ 18 名の尿中、毛髪中の水銀濃度を測定し、水銀曝露との関連性について調べた。18 名は慢性水銀中毒の典型的な自覚症状である唾液分泌過多、睡眠障害、振戦、運動失調、拮抗運動反復不全、共同運動の検査異常 (pathological coordination tests)、口腔内の青みがかった色素沈着が見出された (表 2)。尿中水銀濃度は 8 名の患者が $7 \mu\text{g Hg}/\text{L}$ 以上であり、毛髪中水銀濃度は全員が $1 \mu\text{g Hg}/\text{L}$ 以上であった。15 名の患者は幾つかの症状を呈し、尿、毛髪の水銀レベル

は高く、水銀中毒と診断された。Cisitu は水銀に汚染された灌漑用水で耕作し、そのコメを住民は喫食するという特殊な状況下にある。重症な神経学的徴候や尿、毛髪中水銀の増加は大気中の無機水銀による曝露や水銀に汚染された魚介類や穀類の摂食によるものと述べている。

表2 Frequency and confidence intervals of pathological findings; Medical score sum points; 0–2 low score sum; 3–5 medium score sum; 6–10 high score sum.

Sign	Absolute frequency (%)	95% confidence interval (%)	Score point if pathologic finding or positive result
Excessive salivation	7/18 (38.9)	17.3–64.3	1
Sleep disturbances	13/18 (72.2)	46.5–90.3	1
Subjective tremor	13/18 (72.2)	46.5–90.3	1
Ataxia of gait	13/18 (72.2)	46.5–90.3	1
Finger-to-nose tremor	12/17 (70.6)	44.0–89.7	1
Dysdiadochokinesia	12/16 (75.0)	47.6–92.7	1
Gray to bluish discoloration of the oral cavity	5/18 (27.8)	9.7–53.5	1
Proteinuria	2/15 (13.3)	1.7–40.5	1
Pencil tapping test	8/14 (57.1)	28.9–82.3	1
Matchbox test	8/14 (57.1)	28.9–82.3	1
Maximum medical score			10

金鉱山周辺の子どもへの水銀影響を調査した報告は少ない。Ohlander らは南米チリの田舎町の子どもを対象に水銀曝露と神経運動機能との関連を調べた⁶⁹⁾。288 人の子どもの水銀リスク因子と実態的人口統計学に関する横断データを集めた。解析に必要なデータが揃っていたのは 130 名であったため、その 130 名の結果と、データ補完をおこなった 288 名のデータ (平均年齢 9.6±1.9 歳) を用いて、交絡要因を調整したロジスティック回帰分析により、爪の水銀濃度 (中央値 0.11 µg/g、範囲 0.02~2.36 µg/g) と 4 つの異なる神経運動機能との関連性を調べた。その結果、病的低下が見られた子どもは pure motor skills で 11.1%、adaptive fine motor skills で 14.9%、gross motor skills で 63.9%、そして片足立ち検査で 10.4%であった。これらの運動機能と爪中水銀濃度の間に関連性は認められなかったが、家屋内でアマルガム燃焼している家では子どもの病的 pure motor skills と高い関連性 (Odds 比 3.07、95% CI 1.03-9.18) を有した。以上より、家屋でのアマルガム燃焼に伴う水銀蒸気曝露は子どもの pure motor skills に長期悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

ラテンアメリカやカリブ海沿岸諸国でも小規模金鉱山での水銀の消費と放出そして水銀生産が水銀の環境汚染の主要因となっている。メキシコでは過去 2 年間に水銀採掘量が非公式であるが約 10 倍に増加している。Camacho らは、Queretaro 州 Peñamiller 行政区の Plazuela 村で、住民の尿そして環境中の水銀の濃度を測定し、鉱山地域住民の健康リスクを軽減するためのプログラム作成に着手した⁷⁰⁾。尿試料は出産後からこの地域に住んでいる 6~14 歳の子ども、女性そして現在も鉱山に従事する作業員から採取した。またこの地域の水銀汚染状況を把握するため居住地周辺でより危険性高い地域の採鉱廃棄物、水、土壌を採取した。尿中水銀濃度は子ども 5 名では平均 22.5 (6.1~32.7) µg/g Cr、女性 3 名では均 39.7 (20.2~63.4) µg/g Cr そして鉱山作業員 8 名で平均 54.1 (11.5~144) µg/g Cr であった (表 3)。また土壌中水銀濃度は一般土壌で平均 750 (28.8~3493) mg/kg、堆積物では平均 9,004 (107.8~35,589) mg/kg、汚染地域では平均 5,231 (3,979~7,864) mg/kg であり、いずれもメキシコの水銀に対するガイドライン (23 mg/kg) の 150 倍以上であった。住民の水銀毒

性に対するリスク認識の低さや水銀採掘が唯一の経済活動であることを考慮しながらリスク軽減のためのプログラムが開始された。

表 3 Plazuela 住民における尿中水銀レベル (µg/g Cr)

	子ども	女性	鉱山作業員
Number	5	3	8
Mean	22.5	39.7	54.1
Minimum	6.1	20.2	11.5
Percentile 25	13.8	20.2	17.8
Median	22.7	35.5	52.9
Percentile 75	31.1	63.4	70.3
Maximum	37.7	63.4	14.4
Action level	5	5	25
Risk level	20	20	35

* Action level for children and women risk level for children and women; action level for workers risk level for workers (occupational guideline).

Sari らは、インドネシア中部ジャワ州の Cihonje 村にある金鉱山地域と Semarang 地域の非金鉱山地域について、4つの地域社会脆弱性指標（曝露程度、汚染率、慢性・急性毒性）を用いて地域の脆弱性の比較研究をおこなった⁷¹⁾。急性毒性指標として8種類の自覚症状（図5）について頻度を調べた。他の指標として金鉱山からの排水、Tajum 川の河川水そして毛髪の水銀濃度を用いた。排水中水銀濃度は金鉱山における水銀-金アマルガム工程後が 37.3 µg/mL と最も高く、次に排水管の水が 22.4 µg/mL であり、いずれもインドネシアの排水基準値 (0.005 mg/L) に比べ、2,420 倍の高値であった。さらに Tajum 川の水銀濃度は7か所の平均で 0.27 ng/L であったが、金鉱山が位置しているところの濃度は 685 ng/L と WHO の品質閾値 (the quality threshold standards) を超えていた。住民の健康の質レベルそして慢性毒性の指標として用いた毛髪水銀濃度は非金鉱山地域住

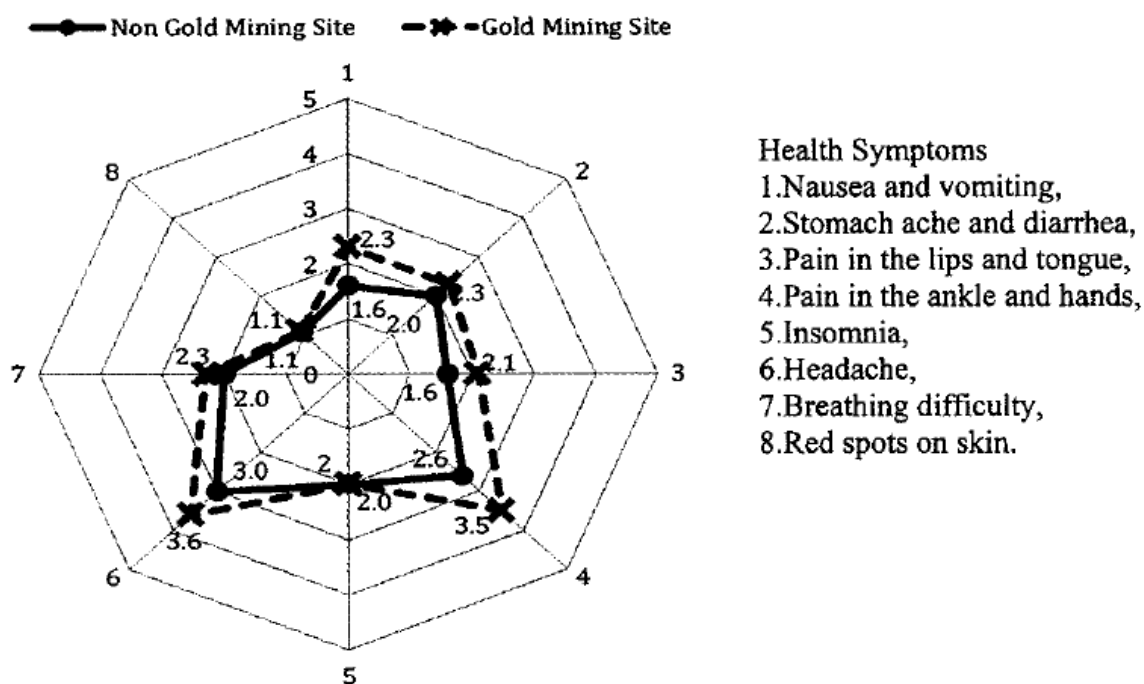


図 6 Health symptoms frequency of respondents as acute toxicity indicator.

民では 0.01~5.38 ng/mg、金鉱山地域住民では 0.90~17.07 ng/mg であり、金鉱山地域住民が高値を示した。水銀による症状の出現頻度をスコア化 (1 点: 1 回/週、2 点: 2 回/週、3 点: 3~4 週、4 点: 6~7 回、5 点: しばしば出現) した結果 (図 6)、水銀健康影響を示す自他覚症状も非金鉱山地域住民に比べ、金鉱山地域住民により影響が認められた。以上より、4 つの地域社会脆弱性指標から金鉱山居住地域は非金鉱山居住地域に比べ水銀汚染に脆弱であると結論づけている。

小規模金鉱山周辺の河川の水銀汚染は魚介類へのメチル水銀の蓄積を引き起こし、魚介類摂取による健康影響が問題となっている。Olivero-Verbel らはコロンビアのアマゾンの Caqueta 川の魚介類そして周辺住民の毛髪中水銀を測定し、魚介類摂取による総水銀摂取のリスク評価をおこなった⁷²⁾。Caqueta 川周辺住民 200 名の毛髪中の平均水銀濃度は $17.29 \pm 0.61 \mu\text{g/g}$ ($1.2 \sim 47.0 \mu\text{g/g}$) であり、94% の人が WHO の閾値である $5 \mu\text{g/g}$ を超えていた (図 7)。また 79% の人が $10 \mu\text{g/g}$ を超える値を示した。魚介類中の平均水銀濃度は非肉食性では $0.10 \sim 0.15 \mu\text{g/g}$ であり、肉食性魚介類では $0.10 \sim 1.5 \mu\text{g/g}$ であった。成人の最大許容魚介類摂取率 (maximum allowable fish consumption rate) に基づく住民のハザード指数は 2.96~31.5 であった。この値は水銀に関連した健康リスクが高いことを意味しており、肉食性魚介類の摂取を避けるべきであると述べ、特に母乳による保育は子どもの健康保護ために避けるべきと提言している。

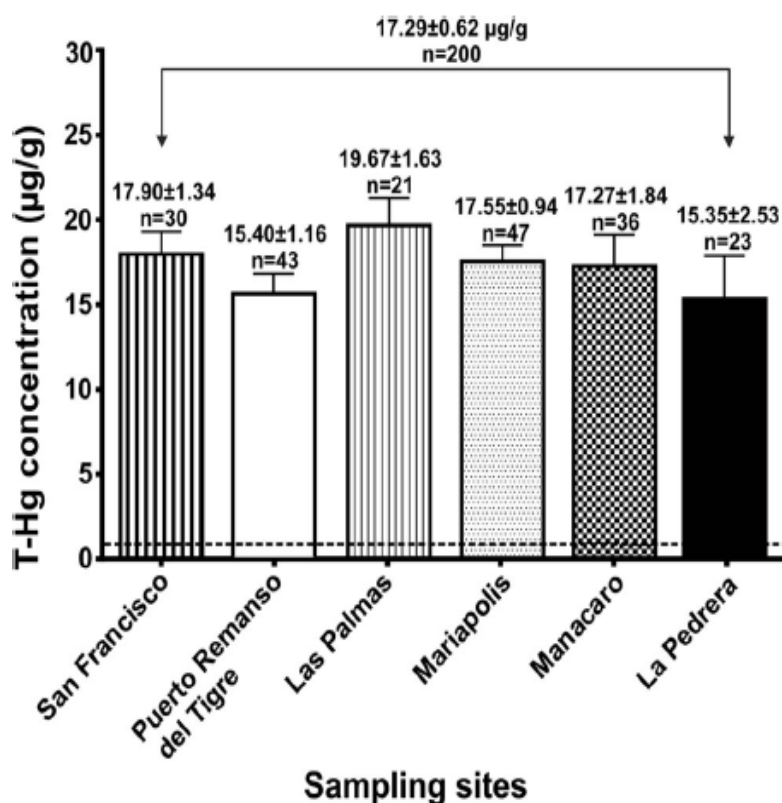


図7 異なる収集地域の毛髪総水銀(T-Hg) 濃度の分布. 収集地域間に有意な差は見られなかった (分散分析、 $p = 0.438$). 破線は国際的に推奨されている毛髪水銀濃度 ($1 \mu\text{g/g}$) を指す。

インドネシアの Buru 島でも小規模金鉱山で水銀アマルガム法による金抽出が 2012 年からおこなわれており、急速に河川、河口、海の堆積物への水銀の蓄積が生じている。Reichelt-Brushett らは Mount Botak 小規模水銀鉱山付近を流れる下流の堆積物を採取するとともに、Gogrea 小規模金鉱山でも採取をおこなった⁷³⁾。採取した全ての堆積物はインドネシアの沈積土品質ガイドライン (1 mg/kg) を超える総水銀濃度を示し、特に Wamsit 川河口堆積物は基準値を 82 倍超えていた。このような環境下では水銀のメチル化といった高い生物学的利用能の水銀種を産生する可能性があることを示唆している。また地元産魚介類の消費による現在の汚染の脅威を評価するため、

Namlea 魚市場から魚介類、軟体動物、甲殻類を購入し、総水銀濃度を測定した。その結果、殆どのサンプルの食用部位が高い水銀濃度を示し、食品安全に対する懸念が高まったと述べている (図 8)。さらに Buru 島における金採掘操業地の下流の河川、河口、海洋の生態系は水系食物連鎖そして漁場資源に大きな影響を与えてほどの危険性の高い水銀に曝されていることを示した (図 9)。またこれらの地域や Mollucas 州の住民の海洋性タンパク質に対する高い食物依存性を考慮すると早急に更なる調査、リスク緩和そして住民に対する教育が必要であると述べている。

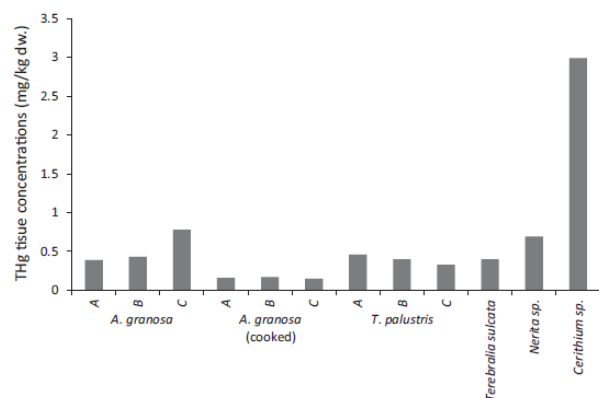


図 8 Total Hg tissue concentrations (mg/kg dw.) of single and replicate (A, Band C) samples of 12 fish species collected from Namlea, Buru Island, Indonesia.

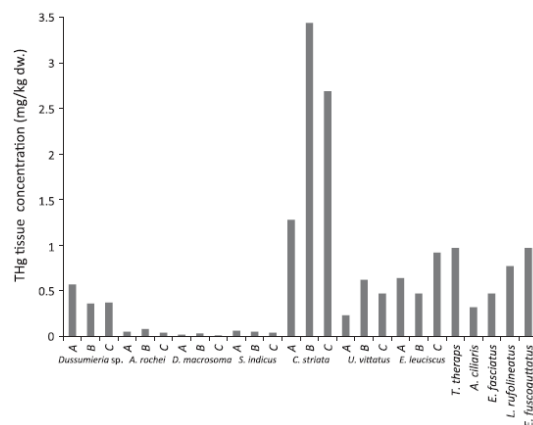


図 9 Total mercury (THg) concentrations (mg/kg dw.) in single and replicate samples (A, B and C) of molluscs collected on Buru Island, Indonesia

ペルーでも南東部を流れるアマゾン川に小規模金鉱山から過去 30 年以上にわたって 69 トンの水銀が放出された。Moreno-Brush らは長年にわたる小規模金鉱山から放出された水銀に対する浮遊物質や水分因子の役割を明らかにするため、ブラジル・アマゾン川の Malinowski-Tambopa 川系に沿って河岸沈殿物や浮遊物を分析するとともに魚介類への水銀蓄積を調べた⁷⁴⁾。加えて、大気中への水銀の放出により生じる水生系への局所的な影響を三日月湖の堆積物コアの分析によって評価した。河岸沈殿物中の水銀濃度 (20~53 ng/g) は浮遊物の水銀濃度 (400~4,000 ng/g) と比べると粒径の相違により低かった。小規模金鉱山の影響を受けた河川域の浮遊物質の水銀濃度は~1400 ng/L であり、影響を受けない河川域 30~120 ng/L に比べ、高値であった。これは浮遊物中の水銀濃度が高いのではなく浮遊物量が多いことに起因していた。三日月湖の沈殿物の値は 64~86 ng/g と低く、金鉱山採鉱活動によって増加する大気への水銀放出に起因するものではなかった。水銀の流動変動は殆どが沈殿物蓄積率の変動によるものであった。分析した魚の 5% (全て魚食性) が、WHO が推奨したヒトにおける摂取量 (500 ng/g) を超えていた。Malinowski- Tambopata 川系の小規模金鉱山の影響を受けた河川域では必ずしも水銀蓄積の増加が認められず、放出された水銀はそこに止まるかあるいは小規模金鉱山地域から離れた地域に運搬されるかのいずれかであることが明らかとなった。特に満潮時の間は浮遊物とともに移動し、小規模金鉱山地域の水生系における水銀濃度の変動の要因であるとした。

小規模金鉱山周辺の地域では水銀に加えて、尾鉱からの流出した重金属による健康リスクが危惧されている。南エクアドルのアマゾン川の山麓地帯の小規模金鉱山でも採掘活動が活発におこなわれている。その結果、金鉱山に隣接する地域の住民の水生系は幾つかの重金属によって汚染され、曝露の危険性が増している。González-Merizalde らは、Nangaritza 川流域の幾つかの支流の水銀とマンガンの汚染を評価するとともに金鉱山周辺に住む 7~12 歳の学童の曝露評価をおこなった⁷⁵⁾。河川水と沈殿物は鉱山近く高度汚染地域と下流の中等度汚染地域から採取した。測定は

毛髪中マンガン濃度と尿中水銀濃度を両地区の学童を対象に実施した。高濃度の不溶性マンガンが高度汚染地域の河川水から 2,660~3,990 µg/L 検出されたが、水銀は検出限界 (1.0 µg/L) 以下であった。同様に沈殿物中のマンガン濃度は 3,090 µg/g~4,086 µg/g に増加していた。学童の毛髪中マンガン濃度は高度汚染地域では 5.5 µg/g、中等度汚染地域では 3.4 µg/g であった。一方、尿中水銀濃度は高度汚染地域では 4.4 µg/g クレアチニン補正 (Cr)、中等度汚染地域では 0.62 µg/g Cr であり、2 つのバイオマーカーは高度汚染地域の方が中等度汚染地域より有意に高かった。沖積地域に住む子どもは毛髪中マンガン濃度が高く、一方、鉱石処理施設の近くにある学校や家の学童の尿中水銀濃度は極めて高濃度であった。

小規模金鉱山での採掘活動は水銀化合物の汚染を引き起こすとともにヒトの健康リスクをもたらす他の重金属が放出されると述べている。Kamunda らは南アフリカの Witwatersrand 金鉱山地域の 2 ヶ所の鉱山村落の土壌 17 試料と 5 か所の選鉱尾鉱土壌 56 試料を採取し、ヒ素、鉛、水銀、カドミウム、クロム、コバルト、ニッケル、銅、亜鉛を ICP-MS で測定し、これらの重金属濃度から成人と子どもの健康リスクの評価をおこなった⁷⁶⁾。土壌中のヒ素、クロム、ニッケルが許容濃度を超えていた。成人に対するハザード指標 (HI、複数のハザード指数 HQ の総和) は全ての侵入経路において 2.13 であり、成人集団に対し発癌性以外の重大な影響を認められた。子どもにおいても HI は 43.8 と金鉱山周辺に住む子どもに発癌性以外の重大な影響が認められた。発癌性リスクは大人では 1.7×10^{-4} であり、これは成人 5,882 名当たり 1 名が影響を受けるかもしれないことを意味している。子どもにおいては 3.67×10^{-4} と 2,725 人当たり 1 人が影響を受けると算出された。大人と子どもの発癌性リスクの値は許容値より高値であったと述べている。

Mataba らはタンザニアの Thigithe 川における水界生態系の微量元素の分布に調べ、健康リスク評価をおこなった⁷⁷⁾。調査は北 Mara 金鉱山の上流と下流で表層水、沈殿物、魚介類 (コイ科、学名 ラベオビクトリアヌス、一般名 Ningu) を採取し、ヒ素、カドミウム、コバルト、クロム、銅、水銀、ニッケル、鉛そして亜鉛濃度を測定した。表層水の微量元素濃度は全て地点で検出限界に近い値か、それ以下であった。沈殿物に関してはヒ素が全ての地点で、そして高濃度の水銀は小規模金採掘をおこなっている下流地点で観察された。Ningu の組織中の微量元素濃度は非汚染地地域の魚介類より僅かに高い値であった。Thigithe 川の魚介類摂取ヒトの健康リスクを計算したとき、タンザニア人の平均体重 70kg そして 1 日平均摂取量を 17g とした場合、全ての微量元素に対するハザード指数 (HQ) は 1 以下であり、計算上では影響は認められなかった。しかしながら、ヒ素と水銀については Ningu の推奨最大摂取量は 100 g 以下であるが、川岸に住む住民や漁師は FAO によって定められた魚介類の平均摂取量を超える量を摂取しており、健康リスクの可能性を示唆している。

Obiri らは ガーナの PresteaHuni Valley 地域の河川水と沈殿物中の毒性重金属に曝露される小規模金鉱山作業員の健康リスク評価をアメリカ環境保護局のリスク評価ガイドラインに沿っておこなった⁷⁸⁾。試料は 70 ヶ所の水と 30 ヶ所の沈殿物を小規模金鉱山の採掘作業によって影響を受ける地域の水域から採取し、ヒ素、カドミウム、水銀そして鉛濃度を測定した。水試料中の金属濃度はヒ素 15~325 µg/L、カドミウム 0.17~340 µg/L、鉛 0.17~122 µg/L そして水銀 132~866 µg/L であった。測定したヒ素、カドミウム、水銀そして鉛濃度から中心傾向曝露 (central tendency exposure、CTE) と合理的最大曝露 (reasonable maximum exposure、REM) を推定し、職業性曝露のシナリオに基づき河川水と沈殿物中のこれら重金属濃度による曝露が発癌および非発癌リスクを計算するための入力パラメーターとして用いた。CTE に基づく HQ を計算すると、Anikoko 川周辺で働く

小規模鉱山作業者の非発癌リスクの評価はカドミウム 0.04、鉛 1.45、水銀 4.60 そしてヒ素 1.98 であった。一方、飲料水として Mansi 川からヒ素を摂取する Dumase の小規模鉱山作業者の発癌リスクは 3.1×10^{-3} であった。本研究の結果、HQ は 1 以上を示し、小規模鉱山作業員の健康リスクが認められた。特に発癌リスクの結果はアメリカ環境保護庁 (EPA) のガイドライン値 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-6}$ より高い値を示した。

小規模金鉱山では水銀アマルガム法とともにシアン化法による金抽出がおこなわれており、その結果、生態系に著しい影響を及ぼしている。西アフリカのブルキナファソではシアン化法を用い、違法な金抽出もおこなわれている。Razanamahandry らは、Zougnazamiline 地区の川の流域から土壌と水の試料を採取し、シアン化物汚染とシアン化物分解細菌 (cyanide degrading bacteria) の評価をおこなった⁷⁹⁾。8 地点から採取した水試料の遊離シアン濃度は $0.7 \sim 23 \mu\text{g/L}$ であり、そして 30 地点から採取した土壌試料の遊離シアン濃度は $0.023 \sim 0.9 \text{ mg/kg}$ であった。試料中にはシアン化物分解細菌が存在しており、分離したシアン化物分解細菌種の遊離シアンの分解能力を試験するため 40、60、80 mg/L の遊離シアンを含む培養液を室温で、pH 9.5 そして栄養素の有無の条件下で培養した。遊離シアンの 95%以上が 25 時間以内に分解し、しかもこの分解は細菌の増殖とアンモニアの産生と関連していた。しかし、遊離シアン濃度が 100 mg/L 以上では菌の増殖とシアン化物の分解が阻害された (図 10)。無生物下での試験では 3%の遊離シアンが蒸発により揮散した。遊離シアンの分解は主に生物学メカニズムによっておこなわれることから、このシアン化物分解菌によるシアンで汚染された土壌、水質の改善に活用すべきと提言している。本研究に用いた細菌群は長く暑く乾燥したサヘル気候の中でも生存している。この菌はローカルな気候条件にも適応し、シアン化物の生物学的分解の潜在力を示すので、違法にシアン化法で金採掘をおこなっている西アフリカの他の汚染地域への適応を探索すべきと述べている。

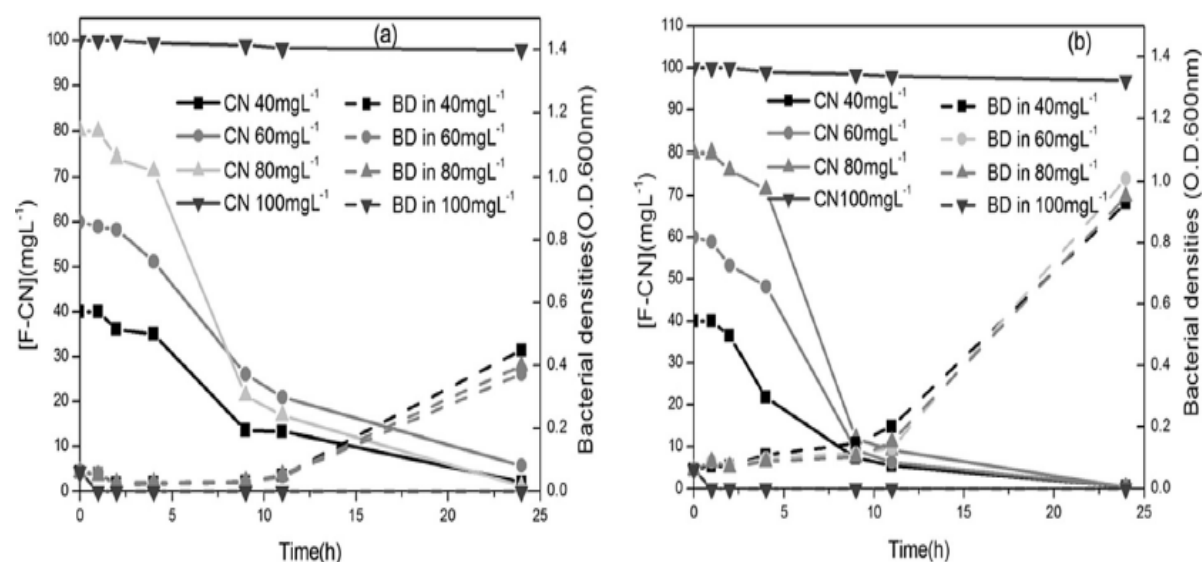


図 10 F-CN removal and bacterial growth in liquid medium (a) without nutrients (M1) and (b) with nutrients (M2) in aerobic conditions.

■ 水銀鉱山における環境汚染と健康影響について

中国では水銀鉱山周辺の水田で栽培される稲のメチル水銀汚染が問題となっている。水銀のメチル化と脱メチル化反応や水銀採掘地域の稲作水田の生態系でのメチル水銀生成をコントロール

する因子の把握は米粒の MeHg 汚染を評価する上で重要である。Zhao らは現在も水銀採掘がおこなわれている地域 (Gouxi、溝溪) と廃鉱になった地域 (Wukeng、呉坑) を対象に水田における水銀のメチル化の調査をおこない、稲の生育期間に水田土壌でのメチル化/脱メチルの関係について調べた⁸⁰⁾。現在も採掘活動をおこなっている Gouxi 地区の水田土壌中のメチル化/脱メチル化速度定数比は過去に水銀の汚染のあった Wukeng 地区に比べ高く、しかも、メチル水銀濃度は最近、土壌に沈着した水銀濃度と一致していた (図 11)。Gouxi 地区では新しく沈着した水銀は土壌中で素早くメチル水銀に変換されるが、Wukeng 地区のように過去に沈着した水銀は土壌中で有機物と結合しており、メチル化に利用されないことを明らかにした。Gouxi 地区の表層土の高濃度のメチル水銀は微生物により利用される水銀の増加とメチル化のための微生物の活性化との相互作用によって生じることから、水田土壌中のメチル水銀濃度の制御には微生物の活性と水銀種が重要である。嫌気性条件下では水銀のメチル化は硫酸塩還元菌や鉄還元菌によって促進されることが知られている。メチル化の代謝過程において、硫酸塩還元菌の活性をコントロールする硫酸塩と水銀の生物学的利用能をコントロールする硫化物の生成と蓄積のバランスが重要であると述べた。しかしながら、硫酸塩還元菌活性を活性化させる硫酸塩は水田での水銀のメチル化の一因子であり、大気から降下した水銀が水田におけるメチル水銀産生に関わる主要な因子であると結論づけた。

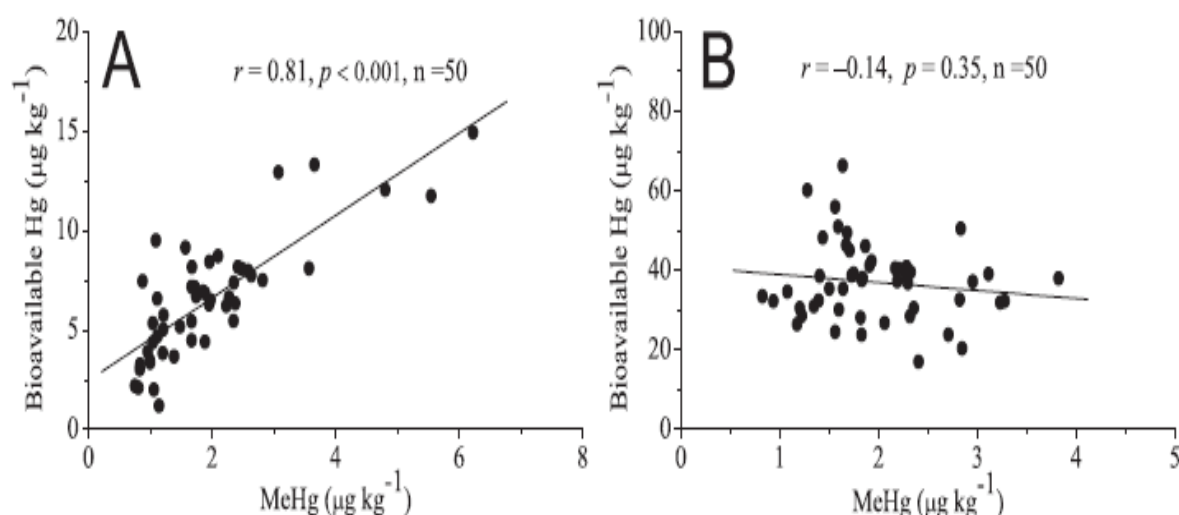


図 11 Correlations between bioavailable Hg and MeHg concentrations in soil cores at Gouxi (A) and Wukeng (B) during the rice growing seasons.

Li らは、万山水銀鉱山周辺 4 か所 (A、D、E、G) で地域住民を対象に血液中水銀、セレンや他の微量元素との相互関係について調べた⁸¹⁾。採鉱廃棄物の山の近くに住む住民の血液中水銀、セレンそしてヒ素濃度は著しく高く、水銀採掘や溶融活動による影響が大きいことを示した。米試料中のセレン濃度は高く、米からセレン摂取量は総セレン量の 72.6%に達した。セレン/総水銀のモル比、セレン/メチル水銀のモル比はそれぞれ 60.7 ± 27.1 と 110 ± 53.6 であり、血液中のセレン/総水銀モル比は血液中水銀濃度と負の相関関係にあった (図 12)。本研究対象の 80.2%が米国環境保護庁 (US EPA) の水銀曝露の危険性を示す規制値 $5.8 \mu\text{g/L}$ を超える血液中水銀濃度であった。一方、血液中セレン濃度は安全範囲内にあり、住民にとっては食事性のセレン摂取は水銀曝露の防御機構としての役割を果たしていることを示唆した。

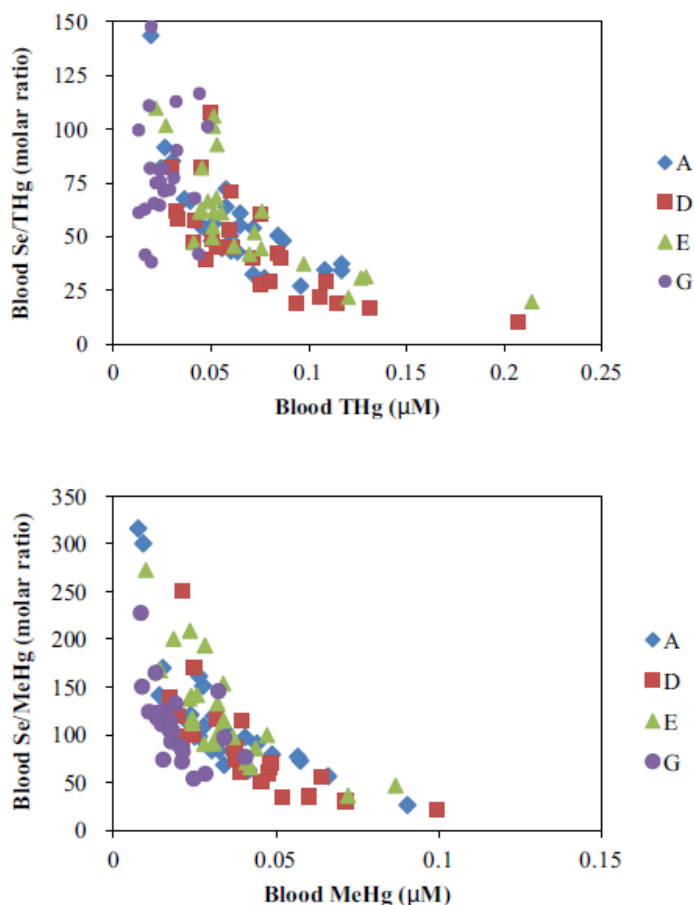


図 12 総水銀 (THg)、メチル水銀 (MeHg) およびセレン/水銀 (Se/Hg) モル比の間の関係. 血中水銀と Se/Hg モル比との相関係数は $r = -0.68, p < 0.01$.

水銀鉱山閉鎖後の水銀による環境および健康影響に関する研究がおこなわれている。スロベニアの Idrija 町の水銀鉱山は 500 年間における水銀採掘は Idrija 町とその周囲に深刻な環境汚染を引き起こした。1995 年後の鉱山閉鎖後もなお水銀汚染は引き続いている。Kobal らは、金属水銀、無機水銀、メチル水銀の曝露源の同定と潜在的な環境曝露の評価そして感受性の高い学童や妊婦の曝露評価を Idrija 町と対照として農村部/都市部でおこなった⁸²⁾。調査は妊婦 31 名については 2003 年～2008 年におこない、学童 176 名については 2008 年に実施した。曝露評価は水銀に対し相互作用を有する血漿中セレン濃度や妊婦の赤血球と臍帯血の抗酸化酵素活性 (グルタチオンペルオキシダーゼ、スーパーオキシジスムターゼ、カタラーゼ) を測定した。また血液、毛髪そして尿の水銀を測定し、曝露評価をおこなった。学童の血中水銀濃度は幾何平均 $0.92 \mu\text{g/L}$ 、母体血では幾何平均 $1.86 \mu\text{g/L}$ であり、尿中水銀濃度は学童では幾何平均 $1.08 \mu\text{g/g}$ クレアチニン補正 (Cr)、母親では $2.51 \mu\text{g/g Cr}$ であり、そして毛髪中水銀濃度は学童では幾何平均 241 ng/g 、母親では 251 ng/g と対照群である農村部に比べると高値であるが一般集団の範囲内であった。生体試料中の水銀値はある程度は大気中水銀を反映しているが、主として歯科アマルガムからの曝露を反映するものであった。しかも妊娠中の体内水銀の負荷量はセレンの生物学的利用能を減少させるものではなかった。また学童においてはセレノプロテインの発現の増加は適度に上昇した水銀曝露によるものかも知れない。酸化ストレスの生物学的指標である抗酸化酵素の変化は水銀曝露の増加によるものではなく妊娠に関連していると思われる。しかしながら、旧水銀鉱山に居住する妊婦については継続的にしかも潜在的な水銀曝露の観点から大規模な縦断研究が必要であると述べた。

水銀鉱山地域の閉山は採鉱廃棄物による水銀や他の重金属が環境中に放出される。これらの重金属は潜在的に毒性を所有するため、粒子状や可溶性金属の動員は主な懸念となっている。Bori ら

は、スペイン・アンダルシア州アルメリア県の Valle del Azogue にある水銀廃鉱周辺の土壌によってもたされる環境リスクを物理化学的パラメーター、重金属濃度の定量、水生・陸生生態毒性バイオアッセイ (aquatic and terrestrial ecotoxicity bioassays) を通して評価した⁸³⁾。土壌中の化学的分析では水銀、ヒ素、バリウム、鉛、アンチモン、亜鉛濃度が国際介入レベル (international intervention values) を超える値を示した。陸生毒性試験の結果は調査した生物 (シマミミズ、トビムシ、種々の植物種) 全てに有害な影響が見られ、中でもミミズの回避反応が最も鋭敏なエンドポイントであった。驚くべきことに、最も有毒なサンプルは高い金属含量によるものではなく、より高い電気抵抗を示すものであった。ビブリオ・フィッシュェリ、緑藻類 *Raphidocelis subcapitata*、オオミジンコ、ゼブラフィッシュによる水生生態毒性試験は陸生試験の結果と一致しており、金属汚染地域の評価に対し、生態毒性ツールと環境化学と組み合わせることが必要であることを確認した。

IV. 考察

わが国の環境省肝煎りでエコチル調査 (JECS) が始まり、そのプロトコル論文が 2014 年に出て以後⁸⁴⁾、現在に至るまで“JECS”を Keywords として PubMed 検索で現れる新規論文は 13 編である⁸⁵⁻⁹⁷⁾。出生コホート研究の魁となったメチル水銀に関する研究論文を数多く紹介してきた本報告書であるが、未だエコチル調査からのメチル水銀に関する研究は発表されておらず、ここで紹介できないのは残念至極と言わざるを得ない。今後のエコチル調査の研究成果発表に対して、本研究が何等かの示唆を示せるよう努力したい。

■ メチル水銀に関する疫学研究の考察

胎児期メチル水銀曝露による障害のうち神経発達への影響は既知の事実であると見做されている^{3,34)}。今回紹介した Bellinger らの論文は³⁴⁾、各々の国の平均母親毛髪水銀濃度を用い、母親毛髪水銀が 1 µg/g 増加する度に子どもの IQ が 0.18 低下すると仮定して、世界のどの地域で知的障害 (IQ 低下) が出やすいのか推定した。上の仮定は小児の鉛曝露による知能 (IQ) 障害の現れ方^{98,99)}ほど強くはないと考えられるので、まずは毛髪水銀濃度の増加に対する IQ 低下の傾きの精度を高めるためのメタ分析が必要となろう。

胎児性メチル水銀曝露による Bayley 乳幼児発達検査 (BSID) の運動発達指標 (PDI) と認知発達指標 (MDI) を検討した報告は 1995 年の Davidson らの論文発表以降¹⁰⁰⁾、PubMed で調べた範囲で 20 編あった (表 4)^{37,38,101-117)}。これらは、生体試料として臍帯血、母親毛髪、乳児毛髪が用いられ、かつ調査月齢および曝露レベルが異なる対象集団であることから、比較可能性があるとはいい難い。生体試料間で有意な関連の認められた論文の割合を比べると、両者に違いはなかった (毛髪試料で 8/12、臍帯血試料で 5/8、 $p > 0.2$)。BSID の内、PDI で有意な結果が多く得られており (PDI では 11/20、MDI では 3/20 であり、指標間の差は Fisher 直接確率で $p = 0.019$)、その関連はメチル水銀の増加に伴い PDI が低下するというものであった。フェロー諸島出生コホート研究は、BSID を使用していないものの、メチル水銀の胎児期曝露により運動発達に関連する指標が影響され易いと主張しており^{118,119)}、今回の BSID 研究の結果と一致する。なお、男女別々に解析をおこなったのはセイシェル、スペイン、イタリア、ブラジル・アマゾンであるが、男女ともに有意な関連が認められる報告はなく、メチル水銀の神経発達影響がいずれかの性に偏っていると判断する根拠にもなり得なかった。とは言え、わが国では BSID を用いたメチル水銀の神経発達影響

に関する研究は未だ報告されておらず、魚消費量の比較的多いと言われる日本における今後の成果に期待が寄せられる。

表 4 Bayley 乳幼児発達検査の運動発達指標 (PDI) および認知発達指標 (MDI) に及ぼすメチル水銀曝露の影響

調査地域	対象者数 (男/女)	水銀 指標*	曝露レベル (集団代表値)	調査 月齢	有意性**		その他の考慮され た有害/有益因子†	発表 年	文献
					PDI	MDI			
セイシエル	736	MTHg	5.9 µg/g	29	M+/F-	M-/F-		1995	100
セイシエル	229	MTHg	5.9 µg/g	30	MF+	MF-	鉛, PUFA	2008	103
セイシエル	228	MTHg	5.7 µg/g	30	MF+	MF-	PUFA	2011	106
セイシエル	242	MTHg	5.6 µg/g	9	MF-	MF-	PUFA	2012	108
セイシエル	1,265	MTHg	3.9 µg/g	20	MF+	MF-	PUFA	2015	112
ポーランド	233	CTHg	0.85 µg/L	12	MF+	MF+	鉛	2006	101
ポーランド	374	CTHg	0.9 µg/L (?)	12	MF+	MF-		2007	102
米国ニューヨーク	111	CTHg	4.3 µg/L	36	MF+	MF-		2008	104
カナダ北極圏	110	CTHg	22.2 µg/L	65	MF-	MF-	鉛, PCB, PUFA, Se	2010	105
カナダ北極圏	91	CTHg	17.0 µg/L	6.5	MF-	MF-	鉛, PCB, PUFA, Se	2014	110
スペイン	882/801	CTHg	8.4 µg/L	14	M-/F+	M-/F-	鉛, PCB	2012	107
スペイン	1541	CTHg	8.5 µg/L (?)	14	MF-	MF-	鉛, PCB, PUFA	2016	38
イタリア	307/299	MTHg	1.06 µg/g	18	M-/F-	M-/F-	PUFA	2013	109
台湾	83	MMHg	1.96 µg/g	36	MF+	MF-		2014	111
ブラジルアマゾン	105/189	NTHg	0.81µg/g/0.79µg/g	6	M+/F-	M-/F-		2015	113
ブラジルアマゾン	365	MTHg	病院 12.2/家 23.9 µg/g	24	MF-	MF-	エチル水銀	2016	114
ブラジルアマゾン	690	MTHg	6.4 µg/g	24	MF-	MF-	エチル水銀	2016	37
ブラジルアマゾン	1,139	MTHg	6.4 µg/g	24	MF-	MF+	エチル水銀	2016	116
中国貴州	270	MTHg	0.39 µg/g	12	MF-	MF+	鉛, PUFA	2016	115
クロアチア・リエカ	135	CTHg	2.98 ng/g	18	MF+	MF-		2017	117

* MTHg, 母親毛髪総水銀; NTHg, 乳児毛髪水銀; MMHg, 母親毛髪メチル水銀; CTHg, 臍帯血総水銀。

** “M” は男子; “F” は女子; “MF” は男女込み; “+” は統計的に有意; “-” は有意でない。

† PUFA, 多価不飽和脂肪酸 (DHA, EPA など); Se, セレン。

厚生労働省のホームページに「魚介類の摂食と水銀に関する Q & A」が掲載され、その中に『小児は、魚介類の摂食に注意しないでいいのですか?』という問い (Q) がある¹²⁰⁾。これに対して食品健康影響評価では、『小児は成人と同様の排泄機能を有しており、脳への作用も成人と類似していること、「セイシエル小児発達研究」において、子どもの神経系の発達にメチル水銀に関連する有害影響が証明されなかった』 (A) と記している。しかし、この根拠として挙げているセイシエル小児発達研究は出産時の母親 (あるいは児) の PUFA 濃度を測定しておらず^{121,122)}、2008 年に報告されたセイシエル小児発達栄養研究では「PUFA を調整するとメチル水銀は有意な負の影響が見られる」と結論が変わったため¹²³⁾、上の回答は適切と言えなくなっている。その上、セイシエルで日常的に食される魚類の多くはメチル水銀濃度 0.5 µg/g 以下であり¹²⁴⁾、わが国で比較的高頻度に食べられているマグロなどのメチル水銀濃度とは一線を画する。以上より、上述の Q & A については科学的根拠を再吟味し、適切に改める必要がある。

メバチやメカジキの赤身 (一切れ約 15g) には 10~15 µg のメチル水銀が含有する。仮に体重 60kg の成人が調理法を変えながら毎週 6 切れくらい食べていると、メチル水銀の摂食量は約 1.5 µg/kg 体重/週となる。Yaginuma-Sakurai らの介入研究では¹²⁵⁾、成人 27 名に 3.4 µg/kg 体重/週のメチル水銀 (メカジキやメバチ) を 14 週間摂食させた。それにより、平均毛髪総水銀は摂食前約 2

μg/g から約 8.5 μg/g まで上昇し、マグロ摂食を止めると徐々に低下した。このマグロ摂食に関わる介入研究で自律神経機能を評価したところ、毛髪水銀濃度が高くなった介入群において交感神経優位状態を示す指標が対照群と比べて有意に高く、かつその指標は毛髪水銀濃度と量-依存関係にあった。胎児期のメチル水銀曝露による自律神経機能への影響についても、議論の余地はあるものの¹²⁶⁾、フェロー諸島出生コホート研究およびわが国の後向きコホート研究で胎児期曝露と自律神経機能影響との有意な関係が 7 歳児、14 歳児で観察されている^{127,128)}。実際に、体重 8kg 前後の乳幼児が母親より週 4 度、一日一切れのマグロを与えられるなら、メチル水銀摂食量は 5~8 μg/kg 体重/週となり、この介入研究での摂食量を大幅に凌駕する。しかしながら、体重 10kg 未満の乳幼児を対象とした観察研究や介入研究は未だ報告されておらず、また脳神経回路の形成と発達が著しい時期でもあることから、乳幼児期における高濃度メチル水銀曝露による健康影響の有無を明らかにすることは、わが国の食習慣を鑑み、喫緊の課題と言えよう。

■ メチル水銀とセレンの関係

“メチル水銀”の他に“セレン”をキーワードに含む 2016 年の論文数は、それ以前に比べると 6 割程度に減少し、水銀とセレンの拮抗作用に関する機序解明研究に関しては進展が望めていない感がある。今年公表された疫学文献では、成人における血中水銀およびセレン濃度と神経行動学的検査結果との関係を調べたものが報告されたが、いずれのアウトカム指標とも関連は見られなかった。一方、成人の爪中水銀とセレン濃度を指標とした疫学調査では、水銀による脂質異常症のリスク上昇をセレンが抑制する可能性があるとして報告された。慢性水銀曝露による種々の有害影響が危惧される魚介類の多食者では、有害性抑制因子となり得るセレン濃度等もあわせて評価すべきであるが、比較的長期間の曝露および栄養状態が反映される爪や毛髪は生体試料として有用と思われる。また、国内の横断調査では、血中水銀とセレン濃度の高い成人でのみ両者の相関関係が認められ、水銀高曝露者では特にセレンプロテイン P の上昇が観察された。一定レベル以上の水銀曝露がある場合にセレンが毒性発現抑制効果を発揮するのではないかと推測され、そのメカニズム解明のためには、毒性緩和に有効な生体内でのセレンの存在形態を明らかにする必要がある、さらなる研究が求められる。

前年度以前に引き続き、自然界に生息する海棲動物や鳥類への水銀曝露とセレンの潜在的な重要性について関心が持たれており、両者の生体レベルに関するモニタリングが各地で続けられている。一部の鳥類や齧歯類、海棲動物ではメチル水銀を無機化し、肝臓などに不活性な水銀・セレン複合体として蓄積し、メチル水銀毒性を抑制していると考えられており、確証に耐えうる関連実験・分析の漸進が待たれる。自然界の生物では、現行の水銀基準値を超えているにも拘わらず有害影響がみられていない場合も多いため、ヒトにおいて魚食習慣のある者のリスクマネジメントを今後行う際に、水銀毒性拮抗作用のある生体内セレン比の情報をどのように活用していくかが検討課題の 1 つといえる。

■ 発展途上国における水銀/メチル水銀問題

小規模金鉱山での水銀-アマルガム燃焼時の作業者の水銀曝露量は個人サンプラーにより米国産業衛生協会の脱出限界許容濃度 IDLH (Immediately Dangerous to Life and Health) を超えることが明らかとなった。またアマルガム燃焼を家屋で行っている作業者の子どもに純粋運動技能に影響が見られた。作業者の腎機能検査では曝露レベルが低い場合は糸球体濾過率の低下が認められ

るものの尿中水銀濃度との相関性はなく、水銀による影響がみられない。金鉱山周辺住民の健康調査では大気からの水銀曝露に加え、水銀に汚染された魚介類や穀類からの曝露が明らかとなった。特に肉食性魚介類のメチル水銀濃度は高く、摂取による健康リスクが高いことから避けるべきである。同様に母乳による保育も子どもの健康保護ために避けるべきである。小規模金鉱山周辺の地域では水銀に加えて、尾鉱から流出した重金属による健康リスクが生じていることが明らかとなった。特に選鉱尾鉱土壌中のヒ素、クロム、ニッケルなどは許容濃度を超過しており、ハザード指標 (HI) は高く、成人や子どもにおいて発癌性以外の影響が認められるとともに発癌性リスクも高い。また河川水や沈殿物中からの重金属曝露によるリスク評価では、ハザード指数 (HQ) は水銀 4.60 そしてヒ素 1.98 と従業員に対し健康リスクが確認され、特にヒ素の発癌リスクはアメリカ環境保護庁のガイドライン値より高値であった。

シアン化法による金抽出は生態系に著しい影響を及ぼしている。シアン汚染土壌からシアン化物分解細菌が検出され、この菌は培養液中で遊離シアン 40~80 mg/L を 25 時間以内に 95% 以上分解することが実験的に証明された。この細菌群はサヘル地方の気候でも生存が可能なことから、シアンで汚染された土壌、水質の改善への活用が期待される。

水銀鉱山周辺の水田における水銀のメチル化の代謝過程において、硫酸塩還元菌活性に関わる硫酸塩と水銀の生物学的利用能に関わる硫化物の生成と蓄積のバランスがメチル水銀産生の制御に重要であることが明らかとなった。特に硫酸塩還元菌を活性化させる硫酸塩は水田でのメチル水銀産生の一因子であるが、主要因子は大気から降下する水銀であった。水銀鉱山周辺住民の食事性セレンと水銀との相互作用に関する調査では、セレン/総水銀比、セレン/メチル水銀比は約 60 と約 110 と高く、しかも血液中総水銀濃度の間には負の相関関係が認められた。これらの事実から住民にとって食事性セレンは水銀に対し防御的な役割を果たしていることが明らかとなった。水銀鉱山閉山後の水銀による住民に対する影響を血漿中セレン濃度と抗酸化酵素活性で評価したが、水銀による血漿セレン濃度や抗酸化酵素活性に対する影響は認められていない。

V. 結論

PubMed で検索されるメチル水銀および水銀に関する論文は 2010 年以降、各々 300 編および 1700 編を超えているが、疫学研究の割合は 2015 年以降減少しているように思われる。

メチル水銀に関する疫学研究では、胎児期メチル水銀曝露による神経発達影響が既知の事実として書かれることが多くなったが、小児の鉛曝露による知能障害ほど明確ではなく、メチル水銀濃度の増加に伴う IQ 低下の傾きなどの精度を高める研究 (メタ分析) が必要である。この一環として胎児期メチル水銀曝露と神経発達影響の関係を種々の発達 (知能) 検査毎に整理することが有用と考えられ、第一弾として、Bayley 乳幼児発達検査 (BSID) を用いた研究に焦点を当てた。この結果、曝露条件・設定が各々の研究で異なることから一貫性が必ずしもあるとは言えないものの、メチル水銀は認知発達指標 (MDI) よりも運動発達指標 (PDI) に影響が出やすいことが示唆された。また、わが国では離乳食時に高濃度メチル水銀を含有するマグロを食べさせる母親もいることから、離乳食時のメチル水銀曝露の発達神経影響について早急に研究する必要がある。

メチル水銀とセレンの関係についての疫学研究では、水銀による脂質異常症のリスク上昇をセレンが抑制する可能性が報告されたが、この機序は一定レベル以上の水銀曝露がある場合のみに限られる可能性も示唆された。セレンのヒト研究の場合、毒性緩和に有効な生体内でのセレンの

存在形態を明らかにする研究が必要と考えられた。

小規模金鉱山での水銀-アマルガム燃焼時の作業者の水銀曝露量はかなり高いことが示され、またアマルガム燃焼を家屋でおこなうと作業者の腎障害の他、小児の運動機能への影響も観察された。

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と考えられた。

VI. 次年度以降の計画

2017 年に発表されたメチル水銀/水銀の疫学的研究およびメチル水銀とセレンの相互作用に関する論文を収集し、ヒトへのメチル水銀の健康影響、途上国におけるメチル水銀/水銀曝露評価、メチル水銀影響に及ぼしうる交絡因子の作用について要約する。また、本年度は Bayley 乳幼児発達検査を用いたメチル水銀の神経発達影響を扱った過去の論文を収集・整理したが、同様に、次年度も異なる健康影響指標 (恐らく Wechsler Intelligence Scale for Children) で検討する予定である。

引用文献

1. <http://www.unep.org/PDF/PressReleases/GlobalMercuryAssessment2013.pdf#search='UNEP+mercury> (2016.6.7).
2. <http://www.unep.org/chemicalsandwaste/Portals/9/Mercury/Documents/Publications/Mercury%20Acting%20Now.pdf> (2016.6.7)
3. 村田勝敬. 意味の異なる 2 つの“予防”. 日衛誌 63: 662, 2008.
4. 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 92: 254-269, 2014.
5. Murata K, Dakeishi M, Shimada M, Satoh H. Assessment of intrauterine methylmercury exposure affecting child development: messages from the newborn. Tohoku J Exp Med 213: 187-202, 2007.
6. 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 dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) and polychlorinated biphenyl (PCB) pollutants. Environ Health Perspect 124: 951-956, 2016.
7. Dalgård C, Petersen MS, Steuerwald U, Weihe P, Grandjean P. Umbilic cord serum 25-hydroxyvitamin D concentrations and relation to birthweight, head circumference and infant length at age 14 days. Paediatr Perinat Epidemiol 30: 237-245, 2016.
8. Timmermann CA, Budtz-Jørgensen E, Petersen MS, Weihe P, Steuerwald U, Nielsen F, Jensen TK, Grandjean P. Shorter duration of breastfeeding at elevated exposures to perfluoroalkyl substances. Reprod Toxicol (2016, in press).
9. Karisen M, Grandjean P, Weihe P, Steuerwald U, Oulhote Y, Valvi D. Early-life exposures to persistent organic pollutants in relation to overweight in preschool children. Reprod Toxicol (2016, in press).

10. Oulhote Y, Shamim Z, Kielsen K, Weihe P, Grandjean P, Ryder LP, Heilmann C. Children's white blood cell counts in relation to developmental exposures to methylmercury and persistent organic pollutants. *Reprod Toxicol* (2016, in press).
11. Grandjean P, Heilmann C, Weihe P, Nielsen F, Mogensen UB, Budtz-Jørgensen E. Serum vaccine antibody concentrations in adolescents exposed to perfluorinated compounds. *Environ Health Perspect* (2016, in press).
12. Oulhote Y, Debes F, Vestergaard S, Weihe P, Grandjean P. Aerobic fitness and neurocognitive function scores in young Faroese adults and potential modification by prenatal methylmercury exposure. *Environ Health Perspect* (2016, in press).
13. Oulhote Y, Steuerwald U, Debes F, Weihe P, Grandjean P. Behavioral difficulties in 7-year old children in relation to developmental exposure to perfluorinated alkyl substances. *Environ Int* 97: 237-245, 2016.
14. Yeates AJ, Love TM, Engström K, Mulhern MS, McSorley EM, Grzesik 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 Acides* 102-103: 13-20, 2015.
15. Engstrom K, Love TM, Watson GE, Zareba G, Yeates A, Wahlberg K, Alhamdow A, Thurston SW, Mulhern M, McSorley EM, Strain JJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Myers GJ, Rnad MD, van Wijngaarden E, Broberg K. Polymorphisms in ATP-binding cassette transporters associated with maternal methylmercury disposition and infant neurodevelopment in mother-infant pairs in the Seychelles child development study. *Environ Int* 94: 224-229, 2016.
16. Rand MD, Vorobeikina D, van Wijngaarden E, Jackson BP, Scrimale T, Zareba G, Love TM, Myers GJ, Watson GE. Methods for individualized determination of methylmercury elimination rate and de-methylation status in humans following fish consumption. *Toxicol Sci* 149: 385-395, 2016.
17. Sakamoto M, Murata K, Domingo JL, Yamamoto M, Oliveira RB, Kawakami S, Nakamura M. Implications of mercury concentrations in umbilical cord tissue in relation to maternal hair segments as biomarkers for prenatal exposure to methylmercury. *Environ Res* 149: 282-287, 2016.
18. Iwata T, Takaoka S, Sakamoto M, Maeda E, Nakamura M, Liu XJ, Murata K. Characteristics of hand tremor and postural sway in patients with fetal-type Minamata disease. *J Toxicol Sci* 41: 757-763, 2016.
19. National Research Council. *Toxicological Effects of Methylmercury*. Washington, DC: National Academy Press, 2000.
20. Sakamoto M, Kakita A, Domingo JL, Yamazaki H, Oliveira RB, Sarrazin SLF, Etoh K, Murata K. Stable and episodic/bolus patterns of methylmercury exposure on mercury accumulation and histopathologic alterations in the nervous system. *Environ Res* 152: 446-453, 2017.
21. 荏田香苗, 坂本峰至, 吉田 稔, 龍田 希, 仲井邦彦, 岩井美幸, 岩田豊人, 前田恵理, 柳沼 梢, 佐藤 洋, 村田勝敬. メチル水銀、水銀およびセレンに関する研究動向－疫学研究を中心に. *日衛誌* 71: 236-251, 2016.
22. Minatoya M, Itoh S, Araki A, Tamura N, Yamazaki K, Nishihara S, Miyashita C, Kishi R. Associated

- factors of behavioural problems in children at preschool age: the Hokkaido study on environment and children's health. *Child Care Health Dev* (2016, in press).
23. Minatoya M, Araki A, Miyashita C, Sasaki S, Goto Y, Nakajima T, Kishi R. Prenatal di-2-ethylhexyl phthalate exposure and cord blood adipokine levels and birth size: the Hokkaido study on environment and children's health. *Sci Total Environ* 579: 606-611, 2017.
 24. Kobayashi S, Sata F, Sasaki S, Braimoh TS, Araki A, Miyashita C, Goudarzi H, Kobayashi S, Kishi R. Combined effects of AHR, CYP1A1, and XRCC1 genotypes and prenatal maternal smoking on infant birth size: biomarker assessment in the Hokkaido study. *Reprod Toxicol* 65: 295-306, 2016.
 25. Yamamoto J, Minatoya M, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Matsumura T, Kishi R. Quantifying bisphenol A in maternal and cord whole blood using isotope dilution liquid chromatography/tandem mass spectrometry and maternal characteristics associated with bisphenol A. *Chemosphere* 164: 24-31, 2016.
 26. Kobayashi S, Azumi K, Goudarzi H, Araki A, Miyashita C, Kobayashi S, Itoh S, Sasaki S, Ishizuka M, Nakazawa H, Ikeno T, Kishi R. Effects of prenatal perfluoroalkyl acid exposure on cord blood IGF2/H12 methylation and ponderal index: the Hokkaido study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* (2016, in press).
 27. Mitsui T, Araki A, Goudarzi H, Miyashita C, Ito S, Sasaki S, Kitta T, Moriya K, Cho K, Morioka K, Kishi R, Shinohara N, Takeda M, Nonomura K. Effects of adrenal androgens during the prenatal period on the second to fourth digit ratio in school-aged children. *Steroids* 113: 46-51, 2016.
 28. Minatoya M, Nakajima S, Sasaki S, Araki A, Miyashita C, Ikeno T, Nakajima T, Goto Y, Kishi R. Effects of prenatal phthalate exposure on thyroid hormone levels, mental and psychomotor development of infants: the Hokkaido study on environment and children's health. *Sci Total Environ* 565: 1037-1043, 2016.
 29. Goudarzi H, Miyashita C, Okada E, Kashino I, Kobayashi S, Chen CJ, Ito S, Araki A, Matsuura H, Ito YM, Kishi R. Effects of prenatal exposure to perfluoroalkyl acids on prevalence of allergic diseases among 4-year-old children. *Environ Int* 94: 124-132, 2016.
 30. Goudarzi H, Araki A, Itoh S, Sasaki S, Miyashita C, Mitsui T, Nakazawa H, Nonomura K, Kishi R. The association of prenatal exposure to perfluorinated chemicals with glucocorticoid and androgenic hormones in cord blood samples: the Hokkaido study. *Environ Health Perspect* 125: 111-118, 2017.
 31. Itoh S, Araki A, Mitsui T, Miyashita C, Goudarzi H, Sasaki S, Cho K, Nakazawa H, Iwasaki Y, Shinohara N, Nonomura K, Kishi R. Association of perfluoroalkyl substances exposure in utero with reproductive hormone levels in cord blood in the Hokkaido study on environment and children's health. *Environ Int* 94: 51-59, 2016.
 32. Kato S, Itoh S, Yuasa M, Baba T, Miyashita C, Sasaki S, Nakajima S, Uno A, Nakazawa H, Iwasaki Y, Okada E, Kishi R. Association of perfluorinated chemical exposure in utero with maternal and infant thyroid hormone levels in the Sapporo cohort of Hokkaido study on the environment and children's health. *Environ Health Prev Med* 21: 334-344, 2016.
 33. Yila TA, Araki A, Sasaki S, Miyashita C, Itoh K, Ikeno T, Yoshioka E, Kobayashi S, Goudarzi H, Baba T, Braimoh T, Minakami H, Endo T, Sengoku K, Kishi R. Predictors of folate status among pregnant Japanese women: the Hokkaido study on environment and children's health, 2002-2012. *Br J*

- Nutr 115: 2227-2235, 2016.
34. Mitsui T, Araki A, Miyashita C, Ito S, Ikeno T, Sasaki S, Kitta T, Moriya K, Cho K, Morioka K, Kishi R, Shinohara N, Takeda M, Nonomura K. The relationship between the second-to-fourth digit ratio and behavioral sexual dimorphism in school-aged children. *PLoS One* 11: e0146849, 2016.
 35. 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* 541: 1002-1010, 2016.
 36. Bellinger DC, O'Leary K, Rainis H, Gibb HJ. Country-specific estimates of the incidence of intellectual disability associated with prenatal exposure to methylmercury. *Environ Res* 147: 159-163, 2016.
 37. Marques RC, Abreu L, Bernardi JVE, Dorea JG. Traditional living in the Amazon: extended breastfeeding, fish consumption, mercury exposure and neurodevelopment. *Ann Hum Biol* 43: 360-370, 2016.
 38. Julvez J, Mendez M, Fernandez-Barres S, Romaguera D, Vioque J, Liop S, Ibarluzea J, Cuxens M, Avella-Garcia C, Tordon A, Riano I, Andiaarena A, Robinson O, Arija V, Esnaola M, Ballester F, Sunyer J. Maternal consumption of seafood in pregnancy and child neuropsychological development: A longitudinal study based on a population with high consumption levels. *Am J Epidemiol* 183: 169-182, 2016.
 39. Morris MC, Brockman J, Schneider JA, Wang Y, Bennett DA, Tangney CC, van de Rest O. Association of seafood consumption, brain mercury level, and APOE ϵ 4 status with brain neuropathology in older adults. *JAMA* 315: 489-497, 2016.
 40. Hui LL, Chan MHM, Lam HS, Chan PHY, Kwok KM, Chan IHS, Li AM, Fok TF. Impact of fetal and childhood mercury exposure on immune status in children. *Environ Res* 144: 66-72, 2016.
 41. Al-Saleh I, Elkhatib R, Al-Rouqi R, Abduljabbar M, Eltabache C, Al-Rajudi T, Nester M. Alterations in biochemical markers due to mercury (Hg) exposure and its influence on infant's neurodevelopment. *Int J Hyg Environ Health* 219: 898-914, 2016.
 42. Karimi R, Vacchi-Suzzi C, Meliker JR. Mercury exposure and a shift toward oxidative stress in avid seafood consumers. *Environ Res* 146: 100-107, 2016.
 43. Rangel-Mendez JA, Arcega-Cabrera FE, Fargher LF, Moo-Puc RE. Mercury levels assessment and its relationship with oxidative stress biomarkers in children from three localities in Yucatan, Mexico. *Sci Total Environ* 543: 187-196, 2016.
 44. Daneshmand R, Kurl S, Tuomainen TP, Virtanen JK. Associations of serum *n*-3 and *n*-6 PUFA and hair mercury with the risk of incident stroke in men: the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study (KIHD). *Br J Nutr* 115: 1851-1859, 2016.
 45. Yeter D, Portman MA, Aschner M, Farina M, Chan W-C, Hsieh K-S, Kuo HC. Ethnic Kawasaki Disease Risk Associated with Blood Mercury and Cadmium in U.S. Children. *Int J Environ Res Public Health* 13: 101, 2016.
 46. Tang M, Xu C, Lin N, Liu K, Zhang Y, Yu X, Liu W. Lead, mercury, and cadmium in umbilical cord serum and birth outcomes in Chinese fish consumers. *Chemosphere* 148: 270-275, 2016.
 47. Al-Saleh I, Nester M, Abduljabbar M, Al-Rouqi R, Eltabache C, Al-Rajudi T, Elkhatib R. Mercury

- (Hg) exposure and its effects on Saudi breastfed infant's neurodevelopment. *Int J Hyg Environ Health* 219: 129-141, 2016.
48. Punshon T, Li Z, Marsit CJ, Jackson BP, Baker ER, Karagas MR. Placental metal concentrations in relation to maternal and infant toenails in a U.S. cohort. *Environ Sci Tech* 50: 1587-1594, 2016.
 49. Rothenberg SE, Keiser S, Ajami NJ, Wong MC, Gesell J, Petrosino JF, Johns A. The role of gut microbiota in fetal methylmercury exposure: insights from a pilot study. *Toxicol Lett* 242: 60-67, 2016.
 50. Vacchi-Suzzi C, Karimi R, Kruse D, Silbernagel SM, Levine KE, Rohlman DS, Meliker JR. Low-level mercury, omega-3 index and neurobehavioral outcomes in an adult US coastal population. *Eur J Nutr* 55: 699-711, 2016.
 51. Park K, Seo E. Toenail mercury and dyslipidemia: Interaction with selenium. *J Trace Elem Med Biol* 39: 43-49, 2017.
 52. Ser PH, Omi S, Shimizu-Furusawa H, Yasutake A, Sakamoto M, Hachiya N, Konishi S, Nakamura M, Watanabe C. Differences in the responses of three plasma selenium-containing proteins in relation to methylmercury-exposure through consumption of fish/whales. *Toxicol Lett* 267: 53-58, 2017.
 53. Fuchsman PC, Henning MH, Sorensen MT, Brown LE, Bock MJ, Beals CD, Lyndall JL, Magar VS. Critical perspectives on mercury toxicity reference values for protection of fish. *Environ Toxicol Chem* 35: 529-549, 2016.
 54. Gajdosechova Z, Brownlow A, Cottin NT, Fernandes M, Read FL, Urgast DS, Raab A, Feldmann J, Krupp EM. Possible link between Hg and Cd accumulation in the brain of long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). *Sci Total Environ* 545-546: 407-413, 2016.
 55. Gajdosechova Z, Lawan MM, Urgast DS, Raab A, Scheckel KG, Lombi E, Kopittke PM, Loeschner K, Larsen EH, Woods G, Brownlow A, Read FL, Feldmann J, Krupp EM. In vivo formation of natural HgSe nanoparticles in the liver and brain of pilot whales. *Sci Rep* 6: 34361, 2016.
 56. Looi LJ, Aris AZ, Haris H, Yusoff FM, Hashim Z. The levels of mercury, methylmercury and selenium and the selenium health benefit value in grey-eel catfish (*Plotosus canius*) and giant mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*) from the Strait of Malacca. *Chemosphere* 152: 265-273, 2016.
 57. Cusack LK, Eagles-Smith C, Harding AK, Kile M, Stone D. Selenium:mercury molar ratios in freshwater fish in the Columbia river basin: potential applications for specific fish consumption advisories. *Biol Trace Elem Res* (2016, in press).
 58. Ackerman JT, Eagles-Smith CA, Herzog MP, Hartman CA. Maternal transfer of contaminants in birds: Mercury and selenium concentrations in parents and their eggs. *Environ Pollut* 210: 145-154, 2016.
 59. Li Y, Fan Y, Zhao J, Xu X, Jing H, Shang L, Gao Y, Li B, Li YF. Elevated mercury bound to serum proteins in methylmercury poisoned rats after selenium treatment. *Biometals* 29: 893-903, 2016.
 60. Evans RD, Grochowina NM, Basu N, O'Connor EM, Hickie BE, Rouvinen-Watt K, Evans HE, Chan HM. Uptake of selenium and mercury by captive mink: Results of a controlled feeding

- experiment. *Chemosphere* 144: 1582-1588, 2016.
61. Wang Y, Dang F, Evans RD, Zhong H, Zhao J, Zhou D. Mechanistic understanding of MeHg-Se antagonism in soil-rice systems: the key role of antagonism in soil. *Sci Rep* 6: 19477, 2016.
 62. Wang Y, Dang F, Zhong H, Wei Z, Li P. Effects of sulfate and selenite on mercury methylation in a mercury-contaminated rice paddy soil under anoxic conditions. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 4602-4608, 2016.
 63. Wang YJ, Dang F, Zhao JT, Zhong H. Selenium inhibits sulfate-mediated methylmercury production in rice paddy soil. *Environ Pollut* 213: 232-239, 2016.
 64. Das K, Dupont A, De Pauw-Gillet MC, Debier C, Siebert U. Absence of selenium protection against methylmercury toxicity in harbour seal leucocytes in vitro. *Mar Pollut Bull* 108: 70-76, 2016.
 65. Dalla Corte CL, Ramos A, Dos Santos CM, Dressler VL, da Rocha JB. Selenium and mercury levels in rat liver slices co-treated with diphenyl diselenide and methylmercury. *Biometals* 29: 543-550, 2016.
 66. Black P, Richard M, Rossin R, Telmer K. Assessing occupational mercury exposures and behaviours of artisanal and small-scale gold miners in Burkina Faso using passive mercury vapour badges. *Environ Res* 152: 462-469, 2017.
 67. Rodríguez LH, Rodríguez-Villamizar LA, Flórez-Vargas O, Fiallo YV, Ordoñez Á, Gutiérrez MD. No effect of mercury exposure on kidney function during ongoing artisanal gold mining activities in Colombia: A cross-sectional study. *Toxicol Ind Health* 33: 67-78, 2017.
 68. Bose-O'Reilly S, Schierl R, Nowak D, Siebert U, William JF, Owi FT, Ir YI. A preliminary study on health effects in villagers exposed to mercury in a small-scale artisanal gold mining area in Indonesia. *Environ Res* 149: 274-281, 2016.
 69. Ohlander J, Huber SM, Schomaker M, Heumann C, Schierl R, Michalke B, Jenni OG, Caflisch J, Muñoz DM, von Ehrenstein OS, Radon K. Mercury and neuromotor function among children in a rural town in Chile. *Int J Occup Environ Health* 22: 27-35, 2016.
 70. Camacho A, Van Brussel E, Carrizales L, Flores-Ramírez R, Verduzco B, Huerta SR, Leon M, Díaz-Barriga F. Mercury mining in Mexico: I. Community engagement to improve health outcomes from artisanal mining. *Ann Glob Health* 82: 149-155, 2016.
 71. Sari MM, Inoue T, Matsumoto Y, Yokota K. Measuring total mercury due to small-scale gold mining activities to determine community vulnerability in Cihonje, Central Java, Indonesia. *Water Sci Technol* 73: 437-44, 2016.
 72. Olivero-Verbel J, Carranza-Lopez L, Caballero-Gallardo K, Ripoll-Arboleda A, Muñoz-Sosa D. Human exposure and risk assessment associated with mercury pollution in the Caqueta River, Colombian Amazon. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 20761-20771, 2016.
 73. Reichelt-Brushett AJ, Stone J, Howe P, Thomas B, Clark M, Male Y, Nanlohy A, Butcher P. Geochemistry and mercury contamination in receiving environments of artisanal mining wastes and identified concerns for food safety. *Environ Res* 152: 407-418, 2017.
 74. Moreno-Brush M, Rydberg J, Gamboa N, Storch I, Biester H. Is mercury from small-scale gold mining prevalent in the southeastern Peruvian Amazon? *Environ Pollut* 218: 150-159, 2016.

75. González-Merizalde MV, Menezes-Filho JA, Cruz-Erazo CT, Bermeo-Flores SA, Sánchez-Castillo MO, Hernández-Bonilla D, Mora A. Manganese and mercury levels in water, sediments, and children living near gold-mining areas of the Nangaritza river basin, Ecuadorian Amazon. *Arch Environ Contam Toxicol* 71: 171-182, 2016.
76. Kamunda C, Mathuthu M, Madhuku M. Health risk assessment of heavy metals in soils from Witwatersrand gold mining basin, South Africa. *Int J Environ Res Public Health* 13: E663, 2016.
77. Mataba GR, Verhaert V, Blust R, Bervoets L. Distribution of trace elements in the aquatic ecosystem of the Thigithe river and the fish *Labeo victorianus* in Tanzania and possible risks for human consumption. *Sci Total Environ* 547: 48-59, 2016.
78. Obiri S, Yeboah PO, Osae S, Adu-kumi S, Cobbina SJ, Armah FA, Ason B, Antwi E, Quansah R. Human health risk assessment of artisanal miners exposed to toxic chemicals in water and sediments in the Prestea Huni valley district of Ghana. *Int J Environ Res Public Health* 12: 139, 2016.
79. Razanamahandry LC, Andrianisa HA, Karoui H, Kouakou KM, Yacouba H. Biodegradation of free cyanide by bacterial species isolated from cyanide-contaminated artisanal gold mining catchment area in Burkina Faso. *Chemosphere* 157: 71-78, 2016.
80. Zhao L, Qiu G, Anderson CW, Meng B, Wang D, Shang L, Yan H, Feng X. Mercury methylation in rice paddies and its possible controlling factors in the Hg mining area, Guizhou province, Southwest China. *Environ Pollut* 215: 1-9, 2016.
81. Li P, Li Y, Feng X. Mercury and selenium interactions in human blood in the Wanshan mercury mining area, China. *Sci Total Environ* 573: 376-381, 2016.
82. Kobal AB, Snoj Tratnik J, Mazej D, Fajon V, Gibičar D, Miklavčič A, Kocman D, Kotnik J, Sešek Briški A, Osredkar J, Krsnik M, Prezelj M, Knap Č, Križaj B, Liang L, Horvat M. Exposure to mercury in susceptible population groups living in the former mercury mining town of Idrija, Slovenia. *Environ Res* 152: 434-445, 2017.
83. Bori J, Vallès B, Navarro A, Riva MC. Geochemistry and environmental threats of soils surrounding an abandoned mercury mine. *Environ Sci Pollut Res Int* 23: 12941-12953. 2016.
84. 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* 14: 25, 2014.
85. Kanatani KT, Adachi Y, Sugimoto N, Noma H, Onishi K, Hamazaki K, Takahashi Y, Ito I, Egawa M, Sato K, Go T, Kurozawa Y, Inadera H, Konishi I, Nakayama T, Japan Environment Y Children's Study Group. Birth cohort study on the effects of desert dust exposure on children's health: protocol of an adjunct study of the Japan Environment & Children's Study. *MBJ Open* 4: e004863, 2014.
86. Michikawa T, Nitta H, Nakayama SF, Ono M, Yonemoto J, Tamura K, Suda E, Ito H, Takeuchi A, Kawamoto T, Japan Environment & Children's Study Group. The Japan Environment and Children's Study (JECS): a preliminary report on selected characteristics of approximately 10,000 pregnant women recruited during the first year of the study. *J Epidemiol* 25: 452-458, 2015.

87. Yamamoto-Hanada K, Futamura M, Kitazawa H, Ohya Y, Kobayashi F, Kusuda T, Sanefuji M, Oda M, Mitsubuchi H, Sibata E, Tsuji M, Kayama F, Suda E, Michikawa T, Katoh T, Saito H. Relieving pain and distress during venipuncture: pilot study of the Japan Environment and Children's Study (JECS). *Pediatr Int* 57: 1044-1047, 2015.
88. Watanabe Z, Iwama N, Nishigori H, Nishigori T, Mizuno S, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Nakai K, Arima T, Takeda T, Sugawara J, Kuriyama S, Metoki H, Yaegashi N, Japan Environment & Children's Study Group. Psychological distress during pregnancy in Miyagi after the Great East Japan Earthquake: the Japan Environment and Children's Study. *J Affect Disord* 190: 341-348, 2016.
89. 新田裕史. エコチル調査の概要と遺伝子解析の位置づけ. *日衛誌* 71: 91-93, 2016.
90. Senju A, Suga R, Tsuji M, Shibata E, Anan A, Yamamoto Y, Kusuhara K, Kawamoto T. Postal contact with participating children and its impact on response rate: Japan Environment and Children's Pilot Study. *Pediatr Int* 58: 1328-1332, 2016.
91. Obara T, Nishigori H, Nishigori T, Metoki H, Ishikuro M, Tatsuta N, Mizuno S, Sakurai K, Nishijima I, Murai Y, Fujiwara I, Arima T, Nakai K, Mano N, Yaegashi N, Kuriyama S, JECS group. Prevalence and determinants of inadequate use of folic acid supplementation in Japanese pregnant women: the Japan Environment and Children's Study (JECS). *J Matern Fetal Neonatal Med* 26: 1-6, 2016.
92. 宮崎 航, 廬 溪, 小田政子, 黒田嘉紀, 青木一雄, 三渕 浩, 大場 隆, 加藤貴彦. 乳児のアレルギー疾患に関する遺伝素因および環境因子の解析 (遺伝素因ならびに睡眠時の環境とアレルギー疾患の関連): 南九州・沖縄地区における「子どもの健康と環境に関する全国調査」データによる検討. *日衛誌* 71: 138-148, 2016.
93. 中山祥嗣. 環境省「子どもの健康と環境に関する全国調査 (エコチル調査)」における曝露評価. *Yakugaku Zasshi* 136: 795-798, 2016.
94. Mizuno S, Nishigori H, Sugiyama T, Takahashi F, Iwama N, Watanabe Z, Sakurai K, Ishikuro M, Obara T, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Arima T, Kuriyama S, Metoki H, Nakai K, Inadera H, Yaegashi N, Japan Environment & Children's Study Group. Association between social capital and the prevalence of gestational diabetes mellitus: an interim report of the Japan Environment and Children's Study. *Diabetes Res Clin Pract* 120: 132-141, 2016.
95. Morokuma S, Shimokawa M, Kato K, Sanefuji M, Shibata E, Tsuji M, Senju A, Kawamoto T, Kusuhara K, Japan Environment & Children's Study Group. Relationship between hyperemesis gravidarum and small-for-gestational-age in the Japanese population: the Japan Environment and Children's Study (JECS). *BMC Pregnancy Childbirth* 16: 247, 2016.
96. Oya N, Ito Y, Hioki K, Asai Y, Aoi A, Sugiura Y, Ueyama J, Oguri T, Kato S, Ebara T, Kamijima M. Quantitative analysis of organophosphate insecticide metabolites in urine extracted from disposable diapers of toddlers in Japan. *Int J Hyg Environ Health* (2016, in press).
97. Nishigori H, Obara T, Nishigori T, Mizuno S, Metoki H, Hoshiai T, Watanabe Z, Sakurai K, Ishikuro M, Tatsuta N, Nishijima I, Fujiwara I, Kuriyama S, Arima T, Nakai K, Yaegashi N, Japan Environment & Children's Study Group. Selective serotonin reuptake inhibitors and risk of major

- congenital anomalies for pregnancies in Japan: a nationwide birth cohort study of the Japan Environment and Children's Study. *Congenit Anom* (2016, in press).
98. Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. *N Engl J Med* 348: 1517-1526, 2003.
 99. Lanpher BP, Hornung R, Khoury J, Yolton K, Baghurst P, Bellinger DC, Canfield RL, Dietrich KN, Bornschein R, Greene T, Rothenberg SJ, Needleman H, Schnaas L, Wasserman G, Graziano J, Roberts R. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: an international pooled analysis. *Environ Health Perspect* 113: 894-899, 2005.
 100. Davidson PW, Myers GJ, Cox C, Shamlaye CF, Marsh DO, Tanner MA, Berlin M, Sloane-Reeves J, Cemichiaro E, Choisy O, Clarkson TW. 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.
 101. Jedrychowski W, Jankowski J, Flak E, Skarupa A, Mroz E, Sochacka-Tatara E, Lisowska-Miszczuk I, Szpanowska-Wohn A, Rauh V, Skolicki Z, Kaim I, Perera F. Effects of prenatal exposure to mercury on cognitive and psychomotor function in one-year-old infants: epidemiologic cohort study in Poland. *Ann Epidemiol* 16: 439-447, 2006.
 102. Jedrychowski W, Perera F, Jankowski J, Rauh V, Flak E, Caldwell KL, Jones RL, Pac A, Lisowska-Miszczuk I. Fish consumption in pregnancy, cord blood mercury level and cognitive and psychomotor development of infants followed over the first three of life: Krakow epidemiologic study. *Environ Int* 33: 1057-1062, 2007.
 103. Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JMW, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiaro E, Canfield RL, Cox C, Huan LS, Jancius J, Clarkson TW. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 29: 767-775, 2008.
 104. Lederman SA, Jones RL, Caldwell KL, Rauh V, Sheets SE, Tang D, Viswanathan S, Becker M, Stein JL, Wang RY, Perera FP. Relation between cord blood mercury levels and early child development in a World Trade Center cohort. *Environ Health Perspect* 116: 1085-1091, 2008.
 105. Plusquellec P, Muckle G, Dewailly E, Ayotte P, Begin G, Desrosiers C, Despres C, Saint-Amour D, Poitras K. The relation of environmental contaminants exposure to behavioral indicators in Inuit preschoolers in Arctic Quebec. *Neurotoxicology* 31: 17-25, 2010.
 106. Stokes-Riner A, Thurston SW, Myers GJ, Duffy EM, Wallace J, Bonham M, Robson P, Shamlaye CF, Strain JJ, Watson G, Davidson PW. A longitudinal analysis of prenatal exposure to methylmercury and fatty acids in the Seychelles. *Neurotoxicol Teratol* 33: 325-328, 2011.
 107. Llop S, Guxens M, Murcia M, Lertxundi A, Ramon R, Riano I, Rebagliato M, Ibarluzea J, Tardon A, Sunyer J, Ballester F, INMA Project. Prenatal exposure to mercury and infant neurodevelopment in a multicenter cohort in Spain: study of potential modifiers. *Am J Epidemiol* 175: 451-465, 2012.
 108. Watson GE, Evans K, Thurston SW, van Wijngaarden E, Wallace JM, McSorley EM, Bonham MP, Mulhern MS, McAfee AJ, Davidson PW, Shamlaye CF, Strain JJ, Love T, Zareba G, Myers GJ.

- Prenatal exposure to dental amalgam in the Seychelles Child Development Nutrition study: associations with neurodevelopmental outcomes at 9 and 30 months. *Neurotoxicology* 33: 1511-1517, 2012.
109. Valent F, Mariuz M, Bin M, Little D, Mazej D, Tognin V, Tratnik J, McAfee AJ, Mulhern MS, Parpinel M, Carrozzi M, Horvat M, Tamburlini G, Barbone F. Associations of prenatal mercury exposure from maternal fish consumption and polyunsaturated fatty acids with child neurodevelopment: a prospective cohort study in Italy. *J Epidemiol* 23: 360-370, 2013.
 110. Boucher O, Muckle G, Jacobson JL, Carter RC, Kaplan-Estrin M, Ayotte P, Dewailly E, Jacobson SW. Domain-specific effects of prenatal exposure to PCBs, mercury, and lead on infant cognition: results from the Environmental Contaminants and Child Development Study of Nunavik. *Environ Health Perspect* 122: 310-316, 2014.
 111. Hsi HC, Jiang CB, Yang TH, Chien LC. The neurological effects of prenatal and postnatal mercury/methylmercury exposure on three-year-old children in Taiwan. *Chemosphere* 100: 71-76, 2014.
 112. Strain JJ, Yeates AJ, van Wijngaarden E, Thurston SW, Mulhern 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* 101: 530-537, 2015.
 113. Marques RC, Bernardi JV, 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* 68: 432-441, 2015.
 114. Marques RC, Bernardi JVE, Cunha MPL, Dorea JG. Impact of organic mercury exposure and home delivery on neurodevelopment of Amazonian children. *Int J Hyg Environ Health* 219: 498-502, 2016.
 115. Rothenberg SE, Yu X, Liu J, Biasini FJ, Hong C, Jiang X, Nong Y, Cheng Y, Korrick SA. Maternal methylmercury exposure through rice ingestion and offspring neurodevelopment: a prospective cohort study. *Int J Hyg Environ Health* 219: 832-842, 2016.
 116. Marques RC, Abreu L, Bernardi JV, Dorea JG. Neurodevelopment of Amazonian children exposed to ethylmercury (from Thimerosal in vaccines) and methylmercury (from fish). *Environ Res* 149: 259-265, 2016.
 117. Prpic I, Milardovic A, Vlastic-Cicvaric I, Spiric Z, Radic Nisevic J, Vukelic P, Snoj Tratnick J, Mazej D, Horvat M. Prenatal exposure to low-level methylmercury alters the child's fine motor skills at the age of 18 months. *Environ Res* 152: 369-374, 2017.
 118. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sorensen N, Dahl R, Jørgensen PJ. Cognitive deficit in 7-year-old with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* 19: 417-428, 1997.
 119. 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* 28: 536-547, 2006.

- 120.厚生労働省. 妊婦への魚介類の摂食と水銀に関する注意事項について【Q & A】(平成 22 年 6 月 1 日改訂).
<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/index-b.pdf>
121. 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* 280: 701-707, 1998.
122. 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* 361: 1686-1692, 2003.
123. Strain JJ, Davidson PW, Bonham MP, Duffy EM, Stokes-Riner A, Thurston SW, Wallace JM, Robson PJ, Shamlaye CF, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Jancius J, Myers GJ, Clarkson TW. Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles child development nutrition study. *Neurotoxicology* 29: 776-782, 2008.
124. Myers GJ, Davidson PW, Strain JJ. Nutrient and methyl mercury exposure from consuming fish. *J Nutr* 137: 2805-2808, 2007.
125. Yaginuma-Sakurai K, Murata K, Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. Intervention study on cardiac autonomic nervous effects of methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* 32: 240-245, 2010.
126. van Wijngaarden E, Thurston SW, Myers GJ, Strain JJ, Weiss B, Zarcone T, Watson GE, Zareba G, McSorley EM, Mulhem MS, Yeaters AJ, Henderson J, Gedeon J, Shamlaye CF, Davidson PW. Prenatal methylmercury exposure in relation to neurodevelopment and behavior at 19 years of age in the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicol Teratol* 39: 19-25, 2013.
127. 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* 144: 169-176, 2004.
128. 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* 79: 379-386, 2006.

A review on health effects of methylmercury exposure in humans

Katsuyuki Murata¹, Kanae Karita², Minoru Yoshida³, Nozomi Tatsuta⁴, Kunihiro Nakai⁴, Miyuki Iwai-Shimada⁵, Kozue Yaginuma-Sakurai⁶, Toyoto Iwata¹, Eri Maeda¹, Mineshi Sakamoto⁸

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

² *Department of Hygiene and Public Health, Kyorin University School of Medicine*

³ *Hachinohe Gakuin University Faculty of Human Health*

⁴ *Development and Environmental Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine*

⁵ *Centre for Health and Environmental Risk Research, National Institute for Environmental Studies*

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

⁷ *Department of Epidemiology, National Institute for Minamata Disease*

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

Abstract

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 in south America, in southeastern Asia, or in Africa. From this view point, we provide an overview of epidemiological studies, mainly issued in 2016, addressing health effects of low-level exposures to methylmercury and mercury.

The following findings were obtained in this fiscal year: (1) Although the effects of prenatal methylmercury exposure on child neurodevelopment has been described as the well-known fact in the *Introduction* section of epidemiological research focusing on methylmercury, it is not so confirmative compared with the effects of lead exposure on intellectual deficits; for this reason, further research with meta-analysis should be conducted to improve the precision of the relation of intellectual deficits to methylmercury dose. (2) Since some Japanese babies seem to be fed Hg contaminated tuna during the weaning period, future study is necessary to clarify the effect of high-level methylmercury exposure during that period on child development. (3) In epidemiological studies for antagonistic interactions of selenium against methylmercury toxicity, the association of chronic mercury exposure with a higher risk of dyslipidemia was possibly counter-acted by selenium levels. Further human studies were required to elucidate the bioavailable chemical form of selenium in protecting harmful effects of methylmercury. (4) Elemental mercury exposure in the household from artisanal gold mining appeared to have adverse long-term effects on children's pure motor skills.

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

参 考 資 料

平成 28 年度
メチル水銀研究ミーティング

講演要旨集

期間：2016 年 12 月 26 日

会場：LMJ 東京研修センター 5 階 特大会議室

主催：環境省

目 次

プログラム.....	1
発表要旨	
一般講演	
講演 1 メチル水銀摂取の指標としての毛髪水銀（安武 章）	5
講演 2 魚におけるメチル水銀濃度の実態調査とその結果を利用した摂取量推定（渡邊敬浩）	10
講演 3 胎児循環におけるメチル水銀に対するセレン、ビタミン E とドコサヘキサエン酸：母体循環との比較（坂本 峰至）	13
講演 4 糖尿病マウスにおけるメチル水銀曝露に伴う神経行動障害の新規評価法（山元 恵）	16
講演 5 マウス第三脳室上衣細胞の繊毛運動性に対するメチル水銀の影響に関する研究（南 武志）	19
講演 6 神経細胞および血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性と MARCKS タンパク質の関与（白石 光也）	23
講演 7 メチル水銀中毒における大脳皮質神経細胞の選択的神経細胞傷害に関する研究（藤村 成剛）	27
講演 8 メチル水銀による心不全リスク増加の分子機構（西田 基宏）	31
講演 9 メチル水銀によるオートファジー活性化に対する高度不飽和脂肪酸の影響（高根 沢 康一）	35
講演 10 小胞体機能に対するメチル水銀の作用（上原 孝）	39
講演 11 小胞体ストレスプレコンディショニングによる膜輸送体発現増加と細胞内水銀濃度（臼杵 扶佐子）	42
若手発表	
発表 1 メチル水銀の妊娠期曝露によるコルチコステロン増加とその影響（人見 将也）	47
発表 2 メチル水銀長期曝露がドパミン神経分化に及ぼす影響（栗田 尚佳）	50
発表 3 オートファジー誘導へのメチル水銀の関与とその機構解析（外山 喬士）	52
発表 4 活性イオウ分子種によるメチル水銀毒性制御機構の解明に関する研究（北村 篤志）	54
発表 5 メチル水銀からニューロンを守るアストロサイト適応応答の分子機構の解明（石原 康宏）	57
発表 6 水俣病における小脳障害の病理仮説-炎症仮説-の分子メカニズム（金 純子）	60
発表 7 シス테인代謝酵素によるメチル水銀毒性制御に関する研究（秋山 雅博）	63
発表 8 胎児期における低濃度メチル水銀曝露が出生時体重に及ぼす影響（龍田 希）	66

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します。

日 時：平成 28 年 12 月 26 日（月） 9:00～17:10（一般講演、若手発表）

場 所：LMJ 東京研修センター 5 階 特大会議室

参加資格：

本ミーティングは非公開での開催で、以下のいずれかの条件に該当する方が参加できます。

- 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（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

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 永沼 章（東北大薬）

9:10～ 9:35	一般 1	安武 章 (元熊本大院自然科学)	メチル水銀摂取の指標としての毛髪水銀
9:35～10:00	一般 2	渡邊敬浩 (国立医薬品食品衛生研究所)	魚におけるメチル水銀濃度の実態調査とその結果を利用した摂取量推定
10:00～10:25	一般 3	坂本峰至 (国水研)	臍帯血における水銀、セレン、ビタミン E とドコサヘキサエン酸：母体循環との比較

10:25～10:35 休 憩

座長 熊谷 嘉人(筑波大学医学医療系)

10:35～11:00	一般 4	山元 恵 (国水研)	糖尿病マウスにおけるメチル水銀曝露に伴う神経行動障害の新規評価法
11:00～11:25	一般 5	南 武志 (近畿大学理工学部)	マウス第三脳室上皮細胞の繊毛運動性に対するメチル水銀の影響に関する研究
11:25～11:50	一般 6	白石光也 (鹿児島大共同獣医)	神経細胞および血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性と MARCKS タンパク質の関与

11:50～12:40 昼 食

■第2部 若手発表「メチル水銀研究の新展開」

座長 坂本 峰至（国水研）

12:40～12:55	若手 1	人見将也 (九州大院薬)	メチル水銀の妊娠期曝露によるコルチコステロン増加とその影響
12:55～13:10	若手 2	栗田 尚佳 (岐阜薬大)	メチル水銀長期曝露がドパミン神経分化に及ぼす影響
13:10～13:25	若手 3	外山喬士 (東北大院薬)	オートファジー誘導へのメチル水銀の関与とその機構解析
13:25～13:40	若手 4	北村篤志 (大阪府立大院理)	活性イオウ分子種によるメチル水銀毒性制御機構の解明に関する研究

座長 臼杵 扶佐子（国水研）

13:40～13:55	若手 5	石原康宏 (広島大院総合科学)	メチル水銀からニューロンを守るアストロサイト適応応答の分子機構の解明
-------------	------	--------------------	------------------------------------

13:55～14:10	若手 6	金 純子 (東京理科大薬)	水俣病における小脳障害の病理仮説-炎症仮説- の分子メカニズム
14:10～14:25	若手 7	秋山雅博 (筑波大学医学医療系)	システイン代謝酵素によるメチル水銀毒性制御 に関する研究
14:25～14:40	若手 8	龍田 希 (秋田大院医)	胎児期における低濃度メチル水銀曝露が出生時 体重に及ぼす影響

14:40～14:50 休 憩

■第3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 黄 基旭 (東北大院薬)

14:50～15:15	一般 7	藤村成剛 (国水研)	メチル水銀中毒における大脳皮質神経細胞の選 択的神経細胞傷害に関する研究
15:15～15:40	一般 8	西田基宏 (自然科学研究機構岡崎統合 バ)	メチル水銀による心不全リスク増加の分子機構
15:40～16:05	一般 9	高根沢康一 (北里大学薬)	メチル水銀によるオートファジー活性化に対す る高度不飽和脂肪酸の影響

座長 鍛冶 利幸 (東京理科大薬)

16:05～16:30	一般 10	上原 孝 (岡山大院医歯薬学総合)	小胞体機能に対するメチル水銀の作用
16:30～16:55	一般 11	臼杵扶佐子 (国水研)	小胞体ストレスプレコンディショニングによる 膜輸送体発現増加と細胞内水銀濃度

16:55～17:05 「若手研究奨励賞」授賞者発表および表彰式

17:05～17:10 閉会 (環境省)

一 般 講 演

メチル水銀摂取の指標としての毛髪水銀

○安武 章(元 熊本大学大学院自然科学研究科)、蜂谷紀之(国立水俣病総合研究センター)

1. 緒言

水銀は環境中に広く分布し、水環境中でその一部がメチル水銀(MeHg)に変化する。MeHgはタンパク質に強く結合するために、水環境中の食物連鎖を介して生息する動物(魚介類、海洋哺乳動物)に蓄積される。MeHgの蓄積は肉食魚において高い傾向があり、生存年数とともに増加する。したがって、マグロやカジキなどの大型の肉食魚では小型魚に比べると高濃度にMeHgが蓄積される傾向がある。またハクジラ類には大型肉食魚よりもさらに高いMeHg濃度を示す傾向のあることも知られている。したがってヒトへの曝露は魚介類の摂取によりおこり、そのほとんどが消化管から体内へと吸収される。摂取されたMeHgは血液循環系を介して各組織に分布する。ヒト血液中のMeHgのうち血漿に存在する約10%が組織への取り込みに関与するが、取り込みと同時に組織からの排出も起こっており、血液と組織の間でMeHgは平衡状態にある。体内のMeHgは徐々に糞尿中へと排泄されるので(ヒトにおける生物学的半減期は50~70日)、魚食習慣に大きな変化がない限り、摂取量と排泄量は均衡しており、体内のMeHg蓄積量はほとんど変化しない。血液中のMeHgは毛髪へも取り込まれ、高濃度(血液中の約250倍)に蓄積する。このような毛髪への濃縮効果は無機水銀には見られず、毛髪中のMeHgは血液中への移行がなく安定であるため、毛髪総水銀濃度(以下、毛髪水銀濃度)はMeHg摂取の良好な指標とされている。ここでは国内で採取した毛髪の水銀濃度を指標として、日本人のMeHg摂取レベルについて考察する。また、毛髪水銀に関連するいくつかの実験データについても紹介する。

2. 国内14地域における調査

2000~2004年にかけて、国内14地域(網走、苫小牧、石巻、さいたま、長野、千葉、新潟、和歌山、鳥取、広島、福岡、熊本、水俣、沖縄)において13,000名近くの住民から毛髪試料を採取し、同時に自記式アンケートにより魚食習慣に関する情報を得た。毛髪試料は洗浄・乾燥後、加熱気化法によって総水銀濃度を分析した。図1に14地域で得た毛髪の水銀濃度の分布を示す。

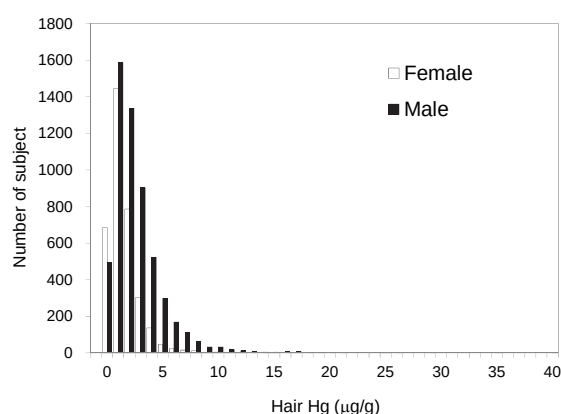


図1 国内14地域で採取された毛髪の水銀濃度分布

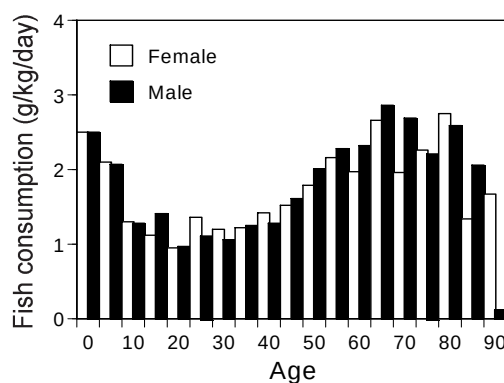


図2 魚介類摂取量の年齢による変化

毛髪水銀濃度には明確な男女差（幾何平均、男：2.47 $\mu\text{g/g}$ ；女：1.64 $\mu\text{g/g}$ ）があるが、魚介類の摂取量（g/kg body weight/day）には差が認められなかった（図2）。この男女差は思春期以降に明確になるため（データ省略）、毛髪への MeHg 取込みに性ホルモンの関与が考えられるが、証明するデータは得られていない。また、調査した地域間にも明確な差が認められたが（図3）、これはマグロの嗜好性との相関がみられた（図4）。

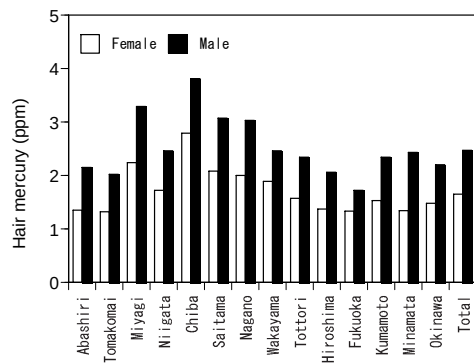


図3 地域別に見た14地域の毛髪水銀濃度

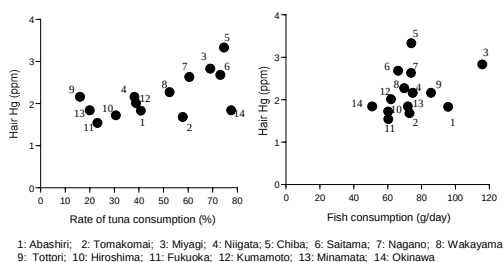


図4 14地域におけるマグロ嗜好性および魚介類摂取量と毛髪水銀濃度

※マグロの嗜好性は「よく食べる」と回答した住民の比率（%）を示す。

MeHg 摂取に関しては、胎児が高感受性を持つために妊婦を考慮した耐容摂取量（JECFA、

2003年；厚生省、2005年）が設定されている。それぞれの耐容摂取量は毛髪水銀濃度 2.2 $\mu\text{g/g}$ および 2.8 $\mu\text{g/g}$ に相当する。表1に14地域で得られた毛髪水銀濃度について、耐容摂取量を超える比率についてまとめた。なお、1 $\mu\text{g/g}$ と 5 $\mu\text{g/g}$ はそれぞれ、米国 EPA の参照値（RfD）および厚生省の一般成人を対象とした耐容摂取量に相当する。出産年齢（15-49歳）の女性では、24.7%および14.7%がそれぞれ、JECFA と厚生省の耐容摂取量を超えて MeHg を摂取していることがわかる。

表1 14地域の毛髪水銀濃度と耐容摂取量

毛髪水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$)	0<	1<	2.2<	2.8<	5<
男性（全体）	100	91.1	57.6	44.2	13.8
女性（全体）	100	80.1	32.3	20.6	3.2
女性（14-49歳）	100	74.7	24.7	14.7	1.4
全体	100	86.3	53.2	47.7	9.9

※毛髪水銀濃度 2.2 $\mu\text{g/g}$ 、2.8 $\mu\text{g/g}$ はそれぞれ、JECFA（2003年）と厚生省（2005年）の耐容摂取量に相当する。

※女性（14-49歳）は妊娠対象年齢を指す。

3. クジラ類多食地域における調査

2009年、和歌山県内の沿岸捕鯨産業をもつ町において、1015名の住民（男：445；女：570）から魚食に関するアンケート情報とともに毛髪試料を得、総水銀濃度を測定した。また、一部の協力者からは血液試料も得、総水銀濃度とセレン濃度を測定した。前記14地域とは異なり、この町では沖合で捕獲されるハクジラ類（マゴンドウ、スジイルカが主）の消費が多い。厚生省ホームページより抜粋したクジラ類と主な魚類の MeHg 濃度を表2に示す。

測定した毛髪の水銀濃度分布を図5に示す。幾何平均値（男：11.0 $\mu\text{g/g}$ ；女：6.63 $\mu\text{g/g}$ ）は男女とも前記14地域の4倍以上の値であり、クジラ類の多食の影響が考えられる。実際にクジラ類の摂取頻度が高いと答えたグループ

ほど毛髪水銀濃度は高い傾向があった（図 6）。

表 2 クジラ類および魚類の MeHg 濃度

種類	メチル水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$ 、平均値)
コビレゴンドウ	1.49
ツチクジラ	0.70
バンドウイルカ	6.62
イシイルカ	0.37
クロマグロ	0.54
ミナミマグロ	0.39
メカジキ	0.67
キンメダイ	0.53
アジ	0.03
サケ	0.01
サバ	0.16
イワシ	0.02

※厚労省ホームページより抜粋。

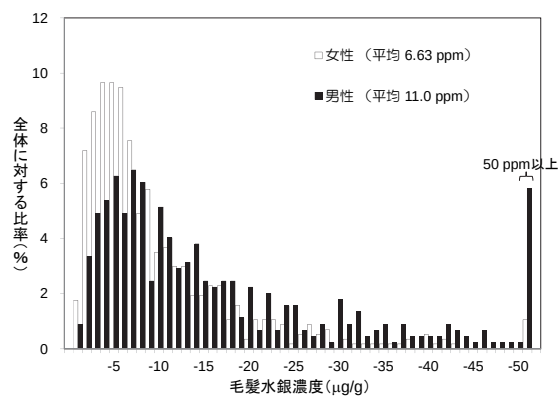


図 5 クジラ類多食地域における毛髪水銀濃度の分布

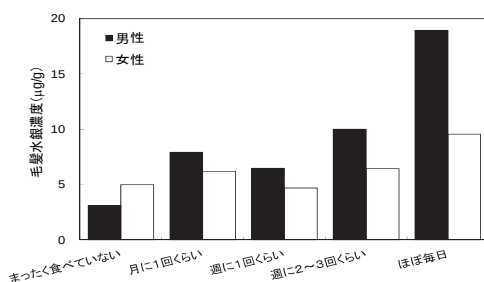


図 6 クジラ類の摂食頻度と毛髪水銀濃度

また、14 地域では 1 例も見られなかったが、MeHg による感覚障害の最大無作用レベルとされる $50 \mu\text{g/g}$ ($50 \sim 125 \mu\text{g/g}$ で 5% に中毒

初期症状) を超える値が対象住民の約 3% (男: 26 名; 女 6 名) に見られた。しかしながら、引き続き行った神経内科検診の結果によると、各種神経症状と毛髪水銀濃度の間には有意の相関はほとんど認められなかった。セレンは MeHg 毒性を修飾しうる因子の一つである可能性が示唆されている。住民から得た血液中の水銀濃度とセレン濃度が相関している（図 7）ことから、MeHg と同時に摂取したセレンが抑制的にはたらいっている可能性も考えられる。

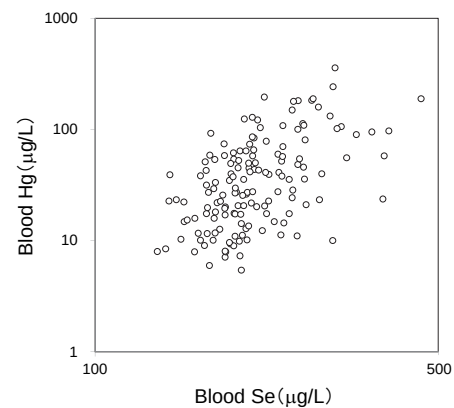


図 7 血液中の水銀濃度とセレン濃度

4. 白髪と黒髪の水銀濃度

白髪の水銀濃度についてはいくつかの報告があるが、黒髪との濃度差に関しては一貫していない。ここでは 14 地域で集めた毛髪試料から、白髪と黒髪の混在している 60 検体（男女各 30）について、それぞれについて総水銀濃度を求めた。図 8 に示すように両者の毛髪濃度には強い相関がみられ、濃度比（白髪／黒髪）には多少のばらつきは認められるものの、その平均値は $1.02 (\pm 0.15)$ であり、両者の水銀濃度には差がないとみなすことができる。

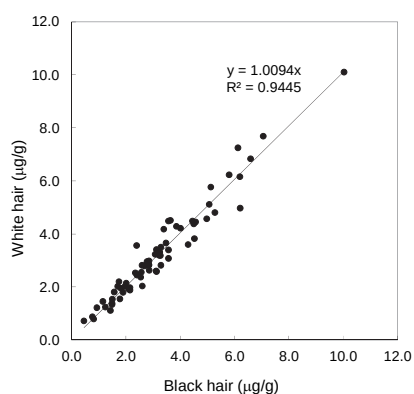


図 8 白髪と黒髪の水銀濃度

5. 手指爪と毛髪の水銀濃度

爪の水銀濃度も毛髪水銀同様に MeHg 摂取の指標として使用される。ここでは両指標の濃度比に関する情報を得るため、2009 年に福岡県 H 町の住民 100 名から集めた毛髪と手指爪の総水銀濃度を測定して比較した。図 9 に示すように、毛髪と爪の濃度比（爪／毛髪）には 0.18～0.54 のばらつきが認められたが、爪の水銀濃度は毛髪の約 1/3 であることがわかった。

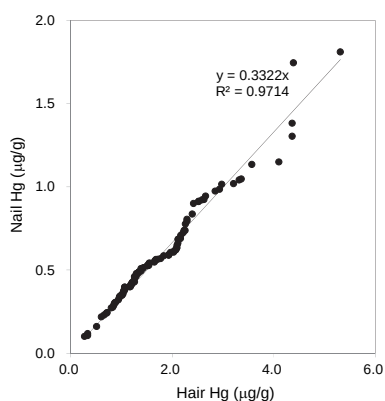


図 9 毛髪と手指爪の水銀濃度

6. 食品摂取頻度調査 (FFQ) による MeHg 摂取量の推定

毛髪の水銀濃度は魚介類の摂取によって

ほぼ決まるが、MeHg 濃度は魚種による変動が大きく、食事調査としては食品摂取頻度調査 (FFQ) によって摂取量の推定が可能である。FFQ では、魚介類全般ならびに水銀濃度が高い 6 品目の摂取頻度、1 回あたりの魚介類摂取量および主要魚介類 23 品目等の摂取傾向の有無から、MeHg 摂取量すなわち毛髪水銀濃度を推定した。図 10 に示すように、45 名の推定値と実測値には強い相関性が認められる一方、FFQ による推定値は過小評価となる傾向もみられた。

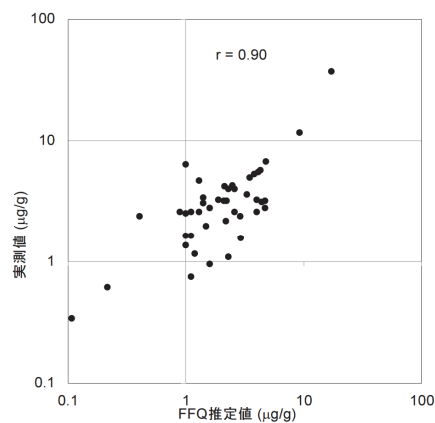


図 10 毛髪水銀濃度：FFQ 推定値と実測値の相関性

6. 妊娠中の毛髪水銀濃度と胎児発達

表 1 に示したように、わが国では出産年齢の女性で、耐容摂取量を超えて MeHg を摂取しているものも少なくない。一方、胎児影響の最大無作用量レベルである毛髪水銀濃度 11 μg/g を超える例は非常に少ない。そこで、最大無作用量レベル未満の摂取レベルにおける胎児へのリスクを明らかにすることが重要である。

表 3 に北海道大学などと共同で 2002 年～2005 年に実施した北海道スタディの結果を示す。出生 430 例（毛髪水銀濃度の中央値は 1.41 μg/g）について、飲酒・喫煙などの主

要因子で調整した低出生体重児のリスク（調整オッズ比）は、中央値以上の毛髪水銀濃度群で有意に1より小さくなるなど、毛髪水銀濃度と負の相関を示した。少なくとも MeHg の最大無作用量より低い場合、魚介類摂取による便益効果が強く反映されたとも考えられる。

表3 妊娠中の母体毛髪水銀濃度と不当軽量児 (Small for Gestational Age by Weight) 出現リスクの負の相関

四分位	毛髪水銀濃度 ($\mu\text{g/g}$)	調整オッズ比 (95%信頼区間)
1	0.24-0.96	1
2	0.96-1.41	0.24 (0.06-1.00)
3	1.41-1.89	0.12* (0.02-0.68)
4	1.89-4.73	0.17* (0.04-0.79)

*: $p < 0.05$, 傾向性検定: $p = 0.014$
(Miyashita et al. 2015 による)

引用文献

- 1) NRC (2000) Toxicological Effects of Methylmercury, National Academy Press, National Research Council. Committee on the Toxicology Effects of Methyl-Mercury, Washington DC.
- 2) WHO (1990) IPCS Environmental Health Criteria 101 Methylmercury. World Health Organization, Geneva.
- 3) JECFA (2003) Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 61st Meeting. Rome, 10-19 June 2003.
- 4) MHLW (2005) The Ministry of Health, Labor and Welfare, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/index.html>.
- 5) 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 (2014) Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. Environ Int 68, 25-32.
- 6) Miyashita C, Sasaki S, Ikeno T, Araki A, Ito S, Kajiwara J, Todaka T, Hachiya N, Yasutake A, Murata K, Nakajima T, Kishi R. (2015) Effects of in utero exposure to polychlorinated biphenyls, methylmercury, and polyunsaturated fatty acids on birth size. Sci Total Environ 533, 256-265.

魚におけるメチル水銀濃度の実態調査とその結果を利用した摂取量推定

○渡邊敬浩（国立医薬品食品衛生研究所）

1. はじめに

メチル水銀は、脳神経系に影響を与える有害物質である。食品衛生において、施策決定の基本となるリスクアナリシスのフレームで捉えれば、メチル水銀はハザードである。ハザードの特定と特徴の解明は、最初に取り組むべき重要な課題である。この初期の課題が達成された後は、特定のハザードに暴露される機会や量を知り、その暴露によって健康危害の頻度や程度(リスク)がどのように変化するかを知ることが重要となる。さらに、健康危害に繋がらないよう、リスクを管理することが課題となる。リスク管理のための行政施策としては、食品の製造規範や上限基準値の策定、摂食指導などがある。しかしリスク管理は、行政施策だけでは完結しない。一人一人がリスクを理解し、食事を摂るまた楽しむことに加えて、健康な生活を営むために若干の注意と工夫をすることが大事である。そのために必要な情報の提供やコミュニケーションもまた、行政に求められる課題の1つとなる。

メチル水銀がハザードとして特定され、リスク管理対象となった後は、人的活動が原因となり健康危害が発生する可能性は極めて低いと言えるだろう。しかし、自然界に水銀が存在し循環している以上、ヒトがメチル水銀に暴露される機会は少なからずある。食品の摂取を介した暴露では、メチル水銀を蓄積することが知られる魚介類への注意が必要となる。単純に魚を食べないという選択をするのではなく、魚食の恩恵を受けるためにも、どのような魚にどのくらいの量のメチル水銀が含まれるかを知り、魚種を選び食べる量に気をつけることが、一人一人に求められる事で

ある。

本研究では、マーケットバスケット方式を採用したトータルダイエツトスタディー(TDS)により、国民の平均的な総水銀摂取量を30年以上にわたり推定している。まず、その結果についてまた、2013年から開始したメチル水銀摂取量の推定について紹介する。さらに、19種の魚におけるメチル水銀濃度の実態調査結果と、それを用いたモンテカルロシミュレーションによる確率論的な摂取量推定の結果についても紹介する。

2. 方法

2-1. 試料

2-1-1. トータルダイエツトスタディー(TDS)

- ・ **試料調製地域**；トータルダイエツト(TD)試料は、沖縄から北海道までの全国11地域で調製した。試料の調製には、各地方自治体の衛生研究所等にご協力いただいた。
- ・ **TD 試料の構成**；厚生労働省が実施する、国民健康・栄養調査結果に基づき、TD試料の構成を決定した。国民健康・栄養調査において食品は、98の小分類に細分されている。この小分類を14群にまとめ、本研究におけるTD試料の群とした。各群のTD試料を構成する個々の食品の重量は、統計法に基づき国民健康・栄養調査結果を入手後、直近3年間分の食品消費量データをTD試料の調製地域別に解析した平均値に基づき決定した。この平均値の算出において、年齢や性別は考慮していない。TD試料に実際に含める個々の食品は、試料調製担当者が任意に選定した。担当者は、選定した食品を小売店等で購入後、基礎的な調理を施した後に秤量し、上記の重量及び構成と

なるように合一し、混合することで試料を調製した。

2-1-2. 魚におけるメチル水銀濃度の実態調査

調査対象には、暫定的規制値の適用及び流通量を考慮し、以下の 19 魚種を選定した。メカジキ、クロマグロ、メバチマグロ、キハダマグロ、ビンナガマグロ、カツオ、ブリ、イナダ、アジ、イワシ、サンマ、カレイ、カンパチ、サケ、サバ、サワラ、タイ、タラ、ニジマス(トラウトサーモン)。

選定した魚種中、クロマグロとブリについては天然と養殖とを区別した。多様な地域で水揚げされた鮮魚 210 製品を東京都内及び神奈川県内の小売店で購入した。一次加工され刺身として販売されていた製品以外の製品は、頭、内臓、皮、骨等を除き筋肉部位のみとした後に、混合して試料とした。

2-2. 分析

認証標準試料や規定量の標準試薬を添加した試料の分析を通じて妥当性を確認した、総水銀分析法並びにメチル水銀分析法を使用した。総水銀分析法では、加熱気化型水銀計(MA-2000 あるいは MA-3000 ; 何れも日本インスツルメンツ社)を使用した。また、メチル水銀分析法には、フェニル誘導体化を介した GC-MS(/MS)法¹⁾を用いた。

3. 結果

3.1 TDS により推定された水銀並びにメチル水銀の国民平均摂取量

本 TDS における総水銀の摂取量推定は、1979 年に開始された。その後 2015 年までの 37 年間に蓄積されたデータの解析から、日本人による平均的な総水銀摂取量は 8.4 $\mu\text{g}/\text{man}$ と推定された。その年間変動は 13%(RSD%)であり、天然に存在する有害物質の摂取量の変動としては小さいと言える。

過去の摂取量は、TD 試料を調製した各地域を所在地とする地方衛生研究所ごとに得ら

れた分析値に基づき推定されてきた。最近では、摂取量推定値の質を量的に保証することが要求されている^{2),3)}。そのため、2013 年～2015 年には、国立医薬品食品衛生研究所において、妥当性確認した分析法を用いて全ての TD 試料を分析した。その結果に基づき推定された総水銀摂取量は 8.3 $\mu\text{g}/\text{man}$ であり、過去の摂取量推定値にほぼ一致した。また、年間変動は 3.7%(RSD%)であり、より精密な摂取量推定が可能になったことを示唆している。総水銀摂取量には、1 群(コメ)、10 群(魚介類)、11 群(肉・卵類)が主に寄与しており、各群の寄与率はそれぞれ 5.4%、89.1%、4.3%となった。新たに開発した分析法を用いて得た分析値に基づき推定したメチル水銀摂取量は、2013 年～2015 年の平均として 6.6 $\mu\text{g}/\text{man}$ となった。メチル水銀摂取量への各食品群の寄与率は、10 群による 90%が最大で支配的と考えられた。

平均摂取量の比較からは、総水銀摂取量の 90%がメチル水銀に由来すると考えられる。

3-2. 魚におけるメチル水銀濃度の実態調査とその結果を利用した摂取量推定

メチル水銀摂取量への 10 群の寄与率が支配的であった結果を踏まえ、種々の魚におけるメチル水銀濃度の実態を調査した。その結果、メカジキやクロマグロといった大型の捕食魚における濃度が高く、カンパチやタイといった中型の魚、アジやサンマといった小型の魚になるにつれて濃度が低くなった。ブリとイナダにおける濃度の比較からは、メチル水銀濃度と体重との相関が示唆された。これらは、山下らの報告^{4), 5)}を支持する結果であった。また、クロマグロとブリの 2 つの魚種の調査結果からは、養殖によりメチル水銀濃度が低下する可能性が示された⁶⁾。

実態調査により得られた 19 魚種 210 試料分のメチル水銀濃度データと国民健康・栄養調査データから抽出した各魚の消費量データ

を用いたモンテカルロシミュレーションを実行し、メチル水銀摂取量を確率論的に推定した。その結果、平均摂取量は $5.8 \mu\text{g}/\text{man}$ となり、TDS により推定された値の約 90% となった。メチル水銀摂取量への魚の寄与が約 90% であるため、モンテカルロシミュレーションにより推定された平均摂取量は妥当であると考えられる。さらに 90% タイル値は、 $15.0 \mu\text{g}/\text{man}$ と推定された。この結果は、高濃度のメチル水銀を含む魚を平均よりも多量に食べることで、平均値の 3 倍程度の量のメチル水銀に暴露されるヒトが存在する可能性を確率論的に示している。この 90% タイル値を、体重を 50 kg と仮定して FAO/WHO 合同食品添加物専門家会議(JECFA)が示している耐容週間摂取量(PTWI: $1.6 \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{bw}$)と比較すると、約 130% となる。ただし、1 週間にわたって毎日、同量のメチル水銀に暴露されることを仮定しているため、極めて保守的な推定に基づく比較の結果である。

4. まとめ

食事を介して日本人が暴露される水銀及びメチル水銀の量を推定した。その結果、日本人は通常の食事を介して、大きく変わらない量の水銀あるいはメチル水銀に暴露されていることが改めて確認された。平均的な暴露量は、JECFA の示した PTWI を下回っており、特に健康危害を心配するようなレベルにはない。ただし、多くの魚にはメチル水銀が含まれているため、特定の魚種ばかりを多量に食べ続けることが、リスクの増加につながることは間違いない。

メチル水銀による健康危害への影響を最も受けやすいのは胎児期であり、WHO 等の国際機関により、「成人ではほぼ問題がないものの、胎児にはリスクがある」と評価されている。厚生労働省もまた、妊娠している女性および妊娠する可能性のある女性を対象に摂食指導⁷⁾を実施している。これら摂食指導の対

象となっているヒトには特に、同じ種類の魚ばかりを多量に食べ続けたいことを心がけて、健康の維持・増進を図るために、魚食を楽しんでいただきたいと思います。そのために、本研究の結果が役立つことがあれば、非常に幸せである。

引用文献

- 1) Watanabe T., Kikuchi H., Matsuda R., Hayashi T., Akaki K., and Teshima R. Performance evaluation of an improved GC-MS method to quantify methylmercury in fish. Food Hyg. Saf. Sci., 56, 69-76 (2015)
- 2) Guidelines for the study of dietary intakes of chemical contaminants (WHO offset publication No.87)
- 3) Towards a harmonised total diet study approach: a guidance document (Joint guidance of EFA, FA and WHO), http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75330/1/9789241502702_eng.pdf
- 4) Yamashita Y., Omura Y., Ozaki E. Total mercury and methylmercury levels in commercially important fishes in Japan. Fishery Sci., 71, 1029-1035 (2005)
- 5) 山下由美子, 山下倫明, 斎藤洋昭. “1 章 魚介類におけるメチル水銀, セレンおよび高度不飽和脂肪酸の含有量”. 魚食と健康-メチル水銀の生物影響. 山下倫明, 鈴木俊之, 横山芳博編. 東京, 恒星社厚生閣, 2014, p.9-28 (ISBN 978-4-7699-1471-6)
- 6) 渡邊敬浩, 林智子, 松田りえ子, 穂山浩, 手島玲子. 食品として流通する魚の総水銀およびメチル水銀濃度の実態調査. 投稿中
- 7) これからママになるあなたへ “お魚について知っておいてほしいこと” 厚生労働省, <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syoku-anzen/suigin/dl/051102-2a.pdf>

胎児循環におけるメチル水銀に対するセレン、ビタミン E とドコサヘキサエン酸： 母体循環との比較

○坂本峰至、Laurie HM Chan（オタワ大学・カナダ）、村田勝敬（秋田大学）

1. 目的

水俣におけるメチル水銀中毒では、高濃度でメチル水銀汚染された魚介類を妊娠中に食べた母親から 20 人以上の胎児性水俣病患者が生まれ、脳性麻痺様の症状を呈した。一方、母親の症状は無いか軽度であり、胎児がメチル水銀にハイリスクであることを示す歴史的に重要な出来事であった。その後、胎児期のメチル水銀曝露が児の神経発達に及ぼす影響に関し、多くのコホート研究や動物実験がなされた。

一方、メチル水銀の毒性を栄養素が緩和するという研究も多く、特にセレン、ビタミン E、DHA のメチル水銀毒性防御/緩和効果が注目されてきた。セレンは必須元素で、グルタチオンペルオキシダーゼやチオレドキシニンレダクターゼの抗酸化酵素の活性中心として重要な役割を果たしている。更に、セレンは水銀と非常に強い親和性があり、Ganther ら¹⁾の発表以降、セレンはメチル水銀の毒性を生存率や体重減少、後肢交差、神経発達や神経行動学的欠損、末梢神経傷害の種々のエンドポイントで防御することが報告されてきた。Sakamoto ら²⁾は、最近、発達期のラットの大脳皮質でメチル水銀が引き起こす神経細胞死を食物由来のセレノメチオニンが防御することを報告した。ビタミン E は、リポプロテイン、多価不飽和脂肪酸、細胞膜を酸化傷害から守る脂溶性抗酸化物質である。ビタミン E のメチル水銀の毒性に対する防御効果も Ganther ら³⁾によって報告された。引き続き、ウズラ、ラット、猫、ハムスター、培養神経組織でも同様な効果が発表された。 $\omega 3$ 系多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸

C20:5 ω -3)やドコサヘキサエン酸(DHA, C22:6 ω -3)はヒトの健康に重要である。特に DHA は、脳の発達や機能にとって重要で、メチル水銀のネガティブな影響を緩和する作用があることが、ヒトのコホート研究で報告された⁴⁾。坂本ら^{5,6)}は、母体血や臍帯血で水銀と DHA が正の相関を持つことを報告しており、母体経由で魚介類を摂取することにより水銀のリスクと DHA のベネフィットの双方を胎児は同時に取り込んでいることになる。

本研究では、1) メチル水銀の胎児移行を評価するため、母親から胎児循環への各栄養素の移行の特徴を臍帯血と母体血の比較で検討する。2) 胎児がメチル水銀毒性へ高感受性である背景を検討するため、臍帯血の水銀、セレン、ビタミン E、DHA の存在状態を母体血と比較する。

2. 方法

試料は平成 18・19 年に、熊本市内の産科病院で出産時に得られた 54 組の母体血である。妊娠初期の母親から本研究に参加するインフォームドコンセントを得た。血液生化学成分（ヘマトクリット値、脂質成分、ビタミン E を含む。）血清アミノ酸、脂肪酸及び全血の元素（水銀、セレン、カドミウム、鉛、ヒ素）の測定を実施した。検討は母体・臍帯血プロファイル比較、水銀との相関等である。

3. 結果・考察

母体血に比べて臍帯血の特徴は、ビタミン E を含む脂質成分が低いことで、これらの脂質成分

は、妊娠中に胎児への胎盤移行が少なく、母体に蓄積傾向にあると言える（表 1）。

表 1. 母体と臍帯血の一般生化学成分組成

	Maternal (n=54)	Cord (n=54)	C/M*100
Hematocrit value	32.1 (29.3–33.6)	45.2 (42.6–47.6)	142
TP	5.80 (5.40–6.18)	5.90 (5.63–6.20)	103
TG	200 (154–241)	21.5 (15.5–26.0)	10.3
TCH	241 (214–269)	65.5 (58.0–73.5)	27.5
HDL-C	68.0 (59.3–82.8)	28.0 (24.3–33.0)	40.1
Vitamin E	1.38 (1.22–1.52)	0.26 (0.23–0.36)	20.5
Essential AA	931 (880–1038)	1250 (1182–1354)	132
Methionine	25.8 (22.7–29.3)	28.6 (25.4–31.3)	109
Total n-3 PUFA	1191 (1046–1292)	221 (189–270)	19.3
Total n-6 PUFA	203 (168–249)	62.1 (52.4–76.9)	32.0

一方、ヘマトクリット値、アミノ酸濃度は胎児血に高く、胎児への酸素取り込みの重要性及び胎児の蛋白質の合成の為にアミノ酸が経胎盤的に能動輸送されている結果が示された。中性アミノ酸のメチオニン（MeHg・システイン抱合体と化学形態が類似）も胎児血で高かったが、例外はシスチンであった（図 1）。

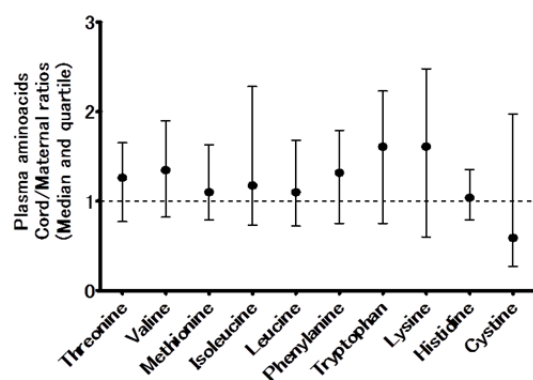


図 1. 母体と臍帯血血漿中アミノ酸濃度比

調べた元素の中で、Hg は突出して臍帯血で高くなっており、逆に、Cd は臍帯血にきわめて低かった（表 2）。

表 2. 母体血と臍帯血の水銀、鉛、カドミウム、セレン、ヒ素の濃度

n=54	Maternal	Cord	r	C/M ratio
Hg	3.79 (3.26–4.69)	7.26 (6.02–9.38)	0.78	1.88
Pb	8.26 (6.61–10.02)	7.18 (6.12–8.19)	0.41	0.88
Cd	0.87 (0.69–1.11)	0.36 (0.33–0.40)	-0.14	0.42
Se	153 (140–172)	172 (163–190)	0.47	1.14
As	3.17 (2.43–4.61)	2.17 (1.77–3.36)	0.74	0.74

先に坂本ら⁷⁾が胎盤絨毛組織と臍帯組織中元素濃度比較で示したように、カドミウムは胎盤に効率よく捕囚されるが、一価の MeHg はトラップされにくく、むしろシステインと結合し能動的に胎児移行することが示された。

脂肪酸は、他の脂質と同様に、胎児への移行性は低く、母体に蓄積傾向であるが、脳に必要な脂肪酸 DHA, アラキドン酸 (AA) は脂肪酸の中では選択的に高く胎児に移行していることが示された（図 2）。

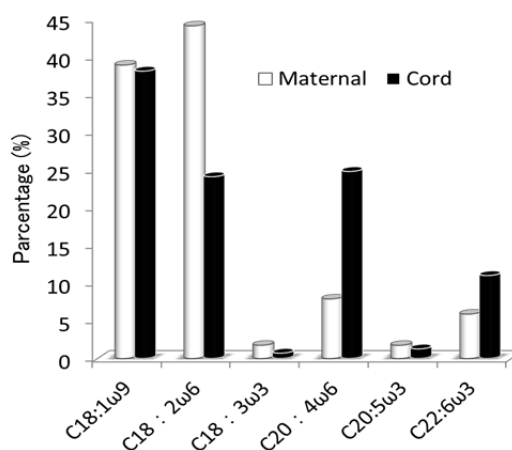


図 2. 母体血と臍帯血の血漿中脂肪酸濃度組成

表 3 に母体血と臍帯血における水銀と他の元素、脂肪酸、ビタミン E との相関を示した。

表 3. 体血と臍帯血における水銀と他の元素、脂肪酸、ビタミン E との相関

n=54	Maternal	Cord
Pb	0.046	0.139
Cd	-0.143	-0.075
Se	0.319*	0.212
As	0.370**	0.123
C20:4 ω 6	0.015	0.075
C20:5 ω 3	0.352**	0.430**
C22:6 ω 3	0.373**	0.402**
Vitamin E	-0.090	-0.194

母体血で Hg は DHA、ヒ素、セレンと正の相関を示し、水銀の殆どが魚介類由来であることから、DHA、ヒ素、セレンも主に魚介類由来であることが示唆された。更に、臍帯血の中では DHA のみが Hg と正の相関を示し、母親の魚介類摂取が胎児における MeHg と DHA の濃度を規定する役割を果たすことが示された。そこで、妊婦はメチル水銀の曝露量を低減し、一方では、DHA の摂取量を増やすには、メチル水銀濃度が低く DHA 濃度の高い、イワシ、秋刀魚、アジ等の魚介類を摂取することが勧められる。

母体血と臍帯血の水銀、セレン、DHA、ビタミン E 濃度を図 3 に纏めた。

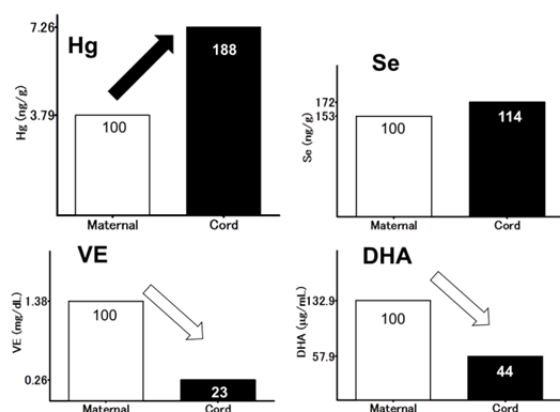


図 3. 母体血と臍帯血の水銀、セレン、DHA、ビタミン E 濃度

Hg、セレン、ビタミン E、DHA の中で、Hg のみが選択的に胎児に移行し、セレンは同じレベル、ビタミン E、DHA の胎児移行性は非常に低いことが示唆された。結果としてセレン/Hg、ビタミン E/Hg、DHA/Hg は胎児循環において母親循環より低い結果となる。MeHg の高い胎児移行性に加え、胎児循環において、胎児の MeHg に対する防御作用が期待される因子であるセレン、DHA、ビタミン E の水銀に対する相対濃度比が低いことが、胎児がメチル水銀に対し高感受性である一因と考えられた。

4. まとめ

胎児循環においては、メチル水銀濃度が約 2 倍高いことに加え、水銀に対するセレン、VE、DHA のメチル水銀毒性への防御効果のある物質の濃度比が低いことが、胎児がメチル水銀の毒性へ高感受性である一因であると考察された。

引用文献

- 1) Ganther, H.E., et al., Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science*, 1972. 175(26): p. 1122-4.
- 2) Sakamoto, M., et al., Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ Sci Technol*, 2013. 47(6): p. 2862-8.
- 3) Ganther, H.E., Modification of methylmercury toxicity and metabolism by selenium and vitamin E: possible mechanisms. *Environ Health Perspect*, 1978. 25: p. 71-6.
- 4) Strain, J.J., et al., Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles Child Development Nutrition Study. *Neurotoxicology*, 2008. 29(5): p. 776-82.
- 5) Sakamoto, M., et al., Mercury and docosahexaenoic acid levels in maternal and cord blood in relation to segmental maternal hair mercury concentrations at parturition. *Environ Int*, 2012. 44: p. 112-7.
- 6) Sakamoto, M., et al., Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. *Environ Sci Technol*, 2004. 38(14): p. 3860-3.
- 7) Sakamoto, M., et al., Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int*, 2013. 60: p. 106-11.

糖尿病マウスにおけるメチル水銀曝露に伴う神経行動障害の新規評価法

○山元 恵（国立水俣病研）、柳澤利枝（国立環境研）、茂木正樹（愛媛大院）、森 友久（星薬科大）、中村政明（国立水俣病研）、竹屋元裕（熊本大院）、衛藤光明（樹心台）

1. 背景

メチル水銀への曝露は、ヒトおよび実験動物において神経行動障害を引き起こすことが知られている。我々は糖代謝異常がメチル水銀の毒性発現に及ぼす影響について 2 型糖尿病モデルマウス KK-Ay を用いて研究を行っている¹⁾。これまでの検討において、メチル水銀に曝露した KK-Ay において観察される神経行動障害を明確に評価することが困難であった。従来、メチル水銀に曝露した齧歯類における神経行動障害は、後肢交叉の観察、ロータロッドテスト、フットプリントテスト等による評価が報告されているが、KK-Ay マウスは肥満を伴うため、これらの評価法の適用が困難である。体荷重測定（Dynamic Weight Bearing : DWB）テストは最近報告例が増えている齧歯類の行動評価法であり、熱や圧力などのストレスを動物に与えないために優れた評価法であるが、これまでメチル水銀曝露に伴う神経行動障害の評価には応用されていない。

2. 目的

メチル水銀による齧歯類の神経行動障害の客観的な評価法として、DWB テストによる神経行動障害の半定量的評価法を確立することを目的とする。

3. 方法

12 週齢の雄マウス（KK-Ay, BL/6）にメチル水銀（5 mg Hg/kg）を週三回投与した。

DWB テストは、マウスを DWB ケージに入れて 5 分間馴化後、5 分間自由に行動させ、その間の四肢にかかる荷重を機器底部のセンサーで自動的に検出した。

ビデオによるマウスの体勢と肢の位置の確認、および機器底センサーによる四肢荷重の検出を

確認後、使用可能なデータを選択した。前肢、後肢の各々について、左+右の値を最終的なデータとして用いた。マウスごとに選択した前肢・後肢の荷重データの平均値を有意差検定した。

病理学的検討の一環として、末梢神経（坐骨神経）における組織傷害をマッソン・ゴールドナー染色により評価した。

4. 結果・考察

4-1: 本来、マウスの前肢・後肢にかかる荷重バランスは前肢<後肢である。本実験条件下における KK-Ay マウスの前肢・後肢にかかる荷重は、①メチル水銀の投与開始前～メチル水銀投与 1 週間後：前肢<後肢、②メチル水銀投与 2 週間～4 週間後：前肢≒後肢、③メチル水銀投与 5 週間後：前肢>後肢と神経症状に伴った荷重変化を検出できた。以上の結果から、DWB テストは、齧歯類におけるメチル水銀曝露に伴う神経行動障害の有用な半定量的評価法になりうるということが明らかになった（図 1～7）。

4-2: メチル水銀曝露に伴う体重変化と DWB テストにより検出された体荷重変化の傾向は平行であった（図 8）。

4-3: メチル水銀の曝露により神経症状を示した KK-Ay マウスの坐骨神経において顕著な病変が検出された（写真 1）。

図 1

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与前

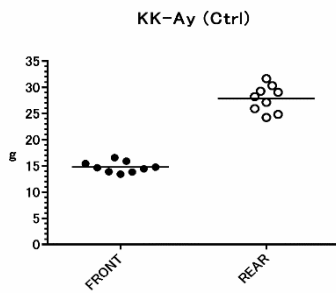


図 5

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与 4 週

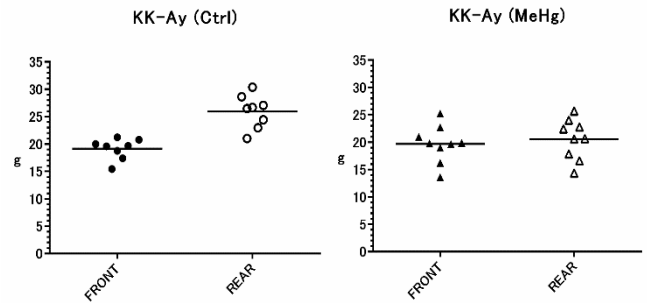


図 2

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与 1 週

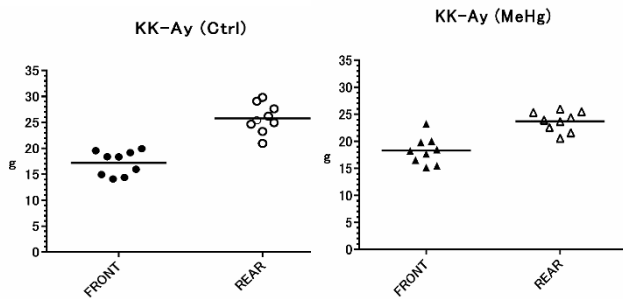


図 6

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与 5 週

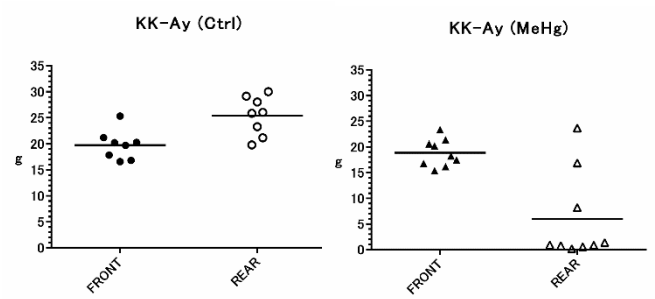


図 3

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与 2 週

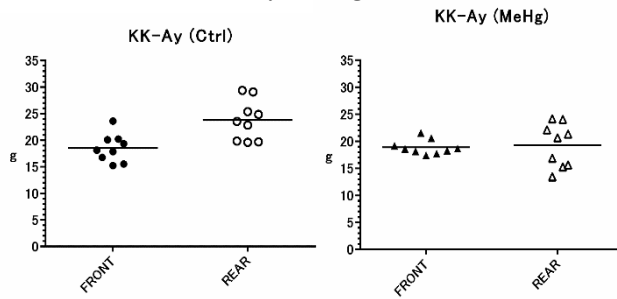


図 7

DWB test (BL/6)

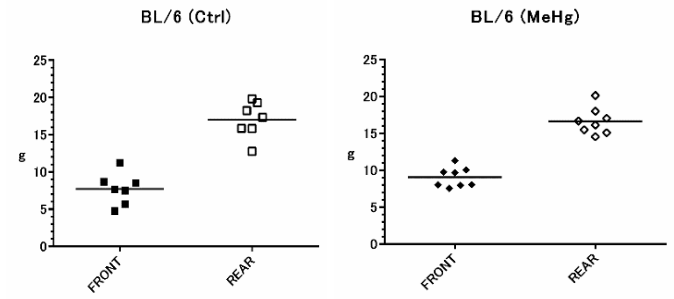


図 4

DWB test (KK-Ay)-MeHg 投与 3 週

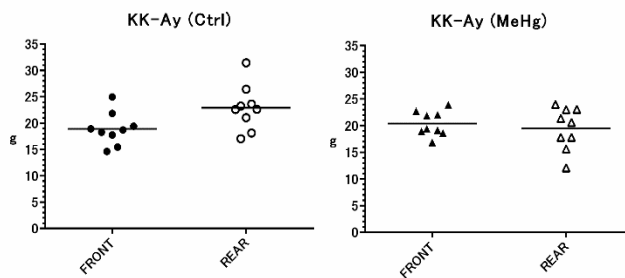


図 8

メチル水銀曝露に伴う体重変化

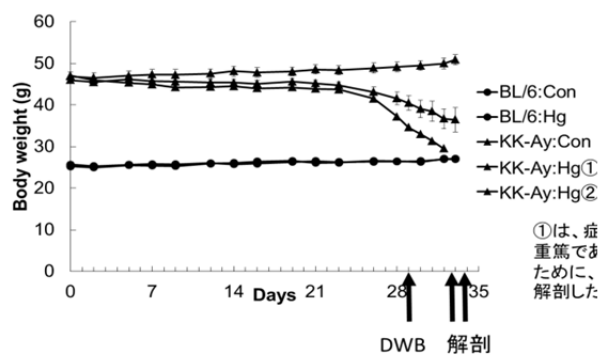
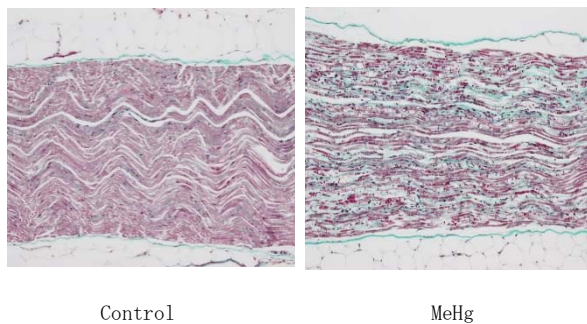


写真 1

KK-Ay 病理 (末梢神経)

Masson-Goldner staining



[参考文献]

- 1) Yamamoto M, Yanagisawa R, Motomura E, Nakamura M, Sakamoto M, Takeya M, Eto K. Increased methylmercury toxicity related to obesity in diabetic KK-Ay mice. J Appl Toxicol. 2014 Aug;34(8):914-23.

マウス第三脳室上皮細胞の繊毛運動性に対するメチル水銀の影響に関する研究

○南 武志、萩原央記、吉田 繁（近畿大理工）

1. はじめに

ほ乳類には、前脳に位置する2つの側脳室と、間脳に位置する第三脳室、および小脳と脳橋の間に位置する第四脳室の4つの脳室が存在しており、脳脊髄液が満たされている。脳室に面して存在する単層円柱上皮細胞である上衣細胞が脳室面側に運動性繊毛を有し、この繊毛が同一方向に運動することが、脳脊髄液が一方向に流れる一因であると考えられている。脳脊髄液流に対する上衣細胞の繊毛運動は、神経細胞の機能維持だけでなく神経芽細胞の移動や各種の神経発生に必要な因子の移動に重要な役割を果たしている。また、上衣細胞繊毛運動機能の低下によって生じる脳脊髄液流の滞留や方向異常は水頭症の原因の一つになると考えられている。

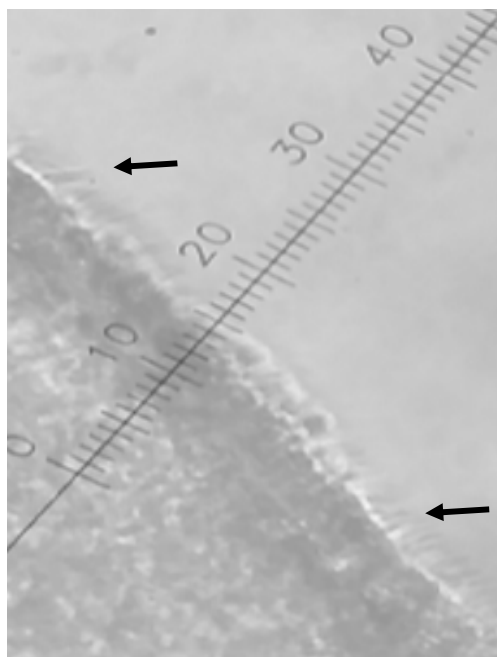


図1 マウス第三脳室上衣細胞の繊毛
矢印は繊毛を示し、右上面は第三脳室を示す。
対物レンズ40倍，2.5 $\mu\text{m}/\text{div}$ 。

上衣細胞繊毛の運動機能の観察は、マウスあるいはラットの脳スライスを高速ビデオカメラで撮影し、1秒間の打頻度を計算する方法が一般に用いられる。図1にマウス第三脳室の上衣細胞の繊毛を示す。繊毛は非対照的な運動を高速で行っており、その往復回数は1秒間におよそ30回を数える。

メチル水銀が摂取されたとき、脳内に移行して中枢機能に影響を与えることは数多くの報告がある。しかし、上衣細胞の繊毛運動能にどのような影響を与えているか、いまだ不明な点が多いことから、明らかにすることを試みた。

2. 材料と方法

2-1. 動物

ICR系雄性マウスとddY系雄性マウスを日本SLC(株)より購入し、12時間明暗交代の部屋で室温22-25℃、湿度40-60%で1週間の予備飼育後に実験に供した。また、水道水と飼料は自由に摂取させた。動物を用いたすべての実験は、近畿大学動物実験委員会の承認を得たのちに実施した。

2-2. 脳スライス作成と上衣細胞繊毛運動の観察

マウスを頸椎脱臼して脳を摘出し、予め空気をバブリングさせて4℃に保った人工脳脊髄液（CSF液：150 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.3 mM CaCl_2 , 1.3 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 5.6 mM glucose, pH 7.3）中に10～15分静置したのち、正中隆起を指標としてリニアスライサー（堂阪イーエム(株)、京都）を用いて冠状面で第三脳室を含む150 μm のスライスを得た。スライスはガラスボトムディッシュにスライスア

ンカー (SHD-26/H10, Warner Instruments) で固定し、 $35.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に温めた CSF 液を 2 mL/sec で灌流させた。

上衣細胞繊毛運動の観察は倒立実体顕微鏡を用いて 40 倍の対物レンズで行い、210 フレーム/秒の高速カメラで撮影し、Area61 VideoBrowser を用いて 1 秒間に 30 フレームとしたのち、1 秒間当たりの往復数を算出して Beat frequency (Hz) で表示した。

2-3. 繊毛運動に対するメチル水銀の影響

2-3-1. スライス添加実験

塩化メチル水銀 (99.9 %, FLUKA Chemie GmBH) を DMSO に溶解後、CSF 液で希釈した。マウス第三脳室を含むスライスをガラスディッシュに入れ、スライスアンカーで固定したのち、CSF 液で 10 分間の灌流を行った。その後、メチル水銀を含む CSF 液に交換して 20 分間行ったのちメチル水銀を含まない CSF 液に交換して 40 分間行った。

2-3-2. メチル水銀飲料水投与実験

飲料水としてマウスに摂取させたメチル水銀が繊毛運動に影響を与えるかを検討するため、塩化メチル水銀 (10, 20, 40 mg/L 水道水) を 7 週令のオスマウスに 19 日間飲料水として摂取させ、19 日目に頸椎脱臼して脳を摘出してスライスを作成し、直ちに上衣細胞繊毛運動を 30 分間観察した。コントロール群は塩化メチル水銀を含まない水道水を 19 日間摂取させたのち、同様の処置を行った。

次に、メチル水銀を飲ませた何日後から繊毛運動に影響が観察されるかを調べるため、水道水に塩化メチル水銀 (20 mg/L) を溶解した飲料水をマウスに摂取させ、投与 4 日後、8 日後、および 12 日後に頸椎脱臼して脳を摘出して作成したスライスを用いて上衣細胞繊毛運動を 30 分間観察した。コントロール群の繊毛運動観察は塩化メチル水銀を摂取させる前のマウスを用いた。

メチル水銀を飲料水として摂取させたのちに摂取をやめると繊毛運動にどのような影響が出るかを調べるため、水道水に塩化メチル水銀 (20 mg/L) を溶解して 19 日間飲ませたのち、メチル水銀を含まない水道水に交換し、10 日後、20 日後、および 30 日後に頸椎脱臼して脳を摘出して作成したスライスを用い、30 分間繊毛運動を観察した。コントロール群は塩化メチル水銀を含まない水道水で 49 日間飼育したマウスを用いた。

2-3-3. 大脳内水銀量の定量

マウス大脳前頭部から湿重量として約 40 mg を採取し、濃硝酸 2 mL を加えて溶解したのち、超純水で全量 10 mL とした。この液を用いて ICP-OES (iCAP 7600Duo, サーモフィッシャー社) 装置で水銀濃度を測定し、湿重量当たりの水銀量を算出した。なお、測定液中の水銀濃度が 25 ng/mL 以下のとき、定量限界以下とした。

2-3-4. 統計処理

データは平均 $\pm$ 標準偏差で表し、一元配置分散分析を行ったのち、Scheffe の方法に従って有意差検定を行い、* $p < 0.05$ および ** $p < 0.01$ で示す。

3. 結果

図 2 に、メチル水銀無添加の水道水で飼育したマウス脳より摘出したスライスを用いて繊毛打頻度に与える CSF 液の影響を検討した結果を示す。マウスを頸椎脱臼して第三脳室を含む脳スライスを作成するまで冷却しながら約 30 分以内で実施できた。作成したスライスをスライスアンカーでガラスディッシュに固定し、 35.5°C に温めた CSF 液を灌流させた直後の繊毛打頻度を観察すると、 22.8 ± 1.7 Hz であった。その後 70 分後の繊毛打頻度は 22.9 ± 1.5 Hz であり、上衣細胞の繊毛運動は脳より摘出して長時間安定な往復運動が

保たれていた。

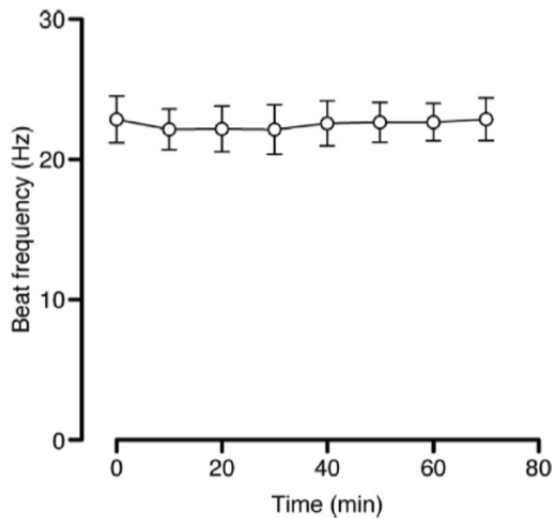


図2 マウス第三脳室上衣細胞の繊毛運動に対するCSF液の影響¹⁾

ICR系マウスを用い150 μm の厚さのスライスをガラスディッシュにスライスアンカーで固定し、35.5℃に維持したCSF液を2 mL/secで70分間灌流した。縦軸は1秒間あたりの打頻度を、横軸はCSF液で灌流した観察時間を示す。n=30, Mean $\pm$ S.D.

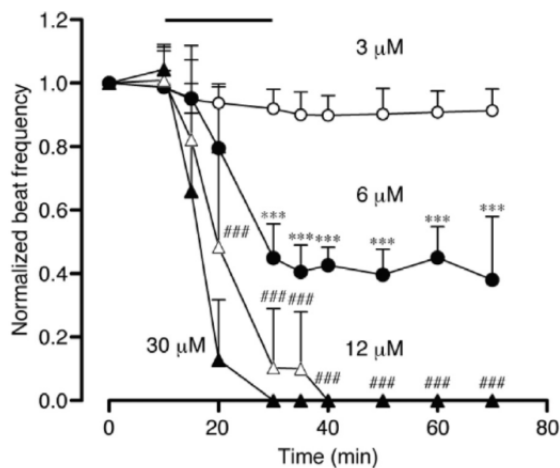


図3 マウス第三脳室上衣細胞の繊毛運動に対する塩化メチル水銀の影響¹⁾

ICR系マウスを用い150 μm の厚さのスライスをガラスディッシュにスライスアンカーで固定し、35.5℃に維持したCSF液を2 mL/secで10分間灌流したのち、塩化メチル水銀 (3, 6, 12, 30 μM)を含むCSF液に交換して20分間灌流し、その後通常のCSF液で灌流した。縦軸はコントロール群の1秒間あたりの打頻度に対する塩化メチル水銀添加群の打頻度の割合を、横軸はCSF液で灌流した観察時間を示す。黒棒は塩化メチル水銀添加時間を示す。Mean $\pm$ S.D. *** $p < 0.001$ between 3 μM and 6 μM , ### $p < 0.001$ between 6 μM and 12 μM .

次に、10分間CSF液で灌流したのち、塩化メチル水銀を含むCSF液に交換して20分間灌流し、さらに通常のCSF液に交換して40分間灌流したときの繊毛打頻度を図3に示す。メチル水銀の濃度が1 μM 以下のとき、繊毛運動に影響は観察されなかった (data not shown)。メチル水銀濃度が3 μM の時、時間経過とともに繊毛運動はコントロール群に対し有意に低下し、メチル水銀を含まないCSF液に置き換えた40分後でも繊毛打頻度の回復は観察されなかった。さらに、繊毛打頻度はメチル水銀添加量に依存して低下が観察され、 IC_{50} は5.5 μM であった。

次に7週令のddY系雄性マウスを用いて、10 mg/L, 20 mg/L,あるいは40 mg/Lのメチル水銀を混和した水道水を19日間飲ませ、19日目に脳を摘出して上衣細胞の繊毛打頻度を観察したところ、用量依存的な打頻度の低下が観察され、20 mg/Lおよび40 mg/L添加群ではコントロール群に比べ有意な減少であった。マウスを19日間観察したところ、40 mg/L添加群ではコントロール群に比べ飲料水摂取量と体重が減少していたが、20 mg/Lおよび10 mg/L添加群ではコントロール群との間に飲料水摂取量と体重に差は認められなかった。そこで、水道水へのメチル水銀添加量を20 mg/Lとし、添加日数と繊毛打頻度の低下の関係を調べたところ、添加4日後には打頻度の減少傾向が観察され、添加12日後には有意な打頻度の減少が示された。

また、20 mg/Lのメチル水銀を含む水道水を19日間摂取させたのち、通常の水道水に換え10日後、20日後、および30日後の繊毛打頻度を観察したところ、10日後では回復は認められなかったが、通常の水道水に換えた20日後と30日後で繊毛打頻度は回復していた。

次に、大脳前頭部の水銀濃度を定量し、第三脳室上衣細胞の繊毛打頻度に相関が認めら

れるかを検討した。定量限界を 25 ng/mL と定めたとき、コントロール群では検出限界以下であったが、19 日間メチル水銀含有水道水を摂取させたとき、前頭部に水銀が検出され、繊毛打頻度との間に負の相関関係 ($p < 0.01$) が成立していた。

4. 考察

脳脊髄液は脳室下帯から脳室経路を経て脳表クモ膜下腔や脊髄クモ膜下腔を循環して上矢状静脈に吸収される。脳室経路では上皮細胞の繊毛運動により流れは一方性が保たれており、神経芽細胞の移動や物質運搬などが行われている。したがって、繊毛運動が抑制されると脳脊髄液流の滞留が生じて頭蓋内に髄液が溜まり、脳室の拡大が生じることから水頭症の原因の一つになると考えられている。上皮細胞の繊毛運動の観察は主にスライス添加実験で行われており、麻酔薬や、髄膜炎惹起毒素および細菌、あるいはエタノールなどの影響が報告されている。PAC1 (PACAP type1) 受容体過剰発現マウスでは、水頭症が発現しており、生体内物質の pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide 27 (PACAP27) が繊毛運動を抑制することから、PAC1 受容体が繊毛運動の制御に関与することが考えられている。また、VEGF シグナルを阻害したとき、上皮細胞の繊毛が消失することも報告されている。このように、生体物質を含めいくつかの物質が繊毛運動の制御に関

係していることから、中枢系に移行し様々な影響を与えるメチル水銀をスライスに添加したところ、メチル水銀も繊毛運動を抑制し、その抑制はメチル水銀を取り除いても回復しないことから、メチル水銀は繊毛運動に不可逆的な影響を与える可能性が示唆された。また、図 2 に示すように生体から摘出したスライスにおいて一定期間は安定した繊毛運動が保たれていたことから、マウスに直接投与しても繊毛運動への影響が観察できるのではないかと考えてメチル水銀含有水道水を 19 日間飲ませたところ、繊毛打頻度の減少が用量依存的に観察され、その影響はメチル水銀を取り除いても 10 日間は継続することが示唆された。スライス添加実験と合わせ、メチル水銀は直接繊毛運動を抑制する可能性が示唆され、その影響は脳内水銀量が低下しても残る可能性があると思われる。また、繊毛運動に対するメチル水銀摂取の影響は比較的早期から認められると思われる。今後、繊毛運動に対するメチル水銀の作用機序の解明を含め、1 回投与の影響なども検討したいと考えている。

引用文献

- 1) Yoshida, S., Matsumoto, S., Kanchika, T., Hagiwara, T., Minami, T. The organic mercury compounds, methylmercury and ethylmercury, inhibited ciliary movement of ventricular ependymal cells in the mouse brain around the concentrations reported for human poisoning. *NeroToxicology* 57: 69-74 (2016).

神経細胞および血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性と MARCKS タンパク質の関与

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

1. 背景

Myristoylated alanine-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り、その構造中のエフェクタードメイン (ED) と呼ばれる領域を介してアクチン、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 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¹⁾。

MARCKS 欠損マウスは周産期致死を示し、大脳皮質などにおいて組織的な異常が観察される。MARCKS の機能的役割としては、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が報告されている¹⁻³⁾。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¹⁾。しかし、毒性学見地から MARCKS の役割を検討した報告はなく、その重要性については不明である。そこで我々は、化学物質の毒性作用と MARCKS との関連について関心を持ち、検討を進めている。

これまでに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⁴⁾から、メチル水銀が濃度依存的に神経突起の退縮と細胞死を引き起こすこと、また MARCKS 発現量の減少とリン酸化の上昇を引き起こすことを明らかとした。さらに 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 ノックダウン細胞ではメチル水銀による細胞生存率の低下が増強されていた。以上の結果から、培養神経細胞株

におけるメチル水銀毒性の発現に MARCKS 発現量およびリン酸化の変化が関与する可能性が示唆された。さらに、メチル水銀暴露ラットの脳においても MARCKS リン酸化の上昇が認められたことから、MARCKS が *in vivo* でのメチル水銀毒性にも深く関与していることが示唆された⁴⁾。

メチル水銀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。メチル水銀暴露マウスを用いた我々の検討⁵⁾では、経時的な平均血圧の上昇が観察され、メチル水銀暴露マウスから摘出した脳底動脈では、アンジオテンシンⅡによる血管収縮反応が増強されている一方、アセチルコリンによる血管弛緩反応の減弱が認められた。アセチルコリンによる血管弛緩反応は、血管内皮細胞からの一酸化窒素 (NO) 産生に依存することが知られていることから、メチル水銀による血管内皮細胞の機能阻害が、メチル水銀の心血管毒性において重要な一因となっていると考えられた。しかし、メチル水銀が内皮細胞に与える影響には不明な点が多い。また MARCKS は血管内皮細胞にも強く発現し、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が⁶⁾、血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性との関連は明らかではない。

2. 血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性と MARCKS タンパク質の関与⁷⁾

2-1. 目的と方法

メチル水銀暴露マウスにおいて血管内皮細胞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血管内皮細胞株である EA.hy926 細胞を用いてメチル水銀による毒性作用の詳細と MARCKS の関与

について検討した。

2-1. 結果と考察

メチル水銀 (0.1-3 μM) の 24 時間処置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。また、同濃度のメチル水銀は、EA.hy926 細胞の細胞生存率を濃度依存的に低下させた。このメチル水銀による細胞生存率の低下は、MARCKS ノックダウン細胞では増強される一方、MARCKS 過剰発現細胞では減弱したことから、神経細胞と同様に MARCKS が血管内皮細胞におけるメチル水銀毒性の発現に関与していることが示唆された (図 1)。

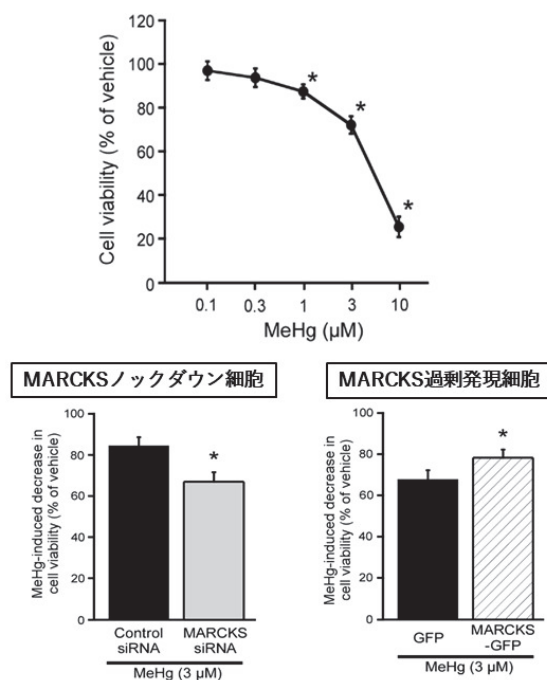


図 1 メチル水銀による細胞生存率の低下と MARCKS の関与 (EA.hy926 細胞)

さらに、血管内皮細胞に対するメチル水銀毒性の詳細と MARCKS の関与を検討するため、血管新生モデル (内皮細胞チューブ形成アッセイ)、細胞遊走能 (スクラッチアッセイ)、NO 産生能 (Griess 法) へのメチル水銀処置の

影響を観察したところ、メチル水銀はすべての反応を濃度依存的に抑制した。そこで MARCKS ノックダウン/過剰発現細胞を用いてメチル水銀毒性への MARCKS の関与を検討したところ、NO 産生において MARCKS ノックダウンがメチル水銀の抑制作用を増強し、MARCKS 過剰発現は減弱することが示された。一方、NO 合成酵素である eNOS の発現は、メチル水銀処置によって変化しなかったことから、メチル水銀は NO 産生メカニズムを阻害する可能性が示唆された (図 2)。

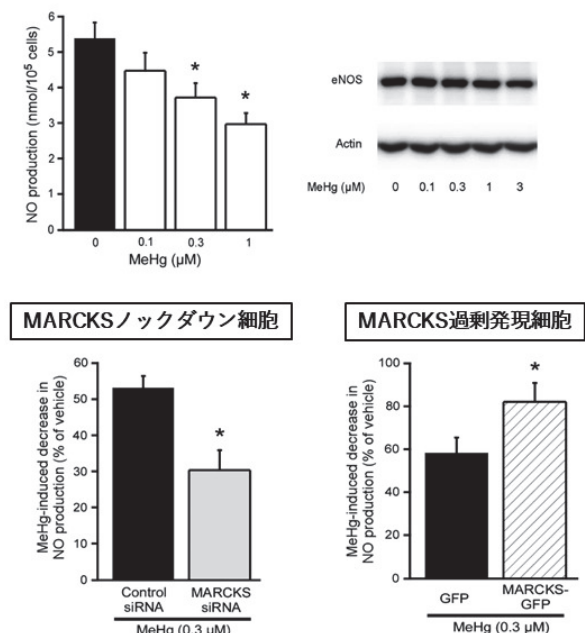


図 2 メチル水銀による NO 産生の低下と MARCKS の関与 (EA.hy926 細胞)

この結果はメチル水銀暴露マウスにおいて NO 依存性血管弛緩の障害が観察されることと一致しており、in vivo におけるメチル水銀による心血管障害の重要な一因となっていることが考えられる。

3. メチル水銀毒性におけるカルパイン活性化と MARCKS タンパク質との関連

3-1. 目的と方法

培養神経細胞株 (SH-SY5Y 細胞) および血管内皮細胞株 (EA.hy926 細胞) を用いた MARCKS ノックダウン/過剰発現の結果から、MARCKS がメチル水銀毒性の発現に関与することが明らかとなった。しかし、メチル水銀による MARCKS 発現量の調節メカニズムについては不明である。そこで、メチル水銀処置により活性化することが知られているプロテアーゼであるカルパインに注目し、MARCKS との関連を明らかにすることを目的としてカルパイン阻害薬 (MDL28170 および calpeptin) を用いて薬理的検討を行った。

3-2. 結果と考察

SH-SY5Y 細胞 (神経細胞) において、カルパイン阻害薬は低濃度 (1 μM) のメチル水銀による細胞生存率の低下を有意に抑制したが、高濃度 (3 μM) による細胞生存率の低下には影響しなかった (図 3)。

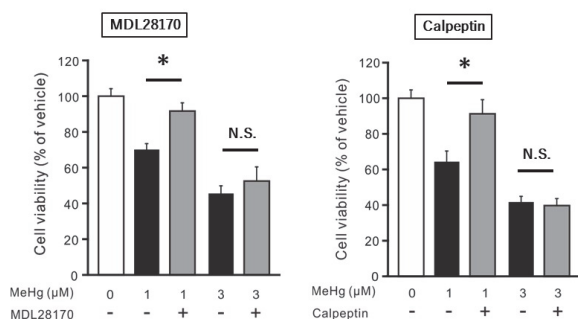


図 3 メチル水銀による細胞生存率の低下とカルパイン阻害薬の影響 (SH-SY5Y 細胞)

この結果から、細胞生存率減少のメカニズムはメチル水銀濃度により異なることが示唆された。一方、EA.hy926 細胞 (血管内皮細胞) では、低濃度 (1 μM) および高濃度 (3 μM) のメチル水銀による細胞生存率の低下は、いずれもカルパイン阻害薬により影響されなかったことから、血管内皮細胞におけるメチル

水銀毒性へのカルパインの関与は小さいと考えられた。

メチル水銀による MARCKS 発現量の減少にカルパインが関与するかどうかを検討するため、カルパイン阻害薬の影響を SH-SY5Y 細胞を用いて検討した (図 4)。

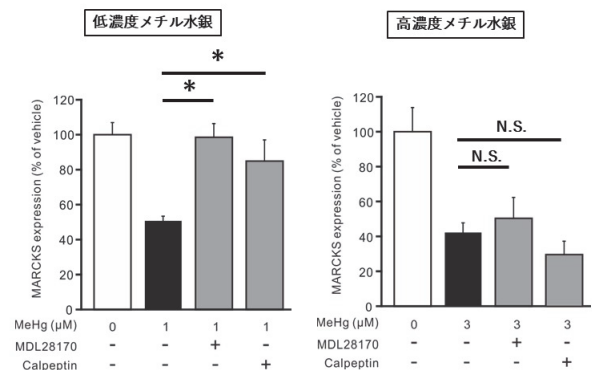


図 4 メチル水銀による MARCKS 発現量の減少とカルパイン阻害薬の影響 (SH-SY5Y 細胞)

細胞生存率の場合と同様に、カルパイン阻害薬は低濃度 (1 μM) のメチル水銀による MARCKS 発現量の減少を有意に抑制したが、高濃度 (3 μM) による MARCKS の減少には影響しなかった。このことから、カルパインは神経細胞において低濃度メチル水銀による MARCKS の分解に関わっていることが示唆された。さらに MARCKS ノックダウンであらかじめ MARCKS 発現量を減少させた細胞では、カルパイン阻害薬はメチル水銀による細胞生存率の低下を回復しなかったことから、低濃度メチル水銀によるカルパインを介した MARCKS 発現量の減少がメチル水銀の毒性発現に重要であることが明らかとなった。

4. まとめ

メチル水銀は血管内皮細胞において様々な機能障害を引き起こすことが明らかとなり、細胞死の誘導や NO 産生の阻害には MARCKS が

そのメカニズムに深く関与していることが示唆された。また、低濃度メチル水銀による MARCKS 発現量の減少には、メチル水銀によって活性化されたカルパインが関わることで神経細胞で示唆されたが、その関与には神経細胞と血管内皮細胞、およびメチル水銀濃度により差があることが明らかとなった。

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 PIP₂ 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) Methylmercury affects cerebrovascular reactivity to angiotensin II and acetylcholine via Rho-kinase and nitric oxide pathways in mice. Islam MZ, Dao CV, Shiraishi M, Miyamoto A. *Life Sci.* 147: 30-38. (2016)
- 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) MARCKS is involved in methylmercury-induced decrease in cell viability and nitric oxide production in EA.hy926 cells. Dao CV, Islam MZ, Sudo K, Shiraishi M, Miyamoto A. *J Vet Med Sci.* 78: 1569-1576. (2016)

メチル水銀中毒における大脳皮質神経細胞の選択的神経細胞傷害に関する研究

○藤村成剛、臼杵扶佐子（国立水俣研）

1. 背景と目的

水俣病に代表されるメチル水銀中毒は、通常の毒性物質が通過できない脳血液関門をメチル水銀が通過し、重篤かつ不可逆的な神経機能障害を引き起こす神経疾患である。その原因病巣は中枢神経および末梢神経であり、限定された神経細胞種に伴う特徴的な神経機能障害を引き起こす。特に成人型水俣病における大脳においては、大脳皮質深部の神経細胞に明確な神経病変（神経細胞死）が認められるが、大脳皮質の表層部神経細胞には神経病変が少なく、さらに通常、外部からの刺激に脆弱な海馬神経細胞には全く神経病変が認められない。

このようなメチル水銀中毒における選択的神経細胞傷害については、水俣病が発見された 1950 年代から現在にいたるまで様々な研究が行われてきたが、未だ解明には至っていない。本メカニズムが解析されれば、メチル水銀中毒の診断、予防および治療において有益な情報になりうるはずである。メカニズム解析には、生化学的および分子生物学的な手法を用いた研究を行い、その原因因子を見出す必要がある。その解明のためには、メチル水銀中毒と同じ神経細胞種に細胞傷害を呈する実験動物を用いることが必須になることから、演者等（藤村、臼杵）はこれまでげっ歯類であるマウスを用いた検討を行い、メチル水銀中毒と同じく大脳皮質深層部に選択的に神経病変を呈するメチル水銀中毒モデルの作成に成功している¹⁾。

一方、近年の分子生物学の進展により、生

理的状況下の神経活動が、MAPK 等の細胞内シグナルトランスダクションによって制御されていることが明らかになってきている²⁾。しかしながら、MAPK 等の異常な活性化は逆に神経細胞傷害に関与している可能性も考えられ、病理的条件下での MAPK 等の細胞内シグナルトランスダクションについての研究も進んでいる^{3,4)}。

今回、メチル水銀中毒と同じ神経細胞種（大脳皮質深層部の神経細胞）に神経病変を呈するメチル水銀中毒マウスモデルおよびヒト神経様細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、選択的神経細胞傷害のメカニズムについて検討を行った。その際には、メチル水銀曝露の病理的条件下における神経活動と細胞内シグナルトランスダクションの変化に着目した生化学的および分子生物学的な解析手法を用いた。

2. 方法

2-1. メチル水銀曝露マウスモデル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。メチル水銀曝露終了後に解剖を行い、組織学的手法および生化学的手法を用いて、脳内各部位の神経病理変化および神経活動に関連する細胞内シグナルトランスダクションへの影響について解析を行った。

2-2. 神経様培養細胞におけるメチル水銀の作用

ヒト神経芽腫細胞である SH-SY5Y 細胞をレ

チノイン酸で7日間処置することによって神経様培養細胞を得た。得られた培養細胞に対してメチル水銀 (0.5 μ M) を 0-24 時間曝露し、生化学的手法を用いて、神経細胞死および神経活動に関連する細胞内シグナルトランスダクションへの影響について解析を行った。

3. 結果および考察

3-1. メチル水銀曝露マウスモデル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、大脳皮質深部の神経細胞に選択的に神経細胞死を生じさせた (図1)。また、神経細胞活性化について検討した結果、6 週間のメチル水銀水曝露の時点で、神経活動活性化の指標である c-fos および BDNF の発現上昇が大脳皮質において観察された (図 2)。なお、c-fos 発現の上昇に関しては免疫組織解析によって大脳皮質深層部に特異的であることが確認された (図 3)。

細胞内シグナルトランスダクションについて検討した結果、神経活動活性化と同様に6 週間のメチル水銀水曝露の時点で、c-fos 発現の上流にある CREB のリン酸化および p44/p42 MAPK, p38 MAPK, PKA の活性化が引き起こされていることが明らかになった (図 4, 5)。

以上の結果から、メチル水銀曝露モデル動物における大脳皮質深層部における神経細胞死に、MAPK 活性化を介した神経活動活性化が関与していることが示唆された。

Results 1

MeHg selectively induces cell loss of neuron in cerebral cortex of mice - NeuN IHC -

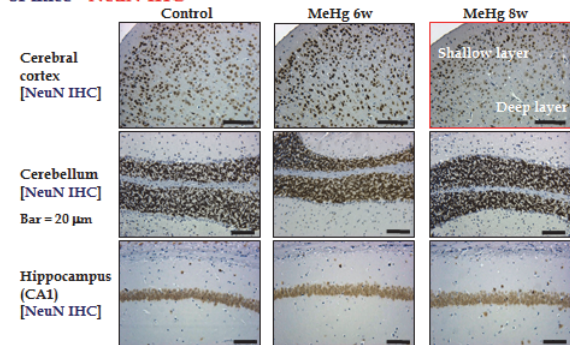


図1 メチル水銀曝露モデルマウスにおける神経細胞死

Results 4

Effects of MeHg on the expression of markers for neuronal activation in each brain region of mice (2)

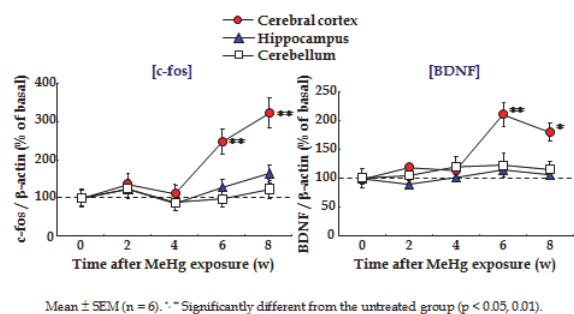


図2 メチル水銀曝露モデルマウスにおける c-fos および BDNF の発現

Results 5

MeHg selectively induces c-fos positive neuron in cerebral cortex of mice - c-fos IHC -

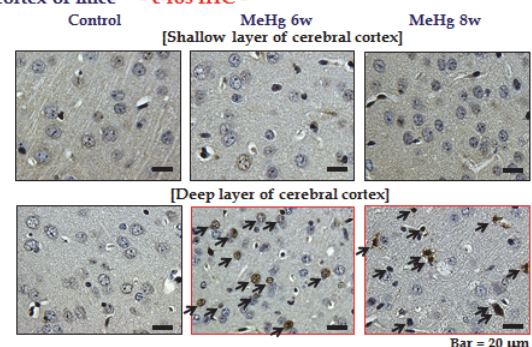


図3 メチル水銀曝露モデルマウスの大脳皮質における c-fos の発現

Results 6

Effects of MeHg on the expression of phosphorylated CREB

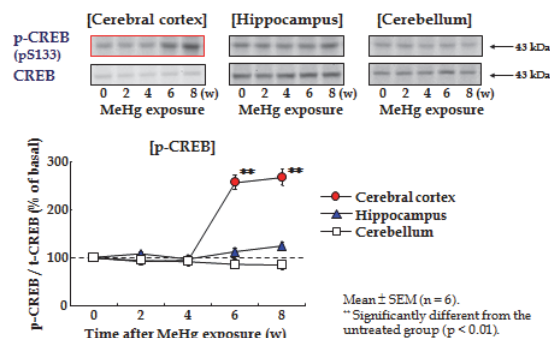


図4 メチル水銀曝露モデルマウスの大脳皮質における CREB のリン酸化

Results 8

Effects of MeHg on related pathways of CREB phosphorylation in cerebral cortex (2)

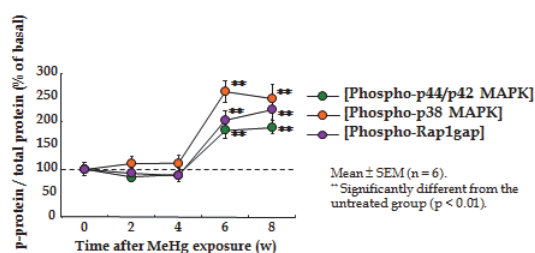


図5 メチル水銀曝露モデルマウスの大脳皮質における MAPK のリン酸化

また、CREB リン酸化上流に位置する細胞内シグナルトランスダクションについて検討した結果、1 時間のメチル水銀曝露の時点で、p44/p42 MAPK および p38 MAPK の活性化が最大上昇を示した。さらに、p44/p42 MAPK および p38 MAPK の特異的な阻害剤によって、メチル水銀による細胞死および CREB リン酸化が抑制されることが明らかになった。

以上の結果から、メチル水銀による神経細胞死に、p44/p42 MAPK および p38 MAPK の活性化を介した神経活動活性化が関与していることが示唆された。

4. 結語

メチル水銀中毒と同じ神経細胞種（大脳皮質深層部の神経細胞）に神経病変を呈するメチル水銀中毒マウスモデルおよびヒト神経様細胞である SH-SY5Y 細胞を用いて、選択的神経細胞傷害のメカニズムについて検討を行った。生化学的および分子生物学的な解析手法を用いて、メチル水銀曝露の病理的条件下における神経活動と細胞内シグナルトランスダクションの変化に着目した解析を行った結果、メチル水銀曝露モデル動物における大脳皮質深層部における神経細胞死に、MAPK 活性化を介した神経活動活性化が関与していることが示唆された。

3-2. 神経様培養細胞におけるメチル水銀の作用

神経様培養細胞（レチノイン酸によって分化誘導した SH-SY5Y 細胞）に対する 24 時間のメチル水銀（0.5 μ M）曝露は、神経細胞死を生じさせた。この条件下における神経細胞活性化について検討した結果、メチル水銀水曝露 1 時間後から神経活動活性化の指標である c-fos およびその上流シグナルである CREB のリン酸化が観察され、6 時間後に最大上昇を示した。

5. 参考文献

- 1) Fujimura M, Usuki F, Sawada M, Takashima A (2009) Methylmercury induces neuropathological changes with tau hyperphosphorylation mainly through the activation of the c-jun N-terminal kinase pathway in the cerebral cortex, but not in the hippocampus of the mouse brain. *Neurotoxicology*, 30, 1000-1007.
- 2) Cruz FC, Koya E, Gues-Barber DH, Bossert JM, Lupica CR, Shaham Y, Hope BT (2013) New technologies for examining the role of neuronal ensembles in drug addiction and fear. *Nat Rev Neurosci*, 14, 743-754.
- 3) Lu TH, Hsieh SY, Yen CC, Wu HC, Chen KL, Hung DZ, Chen CH, Wu CC, Su YC, Chen YW, Liu SH, Huang CF

(2011) Involvement of oxidative stress-mediated ERK1/2 and p38 activation regulated mitochondria-dependent apoptotic signals in methylmercury-induced neuronal cell injury. *Toxicol Lett*, 204, 71-80.

4) Agrawal M, Bhaskar AS, Lakshmana Rao PV (2015) Involvement of mitogen-activated protein kinase pathway in T-2 toxin-induced cell cycle alteration and apoptosis in human neuroblastoma cells. *Mol Neurobiol*, 51, 1379-1394.

メチル水銀による心不全リスク増加の分子機構

○西田基宏（自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター）

1. 要約

活性酸素や活性酸素由来の親電子性物質によるタンパク質の翻訳後修飾（親電子修飾）を介した細胞内シグナル伝達経路（レドックスシグナリング）の活性化が心不全の発症・進展に寄与することが明らかにされつつある。疫学調査によると、神経障害を誘発しない微量のメチル水銀（毛髪濃度 0.66~2 ppm）に曝露された人は心血管病発症リスクが普通の人より2倍以上高くなることが明らかにされている。しかし、その分子機構はよくわかっていない。我々は低用量のメチル水銀曝露が高血圧負荷誘発性の突然死や心機能不全を悪化させることを、マウスを用いて見出した。メチル水銀（10ppm）を含んだ飲水を1週間与えたところ、振戦や体重減少などは全く観察されなかったものの、大動脈狭窄により誘発される心肥大および心機能低下が著明に悪化した。メチル水銀曝露マウスの心臓では、対照マウスの心臓と比べて dynamin-related protein 1 (Drp1)の活性化を伴うミトコンドリアの過剰な分裂が観察された。メチル水銀による圧負荷誘発性の突然死や心不全の増悪は、Drp1 活性化を阻害することで有意に改善された。一方、マウス食餌中に含まれるメチル水銀含有成分（魚粉）を除去した食餌を1週間マウスに与えてから圧負荷を施したところ、驚くべきことに圧負荷による心不全はかえって悪化することが明らかになった。以上の結果は、少用量のメチル水銀曝露がミトコンドリア分裂を介して心臓病リスクを増加していること、その一方で、食餌レベルの微量メチル水銀曝露が心臓の頑健性維持に必要であることを示しており、適切な環境ストレス曝露が心循環の恒常性維持に重要であること

を強く示唆している。

2. 背景

欧米先進諸国において、心疾患は疾患別死亡率第一位の疾患であり、その生命予後も極めて悪い。心不全の主たる原因は、高血圧性心疾患や毒素（抗がん剤やアルコール過剰摂取など）誘発性の心疾患によって生じる左心室の収縮機能低下である。血行力学的負荷は短期的に代償性の心肥大（左室収縮力が保たれた状態での心筋細胞肥大）を誘発する。一方、血行力学的負荷が慢性的に続くと、心臓は非代償性の心肥大（左室収縮力低下を伴う左室拡張）を引きこす。しかし、代償性心肥大から非代償性心肥大に移行する機構については未だに不明な点が多い。近年、細胞内外の親電子物質によるタンパク質の翻訳後修飾により惹起されるレドックスシグナリングが心不全の発症・進展に関与することが示唆されている（1）。我々は、心筋梗塞後のマウス心臓で生成される内因性の親電子物質（8-nitro-cGMP）が、がん遺伝子産物の一つである低分子量Gタンパク質 H-Ras を修飾することで、心筋細胞の早期老化を誘導することを見出した（1）。さらに、イオウドナーとして低濃度 NaHS を細胞およびマウス固体に長時間処置することで細胞内により求核性の高いCys パースルフィドやポリスルフィドが生成され、これが親電子物質の代謝・消去に働き、心筋早期老化が抑制されることも明らかにした（1, 2）。この結果は、内因性あるいは外因性の親電子物質により生じるレドックスシグナリングが心臓の代償性肥大への移行を促進するリスク要因であることを強く示唆している。

メチル水銀は強力な神経毒性作用をもつ環境中親電子物質である。海水中には 0.2-1 ppt 程度しか存在しないものの、食物連鎖的に魚類の体内に蓄積される特徴を有する。メチル水銀は分子量が小さく、その高い胎盤移行性のためにメチル水銀による神経毒性が母体から胎児や幼児に引き継がれるリスクも極めて大きいことが疫学調査から明らかにされている (3, 4)。その一方で、神経毒性障害を起こさない低濃度のメチル水銀曝露が心筋梗塞などの心血管病リスクを 2 倍以上増加させることも疫学調査から明らかにされている (5, 6)。しかし、この結果に対しては、否定的な見解も報告されており、まだ決着はついていない。

ところで、ミトコンドリアの形態構造機能変化が心血管機能維持に重要な役割を果たすことが明らかにされている。メチル水銀は Mn-SOD を標的とし、Mn-SOD の酵素活性を減弱することでスーパーオキシドラジカル産生を増加させる。メチル水銀による酸化ストレスの誘発がミトコンドリア毒性の原因と考えられている。しかし、毒性発現の起こらないレベルでメチル水銀がミトコンドリア機能に影響するかどうかについてはよくわかっていない。ミトコンドリアの動的形態変化（分裂と融合）は、主にミトコンドリア分裂促進 G 結合タンパク質 dynamin-related protein 1 (Drp1) と融合促進 G タンパク質 (mitofusin (Mfn1, Mfn2) や optic atrophy 1 (Opa1)) によって制御されることが知られている。これら G タンパク質はいずれもレドックス感受性があり、細胞内レドックス状態の変化により機能修飾を受けることが知られている (7)。メチル水銀は非常に強い親電子物質であることが知られており、これら G タンパク質に作用する可能性があるものの、メチル水銀が非病態時のミトコンドリア形態変化に寄与する

という知見はこれまでにない。そこで本研究では、細胞毒性を起こさない低用量のメチル水銀がミトコンドリア品質管理に及ぼす影響と心血管病リスクとの関連について、マウスを用いて検討を行った。

3. 方法

マウスおよびラットを用いた全ての実験は、自然科学研究機構動物実験委員会または九州大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験委員会規則に定められた飼育管理条件下で行われた。雄性 C57BL6J マウスは日本 SLC 株式会社 (静岡) から購入した。メチル水銀は大動脈狭窄 (transverse aortic constriction; TAC) 処置を施す 1 週間前から自由飲水により曝露した。6 週齢のマウスを domitor (Nihon Zenyaku Kogyo, Japan), midazolam (Sandoz, Japan), butorphanol (Meiji Seika Pharma, Japan) からなる 3 種混合麻酔にかけ、人工呼吸下で、左横行大動脈と腕頭動脈の間を 27-G 注射針をそえて 5-0 縫合糸で結紮し、その後針を取り除くことで圧負荷を誘発させた。sham 群は、狭窄以外の外科手術プロトコールのみ行った。心機能は、心エコー法、ミラーカテーテルを用いた左心室内圧測定、透過型電子顕微鏡を用いた形態構造観察により評価した。

全ての結果は mean $\pm$ S.E.M で示した。すべての結果は最低 3 回の繰り返し実験により得られたものである。統計的有意差は 2 群比較については two-tailed Student's t-test を、多群検定については一元配置の分散分析の後、Student-Newman-Keuls post-hoc test により検定を行った。

4. 結果と考察

1 年間曝露し続けても行動や外見を全く変

化させない低用量のメチル水銀（1ppm）をマウスに1週間曝露させた後、TACによる圧負荷を誘発させたところ、曝露なしのコントロール群と比べてTAC直後の死亡率が顕著に増加した。また、生き残ったマウスについても、メチル水銀曝露により、圧負荷誘発性の左室機能低下、心重量増大（心臓リモデリング）、および心肥大・線維化関連遺伝子発現増加が顕著に増悪していた。メチル水銀曝露マウスの心機能は無曝露マウスのそれと差がなかったものの、心筋形態においてミトコンドリアの著しい分裂が観察された。メチル水銀は心筋 Drp1 の GTP 結合活性を有意に上昇させ、Mfn1/2, Opa1 タンパク質の発現量には影響与えなかった。

ラット新生児初代心筋細胞に細胞毒性を誘発しない濃度（0.5 μ M）のメチル水銀を曝露したところ、ミトコンドリアの分裂とそれに伴う NADH デヒドロゲナーゼ（MTT）活性および ATP 産生量の緩徐な低下が観察された。質量分析の結果、メチル水銀はラット Drp1 タンパク質の Cys624 残基に直接結合し、Drp1 の活性化を引き起こすことが明らかとなった。Drp1 阻害剤 Mdivi-1 や活性イオウ（ Na_2S_4 ）の処置は、メチル水銀曝露とメカニカルストレスの混合刺激によって誘発される心筋細胞死を抑制した。以上の結果は、Drp1 の酸化的翻訳後修飾によるミトコンドリア品質管理異常が心臓のストレス適応から不適応への移行を促進する原因となること、システインパーサルスフィド／ポリスルフィドをはじめとする活性イオウがその抑制因子として働くことを強く示唆している。

Drp1 のシステイン残基（Cys-624）は一酸

化窒素（NO）により S-ニトロソ化修飾を受けることが報告されているものの、S-ニトロソ化そのものが Drp1 活性化に寄与しないことも報告されている（7, 8）。そこで Cys-624 の求核性に着目した。心筋細胞の内因性 Drp1 は高度にポリイオウ化されており、メチル水銀曝露による Cys-624 ポリイオウ鎖の枯渇が Drp1 活性化の引き金となりうることを新たに見出した。以上の結果から、メチル水銀は Drp1 の Cys パースルフィドを枯渇することで Drp1 を活性化し、ミトコンドリア分裂を介して心不全リスクを高める可能性が示された。

参考文献

- (1) Nishida M, et al. (2012) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. *Nat Chem Biol* 8(8):714-724.
- (2) Ida T, et al. (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(21):7606-7611.
- (3) Salonen JT, et al. (1995) Intake of mercury from fish, lipid peroxidation, and the risk of myocardial infarction and coronary, cardiovascular, and any death in eastern Finnish men. *Circulation* 91(3):645-655.
- (4) Guallar E, et al. (2002) Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. *N Engl J Med* 347(22):1747-1754.
- (5) Yoshizawa K, et al. (2002) Mercury and the risk of coronary heart disease in men. *N Engl J Med* 347(22):1755-1760.
- (6) Mozaffarian D, et al. (2011) Mercury exposure and risk of cardiovascular disease in two U.S. cohorts. *N Engl J Med* 364(12):1116-1125.
- (7) Cho DH, et al. (2009) S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324(5923):102-105.
- (8) Bossy B, et al. (2010) S-Nitrosylation of Drp1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 20:S513-S526.

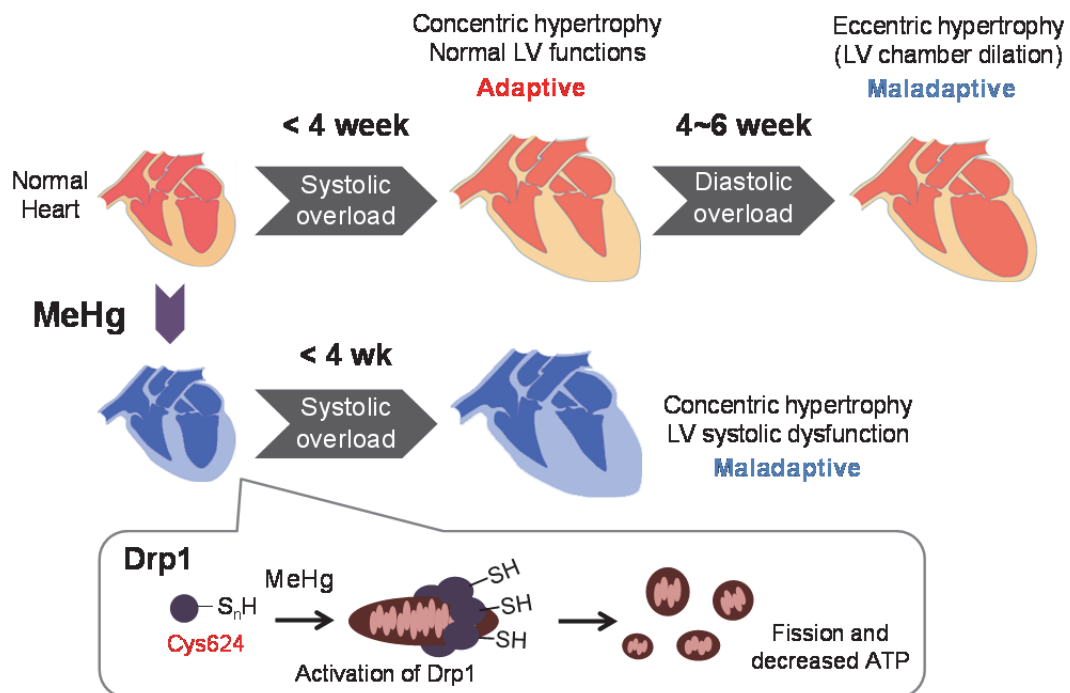


図 メチル水銀 (MeHg) による心不全リスク増加のメカニズム。MeHg による Drp1 の Cys persulfide 枯渇が Drp1 を活性化し、ミトコンドリア分裂を促進する。これが圧負荷による収縮不全を誘発する。

メチル水銀によるオートファジー活性化に対する高度不飽和脂肪酸の影響

○ 高根沢康一、清野正子（北里大学薬学部）

1. 背景と目的

ヒトにおけるメチル水銀の主なばく露源は魚介類の摂取によるものである。一方、魚介類には、エイコサペンタエン酸（EPA, C20:5 n-3）やドコサヘキサエン酸（DHA, C22:6 n-3）等の高度不飽和脂肪酸（Polyunsaturated fatty acid; PUFA）が豊富に含まれており、これらの脂肪酸摂取はヒトの健康に有益であることが知られている。特にこれら PUFA は脳の発達において重要であるとされ、神経の形成や機能に欠かすことのできない脂肪酸である。すなわち魚介類の摂取にはメチル水銀摂取のリスクと脂肪酸摂取のベネフィットの二面性がある。しかしながら、メチル水銀と PUFA の相互作用や細胞応答性について、ほとんどわかっていないのが現状である。

我々はこれまでに細胞内の主要な分解系の一つである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してきた。その結果、低濃度のメチル水銀がオートファジーを活性化させること、さらに、オートファジー欠損細胞（ATG5KO 細胞）を用いた検討から、オートファジーがメチル水銀毒性に対し防御的に働いていることを明らかにした¹⁾。

本研究では、メチル水銀によるオートファジーの活性化機構のさらなる解析とともに、メチル水銀と PUFA によるオートファジーへの影響について検討した。

2. 方法

マウス胎児由来線維芽細胞（MEF 細胞）をメチル水銀で処理し、LC3、cleaved caspase-3 の発現量、および ERK、JNK、p38 のリン酸化をウエスタンブロット法にて検出した。ERK1/2 の阻害剤としては U0126、JNK の阻害剤としては SP600125、p38 の阻害剤としては SB203580 をそれぞれ用いた。GFP-LC3 は、4%パラホルムアルデヒドにて固定した後、その

蛍光を共焦点顕微鏡（LSM-710）にて観察した。

PUFA 処理は、メチル水銀ばく露 24 時間前に行い、メチル水銀ばく露 24 時間後に細胞の形態を観察した。また、全タンパク質をウエスタンブロット解析に用いた。

3. 結果および考察

3-1. メチル水銀による LC3-II とオートファゴソームの増加

MEF 細胞を含む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するが、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。MEF 細胞において、メチル水銀ばく露により LC3-II が増加した。また、GFP-LC3 発現 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 1）。

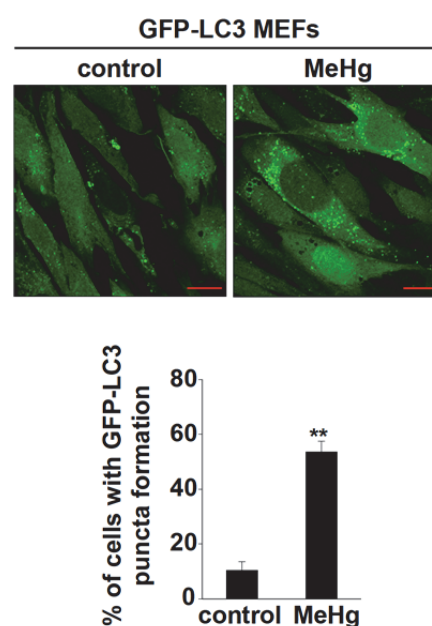


図 1. メチル水銀による GFP-LC3 puncta 形成

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クロロキン (CQ) を用いたフラックスアッセイを行った。CQ により、LC3-II が増加したことからオートファジーの阻害がみられた。一方、CQ とメチル水銀を同時に処理した場合、LC3-II は CQ 単独処理よりも増加した (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。

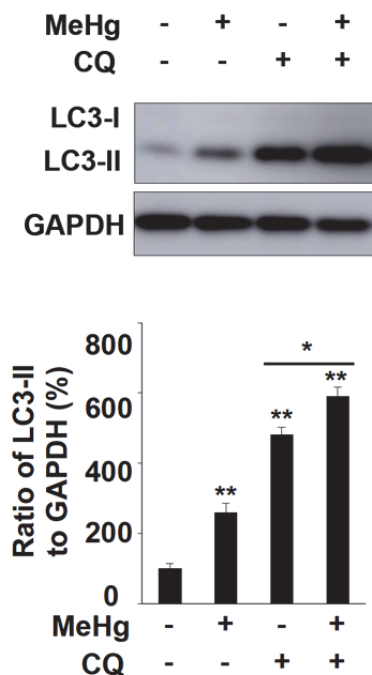


図 2. オートファジーフラックスアッセイ

3-3. メチル水銀による MAPK 活性化と LC3-II 発現

メチル水銀ばく露による細胞応答として、MAPKs 経路の活性化が報告されている。そこで、オートファジーの活性化に対する MAPKs 経路の関与を検討した。メチル水銀処理後、約 4 時間をピークに MAPKs (ERK、JNK、および p38) が活性化された。一方、LC3-II は 8 時間から 12 時間に発現のピークを示した。続いて、それぞれに特異的な阻害剤を前処理し、メチル水銀による LC3-II の増加への影響を評価した。ERK1/2 の阻害剤は、メチル水銀による LC3-II の増加を有意に抑制した。一方、JNK、およ

び p38 阻害剤は、LC3-II の発現にほとんど影響しなかった (図 3)。以上の結果から、メチル水銀は調べた全ての MAPKs を活性化すること、さらにその中で ERK 経路が、オートファジーの活性化を介在していることが示唆された。

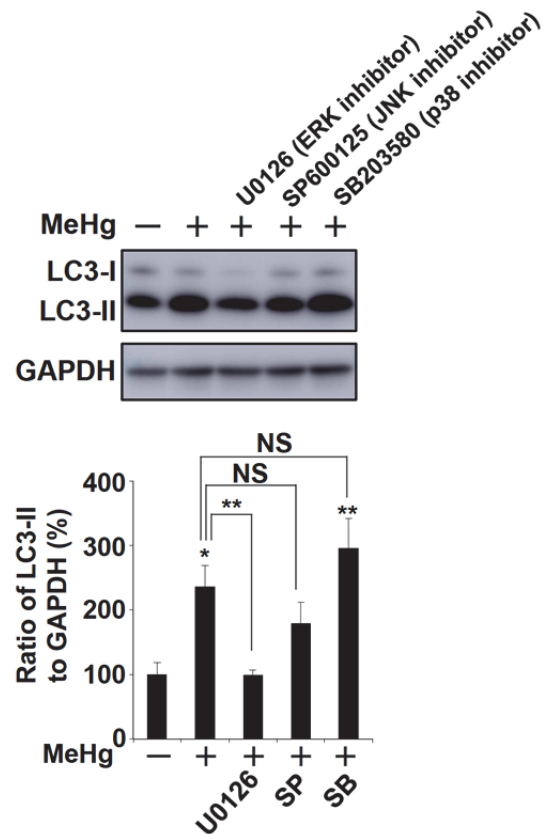


図 3. ERK 経路による LC3-II の増加

3-4. 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。メチル水銀をばく露した野生型 MEF 細胞において、LC3-II がメチル水銀濃度依存的に増加した。一方、ATG5 欠損 MEF 細胞において、LC3-II は増加せず、高濃度のメチル水銀ばく露細胞において、caspase-3 が顕著に増加した。さらに、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ところ、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4)。以上の結果から、ATG5 依存的なオートファジーは、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。

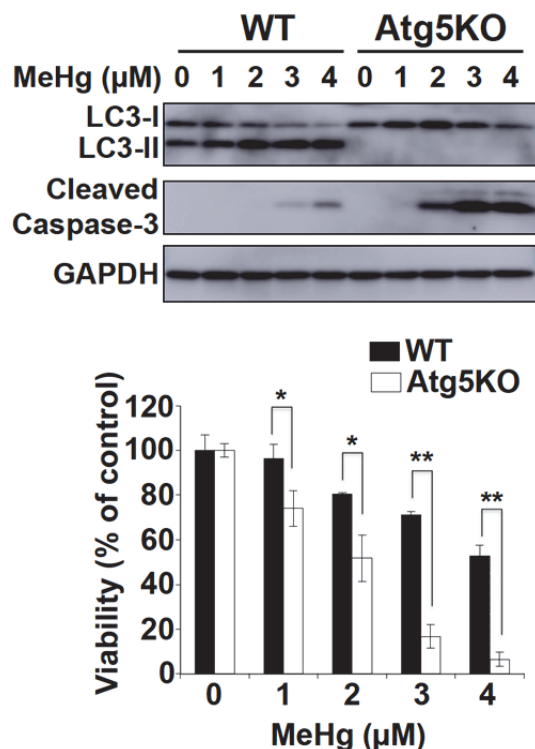


図4. ATG5KO 細胞のメチル水銀に対する感受性

3-5. 高度不飽和脂肪酸とメチル水銀ばく露による細胞死

高度不飽和脂肪酸である DHA および EPA を MEF 細胞に前処理した後、メチル水銀のばく露影響を検討した。DHA および EPA (20 μM) 単独処理、およびメチル水銀 (1 μM) 単独処理において、細胞形態はほとんど変化しなかった。しかし、DHA を前処理した細胞にメチル水銀をばく露した場合、細胞死が惹起された。一方、EPA を用いて同様の操作を行った場合、細胞死は惹起されなかった (図5)。また、Propidium iodide (PI) を用い、死細胞の核を染色したところ、DHA およびメチル水銀処理により、PI 陽性細胞が増加した (data not shown)。

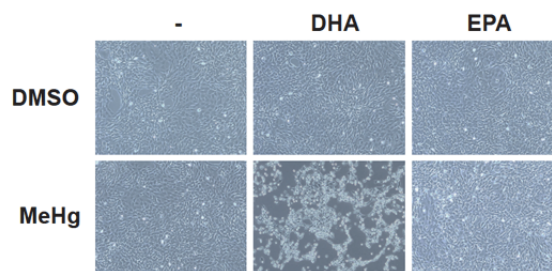


図5. DHA 前処理とメチル水銀ばく露による細胞死の惹起

3-6. 高度不飽和脂肪酸とメチル水銀ばく露による細胞内オートファジー関連分子の変動

続いて、DHA、EPA およびメチル水銀のばく露がオートファジーに及ぼす影響を検討する目的で、オートファジー関連分子抗体を用いたウェスタンブロットを行った。DHA、EPA およびメチル水銀単独ばく露において、オートファジー活性の指標である LC3-II、p62 はわずかに増加した。一方、DHA とメチル水銀をばく露した細胞において、LC3-II、p62 はそれぞれ顕著に増加し、それに伴いリン酸化 mTOR の減少と caspase-3 の活性化の上昇が認められた (図6)。以上の結果から、DHA とメチル水銀のばく露は、オートファジーの過剰な活性化、あるいは阻害を引き起こし、細胞死が誘導される可能性が考えられた。

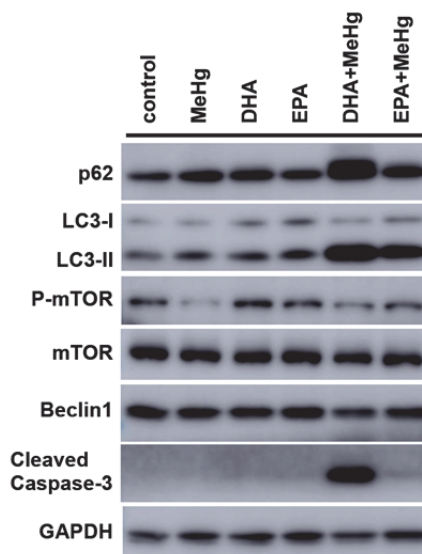


図6. 高度不飽和脂肪酸とメチル水銀によるオートファジー関連分子の発現影響

4. 結論

低濃度のメチル水銀は、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、オートファジーは、メチル水銀に対する防御機構であることが示された。

DHA とメチル水銀のばく露により、細胞死が惹起されるとともに、オートファジー関連分子が過剰に増加した。DHA とメチル水銀の相乗的な毒性発現機構、オートファジーの活性化なのか阻害なのかにつ

いてはさらなる解析が必要である。具体的には、これらの現象と細胞内の活性酸素種との関係を併せて評価し、メチル水銀毒性に対する DHA の作用について検討する予定である。

5. 参考文献

1. Takanezawa Y, Nakamura R, Sone Y, Uraguchi S, Kiyono M. Atg5-dependent autophagy plays a protective role against methylmercury-induced cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 2016, 16, 33143–33145.

小胞体機能に対するメチル水銀の作用 —タンパク質成熟機構と小胞体ストレス応答系への影響—

○上原 孝（岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬効解析学）

1. 研究目的

水俣病の原因物質と推定されるメチル水銀（MeHg）は中枢神経系を傷害し神経細胞死を惹起するものの、細胞死に至るまでの詳細な分子機構については未だ解決されていない。これまで当研究室では、神経細胞小胞体内腔でのタンパク質成熟機構において、重要な役割を担当しているタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ（protein disulfide isomerase；PDI）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、その修飾は酵素活性を消失することを見出してきた。その結果、PDIの機能不全により小胞体内腔に未成熟タンパク質の蓄積（小胞体ストレス）が惹起され、これに応じて特異的シグナル（小胞体ストレス応答，unfolded protein response）が活性化し、神経細胞死が誘導されることを報告した。この修飾は、ヒト孤発性神経変性疾患患者死後脳でも認められたことから、発症との因果関係が強く示唆されている¹⁻³。

一般に、SNO化標的部位であるタンパク質中のシステイン（Cys）残基チオール基はpKa値が酸性側にシフトしていることから反応性に富んでいることが知られている。したがって、NO以外の親電子性物質とも容易に反応することが予想された⁴。

事実、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。これがMeHgの細胞毒性発現に関係すると推定され、これまでに多くの基質が同定されてきている⁵。そこで、私たちは、PDIのCys残基もNOと同様に、MeHgにより酸化されることで酵

素活性が抑制され、タンパク質成熟機構の破綻／小胞体ストレス応答を介して神経細胞死が惹起されると予想し、種々検討した結果、以下の知見を得ることに成功した。

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アッセイから求めた。

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、その回復したリボヌクレアーゼ活性から評価した。

3. 結果および考察

まず初めに、MeHgがPDIをS-水銀化修飾するか否かについて検討した。PDIはN末側とC末側に2箇所の酵素活性中心であるチオレドキシン様部位（CGHC）を有している。この部位に存在するCys残基はNOの標的部位であることから、MeHgも同様にこれらの部位に結合する可能性が推定された。そこで、SNO化修飾を特異的に検出するビオチンスイッチ法を駆使し、MeHgによるNO修飾への影響を調べたところ、濃度依存的にSNO化が抑制された。しかしながら、興味深いこと

に、高濃度 MeHg を処理しても PDI の SNO 化は完全には消失しなかった。このことから、MeHg は少なくとも NO と同じ Cys 残基を標的としているが、N 末あるいは C 末の活性中心に作用している可能性が示唆された⁶。

次に、S-水銀化部位を明らかにするために、精製したリコンビナント PDI を MeHg で処理したのち、MS 解析を行った。その結果、MeHg は C 末側チオレドキシシン様ドメインに存在する活性中心 Cys 残基 (Cys383 もしくは Cys386) を特異的に修飾することが分かった。

さらに、PDI 活性に対する MeHg の影響を検討したところ、MeHg 処理濃度依存的に酵素活性が抑制されることがわかった。したがって、MeHg は PDI 活性部位 Cys 残基の S-水銀化を介して酵素活性を負に調節する可能性が示唆された。

一方、MeHg はヒトニューロblastoma SH-SY5Y 細胞の生存を著しく低下させることが報告されている。上記の成果から MeHg はタンパク質成熟酵素である PDI の活性を抑制することから、小胞体内腔に未成熟タンパク質の蓄積とそれに続く小胞体ストレス応答 (UPR) が惹起される可能性が考えられた。そこで、UPR が活性化されているか否か調べたところ、MeHg 処理によって SH-SY5Y 細胞では BiP や CHOP の発現が促進された。したがって、本細胞死惹起には小胞体ストレスが関与していることが示唆された。

さらに、詳細な UPR 経路について解析を進めた。とくに、代表的な小胞体ストレスセンサーである activate transcription factor 6 α (ATF6 α), inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), PKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) の活性ならびにその下流経路への影響について解析した。

ATF6 α は MeHg 処理によって速やかに限定分解されたことから、変性タンパク質の蓄積に伴って活性化されていることがわかった。

次に、IRE1 α 経路について検討した。IRE1 α

は小胞体内腔側で変性タンパク質を認識し、予め結合していた BiP が解離することで 2 量体/多量体形成が起こることで酵素活性が亢進し、自己リン酸化に続いて自身のエンドヌクレアーゼ活性を介して未成熟 xbp-1 mRNA をスプライシングすることが知られている。最近、私たちは、NO は IRE1 α のリン酸化までは影響しないが、エンドヌクレアーゼ活性を特異的に抑制することを明らかにしている⁷。MeHg も NO と同様の効果があるか否かを調べたところ、xbp-1 mRNA のスプライシングは完全に MeHg 処理で抑制されていたことから、S-水銀化を介して IRE1 のエンドヌクレアーゼ活性を抑制している可能性が示唆された。

PERK に関しては、IRE1 α と同様に小胞体ストレスに応じて、2 量体/多量体形成が起こり、その後、自己リン酸化反応ならびに基質タンパク質のリン酸化が亢進する。とくに、重要な基質の一つに eIF2 α が知られている。PERK による eIF2 α のリン酸化は新規タンパク質合成の抑制を惹起する。そこで、MeHg 処理による影響を調べたところ、PERK は速やかに活性化し、eIF2 α のリン酸化を引き起こすことがわかった。一方、NO は MeHg とは異なる経路を介して eIF2 α のリン酸化を惹起することを明らかにしている。このことから、NO と MeHg の細胞死惹起機構として最終的に UPR を活性化する点では同じだが、PDI の修飾や PERK 活性化機構において差異があることが示唆された。

以上の結果より、MeHg は小胞体内腔のタンパク質成熟機構を破綻させることで小胞体ストレスを惹起することが示唆された。MeHg は、続いて UPR の活性化を引き起こすが、ツニカマイシンのような小胞体ストレスと異なり、センサー分子にも作用することでシグナルが制御されていることがわかった。とくに、IRE1-XBP1 経路は細胞死防御に関わることで、反対に、細胞死惹起に大きく関

わっている chop 発現は ATF6 経路に依存していることが報告されている。したがって、MeHg は IRE1 を介した細胞死抑制経路を遮断する一方、PERK/ATF6 経路を介した細胞死誘導経路を介して細胞死を亢進させていることが示唆された (図 1) ⁸。

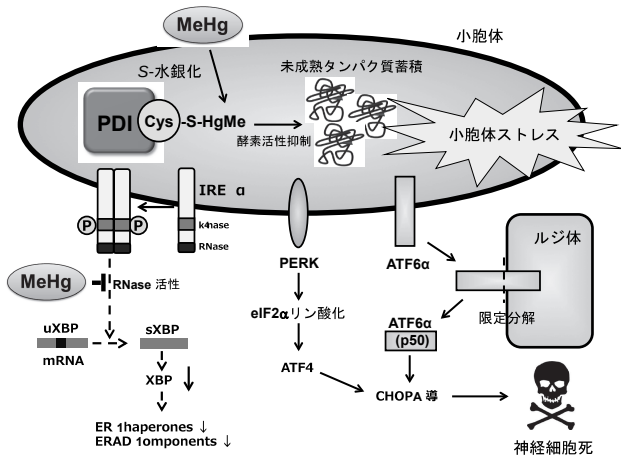


図 1 予想されるメチル水銀の小胞体ストレスを介した神経細胞死惹起機構

SH-SY5Y 細胞にメチル水銀を処理した際に、PDI の酵素活性抑制に起因した変性タンパク質の蓄積が起こり、小胞体ストレス状態となる。これに伴い、3 つの小胞体ストレスセンサーが活性化する。詳細な解析から、IRE1 は MeHg 処理によってリボヌクレアーゼ活性が消失するために、xbp-1 のスプライシングが阻害されることがわかった。このような IRE1-XBP1 経路の調節は、抗細胞死因子遺伝子の転写を抑制することに繋がるため、PERK/ATF6 を介した細胞死がより亢進する一因となることが示唆された。

4. 引用文献

1. Uehara T, Nakamura T, Yao D, Shi ZQ, Gu Z, Ma Y, Masliah E, Nomura Y, Lipton SA. S-nitrosylated protein-disulfide isomerase links protein misfolding to neurodegeneration. *Nature* 2006 441(7092):513-7.
2. Yao D, Gu Z, Nakamura T, Shi ZQ, Ma Y, Gaston B, Palmer LA, Rockenstein EM, Zhang Z, Masliah E, Uehara T, Lipton SA. Nitrosative stress linked to sporadic Parkinson's disease: S-nitrosylation of parkin regulates its E3 ubiquitin ligase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 101(29):10810-4.
3. Numajiri N, Takasawa K, Nishiya T, Tanaka H, Ohno K, Hayakawa W, Asada M, Matsuda H, Azumi K, Kamata H, Nakamura T, Hara H, Minami M, Lipton SA, Uehara T. On-off system for PI3-kinase-Akt signaling through S-nitrosylation of phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN). *Proc Natl Acad Sci USA* 2011 108(25):10349-54.
4. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic Biol Med*. 2008 45(5):549-61.
5. Kanda H, Shinkai Y, Kumagai Y. S-mercuriation of cellular proteins by methylmercury and its toxicological implications. *J Toxicol Sci*. 39(5):687-700.
6. Makino K, Okuda K, Sugino E, Nishiya T, Toyama T, Iwawaki T, Fujimura M, Kumagai Y, Uehara T. Correlation between attenuation of protein disulfide isomerase activity through S-mercuriation and neurotoxicity induced by methylmercury. *Neurotox Res*. 2015 27(2):99-105.
7. Nakato R, Ohkubo Y, Konishi A, Shibata M, Kaneko Y, Iwawaki T, Nakamura T, Lipton SA, Uehara T. Regulation of the unfolded protein response via S-nitrosylation of sensors of endoplasmic reticulum stress. *Sci Rep*. 2015 5:14812.
8. Ohkubo Y, Nakato R, Uehara T. Regulation of Unfolded Protein Response via Protein S-nitrosylation. *Yakugaku Zasshi*. 2016 136(6):801-4.

1. 背景と目的

これまで、メチル水銀毒性発現には酸化ストレス傷害が重要な役割を果たすことを*in vitro*, *in vivo*において明らかにしてきた¹⁻⁴⁾。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)⁵⁾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⁶⁾。メチル水銀曝露後早期に発生する酸化ストレスに対し抗酸化防御系で対応できない場合、細胞ストレスシグナル伝達系の活性化が生じ、毒性後期には小胞体(ER, endoplasmic reticulum)ストレスが起こってアポトーシスがもたらされる⁷⁾。

生体は軽いストレスを受けると、その後の強いストレスに対し耐性をもつことが知られている(preconditioning、プレコンディショニング)。メチル水銀毒性においても、軽度な小胞体ストレスを前処理することで、メチル水銀による細胞障害が抑制されることを報告した⁸⁾。メチル水銀はチオール基と親和性が高く、アミノ酸類似の化合物となりアミノ酸トランスポーターより容易に細胞内に吸収される。今回、小胞体ストレスプレコンディショニングがメチル水銀曝露後の細胞内水銀濃度及びメチル水銀の細胞内流入と排出に関わる膜トランスポーターの発現に及ぼす影響について検討した。

2. 方法

低濃度メチル水銀曝露でアポトーシスをおこすことが明らかになっているメチル水銀高感受性のマウス筋芽細胞培養系^{1, 2)}を用いた。小胞体ストレスプレコンディショニングとして、ER Ca^{2+} -ATPaseであるthapsigargin (TPG)をメチル水銀曝露前に16時間投与した。

メチル水銀曝露後の細胞内水銀濃度を経時的に測定するとともに、メチル水銀の細胞内流入に関係するメチオニントランスポーターであるL-type amino acid transporter 1 (LAT1)、LAT3、sodium-coupled neutral amino acid transporter 2 (SNAT2)とグルタチオン細胞外排出に関係する膜トランスポーターABCC4の発現をquantitative real-time PCR (qPCR)およびwestern blotにて検討した。

小胞体ストレスプレコンディショニング下で機能するストレス防御系と膜トランスポーターmRNA発現変動の関わりについての解析では、eukaryotic initiation factor 2 alpha (eIF2 α)リン酸化の関与についてeIF2 α リン酸化無効の細胞株を用いて検討し、またactivating transcription factor 4 (ATF4)集積、nonsense-mediated mRNA decay (NMD)抑制の関与については、ATF4あるいはNMD構成因子であるSMG-1、SMG-7をsiRNAによりノックダウンした細胞を用いて検討した。

3. 結果

3-1. 細胞内水銀濃度に及ぼす小胞体ストレスプレコンディショニングの影響

細胞内水銀濃度は、メチル水銀添加後速やかに増加し、非プレコンディショニング細胞では添加3時間後にピークとなりその後

次第に低下したことから、水銀排出の方が細胞内への水銀流入より活性化されていると考えられた。小胞体ストレスプレコンディショニングはこの現象を高め、メチル水銀の流入排出とも速やかで、細胞内水銀濃度を非プレコンディショニング時よりも低下させた(図1)。

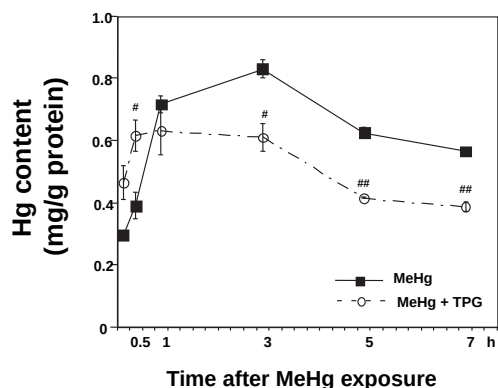


図1. 小胞体ストレスプレコンディショニングによる細胞内水銀濃度の変動

3-2. 小胞体ストレスプレコンディショニングによる膜トランスポーターの発現

小胞体ストレスプレコンディショニング、非プレコンディショニング細胞のメチル水銀

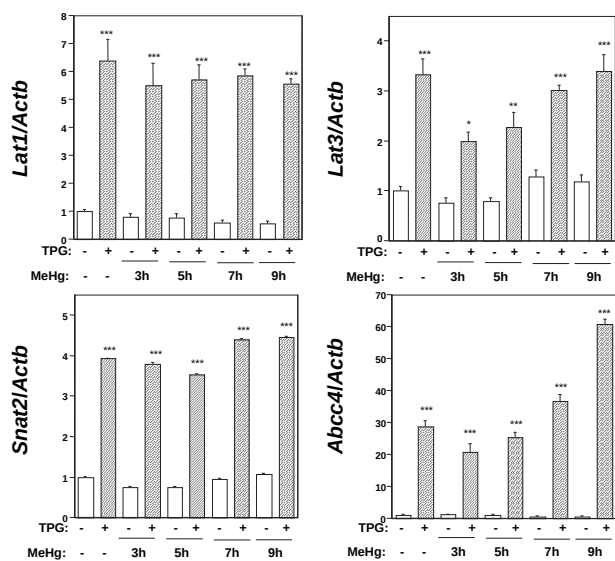


図2. 小胞体ストレスプレコンディショニングによる膜トランスポーターmRNAの発現変動

添加後の膜トランスポーターmRNA発現をqPCRにて解析した結果を図2に示す。小胞体ストレスプレコンディショニングは、LAT1、LAT3、SNAT2、ABCC4すべてのmRNA発現を増加させ、特にABCC4の発現増加が著明であった。また、western blot解析でも、LAT1、SNAT2、ABCC4タンパク質の発現が増加することが明らかになった。

3-3. 膜トランスポーター発現変動に及ぼすストレス防御系の関与

小胞体ストレスプレコンディショニングにより誘導されるストレス防御系(eIF2 α のリン酸化促進とそれに伴うATF4、NMD抑制)と膜トランスポーターmRNA発現変動の関わりについて解析した。

eIF2 α のリン酸化促進の関与は、リン酸化無効の細胞株(図3 SA)を用いて検討した。図3は膜トランスポーターmRNA発現のqPCR解析の結果であるが、SAプレコンディショニング細胞では全ての膜トランスポーターmRNAの発現がコントロール(WT)プレコンディショニング細胞より低下した。

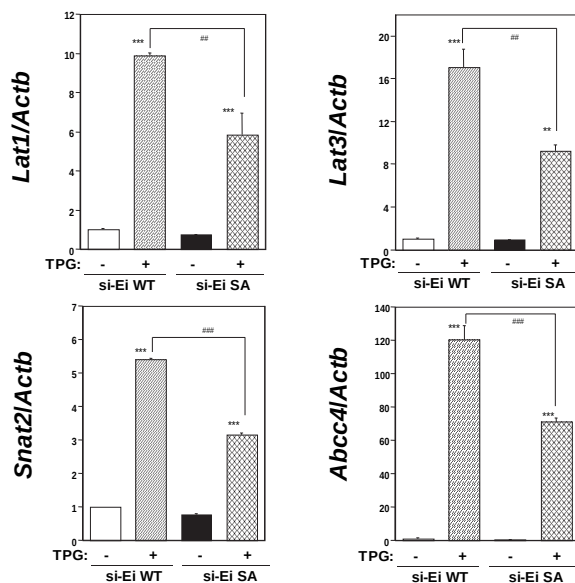


図3. 膜トランスポーターmRNAの発現変動に及ぼすeIF2 α のリン酸化促進の影響

従って、小胞体ストレスプレコンディショニングによる膜トランスポーターmRNA発現増加にはeIF2 α のリン酸化が関与していると考えられた。

また、ATF4の蓄積が膜トランスポーターmRNA発現に及ぼす影響についての解析では、ATF4ノックダウンプレコンディショニング細胞においてLAT1、SNAT2、ABCC4の発現増加がコントロールプレコンディショニング細胞より有意に低下したが、LAT3の発現は有意に増加した。さらに、NMD抑制プレコンディショニング細胞では全ての膜トランスポーターの発現がコントロールプレコンディショニング細胞より増加することが明らかになった。Western blotによる蛋白質発現解析においても同様の結果であった。

以上の結果より、NMD抑制はLAT1、LAT3、SNAT2、ABCC4すべてのmRNA発現に関与し、またATF4がSNAT2、LAT1、ABCC4の発現増加に関係することが明らかになった。

4. 考察

小胞体ストレスプレコンディショニングは、メチル水銀の細胞内流入と排出いずれも増加させ、細胞内水銀濃度を低下させた。小胞体ストレスプレコンディショニング下ではメチル水銀の細胞内流入に関係するメチオニントランスポーター、排出に関係するABCC4トランスポーターの発現が増強したが、特にABCC4トランスポーターの発現増加が著明であった。細胞内メチル水銀濃度の変動は、この膜トランスポーター発現の変動に対応していると考えられた。

小胞体ストレスプレコンディショニングによる膜トランスポーター発現には、NMD抑制とATF4発現が関与しており、NMD抑制により膜トランスポーターLAT1、LAT3、SNAT2、ABCC4 mRNAが増加し、ATF4発現によりその翻訳が活性化されることが考えられた。

5. 結論

細胞内水銀含量は、ATF4の発現やNMD抑制依存的な膜トランスポーター発現増強により変化させ得ることが示唆された。

6. 引用文献

- 1) Usuki F and Ishiura S (1998) Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increases oxidative stress. *NeuroReport* 9: 2291-2296.
- 2) Usuki F, Takahashi N, Sasagawa N et al. (2000) Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys Res Comm* 267: 739-743.
- 3) Usuki F, Yasutake A, Umehara F et al. (2001) In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rats. *Neurosci Lett* 304: 199-203.
- 4) Usuki F, Yasutake A, Umehara F, Higuchi I (2004) Beneficial effects of mild lifelong dietary restriction on skeletal muscle: prevention of age-related mitochondrial damage, morphological changes, and vulnerability to a chemical toxin. *Acta Neuropathol*, 108, 1-9.
- 5) 臼杵扶佐子、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.
- 6) 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.
- 7) Usuki F, Fujita E, Sasagawa N (2008) Methylmercury activates ASK1/JNK signaling pathways, leading to apoptosis due to both mitochondria- and endoplasmic reticulum (ER)-generated processes in myogenic cell lines. *NeuroToxicology* 29:22-30.
- 8) Usuki F, Fujimura M, Yamashita A (2013) Endoplasmic reticulum stress preconditioning attenuates methylmercury-induced cellular damage by inducing favorable stress responses. *Scientific Reports* 3:2346 doi: 10.1038/srep02346

若 手 発 表

メチル水銀の妊娠期曝露によるコルチコステロン増加とその影響

○人見将也 (九州大院)、武田知起、服部友紀子 (九州大院)、藤村成剛 (国水研)

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、妊娠期の曝露により出生後に脳性麻痺様症状および運動・知的機能の発達遅延などの発達障害を惹起する^{1, 2)}。これらは、成人曝露よりも低用量で起こり長期間改善しないために問題が大きい。さらに、男児の方が障害に対して高感受性でもある^{3, 4)}。しかし、これら障害の機構は不明な点が多く、MeHg 妊娠期曝露による胎児への影響を把握出来ていない。当研究室では、MeHg が胎児肝のメタボロームを変動させ、雄胎児の方がその変動が顕著であることを見出している。その結果より、雄胎児のみの血清コルチコステロンの増加という事実を見出した。そこで本研究では、コルチコステロン増加の毒性学的意義およびその増加の原因を検証した。

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 含有水 (0.1, 1 および 5 ppm) を自由に与えた。GD20 に胎児より視床下部、大脳、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、胎児の生存数ならびに性比に影響は観察されなかった。

2-2. 胎児脳メタボロミクス

雌雄胎児視床下部を 3 倍量の 50 mM Tris-HCl を用いてホモジナイズした後、メタノールに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

採取した組織および細胞より 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、 β -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。

2-5. 神経細胞株へのコルチコステロン処理

ラットの神経細胞株である B65 細胞を D-MEM (High Glucose) にて培養した。48, 96 穴プレートに細胞を播種した後、24 時間培養した。その後、コルチコステロンを 24 時間処理した。24 時間経過後に細胞を採取し、細胞サンプルとした。

2-6. MTT assay

2-5 の条件においてコルチコステロンを処理した後に、MTT 溶液 (0.5 mg/ml) を 10 μ l 添加し、37°C の遮光条件下で 4 時間インキュベートした。その後、生成された色素を DMSO に溶解させ、535 nm の吸光度を測定することで細胞の生存率を評価した。

2-7. フローサイトメトリー

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI を用いて、アポトーシスの影響を評価した。2-5 で得られた細胞サンプルを付属のバッファーを用いて懸濁した。これに、FITC Annexin V および Propidium Iodide solution を加えて、

15 分間遮光条件下にて室温でインキュベート後、フローサイトメトリーにて解析した。

3. 結果および考察

3-1. コルチコステロン増加の原因および下流機構への影響の検証

コルチコステロン濃度測定の結果、雄胎児のみで血清中、大脳および視床下部で増加していた (図 1A)。コルチコステロンの下流遺伝子である regulated in development and DNA damage responses 1 (REDD1) の mRNA の増加も判明した (図 1B)。REDD1 の増加は、細胞の増殖/成長の抑制に繋がるため⁵⁾、雄胎児のみで脳の発達を抑制している可能性が浮上した。コルチコステロンの増加は、副腎の合成酵素の一つである 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) の発現増加、ならびに肝臓の代謝酵素である UDP-グルクロン酸転移酵素 1A1 (UGT1A1) および硫酸転移酵素 1A1 (SULT1A1) の発現低下に起因することが示唆された (図 1C)。

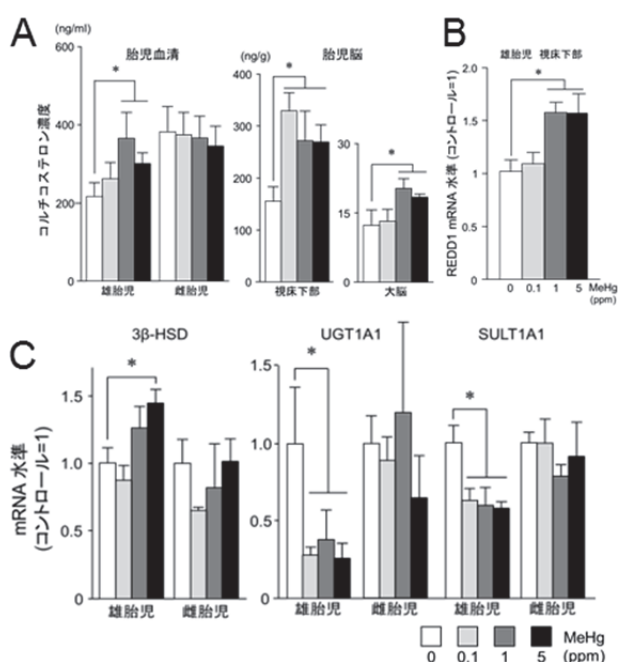


図1. MeHg が胎児コルチコステロンレベルに与える影響 (A) コルチコステロンの下流遺伝子への影響 (B) コルチコステロン増加に寄与する酵素の mRNA 解析 (C) $P < 0.05$

3-2. REDD1 増加の毒性学的意義の検証

ラットの神経細胞株である B65 細胞を用いて REDD1 増加の影響を検証した。B65 細胞において、コルチコステロン濃度依存的に REDD1 mRNA が増加し (図 2A)、これと逆相関して細胞の生存率が低下した (図 2B)。また、生存率低下の原因は、アポトーシスが亢進していることが判明した (図 2C)。以上より、コルチコステロンによる REDD1 の増加は、アポトーシスの誘導を介して細胞の生存率を低下させる可能性が浮上した。すなわち、上記機構が MeHg 妊娠期曝露の雄胎児の脳において生じている可能性が示唆された。

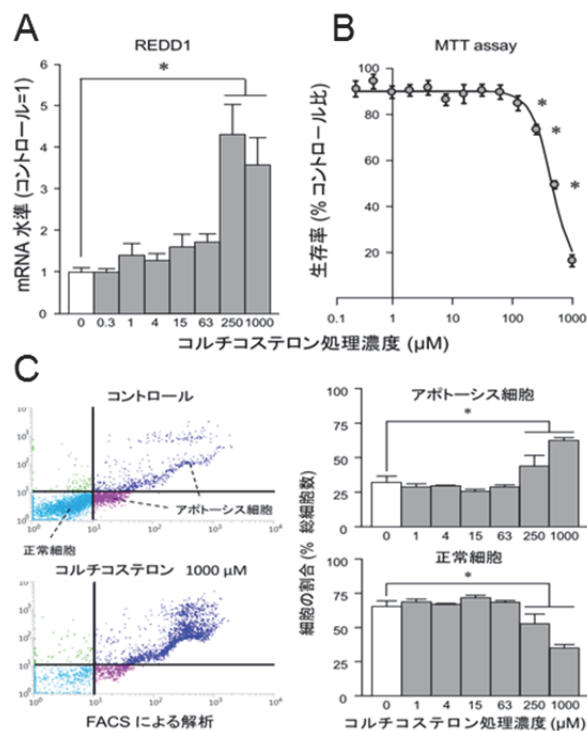
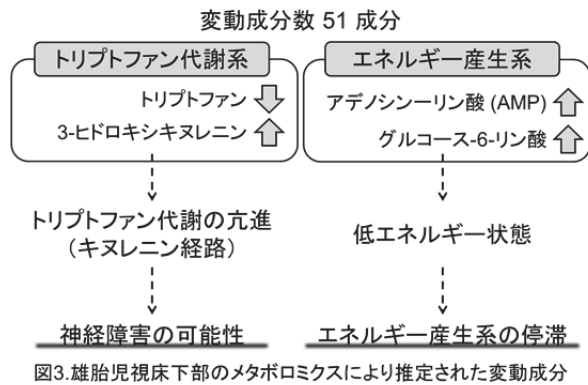


図2. コルチコステロン増加による REDD1 mRNA の誘導 (A) 細胞生存率への影響 (B)、アポトーシスの評価 (C) $P < 0.05$

3-3. 雄胎児脳メタボロミクス

MeHg 妊娠期曝露の雄胎児の視床下部でのメタボロミクスの結果、トリプトファンの低下およびその代謝物である 3-ヒドロキシキヌレニン (3-HK) の増加が推定された。3-HK の蓄積は神経障害性を持つことから⁶⁾、脳においてトリプトファン代謝系のキヌレニ

ン経路の亢進による神経障害の可能性が推定された。また、アデノシンーリン酸およびグルコース-6-リン酸の増加が推定され、エネルギー産生系の停滞の可能性も浮上した。



以上の成果より、MeHg 妊娠期曝露は雄胎児のみで合成酵素の発現増加ならびに代謝酵素の発現減少を介してコルチコステロンの蓄積をもたらすこと、それに伴う REDD1 の発現増加が脳細胞を障害するという、障害性に性差が生じる新たな可能性が浮上した。さら

に、視床下部において障害に寄与しうる因子が推定された。

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) Ben Sahra I., Regazzetti C., Robert G., Laurent K., Le Marchand-Brustel Y., Auberger P., Tanti JF., Giorgetti-Peraldi S., Bost F., Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.*, **71**: 4366-4372 (2011)
- 6) Eastman C. L., Guilarte T. R., The role of hydrogen peroxide in the in vitro cytotoxicity of 3-hydroxykynurenine. *Neurochem. Res.*, **15**: 1101-1107. (1990)

メチル水銀長期曝露がドパミン神経分化に及ぼす影響

○栗田尚佳、畑野 愛、郷すずな、位田雅俊、保住 功（岐阜薬科大 薬物治療学）

1. 背景と目的

成人期におけるメチル水銀 (MeHg) 曝露に比べ、胎児期や乳児期における曝露は脳組織に MeHg が蓄積しやすい。そのため、MeHg の毒性を考える上で、発達期の曝露影響は特に重要である。ヒトにおいて、周産期 MeHg 水銀曝露は子における Attention Deficit Hyperactivity Disorder (ADHD) の発症率の増加¹⁾、Intelligence Quotient (IQ) の低下²⁾などを引き起こす可能性があり、これらの異常にはドパミン神経系の攪乱が考えられる。本研究では、神経分化時における長期 MeHg 曝露がドパミン神経分化に与える影響とそのメカニズムを検討することを目的とした。

2. 方法

ドパミン神経誘導時の長時間における MeHg 曝露影響を、ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y 細胞) を用いて検討を行った。SH-SY5Y 細胞に MeHg 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500 および 1000 nM の濃度で、神経分化誘導開始から神経分化完了の 6 日間曝露し、細胞生存率を WST-8 assay により経時的に評価した。SH-SY5Y 細胞の神経分化誘導条件は、分化誘導開始 3 日目まではレチノイン酸 (RA) 10 μ M、分化誘導開始 3 日目から 6 日目までは、RA 10 μ M およびホルボールエステル (PMA) 80 nM を処置することで行った (図 1)。



図 1. SH-SY5Y 細胞神経分化誘導プロトコール

また、6 日間の長期曝露において、毒性が認められなかった MeHg 0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 および 250 nM 以下の濃度を用いて、ドパミン神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) の発現量をウエスタンブロット法で解析を行った。またアセチル化ヒストン H3 およびアセチル化ヒストン H3K14 の発現量をウエスタンブロット法により検討した。

3. 結果

まず、MeHg の神経分化誘導期の長期間の曝露影響を検討した。ヒト神経芽細胞腫 (SH-SY5Y) に MeHg を種々の濃度で神経分化誘導開始から神経分化完了の 6 日間曝露したところ、曝露 6 日目で MeHg 1000 nM 群では細胞生存率は約 20%、MeHg 500 nM 群では約 60%であった (図 2)。

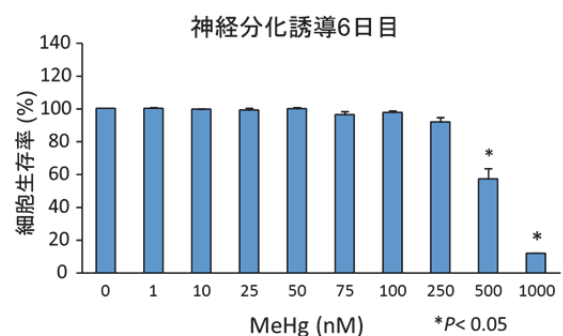
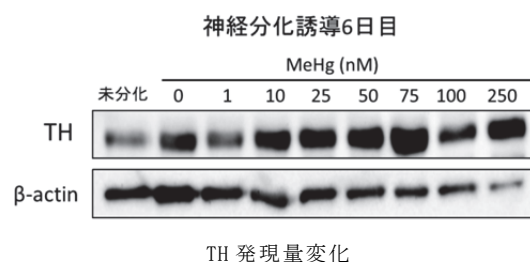


図 2. 神経分化誘導期間 6 日間長期 MeHg 曝露による細胞生存率

またドパミン合成の律速酵素である tyrosine hydroxylase (TH) の発現量は、6 日間の MeHg において 10 nM より高い濃度で上昇した (図 3)。

図 3. 神経分化誘導期間 6 日間長期 MeHg 曝露による



また低濃度の MeHg 曝露においてアセチル化ヒストン H3 発現量の減少傾向が認められた (図 4)。また、アセチル化ヒストン H3K14 は高濃度の MeHg で減少傾向が認められた (図 5)。

図 4. 神経分化誘導期間 6 日間長期 MeHg 曝露による

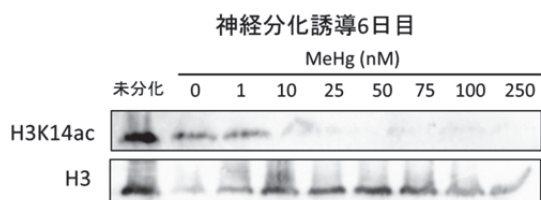
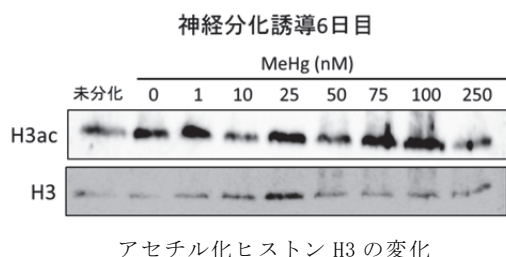


図 5. 神経分化誘導期間 6 日間長期 MeHg 曝露による

アセチル化ヒストン H3K14 の変化

4. 考察

神経分化誘導期に MeHg 曝露した SH-SY5Y 細胞において、細胞死が引き起こされない MeHg 濃度で TH 発現量の増加が認められた。これまでに、マウス MN9D 細胞を用いた報告において、比較的高濃度の短時間 (MeHg 1~10 μ M、24~48 時間) の MeHg 曝露では、ドパミン分泌が減少することが報告されている³⁾。先行報告では、ヒト細胞系を用いた MeHg のドパミン神経系への影響を検討した報告はほとんどなく、今回のヒト細胞を用いた長期間の MeHg 曝露では TH 発現量は上昇した。しかし

ながら、本研究において MeHg の細胞死と TH 発現量の上昇との相互の関連性については不明である。ドパミン生産過剰による毒性は、これまでも報告されている⁴⁾。よって、SH-SY5Y における TH 発現量の上昇が、MeHg の毒性の原因の 1 つである可能性が考えられるが、TH 阻害剤などを用いたさらなる検討が必要である。ヒストン修飾であるアセチル化ヒストン H3 量が低濃度 MeHg 群で低下、アセチル化 H3K14 量が高濃度 MeHg で低下傾向にあった。今後、TH をはじめとする個々のドパミン神経関連遺伝子の詳細なエピジェネティクス変化の解析が必要である。

5. 結論

本研究から、SH-SY5Y 細胞における長期 MeHg 曝露では、TH 発現量の上昇が確認された。ヒストン修飾であるアセチル化ヒストン H3 量が低濃度 MeHg 群で低下、アセチル化 H3K14 量が高濃度 MeHg で低下傾向にあった。今後は、MeHg によるドパミン毒性の関与、ならびに TH をはじめとする個々のドパミン神経関連遺伝子の詳細なエピジェネティクス変化の解析を行っていく。

引用文献

- 1) Boucher O, Jacobson SW, Plusquellec P, Dewailly E, Ayotte P, Forget-Dubois N, Jacobson JL, Muckle G. Prenatal methylmercury, postnatal lead exposure, and evidence of attention deficit/hyperactivity disorder among Inuit children in Arctic Québec. *Environ Health Perspect* 2012; 120(10): 1456-14612)
- 2) Oken E, Radesky JS, Wright RO, Bellinger DC, Amarasiwardena CJ, Kleinman KP, Hu H, Gillman MW. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *Am J Epidemiol* 2008; 167(10): 1171-1181
- 3) Shao Y, Chan HM. Effects of methylmercury on dopamine release in MN9D neuronal cells. *Toxicol Mech Methods*. 2015; 25(8): 637-644
- 4) Izumi Y, Ezumi M, Takada-Takatori Y, Akaike A, Kume T. Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death. *Toxicol Sci*. 2014; 139(2): 466-78

オートファジー誘導へのメチル水銀の関与とその機構解析

○外山 喬士、長谷川 貴、松田 健人、永沼 章、黄 基旭（東北大学 大学院薬学研究科）

1. 背景及び目的

オートファジーは細胞内において異常な構造の蛋白質や機能不全に陥った細胞内小器官を分解することで細胞内恒常性を保つためのクリアランス機構である。一方、オートファジーの過剰な活性化は細胞機能障害や細胞死（autophagic cell death）に関与することが知られている。我々はこれまでの検討より、酵母においてオートファジーの抑制に関わる EGO 複合体¹⁾構成因子の Meh1 が、Ego3 および Gtr2 と液胞膜上で複合体を形成することで、メチル水銀毒性の軽減に関与することを明らかにした。一方、メチル水銀は EGO 複合体の解離と分解を促進することによって液胞の形態異常を惹起し毒性発現に関与することが判明した。以上のように、酵母ではメチル水銀による過剰なオートファジーの誘導が細胞毒性を引き起こすことが示唆されたが、ヒト細胞でのメチル水銀とオートファジーとの関係は不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト培養細胞でのメチル水銀によるオートファジーの誘導に関わる分子機構について検討した。

2. 結果及び考察

LC3 蛋白質がプロセシングされた後にホスファチジルエタノールアミンが付加された LC3-II は、オートファジー誘導時に形成される二重膜構造体（オートファゴソーム）の構成蛋白質であることから、オートファジー誘導の指標として汎用されている。ヒト胎児腎細胞（HEK293 細胞）およびヒト神経芽種（SH-SY5Y 細胞および SK-N-SH 細胞）をそれぞれメチル水銀で処理したところ、メチル水銀の濃度および処理時間に依存した LC3-II レベルの増加が認められた。哺乳動物細胞におけるオートファジーの誘導に関わる細胞内シ

グナル伝達経路として、PI3K/Akt シグナルの不活性化または AMPK シグナルの活性化が知られている。しかし、メチル水銀はオートファジーを誘導する条件下において、逆に PI3K/Akt シグナルを活性化し、AMPK シグナルを不活性化した。このことから、メチル水銀はこれらのシグナル伝達経路非依存的にオートファジーを誘導すると考えられる。

EGO 複合体のヒトホモログである LAMTOR 複合体（LAMTOR1, LAMTOR2, LAMTOR3 からなる複合体）はオートファジー抑制因子 mTORC1 の活性化に関与することが知られている。メチル水銀はこれら3種の LAMTOR 複合体構成蛋白質のレベルを有意に低下させた。また、LAMTOR 複合体構成蛋白質の発現を siRNA でそれぞれ抑制することによってもオートファジーが誘導されたことから、メチル水銀が LAMTOR 複合体構成蛋白質のレベルを低下させることによって、オートファジーを誘導している可能性が考えられる。一方、栄養飢餓によってオートファジーを誘導した際には、LAMTOR 複合体構成蛋白質のレベルの低下が認められなかった。このことは、メチル水銀による LAMTOR 複合体蛋白質の分解を介したオートファジー誘導はメチル水銀が示す特異的作用によって引き起こされる可能性が考えられる。

メチル水銀による LAMTOR 複合体構成蛋白質レベルの低下にリソソームまたはプロテアソームでの分解が関与する可能性が考えられる。そこで、バフィロマイシン（リソソーム阻害剤）または MG132（プロテアソーム阻害剤）で前処理したところ、いずれの阻害剤の存在下においてもメチル水銀による LAMTOR 複合体構成蛋白質レベルの低下が抑制された。このことは、メチル水銀による LAMTOR 複合体

構成蛋白質の分解にユビキチン・プロテアソーム系とリソソーム系が共に関与することを示唆している。

今後、メチル水銀による LAMTOR 複合体構成蛋白質の分解促進に関わる分子機構を明らかにすることによって、メチル水銀によるオ

ートファジー誘導機構の全容が明らかになると期待される。

引用文献

- 1) Frédérique Dubouloz. et. al., The TOR and EGO Protein Complexes Orchestrate Microautophagy in Yeast, 2005, Molecular Cell.

活性イオウ分子種によるメチル水銀毒性制御機構の解明に関する研究

○北村篤志（大阪府大院）、笠松真吾、井田智章、藤井重元、赤池孝章（東北大院）、津々木博康、澤智裕（熊本大院）、西田基宏（岡崎統合バイオ）、熊谷嘉人（筑波大院）、居原秀（大阪府大院）

1. 背景

1-1. メチル水銀の毒性発現機構

メチル水銀は、環境中に存在する親電子分子であり、神経毒性を示すことが知られている。その毒性発現機構については、いくつか報告されている(図1)¹⁻²⁾。



図1 メチル水銀の毒性発現機構

1-1-1. タンパク質 S-水銀化

メチル水銀は、その強い親電子性のため、求核性の高いタンパク質システインチオール基と容易に共有結合を形成する。この反応を「S-水銀化」と呼び、タンパク質機能不全によるメチル水銀毒性の発現に関与していると考えられている(図1)¹⁻²⁾。標的タンパク質として、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)などが知られている¹⁾。

1-1-2. メチル水銀毒性と酸化ストレス

メチル水銀は、神経系において、細胞外グルタミン酸濃度を上昇させる。細胞外グルタミン酸は、神経細胞のグルタミン酸受容体に結合し、細胞内に過剰のカルシウムイオンを流入させる。結果、カルシウムシグナルを破綻させ(グルタミン酸毒性)、活性酸素種(ROS)が産生される。また、メチル水銀はミトコンドリアの電子伝達系を阻害し、細胞内 ROS レベルを上昇させる。このように神経細胞内で酸化ストレスが生じる

ことで生体分子を損傷させ機能不全を導く、あるいは細胞死シグナルに作用し神経毒性を引き起こす(図1)。

1-1-3. メチル水銀と一酸化窒素(NO)

カルシウムイオンの上昇により、nNOS が活性化されることから、メチル水銀毒性に NO が関与すると考えられる。実際にメチル水銀処理により NO 産生が亢進することが報告されており、神経毒性との関与が示唆されてきた。しかし、S-水銀化により nNOS 活性が阻害されることが知られており、メチル水銀毒性と NO の関連性は不明な点が多いままである。

1-2. NO/ROS レドックスシグナルと活性イオウ分子種

1-2-1. NO/ROS レドックスシグナル

NO は可溶性グアニル酸シクラーゼに作用し、cGMP を産生することで、細胞シグナル伝達を行う。一方、これまで毒性分子と考えられてきた ROS がシグナル分子として機能することが明らかとなってきた。NO と ROS によるシグナルのセカンドメッセンジャーとして 8-nitro-cGMP が発見された³⁾。8-nitro-cGMP は、タンパク質チオール基に cGMP 構造を付加する S-グアニル化と呼ばれる反応によって多様な生理機能に関与していることが明らかになった³⁻⁴⁾。

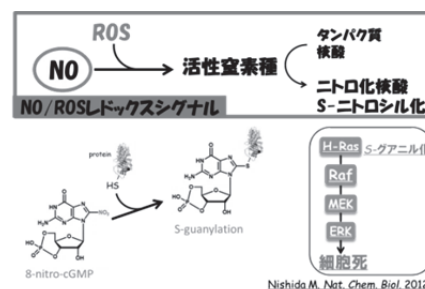


図2 8-nitro-cGMP と S-グアニル化による細胞死シグナル

1-2-2. 活性イオウ分子種

近年、システイン[Cys-SH]に過剰にイオウ原子が付加したシステインパーサルファイド[Cys-SSH]やポリサルファイド[Cys-S(S)nH]が発見され、活性イオウ分子種として注目されている⁵⁾。活性イオウ分子種は強力な抗酸化活性をもち、活性酸素の多彩な生理活性、様々な親電子性物質の代謝を制御している。また、8-nitro-cGMPの代謝にも関与しており、新規環状ヌクレオチドである8-SH-cGMPを生成させる。

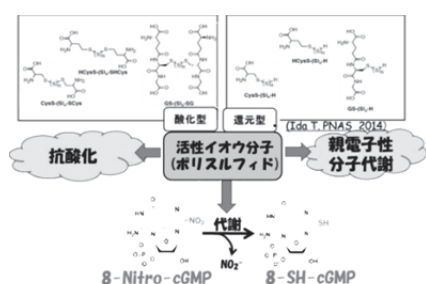


図3 活性イオウ分子種

1-2-3. 活性イオウ分子種とメチル水銀毒性

メチル水銀は親電子性物質であるため、活性イオウ分子種と反応することが予想された。実際に、メチル水銀は活性イオウ分子種と反応し、S-メチル水銀ビス体(MeHg)₂Sが生成され、毒性が軽減された⁶⁻⁷⁾。また、活性イオウ分子種の抗酸化作用などから、活性イオウ分子種がメチル水銀毒性を軽減していることが示唆される。

2. 目的

メチル水銀の毒性発現機構には、いまだ不明な点が多く残されている。これは、メチル水銀が多様な生体反応に影響を与え、その毒性発現機構が複雑になっているためである。本研究では、メチル水銀の強い親電子性に注目し、活性イオウ分子種との関連について検討することを目的とした。

3. 結果

3-1. メチル水銀毒性への8-nitro-cGMPの関与

初代培養ラット小脳顆粒細胞(CGNs)にメチル水銀を処理し、8-nitro-cGMPの産生を検討した(図4A)。メチル水銀により8-nitro-cGMP産生の亢進が認められた。また、NOS阻害剤であるL-NAME、膜透過性SODであるPEG-SODによって減少した。これらの結果から、メチル水銀誘導性の8-nitro-cGMP産生の亢進は、nNOSが関与していることが示唆された。次に、メチル水銀毒性におけるNO/ROSシグナルの関与を検討した(図4B)。メチル水銀により減少した細胞生存率が、L-NAME、PEG-SODを共処理することで回復していた。これらの結果により、NO/ROSシグナルが、メチル水銀毒性に関与していることが示唆された。8-nitro-cGMPはH-RasをS-グアニル化し、その下流シグナルの活性化、細胞死を誘発することが知られている。そこで、メチル水銀処理により、このシグナルが活性化されるかを検討した(図4C, D, E)。活性化H-Rasをプルダウン解析した結果、S-グアニル化によるH-Rasの活性化、およびErkリン酸化の亢進が確認された。また、MEKを阻害すると毒性が低下した。

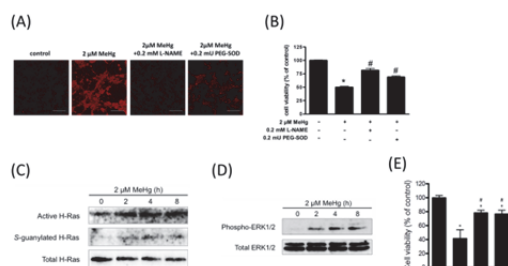


図4 メチル水銀毒性におけるNO/ROSシグナルの影響

各種阻害剤とメチル水銀を処理した。(A)8-nitro-cGMPを蛍光免疫染色によって解析した。(B)細胞毒性をMTT assayによって評価した。(C),(D)活性化H-Ras、S-グアニル化H-Ras、リン酸化Erkをウェスタンブロッティングで解析した。(E)細胞毒性をMTS assayにて解析した。

3-2. 活性イオウ分子レベルに及ぼすメチル水銀の影響

メチル水銀による活性イオウ分子レベルの変化は、活性イオウ分子特異的蛍光プローブであるSSP4を用いて検討した。CGNsをメチル水銀で

処理することで、活性イオウ分子が減少しており、8-SH-cGMP についても減少が認められた(図 5A)。更に、活性イオウ分子種を、高速液体クロマトグラフィー-質量分析装置を用いて定量した(図 5B)。結果、グルタチオン、グルタチオンパーサルファイドの有意な減少が認められた。

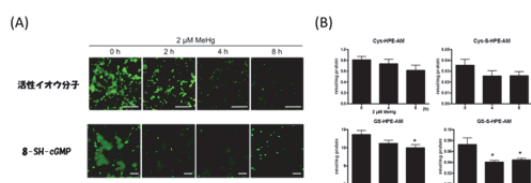


図 5 メチル水銀毒性における活性イオウ分子の影響

メチル水銀を処理した。(A) 活性イオウ分子は SSP4 assay で、8-SH-cGMP は蛍光免疫染色で解析した。(B) 細胞抽出液を LC-MSMS で解析した。

3-3. 活性イオウ分子による NO/ROS シグナルの制御

メチル水銀毒性における活性イオウ分子による保護効果を検討した(図 6A)。メチル水銀により低下した細胞生存率が、外因性の活性イオウ分子である Na_2S_4 を前処理することで回復した。活性イオウ分子は、NO/ROS シグナルを負に制御するので、活性イオウ分子による NO/ROS シグナルの制御を検討した。NO/ROS シグナル下流の H-Ras/ERK シグナルを解析した結果、 Na_2S_4 を前処理することで、ERK のリン酸化の抑制が認められた(図 6B)。この結果から、活性イオウ分子は、NO/ROS シグナルの制御により、メチル水銀毒性を制御していることが示唆された。

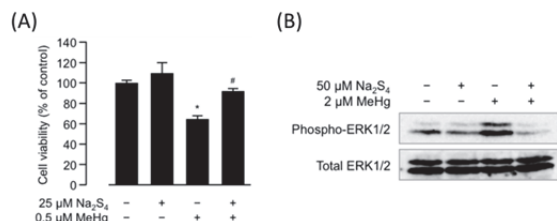


図 6 メチル水銀毒性における活性イオウ分子種の保護効果

Na_2S_4 とメチル水銀を処理した。(A) 細胞毒性を MTT assay によって評価した。(B) Erk のリン酸化をウェスタンブロッティングによって評価した。

4. まとめ

上述の結果より、図 7 に示すモデルが考えられる。メチル水銀によって 8-nitro-cGMP の産生が増加し、細胞内の 8-nitro-cGMP レベルが上昇すると、H-Ras/MEK/ERK シグナルが活性化され、細胞死が誘導される。活性イオウ分子種は、S-メチル水銀ビス体を形成し、解毒していることも報告されているが、8-nitro-cGMP を 8-SH-cGMP へと代謝し、レドックスシグナルを制御することによってもメチル水銀毒性を緩和していることが示唆された。

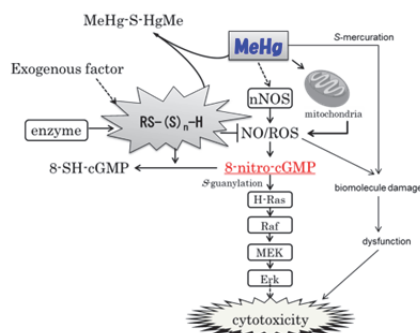


図 7 メチル水銀毒性におけるレドックスシグナルと活性イオウ分子による制御機構

5. 引用文献

- 1) The role of Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury. Kumagai Y, et. al., Oxid Med. Cell Longev., 2013, 2013, 848279
- 2) Methylmercury-induced neurotoxicity and apoptosis. Ceccatelli S, et. al. Chem Biol Interact., 2010, 188, 301-8
- 3) Protein S-guanylation by the biological signal 8-nitroguanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. Sawa T, et.al., Nature. Chem. Biol., 2007, 3, 727-735
- 4) Hydrogen sulfide anion regulates redox signaling via electrophile sulfhydration. Nishida M, et. al., Nature. Chem Biol., 2012, 8, 714-24
- 5) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Ida T, et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2014, 111, 7606-11
- 6) Detoxification of Methylmercury by Hydrogen Sulfide-Producing Enzyme in Mammalian Cells. Yoshida E, et.al., Chem. Res. Toxicol., 2011, 24, 1633-35
- 7) Involvement of Reactive Persulfides in Biological Bismethylmercury Sulfide Formation. Abiko Y, et.al., Chem. Res. Toxicol., 2015, 28, 1301-1306

メチル水銀からニューロンを守るアストロサイト適応応答の分子機構の解明

○ 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。また、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¹、虚血刺激により TGF- β 1 を遊離してニューロンを保護することから²、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ている。

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³、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⁴、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。私たちは、ラット初代アストロサイトをメチル水銀で処置すると、神経成長因子 (NGF) と脳由来栄養因子 (BDNF) の発現が上昇することを見出した⁵。アストロサイトはこれらのニューロトロフィンを細胞外に放出し、ニューロンをメチル水銀毒性から保護する⁵。そこで、本研究では、アストロサイトにおける NGF と BDNF の発現増大機構を明らかにし、アストロサイトのメチル水銀適応応答の全容解明を目指した。

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を除き、14 日間培養した後に実験に使用した。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。ルシフェラーゼ活性の測定は、luciferase assay system (Promega) を使用した。転写因子の網羅的解析には Protein/DNA Array (Affymetrix) を用いた。

3. 結果

3-1. メチル水銀処置による BDNF と NGF の発現上昇

アストロサイトはニューロンと同様、中枢神経系におけるニューロトロフィン産生細胞である。アストロサイトをメチル水銀 (1, 3, 10 μ M) で 6 時間処置し、ニューロトロフィン mRNA (NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5) の発現量を調べたところ、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. 1)。しかし、メチル水銀は、NT-3 と NT-4/5 の発現量に影響しなかった (Fig. 1)。

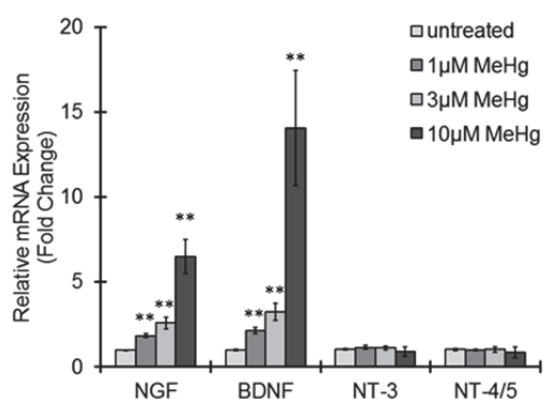


Fig. 1. メチル水銀による NGF と BDNF の発現上昇

また、培養上清中の NGF と BDNF のタンパク量の変化を ELISA 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。メチル水銀で処置したアストロサイトの培養上清をヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞に処理すると、SH-SY5Y 細胞のメチル水銀耐性が上昇した。NGF 受容体である trkA のアンタゴニスト GW445126、または BDNF 受容体である trkB のアンタゴニスト cycrotraxin-B で SH-SY5Y 細胞を前処理すると、メチル水銀耐性の上昇は抑制された。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・放出し、ニューロンをメチル水銀から保護することが明らかとなった。

3-2. NGF と BDNF 転写における Nrf-2 の関与

CREB、AP-1 は NGF と BDNF の転写にはたらく代表的な転写因子であり、Nrf-2 はメチル水銀により活性化することがよく知られている転写因子である。そこで、アストロサイトに転写因子 AP-1、CREB および Nrf-2 の結合領域をもつルシフェラーゼベクターを導入し、メチル水銀で刺激したところ、Nrf-2 の活性化が認められた。しかし、*in silico* で NGF と BDNF のプロモーター解析を行ったところ、NGF と BDNF のプロモーター領域に antioxidant response element (ARE) は認められなかった。従って、メチル水銀により活性化された Nrf-2 は NGF と BDNF の転写に関与するものの、NGF と BDNF は Nrf-2 の直接のターゲットではないと考えられる。

3-3. メチル水銀に応答し NGF と BDNF を活性化する転写因子の同定

ラット NGF と BDNF のプロモーター領域をクローニングし、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、メチル水銀により NGF プロモーターの 0 から -200bp 領域、BDNF プロモーターの -500 から -1000bp 領域が活性化することが明らかとなった。さらに、メチル水銀処理したアストロサイトで活性化する転写因子を網羅的に解析したところ、PAX ファミリーや

GATA など、複数の転写因子がメチル水銀により活性化することが明らかとなった (Fig. 2)⁶。そこで、メチル水銀により活性化するプロモーター領域に結合し得る転写因子を TFBIND ソフトウェアにより抽出し、さらに、網羅的解析結果と併せることにより、メチル水銀により活性化し、NGF と BDNF の転写に働く因子を SP-1、E2F、GATA-1 の 3 種まで絞り込むことができた。

アストロサイトを SP-1、E2F、GATA-1 それぞれの阻害薬である WP631、HLM006474、K-7174 で前処置した後 MeHg で処置すると、WP631 は BDNF と NGF の発現を大きく抑制した一方、他 2 つの阻害薬は NGF と BDNF の発現に影響しなかった。従って、SP-1 がメチル水銀に応答して NGF と BDNF の転写を活性化していると考えられる。

untreated



MeHg



Fig. 2. Protein/DNA array による転写因子の網羅的解析

3-4. SP-1 を活性化するシグナル伝達に関する考察

Nrf-2 の下流でヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) が転写活性化することが知られてい

る。HO-1 は、ヘムをビリベルジン、一酸化炭素と遊離鉄に分解する酵素であるが、一酸化炭素は p38 の活性化を介して SP-1 をリン酸化することによって SP-1 による転写を活性化することが報告されている⁷⁾。そこで、NGF と BDNF 転写活性化における HO-1、ビリベルジン代謝物ビリルビン、一酸化炭素の関与を調べた。

アストロサイトをメチル水銀で刺激すると HO-1 mRNA 量とタンパク質量が増加した。HO-1 阻害薬である ZnPP は、NGF と BDNF の転写を大きく抑制した。また、一酸化炭素生成薬である CORM-2 やビリルビンでアストロサイトを処置すると、いずれも NGF と BDNF の発現を上昇させた。従って、メチル水銀による BDNF と NGF の転写活性化には、HO-1 の下流で産生する一酸化炭素やビリルビンが関与することが示唆される。

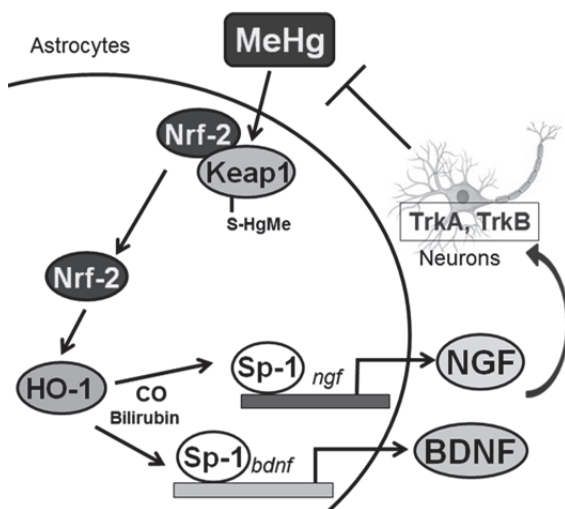


Fig. 3. メチル水銀に対するアストロサイト適応応答の推定作用機序

4. 結論

メチル水銀に応答したアストロサイトは NGF と BDNF を産生・放出し、メチル水銀からニューロンを保護する。アストロサイトにおいて、メチル水銀は Nrf-2、HO-1、一酸化炭素を介したシグナル伝達系を活性化すると考えられる (Fig. 3)。また、このシグナル伝達系の最下流では転写因子 SP-1 が活性化し、NGF と BDNF の転写を促進する (Fig. 3)。以上の知見は、メチル水銀の神経毒性を考える上で、アストロサイト活性の重要性を提示している。

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) Takemoto T, Ishihara Y, Ishida A et al. Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol* 40:199-205, 2015.
- 6) Takemoto T, Ishihara Y, Tsuji M et al. Transcription factor activation in rat primary astrocytes exposed to methylmercury. *Fundam Toxicol Sci* 3:63-65, 2016.
- 7) Lin HH, Lai SC, Chau LY. Heme oxygenase-1/carbon monoxide induces vascular endothelial growth factor expression via p38 kinase-dependent activation of Sp1. *J Biol Chem*. 286:3829-38, 2011.

水俣病における小脳障害の病理仮説-炎症仮説-の分子メカニズム

—Jurkat 細胞においてメチル水銀により活性化されるパーフォリン／グランザイム B 経路—

○金 純子, 吉田 映子, 鍛冶 利幸 (東京理大)

1. 目的

水俣病の原因物質となったメチル水銀は、ハンター・ラッセル症候群と呼ばれる中枢神経障害を主徴とした毒性を発現することが知られている、一方、水俣病患者の病理において未解決となっている主要な問題として以下の2つが挙げられる。

第一に、大脳組織における病変部位の限局性である。水俣病患者の大脳の組織傷害は、大脳皮質の深い脳溝周辺組織に限局しており、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、衛藤らにより“浮腫仮説”が提唱されている¹⁾。これは、メチル水銀曝露の初期段階において脳浮腫が形成されることで、深い脳溝周辺組織が特に強く圧迫され、その結果生じる組織循環障害により神経の脆弱化が引き起されるというものである。

第二に、小脳において小脳性運動失調の原因とされる顆粒細胞層への特異的な傷害が発生していることである。小脳においてもメチル水銀中毒の初期段階において大脳と同様に浮腫形成が認められるが、小脳顆粒細胞層への部位特異的な傷害を“浮腫仮説”だけでは十分に説明することは難しい。しかしながら、それに変わる病理仮説も存在していない。メチル水銀による小脳傷害について、これまでの観点は、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の発現を説明するものが多く、その感受性についてのみ議論の焦点が当てられていた。しか

しながら、そのような感受性の差はメチル水銀の神経細胞に対する直接的な作用の理解には重要であるが、小脳顆粒細胞の急速で大規模な傷害の発現メカニズムを合理的に理解するには難しい。

当研究室では、メチル水銀投与により後肢交叉（典型的な中毒症状）が誘発されたラットの小脳を用いて、病理組織学的な検討を行った。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 日目以降の顆粒細胞層において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では、このような萎縮性の退行性は認められなかった。さらに、この小脳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示された。また、このとき細胞傷害性 T リンパ球およびマクロファージが小脳顆粒細胞層に浸潤しており、IL-2 や TGF- β などの炎症性サイトカインの発現が上昇していることが明らかになった。これらの結果は、メチル水銀曝露の初期段階で生じた顆粒細胞傷害が引き金となり、細胞傷害性 T リンパ球やマクロファージが小脳顆粒細胞層に浸潤した結果、放出された炎症性サイトカインにより顆粒細胞に急速かつ大規模なアポトーシスを誘発する可能性を示唆している。このような炎症性変化を我々は“炎症仮説”として提唱している。

細胞傷害性 T リンパ球は PI3K-Akt 経路を介し、Perforin および GranzymeB が分泌されることで標的細胞のアポトーシスを誘発することが知られている^{2, 3)}。したがって、メチル水銀により Perforin-GranzymeB 経路が

活性化されたことにより、小脳顆粒細胞のアポトーシスが誘発される。そこで、本研究の目的は推測されるため、メチル水銀による細胞傷害性 T リンパ球の Perforin-GranzymeB 経路の活性化、およびそのメカニズムを解明することである。

2. 実験方法

T リンパ球のモデルとしてヒト T リンパ球白血病株 Jurkat E6.1 細胞を用いた。メチル水銀による Perforin および GranzymeB の培地中への蓄積量は ELISA 法にて定量した。また、メチル水銀による Perforin および GranzymeB 遺伝子の発現は Real-time RT-PCR 法を用いて解析した。さらに、メチル水銀による EGFR, Akt, ERK1/2, p38 MAPK および JNK のリン酸化は Western blot 法、細胞内 PTP1B の酵素活性測定は PTP1B の EIA kit を用いて測定した。また、各阻害剤については EGFR 阻害剤 PD153035, PI3K 阻害剤 LY294002, ERK1/2 阻害剤 U0126, p38 MAPK 阻害剤 SB203580 および JNK 阻害剤 SP600125 を用いた。

3. 結果

メチル水銀に曝露した Jurkat 細胞において、5 μ M のメチル水銀により Perforin タンパク質の培地への蓄積量は増加したが、メチル水銀による Perforin mRNA の発現上昇は認められなかった。また、GranzymeB タンパク質はメチル水銀の曝露濃度依存的に培地への蓄積量が顕著に増加した。これと関連し、GranzymeB mRNA についてもメチル水銀による顕著な発現上昇が認められた。このことから、Jurkat 細胞においてメチル水銀が Perforin-GranzymeB 経路、特に GranzymeB を顕著に発現上昇し、本経路が活性化されることが示された。

Perforin-GranzymeB 経路の活性化は T 細胞受容体を介した PI3K/Akt シグナルが関与することから、メチル水銀による Perforin-GranzymeB 経路の活性化に対する PI3K/Akt 経路の関与を検討した結果、メチル水銀により経時的な Akt の活性化が認められたものの、PI3K 阻害剤を処理してもメチル水銀による培地中への Perforin および GranzymeB タンパク質の蓄積量、さらに GranzymeB mRNA の発現上昇に影響しなかった。

一方、Jurkat 細胞にメチル水銀を曝露すると、メチル水銀の曝露濃度および時間依存的な ERK1/2, p38 MAPK および JNK の活性化が認められた。これらシグナルの活性化がメチル水銀による Perforin-GranzymeB 経路の活性化に関与するか検討したところ、メチル水銀による Perforin および Granzyme B タンパク質の分泌は ERK1/2, p38 MAPK および JNK 阻害剤により抑制された。しかしながら、Granzyme B mRNA の誘導は ERK1/2 および p38 MAPK 阻害剤により抑制されたが、JNK 阻害剤による影響は認められなかった。

MAPK を活性化し得る受容体 EGFR は、チロシンホスファターゼ PTP1B によりその活性化が負に制御されている。PTP1B は 1,2-Naphthoquinone などの求電子性物質により阻害されること、それにより EGFR が活性化することが報告されている^{4,5)}ことから、Jurkat 細胞においても EGFR/PTP1B 経路はメチル水銀の作用点となり得ると考えられる。Jurkat 細胞において、メチル水銀による EGFR の活性化と細胞内 PTP1B の酵素活性について検討したところ、メチル水銀による経時的な EGFR の活性化が認められ、事実、EGFR 阻害剤はメチル水銀による培地中への Perforin および GranzymeB タンパク質の蓄

積増加や GranzymeB mRNA の発現誘導を抑制した。このとき、Jurkat 細胞における細胞内 PTP1B 活性はメチル水銀の濃度依存的に阻害された。

さらに、EGFR と MAPK 経路の相互関係について検討した結果、EGFR 阻害剤はメチル水銀による ERK1/2 および p38 MAPK の活性化を抑制したが、JNK の活性化には影響しなかった。

4. 考察

以上の結果より、第一に、Jurkat 細胞において、メチル水銀は Perforin-GranzymeB 経路を活性化することが示された。特に、Perforin タンパク質の分泌の増加は転写後の異常によるのに対し、GranzymeB の発現上昇は遺伝子レベルで誘導されることが示唆された。第二に、Jurkat 細胞におけるメチル水銀による Perforin-GranzymeB 経路の活性化の制御機構は、従来の PI3K/Akt 経路というより、EGFR/MAPK 経路によって介在されることが示された。特に、Perforin 分泌は、メチル水銀による EGFR の活性化とその下流である全ての MAPK の活性化が関与することが明らかとなった。一方、GranzymeB はメチル水銀が EGFR/ERK および p38 MAPK 経路を活性化することで、遺伝子レベルから発現上昇し、タンパク質の分泌に一部 JNK の活性化が関与していることが明らかとなった。さらに、これは求電子性を有するメチル水銀の PTP1B への化学修飾を介した酵素活性阻害を起点とし、メチル水銀による EGFR/MAPK シグナルの活性化を介して、Perforin-GranzymeB 経路の活性化に伴う細胞傷害を惹起することが示唆された。

本研究成果より、小脳顆粒細胞層に浸潤した細胞傷害性 T リンパ球がメチル水銀に刺激され EGFR/MAPK シグナルが活性化される結果、Peforin-GranzymeB 経路を活性化することで顆粒細胞のアポトーシスが増大し、顆粒細胞層の大規模な炎症性傷害に繋がる可能性が示唆された。

水俣病発症のメカニズムについて、従前より中枢神経系におけるメチル水銀の毒性発現機構に関する研究が盛んに行われてきた。しかしながら、メチル水銀の中枢神経に対する感受性の差異だけでは水俣病患者における脳の局所的な傷害についての分子メカニズムを説明するには至らなかった。本研究により、小脳顆粒細胞層における重篤な傷害はメチル水銀の神経細胞に対する直接的な作用だけでなく、細胞傷害性 T リンパ球などの炎症性変化をもたらす細胞が小脳に炎症性変化を引き起こすことで顆粒細胞層の傷害を拡大し、大きな影響を与えると示唆された。本研究成果は、水俣病患者における小脳顆粒細胞特異的な傷害性の分子メカニズムを理解する上で大変重要な知見である。

引用文献

- 1) Eto K, Yasutake A, Kuwana T, Korogi Y, Akima M, Shimozeki T, Tokunaga H, Kaneko Y. *Toxicol. Pathol.*, 29, 565-573. 2001
- 2) Nandagopal N, Ali AK, Komal AK, Lee SH. *Front Immunol.* 2014; 5: 187.,2014
- 3) Makrigiannis AP, Hoskin DW. *J Immunol.* Nov 15;159(10):4700-7.1997
- 4) Iwamoto N, Sumi D, Ishii T, Uchida K, Cho AK, Froines JR, Kumagai Y. *J Biol Chem.* 2007 Nov 16;282(46):33396-404.
- 5) Beei C, Iwamoto N, Inaba T, Shinkai Y, Kumagai Y. *J Toxicol Sci.* 2013;38(5):793-7.

システイン代謝酵素によるメチル水銀毒性制御に関する研究

○秋山雅博、鵜木隆光、熊谷嘉人（筑波大学医学医療系）

1. これまでの研究背景

生活環境中には多種多様な反応性の高い化学物質が存在し、その曝露および摂取による健康リスクが危惧されている。メチル水銀（MeHg）は環境中親電子物質の一つであり、分子中に電子密度の低い（親電子性）部位を有するため、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、被修飾タンパク質の担う細胞機能が破綻すると共に、細胞内のレドックスバランスが崩れ、これらが MeHg による毒性発現の主因と考えられている。一方、MeHg はイオウ含有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。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¹、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 1）。

近年、我々は MeHg 曝露ラットおよびマウス臓器中から、MeHg の新規代謝物の一つとして MeHg のイオウ付加体であるビス MeHg スルフィド $[(\text{MeHg})_2\text{S}]$ を同定し、本代謝物中のイオウ原子の由来がシステイン（CysSH）や GSH に、さらにイオウ原子が付加したシステインパーサスルフィド（CysSSH）やグルタチオンパーサスルフィド（GSSH）などの活性イオウ分子であることを報告した^{2,3}。親電子性を有さない $(\text{MeHg})_2\text{S}$ は、MeHg よりも遥かに毒性が低いことから、活性イオウ分子は MeHg の不活性化に関与する因子と考えられた（図 1）。

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、システイン代謝酵素である cystathionine γ -lyase（CSE）がシスチンを基質として CysSSH を産生し、その可動性イオウ原子が転移した GSSH などの活性イ

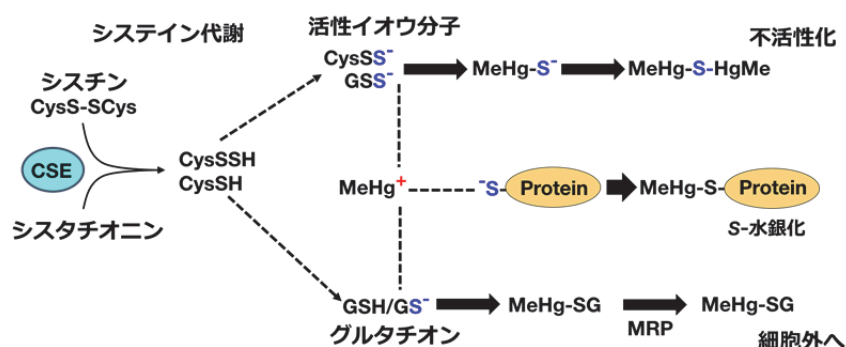


図1. CSEを介したシステイン代謝とメチル水銀毒性との関係

イオウ分子の産生に寄与する酵素であることを発見した⁴。さらに、我々はこれまでに CSE が欠損すると (MeHg)₂S は殆ど生成されないことから、個体レベルでの (MeHg)₂S 生成に CSE が重要な役割を演じている事を見出した²。

2. 作業仮説と先行研究成果

CSE は低い基質特異性を有する酵素として知られ、シスタチオニンを基質とする際は CysSH を産生し、シスチンを基質とした際は CysSSH を産生する。CysSH は GSH 合成の律速アミノ酸であることから、CSE によるシステイン代謝は生体内での GSH および CysSSH を介した活性イオウ分子の産生に重要であることが想定された。また、先行研究において、CSE 欠損マウスが MeHg 曝露に対し、野生型に比べ高い感受性を示すことを見出した。

これらの知見は、CSE による CysSH、GSH およびそれに係る活性イオウ分子の産生が、(MeHg)₂S や MeHg-SG の解毒代謝物形成を介して、MeHg 曝露に対して保護的役割を果たしていることを示唆した。以上より、CSE を介したシステイン代謝が生体内の活性イオウ分子を含むイオウ含有求核低分子量の維持に重要な役割を有し、その生体内量が MeHg 毒性防御制御における重要な要因であるという作業仮説を立てた。

3. 研究成果

親電子プローブを用いた LC-MS による安定同位体希釈法にて、野生型および CSE 欠損マウスの肝臓、腎臓、小脳での活性イオウ分子を含むイオウ含有求核低分子量を測定した。その結果、CSE 欠損により肝臓や腎臓では CysSH や GSH 量の減少と共に、それぞれの活性イオウ分子である CysSSH や GSSH 量の低下が見られた。しかし、小脳では野生型と CSE 欠損マウス間でのイオウ含硫求核低分子量に

殆ど差は見られなかった。これらの結果から、CSE を介したシステイン代謝は、少なくとも肝臓や腎臓における GSH や活性イオウ分子量の維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

さらに、裏取り実験を行うために、我々は CAG プロモーターの下流で CSE を発現させるトランスジェニックマウス (CSE 高発現マウス) を作製した。得られた CSE 高発現マウスは各臓器で高い CSE タンパク質量を示した。ところが、各臓器中の CysSH、GSH、CysSSH および GSSH 量は、野生型のそれらと比べて殆ど変化は見られず、血漿中 CysSSH および GSSH 量のみ有意に高値を示した。このことは、臓器中の CSE 高発現によって過剰に産生した活性イオウ分子が血漿中に排泄される可能性を示唆している。そこで、マウス初代肝細胞のイオウ含有求核低分子の細胞内濃度を経時的に調べた結果、CSE 高発現の CysSH、GSH、CysSSH および GSSH 量は野生型のそれらと比べ大差ないものの、CysSSH および GSSH の細胞外 (培地中) 濃度は顕著に増加していた。また、当初予想された活性イオウ分子量の増加に伴う還元ストレスも観察されなかった。

4. 考察および今後の展望

CSE の発現レベルは肝臓および腎臓では高いが、脳では低いことが報告されている⁵。活性イオウ分子産生酵素として、CSE の他に cystathionine β -synthase や 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase が知られており、中枢神経系に豊富であることが報告されている⁶⁻⁸。これらのことから、野生型マウスと比較して CSE 欠損マウスでは肝臓および腎臓における活性イオウ分子量は低値を示し、脳内の活性イオウ分子量の大幅な変動はみられないことが推測された。この仮説と一致して、CSE 欠損が肝臓および腎臓におけ

る活性イオウ分子量を低下させるのに対して、小脳における活性イオウ分子量の有為な低下は認められなかった。

本研究において、CSEの欠損はCysSHの生体内レベルの低下に伴い、GSH、CysSSHおよびGSSHの産生もすることが示唆された。このようなイオウ含有求核低分子の減少がMeHg-SG付加体および(MeHg)₂S産生低下を生じて、MeHg曝露に対する感受性を上昇させる一因であることが考えられた。

マウスにCSEを高発現すると、CSEタンパク質レベルは何れの臓器においても顕著な増加が見られるにも係わらず、臓器中活性イオウ分子濃度は野生型のそれと同様に保たれており、代わりに血漿中活性イオウ分子濃度は増加することが明らかとなった。さらにマウス初代肝細胞を用いた検討より、当該細胞内活性イオウ分子濃度が野生型とCSE高発現で殆ど変わらない理由が、余剰に産生された活性イオウ分子を細胞外に効率よく排泄するシステムが存在し、それにより細胞内濃度が厳密に保たれていることが示唆された。活性イオウ分子は、その高い求核性・抗酸化性から細胞内に高濃度蓄積するとレドックスバランスが還元より傾き、毒性を示す可能性がある。そのため、生体（細胞）は余剰なRSSによる細胞内の還元ストレスを回避するために、細胞外へと積極的に放出するシステムを有していることが考えられる。

今後の展望として、活性イオウ分子の細胞内濃度を厳密に制御し、還元ストレスの回避

に係る輸送システム（**RE**active **S**ulfur **S**pecies **E**fflux **T**ransporter, **RESSET**）の実態を明らかにし、そのMeHg毒性防御における活性イオウ分子の役割をさらに検討する予定である。

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. Abiko Y, Yoshida E, Ishii I et al. Involvement of reactive persulfides in biological bismethylmercury sulfide formation. *Chem Res Toxicol* 2015; 28: 1301-1306.
3. 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.
4. 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.
5. Ishii I, Akahoshi N, Yu XN et al. Murine cystathionine gamma-lyase: Complete cDNA and genomic sequences, promoter activity, tissue distribution and developmental expression. *Biochem J* 2004; 381: 113-123.
6. Guo W, Kan JT, Cheng ZY et al. Hydrogen sulfide as an endogenous modulator in mitochondria and mitochondria dysfunction. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 878052, doi: 10.1155/2012/878052.
7. Martin GR, McKnight GW, Dicay MS et al. Hydrogen sulphide synthesis in the rat and mouse gastrointestinal tract. *Digest Liver Dis* 2010; 42: 103-109.
8. Zhao H, Chan SJ, Ng YK et al. Brain 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3mst): Cellular localization and downregulation after acute stroke. *Plos One* 2013; 8: e67322, doi: 10.1371/journal.pone.0067322.

胎児期における低濃度メチル水銀曝露が出生時体重に及ぼす影響

○龍田希（秋田大学）、黒川修行（宮城教育大学）、仲井邦彦（東北大学）、岩井美幸（国立環境研究所）、佐藤洋（東北大学）、村田勝敬（秋田大学）

1. 背景

海外における先行研究により、ポリ塩化ビフェニール (PCB) などの難分解性有機汚染物質やメチル水銀などの重金属による胎児期曝露が出生児の発達に影響を及ぼすことが報告されている。出生時体重への影響に焦点を絞った場合、ヨーロッパで進められている 12 のコホート調査結果をメタ分析した報告によると、7,900 人以上の母子を対象とし、低濃度の PCB 曝露は出生時体重に負の影響を及ぼすことが報告されている¹⁾。メチル水銀については、胎児の発育との間に負の影響を報告した論文もある²⁾一方で、その影響が観察されないとする報告もあり³⁾、一貫した結果が得られていない。鉛曝露についても出生時体重に影響を及ぼすとする報告⁴⁾と及ぼさないとする報告⁵⁾が混在している。

海外の先行研究に比較すると、日本人の PCB やメチル水銀、鉛の曝露レベルは決して高いものではないものの、近年では、その曝露レベルが低濃度であっても健康影響が報告されている。そこで、日本人の曝露レベルにおける胎児期曝露が出生児の発達に及ぼす影響を検証することを目的とし、平成 13 年より出生コホート調査 (Tohoku Study of Child Development, TSCD)⁶⁾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、中核都市のコホート調査の出生時体重について報告する。

2. 方法

2-1. 調査対象者

TSCD の中核都市の調査では、平成 13 年 1 月から平成 15 年 9 月の間に同意が得られた 687 名の妊婦より同意を得て、a) 妊娠期間が

37-42 週であること、b) 妊娠期間が 36 週の場合には、出生体重が 2,500g 以上であること、c) 出生児の出生体重が 2,400 g 以上であること等の登録基準に該当した 599 組の母親と出生児を最終的に登録した。

2-2. 調査内容

出生時体重、在胎週数、子どもの性別、出生順位、出産時の母親年齢、母親の身長及び妊娠前体重については、カルテから転載した。妊娠中の喫煙および飲酒の習慣については出産後に自記式質問票により情報収集した。妊娠中の魚摂取量は、Food Frequency Questionnaire (FFQ) を用いて訓練を受けた検査者により調査した。

2-3. 生体試料及びその分析方法

曝露レベルを測定するために臍帯血を用いた。臍帯血全血の総水銀および鉛は原子吸光度法、臍帯血 PCB は高分解能ガスクロマトグラフ質量分析で測定した。

2-4. 統計学的解析

曝露指標は、対数変換後の値を解析に使用した。出生時体重と曝露指標との関連性は相関係数 (Pearson の積率相関係数) から検討した。出生時体重に影響を与える要因を検討するために、強制投入法による重回帰分析を行った。統計処理には、SPSS version 22.0 を使用し、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

出生体重、曝露指標、交絡要因に関するデータの揃った 489 組 (男児 252 組、女児 238

組)の母子を解析の対象とした。対象母子の基本属性を表1、曝露レベルを表2に示す。

出生体重についてみると、男児と女児の間に有意な差異が認められ、男児の方が女児に比べると重かった($p=0.003$) (表1)。そのため、以下の解析については、男児と女児を層別して行った。なお、子どもの性別以外の要因や、曝露指標については、男女間に差異は認められなかった(表1)。

3-2. 曝露指標と出生時体重との関連性

曝露指標と出生時体重との関連性をPearsonの積率相関係数から検討した(表3)。その結果、臍帯血総PCBについては、男児も女児も出生体重との間に負の相関が認められた。臍帯血総水銀については、男児においてのみ負の相関が示されたものの、女児については相関が確認されなかった。鉛については、対象児の性別に関係なく、統計学的な相関は認められなかった。

3-3. 出生時体重に影響を与える要因

次に、出生時体重を従属変数、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)。交絡要因には、妊娠前のBMI、妊娠中の魚摂取量、妊娠中の喫煙/飲酒歴、在胎週数、出生順位とした。その結果、単相関分析の結果同様、臍帯血総PCBについては子どもの性別に関係なく負の関連性が認められた。臍帯血総水銀についてみると、男児においてのみ負の関連性が認められたが、女児については関連性が観察されなかった。臍帯血鉛については、いずれの性別においても出生時体重との間に統計学的な関連性は認められなかった。

4. 考察

PCBの曝露影響としては、出生時体重との間に負の関連性が示された。抄録中では、総PCBの結果を示したが、PCBの指標として用い

られることの多いPCB-153や、高塩素PCB(9CBs)でも同様の結果が得られており、海外で行われたメタ解析の結果と概ね一致した。一方、メチル水銀については、男児においてのみ出生体重との間に負の関連性が認められた。男児においてのみ影響が観察されたメカニズムについては不明であるものの、海外の先行研究にはメチル水銀曝露が男児の発達に負の影響を報告した研究^{7,8)}もあり、男児のほうで感受性が高いと考えられた。鉛については、出生体重との間に関連性が認められなかった。

TSCDでは、主に精神神経発達を指標とするコホート調査として設計したため、出生時の体重が2,400g以上であることを登録基準とした。低体重児では化学物質曝露以外に未知の要因の影響が大きいと考えたためであるが、低体重の子どもを対象外としているにもかかわらず、PCBや水銀との間に負の関連性が認められた。出生時の体重はのちの成長や発達にも影響を及ぼすことが考えられるため、今後もこの子どもたちの発達を追跡し、メチル水銀曝露の健康リスクを明らかにすることが必要と考えられた。

引用文献

- 1) Govarts E, et al: Birth Weight and Prenatal Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE): A Meta-analysis within 12 European Birth Cohorts. *Environ Health Perspect.* 120(2):162-170, 2012.
- 2) Foldspang A and Hansen JC: Dietary intake of methylmercury as a correlate of gestational length and birth weight among newborns in Greenland. *Am J Epidemiol* 132:310-7, 1999.
- 3) Ramirez GB, et al: The Tagum Study I: analysis and clinical correlates of mercury in maternal and cord blood, breast milk, meconium, and infants' hair. *Pediatrics* 106: 774-81, 2000.
- 4) Zhu M, et al: Maternal low-level lead exposure and fetal growth. *Environ Health Perspect* 118: 1471-5, 2010.
- 5) Taylor CM, et al: Low level lead exposure and pregnancy outcomes in an observational birth cohort

study: dose-response relationships. BMC Res Notes 9: 291, 2016.

6) 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.

7) Davidson PW, et al: Longitudinal neurodevelopmental study of Seychellois children following in utero exposure to methylmercury from maternal fish ingestion: outcomes at 19 and 29 months. Neurotoxicology 16(4), 677-688, 1995.

8) Myers GJ, et al: Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. Lancet 361(9370), 1686-1692, 2003.

表1 対象母子の基本属性

	男児 (n=252)	女児 (n=237)	p値 ^a
	Mean±SD, median(5-95%tile), n(%)	Mean±SD, median(5-95%tile), n(%)	
母親の基本属性			
出産時の母親年齢	31.5 ± 4.3	31.3 ± 4.4	0.497
妊娠前BMI (kg/m ²)	21.0 ± 2.4	20.9 ± 3.3	0.906
妊娠中魚摂取量 (g/day)	51.6 (13.1-109.2)	53.6 (12.2-131.4)	0.201
妊娠中の喫煙歴 (有, %)	17 (6.7)	20 (8.4)	0.499
妊娠中の飲酒歴 (有, %)	82 (32.5)	73 (30.8)	0.698
対象児の基本属性			
在胎週数 (週)	39.5 ± 1.3	39.6 ± 1.2	0.516
出生順位 (第一子, %)	131 (52.0)	122 (51.5)	0.742
出生時体重 (g)	3126 ± 353	3036 ± 314	0.003

^a t検定, Mann-Whitney U検定, Fisher正確確率検定によるp値

表2 臍帯血の曝露指標

	男児 (n=252)	女児 (n=237)	p値 ^a
	中央値, (5-95%tile)	中央値, (5-95%tile)	
臍帯血総PCB (ng/g-lipid)	49.4 (16.3 - 118.6)	44.6 (19.6 - 107.5)	0.170
臍帯血総水銀 (ng/g)	10.2 (4.5 - 23.8)	9.9 (4.0 - 21.4)	0.669
臍帯血鉛 (μg/dL)	1.0 (0.6 - 1.7)	1.0 (0.5 - 1.7)	0.252

^a Mann-Whitney U検定によるp値

表3 出生時体重との単相関分析

	男児 (n=252)		女児 (n=237)	
	r 値	p 値	r 値	p 値
臍帯血総PCB	-0.252	< 0.001	-0.170	0.009
臍帯血総水銀	-0.130	0.039	-0.023	0.720
臍帯血鉛	-0.025	0.698	-0.030	0.642

いずれの指標も対数変換後の値を用いた。

表4 出生体重に影響を及ぼす要因 (重回帰分析)

	男児 (n=252)		女児 (n=237)	
	標準化β	p 値	標準化β	p 値
臍帯血総PCB	-0.179	0.003	-0.158	0.014
臍帯血総水銀	-0.118	0.045	-0.044	0.477
臍帯血鉛	0.023	0.689	-0.038	0.521
調整済R ²	0.231	< 0.001	0.170	< 0.001

独立変数: 妊娠前BMI、妊娠中の魚摂取量、妊娠中の喫煙歴/飲酒歴、在胎週数、出生順位

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。