

令和元年6月17日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02972

研究課題名(和文) 鯨・マグロ類多食集団における高濃度メチル水銀曝露のリスク評価と生体防御機構

研究課題名(英文) The risk assessment and biological defense mechanism for high methylmercury exposure group eating whale and tuna

研究代表者

中村 政明 (Nakamura, Masaaki)

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・部長

研究者番号：50399672

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：太地町の成人で明らかなメチル水銀による健康影響が見られなかった原因を明らかにするために、血球水銀濃度と関連性のある蛋白質の検出を試みた。二次元電気泳動の結果、3つの候補蛋白質(ApoE、TTR、adiponectin)が得られた。ELISAで血球水銀濃度との関連性を調べたところ、TTRと有意な正の相関およびadiponectinと負の相関がみられた。また、メチル水銀曝露による小児発達への影響調査を行い、133例のデータを取得した。現在、臍帯メチル水銀濃度(胎児期のメチル水銀曝露の指標)および毛髪水銀濃度(小児期のメチル水銀曝露の指標)と神経発達指標の関連性を解析している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、公害や農薬による人工的な汚染と通常の魚食とを区別されないまま、魚食を通じたメチル水銀摂取のリスク評価がなされてきた。太地町の調査で通常の魚食摂取による高濃度の水銀曝露による成人の健康影響が見られなかったが、その理由を解明することで、日本人の食生活で重要な位置を占める魚食の安全性に対するクワイテリアの確立およびメチル水銀の毒性軽減の手掛かりが得られることが期待される。また、メチル水銀曝露による小児発達に及ぼす影響は結論がでていないが、今回の小児検診によりメチル水銀曝露が小児発達に及ぼす影響が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Since the apparent health effect by clear methylmercury (MeHg) was not seen by adult population in Taiji-cho, we tried detection of serum proteins correlated with blood cell mercury concentration. The three candidate proteins (ApoE, TTR, adiponectin) were obtained as a result of two-dimensional electrophoresis. When relevance between the concentration of blood cell mercury and these proteins was investigated by ELISA, serum TTR concentrations were significant positive associated with blood cell mercury concentrations and serum adiponectin concentrations were negative associated with blood cell mercury concentrations. Moreover, we conducted influence investigation to the child development by MeHg exposure, and acquired the data of 133 examples. Now, we have been analyzing the association between umbilical cord MeHg concentration (index of prenatal MeHg exposure of an embryo term) or hair mercury concentration (index of postnatal MeHg exposure) and a neuronal development index.

研究分野：脳神経内科

キーワード：メチル水銀 健康影響 小児発達 生体防御機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトのメチル水銀の主な曝露源は魚介類であり、また魚介類に含まれる総水銀の殆どはメチル水銀であると推定されている。メチル水銀は消化管から高率(95~100%)に吸収され、血液脳関門を通過して中枢神経系にも侵入し、水俣病で見られた高濃度のメチル水銀曝露は神経細胞の変性・脱落を引き起こし、感覚障害、小脳失調、視野・聴覚障害などの神経症状を呈した。申請者らは、これまでに日本国内で約3万人の毛髪水銀濃度を調べ(男性平均:2.5 ppm;女性平均:1.6 ppm)、体内の水銀濃度が魚介類の摂取量だけでなくその種類に依存することを確認している。つまりメチル水銀は、水中生態系食物連鎖により、イワシやアジ等の小型の魚と比べて大型の肉食魚や歯クジラなどの海棲哺乳類に多く蓄積する傾向にある。和歌山県東牟婁郡太地町は伝統的に捕鯨を主要産業としており、食文化として鯨肉食が根づいている地域であることから、高濃度メチル水銀曝露集団と考えられる(申請者が平成22年に太地町住民(724名)を対象に毛髪水銀濃度を測定したところ、男性平均値は9.86 ppm、女性平均値は6.22 ppmで日本の平均値より高く、WHOクライテリアの神経症状の可能性が否定できない50ppmを超える方が12名含まれていた)。メチル水銀の毒性は中枢神経系に対する影響が最も典型的であることが知られているため(WHO環境保健クライテリア(EHC)101)、申請者ら平成22年度と23年度に神経内科学的検診(194名:男117名、女77名)を行ったところ、年齢と有意な相関を認める神経症候はあったが、毛髪水銀濃度と有意に相関する神経症候は認められなかった(Nakamura et al., Environ Int. 68: 25-32, 2014)。

また、水俣病では、母親に症状が全くないか、あっても軽度であるにもかかわらず、脳性麻痺様の症状を示す胎児性水俣病が発生したことから、メチル水銀は脳の発達期にある胎児に特に感受性が高いことが知られている。メチル水銀による小児の神経発達影響に関して、1980年代後半よりセイシェル(母親の毛髪水銀濃度:0.5~26.7 ppm)およびフェロー諸島(母親の毛髪水銀濃度:0.2~39.1 ppm)で生まれた子供が追跡調査されているが、相反する結果が得られている。

2. 研究の目的

本研究では、これまで申請者らが高濃度メチル水銀曝露集団の一つと考えられる太地町で実施した詳細な神経内科学的検診で成人へのメチル水銀の健康影響がみられなかった原因を明らかにすることを目的とする。

また、メチル水銀は脳の発達期にある胎児に特に感受性が高いことが知られている。これまで、1980年代後半よりセイシェルおよびフェロー諸島で生まれた子供の追跡調査が行われているが、相反する結果で結論が出ていないため、太地町および近隣地域(那智勝浦町)においてメチル水銀曝露による小児発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 成人へのメチル水銀の健康影響がみられなかった原因の解明

成人の健康調査で明らかな健康影響が見られなかった理由を明らかにするために、神経内科検診を受けた153名の血球を用いてセレン以外のメチル水銀毒性に対する防御機構を検討する。メチル水銀毒性に対する防御機構に関与している蛋白質は血球水銀濃度と関連が見られる可能性があるため、所有している太地町住民の血漿(153サンプル)のうち、メチル水銀の生体内動態に影響を及ぼし得る因子(糖尿病、高血圧、癌、喫煙などを持つ人)のない毛髪水銀高値の(男性2名・女性2名)と低値(男性2名・女性2名)の血漿を用いて、二次元電気泳動を用いたプロテオミクス解析を行った。血漿サンプルの夾雑タンパク質の除去処理を行った後に二次元電気泳動を行った。泳動後のゲルは、全タンパク質検出用蛍光染色剤(SYPRO Ruby protein gel stain, S21900, Thermo Fisher Scientific Inc.)を用いて染色し、蛍光スキャナを用いてイメージを保存した。得られた蛍光染色像のtiffイメージファイルをImageMaster Platinum(GE)にインポートし、数値化解析を行った。スポット濃度平均値が毛髪水銀高値群と低値群で1.5倍以上であるスポットを血球水銀濃度と沿相関が考えられる候補蛋白質としてリストアップした。リストアップしたスポットについて統計学的手法を用いて有意性を検定(t検定)し、 $P < 0.2$ のスポットを最終的な候補蛋白質とした。候補蛋白質の同定は、質量分析装置を用いて行った。さらに、ELISA法を用いて、太地町住民120名の血漿中の候補蛋白質の濃度を測定し、血球水銀濃度との関連性をSpearman順位相関係数の検定を用いて解析した。

(2) メチル水銀曝露による小児発達への影響調査

太地町・串本町・那智勝浦町の小学校1年生を対象に以下の項目について、影響調を行った。胎児期のメチル水銀曝露の指標として保存臍帯組織中のメチル水銀濃度を、現在のメチル水銀曝露の指標として毛髪水銀濃度を測定した。メチル水銀の曝露源を推測するために食事調査を行った。小児発達の評価として、WISC知能検査(全検査IQ:一般的な知的発達の水準を把握するもの;言語性IQ:音声処理過程の能力を測定する指標;動作性IQ:運動処理過程の能力を測定する指標)、注意力の検査であるCPT(Continuous Performance Test)、読字検査、追跡眼球運動、聴性脳幹反応(Auditory Brain-stem Response: ABR)、

視覚誘発電位 (Visual evoked potentials: VEP)、色覚検査を行った。

4. 研究成果

(1) 成人へのメチル水銀の健康影響がみられなかった原因の解明

所有している太地町住民の血漿のうち、メチル水銀の生体内動態に影響を及ぼし得る因子(糖尿病、高血圧、癌、喫煙などを持つ人)のない血漿水銀高値の(男性2名・女性2名)と低値(男性2名・女性2名)の血漿を用いて二次元電気泳動を行った。毛髪水銀高値群と低値群でスポット濃度平均値の検体間変動差が1.5倍以上であるスポットをタンパク質同定候補としてリストアップした(図1, 2)。リストアップしたスポットについてt検定を行い、最終的に $P < 0.2$ のスポットを選定し、質量分析装置を用いて蛋白質同定を行った(表1)。

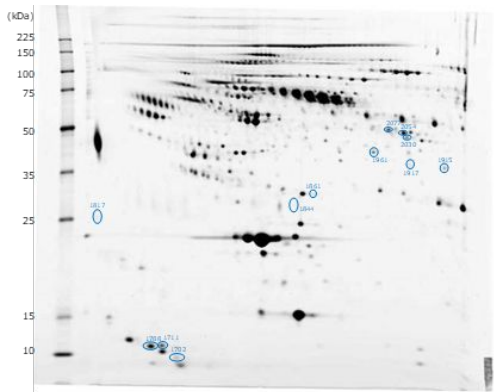


図1: 群間平均値の差が1.5倍以上のスポット (毛髪水銀低値群>高値群)

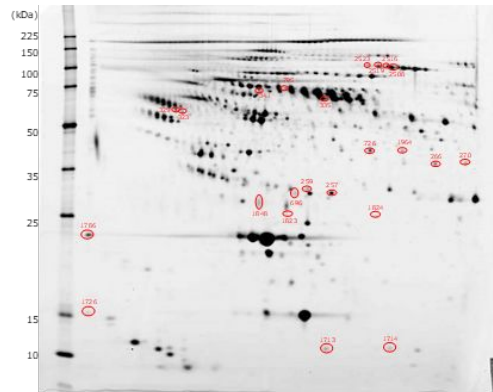


図2: 群間平均値の差が1.5倍以上のスポット (毛髪水銀高値群>低値群)

サンプル名		同定方法	Mowse Score	ペプチド マッチ数	同定結果 (一般名称)
通し番号	Group ID				
L1	1547	MSMS Ion serch	151	5	Complement component C7
L5	1861	MSMS Ion serch	51	3	Apolipoprotein E
L7	1817	MSMS Ion serch	63	2	Apolipoprotein F
L10	1702	MSMS Ion serch	100	1	Apolipoprotein C-III
L14	1708	MSMS Ion serch	113	1	Apolipoprotein C-III
H3	341	MSMS Ion serch	160	6	Alpha-1B-glycoprotein
H5	1786	MSMS Ion serch	72	4	Apolipoprotein A-1
H9	1726	MSMS Ion serch	68	1	Transthyretin
H10	1714	MSMS Ion serch	72	2	Serum amyloid A protein
H11	2519	MSMS Ion serch	65	3	Complement component C7
		MSMS Ion serch	51	3	Complement factor B
H12	1713	MSMS Ion serch	75	2	Serum amyloid A
H14	2523	MSMS Ion serch	60	2	Complement component C7
H17	1848	MSMS Ion serch	128	2	Adiponectin
H22	2516	MSMS Ion serch	134	5	Complement component C7

表1: 質量分析装置による蛋白質同定

L: 血球水銀濃度と負の関連が考えられる蛋白質

H: 血球水銀濃度と正の関連が考えられる蛋白質

これらの中から、下記の理由で、3個の候補蛋白質に絞った。

ApoE: ApoEは水銀毒性を促進するという報告がある。

TTR: TTRはSH基を有するため、メチル水銀と反応する可能性がある。

adiponectin: 抗酸化作用を有するため、メチル水銀毒性軽減に関与する可能性がある。

次に、ELISA法を用いて、太地町住民120名の血漿中のApoE、TTR、Adiponectinの濃度を測定し、血球水銀濃度との関連性を検討したところ、図3に示すように、TTRと有意な正の相関およびadiponectinと有意な負の相関がみられた。

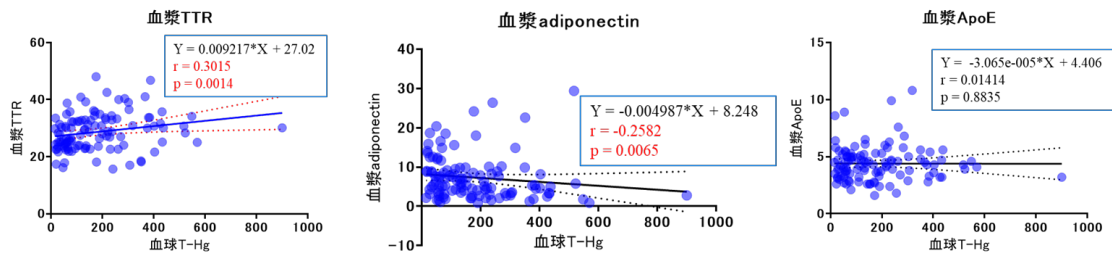


図3：血漿水銀濃度とApoE、TTR、Adiponectinとの関連性

現在、in vitro の系で TTR および adiponectin の水銀毒性への効果について検証を行っているところである。

(2) メチル水銀曝露による小児発達への影響調査

和歌山県紀南地区（太地町・那智勝浦町・串本町）の小学校1年生を対象にメチル水銀曝露による小児発達への影響調査を行い、最終的に対象児133名（男児：66名；女児：67名）の協力が得られた。胎児期のメチル水銀曝露の指標として臍帯（以下、保存臍帯）中メチル水銀濃度を、小児期のメチル水銀曝露の指標として毛髪水銀濃度を用いた。また、メチル水銀の曝露源を推定するために食事調査を実施した。小児発達の指標として、神経心理検査：WISC-III 知能検査・ボストンネーミング検査・読字検査・持続処理課題（CPT）、神経生理検査：聴性脳幹反応（ABR）、視覚誘発電位（VEP）、色覚検査を実施した。

[1] 胎児期のメチル水銀曝露

秋田大学の村田らが秋田県・鳥取県の7歳児に行った保存臍帯中メチル水銀濃度（n=136）と比較して有意に高く（p=0.0007）、紀南地区では胎児期に多くのメチル水銀に曝露していると考えられた（表2）。

[2] 現在（小児期）のメチル水銀曝露

国立水俣病総合研究センターが行った全国調査から抽出した7-8歳児の毛髪水銀濃度（n=805）と比較して、紀南地区では有意に高く（p<0.001）、紀南地区では小児期に多くのメチル水銀に曝露していると考えられた（表3）。

	紀南地区	秋田&鳥取
総数	133	136
中央値 (ppm)	0.12	0.09
最小値 (ppm)	0.02	0.02
最大値 (ppm)	0.80	0.37
5, 95 percentile (ppm)	0.04, 0.41	0.02, 0.27

表2：和歌山紀南地区の保存臍帯中メチル水銀濃度

	紀南地区	全国
総数	133	805
中央値 (ppm)	2.90	1.65
最小値 (ppm)	0.60	0.26
最大値 (ppm)	43.60	15.9
5, 95 percentile (ppm)	0.97, 10.60	0.61, 4.11

表3：和歌山紀南地区の毛髪水銀濃度

[3] 母親の妊娠期と現在のメチル水銀曝露の検討

保存臍帯中メチル水銀濃度から推定される母親の妊娠期の毛髪水銀濃度と現在の毛髪水銀濃度との間に有意な相関（p<0.0001）がみられたことから、妊娠期と現在では魚介類の摂取に大きな変化がないことが推定された。

[4] 対象児の胎児期と現在のメチル水銀曝露の関連の検討

保存臍帯中メチル水銀濃度と対象児の現在の小児の毛髪水銀濃度との間に有意な相関（p<0.0001）がみられたことから、胎児期と現在ではメチル水銀曝露の状況に大きな変化がないことが推定された。

[5] 食事調査によるメチル水銀曝露源の推定

毛髪水銀値とクジラの摂取量に関する関連について、太地町住民は高い正の相関が認められた（n=29, $r=0.71$, $P<0.0001$ ）。那智勝浦町住民において相関は認められなかった（n=77, $r=0.17$, $P=0.151$ ）。太地町の小児においてはクジラの多食がメチル水銀への曝露量の増加につながっていると考えられた。

毛髪水銀値とマグロの摂取量に関する関連について解析した結果、太地町（n=29, $r=0.21$, $P=0.279$ ）、那智勝浦町（n=77, $r=0.36$, $P=0.001$ ）であり、那智勝浦町の小児におけるメチル水銀への曝露量の増加は主にマグロを多食することによるものと考えられた。

[6] 胎児期・小児期のメチル水銀曝露と小児発達指標との関連性の検討

1. 神経心理検査のうち、WISC-III 知能検査、BNT 検査、読字検査では胎児期および

小児期のメチル水銀曝露による影響はみられなかった。
2. CPT では、小児期のメチル水銀曝露は男児で低い成績（注意欠如・多動症）が、女児にはむしろ高い成績（課題の処理速度の向上）が得られた。
3. 神経生理検査のうち、色覚は胎児期および小児期のメチル水銀曝露による影響はみられなかった。
4. ABR の結果から、小児期のメチル水銀曝露は生後 2 歳頃までかかる上部脳幹（脳幹～間脳）の髄鞘化に若干の影響を与えている可能性が考えられた。
5. VEP の結果から、女児は男児に比べて胎児期のメチル水銀曝露と N145 潜時の間に負の関連傾向がみられた（発達障害の一つである自閉スペクトラム症では、障害の程度と N145 潜時が正の相関が見られることが知られており、フェロー諸島の結果では、胎児期曝露と N145 潜時の間に正の関連がみられた）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yamamoto M, Itatani M, Nakamura M, Koriyama C, Sakamoto M. Associations between mercury levels in hair and fish consumption among children in the south area of Wakayama Prefecture, Japan. 58th Annual Meeting of Society of Toxicology 2019

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ: <http://nimd.env.go.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：郡山 千早

ローマ字氏名：Koriyama Chihaya

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 30274814

研究分担者氏名：坂本 峰至

ローマ字氏名：Sakamoto Mineshi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：60344420

研究分担者氏名：植田 光晴

ローマ字氏名：Ueda Mitsuharu

所属研究機関名：熊本大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：60452885

研究分担者氏名：山元 恵

ローマ字氏名：Yamamoto Megumi

所属研究機関名：国立水俣病総合研究センター

部局名：その他部局等

職名：部長

研究者番号（8桁）：70344421

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。