

平成21年5月13日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209022

研究課題名（和文） セレン欠乏は胎児期メチル水銀曝露の影響を増悪するか？

研究課題名（英文） Does selenium deficiency deteriorate the effects of methylmercury exposure?

研究代表者 佐藤 洋 (SATOHI HIROSHI)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 40125571

研究成果の概要：

メチル水銀(MeHg)は強い神経毒性を持ち、感受性の高い胎児への影響が懸念されている。本研究では、水銀の毒性を軽減する Se に着目し、Se の栄養状態が胎児期 MeHg 曝露の生後の発達への影響をどう修飾するか、充足状態と欠乏状態とを比較し、その交絡作用を動物実験で神経行動学的側面および遺伝子発現の観点から明らかにすることを目的とした。実験群は、MeHg(as Hg)を 0 または 1ppm とし、Se 充足または Se 欠乏群で、2つの条件の組み合わせで4群設定した。行動観察の結果、43 週齢頃より Se 欠乏群でマウス歩行時に後肢に跛行のある個体が観察された。また Se 充足群に比較して Se 欠乏群の水銀蓄積濃度が著しく低かった。さらに水銀の分別定量を行ったところ、総水銀に占める MeHg 割合はほとんどの臓器で 90%以上となり、無機化はほとんど起きていなかった。Se 欠乏群でみられた後肢跛行との関係を考えると、Se 欠乏下ではより低濃度のメチル水銀曝露でも影響がみられる可能性を示唆した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2007 年度	10,600,000	3,180,000	13,780,000
2008 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
総計	37,400,000	11,220,000	48,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：環境中毒、交絡作用

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀は、強い神経毒性をもち、特に感受性の高い胎児への影響が懸念されている。水銀は微量ながら、自然界に存在し、微生物の作用によってメチル化される。生成されるメチル水銀量は僅かで環境中の濃度も低いが、生態系の食物連鎖の中で高位の魚介

類は、生物濃縮によってメチル水銀を蓄積する。したがって、魚介類を食する集団はメチル水銀の曝露を受けることになる。体内に入ったメチル水銀は、胎盤を容易に通過し、さらに血液脳関門を通過ののち胎児脳へ移行し、毒性をもたらすと考えられている。

そこで、メチル水銀の胎児期曝露の生後の

発達におよぼす影響への懸念から、世界の数カ所で人集団を対象とした疫学調査が行われてきた。代表的な二つの調査にフェロー諸島とセイシェル共和国で行われたものがあるが、結果が異なってしまった。その原因は不詳であるが、低濃度曝露の影響が、種々の交絡要因で修飾された可能性が指摘されている。現状の魚介類摂取を通じたメチル水銀曝露は低濃度であり、それだけ他の要因の修飾作用を受けやすいと考えられる。したがって、交絡要因の検討を抜きにメチル水銀の影響評価は困難である。その候補として、PCB等の他の環境汚染物質や胎児期曝露時の栄養から生後の環境まで、様々なものが考えられる。本研究では、水銀化合物との交絡作用の知られているセレンに注目した。セレンは必須微量元素として知られ、種々の抗酸化作用に関与している。成獣を用いた動物実験で、セレンとメチル水銀の同時投与した場合、メチル水銀の神経毒性が緩和されることが報告されている。その他、メチル水銀の無機化の促進作用も指摘されている。セレン欠乏下での研究はあまり見られないが、セレンの抗酸化作用やメチル水銀の無機化作用が減少あるいは抑制されるとすれば、メチル水銀の神経毒性を増強することが予測される。

2. 研究の目的

そこで、セレンの栄養状態が胎児期メチル水銀曝露の生後の発達への影響をどう修飾するか、充足状態と欠乏状態とを比較し、その交絡作用を動物実験で明らかにすることを本研究では目的とした。第1実験では、セレン欠乏と充足およびメチル水銀曝露の有無が出生後の仔の発達について、神経行動学的側面から検討した。第2実験では、セレン欠乏と充足の状況下にメチル水銀の微量曝露があった場合、どのような遺伝子に影響が観察されるか網羅的に探索した。

3. 研究の方法

(1) 第1実験

① ばく露群

近交系マウス C57BL/6 の雌を用いて、8週齢から4週間、MeHg0、1ppm含有の餌(as Hg)により飼育し、その後非曝露の雄を用いて交配し仔を得た。出産後、仔の数を6-8匹に揃え、3週間で離乳した。妊娠中、授乳中、さらに離乳後も仔に同一の餌を与えた。実験

群は MeHg と Se との組み合わせで、1) Se 充足/MeHg0ppm、2) Se 充足/MeHg1ppm、3) Se 欠乏/MeHg0ppm、4) Se 欠乏/MeHg1ppm の4つを設定した。Se 欠乏群を作成するため、全ての餌は Se 含有量が少ないトルーラ酵母を使用し、必要に応じて亜 Se 酸ナトリウムを用いて Se 濃度 0.4 ppm とした。仔が 12 週齢、67 週齢にて行動解析を実施した。餌中 Se 濃度の実測値は、未添加餌で 28.1 ± 4.7 ppb (Mean \pm SD, n=8)、添加餌で 404.3 ± 33.5 ppb (n=7) であった。

② 行動解析

行動解析は 12 および 67 週齢時に実施した。Open field test は、50 cm 四方の白い箱に真上から白熱灯により照射し、そこにマウスを投入、2 分間の行動を録画し解析した。

Se 欠乏群では 43 週齢頃より、マウスの歩行に違和感を感じるようになった。ラットでは MeHg 曝露で hind limb crossing が発生し、そのうち麻痺に到ることが報告されているが、そのような典型的な limb crossing ではなく、歩行時に跛行し、著しい場合には足の甲を引きずって後肢を前に出し、次第に体重を支えられなくなるせいか腰が落ち、ついには腹部を地面に擦りながら移動するようになった。そこで観察者 3 名を指定し、実験条件を隠して無作為にマウスの歩行を観察させ、その様子を 4 段階で評価した。各段階は、- : 正常、+/- : どちらかという跛行様の違和感を感じる、+ : 明らかな跛行、++ : 明らかな跛行と腰の下降、+++ : 腰がさらに下降し腹部を地面に接触させて移動、とした。3 名の観察者でスコアが異なる場合は多数決でスコアを決定し、跛行発生の推移を見る際は+以上を「跛行」と分類した。

③ 化学分析

○総水銀測定:均質化した試料(湿重量として 0.2-0.5g 程度)を試験管底部にとり秤量した。次いで、蒸留水 1ml、HNO₃-HClO₄(1+1)2ml および H₂SO₄5ml を順次加え、200-230°C で灰化し、放冷後水を加え定容し試験溶液とした。試験溶液に 10%SnCl₂ を加え反応させ、発生する水銀蒸気を Hg-201(三双製作所)にて検出した(還元気化原子吸光光度法)。

○メチル水銀測定:均質化した試料(湿重量として 0.2-0.5g 程度)を遠沈管底部にとり秤量した。1N KOH-エタノール 10ml を加え、100°C

の恒温槽で加熱した。冷後、HCl,ヘキサンを順次加え、上層を除去した。EDTA 溶液、ジチゾン溶液加えトルエン層に抽出した。その後アルカリ性硫化ソーダに転溶させたのち、再度ジチゾンで再抽出を行った。できた試験溶液はECD-ガスクロマトグラフィー(Yanako社)にて測定した。

○セレン測定：試料(0.1g程度)を秤量し、試験管にいれ、 $\text{HNO}_3\text{-HClO}_4(2+1)$ を加え、湿式灰化した。その後HClを添加したのち、2,3-ジアミノナフタレン(2,3-DAN)を加えた。酸性条件下でシクロヘキサンに転溶し蛍光強度をSpectraMax M2 (Molecular Device社)にて測定した(Watkinson法)。

(2) 第2実験

① ばく露群

近交系マウスC57BL/6の雄を用いて、4週齢から4週間、セレン欠乏あるいは充足の餌にて飼育した。8週齢時に塩化メチル水銀を1mg/kg体重(as Hg)を経口強制投与した。対照群には、DMSOをメチル水銀曝露と同量になるように投与した。実験群はMeHgとSeとの組み合わせで、1) Se充足/MeHg0ppm、2) Se充足/MeHg1ppm、3) Se欠乏/MeHg0ppm、4) Se欠乏/MeHg1ppmの4つを設定した。曝露直後、8時間後、24時間後に屠殺し解剖した。断頭後、脳分割を行い、海馬を採取した。採取した海馬は、すぐにRNAlater(QIAgen社)に浸した。処理後の組織は、RNA抽出まで -80°C にて凍結保存した。

② 遺伝子発現解析

曝露24時間後の海馬からRNAをQIAgen社のキットを使用し抽出した。抽出したRNAは、Nanodrop(Thermo Fisher Scientific社)にて量を測定し、Bioanalyzer2100(Agilent社)にて品質を確認した。その後、蛍光標識cRNAを調製(1色蛍光法)し、Whole Mouse Genome(G4122F, Agilent社、遺伝子数：約 $44,000 \times 4/\text{slide}$)アレイを使用した。スキャニングは、DNAマイクロアレイスキャナ(Agilent社)を用い画像化を行った。その後、GeneSpringGX10(Agilent社)にて、データ解析を行った。パスウェイ解析にはインジェヌイティープラスウェイアナリシス(Tomy Digital Biology社)を使用した。

4. 研究成果

(1) 第1実験

① 行動解析

67週齢時の平均体重(SD)は、(1) Se充足/MeHg0ppm 52.1(7.6)g、(2) Se充足/MeHg1ppm 51.5(5)g、(3) Se欠乏/MeHg0ppm 27.9(3.6)g、(4) Se欠乏/MeHg1ppm 28.1(7.2)gであった($n=6-23$)。

神経行動学的試験のOpen field testの結果、12週齢では雄雌ともにMeHg曝露の有無に関係なく、糞および尿の数がSe欠乏の群で増加し、Se欠の影響が少なからず観察されたものと考えられる。また移動距離、移動速度は、12週および67週齢での有意な相違は観察されなかった。一方、67週齢のSe欠乏群で潜時が著しく短縮したがMeHg曝露による相違は観察されなかった。

跛行発生については、71週齢の段階でSe充足群では発生がみられなかったものの、Se欠乏/MeHg(-)で23匹中2匹、Se欠乏/MeHg(+)で19匹中12匹であった。Se欠乏群内でMeHgの有無で比較すると統計学的に有意な差が観察された($p<0.001$)。

② 水銀とセレン

出生後79週の脳内総水銀濃度(Mean \pm SD, $n=4-6$)は、Se充足/MeHg1ppm 1357 \pm 386ng/g、Se欠乏/MeHg1ppm 363 \pm 91 ng/gであった。Se充足およびSe欠乏のMeHg0ppmでは、水銀はほとんど検出されなかった。また脳内のメチル水銀濃度は、Se充足/MeHg1ppm 1291 \pm 398ng/g、Se欠乏/MeHg1ppm 358 \pm 93ng/gとなった。これより脳内の総水銀に占めるメチル水銀の平均割合は、Se充足/MeHg1ppm 95%、Se欠乏/MeHg1ppm 99%となり、そのほとんどがメチル水銀であることが明らかとなった。またSe充足/MeHg1ppmとSe欠乏/MeHg1ppmを比較すると、Se欠乏の方が水銀濃度は低く、これは他のどの臓器においても同じ傾向を示した(図1)。また脳内の水銀とセレンのモル比についてはセレン充足群の方が、MeHg:Seのモル比が低下した(図2)。

これらの結果から、Seがメチル水銀の蓄積に何らかの影響を与え、Se存在下ではメチル水銀の排泄が抑制されている可能性が考えられた。しかしながら、Se欠乏下のMeHg曝露ではメチル水銀濃度がSe充足群よりも低いにも関わらず、後肢の跛行様症状が観察さ

れた。Se が欠乏することで MeHg の毒性はより低濃度でも観察される可能性があり、セレン欠乏下においてメチル水銀曝露があった場合、どのような遺伝子に影響を与えるか検証するため第2 実験を実施した。

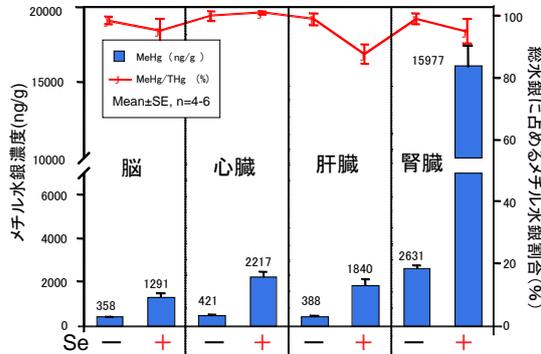


図 1. 79 週齢時のメチル水銀濃度とその割合

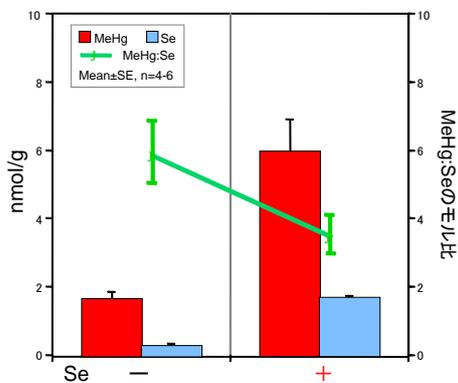


図 2. 79 週齢脳のメチル水銀とセレンのモル比

(2) 第2 実験

4 週齢より Se 充足および欠乏餌にて 4 週間飼育し、MeHg 曝露時の 8 週齢の平均体重(SD) は、Se 充足で 24.3(1.2)g、Se 欠乏で 24.1(1.0)g であった(n=64-66)。群間に有為な差は観察されなかった。

遺伝子発現解析時の Quality として生データの最低シグナル値を全てのアレイで 10 以上とし、かつ全てのアレイにおいて Present あるいは Marginal である遺伝子を採用した。また曝露の有無により 2 群間の比較を行い 5%水準で有意に異なった遺伝子を解析に用いた。各群 n=3-4 とし、別個体とした。その結果、メチル水銀曝露 24 時間後に Se 欠乏群で 2 倍以上変動した遺伝子は 167genes、1.5 倍以上は 1282genes であった。また Se 充足群では 2 倍以上変動した遺伝子は 152genes、1.5 倍以上は 1114genes であった。

変動遺伝子数でみるとそれほど大きな違いはみられないが、両群で変動した遺伝子についてベン図を書くと、共通に変動している遺伝子は約半分あった。これはセレンの有無に関わらず、メチル水銀曝露によって変動する遺伝子と考えられた。一方、セレンの有無によって、約半分の遺伝子が異なる変動を示した。これらは、セレンの有無によってメチル水銀曝露の応答が異なり、メチル水銀曝露でセレンの関与する遺伝子であると推察された (図 3)。

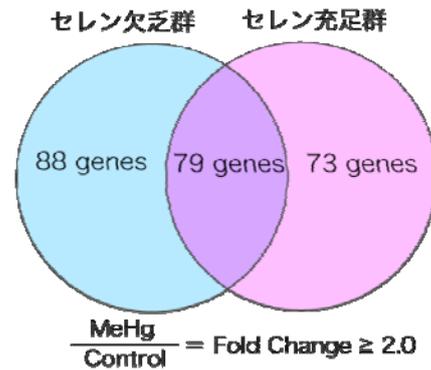


図 3. セレン欠乏とセレン充足群でメチル水銀曝露によって変動する遺伝子のベン図

これらの遺伝子の機能についてまだ解析段階であるが傾向として、Cellular Development や Nervous System Development and Function といったカテゴリーがセレン欠乏および充足群で共通していた。一方、セレン欠乏群でのみ変動した遺伝子をみると炎症や損傷反応に関わる遺伝子群が特徴的であった。しかしながら、これらの解析はまだ断片的なものであり、今後さらなる解析が必要と考えられた。

本研究結果は、Se がメチル水銀の蓄積に何らかの影響を与えている可能性を示唆した。しかしながら、Se 欠乏下のメチル水銀曝露では、メチル水銀濃度が Se 充足群よりも低いにも関わらず、後肢の跛行様症状が観察した。Se が欠乏することでメチル水銀の毒性は、より低濃度でも観察される可能性があり、セレン欠乏下のメチル水銀毒性の発現およびセレン充足下のメチル水銀毒性の緩和について、セレンとメチル水銀の蓄積動態といった視点から今後研究を進める必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Sugawara N, Ohba T, Nakai K, Kakita A, Nakamura T, Suzuki K, Kameo S, Shimada M, Kurokawa N, Satoh C, Satoh H. Effects of perinatal coexposure to methylmercury and polychlorinated biphenyls on neurobehavioral development in mice. Archives of Toxicology 2008, 82(6): 387-397 (査読あり).

② Kameo S, Shimada M, Sugawara N, Murata-Mizukami S, Ohba T, Nakai K, Iwahashi, H, Satoh H. Effects of perinatal exposure to methylmercury and/or polychlorinated biphenyls on mouse neurobehavioral development and analysis of gene expression in the brain. Organohalogen Compounds, 2007, 69: 1813-1816 (査読あり).

③ Sugawara N, Nakai K, Nakamura T, Ohba T, Suzuki K, Kameo S, Satoh C, Satoh H. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to polychlorinated biphenyls in mice. Archives of Toxicology 2006, 80(5): p286-292 (査読あり).

[学会発表] (計1件)

① 島田美幸, 仲井邦彦, 亀尾聡美, 櫻井梢, 佐藤智恵子, 黒川修行, 佐藤洋. セレン欠乏下の長期メチル水銀ばく露マウスにおける臓器内水銀蓄積量, 第79回日本衛生学会, O-109, 2009年3月30日, 東京.

[図書] (計2件)

① 島田美幸, 佐藤洋. 水銀. ミネラルの科学と最新応用技術, 糸川嘉則編. 株式会社シーエムシー出版: 東京, 2008; p349-358.

② 島田美幸, 佐藤洋. 1. メチル水銀. 食中毒予防必携第2版. 社団法人日本食品衛生協会: 東京, 2007; p336-342.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 洋 (SATOHI HIROSHI)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 40125571

(2) 研究分担者

仲井 邦彦 (NAKAI KUNIHICO)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 00291336

亀尾 聡美 (KAMEO SATOMI)
群馬大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40312558

黒川 修行 (KUROKAWA NAOYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30431505

佐藤 智恵子 (SATOHI CHIEKO)
東北大学・大学院医学系研究科・技術補佐員
研究者番号: 10374927

(3) 連携研究者

該当なし。

(4) 研究協力者

櫻井 梢 (SAKURAI KOZUE)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生
日本学術振興会特別研究員

島田 美幸 (SHIMADA MIYUKI)
東北大学・大学院医学系研究科・大学院生
日本学術振興会特別研究員