

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 10 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 21 年度 ～ 平成 24 年度

課題番号：21590657

研究課題名（和文） パーキンソン病発症への重金属の関与を探る疫学及び実験研究

研究課題名（英文） Epidemiologic and experimental study to clarify involvement of heavy metals in Parkinson's disease

研究代表者

福島 哲仁（FUKUSHIMA TETSUHIITO）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：90208942

研究成果の概要（和文）：

中国における患者対照研究による血中と尿中の重金属を比較した結果から、鉄と銅の過度の摂取、マンガンの蓄積、摂取におけるビタミン E と銅のアンバランス、さらに亜鉛欠乏によるビタミン B₁₂ 減少が、パーキンソン病の発症要因として関連し合っていることが示唆された。

一方、ドーパミン作動性ニューロンの培養実験結果から、マンガンによってニコチンアミドメチル化酵素活性が亢進し、脳内のメチルニコチンアミドが増加することによって神経細胞死が引き起こされる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

From the results of the case-control study in China comparing concentrations of metals and vitamins in blood and urine, excessive intake of iron and copper, accumulation of manganese, vitamin E/copper imbalance in intake, and vitamin B₁₂ decrease by zinc deficiency in the body might be involved in the etiology of Parkinson's disease.

Our experimental study using Mouse CD1 brain striatum neuronal cells suggests the possibility that manganese causes increased nicotinamide N-methyltransferase activity, thereby increasing 1-methylnicotinamide levels in the brain and bringing about neuron death.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：予防医学

1. 研究開始当初の背景

双子の研究により、高齢で発症するパーキンソン病（PD）への遺伝的関与は少ないことが知られている。一方 1-methyl-4-phenyl

-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)によって、人工的に PD を発症することが発見されて以来、自然界の MPTP 類似物質の探索が精力的に行われてきた。しかし、PD の有病率は難病と

しては極めて高く、先進諸国では、今や高齢者に普通に見られる「老人病」の一種と考える方が適当と思われるくらい多い疾患である。特殊な化学物質ではなく、だれもが曝露する可能性のあるごくありふれたものに原因を求めるといふ発想の転換が必要であろう。我々は、PD の発症要因としてビタミンの一種であるナイアシン（ニコチンアミド（NA）とニコチン酸の総称）に注目し、ナイアシンの摂取量との関係を疫学研究で、体内におけるナイアシンの代謝（メチル化）の影響を動物実験にて追求してきた。その結果、日本と中国において、ナイアシン低摂取地域では、PD の有病率や年齢調整死亡率が低いという事実が浮かび上がってきた。また、動物実験において、NA が体内でメチル化されてできる 1-methylnicotinamide (MNA) が、脳内のミトコンドリア呼吸鎖酵素複合体 complex I を介してラジカルを産生し、ミトコンドリアを傷害すること、また、ラットの中脳黒質に微量の MNA を注入すると、線条体のドーパミン含有量が低下することがわかり、生体内における MNA の神経毒性が明らかとなった。NA の神経毒性については、海外の研究者も認める報告を行っている。

一方、中国における我々のこれまでの疫学研究結果から、PD 患者の血清マンガンと鉄の濃度がコントロールと比較して有意に高いことが明らかとなった。血清銅、亜鉛濃度は差が認められなかった。これら重金属の食品からの摂取には差が明確ではなく、飲料水等からの摂取量の違いが疑われた。

2. 研究の目的

マンガン中毒によって PD 様症状を呈することが知られているが、その発現メカニズムはよくわかっていない。これまでに我々は、マンガン及び鉄とナイアシン代謝との関係を動物実験にて調べ、マンガンと鉄が、NA をメチル化する酵素である nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) 活性に促進的に作用することを示した。

これらの結果をもとに、「マンガン及び鉄の高摂取により、体内の NNMT 活性が亢進し、生成した MNA が脳内ミトコンドリアで活性酸素を産生し、神経細胞を傷害する」という仮説を立て、疫学研究と実験研究の両面から検証した。

3. 研究の方法

<疫学研究>

研究対象者は、中国湖北襄樊市第一人民医院の外来を受診した、発症 2 年以内のパーキンソン病患者と、脳神経疾患を伴わない性年齢を一致させた人間ドック受診者である。早朝に血液および尿を採取し、金属及びビタミンを測定した。

<実験研究>

MNA とその前駆物質である NA による神経毒性は、Mouse Brain Striatum Neuronal Cells (MS cells) を用い、MNA と NA の濃度を変えて培養し、MTT assay で生存率を測定した。マンガンが NNMT 活性に及ぼす影響は、MS cells をマンガンの濃度を変えて培養し、生存率を測定するとともに、その培養液中の MNA 量を測定した。また、マウス大脳サイトゾール分画を酵素液とし、マンガンの濃度を変えて、産生した MNA 量の違いを比較した。

4. 研究成果

<疫学研究>

血清鉄、全血マンガン、尿中鉄および銅のレベルは、コントロールより PD 患者において有意に高かった。

Table 1. Concentration of metals and vitamins in blood and metals in urine

	Control	PD	p value
Blood			
Fe	1.44±0.77	1.95±0.85	< 0.001
Cu	1.03±0.22	0.99±0.31	0.418
Zn	1.08±0.48	1.06±0.46	0.822
Mn	1.61±0.69	2.50±2.29	0.002
Vit E	0.88±0.33	0.83±0.31	0.279
Vit E/Cu	91.45±45.67	91.84±44.40	0.959
Vit B ₁₂	360.86±264.92	411.25±245.30	0.242
Urine			
Fe	218±190	318±271	0.012
Cu	18.1±13.0	24.1±14.9	0.011
Zn	0.78±1.01	0.80±1.09	0.917
Mn	7.18±7.28	5.42±5.90	0.116
Vit E/Cu	6753±4323	4395±2759	<0.001

Each value is the mean and standard deviation. Fe, Cu, Zn: micrograms/milliliter (serum); Mn: micrograms/deciliter (whole-blood); Vit E: milligrams/deciliter (serum); Vit B₁₂: pictograms/ milliliter (serum); Fe, Mn, Cu: micrograms/liter (urine); Zn: milligrams/liter (urine). Vit E/Cu in "Blood" is serum Vit E/serum Cu. Vit E/Cu in "Urine" is serum Vit E/urine Cu. PD=Parkinson's disease patient; Vit=Vitamin.

PD 患者の血清と尿の鉄は有意な正の相関を示した。

Table 2. Correlations of each metal between blood and urine concentrations in the subjects

	Total	Control	PD
Fe	0.320**	0.226	0.310**
Cu	0.050	0.068	0.066
Zn	-0.111	-0.120	-0.102
Mn	-0.030	-0.152	0.063

**p<0.01.

血清ビタミン E/尿中銅比率は、PD 患者においてコントロールより有意に低かった。血清ビタミン E は、PD 患者において血清銅と負の相関があり、尿中銅と正の相関があった。

Table 3. Correlations between vitamin E and each metal in blood and urine in the subjects

	Total	Control	PD
Blood			
Fe	-0.185*	-0.187	-0.147
Cu	-0.207*	-0.070	-0.330**
Zn	0.000	-0.075	0.078
Mn	-0.178*	0.044	-0.256*
Urine			
Fe	0.121	0.058	0.212
Cu	0.101	0.005	0.235*
Zn	-0.097	-0.133	-0.061
Mn	0.005	-0.029	0.020

*p<0.05, **p<0.01.

血清ビタミン B₁₂ は、PD 患者では、血清亜鉛と正の相関、コントロールでは、尿中亜鉛と負の相関が認められた。

Table 4. Correlations between vitamin B₁₂ and each metal in blood and urine in the subjects

	Total	Control	PD
Blood			
Fe	0.078	0.053	0.050
Cu	0.069	0.173	0.004
Zn	0.229**	0.151	0.323**
Mn	0.060	0.243*	-0.024
Urine			
Fe	0.087	0.128	0.026
Cu	0.058	0.037	0.039
Zn	-0.217**	-0.306**	-0.134
Mn	-0.132	-0.095	-0.156

*p<0.05, **p<0.01.

以上の結果から、鉄と銅の過度の摂取、マンガンの蓄積、摂取におけるビタミン E と Cu のアンバランス、さらに亜鉛欠乏によるビタミン B₁₂ 減少が、PD の要因として関連し合っているものと思われた。

<実験研究>

MNA を 10mM 加えて培養すると、control と比較して有意に細胞生存率が下がった。NA を加えて培養すると生存率が低下する傾向にあった。

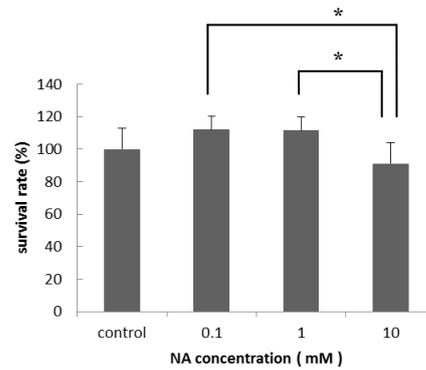
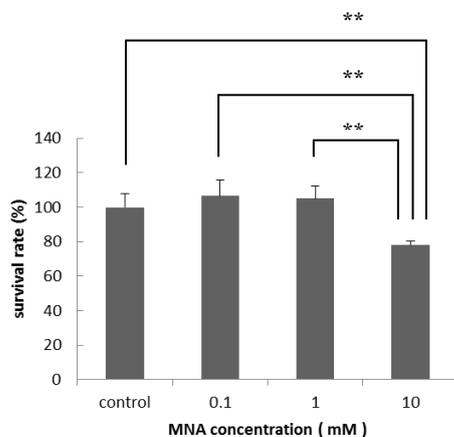


Fig.1 The effect of MNA and NA on MS cell survival. Survival rate is shown as a percentage of the control. Data are presented as the mean ±SD(n=6). ** represent significant difference at p<0.01, respectively between groups. * represent significant difference at p<0.05, respectively between groups.

Mn 濃度を変えて培養した MS cells の生存率は、Mn 濃度が高くなるにつれ低下していたが、培養液中の MNA は、生存細胞数あたりの産生量が増加していた。

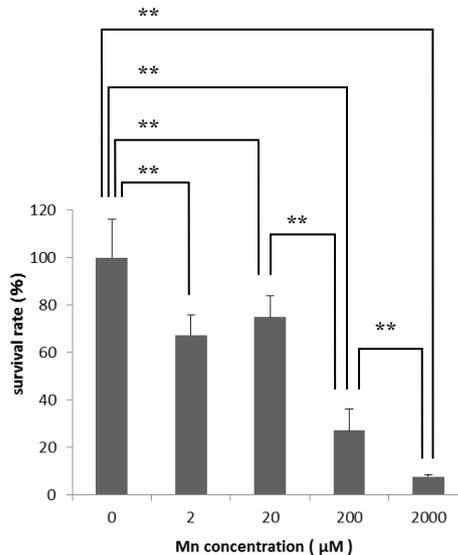


Fig.2 The effect of Mn on MS cell survival. Survival rate is shown as a percentage of the control. Data are presented as the mean ± SD (n=6). ** represent significant difference at

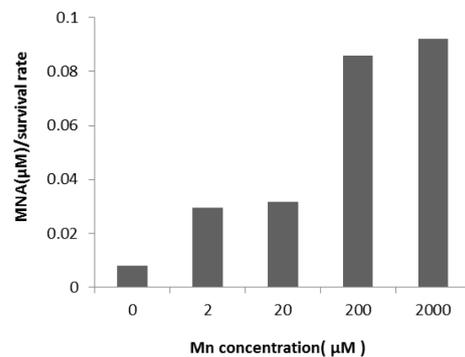


Fig.3 The amount of MNA in the culture medium on the 19th incubation day. Each value is expressed as $\mu\text{M}/\text{survival rate}$.

また、マウス大脳サイトゾール分画を酵素液とし、Mnの濃度を変えて、産生したMNA量の違いを比較して調べた実験では、 $1\mu\text{mol}/\text{mg protein}$ 以上のMn濃度でNNMT活性が亢進した。

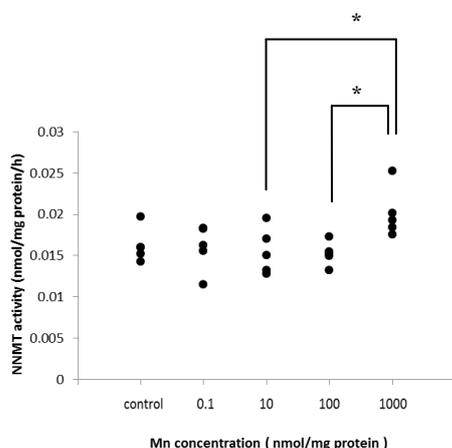


Fig.4 The effect of different Mn concentrations on NNMT activity. NNMT activity is shown as nmol/mg protein/h(n=5). Each value was plotted by each Mn concentration. * represent significant difference at $p < 0.05$, respectively between groups.

以上の結果からMnによってNNMT活性が亢進し、脳内のMNAが増加することによって神経細胞死が引き起こされる可能性が示唆された。MNAの産生増加にかかわるMnやNAは日常的に摂取されており、PD発症への関与が示唆された。

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4件)

Fukushima T. et al. Relationship between blood levels of heavy metals and Parkinson's disease in China. *Neuroepidemiology* 2010; 34: 18-24.

Fukushima T. et al. Serum Vitamins and Heavy Metals in Blood and Urine, and the Correlations among Them in Parkinson's Disease Patients in China. *Neuroepidemiology* 2011; 36: 240-244.

Fukushima T. et al. Nutritional effects on depressive symptoms in Parkinson's disease Patients. *e-SPEN Journal* 2012; 7: e64-e68.

Mori Y. et al. Toxic effects of nicotinamide methylation on mouse brain striatum neuronal cells and its relation to manganese. *Environ Health Prev Med* 2012; 17: 371-376.

[学会発表] (計1件)

Fukushima T. et al. Nutritional effects on depressive symptoms in Parkinson's disease patients. 16th Congress of the European Federation of Neurological Societies, 2012年9月10日, スtockホルム, スウェーデン

6. 研究組織

(1)研究代表者

福島 哲仁 (FUKUSHIMA TETSUHITO)
 福島県立医科大学・医学部・教授
 研究者番号: 90208942

(2)研究分担者

神田 秀幸 (KANDA HIDEYUKI)
 福島県立医科大学・医学部・講師
 研究者番号: 80294370

早川 岳人 (HAYAKAWA TAKEHITO)
 福島県立医科大学・医学部・准教授
 研究者番号: 50362918

(3)連携研究者

なし

研究協力者

譚 曉東 (TAN XIAODONG)
 武漢大学・公共衛生学院・教授

槍 濂鏢 (ZHANG JUNJIANG)
 武漢大学・医学院・教授

罗 韵文 (LUO YUNWEN)
 中国湖北襄樊市第一人民医院・教授