

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：87401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510085

研究課題名(和文) 発達期脳へのメチル水銀毒性に対する食物由来セレン化合物の抑制機構に関する研究

研究課題名(英文) Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat brain.

研究代表者

坂本 峰至 (Sakamoto, Mineshi)

国立水俣病総合研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：60344420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：セレンは必須微量元素で、水銀化合物の毒性防御作用が期待される本研究では、自然界に存在する毒性の低いセレンであるセレンメチオニンがラット新生仔の発達期の脳で直接メチル水銀の毒性を防御することを世界で初めて報告した(Env Sci & Tech 2013)。歯クジラ類は、比較的高濃度の水銀を体内に蓄積するが、無機化能力が高く、無機化された水銀は、非活性で無毒なセレン化水銀に変化し筋細胞内に残留していることが示唆された。捕鯨の町の住民の血液試料中の水銀とセレン濃度は有意な正の相関を示し、セレンが住民における水銀の毒性の防御の役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Selenium(Se) is an essential element and may play a role for the protection of MeHg toxicity. We have detected the protective effect of Se against neuronal degeneration induced by MeHg in the developing postnatal rat brain by using a postnatal model rat which is suitable to extrapolate the effects of MeHg in the fetus brain of human (Eco Tox Env Saf 2010). In tooth-whales, MeHg concentrations were positively associated with T-Hg concentrations. However, the MeHg concentrations appeared to reach a plateau. In all species of tooth-whales, Se/I-Hg molar ratio decreased with the increase in T-Hg concentrations, and eventually reached a constant ratio of 1 (Se:I-Hg=1:1). EPMA showed that Hg and Se in the bottlenose dolphin existed in the same place. Hg and Se in blood of inhabitants in a whaling town showed significant and positive correlations in both sexes. The increased Se in blood associated with the Hg level may play a role in protecting against MeHg toxicity in the inhabitants.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：メチル水銀 セレン 相互作用 歯クジラ 住民 水俣病 水俣湾ヘドロ

1. 研究開始当初の背景

(メチル水銀)MeHgは中枢神経毒性を有し、特に胎児の発達期脳は感受性が高いことが知られている。また、セレン(Se)は必須微量元素で自然界においてHgと共存し、海洋哺乳類の組織やその多食住民には共に高濃度で存在することから、その役割が注目されてきた。加えて、1970年代にSeがHg化合物の毒性発現抑制効果を持つことも知られるようになり多くの研究が行われてきた。しかし、無機Hgと異なり、MeHgの毒性に対するSeの抑制効果と機構については諸説あり十分には解明されていない(NRC, 2000)。最近のMeHgの影響に関する研究で、胎児期曝露の児の発達影響やIQの低下への危惧等が注目され(NRC, 2000; WHO, 2010)、次世代を担う児の脳をMeHgから守る研究の必要性が高まっている(IPCS WHO, 1990)。

水俣におけるMeHg中毒、いわゆる水俣病は胎児性を含む多くの患者を発生させ、海外からも高い注目を浴びた。一方、自然界でも歯鯨類は高濃度のMeHgを含み、鯨を食べる習慣のある住民や児にMeHg中毒症が出ているのでは?と昨今、大いにマスコミをにぎわせた。しかし、発症閾値と言われる50ppmを超える毛髪Hg濃度を示したマグロ釣り漁船員や100ppmを超える毛髪Hg濃度を示した例を含む鯨多食集団においても、水俣病にみられた症状は観察されず、今までに人為的汚染の無い自然界由来の魚介類等による水俣病様患者の報告は知られていない。すなわち、水俣病と自然界由来のMeHg曝露では背景にあるMeHg毒性発現に関する交絡因子に決定的な違いがある可能性が考えられる。その最も可能性が高いと推察されるのがSeである。更に、鯨肉には消化吸収されない不活性なセレン化水銀(HgSe)の存在も想定される。そこで、本研究では、動物実験に続き、鯨多食集団における血中HgとSeの相関に関する調査や鯨組織中のHgをHgSeを考慮に入れての化学形態別定量を行う。また、水俣病におけるMeHgとSeの挙動の特殊性を検討し、水俣病と自然界由来のMeHg曝露の対比により、MeHg毒性出現を左右するであろうSeの共存性や役割を総合的に解析する。

2. 研究の目的

- (1) 我々が開発した胎児性水俣病モデル・ラットは、ヒトの胎児期に相当する脳の発達段階でみられるMeHg投与による大脳皮質の広範な神経変性を確実に惹起する。このモデル・ラットを用い、脳神経細胞死を引き起こすレベルのMeHgに対する自然界の食物由来で、無機のSeより毒性が低くかつ中枢移行性が高いSe化合物のセレノ・メチオニン(SeMet)の抑制効果とその機序を検討する。
- (2) 続いて、妊娠マウスへの、脳神経細胞死は起こさないが、脳高次機能に影響の出る程度の、比較的低用量のMeHgの毒性

発現に対する、Seの抑制効果を検討する。

- (3) 一般住民において血液中HgとSeレベルは正の相関を持つことが知られている。本研究では、血中Hg濃度が高い和歌山県太地町住民の鯨類多食者集団において、Hg濃度に応じた血中Seレベルの上昇(相関)が観察されるのかを調査する。
- (4) これまで、魚介類や鯨類の水銀は総Hg、MeHg、無機Hgの化学形態別でしか測定されてこなかった。しかし、特に鯨類にはSeと強固に結合した不活性で消化吸収されないHgSeが多く含まれる可能性がある。鯨に含まれる水銀を、単純に消化吸収率90%以上のMeHgと約5%の無機Hgのみで分別定量を行って、その毒性を過大評価してしまう。そこで、太地町近海で捕獲された歯鯨数種において、筋肉部や臓器ごとにMeHg、無機Hgに加え、消化不能なHgSeを加え分別定量する。
- (5) 当研究センターのリサーチ・リソースバンクに保存されている水俣病症状を呈した猫の貴重なホルマリン保存臓器中のHgとSeを測定する。そして、非汚染地区の猫と比較し、水俣病発症時の猫の各組織中のHgとSeがバランスを持って存在していたのか、それともMeHgのみに突出して高く曝露されていたのか、歴史的な検証を試みる。

3. 研究の方法

- (1) 哺乳ラット(14日齢、雄)をコントロール、MeHg単独、SeMet単独、MeHg + SeMet同時投与の4群(10匹/群)に分けた。MeHg(8 mg Hg/kg/day)は当モデルシステインを含む50%コンデンストミルクを含む溶液として、SeMet(2 mg Se/kg/day)は水溶液として投与前に調整し、それぞれ10日間連続経口投与した。MeHg + SeMet群においては、SeMet投与30分後にMeHgを投与した。
- (2) 妊娠マウスに1. コントロール、2. メチル水銀(脳に神経変性を引き起こさないレベルの水銀として8 ppm)、3. セレン酵母(セレンとして2 ppmを餌自体に約0.65 ppmのSeを含む繁殖用飼料CE-3に添加)、4. メチル水銀とセレン酵母の双方を添加の4群を作成した。そして、それぞれの餌を妊娠初日から出産時まで与えた。出産後、通常飼料に切り替え、出産時、8日齢、22日齢、50日齢、GSH、GSH-Px、TrxRの低下と酸化物の生成が起こるかを再検証し、脳リン脂質のDHAやAAの含量の低下を確認する。
- (3) 一般住民において血液中HgとSeレベルは正の相関を持つことが知られている。本研究では、血中Hg濃度が高い和歌山県太地町住民の鯨類多食者集団において、Hg濃度に応じた血中Seレベルの上昇(相関)が観察されるのかを調査する。
- (4) クジラは2007-2008年に太地町沖

で捕獲された歯クジラ類の、スジイルカ (n=29)、マゴンドウ(n=30)、ハンドウイルカ (n=31)、ハナゴンドウ(n=31)の筋肉部で検討した。総水銀、メチル水銀の測定は試料に 5 倍容の蒸留水を加えてホモジナイズし、赤木らの方法に準じ、原子吸光法、ECD-ガスクロマトグラフィーで行なった。セレン測定は試料に 5 倍容の 2N-NaOH で 30 分間加熱した分解溶液で、ICP-MS で行った。ハンドウイルカ筋肉に関しては、電子線マイクロアナライザ (EPMA) 分析で水銀と Se の解析を行った。

- (5) 当研究センターのリサーチ・リソースバンクに保存されている水俣病症状を呈した猫の貴重なホルマリン保存臓器中の Hg と Se を測定する。そして、非汚染地区の猫と比較した。

4. 研究成果

- (1) 体重と肝重量減少が MeHg 及び SeMet 群でみられたが、双方の減少が混合曝露で抑制された。MeHg 単独に比べ Se 共存下で、大脳皮質で総水銀 (THg) 濃度が上昇し、Se 単独に比べ MeHg 共存下で大脳皮質 Se 濃度が上昇していた。大脳皮質において MeHg 群では神経変性、反応性アストロサイトの増殖及びグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性低下が起こったが混合曝露群では抑制されていた。SeMet による肝臓障害と考えられる肝萎縮、グルタチオン (GSH) 低下、GSH-Px 活性低下及び血漿 T-Bil 上昇は逆に MeHg 同時曝露により抑えられていた。以上の結果より、MeHg + SeMet 群の大脳中 Hg 濃度は MeHg 単独群より高いにもかかわらず、MeHg によって惹起される神経細胞死が SeMet によって抑えられていたことが分かり、Se の中枢での MeHg 毒性発現に対する抑制効果が初めて直接的に観察された。更に、SeMet による肝毒性は MeHg により抑えられており、それぞれの金属が相互に抑制的に働くことが認められた。これらより、MeHg・SeMet 同時投与では、MeHg と Se の非活性なコンプレックスが形成されお互いの毒性発現が抑制されることが示唆された。
- (2) 現在進行中の実験であるが、出産後の 22 日齢マウスにおいてメチル水銀群で TrxR の低下が確認された。一方、Se にその抑制効果は確認できなかった。
- (3) 太地町住民における血中水銀濃度は男が女より約 2 倍高かった。一方、Se 濃度は男女でほぼ同じであった。血中水銀濃度とセレン濃度は男女ともに正の相関を示した。
- (4) 4 種の歯クジラ類で、総水銀濃度が高くなるとメチル水銀含量も増加した。しかし、メチル水銀はある一定の濃度で増加が停止して保たれる傾向が見られ、総水銀

に占めるメチル水銀 (%) は総水銀濃度が高くなるにつれ急激に低下した。また、いずれの歯クジラ類でも総水銀濃度が高くなるにつれて急激に Se と無機水銀のモル比が低下し、1:1 に近づき一定となった。EPMA 分析では水銀とセレンが筋細胞内の筋細胞膜近接部に、ほぼ同じ場所に粒状に点在することが確認された。以上から、歯クジラ類特にバンドウイルカは、比較的高濃度の水銀を体内に蓄積するが、無機化能力が高く、無機化された水銀は、ヒトが食しても消化されない、非活性で無毒なセレン化水銀に変化し筋細胞内に残留していることが示唆された。

- (5) 水俣病は魚介類やクジラ類からのメチル水銀汚染という自然界での出来事と異なり、細川猫の脳、肝、腎臓への水銀の蓄積に見られるように Se の増加を伴っていなかった。そこで、水俣病は自然界での曝露と異なり Se の増加を伴わない、メチル水銀の突出した汚染で引き起こされた中毒であろうことが確認された。また、水俣湾埋め立て地に眠る高濃度水銀ヘドロに含有される水銀はその殆どが、容易には水や海水に溶出する可能性の低い、硫化物と結合した水銀と考えられる予備実験結果が得られた。

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 8 件)

Nakamura M, Hachiya N, Murata KY, Nakanishi I, Kondo T, Yasutake A, Miyamoto KI, Ser PH, Omi S, Furusawa H, Watanabe C, Usuki F, Sakamoto M. Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. *Environ Int*. 査読有. 2014 Mar 28;68C:25-32. doi: 10.1016/j.envint.2014.03.005.

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. *JAppl Toxicol*. 査読有. 2013 Nov 15. doi: 10.1002/jat.2954.

Sakamoto M, Yasutake A, Domingo JL, Chan HM, Kubota M, Murata K. Relationships between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord tissue: potential use as indicators for prenatal exposure. *Environ Int*. 査読有. 2013 Oct;60:106-11. doi: 10.1016/j.envint.2013.08.007.

Sakamoto M, Yasutake A, Kakita A, Ryufuku M, Chan HM, Yamamoto M,

Oumi S, Kobayashi S, Watanabe C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environ Sci Technol*. 査読有. 2013 Mar 19;47(6):2862-8. doi: 10.1021/es304226h.

Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kubota M, Murata K. Changes in body burden of mercury, lead, arsenic, cadmium and selenium in infants during early lactation in comparison with placental transfer. *Ecotoxicol Environ Saf*. 査読有. 2012 Oct;84:179-84. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.07.014.

7: Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kawakami S, Murata K. Mercury and docosahexaenoic acid levels in maternal and cord blood in relation to segmental maternal hair mercury concentrations at parturition. *Environ Int*. 査読有. 2012 Sep;44:112-7. doi: 10.1016/j.envint.2012.02.007.

8: Murata K, Yoshida M, Sakamoto M, Iwai-Shimada M, Yaginuma-Sakurai K, Tatsuta N, Iwata T, Karita K, Nakai K. Recent evidence from epidemiological studies on methylmercury toxicity. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 査読有. 2011 Sep;66(4):682-95. Review. https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjh/66/4/66_4_682/_article

Mahaffey KR, Sunderland EM, Chan HM, Choi AL, Grandjean P, Mariën K, Oken E, Sakamoto M, Schoeny R, Weihe P, Yan CH, Yasutake A. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev*. 査読有. 2011 Sep;69(9):493-508. doi: 10.1111/j.1753-4887.2011.00415.x.

[学会発表](計 16 件)

坂本峰至. メチル水銀の特異的経胎盤移行と胎児影響. 環境省「重金属等による健康影響に関する総合的研究」メチル水銀研究ミーティング 依頼講演, Dec 11, 2013. 東京.

Sakamoto M. Relationship between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord: Specificity of placental transfer of methylmercury. *Managing Mercury Pollution in 21st Century: bridging science and policy (NIMD-SETAC)*, Oct 6, 2013. Kumamoto city, Japan. 依頼講演.

Sakamoto M, Yasutake A, Iwasaki T, Yasunaga G, Fujise Y, Chan HM. Hg

speciation and Se concentrations in tooth-whale meats consumed in Taiji Town, Japan. The 11th International Conference on Mercury as a Global Pollutant (ICMGP), Aug 2, 2013. Edinburgh, Scotland.

Sakamoto M, Kakita A, Chan HM. Changes in methylmercury uptake into the brain at various growth phases from fetus to adult rats. The International Congress of Toxicology 2013, Jun 3 – Jul 4. Seoul, Korea.

Sakamoto M. Relationship between trace element concentrations in chorionic tissue of placenta and umbilical cord: Specificity of placental transfer of methylmercury. Mini-Symposium "Academic Conference on Heavy Metal Exposure during Human Life", Jun 28. Heavy Metal Exposure Environmental Health Center (Dong A University), Busan, Korea. 依頼講演.

Sakamoto M, Yasutake A, Chan HM, Domingo JL, Kubota M, Murata K. Element profiles of cord tissue and placenta and their usefulness as predictors of prenatal exposure to elements in ordinary Japanese population. The 5th International FESTEM Symposium on Trace Elements and Minerals, May 22-24. Avignon, France.

坂本峰至, 安武章, 村田勝敬. 胎児期曝露指標としての臍帯組織と胎盤の元素濃度. 第 82 回日本衛生学会総会. Mar 24-26, 2013. 石川県金沢市.

Sakamoto M, Yasutake A, Yamamoto M, Chan HM, Ryufuku M, Kakita A, Oumi S, Watanabe C. Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat brain. *Environmental Health*, Mar 3-6. Boston, USA.

坂本峰至. 胎児から成獣の各発達期に於けるラット脳へのメチル水銀取り込みの変化 (Time course changes in methylmercury uptake to the rat brain at various growth phases from fetus to adult.) フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー, Oct 25-26. 愛知県名古屋市.

Sakamoto M, Chan HM, Domingo JL, Kawakami S, Murata K. Mercury and DHA levels in maternal and cord blood in relation to segmental maternal hair mercury concentrations at parturition. NIMD and SETAC Asia/Pacific Joint Forum 2012, Sep 27-28. 熊本県水俣市.

Sakamoto M, Murata M, Domingo JL,

Kubota M, Chan HM. Significances of cord tissue and placenta to predict the metal exposure to fetuses. The 48th Congress of the European Societies of Toxicology. Jun 17-20, 2012. Stockholm, Sweden.

坂本峰至. 妊娠期の母親血、臍帯血のメチル水銀、DHA と毛髪断片水銀における関連. 第 82 回日本衛生学会総会. Mar 24-26, 2012. 京都府京都市.

Sakamoto M, Yasutake A, Yamamoto M, Chan HM, Kakita A, Oumi A, Watanabe C. Protective effecta of selenomethionine against methylmercury-induced neuronal degeneration in developing rat brain. Neurotoxicology Conference, Oct 30 – Nov 2, 2011. Research Triangle Park, NC, USA.

坂本峰至、安武章、山元恵、Chan HM、柿田明美、近江早苗、小林紗弥香、渡辺知保:ラット新生仔におけるメチル水銀とセレノメチオニンの毒性に対する相互防御効果. フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー, Oct 27-28. 石川県金沢市.

Sakamoto M, Murata K, Kubota M, Nakai K, Satoh H. Differences in heavy metal transfer from mother to child during gestation and lactation. The 47th Congress of the European Societies of Toxicology. Aug 28-31, 2011. Paris, France.

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. The 10th International conference on mercury as a global pollutant, Jul 24-28, 2011. Harifax, Canada.

[図書](計1件)

Sakamoto M, Murata K, Kakita A, Sasaki M. A review of mercury toxicity with special reference to methylmercur, in : Advances in Environmental Chemistry and Toxicology of Mercury (Cai Y, Liu G, O'Driscoll N eds.), Wiley-VCH (Weinheim), pp. 501-516 Chapter 15.

6. 研究組織

(1)研究代表者

坂本 峰至 (SAKAMOTO, Mineshi)
環境省 国立水俣病総合研究センター・国際・総合研究部及び環境・疫学研究部・部長

研究者番号 : 60344420

(2)研究分担者

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

丸本 倍美 (MARUMOTO, Masumi)
環境省 国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・主任研究員
研究者番号 : 00335506

安武 章 (Yasutake, Akira)
熊本大学・自然科学研究科・研究員
研究者番号 : 203474418

(3)連携研究者

山元 恵 (Yamamoto, Megumi)
環境省 国立水俣病総合研究センター・基礎研究部・室長
研究者番号 : 70344421