

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659325

研究課題名(和文)水銀高摂取集団における血中セレンの化学形態別分布に関する研究

研究課題名(英文)Chemical speciation of blood selenium in a population with high intake of mercury

研究代表者

渡辺 知保 (Watanabe, Chiho)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70220902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：魚介類など海産物の一部には水銀を比較的高濃度に含むものがあり、これらを頻回に摂取する事によって水銀の摂取量が高まる事が、ヒトの健康にどのような影響をおよぼすのかについて多くの研究がおこなわれてきた。日本人の中でも特に海産物摂取量の多い集団で神経学的な症状が認められないという観察がある。原因として考えられる多くの要因の中で、栄養素の一つセレンに着目し、この集団のセレン栄養状態を、血漿中の"セレンを含有するタンパク質"の量の測定によって評価、セレンと水銀摂取との関連を検討した。その結果、水銀の摂取量がある程度高くなると、これに反応する形でセレン含有タンパク質の濃度が変化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：There has been a concern regarding the potential health risks brought by high consumption of seafoods that contain relatively high concentration of mercury compounds. This research targeted a population that had high dietary consumption of marine products, and showing relatively high biological concentration of mercury in their hair or blood, without showing apparent manifestation of neurological symptoms. We focused on selenium, a micronutrient which has been shown to counteract to the toxicity of mercury (both inorganic and organic). By measuring three "selenium-containing proteins" in the plasma, we analyze the relationship between selenium and mercury exposure. We have found that the relationship between selenium as well as its proteins and mercury depended on the level of mercury exposure, suggesting that selenium is "reacting" to high level of mercury exposure.

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 水銀 メチル水銀 セレン セレンタンパク質 魚介類摂取 毒性軽減 健康リスク

1. 研究開始当初の背景

メチル水銀の神経毒性としては水俣病が最も良く知られているが、1980年代から、魚介類およびクジラなどの海棲ほ乳類を通じたメチル水銀の摂取が、ヒトの健康に影響を及ぼす可能性が指摘され、多くの研究が実施されて来た。先行研究によって、胎児はメチル水銀の神経毒性に感受性が高い事が明らかになってきたため、フェロー諸島あるいはセイシェル諸島など魚あるいはクジラを多食する集団で実施されている主要な疫学研究は、胎児期曝露を受けた集団の出生後の行動発達に焦点をあててきた。しかし、曝露レベルが十分に高ければ成人も影響を受ける。

日本は、世界的に見た場合魚を多食する国であり、したがって水銀摂取も世界的には高いレベルにある。国内でも魚の摂取量の違いにより、水銀摂取のレベルは地域・集団によって異なる。本研究で対象としたA町は、海産物を多食することによって高いレベルの水銀摂取があるにもかかわらず、これまでの調査では水銀によると思われる健康影響が検出されていない。この集団がメチル水銀毒性になぜ低感受性であるのかを解明することは、中等度のメチル水銀摂取による神経毒性を軽減する対策につながるるとともに、毒性の機序についてもヒントを与える可能性がある。

メチル水銀毒性を修飾する因子として、遺伝的・生理的・あるいは他の汚染物質を含む環境的要因についての実験研究・調査研究が行なわれている。ヒト集団を対象とした研究において主として注目されているのが栄養学的要因であり、水銀の主要な供給源となる魚介類に豊富に含まれるヨード、多価不飽和脂肪酸類、あるいはビタミン類などの毒性軽減・拮抗効果についての報告が多い。胎児期のメチル水銀曝露の影響を追跡して来たセイシェル諸島の調査でも、これらの栄養素の栄養状態を統計的モデルに組み込むことによって、初めてメチル水銀の影響が検出されることを示した (Davidson et al, 2008) し、東北地方で行なわれたコホート調査 (Suzuki et al., 2010) でも、(他の栄養素摂取の代理指標としての) 魚摂取量そのものを統計モデルに組み入れて解析するなどの工夫が行なわれている。

セレンは魚介類には比較的豊富に含まれる栄養素であり、実験的に無機水銀・メチル水銀の毒性との拮抗を示した報告が多数ある。ヒト集団においても検討は行なわれて来ている (Chapman and Chan, 2000; Watanabe 2002 などの総説参照) が、多くは血中 (全血中) のセレン濃度を測定している程度にとどまり、十分な検討がおこなわれているわけではない。フェロー諸島のコホート長期追跡

調査では、統計モデルの中にセレン栄養を組み入れた検討が行なわれたことがあるが、メチル水銀毒性に対して有意な効果を見出せなかった。また、セイシェル諸島の調査ではセレンの検討結果は発表されていない。

セレンによるメチル水銀毒性の軽減あるいは拮抗作用を検討するにあたっては、セレンがどのような形態で存在しているかが問題となる。ほ乳類など高等動物の体内で、セレンは20種類程度のタンパク質の構成成分としてその生理的機能を果たしている。これらのタンパク質 (“セレンタンパク質”) は、セレンをセレノシステインという特殊なアミノ酸の形で含有し、これはタンパク質の生合成の転写段階でコーディングされて、アミノ酸骨格に組み込まれ、セレノシステインとして機能を発揮する。また、これ以外のタンパク質でもメチオニンの位置に、これと識別できないセレノメチオニンが組み込まれることがあるが、この場合は本来のメチオニンと機能は変わらない (本報告で、セレン含有タンパク質と記した場合は、セレノメチオニンとして含有している場合を含めている)。セレンタンパク質の機能は個々のタンパク質によって当然異なるが、毒性軽減という点では、いくつかのタンパク質に共通する抗酸化作用が重要である可能性が高い。さらに、毒性学的な作用を考えた場合には、毒性軽減が起こる例が、無機水銀・メチル水銀、ヒ素などで報告されており、セレンとこれらの毒物とが直接結合することが毒性軽減に寄与していることが証明あるいは示唆されてきた。また、これ以外にも抗酸化作用を有する低分子のセレン化合物が食物中に存在する例などが報告されている。

このように、セレンと毒性物質との相互作用と一言で言っても、様々な様態が考えられ、これをヒトから得られる生体試料の情報だけで把握することは容易ではない。一般的に用いられるヒトの生体試料の中で、セレン栄養について最も有用な情報が得られるのは血液、特に血漿 (血清) であって、血漿中のセレン濃度は、最も簡便なセレン栄養指標として用いられている。血漿中でセレンは主として3種類のタンパク質、すなわちグルタチオンペルキシダーゼ (GPx: 厳密には複数あるGPx アイソザイムの中の細胞外型

-extracellular-GPx) であるがここでは単にGPxと記す)、セレノプロテインP (SePP)、アルブミン (Alb) として存在していて、このうち、GPx、SePPが、セレノシステインを含むセレンタンパク質である。

これらの血漿中タンパク質を定量した報告はあり、例えば循環器系疾患のリスクとの関連などが検討されているが、水銀摂取量の高い集団においては報告がほとんどなく、と

くに3種類のタンパク質を同時に調べて解析した報告は存在しなかった。

2. 研究の目的

本研究は、A町住民がメチル水銀毒性になぜ低感受性であるのかを毒性学の立場から解明することを最終的な目的とする。本報告においては、ヒト集団での知見が限られるセレンに着目し、A町住民の血中における高分子(セレン含有タンパク質)のセレン定量を行い、水銀曝露との関連を検証した研究結果を記した。すなわち、魚食により比較的高濃度のメチル水銀を摂取している集団におけるセレン動態の特徴を、水銀摂取レベルと関連づけて把握し、その毒性学上の意義について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、本研究開始前の2010年7月に、国立水俣病総合研究センターが中心となって実施したA町住民調査において採取し、全血・血漿・血球として保存されていたもの(血液試料約200名分)を用いた。同時に実施した質問票を用いた調査に完全に回答した(漏れがなかった)111名分の試料について分析を行なった。

(2) 血中および毛髪中メチル水銀については、分担者の所属していた国立水俣病総合研究センターにおいて、加熱気化-金アマルガム捕集-原子吸光法によって測定した。

(3) 血漿中セレンおよびセレン含有タンパク質の定量: 分離された血漿中の総セレン濃度はコリジョン・セル付きのICP-MSを用いて測定した。セレン含有タンパク質の分離については、Koyamaら(1996)の方法に基づいて実施した。この方法により、血漿中のセレン含有高分子分画としては、既に述べたGPx、セレノプロテインP(SePP)、アルブミン(Alb)に相当するピークを検出することができる。本研究では、これら主要なピーク面積の総計に対する3つのピークの割合を算出し、これらと水銀濃度との関連を検討した。

(4) 本研究については、東京大学大学院医学系研究科の研究倫理審査委員会の承認を得た。また、国立水俣病総合研究センターとの調査実施に関する取り決めに基づいて実施した。

4. 研究成果

(1) 主要な成果:

水銀曝露 対象者(111名:33-83歳、平均年齢62歳)の毛髪中水銀濃度の幾何平均値(以下、単に“平均値”)は $9.1\mu\text{g/g}$ であった。また、血中水銀濃度は、平均値が $34.2\mu\text{g/g}$ で、その範囲は4-184と大きなバラツキを示した。魚介類摂取頻度との関係を検討

したところ、多くの魚介類の摂取頻度と血中および毛髪中の水銀濃度とは強い正の相関を示し、水銀の摂取源が魚介類であることが確認された。

セレンおよびセレン含有タンパク質 血中の平均セレン濃度は $244\mu\text{g/g}$ (範囲156-495)、血漿中セレン濃度は $142\mu\text{g/g}$ (範囲105-222)と平均的な日本人に比較していずれも高値を示した。水銀に比較した場合、セレンが必須微量元素であることを反映して個人間のバラツキの程度は小さかった。

分別定量については時間・測定装置への負担を考慮し、水銀曝露量の最も高い群と低い群(各 $n=19$;全体の上位・下位それぞれ1/6程度に相当)を選んで測定を行った。既に知られている通り、血漿中にはアルブミン(Alb)、グルタチオンペルオキシダーゼ(GPx)、セレノプロテインP(SePP)と判断される3つのピークが得られた。これら3つのピーク面積の総計を100とした場合の相対的な割合の平均値はAlb=31%、GPx=21%、SePP=48%であり、一般集団(水銀摂取の多くない集団)同様、SePPのピークに含まれるセレンが最も多く、総セレンのおよそ半分を占めていた。

水銀曝露レベルとセレン濃度との関係: 全血中の水銀と全血中および血漿中セレンの濃度との間には有意な強い正の相関を認めた。全血中におけるセレンと水銀のモル数を比較すると、前者が後者の18倍であった。多くの動物実験あるいはヒトの剖検例で、高度の水銀曝露があった場合に、脳をはじめとする組織中の水銀・セレン濃度が1に近づくという観察が報告されているが、本調査の対象者の血中ではこのような現象は見られなかった。

魚摂取などで水銀摂取が高い複数の集団でも血中の水銀-セレンの相関が報告されているが、その原因は必ずしも明確ではない。魚肉はセレン濃度が高い場合が多いため、高い相関が単に魚の摂取を反映している可能性も指摘されてきた。本研究では、海産物摂取は血中水銀濃度とは既述の通り高い相関を示したが、血漿中セレンについては相関が低く、少なくとも血漿中セレンの個人間のバラツキは、海産物摂取量のバラツキでは説明できなかった。血漿中セレンのほとんどが肝・腎で生合成され血中に分泌されるセレン含有タンパク質にアミノ酸の形で含まれている。これらを含むセレン代謝プロセスには一定の制御が働いていることを考えると、これは当然の結果と言えるかも知れない。

全血中で見た場合セレンの水銀に対するモル比は10倍を超えている。両者のモル比がメチル水銀毒性においては重要であるという動物実験の報告を考えると、この十分なセレン量が存在していることが、メチル水銀

の毒性軽減に有用であるということも考えられよう。しかし、全血中のモル比と（毒性との関係でより重要な）組織中のモル比との関連、全血中セレンの存在形態などはこれからの検討課題といえる。

血漿中のセレンと血中の水銀との間に、正の相関があったことは上述の通りであるが、両者の関係は、水銀曝露レベルの高さによって修飾を受けていた。すなわち、対象者を血中水銀のレベルによって2群にわけて検討した場合、低水銀群（n=55）では両者（ただし水銀濃度は対数で表現）には相関がないが、高水銀群（n=56）では、有意な強い正の相関が得られた。両群では水銀濃度のバラツキの幅に大きな差がある点には留意しておく必要があるが、この結果は、少なくとも血漿中セレンの増加は、水銀曝露がある“閾値”を超えた場合に起こることを示唆していると考えられる。

血漿中のセレン含有タンパク質と考えられる3つのピークに含まれるセレンの割合については、高水銀と低水銀との間に差はなかった。血中水銀と3つのセレン含有タンパク質との関連も水銀曝露の程度によって変わる。各ピークの割合（%）と血中水銀との間に有意な相関が得られたのは、高水銀群におけるGPxのみであり、有意な負の相関が観察された。他の組み合わせでは有意な相関は得られなかったが、Alb, SePP（特に後者）は高水銀群においてのみ、血中水銀濃度とは正の相関が見られた。

これらの分別定量の結果は、セレン代謝への影響に水銀曝露の閾値が存在するという上述の仮説を補強するものと言える。3つのタンパク質の生合成は、セレンの存在量が少なくなるに連れて、直接・間接に競合的な関係になると考えられる（この場合、血漿へのGPx, SePPの供給源は、それぞれ腎・肝であるので、近傍のセレンを巡って直接的な競合が起こるものではないだろう）。高水銀群において、GPxとSePPの割合と水銀曝露との関係（後者は有意ではないものの）が逆になっているのは、このような競合が起こっている可能性を示唆しているとも考えられる。

(2) 研究の位置づけ

本研究では、セレンと水銀との関連を変化させる水銀曝露の“閾値”が存在する可能性が示された。この閾値は、全血中の両者の関係においては目立たないが、血漿中セレンとの関連では顕著であり、この観察が単に2つの群の水銀曝露のレンジの広さの違いのみに起因するものではないことが示唆される。こうした閾値の存在はおそらくこれまでに報告されていない。さらに、形態別の定量においても、この閾値を超えた場合に、SePP

とGPxとが競合するような結果が得られていることから、この“閾値”については、水銀曝露に対するセレン代謝の“応答”という観点からさらに検討を加える価値がある知見と考える。本結果は2013年に“地球規模汚染物質としての水銀国際会議”（業績欄参照）で発表したが、この会議においてカナダの高水銀摂取集団では、魚の摂取量と血漿中セレンの関係に閾値を見出したことが報告されており、“閾値仮説”を支持する知見と言える（このグループと情報交換を行ない、共同して仮説検証を進めることとなった）。関連して、ブラジルのアマゾン流域に居住する高水銀摂取集団において、セレンが運動機能の低下に対して防御的な効果を持つことが報告された（Lemire et al., 2011）が、ここでも効果は水銀が高濃度の場合のみに観察されていることは興味深い。

水銀曝露のある集団においてセレンの定量的評価を行なった例は少なくないが、多くは両者の血中濃度の関係性を評価するに留まっていて、本研究のように血漿中の主要なセレン含有タンパク質の定量を試みた例はほとんどない。血漿中のこれら3者の割合が疾患の有無と関わるといった報告もあり、水銀曝露がどのような機序でこの割合に影響を与えるのかを調べることで、水銀毒性にセレンが実際に保護的な役割を果たすのか否かのヒントが得られるだろう。これと平行して、血漿中におけるこれらのタンパク質の相対的な割合の変化が、セレン代謝の指標という以上の機能的な意味を持つのかについても検討する必要があるだろう。

閾値の存在は、これまで報告されている水銀-セレンのヒト生体試料における正の相関が、海産物の摂取による両元素の同時摂取に直接起因しているわけではないことを示唆する。魚の摂食量と血漿中セレンとの相関が弱いという解析結果もその傍証の一つと考えられる。

(3) 今後の展望

今回の形態別の分析は、HPLC-ICP-MSという測定に頼っており、特異性の点では限界がある。GPxならびにAlbについては他の方法による評価が可能であるが、SePPについての簡便な定量を開発する必要はあろう。

メチル水銀毒性とセレン動態の変化との関連について、本研究の範囲では結論を得ることは出来ていないが、発表論文（Nakamura et al., 2014）では、この地域において水銀曝露が高いのにも関わらず神経学的症状が欠落していることを指摘し、セレンが十分に存在することが何らかの防御的役割を果たしている可能性について言及した。今後、こうした評価と分別定量の結果とを対応させ

ることによって、この可能性を検証するアプローチも重要であると考える。

なお、全血で水銀とセレンとの相関を認めた点については、血球中のセレンの存在形態を調べる必要がある。

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. Nakamura M, Hachiya N, Murata K, Nakanishi I, Kondo T, Yasutake A, Miyamoto K, Ser PH, Omi S, Furuwasa H, Watanabe C, Usuki F, and Sakamoto M. (2014)

Methylmercury exposure and neurological outcomes in Taiji residents accustomed to consuming whale meat. *Environmental International*, 68, 25-32. (査読有)

2. Sakamoto M, Akira Yasutake, Akiyoshi Kakita, Masae Ryufuku, Hing Man Chan, Megumi Yamamoto, Sanae Oumi, Sayaka Kobayashi, and Chiho Watanabe (2013). Selenomethionine protects against neuronal degeneration by methylmercury in the developing rat cerebrum. *Environmental Science and Technology*, 47, 2862-8. (査読有)

3. Ping Han Ser and C. Watanabe: (2012). Fish advisories in the USA and Japan: Risk communication and public awareness of a common idea with different backgrounds. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*. (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

1. Watanabe C. Relationship between Hg and Se levels in Taiji inhabitants. International Conference for Mercury as Global Pollutant. July 28-Aug 2, 2014. Edinburgh, UK.

〔その他〕

ホームページ(において、本研究の方針について説明している文書)

<http://www.humeco.m.u-tokyo.ac.jp/pdf/selenium.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 知保 (WATANABE, Chiho) 東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70220902

(2)連携研究者

安武 章 (YASUTAKE, Akira) 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：20344418

小椋 康光 (OGURA, Yasumitsu) 昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40292677