

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23710044

研究課題名（和文）線維芽細胞を用いたメチル水銀の毒性リスク評価

研究課題名（英文）Risk assessment of methyl mercury toxicity using fibroblast

研究代表者

寶來 佐和子 (HORAI SAWAKO)

鳥取大学・地域学部・准教授

研究者番号：60512689

研究成果の概要（和文）：本研究において、マンガースの初代肝細胞培養法を確立した。最適培地を決定するために3種の培地（DMEM、RPMI-1640、William's E）を用いて比較検討した結果、William's E培地が最適であった。PAS染色と超微形態観察により、マンガース由来の細胞は肝実質細胞であることが確認された。マンガース肝組織中 Hg の分布を AMG 染色法で調査した結果、多くの Hg は肝小葉中心に存在していた。このことは、Hg が滑面小胞体に存在している可能性を示唆している。本研究結果は、Hg 高蓄積野生動物種の Hg 解毒機構の解明と Hg に対するハイリスクアニマルの特定に有効な知見になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：The present study established a primary hepatocyte culture for the small Indian mongoose (*Herpestes auropunctatus*). To determine the suitable medium for growing the primary hepatic cells of this species, we compared the condition of cells cultured in three media that are frequently used for mammalian cell culture: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), RPMI-1640, and William's E. Of these, William's E medium was best suited for culturing the hepatic cells of this species. Using periodic acid-Schiff (PAS) staining and ultrastructural observations, we demonstrated the cells collected from mongoose livers were hepatocytes. To evaluate the distribution of mercury (Hg) in the liver tissue, we carried out autometallography (AMG) staining. Most of the Hg compounds were found in the central region of hepatic lobules. Smooth endoplasmic reticulum, which plays a role in xenobiotic metabolism, lipid/cholesterol metabolism, and the digestion and detoxification of lipophilic substances is grown in this area. This suggested that Hg colocalized with smooth endoplasmic reticulum. The results of the present study could be useful to identify the detoxification systems of wildlife with high Hg content in the body, and to evaluate the susceptibility of wildlife to Hg toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：マンガース・初代肝細胞・水銀・細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

水銀はグローバルな汚染物質であり、そのリスク評価は現在ハイレベルの国際環境政策課

題となっている。その理由として、1950年代に日本における水俣病の発生、1960年から1970年にかけて北欧で有機水銀農薬の散布による汚

染、1970年代後半には、南米や東南アジアの国々で苛性ソーダ工場による水銀汚染、1980年代にはアマゾン川流域、ミンダナオ島やスラウェシ島、ビクトリア湖にて金鉱山の水銀汚染等が顕在化していることがあげられる。つまり、社会的関心が高いにもかかわらず、世界における水銀公害は依然として発生している。人間活動による環境中への水銀放出量は年間約2200トンと見積もられ、その中で経済発展が著しいアジア諸国の占める割合は54%である(Pacyna et al. 2006, Atoms. Environ.). また、環境中への水銀放出量は経済発展の速度と明らかに比例していることから(Shi et al. 2010, Environ. Pollut.)、今後アジア諸国からの水銀放出量は増加する可能性がある。環境中に放出された水銀は、体内でメチル水銀に変換され、生物濃縮により高次栄養段階の野生生物に高蓄積される。その現象は海洋生態系において顕著であり、多くの海棲哺乳類から高レベルの水銀が検出されている(Horai et al. 2006)。これまで、申請者は外洋性鯨類、カズハゴンドウとスジイルカの肝臓からそれぞれ最高1240ppm、770ppm(乾重量)の濃度の水銀を検出した。これらのレベルは水俣病患者(国立水俣病総合研究センター2005, 平成16年度成果報告書)やネコ(Eto et al. 2001, Tohoku J. Exp. Med.)から検出された濃度をはるかに上回り、毒性が発現してもおかしくない値であった。その一方、水銀を高蓄積する生物種の肝臓は卓越したメチル水銀解毒機構を有していることが指摘されていることから(Ikemoto et al. 2004, AECT; Horai et al. 2008, ET&C)、野生動物における水銀のリスクを正しく評価するには、肝臓のメチル水銀解毒能を理解することが重要となる。なぜなら、メチル水銀毒性の主な標的器官は脳であり、多くの生物において、メチル水銀は肝臓で解毒されるが、解毒能以上に摂取されたメチル水銀は脳に蓄積するからである。しかし、野生動物の脳を用いた水銀汚染のモニタリングやリスク評価に関する報告は極めて少ないのが現状である。そこでカズハゴンドウとスジイルカの脳を用いてメチル水銀暴露による毒性影響がみられた実験動物(Sakamoto et al. 2002, Brain Res.; Oliveira et al. 2008, Brain Res.)と比較した

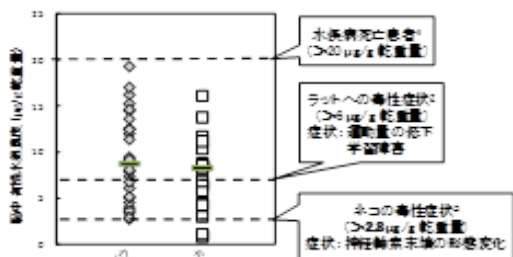


図1 脳中有機水銀レベルのリスク評価
(© 2004-2008 Sakamoto et al., 2002-2008 Oliveira et al. 2008)

ところ、多くの検体で毒性レベルを超過していた(図1)。鯨類は化学汚染物質を高蓄積している一方で、実験動物よりも毒性に脆弱であると言われている(立川, 1995)。さらに近年メチル水銀暴露によるヒトを対象とした疫学調査(Wigle et al. 2008, J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.)や実験動物(Castoldi et al. 2008, Regul. Toxicol. Pharmacol.)を用いた研究から、繁殖や胎児の発育や神経発達への影響が懸念されている。そのため、生態系保全や生物種存続のためにも海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性評価は重要である。しかし、野生動物種を用いた水銀毒性の *in vivo* 研究は困難で、比較生物学的な毒性影響評価に関する研究例は現在のところ皆無である。以上のことから、海棲哺乳類を含む野生動物種の水銀毒性に対するリスク評価法の確立は急務とされている。

2. 研究の目的

マンゲースは陸上哺乳類であるにもかかわらず、肝臓中水銀レベルが海棲哺乳類と同等の高レベルであり、肝臓内の蓄積パターンも類似している(Horai et al. 2006, Chemosphere)。従って本種体内のHg解毒機構を明らかにすることは、同じ水銀高蓄積種である海棲哺乳類体内の水銀動態解明に繋がるのが期待される。初代肝細胞は、短期間であるが、*in vivo* とほぼ同等の肝機能を発現する。そこで、マンゲースを水銀高蓄積モデル動物として、*in vitro*での本種肝臓のメチル水銀に対する細胞内分子応答を明らかにするため、水銀解毒能の指標となる分子マーカー探索を目的とした本種の初代肝細胞培養法を確立した。

3. 研究の方法

(1) 初代肝細胞培養

初代肝細胞培養は佐藤と宮崎の方法に従い、一部改変した。

(2) PAS染色法

単離した肝臓細胞を poly-L-lysine (PLL)-コートスライドグラス に固定した。Schiff's 試薬に浸し、亜硫酸ナトリウム溶液を用いて発色させた。

(3) AMG 染色

AMG 染色は、Danscher and Stoltenberg (2009) も方法に従い実施した。

(4) 超微形態観察

マンゲース肝臓を 0.1M PBS に対し、2% glutaraldehyde/2% paraformaldehyde で調整した溶液中で固定した。超微形態観察は、100kV の条件下で H-7600 (HITACHI, Japan)を用いて実施した。花市電子顕微鏡研究所に委託した。

(5) Hg 分析

マンゲース肝臓を乾燥粉末試料にした後、0.2gを秤量し、3.0mLの硝酸でマイクロウェーブ分解した。Hg測定はHiranuma, Model HG-300を用いた。分析の精度は、DOLT-4 (National Research Council Canada)を用いて回収率を算出し、100%~103%と良好であった。

4. 研究成果

(1) 初代肝細胞培養の確立

マンゲース肝臓から単離した細胞をRPMI-1640、DMEM、William's E培地を用いて72時間培養した。ほとんどすべての細胞は24時間でディッシュに接着した。24時間において、培地の違いによる細胞の形態変化は見られなかった。24時間から48時間の間に、RPMI-1640とDMEMで培養した細胞は脱落し始めた。また、形態が変化した。72時間にはそれらの変化は顕著であった(図2)。一方、William's E培地内の細胞の生存と形態は24時間から72時間まで大きな変化は見られなかった(図2)。

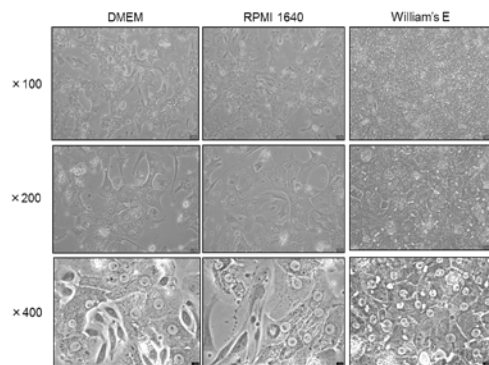


図2 培養72時間後のマンゲース肝臓細胞の様子

肝細胞は、実質細胞と4種の類洞細胞から成る。得られた初代肝細胞がどのような細胞を構成しているか、PAS染色法を用いて検討した。ファイブプロラストや内皮細胞ではわずかにしか染まらない。PAS染色はグリコーゲンを染める染色方法である。PAS染色した結果、PAS陽性を示したことから、得られた初代肝細胞はそのほとんどが実質細胞であることが判明した(図3)。

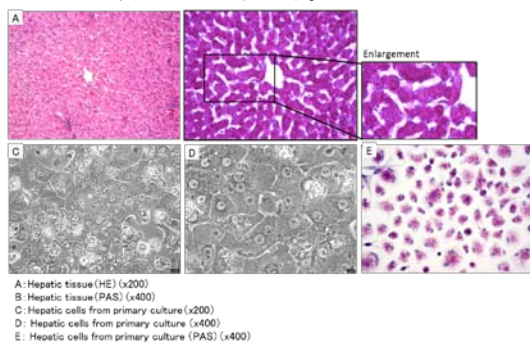


図3 PAS染色

次に、マンゲース肝臓より回収した細胞の超微形態を観察した。回収細胞は核小体が明確な円形の核を1~2個保有しており、細胞体内に消耗色素を含んでいることが判明した。また、微絨毛を備え、豊富なミトコンドリアや小胞体を有していた。これらの超微形態の特徴は、肝組織の肝細胞超微形態と一致

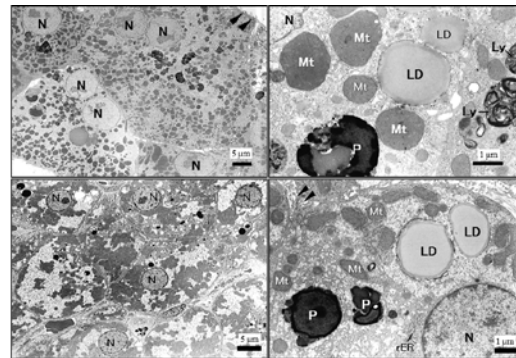
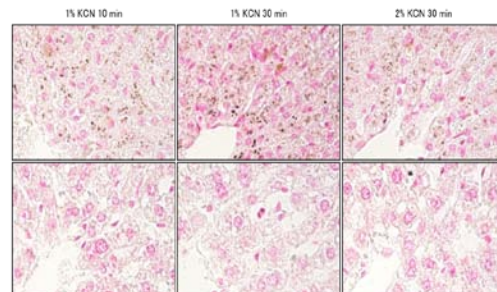


図4 初代肝細胞(上)と肝組織の肝実質細胞(下)の超微形態観察の比較
N; nucleus, Mt; mitochondria, Ly; lysosome, LD; Lipid droplet, P; waste pigment, rER; rough-surfaced endoplasmic reticulum. Microvilli are indicated with arrow heads.

し、回収された細胞は肝実質細胞と考えると矛盾のない結果が得られた(図4)。

(2) 肝組織におけるHg分布

マンゲース肝臓におけるHg分布を明らかにするため、AMG染色を行った。KCN不溶の粒子が肝小葉の中心域で観察された(図5上)。一方、ラット肝臓では粒子は検出されなかった(図5下)。マンゲースで見られた粒子はBiSe、HgS、HgSeであることが推察された。Hg濃度測定の結果、マンゲースにおいて $4.34 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ 、ラットで $0.07 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ であった。これまでの我々の研究において、マンゲース18検体中11サンプルのBiレベルはNDであり、平均レベル(n=7)は $0.01 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$ であった(未発表データ)。これらのことから、KCNおよびHCl不溶粒子は、Hg化合物である可能性が示唆された。また、それら



Upper: Liver of a female mongoose; Hg concentration was $4.34 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$.
Lower: Liver of a female rat; Hg concentration was $0.07 \mu\text{g g}^{-1} \text{DW}$.

図5 マンゲース(上)とラット(下)肝組織のAMG染色比較

の粒子は肝小葉中心帯で多く見られた(図6)。薬物代謝や脂肪、コレステロール代謝、脂溶

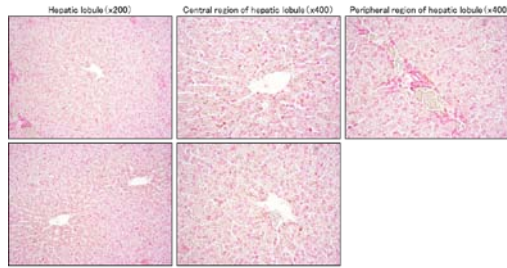


図6 AMG染色を用いた肝組織内Hgの分布

性物質の分解解毒を行うミクロソームを含む滑面小胞体は特に小葉中心帯の肝細胞に発達することが知られている。Hgがこの小葉中心帯に多く存在していたことは、これまでの我々の研究成果から、有機Hgの脱メチル化には薬物代謝酵素あるいは脂溶性分解酵素が関与している可能性が推察された。

これらの結果から、マンガース肝細胞内におけるHg代謝の仮説が導かれる(図7)。メチルHgは脂溶性であるため、脂質二重層を容易に透過することができる。細胞内に取り込まれたメチルHgは、オルガネラ、とくに細胞質と小胞体に分布する。メチルHgは小胞体内で脱メチル化され、細胞質から細胞膜に移動するのかもしれない。従って細胞膜内のHgの多くは無機態であったのかもしれない。最終的に、エンドサイトーシスによってリソソームに集積することが予想された。これらの結果は、Hg高蓄積種のHg解毒機構解明のブレークスルーになると考える。

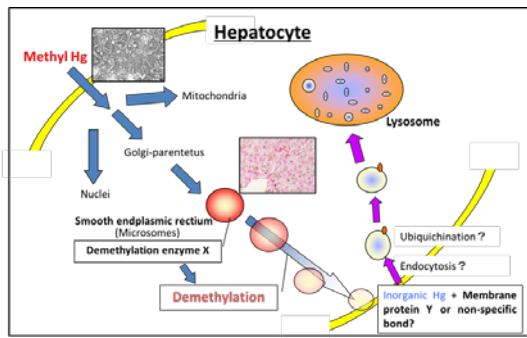


図4 マンゲース肝細胞におけるメチルHg代謝機構の仮説

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寶來 佐和子 (HORAI SAWAKO)
 鳥取大学・地域学部・准教授
 研究者番号：60512689

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：