

平成13年度年報の発刊にあたって

当研究センターは、平成13年1月の省庁再編では発足の歴史的背景をふまえ、これまで通り国立研究機関として残ることになりました。平成7年の政治解決後、自然科学、社会科学の研究領域も組織に加えましたが、水俣病や水銀に関する総合的な研究機関として更に維持・発展に努めてまいりたいと存じます。

13年度の特筆すべきことの一つは、6月に研究センターの附属施設として情報センターを開設したことです。この施設は展示機能も備えておりますが、散逸するおそれのある水俣病に関する資料や文献を収集・保管し、希望者に閲覧することを最も重要な事業としております。行政機関、患者団体、関係企業、研究者など関係者は多くありますが、少なくともどこにどのような資料・文献があるかが分かるようなデータベースを整備する必要があります。

もう一つは、10月に第6回水銀国際学会を水俣に招聘し、学会運営の中心的役割を果たしたことです。日本を含めて41国、433名の参加を得て大規模な学会になりましたが、各専門分野における最新の知見の情報交換が行われました。同時に改めて水俣病の悲劇を海外の研究者に知っていただく良い機会になりました。このような大きな国際会議を度々開催することは困難ですが、国際貢献を重要な任務としている当センターとしては、小規模の国際会議の開催は毎年続けていきたいものです。

13年度中の研究成果・業務活動について取りまとめましたが、定期的に研究・業務について整理報告し、評価を受けることは極めて大切なことと考えております。整理すること自体も見直しの機会となりますが、更に第三者のご意見によって新しい視点を与えられるからであります。

数少ない職員によって支えられている研究センターですが、職員一同、水俣病の苦難を担った患者さんのことを常に忘れず、また研究の視野は広くもって学問の進歩、社会への還元へつながるよう研鑽を積んで参ります。関係の皆様方の変わりないご指導、ご鞭撻をお願い申し上げます。

平成14年3月

国立水俣病総合研究センター
所 長 野 村 瞭

目 次

1. 組織構成

1) 組 織	1
2) 職員構成	2

2. 開発研究

1) 水俣病の臨床医学的研究	3
2) メチル水銀毒性の発現機序の解明と治療法の開発に関する研究	19
3) メチル水銀の毒性検定及び次世代影響に関する実験的研究	36
4) メチル水銀の乳・胎児期曝露におけるリスク評価	44
5) 水銀に関する環境科学的研究	62
6) 水俣病に関する社会科学的研究	81

3. 行政研究・業務計画

1) 水俣病患者のリハビリテーション及び健康相談室	83
2) 有機水銀汚染地区住民の健康影響	85
3) 生活環境に起因する健康影響モニタリングシステムの構築および健康管理エキスパートシステムをそなえた基盤整備	86
4) 国水研の研究情報発信のためのデータベース作成	87
5) 水俣病関連資料整備及び情報提供のためのシステムの開発	88
6) 水俣病認定患者における肝疾患に関する Feasibility Study	89
7) 八代海沿岸に発生した水俣病の地域別の発生時期と脳組織病変の程度についての検討 ―剖検資料を参照して―	90
8) 水俣在住の胎児性・小児性水俣病患者の生活及び健康現状調査	91

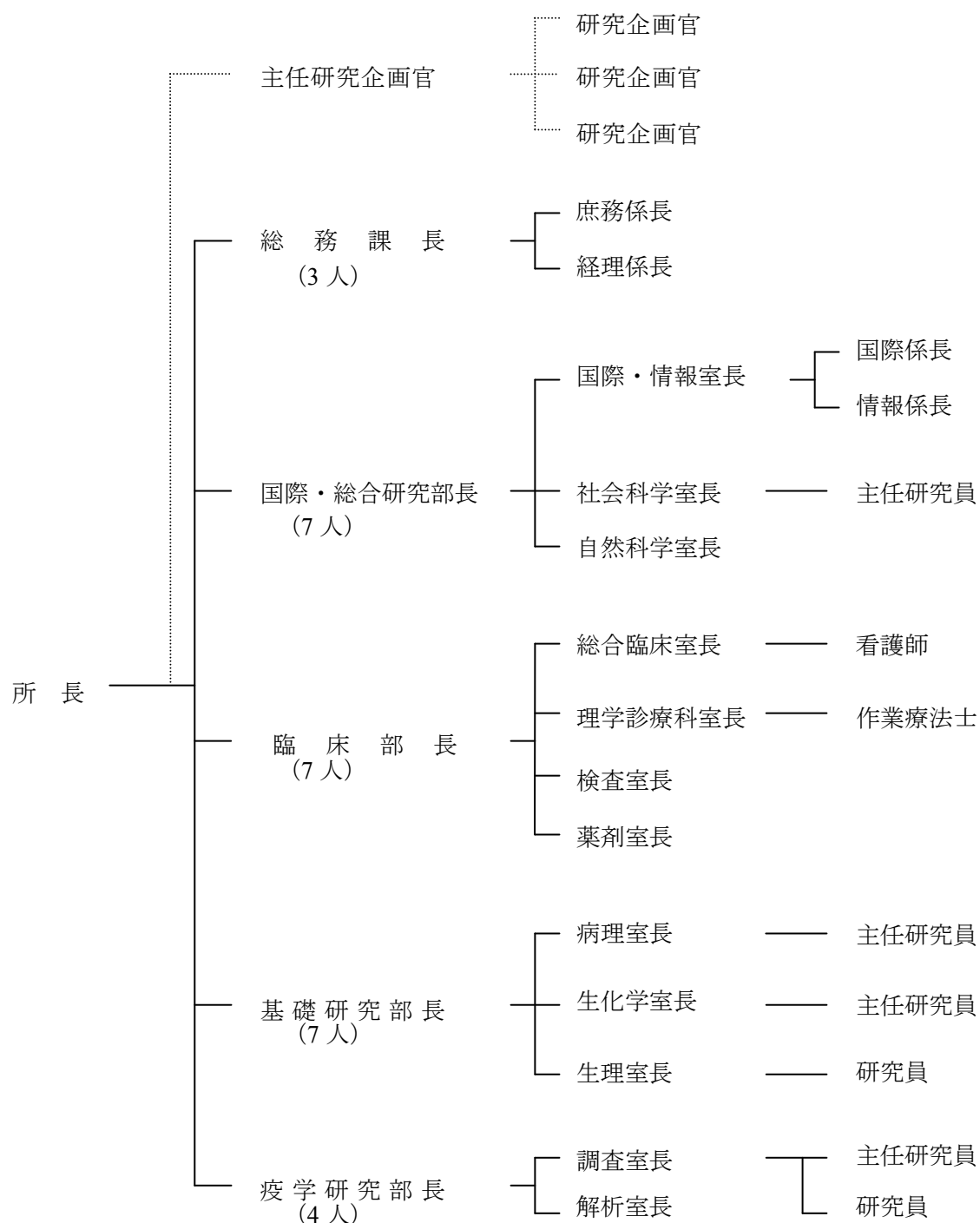
9) 国際協力	
1 中国・貴州省における水銀使用アセトアルデヒド製造工場からの排水水銀 に起因する環境汚染とその影響について……………	92
2 開発途上国からの来訪者の研修指導……………	94
3 「第6回地球環境汚染物質としての水銀に関する国際会議」の開催準備及 び実施……………	95
4. 研究発表一覧	
1) 国際・総合研究部……………	99
2) 臨床部……………	103
3) 基礎研究部……………	107
4) 疫学研究部……………	113
5. 所内セミナー記録……………	117
6. 客員研究員指導記録……………	125
7. 所内研究発表会記録……………	129
8. 客員研究記録……………	131
9. 共同研究記録……………	132
10. 委員会名簿……………	134
11. 国立水俣病総合研究センターの概要	
1) 予算……………	135
2) 定員……………	135
3) 主要施設整備状況……………	136
4) 施設配置図……………	137
附1. 人事異動……………	138
附2. 主な来訪者……………	139

1. 組織構成

1. 組織

国立水俣病総合研究センターは、研究部門の国際・総合研究部、臨床部、基礎研究部及び疫学研究部と事務部門の総務課を合わせ4部1課12室体制、定員29人となっている。

また、主任研究企画官及び研究企画官を設置し、センターの所掌事務のうち重要事項を掌らせている。



2. 職員構成

(平成 14 年 3 月 31 日現在)

所長	技 官	野村 瞭	○臨床部		
主任研究企画官	(併) 同	二塚 信	臨床部長	技 官	衛藤 光明
研究企画官	(併) 同	岩崎 容子	総合臨床室長	同	若宮 純司
同	(併) 同	有村 公良	理学診療科室長	同	白杵扶佐子
同	(委) 同	藤木 素士	検査室長	同	宮本謙一郎
○総務課			薬剤室長	同	村尾 光治
課長	事務官	三橋 英夫	看護師	同	宮本 清香
庶務係長	同	山内 義雄	作業療法士	同	松本美由紀
経理係長	同	中野 剛		事 務	
	同	仁科 英俊		補佐員	千々岩ヨウコ
	事 務		○基礎研究部	同	内山 茜
	補佐員	深水 文恵	基礎研究部長	技 官	中野 篤浩
	同	藤原いのり	病理室長	同	桑名 貴
	同	野口真由子	生化学室長	同	安武 章
	同	小坂 和美	生理室長	同	中村 邦彦
	同	江口 靖夫	主任研究員	同	荒巻 亮二
○国際・総合研究部			主任研究員	同	山元 恵
国際・総合研究部長	技 官	赤木 洋勝	主任研究員	同	足立 達美
国際係長	事務官	永井 克博		事 務	
	同	山崎 学		補佐員	劉 暁潔
社会科学室長	技 官	蜂谷 紀之		同	柿本えつ子
自然科学室長	同	保田 叔昭		同	開田 織
	事 務			同	下田 柳子
	補佐員	嶋本 淑子		同	兵藤 茜
	同	岡田 美鈴	○疫学研究部		
	同	渕上 陽子	疫学研究部長	技 官	赤木 洋勝
	同	柴田真由美	調査室長	同	坂本 峰至
	同	白森加代子	解析室長	事務官	渡邊 正夫
			研究員	技 官	山口 雅子
				事 務	
				補佐員	荒川 育子

(定員 29 人 現員 28 人)

2. 開発研究

1. 水俣病の臨床医学的研究

研究概要

ブラジル・コロンビアなどの水銀汚染地域から、健康被害の実態把握や予防の具体的指導がわが国に求められている。また、わが国においても、メチル水銀と感覚障害を中心とする臨床症状の関係および水俣病の転帰が社会的に問題となっている現状を踏まえ、水俣病の臨床医学的研究は、メチル水銀による臨床症状や、その症状をきたすメカニズムを研究する。すなわち、臨床所見・病理所見・水銀曝露量から各年代層に与えるメチル水銀による健康被害を明確にし、客観的診断法を開発するとともに、各臨床症状をきたすメカニズムを研究し、より優れた診断法、治療法、予防法を開発するための一助とする。

現在、水俣病の病理所見、水俣病の神経所見、健康被害を起す曝露量といった臨床所見に関する研究、サーモグラフィ・ニューロメータを用いた客観的診断法の開発に関する研究、および知的機能障害・脳の選択的障害・免疫系障害のメカニズムと不飽和脂肪酸による臨床症状への影響といった9つのサブテーマで研究を進めている。13年度の進捗状況と14年度の計画の概要は下記のとおりである。

1) 新潟水俣病全剖検例の生化学的・病理学的検討（平成12～16年度）

研究担当者 衛藤光明

新潟水俣病全剖検例の生化学的・病理学的検討では、新潟大学医学部で剖検された症例を当センターに収集する目的で標本作製を依頼すると共に、その臨床症状、病理所見を再検討している。また水銀およびセレンの組織内濃度測定を追加して検討している。

本年度はこれまでに検索された30症例中の10例についてまとめた（詳細後述）。

2) 水俣病患者の病像に関する研究（平成12～16年度）

研究担当者 若宮純司

水俣病患者の病像に関する研究では、新潟、鹿児島、熊本の順で症状が重症化すること、熊本の水俣病患者に合併症が多いこと、新潟では半身麻痺の症例が多いことがわかった（詳細後述）。

3) 胎児期のメチル水銀曝露の健康影響に関する研究（平成12～16年度）

研究担当者 若宮純司

胎児期のメチル水銀曝露の健康影響に関する研究では、水俣葦北地域に居住していた母親から、1950年代に生まれた住民について、臍帯水銀量と知能検査成績が相関する可能性があることがわかったが、現在までに9名のデータが集まった。

4) 有機水銀の知的機能に及ぼす影響に関する研究 (平成 12～16 年度)

研究担当者 若宮純司

有機水銀の知的機能に及ぼす影響に関する研究では、長期間のホルマリン浸漬されている検体を用いたが、tau 蛋白が抗原性を失うことがわかった。そこで、解剖直後のパラフィン切片を用いて tau 蛋白を染色しなおした。

5) 有機水銀の NMDA レセプターを介した神経細胞障害の発生機序に関する研究 (平成 12～16 年度)

研究担当者 若宮純司

有機水銀の NMDA レセプターを介した神経細胞傷害の発生機序に関する研究では、NMDA レセプターを抑制すると、メチル水銀の発症を大脳ではある程度抑制するが、小脳では抑制しないこと、NMDA レセプターの分布範囲がメチル水銀による障害部位と一致すること、小脳顆粒細胞はマウスでは障害されないが、ラットでは障害されることがわかった。これより、大脳では NMDA レセプターを介する障害が強いが、小脳ではメタボトロピックレセプターを介する障害が強いことが示唆された。

6) メチル水銀の免疫機能に及ぼす影響に関する研究 (平成 12～14 年度)

研究担当者 宮本謙一郎

メチル水銀の免疫機能に及ぼす影響に関する研究では、メチル水銀曝露ラットについて初期感染防御に関わるサイトカイン産生能の検査・測定中である。平成 14 年度は、この結果を解析するとともに、培養ヒト末梢血リンパ球で、細胞性免疫能を検討する。

7) サーモグラフィを用いた水俣病患者の客観的診断法の開発に関する研究 (平成 12～16 年度)

研究担当者 若宮純司

サーモグラフィを用いた水俣病患者の客観的診断法の開発に関する研究では、健常者と患者の差画像を描出するための定型化処理ソフトを開発し、本年度までに健常画像の描出可能性を立証した。サーモロジー学会で健常画像を描出するために必要な膨大なデータを収集し、健常画像の描出を行うこととなった。14 年度は学会とともに健常画像の描出の研究を進めることとした (詳細後述)。

8) ニューロメータによる水俣病の感覚障害の客観的定量化に関する研究 (平成 12～14 年度)

研究担当者 宮本謙一郎

ニューロメータによる水俣病の感覚障害の客観的定量化に関する研究では、健常者における電流知覚閾値(CPT)の同時再現性、日差再現性について検討し、データのバラツキが認められた。

9) メチル水銀中毒への不飽和脂肪酸の影響 (平成 12～16 年度)

研究担当者 宮本謙一郎

有機水銀中毒への不飽和脂肪酸の影響では、胎児ラットでは、妊娠中にメチル水銀曝露を受けた胎児ラットの ABR 潜時延長を、n - 3 系多価不飽和脂肪酸の DHA が抑制した。成熟ラットでは、塩化メチル水銀は 5 mg/kg を経口投与し、魚油はメチル水銀中毒の神経症状が発現するまで 1 ml/kg を経口投与したが、モーリスの水迷路学習と ABR・VEP・SEP などの電気生理学的検査を行い、現在、解析中である。

1. 新潟水俣病全剖検例の生化学的・病理学的検討

研究担当者 衛藤 光明（臨床部）
高橋 均（新潟大・脳研）
柿田 明美（新潟大・脳研）
徳永 英博（熊本大・医）
安武 章（基礎研究部）
中野 篤浩（基礎研究部）

〔研究目的〕

熊本大学医学部で剖検された 450 例の水俣病関係の剖検例に関しては、現在リサーチ・リソース・バンクで剖検試料および資料を収集して整理を行っている。本邦における第二の水俣病発生地区である新潟県阿賀野川流域住民の剖検例 30 例の病理標本を収集して、生化学的・病理学的検討を行い、熊本大学医学部の剖検例と比較する事を目的とする。

本研究は今後継続する必要があるが、長期に亘るために中間報告を行うものである。

〔研究対象および方法〕

新潟水俣病の標本は、新潟大学脳研究所で作成している。また、ホルマリン固定の脳、小脳、肝臓、腎臓の一部をパラフィンに再包埋して、6 ミクロン切片を作成して水銀組織化学反応を行うと共に、総水銀、メチル水銀、無機水銀濃度を測定し、さらにセレン濃度も測定した。組織切片には、ヘマトキシリン・エオジン染色、Klüver-Barrera 染色、Bodian 染色を施した。現時点では水俣病の検診記録は未収集のために、臨床症状と病理学所見の詳しい対比はなされていない。今回の検索例は、全例共に臨床的に水俣病あるいはその疑いがあり、病理学的にも水俣病病変が確認された症例である。

〔研究成績および進捗状況〕

新潟大学医学部で実施された水俣病関係剖検 10 例について、脳、小脳、肝臓、腎臓の総水銀、メチル水銀、無機水銀濃度およびセレン濃度の測定結果を **Table 1** に記した。1987 年～1991 年の剖検例で測定された、熊本県内の水銀非汚染地区（対照例：文献参照）脳総水銀値は $0.013 \pm 0.011 \mu\text{g/g}$ 、小脳で $0.025 \pm 0.036 \mu\text{g/g}$ 、肝臓で $0.014 \pm 0.067 \mu\text{g/g}$ 、腎臓で $0.012 \pm 0.112 \mu\text{g/g}$ であった。対照例と比較すると、測定された 9 例はいずれも高値を示していた。小脳では 3 例（症例 6,9,10）以外は高値を示している。また、同様に肝臓、腎臓の水銀およびセレン濃度測定の結果を **Table 2** に示した。熊本県における対照例の肝臓の総水銀値は $0.104 \pm 0.067 \mu\text{g/g}$ であり、腎臓は 0.102 ± 0.112 であった。肝臓の総水銀値は、測定された 4 例（症例 5,6,7,10）は対照例より高く、腎臓では、1 例（症例 10）を除いて高値を示している。セレン濃度に関しては、高値を示す症例は無かった。

Table 1. Total, methyl and inorganic Hg and Se levels in the tissues of cerebrum and cerebellum ($\mu\text{g/g}$), Niigata Univ.

Autopsy No.	Sex (M,F)	Age (Y)	Cerebrum T-Hg	Cerebrum Me-Hg	Cerebrum I-Hg	Cerebrum Se	Cbll. T-Hg	Cbll. Me-Hg	Cbll. I-Hg	Cbll. Se
1	M	72	0.198	0.153	0.044	0.175	0.108	0.062	0.046	0.260
2	M	75	0.274	0.055	0.020	0.255	0.168	0.084	0.093	0.210
3	M	67	0.163	0.134	0.024	0.145	0.133	0.103	0.025	0.190
4	M	58	0.128	0.042	0.082	0.210	0.129	0.030	0.102	0.140
5	M	79	0.097	0.050	0.050	0.240	0.104	0.051	0.054	0.260
6	M	76	0.064	0.042	0.023	0.240	0.058	0.040	0.018	0.080
7	M	86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
8	M	74	0.046	0.031	0.015	0.195	0.092	0.036	0.057	0.255
9	F	86	0.050	0.036	0.014	0.225	0.042	0.031	0.010	0.325
10	F	82	0.028	0.017	0.010	0.245	0.030	0.021	0.010	0.255
n.d.: not done			Cbll.: Cerebellum							

Table 2. Total, methyl and inorganic Hg and Se levels in the tissues of liver and kidney ($\mu\text{g/g}$), Niigata Univ.

Autopsy No.	Sex (M,F)	Age (Y)	Liver T-Hg	Liver Me-Hg	Liver I-Hg	Liver Se	Kidney T-Hg	Kidney Me-Hg	Kidney I-Hg	Kidney Se
1	M	72	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2	M	75	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3	M	67	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
4	M	58	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	M	79	0.497	0.088	0.429	0.670	0.750	0.056	0.696	0.840
6	M	76	0.381	0.103	0.284	0.335	0.357	0.053	0.310	0.655
7	M	86	0.204	0.027	0.182	0.240	0.895	0.034	0.857	0.770
8	M	74	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
9	F	86	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
10	F	82	0.191	0.022	0.173	0.475	0.176	0.028	0.150	0.620

n.d.: not done

Table 3. Summary of the Neuropathological Changes of the Autopsy Cases
in Niigata University

		P.R.N.F.	S.N.	Cbll.	Cal.Cortex	Post.C.G.	Pre.C.G.	Tem.Trans.G
1	77-29	±	+(ND)	+	+	+	+	+
2	77-35	+	(ND)	?(+)	?(+)	?(+)	?(+)	?(+)
3	77-45	+	+(ND)	+	±	±	±	±
4	78-67	+	(ND)	+	+	+	+	+
5	79-49	+	+(ND)	+	+	+	+	+
6	80-18	+	+(ND)※	+	+	+	+	+
7	82-36	+	+(ND)※	+	+	+	+	+
8	86-09	+	+(ND)	+	+	+	+	+
9	92-33	+	+(ND)	+	+(ND)	+	—	—
10	92-R7	—	+(ND)	+	+	+	+	+

(N.D.): not done +: Pathological changes of Minamata disease

±: Slight lesions of Minamata disease

※: Diabetes mellitus

P.R.N.F: Posterior root nerve fiber S.N.: Sural nerve Cbll: cerebellum

Cal. Cortex: Calcarine cortex Post. C.G.:Post-central gyrus Pre.C.G.: Pre-central gyrus

Tem. Trans. G.: Temporal transverse gyrus

臨床症状について：各症例について簡単に臨床歴を記す。

症例 1 (77-29)：1969 年に水俣病認定。1977 年 6 月に食道癌で死亡。

症例 2 (77-35)：1969 年に水俣病認定。1977 年 4 月に脳卒中 1977 年 6 月に蕁疹・無顆粒球血症で死亡。

症例 3 (77-45)：1972 年に水俣病認定。1977 年 9 月に呼吸不全（肺線維症・肺気腫・肺炎）で死亡。

症例 4 (78-67)：1967 年に筋萎縮性側索硬化症発症。1974 年に水俣病認定。1978 年 12 月にエンドトキシン・ショックで死亡。

症例 5 (79-49)：1972 年に水俣病認定。1979 年 12 月に気管支肺炎で死亡。

症例 6 (80-18)：1967 年 5 月より糖尿病治療開始。1975 年 10 月水俣病認定申請をして、1979 年 4 月に棄却された状態で、1980 年 4 月に心筋梗塞で死亡。

症例 7 (82-36)：1965 年 11 月水俣病認定。1982 年 12 月に大葉性肺炎で死亡。

症例 8 (86-09)：1973 年水俣病認定。1986 年 2 月に全身性粟粒結核で死亡。

症例 9 (92-33)：1972 年 8 月に水俣病認定。1992 年 9 月に肺癌で死亡。

症例 10 (92-R7)：1973 年 11 月に水俣病認定。1992 年 5 月に心臓自己損傷で法医解剖。

神経病理学的所見について：検索対象 5 例の神経病理学的所見のまとめを **Table 3** に示した。症例 6 (80-18)、症例 7 (82-36) の 2 例は糖尿病を合併しており、末梢神経病変は強い。10 例全ての腓腹神経および症例 9 (92-33) の鳥距野標本は、新潟大学医学部から送付されていないので検索出来なかったが、症例 2 (77-35) を除き末梢感覚神経に病変が見られたとの記載がある。

水銀組織化学反応について：症例 5 (79-49) の肝臓および腎臓で陽性。症例 6 (80-18) の肝臓、腎臓にわずかに陽性。今回は、臓器の提供が不足して、十分な検索が出来ていない。

〔考察〕

今回検索した新潟大学医学部で剖検された 10 例は、剖検により全て水俣病病変を確認できた症例である。熊本大学医学部で剖検された症例と比較すると軽症例（武内・衛藤の分類で 1 度に相当）の範疇に入る。糖尿病を合併した 2 例（80-18, 82-36）は、その末梢感覚神経病変のみでは水俣病との判断が困難であり、大脳・小脳の選択的傷害病変の確認が必要であることを再確認した。症例 10 (92-R7) の 1 例は、四肢末端の感覚障害を認め、末梢感覚神経に顕著な病変がなかったが、末梢神経は再生する事を考える必要がある。セレン濃度は無機水銀値の濃度に比例して高値を示す傾向がある。

文献：衛藤 光明、須田 郁夫、滝澤 行雄、武藤 一、徳永 英博、岩崎 浩子：最近（1987～1991 年）の水銀非汚染地区住民剖検例の臓器水銀及び水銀組織化学反応について—熊本県内と東京都内住民の比較検討—，熊本医会誌, **67**, 22-32, 1993.

2. 水俣病患者の病像に関する研究

研究担当者	若宮純司（臨床部）
	内野 誠（熊本大・神経内科）
	箕田修治（熊本大・神経内科）
	秋葉澄伯（鹿児島大・公衆衛生）
	有村公良（鹿児島大・第三内科）
	納 光弘（鹿児島大・第三内科）
	辻 省次（新潟大・脳研・神経内科）

〔目的〕

ブラジルなど水銀汚染地域においては、人への健康影響を診断せねばならない状況にあるが。このためには、有機水銀による臨床症状は把握しておかねばならない重要なものである。しかしながら、有機水銀の臨床症状は必ずしも明確になっていない。また、有機水銀中毒症としての症状以外に老化の影響が加わり、複雑化しており、水俣病の診断は容易ではない。そこで、水俣病患者の症状を各発生地域での病像の相違という観点から解析を試みた。

〔方法〕

昭和 50 年以前に処分され、神経所見が明確に記載されている 20 から 89 歳までの申請者 1,618 名、うち、鹿児島県 168 名（認定者 103 名、棄却者 65 名）、熊本県 480 名（認定者 412 名、棄却者 68 名）、新潟県 970 名（認定者 525 名、棄却者 445 名）を対象とした。ただし、熊本県については、昭和 48 年以前を対象とした。

性、年齢、認定の有無および神経症状 49 項目についてデータベースを作成した。このとき、症状は、なし・ありと分類されているものは、それぞれ 0・1 とし、なし・軽度陽性・高度陽性に分類されるものは、それぞれ 0・1・2 とした。ただし、感覚障害については、手首と足首までを 1、肘と膝までを 2、肩と股までを 3、全身を 4 とする 4 段階表示とした。

まず、水俣病認定者と棄却者について単変量解析を行い、病像を診た。次に、水俣病認定者と棄却者について多重ロジスティック解析を行い、水俣病の判別に関する各症状の関与を検討した。また、熊本と鹿児島の水俣病患者について単変量および多重ロジスティック解析を行い、各症状に関する相違と病像全体として特徴を検討した。さらに、熊本と新潟について同様の検討を行った。

〔結果〕

水俣病患者の症状を明確にするため、まず、すべての水俣病認定者と棄却者について単変量解析を行った。その結果、知能低下、口周囲感覚障害、顔面神経障害、構音障害、舌運動障害、頸部運動制限、上肢では不随意運動、筋力低下、運動転換試験拙劣、指鼻試験拙劣、下肢では筋力低下、膝踵試験拙劣、半身麻痺、深部感覚障害、根性感覚障害、感覚障害の左右差、膝蓋腱反射を除く腱反射低下、膝蓋腱反射亢進、バビンスキー反射、歩行障害、ロンベルグ徴候、眼科的所見では視野狭窄、眼球運動異常、眼振、耳鼻科的所見では平均聴力、左右差で有意差があった。

次に、熊本県と鹿児島県の水俣病患者について多変量解析を行うと、**表 1** のように、知能障害、運動

転換障害、ロンベルグ徴候、膀胱直腸障害の関与が熊本に強く、指鼻試験拙劣、構音障害、視野左右差、聴力左右差、一部の腱反射の関与が鹿児島に強い結果が得られた。また、熊本県と鹿児島県の水俣病患者について単変量解析を行うと、**表 2** のように、筋力低下、上下肢の左右差、視野左右差と、判別には関係しない症状のスパーリング徴候、腱反射左右差、聴力左右差が熊本県の水俣病認定者に強く関与していた。さらに、感覚障害について鹿児島県と熊本県の水俣病認定者について単変量解析すると、**表 3** のように、1 では同じであるが、2 では鹿児島が、3 では、熊本が多く、4 では、有意差はないものの熊本に多くなっていた。また、運動転換障害、膝踵試験拙劣でも同様の傾向がみられた。また、熊本・鹿児島をあわせて多重ロジスティック解析を行うと、**表 4** のように、他の神経症状の Odds 比はほとんど変わらないが、不随意運動、感覚障害、指鼻試験拙劣の Odds 比は全体で解析した結果よりさらに高くなっていた。

次に、新潟県の水俣病患者の特徴を明確にするために、新潟県と熊本県の水俣病認定者について多重ロジスティック解析を行うと、**表 5** のように、知能障害、舌運動障害、頸部運動障害、スパーリング徴候、不随意運動、筋萎縮、筋力低下、膀胱直腸障害、視野狭窄が熊本に強く関与し、顔面神経麻痺、構音障害、四肢末梢の腱反射の低下、ロンベルグ徴候が新潟に強く関与していた。

また、熊本県と新潟県の水俣病患者について単変量解析を行うと、**表 6** のように、同じ結果が得られた。ただ、眼球運動障害、聴力障害、歩行障害、上肢左右差、トームス異常が熊本県に多かった。また、半身麻痺が新潟に多かった。さらに、感覚障害について鹿児島・熊本と同じように、新潟県と熊本県の水俣病認定者について単変量解析すると、**表 7** のように、1、2 では同じであるが、3 では、新潟に多く、4 では、熊本に多くなっている。また、運動転換障害、膝踵試験拙劣でも同様の傾向がみられた。つぎに、新潟のみで多重ロジスティック解析を行うと、**表 8** のように、水俣病の判別では大きな影響をもつ視野狭窄、感覚障害、の Odds 比が、3 最も低かった。

〔考察〕

水俣病患者の症状を明確にするため、まず、すべての水俣病認定者と棄却者について単変量解析を行うと、手袋靴下型感覚障害、視野狭窄、難聴、および小脳症状と相関が強かったが、これは、従来から報告されている結果と同じであった。

この結果は、水俣病全体としてみた時も同様であった。すなわち、すべての水俣病認定者と棄却者について多重ロジスティック解析を行うと、感覚障害、運動転換障害、視野狭窄など代表的な症状がきわめて高い値を示しており、中核症状となっているのがわかった。これに対し、頸部運動制限、筋萎縮、バビンスキー反射や左右差などは、マイナスを示し、水俣病ではおこりにくい症状といえ、重要な鑑別点になっているのがわかった。

次に、各県における水俣病認定者の症状の特徴を明確にするため、まず、熊本県と鹿児島県の水俣病患者について多変量解析を行うと、水俣病として判別に強く関与する感覚障害、視野狭窄、上肢不随意運動、眼球運動障害、口周囲知覚障害などの因子が有意な差をもたないことを考えると、若干の相違はあってもほぼ似た症候を示していると考えられた。また、熊本県と鹿児島県の水俣病患者について単変量解析を行うと、非水俣病群に近くなる症状の筋力低下、上下肢の左右差、視野左右差と、判別には関係しない症状のスパーリング徴候、腱反射左右差、聴力左右差が熊本県の水俣病認定者に強く関与していたが、これらの症状はいずれも水俣病以外の疾患で起こるものであり、合併症が熊本県の認定者に多

いと考えられた。ちなみに、感覚障害について鹿児島県と熊本県の水俣病認定者について単変量解析すると、1 では同じであるが、2 では鹿児島が、3 では、熊本が多く、4 では、有意差はないものの熊本に多くなっている。また、運動転換障害、膝踵試験拙劣でも同様の傾向がみられた。これから、鹿児島は、熊本に比し軽症であると考えられた。なお、熊本県と鹿児島県の水俣病患者がほぼ同じ特徴を有していることから、熊本・鹿児島をあわせて多重ロジスティック解析を行うと、他の神経症状の Odds 比はほとんど変わらないが、不随意運動、感覚障害、指鼻試験拙劣の Odds 比は全体で解析した結果よりさらに高くなっていた。これより、この因子が熊本・鹿児島では特に重要な因子であることがわかる。

次に、新潟県の水俣病患者の特徴を明確にするために、新潟県と熊本県の水俣病認定者について多重ロジスティック解析を行うと、視野狭窄、不随意運動といった水俣病の判別に強く影響する症状が熊本に強いことを考えると、水俣病の症状そのものが新潟は軽いことが考えられる。なお、熊本県の認定患者に合併症が多いことは鹿児島と比較した場合と同じであった。また、熊本県と新潟県の水俣病患者について単変量解析を行うと、同じ結果が得られた。ただ、眼球運動障害、聴力障害、歩行障害、上肢左右差、トームス異常が熊本県に多かったことは熊本県に水俣病としての症状が強く、合併症が多いと考えられた。また、半身麻痺をとまなうことは、新潟水俣病患者の特徴であることがわかった。ちなみに、感覚障害について鹿児島・熊本と同じように単変量解析すると、新潟は、熊本に比し、軽症であると考えられた。

以上より、新潟、鹿児島、熊本の順で症度が増すと考えられた。また、熊本では合併症状をもつものが多いことがわかった。さらに、新潟では、半身麻痺を合併することが多いことがわかった。

〔参考文献〕

- 1) 内野誠；慢性水俣病の臨床像について－最近の水俣病認定患者 100 例の神経症候の分析を中心に－：臨床神経, **24**, 235, 1984.
- 2) 徳臣晴比古：水俣病－臨床と病態生理－, 精神神経誌, **62**, 1816, 1960.
- 3) 徳臣晴比古：20 年後の水俣病, 神経内科, **12**, 254, 1980.

表 1 熊本と鹿児島県の神経所見に関する多変量解析
ク解析

Sign	Odds	Est.	S. E.	Test S.
Intelligence	0.14	-1.96	0.37	-5.31
Diadochokinesis	0.01	-1.31	0.43	-3.01
Romberg sign	0.33	-1.10	0.42	-2.61
Bladder & Rectum	0.05	-3.01	0.75	-4.16
Difference of RL	0.10	-2.32	0.68	-3.42
FN test	4.02	1.39	0.42	3.30
Dysarthria	19.1	2.95	0.43	6.89

表 2 熊本と鹿児島県の感覚障害に関する単変量解析

Sign	Odds	Estimate	S.E.
Weakness	0.63	-0.46 (-0.91--0.02)	0.23
Spuring	0.34	-1.06 (-1.53--0.60)	0.24
Difference RL	0.13	-2.07 (-3.10--1.05)	0.23
Intelligence	0.21	-1.58 (-2.06--1.09)	0.25
Invol. Move.	0.56	-0.58 (-1.02--0.13)	0.23

Case: Kagoshima

表 3 熊本と鹿児島県の感覚障害に関する多変量解析

Sign	Odds	Sign	Odds
Sensory 1	1.35	Diadocho.	0.72
2	1.83 **		0.11 **
3	0.50 **	KH test	0.92
4	0.53		0.29 *

*, p<0.05, **, p<0.01

Case:

表 4 熊本と鹿児島を合わせた患者の神経所見に関する多重ロジスティック解析

Sign	Odds	Est.	S. E.	Test S.
Sensory G & S	↑ ↑	15.39	3.26	4.72
Invol.move.	61.2	4.11	1.09	3.79
FN test	1805	7.50	2.54	2.95
Visual field	84.2	4.43	0.79	5.64
Sensory Perioral	6.98	1.94	0.80	2.43
Muscle Atrophy	0.01	-5.24	1.66	-3.15
Neck Movement	0.08	-2.46	0.82	-3.00

表 5 新潟と熊本の神経症状に関する多重ロジスティック
Case: Niigata

Sign	Odds	Est.	S. E.	Test S.
Visual Field	0.01	-4.70	0.58	-8.07
Invol. Movement	0.14	-1.95	0.43	-4.59
Spuring sign	0.04	-3.21	0.68	-4.71
Neck Limitation	0.16	-1.83	0.65	-2.84
Muscle Atrophy	0.04	-3.34	1.40	-2.40
Muscle Weakness	0.33	-1.10	0.41	-2.67
Radial Reflex	10.7	2.37	0.71	3.33
Romberg Sign	6.60	1.89	0.47	3.99
Facial Palsy	90.9	4.51	0.90	5.00
Dysarthria	11.5	2.44	0.70	3.48

表 6 新潟と熊本の神経症状に関する単変量解析

Sign	Odds	Estimate	S.E.
Hemiparesis	316	5.76 (3.79-7.73)	1.01
Facial Palsy	13.9	2.64 (2.09-3.18)	0.28
FN test	1.77	0.57 (0.29-0.85)	0.14
Spuring sign	0.02	-3.92 (-4.51--3.33)	0.30
Neck Limit.	0.06	-2.82 (-3.34--2.29)	0.27
Invol. Move.	0.13	-2.03 (-2.34--1.71)	0.16

表 7 新潟と熊本の感覚障害に関する多変量解析

Signs	Odds	Signs	Odds
Sensory 1	0.97	Diadocho.	2.08 **
2	0.84		1.30
3	1.38 *	KH test	1.12
4	0.22 ***		0.49 *

表 8 新潟の患者と棄却者における神経症状に関する多重ロジスティック解析

Sign	Odds	Est.	S. E.	Test S.
Sensory G & S	1256	7.14	0.99	7.24
Invol.move.	3.42	1.23	0.61	2.01
FN test	6.66	1.90	0.47	4.03
Visual field	22.6	3.12	1.29	2.42
Sensory Perioral	8.45	2.14	0.46	4.68
Muscle Atrophy	0.06	-2.86	1.15	-2.50
Babinski Reflex	0.06	-2.80	1.31	2.42

7. サーモグラフィを用いた水俣病患者の客観的診断法の開発に関する研究

研究担当者 若宮 純司（臨床部）

芝田 宏美（兵庫医大 中央臨床検査部）

〔目的〕

有機水銀中毒症を客観的に診断することは診断上重要である。ブラジルなど有機水銀汚染が深刻な地域では、特に、侵襲ない検査方法が望まれている。これに対し、12年度に診断ソフトを開発したが、16年度までに神経疾患の無侵襲検査法として確立するとともに、有機水銀中毒の診断法として確立する。

〔対象〕

20～32 歳（平均年齢 24.4 ± 3.2 歳）の健常者 28 例（男性 15 例・女性 13 例）である。

〔方法〕

室温 $25 \sim 26^{\circ}\text{C}$ ・湿度 $50 \pm 10\%$ に設定した人工気象室に入室後すぐに脱衣させ、立位・座位・臥位の各姿勢にて、脱衣直後から 2 分間隔で 30 分間前額・右頬・鼻尖部を測定した。この時、クロール値は一定、測定時間は 15～17 時に統一した。測定は、枠内平均温度を用いた。

〔結果〕

1. 馴化の概要

図 1 に示すように、前額部の馴化は、ほぼ一定か、上昇ののち一定のパターンを示した。これに対し、図 2 のように、頬の馴化は、座位・臥位ではゆるやかな上昇を示し、立位ではほぼ一定のパターンを示した。一方、図 3 のように、鼻の馴化は、座位・臥位では上昇の後一定となるパターンを示したが、座位では一定となるまでの時間が様々であり、臥位では一定となった後でも多少の変動がみられた。また、立位では不安定なものがあつた。

2. 馴化における変化量

入室直後から 30 分までの連続 3 点における 2 点の差の平均値を算出して馴化における変化量をみると、座位においては、表 1 のように、鼻は不安定に推移し、他部より変化量は大きかった。また、座位の鼻尖部以外、変化量は 0.05°C 以内となった。さらに、前額は 30 分でもわずかではあるが、小さな変化を示していた。一方、頬は 10 分以降、変化量は 0.01 以下となった。臥位の場合は、表 2 のように、前額・頬・鼻尖部とも、座位より変化量は少なかった。

3. 被検者間の相違

各被検者のグラフを平均値が同じになるように平行移動させて Friedman 検定を行った。入室直後以降で見ると、座位の前額部以外は有意差が認められた。また、入室 12 分以後では、有意差は認められなかった。

4. 馴化の方向

前額・頬・鼻尖部の各部位ごとに、各時間で平均値を出し、入室 12 分以後の馴化過程について 3 次式までの非線形回帰分析を行った。その結果、表 1 のように、一次回帰では、臥位・前額部以外、有意差は認められなかったが、三次回帰で、図 4 のように、座位・臥位ともに、有意差のある回帰式が得られた。

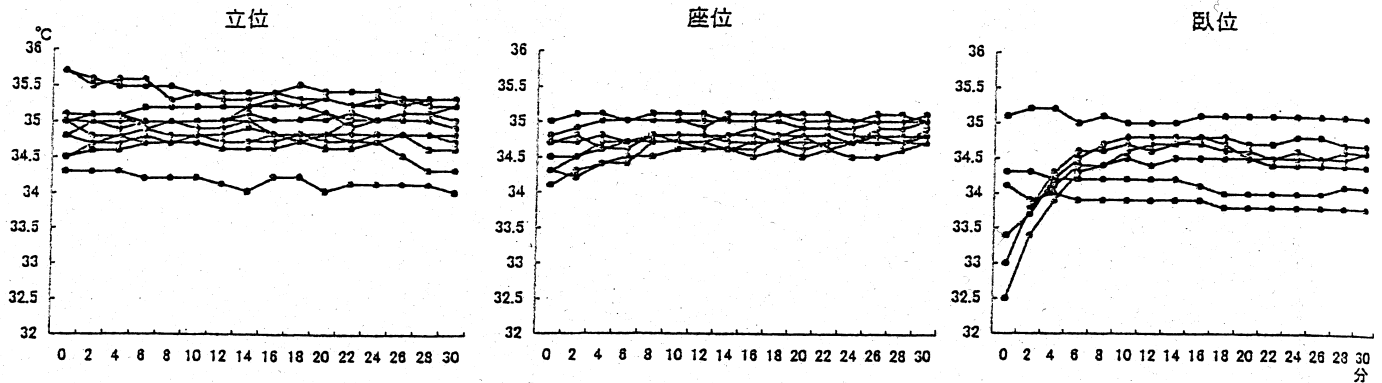


図1 前額部のサーモグラム

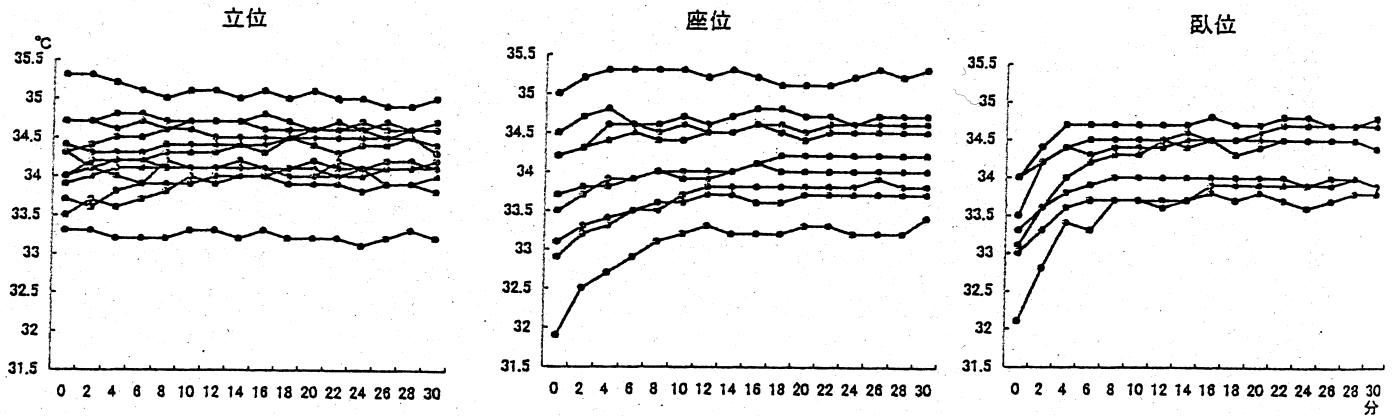


図2 頬部のサーモグラム

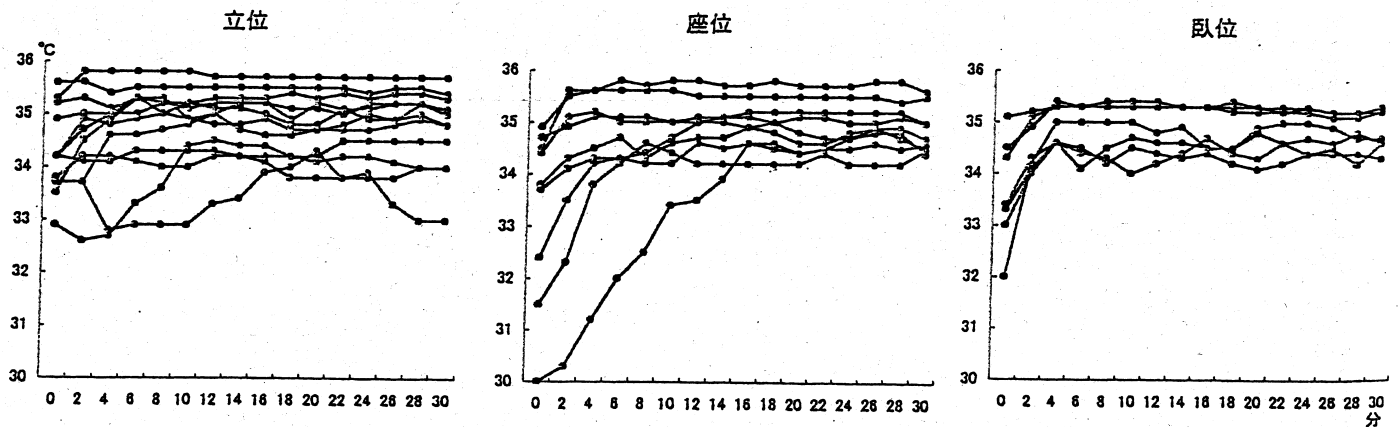


図3 鼻尖部のサーモグラム

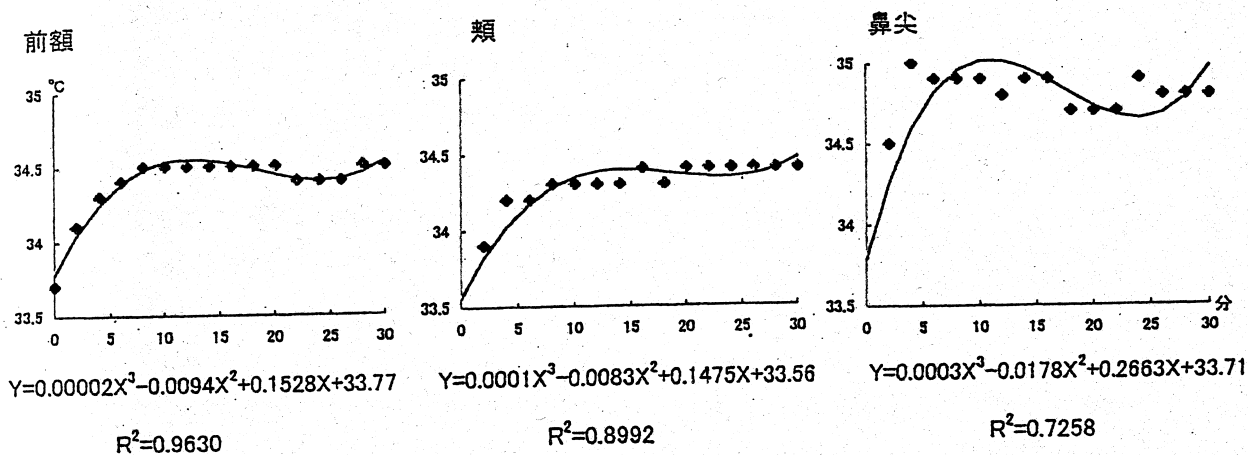
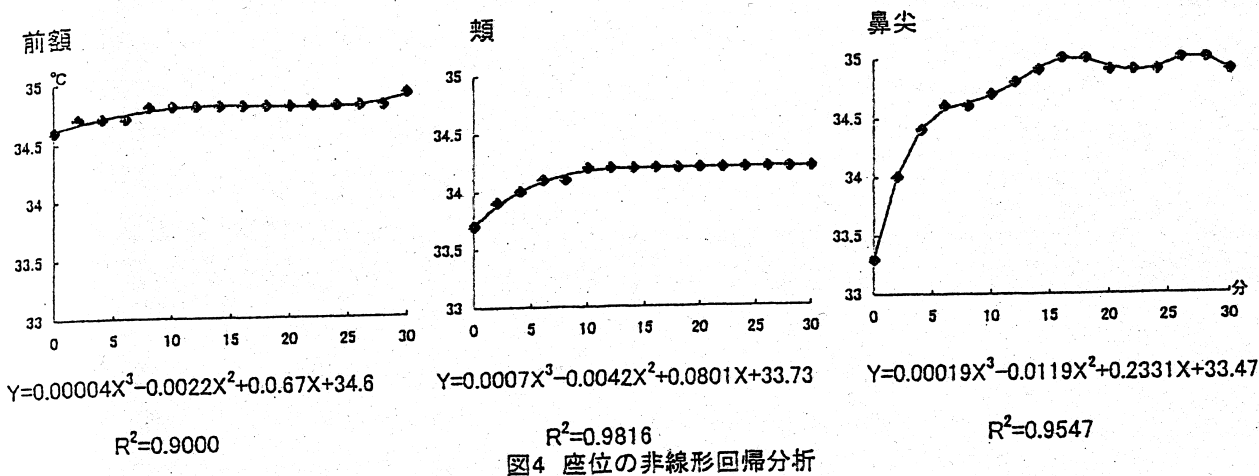


表1 連続3点における連続2点の差の平均: 座位

時間 (分)	前額	頬	鼻尖
0-4	0.033	0.006	0.261
2-6	0.028	0.094	0.244
4-8	0.039	-0.006	0.089
6-10	0.044	0.000	0.072
8-12	-0.022	-0.022	-0.056
10-14	-0.006	0.000	-0.044
12-16	0.006	0.006	0.083
14-18	0.017	0.006	0.044
16-20	0.000	-0.006	-0.039
18-22	-0.011	0.000	0.000
20-24	0.011	0.000	0.022
22-26	0.011	0.000	0.022
24-28	0.028	0.000	0.000
26-30	0.028	0.000	-0.039

表2 連続3点における連続2点の差の平均: 臥位

時間 (分)	前額	頬	鼻尖
0-4	0.321	0.047	0.657
2-6	0.200	0.164	0.150
4-8	0.100	0.064	-0.050
6-10	0.057	0.057	0.029
8-12	0.021	0.007	0.000
10-14	0.007	0.029	-0.014
12-16	0.021	0.029	-0.007
14-18	-0.021	-0.021	-0.043
16-20	-0.050	-0.014	-0.007
18-22	-0.036	0.036	0.043
20-24	0.000	0.007	0.000
22-26	0.007	-0.021	-0.014
24-28	0.000	0.014	-0.050
26-30	0.014	0.007	0.000

[考察]

体位別に鼻尖部の馴化過程をみると、立位では不安定な反応を示すものがあり、座位では前額部や頬部に比べて定常状態となるまでの温度差が大きかった。また、臥位では定常状態となった後でも多少の変動がみられた。したがって、鼻尖部を検討する際は、慎重な解析が必要であると考えられた。立位の場合、10分以降も定常状態となっていないものがあり、特に注意を要すると考えられた。また、定常状態となるまでの温度差が大きいものには、定常状態時に **Hunting** 現象と思われるゆらぎがみられることから鼻尖部は、環境温の変化に微妙に対応していると考えられた。前額部では他部に比較してどの体位も安定していたが、臥位では、定常状態となるまでの温度変化が大きいこと、10分以降もわずかであっても変化を続けるものが多いことを考えると、慎重な解析が必要であると考えられた。

つぎに、被験者間の相違をみたところ、Friedman 検定で 10 分以前は有意差がみられたが、12 分以後は有意差が認められなかったことから、10 分までの変化は入室以前の環境温によって差はあるが、12 分以後は同じ方向性を持つと考えられた。そこで、連続 3 点における連続 2 点の差の平均値から馴化過程における変化量を検討すると、10 分以降では座位の鼻尖部以外は、 0.05°C 以内となりほぼ定常状態に達したと考えられた。しかし、前額部は、座位の場合、臥位と異なり、20 分以降もわずかではあるが、変化しており、注意を要する。なお、変化量としては、座位の頬部は 10 分以降、きわめて安定性が高いことがわかった。

そこで、10 分以降についての変化を推定するため回帰分析を行った。その結果、1 次回帰では有意差はないが、3 次回帰で有意差が得られた。これは、馴化の概要で述べたように、馴化過程で定常状態となるまでの温度変化が大きいものにはハンティング現象と思われるゆらぎがみられることから、このゆらぎが影響しているものと思われた。この際、顔面の場合、環境温の変化が激しいと揺らぎが見られるとすると、計測や解析には慎重を要する。ただ、上記のように、1 次式での回帰は有意ではないが、温度変化が連続量でなく 0.1°C ずつの離散量であること、測定誤差が 0.1°C であることを考えると、一定となっているとしてよいと考えられるが、今後さらに例数を増やし、観察時間をのばして検討をすすめる必要がある。

以上より、健常者の顔面サーモグラムを描出するためには、体位と入室後の時間が重要な因子であることが判明した。

[参考文献]

- 1) 若宮純司、満洲邦彦、藤正巖、他：サーモグラフィにおける解析方法の標準化に関する研究、*Biomedical Thermology*, **19**, 74-80、1999.
- 2) 若宮純司、宮本謙一郎、城之園学、他：正常画像の算出に関する基礎研究、*Biomedical Thermology*, **20** : 91-95、2000
- 3) 柴田宏美、若宮純司、井垣歩、戌角幸治、谷脇清助：顔面サーモグラムの標準化に関する検討 一 体位別馴化過程およびパターン分類と循環機能との相関について一、*Biomedical Thermology*, **21**(2), 55-59, 2001.

2. メチル水銀毒性の発生機序の解明と治療法の開発に関する研究

研究概要

体内にとりこまれたメチル水銀が、生体内で毒性を発現するメカニズムについてはなお不明なことが多い。メチル水銀の毒性発現は、発生期、成熟期、老齢期の各年齢相で異なり、また臓器や細胞の種類、個体によっても異なるが、その理由は未だ解明されていない。最近酵母におけるメチル水銀の細胞内標的分子が明らかにされたが、ほ乳類では同様な物質の存在は同定されていない。これまでにメチル水銀が細胞に酸化ストレス傷害を引き起こすという事実が蓄積されてきている。メチル水銀は、低濃度では遺伝子にプログラムされた細胞死（アポトーシス）を引き起こすが、最終的にアポトーシスが決定されるまでに細胞内では様々な生体ストレス応答、遺伝子発現変化が起こっていて、これらの生体応答が破綻して修復が困難な場合に細胞死が選択されることが考えられる。また、細胞死を引き起こさない微量のメチル水銀濃度でも、生体応答を攪乱している可能性がある。生体内に滞留したメチル水銀は次第に無機化されていくが、この生体内無機化は低濃度慢性曝露の際の重要な問題となる。本課題では、体内にとりこまれたメチル水銀が毒性を発現するメカニズム及びメチル水銀に対する生体の応答メカニズムを解明し、さらにその成果をもとにメチル水銀中毒がもたらす傷害の防御、修復のための新たな治療法の開発へと発展させることを目的として、メチル水銀の生体内動態、シグナル応答、生体防御機構などについて、培養細胞系、モデル動物を用いて下記のような検討を行っている。

研究実施体制と平成13年度の各テーマ毎の進捗状況は下記の通りであり、ほぼまとまった結果が得られているものについては、詳細を後述した。

1. メチル水銀毒性の細胞種依存性についての放射線生物学的研究（平成 12～16 年度）

研究担当者 荒巻亮二

メチル水銀に高感受性を示す Chinese hamster V79 細胞を用いて、定常期と増殖期ではメチル水銀に対する感受性が異なり、その要因が細胞内のみならず、細胞外培地成分にもあることを示唆する結果を得た（詳細後述）。

2. メチル水銀の発生期における細胞分化に及ぼす影響に関する研究（平成 12～16 年度）

---特にシグナル伝達に及ぼす影響に関する検討---

研究担当者 山元 恵

メチル水銀の細胞分化に及ぼす影響を検討する最適な分化モデル培養細胞系を構築するために、マウス胎児由来の株化線維芽細胞である C3H/10T1/2 細胞を用いて、細胞の増殖に影響を及ぼさないメチル水銀曝露条件に関する基礎実験を行っている。1 μM を臨界濃度として cell viability が低下するが、1 μM を超えても、濃度によっては障害を受けながらも confluent な状態まで増殖することが判明した。

3. メチル水銀による酸化ストレス傷害の分子機構解明に関する研究（平成 12～16 年）

研究担当者 臼杵扶佐子

アポトーシスを誘導する濃度のメチル水銀を投与後、蛍光色素を用いて、細胞内 ROS (reactive oxygen species)、NO の *in situ* における経時的動態、細胞内ストレスに呼応したシグナル伝達系について経時的な検討を行った。さらに、メチル水銀曝露が遺伝子発現に与える影響についても検討した（詳細後述）。

4. 抗酸化剤を用いたメチル水銀中毒の病態と治療に関する研究（平成 12～16 年度）

研究担当者 臼杵扶佐子

老齢ラットを用いて、老齢期におけるメチル水銀曝露の影響、抗酸化剤 Trolox の効果、食餌影響（80%制限給餌）について検討した。老齢化のため個体差が大きかったが、不断給餌群で顕著であった筋肉の NADH 染色、CCO 染色で染色の乱れ、活性低下などミトコンドリア障害が、制限給餌群では正常であった。また、メチル水銀によるミトコンドリア電子伝達系酵素活性の低下は制限給餌群で弱かった。小脳、後根神経節、後根神経の病理学的検討は現在進行中である。

5. 塩化メチル水銀の亜慢性・慢性曝露による生殖器官・中枢神経系及び胎児への影響に関する基礎研究（平成 12～14 年度）

研究担当者 安武 章

微量のメチル水銀曝露の投与は世代を経て継代すると、第二世代の雄にのみ、精巣の病理変化および血中ホルモン濃度の低下が観察される。この影響に、精巣のグルタチオン濃度が影響することを示唆する知見を得た（詳細後述）。

6. 脳メタロチオネインの機能に関する研究（平成 12～16 年度）

研究担当者 安武 章

水銀蒸気曝露したモデルラット脳で誘導されるメタロチオネインについて、大脳と小脳を個別に観察した。水銀蓄積は大脳の方が高いにもかかわらず、メタロチオネインの誘導は小脳の方が大きく、誘導の感受性に組織間差のあることがわかった。

7. メチル水銀の生体内無機化反応（平成 12～16 年度）

研究担当者 安武 章

ラットを用いた *in vivo* 実験から分離ミトコンドリアを用いた培養実験までの一連の実験を通して、メチル水銀がミトコンドリア呼吸で産生するスーパーオキシドによって、ミトコンドリア内膜で脱メチル化されることがわかった（詳細後述）。

8. メチル水銀中毒脳神経細胞死の傷害機序に関する研究 (平成 12～16 年度)

研究担当者 宮本謙一郎

NMDA 受容体の関与を証明するため、生後 16 日目のメチル水銀投与ラット脳に、フォドリンの分解産物である 155kDa のバンドが検出され、免疫染色でもラット大脳の Occipital cortex と Parietal cortex にフォドリンに対する抗体の強い染色像が認められた。この結果より、メチル水銀によるフォドリンの分解が「NMDA レセプター刺激→Ca 流入→カルパイン活性化→フォドリン分解」という一連の経路を経て進むことが考えられた。

9. 性ホルモンがメチル水銀中毒に及ぼす影響に関する研究 (平成 12～16 年度)

研究担当者 宮本謙一郎

メチル水銀中毒脳神経細胞傷害に対する更年期傷害の影響とエストラジオール(EST)補充療法の効果を検討するために、卵巣摘出ラットを作成、手術後 7 日より sesame oil と EST を一週間に一回三週間大腿筋肉内に投与した。本モデルラットを用いたメチル水銀投与実験が進行中である。

10.代謝系解析のためのモデル動物開発 (平成 12～16 年度)

研究担当者 桑名 貴

細菌より得られた水銀分解遺伝子群を持つトランスジェニックマウス系統を作成するために、分与を受けた *Bacillus* 属細菌の水銀分解遺伝子 (merA、merB) の塩基配列の確認を行い、Genbank に登録された水銀分解遺伝子 (merA、merB) と比較した。その結果、ホモロジーは非常に高いながら (99%以上) 完全な一致は見られず、merA では一塩基の変異 (塩基 A→塩基 G) を確認し、merB では一塩基 (塩基 C) の挿入を確認した。merA の変異はアミノ酸配列が 1 つ変化するだけであったが、merB では挿入を確認した部位より下流のアミノ酸配列は完全に異なる。しかし、これら両遺伝子 (merA、merB) の水銀分解能を形質転換した大腸菌を用いて確認したところ、変異の有無に関わらず水銀分解能が確認できた。そこで、3 種類のリーディングフレームを持つ発現ベクターへそれぞれの遺伝子 (merA、merB) を導入し、各遺伝子につき 3 種類の計 6 種類の発現ベクターを作製した。

1. メチル水銀毒性の細胞種依存性についての放射線生物学的研究

ー水銀化合物の細胞内分布と感受性の検討ー

研究担当者 荒巻亮二(基礎研究部)

[研究目的]

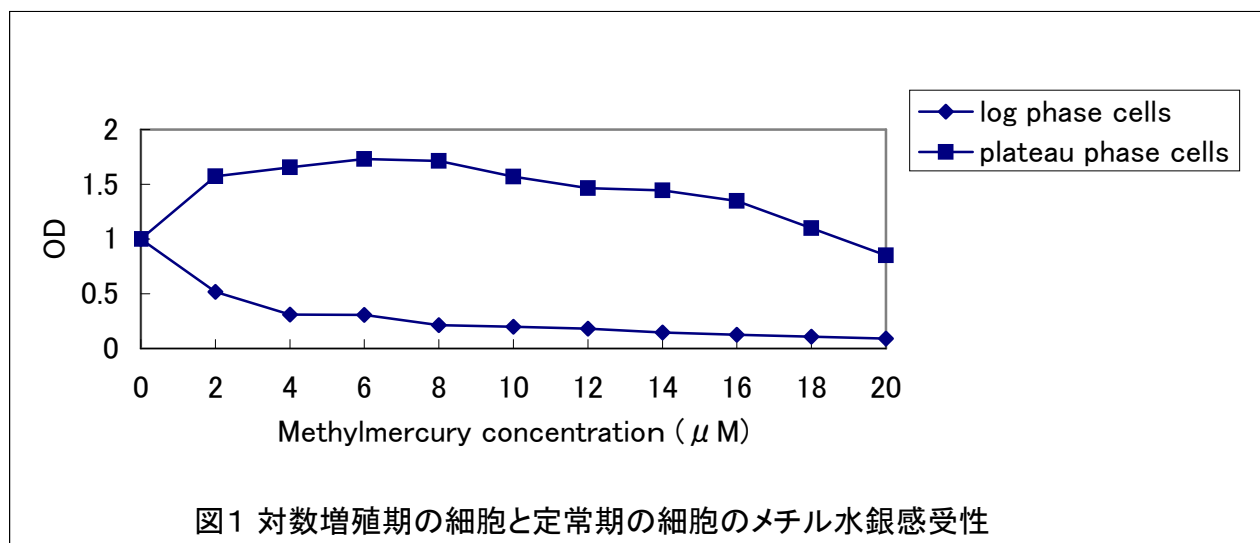
組織の増殖動態は、基本的には分裂を繰り返す幹細胞や成熟中の細胞と分化したまったく増殖しない機能細胞が存在する。このような種々の増殖動態にある細胞のメチル水銀に対する感受性の違いについて検討する。

[方法と結果]

細胞はチャイニーズハムスター正常肺由来の V79 細胞を用いた。培養細胞において正常組織由来細胞は、対数増殖を続けた後、細胞同士の接触阻害 (contact inhibition) によって分裂が停止する定常期の状態 (plateau phase) が生じる。このような対数増殖期の細胞と定常期の細胞のメチル水銀感受性について検討を行った。細胞毒性試験には WST-1 による cell counting kit (同仁化学研究所) を用いた。

定常期の細胞 : $1 \times 10^5/\text{ml}$ の細胞浮遊液を 96 穴のマイクロテストプレートに各 100 μl ずつ入れて培養し、3 日後に培地を新鮮培地に交換して培養を続け、翌日メチル水銀を培地に添加、2 時間後の生細胞数を測定した。

対数増殖期の V79 細胞は 1 μM 以上のメチル水銀で 2 時間以内には生細胞数 (OD) の低下が見られる。一方、定常期の細胞は OD の上昇が見られ、特に 2~10 μM の低濃度域では 50% 以上の上昇が見られた。18 μM 以上の濃度になると OD の低下が見られたが、対数増殖期の細胞のほとんどが死滅する 20 μM においても約 80% 以上の細胞が生きているという結果を得た (図 1)。Vogel ら (1986) もやはり、confluent quiescent cells になるとメチル水銀抵抗性が上昇することを報告している。OD がコントロールレベル以上に上昇したことについては、水銀添加 2 時間以内に生細胞数の急激な上昇が起こるとは考えにくく、低濃度領域のメチル水銀に曝露されることによって、細胞内の脱水素酵素等の活性が上昇した可能性が考えられる。



定常期の細胞でメチル水銀による OD の上昇（メチル水銀抵抗性）が見られることについて、細胞自体のメチル水銀抵抗性が考えられるが、細胞外の培地成分の寄与も否定できない。それを確認するために、対数増殖期にある細胞の培地を定常期にある細胞の培地と交換した場合、および定常期細胞の培地を新鮮培地に変えた場合の定常期細胞のメチル水銀感受性について検討した。

対数増殖期の細胞において、培地を定常期の細胞培養液と交換した場合、メチル水銀感受性の低下（OD 低下の抑制）が見られたが定常期の細胞の場合に見られるような OD の上昇はなかった（図 2）。一方、定常期の細胞において、培地を新鮮培地と交換した場合、メチル水銀に対する感受性の上昇（OD の低下）が観察されたが、対数増殖期の細胞ほどの高感受性にはならなかった（図 3）。

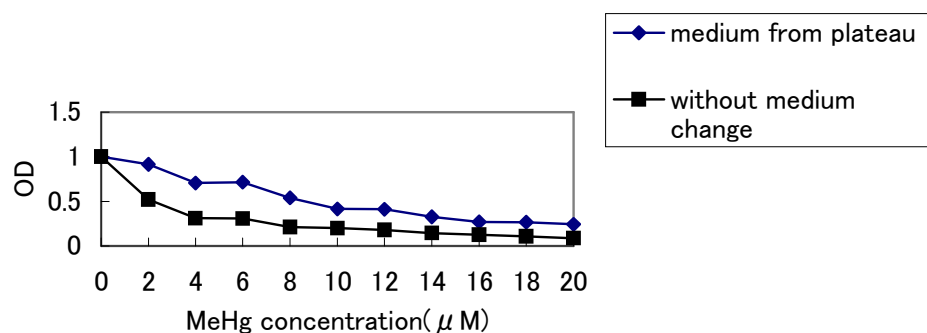


図2 対数増殖期細胞のメチル水銀感受性における定常期培養培地の影響

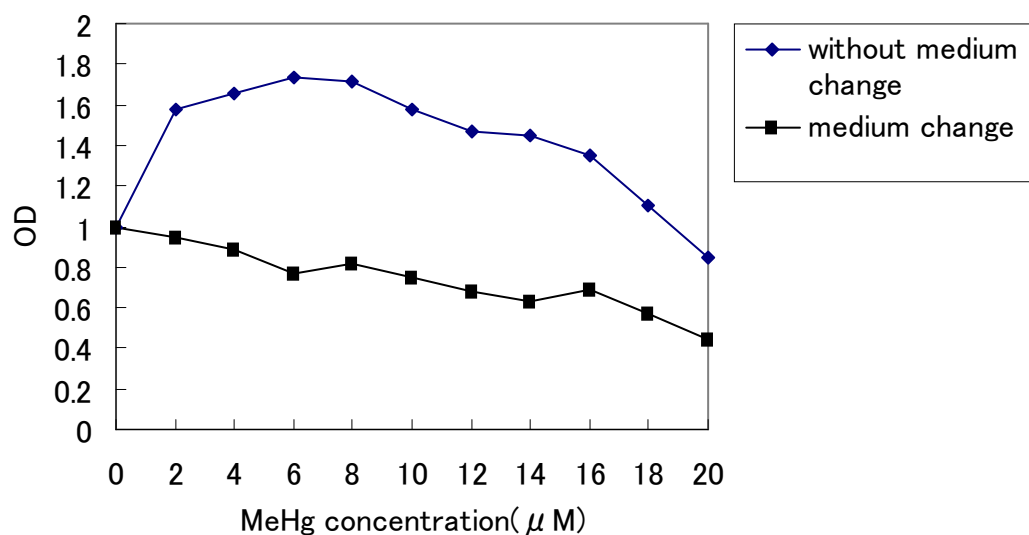


図3 定常期細胞のメチル水銀感受性における新鮮培地の影響

以上の結果から、V79 細胞は定常期になると大きくメチル水銀抵抗性（OD の上昇）になるが、その要因は細胞自体だけではなく、培地にもあると考えられた。それぞれの要因がどのような成分であるのか推定は、現段階では困難である。また、V79 細胞で観察されたような対数増殖期細胞と定常期細胞との間で見られるような大きな感受性の違いは、HeLa や CHO などの他の細胞では観察されなかった（結果は示さない）。

〔参考文献〕

Voge, D. G., Rabinovith, P. S., Mottet, N. K.: Methylmercury effect of cell cycle kinetics. *Cell Tissue Kinet* **19**, 227-242, 1986.

3. メチル水銀による酸化ストレス傷害の分子機構解明に関する研究

研究担当者 臼杵扶佐子（臨床部）

竹下 裕也（東京大・院・生命環境）

笹川 昇（東京大・院・生命環境）

〔目的〕

これまで構築してきた環境ストレスの影響を反映しやすく、その影響を解析評価しやすい培養細胞系、即ち 3' 非翻訳領域に CTG リピートを 160 個もつヒトミオトニンプロテインキナーゼ (DMPK) cDNA を遺伝子導入した C2C12 cell line¹を用いて、メチル水銀添加後の細胞内活性酸素群(ROS)の *in situ* における経時的動態について検討するとともに、メチル水銀曝露がもたらす細胞内 redox 変化による細胞内情報伝達系の攪乱、ストレス応答分子の動態変化について検討した。

〔方法〕

アポトーシスを誘導する濃度のメチル水銀を投与後、蛍光色素 DCF-DA, di (6-carboxy-2'-7'-dichlorofluorescein diacetate, di) 及び DAF-2 DA (diaminofluore-scein -2 diacetyl) を用いて、細胞内 ROS (reactive oxygen species)、NO の *in situ* における経時的動態について検討した。メチル水銀曝露後の細胞内情報伝達系の変動について、MAPK シグナル伝達系及び細胞内ストレスを防御するシグナル伝達系のひとつである Akt について経時的な検討を行った。さらに、メチル水銀曝露が遺伝子発現に与える影響を知る目的で、RNA の UG 部位に結合して RNA processing の splicing 過程に関与すると考えられている RNA 結合蛋白質 CUG-BP²について、C 末アミノ酸配列より得たペプチドにて作成した抗 CUG-BP 抗体を用いてメチル水銀曝露後の細胞内動態について検討した。

〔結果〕

蛍光色素 DCF-DA, di を用いた *in situ* における経時的な ROS 定量の検討から、アポトーシスをおこす 0.3 μ M のシステイン-メチル水銀添加後 2-3 時間より活性酸素の増加が認められることが明らかになった (図 1)。しかしながら、この筋芽細胞系では、蛍光色素 DAF-2 DA による細胞内 NO 定量については増加は認められなかった。

メチル水銀曝露後の細胞内情報伝達系の変動に関する検討では、MAPK シグナル伝達系においてアポトーシス誘導に関与すると考えられている SAPK/JNK、p38 シグナル伝達系では曝露 3 時間後から活性化が認められたが、アポトーシスの防御に関与すると考えられている ERK/ MAPK の活性化は本培養細胞系では認められなかった³。しかしながら、細胞内ストレスを防御するシグナル伝達系のひとつである Akt の系では活性化が認められることが明らかになった。(図 2)

RNA processing の splicing 過程に関与すると考えられている RNA 結合蛋白質 CUG-BP については、免疫細胞染色で、CUG-BP はメチル水銀曝露後に核-細胞質間移行が認められることが明らかになった。

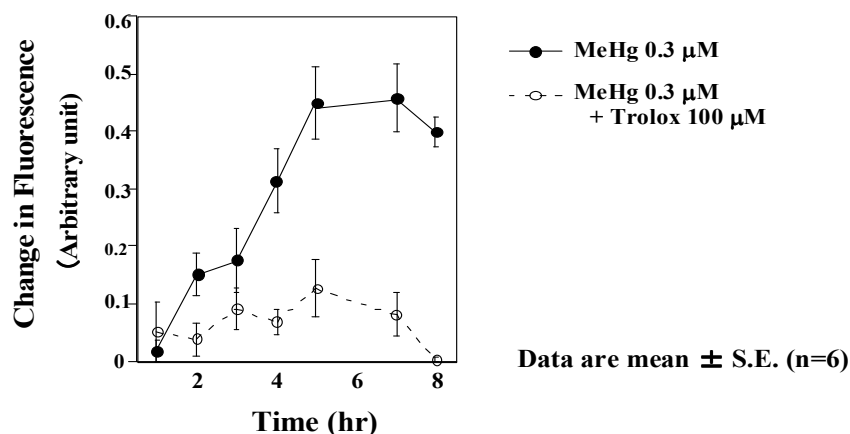


図 1 蛍光色素 DCF-DA, di を用いたメチル水銀曝露後の経時的な活性酸素の変動

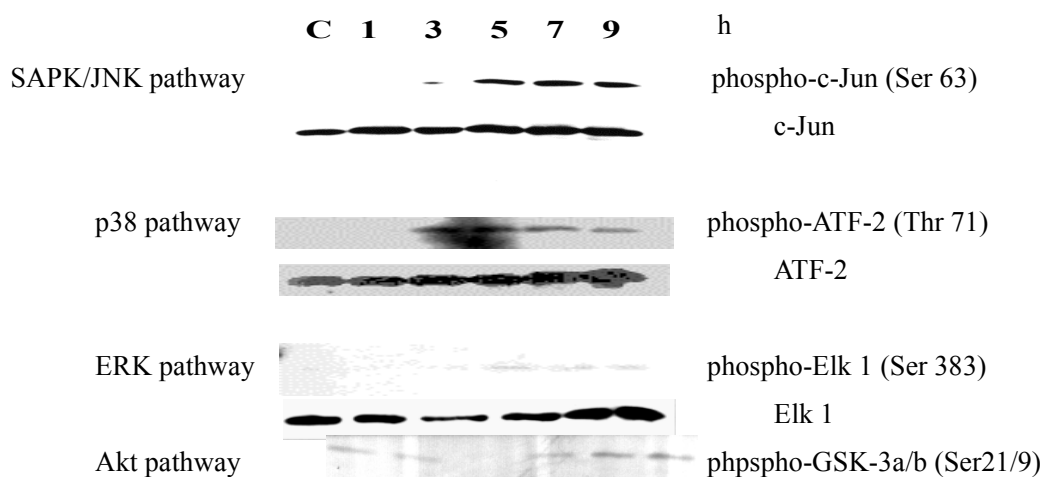


図 2 メチル水銀曝露後の細胞シグナル伝達系の活性化

[考察]

蛍光色素を用いた *in situ* における経時的な ROS 定量の検討から、本培養細胞系ではアポトーシスをおこす 0.3 μ M のシステイン-メチル水銀を添加後 2-3 時間より活性酸素の増加が認められることが明らかになった。この活性酸素の増加時期は、アポトーシス誘導に関与すると考えられている SAPK/JNK、p38 シグナル伝達系の活性化が認められる時期に一致した。メチル水銀によるアポトーシスを抑制することを明らかにしている抗酸化剤 Trolox^{3,5} の投与は、ROS の増加を抑制したことから、ROS はメチル水銀による細胞傷害の mediator になっていることが考えられた。この筋芽細胞系では、蛍光色素 DAF-2 DA による細胞内 NO 定量については増加は認められなかった。神経細胞株である PC12 ではメチル水銀添加後細胞内 NO の増加が認められることから、メチル水銀添加後の細胞傷害における NO の関与は組織によって差があることが考えられた。メチル水銀曝露後、アポトーシスの防御に関与すると考えられている ERK/MAPK の活性化は本培養細胞系では認められなかった。しかしながら、細胞内ストレスを防御するシグナル伝達系のひとつである Akt の系では活性化が認められることが明らかになった。本培養

細胞系では、ERK/MAPK の活性化に問題がある可能性がある。RNA processing の splicing 過程に関与すると考えられている RNA 結合蛋白質 CUG-BP の免疫染色の結果より、メチル水銀曝露は RNA 結合蛋白質の細胞内動態に影響を与え、遺伝子発現を修飾していることが示唆された。今後、マイクロアレイを用いた cDNA 解析を行い、メチル水銀曝露後の遺伝子発現のパターンについてさらに検討し、メチル水銀の標的遺伝子について検討する予定である。

〔文献〕

- 1) Usuki, F., Ishiura, S.: Expanded CTG repeats in myotonin protein kinase increase susceptibility to oxidative stress. *NeuroReport* **9**, 2291-2296, 1998.
- 2) Takahashi, N. Sasagawa, N. Usuki, F. Kino, Y., Kawahara, H., Sorimachi, H. Maeda, T., Suzuki, K., Ishiura, S.: Coexpression of the CUG-binding protein reduces DM protein kinase expression in COS cells. *J Biochem* **130**: 581-7, 2001.
- 3) Usuki, F. Takahashi, N., Sasagawa, N., Ishiura, S.: Differential signaling pathways following oxidative stress in mutant myotonin protein kinase cDNA-transfected C2C12 cell lines. *Biochem Biophys. Res. Comm.* **267**: 739-743, 2000.
- 4) Usuki, F., Yasutake, A., Matsumoto, M., Umehara, F., Higuchi, I.: The effect of methylmercury on skeletal muscle in the rat: a histopathological study. *Toxicol Lett* **94**: 227-232, 1998.
- 5) Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Tokunaga, H., Matsumoto, M., Eto, K., Ishiura, S., Higuchi, I.: In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication in the rat. *Neurosci Lett* **304**: 199-203, 2001.
- 6) Usuki, F., Maruyama, K.: Ataxia caused by mutations in the α -tocopherol transfer protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* **69**: 254-256, 2000.
- 7) Usuki, F., Yasutake, A., Matsumoto, M., Higuchi, I.: Chronic low-dose methylmercury administration decreases mitochondrial enzyme activities and induces myopathic changes in rats. *J Health Science* **47**: 162-167, 2001.

5. 塩化メチル水銀の亜慢性・慢性曝露による生殖器官・中枢神経系及び胎児への影響に関する基礎研究

研究担当者 安武 章（基礎研究部）
永野 匡昭（科学技術振興事業団）
井上 稔（新日本科学）

〔目的〕

これまでの実験から、ラットを 5 ppm Hg のメチル水銀給水曝露というリスクを負った条件で繁殖を繰り返していくと、第二世代の雄精巣に精子形成障害が認められるが、第一世代および第三世代以降は認められない。その原因を検討するために、水銀毒性に密接な関連をもつと考えられるグルタチオンとメタロチオネインという二つの生体内防御因子を指標に再度実験を行った。

〔研究方法〕

メチル水銀曝露は、メチル水銀の安定化と異臭抑制のため、グルタチオン抱合体の水溶液（5 ppm Hg）として給水中より行った。各世代のラットは 11.5 週齢で交配し、生後 3 週で離乳した。第一世代から第四世代までの血漿中におけるテストステロンと性ホルモン分泌に関与するホルモン濃度（LH, FSH）を測定した。また、精巣を中心に、メタロチオネン（MT）とグルタチオン（GSH）レベルについて検討した。実験期間は 1 回目に準じて、第一世代については 1 年間、第二世代から第四世代については 18 週間とした。第二世代から第四世代におけるホルモン濃度および MT ならびに GSH レベルの測定は、生後 1, 2, 3 週齢時および曝露終了時（18 週齢）に行った。

〔結果と考察〕

1. 血漿中テストステロンおよび黄体形成ホルモン濃度への影響

第二世代ラットでは、血漿中総テストステロン濃度の対照群に対する有意な低下が観察されたが、黄体形成ホルモン濃度には有意な変化はなかった。その他の世代のラットでは、血漿中ホルモン濃度にメチル水銀曝露の影響は観察されなかった。

2. 組織 MT レベルへの影響

MT は水銀（無機水銀）、カドミウムなどの重金属によって誘導合成され、重金属をキレートすることによってその毒性を軽減する。精巣の MT レベルは 3 週齢時まで成長と共に上昇し、その後は安定した値を示す。18 週齢時で比較すると、5 ppm Hg 曝露群では、いずれの世代でもわずかであるが対照群に比べて有意に高い値を示した（図 1）。これは、メチル水銀自体には MT 誘導能がないため、派生した無機水銀による誘導合成がおこったためと考えられる。同様の MT の誘導は腎臓でも観察されたが、脳では曝露の影響を見出すことはできなかった。また、肝臓では 3 週齢までは曝露の影響（5 ppm 群 > 対照群）が観察されたが、興味あることにそれ以後はこの差が消失した。これは無機水銀の蓄積量では説明できないため、水銀の直接的な作用ではなく、酸化的ストレスを介した誘導が考えられる。

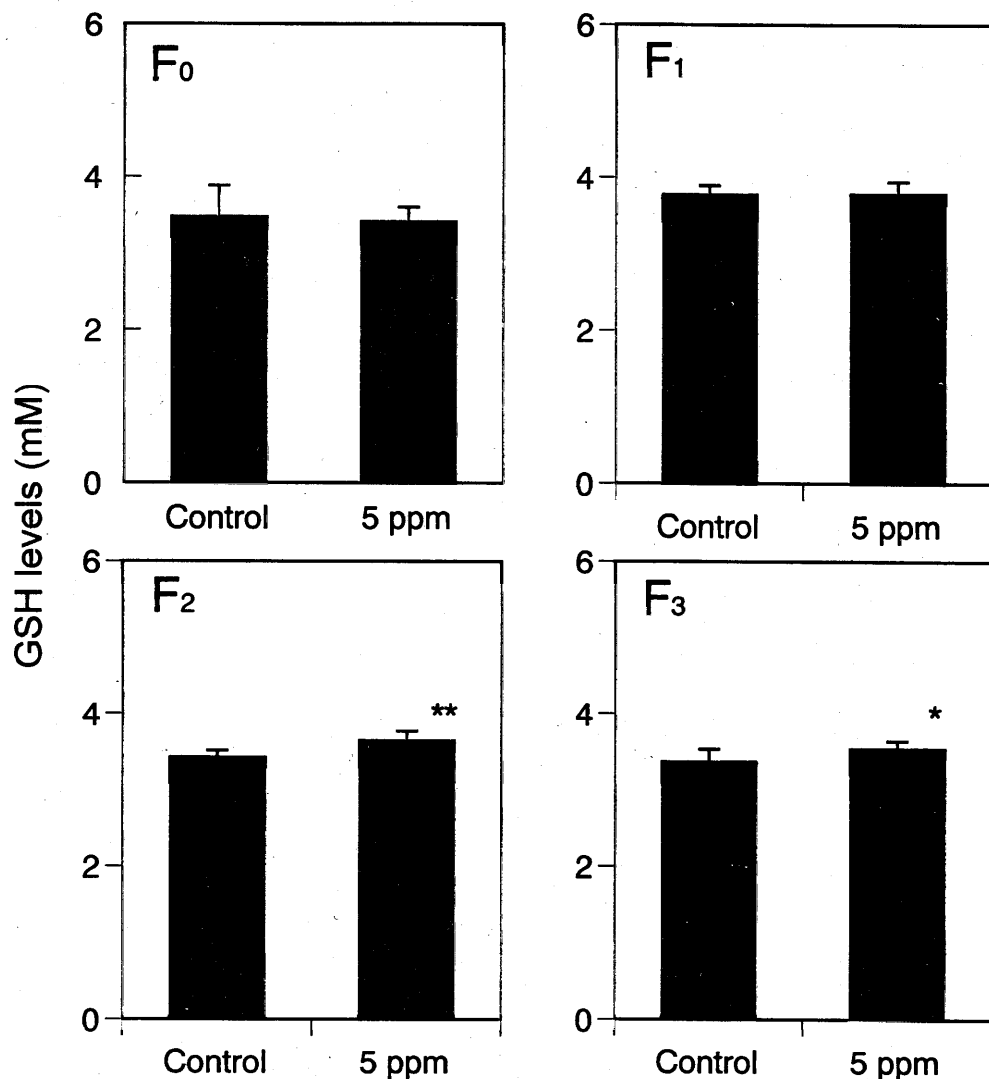


図 1. 第一から第四世代ラット 18 週齢時における精巣のメタロチオネインレベル。対照ラットとの有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で示した。

3. 組織 GSH レベルへの影響

GSH も MT 同様にストレスで誘導合成されるが、MT と異なり、無機水銀のみならずメチル水銀の解毒にも寄与する。これまで、メチル水銀の急性および慢性曝露において、ラット腎臓のレベルが上昇するのを観察してきた (1, 2)。本実験でも腎臓のレベルは世代を通じて曝露群における増加が認められたが、肝臓と脳では曝露の影響は顕著でなかった。しかし精巣では、第三世代と第四世代においてのみ、対照群に比較して曝露群で有意に高い値を認めた (図 2)。この結果は、GSH の誘導合成という防御機構が、第三世代において新たに機能し始めることを示唆している。

以上の結果から、5 ppm Hg 濃度のメチル水銀給水曝露条件下でラットの飼育繁殖を繰り返すと、メチル水銀 (あるいは派生した無機水銀) による精巣毒性が第二世代になって顕在化する。しかし、第三世代からは、精巣の GSH 誘導という新たな防御機構が働き始めるために、第二世代で観察された精巣障害が抑制されたことが推定される。精巣における GSH の誘導合成が、5 ppm Hg メチル水銀給水曝露条件下で、代を重ねることによって初めて発現する遅発性の防御系の一つであることが示唆された。

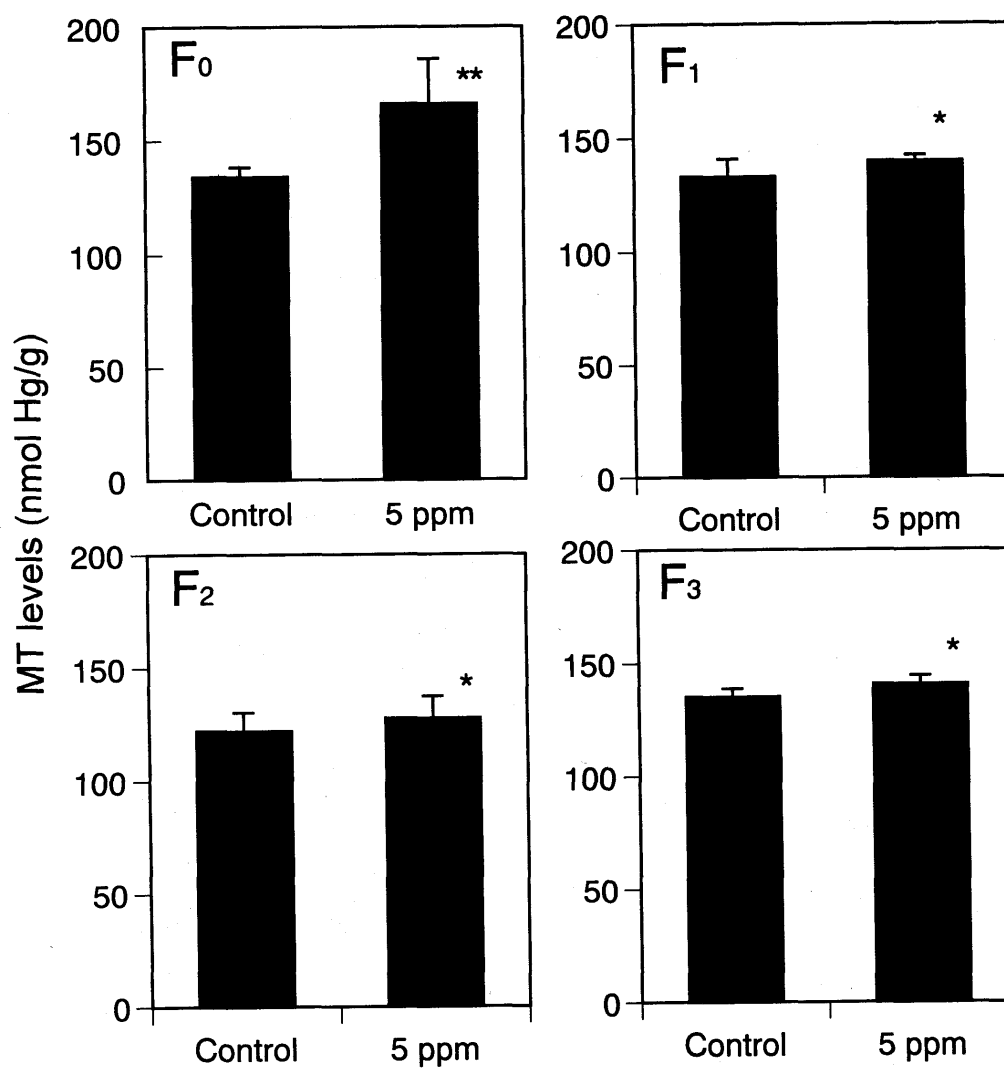


図2. 第一から第四世代ラット18週齢時における精巣のグルタチオンレベル。対照ラットとの有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で示した。

[参考文献]

- 1) Yasutake, A., Hirayama, K.: Acute effects of methylmercury on hepatic and renal glutathione metabolisms in mice. Arch. Toxicol., **68**: 512-516, 1994.
- 2) Yasutake, A., Nakano, A., Miyamoto, K., Eto, K.: Chronic effects of methylmercury in rats. I. Biochemical aspects. Tohoku J. Exp. Med., **182**: 185-196, 1997.

7. メチル水銀の生体内無機化反応

研究担当者 安武 章 (基礎研究部)
平山紀美子 (熊本大学)
井上 稔 (新日本科学)

〔前置〕

メチル水銀が動物体内に取込まれた後、徐々に無機水銀に変化するため、メチル水銀曝露後、新たな曝露なしに長期間経過した動物組織内の水銀は、その大半が無機水銀として検出される (1, 2)。したがって、メチル水銀処理した動物で観察される様々の症状の発現に、この体内で派生した無機水銀の関与する可能性もあり、特に慢性期には無視できないと考えられる。ここでは、実験動物を用いて、メチル水銀の脱メチル化機構について検討した一連の研究経過について概説する。これまで *in vitro* 実験から、メチル水銀の分解が水酸イオンラジカル ($\cdot\text{OH}$)、一重項酸素などの活性酸素あるいは紫外線で起こり得ることが証明されている (3, 4)。このうち、活性酸素は生体組織内でも絶えず産生されていることから、ここでは活性酸素の関与は十分に考えられる。特に、ミクロソームは主な $\cdot\text{OH}$ 産生場であり、ラットより分離したミクロソームで、 $\cdot\text{OH}$ 産生とメチル水銀の分解に良好な相関のあることが報告されているため (4)、ミクロソームにおける反応を考慮しながら実験を進めた。

1. *In vivo* 実験 (5)

実際に脱メチル化反応の起こる組織を確認するために、ラットにメチル水銀を静脈投与し、その後の無機水銀の生成を観察した。投与後数分以内に肝臓と腎臓の水銀濃度はプラトーに達するが、組織内無機水銀濃度を時間を追って測定すると、肝臓ではメチル水銀の蓄積と同時に無機水銀の生成が起こるのに対し、腎臓では水銀の蓄積から3時間の遅れがあって無機水銀の上昇が観察された (図1)。このことは、肝臓で生成した無機水銀の一部が循環系を介して腎臓に移行するためと解釈される。つまり、肝臓はメチル水銀の脱メチル化反応が進行する主要組織の一つと考えられる。そこで、本実験をラットの肝臓を指標として進めた。

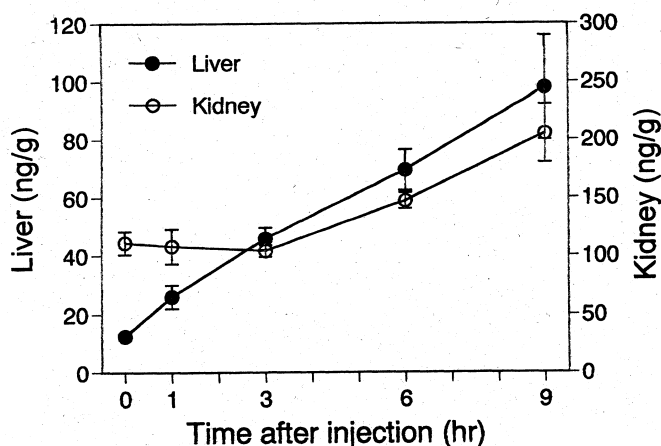


図1. 塩化メチル水銀 (2 mg/kg) 静脈投与後のラット肝臓と腎臓における無機水銀濃度の変化

メチル水銀を投与したラット肝臓における無機水銀の生成量は、静脈投与 4 時間後に測定した。これは、生成した無機水銀の組織からの流出を最小限に抑えるためである。まず、肝臓における活性酸素産生を修飾するいくつかの試薬の効果について検討した。メチルビオロゲン (MV) は組織内での代謝過程でスーパーオキシドを産生し、鉄イオン触媒の作用により、さらに・OHに変化する。期待通り、MV 投与したラットの肝臓では、無機水銀生成の顕著な促進が観察された (図 2)。しかしながら、鉄イオン触媒の作用の増強、あるいは抑制目的で、鉄イオン、あるいは鉄キレート剤デスフェラルを投与しても、無機水銀の生成に影響はなかった。また、NaCN はマイクロソームにおける・OH の産生を促進する (4) ために、無機水銀生成の亢進が期待されたが、本実験では逆に阻害が観察された。これらの結果から、肝臓における無機水銀の生成に、・OH ではない別の活性酸素の寄与することが示唆された。

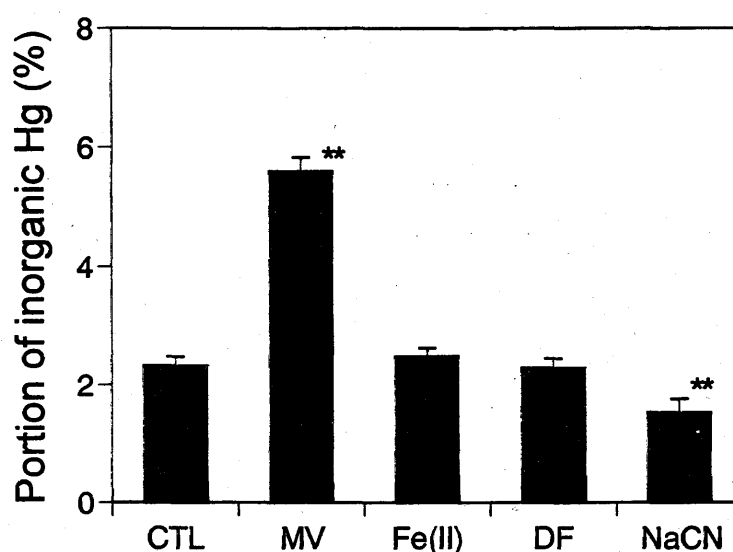


図 2. メチル水銀投与ラットの肝臓における無機水銀濃度に対する活性酸素産生修飾試薬の効果
3 回の実験の平均値±SD を示す。対照との有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で表わす。

MV や NaCN はそれ自体極めて強い毒性をもち、投与量を誤ると動物個体が死亡することもある。また、投与動物で観察される結果が肝臓のみへの影響とは考えにくく、そのため試薬の効果に対する正確な解釈が困難である場合も想定される。そこで分離した肝臓の実験系として、組織切片を用いて実験を進めた。

2. 肝臓切片を用いた実験 (6)

組織切片を用いた反応は、新鮮な肝臓から断面積約 1 cm^2 、厚さ約 0.5 mm のものを調製して、培地中でインキュベートするものであり、in vivo を再現する優良な系とされている。ラットにメチル水銀を静脈投与後、肝臓への取込みが十分と考えられる 20 分後に肝臓を取り出して切片を調製した。このようにして調製した切片を培養すると、反応時間に依存した無機水銀の増加が観察される。反応時間は、直線的な無機水銀の上昇が観察される 4 時間とした。培養系に MV を添加すると、無機水銀の生成は顕著に促進される (図 3)。しかし、・OH 産生を促進する目的で、鉄イオンを添加しても、酸化障害の指標で

ある過酸化脂質レベルは上昇するが、無機水銀の生成は全く影響を受けなかった。逆に、鉄イオンキレート剤デスフェラルを添加しても、過酸化脂質レベルの上昇のみが抑制され、無機水銀の生成には影響がなかった。この結果は、メチル水銀はMVの代謝過程で産生するある種の活性酸素の作用により無機水銀に変化するが、 $\cdot\text{OH}$ は寄与しないことを示唆する。また、 $\cdot\text{OH}$ スカベンジャーであるマニトールやDMSOも脱メチル化反応には全く影響せず、このことから $\cdot\text{OH}$ の寄与は否定される。また、*in vivo*実験と同様に、NaCNは反応を阻害した。以上の結果より、ラット生体におけるメチル水銀の無機化反応に、マイクロソームで産生される $\cdot\text{OH}$ の寄与はほとんど考えられないことがわかる。

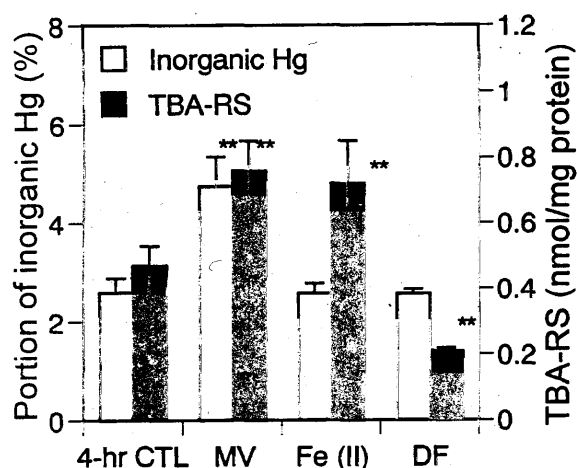


図 3. 肝組織切片における無機水銀の生成および過酸化脂質に対する活性酸素修飾試薬の効果
3 回の実験の平均値 $\pm$ SD を示す。対照との有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で表わす。

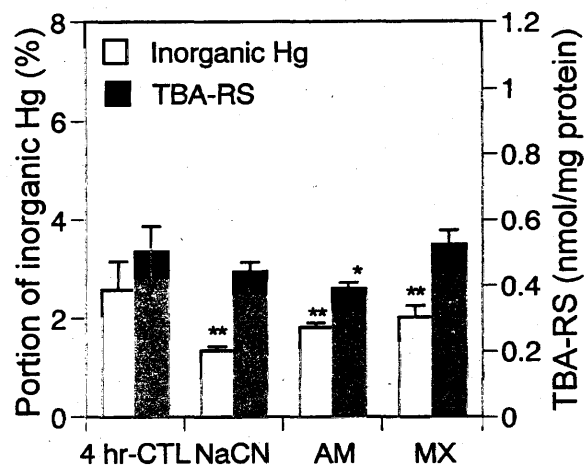


図 4. 肝組織切片における無機水銀生成および過酸化脂質に対するミトコンドリア呼吸阻害剤の効果
3 回の実験の平均値 $\pm$ SD を示す。対照との有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で表わす。

NaCN はマイクロソームにおける $\cdot\text{OH}$ 産生促進剤であるとともに、ミトコンドリアの呼吸阻害剤 (Complex IV) でもあり、ミトコンドリアはマイクロソームと並ぶ、活性酸素産生場である。他のミトコンドリア呼吸阻害剤であるアンチマイシン A やミクソチアゾール (共に Complex III) も同様に無機化反応を阻害した (図 4)。これらの結果は、ミトコンドリア呼吸とメチル水銀の脱メチル化反応が密接に関連しており、反応に関与するのがミトコンドリアで産生するスーパーオキシドであることを示唆する。ところが、この活性酸素分子は、非常に不安定であるため、メチル水銀を分解し得ないことが *in vitro* 実験で既に証明されている (3)。しかし、確かにスーパーオキシドは水分子の存在下では速やかに分解されるが、水分子の存在しない環境、つまり疎水性環境では、その安定性が大きく上昇することがわかっている。生体の大部分は水性環境であるが、ミトコンドリアの電子伝達系が存在する内膜は、細胞膜などと同様に疎水性の環境である。つまり、内膜に侵入したメチル水銀がそこで産生するスーパーオキシドと遭遇した時に初めて、脱メチル化反応がおこる可能性が考えられる。ベンゼンあるいは酢酸エチルなどの有機溶媒中でメチル水銀とスーパーオキシドを共存させると、無機水銀の速やかな生成が認められる (表 1) ことから、膜環境における脱メチル化反応が肯定される。しかし、この反応は 2% の水を添加するだけで完全に抑制される。

以上の結果から、メチル水銀の脱メチル化反応部位が細胞内のミトコンドリアであり、その呼吸過程で産生するスーパーオキシドによっておこることが推定される。このことを確認するために、さらにミトコンドリアを分離して反応を試みた。

表 1. 有機溶媒および水溶液中におけるスーパーオキシドによるメチル水銀からの無機水銀の生成

溶媒	無機水銀生成量 (ng)
ベンゼン	68.3 ± 18.3
ベンゼン + 2%水	0.7 ± 0.3
酢酸エチル	46.3 ± 3.2
水	0.7 ± 0.2
対照 (スーパーオキシド添加なし)	0.7 ± 0.1

各溶液 (0.01 mM MeHgCl, 1 ml) にスーパーオキシドカリウム塩 (0.1 M) - dicyclohexyl-18-crown-6 (0.3 M) 複合体の DMSO 溶液 (0.02 ml) を添加し、1 時間室温で反応後、生成した無機水銀をトルエン抽出法にて定量した。各値は 3 回の測定の平均値 ± SD を示す。

3. 分離ミトコンドリアにおける反応

ミトコンドリアはラット肝臓より遠心分離法で調製し、5 μ M のメチル水銀 - グルタチオンで 20 分間処理することによりメチル水銀を負荷した。これを、呼吸基質として、グルタミン酸、リンゴ酸、コハク酸の存在下、37°C でインキュベートすると、反応時間に依存した無機水銀の生成が観察される。この生成は肝臓切片における反応と同様に、アンチマイシン A あるいはミクソチアゾールなどのミトコンドリア呼吸阻害剤によって抑制される (図 5A)。以上から、ラット肝臓にはメチル水銀がミトコンドリアの呼吸過程で産生するスーパーオキシドで無機水銀に変化するメカニズムが存在し、それが生体内における脱メチル化反応の、少なくとも一部を説明するものと考えられる。

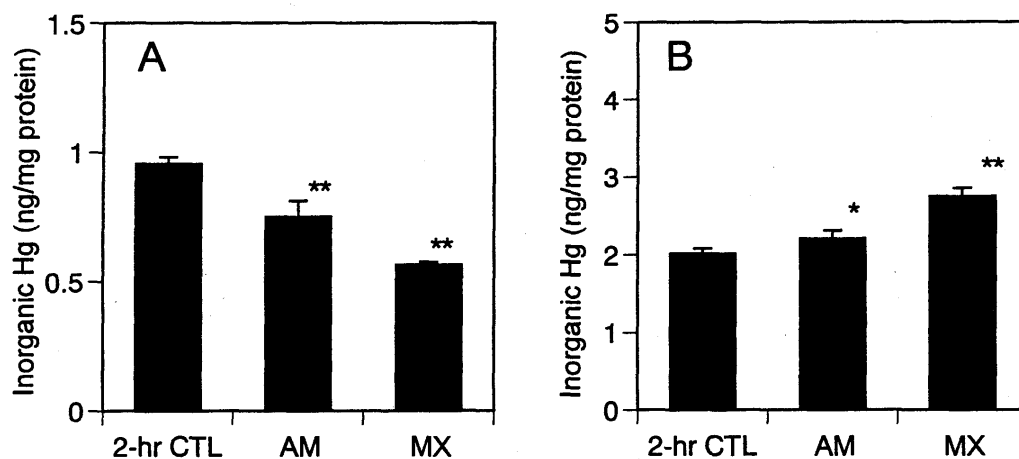


図 5. ラット肝臓 (A) および脳 (B) より招請した、分離ミトコンドリアにおけるメチル水銀の脱メチル化反応 3 回の実験の平均値 ± SD を示す。対照との有意差は、* ($p < 0.05$) および ** ($p < 0.01$) で表わす。

メチル水銀曝露後の無機水銀は生体各組織に検出され、脳もその例外ではない。脳組織における無機水銀が、組織内で生成したものであるのか、あるいは肝臓などの末梢組織で生成したものが血液-脳関

門を通過して侵入したものであるのか、議論が分かれている。上記のミトコンドリア内での脱メチル化が普遍的に起こり得るものであるとすると、脳における無機水銀も組織内で生成したものであると考えられる。脳における反応の可能性を確認するために、ラット脳よりミトコンドリア分画を調製し、肝ミトコンドリアと同様にメチル水銀を負荷して反応を試みた。図 5B に示すように、反応時間に依存した無機水銀の生成が認められ、これまでの反応と同様にミトコンドリア呼吸阻害剤の影響をうけた。しかしながら、その効果は肝ミトコンドリアとは異なり、無機水銀の生成を促進する傾向が見られた。恐らくミトコンドリアの電子伝達系を取り巻く環境が肝臓とは異なるために、スーパーオキシド産生に対する効果の違いが生じたものと推察される。脳では、肝臓と異なり、ATP 産生の大半をミトコンドリアの TCA 回路／電子伝達系ではなく、細胞質の解糖系に依存していることから、組織内におけるミトコンドリアの役割自体が肝臓とは異なっている可能性もある。いずれにせよこの結果は、メチル水銀の脱メチル化反応が脳組織でも起こり得ることを証明するものであり、曝露動物の脳に検出される無機水銀の少なくとも一部は、組織内で生成したものであることを示唆する。

このようにしてミトコンドリア内で生成した無機水銀が、メチル水銀投与後の毒性発現メカニズムにどのように関わってくるかについては、今後の研究を待たなければならない。

〔参考文献〕

- 1) Lind, B., Frberg, L., Nylander, M.: Preliminary studies on methylmercury biotransformation and clearance in the brain of primates. II Demethylation of mercury in brain. J. Trace Elem. Exp. Med., **1**: 49-56, 1998.
- 2) Hansen, J.C., Reske-Nielsen, E., Thorlacius-Ussing, O., Rungby, J., Dansher, J.: Distribution of dietary mercury in a dog. Quantification and localization of total mercury in organs and central nervous system. Sci. Total Environ. **78**: 23-43, 1989
- 3) Suda, I., Takahashi, H.: Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by other reactive oxygen species besides hydroxyl. Arch. Toxicol. **66**: 34-39, 1992
- 4) Suda, I., Hirayama, K.: Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. Arch. Toxicol., **66**, 398-402, 1992
- 5) Hirayama, K., Yasutake, A.: Effects of reactive oxygen modulators on in vivo demethylation of methylmercury. J. Health Sci., **45**, 24-27, 1999
- 6) Yasutake, A., Hirayama, K.: Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices. Arch. Toxicol., **75**, 400-4, 2001

3. メチル水銀の毒性検定及び次世代影響に関する実験的研究

研究概要

メチル水銀、特に微量のメチル水銀曝露が胎児に対してどのような毒性を与えるかを評価解析することは IPCS90 に示された通りである。この胎児組織に対する毒性影響を考えると、各種幹細胞（神経幹細胞、生殖幹細胞、免疫幹細胞、血液幹細胞）への影響は個体全体への波及影響の高さから最も重要視すべきものである。以上のことから本課題では、①生物の本質的機能の一つである生殖機能と次世代に対するメチル水銀毒性影響を最新の研究手法で解析することに加えて、②これら研究手法の限界を解決するための新規の毒性影響評価法を開発することを目的としている。

具体的には、①本研究所の持つ最新のメチル水銀曝露影響評価手法を用いて胎児期に長期微量曝露を行い、胎児、新生児の細胞と組織、生殖細胞、生殖機能への影響、次世代への毒性影響を検討評価する研究を遂行している。加えて、②微量メチル水銀曝露による毒性影響を評価する新規手法を開発する目的のために、現状の最新研究手法で評価が困難な生殖幹細胞を始めとした各幹細胞への定量的直接影響を検討し、次世代影響を解析する手法や感受性の高い発生時期の検討手法を開発、確立しようとしている。また、実験動物系統の中で毒性影響検定に適した系統、種を検討して新しい実験設計を開発する試みを行っている。

研究実施体制と平成 13 年度の各研究テーマの進捗状況は以下の通りである。

(1). 生殖機能と次世代に対する影響解析研究

各種幹細胞（神経幹細胞、生殖幹細胞、免疫幹細胞、血液幹細胞）への影響は個体全体への波及影響が高く、その中でも生殖幹細胞は次世代影響に波及することから、これに対する微量曝露の影響を評価することは重要な研究課題である。本研究項目では既に本研究所で蓄積してきた研究手法を用いて胎児期、新生児期におけるメチル水銀の長期微量影響を、主に生殖機能への影響評価の視点から解析評価する。

1. メチル水銀の健康影響に関するサルとの対比研究

—長期微量有機水銀の胎児カニクイザルへの影響— （平成 12～16 年度）

研究担当者 村尾光治

WHO の IPCS では、メチル水銀曝露の胎児への影響については母親の毛髪水銀レベルが 10－20 ppm で胎児の 5%に障害が現れる恐れがあると報告されている。また、より低濃度で行動異常をきたす報告と影響ないと結論している報告があり国際学会でも意見が二分されている。このようなことからカニクイザルを用いてメチル水銀の胎児影響についての量反応関係や胎児期メチル水銀による児の行動異常などについて多角的に研究を行っている。胎児性サルの研究を継続し妊娠可能な雌性サルを雄性サルと交配し低濃度曝露の実験系を実施する予定にしていたが、Bウイルス抗体陽性カニクイザルを実験系から排除する必要性がでたために、交配可能なサルを維持することができず本年度は妊娠サルを作製することができなかった。現在これまで産まれた胎児ザルの自発運動量を継続して観察している。また、学習行動として遅延見本合わせや WGTA (Wisconsin-General-Test-Apparatus) を利用して認知行動試験を行い学習知能へのメチル水銀の影響がどの程度から発現するのかを検討しているところである。

2. 慢性曝露による経世代影響に関する基礎研究（平成 12～14 年度）

研究担当者 安武 章

メチル水銀への感受性が最も高いとされる胎児をターゲットとして、コモンマーモセットにおける低レベルメチル水銀への慢性曝露時の影響を、新生児の行動および病理変化を指標として評価することを目的として実験を行っている。平成 11 年に導入した雌個体をペアリング後、平成 12 年 10 月から 0.5 ppm Hg のメチル水銀を含む給水で曝露を続けている。平成 13 年 5 月に出生した 2 頭(雌雄各 1)を離乳期（3 カ月齢）に達した時点で解剖し、病理標本を作成すると共に、組織水銀濃度を測定した。光学顕微鏡的には、曝露前に採取した対照個体との間に、有意な差は認められていない。毎月モニターしている本ペアの血中水銀濃度は、ここ半年近く 1.4～1.8 μ g/ml(雌)、1.9 μ g/ml(雄)とプラトー状態を示しており、親固体に神経症状、体重減少等の変化は認められていない。また、平成 12 年秋に出生した雌固体は、単独出生のため、解剖せずにそのまま同じケージないで一緒に飼育しているが、その血中水銀濃度は 3.4～4.0 μ g/ml と親の 1.5～2.0 倍の値を維持している。

（2）. 微量曝露による毒性影響の新規評価法の開発研究

現存の研究手法の限界を解決するために新規の毒性影響評価法を開発することを目的とし、各動物種を用いたより明確で詳細な毒性評価法の開発研究を行っている。

1. 次世代影響に関する生殖学的実験研究（平成 12～16 年度）

研究担当者 桑名 貴

次世代影響、特に次世代の生殖毒性影響を評価する浸検定法を開発するために、マウス及びカニクイザルを用いて研究を行った。まず、母獣の子宮内で発生途中のマウス器官形成期胚に外来始原生殖細胞を移植し、数日後に移植始原生殖細胞の運命を組織学的に追跡した結果、移植始原生殖細胞が宿主胚の生殖巣原基へと移動する例を観察した。これによって、哺乳類においても鳥類同様に外来始原生殖細胞を胚に導入し、その後発生を継続して生殖巣キメラ個体を作製することの可能性を示すことができた。加えて、カニクイザルではカニクイザル胎児の作出とその操作法の検討を詳細に行った結果、未だに多大な労力と熟練を要するものの希望する妊娠日齢の胚を入手することができるようになった。この手法を用いて本年度は 30 日齢と 36 日齢の胚を研究に用い、始原生殖細胞の検出と培養を試みることができた。その結果、生殖巣の細胞がアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS 染色陽性を示すことが確認され、両染色法がカニクイザル始原生殖細胞の検出に適することが判明した。また、予定生殖巣部域およびその周辺の細胞を約 2 ヶ月間培養した後も、アルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS 染色陽性を示す細胞の存在が確認できたことから、カニクイザル始原生殖細胞が体外培養で維持できる可能性が示唆された。

鳥類の始原生殖細胞を用いた毒性検定法に関し、単離精製を行う効率を飛躍的に改良することができた。また、凍結保存に関しては例え少量の始原生殖細胞であっても条件を検討することで凍結融解後の細胞生存率をある程度維持することができるようになった。つまり、単離精製及び凍結保存の両面からも鳥類での生殖毒性検定法はほぼ開発できたものと考えられる段階となった。更に均一な始原生殖細胞

集団を得るために始原生殖細胞増殖培養を行うことに関しても一定の成果を挙げることができた。

一方、哺乳類における生殖細胞系列の操作技術の開発に関しては本年度、研究の緒に就いたばかりの段階であるために、次年度以降の課題となる(詳細後述)。

2. 水銀の変異原性の下等脊椎動物を用いたスクリーニング (平成 10～16 年度)

研究担当者 山口 雅子

水銀には DNA への吸着性があることが知られている。しかし、遺伝影響については細菌を使ったエイムズ法や培養細胞の姉妹染色体交換 (SCE) の観察によって DNA 傷害作用が示唆されているものの、生殖細胞における変異原性についてのデータはない。

本研究では迅速に水銀の遺伝影響の有無とその程度を確認するために、下等脊椎動物を用いた水銀の変異原性のスクリーニングを行う。

昨年度の予備実験で決定した実験条件に従い、今年度からメチル水銀曝露群での実験を行う予定で野生型メダカを繁殖させていたが、飼育室で原因不明の水銀汚染が生じ、飼育していた個体がすべて実験に使用できない状態になった。

このため、飼育室の水銀除去が完了するまでの間飼育室でのメダカ飼育を中止し、屋外のストックを基にした繁殖のみを行ったが、これも、テスター系統で原因不明の大量死が生じ、系統維持が困難な状況にまで陥った。

その後、東京大学より新たにテスター系統個体の分与を受けて再度繁殖させている。今後の繁殖が順調であれば秋頃には投与実験が可能になる見通しである。

3. 神経系細胞の分化・発達に関する新規毒性影響評価法の開発研究 (平成 13～17 年度)

研究担当者 足立達美

今年度は、ラット胎仔大脳半球から調製された初代培養細胞におけるオリゴデンドロサイトの分化のタイミングに及ぼす血小板由来増殖因子 (PDGF) および甲状腺ホルモンの影響を調べた。オリゴデンドロサイトが出現するのは生体内では出生頃で、本培養系では 4 日目に相当する。無血清の基本培地で培養するとオリゴデンドロサイトは 2 日目から観察されたが、PDGF を添加するとオリゴデンドロサイトへの分化は 4 日目でもほとんど起こらなかった。PDGF と同時に甲状腺ホルモンを添加すると、オリゴデンドロサイトは 4 日目から観察され始め、生体内における分化のタイミングと一致した。以上の結果から、基本培地に PDGF および甲状腺ホルモンを添加することにより、生体内におけるオリゴデンドロサイトの分化のタイミングを *in vitro* で再現できることがわかった (詳細後述)。

(2) 1. 次世代影響に関する生殖学的実験研究

研究担当者	桑名 貴 (基礎研究部)
	土屋 英明 (基礎研究部)
	松田 佳子 (基礎研究部)
	趙 東風 (基礎研究部)
	山海 直 (国立感染研究波霊長類センター)
	阿部 訓也 (理化学研究所)
	高橋 慎司 (独法・国環研)
	内藤 充 (独法・農生資源研)
	松崎 正治 (熊本県・農研)
	村田 浩一 (日本大)
	森角 興起 (横浜市繁殖センター)
	野瀬 俊明 (三菱生命研)

〔研究成果及び進捗状況〕

メチル水銀が配偶子（精子や卵子）の形成過程に与える影響を検討するために、鳥類および哺乳類を用いて配偶子の祖細胞である生殖幹細胞（始原生殖細胞）に注目して、発生初期における始原生殖細胞に対する微量メチル水銀曝露の影響を解析するため、鳥類においては本研究で開発してきた手法をいくつかの種を用いることによって従前より効率の良い始原生殖細胞の単離・精製法を確立することができた。

単離精製に関しては、KAv-1 培養液 (Kuwana et al., 1996) を基本培地として 8% と 12% Nycodenz を重層し、800g で 20 分間遠心することで重層界面付近にウズラでは約 70%、ニワトリでは約 78% の始原生殖細胞を回収できた。純化率は上記の操作を再度行うことによってウズラ約 93%、ニワトリ約 92% に達した。これによって本実験研究に使用する可能性のある鳥類種（ウズラ及びニワトリ）の始原生殖細胞に関する単離・精製手法はほぼ確立したと考えられる。

上記の手法を用いてニワトリ胚始原生殖細胞を単離して、倒立顕微鏡下で始原生殖細胞のみを採取した後、より均一な始原生殖細胞集団を大量に得ることを目的として、始原生殖細胞増殖培養法の開発を試みた。純粋な始原生殖細胞集団を選別し、予め MMC 処理した各種の線維芽細胞層の上で培養する。この際に細胞増殖因子として CNTF、TNF- α 、bFGF を添加することによって始原生殖細胞の増殖培養が可能となった。また条件を絞り込むことによって、生体内から採取した生殖幹細胞を他種の細胞と共存させることなしに CNTF、TNF- α 、bFGF を含む培養液で培養することによって始原生殖細胞を増殖させることも可能となった。この点においても本研究成果を次世代生殖細胞への毒性影響検定法に用いることがより現実的になったものとする。

この様に鳥類において生殖毒性影響検定法の開発が順調に進む一方、これらの手法を哺乳類へと応用するための基盤研究も行った。哺乳動物の始原生殖細胞の検出法や培養法は、マウスで多くの報告がなされている反面、ヒトやサル類における知見は少ない。ただし、サル類で始原生殖細胞を実験材料として用いるために必要な、妊娠個体の確保、妊娠週齢の確定につながる妊娠診断、胎児の採取と操

作技術がほとんど確立されていない。これを解決するために、カニクイザル胎児の作出とその操作法について詳細な検討を行った。

まず交配候補ザルの選定方法の確立のため、1. 経産サルで流産等の既往歴の無い個体、2. 未経産のサルで性成熟した健康上問題の無い個体、3. 過去流産の記録はあるが、その後正常に産仔を得ている個体、4. 過去6ヶ月以上に渡り規則的な月経周期の認められる個体、の条件を満たすメスザルを筑波霊長類センターの繁殖群より選定した。更に交配及びその同居期間（3日間）中の排卵日を特定して正確な妊娠週齢を推定するために、予め実験個体から採血を行ってE2値の最も低い時期を確定、更に同居交配期間の前日から同居の翌日まで計5日間の採血によって排卵時期を確定した（推定排卵日の確定）。最終的に妊娠個体を得たかどうかの判定は、推定排卵日から21日及び28日目に血液採取して β -mCGの濃度を測定して妊娠の可能性のある個体から胎児採取を行った。

妊娠ザルを塩酸ケタミンによって麻酔、開腹して子宮頸部を結索、卵巣ごと外科摘出を行った。摘出子宮を密閉容器に保存液とともに空気を遮断して、氷冷状態で本研究所に輸送した。

この様に開発した手技・手法を用いることによって、今回36日齢および30日齢のカニクイザル胚を用いて始原生殖細胞の検出と培養を試みることができた。

36日齢胚では左右の生殖巣が形成されていたため、右生殖巣を培養後アルカリフォスファターゼ染色し、左生殖巣をロスマン固定後PAS染色した。その結果、生殖巣の細胞がアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS染色陽性を示すことが確認された。このことからカニクイザル始原生殖細胞がアルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS染色陽性の細胞として検出できる可能性が示唆された。

30日齢胚では生殖巣は形成されておらず、予定生殖巣部域およびその周辺の細胞を約2ヶ月間培養した。この細胞にアルカリフォスファターゼ染色とPAS染色を行ったところ、アルカリフォスファターゼ活性陽性、PAS染色陽性を示す細胞の存在が確認できた。このことから、カニクイザル始原生殖細胞が体外培養で維持できる可能性が示唆された。

カニクイザルを用いての基盤研究に加え、昨年度に引き続いてマウスを用いた始原生殖細胞操作技術の開発も行い、マウス胚の器官形成期（7.5～9日）胚に予め蛍光標識を施したニワトリの単離始原生殖細胞を移植し、数日後に胚を蛍光及びPAS染色によって観察することにより宿主胚の生殖巣原基中へのニワトリ始原生殖細胞の導入が確認できた。これは、異種の始原生殖細胞でも哺乳類胚の生殖巣原基へ導入が可能であることを世界に先駆けて示したもので、マウス始原生殖細胞においても同様にマウス胚への移植・導入が可能であることを強く示唆する結果となっている。今後はこの手法を更に改良することで、哺乳類胚での始原生殖細胞導入の効率を改良することが必要となる。

〔参考文献〕

- 1) 岡田益吉、長濱嘉孝編：生殖細胞—形態から分子へ、共立出版、1996。
- 2) 桑名貴：鳥類始原生殖細胞の胚間移植、蛋白質核酸酵素、**43**: 390-396, 1998.
- 3) Hamburger, V., Hamilton, H. L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morphol., **88**, 49-92, 1951.
- 4) Kuwana, T., Hashimoto, K., Nakanishi, A., Yasuda, Y., Tajima, A., Naito, M.: Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. Internat. J. Develop. Biol., **40**, 1061-1064, 1996.

- 5) Tsuchiya, H., Ogonuki, N., Kuwana, T., Sankai, T., Kanayama, K.: Short-term preservation of mouse oocytes at 5 °C. *Exp. Anim.*, **50**, 441-443, 2001
- 6) Sankai, T.I., Tsuchiya, H., Ogonuki, N.: Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. **55**: 1759-1768, 2001
- 7) Naito, M., Sano, A., Matsubara, Y., Harumi, T., Tagami, T., Sakurai, M., Kuwana, T.: Fate of donor blastodermal cells derived from the central disc, marginal zone and area opaca transferred into the recipient embryos. *Jour. Poult. Sci.*, **38**, 58-61, 2001.
- 8) Eto, K., Yasutake, A., Kuwana, T., Korogi Y., Akim, M., Shimozeki T., Tokunag, H., Kaneko, Y.: Methylmercury poisoning in common marmosets—A study of selective vulnerability within the cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, **29**, 565-73, 2001
- 9) Naito, M., Sano, A., Matsubara, Y., Harumi, T., Tagami, T., Sakurai, M., Kuwana, T.: Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads. *Reproduction*, **121**.,547-52, 2001

(2) 3. 神経系細胞の分化・発達に関する新規毒性影響評価法の開発研究

研究担当者 足立 達美 (基礎研究部)
阿相 皓晃 (都老人研・神経生物)
国本 学 (北里大・薬)
高永 博実 (北里大・薬)

[研究目的]

メチル水銀毒性に対する感受性は胎児期において高いことが知られている。メチル水銀の主な標的である中枢神経系においては、この時期、細胞が盛んに増殖、分化、発達しており、これらに及ぼす毒性影響を評価することは重要である。そこで、ラット胎仔の脳から調製した初代培養細胞を用いて、グリア細胞の数および特異的マーカー発現量の変化に注目し、微量メチル水銀が神経系細胞の分化・発達に及ぼす影響を細胞化学的・生化学的に解析するための試験系の開発を行う。

[研究成果および進捗状況]

胎生 18 日目のラット胎仔大脳半球から調製した初代培養細胞におけるグリア細胞の分化・発達に及ぼす細胞密度および甲状腺ホルモンの影響を検討した。細胞をまきこんだ 2-3 時間後では、大部分の細胞は微小管関連タンパク質 2 (MAP2) 陽性の神経細胞であり、NG2 プロテオグリカン陽性のオリゴデンドロサイト前駆細胞も観察されたが、分化したグリア細胞のマーカーを発現している細胞は見られなかった。細胞を高密度あるいは低密度でまきこみ、甲状腺ホルモンの存在あるいは非存在下で培養すると、高密度の場合にはグリア繊維酸性タンパク質 (GFAP) 陽性のアストロサイトが観察されたが、低密度ではほとんど見られなかった。アストロサイト誘導因子の一つである白血球遊走阻害因子 (LIF) を加えた培地で細胞を低密度で培養すると、コントロール (甲状腺ホルモン非存在下で高密度で培養した場合) とほぼ同等の GFAP の発現が見られた (図 1) ことから、低密度の場合にもアストロサイト前駆細胞は分化能を有して生存しているが、低密度ではアストロサイト誘導因子の量が少ないためにアストロサイ

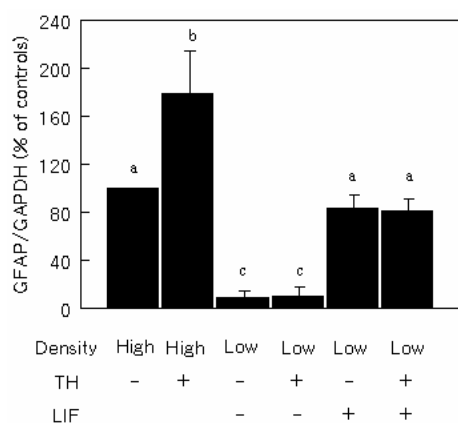


図 1. 培養 4 日目の GFAP 発現量

TH, thyroid hormone; LIF, leukemia inhibitory factor;
GFAP, glial fibrillary acidic protein;
GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

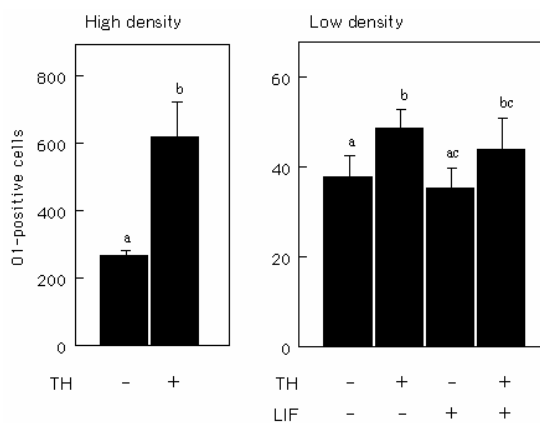


図 2. 培養 2 日目のオリゴデンドロサイトの数

TH, thyroid hormone; LIF, leukemia inhibitory factor.

トへの分化がほとんど起こらないと考えられる。また、高密度で培養した場合には、甲状腺ホルモンの添加によって、GFAP 発現量が増加した (図 1)。O1 陽性のオリゴデンドロサイトは、細胞密度、甲状腺ホルモンの有無に関わらずいずれの培養条件下でも 2 日目から観察され (図 2)、分化のタイミングが生体内のタイミングよりも早いことが明らかとなった。また、オリゴデンドロサイトの数は、甲状腺ホルモンの添加によって増加したが、その効果は高密度の場合の方が大きかった (図 2)。以上の結果から、細胞密度および甲状腺ホルモンはグリア細胞の分化・発達に対して重要な因子であること、並びに、甲状腺ホルモンの効果は細胞間コミュニケーションによって増強されることが示唆された。

〔参考文献〕

Adachi, T., Takanaga, H., Sakurai, Y., Ishido, M., Kunimoto, M., Asou, H.: Influence of cell density and thyroid hormone on glial cell development in primary cultures of embryonic rat cerebral hemisphere. J. Neurosci. Res., (in press), 2002

4. メチル水銀の乳・胎児曝露におけるリスク評価

研究概要

メチル水銀の曝露によって生ずる健康被害及びリスクの発生の評価は固体レベルでの生体影響、人口集団レベルでの一般大衆への影響及び胎児などハイリスク・グループにおける疾病構造や影響の把握が必要となる。特に、胎児に対するメチル水銀の影響検討の重要性は IPCS の勧告でも取り上げられている。我々は先にメチル水銀汚染が最も激しかった昭和 30 年から 34 年に水俣市、漁民及び水俣病患者の出生性比が逆転し男児よりも女児の数が多かったことを報告しその成果が注目された。この結果は、実証されていないが胎児期における児の感受性が女児よりも男児に高く、流産・死産等によって男児が淘汰されたためであろうと推測された。実際に、汚染が最も激しかった時期における死産の性比は女児 1 に対し男児 1.7 と高まっていた。この昭和 30 年から 34 年の汚染が最も激しかった時期に生まれた児の成人時点での健康影響及び次世代影響の検討の為に疫学的検討はメチル水銀の低濃度影響を知る上でも重要な研究としてデータ収集と解析を進めている。また、母体からのメチル水銀を中心とする重金属移行による胎児・乳児期別リスク評価に関する研究は、胎児期も乳児期も共に母体からの栄養に依存している時期では有るが臍帯と母乳を介したメチル水銀の移行に違いが有るのではないかという視点にたつてのもので、実験動物のみならず実際にヒトの試料を分析することによって行う。このようなヒトからの検体採取は綿密な検討を加えたインフォームド・コンセント作成が重要であるので、その作成と病院との検体採取の合意を完成させ得られる成果が期待される。同時に、動物実験により胎児・新生児脳のメチル水銀に対する感受性の高さのリスク評価に関する研究を行う。また、セレンとヨード欠乏のメチル水銀の毒性発現を助長に関する研究も行う。更に、多数の毛髪中水銀濃度を分析し日本人の平均値と分布を求め、妊娠可能な女性におけるメチル水銀曝露のリスク評価の為に基礎資料とする。

それぞれのテーマごとの研究体制と平成 13 年度の進捗状況は下記の通りであり、ほぼまとまった結果が得られたものに関しては詳細を記する。

1. メチル水銀の胎児期曝露影響の疫学的研究

研究担当者 坂本峰至（疫学研究部）

平成 13 年度は、昭和 55 年に水俣市で行われた一斉健康調査のデータベース化とデータの原簿とのつき合わせが完了した。サンプルサイズは約男 1 万 4 千、女 1 万 6 千で昭和 55 年の水俣市の人口が約男 1 万 7 千、女 2 万であることから非常に高い受診率のものである。男女・袋地区とその他水俣地区での愁訴の粗集計をした結果、性差は大きくないが袋地区住民に愁訴率の高い項目が多かった。

〔論文発表〕

Sakamoto, M., Nakano, A. and Akagi, H.: Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. Environmental Research Section A **87**, 92-98, 2001.

2. 母体からのメチル水銀を中心とする重金属移行による胎児・乳児期別リスク評価に関する研究

研究担当者 坂本峰至（疫学研究部）

＝ヒトにおける胎児期と乳児期別メチル水銀リスク評価＝

〔研究要約〕

我々は、平成 12 年度重金属の健康影響に関する総合研究会議で胎児におけるメチル水銀曝露に対する感受性の高さをラットを用いた研究で報告した。その研究で出産直後の仔の脳中水銀濃度は母親の約 1.4 倍の高さであったが、授乳中には仔への水銀の移行は非常に少ないと想定され仔の脳中水銀濃度は 10 日齢では 1/4 以下まで低下する現象が得られた。本研究の目的はヒトの胎児期と乳児期のメチル水銀曝露によるリスク評価を行うためにそれぞれの時期の児のメチル水銀濃度を 7 組の母体血と臍帯血、出生後 3 ヶ月での母体血と児の赤血球中水銀濃度を比較した。7 例全てで臍帯血中の赤血球中水銀濃度は母体血のそれよりも高かった。母体血と臍帯血の赤血球中水銀濃度には強い有意な相関が見られた。水銀の幾何平均値は母体で 7.05 ng/g 臍帯血で 10.6 ng/g と母体血より約 1.4 倍高かった。しかしながら、全ての児で 3 ヶ月間の授乳後の赤血球中水銀濃度は低下しており、有意の差が認められた。3 ヶ月後の児の赤血球中水銀濃度の幾何平均値は 5.75 ng/g で臍帯血の 54 %に相当した。母乳中水銀濃度は 0.21 ng/g で母体血漿の約 20 %であった。3 ヶ月後の体重は出生後時の約 1.9 倍になっていた。授乳期における児の水銀濃度の低下は母乳を介しての低い水銀量の児への移行と児の出生後の急激な成長に伴う希釈によるものと考えられた。その結果、胎児期には児のメチル水銀濃度は胎児期に高いが授乳期に急激に低下した。このことはメチル水銀に対する児のリスクが胎児期には高いが乳児期には低下することを示唆している。

〔研究目的〕

我々はラットを用いた研究での乳児期には児の血液や脳中水銀濃度が急激に低下するという結果から、乳児期にはメチル水銀のリスクが低下することが示唆された。そこで、本研究はヒトでも胎児期に高かったリスクは乳児期には低下するのではないかと仮説を証明するためにデザインされた。胎児並びに新生児は、メチル水銀に対するハイリスク・グループであり、胎児脳に母親より高い濃度の水銀が蓄積し、感受性そのものも高いことが知られている。しかしながら、乳児期の児のメチル水銀曝露に関する研究は充分には行われておらず、魚介類の摂取量の高い集団では授乳中の母親へのメチル水銀曝露の児への影響は解決すべき重要な問題として残っている。メチル水銀は胎児期には胎盤を介して児へ移行し、乳児期には母乳を介して児へ移行する。母乳中のメチル水銀濃度は低いにもかかわらず、母乳保育は乳児のメチル水銀曝露によるリスクを上昇させるであろうとする報告が散見される。しかしながら、我々のラットを用いた研究で乳児期にはメチル水銀のリスクが低下することが示唆された。母乳保育は多くの利点を持っていることが良く知られており、母乳を介して移行するメチル水銀の児のメチル水銀濃度へ及ぼす影響の適切な評価が詳細に検討される必要がある。

本研究は出産後に母乳からのメチル水銀曝露を受ける中での、出生後の児の体内メチル水銀濃度の変化を検討するためにデザインされた。メチル水銀の体内負荷量の指標としては赤血球中水銀濃度が最も優れたバイオマーカーであることが知られているので、その変化を赤血球中水銀濃度で検討した。

〔研究方法〕

対象者

7 人の特別な高濃度のメチル水銀曝露の無い年齢 22–35 歳（平均 29.6 歳）の福岡県宗像市に住む通常の妊婦に本研究の趣旨を説明し、研究の趣旨を理解してもらった上でインフォームド・コンセントを得た。児の平均体重は出生時点で 3,193 g、授乳 3 ヶ月後で 5,919 g であった。2 人の母親は初産で 2 人が 2 人目、3 人が 3 人目であった。6 人の母親は週に 2–3 回魚を食べ、残り 1 人は週に 1 回である。6 人の母親は授乳期の魚の摂取量に妊娠前と変化が無かったと答えている。殆どの母親は 3 ヶ月まではほぼ母乳のみで保育していた。また、本研究は国立水俣病総合研究センターの倫理委員会の承認を得て行われた。

試料と水銀測定

7 組の母親と児から静脈血を得た。内訳は、10 ml の出産時の母体血（出産約 10 日前）、13 ml の臍帯血、出産 3 ヶ月後の 10 ml の母体血と 100 ml の母乳、3 ヶ月齢の乳児血 2 ml である。全ての静脈血は少量の EDTA を含むシリンジで採血し、3,000 rpm で 10 分間の遠心分離で赤血球と血漿に分けた。試料は分析まで -80 °C で保存した。

総水銀濃度は 0.25 g の赤血球中 0.5 g の血漿と 2 g の母乳で赤木法により酸分解後に cold vapor atomic absorption spectrophotometry (CVAAS) で測定した。

〔研究結果〕

母体-臍帯血間水銀濃度

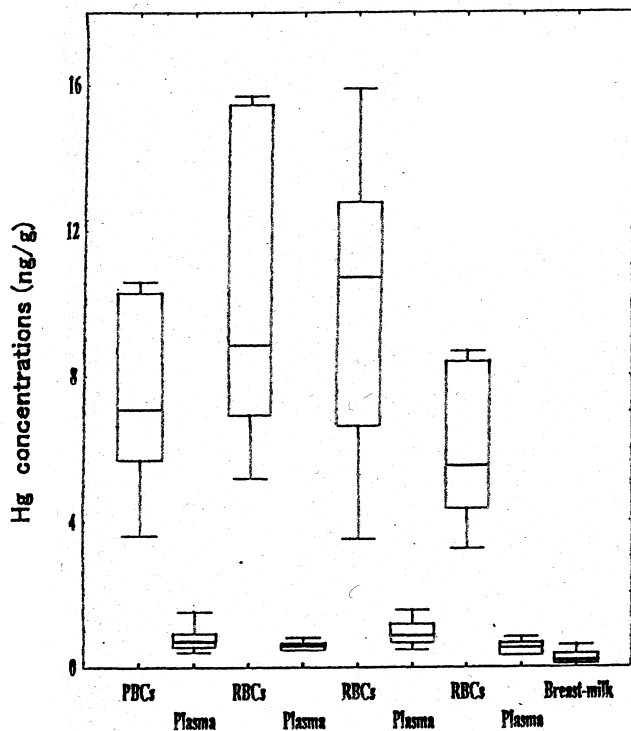
Fig. 1 に出産時の母体血、臍帯血と 3 ヶ月後の母体血、乳児血の赤血球中と血漿中及び 3 ヶ月時点での母乳中水銀濃度を示した。

横バーは幾何平均値、箱の中は 4 分位点、範囲は最少と最大を示す。ヘマトクリット値は出産時の母親で 36.6 % と臍帯血で 34.1 % で、3 ヶ月後の母親 37.2 % 乳児 34.1 % であった。Fig. 2 に母体血と臍帯血の赤血球中水銀濃度の比較を示した。

7 組全例で臍帯血中の赤血球中水銀濃度は出産時の母体血よりも高い値であった。幾何平均値は母体血で 7.75 ng/g 臍帯血で 10.61 ng/g で、paired *t*-test で有意に ($p < 0.001$) 臍帯血中水銀濃度が高かった。また、両者間には強い ($r = 0.96$, $p < 0.001$) 有意な相関が得られた (Fig. 3)。

授乳期間中の水銀濃度の低下

7 組の臍帯血と 3 ヶ月後の乳児の赤血球中水銀濃度の変化を Fig. 4 に示した。7 例全部で 3 ヶ月間の授乳期間で水銀濃度は低下した。幾何平均値は臍帯血が 10.6 ng/g、乳児 3 ヶ月齢で 5.75 ng/g で、paired *t*-test で有意な ($p < 0.001$) 低下が示された。その結果、3 ヶ月後には 7 組全部で母親の赤血球中水銀濃度が乳児よりも高くなっていた。3 ヶ月時点における母乳の水銀値は幾何平均で 0.21 ng/g で母親の血漿の水銀濃度の約 20 % の濃度であった。3 ヶ月時点における母親の血漿と母乳 ($r = 0.84$, $p < 0.05$)、母乳と乳児の血漿 ($r = 0.85$, $p < 0.05$) の水銀濃度はそれぞれ有意な相関が見られた。



Mothers Umbilical Mothers Infants
(delivery) cords (3 mo) (3 mo)
Fig. 1 Hg concentrations in RBCs, plasma and breast-milk in mothers and infants at delivery and 3 months after.

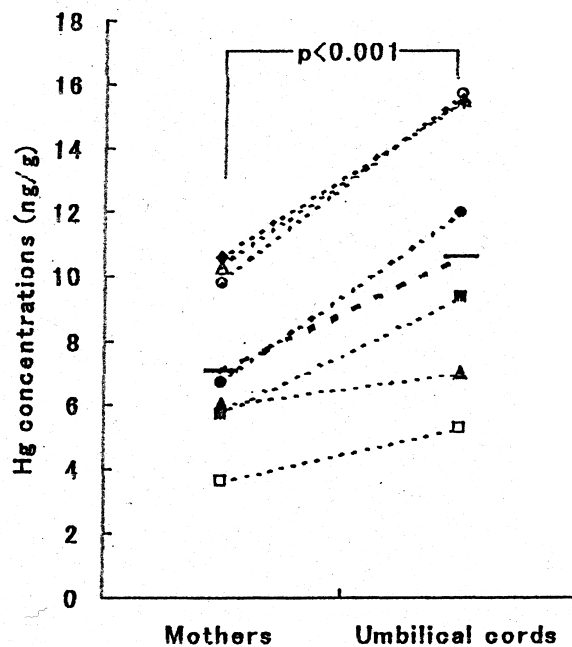


Fig. 2 Comparison of Hg in RBCs between mothers and umbilical cords

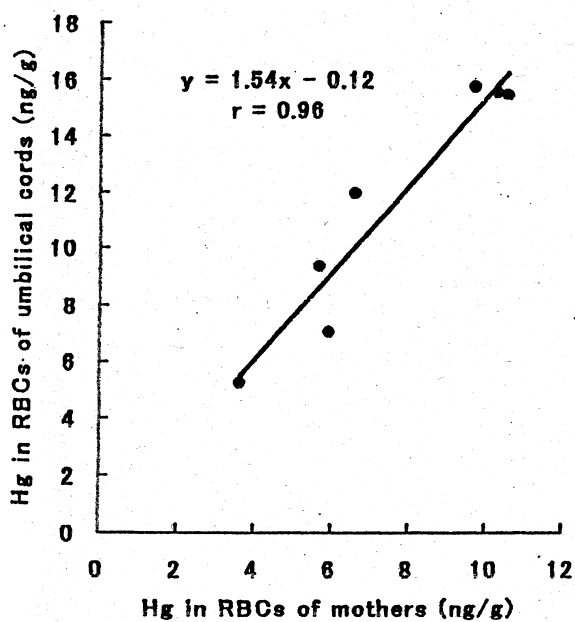


Fig. 3 Correlation of Hg in RBCs between mothers and umbilical cords.

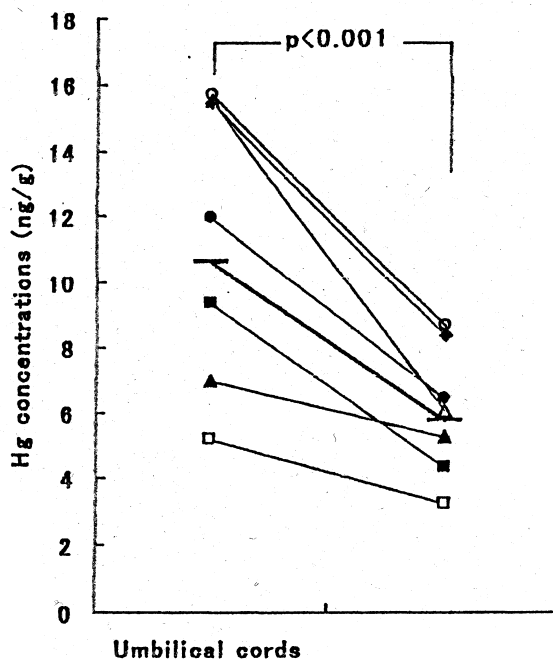


Fig. 4 Changes in RBCs Hg in infants during 3 months lactation

〔考察〕

今回の研究は、出生後引き続き母乳を介してメチル水銀の曝露を受ける児の出産後のメチル水銀濃度の変化を把握するために主にデザインされものである。赤血球中水銀はその殆どがメチル体でメチル水銀の体内負荷量と標的組織である脳水銀濃度の指標として最も優れたバイオマーカーである。サンプル・サイズは7組のみであるが、すべてのデータは貴重な母親-児のペアである。また、母親と臍帯血の比較、臍帯血と3ヶ月時点での乳児の赤血球中水銀濃度の比較では7組全例で同じ傾向を示し、動物実験での結果に基づく胎児期に児に高かったメチル水銀のリスクは授乳時期に低下するのではないかという我々の仮説を強く支持する結果となった。

7組全例で臍帯血の赤血球中水銀濃度は出産時の母体血より幾何平均値で約1.4倍高く、両者間には強い有意な相関が得られたことから、生理的中性アミノ酸の移行機構に乗ったメチル水銀の胎盤を介して胎児への能動的移行システムの存在が示唆される。

しかしながら、3ヶ月間の授乳後児のメチル水銀レベルは出生時の約50%に急減した。このことから、母乳からのメチル水銀児移行は児におけるメチル水銀の負荷への寄与が少ないことを示唆している。胎児期には能動輸送系に乗ってメチル水銀は児に高く蓄積されるが、出生で一度この能動輸送系から切り離されると、児へのメチル水銀の移行は母親の血漿の約20%と水銀濃度の低い母乳に依存することとなる。一方、児の体重は出生後3ヶ月で出生時の約1.9倍となっている。すなわち、母乳を介してメチル水銀の移行が少ないに拘らず、出生後に児の体重が急激に増加することが児の体内メチル水銀濃度を低下させたと考えられる。母親の血漿中水銀濃度は母乳中水銀濃度と相関があり、母乳中水銀濃度は児の血漿中水銀濃度と相関があったことから、児のメチル水銀曝露は母乳に依存しているであろうことも事実である。このように、母乳にはある程度水銀が含まれていても、我々の結果は児の水銀レベルは授乳期間に低下することを示した。もし、水銀の曝露がコンスタントで胎児期に悪影響を及ぼさないくらいに低ければ、母乳保育の利点が母乳からのメチル水銀曝露による影響よりもはるかに大きいと思われ、母親は母乳保育に水銀に関しては心配をする必要は無いと思われる。但し、母乳保育中に高濃度のメチル水銀曝露があった場合は母乳保育への注意が必要となるだろう。

〔結論〕

メチル水銀は胎児期には胎盤を介して母親から胎児に能動輸送され、胎児の水銀濃度は母親より高くなりリスクが非常に高い。一方、乳児期には母乳を介して児に移行するが、児の水銀濃度は減少しリスクも低下するものと思われる。すなわち、児へのメチル水銀曝露による影響を検討する場合には乳児期ではなく胎児期の曝露量の集中的評価が重要であると考えられる。

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Sakamoto, M., Nakano, A., Kajiwar, Y., Naruse, I., Fujisaki T.: Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. In “Neurobehavioral methods and effects in occupational and environmental health” (Araki S Ed.), Academic Press, San Diego, p.p. 829-836, 1994
- 2) Sakamoto, M., Nakano, A.: Comparison of mercury accumulation among the brain, liver, kidney and the brain regions of rats administered methylmercury in various phases of postnatal development. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **55**, 588-596, 1995.
- 3) Wakabayashi, K., Kakita, A., Sakamoto, M., Su, Mu., Iwanaga, K., Ikuta, F.: Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal phases. Brain Res., **705**, 267-272, 1995
- 4) Sakamoto, M., Wakabayashi, K., Kakita, A., Takahashi, H., Adachi, T., Ikuta, F.: Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type Minamata disease. Brain Res., **784**, 351-354, 1998

2. 学会発表

- 1) Kubota, M., Sakamoto, M., Matsumoto S., Nakano, A., Kaneoka, T., Akagi, H.: Exposure assessment of methylmercury in human offspring throughout periods of gestation and lactation. 6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.(Oct 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)

3. 胎児・新生児脳のメチル水銀に対する感受性の高さのリスク評価に関する実験的研究

研究担当者 坂本峰至（疫学研究部）

＝脳発達期におけるメチル水銀影響の量・反応関係と性差＝

〔研究要約〕

今回我々は、メチル水銀の脳発達期における量・反応関係を知る目的から、0, 1, 3, 5 mg/kg/day のメチル水銀を出生当日から連続 30 日間ウイスター系雄ラットに経口投与し、投与終了 3 ヶ月後に運動・学習能力評価の為の行動科学的検索、及び組織学的検索を行った。ラット新生仔期のメチル水銀に対する感受性の性差を知る目的で、新生仔雌ラットに 5 mg/kg/day のメチル水銀を上記と同様の方法で投与し、検索結果を雄の投与群と比較した。メチル水銀 1, 3, 5 mg/kg/day をそれぞれ 30 日間投与終了翌日に脳中水銀濃度を測定したところ、 2.6 ± 0.1 , 4.5 ± 1.2 , $9.6 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ であった。雌 5 mg 投与群では $12.1 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ であり雄のそれより高かった。5 mg 投与群は雌雄共に 25 日目位からコントロールと比べ体重の減少が始まり麻痺や後肢交差等の症状も出現し始めた。投与終了第 3 日目(33 日齢)で重篤な症状を呈した雌のラットを組織学的に検索したところ、高度の神経細胞変性が大脳、小脳および線条体で認められた。一方、3, 1 mg 投与群では体重減少及び麻痺等の明らかな症状を示すこと無く順調に発育した。行動学的検索ではロータ・ロッド法では量・反応関係を示す低下が見られ、雌より雄の低下傾向が強かった。受動回避法では雄の 5, 3, 1 mg でコントロールと比べ差が見られたが、量・反応関係は得られなかった。組織学的には、急性期に認められた変性神経細胞は既に消失していたが、5 mg 投与群では大脳・線状体・小脳に明らかな神経細胞脱落と反応性アストロサイトーシスが認められた。小脳には広範な石灰化を伴っていた。3 mg および 1 mg 投与群でも同部位に反応性アストロサイトーシスが認められた。その程度は 5 mg 投与群より明らかに軽く、1 mg 投与群で最も軽い変化を来しており、病変の程度にも量・反応関係があるものと考えられた。これまで成獣では脳中水銀濃度が約 $3 \mu\text{g/g}$ でも何ら組織学的異常は認められていない。

〔研究目的〕

胎児並びに新生児は、メチル水銀に対するハイリスク・グループで、水俣におけるメチル水銀汚染ではいわゆる胎児性水俣病が発生した。我々は先の研究で、ラット新生仔に長期に渡りメチル水銀を投与することにより、ヒトの胎児性水俣病で見られるような中枢並び末梢に広がる広範な病変を生じさせることに成功している(文献 4)。このように、メチル水銀を脳の発達期に長期に渡って投与することによって中枢並び末梢に広がる広範な病変は起し得る。実際に水俣における胎児性の患者は胎児期には経胎盤的にメチル水銀の曝露を受けていたのだが、ラットとヒトでは脳の発達段階が異なる。そこで、ヒト胎児性水俣病の妊娠後期における影響をラットで検討するにはラット新生仔を用いなければならないが、ラット新生仔には母乳ではメチル水銀が殆ど移行しないことを平成 12 年度重金属の健康影響に関する総合研究班会議で報告した。そこで、今回は 0, 1, 3, 5 mg/kg/day のメチル水銀を 30 日間雄のラット新生仔に経口投与し、運動・学習の行動科学的検索及び組織学的検索を行いメチル水銀の脳発達期における量・反応関係の検討を行った。また、5 mg/kg/day 投与群には雌の群を作成し同様な検索を行いラット新生仔期における性差の検討を行った。

〔研究方法〕

同日に出生した生後 1 日齢の雌ラット 8 匹ずつを 1 匹の母親に振り分け、等モルのシステインと無糖コンデンスミルクを加えた我々独自の従来法（文献 4）に準じ 0, 1, 3, 5 mg/kg/day のメチル水銀を 30 日間連続経口的にマイクロマン・ピペットを用いて投与した。更に、雌ラット 8 匹ずつに 0, 5 mg/kg/day のメチル水銀を 30 日間連続経口的に投与した。投与終了第 3 日目(33 日齢)で重篤な症状を呈した 5 mg 投与群の雌 1 匹は其の日に組織学的検索用に処理を行った。そして、35 日齢の時点で 10 rpm のロータ・ロッド試験で筋協調運動の観察を行った。また、35 日齢で水迷路法、4 ヶ月齢で受動回避法による学習能力の観察を行った。5 mg 群は雄雌共にこの時点でも後肢交差の症状が残っているもの、途中まで症状があったが症状の消失したものをそれぞれ 1 匹ずつ選んで組織学的検索を行った。3, 1 mg の群からはそれぞれの群の中で体重が平均的であった 2 匹を選び出し組織学的検索を行った。更に同様な群を 4 匹ずつ作り 30 回のメチル水銀投与翌日の各組織中の水銀濃度を測定した。組織中の水銀濃度の測定、組織学的検索、ロータ・ロッド法、水迷路及び受動回避法は我々のこれまでの発表した手技に準ずる。

〔研究結果〕

水銀濃度

Fig. 1 にメチル水銀を雄に 1, 3, 5 mg/kg/day、雌に 5 mg/kg/day の 30 日間連続投与した翌日の各組織中水銀濃度を示した。

腎臓を除いては全ての組織で投与量がほぼ反映されていた。脳中水銀濃度はそれぞれ、 2.6 ± 0.1 , 4.5 ± 1.2 , $9.6 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ であった。雌の 5 mg 投与群は $12.1 \pm 1.2 \mu\text{g/g}$ で雄より有意に高かった。他の組織でも同様に雄より雌の水銀濃度が有意に高くなっていた。

運動・学習試験

Fig. 2 に雄に 1, 3, 5 mg/kg/day、雌に 5 mg/kg/day のメチル水銀を 30 日間連続投与した 35 日齢における水銀投与群とそれぞれのコントロール群の 10 rpm によるロータ・ロッド試験の結果を示した。雄の 1 mg 群はコントロールと同じであったが、3, 5 mg と量・反応的に成績が低下した。雌は雄の 5 mg より低い傾向にあった。

Fig. 3 に雄に 1, 3, 5 mg/kg/day、雌に 5 mg/kg/day のメチル水銀を 30 日間連続投与した 6 週齢における水銀投与群とそれぞれのコントロール群の 10 rpm による受動回避試験の結果を示した。雄では、コントロール群で前日に 200 V の電撃を受けた暗箱の中に 5 分を限度とする観察期間内に入ったのは 0/8 匹で 1, 3, 5 mg 投与群で入ったのは 4/8 匹, 5/8 匹, 4/8 匹であった。但し、雌ではコントロール群も 4/8 匹は暗箱入り込み 5 mg 投与群が 5/8 匹入り込んだ。水迷路試験では有意な差は得られなかった。

組織学的検索

投与終了後第 3 日で検索した脳には、広範かつ急性期の変性像が認められた。大脳皮質・線状体では核が pyknotic となり胞体が eosinophilic となった変性神経細胞が多数観察された(Fig. 4A)。小脳皮質でも顆粒細胞の明らかな脱落が認められた。赤核を含む脳幹部にも少数の変性神経細胞が認め

られた。

投与終了後3ヶ月に達した時点で検索した個体のうち、5 mg 投与群では雌に病変が強く、3匹では上記変性神経細胞が依然散在性に認められた。5 mg 投与群のそれ以外の個体では既に変性神経細胞は明らかではなかった。しかしながら大脳皮質・線状体・小脳皮質には明らかな神経細胞脱落と著しい反応性アストロサイトーシスが認められた。小脳皮質には広範な石灰化を伴っていた(Fig. 4B)。3 mg および1 mg 投与群の脳では5 mg 投与群のそれより明らかに軽度ではあるが同様の部位に変化が認められた。両群とも大脳皮質および線状体背側部のアストロサイトーシス、小脳顆粒細胞の脱落が認められた。3 mg 投与群より1 mg 投与群の方がより軽い病変を示しているものと考えられた。

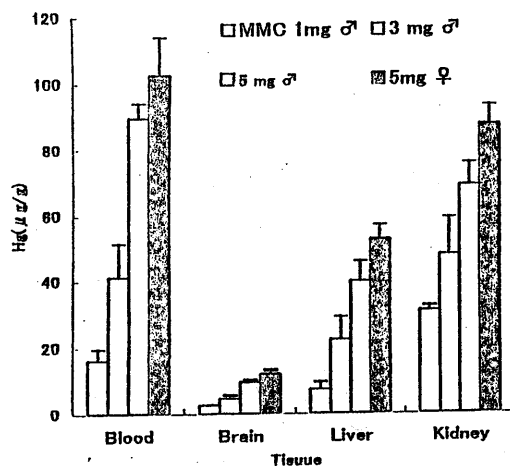


Fig. 1 Mercury concentrations in blood, brain, liver and kidney in male and female rats treated 1,3 and 5 mg/kg/day of methylmercury for consecutive 30 days from postnatal day 1.

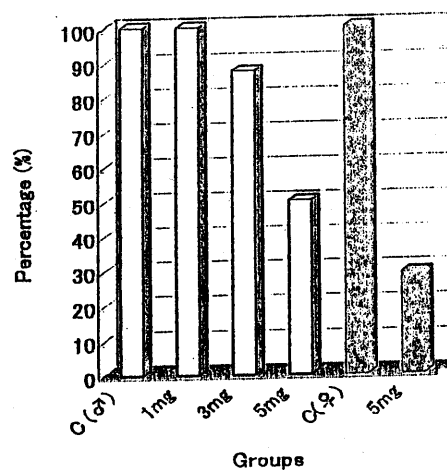


Fig. 2 Percentage of rats (eight rats per group with three trials) reaching criterion of 60 sec on 10 rpm of rotarod test.

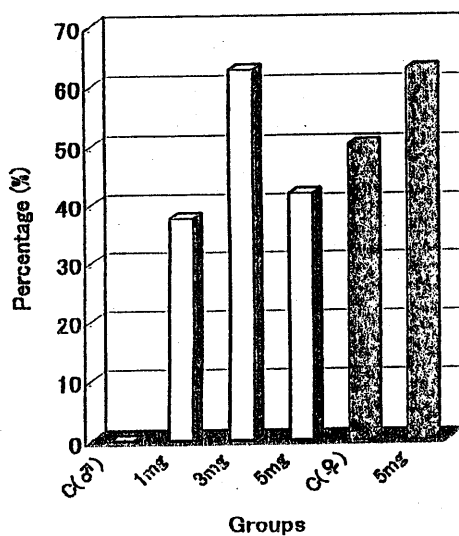


Fig. 3 Percentage of rats entered into dark box in which they had shock 24 hrs before.

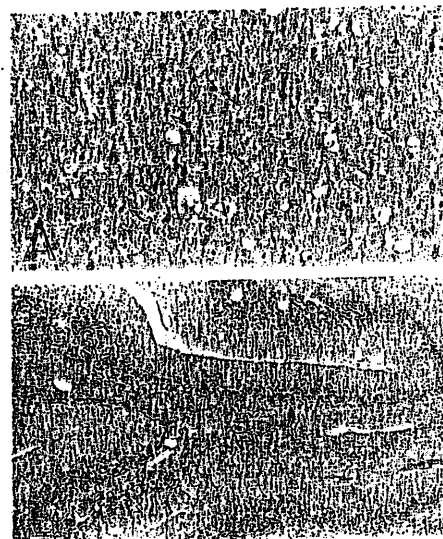


Fig. 4 Light micrograph of the brains of rats received consecutive administration of MeHg through the postnatal phase.
A: Several shrunken and eosinophilic neurons (arrows) in the cerebral cortex.
B: Marked loss of granule cells and calcification in the cerebellar cortex.

〔考察〕

今回は0, 1, 3, 5 mg/kg/dayのメチル水銀を30日間新生仔の雄のラットに経口的に投与し、運動・学習の行動科学的検索及び組織学的検索を行いメチル水銀の脳発達期における量・反応関係の検討を行った。また、5 mg/kg/dayのみに雌の群を作成し同様な検索を行いラット新生仔期における雌雄差の検討を行った。

水銀濃度

1, 3, 5 mg/kg/dayのメチル水銀を30日間新生仔の雄のラットに経口的に投与翌日の脳中水銀濃度はそれぞれ、 2.6 ± 0.1 , 4.5 ± 1.2 , 9.6 ± 0.5 $\mu\text{g/g}$ であった。ここで、最少投与1 mg群の脳中水銀濃度2.6 $\mu\text{g/g}$ で学習能の低下や組織学的検索で軽微ではあるが脳神経細胞に障害があったことが注目される。国立水俣病総合センターで安武、衛藤らが行った2年間連続5 ppmのメチル水銀を含む飼料の摂取させた同ウィスター系雄成獣ラット脳中水銀濃度は1年半近く3 $\mu\text{g/g}$ 近い値を示したがメチル水銀による症状も組織学的検索による変化も起こっていない。すなわち、新生仔期の発達期の脳では成獣より低い濃度でも異常が確認されたことになる。一方、雌の5 mg投与群の脳中水銀濃度は 12.1 ± 1.2 $\mu\text{g/g}$ で雄より有意に高かった。行動試験や組織学的検索で雌の成績が悪かった傾向に有ったことは、この雌が雄より高い水銀濃度を示したことに起因すると考えられる。このように、ウィスター系のラットでは雌の濃度が高くなり、平山、安武らが行ったマウスでは逆の現象が出現する。げっ歯類で、性差によって組織中水銀濃度が異なるということは、ラット・マウスを用いて人に外挿出来るような性差に関する実験が困難であることが示唆された。

運動・学習試験

行動試験ではロータ・ロッド試験で雄の1 mg群はコントロールと同じであったが、3, 5 mgと量・反応的に筋協調運動の障害が示唆された。このことは、後述する組織学的検索で小脳に異常が見られた結果からも支持されると思われる。前日に200 Vの電撃を受けたにも拘わらず暗箱に入るラットが1, 3, 5 mgの水銀曝露群で多く、高次学習機能障害の可能性が示唆された。また、一見、量・反応関係は得られなかったように見えるが、5 mg投与群には後肢の麻痺したままのラットもおり箱の中での移動量が少なく暗箱へ入る機会が低下したことが5 mg投与群での3 mg投与群より良い成績になった原因と思われる。雌ではコントロールでも4/8匹暗箱に入り、雌ラットの高次学習機能検索に受動回避試験が適さない可能性が示唆された。1 mg投与群で体重減少や明らかな中毒症状が現れずとも脳には障害が現れこのような高次学習機能障害や組織学的変化が現れることは新生仔期の発達期の脳のメチル水銀に対する感受性の高さを示している。

組織学的検索

今回の投与法で最も著しい変化は大脳皮質・線状体・小脳皮質に認められた。この病変分布は既に我々が報告している(文献4)ものであり、胎児あるいは成獣に惹起される病変分布、あるいは新生仔への投与であっても比較的短期間の投与によって惹起され得る病変の分布とも異なっている。今回、30日に亘り投与を継続した新生時期脳では、グリア芽細胞の発生期であると同時に神経細胞の突起伸長やシナプス結合など、様々な発生学的イベントがダイナミックに起こる時期に相当する。メチル水銀の神経毒性がこうした特徴を有する発達期脳に独特に作用した可能性が示唆された。また、広範な神経細胞脱落が上記高次機能障害に結びついた可能性が考えられた。

〔結論〕

運動・学習試験及び組織学的検索でメチル水銀の脳発達期における量・反応関係がある程度確認された。更に、成獣では脳や行動に障害を引き起こさない濃度の脳中水銀濃度でも、組織学的に軽微ではあるが障害が確認され、脳の高次機能にも障害が現れている可能性が示唆された。行動試験や組織学的検索で雌の成績が悪かった傾向に有った。これは、雌が雄より高い水銀濃度を示したことに起因したと考えられる。

〔研究発表〕

1. 論文発表

- 1) Sakamoto, M., Nakano, A., Kajiwar, Y., Naruse, I., Fujisaki, T.: Effects of methyl mercury in postnatal developing rats. In “Neurobehavioral methods and effects in occupational and environmental health” (Araki S Ed.), Academic Press, San Diego, p.p. 829-836, 1994
- 2) Sakamoto, M., Nakano, A.: Comparison of mercury accumulation among the brain, liver, kidney and the brain regions of rats administered methylmercury in various phases of postnatal development. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **55**, 588-596, 1995
- 3) Wakabayash, K., Kakita, A., Sakamoto, M., Su, M., Iwanag, K., Ikuta, F.: Variability of brain lesions in rats administered methylmercury at various postnatal phases. Brain Res. **705**, 267-272, 1995
- 4) Sakamoto, M., Wakabayash, K., Kakita, A., Takahashi H, Adachi, T., Ikuta, F.: Widespread neuronal degeneration in rats following oral administration of methylmercury during the postnatal developing phase: a model of fetal-type Minamata disease. Brain Res., **784**, 351-354, 1998
- 5) Kakita, A., Wakabayashi, K., Su, M., Sakamoto, M., Ikuta, F., Takahash, H: Distinct pattern of neuronal degeneration in the fetal rat brain induced by consecutive transplacental administration of methylmercury. Brain Res., **859**, 233-239, 2000
- 6) Kakita, A., Wakabayashi, K., S, M., Yoneoka, Y., Sakamoto, M., Ikut, F., Takahash, H.: Intrauterine methylmercury intoxication. Consequence of the inherent brain leions and cognitive dysfunction in maturity. Brain Res., **877**, 332-330, 2000
- 7) Sakamoto, M., Kakita, A., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Nakano, A., Akagi, H.: Evaluation of changes in methylmercury accumulation in the developing rat brain and its effects: a study consecutive and moderate-dose exposure throughout gestation and lactation periods. Brain Res, **1**, 2002 (in press).

2. 学会発表

- 1) Sakamoto, M., Nakano, A., Kajiwar, Y., Naruse, I., Fujisaki, T.: Toxicity of methyl mercury on neonatal rats. 4th International symposium, Neurobehavior methods and effects in occupational and environmental health, (July, 1991, Tokyo, Japan).

- 2) Sakamoto, M., Nakano, A., Fujisaki, T.: Deficits in cerebellar growth and rotarod performance in rats induced by methylmercury treatment during the brain growth spurt. Annual meeting of the society of toxicology (March, 1993, New Orleans, USA).
- 3) 坂本峰至、中野篤浩、赤木洋勝；ラットの新生仔におけるメチル水銀投与による小脳成長およびロータ・ロッド運動の欠損
第 18 回環境トキシコロジーシンポジウム、
平成 4 年 11 月(東京)
- 4) 坂本峰至、柿田明美、中野篤浩、高橋均；低濃度長期メチル水銀暴露のラット胎児脳への影響に関する研究。
フォーラム 2000: 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム
平成 12 年 10 月（東京）

4. セレンとヨードの欠乏下におけるメチル水銀毒性発現に関する研究

研究担当者 中野 篤浩（基礎研究部）

平成 13 年度研究成果は以下の通りである。

- 1) 従来のメチル水銀分析法は、塩化メチル水銀の溶媒への抽出効率がよくないことと、抽出に際して共存する脂肪成分に強い妨害を受けるなどの大きな欠点がある。そこで、昨年度から脂肪成分の除去法を検討してきた。試料を苛性ソーダで加水分解し塩酸で中和してトルエンやヘキサンで脂肪を抽出すると、メチル水銀も同時に抽出除去された。中性域では塩化メチル水銀は形成されないので、アルカリ分解でイオウイオン (S^{2-}) 遊離し、ビスメチル水銀サルファイドが形成され、脂肪と同時に溶媒へ抽出されるのであろう。そこで、アルカリ分解を行う前に、脂肪を抽出除去する方法を検討した。魚肉等の生体試料を遠沈管に取り、水は加えず有機溶媒のアセトンだけを加えてホモゲナイズしてみた。ガラス製遠沈管ではホモゲナイズ成分が容器に吸着し処理不能となったが、テフロンやポリプロピレン製の遠沈管ではホモゲナイズ成分の吸着が見られず、アセトンによるホモゲナイズ処理が可能であることが分った。この事により、アセトン、トルエン、ヘキサンの組み合わせによるアルカリ加水分解前の脂肪除去が可能となった。この処理法ではメチル水銀の同時抽出は起こらない。
- 2) セレノメチオニンがメチル水銀毒性を軽減するが、過剰量投与されると食欲不振や体重増加抑制を起すことが明らかになった。その原因としては、セレンがメチレーションを受けながら代謝されるので、生体がメチル基過剰利用に陥り、葉酸やビタミン B_{12} の不足状態が起こることが予想される。そこで、生体内で主要なメチル基供与体であるメチオニンの併用投与を検討している。
- 3) セレンとビタミンEの長期投与（飼料 CE-2 にセレンは亜セレン酸ソーダを Se として 1ppm と 3ppm 添加、ビタミンEは α -トコフェロール 500IU 添加）の安全性を近交系雄性マウス BALB/cA Jcl で検討した。90 週経過後の生存数比は、[コントロール群] : [Se+1ppm] : [Se+3ppm] : [VE+500IU] で 10 : 14 : 16 : 14 であった。現在、免疫指標や必須元素濃度等を検索している。

5. 胎児期から乳幼児期における水銀等重金属曝露のモニタリング手法に関する研究

研究担当者 中野 篤浩（基礎研究部）

平成 13 年度研究成果は以下の通りである。

- 1) 胎児曝露のモニタリング指標の開発を目指して、生体試料（動物の肝臓、腎臓、脳など）の酸分解法、その後に続く ICP 発光分析法、ICP 質量分析法の検討を行った。酸分解法の検討では、マイクロウェーブ分解装置による処理法の確立を目指している。現時点では、試料の有機物量、酸の量、エネルギーの照射強度の関係を完全には確立できていない。元素分析においては大部分の元素の分析法は確立出来ているが、セレンとヨードの分析法が不十分である。セレンの分析に陰イオン樹脂のプレカラムの導入を検討したが、適合する物品がなく断念した。次に、水素化物を発生させて ICP 質量分析を行う方法を検討した。この場合には、前処理としての酸分解における硝酸の使用量を出来るだけ抑えることにより、高感度分析が可能となった。ヨードの ICP 質量分析では、ネブライザー等の汚染の累積が大きく連続測定が出来ない。現在、アルカリ性の試料液による導入を検討している。
- 2) 水銀の検出手段として最も安定で感度のよい原子吸光法により、有機態と無機態の水銀を分別定量しているのが Magos 法である。この方法では、無機水銀の還元気化中に共存するメチル水銀の一部で脱メチル化が起こり、無機水銀として計測される欠点がある。このメチル水銀の脱メチル化が一定比率になるような条件を検討してみた。脱メチル化に最も関係するのは、無機水銀の還元気化過程の第一スズイオンの還元力だろう。そこで、第一スズイオンを反応させる前に、水銀イオン (Hg^{2+}) 以外の還元されやすい成分を塩酸ヒドロキシルアミンで還元（前還元）してから、第一スズイオンを反応させてみた。前還元が標準液を添加したメチル水銀では有効であったが、試料由来の水銀には余り効果はなかった。このことは、還元過程に入る前に、有機、無機の両水銀を一度結合体（蛋白質）から解離させる必要性を示唆している。

6. 毛髪水銀レベルの再検討

研究担当者 山口 雅子(疫学研究部)

12年度から13年度にかけて熊本市、鳥取県沿岸部、和歌山市、千葉県外房地域において理髪店等の協力を得て試料を収集し、その測定・解析を行った。なお、試料収集に際しては、年齢・性別・魚食量および種類・パーマの有無などに関するアンケート調査を実施した。

各地点で得られた試料の数を表に示す。

	熊本			鳥取			和歌山			千葉		
年齢	男	女	合計	男	女	合計	男	女	合計	男	女	合計
0～	28	16	44	3	2	5	49	57	106	66	76	142
10～	27	27	54	27	3	30	54	38	92	50	60	110
20～	46	34	80	68	7	75	56	15	71	24	10	34
30～	51	48	99	75	4	79	90	22	112	46	19	65
40～	68	76	144	85	9	94	43	16	59	45	31	76
50～	74	63	137	135	28	163	67	44	111	50	49	99
60～	60	32	92	62	18	80	39	55	94	44	53	97
70～	23	26	49	26	30	56	14	44	58	22	47	69
80～	8	4	12	5	7	12	1	9	10	4	14	18
合計	385	326	711	486	108	594	413	300	713	351	359	710

これまでの調査の結果（図1）を見る限り、現在の水俣市民の毛髪水銀濃度は全国的にもかなり低いレベルであるといえる。

これまでに調査した地点では、千葉だけが顕著に高い値を示していた。この原因として、この地方でマグロを食べる人の割合が約75%と非常に高いことが考えられた。重回帰分析の結果によると、千葉の頭髪水銀濃度は、性別、年齢、魚摂取量およびマグロ摂取傾向と有意の相関を示していた。

また、20代女性の水銀濃度はどの地点でも他の年代と比べて低かった。この要因としては、この年代で魚介類の摂取量が少ない（図2）ことに加え、この年代からパーマをかけ始める人の多いことが考えられた。

毛髪中水銀濃度

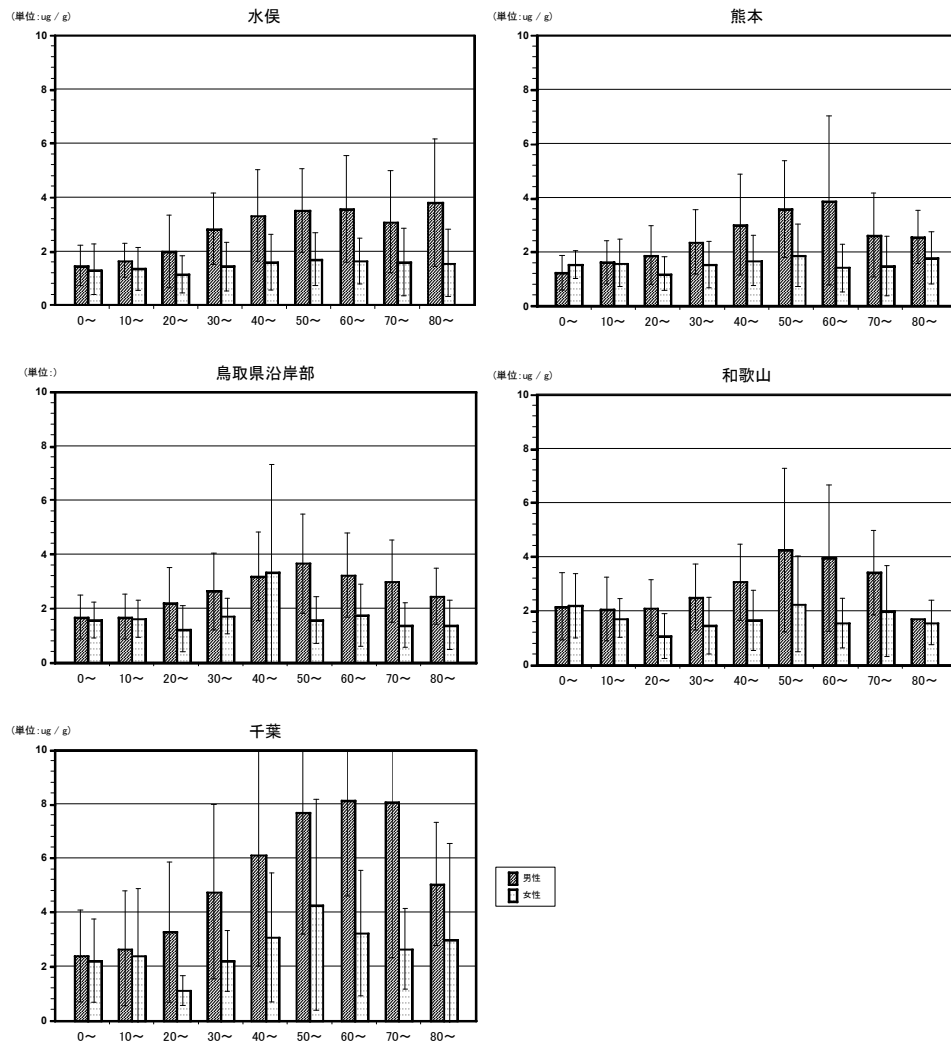


図1. 各地点の年代別毛髪中水銀濃度

魚介類摂取量

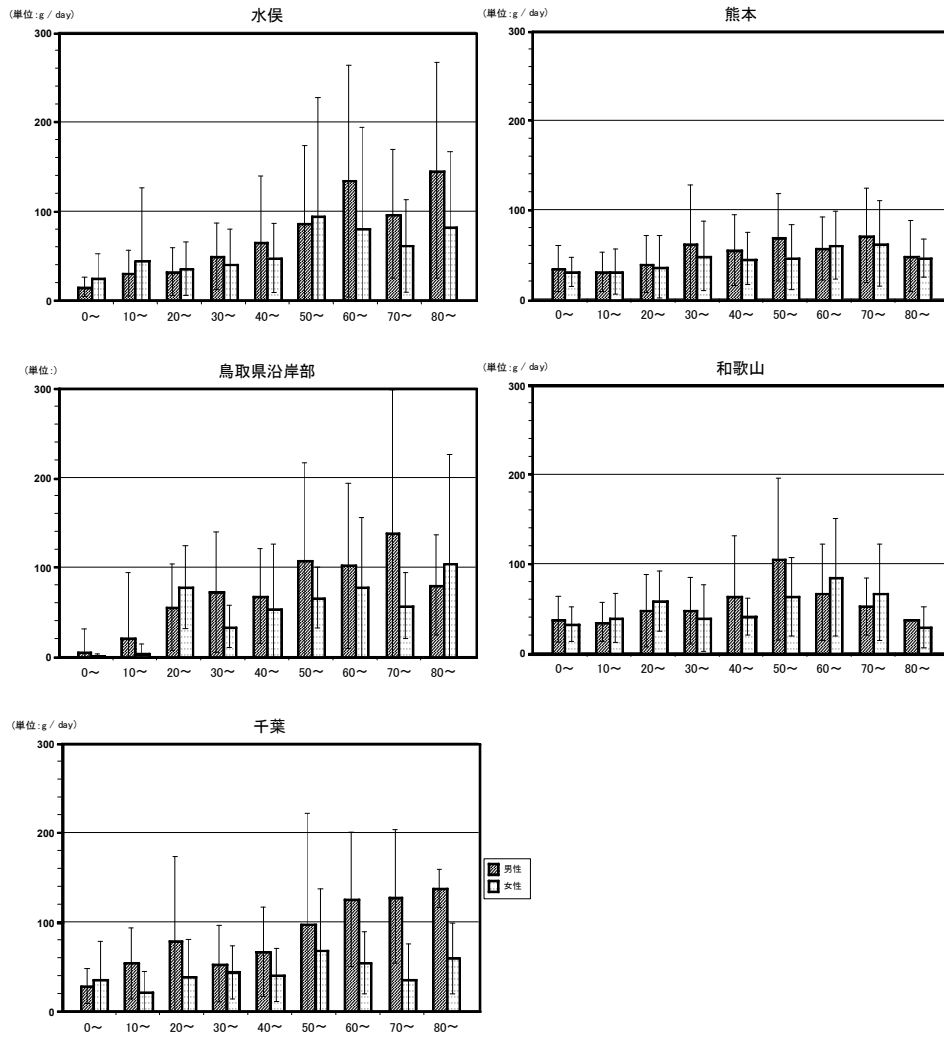


図2. 各地点の年代別魚介類摂取量

7. 胎児期のメチル水銀曝露の健康影響に関する研究

研究担当者 坂本 峰至（疫学研究部）

平成 13 年度は、準備委員会を構成して来年度以降の研究計画の準備を開始した。具体的には有機水銀の健康影響に関する文献レビュー、世界的に研究の進展しているフェロー諸島とセイシェル諸島の研究内容の比較を行った。また、本邦各地における年齢・性別毛髪水銀濃度分布の結果を、対象地域選定の参考にした。以上の基礎的研究を踏まえて、来年度以降のメチル水銀胎児影響に関する調査研究プロトコールの基盤作成を行った。

5. 水銀に関する環境科学的研究

概要

本研究課題は局地的な水銀汚染に起因する地球規模の水銀拡散の問題および汚染地域の環境復元を視野に入れて、環境中での水銀の移動および化学形態変化に関連する研究と、汚染土壌等からの水銀回収に関連する研究を取り扱っている。

水銀が環境汚染物質として重要な元素であることは従来から指摘されていたが、その汚染形態は局地的なものにとどまらず地球規模で拡散・沈殿し汚染源とは全く別の場所で生態系に入って生物濃縮を受けるという性質を持つことが最近の研究で明らかとなりつつある。その拡散・沈殿という挙動には化学形態の転換を伴っており、また生態系に入る際の、いわゆるバイオアベイラビリティを獲得する際にもやはり形態の転換が関わっていることが、平成13年10月に開催された水銀国際会議の中でも再三指摘されていた。

こういった観点に加え、当国立水俣病総合研究センターがかつて重篤な水銀汚染を被った水俣の地にあるという立地を生かして、自然界における水銀の動態に関する様々な局面を研究対象としているのが本課題5の特徴である。

各研究テーマは以下のとおりである。

(1) 環境中での水銀の移動および化学形変化

- a. 水俣湾における水銀の動態
 - ア. 現在の水俣湾における水銀の動態
 - イ. サンゴに刻まれた過去の水銀汚染の痕跡の解説
- b. 魚類の淡水中と海水中における水銀蓄積機構の違いに関する研究
- c. 水俣湾の水銀揮発化細菌の分子生態学的研究
- d. 生体試料および環境試料に含まれる微量水銀の化学形分別測定法の開発

(2) 環境修復

- a. 低温度燃焼法による汚染土壌の修復と水銀回収技術の開発
- b. バクテリア利用による環境中水銀蒸散技術の開発
 - ①水銀揮発化細菌を利用した水銀汚染物処理技術の開発に関する基盤研究
 - ②液状バイオマス処理のための高度な微生物制御技術に関する基盤研究
- c. 放射線を利用したメチル水銀の脱メチル化の開発

これらの研究テーマの平成13年度における研究結果の概要について以下に列挙する。また、まとまった成果があるものについては詳細を添付している。

(1) 環境中での水銀の移動および化学形変化

a ア. 現在の水俣湾における水銀の動態 (平成 12 年～14 年度)

研究担当者 保田叔昭

平成 12 年度末に第 3 回水俣湾潮間帯底生生物群集調査を実施した。その試料はまだ分類・解析作業の途上にある。また、甑島および能登島の調査試料に関する解析結果をまとめた (詳細後述)。

過去 3 回の水俣湾調査結果は、92 年に九大が行った調査結果とを併せて、群集構造特性の経時変化を解析中であり、近日中に投稿する予定である。

これらの試料に関する水銀濃度の調査も同時に実施している。特にヒライソガニについては、過去のデータ ('92 年、'97 年、'99 年) との比較を行い、水銀濃度が自然界の水準より多少高いもののほとんど平衡状態に落ちついていることが確認できた (詳細後述)。

イ. サンゴに刻まれた過去の水銀汚染の痕跡の解読 (平成 12～15 年度)

研究担当者 保田叔昭

水俣湾および牛深周辺のコマルキクメイシについて含まれる微量元素の解析による過去の海水温推移の推定を行った。その結果、両地域間には海水温の隔たりがほとんどないことがわかった。これらのサンゴの水銀濃度の経時変化を年輪単位で測定した。その結果水俣湾のものの方が一貫して濃度が高かった。

b. 魚類の淡水中と海水中における水銀蓄積機構の違いに関する研究 (平成 8～15 年度)

研究担当者 山口雅子

添加する水銀量を 10ppb まで低下させた条件で海水および淡水中の水銀の濃度変化とウナギの諸臓器への取り込みを調べた。結果として、消化管における水銀吸収機構が環境水の塩濃度の影響を受けることが示された。

c. 水俣湾の水銀揮発化細菌の分子生態学的研究 (平成 12～15 年度)

研究担当者 中村邦彦

本年度も、昨年度と同様に、水俣湾から採取した、種々の水銀化合物を揮発化する水銀耐性菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株の水銀揮発化遺伝子の構造を解析した (詳細後述)。

d. 生体試料および環境試料に含まれる微量水銀の化学形分別測定法の開発 (平成 12～13 年度)

研究担当者 赤木洋勝

生体試料を含む様々な環境試料の水銀濃度を効率よく正確に測定する方法の開発は最終段階に入り、

簡易な前処理によってあらゆる試料を共通の水銀測定手法へ統合することができた。今年度はさらにより経済的にかつ廃棄物の減少を目標として試薬の組み合わせや各反応ステップの見直しを行った。

一方、水俣湾において底質のコアサンプルと海水とを採取し、これらに含まれる微量水銀の定量を国水研およびスロベニア・ステファン研究所にて同時に実施した。その測定結果はきわめて近似しており、双方の測定技術の水準を確認できた（詳細後述）。

（２）環境修復

a. 低温度燃焼法による汚染土壌の修復と水銀回収技術の開発（平成 12～15 年度）

研究担当者 松山明人

国内の化学工場跡地水銀汚染土壌を用いて硫化鉄添加による低温加熱処理実験を行った。結果として水銀を 98%以上除去できたものの、含有量基準参考値である 3mg/kg を満足するにはいかなかった。そこで高温燃焼法を組み合わせるハイブリッド処理法を考案した。現在は、気化水銀の捕集法を含む全体構成の検討に入っている。

一方、低温燃焼法を応用して廃棄蛍光管に含まれる水銀の回収装置も開発中である（詳細後述）。

b. バクテリア利用による環境中水銀蒸散技術の開発（平成 12～15 年度）

本年度は、以下の 2 課題について検討した。

①水銀揮発化細菌を利用した水銀汚染物処理技術の開発に関する基盤研究

研究担当者 中村邦彦

本年度は、水俣湾から採取した水銀揮発化細菌を利用し、種々の条件における、水俣湾底質の水銀の除去反応について検討を行った（詳細後述）。

②液状バイオマス処理のための高度な微生物制御技術に関する基盤研究

研究担当者 中村邦彦

本年度は、昨年に引き続き、水俣湾から採取した、種々のメチル水銀揮発化細菌を用いて魚の肉汁などからのメチル水銀除去反応等を検討した（詳細後述）。

c. 放射線を利用したメチル水銀の脱メチル化の開発（平成 13～16 年度）

研究担当者 荒巻 亮二

本年度はメチル水銀を種々の水溶液に溶かして、X-線照射による無機水銀の生成量について検討を行った。その結果 50Gy までの線量について、蒸留水、PBS、中性標準液、アルカリ性標準液などは線量に比例して無機水銀の生成量が増加したが、酸性標準液は X-線照射による無機水銀の生成は見られなかった。このようにメチル水銀を溶解した水溶液の種類によってメチル水銀の無機化は影響を受けることが分かった。

1) a ア.現在の水俣湾における水銀の動態

研究担当者 保田 叔昭 (国際・総合研究部)

山口 雅子 (疫学研究部)

森 敬介 他6名 (九州大・理学研究科)

〔研究目的〕

過去に甚大な水銀汚染を受けた水俣湾において、生態系もまた相当の打撃を受けたことが各種資料からうかがえる。汚染源の化学工場が水銀の排出を停止してすでに 40 年を経過し、湾内の汚染された底質も埋立地に密封されている現在、生態系に含まれる水銀は自然界レベルにまで低下したものの、他の地域に比べると依然としていくぶん高い価を示す。ところで、潮間帯生態系の環境維持に果たす役割の重要性は、近年干潟については多少認識されつつあるが、転石潮間帯については基礎的な研究が希薄なこともあってほとんど認識されていない。しかし調査してみると転石海岸には豊富な生物群集が生息し、底質と水圏とをつなぐ食物連鎖の重要な経路をなしていることが理解できる。そして、海岸における転石潮間帯の総延長も、岩礁海岸と二分して長大なものがある。したがって干潟以上に環境保全および食物連鎖網における重要性を持っていると推察できる。本研究はこのような転石潮間帯の環境維持における重要性を実証することを目的として、不足している基礎研究を実施するものである。

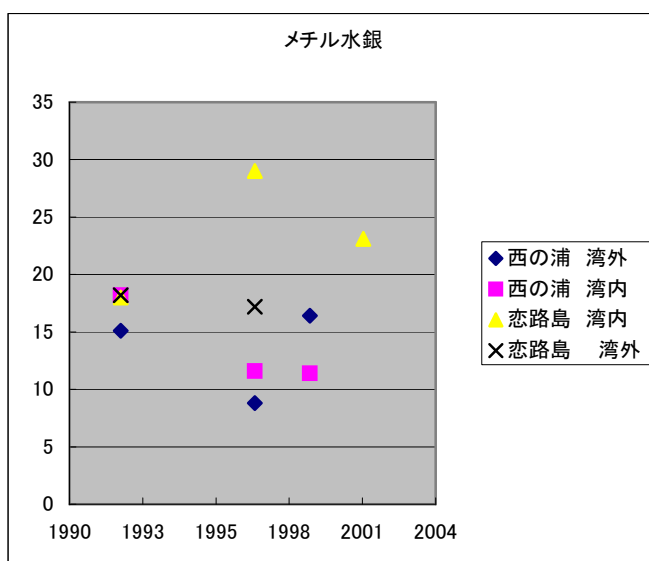
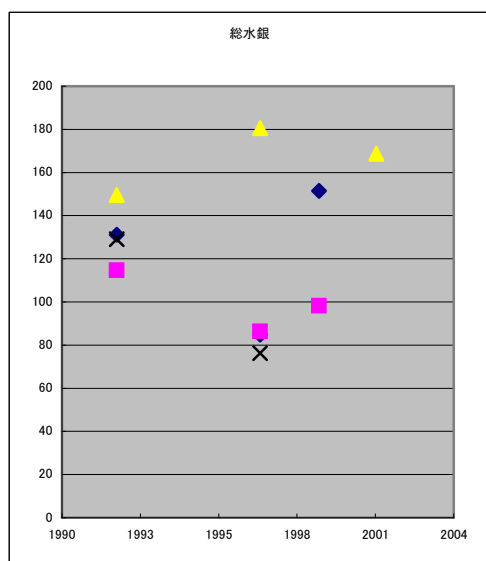
〔研究成果および進捗状況〕

(ア) 潮間帯生物における水銀の動態

水俣湾内外の 4 ヶ所の定点における潮間帯生物群集調査は、平成 12 年度末に第 3 回目を実施した。ここで得られた試料はまだ分類・同定と計数・計量の作業が継続中である。一方ランダムサンプリングによって得られた試料は水銀含有量の測定を行っている。そのうち、カサゴの餌生物であるヒライソガニについては、昨年と同様過去のデータと比較することが可能である (下図)。

この図からは、水銀濃度の分布が一定の変動幅の範囲に納まっていることを示しており、他の地域のものよりは高めであるものの、これ以上の低下には相当の時間が必要であろう。

今後このモニタリングは継続していく。



(イ) 潮間帯無脊椎動物の群集構造とその地域差

水俣湾での3回目の調査と、天草下島の羊角湾及び瀬戸内海の小豆島における定量調査を実施するとともに、昨年度調査を行った甑島と能登島の試料について基本的な指数についての解析を行った。その結果を表に示す。

	甑島		能登島	
	転石	岩礁	転石	岩礁
種数	80	77	79	60
個体数	4255	2595	9857	4861
乾燥重量 (g)	952.98	1244.50	1324.76	360.18
H'	1.029	0.815	0.771	0.636
J'	0.163	0.130	0.122	0.108

※ H'は Shannon-Wiener の多様性指数、J'は Pielous の衡平性指数

また、現在、水俣湾で97年、99年に実施した調査の結果、及び92年に九州大学が調査した結果を比較・解析している。現時点では解析中であるが、主な優占種ではマガキやヒメコザラが増加し、イワフジツボが減少する傾向が見られている。ただし、これらの変化が水俣湾で行われた公害防止事業や仕切り網除去とどの程度関係があるかを見極めるためには、数回の調査を行って通常の周期的変動の範囲を知る必要がある。

〔14年度研究計画〕

測定の継続と共に、過去3回の定量調査および1992年の九大による調査の結果を一つにまとめ、群集構造の特性と関連づけながら報告書を作成する。

また、情報センターに設置された海洋生物飼育設備を用いてヒライソガニ→カサゴの食物連鎖の実験を開始する。

1) c. 水俣湾の水銀揮発化細菌の分子生態学的研究

研究担当者 中村邦彦（基礎研究部）
古川謙介（九大・生物資源環境）
矢木修身（東大・工学系）

〔研究目的〕

水俣湾は長年にわたり水銀に汚染され、そのヘドロの中には世界に類をみない多量の水銀が堆積し、水俣湾の魚介類を食べることにより水俣病が引き起こされた。自然界に暮らす細菌の中には、水銀化合物を分解し、揮発性の水銀蒸気に変えて、自分の生活している環境から取り除いている細菌（水銀揮発化細菌）が存在している。これまでの研究で、水俣湾では、水銀化合物に強い細菌や水銀揮発化細菌の割合が水銀汚染のない海に比べてかなり高いことが判明している。そこで、本研究では、これらの細菌が水銀汚染により、どのような遺伝的变化を受け水俣湾に出現し、水俣湾で、どのような役割を演じているかを明らかにする。

〔研究結果〕

細菌の水銀揮発化遺伝子は、主に *mer R*, *mer T*, *mer P*, *mer A*, *mer B* で構成される。*mer R* は、regulation 遺伝子、*mer T* と *mer P* は、水銀を細胞内に取り込む遺伝子、*mer A* は、酵素レダクターゼの遺伝子、*mer B* は、酵素リアーゼの遺伝子である。2 価の水銀イオンは、細菌の作る酵素レダクターゼにより揮発性の水銀蒸気に変換される。メチル水銀や酢酸フェニール水銀などの有機水銀化合物の場合は、最初に、*mer B* の産物であるリアーゼが水銀と炭素の結合を切り、結果として生じた 2 価の水銀イオンを先程同様にレダクターゼにより揮発性の水銀蒸気に変換される（図 1）。

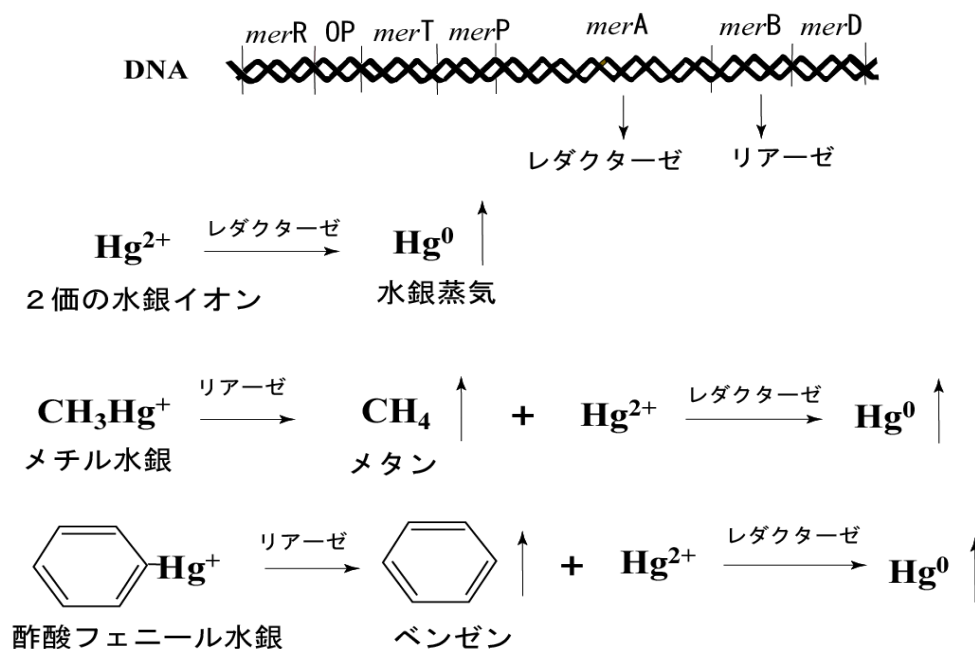


図1. 細菌による水銀化合物揮発化反応

水俣湾海水から分離した *Pseudoalteromonas* 属の細菌は、種々の生化学的性状や生化学的性状などにより *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株に同定された。この菌は、発育に NaCl を要求する好塩性の海洋細菌であり、3%の NaCl 濃度で最もよく塩化第二水銀を揮発化した。この株は、多くの水銀化合物を 30°C24 時間で高率に揮発化した(表1)。この点で、M-1 株は、*mer B* 遺伝子を含む *mer* オペロンを保持しているものと推察された。

表1. 水俣湾海水より採取した *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株の水銀化合物に対する揮発化性

水銀化合物	濃度 (μg/ml)	水銀揮発率 (%)
塩化第二水銀	20	88.9
塩化メチル水銀	0.1	95.4
塩化エチル水銀	0.5	83.8
チメロサル	0.5	91.9
酢酸フェニール水銀	20	74.6
フルオレッセイン酢酸水銀	20	55.7
パラクロロ安息香酸水銀	1.0	92.3

そこで、*mer* 遺伝子の構造を決定するために、水銀還元酵素（レダクターゼ）を精製し、このアミノ酸配列を決定し DNA の塩基配列を調べることにした。最終ステップの活性画分において、約 50 kDa の位置に単一バンドが得られたことより、この蛋白質を目的の mercuric reductase であるとした。既知の mercuric reductase の分子量は、60 kDa 前後であることから、本菌株の mercuric reductase は既知のものに比べ、分子量がやや低いことが明らかになった。

M-1 株の Mer A は既知の Mer A と比較して、アミノ酸レベルで、最も高いもので 76.9%の相同性を示した。また、内部に存在する 2 つのシステイン残基を含む活性部位や、C 末端側に存在する水銀結合部位が保存されていた。しかし、他のレダクターゼと比べ N 末端領域の約 80 のアミノ酸残基が大きく欠損しているのが認められた。これらの点でこのレダクターゼは、人などのグルタチオンレダクターゼに非常によく類似した構造をしていた。

これまでに報告されているグラム陰性の水銀耐性菌の多くは、そのプラスミド上に *mer* オペロンを保持している点、また、比較的大きなプラスミドを保持しているという点より、M-1 株の *mer* オペロンもプラスミド上に保持されている可能性が考えられた。そこで、本株の *mer A* 遺伝子の位置についてサザンブロットハイブリダイゼーション法等で検討した。この結果、この水銀揮発化遺伝子群は、染色体 DNA 上に保持されていることが示唆された。

<i>M-1</i>	1	-----M---\$TNSCCS SDN-SQPE--Q-LHVAI IGS GSGAFASAIKAAEG	38
<i>P. putrefaciens</i>	1	MILLIEGMITCPCVAHVKEALDAIEGVNKVEISYENARATITNGGVSVTVLIGAEALGYIAK--ESTGTAKET--\$PNDC C DNENASNTESNQTHVAI IGTGSGAFACAKAAEG	116
<i>Tn21</i>	1	MSTLKITGMTCDSCAVHVKDALEKVPQVQSADVSYAKGSAKLAIEVGTSPDALTAAVAGLGYRATLADAPSVSTPGGLLDKMRD L LGRNDK-TGSSGALHIAV IGS GGAAMAAALKA VEQ	119
<i>Tn501</i>	1	MTHLKITGMTCDSCAAHVKEALEKVPQVQSALVSYPKGTALAI VPGTSPDALTAAVAGLGYKATLADAPLADNRVGLLDKVRGWMAAAEKHSGNEPPVQVAVIGSGGAAMAAALKA VEQ	120

● Hg^{2+} binding site

<i>M-1</i>	39	GARVTIEGADVIGGCCVNVGCVPSKILIRAAQLAHQRTNPF-DGLENIQPLSRLAHQQTARVEELRGAKYQSILENNPALSLLKGYARFKNENTLLVQMADGSEELVADRILIA	157
<i>P. putrefaciens</i>	117	GAKVTIEGADVIGGCCVNVGCVPSKILIRAAQLAQQRNPF-TGLENHAPQLSRALLTQQQTARVEELRAAKYQNIETNPALSLLKQWAFKNANTLIVRKNDGTEQAVHADKILIA	235
<i>Tn21</i>	120	GARVTIE-RGTIGGTCVNVGCVPSKIMIRAAHIAHLRRESFPGGIAATPTIQRALLAQQQARVDEL RHAKYEGILEGPAITV LHG SARFKDNRLIVQLNDGGERVVA FDRCLIA	238
<i>Tn501</i>	121	GAQVTIE-RGTIGGTCVNVGCVPSKIMIRAAHIAHLRRESFPGGIAATVPTIDRSKLLAQQQARVDEL RHAKYEGILGPNPAITVVHGEARFKDDQSLTVRLN EGGERVVMFDRCLVA	239

● Active site region

<i>M-1</i>	158	TGSTPSIPPIDGLVDPYWTSTEALFSDVLPSSLVVIGSSVIAIEIAQAVARLGSSVTVLARHTLLYAE DPLLGEKLT ECFEKEGIGV LNTQANH V---\$YSNNG FPLETNEGTLTAE	237
<i>P. putrefaciens</i>	236	TGSTPTIPPIDGLTETPYWTSTEALFAQELPQHLVIGSSVVAIEIAQAVRRLGSEVTILARHTLLTREDPLLGEKLTGCFEKEGIRV LNSTQATKV---THGDSQFTLETNAGDLRCD	351
<i>Tn21</i>	239	TGASPAVPPIGLKDTPYWTSTEALVSETIPKRLAVIGSSVVALELAQAFARLGAKVTILARSTLFFREDPAI GEAVTA AFRMEGIEVREHTQASQVAV INGE GDGE FVLTTAHGELRAD	358
<i>Tn501</i>	240	TGASPAVPPIGLKESPYWTSTEALASDTIPERLAVIGSSVVALELAQAFARLGSKVTVLARNTLFFREDPAI GEAVTA AFRA EGIEVLEHTQASQVAHM---DGE FVLTTTHGELRAD	355

<i>M-1</i>	274	KLLISTGRHANTDKLGLGNVGVEDKSGAIVVNSMMETS TANIYAAGDC SNMPQFVYVAAAAGSRAGINMTGGNAQLDLSTMPXVIFTDPQVATVGLTEEQAITGGFEVISRVLDMENVP	393
<i>P. putrefaciens</i>	352	RLIVSTGRHANTCQLNLGAVGVTNKKGEIVNERMETNVPYIAGDCCNMPQFVYVAAAAGSRSGINMTGGYAKLDLSTMPAVIFTDPQVATVGLTEEQANAQDIETDSRVLEMENVP	471
<i>Tn21</i>	359	KLLVATGRAPNTRKLDALDAGVTLTPQGAIVIDPGMRTSV EHIYAAGDC TDQPQFVYVAAAAGTRAAINMTGGDAALNLTAMPVFTDPQVATVGYSEAEAHHDGIKTDSRTLT L DNVP	478
<i>Tn501</i>	356	KLLVATGRTPNTRS LALDAAGVTYNAQGAIVIDQGMRTSNPNYAAGDC TDQPQFVYVAAAAGTRAAINMTGGDAALDLTAMPVFTDPQVATVGYSEAEAHHDGIKTDSRTLT L DNVP	475

<i>M-1</i>	394	RALANFETDGFIKLVADKSTGKILGAQILAH EGGE LQSAALAIHNKMTVEELAGQLFPYLT MVEGLKLC AQTFNKDVKELSCCAG	479
<i>P. putrefaciens</i>	472	RALANFETDGFIKLVTEKATGRILGAQILAMEGGE LQSAALAIRNMTVTELADQLFPYLT MVEGLKLC AQTFNKDVKELSCCAG	557 (76.9%)
<i>Tn21</i>	479	RALANFDTGRFIKLVVEEGSGRLIGVQAV A PEAGELIQTAALAIRNMTVQELADQLFPYLT MVEGLKLA AQTFNKDVKQLSCCAG	564 (59.3%)
<i>Tn501</i>	476	RALANFDTGRFIKLVIEEGSHRLIGVQAV A PEAGELIQTAALAIRNMTVQELADQLFPYLT MVEGLKLA AQTFNKDVKQLSCCAG	561 (59.2%)

● Hg^{2+} binding site

図2. 既知のレダクターゼのアミノ酸組成と比較した水俣湾より採取した M-1 株のレダクターゼのアミノ酸組成

[参考文献]

1. 中村邦彦：海洋水銀汚染と微生物 環境科学会誌 5, 1-14, 1992.
2. Nakamura, K., Sakamoto, M., Uchiyama H., Yagi, O.: Organomercurials-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediment of Minamata Bay, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 56, 304-305, 1990
3. Nakamura, K., Silver, S.: Molecular analysis of mercury-resistant *Bacillus* isolates from sediment of Minamata Bay, Japan. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4595-4599, 1994.
4. Nakamura, K., Iwahara, M., Furukawa, K.: Screening of organomercurials-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan. Clean Prod. Processes. 3, 104-107, 2001.

1) . d. 生体試料および環境試料に含まれる微量水銀の化学形分別測定法の開発

研究担当者 赤木洋勝（国際・総合研究部）
富安卓滋（鹿児島大・理・地球環境科）
安藤哲夫（鹿児島大・医・公衆衛生）
Horvat M.（スロベニア・ヨセフ・ステファン研）
松山明人（特別研究員）

〔目的〕

本研究は、生体内および生態系における水銀の動態研究や環境・生物学的モニタリング等に広く適用し得る高精度で普遍性のある水銀の化学形別分析手法の開発を目的とし、主として形態や組成の異なる各種の生物・生体試料および環境試料中の総水銀およびメチル水銀分析について、それぞれの試料に最も適した簡便な前処理法を確立すると共に、その後に続く試料溶液の調製法について可能な限り系統的に統合化を進め、これまで諸外国の水銀汚染に関する調査研究にも広く応用されてきた。しかしながら、これまでに得られた手法は各種試料中に含まれるバックグラウンドレベルの水銀をも定量し得る高感度分析法であり、広範な試料中水銀の定量分析に適用できる利点はあるが、一方でその高感度分析法が故に、魚介類等の比較的水銀濃度の高い試料に適用した場合、最終的に得られた試験溶液を全て大幅に希釈しなければならないという不都合な面も生じている。そこで、本年度は特にこの点を考慮しつつ、比較的水銀濃度の高い魚介類等の生物試料中総水銀およびメチル水銀分析手法のそれぞれについて手法の簡便化を図ることとした。

〔研究方法〕

生物・生体および環境試料中総水銀およびメチル水銀の分析化学的研究において、これまで当研究センターで開発し改良を重ねてきたで手法を基本とした。即ち、総水銀については、試料を $\text{HNO}_3\text{-HClO}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ 混酸系で湿式分解後、当研究センターにおいて従来の還元気化方式を新たに改良・自動化した水銀分析装置により測定、一方、メチル水銀については、アルカリ分解—ジチゾン抽出—硫化ナトリウム転溶—ジチゾン再抽出のプロセスを経て試験溶液を調製し、電子捕獲型検出器付ガスクロマトグラフィーにより測定する方法で行い、水銀濃度が高いことが予測される魚介類等の生物試料中総水銀およびメチル水銀について、大幅な希釈を要しない迅速、簡便かつ精度の高い手法への改良を試みた。

〔結果および考察〕

これまでに得られたジチゾン抽出—ガスクロマトグラフィーによるメチル水銀分析手法においては、前処理後の試料を 0.01% ジチゾン・トルエンにより抽出し、アルカリ洗浄による過剰のジチゾン除去後、硫化ナトリウム転溶によるクリーンアップ、少量の 0.01% ジチゾン・トルエン再抽出のプロセスを経て試験溶液が調製されるが、このプロセスを経て試料中メチル水銀が大幅に濃縮され、特に低濃度のヒト血液等のメチル水銀分析に至るまで幅広く適用できる手法となっている。しかしながら、本法を比較的水銀濃度の高い生物試料にそのまま適用した場合、測定に際して得られた試験溶液を大幅な希釈を余儀なくされる。この煩雑な希釈操作を避けるにはクリーンアップの段階で硫化ナトリウム転溶に用いるトルエン相の量を少なくすることによっても解決できるが、もう一つの方策として手法の簡便化を試みた。その結果、アルカリ分解後の試料を 0.01% ジチゾン・トルエン抽出し、その抽出液の 1/10 または 1/5 量(1ml を限度とする)

をアルカリによる過剰のジチゾン除去操作を省略してそのまま硫化ナトリウム転溶に供することによりジチゾン共々逆抽出し、微酸性化後窒素ガスを通気して過剰の硫化物イオンを追い出した後、最終的に同量のトルエンのみでメチル水銀・ジチゾン錯体を再抽出するという簡便化された手法を確立することができた。この簡便法の正確さ、精度等についてもこれまでの手法に比して何ら遜色なく、硫化ナトリウム転溶後微酸性化する際もジチゾンが既に含まれているため、その色調の変化も見やすく、今後、比較的水銀濃度が高いことが予測される魚介類等の生物試料中メチル水銀分析の効率化が図られるものと期待される。

一方、総水銀の分析手法については、測定機器の水銀蒸気発生部を中心に水銀蒸気循環系内の容積を可能な限りコンパクトにまとめると共に、水銀蒸気発生部の形状の試作を試み、湿式分解後の試験溶液 1 ml 程度でも精度よく測定し得る構造に改良することが出来た。これらのあらたに改良された手法は、今年度実施したタンザニア・ダルエスサラーム大学およびフィリッピン保健省との共同研究においても、現地から持ち込まれた種々の生物・生体試料および環境試料中水銀分析に応用され、何ら支障なく適用されることが確認されている。

2) a. 低温度燃焼法による汚染土壌の修復と水銀回収技術の開発

研究担当者 松山明人（特別研究員）

赤木洋勝（国際・総合研究部）

〔研究目的〕

土壌・底泥の重金属汚染対策として、現在は不溶化处理が一般的であるが、再溶出の危険性を排除するには汚染物質の除去技術の確立が急務である。また、開発途上国を中心として広く行われている金採掘に伴う金属水銀汚染の拡大は深刻で、低コストの水銀除去技術の確立が望まれている。このような要求に堪えるものとして低温加熱による水銀汚染土壌の再生技術を開発中である。

低温による加熱処理を効果的に行うには適切な添加剤の選択が不可欠である。これまでの研究で塩化第一鉄を使えば効率的な水銀除去が行えることを示したが、この物質は同時に有害な塩化第二水銀を析出し、また塩化水素ガスを発生するなど、問題があった。そこで他により適切な添加物を求めるため、今回の研究を行った。

〔研究方法〕

図1に挙げた装置を用い、加熱温度 $200\sim 300^{\circ}\text{C}$ [$\pm 10.0^{\circ}\text{C}$]、装置内圧力 $99\sim 96\text{Pa}$ 、装置内風量 $500\sim 600\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ で処理を行う。処理後の総水銀濃度は冷原子吸光法により定量した。

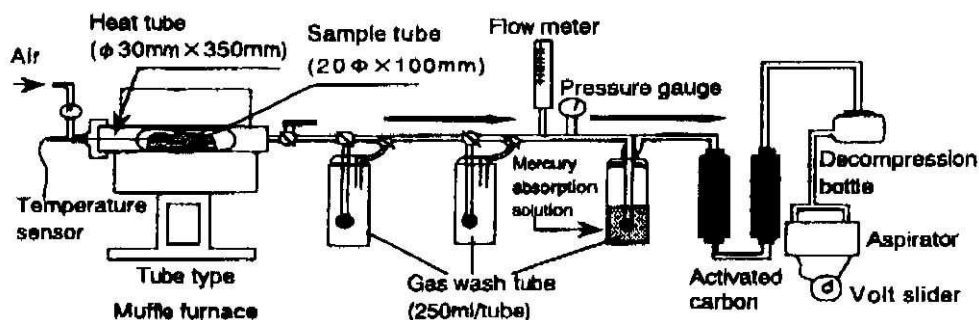


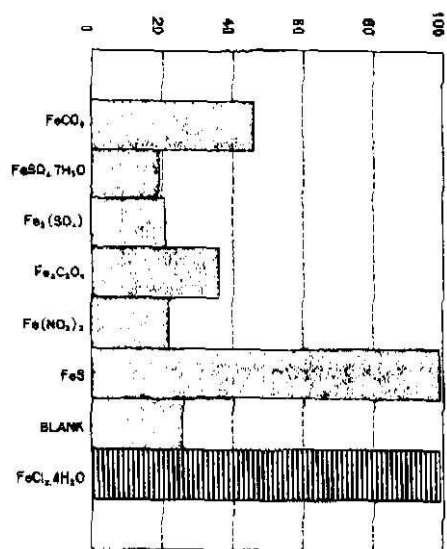
図1 加熱処理実験装置

処理に供した試料は、立川ローム層火山灰、標準砂（山口県産）石英砂、それに国内実汚染底質として水俣湾スラッジを用いた。添加物として検討したのは、 FeCO_3 、 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 、 $\text{Fe}_2\text{C}_2\text{O}_4$ 、 FeS として FeCl_2 である。

〔結果と考察〕

図2に挙げたとおり、硫化鉄と塩化第一鉄が良好な水銀蒸散効率を示した。加熱による硫化鉄の化学変化について検討したところ、加熱一時間後に一部が主にマグネタイト(Fe_3O_4)に変化しており硫化鉄の化学変化に起因する酸化還元反応が水銀除去に関与していることがわかった。

図 2 添加物による水銀除去効率の違い



硫化鉄の添加量、装置内風量、加熱温度等の検討を行った結果、汚染土壤に含まれる水銀量の 10 倍量を添加して 300℃で加熱すれば、30 分で 95%以上の水銀の除去が実現することを見出した。

〔参考文献〕

松山明人, 赤木洋勝: 硫化鉄を用いた低温加熱処理による水銀汚染土壤の浄化技術に関する基礎研究. 水環境学会誌, **23**, 638-642, 2000

2) b. ① 水銀揮発化細菌を利用した水銀汚染物処理技術の開発に関する研究

研究担当者 中村邦彦（基礎研究部）

境 正志（九州産業大工学部）

〔研究目的〕

近年、化学工業からの水銀排出による環境汚染により、水俣病が引き起こされ社会的な問題になった。現在、世界の国々の多くで、各種事業所および金採掘現場などでの環境への水銀汚染が深刻化している。また、水銀は、農薬等として用いられてきた結果として、多くの国で、メチル水銀や酢酸フェニール水銀などの有機水銀化合物による汚染も問題になっている。水銀で汚染された底質や土壌は、主に、浚渫や封じ込めや加熱処理等の物理的処理法により処理されているが、これらの方法は、多額の費用を要し、水銀を除去するのではないので根本的な解決方法になり得ない。

一方、水銀に汚染された環境に生息している微生物、特に、細菌の中には、環境中の水銀化合物と種々の相互作用を行い、水銀を揮発性の水銀蒸気に変換することにより、自然界の清浄化作用を行っている細菌が存在している。そこで、これら細菌を利用し、バイオテクノロジーの手法を活用し、将来的に水銀汚染物の処理技術の開発を目的に研究を行う。

〔研究結果〕

水俣湾のヘドロの中の水銀のほとんどは、硫化水銀として存在していることが知られている。この硫化水銀を直接水銀蒸気に変換する細菌は、まだ発見されていない。そこで、硫化水銀を酸などで2価の水銀イオンに変換し、この2価の水銀イオンを細菌を利用して、水銀蒸気に変換し、除去する方法を開発した。

表 1. 塩酸と塩化鉄による水俣湾ヘドロの水銀の溶出

	残存水銀量 (μg/g)	溶出率 (%)
None	23.94 ^a ± 0.84	0
0.1 M HCl	24.00 ± 1.20	0
0.5 M HCl	10.27 ± 0.80	57.1
1 M HCl	8.78 ± 0.58	63.3
2 M HCl	2.62 ± 0.19	89.1
3 M HCl	1.61 ± 0.21	93.3
6 M HCl	1.30 ± 0.02	94.6

^aN = 5

水俣湾の底質（総水銀量 $22.5 \mu\text{g/g}$ ） 0.5g に塩酸（ HCl ）を各濃度で 10ml 加え、これに、塩化鉄 0.2g を加え、一昼夜室温で放置し、ヘドロからの水銀の溶出を検討した(表 1)。この結果、 2N 以上の濃度の塩酸と塩化鉄でヘドロの水銀の約 90% 以上が溶出されることが分かった。

204 株の水銀耐性菌を $40 \mu\text{g/ml}$ の塩化第二水銀を含んだ、人工海水寒天培地を用いて水俣湾海水より、分離した。これらの細菌のうち、57 株がメチル水銀を揮発し、水銀蒸気に変換した。メチル水銀の揮発率（%）は、 41.3% から 95.4% であった。これら水銀揮発化細菌のうち、最も水銀揮発化活性が強い細菌 1 株(M-1 株)を水銀汚染ヘドロからの水銀の除去実験に使用するために選択した。この細菌は、 30°C 、24 時間で塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、チメロサル、酢酸フェニール水銀、パラクロロ安息香酸水銀、およびフルオレッセイン酢酸水銀を高率に分解・揮発した。この菌の分類を行った結果、この菌は、*Pseudoalteromonas haloplanktis* に同定された。

次に、ヘドロからの細菌を利用した水銀の除去のための簡単な水銀除去装置を考案した(図 2)。

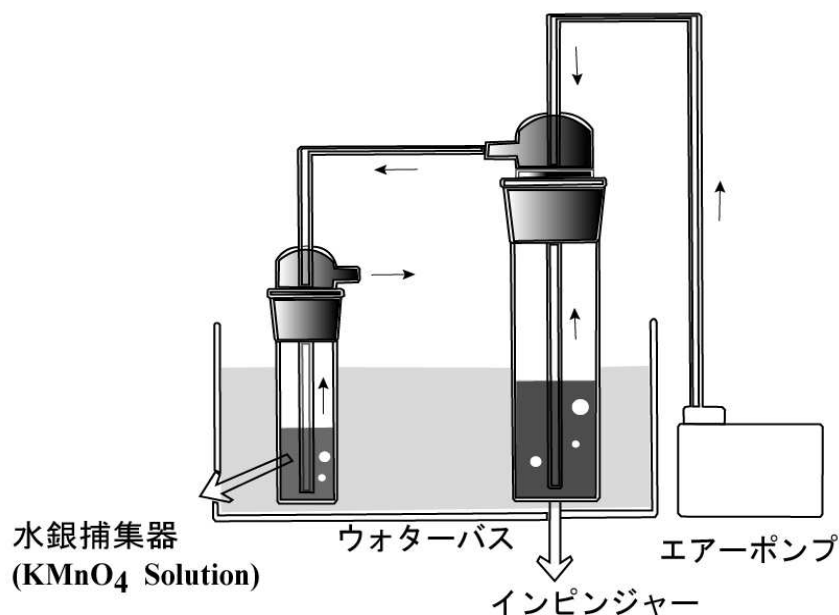


図1. 水銀揮発化細菌を利用したヘドロの水銀を除去するための簡単な装置

インピンジャーの中に 3N の塩酸と 0.2g の塩化鉄を水俣湾のヘドロに加え、一昼夜室温で放置し、ヘドロから水銀の溶出し、翌日、この液を 3N の NaOH で中和し、これに、 0.2M の磷酸バッファーを加え、これに *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株を加えて、水銀の除去を行った。インピンジャーの中で、水俣湾のヘドロの水銀の大半は、最初、塩酸と塩化鉄により 2 価の水銀イオンに変換される。この水銀が、細菌の酵素レダクターゼにより水銀蒸気 (Hg^0) に変換される。この水銀蒸気は、エアープンプにより水銀捕集器の過マンガンカリ溶液に捕集される。

この方法により、水俣湾ヘドロ（総水銀量 $22.5 \mu\text{g/g}$ ）の水銀を溶出し、水銀揮発化細菌 M-1 株で水銀を揮発し除去したところ、1 時間で 53.5% 、3 時間で 71.2% 、6 時間で 72.2% の水銀が水俣湾ヘドロより除去された。さらに、畑土に塩化メチル水銀を添加し、同様の方法で処理したところ、1 時間で 72.2% 、

3 時間で 78.5%の水銀が畑土から除去された(図 3)。

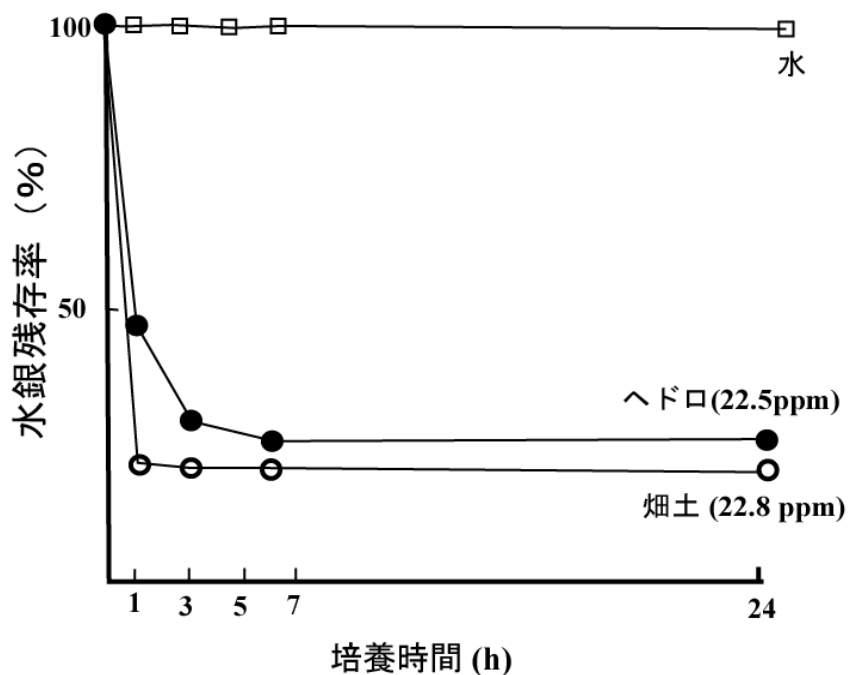


図2. 水俣湾ヘドロおよびメチル水銀を添加した畑土からの水銀揮発化細菌 M-1 株による水銀の除去

〔参考文献〕

- 1) 中村邦彦: 海洋水銀汚染と微生物, 環境科学会誌 **5**, 1-14, 1992.
- 2) Nakamura, K., Naruse, I., Takizawa, Y.: A mass screening method for methylmercury poisoning using mercury-volatilizing bacteria from Minamata Bay. Ecotoxicol. Environ. Safe. **44**, 100-104, 1999.
- 3) Nakamura, K., Hagimine, M., Sakai, M., Furukawa, K.: Removal of mercury sulfide from Minamata Bay sediments by a combined method of chemical and microbial volatilization. Biodegradation **10**, 443-447, 1999.

2) b.②液状バイオマス処理のための高度な微生物制御技術に関する基盤研究

研究担当者 中村邦彦（基礎研究部）
岩原正宣（崇城大工学部応用微生物工学）
内山裕夫（筑波大学応用生物化学）
森下惟一（みなまた環境テクノセンター）

〔研究目的〕

熊本県は、全国有数の農林水産業の基地であり、県では、一次産業から生じるみかん粕などの有機性廃棄物（バイオマス）や食品工業などの二次産業からは焼酎蒸留廃液などのバイオマスが多量に生じている。これらのバイオマスの処理は、主に焼却処分や下水処理などで行っているが、これらは、多額の費用を必要とするばかりでなく、バイオマスに含まれる有用資源の回収をほとんど行っていないため、根本的な処理方法ではない。

本研究では、バイオマスを微生物で分解させ、低分子の物質に変換し、電気透析法で分離することによりバイオマスからの有用物質の回収を行うと共に、バイオマス中の水銀などの有害物質除去を行う環境にやさしいバイオマス処理技術の開発を目的とする。

〔研究結果〕

NaCl 濃度が高い条件や pH が酸性やアルカリ性で水銀を高率で揮発できる細菌を検索する目的で、水俣湾および湯の児から分離してある 45 株の細菌について、種々の NaCl 濃度および pH における発育と塩化第二水銀揮発化反応の関連について検討した。

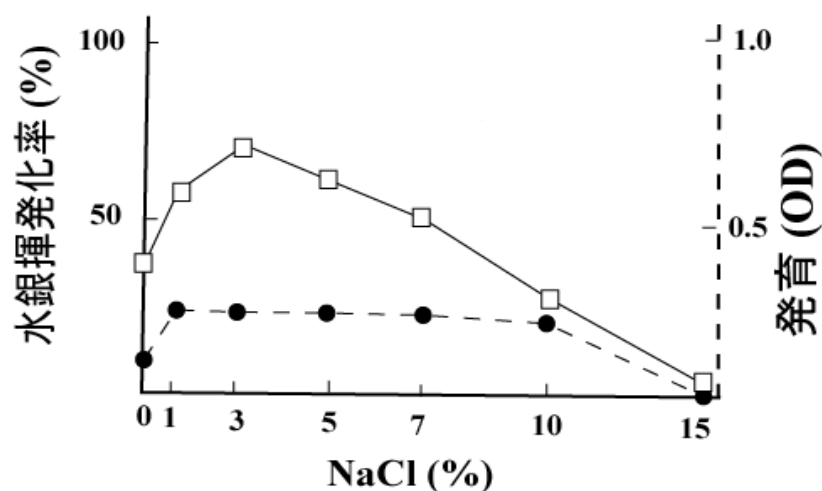


図 1. NaCl 濃度における発育および塩化第二水銀揮発化反応

□：水銀揮発化反応 ●：発育

水俣湾および湯の児海水から採取した 45 株の水銀耐性の最も強い細菌は、NaCl 濃度における発育と水銀揮発化反応により 3 群に大別された。45 株は、全て好塩性の細菌で、7 - 10% の NaCl 濃度まで発育でき、

この範囲で塩化第二水銀を揮発した。この一方で、NaCl を発育に必要とする細菌と必要としない細菌が存在していた。このうち一株の NaCl における発育と水銀揮発化反応を図 1 に示す。また、水銀揮発化反応の至適 NaCl 濃度は、1 - 3% であった。種々の pH における発育と塩化第二水銀揮発化反応の検討では大別して 5 群に分類された。多くの細菌が pH6 - 9 の範囲で発育し、この範囲で最もよく塩化第二水銀を揮発した。また、4 株では、pH10 でも発育がよく、水銀揮発化反応も最高値に近い値で行っていた (図 2)。

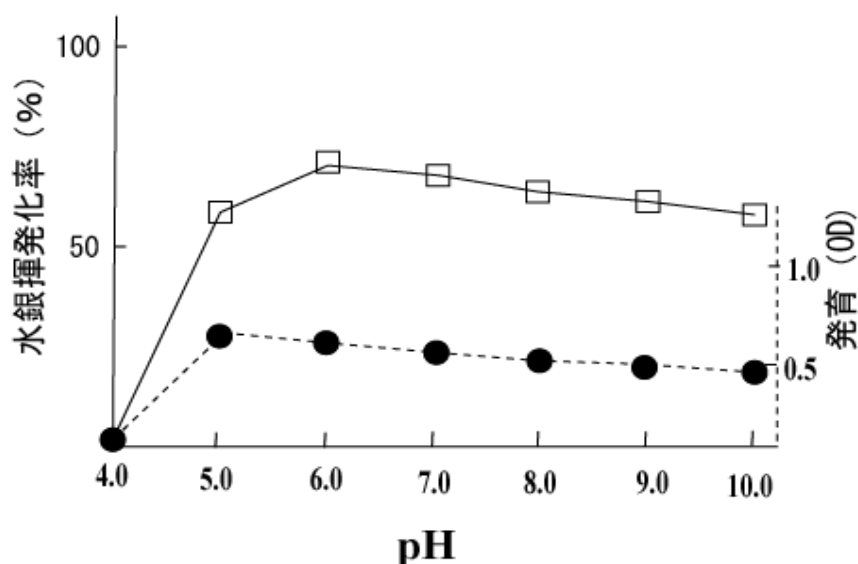


図 2. 水俣湾から分離したアルカリに強い細菌の pH における発育および塩化第二水銀揮発化反応
□ : 水銀揮発化反応 ● : 発育

供試した全ての細菌は、人工海水培地での発育は、ペプトン水培地に比べて格段によく、この点で、これらの細菌の多くが発育に 2 価の陽イオンを必要とする海洋細菌であるものと思われた。

次に、45 株の内の 43 株について、塩化第二水銀を含んだ 0.2 モルリン酸緩衝液に菌を懸濁させ 1 時間後に水銀揮発化反応を調べたところ、全ての細菌が、30 - 68% の範囲で水銀を揮発した。また、同様に 41 株について、塩化メチル水銀の揮発化反応を調べたところ、38 株が 13 - 88% の範囲で、メチル水銀を揮発化することが判明した。次に、これらの細菌の中から特に塩化第二水銀や塩化メチル水銀を高率に分解する細菌を 11 株選び、これら細菌について、細菌細胞への水銀の取り込み、およびリン酸緩衝液からの水銀の除去について 5 時間後まで検討した結果、塩化第二水銀では、1 時間後に、塩化メチル水銀では、30 分-1 時間後に多くの菌で水銀の取り込みが最も多く観察された(図 3)。また、リン酸緩衝液からの水銀の除去では、5 時間後が最も反応が進み塩化第二水銀で、45 - 76%、塩化メチル水銀で 33 - 96% が細菌の水銀揮発化反応により除去された。

以上のように、NaCl に耐性な細菌、NaCl がないと増殖できない細菌、アルカリに強い細菌、塩化第二水銀のような 2 価の水銀イオンを高率に揮発・除去できる細菌やメチル水銀を高率に揮発・除去できる細菌など特殊な水銀揮発化細菌を検索することができた。

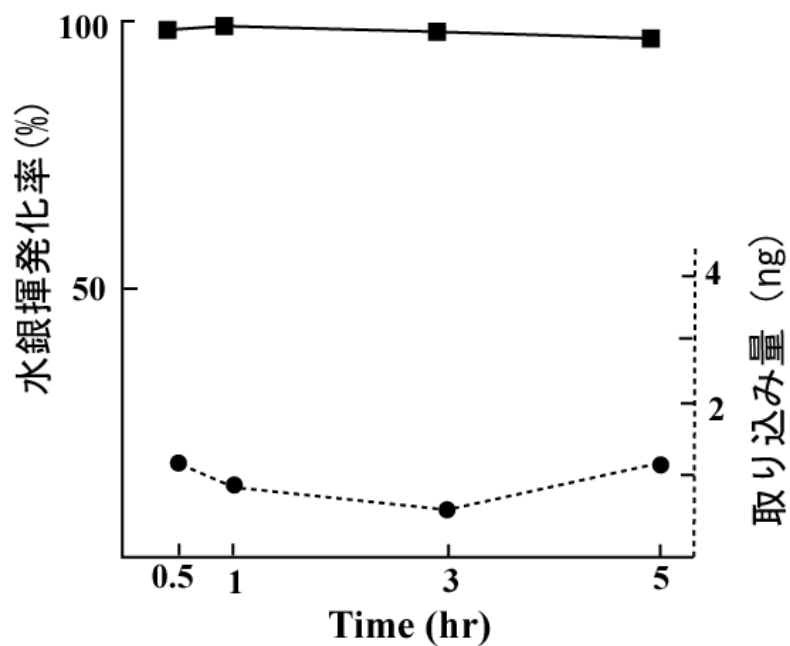


図3. 静止菌での塩化メチル水銀の取り込みおよび水銀揮発化反応

□ : 水銀揮発化反応

● : 取り込み

〔参考文献〕

- 1) 中村邦彦：海洋水銀汚染と微生物，環境科学会誌 **5**, 1-14, 1992.
- 2) Nakamura, K., Aoki, J., Morishita, K., Yamamoto, M.: Mercury volatilization by the most mercury-resistant bacteria from the seawater of Minamata Bay in various physiological conditions. Clean Prod. Processes **2**, 174-178, 2000
- 3) Nakamura, K., Iwahara, M., Furukawa, K.: Screening of organomercurials-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan. Clean Prod. Processes **3**, 104-107, 2001.

6. 水俣病に関する社会科学研究

研究概要

水俣病による被害は、地域住民の健康や生命を損ねただけでなく、社会に与えた影響も甚大で、多種多様な問題が多面的な水俣病問題を形成している。またこのうちのいくつかは、その影響が今日に至るまでも持続し、例えば、現在でも患者・被害者などに対する差別や偏見などの問題が残されている。水俣病に関する社会科学研究では、水俣病の発生から今日に至るまでの期間を通じて、八代海周辺などの患者発生地域において、水俣病の発生がもたらした様々な社会的影響の実態や、被害の発生要因についての検証・考察を行う。これらの研究を通じて、水俣病をめぐる住民相互間のわだかまりを解消し、新たな人間関係の再構築と住民の福祉の向上へ役立てる。また、水俣病事件を今日の化学物質を中心とする環境汚染問題との共通の基盤から歴史的に検証し、水俣病に関する被害の実態を明らかにし、抽出された教訓を国内外の環境問題の予防・被害拡大防止をめざすことを目的とする。

1. 水俣病被害の拡大・存続要因と地域再生に関する研究

研究担当者 蜂谷紀之（国際・総合研究部）
田村憲治（国立環境研究所）
赤木洋勝（国際・総合研究部）

水俣病の発生による地域住民への社会的影響としては、間接的な被害として、水俣病患者に対する差別・偏見の発生とそれに関連して生じた地域社会の分断・対立、地域全体に対する影響があげられる。平成 13 年度においては既存の文献および各種資料などをもとに、患者・被害者などに対する差別や偏見・中傷などの発生や被害について、その起源や性質などの問題点を抽出した。また、この課題と並行して、水俣病に関する社会科学研究会報告書「水俣病の悲劇を繰り返さないために－水俣病の経験から学ぶもの－」（平成 11 年）英語版を作成した。

2. 病名としての「水俣病」に関わる諸問題についての研究

研究担当者 蜂谷 紀之（国際・総合研究部）

衛藤 光明（臨床部）

宮本 清香（臨床部）

松本美由紀（臨床部）

赤木 洋勝（国際・総合研究部）

野村 瞭（所長）

「水俣病」の病名は、時代とともに、また使用するものの立場などにより様々な意味を持って使用されてきた。主な流れを列記すると、①初期に未知の病気に対する仮称として、後にはそのまま通称となった名称として、②メチル水銀中毒症のうち（食物を介した）公害によって発生した中毒に限定する病名として、③発生から解決に至る社会的問題等の象徴としての意義を有する用語、などである。これらの事実は「水俣病」の病名が純粋に医学的な用語としての意義のみで使用されてきたのではないことを示している。この病名の変更運動は、1950年代の終わりころから水俣地域で幾度となく起っている。しかし、患者の救済・補償問題等で地域が対立していた時代においては、病名変更問題もこのような地域対立関係を強く反映したものとなっていた。一方、平成8年の政治的解決などにより、地域のもやい直しなども進んでくると、病名問題についても冷静な議論が行えるようになってきたと言える。「水俣病」の病名問題についての現在の意見は、①この病名が地元への不利益・差別偏見の原因となっているほか、②医学的な病名としての不合理性など、を根拠として変更を求める意見がある一方、他方では、③社会的問題の象徴としての病名の意義を重視する考え方、あるいは④環境モデル都市としての水俣の周知宣伝効果を期待する立場・見解から、この変更に対する意見などがある。

H13年度においては、病名「Minamata Disease」に対する海外の研究者の印象について調べるため、2001年10月に水俣市で開催された6th International Conference on Mercury as a Global Pollutantに参加した外国からの研究者に対してアンケート調査を実施した。この調査はまた、海外の環境水銀の研究者に対して、水俣病問題の一側面を考えてもらう機会にもなった。

3. 行政研究・業務計画

1. 水俣病患者のリハビリテーション及び健康相談室

担当者 松本美由紀(臨床部)

宮本 清香(臨床部)

臼杵扶佐子(臨床部)

〔水俣病患者の外来リハビリテーション〕

水俣病患者に対するデイケア（家族の付き添いなしに患者を預かり、半日を過ごしてもらう）を取り入れた外来リハビリテーションを本年度も引き続き行った。即ち、運動機能の回復や維持を目的とした運動療法（関節可動域訓練、筋力維持・強化訓練、移動動作訓練など）や作業療法（手工芸を取り入れた手指機能訓練）、日常生活動作の改善を目指した指導や訓練、家屋改造や福祉機器に関する相談、疼痛緩和を目的とした物理療法（SSP 療法、低周波治療など）である。同時に医師による医療相談や検査・薬物療法に関する主治医への情報提供なども行った。本年度はこれまで長期に通っていた患者の内一人が明水園へ入院となった。この患者はビタミンE欠損症の合併がありその follow up のため3ヶ月に一回来院予定である。また胎児性患者で内服薬のコントロールのために短期入院があった。

（参考文献）

松本美由紀、宮本清香、臼杵扶佐子：

「PGC モラール・スケールを用いた水俣病患者の主観的満足度についての検討」

総合リハビリテーション 30 (1): 81-85, 2002.

〔健康相談室〕

本年度6月14日から開始した。松本・宮本が、毎週木曜日に情報センター健康相談室に勤務して対応した。他院への紹介、e-mail、電話相談の回答は臼杵室長が、生化学室安武室長とも相談の上行った。また、毛髪水銀の測定は、生化学室安武室長の指導のもとに松本・宮本が対応した。

（1）来館相談

外来リハに参加している患者2名と新規に1名が相談に訪れた。

- ・リハビリ患者の再来延人数6名…外来時に血圧が高く、再検の希望や相談事で来室した。
- ・新規1名……現在の症状と水俣病の関係の有無について検査を含めた相談があり、毛髪水銀値を測定。症状の経過と水銀値から水銀中毒とは考えにくく、詳しい説明が必要なら医師による説明がある旨を伝えた。本人の希望にて他の病院に紹介状を書いてもらい、自宅に郵送した。

（2）e-mailでの問い合わせ

- ・海外1件…イランの火力発電所に勤務している人から、現地人エンジニアが水銀を注射器で除去中に針を誤って腹部に刺してしまったとのことで、処置についての質問があった。事故の内容や用いた水銀（残留塩素計の回転体と電機子間の伝導体として使われていた）について、e-mailを通じてやりとりして回答した。

- ・国内 1 件（宮城県七ヶ浜町）…アメリカの検査機関で毛髪水銀値が高いといわれ、水銀中毒症の治療法についての質問が e-mail で寄せられた。7 ppm では心配いらぬとの回答とともに、当センターでの毛髪水銀値測定について知らせたところ、検査依頼の希望があり、夫婦の毛髪水銀値測定値を郵送した。

（３）電話での問い合わせ 1 件（東京町田市）…アメリカに毛髪水銀値測定を依頼したところ“水銀中毒症の疑い”という結果が返ってきたとのことで、当健康相談室について環境省から紹介されたとのこと。甲状腺機能低下症もあり、現在のしびれ感や全身の疼痛などの症状と水銀中毒症に対する治療を含めた相談があった。毛髪水銀値の再測定を行い総水銀値が 13 ppm でやや高めに出た。メチル水銀値は、0.36 ppm であり、外部からの無機水銀の付着が考えられた。毛髪水銀値からメチル水銀中毒は否定され、検査結果とそのコメントに全身症状に対するコメントを加え返事を送付した。

（４）毛髪水銀値の測定

水銀による健康影響に関心のある情報センター来訪者に、実際の本人の毛髪水銀値を測定し、情報を提供することでさらに水銀に対する意識を高めてもらうことを目的に、平成 13 年 9 月より開始した。平成 14 年 1 月までに 314 名の希望者の測定及びアンケート調査を行った。

毛髪水銀値測定者数内訳 平成 13 年 9 月～平成 14 年 1 月

年齢	0 歳～	10～	20～	30～	40～	50～	60～	70～	80～	合計
男	1	4 5	1 8	1 1	2 2	1 7	9	1 5	3	1 4 1 名
女	1	1 1 2	1 7	9	7	5	8	1 2	2	1 7 3 名
計	2	1 5 7	3 5	2 0	2 9	2 2	1 7	2 7	5	3 1 4 名

（修学旅行生 1 5 7 名、その他の来訪者 1 5 7 名）

毛髪水銀値の検査結果は 0.07 ppm～21.2 ppm であった。また、水俣病や水銀に関する質問も 35 名の方から寄せられ、回答を毛髪水銀値の結果とともに郵送した。

来館者の毛髪水銀値の測定受付は、現在毎週木曜日のみ実施しているが、これ以外の日の希望者も多い。今後、熊本県内の 2 万人の 5 年生を対象にした水俣病に関する社会科見学の誘致計画が検討されており、また他県からの修学旅行者の増加に伴い、毛髪水銀値測定の希望者や水銀に関する質問は今後増加することが予想される。毛髪水銀値が高い人が見つかった場合の栄養指導や follow up の対策とともに、水銀と健康影響に関する情報を提供するためのパンフレットの作成に取り組んでいる。

2. 有機水銀汚染地区住民の健康影響

研究担当者	若宮 純司（臨床部）
	宮本謙一郎（臨床部）
	村尾 光治（臨床部）
	二塚 信（熊本大・医・公衆衛生）
	北野 隆雄（熊本大・医・公衆衛生）
	秋葉 澄伯（鹿児島大・医・公衆衛生）

〔研究成果および進捗状況〕

津奈木町を対象として老人保健法に基づく一般循環器検診に上乗せして有機水銀汚染による健康影響に関するデータを蓄積してきたが、有機水銀汚染が最も激しかった当時のメチル水銀の曝露量は明確でない。したがって、有機水銀汚染地区のデータのみで解析しても各臓器障害に対するメチル水銀の影響については明確な結論を得ることは困難である。そこで、コントロール地区を設定して津奈木町との比較を行うこととした。この際、コントロール地区の条件として、検診に関するデータの精度、内容が同じでなければならない。また、対照者が津奈木町住民とほぼ同じ生活をしてきたものである必要がある。現在これにほぼ合致する地区としては、不知火町がある。この不知火町の検診は、熊本県下 68 市町村の検診を行っている成人病予防協会が行っている。

不知火町に打診したところ、自分たちに負担がかからなければ協力を考えるとのことであった。そこで、成人病予防協会と共同研究体制をとり、津奈木町と同じ検診を行うこととし、昨年度より成人病予防協会と共同研究体制の交渉を行ってきた。検診センターの所長、部長、医師たちは共同研究体制を望んでいたが、事務担当者は水俣病関係機関との共同研究体制やデータ提供を拒否してきた。しかし、平成 14 年に入り、ようやく合意に達し、共同研究体制を確立できた。また、昨年度、熊本県からの要請により津奈木町を含んだ水俣・芦北地区で同じ検診を行っている熊本県の健康管理事業とあわせて解析を行なうこととなった。

14 年度の不知火町の検診が 5 月 23 日から始まるため、現在、このスケジュールにあわせて検診の内容、体制、スタッフ養成など実施に関する打合せを行っている。現在、不知火町で行う予定になっている問診内容と成人病予防協会が行っている問診票とのすりあわせをおこなっている。問診票の取り方に関する指導、スタッフの確保については、熊本県とともに今後の検討すべき課題となっている。

〔平成 14 年度研究計画〕

不知火町において水俣・芦北地区と同精度で検診を行ってデータを得た後、現在までに蓄積された水俣・芦北地区データと今回得られる不知火町のデータとの比較検討を行う。はじめに解析する項目としては、動脈硬化、神経症状、腎疾患、肝疾患を予定している。

3. 生活環境に起因する健康影響モニタリングシステムの構築および健康管理エキスパートシステムをそなえた基盤整備

研究担当者 若宮純司（臨床部）

〔研究成果および進捗状況〕.

現在までに、医療・保健・福祉の統合化について水俣市と検討し、概要を作成した。また、検診システムのうち対象者選定システムと検診結果判定ロジックを作成した。問診票入力システム、検査自動入力システム、データ構築システム、検診結果判定ロジックについては、熊本県の水俣病総合対策事業（健康管理事業）に採用されるとともに、成人病予防協会で、熊本県下の 68 市町村を対象として用いられている。

また、循環器やがんなどの検診システムとその結果に基づいて栄養・運動・休養といった生活習慣の改善指導を行うためのシステムを構築することができるかを検討した。その一部である栄養に関する基本システムを構築した。現在、八潮市（埼玉）で採用されており、好評を得ている。

上記のシステムを当センターの外部機関評価にかけたところ、好評を得た。想思社から質問があり、構想についての概略を述べたところ、患者団体に話して構築したいとのことであった。津奈木町、水俣市に説明を行ったところ、検討したいとのことであった。いずれの機関も市民、水俣病患者、自治体を巻き込んだ広域な地域事業として取り組む方法が実現しやすいのではないかとのことであった。

〔平成 14 年度研究計画〕

13 年度で終了する。今後、自治体において実行可能な状況になり次第、協力することとする。

4. 国水研の研究情報発信のためのデータベース作成

担当者 渡辺正夫（疫学研究部）

若宮純司（臨床部・図書委員長）

〔研究成果及び進捗状況〕

水俣病に関する情報の発信は、水俣病総合研究センターの主たる業務の一つである。情報の発信は、水俣病情報センターを核として実施されることとなるが、研究センターには長年月にわたって研究する際に蓄積してきた水銀に関する書籍や文献がある。この書籍や文献に関するデータを整備し、水俣病情報センターを通じて提供することは、有機水銀の研究者にとって有益なものと考えられる。

現在、既存の図書データは、センター内の研究者が図書利用するのに必要最小限のデータとなっていることから、この書籍や文献に関するデータベースを外部の研究者を含めた一般利用者が利用できるような改変・整備することとした。

本年度は、図書データベースを一般利用者の利用にゆえ得るような内容とするための検討を行うとともに、既存のデータベース修正のために、元データに基づいて入力票を作成した。本年度は和雑誌及び洋雑誌のデータ修正を行うとともに、和書及び洋書件のデータ修正のための入力票を作成した。

〔平成 14 年度研究計画〕

来年度は、残りのデータについて入力票を作成するとともに、全データの入力票に基づいてデータベースを修正する。さらに、水銀関連文献データベースについても一般利用者の利用にゆえ得るような内容を検討するとともに、既存のデータベースの修正を行うために元データに基づいて入力票を作成する。

5. 水俣病関連資料整備及び情報提供のためのシステムの開発

担当者 赤木洋勝（国際・総合研究部）
佐藤邦子（国際・総合研究部）
永井克博（国際・総合研究部）
山崎 学（国際・総合研究部）
蜂谷紀之（国際・総合研究部）
保田叔昭（国際・総合研究部）

〔研究成果及び進捗状況〕

水俣病に関する国内及び国外の膨大且つ多岐にわたる資料、情報を収集、保管、整理し、広く国内外に水俣病に関する情報や教訓を発信していくことは、国立水俣病総合研究センターの重要な任務のひとつである。しかし、これら資料は、その所在が大学、企業、団体、個人、行政機関等と多岐にわたっており、中には水俣病問題の全面的な解決を受け散逸する恐れのあるもの、保存状態の不適切なものなども含まれる。また、水俣病患者等の高齢化も進んでいることから、患者さん等の体験談など生の声を記録するなどの情報、資料の収集を早急且つ重点的に行う必要がある。

こうした状況を踏まえ、国立水俣病総合研究センターでは、平成 13 年 6 月に、新たに水俣病情報センターを開館し、水俣病関連資料整備及び情報提供のために、積極的な取り組みを開始した。

平成 13 年度は、水俣病情報センターとして、水俣病関連資料、情報の収集に取り組むとともに、研究者、行政、患者団体等の水俣病関係団体との話し合いを進め、「情報源情報」の一元化に向けて取り組みを進めている。また、講堂、展示室及び資料室を活用して、水俣病関連資料、情報の提供に積極的に取り組んできた。

さらに、水俣病関連新聞記事データベースの整備や、インターネットを活用しての情報提供に向けて、検討、作業を進めたところである。

（参考）

平成 13 年度水俣病情報センターの情報収集、提供活動の概要について

①来館者の集計

水俣病情報センターでは、平成 14 年 2 月末現在、延べ 22,552 名の来館者を得た。

②講堂の利用状況

講堂では、国立水俣病総合研究センターの主催で「開館記念座談会」を開催し、地域住民をはじめとする 100 名以上の参加を得たほか、水俣市立水俣病資料館による語り部講話や、熊本県環境センターによる環境学習の会場としても利用され、平成 14 年 2 月末現在、68 回の行事が開催された。

③資料室における資料収集状況

資料室では、水俣病に関する資料情報の収集に取り組む、国立水俣病総合研究センターの蔵書を充実するほか、水俣病関係研究者への資料寄贈の呼びかけ等を行い、平成 14 年 2 月末現在 1,244 冊の資料を保管するとともに、資料のデータベース化を進めた。

6. 水俣病認定患者における肝疾患に関する Feasibility Study

研究担当者 坂本峰至（疫学研究部）

劉 曉潔（基礎研究部）

衛藤光明（臨床部）

野村 瞭（所長）

〔研究目的〕

我々は、水俣病認定患者の SMR（標準化死亡比）を認定患者を除く水俣市民を対照に検討した結果、肝疾患死亡による SMR が 1983－1992 年において男女共に高く、1 例を除く全肝疾患死亡の原因が飲酒を原因としない肝硬変であることが明らかになった。肝硬変の SMR は男 282、女 384 で男女共に有意に高い値であった。現在、存命中の患者の健康管理上の問題点の一つが肝疾患への注意であるということを経験した。この肝硬変による死亡が認定患者に多いことの原因はいくつか考えられる。まず、1) メチル水銀そのものが肝疾患を起こす引き金となった。2) 肝疾患のリスクが高いヒトがメチル水銀に感受性が高かった。3) 認定後の投薬等を含む生活習慣。4) 水俣病多発地区が肝炎流行地域と重なり合っていた。5) 患者は医療を受ける機会が多く肝炎の感染率が高い。等である。しかし、二塚らが津奈木町の健診で行った結果からはメチル水銀曝露と肝機能との関連を示唆するような結果は得られていない。今回は、肝疾患のパターンの差が現存の認定患者、救済患者、一般患者の間で見られるかどうかについて Feasibility Study を行う。

〔研究対象および研究方法〕

水俣市の主要医療機関との協力により肝疾患のパターンに認定患者、救済患者、一般患者の間で差があるかどうかの検討が可能であるかどうかの Feasibility Study を行う。もし可能なら、最終的には医療施設、性、居住地域、年齢等をマッチングした対照を設定し、ケース・コントロール研究で診断名、肝機能検査及び肝炎ウイルス検査結果を比較し認定患者における高肝硬変死亡との関連性を検討する。ただし、本研究は Feasibility Study であり、医療機関の協力・患者、対照のデータが得られるかどうかで次年度以降の継続研究とするかどうかを決定する。

7. 八代海沿岸に発生した水俣病の地域別の発生時期と脳組織病変の程度についての検討 —剖検資料を参照して—

研究担当者 坂本 峰至（疫学研究部）
宮本 清香（臨床部）
松本美由紀（臨床部）
衛藤 光明（臨床部）

〔研究目的〕

熊本大学医学部で剖検された 450 例の水俣病関係の剖検例は、現在リサーチ・リソース・バンクに保管されている。水俣病発症当時の資料があり、水俣病の発生時期とその広がりを検討して、チッソ水俣工場から排出されたメチル水銀の拡散状況の再確認とそのヒトへの影響の程度を解析することにより、工場からのメチル水銀排出時期および排水路の変更に伴う水俣病患者の八代海への拡散過程と水俣病病変の程度との関連を検証したい。

〔研究対象および研究方法〕

熊本大学医学部で剖検された 450 症例の中から、発症時期および発生地域の確認できる症例を選び出し、脳組織病変の程度との関連を調べる。チッソ水俣工場からメチル水銀の水俣湾への排出その排水路の水俣川への変更に伴う、水俣病患者の発生時期・地域および病変の程度を解析することにより、水俣病患者発生の地域的並びに時期的特性とその病変の程度との関連を検討する。

〔参考文献〕

Takeuchi, T., Eto, K... The Pathology of Minamata Disease –A tragic story of water pollution-. Nakayama H and Sumiyoshi A (editorial collaborations), Kyushu University Press, INC., Fukuoka, Japan. 1999

8. 水俣在住の胎児性・小児性水俣病患者の生活及び健康現状調査

研究担当者 劉 曉潔 (疫学研究部)
坂本峰至 (疫学研究部)
松本美由紀 (臨床部)
宮本清香 (臨床部)
赤木洋勝 (疫学研究部)
野村 瞭 (所長)
有村公良 (鹿大・第三内科)

〔調査目的〕

胎児性水俣病患者は両親の高齢化もあり健康や将来の生活への不安は増加してきていると思われる。そこで、彼らの生活の質（QOL）の向上に貢献するために日常生活活動（ADL）や健康状態の評価が急務となっている。個別的には臨床部において外来患者や訪問患者に対して ADL や QOL の検討が行われリハビリテーションへの寄与が図られている。今回、我々は水俣市内在住昭和 25 年以後生まれて水俣病と認定された患者数の内現存者全員に対して日常生活の自立度（寝たきり度）等についてバーゼル・インデックス（BI）や機能的自立度（FIM）を中心に主に主治医や介護者からの聞き取りを中心に調べ、水俣在住の胎児性・小児性水俣病患者の全体像を明らかにすることを目指し、彼らの生活の質向上に役立てる基礎資料をする。更に、昭和 55 年に水俣市で行われた健診のデータに基づき現在の健康状態との比較を行い、彼らの健康状態の変化について検討を行う。

〔調査対象及び調査方法〕

調査対象：水俣市内在住昭和 25 年以後に生まれ、水俣病と認定された現存患者全員。

調査方法：BI や機能的自立度 FIM を中心に主治医や介護者への聞き取りによるアンケート調査を行い日常生活の自立度、今後の介護についての問題点の把握を努める。できるだけ、患者および家族とコミュニケーションを取りながら、患者及び家族の抱える問題点を明らかにする。

昭和 55 年に水俣市で行われた健診と同じ問診票を用い、彼らの健康状態の変化について検討を行う。

〔平成 14 年度の計画〕

対象者のリストを作成し、対象者全体の日常生活の自立度、今後の介護についての問題点の把握を行う。さらに、各患者の主治医を把握し、昭和 55 年健診のデータに基づき現在の健康状態を考察する。

9-1). 中国・貴州省における水銀使用アセトアルデヒド製造工場からの排水水銀に起因する環境汚染とその影響について

— 貴州省環境保護科学研究所(環保研)との共同研究 —

担当者	保田 叔昭	(国際・総合研究部)
	中野 篤浩	(基礎研究部)
	安武 章	(基礎研究部)
	山口 雅子	(疫学研究部)
	臼杵 扶佐子	(臨床部)
	荒巻 亮二	(基礎研究部)
	新垣 たずさ	(環境研)
	瞿 麗雅	(貴州省・環保研、中心室)
	姜 平	(貴州省・環保研、所長)

〔研究目的〕

本調査は、最近まで世界でも例外的に稼働していた、水銀を触媒としたアセトアルデヒド製造工場の廃液に起因する、中国・貴州省、貴陽市周辺の土壌水銀汚染の実態調査と、懸念される住民への健康影響を把握することを目的とする。

〔研究対象および研究方法〕

上述の工場からの排水は無処理で放出され、それが下流の灌漑に直接利用されていた。そのため灌漑地一帯は水銀濃度が高いとされる。またその先には百花湖という人工湖があつて、そこでは食用魚の養殖が盛んであり、またその水は付近にある人口 130 万人の都市、貴陽市の飲料水として利用される予定になっている。これまでの調査により、魚、住民の毛髪等の水銀濃度は低く、住民の健康影響を心配する必要がないことがわかっている。しかし水銀に汚染された灌漑地では、住民が生活し農作物が生産されている。子の残留水銀の住民への影響の有無を監視することが必要である。

そこで、従来実施していた毛髪採取と健康に関する聞き取り調査に加え、無機水銀の体内濃度を推定する目的で、尿の採取も行うこととした。また水銀に汚染した土壌を解析し、水銀の存在状態を推定する作業も開始した。

これらの研究のため、環保研より述べ 4 名の研究者を招聘して、尿の水銀測定や土壌の解析等を行うとともに、国水研の研究者も述べ 7 名を 2 回にわたって派遣した。

〔研究の現状〕

毛髪の水銀濃度調査を汚染地区の住民に関して実施したが、今年度は対照地区として猫跳河の上流、清鎮市の南西 20km 地点にある農村の住民を対象とした毛髪、尿の採取と聞き取りを実施した。同時に、水銀汚染を受けた灌漑地のある清鎮市郊外青龍地区の住民についても尿採取とアンケート調査を実施した。

対照地区では合計 100 名の試料が集まったが、その平均の水銀濃度は 0.46ppb と、汚染地区でもっとも低い百花湖の住民よりさらに低い値であった。一方尿については、青龍地区でも 0.43ppb という低い数値が得られ、対照地区ではさらに低い 0.274ppb であった。この両地域の食生活には特に違いがなかった。

〔平成 14 年度研究計画〕

その汚染の実態を知るための組織的な調査は行われていない。そこで灌漑用水の流入した地域を網羅するメッシュを 100m 単位で敷き、その交点の土壌を採取して、いわゆる汚染地図を作る計画を立てた。調査の第一段階として、13 年度末に 2 週間の調査を実施する。また、秋には田畑の収穫を待って残りの試料を採取し、同時に作物も採取する予定である。そのため新たに特別研究員の松山明人氏にメンバーとして加わっていただくこととした。

9－2)．開発途上国からの来訪者の研修指導

担当者	佐藤 邦子（国際・総合研究部）
	永井 克博（国際・総合研究部）
	赤木 洋勝（国際・総合研究部）
	蜂谷 紀之（国際・総合研究部）
	保田 叔昭（国際・総合研究部）
	衛藤 光明（臨床部）
	中野 篤浩（基礎研究部）
	安武 章（基礎研究部）
	坂本 峰至（疫学研究部）

〔研究成果及び進捗状況〕

当研究センターでは毎年、国際協力事業団が、開発途上国の専門家を対象として実施する集団研修コースをはじめとして、開発途上国からの来訪者の受入を行っている。

平成 13 年度においては、中国、韓国、フィリピン、アルゼンチンなどから 215 名、25 集団研修コースを受け入れ、赤木洋勝国際・総合研究部長（6 回）、蜂谷紀之国際・総合研究部社会科学室長（1 回）、保田叔昭国際・総合研究部自然科学室長（1 回）、衛藤光明主任研究企画官（15 回）、中野篤浩基礎研究部長（1 回）、安武章基礎研究部生化学室長（3 回）、坂本峰至疫学研究部調査室長（3 回）がそれぞれ対応し、水俣病に関する講義、環境中の水銀と世界規模から見た水銀汚染の講義、魚、土壌、毛髪中の総水銀分析の講習、見学等多岐にわたる講義、講習を行い、研修員個人の毛髪水銀測定なども実施した。

9-3).「第6回地球環境汚染物質としての水銀に関する国際会議」の開催準備及び実施

担当者 赤木洋勝（国際・総合研究部）

三橋英夫（総務課）

山元 恵（基礎研究部）

佐藤邦子（国際・総合研究部）

安武 章（基礎研究部）

山内義雄（総務課）

永井克博（国際・総合研究部）

当研究センターでは、水俣市、熊本県及び環境省と協力して、「第6回地球環境汚染物質としての水銀に関する国際会議」の開催準備及びその実施の協力に当たった。本国際会議は、平成13年10月15日から19日まで、第6回地球環境汚染物質としての水銀に関する国際会議組織委員会及び財団法人水と緑の惑星保全機構の共催により、熊本県水俣市の水俣市文化会館及び水俣市総合もやい直しセンターにおいて開催された。

今回の会議には、41カ国から433名の参加を得て、我が国はもとより、アジア各地から多くの研究者が参加し、この会議を通じて幅広い学術交流を行ったことは、意義深い成果であった。また、公害の原点といわれる水俣病を経験した水俣市での開催は、海外の水銀研究者にとって特別な意味を持つものであり、これまでの我が国における水銀の健康影響や、毒性に関する長年にわたる研究成果をはじめ、水俣病問題の歴史とその後の取り組み、そこから得られた教訓等を学ぶ絶好の機会となった。こうした水俣からの情報発信が、今後の世界における水銀汚染問題への取り組み、汚染防止等を含めた水銀研究の発展に大きく寄与するものと期待されている。

平成13年に行った主な業務は以下の通りである。

1. 会合開催による全体スケジュールの構築
 - ・第7回 Local Organizing Committee 会議開催（平成13年9月18日）
2. 本会議プログラム作成
 - ・学術会議プログラム作成（abstract 作成等）
 - ・会場使用計画案、輸送計画案等の策定及び運営関係案の作成
 - ・宿泊及びエクスカーション関係計画の作成
3. 会議の広報活動
 - ・ホームページ更新・管理
 - ・学会等における広報活動
4. 会議運営資金調達
 - ・予算案作成
 - ・募金関係、助成金関係申請業務及び機器出展等勧誘活動
5. 関連行事等準備
 - ・水銀汚染対策マニュアル作成業務支援
 - ・市民向け公開行事企画及び会議参加者向け市内ツアーの企画

6. 本会議実施への協力

- ・学会運営への参画
- ・総会及び分科会の進行補佐
- ・国立水俣病総合研究センター見学会の実施

7. 会議開催後の庶務

- ・報告書の作成
- ・決算の作成

平成13年度 国際共同研究事業等一覧 / 派遣

用務地・機関	派遣者	用務名	用務	派遣期間
中華人民共和国 貴州省 貴州省環境保護科学 研究所	国際・総合研究部自然科学室長 保田 叔昭 基礎研究部病理室主任研究員 荒巻 亮二 疫学研究部調査室研究員 山口 雅子 基礎研究部長 中野 篤浩	貴州省清鎮市周辺土壌の水銀汚染による健康影響調査	「貴州省清鎮市周辺土壌の水銀汚染の健康影響と水銀汚染土壌の修復に関する基礎的研究に係る覚書」に基づき、土壌中無機水銀による影響を調査するため、工場のない対照地区の住民100人の毛髪および尿を採取し、併せて健康に関するアンケート調査を実施。	H13.4.1-4.8
中華人民共和国 貴州省 貴州省環境保護科学 研究所	国際・総合研究部自然科学室長 保田 叔昭 疫学研究部調査室研究員 山口 雅子	中国貴州省における水銀汚染調査	前回に引続いた調査で、工場周辺地区の住民100～200人を対照に毛髪、尿の採取及び健康に関するアンケート調査を実施するとともに、汚染土壌に含まれる水銀の化学形態を解析するために土壌試料を採取。	H13.6.11-6.17
中華人民共和国 貴州省 貴州省環境保護科学 研究所	国際・総合研究部自然科学室長 保田 叔昭 基礎研究部生化学室長 安武 章 基礎研究部病理室主任研究員 荒巻 亮二 疫学研究部調査室研究員 山口 雅子	中国貴州省清鎮市周辺における水銀土壌汚染状況調査	覚書に基づき調査で、貴州省清鎮市周辺の汚染地域に100m単位の格子を適用し、その各交点(約400地点)の土壌試料を採取し、汚染地域全体の水銀濃度分布調査を実施。	H14.3.2-3.17
タイ王国 バンコク市 科学技術環境省 厚生省	国際・総合研究部社会科学室長 蜂谷 紀之	「水俣病経験の普及啓発セミナー」出席及び現地状況の視察	研究者の立場から水俣病の経験を伝えることにより、タイ国民に対し、公害の未然ならす環境破壊及び健康影響並びに公害防止や環境保全の重要性を再認識するための情報を提供。また、タイ国の現状視察。	H14.3.24-3.29

平成13年度 国際共同研究事業等一覧 / 招聘

氏名	所属機関	職名	招聘期間	研究テーマ	受入担当者
Yi He Jin	China Medical University 中国医科大学	Association Professor 助教授	13.8.29 - 13.9.29	中国で常用されている男性避妊薬ゴシポルの水銀排泄 機序に関する実験的研究	基礎研究部長 中野 篤浩
Krzysztof Dmowski	University of Warsaw ワルシャワ大学	Habilitowany 助教授	13.9.11 - 13.9.22	重金属公害の生物指標としての鳥類羽毛の解析	基礎研究部病理室長 桑名 貴
Ricardo Bezerra	Universidade Federal do Par アラ連邦大学	Assistant Professor 助教授	13.9.29 - 13.11.1	ラットを用いた、妊娠期における母親と児のメチル水銀曝 露量評価	疫学研究部調査室長 坂本 峰至
Elizaveta Emanuilovna Graevskaya	Moscow State University モスクワ大学	Senior researcher 主任研究員	13.10.9 - 13.11.10	メチル水銀のラット肥満細胞機能に及ぼす影響	基礎研究部 病理室主任研究員 荒巻 亮二 基礎研究部生化学室長 安武 章
Li Ya Qu	Research and Designing Institute of Environmental Science 貴州省環境科学設計院	Vice Director 副院長	13.10.12 - 13.10.21	中国貴州省清鎮市周辺における水銀汚染土壌による健 康影響の有無の監視と土壌の再生に関する基礎研究	国際・総合研究部 自然科学室長 保田 叔昭
Ji Ling Xiong	Environmental Protection Agency of Guizhou Province 貴州省環境保護局	Vice Director 副局長	13.10.12 - 13.10.21	中国貴州省清鎮市周辺における水銀汚染土壌による健 康影響の有無の監視と土壌の再生に関する基礎研究	国際・総合研究部 自然科学室長 保田 叔昭
An Yumin	Research and Designing Institute of Environmental Science 貴州省環境科学設計院	Engineer 高級実験師	13.11.11 - 13.12.15	中国貴州省清鎮市周辺における水銀汚染土壌による健 康影響の有無の監視と土壌の再生に関する基礎研究	基礎研究部長 中野 篤浩
Liu Li	Research and Designing Institute of Environmental Science 貴州省環境科学設計院	Engineer 工程師	13.11.11 - 13.12.15	中国貴州省清鎮市周辺における水銀汚染土壌による健 康影響の有無の監視と土壌の再生に関する基礎研究	基礎研究部長 中野 篤浩
Jean Kokulamuka T. Mujumba	University of Dar es Salaam ダル・エス・サラーム大学	Principal Laboratory Scientists 研究室長	14.1.26 - 14.2.16	人体・環境試料中総水銀およびメチル水銀分析の精度管 理・保証	国際・総合研究部長 赤木 洋勝
Ana Trinidad Francisco - Rivera	Occupational Health Division, Department of Health 保健省労働保健部	Environmental and Occupational Health Cluster 環境・労働保健技士	14.1.29 - 14.2.19	フライビンにおける金採掘に伴う水銀汚染とその健康影響 に関する共同研究	国際・総合研究部長 赤木 洋勝
Nikolay F. Mashyanov	St.-Petersburg State University サンクト・ペテルブルグ国立大学	Head of Laboratory 研究施設長	14.2.9 - 14.2.23	水銀汚染土壌／底質の加熱処理を用いた浄化技術に関 する共同研究	国際・総合研究部長 赤木 洋勝
Zan Dong LI (JSPS フェロー)	China Agricultural University 中国農業大学	Professor 教授	14.2.15 - 14.4.30	生殖毒性検定法への家禽発生工学の応用に関する研究	基礎研究部病理室長 桑名 貴

4. 研究発表一覧

1. 国際・総合研究部

1) 学術刊行物による発表

- (1) Akagi, H., Ikingura J.R.:

Analytical technique in evaluation of the environmental factors influencing the dynamics of mercury in aquatic systems with particular emphasis on tropical areas

In: Proceedings of the NIMD Forum 2001 – Mercury research: Today and Tomorrow –, pp.1-11,2001.

- (2) Ikingura, J.R., Akagi, H.:

Lichens as a good indicator of air pollution by mercury in small-scale gold mining areas, Tanzania
Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. **68**, 699-704,2002.

- (3) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., Ando, T., Tomiyasu, T., Fajon, V.:

Determination of total mercury and monomethylmercury compounds in water samples from Minamata Bay, Japan: an inter-laboratory comparative study of different analytical techniques
Applied Organometallic Chemistry, **15**, 515-526,2001.

- (4) Rajar, R., Agar, D., Sirca, A., Akagi, H., Yano, S., Tomiyasu, T., Ohki, K., Horvat, M.:

Use of modeling in mercury pollution studies with two case studies: Gulf of Trieste and Yatsushiro Sea
In: Proceedings of the NIMD Forum 2001– Mercury research: Today and Tomorrow –, pp.123-135,2001.

- (5) Tutshku, S., Schantz, M.M., Horvat, M., Logar, M., Akagi, H., Emons, H., Levenson, M., Wise, S.A.:

Certification of the methylmercury content in SRM 2977 Mussel Tissue (organic contaminants and trace elements) and SRM 1566b Oyster Tissue
Fresenius' Journal Analytical Chemistry, **369**, 364-369,2001.

2) 学術研究会による発表

- (1) Akagi, H., Ikingura J. R.:

Evaluation of the environmental factors influencing the dynamics of mercury in aquatic systems with particular emphasis on tropical areas.

NIMD Forum 2001, March 2001, (Minamata, Kumamoto, Japan)

- (2) Akagi, H., Ikingura, J.R.:
Analytical techniques for the evaluation of the dynamics of mercury in aquatic systems.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (3) Hachiya, N., Hirasawa, F., Takizawa, Y.:
Hair mercury concentrations in junior high school students in Kagoshima prefecture, Japan
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (4) Yasuda, Y., Kindaichi, M., Akagi, H.:
Changes of mercury concentration in fishes and those preys in Minamata Bay.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (5) Cid de Souza, T.M., Akagi, H., Bastos, W.R.:
Establishment of the methodologies for determination of total mercury and methylmercury in environmental and biological samples.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (6) Ikingura, J.R., Akagi, H.:
Total mercury and Methylmercury levels in fish from hydroelectric reservoirs in Tanzania.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (7) Kashima, Y., Akagi, H., Kinjo, Y., Malm, O., Guimaraes, J.R.D., Branches, F., Doi, R.:
Selenium and mercury concentrations in fish from the Tapajos river and the Balbina Reservoir, Brazilian Amazon.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (8) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H.:
Simultaneous Determination of Inorganic and Methyl Mercury in Water.
12th International Symposium on "Spectroscopy in Theory and Practice" (April 9-12, 2001, Bled, Slovenia)

- (9) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H.:
Simultaneous determination of inorganic mercury and methylmercury in seawater.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (10) Logar, M., Horvat, M., Akagi, H., Ando, T., Tomiyasu, T., Fajon, V.:
Determination of total mercury and methylmercury in water samples from Minamata Bay, Japan;
An Inter-laboratory comparative study of different analytical techniques.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (11) Lojen, S., Horvat, M., Akagi, H., Logar, M., Falnoga, I., Fajon, V., Ando, T., Tomiyasu, T., Ohki.:
Coupling of mercury and nutrient biogeochemical cycles in the recent sediment of Minamata Bay, Kumamoto,
Japan.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (12) Matsuyama, A., Akagi, H.:
Remediation technology for mercury-contaminated soil/sediment by low temperature thermal treatment using
iron sulfide.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (13) Rajar, R., Agar, D., Sirca, A., Akagi, H., Yano, S., Tomiyasu, T., Oki, K., Horvat, M.:
Use of modeling in mercury pollution studies with two case studies: Gulf of Trieste and Yatsushiro Sea.
NIMD Forum 2001, March, 2001, (Minamata, Kumamoto, Japan)
- (14) Rajar, R., Agar, D., Sirca, A., Akagi, H., Yano, M., Tomiyasu, T., Horvat, M.:
Comparative modeling study of mercury transport processes in Minamata bay (Japan) and in Gulf of Trieste
(N. Adriatic).
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)

- (15) 赤木洋勝
環境研究の知的研究基盤の充実に向けて：公害問題から環境学へ
総合科学技術会議との意見交換シンポジウム
平成 14 年 4 月（福岡）
- (16) 矢野真一郎、多田彰秀、山本勝義、野中寛之、中富 慶、深江由美、中村武弘、赤木洋勝、Rudolf Rajar,
Milena Horvat
現地観測による水俣湾の流動構造の解明について
土木学会西部支部研究発表会
平成 14 年 3 月（佐賀）
- (17) 森 敬介、保田叔昭、山口雅子
「岩礁・転石潮間帯生物群集の構造特性及び地域変異」
第 46 回三学会九州支部・地区合同大会、
平成 13 年 5 月（佐賀）
- (18) 森 敬介、保田叔昭、山口雅子
「その後の水俣湾、ベントスの水銀汚染モニタリング調査」
第49回日本生態学会大会、
平成 14 年 3 月（仙台）

2. 臨床部

1) 学術刊行物による発表

- (1) Eto, K., Yasutake, A., Nakano, A., Akagi, H., Tokunaga, H., Kojima, T.:
Reappraisal of the historic 1959 cat experiment in Minamata by the Chisso Factory.
Tohoku J. Exp. Med., **194**, 197-203, 2001.
- (2) Eto, K., Yasutake, A., Kuwana, T., Korogi, Y., Akima, M., Shimozeke, T., Tokunaga, H., Kaneko, Y.:
Methylmercury poisoning in common marmosets-A study of selective vulnerability within the cerebral cortex.
Toxicol. Pathol. **29**, 1-9, 2001.
- (3) Miyamoto, K., Nakanishi, H., Moriguchi, S., Fukuyama, N. , Eto, K. , Wakamiya, J.,
Murao, K., Arimura, K., Osame, M.:
Involvement of enhanced sensitivity of N-methyl-D-aspartate receptors in
vulnerability of developing cortical neurons to methylmercury neurotoxicity.
Brain Res. **901**, 252-258, 2001.
- (4) Usuki, F., Yasutake, A., Matsumoto, M., Higuchi, I.:
Chronic low-dose methylmercury administration decreases mitochondrial enzyme activities and induces
myopathic changes in rats.
J. Health Science **47**, 162-167, 2001.
- (5) Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Tokunaga, H., Matsumoto, M., Eto, K., Ishiura, S., Higuchi, I.:
In vivo protection of a water-soluble derivative of vitamin E, Trolox, against methylmercury-intoxication
in the rat.
Neuroscience Letters **304**, 199-203, 2001.
- (6) Takahashi, N., Sasagawa, N., Usuki, F., Kino, Y., Kawahara, H., Sorimachi, H., Maeda, T., Suzuki, K.,
Ishiura, S.:
Coexpression of the CUG-binding protein reduces DM protein kinase expression in COS cells.
J. Biochem. **130**, 581-587, 2001.
- (7) Arimura, K., Wakamiya, J., Nakagawa, M., Osame, M., Akiba, S., Futatsuka, M.:
The effects of aging on the neurological findings of Minamata disease patients and inhabitants of
methylmercury polluted and non-polluted areas.
In: Proceedings of NIMD Forum 2001 – Mercury research: Today and tomorrow., pp. 92-105, 2001.

- (8) Uchino, M., Mita, S., Satoh, H., Hirano, T., Arimura, K., Nakagawa, M., Nakamura, M., Uyama, E., Ando, Y., Wakamiya, J., Futatsuka, M.:
Clinical investigation of the lesions-Responsible for sensory disturbance of Minamata disease.
Tohoku J. Exp. Med. **195**, 181-189, 2001.
- (9) 松本美由紀、宮本 清香、臼杵美佐子
PGCモラル・スケールを用いた水俣病患者の主観的満足度についての検討
総合リハビリテーション30 (1): 81-85, 2002.
- (10) 芝田宏美、若宮純司、井垣 歩、戌角幸治、谷脇清助
顔面サーモグラムの標準化に関する検討
一 体位別馴化過程およびパターン分類と循環機能との相関について－
Biomed. Thermol. **21**, 55-59, 2001.

2) 学術研究会における発表

- (1) Eto, K., Yasutake, A., Kuwana, T., Korogi, Y., Akima, M., Shimozeki, T., Tokunaga, H., Kaneko, Y.:
The pathogenesis of concentric constriction of the visual fields in Minamata disease.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (2) Eto, K., Yasutake, A., Akima, M., Shimozeki, T., Tokunaga, H.:
Peripheral nerve pathology of methylmercury intoxication in primates.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (3) Matsumoto, M., Miyamoto, K., Usuki, F.:
Investigation of subjective well-being in Minamata disease patients using the PGC Morale Scale.
12th International Roundtable Aging and Intellectualities and Quality of Life
(Mar. 2002, Fukushima, Japan)
- (4) Miyamoto, K., Wakamiya, J., Murao, K., Arimura, K.:
A study of auditory brainstem response (ABR) in fetal Minamata disease rats.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)

- (5) Murao, K., Wakamiya, J., Miyamoto, K.:
Prenatal methylmercury exposure in monkeys (*Macaca Fascicularis*).
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (6) Usuki, F., Yasutake, A., Umehara, F., Eto, K., Higuchi, I., Ishiura, S.:
Central role of oxidative stress in the pathogenesis of methylmercury cytotoxicity.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (7) Wakamiya, J., Uchino, M., Arimura, K., Minoda, S., Miyamoto, K., Murao, K.:
Neurological findings of Minamata disease in Japan.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (8) Wakamiya, J., Miyamoto, K., Murao, K.:
Fetal effects of methyl mercury.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (9) Kino, Y., Sasagawa, N., Usuki, F., Ishiura, S.:
Functional analysis of CUG-BP1 and EXP/MBNL.
3rd International Myotonic dystrophy Conference
(Oct. 2001, Kyoto, Japan)
- (10) Nakagawa, M., Kodama, T., Akiba, S., Arimura, K., Wakamiya, J., Futatsuka, M., Kitano, T.:
Logistic model analysis of neurological findings in Minamata disease and predicting index.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)
- (11) Takahashi, Y., Tsuruta, S., Hasegawa, J., Akagi, H., Eto, K., Tokunaga, H.:
Histological observation of mercury in rat tissues with amalgam fillings.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan)

(12) 衛藤 光明

「メチル水銀中毒症（水俣病）の発症機構について」
ワークショップ9（環境汚染と病理—環境科学の最前線）
第90回日本病理学会総会
平成13年4月（東京）

(13) 衛藤 光明、秋間 道夫

「コモン・マーモセットを用いたメチル水銀中毒症に関する実験的研究（第3報）」
第42回日本神経病理学会総会学術研究会
平成13年5月（東京）

(14) 宮本謙一郎、岩下 眞一、山田 聡子、有村 公良

「健常者における電流知覚閾値（CPT）の再現性の検討」
第31回日本臨床神経生理学会学術大会
平成13年11月（東京）

(15) 臼杵扶佐子、笹川 昇、石浦章一

「Myotonic dystrophy モデル細胞株の筋分化におけるシグナル伝達異常」
第42回日本神経学会総会
平成13年5月（東京）

(16) 竹下裕也、笹川 昇、臼杵扶佐子、石浦章一

「DMモデル筋芽細胞における抗酸化酵素の発現変化」
第74回日本生化学大会
平成13年10月（京都）

3. 基礎研究部

1) 学術刊行物による発表

- (1) Nakamura, K., Iwahara, M., Furukawa, K.:
Screening of organomercurials-volatilizing bacteria in the mercury-polluted sediments and seawater of Minamata Bay in Japan.
Clean Product and Processes., **3**, 104-107, 2001.
- (2) Yasutake, A., Hirayama, K.:
Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices.
Arch. Toxicol., **75**, 400-406, 2001.
- (3) Tsuchiya H., Ogonuki N., Kuwana T., Sankai T., Kanayama K.:
Short-term preservation of mouse oocytes at 5 °C.
Exp. Anim., **50**, 441-443, 2001.
- (4) Naito, M., Sano, A., Matsubara, Y., Harumi, T., Tagami, T., Sakurai, M., Kuwana, T.:
Fate of donor blastodermal cells derived from the central disc, marginal zone and area opaca transferred into the recipient embryos.
Jour. Poult. Sci., **38**, 58-61, 2001.
- (5) Naito M., Sano A., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Sakurai M., Kuwana T.:
Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads.
Reproduction, **121**, 547-552, 2001.
- (6) Iohara, K., Iiyama, R., Nakamura, K., Silver, S., Sakai, M., Takeshita, M., Furukawa, K.:
The mer operon of a mercury-resistant *Pseudoalteromonas haloplanktis* strain isolated from Minamata Bay, Japan.
Appl. Microbiol. Biotechnol., **56**, 736-741, 2001.
- (7) Shimada, H., Nagano, M., Yasutake, A., Imamura, Y.:
Wistar-Imamichi rats exhibit a strong resistance to cadmium toxicity.
J. Health Sci., **48**, 201-203, 2002.
- (8) Li, J., Ando, T., Yamamoto, M., Yoshimitsu, N., Akiba, S.:
Total mercury levels of maternal hair in Kagoshima.
Environ. Sci., **8**: 533-542.2001.

2) その他の刊行物

- (1) Nakamura, K.:
Characteristics of organomercurial-volatilizing bacteria in Minamata Bay. International Symposium on new aspects of environmental biotechnology to clean up contaminated soil and groundwater.
The Core Reach for Evolution Science Technology (CREST) Project on “Fundamental Studies on Bioremediation Technologies of Contaminated Soil Environment” 49-55, 2001.
- (2) Yasutake, A., Hirayama, K.:
Metal toxicology.
In: Handbook of Toxicology: second edition, Eds. Derelanko, M.J., Hollinger, M.A., CRC Press, pp. 913-955, 2002.
- (3) 安武 章, 衛藤 光明
「水銀」
中毒学－基礎・臨床・社会医学－, 荒木俊一編集, 朝倉書店、pp. 88-93, 2002.

3) 学術研究会による発表

- (1) Aramaki, R., Yasutake, A., Kura, S., Sakamoto, M., Yamaguchi, M.:
X-ray induced degradation of methylmercury in aqueous solution.
6th International Conference of Mercury as a Global Pollutant.
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (2) Aramaki, R., Yasutake, A., Mizumoto, K., Iwaki, T.:
Methylmercury hypersensitivity of cultured chinese hamster V79 cells.
6th International Conference of Mercury as a Global Pollutant.
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (3) Nakamura, K., Uchiyama, H.:
Mercury volatilization by marine bacteria isolated from the seawater of Minamata Bay, Japan in various physiological conditions.
9th International Symposium on Microbial Ecology
(Aug. 2001, Amsterdam, the Nederland).

- (4) Nakamura, K.:
Characteristics organomercurials-volatilizing bacteria in Minamata Bay
The Core Research for Evolution Science Technology (CREST) Project on “Fundamental Studies on
Bioremediation Technologies of Contaminated Soil Environment”
Internal Symposium on New Aspects of Environmental Biotechnology to clean up Contaminated Soil and
Groundwater
(2001, Tokyo, Japan).
- (5) Nakamura, K., Morishita, K., Yamamoto, M., Iwahara, M.:
Removal of methylmercury from fish broth by bacteria isolated from Minamata Bay.
6th International Conference on Mercury as a Global pollution
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (6) Yasutake, A., Hirayama, K.:
Evaluation of methylmercury biotransformation using rat liver slices.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (7) Yasutake, A., Hirayama, K.:
Behavior of metallothionein III in Hg vapor exposed rat brain.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (8) Adachi, T., Yasutake, A., Hirayama, K.:
Influence of dietary protein levels on the fate of methylmercury.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (9) Yamamoto, M., Hou, H., Nakano, A., Nakamura, K., Ando, T., Akiba, S.:
Stimulation of elemental mercury oxidation in aquatic environments.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (10) Nakano, A., Sakamoto, M., Yamamoto, M., Miyamoto, K., Liu, X.:
Simplified analytical method for methylmercury in biological sample using monoiodoacetate
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).

- (11) Graevskaya, E.E., Yasutake, A., Aramaki, R., Rubin, A.B., Takizawa, Y.:
The effect of methylmercury on the rat mast cells function.
6th International Conference of Mercury as a Global Pollutant.
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (12) Yanagi, K., Matsuoka, N., Endo, T., Sakamoto, M., Aramaki, R., Nakano, A.:
International cooperation on mercury environmental monitoring in bangladesh.
6th International Conference of Mercury as a Global Pollutant.
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (13) Hirayama, K., Yasutake, A.:
Effects of mercury compounds on reactive oxygen production in submitochondrial membrane particles prepared from rat brain.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (14) Yoshida, M., Satoh, M., Yasutake, A., Shimada, A., Tohyama, C.:
Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (15) Yoshida, M., Satoh, M., Shimada, A., Yasutake, A., Tohyama, C.:
Pulmonary toxicity caused by acute exposure to mercury vapor is enhanced in metallothionein-null mice.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (16) Graevskaya, E.E., Yasutake, A., Aramaki, R., Rubin, A.B., Takizawa, Y.:
The effect of methylmercury on the rat mast cells function..
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (17) Nagano, M., Yasutake, A., Inouye, M., Shimada, H.:
Four-generation study of rats given methylmercury chloride in drinking water.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (18) Kunimoto, M., Takanaga, H., Adachi, T.:
Factors controlling the cell death of cerebellar neurons induced by methylmercury.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).

- (19) Nakano, A., Sakamoto, M., Yamamoto, M., Miyamoto, K., Liu, X.:
Simplified analytical method for methylmercury in biological sample using monoiodoacetate
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (20) Nakamura, K., Morishita, K., Yamamoto, M., Iwahara, M.:
Removal of methylmercury from fish broths by bacteria isolated from Minamata Bay
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (21) Ando, T., Yamamoto, M., Tomiyasu, T., Hashimoto, J., Nakano, A., Akiba, S., Miura, T.:
Bioaccumulation of mercury in a vestimentiferan worm living in Kagoshima Bay, Japan
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (22) Ando, T., Tomiyasu, T., Yamamoto, M., Akiba, S., Akagi, H.:
Mercury concentration in the mussel adductor muscle in Kagoshima Bay, Japan
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (23) Li, J., Ando, T., Yamamoto, M., Yoshimitsu, N., Akiba, S.:
Total mercury levels of maternal hair in Kagoshima, Japan
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant
(Oct. 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (24) 中村邦彦、矢木修身
「細菌を利用したメチル水銀汚染土壌処理法の開発」
環境科学会 2001 年会
平成 13 年 10 月（山梨）
- (25) 安武 章、島田章則、水谷裕輔、谷口巳佐子
「NDMA 投与によるラット肝小葉の MT 誘導組織特異性」
メタロチオネイン 2001
平成 13 年 11 月（仙台）
- (26) 足立達美、高永博実、桜井洋子、石堂正美、国本 学、阿相皓晃
「グリア細胞の分化・発達に及ぼす細胞密度および甲状腺ホルモンの影響」
Neuro2001（第 44 回日本神経化学・第 24 回日本神経科学合同大会）
平成 13 年 9 月（京都）

- (27) 森下惟一、中村邦彦、岩原正宜
「水俣湾海水から分離した水銀耐性菌の水銀揮発化反応」
日本防菌防黴学会 第 28 回年次大会
平成 13 年 5 月（大阪市）
- (28) 岩原正宣、立花直樹、谷口智穂、野村善幸、森下惟一、中村邦彦
「土壌細菌による水銀化合物の分解性」
第 8 回日本生物工学会九州支部大会
平成 13 年 12 月（福岡）
- (29) 山本絵美、島田章則、佐藤雅彦、西村典子、鈴木純子、遠山千春、吉田 稔、安武 章
「水銀のバリアとしての胎盤の役割に関する病理学的検索：メタロチオネイン欠損マウスを用いた水銀蒸気曝露実験」
メタロチオネイン 2001
平成 13 年 11 月（仙台）
- (30) 吉田 稔、佐藤雅彦、遠山千春、島田章則、山本絵美、安武 章
「メタロチオネイン欠損妊娠マウスにおける水銀の胎盤通過について」
メタロチオネイン 2001
平成 13 年 11 月（仙台）
- (31) 永野匡昭、安武 章、井上 稔、島田秀昭
「塩化メチル水銀の低濃度曝露による継世代影響」
メタロチオネイン 2001
平成 13 年 11 月（仙台）
- (32) 島田秀昭、永野匡昭、安武 章、今村順茂
「ラットにおけるカドミウムの毒性発現に及ぼす系統差並びに性差について -MT の関与は？-」
メタロチオネイン 2001
平成 13 年 11 月（仙台）
- (33) 高永博実、足立達美、国本 学、青木康展
「低分子量 G タンパク質 Rho A の発現に対するダイオキシン類の影響」
日本薬学会第 122 年会
平成 14 年 3 月（千葉）

4) 特許

中村邦彦:「水銀汚染物の浄化法とそれに用いる微生物」
特願 2001-295761 号 (H 13.9.27 出願)

4. 疫学研究部

1) 学術刊行物による発表

- (1) Akagi H., Naganuma A.:
Methylmercury accumulation in Amazonian inhabitants associated with mercury pollution
In: Proceedings of US EPA-Japan workshop on Human Health Effects of Low Dose Methylmercury Exposure, Minamata, Japan, pp.133-145, November 28-30, 2001.
- (2) Akagi, H., Sakamoto, M.:
Quantitative evaluation of environmental factors influencing the dynamics of mercury in the aquatic systems
Report on the First Research Co-ordination Meeting on Health Impacts of Mercury Cycling in Contaminated Environments Studied by Nuclear Techniques, NAHRES-61, IAEA, Vienna, pp. 94- 101, 2001.
- (3) Akagi, H., Akiba, S., Arimura, K., Satoh, H., Togashi, S., Naganuma, A., Futatsuka, M., Matsuyama, A., Ando, T., Sakamoto, M.:
Preventive Measures against Environmental Mercury Pollution and Its Health Effects.
Japan Public Health Association, October, 2001.
- (4) Sakamoto, M., Nakano, A., Akagi, H.:
Declining Minamata Male Birth Ratio Associated with Increased Male Fetal Death Due to Heavy Methylmercury Pollution.
Environmental Research Section A **87**, 92-98, 2001.
- (5) Sakamoto, M., Kakita, A., Wakabayashi, K., Takahashi, H., Nakano, A., Akagi, H.:
Evaluation of methylmercury intoxication on the developing brain: A study with consecutive and low-dose exposure throughout gestation and lactation periods.
US-Japan Workshop on Human Health Effects of Low Dose Methylmercury Exposure.
Nov, 2000 (Minamata, Kumamoto, Japan).
- (6) Nilson, S.A. Jr., Costa, M., Akagi, H.:
Total and methylmercury levels of a coastal human population and of fish from the Brazilian Northeast
Environmental Science and Pollution Research, **8**, 280-285, 2001.

(7) 赤木洋勝

水銀による生態影響－アマゾン流域における水銀汚染を中心に－

燃焼プロセスにおける微量成分ワークショップ－Trace Element 2001, pp. 15-23(2001)

2. 学術研究会による発表

- (1) Sakamoto, M., Hachiya, N., Kinjo, Y., Tamashiro, H., Nakano, A., Akagi, H., Futatsuka, M.:
Changes with time in mortality patterns among Minamata disease patients, 1953-1992
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (2) Sakamoto, M., Watanabe, M., Nakano, A., Akagi, H.:
Changes in estimated levels of human exposure to methylmercury from 1960 to 1962 using changes in hair mercury concentrations.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (3) Sakamoto, M., Kakita, A., Wakabayashi, K., Nakano, A., Takahashi, H., Akagi, H.:
Effects of low and long-term exposure of methylmercury throughout the periods of gestation and lactation.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (4) Yamaguchi, M., Yasutake, A., Matsumoto, M., Hachiya, N., Aramaki, R., Tamura, K.
Current hair mercury level in Minamata citizen.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (5) Ando, T., Akiba, S., Akagi, H.:
The distribution of mercury levels in Kagoshima Bay, Japan in relation to the entrance of the Bay.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).

- (6) Ando, T., Akiba, S., Akagi, H.:
The vertical and horizontal distribution of mercury in relation to the 200m deep gas seeping sites of Sakurajima volcano in Kagoshima Bay.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (7) Ando, T., Tomiyasu, T., Yamamoto, M., Akiba, S., Akagi, H.:
Mercury concentration in the Mussel adductor in Kagoshima bay, Japan.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (8) Kaneoka, T., Akagi, H., Ito, H., Kaneko, K., Hara, K.:
Epidemiological studies on mercury exposure to the human fetus in Japan.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (9) Kubota, M., Sakamoto, M., Matsumoto, S., Nakano, A., Kaneoka, T., Akagi, H.:
Exposure assessment of methylmercury in human offspring throughout periods of gestation and lactation.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (10) Oliveira, R.B., Sakamoto, M., Nakano, A., Akagi, H.:
Dose-response and sex difference in effects of methylmercury treatment during neonatal brain growth spurt in rats.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (11) Ramirez, G.B., Vince Cruz, M.C., Berroya, A., Casintahan, D., Akagi, H., Pagulayan, O., Lee, L., Rivera, A.:
Tracking study of the effects of mercury exposure on physical and neurodevelopment.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).
- (12) Takahashi, Y., Tsuruta, S., Hasegawa, J., Akagi, H., Eto, K., Tokunaga, H.:
Histological observation of mercury in rat tissues with amalgam fillings.
6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant.
(Oct, 2001, Minamata, Kumamoto, Japan).

- (13) 坂本 峰至、窪田 真知、松本 信一郎、赤木 洋勝、中野 篤浩、高橋 均
「ヒトにおける胎児期と乳児期別メチル水銀リスク評価」

平成 13 年度 水俣病検診・診査促進に関する調査研究 研究班総会

平成 14 年 3 月（東京）

- (14) 柿田 明美、稲永 親憲、豊島 靖子、坂本 峰至、高橋 均
「メチル水銀が神経系に与える特異的な影響に関する研究」

平成 13 年度 水俣病検診・診査促進に関する調査研究 研究班総会

平成 14 年 3 月（東京）

5. 所内セミナー記録

1. 研究のことども

国立水俣病総合研究センター
顧問 滝澤 行雄
(平成 13 年 5 月 22 日)

国家公務員法第 81 条の 3 の規定による期限の到来により平成 13 年 3 月 31 日をもって、6 年間勤務した環境省国立水俣病総合研究センターを退職した。私は、昭和 32 年（1957 年）に新潟大学医学部を卒業、1 年間のインターンを終えて大学院医学研究科に入学し、小坂隆雄教授のもとで公衆衛生学を専攻した。直ちに同教室に入局、文部教官として新潟大学に 11 年間、引き続き新設の秋田大学に 22 年間と、これに総理府および環境技官の 6 年間を加えた 39 年間で、健康にも恵まれ、大過なく職務を全うできたことは、一重に皆様方の温かいご指導とご支援の賜と深く感謝している次第である。このさい、去来するいろいろな思いを私の足跡として紹介したい。

秋田大学から国立水俣病研究センターに転勤して、奇しくも研究課題の共通のキーワードが放射能と水銀で痛められた哀しいマグロであった。このマグロが身勝手な人間によってビキニの放射能マグロ事件、引き続きニューヨーク州立大マグダフィ教授の缶詰マグロの水銀記事に端を発したマグロの水銀汚染事件と、度重なる痛手を受けているのである。

これまでに、わが国では水俣病を二度も経験している。終戦 50 年目を迎えた 1995 年、私が赴任した年であって、新聞をはじめとするマスメディアは毎日のように、「核実験」と「水俣病」の問題を報じた。これほど人類史的な重要性を認識し、巨大科学や環境汚染の背景をなす社会情勢の解明の上に立って、人間環境の生存に挑戦を迫られている時はない。

科学が創造をひらき、人々に平和と福祉をもたらすことを否定する人はいない。ここで、私は人間の作りだした科学技術が巨大科学にしろ、一般科学にしろ、人間の生存の破滅に使われることの反省として、二つのエピソード～放射能・水銀禍～をマグロに事よせて、大学院時代を加えた 45 年にわたる研究生生活のことどもについて述懐したい。

2. 死体食と捕食:肉食性貝類における季節的な摂餌様式の転換

九州大学理学部附属天草臨海実験所
日本学術振興会特別研究員 大田 直友
(平成 13 年 6 月 20 日)

死肉食(scavenge)と捕食。死肉食は餌を探索・捕獲・処理する手間がなく、エネルギー的により好ましい摂餌様式と考えられる。しかし、死体の出現は予測が困難なため、多くの死体食動物は捕食能力などをあ

わせもつ。転石潮間帯にすむ肉食性の同属貝類、イソニナ・シマベッコウバイもその仲間である。では、この2つの摂餌様式をどのように使い分けているのだろうか。もっとも単純な選択は、死体があればそれを利用し、死体供給がなければ自ら捕食をするだろう。

これを検証するため、両種の餌利用を野外で年間(計175日)を通して観察し、41種2617個体の餌動物、28,198個体の肉食性貝類を得た。7種の主要な餌動物において、季節による明確な餌利用種の転換が観察された。ヒメアサリは年間を通して利用されが、とくに春と秋に多かった。イシダタミとヒライソガニは、おもに暑い季節に利用された。一方、スガイとヒメコザラは寒い季節に利用が多かった。アオガイ・ケハダヒザラについては、特に明確な傾向はなく消費も少なかった。なお、この7種で餌動物全体の94.7%を占め、ベントス群集内で餌が供給されていることが示唆された。

この結果を解釈するために、3つの室内実験を行った。すなわち、a. イソ・シマの餌選択/嗜好実験、b. 移動速度の測定、c. 高温耐性実験である。a. は餌利用と嗜好性の関係を、b. は餌の逃避能力を、c. は夏の干潮/高温時の死亡との関連を意図した。また、調査地の群集組成も同時期に観察し、餌生物の動態も明らかにした。季節的な摂餌様式の転換のメカニズムを、イソニナ・シマベッコウバイと餌動物それぞれの生理的・行動的な制約や餌密度・嗜好性との関連から考察した。

3. 微生物の多様性と環境修復への応用

京都大学大学院工学研究科

教授 今中 忠行

(平成13年7月2日)

地球が1つの惑星として誕生したのは約45億年前、その地球上に原始生命体が出現したのは約35億年前であると言われている。最初の動植物が出現したのは約5-6億年前であることを考えると、地球歴史上の大半が微生物により占められており、まさに微生物は地球の先住民であるといえる。

今まで生活になじみのある微生物、或いは各分野の研究対象となってきた微生物のほとんどは20-40℃、中性付近、豊富な栄養条件の下で活発に増殖するものであった。しかし最近になって、これらは地球上に存在する微生物のごく一部に過ぎないことがわかってきた。蛍光顕微鏡観察やPCR (polymerase chain reaction) 法を利用することにより、研究室で培養可能な微生物は土壌中の全微生物の1-10%程度であることが判明した。また、火山付近などの高温土壌・熱水環境、深海などの高圧環境、北極や南極域などの低温環境にもその環境に見事に適応した極限環境微生物(extremophile)が多数生息していることも近年明らかになった。現在 extremophile としては thermophile (高温)、psychrophile (低温)、acidophile (酸性)、alcalophile (アルカリ性)、halophile (高塩濃度)、barophile (高圧) の6種類が知られている。これらの極限環境微生物は従来の微生物に見られない特性を有し、基礎・応用両面で興味深い研究対象である。

一方、地球容積の主体である深度地下(地下50以深)における生態系の理解は、それまで地下極限環境は無菌状態であると信じられていたため、ほとんどなされていない。しかし最近我々は、-10℃でも生育する好冷菌、100℃でも生育する超好熱菌や、石油を分解したりCO₂から石油を合成したりする細菌など地下から地表に出現したとも予想される嫌気性菌を分離しており、深度地下には未知の生物が多種類存在し

ている可能性が示唆され始めた。実際マレーシア沖の海底油田（海拔下 5000m）からは活発に CO₂ を固定する嫌気性細菌を分離している。そこで我々は、地球最後のフロンティアともいふべき深度地下の極限環境における微生物相を解明し、物質循環系を明らかにするという視野のもと、広く微生物資源の探索を行うとともに、特殊能力を有する微生物の解析と利用に関する研究を行っている。具体的には、(1)深度地下サンプル採取方法の開発、(2)地下微生物生態系の解明、(3)深度地下微生物の環境適応戦略の解明と育種、そして研究成果を基盤とした、(4)新規バイオマテリアル（遺伝子資源、酵素、代謝産物など）の探索と工業、環境改善（污水处理、石油汚染除去など）への利用を具体的に試みている。

4. フェロー諸島における水銀曝露による胎児性神経影響の評価

秋田大学医学部衛生学講座

教授 村田 勝敬

（平成 14 年 1 月 22 日）

〔はじめに〕

水俣病で代表される有機水銀中毒は日本のほか、イラク、中国などの国々で有機水銀の工場排出あるいは食品汚染を介して集団発生した。一方、地殻ガスや産業活動によって大気中へ放出される無機水銀は、微生物や魚介類の体内でメチル化され、食物連鎖により大型魚や魚を補食する哺乳動物へと濃縮される。この結果、これらをヒトが多食することによって発現する健康影響の可能性が懸念されている。後者のように魚由来の高濃度の水銀がヒトにおいて検出された事例は、ニュージーランド（鮫）、セイシェル（鯉）、フェロー諸島（鯨）、グリーンランド（海豹）、マデエイラ諸島（深海魚）、パプアニューギニア（鯨）で報告されている。これらのうち、1993～94 年および 2000～01 年にフェロー諸島で行われた水銀影響に関する国際共同研究の概要について報告する。

〔水銀の曝露状況調査〕

1980 年代半ばにデンマーク領フェロー諸島（デンマークとアイスランドを結ぶ線上の北緯 62 度に位置する 18 群島、現人口 43,000 人）で水銀汚染の予備調査が行われた。小漁村に住む妊娠可能な女性（20～50 歳）53 名の血中水銀濃度の中央値は 12.1（範囲 2.6～50.1）μg/l であり、デンマーク女性の中央値 1.6μg/l の約 8 倍であった¹⁾。フェロー諸島が対象集団として選ばれた理由は、この水銀曝露の範囲（range）が広いことに加えて、言語・文化が北欧圏に属し、社会が均一かつ緊密であったことによる。その上、曝露が自然の状態（natural experiment）に近いという条件を兼ね備えていた。このため、本格的な水銀調査が 1986 年 3 月 1 日より翌年 12 月末までデンマーク・オデンセ大学環境医学教室の Grandjean 教授とフェロー諸島の Weihe 病院部長を中心として行われた²⁾。この期間に出産した母親のうち、毛髪および胎盤が採取でき、かつ妊娠経過、妊娠中の鯨および魚の摂取量、飲酒・喫煙等の質問紙調査ができた 1,022 名（全体の 75.1%）が母子コホートとして登録された。採取時の臍帯血中水銀濃度の中央値は 24.2（0.5～351）μg/l、母親の毛髪水銀濃度の中央値は 4.5（0.2～39.1）μg/g であった（IPCS の基準値 10μg/g 以上が 130 名）。これらの水銀濃度は、月当たりの鯨肉の摂食回数あるいは週当たりの魚（鯉）摂取回数が多くなるにつれ、有意に高

くなることが認められた。「臍の緒」を用いた分析結果より、フェロー島民の水銀曝露レベルは水俣病患者の1/6～1/5程度と推定されたが³⁾、この母親集団に水俣病あるいはそれに類似する症状を示す人はいなかった。

〔7歳児の神経影響調査〕

フェロー諸島における水銀曝露による胎児性神経影響調査は、第1回目が1993～94年の4～6月（計6ヶ月間）に行われ、7歳になったコホート923名（90.3%）が参加した。また、第2回目は2000～01年の4～6月（計6ヶ月間）に実施され、14歳児883名（86.4%）が参加した。検査項目として一般健康診査、小児神経学的検査、神経行動学的検査（知能、運動機能、注意力、視覚空間機能、言語、言語記憶等）、視聴覚検査、神経生理学的検査（聴性脳幹誘発電位、視覚誘発電位、自律神経機能、その他7歳児調査では平衡機能、14歳児調査ではP300）、血液・毛髪採取があり、ひとりの子供に4時間を費やした（午前午後各々4名測定）。神経行動学的検査項目の選択にあたっては、①毒性曝露に鋭敏であり、②各機能を良く反映し、③交絡因子の影響を受けにくい特異性を持ち、④検査年齢や文化に合致し、⑤可能な限りコンピュータ支援の検査である点が考慮された⁴⁾。また、検査者の選択には一層の注意が払われた。

7歳児調査では、運動機能（Finger tapping）、注意（反応時間）、視覚空間（Bender 検査）、言語（Boston naming test）、言語記憶（CVLT short delay）が出生時水銀曝露量と有意な関連を示した⁵⁾。また、聴性脳幹誘発電位潜時が出生時水銀曝露量と有意な正の関連を示した⁶⁾。後者は1995年にポルトガル・マデエイラ諸島で深海魚“エスパーダ”を食べている漁村の子供149名（母親の毛髪水銀濃度の幾何平均9.6μg/g、1.1～54.4μg/g）で調べた水銀と聴性脳幹誘発電位潜時との関連と同様であった⁷⁾。このように集団レベルで検討すると、胎児期の低濃度水銀曝露は神経発達に影響している可能性が高い。

〔水銀およびPCB曝露の影響〕

7歳児調査における交絡因子の影響は統計解析時に考慮された。基本的な交絡因子として、性・年齢、母親の知能、検査者が挙げられた。経験的な交絡因子として、産科・内科的疾患の有無、両親の教育レベル、父親の職業について考慮した。また、その他の交絡因子として、居住地やPCB曝露が考えられた。PCBの分析には臍帯組織中濃度が用いられ、7歳児調査に参加した子供のうち438名で測定された⁸⁾。この中の50名については更に臍帯血PCB濃度も測定され、臍帯血中PCB濃度は臍帯組織湿重量当たりのPCB濃度と非常に高い相関（相関係数 $r=0.90$ ）を示した。

反応時間、Boston naming test、CVLT long delayの3つの検査データがPCBと有意な関連を示した（片側5%の有意水準）。しかしながら、水銀濃度とPCB濃度の両者を説明変数とし、曝露影響指標を目的変数とする重回帰分析を行うと、水銀は反応時間およびBoston naming test成績と有意に関連（ $P<0.05$ ）したが、PCBはいずれの曝露影響指標に対しても有意な関連を示さなかった（ $P>0.05$ ）⁸⁾。

〔14歳児の神経影響調査〕

フェロー諸島における14歳児の神経影響調査は2001年6月末に終了し、現在データ解析の途上にある。一部解析が行われた自律神経機能検査において、14歳児の副交感神経活動が出生時水銀濃度の増加に伴って有意に低下するようである。なお、2000年4～6月のフェロー諸島における調査で、小児科医によって乳房、陰毛、陰茎の性成熟度（タナーの分類）や超音波診断装置での精巣サイズが新たに調べられ、さら

に早朝尿中の精子数も検算された。しかしながら、これらの検査は2000年11月のデンマーク・オデンセ市および2001年4～6月のフェロー諸島で行われた調査では一噂の広まりにより参加者数が減少することを危惧して一行われなかった。

14歳児調査では、測定方法に関する厳しい査察があった。フェロー諸島で用いられていた神経行動学的検査および神経生理学的検査の測定条件・測定項目について、米国EPAから査察官が来て調査開始の2日間チェックし、その報告書が提出され、それに応答するというものであった。もし指摘された測定上の疑問点を我々が認めてしまうと、1993～1994年のデータまで否定されかねない。このため、査察官に対し誠意を示し（一方、質問に非あらばそれを指摘し）ながら慎重に我々の対応策を回答した。例えば、視覚誘発電位を測定する時、被検者はTVスクリーンの前に座り、その画面中央を固視しなければならないが、査察官に「半座位では被検者が疲れるので、リクライニング椅子を使用した方がよい」と忠告された。電氣的遮蔽が施されたリクライニング椅子は、国外に特注しても届くまでに2ヶ月以上要する。我々は、この購入は時間的に無理である旨を伝えるとともに、14歳の子供であれば5分間固視することは可能であると回答し、了解を得た。また、測定波形の精度管理に対しては、全ての起こりうる状況を考慮しながら波形（および潜時）をどのように決定するかについて詳細に回答し了解を得たが、無作為抽出による10%データの外部評価を余儀なくされた（この外部評価は1993年に既に実施しており、改めておこなう必要はないと回答したのだが....）。

〔フェロー研究の教訓〕

フェロー諸島における水銀曝露による胎児性神経影響調査に参加する機会を得て、疫学研究の難しさを教わると同時に、大規模研究に対する幾つかの教訓を得た。大規模な環境疫学的研究を始めようとする場合、最初に検討すべき事は研究目的に照らしてどのような対象集団を用いるかであろう。特に、発達段階の子供が研究対象となるときは可能な限り均一な集団を選ぶべきである。対象集団内で言語や文化が異なると、検査項目によっては測定バイアスが生じる。また、当該集団から無作為抽出した小集団で予備調査（pilot study）を実施し、曝露指標の範囲をチェックすることも必要となろう²⁾。臨界濃度以下の曝露集団あるいは曝露指標の範囲が極端に狭い集団をどんなに多数集めて調査しても、時間とお金の浪費に終わる可能性が高い。この場合、対象集団の変更を余儀なくされることになるかもしれない。

次に、疫学研究を実施するためには大型予算を獲得することが重要となる。フェロー研究では被検者に相応の謝礼を支払っており、この姿勢は検査を途中で拒否した子供に対しても変わらなかった。筆者は、この研究において予算獲得に直接関与していないが、予算配分する人達（あるいは当該領域を専門とする代弁者）が研究デザインや測定方法にまで口出しする現実に、驚異とともに補助金支出に対する厳格さを感じた。

第三に、曝露指標に何を用いるかに加えて、一定レベルの研究成果を得るために使用される影響評価法の選択には細心の注意を払う必要がある。すなわち、妥当性および信頼性の高い検査（分析）法を使用しなければならない⁴⁾。また、得られるデータが3者択一（良い、どちらとも言えない、悪い）のような天井値や底値のある検査法より、連続量データとして得られる検査法の方が検出感度が良くなる傾向がある。さらに、同一検査においても熟練検査者間の交代で測定バイアスが生じうるので、研究途上で検査者の交代がないような研究日程を組む必要がある。特に神経行動学的検査を用いる場合、検査者の微妙な話法の違いが検査に向かう被検者の姿勢・態度を大きく左右するため、検査成績が異なってくることが予想され

る⁵⁾。このような場合、量－影響関係は過小評価される。

最後に、最終検査成績が研究データ管理者の手に全て集まるまで、個々の検査者が得た検査成績を研究グループ内で公表しないことである⁵⁾。特に、曝露指標に関する情報をグループ内で早期に共有すると検査成績に情報バイアスが混入する恐れがある。

〔おわりに〕

毛髪水銀濃度が 10 μ g/g 以上の母親が 1986-87 年に 13% (幾何平均 4.7 μ g/g)、1994 年に 10% (幾何平均 4.0 μ g/g) もいたことを受けて、フェロー諸島公衆衛生部は数度にわたって鯨肉に対する摂食制限指導を行ってきた⁹⁾。例えば、1998 年 8 月には、鯨肉 (whale meat) は水銀含有量が高くかつフェロー人の主たる水銀曝露源であることから、①鯨肉を月 2 回を超えて摂食しない、② 3 ヶ月以内に妊娠を予定している女性や現在妊娠中あるいは授乳中の女性は鯨肉を食べない、③鯨の脂身 (whale blubber) には高濃度の PCB が含まれるので、成人でも脂身の摂食は月に最大 1 ～ 2 回に抑える、④潜在的な PCB の有害影響に胎児が晒されないため、女性は出産を終えるまで鯨の脂身を食べないように勧告した。このような指導の結果、1998-99 年には毛髪水銀濃度が 10 μ g/g 以上の母親は 3 % (幾何平均 2.1 μ g/g) にまで低下した。

予防医学の究極の目的の 1 つが「治療を必要としない人々において、健康を脅かすリスク要因を取り除く」ことであるとするならば、有機水銀や PCB の曝露を抑制することによってフェロー住民の次世代リスクを減らすことは真に実践的予防医学そのものである。私はフェロー諸島で体得したこれら一連の経験を今後の予防医学活動に生かすよう努力したい。

〔参考文献〕

1. Weihe P, Grandjean P: Sources and magnitude of mercury exposure in the Faroe Islands: overall design of the cohort study. In: *Proceedings of the International Symposium on Assessment of Environmental Pollution and Health Effects from Methylmercury*, National Institute for Minamata Disease. Kumamoto, pp.112-126, 1994
2. Grandjean P, Weihe P, Jørgensen PJ, Clarkson T, Cernichiari E, Viderø T: Impact of maternal seafood diet on fetal exposure to mercury, selenium, and lead. *Arch Environ Health* **47**: 185-195, 1992
3. Akagi H, Grandjean P, Takizawa Y, Weihe P: Methylmercury dose estimation from umbilical cord concentrations in patients with Minamata disease. *Environ Res* **77**: 98-103, 1998
4. Dahl R, White RF, Weihe P, Sørensen N, Letz R, Hudnell K, Otto DA, Grandjean P: Feasibility and validity of three computer-assisted neurobehavioral tests in 7-year old children. *Neurotoxicol Teratol* **18**: 413-419, 1996
5. Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F, Araki S, Yokoyama K, Murata K, Sørensen N, Dahl R, Jørgensen PJ: Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* **19**: 417-428, 1997
6. Murata K, Weihe P, Araki S, Budtz-Jørgensen E, Grandjean P: Evoked potentials in Faroese children prenatally exposed to methylmercury. *Neurotoxicol Teratol* **21**: 471-472, 1999
7. Murata K, Weihe P, Renzoni A, Debes F, Vasconcelos R, Zino R, Araki S, Jørgensen PJ, White RF, Grandjean P: Delayed evoked potentials in children exposed to methylmercury from seafood. *Neurotoxicol Teratol* **21**: 343-348, 1999

8. Grandjean P, Weihe P, Burse VW, Needham LL, Storr-Hansen E, Heinzow B, Debes F, Murata K, Simonsen H, Ellefsen P, Budtz-Jørgensen E, Keiding N, White RF: Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicol Teratol* **23**: 305-317, 2001
9. Weihe P, Grandjean P: Intervention study on methylmercury in the Faroe Islands. In: *Abstract of 6th International Conference on Mercury as a Global Pollutant*, Organizing Committee & Steering Committee of 6th ICMGP. Minamata, p.234, 2001

5. 細胞死の機構 – Necrosis, Apoptosis, Mitotic cell death

九州大学大学院医学研究院第一外科

助手 水元一博

(平成14年2月14日)

現在までに知られている3つの細胞死の機構についての概説。

1. Necrosis

ネクロシスには、大きく分類すると Ischemic cell death と Oxidative cell death がある。Ischemic cell death では、細胞内の酸素の供給が低下し、ミトコンドリアの膜電位が低下してミトコンドリア内のカルシウムが細胞質に放出される。その結果、細胞膜の透過性が亢進し細胞が死に至る。Oxidative cell death は、活性酸素によって細胞膜の過酸化 (Lipid peroxidation) が起こり、細胞膜の透過性が亢進することで細胞死に至る。Oxidative cell death は、アルキル化剤投与によって Glutathion が低下することでも、2次的に発生する。これは細胞内の呼吸によって発生する活性酸素の解毒が Glutathion の低下によって出来なくなるために発生してくるものである。さらに、高濃度のアルキル化剤では poly (ADP-rybosylation) によって NAD と ATP が低下してくることで、細胞内エネルギーが枯渇してネクロシスが発生する機構がある。同じアルキル化剤が oxidative stress を誘導するか、ATP の枯渇を引き起こすのかは、細胞の種類は細胞内のエネルギー依存形式 (電子伝達系または解糖系) に関連していると想定される。

2. Apoptosis

アポトーシスの機構は、既に多くの研究者によって報告され、特に death signal が最終的に caspase を誘導することによって発生する能動的細胞死であることは良く知られている。ここでは、テロメラーゼとアポトーシスの関連について説明した。P53 遺伝子を癌細胞に導入するとアポトーシスが誘導される。この時、アポトーシスが誘導される前にテロメラーゼの活性が完全に抑制される。一方、Etoposide を膀胱癌の細胞株に加えると同様にアポトーシスが誘導されるが、この時テロメラーゼは hTERT の発現増強をともなって活性が増強される。これらの知見は、テロメラーゼがアポトーシスに対して抑制的に関与していることを示唆している。

3. Mitotic cell death

Mitotic cell death (分裂期細胞死) は、放射線の照射後に発生することが以前から指摘されていた。しかし、その詳細な機構は未だに解明されていない。中心体は、細胞核の近傍にある細胞内小器官であり、一對の中心小体と中心体マトリックスから形成される。間期では、微小管形成の中心として機能しているが、分裂期には、直前に2つに合成されて紡錘体極の中心となって染色体の性状な分離を誘導する。最近、癌細胞では中心体の過剰複製が癌の染色体不安定性に重要な役割を示すことが報告された。我々は、最近癌細胞に放射線を照射すると中心体が過剰に複製され、その結果多極性の紡錘体極が形成されて異常な染色体分離がおこり、則ちこれが分裂期細胞死の直接的要因になっている可能性があることを示した。中心体の複製を P21 遺伝子導入によって抑制すると分裂期細胞死も抑制できる。しかしながら、中心体過剰複製に伴う分裂期細胞死には Tunnel 染色陽性を示す細胞も一部には見られる。従って、分裂期細胞死の終末段階においてアポトーシスシグナルが一部には関与している可能性もあると考えられる。

以上のように、細胞死には少なくとも3つの細胞死の型がある。しかし、1つの death signal による細胞死は、必ずしも一定の型を示すものではなく、細胞の種類、death signal の種類、death signal の強さなどの様々条件によって、複雑に複合して発生すると考えるべきであろう。

6. 客員研究員指導記録

1. Mercury cycling in ecosystems

Arne Jernelöv (Director of International Institute for Applied System Analysis)

1960 年代後半、世界に先駆けて自然界における微生物による水銀のメチル化反応を明らかにするなど、水銀汚染研究者の先駆者として世界的に知られるスウェーデンの Prof. Jernelöv が、平成 13 年 5 月中旬に来日した機会を捉え、当研究センターにおいて、5 月 18～22 日の 5 日間共同研究を実施し、標記研究課題を中心とした近年の世界における水銀汚染の現状について、所内セミナーを通して情報交換を行うと共に、今後の水銀研究並びに同年 10 月 15～19 日に開催を控えた水俣国際会議についての助言を頂いた。

2. 土壌による 2 価水銀の吸着特性

渡辺紀元（北海道工業大学環境デザイン学科教授）

塩化水銀（Ⅱ）と硝酸水銀（Ⅱ）の比較－

2 価水銀(Hg^{2+})の土壌への吸着特性を明らかにするため、泥炭を含む 15 種の土壌を供試して、分子として溶液中に存在する塩化第二水銀 (HgCl_2)、及びイオンとして溶液中に存在する硝酸第二水銀

($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$) の Hg 濃度を 10～200 ppmHg に変化させ、30℃インキュベーション後の Hg 吸着量について、土壌特性値、陰イオン吸着量、陽イオン溶出量との関係から検討した。

Hg 吸着量と土壌特性値との間の相関をみると、泥炭を除いた場合、Hg 吸着量は強熱減量、全炭素、全窒素、CEC との間にいずれも有意な相関関係がみられた。この関係は、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ により HgCl_2 で明らかであった。したがって、土壌の腐植物質及び陽イオン交換能が高ければ、Hg 吸着量が高いという関係が認められた。

Hg 吸着量と平衡 Hg 濃度の関係を、ラングミュア吸着等温式に適用すると、Hg 最大吸着量を示す定数値は、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ で HgCl_2 の約 2～2.5 倍であった。

陰イオン吸着量との関係をみると、 HgCl_2 の場合、Cl 吸着量は初濃度の増加に伴いわずかに増加したが、Hg 吸着量に比べると著しく低かった。また、イオン電極法による Cl 濃度と Hg 吸着量は正の相関を示した。一方、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ の場合、添加 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度より平衡 $\text{NO}_3\text{-N}$ 濃度が上回り、負の吸着がみられた。

以上より、 HgCl_2 からの Hg 吸着は、Cl 吸着量が Hg 吸着量に比べて低いこと、及び Cl-濃度と Hg 吸着量に密接な関係があることから、 HgCl_2 分子の分子吸着よりも、 HgCl_2 分子のイオン化を伴った吸着が考えられる。一方、 $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ からの Hg 吸着は CEC との相関関係から、 Hg^{2+} のイオン交換吸着と、土壌によ

ってはイオン交換によらない吸着があると考えられる。これらの点は、Hg 吸着総量と陽イオン(Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Na^{+} 、 K^{+})溶出当量との間で、 HgCl_2 で $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ よりも密接な関係があったことから示唆された。

3. 水俣病認定患者の死因解析について

金城芳秀（県立沖縄看護大学助教授）

死亡小票集計は男女、5 歳年齢階級ごとに全死亡数、各疾患ごとの死亡数を調べ、水俣の地域別死亡及び水俣病認定患者の標準化死亡比（SMR）を求める。これは、認定患者の追跡調査であるので水俣病患者リストとのマッチングが必要となるので氏名も必須となる。現在解析を進めている法務局の死亡診断書を用いての解析では、水俣市住民（認定患者を除く）を対照として水俣病患者の SMR を算出し水俣病認定患者が肝炎や脳血管疾患で亡くなりやすいという結果を出しており、水俣病患者の健康管理上肝炎や脳血管疾患への注意が必要であるという非常に貴重なデータの提供が可能となっている。ここで、SMR 算出には国勢調査で得られた人口構成を用いて算出が行われるが、従来の法務局保管の本籍による死亡診断書での死亡確認では水俣市に住んでいるにもかかわらず本籍が水俣市にない場合のデータが入手されず、研究上問題点が多い。同様な理由で、現在の水俣市における出生の調査も法務局保管の出生票を用いての調査は現在の水俣市の現状から乖離している可能性が年々高くなる。そこで、人口動態死亡小票によって、資料の収集が研究上不可欠である。

4. 水俣湾の水銀分解細菌の分子生態学的研究

矢木修身（東京大学大学院工学系研究科教授）

自然界に生息している細菌は、環境中の水銀と種々の相互反応を行っていることが知られている。ある細菌は、水銀化合物を揮発性の水銀蒸気に変換し、その生息している環境から除去している。水俣湾は、長期間高濃度の水銀に汚染され世界に類いのない水銀汚染環境を形成してきた。このような、水俣湾において細菌は、どのような遺伝的に変化し、水俣湾に多数出現してきているのか。また、これらの細菌は、水銀汚染に対して、どのような役割を演じているのか。

細菌の水銀揮発化遺伝子は、主に *mer R*, *mer T*, *mer P*, *mer A*, *mer B* で構成される。*mer R* は、regulation 遺伝子、*mer T* と *mer P* は、水銀を細胞内に取り込む遺伝子、*mer A* は、酵素レダクターゼの遺伝子、*mer B* は、酵素リアーゼの遺伝子である。2 価の水銀イオンは、細菌の作る酵素レダクターゼにより揮発性の水銀蒸気に変換される。メチル水銀や酢酸フェニール水銀などの有機水銀化合物の場合は、最初に、*mer B* の産物であるリアーゼが水銀と炭素の結合を切り、結果として生じた 2 価の水銀イオンを先程同様にレダクターゼにより揮発性の水銀蒸気に変換される。

水俣湾海水から分離した *Pseudoalteromonas haloplanktis* M-1 株のレダクターゼ蛋白 Mer A は既知の Mer A と比較して、アミノ酸レベルで、最も高いもので 76.9 % の相同性を示した。また、内部に存在する 2 つのシステイン残基を含む活性部位や、C 末端側に存在する水銀結合部位が保存されていた。しかしながら、他のレダクターゼと比べ N 末端領域の約 80 のアミノ酸残基が大きく欠損しているのが認められた。これらの点でこのレダクターゼは、人などのグルタチオンレダクターゼに非常によく類似した構造をしていた。

5. メチル水銀の胎・乳児期別リスク評価

窪田真知（宗像水光会総合病院医師）

胎児並びに新生児は、メチル水銀に対するハイリスク・グループであり、胎児脳に母親より高い濃度の水銀蓄積し、感受性そのものも高いことが知られている。しかしながら、乳児期の児のメチル水銀曝露に関する研究は充分には行われておらず、魚介類の摂取量の高い集団では妊婦と授乳中母親へのメチル水銀曝露の影響は解決すべき重要な問題として残っている。メチル水銀は胎児期には胎盤を介して児へ移行し、乳児期には母乳を介して児へ移行する。母乳中のメチル水銀濃度は低いにもかかわらず、母乳保育は乳児のメチル水銀曝露によるリスクを上昇させるであろうとする報告が散見される。しかしながら、坂本のラットを用いた研究で乳児期にはメチル水銀のリスクが低下することが示唆された。母乳保育は多くの利点を持っていることは良く知られており、母乳を介するメチル水銀の児における負荷量の適切な評価が現在より詳細に検討される必要がある。

本研究は出産後に母乳からのメチル水銀曝露を受ける中での、出生後の児のメチル水銀負荷量変化を検討するためにデザインされた。メチル水銀の体内負荷量の指標としては赤血球中水銀濃度が最も優れたバイオマーカーであることが知られている。そこで、我々は胎児期から乳児期に渡るメチル水銀負荷量の変化を赤血球中水銀濃度で検討した。この場合、被験者が母乳のみによる育児期間として 3 ヶ月を決定した。

6. 神経系の分化、発達に関する新規毒性影響評価法の開発研究

国本 学（北里大学薬学部公衆衛生学教室教授）

化学物質の毒性に対する感受性は、細胞が盛んに増殖、分化、発達している胎児期において高いことが知られている。メチル水銀の場合も例外ではなく、いわゆる胎児性水俣病として知られているように、胎児期の中樞神経系は高感受性である。これらの高感受性の細胞に及ぼすメチル水銀の毒性影響を評価することは重要な課題の一つであるが、鋭敏な指標がそれほど多くないため新規の毒性指標の開発が必要である。グリア細胞の一つであるアストロサイトは、神経栄養因子の産生、神経伝達物質の代謝、イオン濃度の調節、血液脳関門の形成等、脳内の環境維持や神経細胞の生存・活動に対して重要な役割を果たしている。アストロサイトは比較的容易に均一に培養することが可能であり、この培養アストロサイトは生体内における増殖相のアストロサイトに相当すると考えられている。従って、培養アストロサイトは成人脳における静止状態のアストロサイトとは異なるが、発達段階のアストロサイトに及ぼす影響を検討する際には有用であると考えられる。本研究では、増殖相のアストロサイトが生体内で分化、発達して静止状態の突起を伸ばした形態に変化するモデルを *in vitro* で構築し、メチル水銀の毒性影響を検討する予定である。神経系細胞の分化・発達に及ぼす微量メチル水銀の毒性影響評価に際して、本研究で開発されたモデル系が鋭敏で有用な毒性指標を提供することが期待される。

7. 所内研究発表会記録

平成 13 年 5 月 29 日

- | | |
|---|-------|
| 「水俣病関係訴訟」 | 野村 瞭 |
| 「グリア細胞の分化、発達を利用した環境リスク評価系開発のための基礎研究」 | 足立 達美 |
| 「長崎県対馬カドミウム土壌汚染地域住民の頭髪、尿及び血液カドミウム濃度—土壌復元前後 18 年での比較—」 | 劉 暁潔 |

平成 13 年 6 月 26 日

- | | |
|---|-------|
| 「熊本水俣病の末梢神経病変について—コモン・マーモセットのメチル水銀中毒実験からの考察—」 | 衛藤 光明 |
| 「水俣病認定患者の死亡像の変化（1953～1992）」 | 坂本 峰至 |
| 「病名としての「水俣病」に関わる諸問題」 | 蜂谷 紀之 |

平成 13 年 7 月 24 日

- | | |
|------------------------------------|-------|
| 「放射線によるメチル水銀の水中における無機化」 | 荒巻 亮二 |
| 「魚類体内中の水銀分布に影響を及ぼす因子」 | 山口 雅子 |
| 「バングラディシュ・チッタゴンと中国・貴州における地中水銀について」 | 中野 篤浩 |

平成 13 年 8 月 28 日

- | | |
|--------------------|-------|
| 「外来患者を通して老人看護を考える」 | 宮本 清香 |
| 「症例 3，胎児性水俣病」 | 松本美由紀 |
| 「OS について」 | 渡邊 正夫 |

平成 13 年 9 月 25 日

- | | |
|---|-------|
| 「水銀汚染土壌底質の浄化技術について」 | 松山 明人 |
| 「塩化メチル水銀の亜慢性・慢性曝露による生殖器官・中枢神経系及び胎児への影響に関する基礎研究」 | 永野 匡昭 |
| 「メタロチオネインの話」 | 安武 章 |

平成 13 年 11 月 27 日

「研究進展の現状について」―基礎・発展・応用―
「細菌を利用した魚煮汁からのメチル水銀の除去」
「南米アマゾン河水銀汚染地域漁村住民における健康調査」

桑名 貴
中村 邦彦
宮本謙一郎

平成 13 年 12 月 21 日

「生体および環境試料中水銀の分析化学的研究」
「水俣病患者の神経症状」
「行政研修（科学技術・研究振興コース）に参加して」

赤木 洋勝
若宮 純司
山元 恵

平成 14 年 1 月 29 日

「生物化学テロリズムに対する備え」
「不飽和脂肪酸」
「メチル水銀による酸化ストレス傷害」
「水俣湾における水銀の動態：サンゴ骨格に刻まれた汚染の歴史の解説」

滝澤 行雄
村尾 光治
臼杵扶佐子
保田 叔昭

8. 客員研究記録

- (1) IIASA Arne Jernelöv
 (国際・総合研究部 赤木 洋勝)
 「環境中水銀の動態について」

- (2) 北海道工業大学環境デザイン学科教授 渡辺 紀元
 (基礎研究部 中野 篤浩)
 「水俣湾へドロ埋立地の地中水銀のリスク対策に関する研究」

- (3) 沖縄県立看護大学助教授 金城 芳秀
 (疫学研究部 坂本 峰至)
 「水俣病認定患者の死亡像の変遷に関する研究」

- (4) 東京大学大学院工学系研究科附属水環境制御センター教授 矢木 修身
 (基礎研究部 中村 邦彦)
 「水俣湾の水銀分解細菌の分子生態学的研究」

- (5) 医療法人宗像水光会総合病院産婦人科医 窪田 真知
 (疫学研究部 坂本 峰至)
 「メチル水銀の乳・胎児期別リスク評価」

- (6) 北里大学薬学部公衆衛生学教室教授 国本 学
 (基礎研究部 足立 達美)
 「神経系細胞の分化・発達に関する新規毒性影響評価法の開発研究」

9. 共同研究記録

- (1) 九州大学大学院理学研究科助手 森 敬介 他
(国際・総合研究部 保田 叔昭)
「潮間帯底生生物群集構造および水銀濃度全国調査」
- (2) 九州大学大学院理学研究科助手 森 敬介 他
(国際・総合研究部 保田 叔昭)
「水俣湾底生生物群集調査 (定点観測地区第3次定量調査)」
- (3) 九州大学大学院理学研究科助手 森 敬介 他
(国際・総合研究部 保田 叔昭)
「底生生物群集調査 (全国レベル) 瀬戸内海予備調査」
- (4) 北海道大学大学院地球環境科学研究科教授 岩熊 敏夫 他
(国際・総合研究部 赤木 洋勝)
「水銀に関する環境科学的研究－熱帯生態系における水銀汚染とその機構の解明」
- (5) 長崎大学環境科学部環境科学科教授 中村 武弘 他
(国際・総合研究部 赤木 洋勝)
「水俣湾および周辺海域における水銀動態予測に関する研究」
- (6) 九州大学大学院理学研究科助手 森 敬介 他
(国際・総合研究部 保田 淑昭)
「底生生物群集調査 (全国レベル) 瀬戸内海本格調査」
- (7) 九州環境管理協会主任 柳 健太郎
(基礎研究部 中野 篤浩)
「水俣湾へドロ埋立地の地中水銀のリスク対策に関する研究」
- (8) 北海道大学大学院地球環境科学研究科大学院生 辰巳 陽子
(国際・総合研究部 赤木 洋勝)
「水銀に関する環境科学的研究－熱帯生態系における水銀汚染とその機構の解明」
- (9) 新潟大学脳研究所病態神経科学部門病理学分野教授 高橋 均
(主任研究企画官 衛藤 光明)
「新潟水俣病剖検例と熊本水俣病剖検例の比較検討」

- (10) 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系助手 笹川 昇
(臨床部 臼杵 扶佐子)
「メチル水銀による酸化ストレス傷害の分子機構解明に関する研究」
- (11) 東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学専攻大学院生 竹下 裕也
(臨床部 臼杵 扶佐子)
「メチル水銀による酸化ストレス傷害の分子機構解明に関する研究」
- (12) 東邦大学医学部病理学第一講座教授 秋間 道夫
(主任研究企画官 衛藤 光明)
「コモン・マーモセットにおける低レベルメチル水銀の慢性曝露影響」
- (13) 鹿児島大学理学部助教授 富安 卓滋
(国際・総合研究部 赤木 洋勝)
「水俣湾および周辺海域における水銀動態に関する研究」
- (14) 東北大学大学院医学部附属病院リハビリテーション科技能補佐員 熊本 圭吾
(疫学研究部 坂本 峰至)
「メチル水銀胎児期別曝露の影響評価のための心理行動検査法の確立」
- (15) 熊本大学医学部附属病院病理部検査技師 徳永 英博
(主任研究企画官 衛藤 光明)
「1) 新潟水俣病剖検例と熊本水俣病剖検例の比較検討
2) コモン・マーモセットに対する低レベルメチル水銀の慢性曝露影響」
- (16) 北里大学薬学部助手 高永 博実
(基礎研究部 足立 達美)
「神経系細胞の分化・発達に関する新規毒性影響評価法の開発研究」
- (17) 明治大学農学部大学院博士前期過程大学院生 原田 康博
(国際・総合研究部 赤木 洋勝)
「水銀除去土壌の再利用に関する基礎的研究」

10. 委員会名簿

各委員会名簿(平成13年度)

(平成13年4月1日)

	総務課	主任研究 企画官	国際・総合 研究部及び 疫学研究部	臨床部	基礎研究部	施設長等
学術委員会	山内 義雄		蜂谷 紀之	宮本 清香	◎山元 恵	
図書・文献委員会	仁科 英俊		渡邊 正夫	◎若宮 純司	足立 達美	
機器整備委員会	中野 剛		◎赤木 洋勝	臼杵扶佐子	荒巻 亮二	
動物実験施設 委員会	仁科 英俊		坂本 峰至	村尾 光治	桑名 貴	◎中野 篤浩
動物実験倫理 安全委員会	中野 剛		山口 雅子	◎宮本謙一郎	中村 邦彦	中野 篤浩
RI 実験施設 運営委員会	久保 恒男		山口 雅子	村尾 光治	足立 達美	赤木 洋勝 ◎荒巻 亮二
組替 DNA 実験安全委員会	久保 恒男		坂本 峰至	◎臼杵扶佐子	中村 邦彦	
リーチ・リソース・バンク 運営委員会	山内 義雄		永井 克博	宮本 清香	桑名 貴	◎衛藤 光明
国際研究協力棟 運営委員会	山内 義雄		◎佐藤 邦子	松本美由紀	荒巻 亮二	赤木 洋勝
コンピューター 環境整備委員会	仁科 英俊		◎山崎 学	若宮 純司	桑名 貴	
定期刊行物編集 委員会	山内 義雄	◎衛藤 光明	保田 叔昭	松本美由紀	安武 章	
化学物質及び 廃棄物管理委 員会	中野 剛		赤木 洋勝	宮本謙一郎	◎安武 章	

※ ◎は委員長

※ 任期は平成14年3月31日までとする

(特別委員会) 水俣病情報センター運営準備委員会、水俣病情報センター情報整備委員会

1 1. 国立水俣病総合研究センターの概要

1. 予 算

(当初予算 単位：千円)

区 分	9 年度	1 0 年度	1 1 年度	1 2 年度	1 3 年度
運 営 費	(581,361) 599,926 (230,736)	(661,249) 629,462 (258,970)	(613,008) 610,220 (250,313)	(642,249) 637,759 (251,691)	(616,962) 647,685 (250,977)
人 件 費	231,254 (119,032)	258,636 (98,982)	255,931 (120,203)	257,656 (114,176)	260,226 (97,319)
事 務 処 理 費	126,018 (231,593)	105,324 (303,297)	100,818 (242,572)	101,401 (276,382)	104,899 (268,666)
試 験 研 究 費	242,654	265,502	253,471	287,702	282,560
施 設 整 備 費	(0) 0	(1,802,000) 0	(0) 0	(0) 0	(0) 0

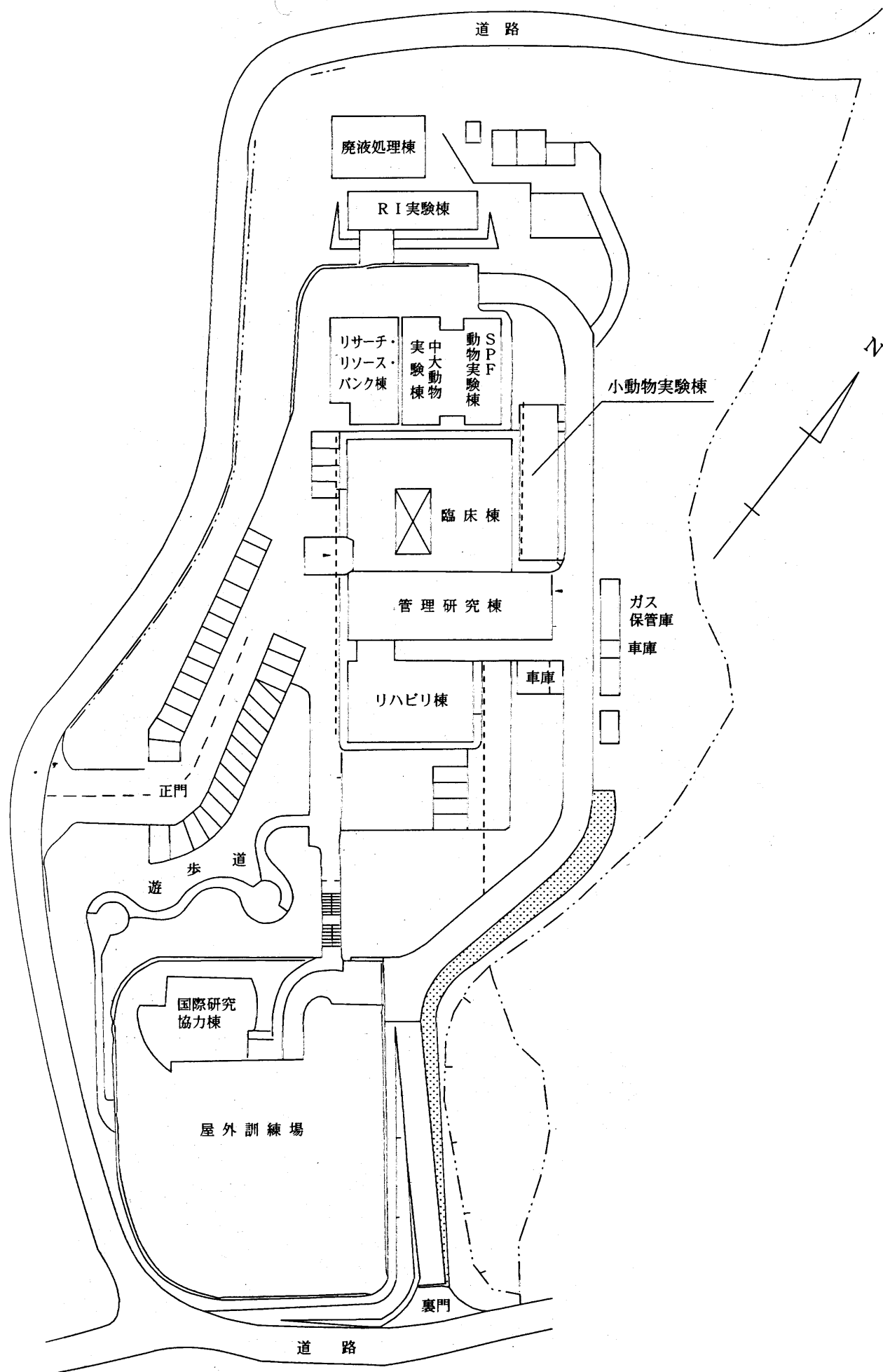
() 外書きは、補正後

2. 定 員

区 分	9 年度	1 0 年度	1 1 年度	1 2 年度	1 3 年度
総務課	4	4	4	4	4
国際・総合研究部	6	7	7	7	7
臨床部	7	7	7	7	7
基礎研究部	7	7	7	7	7
疫学研究部	4	4	4	4	4
計	28	29	29	29	29

3. 主要施設整備状況

施 設 名	面 積	竣 工 時 期
本 館	3,505.14 m ²	昭和 53 年 3 月竣工
小 動 物 実 験 棟	196.98	〃
車 庫	35.94	〃
特殊ガス・プロパン庫	20.32	〃
S P F 動 物 実 験 棟	146.38	昭和 60 年 3 月竣工
中 大 動 物 実 験 棟	231.65	昭和 61 年 11 月竣工
R I 実 験 棟	305.80	昭和 63 年 3 月竣工
リサーチ・リソース・バンク	450.00	平成 8 年 3 月竣工
国 際 研 究 協 力 棟	806.95	平成 9 年 7 月竣工
廃 液 処 理 棟	299.10	平成 12 年 3 月竣工
水 俣 病 情 報 セ ン タ ー	1,808.94	平成 13 年 3 月竣工



附 1. 人事異動

年月日	新 職 名	氏 名	異動事由	備 考
13. 4. 1		滝澤 行雄	退 職	所長
13. 4. 1	所長	野村 瞭	就 任	
13. 4. 1	環境省大臣官房秘書課 秘書第二係長	藤田 佳久	配置換	総務課庶務係長
13. 4. 1	国立環境研究所	新垣たずさ	配置換	国際・総合研究部社会科学室
13. 4. 1	総務課庶務係長	山内 義雄	配置換	国際・総合研究部 情報係長
13. 4. 1	国際・総合研究部	山崎 学	配置換	環境省環境保健部企画課
13. 4. 1	基礎研究部生化学室 主任研究員	足立 達美	配置換	国立環境研究所
13. 4. 1	主任研究企画官	二塚 信	併 任	熊本大学教授医学部
13. 4. 1	研究企画官	有村 公良	併 任	鹿児島大学助教授医学部
13. 4. 1	研究企画官	藤木 素士	委 嘱	熊本県環境センター館長
13.10. 1	環境省自然環境局総務課	久保 恒男	配置換	総務課長
13.10. 1	総務課長	三橋 英夫	配置換	環境省環境保健部 特殊疾病対策室
14. 2. 1	環境省大臣官房秘書課 ヨハネスブルグサミット準備事務局	佐藤 邦子	配置換	国際・総合研究部 国際・情報室長

附 2. 主な来訪者（敬称は省略させていただきました）

平成 13 年 5 月	1 日	環境省総合環境政策局長	中川 雅治	
平成 13 年 6 月	8 日	第 16 回「産業環境対策研修コース」		9 名
	9 日	環境副大臣	風間 昶	
	29 日	JICA 集団研修「有害金属汚染対策コース」		5 名
7 月	5 日	第 3 回 JICA 国別特設「フィリピン環境管理コース」		12 名
	5 日	アルゼンティン国鉱山公害防止対策研究センターC/P 研修		3 名
8 月	23 日	産業衛生管理技師短期研修		17 名
	24 日	第 14 回「産業廃水処理技術研修コース」		10 名
9 月	20 日	JICA 集団研修「水質環境管理」コース		10 名
	20 日	産業医学集団研修コース		13 名
10 月	11 日	韓国中小企業技術者研修「環境先進技術」コース		6 名
	11 日	個別長期派遣専門家(鉱山環境行政)C/P「休廃止鉱山対策に重点を置いた環境政策」		3 名
	12 日	JICA 衛生・環境分析技術者研修		8 名
	15 日	環境大臣	川口 順子	
	23 日	フィリピン鉱山環境管理計画プロジェクト C/P「鉱山環境管理」		5 名
11 月	2 日	JICA「地方自治体による環境再生・保全行政（水俣病の経験と教訓）」コース		13 名
	5 日	同上		13 名
	7 日	JICA 集団研修「環境行政コース」		16 名
	7 日	第 12 回生活排水対策コース		9 名
	9 日	第 2 回「農作業に伴う健康障害予防対策セミナー」		9 名
	14 日	水俣病の調査・研究に関する取り組みの視察研修		7 名
	15 日	発展途上国の「環境 NGO 人材育成コース」研修		6 名
	22 日	JICA/KMCT カウンターパート水俣研修		2 名
平成 14 年 2 月	5 日	環境と水産開発コース		13 名
平成 14 年 2 月	5 日	「海洋社会科学コース」水俣研修		6 名

20 日	アルゼンティン・チリ・ボリビア C/P 合同研修	7 名
22 日	JICA 研修「第 9 回東欧産業環境対策」コース	11 名
25 日	環境副大臣	山下 栄一
3 月 22 日	視察研修	2 名
25 日	中国黒江省環境保護局長 視察研修	2 名