

DB
18118
2002
HG

無機水銀の生体影響に関する研究

- 運動負荷が無機水銀毒性に及ぼす影響と
無機水銀による神経細胞死について -

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

新井 淑弘

寄贈
新井淑弘氏

03006730

目 次

序 章	5
水銀化合物の種類とその利用	6
水銀の毒性	7
本研究の内容	8
第 1 章 金属水銀の生体内動態に及ぼす運動負荷の影響	9
1-1 目的	10
1-2 方法	12
実験動物および飼育条件	
運動負荷	
水銀蒸気暴露および剖検	
酵素活性測定用試料の調整および酵素活性の測定	
水銀測定試料の調整および水銀濃度の測定	
データ処理および統計処理	
1-3 結果	16
酵素活性	
体内水銀量	
各臓器および血液中の水銀濃度	
1-4 考察	26
第 2 章 無機水銀の腎毒性に及ぼす運動負荷の影響	28
2-1 目的	29
2-2 方法	30
実験動物と運動負荷	
水銀の投与、尿検査および剖検	
腎臓中水銀濃度の測定	
腎臓中過酸化脂質の測定	
データ処理および統計処理	
2-3 結果	33
尿検査	
腎臓中の水銀濃度	
腎臓中の過酸化脂質濃度	
2-4 考察	37

第3章	無機水銀による神経系細胞の細胞死	38
3-1	目的	39
3-2	方法	40
	細胞株と培養条件	
	NGFによる細胞分化	
	水銀暴露	
	各種薬剤添加と水銀暴露	
	データ処理および統計処理	
3-3	結果	43
	細胞増殖とNGFによる細胞分化	
	無機水銀暴露によるPC12細胞の細胞死	
	各種薬剤処理による細胞死の抑制効果	
3-4	考察	49
終章	まとめ	50
参考文献		52
参考論文		59
謝辞		61

略 語

DFM ; Dulbecco's modified Eagles medium : Ham's F12 medium=1:1 mixed medium

MTT ; 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide

SDS ; sodium dodecylsulfate

DMF ; N,N-dimethylformamide

PBS ; phosphate buffer saline

FBS ; fetal bovine serum

SOD ; superoxide dismutase

CAT ; catalase

GSHpx ; glutathione peroxidase

AcD ; actinomycin D

Cyc ; cycloheximide

ATA ; aurintricarboxylic acid

Ex ; exercise

N.Ex ; non exercise

MDA ; malondialdehyde

TBA ; thiobarbituric acid

SD ; standard deviation

ANOVA ; analysis of variance

序 章

水銀化合物の種類とその利用

水銀は原子番号 80 番、融点が -38.9°C 、沸点が 357°C であり、常温で液体の唯一の金属である¹⁾。地殻中の水銀の濃度は、各報告によって差はあるが、 $0.03\text{ppm}\sim 0.09\text{ppm}$ と鉄 (Fe: $3.54\sim 5.63\%$) や銅 (Cu: $30\sim 55\text{ppm}$)、亜鉛 (Zn: $60\sim 70\text{ppm}$) など代表的な生体内必須金属と比較すると非常に低い値であることが知られている²⁾。数多くの水銀化合物はその化学的性状から無機水銀と有機水銀の 2 種類に大別される。無機水銀はさらに、電荷をもたない金属水銀 (Hg^0)、一価 (Hg^+) および二価 (Hg^{2+}) の水銀に分類され、ハロゲン化物、酸類の塩、硫化水銀などの化合物が知られている。有機水銀はアルキル水銀、アリル水銀、アルコキシアルキル水銀等に分類され、メチル水銀、エチル水銀、フェニル水銀などがその代表例としてよく知られている (Fig.1)³⁾。

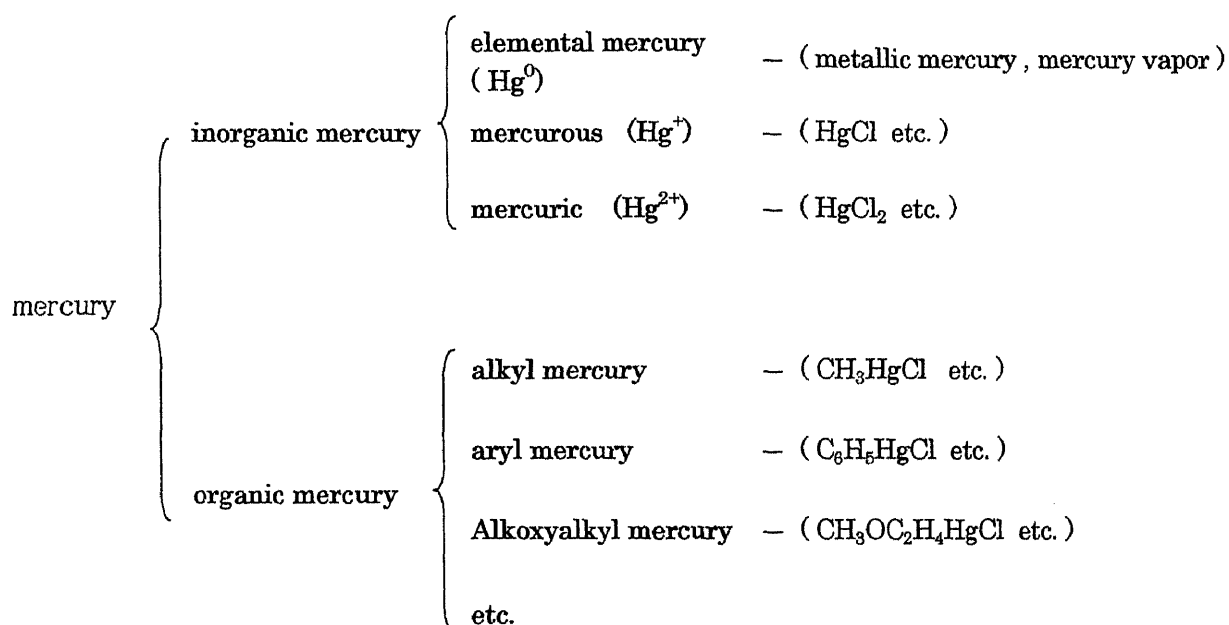


Fig.1 Organic and inorganic compounds of mercury³⁾

水銀と人とのかかわりは古く、赤色の硫化水銀は顔料として紀元前 3000 年の縄文時代や紀元前 1500 年ころからエジプト装飾文化の中に取り入れられてきたと考えられている。また、紀元前 3~4 世紀の中国の青銅器に金メッキがされていることから、水銀-金アマルガムが使用されていたことが推定されている⁴⁾。水銀系農薬は、種子殺菌剤として塩化第二水銀や塩化エチル水銀、酢酸フェニル水銀が、植物病菌に対する使用では酢酸フェニル水銀やヨウ化フェニル水銀などが使われ、土壌殺菌剤としてはエチルリン酸水銀が多用されてきた^{5,6)}。医薬品としては塩化第二水銀が内服用として、塩化第二水銀、オキシシアン化水銀、マーキュロクロム、チメロサルなどが消毒用や防腐剤として使用されていた。しかし、これらの薬剤は、その毒性から、一部の検査薬を除き使用が制限され、現在ではほとんどが使用されなくなった⁴⁾。

様々な産業で使用されてきた水銀化合物の一部は、環境中に放出されて現在でも生活環境中に残存している。有機水銀として環境中に放出された水銀も、微生物の作用により無機化が起り、水銀イオン (Hg^{2+}) や、さらに還元を受けて金属水銀 (Hg^0) とし

でも存在している⁷⁾。また、環境中では金属水銀が酸化され水銀イオン (Hg²⁺) になりさらにメチル化等修飾を受けて、有機水銀の生成も行われている^{8,9)}。この様に、環境中には様々な形の水銀化合物が存在して、地球上の生物に影響を与えている。

水銀の毒性

水銀はその性状により全く違った体内蓄積性や、毒性発現を示すことが知られている¹⁰⁾。水俣病の原因物質として有名なメチル水銀はアルキル水銀の代表例であり、その毒性に関しては多くの研究が行われてきた。また、金属水銀や無機水銀に関しても中毒例が多数報告され、毒性研究の対象として古くから取り上げられてきた。それらの研究の蓄積は、化学物質の生体影響研究におけるモデルケースとして非常に重要なものと考えられている。また、環境汚染物質としてもその歴史は古く、環境問題の解決モデルや今後発生するであろう環境問題を未然に防ぐための資料としてその重要性が取り上げられている¹¹⁾。

有機水銀の毒性に関しては、日本国内ではもとより海外でも水俣病の発生により広く知られるようになった。とくに、ハンターラッセル症候群を主症状とする中枢神経障害や、母体から胎児に水銀が移行して発症する胎児性の水俣病¹²⁾は、その症状の重篤さから人々の脳裏に焼きつくものである。

無機水銀に関しては、歯科用アマルガムで使用された金属水銀が、継続的水銀蒸気暴露の原因として注目されたり¹³⁾、水銀ランプなどの製造工場に従事する労働者の水銀蒸気の吸入と毒性発現^{14~17)}の報告や、体内水銀の残存性¹⁸⁾に関する報告がなされている。水銀蒸気として人体が暴露を受けた場合、その吸収率は経口摂取による消化管からの吸収率(約1~2%)に比べ非常に高くなる(80~90%)事が知られている。吸入された金属水銀は主に肺組織から吸収され、一部は肺で酸化を受けその場にとどまり肺の機能障害を起こし、その他は直接血漿中に溶けて赤血球や各臓器に移行して、そこで酸化されて二価の水銀 (Hg²⁺) として蓄積して毒性を発揮する^{3,19~21)}。このような生体内における金属水銀 (Hg⁰) の酸化には Fig.2 の①②に示す catalase(CAT)による H₂O₂ の消去反応に関わり、③④の反応により酸化されていると考えられている。

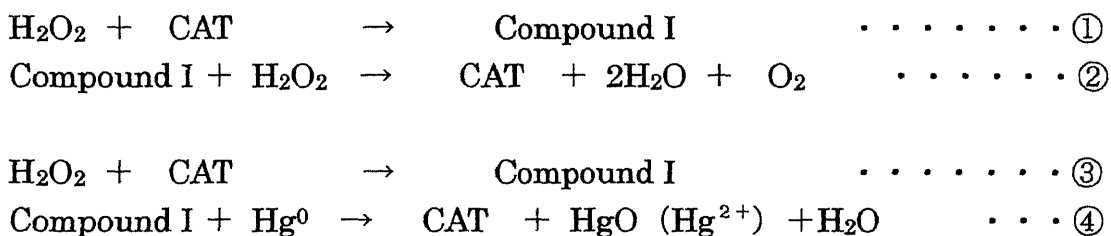


Fig. 2 Oxidation of metallic mercury by catalase

金属水銀はその負荷状態(暴露濃度および暴露時間)により異なった臓器が標的臓器となり、違った症状を示すことが知られている²⁰⁾。高濃度暴露を受けるとまず肺に障害を受け、呼吸障害を起こす。また、腎機能障害は比較的早期からおこり、尿蛋白や糖が検出される。重症では腎不全を起こし死亡することも報告されている^{3,14)}。中程度の

濃度で比較的長い期間暴露を受けると、免疫異常を起こし糸球体性の腎炎を起こすことが報告されている。さらに、低濃度で長期間暴露されると神経症状が発現する事が知られている³⁾。このような各臓器における機能障害発現には、水銀の蓄積性や臓器の感受性の違いが関与していると考えられる。

さらに、人に対する影響評価に関して、特に高濃度暴露による急性中毒に関しては、不慮の事故などによる中毒患者のデータから検討が行われてきた。そのようなデータでは、水銀の影響には個人差が大きく出ることが指摘されている^{14,20,23)}。

多くの化学物質のヒトに対する作用に関しても個人差があることはよく知られている。化学物質の毒性を左右する因子として生物学的因子、環境因子、他の化合物との複合暴露、遺伝的因子、病理学的因子等に分けられる²⁴⁾。このような個体差が生じる原因は、大きく先天的要因と後天的要因の2つに分類することもできる。前者に関しては古くから薬剤の効果における人種差や実験動物の種差、系統差による効果の違いなどがよく検討されてきた。最近ではDNAの一塩基多型(SNP)について調べられるようになり、化学物質の影響予測・評価などに大きく貢献している。後者に関しては栄養状態や環境条件などに関係するものが主に行われているが、さらに今後十分な検討を行う必要があると考えられる。

水銀の毒性発現に関しても、動物実験で性差²⁵⁾、種差²⁶⁾、系統差^{27,28)}および遺伝子多型^{29,30~33)}など先天的要因について多くのデータが示されている。後天的な要因に関しては、栄養摂取^{34,35)}やアルコール摂取³⁶⁾などに関してのものが検討されてきた。

本研究の内容

このような中、金属水銀を含む無機水銀研究でいまだ十分に検討されていない問題もしくは、最近明らかにされてきた生命現象と関係深い事象として、水銀による生体影響の個体差および細胞死の機構があげられる。そこで、本研究では以下の3つの内容について検討を行った。第1章では金属水銀の生体内動態を変化させる後天的因子としての運動負荷をとりあげ、第2章では無機水銀の腎毒性発現を変化させる後天的因子としての運動負荷、さらに、第3章では無機水銀による神経系細胞の細胞死についての検討を行った。

第 1 章

金属水銀の生体内動態に及ぼす運動負荷の影響

1-1 目的

金属水銀は水銀蒸気として人体が暴露を受けた場合、その吸収率は経口摂取による消化管からの吸収率に比べ非常に高くなる(61~88%)事が知られている³⁾。吸入された金属水銀は主に肺から吸収され、一部は肺で酸化を受けその場にとどまり肺の組織障害を起こす。その他は直接血漿中に溶けて赤血球や各臓器に移行して、そこで酸化されて二価の水銀(Hg^{2+})として蓄積して毒性を発現する²¹⁾。金属水銀の生体内での酸化にはカタラーゼによる H_2O_2 の消去反応が関与していると考えられている(序章 p.7 Fig.2)^{37,38)}。

金属水銀の毒性発現は水銀の組織内の蓄積量と組織の水銀感受性によって、その様式が変化する。また、人に対する影響評価に関して、特に高濃度暴露による急性中毒に関しては、不慮の事故などによる中毒患者のデータから検討が行われてきたが、そのようなデータでは、水銀の影響には個人差が大きく出ることが指摘されている^{14,20,22)}。現代の生活スタイルは多様化し、さまざまな生活要素に関して生理的状态に個人差が生じている。そのような中で、ヒトの身体条件を大きく変える一因子として、運動負荷が考えられる。交通の発達やIT (information technology) の普及など生活が便利になると、身体活動量を増加させることなく生活できるようになる。職業によっても1日の身体活動量は大きく違って来るが、運動習慣の有無によってさらに大きな差を生じている。人や動物に対する長期運動負荷は、血液や臓器中のカタラーゼ(catalase: CAT)やスーパーオキシドディスムターゼ(superoxide dismutase: SOD)、グルタチオンペルオキシダーゼ(glutathione peroxidase: GSHpx)などの抗酸化系酵素(Fig.3)の活性を上昇させることが知られている^{39,40)}。

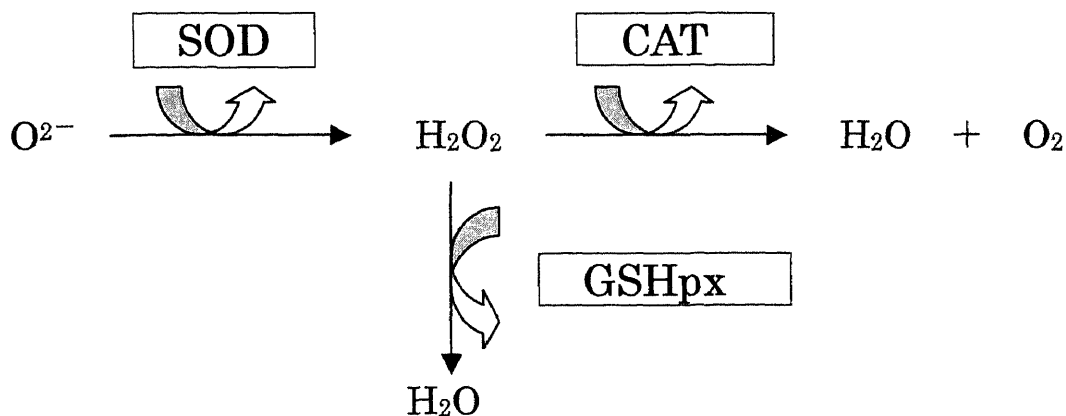


Fig. 3 Antioxidant enzymes in various tissues

そこで、本研究では、長期運動負荷が水銀の体内蓄積量や、各臓器中の水銀蓄積性を変化させる因子であるか否かを検討することを目的として、水泳により長期運動負荷を与えたマウスと運動負荷を与えずに飼育したマウスを、安静状態で水銀蒸気に 1 回暴露して、水銀の体内蓄積量や各臓器中の濃度を経時的に測定し、水銀の体内蓄積量および臓器中水銀濃度について検討を行った。

1-2 方法

実験動物および飼育条件

動物は、C3H He.N の雄性マウスを、4週齢で購入して1週間の順化期間の後、5週齢より運動負荷群と非運動負荷群の2群に分けそれぞれの条件で9週間飼育した。実験期間中、運動負荷を行っている時間帯以外は、両群とも同一の飼育条件下に置いた。12時間ごとの明暗サイクルで、気温は22~24°Cで湿度は55~60%に制御された飼育室内で、固形飼料（日本クレア（株）CE-2）および飲料水はいずれも自由摂取させて飼育した。

運動負荷

運動負荷はKanterら⁴⁰⁾の運動負荷方法をもとに、水泳により1日1時間、週5日間の頻度で9週間行った。水温は28±2°C、縦37cm×横30cm、水深15cmの水槽を用いて緩やかな水流をつけて行った。運動負荷は明期に入ってから約3時間までの間に行った。9週間の運動負荷期間の後、1日の安静期間をおき、水銀蒸気への暴露を行った。実験群は、運動負荷群（Ex群）と非運動負荷群（N.Ex群）の2群を設定した。抗酸化系酵素の活性測定実験の流れはFig.4に示した。水銀蒸気暴露実験の流れはFig.5に示した。

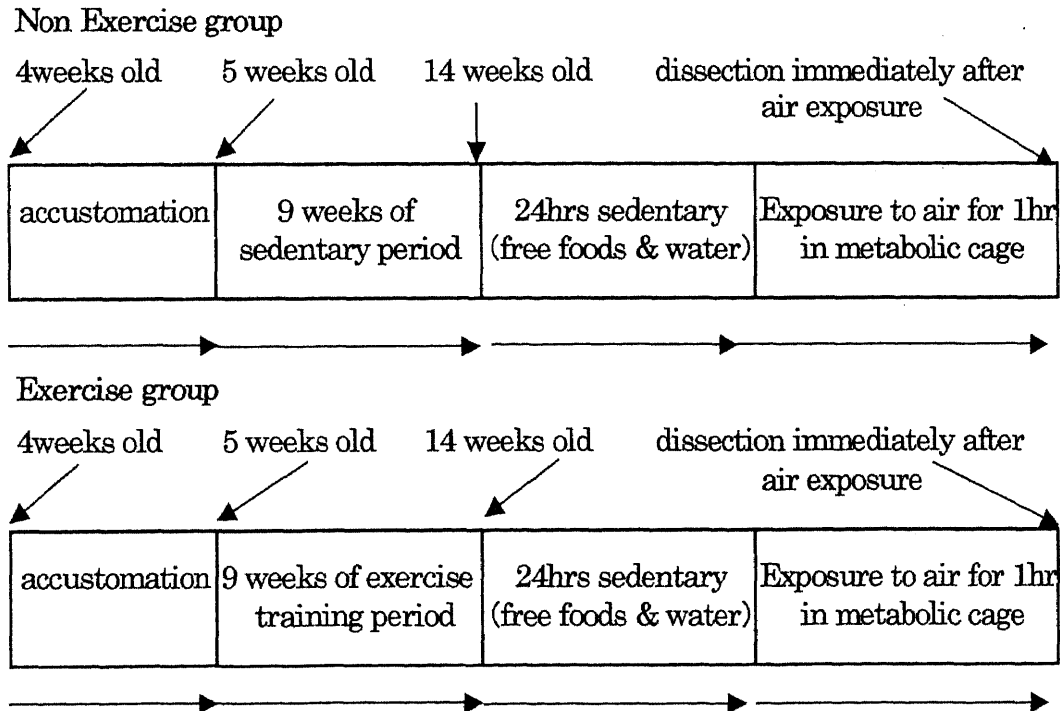


Fig. 4 Experimental procedure for preparation of animals to assay the activities of antioxidant enzymes with and without exercise stress

水銀蒸気暴露および剖検

9週間の運動負荷が全て終了した後に、1日の安静期間をおき、Ex および N.Ex の両群からそれぞれ、水銀蒸気非暴露のマウス（酵素活性測定用）を無作為に選び、水銀代謝測定用ガラスケージ（スギヤマゲン株式会社）内に入れ、大気を通気（1,000 ml/min）して1時間おき、その後剖検を行い各臓器のサンプリングを行った。剖検はエーテル深麻酔下で行った。開胸後、心採血を行い生理食塩水で心灌流をして脱血を行った後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓を摘出した。血液は遠心分離機により $2,400 \times g$ で10分間遠心分離を行い、血漿および白血球層を除去して、生理食塩水を用いて3回洗浄を行った後、赤血球成分を得た。取り出された臓器および赤血球は超低温用のガラス製サンプルビンに入れ窒素ガスを封入し、密閉して -80°C で酵素活性測定時まで保存した。

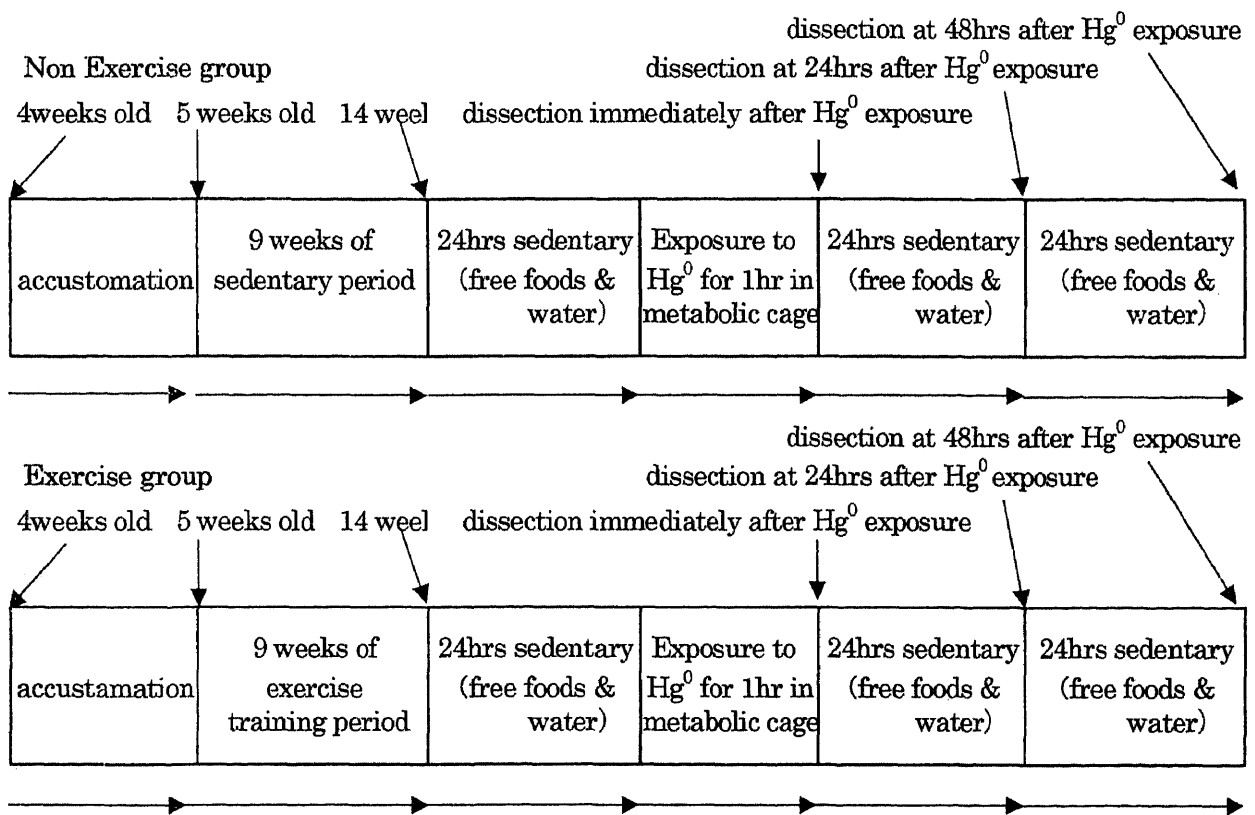


Fig. 5 Experimental procedure for preparation of animals with and without exercise stress and exposure to mercury vapor.

水銀蒸気暴露は、マウスを水銀代謝測定用ガラスケージ（スギヤマゲン株式会社）内に入れ、汚染物質発生導入装置 GAS-104（株式会社島津製作所）により発生させた水銀蒸気（ 3.5 mg/m^3 ）を1分間に1,000 mlの流速で1時間行った。

暴露終了直後、24時間後および48時間後の3時点でEx群、N.Ex群それぞれから7匹ずつ無作為に選び、剖検を行った。剖検はエーテル深麻酔下で開胸後、心採血を行

い生理食塩水で心灌流をして脱血を行った後、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓を摘出した。各臓器は水銀測定用の試料をとり、残りは酵素活性用の試料として、超低温用ガラス製サンプルビンに入れ、窒素ガスを封入して測定まで -80°C で保存した。血液は遠心分離機により $2,400\times g$ で10分間遠心分離を行い、血漿サンプルを得た後、白血球層を除去して、生理食塩水を用いて3回洗浄を行った後、赤血球成分を得た。

酵素活性測定用試料の調整および酵素活性の測定

赤血球は4倍量の蒸留水を加えて溶血を行った後に、 50 mM のリン酸緩衝液($\text{pH } 7.0$)もしくは 100 mM Tris HCl 緩衝液($\text{pH } 7.0$)を加えて、カタラーゼおよびグルタチオンペルオキシダーゼ活性の測定範囲の濃度までそれぞれ希釈して使用した。また、SOD活性測定用試料はTsuchihashi法⁴¹⁾によりヘモグロビンを除去して、測定試料とした。

各臓器は、10倍量の 50 mM のリン酸緩衝液($\text{pH } 7.0$)を加えて、テフロンホモジナイザーにより氷冷中窒素気流下で破碎して、これを $2,400\times g$ で10分間遠心分離を行い、得られた上清をさらに $105,000\times g$ で30分間の遠心分離を行い、その上清を酵素活性測定用の試料とした。

CAT活性の測定は、Cohenら⁴²⁾の方法により測定した。GSHpx活性はLittleら⁴³⁾の方法により測定した。また、SOD活性はBeauchamp⁴⁴⁾らの方法により行った。各測定における吸光度はDouble Beam U.V. 2000 Spectrophotometer (島津製作所)に、恒温セルホルダーをセットして測定を行った。

水銀測定試料の調製および水銀濃度の測定

血液および各臓器中の水銀濃度の測定は、湿式灰化・還元気化原子吸光法^{45,46)}により総水銀濃度として測定した。摘出した臓器は重量を測定した後に、 100 ml のガラス容器に約 200 mg を秤量して入れ、硝酸 5 ml を加え室温で約1日放置し、十分に液化したことを確認した後に、蒸留水:硫酸=1:1(体積比)に希釈した硫酸 5 ml を加え、さらに飽和過マンガン酸カリウム水溶液 10 ml を加え、発泡がおさまった後に飽和過マンガン酸カリウム水溶液 30 ml を追加して、1週間室温で放置した。その後、40%塩酸ヒドロキシルアミン水溶液 4 ml を加え攪拌し、完全に脱色、発泡したのを確認した後に、全量が 70 ml になるまで蒸留水を加えた。

摘出した臓器以外の残骸は、 100 ml の丸底フラスコに入れ、 20 ml の硝酸を加えて24時間加温して液化した。完全に液化したのを確認した後に、硝酸を加えて総量を 70 ml にした。この試料を 100 ml のガラス容器に 5 ml 分取して、上記の方法で湿式灰化を行った。

ガラスボールを用いた洗気ビン中で、一定量の上記の試料に $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ を加えて全量を 20 ml にした後に、10%塩化第一スズ(in $2\text{N H}_2\text{SO}_4$)を 1 ml 加えて水銀の還元を行った。エアープンプにより暴気して、気化した水銀をフレームレス原子吸光装置(スギヤマゲン 253型水銀分析計)により検出した。塩化第二水銀を $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ で希釈して水銀標準液として、上記の方法で測定し、得られた値から最小2乗法により検量線を求め、試料中の水銀濃度を算出した。得られた結果は、臓器(血液) 1g (湿重量)に対

する水銀量 (ng/g) で表した。

また、各臓器中水銀濃度に臓器の重量をかけて、各臓器中水銀量を算出した。血液中の水銀量は、各マウスの体重の 7.6% を血液量として、全血中の水銀濃度を乗じて概算した。これらの各臓器中および血液中の水銀量と残骸中の水銀量を加えて、マウスの体内水銀量を算出した。

データ処理および統計処理

得られたデータは各群ごとの平均値と標準偏差 (SD) を算出し、グラフまたは表形式で示した。さらに Ex 群と N.Ex の 2 群間での比較は two sample T-test を用いて有意差検定を行った。また、水銀暴露直後、24 時間後、48 時間後の 3 時点での値の比較は one way ANOVA により分散分析を行ったのちに、各群間での有意差検定を行った。有意差は危険率 5 % 未満 ($p < 0.05$) および 1 % 未満 ($p < 0.01$) の 2 段階で表示した。

順化期間中および運動負荷期間中、マウスの体重は運動負荷群、非運動負荷群ともに標準的な増加を示し、運動負荷終了時において両群間の体重に有意差は見られなかった。

酵素活性

9週間の運動負荷終了後の各臓器および赤血球中CAT、GSHpx、SOD活性値をTable 1に示した。

Table 1 Antioxidant enzyme activities in various tissues and red blood cells in Ex mice and N.Ex mice

tissue	enzyme	N.Ex		Ex	
brain	CAT	7.0 ± 0.5		6.8 ± 0.7	
	GSHpx	10.2 ± 1.2		11.0 ± 4.9	
	SOD	33.1 ± 6.1		34.3 ± 2.9	
lung	CAT	8824 ± 2252		7663 ± 731	
	GSHpx	10.9 ± 5.5		8.5 ± 3.5	
	SOD	52.0 ± 19.7		42.5 ± 7.1	
heart	CAT	41.4 ± 3.4		36.0 ± 14.2	
	GSHpx	9.0 ± 1.5		9.9 ± 2.5	
	SOD	44.5 ± 14.5		37.4 ± 10.9	
liver	CAT	1263 ± 236		1290 ± 293	
	GSHpx	120.6 ± 34.2		138.0 ± 26.4	
	SOD	451.9 ± 134.0	*	703.2 ± 195.5	
kidney	CAT	1041 ± 94	**	1328 ± 165	
	GSHpx	144.3 ± 13.0	**	176.4 ± 16.4	
	SOD	73.8 ± 10.9		91.5 ± 75.1	
red blood cells	CAT	80.2 ± 4.9	**	95.9 ± 3.0	
	GSHpx	92.7 ± 7.2	**	132.4 ± 8.0	
	SOD	437.7 ± 73.0	*	556.0 ± 104.0	

Valuse are mean ± SD expressed as enzyme units per g of tissue for the brain, lung, heart, liver, and kidneys. Red blood cells levels are expressed as enzyme units per ml to blood. Ex; exercised mice, N.Ex; non-exercised mice, CAT: catalase, GSHpx: glutathione peroxidase, SOD: superoxide dismutase. significant difference, **: p<0.01, *: p<0.05 between Ex and N.Ex.

CAT 活性は肺で高く、次いで肝臓および腎臓で高い値を示し、脳や心臓では他の臓器と比べると低い活性値を示した。Ex 群と N.Ex 群との比較では、腎臓および赤血球中で N.Ex 群に比べ Ex 群が有意に高い値を示した。GSHpx 活性は肝臓、腎臓および赤血球で、他の臓器と比べ高い値を示した。Ex 群と N.Ex 群との比較では、CAT 活性と同様に腎臓と赤血球で N.Ex 群に比べ Ex 群が有意に高い値を示した。SOD 活性は肝臓と赤血球で他の臓器と比べ、高い活性値を示した。Ex 群と N.Ex 群との比較では、肝臓および赤血球で N.Ex 群に比べ Ex 群が有意に高い値を示した。

体内水銀量

水銀蒸気に暴露した後の体内水銀量の変化を Fig.6 に示した。

N.Ex 群 Ex 群ともに暴露直後で最も高い値を示し、24 時間後 48 時間後と経時的に減少する傾向が見られた。とくに、暴露後 48 時間の値は両群とも暴露直後と比べて有意に低い値を示した。運動負荷群 (Ex 群) と非運動負荷群 (N.Ex 群) との比較では暴露後どの時点においても有意な差は見られなかった。

これらのことから、一旦体内に吸収された水銀は暴露後 48 時間で 25~30%程度が排出されることが明らかになった。

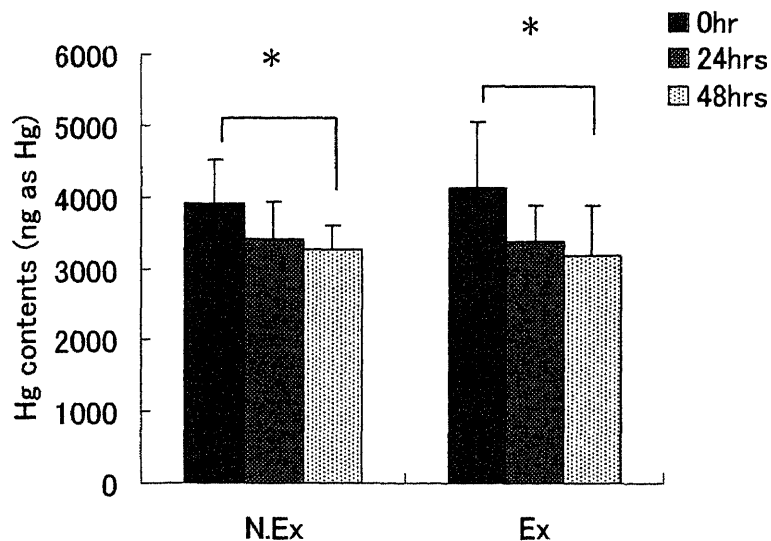


Fig. 6 Mercury contents in the whole body of mice exposed to mercury vapour . Values are mean \pm SD . * : $p < 0.05$.

各臓器および血液中の水銀濃度

Fig.7 に脳内水銀濃度の経時的变化を示した。N.Ex 群は 3 時点全てで 120 ng/g 程度で経時的に変化を示さなかった。Ex 群は暴露直後では Ex 群同様の 120 ng/g 程度であったが、経時的に増加して 24 時間後で約 150 ng/g、48 時間後では約 160 ng/g の濃度を示した。Ex 群 ($p<0.05$) と N.Ex 群との比較では、水銀暴露後 24 時間と 48 時間で N.Ex 群に比べ Ex 群で有意に高い値を示した。

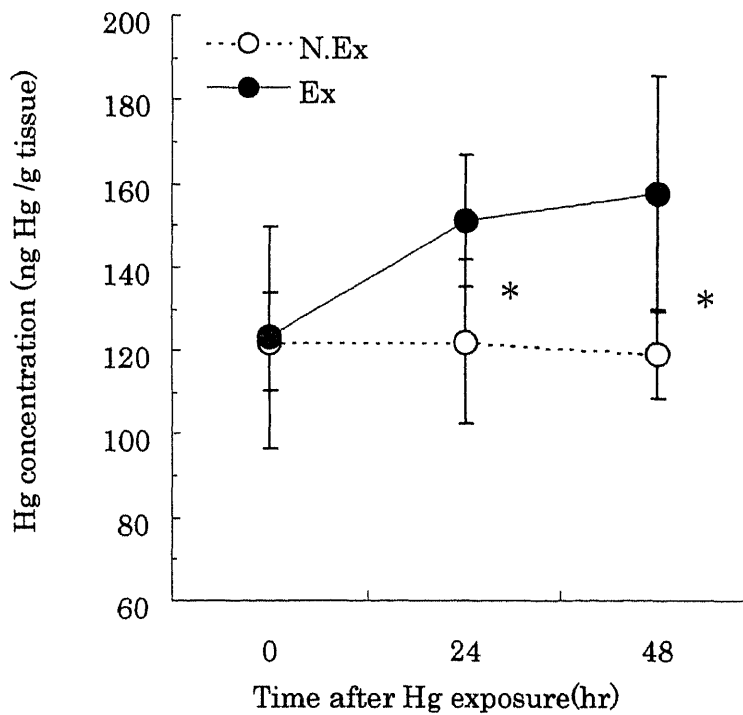


Fig. 7 Mercury concentration in brain after exposure to mercury vapour. Values are mean \pm SD (ng Hg/g tissue). Ex: exercised mice, N.Ex: non-exercised mice, *: $p<0.05$ (Ex vs N.Ex).

Fig.8 に心臓中の水銀濃度を示した。 N.Ex 群では暴露直後 400 ng/g 程度であったが、24 時間後、48 時間後と経時的に有意な減少を示した。一方 Ex 群では暴露直後 400 ng/g を示し、その後有意な濃度変化を示さなかった。 Ex 群と N.Ex 群との比較では、水銀暴露後 24 時間と 48 時間で N.Ex 群に比べ Ex 群で有意に高い値を示した。

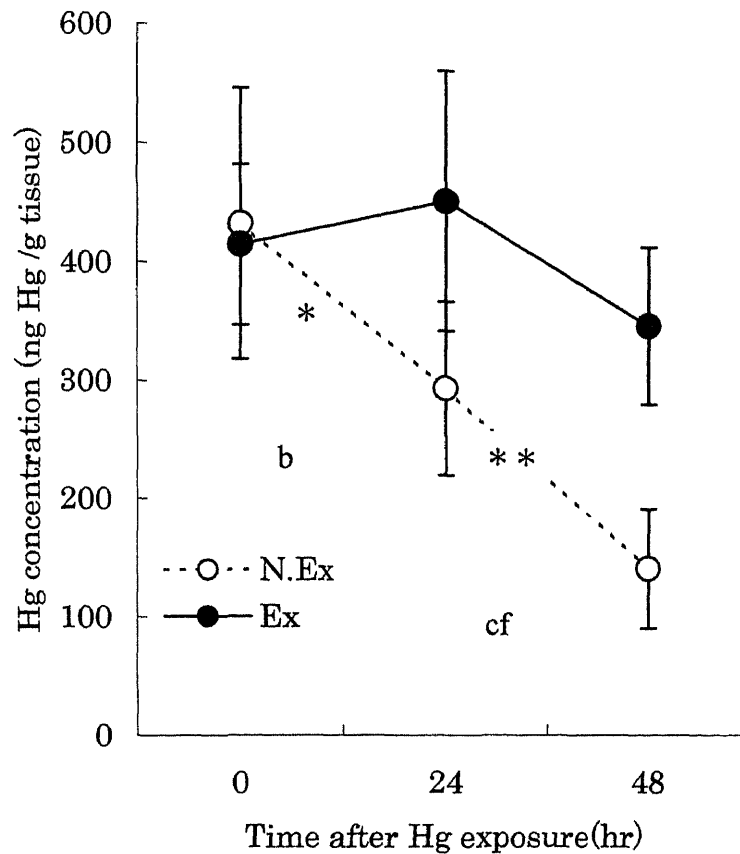


Fig. 8 Mercury concentration in heart after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g tissue) .
 Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised mice , * : $p < 0.05$ (Ex vs N.Ex) , * : $p < 0.01$,
 * : $p < 0.05$ (Ex vs N.Ex) , b : $p < 0.05$ (0hour vs 24hours) ,
 c : $p < 0.01$ (0hour vs 48hours) , f : $p < 0.05$ (24hours vs 48hours) .

Fig.9 に肺の水銀濃度の変化を示した。肺での濃度変化は、暴露直後に両群とも 2000 ~2500 ng/g と高い濃度を示し、その後 24 時間後までに急激な減少を示し、48 時間後には暴露直後の 1/10 程度の値にまで減少した。N.Ex 群と Ex 群の間には 3 時点とも有意な差は見られなかった。

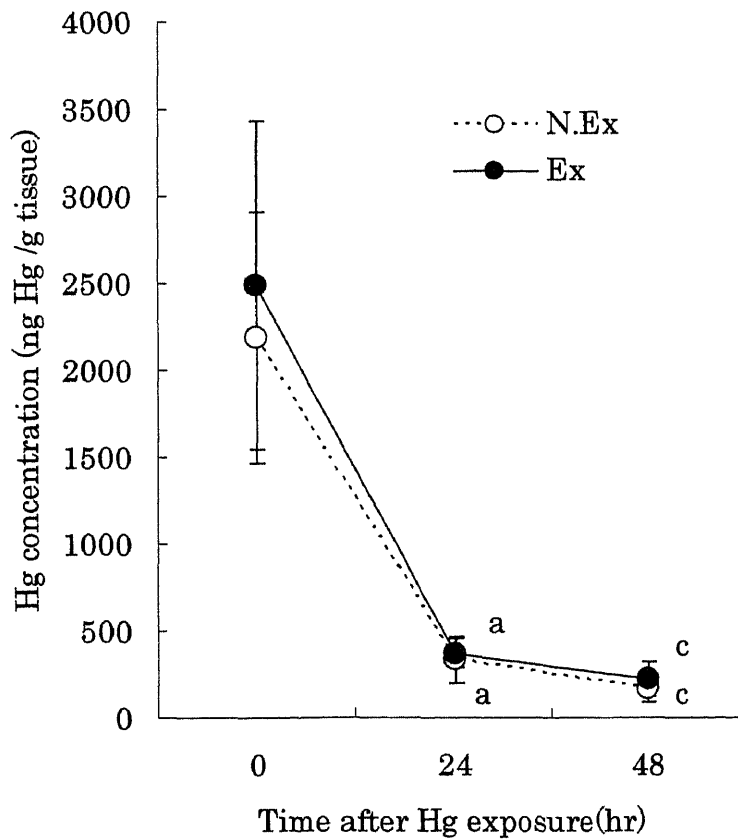


Fig.9 Mercury concentration in lung after exposure to mercury vapour. Values are mean \pm SD (ng Hg/g tissue). Ex : exercised mice, N.Ex : non-exercised, a : $p < 0.01$ (0hour vs 24hours), c : $p < 0.01$ (0hour vs 48hours).

Fig.10 に肝臓中の水銀濃度の変化を示した。肝臓中の水銀濃度は、両群とも暴露直後 80~90 ng/g で経時的にわずかに増加する傾向を示したが、Ex 群では統計的な有意差は見られなかった。N.Ex 群は、暴露 24 時間後に 120ng/g 程度まで統計的に有意な上昇を示し、48 時間後でも暴露直後に比べ有意に高い値を示した。しかし、Ex 群と N.Ex 群との比較ではどの時点でも有意差は見られなかった。

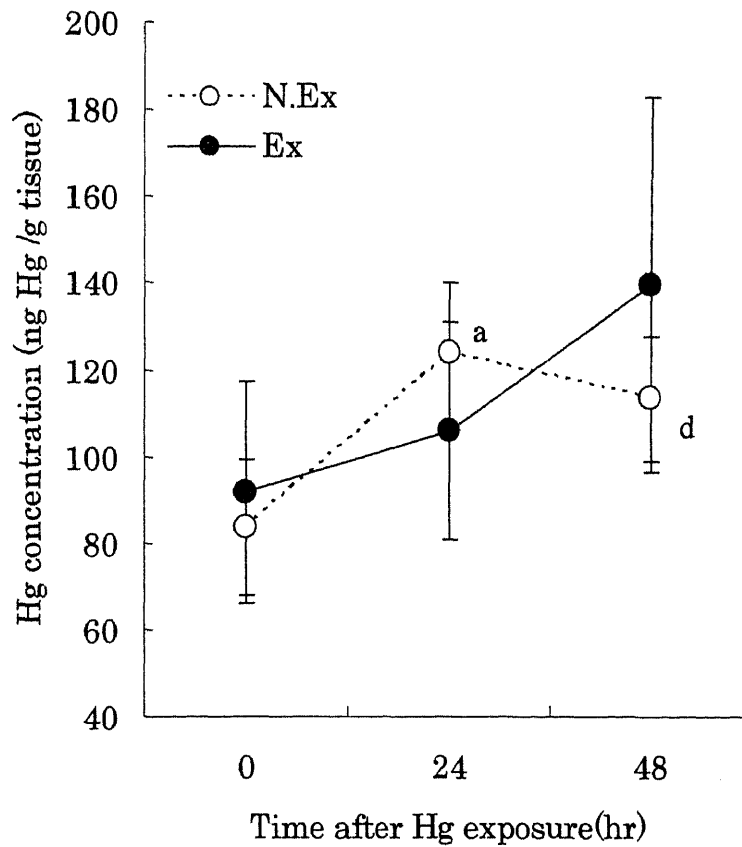


Fig. 10 Mercury concentration in liver after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g tissue) . Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised mice , a : $p < 0.01$ (0hour and 24hours) , d : $p < 0.05$ (0hour vs 48hours) .

Fig.11 に腎臓中の水銀濃度の変化を示した。N.Ex 群は暴露直後 1,000 ng/g と高い値を示し、さらに 24 時間後では 3,000 ng/g まで有意な上昇を示した。その後、48 時間後までに 2,300 ng/g 程度まで有意な減少を示した。しかし、暴露直後と比較すると 48 時間後でも有意に高い値であった。Ex 群は、N.Ex 群と同様に暴露直後に 1,000 ng/g と高い値を示し、さらに 24 時間後では 2,400 ng/g まで有意な上昇を示し、その後は有意な変化は見られなかった。Ex 群と N.Ex 群との比較では、水銀暴露 24 時間後に Ex 群に比べ N.Ex 群で有意に高い値を示した。

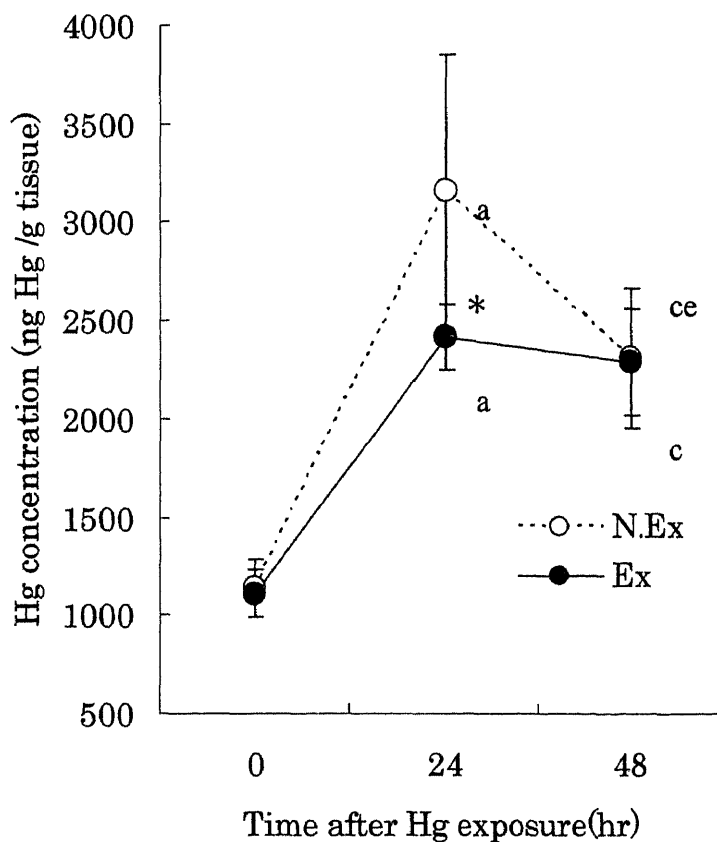


Fig. 11 Mercury concentration in kidney after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g tissue) . Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised mice , * : $p < 0.05$ (Ex vs N.Ex) , a : $p < 0.01$ (0hour and 24hours) , c : $p < 0.01$ (0hour vs 48hours) , e : $p < 0.01$ (24hours vs 48hours) .

Fig.12 に全血中の水銀濃度の変化を示した。N.Ex 群では暴露直後 90 ng/g であったが、24 時間後までに 20 ng/g まで急激に低下し、その後はほとんど変化を示さなかった。Ex 群では暴露直後に 80 ng/g を示し、24 時間後までの間ではほとんど濃度変化を示さなかった。しかし、48 時間後には 30 ng/g まで有意な低下を示した。Ex 群と N.Ex 群との比較では、水銀暴露 24 時間後に N.Ex 群に比べ Ex 群で有意に高い値を示した。

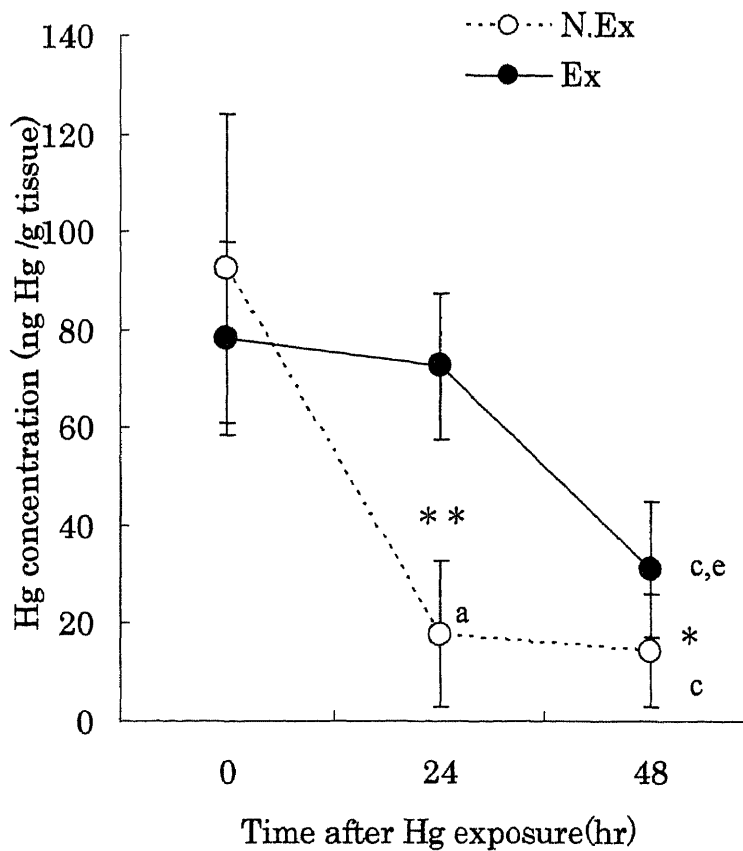


Fig.12 Mercury concentration in whole blood after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g whole blood) . Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised mice ,
 * : $p < 0.05$ (Ex vs N.Ex) , a : $p < 0.01$ (0hour vs 24hours) ,
 c : $p < 0.01$ (0hour vs 48hours) , e : $p < 0.01$ (24hours vs 48hours) .

Fig.13 に血漿中の水銀濃度変化を示した。両群とも経時的に減少する傾向を示したが、N.Ex 群では水銀暴露直後に比べ 24、48 時間後ともに有意に低い値を示したのに対して、Ex 群では 48 時間後のみで有意に低い値を示した。また、Ex 群と N.Ex 群との比較では、水銀暴露 24 時間後に N.Ex 群に比べ Ex 群で有意に高い値を示した。

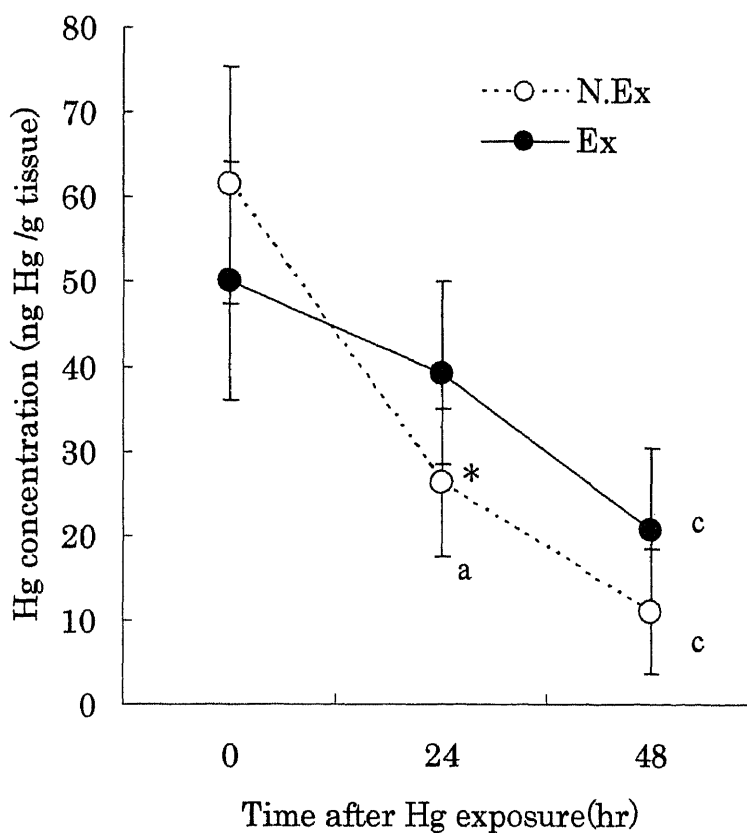


Fig. 13 Mercury concentration in plasma after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g tissue) . Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised mice , * : $p < 0.05$ (Ex vs N.Ex) , a : $p < 0.01$ (0hour vs 24hours) , c : $p < 0.01$ (0hour vs 48hours).

Fig.14 に赤血球中の水銀濃度を示した。N.Ex 群では暴露直後 50 ng/g 程度であったが、24 時間後、48 時間後と経時的に減少を示し、48 時間後では暴露直後と比べて有意に低い値であった。一方、Ex 群では暴露直後約 60 ng/g を示し、その後有意な濃度変化を示さなかった。Ex 群と N.Ex 群との比較では、水銀暴露後 24 時間と 48 時間で N.Ex 群に比べ Ex 群で有意に高い値を示した。

これらのことより、N.Ex 群に比べ Ex 群では脳、心臓、血液中での水銀の残存性が高いことが示された。また、腎臓では水銀暴露 24 時間後のみであったが、N.Ex 群が高い値を示すことが明らかになった

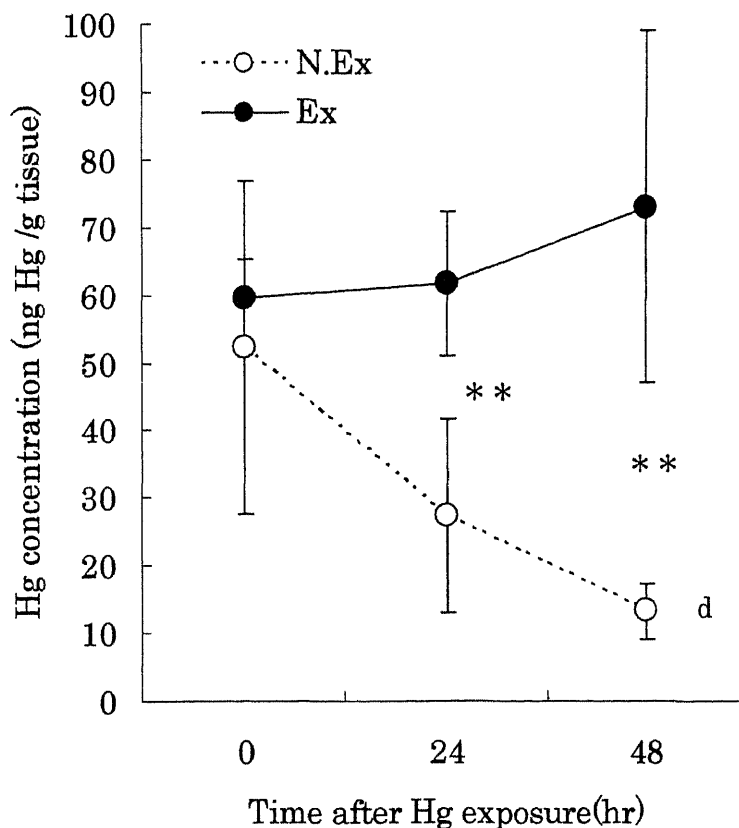


Fig.14 Mercury concentration in red blood cells after exposure to mercury vapour . Values are mean \pm SD (ng Hg / g red blood cells) . Ex : exercised mice , N.Ex : non-exercised , ** : $p < 0.01$ (Ex vs N.Ex) , d : $p < 0.05$ (0hour vs 48hours) .

1-4 考察

本研究は長期間の運動負荷によって起こる生理的な変化が、水銀蒸気に暴露されたときの体内水銀蓄積量やその排出、各臓器中への蓄積を変えるか否かを明らかにすることを目的に、マウスに9週間の運動負荷を与えて、その後安静状態で水銀蒸気に暴露して水銀の体内蓄積等について測定を行った。

今回行った運動負荷はマウスの体内の抗酸化系酵素活性を上昇させるものであった。これは、Kanter ら⁴⁰⁾の結果とほぼ一致するものであった。Kanter らは、マウスに水泳により1日50~55分間、週5日間の強度で9週間運動負荷を行った。その結果、血液中のCAT、GSHpx およびSODの活性が、安静飼育したマウスに比べ、有意に高い値となることを示している。今回の実験でも、運動負荷を与えたマウスの赤血球中のCAT、GSHpx およびSODの活性は安静飼育したマウスのものに比べ、有意に高い値を示した。さらに、Ohno ら³⁹⁾は人に対する10週間の運動負荷でも赤血球中の抗酸化系酵素活性が上昇することを明らかにしている。これらのことから、ここで観られた抗酸化系酵素の活性上昇は、運動負荷を原因とする酸化ストレスの増加に対する生体適応反応であると考えられる。また、今回行った運動負荷は、運動負荷と水銀の毒性の関係を検討するのに適当なモデルとなることが考えられた。

水銀蒸気に暴露されたとき、水銀の主要な体内吸収経路は経気道によるものである。とくに、イオン化されていない金属水銀(Hg^0)は肺胞から拡散により、速やかに血液中や肺組織に取り込まれる。血液中に入った Hg^0 は赤血球や各臓器に移行して、そこで酸化され Hg^{2+} の状態になる^{38,47)}。Magos らは生体内の Hg^0 の酸化にはCatによる H_2O_2 の消去反応がかかわっていることを示している³⁷⁾。さらにOgata らは体内Cat活性が先天的に低いacatalasemiaのマウスやヒトの赤血球を用いた研究により、Cat活性と Hg^0 の生体内酸化について詳細に調べている^{30~32,48)}。これらの研究より、生体内ではFig.2に示した反応が Hg^0 の主要な酸化反応であることが考えられる。また、Catの基質である H_2O_2 の濃度も赤血球中の水銀酸化とその蓄積性に影響を与えることが示されている³⁸⁾。

さらに、生体内では Hg^{2+} から Hg^0 への還元反応が起こっていることが明らかにされている。その反応には O_2^- がかかわっている事が示されている³⁰⁾。Ex群の赤血球中でCAT活性とSOD活性が高い値を示したことは、赤血球中での水銀の酸化還元反応が酸化の方向に進みやすい条件になっていることを示し、この赤血球内での水銀残存性が高くなった理由として考えられる。

また、赤血球においてはGSHpxによる H_2O_2 消去反応でもCATと同様に Hg^0 の酸化を行うことが示されている。しかし、その反応速度は非常に低く、生理的条件下ではCATの約1/40程度であることが示されている⁴⁸⁾。さらに、 H_2O_2 の消去に関してCATは競争的に働く⁴⁹⁾ことから、生理的条件下では赤血球の水銀取り込みを減少させる因子となる可能性も考えられる。

今回運動負荷により赤血球中のCAT活性は非運動負荷群の約1.2倍の活性値を示し、GSHpx活性は約1.4倍と、カタラーゼの活性上昇を上回るものであった。しかし、赤血球中の水銀残存性はEx群で高く、水銀の酸化量も多いことが示唆された。このことより、運動負荷によるCAT活性の上昇は水銀酸化を増加させ、GSHpx活性の上昇は

水銀酸化を大きく減少させるものではなかったことが考えられた。

赤血球と同様に他の臓器でも水銀の臓器中の蓄積には CAT による H_2O_2 消去反応がかかわっている事が示唆されている³⁷⁾。今回の実験では赤血球に加え、脳と心臓で N.Ex 群に比べ Ex 群で高い水銀の残存性が観察された。しかし、脳と心臓中の CAT 活性は N.Ex 群と Ex 群との間で差は見られなかった。このことより、今回、脳および心臓で見られた N.Ex 群と Ex 群との水銀濃度の違いは、臓器中 CAT 活性によるものでなく、血液中の水銀濃度の違いや、臓器中の H_2O_2 の生成量の違いなど CAT 活性以外の条件によることが考えられる。

本研究では、長期運動負荷を与えたマウスと安静飼育したマウスを水銀蒸気に暴露して体内水銀量の変化を経時的に測定した。その結果、水銀の総取り込みと総排出に差は見られなかったが、運動負荷を与えたマウスでは水銀の血液中の残存性が高くなったり、標的臓器の一つである脳や心臓内の水銀蓄積性が高まることが明らかになった。しかし、無機水銀の急性、亜急性中毒時の主要な標的臓器である腎臓中の水銀濃度は、一時的ではあるが、運動負荷を与えたマウスでは低くなることが明らかになった。

このように、長期の運動負荷は水銀の生体内動態を変化させる後天的な因子であることが明らかになった。序章でも述べたように、水銀の毒性を変化させる因子の研究は重要視されている。そのため、運動負荷と水銀毒性の発現に関してさらに詳しく調査することは重要な課題であると考えられる。

第 2 章

無機水銀の腎毒性に及ぼす運動負荷の影響

2-1 目的

第1章で述べたように、金属水銀 (Hg^0) は蒸気として呼吸器に吸入されると、80%以上の吸収率で体内に取り込まれる。吸収された Hg^0 は肺や赤血球および各臓器で酸化されて Hg^{2+} となり体内に貯留して、細胞障害を引き起こす。このような水銀の毒性発現は各臓器の水銀蓄積性と、臓器の水銀に対する感受性によって変化すると考えられる。すなわち、水銀の蓄積性の高い臓器は標的臓器として障害を受けやすく、また、同程度の水銀蓄積量であっても感受性の高い（細胞障害性の高い）組織では重大な影響を受けることになる²⁰⁾。

第1章では長期運動負荷を与えたマウスを水銀蒸気に暴露した時の血液中の水銀残存性や脳内水銀濃度が、運動負荷を与えていないマウスに比べ高くなること等を示し、長期運動負荷が水銀の生体内動態を変化させる後天的な因子であることを明らかにした。

第2章では第1章の結果から毒性発現の検討が必要であると考えられたため、長期的な運動負荷が無機水銀による腎障害の発症に影響を及ぼすか否かを検討することを目的として、水泳により長期運動負荷を与えたマウスと運動負荷を与えずに飼育したマウスに塩化第二水銀 (HgCl_2) を投与して、水銀の腎臓内蓄積量や尿中の蛋白、糖を経時的に測定して、運動負荷が無機水銀投与による腎機能障害を変化させる後天的な因子であるか否かを検討を行った。

さらに、無機水銀による毒性発現機構の1つとして、活性酸素種による細胞障害があることを示唆する報告がなされている^{50,51)}。そのため、本研究では無機水銀による腎障害発症に活性酸素種による細胞膜障害が関与しているか否かをあわせて検討するために、水銀投与後の腎臓中の過酸化脂質量を測定し、検討を行った。

2-2 方法

実験動物と運動負荷

ICR 系のマウス (5 週齢) を無作為に運動負荷群と非運動負荷群に分け、運動負荷群は第 1 章で行ったのと同様の方法⁴⁰⁾で、1 日 1 時間、週 5 日間の頻度で 9 週間の運動負荷を行った。実験期間中マウスは 12 時間の明暗サイクル、気温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 55% の人工気象室内で飼育を行った。固形飼料 (CE2、日本クレア) および水の摂取は自由摂取とした。運動負荷は明期に入ってから約 3 時間までの間に行った。9 週間の運動負荷を行った後、1 日の安静期間をおき、水銀もしくは生理食塩水の投与を行った。実験群は、運動負荷を行い水銀を投与した群 (Ex+Hg 群)、運動負荷を行い生理食塩水を投与した群 (Ex 群)、運動負荷を行わず水銀を投与した群 (N.Ex+Hg 群)、運動負荷を行わず生理食塩水を投与した群 (N.Ex 群) の 4 群を設定した。腎障害の指標となる尿中の蛋白質および糖の測定実験の流れを Fig.15 に示した。

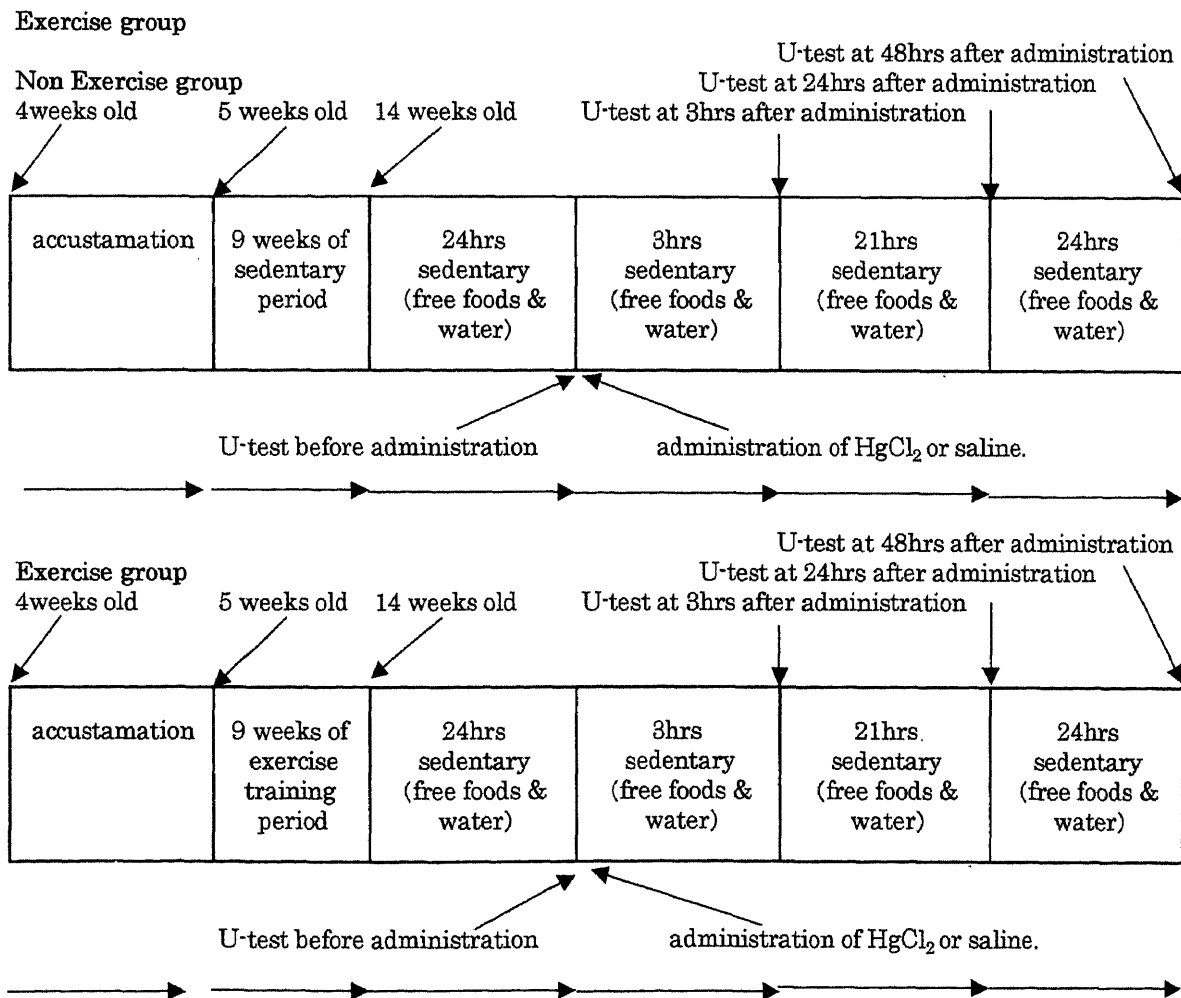


Fig. 15 Experimental procedure for preparation of animals for U-Test administered HgCl_2 or saline.
U-Test : urinary test

無機水銀の投与、尿検査および剖検

投与液は、塩化第二水銀（試薬特級、Sigma co.ltd.）を生理食塩水で溶解して 100 mg (as Hg) / l の濃度に調整して、3.0 mg(as Hg)/kg(体重)の割合で背部皮下に 1 回投与を行った。また、投与対照群は 30 ml/kg(体重)の生理食塩水を背部皮下に投与した。

尿検査は各投与液投与前、投与後 3 時間、投与後 24 時間および投与後 48 時間の 4 時点で採尿して、エームス試験紙（三共）を用いて尿蛋白および糖の測定を行った。判定は尿蛋白、糖ともに－、±、＋、2＋、3＋、4＋の 6 段階の濃度評価で行った。

腎臓中の水銀濃度および過酸化脂質測定実験の流れを Fig.16 に示した。

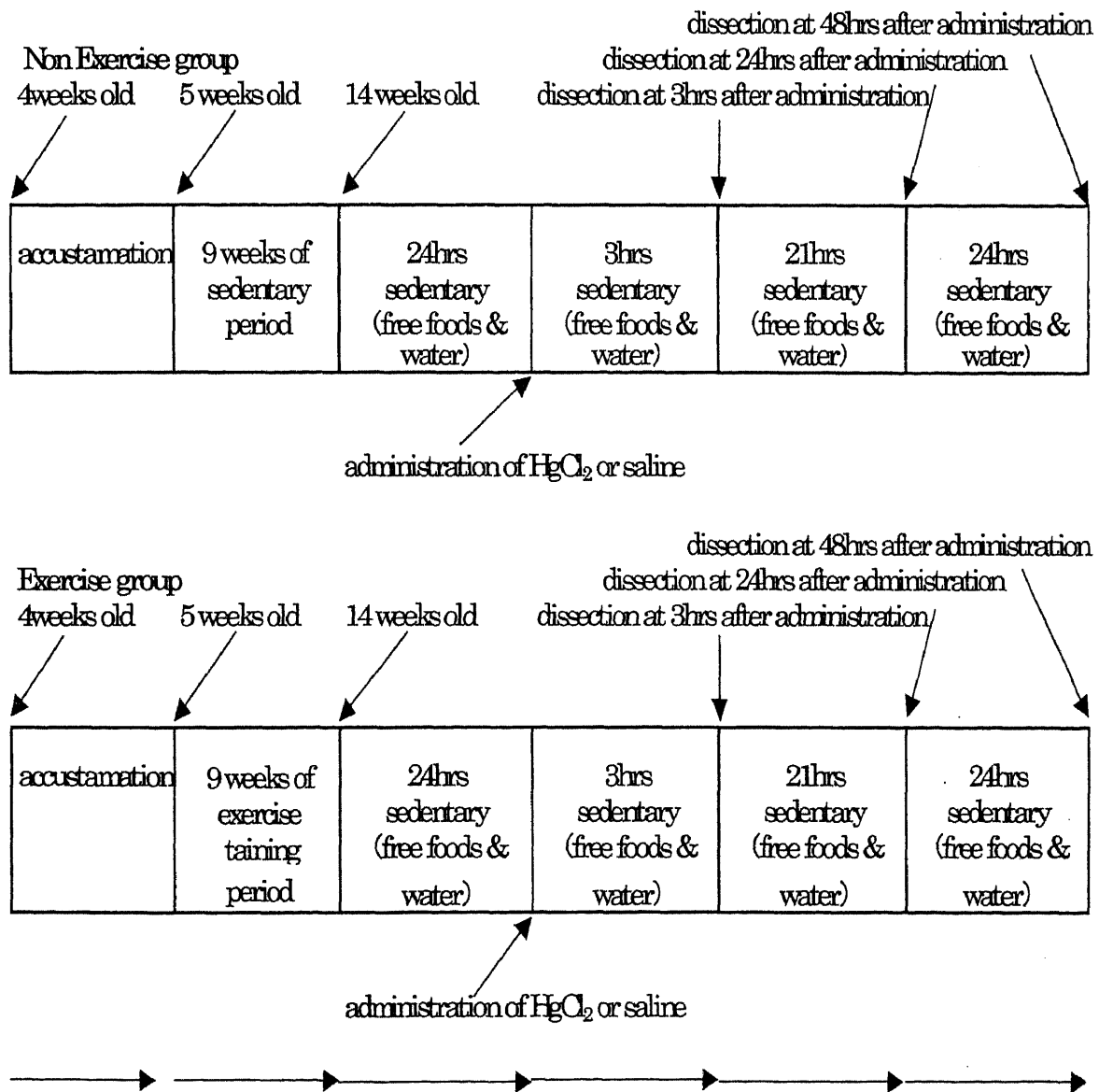


Fig. 16 Experimental procedure for preparation of animals for measurement of Hg concentration and MDA concentration in kidney

腎臓中の水銀濃度および過酸化脂質の測定を行うため、各投与液の投与後 3 時間、投与後 24 時間および投与後 48 時間の 3 時点で、各群 5 匹を無作為に選び、エーテル深麻酔下で心採血を行い生理食塩水で心灌流をして脱血を行った後、左右の腎臓を摘出した。片方の腎臓は水銀測定用として秤量して 100 ml のガラス容器に入れた。もう片方の腎臓は超低温用のサンプルビンに入れ窒素封入して -80°C で保存した。

腎臓中水銀濃度の測定

腎臓中の水銀濃度の測定は、1 章で示したのと同様の方法で、湿式灰化・還元気化原子吸光法^{45,46)}により総水銀濃度として測定した。水銀測定用の腎臓は秤量して 100 ml のガラス容器に入れた後に、直ちに硝酸 5ml を加え室温で約 1 日放置し、十分に液化したことを確認し、蒸留水：硫酸=1：1（体積比）に希釈した硫酸 5 ml を加え、さらに飽和化マンガン酸カリウム水溶液 10 ml を加え、発泡が治まった後に飽和化マンガン酸カリウム水溶液 30 ml を追加して、1 週間室温で放置した。その後、40%塩酸ヒドロキシルアミン水溶液 4 ml を加え攪拌した後に、全量が 70 ml になるまで蒸留水を加えた。

ガラスボールを用いた洗気ビン中で、一定量の上記の試料に 2N H_2SO_4 を加えて全量を 20 ml にした後に、10%塩化第一スズ (in 2N H_2SO_4) を 1 ml 加えて水銀の還元を行った。エアープンプにより暴気して、気化した水銀をフレイムレス原子吸光装置（スギヤマゲン 253 型水銀分析計）により検出した。塩化第二水銀を 2N H_2SO_4 で希釈して水銀標準液として、上記の方法で測定し、得られた値から最小 2 乗法により検量線を求め、臓器中水銀濃度を算出した。

得られた結果は、臓器 1 g（湿重量）に対する水銀量 ($\mu\text{g/g}$) で表した。

腎臓中過酸化脂質の測定

腎臓は 10 倍量の 1.15% KCl を加え、テフロンホモジナイザーを用いて窒素ガス気流下で十分に破碎して試料とした。過酸化脂質の定量は過酸化脂質の分解によって生じるマロンジアルデヒド (MDA) がチオバルビツール酸と縮合した結果生じる赤色物質を 532 nm で比色定量する Asakawa らのチオバルビツール酸 (TBA) 法⁵²⁾で行った。測定試料中の蛋白質はプロテインアッセイキット (Bio-Rad 社製) を用い Bradford 法⁵³⁾で測定した。Double Bean U.V.2000 Spectrophotometer (島津製作所) を用いて、595 nm における吸光度を測定した。また、標準物質として牛血清アルブミンを蒸留水に希釈して、同様の方法で測定した値から検量線を作成して、試料中の蛋白質量を求めた。得られた結果は試料中の蛋白質 1 mg あたりのマロンジアルデヒド (MDA) 量 (nmol/mg protein) として表した。

データ処理および統計処理

尿検査の結果は Willcoxon-Mann Whitney test により各群の間での有意差検定を行った。また、腎臓中の水銀濃度および MDA 濃度は one-way ANOVA により分散分析を行った後に、各群間の有意差検定を行った。

2-3 結果

運動負荷期間中、マウスの体重は運動負荷群、非運動負荷群ともに標準的な増加を示し、運動負荷終了時において両群間の体重に有意差は見られなかった。

尿検査

尿中の蛋白質の変化を Fig.17 に示した。

水銀投与前の尿中の蛋白質は運動負荷の有無にかかわらず、±もしくは+を示し特に差は見られなかった。また、生理食塩水投与群では全ての検査で±もしくは+を示し、特に変化は見られなかった。水銀投与後 3 時間では Ex+Hg 群、N.Ex+Hg 群ともに 5 匹中 4 匹が 2+ を示し、それぞれ Ex 群、N.Ex 群に比べ有意($P<0.01$)に高い値となった。

また、投与後 24 時間では Ex+Hg 群では 3 匹、N.Ex+Hg 群では 5 匹が 3+ を示し、高濃度の尿蛋白が検出された。投与後 3 時間と同様に、それぞれの群の生理食塩水投与群に比べ有意($P<0.01$)に高い値となった。さらに、投与後 48 時間では Ex+Hg 群の 4 匹が 3+、1 匹が 2+ で、Ex 群に比べ有意($P<0.01$)に高い値となったのに比べ、N.Ex+Hg 群では 4 匹が 2+、1 匹が + とすべての個体で低下して N.Ex 群との間に有意差は見られなかった。

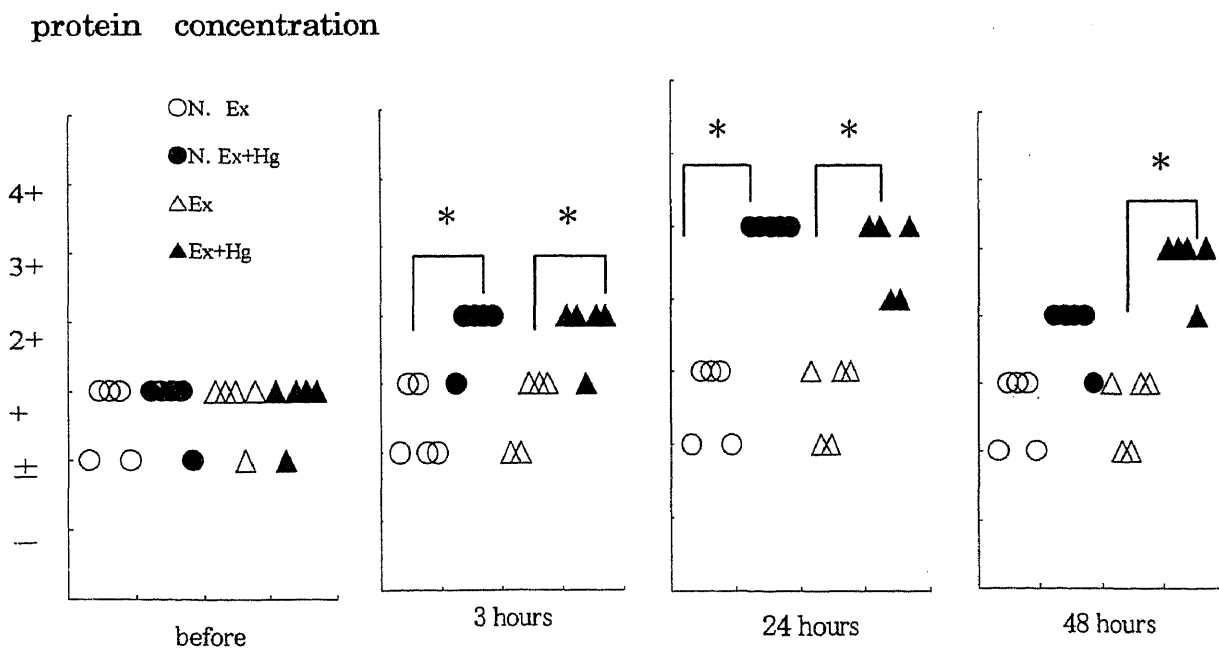


Fig. 17 Effects of inorganic mercury administration on urinary protein concentration in the exercised mice or non exercised mice . N.Ex : non exercised and saline administered mice , Ex : exercised and saline administered mice , N.Ex+Hg : non exercised and HgCl₂ administered mice , Ex+Hg : exercised and HgCl₂ administered mice , * : $P<0.01$.

尿中の糖濃度の変化を Fig.18 に示した。

尿中の糖は、投与前および投与後 3 時間ではどの群も-のみで、全く検出されなかった。また、生理食塩水投与群では投与後どの時点でも糖は検出されなかった。一方、水銀投与後 24 時間の Ex+Hg 群では 3 匹が 3+ を示した。N.Ex+Hg 群は 2 匹が 3+ を示し、3 匹が 2+ であり、N.Ex 群に比べ有意($P<0.01$)に高い値となった。さらに、投与後 48 時間では Ex+Hg 群で 1 匹が 3+、1 匹が 2+、他の 3 匹が ± を示し、Ex 群に比べ有意($P<0.01$)に高い値となった。N.Ex+Hg では 1 匹が + を示したのみで、他の 4 匹は - を示し、N.Ex 群との間に差は見られなかった。

glucose concentration

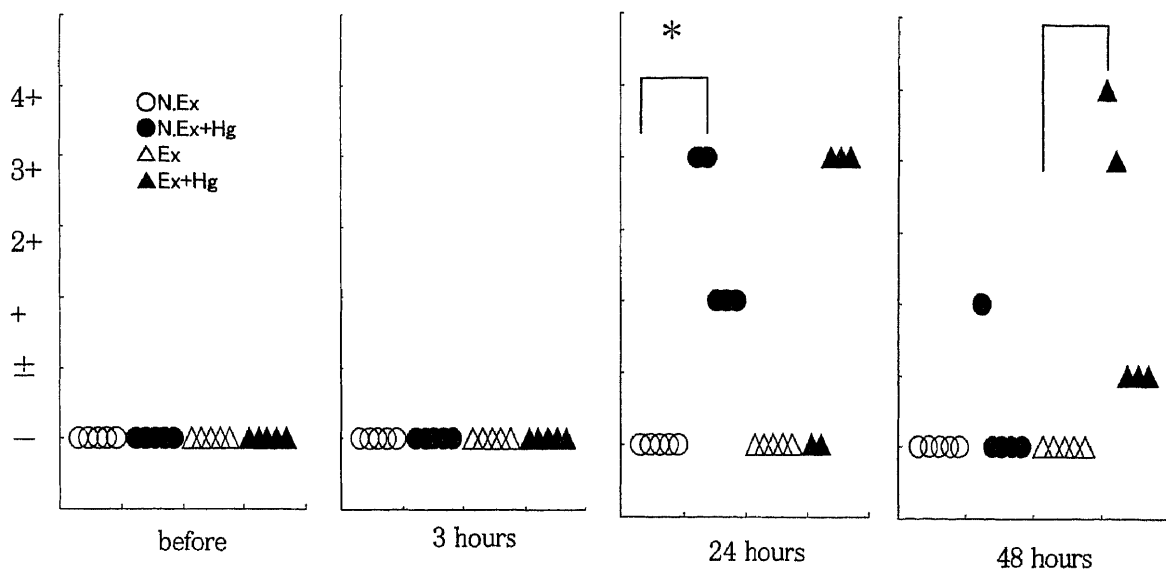


Fig. 18 Effects of inorganic mercury administration on urinary glucose concentration in the exercised mice or non exercised mice . N.Ex : non exercised and saline administered mice , Ex : exercised and saline administered mice , N.Ex+Hg : non exercised and HgCl₂ administered mice , Ex+Hg : exercised and HgCl₂ administered mice , * : $P<0.01$.

腎臓中の水銀濃度

腎臓中水銀濃度を Fig.19 に示した。

Ex+Hg 群、N.Ex+Hg 群ともに Ex 群、N.Ex 群に比べ全ての時点で有意に高い値を示した。また、Ex+Hg 群と N.Ex+Hg を水銀投与後の各 3 時点で比較した場合、両群間に有意な差は見られなかった。

一方、Ex+Hg 群および N.Ex+Hg 群それぞれを経時的に比較した場合、Ex+Hg 群は投与後 3 時間が最も高い値を示し、24 時間後、48 時間と経時的に減少を示した。有意差検定の結果、投与後 3 時間と投与後 24 時間($p < 0.05$)および投与後 3 時間と投与後 48 時間($p < 0.01$)との間で有意差が見られた。また、N.Ex+Hg 群でも投与後 3 時間が最も高い値を示し、24 時間後、48 時間と経時的に減少を示した。統計的な有意差は、投与後 3 時間と投与後 48 時間($p < 0.01$)との間でのみ検出された。

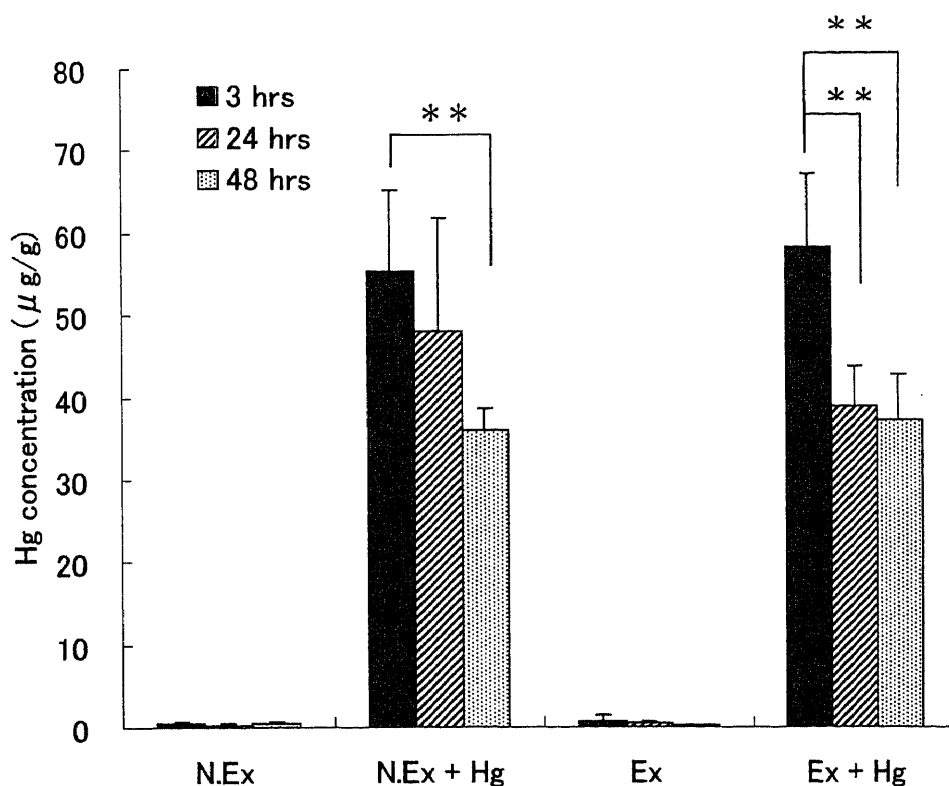


Fig. 19 Hg concentration in kidney at 3,24,48 hours after administration of HgCl₂ or saline in exercised or non exercised mice . Values are mean \pm SD (μ g/g tissue) . N.Ex : non exercised and saline administered mice, Ex : exercised and saline administered mice, N.Ex+Hg : non exercised and HgCl₂ administered mice, Ex+Hg : exercised and HgCl₂ administered mice. ** : $p < 0.01$.

腎臓中の過酸化脂質濃度

腎臓中の MDA 濃度を Table 2 に示した。投与後全ての時間で Ex+Hg 群、Ex 群、N.Ex+Hg 群、N.Ex 群の 4 群間における腎臓中 MDA 濃度に有意な差は見られなかった。また、それぞれの群内での投与後の 3 時点での MDA 濃度を比較した結果、全ての群において経時的な変化は観察されなかった。

Table 2 MDA concentration in kidney at 3, 24, 48 hours after administration of HgCl₂ or saline in exercised or non exercised mice .

condition	time after administration of HgCl ₂		
	3 hrs	24 hrs	48 hrs
N.Ex	0.41 ± 0.24	0.37 ± 0.10	0.48 ± 0.21
N.Ex + Hg	0.38 ± 0.08	0.40 ± 0.06	0.37 ± 0.04
Ex	0.47 ± 0.14	0.44 ± 0.09	0.42 ± 0.02
Ex + Hg	0.42 ± 0.12	0.40 ± 0.08	0.43 ± 0.07

Values are mean ± SD (nmol MDA/mg protein). N.Ex : non exercised and saline administered mice, Ex : exercised and saline administered mice, N.Ex+Hg : non exercised and HgCl₂ administered mice, Ex+Hg : exercised and HgCl₂ administered mice

2-4 考察

尿中の蛋白質および糖は腎障害の指標として一般的に用いられる⁵⁴⁾。今回の結果では、マウスに塩化第二水銀を 3.0mg(as Hg)/kg(body weight)背部皮下に投与すると、投与後 3 時間と比較的早い時期から尿中に蛋白および糖が検出されて、腎機能に障害が出ることを示された。また、尿中の蛋白濃度の増加は、糖が検出されるより早期から見られることが明らかとなり、尿蛋白は糖に比べ水銀毒性の鋭敏な指標となることを示された。

N.Ex+Hg 群の尿蛋白は、投与後 24 時間で最も高い値を示し、48 時間後には減少しているのに対して、Ex+Hg 群は 48 時間後まで上昇を続けている。さらに、糖では N.Ex+Hg 群が投与 24 時間後に、N.Ex 群に比べ有意に高い値を示した後、48 時間後では低下しているのに対して、Ex+Hg 群では 48 時間後に Ex 群に比べ有意に高い値を示した。このことから、無機水銀投与前の長期運動負荷は、無機水銀による腎機能障害を延長もしくは回復を遅延させることが考えられた。さらに、腎臓中の水銀濃度の変化から、運動負荷を与えたマウスでは、運動負荷を与えなかったマウスよりも早く腎臓からの水銀排出が起っていることが示された。これらの結果から、長期の運動負荷は無機水銀による腎障害を変化させる後天的要因の 1 つであることが示唆された。

水銀化合物の毒性発現に活性酸素が関与しているとの報告がある^{50,51)}。しかし、今回の実験では、塩化第二水銀を投与したマウスの腎臓中の MDA 濃度が生理食塩水を投与したマウスの腎臓中の値と変わらなかったことより、今回のような塩化第二水銀 1 回投与による急性の腎毒性の発現には、TBA 反応で検出できるような、活性酸素による脂質の過酸化は関与していないことが示唆された。この結果は、Paller の結果⁵¹⁾を支持するものであった。

第3章

無機水銀による神経系細胞の細胞死

3-1 目的

金属水銀取り扱い中の事故等による水銀蒸気に対するヒトの暴露では、神経症状が発現することが知られている^{14,17,18,55~57}。電荷をもたない金属水銀は脳血液関門を容易に通過して、脳内に進入した後に酸化を受けて、2価の水銀イオン (Hg^{2+}) の形で神経細胞障害を発現すると考えられている^{19,21}。

水銀化合物の細胞毒性に関しては、マウスのグリオーマやニューロblastomaなど株化細胞を用いた研究が行われ、細胞の生存率や増殖率に対する水銀の影響や、機能的なものに関しては、蛋白質の合成能やDNA・RNAの合成能に対する水銀の影響が調べられている⁵⁸。また、神経細胞に関しては初代培養系を用いる方法が試行されている。しかし、神経系の初代培養系は細胞の分離技術の煩雑さや、神経細胞の回収率の低さ、分離・回収時の細胞に対するダメージなどが問題となり、使用することの障害となっている。

そのため、本研究では無機水銀の神経系細胞への影響を検討するための1モデルとして、最近多くの分野で利用されている神経系の細胞株であるPC12細胞を用いて、無機水銀の細胞影響の検討を行った。PC12細胞はラットの副腎より得られた褐色細胞腫由来の株化細胞で、神経成長因子(NGF)に反応して神経突起の伸長や、カテコールアミン合成促進等の神経細胞様の分化を起こす細胞で、神経細胞の分化機構に関する研究で多くの報告がなされている⁵⁹。

無機水銀による細胞への影響を、細胞の生存率から検討を行ったが、その際、低濃度暴露時に見られるPC12細胞の細胞死を光学顕微鏡で観察した結果、小体状になり細胞死を起こす形態変化が観察された。これまでは、水銀による神経障害は細胞壊死によるものであるという説が主なものであったが、この結果は、比較的低濃度の無機水銀暴露時にはapoptosis様の細胞死が起こっていることを示唆するものである。

そこで3章ではさらに、無機水銀に暴露したと時のPC12細胞の細胞死が、細胞死に先行する蛋白合成を必要とする細胞死であるか否かを検討するために、あらかじめNGF処理により神経細胞様に分化させたPC12細胞に、RNA合成阻害剤actinomycin D (Ac D)、蛋白合成阻害剤cycloheximide (Cyc)もしくはエンドヌクレアーゼ阻害剤aurintricarboxylic acid (ATA)処理をした後に無機水銀に暴露した場合に、その細胞死が抑制されるか否かについて検討を行った。

3-2 方法

細胞株と培養条件

今回使用した PC12 細胞は理化学研究所細胞バンクより供与されたものを、Mesner らの方法⁶⁰⁾に従い、継代維持し増殖させたものを実験に使用した。継代中細胞は 75 cm² のプラスチックフラスコ中で培養を行った。提供された時点から 3~4 回の継代の後、増殖した細胞をカルシウム・マグネシウム不含のダルベッコ磷酸緩衝液 (Ca, Mg free-PBS) 中でパスツールピペットを用いて分散させ、遠心分離を行い細胞を回収した後、30%牛胎仔血清 (FBS) および 10%ジメチルスルフォキシド (DMSO) を含む DF 培地中で分散させ、1 ml セラムチューブに分取して液体窒素中で保存した。上記で分取した細胞を解凍の後、3~4 回継代して増殖活性が高まったところで、各実験に使用した。インキュベータ内は 37±1℃、20%O₂、5%CO₂に調整した。

NGF による細胞分化

増殖した細胞は Ca, Mg free-PBS 中でパスツールピペットを用いて分散した後に、遠心分離で細胞を回収し、10%牛胎児血清を含む DF 培地中で分散し、96well のマイクロプレートに 2000 cells/well の密度になるよう分注した。マイクロプレートに移してから 24 時間経過して、細胞が well の底面に付着・安定した後、分化用の DF 培地 (2%の牛胎児血清、5 μg/ml の transferrin、5 μg/ml の insurin、20 mM の progesterone および 10 μM の 5-fluorodeoxyuridine を含む) 中で、NGF (100 ng/ml) を加えて 2 週間培養を行い分化させた。

水銀暴露

上記の方法で 96well マイクロプレート上で NGF を作用させ分化させた細胞を、HgCl₂ を 1 μM~50 μM の濃度で含む分化用の DF 培地中で NGF (100 ng/ml) を加えて培養し、24 時間後に光学顕微鏡による形態観察および MTT 法による生細胞数の測定を行った。MTT 法は Hansen ら⁶¹⁾の方法に従い行った。水銀暴露終了後に well を DF 培地で静かに 1 回洗い、100 μl の分化用の DF 培地を入れた。10 μl の MTT (5 mg/ml) 溶液を加えて 37℃で 2 時間インキュベーションを行い、100 μl の Lysing buffer (20%SDS, 50%DMF) を加えて、さらに 20 時間インキュベートした。吸光度 (OD 値) の測定は、マイクロプレートリーダー (MTP-32 CORONA) により行った。

吸光度として得られたデータは、細胞数と吸光度 (OD 値) の回帰直線 (Fig. 20) から生存細胞数を求めた。

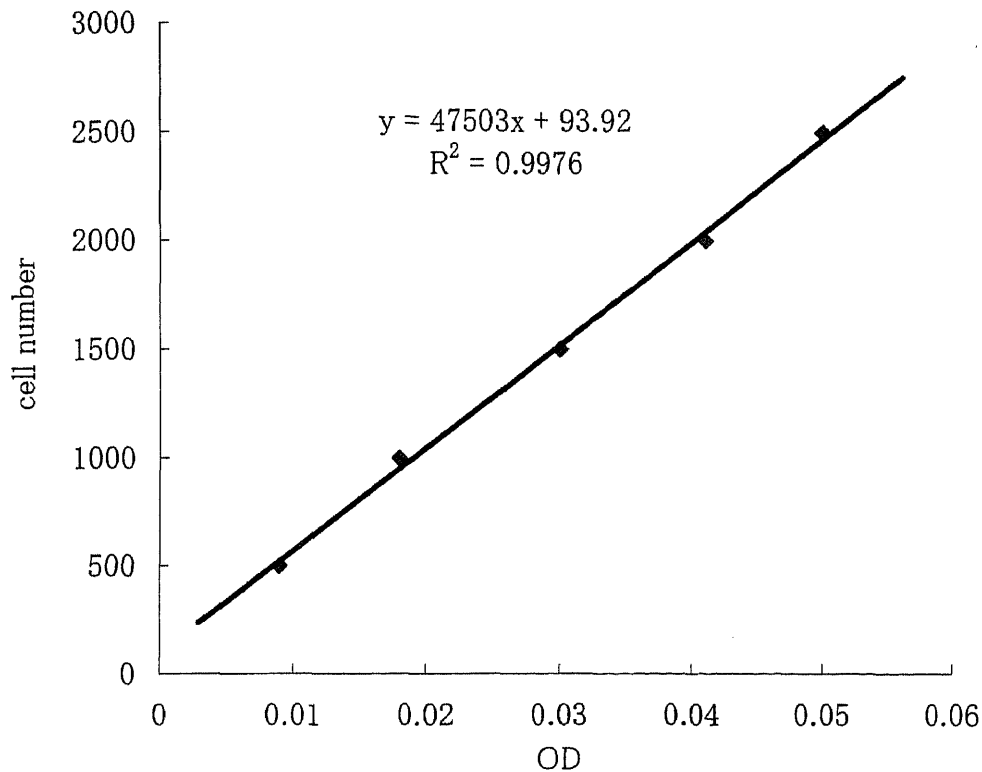


Fig. 20 Correlation between cell number and OD at 550nm by MTT assay

各種薬剤添加と水銀暴露

2週間の分化期間の後に、NGFを含む分化用の培地中で、蛋白合成阻害剤 actinomycin D (Ac D) を $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、RNA 合成阻害剤 cycloheximide (Cyc) を $10\mu\text{g}/\text{ml}$ もしくはエンドヌクレアーゼ阻害剤 aurintricarboxylic acid (ATA) を $30\mu\text{M}$ の濃度で添加して、さらに塩化第二水銀を各濃度（最終濃度として $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $30\mu\text{M}$ ）で加えて培養を行った。水銀を添加して24時間培養した後に、細胞の生存率を MTT 法で測定した。

MTT 法は上記と同様の Hansen ら⁶¹⁾の方法を一部修正して行った。まず、金属暴露終了後に well を D F 培地で静かに1回洗い、 $100\mu\text{l}$ の分化用の D F 培地をいれた。 $10\mu\text{l}$ の MTT ($5\text{mg}/\text{ml}$) 溶液を加えて 37°C で2時間放置した。その後、 $100\mu\text{l}$ の Lysing buffer (20%SDS, 50%DMF) を加えて、さらに20時間インキュベーションを行った。OD 値の測定は、マイクロプレートリーダー (MTP-32 CORONA) により行った。

吸光度として得られたデータは、細胞数と吸光度 (OD 値) の回帰直線 (Fig. 20) から生存細胞数を求めた。

データ処理および統計処理

得られたデータはコントロール（水銀暴露及び薬剤添加を行っていないもの）の値を100%とする相対値で表した。さらに、各種薬剤添加を行った実験では、金属暴露のみを行った群と薬剤を作用させてから金属暴露を行った各群とを比較するために、統計処理を行った。統計処理はまず、one way - ANOVA を行い有意差 ($p < 0.05$) がみられたので、Fisher's PLSD によって各群間の検定を行った。

3-3 結果

細胞増殖と NGF による細胞分化

理化学研究所より供与された細胞は、解凍後 2~3 日で速やかに増殖をはじめ、75 ml のフラスコの底面を約 90% 覆うまでに増殖した段階で継代を行った。増殖は非常に良好で、3~4 回継代を行った後に回収し凍結保存を行った。実験に使用するために解凍した細胞も同様に正常の増殖活性を示し 3~4 回の継代を行った後に 96 well のマイクロプレートに移し、分化用の D/F 培地中で NGF を添加して分化誘導を行った。NGF を加えてから 4 から 5 日目から急激な形態変化を示して、神経細胞様の突起を多数伸ばした。約 2 週間で急激な形態変化は止まり、その後同様の条件で培地交換を行いながら培養を続けると、2 週間以上安定した状態でその形態を保っていた (Fig.21)。

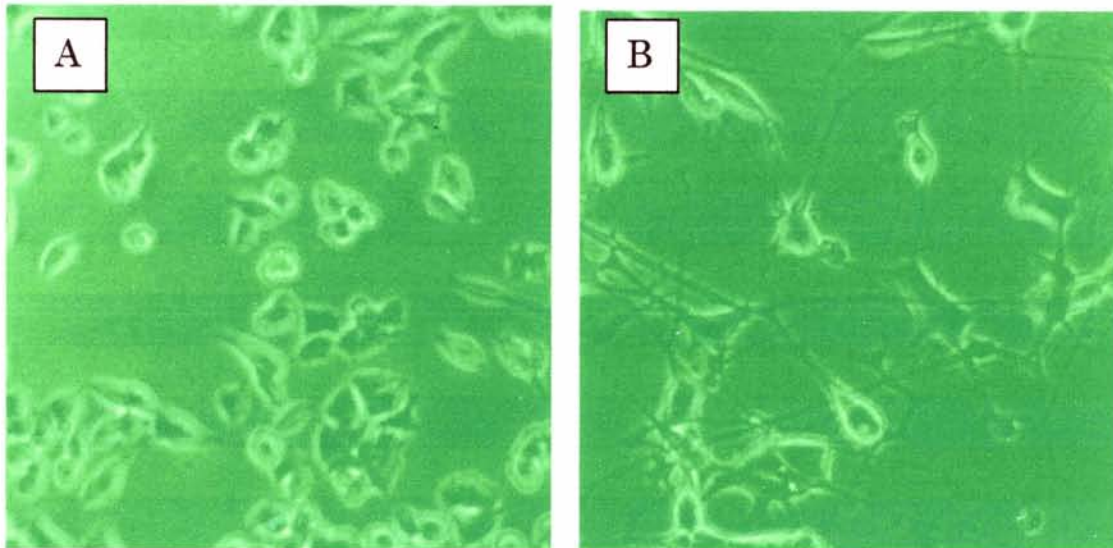


Fig. 21 Morphological changes of PC12 cells by NGF .
A : before , B : after 2weeks culture with NGF.

無機水銀暴露による PC12 細胞の細胞死

HgCl₂ を 1 μM ~ 50 μM の濃度で含む培地に暴露したときの PC12 細胞の生存率を、水銀暴露を行っていないものを 100% とした相対値で表した (Fig.22)。

1 μM ではほとんどの細胞が生存しており、形態的な変化もほとんど観察されなかった。しかし、10 μM では 80% 強の生存率で、さらに 20 μM では 35% の生存率を示し、多くの細胞が細胞死を起こしていた。50 μM ではほとんどの細胞が死滅しており、神経突起はほとんど残らず、小体状のものも含めて細胞の形態をとどめるものが少なくなっていた。

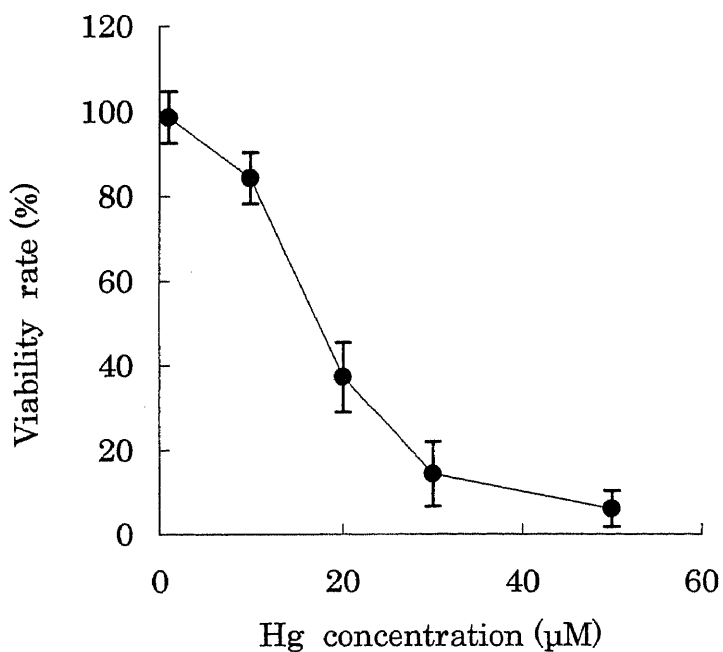


Fig. 22 Viability rate of neuronal PC12 cells exposed to HgCl₂

Fig. 23 は NGF により神経細胞様に分化した PC12 細胞 (A) に HgCl_2 ($20 \mu\text{M}$) を添加した培地中で 24 時間培養したときの細胞 (B) の形態の変化を示した位相差顕微鏡像である。NGF により 2 週間分化させた細胞は多数の突起を伸展させて、神経細胞様の形態を示した。しかし、その後水銀を含む培地中で 24 時間培養した細胞では、突起をなくし丸い形態を示すものや、小体状になり MTT 反応を示さないものが観察された。

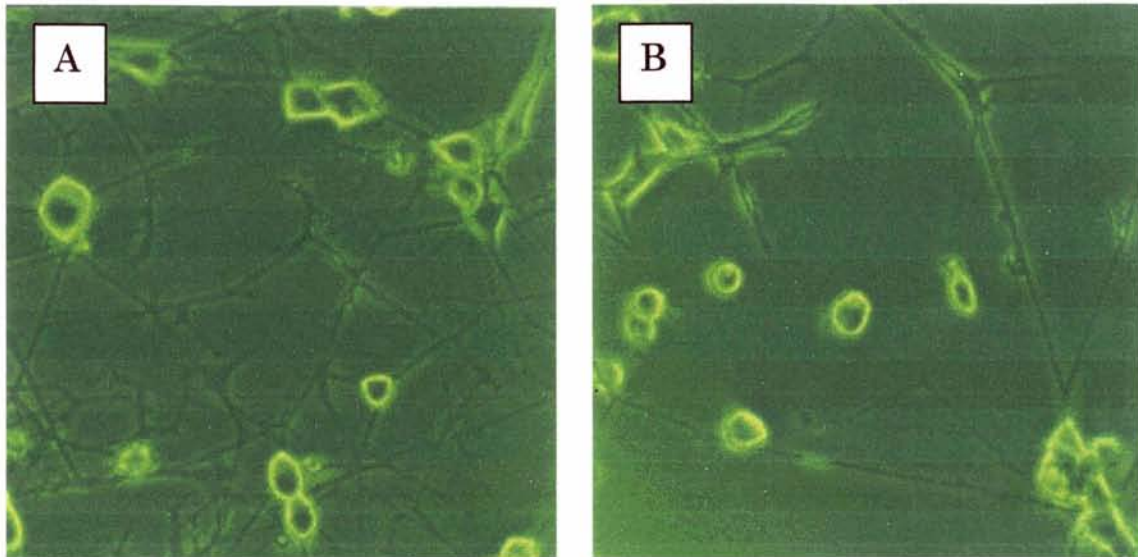


Fig. 23 Morphological changes of neuronal PC12 cells following exposure to HgCl_2 . A : control , B : exposed to HgCl_2

各種薬剤処理による細胞死の抑制効果

Fig.24 には 10 μ M の濃度の HgCl₂ に暴露したときの細胞死に対する Cyc、Ac D 及び ATA の効果を示した。HgCl₂ のみを培地中に添加したものは約 84% の生存率であった。しかし、Cyc を作用させた場合、その生存率は 89% 程度となり、HgCl₂ のみに暴露したものに比べて有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。Ac D 及び ATA でも水銀のみを添加したものに比べ高い生存率を示したが、有意差は見られなかった。

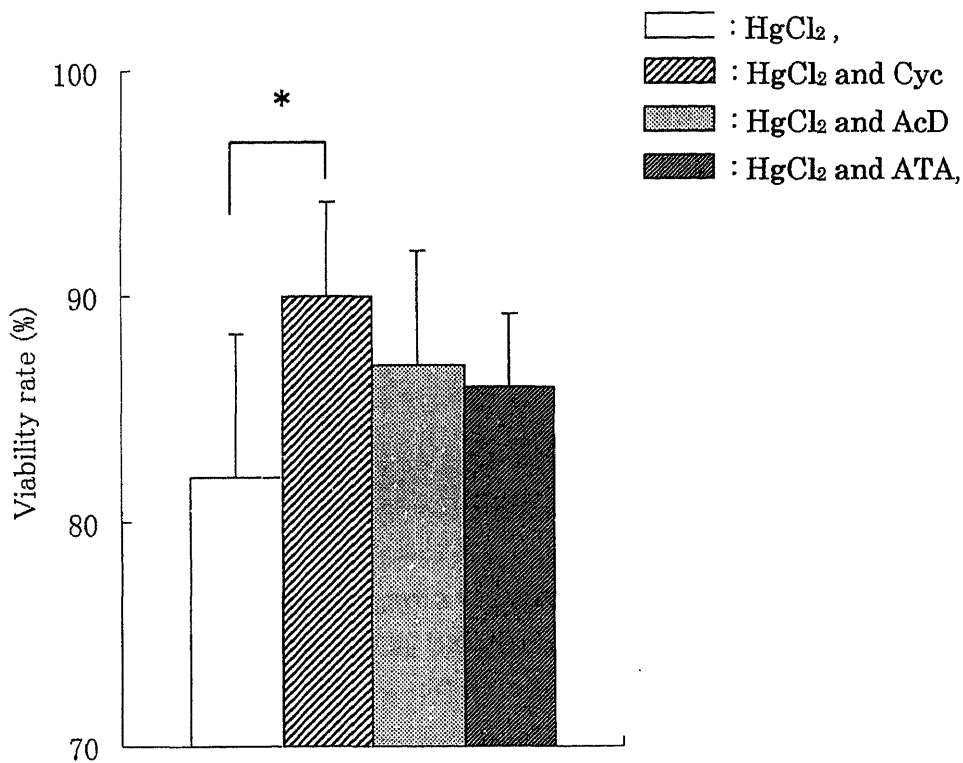


Fig. 24 Ability of agents to block cell death following HgCl₂ (10 μ M) exposure.,

N=4, * : $p < 0.05$,

Cyc : 10 μ g/ml cycloheximide ,

AcD : 2 μ g/ml actinomycin D ,

ATA : 30 μ M aurin tricarboxylic acid.

Fig.25 には 20 μ M の濃度の HgCl₂ に暴露したときの細胞死に対する Cyc、Ac D 及び ATA の効果を示した。HgCl₂ のみに暴露した群は約 35% の生存率であった。各種薬剤の効果は、水銀 10 μ M に暴露したときと同様の傾向を示し、水銀のみに暴露したものと Cyc を作用させたもの間に有意差 ($p < 0.01$) がみられた。

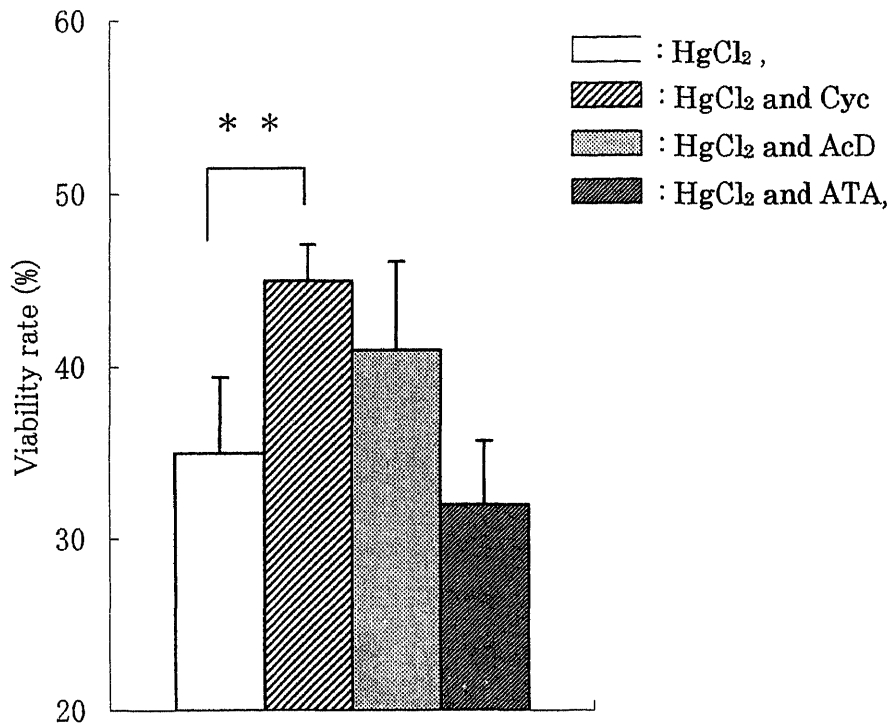


Fig. 25 Ability of agents to block cell death following HgCl₂ (20 μ M) exposure.
 N=4, ** : $p < 0.01$.
 Cyc : 10 μ g/ml cycloheximide ,
 AcD : 2 μ g/ml actinomycin D ,
 ATA : 30 μ M aurin tricarboxylic acid.

Fig.26 には 30 μ M の濃度の HgCl_2 に暴露したときの細胞死に対する Cyc、Ac D 及び ATA の効果を示した。 HgCl_2 のみに暴露した群は約 12%の生存率であった。各種薬剤の効果は見られなかった。

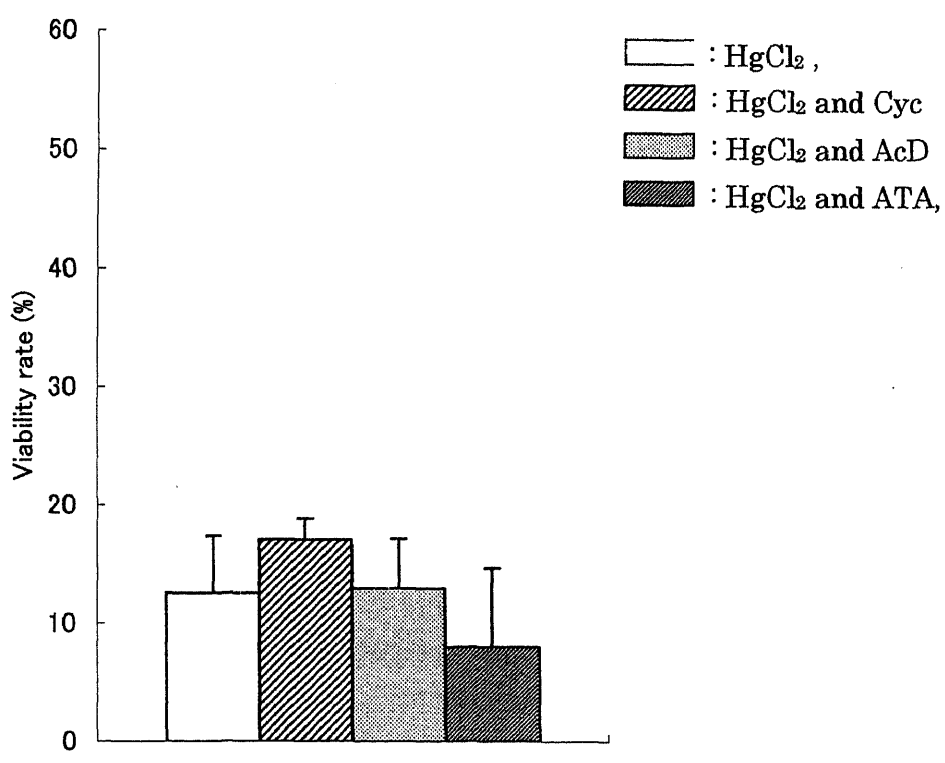


Fig. 26 Ability of agents to block cell death following HgCl_2 (30 μ M) exposure.
N=4.
Cyc : 10 μ g/ml cycloheximide ,
AcD : 2 μ g/ml actinomycin D ,
ATA : 30 μ M aurin tricarboxylic acid.

3-4 考察

近年、無機水銀の神経細胞への影響については、運動神経の軸索の変性⁶²⁾や小脳の神経細胞の脱落等⁶³⁾が詳細に調べられている。また、株化された細胞^{60,64,65)}や初代培養細胞を用いた系⁶⁶⁾で様々な因子による神経細胞死について検討されている。

今回、HgCl₂を培地中に添加して、24時間後のPC12細胞の生存率を検討した。水銀1 μM~50 μMの濃度範囲で添加すると水銀濃度が高くなるに従い細胞生存率が低くなる結果が得られた。このことは、今回設定した水銀濃度および培養条件ではPC12細胞は濃度依存的に細胞死を起こすことを示している。

また、Fig.25に見られるように、低濃度のHgCl₂暴露により起こるPC12細胞の細胞死はアポトーシス様の形態変化を示すことが明らかになった。さらに蛋白合成阻害剤であるCycによって細胞死の抑制が見られたことより細胞死に先行する蛋白合成の必要性が示唆された。

Pittmannら⁶⁴⁾やMesnerら⁶⁰⁾はPC12細胞を無血清培地中でNGF除去して培養した時に観られる細胞死は、蛋白合成阻害剤やRNA合成阻害剤により抑制されることを報告している。またKunimoto⁶⁶⁾は大脳神経細胞の初代培養系でメチル水銀暴露実験を行って、今回の結果と同様のアポトーシス様の形態変化と、さらにDNAの断片化を観察している。

今回、NGFにより分化させたPC12細胞をHgCl₂に暴露するとアポトーシス様の形態変化が観察され、蛋白合成阻害剤のCycによる細胞死の抑制効果が見られたことから、Pittmannら⁶⁴⁾やMesnerら⁶⁰⁾が観察したような細胞死であることが考えられた。また、細胞死を進めるための蛋白合成を必要とする細胞死の過程があることが示された。しかし、ATAの添加による細胞死抑制効果が観察されなかったことから、今回見られたHgCl₂による細胞死では、BatisutauとGreenが^{67,68)}が報告した細胞死とは違い、DNAの断片化が細胞死の決定にかかわるものではないことが考えられた。

これらのことより、HgCl₂による細胞死は、基本的には細胞死に先行する蛋白合成を必要とするアポトーシス様の細胞死であるが、NGF除去による細胞死やメチル水銀による細胞死とは違った調節機構によって制御されていることが考えられた。また、30 μM以上のHgCl₂に対する暴露では、Cyc添加によっても細胞死の抑制が見られなかったことより、水銀の暴露濃度によって細胞死の様式も違ってくることが示唆された。とくに、高濃度のHgCl₂への暴露では細胞は、細胞膜の破壊を中心とするえ死の形態をとることが示された。

Rossiら⁶⁵⁾は0.3 μM~0.5 μMの濃度のHg²⁺に暴露した時のPC12細胞でNGFによる神経線維の伸展が阻害されることや、2 μM以上のHg²⁺に暴露した時は細胞死が見られることを報告している。今回の結果とあわせて考えると、PC12細胞は狭い水銀濃度範囲の中で多様な反応を示すと考えられる。

終章

まとめ

水銀による中毒は、水俣病に見られるメチル水銀中毒が有名であるが、そのほかにも農薬として使われた有機水銀による中毒や、水銀製錬工場や水銀灯および体温計等の工場で見られる水銀蒸気の職業性暴露によるものなどがある。より低濃度で長期的な暴露としては歯科アマルガムからの水銀蒸気の散出によるものなどが注目されている。これら水銀中毒に関しては、水銀が産業活動に使用されるようになってから多くの事例が報告されているが、最近でも事故による水銀中毒の報告は後を絶たない。本研究は、水銀化合物の中でも特に金属水銀を含む無機水銀を中心に、その毒性発現に影響を及ぼす因子や毒性発現機構に関する検討を行った。

第1章「金属水銀の生体内動態に及ぼす運動負荷の影響」では金属水銀の生体内動態に個体差が生じる原因の一つとして、運動負荷を検討した。その結果、水銀の総取り込み量や排出量に関しては運動負荷を与えたマウスと与えないマウスの間で差は見られなかった。しかし、運動負荷を与えていないマウスに比べ、長期運動負荷を与えたマウスでは血液、脳内および心臓での水銀濃度が高くなることや、腎臓での濃度が低くなることなどが示され、運動負荷が水銀の生体内動態を変化させる因子であることが明らかになった。

第2章「無機水銀による腎毒性に及ぼす運動負荷の影響」では、第1章の結果をもとに、運動負荷が無機水銀投与による腎毒性を変化させるか否かを検討した。その結果、無機水銀投与前の長期運動負荷は無機水銀による腎障害を変化させる因子であることが明らかになった。

第3章「水銀化合物による神経系細胞の細胞死」では、株化細胞の培養系を用いて神経系細胞の細胞死について検討を行った。その結果、無機水銀によるPC12細胞の細胞死は、比較的低濃度の無機水銀暴露では、細胞死に先行する蛋白の合成を必要とするアポトーシス様の細胞死を起こしていることが示唆された。

これらの結果から、現在までほとんど検討が行われてこなかった化学物質の生体影響に対する運動負荷の影響を評価することの重要性を指摘することができたと考えられる。また、無機水銀の神経細胞への影響は比較的低濃度の暴露から現れ、高濃度暴露時とは違う細胞死機構が存在することが明らかになった。

本研究では、長期運動負荷がもたらす生理的な変化が、水銀の体内動態や毒性に及ぼす影響に関して検討を行い、いくつかの結果を得た。しかし、今回の運動負荷条件は運動強度や頻度、運動の種類に関する検討は行っておらず、人の「運動」を考えていくには十分なものではない。そのため、今後これらの運動条件に関する検討を進めることは、化学物質の生体影響を変化させる一因子としての運動を理解する上で重要であると考えられる。また、無機水銀による神経細胞死の機構を明らかにするため、どのような蛋白の発現がこの細胞死の鍵となっているのかを解明する必要があると考えられる。無機水銀による細胞死の機構に関する研究は、近年、免疫系の細胞を用いたものが多数発表されている^{69,70-73)}。そこでは、細胞の種類や水銀暴露条件の違いにより多様な細胞

死が存在することが示されている。無機水銀による神経細胞死も同様に多様な細胞死の形態があることが予想でき、無機水銀の神経毒性を理解する上でその解明は重要な課題であると考えられる。

参考文献

1. 大木道則、大沢利昭、田中元治、千原秀昭 「水銀」 化学辞典 (株) 東京化学同人 1994; 701.
2. 多賀光彦 須賀淑子 「第1章 はじめに」 地球の化学と環境 三共出版(株) 1995; 1-5.
3. 佐藤洋 「無機(金属型)水銀」 Toxicology Today—中毒学から生体防御の科学へ— 金芳堂 1994; 71-78.
4. 三浦豊彦 「水銀中毒の歴史」 労働と健康の歴史 労働科学研究所出版部 1992; 7: 48-79.
5. 農文協 編 「各重金属の性質とイネの被害の状況」 稲作大百科 I 総説/品質と食味 農山漁村文化協会 1991; 498-501, 338-341.
6. 椿忠雄 「有機水銀中毒」 農薬中毒—基礎と臨床— 南江堂(株) 1978; 247-253.
7. T. J. Foster , H. Nakahara , A. A. Weiss , and S. Silver . Transposon A-Generated Mutation in the Mercuric Resistance Genes of Plasmid R100-1. *Journal of Bacteriology* . 1979 ; 140(1) : 167-181.
8. Tracy Smith, Keith Pitts , Jeffery A. McGarvey , and Anne O. Summers . Bacterial Oxidation of Mercury Metal Vapor, Hg(0) . *Applied and Environmental Microbiology*. 1998 ; 64(4) : 1328-1332.
9. 鈴木継美 (監訳) 国立水俣病研究センター (翻訳) 「無機水銀」 日本公衆衛生協会 1992; 1-148.
10. Berlin M and Johansson LG. Mercury in Mouse Brain after Inhalation of Mercury Vapour and after Intravenous Injection of Mercury Salt. *Nature* 1964 ; 3 : 85-86
11. 白木博次 「4 水俣病と環境問題」 全身病—しのびよる脳・内分泌系・免疫系汚染 藤原書店 (株) 2001; 200-231 .

12. 土井陸雄 「水俣病」 *Toxicology Today*—中毒学から生体防御の科学へ— 金芳堂 1994 ; 93-108
13. Berglund A. Estimation by a 24-hour Study of the Daily Dose of Intra-oral Mercury Vapor Inhaled after Release from Dental Amalgam. *Journal of Dental Research* 1990 ; 69 : 1646-1651.
14. Kanluen S and Gottlieb CA. A Clinical Pathologic Study of Four Adult Cases of Acute Mercury Inhalation Toxicity . *Achives of Pathology and Laboratory Medicine* 1991 ; 115 : 56-60.
15. S.H.Park, S.Araki, A.Nakata , Y.H.Kim , J.A.Park , T.Tanigawa ,K.Yokoyama , H.Sato. Effects of occupational metallic mercury vapour exposure on suppressor-inducer (CD4+CD45RA+) T lymphocytes and CD57+CD16+natural killer cells . *Int Arch Occup Environ Health.* 2000 ; 73 : 537-542.
16. L.Vimercati , L.Santarelli , G.Pesola , I.Drago , G.Lasorsa , M.Valentino , A.Vacca , L.Soleo. Monocyte-macrophage system and polymorphonuclear leukocytes in workers exposed to low levels of metallic mercury . *The Science of the Total Environment* . 2001 ; 270 : 157-163.
17. Alessandro Cavalleri and Fabriziomaria Gobba . Reversible Color Vision Loss in Occupational Exposure to Metallic Mercury. *Environmental Research Section A.* 1998 ; 77 : 173-177.
18. L.Barregård , G.Sällsten , N.Conradi . Tissue levels of mercury determined in a deceased worker after occupational exposure. *Int Arch Occup Environ Health* . 1999 ; 72 : 169-173.
19. 菅田安男 水銀代謝の遺伝的背景 - 金属水銀の酸化を中心に - 「水銀とセレン」 1977年 篠原出版 73-81.
20. 鈴木継美 水銀とその化合物についての量 - 影響、量 - 反応関係 「金属中毒学」 医歯薬出版 (株) 1983 ; 257-279.
21. 鈴木継美 「水銀化合物の代謝・補遺」 金属中毒学 医歯薬出版 1983 ; 249-255.

22. Andersen A, Ellingsen DG, Morland T, Kjuus H. A neurological and neurophysiological study of Chloralkali workers previously exposed to mercury vapour. *Acta Neurol Scand* 1993 ; 88 : 427-433.
23. 鈴木継美 監訳 無機水銀 (財) 日本公衆衛生協会 1992 ; 16-17.
24. 佐藤哲男 . 毒性学序論 . 「毒性学」 (株) 南江堂 1986 ; 1-33.
25. Pamphlett R., Ewan K.B., McQuilty R., Waley P., Gender Differences in the Uptake of Inorganic Mercury by Motor Neurons. *Neurotoxicology and Teratology*. 1997 ; 19(4) : 287-293 .
26. Clarkson T.W. Biochemical Aspects of Mercury Poisoning . *Journal of Occupational Medicine* 1968 ; 10(7) : 351-355 .
27. V.L.Miller and Elizabeth Csonka , Mercury Retention in Two Strains of Mice . *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1968 ; 13 : 207-211.
28. Jesper Bo Nielsen and Ole Anderson . Methyl Mercuric Chloride Toxicokinetics in Mice.I : Effects of Strain , Sex , Route of Administration and Dose . *Pharmacology and Toxicology* . 1991 ; 68 : 201-207.
29. Ogata M, Matsuda A, Meguro T and Aikoh H. METALLIC MERCURY IN THE ARTERIAL BLOOD OF NORMAL AND ACATALASEMIC MICE EXPOSED TO METALLIC MERCURY VAPOR. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR* 1987 ; 19 : 79-82.
30. Ogata M, Kenmotsu K and Hirota N. Reduction of Mercuric Ion and Exhalation of Mercury in Acatalasemic and Normal Mice. *Archives of Environmental Health* 1987 ; 42 : 26-30.
31. Ogata M and Aikoh H. Ratio of Organs to Blood of Mercury during Its Uptake by Normal and Acatalasemic Mice. *Environmental Research* 1987 ; 42 : 421-424.
32. M.Ogata and H.Aikoh . MERCURY CONCENTRATION IN THE BLOOD AND ORGANS OF NORMAL AND ACATALASEMIC MICE AFTER INTRAPERITONEAL INJECTION OF METALLIC MERCURY($^{203}\text{Hg}^{\circ}$) . *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR* 1984 ; 16 : 71-73.

33. Minoru Yoshida , Masahiko Satoh , Akira Yasutake , Akinori Shimada , Yawara Sumi , Chiharu Tohyama . Distribution and retention of mercury in metallothionein-null mice after exposure to mercury vapor . *Toxicology* . 1999 ; 139 : 129-136.
34. 山口誠哉 水銀の毒性を修飾する因子 「金属中毒学」 医歯薬出版(株) 1983 ; 64-71.
35. Sven-Peter Nygaard , and Jens Carl Hansen . Mercury-selenium Interaction at Concentrations of Selenium and of Mercury Vapours as Prevalent in Nature. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* . 1978 ; 20 : 20-23.
36. M.Yoshida , H.Satoh and Y.Sumi . Effect of ethanol pretreatment on mercury distribution in organs of fetal guinea pigs following in utero exposure to mercury vapor . *Toxicology*. 1997 ; 119 : 193-201.
37. Magos L, Halbach S and Clarkson TW. ROLE OF CATALASE IN THE OXIDATION OF MERCURY VAPOR. *Biochemical Pharmacology* 1978 ; 27 : 1373-1377.
38. Halbach S and Clarkson TW. ENZYMATIC OXIDATION OF MERCURY VAPOR BY ERYTHROCYTES. *Biochemica. Biophysica Acta* 1978 ; 523 : 522-531.
39. Ohno H, Yahata T, Sato Y, Yamamura K and Taniguchi N. Physical training and fasting erythrocyte activities of free radical scavenging enzyme systems in sedentary men. *European Journal of Applied Physiology* 1988 ; 57 : 173-176.
40. Kanter MM, Hamlin RL, Unverferth DV, Davis HW and Merola AJ. Effect of exercise training on antioxidant enzymes and cardiotoxicity of doxorubicin. *Journal of Applied Physiology* 1985 ; 59 : 1298-1303.
41. 浅田浩二 中野稔 柿沼カツ子(編) 「5. 生体における活性酵素消去系の測定法」 活性酵素測定マニュアル 講談社サイエンティフィック 1992 ; 180-205 .
42. Cohen G, Dembiec D and Marcus J. Measurement of Catalase Activity in Tissue Extracts. *Analytical Biochemistry* 1970 ; 34 : 30-38.

43. Little C, Olinescu R, Reid KG and O'Brien PJ. Properties and Regulation of Glutathione Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1970 ; 245 : 3632-3636.
44. Beauchamp C and Fridovich I. Superoxid Dismutase: Improved Assays and an Assay Applicable to Acrylamide Gels. *Analytical Biochemistry* 1971 ; 44 : 276-287.
45. Jacobs MB, Yamaguchi S a Goldwater LJ. Determination of mercury in blood. *American Industrial Hygiene Association Journal* 1960 ; 21: 475-80.
46. 日本薬学会 編 「衛生試験法・注解」 金原出版 1980 ; 33-39.
47. Hursh JB, Sichak SP and Clarkson TW. In Vitro Oxidation of Mercury by the Blood. *Pharmacology and Toxicology* 1988 ; 63 : 266-273.
48. Ogata M, Katashi K. Noboru H and Hiromi A. Mercury Oxidation in vitro by Ferric Compounds . *Archives of Toxicology* 1982 ; 50 : 93-95.
49. Gian F.Gaetani , Silvana Galiano , Letizia Canepa , Anna M. Ferraris , and Henry N. Kirkman , Catalase and Glutathione Peroxidase Are Equally Active in Detoxification of Hydrogen Peroxide in Human Erythrocytes . *Blood* 1989 ; 73(1) : 334-339.
50. Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P. GLUTATHIONE DEPLETION AND IN VITRO LIPID PEROXIDATION IN MERCURY OR MALEATE INDUCED ACUTE RENAL FAILURE. *Biochemical Pharmacology* 1983 ; 32 : 2969- 2972.
51. Paller MS. Free radical scavengers in mercuric chlohride-induced acute renal failure in the rat. *J Lab Clin Med* 1985 ; 105(4) : 459-463.
52. Asakawa T, Matsushita S. Thiobarbituric Acid Test for Detecting Lipid Peroxides. *lipids* 1980 ; 14 (4) : 401-406.
53. Marion M. Bradford . A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding . *Annalytical Biochemistry* 1975 ; 72 : 248-254 .

54. 長瀬すみ, 田中寿子. 実験的腎障害. 「実験動物の臨床生化学データ」. ソフトサイエンス社 1976:292-323.
55. Roger Pamphlett, Stephen Kum-Jew. Mercury vapor uptake into the nervous system of developing mice. *Neurotoxicology and Teratology*. 2001; 23:191-196.
56. Frans W. Sorensen, Jytte O. Larsen, Rune Eide, Jorgen Drasbæk Schionning. Neuron loss in cerebellar cortex of rats exposed to mercury vapor: a stereological study. *Acta Neuropathol*. 2000; 100:95-100.
57. Katsuhiko Fukuda. Metallic mercury induced tremor in rabbits and mercury content of the central nervous system. *Brit. J. industr. Med.* 1971; 28:308-311.
58. 中田進 三浦郷子 井村伸正 「無機水銀、メチル水銀の細胞毒性」 中毒学における生化学的アプローチ—重金属を中心として— 篠原出版 1980;222-235
59. 佐野譲 「神経成長因子の作用機構及び神経細胞分化研究モデル」 神経進歩 1991; 35 (1) :132-146.
60. Mesner PW, Winters TR, Green SH. Nerve Growth Factor Withdrawal-induced Cell Death in Neuronal PC12 Cells Resembles That in Sympathetic Neurons. *The Journal of Cell Biology*. 1992; 119:1669-1680.
61. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *Journal of Immunological Methods*. 1989; 119:203-210.
62. Roger Pamphlett, MD, Fracp Frcpath, and Françoise Y.png. Shrinkage of Motor Axons following Systemic Exposure to Inorganic Mercury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. 1998; 57(4):360-366.
63. Sorensen, F.W; Larsen, J.O; Eide, R; Schionning, J-D. Neuron loss in cerebellar cortex of rats exposed to mercury vapor: a stereological study. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2000; 100(1):95-100.
64. Pittman RN, Wang S, DiBenedetto AJ, Mills JC. A System for Characterizing Cellular and Molecular Events in Programmed Neuronal Cell Death. *The Journal of Neuroscience*. 1993; 13 (9) :3669-3680.

65. Anna D. Rossi , Olof Larsson , Luigi Manzo , Sten Orrenius , Marie Vahter , Per-Olof Berggren , and Pierluigi Nicotera . Modifications of Ca²⁺ signaling by inorganic mercury in PC12 cells . Research Communications . 1993 ; 7: 1506-1515
66. Kunimoto M. METHYL MERCURY INDUCES APOPTOSIS OF RAT CEREBELLAR NEURONS IN PRIMARY CULTURE. Biochemical and Biophysical Research Communication 1994 ; 204 (1) : 310–317 .
67. Anna Batistatou and Lloyd A. Greene , Aurintricarboxylic Acid Rescues PC12 Cells and Sympathetic Neurons from Cell Death Caused by Nerve Growth Factor Deprivation : Correlation with Suppression of Endonuclease Activity . The Journal of Cell Biology 1991 ; 115(2) : 461-471.
68. Anna Batistatou and Lloyd A. Greene , Internucleosomal DNA Cleavage and Neuronal Cell Survival / Death. The Journal of Cell Biology. 1993 ; 122(3) : 523-532 .
69. K. Michael Pollard , Deborah K. Lee , Carlos A. Casiano , Martin Blüthner , Melissa M. Johnston , and Eng M. Tan , The Autoimmunity-Inducing Xenobiotic Mercury Interacts with the Autoantigen Fibrillarin and Modifies Its Molecular and Antigenic Properties . The Journal of Immunology 1997 ; 158 : 3521-3528.
70. Anja Roos , Nike Claessen , Esther J.M. Schilder-Tol , M. Anwar Chand , Jan J. Weening , and Jan Aten , Thiol Levels in CD134-Defined Subsets of Rat T Lymphocytes : Possible Implications for HgCl₂-Induced Immune Dysregulation . Biochemical and Biophysical Research Communications 1997 ; 240 : 452-457 .
71. Michael J. Whitekus , Ronald P. Santini , Allen J. Rosenspire , and Michael J. McCabe, Jr. Protection Against CD95-Mediated Apoptosis by Inorganic Mercury in Jurkat T Cells . The Journal of Immunology . 1999 ; 162: 7162-7170.
72. Peter L. Goering , Delma Thomas , Jennifer L. Rojko , Anne D. Lucas . Mercuric chloride-induced apoptosis is dependent on protein synthesis. Toxicology Letters. 1999 ; 105 : 183-195.
73. Bruce J. Shenker , Tai L. Guo , and Irving M. Shapiro . Mercury-Induced Apoptosis in Human Lymphoid Cells : Evidence That the Apoptotic Pathway Is Mercurial Species Dependent . Environmental Research Section A. 2000 ; 84 : 89-99.

参考論文（本論文に直接関係する論文）

1. N.Shimojo , Y.Arai : Effects of Exercise Training on the Distribution of Metallic Mercury in Mice . Human & Experimental Toxicology , (1994) 13 (8) 524-528

2. 新井淑弘、孫貴範、下條信弘 「無機水銀投与による急性腎障害に及ぼす運動負荷の影響」 産業衛生学雑誌 1995年 37巻 3号 195-196

3. 新井淑弘、田島静子、下條信弘 「無機水銀暴露によるPC12細胞の細胞死」 産業衛生学雑誌 1995年 37巻 4号 253-254

その他の論文

1. 新井淑弘、小林守、下條信弘 「筑波研究学園都市における大気中のNO₂濃度について」 筑波の環境研究 1992年 14 63-69
2. 下條信弘、新井淑弘、牛田 等、佐藤誠孝、石崎睦雄
「乳酸アルミニウムを側脳室内に投与したラットの自発行動の変化」
産業衛生学雑誌 1994年 36巻 4号 213-214
3. 加藤さおり、新井淑弘 「キダチアロエのSOD活性について」
New Food Industry 1997年 Vol.39, No.10, 1-8
4. 山西哲郎、荻野寛美、新井淑弘 「運動後の栄養補助食品の摂取がヘモグロビンおよび赤血球中の抗酸化系酵素活性に及ぼす影響」 群馬大学教育学部紀要
芸術・技術・体育・生活科学編 (1999年) 第34巻 189 - 194
5. 新井淑弘、山西哲郎「保健学習における大気中有害物質簡易測定器の利用について」 科教研報 日本科学教育学会 (2000年) 第14巻5 39 - 42
6. 新井淑弘、山西哲郎「地方都市におけるNO₂汚染の状況について」
群馬栃木保健体育学研究 (2000年) 第16号 25 - 27

謝 辞

本学位論文作成にあたり終始ご指導ご援助いただきました筑波大学応用生物化学系教授 松村正利先生 および同教授 田中秀夫先生に心より御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり懇切丁寧なご指導、ご助力いただきました筑波大学社会医学系教授 下條信弘先生、筑波大学応用生物化学系教授 國府田悦男先生、日立メディカルセンター 佐野憲一先生、元筑波大学社会医学系助教授 田島静子先生および中国医科大学教授 孫 貴範先生に心より御礼申し上げます。

さらに、本論文をまとめるにあたり多くのご助言、ご協力をいただきました筑波大学応用生物化学系助手 中野和典先生、(財)茨城県科学技術振興財団研究員 野村名可男先生、Philippines Los Banos 大学 Veronica P. Migo 先生および群馬大学教育学部 John Rippey 先生に心より御礼申し上げます。

最後に、研究に対する考え方など多くのご示唆いただき、ご支援をいただきました群馬大学教育学部教授 福地豊樹先生および同教授 山西哲郎先生に心よりお礼申し上げます。

平成 14 年 10 月

新井 淑弘