

研究課題の概要

研究課題名	メチル水銀の継続的負荷による毛髪／血液水銀濃度比の個体差の解明
主任研究者	佐藤 洋
所属機関	東北大学
研究成果の概要	メチル水銀の耐容週間摂取量に関する検討を目的として、メチル水銀濃度の比較的高い魚を成人男女27名に14週間摂取させ、同数の対照群と比較し、その後15週間に渡り血液および毛髪中水銀濃度の経時的データから毛髪／血液濃度比の変動について解析した。その結果、総水銀の毛髪／血液の比は最小値157から最大値1051(2番目に高い値585)と幅があることが示された。血液から毛髪への移行の時間的ずれにも1週間から3週間の個人差が観察された。リスク評価を行う上で、メチル水銀代謝における不確実性要因の基礎的検討が今後必要と考えられた。また、研究協力者の心拍(R-R間隔)の周波数分析から、一過性の交感神経活動の上昇を示唆する結果が得られた。一般に、交感神経優位の状態は心疾患とも関連すると報告されている。メチル水銀の低用量域ばく露の成人における影響についても評価に加える必要性を示唆する結果と考えられた。

評価所見	毛髪/血液中水銀濃度比について、多数の被験者を使い長期間にわたり厳密に分析されており、ヒトデータの個体差の根拠となり、今後のメチル水銀のリスク評価への活用が十分に期待される。
評価結果	目標以上の成果があった。

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	メチル水銀の継続的負荷による毛髪／血液水銀濃度比の個体差の解明
主任研究者名	東北大学大学院医学系研究科氏名： 佐藤 洋(研究課題番号：0803)

メチル水銀の耐容週間摂取量に関する検討を目的として、メチル水銀濃度の比較的高い魚を成人男女27名に摂取させ、同数の対照群と比較し、血液および毛髪中水銀濃度の経時的データから毛髪／血液濃度比の変動について解析した。その結果、総水銀の毛髪／血液の比は最小値157から最大値1051（2番目に高い値585）と幅があることが示された。血液から毛髪への移行の時間的ずれにも1週間から3週間の個人差が観察された。リスク評価を行う上で、メチル水銀代謝における不確実性要因の基礎的検討が今後とも必要と考えられた。また、研究協力者の心拍（R-R間隔）の周波数分析から、一過性の交感神経活動の上昇を示唆する結果が得られた。一般に、交感神経優位の状態は心疾患とも関連すると報告されている。メチル水銀の低用量域ばく露の成人における影響についても評価に加える必要性を示唆する結果であった。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	メチル水銀の継続的負荷による毛髪／血液水銀濃度比の個体差の解明 (研究期間：平成20年度～21年度)
主任研究者名	所属： 東北大学大学院医学系研究科 氏名： 佐藤 洋(研究課題番号：0803)

1. 研究の概要

メチル水銀は神経毒であり、水俣病の原因物質となった化学物質である。メチル水銀ばく露に感受性の高い集団は胎児と考えられており、現在では胎児期ばく露による健康影響が世界的に注目されている。その一方で、成人期のメチル水銀ばく露が心血管疾患による死亡率を増加させるとの報告があり (Salonen et al. 1995)、心血管系への影響も懸念されている。メチル水銀は食物連鎖を経て魚介類に蓄積するため、我々は職業ばく露や環境汚染がなくても、魚介類の摂取を介して低濃度ながら継続的にメチル水銀のばく露を受けることとなる。このため、メチル水銀の摂取量に関する勧告がJECFAや内閣府食品安全委員会などから出された。しかしながら、その勧告(＝耐容週間摂取量：TWI)の算出方法には、いくつかの仮定が用いられており、中でも毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比に関する仮定は、TWIの妥当性に大きく影響する要因である。これまで、その毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比は250:1 (WHO, 1976年) がTWI算出の際に用いられてきたが、この濃度比には比較的大きな個体差が存在することが示唆されている。TWIの妥当性を高めるために、毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比に関する更なる検討と解析が必要である。そこで本研究は、毛髪／血液濃度比の変動におよぼす要因を明らかにすることを目的とし、ヒトを対象とした低濃度メチル水銀ばく露実験を実施した (Fig. 1)。さらに、メチル水銀の低濃度ばく露の健康影響を探索的に検討することを意図し、心拍変動への影響を指標として観察を行った。このため、ばく露を行わない対照群 (摂取群と同じく27名の成人男女) を設定し比較した。また、メチル水銀は主に魚摂取により取り込まれるが、魚には不飽和脂肪酸やセレンなど栄養学的な成分が含まれる。不飽和脂肪酸は成人の心血管疾患リスクの軽減に寄与するとされ、またセレンはメチル水銀の毒性を軽減すると期待されており、魚摂取にはベネフィットの側面が期待されることとなる。これらメチル水銀の摂取や健康影響に関与すると考えられる交絡要因についても可能な範囲で検討を試みた。

ヒトへのメチル水銀ばく露については、摂取群である成人男女27名にメチル水銀濃度が $1\mu\text{g/g}$ 程度のメバチマグロ、メカジキを暫定耐容週間摂取量 (PTWI: $3.4\mu\text{g/kg}$ 体重/週, 厚生省, 1973年) を限度として14週間摂取させ、定期的に毛髪および血液を採取した (実施担当：佐藤、仲井)。ばく露終了後も更に15週間の観察期間を設け、生体試料の収集を続けた。また、メチル水銀ばく露の心血管系への影響を検討するため、ばく露前、ばく露終了時および観察終了時に心拍動R-R間隔を測定し、その変動を観察した (実施担当：村田)。

メチル水銀ばく露開始後の血球中および血漿中の水銀濃度の推移について、個人差があるものの、全体としては血球中では14週目でもっとも高い濃度となり、血漿中では15週目でもっとも高い濃度が観察された。血漿の総水銀に占めるメチル水銀の割合には幅があり、ベース時、

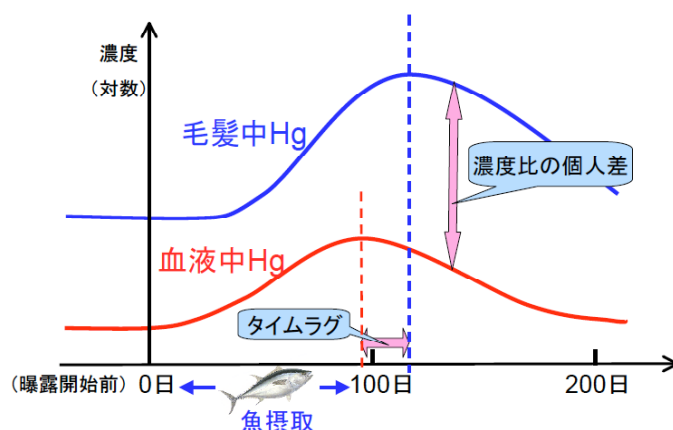


Fig. 1 健康な一般成人男女にメチル水銀濃度の高い魚(マグロ、カジキ)を摂取させることによって、メチル水銀をTWIレベルでばく露するモデルを作製した。血液中および毛髪中水銀濃度の経時的なデータを収集し解析を行った。

摂取期間ならびに観察期間を通しての平均は91%、最小値は41%であった。血漿および血球中の総水銀に占めるメチル水銀の割合の変化を概観すると、メチル水銀を摂取している期間は血球においてメチル水銀が増加し、メチル水銀の摂取が終了し、メチル水銀の供給がなくなると血球から血漿にメチル水銀が移行すると推察された。毛髪中の総水銀について高感度分析計を用いた詳細な解析を9名で行ったが、毛髪濃度がもっとも高くなった時期には個人差が見られ、範囲は12週目から17週目であった。一方、全血総水銀濃度の最大値にも個人差が見られ、範囲は9週目から14週目となった。血液から毛髪へ移行するタイムラグに関する解析でも個人差が観察され、タイムラグが1週間のケースと3週間のケースが観察された。毛髪の微量分析を実施したこの9名について、血液と毛髪の総水銀比を解析したところ、個人差が非常に大きく、範囲は最小値157から最大値1051となった。TWI算出に際してはWHO(1990)で報告されている250:1(毛髪:血液)の比と排泄係数の不確実性から不確実係数4がとられた。しかしながら、今回のデータからそれでは不十分な可能性が考えられ、今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。

心拍変動の結果について、14週間のPTWIを限度としたメチル水銀のばく露により、HRVパラメータのCCV_{LF}、LF/HF ratioおよび%LFが上昇したことから、交感神経活動の上昇が示唆された。交感神経活動の上昇は、精神的ストレスの負荷がかかった状態においてもみられるが、その場合は心拍数や血圧も同時に上昇する。本研究においては心拍数と血圧に変動は認められず、この現象に精神的ストレスの関与はなかったと考えられた。このメチル水銀ばく露後の交感神経優位の状態は、実験終了時にはもとの状態に回復する可逆的なものであったことも確認された。ただし、ばく露が長期間に及んだ場合も、このような可逆的な影響であるかは明らかでない。一般に、交感神経優位の状態は、心疾患や心臓死に強く関連することが知られている。また、本研究で観察されたようなLF成分の上昇による交感神経優位の状態が、心筋梗塞の患者で多く見られるとの報告もある。PTWIでの長期ばく露と心血管疾患リスクとの関連性に加え、メチル水銀ばく露に伴う交感神経活動の上昇の発生機序やメカニズムの解明、また魚摂取に伴う不飽和脂肪酸等の交絡因子の解析といった検討が必須と考えられた。

2. 研究の成果

(1) 研究の成果と概要

本研究は、ヒトへの低濃度メチル水銀ばく露実験で得られた試料の分析を通してメチル水銀のリスク評価に必要な知見を得ることが目的であるが、ばく露実験の手続きおよび実施そのものは研究課題申請時前より進行しており、採択時にはばく露実験および生体試料の収集は既に終了していた。このため本研究の主な実施内容は、収集した生体試料の化学分析とデータ解析となった。

具体的には、研究初年度は毛髪中総水銀濃度の分析、心拍変動の予備的な解析を行うとともに、血液中総水銀・メチル水銀濃度の分析を開始した。次年度(最終年度)では、毛髪総水銀について高感度分析計を整備して詳細な水銀分析を行うとともに、血液中総水銀・メチル水銀濃度の分析を終了し毛髪の水銀レベルとの比較を実施した。さらに、心拍変動について統計学的に詳細な解析を実施した。また、メチル水銀の摂取や健康影響に関わる交絡要因について、可能な範囲で検討を行った。なお、全体としてメチル水銀ばく露実験の実施および水銀指標の解析を佐藤、仲井が担当し、心拍変動のデータ解析を村田が分担して実験を進めた。

1) 平成20年度研究成果の概要

① 平成20年度研究の目的

メチル水銀の毒性とリスク評価については次章において詳細に述べるが、成人期のメチル水銀ばく露が心血管疾患による死亡率を増加させるとの報告があり、心血管系への影響が懸念されている。メチル水銀の摂取量に関する勧告がJECFAや内閣府食品安全委員会などから出されているが、その勧告(=耐容週間摂取量: TWI)の算出方法には、いくつかの仮定が用いられており、中でも毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比に関する仮定は、TWIの妥当性に大きく影響すると考えられる。これまで、毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比250:1(WHO, 1976年)がTWI算出の際に用いられてきたが、この濃度比には比較的大きな個体差が存在することが示唆されており、実際に、我々が実施している妊娠女性を対象とした疫学研究(厚生労働科学研究 化学物質リスク研究: Tohoku Study of Child Development)のデータにおいても、毛髪と血液の濃度比は平均で320:1を示し、250:1とは外れていることが示された。TWIの妥当性を高めるため、毛髪中水銀と血液中水銀の濃度比に関する検討が必

要と考えられた。そこで本研究は、毛髪／血液濃度比の変動におよぼす要因を明らかにすることを目的とし、ヒトを対象とした低濃度メチル水銀ばく露実験を実施した。

さらに、そのような低濃度のメチル水銀ばく露がヒトの心血管機能にどのような影響を与えるのかを探索的に検討するため、心拍変動の測定を実施した。心拍変動を指標としたのは、先行研究として海外でメチル水銀ばく露により心拍動R-R間隔の周波数成分に変動が見られるという知見を参考とした。

② 平成20年度研究の方法

成人男女27名にメチル水銀濃度が $1\mu\text{g/g}$ 程度のメバチマグロ、メカジキをPTWI ($3.4\mu\text{g/kg}$ 体重/週、厚生省、1973年)を限度として14週間摂取させ、定期的に毛髪および血液を採取した。ばく露終了後も更に15週間の観察期間を設け、生体試料の収集を続けた(実施担当研究者:佐藤、仲井、亀尾)。なお、摂取群と同じく27名の成人男女を対照群とした。また、メチル水銀ばく露の心血管系への影響が懸念されていることから、その基礎的研究として、ばく露前、ばく露終了時、観察終了時に心拍動R-R間隔を測定し、その変動の様子を観察した(実施担当研究者:村田)。血漿中不飽和脂肪酸について分析した。なお、本実験では研究協力者の健康面や倫理面で発生した問題はなく、実験辞退者は一名も出ず順調に終了した。

③ 平成20年度研究の成果

メチル水銀ばく露に伴う毛髪中水銀濃度の変化を明らかにするため、毛髪総水銀分析を実施した(Fig. 2)。ピーク時の毛髪中総水銀濃度は、ばく露開始前の濃度より平均で4.3倍増加しており、その範囲は1.7~7.5倍と広がった。また、ワンコンパートメントモデルを用いて予測した場合の増加量とは誤差が生じていた。以上の結果から、メチル水銀の血液から毛髪への移行速度や移行量には大きな個体差が存在することが示唆された。

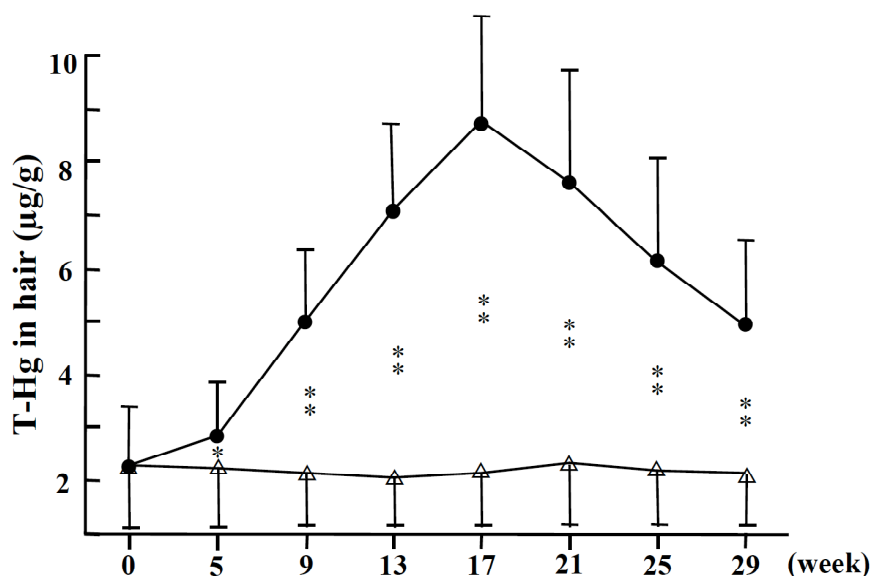


Fig. 2 PTWIレベルのばく露に伴う毛髪総水銀値の推移。
(●摂取群、△対照群、平均とSD)。* $p<0.05$, ** $p<0.01$

一方、毛髪／血液中水銀濃度比の解析については、化学分析を実施中であり、詳細な結果は次年度の課題とした。

心拍動についても予備的な解析を実施し、14週間のPTWIを限度としたメチル水銀のばく露により、HRVパラメータの CCV_{LF} 、 LF/HF ratioおよび%LFが上昇したことから、交感神経活動の上昇が示唆された。詳細な解析結果については統計解析の手法についても十分に検討した上で、次章の次年度報告にて詳述した。

なお、研究協力者の血中不飽和脂肪酸について、両群に大きな差はなく、魚摂取群でも血中濃度は増加しなかった。

2) 平成21年度研究成果の概要

1 研究全体の成果

① 平成21年度研究の目的

メチル水銀のリスク評価に関する基礎的な検討を行うため、メチル水銀の暫定耐容週間摂取量 (PTWI: $3.4 \mu\text{g/kg}$ 体重/週, 厚生省, 1973年) を限度としてヒトへばく露を行って得た試料を用いて、前年度に引き続き以下について検討した。

第1に、魚摂取を介したヒト低濃度メチル水銀ばく露実験から得られるメチル水銀の摂取量、毛髪中および血液中水銀濃度の系統的なデータを解析し、毛髪/血液濃度比の変動におよぼす要因を明らかにすることを目的とした。(毛髪/血液水銀濃度比の解析)

第2に、メチル水銀ばく露の心血管系への影響が懸念されていることから、その基礎的研究として、心拍変動への影響についてヒトを対象に実験的な検討を実施し、メチル水銀ばく露と生理学的指標との関連性を解析した。(心拍変動への影響)

ばく露とその影響に関する交絡要因のうち、セレンとの関連性、メチル水銀のばく露源としての魚の特徴、特に魚の寿命または魚の体長とメチル水銀レベルとの関係などについて検討した。また、前年度の研究で、研究協力者の血中n-3系不飽和脂肪酸の濃度に群間で差は見られなかった。その理由を考察するため2点について検討した。栄養疫学分野では、不飽和脂肪酸の動態は赤血球膜構成脂質による解析が行なわれているが、前年度の解析では血漿中脂質濃度を分析した。この試料の選択が正しかったかを確認するため、今回、別の研究協力者の協力を得て、血漿と赤血球膜中の不飽和脂肪酸の相関を解析した。さらに、魚の不飽和脂肪酸を測定し、どの程度の個体差があるかを調査した。

② 平成21年度全体の研究方法

研究協力者は、健康な男性28名、女性26名の合計54名であり、市場に流通していたメバチマグロまたはメカジキを継続的に消費することによりメチル水銀を定常的に摂取したものであり、定期的に毛髪と血液採取を行った。得られた試料について、以下の2つの研究を実施した。

毛髪/血液総水銀濃度比の解析：前年度までに1398検体の血球および血漿中の総水銀・メチル水銀濃度を分析しており、これに加えてさらに毛髪について全長が残っていた9名について、毛髪をさらに細分化し各セグメントの水銀濃度を高感度原子蛍光水銀分析計により測定した。このことにより、より短期間の濃度変動を詳細に解析し濃度比の詳細な解析を行なった。また、血球と血漿を分けて分析を実施しており、メチル水銀の血液中の動態についても検討を行った。

心拍変動への影響：1973年に厚生省が定めた成人のPTWI ($3.4 \mu\text{g/kg}$ 体重/週) を限度とし、メバチマグロまたはメカジキを用いてメチル水銀ばく露を行った。心拍変動の測定は、ベースライン時、15週目、29週目に行なった。10分間の安静臥床後、心拍動R-R間隔を5分間測定し (1271SP, NEC-Sanei Co., Tokyo, Japan)、標準偏差 (SD) が最小となる100個の連続したR-R間隔を自動的に抽出し、周波数分析を行った。

その他の研究：魚の寿命または魚の体長とメチル水銀レベルとの関係などについては、キンメダイを中心の指標魚としながら、様々な体長の魚を入手し総水銀分析、メチル水銀、脂肪酸分析などを行った。血漿と赤血球の不飽和脂肪酸については、EDTA採血した後それぞれ分析を行った。

なお、本研究を開始するに際しては、事前に東北大学大学院医学系研究科倫理委員会に実験計画書を提出し承認を得るとともに (受付番号：2006-328)、研究協力者より書面による同意を得て実施した。

③ 平成21年度研究の成果

血球中の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の血球中総水銀濃度の平均(標準偏差)は $13.5 (6.4) \text{ ng/g}$ に対して、14週のピーク時は $56.9 (13.5) \text{ ng/g}$ 、最終29週時は $24.2 (8.3) \text{ ng/g}$ であった。血球の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均96%とほとんどがメチル水銀であった。血漿中の水銀濃度の推移は、摂取終了の次週15週目でもっとも高い値となった。血漿中の水銀濃度のベース時平均(標準偏差)は $1.4 (0.5) \text{ ng/g}$ 、15週のピーク時は $4.8 (1.1) \text{ ng/g}$ 、最終29週時は $2.4 (0.7) \text{ ng/g}$ であった。血漿の総水銀に占めるメチル水銀の割合には幅があり、ベース時、摂取期間ならびに観察期間とおしての平均は91%、最小値は41%であった。血漿と血球の値から計算した全血の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなっ

た。全血総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均95%とほとんどがメチル水銀であった。また全血に占める血球の割合について、ベース時、摂取前半（7週まで）、摂取後半（8-14週まで）ならびに観察期間（15週-29週）を比較すると、魚を食べている摂取期間において血球の割合が高くなった。血漿については、ベース時、ばく露終了後の観察期間、摂取前半ならびに摂取後半の順に血漿の割合が低くなっており、このことから、メチル水銀を摂取している期間は血球において増加し、メチル水銀の摂取が終了しメチル水銀の供給がなくなると血球から血漿にメチル水銀が移行すると推察された。

摂取期間プラス3週間分の毛髪長さ7-8cm以上ある女性研究協力者9名について、微量毛髪の総水銀分析を行った。毛髪濃度がもっとも高くなった時期には個人差が見られ、範囲は12週目から17週目であった。一方、全血総水銀濃度の最大値にも個人差が見られ、範囲は9週目から14週目となった。血液から毛髪へ移行するタイムラグに関する解析でも個人差が観察され、タイムラグが1週間のケースと3週間のケースが観察された。

毛髪の微量分析を実施したこの9名について、採血時に相当する毛髪セグメントの総水銀値から血液と毛髪比を算出した。その結果、毛髪／血液の比は最小値157から最大値1051（2番目に高い値585）と幅があることが示された。このように毛髪／血液比が大きく変化するのは、魚摂取で血中の水銀濃度は速やかに高くなるが、血液から毛髪への移行にはタイムラグがあり毛髪に反映されるまで時間がかかること。さらに、血液から毛髪に反映されるまでに個人差が伴うことなどが理由の一つと考えられた。TWI算出にあたって、250：1（毛髪：血液）の比と排泄係数の不確実性から不確実係数4が用いられているが、今回のデータから毛髪／血液の比は157-1051と幅が大きく、TWI算出に使用された4では不十分な可能性が考えられた。今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。

次に、メチル水銀による成人期ばく露の影響として、心血管系へのリスクが懸念されているため、同じ研究協力者を対象としてメチル水銀の心拍変動に与える影響について検討した。その結果、14週間に渡る魚を介したPTWIでのメチル水銀ばく露により、心臓性自律神経活動バランスに変動が生じ、交感神経優位の状態が引き起こされた。この時、毛髪中総水銀濃度はばく露前の濃度（2.30 $\mu\text{g/g}$ ）に比べて6.46 $\mu\text{g/g}$ 上昇していた。交感神経優位の状態は、心疾患や心臓死に関連するとされており、PTWIレベルでも継続的にメチル水銀のばく露を受けた場合、心疾患のリスクファクターになりうる可能性が示唆された。ただし、この現象はメチル水銀ばく露終了後に消失したことから一過性であり、発生機序やメカニズムについては不明な点が残るため、今後の更なる検証が必要と考えられた。

様々な魚種と総水銀、メチル水銀および不飽和脂肪酸との関連について検討した。一部の魚種を除きメチル水銀の割合はほぼ90%以上であり、また同じ魚種でも不飽和脂肪酸（EPAやDHA）の割合や含有量にはばらつきが確認された。キンメダイについては、市場で様々な大きさを揃えることが可能だったため、体重、全長（口から尾の先まで）ならびに尾叉長（口から尾の付け根まで）を測定し水銀濃度との関係を検討した。その結果、体重と全長、尾叉長ともに高い相関関係が観察され、体重の重い、年齢の高い魚はメチル水銀の蓄積も高いことが示された。

不飽和脂肪酸のうちアラキドン酸、EPA、DHAなどについては、血漿中と赤血球中の値の相関は良好であり、血漿を用いた解析でも不飽和脂肪酸の摂取を十分に推定できることが示された。その一方で、魚中の不飽和脂肪酸については個体差が大きく、魚摂取群の血中不飽和脂肪酸濃度が必ずしも上昇しなかったことの1つの要因となったものと推測された。

2 各分担研究者（分担課題）の成果

1) 分担課題：毛髪／血液水銀濃度比の解析

① 研究目的

本分担研究では、大きく2つの点について明らかにすることを目的とした。第1に、魚摂取群の血中のメチル水銀分布を明らかにすることとし、メチル水銀の蓄積量が増えることで血漿と赤血球中メチル水銀の分布にどのような影響を与えるかを検討した。第2に、摂取されたメチル水銀が血液から毛髪へ移行するまでのタイムラグを明らかにすること、ならびに血液と毛髪中の比を明らかにすることを目的とした。このため、マグロまたはメカジキを用いてメチル水銀ばく露を行った27名のうち、摂取期間プラス3週間分の毛髪長さがある研究協力者について3mm毎に切り取ったセグメントの毛髪総水銀測定を実施した。第3に、メチル水銀の摂取や健康影響に交絡する要因について明らかにする

ため、魚に含有される不飽和脂肪酸（PUFA）とメチル水銀との関係について検討した。特に、日本人の魚摂取の中でメチル水銀の寄与率の高いマグロ・カジキ類とキンメダイについて、摂取のリスクとベネフィットの観点から魚中のメチル水銀とPUFAの関係に焦点をあてた。魚種ごとの総水銀に占めるメチル水銀割合、魚の寿命とメチル水銀濃度、メチル水銀とPUFAの関係について検討することを目的とした。このことにより、メチル水銀濃度の比較的高値な魚を摂取した群に観察された心臓性自律神経バランスの変動と、摂取群に不飽和脂肪酸の変動は観察されなかった点（昨年度報告済み）を鑑み、魚に含有されるメチル水銀（リスク）と不飽和脂肪酸（ベネフィット）との関係性を明らかにすることを目的とし、魚摂取のあり方を検討することを意図した。

本研究成果は、ヒトの食品を介したメチル水銀ばく露におけるリスク評価に重要な資料となり、将来的にはメチル水銀のTWIの見直しに必要な科学的根拠に基づいたデータを提供できるものと考えた。本分担研究は佐藤、仲井が担当して実施した。

② 研究方法

研究協力者とメチル水銀のばく露方法

ヒトへのメチル水銀ばく露は前年度までに終了しているが、そこで得られた試料とデータを用いて本年度も解析したため、以下に整理して述べる。

研究協力者は、2007年3月上旬から4月中旬にかけて宮城県内の大学にポスター掲示をして募集した成人男女である。登録に際して、除外基準を心疾患の既往のある者、妊娠中もしくは調査期間中に妊娠の可能性のある者、授乳中の者とし、調査開始前に既往歴に関するアンケート調査、一般血液生化学検査、身長および体重測定を行った。合計56名の応募があったが、そのうち1名は授乳中の女性であり、1名は貧血の傾向が認められたため、研究協力者から除外した。最終的に、本研究の調査内容を十分に理解し、インフォームドコンセントの得られた男性28名、女性26名の合計54名を研究協力者として登録した。

この54名の研究協力者を、性、年齢、BMIを考慮し、メチル水銀をばく露する摂取群（男性14名、女性13名）とばく露しない対照群（男性14名、女性13名）の2群に分けた。

メチル水銀のばく露は、1973年に厚生省が定めた成人のPTWI（ $3.4 \mu\text{g/kg}$ 体重/週）を限度とし、魚摂取を介して14週間継続して行なった。ばく露終了後には、更に15週間の観察期間を設けた。ばく露源には、メバチマグロ（およそ40kg）2尾とメカジキ（およそ70kg）1尾を用いた。メバチマグロおよびメカジキの平均魚肉中総水銀濃度は、それぞれ $1.08 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ （ $n=20$ ）、 $1.08 \pm 0.11 \mu\text{g/g}$ （ $n=10$ ）で、いずれの個体も身の大部分が均一な赤身であったため、部位による濃度差はほとんどなかった。この総水銀中に占めるメチル水銀の割合については、実験開始前に市販マグロおよびメカジキの魚肉について予備検討を実施し（ $n=34$ ）、メチル水銀の総水銀に対する割合は平均98%（範囲94～100%）であったことから、総水銀濃度の94%を魚肉中のメチル水銀濃度と仮定し個人毎のメチル水銀ばく露量を求めた。摂取群の研究協力者には、1週間に1度、個人毎に規定量の冷凍した魚を配布し、次週までに全て摂取することを条件として、14週間継続して摂取させた。ただし、メチル水銀のばく露量をコントロールできなくなるため、配布する魚以外のメチル水銀濃度の高い魚の摂取は、調査期間中控えてもらった。一方、対照群の研究協力者には、これまでの食生活を変えないことを条件として、普段通りの生活を送ってもらった。

生体試料の採取

メチル水銀のばく露指標として、毛髪中総水銀濃度を用いた。実験開始前に蓋頭隆起骨付近の毛髪を 1cm^2 程度剃り落とし、その部分から伸びた毛髪を4週間毎に伸長速度を測定しながら採取し、分析に供した。血漿中および血球中のメチル水銀および総水銀分析、ならびに不飽和脂肪酸分析のため、空腹時採血を実施した。摂取群については、摂取期間中は1週間に1度、摂取終了後は2週間に1度採取したため、実験期間中計22回となった。対照群は8～13週毎に1度、計4回採取した。血液はヘマトクリット値測定後、血球と血漿に分離し、 -80°C で凍結保存した。採血は、いずれも空腹時採血とした。研究協力者の健康状態の確認のため、採血の時期にあわせてAST、ALT、コレステロール、中性脂肪、赤血球数、ヘマトクリット、白血球数等の測定を行なうとともに、血圧、体重測定を行なった。

化学分析

毛髪中および魚肉中の総水銀分析は、還元気化-原子吸光光度法（CVAAS）により行った。分析の精度管理には、標準物質DORM-2（Dogfish Muscle：評定値 $4.64 \pm 0.26 \mu\text{g/g}$ ）およびNIES CRM No13（Human Hair：評定値 $4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ ）を用い、それぞれの測定値は $4.65 \pm 0.12 \mu\text{g/g}$ （ $n=27$ ）、 $4.46 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ （ $n=27$ ）であった。なお、毛髪総水銀の高感度微量分析は次項に記載した。

血液は血漿および血球1398検体を測定した。総水銀は還元気化-原子吸光光度法（CVAAS）にて、メチル水銀はECDガスクロマトグラフィーにて測定した。測定にあたって水銀分析マニュアル（環境省）に従った。分析はいであ株式会社に委託して実施した。

血漿中およびばく露に使用した魚肉中のDHA、EPAの分析は、ガスクロマトグラフィー法によりエスアールエル株式会社にて行なった。ばく露源に用いたメバチマグロおよびメカジキの可食部100g当りのDHAとEPAの合計は、それぞれ $112 \pm 38 \text{ mg/100 g}$ （ $n=4$ ）、 $76 \pm 2 \text{ mg/100 g}$ （ $n=4$ ）であった。

全ての化学分析は、実験終了後に一斉に行なった。

毛髪総水銀の微量分析

マグロを摂取した27名のうち、摂取開始から21週後の段階で毛髪の全長を採取した。摂取期間プラス3週間分の毛髪長さ7-8cm以上ある研究協力者9名について、21週間プラス3週間の約24週間分に相当する長さでカットし、重量を測定した。摂取期間中は1週間に1度、摂取終了後は2週間に1度採血し、採血日ごとに該当するセグメント微量毛髪（1-2週間に伸びた毛髪断片3-6mm程度）を作成した。その後、溶液化したのち灰化（前処理）し、還元気化-原子蛍光分析（CVAFS）を実施した。測定にあたってMercur DUO Plus（株式会社アナリティックイエナ）を用いた。

前処理として、根元を揃え8-10本の毛髪を並べた。個人の伸長速度をもとに摂取期間21週間プラス3週間の約24週間分に相当する長さでカットし、その全長の重量を測定した。再度根元を揃えて並べ、血液採取日に該当するように毛髪をカット（3mm程度 $200-280 \mu\text{g}$ ）した。その毛髪断片を $\text{HClO}_4+\text{HNO}_3$ （1+1）の混酸1mlに溶かした（室温、overnight）。リファレンスも同様に溶液化した。溶液化したサンプルについては $200 \mu\text{l}$ 採取し重量を測定した。次に超純水、 $\text{HClO}_4+\text{HNO}_3$ （1+1）0.8ml（アプライ量と併せて1ml）、硫酸2.5mlを添加し、 200°C で30分灰化した。その後10mlに定容し試験溶液とした。測定に際しては、測定用のキャリア溶液として2% HCl 、還元剤2% SnCl_2 、キャリアガスとして Ar ガス99.999%を使用した。1サンプル3回測定により、1回目をプレ測定とし、2-3回を本測定データとした。標準物質NIES CRM No13（Human Hair：評定値 $4.42 \pm 0.20 \mu\text{g/g}$ ）、IAEA-085（Human Hair：評定値22.9（ $21.9-23.9 \mu\text{g/g}$ ））を用い、それぞれの測定値の平均は $4.3 \pm 0.1 \mu\text{g/g}$ （CV3.0%, $n=9$ ）、 $23.4 \pm 0.3 \mu\text{g/g}$ （CV1.4%, $n=9$ ）であった。NIES、IAEAともに保証値の範囲内の値となり信頼できる結果と考えられた。

魚の収集と分析

魚の収集は、魚市場、スーパー、百貨店、インターネット通販にてある1ヶ月間実施した。マグロおよびカジキ類は冊で購入のため、同じスーパー等で産地が同じ場合は同一日に1つ以上購入しない。同スーパーを使用する場合は、産地が異なるあるいは数週間後に購入することで同一個体にならないように配慮した。またマグロは赤身を購入した。マグロはクロマグロ、メバチマグロ、ビンチョウマグロを、カジキ類はメカジキ、クロカジキ、マカジキをサンプリングした。キンメダイについては、まるごと1本購入し、体重、尾叉長、全長を測定した。分析にあたり、背の部分を対象とした。

魚肉の総水銀およびメチル水銀分析については、血液と同様に実施した。脂質はソックスレー抽出法にて、脂肪酸量ならびに脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにて測定し、日本食品分析センターに委託した。

不飽和脂肪酸に関する追加調査

これまでの研究協力者とは別の健康な女性133名より、抗凝固剤としてEDTAを用いて空腹時の末梢血を採取した。遠心分離後に血漿と赤血球膜中の全脂肪酸分析をガスクロマトグラフィー方により実施した。化学分析は女子栄養大学の支援を受けて行った。なお、研究協力者には脂肪酸分析を行うことを説明し、書面による同意を得て実施した。本追加調査に当たり別に本学倫理委員会に研究計画を提出し承認を得た。

③ 研究の成果

研究協力者の属性

前年度と同様な結果となるが、研究協力者の属性をTable 1に示す。各群の年齢およびBMIの平均値（標準偏差）は、それぞれ、摂取群25.2 (4.1) 歳、22.2 (3.2) kg/m²、対照群23.7 (3.2) 歳、21.0 (2.7) kg/m²で、年齢、BMIとも2群間に有意差は認められなかった。血圧および一般血液生化学検査の結果についても、全ての項目において2群間に有意差は認められなかった。

なお、性差については、収縮期血圧およびALT、中性脂肪、ヘモグロビンにおいて有意差が認められたが、その他の項目においては認められなかった。

Table 1. 対象者の属性

	実験群 (n=27)			対照群 (n=27)			p *
	Mean	(SD)	Range	Mean	(SD)	Range	
年齢 (歳)	25.2	(4.1)	20 ~ 35	23.7	(3.2)	20 ~ 30	0.147
BMI (kg/m ²)	22.2	(3.2)	17.6 ~ 30.5	21.0	(2.7)	16.5 ~ 27.3	0.125
収縮期血圧 (mmHg)	115.2	(11.5)	93 ~ 135	114.8	(12.0)	95 ~ 141	0.890
拡張期血圧 (mmHg)	70.3	(7.9)	54 ~ 85	68.6	(6.9)	58 ~ 84	0.401
AST (IU/l)	19.2	(4.7)	13 ~ 33	18.8	(5.5)	13 ~ 41	0.792
ALT (IU/l)	19.0	(9.5)	7 ~ 52	15.9	(8.3)	4 ~ 39	0.205
総コレステロール (mg/dl)	181.6	(29.3)	112 ~ 240	177.8	(34.2)	115 ~ 285	0.668
中性脂肪 (mg/dl)	78.9	(35.8)	27 ~ 177	84.3	(56.6)	31 ~ 277	0.681
ヘモグロビン (g/dl)	14.3	(1.4)	12.0 ~ 16.7	14.1	(1.5)	11.4 ~ 17.1	0.757

*Student's *t*-test

血漿と血球の水銀濃度と分布変動

摂取群27名のベースおよび29週間の血液中水銀濃度の推移をFig. 3に示す。血漿と血球に分離する際ヘマトクリット値 (Ht) を測定しており、その値をもとに全血中水銀濃度を算出した。血球中の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の血球中総水銀濃度の平均(標準偏差)は13.5 (6.4) ng/g、14週のピーク時は56.9 (13.5) ng/g、最終29週時は24.2 (8.3) ng/gとなった。血球の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均96%とほとんどがメチル水銀であった。血漿中の水銀濃度の推移は、摂取終了の次週15週目でもっとも高い値となった。血漿中の水銀濃度のベース時の平均(標準偏差)は1.4 (0.5) ng/g、15週のピーク時は4.8 (1.1) ng/g、最終29週時は2.4 (0.7) ng/gとなった。血漿の総水銀に占めるメチル水銀の割合には幅があり、ベース時、摂取期間ならびに観察期間とおしての平均は91%、最小値は41%を示していた。

全血の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の平均(標準偏差)は6.7 (3.3) ng/g、14週のピーク時は26.9 (6.8) ng/g、最終29週時は11.9 (4.2) ng/gとなった。全血の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均95%とほとんどがメチル水銀であった。また全血に占める血球の割合について、ベース時、摂取前半 (7週まで)、摂取後半 (8-14週まで) ならびに観察期間 (15週-29週) を比較すると、群間に有意な差が認められた($p < 0.01$)。多重比較の結果、ベース時・観察期間 (ばく露終了後の魚を食べていない期間) と摂取前半・後半 (魚を食べている) で有意な差を認め、魚を食べている方が血球の割合が高くなった。

同様に血漿についても全血に占める血漿の割合について解析を行うと、群間に有意な差が認められた($p < 0.01$)。多重比較の結果、すべての群間に有意差が認められた。全血に占める血漿の割合は、ベース時、ばく露終了後の観察期間、摂取前半ならびに摂取後半の順に血漿の割合が低くなった。このことから、魚を食べている期間は血球によりメチル水銀が移行し、摂取が終了しメチル水銀の供給がなくなると血球から血漿にメチル水銀が移行すると推察された。

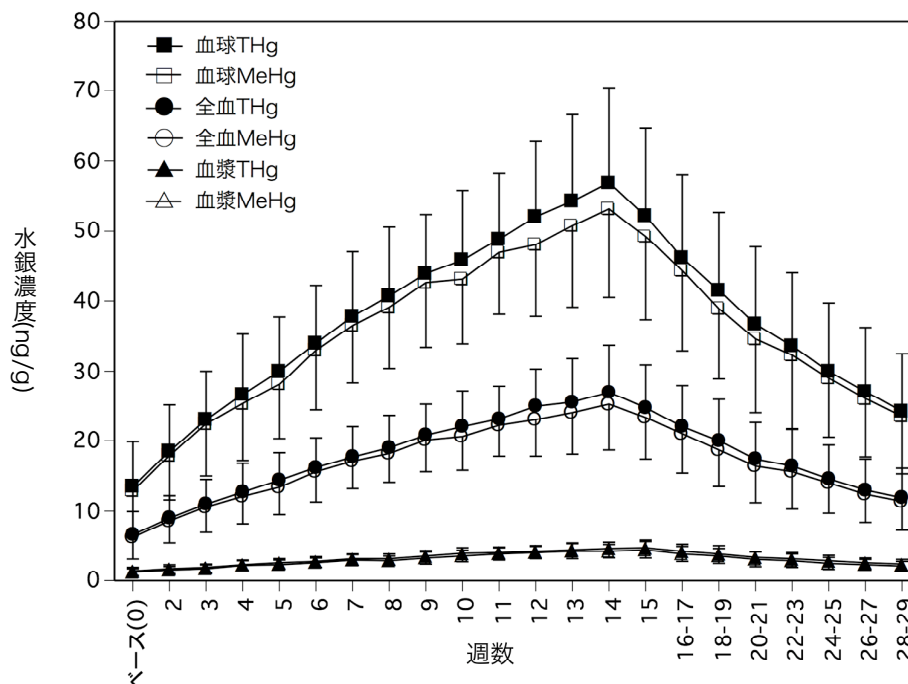


Fig.3 摂取群27名の血液中水銀濃度の変化。14週までが摂取期間、15週以降は観察期間、平均値と標準偏差で示した。THgは総水銀、MeHgはメチル水銀を示す。

毛髪微量分析、タイムラグ

摂取期間プラス3週間分の毛髪長さ7-8cm以上ある女性研究協力者9名について、微量毛髪の総水銀分析を行った。それぞれ、毛髪では12週目から17週目、血液では9週目から14週目にピークを迎えた。毛髪と血液のピーク値から、血液から毛髪に移行するタイムラグを算出したところ、1週間の早いタイプと、3週間の遅いタイプの2つのパターンがあるものと推測された。

血液と毛髪中の総水銀比

毛髪の微量分析を実施した9名について、採血時に相当する毛髪セグメントの総水銀値から血液と毛髪比を算出した。その結果、最小値157から最大値1051（2番目に高い値585）と幅があることが示された。また、濃度比の変化パターンについて解析したところ、摂取始めの時期は比が小さく、ばく露終了後の観察期間に比が大きくなるパターンと、摂取始めは比が大きく、摂取半ばで比が小さくなるパターンの概ね2つのパターンに分けることができた。前者のパターンは、毛髪中総水銀レベルの低下に比べ、血中レベルの低下が早いケースでみられた。一方、後者のパターンは、摂取後すぐに毛髪レベルが上昇するケースでみられた。このため、毛髪/血液比には個人差に加え、個人内でも魚の摂取状況によって変動するものと推測された。

TWI算出にあたって、250 : 1（毛髪 : 血液）の比が用いられているが、今回のデータから毛髪/血液の比は157-1051と幅が大きく、TWI算出に使用された250 : 1とは異なる可能性が考えられた。今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。

魚の寿命と水銀濃度、不飽和脂肪酸

魚はキンメダイ28、クロマグロ8、メバチマグロ7、ビンチョウマグロ5、メカジキ5、クロカジキ3、マカジキ1検体を市場から収集した。分析値はTable 2に示した。クロカジキでは総水銀に占めるメチル水銀の割合が56%と低かったが、その他の魚種ではほぼ90%以上がメチル水銀となった。同じ魚種でも不飽和脂肪酸（EPAやDHA）の割合や含有量にはばらつきが確認された。本研究でメチル水銀のヒトへのばく露に用いたメバチマグロおよびメカジキの可食部100g当りのDHAとEPAの合計平均は、それぞれ112 mg/100 g (n=4)、76 mg/100 g (n=4)であった。これに対し、今回分析したメバチマグロ可食部100g当りのDHAとEPAの合計含有量の平均（最小値-最大値）は、240 (70-900) mg/100 g (n=7)、メカジキでは610 (100-1860) mg/100 g (n=5)であった。ばく露に用いた魚のPUFAレベルは季節変

動もあるだろうがメバチマグロ、メカジキの中では少ない方に該当し、このため摂取期間中はPUFAについて大きな変動がみられなかったと考えられる。

Table 2 魚種ごとの総水銀（THg）、メチル水銀（MeHg）、メチル水銀／総水銀比（Me/T）、脂質、総脂肪酸、EPA、DHA（Mean, Min-Max）

魚種	n	THg (ng/g)	MeHg (ng/g)	Me/T (%)	脂質 (g/100g)	総脂肪酸 (mg/g)	EPA (%)	EPA (g/100g)	DHA (%)	DHA (g/100g)
キンメダイ	28	736 198-2112	702.1 186-1834	95.4 86.8-100.9	3.9 0.8-13.8	745 591-880	3.9 2.0-5.8	0.12 0.02-0.50	16.1 8.2-38.9	0.37 0.16-1.22
クロマグロ	8	394 183-652	376 169-598	95.2 91.7-98.5	6.8 1.7-11.2	763 629-867	8.9 6.3-12.1	0.47 0.11-1.10	20.0 12.7-28.5	0.92 0.24-1.51
メバチマグロ	7	779 674-883	749 666-824	96.4 93.3-99.1	1.4 0.6-5.3	562 428-761	4.0 2.5-5.8	0.05 0.01-0.23	24.7 16.7-32.1	0.19 0.06-0.67
ビンチョウ	5	452 277-650	417 260-563	92.7 86.6-97.9	3.2 0.4-13.3	652 531-811	4.4 2.2-8.8	0.25 0.01-0.95	25.5 17.8-34.8	0.59 0.04-2.51
メカジキ	5	1139 814-1373	1084 769-1320	95.5 85.1-101.7	5.4 0.9-15.3	722 552-887	3.2 1.7-5.4	0.19 0.01-0.69	13.9 8.9-26.7	0.42 0.09-1.17
クロカジキ	3	757 352-1473	389 225-686	55.9 46.6-63.9	3.4 2.5-4.6	569 555-589	3.4 2.5-4.6	0.01 0.01-0.01	31.5 27.5-35.4	0.10 0.07-0.12
マカジキ	1	279	248	88.9	0.5	605	4.5	0.01	32.8	0.1

キンメダイについては、市場で様々な大きさを揃えることが可能だったため、体重、全長（口から尾の先きまで）ならびに尾叉長（口から尾の付け根まで）を測定し水銀濃度との関係を検討した（Fig. 4,5）。体重の平均（最小-最大値）は1080g（368-3000、n=28）、全長平均41.5cm（31-57、n=22）ならびに尾叉長34.3cm（25-48、n=22）となった。全長と尾叉長は一部欠損値があったものの体重との関係をみると、体重と全長、尾叉長ともにPearsonの積率相関係数（r）0.97と高い相関関係を示した。体重と魚肉中水銀濃度を比較すると、有意な相関関係を示し、総水銀では $r=0.91$ 、メチル水銀では $r=0.92$ と高い相関関係を示した（Fig. 6）。魚の年齢と尾叉長、体重は強い関連がすでに報告されていることから、体重の重い、年齢の高い魚はメチル水銀の蓄積レベルも高いと考えられた。一方、セレンの分析については精査を行うことが必要と考えられ、総水銀及びメチル水銀との関連性について引き続き検討課題とした。

血漿中および赤血球膜中の不飽和脂肪酸

血漿および赤血球膜中の不飽和脂肪酸の相関について検討した。両材料間のPearson相関係数は、アラキドン酸で0.435と低かったものの、n-3系のEPAでは0.756、DHAでは0.669であった。飽和脂肪酸全体では0.147、一価不飽和脂肪酸では0.285、n-3系不飽和脂肪酸全体では0.691、n-6系不飽和脂肪酸では0.615であった。前年度の解析で、魚摂取群の血漿中不飽和脂肪酸の濃度が増えないことを述べたが、その原因として赤血球膜ではなく血漿を試料としたことによる方法論上の問題点では説明できないことが示された。前述のように、魚の不飽和脂肪酸には個体差が大きく、そのことが1つの要因とも考えられた。



Fig.4 実験で用いたキンメダイ

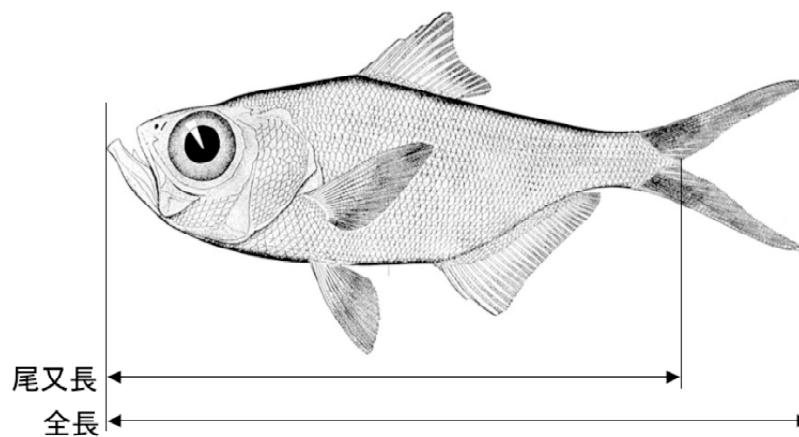


Fig.5 キンメダイの全長および尾又長の測定方法

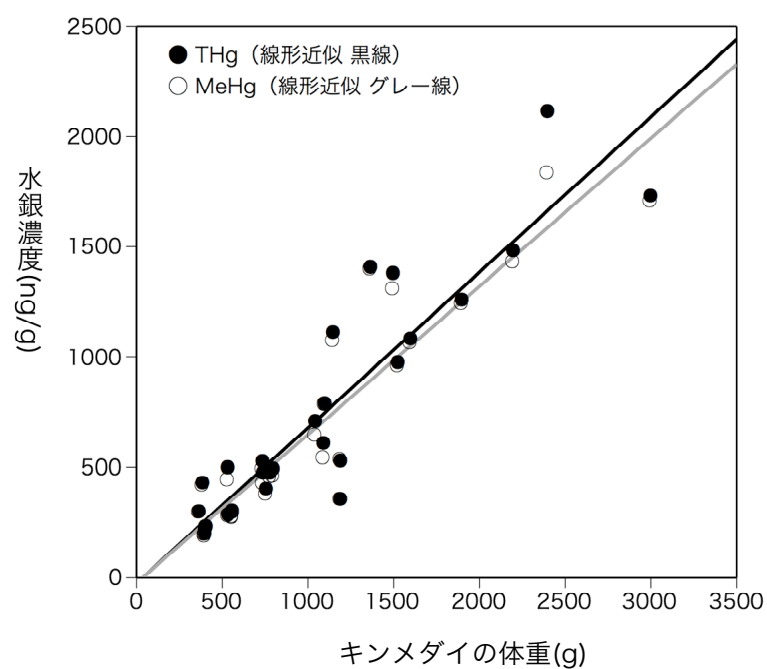


Fig.6 キンメダイの体重と総水銀（THg）およびメチル水銀（MeHg）濃度の関連性。ピアソンの積率相関係数はそれぞれ $r=0.91$ （THg）、 0.92 （MeHg）、いずれも $p<0.05$

2) 分担課題：心拍変動への影響

① 研究目的

メチル水銀ばく露の心血管系への影響が懸念されていることから、その基礎的研究として、心拍変動への影響についてヒトを対象に実験的な検討を実施し、メチル水銀ばく露と生理学的指標との関連性を解析した。

東部フィンランドでは魚摂取量が多いにも関わらず、冠状動脈疾患の死亡率が高いことが知られている。1995年、Salonenらは、東部フィンランドの一般住民を対象としたメチル水銀ばく露と心疾患による死亡率に関するコホート調査を行なった。その結果、毛髪中水銀濃度と死亡率の間には正の関連性が認められ、メチル水銀の低濃度ばく露が心疾患のリスクファクターになりうることを指摘した。この報告に続き、同じ研究グループより、同一コホートの追跡調査結果が2000年と2005年にそれぞれ報告された。これら一連の研究では、魚由来の不飽和脂肪酸についても着目しており、毛髪中水銀濃度が2 $\mu\text{g/g}$ よりも低い場合は、不飽和脂肪酸の心疾患を防ぐ効果がみられるが、2 $\mu\text{g/g}$ 以上の場合には、この効果はメチル水銀の影響に打ち消されるとした。東部フィンランドの他には、ヨーロッパ諸国とアメリカ合衆国を調査地域とした症例対照研究が、それぞれ2002年にGuallarらとYoshizawaらによって行なわれている。しかしながら、この2つの研究結果は、メチル水銀の心臓毒性を示唆する報告と関連性を否定する報告で相反するものであった。このほかにも、Hallgrenらが2001年に北部スウェーデンを調査地域とした症例対照研究を行なっており、魚由来のメチル水銀ばく露が心筋梗塞のリスクを増加させるとし、メチル水銀の心臓毒性を示唆した。以上の研究において共通しているのは、いずれも水俣病のような高濃度ばく露ではなく、日常的に受ける低濃度ばく露を対象としている点である。結論は必ずしも一致せず、詳細については未だ明らかになっていないが、メチル水銀は低濃度であっても心血管系に何らかの影響を与えることが懸念された。TWIのメチル水銀を摂取した場合の毛髪中水銀濃度を代謝モデル式から算出すると2.75 $\mu\text{g/g}$ となり、東部フィンランドの研究でリスクがあるとされた集団（毛髪中水銀濃度2.0 $\mu\text{g/g}$ 以上）よりも高いばく露レベルとなる。したがって、我々日本人のような魚食の習慣を有する国民においては、日常的なメチル水銀ばく露が、心疾患のリスクファクターになりうる可能性は否定できない。

メチル水銀ばく露による生体への健康影響は、これまで主に動物実験や疫学研究により議論され、実際にヒトを対象とした実験的な検証はほとんど行われてこなかった。しかしながら、現在安全と考えられている耐容摂取量の是非を議論するような低濃度ばく露の場合、あらためてヒトを対象とした実験的なアプローチによる検証が必要と考えられる。そこで本分担研究では、低濃度メチル水銀ばく露の心血管系への影響について明らかにすることを目的とし、耐容摂取量レベルのメチル水銀ばく露が心拍変動に与える影響を、実際にヒトを対象としたメチル水銀ばく露実験により検討した。

② 研究方法

解析対象の研究協力者とデータ収集

研究協力者は前章と同一の研究協力者であり、心拍変動のデータ収集も佐藤、仲井が担当した。そのデータの解析を村田が担当した。研究協力者、ばく露方法、心拍変動の解析に際して変数として使用した毛髪総水銀値、不飽和脂肪酸値も同様などは前章に記載した。

心拍変動の測定

心拍変動（Heart Rate Variability: HRV）の測定は、ベースライン時、15週目、29週目に行なった。10分間の安静臥床後、心拍動R-R間隔を5分間測定した（1271SP, NEC-Sanei Co., Tokyo, Japan）（Fig. 7）。得られたデータの中から、標準偏差（SD）が最小となる100個の連続したR-R間隔を自動的に抽出し、その抽出された区間のデータを用いて周波数分析を行った。心拍変動解析に用いたパラメータをTable 3に示す。本分担研究者は、摂取群と対照群の別の属性を知り得ない状況で統計解析を担当した。

Table 3 心拍変動解析に用いたパラメータ

パラメータ	説明
$CV_{RR}(\%)$	R-R 間隔の変動係数
HF	高周波数領域 (0.15~0.40 Hz) の構成成分
LF	低周波数領域 (0.01~0.15 Hz) の構成成分
$PSD_{HF}(ms^2)$	高周波領域のパワースペクトル密度 (副交感神経活動)
$PSD_{LF}(ms^2)$	低周波領域のパワースペクトル密度 (交感神経活動)
$CCV_{HF}(\%)$	$100 \times (PSD_{HF})^{1/2} / RR_{mean}$ (副交感神経活動)
$CCV_{LF}(\%)$	$100 \times (PSD_{LF})^{1/2} / RR_{mean}$ (交感神経活動)
%LF	$100 \times PSD_{LF} / (PSD_{LF} + PSD_{HF})$ (交感-副交感神経活動のバランス)
LF/HF ratio	PSD_{LF} / PSD_{HF} (交感-副交感神経活動のバランス)

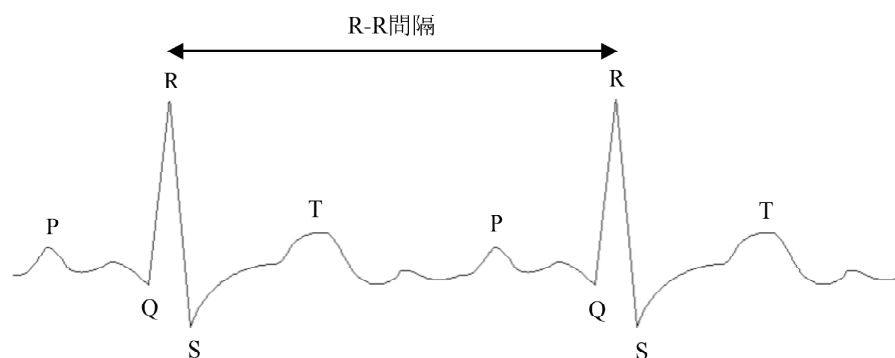


Fig. 7 心拍動R-R間隔の測定。10分間の安静臥床後、心拍動R-R間隔を5分間測定して計測した。

統計解析

摂取群と対照群の2群間における各項目の差は、Student's *t*-testを用いて検定した。ばく露期間中の変化量は、15週目の測定値からベースライン時の測定値を引くことにより求めた。毛髪中総水銀濃度の変動パターンにおける2群間の違いは、Morrisonの多重比較法を用いて検定した。HRVパラメータ、血漿中DHA+EPA濃度、毛髪中総水銀濃度の経時的変化は、時間変動と個人内変動を要因とし、二元配置分散分析法により検定した。なお、有意差が認められた場合は、Sheffeの多重比較をあわせて行った。HRVパラメータと毛髪中総水銀濃度との関係は、性、年齢、BMIおよび血漿中DHA+EPA濃度を補正因子として、重回帰分析により検討した。HRVパラメータの PSD_{LF} 、 PSD_{HF} 、LF/HF ratioはいずれも対数正規分布を示したため、これらにおいては、対数変換後の値を統計解析に用いた。統計解析は全て両側検定とし、有意水準を5%とした。以上の統計解析は、SPBS (Murata and Yano 2002) を用いて行った。

③ 研究の成果

摂取群と対照群におけるHRVパラメータ、血漿中DHA+EPA濃度、毛髪中総水銀濃度の経時的変化をTable 4に示す。摂取群において、15週目の CCV_{LF} 、LF/HF ratio、%LFがベースライン時に比べて有意に上昇し ($p<0.05$)、15週目のLF/HF ratioおよび%LFには、2群間に有意差が認められた ($p<0.05$) (Fig. 8)。

ベースライン時から15週目までの変化量については、 CCV_{LF} においてのみ2群間に有意差が認められ、摂取群の変化量が対照群の変化量に比べて有意に大きいことが示された ($p<0.05$)。なお、15週目に上昇した摂取群の CCV_{LF} 、LF/HF ratio、%LFは、29週目にはもとのレベルに戻っていた。血漿

中DHA+EPA濃度は、摂取群において徐々に減少していった ($p<0.05$)。対照群については、HRVパラメータおよび血漿中DHA+EPA濃度、毛髪中総水銀濃度の全てにおいて有意な変化は認められなかった。

Table 4 HRVパラメータ、PUFA、毛髪総水銀の経時変化

Parameters *	Experimental group (n = 27)				Control group (n = 27)			
	Baseline	15th week	29th week	<i>p</i>	Baseline	15th week	29th week	<i>p</i>
CV _{RR} (%)	4.31 ± 1.79	4.47 ± 2.16	4.14 ± 1.38	0.682	4.61 ± 1.75	4.12 ± 1.55	4.12 ± 1.43	0.298
CCV _{LF} (%)	2.25 ± 0.98	2.99 ± 1.62	2.32 ± 0.97	0.025	2.55 ± 1.32	2.28 ± 0.96	2.27 ± 0.86	0.346
CCV _{HF} (%)	2.97 ± 1.62	2.68 ± 1.31	2.70 ± 1.23	0.452	3.04 ± 1.32	2.72 ± 1.28	2.74 ± 1.19	0.387
log[PSD _{LF} (ms ²)]	2.60 ± 0.38	2.78 ± 0.56	2.61 ± 0.50	0.158	2.66 ± 0.51	2.60 ± 0.37	2.61 ± 0.38	0.776
log[PSD _{HF} (ms ²)]	2.81 ± 0.53	2.71 ± 0.53	2.73 ± 0.52	0.567	2.85 ± 0.44	2.74 ± 0.45	2.75 ± 0.48	0.400
log[LF/HF ratio]	-0.21 ± 0.43	0.07 ± 0.32	-0.12 ± 0.34	0.004	-0.19 ± 0.36	-0.13 ± 0.34	-0.14 ± 0.29	0.740
%LF	44.4 ± 11.9	52.0 ± 9.0	46.7 ± 9.7	0.004	44.8 ± 9.9	46.3 ± 9.4	46.0 ± 8.1	0.742
Heart rate (/min)	63 ± 8	64 ± 10	63 ± 10	0.630	63 ± 8	63 ± 8	64 ± 10	0.882
DHA+EPA in plasma (μg/mL)	140.9 ± 49.5	122.5 ± 44.7	115.1 ± 38.0	0.045	136.8 ± 61.8	145.9 ± 75.5	127.2 ± 67.4	0.359
T-Hg in hair (μg/g)	2.30 ± 1.08	8.76 ± 2.01	4.90 ± 1.65	<0.001	2.27 ± 1.20	2.14 ± 1.03	2.13 ± 1.03	0.208

Probability of time-dependent changes tested by two-way analysis of variance.

15週目におけるHRVパラメータと毛髪中総水銀濃度との関係をFig. 9に示す。CCV_{LF}においてのみ、毛髪中総水銀濃度 ($\beta=0.105$, $p<0.05$) と血漿中DHA+EPA濃度 ($\beta=0.006$, $p<0.05$) の間に有意な正の関連性が認められた。この関係は15週目の測定値においてのみ認められ、ベースライン時および29週目の測定値においては認められなかった。なお、群毎に回帰式を算出し、2群間の母回帰係数の勾配を分散分析により比較したところ、毛髪中総水銀濃度と血漿中DHA+EPA濃度のどちらの場合においても有意差は認められなかった (それぞれ $p=0.10$, $p=0.48$)。

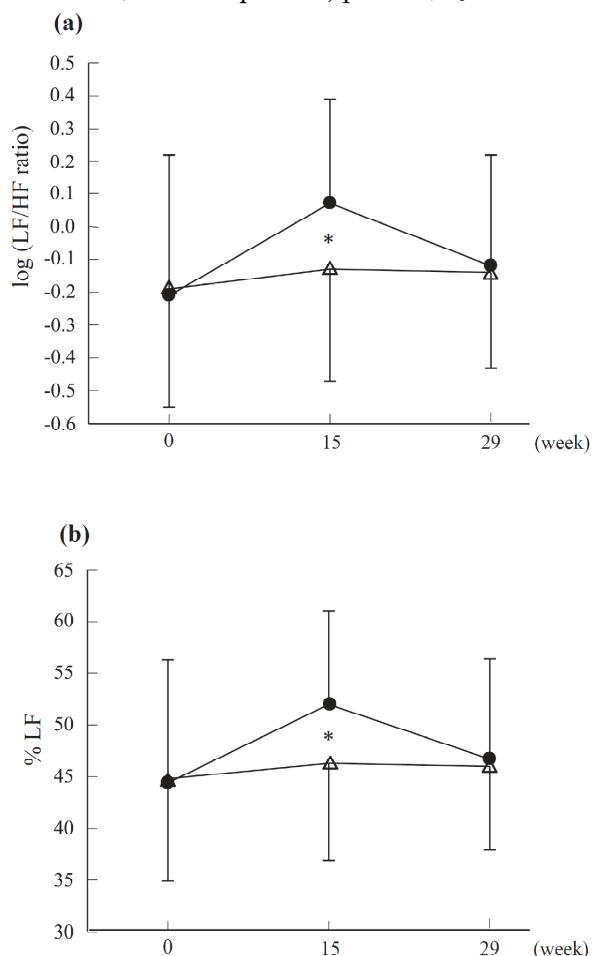


Fig. 8 LF/HF ratio (a) および %LF (b) の経時的変化 (平均値と標準偏差)

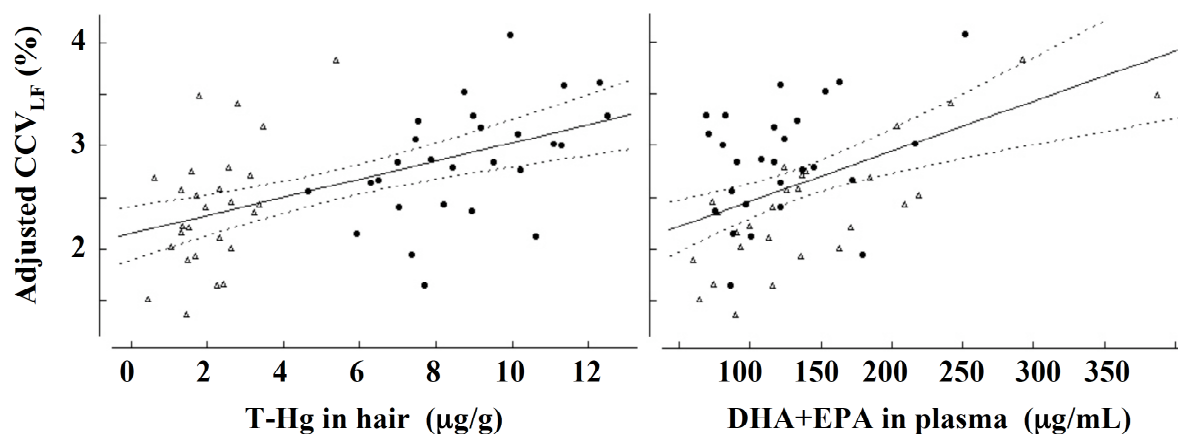


Fig. 9 15週目における性、年齢、BMIで補正したCCV_{LF}と毛髪中総水銀濃度（左）および血漿中DHA+EPA濃度（右）との関係（n=54）

メチル水銀ばく露による心拍変動への影響について、14週間のPTWIを限度としたメチル水銀のばく露後、HRVパラメータのCCV_{LF}、LF/HF ratio、%LFが上昇したことから、交感神経活動の上昇が示唆された。交感神経活動の上昇は、精神的ストレスの負荷がかかった状態においてもみられるが、その場合は心拍数や血圧も同時に上昇する。しかし、本研究においては心拍数と血圧に変動は認められず、この現象に精神的ストレスの関与はなかったと考えられた。LF/HF ratioおよび %LFは、交感-副交感神経活動のバランスを反映し、副交感神経活動の減少または交感神経活動の上昇によって変化すると報告されている。したがって本研究では、交感神経活動の上昇による交感神経優位の状態が引き起こされたと考えられた。7歳児を対象とした先行研究では、臍帯組織中メチル水銀濃度とLF/HF ratioに正の関連性がみられているが、このケースでは副交感神経活動の減少による交感神経優位の状態と報告されており、メチル水銀ばく露が要因で引き起こされる交感神経優位の状態でも、胎児期ばく露と成人期ばく露とでは、その発生機序が異なることが考えられた。メチル水銀ばく露と心血管系との関連は動物実験によっても検討されており、無機水銀ばく露が心血管機能に影響を与えることが報告されている。しかしながら、メチル水銀ばく露による影響についての報告や、心臓性自律神経活動を量的に評価した報告は見当らず、メチル水銀ばく露が心臓性自律神経活動バランスを変動させるメカニズム等に関しては不明な点が残る。

魚にはメチル水銀が含まれるが、その一方で、栄養素として含まれているn-3系不飽和脂肪酸の心疾患や心臓死を防ぐ効果が、多くの研究により報告されている。そのため血漿中不飽和脂肪酸（DHA+EPA）とHRVの関連性についても検討した。Mozaffarianらは、魚摂取に伴うn-3系血中不飽和脂肪酸の増加により、HRVパラメータのHF成分が上昇し、副交感神経優位の状態が導かれたと報告している。本研究では、マグロ・カジキを摂取しているにもかかわらず、摂取群の血漿中DHA+EPA濃度は徐々に減少し、15週目のCCV_{LF}と血漿中DHA+EPA濃度の間には正の関連性がみられた。血漿中DHA+EPA濃度が減少した理由としては、ばく露に用いたマグロ・カジキ中のDHA+EPA濃度が低かったこと、また、マグロ・カジキの摂取量が増えた反面、不飽和脂肪酸が豊富に含まれる青魚等の消費が抑制されたことが考えられた。HRVパラメータの変化に関する不一致の理由としては、メチル水銀のばく露レベルにより、n-3系不飽和脂肪酸がもたらす心血管系への効果が異なることが考えられた。東部フィンランドでメチル水銀ばく露と心疾患との関連性を調査した研究では、毛髪中水銀濃度が2.0 μg/gより低い集団においては、n-3系不飽和脂肪酸の心疾患を防ぐ効果が見られるが、2.0 μg/g以上の集団では、効果が弱められると報告されている。また、心血管系との関連ではないが、セイシエル諸島での小児発達コホート研究においては、n-3系不飽和脂肪酸と子どもの発達指標との間にみられる正の関連性は、メチル水銀のばく露を考慮すると弱まることが報告されている。一般に、魚食の習慣を有する我々日本人のメチル水銀およびn-3系不飽和脂肪酸レベルは、米国人のレベルに比べて遥かに高い。今後は、魚に含まれるメチル水銀とn-3系不飽和脂肪酸の相互作用に関して、不足や過剰といった量的な面も考慮した研究が必要と考えられた。

本研究で観察された、メチル水銀ばく露後の交感神経優位の状態は、実験終了時にはもとの状態に戻っていた。この現象は、メチル水銀の影響が可逆的なものであったことを示している。しかしなが

ら、ばく露が長期間に及んだ場合も、このような可逆的な影響で済むかは明らかでない。一般に、交感神経優位の状態は、心疾患や心臓死に強く関連することが知られている。また、本研究で観察されたようなLF成分の上昇による交感神経優位の状態が、心筋梗塞の患者で多く見られるとの報告もある。したがって、長期的なメチル水銀ばく露が継続的な交感神経優位の状態を引き起こすのであれば、心疾患のリスクと関連する可能性は否定できない。今回の実験では、PTWIでのばく露によりこのような現象が生じることが確認された。発生機序やメカニズムの解明、また、魚摂取に伴う不飽和脂肪酸等の交絡因子の解析といった更なる検討が必要であるものの、現在、内閣府食品安全委員会は、妊娠女性および妊娠の可能性のある女性を対象として、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 体重/週というTWIを提示しているが、心血管系へのリスクが証明された場合には、一般成人についても考察する必要性があるかもしれない。今回は探索的な研究と位置づけられるため、今後、さらなる実証的な追加研究が必要と考えられた。

3) 2年間の研究成果のまとめ

本研究はヒトを対象とした実験的研究について、すでにはほぼ終了した実験で得られた資料の解析を二年間に渡って実施したものであり、初年度に分析を開始し、次年度にその統計学的な解析を行った。このため「2年間のまとめ」は平成21年度の研究成果とほぼ重複する。以下にその内容を整理し記載するが、図表等の重複は避けて記載することとした。

1 研究全体の成果

① 全体の研究目的

本研究申請前に開始したヒトへのメチル水銀ばく露の実験結果の解析を行った。その主な目的は、まず第1に、魚摂取を介したヒト低濃度メチル水銀ばく露実験から得られるメチル水銀の摂取量、毛髪中および血液中水銀濃度の系統的なデータを解析し、毛髪／血液濃度比の変動におよぼす要因を明らかにすることである（毛髪／血液水銀濃度比の解析）。第2に、メチル水銀ばく露の心血管系への影響が懸念されていることから、その基礎的研究として、心拍変動への影響についてヒトを対象に実験的な検討を実施し、メチル水銀ばく露と生理学的指標との関連性を探索的に解析した。（心拍変動への影響）。その他に、ばく露とその影響に関する交絡要因のうち、セレンとの関連性、メチル水銀のばく露源としての魚の特徴、特に魚の寿命または魚の体長とメチル水銀レベルとの関係などについて検討した。

② 全体の研究方法

研究協力者は、健康な男性28名、女性26名の合計54名であり、市場に流通していたメバチマグロまたはメカジキを継続的に消費することによりメチル水銀を定常的に摂取したものであり、定期的に毛髪と血液採取を行った。得られた試料について、以下の2つの研究を実施した。

毛髪／血液総水銀濃度比の解析：前年度までに1398検体の血球および血漿中の総水銀・メチル水銀濃度を分析しており、これに加えてさらに毛髪について全長が残っていた9名について、毛髪をさらに細分化し各セグメントの水銀濃度を高感度原子蛍光水銀分析計により測定した。このことにより、より短期間の濃度変動を詳細に解析し濃度比の詳細な解析を行なった。また、血球と血漿を分けて分析を実施しており、メチル水銀の血液中の動態についても検討を実施した。

心拍変動への影響：1973年に厚生省が定めた成人のPTWI ($3.4 \mu\text{g/kg}$ 体重/週)を限度とし、メバチマグロまたはメカジキを用いてメチル水銀ばく露を行った。心拍変動の測定は、ベースライン時、15週目、29週目に行なった。10分間の安静臥床後、心拍動R-R間隔を5分間測定し（1271SP, NEC-Sanei Co., Tokyo, Japan）、標準偏差（SD）が最小となる100個の連続したR-R間隔を自動的に抽出し周波数分析を行った。

その他の研究：魚の寿命または魚の体長とメチル水銀レベルとの関係などについては、キンメダイを中心の指標魚とし、様々な体長の魚を入手し総水銀分析、メチル水銀、脂肪酸分析などを行った。また、不飽和脂肪酸の摂取量を推定する上で、血漿を用いた場合と赤血球を用いた場合でどの程度の乖離があるのかを検討した。

① 全体の研究成果

PTWIに相当するメチル水銀ばく露に伴う毛髪総水銀値の推移はFig. 2に示したとおりである。以下

に記すように、血中の水銀値の推移との間に時間的な差（タイムラグ）が認められた。このタイムラグの定量的な議論については、毛髪水銀値のより詳細な変化を考慮すべきと考え、精密分析の結果を用いることとし後述した。

血球中の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の血球中総水銀濃度の平均(標準偏差)は13.5 (6.4) ng/gに対して、14週のピーク時は56.9 (13.5) ng/g、最終29週時は24.2 (8.3) ng/gであった。血球の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均96%とほとんどがメチル水銀であった。血漿中の水銀濃度の推移は、摂取終了の次週15週目でもっとも高い値となった。血漿中の水銀濃度のベース時平均(標準偏差)は1.4 (0.5) ng/g、15週のピーク時は4.8 (1.1) ng/g、最終29週時は2.4 (0.7) ng/gであった。血漿の総水銀に占めるメチル水銀の割合には幅があり、ベース時、摂取期間ならびに観察期間とおしての平均は91%、最小値は41%であった。血漿と血球の値から計算した全血の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。全血総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均95%とほとんどがメチル水銀であった。また全血に占める血球の割合について、ベース時、摂取前半（7週まで）、摂取後半（8-14週まで）ならびに観察期間（15週-29週）を比較すると、魚を食べている摂取期間において血球の割合が高くなった。血漿については、ベース時、ばく露終了後の観察期間、摂取前半ならびに摂取後半の順に血漿の割合が低くなっており、このことから、メチル水銀を摂取している期間は血球において増加し、メチル水銀の摂取が終了しメチル水銀の供給がなくなると血球から血漿にメチル水銀が移行すると推察された。

摂取期間プラス3週間分の毛髪長さ7-8cm以上ある女性研究協力者9名について、微量毛髪の総水銀分析を行った。毛髪濃度がもっとも高くなった時期には個人差が見られ、範囲は12週から17週であった。一方、全血総水銀濃度の最大値にも個人差が見られ、範囲は9週目から14週目となった。血液から毛髪へ移行するタイムラグに関する解析でも個人差が観察され、タイムラグが1週間のケースと3週間のケースが観察された。

毛髪の微量分析を実施したこの9名について、採血時に相当する毛髪セグメントの総水銀値から血液と毛髪比を算出した。その結果、毛髪／血液の比は最小値157から最大値1051（2番目に高い値585）と幅があることが示された。このように毛髪／血液比が大きく変化するのは、魚摂取で血中の水銀濃度は速やかに高くなるが、血液から毛髪への移行にはタイムラグがあり毛髪に反映されるまで時間がかかること。さらに、血液から毛髪に反映されるまでに個人差が伴うことなどが理由の一つと考えられた。TWI算出にあたって、250 : 1（毛髪 : 血液）の比と排泄係数の不確実性から不確実係数4が用いられているが、今回のデータから毛髪/血液の比は157-1051と幅が大きく、TWI算出に使用された4では不十分な可能性が考えられた。今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。

次に、メチル水銀による成人期ばく露の影響として、心血管系へのリスクが懸念されているため、同じ研究協力者を対象としてメチル水銀の心拍変動に与える影響について検討した。その結果、14週間に渡る魚を介したPTWIでのメチル水銀ばく露により、心臓性自律神経活動バランスに変動が生じ、交感神経優位の状態が引き起こされた。この時、毛髪中総水銀濃度はばく露前の濃度（2.30 µg/g）に比べて6.46 µg/g上昇していた。交感神経優位の状態は、心疾患や心臓死に関連するとのされており、PTWIレベルでも継続的にメチル水銀のばく露を受けた場合、心疾患のリスクファクターになりうる可能性が示唆された。ただし、この現象はメチル水銀ばく露を終了後に消失したことから一過性であり、発生機序やメカニズムについては不明な点が残るため、今後の更なる検証が必要と考えられた。

様々な魚種と総水銀、メチル水銀および不飽和脂肪酸との関連について検討した。一部の魚種を除きメチル水銀の割合はほぼ90%以上であり、また同じ魚種でも不飽和脂肪酸（EPAやDHA）の割合や含有量にはばらつきが確認された。キンメダイについては、市場で様々な大きさを揃えることが可能だったため、体重、全長（口から尾の先きまで）ならびに尾叉長（口から尾の付け根まで）を測定し水銀濃度との関係を検討した。その結果、体重と全長、尾叉長ともに高い相関関係が観察され、体重の重い、年齢の高い魚はメチル水銀の蓄積も高いことが示された。また、血漿中と赤血球膜中の不飽和脂肪酸濃度の間には高い相関性が観察され、血漿を用いた解析でも不飽和脂肪酸の摂取量の推定は可能であることが示唆された。

2 各分担研究者（分担課題）の成果

1) 分担課題：毛髪／血液水銀濃度比の解析

① 研究目的

本分担研究では、大きく2つの点について明らかにすることを目的とした。第1に、魚摂取群の血中のメチル水銀分布を明らかにすることとし、メチル水銀の蓄積量が増えることで血漿と赤血球中メチル水銀の分布にどのような影響を与えるかを検討した。第2に、摂取されたメチル水銀が血液から毛髪へ移行するまでのタイムラグを明らかにすること、ならびに血液と毛髪中の比を明らかにすることを目的とした。このため、マグロまたはメカジキを用いてメチル水銀ばく露を行った27名のうち、摂取期間プラス3週間分の毛髪長がある研究協力者について3mm毎に切り取ったセグメントの毛髪総水銀測定を実施した。第3に、メチル水銀の摂取や健康影響に交絡する要因について明らかにするため、魚に含有されるPUFAとメチル水銀との関係について検討した。特に、日本人の魚摂取の中でメチル水銀の寄与率の高いマグロ・カジキ類とキンメダイについて、摂取のリスクとベネフィットの観点から魚中のメチル水銀とPUFAの関係に焦点をあてた。魚種ごとの総水銀に占めるメチル水銀割合、魚の寿命とメチル水銀濃度、メチル水銀とPUFAの関係について検討することを目的とした。

② 研究方法

ヒトへのメチル水銀ばく露方法については、平成21年度報告に詳細を記した。以下に簡素化して再度記述した。

研究対象とばく露の方法

2007年3月上旬から4月中旬にかけて宮城県内の大学にポスター掲示をして募集した成人男性28名、女性26名の合計54名を研究協力者として、実験を実施した。性、年齢、BMIを考慮し、メチル水銀をばく露する摂取群（男性14名、女性13名）とばく露しない対照群（男性14名、女性13名）の2群に分けた。メチル水銀のばく露は、1973年に厚生省が定めた成人のPTWI（ $3.4 \mu\text{g/kg}$ 体重/週）を限度とし、魚摂取を介して14週間継続して行なった。ばく露終了後には、更に15週間の観察期間を設けた。ばく露源には、メバチマグロとメカジキを用いた。この総水銀中に占めるメチル水銀の割合については、実験開始前に予備検討を実施し、メチル水銀の総水銀に対する割合を94%と仮定して計算した。摂取群の研究協力者には、1週間に1度、個人毎に規定量の冷凍した魚を配布し、次週までに全て摂取することを条件として、14週間継続して摂取させた。ただし、メチル水銀のばく露量をコントロールできなくなるため、配布する魚以外のメチル水銀濃度の高い魚の摂取は、調査期間中控えてもらった。一方、対照群の研究協力者には、これまでの食生活を変えないことを条件として、普段通りの生活を送ってもらった。

なお、本研究は、東北大学医学系研究科倫理委員会の審査と承認のもとに実施した（受付番号：2006-328）。

生体試料の採取

メチル水銀のばく露指標として、毛髪中総水銀濃度を用いた。実験開始前に蓋頭隆起骨付近の毛髪を1cm²程度剃り落とし、その部分から伸びた毛髪を4週間毎に伸長速度を測定しながら採取し、分析に供した。血漿中および血球中のメチル水銀および総水銀分析、ならびに不飽和脂肪酸分析のため、空腹時採血を実施した。摂取群については、摂取期間中は1週間に1度、摂取終了後は2週間に1度採取した。対照群は8～13週毎に1度、計4回採取した。血液はヘマトクリット値測定後、血球と血漿に分離し、-80℃で凍結保存した。なお、研究協力者の健康状態の確認のため、採血の時期にあわせてAST、ALT、コレステロール、中性脂肪、赤血球数、ヘマトクリット、白血球数等の測定を行なうとともに、血圧、体重測定を行なったが、健康上の問題は観察されず無事に実験を終了した。

化学分析

毛髪中および魚肉中の総水銀分析は、湿式灰化・還元気化原子吸光光度法により行った。分析の精度管理には、標準物質DORM-2およびNIES CRM No13を用いたが、それぞれ良好な結果が得られた。なお、毛髪総水銀の高感度分析は次章に記載した。

血液は血漿および血球に分割して測定した。総水銀は還元気化・原子吸光光度法にて、メチル水銀は

ECDガスクロマトグラフィーにて測定した。測定にあたって水銀分析マニュアル(環境省)に従った。分析はいで株式会社にて委託して実施した。

血漿中および魚肉中のDHA、EPAの分析は、ガスクロマトグラフィー法によりエスアールエル株式会社にて行なった。

全ての化学分析は、精度管理の観点から実験中の分析は行わず、実験終了後に一斉に行なった。

毛髪総水銀の微量分析

マグロを摂取した27名のうち、摂取開始から21週後の段階で毛髪の全長を採取した。解析に必要な摂取期間プラス3週間分の毛髪の長さ7・8cm以上ある研究協力者9名について、21週間プラス3週間の約24週間分に相当する長さでカットし、採血日に該当するセグメント微量毛髪(1・2週間に伸びた毛髪断片3・6mm程度)を作成し分析に用いた。溶液化ならびに灰化し、還元気化原子蛍光分析を実施した。測定にあたってMercur DUO Plus(株式会社アナリティックイエナ)を用いた。精度管理用標準物質の測定値についても良好な結果であった。

不飽和脂肪酸に関する追加調査

これまでの研究協力者とは別の健康な女性133名より、抗凝固剤としてEDTAを用いて空腹時の末梢血を採取した。遠心分離後に血漿と赤血球膜中の全脂肪酸分析をガスクロマトグラフィー方により実施した。化学分析は女子栄養大学の支援を受けて実施した。なお、研究協力者には不飽和脂肪酸の分析を行うことを説明し、書面による同意を得て調査を実施した。本追加調査に当たり別に本学倫理委員会に研究計画を提出し承認を得て実行した。

③ 研究の成果

研究協力者の属性

前年度と同様な結果となるが、研究協力者の属性をTable 1に示す。各群の年齢およびBMIの平均値(標準偏差)は、それぞれ、摂取群25.2(4.1)歳、22.2(3.2)kg/m²、対照群23.7(3.2)歳、21.0(2.7)kg/m²で、年齢、BMIとも2群間に有意差は認められなかった。血圧および一般血液生化学検査の結果についても、全ての項目において2群間に有意差は認められなかった。

なお、性差については、収縮期血圧およびALT、中性脂肪、ヘモグロビンにおいて有意差が認められたが、その他の項目においては認められなかった。

血漿と血球の水銀濃度と分布変動

摂取群27名のベースおよび29週間の血液中水銀濃度の推移をFig. 3に示す。血漿と血球に分離する際Htを測定しており、その値をもとに全血中水銀濃度を算出した。血球中の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の血球中総水銀濃度の平均(標準偏差)は13.5(6.4)ng/g、14週のピーク時は56.9(13.5)ng/g、最終29週時は24.2(8.3)ng/gとなった。血球の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均96%とほとんどがメチル水銀であった。血漿中の水銀濃度の推移は、摂取終了の次週15週目でもっとも高い値となった。血漿中の水銀濃度のベース時平均(標準偏差)は1.4(0.5)ng/g、15週のピーク時は4.8(1.1)ng/g、最終29週時は2.4(0.7)ng/gとなった。血漿の総水銀に占めるメチル水銀の割合には幅があり、ベース時、摂取期間ならびに観察期間とおしての平均は91%、最小値は41%を示していた。

全血の水銀濃度の推移は、14週目でもっとも濃度が高くなった。ベース時の平均(標準偏差)は6.7(3.3)ng/g、14週のピーク時は26.9(6.8)ng/g、最終29週時は11.9(4.2)ng/gとなった。全血の総水銀に占めるメチル水銀の割合は、ベース時、摂取期間、観察期間とおして平均95%とほとんどがメチル水銀であった。また全血に占める血球の割合について、ベース時、摂取前半(7週まで)、摂取後半(8・14週まで)ならびに観察期間(15週・29週)を比較すると、群間に有意な差が認められた($p < 0.01$)。多重比較の結果、ベース時・観察期間(ばく露終了後の魚を食べていない期間)と摂取前半・後半(魚を食べている)で有意な差を認め、魚を食べている方が血球の割合が高くなった。

同様に血漿についても全血に占める血漿の割合について解析を行うと、群間に有意な差が認められた($p < 0.01$)。多重比較の結果、すべての群間に有意差が認められた。全血に占める血漿の割合は、ベース時、ばく露終了後の観察期間、摂取前半ならびに摂取後半の順に血漿の割合が低くなった。この

ことから、魚を食べている期間は血球によりメチル水銀が移行し、摂取が終了しメチル水銀の供給がなくなると血球から血漿にメチル水銀が移行すると推察された。

毛髪微量分析、タイムラグ

摂取期間プラス3週間分の毛髪長さ7-8cm以上ある女性研究協力者9名について、微量毛髪の総水銀分析を行った。その結果、それぞれ、毛髪では12週目から17週目、血液では9週目から14週目にピークを迎えた。毛髪と血液のピーク値から、血液から毛髪に移行するタイムラグを算出したところ、1週間の早いタイプと、3週間の遅いタイプの2つのパターンがあるものと推測された。

血液と毛髪中の総水銀比

毛髪の微量分析を実施した9名について、採血時に相当する毛髪セグメントの総水銀値から血液と毛髪比を算出した。その結果、最小値157から最大値1051（2番目に高い値585）と幅があることが示された。また、濃度比の変化パターンについて解析したところ、摂取始めの時期は比が小さく、ばく露終了後の観察期間に比が大きくなるパターンと、摂取始めは比が大きく、摂取半ばで比が小さくなるパターンの概ね2つのパターンに分けることができた。前者のパターンは、毛髪中総水銀レベルの低下に比べ、血中レベルの低下が早いケースでみられた。一方、後者のパターンは、摂取後すぐに毛髪レベルが上昇するケースでみられた。このため、毛髪/血液比には個人差に加え、個人内でも魚の摂取状況によって変動するものと推測された。

TWI算出にあたって、250:1（毛髪:血液）の比が用いられたが、今回のデータから毛髪/血液の比は157-1051と幅が大きく、TWI算出に使用された250:1とは異なる可能性が考えられた。今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。

魚の寿命と水銀濃度、不飽和脂肪酸

魚はキンメダイ28、クロマグロ8、メバチマグロ7、ビンチョウマグロ5、メカジキ5、クロカジキ3、マカジキ1検体を市場から収集した。分析値はTable 2に示した。クロカジキでは総水銀に占めるメチル水銀の割合56%と低かったが、その他の魚種ではほぼ90%以上がメチル水銀となった。同じ魚種でも不飽和脂肪酸（EPAやDHA）の割合や含有量にはばらつきが確認された。本研究でメチル水銀のヒトへのばく露に用いたメバチマグロおよびメカジキの可食部100g当りのDHAとEPAの合計平均は、それぞれ112 mg/100 g (n=4), 76 mg/100 g (n=4)であった。これに対し、今回分析したメバチマグロ可食部100g当りのDHAとEPAの合計含有量の平均（最小値-最大値）は、240 (70-900) mg/100 g (n=7)、メカジキでは610 (100-1860) mg/100 g (n=5)であった。ばく露に用いた魚のPUFAレベルは季節変動もあるだろうがメバチマグロ、メカジキの中では少ない方に該当し、このため摂取期間中はPUFAについて大きな変動がみられなかったと考えられる。

キンメダイについては、市場で様々な大きさを揃えることが可能だったため、体重、全長（口から尾の先きまで）ならびに尾叉長（口から尾の付け根まで）を測定し水銀濃度との関係を検討した（Fig. 4,5）。体重の平均（最小-最大値）は1080g（368-3000、n=28）、全長平均41.5cm（31-57、n=22）ならびに尾叉長34.3cm（25-48、n=22）となった。全長と尾叉長は一部欠損値があったものの体重との関係をみると、体重と全長、尾叉長ともにPearsonの積率相関係数（r）0.97と高い相関関係を示した。体重と魚肉中水銀濃度を比較すると、有意な相関関係を示し、総水銀では $r=0.91$ 、メチル水銀では $r=0.92$ と高い相関関係を示した（Fig. 6）。魚の年齢と尾叉長、体重は強い関連がすでに報告されていることから、体重の重い、年齢の高い魚はメチル水銀の蓄積レベルも高いと考えられた。

一方、セレンの分析については精査を行うことが必要と考えられ、総水銀及びメチル水銀との関連性について引き続き検討課題とした。

血漿中および赤血球膜中の不飽和脂肪酸

血漿および赤血球膜中の不飽和脂肪酸の相関について検討した。両材料間のPearson相関係数は、アラキドン酸で0.435と低かったものの、n-3系のEPAでは0.756、DHAでは0.669であった。飽和脂肪酸全体では0.147、一価不飽和脂肪酸では0.285、n-3系不飽和脂肪酸全体では0.691さらにn-6系不飽和脂肪酸では0.615であった。このことから、血漿を用いても不飽和脂肪酸の摂取量は十分に推定できることが示された。

2) 分担課題：心拍変動への影響

① 研究目的

メチル水銀ばく露の心血管系への影響が懸念されていることから、その基礎的研究として、心拍変動への影響についてヒトを対象に実験的な検討を実施し、メチル水銀ばく露と生理学的指標との関連性を解析した。

東部フィンランドでは魚摂取量が多いにも関わらず、冠動脈疾患の死亡率が高いことが知られている。1995年、Salonenらは、東部フィンランドの一般住民を対象としたメチル水銀ばく露と心疾患による死亡率に関するコホート調査を行なった。その結果、毛髪中水銀濃度と死亡率の間には正の関連性が認められ、メチル水銀の低濃度ばく露が心疾患のリスクファクターになりうることを指摘した。この報告に続き、同じ研究グループより、同一コホートの追跡調査結果が2000年と2005年にそれぞれ報告された。これら一連の研究では、魚由来の不飽和脂肪酸についても着目しており、毛髪中水銀濃度が2 $\mu\text{g/g}$ よりも低い場合は、不飽和脂肪酸の心疾患を防ぐ効果がみられるが、2 $\mu\text{g/g}$ 以上の場合には、この効果はメチル水銀の影響に打ち消されるとした。東部フィンランドの他には、ヨーロッパ諸国とアメリカ合衆国を調査地域とした症例対照研究が、それぞれ2002年にGuallarらとYoshizawaらによって行なわれている。しかしながら、この2つの研究結果は、メチル水銀の心臓毒性を示唆する報告と関連性を否定する報告で相反するものであった。このほかにも、Hallgrenらが2001年に北部スウェーデンを調査地域とした症例対照研究を行なっており、魚由来のメチル水銀ばく露が心筋梗塞のリスクを増加させるとし、メチル水銀の心臓毒性を示唆した。以上の研究において共通しているのは、いずれも水俣病のような高濃度ばく露ではなく、日常的に受ける低濃度ばく露を対象としている点である。結論は必ずしも一致せず、詳細については未だ明らかになっていないが、メチル水銀は低濃度であっても心血管系に何らかの影響を与えることが懸念された。TWIのメチル水銀を摂取した場合の毛髪中水銀濃度を代謝モデル式から算出すると2.75 $\mu\text{g/g}$ となり、東部フィンランドの研究でリスクがあるとされた集団（毛髪中水銀濃度2.0 $\mu\text{g/g}$ 以上）よりも高いばく露レベルとなる。したがって、我々日本人のような魚食の習慣を有する国民においては、日常的なメチル水銀ばく露が、心疾患のリスクファクターになりうる可能性は否定できない。

メチル水銀ばく露による生体への健康影響は、これまで主に動物実験や疫学研究により議論され、実際にヒトを対象とした実験的な検証はほとんど行われてこなかった。しかしながら、現在安全と考えられている耐容摂取量の是非を議論するような低濃度ばく露の場合、あらためてヒトを対象とした実験的なアプローチによる検証が必要と考えられる。そこで本分担研究では、低濃度メチル水銀ばく露の心血管系への影響について明らかにすることを目的とし、耐容摂取量レベルのメチル水銀ばく露が心拍変動に与える影響を、実際にヒトを対象としたメチル水銀ばく露実験により検討した。

なお、本分担研究は初年度からデータ解析を開始し、実際に統計学的な総括を平成21年度に行ったため、以下の内容は平成21年度報告書と重複する。

② 研究方法

解析対象の研究協力者とデータ収集

研究協力者は前章と同一の研究協力者であり、心拍変動のデータ収集も佐藤、仲井が担当した。そのデータの解析を村田が担当した。研究協力者、ばく露方法、心拍変動の解析に際して変数として使用した毛髪総水銀値、不飽和脂肪酸値も同様などは前章に記載した。

心拍変動の測定

心拍変動（HRV）の測定は、ベースライン時、15週目、29週目に行なった。10分間の安静臥床後、心拍動R-R間隔を5分間測定した（1271SP）（Fig. 7）。得られたデータの中から、標準偏差（SD）が最小となる100個の連続したR-R間隔を自動的に抽出し、その抽出された区間のデータを用いて周波数分析を行った。心拍変動解析に用いたパラメータをTable 3に示す。本分担研究者は、摂取群と対照群の別の属性を知り得ない状況で統計解析を担当した。

統計解析

摂取群と対照群の2群間における各項目の差は、Student's t-testを用いて検定した。ばく露期間中の変化量は、15週目の測定値からベースライン時の測定値を引くことにより求めた。毛髪中総水銀濃

度の変動パターンにおける2群間の違いは、Morrisonの多重比較法を用いて検定した。HRVパラメータ、血漿中DHA+EPA濃度、毛髪中総水銀濃度の経時的変化は、時間変動と個人内変動を要因とし、二元配置分散分析法により検定した。なお、有意差が認められた場合は、Scheffeの多重比較をあわせて行った。HRVパラメータと毛髪中総水銀濃度との関係は、性、年齢、BMIおよび血漿中DHA+EPA濃度を補正因子として、重回帰分析により検討した。HRVパラメータの PSD_{LF} 、 PSD_{HF} 、 LF/HF ratio はいずれも対数正規分布を示したため、これらにおいては、対数変換後の値を統計解析に用いた。統計解析は全て両側検定とし、有意水準を5%とした。以上の統計解析は、SPBS (Murata and Yano 2002) を用いて行った。

③ 研究の成果

摂取群と対照群におけるHRVパラメータ、血漿中DHA+EPA濃度、毛髪中総水銀濃度の経時的変化をTable 4に示す。摂取群において、15週目の CCV_{LF} 、 LF/HF ratio、 $\%LF$ がベースライン時に比べて有意に上昇し ($p<0.05$)、15週目の LF/HF ratioおよび $\%LF$ には、2群間に有意差が認められた ($p<0.05$) (Fig. 8)。

ベースライン時から15週目までの変化量については、 CCV_{LF} においてのみ2群間に有意差が認められ、摂取群の変化量が対照群の変化量に比べて有意に大きいことが示された ($p<0.05$)。なお、15週目に上昇した摂取群の CCV_{LF} 、 LF/HF ratio、 $\%LF$ は、29週目にはもとのレベルに戻っていた。血漿中 DHA+EPA 濃度は、摂取群において徐々に減少していった ($p<0.05$)。対照群については、HRV パラメータおよび血漿中 DHA+EPA 濃度、毛髪中総水銀濃度の全てにおいて有意な変化は認められなかった。

15週目におけるHRVパラメータと毛髪中総水銀濃度との関係をFig. 9に示す。 CCV_{LF} においてのみ、毛髪中総水銀濃度 ($\beta=0.105$, $p<0.05$) と血漿中 DHA+EPA 濃度 ($\beta=0.006$, $p<0.05$) の間に有意な正の関連性が認められた。この関係は15週目の測定値においてのみ認められ、ベースライン時および29週目の測定値においては認められなかった。なお、群毎に回帰式を算出し、2群間の母回帰係数の勾配を分散分析により比較したところ、毛髪中総水銀濃度と血漿中 DHA+EPA 濃度のどちらの場合においても有意差は認められなかった (それぞれ $p=0.10$, $p=0.48$)。

メチル水銀ばく露による心拍変動への影響について、14週間のPTWIを限度としたメチル水銀のばく露後、HRVパラメータの CCV_{LF} 、 LF/HF ratio、 $\%LF$ が上昇したことから、交感神経活動の上昇が示唆された。交感神経活動の上昇は、精神的ストレスの負荷がかかった状態においてもみられるが、その場合は心拍数や血圧も同時に上昇する。しかし、本研究においては心拍数と血圧に変動は認められず、この現象に精神的ストレスの関与はなかったと考えられた。 LF/HF ratioおよび $\%LF$ は、交感-副交感神経活動のバランスを反映し、副交感神経活動の減少または交感神経活動の上昇によって変化すると報告されている。したがって本研究では、交感神経活動の上昇による交感神経優位の状態が引き起こされたと考えられた。7歳児を対象とした先行研究では、臍帯組織中メチル水銀濃度と LF/HF ratioに正の関連性がみられているが、このケースでは副交感神経活動の減少による交感神経優位の状態と報告されており、メチル水銀ばく露が要因で引き起こされる交感神経優位の状態でも、胎児期ばく露と成人期ばく露とでは、その発生機序が異なることが考えられた。メチル水銀ばく露と心血管系との関連は動物実験によっても検討されており、無機水銀ばく露が心血管機能に影響を与えることが報告されている。しかしながら、メチル水銀ばく露による影響についての報告や、心臓性自律神経活動を量的に評価した報告は見当らず、メチル水銀ばく露が心臓性自律神経活動バランスを変動させるメカニズム等に関しては不明な点が残る。

魚にはメチル水銀が含まれるが、その一方で、栄養素として含まれているn-3系不飽和脂肪酸の心疾患や心臓死を防ぐ効果が、多くの研究により報告されている。そのため血漿中不飽和脂肪酸 (DHA+EPA) とHRVの関連性についても検討した。Mozaffarianらは、魚摂取に伴うn-3系血中不飽和脂肪酸の増加により、HRVパラメータのHF成分が上昇し、副交感神経優位の状態が導かれたと報告している。本研究では、マグロ・カジキを摂取しているにもかかわらず、摂取群の血漿中DHA+EPA濃度は徐々に減少し、15週目の CCV_{LF} と血漿中DHA+EPA濃度の間には正の関連性がみられた。血漿中DHA+EPA濃度が減少した理由としては、ばく露に用いたマグロ・カジキ中のDHA+EPA濃度が低かったこと、また、マグロ・カジキの摂取量が増えた反面、不飽和脂肪酸が豊富に含まれる青魚等の消費が抑制されたことが考えられた。HRVパラメータの変化に関する不一致の理由としては、メチル

水銀のばく露レベルにより、n-3系不飽和脂肪酸がもたらす心血管系への効果が異なることが考えられた。東部フィンランドでメチル水銀ばく露と心疾患との関連性を調査した研究では、毛髪中水銀濃度が $2.0 \mu\text{g/g}$ より低い集団においては、n-3系不飽和脂肪酸の心疾患を防ぐ効果が見られるが、 $2.0 \mu\text{g/g}$ 以上の集団では、効果が弱められると報告されている。また、心血管系との関連ではないが、セイシェル諸島での小児発達コホート研究においては、n-3系不飽和脂肪酸と子どもの発達指標との間にみられる正の関連性は、メチル水銀のばく露を考慮すると弱まることが報告されている。一般に、魚食の習慣を有する我々日本人のメチル水銀およびn-3系不飽和脂肪酸レベルは、米国人のレベルに比べて遥かに高い。今後は、魚に含まれるメチル水銀とn-3系不飽和脂肪酸の相互作用に関して、不足や過剰といった量的な面も考慮した研究が必要と考えられた。

本研究で観察された、メチル水銀ばく露後の交感神経優位の状態は、実験終了時にはもとの状態に戻っていた。この現象は、メチル水銀の影響が可逆的なものであったことを示している。しかしながら、ばく露が長期間に及んだ場合も、このような可逆的な影響で済むかは明らかでない。一般に、交感神経優位の状態は、心疾患や心臓死に強く関連することが知られている。また、本研究で観察されたようなLF成分の上昇による交感神経優位の状態が、心筋梗塞の患者で多く見られるとの報告もある。したがって、長期的なメチル水銀ばく露が継続的な交感神経優位の状態を引き起こすとすれば、心疾患のリスクと関連する可能性は否定できない。今回の実験では、PTWIでのばく露によりこのような現象が生じることが確認された。発生機序やメカニズムの解明、また、魚摂取に伴う不飽和脂肪酸等の交絡因子の解析といった更なる検討が必要であるものの、現在、内閣府食品安全委員会は、妊娠女性および妊娠の可能性のある女性を対象として、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 体重/週というTWIを提示しているが、心血管系へのリスクが証明された場合には、一般成人についても考察する必要性があるかもしれない。今回は探索的な研究と位置づけられるため、今後、さらなる実証的な追加研究が必要と考えられた。

(2) 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト（論文は、添付すること。）

- Yaginuma-Sakurai K, Murata K, Shimada M, Nakai K, Kurokawa N, Kameo S, Satoh H. Intervention study on cardiac autonomic nervous effects of methylmercury from seafood. Neurotoxicol Teratol 32:240-245, 2010.

(3) 特許及び特許出願の数と概要

なし

(4) その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

なし

3 今後の問題点等

- PTWI に相当するメチル水銀ばく露後の、血液および毛髪に移行するメチル水銀のピークとタイムラグ、その時の毛髪／血液水銀比、血漿と血球の比について実験的に検討を行った。その結果、いずれの指標においても個人差が大きいことが示され、特に毛髪／血液水銀比については、メチル水銀のばく露が増加している過程とそうではない過程でも大きく異なることが示された。毛髪／血液比の幅は157から1051と大きく、PTWI算出にあたっては、WHO(1990)で報告されている250:1（毛髪：血液）が用いられ、比の不確実係数として2が考慮されているが、それでは過小評価となるケースもあるものと懸念された。今後、個人差に加え個人内変動についても基礎的な資料の収集が必要と考えられた。
- PTWI に相当するメチル水銀ばく露により、一過性ながら心臓性自律神経バランスに変動が生じ、交感神経優位の状態が引き起こされることが示された。心血管疾患リスクとの関連性は不明であり、また魚摂取により心血管疾患リスクを軽減するとされる不飽和脂肪酸なども摂取されることから、リスク評価にはさらなる実証的な研究が必須と考えられた。我々日本人の毛髪中水銀濃度の平均レベルは2 $\mu\text{g/g}$ で、欧米人のレベルに比べて高い。不飽和脂肪酸の摂取量についても同様に日本人のレベルは高く、わが国独自のデータ収集が必要と思われた。
- 本研究ではメチル水銀のみを議論の対象としたが、魚にはメチル水銀の他に、PCB などの難分解性有機汚染物質（POPs）などの化学物質も含まれる。リスクとベネフィットを持ち合わせる魚介類について、魚食の安全性に関して総合的な評価が求められる。