ミニ特集

環境因子により誘発される疾患の機構解明：
フィールドワーク研究と実験研究のクロストークを介した衛生学研究

フィールドワーク研究と実験研究を基にした重金属によって 誘発された疾患の機構解明と浄化法の開発

矢嶋伊知朗, Cunchao ZOU, Xiang LI, 中野 千尋,
小又 尉広, 熊坂真由子

名古屋大学大学院医学系研究科環境労働衛生学

Analysis of Heavy-Metal-Mediated Disease and Development of a Novel Remediation System Based on Fieldwork and Experimental Research

Ichiro YAJIMA, Cunchao ZOU, Xiang LI, Chizuru NAKANO,
Yasuhiro OMATA and Mayuko Y. KUMASAKA

Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine

Abstract Heavy-metal pollution occurs in various environments, including water, air and soil, and has serious effects on human health. Since heavy-metal pollution in drinking water causes various diseases including skin cancer, it has become a global problem worldwide. However, there is limited information on the mechanism of development of heavy-metal-mediated disease. We performed both fieldwork and experimental studies to elucidate the levels of heavy-metal pollution and mechanisms of development of heavy-metal-related disease and to develop a novel remediation system. Our fieldwork in Bangladesh, Vietnam and Malaysia demonstrated that drinking well water in these countries was polluted with high concentrations of several heavy metals including arsenic, barium, iron and manganese. Our experimental studies based on the data from our fieldwork demonstrated that these heavy metals caused skin cancer and hearing loss. Further experimental studies resulted in the development of a novel remediation system with which toxic heavy metals were absorbed from polluted drinking water. Implementation of both fieldwork and experimental studies is important for prediction, prevention and therapy of heavy-metal-mediated diseases.

Key words: heavy metal (重金属), fieldwork (フィールドワーク), experimental study (実験研究), cancer (癌), drinking water (飲用水)

緒 言

重金属による環境汚染は自然発生から人為的(産業的)発生まで、様々な原因によって引き起こされる。中でも飲用水に関わる汚染は、安全な水の確保を阻害し、人々

の健康に大きな影響を及ぼしている。飲用水の重金属汚染は深刻な問題の1つであり、世界中で深刻な問題となっている(1)。中でも飲用井戸水のヒ素汚染はアジア・アフリカ及び南米地域の広範囲にわたって広がっており、癌を含む多くの疾患発症の原因となっている。例えばバングラデシュでは2,500万人、ベトナムでは1,100万人もの人々が慢性ヒ素中毒を発症している(2, 3)。また、メキシコ及びチリで各40万人、アルゼンチンで20万人、ガーナでは10万人の人々が、安全でないレベルのヒ素に曝露している(4)。慢性的なヒ素の曝露は皮膚癌や肺癌、膀胱癌、肝癌等の発症を誘導し、人々の健康だけでなく、生命をも脅かしている(4)。近年は飲用井

受付 2014 年 10 月 15 日, 受理 2014 年 10 月 28 日
Reprint requests to: Ichiro YAJIMA
Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, Aichi 466-8550, Japan
TEL: +81(52)744-2125, FAX: +81(52)744-2126
E-mail: yajimai@med.nagoya-u.ac.jp

戸水にはヒ素だけではなく、様々な重金属によって複合的に汚染され、新たな疾患発症因子として注目されている (5-10)。このような背景から、飲用井戸水の重金属汚染について、ヒ素だけでなくその他の重金属との複合汚染に着目し、その実態や疾患発症機構の解明、またそれらの浄化法を開発することは、重金属によって誘発された疾患の予知・予防法の開発に繋がり、安全な水をより多くの人々が享受するための極めて重要な研究であるといえる。筆者らはこれまで、飲用井戸水の重金属汚染について様々なアプローチ方法を基に研究を行ってきた (5-14)。これらの研究の多くは衛生学的研究において必須のフィールドワーク研究と、培養細胞や実験動物を用いた実験研究を組み合わせることによって成立している。本稿では、重金属によって誘発された疾患に関して、特に飲用井戸水に焦点を当て、筆者らが現在行っているフィールドワーク研究及び実験研究によって得られた重金属汚染実態と関連疾患発症機構、新たに開発した重金属浄化法について紹介するとともに、フィールドワーク研究だけでなく、実験研究を同時に行うことによる利点、可能性、また課題について述べたい。

飲用井戸水重金属汚染の実態

飲用井戸水の重金属汚染について、これまで多くの研究がヒ素に焦点を当てて行われてきたが、近年、筆者らはヒ素以外の重金属による汚染について幾つか報告を行った。バングラデシュ、ベトナム、マレーシアの井戸水や、汚染された水を飲用している現地居住者の毛髪、爪、尿に含まれる、重金属を含む様々な元素含有量を ICP-MS を用いて測定し、ヒ素以外にもバリウム、鉄、マンガンといった元素が安全ではないレベルで含まれていることが明らかとなった (5, 6, 8, 10, 12)。また、井戸水に含まれるこれらの元素の中には、鉄やバリウムのようにヒ素含有量と正の相関関係を示す元素も存在し、飲水によってヒ素に曝露される場合、これら他の重金属にも曝露される可能性が高いことを示している (5, 6, 12)。

飲用井戸水に含まれる重金属元素の毒性

フィールドワーク研究によって明らかとなった、飲用井戸水に含まれる重金属元素の毒性を明らかにするため、筆者らは実験動物や培養細胞を用いた曝露実験を行い、主に聴力異常と発癌に関する研究を行った。バリウムの聴力に対する影響については、3 週齢 ICR マウスに 12.5 及び 125 μM の塩化バリウムを 2 週間飲水投与し、聴性脳幹反応 (Auditory Brain-stem Response; ABR) 測定によって聴力への影響を調査した。その結果、測定した 4, 12, 20, 32 kHz のうち、4, 12, 20 kHz で聴力低下が観察され、同時に内耳有毛細胞及び蝸牛神経節に形態的異常が観察された (15)。

バリウムの発癌毒性については、ヒ素を含む飲用井戸

水による発癌の中でも皮膚癌に注目し、ヒト皮膚角化細胞株 (HaCaT) (16) を用いた培養細胞実験を行った。HaCaT 細胞に 5-50 μM の塩化バリウムを 24-48 時間曝露したところ、癌化した細胞に特徴的な足場非依存的増殖と浸潤能活性が上昇し、癌関連分子である c-SRC, FAK, ERK1/2 のリン酸化レベルの上昇を伴っていた (8)。また、5 μM の塩化バリウムを HaCaT 細胞に 4 ヶ月間長期曝露したところ、不可逆的な足場非依存的増殖の活性化が観察されたことから、バリウムは少なくともヒト皮膚正常角化細胞株に対して、癌化した細胞に特徴的な複数の表現型を示すことを明らかにした (9)。これらの結果は、これまで知られていなかったバリウムによる毒性を示すものであり、飲用井戸水による重金属曝露の影響について、バリウムの影響を考慮する必要性を示唆している。

ヒ素による毒性発露における、他の重金属の影響

フィールドワーク研究によって明らかになったように、ヒ素汚染された飲用井戸水には、他の毒性重金属元素によっても同時に汚染されている可能性が高いが、これらの重金属が、ヒ素によって発露される毒性に対してどのような影響を及ぼすのかは明らかになっていない。筆者らはヒ素による皮膚癌発症における他の重金属元素の影響を明らかにするため、HaCaT 細胞又はヒト皮膚扁平上皮細胞株 (A431, HSC-5) にヒ素と同時にバリウム、又は鉄を複合曝露し、その影響を解析した。ヒ素は発癌毒性の他に細胞毒性 (細胞死誘導) も持つため、ヒ素を高濃度で曝露すると、全ての細胞が細胞死を呈するが、バリウムを同時に曝露すると A431 及び HSC-5 細胞ではヒ素誘導性細胞死が抑制され、HaCaT 細胞では細胞死抑制は観察されなかった。A431 及び HSC-5 細胞への複合曝露では、NF- κ B の活性化とともに、XIAP の発現上昇と JNK1/2 の活性阻害が観察された。JNK1/2 を介した細胞死誘導シグナルは NF- κ B 活性化によって発現誘導された XIAP が阻害することが知られている (17, 18) ことから、バリウムはヒ素によって誘導される皮膚癌細胞の細胞死を抑制していることが明らかとなった。また、正常皮膚角化細胞株である HaCaT ではこのような細胞死抑制は観察されなかった (10)。前述したように、ヒ素は発癌毒性と細胞毒性の両方の特性を持つ元素であり、正常細胞を癌化させるとともに、癌細胞を細胞死誘導する。しかし、バリウムの共存在下では細胞死誘導が阻害され、本来細胞死誘導されるはずの皮膚癌細胞が生き残ることになる。これはヒ素によって誘導された皮膚癌細胞がバリウム共存在下ではより多く生き残ることを示しており、ヒ素単独の曝露よりも、ヒ素とバリウムの複合曝露のほうが発癌、或いは癌の悪性化リスクが高いことを示唆している。

ヒ素と鉄の複合曝露は、バリウムの場合と少し異なる。筆者らのフィールドワーク研究の結果、ヒ素汚染された井戸水では鉄にも同時に汚染されており、その濃度比は

モル濃度でほぼ 1 : 10 の関係にあることが判明した。この濃度比を維持して HaCaT 細胞への曝露実験を行った結果、足場非依存的増殖と浸潤能活性が、ヒ素単独曝露による効果よりも相乗的に活性化していることを明らかにした。また、発癌及び浸潤に関与する細胞内シグナル分子である SRC 及び ERT1/2 も同様に活性化していることが明らかとなった。これらの結果は、ヒ素単独曝露よりも、鉄との複合曝露のほうが皮膚癌発症のリスクが高い可能性を示唆している。また、このようなヒ素と鉄の複合曝露による効果は、ヒト皮膚扁平上皮細胞株 (A431) に対しても引き起こされたことから、皮膚癌が発症した後の悪性化、浸潤のリスクもまた複合曝露のほうがより高い可能性を示唆している (6)。

ハイドロタルサイト様化合物を用いた ヒ素複合汚染水の浄化法開発

前述したフィールドワーク研究や実験研究を推し進めれば、ヒ素及びその他の重金属に汚染された飲用水によって引き起こされる癌等の疾患を予知し、明らかとなった発症メカニズムを応用した予防法や治療法を開発することが可能となる。このようなアプローチは極めて論理的であり、妥当な方法論ではある（実際に筆者らはこのようなアプローチを実行している）が、一方で、疾患の原因となる環境因子を取り除くことができれば、少なくともその後の関連疾患の発症リスクを限りなくゼロに近づけることになる。このような考えから、筆者らはヒ素及びその他の重金属によって汚染された水を浄化する方法について検討を行ってきた。これまでに報告されている例として、ハイドロタルサイト（様）化合物を利用した浄化法がある。ハイドロタルサイト（HT）はマグネシウムやアルミニウム等の金属イオンを成分に持つ層状複水酸化物の一つで、アニオン交換機能と、カチオン吸着機能を有している。これまでも、ヒ素を始めとして、カドミウム、鉛、ニッケル、クロム等が実際に浄化可能であることが報告されている (19-21)。筆者らは、マグネシウムと鉄をベースとしたハイドロタルサイト様化合物 (MF-HT) を新たに作成し、ヒ素及びその他の毒性重金属元素の吸着試験を行った。ヒ素の場合、初濃度 500 µg/L (WHO 飲料水水質ガイドライン : 10 µg/L) を 15 秒以内に 99.9% 以上除去が可能であり、前述した鉄やバリウムに対しても高効率で除去が可能であった。また、前述したヒ素との複合汚染を考慮し、ヒ素・鉄またはヒ素・バリウム混合液に対しても、ほぼ同様の除去率を示した。さらには、バングラデシュやベトナムで実際に使用されており、ヒ素や鉄、バリウムに複合汚染されている井戸水（汚染レベルはヒ素 : 90.3-459.3 µg/L、鉄 : 1,205.0-2,956.0 µg/L、バリウム : 97.0-206.7 µg/L）に対しても同様の試験を行ったところ、上記の結果とほぼ同様の除去能力を示した (5, 6)。これらの結果は、筆者らが新たに作成した MF-HT はヒ素汚染水を速やかに且つ効

率的に浄化することが可能だけでなく、ヒ素との複合汚染によって疾患発症リスクを持つ鉄やバリウムも、ヒ素と同時に浄化が可能であることを示唆している。また、これ迄に報告されている、HT を用いたヒ素吸着試験では、十分なヒ素の除去に 10-16 時間必要であった (19) ことから、筆者らが作成した MF-HT の 15 秒以下という除去スピードは、極めて高率の高い吸着剤であるといえる。現在は実験系での試験のみであるが、将来的にはより大規模な除去システムを構築し、直接、現地の汚染水に対して行うことで、実用化を進めていく必要があると考えられる。

フィールドワーク研究と実験研究の相互作用

衛生学におけるフィールドワーク研究と実験研究を同時に実践するためには、包括的な計画と相互のフィードバックが重要である。著者らが行った、或いは現在行っている重金属汚染関連疾患に関する研究における、フィールドワーク研究と実験研究の位置づけを図 1 に示した。本研究の出発点は、衛生学の基本であるフィールドワークによって環境及び生体内の重金属を測定することで、汚染されている元素の種類及びそのレベルを明らかにすることから始まる。このデータそのものが汚染実態の一部を解明することになるが、その毒性をより詳細に検討するための実験研究の基礎データとしても利用される。実験研究において、培養細胞実験と動物実験は重金属の毒性を評価し、その発症メカニズムを解明するために有効な手法である。培養細胞実験は毒性発症メカニズムを分子細胞生物学的に解析する上で重要であり、特に複合汚染のように、実験条件が複雑で多岐にわたる場合には培養細胞実験が有効である。培養細胞は基本的に単一の種類細胞であり、重金属曝露に対する反応が一律で、その表現型を高い感度で検出できる。また、細胞内で引き起こされる様々な反応（遺伝子発現、遺伝子変異、エピジェネティック変異、タンパク質の量的変化や活性変化など）も一律なため、バックグラウンドの低い検出が可能である。しかし、重金属は直接培養細胞に曝露するため、飲水による曝露等を想定した場合、その重金属が実際に標的臓器（細胞）に到達する際の化学形態や濃度に注意する必要がある。一方、動物実験はヒトの飲水による曝露を再現させるため、体内での吸収や排出、重金属の修飾等がヒトと同様に起こっていると仮定できれば、非常に有効な手法である。生体としての毒性の発露、組織学的な解析による形態変化や遺伝子・タンパク質の発現及び活性の変化を検出することが可能である。培養細胞実験、動物実験による解析によって、重金属の毒性の解明や、その発症メカニズムの解明が可能となり、分子レベルの予知／診断マーカーを見出すことも可能である。

上述の生物実験の他に、水を浄化するための浄化剤開発を目的とした化学実験も行っている。ハイドロタルサイトは特殊な構造を持つだけでなく、合成に必要なコス

図 1 重金属汚染関連疾患に関する研究における、フィールドワーク研究と実験研究の位置づけ

トも安価であり、開発途上国のような経済的に水質浄化に多くのコストを掛けられない国々でも導入が可能である。フィールドワークでは複数の毒性重金属による複合汚染が明らかになっていることから、同時に複数の重金属を吸着できる新たなハイドロタルサイト様化合物を合成する必要がある。様々な検討の結果、MF-HT が最も有効な化合物であることを見出している。上述したように、MF-HT はヒ素のみならず、鉄やバリウムも同時に除去可能であり、現在は様々な複合汚染に対応した浄化システムの構築を目指している。吸着試験は人工的に再現させた汚染水を使用して行いが、最終的には実際の汚染井戸水を使用した試験が必要となる。筆者らは小規模の（少量の）井戸水による実証試験を実施しており、前述したように有効な結果が得られている。今後は、より大規模な実証試験を現地にて行い、実際に居住者の生活に利用可能かどうかをテストする必要がある。また、より長期的な視野としては、長期にわたって浄化システムを利用した人々に対して重金属によって誘発された疾患の発症リスクがどのように推移するのかを検証しなければならない。

おわりに

安全な水の確保は、人類が安全で幸福な生活を維持するための最も重要な点であり、最低限保証されるべきである。にもかかわらず、これらの安全と幸福を脅かされている地域が地球上に多数存在している。飲用水の重金属汚染は極めて重大な問題であり、速やかに解決されるべきではあるが、実際には政治・経済・社会・科学、様々な分野の様々な要因から、多くの問題が未解決のままで

ある。衛生学は上記の問題解決へのアプローチには極めて有効な学問である。フィールドワークを基本とした研究は環境因子と疾患の因果関係を見出し、その危険性を指摘することが可能である。疾患の発症メカニズムや予防法は、フィールドワークによって得られた知見をベースとして実験研究を行うことで明らかにすることが可能であり、フィールドワーク研究を十全に行い、尚且つ実験研究をこれまで以上に推進していくことが、衛生学において必要である。衛生学におけるフィールドワーク研究の充実に比べて、実験研究は未だ十分に実施されているとはいえず、フィールドワーク研究と実験研究を衛生学における「両輪」として実施することが、今後更に増えるであろう、様々な問題の解決に必須である。安全な水をより多くの人々が享受できる社会を構築するために、衛生学という分野において、フィールドワークと実験研究両方を実践していくことが重要である。

謝 辞

本研究の一部は、科学研究費補助金 (25340052, 26460798, 25-40080), Lydia O'Leary Memorial Foundation, Kurita Water and Environment Foundation の助成を得て行われた。

利益相反なし

文 献

- (1) Fernandez-Luqueno F, Lopez-Valdez F, Gamero-Melo P, Luna-Suarez S, Aguilar-Gonzalez E, Martinez A, et al.

- Heavy metal pollution in drinking water—a global risk for human health: A review. *Af J Envi Sci Tech* 2013;7:567–584.
- (2) Berg M, Stengel C, Pham TK, Pham HV, Sampson ML, Leng M, et al. Magnitude of arsenic pollution in the Mekong and Red River Deltas—Cambodia and Vietnam. *Sci Total Environ* 2007;372:413–425.
 - (3) Chowdhury UK, Biswas BK, Chowdhury TR, Samanta G, Mandal BK, Basu GC, et al. Groundwater arsenic contamination in Bangladesh and West Bengal, India. *Environ Health Perspect* 2000;108:393–397.
 - (4) IARC. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including Arsenic. *Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 2004;84:68–70, 223–226.
 - (5) Kato M, Kumasaka MY, Ohnuma S, Furuta A, Kato Y, Shekhar HU, et al. Comparison of Barium and Arsenic Concentrations in Well Drinking Water and in Human Body Samples and a Novel Remediation System for These Elements in Well Drinking Water. *PLoS One* 2013;8:e66681.
 - (6) Kumasaka MY, Yamanoshita O, Shimizu S, Ohnuma S, Furuta A, Yajima I, et al. Enhanced carcinogenicity by co-exposure to arsenic and iron and a novel remediation system for the elements in well drinking water. *Arch Toxicol* 2013;87:439–447.
 - (7) Tamura H, Ohgami N, Yajima I, Iida M, Ohgami K, Fujii N, et al. Chronic exposure to low frequency noise at moderate levels causes impaired balance in mice. *PLoS One* 2012;7:e39807.
 - (8) Thang ND, Yajima I, Kumasaka MY, Ohnuma S, Yanagishita T, Hayashi R, et al. Barium promotes anchorage-independent growth and invasion of human HaCaT keratinocytes via activation of c-SRC kinase. *PLoS One* 2011;6:e25636.
 - (9) Thang ND, Yajima I, Ohnuma S, Ohgami N, Kumasaka MY, Ichihara G, et al. Enhanced constitutive invasion activity in human nontumorigenic keratinocytes exposed to a low level of barium for a long time. *Environ Toxicol* 2015;30:161–167.
 - (10) Yajima I, Uemura N, Nizam S, Khalequzzaman M, Thang ND, Kumasaka MY, et al. Barium inhibits arsenic-mediated apoptotic cell death in human squamous cell carcinoma cells. *Arch Toxicol* 2012;86:961–973.
 - (11) Kato M, Kumasaka MY, Takeda K, Hossain K, Iida M, Yajima I, et al. L-cysteine as a regulator for arsenic-mediated cancer-promoting and anti-cancer effects. *Toxicol In Vitro* 2011;25:623–629.
 - (12) Kato M, Onuma S, Kato Y, Thang ND, Yajima I, Hoque M, et al. Toxic elements in well water from Malaysia. *Toxicol Environ Chem* 2010;92:1609–1612.
 - (13) Kumasaka MY, Yajima I, Ohgami N, Naito H, Omata Y, Kato M. Commentary to Krishna et al. (2014): Brain deposition and neurotoxicity of manganese in adult mice exposed via the drinking water. *Arch Toxicol* 2014;88:1185–1186.
 - (14) Thang ND, Yajima I, Kumasaka MY, Kato M. Bidirectional functions of arsenic as a carcinogen and an anti-cancer agent in human squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014;9:e96945.
 - (15) Ohgami N, Hori S, Ohgami K, Tamura H, Tsuzuki T, Ohnuma S, et al. Exposure to low-dose barium by drinking water causes hearing loss in mice. *Neurotoxicology* 2012;33:1276–1283.
 - (16) Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988;106:761–771.
 - (17) Kaur S, Wang F, Venkatraman M, Arsura M. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibits c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) activation by transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) through ubiquitin-mediated proteosomal degradation of the TGF-beta1-activated kinase 1 (TAK1). *J Biol Chem* 2005;280:38599–38608.
 - (18) Tang G, Minemoto Y, Dibling B, Purcell NH, Li Z, Karin M, et al. Inhibition of JNK activation through NF-kappaB target genes. *Nature* 2001;414:313–317.
 - (19) Gillman GP. A simple technology for arsenic removal from drinking water using hydrotalcite. *Sci Total Environ* 2006;366:926–931.
 - (20) Lazaridis NK, Asouhidou DD. Kinetics of sorptive removal of chromium(VI) from aqueous solutions by calcined Mg-Al-CO(3) hydrotalcite. *Water Res* 2003;37:2875–2882.
 - (21) Turk T, Alp I, Deveci H. Adsorption of As(V) from water using Mg-Fe-based hydrotalcite (FeHT). *J Hazard Mater* 2009;171:665–670.