

the cerebral cortex of gerbils. *Neurochem. Res.*, 24: 629-635, 1999.

- ③ Kondo, Y., Asanuma M., Iwata, E., Kondo, F., Miyazaki, I. and Ogawa, N.: Early treatment with cyclosporin A ameliorates the reduction of muscarinic acetylcholine receptors in gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. *Neurochem. Res.*, 24: 9-13, 1999.
- ④ Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M. and Ogawa, N.: Glial cells protect neuronal cells against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione system. *J. Neurochem.*, 72: 2334-2344, 1999.
- ⑤ Sogawa, C.A., Miyazaki, I., Sogawa, N., Asanuma, M., Ogawa, N. and Furuta, H.: Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III (GIF) mRNA expression in mouse glial cell line (VR-2g). *Brain Res.*, 853: 310-316, 2000.

2. 学会発表

- ① 小川紀雄, 浅沼幹人, 近藤文雄: 大脳基底核部におけるメタロチオネイン(MT)-III mRNA の発現: パーキンソニズムにおける変化と levodopa 投与の影響, 第 40 回日本神経学会, 1999.
- ② Ogawa, N., Miyazaki, I., Tanaka, K., Iida, M. and Asanuma, M.: Dopamine D2 receptor mediated antioxidant and neuroprotective effects of ropinirole, XIII International Congress on Parkinson's Disease, 1999.
- ③ 浅沼幹人, Cadet, J.L., 小川紀雄: メタンフェタミンの転写因子への直接作用, 第 22 回日本神経科学大会, 1999.
- ④ 田中健一, 宮崎育子, 藤田尚子, 浅沼幹人, 小川紀雄: 6-OHDA 投与後の脳内酸化ストレス消去系の経時変化, 第 29 回日本神経精神薬理学会年会, 1999.
- ⑤ 小川紀雄, 田中健一, 宮崎育子, 浅沼幹人,

飯田基之: D2 レセプターを介するドパミンアゴニスト ropinirole の抗酸化作用ならびに神経保護効果, 第 29 回日本神経精神薬理学会年会, 1999.

- ⑥ 宮崎育子, 浅沼幹人, 十川千春, 田中健一, 東 洋一郎, 小川紀雄: 加齢による脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第 42 回日本神経化学会, 1999.
- ⑦ 浅沼幹人, 宮崎育子, 田中健一, 小川紀雄: ドパミンの核内転写因子への直接作用に関する検討, 第 42 回日本神経化学会, 1999.
- ⑧ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東 洋一郎, 十川千春, 田中健一, 小川紀雄: ドパミン神経変性および加齢に伴う脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第 2 回メタロチオネイン研究会, 1999.
- ⑨ 東 洋一郎, 浅沼幹人, 宮崎育子, 小川紀雄: ドーパミン神経におけるチロシナーゼの機能解析, 第 22 回日本分子生物学会年会, 1999.
- ⑩ Asanuma, M., Ogawa, N.: Effects of different transition metals on free radical generation and peroxide reaction in the brain: Modification by dopamine-related compounds, 6th Internet World Congress for Biomedical Sciences, 2000.

研究協力者

- 河野 雅弘 (日本電子(株)応用研究センター
ESR 応用研究グループ長)
- 宮崎 育子 (岡山大学医学部神経情報学部門)
- 佐藤 公美 (岡山大学医学部神経情報学部門)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

鉄代謝のマスター蛋白 IRP2 の神経変性疾患への関与に関する研究

分担研究者 岩井 一宏

京都大学大学院生命科学研究科認知情報学講座 助教授

研究要旨

神経変性疾患では病巣部での鉄等の金属、蛋白の酸化的变化が認められ、組織障害への関与が注目されている。鉄代謝のマスター制御因子である RNA 結合蛋白、IRP2 は脳で発現が高く、アルツハイマー病巣に蓄積していることが報告されている。我々は IRP2 の RNA 結合活性増強因子としてアルミニウムを同定したが、アルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在は否定的であると考えられていることから、神経変性疾患における鉄代謝異常への IRP2 の関与の解析を進める一環として IRP2 の安定化を来す因子の更なる検索を進める目的で、IRP2 の酸化変化依存的ユビキチン修飾に関与する酵素群の同定を行い、UbcH5s が E2 として機能していることを示した。

A. 研究目的

アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性疾患においては病巣部での鉄などの金属イオンの沈着が認められ、その病態形成との関連が注目されている。しかしながら、神経変性疾患における鉄イオンの蓄積機序に関する研究は進んでいないのが現状である。そこで、本研究においては我々がこれまで研究してきた鉄代謝のマスター制御蛋白である IRPs (iron regulatory proteins) の神経変性疾患における鉄沈着の関与の可能性を検索してきた。IRPs には高い相同性を有した IRP1 及び IRP2 の 2 種の IRPs の存在が知られている。IRPs は細胞内鉄イオン濃度が低い場合にのみ鉄代謝に関与する分子をコードする mRNA 上にある stem-loop 構造をした iron responsive element (IRE) と特異的に結合することにより細胞内遊離鉄イオン濃度を一定に保つように制御している。したがって、鉄イオン以外の IRE 結合活性増強因子により IRPs の IRE 結合活性が鉄非依存的に増強されれば、細胞内遊

離鉄イオン濃度が上昇し、フリーラジカルの産生亢進などを介し細胞死を来す可能性が考えられる。神経細胞においては IRP2 の発現が高いこと、また、IRP2 の発現がアルツハイマー病巣で亢進していることが知られていることから、鉄イオン以外の IRP2 の IRE 結合活性増強因子の検索を進めることにより、IRP2 の神経変性疾患への関与について検討している。

IRP2 は鉄イオン存在下でユビキチン依存的にプロテアソームで急速に分解されることによりその IRE 結合活性が鉄イオン濃度依存的に制御されていることが知られている。そこで昨年度は鉄イオンに拮抗的に作用し得る分子が IRP2 の鉄イオン依存性分解を阻害し得るという可能性から検討を加え、アルミニウムが IRP2 の結合活性を鉄イオンと拮抗的に増強させることにより細胞の鉄イオン代謝を障害させる可能性を示した。しかしながら、現状ではアルツハイマー病とアルミニウムの関連については否定的であると考えられてい

ることから、神経変性疾患における鉄イオン代謝異常の分子メカニズムの検索のために、本年度は我々はアルミニウムにはとらわれず、IRP2の安定化を来す因子の更なる検索を進めることを目指し、*in vitro* アッセイ系を用いてIRP2の鉄イオン存在下におけるユビキチン修飾機構の分子メカニズムを解析した。

B. 研究方法

バキュロウイルス発現系を用いて精製したIRP2を用い、酸化変化を受けたIRP2の*in vitro* ubiquitination assay系を樹立し、IRP2のユビキチン修飾を指標にIRP2のユビキチン修飾に関与する酵素群の同定および、IRP2の鉄イオン依存性選択的ユビキチン修飾メカニズムに関して詳細な検索を進めた。

C. 研究結果

ユビキチンシステムはE1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン結合酵素)、E3(ユビキチンリガーゼ)と呼ばれる三種の酵素群の作用により、基質蛋白のリシン残基のε-アミノ基にユビキチンが付加され、付加されたユビキチンにさらにユビキチンが付加されることによりポリユビキチン鎖が形成されることにより基質蛋白がプロテアソームにより分解されることが知られている。E1は1つ、E2は十数種存在することが示されており、E3は数百種存在する可能性が示唆されている。

我々はこれまで鉄イオンが結合することによりIRP2に生じる酸化修飾がシグナルとなってIRP2蛋白がユビキチン依存性にプロテアソームで分解されることによってその活性が制御されていることを示してきた。IRP2の鉄依存的ユビキチン修飾の分子メカニズムを検索すべく、ヒトHeLa細胞のS100ライセートを用いた*in vitro* ubiquitination assayの樹立を試み、*in vitro*で鉄イオンにより酸化修飾を受けたIRP2が選択的にユビキチン修飾を受ける*in vitro* ubiquitination assay系の樹立に成功した。

我々はこれまで、酸化修飾自体がIRP2のユビキチン修飾のシグナルとなる可能性を強く示唆する結果を示してきたが、酸化変化を認識するキナーゼによりリン酸化されることがIRP2のユビキチン修飾のシグナルとなる可能性は完全には排除できてはいなかった。ユビキチンシステムはエネルギーソースとしてATP-AMP反応を利用するのに対し、ほとんど全てのキナーゼはATP-ADP反応によることから、ATPγSを用いた*in vitro* ubiquitination系を用いることによりリン酸化の関与を検索することが出来る。そこでATPではなくATPγSを用いた*in vitro* ubiquitination系で酸化IRP2のユビキチン修飾を検討したところ、ATPγS存在下においても酸化IRP2特異的なユビキチン修飾が観察されたことから、酸化IRP2のユビキチン修飾には蛋白キナーゼの関与は否定的であると考えられ、ユビキチンシステムはIRP2の酸化修飾による構造変化を認識していると考えられた。

また、酸化IRP2のユビキチン修飾に関与する酵素群の同定を進めるために、HeLa細胞ライセートを陰イオン交換カラム非結合分画(Fr I)と結合分画(Fr II)に分画したところ、Fr IとFr IIを加えた場合にのみ酸化IRP2のユビキチン修飾が観察された。E1と現在まで知られている全てのE3はFr IIに存在することが報告されていることから、E2がFr Iに存在する可能性が示唆された。そこで、バキュロウイルス発現系を用いて精製した種々のレコンビナントE2とFr II存在下で酸化IRP2のユビキチン修飾を検討したところ、UbcH5a, b, cがIRP2のユビキチン修飾を触媒するE2であることが判明した。現在、レコンビナントE1, UbcH5cを添加したアッセイ系を用いて、HeLa細胞ライセートを分画することにより、IRP2のユビキチン修飾を触媒するE3の精製を進めている。

D. 考察

鉄イオンは各種神経変性疾患の病巣に蓄積

しているのみならず、フェロオキシダーゼであるセルプラスミン欠損患者において神経細胞死が認められることから、鉄代謝異常自体が神経細胞死の引き金となると考えられている。それゆえ、鉄代謝のマスター制御因子である IRPs の神経変性疾患における意義の検索は重要であると考えられる。我々はアルミニウムが IRP2 の IRE 結合活性増強因子であることを示したてきたが、病巣での IRP2 の蓄積が示されているアルツハイマー病とアルミニウムの関連については、現在は否定的であると考えられていることから、アルミニウム以外の IRP2 の安定化を来す因子の検索を進める目的で IRP2 のユビキチン修飾の分子メカニズムの解析を進めた。

これまで、リン酸化が基質の選択的ユビキチン修飾のシグナルとして機能することは既に報告されているが、基質の酸化修飾が選択的ユビキチン修飾のシグナルになること示したのは我々の報告が初めてである。しかしながら、我々のこれまでの結果では、酸化修飾により基質がリン酸化されることが選択的ユビキチン修飾のシグナルとなる可能性が完全には否定できていなかったが、本研究において ATP γ S を用いた *in vitro* ubiquitination assay においても酸化 IRP2 特異的なユビキチン修飾が検出されたことにより、酸化修飾そのものが選択的ユビキチン修飾のシグナルとなることが強く示唆された。蛋白の酸化変化は蛋白変性の代表であり、蛋白凝集を引き起こすことも知られている。種々の神経変性疾患においては蛋白封入体の形成が病因の一つであると考えられており、また、酸化ストレスの疾患への関与も取り沙汰されている。それゆえ、酸化修飾を認識するユビキチン修飾系を検索することは、IRP2 の神経変性疾患への関与を検索するのみならず、多くの神経変性疾患の封入体形成メカニズムの解析に繋がることも期待される。基質蛋白は E1, E2, E3 と呼ばれる 3 種の酵素群よりユビキチン修飾されるが、基質特異性は主として E3 が

担うと考えられていることから、酸化 IRP2 の E3 は酸化変化を認識するユビキチンシステムの解明の上で重要であると考えられることから、現在その同定を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tysgankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., Lipkowitz, S. and Yarden, Y.: Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1. *Mol. Cell.*, 4: 1029-1040, 1999.
- ② Yamanaka, K., Minato, N. and Iwai, K.: Stabilization of iron regulatory protein 2, IRP2, by aluminum. *FEBS Lett.*, 462: 216-220, 1999.
- ③ Iwai, K., Yamanaka, K., Kamura, T., Minato, N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D. and Pause, A.: Identification of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 12436-12441, 1999.
- ④ Gonen, H., Bercovich, B., Orian, A., Carrano, A. Takizawa, C., Yamanaka, K., Pagano, M., Iwai, K. and Ciechanover, A.: Identification of the ubiquitin carrier proteins, E2s, involved in signal-induced conjugation and subsequent degradation of I κ B α . *J. Biol. Chem.*, 274: 14823-14830, 1999.
- ⑤ Nakamura, E., Sato, M., Yang, H., Miyagawa, F., Harazaki, M., Tomita, K., Matsuoka, H., Noma, A., Iwai, K. and Minato, N.: 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *J.*

- Biol. Chem., 274: 3009-3016, 1999.
- ⑥ 岩井一宏: アミノ酸トランスポーター4F2 L鎖の同定: 4F2 L鎖は4F2 H鎖(CD98)とヘテロダイマーを形成することにより細胞表面に発現する. 細胞工学, 18: 86-87, 1999.
 - ⑦ 岩井一宏: ユビキチンシステムとストレス応答. 蛋白質核酸酵素, 44: 759-765, 1999.
 - ⑧ 岩井一宏: 癌抑制性遺伝子産物 pVHL ユビキチンリガーゼ欠損による発癌機構. Molecular Medicine, 37: 206-214, 1999.
 - ⑨ 岩井一宏: ユビキチンワールド: モディファイヤー蛋白による新しい生体反応制御系. 免疫・Immunology Frontier, 印刷中.

2. 学会発表

- ① Iwai K. Oxidation-induced ubiquitination of iron regulatory protein 2: Implications for degradation of oxidized proteins. (Symposist). 6th CCGH symposium "Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease", 1999.
- ② Iwai K., Yamanaka, K., Kamura, T., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Klausner, R. D., Minato, N., and Pause, A. Ubiquitin ligase activity associated with the VHL tumor suppressor protein, pVHL. (Oral presentation). FASEB Summer Research Conference: Ubiquitin and Intracellular Protein Degradation, 1999.
- ③ 岩井一宏, 湊 長博. アミノ酸トランスポーター4F2L鎖の細胞膜表層への移行における4F2H鎖の役割. 第72回日本生化学会大会, シンポジウム, 1999.
- ④ 岩井一宏, 山中宏二, 嘉村 巧, Conaway, R.C., Conaway, J.W., Klausner, R. D., Pause, A., 湊 長博. 癌抑制性遺伝子産物 pVHL はユビキチンリガーゼの基質認識サブユニットである. 第22回日本分子生物学会年会, ワークショップ, 1999.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

メタロチオネイン-IIIの発現様式と神経生存維持の検討に関する研究

分担研究者 十川 千春
岡山大学歯学部歯科薬理学講座 助手

研究要旨

メタロチオネイン (MT) は、金属イオン調節に関わる因子の一つである。中でも脳に特異的に発現する MT-III は、種々の神経変性疾患脳で著しく減少し、フリーラジカル消去能を有するといわれている。本研究では、前年度までに、培養グリア細胞における MT-III mRNA の発現が dopamine (DA) により誘導され、その誘導は DA レセプターを介するものではなく、抗酸化物質の共存下で誘導が抑制されることから、活性酸素種による制御機構を介することがわかった。さらに今年度 MT-III 発現を抑制することにより、DA の細胞毒性を増強させる結果を得た。これらのことより、脳内の MT-III 発現は、DA 系化合物のラジカル産生や消去、細胞障害性といった二面性に関わっており、老化や老化関連疾患に伴い引き起こされる金属代謝異常と DA 低下による神経細胞死に深く関与しているといえる。

A. 研究目的

メタロチオネイン (metallothionein:MT) -III は金属結合蛋白質の一種で、従来の MT -I, II と異なり脳に特異的に発現し、神経栄養因子活性を押さえるため、当初、成長抑制因子 (GIF) として発見され、Alzheimer 病 (AD) 脳で著しくその発現が減少していることから、AD 発症に大きく関わっていると考えられた。生体内における MT-III の局在および作用については未だ十分解明されてはいないが、AD 脳のみならず種々の神経変性疾患の病変部において神経細胞の脱落と相関して著しく減少すること、フリーラジカル消去作用を有すること、脳内の亜鉛代謝調節に関わる可能性があることなどから、脳内における MT-III 発現の減少は神経細胞死を導く大きな要因の一つと考えられる。

本研究では、老化および老化関連疾患の生体内金属代謝調節異常の機序解明を目的とし、

我々はこれまで、MT-III の主な発現細胞であると考えられているグリア細胞における MT-III mRNA 発現誘導物質の探索を行ってきた。前年度までの成果として培養グリア細胞において MT-III mRNA の発現がカテコール化合物、中でも内因性のカテコール化合物である dopamine (DA) によって誘導されることを明らかにした。しかし、DA アゴニストやアンタゴニストによる MT-III mRNA の発現誘導への影響はみられず、グルタチオンやビタミン E などの抗酸化物質によって DA による誘導が抑制され、また 6-hydroxydopamine でも DA より低濃度で MT-III mRNA の発現誘導がみられることから、MT-III mRNA の発現誘導は DA レセプターを介する発現制御系を経たものではなく、細胞内で産生される活性酸素種によって促進されることが考えられた。本年度はさらに、MT-III の細胞障害性への関与を検討するため、培養グリア細胞を MT-III アンチセ

ンスオリゴDNAにて前処理を行い、DAにより生じる細胞毒性への影響を検討した。一方、カドミウムや亜鉛によるMT-IIIの発現誘導を検討した報告はいくつかあるが、老化と関連性が強いとされる鉄、銅、アルミニウムなどの金属イオンについてMT-III mRNAの発現に対する影響を検討した報告はこれまでなく、本研究において培養グリア細胞を用いて検討を行った。

B. 研究方法

今回検討するグリア細胞としてはマウスグリア細胞株(VR-2g)を用いた。この細胞はグリア細胞骨格蛋白である glial fibrillary acidic protein (GFAP)陽性でかつ、神経栄養因子を発現する。培養にはダルベッコ変法イーグルMEM培地に10%ウシ胎児血清を添加した。

1. 培養グリア細胞におけるMT-IIIアンチセンスオリゴDNA前処理のDA細胞毒性への影響

VR-2g細胞を $2.5 \times 10^4/cm^2$ で96wellプレートへ播き込み、4時間後にMT-III mRNA配列に対して設計したアンチセンスオリゴDNA (24 mer)およびコントロールとしてランダムに設計したオリゴDNA (24 mer)を最終濃度 $2.5 \mu M$ になるよう添加した。播き込みから24時間後にオリゴDNAの入っていない培地に交換した後、DAを $100 \mu M$ (最終濃度)添加し、さらに24時間培養後生細胞率を測定するためMTTアッセイを行った。

2. 培養グリア細胞における各種金属イオン添加時のMT-III mRNA発現量の解析

VR-2g細胞を $2.5 \times 10^4/cm^2$ で播き込み24時間培養後、 $CuCl_2$ (最終濃度 $10 \mu M$)、 $FeCl_3$ (最終濃度 $200 \mu M$)、 $AlCl_3$ (最終濃度 $200 \mu M$)、をそれぞれ添加した。24時間培養後、MT-III mRNA発現を調べるため、VR-2g細胞よりtotal RNAをAGPC法にて抽出し、さらにDNase I処理したRNAを、マウスMT-III cDNAより設計したプライマーを用いてRT-PCR反応を行った。また、PCR反応の内部標準とし

て glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) mRNAを同時に増幅させた。PCR反応の際、 $[\alpha-^{32}P]dCTP$ を取り込ませ、得られたPCR増幅産物をポリアクリルアミド電気泳動後、バイオイメージングアナライザー (Fuji BAS 2000)にてMT-III mRNA発現量を定量的に解析した。なお、RT-PCR反応に用いるRNA量およびcycle数は、PCR増幅産物がmRNA発現量と比例関係を示す範囲内で設定した。

C. 研究結果

1. 培養グリア細胞におけるDAの細胞毒性へのMT-IIIアンチセンスオリゴDNAの影響

DAを添加しなかった場合のオリゴDNAのみの影響は、MT-IIIアンチセンスオリゴDNA処理とランダムオリゴDNA処理の間には生細胞率に有意差はみられなかった(図1)。一方、DA添加24時間後の生細胞率は、MT-IIIアンチセンスオリゴDNAで前処理した方が、ランダムオリゴDNAの場合と比較して有意に減少していた(図2)。

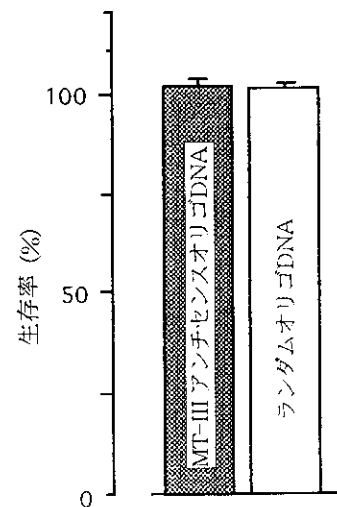


図1. MT-IIIアンチセンスオリゴDNA処理の影響 (ランダムオリゴDNA処理の平均値を100%とした数値の平均値 \pm S.D. (n=6))

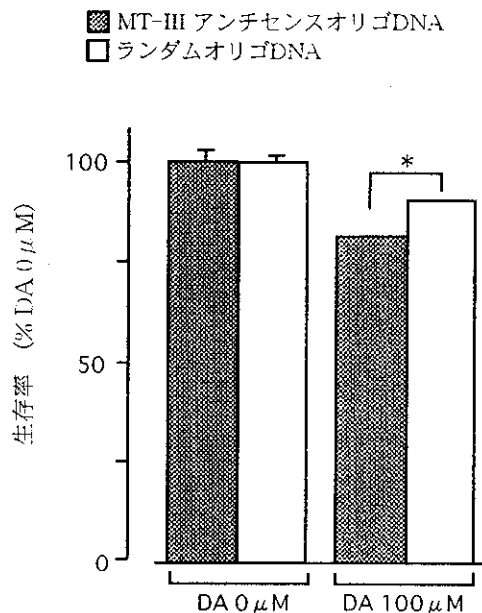


図2. MT-III アンチセンスオリゴDNA 前処理の DA 細胞毒性への影響 (平均値±S.D. n=6, *P<0.01)

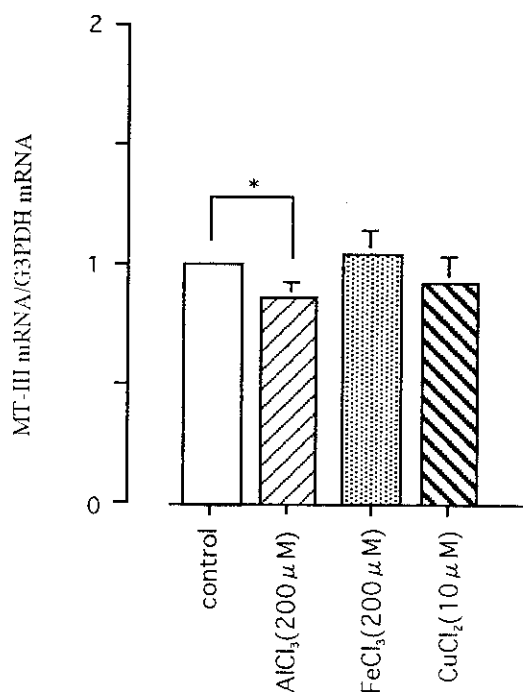


図3. 金属イオン添加時の MT-III mRNA 発現量の変化 (結果は無添加の発現量を1とした数値の平均値±S.D. (n=4), *P<0.05)

2. 培養グリア細胞における各種金属イオン添加時の MT-III mRNA 発現量の解析

FeCl₃ および CuCl₂ 添加後 24 時間後の MT-III mRNA 発現量はコントロールと比較して変化がなかった. 一方 AlCl₃ (200 μM) 添加の場合は MT-III mRNA の発現がわずかであるが減少していた (図 3) .

D. 考察

昨年の報告で、培養グリア細胞における DA による MT-III mRNA 発現誘導は抗酸化物質によって抑制されたことから、MT-III mRNA の発現は細胞内で産生される活性酸素やフリーラジカルによって促進されていると考えられた. 本年度研究では、MT-III が細胞障害へどのように関わっているかをさらに検討するため、MT-III アンチセンスオリゴ DNA を前処理することにより MT-III の発現を抑制した場合の DA による細胞毒性への影響を検討したところ、DA による細胞毒性はコントロールとしてランダムオリゴ DNA で前処理した場合と比較してより強くなる結果を得た. これは、DA の細胞障害性に対する MT-III の防御的役割を裏付けるものである. 一方、鉄、銅、アルミニウムイオンに対する MT-III mRNA の発現変動については、鉄と銅の場合にはコントロールとの間に有意な差はみられなかったが、アルミニウムに関しては MT-III mRNA の発現がむしろ減少していた. 今回、鉄、銅、アルミニウムのような老化関連疾患のモデル動物において調節機能の異常が関与していると考えられる金属について検討を行ったが、特にアルミニウムが MT-III mRNA の発現を減少させる傾向があるという結果は非常に興味深い. AD やその他の神経変性疾患の病変部において、MT-III の著しい減少がみられることも考え併せると、今回の結果は老化における金属イオン調節機構の異常に対する MT-III の関与を示唆する結果である. しかし、本実験系においては共存する血清中の蛋白の影響などが考えられるため、今後さらに無血清培

地での検討などが必要であると考える。

E. 結論

昨年、DAによるMT-IIIの発現誘導は活性酸素やフリーラジカルによって制御されていることを培養グリア細胞を用いた実験によって明らかにした。今回さらに、MT-IIIの減少がDAの細胞毒性を増強させる結果を得たことにより、MT-IIIの細胞障害への関わりを明らかにした。これらのことから、DA系化合物のラジカル産生や消去、細胞障害性といった二面性に対して、脳内MT-III発現は深く関わっていると考えられる。また、MT-IIIはその金属結合性から脳内の金属代謝調節に関わっているといわれており、その観点からも老化や老化関連疾患に伴い引き起こされる金属代謝異常とDA低下による神経細胞死に深く関与しているといえる。そして、種々の神経変性疾患におけるMT-IIIの発現低下の是正は、神経細胞死を防止するための新しい方法として応用できる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- ① Sogawa, A. C., Miyazaki, I., Sogawa, N., Asanuma, M., Ogawa, N. and Furuta, H.: Antioxidants protect against dopamine-induced metallothionein-III (GIF) mRNA expression mouse glial cell line (VR-2g). *Brain Res.*, 853: 310-316, 2000.
- ② Sogawa, N., Sogawa, A. C., Furuta, H.: The influence of cepharanthin on the induction of histidine decarboxylase activity by lipopolysaccharide in mouse spleen. *Medicine and Biology*, 140: 7-10, 2000.
- ③ Itota, T., Torii, Y.; Sogawa, N., Sogawa, C., Inoue, K.: Cytotoxicity of a trial resin composite liner containing TiK2F6 on rat dental pulp cells. *Dent. Mater. J.*, 18: 271-277, 1999.

2. 学会発表

- ① 十川千春, 十川紀夫, 古田裕昭: ラット歯髄におけるカドミウムによるメタロチオネインの発現誘導, 第41回歯科基礎医学学会学術大会, 1999.
- ② 宮崎育子, 浅沼幹人, 十川千春, 田中健一, 東洋一郎, 小川紀雄: 加齢による脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第42回日本神経化学全国大会, 1999.
- ③ 十川千春, 十川紀夫, 宮崎育子, 浅沼幹人, 小川紀雄, 古田裕昭: マウスグリア細胞におけるドーパミンにより誘導されるメタロチオネイン-III mRNA の発現制御機構, 第2回メタロチオネイン研究会, 1999.
- ④ 浅沼幹人, 宮崎育子, 東洋一郎, 十川千春, 田中健一, 小川紀雄: ドパミン神経変性および加齢に伴う脳内 metallothionein-III mRNA 発現の変化, 第2回メタロチオネイン研究会, 1999.
- ⑤ 十川紀夫, 十川千春, 古田裕昭: マウス脾臓でのLPSによるメタロチオネイン mRNA の発現誘導に対するヒスタミンの関与, 第2回メタロチオネイン研究会, 1999.
- ⑥ 十川紀夫, 十川千春, 藤岡健, 古田裕昭: カドミウム投与時のマウス肝臓でのメタロチオネイン mRNA 発現における性差について, 第73回日本薬理学会年会, 2000.

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

老化を示すヒト正常線維芽細胞と不死化ヒト線維芽細胞とに対する
鉄イオンの影響に関する研究

分担研究者 難波 正義

岡山大学医学部分子細胞医学研究施設細胞生物学部門 教授

研究要旨

ヒト正常細胞は一定の回数分裂を終えると分裂を停止する。この現象は細胞の老化と言われている。そして、この老化現象は遺伝的に優性の形質を示す。すなわち、老化細胞と老化を免れ不死化した細胞との融合細胞は老化形質を示す。このことから、我々は老化細胞で発現しているが、不死化細胞で発現の減少あるいは消失する遺伝子の同定を進めている。この研究の過程で、老化を示すヒト正常線維芽細胞はその不死化細胞に比べ、多くのトランスフェリンを産生していることをみいだした。トランスフェリンは鉄をキレートし、鉄の関与するラジカル発生を抑制し、鉄による細胞傷害を防いでいる可能性がある。したがって、今回、ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の影響を調べた。その結果、トランスフェリン産生の少ない不死化細胞は、鉄による毒性が正常細胞より強く現れた。すなわち、不死化細胞は正常細胞に比べ、鉄により細胞増殖がより強く抑制された。また、鉄の細胞傷害はミトコンドリアの傷害に基づくことを証明した。さらに、この細胞傷害は、ビタミンE、マニトール、DMSOで軽減された。以上の実験は、20%酸素条件の培養細胞でなされたが、1%の酸素条件では鉄の細胞傷害は発現しなかった。同時に、この低酸素状態では活性酸素の産生が低下していた。このことは、鉄の細胞傷害は細胞の置かれる酸素環境条件に左右されることを示している。

A. 研究目的

ヒト細胞の老化は、細胞の分裂ごとにテロメアが短縮することで、説明できるようになったが、しかし、これで完全に老化の機構が解明されたとは言えない。すなわち、正常細胞にテロメラーゼ遺伝子を導入し、発現させても、細胞は老化する場合が多いからである。我々は、ヒト細胞の老化・不死化に関連する遺伝子をみいだすことを研究の目的としている。研究の要旨の始めに記したように、老化の形質は優性に発現するので、老化を示す正常細胞で発現し、不死化した細胞で発現の低

下あるいは消失する遺伝子を探索している。この研究の過程で、ヒト正常線維芽細胞は不死化した細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成していることをみいだした。トランスフェリンは鉄をキレートし、鉄の関与するラジカル発生を抑え、細胞傷害を抑制している可能性がある。したがって、今回の研究の目的は、ヒト正常細胞と不死化細胞に対する鉄の傷害作用に差があるかどうかを、そして、鉄の傷害が細胞の置かれる酸素環境条件でどのように発現するかを調べることを研究の目的とした。

B. 研究方法

1. 細胞と培養

正常ヒト線維芽細胞(OUMS-36)と、正常ヒト線維芽細胞をコバルト-60ガンマー線で照射し不死化した細胞(KMST-6)を用いた。培地は10%牛胎児血清を添加したMEMを用いた。また、MTTアッセイではMEMのみで6日間培養した細胞を用いた。細胞の継代は0.1%のトリプシンで行った。これらの細胞の培養方法とその不死化方法の詳細は別に報告した(Namba et al., Mutat. Res., 199: 415, 1988)。細胞の培養は通常の炭酸ガス孵卵器(20%酸素)と特別に作製した孵卵器(1%酸素)を使用した。

2. 細胞の増殖に対する鉄の影響

鉄は水にきわめて溶けにくいのでNitrirolotriacetate 2 ナトリウム塩(NTA) 4 モルに硝酸鉄 1 モル比でキレートして溶かした。細胞の増殖は、①細胞増殖率と②コロニー形成率の2方法で調べた。細胞増殖率による方法は、約10万個の細胞を2 mlの培地を含む35 mm径のシャーレにまき、24時間後、種々の濃度の鉄を添加し、96時間後の細胞を数えた。そして、鉄を添加していない対照群の増殖した細胞数を100%として、鉄添加群の細胞の増殖抑制率を求めた。

コロニー形成率による方法は、約500個の細胞を5 mlの培地を含む6 cmシャーレにまき、約6時間後に細胞がシャーレ面に接着した時期に種々の濃度の鉄を添加し、さらに7-10日間培養し、細胞をメタノール固定後、ギムザ染色し、コロニーを数えた。そして、鉄を添加していない対照群のコロニー数を100%として、鉄添加群の細胞のコロニー形成がどれだけ抑制されたか算定した。

3. MTTアッセイ

以上、①、②の方法で細胞の増殖およびコロニー形成に及ぼす鉄の影響を調べたが、この方法では血清を含む培地を使用しているので、鉄の細胞に対する影響をみられない可能性がある。すなわち、血清に含まれるトラン

スフェリンに添加した鉄が反応するからである。そこで、正常および不死化細胞を無血清で培養した後、MTTアッセイ(同仁、MTTアッセイキット)を行った。

4. LDHアッセイ

MTTアッセイを行ったとき、同時に培地中に細胞からLDHが遊出するかどうかを調べた。極東試薬LDHキットを使用した。

5. 活性酸素の測定

2',7'-dichlorofluorescein diacetate を使用し、蛍光分光光度計で測定した。

C. 研究結果

1. 細胞の増殖に対する鉄の影響

表1に示したように、正常細胞に比べ不死化細胞のほうが鉄に対する感受性が高く、強い細胞傷害を示した。

表1. 鉄のヒト正常(OUMS-36)及び不死化(KMST-6)線維芽細胞の増殖に及ぼす影響*

Fe ($\mu\text{g/ml}$)	細胞数($\times 10^4$)/シャーレ	
	OUMS-38	KMST-6
0	31.5 \pm 1.1	101 \pm 2.4
10	33.0 \pm 1.1	96 \pm 4.4
20	28.0 \pm 2.7	74 \pm 3.0**

*細胞を35 mmシャーレにまき、24時間後に鉄を添加し、96時間後に細胞を数えた。実験値は3枚のシャーレの平均と標準誤差。 ** $p < 0.05$

表2. 鉄のヒト正常(OUMS-36)及び不死化(KMST-6)細胞に対するコロニー形成率

Fe ($\mu\text{g/ml}$)	% of control	
	OUMS-38	KMST-6
0	100	100
0.3	95	76*
1.0	86	55*
3.0	95	47*

* $p < 0.01$

2. コロニー形成に対する鉄の影響

表2に示すように、不死化細胞のほうが正常細胞に比べより強くコロニー形成が阻害された。

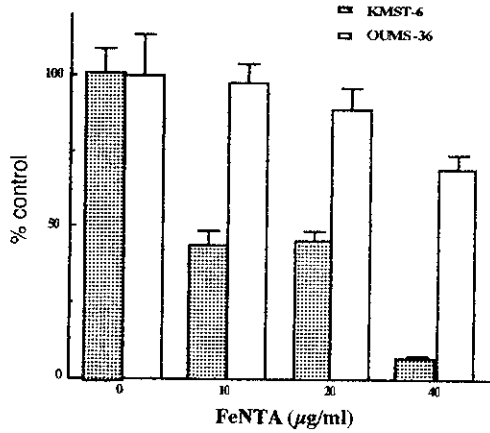


図1. 鉄処理後のヒト正常 (OUMS-36) 及び不死化 (KMST-6) 細胞のミトコンドリア傷害

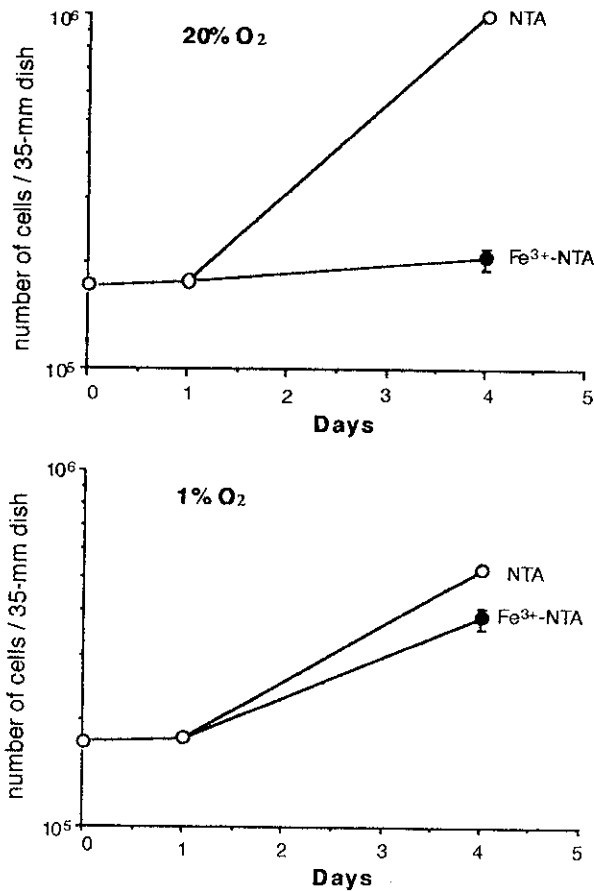


図2. 20%, 1%酸素条件下における鉄の細胞傷害

3. 鉄処理後の細胞の MTT アッセイ

細胞を無血清で培養した後に鉄の影響をみたところ鉄の傷害作用は不死化細胞のほうが正常細胞に比べ有意に大きかった (図1)。

4. LDH アッセイ

上記の MTT アッセイと同時に、細胞から培地に遊出する LDH 活性を測定した。その結果、10 mg/ml 濃度までの鉄では、正常細胞と不死化細胞とで有意な LDH の遊出は認められなかった。このことより、細胞の鉄による傷害は細胞の膜ではなく、ミトコンドリアをターゲットにしていることが判明した。

5. 20%酸素, 1%酸素条件下での鉄の細胞増殖傷害作用

図2に示したように、通常の大気の酸素条件(20%)では、鉄による著しい細胞増殖阻害がみられたが、1%酸素条件では鉄の細胞増殖阻害は軽度であった。

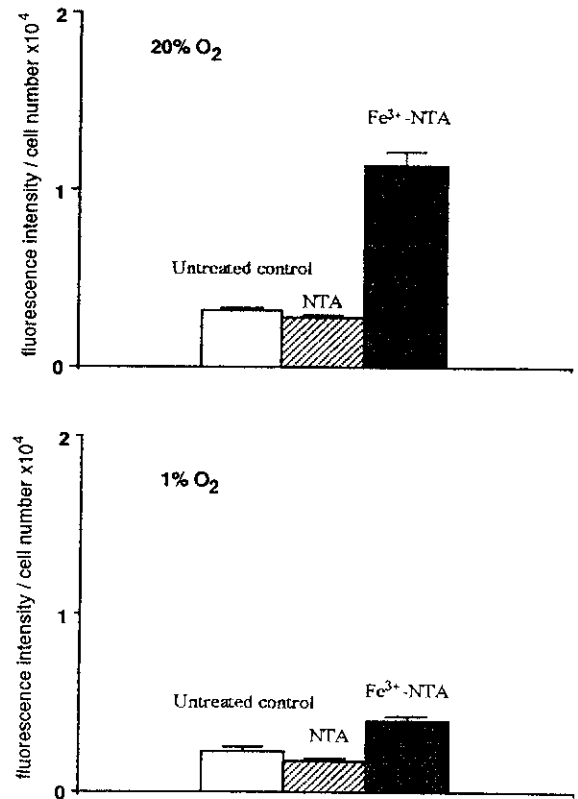


図3. 20%, 1%酸素条件下での鉄処理後の細胞内活性酸素量

表3. ヒト不死化細胞(KMST-6)の20% O₂条件下での鉄の細胞傷害に対する抗酸化剤の効果

Treatment	Viability ×10 ⁴	DCFH fluorescence intensity (U)
Medium alone	102.3±2.5	0.066±0.003
0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	47.3±6.4	0.172±0.007
600 U SOD + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	58.0±1.9	0.278±0.001
50 mM mannitol + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	73.7±1.5	0.139±0.076
30 μM vitamin E + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	90.0±1.6	0.073±0.002
1% DMSO + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	71.6±3.2	0.127±0.002
0.05 mM vitamin C + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	36.8±2.0	0.234±0.025
50 U catalase + 0.8 mM Fe ³⁺ -NTA	10.2±1.6	0.251±0.003

6. 20%酸素, 1%酸素条件で鉄処理された細胞の活性酸素量

図3に示したように, 20%酸素条件では鉄処理により有意に細胞内の活性酸素が上昇したが, 1%酸素条件ではその上昇はみられなかった。

7. 活性酸素スカベンジャーによる鉄の細胞傷害抑制作用

表3に示したようにビタミンE, マニトール, DMSOは鉄による細胞傷害を軽減した。

D. 考察

1. 老化形質を示すヒト正常線維芽細胞と不死化細胞とに対する鉄の作用

我々は, ヒト正常線維芽細胞は不死化細胞に比べ多くのトランスフェリンを合成していることを見いだした。ヒト正常線維芽細胞が培養条件下でトランスフェリンを合成している生理的意味として, 鉄の関与するラジカルによる細胞傷害を防いでいるのではないかと推測した。そして, 正常細胞のほうが不死化細胞にくらべ多くのトランスフェリンを合成しているので, 鉄の細胞傷害作用は不死化細胞にくらべ正常細胞のほうが軽いのではないかと予想した。

そこで, ヒト正常線維芽細胞とその不死化細胞とに対する鉄の細胞傷害を, 細胞の増殖,

コロニー形成能, ミトコンドリアの機能の観点から検討した。その結果, 予想されたように不死化細胞のほうが正常細胞にくらべ鉄の細胞傷害を強く示すことが分かった。また, MTT, LDH アッセイの結果より, 鉄の細胞傷害はミトコンドリアをターゲットにしていることが分かった。

不死化細胞は著しい染色体の変化を示し, 長期にわたって培養されると腫瘍性になる場合が多い (Mihara et al., Int. J. Cancer, 50: 639, 1992)。このことは, 不死化細胞が遺伝的に変異しやすいこと (遺伝子の不安定性) を示している。トランスフェリンの減少している不死化細胞は, 正常細胞に比べてラジカルに高感受性になっていると考えられる。このことは, 不死化細胞の遺伝子を変異し易くする原因になっているのかもしれない。

2. 鉄の細胞傷害と細胞環境中の酸素濃度

鉄の毒性は酸素濃度に依存することが分かった。このことは, 生体の組織の酸素濃度によって細胞の傷害が左右されることで, 実験の結果の解釈に注意する必要がある。

E. 結論

老化現象をおこすヒト正常細胞は不死化した細胞に比べ多くのトランスフェリンを産生していた。このことは, 鉄の関与するラジカ

ルの細胞傷害作用を正常細胞は不死化細胞に比べ効率よく防いでいると考えられる。この仮定のもとで、鉄処理後の両細胞の細胞傷害を比較したところ、正常細胞のほうが不死化細胞に比べ軽度であった。不死化細胞はラジカルなどの細胞傷害作用を受けやすく、そのため、染色体の変化や腫瘍性への変化をおこし易くなっていると考えられる。鉄処理を受けた細胞の細胞傷害に活性酸素がかかわることの証明として、低酸素条件では、有意な細胞傷害はみられなかった。また、ビタミンE、マニトール、DMSOなどの活性酸素スカベンジャーで鉄の細胞傷害は軽減された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① 近藤 格, 阪口政清, 難波正義: 老化と癌化: 不死化機構の研究. 電気泳動実験法, 日本電気泳動学会編, 医歯薬出版, 東京, 1999.
- ② Sakaguchi, M., Kondo, T., Pu, H. and Namba, M.: Transferrin synthesized in cultured human fibroblasts is associated with tubulins and has iron binding capacity. Cell Struct. Funct., 24: 5-9, 1999.
- ③ 近藤 格: ヒト線維芽細胞の不死化に伴う細胞内トランスフェリンの減少. 生物学に関する試験論叢, 14: 124-129, 1999.

研究協力者

近藤 格 (岡山大学医学部細胞生物学部門 助手)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

アルツハイマー病とアルミニウムに関する疫学研究のメタアナリシス

分担研究者 三野 善央
岡山大学医学部衛生学講座 助教授

研究要旨

アルツハイマー病の危険要因としてアルミニウム摂取があげられているが、いまだ知見が確定していないことからこれまでの疫学研究を概括し、メタアナリシスによる分析を行った。Medline によって文献を検索したところ、研究課題に関する疫学研究は、① 制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての症例対照研究、② 飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての ecological 研究、③ 飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究に分けられた。①に関しては症例対照研究が 6 件あり、Peto の方法によりオッズ比の併合を行ったところ、併合オッズ比（95%信頼区間）は 1.11 (0.85-1.44)であった。③に関しての症例対照研究を検討すると 3 件認められた。これらの研究結果の併合オッズ比（95%信頼区間）は 1.17 (1.04-1.31)となり、関連が認められた。したがって制酸剤によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病と無関係であるが、飲料水によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病を引き起こす可能性がある。

A. 研究目的

わが国はこれまでにない人口の高齢化に直面し、国民の疾病構造も大きく変化した。とりわけアルツハイマー病や脳血管疾患による痴呆はその社会的影響の大きさから重視されている。厚生省の推計によれば、65 歳以上の痴呆性老人数は 2000 年には 150 万人、2020 年には 270-290 万人に及ぶとされている。したがってこうした痴呆の危険要因を特定し、それを除くことによる予防は非常に重要な課題となっている。

痴呆は大きくはアルツハイマー病と血管性痴呆に分けられ、その危険要因も異なる。血管疾患の危険要因はこれまでに多くが特定され、高血圧予防のための食生活指導や生活関連病の立場からの予防の取り組みがなされている。一方、アルツハイマー病に関しては遺

伝学的、分子生物学的、生化学的研究が進められ、疫学分野でもその危険要因を明らかにするための研究が進められている。しかしながら、性、年齢、学歴、頭部外傷の既往、家族歴などが指摘されているが、いまだその危険要因が解明されたとは言い難い。とりわけ予防的介入が可能な危険要因の解明が待たれている。

アルミニウムはその危険要因として注目されてきたが、いまだ危険要因のひとつとして確定されたわけではない。そこでアルツハイマー病の危険要因の一つとして注目されているアルミニウム摂取あるいは暴露と当該疾患との間の関連を検討した疫学研究を概括し、メタアナリシスを行いたいと考えた。アルミニウムは日常生活に密着した物質であり、消化器用の制酸剤として使用されてきたし、飲

料水にも含まれている。また最近では清涼飲料水やアルコール飲料の缶として使用されており、そのアルツハイマー病への影響を明らかにすることは社会的にも非常に重要である。

B. 研究方法

2年度の作成した Medline を用いたデータベースをもとに、文献の検索を行った。キーワードとして「アルツハイマー病」および「アルミニウム」および「疫学あるいはコホート研究あるいは症例対照研究」として検索した。さらに研究課題に関する疫学研究として、①制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての症例対照研究、②飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての ecological 研究、③飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究に分けた。

それぞれに関して当該文献を収集し、研究結果の検討を行った。その際、メタアナリシスに必要な情報が記載されているか否かの検討を行った。

必要な情報が記載されている文献を用いてメタアナリシスを行い、Petoの方法によるオッズ比の併合とその95%信頼区間の算出を行った。その際、それに必要な情報が記載されている論文のみを選んだ。また、マッチド・ペア法を用いた研究については論文の結果から通常の症例対照研究の表を作成し、必要な情報を集めた。飲料水のアルミニウム濃度に関しては0.1mg/l以上と未満で2分割して分析を行った。

C. 研究結果

1. 制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究

制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究は6件あった(表1)。各研究の主な結果を表2に示した。両者の間の関連の見られた研究は1件のみであり、他の研究では関連は認められなかった。

唯一両者の関連がみとめられた Graves らの研究では130のマッチドペアによる症例対照研究が行われた。アルミニウムの包含量を考慮せずに分析した場合には調整オッズ比(95%信頼区間)は3.1(1.2-7.9)であり、量反応関係も認められた。しかしながらアルミニウムを包含していることが明確であった制酸剤のみに関して分析するとオッズ比(95%信頼区間)は0.7(0.3-2.0)となり関連は認められなかった。また彼らはアルミニウムを包含する防汗剤についても分析し、防汗剤全体では関連はなかったが、アルミニウム包含防汗剤のみについて検討するとアルツハイマー病との関連があったと報告している。これらの結果は一定程度、制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病との関連を示唆するものであるが、同一研究内でも知見が一定せず結論的なコメントはできないと記している。その他の5研究ではいずれも有意な関連は認められなかった。

Petoの方法によるメタアナリシスを行ったが、併合オッズ比(95%信頼区間)は1.11(0.85-1.44)であった。

2. 飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する ecological 研究

飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する ecological 研究は7件あり、ほとんどが飲料水とアルツハイマー病との関連を示唆するものであった。しかしながらこの種の研究は暴露を実際に測定していないことから因果関係の推定には限界があった。また、シリコンの影響が大きいのではないかという解釈もあった。

3. 飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究

飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病についての症例対照研究を検討すると文献は5件認められた(表3)。しかしながら、このうち2件はメタアナリシスのための情報が十分に記載されておらず、オッズ比に併合のために活用できたのは3件の研究の

表1 制酸剤によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究

1. Heyman A, Wilkinson WE, Stafford JA, Helms MJ, Sigmon AH, Weinberg T: Alzheimer's disease: a study of epidemiological aspects. *Annals of Neurology*, 15; 335-341, 1984
2. Amaducci L, Lippi A: Risk factors and genetic background for Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica*, Supple 116; 13-18, 1988
3. Broe GA, Henderson AS, Creasey H, McCusker E, Korten AE, Jorm AF, Longley W, Anthony JC: A case-control study of Alzheimer's disease in Australia. *Neurology*, 40; 1698-1707, 1990
4. Graves AB, White E, Koepsell TD, Reifler BV, van Belle G, Larson EB: The association between Aluminium-containing products and Alzheimer's disease. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43; 35-44, 1990
5. Canadian Study of Health and Aging: The Canadian study of Health and Aging: Risk factors for Alzheimer's disease in Canada. *Neurology*, 44; 2073-2080, 1994
6. Forster DP, Newens AJ, Kay DWK, Edwardson JA: Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 49; 253-258, 1995

表2 アルツハイマー病と制酸剤によるアルミニウム摂取に関する症例対照研究のメタアナリシス

著者 (年)	国	症例		対照		オッズ比(95%CI)
		暴露	非暴露	暴露	非暴露	
Heyman et al.(1984)	USA	5	35	15	65	0.61 (0.21-1.85)
Amaducchi et al.(1988)	Italy	7	2	8	1	0.44 (0.03-5.93)
Broe et al.(1990)	Australia	32	138	33	137	0.96 (0.56-1.65)
Graves et al.(1990)	USA	36	92	19	109	2.24 (1.21-4.18)*
Canadian group (1994)	Canada	36	117	104	269	0.80 (0.51-1.23)
Foster et al.(1995)	UK	22	87	14	95	1.72 (0.83-3.56)
* p<0.01 (カイ二乗検定, カイ二乗値=6.69, df=1), 他の研究は有意差なし						
併合オッズ比(95%CI)**						1.11 (0.85-1.44)

CI: 95%信頼区間, **Peto method による

みであった。メタアナリシスが可能であった3研究のうち関連が認められていた研究は1件であった。Neriらは2232名のアルツハイマー病患者と性と年齢を一致させた対照群の間での飲料水のアルミニウム濃度を比較検討

した。その結果0.01mg/l未満をreferenceとすると0.01-0.099mg/lで比較危険度が1.13, 0.10-0.199mg/lで比較危険度1.26, 0.2mg/l以上で比較危険度1.46であった。これらの結果から彼らは飲料水によるアルミニウム摂取

表3 飲料水によるアルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究

1. Neri LC, Hewitt D: Aluminium, Alzheimer's disease, and drinking water. Lancet, 338; 390, 1991
2. Forbes WF, McAiney CA: Aluminium and dementia. Lancet, 340; 668-669, 1992
3. Forster DP, Newens AJ, Kay DWK, Edwardson JA: Risk factors in clinically diagnosed presenile dementia of the Alzheimer type: a case-control study in northern England. Journal of Epidemiology and Community Health, 49; 253-258, 1995
4. McLachlan DRC, Bergeron C, Smith JE, Boomer D, Rifat SL: Risk for neuropathologically confirmed Alzheimer's disease and residual aluminum in municipal drinking water employing weighted residential histories. Neurology, 46; 401-405, 1996
5. Martyn CN, Coggon DN, Inskip H, Lacey RF, Young WF: Aluminum concentrations in drinking water and risk of Alzheimer's disease. Epidemiology, 8; 281-286, 1997

表4 アルツハイマー病と飲料水によるアルミニウム摂取に関する症例対照研究のメタアナリシス

著者 (年)	国	症例		対照		オッズ比(95%CI)
		暴露	非暴露	暴露	非暴露	
Neri & Hewitt(1991)	Canada	957	1275	854	1378	1.21 (1.07-1.37)*
Forster et al.(1995)	UK	67	44	70	39	0.85 (0.49-1.46)
Martyn et al.(1997)	UK	18	79	163	526	0.74 (0.43-1.26)
* p<0.002 (カイ二乗検定, カイ二乗値=9.86, df=1), 他の研究は有意差なし						
併合オッズ比(95%CI)**						1.17 (1.04-1.31)
その他のメタアナリシスのための情報が不十分であった研究						
Forbes & McAiney (1992)	Canada			NA		1.86***
McLachlan et al.(1996)	Canada			NA		2.5 (1.2-5.3)***

CI: 95%信頼区間, NA: not available

Peto method による, *統計学的な有意差あり

がアルツハイマー病の危険要因となりうることを主張した。一方、他の英国での2研究では関連は認められなかった。これらの研究結果について Peto の方法でのオッズ比の併合を行うと、併合オッズ比 (95%信頼区間) は 1.17 (1.04-1.31)となり関連が認められた (表4)。

また、情報の記載が十分でなかったためにメタアナリシスに活用できなかった研究の結果を表4の下に示したが、これらは飲料水からのアルミニウム摂取とアルツハイマー病との関連を示唆するものであった。

D. 考察

アルミニウムが記憶障害を含む神経毒性を持つことはすでに20世紀のはじめに報告されていた。その後、痴呆との関連が注目されるようになったのは、1970年代に長期透析患者に痴呆症状が頻発し、透析痴呆として知られるようになってからである。これは透析に使用した水道水および高リン酸血症防止のために投与された薬剤中のアルミニウムが原因となったと考えられ、アルミニウムの除去によりこうした症状は起こらなくなった。アルミニウムが脳内に入った場合には痴呆症状を引き起こすことが明らかになったが、これら透析痴呆患者の場合には、アルツハイマー病に特異的なアルツハイマー神経原線維変化(neurofibrillary tangle: NFT)や老人斑(senile plaque)などの病理像が観察されなかったことからアルツハイマー病とは異なるとの考えられた。一方、透析患者の脳内にもこうした病理変化があるとの報告もある。

その後、本研究で分析を行った疫学研究が精力的に行われてきたが、知見が確定したとは言い難かった。そこで本研究によりメタアナリシスを行い、知見の確定を行った。本研究ではアルミニウム暴露を制酸剤による摂取と飲料水による摂取に分けて分析を行った。その結果、制酸剤によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病の危険要因とはならないが、飲料水による摂取は危険要因となる可能性が示唆された。しかし、メタアナリシスによる併合オッズ比は制酸剤で1.11、飲料水で1.17であり、飲料水によるアルミニウム摂取がアルツハイマー病の危険要因であったとしてもその影響の大きさはそれほど大きくはない可能性がある。

飲料水によるアルミニウム摂取がアルツハイマー病の危険要因となるメカニズムについて考察する。アルミニウムの1日摂取量は10-40mgとされており、ほとんどが食品あるいはその添加物からであり、飲料水からの摂取は数%程度にすぎないとされている。しか

しながら飲料水のアルミニウムは吸収されやすく、脳内に移行しやすい可能性がある指摘されている。また、飲料水からの摂取は慢性的の長期間の暴露となること、とりわけ胎生期、乳児期での暴露と脳内移行の可能性があり、などから影響がしやすい可能性がある。

研究の限界について討論する。制酸剤によるアルミニウム摂取は比較的情報を集めやすいことから本研究でのメタアナリシスの結果は妥当なものと考えて良いだろう。しかしながら飲料水からのアルミニウム暴露は少量でかつ慢性的であることから暴露量の推定がなかなか困難である。今回の研究では多くが飲料水のアルミニウム濃度から暴露量を推定していたが、より正確な暴露量の推定が求められる。また、飲料水からのアルミニウム摂取についてはメタアナリシスに活用できた研究は3件のみであり、より多くの質の高い疫学研究を積み重ね、知見の確定をする必要がある。

E. 結論

アルミニウム摂取とアルツハイマー病に関する症例対照研究のメタアナリシスを行った。その結果、制酸剤によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病とは無関係であるが、飲料水によるアルミニウム摂取はアルツハイマー病を引き起こす可能性があることが示唆された。しかしながら、これらの研究には疫学方法論上の問題も認められ、さらなる追試研究が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 論文発表

- ① Mino, Y., Oshima, I. and Okagami, K.: Mood disorders and influenza epidemics in Japan. *Psychiatry Clin. Neurosci.*, 54; 59-65, 2000.
- ② Shimodera, S., Mino, Y., Inoue, S., Izumoto,

- Y., Kishi, Y. and Tanaka, S.: Validity of a Five-Minute Speech Sample in measuring expressed emotion in the families of patients with schizophrenia in Japan. *Compreh. Psychiatry*, 40; 372-376, 1999.
- ③ Shigemi, J., Mino, Y. and Tsuda, T.: The role of perceived job stress in the relationship between smoking and the development of peptic ulcer. *J. Epidemiol.*, 9; 320-326, 1999.
- ④ Maeda, K., Yasuda, N., Ohara, H. and Mino, Y.: Effects on mortality of getting the basic health examination under the Health Service for the Elderly Act and modification of the effects by health status among elderly persons in a rural community. *J. Epidemiol.*, 10; 22-28, 2000.
- ⑤ Mino, Y., Oshima, I. and Okagami, K.: Seasonality of birth of patients with mood disorders in Japan. *J. Affect. Disord.*, in press.
- ⑥ Mino, Y., Inoue, S., Shimodera, S. and Tanaka, S.: Evaluation of expressed emotion (EE) status in mood disorders in Japan: Inter-rater reliability and characteristics of EE. *Psychiatry Res.*, in press.
- ⑦ Mino, Y., Shigemi, J., Otsu, T., Tsuda, T. and Babazono, A.: Does smoking cessation improve mental health? *Psychiatry Clin. Neurosci.*, in press.
- ⑧ Shimodera, S., Mino, Y., Inoue, S., Izumoto, Y., Fujita, H. and Ujihara, H.: Expressed emotion and family distress in relatives of patients with schizophrenia in Japan. *Compreh. Psychiatry*, in press.
- ⑨ Mino, Y., Shigemi, J., Tsuda, T., Yasuda, N., Babazono, A. and Bebbington, P.: Recovery from mental ill health in an occupational setting: A cohort study in Japan. *J. Occup. Health*, in press.
- ⑩ Mino, Y. and Aoki, S.: Methylphenidate-induced psychosis in an adolescent with hyperkinetic disorder. *Kawasaki Med. J.*, in press.
- ⑪ Mino, Y., Shigemi, J., Otsu, T., Ohta, M., Tsuda, T., Yasuda, N. and Babazono, A.: Smoking and mental health: cross-sectional and cohort studies in an occupational setting in Japan. *Prev. Med.*, in press.
- ⑫ Mino, Y., Oshima, I., Tsuda, T. and Okagami, K.: No relationship between schizophrenic birth and influenza epidemics in Japan. *J. Psychiatr. Res.*, in press.
- ⑬ Mino, Y., Yasuda, N. and Inoue, S.: Effects of medical education on attitudes towards mental illness among medical students: A five-year follow-up study. *Acta Med. Okayama*, in press.
- ⑭ Mino, Y., Shimodera, S., Inoue, S., Fujita, H. and Tanaka, S.: Expressed emotion of families and the course of mood disorders: A cohort study in Japan. *J. Affect. Disord.*, in press.