

重金属の影響に関する研究

前田 博
(東京医科歯科大学公衆衛生学)

上田 喜一
(東京歯科大学衛生学)

長岡 滋

遠藤 立一

1 研究班員および分担課題

- (1) メチル水銀の作用機序 I. 生体に及ぼす影響,
II. 中枢神経系に及ぼす影響 (第1報),
代永宝 (帝京大学医学部)
- (2) 魚類における水銀化合物の体内分布と生物学的半減期,
上田喜一 (東京歯科大学)
- (3) 職場環境中濃度水銀による中毒患者(温度計業者)の臨床的検討, 山村行夫 (聖マリアンヌ医科大学)
- (4) I. マウス, ミエローマ細胞および吉田肉腫細胞の生体高分子合成機能ならびに表面膜構造に対する水銀化合物の影響, II. マウス, ノイロblastoma C1300培養系の確立, 井村伸正 (東京大学)
- (5) メチル水銀中毒に対するカドミウムの影響について,
増原泰三 (日本歯科大学)

2 本年度の研究成績の抜粋

本年度は研究第1年度であるから, 新しい研究課題に着手した班員は未だ十分な成果が得られず, ことに長期慢性毒性試験では半年経過では未だ実験途上で, 情報の得られないのは当然である。

それにもかかわらず, いくつかの注目される新知見が報告された。

代永班員はラットの亜急性毒性実験において血液凝固の抑制を認め, また硬組織(切歯, 脛骨)の成長抑制, カルシウム沈着阻害を見出したが, これは従来未報告の反応である。

増原班員はメチル水銀とカドミウムの同時投与が, 中毒症状(後肢麻痺)を軽減し, 大脳, 小脳, 体毛等の水銀蓄積を著しく低くすることを認めた。金属相互作用は興味ある現象で, その作用機序の解明を期待したい。

井村班員は腫瘍起原細胞を培養し, 水銀化合物はそのDNA合成と, 蛋白合成を低濃度で抑制し, DNA合成のほうが感受性が高く, またメチル水銀は塩化第二水銀よりその作用が10倍強力であることを示した。

また菌体を破壊分離した上清の上記酵素作用がまったく阻害されないことから, 水銀化合物はまず膜構造に作用し, 不可逆的变化を与えると推定し, これは欧米の水準を抜く実験成果と考える。

上田班員は放射性メチル水銀を魚類に腹腔内注射し, 生物学的半減期が220日前後, もし46日以後の安定期から計算すると320日の長期であることを示した。これは日本では最初の魚類についてのデータである。

山村班員は家庭体温計工場の環境が著しく不良で, 血中水銀は37.7~6 μ g/100gに達し, 中毒症状を認められること, また毛髪, 血液, 尿の水銀濃度の相関性を示した。

また治療剤としてのペニシラミン, チオラバルなどの効果を入院患者で比較した。

無機水銀の中でも金属水銀蒸気はアルキル水銀に似た態度を示し, 脳内にも侵入し, 振戦などの神経症状も示す。したがって水銀蒸気による中毒の研究, その血液内運搬機構の解明はアルキル水銀の作用の研究にも役立つであろう。

前田班員, 竹本班員は2ヵ年の慢性中毒実験が継続中で, 来年度の中間報告を期待したい。

3 各班員の研究成績の概要

(1) 代永班員は亜急性中毒時の諸種の生体反応, ことに硬組織に及ぼす影響を研究した。50g前後の雄ウィスター系ラットに塩化メチル水銀(5%アラビアゴム懸濁液)を2mg, 8mg, 16mg/kg, 塩化第二水銀(水溶液)は2mg, 4mg, 8mg/kgを1日1回, 連続6日間皮下注射した。

a) 体重についてはHgCl₂群は, 8mg/kgから体重抑制が見られたが, 注射終了後はただちに回復した。塩化メチル水銀(MMC)群は, 8mg/kgから体重増加抑制が見られ, 歩行も拙劣となり, 注射終了後も回復しなかった。

b) 血液凝固に及ぼす影響

注射時に出血傾向が目立ってきたので、血液凝固系に及ぼす影響を検索したところ、第1期すなわち factor 12から factor 5までの連鎖反応および plasmin の作用が好んで抑制されることが判明した。一方、血管壁もおかされる可能性もあるので検索している。

c) 臓器重量に対する影響

腎是水銀化合物により増大し、ことにMMCでは投与量に比例して直線的に増加した。その他副腎、睪丸、下垂体のような内分泌腺も重量増加したが、 HgCl_2 ではMMCのような投与量と反応との比例性は見られなかった。

d) 切歯の成長に及ぼす影響

3日間隔で酢酸鉛を注射して、その沈着によって現われた鉛線の end-point 間の距離を顕微鏡で測定した結果、切歯の成長が水銀化合物で抑制されることを見出した。 HgCl_2 では注射後すぐ効果が現われ、注射終了後ただちに消失するが、MMCでは少量ではかえって成長促進、抑制は注射後遅れて3日目頃より始まり、注射終了後も継続した。

e) 脛骨の成長に及ぼす影響

200 μ /日前後の速度で脛骨は成長するが、 HgCl_2 投与により抑制され、切歯より著しい。MMCは徐々に作用するが、骨端軟骨層の短縮が明瞭で、骨粗鬆症も発生する。

以上の成績から、水銀化合物は上胚葉性の組織よりも中胚葉性の組織を好んでおかすこと、成熟細胞よりも未熟細胞に親和性が強いことが結論される。またMMCと無機水銀の間に作用の差がある。

f) 石灰化の抑制

切歯への石灰沈着が抑制されるが、成長抑制より遅く現われ、注射終了後の回復は速い。

g) 粘液多糖類の形成の抑制

トルイジンブルー染色により追及したが、注射終了後は形成促進が起った。

代永班員はまた、中枢神経系に及ぼす影響を電気生理的方法で検討を試みた。

哺乳動物から脊髄を前根、後根とともに摘出、リング液で灌流すると、数分以内で action potential が現われなくなり死滅する。しかし、出生後24時間以内のラットでは3時間以上も生存することが判明したので、方

法を利用して、MMCを灌流槽内に直接適用して、後根の電気刺激により前根に生じた電位変化をオシロスコープおよびペンレコーダーで観察続行中である。

(2) 上田班員は魚類にメチル水銀が蓄積する原因の一つとして、a) 生物学的半減期が長いことがあげられているので、これを魚種別に確かめるために、放射性無機水銀 ($^{203}\text{HgCl}_2$) およびメチル水銀 ($\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$)、エチル水銀 ($\text{C}_2\text{H}_5^{203}\text{HgCl}$) をコイ(30g)、ニジマス(20g)、ナマズ(40g)に腹腔内注射し、 γ 線全身放射能を生体のまま一定期日ごとに測定し、100日まで追求した。

その結果、無機水銀(塩化第2水銀)では100日前後(ニジマス110, コイ90, ナマズ140日)、塩化メチル水銀では220日前後(ニジマス220, コイ230, ナマズ190日)、塩化エチル水銀160日(ナマズ)の生物学的半減期を得た。

しかし、体内濃度は最初20日前後の急速の低下期と、安定して徐々に低下する後期と2段階に分れるので、46日以後の安定期からのみ計算すると、メチル水銀に対し320日という1年に近い生物学的半減期が得られた。

これをスウェーデン、フィンランドで行われた人体実験による70日という半減期と比較すれば、魚類のそれは著しく長く、メチル水銀の濃度が高いことの大半を説明できる。

b) 放射性メチル水銀による魚類オートラジオグラム
コイに配合飼料に吸収させて経口投与し、24時間後に全身凍結切片を作製、X線フィルムを密着露出を行った。MMCは無機水銀と異なり、24時間で脳、筋肉に分布しているが、魚類の特徴として pseudo-blanch (偽鯉、甲状腺の機能を有する) や頭腎(副腎に相当する)に分布が著しいことが見られた。

c) クジラ類、マグロ類、メヌケ(深海魚)の体内水銀分布は常に筋肉が最高で、肝臓の2倍程度に高いことが見出された。これは魚類分析で筋肉を代表的試料とすることは、単に食品衛生上の目的ばかりでなく、生体の代表的濃度を示す意義を明らかにした。

(3) 山村班員は無機水銀蒸気に暴露される小企業体温計工場作業員の血中および毛髪水銀濃度、空气中濃度および中毒症状を疫学的に調査した。

a) 家庭工業の特徴は作業場と家族の居室が同一家屋

内に隣接し、小児、老人もまた水銀蒸気を吸入して生活している点にある。例えば同居者の21歳の長女でも血中水銀 $16.7\mu\text{g}/100\text{g}$ 、尿中 Hg $214\mu\text{g}/\ell$ と異常な高値を示した。

この水銀温度計工場の隣接居間でも $87.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ の空中濃度を実測したので、吸入による取込みが原因である。

小規模家庭工業では労働者の空气中抑制濃度 $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ をこす作業場が多く、 $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ に達するものもあり、強度の振戦、痙性麻痺さらに構音障害、唾液分泌亢進、下痢などの症状を伴う慢性中毒患者がしばしば発見される。

血中水銀は $37.7\sim 6\mu\text{g}/100\text{g}$ の範囲にあり、管理の比較的良好な中企業における $1\sim 5\mu\text{g}/100\text{g}$ と比較して著しく不良である。

b) 毛髪総水銀と血中水銀の相関係数は男で 0.734 であるが、毛髪水銀対尿中水銀の相関は 0.492 と低い。女子は例数が低く計算できない。

c) 有機水銀チメロサル製造業

医用殺菌剤チメロサル（エチル水銀チオサリチール酸ナトリウム）製造従事者の血中水銀は $1\sim 3.6\mu\text{g}/100\text{g}$ 、尿中水銀は $50\mu\text{g}/\ell$ 以下であったが、毛髪水銀は 45.9 と 92.5ppm（2名）の高値を示し、アルキル水銀の蓄積性を示唆した。

d) 治療剤による尿中排出効果

中毒症状を有する患者を入院させ、D-ペニシラミン 1g/日の内服、チオラ 800mg/日、BAL 100mg 筋注グルタチオン 100mg/日注で断続的に治療し、尿中水銀排泄効果を50日にわたり観察したが、ペニシラミン、チオラで比較的排泄促進が見られたが、水銀レベルは徐々に下降し、血中レベルも下降した。

e) 呼吸水銀濃度の診断応用

入院前呼吸は $0.8\mu\text{g}/\text{m}^3$ 、入院中次第に低下し、 $0.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ 程度に達した。症例 2 では $1.2\mu\text{g}/\text{m}^3$ の呼吸中濃度がやはり漸減し、3ヵ月後は $0.1\mu\text{g}/\text{m}^3$ 以下に達した。

近来海外では揮発性物質の体内レベルを呼吸でスクリーニングすることが着目されているが、水銀でも可能なことを示した。

(4) 井村班員は培養細胞に対する水銀化合物の影響をしらべた。

mouse myeloma 細胞および吉田肉腫細胞を用いて、

DNA 生合成の活性はトリチウムでラベルしたチミジン (^3H -thymidine) の酸不溶性画分への取込みで測定し、蛋白合成活性はトリクロル酢酸不溶画分への放射性ロイシン (^3H -leucine) の取込みで測定した。

a) DNA 生合成は mouse myeloma 細胞の場合 HgCl₂ では $2\times 10^{-6}\text{M}$ で阻害が現われ、 $2\times 10^{-5}\text{M}$ では 75~80% 活性が失われた。塩化メチル水銀 (MMC) では $2\times 10^{-7}\text{M}$ で阻害が始まり、 $2\times 10^{-6}\text{M}$ ではほとんど失活した。

吉田肉腫細胞でもほぼ同傾向であったが、やや感受性が強い印象を受けた。

b) 蛋白合成活性は myeloma 細胞の場合 HgCl₂ では 10^{-5}M で阻害が始まったが、MMC では $2\times 10^{-6}\text{M}$ で阻害が見られ、 $2\times 10^{-5}\text{M}$ ではほとんど失活した。

吉田肉腫細胞でも HgCl₂ では $2\times 10^{-5}\text{M}$ でほとんど活性を失い、MMC では $2\times 10^{-6}\text{M}$ で既に著しい阻害が見られ、 $2\times 10^{-5}\text{M}$ で完全に失活した。

c) DNA 合成、蛋白合成作用において、MMC は HgCl₂ の約 1/10 の濃度で同程度の阻害を示した。

d) DNA 合成が蛋白合成活性より水銀化合物に対して感受性が強い。

e) 細胞の水銀剤による前処理の影響

myeloma 細胞を $2\times 10^{-5}\text{M}$ の水銀化合物で 30分処理した後、培養液で洗滌した後の酵素活性は、DNA 合成では MMC では完成阻害、HgCl₂ でも著しい阻害、蛋白合成では MMC では完全阻害、HgCl₂ ではわずかな阻害が見られた。

f) 無細胞蛋白合成系への影響

mouse myeloma 細胞を破壊し、15,000rpm で遠沈して上清を集め S-30 preparation とした。mouse myeloma からの系では $2\times 10^{-6}\text{M}$ では HgCl₂、MMC ともまったく阻害を示さず、さらに $2\times 10^{-5}\text{M}$ MMC もまったく阻害を示さず、細胞懸濁液とは異なる反応を示した。

g) ヒマの血球凝集素 (PHA) による細胞凝集作用への影響

上記 e)、f) の実験は細胞膜への水銀剤の作用を示唆するので、本実験を行った。

mouse myeloma 細胞では HgCl₂ も MMC も 10^{-6}M では凝集阻害を起さなかったが、吉田肉腫細胞では、 10^{-6}M の MMC で凝集が 30分まで見られず 10^{-5}M では 30分まで陰性であった。この点では HgCl₂ と差があった。

以上の成績はMMCが細胞膜に変化を起したことを示唆し、その態度は2,4-ジニトロフェノールなどの共役阻害剤と似ている。

h) 以上の実験成績は、水銀と細胞表面膜との反応が第一義的に重要で、細胞内部への影響は特殊な作用伝達系の存在を考えたい。

井村班員はまたアルキル水銀の神経細胞への作用は神経細胞由来の培養細胞を用いて研究する必要があると考え、mouse neuroblastoma B-1300の培養条件を検討した。

その結果、培養液中に重炭酸ナトリウムを添加することにより、一般培養装置が使用可能となったので、来年度研究に活用しうると期待される。

(5) 増原班員はメチル水銀の毒性に対するカドミウムの影響を検討した。これは最近では金属相互間にも毒性の増強、あるいは軽減作用があることが内外で報告されているからである。

体重180gのSD系雄ラットを1群10匹とし、次の6群に分けた。すなわち、対照群、無機水銀(HgCl₂)群、メチル水銀(CH₃HgCl)群、カドミウム(CdCl₂)群、無機水銀+カドミウム群、メチル水銀+カドミウム群。

金属塩は基礎飼料に対し、水銀群はHgとして2mg/体重1kg、カドミウム群はCdとして20mg/体重1kgとなるように加え、飼料を1匹当り1日20gに制限した。実験期間は26日間である。

実験成績の中で顕著な点は、メチル水銀単独群は14日頃より体重が減少し、Cd群はすべて投与開始後8日目まで著しい体重減少をきたし、それ以後はゆるやかに低下した。

メチル水銀中毒症状とされる後肢麻痺は、単独投与群は18日より始まり、26日では歩行障害は全例(10/10)に、後肢交叉(尾で垂下時)はほぼ全例(8/10)に現われたのに対し、メチル水銀、カドミウム併用群では20日で初めて歩行障害が2/10、後肢交叉は22日で初めて1例

に認められ、26日(最終日)でも出現率は5/10で、後肢麻痺の出現を遅延し、軽減する効果があったと考えられる。

さらに体内臓器組織における水銀蓄積量を単独投与群を100として、それに対する%で示すと、メチル水銀・カドミウム併用群では腎では差がなく100であるが、肝、脾では74%、小腸60%、血液52%で、さらに顕著なのは大脳50.7%、小脳39.7%、体毛23.2%と1/2あるいはそれ以下の蓄積軽減が見られた。

この効果の現われる作用機構は、腸からの吸収の抑制か、あるいは排泄の促進か、現在の実験段階では不明であるが、さらに次の段階の実験での究明を期待している。

(6) 竹本班員は、SD系雌ラットを用い、生たらこに塩化メチル水銀を10ppmおよび1ppm混和群および無添加対照群に分け、1匹当り1日10gを与え、その後は通常の粉末飼料で補う方法で2ヵ年の慢性中毒実験を継続中である。48年9月開始、6ヵ月では各群の体重増加には有意の差はない。

100ppm添加群は3週より体重減少が現われ、4週に入り後肢麻痺が2例に見られ、立毛して衰弱し、5週では12/30に麻痺が見られ、死亡例も5例、8週では全例に中毒症状が現われ、逐次死亡した。

(7) 前田班員は、竹本班員と協力して、慢性中毒例の電顕的研究、ならびに体内移行に関する研究を分担しているが、慢性中毒実験の経過を追うので材料の入手が遅れてくる。

すでに終了した予備実験の100ppm群についての電顕的検索は進行中である。

また、ラットの胸管からリンパを経時的に採取する技法を開発したので、投与メチル水銀濃度別に、血液およびリンパ液中濃度の比較を行う計画である。