

# 重金属の影響に関する研究 (第2報)

前田 博 上田 喜一 長岡 滋  
(東京医科歯科大学医学部) (昭和大学歯学部)

遠藤 立一

## 1. 研究班員および分担課題

- (1) 低級アルキル水銀が生体に及ぼす影響についての基礎的研究 ア 動物細胞の生体高分子合成機能に及ぼす水銀化合物の影響, イ 中枢由来の培養細胞に対する水銀化合物の影響…形態的变化

井村伸正 (東京大学)

- (2) ラット・マウスにおける放射性水銀化合物の分布および臓器別半減期

上田喜一 (昭和大学)

- (3) ラット慢性中毒実験による電顕的研究ならびに体内移行に関する研究 (II)

前田博 (東京医科歯科大学)

- (4) NEHG の慢性毒性影響病理学的検討

竹本和夫 (埼玉医科大学)

- (5) ア メチル水銀中毒に対する無機水銀の影響について, イ MMC 投与による臓器内 SH 基の変動とそれに対する他金属の影響について, ウ メチル水銀の吸収・運命に関する研究 増原泰三 (日本歯科大学)

- (6) ア メチル水銀の作用機序 (その1) —成長に及ぼす影響, イ 水銀中毒に及ぼす影響 N—(2, 3—dimercaptopyryl) —ph+halamidic acid の影響

代永 宝 (帝京大学)

- (7) 金属水銀暴露者の毛髪・血液および呼気水銀に関する研究 山村行夫 (聖マリアンナ医科大学)

## 2. 各班員の研究成績の概要

- (1) 井村班員は前年度に引続き細胞培養の手技を応用して, 細胞レベルの生化学的反応 (核破・蛋白合成) へのアルキル水銀の影響を追求した。

ア) 吉田肉腫細胞の DNA 合成阻害を前年度に報告したが, 今回はトリチウム標識ウリジン ( $^3\text{H}$ -uridine) の取込みから RNA 合成を追求し, DNA と同様にメチル水銀は  $10^{-7}\text{M}$  で既に阻害が認められ, 無機水銀

では  $10^{-6}\text{M}$  で漸く阻害が起った。

しかし, ウサギの網状赤血球の蛋白合成能をトリチウム標識ロイジンの取り込みでしらべると, 無機・有機水銀とも  $10^{-6}\text{M}$  で阻害が認められた。網状赤血球を溶血, 遠沈した上清 (無細胞蛋白合成系) に対して, 無機水銀 ( $\text{HgCl}_2$ ) は  $2 \times 10^{-5}\text{M}$  で強い阻害がみられるのに反し, メチル水銀はこの濃度では全く阻害が認められなかった。この成績は前年度の mouse myeloma 無細胞酵素系と一致する成績である。

この結果から, 2 価の無機水銀イオンの酵素蛋白の SH 基に対する親和力は 1 価の有機水銀イオンより強く, したがって細胞内に侵入した後は阻害を強く現わす。メチル水銀の作用は細胞膜への吸着・反応 (透過性) に特徴があり, 細胞膜の存在しない系では特異性を失うと説明しうる。

イ) 井村班員は組織細胞の生活により近似する系として, mouse glioma (astrocytoma) を cover slip 法で板面培養し, RNA 合成能は  $10^{-6}\text{M}$  では影響されず,  $10^{-5}\text{M}$  で無機・有機水銀とも 50% 阻害を示した。一方蛋白合成能は, 無機水銀は  $10^{-5}\text{M}$  でほとんど完全に阻止するが, メチル水銀は 30% 阻害に止った。この傾向は無細胞系酵素阻害の場合に似るから, この glioma の表面膜構造が, 膜水腫細胞のそれとは異っていることも推定される。

これらの水銀作用細胞の形態的变化も電顕像により追求中である。

- (2) 上田班員は, 前年度は魚類におけるメチル水銀の生物学的半減期が 200~300 日と長いことを報告したが, 本年度は同一手技によりラット・マウスにおける半減期を測定した。

放射性無機水銀 ( $^{203}\text{HgCl}_2$ ) 或はメチル水銀 ( $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$ ) を腹腔内に 1 回注射し, 全身から放射される  $\gamma$  線の推移と whole body counting により 100 日まで

追求計算した。

ラットにおけるメチル水銀の生物学的半減期は51日、ヒトの70日とオーダーは一致した。無機水銀に対しては31日を得た。マウスはラットより排泄が速かであった。

注射後一定日ごとに数匹を殺して臓器別半減期を求めたが、メチル水銀の減衰は血液・肝・脾・脳いずれも平行した曲線が得られ半減期は15日前後となった。大脳より注射当日より数日遅れて最高点に達するが、その後の減衰経過は他の臓器と異なる。したがっていわゆる第3水俣病事件当時熊本大学から提唱されたような大脳における半減期が特に長いという現象はラットにおいては認められなかった。腎と体毛の半減期はそれぞれ38日、52日と長い、これらが排泄路であることを考えれば当然であろう。

特に注目すべきことは、メチル水銀のように毛髪に移行しやすい物質では、体毛の半減期が全身の半減期に支配的影響を与えることで、有毛動物や、人体頭部の放射能 counting では注意すべき現象であろう。

ラットの無機水銀の半減期は31日とやや短い、この場合も腎を除く臓器半減期は15日前後で、体毛の値で支配されていた。無機水銀も高率に毛髪に移行することが示された。

20日後注射量の70%は排泄され、そのうち尿には3%程度に過ぎなかった。

(3) 前田班員はラット胸管にポリエチレン・チューブを挿入する手技を利用して、経口投与した有機水銀のリンパ液への移行を追求した。100ppmのメチル水銀経口投与後2~16時間にわたりリンパ液中濃度は0.02~0.05ppmに止り、肝2.5ppm、血液4.4ppmに比して極めて低く、16時間までに投与量の0.05~0.14%移行に過ぎなかった。

なお、ラットをメチル水銀1、および10ppmの飼料ですでに一年以上飼育中であるが、その神経の電顕的所見は目下追求中である。

(4) 竹本班員は、有機水銀の吸収・排泄に対する蛋白SH基の影響に注目して、SH基に富む「生たらこ」を基礎飼料としたメチル水銀添加飼料(1, 10, 50, 100ppm)をラット(♀)1匹当たり毎日10gを投与した。これを通常の固形飼料に相当する量のメチル水銀を加えた群と比較した。

50および100ppm群は4週までに死亡例が現われたので水銀投与を中止した。10ppm群は8カ月後に後肢運動障害が出現したが、普通粉末飼料群の方が「たら子」群よりも症状が強く、1ppm群では両群とも発症を見ていない。この慢性毒性試験は目下継続中である。

(5) ア) 増原班員は、前年度年にメチル水銀とカドミウムの相互作用を報告したが、今回は無機水銀の共存の影響をしらべた。ラット(体重200g)を用い、無機水銀( $HgCl_2$ )2mg/kg、メチル水銀4mg/kg及び両者併用の3群をつくり、15日間毎日経口投与した。両者併用群が最も影響が強く、体重は急速に減少、9日目頃から歩行障害、後肢麻痺が出現した。

臓器の水銀分析では、併用群はメチル水銀単独投与群の概ね2倍の総水銀濃度を示したが、腎は例外として僅かに25%増に止った。一方メチル水銀分析値は、腎、脾、血液では併用群の方が単独投与群より低く、ことに腎では $\frac{1}{2}$ に低下していた。

この現象は無機水銀によるメチル水銀の排泄促進を示唆するが、7日目および14日目に代謝ケージにラットを入れて糞、尿を採取し分析したところ、7日目の糞中メチル水銀濃度は併用群の方が2倍高く、14日目では5倍も高濃度であって排泄促進がみられた。しかし併用群の腎は著明な浮腫を伴う変性を示したので病理組織的变化が原因する可能性もあり、無機水銀によるメチル水銀の追出しが否かは直ちに結論を下しえない。

イ) 増原班員はさらにメチル水銀投与によるSH基の変動をしらべた。これはメタロチオネイン(metallothionein)の誘導形成との関連を意図したものである。

ラット(180g、雄)をメチル水銀(2mg/kg)、無機水銀(4mg/kg)、カドミウム(10mg/kg)の各群および2物質同時投与の組合せの各群に分け、胃ゾンデにより3週間連続投与を行った。

臓器SH量をDTNB法で測定すると、肝では多い方からカドミウム(Cd)群、メチル水銀+無機水銀群、メチル水銀(単独)、Cd単独の順に蛋白結合型SH基が低下した。腎では多い方からメチル水銀+無機水銀、無機水銀(単独)、メチル水銀(単独)メチル水銀+Cdの順に非蛋白型SHの増加が見ら

れたが、無機水銀を共存した群は蛋白結合型SHも増加した。小腸ではメチル水銀+無機水銀、無機水銀(単独)、メチル水銀(単独)、メチル水銀+Cd、Cd(単独)群の順で非蛋白型SHの増加がみられ、Cd或は無機水銀群では蛋白結合型SHも増加した。

肝、腎、小腸は、システイン(SH基アミノ酸)に富む蛋白であるメタロチオネイン(metallothionein)の誘導形式のある臓器として知られているから、上記の所見はそれを裏書きしたものと解されよう。肝ではCdの方がより強く誘導形成を起し、腎では無機水銀の方がより強く誘導する傾向がみられた。

ウ) 増原班員はさらに有機水銀が主として胆汁から排泄されるといわれるので、ラットの胆管にポリエチレン管を挿入し、胆汁のビリルビン値とメチル水銀を測定した。2mg/kgの塩化メチル水銀と連日経口投与し、途中6日毎に数匹づつ抜き取り分析した。血液メチル水銀の上昇と比例して胆汁中濃度も上昇したが、血液レベルの30~50%程度であった。

(6) ア) 代永班員は、前年度に引続き3日ごとに動物に酢酸鉛溶液を注射して、その硬組織への沈着性を利用して注射時点をマークする方法を利用して、水銀の硬組織の成長への影響を追求した。

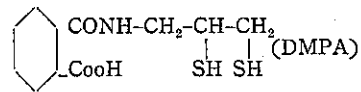
ラット切歯の長軸方向の成長は、塩化水銀(2~8mg/kg)注射直後より抑制されるが、塩化メチル水銀(2~8mg/kg)は4日間注射後から遅れて抑制が始まり、6日後注射を中止すると無機水銀では速かに回復したが、有機水銀では作用がなお持続した。

横軸成長にも同様な影響が見られたが、メチル水銀の低濃度では3日後に一過性の成長促進が見られた。

脛骨の成長には切歯よりも鋭敏な効果が見られた。また骨粗鬆症(osteoporosis)が見られた。その発生機序は骨形成と骨吸収の両方とも水銀により抑制されるが、前者がより強く抑制されるためと考えられた。注射終了後にも起る本症発症の機序はメチル水銀では注射中と同じ作用の継続であるが、無機水銀では強い量吸収の促進によると理解された。

イ) 代永班員は新しい水銀解毒剤を提唱した。流行性肝炎治療の目的で開発されたN-(2, 3-dimerc-

aptopropyl)-ph+halamic acid (DMPA)がSH基を2つ有することに着目した。



無機水銀(HgCl<sub>2</sub>)或は塩化メチル水銀0.5mg Hg/kgの割にマウスに1日1回、5日間注射する。毎回水銀注射10分前にDMPA75mg/kg(LD<sub>50</sub>の1/4)と他の水銀解毒剤もLD<sub>50</sub>の1/4量即ちBAL(25mg/kg)、DL-penicillamine(50mg/kg)、cysteamine(50mg/kg)、L-cysteine 400mg/kgを注射してマウス臓器内水銀貯留度により解毒効果(排泄効果)を比較した。

BAL、ペニシラミン、DMPAが貯蔵低下の効果が人で、BALは主として無機水銀に、ペニシラミンは有機水銀(メチル水銀)に有効に作用するが、DMPAは無機、有機水銀に共に有効であった。水銀の排泄経路は、BAL、ペニシラミンは尿中排泄を高めるが、DMPAは糞中排泄を高めると認められた。

解毒剤の効力の比較は等しい量を与えないと正しい比較にならないので、BAL 25mg/kgと等モルの解毒剤を3日或は5日間投与で比較すると、無機水銀に対しては、DMPA>BAL>L-cysteamine≥DL-penicillamineの順序、有機水銀(メチル水銀)に対しては、DL-penicillamine>DMPA>cysteamine>L-cysteine>BALの順序で効力を示した。

◎DMPAの作用持続性(鉛中毒を利用する観察)

鉛レジン(鉛型アンバーライトIRC-50)をウサギに皮下注射し、持続的に血中に鉛を放出させた。これにDMPA、BAL、Ca-EDTAを注射し、切歯象牙質縦断面の鉛沈着の軽減或は阻止の程度および持続期間から血中鉛量の低下効果を推定した。一般に解毒剤の持続は非常に短い(6時間程度である)のに反し、DMPA100mg/kgは3日内外も効果が持続した。

◎治療実験 始めに、マウス無機水銀或はメチル水銀を2mg/kg2日間注射しておいて治療剤をLD<sub>50</sub>の量1/4を1日2回皮下注射した。無機水銀に対してDMPAとBALは尿中排泄を促進し、臓器中濃度も低下したが、メチル水銀に対してはDL-ペ

ニシラミンが最も排泄を促進し、DMPA は BAL 程度に止った。

(7) 山村班員は金属水銀、或はエチル水銀に暴露される作業者の観察を中心に、診断基準として血液、毛髪、呼気水銀の値を比較し、また無機水銀の人体内でメチル化の可能性を追求した。

ア) 正常者の頭髮水銀濃度は、男(17名平均) 5.5ppm (メチル水銀3.3ppm)、女(8名平均) 3.3ppm (メチル水銀2.3ppm) であった。

水銀蒸気に暴露される水銀電解槽(塩素ソーダ工場) 作業者100名中総水銀の最高は921ppm、次いで524ppm で、メチル水銀の最高は26ppmであった。チメロサール工場では、A例総水銀141ppm 中エチル水銀128、メチル水銀4.0、B例では67ppm 中エチル水銀58、メチル水銀7.0であった。

正常者頭髮総水銀中メチル水銀の占める割合は70%であるのに比し、水銀暴露群では9~54%で外部吸着の占める割合の大きいことを示した。しかし金属水銀(蒸気) 暴露者のメチル水銀平均4.4ppm と正常者の3.4ppm との間に有志の差があり、無機水銀の一部の体内メチル化を支持する所見であった。

イ) 血液水銀濃度(山村)

正常者男17名の平均は総水銀 2.5ppm、うち無機0.8、有機1.8ppm、女7名平均は総水銀 2.0ppm、うち無機0.8、有機1.2ppm で、毛髪メチル水銀と血中メチル水銀値の間には相違がある(相関係数、正常者0.79、水銀職場0.7)。

ウ) 慢性水銀中毒患者の血中水銀濃度の推移(山村)

家庭工業として金属水銀蒸留精製を行っていた主人と子供が中毒症状を示し、聖マリアンナ医科大学病院に入院した。

症例1(主人) 入院中血液中総水銀60.2 $\mu$ g/100g(うちメチル水銀3.6)、6カ月入院後4.2 $\mu$ g/100g(メチル水銀1.8)まで低下、退院後自宅で再び総水銀6.1 $\mu$ g/100g(メチル水銀2.5)と上昇。

症例2(妻) 最初27.8 $\mu$ g/100g(メチル水銀9.1) 治療後8.6(メチル水銀4.7) $\mu$ g/100gと低下。

この所見も、人体内で無機水銀の一部メチル化を支持するものと考えられる。もちろん血液メチル水銀の起源は大部分食餌性であろうが、大量の無機水銀が取り込まれるとメチル水銀が上昇するのであ

る。

エ) 血中水銀の血漿血球分布(山村)

金属水銀(蒸気) 暴露者では血漿中水銀の90%は無機水銀、全血中有機水銀の80%は血球中に分布していた。全血総水銀の血球:血漿の分配比は1.2前後で、ほぼ等しく分布していた。全血無機水銀の分配比は0.65で、血漿に多いことを示し、無機水銀が高い症例では血漿中濃度が上昇する。

全血水銀濃度と中毒症状の程度は平行しないといわれているから、無機水銀暴露者の血液水銀濃度を評価する目的には、血漿総水銀濃度、或は全血無機水銀濃度を測定するのがより合理的であろう。

オ) 山村班員は水銀環境での作業者の呼気に水銀の放出されるのを認め、呼気中に水銀が排泄される意義及び診断基準としての値を追及した。正常者の呼気には水銀を検出しなかったが、水銀温度計製造業では作業役の呼気に0.46~4.33 $\mu$ g/m<sup>3</sup>の水銀を検出した。血液無機水銀(同一個人)との相関は0.8で有意であったが、作業環境の空中濃度との相関はかえって認められなかった。(r=-0.04)

カ) ペニシラミンによる血液無機水銀の還元

上記入院患者の呼気水銀を追跡中、ペニシラミン治療時に呼気水銀の増加することを認めた。振戦などの中毒症状もこのような時に増悪した。試みにin vitro で塩化第2水銀にペニシラミンを添加すると水銀蒸気を発生することを証明した。ペニシラミンは還元作用(Hg<sup>++</sup>→Hg<sup>0</sup>)があると考えられ、無機水銀の脳血管関門の通過を促進するのではないかと疑われる。

### 3. 昭和49年度の研究進歩の抜粋

上記各班員の業績のうち、着目すべき新しい進歩を抜粋すると下記の諸事項であろう。

- a) 2価の無機水銀イオンの方が酵素蛋白のSH基に対する親和力が強く、したがって阻害が強い。1価のメチル水銀の毒性は細胞膜との反応性にあると推察され、無機水銀と有機水銀の作用機序の理解に一進歩をもたらした。(井村)
- b) 臓器別メチル水銀半減期は腎を除けば比較的短かく、脳が特に排泄が遅いという現象は発見されなかった。(上田)

- c) 無機水銀の共存は、メチル水銀の糞中排泄を促進し、腎の濃度が低下する。(増原)
- d) 水銀で硬組織の発育が抑制され、メチル水銀は投与中止後もその効果が持続する。メチル水銀は比較的低濃度では初期にかえって促進がみられた。水銀で骨粗鬆症 (osteoporosis) が発生する。(代永)
- e) 新しい解毒剤、N-(2, 3-dimercaptopropyl)phthalamic acid が水銀中毒治療剤として、ことに無機水銀排泄に対して有効なことが示された。(代永)
- f) 金属水銀暴露者の血中濃度の推移を観察して、血中無機水銀の低下とともにメチル水銀も低下することから、無機水銀の一部が体内でメチル化する可能性を人体のデータで示した。(山村)
- g) 作業後呼気中水銀は作業環境濃度との相関は少なく、血液無機水銀レベルを反映している。(山村)
- h) 無機水銀中毒患者の治療の目的で D-ペニシラミ

ンを投与すると、中毒症状(振戦)が増悪すると共に呼気中水銀が増加することを発見した。即ちペニシラミンが血液無機水銀を金属水銀に還元することを意味する。このことは水銀の脳内移行を促進するおそれがあり、無機水銀中毒治療にペニシラミンを使用することに対する反省を呈供した。(山村)

i) 日本でかつて報告されなかった水銀中毒患者の水晶体前囊の水銀沈着(着色)を眼科専門家の協力で発見し、そのカラー写真を添付した。(山村)

上記のように本研究班の活動も2年度に入り、いくつかの注目すべき新知見を得て、アルキル水銀及び無機水銀の生体への影響および作用機序に関して、より深い理解に達した。第3年度はさらに微量慢性中毒に関する知見が追加されると共に、他元素との相互作用による毒性の変化、作用機序に基づく治療剤など新しい分野が開かれるであろう。